

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 794**

51 Int. Cl.:

A61K 38/46 (2006.01)

A61P 9/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2012 PCT/NL2012/050400**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012 WO2012169892**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2012 E 12729755 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2717906**

54 Título: **El uso de fosfatasa alcalina para preservar la función renal**

30 Prioridad:

08.06.2011 EP 11169143

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

22.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**AREND, JACQUES SALOMON ROBERT;
VAN DEN BERG, ERIK JAN y
RAABEN, WILLEM**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 618 794 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

El uso de fosfatas alcalina para preservar la función renal

La invención se relaciona con el campo de la medicina y en particular con medios y usos en la prevención y/o tratamiento de fibrilación auricular.

5 Los riñones realizan diversas funciones en un cuerpo animal, tales como excreción de residuos, homeostasis de ácido-base, regulación de osmolalidad, regulación de presión arterial y secreción de hormonas. Para activar los riñones para que realicen estas tareas, los riñones reciben, a pesar de su tamaño relativamente pequeño, aproximadamente el 20% del gasto cardíaco. En consecuencia, una interrupción del flujo sanguíneo a los riñones (flujo sanguíneo renal, RBF) tiene un impacto directo en muchas de las funciones del riñón. Por ejemplo podrían ocurrir reducción de excreción de desechos nitrogenados y alteraciones de fluido y equilibrio hidroelectrolítico. A largo plazo, el RBF reducido, pero también otros eventos tóxicos, tales como isquemia (lesión por reperfusión), uso de medios de contraste u (otros) fármacos nefrotóxicos, por ejemplo, antibióticos, pueden ser muy estresantes para los riñones lo que resulta en lesión renal aguda (AKI).

15 Es muy importante para prevenir y/o tratar adecuadamente la AKI, porque en primer lugar, la AKI está acompañada con altos costes, morbilidad y mortalidad, y en segundo lugar, la AKI prolongada puede conducir a lesión renal crónica (CKI), que posiblemente puede llevar a pérdida irreversible de la función renal. Adicionalmente, un individuo que ha adquirido CKI es más propenso a (de nuevo) adquirir AKI, que a continuación se denomina "lesión renal aguda sobre crónica". Debido a que la función renal en pacientes de CKI ya está reducida, la lesión renal aguda sobre crónica puede reducir la función renal por debajo de un umbral crítico. Por lo tanto, es particularmente importante esa prevención de AKI en pacientes de CKI. Adicionalmente, se ha especulado que la AKI en la parte superior de CKI deja al paciente con una función renal aún más reducida, incluso después de que se resuelve el componente agudo de la lesión renal.

25 Dependiendo de la causa de la AKI (prerenal, renal o postrenal), están disponibles diferentes métodos de tratamiento. Si, por ejemplo, el RBF reducido es causante de la AKI, la normalización de RBF temprana predice un mejor pronóstico para recuperación de la función renal. El tratamiento inicial se debe enfocar en corregir los equilibrios de fluidos y electrolitos y la uremia, mientras que se busca la causa de la AKI aguda. Un paciente con volumen agotado se resucita con solución salina. Sin embargo, más a menudo, se presenta sobrecarga de volumen, especialmente si los pacientes tienen oliguria o anuria.

30 Si la AKI no es provocada por una reducción en el RBF, sino por ejemplo resulta de isquemia o exposición a agentes nefrotóxicos, tales como agentes de contraste o antibióticos, es importante eliminar esta causa de AKI. Por ejemplo esto se puede realizar al eliminar la causa de isquemia, por ejemplo, un trombo, o al detener el medicamento que daña el riñón.

35 Un ejemplo de un tratamiento actual de AKI provocada por el RBF reducido es la furosemida administrada de forma intravenosa (Lasix). Otro ejemplo de uno de los tratamientos actuales es calcio administrado por vía intravenosa. El potasio se puede desplazar temporalmente en el compartimiento intracelular utilizando insulina administrada por vía intravenosa (10 unidades) y glucosa (25 g), agonistas beta inhalados o bicarbonato de sodio administrado por vía intravenosa. La excreción de potasio se consigue con sulfonato de poliestireno de sodio (Kayexalato) y/o diuréticos. El sulfonato de poliestireno de sodio se administra por vía oral (25 a 50 g se mezcla con 100 mL de 20 por ciento de sorbitol) o como un enema (50 g en 50 mL de 70 por ciento de sorbitol y 150 mL de agua del grifo). Si estas medidas no controlan el nivel de potasio, se inicia el procedimiento de diálisis.

40 La acidosis normalmente se trata con bicarbonato de sodio administrado por vía intravenosa o por vía oral si el nivel de bicarbonato en suero es menor de 15 mEq por L (15 mmol por L) o el pH es menor de 7.2. Los pacientes también se pueden tratar por vía oral con comprimidos de bicarbonato de sodio, solución de Shohl en dosis de 30 mL o bicarbonato de sodio en polvo. Los niveles de bicarbonato en suero y el pH se deben seguir de cerca. La acidosis intratable requiere diálisis.

45 Todos los medicamentos se deben revisar, y se deben ajustar las dosis con base en la tasa de filtración glomerular y los niveles de suero de medicamentos.

50 Entre el 20 y el 60 por ciento de los pacientes con AKI requieren diálisis a corto plazo, particularmente cuando el nitrógeno de urea en sangre (BUN) es superior a 100 mg por dL (35.7 mmol por L de urea) y el nivel de creatinina en suero excede el rango de 5 a 10 mg por dL (442 a 884 µmol por L). Las indicaciones para diálisis incluyen alteraciones de acidosis o electrolíticas que no responden a la terapia farmacológica, sobrecarga de fluidos que no responden a diuréticos, y uremia. La EMEA, por ejemplo, aconseja los siguientes criterios, que están en línea con las recomendaciones ADQII para determinación del requisito del RRT:

a) oliguria <0.3 ml/kg/h O

b) anuria >12 h Y urea en suero >15 mmol/L O

55 c) hipercalcemia >7.5 mmol/L o con cambios del ECG típicos a pesar de la intervención terapéutica O

d) acidosis con bicarbonato estándar <15 mmol/L a pesar de intervención terapéutica O

e) hiponatremia <120 mmol/L a pesar de intervención terapéutica O

f) diagnóstico clínico de sobrecarga de fluidos con existencia o amenaza de edema pulmonar o cerebral a pesar de intervención terapéutica.

5 En algunos casos, los pacientes que sufren de CKI y/o AKI no pueden recibir un tratamiento médico importante para una (otra) afección, debido a los posibles efectos tóxicos, que dicho tratamiento puede tener. Por ejemplo, un umbral de nivel de creatinina en la sangre se podría fijar en 1.4 mg/dL con el fin de recibir contraste yodado. Aunque aparentemente contradictorio, bajo ciertas circunstancias, la terapia de reemplazo renal (RRT) en sí también es estresante para los riñones.

10 Normalmente, la RRT agota el volumen desde dentro del espacio intravascular, ya que, como resultado de la eliminación de desechos, también se eliminan fluidos. El volumen de agotamiento se restablece lentamente desde el espacio extravascular. Sin embargo, en pacientes críticamente enfermos, que ya están hipovolémicos, el agotamiento del volumen intravascular puede conducir a lesiones isquémicas, por ejemplo, en los riñones. Por lo tanto, se considera que el RRT es un tratamiento estresante para los riñones. También se ha reportado que los pacientes que requieren RRT crónica con el tiempo (3 a 12 meses) pueden perder cualquier función renal residual que puedan tener, probablemente como resultado de RRT.

Por lo tanto, se necesitan medios y/o métodos alternativos que conserven y o aumenten la función renal, prevengan o acorten la duración de la RRT, o aumenten la depuración de creatinina renal.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar medios y métodos para prevenir o tratar fibrilación auricular.

20 La farmacoterapia de la fibrilación auricular se revisa en Jacob et al, Am. J. of Therapeutics, 18, 241-260 (2011).

La presente divulgación proporciona fosfatasa alcalina (AP) para uso en por lo menos en parte la conservación y/o aumento de la función renal después de un tratamiento con el riesgo de reducir la función renal. Dicho tratamiento implica administrar dicha fosfatasa alcalina antes de, y, opcionalmente, durante y/o después del tratamiento con el riesgo de reducir la función renal. También se divulga el uso de fosfatasa alcalina para la fabricación de un medicamento para por lo menos en parte conservar y/o aumentar la función renal después de un tratamiento con el riesgo de reducir la función renal. Dicha fosfatasa alcalina se administra preferiblemente antes de, y, opcionalmente, durante y/o después del tratamiento con el riesgo de reducir la función renal.

30 Como se utiliza aquí, el término "conservar" incluye prevenir una reducción, ralentizar una reducción, detener una reducción y/o por lo menos revertir parcialmente, una reducción de una función renal. El término "aumentar" no se limita necesariamente a aumentar dicha función renal a un valor igual o mayor que antes que ocurra dicho tratamiento. Incluye restaurar parcialmente la función renal.

El término "tratamiento con riesgo de reducir la función renal" se utiliza normalmente para referirse a un tratamiento que lleva el riesgo de que se reduzca la función renal en dicho tratamiento al comparar el valor de por lo menos un parámetro renal relacionado con un valor reconocido o promedio (laboratorio) de dicho parámetro, o al comparar dicho parámetro con el valor antes de que se realice dicho tratamiento. Si, por ejemplo, la cantidad de proteína en la orina de un sujeto, preferiblemente un humano está significativamente por encima de un valor reconocido o promedio (laboratorio), se dice que se "reduce" dicha función. El análisis correspondiente se puede realizar en un laboratorio, pero también en el hogar. Por ejemplo, desde septiembre de 2006, el holandés "Nierstichting" ha introducido una prueba simple (llamada verificación de riñón ("Niercheck")) que se puede realizar en casa para probar si los riñones funcionan correctamente. Esta prueba se dirige por ejemplo a la cantidad de proteína en la orina.

45 Otros ejemplos de parámetros que se pueden revisar con el fin de determinar la función renal son la tasa de filtración glomerular (GFR), depuración de creatinina endógena como una aproximación de GFR, los niveles de creatinina en suero, alteración de electrolitos, cantidad de orina producida, BUN, niveles de calcio, niveles de fósforo, niveles de albúmina y/o glóbulos rojos y blancos en la orina. Otras pruebas que se pueden realizar son un conteo sanguíneo completo con diferencial.

Como se describe aquí dentro de la parte experimental también es posible analizar una muestra de orina en la presencia o ausencia de una molécula de ARN. Preferiblemente, dicha molécula de ARN es una molécula de mARN. Incluso más preferida, dicha molécula de mARN es mARN de iNOS. En una realización más preferida dicho ARN se obtiene de células renales secretadas en orina.

50 Un tratamiento con riesgo de reducir la función renal incluye de este modo cualquier tratamiento que tiene el potencial de influir negativamente en cualquiera de los parámetros mencionados anteriormente, de tal manera que se dice de la función renal se disminuye. Los tratamientos típicos que pueden tener riesgo de reducción de función renal son la terapia de reemplazo renal, exposición a medios de contraste intravascular, cirugía de riñón y/o corazón, trasplante de riñón y/o corazón, transfusión de sangre, transfusión de glóbulos rojos, tratamiento con fármacos nefrotóxicos y/o reexploración quirúrgica. La presente divulgación proporciona la percepción de que la AP es muy bien capaz de prevenir

el daño renal cuando se realiza dicho tratamiento que lleva a un riesgo de reducción de la función renal. Se prefiere que la AP se administre antes de que se realice el tratamiento que lleva el riesgo de reducción de la función renal, con el fin de evitar la reducción de la función renal.

Esta nueva percepción es especialmente útil para un sujeto en el que ya se confirmó que tiene una función renal reducida y programada para un tratamiento con un riesgo de reducir la función renal. En general, dicho tratamiento tiene el riesgo de reducir la función renal aún más. Esto puede ser problemático si el sujeto programado para dicho tratamiento tiene sólo queda poco de la función renal. En dicho caso, puede ser necesario posponer o incluso abstenerse de dicho tratamiento, tal como por ejemplo administración de medios de contraste para propósitos de diagnóstico. Esto por supuesto no es una situación ideal ya que dicho tratamiento o método de diagnóstico puede ser importante para el bienestar de los pacientes. Hasta la presente divulgación, se ha decidido si se va a abstener del tratamiento o tomar el riesgo de reducir la función renal aún más. Sin embargo, con la percepción proporcionada por la presente divulgación ya no es necesario elegir entre estas dos opciones, ya que la AP es capaz de conservar la función renal en una persona que experimenta un tratamiento que tiene el riesgo de reducir la función renal. Por lo tanto, la divulgación proporciona un método para por lo menos en parte conservar y/o aumentar la depuración de creatinina renal en un sujeto que experimenta un tratamiento con un riesgo de reducir la depuración de creatinina renal, por lo menos de esta manera en parte conservar y/o aumentar dicha depuración de creatinina renal. Esto es particularmente útil si dicha persona que experimenta dicho tratamiento tiene un riesgo de reducción de la función renal por debajo de un umbral crítico. De acuerdo con la presente divulgación, la fosfatasa alcalina es capaz de evitar la reducción de la función renal por debajo de un umbral crítico y por lo tanto permite a dicha persona a recibir el tratamiento, ahora lleva un riesgo mucho menor de reducción de la función renal. Preferiblemente una función renal, preferiblemente la depuración de creatinina renal, se determina antes de que se utilice la AP para conservar la función renal con el fin de determinar el riesgo de que la función renal de dicha persona se reduzca por debajo de un cierto nivel de umbral.

Preferiblemente, se proporciona un uso de AP de acuerdo con la divulgación, en la que dicha AP es para administración a un sujeto que ya sufre de enfermedad renal. Como se dijo anteriormente, dicha persona, que ya sufre de enfermedad renal tiene un mayor riesgo de que el tratamiento conlleve al riesgo de reducir la función renal resultando en una función renal por debajo de un nivel de umbral. Preferiblemente la AP se utiliza de acuerdo con la invención en un sujeto que ya sufre de enfermedad renal, que tiene una tasa de filtración glomerular estimada (GFR) o calculada de menos de aproximadamente 75 ml/min por 1.73 m², más preferiblemente menos de aproximadamente 55 ml/min por 1.73 m², más preferiblemente menos de aproximadamente 45 ml/min por 1.73 m², más preferiblemente menos de aproximadamente 35 ml/min por 1.73 m². Especialmente en estos bajos valores de GFR, es muy importante conservar la función renal restante. Por lo tanto, es importante que las personas que tienen dichos bajos valores de GFR reciban AP con el fin de conservar tanto como sea posible la función renal. La GFR se puede evaluar de diversas maneras: En primer lugar, se puede medir por la depuración de inulina o de cromo EDTA. Sin embargo, es decir se restringe a configuraciones experimentales, y en general es muy costoso y consume mucho tiempo para la práctica clínica general. Alternativamente, se puede hacer una aproximación de la GFR, por ejemplo, al calcular la depuración de creatinina endógena (ECC). Esto se calcula a partir de un volumen medido en orina de 24 horas, nivel de creatinina en orina y nivel de creatinina en suero. Esto no se hace de forma rutinaria en la práctica clínica, pero en principio es posible. En este cálculo de ECC existen errores sistemáticos, y los resultados tienden a sobrestimar la GFR real. Los otros métodos para evaluar la GFR son métodos de estimación. Existen dos métodos principales conocidos en la técnica, es decir, Cockcroft-Gault y MDRD, ambos son más confiables en enfermedad renal crónica (CKD) que en AKI.

A pesar de que la conservación a corto plazo de la función renal ya puede tener consecuencias inmediatas de soporte vital, se prefiere que el efecto de la AP sobre la función renal sea de larga duración.

Se prefiere que se utilice una AP para conservar la función renal después de tratamiento con riesgo de reducir la función renal, en el que dicho tratamiento es de duración relativamente corta. Se prefiere que dicho tratamiento sea menor de aproximadamente 4 días. Cuando dicho tratamiento comprende por ejemplo los medios de contraste yodados, dicho tratamiento es relativamente corto. Una ventaja de utilizar AP para dichos tratamientos cortos es que la AP también se administra durante un período relativamente corto que por ejemplo mejora el cumplimiento de la medicación.

Se divulga aquí la AP para conservar la función renal después de un tratamiento con el riesgo de reducir la función renal, en el que la duración de dicho tratamiento con el riesgo de reducir la función renal es de menos de 4 días, preferiblemente menos de 3 días, más preferiblemente menos de 2 días, más preferiblemente menos de 1 día.

Como ya se dijo anteriormente, el riñón tiene diversas funciones. Una función muy importante es la depuración de productos de desecho nitrogenados de la sangre. Si estos productos de desecho nitrogenados no se depuran por el riñón, se acumulan en el cuerpo y pueden llevar a toxicidad, por ejemplo, en el sistema nervioso central. La función de depuración de los riñones se mide preferiblemente por depuración de creatinina renal (endógena), pero por ejemplo también son adecuadas otras formas de estimación de la GFR. La depuración de creatinina se puede determinar por métodos conocidos en la técnica. Un método para el cálculo de la depuración de creatinina endógena es recoger orina (usualmente 24 horas) para determinar la cantidad de creatinina que se elimina de la sangre durante un intervalo de tiempo dado. Si se quita, por ejemplo, 1440 mg en 24 horas, esto es equivalente a la eliminación de 1 mg/min. Si la concentración de sangre es 0.01 mg/mL (1 mg/dL), se dice que la depuración de creatinina es 100 mL/min. Esto se debe a que, con el fin de excretar 1 mg de creatinina, tendrían que haber sido depurados 100 mL de sangre que contenía 0.01 mg/mL. De acuerdo con la descripción, la AP es muy capaz de retener la función renal. Como

consecuencia la AP es capaz de mejorar muchos parámetros relacionados con la función renal, tales como BUN, depuración de creatinina y niveles de creatinina en suero. Es especialmente útil conservar la depuración de creatinina, ya que la depuración de creatinina reducida generalmente resulta en aumento de la creatinina y otros productos de desecho tóxicos en suero.

5 Un uso de la AP se divulga aquí, en el que dicha conservación y/o aumento de función renal comprende conservar y/o aumentar la depuración de creatinina renal con respecto a la depuración de creatinina renal antes de dicho tratamiento con el riesgo de reducir la función renal.

10 Como se dijo anteriormente, un tratamiento con un riesgo de reducir la función renal puede ser cualquier tratamiento que tiene el potencial de reducir la función renal en un sujeto cuando dicho sujeto ha recibido dicho tratamiento. Dicho tratamiento comprende terapia de reemplazo de renal (RRT) de ejemplo, exposición a medios de contraste intravasculares, cirugía de riñón y/o corazón, trasplante de riñón y/o corazón, transfusión de sangre, transfusión de glóbulos rojos, tratamiento de fármaco y/o reexploración quirúrgica. La divulgación proporciona ahora la percepción de que la AP es adecuada para conservar la función renal durante todos estos diferentes tratamientos.

15 Como ya se ha explicado anteriormente, la función renal reducida puede ser una indicación de RRT, pero en algunos casos la función renal reducida también puede ser una contraindicación para la RRT. Esto se explica por el hecho de que la RRT generalmente está acompañada por el agotamiento de fluido intravascular y los pacientes críticamente enfermos no toleran las fluctuaciones en la cantidad de fluido intravascular. Esto en última instancia puede llevar a un choque hipovolémico, que compromete el flujo sanguíneo a los riñones, exponer los riñones a una lesión isquémica. Como ya se mencionó anteriormente, se ha observado la pérdida completa de la función renal residual en los sujetos que recibieron RRT crónica. La presente divulgación proporciona ahora la idea de que dicha pérdida completa de la función renal residual en sujetos que recibieron RRT crónica se puede evitar cuando se administra AP antes y/o durante RRT. Por lo tanto, la divulgación proporciona el uso de AP para evitar y/o reducir una pérdida de función renal en un sujeto que recibe RRT crónica.

