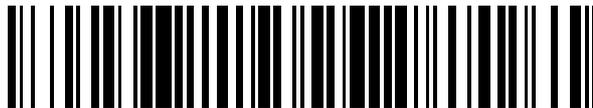


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 958 165**

21 Número de solicitud: 202230612

51 Int. Cl.:

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 31/7042 (2006.01)

A61P 7/08 (2006.01)

A61M 1/28 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

05.07.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.02.2024

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)
C/ Serrano, nº 117
28006 Madrid (Madrid) ES y
UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SUCUNZA SAENZ, David;
VAQUERO LÓPEZ, Juan José;
LÓPEZ CABRERA, Manuel;
GONZALEZ MATEO, Guadalupe Tirma y
KOPYTINA, Valeria**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Soluciones para diálisis peritoneal que contienen un flavonoide natural como agente osmótico**

57 Resumen:

Soluciones para diálisis peritoneal que contienen un flavonoide natural como agente osmótico.

La presente invención se refiere a soluciones de diálisis peritoneal que comprenden troxerutina o vitamina P4 como agente osmótico. La invención también se refiere al procedimiento para preparar dichas soluciones y al nuevo uso de la troxerutina.

ES 2 958 165 A1

DESCRIPCIÓN

SOLUCIONES PARA DIÁLISIS PERITONEAL QUE CONTIENEN UN FLAVONOIDE NATURAL COMO AGENTE OSMÓTICO

5

La invención se refiere a soluciones de diálisis peritoneal que contienen troxerutina o vitamina P4 como agente osmótico. La invención también se refiere al nuevo uso de la troxerutina en la preparación de dichas soluciones.

10

Por lo tanto, la presente invención pertenece al campo de la medicina biotecnológica, en particular, al de las soluciones de diálisis utilizadas para el tratamiento de enfermedad renal (nefropatía).

ESTADO DE LA TÉCNICA

15

En la actualidad, aproximadamente 850 millones de personas padecen diferentes tipos de trastornos renales, mientras que uno de cada diez adultos en todo el mundo tiene enfermedad renal crónica (ERC) (Li PK, *et al. Kidney Int.* 2020 Feb;97(2):226-32). Se pronostica que en el 2040, la ERC se convierta en la 5ª causa más común de fallecimiento en todo el mundo (Foreman KJ, *et al. Lancet.* 2018;392(10159):2052-90).

20

En 2020, se trataron aproximadamente 4,5 millones de pacientes con insuficiencia renal crónica en todo el mundo. De estos pacientes, aproximadamente 3,7 millones recibieron tratamientos de diálisis, el 11 % de ellos con diálisis peritoneal (entre el 5 y el 70 % de los programas de diálisis según el país) (Informe Anual Fresenius 2020).

25

En España, lejos de detener su avance, la ERC sigue creciendo, y en 2019 su prevalencia alcanzó la cifra de 1.367 personas por millón de habitantes, con más de 64.000 personas en tratamiento de sustitución renal (diálisis o trasplante), según datos de 2019 del Registro Español de Enfermedades Renales (REER).

30

La diálisis peritoneal (DP) es una forma de tratamiento de sustitución renal que utiliza la cavidad abdominal como reservorio para intercambiar agua y solutos a través de la membrana peritoneal (MP). La MP está cubierta por una barrera monocapa semipermeable de células mesoteliales (CM).

35

La glucosa es el agente osmótico más utilizado para las soluciones de DP. Es bien sabido que la glucosa produce complicaciones locales y sistémicas que conducen al fallo de la MP y a complicaciones cardiovasculares debido a trastornos metabólicos. Los productos de degradación de glucosa (PDG) son en parte responsables de este deterioro de la MP y son esenciales para la formación de productos finales de glucosilación avanzada (AGE, del inglés *advanced glycation end-products*). Los AGE generalmente se incorporan en los tejidos, induciendo la hiperproducción de citocinas y de factores de crecimiento (VEGF y TGF-®), iniciando y perpetuando la lesión de la MP a través de la síntesis de la matriz extracelular (MEC) descontrolada (fibrosis), la angiogénesis y la transición mesotelio-mesenquimatoso (TMM) de las CM. Estos cambios estructurales son característicos del fallo de tipo I de la MP.

Aunque existen líquidos para la DP no basados en glucosa como agente osmótico (icodextrina y aminoácidos), ninguno de ellos puede utilizarse en todos los intercambios de DP a lo largo del día. Una razón para limitar su uso es su peso molecular. Mientras que la glucosa muestra un peso molecular de aproximadamente 180 Da, el de la icodextrina es superior a 7000 Da.

Algunos de los documentos en los que se describen agentes osmóticos distintos de la glucosa son los siguientes: WO 2016/066672, US4339433, US4761237, US6770148, US4649050.

En vista de lo anterior, sigue existiendo la necesidad de proporcionar nuevos compuestos que tengan baja o nula toxicidad, solubilidad en agua, peso molecular adecuado, alta estabilidad y valores de molalidad adecuados para utilizar como agentes osmóticos alternativos a la glucosa.

En este contexto, la presente invención desvela un compuesto para su uso como agente osmótico alternativo a la glucosa que cumple con todas las características anteriores y que puede solucionar un problema de salud que afecta a un número importante de pacientes renales que reciben tratamiento de DP.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han demostrado que la troxerutina (también denominada vitamina P4) es un compuesto con propiedades óptimas para su uso como agente osmótico en

soluciones de diálisis peritoneal.

