

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 365 429**

21 Número de solicitud: 201030326

51 Int. Cl.:

A61K 31/165 (2006.01)

A61M 1/28 (2006.01)

C07C 237/22 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **05.03.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **05.10.2011**

Fecha de la concesión: **27.08.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **06.09.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
06.09.2012

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE CASTILLA DE LA MANCHA
EDIFICIO JOSE PRAT PLAZA DE LA
UNIVERSIDAD 2
02071 ALBACETE, ES**

72 Inventor/es:

**CEÑA CALLEJO, VALENTÍN;
PEREZ MARTINEZ, FRANCISCO CARLOS;
PEREZ MARTINEZ, JUAN;
GOMEZ ROLDAN, CARMEN;
ORTEGA CERRATO, AGUSTIN y
LLAMAS FUENTES, FRANCISCO**

74 Agente/Representante:

Pons Ariño, Ángel

54 Título: **SOLUCION PARA DIALISIS PERITONEAL**

57 Resumen:

Solución para diálisis peritoneal.

El presente invención se refiere a un tipo de solución para diálisis peritoneal que comprende Aliskiren o cualquiera de sus derivados, al menos un electrolito, al menos una solución tampón y al menos un agente osmótico. De esta manera se consigue reducir la toxicidad de estas soluciones habituales de diálisis peritoneales sobre las células mesoteliales de peritoneo. Por otra parte, la presente invención se refiere al uso de este tipo de soluciones para procesos en los cuales sea necesario el llevar a cabo diálisis peritoneal, como en el caso del fallo renal crónico.

ES 2 365 429 B1

DESCRIPCIÓN

Solución para diálisis peritoneal.

5 El presente invención se refiere a un tipo de solución para diálisis peritoneal que comprende Aliskiren, al menos un electrolito, al menos una solución tampón y al menos un agente osmótico. De esta manera se consigue reducir la toxicidad de estas soluciones habituales de diálisis peritoneales sobre las células mesoteliales de peritoneo. Por otra parte, la presente invención se refiere al uso de este tipo de soluciones para procesos en los cuales sea necesario el llevar a cabo diálisis peritoneal, como en el caso del fallo renal crónico.

10

Estado de la técnica anterior

15 La diálisis peritoneal (DP) es una terapia eficiente para la insuficiencia renal crónica, donde la membrana peritoneal es utilizada como membrana semipermeable para eliminar sustancias nocivas como la urea y el potasio de la sangre, así como también el exceso de líquido. Los pacientes sometidos a este tratamiento tienen la ventaja de poder llevar una vida activa, sin la necesidad de ir al hospital frecuentemente, debido a que la DP se realiza normalmente en el hogar o en el lugar de trabajo del paciente (*Grassmann A, Gioberge S, Moeller S, et al. Nephrol Dial Transplant* 2005; 20:2587-93 y *Burkart JM, Nolph KD. NIDDK* 2006; 6: 1-24).

20

El principal inconveniente de este método de diálisis es la predisposición a padecer infecciones en el peritoneo (peritonitis), aunque su incidencia ha disminuido drásticamente desde la aparición de nuevos sistemas de conexión especialmente diseñados para asegurar la máxima esterilidad. Por otro lado, la exposición continua al líquido de diálisis conlleva el deterioro de la capacidad dializante de la membrana peritoneal, que se asocia a fibrosis y vasculopatías, aunque los factores que influyen en la velocidad de deterioro de la función peritoneal tampoco están completamente aclarados (*Gillerot G, Devuyst O. Clin Nephrol* 2003; 60: 1-6).

25

La alteración de las células mesoteliales que forman la membrana peritoneal por el efecto de la exposición continua a líquido de diálisis con una elevada osmolaridad y alta concentración de glucosa puede ser uno de los mecanismos causantes de la disfunción peritoneal (*Coles GA, Topley N. Adv Ren Replace Ther* 2000; 7: 289-301). Se conocen muchos tipos de estímulos que pueden inducir apoptosis, tales como citoquinas, hormonas, infecciones o fármacos (*Catalan MP, Subirá D, Reyero A, et al. Kidney Int* 2003; 64: 321 -30.; *Zheng Z, Ye R, Yu X, et al. Adv Perit Dial* 2001; 17: 53-7). Además, se sabe que altas concentraciones de glucosa también inducen apoptosis en muchos tipos celulares, incluyendo a las células mesoteliales (*Sharifi AM, Mousavi SH, Farhadi M, et al. J Pharmacol Sci* 2007; 35 104:258-62).

30

Además de estudios en cultivos de células mesoteliales de peritoneo, el modelo animal de DP más usado es la rata (*González-Mateo GT, Loureiro-Alvarez J, Rayego-Mateos S, et al. Nefrologia* 2008; 28 (Supl 6): 17-22). Estudios previos con estos modelos han permitido estudiar la biocompatibilidad de los líquidos de diálisis, la respuesta inflamatoria desarrollada en el peritoneo frente a la exposición al líquido de diálisis, la angiogénesis y la importancia de la red vascular en la permeabilidad de la membrana peritoneal o la fibrosis, y el papel de las peritonitis en el daño de la membrana peritoneal (*Krediet RT, Zweers MM, Van der Wal AC, et al. Perit Dial Int* 2000; 20 (Supl 2): S19-25; *Bazargani F. Swed Dent J Suppl* 2005; 171: 1-57; *Hurst SM, McLoughlin RM, Monslow J, et al. J Immunol* 2002; 169:5244-51; *Kim YL, Do J, Park SH, et al. Nephrology (Carlton)* 2003; 8 (Supl): S28-32; *Gillerot G, Devuyst O. Clin Nephrol* 2003; 60: 1-6; *Lameire N, Van Biesen W, Mortier S, et al. Contrib Nephrol* 2006; 150: 70-6; *Margetts PJ, Bonniaud P, Liu L, et al. J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 425-36; *Margetts PJ, Kolb M, Galt T, et al. J Am Soc Nephrol* 2001; 12:2029-39).

40

La investigación sobre la DP se remonta a mediados del siglo XX donde se empezó a estudiar en situaciones de uremia y, más adelante, como tratamiento del fracaso renal agudo o crónico. Sin embargo, la DP como ahora la entendemos en su modalidad continua ambulatoria, se concibió en 1978 por *Popovich RP, Moncrief JW, Nolph KD, et al. J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 901-10. Desde entonces, su uso ha crecido de forma constante hasta llegar a más de 180.000 pacientes en todo el mundo (*Lysaght MJ. J Am Soc Nephrol* 2002; 13 (Supl 1): S37-40). El crecimiento en los últimos años ha sido muy diverso en los diferentes países, siendo de un 90% en Méjico, entre un 30-50% en los países nórdicos de Europa y Canadá, 17% en EEUU, un 8-11% para los países de centro y sur de Europa y un 5% en Japón (*Lysaght MJ. J Am Soc Nephrol* 2002; 13 (Supl 1): S37-40).

55

Un tercio de pacientes de DP pasan anualmente a hemodiálisis a causa de una pérdida de eficacia de la membrana peritoneal (*Kawaguchi Y. Perit Dial Int* 1999; 19: S327-8), por lo que se precisa seguir investigando para conseguir un aumento del potencial dialítico de la membrana peritoneal y un incremento de su vida media en pacientes con insuficiencia renal crónica. Esto probablemente se conseguirá con aditivos farmacológicos al líquido de diálisis como el que se presenta en la presente invención.

