



Universitat
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL
2021

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN ENSAYO
FARMACODINÁMICO EX-VIVO Y SU
APLICACIÓN PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD
DE INHIBIDORES DE LA CALCIFICACIÓN
CARDIOVASCULAR EN ESTUDIOS
PRECLÍNICOS Y CLÍNICOS**

Maria del Mar Pérez Ferrer



Universitat
de les Illes Balears



SANIFIT

TESIS DOCTORAL
2021

Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología
Química

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN ENSAYO
FARMACODINÁMICO EX-VIVO Y SU
APLICACIÓN PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD
DE INHIBIDORES DE LA CALCIFICACIÓN
CARDIOVASCULAR EN ESTUDIOS
PRECLÍNICOS Y CLÍNICOS

Maria del Mar Pérez Ferrer

Director: Dr. Joan Perelló Bestard

Director: Dr. Miguel David Ferrer Reynés

Tutor: Dr. Félix Grases Freixedas

Doctora por la Universitat de les Illes Balears

Directores de la Tesis Doctoral,

Dr. Joan Perelló Bestard
Profesor Titular de Química Analítica
Universitat de les Illes Balears
Director General de Sanifit Therapeutics

Dr. Miguel David Ferrer Reynés
Profesor Contratado Doctor Interino
de Bioquímica y Biología Molecular
Universitat de les Illes Balears

Memoria presentada por
Maria del Mar Pérez Ferrer
Licenciada en Química para
aspirar al grado académico de Doctora
en Ciencia y Tecnología Química
por la Universitat de les Illes Balears



Universitat
de les Illes Balears

Dr. Joan Perelló Bestard, Profesor Titular del área de Química Analítica de la Universitat de les Illes Balears y Director General de Sanifit Therapeutics.

DECLARO:

Que la tesis doctoral que lleva por título *Desarrollo y validación de un ensayo farmacodinámico ex-vivo y su aplicación para evaluar la actividad de inhibidores de la calcificación cardiovascular en estudios preclínicos y clínicos*, presentada por Maria del Mar Pérez Ferrer para la obtención del grado académico de doctora, ha sido dirigida bajo mi supervisión.

Y para que quede constancia de ello firmo este documento.

Firma,

Palma, 30 de junio de 2021



Universitat
de les Illes Balears

Dr. Miguel David Ferrer Reynés, Profesor Contratado Doctor Interino de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de les Illes Balears

DECLARO:

Que la tesis doctoral que lleva por título *Desarrollo y validación de un ensayo farmacodinámico ex-vivo y su aplicación para evaluar la actividad de inhibidores de la calcificación cardiovascular en estudios preclínicos y clínicos*, presentada por Maria del Mar Pérez Ferrer para la obtención del grado académico de doctora, ha sido dirigida bajo mi supervisión.

Y para que quede constancia de ello firmo este documento.

Firma,

Palma, 30 de junio de 2021

A la meva mare i al meu pare,

A la meva germana

A la meva família

Duc molt de temps desitjant que aquest moment arribi, a la fi ho ha fet. És difícil definir tot el camí que una fa durant el doctorat ja que cada persona ho viu de manera distinta i està envoltada per tot un grup de professionals diferents. Per a mi ha estat un procés en el qual he adquirit tot un conjunt de competències i habilitats que han culminat en l'elaboració de la tesi doctoral. Durant aquest procés he après a ser autònoma en el procés d'investigació i a prendre decisions. A més, en el meu cas, he desenvolupat la tesi doctoral en una empresa biofarmacèutica, Sanifit Therapeutics, que actualment està en avançat estat clínic. Vaig començar la inserció en la vida laboral a Sanifit, on també vaig iniciar el meu creixement com a investigadora, envoltada i enriquida pel gran equip que el forma. No ha estat fàcil combinar la vida laboral amb l'elaboració d'una tesi, implica un gran esforç i deixar de banda certes coses per poder aconseguir l'objectiu que t'has proposat. Tot i així, aquí estic.

A tots i totes que heu estat partícips, directa o indirectament, a alguna part o en tota l'etapa d'aquest camí, us ho vull agrair.

Primer de tot voldria agrair als meus directors, el Dr. Joan Perelló i el Dr. Miguel D. Ferrer, per tot el que m'han guiat i ajudat durant aquest camí. Són dos investigadors brillants dels quals mai deixes d'aprendre. Del Dr. Joan he après què és l'esforç elevat a la màxima potència, i com aquest ens ha permès a tots els de Sanifit poder continuar amb aquest gran projecte en el que tots creiem fermament. Del Dr. Miguel, que en els inicis era investigador post doctorat i el meu cap de laboratori i ara ja està a punt de ser professor titular de la Universitat, he après infinitat de coses; especialment la importància de la feina ben feta, la seva meticulositat i la gran paciència. Vull agrir-li, sobretot, la seva infinita disponibilitat per a orientar-me i ajudar-me tantes vegades com ho he necessitat. Crec que és el perfil perfecte de personal docent investigador, ja que és un gran investigador i un docent motivador. Moltes gràcies.

A tot l'equip de Sanifit, especialment a la directora científica, la Dra. Carolina Salcedo per ser la meva segona guia dins Sanifit. És una gran investigadora de la qual destacaria les qualitats d'empatia, responsabilitat, execució i, sobretot ser una gran persona. I would also thank Dr. Firas Bassissi. He joined Sanifit when I was on the second part of the process. I have also learned a lot from him, especially in the drug discovery and pharmacokinetic/pharmacodynamic field. Thanks for sharing your knowledge and experience with me. També vull agrair als meus companys de Sanifit, tant del laboratori (Marc, Cris, Fran) com dels diferents departaments (de preclínica, clínica, finances, CMC, patents, etc.). Addicionalment, voldria agrair a Bernat per ser el cofundador de Sanifit i donar-me l'oportunitat de poder treballar amb aquest gran equip.

Al Laboratori Experimental de Nefrologia i Transplantament, especialment a Marta Lazo i a la Dra. Elisenda Bañón per la seva participació en els experiments *in vivo*. Moltes gràcies per la vostra professionalitat i la tasca ben feta.

A Joan Albertí, expert en farmacocinètica i farmacodinàmica, per el seu suport i participació en els estudis farmacocinètics.

A l'empresa Syntax for science (ara part de Optimapharm) per la seva participació en els càlculs estadístics dels estudis clínics.

A l'empresa Envigo (ara Anapath) per la seva participació en les determinacions bioanalítiques que formen part d'aquesta tesi.

Al personal i tècnics especialistes dels serveis científicotècnics de la UIB, especialment a Jose, pel seu suport i les ganes de treballar.

Al grup de recerca de Litiasis Renal en general i en particular, als meus companys del laboratori de Litiasis Renal, que han anat canviant al llarg de tot aquest camí. Vaig iniciar aquest procés compartint laboratoris i experiències amb dos grans amics i companys de llicenciatura, el Dr. Adrián Rodríguez i el Dr. Francisco Berga. Després també amb Maria, i l'hauré acabat en companyia de Paula i Xisca. Moltes gràcies a tots i totes per compartir coneixements, divertides anècdotes i grans moments amb mi.

Als altres companys de la Universitat, ja siguin del departament de Química, investigadors de la UIB, o del servei de prevenció: Miki, Marga, Maribel, Toni, Xisca V., Sofi, Clara, Juanmi; per compartir grans moments i rialles en els berenars i dinars a la Universitat, i també a fora de l'àmbit universitari, amb trekkings, viatges, etc. Els dies són més agradables amb vosaltres!

A l'entorn de fora de la universitat, a les meves amigues i als meus amics de tota la vida, "el Súper Grup" perquè tot i que no formin part del món investigador que envolta aquesta tesi, sempre estan allà per donar-me ànims i suport; o senzillament per fer unes cerveses i desconnectar totalment, recordant anècdotes o moments especials. Gràcies per la vostra amistat.

A Cati per donar-me grans consells, estratègies i força per a créixer personalment en certs moments clau d'aquest procés.

A la meva família, un dels meus grans pilars! Moltes gràcies a tots i totes, especialment als meus pares (Xisco i Joana) per donar-me tot el que sempre he necessitat sense deixar-me perdre la perspectiva de la realitat, la que si vols aconseguir algun objectiu s'ha de lluitar per a ell. I també per donar-me suport i acompanyar-me en el camí per arribar a ser la persona que soc avui. A la meva germana, la meva gran amiga, i a la que no li puc amagar res. Si algú sap com me sent o comestic, apart de mi mateixa, sempre és ella. Gràcies per dir-me aquelles coses que a vegades ningú et diu però que necessites sentir. A Joan, el meu *cunyi* que és com un germà per a mi. A la meva *filloleta* Neus, que sempre me treu una rialla i al meu nebot Marc, que he tingut el plaer de conèixer fa uns mesos. Als meus oncles i tietes, especialment a la meva tia Maria amb la que més he pogut parlar ja que també va passar pel mateix procés i, tal vegada, és la que més m'ha pogut entendre. A tots els meus cosins i cosines. Sembla que som una família molt nombrosa, no és així, el que si puc dir és que estem molts units!

