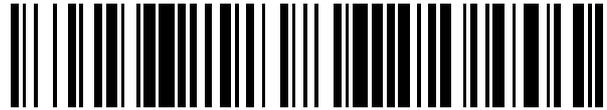


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 473 665**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/70** (2006.01)

**A61K 31/715** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2006 E 06846375 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 1954292**

54 Título: **Composiciones útiles para reducir la nefrotoxicidad y los métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

**28.11.2005 US 740142 P**

**01.03.2006 US 778037 P**

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

**07.07.2014**

73 Titular/es:

**VERROW PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**

**8550 MARSHALL DR.**

**LENEXA, KS 66214, US**

72 Inventor/es:

**ROWE, VERNON D.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 473 665 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

Composiciones útiles para reducir la nefrotoxicidad y los métodos de uso de las mismas.

5 **Antecedentes de la invención**

Se sabe que hay numerosos fármacos y otras sustancias que son nefrotóxicos y pueden causar insuficiencia renal a través de una variedad de mecanismos, entre los que se incluyen la toxicidad directa en los túbulos renales, la nefritis intersticial alérgica y la cristalización del fármaco dentro de los túbulos renales, que puede conducir a insuficiencia renal oligúrica aguda. Los fármacos nefrotóxicos incluyen agentes antineoplásicos tales como cisplatino, metotrexato y doxirubicina, antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tales como los inhibidores de COX-2, antibióticos (por ejemplo, aminoglucósidos, anfotericina), antivirales (por ejemplo, aciclovir, indinavir), inhibidores de la acetilcolinesterasa, bloqueadores del receptor de la angiotensina II (BRA), litio y medios de contraste radiográfico.

El fármaco nefrotóxico puede ser cualquier agente farmacéutico, incluyendo moléculas de bajo peso molecular y péptidos, que provoque daño renal tras su administración a un hospedador. Dichos fármacos incluyen, a modo de ejemplo, diuréticos, AINE, inhibidores de la ECA, ciclosporina, tacrolimus, medios de contraste radiográfico, interleucina-2, vasodilatadores (hidralazina, bloqueadores del canal del calcio, minoxidil, diazoxida), mitomicina C, estrógenos conjugados, quinina, 5-fluorouracilo, ticlopidina, clopidogrel, interferón, valaciclovir, gemcitabina, bleomicina, heparina, warfarina, estreptocinasa, aminoglucósidos, cisplatino, nedaplatino, metoxiflurano, tetraciclina, anfotericina B, cefaloridina, estreptozocina, tacrolimus, carbamazepina, mitramicina, quinolonas, foscarnet, pentamidina, gammaglobulina intravenosa, fosfamida, zoledronato, cidofovir, adefovir, tenofovir, manitol, dextrán, hidroxietilalmidón, lovastatina, etanol, codeína, barbituratos, diazepam, quinina, quinidina, sulfonamidas, hidralazina, triamtereno, nitrofurantoína, mefenitoína, penicilina, meticilina, ampicilina, rifampina, sulfonamidas, tiazidas, cimetidina, fenitoína, alopurinol, cefalosporinas, citosina arabinósido, furosemida, interferón, ciprofloxacina, claritromicina, telitromicina, rofecoxib, pantoprazol, omeprazol, atazanavir, oro, penicilamina, captopril, litio, mefenamato, fenopropén, mercurio, interferón, pamidronato, fenclofenac, tolmetin, foscarnet, aciclovir, metotrexato, sulfanilamida, triamtereno, indinavir, foscarnet, ganciclovir, metisergida, ergotamina, dihidroergotamina, metildopa, pindolol, hidralazina, atenolol, taxol, factor de necrosis tumoral, clorambucil, interleucinas, bleomicina, etopósido, fluorouracil, vinblastina, doxorubicina, cisplatino y similares (véase, en general, Devasmita *et al.*, *Nature Clinical Practice Nephrology* (2006) 2, 80-91).

Metotrexato

De acuerdo con una realización, el fármaco nefrotóxico es el metotrexato, o un derivado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El metotrexato (ácido *N*-[4-[(2,4-diamino-6-pteridinil)metil]metilamino]benzoil]-L-glutámico) es un antimetabolito quimioterapéutico de fase S usado para el tratamiento de diversos neoplasmas, particularmente, linfomas del SNC. El MTX es uno de los agentes antineoplásicos más ampliamente usados, y se emplea en el tratamiento de enfermedades neoplásicas tales como coriocarcinoma gestacional, osteosarcoma, corioadenoma destruens, mola hidatidiforme, leucemia linfocítica aguda, cáncer de mama, cánceres epidermoides de cabeza y cuello, micosis fungoide avanzada, cáncer de pulmón y linfomas no de Hodgkins ("Physicians Desk Reference" (45 ed.), Medical Economical Co., Inc., 1185-89 (Des Moines, Iowa (1991))). El MTX también es un eficaz agente inmunosupresor, con utilidad en la prevención de la reacción del injerto contra hospedador que se puede producir como consecuencia de los trasplantes de tejidos, así como en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Por consiguiente, el MTX se puede emplear en el tratamiento de la psoriasis grave e incapacitante y de la artritis reumatoide (Hoffmeister, *The American Journal of Medicine* (1983) 30:69-73; Jaffe, "Arthritis and Rheumatism" (1988) 31: 299).

Sin embargo, el metotrexato se asocia con la toxicidad renal y hepática cuando se aplica en la "pauta de dosificación elevada" que normalmente es necesaria para obtener su eficacia máxima (Barak *et al.*, *J. American Coll. Nutr.* (1984) 3:93-96).

Numerosas patentes desvelan el MTX y análogos de MTX, pudiéndose usar cualquiera de ellas en la puesta en práctica de la presente invención. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 2.512.572, 3.892.801, 3.989.703, 4.057.548, 4.067.867, 4.079.056, 4.080.325, 4.136.101, 4.224.446, 4.306.064, 4.374.987, 4.421.913, 4.767.859, 3.981.983, 4.043.759, 4.093.607, 4.279.992, 4.376.767, 4.401.592, 4.489.065, 4.622.218, 4.625.014, 4.638.045, 4.671.958, 4.699.784, 4.785.080, 4.816.395, 4.886.780, 4.918.165, 4.925.662, 4.939.240, 4.983.586, 4.997.913, 5.024.998, 5.028.697, 5.030.719, 5.057.313, 5.059.413, 5.082.928, 5.106.950, 5.108.987, 4.106.488, 4.558.690, 4.662.359, 6.559.149, estando cada una de las cuales incorporada en el presente documento por referencia. Otros análogos de MTX y compuestos de antifolato relacionados incluyen trimetrexato, edatrexato, AG331, piritrexim, 1843U89, LY 231514, ZD 9331, raltritrexed, lometrexol, MTA y AG337 (Takimoto, "Seminars in Oncology" (1997) 24:S18-40-51; Sorbello *et al.*, "Haematologica" (2001) 86:121-27); CB 3717, LY 309887 (Calvert, "Seminars in Oncology" (1999) 26:S6, 3-10; Rosowsky, *Progress in Med. Chem.* (1989) 26:1-237)).

Por consiguiente, las composiciones desveladas en el presente documento se pueden usar para el tratamiento del cáncer o para la inhibición del crecimiento del cáncer, así como para el tratamiento de la esclerosis múltiple y los

síntomas asociados con la misma. Las composiciones se pueden usar en conjunción con o en combinación con otros agentes activos tales como el interferón. Además, las composiciones se pueden usar para el tratamiento de trastornos autoinmunes tales como el lupus y la artritis reumatoide.

5 Antibióticos

Los antibióticos aminoglucósidos, tales como las gentamicinas, kanamicinas, estreptomycinas y tobramicinas, generalmente se utilizan como agentes antimicrobianos de amplio espectro contra, por ejemplo, bacterias gram positivas, gram negativas y resistentes a ácidos. Sin embargo, los aminoglucósidos se suelen asociar a efectos secundarios no deseados tales como nefrotoxicidad y ototoxicidad. Otros antibióticos que se pueden usar en la práctica de la presente invención incluyen la vancomicina y la cefalosporina, tales como Rocephin® y Kefzol.

Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE)

15 Todos los AINE presentan toxicidad renal. Por lo general, los AINE se usan para reducir el dolor, evitando el uso de derivados opiáceos. Dos AINE ampliamente usados son la indometacina y Toradol® fabricados por Roche Pharmaceuticals.

Agentes antifúngicos

20 Se sabe que tanto la caspofungina y como la anfotericina B son nefrotóxicas, y se pueden usar en la puesta en práctica de la invención desvelada.

Agentes antineoplásicos

25 Muchos agentes antineoplásicos presentan una toxicidad renal limitante de la dosis, y se pueden usar en la puesta en práctica de la presente invención. Dichos agentes incluyen, a modo de ejemplo, cisplatino, doxirubicina, ciclofosfamida, butasulfano y similares.

30 Varias referencias han enseñado que un derivado de ciclodextrina usado en exceso molar en comparación con un fármaco reduce la nefrotoxicidad del mismo (véanse, por ejemplo, los documentos U.S. 2005/0032676 relativo a un antibiótico glucopeptídico, WO 01/182971, U.S. 5.134.127, U.S. 5.759.573 y U.S. 2003/0220294).

35 El titular de la patente ha descubierto que es posible reducir la nefrotoxicidad de fármacos y agentes de contraste en un grado mucho mayor con una proporción mucho menor de ciclodextrina.

Existe la necesidad de reducir el daño renal provocado por los fármacos nefrotóxicos.

**Sumario de la invención**

40 La presente invención proporciona composiciones y métodos para reducir el daño renal provocado por fármacos nefrotóxicos. La invención proporciona composiciones que comprenden un oligosacárido aniónicamente sustituido, un fármaco nefrotóxico y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde el oligosacárido está presente en una cantidad eficaz para inhibir sustancialmente el efecto nefrotóxico del fármaco.

45 También se proporcionan composiciones que tienen un reducido efecto nefrotóxico que comprenden un compuesto farmacéuticamente activo que tiene efecto nefrotóxico y un oligosacárido polianiónico, donde el oligosacárido está presente en una cantidad eficaz para reducir sustancialmente el efecto nefrotóxico del compuesto farmacéuticamente activo.

50 También se desvelan en el presente documento métodos de reducción del efecto nefrotóxico de un compuesto farmacéuticamente activo que comprenden poner en contacto el compuesto con un oligosacárido polianiónico. Además, se desvelan métodos para inhibir la nefrotoxicidad asociada con un fármaco nefrotóxico, métodos que comprenden administrar una composición farmacéutica que comprende un sulfato de polisacárido cíclico, el fármaco inductor nefrotóxico y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

**Breve resumen de las figuras**

60 La Figura 1 muestra los resultados del estudio de solubilidad con metotrexato (MTX) y captisol en solución ácida acuosa.

La Figura 2 muestra las puntuaciones de la patología renal que indican el daño renal total provocado en un modelo murino de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) inducida por la glucoproteína de mielina del oligodendrocito (MOG) tras el tratamiento con MTX y MTX + captisol.

La Figura 3 muestra las puntuaciones clínicas tras el tratamiento con MTX o MTX + captisol en ratones con EAE.

65 La Figura 4 muestra las puntuaciones de la patología renal en cortes renales tras un solo bolo intravenoso de MTX con o sin captisol simultáneo a diferentes proporciones molares en ratones normales.

La Figura 5 muestra las puntuaciones de la patología renal en el tejido renal de ratones 24 y 48 horas después del tratamiento con MTX con o sin captisol simultáneo a diferentes proporciones molares.

La Figura 6 muestra las puntuaciones medias de patología en un modelo nefrotóxico inducido por doxorubicina para cada grupo de tratamiento al nivel de la corteza renal superficial.

5 La Figura 7 muestra las puntuaciones de la patología renal para cada ratón tratado con doxorubicina o doxorubicina + captisol al nivel de la corteza renal superficial.

La Figura 8 muestra las puntuaciones medias de patología en un modelo nefrotóxico inducido por doxorubicina para cada grupo de tratamiento al nivel de la corteza renal profunda + la médula externa.

10 La Figura 9 muestra las puntuaciones de la patología renal para cada ratón tratado con doxorubicina o doxorubicina + captisol al nivel de la corteza renal profunda + médula externa.

La Figura 10 muestra las puntuaciones medias al nivel de la corteza superficial en los grupos tratados con cisplatino y cisplatino + captisol.

La Figura 11 muestra las puntuaciones patología en un modelo nefrotóxico inducido por cisplatino de cada ratón de cada grupo de tratamiento a nivel de la corteza renal superficial.

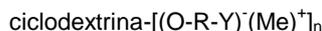
15 La Figura 12 muestra las puntuaciones medias al nivel de la corteza profunda y la médula externa de los grupos tratados con cisplatino y cisplatino + captisol.

La Figura 13 muestra las puntuaciones de patología en un modelo nefrotóxico inducido por cisplatino de cada ratón de cada grupo de tratamiento a nivel de la corteza renal profunda y la médula externa.

## 20 Descripción detallada de la invención

Las composiciones de la presente invención, por lo general, comprenden un oligosacárido aniónicamente sustituido, un agente de contraste nefrotóxico sustituido y, normalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable u otro excipiente comúnmente usado en la técnica. El oligosacárido está presente en una cantidad eficaz para inhibir  
25 sustancialmente el efecto nefrotóxico del agente de contraste. En una realización, los oligosacáridos están sustituidos con restos polares o cargados, tales como sustituyentes catiónicos o aniónicos. En un ejemplo, el oligosacárido aniónicamente sustituido es un oligosacárido polianiónico que comprende una ciclodextrina que tiene uno o más sustituyentes aniónicos seleccionados del grupo que consiste en sulfonato, sulfato, carboxilato, fosfonato y fosfato. En otra realización, el oligosacárido es un sulfato de polisacárido cíclico, preferentemente un sulfato de  $\alpha$ ,  
30  $\beta$  o  $\gamma$ -ciclodextrina.

