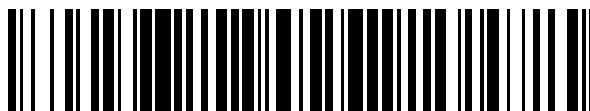


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 168**

51 Int. Cl.:
A61K 31/195 (2006.01)
A61K 31/35 (2006.01)
A61P 13/00 (2006.01)
A61M 1/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06708437 .6**
96 Fecha de presentación: **22.02.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1858504**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.11.2007**

54 Título: **Solución de diálisis peritoneal que contiene carnitina y que tiene biocompatibilidad mejorada**

30 Prioridad:
10.03.2005 WO PCT/IT2005/000130

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.05.2012

73 Titular/es:
**SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE
RIUNITE S.P.A.
VIALE SHAKESPEARE 47
00144 ROMA, IT**

72 Inventor/es:
ARDUINI, Arduino

74 Agente/Representante:
Campello Estebaranz, Reyes

ES 2 380 168 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 diálisis peritoneal que contiene carnitina y que tiene biocompatibilidad mejorada.

La presente invención se refiere al campo de la diálisis peritoneal, en particular a soluciones para diálisis peritoneal que tienen biocompatibilidad mejorada.

5 **Antecedentes de la invención**

10 El mesotelio es el primer órgano que entra en contacto con las soluciones de diálisis y tiende a perder gradualmente su viabilidad durante la diálisis peritoneal. Esto es evidente por los cambios morfológicos observados durante la diálisis peritoneal (Di Paolo, N., et al., *Nephron*, 1996; 74:594-9; Di Paolo, N., et al., *Perit. Dial. Int.*, 2000; 20 (Supl. 3): S1 -100). Los síntomas de angustia anatómica incluyen una disminución en la capacidad de lubricación y en las propiedades secretoras del peritoneo (Di Paolo, N., et al.; *Nephron*, 1986; 44, 365-370; Shامbye, H.T., et al.; *Perit. Dial. Intern.*, 1992; 12, 284-286. Para obviar este problema, existe la necesidad médica de encontrar nuevas soluciones que contengan sustancias no tóxicas con osmolaridad alta. Las características de la PDS ideal son bien conocidas: baja glucosa, pH 7, presión osmótica satisfactoria, ausencia de plastificantes, partículas y elementos traza y compatibilidad satisfactoria in vitro e in vivo.

15 Desde el advenimiento de la Diálisis Peritoneal Continua Ambulatoria (CAPD), no se ha comercializado hasta ahora una alternativa válida a la PDS clásica. Las PDS que contienen bicarbonato, aminoácidos o icodextrina han tenido un éxito clínico limitado debido a efectos secundarios sistémicos (Shامbye, H.T., et al.; *Perit. Dial. Intern.*, 1992; 12, 284-286; Cooker, L.A., et al.; *Kidney Int. Suppl.*, 2002; (81) S34-45, Gotloib, L.; *Free Radic. Biol. Med.*, 2003; Feb 15; 34(4):419-28; Holmes, C.J. and Faict, D.; *Kidney Int. Suppl.*, 2003; Dec.; (88):550-6).

20 La biocompatibilidad de una solución de diálisis peritoneal puede definirse como su capacidad para dejar las características anatómicas y funcionales del peritoneo inalteradas en el tiempo (Di Paolo, N., et al.; *Per. Dial. Intern.*, 1993; 1 (S2), 109-112; Di Paolo, N., et al.; *Perit. Dial. Intern.*, 1995; 15 (supp. 7), 61-70). Un paso importante en el estudio de la biocompatibilidad de una solución de diálisis peritoneal (PDS) es la experimentación in vitro, que se testa convenientemente en cultivos de células mesoteliales (Di Paolo, N., et al.; *Per. Dial. Intern.*, 1993; 1 (S2), 109-112; Di Paolo, N., et al.; *Nephron* 1996; 74:594-9. De acuerdo con la definición anterior, los estudios de biocompatibilidad in vitro deben incluir una amplia gama de aspectos desde las modificaciones histológicas de las células mesoteliales a sus modificaciones funcionales durante el contacto con las soluciones (Di Paolo, N., et al.; *Perit. Dial. Int.*, 1994; supp. 3, 12-15).

30 Las soluciones de diálisis peritoneal tienen que conservar la integridad de la membrana peritoneal y su función, permitiendo el deslizamiento sin fricción de las vísceras abdominales (Di Paolo, N.; et al.; *Nephron*, 1986; 44, 365-370).

35 La diálisis peritoneal (PD) expone el peritoneo a glucosa hiperosmolar que contiene cantidades variables de productos no enzimáticos de descomposición de la glucosa (Di Paolo, N., et al.; *Nephron*, 1991; 57:323-31 *Perit. Dial. Int.*, 2000; 20 (Suppl 3): 81-100). Estas soluciones son tóxicas para el peritoneo. Se han documentado cambios ultraestructurales importantes en el mesotelio de los pacientes de PD. El reemplazamiento de glucosa con aminoácidos dio resultados satisfactorios (Holmes, C.J.; *Perit. Dial. Intern.*, 1991; 13, 88-94; Jorres, A., et al.; *Intern. J. of Artif. Organs* 1992; 15, 79-83) en términos de biocompatibilidad peritoneal, pero la aplicación clínica se ve limitada por efectos farmacológicos sistémicos debidos a absorción alta (Garosi, G., et al.; *Perit. Dial. Intern.*, 1998; 18: 610-81).

