

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
9 de septiembre de 2011 (09.09.2011)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2011/107649 A2**

- (51) **Clasificación Internacional de Patentes:** Sin clasificar **Francisco** [ES/ES]; Universidad de Castilla la Mancha, Edificio José Prat, Plaza de la Universidad, 2, E-02071 Albacete (ES).
- (21) **Número de la solicitud internacional:** PCT/ES2011/070142 (74) **Mandatario:** PONS ARIÑO, Ángel; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).
- (22) **Fecha de presentación internacional:** 4 de marzo de 2011 (04.03.2011) (81) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (25) **Idioma de presentación:** español
- (26) **Idioma de publicación:** español
- (30) **Datos relativos a la prioridad:** P201030326 5 de marzo de 2010 (05.03.2010) ES
- (71) **Solicitante** (para todos los Estados designados salvo US): **UNIVERSIDAD DE CASTILLA LA MANCHA** [ES/ES]; Edificio José Prat, Plaza de la Universidad, 2, E-02071 Albacete (ES).
- (72) **Inventores; e**
- (75) **Inventores/Solicitantes** (para US solamente): **CEÑA CALLEJO, Valentín** [ES/ES]; Universidad de Castilla la Mancha, Edificio José Prat, Plaza de la Universidad, 2, E-02071 Albacete (ES). **PÉREZ MARTÍNEZ, Francisco Carlos** [ES/ES]; Universidad de Castilla la Mancha, Edificio José Prat, Plaza de la Universidad, 2, E-02071 Albacete (ES). **PÉREZ MARTÍNEZ, Juan** [ES/ES]; Universidad de Castilla la Mancha, Edificio José Prat, Plaza de la Universidad, 2, E-02071 Albacete (ES). **GÓMEZ ROLDÁN, Carmen** [ES/ES]; Universidad de Castilla la Mancha, Edificio José Prat, Plaza de la Universidad, 2, E-02071 Albacete (ES). **ORTEGA CERRATO, Agustín** [ES/ES]; Universidad de Castilla la Mancha, Edificio José Prat, Plaza de la Universidad, 2, E-02071 Albacete (ES). **LLAMAS FUENTES,**
- (84) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

- sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))



WO 2011/107649 A2

(54) **Title:** SOLUTION FOR PERITONEAL DIALYSIS

(54) **Título :** SOLUCIÓN PARA DIÁLISIS PERITONEAL

(57) **Abstract:** The invention relates to a type of solution for peritoneal dialysis, comprising Aliskiren or one of the derivatives thereof, at least one electrolyte, at least one buffer solution, and at least one osmotic agent. The invention reduces the toxicity of commonly used peritoneal dialysis solutions on mesothelial peritoneal cells. The invention also relates to the use of this type of solution for processes requiring peritoneal dialysis, such as in the case of chronic renal failure.

(57) **Resumen:** El presente invención se refiere a un tipo de solución para diálisis peritoneal que comprende Aliskiren o cualquiera de sus derivados, al menos un electrolito, al menos una solución tampón y al menos un agente osmótico. De esta manera se consigue reducir la toxicidad de estas soluciones habituales de diálisis peritoneales sobre las células mesoteliales de peritoneo. Por otra parte, la presente invención se refiere al uso de este tipo de soluciones para procesos en los cuales sea necesario el llevar a cabo diálisis peritoneal, como en el caso del fallo renal crónico.

## **SOLUCIÓN PARA DIÁLISIS PERITONEAL**

El presente invención se refiere a un tipo de solución para diálisis peritoneal que comprende Aliskiren, al menos un electrolito, al menos una solución tampón y al menos un agente osmótico. De esta manera se consigue reducir la toxicidad de estas soluciones habituales de diálisis peritoneales sobre las células mesoteliales de peritoneo. Por otra parte, la presente invención se refiere al uso de este tipo de soluciones para procesos en los cuales sea necesario el llevar a cabo diálisis peritoneal, como en el caso del fallo renal crónico.

### **ESTADO DE LA TECNICA ANTERIOR**

La diálisis peritoneal (DP) es una terapia eficiente para la insuficiencia renal crónica, donde la membrana peritoneal es utilizada como membrana semipermeable para eliminar sustancias nocivas como la urea y el potasio de la sangre, así como también el exceso de líquido. Los pacientes sometidos a este tratamiento tienen la ventaja de poder llevar una vida activa, sin la necesidad de ir al hospital frecuentemente, debido a que la DP se realiza normalmente en el hogar o en el lugar de trabajo del paciente (*Grassmann A, Gioberge S, Moeller S, et al. Nephrol Dial Transplant 2005; 20: 2587-93 y Burkart JM, Nolph KD. NIDDK 2006; 6: 1-24*).

El principal inconveniente de este método de diálisis es la predisposición a padecer infecciones en el peritoneo (peritonitis), aunque su incidencia ha disminuido drásticamente desde la aparición de nuevos sistemas de conexión especialmente diseñados para asegurar la máxima esterilidad. Por otro lado, la exposición continua al líquido de diálisis conlleva el deterioro de la capacidad dializante de la membrana peritoneal, que se asocia a fibrosis y vasculopatías, aunque los factores que influyen en la velocidad de deterioro de la función peritoneal tampoco están completamente aclarados (*Gillerot G, Devuyst O. Clin Nephrol 2003; 60: 1-6*).

La alteración de las células mesoteliales que forman la membrana peritoneal por el efecto de la exposición continua a líquido de diálisis con una elevada osmolaridad y alta concentración de glucosa puede ser uno de los mecanismos causantes de la disfunción peritoneal (*Coles GA, Topley N. Adv Ren Replace Ther 2000; 7: 289-301*). Se conocen muchos tipos de estímulos que pueden inducir apoptosis, tales como citoquinas, hormonas, infecciones o fármacos (*Catalan MP, Subirá D, Reyero A, et al. Kidney Int 2003; 64: 321-30.; Zheng Z, Ye R, Yu X, et al. Adv Perit Dial 2001; 17: 53-7*). Además, se sabe que altas concentraciones de glucosa también inducen apoptosis en muchos tipos celulares, incluyendo a las células mesoteliales (*Sharifi AM, Mousavi SH, Farhadi M, et al. J Pharmacol Sci 2007; 104: 258-62*).

Además de estudios en cultivos de células mesoteliales de peritoneo, el modelo animal de DP más usado es la rata (*González-Mateo GT, Loureiro-Alvarez J, Rayego-Mateos S, et al. Nefrología 2008; 28 (Supl 6): 17-22*). Estudios previos con estos modelos han permitido estudiar la biocompatibilidad de los líquidos de diálisis, la respuesta inflamatoria desarrollada en el peritoneo frente a la exposición al líquido de diálisis, la angiogénesis y la importancia de la red vascular en la permeabilidad de la membrana peritoneal o la fibrosis, y el papel de las peritonitis en el daño de la membrana peritoneal (*Krediet RT, Zweers MM, Van der Wal AC, et al. Perit Dial Int 2000; 20 (Supl 2): S19-25; Bazargani F. Swed Dent J Suppl 2005; 171: 1-57; Hurst SM, McLoughlin RM, Monslow J, et al. J Immunol 2002; 169: 5244-51; Kim YL, Do J, Park SH, et al. Nephrology (Carlton) 2003; 8 (Supl): S28-32; Gillerot G, Devuyst O. Clin Nephrol 2003; 60: 1-6; Lameire N, Van Biesen W, Mortier S, et al. Contrib Nephrol 2006; 150: 70-6; Margetts PJ, Bonniaud P, Liu L, et al. J Am Soc Nephrol 2005; 16: 425-36; Margetts PJ, Kolb M, Galt T, et al. J Am Soc Nephrol 2001; 12: 2029-39*).

La investigación sobre la DP se remonta a mediados del siglo XX donde se empezó a estudiar en situaciones de uremia y, más adelante, como tratamiento del fracaso renal agudo o crónico. Sin embargo, la DP como ahora la entendemos en su modalidad continua ambulatoria, se concibió en 1978 por *Popovich RP, Moncrief JW, Nolph KD, et al. J Am Soc Nephrol 1999; 10: 901-10*. Desde entonces, su uso ha crecido de forma constante hasta llegar a más de 180.000 pacientes en todo el mundo (*Lysaght MJ. J Am Soc Nephrol 2002; 13 (Supl 1): S37-40*). El crecimiento en los últimos años ha sido muy diverso en los diferentes países, siendo de un 90% en Méjico, entre un 30-50% en los países nórdicos de Europa y Canadá, 17% en EEUU, un 8-11% para los países de centro y sur de Europa y un 5% en Japón (*Lysaght MJ. J Am Soc Nephrol 2002; 13 (Supl 1): S37-40*).

Un tercio de pacientes de DP pasan anualmente a hemodiálisis a causa de una pérdida de eficacia de la membrana peritoneal (*Kawaguchi Y. Perit Dial Int 1999; 19: S327-8*), por lo que se precisa seguir investigando para conseguir un aumento del potencial dialítico de la membrana peritoneal y un incremento de su vida media en pacientes con insuficiencia renal crónica. Esto probablemente se conseguirá con aditivos farmacológicos al líquido de diálisis como el que se presenta en la presente invención.

El coste aproximado por año y por paciente en diálisis es de unos 60.000 Euros. Teniendo en cuenta el elevado número de pacientes que en la actualidad requieren un tratamiento de diálisis, el coste mundial del tratamiento de la insuficiencia renal ronda los sesenta mil millones de euros al año. La población de nuestro planeta está creciendo a un ritmo del 1,3%, mientras que el de la población que requiere diálisis continúa creciendo a una frecuencia anual del 7-8% (*Lysaght MJ. J Am Soc Nephrol 2002; 13 (Supl 1): S37-40*). Está claro, que estamos asistiendo a un enorme crecimiento de la población en diálisis en todo el

mundo, de forma que en el año 2010 habrá aproximadamente 2 millones de pacientes, con la consiguiente importancia económica que esto conlleva.

De los pacientes con insuficiencia renal en tratamiento sustitutivo, el 68% está siendo tratado con hemodiálisis, el 23% vive con un trasplante renal y sólo un 9% con DP (*Lysaght MJ. J Am Soc Nephrol 2002; 13 (Supl 1): S37-40*). Se han producido importantes mejoras en la evolución de los pacientes tratados con DP, de forma que es aceptada en el momento actual como un tratamiento equivalente a la hemodiálisis. En los últimos años, la DP ha demostrado ser un tratamiento tan efectivo como la hemodiálisis, por lo menos, en los primeros 4 o 5 años de su utilización, en términos de supervivencia y calidad de vida, y con una buena relación coste/efectividad.

Hasta el momento, la DP ha demostrado su utilidad y se ha establecido como una excelente opción alternativa a la hemodiálisis, incluso como tratamiento sustitutivo inicial porque tiene cualidades positivas establecidas fuera de toda duda:

- Coste más bajo que la hemodiálisis, especialmente en el mundo occidental.
- Supervivencia similar a la hemodiálisis, y algo superior en los primeros 2 a 3 años.
- Tratamiento de elección para niños y jóvenes.
- Tratamiento óptimo antes del trasplante renal.

Sin embargo, si la DP quiere conseguir una mayor aceptación, y aumentar el porcentaje de su utilización, tienen que resolverse diversos problemas pendientes que habitualmente son los que detraen de su mayor utilización. Dos cuestiones importantes son:

- La DP posee un índice más elevado de fallo, comparado con la hemodiálisis. De hecho, se necesita seguir investigando para conseguir un menor fallo en la ultrafiltración a medio y largo plazo, una mejor aclaración de los solutos y una reducción de la incidencia de peritonitis.

- Existe todavía una imposibilidad de mantener a un paciente en DP prolongada (más de 10 años) debido a las alteraciones que se producen a largo plazo en la estructura y función de la membrana peritoneal. En este sentido, la investigación de nuevos tratamientos farmacológicos que eviten este deterioro, son cruciales para incrementar la utilización de la DP y reducir el coste que conlleva en la actualidad el uso de la hemodiálisis.

El bajo pH del líquido de diálisis, su alto poder osmótico, el proceso mecánico de introducir y retirar el líquido, la glucosa y sus productos de degradación hacen de la diálisis peritoneal un proceso bioincompatible capaz de producir daño a la cavidad peritoneal. Por este motivo, hacen falta más estudios a nivel molecular y celular que permitan conocer los efectos in vitro e in vivo de la exposición a estas soluciones y estudiar nuevos tratamientos farmacológicos que permitan minimizar los efectos adversos que pueden aparecer en los pacientes que precisan DP.

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso celular genéticamente controlado por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos. La exposición a los líquidos de DP incrementa las especies reactivas de oxígeno (ROS) e induce apoptosis en las células mesoteliales de peritoneo (*Yang AH, Chen JY, Lin YP, et al. Kidney Int 1997; 51: 1280-8*). Estos dos procesos pueden estar relacionados, ya que se sabe que las ROS pueden activar p38 MAPKs y desencadenar un proceso apoptótico, e incrementar la expresión de mediadores proinflamatorios que intensifican la citotoxicidad de los líquidos de diálisis. Se observa que, en la apoptosis inducida se produce un incremento de la fosforilación de p38-MAPK (*Sepúlveda JC, Moreno Manzano V, Alique M, et al. Nefrología 2005; 25: 131-40*), y que, por el contrario, tratamientos antiapoptóticos disminuyen la fosforilación de p38 MAPK (*Vorobiov M, Malki M, Shnaider A, et al. Perit Dial Int 2008; 28: 648-54*). Por este motivo, la medición de la fosfoproteína 38 (fosfo-p38) MAPK sirve para evaluar el efecto antiapoptótico que poseen distintos agentes.

Otro proceso que desencadena la exposición a los líquidos de diálisis peritoneal es la producción de fibronectina (*Ha H, Yu MR, Lee HB. Kidney Int 2001; 59: 463-70; Lee HB, Yu MR, Song JS, et al. Kidney Int 2004; 65: 1170-9*). Esta proteína es importante en procesos fibrosantes y en la transición epitelio-mesenquimal de las células mesoteliales de peritoneo. Ambos procesos están relacionados con la pérdida de capacidad dialítica del peritoneo.

En los pacientes tratados con DP se siguen buscando complementos terapéuticos que minimicen el daño de los líquidos de diálisis a largo plazo.

La renina es la primera enzima del eje renina-angiotensina-aldosterona, que juega un papel central en el control de la tensión arterial. La renina transforma el angiotensinógeno en angiotensina I, la cual, por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), es convertida en angiotensina II. La angiotensina tiene tanto efectos directos como indirectos sobre las causas de la hipertensión arterial. Por un lado origina contracción de la musculatura lisa arterial, lo que lleva a vasoconstricción y aumento de la presión arterial. Por otra parte aumenta la síntesis de aldosterona, lo que origina retención de sodio y agua en los túbulos renales, aumento del volumen plasmático e indirectamente aumento de la tensión arterial. Aliskiren (WO2007147596 (A1)) se une a la proteína S3<sup>bp</sup>, necesaria para el paso de angiotensina I a angiotensina II, con lo que se impide la síntesis de la renina (*Rahuel J, Rasetti V, Maibaum J, et al. Chem Biol 2000;7:493-504*).