Una composición que comprende una ciclodextrina sustituida de fórmula:



35 donde R se selecciona del grupo que consiste en alquilo, alquenoilo o alquinilo  $\text{C}_{1-10}$  de cadena lineal o ramificado; cicloalquilo  $\text{C}_{3-8}$  y arilo  $\text{C}_{3-8}$ , conteniendo cada anillo opcionalmente 1 o más heteroátomos seleccionados de entre S, N y O; y opcionalmente sustituido con halo o hidroxilo;

Y es un grupo seleccionado del grupo que consiste en  $\text{COO}^-$ ,  $\text{SO}_4^-$ ,  $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{PO}_3\text{H}^-$  y  $\text{PO}_4^-$ ;

40  $\text{Me}^+$  es un catión farmacéuticamente aceptable;

y n es un número entero superior a 1; y

uno o varios agentes de contraste nefrotóxicos seleccionados de entre iohexol, ioversol, diatrizoato de meglumina e ioxaglato, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, estando dicha ciclodextrina presente en una cantidad eficaz para inhibir sustancialmente el efecto nefrotóxico de dicho agente, y donde la proporción molar  
45 del agente con respecto a la ciclodextrina es de 1,1:1 a 50:1.

La presente invención también proporciona composiciones que tienen un reducido efecto nefrotóxico que comprenden un compuesto farmacéuticamente activo que tiene efecto inductor nefrotóxico y un oligosacárido polianiónico. "Nefrotóxico", como se usa en el presente documento, significa tóxico o destructor para el riñón o  
50 cualquiera de sus componentes.

### Oligosacáridos sustituidos

Los oligosacáridos sustituidos generalmente se refieren a oligosacáridos que tienen al menos un sustituyente por molécula, preferentemente un sustituyente cargado o polar. Los oligosacáridos son preferentemente sacáridos de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 unidades de azúcar y que tienen pesos moleculares, cuando no están sustituidos, de aproximadamente 650 a aproximadamente 1.300. Cuando el oligosacárido está aniónicamente sustituido, en general, es preferible que los sustituyentes sean seleccionados del grupo que consiste en grupos sulfonato, sulfato, carboxilato, fosfonato y fosfato, y combinaciones de los mismos. Los sustituyentes están  
60 preferentemente presentes en la molécula en un grado de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3 sustituyentes por unidad de azúcar. Las composiciones especialmente preferidas son aquellas a base de oligosacáridos que tienen aproximadamente 1 sustituyente sulfonato por unidad de azúcar. Otras composiciones preferidas son aquellas a base de oligosacáridos que tienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 sustituyentes por unidad de azúcar, donde los sustituyentes comprenden sustituyentes sulfato, sulfonato y/o fosfato.

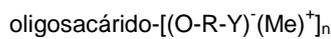
65

Los oligosacáridos son cadenas de varias unidades de azúcar, tales como unidades de glucosa, conectadas a través de átomos de oxígeno glucosídicos. Como se usa en el presente documento, el prefijo "oligo" indica un número intermedio de unidades de azúcar o sacárido, en comparación con una unidad monomérica de azúcar de uno, o como máximo, dos como en sacarosa, y un polisacárido que tiene veinte o más unidades de azúcar y alto peso molecular. Si bien se cree que todos estos oligosacáridos son operables dentro del alcance de la presente invención, los oligosacáridos del presente documento tienen preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 unidades de sacárido por molécula. Este intervalo corresponde a sacáridos no sustituidos que tienen pesos moleculares que varían de aproximadamente 650 a aproximadamente 1.300. Los oligosacáridos que tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 unidades de sacárido por molécula a veces se denominan en el presente documento oligosacáridos "simples" o "de bajo peso molecular". Los oligosacáridos se obtienen habitualmente mediante procedimientos de degradación de almidones o celulosa que generan fragmentos de oligosacáridos en un amplio intervalo de tamaños.

Una familia de materiales relacionada de alguna manera son los glucosaminoglucanos. Se trata de estructuras que comprenden un esqueleto de polisacárido, modificado por una variedad de sustituyentes que contienen átomos de nitrógeno, azufre y oxígeno, y que comprenden varios segmentos tales como glucosaminas, iduronatos, glucuronatos y similares. Sus estructuras son variables entre las diferentes muestras del grupo con el mismo nombre, tal como las condroitinas, los dermatanos, el ácido hialurónico, los sulfatos de heparán y las heparinas. Se sabe que cada familia es heterogénea, es decir, mezclas de composiciones. Su peso molecular varía generalmente entre 10.000 y 25.000.

Los oligosacáridos sustituidos, y, en particular, los oligosacáridos simples y de bajo peso molecular con sustituyentes polares o cargados, poseen la capacidad de proteger los riñones del efecto nefrotóxico de ciertas clases de fármacos. Se prefieren las ciclodextrinas aniómicamente sustituidas, al menos en parte, debido a la relativa uniformidad y facilidad de producción de dichos compuestos, aunque se pueden usar otros sustituyentes polares tales como OH.

Los sustituyentes aniónicos incluyen, a modo de ejemplo, los descritos en la patente de EE.UU. Nº 3.426.011. Los oligosacáridos pueden ser de fórmula general:



donde R se selecciona del grupo que consiste en alquilo, alquenoilo o alquínilo C<sub>1-10</sub> de cadena lineal o ramificado; cicloalquilo C<sub>3-8</sub> y arilo C<sub>3-8</sub>, conteniendo cada anillo opcionalmente 1 o más heteroátomos seleccionados de entre S, N y O; y estando cada uno de los grupos anteriormente mencionados opcionalmente sustituido con halo (es decir, F, Cl, Br, I) o hidroxilo;

Y es un grupo tal como COO, SO<sub>3</sub>, SO<sub>4</sub>, PO<sub>3</sub>H y PO<sub>4</sub> o un ácido fosforoso, fosfinoso, fosfónico, fosfínico, tiofosfónico, tiofosfínico y sulfónico;

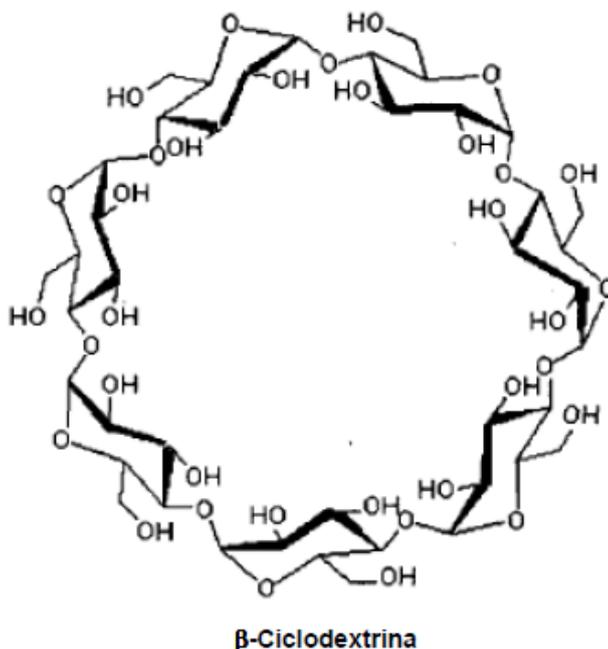
Me es un catión farmacéuticamente aceptable, tal como litio, sodio, potasio, calcio, magnesio o aluminio, o una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria tal como metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, dietilamina, etilamina, tributilamina, piridina, *N,N*-dimetilaniolina, *N*-metilpiperidina, *N*-metilmorfolina, dicitlohexilamina, procaína, dibencilamina, *N,N*-dibencilfenetilamina, 1-efenamina, y *N,N'*-dibenciletildiamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina, piperazina y similares; y

n es el número de sustituyentes por oligosacárido, cada uno de los cuales se selecciona de manera independiente, es decir, cada sustituyente puede ser igual o diferente. "N" será un número entero superior a 1, dependiendo el límite superior del oligosacárido en particular. En una población de oligosacáridos, se entenderá que n representará el número medio de sustituyentes por molécula.

De acuerdo con una realización, R es alquilo C<sub>1-10</sub>, preferentemente alquilo C<sub>1-4</sub> seleccionado de entre metilo, etilo, propilo y butilo, estando cada uno opcionalmente sustituido con halo o hidroxilo. Se prefieren específicamente los oligosacáridos donde en uno o más grupos, Y es SO<sub>3</sub>. Los oligosacáridos polianiónicamente sustituidos resultantes preferidos tienen pesos moleculares de aproximadamente 1.600 a aproximadamente 4.000.

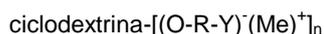
### Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (también denominadas "CD") son oligosacáridos cíclicos que consisten en al menos seis unidades de glucopiranososa. Aunque se conocen CD con hasta doce unidades de glucopiranososa, solo se han estudiado ampliamente los tres primeros homólogos,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , que tienen 6, 7 y 8 unidades de glucopiranososa, respectivamente. Por ejemplo, la molécula de ciclodextrina  $\beta$  se compone de siete unidades de glucopiranososa enlazadas en las posiciones 1,4 con  $\alpha$ , formando una molécula en forma de cono que tiene una superficie exterior hidrófila y una cavidad central lipófila. Se cree que existen ciclodextrinas como moléculas en forma cónica con los hidróxilos primarios situados en el extremo menor del cono y los hidróxilos secundarios situados en la abertura mayor del cono.



Topográficamente, las CD se pueden representar como una forma toroidal, cuyo borde superior está cubierto por grupos  $-\text{CH}_2\text{OH}$  primarios, y el borde inferior, por grupos hidroxilo secundarios. Alineada coaxialmente con la forma toroidal, hay una cavidad en forma de canal de aproximadamente 5, 6 o 7,5 UA de diámetro para las CD  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , respectivamente. Estas cavidades permiten a las ciclodextrinas formar compuestos de inclusión con moléculas huésped hidrófobas de diámetros adecuados.

En la literatura, se ha preparado y descrito un número razonablemente elevado de derivados de CD. En general, estas CD modificadas químicamente se forman mediante la reacción de los grupos hidroxilo primarios o secundarios unidos a los carbonos 2, 3 o 6, sin afectar a los enlaces hemiacetales (1 $\rightarrow$ 4)  $\alpha$ . En Croft *et al.*, (*Tetrahedron* (1983) 39 (9): 1417-1474), incorporado en el presente documento por referencia, se ofrece una revisión de dichas preparaciones. La sustitución a través de los grupos hidroxilo de las unidades de glucopiranosas incluiría hasta 18 para las CD  $\alpha$ ; 21 para las CD  $\beta$ ; y 24 para las CD  $\gamma$ . Las ciclodextrinas se seleccionan de entre las dextrinas de fórmula:



donde R, Y, Me y n son como se han desvelado anteriormente. Como será evidente, n es 1 a 18 para CD  $\alpha$ ; 1 a 21 para CD  $\beta$ ; y 1 a 24 para CD  $\gamma$ .

Preferentemente, la ciclodextrina tendrá uno o más restos cargados, preferentemente sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en sulfonato, sulfato, carboxilato, fosfonato y fosfato. De acuerdo con una realización, R es alquilo  $\text{C}_{1-10}$  de cadena lineal o ramificado, preferentemente alquilo  $\text{C}_{1-4}$  seleccionado de entre metilo, etilo, propilo y butilo, cada uno opcionalmente sustituido con halo o hidroxilo. Se prefieren específicamente los oligosacáridos donde en uno o más grupos, Y es  $\text{SO}_3$ .

Las CD preferidas son derivados de sulfato o sulfonato de ciclodextrinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La preparación de sulfatos y sulfonatos de cicloamilosa, y sulfatos y sulfonatos de ciclodextrina modificada se describen en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N $^\circ$  2.923.704; 4.020.160; 4.247.535; 4.258.180; 4.596.795 y 4.727.064, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia. Por lo general, estos sulfatos y sulfonatos de ciclodextrina se asocian con un catión fisiológicamente aceptable.

De acuerdo con otra realización, los grupos hidroxilo están sustituidos con alquilétersulfonatos de fórmula  $-\text{O}-(\text{alquilo } \text{C}_{1-8})-\text{SO}_3$ . En un ejemplo, se puede usar Captisol $^\circledR$  disponible en el mercado (CyDex), que es un derivado de sulfobutiléter de ciclodextrina  $\beta$  que tiene una media de siete grupos sulfobutiléter por molécula de ciclodextrina (es decir, O-R-Y es  $-\text{O}-(\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{Na}^+$ ). El captisol no presenta la nefrotoxicidad asociada con la ciclodextrina  $\beta$  no derivatizada. En las patentes de EE.UU. N $^\circ$  5.134.127; 6.165.995 y 6.060.597, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia, se describen derivados adicionales de ciclodextrina.

Agentes de contraste

Los agentes de contraste se inyectan en un paciente antes de las exploraciones de rayos X. Los agentes de contraste son compuestos yodados muy concentrados (soluciones al 50-66 %). En vista de esta alta concentración, es probable que baste solo con una proporción máxima del agente de contraste con respecto a la ciclodextrina de 1:1. Los ejemplos del posible uso de ciclodextrinas para proteger contra el daño renal causado por los agentes de contraste incluyen el iohexol y el ioversol. Otros agentes de contraste que se pueden usar en la práctica de la presente invención incluyen diatrizoato de meglumina e ioxaglato.

Administración

El oligosacárido puede formar un complejo con el agente de contraste nefrotóxico, aunque no se considera necesario para el efecto de protección antinefrotóxica de la composición. La proporción del fármaco con respecto al oligosacárido está preferentemente en un intervalo tal que el agente de contraste no precipite al pH normalmente encontrado en el riñón, teniendo en cuenta el tiempo de tránsito del fármaco a través del riñón. En algunos casos, puede ser deseable reducir al mínimo la cantidad de oligosacáridos *in vivo*. Se pueden usar sencillos experimentos de solubilidad *in vitro*, tales como los descritos en los ejemplos, para determinar la cantidad mínima de oligosacárido necesaria para proteger eficazmente del daño renal. La proporción molar del agente de contraste con respecto al oligosacárido es superior a 1:1, y varía de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 50:1, preferentemente de aproximadamente 1,25:1 a aproximadamente 25:1; más preferentemente de aproximadamente 1,75:1 a aproximadamente 2:1 a aproximadamente 10:1. En el caso del metotrexato, solamente a modo de ejemplo, se encontró que una proporción molar de aproximadamente 2:1 de metotrexato:captisol funcionó bien para mantener el metotrexato en solución *in vitro* y proporcionó el efecto nefrotóxico deseado. Cuando se desean cantidades inferiores de oligosacáridos, se contempla la posibilidad de usar agentes solubilizantes adicionales, siempre que la cantidad de oligosacáridos de la composición siga siendo suficiente para proporcionar un efecto de protección renal.

