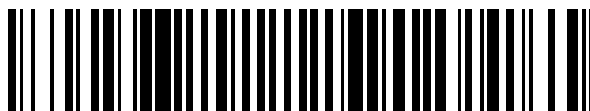


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 001**

51 Int. Cl.:

A61K 31/198 (2006.01)
A61K 38/05 (2006.01)
A61K 38/06 (2006.01)
A61K 38/07 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61M 1/28 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2008 E 08706039 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 2129370**

54 Título: **Fluido de diálisis peritoneal basado en carbohidratos que comprende residuo de glutamina**

30 Prioridad:

02.03.2007 AT 3402007

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

04.04.2013

73 Titular/es:

**ZYTOPROTEC GMBH (100.0%)
Stadiongasse 2/13
1010 Wien, AT**

72 Inventor/es:

AUFRICHT, CHRISTOPH

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 400 001 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

Fluido de diálisis peritoneal basado en carbohidratos que comprende residuo de glutamina.

La presente invención se refiere a un fluido de diálisis peritoneal (en lo sucesivo también llamado "FDP").

5 Los fluidos de diálisis peritoneal retiran solutos y agua del paciente urémico. Mediante varias observaciones clínicas y experimentales se ha mostrado que el FDP es citotóxico, asociado con un riesgo de fallo técnico de hasta el 30 % con tratamiento de diálisis peritoneal (DP) (6) a largo plazo. Por lo tanto, el tratamiento de DP prolongado da como resultado frecuentemente daños crónicos graves en la integridad de la membrana peritoneal. La bioincompatibilidad del FDP y la inflamación peritoneal se consideran las principales culpables. La exposición al FDP dificulta el metabolismo celular peritoneal, reduce la proliferación e incrementa la muerte celular, así como altera la
10 organización del citoesqueleto y la señalización celular, incluyendo la regulación de la diferenciación y la inflamación. Lo anterior tiene como resultado procedimientos curativos aberrantes, transdiferenciación epitelial-mesenquimal, neoangiogénesis, fibrosis y esclerosis crónica de la membrana peritoneal (7). El análisis de muestras de biopsia peritoneal secuenciales de pacientes en DP reveló alteraciones estructurales dañinas. En casos graves, las células mesoteliales se desprenden, el peritoneo se queda al descubierto y se cubre con una capa amorfa gruesa de tejido
15 conjuntivo. Estos cambios morfológicos dan como resultado una alteración grave de la función barrera del peritoneo como una membrana de diálisis semipermeable. Hasta un tercio de los pacientes adultos en DP sufrirán fallos técnicos durante el curso del tratamiento debido al fallo de la membrana peritoneal (6).

Por tanto, la investigación presente actual tiene como objetivo incrementar la biocompatibilidad del FDP y, por consiguiente, reducir el daño en las células mesoteliales durante la DP. De hecho, en varios estudios experimentales y clínicos *in vitro* e *in vivo* (7,10) se ha demostrado que las nuevas y mejoradas formulaciones son menos tóxicas. Se ha demostrado que la adición del antioxidante/sequestrante carnosina (un dipéptido de β -alanil-L-histidina), o glutatión (gamma-glutamil-L-cisteinil-glicina) y de compuestos relacionados (tales como el profármaco de la cisteína L-2-oxotiazolidina-4-carboxilato) tiene una influencia positiva sobre la biocompatibilidad del FDP y que reduce de forma pasiva el impacto perjudicial de los productos de degradación de la glucosa en la DP (20-22).

25 Sin embargo, el principal principio de trabajo del FDP es la eliminación de solutos y agua del paciente urémico debido a su hipertonicidad. Por tanto, es probable que el FDP nunca represente un fluido fisiológicamente inerte o completamente biocompatible y la carga y el drenaje repetidos hacia y desde la cavidad abdominal retendrá siempre alguna citotoxicidad.

Las desventajas mencionadas en lo que antecede se aplican especialmente al FDP basado en carbohidratos. En el FDP "basado en carbohidratos" el técnico experto entiende un fluido de análisis peritoneal basado en glucosa o en oligómeros de glucosa y polímeros de glucosa como agente osmótico. En la presente invención preferentemente se usan FDP basados en glucosa y pueden contener típicamente desde 10 hasta 45 g/l de glucosa (véase el documento EP 1 166 787). Ejemplos adicionales de FDP basados en carbohidratos se divulgan en los documentos WO 82/03773 AI, US 4.976.683 A, WO 01/02004 AI, US 2003/0232093 AI, EP 1 369,432 A2, KR 2001/008659, WO 94/14468 AI, WO 99/01144 AI, US 6.077.836 A, WO 95/19778 AI, US 2005/0074485 AI, EP 0 207 676 A2, EP 1 563 858 A1 y WO 93/14796.

Recientemente, se demostró que la citotoxicidad de, especialmente, el FDP basado en glucosa no solamente da como resultado daño celular, sino que activa también una maquinaria endógena hallada en cada célula, las proteínas del choque térmico (HSP) en células mesoteliales en modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de DP (1-4,16).
40 Mientras que los estudios anteriores se centraron en regulación por aumento de las HSP como marcadores de biocompatibilidad del FDP, los datos más recientes han puesto de manifiesto que las HSP protegen células durante la DP experimental (3,5,9).

