

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 293**

51 Int. Cl.:

A61K 38/43 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2008 E 08705122 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2012 EP 2114441**

54 Título: **El uso de la fosfatasa alcalina en el tratamiento de la función renal reducida**

30 Prioridad:

30.01.2007 EP 07101437

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

06.03.2013

73 Titular/es:

**AM-PHARMA B.V. (100.0%)
RUMPSTERWEG 6
3981 AK BUNNIK, NL**

72 Inventor/es:

**PICKKERS, ROELOF, PETER;
HEEMSKERK, SUZANNE;
VELDERS, MARKWIN, PAUL;
RAABEN, WILLEM y
WULFERINK, MARTY, BERNARDUS,
FRANSISCUS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 397 293 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

El uso de la fosfatasa alcalina en el tratamiento de la función renal reducida

Descripción

5 La invención se refiere al campo de la medicina y, en particular, al uso de la fosfatasa alcalina en el tratamiento de enfermedades renales tales como la función renal reducida. La presente invención también se refiere al campo de la farmacia y, en particular, al uso farmacéutico de la fosfatasa alcalina.

Hay múltiples enfermedades renales que pueden provocar una función renal reducida. La insuficiencia renal aguda (IRA) es uno de los trastornos renales que provoca una función renal reducida. Sin limitar el alcance de la invención, la IRA se describe más detalladamente.

10 La insuficiencia renal aguda (IRA) se define como una pérdida aguda de la función renal que provoca un aumento del nivel de la creatinina en suero.

15 La incidencia anual de la IRA adquirida en la comunidad es de aproximadamente 100 casos por cada millón de habitantes y, en la actualidad, sólo se diagnostica en el 1 % de los ingresos hospitalarios. Por otro lado, la IRA adquirida en los hospitales se produce en hasta un 4 % de las hospitalizaciones y un 20 % de los ingresos de cuidados intensivos. Este aumento en la incidencia de la IRA adquirida a nivel hospitalario es multifactorial: está relacionado con un envejecimiento de la población con mayor riesgo de padecer IRA, la alta prevalencia de las posibles exposiciones nefrotóxicas en el entorno hospitalario y la creciente gravedad de la enfermedad.

20 En los últimos 40 años, la tasa de supervivencia para la insuficiencia renal aguda no ha mejorado, principalmente porque los pacientes afectados son ahora mayores y tienen más afecciones comórbidas. Dependiendo de la gravedad de la insuficiencia renal, la tasa de mortalidad puede variar del 7 por ciento hasta tanto como el 80 por ciento.

25 En la insuficiencia renal aguda, la tasa de filtración glomerular disminuye durante días a semanas. Como resultado de ello, se reduce la excreción de desechos nitrogenados, no pudiéndose mantener el equilibrio entre fluidos y electrolitos. Los pacientes con insuficiencia renal aguda no suelen presentar síntomas, y la afección se diagnostica por la observación de elevaciones de los niveles del nitrógeno ureico en sangre (NUS) y de la creatinina sérica. El paro renal completo se presenta cuando el nivel de creatinina sérica aumenta en al menos 0,5 mg por dl al día (lo que equivale a 44 µmol por litro al día) y la producción de orina es menor de 400 ml al día (oliguria).

30 **Patofisiología:** la fuerza motriz de la filtración glomerular es el gradiente de presión desde el glomérulo hacia el espacio de Bowman. La presión glomerular depende principalmente del flujo sanguíneo renal (FSR) y se controla mediante la combinación de las resistencias de las arteriolas renales aferentes y eferentes. Independientemente de la causa de la IRA, las reducciones en el FSR representan una vía patológica común para la disminución de la tasa de filtración glomerular (TFG). La etiología de la IRA comprende 3 mecanismos principales.

35 - La insuficiencia prerrenal se define por afecciones con la función tubular y glomerular normales. En la insuficiencia renal aguda prerrenal, el problema está en el deterioro del flujo sanguíneo renal como consecuencia de una verdadera disminución del volumen intravascular, la disminución del volumen de circulación efectivo hacia los riñones o agentes que alteran el flujo sanguíneo renal como consecuencia de la disminución de la TFG.

40 - La insuficiencia renal aguda intrínseca se divide en 4 categorías: enfermedad tubular, enfermedad glomerular, enfermedad vascular y enfermedad intersticial. En la insuficiencia renal aguda intrínseca, se daña el parénquima renal.

- La insuficiencia renal postobstructiva inicialmente provoca un aumento de la presión tubular, disminuyendo la fuerza impulsora de la filtración. La insuficiencia renal aguda postrenal sólo se puede producir si se obstruyen ambos tractos urinarios de salida o se obstruye el tracto de salida de un solo riñón. Lo más habitual es que la afección se deba a la obstrucción del tracto urinario inferior.

45 **Insuficiencia prerrenal**

50 Los principales agentes que causan insuficiencia renal aguda prerrenal son los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) y los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). La inhibición de la ECA impide la conversión de la angiotensina I en la angiotensina II, lo que conduce a la disminución de los niveles de la angiotensina II. La angiotensina II aumenta la tasa de filtración glomerular al causar la constricción de la arteriola eferente y su ausencia disminuye la tasa de filtración glomerular debido a la dilatación de la arteriola eferente.

Insuficiencia renal aguda intrínseca

Enfermedad Tubular

5 La necrosis tubular aguda producida por la disminución del FSR es la causa más común de insuficiencia renal aguda intrínseca en los pacientes hospitalizados. La disminución del flujo sanguíneo renal provoca isquemia en el parénquima renal. Si la isquemia se prolonga, se puede desarrollar la necrosis tubular aguda. Este ataque isquémico inicial desencadena la producción de radicales libres de oxígeno y enzimas que siguen causando daño celular, incluso tras la restauración del FSR. Los daños celulares tubulares rompen las sólidas uniones entre las células, lo que permite que se vuelvan a producir fugas de filtrado glomerular y una mayor disminución de la TFG efectiva.

10 Además, las células moribundas se desprenden en los túbulos, formando cilindros obstruccionales, que reducen aún más la TFG y provocan oliguria. La necrosis tubular aguda isquémica suele ser reversible, pero si la isquemia es lo suficientemente grave como para provocar necrosis cortical, se puede producir insuficiencia renal irreversible.

15 La necrosis tubular aguda tiene tres fases. El daño renal se desarrolla durante la fase inicial, que dura de horas a días. En la fase de mantenimiento, que dura de días a semanas, la tasa de filtración glomerular alcanza su punto más bajo y la producción de orina está en su nivel más bajo. La fase de recuperación dura días, comenzando a menudo con diuresis por necrosis tubular postaguda. La hipovolemia producida como consecuencia de una sobreproducción de orina es un problema que aparece en esta fase. A pesar de la recuperación de la producción de orina, los pacientes pueden seguir teniendo dificultad con la uremia y la homeostasis de los electrolitos y el ácido, porque la función tubular no está completamente recuperada.

20 *Enfermedad glomerular*

La enfermedad glomerular más común que produce IRA es la glomerulonefritis. La glomerulonefritis se caracteriza por hipertensión, proteinuria y hematuria. De los muchos tipos de glomerulonefritis, la mayoría se asocia con la enfermedad renal crónica. En general, los dos tipos de glomerulonefritis que provocan insuficiencia renal aguda son glomerulonefritis rápidamente progresiva y glomerulonefritis proliferativa aguda. El último tipo se produce en

25 pacientes con endocarditis bacteriana u otras afecciones postinfecciosas.

Enfermedad vascular

La enfermedad microvascular o macrovascular (la oclusión de las principales arterias renales o la enfermedad grave de la aorta abdominal) puede causar insuficiencia renal aguda.

Enfermedad intersticial

30 La nefritis intersticial aguda habitualmente presenta fiebre, sarpullido y eosinofilia. La tinción de la orina que es positiva en eosinófilos sugiere la presencia de esta afección. La nefritis intersticial aguda es generalmente el resultado de una reacción alérgica a un fármaco, pero también puede estar causada por una enfermedad autoinmune, una infección o una enfermedad infiltrativa.

35 La recuperación de la IRA depende en primer lugar de la restauración del FSR. La normalización temprana del FSR predice un mejor pronóstico para la recuperación de la función renal. En la insuficiencia prerrenal, habitualmente basta con la restauración del volumen sanguíneo circulante. El alivio rápido de la obstrucción urinaria en la insuficiencia postrenal produce un descenso rápido de la vasoconstricción. Con la insuficiencia renal intrínseca, sólo la restauración del volumen sanguíneo no restaura la función renal. La eliminación de toxinas tubulares y el inicio de la terapia para enfermedades glomerulares o tubulares disminuye la vasoconstricción aferente renal y puede invertir la IRA. El tratamiento inicial debe centrarse en corregir el equilibrio entre líquido y electrolitos, y en la uremia, mientras se busca la causa de la insuficiencia renal aguda. Un paciente con disminución del volumen se resucita con solución salina. Sin embargo, es más habitual que se presente una sobrecarga del volumen, especialmente, si los

40 pacientes son oligúricos o anúricos.

45 Un ejemplo de un tratamiento actual es la furosemida (Lasix) administrada por vía intravenosa. Otro ejemplo de uno de los tratamientos actuales es el calcio administrado por vía intravenosa. El potasio se puede desplazar temporalmente al compartimiento intracelular usando insulina administrada por vía intravenosa (10 unidades) y glucosa (25 g), agonistas beta inhalados o bicarbonato sódico administrado por vía intravenosa. La excreción de potasio se consigue con sulfonato de poliestireno sódico (Kayexalate) y/o diuréticos. El sulfonato de poliestireno sódico se administra por vía oral (de 25 a 50 g mezclados con 100 ml de sorbitol al 20 por ciento) o en forma de enema (50 g en 50 ml de sorbitol al 70 por ciento y 150 ml de agua corriente). Si estas medidas no controlan el nivel

50 de potasio, se inicia la diálisis.

La acidosis comúnmente se trata con bicarbonato de sodio por vía intravenosa o vía oral si el nivel de bicarbonato

sérico es menor de 15 mEq por l (15 mmol por litro) o el pH es inferior a 7,2. Los pacientes también se pueden tratar por vía oral con comprimidos de bicarbonato de sodio, solución de Shohl en dosis de 30 ml o bicarbonato de sodio en polvo. Se deben controlar rigurosamente los niveles de bicarbonato séricos y el pH. La acidosis intratable requiere diálisis.

- 5 Se deben revisar todos los medicamentos, y las dosis deben ajustarse en función de la tasa de filtración glomerular y los niveles séricos de los medicamentos.

Entre un 20 y un 60 por ciento de los pacientes requiere diálisis a corto plazo, particularmente, cuando el NUS supera los 100 mg por dl (35,7 mmol por l de urea) y el nivel de creatinina sérica supera el intervalo de 5 a 10 mg por dl (442 a 884 μ mol por l). Las indicaciones para la diálisis incluyen acidosis y alteraciones de los electrolitos que no responden a la terapia farmacológica, la sobrecarga de líquidos que no responde a los diuréticos y la uremia. En pacientes con insuficiencia renal aguda progresiva lo indicado es consultar urgentemente a un nefrólogo.

10 En el documento WO 2005/074978, se revela el uso de fosfatasa alcalina para la profilaxis o el tratamiento de las enfermedades mediadas por LPS. Según el documento WO 2005/074978, la fosfatasa alcalina actúa mediante la desintoxicación del resto de lípido A del LPS. Las enfermedades renales mediadas por LPS están entre las enfermedades que se pueden tratar con la fosfatasa alcalina.

Parte de los tratamientos anteriormente mencionados restauran (parcialmente) la función renal. Otro tratamiento mejora la función en comparación con las personas que no reciben tratamiento. Sin embargo, todavía se necesitan tratamientos alternativos.

20 El objetivo de la presente invención es proporcionar un tratamiento alternativo para mejorar la función renal, especialmente, en los casos en los que se deteriora/reduce, al menos parcialmente, la función renal.

La presente invención proporciona un tratamiento alternativo en el que se usa la fosfatasa alcalina para mejorar una situación en la que se reduce la función renal.

25 En una primera realización, la invención proporciona el uso de fosfatasa alcalina (FAL) en la fabricación de un medicamento para mejorar la función renal reducida, en el que dicha función renal se reduce debido a una insuficiencia renal.

El término "mejorar" incluye frenar la reducción, detener la reducción o invertir, al menos parcialmente, la función renal reducida.

30 La expresión "función renal reducida" se usa normalmente para referirse a una situación en la que se reduce la función renal en comparación con el valor de al menos un parámetro renal relacionado hasta un valor reconocido o medio (laboratorio) de dicho parámetro. Si, por ejemplo, la cantidad de proteína presente en la orina de un sujeto (preferiblemente, de un ser humano) es (significativamente) superior a un valor reconocido o medio (laboratorio) valor, se dice que dicha persona tiene una "función renal reducida". El análisis correspondiente se puede realizar en un laboratorio, pero también en el entorno doméstico. Por ejemplo, desde septiembre de 2006, la compañía holandesa "Nierstichting" ha introducido una sencilla prueba de análisis (llamada Niercheck) que se puede realizar en casa para comprobar si los riñones funcionan adecuadamente. Esta prueba analiza la cantidad de proteína de la orina.