40 Se han presentado diferentes propuestas para una mejor biocompatibilidad de las soluciones de diálisis peritoneal.

En WO 97/06810, Wu, Tam y French describen una solución biocompatible para diálisis peritoneal que comprende una cantidad eficaz de un aminoazúcar acetilado o desacetilado y/o combinaciones de los mismos. Estos azúcares son monómeros u oligómeros.

45 US 6.277.815, otorgada a Fresenius, describe una solución para diálisis peritoneal o para infusión que comprende dos soluciones simples que se ponen en contacto y se dosifican, conteniendo la primera solución simple iones calcio, sales electrolíticas adicionales y glucosa en una concentración osmóticamente eficaz, y conteniendo la segunda solución simple bicarbonato y un ácido débil con pKa menor que 5. Para proporcionar una solución biocompatible, en particular para uso como solución de diálisis peritoneal, la primera solución simple se acidifica con un ácido fisiológicamente compatible a un pH inferior a 3,2. La segunda solución simple contiene bicarbonato sólo en una proporción que no excede de 10 mmoles/l.

50 JP 2002282354, otorgado a JMS Co. Ltd., proporciona una solución biocompatible para diálisis peritoneal, en la cual la absorción de glucosa se reduce por adición de al menos una clase de trehalosa o rafinosa a la solución.

Sin embargo, el problema de la biocompatibilidad de las soluciones para uso en diálisis peritoneal está todavía pendiente de resolución de manera satisfactoria. De hecho, también los agentes osmóticos alternativos a la glucosa

pueden presentar efectos no deseados o se ven afectados por su alto coste de producción, lo que hace difícil su uso en aquellas situaciones en las cuales la diálisis peritoneal se practica en individuos de posición social desventajosa.

La baja biosíntesis de L-carnitina puede estar asociada con enfermedad renal crónica y los suplementos de L-carnitina parecen tener efectos beneficiosos en los pacientes sometidos a hemodiálisis (Hurot, J.M., et al.; J. Am. Soc. Nephrol. 2002; 11, 13:708-14).

WO 01/26649 describe el uso de L-carnitina y sus derivados de alcanofilo inferior (designados colectivamente como carnitinas) como agentes osmóticos para soluciones médicas. En una realización particular, se utilizan carnitinas como reemplazamiento total o parcial de la glucosa en soluciones para diálisis peritoneal. Se describen también cierto número de combinaciones de carnitinas, en particular L-carnitina y glucosa o aminoácidos en diferentes concentraciones. La carnitina se proporciona en un intervalo que va desde 0,5% p/v a 10% p/v, describiéndose 0,5% p/v L-carnitina y 4,0% p/v glucosa; 4,0% p/v L-carnitina y 0,5% p/v glucosa.

WO 99/07419, Gupta et al., describe soluciones para diálisis con la finalidad de proporcionar al paciente un suplemento nutricional a fin de compensar la pérdida de vitaminas, que sufren los pacientes durante la diálisis, sea peritoneal o hemodiálisis. La L-carnitina está prevista sólo como un ingrediente opcional, dado que las vitaminas son los componentes principales. Además, el intervalo de concentración propuesto por Gupta para L-carnitina es insuficiente, incluso en el extremo superior (1 mM - 0,16% p/v) para proporcionar un efecto osmótico.

El problema de una solución altamente compatible para diálisis peritoneal es todavía una gran necesidad médica.

Se ha encontrado ahora sorprendentemente que por utilización de L-carnitina o un derivado de alcanofilo inferior de la misma o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en un intervalo de concentración de aproximadamente 0,02% p/v a aproximadamente 0,5% p/v junto con un agente osmótico para diálisis peritoneal, en particular glucosa, se obtiene un efecto beneficioso sobre la biocompatibilidad de la solución para diálisis peritoneal.

Otro descubrimiento sorprendente es que la adición de xilitol a una solución para diálisis peritoneal que contiene carnitina y glucosa mejora la biocompatibilidad de la solución.

Sumario de la invención

La presente invención está basada en el descubrimiento de que L-carnitina, en una concentración comprendida entre aproximadamente 0,02% p/v y aproximadamente 0,5% p/v, ejerce un efecto protector sobre el peritoneo, cuando se expone a una solución de diálisis peritoneal.

De acuerdo con ello, es un objeto de la presente invención una solución para diálisis peritoneal que comprende desde 0,02% p/v a 0,5% p/v de carnitina y glucosa y xilitol para diálisis peritoneal.

Otro objeto de la presente invención es el uso de una solución de este tipo para la preparación de un paquete para diálisis peritoneal.

Estos y otros objetos de la presente invención se expondrán en detalle también en lo que sigue mediante ejemplos.

Descripción detallada de la invención

Se hace referencia a WO 01/26649 y a la técnica referida en dicho lugar para una descripción del uso de carnitinas en diálisis peritoneal así como para la comprensión de la presente invención en el contexto del campo técnico de la diálisis peritoneal.