25 Otro tratamiento con riesgo de reducir la función renal es el uso de medio de contraste intravascular, tal como, por ejemplo, medio de contraste yodinado. Especialmente el medio de contraste yodinado, que es altamente hiperosmolar en comparación con plasma (sangre) se asocia frecuentemente con una reducción en la función renal. Sin estar limitado por la teoría, el efecto de los medios de contraste iónicos se puede explicar cómo sigue. El agente de contraste hiperosmolar puede atraer fluidos extravasales en el sistema vascular, lo que puede provocar que las arterias de los riñones se expandan. Cuando las arterias se expanden los vasoconstrictores se liberan para compensar la expansión arterial. Estas acciones pueden resultar en una acción de apertura y cierre rápido de las arterias. El resultado de esta acción es un suministro sanguíneo disminuido a los riñones que puede conducir a un cierre total de los riñones. También existe una posibilidad de que las arterias se puedan restringir en una medida tal que queden completamente cerradas. El cuerpo intenta regular la sobrecarga de fluidos en el sistema vascular. Sin embargo, si los riñones no son funcionales, como resultado del agente de contraste o independiente de este, el fluido se ve obligado a buscar otras venas de escape provocando que ocurra sobrecarga de fluido en otros sistemas del cuerpo. Uno de los principales resultados de este evento es el edema pulmonar. De acuerdo con la divulgación, se utiliza AP para retener o mejorar la función renal cuando se utilizan medios de contraste iónicos. En dicho caso, un paciente que requiere medios de contraste puede recibir dicho tratamiento necesario con menos riesgo de reducir la función renal. En casos en donde, antes de la divulgación actúa, los medios de contraste fueron contraindicados en pacientes con función renal reducida (severa), ahora es posible tratar dichos pacientes con AP con el fin de permitirles recibir dicho medio de contraste.

40 Se ha mostrado que la cirugía cardíaca también puede reducir la función renal y que no sólo la cirugía cardíaca propiamente dicha un factor de riesgo para AKI, sino también que los parámetros perioperatorios influyen independientemente en el riesgo en AKI después de cirugía cardíaca. Estos parámetros fueron: anemia preoperatoria, transfusión de glóbulos rojos y re-exploración quirúrgica. Sin estar limitado por la teoría, estos parámetros, y la cirugía cardíaca como tal, se considera que todos provocan isquemia al riñón. Por supuesto, no sólo la cirugía cardíaca, sino también por ejemplo la cirugía de riñón o trasplante de riñón provoca isquemia al tejido renal, lo que por lo tanto también se considera como un tratamiento con un riesgo de reducir la función renal. Como la cirugía cardíaca es un tratamiento que conlleva un riesgo de reducir la función renal, la administración de AP es capaz de mejorar o retener la función renal en un paciente que recibe cirugía cardíaca.

50 Otros tratamientos que tienen un riesgo de reducir la función renal incluyen, por ejemplo, el uso de determinada medicación o fármaco. La lesión y disfunción renal secundaria a medicamentos son comunes y pueden presentarse como lesiones sutiles y/o sobrefalla renal. Algunos fármacos perturban la perfusión renal e inducen pérdida de capacidad de filtración. Otros lesionan directamente las células vasculares, tubulares, glomerulares e intersticiales, de tal manera que la pérdida específica de la función renal conduce a hallazgos clínicos, que incluyen microangiopatía, síndrome de Fanconi, necrosis tubular aguda, nefritis intersticial aguda, síndrome nefrótico, obstrucción, diabetes nefrogénica insípida, anomalías de electrolitos y falla renal crónica. Específicamente, el uso de determinados agentes antimicrobianos (tal como anfotericina B, caspofungina, vancomicina, levofloxacina y aminoglicósidos tal como tobramicina y gentamicina), otros fármacos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos (tal como cisplatina, carboplatina, metotrexato), inhibidores de proteasa (tal como indinavir y ritonavir), oro, litio, fármacos antiinflamatorios (tal como fármacos antiinflamatorios no esteroideos, cidosporina, tacrolimus, sirolimus), y fármacos hipertensivos (tal como inhibidores de enzimas que convierten angiotensina (ACE) y bloqueadores del receptor de angiotensina (ARB)) y

determinados productos químicos (tal como silicatos, hidrocarburos, metales pesados (tal como Cd, Hg, Pb), insecticidas, herbicidas, etilenglicol y toxinas bacterianas (tal como tétano, toxinas estreptocócicas) Son conocidas por tener riesgo de reducir la función renal en sujetos que han tomado o han sido expuestos a dichos agentes o productos químicos. De acuerdo con la presente divulgación, ahora es posible reducir el efecto de estos agentes o productos químicos al administrar AP a sujetos expuestos a dichos agentes o productos químicos. También es posible reducir la cantidad de determinados fármacos, ya que la presente invención proporciona la idea de que el uso de AP de acuerdo con la invención reduce la cantidad de medicación en un paciente.

Se divulga el uso de AP, en el que dicho tratamiento con riesgo de reducir la función renal comprende terapia de reemplazo renal (RRT), exposición a medio de contraste intravascular, cirugía cardíaca y/o renal, trasplante de corazón y/o riñón, transfusión sanguínea, transfusión de glóbulos rojos, tratamiento de fármacos y reexploración quirúrgica.

Un tratamiento que tiene riesgo de reducir la función renal puede resultar en reducción del flujo sanguíneo a través de los riñones. La médula externa del riñón es especialmente susceptible a lesión y/o daño celular cuando se reduce el suministro sanguíneo, provocando un evento isquémico. De acuerdo con la divulgación, es especialmente útil utilizar AP para retener o mejorar la función renal cuando la presión sanguínea arterial media es, o se espera que sea, menor de 80 mm Hg. Por debajo de una presión sanguínea arterial media de 80 mm Hg, el riñón está en riesgo de lesión, lo que por lo general resulta en una reducción de la función renal.

Por lo tanto, se divulga el uso de AP, en el que dicho tratamiento con riesgo de reducir la función renal resulta en o está acompañado por, hipoperfusión del riñón, preferiblemente debido a que la presión sanguínea arterial está por debajo de 80 mm Hg, preferiblemente por debajo de 75 Mm Hg, más preferiblemente por debajo de 70 mm Hg, más preferiblemente por debajo de 65 mm Hg, más preferiblemente por debajo de 60 mm Hg. De acuerdo con la divulgación, la AP es capaz, por lo menos en parte, evitar la reducción en la función renal al evitar la lesión del riñón debido a la caída de la presión sanguínea media arterial.

La AP se utiliza preferiblemente con el fin de conservar y/o mejorar la función renal durante un tratamiento que tiene riesgo de reducir la función renal, debido a una reducción transitoria en la función renal resulta frecuentemente en una condición que en sí misma es posiblemente dañar el riñón, tal como por ejemplo el requerimiento RRT. Como se dijo anteriormente, el RRT propiamente dicho se puede contraindicar en sujetos que tienen función renal reducida. Por lo tanto, se proporciona un uso de AP de acuerdo con la divulgación, en el que dicha función renal se preserva durante dicho tratamiento con un riesgo de reducir la función renal. En dicho caso, se evita preferiblemente el requerimiento de RRT. Esto es especialmente útil en sujetos que ya tienen una reducción (severa) en la función renal.

Preferiblemente, se utiliza una fosfatasa alcalina para acortar la duración del RRT. De esta manera, se divulga aquí una fosfatasa alcalina para uso en un método para acortar la duración de RRT a través de por lo menos en parte conservar y/o aumentar la función renal durante y/o después de RRT, al administrar dicha AP antes de, y opcionalmente durante y/o después de RRT. Como se dijo anteriormente, el RRT y especialmente el RRT crónico se consideran un tratamiento con riesgo de reducir la función renal. Por lo tanto, es especialmente útil acortar la duración del RRT con el fin de disminuir el riesgo de reducir la función renal. Preferiblemente se detiene el RRT cuando una función renal ha alcanzado un nivel umbral, de tal manera que ya no se requiere más RRT. Por lo tanto, se divulga el uso de AP, en el que se determina una función renal, preferiblemente GFR, más preferiblemente depuración de creatinina renal, y se detiene dicho RRT cuando dicha función renal, preferiblemente dicho GFR, más preferiblemente dicha depuración de creatinina renal, se aumenta a y/o preserva en un nivel umbral.

Como ya se dijo anteriormente, se prefiere que la preservación y/o aumento de la función renal, tal como la depuración de creatinina renal, sea de larga duración. Sin embargo, también se prefiere que dicha preservación y/o aumento ya inicié durante un tratamiento que tiene riesgo de reducir la función renal, tal como RRT. De esta manera, se prefiere que el uso de AP preserve y/o aumente la depuración de creatinina renal durante RRT. En un ejemplo de trabajo, la presente divulgación muestra que la fosfatasa alcalina es capaz de conservar y/o aumentar la depuración de creatinina renal después de RRT.

Un nivel crítico de depuración de creatinina crítico, en particular para enfermedad renal crónica, se considera que es de aproximadamente 15-25 ml/min. Por debajo de dicho umbral, se acumulan residuos nitrogenados en el cuerpo, ejerciendo posiblemente efectos tóxicos. Por lo tanto, se divulga aquí, el uso de fosfatasa alcalina para aumentar y/o conservar la depuración de creatinina renal en un nivel de por lo menos 15 ml/min, preferiblemente por lo menos 20 ml/min, más preferiblemente por lo menos 25 ml/min, más preferiblemente por lo menos 50 ml/min.

La divulgación proporciona adicionalmente la idea de que los pacientes en UCI requieren significativamente menos medicación cuando se administra AP. En un ejemplo de trabajo se mostró, por ejemplo, que la medicación específicamente que se proporcionó para tratamiento de una afección cardíaca, tal como una afección cardíaca que resulta de infarto de miocardio o falla cardíaca. Se administró significativamente menos a sujetos que reciben AP en comparación con sujetos que reciben medicación de placebo. Ahora que la divulgación proporciona esta idea, es posible utilizar AP para reducir la cantidad de medicación para el tratamiento de una afección cardíaca, reduciendo por lo tanto por ejemplo los efectos colaterales adversos de dicha medicación.

Por lo tanto, se divulga el uso de una fosfatasa alcalina, para reducir la cantidad de (co)medicación, conservando y/o incrementando de este modo por lo menos en parte la función renal. Adicionalmente, la divulgación proporciona una fosfatasa alcalina para uso en un método para reducir la cantidad de (co)medicación en un paciente que ya sufre de (o en riesgo de sufrir) de función renal reducida.

5 Preferiblemente, dicha (co)medicación es para el tratamiento de una afección cardíaca, preferiblemente una afección cardíaca que resulta de infarto de miocardio o falla cardíaca. Preferiblemente, dicha (co)medicación es un medicamento diurético. Los medicamentos diuréticos influyen el equilibrio de fluidos en un individuo mediante diuresis forzada. Se ha probado que los diuréticos son útiles para, entre otras cosas, el tratamiento de la falla cardíaca, hipertensión y enfermedades renales. De otra parte, en una persona que ya sufre de función renal reducida, los diuréticos pueden
10 reducir aún más la función renal, como resultado de una reducción en la presión sanguínea debido a diuresis. Sin embargo, la AP es capaz de disminuir dicha reducción en la presión sanguínea y/o evitar o mejorar la función renal reducida que resulta de dicha reducción en presión sanguínea.

Preferiblemente, se divulga el uso de una fosfatasa alcalina de acuerdo con la invención para reducir la (co)medicación en la que la (co)medicación es un antiarrítmico clase III, un bloqueador selectivo, un glucósido digitalis, un antagonista
15 de vitamina K, o un agonista selectivo de β -2-adrenoceptor. En un ejemplo de trabajo, se ha mostrado que la necesidad de dicha medicación se reduce en sujetos que reciben AP.

Preferiblemente, se divulga un uso de fosfatasa alcalina para reducir la (co)medicación, en la que la (co)medicación es potasio, un benzoderivado, una sulfonamida simple, magnesio y/o glucósidos digitálicos. Como los fármacos mencionados anteriormente son potencialmente perjudiciales para el riñón, el uso de AP para reducir la cantidad de estos fármacos,
20 disminuye por consiguiente el riesgo de reducción de función renal en pacientes que reciben AP.

Sin estar limitada por la teoría, se considera que la reducción en la (co)medicación observada en individuos que reciben AP es un efecto beneficioso directo o indirecto de AP en el riesgo de fibrilación auricular u otros trastornos vasculares o
25 cardíacos. Por lo tanto, en una realización, se proporciona un uso de AP de acuerdo con la invención, en el que dicha AP es para uso en un método para evitar y/o tratar fibrilación auricular, en el que dicha fibrilación auricular se debe a función renal reducida.

Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona una fosfatasa alcalina para uso en un método con el fin de evitar y/o tratar la fibrilación auricular, el que dicha fibrilación auricular se debe a función renal reducida. También se describe el uso de AP para la preparación de un medicamento de cualquiera de las indicaciones anteriores.

Ahora que la divulgación ha proporcionado la idea de que la AP es útil para conservar y/o aumentar la función renal en un individuo que experimenta un tratamiento con riesgo de reducir la función renal, se divulgan métodos para el
30 tratamiento de individuos en riesgo de reducción de función renal.

Se divulga un método para conservar y/o aumentar por lo menos en parte el GFR, preferiblemente por la depuración de creatinina renal en un sujeto que experimenta un tratamiento con riesgo de reducción de GFR y/o depuración creatinina renal, el método comprende administrar fosfatasa alcalina antes, y opcionalmente durante y/o después de dicho
35 tratamiento, conservado y/o aumentando por lo menos en parte dicho GFR, preferiblemente dicha depuración de creatinina renal y determinar dicha GFR conservada y/o aumentada, preferiblemente dicha depuración de creatinina renal de por menos 7 días después, preferiblemente por lo menos 14 días después, más preferiblemente por lo menos 21 días después, más preferiblemente por lo menos 28 días después de dicho tratamiento con riesgo de reducción de depuración de creatinina renal.

40 Se prefiere que brevemente después del inicio de la administración de AP, se tome la decisión de si el tratamiento con AP se continúa o se detiene. Los individuos que reciben AP para conservación de la función renal se dividen preferiblemente en sujetos que responden bien a tratamiento y sujetos que no responden bien a tratamiento con AP. Prefieren que los buenos respondedores reciban continua administración de AP hasta que se alcance un nivel umbral de la función renal, mientras que se prefiere que los sujetos que no responden bien no reciban necesariamente
45 medicación AP adicional. Sujetos que no responden bien a tratamiento con AP se cambian preferiblemente a otro tipo de medicación tal como diuréticos u otros medicamentos de soporte para función renal. Por lo tanto, se divulga un método para determinar si un sujeto experimenta un tratamiento con riesgo de reducir GFR y/o depuración de creatinina renal responde bien a un tratamiento de fosfatasa alcalina para por lo menos en parte conservar y/o aumentar el GFR, preferiblemente depuración de creatinina renal, el método que comprende administrar fosfatasa alcalina antes, y
50 opcionalmente durante y/o después de dicho tratamiento; Determinar el GFR, preferiblemente depuración de creatinina renal en valores iniciales y/o en el primer día después del inicio de administración de fosfatasa alcalina; Determinar GFR, preferiblemente depuración de creatinina renal en el segundo y/o tercer día después del inicio de administración de fosfatasa alcalina, en el que un aumento de dicha GFR y/o dicha depuración de creatinina renal en el segundo y/o
55 tercera día, con relación a dicha GFR y/o depuración de creatinina renal en valores iniciales y/o en el primer día es indicador que dicho sujeto respondiendo bien a dicho tratamiento con fosfatasa alcalina; y determinar si dicho individuo responde bien a dicho tratamiento con fosfatasa alcalina.

No sólo es posible discriminar entre sujetos que responden bien a AP y sujetos que no responden bien a AP mediante comparación de una función renal en valores iniciales y/o en el día 1 con una función renal en el segundo y/o tercera

día, sino también al comparar una función renal en el segundo y/o tercer día después del inicio de administración de fosfatasa alcalina con un nivel umbral. Dicho nivel umbral se fija en, por ejemplo, una depuración de creatinina de 15 ml/min, preferiblemente de 20 ml/min, más preferiblemente 25 ml/min, más preferiblemente 50 ml/min, más preferiblemente 75 ml/min. Dicho umbral puede depender por ejemplo de la condición general del sujeto en cuestión, o por ejemplo la función renal en valores iniciales, es decir, antes de administrar la AP.

Por lo tanto, se divulga un método para determinar si un sujeto que experimenta un tratamiento con riesgo de reducir GFR y/o depuración de creatinina renal responde bien a un tratamiento de fosfatasa alcalina para por lo menos en parte conservar y/o aumentar el GFR, preferiblemente depuración de creatinina renal, el método comprende administrar fosfatasa alcalina antes, durante y/o después de dicho tratamiento; determinar GFR, preferiblemente depuración de creatinina renal en el segundo y/o tercer día después del inicio de la administración de fosfatasa alcalina, en el que una depuración de creatinina renal de por lo menos 15 ml/min, preferiblemente por lo menos 20 ml/min, más preferiblemente por lo menos 25 ml/min, más preferiblemente por lo menos 50 ml/min, más preferiblemente por lo menos 75 ml/min en el segundo o tercer día es indicador de que dicho sujeto responde bien a dicho tratamiento de fosfatasa alcalina; y determinar si dicho individuo responde bien a dicho tratamiento con fosfatasa alcalina.

Un experto puede determinar fácilmente un umbral comparable para GFR basado en los umbrales de depuración de creatinina suministrado anteriormente. Un experto en la técnica es capaz de estimar el GFR sobre la base de una depuración de creatinina dada y viceversa. El experto puede ser guiado, por ejemplo, por Levey et al.

Como se dijo anteriormente, la fosfatasa alcalina se administra preferiblemente a un sujeto que recibe un tratamiento con riesgo de reducir la función renal, en el que la duración de dicho tratamiento es relativamente corta. Preferiblemente, para dicho tratamiento corto, se administra AP durante un corto período de tiempo, así, mejorando de esta manera por ejemplo la conformidad de la medicación. Por lo tanto, se divulga un método, en el que la duración de dicho tratamiento con riesgo de reducir la función renal es de menos de 4 días, preferiblemente menos de 3 días, más preferiblemente menos de 2 días, más preferiblemente menos de 1 día. Como se dijo anteriormente, la AP es especialmente útil para tratar pacientes que ya sufren de función renal reducida, debido a que dichos pacientes son propensos a tener su función renal reducida por debajo de un nivel umbral, que puede resultar en AKI. Con el fin de determinar si un individuo que experimenta un tratamiento con un riesgo de función renal reducida ya está sufriendo de función renal reducida, dicha función renal se determina preferiblemente antes de empezar dicho tratamiento de potencial daño renal. Por lo tanto, se divulga un método de acuerdo con la descripción, dicho método comprende adicionalmente determinar el índice de filtración glomerular, depuración de creatinina, y/o niveles KIM-1 urinarios antes de empezar dicho tratamiento, como se discutió aquí anteriormente.

Preferiblemente, dicho tratamiento con riesgo de reducir la función renal comprende terapia de reemplazo renal, exposición a medios de contraste intravasculares, trasplante de corazón y/o riñón, cirugía de corazón y/o riñón, transfusión sanguínea, transfusión de glóbulos rojos, y/o reexploración quirúrgica. Preferiblemente, se utiliza AP durante tratamiento que resultaría en, o estaría acompañado por, hipoperfusión renal, preferiblemente debido a presión sanguínea arterial media que está por debajo de 80 mm Hg, preferiblemente por debajo de 75 mm Hg, más preferiblemente por debajo de 70 mm Hg, más preferiblemente por debajo de 65 mm Hg, más preferiblemente por debajo de 60 mm Hg, si la AP no se hubiera administrado. Dicha presión sanguínea arterial baja generalmente resulta en función renal reducida y/o lesión renal. El uso de AP durante dicho tratamiento, sin embargo, resulta en menor hipoperfusión, menos reducción en la función renal y/o menos daño renal.

