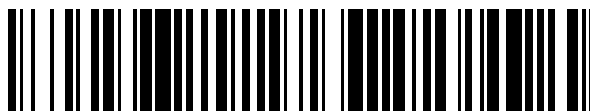


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 715**

51 Int. Cl.:

A61K 31/198 (2006.01) **A61K 31/7048** (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 39/00 (2006.01)
A61K 31/167 (2006.01)
A61K 31/282 (2006.01)
A61K 31/436 (2006.01)
A61K 31/662 (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)
A61K 31/7036 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2009 E 09164710 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2143429**

54 Título: **Uso de la cilastatina para reducir la nefrotoxicidad de distintos compuestos**

30 Prioridad:

11.07.2008 WO PCT/ES2008/070137

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

28.03.2014

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL GREGORIO
MARAÑÓN (100.0%)
C/ Doctor Esquerdo, 46
28007 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**TEJEDOR JORGE, ALBERTO;
LÁZARO FERNÁNDEZ, ALBERTO;
CAMANO PÁEZ, SONIA;
TORRES REDONDO, ANA MARÍA;
LÁZARO MANERO, JOSÉ ANTONIO;
CASTILLA BARBA, MANUELA y
DE LUCAS COLLANTES, MARÍA DEL CARMEN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 451 715 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

Uso de la cilastatina para reducir la nefrotoxicidad de distintos compuestos

5 CAMPO TÉCNICO

La invención se refiere a la administración de cilastatina para reducir la nefrotoxicidad de diversos compuestos. Más concretamente, la invención se refiere al uso de la cilastatina para usar en la reducción de la nefrotoxicidad en un sujeto, caracterizado porque la nefrotoxicidad es causada por un fármaco nefrotóxico que es foscanet o iopamidol.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La dehidropeptidasa renal (DHP I) (también conocida como dihidropeptidasa I, dipeptidasa microsomal ó EC 3.4.13.19) es una glicoproteína involucrada en la hidrólisis del enlace peptídico de los dipéptidos (Adachi 1990, 15 Campbell 1966), que se encuentra localizada mayoritariamente en el borde en cepillo de las células del túbulo proximal del riñón. La DPH I es un homodímero con dos subunidades (α, β) constituidas cada una por un péptido de 369 aminoácidos (42 KDa). Las subunidades tienen cuatro posibles lugares de glicosilación y, se puede obtener una forma de 63 KDa altamente glicosilada. El sitio activo de cada una de las subunidades que componen el dímero (α, β) está compuesto por iones de zinc los cuales están orientados hacia las micro vellosidades del túbulo renal 20 (Nitanai 2002). La DHP I está implicada en el metabolismo renal del glutatión, en la conversión de leucotrieno D4 en leucotrieno E4 (Kozak 1982) y, es hasta el momento, la única enzima de mamíferos capaz de hidrolizar el anillo beta-lactámico (Campbell 1984). La DHP I es la responsable de hidrolizar el anillo β -lactámico del imipenem, inactivándolo (Kaham 1983), aunque no afecta a las penicilinas ni a las cefalosporinas.

25 La DHP I se encuentra anclada a la membrana celular mediante un enlace covalente a una estructura glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (Adachi 1990). La modificación del destino celular de la proteína por el anclaje GPI durante la traducción de la proteína es una modalidad de unión a la membrana de más de 200 proteínas en las células eucariotas. Además de permitir la unión de la proteína a la membrana tiene importantes funciones especialmente en la traducción de señales o en el proceso de reconocimiento (Nosjean 1997). Los residuos GPI se localizan 30 típicamente en dominios de la membrana ricos en colesterol y esfingolípidos llamados balsas de colesterol o "BDCs" (Morandat S 2002).

En una misma célula coexisten diferentes clases de BDC lipídicas. Además de las clásicas BDC sin proteínas estructurales, estos dominios ordenados pueden estar enriquecidos en un componente proteico estructural, que 35 drásticamente cambia la morfología y la función de la BDC. A esta clase emergente de proteínas se la denomina MORFs (Modifiers of BDC function). La primera MORF identificada fue la caveolina-1 (Cav-1). Se conocen tres genes de caveolina; las caveolinas 1 y 2 se expresan ubicuamente mientras que la 3 se expresa únicamente en astrocitos y células musculares (Smart 1999).

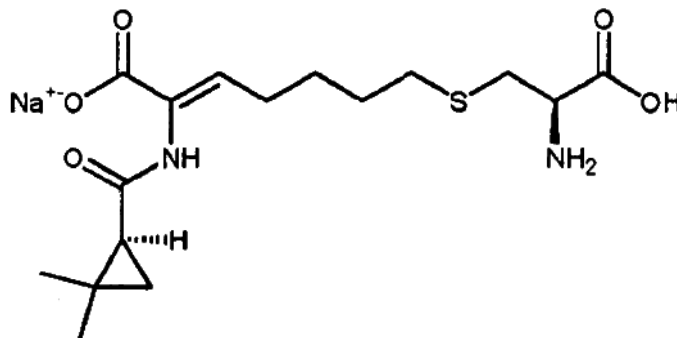
40 Cav-1 está integrada en el microambiente de la BDC pero está, además, anclada por su dominio citoplasmático al citoesqueleto. Esta disposición permite que las BDC así formadas generen depresiones en forma de plato de 50-100 nm (caveolas) y puedan ser localizadas o desplazadas de modo regulado.

Aunque las caveolas y las BDC comparten ciertas propiedades bioquímicas, la localización de las caveolinas en las 45 caveolas distinguen esos dominios de membrana. Desde su descubrimiento en los años cincuenta (Yamada 1955), se ha especulado mucho sobre la función de las caveolas. Las caveolas han sido implicadas en numerosas funciones como endocitosis, homeostasis de lípidos, tumorigénesis, transporte / regulación del calcio, transporte / regulación del colesterol, transcritosis de albúmina y otras proteínas a través del endotelio (Simons 2000, Razani 2002). Además las caveolinas interaccionan con las proteínas que residen en las caveolas. Esta interacción 50 proteína-proteína incluye entre otras a la sintetasa inducible del óxido nítrico (NOS 2) (Razani 2002).

El modelo de transporte apical basado en las BDC está fundamentado en las relaciones lípido-lípido y lípido-proteína. Recientemente se ha sugerido que las BDC podrían ser importantes en el transporte a través de una ruta endocítica alternativa a la de las vesículas recubiertas de clatrina. Las BDC podrían servir de sitio de entrada de 55 ciertos patógenos y toxinas, como en el caso de *Listeria monocitógenas* (Seveau 2004). Sin embargo, no se había sugerido que pudieran tener ninguna relevancia para el transporte de los fármacos conocidos por provocar citotoxicidad.

El nombre químico de la cilastatina sódica es sal monosódica del ácido [R-[R*,S*-(Z)]]-7-[(2-amino-2-carboxietil) tio]-

2-[[[2,2-dimetilciclopropil]carbonil]amino]-2-heptenoico. Su fórmula empírica es $C_{16}H_{25}N_2NaO_5S$, y tiene un peso molecular de 380,44 Da. Es un compuesto amorfo, de color blanquecino a blanco amarillento, higroscópico, muy soluble en agua y en metanol (Drusano GL 1984). Su estructura química es la siguiente:



5

La cilastatina inhibe la degradación renal de imipenem, llegando a alcanzar una tasa de excreción urinaria del 70% de la dosis inicial de imipenem administrada. Se estableció como dosis óptima un ratio imipenem: cilastatina (I/C) de 1:1 para mantener esta inhibición de 8 a 10 horas (Norrby 1983). Estudios con múltiples dosis revelan que la cilastatina no se acumula en sujetos sanos.

Se demostró que la cilastatina tiene una fuerte afinidad por la DHP I, midiendo los niveles de leucotrieno E4, cuya formación a partir del leucotrieno D4 tiene lugar en el riñón por la dehidropetidasa renal del borde en cepillo. En presencia de cilastatina, esta transformación se encontraba fuertemente inhibida, confirmando la interacción cilastatina-DHP I (Koller 1985, Campbell 1988).

Además de su efecto bien conocido como inhibidor de la dihidropeptidasa renal, la cilastatina puede inhibir los sistemas de transporte aniónicos (OATP) a nivel basolateral.

Como se mencionaba en la introducción de la revisión de Douglas H. Sweet (Sweet 2004), los transportadores de aniones orgánicos (OAT) tienen una función como “portales” a través de los cuales moléculas orgánicas cargadas cruzan la membrana plasmática del túbulo renal proximal, teniendo una función crítica en la excreción renal y desintoxicación de una amplia variedad de compuestos incluyendo fármacos, toxinas, hormonas y metabolitos neurotransmisores. Dos miembros de la familia de OAT, OAT1 y OAT3 (y posiblemente OAT2) median en la absorción basolateral de aniones orgánicos pequeños (300-500 Da). Se localizan en la membrana basolateral del túbulo proximal, es decir, al lado de los vasos sanguíneos, mientras que la DHP-1 y las balsas de colesterol están situadas en el sitio apical. En esta revisión (sección de “Future perspectives”) se comenta que está cada vez más claro que es la acción concertada de muchos transportadores de múltiples familias lo que determina finalmente el perfil de distribución sistémico in vivo final de cualquier sustrato dado. Diferentes factores como la afinidad del transportador, nivel de expresión, distribución espacial, localización de membrana y la ruta de exposición influirán todos en el grado en que los transportadores individuales actúan como determinantes de las toxicidades específicas de células u órgano.

El efecto inhibidor de la cilastatina en los OAT a nivel basolateral, lo han descrito por ejemplo Takeda M y col. (Takeda M 2001), que describen que la cilastatina es más selectiva para OAT3 que para OAT1, comentando que dichos miembros de la familia de OAT están implicados en la absorción activa de diferentes fármacos y sustancias endógenas por la membrana basolateral del túbulo proximal, es decir, fármacos antiinflamatorios no esteroideos o fármacos antitumorales. Se ha discutido la implicación en el metabolismo de otros fármacos, con poco éxito debido a que el efecto esperado de la acción de la cilastatina en los OATP sería aumentar los niveles en la circulación del fármaco implicado y disminuir su aclaramiento general, exactamente los efectos opuestos a los observados.

El documento WO 2007/130509 describe el uso de la cilastatina como un nefroprotector para reducir o prevenir la toxicidad renal de la PQQ (pirrolo-quinolina quinona), un compuesto que se mantuvo que era un nutriente hasta que se descubrió que era un agente cardioprotector. El efecto nefroprotector de la cilastatina (y otros agentes tales como el probenecid) se basa en su actividad como un bloqueante de la impedancia para el flujo transtubular. En el documento WO 2007/130509 se consideran diferentes formulaciones y dosificaciones, que incluyen la administración secuencial y simultánea de PQQ y el nefroprotector, así como varias vías de administración,

incluyendo la administración oral e intravenosa.

En los años 80, la investigación farmacológica sobre la ciclosporina A y sus posibles interacciones con otros fármacos de uso común permitió obtener evidencias de que la asociación de I/C podía ser útil para disminuir la nefrotoxicidad de la primera. La ciclosporina A (CsA) es un endecapéptido cíclico lipofílico, identificado en principio como antifúngico, para el cual se demostró en 1972 una potente actividad inmunosupresora, aprobándose su uso definitivo en 1983. Desde la introducción de la CsA y su combinación con otros inmunosupresores ha mejorado notablemente la terapia inmunosupresora tanto en los trasplantes de órganos sólidos y de médula ósea, como en numerosas enfermedades autoinmunes. CsA actúa principalmente sobre los linfocitos T, inhibiendo la cascada de reacciones bioquímicas altamente dependientes del ion calcio que tienen lugar tras la unión de un antígeno al receptor de las células T y que marca la activación y la proliferación de los linfocitos T a través de la síntesis de IL-2 (Belitsky 1986, Ryffel 1990).

El principal efecto secundario de la CsA es la nefrotoxicidad, que afecta tanto al riñón nativo (en casos de trasplante hepático, cardíaco o de médula ósea) como al trasplantado (trasplante renal) (Calne 1978). En ambos casos el efecto es dependiente de la dosis. A nivel tubular, la entrada de CsA en el túbulo proximal es muy rápida. In vitro el 80% del total se transporta en los diez primeros minutos a 30° C (Jackson 1988). Las evidencias morfológicas sugieren que el daño subletal tubular incluye hinchazón del retículo endoplasmático, vacuolización isométrica, aparición de autolisosomas, mitocondrias gigantes, micro calcificaciones, cambios en el citoplasma del epitelio tubular, necrosis, exfoliación de las células tubulares, regeneración tubular, y aumento ocasional de mitosis (Mihatsch 1986). Se ha visto que bajas dosis de CsA causan una elevación importante del calcio intracelular en primer lugar antes de la pérdida de la viabilidad celular. También se ha demostrado que CsA activa genes proapoptóticos en las células tubulares e intersticiales.

Sin embargo, se observó que la inclusión de I/C en el tratamiento con CsA producía una disminución de la alteración de la función renal en ratas (Sido 1987). Estos experimentos se confirmaron en ratas nefrectomizadas sometidas a un trasplante renal (Hammer, 1989) y, posteriormente, en seres humanos, demostrándose que la administración de cilastatina puede contrarrestar de manera eficaz la nefrotoxicidad inducida por la CsA en el período inmediato posterior a un trasplante cardíaco (Markewitz, 1994), de médula ósea (Gruss, 1996) y renales (Carmellini, 1997, 1998).

Dado que la ciclosporina A no es un sustrato de la DHP I, no se conocían hasta ahora las razones del efecto nefroprotector de imipenem/cilastatina (I/C) cuando se administraba conjuntamente, especialmente si se tiene en cuenta que el hecho de que al no disponer de cilastatina aislada, no se habían realizado experimentos en los que se administrara cilastatina o imipenem por separado. Lo que no permitía atribuir de forma clara dichos efectos a uno u otro fármaco. Mraz (1987, 1992) sugirió que el efecto nefroprotector, atribuido en su caso a la cilastatina, se debía a la reducción de las concentraciones plasmáticas de CsA. Sin embargo, Markewitz no encontró diferencias significativas en las dosis de CsA ni en los niveles sanguíneos de CsA o sus metabolitos, al igual que Sido (Sido 1987) y Hammer (Hammer 1989). Por su parte Gruss observó que los pacientes tratados con I/C tenían niveles de CsA menores que los pacientes no tratados con I/C. Sin embargo, el efecto protector de I/C no se pudo atribuir a cambios en los niveles de CsA (Gruss 1996).

El documento WO 97/37649 describe un procedimiento para reducir la nefrotoxicidad en un paciente que recibe un agente terapéutico principal que causa nefrotoxicidad, por la administración de un inhibidor de la deshidropeptidasa (DHP), citando la cilastatina como el inhibidor de deshidropeptidasa preferido. La realización más preferida parece ser la reducción de la nefrotoxicidad debido a CyA en tratamientos que implicaban inmunosupresión, aunque también se mencionan la gentamicina, anfotericina B y cisplatino como fármacos cuya toxicidad se reduce. No se proporcionan ejemplos en el documento WO 97/37649; el procedimiento descrito en dicha solicitud se puede considerar como basado en el descubrimiento de que la cilastatina protege frente a la nefrotoxicidad en general como un inhibidor de DHP. El mecanismo por el que la inhibición de DHP podría tener un efecto nefroprotector no se discute en el documento WO 97/37649, y no se había establecido conexión entre la toxicidad causada por los compuestos quimioterapéuticos tales como el cisplatino y la posible mediación de la deshidropeptidasa, cuando se presentó la solicitud.

De hecho, el folleto proporcionado por el fabricante de cilastatina, Biomol International LP (folleto accesible en internet en <http://www.biomol.com/SiteData/docs/ProductData/pi153.pdf>), describe la cilastatina como un inhibidor de dipeptidasa que inhibe la hidrólisis de antibióticos β -lactámicos, atribuyendo su acción nefroprotectora sobre los efectos secundarios de la ciclosporina A, a la inhibición de la dipeptidasa del borde en cepillo del túbulo proximal.

Ciclosporina es apolar, muy levemente soluble en agua, soluble en lípidos y solutos orgánicos, y la posibilidad de que alcance el interior de las células del epitelio del túbulo proximal mediante el sistema de transporte de aniones orgánicos (OATP) es muy baja, considerado hasta ahora que su mecanismo de transporte era por difusión pasiva transmembrana.

5

Aunque la cilastatina es considerada exclusivamente como un inhibidor de DHPI renal, su capacidad para reducir la toxicidad renal de la ciclosporina cuando la ciclosporina no es un sustrato de DHPI, sugiere a los autores de la invención que quizás la DHPI – y la cilastatina, estaban implicados en una forma diferente en las acciones tóxicas locales de la ciclosporina. Puesto que la ciclosporina es tóxica para el túbulo proximal, donde está presente el DHPI, debido a una gran reabsorción transcelular, los autores de la invención suponen que la cilastatina podría interferir con la misma. Sin embargo, esto tendría un gran interés, debido a que la nefrotoxicidad es un problema que afecta a muchos fármacos y limita la administración de dosis que serían necesarias para lograr su efecto en la afección que se pretende tratar. Los efectos nefrotóxicos requieren reducir dichas dosis o suspender la administración del fármaco antes de cumplir el tratamiento. Por ello, identificar algún compuesto que reduzca la nefrotoxicidad para un alto número de fármacos con potencialidad nefrotóxica sería de gran interés para la práctica clínica.

Pérez y col. (Pérez M 2004) publicaron ensayos que demuestran que la cilastatina reduce la nefrotoxicidad de los inhibidores de calcineurina ciclosporina A (CyA) y FK506 (tacrolimus) y mencionan que la nefrotoxicidad de la vancomicina y el cisplatino también se reduce cuando se coadministran con imipenem/cilastatina, atribuyendo este último efecto nefroprotector a la cilastatina. Se sugiere que la cilastatina podría reducir la toxicidad de la CyA (y tacrolimus) inhibiendo su transporte transcelular. También se plantea que la interferencia de la cilastatina con el transporte de la CyA a través de la membrana está probablemente relacionada con interacciones con MBCR (balsas ricas en colesterol unidas a membrana) que se menciona que supuestamente son usadas por la CyA para su transporte difusivo a través de la membrana celular. De acuerdo con la sección de discusión del artículo, las MBCR se considerarían como rutas de transporte difusivo preferidas (“agujeros de colesterol”) por diferentes xenobióticos tales como imipenem, CyA, FK506, vancomicina o cisplatino; la cilastatina regularía la absorción de sustancias tales como la CyA a través del borde en cepillo del túbulo proximal a través de su interacción con las MBCR. Aunque se concluye que la utilidad de la cilastatina como un protector renal amplio es una posibilidad que merece mayor atención, no se hace ningún comentario o sugerencia sobre la posible extensión de la protección o las características estructurales y/o funcionales que deben cumplir los compuestos que podrían usar las balsas de colesterol (MBCR) como rutas de transporte difusivo. Por lo tanto, queda sin resolver el problema de proporcionar agentes que causen nefrotoxicidad que se podría tratar o prevenir con la cilastatina, alternativos a los mencionados antes.

35 Esta invención proporciona una solución a ese problema.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención proporciona cilastatina para usar en la reducción de la nefrotoxicidad en un sujeto, caracterizado porque la nefrotoxicidad es causada por un fármaco nefrotóxico que es foscarnet o iopamidol.

Se basa en el descubrimiento, divulgado en la presente memoria descriptiva, de que gran cantidad de fármacos y otros compuestos con conocido efecto nefrotóxico, cuyo mecanismo de transporte al interior de las células del epitelio tubular proximal era desconocido o estaba adscrito a otras moléculas de membrana, penetran en las mismas a través de la ruta dependiente de las balsas de colesterol. Esta ruta de transporte parece ser un mecanismo general, independiente de la naturaleza química del compuesto transportado, pues entre los compuestos ensayados para los que se ha detectado este transporte (la mayoría de ellos fármacos con reconocida utilidad terapéutica pero en los que la nefrotoxicidad es un inconveniente mayor) se encuentran tanto compuestos polares como apolares, catiónicos o neutros; tanto liposolubles como hidrosolubles. En la siguiente tabla, pueden observarse las características de solubilidad y acidez/basicidad de los mismos:

Tabla 1: Características químicas de los compuestos nefrotóxicos con los que se ha ensayado el efecto nefroprotector de la cilastatina:

FÁRMACO	ACIDEZ/BASICIDAD	SOLUBILIDAD EN MEDIO ORGÁNICO	SOLUBILIDAD EN AGUA
CICLOSPORINA	apolar	alta	baja
TACROLIMUS	apolar	alta	insoluble
VANCOMICINA	anfótero	-	alta
GENTAMICINA	neutro	soluble en DMF, insoluble en solutos orgánicos	soluble en agua
CISPLATINO	neutro	DMF (9,7 mg/kg)	0,253 g /100 g
PARACETAMOL	neutro	soluble en etanol y acetona, insoluble en suero	moderadamente soluble en agua caliente
FOSCARNET	aniónico	insoluble	soluble en agua
IOPAMIDOL	aniónico	soluble en metanol, insoluble en cloroformo	soluble en agua
CLOROFORMO	apolar	soluble	miscible en agua
ANFOTERICINA	aniónico	soluble en DMF (2-4 mg/ml), DMF+HCl (60-80 mg/ml) (30-40 mg/ml)	soluble en agua a pH 2 o pH 11 (0,1 mg/ml)
MANITOL	aniónico	soluble en glicerol, insoluble en éter	soluble en agua (1 g/5,5 ml)

Los ensayos que se muestran en los ejemplos de la presente memoria demuestran que la cilastatina es capaz de interferir con este mecanismo de transporte, disminuyendo la acumulación de los principales nefrotóxicos en la célula del túbulo renal, reduciendo con ello el daño producido por los mismos al túbulo proximal. Así mismo, la cilastatina da lugar a una disminución tanto de los fenómenos tempranos como tardíos asociados con la muerte celular por apoptosis de las células del túbulo proximal, así como a la restauración de la morfología y de la capacidad regenerativa del epitelio tubular, todo ello cuando se administra simultáneamente con el nefrotóxico cuyo efecto se pretende paliar.

10 Por tanto, la administración de cilastatina es capaz de disminuir la nefrotoxicidad de un compuesto que penetre en las células del epitelio tubular proximal renal mediante el mecanismo de transporte en el que están implicadas las balsas de colesterol que contienen DHPI. Ello da lugar al uso propuesto en la invención.

Además, la especificidad conferida a la acción de la cilastatina por su direccionamiento hacia una proteína que sólo se localiza en las balsas de colesterol del túbulo proximal permite suponer que no tendrá efecto sobre células desprovistas de borde en cepillo (desprovistas de DPH-I), y por lo tanto ejercerá un efecto específico de riñón. Esto hace especialmente apropiada a la cilastatina para ser utilizada en afecciones clínicas diversas, en combinación con fármacos dirigidos a distintos tejidos, sin que se produzca reducción en la actividad farmacológica de los mismos en sus órganos-diana.

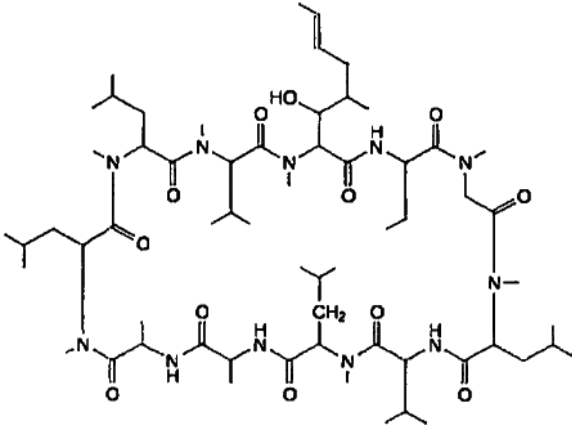
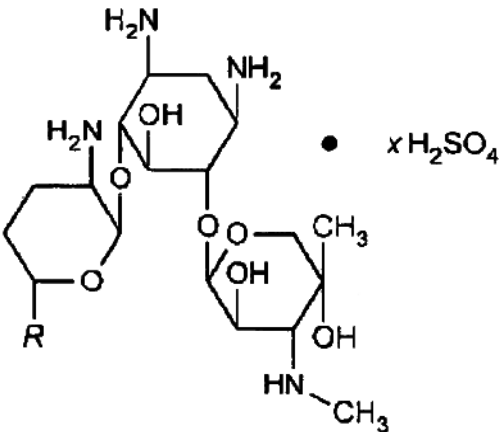
20 En la presente invención, el compuesto cuya nefrotoxicidad se pretende reducir es un fármaco que se selecciona entre foscarnet e iopamidol.