En la presente invención, carnitina significa L-carnitina o un derivado de alcanofilo inferior de la misma, prefiriéndose L-carnitina.

Un derivado de alcanofilo inferior es un acil-derivado C₂-C₈, tal como, por ejemplo acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, valerilo, isovalerilo, hexanoílo, octanoílo y todos sus isómeros posibles.

Normalmente, se utiliza carnitina, en particular L-carnitina en la forma de sal interna. En caso apropiado, puede utilizarse una sal farmacéuticamente aceptable. Las definiciones y ejemplos de dichas sales se proporcionan en el documento WO 01/26649 arriba mencionado.

Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son cloruro, bromuro, orotato, aspartato ácido, citrato ácido, citrato de magnesio, fosfato ácido, fumarato y fumarato ácido, fumarato de magnesio, lactato, maleato y maleato ácido, mucato, oxalato ácido, pamoato, pamoato ácido, sulfato ácido, glucosa-fosfato, tartrato, tartrato ácido, tartrato de magnesio, 2-amino-etanosulfonato, 2-amino-etanosulfonato de magnesio, tartrato de colina y tricloroacetato.

La L-carnitina y sus derivados de alcanofilo inferior están ampliamente comercializados; sin embargo, su preparación se proporciona exhaustivamente en la bibliografía; véanse por ejemplo las referencias de patente a nombre de la Solicitante.

La fabricación de las soluciones para diálisis peritoneal de acuerdo con la presente invención requiere sólo la práctica conocida comúnmente en posesión de quienes tienen una experiencia ordinaria en la técnica. Un ejemplo de referencia útil es WO 2004/052269 y las referencias afines.

Puede encontrarse información útil en las patentes arriba mencionadas.

- 5 La descripción siguiente se proporciona haciendo referencia al miembro preferido de la familia de las carnitinas, a saber L-carnitina.

La L-carnitina se utiliza en solución a una concentración comprendida entre 0,2% p/v y 0,5% p/v. Un primer intervalo preferido es de 0,02% p/v a 0,45% p/v.

- 10 La presente invención se refiere a soluciones para diálisis peritoneal. Esto significa para la persona experta en la técnica que la solución será adecuada para uso médico y contendrá al menos un agente osmótico. El agente osmótico es un soluto contenido en una concentración suficiente para crear una presión osmótica que reemplace la función del riñón por difusión de la sangre del paciente a través de la membrana peritoneal a la solución.

- 15 Los agentes osmóticos para diálisis peritoneal son bien conocidos en la técnica y el agente se selecciona preferiblemente del grupo constituido por: glucosa; galactosa; xilitol, poliglucosa; fructosa; sorbitol; glicerol; aminoácidos, tripiruvato de glicerol (tripiruvina), un péptido simple, una mixtura de péptidos, polipéptidos, compuesto de piruvato en forma de un éster azúcar-piruvato, un éster poliol-piruvato, tioéster piruvato, o un éster dihidroxiacetona-piruvato. Otros agentes osmóticos, aunque no se mencionan específicamente en esta memoria, no están excluidos de la presente invención.

- 20 Los agentes osmóticos para uso en diálisis peritoneal están disponibles comúnmente y una descripción de estos agentes puede encontrarse en la bibliografía técnica, por ejemplo en los documentos WO 01/26649 y US 5.126.373 arriba mencionados.

- 25 En la presente invención, dirigida a la glucosa utilizada comúnmente, la misma está presente en una concentración suficiente para asegurar el efecto osmótico en asociación con la concentración de L-carnitina. Se utilizan las concentraciones usuales conocidas en la técnica, por ejemplo desde aproximadamente 1,5% p/v a aproximadamente 4,5% p/v.

En la presente invención, se utiliza L-carnitina en una solución que comprende glucosa y xilitol, el último en una concentración comprendida entre 0,5% p/v y 2,5% p/v. Un primer intervalo preferido es de 0,5% p/v a 1,5% p/v, siendo el valor más preferido 1% p/v.

- 30 La glucosa y el xilitol están presentes en una concentración suficiente para asegurar el efecto osmótico en asociación con la concentración de L-carnitina. En cada realización de la presente invención, cuando se utiliza un derivado de alcanóilo inferior de L-carnitina, la concentración se determinará de tal modo que se produzca un efecto protector equivalente, sin afectar a la propiedad osmótica de la solución.

Esto mismo es aplicable cuando se utiliza una sal de carnitina.

- 35 La determinación del efecto osmótico puede realizarse por cualquier método convencional, por ejemplo el descrito en el documento WO 01/26649 arriba mencionado.

Para la realización de la doctrina de la presente invención, no es realmente necesario que la carnitina esté presente en una cantidad suficiente para actuar como agente osmótico.

- 40 La presente invención está basada en el descubrimiento de que una carnitina, en particular L-carnitina, es un agente protector para el mesotelio cuando se trata con una solución para diálisis peritoneal, en particular cuando el agente osmótico es glucosa.

Por consiguiente, las ventajas de la presente invención pueden conseguirse utilizando concentraciones bajas de carnitina, junto con las concentraciones de glucosa utilizadas normalmente en diálisis peritoneal.