A n'Alberto, tot i que el vaig conèixer cap a la meitat d'aquest camí, en el moment en què me faltava la motivació per a continuar, ell me va donar suport i ànims per a fer-ho. Ja cap al final, quan es va iniciar el compte enrere per a l'entrega, m'ha calmat en els moments més estressants i sempre m'ha aconseguit fer riure i desconnectar quan ho he necessitat. Gràcies pels teus "eres la mejor", "eres una crack", "ya casi has acabado" quan me feien falta.

Finalment, vull agrair a la protagonista d'aquest procés, a la persona que ha fet possible l'elaboració d'aquesta memòria i de tot el treball que hi ha al darrere. Tal vegada sembla estrany agrair-se a un mateix, però és una de les grans coses que he après, és important agrair-nos els nostres avanços i els esforços que fem.

A tots i a totes, moltes gràcies!

No deixem mai d'aprendre ni
de créixer com a persones

ÍNDICE

Resumen	VII
Resum	IX
Abstract	XI
Lista de abreviaturas	XIII
Lista de publicaciones derivadas de la tesis	XVII
I. Introducción	1
1. Cristalizaciones fisiológicas y cristalizaciones patológicas	3
2. Enfermedad Renal Crónica	6
2.1. Alteraciones del metabolismo óseo-mineral en la enfermedad renal crónica	8
2.1.1. Alteraciones bioquímicas	9
2.1.2. Alteraciones óseas	12
2.1.3. Calcificaciones cardiovasculares	12
3. Enfermedad cardiovascular en la enfermedad renal	13
4. Estructura vascular	14
5. Calcificaciones cardiovasculares	16
5.1. Calcificación vascular y valvular, su distribución y consecuencias clínicas	19
5.1.1. Calcificación cardiovascular periférica	20
5.1.1.1. Calcificación arterial periférica	20
5.1.1.2. Calcificación de las arteriolas en la piel	21
5.1.2. Calcificación cardiovascular central	22
5.1.2.1. Calcificación de las válvulas cardíacas	22
5.1.2.2. Calcificación de las arterias coronarias	23
5.1.2.3. Calcificación de las arterias carótidas	24
5.2. Técnicas de detección de calcificación vascular y valvular	25
6. Mecanismos de calcificación cardiovascular en la enfermedad renal crónica	26
6.1. Proceso de nucleación	27
6.2. Hiperfosfatemia e hipercalcemia	27
6.3. Toxinas urémicas	27
6.4. Proteínas implicadas en el proceso de calcificación	28
6.4.1. Proteínas promotoras de la calcificación	28
6.4.2. Proteínas represoras de la calcificación cardiovascular	30

7. Enfoques terapéuticos y control de los factores relacionados con el complejo CKD-MBD	35
7.1. Quelantes de fosfato	36
7.2. Vitamina D y activadores del receptor de vitamina D	37
7.3. Calcimiméticos	39
7.4. Vitamina K	41
7.5. Magnesio	42
7.6. Tiosulfato de sodio	43
7.7. Compuestos polifosforilados como inhibidores fisicoquímicos de la calcificación	44
7.7.1. Pirofosfato	45
7.7.2. Bifosfonatos	46
7.7.3. Myo-inositol hexafosfato	49
8. InsP ₆ como inhibidor de las calcificaciones cardiovasculares	52
8.1. Evidencias del InsP ₆ como inhibidor de las calcificaciones cardiovasculares en modelos animales	52
8.2. Efectos del InsP ₆ en el sistema cardiovascular humano	54
8.2.1. Consumo de InsP ₆ para proteger el sistema cardiovascular	54
8.2.2. Desarrollo clínico del SNF472 para el tratamiento de la calcificación cardiovascular en pacientes en hemodiálisis	55
9. Referencias	56
II. Objetivos	83
III. Materiales y métodos	87
1. Ensayo de farmacodinamia <i>in vivo/ex vivo</i> para determinar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en plasma	89
1.1. Reactivos y preparación de disoluciones	89
1.2. Desarrollo del ensayo de farmacodinamia	89
1.2.1. Ensayos de cristalización en matriz acuosa de NaCl	89
1.2.2. Ensayos de cristalización en matriz plasmática	90
1.2.3. Inhibición de la cristalización de fosfato de calcio en plasma humano	93
1.3. Validación del ensayo de farmacodinamia para determinar la eficacia del SNF472 en la inhibición de la cristalización <i>in vitro/ex vivo</i> en plasma humano	94
1.3.1. Linealidad	94
1.3.2. Precisión intradía e interdía	95

ÍNDICE

1.3.3. Dilución de las muestras de plasma	95
1.3.4. Estabilidad de SNF472 en muestras de plasma	96
1.4. Verificación del ensayo de farmacodinamia en muestras de plasma de rata	97
1.5. Ensayo de farmacodinamia en pacientes de hemodiálisis	98
1.6. Análisis estadístico	99
2. Estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos de eficacia para la prevención y tratamiento de la progresión de la calcificación cardiovascular en modelos animales	99
2.1. Farmacocinética por infusión intravenosa de SNF472 en rata	99
2.1.1. Experimento <i>in vivo</i>	99
2.1.2. Bioanálisis de SNF472 en plasma	102
2.1.3. Análisis farmacocinético y estadístico	102
2.2. Estudios farmacodinámicos con SNF472 para prevenir e inhibir la progresión de la calcificación cardiovascular inducida por vitamina D ₃ en modelos animales	104
2.2.1. Desarrollo y optimización de un modelo animal para la calcificación cardiovascular inducida por vitamina D ₃	104
2.2.1.1. Experimento <i>in vivo</i>	104
2.2.1.2. Determinaciones analíticas	105
2.2.1.3. Análisis estadístico	105
2.2.2. Estudios de eficacia con SNF472 para estudiar la prevención y la inhibición de la progresión de la calcificación cardiovascular inducida por Vitamina D ₃ en rata	106
2.2.2.1. Experimentos <i>in vivo</i>	106
2.2.2.2. Determinaciones analíticas	110
2.2.2.3. Análisis estadístico	112
3. Ensayos clínicos con SNF472: análisis farmacocinético y farmacodinámico	113
3.1. Ensayo clínico de calcifilaxis	113
3.1.1. Bioanálisis en plasma	114
3.1.2. Ensayo de farmacodinamia <i>ex vivo</i> en plasma	114
3.1.3. Análisis estadístico	115
3.2. Estudio CaLIPSO: ensayo clínico de progresión de la calcificación cardiovascular	115
3.2.1. Bioanálisis en plasma y ensayo de farmacodinamia <i>ex vivo</i> en plasma	117
3.2.2. Determinación del porcentaje de cambio del índice CAC	117



3.2.3. Análisis estadístico	118
4. Referencias	120
IV. Resultados	123
1. Ensayo de farmacodinamia <i>in vivo/ex vivo</i> para determinar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en plasma	125
1.1. Desarrollo del ensayo de farmacodinamia	125
1.1.1. Ensayos de cristalización en matriz acuosa de NaCl	125
1.1.2. Ensayos de cristalización en matriz plasmática	130
1.1.3. Inhibición de la cristalización de fosfato de calcio en plasma humano	132
1.2. Validación del ensayo de farmacodinamia para determinar la eficacia del SNF472 en la inhibición de la cristalización <i>in vitro/ex vivo</i> en plasma humano	133
1.3. Verificación del ensayo de farmacodinamia en muestras de plasma de rata	139
1.4. Ensayo de farmacodinamia en pacientes de hemodiálisis	141
2. Estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos de eficacia para la prevención y tratamiento de la progresión de la calcificación cardiovascular en modelos animales	143
2.1. Farmacocinética por infusión intravenosa de SNF472 en rata	143
2.2. Estudios farmacodinámicos con SNF472 para prevenir e inhibir la progresión de la calcificación cardiovascular inducida por vitamina D ₃ en modelos animales	146
2.2.1. Desarrollo y optimización de un modelo animal para la calcificación cardiovascular inducida por vitamina D ₃	146
2.2.2. Estudios de eficacia con SNF472 para estudiar la prevención y la inhibición de la progresión de la calcificación cardiovascular inducida por vitamina D ₃ en rata	148
3. Ensayos clínicos con SNF472: análisis farmacocinético y farmacodinámico	170
3.1. Ensayo clínico de calcifilaxis	170
3.2. Estudio CaLIPSO: ensayo clínico de progresión de la calcificación cardiovascular	175
3.2.1. Farmacocinética y acumulación de SNF472	175
3.2.2. Ensayo de farmacodinamia <i>ex vivo</i>	177
3.2.3. Análisis de la relación PK – PD	178
3.2.4. Análisis de la relación PK - Progresión índice CAC	180
3.2.5. Análisis de la relación PD - Progresión índice CAC	182
4. Referencias	183