La troxerutina es un flavonoide natural de fórmula molecular $C_{33}H_{42}O_{19}$ y peso molecular de 743 g/mol que está presente en el té, café, granos de cereales, y una
 5 variedad de frutas y verduras. Muestra propiedades antiinflamatorias y antiapoptóticas. Actúa como antioxidante y se utiliza como fármaco vasoprotector comercializado en seres humanos, además de tener otros efectos interesantes notificados. (M. Zamanian, S. Shirooie, *et al. Current Neuropharmacology*, 2021, 19, 97-110). Su n.º CAS es 7085-55-4 y, según la Farmacopea Europea (10.0 Vol. III), se define como
 10 una mezcla de derivados O-hidroxietilados de rutósido que contienen un mínimo de 80 por ciento de 2-[3,4-bis(2-hidroxietoxi)fenil]-3-[[6-O-(6-desoxi- α -L-manopiranosil)- β -D-glucopiranosil]oxi]-5-hidroxi-7-(2-hidroxietoxi)-4H-1-benzopiran-4-ona(tris(hidroxietil)rutina).

15 Un primer aspecto de la invención se refiere a una solución de diálisis peritoneal que comprende troxerutina como agente osmótico.

La expresión "solución de diálisis peritoneal" se conoce en el estado de la técnica y pretende significar una solución que comprende un electrolito, un tampón y un agente
 20 osmótico, en donde el electrolito comprende iones, tales como sodio, potasio, calcio y magnesio; el tampón comprende componentes, tales como acetato, lactato y bicarbonato. Se pueden encontrar ejemplos de soluciones médicas para utilizar como soluciones de diálisis peritoneal en Wieslander *et al.*, 1991, *Kidney Int* 40:77-79.

25 La expresión "agente osmótico", también conocida en el estado de la técnica, pretende significar una sustancia en un líquido que provoca una fuerza osmótica para extraer líquido del paciente al líquido de diálisis si está presente a una concentración suficientemente alta. Por consiguiente, el líquido se transporta sobre la membrana peritoneal hacia el líquido de DP.

30

En una realización preferida, la solución de diálisis peritoneal contiene entre el 1 % y el 6 % p/v de troxerutina, más preferentemente entre el 1 % y el 3 % p/v. %p/v= 100 * [masa de troxerutina (g)/ volumen de solución (ml)]

35 El procedimiento para preparar la solución de diálisis peritoneal que comprende troxerutina como agente osmótico, comprende mezclar todos los componentes de la

solución de diálisis peritoneal y esterilizar la mezcla resultante, preferentemente calentando a una temperatura entre 110 y 130 °C durante 0,5 a 2 h, más preferentemente a 121 °C y/o durante 1 hora. Se puede preparar en una bolsa unicameral, sin necesidad de dividir el producto en diferentes cámaras.

5

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la troxerutina para su uso como agente osmótico en una solución de diálisis peritoneal, la solución se prefiere como se describe en el primer aspecto de la presente invención. Después, la troxerutina se utiliza para la preparación de una solución de diálisis peritoneal.

10

Resumiendo, en los ejemplos proporcionados en la presente invención se ha demostrado que la troxerutina (vitamina P4) presenta muchas ventajas con respecto a un agente osmótico convencional conocido en el estado de la técnica. Concretamente, la troxerutina tiene un peso molecular ideal, una alta solubilidad en agua, y una capacidad osmótica 3-4 veces mayor que la de la glucosa y es una molécula segura en un modelo animal.

15

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende normalmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. En la práctica de la presente invención se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones, no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Objetos adicionales, ventajas y características de la invención, serán evidentes para los expertos en la materia tras examinar la descripción, o pueden aprenderse poniendo en práctica la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo ilustrativo y no pretenden limitar la presente invención.

20

25

30 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

FIG. 1: Representación de la fórmula estructural de la troxerutina (componente mayoritario).

35

FIG. 2: Gráfico que muestra las capacidades de ultrafiltración de diferentes concentraciones de troxerutina (denominada F4 en los ejemplos) y glucosa.

FIG. 3: Análisis de ARNm de marcadores de TMM en células mesoteliales omentales humanas (CMOH) cultivadas tratadas con F4 al 1 % o glucosa al 4,25 %, así como con TGF-beta (control positivo) o sin tratamiento (control negativo).

5 FIG. 4: Análisis de ARNm de marcadores de TMM en células Met5a expuestas a altas concentraciones de F4.

FIG. 5: Imágenes de microscopía óptica de células Met5a cultivadas expuestas a altas concentraciones de F4 durante 72 h y medición de la viabilidad celular (%).

10

FIG. 6: Células drenadas en efluentes peritoneales de ratones expuestos a glucosa al 4,25 %, glucosa al 2,3 % o F4 al 3 % y al 1,5 %.

15

FIG. 7: Grosor de la membrana peritoneal de ratones y peso de los animales a lo largo del tratamiento.

FIG. 8: Evaluación de marcadores hipertróficos en tejidos cardíacos

20

FIG. 9: Función sistólica de los ratones tratados con diferentes líquidos de DP.

EJEMPLOS

Los siguiente son algunas pruebas realizadas por los inventores con troxerutina (citada en los ejemplos como F4) para demostrar su eficacia respecto al uso reivindicado. La troxerutina se adquirió en Biosynth Carbosynth®.

25

Ejemplo 1: Capacidad de ultrafiltración (UF) de F4

Se analizó la capacidad de ultrafiltración (UF) de F4 *in vitro* a diferentes concentraciones. Estos análisis se realizaron en las instalaciones de la empresa Fresenius Medical Care. Los experimentos de UF se realizaron utilizando membranas de diálisis (serie V de ZelluTrans/Roth) con un límite de peso molecular (MWCO, *molecular weight cutoff*) de 25 kDa adquiridas en Carl Roth. En todos los experimentos se utilizó un tubo de diálisis de 11 cm de longitud. El volumen de llenado de los tubos de diálisis al comienzo de los experimentos era de 10 ml, cerrados por dos abrazaderas, cada sistema con una plomada y un nadador. Las bolsas llenas se

35

colocaron en un vaso de precipitados con $900 \pm 0,1$ g de matriz de lactato templada a 37°C y para determinar el cambio de masa durante los 30 minutos durante un período de 24 horas se midió el peso de cada bolsa. Se calculó el aumento de masa de cada intervalo de tiempo de permanencia. Los experimentos se llevaron a cabo 3 veces, se
5 calculó el valor medio y la desviación estándar. Adicionalmente, la osmolalidad se midió por depresión del punto de congelación (o descenso crioscópico) (Osmomat 030, Gonotec GmbH). La determinación de la concentración del agente osmótico se realizó midiendo el índice de refracción (Refractómetro DR 6300-T, KRÜSS Optronic). Para cada sustancia se preparó una curva de calibración y la solución de prueba se
10 midió después de una prueba de ultrafiltración de 24 horas.