- 45 No obstante, si se desea rebajar el contenido de glucosa teniendo en cuenta los problemas bien conocidos, o en caso de que el paciente sometido a hemodiálisis haya sufrido ya un deterioro en el mesotelio, puede utilizarse xilitol como sustituto parcial de la glucosa. La presente invención se expresa en la realización de una solución ternaria que comprende una carnitina, glucosa y xilitol.

Las soluciones de acuerdo con la presente invención pueden contener otros ingredientes utilizados convencionalmente en la fabricación de soluciones para diálisis peritoneal. Se hace referencia al conocimiento general común de este campo.

- 50 Otra posible realización es el uso de L-carnitina en el intervalo de concentración de 0,02% p/v a 0,5% p/p en las soluciones descritas en WO 99/07419, en donde se selecciona una vitamina del grupo constituido por ácido fólico, vitamina B6, tiamina, vitamina B2, o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

En otra realización conveniente de la presente invención, la solución para diálisis peritoneal comprende adicionalmente:

- 120 a aproximadamente 150 (mEq/l) sodio;
- 0 a aproximadamente 110 (mEq/l) cloruro;
- 5 0 a aproximadamente 45 (mEq/l) lactato;
- 0 a aproximadamente 45 (mEq/l) bicarbonato;
- 0 a aproximadamente 4,0 (mEq/l) calcio;
- 0 a aproximadamente 4,0 (mEq/l) magnesio.

10 Convenientemente, la solución de acuerdo con la presente invención puede comprender además una sustancia útil en el tratamiento de un paciente que se encuentra en necesidad de diálisis peritoneal. Una sustancia de este tipo será determinada por una persona con experiencia ordinaria en la técnica, dependiendo de las necesidades y las condiciones del o de la paciente, tales como la presencia de otros estados patológicos de necesidades particulares. Ejemplos de dicha sustancia son: vasodilatadores, diuréticos, hormonas, vitaminas, antioxidantes y agentes antifibróticos (tales como 2-(1H)piridona(s) N-sustituidas y/o 3-(1H)piridonas N-sustituidas.

15 Otro objeto de la presente invención es el uso de la solución para diálisis peritoneal descrita en esta memoria en la fabricación de un paquete para diálisis peritoneal.

20 Un paquete para diálisis peritoneal es un conjunto de suministros para ejecutar uno o más ciclos de diálisis peritoneal. Un paquete puede contener, por ejemplo una o más bolsas que contengan la solución de diálisis peritoneal de la presente invención, incluso con formulaciones diferentes, por ejemplo para ciclos de día y/o noche. Pueden estar presentes suministros/equipos adicionales, tales como un conector desechable para ejecutar el ciclo de diálisis peritoneal. Ejemplos de paquetes son los que se encuentran comúnmente en el comercio.

Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la invención.

Ejemplo 1

25 La finalidad de este ejemplo es comparar las características in vitro e in vivo de las soluciones de diálisis peritoneal (PDS) de acuerdo con la presente invención con soluciones estándar bicarbonato-glucosa para diálisis peritoneal.

Se prepararon PDS que tenían la composición siguiente.

PDS de glucosa, con o sin carnitina

	G-2	GC-2
Sodio mmoles/l	134	134
Calcio mmoles/l	1,75	1,75
Magnesio mmoles/l	0,5	0,5
Cloro mmoles/l	103,5	103,5
Bicarbonato mmoles/l	34	34
pH	7,2	7,2
Glucosa %	3,86	3,86
Carnitina %	-	0,2
%, (g/100 ml)		

PDS xilitol-glucosa

	XG-1	XG-2
Sodio mmoles/l	134	134
Calcio mmoles/l	1,75	1,75
Magnesio mmoles/l	0,5	0,5
Cloro mmoles/l	103,5	103,5
Bicarbonato mmoles/l	34	34

ES 2 380 168 T3

pH	7,2	7,2
Xilitol %	1,0	1,0
Glucosa %	0,36	2,86
%, (g/100 ml)		

PDS xilitol-glucosa-carnitina

	XGC-1	XGC-2
Sodio <i>mmoles/l</i>	134	134
Calcio <i>mmoles/l</i>	1,75	1,75
Magnesio <i>mmoles/l</i>	0,5	0,5
Cloro <i>mmoles/l</i>	103,5	103,5
Bicarbonato	34	34
pH	7,2	7,2
Xilitol %	1,0	1,0
Glucosa %	0,36	2,86
Carnitina %	0,05	0,2
%, (g/100 ml)		

Estudios in vitro

- 5 Los autores de la invención estudiaron el crecimiento, la morfología y la función de células mesoteliales peritoneales de conejo cultivadas en presencia de diversas PDS que contenían glucosa sola, glucosa y carnitina, xilitol y glucosa, o xilitol, glucosa y carnitina (véase abajo la composición exacta de las diversas PDS). La glucosa estaba presente a dos concentraciones diferentes (1,36 y 3,86%, p/v). La carnitina estaba presente también a dos concentraciones diferentes (0,05 y 0,2%, p/v). En cambio, la concentración de xilitol se mantuvo fija en 1% (p/v).
- 10 La biocompatibilidad de las soluciones se evaluó en diversos tests:
- 1) crecimiento de cultivos de células mesoteliales
 - 2) secreción de PLPs y PC por las células mesoteliales;
 - 3) secreción de PgE2 por las células mesoteliales;
 - 4) liberación de LDH por las células mesoteliales.