En algunos casos, puede ser deseable tener una proporción del agente de contraste con respecto al oligosacárido inferior a 1:1. Cuando, por ejemplo, la constante de unión del agente de contraste sea baja o el agente de contraste sea procesado por los riñones a una velocidad inferior a la de la ciclodextrina, puede ser beneficioso tener un exceso molar de oligosacárido. Esto puede valer para muchas clases de agentes de contraste, cuando la dosis del agente de contraste requerida para obtener un efecto terapéutico sea baja. Por lo tanto, aunque la proporción molar de oligosacárido podría ser mayor, la cantidad o concentración absoluta *in vivo* no se aumenta necesariamente. Como tal, la composición puede comprender un exceso molar de aproximadamente 2 a aproximadamente 50; de aproximadamente 2 a aproximadamente 20; o de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces de oligosacárido, o preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 5:1, y más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 5:1, del oligosacárido con respecto al agente de contraste.

Además, se proporcionan métodos para reducir el efecto nefrotóxico de un compuesto de contraste que comprenden poner en contacto el compuesto con un oligosacárido polianiónico. Se incluyen métodos para inhibir o reducir la nefrotoxicidad asociada con un compuesto nefrotóxico, que comprenden administrar una composición farmacéutica que comprende un oligosacárido polianiónico, el agente de contraste nefrotóxico y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Aunque es preferible que la administración se produzca en una sola dosis, en particular cuando el oligosacárido ayude en la solubilización del agente de contraste, los métodos también se pueden efectuar administrando simultáneamente una composición farmacéutica que comprenda un oligosacárido polianiónico y una composición farmacéutica que comprenda el agente inductor nefrotóxico, es decir, en dosis separadas. Cuando el agente y el oligosacárido se combinan en una sola unidad de dosificación, se pueden combinar con un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, en forma de solución conjunta o dispersión en un disolvente inerte farmacéuticamente aceptable o un agente dispersante, o similar.

Como alternativa, el oligosacárido se puede formular por separado con materiales farmacéuticamente aceptables y administrarse por separado; bien simultáneamente con el agente, o aproximadamente una hora antes o después de la administración del fármaco. Por simultáneamente, se entiende que la administración de las dosis separadas se realiza sustancialmente al mismo tiempo, de modo que tanto el oligosacárido como los agentes están presentes *in vivo*. Como alternativa, la administración se puede realizar secuencialmente, siempre que los oligosacáridos estén presentes en el entorno renal a medida que aumenta la concentración de agente en el riñón hasta los niveles en los que se puede producir el efecto tóxico del fármaco.

El modo de administración, la dosis y la frecuencia de dosificación se rigen por el modo de administración y las consideraciones de dosificación empleadas convencionalmente con el agente farmacéutico. Así pues, por ejemplo, se pueden administrar varias combinaciones de la invención por vía intramuscular o intravenosa, o de otra manera, según lo estipulado por la práctica médica y farmacológica relacionada con el uso deseado del agente empleado en particular. La administración se puede realizar por vía oral o parenteral, incluyendo, entre otras cosas, la aplicación tópica, inyección intravenosa, intraarterial o subcutánea, e incluyendo la absorción, así como la inyección y la introducción en las aberturas u orificios corporales.

Se entenderá que el nivel de dosis específico para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto empleado en particular, la edad, el peso corporal, el estado de general, el sexo, la dieta, el momento de la administración, la vía de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad concreta sometida a terapia.

5 Las otras características de la invención se harán evidentes a lo largo de las siguientes descripciones de realizaciones de referencia a modo de ejemplo que se dan para ilustrar los antecedentes de la invención.

### 10 Ejemplos

Ejemplo 1. Efecto del pH sobre la solubilidad del MTX

15 Se llevaron a cabo estudios de solubilidad para determinar si el captisol podía impedir la precipitación del MTX durante un período de tiempo superior al tiempo de tránsito del MTX a través del riñón (es decir, inferior a 2 minutos). Las soluciones se prepararon como se muestra en la Tabla 1. Se acidificó cada solución con HCl, se centrifugó y se extrajeron alícuotas del sobrenadante en función del tiempo, y se midió la concentración de MTX en la solución espectrofotométricamente.

20 Como se muestra en la Figura 1, el captisol impidió la precipitación del MTX a una velocidad dependiente de la concentración. A una proporción molar de 1:1, el MTX permanece en solución indefinidamente. A proporciones inferiores, la precipitación se produce a una velocidad dependiente de la concentración. A una proporción de 0,50:1 del captisol con respecto al MTX, el MTX permanece en solución durante al menos 15 minutos, y a una proporción de 0,25:1, gran parte del mismo permanece durante 10 minutos. En vista de la alta velocidad de tránsito de la filtración renal, se pueden realizar experimentos *in vivo* para determinar la proporción óptima del MTX con respecto  
25 al captisol para prevenir el daño renal.

Tabla 1

Solubilidad de MTX-captisol									
MTX añadido: 0,91 mg/ml									
Concentración del MTX: 0,002 M									
Velocidad de precipitación del MTX a pH 5,0 en presencia y ausencia de captisol									
Proporción molar de captisol:MTX de 1:1									
captisol añadido	Tiempo tras la adición del ácido	DO a 302-304 nm	Cantidad de MTX en solución		Corrección para la dilución		Conc. de MTX	Proporción de captisol/MTX	
			(mM)	(ug/ml)	(nm)	(ug/ml)			
0,002	5	2,71	33,28800989	832,2002	0,8322	0,0018308	1:1		
0,002	10	2,291	28,10877627	702,7194	0,702719	0,001546	1:1		
0,002	15	2,296	28,17058096	704,2645	0,704265	0,0015494	1:1		
0,002	20	2,127	26,0815822	652,0396	0,65204	0,0014345	1:1		
0,002	30	2,067	25,33992583	633,4981	0,633498	0,0013937	1:1		
0,002	40	2,202	27,00865266	675,2163	0,675216	0,0014855	1:1		
0,002	50	2,078	25,47589617	636,8974	0,636897	0,0014012	1:1		
0,002	60	2,004	24,56118665	614,0297	0,61403	0,0013509	1:1		
<b>Proporción molar de captisol:MTX de 0,5:1</b>									
captisol añadido	Tiempo tras la adición del ácido	DO a 302-304 nm	MTX en solución		Corrección para la dilución		Conc. de MTX	Proporción de captisol/MTX	
			(M)	(ug/ml)	(nm)	(ug/ml)			
0,001	5	1,854	22,70704574	567,6761	0,567676	0,0012489	0,5:1		
0,001	10	2,263	27,76266996	694,0667	0,694067	0,0015269	0,5:1		
0,001	15	2,594	31,85414091	796,3535	0,796354	0,001752	0,5:1		
0,001	20	1,531	18,7144623	467,8616	0,467862	0,0010293	0,5:1		
0,001	30	1,044	12,6946848	317,3671	0,317367	0,0006982	0,5:1		
0,001	40	0,959	11,64400494	291,1001	0,2911	0,0006404	0,5:1		

Proporción molar de captisol:MTX de 0,5:1							
captisol añadido	Tiempo tras la adición del ácido (min)	DO a 302-304 nm (nm)	MTX en solución		Corrección para la dilución 1:500		Proporción de captisol/MTX
			(ug/ml)	(ug/ml)	(ug/ml)	(mg/ml)	
(M)							
0,001	50	0,864	10,4697157		261,7429	0,261743	0,0005758 0,5:1
0,001	60	0,861	10,43263288		260,8158	0,260816	0,0005738 0,5:1
Proporción molar de captisol:MTX de 0,25:1							
captisol añadido	Tiempo tras la adición del ácido (min)	DO a 302-304 nm (nm)	Conc. de MTX		Dilución 1:500		Proporción de captisol/MTX
			(ug/ml)	(ug/ml)	(ug/ml)	(mg/ml)	
(M)							
0,0005	5	2,363	28,99876391		724,9691	0,724969	0,0015949 0,25:1
0,0005	10	1,798	22,01483313		550,3708	0,550371	0,0012108 0,25:1
0,0005	15	1,173	14,28924598		357,2311	0,357231	0,0007859 0,25:1
0,0005	20	0,864	10,4697157		261,7429	0,261743	0,0005758 0,25:1
0,0005	30	0,686	8,26946848		206,7367	0,206737	0,0004548 0,25:1
0,0005	40	0,633	7,61433869		190,3585	0,190358	0,0004188 0,25:1
0,0005	50	0,556	6,662546354		166,5637	0,166564	0,0003664 0,25:1
0,0005	60	0,556	6,662546354		166,5637	0,166564	0,0003664 0,25:1
Proporción molar de captisol:MTX de 0:1							
captisol añadido	Tiempo tras la adición del ácido (min)	DO a 302-304 nm (nm)	Conc. de MTX		Dilución 1:500		Proporción de captisol/ MTX
			(ug/ml)	(ug/ml)	(ug/ml)	(mg/ml)	
(M)							
0	5	0,296	3,448702101		86,21755	0,086218	0,0001897 0:1
0	10	0,22	2,509270705		62,73177	0,062732	0,000138 0:1
0	15	0,274	3,176761434		79,41904	0,079419	0,0001747 0:1

**Proporción molar de captisol:MTX de 0:1**

captisol añadido (M)	Tiempo tras la adición del ácido (min)	DO a 302-304 nm (nm)	Conc. de MTX (ug/ml)	Dilución 1:500		molaridad de MTX (M)	Proporción de captisol/ MTX
				(ug/ml)	(mg/ml)		
0	20	0,328	3,844252163	96,1063	0,096106	0,0002114	0:1
0	30	0,325	3,807169345	95,17923	0,095179	0,0002094	0:1
0	40	0,284	3,300370828	82,50927	0,082509	0,0001815	0:1
0	50	0,293	3,411619283	85,29048	0,08529	0,0001876	0:1
0	60	0,333	3,90605686	97,65142	0,097651	0,0002148	0:1

**Ejemplo 2. Efecto protector de captisol-MTX**

Se comparó el efecto de 40 mg/kg de MTX con y sin Captisol® (proporción molar de 1:1) en la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) inducida por glucoproteína de mielina del oligodendrocito (MOG) en ratones C57BL6. Se midieron los signos clínicos, la patología del SNC y la patología renal.

La EAE se indujo de la siguiente manera. Se anestesiaron los ratones con Avertin (222 tribromoetanol) y se les administraron dos inyecciones subcutáneas de 150 µg de MOG en PBS (dosis total de 300 µg) que se había emulsionado en un volumen igual de adyuvante incompleto de Freund que contenía 250 µg de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>RA (dosis total de 500 µg). La primera inyección se administró en la nuca y la segunda, en el dorso. Se administró toxina Pertussis (100 ng; iv a través de la vena de la cola) a los días 0, 3, 7 de la encefalopatía.

Se usó solución madre de MTX a 25 mg/ml (Bedford Laboratories). Se diluyó la solución madre de MTX 3,67 veces con PBS (2 ml de solución madre + 5,34 ml de PBS) para un volumen total de 7,34 ml, a una concentración de 6,8 mg/ml (14,9 mM).

Se dividieron en alícuotas 3,00 ml de la solución diluida de MTX y se añadieron a 96,6 mg de captisol en polvo, y se mezcló la solución con movimientos vorticiales. La solución resultante resultó ser prácticamente transparente, pero de color amarillo pálido. Todas las soluciones se mantuvieron a oscuras a temperatura ambiente hasta que estuvieron listas para su inyección. 96,6 mg/3 ml = 32,228 mg/ml = 14,9 mM; proporción molar de MTX:captisol de 1:1.

Las mezclas de ensayo se administraron a 5 grupos de ratones (grupos I-V; véase la Tabla 2).

Tabla 2.

Grupos	EAE/control	Tratamiento	Número de ratones
Grupo I	EAE	PBS	5
Grupo II	EAE	40 mg/kg de MTX	10
Grupo III	EAE	40 mg/kg de MTX + captisol (proporción molar de 1:1)	10
Grupo IV	EAE	201,25 mg/kg de captisol solamente	10
Grupo V	EAE	Sin tratamiento	5

Veinticuatro (24) horas después de la aparición de los síntomas, se administró MTX (40 mg/kg de peso corporal) a través de la vena de la cola. El volumen de inyección fue de entre 100 y 120 µl. MTX + captisol se inyectó en un volumen de 100-120 µl a través de la vena de la cola. El captisol solo (32,22 mg/ml) se inyectó a través de la vena de la cola en un volumen de 100-120 µl. La leucovorina (20 mg/kg de peso corporal) se inyectó a través de la vena de la cola 4 horas después de la inyección de MTX y, de nuevo, 24 horas después. La leucovorina, el metabolito activo del ácido fólico, normalmente se administra con metotrexato en la quimioterapia contra el cáncer para ayudar a proteger las células normales.

Se pesaron los animales y se puntuaron los signos clínicos diariamente. Las puntuaciones se basaron en los siguientes signos:

- 0: normal,
- 1: cola flácida, piloerección y/o pérdida de peso
- 2: debilidad de las extremidades posteriores que dificulta el enderezamiento
- 3: debilidad de las extremidades posteriores que imposibilita el enderezamiento
- 4: paresia de las extremidades posteriores, cojera y/o incontinencia
- 5: parálisis parcial de las extremidades posteriores
- 6: parálisis total de las extremidades posteriores más debilidad de las extremidades anteriores
- 7: parálisis total de las extremidades posteriores más paresia o parálisis de las extremidades anteriores
- 8: muerte o estado moribundo que requiere el sacrificio del animal.