Sea cual sea el fármaco, es una realización preferida de la invención aquella en la que el medicamento fabricado contiene tanto cilastatina como el fármaco cuyos efectos nefrotóxicos se desean paliar, pues ello facilita su administración simultánea, aunque pueden constituir parte de la misma forma de presentación farmacéutica (suspensión, solución, comprimido, polvo liofilizado...) o formar parte de formas de presentación farmacéuticas diferentes, pero incluidas en un mismo medicamento (contenidas, por ejemplo, en dos viales o ampollas diferentes), facilitando esta última presentación administrar la cilastatina en distintas proporciones relativas con respecto al fármaco nefrotóxico o, incluso, decidir si ambos compuestos se administran al individuo a tratar simultáneamente o separados en el tiempo. Se prefiere particularmente que ambos fármacos se administren al individuo simultáneamente. La administración de cilastatina, sin embargo, puede realizarse en dosis divididas, separadas en el tiempo. La primera de dichas dosis preferiblemente se administra de forma simultánea con el fármaco cuyo efecto nefrotóxico se desea reducir, siendo posible la administración de otras dosis de cilastatina en el período comprendido entre dosis sucesivas del fármaco nefrotóxico. La administración de cilastatina puede ser oral o parenteral (intramuscular, intraperitoneal o intravenosa). Se prefiere que la cilastatina se administre por vía parenteral, especialmente por vía intravenosa (que es la forma de administración parenteral más común en seres humanos). Por lo tanto, se prefiere particularmente que el medicamento que comprenda cilastatina esté diseñado para ser administrado por vía parenteral, tal como una solución en suero salino u otro disolvente adecuado farmacéuticamente aceptable. Son también formas de presentación preferidas las que faciliten la preparación de

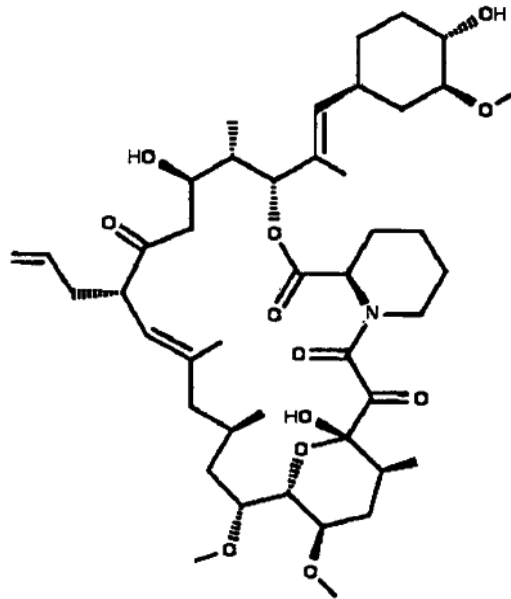
soluciones o suspensiones de cilastatina en el momento de su administración, a la concentración deseada, tales como las presentaciones en polvo.

Como se ha comentado antes, los fármacos ensayados tiene diferentes efectos farmacológicos (antibióticos, 5 citotóxicos, antiinflamatorios, antirretrovirales, anestésicos e inmunosupresores). Concretamente, en los ejemplos que se muestran más adelante en la presente memoria se han realizado ensayos con los siguientes compuestos:

Tabla 2: Fórmula y actividad de los compuestos nefrotóxicos con los que se ha ensayado el efecto nefroprotector de la cilastatina:

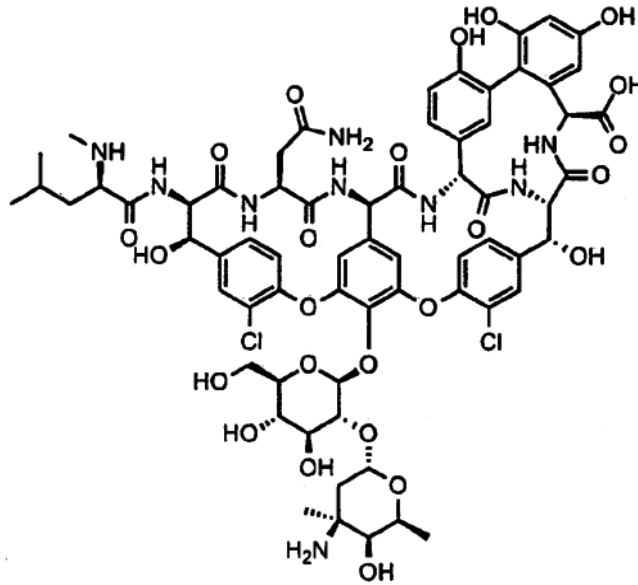
10	Compuesto Ciclosporina A (CsA)	Fórmula química	Descripción
			<p>Endecapéptido cíclico con fórmula química $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ y un peso molecular de 1202,16 Da. Se usa como inmunosupresor.</p>
	Gentamicina		<p>Antibiótico aminoglucósido con fórmula química $C_{12}H_{43}N_5O_7$ y un peso molecular de 449,5</p>

Tacrolimus



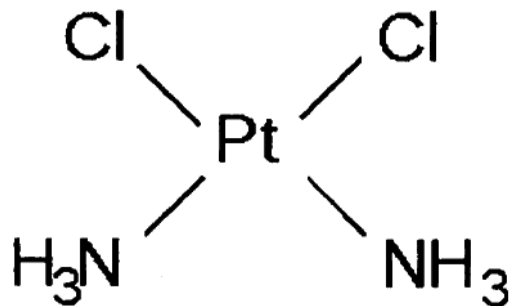
Macrólido cuya fórmula empírica, en su forma de monohidrato es, $C_{44}H_{69}NO_{12}$, y con un peso molecular de 822 Da. Se usa como inmunosupresor.

Vancomicina



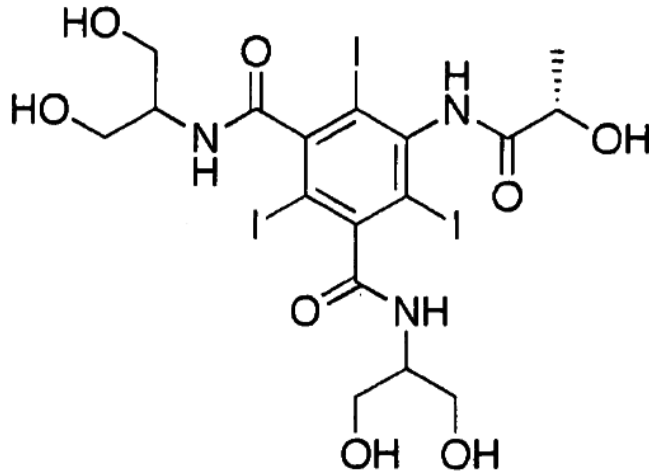
Antibiótico glicopéptido con una estructura compleja. Su fórmula empírica es $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$ y su peso molecular es 1485,7 Da.

Cisplatino



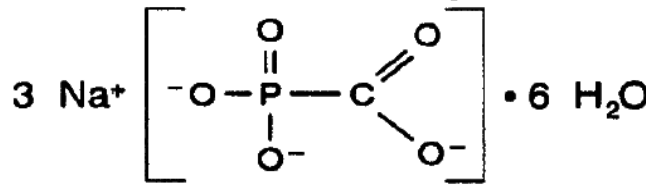
Agente quimioterapéutico que contiene platino (diaminodicloroplatino (trans)). Fórmula empírica: $Pt(NH_3)_2Cl_2$, y peso molecular de 300 Da.

Contraste yodado
(Iopamidol)



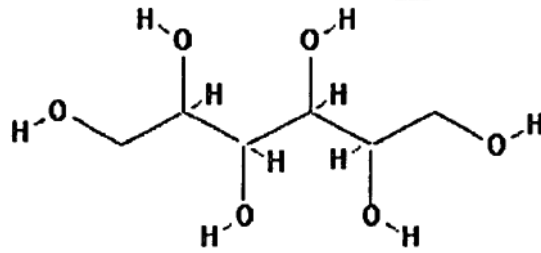
Usado para el diagnóstico por un contraste radiológico nefrótico. Fórmula empírica $C_{17}H_{22}I_3N_3O_8$ y peso molecular de 777,09 D.

Foscarnet



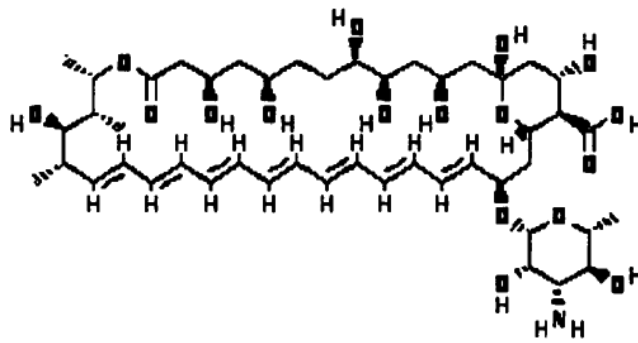
Antirretroviral.
Análogo de pirofosfato.

Manitol



Análogo de azúcar alcohólico con fórmula $C_6H_{14}O_6$ y peso molecular de 182,17 Da. Se usa como diurético osmótico.

Anfotericina B



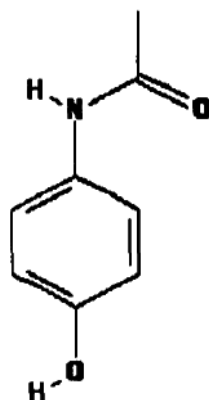
Macrólido antifúngico con una fórmula empírica $C_{47}H_{73}NO_{17}$ y un peso molecular de 924,07902 Da.

Cloroformo

$CHCl_3$

Compuesto tóxico que puede entrar en el cuerpo por inhalación, ingestión o a través de la piel. La inhalación o ingestión de cloroformo durante periodos prolongados puede dañar el hígado, riñones, piel, y sistema nervioso central. La exposición esporádica a niveles muy altos puede causar la muerte.

Paracetamol



Analgésico antipirético derivado de acetanilida, con fórmula empírica $C_8H_9NO_2$ y peso molecular de 151,16256 Da.

Como puede observarse a partir de su fórmula y por las características expuestas en la Tabla 1, todos ellos son compuestos de distinta naturaleza. En el caso de fármacos a los que por su carácter aniónico, o por ser extremadamente lipofílicos, pueda existir un segundo mecanismo de penetración celular, el efecto nefroprotector de la cilastatina podría ser menor, si dicho mecanismo no es inhibido por la última. Adicionalmente al sistema de transporte en el que intervienen las balsas de colesterol aquí descrito, los fármacos de carácter aniónico a pH fisiológico pueden penetrar también en la célula renal mediante los sistemas de transporte de aniones orgánicos (OATPs). Por ello, el efector nefroprotector de la administración de cilastatina es menor en los fármacos de naturaleza aniónica, tales como la anfotericina B, al poseer un mecanismo alternativo de entrada a la célula que no es inhibido por la cilastatina. Es por ello que una de las realizaciones preferidas de la invención es aquella en la que el fármaco es de naturaleza catiónica o neutro a pH fisiológico, al pH normal de la sangre, cuyo valor es 7 o próximo a 7. Tal como puede observarse en la Tabla I, de los compuestos con los que se han realizado los ensayos que se exponen en los ejemplos, relacionados con el efecto nefroprotector de la cilastatina, presentan carácter neutro a pH fisiológico la gentamicina, el cisplatino y el paracetamol, mientras que foscarnet, iopamidol, anfotericina y manitol son de naturaleza aniónica a dicho pH. La ciclosporina, el tacrolimus y el cloroformo son de naturaleza apolar, por lo que podrían penetrar también en las células del túbulo proximal por difusión pasiva. Hay que indicar que los ejemplos y resultados discutidos en el presente documento que se refieren a otros fármacos o compuestos nefrotóxicos distintos del foscarnet y el iopamidol, no forman parte de la invención reivindicada.

En cualquier caso, tal como se ha mencionado previamente, son realizaciones preferidas de la invención aquellas en las que el fármaco es:

- gentamicina;
- tacrolimus;
- 25 - foscarnet;
- paracetamol;
- cisplatino;
- anfotericina; manitol; o
- iopamidol.

En una realización particularmente preferida de la invención, el fármaco nefrotóxico es el foscarnet (ácido fosfonofórmico, administrado normalmente en forma de su sal trisódica hidratada), un análogo del pirofosfato que inhibe específicamente la DNA polimerasa de los virus herpes y que tiene también actividad anti-VIH. El foscarnet se utiliza para el tratamiento de la retinitis provocada por el citomegalovirus en pacientes aquejados de SIDA tratados con AZT, así como en infecciones provocadas por herpes resistentes a AZT. Su principal efecto adverso es precisamente su toxicidad renal, que limita su uso.

El paracetamol (N-(4-hidroxifenil)etanamida), también conocido como acetaminofén, fármaco de conocida actividad analgésica y antipirética cuya extendida utilización, a menudo sin conciencia de que la dosis normal es cercana a la sobredosis, ha dado lugar a frecuentes intoxicaciones e, incluso, a su utilización en intentos de suicidio. Aunque el efecto más común de la sobredosis de paracetamol (una dosis única de paracetamol de 10 gramos o dosis continuadas de 5 g/día en un no consumidor de alcohol con buena salud, ó 4 g/día en un consumidor habitual de alcohol, podrían dar lugar a toxicidad) es el daño hepático. Es frecuente también el fallo renal, que sería importante paliar en caso de una ingesta excesiva de este fármaco.

El cisplatino (cis-diaminodicloroplatino II) es un compuesto simple de platino utilizado como antineoplásico frente a una gran cantidad de tumores (ovario, testículo, vejiga, cabeza y cuello, pulmón, endometrio). Sin embargo, tiene efectos adversos potencialmente letales que afectan a diferentes órganos, de los que el más frecuente, que limita su uso, es la nefrotoxicidad. A menudo, los tratamientos con cisplatino deben interrumpirse, o sus dosis deben reducirse a niveles muy inferiores a los que sería deseable para conseguir el efecto quimioterapéutico buscado, debido a la nefrotoxicidad causada por el mismo. Es por ello que la búsqueda de metodologías para intentar paliar su efecto nefrotóxico, sin disminuir su actividad quimioterapéutica, se ha convertido en un problema importante para el cual la coadministración con cilastatina significa una esperanzadora solución. Como se ha comentado de forma general para cualquier otro fármaco, la administración de cilastatina puede ser previa, simultánea o posterior a la administración del cisplatino, puede realizarse en más de una dosis y la vía de administración puede ser la misma o diferente a la vía de administración del cisplatino. Se prefiere que la cilastatina se administre por vía parenteral (con preferencia, en el caso de seres humanos, por la vía intravenosa, aunque en los experimentos en ratas es corriente que la forma de administración parenteral con la que se experimenta sea la vía intraperitoneal) y se prefiere que la dosis de cilastatina sea de al menos 750 mg/día en una dosis diaria o repartida en al menos dos dosis diarias.

Un compuesto que no tiene actividad conocida como fármaco, puede ser cualquier otro agente nefrotóxico cuyos efectos se desean limitar, que pueda haber sido administrado a un individuo por distintas causas, fortuitas o no. Así, el medicamento en cuya fabricación se usa la cilastatina podría servir también para paliar los efectos dañinos sobre el riñón de distintos compuestos de naturaleza tóxica que actúen sobre el mismo, tales como venenos ingeridos o inhalados de forma voluntaria o fortuita, administrando dicho medicamento con posterioridad al momento en el que el compuesto nefrotóxico se ha introducido en el organismo a tratar o, incluso, de forma simultánea. Situación ésta última en la que la cilastatina podría servir como antídoto de los efectos nefrotóxicos de un compuesto cualquiera cuando dicho compuesto se ingiera de forma voluntaria.

En la presente invención, la cilastatina se proporciona para usar en la reducción de la nefrotoxicidad de un compuesto en un sujeto, en el que se desea reducir el efecto nefrotóxico. El compuesto cuya nefrotoxicidad se pretende reducir es un fármaco que es foscarnet o iopamidol. La cilastatina se puede administrar al mismo tiempo que el fármaco cuyo efecto nefrotóxico se pretende reducir, pero también antes y/o después de la administración del fármaco nefrotóxico. Dicha administración puede producirse en una única dosis o en dosis divididas, la primera de las cuales puede ser previa, simultánea o posterior a la de administración del fármaco nefrotóxico. Se prefiere un fármaco distinto de ciclosporina A, vancomicina o imipenem, que es el foscarnet.

En la presente invención, la cilastatina puede administrarse por vía oral, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa (de las cuales, las tres últimas pueden considerarse vías parenterales, es decir, vías en las que se elude que el fármaco tenga que llegar al intestino y pasar a la sangre por mecanismos asociados a este órgano). Se prefiere que la cilastatina se administre por vía parenteral, especialmente por vía intravenosa, por ejemplo, en forma de solución en suero salino u otro disolvente adecuado farmacéuticamente aceptable. En el caso de la administración parenteral, se prefiere que la dosis de cilastatina sea de al menos 750 mg/día, que puede administrarse en forma de una única dosis diaria o repartida en al menos dos dosis diarias.

Un aspecto más de la invención lo constituye una composición que comprende un fármaco nefrotóxico y cilastatina, caracterizado porque el fármaco nefrotóxico es foscarnet o iopamidol. Una realización preferida de la invención es aquella en la que la composición carece de imipenem. Se prefiere particularmente que el fármaco nefrotóxico sea distinto de ciclosporina A y se selecciona entre foscarnet o iopamidol. En cualquiera de los casos, la composición puede comprender al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable y puede estar, entre otras, en forma de polvo o en forma de solución. En este último caso, el disolvente preferido es suero salino. En cualquiera de las realizaciones, se prefiere que la composición esté diseñada para reducir la nefrotoxicidad del fármaco nefrotóxico en el individuo al que se le administre.

La invención se explicará ahora con mayor detalle mediante las siguientes figuras y ejemplos, en los que solo aquellos ejemplos que se refieren a foscarnet o iopamidol forman parte de la invención reivindicada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Fig. 1 se refiere al bloqueo de la circulación de balsas de colesterol por cilastatina. La figura muestra la fluorescencia debida a toxina B fluorescente en células del epitelio tubular proximal porcino en un cultivo primario, en concreto:

- La Fig. 1A muestra la evolución de la fluorescencia frente al tiempo en células control (fotografías superiores de la parte derecha de la figura) y células incubadas en presencia de cilastatina (Control + RRbp-x).

5 - La Fig. 1B es un gráfico donde se representa la fluorescencia observada en el aparato de Golgi a las 2,5 horas de haber marcado las caveolas de las membranas con toxina B fluorescente (toxina B-FITC), expresada como el número de células que mostraban dicha fluorescencia por milímetro cuadrado (Nº. Cel/mm²), en células control (barra sin relleno) y células tratadas con cilastatina (barra con relleno oscuro continuo) o con filipina (barra rellena con líneas verticales).

10 La Fig. 2 muestra la falta de efectos dañinos de cilastatina en células y el crecimiento durante los días de cultivo, expresado como miles de células observadas por centímetro cuadrado (células x 1000/cm²), de un cultivo primario de células del epitelio tubular proximal porcino, en ausencia de cilastatina (control) o en presencia de las concentraciones de cilastatina (CIL) indicadas en la figura.

15 La Fig. 3 se refiere a la reducción o ausencia de apoptosis celular en presencia de cilastatina. El gráfico muestra el factor de enriquecimiento en oligonucleosomas, calculado respecto a las células control incubadas sin nefrotóxicos (primer par de barras), observado al incubar cultivos primarios de células de túbulo proximal de cerdo con los nefrotóxicos indicados, en ausencia (barras primeras de cada par, sin relleno) o en presencia de cilastatina (barras segundas de cada par, con relleno negro). *: ANOVA: efecto de cilastatina sobre cada fármaco: p<0,05.

20 La Fig. 4 muestra que la cilastatina impide o reduce la muerte celular por Anokis:

- La Fig. 4A muestra las citometrías de flujo de los líquidos sobrenadantes de cultivos primarios de células del túbulo proximal incubadas con cisplatino (gráficos de la columna izquierda) o vancomicina (gráficos de la columna derecha), en ausencia o en presencia de cilastatina (RRbp-X) (gráficos inferiores en ambos casos).

30 - La Fig. 4B muestra el recuento de las células desprendidas detectadas por microlitro de líquido sobrenadante (Nº. cel/µl SN) al incubar cultivos primarios de células del túbulo proximal con las dosis indicadas en el eje X de los fármacos nefrotóxicos vancomicina, gentamicina, cisplatino y paracetamol, según se indica bajo cada gráfico. En cada pareja de barras, la barra inicial (barras con relleno gris claro) corresponde al valor obtenido en la incubación con el nefrotóxico y la segunda barra (barras con relleno gris oscuro) al valor obtenido al coincubar con cilastatina (RRbp-X).

35 - La Fig. 4C muestra los recuentos de células desprendidas al líquido sobrenadante tras incubar cultivos de células del túbulo proximal con los fármacos nefrotóxicos vancomicina (datos indicados por rombos, ♦), gentamicina (datos indicados por triángulos, ▲), o cisplatino (datos indicados por círculos, ●). En el eje X se dan los valores obtenidos en las incubaciones sin cilastatina, mientras que en el eje Y aparecen los valores después de incubaciones con cilastatina (RRbp-X). Se representa también la línea de identidad que se obtendría si los valores obtenidos en presencia o en ausencia de cilastatina fueran idénticos para cada nefrotóxico.

40 La Fig. 5 se refiere a la restauración de la capacidad oxidativa mitocondrial del túbulo proximal en presencia de cilastatina. Se muestra la reducción del MTT (dando lugar a la aparición de un compuesto de color azul, formazán) por células del túbulo proximal en cultivo primario incubadas con los nefrotóxicos indicados en cada uno de los gráficos. Los gráficos de la parte izquierda corresponden a la aparición de formazán (medido como aumento relativo
45 en la absorbancia del medio a 595 nm) observado en las células incubadas durante 24 horas con las concentraciones de nefrotóxico indicadas en el eje X, en ausencia (primera barra de cada par, con relleno más claro o sin relleno) o en presencia de cilastatina (segunda barra de cada par, con relleno negro). Los gráficos de la parte derecha corresponden a la formación de formazán detectado en células aisladas en tiempo real sin ningún
50 tratamiento (control) o incubadas con las concentraciones de nefrotóxico que se indican en la gráfica, en ausencia o en presencia de cilastatina (RRbp-X), después de los tiempos de incubación en segundos dados en el eje X. Los fármacos nefrotóxicos cuyos resultados se muestran incluyen vancomicina (Fig. 5A), cisplatino (Fig. 5B), paracetamol (Fig. 5C), ciclosporina (Fig. 5D) y tacrolimus (Fig. 5E).

55 La Fig. 6 demuestra que la cilastatina restaura la morfología celular. La figura muestra fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido de cultivos de células del túbulo proximal, incubadas en presencia de 1 µg/ml de ciclosporina (CsA 1 µg/ml, fotografías A y B) o en presencia de 1 µg/ml de ciclosporina y 200 µg/ml de cilastatina (fotografías C y D).