La sobreexpresión de las HSP dio como resultado la supervivencia de una exposición a FDP usualmente letal en el modelo *in vitro* de DP y evitó que las células mesoteliales se desprendieran de su revestimiento peritoneal en el modelo *in vivo* de DP (5,9).
45

Sin embargo, ninguno de los protocolos usados para inducir sobreexpresión de HSP, tales como hipertermia o transfección transitoria, son aproximaciones atractivas en el ámbito clínico de la DP.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un fluido de diálisis peritoneal basado en carbohidratos que tiene menos citotoxicidad que los productos conocidos anteriormente. Especialmente, es un objeto de la presente invención proporcionar un fluido de diálisis peritoneal basado en carbohidratos que inhiba el fallo técnico en un paciente en tratamiento de DP optimizando de forma activa las respuestas celulares al estrés patofisiológico tras la exposición al FDP.
50

La expresión "fallo técnico" es bien conocida por el técnico experto y quiere decir la necesidad de terminar la diálisis peritoneal y de alternar terapias de reemplazo renal tal como la hemodiálisis (6). Especialmente, la inhibición del fallo técnico incluye etapas para evitar el fallo de la membrana peritoneal y para atenuar la alteración de la función de barrera y de prevenir el desprendimiento de las células mesoteliales.
55

Este objeto se resuelve mediante un fluido de diálisis peritoneal basado en glucosa que contiene un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

- L-glutamina,

5 - un dipéptido capaz de liberar L-glutamina, en forma libre, seleccionado preferentemente del grupo que consiste en glutaminil-glicina, glicinil-glutamina, glutaminil-alanina y alanil-glutamina

- un oligopéptido que consiste en de dos a siete residuos de L-glutamina y

- mezclas de los mismos.

Adicionalmente, este objeto se resuelve mediante un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

- L-glutamina,

10 - un dipéptido capaz de liberar L-glutamina en forma libre, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en glutaminil-glicina, glicinil-glutamina, glutaminil-alanina y alanil-glutamina

- un oligopéptido que consiste en de dos a siete residuos de L-glutamina y

- mezclas de los mismos

15 para el uso específico de prevención de fallo de la membrana peritoneal, atenuación de la alteración de la función de barrera y prevención del desprendimiento de las células mesoteliales en un tratamiento de diálisis peritoneal con un fluido de diálisis peritoneal basado en glucosa.

El objeto de la presente invención se resuelve también mediante un fluido de diálisis peritoneal basado en glucosa que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

- L-glutamina,

20 - un dipéptido capaz de liberar L-glutamina, en forma libre, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en glutaminil-glicina, glicinil-glutamina, glutaminil-alanina y alanil-glutamina

- un oligopéptido que consiste en de dos a siete residuos de L-glutamina y

- mezclas de los mismos

25 para el uso específico de prevención de fallo de la membrana peritoneal, atenuación de la alteración de la función de barrera y prevención de desprendimiento de las células mesoteliales.

30 Sorprendentemente se ha encontrado que la glutamina induce expresión de HSP en células mesoteliales. Además, se ha encontrado que un fluido de diálisis basado en glucosa que contiene L-glutamina, o un dipéptido capaz de liberar L-glutamina en forma libre, tal como glutaminil-alanina y alanil-glutamina, tiene una citotoxicidad más baja que los productos conocidos anteriormente. El uso de dipéptidos que contienen L-glutamina tales como glutaminil-glicina y glicinil-glutamina como precursores de glutamina también es ventajoso.

35 La glutamina es no tóxica y anteriormente se ha comunicado que participa en la citoprotección incrementando expresión de HSP (14,18). In vitro, las dosis farmacológicas de glutamina dieron como resultado mayor unión a ADN de HSF-1 a su promotor, de forma similar a como se ha descrito para la indometacina y otros AINE (11,12). Como alternativa, se ha demostrado que los suplementos con glutamina dan como resultado estabilización del ANRm de HSP-72 en condiciones de estrés, incrementando por lo tanto la expresión de HSP (8). Sin embargo, el uso de glutamina para potenciar la expresión de HSP en células mesoteliales cuando se expusieron al FDP no se ha propuesto aún.

40 De acuerdo con la presente invención, la L-glutamina se puede usar en su forma monomérica y/o en forma de un dipéptido capaz de liberar L-glutamina en forma libre. Se sabe que la administración de aminoácidos a mamíferos se tolera mejor si se administran en forma de un di- o tripéptido. Especialmente, la glutamina es poco soluble en soluciones acuosas y es un aminoácido relativamente inestable y, por tanto, se usa preferentemente en el ámbito clínico como un dipéptido que consiste en glutamina y otro aminoácido, preferentemente alanina y glicina (23). Los dipéptidos que contienen L-glutamina como un componente se divulgan en, por ejemplo, el documento US 5.189.016.

45 Preferentemente, dicho dipéptido se selecciona a partir del grupo que consiste en alanil-glutamina, glutaminil-alanina, glutaminil-glicina y glicinil-glutamina.

En una realización preferida, el FDP de acuerdo con la presente invención contiene dicho compuesto en una cantidad suficiente para potenciar la expresión de la proteína del choque térmico (HSP) en células mesoteliales.

La concentración de dicho compuesto, especialmente de L-glutamina, en el fluido puede variar desde 2 mM hasta 25 mM.