60

El coste aproximado por año y por paciente en diálisis es de unos 60.000 Euros. Teniendo en cuenta el elevado número de pacientes que en la actualidad requieren un tratamiento de diálisis, el coste mundial del tratamiento de la insuficiencia renal ronda los sesenta mil millones de euros al año. La población de nuestro planeta está creciendo a un ritmo del 1,3%, mientras que el de la población que requiere diálisis continúa creciendo a una frecuencia anual del 7-8% (*Lysaght MJ. J Am Soc Nephrol* 2002; 13 (Supl 1): S37-40). Está claro, que estamos asistiendo a un enorme

65

crecimiento de la población en diálisis en todo el mundo, de forma que en el año 2010 habrá aproximadamente 2 millones de pacientes, con la consiguiente importancia económica que esto conlleva.

De los pacientes con insuficiencia renal en tratamiento sustitutivo, el 68% está siendo tratado con hemodiálisis, el 23% vive con un trasplante renal y sólo un 9% con DP (*Lysaght MJ. J Am Soc Nephrol 2002; 13 (Supl 1): S37-40*). Se han producido importantes mejoras en la evolución de los pacientes tratados con DP, de forma que es aceptada en el momento actual como un tratamiento equivalente a la hemodiálisis. En los últimos años, la DP ha demostrado ser un tratamiento tan efectivo como la hemodiálisis, por lo menos, en los primeros 4 o 5 años de su utilización, en términos de supervivencia y calidad de vida, y con una buena relación coste/efectividad.

Hasta el momento, la DP ha demostrado su utilidad y se ha establecido como una excelente opción alternativa a la hemodiálisis, incluso como tratamiento sustitutivo inicial porque tiene cualidades positivas establecidas fuera de toda duda:

- Coste más bajo que la hemodiálisis, especialmente en el mundo occidental.
- Supervivencia similar a la hemodiálisis, y algo superior en los primeros 2 a 3 años.
- Tratamiento de elección para niños y jóvenes.
- Tratamiento óptimo antes del trasplante renal.

Sin embargo, si la DP quiere conseguir una mayor aceptación, y aumentar el porcentaje de su utilización, tienen que resolverse diversos problemas pendientes que habitualmente son los que detraen de su mayor utilización. Dos cuestiones importantes son:

- La DP posee un índice más elevado de fallo, comparado con la hemodiálisis. De hecho, se necesita seguir investigando para conseguir un menor fallo en la ultrafiltración a medio y largo plazo, una mejor aclaración de los solutos y una reducción de la incidencia de peritonitis.

- Existe todavía una imposibilidad de mantener a un paciente en DP prolongada (más de 10 años) debido a las alteraciones que se producen a largo plazo en la estructura y función de la membrana peritoneal. En este sentido, la investigación de nuevos tratamientos farmacológicos que eviten este deterioro, son cruciales para incrementar la utilización de la DP y reducir el coste que conlleva en la actualidad el uso de la hemodiálisis.

El bajo pH del líquido de diálisis, su alto poder osmótico, el proceso mecánico de introducir y retirar el líquido, la glucosa y sus productos de degradación hacen de la diálisis peritoneal un proceso bioincompatible capaz de producir daño a la cavidad peritoneal. Por este motivo, hacen falta más estudios a nivel molecular y celular que permitan conocer los efectos *in vitro* e *in vivo* de la exposición a estas soluciones y estudiar nuevos tratamientos farmacológicos que permitan minimizar los efectos adversos que pueden aparecer en los pacientes que precisan DP.

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso celular genéticamente controlado por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos. La exposición a los líquidos de DP incrementa las especies reactivas de oxígeno (ROS) e induce apoptosis en las células mesoteliales de peritoneo (*Yang AH, Chen JY, Lin YP, et al. Kidney Int 1997; 51: 1280-8*). Estos dos procesos pueden estar relacionados, ya que se sabe que las ROS pueden activar p38 MAPKs y desencadenar un proceso apoptótico, e incrementar la expresión de mediadores proinflamatorios que intensifican la citotoxicidad de los líquidos de diálisis. Se observa que, en la apoptosis inducida se produce un incremento de la fosforilación de p38-MAPK (*Sepúlveda JC, Moreno Manzano V, Alique M, et al. Nefrología 2005; 25: 131-40*), y que, por el contrario, tratamientos antiapoptóticos disminuyen la fosforilación de p38 MAPK (*Vorobiov M, Malki M, Shnaider A, et al. Perit Dial Int 2008; 28: 648-54*). Por este motivo, la medición de la fosfoproteína 38 (fosfo-p38) MAPK sirve para evaluar el efecto antiapoptótico que poseen distintos agentes.

Otro proceso que desencadena la exposición a los líquidos de diálisis peritoneal es la producción de fibronectina (*Ha H, Yu MR, Lee HB. Kidney Int 2001; 59: 463-70; Lee HB, Yu MR, Song JS, et al. Kidney Int 2004; 65: 1170-9*). Esta proteína es importante en procesos fibrosantes y en la transición epitelio-mesenquimal de las células mesoteliales de peritoneo. Ambos procesos están relacionados con la pérdida de capacidad dialítica del peritoneo.

En los pacientes tratados con DP se siguen buscando complementos terapéuticos que minimicen el daño de los líquidos de diálisis a largo plazo.

La renina es la primera enzima del eje renina-angiotensina-aldosterona, que juega un papel central en el control de la tensión arterial. La renina transforma el angiotensinógeno en angiotensina I, la cual, por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), es convertida en angiotensina II. La angiotensina tiene tanto efectos directos como indirectos sobre las causas de la hipertensión arterial. Por un lado origina contracción de la musculatura lisa arterial, lo que lleva a vasoconstricción y aumento de la presión arterial. Por otra parte aumenta la síntesis de aldosterona,

lo que origina retención de sodio y agua en los túbulos renales, aumento del volumen plasmático e indirectamente aumento de la tensión arterial. Aliskiren (WO2007147596 (A1)) se une a la proteína S3^{bp}, necesaria para el paso de angiotensina I a angiotensina II, con lo que se impide la síntesis de la renina (*Rahuel J, Rasetti V, Maibaum J, et al. Chem Biol 2000;7:493-504*).

Por lo tanto es necesario desarrollar nuevas soluciones para diálisis peritoneal que solucionen todos los problemas anteriormente enunciados. De esta manera, en la presente invención se ha desarrollado un nuevo tipo de solución para diálisis que previene las deficiencias de otras soluciones descritas en el estado de la técnica.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a soluciones de diálisis peritoneal que comprenden Aliskiren, al menos un electrolito, al menos una solución tampón, y al menos un agente osmótico para el tratamiento de pacientes con fallo renal sometidos a diálisis peritoneal.

De esta manera se ejerce una doble funcionalidad, la primera o clásica perteneciente a los líquidos de diálisis y la segunda debido al aliskiren, el cual reduce la toxicidad de estas soluciones sobre las células mesoteliales de peritoneo. Ello es debido mediante la reducción de especies reactivas de oxígeno, la fosforilación de p38MAPK y la activación de la Caspasa 3, procesos que pueden ser generados por las altas concentraciones de glucosa que contienen las soluciones de diálisis peritoneal.

En consecuencia, la solución de diálisis peritoneal de la presente invención, previene el estrés oxidativo, los procesos apoptóticos y el consecuente daño peritoneal alargando, en consecuencia, el tiempo durante el cual el paciente puede utilizar diálisis peritoneal antes de tener que ser sometido a hemodiálisis.