35 Otros ejemplos de parámetros que se pueden analizar son la tasa de filtración glomerular (TFG), los niveles de creatinina sérica, la alteración electrolítica, la cantidad de orina producida, el nitrógeno ureico en sangre (NUS), el calcio, el fósforo, los niveles de albúmina o los glóbulos rojos y blancos de la orina. Otras pruebas que se pueden realizar son un recuento sanguíneo completo con diferencial. Preferiblemente, todos los posibles pacientes se someten a los siguientes análisis de orina: prueba con tira reactiva, microscopía, niveles de sodio y creatinina, y determinación de la osmolalidad urinaria.

40 Como se describe en la presente memoria dentro del apartado experimental, también es posible analizar la presencia o ausencia de una molécula de ARN de una muestra de orina. Preferiblemente, dicha molécula de ARN es una molécula de ARNm. Incluso más preferiblemente, dicha molécula de ARNm es ARNm de iNOS. En una realización más preferida, dicho ARN se obtiene de células renales secretadas en la orina.

45 En base al análisis anteriormente descrito, se determina si un sujeto (preferiblemente, un ser humano) está padeciendo o no una función renal renal. Una disminución de la TFG o un nivel elevado de creatinina sérica o una reducción de la cantidad de orina producida o cualquier combinación de los mismos son, por ejemplo, (a) claro/s indicios/s de que el sujeto analizado necesita tratamiento según lo descrito en la presente memoria.

50 Así pues, el uso descrito en la presente memoria puede estar precedido por una etapa de análisis que comprende, por ejemplo, tomar una muestra de un sujeto que se sospecha que padece una función renal reducida y analizar

dicha muestra en busca de cualquiera de los parámetros anteriormente dados (o una combinación de los mismos) y comparar el/los resultado/s obtenido/s con los valores medios o reconocidos. Los ejemplos de muestras adecuadas son una muestra de orina o una muestra de sangre. Los análisis de las muestras de orina y/o de sangre pueden estar acompañados además por un examen renal de ultrasonidos. En una realización preferida, el análisis se realiza bajo la responsabilidad de un médico. En cuanto está claro que la función renal ha disminuido, se inicia el tratamiento según la invención.

Una función renal reducida puede producirse como consecuencia de diferentes trastornos. Muchos casos de alteración de la función renal provocan una enfermedad leve y asintomática que no es reconocida por el paciente, que no llama la atención a los médicos y que no se diagnostica. La incidencia y la prevalencia de tales episodios leves de afección de la función renal son desconocidas, pero se considera que son importantes. Sin embargo, tal disfunción leve puede derivar en graves problemas y, por lo tanto, resulta importante un tratamiento temprano (por ejemplo, según lo descrito en la presente memoria).

La invención proporciona el uso de la fosfatasa alcalina (FAL) en la fabricación de un medicamento para mejorar la función renal reducida, en el que dicha función renal se reduce debido a una insuficiencia renal. La insuficiencia renal es la afección en la cual los riñones dejan de funcionar adecuadamente. Fisiológicamente, la insuficiencia renal se describe como una disminución de la tasa de filtración glomerular. Clínicamente, esto se manifiesta en un nivel elevado de creatinina sérica. En líneas generales, se puede dividir en dos categorías: insuficiencia renal aguda e insuficiencia renal crónica.

La insuficiencia renal crónica (IRC) se desarrolla lentamente e, inicialmente, da pocos síntomas. Puede ser la complicación de un gran número de enfermedades renales tales como glomerulonefritis, pielonefritis crónica y retención urinaria. La insuficiencia renal en fase terminal (IRFT) es la última consecuencia, en cuyo caso, generalmente, se requiere diálisis hasta que se encuentre un donante que permita realizar un trasplante renal. En la insuficiencia renal aguda, la función del riñón se inhibe casi por completo. En una realización preferida, dicha insuficiencia renal es insuficiencia renal aguda.

La insuficiencia renal aguda (IRA) es, como su nombre implica, una pérdida rápida progresiva de la función renal que, generalmente, se caracteriza por la oliguria (disminución de la producción de orina, cuantificada como menos de 400 ml al día en adultos, menos de 0,5 ml/Kg/h en niños o menos de 1 ml/Kg/h en bebés), perturbaciones del agua corporal y los fluidos corporales, y trastorno electrolítico. Los pacientes que sufren insuficiencia renal aguda, normalmente, son hospitalizados debido a la gravedad de su afección. En la actualidad, se debe identificar una causa subyacente para detener el progreso, y puede ser necesario aplicar diálisis hasta que se puedan tratar estas causas fundamentales. En base a la presente invención, la terapia con fosfatasa alcalina se puede iniciar inmediatamente incluso sin conocer la causa subyacente y sin perder el preciado tiempo. En una realización preferida, la invención proporciona el uso de fosfatasa alcalina (FAL) en la fabricación de un medicamento para mejorar la función renal reducida, en el que dicha función renal reducida se induce o se mantiene o se agrava debido a una insuficiencia renal y en el que la insuficiencia renal es una insuficiencia renal aguda; es decir, en una realización preferida, la invención proporciona el uso de fosfatasa alcalina (FAL) en la fabricación de un medicamento para tratar la función renal reducida inducida o mantenida o agravada por la insuficiencia renal aguda (IRA).

La insuficiencia renal aguda puede estar presente además de la insuficiencia renal crónica. Esto se denomina insuficiencia renal aguda sobre crónica. La parte aguda de la insuficiencia renal aguda sobre crónica puede ser reversible y el objetivo del tratamiento es devolver al paciente a su función renal inicial, que se mide comúnmente por la creatinina sérica. En otra realización más, la invención proporciona, por tanto, el uso de la fosfatasa alcalina (FAL) en la fabricación de un medicamento para mejorar la función renal reducida, en el que dicha función renal se reduce (además) debido a una insuficiencia renal aguda sobre crónica.

En otra realización preferida más, la función renal reducida es reversible, es decir, la función renal se puede mejorar, al menos algo, mediante el tratamiento según la invención.

Como Agrawal y Swartz describen detalladamente (American Family Physician, 1 de abril de 2000, vol. 61, n.º 7, noticia de portada), la causa de la insuficiencia renal aguda se puede determinar mediante el uso de un enfoque por etapas. En base a este artículo, el experto podrá dividir fácilmente los pacientes en cualquiera de las 3 categorías de IRA, es decir, determinar si un paciente sufre IRA prerrenal, IRA intrínseca o IRA postrenal.

Por ejemplo, el diagnóstico de IRA intrínseca se determina, comúnmente, en base a los antecedentes y las observaciones físicas que la indiquen, la excreción fraccionada de sodio de más del 3 %, la osmolalidad ureica de 250 a 300 mOsm y el sedimento ureico activo. En la IRA aguda intrínseca, se daña el parénquima renal. El daño de las células tubulares conduce a ciertas observaciones microscópicas en la orina. La lesión del parénquima afecta a la reabsorción del sodio y genera los parámetros anteriormente descritos, tales como una excreción fraccionada del sodio de más del 3 por ciento y una osmolalidad de la orina isotónica de 250 a 300 mOsm. La insuficiencia renal

aguda intrínseca se divide en 4 categorías: enfermedad tubular, enfermedad glomerular, enfermedad vascular y enfermedad intersticial.

La necrosis tubular aguda es la causa más común de insuficiencia renal aguda intrínseca en los pacientes hospitalizados. Esta afección suele estar producida por isquemia o toxinas. En la necrosis tubular aguda isquémica, a diferencia de la insuficiencia renal aguda prerrenal, la tasa de filtración glomerular no mejora con la restauración del flujo sanguíneo renal. La necrosis tubular aguda isquémica suele ser reversible, pero si la isquemia es lo suficientemente grave como para provocar necrosis cortical, se puede producir insuficiencia renal irreversible. Los agentes de contraste y los antibióticos, especialmente los aminoglucósidos, son los agentes más frecuentemente asociados con la necrosis tubular aguda. La afección también puede estar causada por el pigmento de la mioglobina (rhabdomiólisis) o hemoglobina (hemólisis). La necrosis tubular aguda tiene tres fases. El daño renal, que se desarrolla durante la fase inicial y dura de horas a días. En la fase de mantenimiento, que dura de días a semanas, en la que la tasa de filtración glomerular alcanza su punto más bajo y la producción de orina está en su nivel más bajo. La fase de recuperación dura días, comenzando a menudo con diuresis de necrosis tubular postaguda. La hipovolemia producida como consecuencia de una sobreproducción de orina es un problema que ocurre durante esta fase. A pesar de la recuperación de la producción de orina, los pacientes pueden seguir teniendo dificultad con la uremia y la homeostasis de los electrolitos y el ácido, porque la función tubular no se recupera por completo. Está indicada una vigilancia diligente en todas las fases de la necrosis tubular aguda. Los pacientes con riesgo de necrosis tubular aguda incluyen aquellos que tienen diabetes, insuficiencia cardíaca congestiva o insuficiencia renal crónica. La necrosis tubular aguda se puede prevenir mediante el tratamiento temprano de los pacientes con causas reversibles de insuficiencia renal aguda prerrenal o isquémica, y manteniendo una hidratación adecuada en los pacientes que están recibiendo nefrotoxinas. Una vez que se desarrolla la necrosis tubular aguda, el tratamiento es de apoyo. Los fármacos tales como el manitol, los diuréticos de asa, la dopamina y los bloqueadores de los canales del calcio han potenciado con cierto éxito la diuresis en animales, pero no se han obtenido resultados similares en los seres humanos.

En una realización preferida, la invención proporciona el uso de la fosfatasa alcalina (FAL) en la fabricación de un medicamento para mejorar la función renal reducida, en el que dicha función renal se reduce debido a una insuficiencia renal, preferiblemente, insuficiencia renal aguda, y en el que dicha función renal reducida se induce o se mantiene o se agrava por una insuficiencia renal aguda intrínseca, preferiblemente, necrosis tubular aguda. Es decir, la invención también proporciona el uso de la fosfatasa alcalina (FAL) en la fabricación de un medicamento para tratar la necrosis tubular aguda.

La glomerulonefritis se caracteriza por hipertensión, proteinuria y hematuria. La glomerulonefritis comúnmente se describe como una inflamación de los glomérulos. De los muchos tipos de glomerulonefritis, la mayoría se asocia con la enfermedad renal crónica. En general, los dos tipos de glomerulonefritis que provocan insuficiencia renal aguda son glomerulonefritis rápidamente progresiva y glomerulonefritis proliferativa aguda. El último tipo se produce en pacientes con endocarditis bacteriana u otras afecciones postinfecciosas. La glomerulonefritis rápidamente progresiva puede ser un trastorno primario, o puede ser secundaria a la enfermedad sistémica. Una vez que se sospecha de esta afección, se debe buscar la enfermedad sistémica tratable mediante marcadores serológicos o biopsia renal. La función renal puede decrecer rápidamente en pacientes con glomerulonefritis rápidamente progresiva, pudiéndose desarrollar la enfermedad renal en fase terminal en días a semanas. Los pacientes con glomerulonefritis rápidamente progresiva normalmente se tratan con glucocorticoides y ciclofosfamida (Cytoxan). Se cree que el intercambio de plasma beneficiará a los pacientes con el síndrome de Goodpasture, pero no se ha probado que sea beneficioso en pacientes con otros tipos de glomerulonefritis.

Además, este tipo de IRA se puede tratar mediante el uso de fosfatasa alcalina y, por tanto, en una realización preferida, la invención proporciona el uso de fosfatasa alcalina (FAL) en la fabricación de un medicamento para mejorar la función renal reducida, en el que dicha función renal se reduce debido a una insuficiencia renal, preferiblemente, una insuficiencia renal aguda, y en el que la función renal reducida se induce o se mantiene o se agrava por la insuficiencia renal aguda intrínseca, preferiblemente, glomerulonefritis. Es decir, la invención también proporciona el uso de la fosfatasa alcalina (FAL) en la fabricación de un medicamento para tratar la glomerulonefritis.