ÍNDICE

V. Discusión	185
1. Ensayo de farmacodinamia <i>in vivo/ex vivo</i> para determinar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en plasma	189
2. Estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos de eficacia para la prevención y tratamiento de la progresión de la calcificación cardiovascular en modelos animales	195
2.1. Farmacocinética por infusión intravenosa de SNF472 en rata	195
2.2. Estudios farmacodinámicos con SNF472 para prevenir e inhibir la progresión de la calcificación cardiovascular inducida por vitamina D ₃ en modelos animales	197
2.2.1. Desarrollo y optimización de un modelo animal para la calcificación cardiovascular inducida por vitamina D ₃	197
2.2.2. Estudios de eficacia con SNF472 para estudiar la prevención y la inhibición de la progresión de la calcificación cardiovascular inducida por vitamina D ₃ en rata	198
3. Ensayos clínicos con SNF472: análisis farmacocinético y farmacodinámico	202
3.1. Ensayo clínico de calcifilaxis	202
3.2. Estudio CaLIPSO: ensayo clínico de progresión de la calcificación cardiovascular	204
4. Referencias	207
VI. Conclusiones	213
VII. Artículos publicados	219
VIII. Anexo 1	263
IX. Anexo 2	267
X. Anexo 3	283



Resumen

La calcificación cardiovascular (CCV) es un proceso patológico complejo y activo consistente en la formación de depósitos minerales de fosfato cálcico en forma de hidroxapatita que provocan un engrosamiento y una pérdida de elasticidad de las paredes arteriales y de las válvulas cardíacas. En condiciones normales, la CCV no ocurre de forma significativa ya que existe un balance entre los promotores y represores de la calcificación. En cambio, cuando hay alteraciones fisiológicas, como consecuencia de determinadas patologías o del envejecimiento, puede existir un desequilibrio entre dichos factores que provoca la degeneración del sistema cardiovascular. La CCV acelerada es una complicación grave de la enfermedad renal crónica que contribuye a una alta morbilidad y mortalidad, especialmente en pacientes sometidos a diálisis. De hecho, al menos el 80% de estos pacientes sufren algún tipo de CCV. Actualmente no existe ningún tratamiento aprobado para prevenir y tratar la progresión de la CCV en enfermedades relacionadas con esta complicación en pacientes en diálisis. Por tanto, es necesaria la búsqueda de nuevos biomarcadores para evaluar la efectividad de nuevas terapias de intervención para tratar la CCV en ensayos clínicos. El SNF472 es una formulación intravenosa de myo-inositol hexafosfato, un inhibidor selectivo de la formación y el crecimiento de la hidroxapatita, que se está desarrollando para tratar enfermedades relacionadas con la CCV, como la calcifilaxis y la enfermedad arterial periférica, en pacientes dializados.

Así pues, el objetivo general de esta tesis fue desarrollar y validar una técnica espectrofotométrica *in vitro/ex vivo* para evaluar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en plasma, y establecer una relación entre la inhibición de la CCV *in vivo* y la inhibición de la cristalización *ex vivo* a nivel preclínico y clínico usando el SNF472 como inhibidor.

Para alcanzar este objetivo, realizamos un conjunto de ensayos para desarrollar y poner a punto un nuevo método de farmacodinamia para determinar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en plasma humano, y evaluamos su respuesta en muestras de plasma con diferentes inhibidores/represores de la cristalización. Posteriormente, validamos dicha técnica *in vitro* en plasma de voluntarios sanos usando el SNF472 como inhibidor, y comprobamos su aplicabilidad en plasma de rata. También hemos comparado la respuesta del ensayo en muestras de plasma de voluntarios sanos y pacientes en tratamiento de hemodiálisis. Adicionalmente, hemos realizado un conjunto de experimentos *in vivo* en ratas: un estudio farmacocinético por infusión intravenosa de SNF472; un estudio para optimizar el modelo patológico animal para inducir la CCV por vitamina D; dos estudios de eficacia para evaluar el efecto del SNF472 en la prevención de la CCV; y un último estudio para evaluar el efecto del SNF472 en la inhibición de la progresión de la CCV inducida por vitamina D. Finalmente, llevamos a cabo el análisis de farmacodinamia y farmacocinética en el marco de dos ensayos clínicos de fase 2 con SNF472, y buscamos correlaciones entre las concentraciones de SNF472, la eficacia clínica y la inhibición de la cristalización *ex vivo* con el método validado.

En conclusión, los resultados de estos estudios nos han permitido obtener un ensayo de farmacodinamia *in vitro/ex vivo* para determinar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en plasma humano y de rata. Además, hemos demostrado la correlación de los resultados del ensayo *ex vivo* tanto con la inhibición de la calcificación *in vivo* en rata como con la eficacia clínica en pacientes en tratamiento de diálisis. Por tanto, este método no invasivo podría ser utilizado para evaluar desde fases preclínicas y clínicas muy tempranas los potenciales efectos terapéuticos de inhibidores de la calcificación, como el SNF472, en enfermedades relacionadas con la CCV.

Resum

La calcificació cardiovascular (CCV) és un procés patològic complex i actiu que consisteix en la formació de dipòsits minerals de fosfat de calci en forma d'hidroxiapatita que provoquen un engrossiment i una pèrdua d'elasticitat de les parets arterials i de les vàlvules cardíques. En condicions normals, la CCV no es dona de manera significativa degut al balanç entre els promotors i repressors de la calcificació. En canvi, quan hi ha alteracions fisiològiques, com a conseqüència de determinades patologies o de l'envelliment, pot existir un desequilibri entre aquests factors que provoca la degeneració del sistema cardiovascular. La CCV accelerada és una complicació greu de la malaltia renal crònica que contribueix a una alta morbiditat i mortalitat, especialment en pacients sotmesos a diàlisi. De fet, almanco un 80% d'aquests pacients pateixen algun tipus de CCV. Actualment no existeix cap tractament aprovat per prevenir i tractar la progressió de la CCV en malalties relacionades amb aquesta complicació en pacients en diàlisi. Per tant, és necessària la recerca de nous biomarcadors per avaluar l'eficàcia de noves teràpies d'intervenció per tractar la CCV en assaigs clínics. El SNF472 és una formulació intravenosa de myo-inositol hexafosfat, un inhibidor selectiu de la formació i el creixement de la hidroxiapatita, que s'està desenvolupant per tractar malalties relacionades amb la CCV en pacients dialitzats, com són la calcifilaxi i la malaltia arterial perifèrica.

Així doncs, l'objectiu general d'aquesta tesi va ser desenvolupar i validar una tècnica espectrofotomètrica *in vitro/ex vivo* per avaluar el potencial de cristal·lització de fosfat de calci en plasma, i establir una relació entre la inhibició de la CCV *in vivo* i la inhibició de la cristal·lització *ex vivo* a nivell preclínic i clínic, amb el SNF472 com a inhibidor.

Per tal d'assolir aquest objectiu, hem realitzat un conjunt d'assajos per desenvolupar i posar a punt un nou mètode de farmacodinàmia per determinar el potencial de cristal·lització de fosfat de calci en plasma humà, i hem avaluat la seva resposta en mostres de plasma amb diferents inhibidors/repressors de la cristal·lització. Posteriorment, s'ha validat aquesta tècnica *in vitro* en plasma de voluntaris sans usant el SNF472 com a inhibidor, i hem comprovat la seva aplicabilitat en plasma de rata. També hem comparat la resposta de l'assaig en mostres de plasma de voluntaris sans i pacients en tractament d'hemodiàlisi. Addicionalment, hem realitzat un conjunt d'experiments *in vivo* en rates: un estudi farmacocinètic per infusió intravenosa de SNF472; un estudi per optimitzar el model patològic en rata per induir la CCV amb vitamina D; dos estudis d'eficàcia per avaluar l'efecte del SNF472 en la prevenció de la CCV; i un últim estudi per avaluar l'efecte del SNF472 en la inhibició de la progressió de la CCV induïda per vitamina D. Finalment, hem realitzat l'anàlisi de farmacodinàmia i farmacocinètica en el marc de dos assajos clínics de fase 2 amb SNF472, i hem buscat correlacions entre els nivells circulants de SNF472, l'eficàcia clínica i la inhibició de la cristal·lització *ex vivo* amb el mètode validat.

En conclusió, els resultats d'aquests estudis han permès obtenir un assaig de farmacodinàmia *in vitro/ex vivo* per determinar el potencial de cristal·lització de fosfat de calci en plasma humà i de rata. A més, hem demostrat la correlació dels resultats de l'assaig *ex vivo* tant amb la inhibició de la calcificació *in vivo* en rata com amb l'eficàcia clínica en pacients en tractament de diàlisi. Per tant, aquest mètode no invasiu es podria utilitzar per avaluar des de fases preclíniques i clíniques molt primerenques els potencials efectes terapèutics d'inhibidors de la calcificació, com el SNF472, en malalties relacionades amb la CCV.