Por lo tanto es necesario desarrollar nuevas soluciones para diálisis peritoneal que solucionen todos los problemas anteriormente enunciados. De esta manera, en la presente invención se ha desarrollado un nuevo tipo de solución para diálisis que previene las deficiencias de otras soluciones descritas en el estado de la técnica.

## DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a soluciones de diálisis peritoneal que comprenden Aliskiren, al menos un electrolito, al menos una solución tampón, y al menos un agente osmótico para el tratamiento de pacientes con fallo renal sometidos a diálisis peritoneal.

De esta manera se ejerce una doble funcionalidad, la primera o clásica perteneciente a los líquidos de diálisis y la segunda debido al aliskiren, el cual reduce la toxicidad de estas soluciones sobre las células mesoteliales de peritoneo. Ello es debido mediante la reducción de especies reactivas de oxígeno, la fosforilación de p38MAPK y la activación de la Caspasa 3, procesos que pueden ser generados por las altas concentraciones de glucosa que contienen las soluciones de diálisis peritoneal.

En consecuencia, la solución de diálisis peritoneal de la presente invención, previene el estrés oxidativo, los procesos apoptóticos y el consecuente daño peritoneal alargando, en consecuencia, el tiempo durante el cual el paciente puede utilizar diálisis peritoneal antes de tener que ser sometido a hemodiálisis.

Por lo tanto un primer aspecto esencial de presente invención se refiere a una solución para diálisis peritoneal que comprende los siguientes elementos:

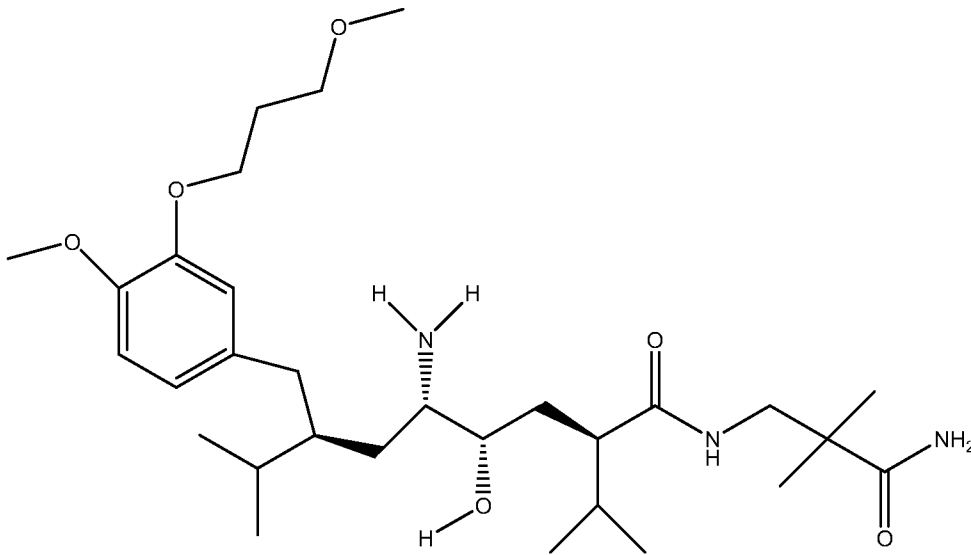
- a) al menos un electrolito;
- b) al menos una solución tampón;
- c) al menos un agente regulador de la presión osmótica;
- d) aliskiren o cualquiera de sus derivados.

En una realización preferida, el o los electrolitos se seleccionan del grupo formado por los siguientes electrolitos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  de diferentes sales o cualquier combinación de los mismos. La concentración de electrolito a añadir es: Na 100-200 mmol/l; K 0-4 mmol/l; Mg 0,1-2 mmol/l; Ca 0.5-3 mmol/l; Cl 50-200 mmol/l.

En otra realización preferida, la solución tampón se selecciona entre lactato, bicarbonato o combinación de los mismos. Según una realización preferida, el tampón es de bicarbonato. La concentración de tampón a añadir es desde 10 hasta 150 mmol/l.

En otra realización preferida, el agente osmótico de la solución de diálisis peritoneal, utilizado para remover el exceso de agua de la sangre, se selecciona y sin sentido limitativo del grupo formado por glucosa, poliglucosa, manitol, glicerol, aminoácidos, polipéptidos o cualquier combinación de los mismos. La cantidad de agente osmótico a añadir es desde 100 hasta 600 mOsm/kg.

Según otra realización preferida, el aliskiren es utilizado en la solución de diálisis peritoneal a una concentración entre 50nM y 1mM, por sus efectos inhibidores de los mecanismos responsables de la toxicidad de los líquidos de diálisis peritoneal sobre las células del peritoneo que incluyen, entre otros, la producción de radicales libres de oxígeno, por sus efectos inhibidores de la vía de la p38MAPK y de la vía de la Caspasa 3.



Un segundo aspecto esencial de la presente invención se refiere al uso de la solución de diálisis peritoneal para la elaboración de un medicamento.

Una realización preferida se refiere al uso de la solución de diálisis para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de enfermedades renales.

Otra realización preferida se refiere al uso de la solución de diálisis para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de la toxicidad sobre células mesoteliales del peritoneo.

Otra realización preferida se refiere al uso de la solución de diálisis para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o reducción de especies reactivas de oxígeno, la fosforilación de la proteína p39MAPK y la activación de la caspasa 3.

Otra realización preferida se refiere al uso de la solución de diálisis para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento del estrés oxidativo, los procesos apoptóticos, la expresión de genes que conllevan daño de las células peritoneales y el daño peritoneal generado por los líquidos de diálisis.

Otra realización preferida se refiere al uso de la solución de diálisis para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de la insuficiencia renal crónica.

Normalmente, la solución de diálisis peritoneal de la presente invención es administrada 4 veces al día, en un volumen de 2 litros por dosis. La solución es administrada a pacientes que sufren insuficiencia renal crónica de acuerdo a los métodos normalmente utilizados para realizar la diálisis peritoneal. Más concretamente, la solución es administrada al peritoneo a través de un catéter preimplantado en el peritoneo. Normalmente, se necesitan unas 4-6 horas para remover los desechos metabólicos acumulados en la sangre de pacientes con fallo renal.

A continuación se describen ejemplos de la metodología y los resultados que apoyan la presente invención, pero la cobertura de la presente invención no está limitada a ellos.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**FIG. 1,** describe una tinción inmunohistoquímica con HBME-1 positiva en cultivo primario de células mesoteliales de peritoneo de rata (100x). Los controles negativos utilizados no mostraron positividad (datos no mostrados).

**FIG. 2,** Efectos de D-glucosa a 50 mM (A) y 83 mM (B) sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en PMCs de rata. Tras la incubación de las células con vehículo o D-glucose (50 mM or 83 mM) durante 1-8 h, la intensidad de dichlorofluorescein (DCF) se midió por citometría de flujo como se describe en Material y Métodos. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM, n=3. \* p <0,05 comparado con el vehículo (V).

**FIG. 3,** Papel de la caspasa 3 en la toxicidad celular mediada por 50 mM (A) y 83 mM (B) de D-glucosa en PMCs. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM, n=3. \* p <0,05 comparado con el vehículo (V).

**FIG. 4,** Efectos de D-glucosa a 50 mM (A) y 83 mM (B) sobre la fosforilación de p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) en PMCs de rata. Panel superior: Un experiment representativo. Panel inferior: Análisis densitométrico de los niveles de phospho-p38 normalizados con respect a las células tratadas con el vehículo (V). Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM, n=3. \* p <0,05 comparado con el vehículo (V).

**FIG. 5,** Efectos tóxicos de aliskiren en PMCs de rata. Las células se trataron con vehículo o aliskiren durante 72 h y la viabilidad celular se evaluó cuantificando la LDH liberada al medio de cultivo. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM, n=12. \* p <0,05 comparado con el control (vehicle).

**FIG. 6,** Efecto de aliskiren sobre los cambios producidos por D-glucosa a 50 mM (A) y 83 mM (B) en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en PMCs de rata. Las células se incubaron con D-glucosa a 50 mM (A) y 83 mM (B) durante 8 h en presencia o ausencia de aliskiren (10-100  $\mu$ M) y la intensidad de dichlorofluorescein (DCF) se midió por citometría de flujo como se describe en Material y Métodos. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM, n=3. \* p <0,05 comparado con células no tratadas (control). # p <0,05, comparado con células tratadas con D-glucosa en presencia del vehículo (0).

**FIG. 7,** Efecto de aliskiren sobre los cambios producidos por D-glucosa a 50 mM en la actividad caspasa 3 en PMCs de rata. Las células se incubaron con D-glucosa a 50 mM durante 24 h en presencia o ausencia de aliskiren (10-100  $\mu$ M), y la actividad caspasa 3 se midió como se describe en Material y Métodos. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM, n=3. \* p <0,05 comparado con el control (C). # p <0,05 comparado con células no tratadas (control). # p <0,05, comparado con células tratadas con D-glucosa en presencia del vehículo (0).

**FIG. 8,** Efecto de aliskiren sobre los cambios producidos por D-glucosa a 50 mM en la fosforilación del p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) en PMCs de rata. Análisis densitométrico de los niveles de phospho-p38 normalizados con respect a los controles (C). Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM, n=3. \* p <0,05 comparado con células no tratadas (control). # p <0,05, comparado con células tratadas con D-glucosa en presencia del vehículo (0).

**FIG. 9,** Efecto de aliskiren en la expresión génica de Colágeno I en PMCs de rata expuestas a PDFs con glucosa al 1,5% (PDF 1,5%) diluidas 1:1 en medio de cultivo. Tras la incubación de las PMCs de rata con PDF 1,5% diluidas 1:1 en medio de cultivo durante 24 h, en presencia o ausencia de vehículo o distintas concentraciones de aliskiren (10-100  $\mu$ M), el RNA total se aisló y la real-time RT-PCR se llevó a cabo como se describe en Material y Métodos. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM, n=3. \* p <0,05 comparado con células no tratadas (control). # p <0,05, comparado con células tratadas con PDF 1,5% en presencia del vehículo (0).

**FIG. 10,** Efecto de aliskiren sobre la expresión génica de Colágeno III en PMCs de rata expuestas a PDFs con glucosa al 1,5% (PDF 1,5%) diluidas 1:1 en medio de cultivo. Tras la incubación de las PMCs de rata con PDF 1,5% diluidas 1:1 en medio de cultivo durante 24 h, en presencia o ausencia de vehículo o distintas concentraciones de aliskiren (10-100  $\mu$ M), el RNA total se aisló y la real-time RT-PCR se llevó a cabo como se describe en Material y Métodos. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM, n=3. \* p <0,05 comparado con células no tratadas (control). # p <0,05, comparado con células tratadas con PDF 1,5% en presencia del vehículo (0).

**FIG. 11,** Efecto de aliskiren en la expresión génica de Fibronectina en PMCs de rata expuestas a PDFs con glucosa al 1,5% (PDF 1,5%) diluidas 1:1 en medio de cultivo. Tras la incubación de las PMCs de rata con PDF 1,5% diluidas 1:1 en medio de cultivo durante 24 h, en presencia o ausencia de vehículo o distintas concentraciones de aliskiren (10-100  $\mu$ M), el RNA total se aisló y la real-time RT-PCR se llevó a cabo como se describe en Material y Métodos. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM, n=3. \* p <0,05 comparado con células no tratadas (control). # p <0,05, comparado con células tratadas con PDF 1,5% en presencia del vehículo (0).

**FIG. 12,** Niveles de D<sub>2</sub>D<sub>0</sub> glucosa tras la diálisis durante 4 semanas a PDFs en ratas. Las ratas se expusieron diariamente durante 4 semanas a vehículo (suero salino), 1,5% PDF, 2,3% PDF o 4,5% PDF suplementados con vehículo, 0,1 mg/Kg aliskiren o 1 mg/Kg aliskiren. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM, n=6 ratas por grupo. \* p <0,05, comparado con el grupo tratado con vehículo en ausencia de aliskiren (Vehículo). # p <0,05, comparado con sus respectivos grupos tratados con PDFs en ausencia de aliskiren.

**FIG. 13,** Niveles de  $D_2P_2$  creatinina tras la diálisis durante 4 semanas a PDFs en ratas. Las ratas se expusieron diariamente durante 4 semanas a vehículo (suero salino), 1,5% PDF, 2,3% PDF o 4,5% PDF suplementados con vehículo, 0,1 mg/Kg aliskiren o 1 mg/Kg aliskiren. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM, n=6 ratas por grupo. \* p <0,05, comparado con el grupo tratado con vehículo en ausencia de aliskiren (Vehículo). # p <0,05, comparado con sus respectivos grupos tratados con PDFs en ausencia de aliskiren.

**FIG. 14,** Expresión génica de p53 tras la diálisis durante 4 semanas a PDFs en ratas. Las ratas se expusieron diariamente durante 4 semanas a vehículo (suero salino), 1,5% PDF, 2,3% PDF o 4,5% PDF suplementados con vehículo, 0,1 mg/Kg aliskiren o 1 mg/Kg aliskiren. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM, n=6 ratas por grupo. \* p <0,05, comparado con el grupo tratado con vehículo en ausencia de aliskiren (Vehículo). # p <0,05, comparado con sus respectivos grupos tratados con PDFs en ausencia de aliskiren.

**FIG. 15,** Porcentaje de niveles de RNAm para BAX tras la diálisis durante 4 semanas a PDFs en ratas. Las ratas se expusieron diariamente durante 4 semanas a vehículo (suero salino), 1,5% PDF, 2,3% PDF o 4,5% PDF suplementados con vehículo, 0,1 mg/Kg aliskiren o 1 mg/Kg aliskiren. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM, n=6 ratas por grupo. \* p <0,05, comparado con el grupo tratado con vehículo en ausencia de aliskiren (Vehículo). # p <0,05, comparado con sus respectivos grupos tratados con PDFs en ausencia de aliskiren.

**FIG. 16,** Porcentaje de niveles de RNAm para Bcl-2 tras la diálisis durante 4 semanas a PDFs en ratas. Las ratas se expusieron diariamente durante 4 semanas a vehículo (suero salino), 1,5% PDF, 2,3% PDF o 4,5% PDF suplementados con vehículo, 0,1 mg/Kg aliskiren o 1 mg/Kg aliskiren. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM, n=6 ratas por grupo. \* p <0,05, comparado con el grupo tratado con vehículo en ausencia de aliskiren (Vehículo). # p <0,05, comparado con sus respectivos grupos tratados con PDFs en ausencia de aliskiren.

**FIG. 17,** Porcentaje de niveles de RNAm para Fibronectina tras la diálisis durante 4 semanas a PDFs en ratas. Las ratas se expusieron diariamente durante 4 semanas a vehículo (suero salino), 1,5% PDF, 2,3% PDF o 4,5% PDF suplementados con vehículo, 0,1 mg/Kg aliskiren o 1 mg/Kg aliskiren. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM, n=6 ratas por grupo. \* p <0,05, comparado con el grupo tratado con vehículo en ausencia de aliskiren (Vehículo). # p <0,05, comparado con sus respectivos grupos tratados con PDFs en ausencia de aliskiren.