Como se dijo anteriormente, la AP es esencialmente útil para el acortamiento del RRT. Por lo tanto, se divulga un método para acortar la duración de RRT en un sujeto que experimenta RRT, el método comprende administrar una fosfatasa alcalina antes, durante y/o después de que dicho sujeto experimenta RRT; y determinar la función renal, antes, durante y/o después de que dicho sujeto experimenta RRT; y descontinuar el RRT en dicho sujeto cuando dicha función renal se ha incrementado a y/o conservado en un valor umbral, acortando por lo tanto la duración del RRT en dicho sujeto. Como se dijo anteriormente, la reducción del RRT es especialmente útil cuando el RRT (crónico) se considera un tratamiento con un riesgo de reducción de la función renal.

Como se dijo anteriormente, la AP es especialmente útil en reducir la cantidad y/o efectos colaterales adversos de la (co)medicación. Por lo tanto, también se divulga un método para reducir la cantidad de (co)medicación, el método comprende administrar fosfatasa alcalina a un sujeto que recibe dicha (co)medicación o está en riesgo de recibir dicha (co)medicación. Los inventores han observado que no sólo la cantidad de (co)medicación se reduce en sujetos que recibieron AP en comparación con sujetos que reciben placebo, sino también esa administración de AP reduce los efectos adversos de la (co)medicación. Por lo tanto, se divulga un método para reducir los efectos adversos de la (co)medicación en un sujeto que recibe dicha (co)medicación o está en riesgo de recibir dicha (co)medicación, el método comprende administrar fosfatasa alcalina antes, durante y/o después de que dicho sujeto recibe dicha medicación, reduciendo por lo tanto los efectos adversos de dicha (co)medicación en dicho sujeto.

Preferiblemente, se divulga un método, en el que la AP se utiliza para reducir la (co)medicación para el tratamiento de una afección cardíaca, preferiblemente una afección cardíaca que resulta de infarto de miocardio o falla cardíaca.

Preferiblemente, se divulga un método, en el que la (co)medicación es un antiarrítmico clase IIIβ un -bloqueador selectivo, un glucósido digitalis, un antagonista de vitamina K, o un antagonista β-2-adrenoceptor selectivo. La

divulgación proporciona la idea de que la necesidad de que estos fármacos especialmente es menor en sujetos que reciben AP.

Preferiblemente, se divulga un método, en el que la (co)medicación es potasio, un benzo-derivado, una sulfonamida simple, magnesio y/o glucósidos digitalis. Como los fármacos mencionados anteriormente son potencialmente perjudiciales para el riñón en sujetos expuestos a ellos, reducir la cantidad de estos fármacos resulta en disminución del riesgo de función renal reducida en estos sujetos.

Cuando se reduce especialmente la (co)medicación que se proporciona generalmente para el tratamiento de una afección cardíaca, especialmente para el tratamiento de fibrilación auricular, la invención proporciona la idea de que la AP es capaz de evitar y/o tratar fibrilación auricular. Por lo tanto, se divulga un método para evitar y/o tratar fibrilación auricular, el método comprende administrar fosfatasa alcalina a un sujeto que sufre o está en riesgo de sufrir de fibrilación auricular, evitando por lo tanto o tratando dicha fibrilación auricular. En pacientes de unidad de cuidados intensivos (UCI), la incidencia de y morbilidad debido a la fibrilación auricular es relativamente alta (hasta 70%, dependiendo del tipo de UCI).

Fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina (AP; EC 3.1.3.1 de acuerdo con nomenclatura de enzimas IUBMB), es una enzima que cataliza la reacción de un monoéster de fosfatasa y H₂O a un alcohol y fosfato. Otros nombres para la AP son fosfomonoesterasa alcalina; fosfomonoesterasa; glicerofosfatasa; fosfohidrolasa alcalina; fenil fosfatasa alcalina; fosfohidrolasa monoéster ortofosfórico (alcalino óptimo). El nombre sistémico la AP es fosfohidrolasa monofosfato monoéster (óptimo alcalino).

La AP es una enzima ampliamente específica, también cataliza las transfosforilaciones. En humanos y otros mamíferos se conocen por lo menos cuatro AP distintos pero relacionados. Ellos son AP intestinal, placentario, similar a placenta, y de hígado/hueso/riñón (o de tejido no específico). Las tres primeras se ubican juntas en el cromosoma 2 mientras que la forma no específica del tejido se ubica en el cromosoma 1. Las funciones fisiológicas exactas de la AP no se conocen, pero la AP parece estar implicada en un gran número de procesos fisiológicos.

Una fuente de AP para uso en la invención puede ser enzima AP comercial, o cualquier composición que comprende la enzima AP y cualesquier medios capaces de producir enzima AP funcional en el contexto de la presente invención, tal como ácidos nucleicos ADN o ARN que codifican una proteína AP. El ácido nucleico que codifica AP puede ser incorporados en vectores adecuados, tales como plásmidos, fagémidos, fagos, (retro) virus, transposones, vectores de terapia génica y otros vectores capaces de inducir o conferir producción de AP. También microorganismos naturales o recombinantes, tales como bacterias, hongos, protozoos y levadura se pueden aplicar como una fuente de AP en el contexto de la presente invención.

Las composiciones que contiene AP para uso de acuerdo con la presente invención comprenden preferiblemente una AP eucariótico, más preferiblemente una AP de mamíferos, que puede ser de los tipos de tejido AP no específicos, tal como del tipo riñón, hígado o hueso, o tejido específico, tal como AP placentario, AP intestinal y AP similar a placenta. Este último, también conocido como AP de estirpe celular, se localiza en los testículos, timo y determinados tumores de células germinales (1), y está estrechamente relacionado con las formas de (2) placentarias e intestinales. El experto es muy capaz de buscar colecciones de ácido nucleico y seleccionar una secuencia que codifique AP. Más preferiblemente el mamífero es una AP humano o una AP de bovina. Por lo tanto, preferiblemente, se divulga aquí el uso de AP en la fabricación de un medicamento para mejorar la función renal reducida, en el que dicha AP es AP de mamíferos e incluso más preferiblemente en el que dicha AP es AP humano. Ejemplos no limitantes de una secuencia de AP humana se pueden encontrar en la colección NCBI (Genpept) e incluyen: NP_001622 (AP intestinal), NP_001623 (AP placentario), NP_112603 (AP similar a placenta) o NP_000469 (AP no específico de tejido). La invención también comprende el uso de polimorfismos de cualquiera de dichas secuencias. En aún otra realización preferida, dicha AP es AP placentaria, AP similar a placenta, AP intestinal o AP de hígado/hueso/riñón.

En aún otra realización preferida, se proporcionan métodos y usos de acuerdo con la invención en el que la AP es AP recombinante.

Desde un punto de vista conformacional, rigurosamente la AP consiste de dos dominios: un dominio de corona y un dominio de sitio activo. El dominio de sitio activo se puede dividir en partes separadas similares al residuo catalítico y los tres sitios de iones de metal (Zn₁, Zn₂ y Mg₃). Desde un punto de vista la estructura primaria es claro que el dominio de corona se flanquea por los aminoácidos que forman el dominio de sitio activo. La secuencia de aminoácidos de AP y las posiciones relativas del dominio de corona y catalítico son conocidos por el experto. Como un ejemplo, se hace referencia a la figura 20 que muestra, entre otras cosas, la secuencia de aminoácido de las cuatro AP humanas. El dominio de corona se subraya en estas secuencias.

Las AP están presentes en virtualmente todos los organismos, desde bacterias hasta humanos. Se prefiere que una AP para uso en la invención sea una AP aislada o recombinante que comprende un dominio de corona y un dominio catalítico, en el que dicho dominio de corona y dicho dominio catalítico se obtienen de diferentes AP y en el que por lo menos una de dichas fosfatasas diferentes es una fosfatasa humana. Las otras fosfatasas, son por ejemplo ECAP (AP *Escherichia coli*) o una de las siete BIAP (AP Intestinal de bovino) conocidas. Preferiblemente, se utiliza una AP recombinante o aislada que comprende un dominio de corona y un dominio catalítico, en el que dicho dominio de corona

5 y dicho dominio catalítico se obtienen de diferentes AP y en el que las diferentes AP son AP humanas. Esto es especialmente útil si la fosfatasa modificada se utiliza posteriormente en terapia humana. Se espera que dichas AP modificadas (genéticamente) de origen humano no sean inmunogénicas o sean poco inmunogénicas. Sin embargo, es claro para el experto que si una AP modificada se utiliza por ejemplo "in vitro" o "ex vivo" de una fosfatasa modificada podrá estar bien compuesto de, por ejemplo, una AP humana y de E. coli o puede estar compuesto de una AP de bovina y una AP E. coli.

10 Una AP para uso en la invención es preferiblemente una AP aislada o recombinante que comprende un dominio de corona y un dominio catalítico, en el que dicho dominio de corona y dicho dominio catalítico se obtienen de diferentes AP y en el que dicho dominio de corona es el dominio de corona de la AP placentaria (ALPP) y en el que dicho dominio catalítico es el dominio catalítico de la AP intestinal (ALPI). Preferiblemente, por lo menos una de dichas fosfatasas diferentes es una fosfatasa humana y en una realización más preferida, ambas fosfatasas diferentes son fosfatasas humanas.

Otros dominios de mutantes de intercambio preferidos adecuados para uso de acuerdo con la presente invención se basan en las AP humanas y se enumeran en la Tabla 1.

15 Tabla 1. Dominios de enzimas de fosfatasa alcalina intercambiados

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

Por motivo de claridad, el ALPI es AP intestinal, ALPP es AP placentario, GCAP es AP similar a placenta y TNAP es tejido AP no específico.

20 Es claro que también se pueden preparar las combinaciones entre el dominio catalítico de ECAP para cualquiera de las formas humanas (ALPI, ALPP, GCAP o TNAP) con el dominio corona de BIAP. Más aún, también se pueden producir las combinaciones de los dominios de corona del BIAP con el dominio catalítico del ECAP o cualquiera de las formas humanas.

25 Otra clase de fosfatasas modificadas útiles son fosfatasas que bajo condiciones naturales se ligan a la membrana de una célula a través de un anclaje glucosilfosfatidilinositol (GPI), pero que se modifican ahora de tal manera que no se unen más a la membrana de una célula. Ejemplos de fosfatasas que son GPI ancladas son AP y nucleotidasa 5'. Todas las isoenzimas son funcionalmente activas en la membrana celular y las formas deficientes de GPI anclado no están naturalmente presentes en niveles detectables. Aunque se ha demostrado actividad fosfatasa de alcalina de suero es generalmente aceptado que la enzima aún esté presente en vesículas de membrana o fracciones de membrana desprendidas. La actividad en la leche también está presente en fracciones que contienen vesículas de membrana. El anclaje GPI se almacena como una molécula precursora en la célula en donde se une al sitio de unión a través de una transamidasa. La estructura del anclaje GPI es idéntica en mamíferos, pero se conocen modificaciones dependientes del tipo celular.

30 Para uso farmacéutico de la AP en sujetos humanos se prefiere para la mayoría de aplicaciones aplicar formas humanas de la enzima para uso en medicamentos y tratamiento, ya que las formas de AP obtenidas a partir de otras especies pueden ser inmunogénica en sujetos humanos y el tratamiento puede provocar reacciones inmunológicas y efectos colaterales patológicos. En algunos sujetos incluso efectos secundarios letales, es decir, puede ocurrir choque anafiláctico y riesgo de efectos secundarios inmunológicos, por lo tanto, se prefiere minimizar el uso de formas AP humanas. Como el aislamiento del AP de humanos prácticamente no es factible, las formas recombinantes humanas de las proteínas AP se pueden producir en forma rutinaria en diferentes plataformas de expresión recombinantes. Sin

embargo, la expresión y purificación de GPI modificado y proteínas de membrana anclada es notoriamente difícil; las proteínas GPI son difíciles de separar de las membranas y difíciles de aislar y purificar. Por lo tanto, se prefiere utilizar una AP aislada o recombinante que comprende una modificación en la secuencia de señal glucosilfosfatidilinositol (GPI), en el que dicha modificación resulta en una fosfatasa secretada, es decir, la fosfatasa no se une a la membrana celular.

- 5 Preferiblemente, se utiliza dicha fosfatasa recombinante o aislada que comprende una modificación en la secuencia de señal glucosilfosfatidilinositol (GPI), en el que dicha modificación resulta en una fosfatasa secretada que es biológicamente activa, es decir muestra actividad hacia un sustrato biológico (relevante).

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

- 10 1. Estiramiento hidrófobo de aminoácidos en el terminal C (por lo menos 11 aminoácidos, pero preferiblemente más de 11 aminoácidos)
2. Dirección 5' de la región hidrófoba, un separador de aminoácidos hidrófilos (5-12 aminoácidos)
3. El GPI se une a un aminoácido pequeño: glicina, ácido aspártico, asparagina, alanina, serina o cisteína.
4. Los 2 aminoácidos posteriores en dirección 3' del sitio de unión GPI deben ser aminoácidos pequeños y en la mayoría de casos se seleccionan de glicina, ácido aspártico, asparagina, alanina, serina o cisteína.

- 15 Basado en este consenso, el experto es capaz de mutar este consenso, por ejemplo al insertar uno o múltiples aminoácidos e interrumpir parte del consenso. Sin embargo, en una realización preferida, se utiliza una fosfatasa aislada o recombinante que comprende una modificación en la secuencia de señal glucosilfosfatidilinositol (GPI), en el que dicha modificación resulta en una fosfatasa secretada y en el que dicha modificación comprende una mutación o una eliminación de la secuencia de aminoácidos que abarca la secuencia de señal GPI consenso.

- 20 Para aplicaciones en terapia humana se desea que la fosfatasa modificada resultante no sea inmunogénica o sea poco inmunogénica, es decir, que la fosfatasa modificada sea esencialmente de origen humano. En una realización preferida, se proporciona un uso de acuerdo con la invención, en la que la AP es una fosfatasa recombinante o aislada que comprende una modificación en la secuencia de señal glucosilfosfatidilinositol (GPI), en el que dicha modificación resulta en una fosfatasa secretada (preferiblemente con actividad contra un sustrato relevante biológico) y en el que dicha fosfatasa es una fosfatasa humana.

- 25 Ejemplos de fosfatasas que son GPI ancladas son AP y 5' nucleotidasa y por lo tanto en una realización preferida, se utiliza una fosfatasa aislada o recombinante, que comprende una modificación en la secuencia de señal de glucosilfosfatidilinositol (GPI), en el que dicha modificación resulta en una fosfatasa secretada y en el que dicha fosfatasa es una AP, por ejemplo, una AP humana, tal como por ejemplo una fosfatasa hígado-riñón-hueso, AP intestinal humana, o fosfatasa de alcalina similar a placenta humana.

- 30 Es claro que cualquiera de las fosfatasas modificadas secretables descritas se puede producir por ejemplo al introducir en una célula huésped un ácido nucleico capaz de codificar dicha fosfatasa secretable, preferiblemente en conexión operable con secuencias reguladoras, y permitir que dicha célula anfitriona exprese dicha fosfatasa secretable y opcionalmente aislé la fosfatasa producida del medio en que crece y/o se mantiene la célula anfitriona. Sin embargo, aparte de las mutaciones en la secuencia de unión GPI mencionado anteriormente, existen otros métodos que hacen proteínas secretadas, GPI-menos anclables:

- 35 1. Después de expresión como proteínas de membrana anclada, se pueden utilizar fosfolipasas para dividir el anclaje GPI.
- 40 2. Interferencia con la producción de andaje GPI o uso de células (tipo) que es deficiente en la producción de anclaje GPI también se puede utilizar para realizar una forma secretable de una proteína GPI anclada de otra forma. Ejemplos de estirpes celulares que se han elaborado para que sean deficientes en bioquímica de andaje GPI son por ejemplo, Jurkat, AM-B, C84, BW, S49, CHO y Raji.
- 45 3. Se puede utilizar interferencia con o el uso de células deficientes en transamidasa para inhibir la unión de un anclaje GPI a la proteína, haciendo que a la proteína menos anclable y secretable. Dicha célula deficiente se ha obtenido a través de mutagénesis en CHO.

- 50 Está claro para el experto que una fosfatasa modificada que comprende un dominio de corona y un dominio catalítico, en el que dicho dominio de corona y dicho dominio catalítico se obtienen de diferentes APs adicionalmente se puede modificar y hacer secretable. Por lo tanto, en una realización preferida, se utiliza una AP que es una fosfatasa aislada o recombinante que comprende una modificación en la secuencia de señal de glucosilfosfatidilinositol (GPI), en la que dicha modificación resulta en una fosfatasa secretada y en la que dicha fosfatasa recombinante comprende adicionalmente un dominio de corona y un dominio catalítico que se obtienen de diferentes fosfatasas. Ejemplos no limitantes de dichos mutantes de fosfatasa (alcalinas) se proporcionan en la Figura 20. Dicho mutante combinado o "doble" resulta por ejemplo en una fosfatasa modificada con una determinada actividad específica, estabilidad o especificidad de sustrato y al mismo tiempo la producción de dicho producto es mucho mayor por el hecho de que se

puede aislar a partir del medio que rodea a las células productoras. Dicha fosfatasa alcalina mutante o quimérica recombinante se ha descrito ampliamente en la solicitud de patente internacional publicada WO 08/133511.

La AP se puede administrarse por diferentes rutas, por ejemplo por vía intravenosa, rectal, bronquial u oral.

5 En una realización preferida, la ruta de administración utilizada es por vía intravenosa. Es evidente para el experto, que preferiblemente se suministra una cantidad efectiva de AP. Como punto de partida se puede utilizar 10 a 500 U/kg/día. Si se utiliza la ruta de administración intravenosa, la AP (por lo menos para una cierta cantidad de tiempo) se aplica preferiblemente a través de infusión continua.

La invención se explicará con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

Descripción de las figuras

10 Figura 1: Requisito (ITT) de Terapia de Reemplazo Renal (diálisis)

Figura 2: Duración de Terapia de Reemplazo Renal (ITT; medios/EEM); p: prueba t

Figura 3: Media de Duración Relativa de la Terapia de Reemplazo Renal (horas; ITT; media/EEM); t: prueba t; [(duración acumulada de RRT)/(tiempo (d) en el estudio)/*100%]

Figura 4: Análisis de Regresión de Depuración de creatinina 0 a 7 días; (AP versus placebo; FAS; media/EEM)

15 Figura 5: Progresión de Depuración de creatinina (FAS; media/EEM)

Figura 6: Progresión de Depuración de creatinina Ajustada a Valores Perdidos (FAS; media/EEM)

Figura 7: Duración de la Estancia en UCI (subgrupo A; ITT; media/EEM)

Figura 8: Requerimiento de Ventilación Mecánica (ITT; media/EEM)

Figura 9: Cambios en Clasificación SOFA (ITT; media/EEM)

20 Figura 10: Análisis del biomarcador KIM-1 en los pacientes durante las primeras 48 horas de tratamiento. El gráfico representa la concentración media (en ng/ml) en la orina de pacientes (A) y la concentración media (en ng/mg de creatinina) en la orina de pacientes que requerían RRT (B). Los diamantes denotan el grupo de tratamiento con AP, los triángulos denotan el grupo placebo.

25 Figura 11: Análisis del biomarcador IL-18 en pacientes durante las primeras 48 horas de tratamiento. El gráfico representa la concentración media (en pg/ml) en la orina de pacientes (A) y la concentración media (en pg/ml) en la orina de pacientes que requerían RRT (B). Los diamantes denotan grupo de tratamiento con AP, los triángulos denotan grupo placebo.

30 Figura 12: Análisis del biomarcador KIM-1 en pacientes durante las primeras 168 horas después del inicio del tratamiento. El gráfico representa la concentración media (en ng/ml) en la orina de pacientes (A) y la concentración media (en ng/ml) en pacientes que requerían RRT (B). Los diamantes denotan el grupo de tratamiento con AP, los triángulos denotan el grupo placebo.

35 Figura 13: Análisis del biomarcador de IL-18 en pacientes durante las primeras 168 horas después del inicio del tratamiento. El gráfico representa la concentración media (en pg/ml) en orina de pacientes (A) y la concentración media (en pg/ml) en pacientes que requerían RRT (B). Los diamantes denotan el grupo de tratamiento con AP, los triángulos denotan el grupo placebo.