Abstract

Cardiovascular calcification (CVC) is a complex and active pathological process that involves the formation of calcium phosphate mineral deposits in the form of hydroxyapatite and can cause thickening and stiffness of the arterial walls and heart valves. Under normal conditions, CVC does not significantly occur since there is a balance between promoters and repressors of calcification. On the other hand, in the presence of physiological disorders (because of specific pathologies or aging), there may be an imbalance between these factors that can cause the degeneration of the cardiovascular system. Accelerated CVC is a serious complication of chronic kidney disease that contributes to the high morbidity and mortality observed in dialysis patients. In fact, at least 80% of these patients suffer from some type of CVC. There are currently no approved therapies to prevent or treat the progression of CVC-related diseases in dialysis patients. Therefore, the search for novel biomarkers is necessary to assess the efficacy of new interventional therapies to treat CVC in clinical trials. SNF472 is an intravenous formulation of myo-inositol hexaphosphate, a selective inhibitor of hydroxyapatite formation and growth, that is being developed to treat CVC-related diseases in dialysis patients, such as calciphylaxis and peripheral arterial disease.

Thus, this thesis aimed to develop and validate an *in vitro/ex vivo* spectrophotometric method to evaluate the calcium phosphate crystallization potential in plasma, and to look for relations between the inhibition of CVC *in vivo* and the *ex vivo* crystallization inhibition in preclinical and clinical studies using SNF472 as an inhibitor.

To achieve this objective, we performed different studies to set up a new pharmacodynamic method to determine the calcium phosphate crystallization potential in human plasma, and we evaluated its response in plasma containing different inhibitors/repressors of crystallization. Subsequently, this method was validated in plasma from healthy volunteers adding SNF472 *in vitro* as an inhibitor, and we also verified its applicability in rat plasma. We compared the response of the method in plasma samples from healthy volunteers and haemodialysis patients. Then, we performed a set of *in vivo* experiments in rats: a pharmacokinetic study by intravenous infusion of SNF472; an optimization of the pathological model to induce CVC by vitamin D in rats; two efficacy studies to assess the effect of SNF472 in the prevention of CVC in the rat model; and a last study to evaluate the effect of SNF472 on the inhibition of CVC progression in a vitamin D-induced rat model. Finally, we analysed the pharmacodynamics and pharmacokinetics in two phase 2 clinical trials with SNF472, and we studied the correlations between SNF472 concentrations, clinical efficacy, and *ex vivo* plasma crystallization inhibition using the previously validated method.

In conclusion, the results of these studies allowed us to obtain an *in vitro/ex vivo* pharmacodynamic assay to determine the calcium phosphate crystallization potential in human and rat plasma. Moreover, we demonstrated the direct correlation between *ex vivo* inhibition of crystallization with both *in vivo* calcification inhibition in rats and with clinical efficacy in dialysis patients. Therefore, this non-invasive pharmacodynamic method could be used to evaluate the potential therapeutic effects of calcification inhibitors, such as SNF472, in CVC-related diseases from early preclinical and clinical stages.

LISTADO DE ABREVIATURAS

ACP	Fosfato de calcio amorfo
ALP	Fosfatasa alcalina
AMP	Monofosfato de adenosina
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Trifosfato de adenosina
AUC	Área bajo la curva
BQ	Bioquímica
BUN	Nitrógeno ureico en sangre
BWAT	Bates-Jensen wound assessment tool
Ca	Calcio
CAA	Calcificación aórtica abdominal
CAC	Calcificación de arterias coronarias
CAD	Enfermedad arterial coronaria
CAVD	Enfermedad de la válvula aórtica calcificada
CCV	Calcificación cardiovascular
CEEA	Comité de ética de experimentación animal
CKD-MBD	Alteraciones del metabolismo mineral en la enfermedad renal crónica (Chronic kidney disease-mineral and bone disorder)
C_{max}	Concentración máxima en sangre
CMLV	Células del músculo liso vascular
CPP	Partículas de calciproteína
CUA	Calcifilaxis o arteriopatía urémica calcificante
CV	Coefficiente de variación
DP	Diálisis peritoneal
DQ	Desviación cuartil
ECV	Enfermedad cardiovascular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE. UU.	Estados Unidos de América
ENPP1	Ecto-nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1
ERC	Enfermedad renal crónica
ERT	Enfermedad renal terminal
FG	Filtrado glomerular
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FTIR	Transformada de fourier infrarroja
HAP	Hidroxiapatita
HD	Hemodiálisis
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
HPLC-MS/MS	Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem
HPT2°	Hiperparatiroidismo secundario
HVI	Hipertrofia del ventrículo izquierdo
i.v.	Intravenoso/a

LISTADO DE ABREVIATURAS

IC	Concentración inhibitoria
IC 95%	Intervalos de confianza del 95%
ICC	Índice de calcificación coronaria
ID₅₀	Dosis que causa el 50% del efecto máximo
Ins	Myo-inositol
InsP₁	Myo-inositol monofosfato
InsP₂	Myo-inositol bifosfato
InsP₃	Myo-inositol I trifosfato
InsP₄	Myo-inositol tetrafosfato
InsP₅	Myo-inositol pentafosfato
InsP₆	Myo-inositol hexafosfato
IPC-OES	Espectroscopia de emisión por plasma de acoplamiento inductivo
LLOQ	Límite inferior de cuantificación
LOCF	Last observation carried forward
LSD	Least significant difference
MDCT	Tomografía Computarizada Multidetectores
MGP	Proteína Gla de matriz
mL	Mililitros
MMP	Metaloproteinasas de matriz
OCP	Fosfato octocálcico
OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
PAD	Enfermedad arterial periférica
PD	Farmacodinamia
PET	Tereftalato de polietileno
PK	Farmacocinética
PO₄³⁻	Fosfato
PPI	Pirofosfato
PTH	Parathormona o hormona paratiroidea
r.p.m.	Revoluciones por minuto
R²	Coefficiente de determinación
Rac C_{max}	Factor de acumulación de la concentración
RANK	Receptor activador para el factor nuclear kappa-B
RANKL	Ligando de receptor activador para el factor nuclear kappa-B
s	Desviación Estándar
SE	Error estándar de la media
STS	Tiosulfato de sodio
t_{max}	Tiempo al que se consigue la C _{max}
TNAP	Fosfatasa alcalina no específica de tejido
TNF	Factor de necrosis tumoral
UA	Unidades Arbitrarias

LISTADO DE ABREVIATURAS

UI	Unidades internacionales
UIB	Universitat de les Illes Balears
VAS	Visual analog scale
VDR	Receptor de vitamina D
VDRA	Activador del receptor de vitamina D

Artículo original 1:

M. D. Ferrer, M. M. Pérez, M. M. Cànaves, J. M. Buades, C. Salcedo, J. Perelló. A novel pharmacodynamic assay to evaluate the effects of crystallization inhibitors on calcium phosphate crystallization in human plasma. *Scientific Reports* (2017), 31;7(1): 6858. doi: 10.1038/s41598-017-07203-x.

Artículo original 2:

J. Perelló, M. D. Ferrer, M. M. Pérez, N. Kaesler, V. M. Brandenburg, G. J. Behets, P. C. D'Haese, R. Garg, B. Isern, A. Gold, M. Wolf, C. Salcedo. Mechanism of action of SNF472, a novel calcification inhibitor to treat vascular calcification and calciphylaxis. *British Journal of Pharmacology* (2020), 177(19):4400-4415. doi: 10.1111/bph.15163.

Artículo original 3:

M. M. Perez, M. D. Ferrer, M. Lazo-Rodriguez, A. Z. Canals, E. Banon-Maneus, J. M. Campistol, S. Miller, R. Garg, A. Gold, C. Salcedo, J. Perelló. A novel assay to measure calcification propensity: from laboratory to humans. *Scientific Reports* (2020), 10(1): 17578. doi: 10.1038/s41598-020-74592-x.

I. INTRODUCCIÓN

1. Cristalizaciones fisiológicas y cristalizaciones patológicas

Las cristalizaciones en el ser humano son en su inmensa mayoría sales de calcio, y se llaman por lo tanto calcificaciones. Éstas pueden tener lugar de forma fisiológica, como es el caso de la formación de los huesos y los dientes. Cualquier otra forma de calcio sólido en el cuerpo humano, generalmente en tejidos blandos, será una calcificación patológica. Cuando estas calcificaciones patológicas tienen lugar en el sistema cardiovascular, hablamos de calcificaciones cardiovasculares (CCVs), y se estudiarán ampliamente en esta memoria de tesis doctoral.

La cristalización es el proceso por el cual se forma un sólido en el que los átomos o moléculas están organizados en una red cristalina rígida y definida, llamada cristal, para minimizar su estado energético. Los cristales se pueden formar de formas diferentes, ya sea a partir de la precipitación de una disolución, la congelación o, más raramente, la deposición directa de un gas.