La Fig. 7 se refiere a la mejora de la recuperación celular, tras la agresión, que se observa en presencia de

- cilastatina. La figura muestra el crecimiento a lo largo de los días de cultivo, expresado como miles de células observadas por centímetro cuadrado (células x 1000/cm²), del cultivo primario de células del túbulo proximal, en ausencia (control) o presencia de las cantidades expresadas en los gráficos de los fármacos nefrotóxicos ciclosporina (CsA) (Fig. 7A) o tacrolimus (FK 506) (Fig. 7B), en ausencia o en presencia de cilastatina (Cil). En la Fig. 7A, los símbolos sobre las gráficas tienen los siguientes significados: *: ciclosporina vs. control, p<0,05; † : cilastatina + ciclosporina vs. control, p<0,05; #: cilastatina + ciclosporina vs ciclosporina, p<0,05. En la Fig. 7B, los significados son análogos: *: FK506 vs. control, p<0,05; † : FK506 + cilastatina vs. control, p<0,05; #: FK 506 + cilastatina vs. FK 506, p<0,05.
- 10 La Fig. 8 muestra los resultados de los ensayos de formación de colonias supervivientes, formadoras potenciales de colonias de regeneración, detectadas mediante tinción con violeta cristal de células en cultivo tratadas con cada uno de los nefrotóxicos que se indican bajo los gráficos, en presencia y ausencia de cilastatina. Puede observarse una mejora de la recuperación celular a la agresión de los nefrotóxicos, con aumento de la supervivencia a largo plazo (7 días), tras la coadministración de cilastatina y los nefrotóxicos que se indican bajo los gráficos: Fig. 8A: gentamicina (en este caso y a modo de ejemplo de todas las demás, se muestran fotografías de las placas donde las células supervivientes a la agresión aparecen teñidas con violeta cristal); Fig. 8B: vancomicina, Fig. 8C: cisplatino, Fig. 8D: paracetamol, Fig. 8E: ciclosporina; Fig. 8F: tacrolimus (FK506). Las gráficas muestran los resultados obtenidos al medir la absorbancia, a 595 nm, del colorante de las células del túbulo proximal incubadas durante 24 horas con los nefrotóxicos indicados en cada uno de los casos, a las concentraciones indicadas bajo las barras, tras la tinción de las células con cristal violeta. La primera barra de cada pareja corresponde a la incubación en ausencia de cilastatina (barras blancas) y la segunda a la incubación en presencia de cilastatina (barras negras).
- La Fig. 9 muestra la acumulación intracelular de diversos nefrotóxicos (de izquierda a derecha: vancomicina, ciclosporina, tacrolimus (FK506), paracetamol, cisplatino y gentamicina) cuando cultivos primarios de células del túbulo proximal se exponen durante 24 horas a concentraciones crecientes de los nefrotóxicos en ausencia (barras blancas) o en presencia (barras negras) de cilastatina (RRbp-x). Se mostró que la cilastatina impide la entrada de nefrotóxicos a la célula proximal. *: efecto cilastatina p<0,05; #: efecto dosis p<0,05.
- La Fig. 10 muestra que el efecto nefroprotector de cilastatina es específico del túbulo proximal. Se muestra la ausencia de un efecto protector de la cilastatina (RRbp-X) sobre la inducción de muerte celular inducida por ciclosporina A (CsA), mediante la representación del porcentaje de muerte celular observado en linfocitos T (diana de la ciclosporina A) incubados en ausencia de tratamiento ("Control negativo"), o incubados con camptotecina ("Control positivo"), ciclosporina A ("CSA"), o ciclosporina A + cilastatina. La Fig. 10A muestra el curso temporal del aumento del porcentaje de muerte celular producida por CsA en el tiempo estudiado: tras 4 horas de incubación (primera barra de cada pareja) o tras 16 horas de incubación (segunda barra de cada pareja). La Fig. 10B representa el efecto dosis-respuesta del efecto letal de CsA sobre linfocitos T humanos, mostrado por las diferencias encontradas al incubar con distintas dosis de CsA. Esta figura muestra la ausencia del efecto protector de la cilastatina (RRbp-X) sobre la inducción de muerte celular inducida por ciclosporina A (CsA), mediante la representación del porcentaje de muerte celular observado en linfocitos incubados en ausencia de tratamiento ("Control negativo") o incubados con camptotecina ("Control positivo"), ciclosporina a 1 µg/ml (tercera pareja de barras) o con ciclosporina a 100 µg/ml (cuarta pareja de barras), observándose la ausencia de efecto protector en presencia de cilastatina (segunda barra de las parejas, tercera y cuarta de barras).
- La Fig. 11 muestra también que el efecto nefroprotector de cilastatina es específico del túbulo proximal. Se muestra el efecto del cisplatino sobre la actividad mitocondrial en células tumorales HeLa (diana del cisplatino), obtenido a partir de los valores de absorbancia a 595 nm medidos en las células tras la realización del ensayo de reducción del MTT tras 12 horas (Fig. 11A) o 24 horas de incubación (Fig. 11B) con los compuestos indicados bajo las barras: Control: células sin tratamiento, incubadas sólo con el medio de cultivo; CISPLA: células incubadas con cisplatino, a concentraciones de 1 µM (segunda pareja de barras de cada gráfico), 10 µM (tercera pareja de barras de cada gráfico) ó 30 µM (cuarta pareja de barras de cada gráfico); CAMPTO: camptotecina, control positivo de muerte por apoptosis. Cada uno de los tratamientos se llevó a cabo en ausencia de cilastatina (primera barra de cada pareja: barras con relleno gris, "SIN CIL") o en presencia de cilastatina (segunda barra de cada pareja: barras con relleno negro, "CON CIL"). *p<0,05 vs. Control y control + cilastatina; ns= no significativo.
- 55 La Fig. 12 se refiere a un estudio preliminar realizado in vivo (ratas Wistar), realizado con el fin de comprobar que el efecto nefroprotector de la cilastatina se podía observar in vivo. El estudio se diseñó concretamente para mostrar la nefroprotección por cilastatina frente al fracaso renal agudo tóxico causado por cisplatino:

La Fig. 12A muestra un esquema del régimen de administración de cisplatino y cilastatina suministrado a los

animales.

Las Figs. 12B y 12C muestran, respectivamente, los valores de BUN (blood urea nitrogen) y de creatinina (CREA), en ambos casos expresados en mg/dL, obtenidos en el suero sanguíneo de los 5 animales observados: Cisplatino + cilastatina (RRbp-X) 75 mg/kg/12 h: animal con inyección intraperitoneal de cisplatino (5 mg/Kg/peso corporal disuelto en suero salino) + cilastatina (RRbp-X) -disuelta en suero salino- a dosis de 75 mg/Kg de peso corporal cada 12 horas intraperitonealmente desde el día de administración del cisplatino y hasta el día del sacrificio; Cisplatino + cilastatina (RRbp-X) 150 mg/kg/12 h: animal con inyección intraperitoneal de cisplatino (5 mg/Kg/peso corporal disuelto en suero salino) + cilastatina (RRbp-X) a dosis de 150 mg/Kg de peso corporal cada 12 horas en el mismo régimen y formulación que el anterior; Cisplatino: animal con inyección intraperitoneal de cisplatino (5 mg/Kg/peso corporal disuelto en suero salino) más suero salino cada 12 horas en los mismos volúmenes y regímenes que los grupos tratados con cilastatina; Vehículo: animal tratado con suero salino en los mismos volúmenes y regímenes que si fuera tratado con cisplatino y cilastatina; Control: animal sin inyección ni tratamiento alguno.

15 La Fig. 13 se refiere a un segundo estudio de nefroprotección también in vivo (ratas Wistar) realizado con el fin de confirmar el efecto nefroprotector de la cilastatina frente al fracaso renal agudo tóxico causado por cisplatino:

- La Fig. 13A muestra un esquema del régimen de administración de cisplatino y cilastatina suministrado a los animales.

20 - Las Figs. 13B, 13C, 13D y 13E muestran, respectivamente, los valores de creatina sérica (mg/dl), aclaramiento renal (ml/min/100 g), proteinuria (mg/24 horas) y osmolalidad (mOsm/kg) medidos en muestras de los 4 grupos de animales en observación: Control (tratado sólo con suero salino) (barras blancas, sin relleno); control + cilastatina (animales a los que se suministró cilastatina disuelta en suero salino a dosis de 75 mg/Kg de peso corporal cada 12 horas intraperitonealmente desde el día de administración del cisplatino y hasta el día del sacrificio) (barras blancas con relleno puntuado oscuro); cisplatino (animales con inyección intraperitoneal de cisplatino (5 mg/Kg de peso corporal, disuelto en suero salino), más suero salino cada 12 horas en los mismos volúmenes y regímenes que los grupos tratados con cilastatina) (barras con relleno negro continuo); cisplatino + cilastatina (animales con inyección intraperitoneal de cisplatino (5 mg/Kg de peso, disuelto en suero salino) más cilastatina disuelta en suero salino a dosis de 75 mg/Kg de peso cada 12 horas intraperitonealmente desde el día de administración del cisplatino y hasta el día del sacrificio) (barras con relleno negro y puntuado blanco). En las Figs. 13B y 13C: *: $P < 0,0001$ vs. control y control + cilastatina; &: $P < 0,005$ vs. cisplatino. En las Figs. 13D y 13E, *: $P < 0,005$ vs. resto de grupos.

La Fig. 14 muestra un diagrama deducido a partir de las especificaciones de la ficha técnica de cilastatina, ensayos en animales, ensayos en células en cultivos y referencias a otros modelos animales. El diagrama se refiere a las dosis efectivas de cilastatina suministradas, en miligramos por kilogramo de peso corporal (mg/kg) (datos indicados en el eje X) con los niveles de cilastatina pericelulares, expresados en miligramos por litro (mg/l), que se indican en el eje Y. Símbolos: rombos (◆): datos de conejo; triángulos (▲): datos de ratas; cuadrados sin relleno (□): datos de los experimentos llevados a cabo con células en cultivo de cerdo; cuadrados rellenos con punto central (■): datos de la ficha técnica del producto comercial para seres humanos que contiene cilastatina. El recuadro sombreado representa el área de seguridad deducida en base a datos de concentración pericelular (cerdo). Los símbolos rodeados por circunferencias representan las dosis a las cuales se demuestra eficacia de la cilastatina en la presente memoria.

45 EJEMPLOS

Los siguientes productos y procedimientos experimentales se usaron para los ejemplos descritos a continuación:

Nefrotóxicos y nefroprotector (cilastatina)

- 50 - Ciclosporina A: Adquirido a Sandoz (Novartis), Sandimum (solución inyectable).
- Tacrolimus: Adquirido a Astellas, Prograf, (solución inyectable).
- 55 - Gentamicina: Adquirido a Guinama (polvo).
- Vancomicina: Adquirido a Combino Pharm (polvo).
- Cisplatino: Adquirido a Pharmacia (solución inyectable).

- Paracetamol: Adquirido a Bristol-Myers Squibb, Perfalgan, (solución inyectable).

- Anfotericina B: Adquirida a Bristol, Fungicina, (polvo).

5

- Cloroformo: Adquirido a Scharlau, (solución líquida).

- Manitol: Adquirido a Braun, Osmofundina (manitol al 20%) (solución inyectable).

10 - Foscarnet: Adquirida a AstraZeneca, Foscavir, (solución inyectable).

- Contraste yodado (iopamidol): Adquirido a Rovi, Iopamiro, (solución inyectable).

- Cilastatina: Adquirida a Merck, Sharp & Dohme, (polvo)

15

Cultivos primarios de células del epitelio tubular proximal. Los cultivos primarios de células del epitelio tubular proximal se obtuvieron de riñones de cerdos enanos de estirpe Maryland. Este tipo de cerdos han sido seleccionados genéticamente para estudios de trasplantes de órganos y son homocigóticos para tres loci del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) (Sachs et al, 1976). Los animales procedían de la granja especializada del Complejo Agropecuario de Aranjuez que la Comunidad de Madrid mantiene con fines de experimentación animal.

20

Los animales seleccionados para este estudio tenían una edad media de 3 meses y un peso medio de $31,3 \pm 0,7$ Kg., siendo indistintamente machos o hembras.

25

El manejo de los animales utilizados se realizó siempre siguiendo la normativa legal vigente (Real Decreto 1205/2005, del 10 de Octubre, 252/2005) por personal acreditado en el manejo de animales de experimentación y bajo supervisión del veterinario responsable.

30 Doce horas antes de la intervención, los animales eran sometidos a ayuno con agua ad libitum. Los animales se premedicaron 15 minutos antes de la cirugía con ketamina 10 mg/kg peso y atropina 0,025 mg/kg i.m. Una vez sedado, los animales eran trasladados a la mesa de quirófano, colocados en decúbito supino, anestesiados con una dosis de inducción de propofol 10 mg/kg i.v e intubados. La anestesia durante la cirugía se mantenía con peróxido de nitrógeno/oxígeno (4 l/min NO₂ y 2 l/min O₂), Diprivan® (propofol) 15 mg/kg/h, Fentanest® (fentanilo) 0,75 mg/20 min y Pavulon® (bromuro de pancuronio) 2 mg/20 min. El animal se sacrificaba mediante una sobredosis anestésica y cloruro potásico (KCl).

35

Los riñones eran extraídos en quirófano bajo condiciones de esterilidad mediante nefrectomía simple bilateral por vía transperitoneal. Una vez extraídos eran pasados inmediatamente a HAM' S-F 12 (Bio-Whittaker) con penicilina (100 UI/ml) y estreptomina (100 µg/ml) (Bio-Whittaker) a 4°C.

40

Para aislar los túbulos proximales, bajo una campana de flujo laminar (Gelaire Flow laboratories, modelo BSB 3A), la corteza fue disecada y seccionada mediante un microtomo Steadie-Riggs (Tomas Scientific, USA). Las láminas eran gaseadas con carbógeno y digeridas con colagenasa A (Sigma) (30 mg/riñón), diluidas en HAM'S F12 (50 ml/riñón, concentración final de colagenasa 0,6 mg/ml) durante 20 ó 30 minutos en agitación (150 rpm) a 37°C. Este proceso se controlaba para impedir que la digestión fuese excesiva, retirando el tejido en el momento en el que se observaba turbidez en el medio y los bordes de las láminas de tejido aparecían disgregados.

45

Tras parar la digestión con HAM'S F12 frío, el material digerido se filtró por una malla metálica de 250 µm (ENDECOTTS LDT). El filtrado se lavó tres veces con HAM'S-F12 en una centrifuga (Sorvall GLC-2B. Rotor basculante) a 150 g durante un minuto para retirar los restos de colagenasa. El sedimento final contiene un 80% de túbulos. Para aumentar la pureza y eliminar contaminantes se procesaba a través de un gradiente de Percoll (Pharmacia) isotónico al 45% en tampón Krebs-bicarbonato (NaCl 112 mM, KCl 3,3 mM, PO₄H₂K 1,2 mM, MgSO₄.7H₂O 1,2 mM, CaCl₂ 0,5 mM, 95% O₂/5% CO₂) centrifugándose a 20000 g durante 30 min (RC-5B, Refrigerated superspeed Centrifuge, Rotor SS-34J. En la cuarta banda se encuentran los túbulos proximales (Tejedor 1988) con una pureza superior al 98%.

55

Los túbulos se recogieron con una pipeta Pasteur estéril, lavándose tres veces con HAMS-F 12 con penicilina (10000 UI/ml) y estreptomina (10000 µg/ml) frío a 150 g para eliminar el Percoll. Para conocer el rendimiento se

pesaba el precipitado obtenido.

Para obtener el cultivo primario de células del túbulo proximal (CTP), los túbulos se diluyeron a una concentración de 0,66 mg de túbulos/ml de medio de cultivo (MC): HAM'S-F12 / DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Médium con 1 g/l glucosa, Bio-Whittaker) en una proporción 1:1, suplementado con HEPES 25 mM, glutamina 2,5 mM, aminoácidos no esenciales al 1%, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml, suero bovino fetal (SBF) al 2% (Bio-Whittaker), bicarbonato sódico 20 mM (MERCK), hidrocortisona 5×10^{-8} M, insulina 5 µg/ml, transferrina 5 µg/ml, y selenio 5 ng/ml (SIGMA).

10 Se repartieron 5 ml de esta suspensión en cada placa de (60 mm de diámetro, Corning). Las placas se mantuvieron en un incubador (Heraeus) a 37°C con 5% de CO₂. No se hizo el primer cambio de medio hasta el cuarto día, para permitir la adhesión de las células a la placa. A partir de este día, el medio se fue cambiando cada 2-3 días. Las células alcanzaban confluencia entre 8-10 días, comenzando a aparecer signos de senescencia a los 12-13 días.

15 Dinámica de crecimiento celular

El recuento de las células en cultivo se realizó in situ sobre imágenes de la monocapa celular obtenidas en un microscopio en un campo de 40X, calibrado mediante una rejilla de Neubauer y correspondiente a 0,0775 mm². Las imágenes se adquirían mediante un sistema de videomicroscopía (Cámara COHU acoplada a un ordenador a través de una tarjeta grabadora de video VG-5 con chip de integración) que permite la grabación rápida de imágenes de forma que las células eran devueltas al incubador tras un corto periodo de tiempo. Las imágenes fueron analizadas mediante el programa "Scion image" (Scion Corporation, 1998), basado en el programa Image de McIntosh del National Institute of Health, EEUU.

25 En cada cultivo, cada tratamiento en estudio se aplicó a un mínimo de seis placas. A cada placa se le asignó un número y fue dividida en siete sectores, seis periféricos y uno central. Para la toma de imágenes a los tiempos especificados, las placas se eligieron mediante una tabla de números aleatorios (Epiinfo). Se eligieron tres placas del tratamiento correspondiente, en cada una de las cuales se tomaron siete imágenes, una de cada sector. El valor medio de los 21 recuentos se considera el valor de n = 1 para el día y tratamiento en cuestión. El "n" indicado en los experimentos correspondientes representa el número de animales estudiados para cada condición y las medidas de variación se corresponden con los errores de las medias entre animales para la condición estudiada.

Microscopía confocal

35 Para estudiar la interacción de cilastatina con las BDC se utilizó toxina B colérica conjugada con un fluoróforo (FICT, suministrado por Molecular Probes) que utiliza dichas balsas para su internalización celular. Se utilizaron así mismo, como controles negativos dos agentes modificadores de las balsas de colesterol: ciclodextrina, suministrada por Sigma España, y filipina, suministrada por Calbiochem.

40 Cultivos primarios de CTP fueron pre-incubados con ciclodextrina (CDX) (1 mM), filipina (50 µg/ml), cilastatina (200 µg/ml) o exclusivamente con medio de cultivo (controles) durante 20 minutos. Posteriormente fueron incubados con toxina B colérica-FITC (10 µg/ml) a diferentes tiempos (1 hora y 2,5 horas). Las células fueron lavadas con PBS y fijadas con formaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las muestras se montaron en posición invertida sobre portaobjetos con una gota de medio de montaje DAKO *Fluorescent mounting medium* y fueron observadas al microscopio confocal.

Enriquecimiento nucleosomal: Liberación de ADN oligonucleosomal al citosol

50 Para cuantificar los oligonucleosomas presentes en el citosol de los cultivos de las células del túbulo proximal tratadas durante 48 h con los compuestos nefrotóxicos elegidos (ciclosporina A, gentamicina, tacrolimus (FK506), vancomicina, cisplatino, contraste yodado, foscarnet, manitol, anfotericina B, cloroformo y paracetamol), en presencia o ausencia de cilastatina, se utilizó el kit de enzimo-inmunoanálisis para muerte celular *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* (Boehringer Mannheim), que determina los oligonucleosomas con anticuerpos antihistona-biotina y anti-ADN-peroxidasa.

55 Las células del túbulo proximal anteriormente descritas se cultivaron hasta confluencia en placas de 24 pocillos de 16 mm de diámetro, sometidas durante 48 h a los tratamientos correspondientes, y lisadas con 200 µl de solución de lisis durante 30 min a temperatura ambiente. El lisado fue recogido y centrifugado a 200 g durante 10 min (Eppendorf 5417C). Del líquido sobrenadante resultante (fracción citosólica), se añadieron 20 µl a cada pocillo de la

placa de ELISA cubiertos de estreptavidina, añadiendo una mezcla de anticuerpos anti-histona-biotina (que reconocían la estreptavidina del fondo de la placa y las proteínas histonas del ADN) y anti-ADN-peroxidasa (que reconoce el ADN; la peroxidasa lleva a cabo la reacción colorimétrica que permite la cuantificación) e incubando 2 horas a temperatura ambiente.

5

Una vez producida la incubación se lavaron los pocillos, se añadió ABTS (sustrato de la peroxidasa) y se determinó su actividad fotométricamente a 405 nm con un lector de placas Anthos 2020. Se calculó la relación entre la actividad enzimática de una muestra incubada por un período de tiempo dado, y el correspondiente valor a tiempo 0 horas tras la activación (factor de enriquecimiento).

10

Evaluación de la actividad mitocondrial mediante MTT

La funcionabilidad mitocondrial de las CTP se midió por la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, suministrado por Calbiochem), realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, dando lugar a un compuesto coloreado de color azul (formazán). Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos, crecidas hasta semiconfluencia y sometidas a sus tratamientos correspondientes durante 24 horas. Posteriormente, el MTT era añadido a cada pocillo a una concentración final de 0,5 mg/ml e incubado durante 3 horas a 37°C en oscuridad. Finalizada esta incubación, se añadieron 100 µl de tampón de lisis (20% SDS en 50% N,N-dimetilformamida, pH 4,7) y la placa se incubó toda la noche a 37°C en oscuridad. Al día siguiente se determinó la absorbancia a 595 nm.

20

El porcentaje de viabilidad se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{DO células tratadas} \times 100}{\text{DO células control}}$$

25

La reducción del MTT a tiempo real se determinó en células proximales semiconfluentes sembradas en placas de 24 pocillos (16 mm de diámetro), a las que se les sustituyó el medio de cultivo por MTT 0,5 mg/ml de concentración final en PBS. Esta reducción fue determinada midiendo la absorbancia a 595 nm, con un microscopio de fluorescencia invertido Olympus 1X70 acoplado a un fotomultiplicador controlado desde un fluorímetro SLM Aminco 2000. En el primer ensayo (con vancomicina) se realizaron dos determinaciones, un control para cuantificar la cantidad de MTT que reducían las células en ausencia del tóxico y una incubación con vancomicina 25 mg/ml durante 20 min. En el segundo ensayo (cisplatino, paracetamol, ciclosporina y tacrolimus) se realizaron las mismas determinaciones, pero en este caso, en vez de incubar con el tóxico, se añadió éste directamente a la placa durante el registro de absorbancia. En este ensayo se añadió un tercer registro, en el que se determinó la reducción del MTT en células proximales tratadas con vancomicina a la misma concentración anterior y cilastatina 200 µg/ml desde el principio del registro. En este ensayo, como en los anteriores, la vancomicina era añadida directamente a la placa durante la determinación de la absorbancia

30

35

Viabilidad de las células de túbulo proximal: citometría de flujo

40

Se utilizaron cultivos primarios subconfluentes de CTP, sometidos a los tratamientos correspondientes durante 24 horas. Las células desprendidas al líquido sobrenadante se recogieron mediante aspiración directa con pipeta automática y las células adherentes se separaron de la placa de cultivo mediante tripsinización.

45

Las CTP así obtenidas se fijaron y permeabilizaron de manera independiente con etanol al 70%, guardándose a -20°C. Tras retirar el etanol, las células fueron lavadas dos veces con PBS. Posteriormente, se incubaron con PBS-EDTA, yoduro de propidio (IP) 40 µg/ml y ARNasa 250 µg/ml durante 45 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.

50

El recuento se realizó en un citómetro FACScan (Beckton Dickinson) equipado con un láser simple de ion argón. Se fijaron ventanas en base a las características de FSC (tamaño), SSC (complejidad), FL2-H (altura), FL2-A (área) y FL2-W (anchura). Las dos últimas se utilizaron para descartar dobletes celulares. El análisis se realizó con el programa WinMDI 2.9.

55

Microscopía electrónica de barrido

Los estudios de microscopía electrónica de barrido se realizaron en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

- Para las técnicas de microscopía de barrido se colocó en la base de las placas de cultivo unos cubreobjetos de plástico de 25 mm de diámetro (Nunc). Tras el correspondiente tratamiento, las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1% en PBS durante una hora, lavadas e incubadas durante 24 horas a 4°C con tetróxido de osmio al 1% en PBS en proporción 1:1. Tras ser eliminado el tetróxido de osmio, las muestras fueron deshidratadas con acetona aumentando secuencialmente su porcentaje desde un 50% a un 100% en pases de 30 minutos y montadas sobre un soporte de aluminio y sombreadas con oro (Fine Coat Ion Sputter JFC-1100 JEOL). Finalmente, se hicieron las fotos utilizando un microscopio de barrido JEOLJSM-T300.
- 10 Ensayo de formación de colonias mediante tinción con violeta cristal. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos hasta semiconfluencia y fueron tratadas durante 24 horas con los tóxicos correspondientes en presencia y ausencia de cilastatina. A continuación las células fueron despegadas con tripsina y lavadas con suero salino estéril para eliminar los restos de los estímulos. Las células se resembraron en placas petri de 100 mm con medio al 10% SBF dejándose crecer durante 7-10 días. Pasado este tiempo, se retiró el medio de cultivo de las placas, se fijaron durante 5 minutos con paraformaldehído al 5% en PBS y se tiñeron durante 2 minutos con violeta cristal (0,5 % violeta cristal en 20 % de metanol). Una vez teñidas, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X y se fotografiaron. Después de fotografiar, el violeta cristal fue eluido con 2 ml de solución de eluido (50% etanol y 50% citrato sódico 0,1 M, pH 4,2). La absorbancia del eluido fue cuantificada en un lector de ELISA a 595 nm.
- 15
- 20 Extracción total de proteínas y cuantificación de la concentración intracelular de tóxicos en las CTP
- Cultivos primarios subconfluentes de CTP fueron sometidos al tratamiento con los distintos nefrotóxicos en estudio durante 24 horas. Tras la incubación, el medio de cultivo fue desechado, añadiéndose 400 µl de tampón de lisis (2,2 % (p/v) SDS; 19,33 % (v/v) glicerol al 87% (v/v); 790 mM Tris HCl pH 6,8, 50 ml) por placa de 100 mm de diámetro, a 25 70°C. Posteriormente, se despegaron las células y se recogió el volumen final obtenido. El lisado celular se sometió a un choque térmico, calentándose primeramente durante 5 min a 100 °C y poniéndose a continuación en hielo. Cada muestra fue sometida a descompresión brusca. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 min, recogiendo el líquido sobrenadante. La concentración de las proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford 1976), y las muestras fueron almacenadas a - 20° C hasta el momento de su uso.
- 30
- La determinación de la acumulación intracelular se realizó en los lisados celulares de las células tratadas con los nefrotóxicos, en presencia o en ausencia de cilastatina, mediante inmunoanálisis de polarización de fluorescencia (TDX) (ABBOTT Laboratories, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, salvo en el caso del cisplatino, en el que la concentración intracelular fue determinada mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo ICP-MS Termo X-Series (Termo Electrón, Windsford, Cheshire, Reino Unido) monitorizando los isótopos ¹⁹⁵Pt, ¹⁹⁴Pt y ¹⁹¹Ir.
- 35
- Viabilidad celular en linfocitos
- 40 Para valorar la posible interacción de cilastatina en linfocitos tratados con CsA se utilizaron linfocitos CD3+ aislados de sangre periférica, separados por inmunomagnetismo, de donantes sanos, previo consentimiento informado (muestras celulares cortesía del Dr. Buño, Servicio de Trasplante de Médula Ósea del Hospital Gregorio Marañón). La muestra se centrifugó a 120 g y se resuspendió en 750 µl de medio RPMI (en ausencia de SBF: Suero Bovino Fetal) para cuantificar el número de células de las que se disponía mediante Trypan Blue. Se repartieron 100.000 células por punto.
- 45
- Se llevó a cabo la incubación de los linfocitos en RPMI (Bio-Whittaker), sin tratamientos (control negativo), con CsA, con cilastatina, con ambos y por último con Camptotecina (Sigma) como control positivo de muerte por apoptosis. La incubación se realizó durante 4 horas a 37°C. Se centrifugaron las células durante 6 minutos a 1200 rpm. El precipitado se resuspendió en 100 µl de tampón (10 mmol/l HEPES, 150 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 1 mmol/l Mg Cl₂, 1,8 mmol/l CaCl₂) y 5 µl de anexina-V. Se incubó en oscuridad durante 10 minutos.
- 50
- La intensidad de la fluorescencia verde de las células se cuantificó como el desplazamiento en la escala logarítmica con respecto al control (células creciendo en 10% SBF), frente al número de células analizadas. Los detritos celulares se excluyeron del análisis.
- 55
- También se realizó la determinación de apoptosis en linfocitos a las 16 horas añadiendo a las dosis anteriores dosis más altas, 100 µg/ml y 1000 µg/ml.