La insuficiencia renal, en general, y la insuficiencia renal aguda, en concreto, pueden evolucionar por diferentes causalidades subyacentes o en el curso de diversas enfermedades tales como la isquemia, los pigmentos de agentes de contraste, lupus eritematoso sistémico, vasculitis de vasos pequeños, púrpura de Henoch-Schönlein, síndrome de Goodpasture, endocarditis, infección postestreptocócica, infección postneumocócica, diabetes, hipertensión, aterosclerosis o cáncer. También se sabe que el uso de ciertos agentes antimicrobianos (tales como anfotericina B, caspofungina, vancomicina, levofloxacina y aminoglucósidos tales como tobramicina y gentamicina), otros fármacos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, metotrexato), inhibidores de proteasa (tales como indinavir y ritonavir), oro, litio, fármacos antiinflamatorios (tales como los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus), los medicamentos para la presión arterial (como los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) y los bloqueadores de los receptores

de angiotensina (BRA)) y ciertos productos químicos (tales como silicatos, hidrocarburos, metales pesados (tales como Cd, Hg, Pb), insecticidas, herbicidas, etilenglicol y toxinas bacterianas (tales como el tétanos, toxinas estreptocócicas)) provocan una función renal reducida en sujetos que han tomado o se han expuesto a dichos agentes o productos químicos.

5 La presente invención se puede usar para tratar la función renal reducida inducida o mantenida o agravada por cualquiera de las causalidades anteriormente mencionadas. Por consiguiente, en una realización preferida, la invención proporciona el uso de fosfatasa alcalina (FAL) en la fabricación de un medicamento para mejorar la función renal reducida, en el que dicha función renal se reduce debido a una insuficiencia renal y en el que dicha función renal reducida se induce o se mantiene o se agrava por a un medicamento, un fármaco y/o una toxina, 10 preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en antibióticos, inhibidores de proteasa, agentes quimioterapéuticos, agentes antiinflamatorios, medicamentos para la presión arterial, insecticidas, herbicidas, etilenglicol, colorantes de contraste, metales pesados y toxinas bacterianas.

En otra realización preferida más, la invención proporciona el uso de la fosfatasa alcalina (FAL) en la fabricación de un medicamento para mejorar la función renal reducida, en el que la mejora de la función renal obtenida no se produce como consecuencia de la desintoxicación de LPS por parte de la FAL. En una realización aún más preferida, 15 la invención proporciona el uso de la fosfatasa alcalina (FAL) en la fabricación de un medicamento para mejorar la función renal reducida, en el que dicha función renal se reduce debido a una insuficiencia renal, y en el que dicha función renal reducida se induce o se mantiene o se agrava por la disminución del flujo sanguíneo renal y/o isquemia. Dicha disminución del flujo sanguíneo renal y/o isquemia, preferiblemente, se induce o mantiene o agrava 20 debido a deshidratación, insuficiencia cardíaca, choque séptico, pérdida grave de sangre, hipertensión, aterosclerosis y/o trombosis. En otra realización preferida más, la invención proporciona el uso de la fosfatasa alcalina (FAL) en la fabricación de un medicamento para mejorar la función renal reducida, en el que dicha función renal disminuye debido a una insuficiencia renal y en el que dicha función renal reducida se induce o se mantiene o se agrava por la disminución del flujo sanguíneo renal y/o isquemia, en el que dicha disminución del flujo sanguíneo renal y/o 25 isquemia, preferiblemente, se induce o se mantiene o se agrava por un medicamento o fármaco o toxina, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en agentes antiinflamatorios (más preferiblemente, fármacos antiinflamatorios no esteroideos) y medicamentos para la presión arterial (lo más preferiblemente, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) y/o bloqueadores del receptor de la angiotensina (BRA))

También se revela el uso de la fosfatasa alcalina (FAL) en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la 30 función renal reducida producida como consecuencia del aumento de la expresión de la NO sintasa inducible (iNOS) (renal). Tal tratamiento es muy útil en el tratamiento del denominado daño o insuficiencia renal temprana y, por lo tanto, se puede usar, por ejemplo, para tratar o prevenir la nefropatía temprana. Las personas en necesidad de tal tratamiento se pueden identificar fácilmente mediante la determinación de la cantidad de iNOS y comparando el valor obtenido con un nivel medio. Mediante la administración de una cantidad eficaz de fosfatasa alcalina a una persona 35 diagnosticada con daño o insuficiencia renal temprana, se reduce la cantidad de iNOS renal. Los presentes inventores han determinado que el tratamiento con fosfatasa alcalina produjo una atenuación del aumento de la expresión de ARNm de iNOS en células renales, generando una reducción de la excreción urinaria de metabolitos de NO. El tratamiento con FAL mejora las respuestas inflamatorias, produciendo una reducción de la inducción de la expresión de iNOS renal, lo que conduce a una atenuación de la producción de metabolitos de NO y a un menor 40 daño tubular proximal.

La insuficiencia renal, generalmente, está acompañada de un daño estructural de las células renales que se secretan en la orina. El aislamiento de estas células de una muestra de orina y el posterior análisis de la síntesis de ARN proporciona una útil herramienta de control de la función renal, del daño del riñón y, con el tiempo, la inversión del 45 daño. En el ejemplo 1, la expresión de ARNm de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en las células renales secretadas en la orina se usa como marcador de la insuficiencia renal y, por lo tanto, se podría usar para controlar el daño y la inversión del daño gracias a un tratamiento con FAL. El mecanismo subyacente del daño es la inducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) por la iNOS, dando lugar a fugas del riñón. La reducción de la inducción de ERO a través de la infrarregulación de la iNOS se puede controlar mediante el uso de este procedimiento.

Por lo tanto, se revela el uso de la FAL en la preparación de un medicamento para mejorar la función renal reducida, 50 que comprende además el análisis de la presencia o la ausencia de una molécula de ARN en una muestra de orina. Preferiblemente, dicha molécula de ARN es una molécula de ARNm. Incluso más preferiblemente, dicha molécula de ARNm es ARNm de iNOS. Lo más preferible es que dicho ARN se obtenga de células renales secretadas en la orina.

La invención usa la fosfatasa alcalina (FAL) para mejorar una reducción (o una afección) de la función renal.

55 La fosfatasa alcalina (FAL); EC 3.1.3.1 según la nomenclatura de enzimas IUBMB, cuyo nombre común es fosfatasa alcalina (FAL), es una enzima que cataliza la reacción de un monoéster de fosfatasa y H₂O en un alcohol y fosfato. Otro/s nombre/s de la FAL son fosfomonoesterasa alcalina; fosfomonoesterasa; glucerofosfatasa; fosfohidrolasa

alcalina; fenilfosfatasa alcalina; ortofosfórico monoéster fosfohidrolasa (óptimo alcalino). El nombre sistemático de la FAL es fosfato monoéster fosfohidrolasa (óptimo alcalino).

La FAL es una enzima de amplia especificidad; también cataliza las transfosforilaciones. En los seres humanos y otros mamíferos, se conocen al menos cuatro fosfatasa alcalinas distintas, pero relacionadas. Éstas son la fosfatasa alcalina intestinal, placentaria, de tipo placenta y hepática/ósea/renal (o no específica del tejido). Las tres primeras se encuentran juntas en el cromosoma 2, mientras que la forma no es específica del tejido está ubicada en el cromosoma 1. Se desconocen las funciones fisiológicas exactas de las FAL, pero la FAL parece estar implicada en un gran número de procesos fisiológicos.

Una fuente de FAL puede ser una enzima FAL comercial o cualquier composición que comprenda la enzima FAL y cualquier medio que sea capaz de producir una enzima FAL funcional en el contexto de la presente invención, tal como ácidos nucleicos ADN o ARN que codifiquen una proteína FAL. El ácido nucleico que codifica la FAL se puede incorporar a vectores adecuados tales como plásmidos, fagémidos, fagos, (retro)virus, transposones, vectores de terapia génica y otros vectores capaces de inducir o conferir la producción de la FAL. También se pueden aplicar como fuente de la FAL en el contexto de la presente invención microorganismos nativos o recombinantes tales como bacterias, hongos, protozoos y levaduras.

Las composiciones que contienen FAL para su uso según la presente invención comprenden preferiblemente una FAL eucariota, más preferiblemente, una FAL de mamífero, que puede ser del tipo de FAL no específica del tejido, tal como de tipo hepático-óseo o renal, o específica del tejido, tal como la FAL placentaria, FAL intestinal y la FAL de tipo placenta. Esta última, también conocida como FAL de células germinales, se encuentra en los testículos, el timo y ciertos tumores de células germinales (1) y está estrechamente relacionada con las formas de fosfatasa alcalina tanto placentaria como intestinal (2). El experto está perfectamente capacitado para buscar en bancos de ácidos nucleicos y seleccionar una secuencia que codifique la fosfatasa alcalina. Lo más preferible es que la FAL de mamífero sea una FAL humana o bovina. Por consiguiente, en una realización preferida, la invención proporciona el uso de la fosfatasa alcalina (FAL) según la invención, en el que dicha FAL es FAL de mamífero e, incluso más preferiblemente, en el que dicha FAL es FAL humana. Los ejemplos no restrictivos de una secuencia de FAL humana se pueden encontrar en la colección del NCBI (Genpept) e incluyen: NP_001622 (FAL intestinal), NP_001623 (FAL placentaria), NP_112603 (FAL de tipo placenta) o NP_000469 (FAL no específica del tejido). La invención también comprende el uso de un polimorfismo de cualquiera de dichas secuencias. En otra realización preferida más, dicha FAL es FAL placentaria, FAL de tipo placenta, FAL intestinal o FAL hepática/ósea/renal.

En otra realización preferida más, la invención proporciona el uso de la FAL según la invención, en el que dicha FAL es FAL recombinante.

Desde un punto de vista de la configuración, una fosfatasa alcalina consiste aproximadamente en dos dominios: un dominio de corona y un dominio de sitio activo. El dominio de sitio activo se puede dividir en partes separadas, como el residuo catalítico y los tres sitios de iones metálicos (Zn1, Zn2 y Mg3). Desde un punto de vista de la estructura primaria, es evidente que el dominio de corona está flanqueado por los aminoácidos que forman el dominio del sitio activo. La secuencia de aminoácidos de las fosfatasas alcalinas y las posiciones relativas del dominio catalítico y del dominio de corona son conocidas por los expertos. Como ejemplo, se hace referencia a la Figura 10, que muestra, entre otras, la secuencia de aminoácidos de las cuatro fosfatasas alcalinas humanas. El dominio de corona está subrayado en estas secuencias.

Las fosfatasas alcalinas están presentes en casi todos los organismos, desde las bacterias hasta los seres humanos. En una realización preferida, la FAL es una fosfatasa alcalina aislada o recombinante que comprende un dominio de corona y un dominio catalítico, en la que dicho dominio de corona y dicho dominio catalítico se obtienen de diferentes fosfatasas alcalinas y la que al menos una de dichas diferentes fosfatasas es una fosfatasa humana. La otra fosfatasa es, por ejemplo, fosfatasa alcalina de *Escherichia coli* o una de las siete fosfatasas alcalinas intestinales bovinas conocidas. En una realización preferida, se usa una fosfatasa alcalina aislada o recombinante que comprende un dominio de corona y un dominio catalítico, en la que dicho dominio de corona y dicho dominio catalítico se obtienen de diferentes fosfatasas alcalinas y en la que las diferentes fosfatasas alcalinas son fosfatasas humanas. Ésta es especialmente útil si la fosfatasa modificada se usa posteriormente en la terapia humana. Se espera que tales fosfatasas modificadas (genéticamente) de origen humano no sean o sean muy poco inmunógenas. Sin embargo, es evidente para los expertos que si se usa una fosfatasa modificada, por ejemplo, en diagnósticos "*in vitro*" o "*ex vivo*", ésta puede estar compuesta, por ejemplo, de una fosfatasa alcalina humana y una de *E. coli* o puede estar compuesta de una fosfatasa alcalina bovina o una de *E. coli*.

En otra realización preferida más, la FAL es una fosfatasa alcalina aislada o recombinante que comprende un dominio de corona y un dominio catalítico, en la que dicho dominio de corona y dicho dominio catalítico se obtienen de diferentes fosfatasas alcalinas y en la que dicho dominio de corona es el dominio de corona de la FAL placentaria (ALPP) y en la que dicho dominio catalítico es el dominio catalítico de la FAL intestinal (ALPI). Preferiblemente, al menos una de dichas fosfatasas diferentes es una fosfatasa humana y, en una realización aún más preferida, ambas

fosfatasa diferentes son fosfatasa humanas.

Otras mutantes preferidas con el dominio cambiado que se basan en las fosfatasa alcalinas humanas son:

Dominio catalítico	Dominio de corona	Denominada
ALPI	GCAP	catALPI/crownGCAP
	TNAP	catALPI/crownTNAP
ALPP	GCAP	catALPP/crownGCAP
	TNAP	catALPP/crownTNAP
GCAP	ALPI	catGCAP/crownALPI
	ALPP	catGCAP/crownALPP
	TNAP	catGCAP/crownTNAP
TNAP	ALPI	catTNAP/crownALPI
	ALPP	catTNAP/crownALPP
	GCAP	catTNAP/crownGCAP

5 En aras de la claridad, ALPI es FAL intestinal, ALPP es FAL placentaria, GCAP es FAL de tipo placenta y TNAP es FAL no específica del tejido.