Figura 14: Análisis del biomarcador CRP en pacientes durante las primeras 168 horas después del inicio del tratamiento. El gráfico representa la concentración media (en mg/dl) en la sangre de los pacientes (A) y la concentración media (en mg/dl) en pacientes que requerían RRT (B). Los diamantes denotan el grupo de tratamiento con AP, los triángulos denotan el grupo placebo.

40 Figura 15: Análisis del biomarcador LBP en los pacientes durante las primeras 168 horas después del inicio del tratamiento. El gráfico representa la concentración media en sangre de los pacientes. Los diamantes denotan el grupo de tratamiento con AP, los triángulos denotan el grupo Placebo

45 Figura 16: Análisis del biomarcador NGAL en los pacientes durante las primeras 144 horas después del inicio del tratamiento. El gráfico representa la concentración media normalizada, creatinina en la orina de los pacientes. Los diamantes denotan el grupo de tratamiento con AP, los triángulos denotan el grupo Placebo

Figura 17: Análisis del biomarcador IL-6 en pacientes durante las primeras 168 horas después del inicio del tratamiento. El gráfico representa la concentración media en sangre de los pacientes. Los diamantes denotan el grupo de tratamiento con AP, los triángulos denotan el grupo Placebo

Figura 18: Análisis del biomarcador GST alfa en los pacientes durante las primeras 144 horas después del inicio del tratamiento. El gráfico representa la concentración media normalizada de creatinina en la orina de los pacientes. Los diamantes denotan el grupo de tratamiento con AP, los triángulos denotan el grupo Placebo

5 Figura 19: Análisis del biomarcador GST pi en los pacientes durante las primeras 144 horas después del inicio del tratamiento. El gráfico representa la concentración media normalizada de creatinina en la orina de los pacientes. Los diamantes denotan el grupo de tratamiento con AP, los triángulos denotan el grupo Placebo

Figura 20: Secuencias de enzimas de fosfatasa alcalina en humanos. Se representan las secuencias de las proteínas maduras (es decir, sin secuencia de señal), pero antes de la adición del andaje GPI y procesamiento concomitante de los aminoácidos de terminal C con excepción de las AP quiméricas.

10 Ejemplos

Materiales y métodos

Ejemplo 1 - Efecto de la AP sobre la función renal en pacientes con septicemia

Pacientes

15 Un total de 36 pacientes fueron asignados al azar y se inscribieron en seis centros en Bélgica y los Países Bajos. La inscripción a través de los centros varió entre 1 a 13 pacientes. Los parámetros demográficos y de gravedad de la enfermedad en los valores iniciales no sugirieron diferencias relevantes o significativas entre los grupos de tratamiento, tal como se resume en la Tabla 2.

Tabla 2: Comparación de línea base entre grupos

Parámetro al inicio del estudio	AP (n = 16)	Placebo (n = 19)
Hombre: n (%)	13 (81)	14 (74)
Edad: media de años (DE)	65 (12)	67 (15)
Altura: media de cm (DE)	176 (10)	174 (8)
Peso: media de kg (DE)	86 (12)	80 (14)
Frecuencia cardíaca: media de bpm (DE)	103 (23)	105 (22)
PB sistólica: media de mmHg (DE)	103 (26)	110 (26)
BP diastólica: media de mmHg (DE)	52 (13)	55 (13)
Temperatura: media de °C (DE)	37 (1)	37 (1)
Clasificación APACHE-II: media (DE)	24 (7)	23 (8)
Clasificación SOFA: media (DE)	10 (4)	11 (5)
Creatinina en suero: media de µmol/L (IQR)	172 (126; 198)	173 (115; 268)
Depuración de creatinina: media de mL/min (DE)*	50 (27)	40 (37)
Notas: todos los pacientes eran caucásicos. *: Valores faltantes estimados por la fórmula Cockcroft-Gault.		

20 Intervención

La medicación del estudio fue preparada dentro de 1 hora antes de dosificación. La medicación del estudio fue marcada (según las regulaciones vigentes) por la Farmacia del Hospital.

25 El ingrediente activo fue fosfatasa alcalina intestinal bovina (BIAP), que es una enzima de origen bovino, compuesta de 533 aminoácidos con un peso molecular de 140 kD, y que lleva a cabo reacciones de esterasa sobre sustratos que contienen fosfato en un alto pH óptimo bajo condiciones de ensayo bioquímico in vitro. La AP se suministra como una solución estéril para infusión que contiene la actividad de AP de 13.600U/mL (según se determina utilizando regulador de glicina a 25°C) en un regulador acuoso que contiene Tris-HCl 5 mM, cloruro de magnesio 5 mM, cloruro de zinc 0.1 mM, pH 7.2 a 7.4, con 30-35% (p/v) de glicerol como estabilizador. El placebo correspondiente para uso en ensayos controlados consiste en una solución estéril para infusión que contiene un regulador acuoso que contiene Tris-HCl 5 mM, cloruro de magnesio 5 mM, cloruro de zinc 0.1 mM, pH 7.2-7.4, 30-35% (p/v) de glicerol y agua para inyección (cs).

30

Los pacientes recibieron una inyección intravenosa de AP 67.5 U/kg durante 10 minutos seguido de una infusión continua 132.5 U/kg/24 h durante 48 horas, o placebo, y se hizo seguimiento por 28 días.

5 La AP se suministró como una solución clara a ligeramente opalescente, incolora, estéril, libre de pirógenos en frascos de vidrio tipo I de 10 mL con un tapón de caucho de bromobutilo recubierto de teflón. Cada frasco contenía 1 mL de solución de AP (13.600 unidades).

El placebo correspondiente se suministró como una solución clara, incolora, estéril, libre de pirógenos en frascos de vidrio tipo I con tapón de caucho de bromobutilo recubierto de teflón. Cada frasco de 1 mL de placebo contenía Tris-HCl 5 mM, cloruro de magnesio 5 mM, cloruro de zinc 0.1 mM, pH 7.2-7.4, con 30-35% (p/v) de glicerol como estabilizador y agua para inyección (cs).

10 Toda la medicación de estudio se almacenó en el Hospital Pharmacy en una instalación de almacenamiento con llave bajo condiciones farmacéuticas adecuadas.

Requisitos para Terapia de Reemplazo Renal

15 La RRT (diálisis) es actualmente la principal intervención para la lesión renal aguda (AKI) en la configuración UCI, mientras que la AKI que requiere que la RRT se asocie con un peor pronóstico. Por lo tanto, la necesidad reducida de RRT se definió como un criterio de valoración de eficacia principal para el tratamiento de la AKI en el entorno de septicemia.

20 La elegibilidad (requisito) para RRT se definió estrictamente en el Protocolo por varias razones. En primer lugar, sólo ha surgido recientemente un consenso sobre los criterios para la iniciación RRT, el método sigue siendo diferente en todos los hospitales y entre los médicos en el mismo hospital. Por lo tanto, la EMEA aconseja la adopción de una definición estricta para el requerimiento de RRT, en línea con el Consenso de Diálisis Aguda de Iniciativa de Calidad Internacional (ADQII), que consta de los siguientes criterios (incorporados en el Protocolo):

1. Oliguria: <0.3 mL/kg/h para >6h Y urea en suero >20 mmol/L, O
2. Anuria : >12h Y urea en suero >15 mmol/L, O
3. hipercalemia: >7.5 mmol/L o con cambios en ECG típicos a pesar de intervención terapéutica, O
- 25 4. Acidosis con bicarbonato estándar <15 mmol/L a pesar de intervención terapéutica, O
5. Hiponatremia: <120 mmol/L a pesar de intervención terapéutica, O
6. Diagnóstico clínico de la sobrecarga de líquidos con lo existente o amenazar edema pulmonar o cerebral pesar de la intervención terapéutica.

30 Adicionalmente, las autoridades holandesas (CCMO, IRB Central) mandan que los pacientes que ya están en RRT en la entrada se deban excluir del Protocolo.

Los resultados para requisito RRT (análisis Sí-No) se ilustran en la Figura 1, con los datos numéricos que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Requisito y duración de terapia de reemplazo renal (ITT)

	AP (n = 16)	Placebo (n = 19)
RRT requerido: n	3 (19%)	7 (37%)
RRT no requerido: n	13 (81%)	12 (63%)
p*	0.2853	
Duración media de RRT: horas (DE)	10 (23)	53 (99)
p**	0.0801	
Duración RRT relativa (pacientes que se requieren RRT):% (DE)	12 (4.8)	34 (15.8)
p**	0.0456	
*: Prueba exacta de Fisher; **: Prueba T [(Duración de RRT acumulada)/(Tiempo (d) en el estudio)]* 100%		

Los resultados de la Figura 1 y Tabla 3 demuestran que el grupo de placebo tenía aproximadamente unas 2 veces más necesidad de intervenciones de RRT (37%) que el grupo de AP (19%). La media de duración de RRT mostró una fuerte tendencia ($p=0.0801$; prueba t) a favor del grupo tratado con AP con 10 ± 23 h, con relación a 53 ± 99 h sobre placebo, como se muestra en la Figura 2.

- 5 La duración relativa de RRT para pacientes que requieren diálisis también fue significativamente menor en el grupo de AP ($p=0.0456$), en comparación con placebo (Figura 3).

Depuración de creatinina

10 La depuración de creatinina es probablemente la medida más adecuada de la función renal. Es importante destacar que a diferencia de los niveles séricos de creatinina, la depuración de creatinina tiene un grado mucho menos influenciado por RRT, siendo así un indicador más robusto para la función renal en esta configuración. Los AUC de depuración de creatinina se calcularon utilizando niveles de creatinina en suero y orina, producción de orina y área corporal. Cuando la producción de orina en 24 h no estuvo disponible (en el inicio del estudio), se utilizó la fórmula de Cockcroft-Gault para estimar la depuración. Los valores faltantes fueron imputados de la última extrapolación de la última observación (LOCF) o interpolación lineal.

15 Para permitir la estimación del efecto del tratamiento sobre la depuración de creatinina en el tiempo, se condujo un análisis de regresión para dilucidar una posible relación de cualquier grupo de tratamiento con la dirección del efecto y tiempo. El análisis de regresión de los valores corregidos del inicio del estudio confirmó una diferencia altamente significativa ($p=0.0181$) y el efecto progresivo de AP sobre los niveles de depuración hasta el día 7, en relación con el placebo, como se muestra en la Figura 4.

20 La Figura 5 muestra el progreso de la depuración de creatinina por punto de tiempo a lo largo período de estudio de 28 días. Por lo tanto, el efecto del tratamiento observado sugiere una mejora en la depuración de creatinina en el grupo tratado a niveles normales (~ 100 mL/min), en relación con placebo donde la depuración permanece alterada.

25 En la Figura 5, después del día 14 los datos están influenciados porque hay muy pocos pacientes aún en UCI, particularmente en el grupo de AP ($n=4$), debido a que no se recolecta de forma rutinaria la producción de orina de 24 horas en la UCI. En consecuencia, los medios de la Figura 5 son una subestimación de la muestra completa del paciente debido a la ausencia de pacientes que mejoraron y dejaron la UCI. Una estimación de la depuración se presenta en la Figura 6, con valores faltantes imputados de la última extrapolación de la última observación (LOCF) o interpolación lineal. La depuración de creatinina durante el período de 28 días fue significativamente superior para el grupo tratado con AP en relación con el placebo ($p=0.0199$; ANOVA de medidas repetidas).

30 Por lo tanto, los resultados de los datos de depuración de creatinina confirman que el efecto del tratamiento es superior para el grupo de AP, tanto durante los primeros 7 días como a través de toda la duración del estudio de 28 días.

Creatinina en suero

35 La creatinina en suero se utiliza ampliamente para la evaluación de la función renal en la práctica clínica. Sin embargo, la creatinina en suero no es óptima debido a que es un marcador tardío del daño tisular. La creatinina en suero solo empieza a aumentar después de ya ha ocurrido un daño considerable en las nefronas; por lo tanto, los incrementos relativamente pequeños en los niveles tienen gran influencia sobre los resultados. Adicionalmente, los niveles de creatinina en suero se ven afectados en gran medida por la intervención de la TRR. Por lo tanto, los niveles de creatinina en suero son punteros de la dirección de los resultados, pero no reflejan la función renal en presencia de RRT.

40 De acuerdo con el Protocolo, se tomaron muestras de creatinina en suero en los días de estudio 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21 y 28. Sin embargo, como en las UCI LA creatinina se determina diariamente, todos los valores de creatinina en suero que estaban disponibles se recolectaron y entraron en la base de datos con el fin de conseguir tan completamente como sea posible una representación sobre el período de estudio completo.

45 Debido a la mayor proporción de pacientes en RRT en el grupo de placebo ($n=7$) con respecto al grupo de AP ($n=3$) y la duración más larga de RRT en pacientes con placebo, la magnitud real del efecto RRT no puede estimar de manera confiable, pero se puede suponer con seguridad que los niveles de creatinina observados en placebo son una subestimación, ya que los valores reales serían considerablemente más altos sin intervención de RRT.

50 Las AUC de valores de creatinina en suero se calcularon utilizando los niveles de creatinina en suero según los resultados bioquímicos. Los valores faltantes se imputaron de la última extrapolación de la última observación (LOCF) o interpolación lineal. Las diferencias en las AUC de creatinina en suero para los periodos de 0-7 y 0-28 días, como se muestra en la Tabla 4, no alcanzaron significancia.

Tabla 4: Creatinina en suero de AUC (µmol/L; FAS)

	AP	Placebo	Q1; Q3	
			AP	Placebo
Media (DE) 0-7 días	1099 (510)	1411 (843)	725; 1265	710; 1977
Media (DE) 0-28 días	4091(2623)	4284 (2920)	2298; 4833	2400; 4562
Los valores de AUC menores denotan mejor función renal.				

5 Los resultados anteriores confirman que los niveles de creatinina en suero en el periodo de 28 días en el grupo de AP fueron similares a, aunque ligeramente mejores que el placebo. La diferencia observada es una subestimación debido a la creatinina sustancial que reduce el efecto de la RRT intensa requerida por los pacientes con placebo.

Efectos del tratamiento combinado sobre parámetros de eficacia

Un análisis combinado de todas las variables principales de eficacia se realizó de acuerdo al Plan de Estadística, para evaluar el efecto del tratamiento global sobre la función renal mediante un método aceptado existente cuando se consideran todos los parámetros principales. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

10 Tabla 5: Análisis de las significancias de las variables combinadas (ITT)

Leyenda:

A: Requisito de RRT (0-28d)

B: duración acumulada de RRT (0-28d)

C: duración relativa de RRT (0-28d)

D: regresión lineal de depuración de creatinina (0-7d)

E: creatinina en suero de AUC sin corrección de RRT (0-7d; día 0 como covariable)

Parámetros Combinadas	valor de p *
A+C+D+E	0.005
B+D+E	0.001
A+C+D	0.018
B+D	0.016

*: unilateral

Parámetros de eficacia secundarios

15 Los siguientes parámetros relacionados con severidad clave se examinaron y resumieron: Calificación SOFA, duración de la estancia hospitalaria/UCI, duración de ventilación mecánica y mortalidad. Como se mostró anteriormente, los dos grupos de tratamiento se equilibraron en la entrada (véase Tabla 2). Por lo tanto, las siguientes secciones muestran diferencias en los puntos relevantes durante el estudio, en relación con el inicio del estudio.

Duración de la estancia en cuidados intensivos y en el hospital

20 La duración de la estancia en la UCI fue considerablemente más corta para el grupo de AP en relación con el placebo en todos los análisis y en todos los subgrupos.

La duración de la estancia en la UCI y hospitalaria se registró durante toda la duración de la hospitalización. Ya que las muertes pueden sesgar la duración de la estancia, este parámetro se analizó sin muertes durante el período de estudio

(subgrupo A) e incluyendo muertes (subgrupo B, donde la muerte se consideró estancia máxima, es decir, 28 días). En ambos análisis, los resultados mostraron una clara ventaja para el grupo de AP. La media de la estancia en la UCI fue significativamente más corta en >2 veces para el grupo de AP en el subgrupo A (p=0.0174), mientras que el subgrupo B mostró una tendencia a favor del grupo de AP (p=0.1099). La duración total de la estancia hospitalaria también mostró estancia más larga para el placebo en un 42% con respecto al grupo de AP en el subgrupo A, aunque la diferencia no alcanzó significancia.

El análisis de la duración de la estancia en la UCI confirmó que no se logró hospitalización más corta general a expensas de estancia en UCI más larga, como se muestra en la siguiente Tabla 6 (subgrupos A y B) y en la Figura 7 (subgrupo A).

Tabla 6: Duración de estancia en UCI y el hospital (n=35)

	AP	Placebo
Subgrupo A		
Estancia en UCI (días): media (DE)	10.9 (7.5)	24.5 (17.9)
AP-placebo (95% de CI)	13.6 (-26.6; -0.5)	
p*	0.0174	
Estancia en hospital (días): media (DE)	33.4 (26.4)	47.1 (35.7)
AP-Placebo (95% de CI)	-13.7 (-42.2; 14.8)	
P*	0.3305	
Subgrupo B		
Estancia en UCI (días): media (DE)	13.9 (9.8)	23.6 (17.6)
AP-placebo (95% de CI)	-9.7 (-21.8; 2.4)	
*p	0.1099:	
*: prueba t; A = excluir muertes; B = incluir muertes (contadas como 28 días de estancia)		

Duración de ventilación mecánica

La duración de la ventilación mecánica se registró durante toda la duración del requisito. Normalmente, la ventilación mecánica se lleva a cabo en la UCI, y 13 pacientes de ambos grupos estaban ya en ventilación mecánica al inicio del estudio. Los resultados mostraron una fuerte tendencia para el grupo de AP en relación con el placebo (p=0.094). El requisito de ventilación mecánica se relaciona directamente con la supervivencia. La magnitud de las diferencias representa un requisito mayor del 74% de ventilación mecánica en el placebo, como se muestra en la Tabla 7 y la Figura 8.

Tabla 7: Duración de la ventilación mecánica requerida (ITT)

	AP	Placebo
Duración MV (días): media (DE)	8.0 (8.3)	13.9 (11.3)
AP-Placebo (95% de IC)	-5.9 (-12.8; 1.1)	
p *	0.094	
*: prueba t		

5 SOFA es un sistema de calificación utilizado en ensayos clínicos de septicemia con fallo múltiple de órgano. Por lo tanto, la calificación SOFA refleja la gravedad general de los pacientes en la UCI, relacionada con la insuficiencia de órganos al evaluar seis sistemas de órganos, con lo que cada uno contribuye un máximo de 4 puntos; por lo tanto, la calificación total máxima es de 24 puntos, los puntos más altos indican una peor condición. La calificación SOFA se relaciona directamente con la supervivencia. Un descenso de la calificación SOFA en 2 puntos se considera clínicamente significativo. La media de calificación SOFA del estudio inicial fue de 10.4 (DE = 3.6) y 10.6 (DE = 5.3) en los grupos activo y placebo, respectivamente, y los elementos de calificación se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: elementos del sistema de calificación SOFA

Sistema respiratorio PaO2/FiO2 (mmHg)	Calificación	Hígado: de bilirubina (mg/dL)	Calificación
>400	0	<1.2	0
<400	1	1.2-1.9	1
<300	2	2.0-5.9	2
<200 y ventilados mecánicamente	3	6.0-11.9	3
<100 y ventilados mecánicamente	4	>12.0	4
Sistema Nervioso central: Escala de Glasgow Coma		Coagulación: plaquetas x 10 ³ /μL	
15	0	>150	0
13-14	1	<150	1
10-12	2	<100	2
6-9	3	<50	3
<6	4	<20	4
Sistema cardiovascular (presión arterial media/ administración de vasopresores requeridos)		Sistema renal: creatinina (mg/dL) (o producción de orina)	
Sin hipotensión	0	<1.2	0
MAP <70 mmHg	1	1.2-1.9	1
Dopamina ≤5 o dobutamina (cualquier dosis)	2	2.0-3.4	2
Dopamina >5 o epinefrina/noradrenalina ≤0.1	3	3.5-4.9 (o <500 mL/d)	3
Dopamina >15 o epinefrina/norepinefrina >0.1	4	>5.0 (o <200 mL/d)	4

10 Las calificaciones de SOFA se registraron hasta el día 28. Los datos más allá del día 7 son menos confiables cuando los números de los pacientes son pequeños, en particular en el grupo de AP, debido a la descarga temprana de la UCI. Aunque el tamaño de la muestra no fue diseñado para detectar diferencias de tratamiento en las calificaciones SOFA, el grupo de AP tenía aproximadamente un 30% más mejoría que el placebo en el día 7, como se ilustra en la Figura 9.