Viabilidad celular en células tumorales (Hela)

Otro de los fármacos en los que resulta más crítico discernir si la nefroprotección ofrecida por cilastatina se acompaña o no de reducción en la potencia del fármaco es el cisplatino.

Para establecer que en presencia de cilastatina el cisplatino no perdía actividad citotóxica antitumoral ensayamos el fármaco sobre una línea de células tumorales como las células HeLa. La técnica que se utilizó para realizar los ensayos fue la evaluación de la actividad mitocondrial mediante MTT previamente descrita. El procedimiento se llevó a cabo a 12 y 24 horas, con diferentes dosis de cisplatino, 10 y 30 μ M. Como control positivo se utilizó camptotecina a 50 μ g/ml. La presencia o ausencia de cilastatina (200 μ g/mL) no supuso ningún cambio en su efecto citotóxico.

Modelo experimental in vivo de nefroprotección por cilastatina frente al fracaso renal agudo tóxico causado por cisplatino: ensayo preliminar

Para el ensayo preliminar in vivo de protección de cilastatina frente a la agresión renal producida por cisplatino, se utilizaron ratas Wistar macho de un peso medio de 290 ± 20 g, y una edad media de 8-9 semanas, criadas y estabuladas en el animalario del Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Toda la manipulación de los animales se lleva a cabo según la normativa legal vigente recogida en el Real Decreto 1201/2005 de 10 de Octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, bajo la supervisión directa del veterinario responsable.

Se utilizaron de manera preliminar 5 animales, siendo cada uno de ellos sometido a un régimen de tratamiento diferente. Dos de los animales no recibieron cisplatino (control y vehículo), mientras que los otros tres recibieron en administración única intraperitoneal cisplatino disuelto en suero salino a dosis de 5 mg/Kg peso corporal. De los tres animales que recibieron cisplatino, uno recibió además cilastatina (RRbp-X) disuelta en suero salino por vía intraperitoneal, a dosis de 150 mg/Kg de peso cada 12 horas desde el día de administración del cisplatino hasta el día del sacrificio. Otro de los animales tratados con cisplatino recibió cilastatina (RRbp-X) en el mismo régimen y formulación, pero a una dosis de 75 mg/Kg de peso corporal cada 12 horas. El último de los animales tratados con cisplatino recibió suero salino (vehículo de la cilastatina) en el mismo régimen y formulación que los dos grupos anteriores. De los animales que no fueron tratados con cisplatino, uno de ellos recibió suero salino en los mismos volúmenes y regímenes que los otros tres grupos (vehículo), mientras que el otro no recibió pinchazo ni tratamiento alguno (control) (Fig. 12A).

Como puede observarse en la Fig. 12A, el estudio duró 5 días a partir de la administración intraperitoneal del cisplatino o suero salino en el caso del animal vehículo y durante todo el periodo, los animales tuvieron libre acceso tanto al agua como a la comida (dieta estándar) en un ambiente controlado de luz, temperatura y humedad. En el momento del sacrificio, los animales fueron pesados y anestesiados con ketamina (10 mg/kg) y diazepam (4 mg/kg). Una vez anestesiados, se les extrajo la sangre mediante la canulación de la aorta abdominal a la altura de la bifurcación. Esta sangre se mantuvo 30 minutos a 37°C, posteriormente 1 hora a 4°C y a continuación se centrifugó a 2000 rpm 15 minutos a 4°C. Esto permitió la obtención de suero sanguíneo que fue almacenado a - 80°C hasta el momento de uso.

Modelo experimental in vivo de nefroprotección por cilastatina frente al fracaso renal agudo tóxico causado por cisplatino: ensayo sobre ratas Wistar.

Para el modelo experimental in vivo de protección de cilastatina frente a la agresión renal inducida por cisplatino se utilizaron ratas Wistar macho de un peso medio de 260 ± 15 g, y una edad media de 7-8 semanas, criadas y estabuladas en el animalario del Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Toda la manipulación de los animales se lleva a cabo según la normativa legal vigente recogida en el Real Decreto 1201/2005 de 10 de Octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, bajo la supervisión directa del veterinario responsable.

Dos semanas antes de comenzar el modelo animal experimental, se pesaron los animales, se identificaron mediante numeración y se separaron en distintas jaulas en función de los grupos a estudiar. Para conocer la evolución de

éstos, los animales fueron observados y pesados en varias ocasiones antes de comenzar el estudio.

Se utilizaron en total 28 animales que fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos con un tamaño muestral n=6-8 animales por grupo. Así pues los grupos de estudio y sus tratamientos fueron los siguientes (Fig. 13A):

- 5
- Grupo Cisplatino + Cilastatina (n=8): animales con administración única intraperitoneal de cisplatino (5 mg/Kg peso corporal) disuelto en suero salino, mas cilastatina (disuelta en suero salino) en una dosis de 75 mg/Kg de peso corporal cada 12 horas intraperitonealmente desde el día de administración del cisplatino y hasta el día del sacrificio.
 - 10 - Grupo Cisplatino (n=8): animales con administración única intraperitoneal de cisplatino (5 mg/Kg peso corporal) disuelto en suero salino, cada 12 horas en los mismos volúmenes y regímenes que los grupos tratados con cilastatina.
 - Grupo Control + Cilastatina (n=6): animales tratados con administración intraperitoneal de suero salino (vehículo del cisplatino) en el mismo volumen que los grupos tratados con cisplatino, más cilastatina (disuelta en suero salino) en una dosis de 75 mg/Kg de peso corporal cada 12 horas intraperitoneal desde el día de administración del suero salino (vehículo del cisplatino) y hasta el día del sacrificio
 - 15 del cisplatino)
 - Grupo Control (n=6): animales tratados con suero salino en los mismos volúmenes y regímenes que en los grupos tratados con cisplatino y/o cilastatina.
 - 20

Como puede observarse en la Fig. 13 A, el estudio duró 5 días a partir de la administración intraperitoneal del cisplatino (en los grupos cisplatino y cisplatino + cilastatina) o suero salino (en los grupos control y control + cilastatina) A partir de ese momento y cada 12 horas se coadministraron cilastatina (en los grupos control + cilastatina y cisplatino + cilastatina), o su vehículo suero salino (en los grupos cisplatino y control). Durante todo el período, los animales tuvieron libre acceso tanto al agua como a la comida (dieta estándar) en un ambiente controlado de luz, temperatura y humedad. Un día antes del sacrificio, los animales fueron introducidos en jaulas metabólicas, con libre acceso a la comida y agua "ad libitum", para recoger la orina de 24 horas, con la finalidad de cuantificar la diuresis y la concentración de proteínas. La proteinuria se determinó por el método del ácido sulfosalicílico (Gyure, 1977), obteniendo la proteinuria en mg de proteína/24 horas.

En el momento del sacrificio, los animales (previamente pesados) se anestesiaron en el quirófano experimental con ketamina (10 mg/kg) y diazepam (4 mg/Kg), y se les extrajo la sangre a través de la canulación de la aorta abdominal a la altura de la bifurcación. Ésta se incubó primero durante 30 minutos a 37°C, seguido de una hora a 4°C. Una posterior centrifugación a 2000 rpm durante 15 minutos a 4°C, permitió la obtención del suero sanguíneo, que fue congelado a -80°C hasta el momento de su uso. Tras la exsanguinación se clampó la aorta cortando su flujo por encima de los riñones, se perforó la vena cava inferior y se perfundieron los riñones a través de la cánula con suero salino frío (Braun Medical S. A., Barcelona, España). Posteriormente los riñones fueron extraídos, decapsulados y mantenidos en suero salino frío durante su manipulación para minimizar la degradación del tejido.

40 Tras pesar los riñones (derecho e izquierdo), éstos se manipularon de manera parecida. Los riñones derechos fueron seccionados transversalmente justo por encima de la arteria renal obteniendo los polos renales superiores que fueron introducidos en paraformaldehído al 4% en PBS durante 24 horas para su fijación y posterior inclusión en parafina. El resto de los riñones derechos, así como los riñones izquierdos fueron separados en corteza y médula congelando ambas muestras en nitrógeno líquido y almacenándolas a -80° hasta el momento de su uso.

45 También se obtuvieron de los animales muestras de corazón, hígado y aorta, que fueron convenientemente procesadas y almacenadas a -80°C.

Las muestras renales inmersas en paraformaldehído se fijaron durante 24 horas a 4°C. Posteriormente fueron deshidratadas con concentraciones crecientes de etanol e incluidas finalmente en parafina en el procesador de tejidos Histolab ZX (Especialidades Médicas MYR SL, Tarragona, España), para estudios de morfología e inmunohistoquímica.

Los parámetros hemodinámicos y de función renal en suero y orina (figura 14) se determinaron usando un autoanalizador Dimensión RxL de Dade-Behring, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico

- Experimentos in vitro

Las variables de interés estudiadas fueron todas cuantitativas continuas, y sus valores se presentan como la media + error estándar de la media. Todas las mediciones se han realizado por duplicado, y cada resultado presentado se ha obtenido en al menos tres preparaciones procedentes de animales diferentes. Cuando se presentan trazados
5 singulares, resultados similares han sido obtenidos en al menos dos ocasiones más.

Los efectos de cilastatina sobre las variables modificadas por los fármacos nefrotóxicos sometidos a estudio, analizaron mediante ensayos factoriales de medias repetidas. Los resultados se han analizado mediante un modelo general de ANOVA de dos vías para medidas independientes. Los dos factores habituales en cada estudio han sido
10 el "factor cilastatina", con dos niveles (sí, no), y el factor "dosis del tóxico", habitualmente con cuatro niveles correspondientes a las dosis (en tal caso, el ensayo se controlaba con una dosis de "0" en el primer nivel del factor). En los modelos mencionados se ha incluido siempre el factor interacción "cilastatina*dosis del tóxico", así como un análisis a posteriori de las diferencias entre niveles, utilizando el test LSD ("least significant difference": diferencia menos significativa) como discriminante. Se ha usado un α bilateral de 0,05 como índice de significación. Cuando se
15 han encontrado diferencias significativas para el factor de protección por cilastatina, se ha procurado confirmar dicha diferencia mediante comparación de los ajustes no lineales de las dosis-respuesta correspondientes.

En el caso de datos extremos ("out layer"), se ha considerado como criterio de no inclusión la separación de la mediana por más de dos rangos intercuartílicos.
20

- Experimentos in vivo

Para calcular la igualdad de varianza entre los grupos se utilizó el test de Levene. Aquellas variables continuas que presentaban igualdad de varianza y una distribución que se ajustaba a la normal se analizaron mediante el test de
25 ANOVA y en el caso contrario, con el de Kruskal-Wallis. Los resultados son expresados como media + error estándar de la media. Valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos. Todos los test estadísticos utilizados se realizaron con el programa informático SPSS.

- Ejemplo 1: Reducción de la internalización de las balsas de colesterol mediante la interacción de la cilastatina con la DHP-I
30

Este ensayo se llevó a cabo para demostrar si la cilastatina, a través de su interacción con la DHP-I, anclada a las balsas de colesterol (BDC) por un grupo GPI, podría bloquear el transporte a través de las BDC o interferir con la ruta endocítica dependiente de las BDC.
35

Para ello, se identificaron las caveolas sobre células del epitelio tubular proximal porcino en cultivo primario obtenidas según se describe más arriba. Para ello se utilizó una de las proteínas de la caveola, el receptor de la toxina B colérica. Al añadir toxina B fluorescente, marcada con un fluoróforo (FITC), se marcan las caveolas y puede seguirse su destino a lo largo del tiempo mediante microscopía confocal.
40

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 1 A. A los 15 minutos se observa tinción fluorescente a lo largo de todas las membranas celulares, independientemente del tratamiento.

En la parte superior de la imagen, puede verse la evolución de la fluorescencia en ausencia de cilastatina: a la hora, la fluorescencia comienza a acumularse en posición perinuclear, en la región correspondiente al aparato de Golgi; a las 2,5 horas, la tinción de los Golgi es evidente, al tiempo que se observa desaparición de la tinción en las membranas celulares.
45

En la parte inferior de la Fig. 1A se muestran las mismas células incubadas en presencia de cilastatina (RRbp-X). Como puede verse, a las 2,5 horas las caveolas marcadas no se han movido de la membrana celular.
50

En la Fig. 1 B se presenta la reducción observable en el marcaje en el aparato de Golgi a las 2,5 horas de haber marcado las caveolas de la membrana celular con toxina B fluorescente, en presencia de cilastatina o de filipina. La destrucción de las caveolas con filipina impide la internalización de las mismas. Pero filipina causa muerte celular en poco tiempo. Cilastatina también impide la localización en el aparato de Golgi del marcaje de las caveolas. Pero lo hace a través de su unión a la DPH-I renal.
55

- Ejemplo 2: Inocuidad de la cilastatina

En alguno de los primeros trabajos sobre cilastatina, previos a su comercialización, se afirmaba que cilastatina a dosis de 1 g/kg/día podía producir descamación del endotelio tubular como manifestación de toxicidad renal (Sack 1985).

5 Para comprobar esto, se realizó un ensayo in vitro sobre cultivos primarios de células del túbulo proximal, CTP incubados en presencia de cilastatina a dosis crecientes durante un total de 14 días. Se realizó el recuento de las células en cultivo según se comentó anteriormente en el apartado de "Dinámica de Crecimiento Celular". Los resultados se muestran en la Fig. 2, donde se indican las diferentes concentraciones de cilastatina utilizadas.

10 No se pudo constatar ningún efecto significativo ni sobre la dinámica de crecimiento, ni sobre la confluencia celular, ni sobre la morfología de la monocapa. Las concentraciones utilizadas llegaron a ser hasta casi 10 veces las alcanzadas in vivo a nivel plasmático.

- **Ejemplo 3:** La cilastatina anula o reduce el daño producido por los principales nefrotóxicos al túbulo proximal

15

3.1.- La cilastatina impide o reduce la apoptosis celular

Durante la apoptosis, las endonucleasas endógenas rompen el ADN en oligonucleosomas que pasan al citoplasma, donde permanecen durante varias horas antes de pasar a formar parte de los "blebs" o corpúsculos apoptóticos. La aparición de estos oligonucleosomas puede interpretarse como una manifestación del proceso de apoptosis.

20

Para valorar la protección por cilastatina de la nefrotoxicidad causada por distintos nefrotóxicos, se utilizó la metodología de "Enriquecimiento Nucleosomal" descrita más arriba, cuantificando la aparición de fragmentos de ADN a nivel citosólico como una manifestación del proceso de apoptosis.

25

Se incubaron cultivos primarios de células del túbulo proximal frente a una batería de once fármacos nefrotóxicos: ciclosporina A (inmunosupresor), gentamicina (antibiótico aminoglucósido), tacrolimus (FK506) (macrólido inmunosupresor), vancomicina (antibiótico glicopeptídico), cisplatino (fármaco anticancerígeno), contraste yodado (iopamidol), foscarnet (antivírico), manitol (diurético), anfotericina B (antifúngico), cloroformo y paracetamol (analgésico y antipirético). Entre los fármacos ensayados, ninguno es sustrato de la DPH-I; algunos son aniónicos y podrían alcanzar el interior celular a través de OATs, pero otros son neutros o incluso catiónicos. Algunos son liposolubles y otros hidrosolubles, como se ha indicado anteriormente en la Tabla 1 de la presente memoria. En general, el mecanismo de transporte intracelular para la mayoría de ellos es desconocido, asumiéndose que difunden libremente a través de la membrana celular.

30

Los resultados obtenidos en los cultivos primarios incubados con los nefrotóxicos y cuando los cultivos primarios son coincubados con los mismos nefrotóxicos más cilastatina (RRbp-X), se muestran en la Fig. 3A. La figura muestra que se produce un incremento respecto al control en la cuantificación de nucleosomas para todos los tóxicos ensayados. Cuando los cultivos primarios son coincubados con los mismos nefrotóxicos más cilastatina, la inducción de apoptosis cesa o se reduce significativamente. En muchos de los casos se vuelve a una situación similar a la basal.

35

3.2.- La cilastatina impide o reduce la muerte celular por anoikis

45 La agresión tóxica o isquémica sobre el túbulo se traduce en un tipo de muerte celular asociada al desprendimiento de las células dañadas, proceso conocido como anoikis.

La inducción de anoikis por los nefrotóxicos en estudio se puede medir cuantificando el número de células que pasan de la monocapa al líquido sobrenadante del cultivo mediante citometría de flujo, lo cual se realizó en este caso siguiendo el procedimiento descrito más arriba para calcular la viabilidad de las células del túbulo proximal.

50

La adición de cilastatina (RRbp-X) a los cultivos redujo en todos los casos el número de células muertas.

En la representación gráfica de la Fig. 4A, se presentan todos los valores correspondientes a los recuentos de células en el sobrenadante de todas las condiciones y dosis ensayadas, representando en el eje X las incubaciones sin cilastatina y en el eje Y las incubaciones con cilastatina (RRbp-X). Si cilastatina no tuviese ningún efecto protector, las células desprendidas por anoikis en ambos ejes serían idénticas, y los puntos caerían todos sobre la línea de identidad. Pero puede verse que para todas las condiciones, tóxicos y dosis ensayados los puntos caen en la zona de protección: Hay mucha menos muerte celular si hay cilastatina presente.

55

A modo de ejemplo, la Fig. 4B muestra las citometrías de flujo de los líquidos sobrenadantes de cultivos primarios de células del túbulo proximal incubadas con dos potentes nefrotóxicos, cisplatino o vancomicina, en ausencia o en presencia de cilastatina (RRbp-X). La Fig. 4C muestra la cuantificación de las células desprendidas al líquido sobrenadante con dosis progresivas de cuatro fármacos nefrotóxicos (vancomicina, gentamicina, cisplatino y paracetamol) (barras gris claro) y la reducción en las mismas inducida por la coincubación con cilastatina (RRbp-X) (barras gris oscuro), habiendo realizado un ANOVA para medidas repetidas (efecto global de la cilastatina=0,012) y un análisis post hoc (efecto de cilastatina sobre cada fármaco: $p < 0,05$).

10 3.3.- La cilastatina restaura la capacidad oxidativa mitocondrial del túbulo proximal

Tanto la acumulación de oligonucleosomas como el fenómeno de anoikis son fenómenos tardíos del proceso de daño tóxico de los compuestos estudiados sobre la célula del túbulo proximal.

15 La mitocondria del túbulo proximal es probablemente el orgánulo que resulta alterado más precozmente durante la muerte celular por apoptosis. El deterioro mitocondrial ocurre con frecuencia algunas horas antes de la puesta en marcha de los mecanismos que finalmente resultarán en la fragmentación del ADN (formación de nucleosomas previamente mostrada) y el desprendimiento de las células de la monocapa (anoikis). Así pues, estudiar la función mitocondrial en relación con los nefrotóxicos valorados puede ser útil para entender la latencia del fenómeno de protección. Esto se hizo midiendo la actividad de la cadena oxidativa mitocondrial a través de la transferencia electrónica al bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, de la forma abreviada metiltiazoltetrazolio), que al reducirse se transforma en cristales insolubles de azul de formazán.

20 Los resultados obtenidos para distintos nefrotóxicos se muestran en la Fig. 5, tanto en lo que se refiere a la reducción del MTT tras tratamientos de 24 horas con cada uno de los nefrotóxicos como los obtenidos a tiempo real.

Los resultados de los ANOVA realizados fueron los siguientes:

30 - vancomicina: efecto vancomicina no significativo, efecto cilastatina $p=0,025$, efecto "interacción" (vancomicina + cilastatina) no significativo;

- cisplatino: efecto cisplatino $p=0,038$, efecto cilastatina $p=0,001$, efecto "interacción" (cisplatino + cilastatina) no significativo

35 - paracetamol: efecto paracetamol $p=0,05$, efecto cilastatina no significativo y efecto "interacción" (paracetamol + cilastatina) no significativo.

Como puede verse, en todos los casos los nefrotóxicos ensayados producen una inhibición dependiente de dosis de la transferencia electrónica mitocondrial. La presencia de cilastatina restaura total o parcialmente dicha capacidad.

40 - **Ejemplo 4:** La cilastatina restaura la morfología y la capacidad regenerativa del epitelio tubular lesionado por nefrotóxicos

4.1.- La cilastatina restaura la morfología celular

45 Se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica de barrido, siguiendo la metodología anteriormente expuesta, que mostraban el aspecto de los cultivos de células del epitelio tubular proximal, incubados durante 11 días en presencia de 1 $\mu\text{g/ml}$ de ciclosporina A o de la misma concentración de ciclosporina pero en presencia de 200 $\mu\text{g/ml}$ de cilastatina.

50 En la Fig. 6 pueden observarse ejemplos de las fotografías obtenidas. Puede observarse en las dos imágenes de la izquierda cómo la ciclosporina A provoca condensación citosólica, rotura celular, y disrupción de la monocapa, características de la apoptosis que induce. En las imágenes de la derecha, dos instantáneas del epitelio sometido a las mismas dosis de ciclosporina A, pero en presencia de cilastatina (RRbp- X), puede observarse cómo estas alteraciones, en general, no aparecen en presencia de cilastatina, aunque se puede ver cómo aparecen ocasionales "blebs" apoptóticos también en su presencia.

4.2.- La cilastatina mejora la recuperación celular tras la agresión

Para comprobar si la cilastatina tenía algún efecto sobre la recuperación celular, se realizó un nuevo experimento en el que se ensayó la dinámica de crecimiento celular de cultivos primarios de células del túbulo proximal, en presencia de dos nefrotóxicos, ciclosporina A y tacrolimus (FK-506), comprobando las diferencias en presencia y en ausencia de cilastatina.

5

Tal como se puede observar las gráficas de las Figs. 7 A y 7B, cuando las células en cultivo se hicieron crecer, desde el momento de la siembra, en presencia de ciclosporina A (1 ó 10 µg/ml) o de tacrolimus (50 ng/ml), el crecimiento de las células se redujo de forma dependiente de la dosis.

10 Así, se muestra con estos ensayos que la coincubación con el nefrotóxico y la cilastatina (200 µg/ml) previene de forma parcial el efecto de los nefrotóxicos sobre el crecimiento celular, protegiendo de su nefrotoxicidad.

Los resultados del análisis estadístico fueron los siguientes:

15 - ANOVA factorial N=5: Efectos combinados: $p < 0,0001$; factor "tratamiento": $p < 0,0001$; factor "días de cultivo": $p < 0,0001$; factor "tratamiento x días de cultivo": $p < 0,004$.

- El análisis post hoc para ciclosporina muestra un descenso significativo del crecimiento celular inducido por cilastatina comparado con el control desde el día 8 (dosis de 1 µg/ml y dosis de 10 µg/ml) y una recuperación del crecimiento celular con cilastatina desde el día 11.

20 - El análisis Post hoc para el tacrolimus (FK506) mostró un descenso significativo del crecimiento celular desde el día 7, con una recuperación desde el mismo momento con cilastatina

25 Para confirmar estos datos, se recurrió a otro método para estudiar la capacidad regenerativa celular tras una agresión: determinar el número de unidades formadoras de colonias mediante la tinción con violeta cristal, un colorante que requiere integridad celular para ser incorporado a las células. Esta técnica tiene la ventaja de permitir visualizar macroscópicamente la intensidad de la agresión, así como tener una cuantificación de la misma si las células son resuspendidas y el colorante determinado por espectrofotometría visible. Así, en estudios de
30 nefrotoxicidad in vitro sobre células en cultivo, la tinción con violeta cristal sirve para detectar células supervivientes, potenciales formadoras de colonias en regeneración.