Es evidente que también se pueden hacer combinaciones entre el dominio catalítico de la fosfatasa alcalina de *Escherichia coli* o cualquiera de las formas humanas (ALPI, ALPP, GCAP o TNAP) con el dominio de corona de una fosfatasa alcalina intestinal bovina. Además, también se pueden producir combinaciones del dominio de corona de una fosfatasa alcalina intestinal bovina con el dominio catalítico de la fosfatasa alcalina de *Escherichia coli* o cualquiera de las formas humanas.

Otra clase de fosfatasa modificadas útiles son fosfatasa que en condiciones naturales están ligadas a la membrana de una célula a través de un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI), pero que ahora están modificadas de modo que ya no están unidas a la membrana de una célula. Los ejemplos de fosfatasa que están ancladas a través de GPI son la fosfatasa alcalina y la 5'-nucleotidasa. Todas las isoenzimas son funcionalmente activas en la membrana celular y las formas deficientes en el anclaje GPI no se encuentran presentes de forma natural a niveles detectables. Aunque se ha demostrado la actividad de la fosfatasa alcalina en suero, en general, se acepta que la enzima sigue estando presente en las fracciones de membrana o vesículas de membrana desprendidas. La actividad de la FAL en la leche también está presente en las fracciones que contienen vesículas de membrana. El anclaje GPI se almacena como una molécula precursora en la célula en la que está unida al sitio de unión a través de una transamidasa. La estructura central del anclaje GPI es idéntica en los mamíferos, pero se conocen modificaciones en función del tipo de célula.

Las fosfatasa alcalinas se encuentran predominantemente en asociación con membranas plasmáticas a través de su anclaje GPI. Por ejemplo, los neutrófilos presentan la enzima contra el fondo de su membrana celular con carga negativa en vez de liberarla en el microambiente inflamatorio. Por esta razón, antes de la presente invención, se reconocía en general que para una actividad *in vivo* óptima de FAL, la encima debía estar dentro de una membrana celular o una membrana vesicular.

Para un uso farmacéutico de la FAL en sujetos humanos, se prefiere, para la mayoría de aplicaciones, aplicar formas humanas de la enzima a medicamentos y tratamiento, pues las formas de FAL obtenidas de otras especies pueden ser inmunógenas en seres humanos y el tratamiento podría provocar reacciones inmunológicas y efectos secundarios patológicos. En algunos sujetos, se pueden producir incluso efectos secundarios letales, es decir, se puede generar un choque anafiláctico (mostrado en los estudios con animales de los presentes inventores), por tanto, es preferible minimizar los riesgos de sufrir efectos secundarios inmunológicos. Como, en la práctica, resulta inviable el aislamiento de la FAL de los seres humanos, se pueden producir de la manera habitual formas recombinantes humanas de las proteínas FAL en diferentes plataformas de expresión recombinantes. Sin embargo, la expresión y la purificación de proteínas modificadas en cuanto al GPI y ancladas a la membrana es muy difícil; las proteínas GPI son difíciles de separar de las membranas, y difíciles de aislar y purificar. No obstante, antes de la presente invención, el anclaje GPI y la localización de la membrana siempre se han considerado esenciales para la

actividad biológica de la FAL.

Sin embargo, en una de las realizaciones de la presente invención, la FAL es una fosfatasa aislada o recombinante que comprende una modificación en la secuencia señal de glicosilfosfatidilinositol (GPI), en la que dicha modificación provoca una fosfatasa secretada, es decir, la fosfatasa no está unida a la membrana celular.

- 5 En una realización preferida, se usa una fosfatasa aislada o recombinante que comprende una modificación en la secuencia señal de glicosilfosfatidilinositol (GPI), en la que dicha modificación provoca una fosfatasa secretada que es biológicamente activa, es decir, muestra una actividad hacia un (determinado) sustrato biológico.

No hay ninguna secuencia general responsable de la unión de un anclaje GPI, pero existe un consenso claro:

- 10 1) tramo hidrófobo de aminoácidos en el extremo C-terminal (al menos 11 aminoácidos, pero preferiblemente más de 11 aminoácidos);
- 2) secuencia arriba de la región hidrófoba, un espaciador de aminoácidos hidrófilos (5-12 aminoácidos);
- 3) el GPI está unido a un aminoácido pequeño: glicina, ácido aspártico, asparagina, alanina, serina o cisteína;
- 4) los 2 aminoácidos posteriores secuencia abajo del sitio de unión de GPI deben ser aminoácidos pequeños y en la mayoría de los casos se seleccionan entre glicina, ácido aspártico, asparagina, alanina, serina o cisteína.

- 15 Basándose en este consenso, el experto en la técnica es capaz de mutar este consenso, por ejemplo, mediante la inserción de uno o múltiples aminoácidos y la alteración de parte del consenso. Sin embargo, en una realización preferida, se usa una fosfatasa aislada o recombinante que comprende una modificación en la secuencia señal de glicosilfosfatidilinositol (GPI), en la que dicha modificación produce una fosfatasa secretada y en la que dicha modificación comprende una mutación o una delección de la secuencia de aminoácidos que abarca la secuencia señal de GPI consenso.

- 20 Para aplicaciones en terapia humana, se desea que la fosfatasa modificada resultante no sea o sea muy poco inmunógena, es decir, que la fosfatasa modificada sea esencialmente de origen humano. En una realización preferida, la FAL es una fosfatasa aislada o recombinante que comprende una modificación en la secuencia señal de glicosilfosfatidilinositol (GPI), en la que dicha modificación produce una fosfatasa secretada (preferiblemente, con actividad contra un determinado sustrato biológico) y en la que dicha fosfatasa es una fosfatasa humana.

- 30 Ejemplos de fosfatasas que tienen anclaje GPI son la fosfatasa alcalina y la 5'-nucleotidasa, y por lo tanto, en una realización preferida, se usa una fosfatasa aislada o recombinante que comprende una modificación en la secuencia señal de glicosilfosfatidilinositol (GPI), en la que dicha modificación produce una fosfatasa secretada y en la que dicha fosfatasa es una fosfatasa alcalina, por ejemplo, una fosfatasa alcalina humana tal como, por ejemplo, fosfatasa hepática-renal-ósea humana, fosfatasa alcalina intestinal humana o fosfatasa alcalina de tipo placenta humana.

- 35 Es evidente que cualquiera de las fosfatasas modificadas secretables descritas se pueden producir, por ejemplo, mediante la introducción en una célula huésped de un ácido nucleico capaz de codificar dicha fosfatasa secretable, preferiblemente, unida operativamente a secuencias reguladoras, y permitiendo que dicha célula huésped exprese dicha fosfatasa secretable y, opcionalmente, mediante el aislamiento de la fosfatasa producida del medio en el que se cultiva y/o se mantiene la célula huésped. Sin embargo, aparte de las mutaciones de la secuencia con unión GPI mencionada anteriormente, existen otros procedimientos que producen proteínas secretadas sin anclaje GPI:

- 1) Tras la expresión como proteínas ancladas a la membrana, se pueden usar fosfolipasas para escindir el anclaje GPI.
- 40 2) La interferencia en la producción del anclaje GPI o el uso de una célula (tipo de célula) que sea deficiente en la producción de anclaje GPI también se pueden usar para crear una forma secretable de una proteína anclada a GPI de otra manera. Los ejemplos de líneas celulares que se han creado para que sean deficientes en la bioquímica del anclaje GPI son, por ejemplo Jurkat, AM-B, C84, BW, S49, CHO y Raji.
- 45 3) La interferencia en o el uso de una célula deficiente en transamidasa se puede usar para inhibir la unión de un anclaje GPI a la proteína, haciendo que la proteína carezca de anclaje y sea secretable. Dicha célula deficiente se ha obtenido mediante mutagénesis en células CHO.

- 50 Es evidente para los expertos en la técnica que se puede modificar más y convertir en secretable una fosfatasa modificada que comprende un dominio de corona y un dominio catalítico, en la que dicho dominio de corona y dicho dominio catalítico se obtienen de diferentes fosfatasas alcalinas. Por lo tanto, en una realización preferida, la FAL es una fosfatasa aislada o recombinante que comprende una modificación en la secuencia señal de glicosilfosfatidilinositol (GPI), en la que dicha modificación produce una fosfatasa secretada y en la que dicha

fosfatasa recombinante comprende además un dominio de corona y un dominio catalítico que se obtienen de diferentes fosfatasas. En la Figura 10, se proporcionan ejemplos no restrictivos de tales fosfatasa (alcalinas) mutantes. Tal mutante combinada o "doble" produce, por ejemplo, una fosfatasa modificada con una cierta actividad específica, estabilidad o especificidad de sustrato y, al mismo tiempo, la producción de tal producto es mucho mayor por el hecho de que puede ser aislado del medio que rodea las células productoras.

La FAL se puede administrar por diferentes vías, por ejemplo, intravenosa, rectal, bronquial u oral.

En una realización preferida, la vía de administración usada es la intravenosa. Es evidente para el experto en la técnica que, preferiblemente, se administra una cantidad eficaz de FAL. Como punto de partida, se pueden usar 10-500 U/Kg /día. Si se usa la vía de administración intravenosa, la FAL (al menos durante un cierto periodo de tiempo) se aplica, preferiblemente, mediante una infusión continua.

Se revelan composiciones que comprenden una fuente de FAL, entre las que hay composiciones farmacéuticas y nutracéuticas que comprenden una fuente de FAL. Las composiciones pueden comprender opcionalmente excipientes farmacéuticamente aceptables, estabilizantes, activadores, vehículos, permeadores, propulsores, desinfectantes, diluyentes y conservantes. Los excipientes adecuados son comúnmente conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica, y los expertos en la técnica los pueden encontrar y aplicar fácilmente en referencias como, por ejemplo, "Remington Pharmaceutical Sciences", Mace Publishing Company, Filadelfia, PA., XVII ed. 1985. Preferiblemente, las composiciones que comprenden una fuente de FAL son adecuadas para la administración oral y comprenden una cubierta entérica para proteger la FAL de los efectos adversos de los jugos gástricos y un pH bajo. La cubierta entérica y las formulaciones de liberación controlada son bien conocidas en la técnica (referencias descritas anteriormente). Las composiciones de las cubiertas entéricas de la técnica pueden estar compuestas de una solución de un polímero de recubrimiento entérico hidrosoluble mezclado con el/los ingrediente/s activo/s tales como la FAL y otros excipientes, que están dispersos en una solución acuosa y que posteriormente se pueden secar y/o sedimentar. La cubierta entérica formada ofrece resistencia a la FAL contra el ataque de la humedad atmosférica y el oxígeno durante el almacenamiento, así como de los fluidos gástricos y un bajo pH tras su ingestión, mientras que se descompone fácilmente en las condiciones alcalinas que existen en el tracto intestinal inferior.

Se proporciona a un sujeto (preferiblemente, un ser humano) una cantidad eficaz de FAL por cualquier vía de administración adecuada y con la FAL en cualquier forma apropiada. Preferiblemente, los parámetros indicativos de la función renal se determinan antes de la administración de la FAL y después de la administración de la FAL, lo que permite determinar si el tratamiento es exitoso. La administración de dosis adicionales se repite tantas veces como sea necesario, preferiblemente, hasta que los parámetros de la función renal se consideran aceptables. Un ejemplo de un parámetro adecuado es la presencia o la ausencia de una molécula de ARN. Preferiblemente, dicha molécula de ARN es una molécula de ARNm. Incluso más preferiblemente, dicha molécula de ARNm es ARNm de iNOS. Lo más preferible es que dicho ARN se obtenga de células renales secretadas en la orina.

Otro modo preferido de administración comprende el uso de composiciones farmacéuticas que comprenden fuentes de FAL que se pueden administrar en una pauta de dosificación diaria durante un periodo de tiempo prolongado. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas comprenden una cubierta entérica para proteger la FAL de los efectos perjudiciales producidos por los jugos gástricos (pH 1,0 a 2,5) y garantizar la administración eficaz de la FAL.

En otra realización más, el uso de FAL en la preparación de un medicamento para mejorar la función renal reducida se combina con cualquier otra terapia (es decir, terapia de combinación). Otra terapia de este tipo también se dirige, por ejemplo, a mejorar la función renal. Los ejemplos de otras terapias dirigidas a mejorar la función renal se han descrito anteriormente. Ejemplos no restrictivos son el tratamiento con furosemida (Lasix), calcio o diálisis. Otros ejemplos de la terapia de combinación adecuada son el tratamiento con FAL y al menos un inhibidor de iNOS o un tratamiento con FAL y al menos un inhibidor de TNF α . Los compuestos activos se pueden administrar secuencialmente o al mismo tiempo.

