

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 605**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2014 PCT/CA2014/000843**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15074139**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2014 E 14863795 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3071030**

54 Título: **Solución de preservación del trasplante basada en polímeros**

30 Prioridad:

21.11.2013 US 201361907291 P

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

04.01.2021

73 Titular/es:

**KIZHAKKEDATHU, JAYACHANDRAN (25.0%)
177 Dockside Court
New Westminster, BC V3M 0B2, CA;
DU, CAIGAN (25.0%);
BROOKS, DONALD (25.0%) y
NGUAN, CHRISTOPHER (25.0%)**

72 Inventor/es:

**KIZHAKKEDATHU, JAYACHANDRAN;
DU, CAIGAN;
BROOKS, DONALD y
NGUAN, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 800 605 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 de preservación del trasplante basada en polímeros

Campo técnico

Esta invención se refiere al campo del poliglicerol. En particular, la invención se refiere a soluciones de conservación del trasplante basadas en poligliceroles y sus usos.

Antecedentes

El lavado y el almacenamiento de órganos de donantes con una solución de conservación en frío es un procedimiento común para minimizar la lesión isquémica durante la obtención de órganos de donantes. Se han desarrollado diversas soluciones y tecnologías de almacenamiento para este propósito con diversos grados de éxito, incluida la tecnología contemporánea de perfundido. La función diferida del injerto (DGF) es un problema que se puede encontrar en aloinjertos renales de donantes de criterios extendidos que se lavan y almacenan con algunas de las soluciones de Celsior y Cetoglutarato de Histidina Triptófano que se utilizan actualmente en la Universidad de Wisconsin (UW) (Agarwal, A., Murdock, P., Fridell, J.A., 2006. Comparison of histidine-tryptophan ketoglutarate solution and University of Wisconsin solution in prolonged cold preservation of kidney allografts. *Transplantation* 81, 480-482.; Montalti, R., Nardo, B., Capocasale, E., Mazzoni, M.P., Dalla Valle, R., Busi, N., Beltempo, P., Bertelli, R., Puviani, L., Pacile, V., Fuga, G., Faenza, A., 2005. Kidney transplantation from elderly donors: a prospective randomized study comparing celsior and UW solutions. *Transplant Proc* 37, 2454-2455; and Stevens, R.B., Skorupa, J.Y., Rigley, T.H., Yannam, G.R., Nielsen, K.J., Schriener, M.E., Skorupa, A.J., Murante, A., Holdaway, E., Wrenshall, L.E., 2009. Increased primary non-function in transplanted deceased-donor kidneys flushed with histidine-tryptophan-ketoglutarate solution. *Am J Transplant* 9, 1055-1062).

Las diferentes soluciones de conservación difieren sustancialmente en su composición, pero a menudo apuntan a prevenir el edema celular e intersticial y la muerte celular, por lo tanto, apuntan a maximizar la función del órgano después del trasplante. La solución UW se usa tanto para el lavado aórtico *in situ* como para el almacenamiento en frío *ex vivo* del riñón, el hígado y el páncreas. Sin embargo, la inclusión de hidroxietilalmidón (HES) en la solución UW puede tener un impacto negativo en su aplicación en la conservación en frío de órganos, particularmente de donantes fallecidos. HES se usa comúnmente como un coloide para la reanimación por aplicación de volumen de pacientes críticamente enfermos, pero su seguridad ha sido cuestionada recientemente; la reanimación con líquidos con HES se asocia con coagulopatía, prurito y daño renal agudo (Hartog, C., Reinhart, K., 2009. CONTRA: Hidroxietilalmidón solutions are unsafe in critically ill patients. *Intensive Care Med* 35, 1337-1342; Perner, A., Haase, N., Guttormsen, A.B., Tenhunen, J., Klemenzson, G., Aneman, A., Madsen, K.R., Moller, M.H., Elkjaer, J.M., Poulsen, L.M., Bendtsen, A., Winding, R., Steensen, M., Berezowicz, P., Soe-Jensen, P., Bestle, M., Strand, K., Wiis, J., White, J.O., Thornberg, K.J., Quist, L., Nielsen, J., Andersen, L.H., Holst, L.B., Thormar, K., Kjaeldgaard, A.L., Fabritius, M.L., Mondrup, F., Pott, F.C., Moller, T.P., Winkel, P., Wetterslev, J., 2012. Hidroxietilalmidón 130/0.42 versus Ringer's acetate in severe sepsis. *N Engl J Med* 367, 124-134; Perner, A., Haase, N., Wetterslev, J., Aneman, A., Tenhunen, J., Guttormsen, A.B., Klemenzson, G., Pott, F., Bodker, K.D., Badstolokken, P.M., Bendtsen, A., Soe-Jensen, P., Tousi, H., Bestle, M., Pawlowicz, M., Winding, R., Bulow, H.H., Kancir, C., Steensen, M., Nielsen, J., Fogh, B., Madsen, K.R., Larsen, N.H., Carlsson, M., Wiis, J., Petersen, J.A., Iversen, S., Schoidt, O., Leivdal, S., Berezowicz, P., Pettila, V., Ruokonen, E., Klepstad, P., Karlsson, S., Kaukonen, M., Rutanen, J., Karason, S., Kjaeldgaard, A.L., Hoist, L.B., Wemerman, J., 2011. Comparing the effect of Hidroxietilalmidón 130/0.4 with balanced crystalloid solution on mortality and kidney failure in patients with severe sepsis (6S--Scandinavian Starch for Severe Sepsis/Septic Shock trial): study protocol, design and rationale for a double-blinded, randomised clinical trial. *Trials* 12, 24; Schortgen, F., Lacherade, J.C., Bruneel, F., Cattaneo, I., Hemery, F., Lemaire, F., Brochard, L., 2001. Effects of hydroxyethylstarch and gelatin on renal function in severe sepsis: a multicentre randomised study. *Lancet* 357, 911-916; and Winkelmayr, W.C., Glynn, R.J., Levin, R., Avorn, J., 2003. Hidroxietilalmidón and change in renal function in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Kidney Int* 64, 1046-1049), y deteriora la función renal inmediata del donante después del trasplante (Cittanova, M.L., Leblanc, I., Legendre, C., Mouquet, C., Riou, B., Coriat, P., 1996. Effect of hydroxyethylstarch in brain-dead kidney donors on renal function in kidney-transplant recipients. *Lancet* 348, 1620-1622).

El poliglicerol hiperramificado (HPG) es un polímero de poliéter ramificado soluble en agua que se ha investigado para muchas aplicaciones médicas, tales como la restauración del volumen de circulación como un sustituto de albúmina (Kainthan, R.K., Janzen, J., Kizhakkedathu, J.N., Devine, D.V., Brooks, D.E., 2008. Hydrophobically derivatized hyperbranched polyglycerol as a human serum albumin substitute. *Biomaterials* 29, 1693-1704.) y en solución de diálisis peritoneal como agente osmótico primario (Mendelson, A.A., Guan, Q., Chafeeva, I., da Roza, G.A., Kizhakkedathu, J.N., Du, C., 2013. Hyperbranched polyglycerol is an efficacious and biocompatible novel osmotic agent in a rodent model of peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 33, 15-27). El documento CA 2 742 345 divulga un procedimiento para mejorar la función cardíaca en un sujeto que comprende administrar una cantidad efectiva de un poliglicerol hiperramificado a un sujeto. HPG es un polímero altamente soluble en agua (> 400 mg/ml) y compacto, tiene un perfil de biocompatibilidad igual o mejor en comparación con el polietilenglicol (PEG), HPG tiene una baja viscosidad intrínseca que es similar a la de las proteínas y es aproximadamente 10 veces más bajo que el de los polímeros lineales (es decir, PEG, HES, dextrano) (Kainthan, R.K., Janzen, J., Kizhakkedathu, J.N., Devine, D.V.,

Brooks, D.E., 2008. Hydrophobically derivatized hyperbranched polyglycerol as a human serum albumin substitute. *Biomaterials* 29, 1693-1704; and ul-Haq, M.I., Lai, B.F.L., Chapanian, R., Kizhakkedathu, J.N., 2012. Influence of architecture of high molecular weight linear and branched polyglycerols on their biocompatibility and biodistribution. *Biomaterials* 33, 9135-9147); y HPG no precipita proteínas ni agrega las células (por ejemplo, glóbulos rojos) incluso a concentraciones muy altas (Liu, Z., Janzen, J., Brooks, D.E., 2010. Adsorption of amphiphilic hyperbranched polyglycerol derivatives onto human red blood cells. *Biomaterials* 31, 3364-3373; Rossi, N.A., Constantinescu, I., Kainthan, R.K., Brooks, D.E., Scott, M.D., Kizhakkedathu, J.N., 2010. Red blood cell membrane grafting of multi-functional hyperbranched polyglycerols. *Biomaterials* 31, 4167-4178; and ul-Haq, M.I., Lai, B.F.L., Chapanian, R., Kizhakkedathu, J.N., 2012. Influence of architecture of high molecular weight linear and branched polyglycerols on their biocompatibility and biodistribution. *Biomaterials* 33, 9135-9147).

Sumario

En un aspecto, la presente invención proporciona una solución de conservación del trasplante que comprende un poliglicerol hiperramificado o dendrítico en el que el poliglicerol hiperramificado o dendrítico tiene un peso molecular entre 0,48 kDa y 3,00 kDa, y en el que la solución de preservación del trasplante es una solución de tipo UW que no comprende rafinosa o hidroxietilalmidón, la solución de preservación del trasplante para su uso como medicamento para reducir los efectos dañinos de la isquemia por frío y la reperfusión cálida sobre la función del órgano en un procedimiento que comprende la obtención de un órgano, el mantenimiento del órgano, en la solución de preservación del trasplante y el trasplante del órgano, a un paciente que va a ser tratado por insuficiencia orgánica. En algunas realizaciones, el peso molecular del poliglicerol está entre aproximadamente 0,50 kDa y aproximadamente 3 kDa, o entre aproximadamente 0,75 kDa y aproximadamente 2,0 kDa. El peso molecular (MW) de cada polímero se determina usando cromatografía de permeación en gel (GPC) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).

En algunas realizaciones, la solución de conservación del trasplante está en solución acuosa. En una realización, el poliglicerol comprende aproximadamente 0,01 % en peso a aproximadamente 50 % en peso de la solución de solución de preservación del trasplante, aproximadamente 0,20 % en peso a aproximadamente 40 % en peso de la solución de solución de preservación del trasplante, aproximadamente 0,40 % en peso a aproximadamente 30 % en peso de la solución de solución de preservación del trasplante, aproximadamente 0,60 % en peso a aproximadamente 25 % en peso de la solución de solución de preservación del trasplante, aproximadamente 1,00 % en peso a aproximadamente 23 % en peso de la solución de solución de preservación del trasplante, o aproximadamente 1,25 % en peso a aproximadamente 20 % en peso de la solución de solución de preservación del trasplante.

En algunas realizaciones, el pH de la solución de conservación del trasplante está entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 9,0, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 7,9, entre aproximadamente 5,1 y aproximadamente 7,9, entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,6, entre aproximadamente 6,1 y aproximadamente 7,6, entre aproximadamente 6,2 y aproximadamente 7,6, entre aproximadamente 6,3 y aproximadamente 7,6, entre aproximadamente 6,4 y aproximadamente 7,6, o entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5.