En la Fig. 8 se presentan algunos ejemplos de determinación de Unidades Formadoras de Colonias a las 24 horas (12 horas en el caso del cisplatino) de una agresión con dosis crecientes de varios nefrotóxicos, en ausencia o en presencia de cilastatina (RRbp-X). Esta prueba confirma que la coincubación con cilastatina restaura total o
35 parcialmente el crecimiento celular inhibido por el nefrotóxico, pues el ensayo demuestra que se observa una mejora de la recuperación celular, con aumento de la supervivencia a largo plazo (7 días) en aquellos casos en los que el nefrotóxico se ha coadministrado con cilastatina.

40 - **Ejemplo 5:** La cilastatina impide la entrada de nefrotóxicos a la célula proximal debido a su efecto sobre el borde en cepillo

En los ejemplos anteriores se ha demostrado cómo la presencia de cilastatina en los medios de cultivo impide o reduce en gran medida la inducción de apoptosis y el fenómeno de anoikis, restaura la capacidad oxidativa
45 mitocondrial y aumenta el número de células supervivientes a las distintas agresiones nefrotóxicas, lo que aumenta la resistencia del túbulo renal a la agresión y su capacidad de regeneración.

Todos los tóxicos estudiados tienen distintas características físico-químicas, y distintas dianas intracelulares. Ninguno de ellos es sustrato de la DHP-I, y hasta el momento, no se había descrito que utilizaran ninguna vía de
50 entrada común a la célula. El efecto descrito en la presente memoria sobre la capacidad de cilastatina de inhibir el ciclado de caveolas del túbulo proximal, podría ser el sustrato del efecto nefroprotector de amplio espectro que presenta este fármaco.

Para confirmar que esta nueva hipótesis era cierta, era necesario demostrar que cilastatina interfería con la acumulación intracelular de todos los fármacos estudiados, para lo cual se realizó un ensayo de incubación de las
55 células CTP con los distintos nefrotóxicos del estudio y cuantificación de la concentración intracelular de tóxicos acumulada en las CTP, siguiendo el procedimiento descrito al inicio de los Ejemplos.

Los resultados obtenidos con vancomicina, ciclosporina, tacrolimus (FK506), paracetamol, cisplatino y gentamicina

se muestran en la Fig. 9, en la que pueden observarse también las distintas concentraciones progresivas de cada uno de estos nefrotóxicos a las que se expusieron las células.

De acuerdo con estos resultados, que indican que la cilastatina interfiere con la administración intracelular de todos los nefrotóxicos estudiados, la cilastatina parece capaz de inhibir una vía de acumulación intracelular de nefrotóxicos no conocida como tal hasta ahora, como resultado de su unión a la dipeptidasa renal-I.

- **Ejemplo 6:** El efecto nefroprotector de amplio espectro de cilastatina es específico para el túbulo proximal

10 Habitualmente, las estrategias de protección celular contra fármacos de utilidad clínica pero reconocida toxicidad específica, basadas en el bloqueo del transporte del fármaco, no suelen ser de aplicación clínica, ya que con frecuencia el agente protector bloquea también la entrada del fármaco agresor en su propia diana celular.

15 Sin embargo, la especificidad conferida a la acción de cilastatina por su direccionamiento hacia una proteína que sólo se localiza en las balsas de colesterol del túbulo proximal, permite suponer que no tendrá efecto protector sobre células desprovistas de borde en cepillo (y, por tanto, de DPH-I).

La experiencia acumulada con la combinación I/C, antibiótico ampliamente utilizado en las condiciones clínicas más diversas sin que se haya descrito reducción en la actividad farmacológica de otras drogas administradas simultáneamente así lo sugiere. Ninguno de los autores que describieron la interacción entre I/C y CsA publicaron o mencionaron mayor riesgo de rechazo asociado a la interacción, lo que parece indicar que la muerte celular inducida por CsA sobre el linfocito T no es modificada por cilastatina, hecho que corroboraron los autores de la invención, observando que la cilastatina no protege al linfocito T del efecto letal de la ciclosporina A. Los ensayos se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita en el apartado "Viabilidad celular en linfocitos" y los resultados se muestran en las Figs. 10A y 10B. Se observa tanto el efecto dosis-respuesta del efecto letal de la ciclosporina A sobre linfocitos T humanos, como la ausencia de efecto protector (no hay disminución del porcentaje de muerte celular) en presencia de cilastatina 200 µg/ml.

Otro de los fármacos en los que resulta más crítico discernir si la nefroprotección ofrecida por cilastatina se acompaña o no de reducción en la potencia del fármaco es el cisplatino. Para establecer que en presencia de cilastatina el cisplatino no perdía actividad citotóxica antitumoral, se ensayó el cisplatino sobre una línea de células tumorales (células HeLa), siguiendo el método de "Evaluación de la actividad mitocondrial mediante MTT" descrito anteriormente, con los tiempos y concentraciones de compuestos descritos en el apartado de "Viabilidad en células tumorales (HeLa)". La presencia o ausencia de cilastatina no supuso ningún cambio en su efecto citotóxico. Los gráficos de los porcentajes de reducción de MTT en células HeLa tras 12 y 24 horas de tratamiento pueden observarse, respectivamente, en las Figs. 11A y 11B. Los resultados mostrados en ellos demuestran que la cilastatina (200 µg/ml) no impide la acción quimioterapéutica del cisplatino en células cancerígenas (*p≤0,05 vs. Control y control + cilastatina; ns=no significativo).

40 - **Ejemplo 7:** El efecto protector de cilastatina es observable in vivo

Para comprobar que realmente se producía nefroprotección in vivo, se realizaron dos estudios sobre ratas Wistar, como modelo experimental in vivo de nefroprotección por cilastatina frente al fracaso renal agudo tóxico causado por cisplatino, un modelo preliminar que proporcionó las pautas a seguir para la realización del segundo modelo experimental más amplio y con mas variables de medida. Las ratas fueron sometidas a tratamiento en ambos estudios con una sola dosis de cisplatino y seguimiento durante 5 días.

7.1. Ensayo preliminar

50 En el ensayo preliminar se comprobó el efecto de dos regímenes paralelos de administración de cilastatina, según se describe en la sección "Modelo experimental in vivo de nefroprotección por cilastatina frente al fracaso renal agudo tóxico causado por cisplatino: ensayo preliminar". Tal como se indica en dicho apartado, los grupos de estudio fueron los siguientes:

55 - Cisplatino + cilastatina (RRbp-X) 75 mg/kg/12 h: animal con inyección intraperitoneal de cisplatino (5 mg/Kg/ peso corporal disuelto en suero salino) + cilastatina (RRbp-X) -disuelta en suero salino- a dosis de 75 mg/Kg de peso corporal cada 12 horas intraperitonealmente desde el día de administración del cisplatino y hasta el día del sacrificio;

- Cisplatino + cilastatina (RRbp-X) 150 mg/kg/12 h: animal con inyección intraperitoneal de cisplatino (5 mg/Kg/ peso

corporal disuelto en suero salino) + cilastatina (RRbp-X) a dosis de 150 mg/Kg de peso corporal cada 12 horas en el mismo régimen y formulación que el anterior; -Cisplatino: animal con inyección intraperitoneal de cisplatino (5 mg/Kg/ peso corporal disuelto en suero salino) mas suero salino cada 12 horas en los mismos volúmenes y regímenes que los grupos tratados con cilastatina;

5

- Vehículo: animal tratado con suero salino en los mismos volúmenes y regímenes que si fuera tratado con cisplatino y cilastatina;

- Control: animal sin inyección ni tratamiento alguno.

10

Estos regímenes de tratamiento se llevaron a cabo durante 5 días sucesivos, a partir de la administración inicial de cisplatino, o de su vehículo (suero salino), sacrificando entonces a los animales para la obtención del suero sanguíneo.

15 Una representación de los regímenes de administración y de los resultados obtenidos para el nitrógeno ureico en la sangre (BUN) y la creatinina (CREA) para el ensayo preliminar pueden observarse en la Fig. 12.

En el ensayo preliminar, el animal que recibió sólo cisplatino perdió el 30% de su peso en 5 días y presentó elevación significativa de la creatinina plasmática (véase la Fig. 12C). Los animales tratados con la misma dosis de

20

cisplatino y con cilastatina no perdieron peso de manera significativa ni modificaron su creatina plasmática.

Al confirmar que la dosis utilizada de cisplatino era capaz de provocar disfunción renal, y que las dos dosis utilizadas de cilastatina ofrecían una protección similar (Figs. 12B y 12C), se diseñó el siguiente ensayo, en el que se utilizaron varios animales por grupo y se amplió el número de variables a estudiar.

25

7.2. Ensayo ampliado sobre ratas Wistar

De la misma manera, en el ensayo siguiente (Fig. 13A) y según también se describe en el apartado "Modelo experimental in vivo de nefroprotección por cilastatina frente al fracaso renal agudo tóxico causado por cisplatino: ensayo sobre ratas Wistar", los grupos de ensayo con su n correspondiente, fueron los siguientes:

30

- Grupo Cisplatino + Cilastatina (n=8): animales con administración única intraperitoneal de cisplatino (5 mg/Kg peso corporal) disuelto en suero salino, más cilastatina (disuelta en suero salino) a dosis de 75 mg/Kg de peso cada 12 horas intraperitonealmente desde el día de administración del cisplatino y hasta el día del sacrificio.

35

- Grupo Cisplatino (n=8): animales con administración única intraperitoneal de cisplatino (5 mg/Kg peso corporal) disuelto en suero salino, cada 12 horas en los mismos volúmenes y regímenes que los grupos tratados con cilastatina.

40

- Grupo Control + Cilastatina (n=6): animales tratados con administración intraperitoneal de suero salino (vehículo del cisplatino) en el mismo volumen que los grupos tratados con cisplatino, más cilastatina (disuelta en suero salino) a dosis de 75 mg/Kg de peso cada 12 horas intraperitonealmente desde el día de administración del suero salino (vehículo del cisplatino) y hasta el día del sacrificio.

45

- Grupo Control (n=6): animales tratados con suero salino en los mismos volúmenes y regímenes que en los grupos tratados con cisplatino y/o cilastatina.

Como en el ensayo anterior, estos regímenes de tratamiento se llevaron a cabo durante 5 días sucesivos, a partir de la administración inicial de cisplatino, o su vehículo (suero salino), sacrificando entonces a los animales para la obtención del suero sanguíneo. En esta ocasión, previamente al sacrificio, se tomaron muestras de orina, tal como se ha indicado en el apartado que describe el procedimiento descrito.

50

Una representación de los regímenes de administración puede observarse en la Fig. 13A, mientras que los resultados obtenidos para la creatina, el aclaramiento, la proteinuria y la osmolalidad en orina para el segundo y más completo modelo experimental, pueden observarse en las Figs. 13B a 13E). Puede observarse cómo los animales tratados con cisplatino más cilastatina presentan una reducción parcial significativa en los niveles de creatinina y aclaramiento, con respecto a los animales tratados con cisplatino que no recibieron la cilastatina, asemejándose los valores obtenidos en ellos a los valores control. Por otra parte, en la medida de proteinuria y osmolalidad en orina, cilastatina revertió completamente los valores, situándolos en valores normales en relación a los de los animales que

55

recibieron cisplatino sin cilastatina.

Los datos relativos a la pérdida de peso pueden observarse en la Tabla 3:

5 Tabla 3.- Balance de peso corporal al final del estudio ampliado

GRUPO	PESO INICIAL	PESO FINAL	Δ PESO
Control	264 ± 3	279 ± 2	14,8 ± 1,3
Control + Cil	259 ± 8	273 ± 7	14,3 ± 1,5
Cisplatino	272 ± 4	249 ± 5	-23,0 ± 2,9*
Cisplatino + Cil	272 ± 5	259 ± 3	-13,0 ± 3,7*&
* P<0,0001 vs. Control y control + Cil; & P<0,05 vs. Cisplatino			

Los animales que recibieron cilastatina junto con cisplatino tuvieron una pérdida de peso claramente menor que los que recibieron sólo cisplatino. Así, los animales control y control más cilastatina, aumentaron su peso medio unos 14
10 gramos aproximadamente, mientras que en los grupos tratados con cisplatino se produjo una pérdida significativa de peso en comparación con los primeros (p<0,0001). Los animales que recibieron cisplatino y fueron tratados con cilastatina, perdieron menos peso que los no tratados, siendo este dato significativo (P<0,05).

7.3. Extrapolación de los datos obtenidos a seres humanos

15 Para deducir una dosis efectiva que pudiera ser adecuada a seres humanos, se han tenido en cuenta los datos disponibles, referentes a animales de experimentación, sobre la relación entre las dosis de cilastatina suministradas, expresadas en mg/kg de peso, y los niveles plasmáticos de cilastatina que se obtienen con las mismas, expresadas en mg/l. Se ha recurrido a los datos disponibles para conejo (Toyoguchi, 1997), rata (Lin, 1999 y Pérez 2004) y los
20 experimentos in vitro descritos en la presente memoria, en los que se incuban células de cerdo en presencia de distintas concentraciones de cilastatina. No existen datos publicados para seres humanos, por lo que se ha recurrido a los datos procedentes de la ficha técnica del producto para seres humanos, por lo que se ha recurrido a los datos procedentes de la ficha técnica del producto Tienam®, de Merck, Sharp and Dohme España S. A., fabricado por Abelló Farmacia S.L., (producto que contiene imipenem y cilastatina sódica), para deducir los datos
25 correspondientes a seres humanos (ficha técnica IPC 0195a, Tracer n° TEN/IV-E-14417, MOH modificaciones-5/99 (6/99), disponible en la dirección de Internet: http://www.msd.es/content/hcp/products/ft/ft_tienam_iv_500mg_es.pdf) Con esos datos, se ha construido la gráfica de relación entre dosis suministrada y niveles pericelulares, expresados en mg/l: en el caso de los estudios realizados en conejo y rata, se ha considerado que estos niveles pericelulares equivaldrían a los niveles plasmáticos detectados para cada dosis suministrada; en el caso de los experimentos in vitro realizados con células de cerdo, la concentración pericelular sería la concentración de cilastatina en el medio de cultivo. La gráfica resultante se presenta en la Fig. 14 (rombos: datos de conejo; triángulos: datos de rata; cuadrados sin relleno: datos de los experimentos relativos a cerdos; cuadrados rellenos que incluyen un punto blanco: datos de la ficha técnica del producto para seres humanos). En dicha gráfica, el recuadro sombreado representa el rango de niveles plasmáticos (concentraciones pericelulares) en el cual se ha demostrado seguridad y ausencia de toxicidad
35 para la cilastatina.

En la gráfica puede observarse que existe una relación lineal entre las dosis administradas y los niveles plasmáticos alcanzados para todas las especies, linealidad que se mantiene hasta dosis de 200 mg/kg peso corporal y niveles plasmáticos en torno a 800 mg/l. Por encima de dichas cifras la relación tiende a perderse.

40 Las circunferencias con las que se han rodeado algunos datos representan las dosis a las cuales se ha demostrado eficacia del fármaco en la presente memoria. Como puede verse, la dosis mínima eficaz demostrada en los estudios reflejados en la presente memoria se corresponden con el rango de utilización terapéutica propuesto en la ficha técnica. Dicha dosis puede estimarse en 10 mg/Kg de peso corporal, lo que representa un valor medio de 750
45 mg/día para un ser humano en edad adulta, que representa la dosis mínima nefroprotectora estimada en seres humanos.

- Conclusiones

50 Los resultados mencionados en los Ejemplos anteriores indican que la cilastatina presenta un efecto inesperado y no conocido sobre el borde en cepillo del túbulo proximal, como consecuencia del cual es capaz de impedir en grados variables la nefrotoxicidad de antibióticos, citotóxicos, antiinflamatorios, antirretrovirales, anestésicos e

inmunosupresores. Dada la diferencia en estructura química, solubilidad en agua o lípidos y carácter iónico a pH fisiológico, puede asumirse que este efecto nefroprotector puede extenderse a cualquier fármaco, o compuesto sin actividad conocida como fármaco, capaz de lesionar el túbulo proximal. Esta nefroprotección de amplio espectro es específica para el riñón y no interfiere con los efectos de los tóxicos en cuestión sobre sus propias dianas. La cilastatina está desprovista ella misma de efectos tóxicos sobre las células del túbulo proximal. Por ello, su administración puede servir para reducir los efectos nefrotóxicos de fármacos y otros compuestos con efecto nefrotóxico. La administración de la cilastatina puede ser simultánea a la del fármaco y/o posterior a la misma, en una única dosis o en varias dosis, de las cuales una de ellas puede ser simultánea a la administración del compuesto cuya nefrotoxicidad se quiere reducir.

10

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adachi H, Tawaragi Y, Inuzuka C, Kubota I, Tsujimoto M, Nishihara T, Nakazato H. Primary structure of human microsomal dipeptidase deduced from molecular cloning. *J Biol Chem* 5;265(7):3992-3995 (1990).

15

Bagahie A, Bayat M, Abobo C et al. The effect of imipenem/cilastatin on acute cyclosporin nephrotoxicity in heart/lung transplant patients. *Crit Care Med* 23: A241 (1995)

Belitsky P, Ghose T, Girner M, Rowden G, Pope B. Tissue distribution of cyclosporine A in the mouse: a clue to toxicity?. *Clin Nephrol* 25:27-29 (1986).

20

Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Pentlow BD. Cyclosporin A in patients receiving renal allograft from cadaver donors. *Lancet* 23:1323-1327 (1978).

25 Campbell BJ, Di Shih Y, Forrester LJ, Zahler WL. Specificity and inhibition studies of human renal dipeptidase. *Biochim Biophys Acta* 21;956(2):110-118 (1988).

Campbell BJ, Forrester LJ, Zahler WL, Burks M. Beta-lactamase activity of purified and partially characterized human renal dipeptidase. *J Biol Chem* 10;259(23):14586-14590 (1984).

30

Campbell BJ, Lin YC, Davis RV, Ballew E. The purification and properties of a particulate renal dipeptidase. *Biochim Biophys Acta* 5;118(2):371-386 (1966).

35 Carmellini M, Frosini F, Filippini F, Boggi U, Mosca F. Effect of cilastatin on cyclosporine-induced acute nephrotoxicity in kidney transplant recipients. *Transplantation* 64:164-166 (1997).

Carmellini M, Matteucci E, Boggi U, Cecconi S, Giampietro O, Mosca F. Imipenem/cilastatin reduces cyclosporin-induced tubular damage in kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 30(5):2034-2035 (1998).

40 Drusano GL, Standiford HC, Bustamante CI, Forrest A, Rivera G, Tatem B, Schimpff SC. The plasma pharmacokinetics of high dose (1 g) imipenem coadministered with 1 g cilastatin in six normal volunteers. *Eur J Clin Microbiol* 3(5):468-70 (1984).

45 Drusano GL, Standiford HC, Bustamante CI, Rivera G, Forrest A, Leslie J, Tatem B, Delaportas D, Schimpff SC. Safety and tolerability of multiple doses of imipenem/cilastatin. *Clin Pharmacol Ther* 37(5):539-543(1985).

Garcia del Moral R, O'Valle F, Andujar M, Aguilar M, Lucena MA, Lopez-Hidalgo J, Ramirez C, Medina-Cano MT, Aguilar D, Gómez-Morales M. Relationship between P-glycoprotein expression and cyclosporin A in kidney. An immunohistological and cell culture study. *Am J Pathol* 146:398-408 (1995)

50

Greenstein, J.P. *Advances in enzymology and related subjects of biochemistry*. F.F. Nord (ed) Interscience Publishers, Inc. New York (8): 117-169

55 Gruss E, Tomas JF, Bernis C, Rodríguez F, Traver JA, Fernandez-Ranada JM. Nephroprotective effect of cilastatin in allogeneic bone marrow transplantation. Results from a retrospective analysis. *Bone Marrow Transplant* 18:761-765 (1996).

Gyure, WL. Comparison of several methods for semiquantitative determination of urinary protein. *Clin. Chem.* 23: 876-879 (1977)

- Hammer C, Thies JC, Mraz W, Mihatsch M. Reduction of cyclosporin nephrotoxicity by imipenem/cilastatin after kidney transplantation in rats. *Transplant proc* 21:931-936 (1989).
- 5 Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226(4674):544-547 (1984).
- 10 Hooper NM. Glycosyl-phosphatidyl inositol anchored membrane enzymes. *Clin Chim Acta* 266 (1):3-12 (1997).
- Jackson NM, O'Connor RP, Humes HD. Cyclosporine effects on isolated membranes, proximal tubule cells, and interstitium of the kidney. *Transplant Proc* 20:748-758 (1988).
- 15 JH Lin, I-W Chen, EH Ulm Dose-dependent kinetics of cilastatin in laboratory animals. *Drug Metabolism and Disposition*. 1989. 17(4):426-432.
- Kahan BD. Cyclosporin. *New Engl J Med* 321:1725-1728 (1989).
- 20 Kahan BD. The First International Congress on cyclosporine. Houston, Texas. May 16-19, 1983. *Dial Transplant* 16: 620-630 (1983).
- Kahan JS, Kahan FM, Goegelman R, Currie SA, Jackson M, Stapley EO, Miller TW, Miller AK, Hendlin D, Mochales S, Hernández S, Woodruff HB, Birnbaum J. Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *J Antibiot (Tokyo)* 32(1):1-12.(1979).
- 25 Kim JY, GW Kim, SH Choi, JS We, HS Park, J Yang: Renal Dehydropeptidase-I(DHP- I) stability and pharmacokinetics of DA-1131, a new carbapenem antibiotic. 1996, abstr III P-45, p 238. In Abstracts of the Annual Meeting of the Korea Society of Applied Pharmacology, Seoul National University, Seoul, Korea.
- 30 Kim SH, JW Kwon, WB Kim, MG Lee: Effects of cilastatin on the pharmacokinetics of a new carbapenem, DA-1131, in rats, rabbits and dogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999; 43(10):2524-2527.
- Klintmalm GB, Iwatsuki S, Starzl TE. Nephrotoxicity of cyclosporin A in liver and kidney transplant patients. *Lancet* 35 28:470-1 (1981).
- Koller M, Brom J, Raulf M, Konig W. Cilastatin (MK 0791) is a potent and specific inhibitor of the renal leukotriene D4-dipeptidase. *Biochem Biophys Res Commun* 16;131(2):974-979 (1985).
- 40 Kozak EM, Tate SS. Glutathione-degrading enzymes of microvillus membranes. *J Biol Chem* 10;257(II):6322-6327 (1982).
- Markewitz A, Hammer C, Pfeiffer M, Zahn S, Drechsel J, Reichenspurner H, Reichart B. Reduction of cyclosporine-induced nephrotoxicity by cilastatin following clinical heart transplantation. *Transplantation* 57:865-870 (1994).
- 45 Metabolism of thienamycin and related carbapenems antibiotics by the renal dipeptidase, dehydropeptidase I. *Antimicrob Agents Chemother* 22:62-70
- Mihatsch MJ, Ryffel B, Hermle M, Brunner FP, Thiel G. Morphology of cyclosporine nephrotoxicity in the rat. *Clin Nephrol* 25:S2-S8 (1986)
- 50 Morandat S, Bortolato M, Roux B. Cholesterol-dependent insertion of glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme. *Biochim Biophys Acta*. 31;1564(2):473-478 (2002).
- 55 Mraz W, Modic PK, Hammer C. Impact of imipenem/cilastatin on cyclosporine metabolism and excretion. *Transplant Proc* 24(5): 1704-1708 (1992).
- Mraz W, Sido B, Knedel M, Hammer C. Concomitant immunosuppressive and antibiotic therapy— reduction of cyclosporine A blood levels due to treatment with imipenem/cilastatin. *Transplant Proc* 19(5):4017-4020 (1987).