En otra realización más, la invención proporciona FAL para un uso en el tratamiento de la función renal reducida, en el que dicha función renal se reduce como consecuencia de una insuficiencia renal. La FAL para su uso según la invención se puede extender más mediante la identificación de un sujeto que padezca función renal reducida. En una realización, la invención proporciona FAL para un uso en el tratamiento de la función renal reducida, en el que la mejora de la función renal obtenida no se debe a la desintoxicación de LPS por parte de la FAL.

Una realización proporciona FAL para un uso según la invención, en el que dicha función renal reducida se induce o se mantiene o se agrava por un medicamento o un fármaco y/o una toxina. Dicho medicamento, fármaco y/o toxina se selecciona, preferiblemente, del grupo que consiste de antibióticos, inhibidores de proteasa, agentes quimioterapéuticos, agentes antiinflamatorios, medicamentos para la presión arterial, insecticidas, herbicidas, etilenglicol, colorantes de contraste, metales pesados y toxinas bacterianas.

También se proporciona FAL para un uso según la invención, en el que dicha función renal reducida se induce o se

5 mantiene o se agrava debido a una insuficiencia renal aguda. Dicha función renal reducida, preferiblemente, se induce o se mantiene o se agrava por insuficiencia renal aguda intrínseca. En una realización, dicha insuficiencia renal aguda se induce o se mantiene o se agrava por un medicamento o un fármaco o una toxina, preferiblemente, seleccionado del grupo que consiste en aminoglucósidos, agentes quimioterapéuticos, colorantes de contraste, metales pesados y toxinas bacterianas.

10 También se proporciona una FAL para un uso según la invención, en el que dicha función renal reducida se induce o se mantiene o se agrava debido a una insuficiencia renal aguda intrínseca. Dicha insuficiencia renal aguda intrínseca es, preferiblemente, necrosis tubular aguda y/o glomerulonefritis. Preferiblemente, dicha necrosis tubular aguda y/o glomerulonefritis se induce o se mantiene o se agrava por un medicamento o un fármaco o una toxina, lo más preferiblemente, seleccionado del grupo que consiste en aminoglucósidos, agentes quimioterapéuticos, colorantes de contraste, metales pesados y toxinas bacterianas.

15 También se proporciona FAL para un uso según la invención, en el que dicha función renal reducida se induce o se mantiene o se agrava por la disminución del flujo sanguíneo renal y/o isquemia. Dicha disminución del flujo sanguíneo renal y/o isquemia, en una realización, se induce o se mantiene o se agrava por deshidratación, insuficiencia cardíaca, choque séptico, pérdida grave de sangre, hipertensión, aterosclerosis y/o trombosis. Preferiblemente, dicha reducción del flujo sanguíneo renal y/o isquemia se induce o se mantiene o se agrava por un medicamento o un fármaco o una toxina, lo más preferiblemente, seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

20 También se proporciona FAL para un uso según la invención, en el que dicha FAL es una FAL de mamífero, preferiblemente, una FAL humana. Más preferiblemente, la FAL es FAL placentaria, FAL de tipo placenta, FAL intestinal o FAL hepática/ósea/renal. Más preferiblemente, la FAL es recombinante.

La invención se explicará más detalladamente en los siguientes ejemplos no restrictivos.

Parte experimental

Materiales y procedimientos

Ejemplo 1- Efecto de la FAL en la función renal de pacientes con sepsis

Pacientes

Se asignaron al azar quince pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos con diagnóstico de función renal reducida a un tratamiento con FAL (2 FAL: 1 Placebo).

30 Se extrajeron sangre arterial y orina cateterizada en varios puntos temporales comprendidos entre las 0 y las 24 h posteriores a su inclusión en el estudio. Se registraron los volúmenes de orina y se congelaron las muestras para la determinación de los metabolitos de NO a -80 °C hasta que se emplearon para el ensayo como se describe anteriormente (6). La creatinina y la proteína se determinaron mediante la química clínica habitual.

Intervención

35 Se obtuvo fosfatasa alcalina intestinal bovina (FAL, AM-Pharma, Bunnik, Países Bajos) de la mucosa intestinal de ternero de < 6 meses de vida. Los pacientes que reunían los requisitos necesarios recibieron bien FAL o placebo (Tris-HCl 2,5mM, cloruro magnésico 2,5mM, cloruro de cinc 0,05mM, pH 7,3, con glicerol al 40 % como estabilizador) por vía intravenosa durante 24 h en una proporción de 2:1. Los pacientes asignados al azar al tratamiento con FAL recibieron una inyección de bolo inicial de 67,5 U/Kg de peso corporal administrada durante 10 minutos, seguida de una infusión continua de 132,5 U/Kg durante las 23 h y 50 minutos restantes.

Ensayos químicos

40 Se determinaron la cantidad total de metabolitos de NO estables, nitrato y nitrito como una medida de la producción de radicales de NO, usando la reacción de Griess, según Moshage *et al.* (18). Se diluyeron el plasma heparinizado y las muestras de orina por cuatro y por cuarenta con agua destilada, respectivamente. Se determinaron las cantidades de glutatión-S-transferasa A1-1 (GSTA1-1) y GSTP1-1 en orina para diferenciar entre una lesión de las células tubulares proximales y distales, y se analizaron por triplicado mediante ELISA como se ha descrito previamente (19, 20).

Determinación de la expresión del ARNm de iNOS

Se centrifugaron las muestras de orina a 700 g durante 10 minutos a 4 °C. Se aisló el ARN de los sedimentos celulares y se transcribió de forma inversa en ADNc según lo descrito anteriormente (6). Se amplificaron la iNOS humana y GAPDH con un ensayo de expresión génica previamente desarrollado proporcionado por Applied Biosystems (iNOS; Hs00167248_m1, GAPDH; Hs99999905_m1). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las cantidades de muestras se normalizaron con respecto a la expresión del gen constitutivo GAPDH.

Ejemplo 2- Efecto de la FAL en la insuficiencia renal inducida por gentamicina

Se evaluaron los efectos de la fosfatasa alcalina (FAL) en un modelo de nefrotoxicidad inducida por gentamicina en ratas Wistar. Se administró a los animales gentamicina a 120 mg/Kg por vía intramuscular durante siete días consecutivos. Se extrajeron muestras de orina durante las 24 horas del día 6 para medir el volumen de orina, los electrolitos (Na⁺, K⁺), la creatinina, la N-acetilglucosaminidasa (NAG) y las proteínas. Se extrajeron muestras de sangre en fase terminal el día 7; se midieron las concentraciones de creatinina sérica, el NUS y los electrolitos (Na⁺, K⁺). Se proporcionó a los grupos tratados con gentamicina (n = 8 por grupo) una inyección intravenosa lenta de vehículo o FAL (100 U/Kg), inmediatamente antes de la dosis diaria de la gentamicina, seguida de otra dosis cada 12 horas durante siete días consecutivos (total de 14 dosis de FAL = 1.400 U/Kg). Un grupo de control (n = 8) recibió una inyección intraperitoneal de solución salina fisiológica el día 0 e inyecciones intravenosas lentas de vehículo usando la misma pauta de dosificación de dos veces al día, según lo indicado para la FAL.

Ejemplo 3 - Efecto de la FAL sobre la insuficiencia renal inducida por cisplatino

Se evaluaron los efectos de la fosfatasa alcalina en la función renal de ratas Wistar macho tras una sola inyección intraperitoneal de cisplatino a 7,5 mg/Kg (indicado como el día 0). Se recogieron muestras de orina durante las 24 horas del día 2 y del día 5 para medir el volumen de orina, los electrolitos (Na⁺, K⁺), la creatinina y las proteínas. Se extrajeron muestras de sangre el día 3 y el día 6; se midieron las concentraciones de creatinina sérica, el NUS y los electrolitos (Na⁺, K⁺). Se administró a los grupos tratados con cisplatino (n = 8 por grupo) una inyección intravenosa lenta de vehículo o FAL (200 U/kg) 30 min antes de la prueba de provocación con el cisplatino, tras lo que se administró una segunda dosis 12 horas más tarde; la dosificación i.v. continuó el día 1 (x 2) y el día 2 (x 1) para un total de 5 dosis (dosis total de FAL de 1.000 U/Kg). Un grupo de control (n = 8) recibió una inyección intraperitoneal de solución salina fisiológica el día 0 e inyecciones intravenosas lentas de vehículo usando la misma pauta de dosificación de dos veces al día, según lo indicado para la FAL.

Ejemplo 4 - Efecto de la FAL en pacientes de sepsis con insuficiencia renal*Pacientes*

Se asignaron al azar treinta y seis pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos de ocho hospitales independientes, con diagnóstico de sepsis a un tratamiento con FAL (2 FAL: 1 Placebo). Se extrajeron sangre arterial y la orina cateterizada en varios puntos temporales comprendidos entre las 0 y las 48 h posteriores a su inclusión en el estudio. Los grupos tratados con verum y placebo se analizaron en conjunto o como subgrupos limitados a los pacientes que presentaban insuficiencia renal, definida como creatinina sérica > 150 µmol/l al inicio del estudio, o que ya estaban en tratamiento renal sustitutivo. Se analizaron la creatinina sérica (mediante la química clínica habitual), la mortalidad y la necesidad de terapia renal sustitutiva de los grupos.

Intervención

Se obtuvo fosfatasa alcalina intestinal bovina (FAL, AM-Pharma, Bunnik, Países Bajos) de la mucosa intestinal de ternero de < 6 meses de vida. Los pacientes que reunían los requisitos necesarios recibieron FAL o placebo (Tris-HCl 2,5mM, cloruro magnésico 2,5mM, cloruro de cinc 0,05mM, pH 7,3, con glicerol al 40 % como estabilizador) por vía intravenosa durante 24 h en una proporción de 2:1. Los pacientes asignados al azar al tratamiento con FAL recibieron una inyección de bolo inicial de 67,5 U/Kg de peso corporal administrada durante 10 minutos, seguida de una infusión continua de 132,5 U/Kg durante las 23 h y 50 minutos restantes.

Otros ejemplos de modelos adecuados que se pueden usar para demostrar mejor la eficacia de la fosfatasa alcalina en el tratamiento de la función renal reducida son:

(1) Insuficiencia renal aguda inducida por endotoxina en ratas (*J. Nephrol.* 2005, 18: 374-381)

Se puede producir una insuficiencia renal aguda en ratas hembra Sprague-Dawley mediante una inyección intravenosa de LPS (1 mg/Kg de O111:B4 de *E. coli*, Sigma, Alemania). Este modelo se caracteriza por una reducción de la tasa de filtración glomerular, una reducción de la presión arterial y un aumento de la excreción de NOx.

(2) Modelo Anti-Thy-1.1 de glomerulonefritis proliferativa mesangial experimental

Como se describe en Jefferson *et al.* (*J. Nephrol* 1999; 12: 297-307), se puede producir suero de timocitos de cabra anti-rata mediante inmunizaciones repetidas de una cabra con timocitos de rata Lewis (2×10^8 células por inyección). Se extrae suero después de la segunda y la tercera inyección, se combinan y se obtiene una fracción enriquecida en IgG mediante un procedimiento de ácido caprílico. Seguidamente, se usa una sola dosis intravenosa de 20 mg por 100 g de peso corporal para inducir la enfermedad en ratas Wistar macho de 180-230 g.

(3) Glomerulonefritis inducida por cadmio

Las ratas, intoxicadas mediante una inyección i.p. diaria durante 5 días con $500 \mu\text{g Cd}^{2+}$ por kg al día y dejadas después sin tratamiento durante 15 días muestran una reducción de la tasa de filtración glomerular según lo descrito en Jacquillet *et al.* (*Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2006, 290: 127-137). 2 0 06 ; 290: 127-137).

En estos modelos experimentales, la fosfatasa alcalina se administra por vía intravenosa con el fin de prevenir, retrasar, detener o invertir el proceso patológico. La fosfatasa alcalina se puede administrar antes de la inducción de la enfermedad, o antes o después del establecimiento de la enfermedad. La fosfatasa alcalina se puede administrar sólo una vez o, durante el establecimiento de la enfermedad, la fosfatasa alcalina se puede administrar varias veces o en forma de una infusión continua. La fosfatasa alcalina se administrará, por ejemplo, en el intervalo de dosis de 10 U/Kg/día a 500 U/Kg/día.

Los parámetros que miden la eficacia se pueden seleccionar, pero sin limitación, entre los siguientes: los parámetros inflamatorios (infiltración, estado de activación de leucocitos y macrófagos, producción de citocinas, activación de complementos), estrés oxidativo (producción de H_2O_2 , contenido de mieloperóxidos en el riñón, inducción de iNOS, producción de NOx, etc.), daño renal (disposición de anticuerpos, coagulación, histología) y análisis químicos de la sangre, por ejemplo, los niveles de creatinina.

Resultados**Ejemplo 1- Efecto de la FAL sobre la función renal de pacientes con sepsis****Pacientes**

Se asignaron al azar quince pacientes (FAL, $n = 10$; placebo, $n = 5$) con función renal reducida durante un período de quince meses.