En algunas realizaciones, la solución de preservación del trasplante tiene una osmolaridad entre aproximadamente 150 miliosmoles por litro y aproximadamente 1500 miliosmoles por litro, entre aproximadamente 240 y aproximadamente 600 miliosmoles por litro, entre aproximadamente 290 miliosmoles por litro y aproximadamente 580, entre aproximadamente 290 miliosmoles por litro y aproximadamente 480 miliosmoles por litro, aproximadamente 290 miliosmoles por litro y aproximadamente 460 miliosmoles por litro, o entre aproximadamente 290 miliosmoles por litro y aproximadamente 450 miliosmoles por litro,

En algunas realizaciones, el grado de ramificación del poliglicerol está entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 0,7, entre aproximadamente 0,6 y aproximadamente 0,7, entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 0,6, entre aproximadamente 0,55 y aproximadamente 0,7, o entre aproximadamente 0,55 y aproximadamente 0,65.

En algunas realizaciones, la solución de conservación del trasplante comprende al menos dos poligliceroles en los que el peso molecular de cada uno de los al menos dos poligliceroles son diferentes. En algunas realizaciones, la solución de preservación del trasplante comprende poligliceroles de un único peso molecular. En realizaciones en las que la solución de preservación del trasplante comprende poligliceroles de un único peso molecular, algunas de esas realizaciones comprenden un único poliglicerol y otras realizaciones comprenden al menos dos poligliceroles que tienen el mismo peso molecular pero diferentes estructuras químicas.

En algunas realizaciones, el poliglicerol puede comprender además uno o más grupos hidrófobos, grupos hidrófilos o ambos. En algunas realizaciones, el uno o más grupos hidrófobos, grupos hidrófilos o ambos se unen para formar de aproximadamente 1 % a aproximadamente 100 % de grupos hidroxilo en el poliglicerol. En algunas realizaciones, el uno o más grupos hidrófobos, grupos hidrófilos o ambos se unen para formar de aproximadamente 1 % a aproximadamente 40 % de grupos hidroxilo en el poliglicerol. En algunas realizaciones, el uno o más grupos hidrófobos, grupos hidrófilos o ambos comprenden uno o más de un ácido carboxílico, una amina, una amina sustituida, un aminoácido, un fosfato, un sulfato, un alquilo, un alquiléter, un grupo aromático, un grupo zwitteriónico, un carbohidrato, grupos quelantes de metales, grupos reactivos de depuración de oxígeno, un disulfuro o un tiol.

En algunas realizaciones, la solución de preservación del trasplante comprende además uno o más de antioxidantes, nucleósidos, ácidos, bases, inhibidor de xantina oxidasa, agente de difusión, agente osmótico, ácido lactobiónico, vitaminas, proteínas, factores de crecimiento, agentes antiinflamatorios, inhibidores de muerte celular, agentes estabilizadores de la membrana celular, antibióticos.

- 5 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una solución de preservación del trasplante que comprende un poliglicerol hiperramificado (HPG) como se describe en este documento.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una solución de preservación del trasplante que comprende un poliglicerol hiperramificado en el que el poliglicerol hiperramificado tiene un peso molecular entre aproximadamente 1,0 kDa y aproximadamente 2,0 kDa.

- 10 En otro aspecto, se proporciona el uso de una solución de conservación del trasplante que comprende un poliglicerol hiperramificado o dendrítico, en el que el poliglicerol hiperramificado o dendrítico es de un peso molecular entre 0,48 kDa y 3,00 kDa, y en el que la solución de preservación del trasplante es una solución de tipo UW que no comprende rafinosa o hidroxietilalmidón, para la conservación de un órgano, en el transporte de un órgano, en el transporte de un tejido corporal o en el transporte de una célula, en el que el órgano, el tejido corporal o la célula se transporta *ex-vivo*,
15 con el con la condición de que el uso no constituya un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.

Los trasplantes de órganos pueden ser aloinjertos, isoinjertos o autógrafos. En los que los órganos pueden incluir el corazón, los riñones, el hígado, los pulmones, el páncreas, el intestino, el bazo, las extremidades, incluidos los dedos de manos y pies, los órganos sexuales y el timo.

- 20 La solución de preservación del trasplante puede usarse para reducir y/o minimizar los efectos dañinos de la isquemia por frío y la reperfusión cálida sobre la función de los órganos, tejidos o células durante la obtención y el trasplante de órganos.

En algunas realizaciones, la solución de preservación del trasplante puede usarse a baja temperatura. En algunas realizaciones, la temperatura de la solución de preservación del trasplante puede estar entre 0 y 25 grados Celsius.

- 25 En algunas realizaciones, la temperatura de la solución de preservación del trasplante puede estar entre 0 y 10 grados Celsius. En algunas realizaciones, la temperatura de la solución de preservación del trasplante puede estar entre 1 y 6 grados Celsius. En algunas realizaciones, la temperatura de la solución de preservación del trasplante puede estar entre 2 y 5 grados Celsius.

En algunas realizaciones, la solución de preservación del trasplante puede usarse a temperatura corporal de mamífero.

- 30 En algunas realizaciones, la temperatura de la solución de preservación del trasplante puede estar entre 25 y 40 grados Celsius. En algunas realizaciones, la temperatura de la solución de preservación del trasplante puede estar entre 29 y 38 grados Celsius. En algunas realizaciones, la temperatura de la solución de preservación del trasplante puede estar entre 35 y 38 grados Celsius.

- 35 En este documento se divulgan procedimientos para tratar a un paciente que tiene insuficiencia orgánica, comprendiendo los procedimientos obtener un órgano y mantenerlo en una solución de preservación del trasplante, y trasplantar dicho órgano al paciente. El órgano puede ser del paciente o el órgano puede ser de una persona diferente del paciente.

- 40 En este documento se describen procedimientos para tratar a un paciente que tiene enfermedad tisular, destrucción tisular o mal funcionamiento tisular, comprendiendo los procedimientos procurar tejido y mantenerlo en una solución de preservación del trasplante, y trasplantar dicho tejido al paciente. El tejido puede ser del paciente o el tejido puede ser de una persona diferente del paciente.

- 45 En este documento se divulgan procedimientos para tratar a un paciente que tiene una enfermedad basada en células, destrucción basada en células o mal funcionamiento basado en células, comprendiendo los procedimientos procurar células y mantenerlas en una solución de preservación del trasplante, y trasplantar dichas células al paciente. El tejido puede ser del paciente o el tejido puede ser de una persona diferente del paciente.

Una solución de preservación del trasplante como se describe en el presente documento puede usarse en el trasplante de un órgano a una persona con insuficiencia orgánica o con enfermedad orgánica.

- 50 Una solución de preservación del trasplante como se describe en el presente documento puede usarse en la extracción de un donante de órganos de un corazón, riñón, hígado, pulmón, páncreas, intestino, bazo, extremidades que incluyen dedos de manos y pies, órganos sexuales o timo.

Una solución de preservación del trasplante como se describe en este documento puede usarse en la extracción de tejido de un donante de tejido.

Una solución de preservación del trasplante como se describe en este documento puede usarse en la extracción de células de un donante de células.

La invención también se refiere a procedimientos para mantener viable un órgano del trasplante, tejido del trasplante o célula del trasplante, comprendiendo los procedimientos poner en contacto el órgano, tejido o célula con una solución de conservación del trasplante como se describe en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

5 Solamente soluciones de conservación del trasplante que comprenden poliglicerol hiperramificado o dendrítico en el que el poliglicerol hiperramificado o dendrítico tiene un peso molecular entre 0,48 kDa y 3,00 kDa, y en el que la solución de conservación del trasplante es una solución de tipo UW que no comprende rafinosa o hidroxietilalmidón y usos reivindicados de los mismos, entran dentro del ámbito de protección.

10 Figura 1: Menos daño tisular en corazones de ratones preservados con solución de preservación del trasplante HPG. Los corazones de los ratones B6 ingenuos se almacenaron en solución HPG o UW (0,2 ml/órgano) a 4 °C durante 24 h. (A) El daño tisular de los corazones se determinó mediante la liberación de LDH a la solución de conservación. Los datos se presentan como media \pm SEM. Se utilizó ANOVA de dos vías para los análisis estadísticos ($p < 0,0001$, HPG vs. UW, $n = 4 - 7$). (B) Una imagen representativa de rebanadas de corazón teñidas con EB después de la conservación en frío de 24 h con solución HPG o UW. Los corazones se teñieron con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de EB en PBS durante 15 minutos después de la conservación en frío. Después de eliminar el EB no unido mediante un lavado exhaustivo con PBS, los corazones se cortaron transversalmente en cuatro piezas. La intensidad de fluorescencia en células muertas teñidas con EB se visualizó con luz UV.

20 Figura 2: La conservación en frío de los corazones de los donantes en la solución HPG potencia la recuperación funcional después del trasplante. Se recolectaron corazones de donantes de ratones B6 ingenuos y se almacenaron en solución HPG o UW (0,5 ml/órgano) a 4 °C durante 24 h. Después del trasplante a ratones receptores B6 singénicos, se examinó la función del injerto la que se determinó mediante la puntuación clínica de contracción/latido del injerto tanto a los 15 min como a las 24 h después del trasplante. Puntuación 4: contracción normal (igual a < 30 minutos de conservación en frío en solución UW). A los 15 min, $p < 0,0001$ (prueba t , HPG vs. UW). A las 24 h, $p = 0,0209$ (prueba t , HPG vs. UW).

25 Figura 3: La conservación en frío con solución HPG reduce la inflamación cardíaca y la muerte celular en los trasplantes de corazón. Los corazones de los donantes se trataron con preservación prolongada en frío en solución HPG versus solución UW y se trasplantaron como se describe en la Figura 2. Los injertos se recolectaron a las 24 h después del trasplante y se fijaron con formalina y se embebieron en parafina. (A) La lesión del injerto se examinó en secciones teñidas con H&E. Los datos se presentan como una imagen típica de la microscopía de luz, que muestra inflamación perivascular y necrosis de cardiomiocitos. (B) Puntuaciones histológicas de la lesión del injerto en el grupo de solución HPG versus UW. Los datos se presentan como media \pm SEM en cada grupo ($p = 0,0347$, Prueba t , HPG vs. UW, $n = 9-10$). (C) La lesión del injerto se determinó por la liberación de LDH de los trasplantes de corazón al suero. Se recolectaron sueros de receptores a las 24 h después del trasplante, y se midieron cuantitativamente los niveles séricos de LDH como marcador bioquímico de la lesión del injerto cardíaco utilizando un kit de detección de citotoxicidad. Los datos se presentan como media \pm SEM de diez receptores en cada grupo ($p = 0,0381$, prueba t , HPG vs. UW).

30 Figura 4: La conservación en frío con solución HPG reduce la infiltración positiva a mieloperoxidasa (MPO) en trasplantes de corazón. Las células positivas a MPO en las secciones de isoinjertos cardíacos se detectaron mediante tinción inmunohistoquímica con anticuerpo anti-MPO. Los datos se presentan como una vista microscópica típica en cada grupo: (A) grupo UW; (B) grupo HPG; y (C) Control positivo, coágulo sanguíneo. Las flechas rojas señalan las células positivas a MPO en las secciones. (D) El número de infiltrados positivos a MPO contados usando un microscopio con un aumento de 400 \times (campo de alta potencia, o hpf). La vista no se superpuso y se seleccionó al azar. Se contaron y promediaron al menos 25 vistas de dos secciones separadas para cada injerto. Los datos se presentan como media \pm SEM de seis injertos en cada grupo ($p = 0,0287$, prueba t , HPG vs. UW).