La formación de un cristal en una disolución puede tener lugar cuando un soluto está en un medio sobresaturado o, dicho de otro modo, cuando éste se encuentra en concentraciones superiores a las que establece su producto de solubilidad. La cristalización implica un cambio de fase, pasando de un sistema en estado de desequilibrio a uno en equilibrio donde aumenta el orden. Para que este proceso sea espontáneo se debe producir un descenso de energía que compense el aumento del orden del sistema¹. Éstas son las condiciones termodinámicas favorables para que ocurra un cambio de fase. En cambio, el mecanismo y tiempo de formación del cristal se explica por el factor cinético.

Por tanto, los procesos de cristalización, ya sean fisiológicos o patológicos, dependen de los factores cinéticos y termodinámicos^{1,2}:

- El grado de **sobresaturación** o fuerza impulsora de la cristalización. Se trata de un factor termodinámico y ocurre cuando un soluto está en concentración mayor a la permitida por su solubilidad. Esta condición es termodinámicamente inestable, por lo que puede formarse un cristal. A pesar de ello, el cristal se formará si las condiciones cinéticas favorecen su formación. El tiempo transcurrido antes del inicio de dicho proceso es una medida de la habilidad del sistema sobresaturado para permanecer en un estado de equilibrio metaestable para que tenga lugar la nucleación y se llama periodo de inducción. Este período puede tener una duración de unos milisegundos hasta años.
- La presencia de **promotores de la cristalización** o nucleantes heterogéneos. Son sustancias que pueden actuar como núcleo sobre el cual se forma un nuevo cristal, se trata de un factor cinético y disminuyen el periodo de inducción para la formación de éste. Algunas macromoléculas, lesiones epiteliales o restos celulares pueden actuar como promotores de la cristalización.
- La presencia de **inhibidores de la cristalización** es otro factor cinético. Estos compuestos obstruyen o previenen la formación y/o el desarrollo del cristal. En general los inhibidores de la cristalización se unen o adsorben al núcleo del cristal o a una cara de éste, previniendo o alterando su desarrollo. Cabe destacar que los inhibidores de la cristalización pueden actuar en las diferentes etapas de la cristalización.

I. INTRODUCCIÓN

Para entender cómo intervienen los factores cinéticos en el proceso de cristalización, es necesario explicar las etapas de la cristalización anteriormente mencionadas². La cristalización empieza con la nucleación o etapa de formación de nuevos núcleos cristalinos con una mínima masa y tamaño crítico (clúster crítico) para poder crecer sin disgregarse. Esta formación puede darse a través de diferentes mecanismos, pero solo se explicarán los dos mecanismos de **nucleación primaria**, en la que pueden actuar los inhibidores de la cristalización:

- **Nucleación homogénea**, en la cual solo intervienen las mismas especies presentes en disolución que formarán el cristal. Este tipo de nucleación ocurre con mayor dificultad, ya que requiere que el clúster crítico se forme desde una sustancia uniforme. En la Figura I.1A se representa el proceso de formación del núcleo homogéneo con tamaño crítico para que se produzca el posterior crecimiento cristalino. En este caso, un inhibidor de la nucleación homogénea se une a las micropartículas con un tamaño menor al crítico, impidiendo la formación del núcleo estable y provocando su disgregación (Figura I.1B).
- En la **nucleación heterogénea**, la más común, el nuevo cristal a formar crece sobre otros cristales o sólidos ya existentes, y de diferente naturaleza química, por lo que se forma un núcleo heterogéneo. En la Figura I.2A se representa el proceso de formación del cristal a través de este mecanismo de nucleación. En estas condiciones, el inhibidor se unirá al nucleante heterogéneo o promotor de la cristalización para impedir que se agreguen las especies en disolución que tienen que formar el futuro cristal (Figura I.2B).

Tras la formación del núcleo se producen el crecimiento cristalino y la agregación:

- El **crecimiento cristalino** implica la incorporación de otras unidades constructivas al cristal en formación en las caras más favorables, es decir, aquellas en las que se requiera menos energía. Con el tiempo, el crecimiento de los núcleos estables da lugar a la aparición de pequeños cristales. En este caso, un inhibidor del crecimiento cristalino se adsorbe sobre la superficie dificultando o evitando el crecimiento del cristal por esa zona en concreto.
- La **agregación** puede ocurrir con la formación de nuevos cristales sobre las caras de los ya existentes (agregación primaria), o bien, con la unión mediante enlaces débiles de cristales ya formados (agregación secundaria). Los inhibidores del crecimiento cristalino también lo suelen ser de la agregación primaria. En cambio, los inhibidores de la agregación secundaria son moléculas cargadas que se adsorben sobre la superficie del cristal provocando repulsiones y dificultando o evitando dicha agregación.

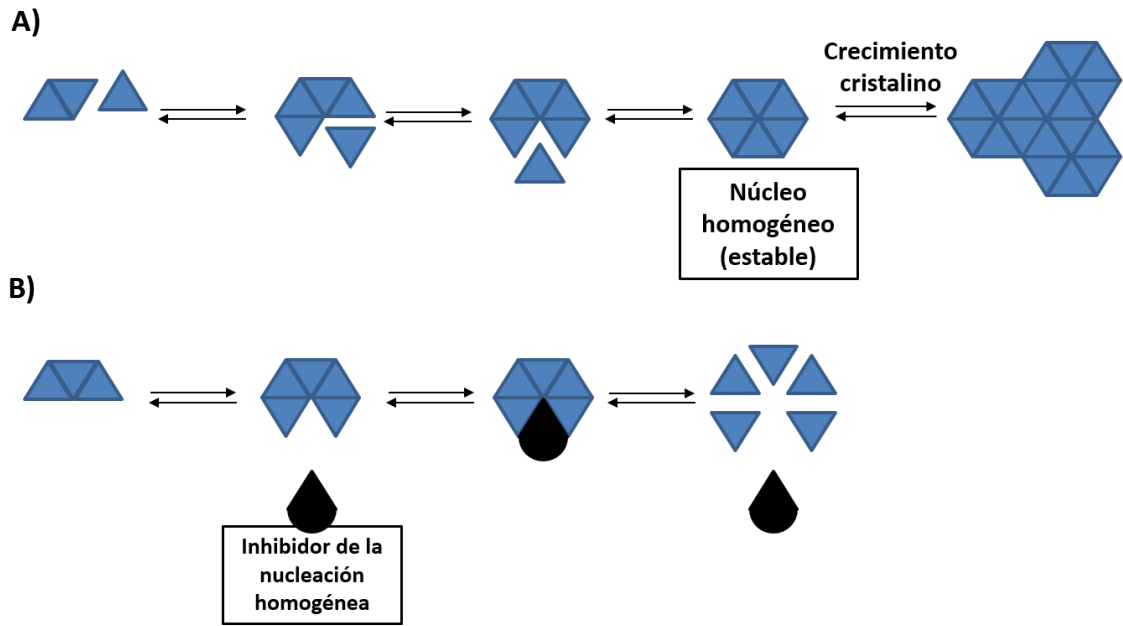


Figura I.1. (A) Esquema del proceso de la formación de un núcleo homogéneo con tamaño crítico. (B) Esquema del mecanismo de acción de un inhibidor de la nucleación homogénea.