**FIG. 18,** Porcentaje de niveles de RNAm para Colágeno III tras la diálisis durante 4 semanas a PDFs en ratas. Las ratas se expusieron diariamente durante 4 semanas a vehículo (suero salino), 1,5% PDF, 2,3% PDF o 4,5% PDF suplementados con vehículo, 0,1 mg/Kg aliskiren o 1 mg/Kg aliskiren. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM, n=6 ratas por grupo. \* p <0,05, comparado con el grupo tratado con vehículo en ausencia de aliskiren (Vehículo). # p <0,05, comparado con sus respectivos grupos tratados con PDFs en ausencia de aliskiren.

## EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención. Sin embargo, estos ejemplos no son limitativos. Tienen carácter informativo y en ningún caso limitante de las metodologías empleadas, las cuales pueden ser alteradas con el fin de alcanzar unos resultados similares.

En esta memoria descriptiva los símbolos y convenciones usadas en estos procedimientos, esquemas y ejemplos son consistentes con los usados en el Sistema Internacional y la bibliografía científica contemporánea, por ejemplo, el Journal of Medicinal Chemistry. Salvo que se indique otra cosa, todos los materiales de partida se obtuvieron de proveedores comerciales y se usaron sin purificación adicional. Específicamente, se pueden usar las siguientes abreviaturas en los ejemplos y a lo largo de toda la memoria descriptiva: g (gramos); mg (miligramos); Kg (kilogramos); mL (mililitros);  $\mu$ L (microlitros); mmol (milimoles); P.f. (punto de fusión); Hz (hertzio); MHz (megahertzio);  $\delta$  (desplazamiento químico); ppm (partes por millón); s (singlete); d (doblete); t (tripleto); q (cuartete); c (quintuplete); m (multiplete); J (constante de acoplamiento); RMN (resonancia magnética nuclear); EM (espectro de masas); ES (electrospray);  $m/z$  (Relación masa/carga); Anal. (Análisis Elemental); Rto (Rendimiento); TEA (triethylamina);  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (diclorometano);  $\text{CDCl}_3$  (cloroformo deuterado); DMSO (dimetilsulfóxido); i.p. (administración parental). Todas las temperaturas se expresan en  $^{\circ}\text{C}$  (grados Celsius).

### Ejemplos

#### *Cultivos de células mesoteliales de peritoneo de rata*

Las células mesoteliales de peritoneo de rata se aislaron por digestión enzimática conforme a protocolos descritos en *Hjelle JT, Golinska BT, Waters DC, et al. Perit Dial Int 1989; 9: 341-7*. Brevemente, ratas hembra de 200-400 g de peso de la cepa *Spragle-Dawley* fueron sacrificadas de acuerdo a lo establecido en el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre Protección de los Animales utilizados para Experimentación y otros fines científicos. Rápidamente, se abrió la cavidad abdominal y se extrajo la pared abdominal (peritoneo y músculo liso) en condiciones estériles. Las células mesoteliales se separaron de la superficie interna de la pared abdominal por digestión enzimática, incubando dicha superficie con medio de cultivo 199 (Sigma) y 0,5 mg/ml de colagenasa (Sigma) durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Tras la incubación, la superficie digerida de la pared abdominal se raspó para liberar completamente las células mesoteliales adheridas. Las células mesoteliales obtenidas se sembraron en placas de cultivo para su crecimiento y estudio, y se mantuvieron en medio 199 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100U/ml de penicilina y 100 $\mu$ g/ml de estreptomicina. Tras cada cultivo, la presencia de células mesoteliales de peritoneo se confirmó por su apariencia

morfológica y la expresión de marcadores específicos. Se utilizaron células entre los pases 3 y 6.

### *Estudios In vivo*

#### Animales

Setenta y ocho ratas hembra de la cepa female Sprague–Dawley y con un peso de 200–240 g (Charles River Breeding Laboratories) fueron utilizadas para los experimentos *in vivo*. Los animales se alojaron en un ambiente a temperatura constante, con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La comida y la bebida se administraron *ad libitum*. Todos los protocolos experimentales se llevaron a cabo siguiendo la directiva europea “European Community Council Directive 86/609/EEC”. Además, los experimentos con animales se aprobaron por el Comité de Uso y Cuidado Animal del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete.

#### Diseño experimental de los estudios in vivo y del Test de Equilibrio Peritoneal (PET)

Para los estudios in vivo, 78 ratas hembra de la cepa female Sprague–Dawley con un peso de 200–240 g (Charles River Breeding Laboratories) fueron utilizadas: 54 ratas se asignaron al grupo de animales en los que se administraron soluciones de diálisis peritoneal (PDF) con alta glucosa, las cuales se dividieron en 3 diferentes subgrupos con 18 ratas cada uno a los que se les administraron, respectivamente, 3 PDFs con diferentes concentraciones de glucosa (**Fresenius** Medical Car, Bad Homburg, Germany). Además, a 18 ratas se les administró un vehículo (suero salino) y otras 6 ratas fueron utilizadas como grupo control (no dializadas). Las 18 ratas del grupo “vehículo” y las pertenecientes a los grupos 1,5% PDF, 2,3% PDF y 4,5% PDF, se dividieron en otros 3 subgrupos de 6 ratas cada uno. Las PDFs administradas a cada uno de estos grupos se complementaron con suero salino, con 0.1 mg/Kg/day aliskiren aliskiren (Novartis Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA) o con 1 mg/Kg/day aliskiren. Para la dialysis peritoneal, las ratas recibieron 20 ml de la PDF correspondiente, a través de una aguja de 22G, diariamente durante 4 semanas.

Al final del periodo experimental (4 semanas), 30 ml de una PDF comercial con glucosa al 2,3% (**Fresenius** Medical Car, Bad Homburg, Germany) se administró intraperitonealmente utilizando una aguja de 22G. Dos horas más tarde, los animales se anestesiaron intraperitonealmente con pentobarbital (50 mg/kg) y se recogió sangre a través de una punción cardiaca. A continuación, se hizo una incisión abdominal por la línea alba y se recogió el volumen residual del peritoneo con una jeringa. Durante el PET, los animales estuvieron despiertos y tuvieron acceso libre al agua y a la comida. El peso corporal se midió al inicio y al final del periodo experimental. Ninguna rata se perdió y todos los animales mostraron signos de estar sanos durante el estudio, el cual incluye las repetidas inyecciones de PDFs.

Las muestras de sangre y dializado se centrifugaron y almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las concentraciones de creatinina y glucosa en el suero y el dializado se midieron utilizando métodos enzimáticos. El transporte peritoneal de solutos se calculó, por un lado, como la concentración de glucosa en el dializado a las 2 h del PET relativa a la concentración de glucosa inicial en la PDF ( $D_2/D_0$  glucosa), y por otro, como el ratio de concentración dializado/plasma de creatinina ( $D_2/P_2$  creatinine) a las 2 h del PET. Al final del PET, los animales se sacrificaron con una sobredosis de anestesia y las células mesoteliales de peritoneo (PMCs) se aislaron y cultivaron como se describe más adelante.

#### *Preparación de las soluciones de diálisis peritoneal de la presente invención*

Las soluciones de diálisis peritoneal se prepararon añadiendo a medio M199, cuya composición aparece en la Tabla 1, las cantidades de aliskiren descritas en la Tabla 2 y las cantidades de glucosa descritas en la Tabla 3. Se han estudiado las combinaciones de cada una de las concentraciones de aliskiren que aparecen en la Tabla 2 y las de glucosa que aparecen en la Tabla 3.

**TABLA 1.** Composición del medio 199.

Sales Inorgánicas (electrolitos)	g/L	Buffer tampon de pH	g/L	Agente osmótico	g/L
CaCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O	0,2	NaHCO <sub>3</sub>	2,2	Glucosa	1
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> + 9H <sub>2</sub> O	0,00072				
MgSO <sub>4</sub>	0,09767				
KCl	0,4				
Acetato sódico	0,05				
NaCl	6,8				
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,122				
Aminoácidos	g/L	Vitaminas	g/L	Otros	g/L
L-Alanina	0,025	Ácido Ascórbico Na	5,66E-05	Sulfato de Adenina	0,01
L-Arginina HCl	0,07	D-Biotina	0,00001	Trifosfato de Adenosina 2Na	0,001
Ácido L-Aspartico	0,03	Calciferol	0,0001	Monofosfato de Adenosina Na	0,000239
L-Cistina HCl + H <sub>2</sub> O	0,00011	Colina Cl	0,0005	Colesterol	0,0002
L-Cisteina 2HCl	0,026	Ácido Fólico	0,00001	Deoxirribosa	0,0005
Acido L-Glutámico	0,0668	Menadiona (bisulfito sódico)	0,000016	Glutation (reducido)	0,00005
L-Glutamina	0,1	mio-Inositol	0,00005	Guanina HCl	0,0003
Glicina	0,05	Niacinamida	0,000025	Hipoxantina	0,0003
L-Histidina HCl + H <sub>2</sub> O	0,02188	Ácido Nicotínico	0,000025	Rojo Fenol Na	0,0213
Hidroxil-L-Prolina	0,01	Ácido p-Amino Benzoico	0,00005	TWEEN 80	0,02
L-Isoleucina	0,02	Ácido D-Pantoténico ½Ca	0,00001	Ribosa	0,0005
L-Leucina	0,06	Piridoxal HCl	0,000025	Timina	0,0003
L-Lisina HCl	0,07	Piridoxina HCl	0,000025	Uracilo	0,0003
L-Metionina	0,015	Acetato de Retinol	0,00014	Xantina Na	0,000344
L-Fenilalanina	0,025	Riboflavina	0,00001		
L-Prolina	0,04	Fosfato de DL-alfa-Tocoferol Na	0,00001		
L-Serina	0,025	Tiamina HCl	0,00001		
L-Treonina	0,03				
L-Triptofano	0,01				
L-Tirosina 2Na 2H <sub>2</sub> O	0,05766				
L-Valina	0,025				

**TABLA 2.** Concentraciones de Aliskiren de las soluciones de diálisis peritoneal.

Concentración de Aliskiren ( $\mu\text{M}$ )	Cantidad de Aliskiren añadida (g/L)
0,1	0,000055
1	0,00055
10	0,0055
50	0,0275
100	0,055
1000	0,55

**TABLA 3.** Concentraciones de Glucosa de las soluciones de diálisis peritoneal.

Concentración de Glucosa (mM)	Cantidad de Glucosa añadida (g/L)
5,6	0
50	8
83	14

### *Estudios de Citotoxicidad*

Pruebas de toxicidad se realizaron en los cultivos de células mesoteliales de peritoneo de rata determinando la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (*Posadas I, López-Hernández B, Clemente MI, et al. Pharm Res 2009; 26: 1181-91*). Estos estudios se realizaron para estudiar la toxicidad de las soluciones de diálisis peritoneal del presente invento.

Para ello, las células se sembradas en placas de 24 pocillos y fueron expuestas a las soluciones de diálisis peritoneal objetivo del presente invento para realizar el estudio de su toxicidad. Los efectos tóxicos se evaluaron midiendo la ruptura de la membrana celular y la consiguiente liberación de la LDH al sobrenadante a través del kit CytoTox96® (Promega). Las células se despegaron mecánicamente, lavadas con PBS, y centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos. La absorbancia del lisado y del sobrenadante celular se obtuvo utilizando un espectrofotómetro de microplacas a una longitud de onda de 490 nm, siguiendo las indicaciones comerciales.

### *Evaluación de cambios en la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) por citometría de flujo*

Tras lavados con PBS, las células se incubaron con 5,6-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H2DCFDA, Invitrogen) durante 15 minutos a 37°C, siguiendo el protocolo estándar (Lee HB, 2004). Tras la incubación, se recogieron los medios condicionados y las células se lavaron con PBS y se tripsinizaron. Las células totales - vivas y muertas - presentes en la suspensión resultante al juntar el tripsinizado celular y el medio condicionado se centrifugaron a 3000 x g durante 5 min a 4°C. Por último, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en medio de cultivo 199 para su análisis en el citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU). A partir de la evaluación

de 10.000 células por condición experimental se calculó la producción de especies reactivas de oxígeno.

#### *Evaluación de la fosforilación/desfosforilación de p38 MAPK por Western blot*

Para obtener la proteína total de los cultivos celulares se procedió a recoger el medio de cultivo y reemplazarlo con PBS. Las células se despegaron mediante tripsinización y se juntaron con el medio recogido anteriormente. El "pellet" resultante al centrifugar a 3000 x g durante 5 min a 4°C., enriquecido en proteínas, se resuspendió en un buffer de lisis (100mM HEPES, 5mM DTT, 5mM EGTA, 0,04% Nonidet P-40 y 20% glicerol) con inhibidores de proteasas y fosfatasa y se incubó 60 minutos a 4°C. Tras la incubación, se procedió a centrifugar las muestras a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y las sobrenadantes se conservaron a -80°C. El contenido en proteína de los lisados celulares se determinó mediante el método Bradford, según protocolo estándar (*Vorobiov M, Malki M, Shnaider A, et al. Perit Dial Int 2008; 28: 648-54*). Se cargaron 20 µg de proteína/pocillo de cada muestra en geles de poliacrilamida al 10%. Los geles se transfirieron por electroforesis a membranas de nitrocelulosa usando un "blotter" semi-seco. Las proteínas unidas a nitrocelulosa se visualizaron con Ponceau S, seguidas de bloqueo con TTBS (50 mM Tris, pH 7.5, 200 mM NaCl, 0.1% Tween) con 5% de leche desnatada y, posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario para p38 MAPK o phospho-p38 MAPK (Cell Signaling Technology) toda la noche a 4°C. Tras lavados en TTBS, se aplicó el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección se realizó por quimioluminiscencia (ECL). La intensidad de las bandas se cuantificó por niveles de gris con un sistema de análisis de imagen apropiado (Quantity One).

#### *Determinación de la actividad de caspasa 3 por ELISA*

Para determinar la actividad de caspasa 3 (*Posadas I, Vellecco V, Santos P, et al. Br J Pharmacol 2007; 150: 577-85*), las células mesoteliales de rata fueron sembradas en placas de 6 pocillos hasta que llegaron a una confluencia del 80%. Tras la exposición a las soluciones de diálisis peritoneal con aliskiren, se procedió a recoger el medio de cultivo y reemplazarlo con PBS. Las células se despegaron mediante tripsinización y se juntaron con el medio recogido anteriormente. El "pellet" resultante al centrifugar a 3000 x g durante 5 min a 4°C., enriquecido en proteínas, se resuspendió en un buffer de lisis (100mM HEPES, 5mM DTT, 5mM EGTA, 0,04% Nonidet P-40 y 20% glicerol) y se incubó 60 minutos a 4°C. Tras la incubación, se procedió a centrifugar las muestras a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y la concentración de proteína en los sobrenadantes se determinará mediante el método Bradford, según protocolo estándar. Los extractos celulares (40 µg de proteína) se incubaron con un buffer de reacción (25mM HEPES, 10% sucrose, 0,1% 3-[(3-cholamido propyl)-dimethylammonio]-2-

hydroxy-1-propanesulfonic acid, 10mM DTT) que contenía sustrato fluorescente Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4 trifluoromethyl-coumaryl (Z-DEVD-AFC) 50µM, a 37°C durante 1h. La fluorescencia emitida se determinó en un espectrofluorímetro (Tecan, Austria) a una longitud de onda de excitación de 400 nm y una longitud de onda de emisión de 505 nm.