35 Figura 5: La conservación en frío con solución HPG prolonga la supervivencia de los aloinjertos cardíacos. Los corazones de donantes de ratones B6 ingenuos se almacenaron en solución HPG o UW (0,5 ml/órgano) a 4 °C durante 24 h, y se trasplantaron en ratones BALB/c alogénicos que se trataron con CsA diariamente. La supervivencia del injerto se evaluó mediante palpación transabdominal diaria, y el cese del latido del injerto se consideró como una falla del injerto. (A) Supervivencia del injerto en el grupo HPG versus UW ($p = 0,0175$, prueba de rango logarítmico, $n = 9-10$). (B, C) Vistas microscópicas típicas de secciones teñidas con H y E de injertos funcionales el día 20 después del trasplante.

55 Figura 6: La conservación en frío con solución HPG protege los HUVEC de la lisis celular a temperatura fría. Se incubó una monocapa de HUVEC en placas de 24 pocillos con solución HPG versus UW a 4 °C durante 24 h: (A) La supervivencia celular se determinó mediante un ensayo de exclusión con azul de tripano. Los datos se presentan como media \pm SEM de cuatro experimentos separados en cada grupo ($p = 0,0063$, prueba t , HPG vs. UW). (B) La muerte celular en los mismos cultivos se confirmó mediante la medición de la liberación

de LDH. Se midió la LDH en la solución de conservación como un marcador de lisis celular y se calculó como un porcentaje de la LDH total en un control positivo correspondiente (solución UW que contenía Triton-100 al 2 %). Los datos se presentan como media \pm SEM de cuatro experimentos separados en cada grupo ($p = 0,0002$, prueba t, HPG vs. UW).

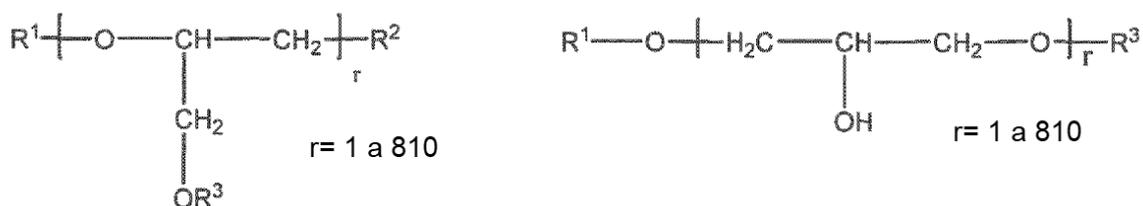
5 Figura 7: La conservación en frío con solución HPG mejora la fluidez de la membrana celular de HUVEC a temperatura fría. La fluidez de la membrana celular de HUVEC en HPG versus solución UW a 4 °C se controló con un exímero de pireno durante un período de 4 h. La relación de exímero a monómero (E/M) se calculó como un indicador de la fluidez de la membrana en los diversos puntos de tiempo. Los datos se presentan como media \pm SEM de cinco experimentos separados ($p < 0,0001$, ANOVA de dos vías, HPG vs. UW).

10 Figura 8: Los efectos del peso molecular de HPG en la conservación en frío de corazones de ratones se muestran en cuatro gráficos que muestran el porcentaje de liberación de LDH de varias soluciones diferentes a lo largo del tiempo y a diferentes temperaturas.

Descripción detallada

15 Se entenderá que cualquier término no directamente definido en este documento tiene los significados comúnmente asociados con ellos tal como se entiende en la técnica de la invención.

El término "poliglicerol" se usa en el presente documento, ya que normalmente se entiende por una persona con conocimientos normales en la técnica y a menudo se refiere a un polímero que tiene un grado de ramificación, por ejemplo, entre 0 y 1,0 en el que el número de grupos hidroxilo es igual al número de unidades repetidas y las unidades repetidas consisten en lo siguiente (en el que "r" es la unidad repetida):



20 en la que R¹ es H-, CH₃-, CH₃CH₂-, t-Bu-, N₃-CH₂-CH₂-, cadenas de alquilo (1 a 18 carbonos), -CH₂-NH₂-, -CH₂-N(CH₃)₂-, -CH₂-NH(CH₃)-, r-, r-CH₂- o (r-)₂CH-; R² es -r-, -O-r-, -O-CH₂-CH-r-, o -OH; y R³ es - H-, -CH₃-, -CH₂-CH₃-, r-, -CH₂-r o -CH(-r)₂. Las unidades de repetición anteriores no se limitan a la estereoquímica mostrada. Las realizaciones del poliglicerol como se describe en el presente documento incluyen todas las alternativas estereoquímicas posibles, incluidas las ilustradas o descritas en el presente documento.

25 El término "poliglicerol hiperramificado" se usa en el presente documento, como lo entiende normalmente una persona con conocimientos normales en la técnica y a menudo se refiere a un poliglicerol que tiene un grado de ramificación entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 0,7.

30 El término "poliglicerol lineal" se usa en el presente documento como lo entiende normalmente una persona de experiencia normal en la técnica, y a menudo se refiere a un poliglicerol que tiene un grado de ramificación "cero".

El término "poliglicerol dendrítico o dendrímero de poliglicerol" se usa en el presente documento como lo entiende normalmente una persona experta en la técnica, y a menudo se refiere a un poliglicerol que tiene un grado de ramificación 1,0.

35 El término "agente osmótico" se usa en el presente documento como lo entiende normalmente una persona de experiencia normal en la técnica y a menudo se refiere a una sustancia que crea un gradiente osmótico a través de una membrana semipermeable para provocar el movimiento del agua a través de la membrana.

40 El término "agente de difusión" se usa en el presente documento como lo entiende normalmente una persona de experiencia normal en la técnica y a menudo se refiere a una sustancia que crea un gradiente de concentración a través de una membrana para provocar el movimiento de solutos desde un área de mayor concentración de solutos a un área de menor concentración de soluto.

El término "electrolito" se usa en el presente documento como lo entiende normalmente una persona de experiencia normal en la técnica y a menudo se refiere a un soluto ionizado.

45 Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa, a menos que se indique otra cosa, una cadena lineal o ramificada, o un radical hidrocarburo cíclico, o una combinación de los mismos, que puede estar completamente saturado, mono o poliinsaturado y puede incluir radicales di y multivalentes, que tienen el número de átomos de carbono designado (por ejemplo, C₁-C₁₀ o de 1 a 10 miembros

significa uno a diez carbonos), o si no se designa es un alquilo C₁-C₁₀. Ejemplos de radicales hidrocarburos saturados incluyen, pero no se limitan a, grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más dobles enlaces o triples enlaces. Ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, pero no se limitan a, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo y los homólogos e isómeros superiores.

El término "solución de preservación del trasplante" se usa en el presente documento como lo entiende normalmente una persona de experiencia normal en la técnica y a menudo se refiere a una sustancia que puede usarse para minimizar los efectos dañinos de la isquemia por frío y la reperfusión cálida en órganos o tejidos durante el trasplante. Los términos con un significado similar incluyen solución del trasplante, solución de preservación, solución de preservación de órganos, solución de preservación para trasplante. Algunos ejemplos de composiciones típicas de algunos ejemplos no limitantes de soluciones de conservación del trasplante conocidas en la técnica incluyen, pero no se limitan a, soluciones de la Universidad de Wisconsin (UW) y soluciones HTK. Las soluciones de tipo HTK son soluciones de preservación de órganos que comprenden histidina, triptófano y cetoglutarato, mientras que las soluciones de tipo UW no comprenden histidina, triptófano ni cetoglutarato. A continuación se proporcionan algunos ejemplos de las composiciones de estos tipos de soluciones de preservación de órganos:

Componentes base de una solución de preservación del trasplante de tipo UW típica	
	ácido lactobiónico
	Fosfato de potasio monobásico
	Heptahidratado de sulfato de magnesio
	Pentahidrato de rafinosa
	Adenosina
	Glutati3n
	Alopurinol
	KOH
	Hidroxietilalmid3n
Componentes base de una soluci3n de preservaci3n del trasplante de tipo HTK t3pica	
	Sodio
	Potasio
	Magnesio
	Calcio
	Cetoglutarato/3cido glut3mico
	Histidina
	Manitol
	Tript3fano

Composición de la solución UW	
	Viaspan™ (DuPont) solución UW
Ácido lactobiónico	100 mM
KOH	100 mM
KH ₂ PO ₄	25 mM
MgSO ₄	5 mM
Adenosina	5 mM
Glutación	3 mM
Alopurinol	1 mM
Rafinosa	30 mM
Hidroxietilalmidón	50 g/L
NaOH/HCl: pH 7.4	+
Osmolaridad	320 mOsmol/k

Composición de la solución HTK	
	Custodiol™ HTK
NaCl (mM)	15
KCl (mM)	9
Cetoglutarato de hidrógeno y potasio (mM)	1
MgCl (mM)	4
Histidina* (mM)	198
CaCl (μM)	15
Triptófano (mM)	2
Manitol (mM)	30
Osmolalidad:	310 mOsmol/k

A continuación se presentan algunos ejemplos no limitantes de soluciones de preservación del trasplante de la presente invención en comparación con una solución de preservación de órganos conocida.

ES 2 800 605 T3

Composición y comparación de la solución HPG-UW		
	Viaspan™ (DuPont) solución UW	solución HPG-UW
Ácido lactobiónico	100 mM	100 mM
KOH	100 mM	100 mM
KH ₂ PO ₄	25 mM<	25 mM
MgSO ₄	5 mM	5 mM
Adenosina	5 mM	5 mM
Glutación	3 mM	3 mM
Alopurinol	1 mM	1 mM
Rafinosa	30 mM	Ninguno
Hidroxietilalmidón	50 g/L	Ninguno
HPG	Ninguno	30 g/L
NaOH/HCl: pH 7.4	+	+
Osmolaridad	320 mOsmol/kg	320 mOsmol/kg

Composición y comparación de la solución HPG-HTK		
	Custodiol™ HTK	HPG-HTK
NaCl (mM)	15	15
KCl (mM)	9	9
Cetoglutarato de hidrógeno y potasio (mM)	1	1
4 mM MgCl (mM)	4	4
Histidina* (mM)	198	168
CaCl (µM)	15	15
Triptófano (mM)	2	2
Manitol (mM)	30	Ninguno
HPG (g/100 mL)	Ninguno	3 (3 %, 1 kDa)
pH 7.02-7.2 a 25 °C	+	+

(continuación)

Composición y comparación de la solución HPG-HTK		
	Custodiol™ HTK	HPG-HTK
pH 7.4-7.45 a 4 °C		
Osmolalidad:	310 mOsmol/kg	310 mOsmol/kg

5 Las soluciones de conservación del trasplante de la presente invención no comprenden lactato. Por ejemplo, la solución de lactato de Ringer se ha usado como una solución de preservación de órganos, sin embargo, las realizaciones que comprenden lactato no se incluyen en la presente invención.

La invención incluye un poliglicerol como se describe en el presente documento junto con los componentes de una solución de tipo UW que no comprende rafinosa ni hidroxietilalmidón. Una realización particular incluye un poliglicerol como se describe en el presente documento junto con los componentes de Viaspan™, excepto la rafinosa y el hidroxietilalmidón.

10 El poliglicerol es un polímero poliéter alifático hidrófilo flexible que se puede sintetizar en formas lineales, hiperramificadas y dendrímicas con un control preciso del peso molecular. La vida media de circulación en ratones a menudo depende del peso molecular del polímero, pero puede alcanzar aproximadamente 60 horas para un peso molecular de 540 kDa. Los poligliceroles para su uso en la presente invención pueden contener glucosa o carbohidratos y son estables y se administran fácilmente a pH fisiológico.