- National Institutes of Health Consensus Conference. *JAMA* 259:2961 (1983).
- 5 Nitanei Y, Satow Y, Adachi H, Tsujimoto M. Crystal structure of human renal dipeptidase involved in beta-lactam hydrolysis. *J Mol Biol* 321(2): 177-84 (2002).
- Norbby SR, Alestig K, Bjornegard B, Burman LA, Ferber F, Huber JL, Jones KH, Kahan FM, Kahan JS, Kropp H, Meisinger MA, Sundelof JG. Urinary recovery of N-formimidoyl thienamycin (MK0787) as affected by coadministration of N- formimidoyl thienamycin dehydropeptidase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 23(2):300-307 (1983).
- 10 Nosjean O, Briolay A, Roux B. Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions. *Biochim Biophys Acta* 8; 1331(2):153-186 (1997).
- Pérez M, Castilla M, Torres AM, Lázaro JA, Sarmiento E, Tejedor A. *Nephrol Dial Transplant*. 19(10):2445-2455
15 (2004).
- Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 54(3) :431-467 (2002)
- 20 Ryffel B. Pharmacology of cyclosporine. Cellular activation: regulation of intracellular events by cyclosporine. *Pharmacol Rev* 41(3):407-422 (1990).
- Sack K, Herhahn J, Marre R, Schulz E. Renal tolerance of imipenem cilastatin and other beta-lactam antibiotics in rats. *Infection* 13:S156-60 (1985).
- 25 Seveau S, Bierne H, Giroux S, Prevost MC, Cossart P. Role of lipid rafts in E-cadherin- - and HGF-R/Met— mediated entry of *Listeria monocytogenes* into host cells. *J Cell Biol* 30;166(5):743-753 (2004).
- Sido B, Hammer C, Mraz W, Krombach F. Nephroprotective effect of imipenem/cilastatin in reducing cyclosporine toxicity. *Transplant proc* 1:1755- 1758 (1987).
- 30 Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1):31-39 (2000).
- Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 19(II):7289-7304 (1999).
- 35 Sweet DH: Organic anion transporter (S1c22a) family members as mediators of toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 204 (2005): 198-215
- 40 T Nakamura, Y Hashimoto, T Kokuryo, K-I Inui: Effects of Fosfomycin and Imipenem/Cilastatin on Nephrotoxicity and Renal Excretion of Vancomycin in Rats. *Pharmaceutical Research* 1998; 15 (5):734-738.
- T Toyoguchi Y Nakagawa: Nephrotoxicity and drug interaction of vancomycin (2). *Folia Pharmacol Jpn* 1996. 107: 225-235
- 45 Tally FP, Jacobus NV, Gorbach SL. In vitro activity of N-formimidoyl thienamycin (MK0787). *Antimicrob Agents Chemother* 18(4):642-644 (1980).
- Takeda M, Narikawa S, Hosoyamada M, Cha SK, Sekine T, Endou H: Characterization of organic anion transport inhibitors using cells stably expressing human organic anion transporters. *European Journal of Pharmacology* 419
50 (2001):113-120
- Tejedor A, Torres AM, Castilla M, Lázaro JA, de Lucas C, Caramelo C. Cilastatin protection against cyclosporin A-induced nephrotoxicity: clinical evidence. *Curr Med Res Opin*. 2007 Mar;23(3):505-13.
- 55 Thiel G, Mihatsch M, Landmann J, Hermle M, Brunner FP, Harder F. Is cyclosporine A-induced nephrotoxicity in recipients of renal allografts progressive? *Transplant Proc* 17:169-178 (1985).
- Tropschug M, Barthelmeß IB, Neupert W. Sensitivity to cyclosporin A is mediated by cyclophilin in *Neurospora*

crassa and *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 21- 28:953-955 (1989).

Welch CL, Campbell BJ. Uptake of glycine from L-alanylglycine into renal brush border vesicles. *J Membr Biol* 54(1):39-50 (1980).

5

Yamada E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 25;(5):445-458 (1955).

REIVINDICACIONES

1. Cilastatina para usar en la reducción de la nefrotoxicidad en un sujeto, caracterizado porque la nefrotoxicidad es causada por un fármaco nefrotóxico que es foscarnet o iopamidol.
5
2. Cilastatina para usar en la reducción de la nefrotoxicidad en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la nefrotoxicidad es causada por foscarnet.
3. Cilastatina para usar en la reducción de la nefrotoxicidad en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 10 1, en el que la nefrotoxicidad es causada por iopamidol.
4. Cilastatina para usar en la reducción de la nefrotoxicidad en un sujeto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la cilastatina se administra en dosis adicionales sucesivas posteriores a la administración del fármaco nefrotóxico.
15
5. Cilastatina para usar en la reducción de la nefrotoxicidad en un sujeto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la cilastatina se administra antes de la administración del fármaco nefrotóxico.
6. Cilastatina para usar en la reducción de la nefrotoxicidad en un sujeto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la cilastatina se administra simultáneamente con la administración del fármaco nefrotóxico.
20
7. Cilastatina para usar en la reducción de la nefrotoxicidad en un sujeto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la cilastatina se administra por vía oral o parenteral.
25
8. Cilastatina para usar en la reducción de la nefrotoxicidad en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 7, donde la cilastatina se administra por vía intravenosa.
9. Cilastatina para usar en la reducción de la nefrotoxicidad en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 30 8, donde la dosis diaria de cilastatina es al menos 750 mg/día.
10. Cilastatina para usar en la reducción de la nefrotoxicidad en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 9, donde la cilastatina se administra como una dosis diaria única o al menos dos dosis divididas diarias.
- 35 11. Cilastatina para usar en la reducción de la nefrotoxicidad en un sujeto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el sujeto es un ser humano.
12. Una composición que comprende un fármaco nefrotóxico junto con cilastatina, caracterizado porque el fármaco nefrotóxico es foscarnet o iopamidol.
40
13. Composición de acuerdo con la composición 12, que no contiene imipenem.
14. Composición de acuerdo con la composición 13, en la que el fármaco nefrotóxico es foscarnet.
- 45 15. Composición de acuerdo con la composición 13, en la que el fármaco nefrotóxico es iopamidol.
16. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, que comprende además al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50 17. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, que está en forma de polvo.
18. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, que está en forma de solución.
55
19. Composición de acuerdo con la reivindicación 18, en la que el disolvente es suero salino.
20. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19, para usar en la reducción de la nefrotoxicidad del fármaco nefrotóxico comprendido en la composición.

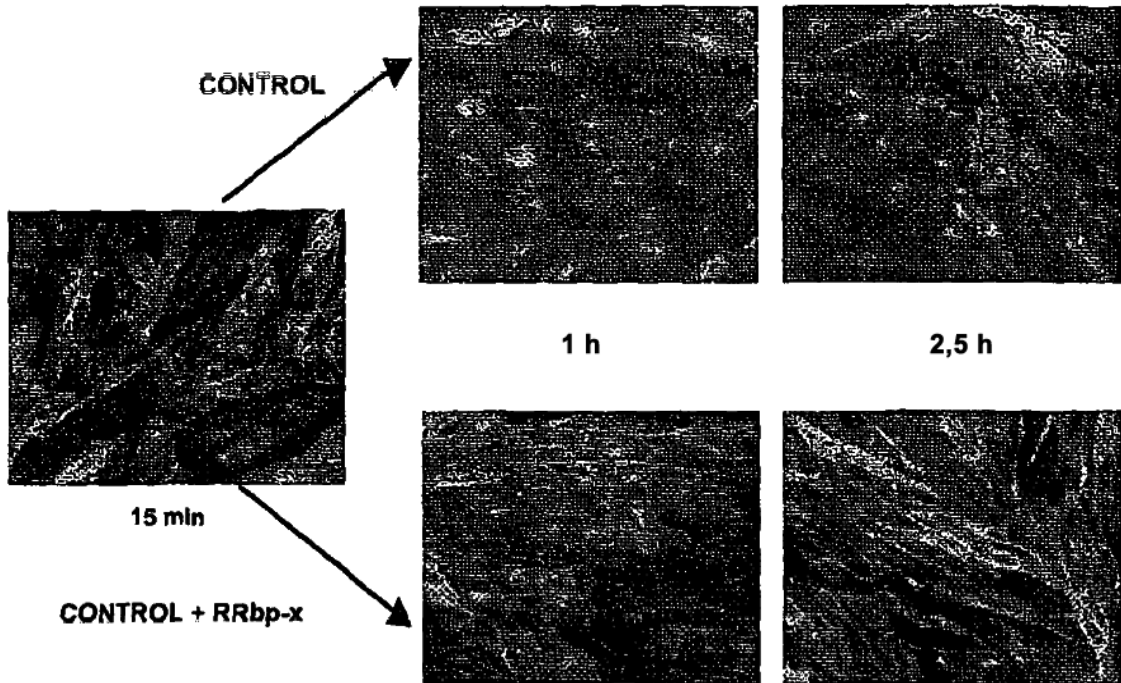


Fig. 1A

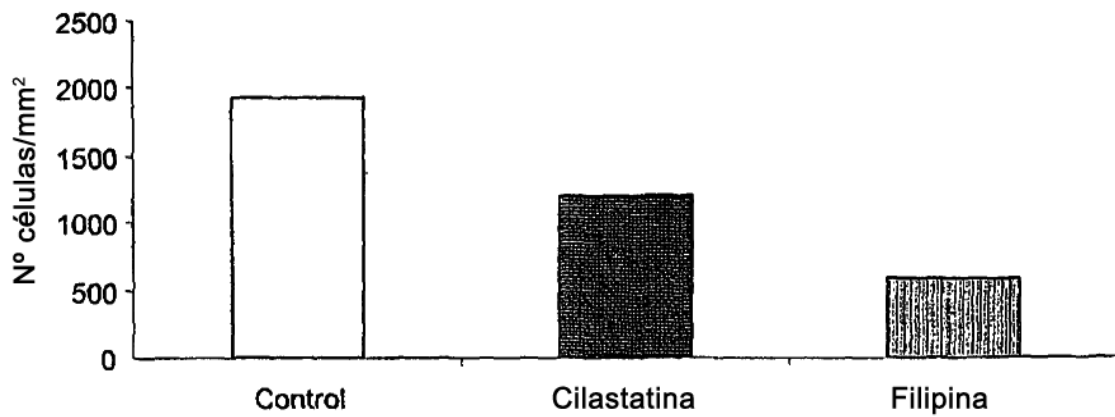


Fig. 1B

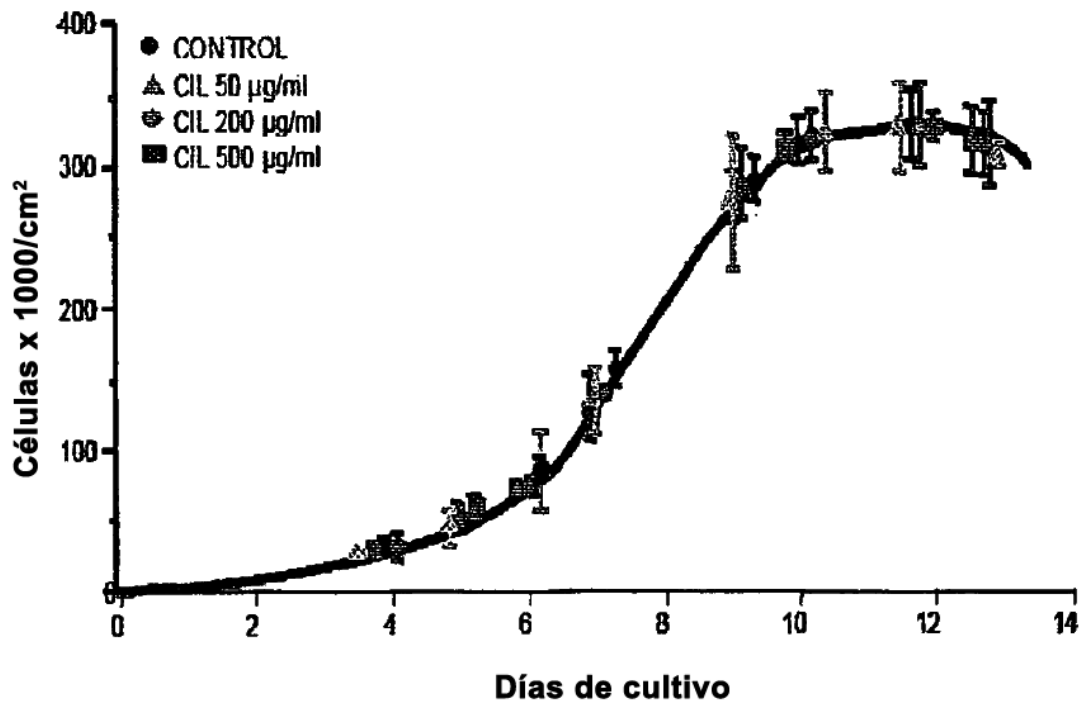


Fig. 2

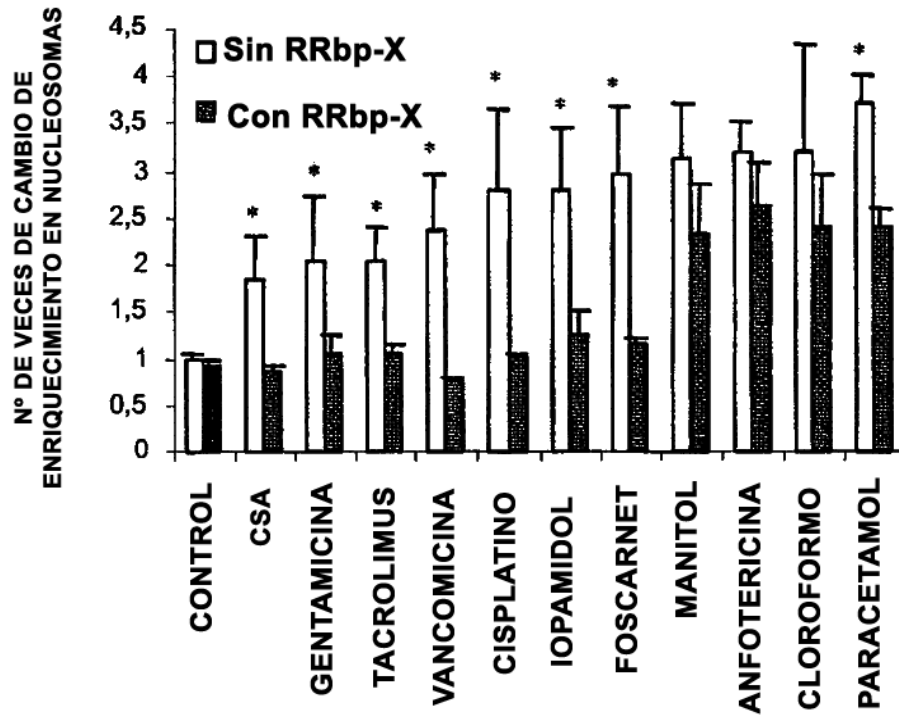


Fig. 3

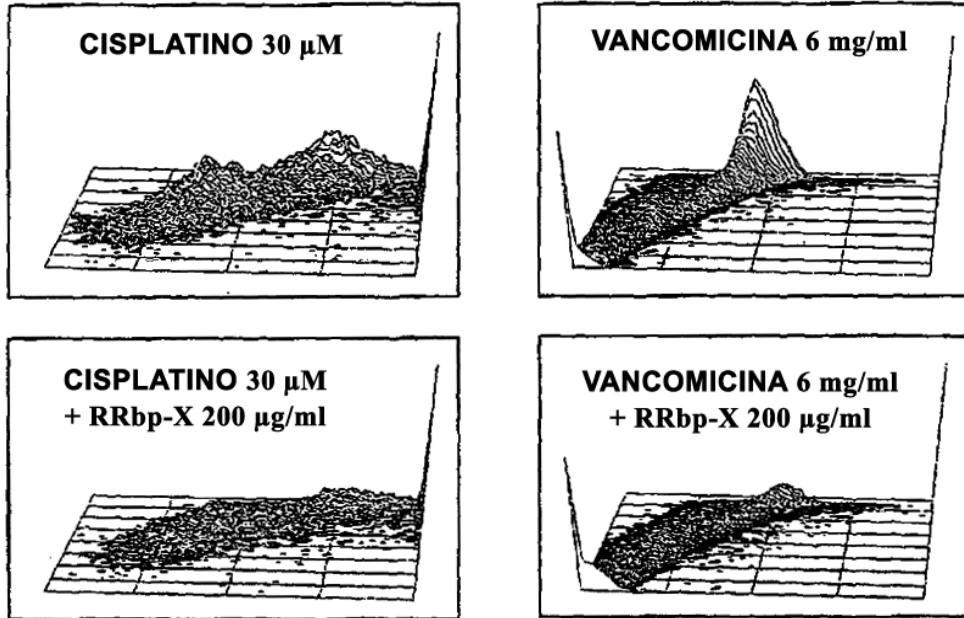


Fig. 4A

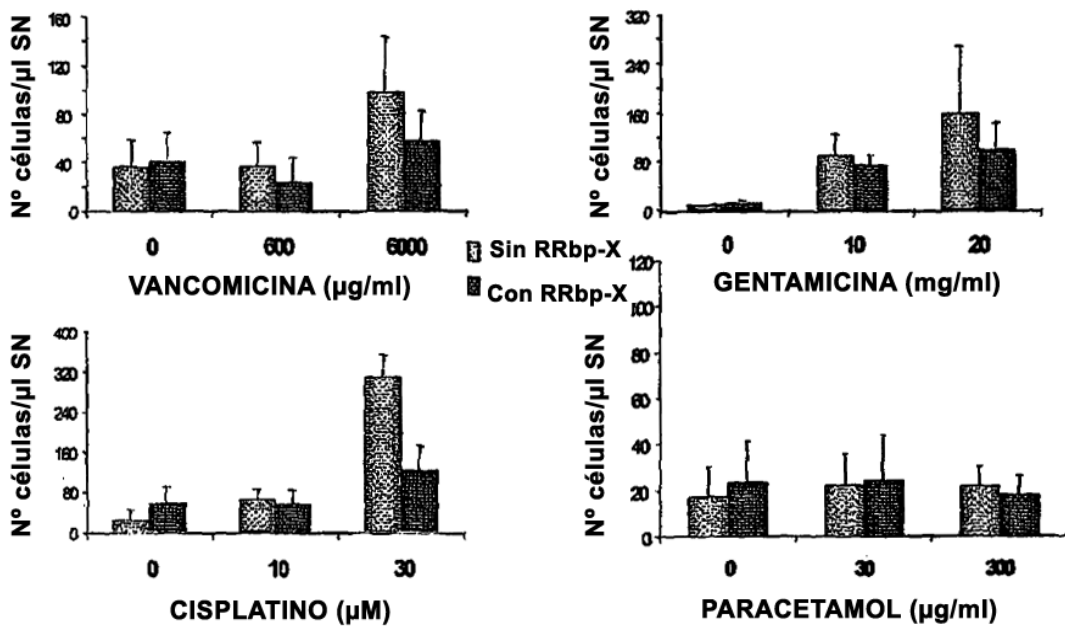


Fig. 4B

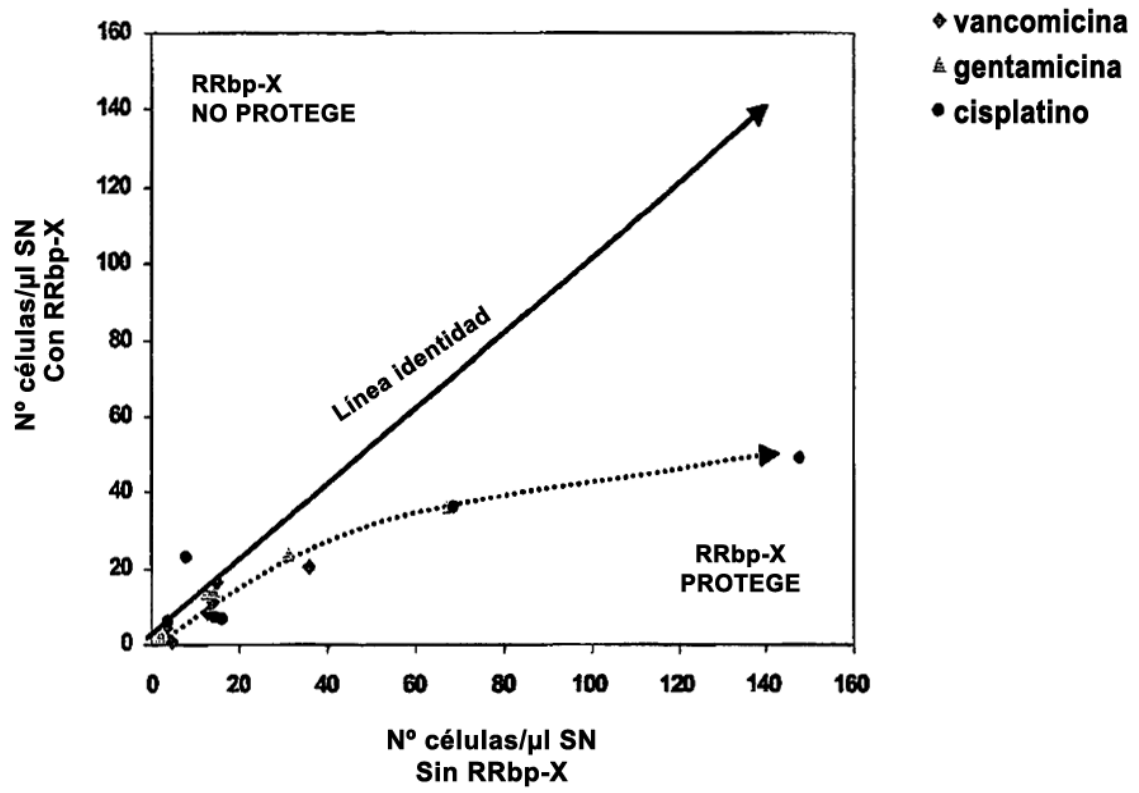


Fig. 4C

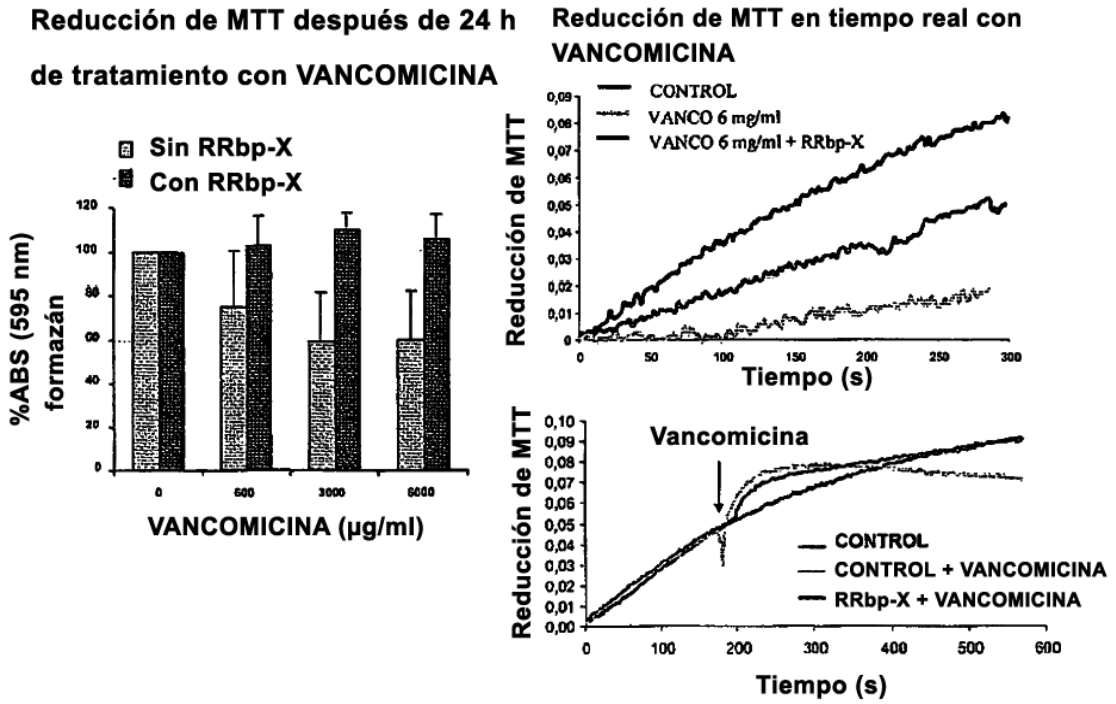


Fig. 5A

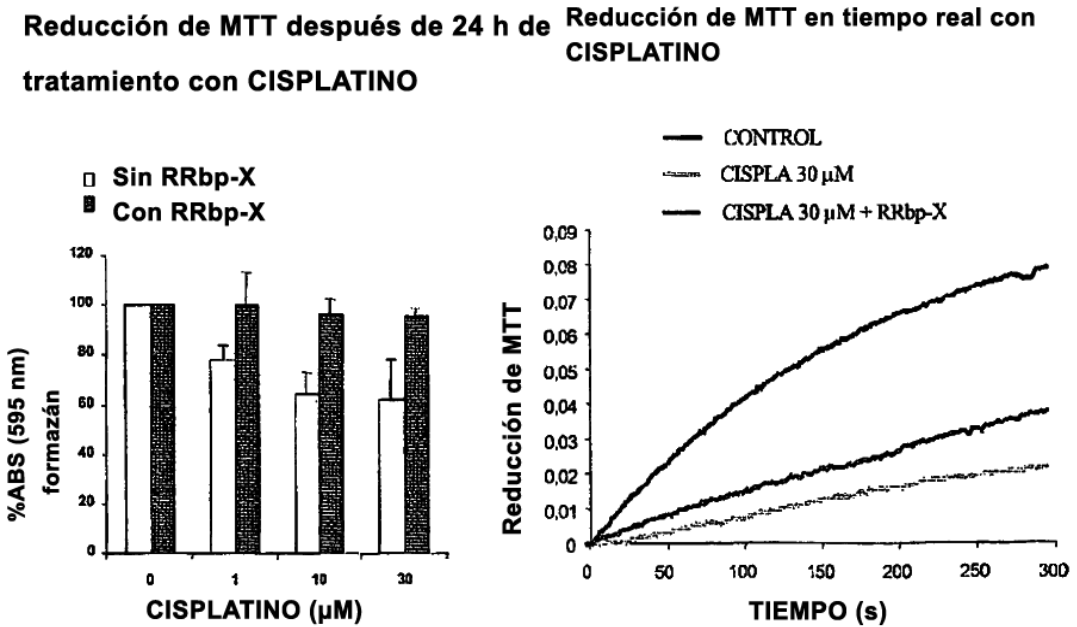
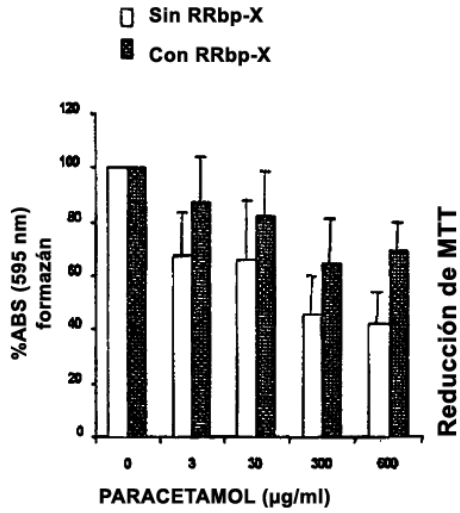