Los resultados mostraron que F4 a concentraciones del 1 % p/v tiene un patrón de UF similar al de la glucosa al 4,25 %, la mayor concentración de glucosa utilizada en la práctica clínica (Fig. 2). Ante estos resultados, se decidió utilizar F4 al 1 % p/v para
15 realizar análisis *in vitro* adicionales para comprobar la toxicidad.

Ejemplo 2: Efectos de F4 en células mesoteliales

El efecto de F4 en células mesoteliales se analizó *in vitro* en células mesoteliales
20 omentales humanas (CMOH) cultivadas, conteniendo los líquidos preparados por Fresenius Medical Care, glucosa o F4, y utilizándose el tampón para líquidos de DP y esterilizados como líquidos de DP comerciales (en el caso de la glucosa al 4,25 % p/v, este proceso genera productos de degradación, PDG, que se sabe que promueven el daño peritoneal). Se observó que F4 al 1 % p/v induce menos TMM que la glucosa al
25 4,25 % p/v, ya que hay menor inducción de genes mesenquimatosos (VEGF-A, Fibronectina), y menor represión de genes epiteliales (Calretinina y E-cadherina) (Fig. 3). También se observó que la glucosa al 4,25 % p/v indujo una mayor tasa de muerte de células mesoteliales en comparación con F4 al 1 % p/v.

30 Ejemplo 3: Ensayos de citotoxicidad

Asimismo, la línea celular Met5a se utilizó para analizar la TMM a concentraciones más altas de F4 (1 %, 2 % y 3 % p/v). F4 se diluyó en tampón de Lactato que contenía calcio 1,25 mmol/l, sodio 134 mmol/l, magnesio 0,5 mmol/l, cloruro 100,5 mmol/l,
35 lactado 25 mmol/l, con un pH = 7,0. Para comparar con los resultados de F4, se utilizó glucosa al 4,25 % p/v (solución Stay Safe, Fresenius Medical Care) y al 2,3 % p/v

(solución Balance, Fresenius Medical Care). Todas las soluciones se diluyeron en medio de cultivo FBS M199 al 20 % con una proporción de 50:50. CTRL y CTRL+TGF-beta contenían medio M199+FBS 20%: Tampón Lactato 50:50. Para inducir la TMM se utilizó TGF-beta. F4 no indujo muerte celular ni TMM en ninguna de las concentraciones probadas (Fig. 4 y Fig. 5).

Para descartar por completo la citotoxicidad, durante 72 h se añadieron concentraciones aún más altas de F4 (5 %, 7 %, 9 % p/v) a cultivos de Met5a y las células conservaron una morfología empedrada y buena viabilidad (Fig. 5).

10

Ejemplo 4: Prueba del agente osmótico en un modelo de ratón de exposición peritoneal a líquidos de DP

Después de los resultados *in vitro*, se probó la idoneidad de este compuesto como agente osmótico en un modelo de ratón de exposición peritoneal a líquidos de DP. En primer lugar, ratones con un catéter implantado se sometieron a DP durante 50 días, recibiendo glucosa a concentraciones de 4,25 % p/v, F4 al 3 % o F4 al 1,5 % p/v. Todos los ratones completaron satisfactoriamente el tratamiento con F4 y presentaron un menor número de células granulocíticas en los lavados peritoneales, mientras que se detectó una mayor presencia de macrófagos antiinflamatorios en estos grupos dentro de la población mieloide, lo que indicaba un patrón inflamatorio protector (Fig. 6).

Asimismo para imitar la insuficiencia renal en seres humanos, ratones se sometieron a nefrectomía 5/6. Para ello, se extirpó el riñón derecho y se insertó un catéter en la cavidad peritoneal, y después de una semana de recuperación, los polos del riñón izquierdo se extrajeron mediante cauterización. Después de 2 semanas de recuperación, los ratones recibieron líquido Stay Safe de DP (glucosa al 4,25 % p/v, con una alta concentración de PDG) y LDP basado en F4 a una concentración del 1 % p/v (la concentración que mostró el mismo patrón de UF que la glucosa al 4,25 % p/v como se analizó previamente *in vitro*) durante 2 meses. Los ratones de control recibieron solución salina y se realizaron dos grupos de control adicionales, utilizando ratones sin cirugía o exposición a LDP, ratones expuestos únicamente a la cirugía. Se observó que F4 inducía menos fibrosis de la membrana peritoneal que Stay-Safe con glucosa al 4,25 % p/v (fig. 7).

Durante el experimento se controló el peso de los ratones, el daño cardiovascular se evaluó mediante ecografía y las células drenadas en lavado peritoneal se analizaron mediante citometría de flujo.

- 5 F4 indujo menos fibrosis de la membrana peritoneal así como menos infiltración celular en la membrana peritoneal (Fig. 7). Estos resultados sugieren que F4 puede tener un menor impacto local en la funcionalidad de la membrana peritoneal. El peso de los animales aumentó por igual en todos los grupos.
- 10 Adicionalmente, estábamos interesados en la evaluación de la insuficiencia cardíaca en los ratones tratados con DP. Inicialmente, se pesaron las muestras de corazón y se midió la proporción entre el peso cardíaco y el peso corporal, que es una medida establecida de la hipertrofia cardíaca. La proporción entre el peso cardíaco y el peso corporal se elevó significativamente en el grupo de tratamiento con SS y el efecto se
- 15 atenuó en el del tratamiento basado en F4 (Fig. 8). Para confirmar el estado hipertrófico, observamos los marcadores de estrés cardíaco. La expresión de ARN de los péptidos natriuréticos auricular y cerebral (PNA y PNC) en los tejidos cardíacos, no se vio afectada por la solución basada en F4 en comparación con el grupo de tratamiento con SS (Fig. 8).