15 El poliglicerol hiperramificado (HPG), que es un poliglicerol que tiene un grado de ramificación entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 0,7, se prepara mediante polimerización con apertura de anillo de ramificación múltiple de glicidol bajo adición lenta de monómero. Los dendrímeros de poliglicerol se preparan mediante múltiples reacciones orgánicas. La estructura contiene ramas grandes y pequeñas con funcionalidades hidroxilo que hacen que HPG sea un material altamente funcional. El poliglicerol lineal (LPG) se puede preparar por polimerización por apertura de anillo de etoxietilglicidiléter usando *t*-BuO-K⁺ como iniciador en presencia de 1,4-dioxano seguido de desprotección en HCl (Gervais, M., Brocas, A.L., Cendejas, G., Deffieux, A., Carlotti, S., 2010. Synthesis of Linear High Molar Mass Glycidol-Based Polymers by Monomer-Activated Anionic Polymerization. *Macromolecules* 43, 1778-1784; Kainthan, R.K., Janzen, J., Levin, E., Devine, D.V., Brooks, D.E., 2006b. Biocompatibility testing of branched and linear polyglycidol. *Biomacromolecules* 7, 703-709; and Stiriba, S.E., Kautz, H., Frey, H., 2002. Hyperbranched molecular nanocapsules: Comparison of the hyperbranched architecture with the perfect linear analogue. *J Am Chem Soc* 124, 9698-9699).

20 El poliglicerol es un líquido transparente y viscoso. A temperatura ambiente, es altamente viscoso y esencialmente no volátil. Tanto los poligliceroles lineales como los hiperramificados son de naturaleza compacta en solución y altamente solubles en agua (por ejemplo, HPG tiene una solubilidad en agua superior a 200 mg/ml). El radio hidrodinámico (R_h) de un LPG con $M_n = 104.000$ en solución acuosa de NaNO₃ 0,1 N puede ser 4,55 nm según lo determinado por las mediciones QELS. A modo de comparación, el valor R_h de un HPG con $M^n = 104.000$ puede ser 4,85 nm y un PEG con un peso molecular similar puede ser 12,23 nm. El valor R_h muy pequeño de LPG indica que tiene una estructura de solución bastante diferente en comparación con otros polímeros lineales solubles en agua y puede aproximarse más estrechamente a la estructura de solución y las propiedades de HPG. En términos de viscosidad intrínseca, el LPG tiene una viscosidad intrínseca (0,047 dl/g) que es más similar a la del HPG (0,052 dl/g) que el PEG (1,308 dl/g), lo que nuevamente sugiere que el LPG tiene una estructura altamente compacta. en solución. La viscosidad intrínseca del poliglicerol aumenta con el aumento del peso molecular (similar a las proteínas) y es significativamente menor que otros polímeros lineales.

Las soluciones de conservación del trasplante de la presente invención pueden tener un pH entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 9,0 o entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5.

40 Las soluciones de conservación del trasplante de la presente invención pueden estar en solución acuosa, en la que el poliglicerol comprende aproximadamente 0,01 % en peso a aproximadamente 50 % en peso de la solución o entre aproximadamente 1,25 % en peso a aproximadamente 20 % en peso de la solución. Por ejemplo, 1,25 % en peso de HPG de 0,5 kDa a 20 % en peso de HPG de 0,5 kDa.

45 Las soluciones de conservación del trasplante de la presente invención pueden tener una osmolaridad entre aproximadamente 150 miliosmoles por litro y aproximadamente 1500 miliosmoles por litro. Para aplicaciones del trasplante de órganos, la osmolaridad puede estar entre aproximadamente 290 miliosmoles por litro y aproximadamente 450 miliosmoles por litro. Para aplicaciones *ex vivo*, se puede usar alta osmolaridad; por ejemplo, se pueden lograr aproximadamente 1500 miliosmoles por litro usando aproximadamente de 40 % en peso hasta aproximadamente 50 % en peso de soluciones de HPG de 0,5 kDa. Con HPGs de menor peso molecular, esta

osmolaridad se puede lograr con aproximadamente 30 % en peso hasta aproximadamente 40 % en peso de soluciones de HPG.

Las soluciones de conservación del trasplante de la presente invención pueden tener una polidispersidad entre aproximadamente 1,0 y 15.

5 En algunas realizaciones, las soluciones de conservación del trasplante de la presente invención pueden comprender al menos dos polígliceroles en los que el peso molecular de cada uno de los al menos dos polígliceroles es diferente. Los pesos moleculares de cada uno de los al menos dos polígliceroles pueden variar tan poco como 74 Da, lo que corresponde al peso aproximado de una unidad repetida. Los pesos moleculares también pueden variar en cantidades tales como aproximadamente 0,5 kDa, aproximadamente 1 kDa o aproximadamente 2 kDa.

10 En algunas realizaciones, las soluciones de conservación del trasplante de la presente invención pueden comprender polígliceroles de un único peso molecular. En algunas de estas realizaciones, la solución de preservación del trasplante comprende solo un polígliceroles único y en otras realizaciones la solución de preservación del trasplante comprende al menos dos polígliceroles que tienen el mismo peso molecular pero diferentes estructuras químicas.

15 La solución de preservación del trasplante como se describe en el presente documento puede comprender además uno o más electrolitos, uno o más aminoácidos, uno o más agentes de difusión, uno o más antioxidantes, uno o más factores de crecimiento, uno o más agentes tamponantes, uno o más agentes antimuerte celular y/o uno o más agentes osmóticos. El agente de difusión o agente osmótico puede comprender sodio, cloruro, bicarbonato, un agente productor de bicarbonato, sulfato, fosfato, calcio, potasio, magnesio, latobionato, dextrosa, fructosa, glicerol, sorbitol, manitol, L-carnitina, albúmina de suero bovino (BSA), maltosa, maltotriosa, maltopentosa, xilitol, adenosina, glutatión, ácido lactobiónico, hidróxido de potasio o mezclas de los mismos. El agente tampón puede comprender ácido maleico, ácido fosfórico, sulfato, ácido cítrico, ácido málico, ácido fórmico, ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, pivalico (ácido trimetilacético), piridina, piperazina, ácido picolínico, L-histidina, ácido 3- (N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 4-(2-hidroxietil) -1-piperazin-metanosulfónico (HEPES), tricina, gliciglicina, bicina, ácido bórico, glicina o mezclas de los mismos.

25 La solución de preservación del trasplante como se describe en el presente documento puede usarse en el proceso del trasplante de órganos. El trasplante de órganos puede realizarse para un mamífero.

La lesión isquémica por frío durante la preservación hipotérmica de un órgano donante, junto con la lesión adicional por recalentamiento o reperfusión, contribuye en gran medida a la función deficiente del órgano en el postrasplante inmediato, así como a los episodios de rechazo subsecuentes (Garlicki, M., 2003. May preservation solution affect the incidence of graft vasculopathy in transplanted heart? *Ann Transplant* 8, 19-24; Hilmi, I., Horton, C.N., Planinsic, R.M., Sakai, T., Nicolau-Raducu, R., Damian, D., Gligor, S., Marcos, A., 2008. The impact of postreperfusion syndrome on short-term patient and liver allograft outcome in patients undergoing orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl* 14, 504-508; and Lauzurica, R., Pastor, M.C., Bayes, B., Hernandez, J.M., Bonet, J., Dolade, M., Navarro, M., Romero, R., 2008. Pretransplant inflammation: a risk factor for delayed graft function? *J Nephrol* 21, 221-228). La solución de preservación del trasplante puede potenciar la protección de los órganos donantes de la lesión isquémica por frío y de las células endoteliales humanas de la muerte celular inducida por el frío.

Los órganos de los donantes almacenados y transportados a temperaturas hipotérmicas (0-5 °C), provocan el cese del metabolismo aeróbico y evitan las lesiones isquémicas por calor durante la obtención y el transporte de órganos. La solución de preservación del trasplante puede ser un procedimiento eficaz en la práctica clínica para prolongar el período de almacenamiento, y el uso de soluciones de preservación del trasplante como solución de preservación hipotérmica evita que las células se hinchen durante el almacenamiento isquémico en frío.

40 Mantener la viabilidad de las células endoteliales o la integridad de la monocapa endotelial es útil para limitar con éxito la permeabilidad vascular de los órganos sólidos después del trasplante. Cuando la sangre en un órgano donante es reemplazada por una solución de conservación en frío para su conservación en frío antes del trasplante, el endotelio vascular a menudo es el primero en interactuar con el entorno frío. La pérdida de integridad endotelial a menudo representa un evento primario en la lesión del injerto relacionada con la preservación en frío en diversos trasplantes de órganos. La lesión por frío puede afectar la función de barrera del endotelio, lo que lleva a edema parenquimatoso y hemorragia después de la reperfusión y la disfunción temprana del injerto. Las soluciones de conservación del trasplante de la presente invención pueden aumentar la protección de las células endoteliales cultivadas contra la necrosis, y pueden reducir la lesión de los injertos durante la conservación en frío. La recuperación funcional mejorada, la inflamación perivascular reducida, la infiltración celular reducida y la supervivencia prolongada del injerto después del trasplante pueden observarse usando soluciones de preservación del trasplante de la presente invención.

55 La membrana celular puede ser un sitio de lesión inducida por el frío. Cuando las células se transfieren a una temperatura fría, las membranas celulares pueden desestabilizarse, por ejemplo, mediante un cambio en la estructura de la membrana. Los ejemplos incluyen modificaciones de la interacción específica de lípido-proteína, asimetría de fosfolípidos y composición lipídica. Una transición de membrana de la fase cristalina líquida a la fase de gel puede provocar la muerte celular. La solución de preservación del trasplante en frío puede prevenir tal transición, así como otras lesiones inducidas por el frío.

Ejemplos

Diversas realizaciones alternativas y ejemplos se describen en el presente documento. Estas realizaciones y ejemplos son ilustrativos y no limitan el alcance de la invención. Solo soluciones de conservación del trasplante que comprenden poliglicerol hiperramificado o dendrítico en el que el poliglicerol hiperramificado o dendrítico tiene un peso molecular entre 0,48 kDa y 3,00 kDa, y en el que la solución de conservación del trasplante es una solución de tipo UW que no comprende rafinosa o hidroxietilalmidón y usos reivindicados de los mismos, entran dentro del ámbito de la protección.