5 El fluido de diálisis peritoneal de acuerdo con la presente invención se puede producir mediante un procedimiento que comprende la etapa de mezclar el compuesto (es decir, L-glutamina en forma monomérica o como un componente de un oligopéptido como se ha definido anteriormente) con un fluido de diálisis peritoneal basado en glucosa. El fluido de diálisis peritoneal basado en glucosa usado para fabricar el FDP de acuerdo con la invención puede ser un producto estándar como está actualmente disponible comercialmente.

10 Preferentemente, el compuesto se mezcla con el fluido de diálisis peritoneal basado en glucosa en una cantidad suficiente para potenciar la expresión de la proteína del choque térmico (HSP) en células mesoteliales.

Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso de compuesto seleccionado del grupo que consiste en

- L-glutamina,

15 - un dipéptido capaz de liberar L-glutamina, en forma libre, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en glutaminil-glicina, glicinil-glutamina, glutaminil-alanina y alanil-glutamina

- un oligopéptido que consiste en de dos a siete residuos de L-glutamina y

- mezclas de los mismos

para la preparación de un fluido de diálisis peritoneal basado en glucosa para inhibir el fallo técnico.

20 La presente invención se explica con más detalle a continuación en base a los ejemplos y figuras que ejemplifican realizaciones preferidas de la invención.

A este respecto, las Figuras 1 y 2 muestran los efectos de la exposición a L-glutamina en células mesoteliales humanas cultivadas. La viabilidad se valoró mediante la liberación de LDH (Figura 1) y la expresión de HSP-72 (Figura 2) después de exposición a dosis crecientes de glutamina (GLN) en condiciones de control. La adición de L-glutamina hasta 20 mM dio como resultado una viabilidad sin cambios. La expresión de HSP-72 se potenció a una
25 concentración de glutamina de 8 y 10 mM. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes.

Las Figuras 3 y 4 muestran el efecto de la L-glutamina durante la exposición al FDP en células mesoteliales humanas cultivadas. La viabilidad se valoró mediante liberación de LDH (Figura 3) y expresión de HSP-72 (Figura 4) después de la exposición al FDP con o sin glutamina añadida (GLN) durante 120 minutos. Los datos se muestran como diagrama de distribución de datos en cajas (25^o y 75^o), de bigotes (percentiles 10 y 90) y de medianas. La
30 adición de L-glutamina dio como resultado una viabilidad significativamente conservada y expresión de HSP-72 incrementada. Los datos se obtuvieron a partir de 6 experimentos, las estadísticas detalladas se dan en la sección de resultados.

Las figuras 5 y 6 muestran los efectos de la manipulación farmacológica de la expresión de HSP-72 sobre el desprendimiento de las células mesoteliales y la pérdida de proteínas peritoneales en el modelo de rata de diálisis peritoneal. Se investigó la expresión de HSP-72 en células mesoteliales de rata recogidas mediante lavado peritoneal con tripsina después de un tiempo de permanencia de 4 horas bien con FDP estándar (FDP) o bien con FDP con L-glutamina añadida (GLN-FDP). La adición de L-glutamina dio como resultado expresión de HSP-72
35 potenciada.

El desprendimiento de células mesoteliales (Figura 5) y la pérdida de proteínas peritoneales (Figura 6) se muestran como diagramas de distribución de datos de cajas (25 y 75), de bigotes (percentiles 10 y 90) y de medianas. La adición de L-glutamina al FDP se asoció con recuentos de células mesoteliales (CM) significativamente menores y menor pérdida de proteínas en el efluato dializado. Los datos se obtuvieron en 6 ratas en cada grupo en 3
40 experimentos independientes.

Material y procedimientos

45 Modelo in vitro de DP (adaptado de referencia N° 5)

Se cultivaron células mesoteliales humanas inmortalizadas (Met5A, ATCC CRL-9444) en medio M199/MCDB 105 (1:1) suplementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y FCS al 10 %. Los cultivos se mantuvieron en matraces de cultivo tisular de 75 cm² (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, California) a 37 °C en CO₂ al 5 % y se sometieron a tripsinización regular. El medio se cambió cada dos a tres días. De media, se alcanzó la
50 confluencia después de 6 a 7 días.

Los cultivos confluyentes se expusieron después durante 120 minutos al FDP de monómero de glucosa estándar y al FDP basado en lactato ácido (Fresenius 2, Bad Homburg, Alemania), que contiene dextrosa anhidra al 1,5 % a pH 5,5, con o sin adición de compuesto citoprotector (glutamina a 4 a 20 mM) y se dejaron recuperar en medio de crecimiento regular durante 16 horas. Los cultivos control se mantuvieron en medios de cultivo regulares a 37 °C y se sometieron a "cambios de medios simulados", es decir, a la vez que expusieron a FDP se expusieron al medio de control.

La viabilidad de las células se valoró mediante análisis con lactato deshidrogenasa (LDH). Después de la configuración experimental descrita se extrajeron alícuotas de cincuenta µl de sobrenadantes y se mantuvieron a 4 °C hasta que se analizaron en 48 horas. Se llevaron a cabo medidas por duplicado con el kit Sigma TOX-7 LDH de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se calculó el flujo de salida de LDH como el porcentaje de valores LDH medidos en cada experimento de control negativo. La inducción de HSP se valoró en cultivos paralelos como se describe más adelante.