La FAL atenúa la inducción renal de iNOS

Se usó una Q-PCR (RT-PCR cuantitativa) para determinar los niveles de ARNm de iNOS de los sedimentos celulares que se aislaron de muestras de orina al inicio del estudio y en tres puntos temporales separados durante las primeras 24 h posteriores a la intervención. Se normalizó la expresión relativa de iNOS en voluntarios sanos de control ($n = 4$, no se muestran los datos) para el valor umbral de ciclo medio (C_T) del gen constitutivo GAPDH ($C_T = 23,6 \pm 0,3$, C_T delta = $12,1 \pm 0,1$) y se fijó en 1 según lo descrito anteriormente (6). La expresión de iNOS se indujo 42 veces más en este grupo de pacientes en comparación con los controles, y la administración de FAL redujo esta inducción en un $80 \pm 5 \%$ en las primeras 24 h. Por el contrario, los pacientes tratados con placebo tuvieron un mayor aumento de los niveles de iNOS durante las primeras 24 h posteriores a su inclusión en el estudio ($840 \pm 85 \%$, Fig. 1A) en comparación con los niveles iniciales.

Los metabolitos de NO en sangre no fueron significativamente diferentes entre los pacientes tratados con FAL y placebo (datos no mostrados). Sin embargo, la excreción urinaria de los metabolitos de NO disminuyó un 80% [-85 a -75] de 227 [166-531] al inicio del estudio a 41 [28-84] $\mu\text{mol}/10 \text{ mmol}$ de creatinina ($P < 0,05$) tras 24 h de la administración de la FAL. Tras el tratamiento con placebo, la cantidad de metabolitos de NO urinarios aumentó aún más en un 70% [45-570] (de 81 [64-419] a 628 [65-1479] $\mu\text{mol}/10 \text{ mmol}$ de creatinina, $P < 0,05$). Además, la excreción urinaria acumulada de los metabolitos de NO fue significativamente inferior en los pacientes tratados con FAL (figura 1B).

La FAL atenúa el daño renal

Ninguno de los pacientes requirió terapia renal sustitutiva durante los 28 días del periodo de seguimiento. Todos los pacientes mostraron un deterioro de la función renal con proteinuria leve como se muestra en la Tabla 1. Las primeras 24 horas, mejoró la depuración de la creatinina en plasma en un 45% [30-180] de los pacientes tratados con FAL y se deterioró en un 25% [-35 a -15] en los pacientes tratados con placebo, como se ilustra en la Tabla 1. Durante el periodo de seguimiento, disminuyeron significativamente los niveles medios de creatinina en plasma en los pacientes tratados con FAL, mientras que no se observó ningún cambio significativo en los pacientes tratados

con placebo (Tabla 1).

La excreción urinaria tanto de GSTA1-1 como de GSTP1-1 fue elevada en todos los pacientes, indicando un daño tubular proximal y distal, respectivamente. Durante las primeras 24 h, disminuyó la cantidad de GSTA1-1 en la orina de los pacientes tratados con FAL en un 70 % [-80 a -50] de 32,7 [11,5-131,1] a 6,5 [5,4-15,7] $\mu\text{g}/10 \text{ mmol}$ de creatinina ($P < 0,05$) en comparación con un aumento de un 200 % [45-525] en los pacientes tratados con placebo (de 26,9 [15,2-32,8] a 38,9 [33,0-205,8] $P < 0,05$). El excreción urinaria acumulada de GSTA1-1A fue significativamente menor en los pacientes tratados con FAL (Fig. 1C). Por otra parte, la excreción urinaria de GSTP1-1 tendió a aumentar levemente (de 22,7 [13,6-41,3] al inicio del estudio a 11,9 [8,5-82,5] $\mu\text{g}/10 \text{ mmol}$ de creatinina a las 24 h, $P = 0,072$) tras el tratamiento con FAL. Sin embargo, para la excreción urinaria acumulada de GSTP1-1 no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de tratamiento durante las primeras 24 horas del tratamiento (figura 1D).

Ejemplo 2- Efecto de la FAL en la insuficiencia renal inducida por gentamicina

La gentamicina a 120 mg/Kg x 7 provocó una insuficiencia renal grave en ratas manifestada por poliuria, proteinuria, la reducción de la excreción de electrolitos, el aumento de FE_{Na} , enzimuria (NAG), elevación de la creatinina sérica y del NUS, disminución de la depuración de la creatinina, una medida de tasa de filtración glomerular, y aumento del peso del riñón.

Las dos inyecciones diarias de FAL durante 7 días (100 U/Kg b.i.d. x 14), administrándose la primera dosis antes de la administración diaria de la gentamicina, provocó una reducción de la creatinina sérica (Fig. 2) y los niveles de NUS (Fig. 3), así como un aumento en la excreción de la creatinina en la orina (Fig. 4). Estas mejoras contribuyen al aumento de la depuración de la creatinina como resultado del tratamiento con FAL (Fig. 5). En este ejemplo, se muestra que la FAL, 100 U/kg b.i.d. IV x 7 tiene efectos protectores contra la nefrotoxicidad inducida por la gentamicina en ratas, con respecto a NUS, Sc_r , CC_p y UC_r .

Ejemplo 3 - Efecto de la FAL sobre la insuficiencia renal inducida por cisplatino

Los 7,5 mg/Kg i.p. de cisplatino provocaron la función renal reducida, como se refleja en los siguientes parámetros: poliuria, proteinuria, disminución de la excreción de electrolitos, elevación de la creatinina sérica y del NUS, y disminución de la depuración de la creatinina, una medida de la tasa de filtración glomerular.

En este ejemplo, se muestra que la FAL (200 U/Kg x 5 i.v.), protege contra la proteinuria inducida por cisplatino en ratas (Fig. 6), una medida del daño tubular en este modelo, y mejora la depuración de la creatinina endógena.

Ejemplo 4 - Efecto de la FAL en pacientes de sepsis con insuficiencia renal

Pacientes

Se asignaron al azar treinta y seis pacientes con sepsis a un tratamiento con placebo ($n = 11$) o FAL ($n = 25$), y se analizaron los niveles de creatinina en suero, la necesidad de terapia renal sustitutiva y la mortalidad. Además, se analizaron estos resultados en un subgrupo (placebo $n = 5$; FAL $n = 11$) que presentaba insuficiencia renal al inicio del estudio.

Creatinina sérica

Al inicio del estudio y a las 12 h, 24 h y 48 h después de la intervención, se midieron los niveles de creatinina sérica. La Figura 8 muestra que el grupo de pacientes con sepsis presenta niveles de creatinina sérica al inicio del estudio, que demuestran una función renal reducida. La Figura 8 también muestra que la FAL, pero no el tratamiento con placebo, es capaz de reducir los niveles de creatinina sérica en el plazo de las 48 horas posteriores al inicio del tratamiento. Este efecto se hace más notable (Fig. 9), si sólo se incluyen los pacientes que presentan insuficiencia renal (definida como creatinina sérica $> 150 \mu\text{mol/l}$, o que ya están en tratamiento renal sustitutivo al inicio del estudio). Por tanto, se concluye que, en este ejemplo, la FAL es capaz de mejorar la función renal en pacientes con sepsis y que el efecto es más notable en los pacientes de sepsis que presentan insuficiencia renal.

Terapia renal sustitutiva

La Tabla II muestra que de todos los pacientes incluidos en el estudio, el 36 % requiere terapia renal sustitutiva (diálisis) durante el tratamiento con placebo, mientras que el 24 % de los pacientes tratados con FAL necesitó tal tratamiento. De los pacientes que ya presentaban insuficiencia renal al inicio del estudio, estos porcentajes fueron del 80 y del 27 %, respectivamente. Por lo tanto, los datos presentados en este ejemplo muestran que el tratamiento con FAL es capaz de reducir la necesidad de diálisis en los pacientes con sepsis que presentan insuficiencia renal.

Mortalidad

Durante el período de observación de 90 días, la mortalidad por todas las causas de la población estudiada fue del 28 % (Tabla II). Hubo una ligera ventaja (24 % de la mortalidad) en la mortalidad tratada con FAL frente a la tratada con placebo (36 %). Sin embargo, en la sepsis, la insuficiencia renal es la insuficiencia orgánica terminal más común, representada en este estudio por la mayor mortalidad en el subgrupo que presentaba insuficiencia renal (36 % en el grupo de insuficiencia renal frente al 28 % de todos los pacientes). Curiosamente, el efecto de la FAL en la reducción de la mortalidad en el grupo de insuficiencia renal (60 % en el grupo de placebo frente al 27 % en el grupo tratado con FAL) fue mucho más potente.

En este ejemplo, se muestra que el tratamiento con FAL (200 U/Kg/24 h) mejora la función renal en pacientes con sepsis que presentan una función renal reducida, lo que reduce la mortalidad y la necesidad de una terapia renal sustitutiva.

Tabla 1: Función renal

Parámetro de la función renal	Duración	FAL (n = 10)	Placebo (n = 5)
Volumen de orina total (ml)	0-24 h	1.876 (940-2.227)	1.470 (1.115-2.775)
Excreción de proteína (mg/día)	0-24 h	454 (323-533)	447 (414-769)
Depuración de la creatinina (ml/min)	Inicio del estudio	54 (24-84)	80 (77-91)
	24 h	76 (25-101) *	59 (45-59)
Creatinina sérica ($\mu\text{mol/l}$)	Inicio del estudio	91 (73-138)	99 (86-114)
	1 día	83 (58-135) ##	125 (71-129)
	7 días	70 (60-90) ##	106 (73-141)

Los datos se expresan como la mediana (intervalo del 25-75 %). Significativamente diferentes en comparación con el grupo de placebo, * $P < 0,05$, o en comparación con el inicio del estudio, $P < 0,01$.

Tabla II: Mortalidad y terapia de renal sustitutiva

	n de placebo (%)	n activos (%)	n total (%)
Todos los pacientes	11 (31)	25 (69)	36 (100)
Mortalidad	4 (36)	6 (24)	10 (28)
TRS necesaria	4 (36)	6 (24)	10 (28)
Sepsis con insuficiencia renal*	5 (45)	11 (44)	16 (44)
Mortalidad	3 (60)	3 (27)	6 (38)
TRS necesaria	4 (80)	3 (27)	7 (44)
TRS: Terapia Renal Sustitutiva			
* Creatinina sérica $\geq 150 \mu\text{mol/l}$ al inicio del estudio O ya con TRS al inicio del estudio			

Descripción de las figuras

Figura 1. Expresión de iNOS renal y excreción urinaria de NO y GST. (A) Se da la expresión de ARNm de iNOS para los pacientes tratados con placebo (barras abiertas, $n = 4$) y los tratados con FAL (barras cerradas, $n = 8$). Se normalizó la expresión relativa del ARNm de iNOS en voluntarios sanos de control (datos no mostrados) para el valor umbral de ciclo medio (C_T) del gen constitutivo GAPDH ($C_T = 23,6 \pm 0,3$, C_T delta = $12,1 \pm 0,1$) y se fijó en 1. Se midieron los niveles de (B) metabolitos de NO; de (C) GSTA1-1 y de (D) GSTP1-1 en orina en diferentes momentos después de la intervención en los pacientes tratados con placebo (Δ , $n = 5$) y con FAL (\blacksquare , $n = 10$). Se

corrigió la excreción urinaria de metabolitos de NO y GST para la excreción de creatinina y se analizaron mediante ANOVA con medidas repetidas en la curva completa. (A) Los datos se expresan como la media \pm ETE y (B+C+D) como la mediana con un intervalo del 25 % para el placebo y un intervalo del 75 % para la FAL. (*; Significativamente diferentes en comparación con el grupo de placebo, $P < 0,05$).

5 **Figura 2.** Niveles de creatinina sérica en ratas de control, ratas con nefrotoxicidad inducida por gentamicina y ratas con nefrotoxicidad inducida por gentamicina tratadas con fosfatasa alcalina.

Figura 3. Niveles de nitrógeno ureico en sangre (NUS) en ratas de control, ratas gentamicina con nefrotoxicidad inducida por gentamicina y ratas con nefrotoxicidad inducida por gentamicina tratadas con fosfatasa alcalina.

10 **Figura 4.** Niveles de creatinina sérica en ratas de control, ratas con nefrotoxicidad inducida por gentamicina y ratas con nefrotoxicidad inducida por gentamicina tratadas con fosfatasa alcalina.

Figura 5. Depuración de la creatinina en ratas de control, ratas con nefrotoxicidad inducida por gentamicina y ratas con nefrotoxicidad inducida por gentamicina tratadas con fosfatasa alcalina.

15 **Figura 6.** La FAL reduce significativamente la secreción de proteínas en orina tras la nefrotoxicidad provocada por cisplatino. Tratamiento simulado: sin tratamiento con cisplatino; tratamiento de control: cisplatino + vehículo; FAL: cisplatino + fosfatasa alcalina.