Mortalidad

15 Toda la mortalidad provocada en el día 28 fue relativamente baja (n=12; 33%), sin diferencias significativas entre los grupos de tratamiento. En total, hubo siete muertes en AP y cinco en placebo (Tabla 9). Las causas de las muertes fueron atribuidas a la afección subyacente en todos los casos.

Tabla 9: Estado de mortalidad

Grupo SAF	AP (n=16)	Placebo (n=20)
Muertes	7	5
p*	p = 0.2532	

Grupo PP	AP (n=14)	Placebo (n=18)
Muertes	5	3
p*	p = 0.2653	
* rango logarítmico		

Todos los informes de muerte fueron revisados por el DSMB independiente y no plantearon problemas de seguridad.

Eventos adversos

La incidencia y el tipo de eventos adversos (AE) fueron los esperados para una población con septicemia e insuficiencia renal. En el punto de bloqueo de base de datos final, la incidencia de eventos general fue similar en los dos grupos de tratamiento (AP: 94%; placebo: 100%). Los eventos adversos graves reflejan la gravedad de la enfermedad.

10 Todos los datos de seguridad se revisaron por el DSMC independiente que notaron que si bien su cometido no incluía estrictamente consideraciones de eficacia, no obstante, se observaron tendencias favorables en las pruebas de laboratorio para pacientes tratados con AP, particularmente en términos de los parámetros renales. El DSCM concluyó que la AP tiene un perfil de seguridad favorable en los pacientes gravemente enfermos estudiados y tiene un equilibrio potencial de riesgo: beneficio en este grupo.

15 Un resumen de los AE y SAE reportados se presentan en la Tabla 10 adelante.

Tabla 10: Resumen de los EA y reacciones adversas graves (SAF)

		AP	Placebo
TODOS EA	n (%)	130 (100)	154(100)
AE emergentes de tratamiento	n (%)	124 (95)	147 (96)
Pacientes con AE emergentes de tratamiento	n (%)	15 (94)	20 (100)
AE emergentes de tratamiento no grave *:			
Fibrilación auricular		3	6
Diarrea		6	3
Hipotensión		2	7
Delirio		2	5
Úlcera de decúbito		1	4
Dolor abdominal		3	2
Pirexia		1	4
Deterioro de vaciado gástrico		3	2
Traqueotomía		1	3
Estreñimiento		1	3
Inquietud		2	2
aleteo auricular		1	3
Taquicardia	n	.	3
Hipertensión		2	1
Edema periférico		2	1
Neumotórax		.	3
Dolor		1	2
Estado de confusión		1	2
Hipocalcemia		3	.

ES 2 618 794 T3

		AP	Placebo
TODOS EA	n (%)	130 (100)	154(100)
AE emergentes de tratamiento	n (%)	124 (95)	147 (96)
Pacientes con AE emergentes de tratamiento	n (%)	15 (94)	20 (100)
Agitación		1	2
Insomnio		1	2
Hemoglobina reducida		2	1
Saturación de oxígeno reducida		3	.
Herpes simple		1	1
Acidosis metabólica		1	1
Hematoma		1	1
Falla de destete		.	2
Hemorragia posterior a procedimiento		1	1
Erupción		1	1
Hiperglucemia		1	1
Fósforo en sangre		2	.
Vómito reducido		1	1
Dolor de espalda		2	.
Taquipnea		.	2
Todos los AE emergentes de tratamiento grave			
Choque séptico		2	2
Insuficiencia respiratoria		3	1
Necrosis gastrointestinal		2	.
Hipotensión		.	2
Muerte		2	.
Necrosis hepática	n	1	.
Necrosis de vesícula biliar		1	.
Desequilibrio electrolítico		1	.
Azotemia		1	.
Paro cardíaco		.	1
Bradicardia		.	1
Electrocardiograma QT prolongado		.	1
Reducción de calcio en sangre		.	1
Coma		.	1
Hiperlactacidemia		.	1

ES 2 618 794 T3

		AP	Placebo
TODOS EA	n (%)	130 (100)	154(100)
AE emergentes de tratamiento	n (%)	124 (95)	147 (96)
Pacientes con AE emergentes de tratamiento	n (%)	15 (94)	20 (100)
Disminución del nivel de conciencia		.	1
Osteomielitis		1	.
Neoplasia cerebral		.	1
Insuficiencia renal		.	1
Cese de terapia		1	.
Ecocardiograma anormal		1	.
*: Incluye >1 evento reportado en cualquiera los grupos de tratamiento			
Revisión de los datos de seguridad por el DSMB independiente no plantea un problema de seguridad real.			

Medicación concomitante

MEDICACIÓN CONCOMITANTE: FÁRMACOS CARDIOVASCULARES POR CÓDIGO ATC	Grupo de tratamiento	
	Placebo	AP
	n	n
AGENTES ADRENÉRGICOS Y DOPAMINÉRGICOS	132	102
ANTIARRÍTMICOS, CLASE III	41	20
AGENTES BETA BLOQUEANTES, SELECTIVOS	32	20
GLUCÓSIDOS DIGITALÍCOS	23	5
INHIBIDORES DE ACE, SIMPLES	13	9
ANTIARRÍTMICOS, CLASE IB	9	6
ANTAGONISTAS DE VITAMINA K	9	3
DERIVADOS DE DIHIDROPIRIDINA	7	4
AGONISTAS BETA-2 DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS SELECTIVOS	8	2
ACTH	4	4
SIMPATICOMIMÉTICOS, SIMPLE	4	4
FÁRMACOS PARA TRATAMIENTO DE HIPERCALEMIA	2	3
AGENTES DE BLOQUEO BETA, NO SELECTIVOS	.	4
VASOPRESINA Y ANÁLOGOS	.	4
ANTAGONISTAS DE ANGIOTENSINA II, SIMPLES	1	2
THIAZIDAS, SIMPLES	2	1

MEDICACIÓN CONCOMITANTE: FÁRMACOS CARDIOVASCULARES POR CÓDIGO ATC	Grupo de tratamiento	
	Placebo	AP
	n	n
OTROS VASODILATADORES UTILIZADOS EN ENFERMEDADES CARDÍACAS	.	3
AGENTES DE BLOQUEO ALFA-ADRENÉRGICOS	.	2
CANAL DE BLOQUEO DE CALCIO DEL ANTAGONISTA DE ANGIOTENSINA II	.	2
AGENTES ALFA Y BETA-BLOQUEANTES	.	2
OTROS VASODILATADORES PERIFÉRICOS	.	1
ANTIARRÍTMICOS, CLASE IC	.	1
ANTAGONISTAS Y DIURÉTICOS DE ANGIOTENSINA II	.	1
OTRAS PREPARACIONES CARDÍACAS	.	1
Todos	288	205

MEDICAMENTOS CONCOMITANTES: FÁRMACOS CV CON ACCIONES VASOPRESORAS O VASODILATADORAS POR CÓDIGO ATC	Grupo de Tratamiento	
	Placebo	AP
	n	n
AGENTES ADRENÉRGICOS Y DOPAMINÉRGICOS	132	102
AGENTES BETA BLOQUEANTES, SELECTIVOS	32	20
GLUCÓSIDOS DIGITÁLICOS	23	5
INHIBIDORES DE ACE, SIMPLES	13	9
ANTAGONISTAS DE VITAMINA K	9	3
ACTH	4	4
SIMPATICOMIMÉTICOS, SIMPLES	4	4
FÁRMACOS PARA TRATAMIENTO DE HIPERCALEMIA	2	3
VASOPRESINA Y ANÁLOGOS	.	4
ANTAGONISTAS DE ANGIOTENSINA II, PLANAS	1	2
TIAZIDAS, PLANAS	2	1
OTROS VASODILATADORES UTILIZADOS EN ENFERMEDADES CARDÍACAS	.	3
AGENTES DE BLOQUEO ALFA-ADRENÉRGICOS	.	2
CANAL DE BLOQUEO DE CALCIO DEL ANTAGONISTA DE ANGIOTENSINA II	.	2
AGENTES ALFA Y BETA-BLOQUEANTES	.	2
OTROS VASODILATADORES PERIFÉRICOS	.	1
ANTAGONISTAS Y DIURÉTICOS DE ANGIOTENSINA II	.	1

MEDICAMENTOS CONCOMITANTES: FÁRMACOS CV CON ACCIONES VASOPRESORAS O VASODILATADORAS POR CÓDIGO ATC	Grupo de Tratamiento	
	Placebo	AP
	n	n
Todos	222	168

Biomarcadores y muestreo

Para investigar el efecto de la AP sobre los parámetros inflamatorios en pacientes con septicemia con insuficiencia renal se analizaron los siguientes biomarcadores:

5 Orina

- Molécula-1 de Lesión de riñón (KIM- 1), aumento de expresión en túbulo proximal
- interleuquina-18 (IL-18)
- lipocalina-2/lipocalina asociada con gelatinasa neutrófila (NGAL)

10 Nota: Los ensayos para α - o π -glutatión S-transferasa (α -GST o π -GST) esperan validación y resultados de los análisis estarán disponible en breve.

Sangre

- Proteína de unión a lipopolisacárido (LBP)
- Proteína C reactiva (CRP)
- Interleuquina-6 (IL-6)

15 Muestreo

Se recolectaron muestras a intervalos regulares (Tablas 11-13) y se congelaron inmediatamente:

Tabla 11. Programación de muestreo de biomarcadores urinarios

Puntos de tiempo de muestra	Tiempo acumulado (h)
Día 1, t = 0, 3, 6, 12,18	0, 3, 6, 12, 18
Día 2, t = 0, 6, 12, 18	24 , 30, 36, 42
Día 3, t = 0, 12	48, 60
Día 4, t = 0, 12	72, 84
Día 5, t = 0, 12	96, 108
Día 6, t = 0, 12	120, 132
Día 7, t = 0, 12	144, 156
Día 8, t = 0, 12	168, 180
Día 14, t = 0, 12	336, 348
Día 21, t = 0, 12	504, 516
Día 28, t = 0 , 12	672, 684

Tabla 12. Programación de muestreo de biomarcadores sanguíneos (LBP, IL-6)

Puntos de tiempo de muestra	Tiempo acumulado (h)
Día 1, t = 0, 12	0, 12
Día 2, t = 0, 12	24, 36
Día 3, t = 0, 12	48, 60
Día 4, t = 0	72
Día 5, t = 0	96
Día 6, t = 0	120
Día 7, t = 0	144
Día 8, t = 0	168

Tabla 13. Programación de muestreo de biomarcadores en sangre (CRP)

Puntos de tiempo de muestra	Tiempo acumulado (h)
Día 1, t = 0	0
Día 2, t = 0	24
Día 3, t = 0	48
Día 4, t = 0	72
Día 5, t = 0	96
día 6, t = 0	120
día 7, t = 0	144
día 8, t = 0	168
día 14, t = 0	336
día 21, t = 0	504
día 28, t = 0	672

5 Análisis de biomarcadores

NGAL

La lipocalina asociada con gelatinasa neutrófila (NGAL) se determinó por medio de ELISA. Se obtuvieron anticuerpo de captura y anticuerpo de detección de R&D systems (Abingdon, Reino Unido). El anticuerpo de captura se diluyó en regulador de carbonato de sodio pH 9.6 y se pipeteó en placas de microtitulación de 96 pozos Nunc Maxisorp. Después de incubación durante 12 horas a 4°C las placas se lavaron tres veces con PBS 50 mM, pH 7.4 que contiene 0.1% de Tween-20 (ELx50 BioTek Instruments, Winooski, VT, EE.UU.). Las muestras de orina se diluyeron 10, 100, o 1000 veces en 0.1% de BSA en PBS. Las curvas de estándar fueron hechas de NGAL purificada, variando de 20 a 0 ng/ml. Las muestras y los estándares se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). Después de lavar tres veces, el anticuerpo de detección, se diluyó en 1% de BSA en PBS, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar se agregó 100 µl de estreptavidina-HRP en 1% de BSA en PBS y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó de nuevo y luego se agregó 100 µl de solución de sustrato, regulador de citrato-fosfato pH 5 + 0.05% de O-fenilendiamina (OPD) + 0.03% de H₂O₂ y la formación de color se detuvo después de 15 minutos a temperatura ambiente al agregar H₂SO₄ 0.5 M. La placa se leyó a 490 nm en un lector de placa Biotek (Powerwave 200, (BioTek Instruments, Winooski, VT, EE.UU.)

20 Kim-1

El marcador 1 de lesión renal (Kim-1) se determinó por medio de ELISA. Se obtuvieron anticuerpo de captura y anticuerpo de detección de R&D systems. El anticuerpo de captura se diluyó en regulador de carbonato de sodio pH 9.6 y se pipeteó en placas de microtitulación 96 pozos Nunc Maxisorp. Después de incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, las placas se lavaron tres veces con PBS 50 mM, pH 7.4 que contiene 0.1% de Tween-20 (ELx50, BioTek Instruments, Winooski, VT, EE.UU.). Las muestras de orina se diluyeron 2 veces en 0.1% de BSA en PBS. Las curvas estándar se hicieron de KIM-1 purificado, variando de 8 a 0 ng/ml. Las muestras y los estándares se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). Después de lavar tres veces, se agregó el anticuerpo de detección, diluido en 1% de BSA en PBS, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavado se agregó 100 µl de estreptavidina-HRP en 1% de BSA en PBS y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó de nuevo y luego se agregó 100 µl de solución de sustrato, regulador de citrato-fosfato de pH 5 + 0.05% de O-fenilendiamina (OPD) + 0.03% de H₂O₂ y la formación de color se detuvo después de 15 minutos a temperatura ambiente al agregar H₂SO₄ 0.5 M. La placa se leyó a 490 nm en un lector de placas Biotek (Powerwave 200, Instrumentos BioTek, Winooski, VT, EE.UU.)

GST-pi

La glutatión S-transferasa (GST)-PI se determinó por medio de EIA. Placas de Polysorp-NUNC se recubrieron con GST-pi purificada (0.33 µg/ml, Abnova, Taipei City Taiwán) en cada pozo 100 µl de regulador de carbonato de sodio pH 9.6 durante 16 horas a 4°C. Las muestras de orina sin diluir (60 µl) y anticuerpo GST-pi anti-humano (Imundiagnostik, Bensheim, Alemania, AK3105) en 1% de BSA-PBS (60 ml) también se incubaron durante 12 horas a 4°C en placas de fondo redondo Greiner separadas. Las curvas estándar se hicieron de GST-pi purificada, variando desde 82 hasta 0 ng/ml. Después de 12 horas la placa de Polysorp se lavó tres veces y 100 µl de la mezcla de muestra/anticuerpo se pipeteó en la placa de Polysorp. Después de lavado se agregó 100 µl de estreptavidina-HRP en 1% de BSA en PBS y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó de nuevo y después se agregó 100 µl de solución de sustrato, regulador de citrato-fosfato pH 5 + 0.05% de O-fenilendiamina (OPD) + 0.03% de H₂O₂ y la formación de color se detuvo después de 15 minutos a temperatura ambiente al agregar H₂SO₄ 0.5 M. La placa se leyó a 490 nm en un lector de placas Biotek (Powerwave 200, Instrumentos BioTek, Winooski, VT, EE.UU.).

GST alfa

La glutatión S-transferasa (GST)-alfa se determinó por medio de EIA. Placas Maxisorp-NUNC se recubrieron con GST-alfa purificada (0.9 µg/ml, Abnova, Taipei City Taiwán) en cada pozo 100 µl de regulador de carbonato de sodio pH 9.6 durante 16 horas a 4°C. Las muestras de orina sin diluir (60 µl) y anticuerpo GST-alfa anti-humano (Abnova) en 1% BSA-PBS (60 µl) se mezclaron en placas Greiner de fondo redondo separadas. Después de 16 horas se lavó la placa Maxisorp tres veces y 100 µl de la mezcla de muestra/anticuerpo se pipeteó en la placa Maxisorp. Las curvas estándar se realizaron de GST-alfa purificada, variando desde 900 hasta 0 pg/ml. Después de incubación de 1 hora a temperatura ambiente y lavado se agregó 100 µl de anticuerpo marcado con biotina ml anti-ratón de conejo en 1% de BSA en PBS y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó de nuevo y luego se agregó 100 µl de solución de sustrato, regulador de citrato-fosfato pH 5 + 0.05% de O-fenilendiamina (OPD) + 0.03% de H₂O₂ y la formación de color se detuvo después de 45 minutos a temperatura ambiente al agregar H₂SO₄ 0.5 M. La placa se leyó a 490 nm en un lector de placas Biotek (Powerwave 200, (BioTek Instruments, Winooski, VT, EE.UU.).

IL-18

Placas Maxisorp NUNC se recubrieron con 100 µl de antígeno IL-18 (Randox, Crumlin, Reino Unido) 125 pg/ml de concentración en regulador de carbonato pH 9.6 y se incubaron 16 horas a 4°C. Las muestras de orina sin diluir (60 µl) se pipetearon en una placa Greiner de fondo redondo y se agregó 60 µl de anticuerpo de unión (Randox, anticuerpo polidonal anti-IL-18 de oveja) a las muestras y se incubó 16 horas a 4°C. Las placas Maxisorp se lavaron y 100 µl de la mezcla de muestra/anticuerpo se pipeteó en la placa Maxisorp. Las curvas estándar se hicieron de IL-18 purificado, variando desde 125 hasta 0 pg/ml. Después de lavar tres veces, se agregó anticuerpo marcado con HRP anti oveja de conejo, diluido en 1% de BSA-PBS y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó de nuevo y luego se agregó 100 µl de solución de sustrato, regulador de citrato-fosfato pH 5 + 0.05% de O-fenilendiamina (OPD) + 0.03% de H₂O₂ y la formación de color se detuvo después de 45 minutos a temperatura ambiente al agregar H₂SO₄ 0.5 M. La placa se leyó a 490 nm en un lector de placas Biotek (Powerwave 200, (BioTek Instruments, Winooski, VT, EE.UU.).

50 Análisis estadístico

Los datos del período de tratamiento de 48 horas se presentan como medias de cada punto de tiempo ± error estándar de la media (EEM) y se analizaron utilizando GraphPad Prism. Se realizaron pruebas t apareadas y los medios se consideraron significativamente diferentes cuando los valores de p fueron <0.05.

55 El análisis de los datos de 7 días se realizó mediante mediciones repetidas de ANOVA utilizando el paquete de software estadístico SigmaStat y las diferencias se consideraron significativas cuando los valores de P fueron <0.05.

Biomarcadores urinarios durante periodo de tratamiento de 48 h

Todos los análisis se realizaron sobre los valores del estudio inicial corregidos. Se encontraron efectos de tratamiento estadísticamente significativos (prueba t apareada) a favor de BIAP para KIM-1 ($p=0.0002$) (Figura 10) e IL18 ($p=0.0027$) (Figura 11) durante las primeras 48 horas de tratamiento. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento y placebo para NGAL o IL-6 (datos no mostrados).

5 Análisis de orina y biomarcadores en suero durante 7 días después del inicio del tratamiento.

Se determinaron los niveles de KIM-1, IL-18 y NGAL (en orina) y CRP, LBP e IL-6 (en suero). Todos los análisis se realizaron sobre los valores de estudio inicial corregidos (Figuras 12-15). Se encontraron efectos de tratamiento estadísticamente significativos (mediciones repetidas de ANOVA) a favor de BIAP para KIM-1, IL18, CRP y LBP ($p<0.0001$) durante 7 días después del inicio del tratamiento. Se encontraron diferencias, aunque no estadísticamente significativas, entre los grupos de tratamiento y placebo para NGAL e IL-6 (Figuras 16 y 17).