Modelo de rata aguda in vivo de DP (adaptado a partir de la referencia Nº 9):

Los estudios se llevaron a cabo en ratas Sprague Dawley endogámicas macho adultas (peso promedio 310 g). Después de la introducción de la anestesia (100 mg/kg de ketamina y 5 mg/kg de xilazina, por vía intramuscular), los animales se colocaron en una camilla térmica de operaciones para animales pequeños. Se insertó un catéter estéril dentro de la cavidad peritoneal a través de una incisión en la línea media abdominal pequeña y se infundieron lentamente 35 ml de fluido de prueba (FDP con o sin adición de L-glutamina a 4-10 mM) en 45-60 segundos. Se movió al animal con cuidado, se aspiró un volumen pequeño de fluido peritoneal, se retiró el catéter y se suturó el abdomen. Los animales despertaron unos 20 minutos después del procedimiento y tuvieron acceso libre a comida y agua corriente. A las 4 horas de la inyección intraperitoneal se anestesió de nuevo a los animales, se aspiró otro volumen pequeño de fluido peritoneal y se sacrificó a los animales mediante punción cardíaca y exanguinaciones. Después, se abrió el abdomen mediante incisión en la línea media y suavemente se recogió el fluido intraperitoneal completo. Se registraron los volúmenes de los fluidos recogidos y el recuento de células totales y los recuentos diferenciales de los dos puntos temporales (0 y 4 horas) se valoraron mediante recuento manual después de tinción con giemsa y recuento automático mediante un contador Coulter. Después se calculó el número total de células mesoteliales desprendidas para cada rata. En animales seleccionados, las células endoteliales que recubren la cavidad peritoneal se recogieron tras el tiempo de permanencia de 4 horas mediante lavado peritoneal con 20 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene tripsina al 0,1 % y EDTA al 0,1 % durante 20 minutos.

Para analizar la función de barrera de la membrana peritoneal se midieron los niveles de creatinina, glucosa y la proteína total en muestras de dializado (D) y creatinina en plasma (P) al final del protocolo. Se calcularon las proporciones D/P para creatinina y las proporciones D/D0 para glucosa. Se calculó la pérdida peritoneal de proteína como la concentración de dializado final x volumen final.

Todos los animales recibieron cuidados humanitarios cumpliendo con los principios de cuidados animales de laboratorio según lo preparado por la Academia Nacional de Ciencias y según publicaron los Institutos Nacionales de Salud.

Detección de HSP-72 y estadística:

Transferencia de tipo Western: el contenido en proteínas de la recolección de células mesoteliales se determinó mediante ensayo de Bradford (BioRad) y se separaron cantidades iguales de muestras proteicas (5 µg/carril) mediante SDS-PAGE estándar usando una unidad de Pharmacia Multiphore II. Las proteínas separadas en fracciones por tamaño se transfirieron a membranas de PVDF por transferencia semiseca en una unidad de Pharmacia Multiphore II Novablot. Las membranas se bloquearon en leche en polvo al 5 % en TBS-Tween (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 %, pH 8,0). Las membranas se incubaron con el anticuerpo HSP-72 (SPA 810, Stressgen, B.C., Canadá). La detección se llevo a cabo mediante incubación con anticuerpos secundarios, acoplados a peroxidasa (Sigma, EE.UU.) y quimioluminiscencia potenciada (ECL) usando sistema y protocolos de análisis de tipo Western de ECL (Renaissance, N EN-Life Science Products, Boston, MA, EE.UU.). La densitometría se llevó a cabo con software de análisis de imagen (software Molecular Analyst, Bio-Rad, EE.UU.). La expresión diferencial de HSP-72 se derivó de la proporción de señales específicas en el intervalo lineal de la relación de proteína/intensidad de señal, se normalizó con un patrón interno y se comparó entre experimentos paralelos.

Análisis estadístico: Se compararon los efectos de tratamientos (+/- exposición a FDP, +/- adición de aditivo citoprotector (L-glutamina)) mediante ANOVA multifactorial en los experimentos in vitro. En los experimentos in vivo, los efectos de la exposición al FDP con adición de glutamina frente a sin adición de glutamina se compararon usando la prueba U de Mann-Whitney (Statview IV, Abacus, EE.UU.). Se considera que las diferencias son significativas dada una $p < 0,05$. Los datos se expresaron como la media +/- SD.

Resultados

Efecto citoprotector de la L-glutamina

Los experimentos in vitro demostraron citoprotección mediada por HSP en células mesoteliales tras la adición de L-

glutamina al FDP.

Las figuras 1 y 2 demuestran los efectos de la exposición a dosis crecientes de L-glutamina en células mesoteliales humanas cultivadas en condiciones de control. La adición de L-glutamina hasta 20 mM dio como resultado una viabilidad sin cambios, los niveles de 8 y 10 mM se asociaron con expresión de HSP-72 incrementada.