Fig. 5B

Reducción de MTT después de 24 h de tratamiento con PARACETAMOL



Reducción de MTT en tiempo real con PARACETAMOL

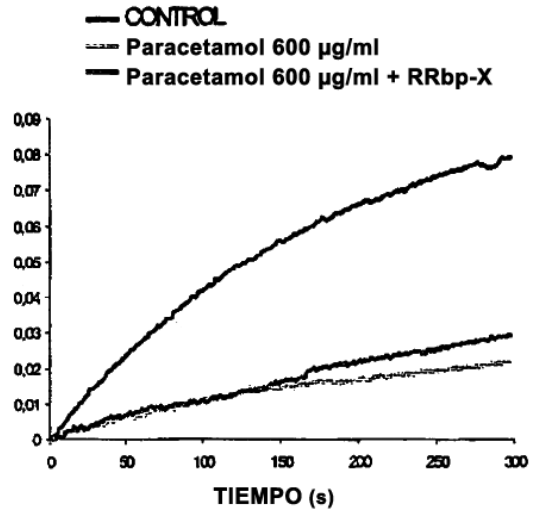
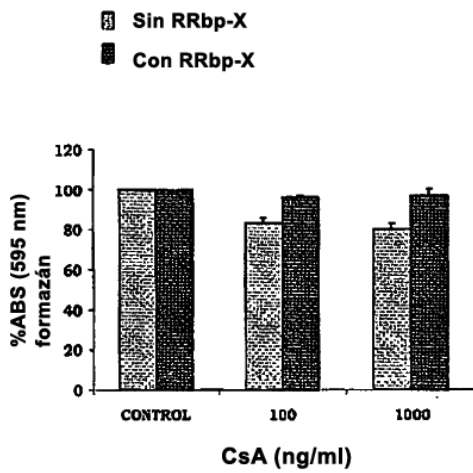


Fig. 5C

Reducción de MTT después de 24 h de tratamiento con CICLOSPORINA



Reducción de MTT en tiempo real con CICLOSPORINA

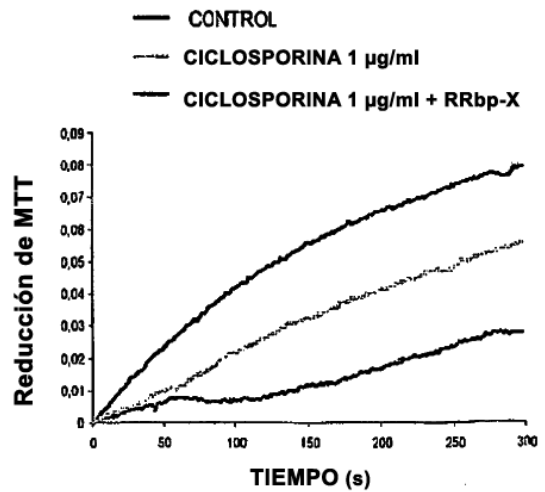


Fig. 5D

Reducción de MTT después de 24 h de tratamiento con TACROLIMUS **Reducción de MTT en tiempo real con TACROLIMUS**