Referencias

Levey AS, Green T, Kusek JW, Beck GJ, MDRD Study Group. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine. J Am Soc Nephrol. 2000; 11: A0828.

REVINDICACIONES

1. Fosfatasa alcalina para uso en un método para prevenir y/o tratar fibrilación auricular, en la que dicha fibrilación auricular se debe a función renal reducida.

5 2. Fosfatasa alcalina para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha fibrilación auricular se debe a depuración de creatinina renal reducida.

3. Fosfatasa alcalina para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que se reduce la (co)medicación para el tratamiento de fibrilación auricular.

4. Fosfatasa alcalina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que fibrilación auricular se evita o se trata en un paciente de unidad de cuidado intensivo.

10

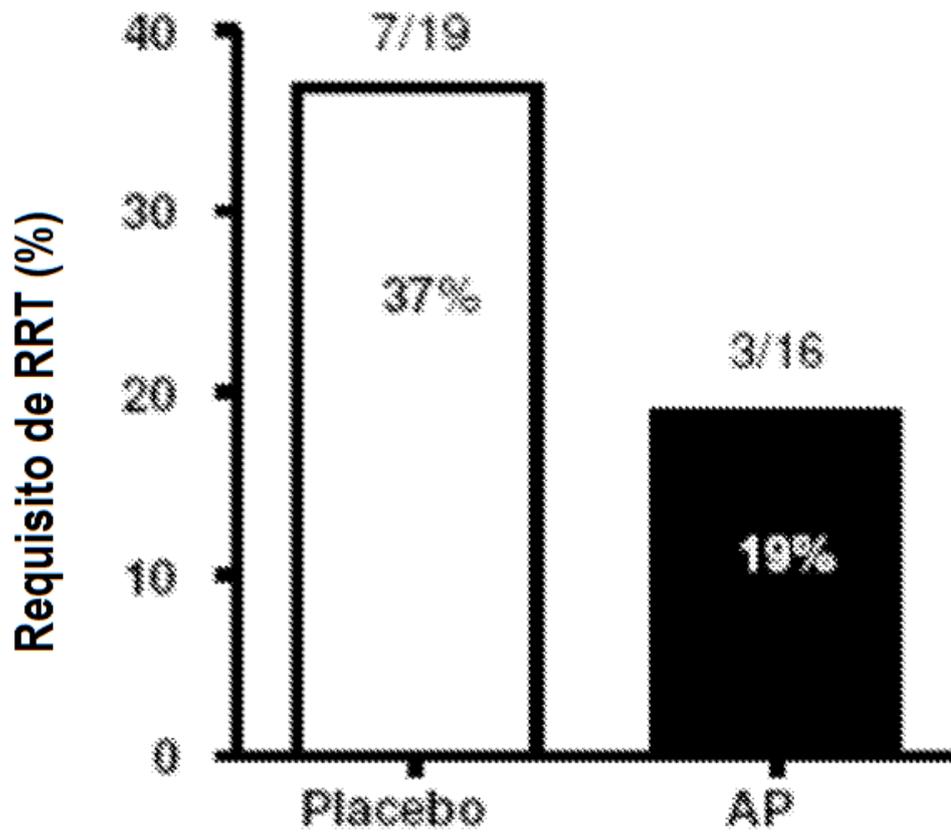


Figura 1

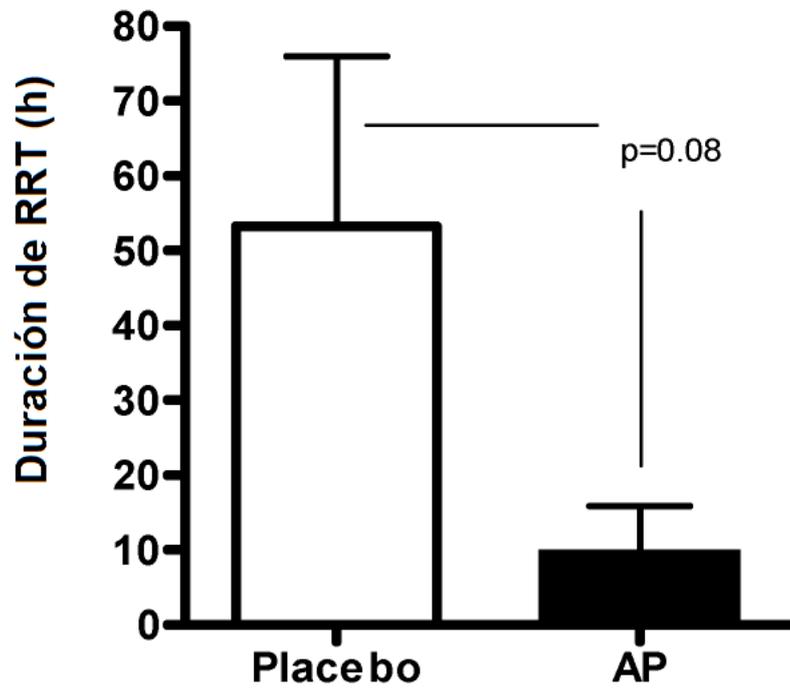


Figura 2

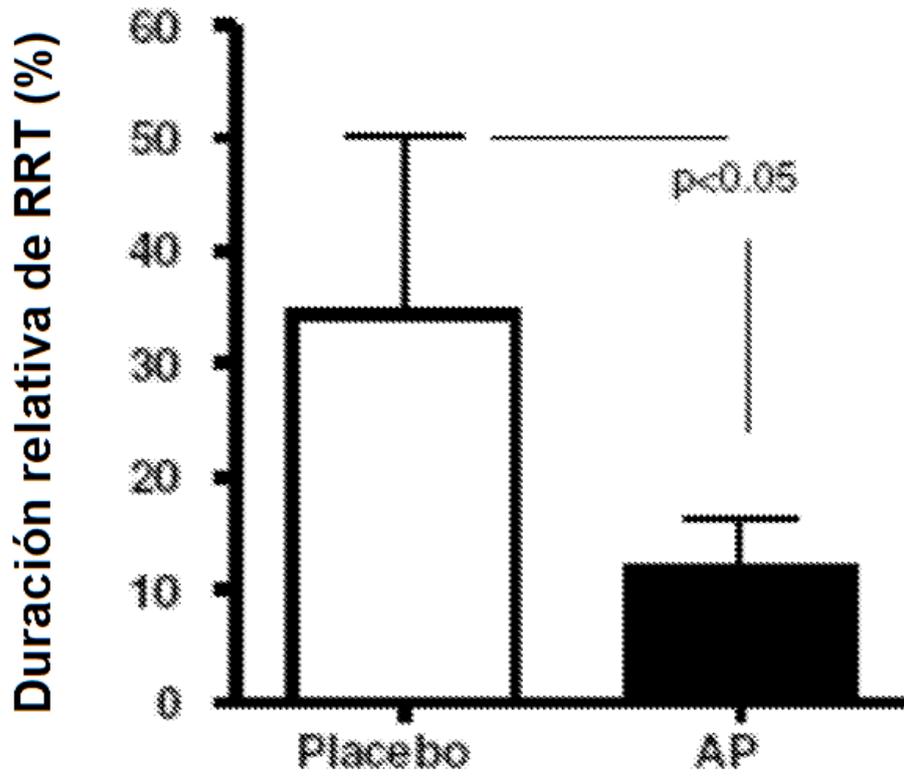


Figura 3

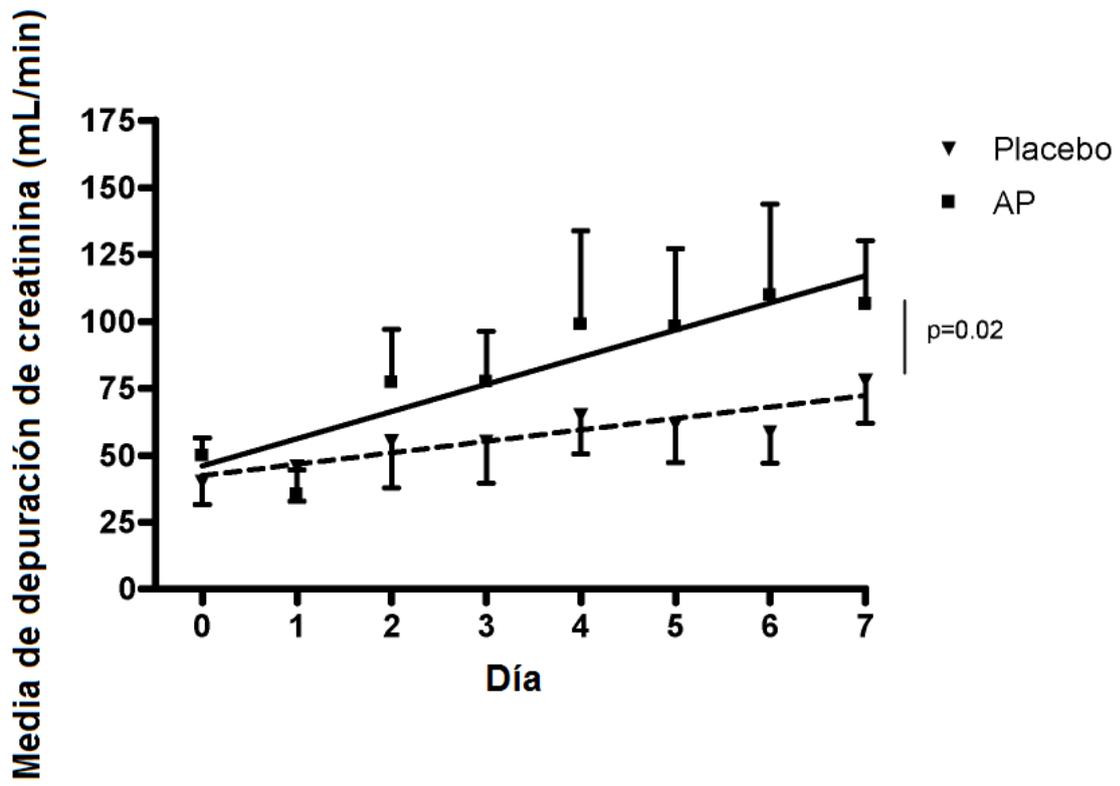


Figura 4

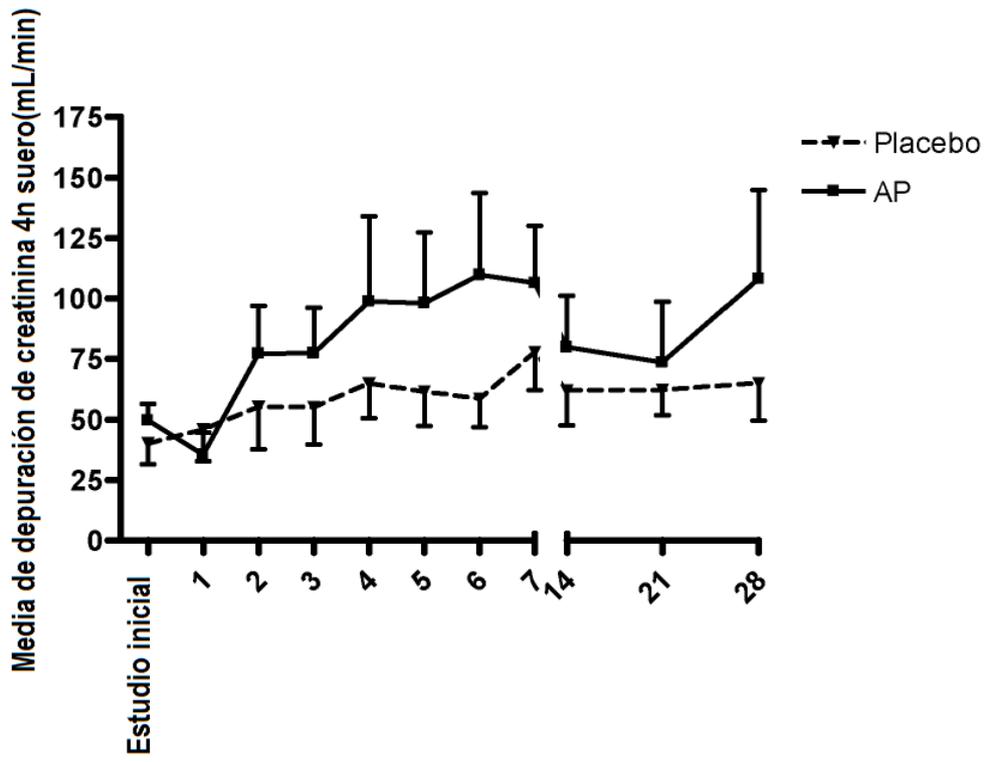


Figura 5

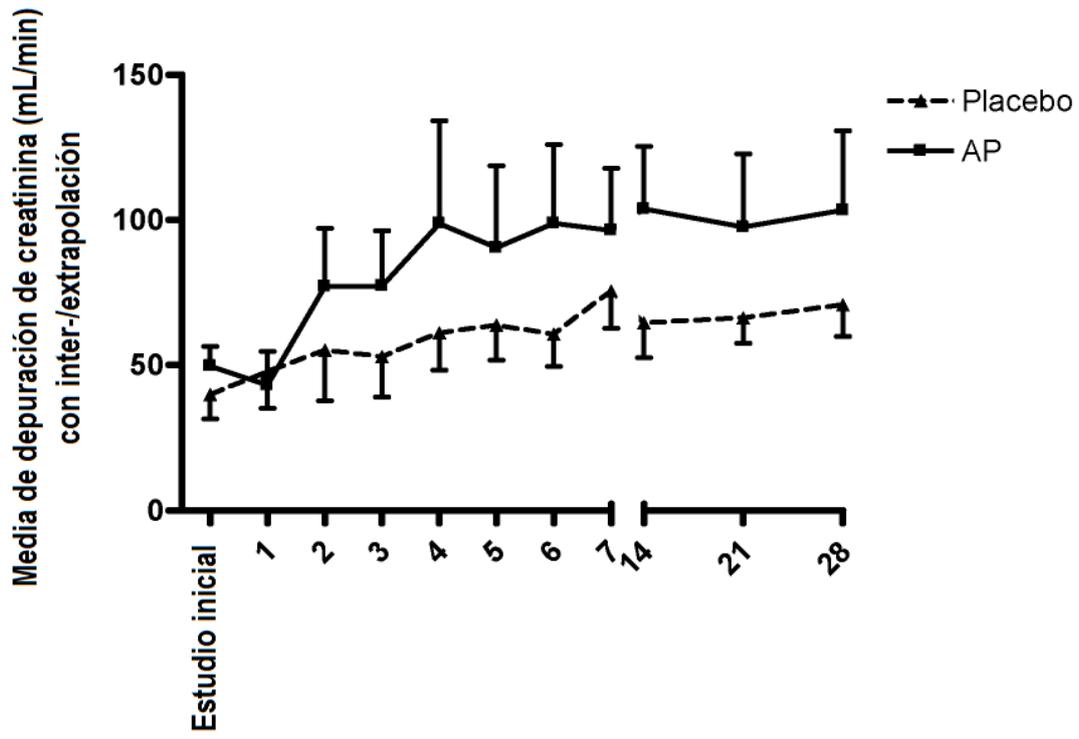


Figura 6

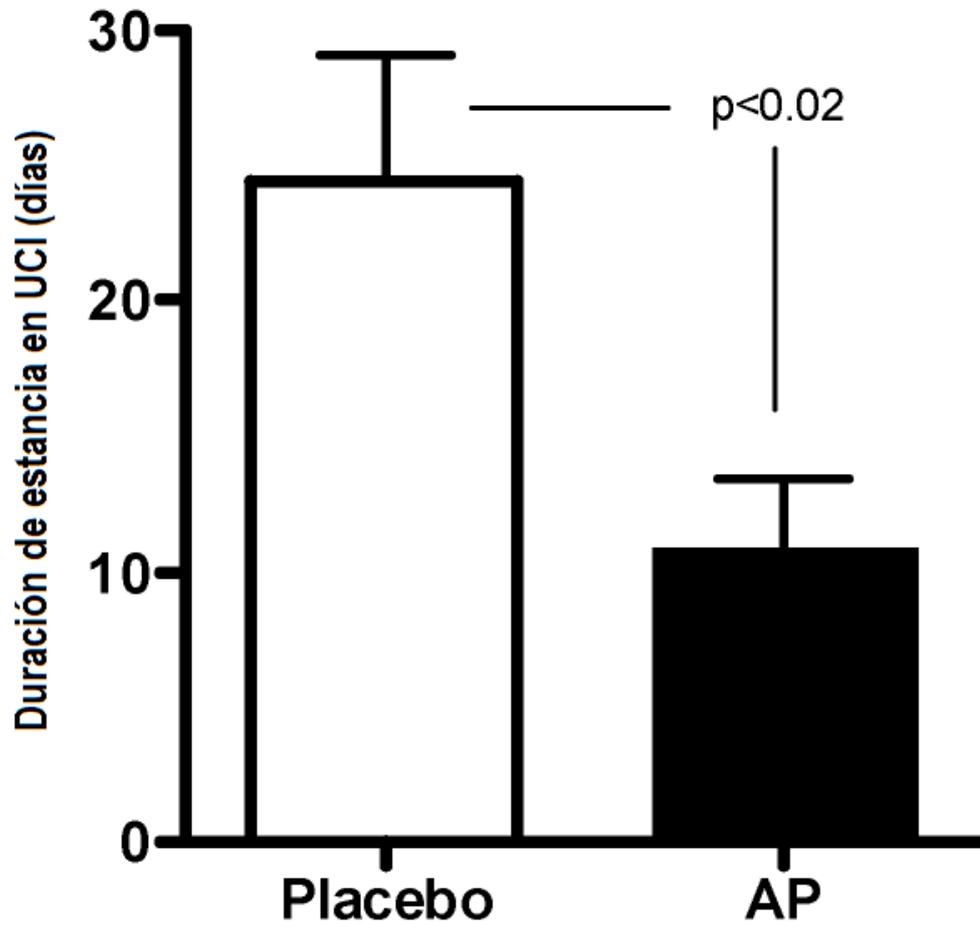


Figura 7

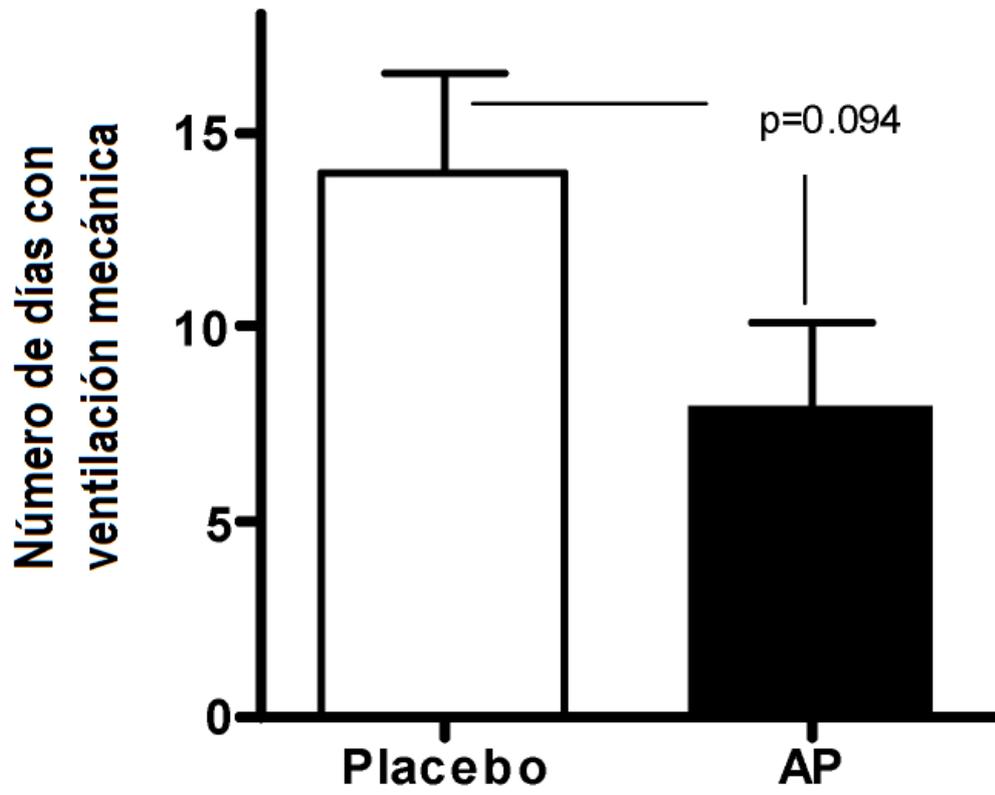


Figura 8

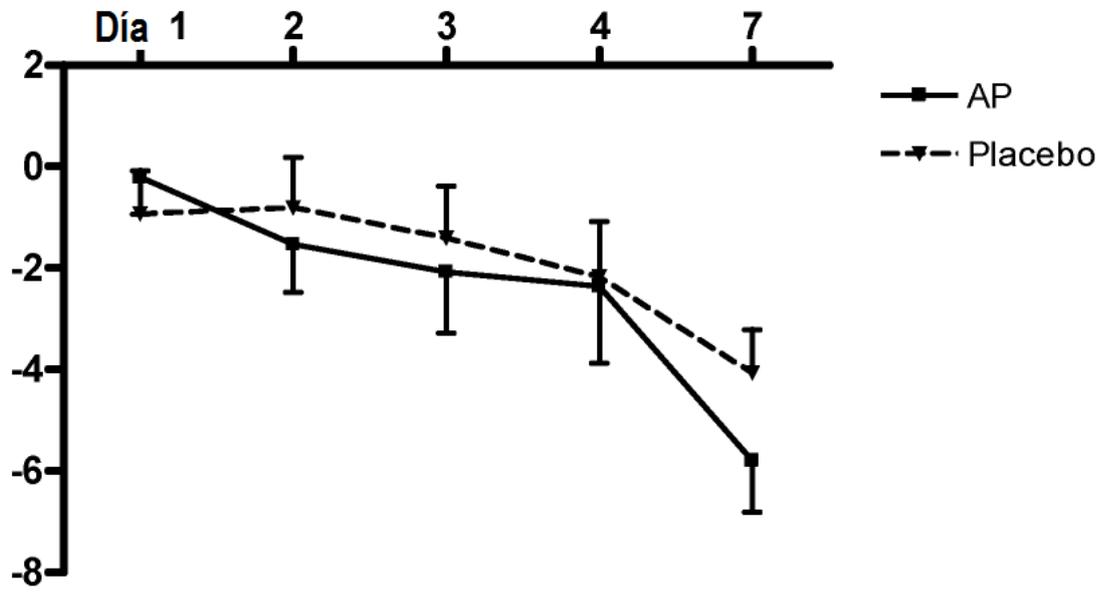


Figura 9

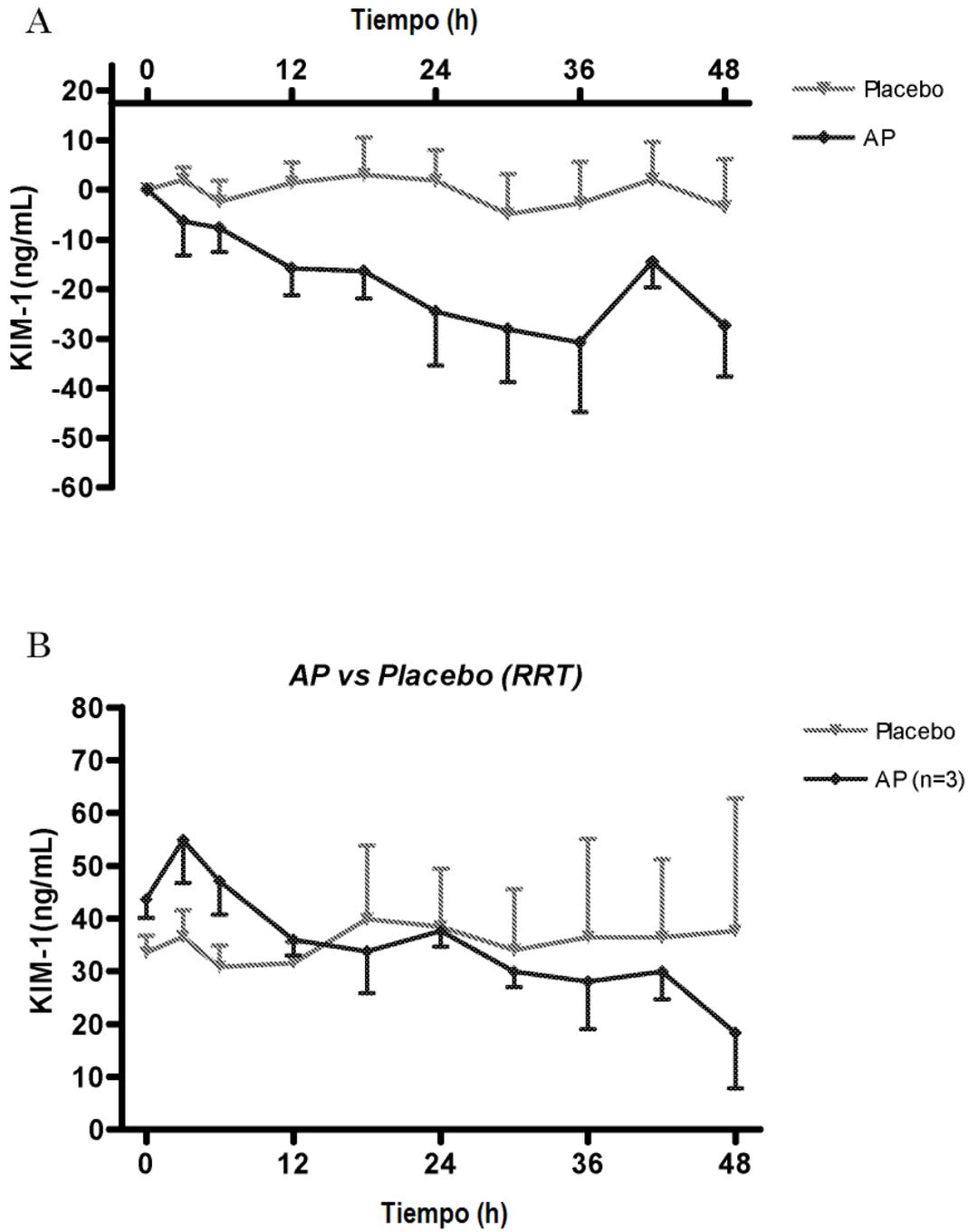


Figura 10

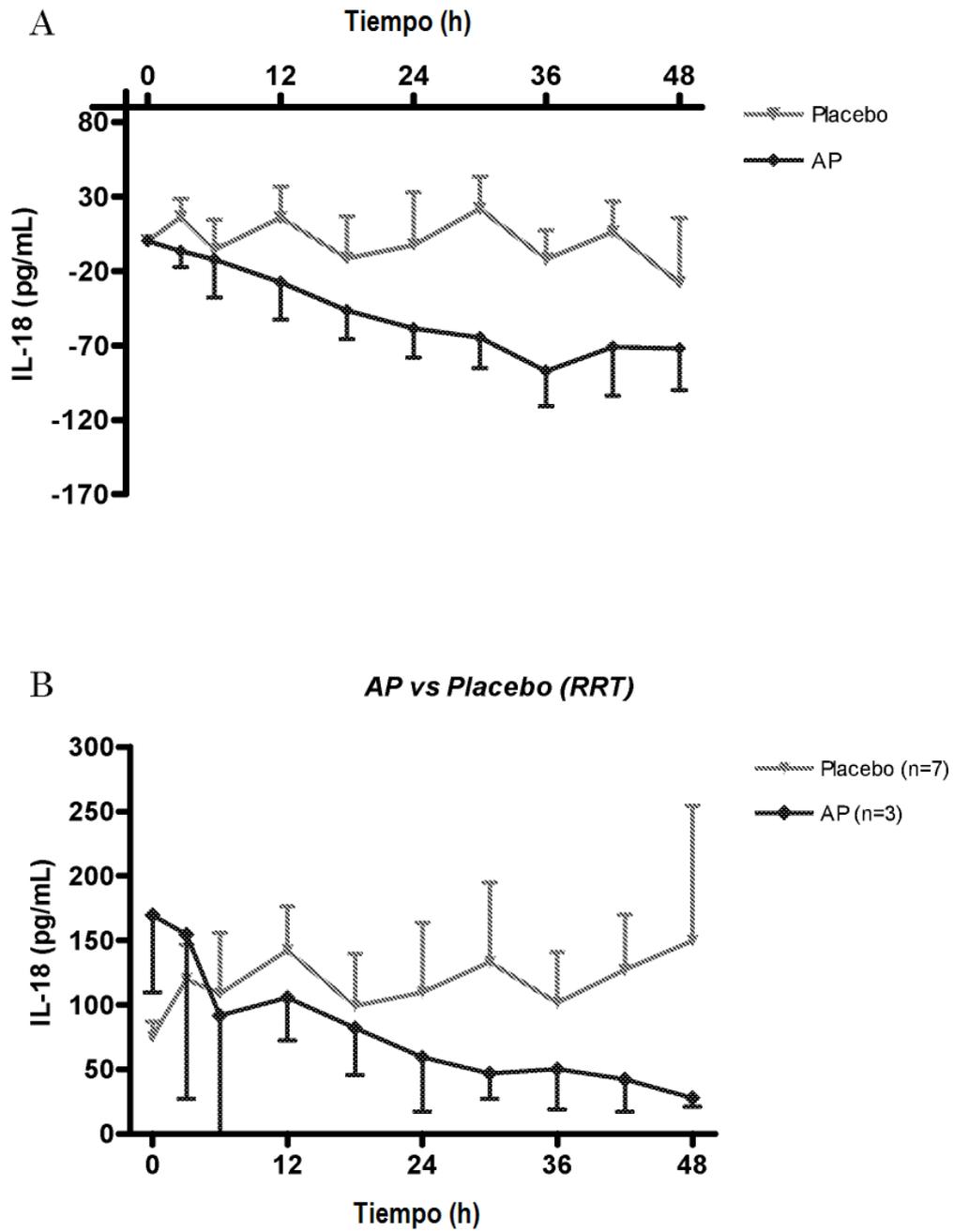


Figura 11

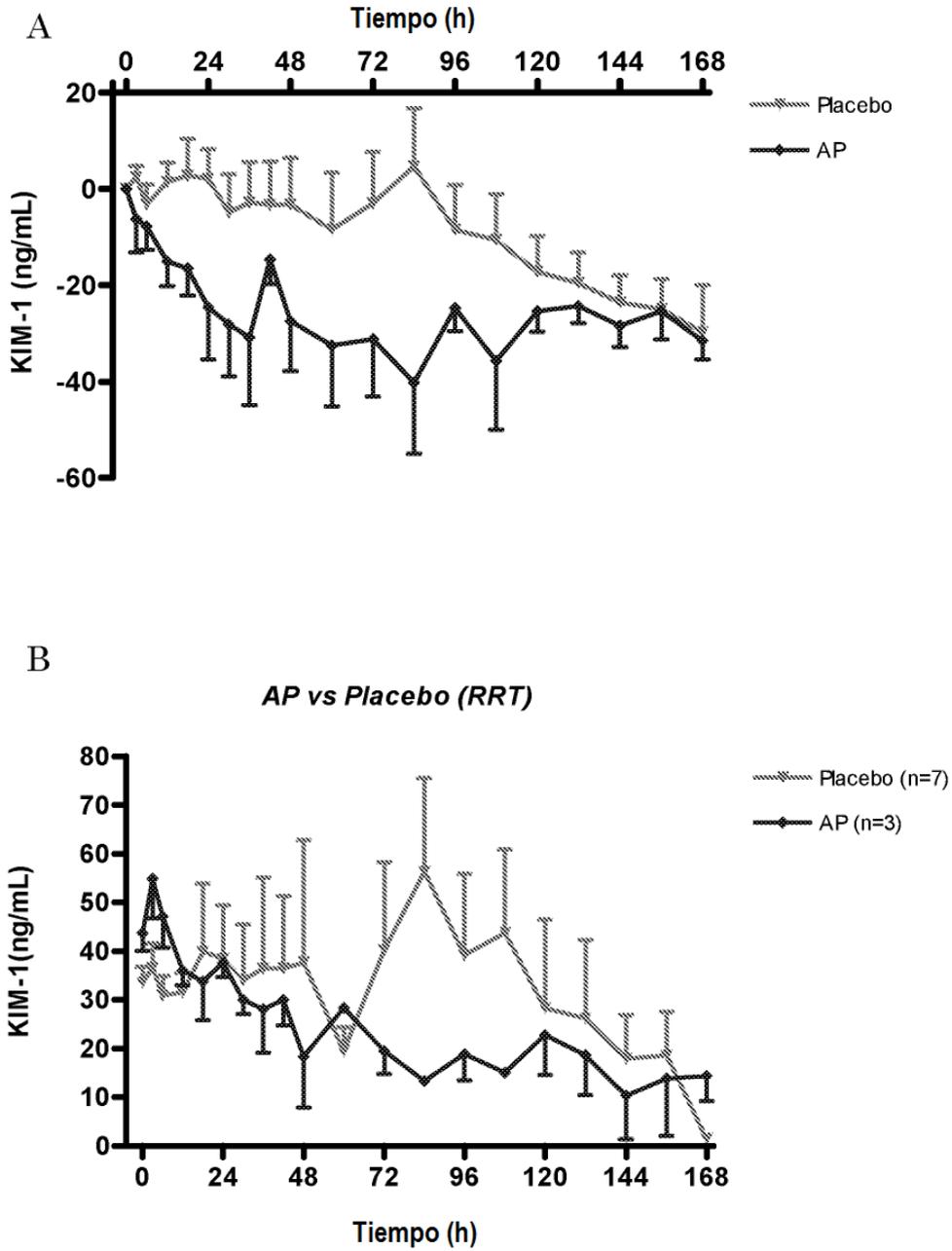


Figura 12

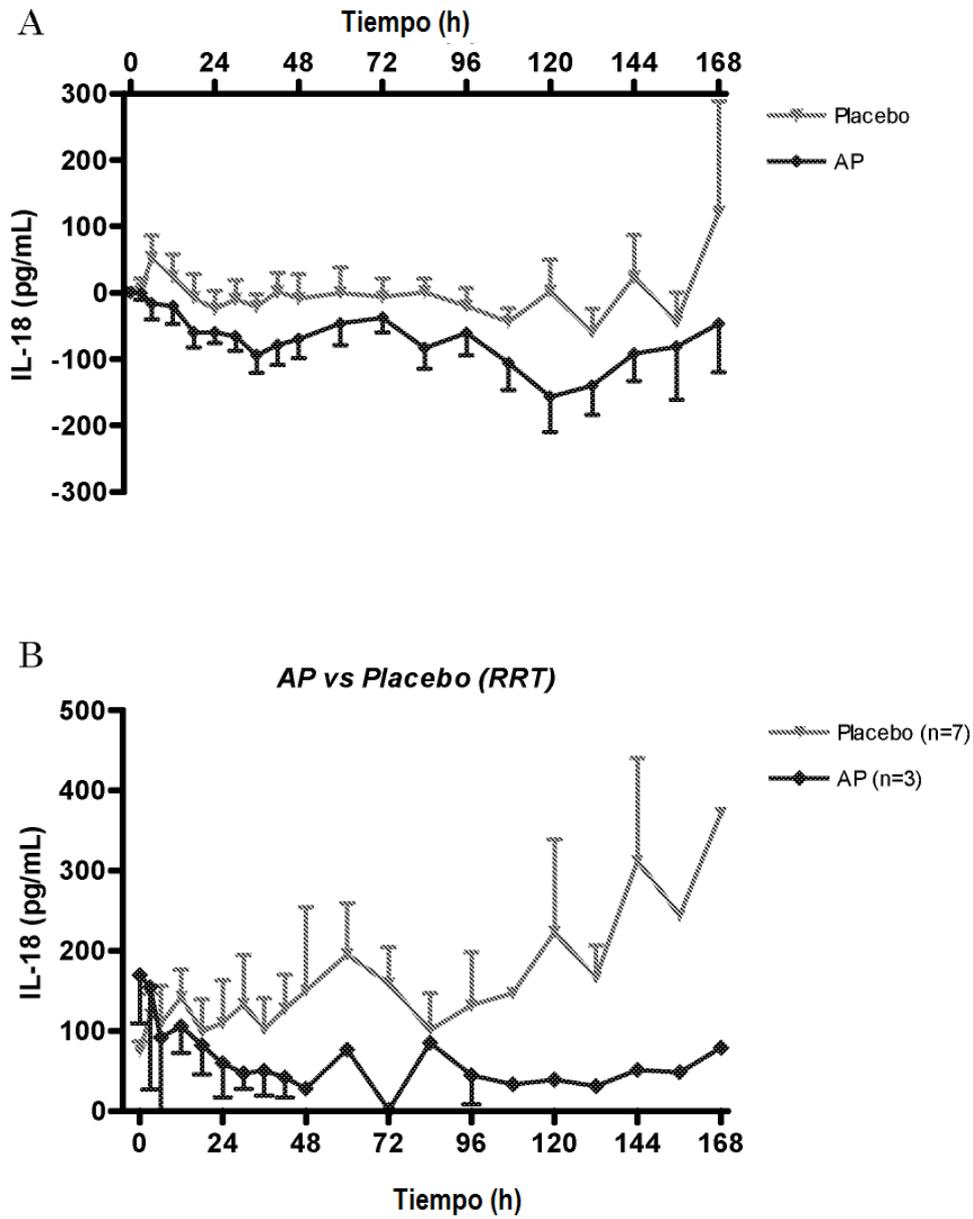


Figura 13

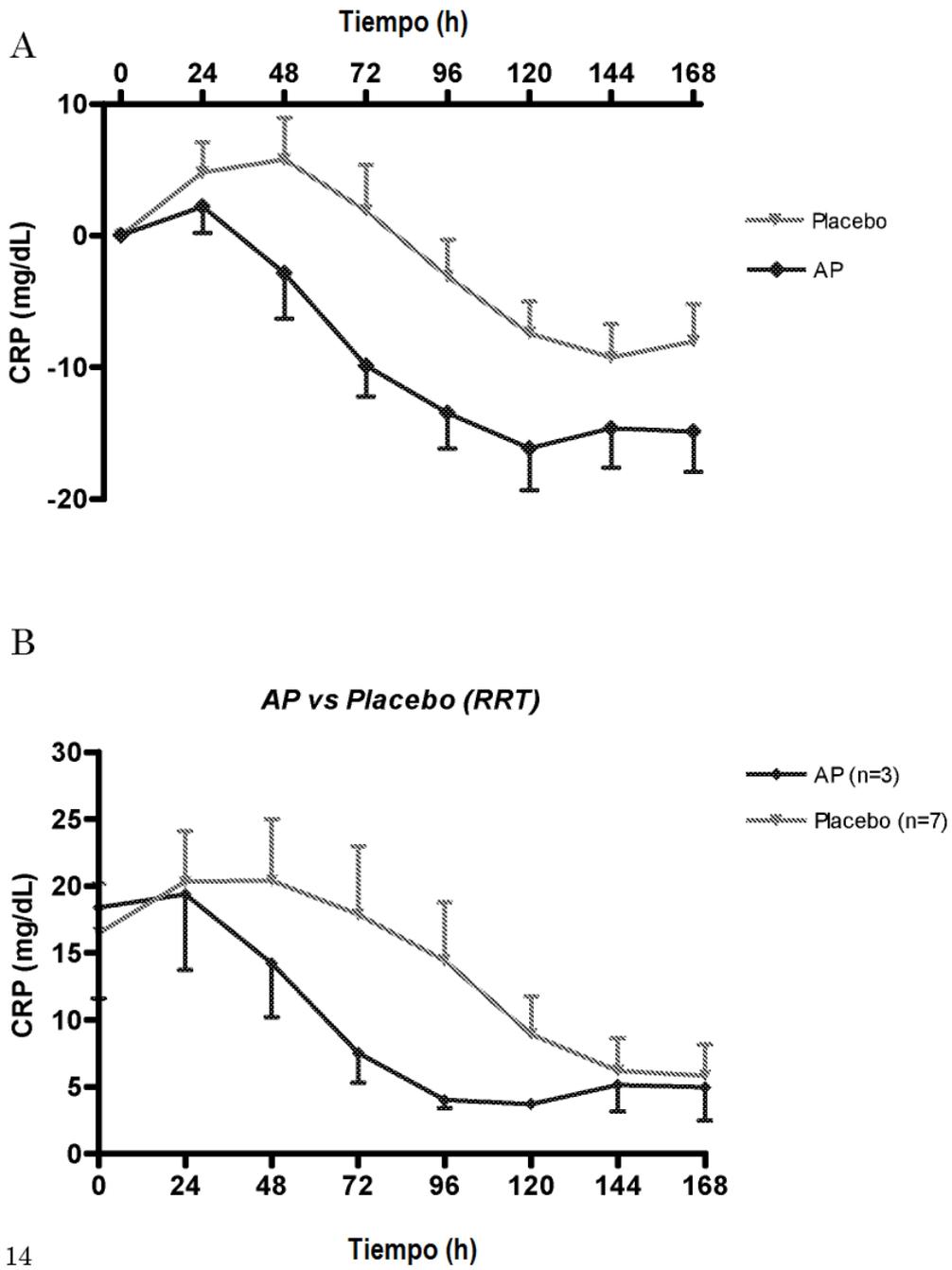


Figura 14

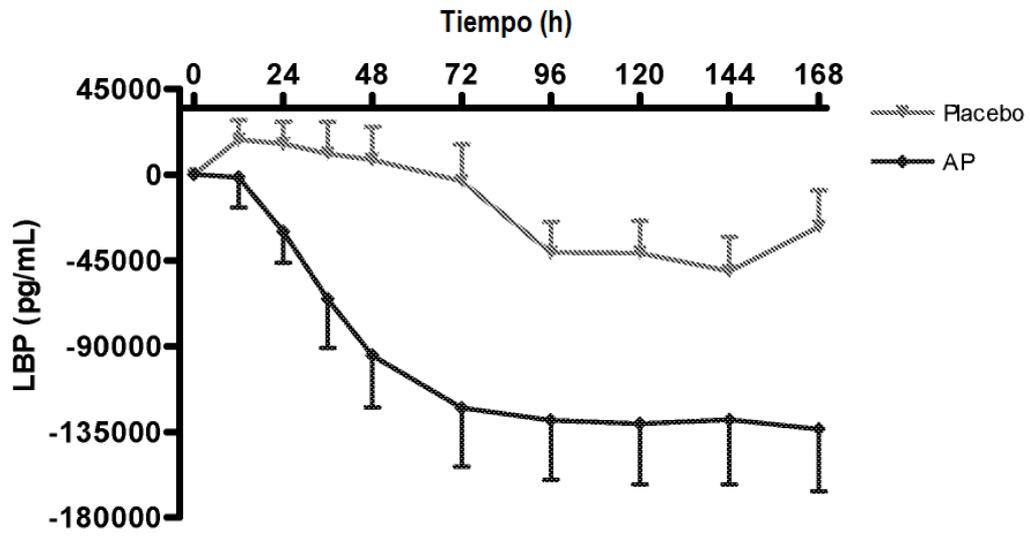


Figura 15

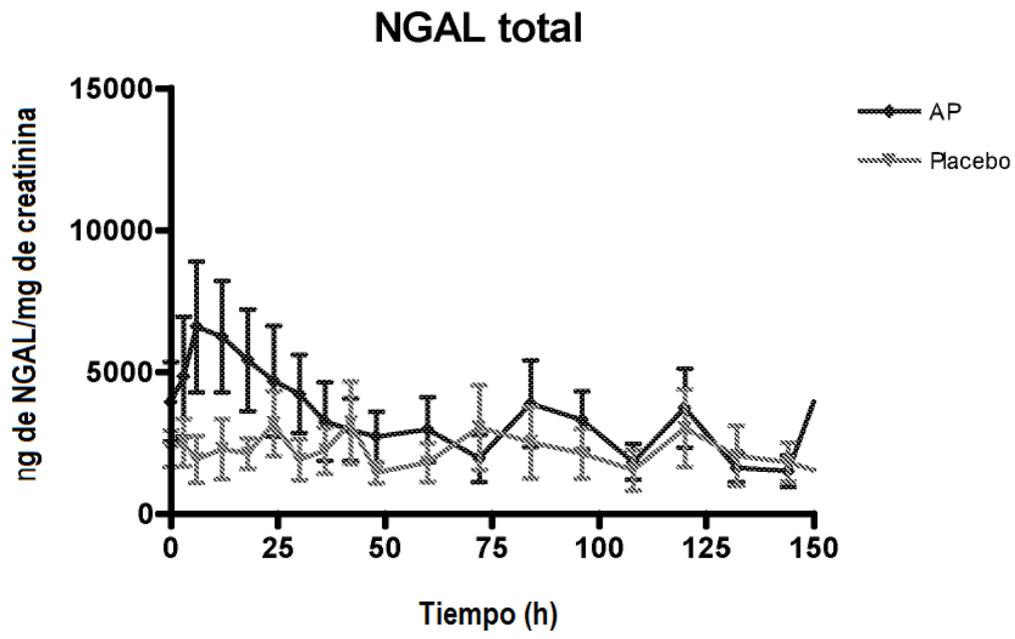


Figura 16

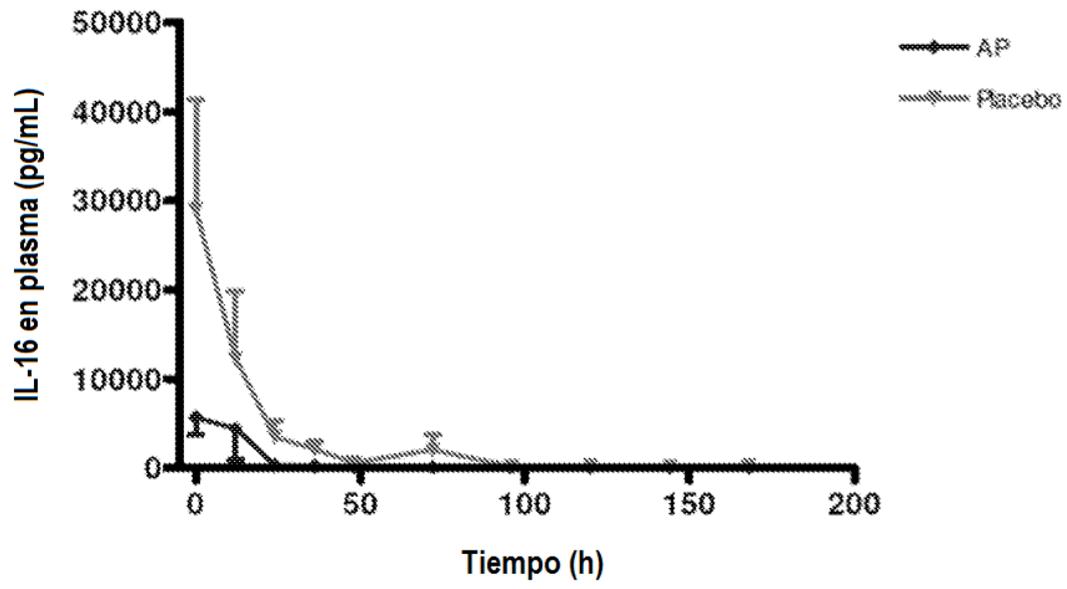


Figura 17

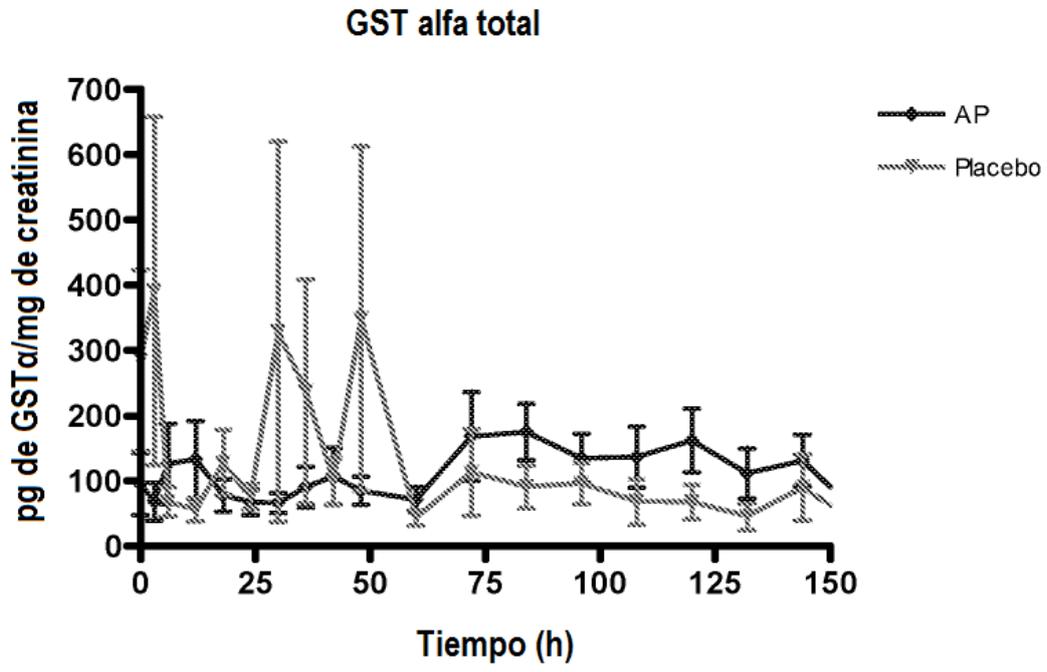


Figura 18

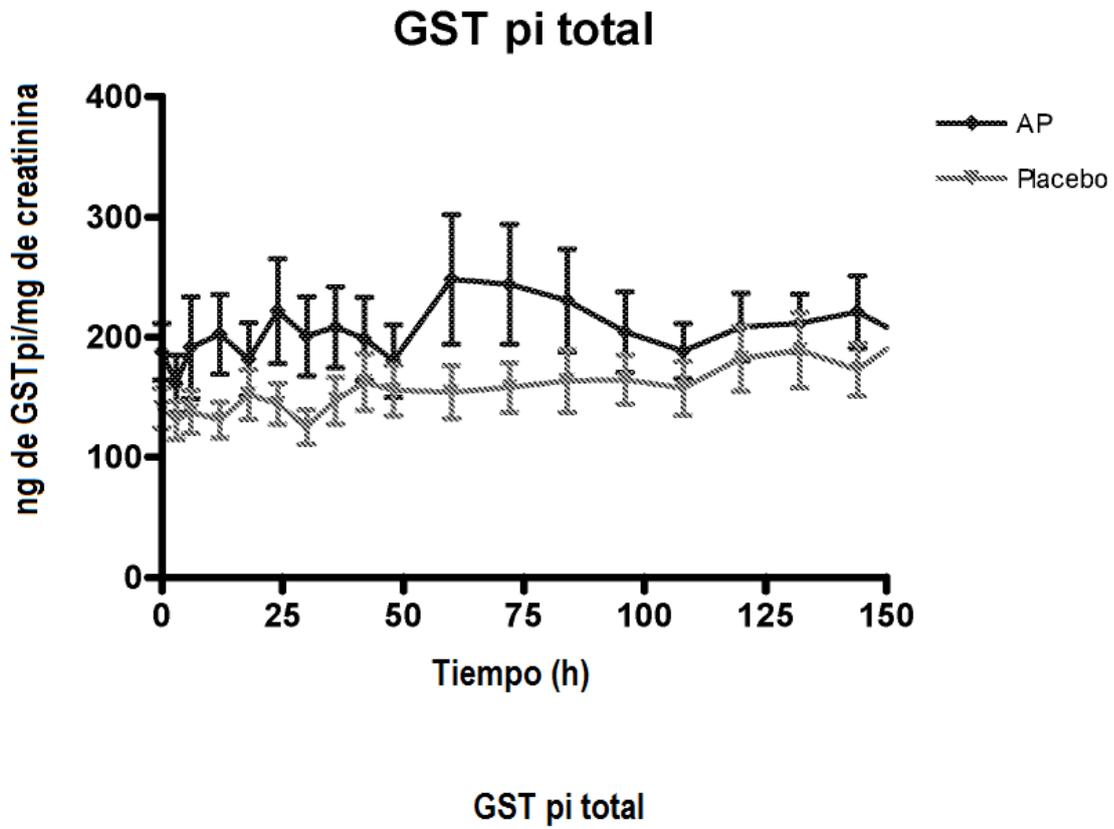


Figura 19

NP_001623 ALPP (placentario)

1 IIPVEEENPDFWNREAAEALGAAKKLQPAQTAAKNLII FLGDGMGVSTVTAARILKGQKK 60
 61 DKLGPETPLAMDRFPYVALSKTYNVDKHVPDSGATATAYLCGVKGNFQTI GLSAAARFNQ 120
 121 CNTTRGNEVISVMNRAKKAGKSGVGVVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSDADVPASARQ 180