Se puntuaron diariamente los ratones en cuanto a la gravedad de la enfermedad y luego se sacrificaron al décimo día de la enfermedad. Se fijaron en formol el cerebro, el riñón y el bazo. Para evaluar la infiltración de los linfocitos T en el SNC, se realizó una inmunohistoquímica CD3<sup>+</sup> en cortes de la parte posterior del cerebro de 8 micrómetros de espesor introducidos en parafina de ratones con EAE no tratados y ratones con EAE tratados simultáneamente con MTX y captisol. Para examinarlos bajo el microscopio óptico, se fijaron los riñones en formol tamponada al 10 % y se procesaron de la manera habitual para su inclusión en parafina. Se tiñeron cortes tisulares de 5 micrómetros con hematoxilina y eosina, y se examinaron bajo un microscopio óptico Coolpix de Nikon.

5 Se evaluó la gravedad del daño renal total mediante una medición semicuantitativa del daño como se ha descrito. Se evaluó la degeneración de la estructura glomerular, el hacinamiento y la congestión glomerular, la dilatación del espacio de Bowman, la degeneración de los túbulos proximales y distales, y la dilatación de los túbulos renales, la congestión vascular y la infiltración de células inflamatorias de cada corte de tejido renal. Para la atrofia glomerular, los glomérulos que contenían más de 20 núcleos recibieron la puntuación de "0", y los que contenían menos de 10 núcleos recibieron la puntuación de "4". Las etapas intermedias fueron de 1, 2 y 3. Otro criterio se calificó en una escala del 0 al 3: 0 = ninguno; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave.

10 La puntuación microscópica de cada tejido se calculó como la suma de las puntuaciones otorgadas a cada criterio, y se analizaron al menos 100 nefronas (glomérulos más túbulos circundantes) por corte. Los datos se representan como media  $\pm$  ETM (véase la Figura 2).

15 Los ratones tratados con MOG desarrollaron manifestaciones clínicas graves a partir del día 10-11. Se mantuvieron hasta su sacrificio realizado el décimo tercer día. Todos los animales se vieron afectados. Parálisis parcial o total de las patas posteriores (puntuación clínica).

La eficacia de 40 mg/kg de MTX + captisol fue comparable a la eficacia observada con el tratamiento de MTX solo.

20 El resultado de la patología del SNC – inmunotinción con CD3<sup>+</sup> demostró que los ratones con EAE no tratados tuvieron una extensa infiltración de linfocitos T CD3<sup>+</sup> en la parte posterior del cerebro y la médula espinal (que no se muestra). Los ratones con EAE tratados tras la aparición de los síntomas simultáneamente con MTX + captisol (40 mg/kg + captisol, proporción molar de 1:1) demostraron una reducción del 80-90 % en la infiltración de los linfocitos T (que no se muestra). La eficacia de MTX + captisol fue comparable a la eficacia con el tratamiento de MTX solo.

25 En la Tabla 3, se muestran las puntuaciones de la patología renal. Los cortes renales de 3 ratones diferentes con EAE tratados con 40 mg/kg de MTX mostraron dilatación de los túbulos renales y degeneración de los túbulos proximales. Los cortes renales de los ratones tratados simultáneamente con MTX + captisol mostraron un efecto protector sobre los túbulos. Una sola inyección en bolo intravenosa de 40 mg/kg de MTX produjo cambios morfológicos en el riñón que se limitaron principalmente a la dilatación de los túbulos renales de la corteza. La administración simultánea de captisol con MTX produjo una reducción de la puntuación de la patología en los ratones con EAE.

### 35 **Ejemplo 3. Captisol-MTX a varias proporciones molares.**

Se realizó un estudio de los cambios histopatológicos en el riñón tras un solo bolo por vía intravenosa de MTX con o sin captisol simultáneo a diferentes proporciones molares.

40 Las soluciones de MTX se prepararon de la siguiente manera. La solución A (24 mg/ml (53 mM)) se preparó a partir de solución madre de 25 mg/ml (metotrexato de Bedford Laboratories), en PBS estéril (volumen total de 6 ml). La solución B se preparó diluyendo 3 ml de solución A hasta 1:1,33 en PBS, obteniéndose una dilución de trabajo de 18 mg/ml (39,6 mM), pH 7,4. La solución C se preparó diluyendo 2 ml de solución A 1:2, obteniéndose una dilución de trabajo de 12 mg/ml (26,4 mM), pH 7,2.

45 Las soluciones de MTX + captisol se prepararon de la siguiente manera. La solución D se preparó mediante la adición de 57,32 mg de captisol a una alícuota de 500 microlitros de solución A (proporción molar de 1:1, pH neutro). La solución E se preparó mediante la adición de 85,6 mg de captisol a una alícuota de 1 ml de solución B (proporción molar de 1:1, pH neutro). La solución F se preparó mediante la adición de 57,10 mg de captisol a una alícuota de 1 ml de la solución C (proporción molar de 1:1, pH neutro). La solución G se preparó mediante la adición de 42,8 mg de captisol a una alícuota de 1 ml de solución B. La solución H se preparó mediante la adición de 28,6 mg de captisol a una alícuota de 1 ml de solución C.

55 Se administraron el MTX y el captisol a 8 grupos de ratones (Grupos I-VIII; véase la Tabla 3) a través de la vena de la cola mediante una sola inyección en un volumen de 100-120  $\mu$ l. Los animales fueron sacrificados a las 48 horas. Se registraron los síntomas clínicos y los pesos corporales. Se conservaron los riñones (uno congelado y otro fijado en formol) para el análisis patológico. Se administró leucovorina a las 4 horas y después de 18 horas. La orina no se alcalinizó.

Tabla 3.

GRUPOS	GRUPO	TRATAMIENTO	Molaridad del MTX	Molaridad del captisol	Prop, molar de MTX:captisol	Nº de ratón
Grupo I	Ratones normales	solo MTX, 80 mg/kg, bolo iv, Solución A	26,4 mM			3
Grupo II	Ratones normales	solo MTX, 120 mg/kg, iv, bolo, Solución B	39,6 mM			3
Grupo III	Ratones normales	solo MTX, 160 mg/kg, iv, bolo, Solución C	53 mM			1
Grupo IV	Ratones normales	MTX, 80 mg/kg, iv + Captisol 382 mg/kg de peso corporal, Solución D	26,4 mM	26,4 mM	1:1	3
Grupo V	Ratones normales	MTX, 120 mg/kg, iv + Captisol 570 mg/kg, Solución E	39,6 mM	39,6 mM	1:1	3
Grupo VI	Ratones normales	MTX, 160 mg/kg, iv + Captisol 764 mg/kg de peso corporal, Solución F	53 mM	53 mM	1:1	1
Grupo VII	Ratones normales	MTX, 80 mg/kg, iv + Captisol 191 mg/kg, Solución G	26,4 mM	13,2 mM	1:0,5	3
Grupo VIII	Ratones normales	MTX, 120 mg/kg, iv + Captisol 285 mg/kg, Solución H	39,6 mM	19,8 mM	1:0,5	3

En la Figura 4, se muestran las estimaciones semicuantitativas del daño renal total en los ratones tratados con 80 mg/kg, 120 mg/kg de MTX y una combinación de MTX + captisol en una proporción molar del MTX con respecto al captisol de 1:1 y 1:0,5. Las puntuaciones para el riñón de control estaban entre 3 y 4 (no mostradas en el gráfico). Para determinar la extensión del daño renal, se analizaron microscópicamente cortes teñidos con hematoxilina y eosina de riñón introducido en parafina. Los datos se expresan como la media  $\pm$  ETM. Los datos para el MTX a 160 mg/kg no se incluyen en el gráfico, ya que solo había un ratón en este grupo.

Los cortes en parafina de los riñones teñidos con hematoxilina y eosina (no mostrados) demostraron que los riñones de los ratones que habían recibido 80 mg/kg de MTX sufrían de dilatación de los túbulos, cambios degenerativos en los túbulos, hiper celularidad en el glomérulo, y colección atípica de células intersticiales y túbulos convolutos. Los riñones de los ratones que habían recibido 80 mg/kg de MTX + captisol en una proporción molar del MTX con respecto al captisol de 1:1 y 80 mg/kg de MTX + captisol en una proporción molar del MTX con respecto al captisol de 1:0,5 mostraron una degeneración más leve de los túbulos, glomérulo normal y ausencia de infiltración de células inflamatorias. Sin embargo, el grado de protección del riñón fue mucho mayor cuando la proporción molar del MTX con respecto al captisol fue de 1:0,5.

Los cortes en parafina de riñón teñido con hematoxilina y eosina (no mostrados) demostraron que los riñones de los ratones que habían recibido 120 mg/kg de MTX, iv, sufrían de atrofia glomerular, degeneración de la membrana basal de la cápsula de Bowman, cambios degenerativos en los túbulos, hiper celularidad en el glomérulo e infiltración de las células mononucleares. Los riñones de los ratones que habían recibido 120 mg/kg de MTX + captisol en una proporción molar del MTX con respecto al captisol de 1:1 y 120 mg/kg de MTX + captisol en una proporción molar del MTX con respecto al captisol de 1:0,5, mostraron un glomérulo en su mayor parte normal, protección de túbulos proximales y distales, y ausencia de infiltración de células inflamatorias.

#### Ejemplo 4. Estudios temporales del Captisol-MTX

Se administraron mezclas de MTX-Captisol como se expone en la Tabla 4.

Tabla 4.

Ratones normales	Tratamiento	Obtención de tejidos	Proporción molar de MTX:Captisol	Número de ratones
	Inyección de un solo bolo intravenoso a través de la vena de la cola			
	160 mg/kg de MTX	Riñón extraído 24 h después de la administración del fármaco	1:0	4
	160 mg/kg de MTX + 764 mg/kg de captisol		1:1	4
	160 mg/kg de MTX + 382 mg/kg de captisol		1:0,5	4
	160 mg/kg de MTX + 191 mg/kg de captisol		1:0,25	4
Ratones normales	160 mg/kg de MTX	Riñón extraído 48 h después de la administración del fármaco	1:0	4
	160 mg/kg de MTX + 764 mg/kg de captisol		1:1	4
	160 mg/kg de MTX + 382 mg/kg de captisol		1:0,5	4
	160 mg/kg de MTX + 191 mg/kg de captisol		1:0,25	4
Ratones normales	160 mg/kg de MTX	Riñón extraído 1 semana después de la administración del fármaco	1:1	4
	160 mg/kg de MTX + 764 mg/kg de captisol			4

5 Para el examen con el microscopio óptico, se fijaron los riñones en formol tamponado al 10 % y se procesaron de la manera habitual para su introducción en parafina. Se tiñeron cortes de tejido de 5 micrómetros con hematoxilina y eosina, y se examinan bajo un microscopio óptico Coolpix de Nikon, siendo la fotografía realizada con una cámara Coolpix de Nikon. Se evaluó la gravedad del daño renal total mediante una medición semicuantitativa del daño como se describe a continuación. Se evaluó cada corte de tejido renal en cuanto a la degeneración de la estructura glomerular, el hacinamiento y la congestión glomerular, la dilatación del espacio de Bowman, la degeneración de los túbulos proximales y distales, y la dilatación de los túbulos renales, la congestión vascular y la infiltración de células inflamatorias. Para la atrofia glomerular, los glomérulos que contenían más de 20 núcleos recibieron la puntuación de "0" y los que contenían menos de 10 núcleos obtuvieron la puntuación de "4". Las etapas intermedias fueron 1, 2 10 y 3. Otro criterio se calificó en una escala del 0 al 3: 0 = ninguno; 1 = leve; 2 = moderado; y 3 = grave.

15 La puntuación microscópica de cada tejido se calculó como la suma de las puntuaciones otorgadas a cada criterio, y se analizaron al menos 100 nefronas (glomérulos más túbulos circundantes) por corte. Véase, por ejemplo, Bhat *et al.*, PNAS (2003) 100 (7); Sener *et al.*, *Cell Biol Toxicol* (2006) 22:470-60.

20 En cuanto a la Figura 5, el tejido renal de los ratones tratados con MTX muestra grandes cambios histopatológicos tras 24 y 48 horas. A las 24 y 48 horas, había atrofia del glomérulo, degeneración y dilatación del espacio de Bowman, infiltración de células inflamatorias en el intersticio tubular y degeneración tubular. El grupo tratado con captisol + MTX mostró cambios glomerulares y tubulares más leves y una menor infiltración de células inflamatorias. Sin embargo, algunos de los cambios observados tras 24 horas parecían ser reversibles, pues la puntuación patológica acumulativa fue menor a las 48 horas que a las 24 horas.

25 Se estudiaron los cambios histopatológicos en el riñón a las 24 horas de la inyección de MTX con o sin la administración conjunta de captisol. Los ratones se sacrificaron 24 horas después de la administración de MTX o MTX + captisol. Se tiñeron los cortes renales en parafina con hematoxilina y eosina (no mostrados). La administración de 160 mg/kg de MTX dio lugar a la degeneración de la estructura glomerular y dilatación del espacio de Bowman, degeneración de los túbulos proximales y distales, e infiltración de células inflamatorias. Se observó 30 una denegación glomerular y tubular más leve para 160 mg/kg de MTX + captisol en una proporción molar del MTX con respecto al captisol de 1:1. El tratamiento de 160 mg/kg de MTX + captisol en una proporción molar del MTX con respecto al captisol de 1:0,5 fue más eficaz en la preservación de las estructuras glomerulares y tubulares. La infiltración de células inflamatorias estuvo completamente ausente. El tratamiento de 160 mg/kg de MTX + captisol

usado en una proporción molar de 1:0,25 no protegió contra el daño renal.

Se registraron los cambios histopatológicos producidos en el riñón a las 48 horas de la inyección de MTX con o sin la administración conjunta de captisol. Los ratones se sacrificaron 48 horas después de la administración de MTX o MTX + captisol. Se tiñeron los cortes renales en parafina con hematoxilina y eosina (no mostrados). 48 h después de la inyección, la administración de 160 mg/kg de MTX (iv) dio lugar a la degeneración de la estructura glomerular, la dilatación del espacio de Bowman, la dilatación de los túbulos proximales y distales, la degeneración de los túbulos proximales y distales y la infiltración de células inflamatorias. Se observó una denegación glomerular y tubular más leve para 160 mg/kg de MTX + captisol (proporción molar del MTX con respecto al captisol de 1:1). El tratamiento de 160 mg/kg de MTX + captisol en una proporción molar de 1:0,5 dio lugar a una preservación relativamente mejor de las estructuras glomerulares y tubulares. La infiltración de células inflamatorias estuvo completamente ausente. 160 mg/kg de MTX + captisol usado en una proporción molar de 1:0,25 no fue eficaz en la protección del riñón del daño inducido por MTX. La mayor protección se observó con una proporción molar del MTX con respecto al captisol de 1:0,5.