Los ratones C57BL/6j (B6) y BALB/c (machos, de 8-10 semanas de edad) se compraron en el Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EE. UU.). Todos los procedimientos relacionados con el uso de animales en este estudio se realizaron y monitorizaron de acuerdo con las directrices del Canadian Council on Animal Care bajo los protocolos aprobados por el Animal Use Subcommittee at the University of British Columbia. Las células endoteliales de la vena umbilical humana primaria (HUVECs) se adquirieron de Lonza Walkersville Inc (Walkersville, MD, EE. UU.) y se inmortalizaron con ADN SV40 de origen deficiente para experimentos en nuestro laboratorio. Los cultivos de células endoteliales se mantuvieron y crecieron en medio 199 suplementado con suero de ternera bovino al 10 %, suplemento de crecimiento de células endoteliales, heparina 50 µg/ml y antibióticos (penicilina y estreptomina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) a 37 °C bajo CO₂ al 5 %. Los datos se presentaron como media ± error estándar de la media (SEM). La significación estadística de la diferencia entre dos grupos se determinó mediante prueba *t*. El análisis de varianza unidireccional (ANOVA) o bidireccional con la prueba de comparación múltiple de Tukey se usó como apropiado para las comparaciones entre grupos múltiples. Los valores de $p \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Ejemplo 1: Daño orgánico reducido en el almacenamiento hipotérmico de corazones aislados con solución HPG

Para demostrar el efecto beneficioso de la solución HPG en comparación con la solución UW en la prevención de la lesión por isquemia por frío durante el almacenamiento en frío de los órganos donantes, el daño tisular de los corazones de ratones aislados se conserva con solución HPG versus solución UW (0,2 ml/órgano a 4 °C) se determinó mediante la liberación de LDH de los tejidos de los donantes en diferentes momentos. Como se muestra en la Figura 1A, los niveles de LDH en el sobrenadante, liberados del tejido dañado o de las células muertas del órgano, aumentaron al aumentar el tiempo de almacenamiento hipotérmico tanto para la solución UW como de HPG, pero la cantidad de LDH fue significativamente menor con HPG solución en comparación con la solución UW. El nivel de LDH para el grupo HPG aumentó de $0,75 \pm 0,43$ a las 2 h a $1,71 \pm 0,55$ a las 24 h en comparación con $1,15 \pm 0,22$ a las 2 h a $2,46 \pm 0,24$ a las 24 h en el grupo UW ($P < 0,0001$, ANOVA de dos vías, $n = 4-7$). La protección mejorada de los órganos fue indicada por los niveles más bajos de liberación de LDH de los corazones en el grupo HPG en comparación con el grupo UW, que se confirmó adicionalmente por tinción con bromuro de etidio (EB) (Figura 1B). El EB es un pigmento fluorescente impermeable a la membrana celular que tiñe los ácidos nucleicos y se ha utilizado para la tinción de células muertas. Como se muestra en la Figura 1B, la intensidad de la tinción con EB de los corazones después de 24 h con solución HPG fue más débil que la almacenada en la solución UW. Estos datos sugieren que el almacenamiento hipotérmico de corazones de ratones aislados con solución HPG da como resultado menos daño a los órganos en comparación con la solución UW.

Ejemplo 2: Mejora de la recuperación funcional de los trasplantes de corazón con menos daño tisular en receptores singénicos después del almacenamiento hipotérmico con solución HPG

Para examinar adicionalmente si la protección potenciada de los órganos de los órganos donantes después del almacenamiento en frío en solución HPG podría traducirse a su recuperación funcional después del trasplante, los corazones de los ratones B6 después de 24 h de almacenamiento en frío a 4 °C con solución HPG (5 ml/órgano) se trasplantaron heterotópicamente a ratones singénicos B6. Se realizó un experimento similar con corazones almacenados en solución UW. La función de los injertos se examinó tanto a los 15 min como a las 24 h después de la cirugía. Como se muestra en la Figura 2, la puntuación clínica de la función del injerto de los injertos de corazón pretratados con solución HPG fue significativamente mayor que los almacenados en la solución UW en ambos dos puntos de tiempo. La puntuación media de 3,542 en el grupo de solución HPG en comparación con 2,292 en el grupo de solución UW a los 15 min ($P < 0,0001$), o 3,833 en el grupo de solución HPG en comparación con 2,833 en el grupo de solución UW ($P = 0,0209$) a las 24 h. En el caso del grupo de solución UW, 2 de cada 12 injertos perdieron su función en el punto del tiempo de las 24 h. Estos datos sugieren que los corazones de los donantes después de una preservación prolongada en frío con solución HPG tienen una mejor recuperación funcional que los de la solución UW después del trasplante.

Para comprender adicionalmente la razón por la cual los trasplantes conservados en solución HPG tuvieron una mejor recuperación funcional, se examinó la lesión tisular y la infiltración de neutrófilos en los injertos cardíacos a las 24 h después del trasplante. Las secciones de injertos de corazón teñidos con tinción de H&E mostraron que los corazones almacenados en solución HPG exhibieron menos inflamación perivascular y necrosis de cardiomiocitos en comparación con los injertos almacenados en solución UW (Figura 3A). El resultado fue confirmado por la puntuación semicuantitativa (Figura 3B), que indica una puntuación significativamente menor ($1,111 \pm 0,423$) en el grupo de solución HPG en comparación con $2,0 \pm 0,258$ en el grupo de solución UW ($P = 0,0347$). Los niveles séricos más bajos de LDH en ratones receptores que recibieron injertos conservados en solución HPG confirmaron además menos daño

tisular en el análisis histológico. La Figura 3C mostró que los niveles de LDH en suero, representados por el valor de absorbancia en la medición, en receptores en el grupo HPG fueron $1,21 \pm 0,76$, significativamente más bajos que en el grupo UW $1,97 \pm 1,34$ ($p = 0,0381$).

5 Los neutrófilos son una de las células inflamatorias de primera respuesta reclutadas en el sitio de la lesión en cuestión de minutos después del trauma, y son el sello distintivo de la lesión muscular aguda (Tidball JG, 1995). Los infiltrados que expresan MPO (neutrófilos activados) en las secciones cardíacas se determinaron usando tinción inmunohistoquímica con anticuerpo anti-MPO, y se contaron con un procedimiento semicuantitativo. Como se muestra en la Figura 4, la tinción inmunohistoquímica de infiltrados MPO⁺ mostró que las secciones de injerto en el grupo de solución HPG tenían menos células MPO⁺ infiltrantes ($3,712 \pm 0,615$ células/hpf) que en el grupo de solución UW ($6,237 \pm 0,921$ células/hpf) ($p = 0,0287$, $n = 6$). En conjunto, todos estos datos sugieren que la preservación en frío de los corazones de los donantes con la solución HPG podría mejorar la recuperación de la función del injerto después del trasplante, lo que se asocia con menos lesión del injerto.

Ejemplo 3: Supervivencia prolongada del trasplante de corazón después del almacenamiento hipotérmico con solución HPG

15 En el trasplante clínico, los órganos donantes se trasplantan principalmente a receptores alogénicos, y estos aloinjertos sobreviven bajo terapia inmunosupresora. Para probar si la solución HPG era superior a la solución UW en este contexto, los corazones de donantes de ratones B6 se conservaron tanto con solución HPG como con solución UW (5 ml/órgano) a 4 °C durante 24 h. Los corazones almacenados se trasplantaron heterotópicamente a ratones BALB/c alogénicos que recibían tratamiento diario con CsA inmediatamente después de la cirugía. Como se muestra en la Figura 5, los aloinjertos conservados con la solución HPG sobrevivieron más tiempo que los almacenados en la solución UW. Solamente sobrevivió un trasplante con grupo de solución UW 3 días, el resto de ellos falló en 24 h. En comparación, dentro de los grupos de HPG, tres de los injertos sobrevivieron con función en receptores tratados con CsA hasta el final del experimento - durante 20 días ($P = 0,0175$, prueba de Rango logarítmico) y cuatro de nueve trasplantes rechazados dentro de las 24 h. Estos datos sugieren que la conservación en frío de corazones de donantes con solución HPG prolonga la supervivencia del injerto en receptores alogénicos.

Ejemplo 4: Supervivencia celular potenciada en células endoteliales humanas cultivadas por exposición a solución HPG en condiciones hipotérmicas

30 Para probar adicionalmente la ventaja de la solución HPG sobre la solución UW en la preservación hipotérmica de los órganos donantes, se comparó el impacto de estas soluciones en la supervivencia de HUVECs cultivados a 4 °C. Como se muestra en la Figura 6, hubo más células sobrevivientes en HUVECs cultivadas expuestas a la solución HPG en comparación con la solución UW, evidenciado por una supervivencia celular significativamente mayor en las HUVECs tratadas con solución HPG ($40,19 \pm 3,77$ %) en comparación con aquellos ($20,75 \pm 2,87$ %) con solución UW ($P = 0,0063$) (Figura 7A). El efecto beneficioso de la solución HPG sobre la supervivencia celular se confirmó adicionalmente por los niveles más bajos de liberación de LDH en la solución HPG ($21,76 \pm 0,29$ %) en comparación con aquellos ($43,46 \pm 2,6$ %) en la solución UW ($P = 0,0002$). La liberación de LDH de los cultivos HUVEC bajo condiciones normales de cultivo después de una incubación de 24 h fue de aproximadamente el 21 %, lo que sugiere que la solución HPG podría proteger completamente las células endoteliales humanas cultivadas de la lisis celular a temperatura fría en un período de 24 h.

Ejemplo 5: Mantenimiento de la fluidez de la membrana celular y ATP intracelular en preservación hipotérmica con solución HPG

45 Para investigar la razón detrás de la ventaja de la solución HPG sobre la solución UW en la protección hipotérmica de HUVECs cultivadas de la muerte celular, se examinó su influencia en la fluidez de la membrana y el ATP intracelular. La fluidez de la membrana celular se determinó mediante la formación de exímero de pireno usando una sonda formadora de exímero de pireno, ácido pirenododecanoico. Como se muestra en la Figura 7, hubo una tendencia decreciente en la relación E/M de $0,99 \pm 0,02$ a las 0 h a $0,85 \pm 0,07$ a las 4 h ($P = 0,1887$, ANOVA unidireccional, $n = 3$) en HUVECs después de la exposición al frío en solución UW. Sin embargo, la relación E/M en estas células con solución HPG se mantuvo sin cambios en el período de estudio (4 h), indicado por $1,04 \pm 0,07$ a las 0 h a $1,10 \pm 0,1$ a las 4 h ($P = 0,4647$, ANOVA unidireccional, $n = 3$). La comparación estadística de la relación E/M entre estos grupos sugirió que la relación E/M fue significativamente mayor en HUVEC con solución HPG que en aquellos con solución UW ($P < 0,0001$, ANOVA de dos vías). Estos datos sugieren que la solución HPG puede mantener la fluidez de la membrana en células endoteliales cultivadas incluso cuando se expone a temperatura fría, mientras que la fluidez de la membrana en las células con solución UW disminuyó durante la conservación en frío.

55 Para confirmar esta observación, se midieron los niveles de ATP tanto extracelular como intracelular en estas células después de 4 h de preservación hipotérmica con soluciones de UW y HPG. Como se lista en la Tabla 1, el ATP extracelular, liberado de HUVECs después de la exposición a la solución fría de UW o solución HPG, no fue significativamente diferente ($137,14 \pm 20,11$ pmol vs. $130,04 \pm 18,19$ pmol, $P = 0,5740$), mientras que el ATP intracelular ($50,67 \pm 4,03$ pmol) de HUVECs con solución HPG fue significativamente mayor que eso ($43,0 \pm 4,4$ pmol) de aquellos preservados con solución UW ($P = 0,0208$), lo que fue respaldado adicionalmente por el hecho de que la relación de ATP extracelular a intracelular en solución HPG el grupo fue significativamente más bajo que en el grupo

de solución UW ($2,55 \pm 0,17$ vs. $3,18 \pm 0,31$, $P = 0,0039$). Tomados en conjunto, la supervivencia celular mejorada en células endoteliales humanas a temperatura fría con solución HPG en comparación con la solución UW se correlaciona positivamente con su capacidad de mantener la fluidez de la membrana y la biosíntesis de ATP.

Ejemplo 6: Preparación de la solución HPG

5 El polímero HPG (0,5, 1, 3,5 kDa) se sintetizó mediante la polimerización de ramificación aniónica de múltiples ramificaciones de glicidol como se describió anteriormente (Sunder, A., Hanselmann, R., Frey, H., Mulhaupt, R., 1999. Controlled synthesis of hyperbranched polyglycerols by ring-opening multibranching polymerization. *Macromolecules* 32, 4240-4246). Las características moleculares del polímero se determinaron mediante cromatografía de permeación en gel y espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones. HPG se purificó por diálisis contra agua filtrada por MilliQ y se liofilizó. Las soluciones de conservación basadas en HPG se prepararon disolviendo HPG (3 %, p/v) en una solución que contenía: ácido lactobiónico 100 mM, hidróxido de potasio (KOH) 100 mM, fosfato de dihidrógeno de potasio 25 mM (KH_2PO_4), sulfato de magnesio 5 mM (MgSO_4), adenosina 5 mM, glutatión 3 mM y alopurinol 1 mM, la misma composición que en la solución UW de Viaspan™ (solución UW, DuPont Canada, Mississauga, ON, Canadá) omitiendo la rafinosa 30 mM y HES al 5 %. El pH de la solución de conservación de HPG se ajustó a 7,4 utilizando NaOH/HCl a 22 °C, y su osmolalidad (~ 320 mOsm/kg) se determinó utilizando el Microosmómetro Advanced® Modelo 3320 (Advanced Instruments, Inc., Norwood, MA, EE. UU.) En el Vancouver Coastal Health Regional Laboratory Medicine (Vancouver, BC, Canadá).