15 *Cultivo de células mesoteliales*

- Se prepararon cultivos de células mesoteliales de conejo y se caracterizaron en el pelet de células como ha sido consignado previamente (véanse las referencias de Di Paolo anteriores). Se prepararon cultivos de confluencia de células mesoteliales de conejo en matraces TC de 225 cm². El medio de cultivo se retiró y se añadieron 20 ml de tripsina EDTA al 0,1% en tampón PBS A a cada matraz, bañando la capa durante unos cuantos segundos. Después de la eliminación de la mixtura de tripsina, se incubaron las células a 37°C durante 5 minutos para obtener el desprendimiento completo de las células. Se añadieron luego a cada matraz 20 ml de medio 199 que contenía 10% de FCS. Las células se caracterizaron como se describe en Di Paolo.
- 20

Crecimiento de los cultivos de células mesoteliales

- Las cuatro soluciones PDS de test se diluyeron a 20, 40, 60 y 80% con medio 199 que contenía 10% de FCS. Como control se utilizó medio sin solución. Se pusieron 3,6 ml de cada dilución de las cuatro soluciones y medio puro en 102 pocillos (6 por dilución y 6 controles). Se sembraron en cada pocillo 0,4 ml de la suspensión de células mesoteliales (30.000/ml). La incubación se realizó a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de aire. Se comprobó el crecimiento celular diariamente al microscopio y se calculó el número de células mesoteliales después de 7 días de incubación (véanse las referencias de Di Paolo anteriores).
- 25
- 30 Las Tablas 1-3 siguientes presentan los resultados de los experimentos anteriores.

Tabla 1

Crecimiento de células mesoteliales ($\times 10^3$) en cultivo expuesto a PDS que contenían glucosa sola (G-2) y con carnitina (GC-2). Las PDS se diluyeron a 20, 40, 60 y 80% con medio 199 que contenía 10% de FCS. Los datos se expresan como valor medio \pm SD.

	% de PDS			
	20	40	60	80
G-2	8.11 \pm 2.4	5.40 \pm 1.7	1.82 \pm 0.8	0.86 \pm 0.15
GC-2	22.2 \pm 4.1*	10.3 \pm 2.8**	4.13 \pm 1.8**	1.04 \pm 0.14

*p<0.01; **p<0.05

Tabla 2

Crecimiento de células mesoteliales ($\times 10^3$) en cultivo expuesto a PDS que contenían glucosa y xilitol solos (GX-1) o con carnitina (XGC-1). Las PDS se diluyeron a 20, 40, 60 y 80% con medio 199 que contenía 10% de FCS. Los datos se expresan como valor medio \pm SD.

	% de PDS			
	20	40	60	80
XG-1	62.2 \pm 6.4	52.3 \pm 6.6	15.1 \pm 1.8	4.51 \pm 0.6
XGC-1	75.5 \pm 6.1**	68.6 \pm 5.8**	20.4 \pm 3.5**	6.32 \pm 0.7*

*p<0.01; **p<0.05

Tabla 3

Crecimiento de células mesoteliales ($\times 10^3$) en cultivo expuesto a PDS que contenían glucosa y xilitol solos (GX-2) o con carnitina (XGC-2). Las PDS se diluyeron a 20, 40, 60 y 80% con medio 199 que contenía 10% de FCS. Los datos se expresan como valor medio \pm SD.

	% de PDS			
	20	40	60	80
XG-2	21.2 \pm 2.8	14.3 \pm 2.7	3.51 \pm 0.7	1.12 \pm 0.3
XGC-2	32.6 \pm 3.1*	21.4 \pm 3.9**	5.20 \pm 1.5	1.62 \pm 0.7

*p<0.01; **p<0.05

El crecimiento de las células mesoteliales de conejo era mejor en la PDS que contenía carnitina que en las otras (Tablas 1-3). Cuando estaba presente carnitina en la solución que contenía solamente glucosa, se encontró un aumento estadísticamente significativo de crecimiento celular incluso en el medio que contenía 60% de PDS (Tabla 1). En las PDS compuestas de glucosa y xilitol (XG-1 y XG-2), la presencia de carnitina (XGC-1 y XGC-2) conducía también a un aumento estadísticamente significativo del crecimiento celular. En cambio, un efecto significativo sobre el crecimiento mesotelial entre XG-2 y XGC-2 se observó únicamente en el medio que contenía 20 y 40% de PDS (Tabla 3), mientras que se observó una diferencia significativa entre XGC y XGC-1 para todas las diluciones de la PDS en el medio (20, 40, 60 y 80%, véase también la Tabla 2). Así, aunque el efecto perjudicial de la glucosa es claramente dependiente de la dosis (XG-1 frente a XG-2), la adición de carnitina es capaz de atenuar el efecto tóxico de la glucosa sobre el crecimiento de las células mesoteliales con indiferencia de la concentración de glucosa.