Por lo tanto un primer aspecto esencial de presente invención se refiere a una solución para diálisis peritoneal que comprende los siguientes elementos:

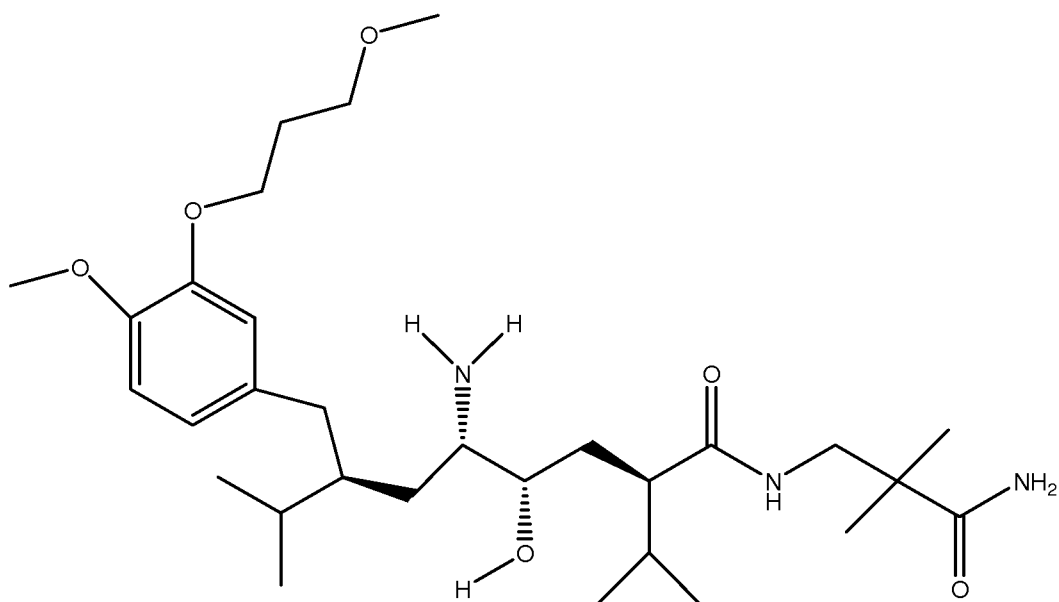
- a) al menos un electrolito;
- b) al menos una solución tampón;
- c) al menos un agente regulador de la presión osmótica;
- d) aliskiren o cualquiera de sus derivados.

En una realización preferida, el o los electrolitos se seleccionan del grupo formado por los siguientes electrolitos Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cl⁻ de diferentes sales o cualquier combinación de los mismos. La concentración de electrolito a añadir es: Na 100-200 mmol/l; K 0-4 mmol/l; Mg 0,1-2 mmol/l; Ca 0.5-3 mmol/l; Cl 50-200 mmol/l.

En otra realización preferida, la solución tampón se selecciona entre lactato, bicarbonato o combinación de los mismos. Según una realización preferida, el tampón es de bicarbonato. La concentración de tampón a añadir es desde 10 hasta 150 mmol/l.

En otra realización preferida, el agente osmótico de la solución de diálisis peritoneal, utilizado para remover el exceso de agua de la sangre, se selecciona y sin sentido limitativo del grupo formado por glucosa, poliglucosa, manitol, glicerol, aminoácidos, polipéptidos o cualquier combinación de los mismos. La cantidad de agente osmótico a añadir es desde 100 hasta 600 mOsm/kg.

Según otra realización preferida, el aliskiren es utilizado en la solución de diálisis peritoneal a una concentración entre 50 nM y 1 mM, por sus efectos inhibidores de la producción de radicales libres de oxígeno, por sus efectos inhibidores de la vía de la p38MAPK y de la vía de la Caspasa 3.



Una realización preferida se refiere al uso de la solución de diálisis para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de enfermedades renales.

Otra realización preferida se refiere al uso de la solución de diálisis para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de la toxicidad sobre células mesoteliales del peritoneo.

Otra realización preferida se refiere al uso de la solución de diálisis para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o reducción de especies reactivas de oxígeno, la fosforilación de la proteína p39MAPK y la activación de la caspasa 3.

Otra realización preferida se refiere al uso de la solución de diálisis para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento del estrés oxidativo, los procesos apoptóticos y el daño peritoneal generado por los líquidos de diálisis.

Otra realización preferida se refiere al uso de la solución de diálisis para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de la insuficiencia renal crónica.

Normalmente, la solución de diálisis peritoneal de la presente invención es administrada 4 veces al día, en un volumen de 2 litros por dosis. La solución es administrada a pacientes que sufren insuficiencia renal crónica de acuerdo a los métodos normalmente utilizados para realizar la diálisis peritoneal. Más concretamente, la solución es administrada al peritoneo a través de un catéter preimplantado en el peritoneo. Normalmente, se necesitan unas 4-6 horas para remover los desechos metabólicos acumulados en la sangre de pacientes con fallo renal.

A continuación se describen ejemplos de la metodología y los resultados que apoyan la presente invención, pero la cobertura de la presente invención no está limitada a ellos.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1, describe una tinción inmunohistoquímica con HBME-1 positiva en cultivo primario de células mesoteliales de peritoneo de rata (100x). Los controles negativos utilizados no mostraron positividad (datos no mostrados).

Fig. 2 se refiere al estudio de la producción de Especies Reactivas de Oxígeno tras la exposición a glucosa 50 mM (A) y glucosa 83 mM (B) en cultivos primarios de células mesoteliales de peritoneo mediante citometría de flujo. Los controles son tratamientos con glucosa 5,6 mM. Los datos se expresan como media \pm SEM, n=3. *p<0.05, comparados con el control.

Fig. 3 se refiere a un estudio de la activación de caspasa 3 tras tratamientos con glucosa 50 mM (A) y glucosa 83 mM (B) en cultivos primarios de células mesoteliales de peritoneo. Los controles son tratamientos con glucosa 5.6 mM. Los datos se expresan como media \pm SEM, n=3. *p<0.05, comparados con el control.

Fig. 4 describe el estudio de los efectos de glucosa 50 mM (A) y glucosa 83 mM (B) en cultivos primarios de células mesoteliales de peritoneo sobre la fosforilación de p38MAPK (p-p38) por Western blot. Los controles son tratamientos con glucosa 5,6 mM. Los datos se expresan como media \pm SEM, n=3. *p<0.05, comparados con el control.

Fig. 5 describe el estudio de toxicidad de la adición de aliskiren (100 nM a 1 mM) durante 48 horas en cultivos primarios de células mesoteliales de peritoneo mediante la determinación de la cantidad de LDH liberada al medio de cultivo. Los datos se expresan como media \pm SEM, n=12. *p<0.05, comparados con el control.

Fig. 6 describe el estudio del efecto de pretratamientos con aliskiren (0 a 100 μ M) durante 48 horas sobre la producción de Especies Reactivas de Oxígeno tras la exposición a glucosa 50 mM (A) y glucosa 83 mM (B) durante 8 horas en cultivos primarios de células mesoteliales de peritoneo mediante citometría de flujo. Los controles son tratamientos con glucosa 5,6 mM sin aliskiren. Los datos se expresan como media \pm SEM, n=3. *p<0.05.