20

Además, el VEGF-A (factor de crecimiento endotelial vascular A) cuya función es promover la angiogénesis en el tejido miocárdico, la MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos 1) y el marcador fibrótico, la fibronectina, mejoraron en los ratones tratados con solución F4 (Fig. 8). Estos resultados sugieren que F4 puede tener menor

25 impacto en el corazón mejorando la función cardíaca.

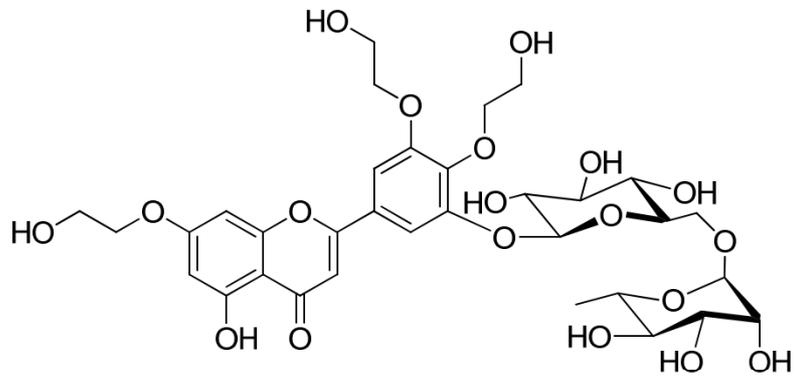
Para medir la función sistólica de los ratones tratados con diferentes líquidos de DP utilizamos la técnica de ecocardiografía. Las medidas se tomaron tanto en sístole como en diástole. A partir de estos valores, se calcularon los valores de acortamiento fraccionario (AF), los volúmenes telesistólico y telediastólico del VI (VTSVI y VTDVI), la fracción de expulsión (FE) y el volumen sistólico (VS). Los datos de ecocardiografía

30 revelaron que los niveles de VS, AF y FE que miden la contractilidad muscular del corazón, se redujeron en el grupo tratado con SS después de 20 y 60 días de DP (Fig. 9). Esto indica que la eficiencia del corazón para expulsar sangre se ve afectada por la

35 DP basada en glucosa que fue rescatada por la solución F4.

REIVINDICACIONES

1. Una solución de diálisis peritoneal que comprende troxerutina como agente osmótico.
5
2. Una solución de diálisis peritoneal, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la concentración de troxerutina varía entre 1 y 6 % p/v.
3. Una solución de diálisis peritoneal, de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la concentración de troxerutina varía entre 1 y 3 % p/v.
10
4. Uso de troxerutina como agente osmótico en una solución de diálisis peritoneal.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la troxerutina está en una concentración entre 1 y 6 % p/v en la solución.
15