#### *Real-time RT-PCR.*

La expresión de RNA se evaluó por real-time RT-PCR en PMCs. RNA total se aisló mediante un reactivo comercial (Tripure, Sigma, St. Louis, MO) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y concentración del RNA se evaluó por espectrofotometría (Infinite 200, Tecan, Salzburg, Austria) usando 1 µl de la muestra de RNA. El RNA total se testó siempre en un gel de agarosa, para confirmar la integridad de las bandas de 18S y 28S mRNA. El cDNA se sintetizó utilizando was el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para la real-time RT-PCR, el cDNA se amplificó usando SYBR Green PCR Master mix con el StepOne Real-Time PCR System y el software StepOne v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las siguientes parejas de primers se utilizaron para amplificar: fibronectina, 5'-GCA-CAG-GGG-AAG-AAA-AGG-AG-3' (sense) y 5'-TTG-AGT-GGA-TGG-GAG-GAG-AG-3' (antisense); Colágeno I, 5'-TCA-CCT-ACA-GCA-CGC-TTG-3' (sense) y 5'-GGT-CTG-TTT-CCA-GGG-TTG-3'(antisense); Colágeno III, 5'-ATA-TCA-AAC-ACG-CAA-GGC-3' (sense) y 5'-GAT-TAA-AGC-AAG-AGG-AAC-AC-3' (antisense); P53, 5'-CCT-CCT-CAG-CAT-CTT-ATC-CG-3' (sense) y 5'-CAC-AAA-CAC-GCA-CCT-CAA-A-3' (antisense); BAX, 5'-GAT-GCG-TCC-ACC-AAG-AA-3' (sense) y 5'-AGT-AGA-AGA-GGG-CAA-CCA-C-3' (antisense); y Bcl-2, 5'-CCC-AAG-GGA-AGA-CGA-TG-3' (sense) y 5'-GAG-CGG-GTA-GGG-AAA-GA-3'(antisense). Las secuencias de primers tenían una temperatura de annealing similar a 60°C. La reacción de real-time RT-PCR se realizó a 95°C durante 10 min, seguida por 40 ciclos de: 95°C durante 15 sec y 60°C durante 1 min. Las curvas de disociación se analizaron para confirmar la amplificación de un único producto de PCR. Todas las muestras fueron procesadas por triplicado. En cada experimento, se calculó la media del ciclo umbral [cycle threshold (CT)] de los triplicados de cada uno de los genes estudiados, pudiendo así comparar

la expresión génica tras diferentes tratamientos (*Methods* 25, 402-408 (2001)). Para normalizar los datos, la expresión génica de  $\beta$ -actina se utilizó como control endógeno.

#### *Recogida y análisis de datos*

Cada valor obtenido corresponderá a un mínimo de 3 experimentos realizados por duplicado. Todos los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM. Las diferencias entre los grupos, para cada uno de los parámetros analizados, se analizaron con un test ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis), seguido de una prueba ad-hoc (Dunnett). Una p menor o igual a 0,05 se consideró significativa. El software SPSS 13.0 (Chicago, IL) se utilizó para realizar todo el análisis estadístico.

#### *Resultados*

El cultivo de células mesoteliales utilizado en los experimentos de esta invención, muestra reactividad para HBME-1 (Figura 1).

El incremento en el tiempo de exposición a diferentes concentraciones de glucosa en el líquido de diálisis es tóxico para las células mesoteliales, lo que constituye la base de la toxicidad de las soluciones de diálisis peritoneal sobre el peritoneo. Puede observarse que el incremento en el tiempo de exposición a glucosa, aumenta la producción de radicales libres en las células mesoteliales (Figura 2).

Debido a esta producción de radicales libres, se activan mecanismos efectores de muerte celular como es la activación de caspasa 3 (Figura 3)

La exposición a soluciones con elevadas concentraciones de glucosa incrementa la fosforilación de la proteína p38 que es considerado un índice de toxicidad en las células mesoteliales (Figura 4).

La adición de aliskiren al medio de cultivo no mostró toxicidad para las células mesoteliales hasta que se alcanzó una concentración de 1 mM (Figura 5)

La adición de Aliskiren al medio de diálisis previno tanto la producción de especies reactivas del oxígeno (Figura 6) como la activación de caspasa (Figura 7) como la fosforilación de la proteína p38 (Figura 8) en células peritoneales en cultivo.

La adición de Aliskiren al medio de diálisis redujo los niveles de los RNAm para los marcadores de fibrosis peritoneal colágeno I (Figura 9), colágeno III (Figura 10) y fibronectina (Figura 11) en células peritoneales en cultivo.

La presencia de Aliskiren en el medio de diálisis redujo el daño peritoneal in vivo en ratas dializadas (Figuras 12 y 13).

La presencia de aliskiren durante la diálisis peritoneal crónica en ratas redujo la expresión de RNAm, en células peritoneales obtenidas de dichas ratas, para las proteínas pro-apoptóticas p53 (Figura 14) y Bax (Figura 15).

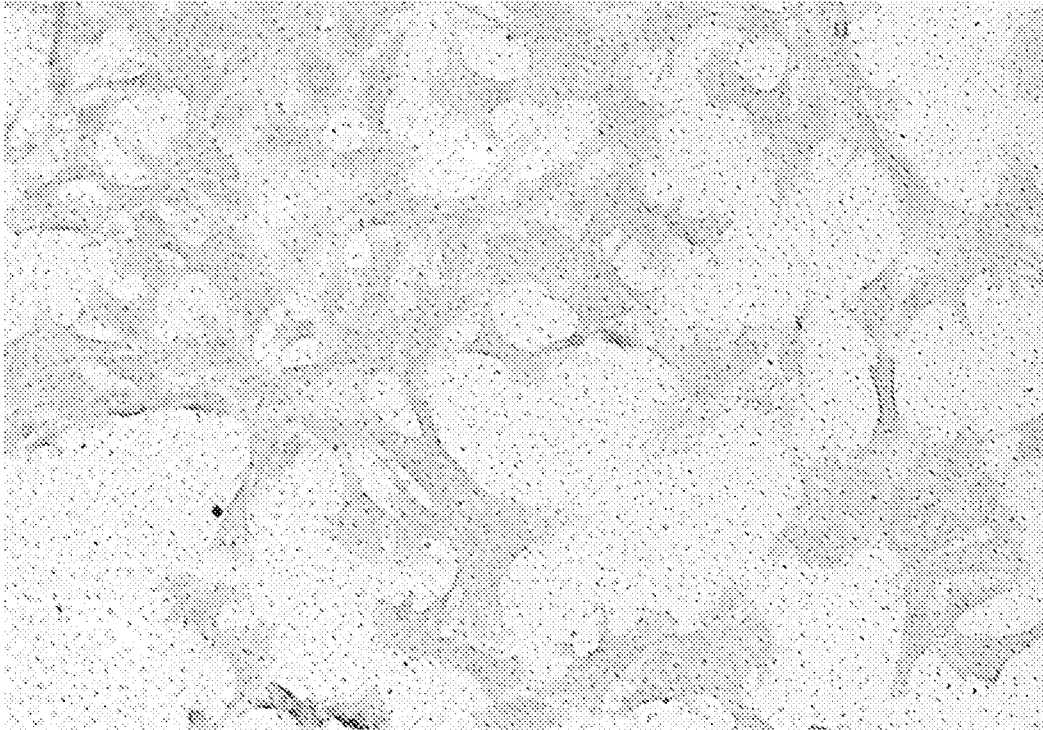
La presencia de aliskiren durante la diálisis peritoneal crónica en ratas aumentó la expresión de RNAm, en células peritoneales obtenidas de dichas ratas, para la proteína anti apoptótica Bcl-2 (Figura 16).

La presencia de aliskiren durante la diálisis peritoneal crónica en ratas aumentó la expresión de RNAm, en células peritoneales obtenidas de dichas ratas, para los marcadores de fibrosis peritoneal, fibronectina (Figura 17) y colágeno III (Figura 18).

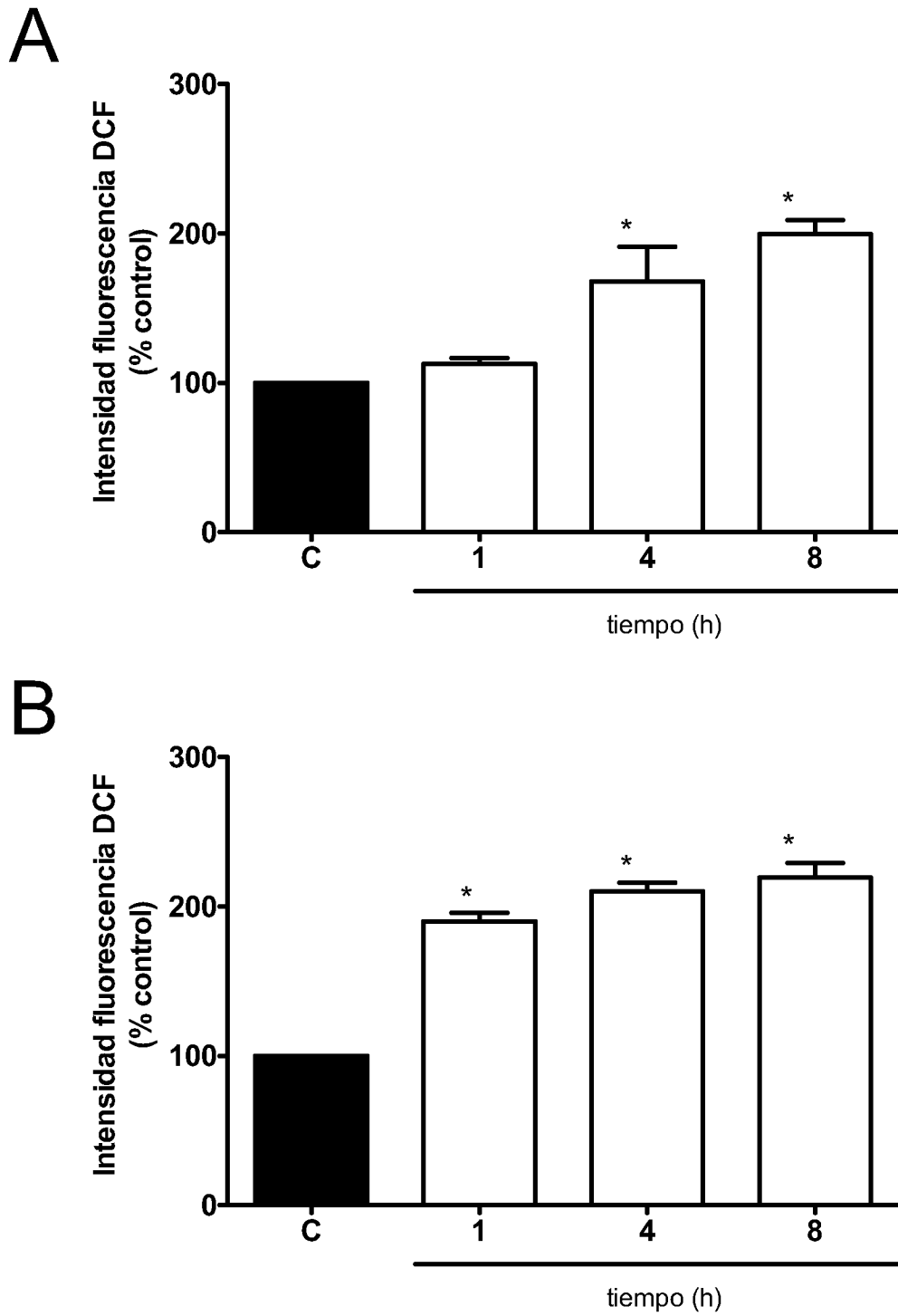
## REIVINDICACIONES

1. Solución para diálisis peritoneal que comprende los siguientes elementos:
  - a) al menos un electrolito;
  - b) al menos una solución tampón;
  - c) al menos un agente regulador de la presión osmótica; y
  - d) aliskiren o cualquiera de sus derivados.
2. Solución para diálisis peritoneal según la reivindicación 1, donde el o los electrolitos se seleccionan del siguiente grupo formado por:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  o cualquier combinación de los mismos.
3. Solución para diálisis peritoneal según la reivindicación 2, donde cada electrolito tiene el siguiente rango de concentraciones: Na 100-200 mmol/l; K 0-4 mmol/l; Mg 0,1-2 mmol/l; Ca 0.5-3 mmol/l; Cl 50-200 mmol/l.
4. Solución para diálisis peritoneal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la solución tampón se selecciona entre lactato, bicarbonato o combinación de los mismos.
5. Solución para diálisis peritoneal según la reivindicación 4, donde la solución tampón está en una concentración desde 10 hasta 150 mmol/l.
6. Solución para diálisis peritoneal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el agente osmótico se selecciona del grupo formado por glucosa, poliglucosa, manitol, glicerol, aminoácidos, polipéptidos o cualquier combinación de los mismos.
7. Solución para diálisis peritoneal según la reivindicación 6, donde la cantidad del agente osmótico a añadir es desde 100 hasta 600 mOsm/kg.
8. Solución para diálisis peritoneal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el aliskiren o cualquiera de sus derivados está en una concentración desde 50nM hasta 1mM.
9. Uso de la solución de diálisis peritoneal para la elaboración de un medicamento.
10. Uso de la solución de diálisis para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de enfermedades renales.
11. Uso de la solución de diálisis para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de la toxicidad sobre células mesoteliales del peritoneo.
12. Uso de la solución de diálisis para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o reducción de especies reactivas de oxígeno, la fosforilación de la proteína p39MAPK y la activación de la caspasa 3.
13. Uso de la solución de diálisis para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento del estrés oxidativo, los procesos apoptóticos, la expresión de genes que conllevan daño de las células peritoneales y el daño peritoneal generado por los líquidos de diálisis.
14. Uso de la solución de diálisis para la elaboración de un medicamento para la