 181 EGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYPDDYSQGGTRLDGKNLVQEWLAK 240
 241 RQGARYVWNRTELMOASLDPSVTHLMGLFEPGDMKYEIHRDSTLDPSLMEMTEAALRLLS 300
 301 RNPRGFLLFVEGGRIDHGHESRAYRALTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTLSLVTADHSH 360
 361 VFSFGGYFLRGSSIFGLAPGKARDPKAYTVLLYGNGPGYVLEKDGARFDVTESESSGSPFYR 420
 421 QQSAVFLDEETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVEQTFIAHVMAFAACLEPYTACDLAPPA 480
 481 GTTDAAHPPGRSVV PALLPLL LAGTLLLLLETATAP 513

AAI32679 ALPI (Intestinal)

1 VIPAEEENPAFWNRQAAEALDAAKKLQPIQKVAKNLILFLGDGLGVPTVTATRILKGQKN 60
 61 GKLGPETPLAMDRFPYLALSHTYNVDRQVPDSAAATATAYLCGVKANFQTI GLSAAARFNQ 120
 121 CNTTRGNEVISVMNRAKQAGKSGVGVVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSDADMPASARQ 180
 181 EGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYPADASQNGI RLDGKNLVQEWLAK 240
 241 HQGAWYVWNRTELMOASLDQSVTHLMGLFEPGDTKYEIHDPPTLDPSLMEMTEAALRLLS 300
 301 RNPRGFYLFVEGGRIDHGHHEGVAYQALTEAVMFDDAIERAGQLTSEEDTLTLVTADHSH 360
 361 VFSFGGYTLRGSSIFGLAPSKAQDSKAYTSILYGNGPGYVFNISGVRFDVNESESSGSPDYQ 420
 421 QQAAVPLESEETHGGEDVAVFARGPQAHLVHGVEQSFVAHVMAFAACLEPYTACDLAPPA 480
 481 CTTDAAHPPVAASLPLL LAGTLLLLGASAAP 509

P10696 GCAP (célula germinal o similar a placenta)

1 IIPVEEENPDFWNRQAAEALGAAKKLQPAQTAAKNLII FLGDGMGVSTVTAARILKGQKK 60
 61 DKLGPETFLAMDRFPYVALSKTYSVDKHVPDSGATATAYLCGVKGNFQTI GLSAAARFNQ 120
 121 CNTTRGNEVISVMNRAKKAGKSGVGVVTTTRVQHASPAGAYAHTVNRNWYSDADVPASARQ 180
 181 EGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYPDDYSQGGTRLDGKNLVQEWLAK 240
 241 RQGARYVWNRTELLQASLDPSVTHLMGLFEPGDMKYEIHRDSTLDPSLMEMTEAALLLS 300
 301 RNPRGFLLFVEGGRIDHGHESRAYRALTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTLSLVTADHSH 360
 361 VFSFGGYFLRGSSIFGLAPGKARDPKAYTVLLYGNGPGYVLEKDGARFDVTESESSGSPFYR 420
 421 QQSAVFLDGETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVEQTFIAHVMAFAACLEPYTACDLAPRA 480
 481 GTTDAAHPPGPSVV PALLPLL LAGTLLLLGTATAP 513

AAI10910 (tejido no específico)

1 LVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTVTAARILKGQL 60