Fig. 7 describe el estudio del efecto de pretratamientos con aliskiren (0 a 100 μ M) durante 48 horas sobre la activación de caspasa 3 tras tratamientos con glucosa 50 mM durante 24 horas en cultivos primarios de células mesoteliales de peritoneo. Los controles son tratamientos con glucosa 5,6 mM sin aliskiren. Los datos se expresan como media \pm SEM, n=3. *p<0.05.

Fig. 8 describe el estudio por Western blot del efecto de pretratamientos con aliskiren (0 a 100 μ M) durante 48 horas en cultivos primarios de células mesoteliales de peritoneo sobre la fosforilación de p38MAPK (p-p38) inducida por el tratamiento con glucosa 50 mM durante 48 horas. Los controles son tratamientos con glucosa 5,6 mM sin aliskiren. Los datos se expresan como media \pm SEM, n=3. *p<0.05.

Ejemplos de realización de la invención

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención. Sin embargo, estos ejemplos no son limitativos. Tienen carácter informativo y en ningún caso limitante de las metodologías empleadas, las cuales pueden ser alteradas con el fin de alcanzar unos resultados similares.

En esta memoria descriptiva los símbolos y convenciones usadas en estos procedimientos, esquemas y ejemplos son consistentes con los usados en el Sistema Internacional y la bibliografía científica contemporánea, por ejemplo, el Journal of Medicinal Chemistry. Salvo que se indique otra cosa, todos los materiales de partida se obtuvieron de proveedores comerciales y se usaron sin purificación adicional. Específicamente, se pueden usar las siguientes abreviaturas en los ejemplos y a lo largo de toda la memoria descriptiva: g (gramos); mg (miligramos); Kg (kilogramos); mL (mililitros); μ L (microlitros); mmol (milimoles); P.f. (punto de fusión); Hz (hertzio); MHz (megahertzio); δ (desplazamiento químico); ppm (partes por millón); s (singlete); d (doblete); t (triplete); q (cuartete); c (quintuplete); m (multiplete); J (constante de acoplamiento); RMN (resonancia magnética nuclear); EM (espectro de masas); ES (electrospray); m/z (Relación masa/carga); Anal. (Análisis Elemental); Rto (Rendimiento); TEA (triethylamina); CH₂Cl₂ (diclorometano); CDCl₃ (cloroformo deuterado); DMSO (dimetilsulfóxido); i.p. (administración parental). Todas las temperaturas se expresan en °C (grados Celsius).

Ejemplo

Cultivos de células mesoteliales de peritoneo de rata

Las células mesoteliales de peritoneo de rata se aislaron por digestión enzimática conforme a protocolos descritos en Hjelle JT, Golinska BT, Waters DC, et al. *Perit Dial Int* 1989; 9: 341-7. Brevemente, ratas hembra de 200-400 g de peso de la cepa Spragle-Dawley fueron sacrificadas de acuerdo a lo establecido en el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre Protección de los Animales utilizados para Experimentación y otros fines científicos. Rápidamente, se abrió la cavidad abdominal y se extrajo la pared abdominal (peritoneo y músculo liso) en condiciones estériles. Las células mesoteliales se separaron de la superficie interna de la pared abdominal por digestión enzimática, incubando dicha superficie con medio de cultivo 199 (Sigma) y 0,5 mg/ml de colagenasa (Sigma) durante 30 minutos a 37°C. Tras la incubación, la superficie digerida de la pared abdominal se raspó para liberar completamente las células mesoteliales adheridas. Las células mesoteliales obtenidas se sembraron en placas de cultivo para su crecimiento y estudio, y se mantuvieron en medio 199 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin. Tras cada cultivo, la presencia de células mesoteliales de peritoneo se confirmó por su apariencia morfológica y la expresión de marcadores específicos. Se utilizaron células entre los pases 3 y 6.

Preparación de las soluciones de diálisis peritoneal de la presente invención

Las soluciones de diálisis peritoneal se prepararon añadiendo a medio M199, cuya composición aparece en la Tabla 1, las cantidades de aliskiren descritas en la Tabla 2 y las cantidades de glucosa descritas en la Tabla 3. Se han estudiado las combinaciones de cada una de las concentraciones de aliskiren que aparecen en la Tabla 2 y las de glucosa que aparecen en la Tabla 3.

TABLA 1

Composición del medio 199

| Sales Inorgánicas (electrolitos) | g/L | Buffer tampon de pH | g/L | Agente osmótico | g/L |
|---|---------|---------------------------------|----------|-----------------------------|----------|
| CaCl ₂ + 2H ₂ O | 0,2 | NaHCO ₃ | 2,2 | Glucosa | 1 |
| Fe(NO ₃) ₃ + 9H ₂ O | 0,00072 | | | | |
| MgSO ₄ | 0,09767 | | | | |
| KCl | 0,4 | | | | |
| Acetato sódico | 0,05 | | | | |
| NaCl | 6,8 | | | | |
| NaH ₂ PO ₄ | 0,122 | | | | |
| Aminoácidos | g/L | Vitaminas | g/L | Otros | g/L |
| L-Alanina | 0,025 | Ácido Ascorbico Na | 5,66E-05 | Sulfato de Adenina | 0,01 |
| L-Arginina HCl | 0,07 | D-Biotina | 0,00001 | Trifosfato de Adenosina 2Na | 0,001 |
| Ácido L-Aspartico | 0,03 | Calciferol | 0,0001 | Monofosfato de Adenosina Na | 0,000239 |
| L-Cistina HCl + H ₂ O | 0,00011 | Colina Cl | 0,0005 | Colesterol | 0,0002 |
| L-Cisteina 2HCl | 0,026 | Ácido Fólico | 0,00001 | Deoxiribosa | 0,0005 |
| Ácido L-Glutámico | 0,0668 | Menadiona (bisulfito sódico) | 0,000016 | Glutation (reducido) | 0,00005 |
| L-Glutamina | 0,1 | mio-Inositol | 0,00005 | Guanina HCl | 0,0003 |
| Glicina | 0,05 | Niacinamida | 0,000025 | Hipoxantina | 0,0003 |
| L-Histidina HCl + H ₂ O | 0,02188 | Ácido Nicotínico | 0,000025 | Rojo Fenol Na | 0,0213 |
| Hidroxi-L-Prolina | 0,01 | Ácido p-Amino Benzoico | 0,00005 | TWEEN 80 | 0,02 |
| L-Isoleucina | 0,02 | Ácido D-Pantoténico ½Ca | 0,00001 | Ribosa | 0,0005 |
| L-Leucina | 0,06 | Piridoxal HCl | 0,000025 | Timina | 0,0003 |
| L-Lisina HCL | 0,07 | Piridoxina HCl | 0,000025 | Uracilo | 0,0003 |
| L-Metionina | 0,015 | Acetato de Retinol | 0,00014 | Xantina Na | 0,000344 |
| L-Fenilalanina | 0,025 | Riboflavina | 0,00001 | | |
| L-Prolina | 0,04 | Fosfato de DL-alfa-Tocoferol Na | 0,00001 | | |
| L-Serina | 0,025 | Tiamina HCl | 0,00001 | | |
| L-Treonina | 0,03 | | | | |
| L-Triptofano | 0,01 | | | | |
| L-Tirosina 2Na 2H ₂ O | 0,05766 | | | | |
| L-Valina | 0,025 | | | | |

TABLA 2

Concentraciones de Aliskiren de las soluciones de diálisis peritoneal

| Concentración de Aliskiren (µM) | Cantidad de Aliskiren añadida (g/L) |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| 0,1 | 0,000055 |
| 1 | 0,00055 |
| 10 | 0,0055 |
| 50 | 0,0275 |
| 100 | 0,055 |
| 1000 | 0,55 |

TABLA 3

Concentraciones de Glucosa de las soluciones de diálisis peritoneal

| Concentración de Glucosa (mM) | Cantidad de Glucosa añadida (g/L) |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| 5,6 | 0 |
| 50 | 8 |
| 83 | 14 |

Estudios de Citotoxicidad

Pruebas de toxicidad se realizaron en los cultivos de células mesoteliales de peritoneo de rata determinando la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Posadas I, López-Hernández B, Clemente MI, et al. *Pharm Res* 2009; 26: 1181-91). Estos estudios se realizaron para estudiar la toxicidad de las soluciones de diálisis peritoneal del presente invento.