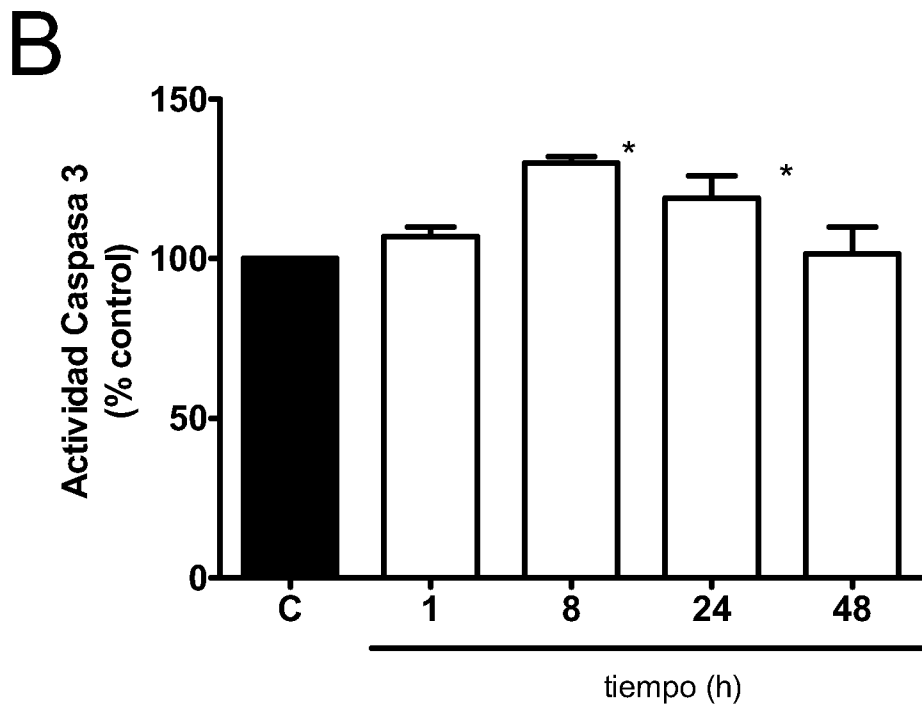
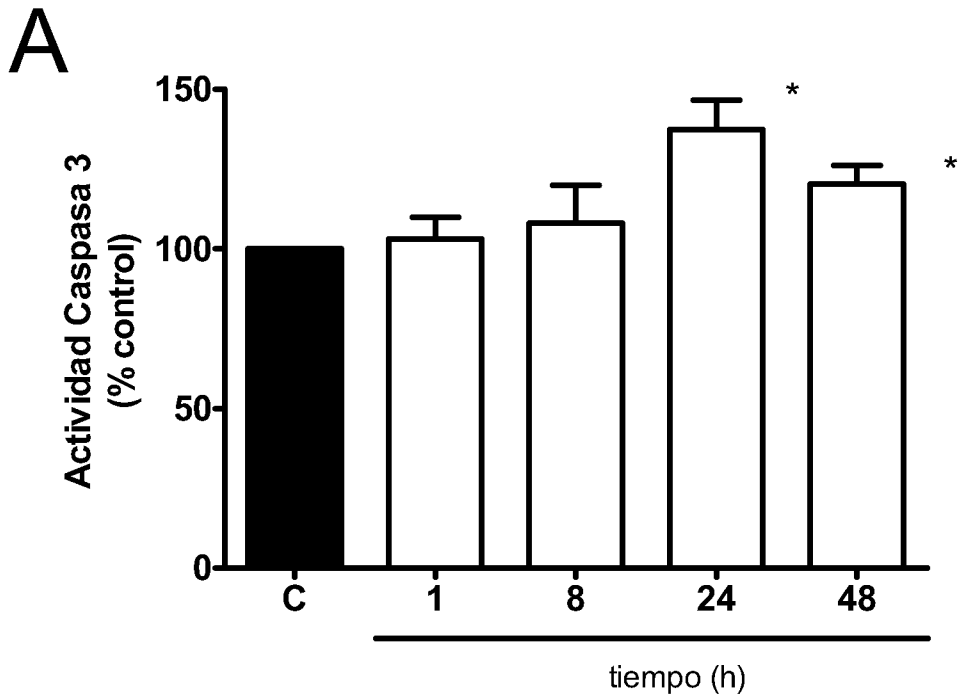
prevención y/o tratamiento de la insuficiencia renal crónica.



**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**

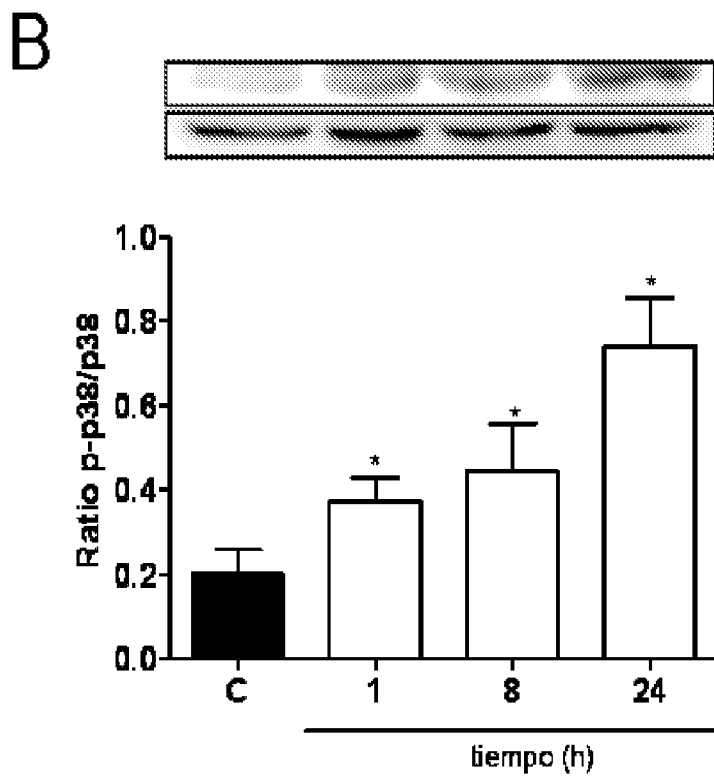
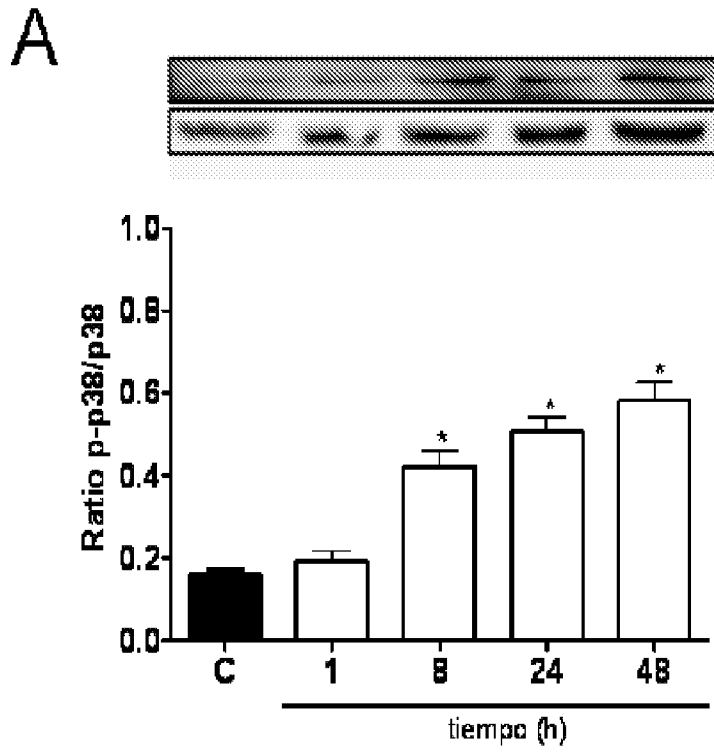


Fig. 4

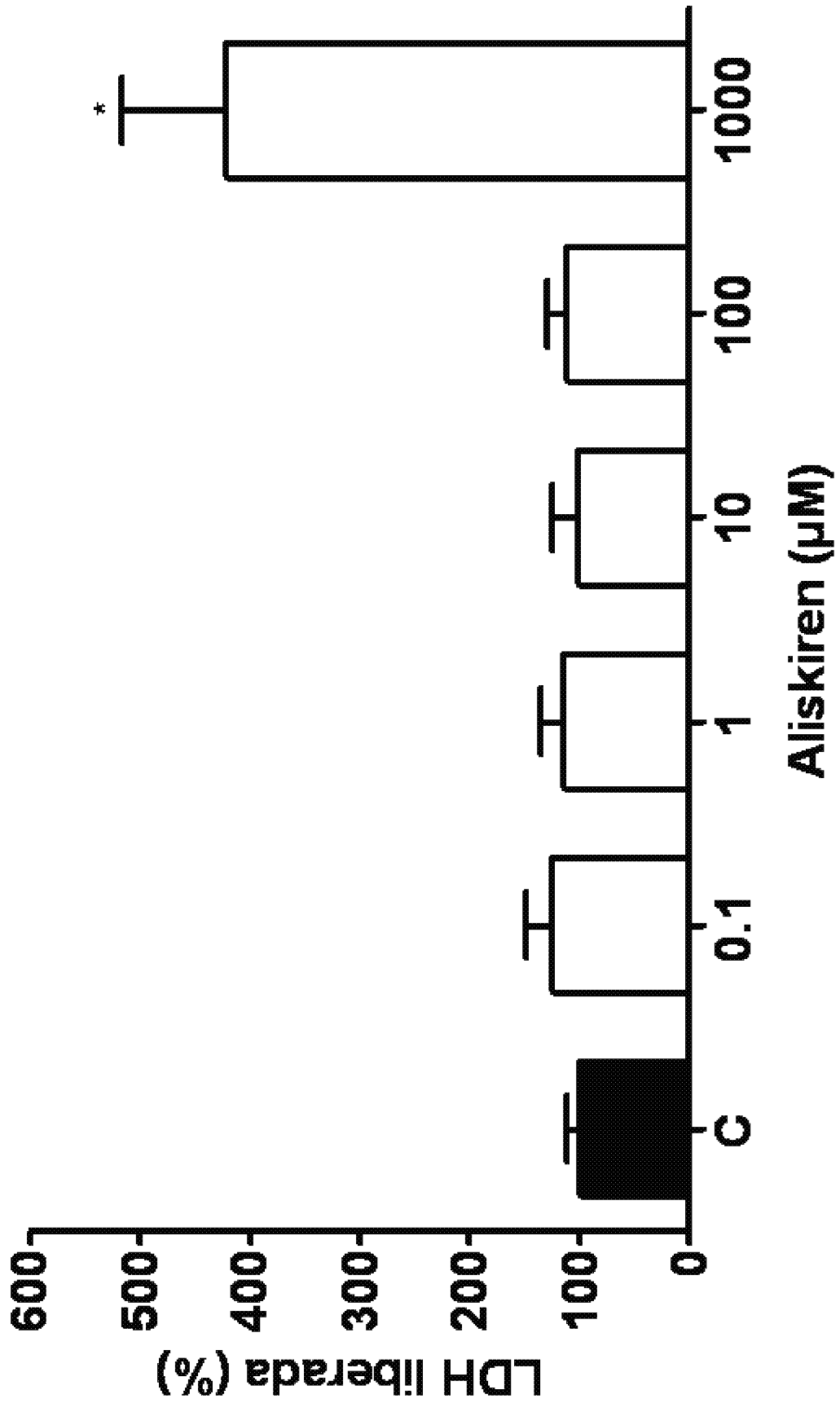
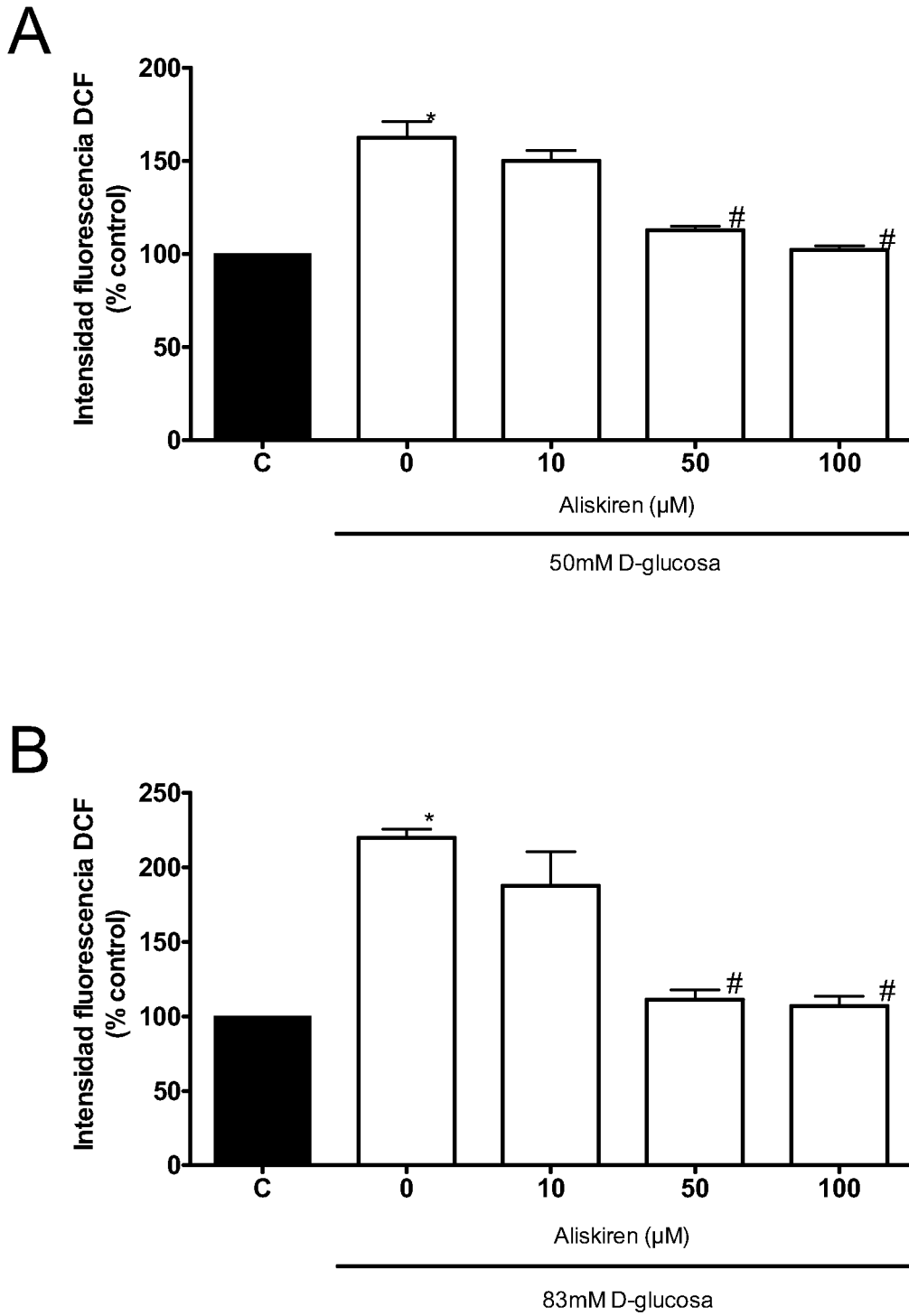