Figura 7. La FAL reduce la secreción de proteína en orina tras la nefrotoxicidad provocada por cisplatino. Tratamiento simulado: sin tratamiento con cisplatino; tratamiento de control: cisplatino + vehículo; FAL: cisplatino + fosfatasa alcalina.

Figura 8. La FAL disminuye la creatinina sérica en los pacientes de sepsis con función renal reducida.

20 **Figura 9.** La FAL disminuye la creatinina sérica en los pacientes de sepsis con insuficiencia renal (definida como creatinina sérica $> 150 \mu\text{mol/l}$, o que ya están en tratamiento renal sustitutivo al inicio del estudio).

Figura 10. Secuencias de las cuatro isoenzimas de fosfatasa alcalina humanas. Nota: estas son las secuencias de las proteínas maduras (es decir, sin secuencia señal), pero antes de añadir el anclaje GPI y el procesamiento concomitante de los aminoácidos C-terminales a excepción de las FAL quiméricas.

25 **Referencias**

1. Hendrix P. G., Hoylaerts M. F., "Nouwen EJ and De Broe ME. Enzyme immunoassay of human placental and germ-cell alkaline phosphatase in serum". *Clin Chem* 1990; 36 (10):1793-1799.

2. Le Du M-H, Millán J. L., "Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases". *J Biol Chem* 2002; 51:49808-49814.

30 6. Heemskerk S., Pickkers P., Bouw M. P., Draisma A., van der Hoeven J. G., Peters W. H. *et al.* "Up-regulation of renal inducible nitric oxide synthase during human endotoxemia and sepsis is associated with proximal tubule injury". *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1:853-62.

18. Moshage H., Kok B., Huizenga J. R., Jansen P. L. "Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation". *Clin. Chem.* 1995; 41(6 Pt 1):892-6.

35 19. Mulder T. P., Peters W. H., Court D. A., Jansen J. B. "Sandwich ELISA for glutathione S-transferase Alpha 1-1: plasma concentrations in controls and in patients with gastrointestinal disorders". *Clin. Chem.* 1996; 42(3):416-9.

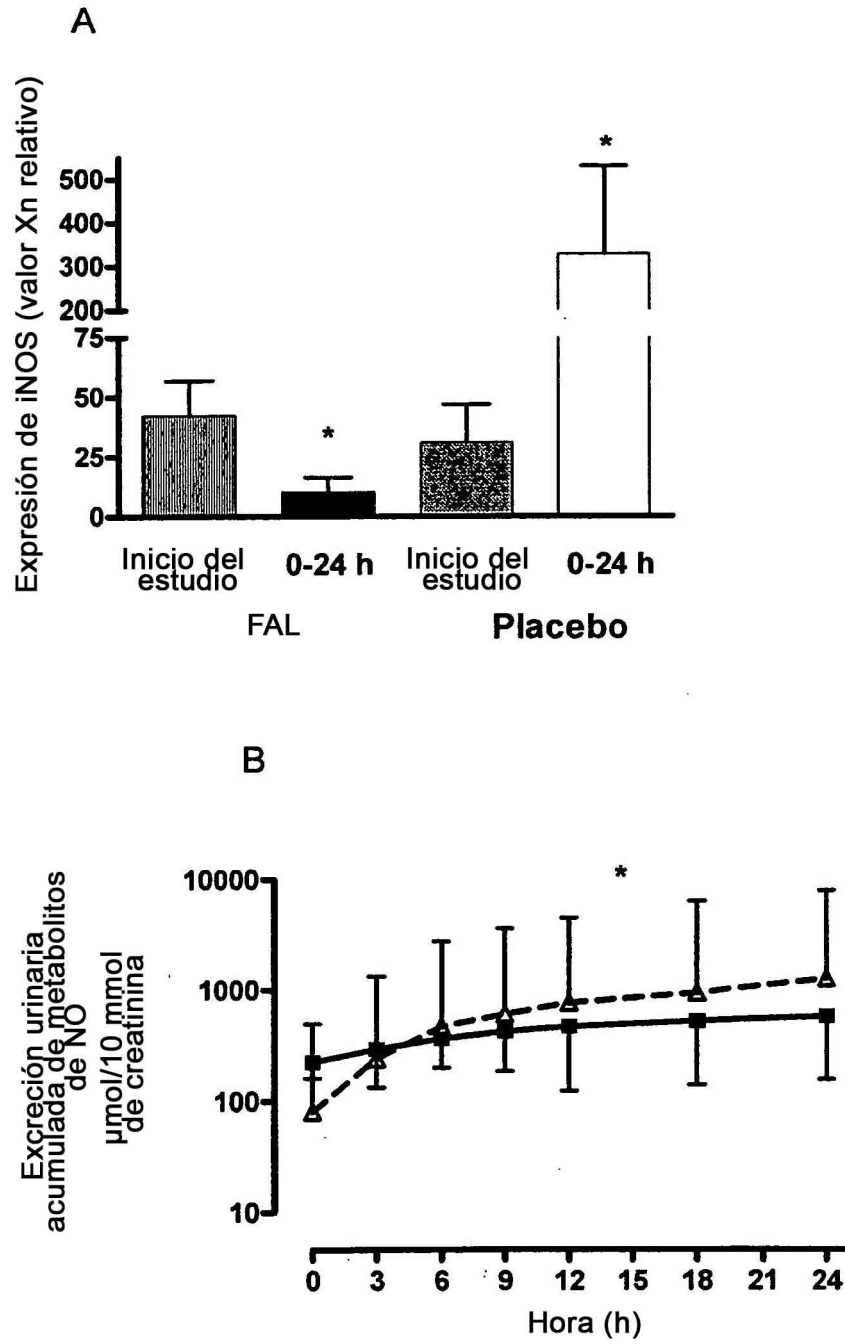
20. Mulder T. P., Peters W. H., Wobbes T., Witteman B. J., Jansen J. B. "Measurement of glutathione S-transferase P1-1 in plasma: pitfalls and significance of screening and follow-up of patients with gastrointestinal carcinoma". *Cancer* 1997; 80(5):873-80.

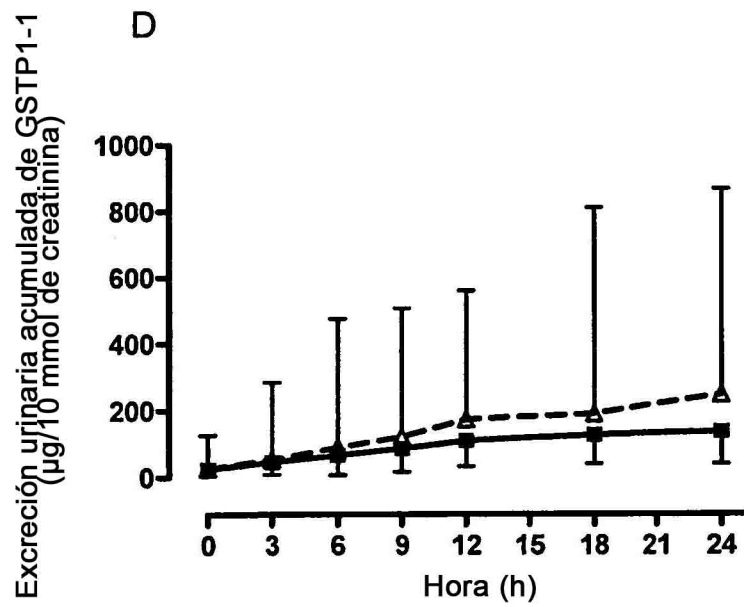
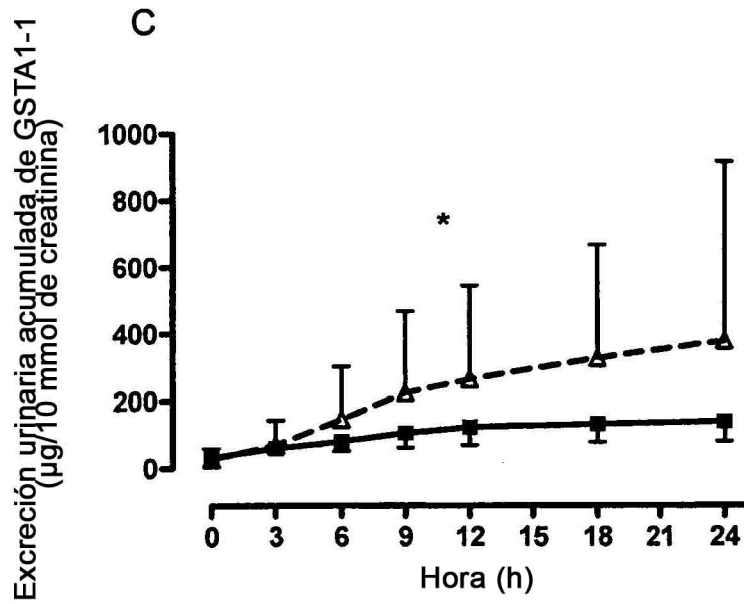
40

REIVINDICACIONES

1. Uso de la fosfatasa alcalina (FAL) en la fabricación de un medicamento para mejorar la función renal reducida, en el que dicha función renal se reduce debido a una insuficiencia renal.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicha función renal se reduce debido a una insuficiencia renal aguda.
- 5 3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha función renal reducida se induce o se mantiene o se agrava por una insuficiencia renal aguda intrínseca.
4. Uso según la reivindicación 3, en el que dicha insuficiencia renal aguda intrínseca es un daño celular tubular agudo.
5. Uso según la reivindicación 3, en el que dicha insuficiencia renal aguda intrínseca es glomerulonefritis.
- 10 6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha función renal reducida se induce o se mantiene o se agrava debido a un medicamento, un fármaco y/o una toxina.
7. Uso según la reivindicación 6, en el que dicho medicamento o fármaco o toxina se selecciona del grupo que consiste en antibióticos, inhibidores de proteasa, agentes quimioterapéuticos, agentes antiinflamatorios, medicamentos para la presión arterial, insecticidas, herbicidas, etilenglicol, colorantes de contraste, metales pesados y toxinas bacterianas.
- 15 8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha función renal reducida se induce o se mantiene o se agrava por el flujo sanguíneo renal reducido y/o la isquemia.
9. Uso según la reivindicación 8, en el que dicho flujo sanguíneo renal reducido y/o isquemia se inducen o se mantienen o se agravan por deshidratación, insuficiencia cardíaca, choque séptico, pérdida grave de sangre, hipertensión, aterosclerosis y/o trombosis.
- 20 10. Uso según la reivindicación 8, en el que dicho flujo sanguíneo renal y/o isquemia se inducen o se mantienen o se agravan por un medicamento, un fármaco o una toxina.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que dicho medicamento o fármaco o toxina se selecciona del grupo que consiste en inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE).
- 25 12. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicha FAL es FAL de mamífero.
13. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicha FAL es FAL humana.
14. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicha FAL es FAL placentaria, FAL de tipo placenta, FAL intestinal o FAL hepática/ósea/renal.
- 30 15. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dicha FAL es recombinante.
16. Fosfatasa alcalina (FAL) para su uso en el tratamiento de la función renal reducida, en el que dicha función renal se reduce debido a una insuficiencia renal.
17. Uso de la fosfatasa alcalina (FAL) en la fabricación de un medicamento para mejorar la función renal reducida, en el que la mejora de la función renal obtenida no se debe a la desintoxicación de LPS por parte de la FAL.