Para ello, las células se sembradas en placas de 24 pocillos y fueron expuestas a las soluciones de diálisis peritoneal objetivo del presente invento para realizar el estudio de su toxicidad. Los efectos tóxicos se evaluaron midiendo la ruptura de la membrana celular y la consiguiente liberación de la LDH al sobrenadante a través del kit CytoTox96® (Promega). Las células se despegaron mecánicamente, lavadas con PBS, y centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos. La absorbancia del lisado y del sobrenadante celular se obtuvo utilizando un espectrofotómetro de microplacas a una longitud de onda de 490 nm, siguiendo las indicaciones comerciales.

Evaluación de cambios en la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) por citometría de flujo

Tras lavados con PBS, las células se incubaron con 5,6-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H2DCFDA, Invitrogen) durante 15 minutos a 37°C, siguiendo el protocolo estándar (Lee HB, 2004). Tras la incubación, se recogieron los medios condicionados y las células se lavaron con PBS y se tripsinizaron. Las células totales - vivas y muertas - presentes en la suspensión resultante al juntar el tripsinizado celular y el medio condicionado se centrifugaron a 3000 x g durante 5 min a 4°C. Por último, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en medio de cultivo 199 para su análisis en el citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU). A partir de la evaluación de 10.000 células por condición experimental se calculó la producción de especies reactivas de oxígeno.

Evaluación de la fosforilación/desfosforilación de p38 MAPK por Western blot

Para obtener la proteína total de los cultivos celulares se procedió a recoger el medio de cultivo y reemplazarlo con PBS. Las células se despegaron mediante tripsinización y se juntaron con el medio recogido anteriormente. El “pellet” resultante al centrifugar a 3000 x g durante 5 min a 4°C., enriquecido en proteínas, se resuspendió en un buffer de lisis (100 mM HEPES, 5 mM DTT, 5 mM EGTA, 0,04% Nonidet P-40 y 20% glicerol) con inhibidores de proteasas y fosfatasa y se incubó 60 minutos a 4°C. Tras la incubación, se procedió a centrifugar las muestras a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y las sobrenadantes se conservaron a -80°C. El contenido en proteína de los lisados celulares se determinó mediante el método Bradford, según protocolo estándar (Vorobiov M, Malki M, Shnaider A, et al. *Perit Dial Int* 2008; 28: 648-54). Se cargaron 20 µg de proteína/pocillo de cada muestra en geles de poliacrilamida al 10%. Los geles se transfirieron por electroforesis a membranas de nitrocelulosa usando un “blotter” semi-seco. Las proteínas unidas a nitrocelulosa se visualizaron con Ponceau S, seguidas de bloqueo con TTBS (50 mM Tris, pH 7.5, 200 mM NaCl, 0.1% Tween) con 5% de leche desnatada y, posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario para p38 MAPK o phospho-p38 MAPK (Cell Signaling Technology) toda la noche a 4°C. Tras lavados en TTBS, se aplicó el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección se realizó por quimioluminiscencia (ECL). La intensidad de las bandas se cuantificó por niveles de gris con un sistema de análisis de imagen apropiado (Quantity One).

Determinación de la actividad de caspasa 3 por ELISA

Para determinar la actividad de caspasa 3 (Posadas I, Vellecco V, Santos P, et al *Br J Pharmacol* 2007; 150: 577-85), las células mesoteliales de rata fueron sembradas en placas de 6 pocillos hasta que llegaron a una confluencia del 80%. Tras la exposición a las soluciones de diálisis peritoneal con aliskiren, se procedió a recoger el medio de cultivo y reemplazarlo con PBS. Las células se despegaron mediante tripsinización y se juntaron con el medio recogido anteriormente. El “pellet” resultante al centrifugar a 3000 x g durante 5 min a 4°C., enriquecido en proteínas, se resuspendió en un buffer de lisis (100 mM HEPES, 5 mM DTT, 5 mM EGTA, 0,04% Nonidet P-40 y 20% glicerol) y se incubó 60 minutos a 4°C. Tras la incubación, se procedió a centrifugar las muestras a 13.000 rpm durante 15

minutos a A-C y la concentración de proteína en los sobrenadantes se determinará mediante el método Bradford, según protocolo estándar. Los extractos celulares (40 μ g de proteína) se incubaron con un buffer de reacción (25 mM HEPES, 10% sucrose, 0,1% 3-[(3-cholamido propyl)-dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid, 10 mM DTT) que contenía sustrato fluorescente Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4 trifluoromethyl-coumaryl (Z-DEVD-AFC) 50 μ M, a 37°C durante 1 h. La fluorescencia emitida se determinó en un espectrofluorímetro (Tecan, Austria) a una longitud de onda de excitación de 400 nm y una longitud de onda de emisión de 505 nm.

Recogida y análisis de datos

Cada valor obtenido corresponderá a un mínimo de 3 experimentos realizados por duplicado. Todos los datos se presentan como medias \pm SEM. Las diferencias entre los grupos, para cada uno de los parámetros analizados, se analizaron con un test ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis), seguido de una prueba *ad-hoc* (Dunnett). Una p menor o igual a 0,05 se consideró significativa. El software SPSS 13.0 (Chicago, IL) se utilizó para realizar todo el análisis estadístico.

Resultados

El cultivo de células mesoteliales utilizado en los experimentos de esta invención, muestra reactividad para HBME-1 (Figura 1).

El incremento en el tiempo de exposición a diferentes concentraciones de glucosa en el líquido de diálisis es tóxico para las células mesoteliales, lo que constituye la base de la toxicidad de las soluciones de diálisis peritoneal sobre el peritoneo. Puede observarse que el incremento en el tiempo de exposición a glucosa, aumenta la producción de radicales libres en las células mesoteliales (Figura 2).

Debido a esta producción de radicales libres, se activan mecanismos efectores de muerte celular como es la activación de caspasa 3 (Figura 3).

La exposición a soluciones con elevadas concentraciones de glucosa incrementa la fosforilación de la proteína p38 que es considerado un índice de toxicidad en las células mesoteliales (Figura 4).

La adición de aliskiren al medio de cultivo no mostró toxicidad para las células mesoteliales hasta que se alcanzó una concentración de 1 mM (Figura 5).

La adición de Aliskiren al medio de diálisis previno tanto la producción de especies reactivas del oxígeno (figura 6) como la activación de caspasa (figura 7) como la fosforilación de la proteína p38 (figura 8).