Fig. 5



**Fig. 6**

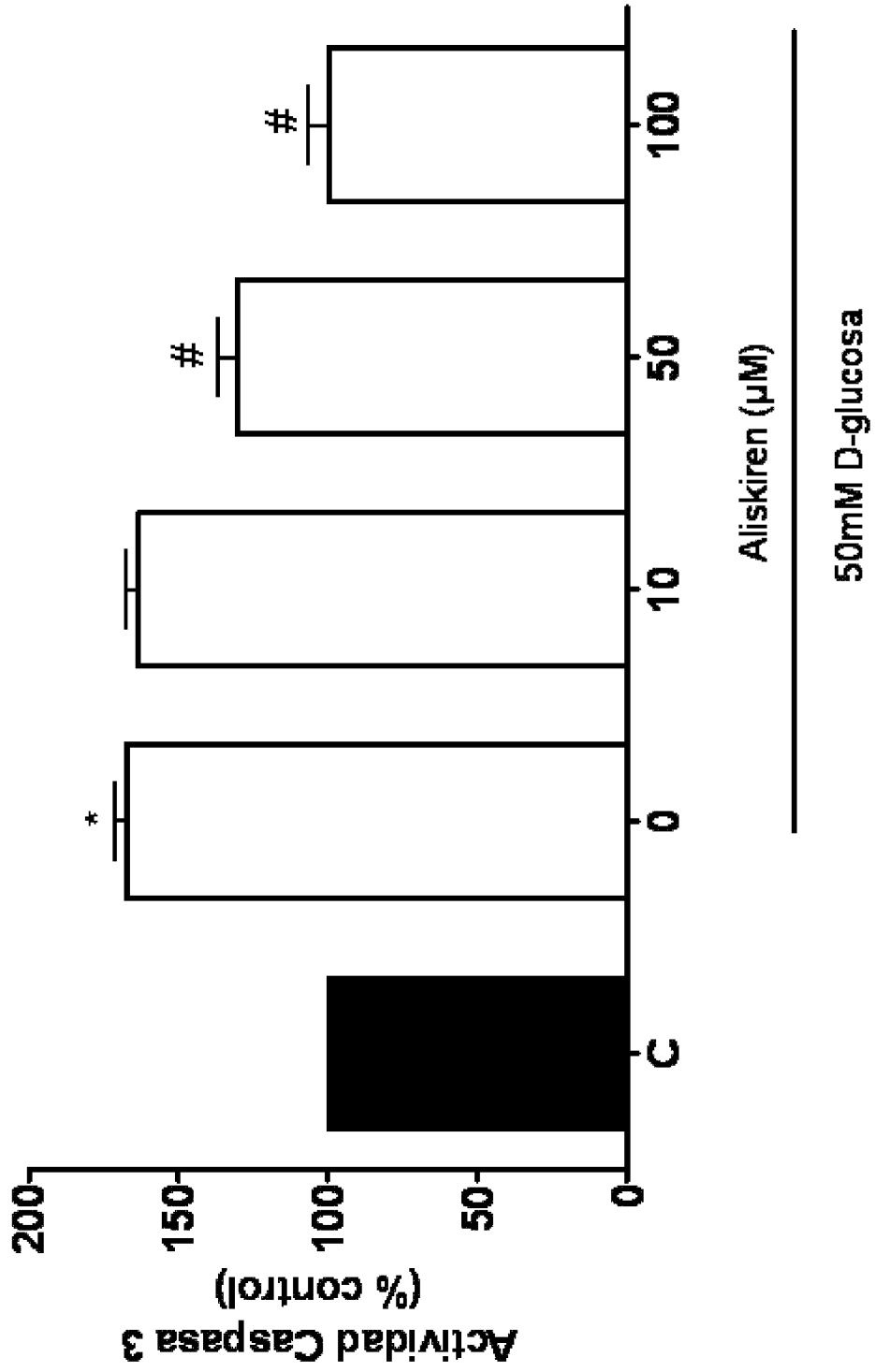


Fig. 7

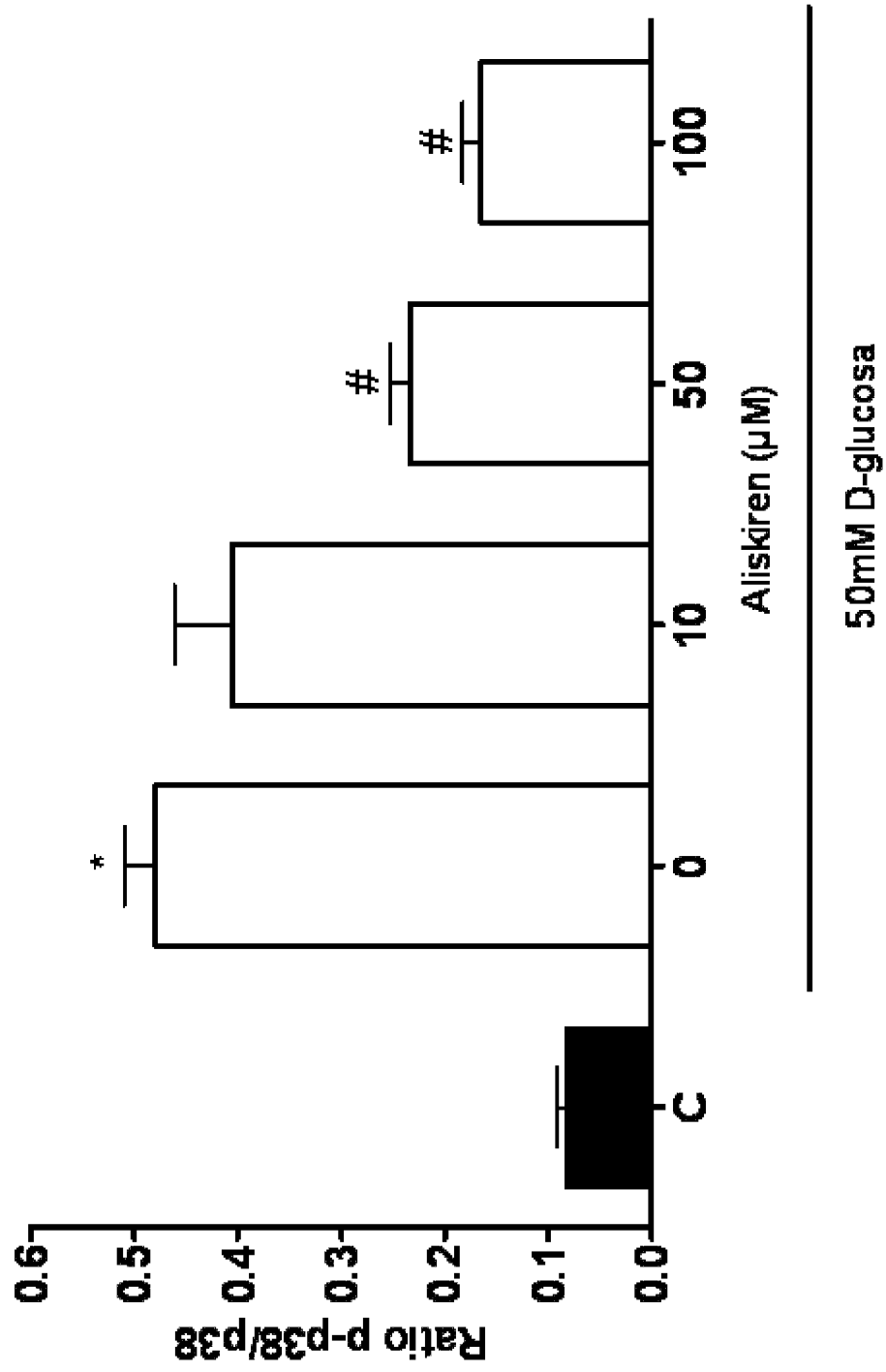


Fig. 8

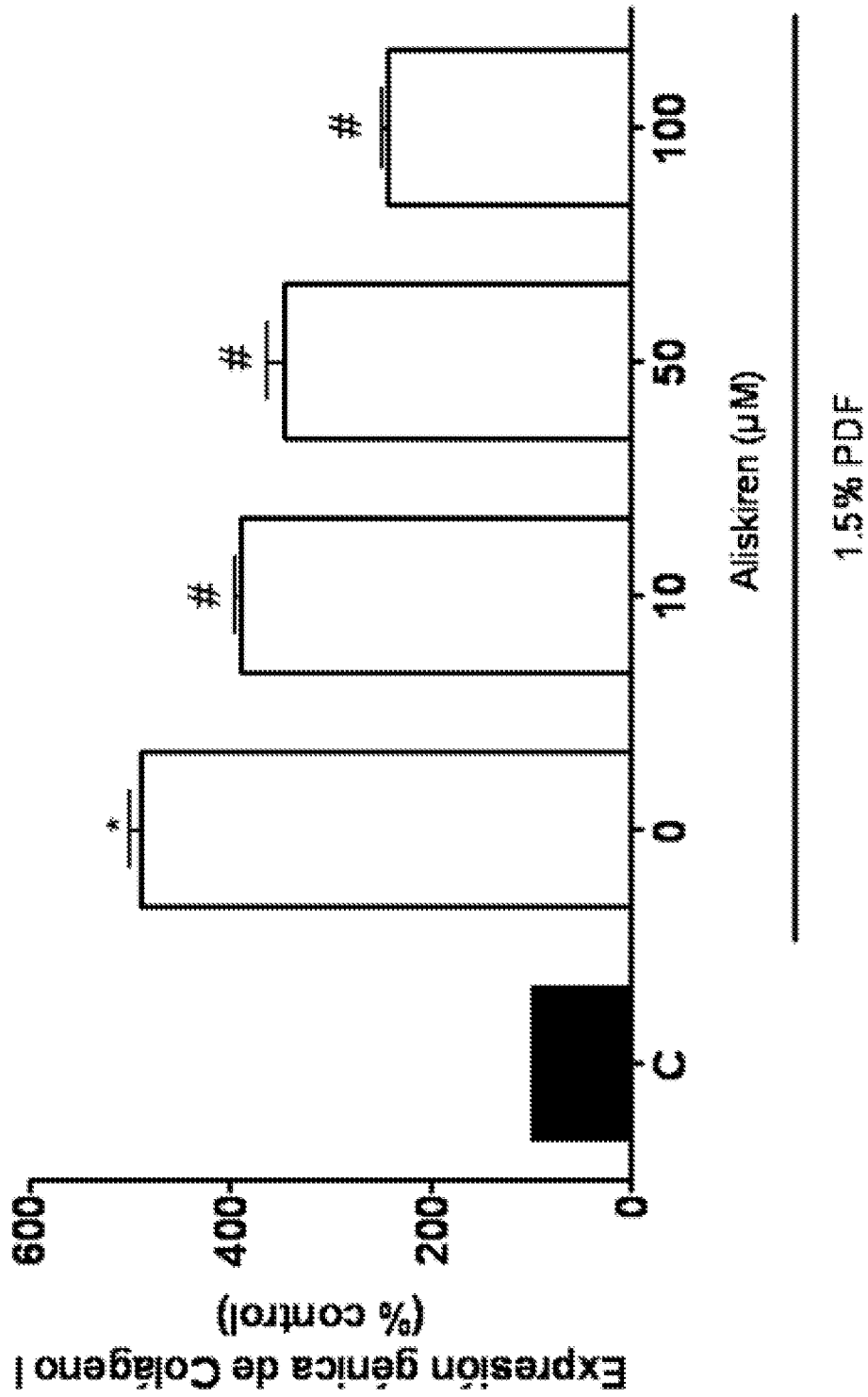


Fig. 9

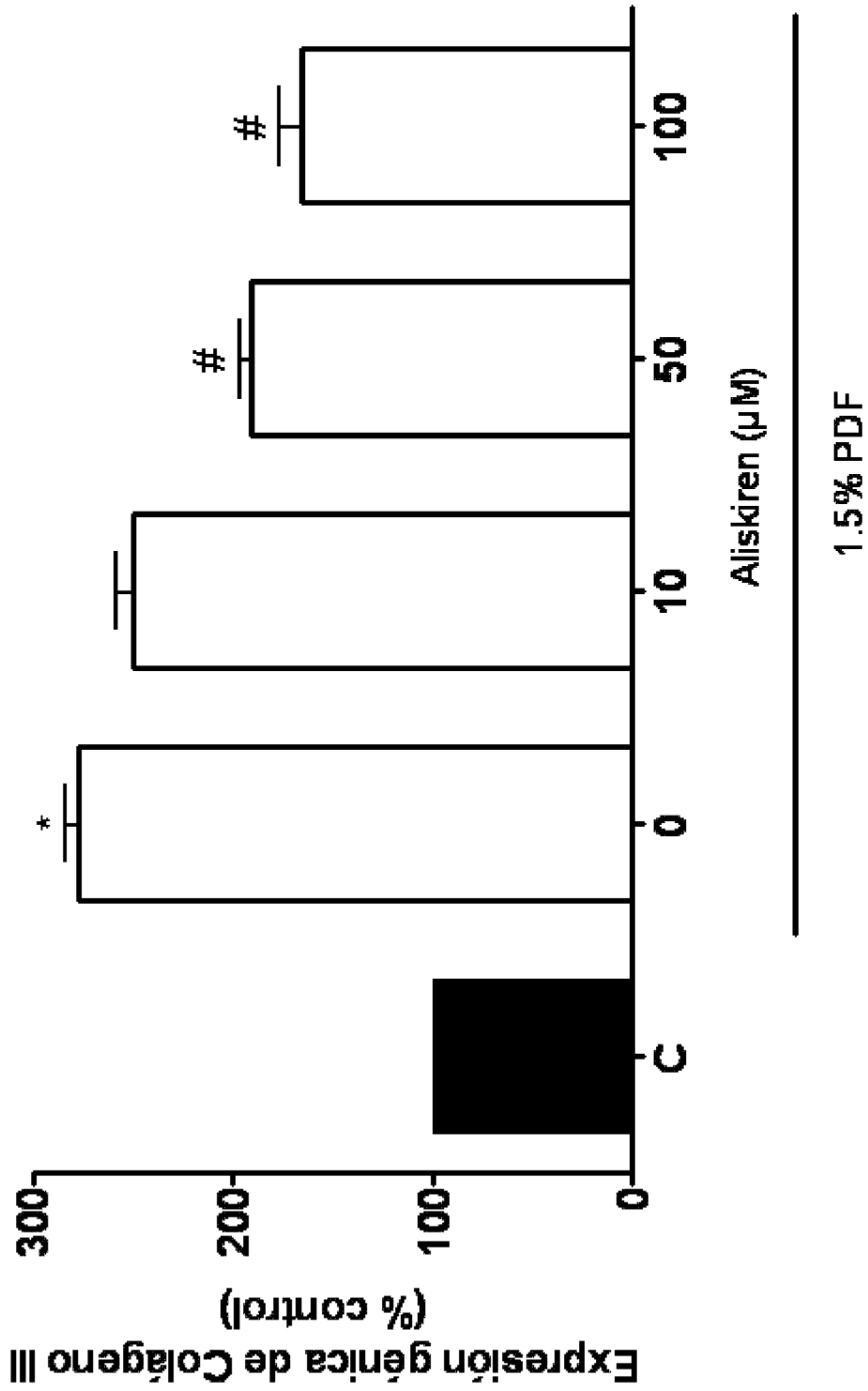