TROXERUTINA

FIG. 1

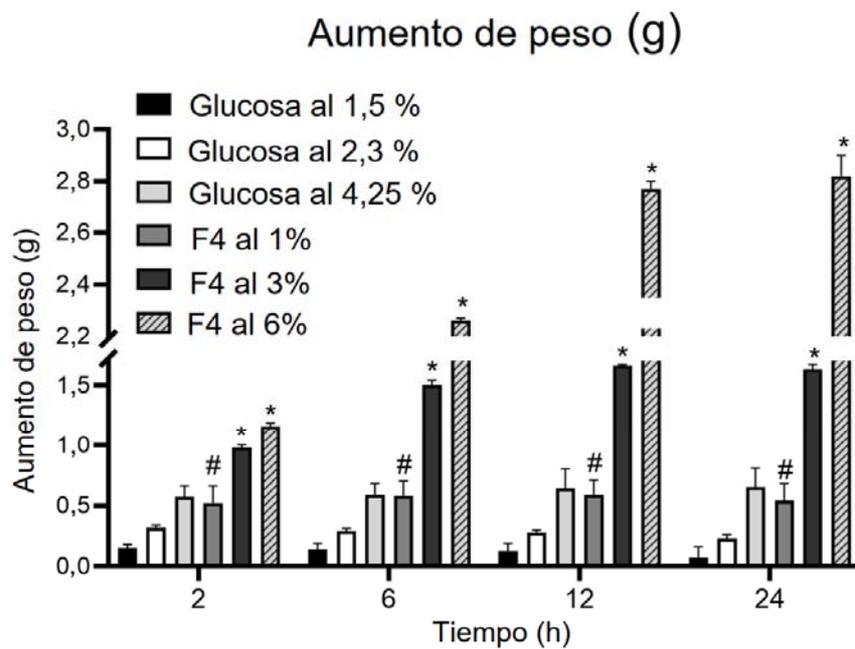


FIG. 2

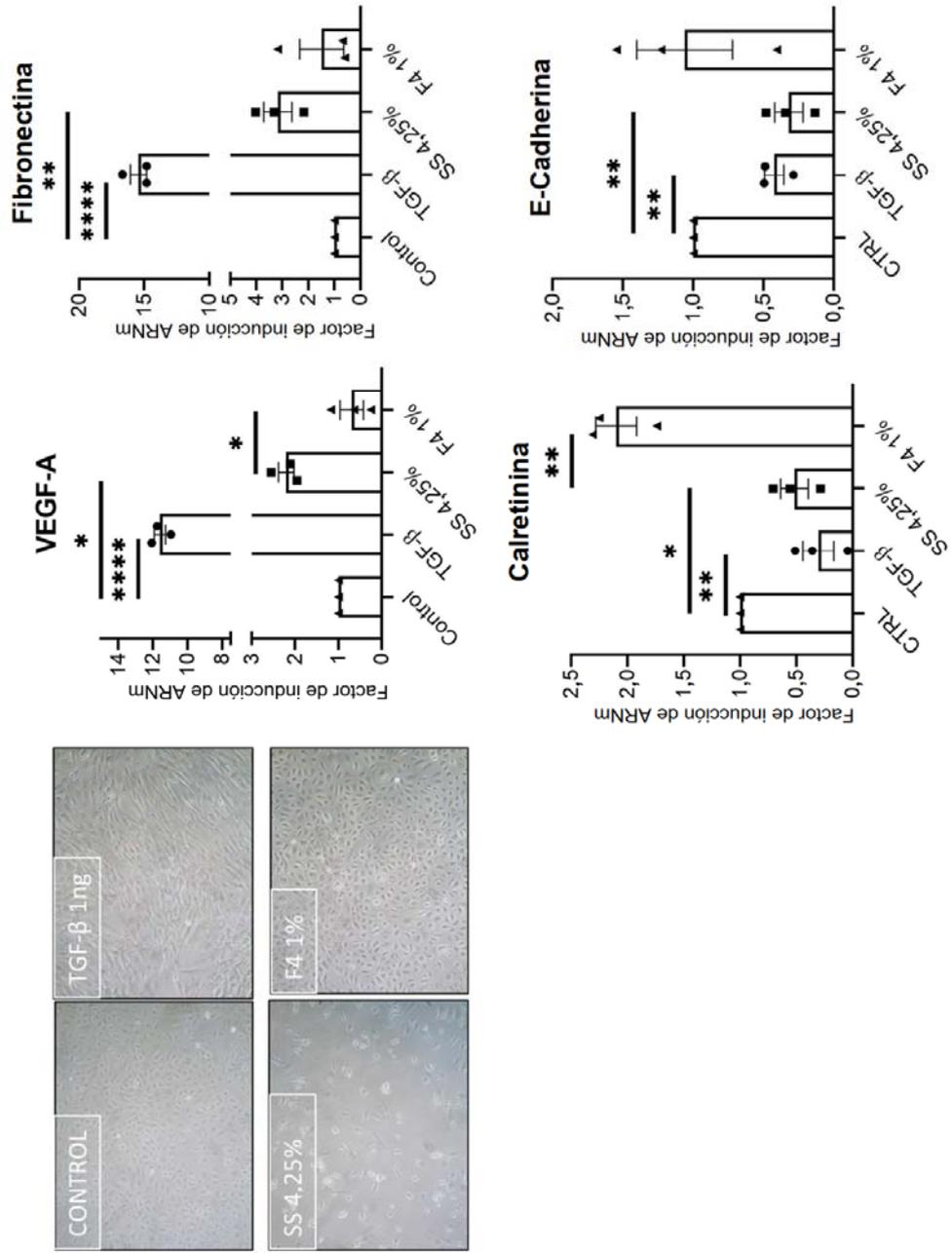


FIG.3