 61 HHNPGEETRLEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANEGTVGVSAATERS 120
 121 RCNNTQGNVETSILRWAKDAGKSGVIVTTTRVNHATPSAAYAHSADRDWYSDNEMPPPEAL 180
 181 SQGCKDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKYMYPKNKTDVEYESDEKARGTRLDGLDLVDTWK 240
 241 SFKPRHKHSHFIWNRTELLTLDPHNVYLLGLFEPGDMQYELNRNNVTDPSLSEMVVAI 300
 301 QILRKNPKGFFLLVEGGRIDHGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIGQAGSLTSS EDTLVVTA 360
 361 DHSHVFTFGGYTFRGNISIFGLAPMLSDTDFKFPPTAILYGNGPGYKVVGGEREENVSMVDYA 420
 421 HNNYQAQSAVFLRHETHGGEDVAVFSKGPMAHLLHGVEQNYVPHVMAYAACIGANLGH 480
 481 APASSAGSLAAGPLLL LALALYPLSVLF 507

Figura 20

ALPI secretable con dominio de corona de PLAP (quimera)

```

1  VIPAEENPAFWNRQAAEALDAAKKLQPIQKVAKNLILFLGDGLGVPTVTATRILKGQKN 60
61  GKLGPETPLAMDRFPYLALSPTYNVDRQVPDSAATATAYLCGVKANFQTI GLSAAARFNQ 120
121 CNTTRGNEVISVMNRAKQAGKSVGVVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSADAMPASARQ 180
181 EGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFPMPGTPDPEYPADASQNGIRLDGKNLVQEWLAK 240
241 HQGAWYVWNRTQLMQASLDQSVTHLMGLFEPGDTKYEIHRDPTLDP SLMEMTEAALRLLS 300
301 RNPRGFYLFVEGGRIDHGHHEGVAYQALTEAVMFDDAI ERAGQLTSEEDTLTLVTADHSH 360
361 VFSFGSTPLRGSSTFGLAPGKADPKAYTVLLYGNQPGYVLDGAKPDVHSESSGSPFYK 420
421 QSSAVFLDEETHGGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQSFVAHVMAFAACLEPYTACDLAPPA 480
481 CTTD 484

```

ALPP secretable con dominio de corona de ALPI (quimera)

```

1  IIPVEEENPDFWNREAAEALGAAKKLQPAQTAANKLII FLGDGMGVSTVTAARILKGQKK 60
61  DKLGPETPLAMDRFPYVALSKTYNVDKHVPDSGATATAYLCGVKGNFQTI GLSAAARFNQ 120
121 CNTTRGNEVISVMNRAKAGKSVGVVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSADVPASARQ 180
181 EGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTDPPEYDDYSQGGTRLDGKNLVQEWLAK 240
241 RQGARYVWNRTQLMQASLDPSVTHLMGLFEPGDMKYEIHRDSTLDP SLMEMTEAALRLLS 300
301 RNPRGFYLFVEGGRIDHGHHESTRAYRALTETIMFDDAI ERAGQLTSEEDTLTLVTADHSH 360
361 VFSFGYTLRGSSTFGLAPSKAQDSKAYTSILYGNQPGYVFNSSVRFVYNESESSESDYQ 420
421 QAAVPLSSETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQTFLAHVMAFAACLEPYTACDLAPPA 480
481 GTTD 484

```

Figura 20, continuación