Fig. 10

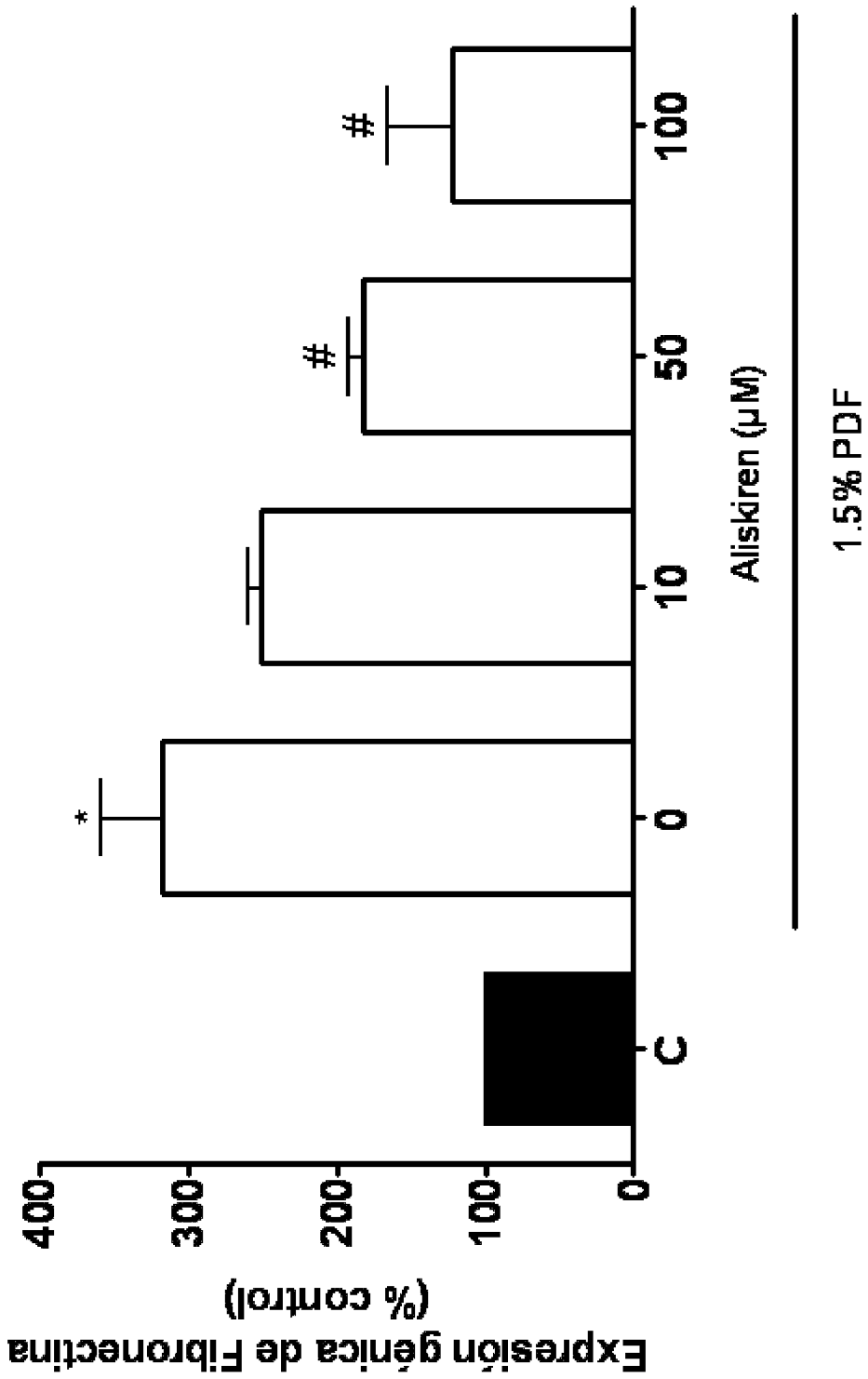


Fig. 11

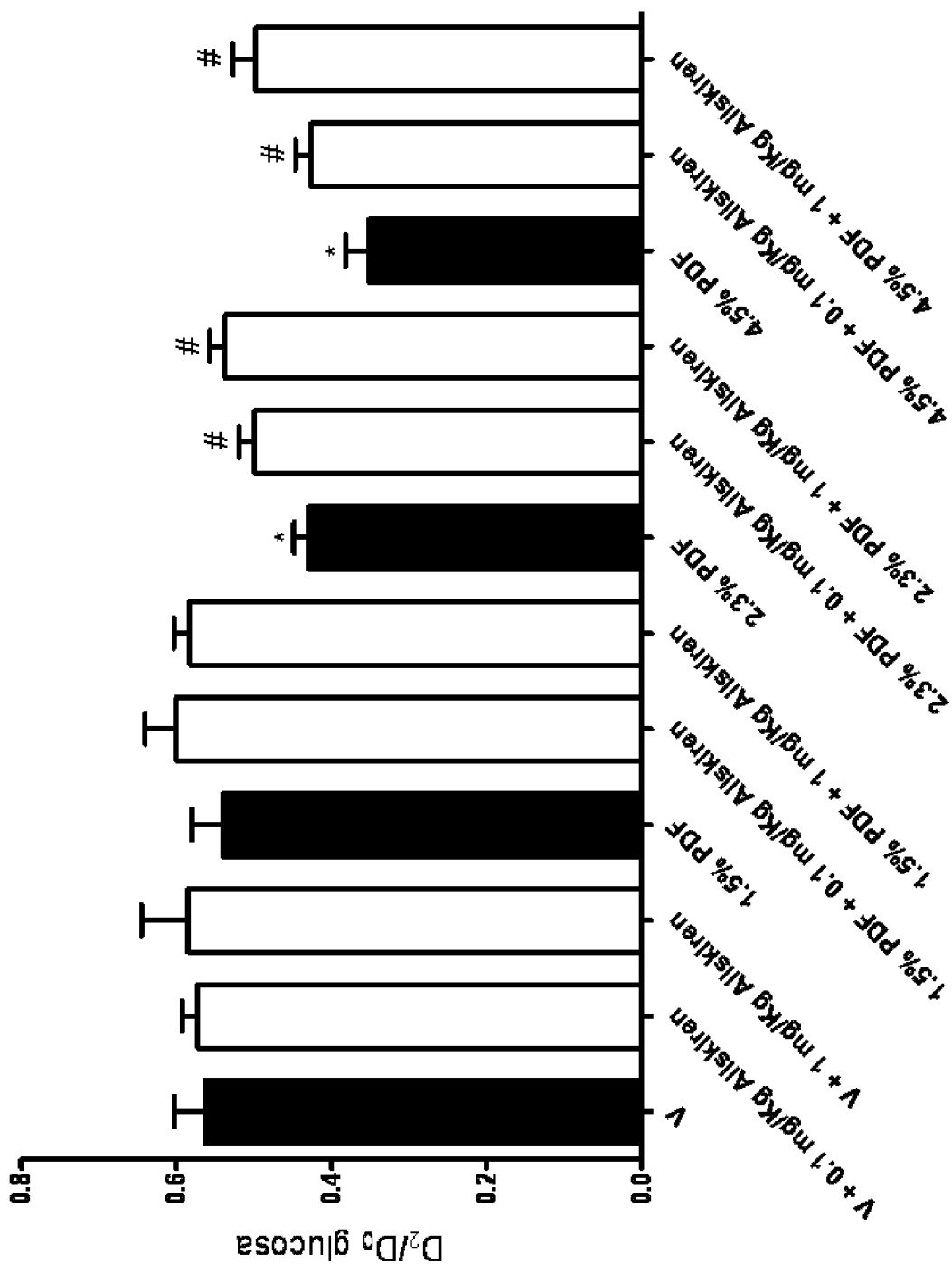


Fig. 12

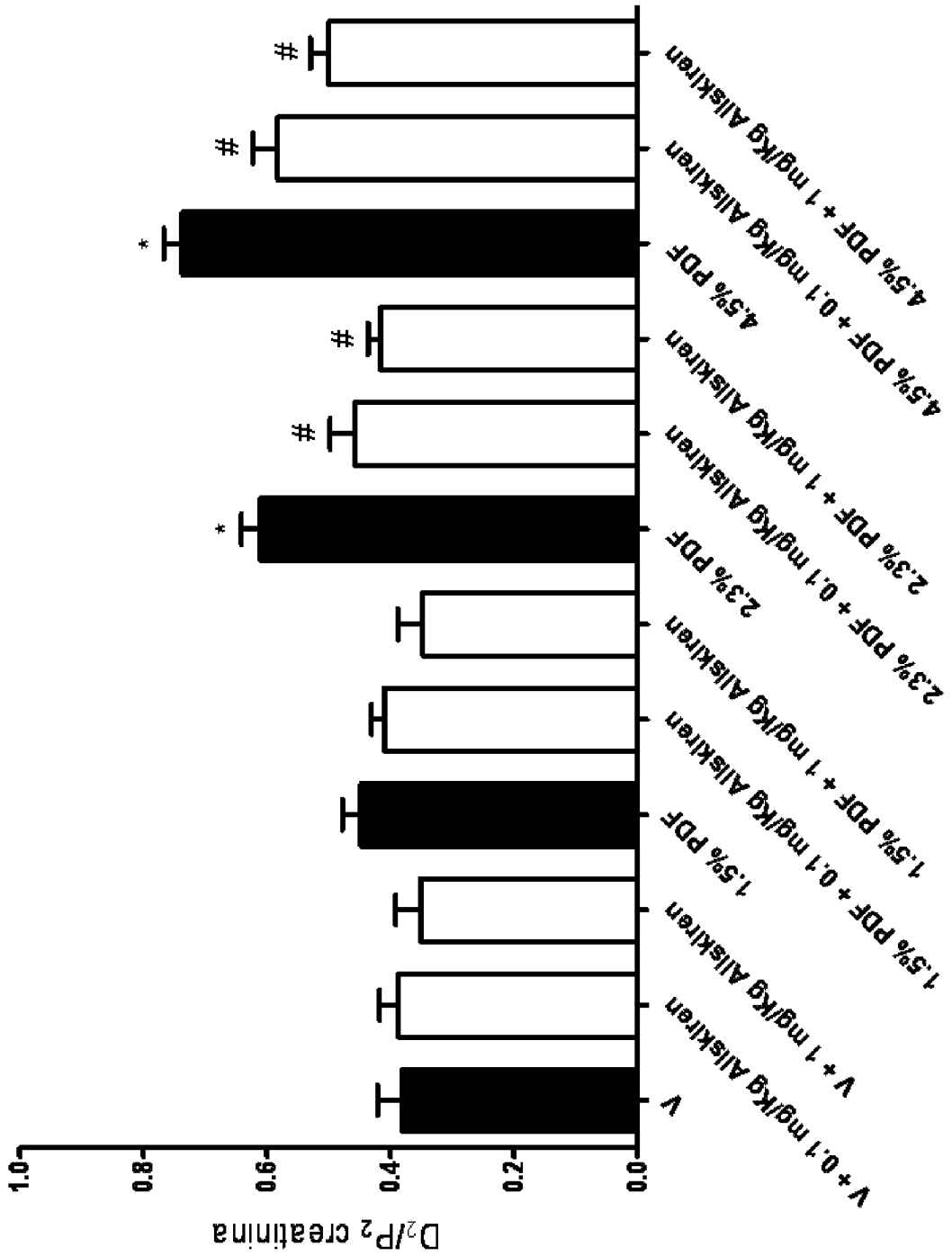


Fig. 13

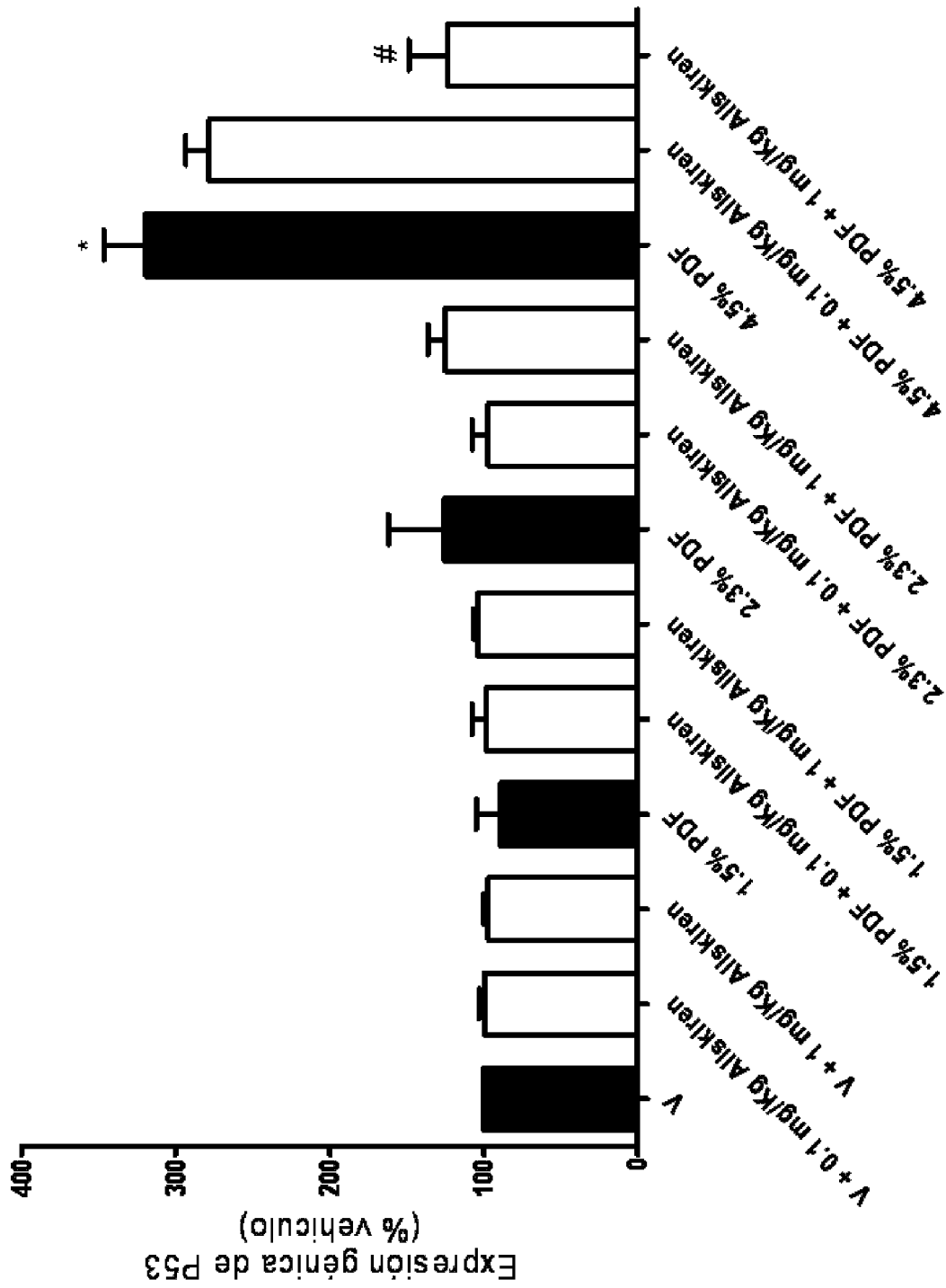