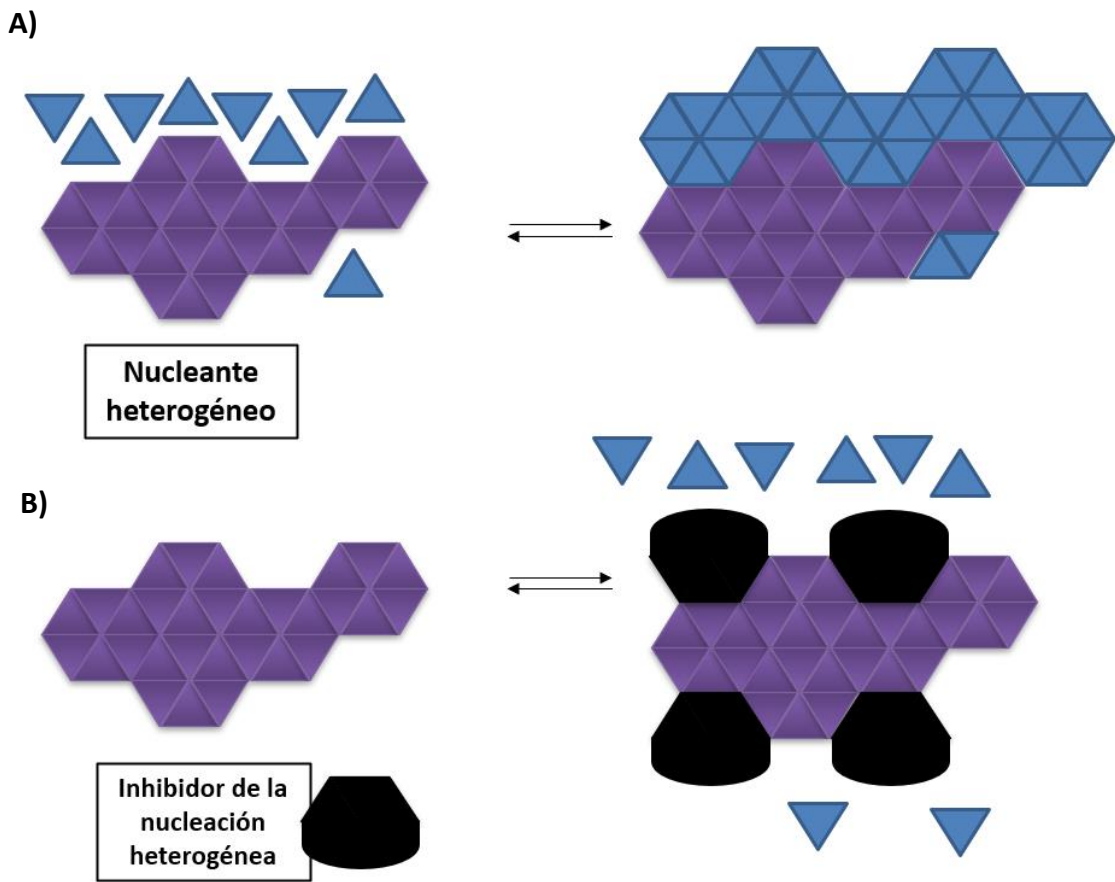


Figura I.2. (A) Esquema del proceso de la formación de un núcleo heterogéneo. (B) Esquema del mecanismo de acción de un inhibidor de la nucleación heterogénea.

En los fluidos biológicos como la sangre y la orina algunos solutos se encuentran sobresaturados. Por ejemplo, la orina está sobresaturada respecto al oxalato cálcico³ y, dependiendo del pH urinario, respecto al ácido úrico (a pH < 5.5) o el fosfato de calcio (hidroxiapatita (HAP) y brushita, a pH > 6.0). En cuanto al plasma sanguíneo (pH ~ 7.4), éste se encuentra sobresaturado respecto a la formación de fosfato de calcio (HAP). Aun así, en el organismo no se producen cristalizaciones masivas en dichos fluidos ya que el proceso de cristalización a nivel biológico está controlado por diferentes factores cinéticos, como pueden ser los inhibidores y los promotores de la cristalización. Este hecho hace que, en condiciones normales, los procesos de cristalización fisiológica para formar estructuras de fosfato de calcio en la forma mineral de HAP ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) se produzcan mayoritariamente en tejidos óseos y dentales. En cambio, cuando existen alteraciones fisiológicas que provocan un desequilibrio entre los factores inhibidores y los factores promotores de la cristalización, ya sea como consecuencia de determinadas patologías o del propio proceso de envejecimiento, puede ocurrir la formación de cristalizaciones patológicas en tejidos blandos⁴. Algunos ejemplos de éstas son las calcificaciones asociadas al cáncer⁵, la CCV⁶, la calcificación cutánea⁷, la formación de cálculos⁸, tanto renales como biliares, etc. Estas cristalizaciones pueden provocar disfuncionalidad, que puede ir desde el tejido afectado a efectos sistémicos más generales.

Cuando en las cristalizaciones intervienen iones calcio, se llaman calcificaciones. Si las cristalizaciones de sales de calcio se depositan en tejido extraesqueléticos, reciben el nombre de calcificación ectópica, siendo la CCV un ejemplo de ésta. Las calcificaciones ectópicas tienen una etiología multifactorial debido a la diversidad de condiciones patológicas causantes. Adicionalmente a los factores explicados, pueden intervenir otros factores para promover o para inhibir la cristalización. Por ejemplo, en el caso de las CCVs, hay factores promotores, que no se consideran nucleantes heterogéneos, como la inflamación, el estrés oxidativo o el uso de medicamentos; y factores represores, como determinadas proteínas o la vitamina K. Los factores específicos que intervienen en las CCVs se explicarán más adelante.

2. Enfermedad Renal Crónica

La enfermedad renal crónica (ERC) es un problema de salud pública a nivel mundial que lleva asociada una morbilidad significativa, mortalidad prematura y disminución de la calidad de vida^{9,10}. Esta enfermedad conlleva una progresiva pérdida de la función renal hasta llegar a la enfermedad renal terminal (ERT), en la cual el paciente necesita un tratamiento sustitutivo renal, ya sea hemodiálisis (HD), diálisis peritoneal o trasplante renal. Además, cabe destacar que la progresiva disminución del filtrado glomerular (FG) y el incremento de albuminuria (relación albúmina/creatinina en orina (mg/g)) que padece el paciente en estadios más tempranos de la enfermedad origina alteraciones del metabolismo óseo y mineral que pueden derivar en calcificaciones ectópicas y, más particularmente, en CCVs. Por ello, las complicaciones cardiovasculares presentan una elevada prevalencia en los distintos estadios de la enfermedad^{11,12}.

I. INTRODUCCIÓN

La *National Kidney Foundation* americana elaboró en 2003 las guías KDOQI (*Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*) con el objetivo de proporcionar una guía para el manejo de los pacientes con ERC¹³. En estas guías se dan dos definiciones a la ERC:

- a) Presencia de daño renal durante un período de tiempo igual o mayor a 3 meses, caracterizado por una alteración funcional o estructural del riñón, con o sin disminución del FG, manifestándose a través de anomalías patológicas o marcadores de daño renal.
- b) Situación en la que se mantiene un $FG < 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ durante un periodo de tiempo igual o superior a 3 meses, ya sea con o sin daño renal.

El pronóstico de ERC según el grado de FG y albuminuria se recoge en las guías KDIGO (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) universales¹⁴. En este documento, la ERC se clasifica en 5 estadios diferentes según el FG (Tabla I.1). Además, atendiendo al grado de albuminuria, puede clasificarse en tres categorías: A1, A2 y A3 según sea <30 , $30-300$ o $>300 \text{ mg/g}$, respectivamente.

Tabla I.1. Clasificación de la enfermedad renal crónica según el filtrado glomerular (FG).

Estadios	FG (mL/min/1.73 m ²)	Descripción
1	≥ 90	FG normal o elevado
2	60-89	Disminución leve del FG
3a	45-59	Disminución leve - moderada del FG
3b	30-44	Disminución moderada - severa del FG
4	15-29	Disminución severa del FG
5	<15 o diálisis	Fallo renal

Según los resultados del estudio EPIRCE (Epidemiología de la Insuficiencia Renal Crónica en España) de 2010 realizado por la Sociedad Española de Nefrología¹⁵, la ERC afecta aproximadamente al 9% de la población española, con estimación de porcentaje de prevalencias para un $FG < 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ del 6.8%, llegando a ser mayor al 20% en edades iguales o superiores a 65 años.

Los datos extraídos del Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España (ENRICA) concluyen que la ERC afecta particularmente a hombres, a personas de edad avanzada y a personas con enfermedad cardiovascular (ECV). Además, se observó que la prevalencia de ERC aumenta de forma marcada con la existencia de factores de riesgo cardiovascular. En pacientes con enfermedades frecuentes como la hipertensión arterial o la diabetes mellitus, la prevalencia de ERC puede alcanzar hasta el 35-40%¹⁶.

Los factores de riesgo de iniciación y progresión de la ERC se pueden clasificar en:

- **Factores no modificables** como la edad, sexo, raza y bajo peso al nacer.
- **Alteraciones comórbidas potencialmente modificables**, que pueden inducir daño renal de manera directa o indirecta: hipertensión arterial, diabetes mellitus¹⁷, obesidad, dislipemia, tabaquismo, hiperuricemia, hipoalbuminemia y ECV¹⁸.
- **Alteraciones inherentes a la ERC**. Éstos son los factores de riesgo de progresión: anemia, alteraciones del metabolismo óseo y mineral, acidosis metabólica.

Como se ha mencionado anteriormente, la ERT se refiere a una condición permanente en la cual los riñones mantienen una tasa de FG menor a 15 mL/min, por lo que se precisa un tratamiento sustitutivo renal. La manifestación de la ERT, según se refleja en las tasas de incidencia de 2017 del registro ERA-EDTA para el tratamiento sustitutivo renal, varía según la región, con países en Europa que oscilan entre 37 (Ucrania) y 252 (Grecia) por millón de habitantes, y con un promedio de 127 por millón de habitantes¹⁹. Esta incidencia es incluso mayor en los EEUU (370.2 por millón de habitantes), debido a una mayor incidencia de ERT diabética²⁰. Según el informe de diálisis y trasplante renal en España²¹, se observó mayor incidencia de la ERT en los grupos de edad más avanzada, superior a los 65 años.

Las principales causas de la ERT son la diabetes mellitus y la edad²². Otros factores de riesgo que pueden conducir al estadio terminal de la enfermedad incluyen la hipertensión, las enfermedades o infecciones renales, como la glomerulonefritis, la enfermedad renal poliquística; y el uso prolongado de ciertos medicamentos, como antiinflamatorios no esteroideos y antirretrovirales.