- 5 Los efectos de la L-glutamina durante exposición a FDP estándar en células mesoteliales humanas cultivadas se muestran en las figuras 3 y 4. La adición de L-glutamina al FDP dio como resultado una viabilidad conservada y expresión de HSP-72 incrementada. La liberación de LDH se incrementó desde 100 +/- 3 % en condiciones control hasta 226 +/- 29 % durante la exposición al FDP sin agente citoprotector frente a 91 +/- 7 a 190 +/- 19 % durante la exposición al FDP con L-glutamina añadida (Figura 3). El ANOVA multifactorial demostró que los efectos de la exposición al FDP y los efectos de la adición de L-glutamina fueron ambos significativos ($p = 0,0001$ y $p = 0,001$).
10 Estos efectos fueron interdependientes, es decir los efectos (citoprotectores) de la L-glutamina fueron significativamente más altos durante la exposición al FDP (citotóxico) ($p = 0,037$).

- La expresión de HSP-72 se incrementó desde 100 +/- 43 % en condiciones control hasta 423 +/- 661 % durante la exposición al FDP sin agente citoprotector frente a 234 +/- 221 a 1895 +/- 1928 durante la exposición al FDP con L-glutamina añadida (Figura 4). De nuevo, el ANOVA multifactorial demostró que los efectos de la exposición al FDP y los efectos de la adición de L-glutamina fueron ambos significativos ($p = 0,003$ y $p = 0,023$). Además, estos efectos fueron interdependientes, es decir los efectos (que co-inducen HSP) de la L-glutamina fueron significativamente más altos durante la exposición al FDP ($p = 0,011$).
15

- Para confirmar el papel biológico de citoprotección farmacéutica mediada por HSP en la DP, se valoraron los efectos de potenciar expresión de HSP-72 mediante FDP suplementado con L-glutamina en el desprendimiento de células mesoteliales a partir de su monocapa peritoneal en el modelo de rata de DP. Como se muestra en las figuras 5 y 6, el uso de este FDP citoprotector dio como resultado sobreexpresión de HSP-72 y desprendimiento de células mesoteliales significativamente reducido tras exposición al FDP in vivo durante un tiempo de permanencia de 4 horas (93 +/- 39 células frente a 38 +/- 38 células, $p = 0,044$; figura 5). La adición de L-glutamina al FDP se asoció también con pérdida de proteínas disminuida dentro del efluato dializado (75 +/- 7 mg frente a 65 +/- 4 mg, $p = 0,045$; figura 6). La suplementación de L-glutamina no produjo ningún efecto sobre la ultrafiltración neta (6,8 +/- 1,1 ml frente a 5,4 +/- 2,7 ml), creatinina D/P (0,414 +/- 0,08 frente a 0,375 +/- 0,11) o glucosa D/Do (0,473 +/- 0,02 frente a 0,469 +/- 0,04).
20
25

- De acuerdo con los ejemplos anteriores, en un modelo in vitro de DP, la adición de L-glutamina dio como resultado una marcada sobreexpresión de HSP y mejor supervivencia de las células mesoteliales durante la exposición al FDP.
30

Por tanto, estos hallazgos in vitro vinculan la expresión de HSP y el resultado celular en células mesoteliales y respaldan claramente el concepto de que un aditivo farmacéutico puede inducir citoprotección mediada por HSP frente a la exposición al FDP.

- 35 En la parte final de este estudio, la expresión de HSP en el modelo de rata de DP se manipuló añadiendo la L-glutamina co-inductora al FDP. Como se espera de los resultados in vitro, la suplementación de L-glutamina potenció la expresión de HSP en células mesoteliales durante la exposición in vivo. De forma consistente con el concepto de citoprotección mediada por HSP, la adición de L-glutamina al FDP también dio como resultado un número menor de células mesoteliales desprendidas. Se encontró evidencia de una alteración de la función de barrera atenuada, coherente con la estabilización de la monocapa mesotelial peritoneal, como se demuestra con el menor contenido de proteínas en el efluente de la DP en las ratas tratadas. Por tanto, los experimentos in vivo extienden los hallazgos anteriores tras pretratamiento por calor a un modelo de intervención farmacológica más factible (9).
40

- También se describen relaciones entre la expresión incrementada de HSP y el resultado mejorado en modelos de supervivencia animal de sepsis e hipertermia tras suplementación de glutamina (17). En un pequeño ensayo controlado aleatorizado en seres humanos con pacientes de la UCI, hubo también una correlación significativa entre los incrementos en suero de HSP-70 y la reducción de la duración de la estancia en la UCI tras suplementación con glutamina durante la nutrición parenteral (19). Por último, se ha observado que los pacientes con enfermedad crítica sufren con frecuencia depleción de glutamina, lo que respalda el potencial de la suplementación de glutamina en esa población (13).
45
50

Efecto citoprotector de un dipéptido capaz de liberar L-glutamina en forma libre.

- El contexto experimental de recuperación aguda como se describe para la glutamina como una prueba de principios para el FDP citoprotector, es el mejor representante de los efectos tóxicos tempranos del FDP, debido principalmente al pH bajo y al lactato como principales culpables. Los modelos alternativos, tales como un modelo de exposición a largo plazo a FDP no usado diluido 1:1 con medio de cultivo normal, son las herramientas mejor aceptadas para evaluar los efectos de los procesos celulares que tienen lugar en el peritoneo tras la exposición más prolongada al FDP, como ocurre en la DP clínica.
55

Por lo tanto, el potencial de la L-alanil-L-glutamina para conferir efectos citoprotectores se analiza exponiendo cultivos confluyentes durante 24 horas a FDP basado en lactato ácido convencional que contiene dextrosa anhidra al 1,5 %, diluida 1:1 con medio M199 que contiene FCS al 10 % sin o con adición de L-alanil-L-glutamina a una concentración de 0,5 y 10,0 g/l ("dosis baja y alta"). Cultivos control adicionales se conservan en medios de cultivo regulares puros a 37 °C durante el mismo tiempo. Al final del estudio, la viabilidad celular y la expresión de proteínas se valoran en cultivos paralelos para identificar el FDP citoprotector.