También se estudiaron los cambios histopatológicos producidos en el riñón una semana después de la administración de MTX. Los ratones se sacrificaron 1 semana después de la administración de 160 mg/kg de MTX en una sola inyección de bolo iv. Se tiñeron los cortes renales en parafina con hematoxilina y eosina (no mostrados). La administración de solo MTX dio lugar principalmente a la degeneración de los túbulos proximales y distales, con atrofia o hacinamiento glomerular ocasional. Se observaron células en degeneración con núcleos hinchados recubriendo los túbulos proximales y distales. Ocasionalmente, se observaron algunos túbulos recubiertos por una capa doble de células. Algunos túbulos se congestionaron con materiales eosinófilos. Los cambios patológicos se encontraron sobre todo en las zonas corticales del riñón. La mayoría de las estructuras glomerulares resultaron ser normales.

Se registraron los cambios histopatológicos producidos en el riñón 1 semana después de la inyección de MTX + captisol. Los ratones fueron sacrificados 1 semana después de la administración conjunta de MTX + captisol. Se tiñeron los cortes renales en parafina con hematoxilina y eosina de cuatro ratones separados (no mostrados). Los riñones de los ratones que habían recibido la administración conjunta de 160 mg/kg de MTX + captisol en una proporción molar del MTX con respecto al captisol de 1:1 mostraron un trastorno glomerular significativamente menor y una mayor preservación de los túbulos. No se produjo infiltración de células inflamatorias.

#### **Ejemplo 5. Evaluación del efecto nefroprotector del captisol en un modelo murino de nefrotoxicidad inducida por doxorubicina.**

Ratones C57BL/6 hembra recibieron una inyección por vía intravenosa con una dosis única de (10 mg/kg) doxorubicina. Los ratones se sacrificaron 72 horas después. Se evaluó el desarrollo de la lesión glomerular y tubulointerstitial tras la doxorubicina y la doxorubicina + captisol por medio de la histología renal. Se hicieron cortes en parafina de 5  $\mu$ M, y se tiñeron con H y E y ácido periódico de Schiff (PAS). Se examinaron por microscopía óptica y se puntuaron de forma ciega. Se puntuaron treinta glomérulos y túbulos circundantes de la corteza superficial (cerca de la superficie de la cápsula) y cien glomérulos y túbulos circundantes a nivel de la corteza renal profunda y de alrededor de las tiras exteriores de la médula externa.

La Figura 6 muestra las puntuaciones medias de patología para cada grupo de tratamiento a nivel de la corteza renal superficial. La Figura 7 muestra las puntuaciones de patología renal de cada ratón tratado con doxorubicina o con doxorubicina + captisol a nivel de la corteza renal superficial. La Figura 8 muestra las puntuaciones medias de patología para cada grupo de tratamiento a nivel de la corteza renal profunda + médula externa. La Figura 9 muestra las puntuaciones de la patología renal de cada ratón tratado con doxorubicina o con doxorubicina + captisol a nivel de la corteza renal profunda + médula externa.

Ninguno de los ratones de control o tratados con captisol resultó tener cambios túbulointersticiales. El grupo tratado con doxorubicina mostró cilindros tubulares, abundantes túbulos dilatados y pérdida moderada del borde en cepillo de algunos túbulos proximales. Algunos de los glomérulos se plegaron y en distintas etapas de la degeneración. La patología resultó ser más prominente en la periferia exterior de la corteza renal. No se observó atrofia tubular ni infiltración de neutrófilos. En los ratones tratados con doxorubicina + captisol, se produjo una reducción de casi el 71 % de la degeneración y una reducción de casi el 72 % de la dilatación tubular. En la corteza renal más profunda y en la médula, se produjo una reducción del 90 % de la degeneración glomerular y una reducción del 50 % de la dilatación tubular.

#### **Ejemplo 6. Evaluación del efecto nefroprotector del captisol en un modelo murino de nefrotoxicidad inducida por cisplatino**

Ratones C57BL/6 hembra recibieron una inyección por vía intravenosa con una dosis única de (10 mg/kg) cisplatino (N = 5) o cisplatino + captisol en una proporción molar del cisplatino con respecto al captisol de 1:1, 1:0,5 y 1:0,25 (N = 5, N = 4 y N = 6, respectivamente). Los animales se sacrificaron 72 horas después.

5 Se evaluó el desarrollo de la lesión glomerular y tubulointersticial tras el cisplatino y la protección del cisplatino + captisol por medio de la histología renal. Se hicieron cortes en parafina de 5  $\mu$ M, y se tiñeron con H y E y ácido periódico de Schiff (PAS). Se examinaron por microscopía óptica y se puntuaron de forma ciega. Se puntuaron treinta glomérulos y túbulos circundantes de la corteza superficial (cerca de la superficie de la cápsula) y cien glomérulos y túbulos circundantes a nivel de la corteza renal profunda y de alrededor de las tiras exteriores de la médula externa.

10 La Figura 10 muestra las puntuaciones medias a nivel de la corteza superficial en los grupos tratados con cisplatino y cisplatino + captisol (proporción molar del cisplatino con respecto al captisol de 1:1, 1:0,5 y 1: 0,25). La Figura 11 muestra las puntuaciones de patología de cada ratón de cada grupo de tratamiento a nivel de la corteza renal superficial. La Figura 12 muestra las puntuaciones medias a nivel de la corteza profunda y la médula externa en los grupos tratados con cisplatino y cisplatino + captisol (proporción molar del cisplatino con respecto al captisol de 1:1, 1:0,5 y 1:0,25). La Figura 13 muestra las puntuaciones de patología de cada ratón de cada grupo de tratamiento a nivel de la corteza renal profunda y la médula externa.

15 Ninguno de los ratones de control resultó tener cambios túbulointersticiales. Los ratones tratados con cisplatino mostraron necrosis, descamación de células epiteliales tubulares y pérdida del borde en cepillo de algunos túbulos proximales. La abundante presencia de túbulos dilatados fue una característica destacada de la nefrotoxicidad inducida por el cisplatino. Algunos de los glomérulos se plegaron y algunos mostraron cambios degenerativos tempranos. Todos estos cambios fueron mucho menos destacados mediante el tratamiento con cisplatino + captisol, demostrando que el captisol protegió el riñón tanto a la proporción del cisplatino con respecto al captisol de 1:1 como a la proporción del cisplatino con respecto al captisol de 1:0,5.