2.1. Alteraciones del metabolismo óseo-mineral en la enfermedad renal crónica

La ERC conlleva un conjunto de alteraciones del metabolismo óseo y mineral (MOM) a las que se da la denominación de ERC-MOM, o su equivalente en inglés de uso más generalizado, **CKD-MBD** (*chronic kidney disease-mineral and bone disorder*)²³. Este concepto ha ido evolucionando desde finales del siglo XIX hasta la actualidad. La primera asociación entre la enfermedad renal y la enfermedad ósea se publicó en el primer volumen de *The Lancet* en el año 1883, en un artículo en el que se reportó por primera vez anemia, enanismo y raquitismo en niños con ERC²⁴. En 1943 se introdujo el concepto de osteodistrofia renal, que hace referencia a las alteraciones de la morfología y arquitectura ósea propias de la ERC^{23,25}. Finalmente, el concepto actual de CKD-MBD apareció debido a la necesidad de relacionar las alteraciones existentes del esqueleto y del sistema cardiovascular en la ERC²⁶.

La CKD-MBD se define como un conjunto de desórdenes sistémicos graves que son consecuencia de la pérdida progresiva de la función renal y que se manifiestan por una o más alteraciones bioquímicas y esqueléticas (óseas), y calcificaciones extraóseas en el organismo^{23,27} (Figura I.3, adaptada de Moe et al.²³ y Bover et al.²⁸). La importancia de estas alteraciones sistémicas se halla en el hecho de que están estrechamente asociadas con fracturas, y parecen contribuir de manera importante al incremento desmesurado del riesgo cardiovascular y la mortalidad global que presentan los pacientes²⁹. De hecho, la principal causa de mortalidad en la ERC es la cardiovascular, con una prevalencia de morbilidad y mortalidad en pacientes de diálisis hasta 30 veces mayor que en la población general³⁰.

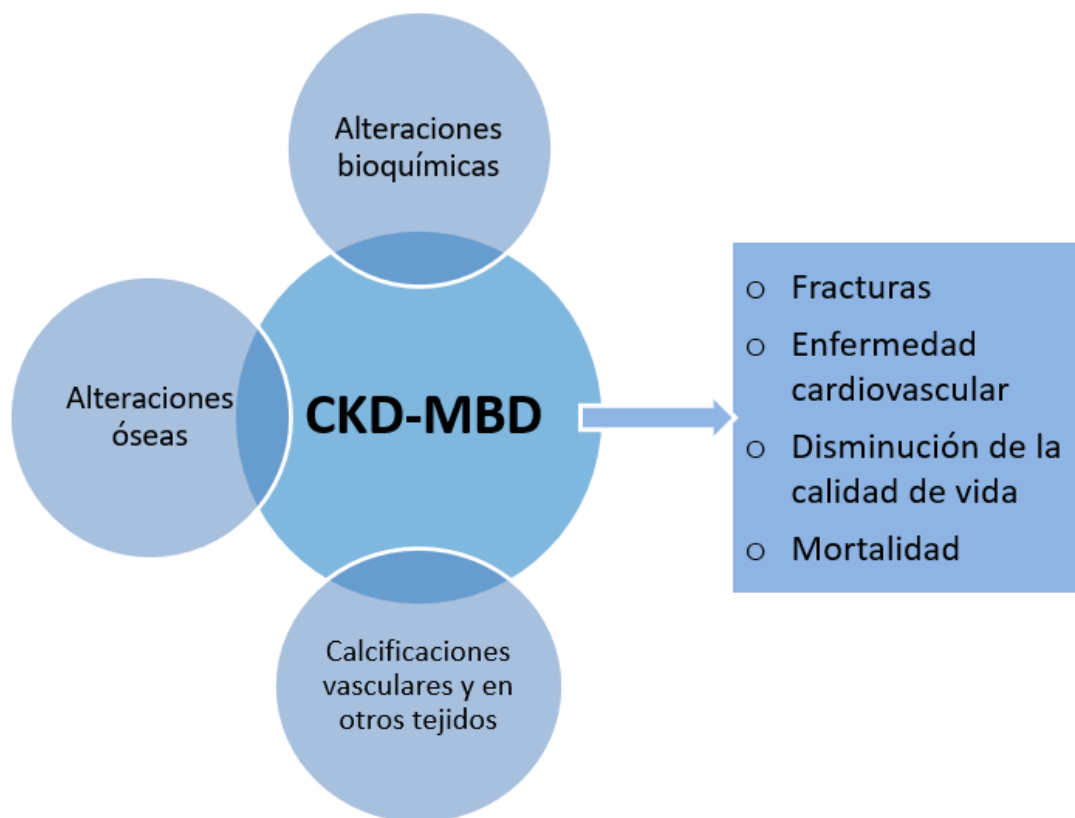


Figura I.3. Esquema de las alteraciones del metabolismo óseo y mineral asociados a la enfermedad renal crónica (CKD-MBD). Fuente: adaptada de Moe et al.²³ y Bover et al.²⁸.

2.1.1. Alteraciones bioquímicas

Las alteraciones bioquímicas pueden ocurrir principalmente en los niveles de calcio, fosfato, hormona paratiroidea y vitamina D.

El calcio y el fosfato son iones importantes para muchas funciones bioquímicas y fisiológicas. Se encuentran principalmente en el tejido óseo, y una pequeña cantidad en el líquido extracelular y en tejidos blandos. Las concentraciones plasmáticas de estos iones se regulan a través de un conjunto de órganos (piel, hígado, riñones, intestino delgado, hueso) y del balance entre la formación-resorción ósea, la absorción intestinal y la excreción renal. Las principales hormonas que regulan estos procesos son la hormona paratiroidea (PTH), la vitamina D, la calcitonina y el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23). Estas hormonas pueden ser estimuladas o inhibidas bajo ciertas condiciones, y con ello, provocar unos efectos sobre el hueso, los riñones o el tracto gastrointestinal.

Las glándulas paratiroides, a través de su sensor de membrana sensible al calcio, responden a los descensos de calcio en sangre secretando PTH. La PTH actúa en los riñones estimulando la reabsorción tubular de calcio y disminuyendo la reabsorción de fosfato. Adicionalmente, en respuesta a niveles séricos de calcio bajos, la PTH puede actuar directamente sobre el hueso aumentando la actividad de osteocitos y osteoclastos. De este modo, se incrementa la resorción

I. INTRODUCCIÓN

ósea y se libera calcio y fosfato al líquido extracelular. El FGF-23 inhibe la secreción de PTH en la glándula paratiroidea.

La vitamina D es esencial para el correcto desarrollo del hueso. Se puede ingerir en la dieta como vitamina D₃ (colecalfiferol) o como vitamina D₂ (ergocalciferol), o sintetizarse en la piel por acción de la radiación ultravioleta sobre el precursor 7-dehidrocolesterol. La vitamina D es una prohormona que sufre un conjunto de reacciones para convertirse a la forma activa. Primeramente, en el hígado se convierte en 25-hidroxicolecalciferol (calcidiol) por acción de la enzima 25-hidroxilasa. En el riñón sufre una segunda hidroxilación mediante la enzima 1-alfahidroxilasa para obtener 1,25-dihidroxicolecalciferol (calcitriol), la hormona activa. La Figura I.4 resume el metabolismo de la vitamina D. La PTH, la hipocalcemia e hipofosfatemia estimulan la enzima renal que cataliza esta última reacción. Cuando las concentraciones de calcio y fosfato son normales, la mayor parte de la vitamina D se transforma en el riñón en metabolitos inactivos. El calcitriol actúa sobre el intestino delgado favoreciendo la absorción de calcio y de fosfato. Además, facilita la mineralización ósea, incrementando la concentración de calcio y de fosfato en el líquido extracelular. El calcitriol también puede actuar directamente sobre la glándula paratiroidea a través de su receptor específico (VDR) para inhibir la síntesis de PTH.