Los experimentos in vitro demuestran citoprotección mediada por HSP en células mesoteliales tras exposición a FDP con adición de L-alanil-L-glutamina similar a la que se ha demostrado para glutamina. El FDP citoprotector que contiene L-alanil-L-glutamina da como resultado viabilidad conservada valorada mediante la liberación de LDH y expresión de HSP-72 incrementada cuando se compara con la exposición al FDP estándar.

En conjunto, los efectos concordantes de los nuevos FDP de acuerdo con la presente invención sobre la expresión de HSP y el resultado celular respaldan claramente el concepto de citoprotección mediada por HSP en la DP. Más específicamente, se describe un potencial alto para L-glutamina como aditivo del FDP para optimizar las respuestas de las células mesoteliales al estrés patofisiológico tras exposición al FDP in vitro e in vivo. Tal citoprotección mediada por HSP tras la adición de glutamina al FDP tendrá probablemente relevancia biológica, ya que se asoció con un menor desprendimiento de células mesoteliales y menor pérdida de proteínas peritoneales tras la exposición aguda al FDP. Dado que el metabolismo de la glutamina está alterado en los pacientes con insuficiencia renal crónica, la glutamina y los dipéptidos capaces de liberar glutamina en forma libre representan un candidato extremadamente atractivo como "aditivo citoprotector" al FDP (15).

Referencias:

1. Arbeiter K, Bidmon B, Endemann M, y cols. (2001) Peritoneal dialysate fluid composition determines heat shock protein expression patterns in human mesothelial cells. *Kidney Int* 60: 1930-1937
2. Arbeiter K, Bidmon B, Endemann M, y cols. (2003) Induction of mesothelial HSP-72 in mesothelial cells exposed to peritoneal dialysis fluid. *Perit Dial Int* 23: 499-501
3. Aufricht C (2005) Heat-shock protein 70: Molecular supertool? *Pediatr Nephrol* 20: 707-13
4. Aufricht C, Endemann M, Bidmon B, Arbeiter K y cols. (2001) Peritoneal dialysis fluids induce the stress response in human mesothelial cells. *Perit Dial Int* 21: 85-88
5. Bidmon B, Endemann M, Arbeiter K, Ruffingshofer D y cols. (2004) Overexpression of HSP-72 confers cytoprotection in experimental peritoneal dialysis. *Kidney Int* 66: 2300-2307
6. Davies SJ, Phillips L, Griffiths AM, y cols. (1998) What really happens to people on long-term peritoneal dialysis? *Kidney Int* 54: 2207-17
7. Devuyst O, Topley N, Williams JD (2002) Morphological and functional changes in the dialysed peritoneal cavity: impact of more biocompatible solutions. *Nephrol. Dial. Transplant.* 17 S3: 12-5
8. Eliassen MM, Brabec M, Gerner C y cols. (2006) Reduced stress tolerance of glutamine-deprived human monocytic cells is associated with selective down-regulation of Hsp70 by decreased mRNA stability. *J Mol Med.* 84: 147-58.
9. Endemann M, Bergmeister H, Boehm M y cols. (2007) Evidence for HSP-mediated cytoskeletal stabilization in mesothelial cells during acute experimental peritoneal dialysis. *American J Physiol Renal Physiol.* 292 Número de Enero
10. Jorres A, Topley N, Gahl GM (1992) Biocompatibility of peritoneal dialysis fluids. *Int J Artif Organs* 15: 79-83
11. Lee BS, Chen J, Angelidis C y cols. (1995) Pharmacological modulation of heat shock factor 1 by antiinflammatory drugs results in protection against stress-induced cellular damage. *Proc Natl Acad Sci E E . U U .* 92: 7207-11.
12. Morrison AL, Dinges M, Singleton KD y cols. (2006) Glutamine's protection against cellular injury is dependent on heat shock factor-1. *Am J Physiol Cell Physiol.* 290: C1625-32.
13. Novak F, Heyland DK, Avenell A y cols. (2002) Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence. *Crit Care Med.* 30: 2022-9.
14. Oehler R, Roth E (2003) Regulative capacity of glutamine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 6: 277-82
15. Raj DS, Welbourne T, Dominic EA y cols. (2005) Glutamine kinetics and protein turnover in end-stage renal disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288: E37-46.