20



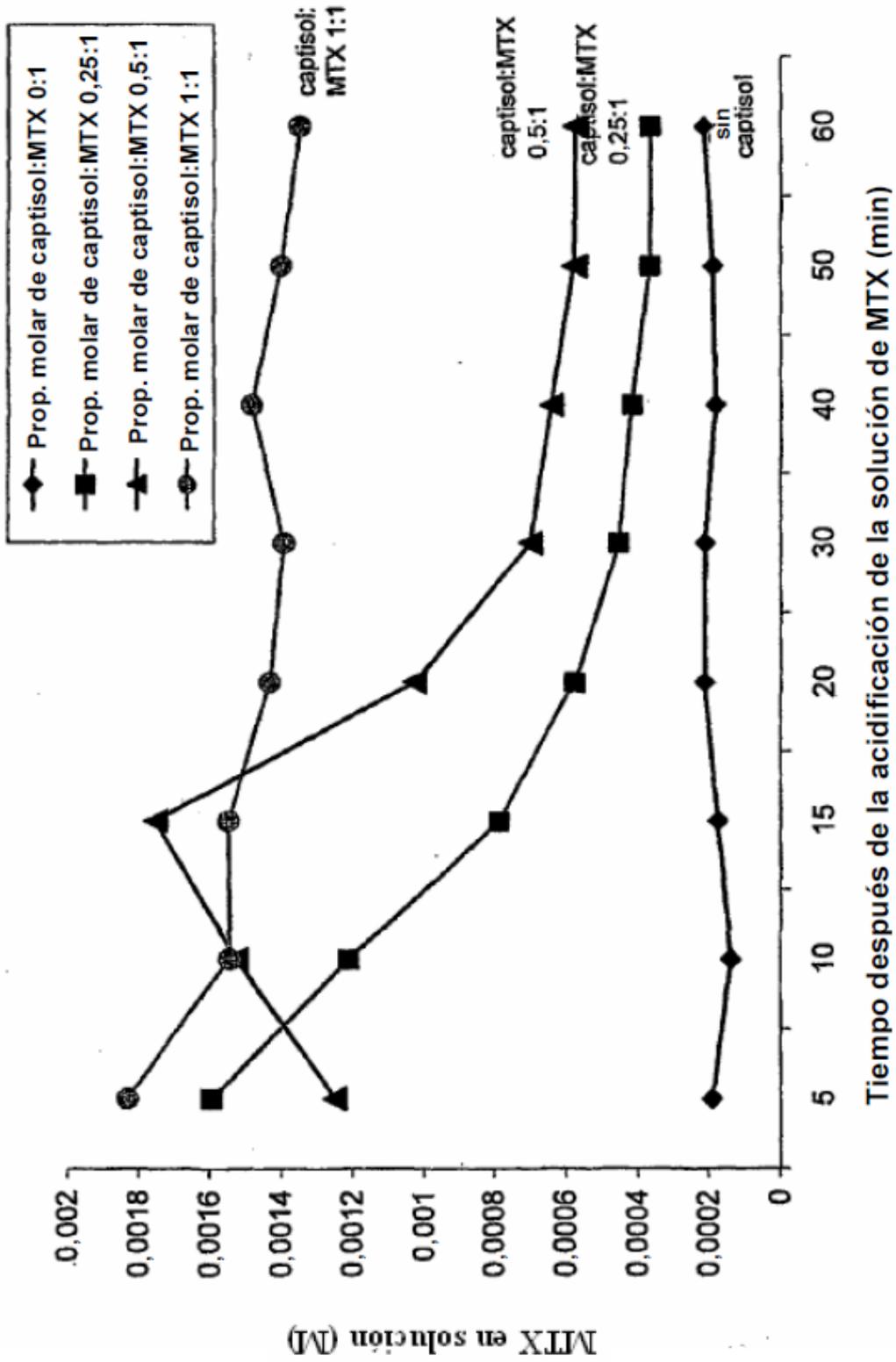


FIGURA 1

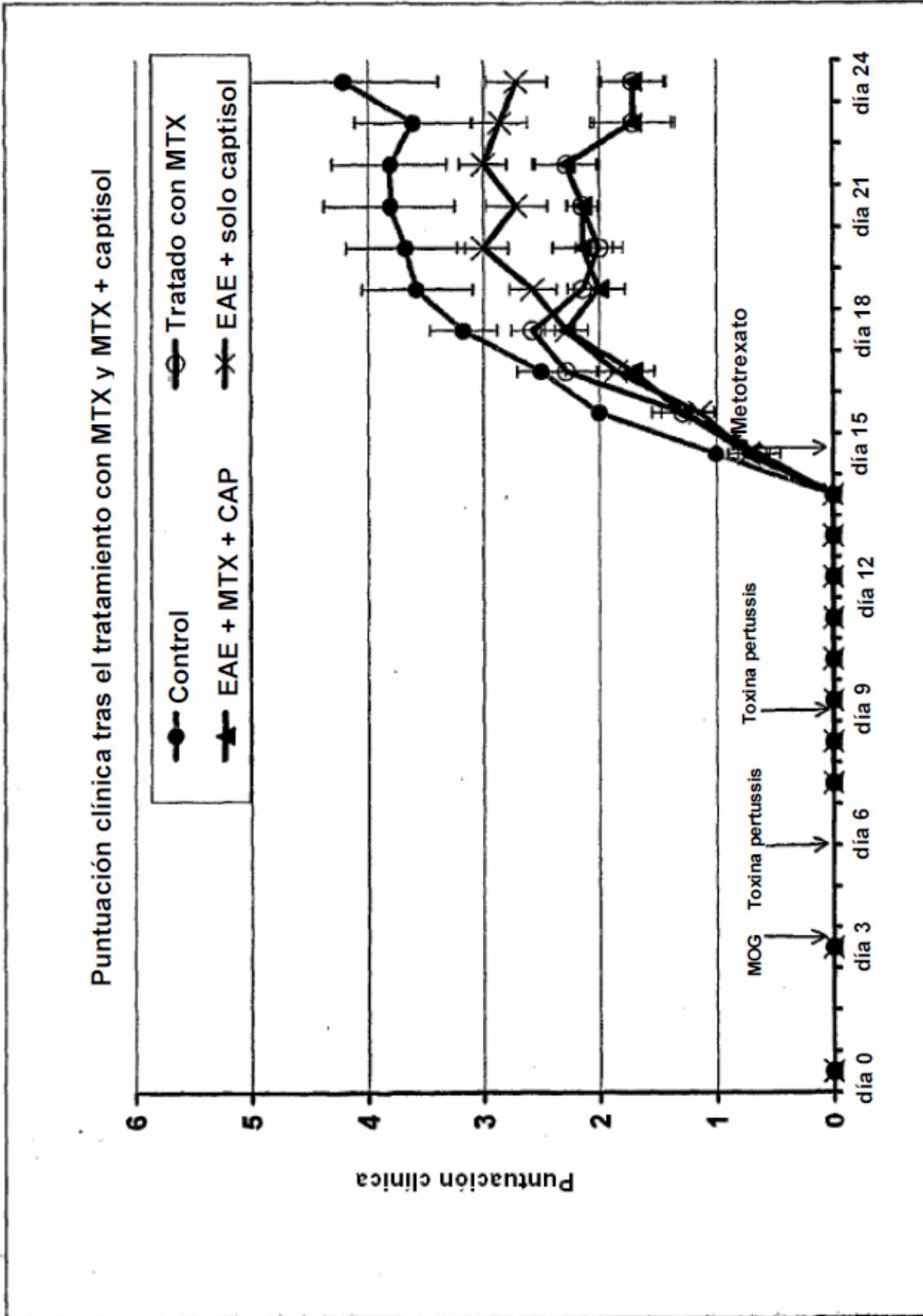


FIGURA 2

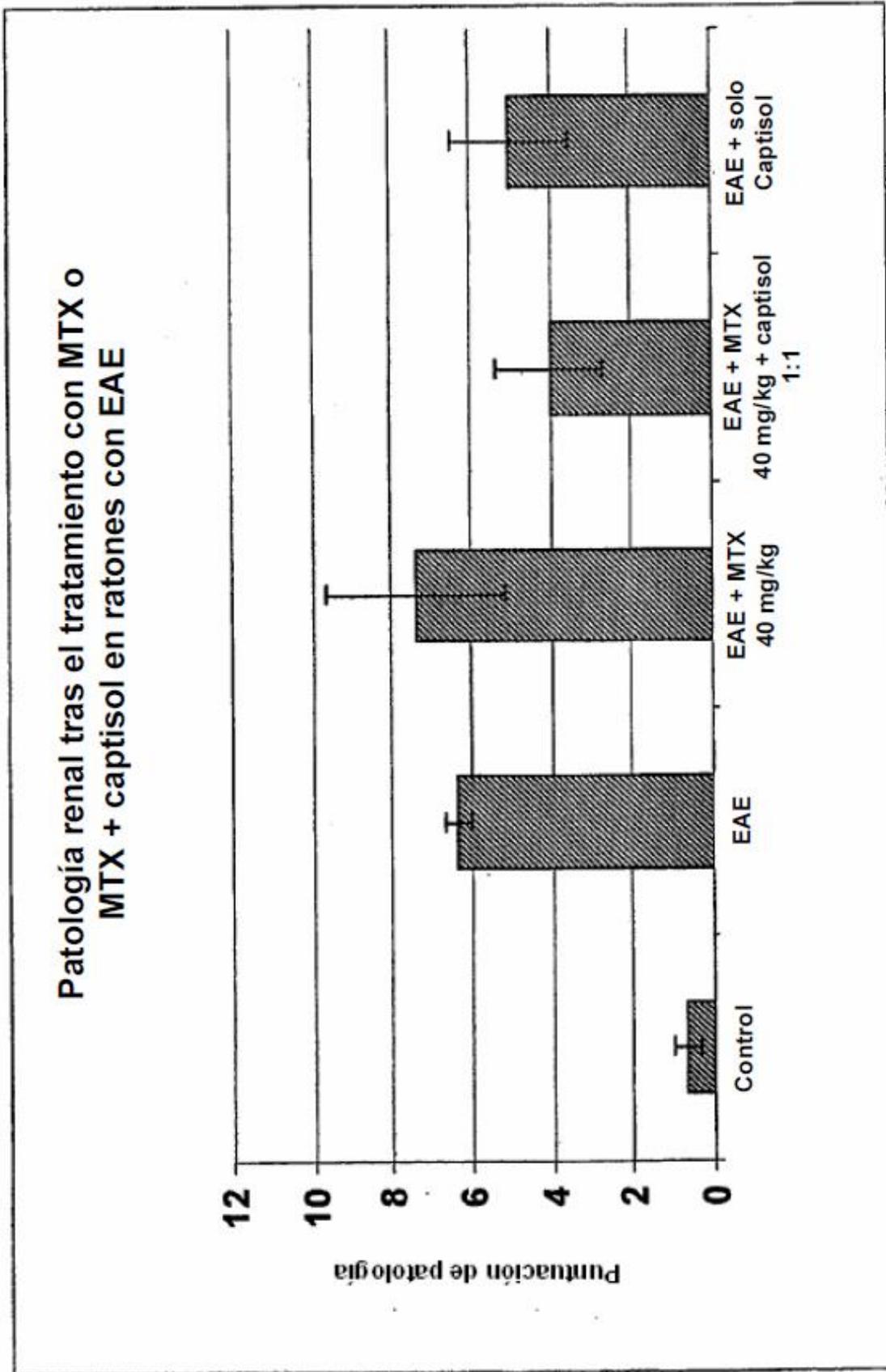


FIGURA 3

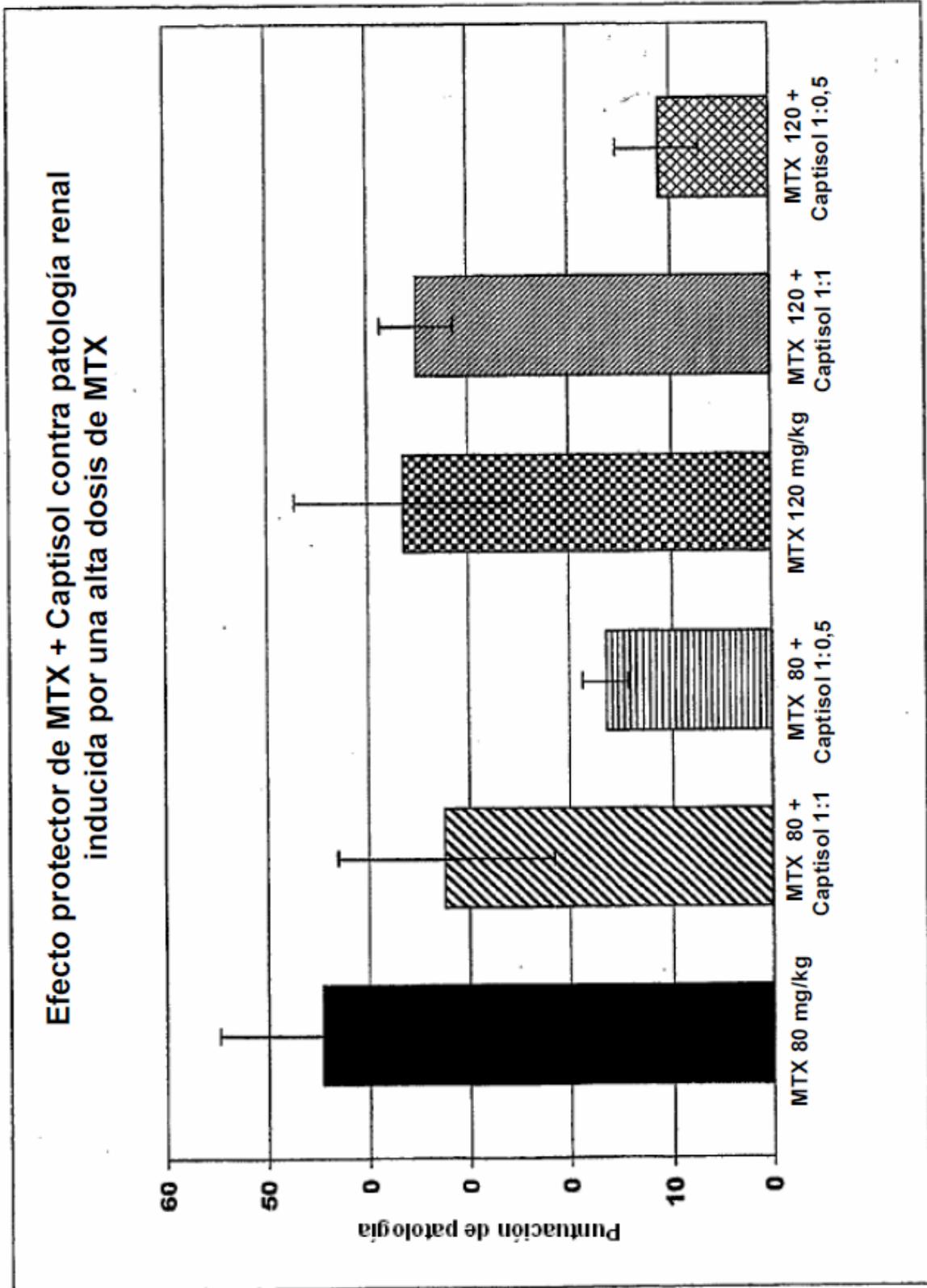
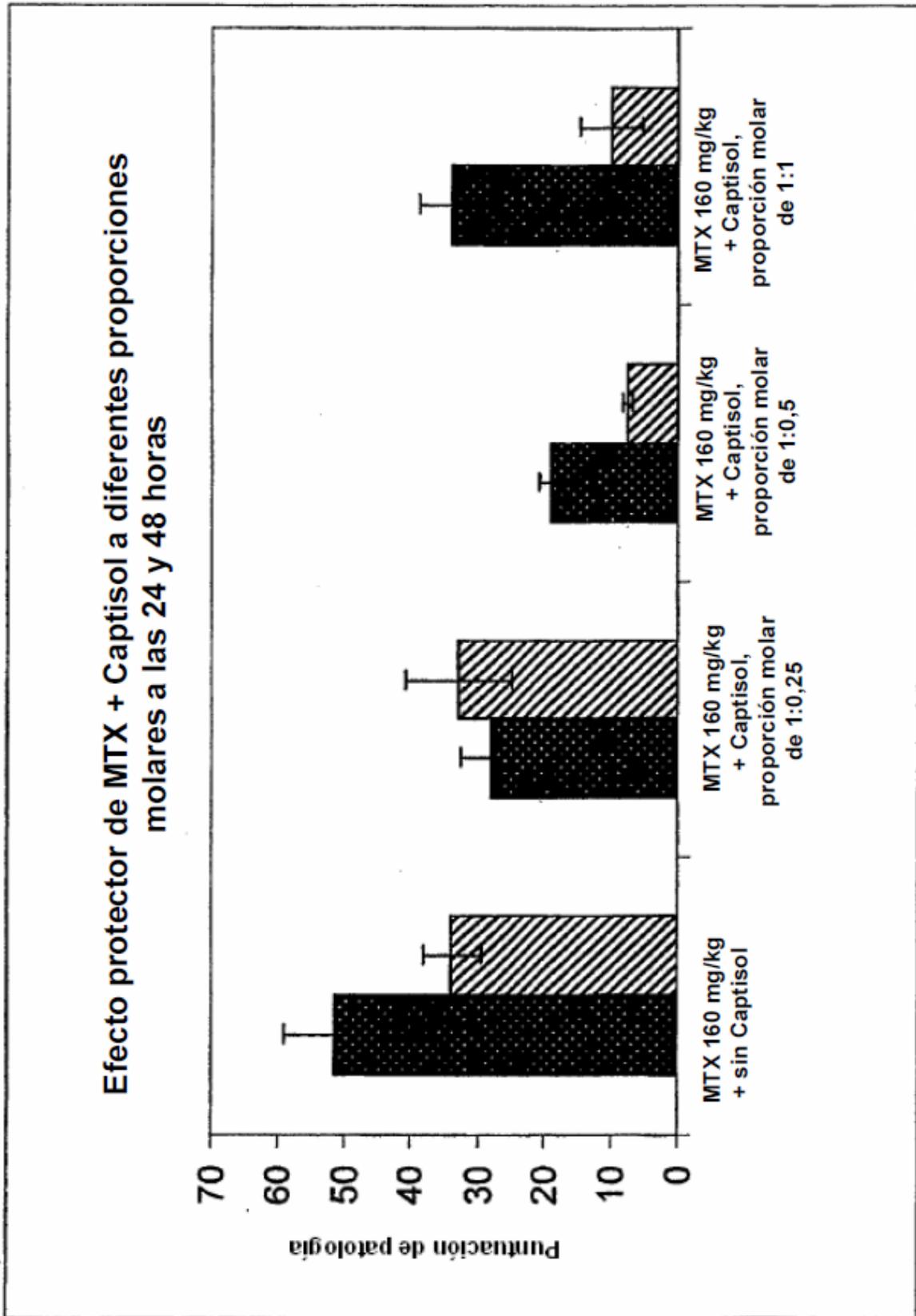