Ejemplo 7: Preservación del donante y trasplante cardíaco heterotópico

20 Se recogieron corazones de donantes de ratones donantes B6 después de la perfusión con 10 unidades/ml de heparina, y se almacenaron con venas pulmonares ligadas en solución HPG versus solución UW a 4 °C. Después de 24 h de conservación en frío, los corazones de los donantes se trasplantaron heterotópicamente en ratones B6 singénicos (isotrasplante) o ratones BALB/c alogénicos (alotrasplante) como se describió anteriormente (Li, S., Guan, Q., Chen, Z., Gleave, M.E., Nguan, C.Y., Du, C., 2011. Reduction of cold ischemia-reperfusion injury by graft-expressing clusterin in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 30, 819-826). La función del injerto se puntuó por su contracción o latido tanto a los 15 min y 24 h después del trasplante de injerto de acuerdo con un procedimiento de semicuantificación como se describió anteriormente (Kuznetsov, A.V., Schneeberger, S., Seiler, R., Brandacher, G., Mark, W., Steurer, W., Saks, V., Usson, Y., Margreiter, R., Gnaiger, E., 2004. Mitochondrial defects and heterogeneous cytochrome c release after cardiac cold ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286, H1633-1641; and Li, S., Guan, Q., Chen, Z., Gleave, M.E., Nguan, C.Y., Du, C., 2011. Reduction of cold ischemia-reperfusion injury by graft-expressing clusterin in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 30, 819-826). En el alotrasplante, después de la cirugía, los ratones receptores recibieron terapia con ciclosporina (CsA) (15 mg/kg/día, Novartis, Basilea, Suiza) inmediatamente hasta el final del experimento o durante 20 días. La supervivencia del injerto se evaluó mediante palpación transabdominal diaria de forma cegada. El cese de los latidos cardíacos indicó el fracaso del trasplante cardíaco, que subsecuentemente se confirmó mediante examen histológico.

35 Ejemplo 8: Medición de lactato deshidrogenasa (LDH)

La muerte celular con disrupción de la membrana celular y/o lesión cardíaca se determinó mediante la liberación de LDH, que se cuantificó mediante un ensayo de LDH usando un kit de detección de citotoxicidad (Roche Applied Science, Laval, QC) siguiendo los protocolos de los fabricantes. En células cultivadas, la liberación de LDH en la solución de conservación se presentó como un porcentaje de control positivo (células que se incuban con Triton X-100 al 2 %), o en ratones, la liberación de LDH en el suero como una unidad de absorbancia (OD_{490}).

Ejemplo 9: Semicuantificación de viabilidad celular por ensayo de exclusión con azul de tripano

45 La viabilidad celular se evaluó mediante tinción negativa con azul de tripano, un tinte impermeable a la membrana celular. En resumen, se cultivó una monocapa confluyente de HUVECs ($0,2 \times 10^6$ células/pocillo) en placas de 24 pocillos durante la noche, seguido de incubación con 0,5 ml de solución HPG o solución UW a 4 °C. Después de la preservación hipotérmica durante 24 h, las células se desprendieron con solución de trippin-EDTA (Sigma-Aldrich Canadá), y las células sobrevivientes viables, teñidas negativamente con azul de tripano, se contaron automáticamente usando el contador de células TC10™ automatizado (Laboratorios Bio-Rad Canadá, Mississauga, ON, Canadá). El porcentaje de células sobrevivientes se calculó de la siguiente manera: $\% = (T_x/T_0) \times 100$, donde T_x representaba el número total de células viables en el punto de tiempo indicado, y T_0 indicaba el número total de células viables en monocapa de células no tratadas (punto de tiempo de 0 h). El número de células viables en cada muestra se presentó por el promedio de al menos tres determinantes.

Ejemplo 10: Evaluación de la fluidez de la membrana celular.

La fluidez de la membrana celular de HUVECs cultivadas se midió usando un kit de fluidez de membrana siguiendo el protocolo del fabricante (Marker Gene Technologies, Eugene, OR, EE. UU.).

55 Las HUVEC (1×10^6 células/ml) en medio de cultivo se marcaron con ácido pirenododecanoico por sonda análoga de lípidos por incubación a 25 °C durante 20 minutos. Después de dos lavados con PBS, las células se incubaron en solución HPG o solución UW a 4 °C. La emisión de monómero (M) a 390 nm o exímero (E) a 480 nm de la sonda en

la membrana celular se monitorizó utilizando un espectrómetro de fluorescencia a una excitación de 340 nm a 4 °C durante un período de 6 h. La relación E/M se calculó como un indicador de la fluidez de la membrana.

Ejemplo 11: Análisis inmunohistoquímico.

5 La mieloperoxidasa (MPO), un biomarcador de neutrófilos infiltrantes, en las secciones de tejidos cardíacos se localizó mediante un procedimiento inmunohistoquímico estándar, y los infiltrados MPO⁺ se semicuantificaron como se describió anteriormente (Guan, Q., Li, S., Yip, G., Gleave, M.E., Ngan, C.Y., Du, C., 2012. Decrease in donor heart injury by recombinant clusterin protein in cold preservation with University of Wisconsin solution. *Surgery* 151, 364-371; and Li, S., Guan, Q., Chen, Z., Gleave, M.E., Ngan, C.Y., Du, C., 2011. Reduction of cold ischemia-reperfusion injury by graft-expressing clusterin in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 30, 819-826).

10 **Ejemplo 12: Medición de trifosfato de adenosina**

Los niveles de trifosfato de adenosina (ATP) en las soluciones o extractos celulares se midieron utilizando un kit de determinación de ATP siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen - Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canadá). En resumen, se cultivaron HUVECs (1 x 10⁶ células/pocillo) en medio de cultivo en placas de 6 pocillos durante la noche, seguido de exposición a solución HPG versus solución UW (0,5 ml/pocillo) a 4 °C durante 4 h. 15 Después de la recolección de la solución/sobrenadante, el ATP intracelular se extrajo por incubación de la célula con 0,35 ml/pocillo de agente liberador de ATP de células somáticas (Sigma-Aldrich Canadá). Tanto el ATP extracelular en el sobrenadante como los niveles de ATP intracelular en cada experimento se calcularon con base en los estándares de ATP determinados en el mismo ensayo.

Ejemplo 13: Análisis histológico de la lesión del injerto

20 Después de la perfusión de solución salina tamponada con fosfato (PBS), se extrajeron muestras de tejido en la necropsia y se fijaron en formaldehído tamponado al 10 %. Las muestras se embebieron en parafina y se seccionaron para la tinción con hematoxilina y eosina (H&E). La lesión del injerto se determinó en secciones teñidas con H&E mediante análisis histológico, y se calificó patológicamente de forma cegada con base en la gravedad del daño del tejido cardíaco bajo la vista microscópica como: 0: tejido cardíaco normal; 1: daño leve, indicado por lesión 25 perivascular; 2: daño severo, indicado por la presencia tanto de lesión perivascular como por hemorragia cardíaca leve; o 3: hemorragia severa y dilatación cardíaca.

Ejemplo 14: El efecto del peso molecular de HPG sobre la conservación en frío de corazones de ratones

También se realizó un experimento para probar los efectos del peso molecular de HPG sobre la conservación en frío de corazones de ratones usando un protocolo similar al Ejemplo 1. Los resultados de este experimento se exponen 30 en la tabla a continuación y más adelante en la Figura 8.

El efecto del peso molecular de HPG en la conservación en frío de corazones de ratones			
Grupo*	6 h**	24 h	Valor P ***
Solución UW	1,991 ± 0,104	2,325 ± 0,169	
0,5 kDa) HPG	1,046 ± 0,353	1,723 ± 0,304	0,0007
1 kDa HPG	0,739 ± 0,165	1,593 ± 0,148	< 0,0001
3,5 kDa HPG	0,987 ± 0,039	1,713 ± 0,346	0,0001
8,7 kDa HPG	1,129 ± 0,479	1,780 ± 0,699	0,0064
10 kDa) HPG	1,524 ± 0,470	2,048 ± 0,423	0,0881
25 kDa HPG	1,705 ± 0,754	2,182 ± 0,678	0,4919
52 kDa) HPG	1,661 ± 0,254	2,152 ± 0,216	0,0550
119 kDa) HPG	1,833 ± 0,386	2,413 ± 0,175	0,8003

* Todas las soluciones de HPG contenían 3% (w/v) de HPG.
 ** El daño cardíaco del ratón después de la preservación a 4 °C durante 6 o 24 h se determinó mediante la liberación de LDH, y se presentó por la absorbancia en la medición de LDH.
 *** La diferencia entre la solución UW y cada solución HPG se analizó estadísticamente mediante ANOVA de dos vías (n = 3). P ≤ 0,05 se consideró significativo.

Los rangos numéricos incluyen los números que definen el rango. Adicionalmente, se proporcionan rangos numéricos de tal manera que cita el rango de valores además de los valores individuales dentro del rango citado que es citado específicamente en ausencia del rango. La palabra "que comprende" se usa en el presente documento como un término abierto, sustancialmente equivalente a la expresión "que incluye, pero no se limita a", y la palabra "comprende" 35