16. Ruffingshofer D, Endemann M, Arbeiter K y cols. (2003) Induction of heat shock protein-72 in mesothelial cells exposed to peritoneal dialysis effluent. *Perit. Dial. Int.* 23: 74-77
17. Singleton KD, Wischmeyer PE (2006) Oral glutamine enhances heat shock protein expression and improves survival following hyperthermia. *Shock.* 25: 295-9.
- 5 18. Wischmeyer PE (2002) Glutamine and heat shock protein expression. *Nutrition.* 18: 225-8
19. Ziegler TR, Ogden LG, Singleton KD y cols. (2005) Parenteral glutamine increases serum heat shock protein 70 in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 31: 1079-86.
20. Saeed Alhamdani y cols. (2007) Antiglycation and antioxidant effect of carnosine against glucose degradation products in peritoneal mesothelial cells. *Nephron Clin Pract* 107: c26-34.
- 10 21. Breborowicz A, Witowski J, Polubinska A y col. (2004) L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid reduces in vitro cytotoxicity of glucose degradation products. *Nephrol. Dial. Transplant.* 19: 3005-11
22. Inagi R, Miyata T, Ueda Y y cols. (2002) Efficient in vitro lowering of carbonyl stress by the glyoxalase system in conventional glucose peritoneal dialysis fluid. *Kidney Int* 62: 679- 87.
23. Fürst P (2001) New Developments in Glutamine Delivery, *J Nutrition* 131 (9 Supl.): 2562S-8S

15

REIVINDICACIONES

1. Un fluido de diálisis peritoneal basado en glucosa, que contiene un compuesto seleccionado del grupo que consiste en
- L-glutamina,
- 5 - un dipéptido capaz de liberar L-glutamina, en forma libre, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en glutaminil-glicina, glicinil-glutamina, glutaminil-alanina y alanil-glutamina
- un oligopéptido que consiste en de dos a siete residuos de L-glutamina y
 - mezclas de los mismos.
2. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en
- 10 - L-glutamina,
- un dipéptido capaz de liberar L-glutamina, en forma libre, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en glutaminil-glicina, glicinil-glutamina, glutaminil-alanina y alanil-glutamina
 - un oligopéptido que consiste en de dos a siete residuos de L-glutamina y
 - mezclas de los mismos,
- 15 para uso en la prevención de fallo de la membrana peritoneal, atenuación de la alteración de la función de barrera y prevención del desprendimiento de células mesoteliales en un tratamiento de diálisis peritoneal con un fluido de diálisis peritoneal basado en glucosa.
3. Un fluido de diálisis peritoneal basado en glucosa que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en
- 20 - L-glutamina,
- un dipéptido capaz de liberar L-glutamina, en forma libre, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en glutaminil-glicina, glicinil-glutamina, glutaminil-alanina y alanil-glutamina
 - un oligopéptido que consiste en de dos a siete residuos de L-glutamina y
 - mezclas de los mismos,
- 25 para uso en la prevención de fallo de la membrana peritoneal, atenuación de la alteración de la función de barrera y prevención del desprendimiento de células mesoteliales.
4. Fluido de diálisis peritoneal de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho oligopéptido está seleccionado del grupo que consiste en alanil-glutamina y glutaminil-alanina.
- 30 5. Compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 2 o el fluido de diálisis peritoneal para uso de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por que dicho oligopéptido está seleccionado del grupo que consiste en alanil-glutamina y glutaminil-alanina.
6. Uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en
- L-glutamina,
- 35 - un dipéptido capaz de liberar L-glutamina, en forma libre, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en glutaminil-glicina, glicinil-glutamina, glutaminil-alanina, alanil-glutamina
- un oligopéptido que consiste en de dos a siete residuos de L-glutamina y
 - mezclas de los mismos,
- 40 para la preparación de un fluido de diálisis peritoneal basado en glucosa para la prevención del fallo de la membrana peritoneal, la atenuación de la alteración de la función de barrera y la prevención del desprendimiento de las células mesoteliales.