FIGURA 4



**FIGURA 5**

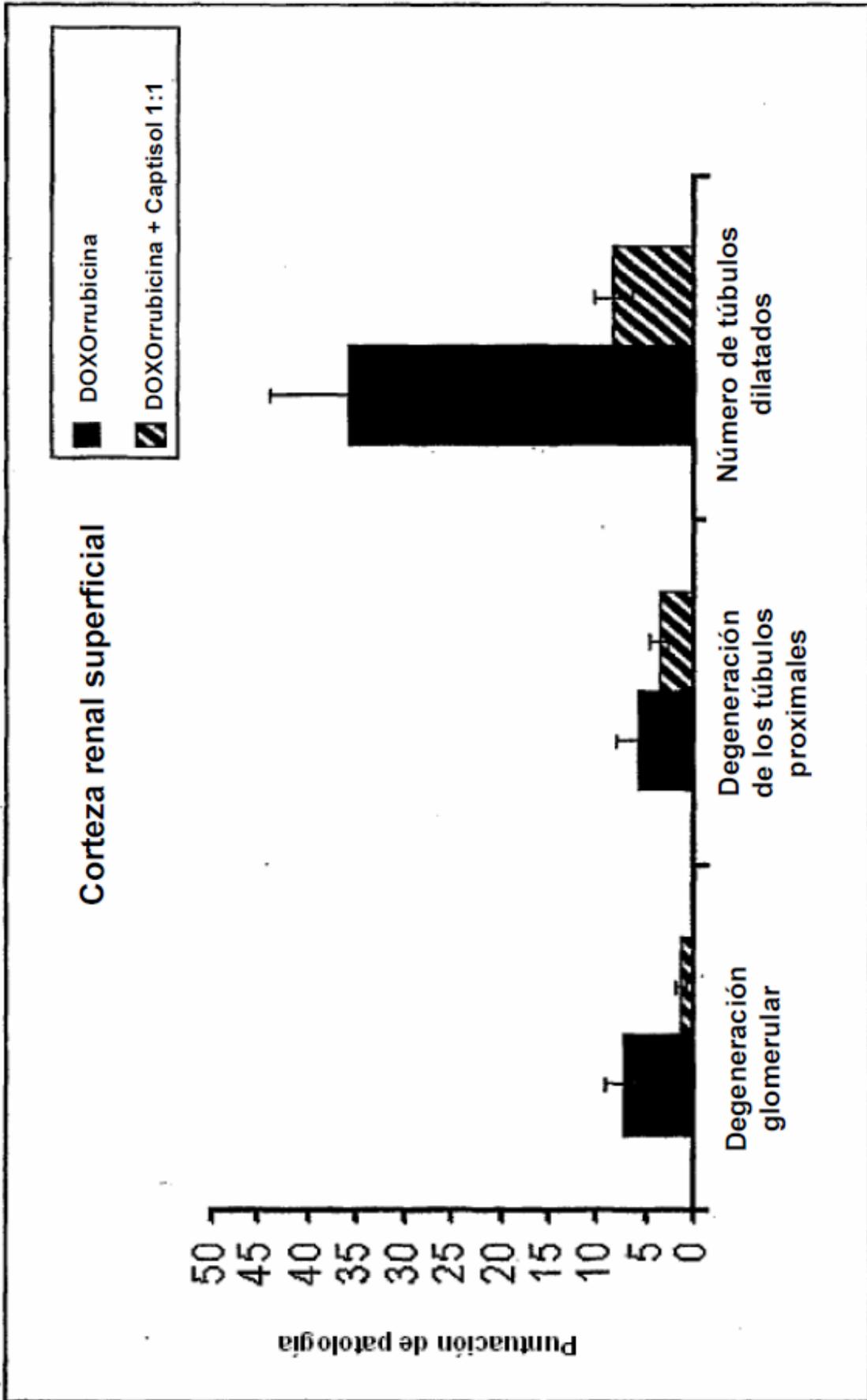
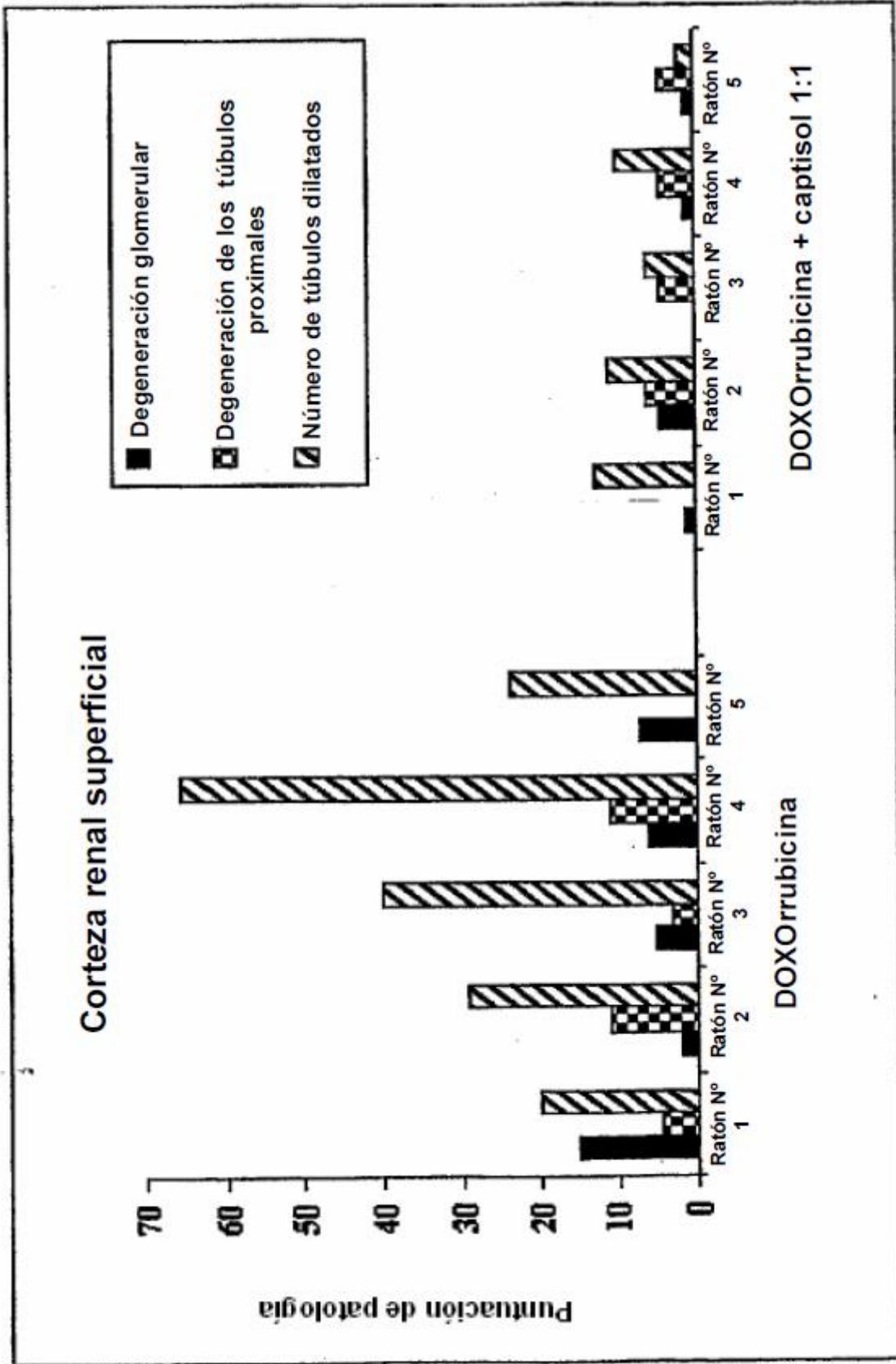
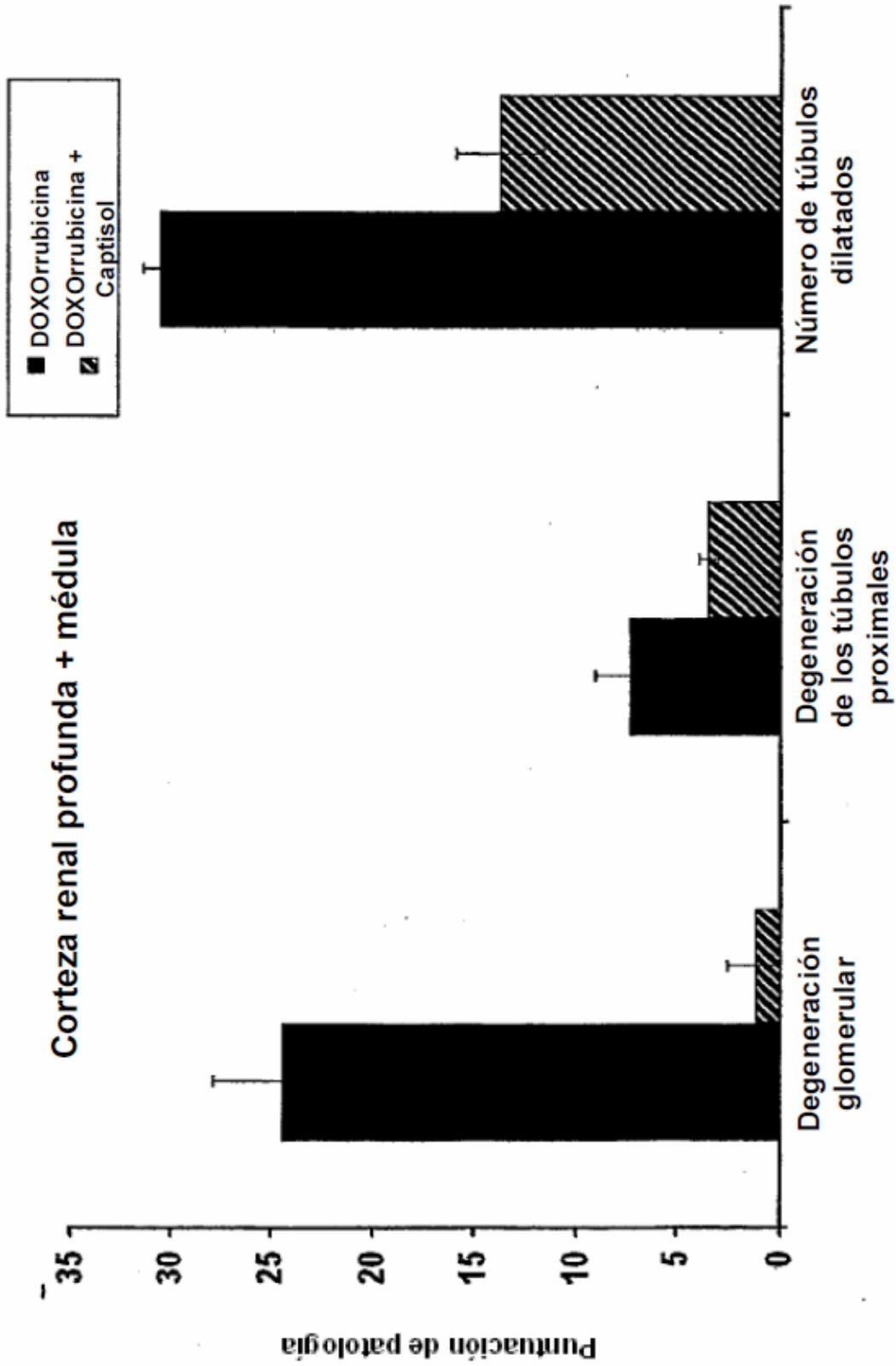


FIGURA 6



**FIGURA 7**



**FIGURA 8**

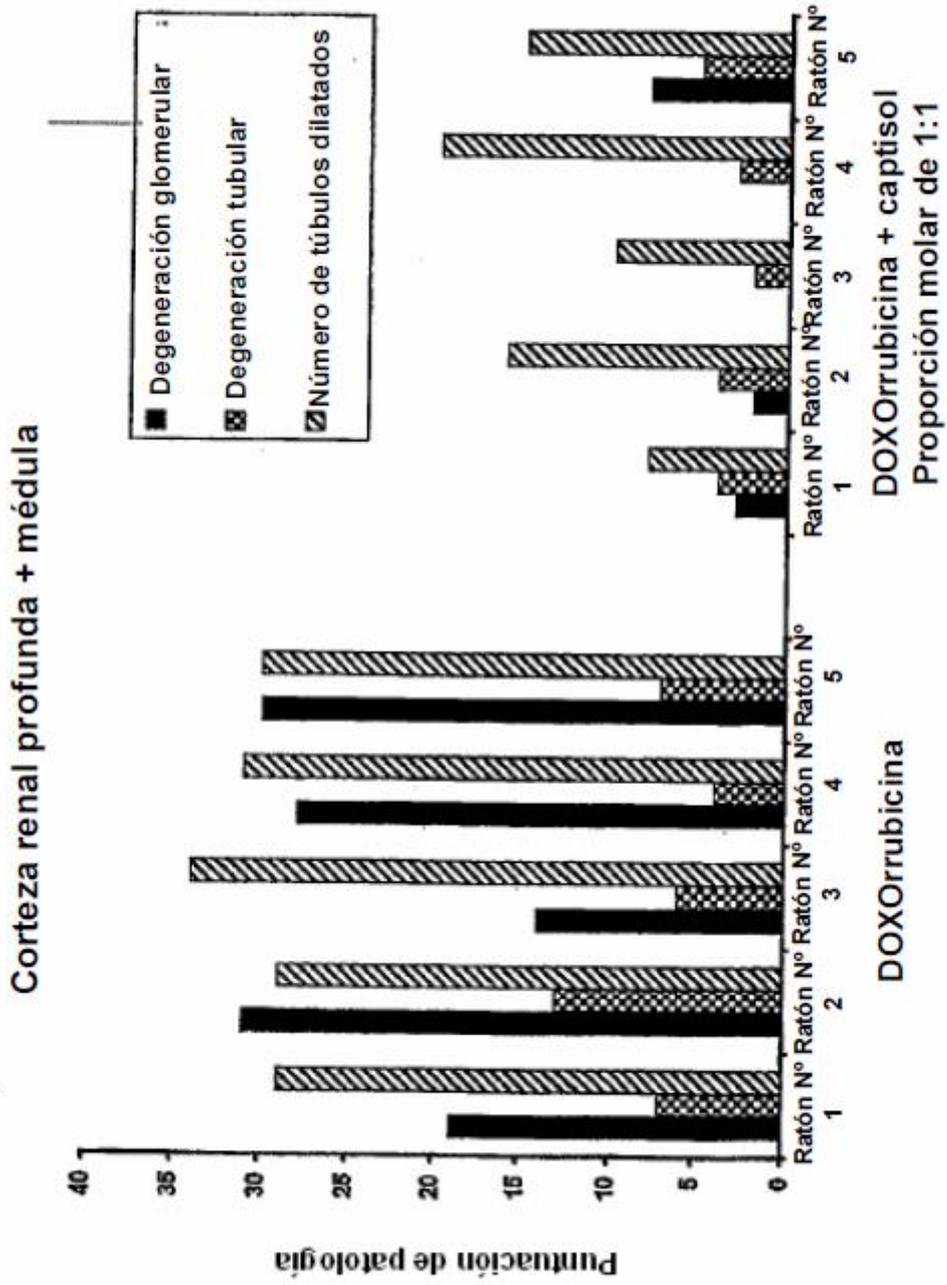
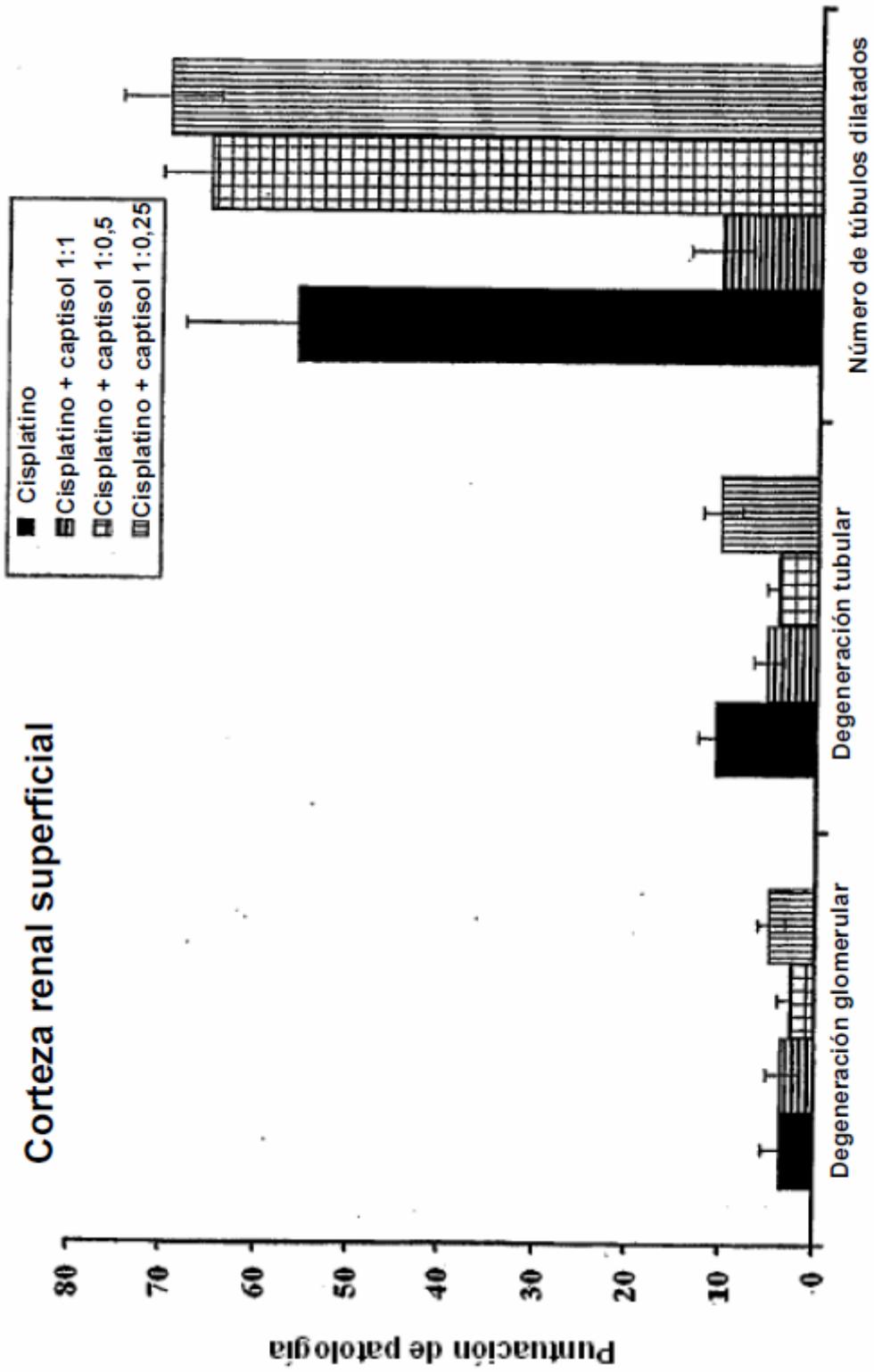