Sustancias secretadas por las células mesoteliales cultivadas

El procedimiento de cultivo descrito para las células mesoteliales se repitió en 102 pocillos con medio estándar únicamente. Después de 6 días de incubación, se retiró el sobrenadante de los cultivos y se añadieron las 4 PDS, a 100% de concentración, (6 para cada solución y 6 con medio únicamente como controles). Después de otras 6 horas de incubación, se recogió el sobrenadante para el ensayo de fosfolípidos (PLPs) totales, fosfatidilcolina (PC) (Kit, NEN, Dupont) y PgE2 (Kit RIA, New England Nuclear), como indicadores de la eficiencia funcional de las células, y LDH como indicador de citotoxicidad.

Los fosfolípidos se extrajeron del sobrenadante por el método de Folch et al. (Folch J., Lees M. y Stanley HS.; 1957, J. Biol. Chem., 226; 497-509). Para permitir la comparación de los datos, se utilizaron 6 horas de incubación, que es el tiempo estándar que permanece la PDS en el abdomen de los humanos.

Las Tablas 4-6 siguientes presentan los resultados de los experimentos anteriores.

Tabla 4

Sustancias secretadas por células mesoteliales cultivadas expuestas a PDS que contiene glucosa solamente (G-2) y con carnitina (GC-2). Los datos se expresan como valor medio \pm SD.

	PC $\mu\text{g/ml}$	PLPs $\mu\text{g/ml}$	PgE ₂ mg/ml	LDH U/ml
G-2	0.45 \pm 0.07	0.71 \pm 0.1	0.91 \pm 0.09	32.7 \pm 4.5
GC-2	1.03 \pm 0.4**	1.14 \pm 0.3**	1.43 \pm 0.4**	15.3 \pm 1.6*

*p<0.01;
**p<0.05

5

Tabla 5

Sustancias secretadas por células mesoteliales cultivadas expuestas a PDS que contiene glucosa y xilitol solos (XG-1) o con carnitina (XGC-1). Los datos se expresan como valor medio \pm SD.

	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	mg/ml	U/ml
XG-1	2.21 \pm 0.3	2.42 \pm 0.4	2.41 \pm 0.3	22.2 \pm 2.6
XGC-1	2.13 \pm 0.4	2.35 \pm 0.3	2.56 \pm 0.3	10.1 \pm 0.9*

*p<0.01

Tabla 6

10 Sustancias secretadas por células mesoteliales cultivadas expuestas a PDS que contiene glucosa y xilitol solos (XG-2) o con carnitina (XGC-2). Los datos se expresan como valor medio \pm SD.

	PC $\mu\text{g/ml}$	PLPs $\mu\text{g/ml}$	PgE ₂ mg/ml	LDH U/ml
XG-2	1.23 \pm 0.1	1.20 \pm 0.2	1.30 \pm 0.3	28.5 \pm 3.4
XGC-2	1.64 \pm 0.3**	1.78 \pm 0.4**	2.01 \pm 0.4**	18.3 \pm 2.5*

*p<0.01;
**p<0.05

15 Los niveles máximos de PLPs y PC secretados por las células mesoteliales se encontraron con medio que contenía las soluciones XG-2 y XGC-1 (Tablas 4-6), y era indistinguible del de los controles (datos no presentados). En cambio, los niveles mínimos de PLPs y PC secretados por las células mesoteliales se encontraron con medio que contenía las soluciones G-2 (Tabla 4). Sin embargo, la presencia de carnitina en el último medio que contenía PDS (GC-2), dio como resultado una recuperación estadísticamente significativa de células mesoteliales que secretaban a la vez PLPs y PC (Tabla 4). La capacidad para secretar PC y PLPs estaba deprimida también en el medio que contenía XG-2, aunque en menor proporción que el medio que contenía G-2. La presencia de carnitina en el medio que contenía XG-2 (XGC-2) daba como resultado una recuperación significativa tanto de PC como de PLPs (Tabla 6). Es evidente también que cuanto mayor era la cantidad de glucosa en la PDS (G-2 > XG-2 > XG > 1) tanto menor era la capacidad de las células mesoteliales para secretar PC y PLPs.

20 Debe indicarse que niveles elevados de carnitina pueden actuar como una trampa de acil-CoAs largos, lo que dificultaría a su vez la síntesis de PC y PLPs (la síntesis de PLP requiere varios pasos de acilación, en los cuales el sustrato es un sustrato acil-CoA largo). Así pues, los resultados anteriores pueden considerarse totalmente sorprendentes, en los que la acción mejoradora de la carnitina sobre la secreción de PC y PLPs sigue siendo elusiva.