Fig. 14

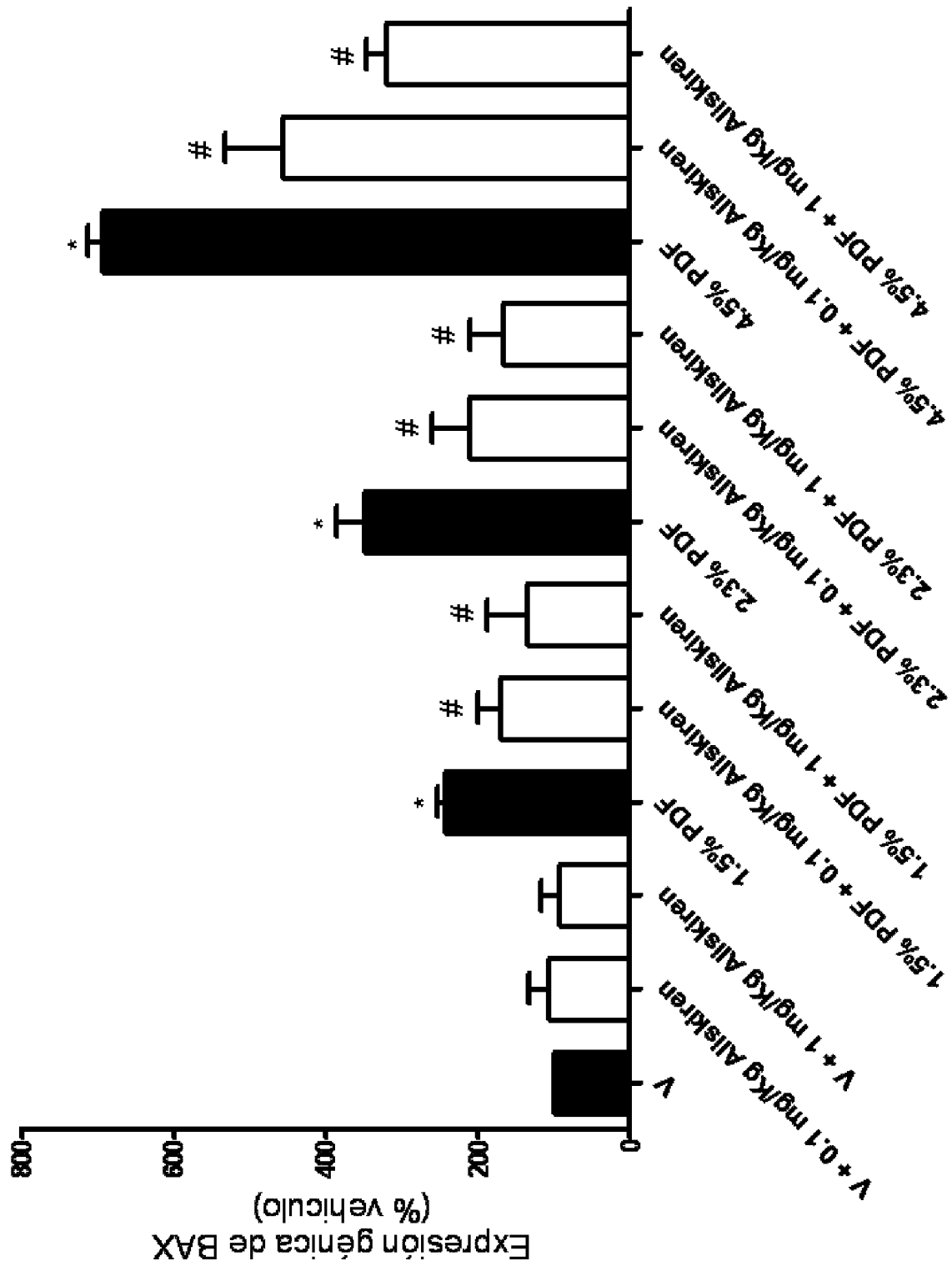


Fig. 15

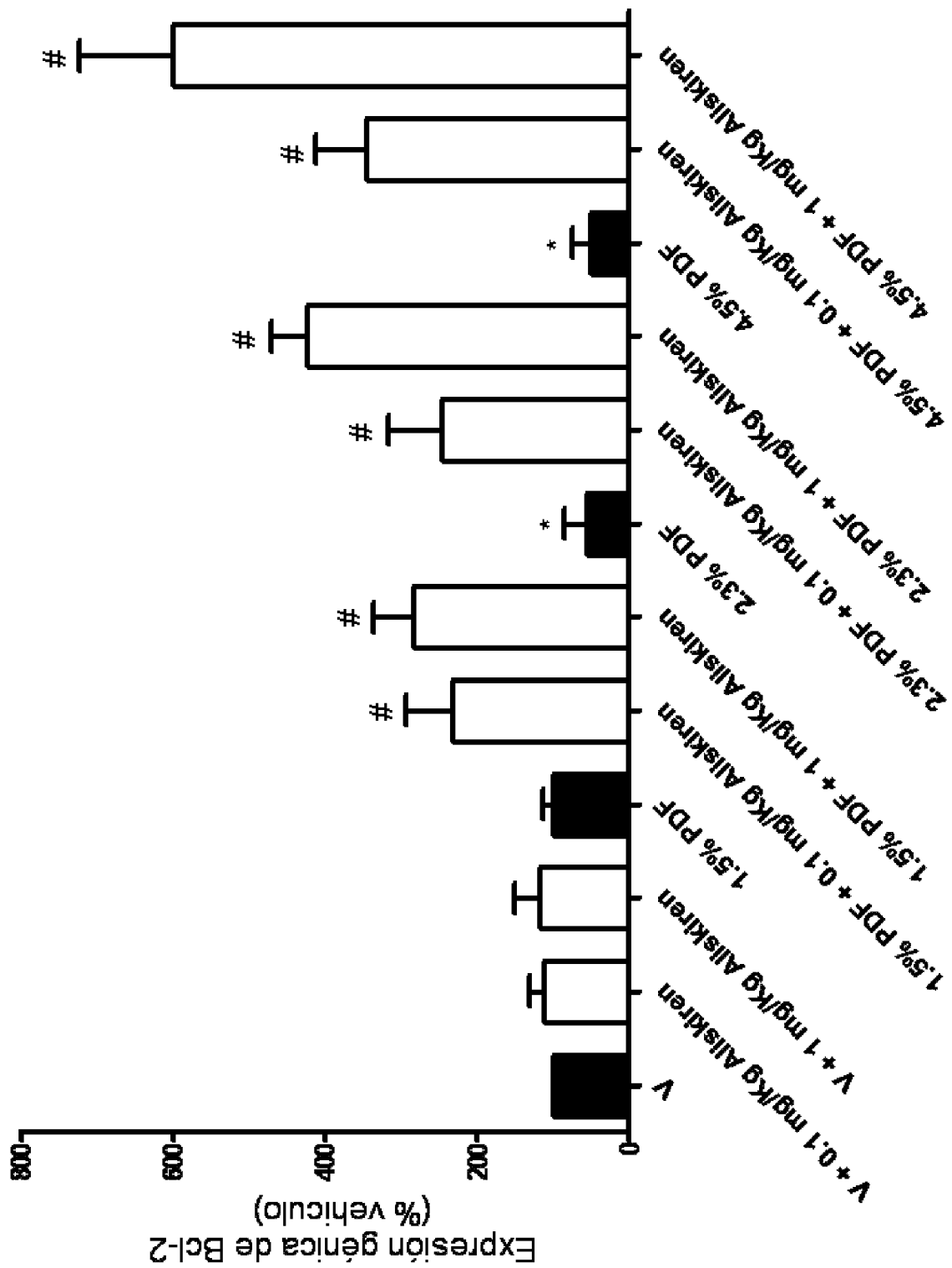


Fig. 16

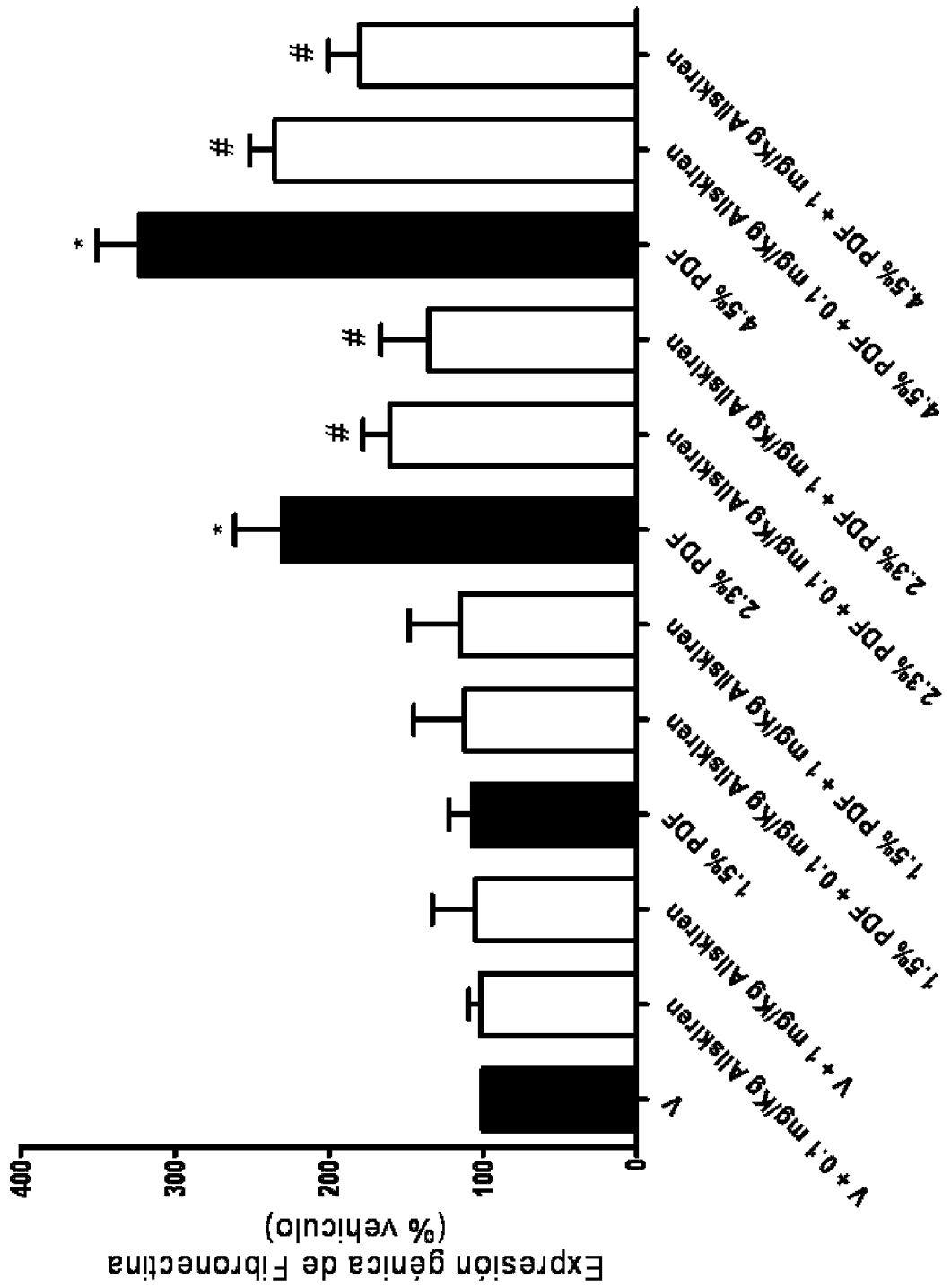


Fig. 17

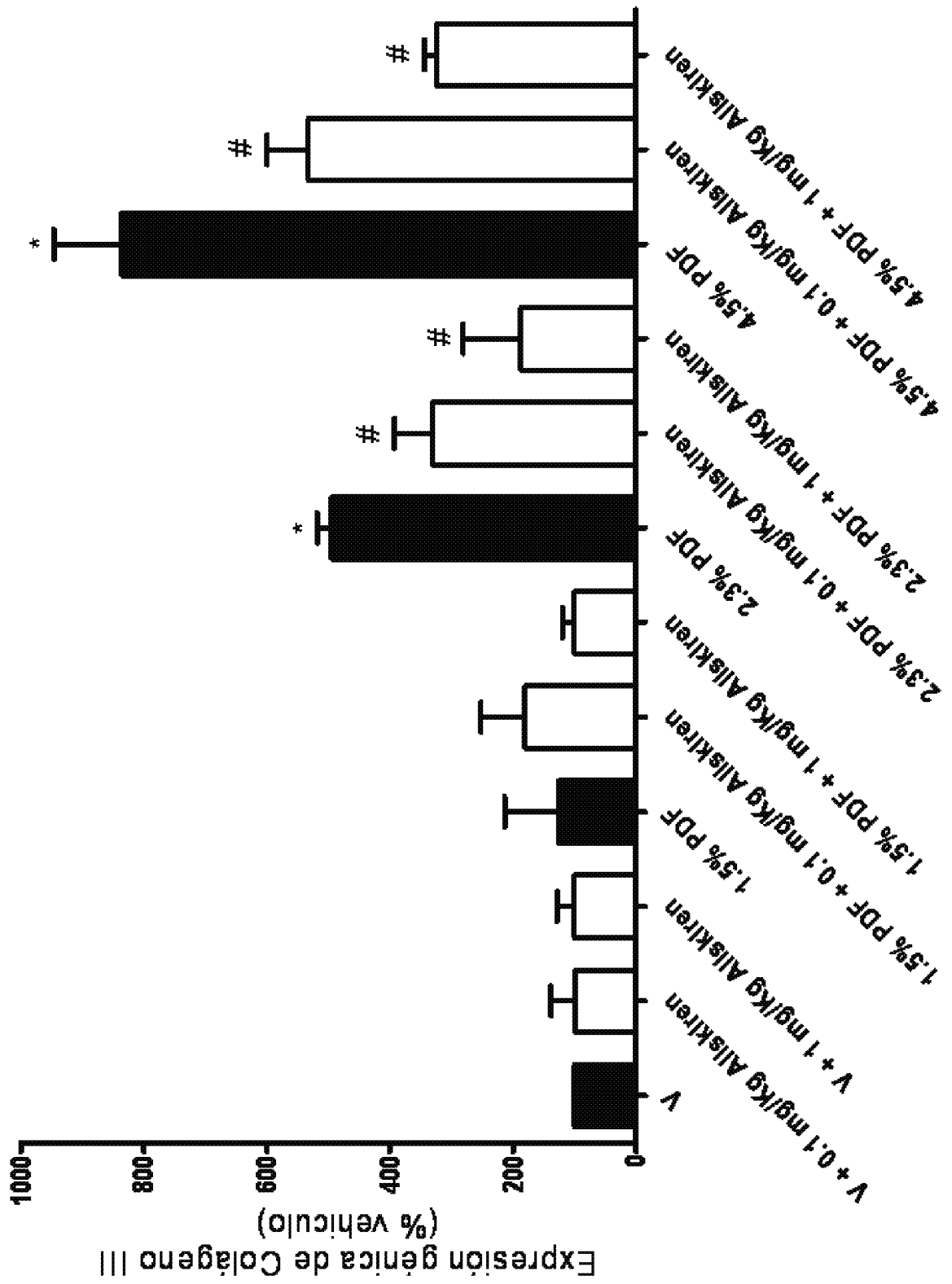


Fig. 18