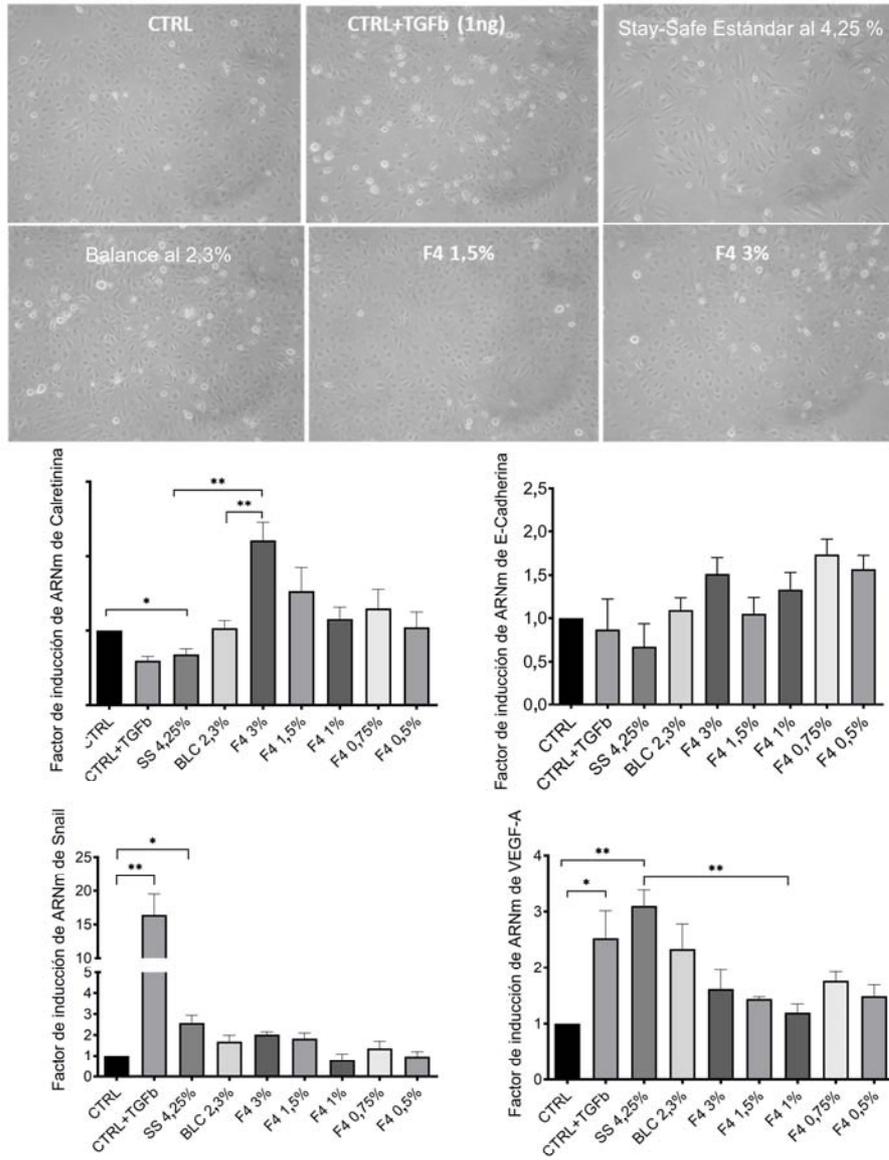


FIG. 4

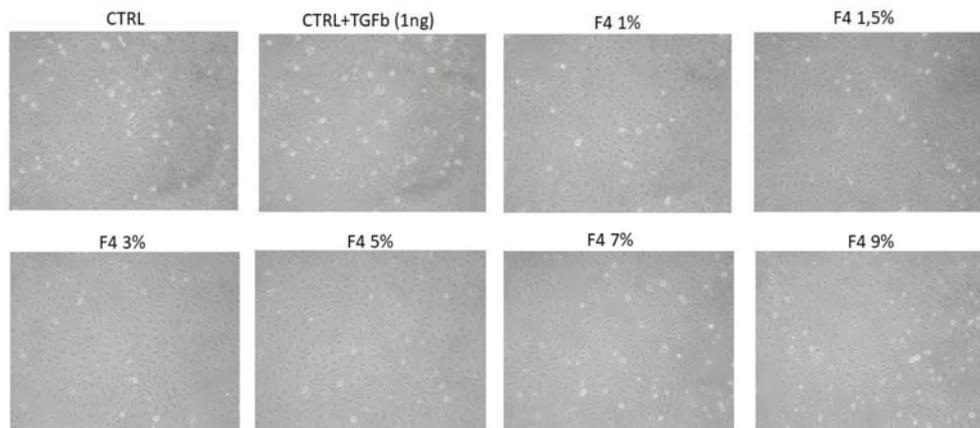
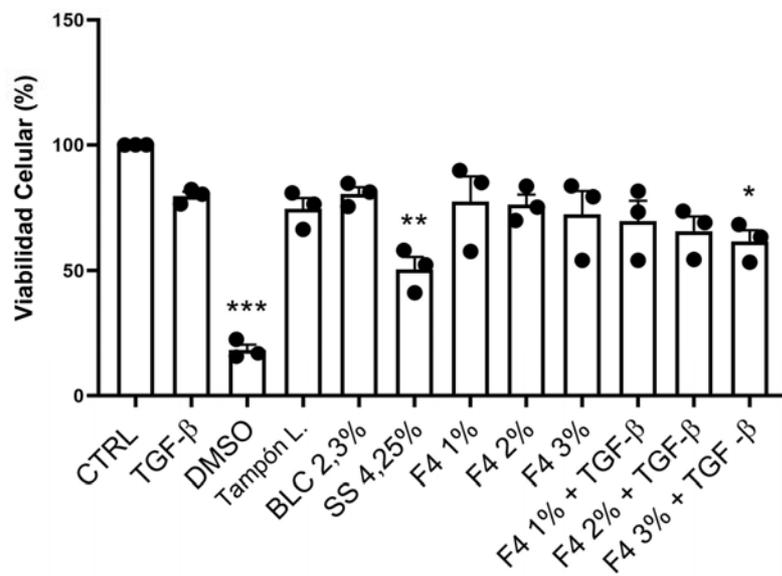