25 *Secreción de PgE2 por las células mesoteliales*

30 La porción de eicosanoides por las células mesoteliales es un índice válido de la eficiencia dialítica del peritoneo. A este respecto, los autores de la invención han determinado PgE2 en el sobrenadante de células mesoteliales expuestas a diferentes PDS. Entre las diversas PDS testadas, los niveles máximos de PgE2 se encontraron en el sobrenadante de células mesoteliales expuestas a XG-1 y XGC-1 (Tablas 4-6), aunque la PDS que contenía carnitina (XGC-1) exhibía niveles no significativamente mayores de PgE2 que la PDS sin carnitina (XG-1). Adicionalmente, no se observaron diferencias significativas en los niveles de PgE2 entre las muestras de control y las dos últimas PDS (datos no presentados). Los niveles más bajos de PgE2 se encontraron en el sobrenadante de células mesoteliales expuestas a G-2. Sin embargo, la presencia de carnitina en esta PDS (GC-2) daba como resultado un aumento notable de PgE2 recuperada. Como se ha observado previamente para la secreción de PC y

PLPs, la capacidad para secretar PgE2 estaba deprimida también en el medio que contenía XG-2, aunque en menor proporción que el medio que contenía G-2. La adición de carnitina al medio que contenía XG-2 (XGC-2) daba como resultado un aumento estadísticamente significativo de los niveles de PgE2 (Tabla 6).

Liberación de LDH por las células mesoteliales

5 La liberación de LDH en el sobrenadante por las células mesoteliales representa un marcador útil de lesión celular. Estaban presentes cantidades medibles de LDH en el sobrenadante de células mesoteliales expuestas a la totalidad de las PDS testadas; sin embargo, aquellas PDS que no contenían carnitina liberaban niveles mayores en un grado estadísticamente significativo de LDH que aquéllos que contenían carnitina (G-2 frente a GC-2, XG-1 frente a XGC-1, y GC-2 frente a XGC-2). Adicionalmente, la liberación de LDH por las células mesoteliales expuestas a XGC-1, una de las PDS que contenían carnitina, era comparable a las células de control (datos no presentados). Los datos de los autores de la invención muestran también que cuanto mayor es la cantidad de glucosa en las PDS (G-2 > XG-2 > XG > 1) tanto mayor es la cantidad de LDH liberada por las células mesoteliales.

15 Comparando los efectos de las PDS que contienen glucosa sola con o sin carnitina, y glucosa y xilitol con o sin carnitina sobre las células mesoteliales cultivadas, el autor de la presente invención llegó a las conclusiones siguientes:

- Las células mesoteliales crecían mucho mejor en las PDS que contenían carnitina que en aquéllas PDS que no la contenían. En la PDS glucosa-xilitol que contenía carnitina, el crecimiento mesotelial era mayor que en aquéllas que contenían glucosa y carnitina. De hecho, cuanto más baja era la cantidad de glucosa tanto mejor era el crecimiento. Sin embargo, la presencia de carnitina exhibía siempre un aumento del crecimiento mesotelial.
- La secreción de fosfolípidos por las células mesoteliales era mucho mayor cuando estaba presente carnitina en las PDS. Éste es un índice importante de la función celular, dado que los fosfolípidos son esenciales para la fisiología del peritoneo. La secreción de fosfatidilcolina, el agente tensioactivo mesotelial más activo, era indistinguible entre las células cultivadas en el medio con carnitina (particularmente XGC-2) y los controles. Se observaba una secreción significativamente menor con el medio que contenía niveles altos de glucosa.
- Como índice general de citotoxicidad, la secreción de LDH por las células mesoteliales era mayor en los medios con PDS que contenían glucosa sola y glucosa más xilitol que en las respectivas PDS con carnitina.
- La secreción de prostaglandina E2 era significativamente mayor en medios que contenían carnitina.

REIVINDICACIONES

1. Una solución para diálisis peritoneal que se caracteriza por comprender desde 0,02% p/v a 0,5% p/v de L-carnitina, xilitol y glucosa.
- 5 2. La solución de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza porque en la misma la carnitina está comprendida en el intervalo de 0,02% p/v a 0,45% p/v.
3. La solución de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que se caracteriza porque en la misma la L-carnitina está sustituida o parcialmente sustituida por un derivado de alcanoílo inferior de la misma.
4. La solución de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que se caracteriza porque en la misma se utiliza una sal farmacéuticamente aceptable de L-carnitina o un derivado de alcanoílo inferior de la misma.
- 10 5. La solución de acuerdo con la reivindicación 4, que se caracteriza porque en la misma dicha sal se selecciona del grupo constituido por cloruro, bromuro, orotato, aspartato ácido, citrato ácido, citrato de magnesio, fosfato ácido, fumarato y fumarato ácido, fumarato de magnesio, lactato, maleato y maleato ácido, mucato, oxalato ácido, pamoato, pamoato ácido, sulfato ácido, glucosa-fosfato, tartrato, tartrato ácido, tartrato de magnesio, 2-amino-etanosulfonato, 2-amino-etanosulfonato de magnesio, tartrato de colina y tricloroacetato.
- 15 6. La solución de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que se caracteriza porque comprende adicionalmente un agente osmótico animal seleccionado del grupo constituido por: galactosa; poliglucosa; fructosa; sorbitol; glicerol; aminoácidos, tripiruvato de glicerol (tripiruvina), un péptido simple, una mixtura de péptidos, polipéptidos, compuesto de piruvato en forma de un éster azúcar-piruvato, un éster poli-ol-piruvato, tioéster piruvato, o un éster dihidroxiacetona-piruvato.
- 20 7. La solución de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que se caracteriza porque en la misma la glucosa está comprendida en la concentración de 1,5% p/v a 4,5% p/v.
8. La solución de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que se caracteriza porque en la misma el xilitol está comprendido en una concentración de 0,5% p/v a 2,5% p/v.
9. La solución de acuerdo con la reivindicación 8, que se caracteriza porque tiene la composición siguiente