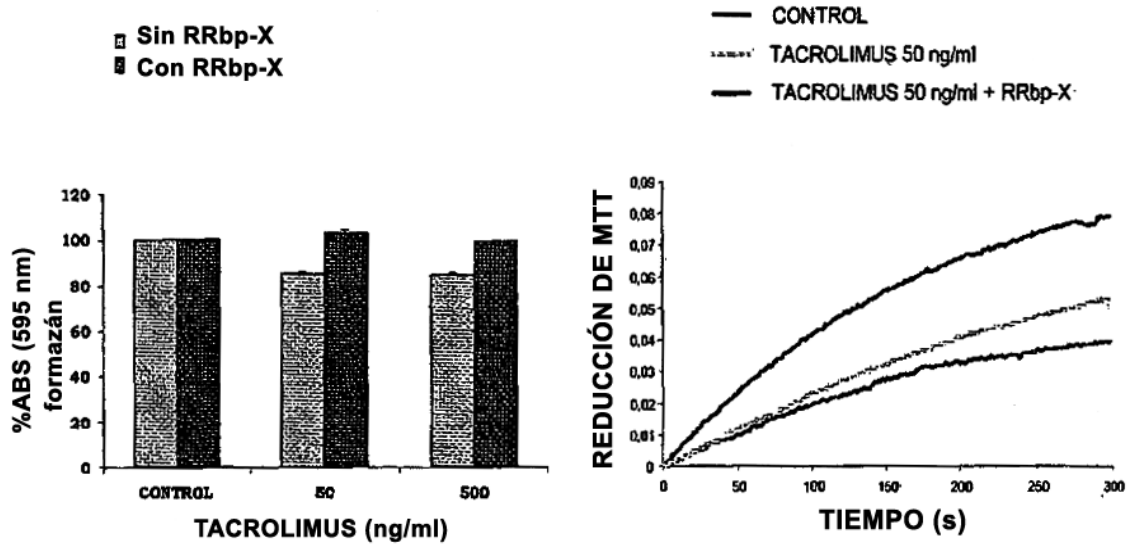


Fig. 5E

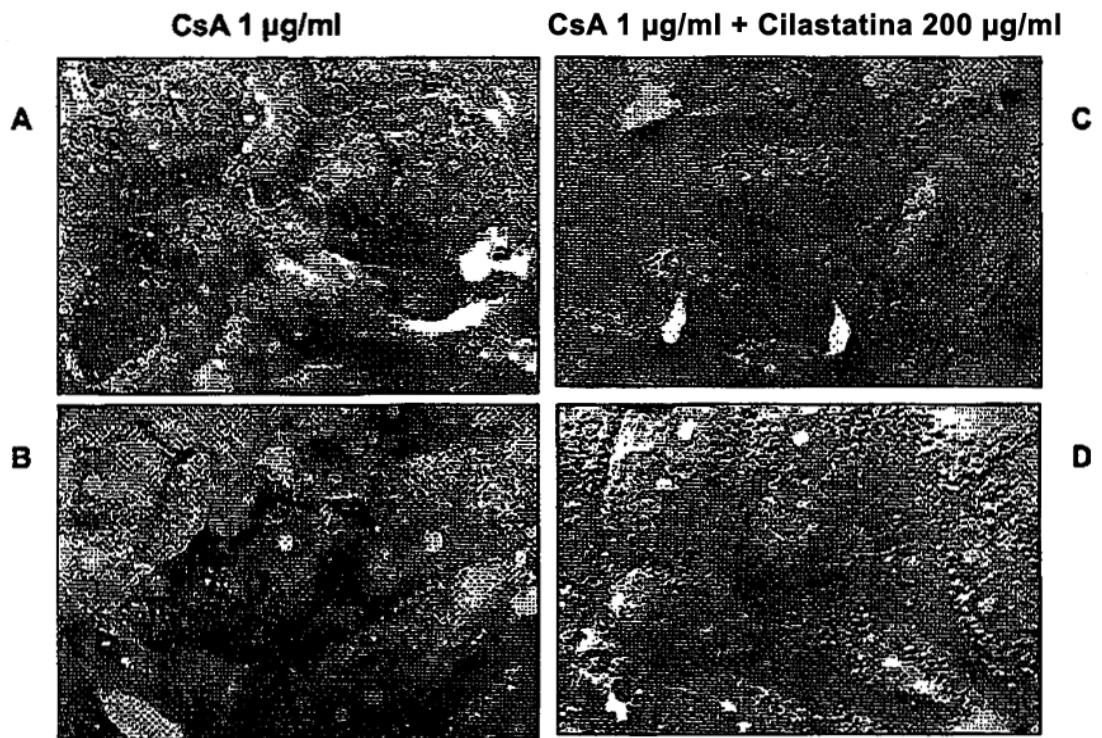


Fig. 6

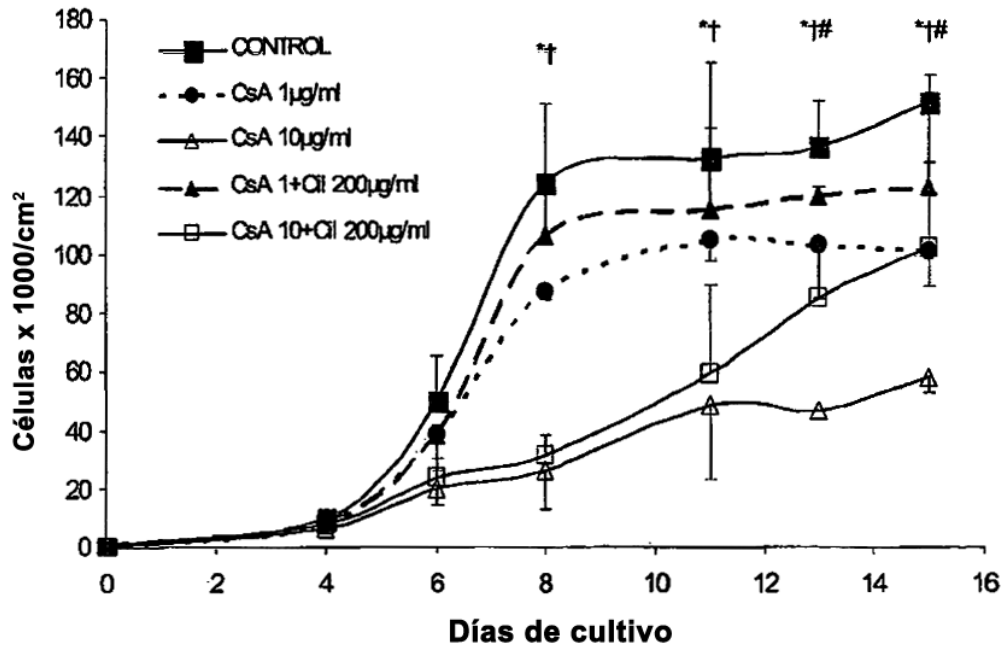


Fig. 7A

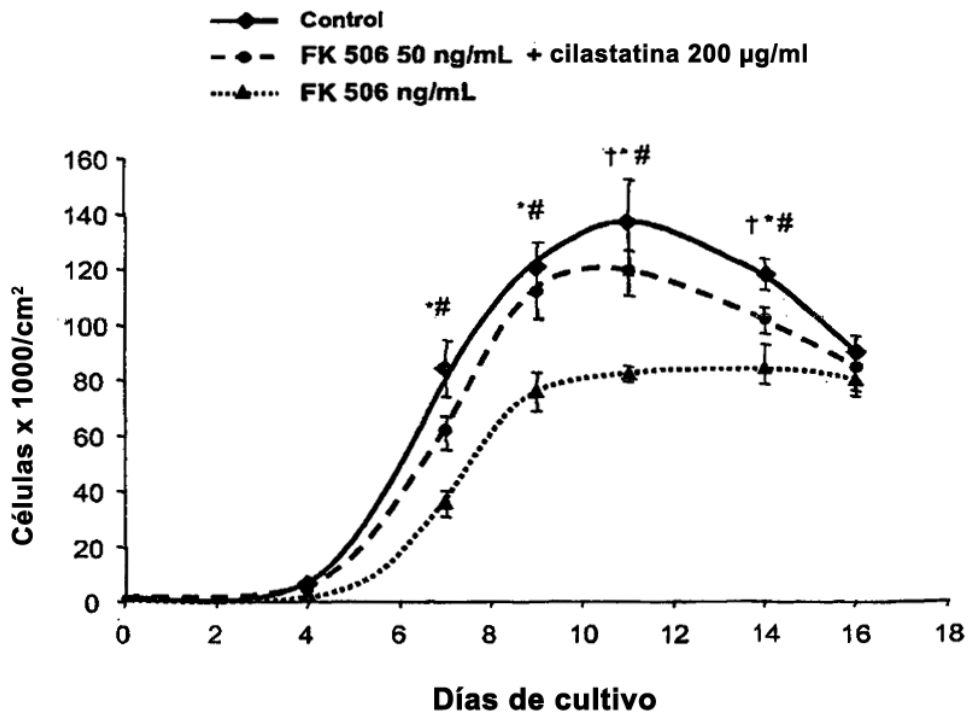


Fig. 7B

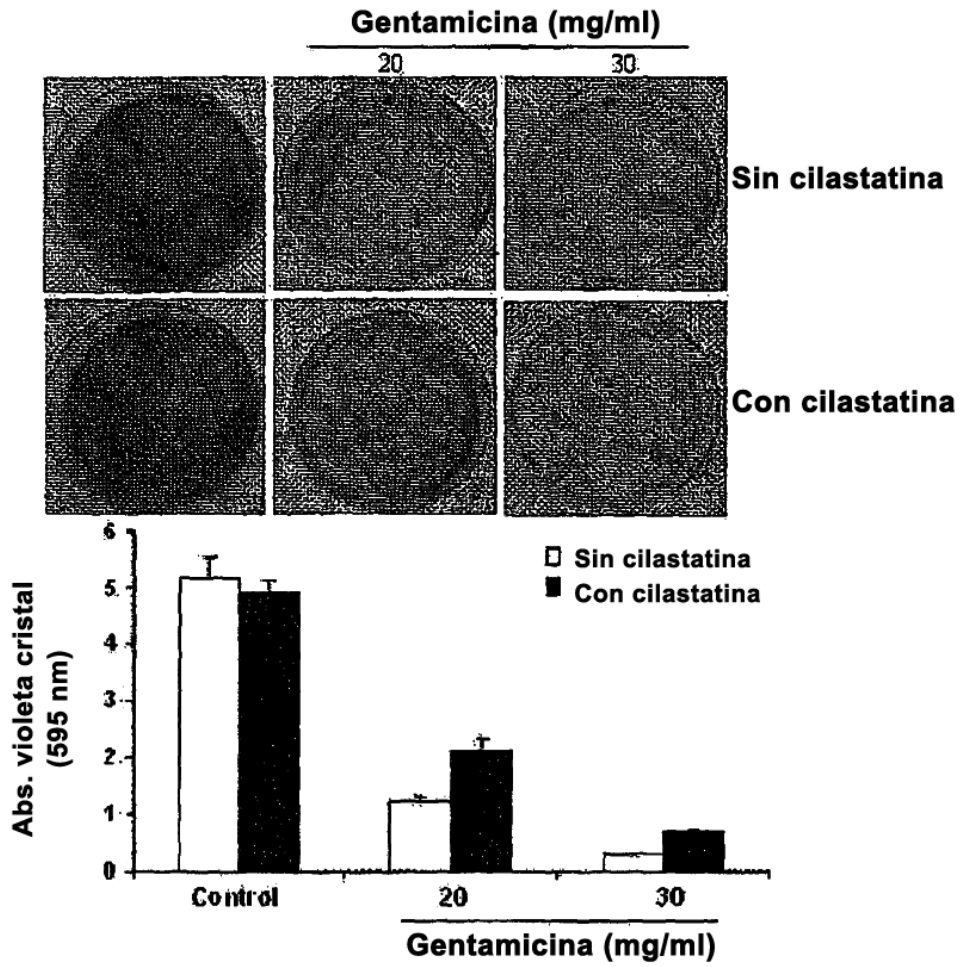


Fig. 8A

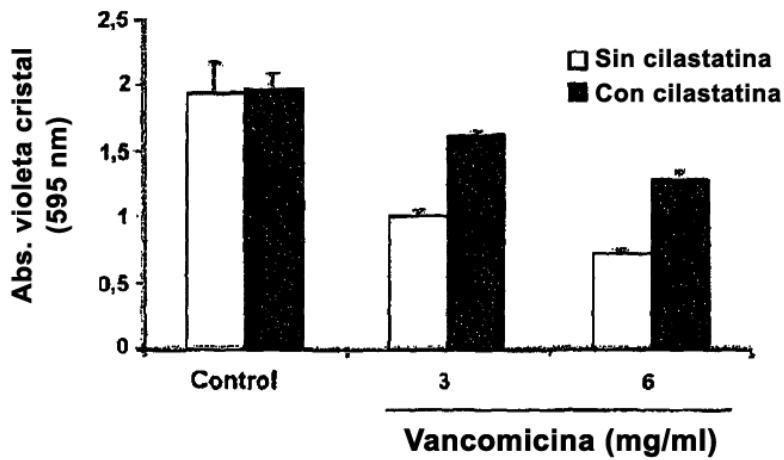


Fig. 8B

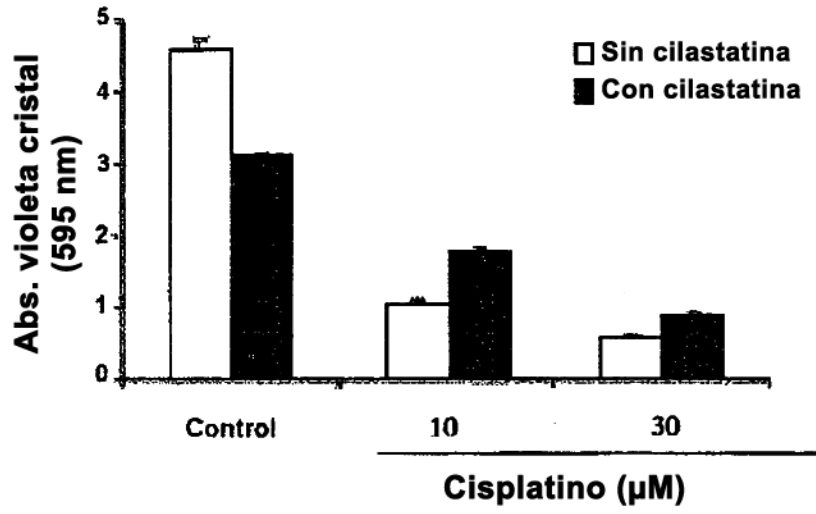


Fig. 8C

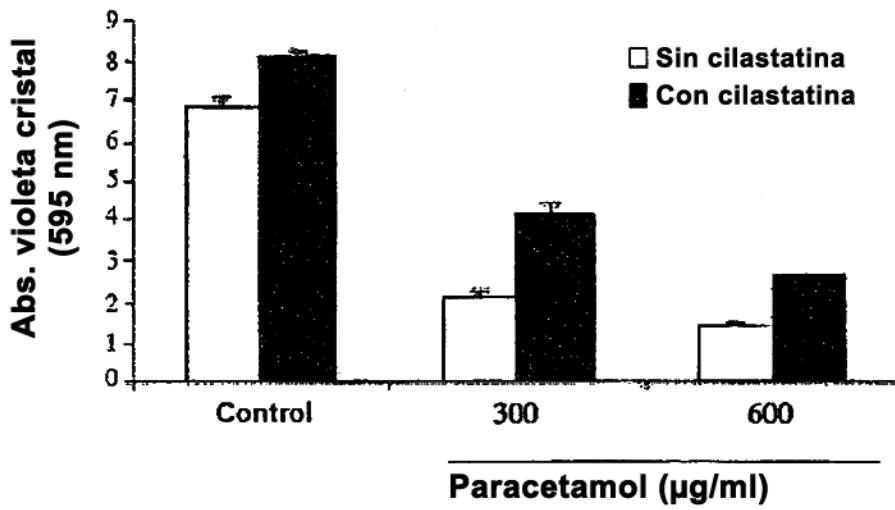


Fig.8D

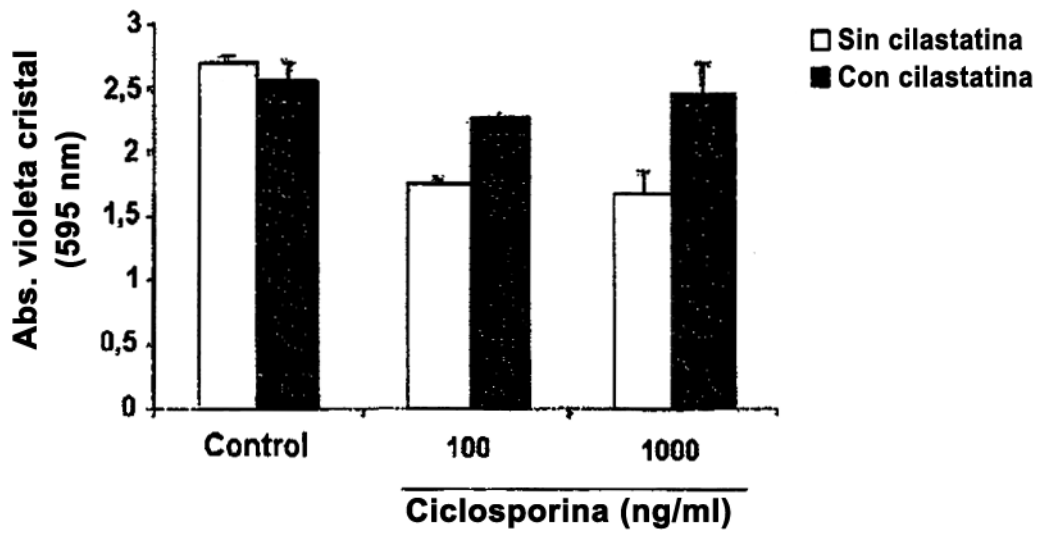


Fig. 8E

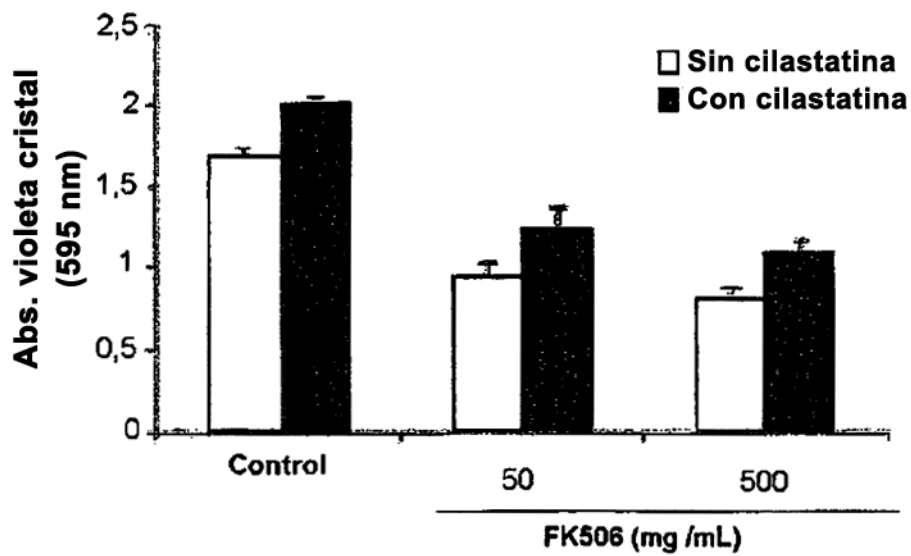


Fig. 8F

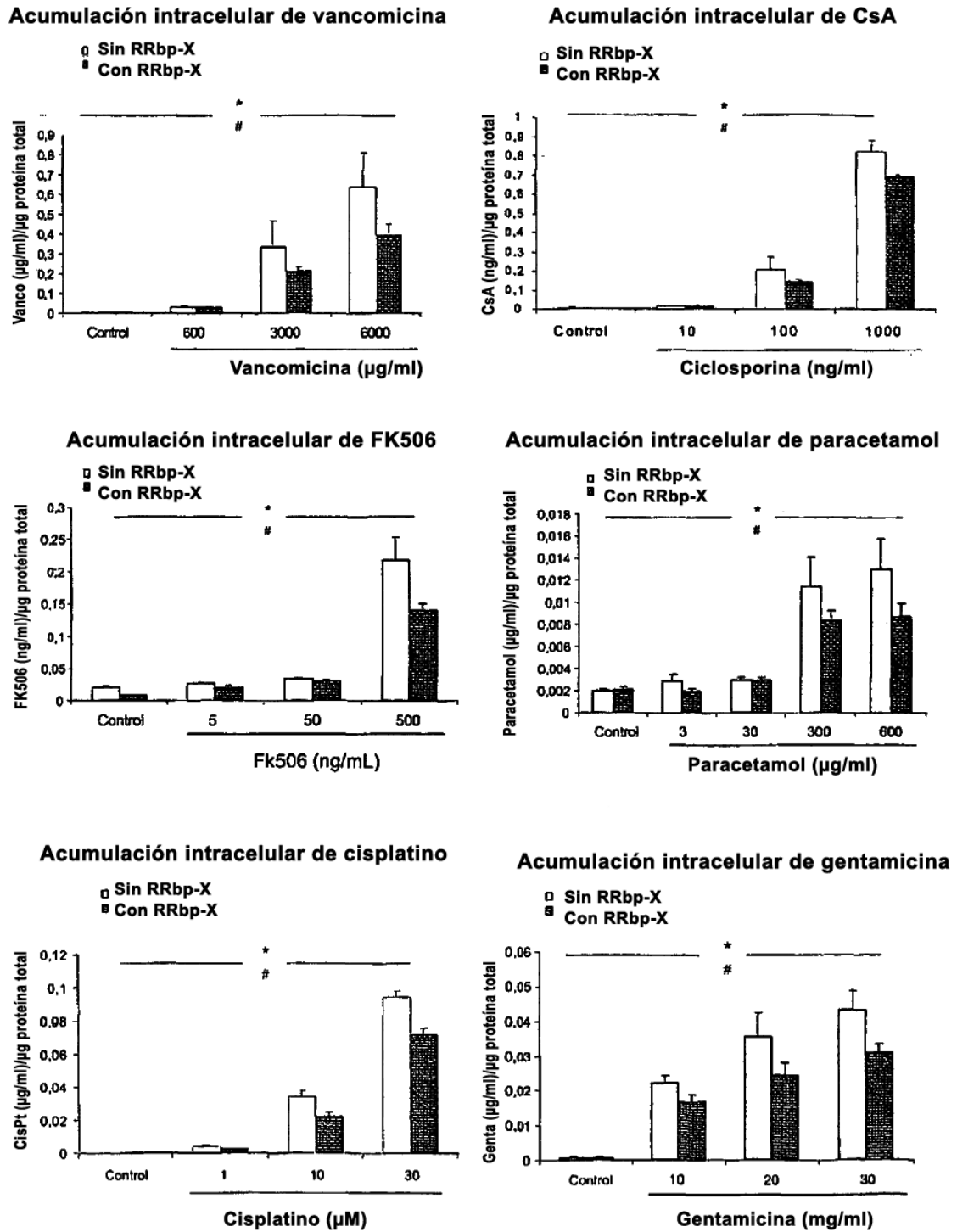


Fig. 9

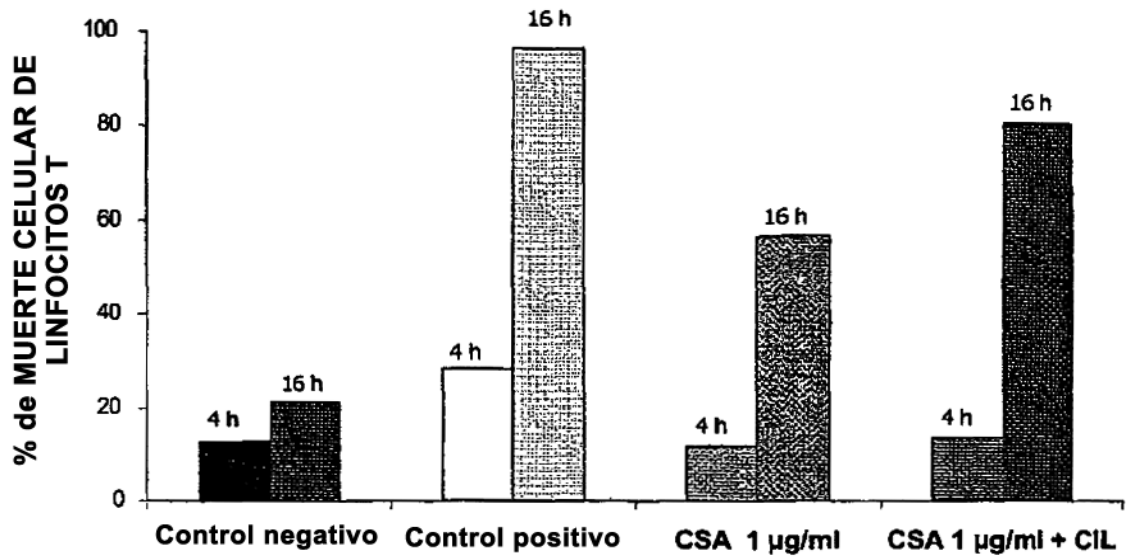


Fig. 10A

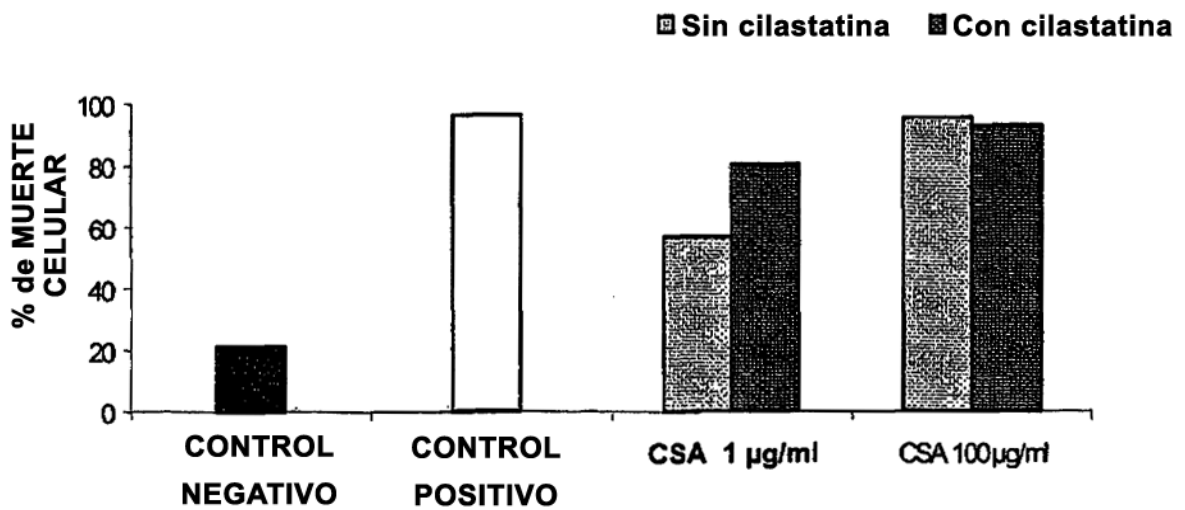


Fig. 10B

PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE MTT EN CÉLULAS HELA DESPUÉS DE 12 H DE TRATAMIENTO

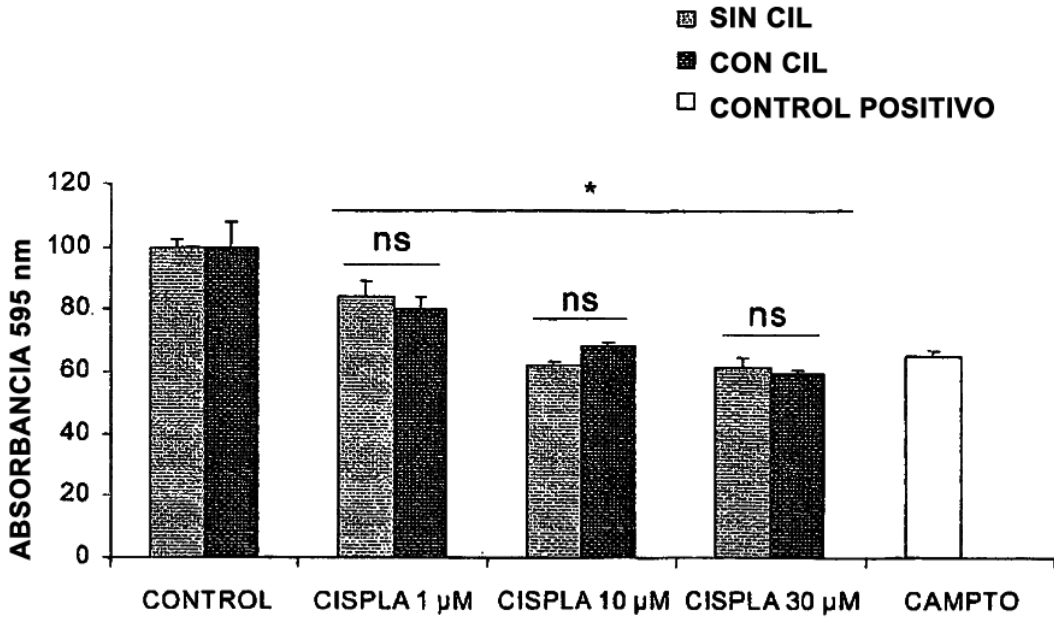


Fig. 11A

PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE MTT EN CÉLULAS HELA DESPUÉS DE 24 H DE TRATAMIENTO

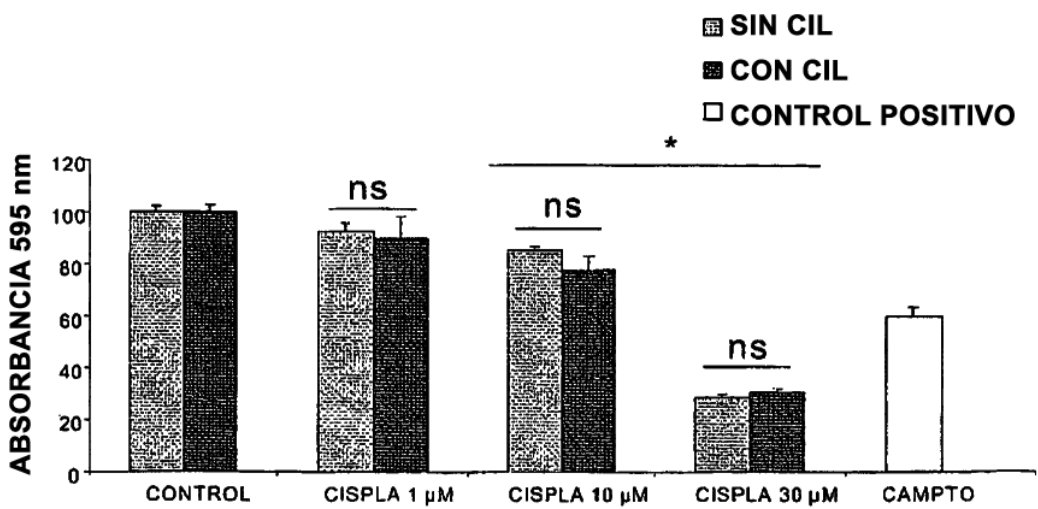


Fig. 11B

ESTUDIO PRELIMINAR IN VIVO

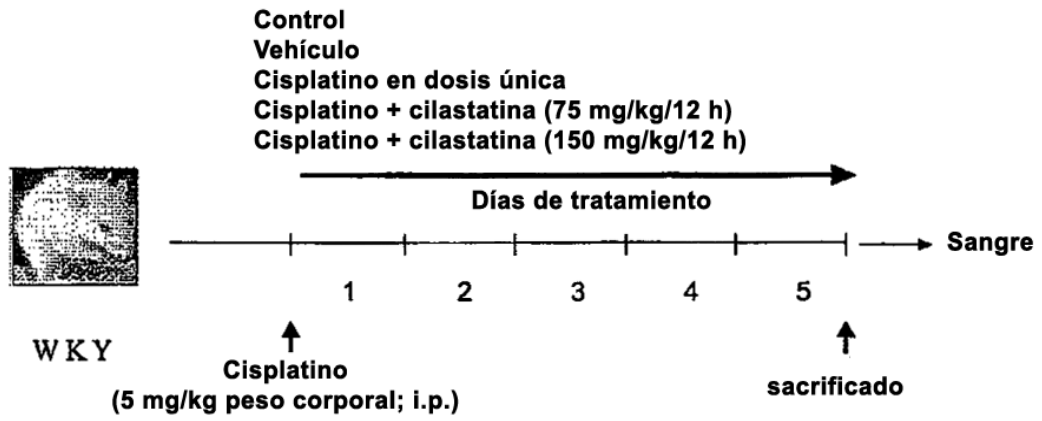


Fig. 12A

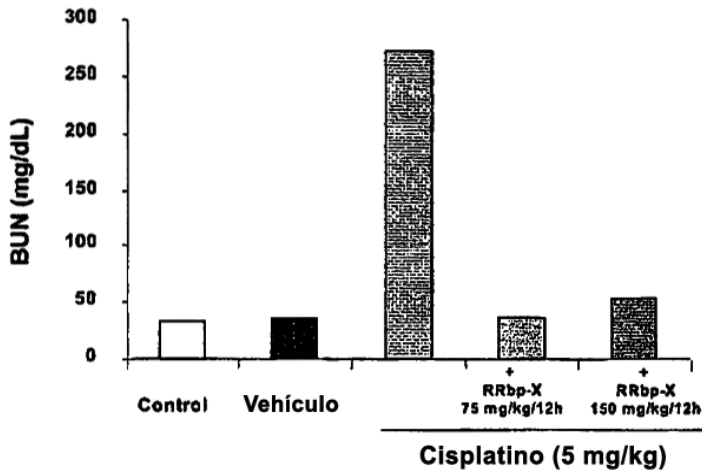


Fig. 12B

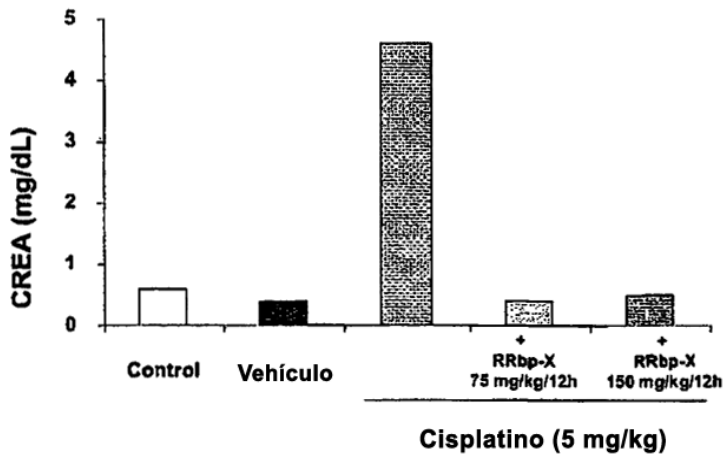


Fig. 12C

ESTUDIO DE CONFIRMACIÓN IN VIVO

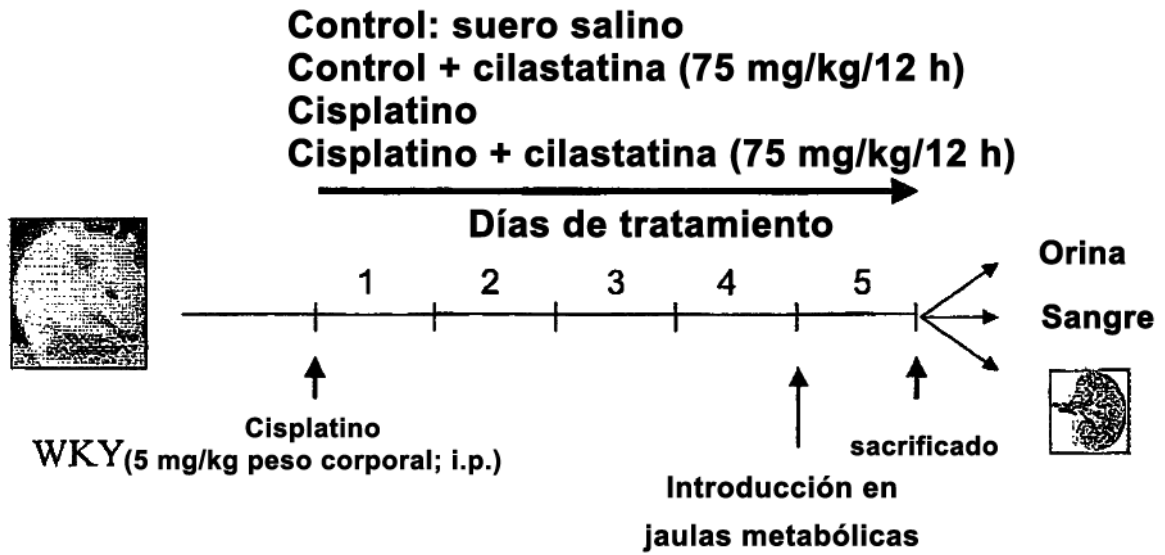
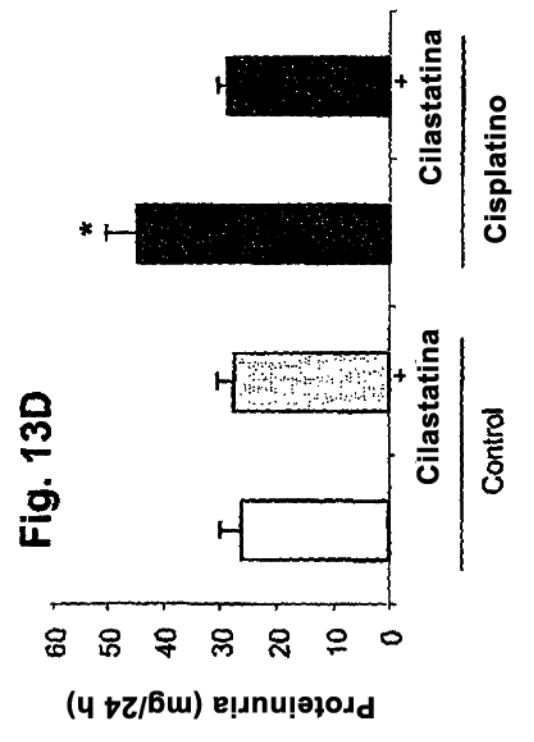
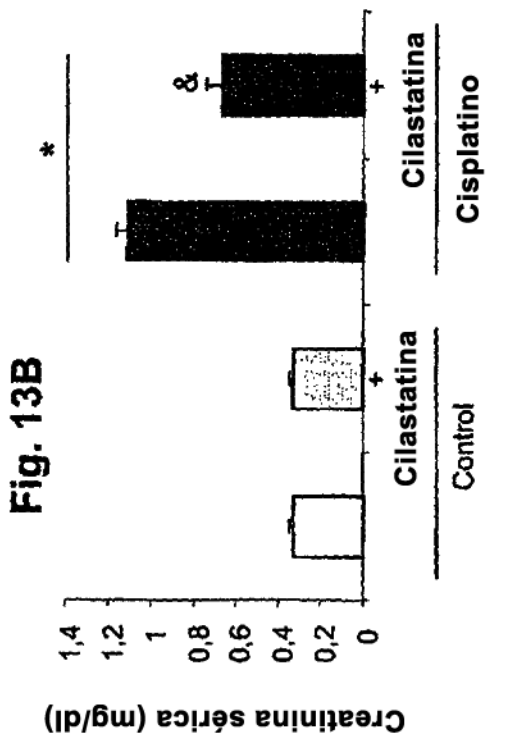
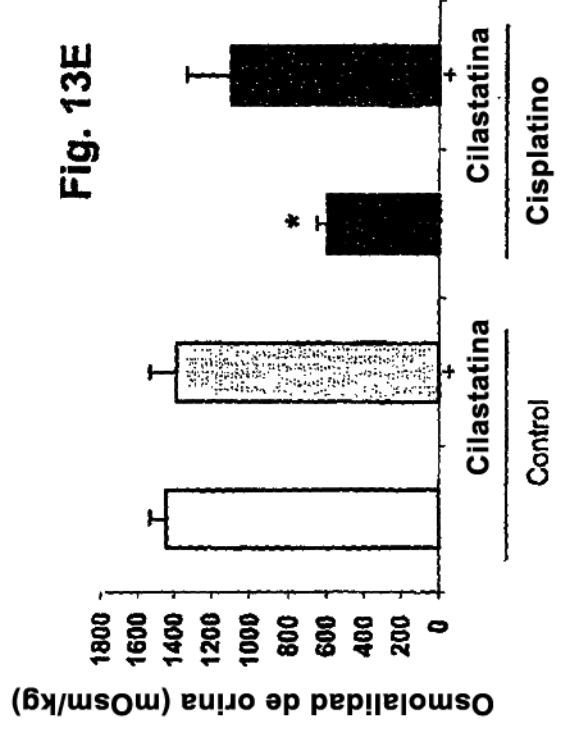
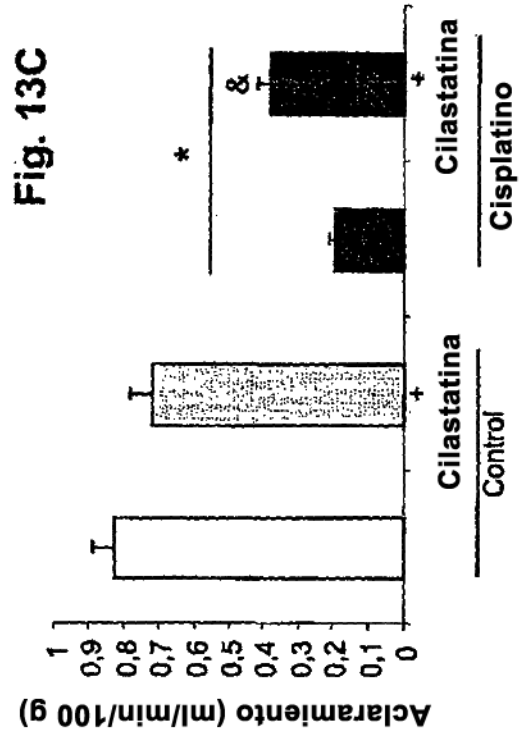


Fig. 13A



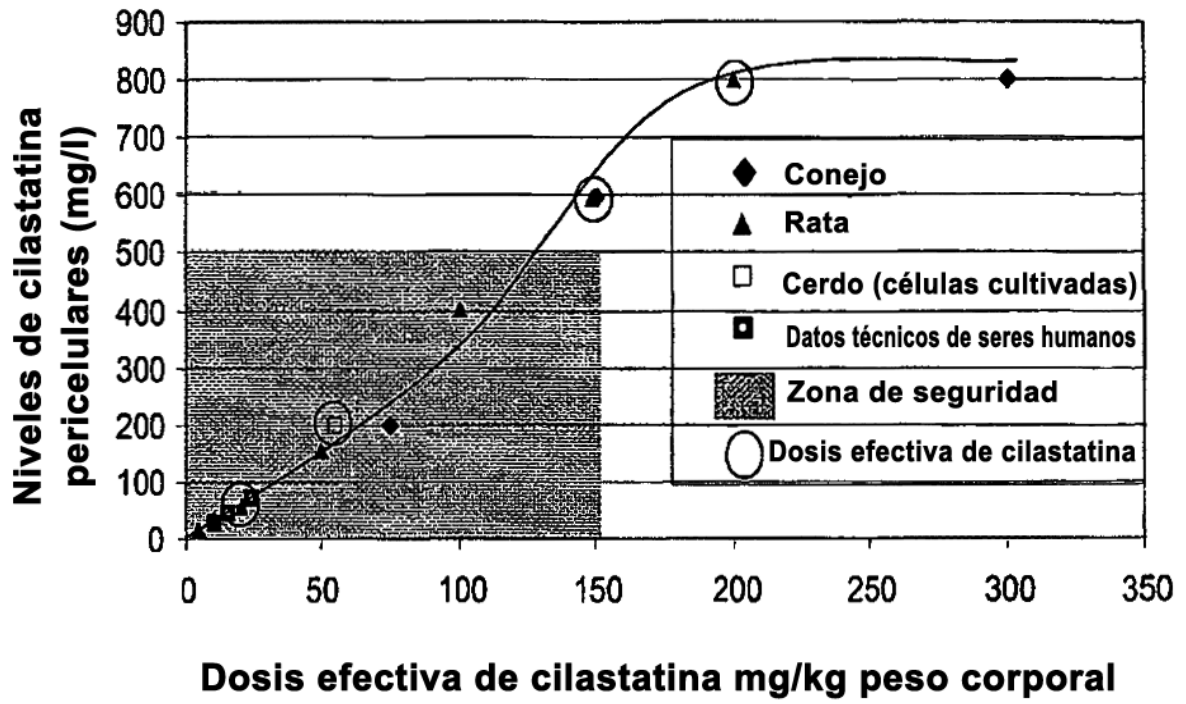


Fig. 14