Figura 1





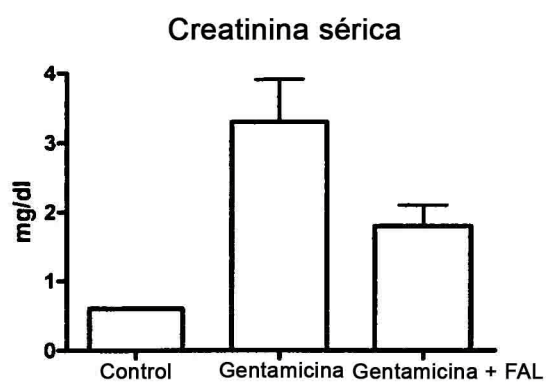


Figura 2

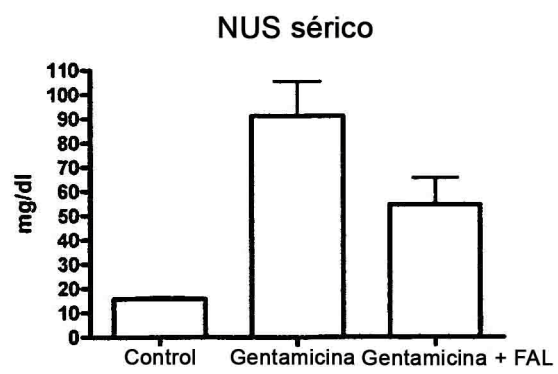


Figura 3

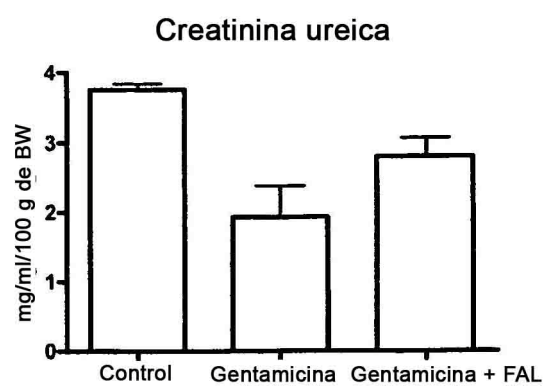


Figura 4

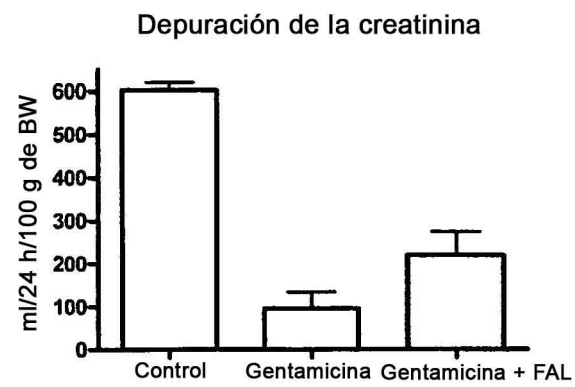


Figura 5

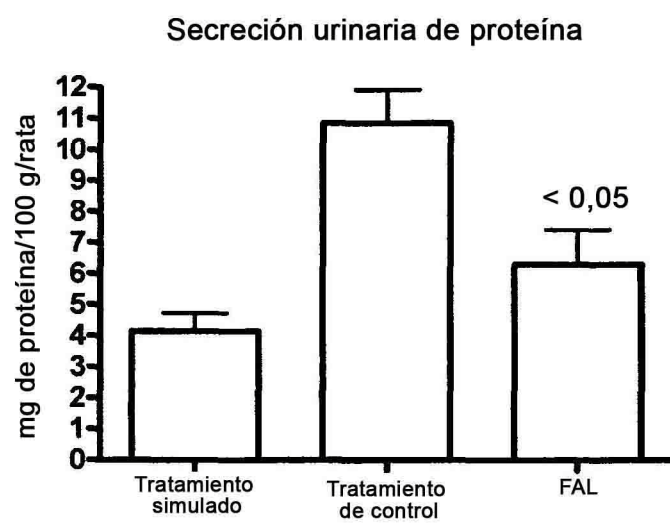


Figura 6

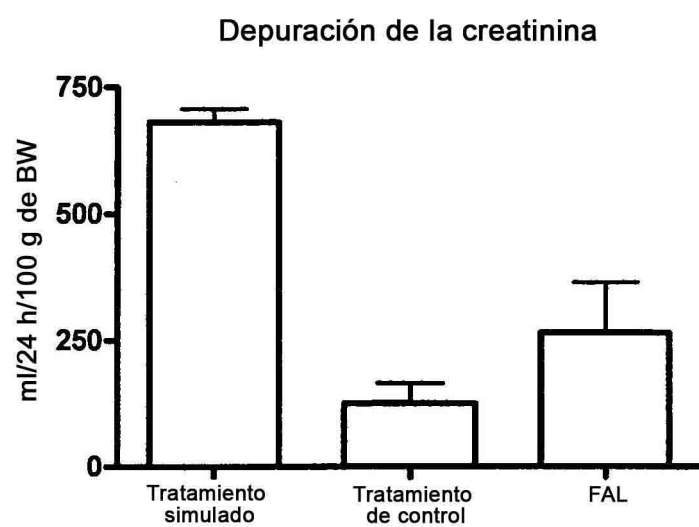


Figura 7

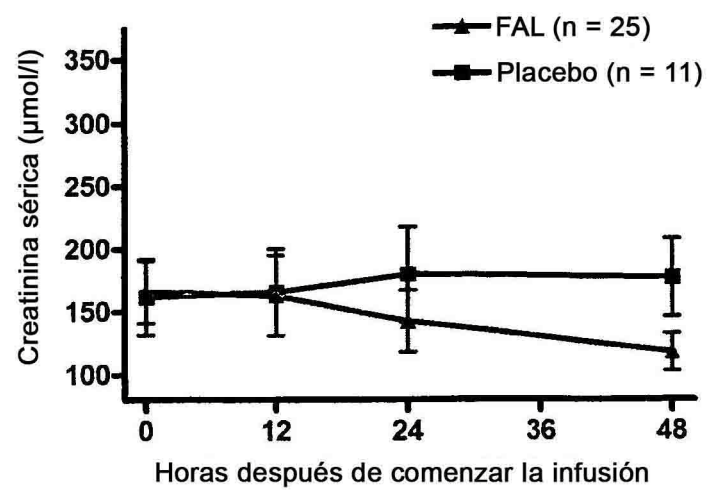


Figura 8

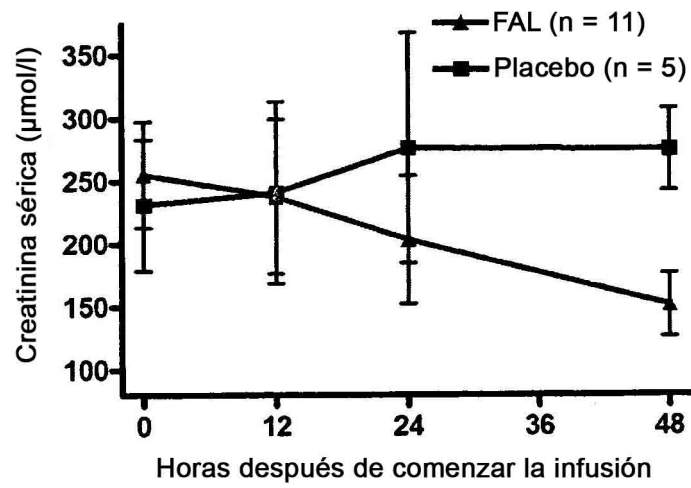


Figura 9

Fig. 10

NP_001623 ALPP (de placenta)

1 IIPVEEENPDFWNREAAEALGAACKLQPAQTAAKNLII FLGDGMGVSTVTAARILKGQKK 60
 61 DKLGPETPLAMDRFPYVALSKTYNVDPKHPD SGATATAYLCGVKGNFQTIGLSAAARFNQ 120
 121 CNTTRGNEVISVMNRACKAGKSVGVT TTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSDADVPASARQ 180
 181 EGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYPDDYSQGGTRLDGKNLVQEWLAK 240
 241 HQGARYVWNRTELMQASLDPSVTHLMGLFEPGDMKYEIHRDSTLDPSLMEMTEAALRLLS 300
 301 RNPRGFFLFVEGGRIDHGHESRAYRALTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTSLVTDHSH 360
 361 VFSFGGYPLRGSSIFGLAPGKARDRKAYTVLLYGNPGYVLKD GARPDVTESESGSPEYR 420
 421 QQSAVPLDEETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQT FIAHVMAFAACLEPYTACDLAPPA 480
 481 GTTDAHPGRSVVPALLPLLAGTLLLLLETATAP 513

AAI32679 ALPI (Intestinal)

1 VIPAEENPAFWNRQAAEALDAACKLQPIQKVAKNLIL FLGDGLGVPTVTATRILKGQKN 60
 61 GKLGPETPLAMDRFPYLALSKTYNVDRQVPD SAATATAYLCGVKANFQTIGLSAAARFNQ 120
 121 CNTTRGNEVISVMNRACKAGKSVGVT TTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSDADVPASARQ 180
 181 EGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYPADASQNGIRLDGKNLVQEWLAK 240
 241 HQGAWYVWNRTELMQASLDQSVTHLMGLFEPGDTKYEIHRDPTLDPSLMEMTEAALRLLS 300
 301 RNPRGFYLFVEGGRIDHGHHEGVAYQALTEAVMFDDAIERAGQLTSEEDTLTLVTADHSH 360
 361 VFSFGGYTLRGSSIFGLAPSKAQDSKAYTSILYGNPGYVFN SGVRPDVNESESGSPDYQ 420
 421 QQAAVPLSSETHGGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQS FVAHVMAFAACLEPYTACDLAPPA 480
 481 CTTDAHPVAASLPLLAGTLLLLLGASAAP 509

P10696 GCAP (célula germinal o de tipo placenta)

1 IIPVEEENPDFWNRQAAEALGAACKLQPAQTAAKNLII FLGDGMGVSTVTAARILKGQKK 60
 61 DKLGPETFLAMDRFPYVALSKTYSVDKHPD SGATATAYLCGVKGNFQTIGLSAAARFNQ 120
 121 CNTTRGNEVISVMNRACKAGKSVGVT TTRVQHASPAGAYHTVNRNWYSDADVPASARQ 180
 181 EGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYPDDYSQGGTRLDGKNLVQEWLAK 240
 241 HQGARYVWNRTELLQASLDPSVTHLMGLFEPGDMKYEIHRDSTLDPSLMEMTEAALLLS 300
 301 RNPRGFFLFVEGGRIDHGHESRAYRALTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTSLVTDHSH 360
 361 VFSFGGYPLRGSSIFGLAPGKARDRKAYTVLLYGNPGYVLKD GARPDVTESESGSPEYR 420
 421 QQSAVPLDGETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQT FIAHVMAFAACLEPYTACDLAPRA 480
 481 GTTDAHPGPSVVPALLPLLAGTLLLLGTATAP 513

AAI10910 (Inespecífica del tejido)

1 LVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNTNVAKNVIM FLGDGMGVSTVTAARILKGQL 60
 61 HHNPGEETRLEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPD SAGTATAYLCGVKANEGTVGVSAATERS 120
 121 RCNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAYAH SADRWDYSDNEMPEAL 180
 181 SQGCKDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKYMYPKNKTDVEYESDEKARGTRLDGLDLVDTWK 240
 241 SFKPRHKHSHFIWNRTELLTLDPHNV DYLGLFEPGDMQYELNRNNVTDPSLSEMVVAI 300
 301 QILRNPKPGFFLLVEGGRIDHGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIGQAGSLTSS EDTLTVVTA 360
 361 DHSHVFTFGGYTPRGNSIFGLAPMLSDTDKKPFTAILYGNPGYKV VGGERENVSMVDYA 420
 421 HNNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKGPMALLHGVHEQNYVPHVMAYAACIGANLGHC 480
 481 APASSAGSLAAGPLLLALALYPLSVLF 507

Continuación de la Fig. 10

ALPI secretable con dominio corona de PLAP (quimera)

```

1 VIPAEENPAFWNRQAAEALDAKKLQPIQKVAKNLILFLGDGLGVPTVTATRILKGQKN 60
61 GKLGPETPLAMDRFPYLALSKTYNVDRQVPDSAATATAYLCGVKANFQTIGLSAAARFNQ 120
121 CNTTRGNEVISVMNRAKQAGKSVGVTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSADAMPASARQ 180
181 EGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFPMTGPDPEYPADASQNGIRLDGKNLVQEWLAK 240
241 HQGAWYVWNRTLMQASLDQSVTHLMGLFEPGDTKYEIHRDPTLDPSLMEMTEAALRLLS 300
301 RNPRGFYLFVEGGRIDHGHHEGVAYQALTEAVMFDDAIERAGQLTSEEDTLTLVTADHSH 360
361 VFSFGGYPLRGSSIFGLAPGKARDRKAYTVLLYGNGPGYVLKDGARPDVTESESGSPEYR 420
421 QSAVPLDEETHGGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQSFVAHVMAFAACLEPYTACDLAPPA 480
481 CTTD 484

```

ALPP secretable con dominio corona de ALPI (quimera)

```

1 IIPVEENPDFWNREAAEALGAACKLQPAQTAAKNLIIFLGDGMGVSTVTAARILKGQKK 60
61 DKLGPETPLAMDRFPYVALSKTYNVDKHVPDSGATATAYLCGVKGNFQTIGLSAAARFNQ 120
121 CNTTRGNEVISVMNRAKKAGKSVGVTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSADVPASARQ 180
181 EGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMTGPDPEYPDDYSQGGTRLGKNLVQEWLAK 240
241 RQGARYVWNRTLMQASLDPSVTHLMGLFEPGDMKYEIHRDSTLDPSLMEMTEAALRLLS 300
301 RNPRGFFLFVEGGRIDHGHESRAYRALTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTLTLVTADHSH 360
361 VFSFGGYTLRGSSIFGLAPSKAQDSKAYTSILYGNGPGYVFNSGVRPDVNESESGSPDYQ 420
421 QAAVPLSSETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQTFIAHVMAFAACLEPYTACDLAPPA 480
481 GTTD 484

```