Sodio <i>mmoles/l</i>	134
Calcio <i>mmoles/l</i>	1,75
Magnesio <i>mmoles/l</i>	0,5
Cloro <i>mmoles/l</i>	103,5
Bicarbonato <i>mmoles/l</i>	34
pH	7,2
Xilitol % p/v	1,0
Glucosa % p/v	0,36
L-Carnitina % p/v	0,05

25

10. La solución para diálisis peritoneal que se caracteriza porque tiene la composición siguiente

Sodio <i>mmoles/l</i>	134
Calcio <i>mmoles/l</i>	1,75
Magnesio <i>mmoles/l</i>	0,5
Cloro <i>mmoles/l</i>	103,5
Bicarbonato <i>mmoles/l</i>	34
pH	7,2
Xilitol % p/v	1,0
Glucosa % p/v	2,86
L-Carnitina % p/v	0,2

5

10

15

11. La solución de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que se caracteriza porque comprende además:
- 120 a aproximadamente 150 (mEq/l) sodio;
 - 5 0 a aproximadamente 110 (mEq/l) cloruro;
 - 0 a aproximadamente 45 (mEq/l) lactato;
 - 0 a aproximadamente 45 (mEq/l) bicarbonato;
 - 0 a aproximadamente 4,0 (mEq/l) calcio;
 - 0 a aproximadamente 4,0 (mEq/l) magnesio.
- 10 12. La solución de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza porque comprende adicionalmente una sustancia útil en el tratamiento de un paciente que se encuentra en necesidad de diálisis peritoneal.
- 15 13. La solución de acuerdo con la reivindicación 12, que se caracteriza porque en la misma dicha sustancia se selecciona del grupo constituido por: vasodilatadores, diuréticos, hormonas, vitaminas, antioxidantes y agentes antifibróticos.
14. La solución de acuerdo con la reivindicación 13, que se caracteriza porque en la misma dicha vitamina se selecciona del grupo constituido por ácido fólico, vitamina B6, tiamina, vitamina B12, o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.
- 20 15. Un paquete para diálisis peritoneal que se caracteriza porque comprende una solución de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es para comodidad del lector únicamente. No forma parte del documento de la patente europea. Aun cuando se tuvo gran cuidado al reunir las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes (EPO) declina toda responsabilidad a este respecto.

5 Documentos de patente citados en la descripción

- WO 9706810 A [0008]
- US 6277815 B, Fresenius [0009]
- JP 2002282354 B [0010]
- WO 0126649 A [0013] [0022] [0025] [0034] [0039]

10

- WO 9907419 A, Gupta [0014] [0045]
- WO 2004052269 A [0028]
- US 5126373 A [0034]

Literatura no de patentes citada en la descripción**15**

- DI PAOLO, N. et al. Nephron, 1996, vol. 74, 594-9 [0002] [0004]
- DI PAOLO, N. et al. Perit. Dial. Int., 2000, vol. 20 (3), 1-100 [0002]
- DI PAOLO, N. et al. Nephron, 1996, vol. 44, 365-370 [0002] [0005]
- SHAMBYE, N. et al. Perit. Dial. Intern., 1992, vol. 12, 284-286 [0002]
- SHAMBYE, N. et al. Perit. Dial. Intern., 1992, vol. 12, 284-286 [0003]

20

- COOKER, L. A. et al. Perit. Kidney Int. Suppl., 2002, 34-45 [0003]
- GOLTLOIB, L. Free Radic. Biol. Med., 15 February 2003, vol. 34 (4), 419-28 [0003]
- HOLMES, C.J.; FAICT, D. Kidney Int. Suppl., December 2003, 550-6 [0003]
- DI PAOLO, N. et al. Per. Dial. Intern., 1993, vol. 1 (S2), 109-112 [0004]
- DI PAOLO, N. et al. Perit. Dial. Intern., 1995, vol. 15 (7), 61-70 [0004]

25

- DI PAOLO, N. et al. Perit. Dial. Int., 1994, vol. 3, 12-15 [0004]
- DI PAOLO, N. et al. Nephron, 1991, vol. 57, 323-31 [0006]
- Perit. Dial. Int., 2000, vol. 20 (3), 81-100 [0006]
- HOLMES, C.J.; Perit. Dial. Intern., 1991, vol.13, 88-94 [0006]
- JORRES, A. et al. Intern. J. of Artif. Organs, 1992, vol. 15, 79-83 [0006]

30

- GAROSI, G.ET AL. Perit. Dial. Intern., 1998, vol. 18, 610-81 [0006]
- HUROT, J.M. J. Am. Soc. Nephrol., 2002, vol. 11 (13), 708-14 [0012]
- FOLCH J.; LES M.; STANLEY HS. J. Biol. Chem., 1957, vol. 226, 497-509 [0063]