FIG. 5



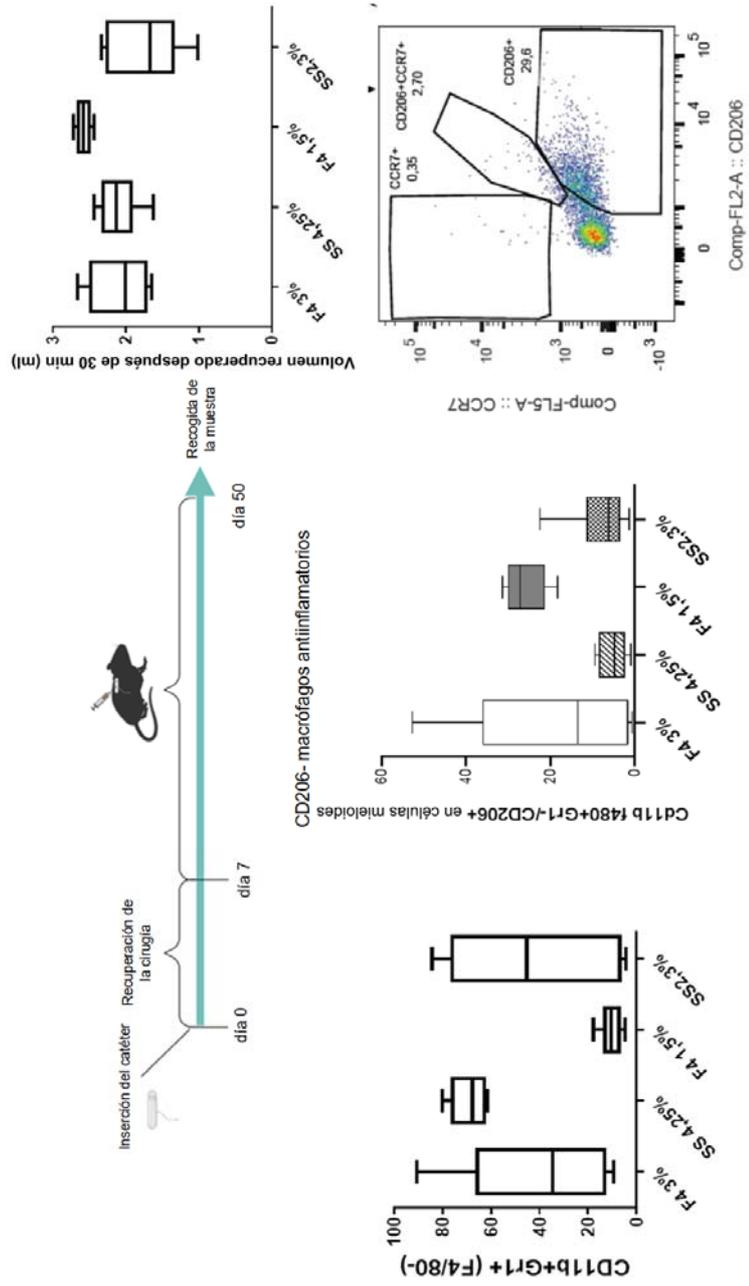


FIG. 6

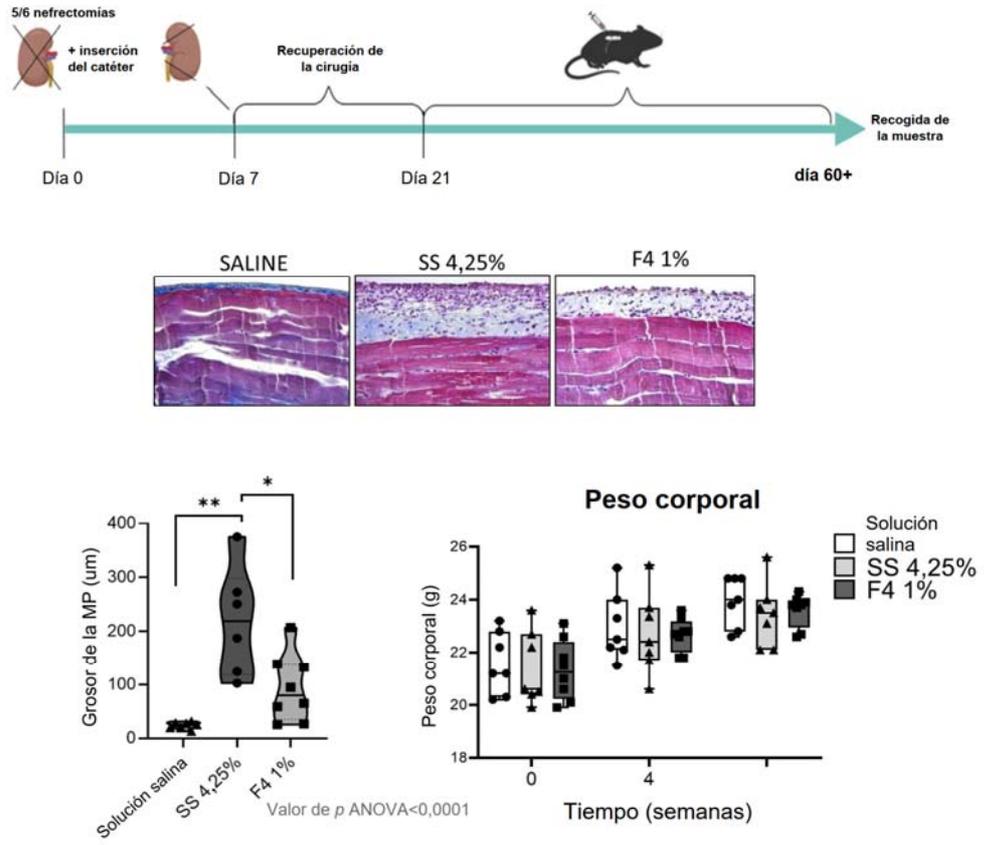


FIG. 7

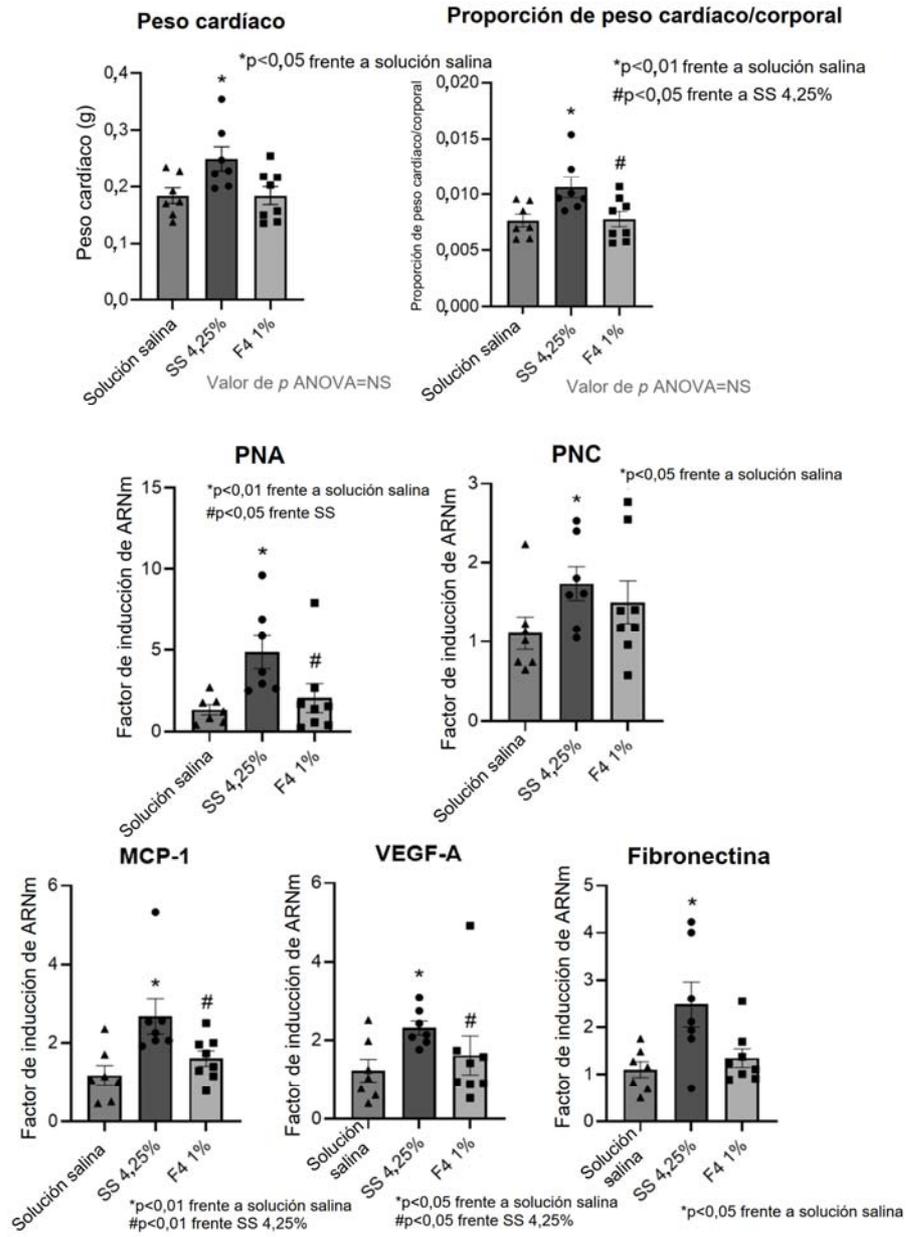


FIG. 8

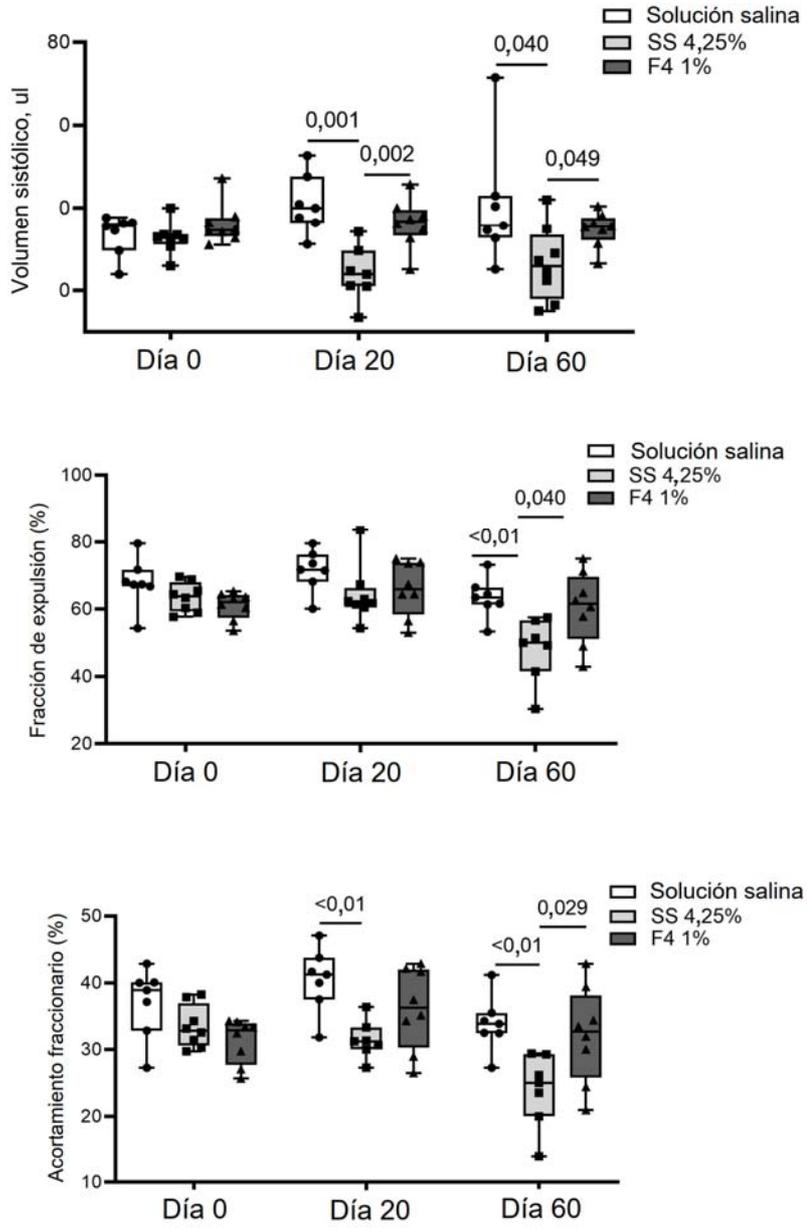


FIG. 9



- ②① N.º solicitud: 202230612
②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.07.2022
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CN 1520812 A (SICHUAN CENTRAL PHARMACEUTICAL) 18/08/2004, (resumen) [en línea] [recuperado el 19.05.2023] Recuperado de: EPOQUE WPI Database, DW200479, nº acceso 2004-797026; & TXPCNEA / EPO Database (ejemplos).	1-5
A	CN 108310005 A (ZHEJIANG TIANRUI PHARMACEUTICAL CO LTD) 24/07/2018, (resumen) [en línea] [recuperado el 19.05.2023] Recuperado de: EPOQUE EPODOC Database & TXPMTCEA / EPO Database.	1-5
A	US 2005256169 A1 (KAROOR SUJATHA et al.) 17/11/2005; párrafos [0069]- [0077], [0118].	1-5
A	US 2007199898 A1 (SAKAI ASAHI et al.) 30/08/2007; párrafos [0019], [0027], [0033].	1-5

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
30.05.2023

Examinador
N. Vera Gutierrez

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K9/08 (2006.01)

A61K31/7042 (2006.01)

A61P7/08 (2006.01)

A61M1/28 (2006.01)

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

A61K, A61P, A61M

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

INVENES, EPODOC, REGISTRY, CAS, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, NPL, XPESP, PATENW