Figura 1

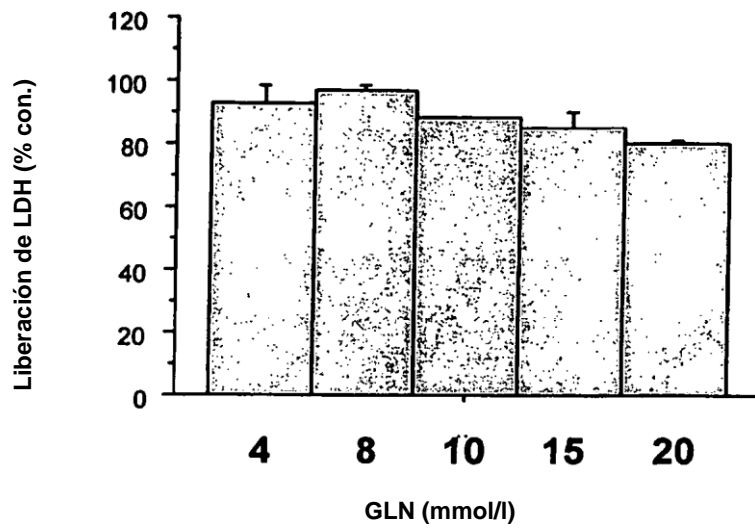


Figura 2

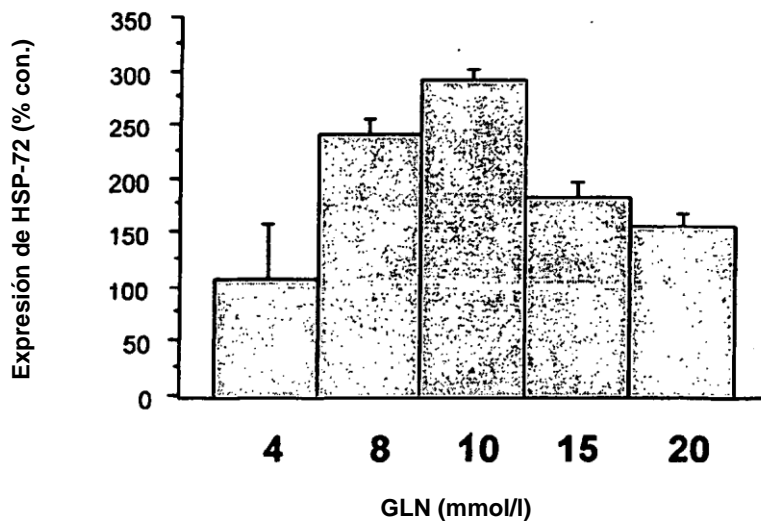


Figura 3

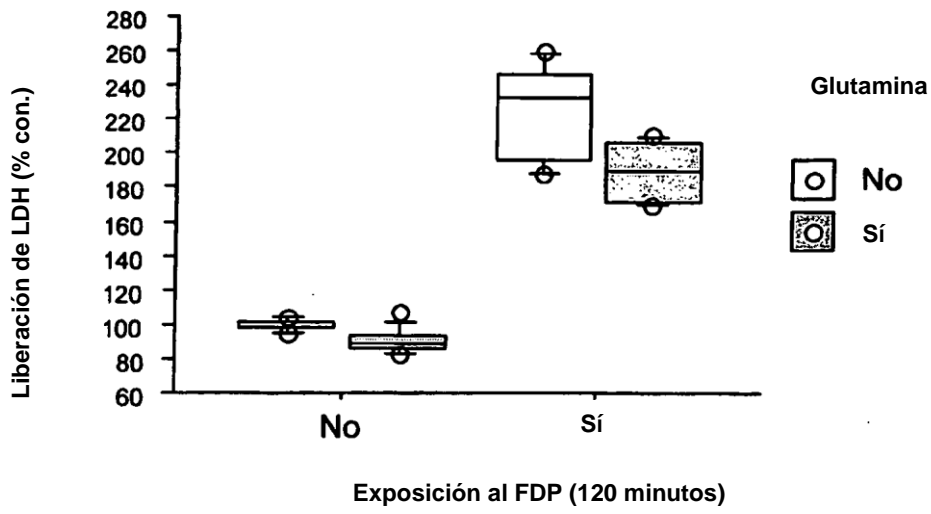


Figura 4

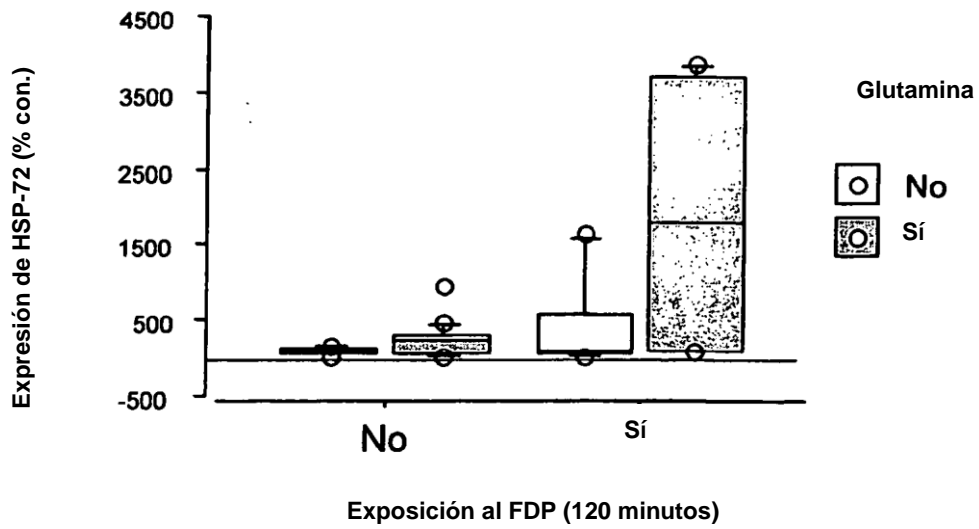


Figura 5

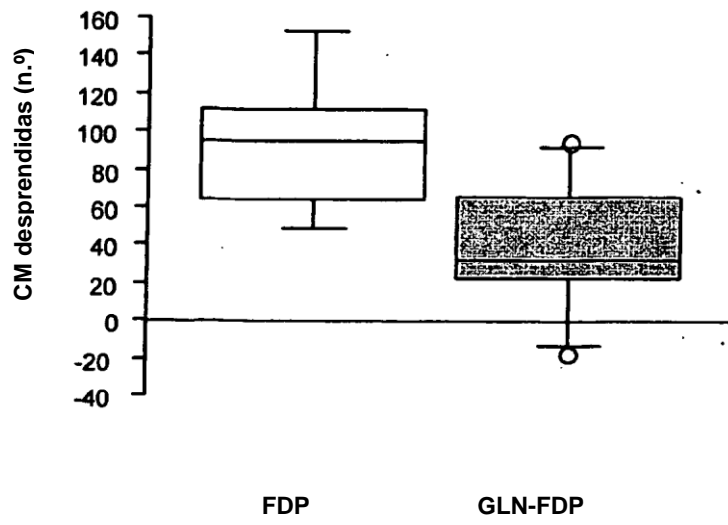


Figura 6