5 tiene un significado correspondiente. Como se usa en este documento, las formas singulares "un", "no, una" y "el, la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "una cosa" incluye más de una tal cosa. La cita de referencias en este documento no es una admisión de que tales referencias son técnica anterior a la presente invención. Adicionalmente, el material que aparece en la sección de antecedentes de la memoria descriptiva no es una admisión de que tal material es una técnica anterior a la invención. La cita de referencias en este documento no es una admisión de que tales referencias son técnica anterior a la presente invención ni constituye ninguna admisión en cuanto al contenido o la fecha de estos documentos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una solución de preservación del trasplante que comprende un poliglicerol hiperramificado o dendrítico en el que el poliglicerol hiperramificado o dendrítico tiene un peso molecular entre 0,48 kDa y 3,00 kDa, y en la que la solución de preservación del trasplante es una solución de tipo UW que no comprende rafinosa o hidroxietilalmidón, la solución de preservación del trasplante para su uso como medicamento para reducir los efectos dañinos de la isquemia por frío y la reperfusión cálida sobre la función del órgano en un procedimiento que comprende obtener un órgano, mantener el órgano, en la solución de preservación del trasplante y trasplantar el órgano a un paciente para ser tratado por insuficiencia orgánica.
- 10 2. La solución de preservación del trasplante para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la que el pH de la solución de preservación del trasplante está entre 2,0 y 9,0.
3. La solución de preservación del trasplante para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en la que la solución de preservación del trasplante está en solución acuosa, en la que el poliglicerol hiperramificado o dendrítico comprende 0,01 % en peso a 50 % en peso de la solución de preservación del trasplante.
- 15 4. La solución de preservación del trasplante para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la solución de preservación del trasplante tiene una osmolaridad entre 150 miliosmoles por litro y 1500 miliosmoles por litro.
5. La solución de conservación del trasplante para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el poliglicerol hiperramificado o dendrítico tiene una polidispersidad de 1,0 a 15.
- 20 6. La solución de preservación del trasplante para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la solución de preservación del trasplante comprende al menos dos poligliceroles hiperramificados o dendríticos en la que el peso molecular de cada uno de los al menos dos poligliceroles hiperramificados o dendríticos es diferente.
- 25 7. La solución de conservación del trasplante para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el poliglicerol ramificado o dendrítico comprende además uno o más grupos hidrófobos, grupos hidrófilos o ambos, de los cuales uno o más grupos hidrófobos, grupos hidrófilos o ambos están bien sea (a) opcionalmente unidos del 1 % al 100 % de grupos hidroxilo en el poliglicerol hiperramificado o dendrítico, o (b) opcionalmente unidos del 1 % al 40 % de grupos hidroxilo en el poliglicerol hiperramificado o dendrítico.
- 30 8. La solución de preservación del trasplante para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el uno o más grupos hidrófobos, grupos hidrófilos o ambos comprenden uno o más de un ácido carboxílico, una amina, una amina sustituida, una amina cuaternaria, un aminoácido, un fosfato, un sulfato, un sulfonato, un fosfonato, un alquilo, un alqueno, un alquino, un alquiléter, un aromático, un éter aromático, un grupo zwitteriónico, un carbohidrato, un disulfuro, un cetel, un acetal, un cetel sustituido, un acetal sustituido, grupos éster, tioésteres, un uretano, éster-amidas, grupos amida, un péptido, un fenol, halógenos o un tiol.
- 35 9. La solución de conservación del trasplante para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la solución de conservación del trasplante comprende además al menos uno seleccionado del grupo que consiste en: uno o más electrolitos, uno o más inhibidores de la xantina oxidasa, uno o más antioxidantes, uno o más nucleósidos, uno o más aminoácidos, uno o más agentes de difusión, uno o más agentes osmóticos, uno o más factores de crecimiento, uno o más agentes tamponantes y uno o más agentes antimuerte celular.
- 40 10. La solución de preservación del trasplante para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la solución de preservación del trasplante (a) comprende al menos uno de un agente osmótico y un agente de difusión, seleccionando el al menos un agente osmótico o agente de difusión del grupo que consiste en: sodio, cloruro, bicarbonato, un agente productor de bicarbonato, sulfato, fosfato, calcio, potasio, magnesio, lactobionato, dextrosa, fructosa, glicerol, sorbitol, manitol, L-carnitina, albúmina de suero bovino (BSA), maltosa, maltotriosa, maltopentosa, xilitol, adenosina, glutatión, ácido lactobiónico, hidróxido de potasio, polímeros sintéticos y polímeros naturales;
- 45 o (b) comprende un agente osmótico, cuyo agente osmótico comprende lactobionato.
11. La solución de conservación del trasplante para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la solución de conservación del trasplante comprende un agente tampón y el agente tampón se selecciona de al menos uno del grupo que consiste en: ácido maleico, ácido fosfórico, sulfato, ácido cítrico, ácido málico, ácido fórmico, ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, ácido pivalico, piridina, piperazina, ácido picolínico, L-histidina, ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetasulfónico (HEPES), tricina, gliciglicina, bicina, ácido bórico y glicina.
- 50 12. Uso de una solución de preservación del trasplante que comprende un poliglicerol hiperramificado o dendrítico, en el que el poliglicerol hiperramificado o dendrítico tiene un peso molecular entre 0,48 kDa y 3,00 kDa, y en la que la solución de preservación del trasplante es una solución de tipo UW que no comprende rafinosa o hidroxietilalmidón, para la conservación de un órgano, en el transporte de un órgano, en el transporte de un tejido corporal, o en el
- 55

transporte de una célula, en el que el órgano, tejido corporal o célula se transporta *ex-vivo*, con la condición de que el uso no constituye un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.

13. Uso de una solución de preservación del trasplante de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el pH de la solución de preservación del trasplante está entre 2,0 y 9,0.

5 14. Uso de una solución de preservación del trasplante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13 en el que la solución de preservación del trasplante está en solución acuosa, en el que el poliglicerol hiperramificado o dendrítico comprende 0,01 % en peso a 50 % en peso de la solución de preservación del trasplante.

10 15. Uso de una solución de preservación del trasplante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en la que la solución de preservación del trasplante tiene una osmolaridad entre 150 miliosmoles por litro y 1500 miliosmoles por litro.

16. Uso de una solución de preservación del trasplante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que el poliglicerol hiperramificado o dendrítico tiene una polidispersidad de 1,0 a 15.

15 17. Uso de una solución de preservación del trasplante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en el que la solución de preservación del trasplante comprende al menos dos poligliceroles hiperramificados o dendríticos en el que el peso molecular de cada uno de los al menos dos poligliceroles hiperramificados o dendríticos es diferente.

20 18. Uso de una solución de conservación del trasplante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, en el que el poliglicerol hiperramificado o dendrítico comprende además uno o más grupos hidrófobos, grupos hidrófilos o ambos, de los cuales uno o más grupos hidrófobos, grupos hidrófilos o ambos están (a) opcionalmente unidos de 1 % al 100 % de grupos hidroxilo en el poliglicerol hiperramificado o dendrítico, o (b) opcionalmente unidos de 1 % al 40 % de grupos hidroxilo en el poliglicerol hiperramificado o dendrítico.

25 19. Uso de una solución de preservación del trasplante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, en el que la solución de preservación del trasplante comprende además al menos uno seleccionado del grupo que consiste en: uno o más electrolitos, uno o más inhibidores de la xantina oxidasa, uno o más antioxidantes, uno o más nucleósidos, uno o más aminoácidos, uno o más agentes de difusión, uno o más agentes osmóticos, uno o más factores de crecimiento, uno o más agentes tamponantes y uno o más agentes de antimuerte celular.

30 20. Uso de una solución de preservación del trasplante de la reivindicación 19, en el que (a) la solución de preservación del trasplante comprende al menos uno de un agente osmótico o un agente de difusión, seleccionándose el agente osmótico o agente de difusión del grupo que consiste en: sodio, cloruro, bicarbonato, un agente productor de bicarbonato, sulfato, fosfato, calcio, potasio, magnesio, lactobionato, dextrosa, fructosa, glicerol, sorbitol, manitol, L-carnitina, albúmina de suero bovino (BSA), maltosa, maltotriosa, maltopentosa, xilitol, adenosina, glutatión, ácido lactobiónico, hidróxido de potasio, polímeros sintéticos y polímeros naturales; o

(b) comprende un agente osmótico, agente osmótico que comprende lactobionato.

35 21. Uso de una solución de conservación del trasplante de la reivindicación 19, en el que la solución de conservación del trasplante comprende además un agente tampón y el agente tampón se selecciona de al menos uno del grupo que consiste en: ácido maleico, ácido fosfórico, sulfato, ácido cítrico, málico ácido, ácido fórmico, ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, ácido pivalico, piridina, piperazina, ácido picolínico, L-histidina, ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES), tricina, gliciglicina, bicina, ácido bórico y glicina.