REIVINDICACIONES

1. Solución para diálisis peritoneal que comprende los siguientes elementos:

- a) al menos un electrolito;
- b) al menos una solución tampón;
- c) al menos un agente regulador de la presión osmótica; y
- d) aliskiren o cualquiera de sus derivados.

2. Solución para diálisis peritoneal según la reivindicación 1, donde el o los electrolitos se seleccionan del siguiente grupo formado por: Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- o cualquier combinación de los mismos.

3. Solución para diálisis peritoneal según la reivindicación 2, donde cada electrolito tiene el siguiente rango de concentraciones: Na 100-200 mmol/l; K 0-4 mmol/l; Mg 0,1-2 mmol/l; Ca 0.5-3 mmol/l; Cl 50-200 mmol/l.

4. Solución para diálisis peritoneal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la solución tampón se selecciona entre lactato, bicarbonato o combinación de los mismos.

5. Solución para diálisis peritoneal según la reivindicación 4, donde la solución tampón está en una concentración desde 10 hasta 150 mmol/l.

6. Solución para diálisis peritoneal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el agente osmótico se selecciona del grupo formado por glucosa, poliglucosa, manitol, glicerol, aminoácidos, polipéptidos o cualquier combinación de los mismos.

7. Solución para diálisis peritoneal según la reivindicación 6, donde la cantidad del agente osmótico a añadir es desde 100 hasta 600 mOsm/kg.

8. Solución para diálisis peritoneal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el aliskiren o cualquiera de sus derivados está en una concentración desde 50 nM hasta 1 mM.

9. Uso de la solución de diálisis peritoneal para la elaboración de un medicamento.

10. Uso de la solución de diálisis para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de enfermedades renales.

11. Uso de la solución de diálisis para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de la toxicidad sobre células mesoteliales del peritoneo.

12. Uso de la solución de diálisis para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o reducción de especies reactivas de oxígeno, la fosforilación de la proteína p39MAPK y la activación de la caspasa 3.

13. Uso de la solución de diálisis para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento del estrés oxidativo, los procesos apoptóticos y el daño peritoneal generado por los líquidos de diálisis.

14. Uso de la solución de diálisis para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de la insuficiencia renal crónica.