FIGURA 9



**FIGURA 10**

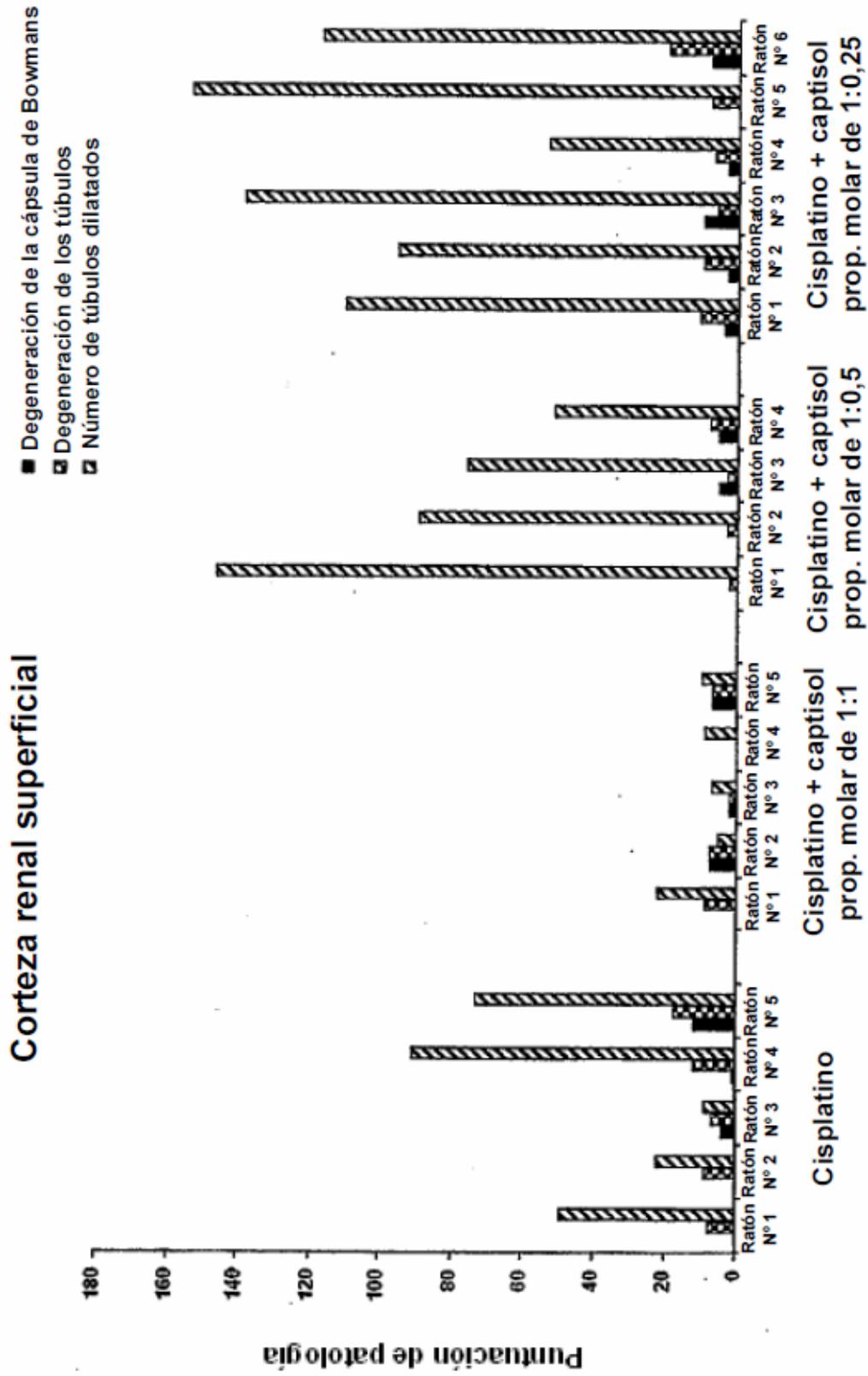
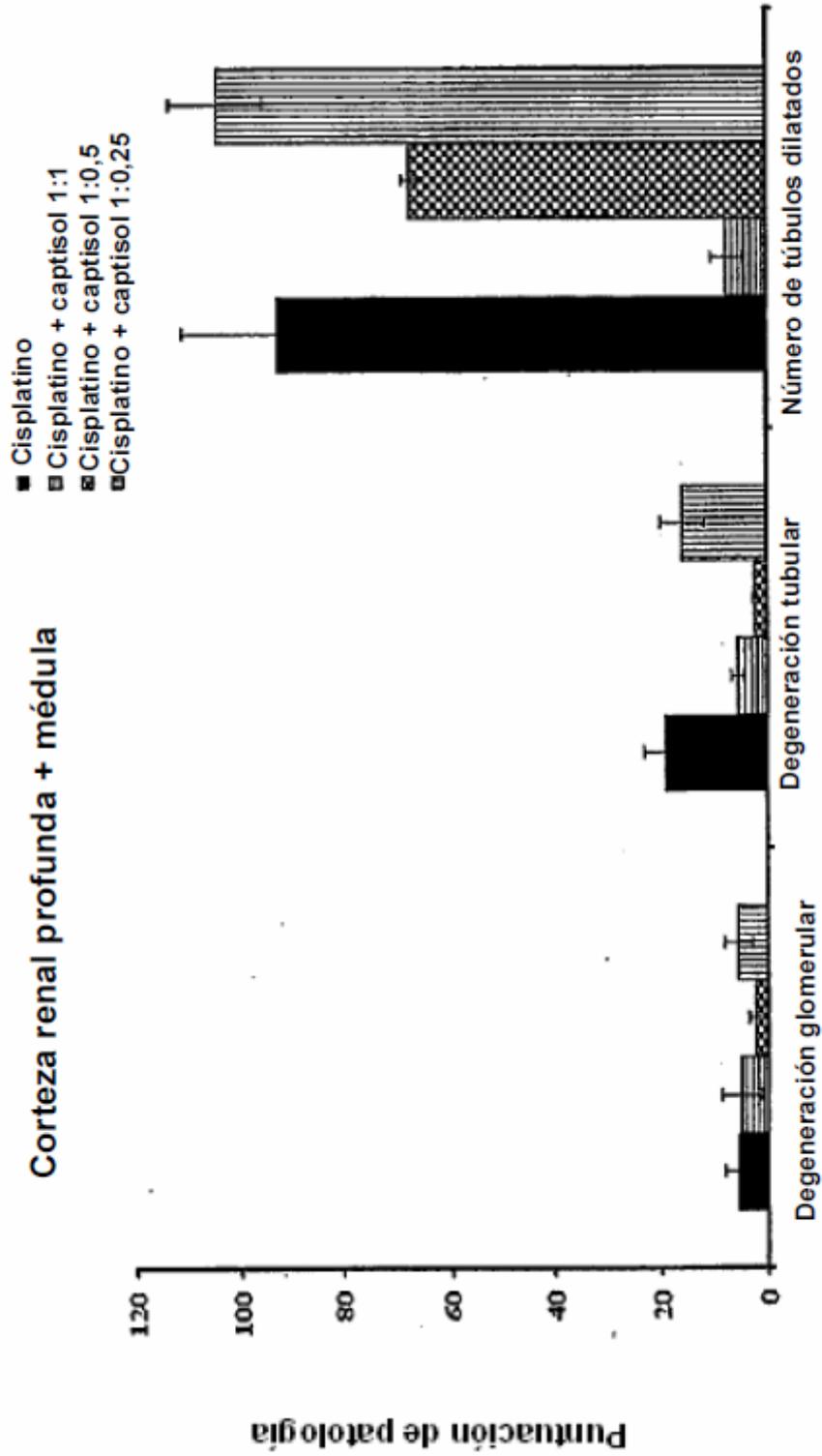


FIGURA 11



**FIGURA 12**

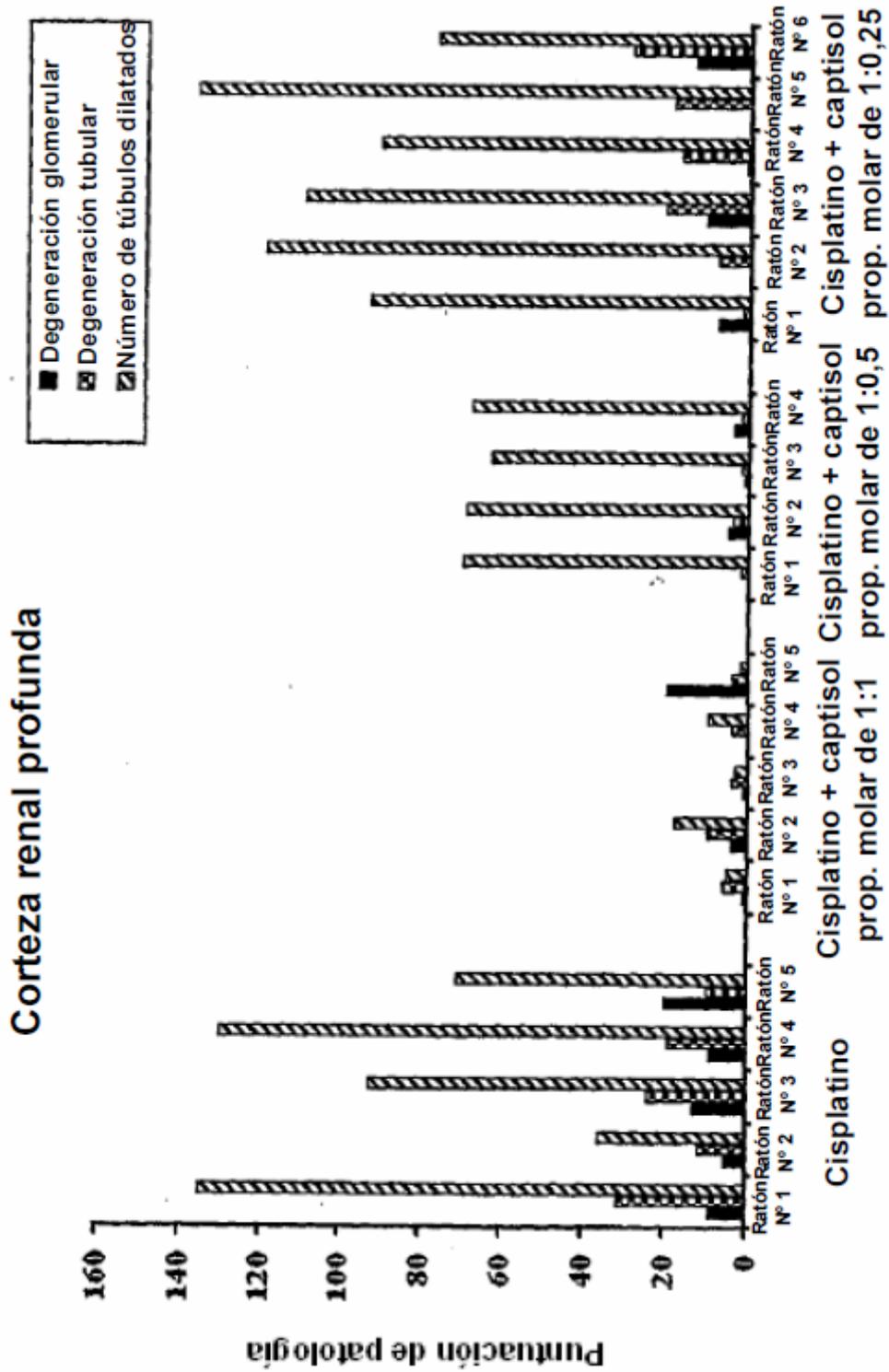


FIGURA 13