40

FIG.1

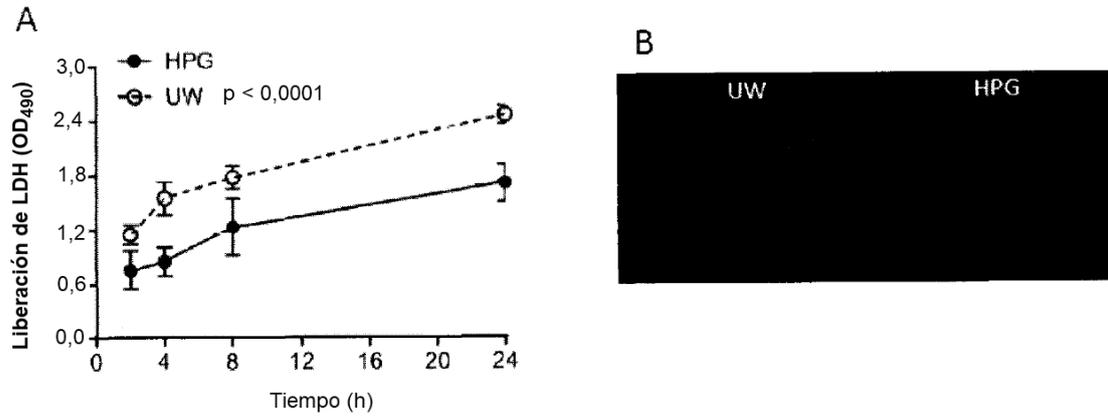


FIG.3

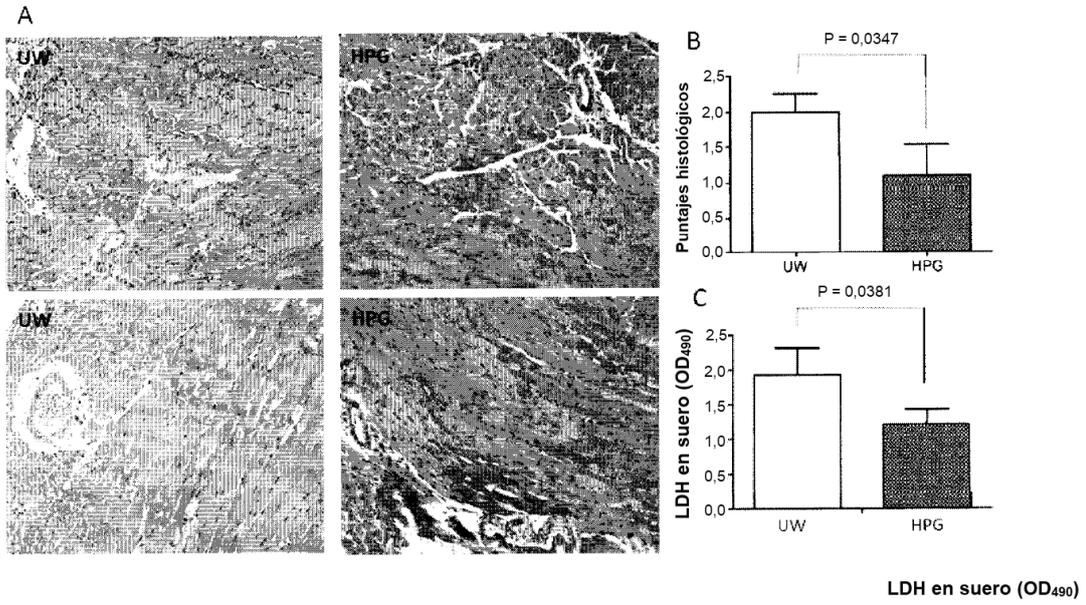


FIG.4

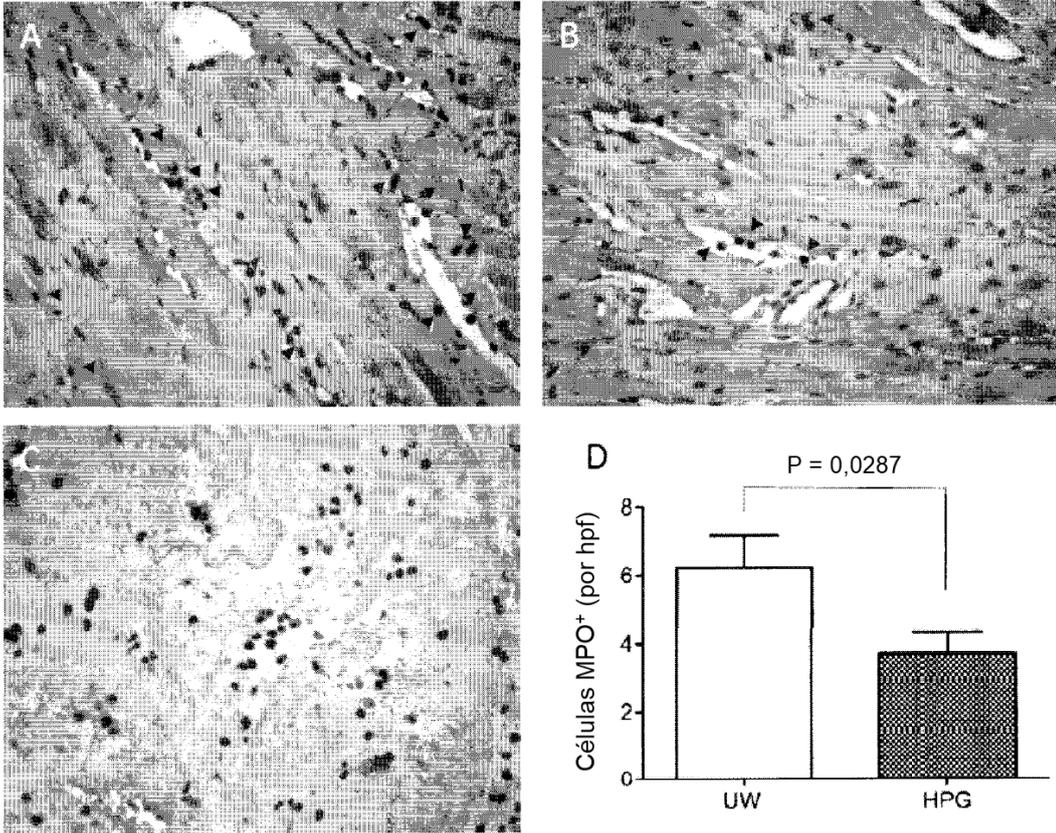


FIG.5

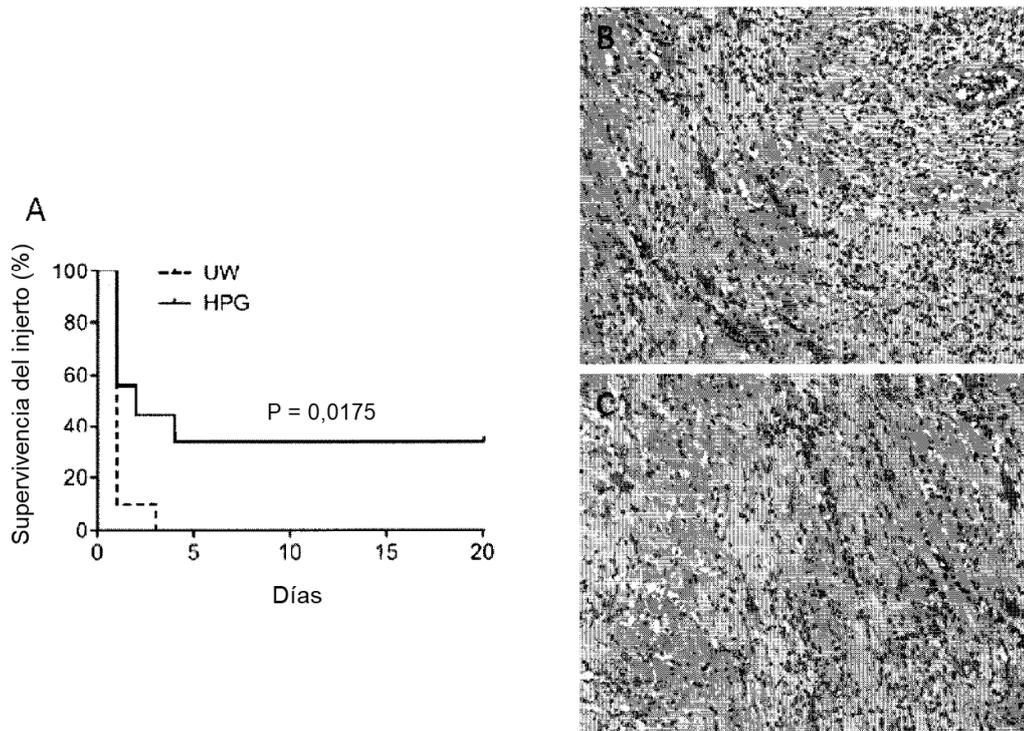


FIG.6

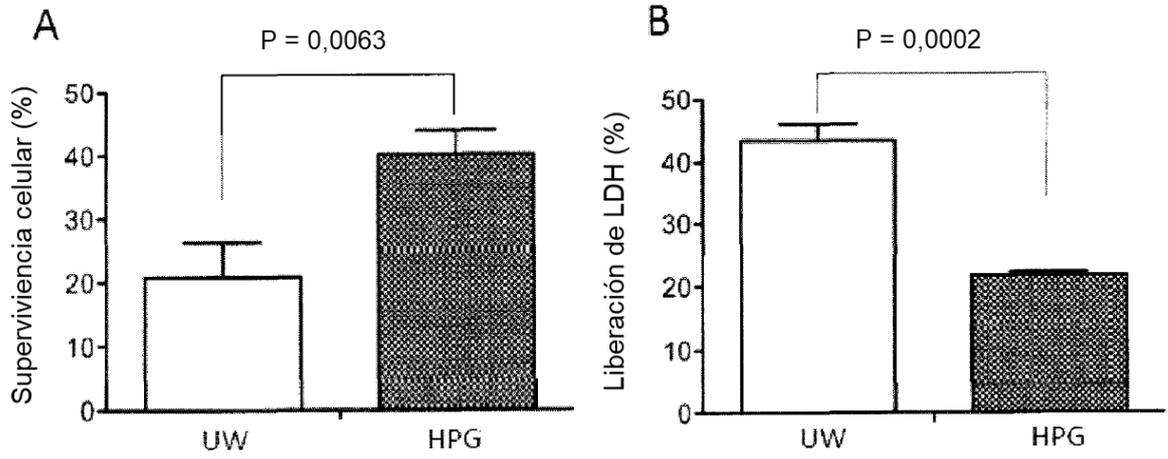


FIG.7

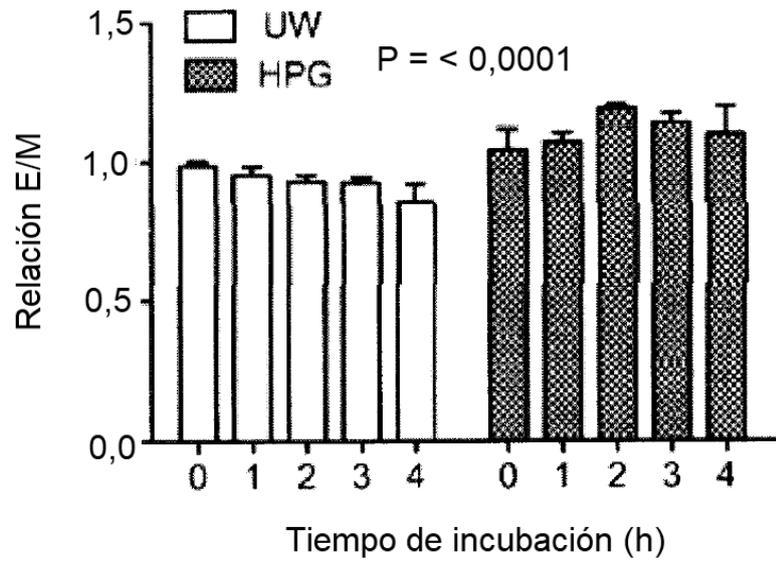
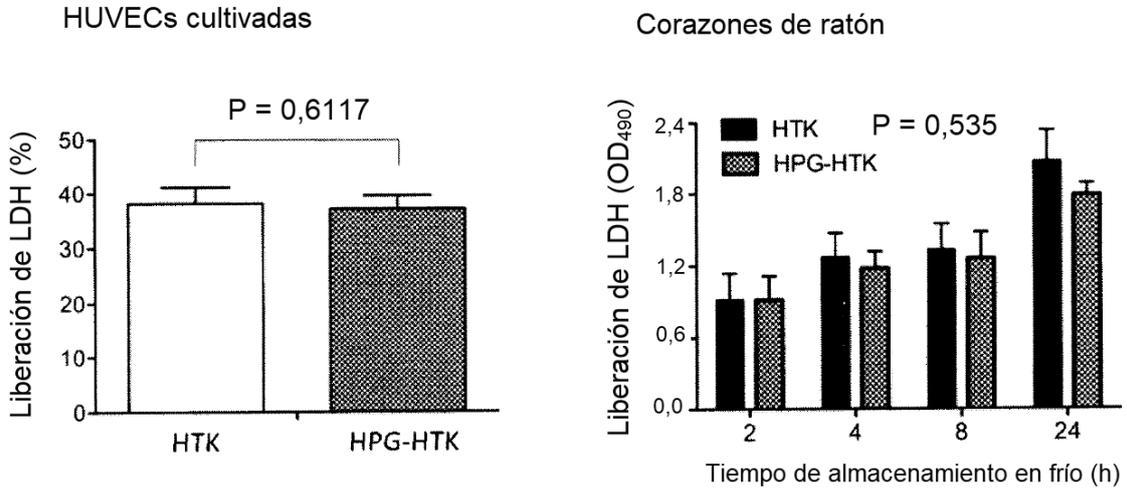
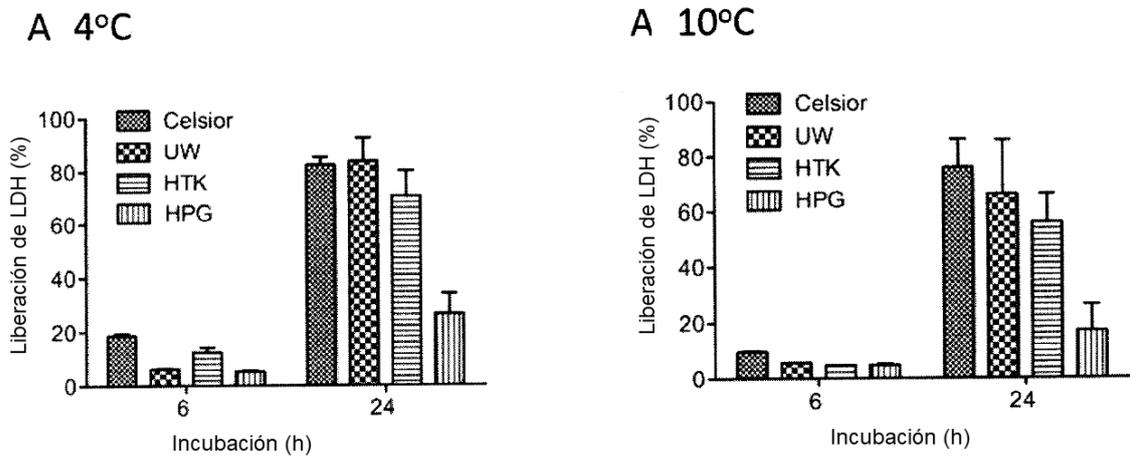


FIG. 8



Células H9C2 cultivadas



Dos-ANOVA
 P = 0,0001 (HPG vs. Celsior, UW o HTK)

Dos-ANOVA
 P = 0,0001 (HPG vs. Celsior)
 P = 0,0039 (HPG vs. UW)
 P = 0,0006 (HPG vs. HTK)