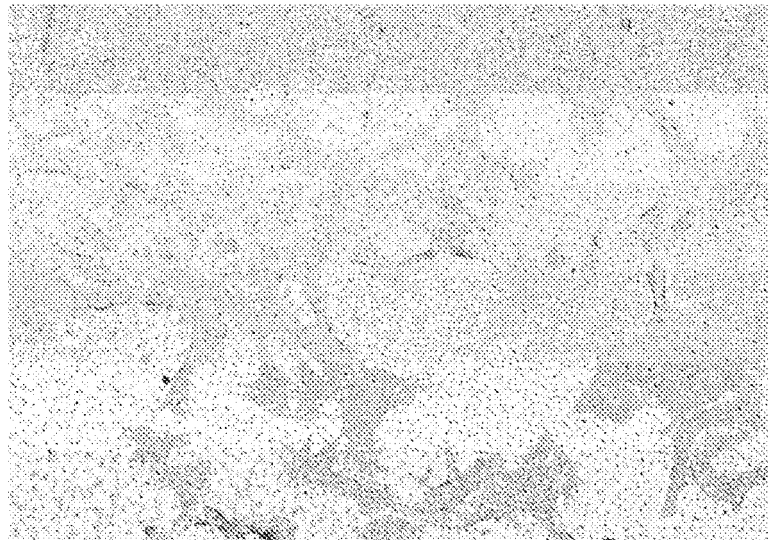


FIG. 1

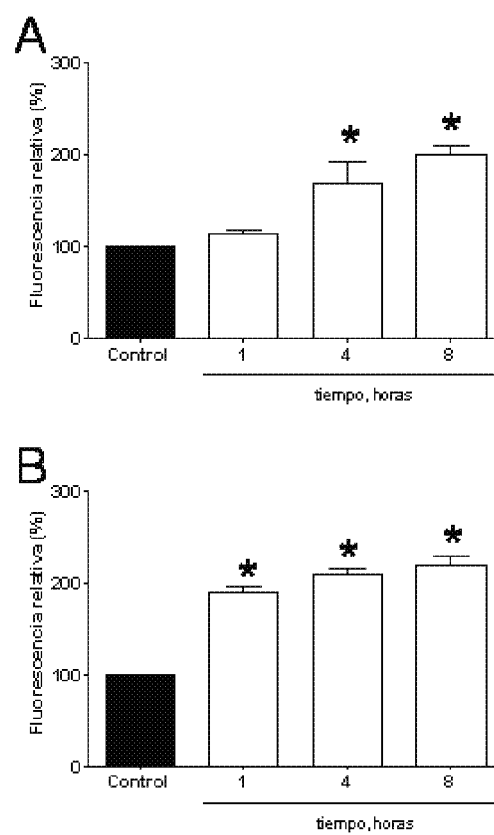


FIG. 2

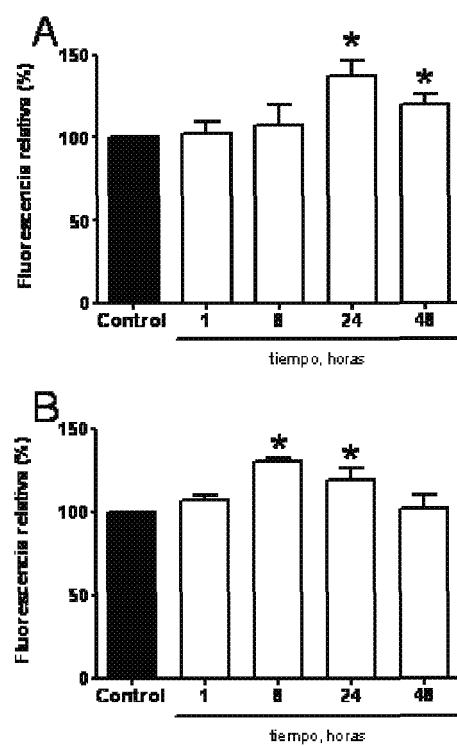


FIG. 3

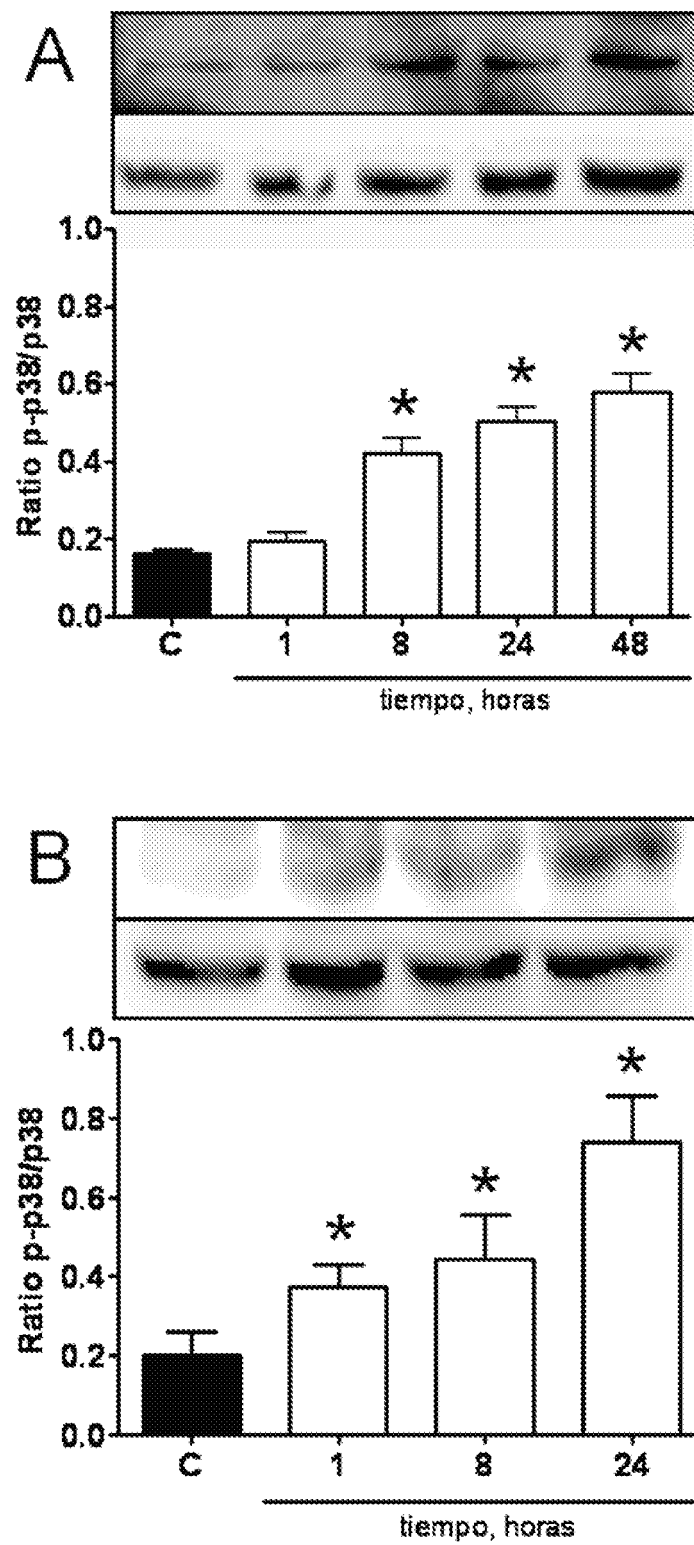


FIG. 4

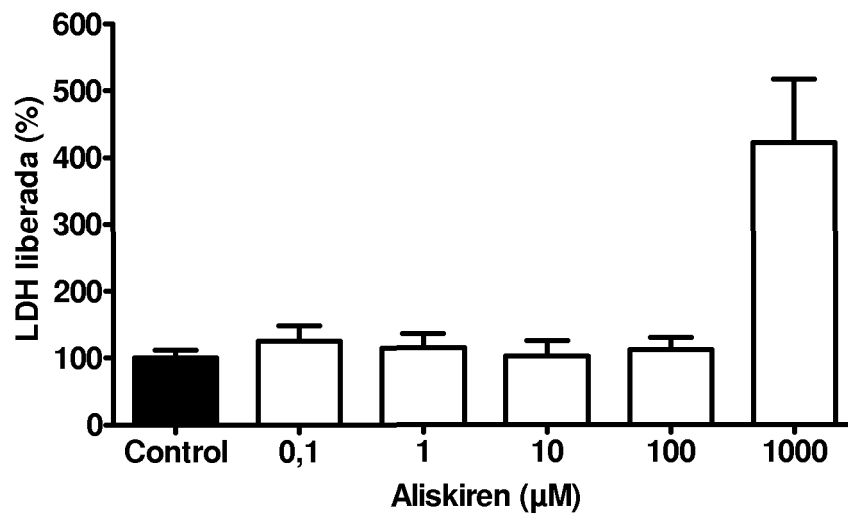


FIG. 5

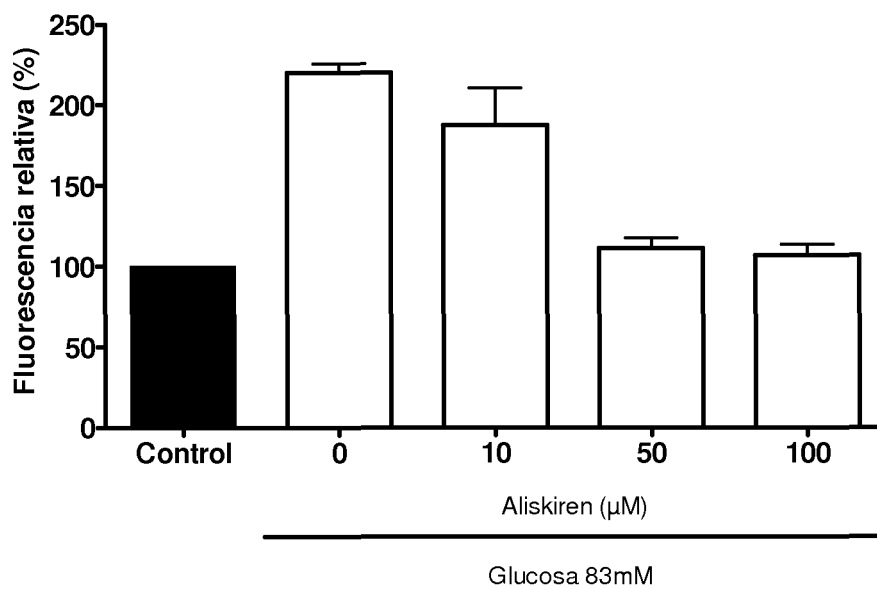


FIG. 6

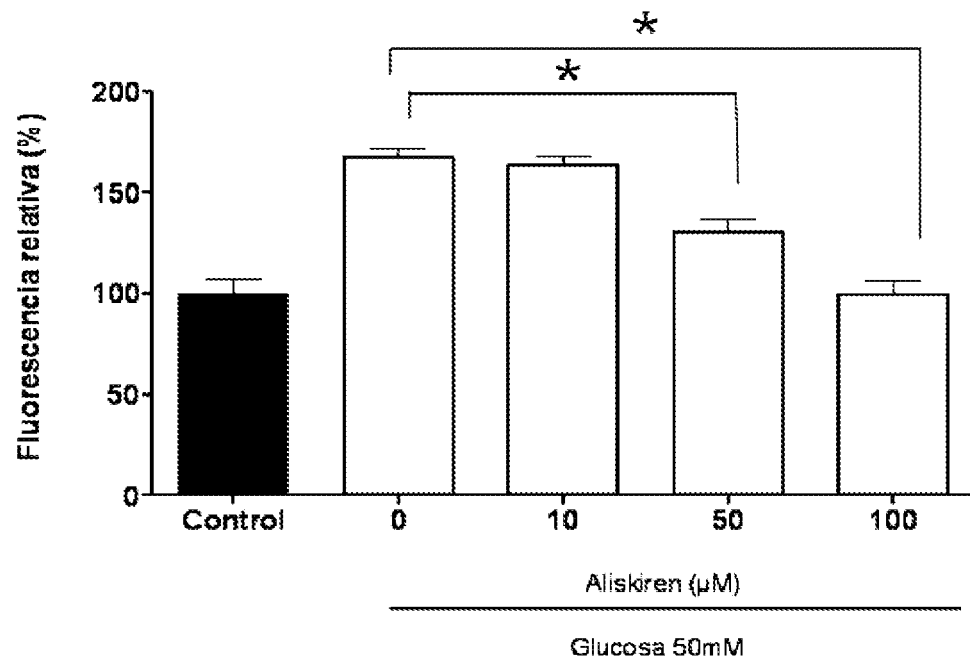


FIG. 7

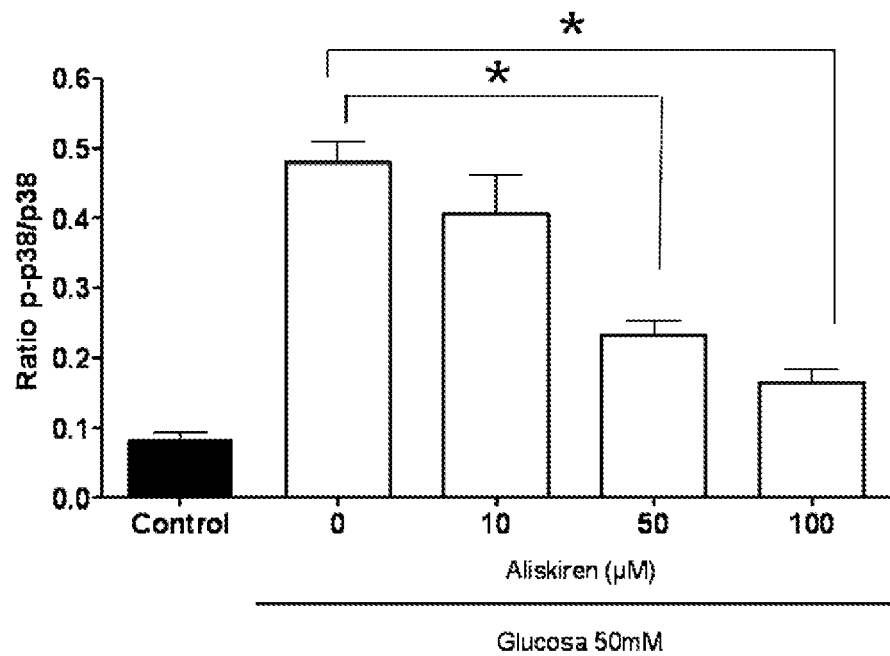


FIG. 8



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030326

②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.03.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| A | CHUN-YEN KE y col. Aliskiren ameliorates chlorhexidine digluconate-induced peritoneal fibrosis in rats. European Journal of Clinical Investigation. Abril 2010, Volumen 40, Nº 4, páginas 301-309, Abril 2010. Publicación on-line 4 Marzo 2010: Recuperado de Internet: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2362.2010.02264.x/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+be+disrupted+2nd+Apr+from+10-12+BST+for+monthly+maintenance | 1-14 |
| A | BAJO, M.A. y col. Nuevas soluciones de diálisis peritoneal y sus combinaciones. Nefrología, 2008, Supl. 6, páginas 59-66. Todo el documento. | 1-14 |
| A | BERL, T. Renal protection by inhibition of the renin-angiotensin-aldosterone system. Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. Marzo 2009, Vol. 10, Nº 1, Páginas 1-10. Todo el documento. | 1-14 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
31.03.2011

Examinador
E. Albarrán Gómez

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/165 (2006.01)

A61M1/28 (2006.01)

C07C237/22 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61M, C07C

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, PUBMED, MEDLINE, BIOSIS, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.03.2011

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-14
Reivindicaciones

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 1-14
Reivindicaciones

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|---|-------------------|
| D01 | CHUN-YEN KE y col. Aliskiren ameliorates chlorhexidine digluconate-induced peritoneal fibrosis in rats. European Journal of Clinical Investigation. Abril 2010, Volumen 40, Nº 4, páginas 301–309, Abril 2010. Publicación on-line 4 Marzo 2010: Recuperado de Internet: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2362.2010.02264.x/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+be+disrupted+2nd+Apr+from+10-12+BST+for+monthly+maintenance . | |
| D02 | BAJO, M.A. y col. Nuevas soluciones de diálisis peritoneal y sus combinaciones. Nefrología, 2008, Supl. 6, páginas 59-66. | |
| D03 | BERL, T. Renal protection by inhibition of the renin-angiotensin-aldosterone system. Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. Marzo 2009, Vol. 10, Nº 1, Páginas 1-10. | |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención se refiere a una solución para diálisis peritoneal que comprende Aliskiren (inhibidor directo, selectivo y potente de la enzima renina), al menos un electrolito (Na, K, Mg, Ca o Cl.), al menos una solución tampón (lactato, bicarbonato o combinación de los mismos) y al menos un agente regulador de la presión osmótica (glucosa, poliglucosa, manitol, glicerol, aminoácidos, polipéptidos o cualquier combinación de los mismos) y su uso como medicamento para la prevención y/o tratamiento de enfermedades renales. La presencia de Aliskiren en la solución de diálisis, reduce la toxicidad de estas soluciones sobre las células mesoteliales del peritoneo, debido a que el Aliskiren reduce la presencia de especies reactivas de oxígeno, la fosforilación de p38MAPK (considerado un índice de toxicidad de en las células mesoteliales) y la activación de la Caspasa 3 (mecanismo efector de muerte celular), procesos que pueden ser generados por las altas concentraciones de glucosa que contienen las soluciones de diálisis.

El documento D01 divulga un estudio en el que los autores concluyen que Aliskiren protege contra la fibrosis peritoneal inducida por digluconato de clorhexidina en ratas. En los ensayos realizados se utiliza una solución de diálisis peritoneal convencional con 4,25% glucosa (Dianeal® de Baxter Healthcare) y la administración de Aliskiren se hace por vía intravenosa en dosis de 1mg/kg o 10 mg/kg.

El documento D02 es una revisión que describe las características de las nuevas soluciones de diálisis peritoneal que tratan de evitar la aparición de alteraciones estructurales y funcionales en la membrana peritoneal. Esta bioincompatibilidad está relacionada fundamentalmente con la utilización de glucosa como agente osmótico, el empleo de lactato como tampón, la osmolaridad, la presencia de productos de degradación de la glucosa (formados durante el proceso de esterilización de las soluciones). Se analiza el uso de agentes osmóticos alternativos, como la icodextrina y los aminoácidos, la utilización de sistemas de doble bolsa que permiten obtener soluciones con concentraciones bajas en productos de degradación de la glucosa en el fin de conseguir la mayor eliminación de sodio y agua, la mejoría del estado nutricional y la disminución de las alteraciones metabólicas relacionadas con el uso de glucosa como agente osmótico.

El documento D03 es también una revisión bibliográfica, donde se analiza el ensayo clínico AVOID de 6 meses de duración con 599 pacientes donde se evaluó el efecto protector renal de la asociación de Aliskiren con Losartan frente a Losartan sólo, en pacientes con hipertensión, diabetes mellitus tipo 2 y nefropatía. La adición de Aliskiren 300 mg redujo en un 20% el cociente albunina/creatinina en orina frente al placebo. Este efecto del Aliskiren parece ser independiente de actividad como antihipertensivo.

No se han encontrado divulgado en el estado de la técnica una solución para diálisis peritoneal que comprenda Aliskiren, electrolitos, solución tampón, y agente regulador de la presión osmótica, como aparece en la presente solicitud, ni su uso como medicamento en la prevención y/o tratamiento de enfermedades renales.

En consecuencia, se considera que las reivindicaciones 1-14 de la solicitud tienen novedad e implican actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).

Observaciones:

La cita bibliográfica que aparece en la página 14, líneas 15 y 16, es errónea.