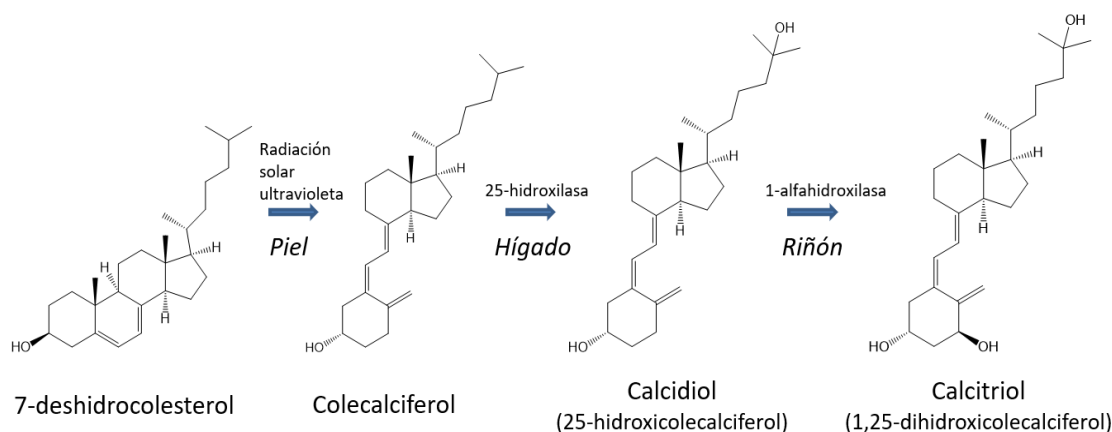


Figura I.4. Esquema del metabolismo de la vitamina D. Paso 1. Conversión del 7-dehidrocolesterol a colecalfiferol gracias a la acción de la radiación ultravioleta. Paso 2. Primera hidroxilación en el hígado a través de la 25-hidroxilasa. Paso 3. Segunda hidroxilación en el riñón por acción de la 1-alfahidroxilasa (regulado por diversos factores como son el factor de crecimiento fibroblástico 23, la parathormona y el propio calcidiol). El último paso, no recogido en este esquema, es el de inactivación de la vitamina D.

Las alteraciones del metabolismo mineral y óseo se inician tempranamente en el desarrollo de la ERC. En los pacientes con ERC se suele observar primeramente un descenso en los niveles de calcitriol, previo al aumento de PTH. Aun así, en la práctica clínica, un incremento de los niveles de PTH se puede detectar asociado o no a niveles bajos de calcitriol. Estas alteraciones suelen ocurrir a partir del estadio 3, mientras que los niveles de calcio y fosfato sérico son habitualmente normales hasta estadios más avanzados.

La pérdida de masa renal provoca menor disponibilidad de 1-alfahidroxilasa para sintetizar calcitriol. El incremento de los niveles de PTH se puede explicar debido a que la pérdida de la función renal provoca el incremento de retención de fosfato (hiperfosfatemia). Esta alteración

I. INTRODUCCIÓN

estimula la producción del FGF-23 por los osteocitos del hueso y promueve la inhibición de reabsorción de fosfato en el túbulo proximal, seguida de fosfaturia y, por tanto, normalización del fosfato sérico.

En este proceso, el FGF-23 puede actuar sobre su receptor (FGFR1) mediante la unión a una proteína transmembrana llamada Klotho, provocando la disminución del número de cotransportadores sodio/fosfato NaPi-2A en la superficie apical de las células del túbulo proximal y determinando así la pérdida urinaria de fosfato. Este mecanismo se ha confirmado en estudios *in vivo* donde ratones con sobreexpresión de FGF-23 presentan hipofosfatemia y niveles reducidos de calcitriol sanguíneo. Por el contrario, ratones deficientes en FGF-23 o Klotho presentan hiperfosfatemia, niveles elevados de calcitriol y desarrollo de calcificaciones extraóseas³¹⁻³³. Durante este proceso, el FGF-23 inhibe la enzima 1- α -hidroxilasa en el riñón. Por tanto, durante el desarrollo de la ERC se produce una caída en los niveles de calcitriol; aunque otros factores, como la deficiencia de sustrato (calcidiol), también pueden contribuir al déficit de esta vitamina. Se considera deficiencia de vitamina D (calcidiol) cuando las concentraciones séricas son menores a 15 ng/mL e insuficiencia entre 15 y 30 ng/ml. En conjunto, deficiencias tanto de calcitriol como de calcidiol se han asociado a la progresión de ERC y riesgo aumentado de mortalidad en estadios 3-4 de ERC.

Adicionalmente, los niveles subóptimos de vitamina D, tanto calcidiol como calcitriol, contribuyen al desarrollo del hiperparatiroidismo secundario (HPT2°) mediante una reducción en la absorción intestinal de Ca y disminución de los niveles séricos de Ca (hipocalcemia), una mayor síntesis de la PTH y crecimiento de la glándula paratiroidea (hiperplasia). Este proceso provoca un aumento del remodelado óseo (liberación de calcio y fosfato del hueso), que a su vez incrementa los niveles circulantes de Ca para contrarrestar la hipocalcemia. La progresión del HPT2° está asociado con un aumento de la incidencia de la ECV³⁴.

Por tanto, este mecanismo explica que la primera alteración mineral que se aprecia en los pacientes con ERC es la caída de los niveles de calcitriol, seguida del aumento de PTH. Las alteraciones de los niveles séricos de calcio y fosfato se aprecian en etapas finales de la enfermedad debido a los fenómenos adaptativos que ocurren en estadios tempranos. De hecho, según un estudio de Gutiérrez et al.³⁵ en 80 pacientes con ERC, se concluyó que el incremento de FGF-23 a medida que avanza la ERC contribuye a mantener los niveles normales de fosfato a expensas de un empeoramiento en el déficit de calcitriol. Adicionalmente, un estudio de Levin et al.³⁶, en pacientes con ERC en estadios 3-5, mostró que en torno a un 60% de los pacientes con FG < 60 mL/min presentaban niveles altos de PTH. En cambio, los niveles de calcio y fosfato se mantenían estables hasta que el FG descendía de 20 mL/min. Es importante destacar que se ha demostrado que tanto la hiperfosfatemia como el aumento de PTH o la hipercalcemia son factores independientes de riesgo cardiovascular y mortalidad³⁷⁻³⁹. Ganesh et al.⁴⁰ relacionaron estos tres parámetros con muertes por causas cardíacas en pacientes en HD, destacando las debidas a enfermedad arterial coronaria y muerte súbita.

2.1.2. Alteraciones óseas

Se manifiestan como alteraciones en el remodelado, mineralización, volumen, crecimiento o resistencia del esqueleto. Podemos distinguir tres tipos de histopatologías⁴¹:

- Un **alto remodelado óseo**, que se origina en el HPT2° y se caracteriza por un número elevado de osteoclastos y osteoblastos, y la presencia de fibrosis medular. El desarrollo del HPT2° en enfermos con ERC en estadios más precoces es la afección ósea más frecuente.
- Un **bajo remodelado óseo**. Contrariamente al caso anterior, el número de osteoclastos y osteoblastos es bajo y no hay fibrosis medular. En estos casos se puede presentar una mineralización deficiente (osteomalacia) o mineralización normal (adinámica). Esta patología se manifiesta en estadios más avanzados de la ERC (estadio 5) y recibe el nombre de enfermedad ósea adinámica.
- Un **remodelado mixto**, donde se observan las características de elevado remodelado óseo, pero con mineralización deficiente.

2.1.3. Calcificaciones cardiovasculares

La CCV es un proceso patológico activo en el que los depósitos minerales formados en las paredes de los vasos sanguíneos (túnica media y/o íntima) y en las válvulas cardíacas pueden provocar rigidez de los tejidos e insuficiencia cardíaca⁴². A medida que los riñones van fallando progresivamente, se acumula una variedad de anormalidades metabólicas y hormonales, que eventualmente conducen a un estado crónico de inflamación, desnutrición, alteraciones del metabolismo óseo y mineral, anemia y alteraciones electrolíticas. Estas condiciones contribuyen a una elevada incidencia y prevalencia de la ECV en la población con ERC, especialmente en la etapa terminal de la enfermedad, donde, aproximadamente el 80% de pacientes en HD tiene uno o más tipos de CCV^{43,44}. Cada vez más, se ha reconocido que la calcificación de tejidos blandos, particularmente la CCV, juega un papel importante en la manifestación clínica de la ECV en estos pacientes. Además, la CCV en la población con enfermedad renal ocurre de forma precoz y progresa rápidamente⁴⁵. Estudios post mortem en 120 niños urémicos en diálisis, mostraron que el 60% presentaba calcificación en tejidos blandos y, de éstos, el 60% CCV (36% del total)⁴⁶.

La ERC es un factor independiente de riesgo cardiovascular y sus tasas de mortalidad aumentan exponencialmente con el deterioro progresivo de la función renal⁴⁷. Un estudio prospectivo reveló que la supervivencia a cinco años en pacientes en diálisis solo fue del 40%, siendo el 40% de las muertes por causa cardiovascular⁴⁸. Por tanto, destacamos la causa cardiovascular como la principal causa de muerte en pacientes en HD, la cual es extremadamente alta incluso en pacientes jóvenes. De hecho, la mortalidad anual en un paciente de HD de 40 años sería comparable a la mortalidad observada en un adulto de 80 años en la población general⁴⁹.

3. Enfermedad cardiovascular en la enfermedad renal

Los pacientes con ERC tienen un mayor riesgo de muerte que el de la población general. En particular, en pacientes con ERT que reciben tratamiento de diálisis este riesgo se incrementa de 5 a 30 veces respecto a la población general por edad y sexo^{50,51}, siendo la principal causa de mortalidad los eventos cardiovasculares⁵². De hecho, la mortalidad por causas cardiovasculares representa entre el 39 y el 50% en los pacientes con ERC, según datos de diferentes países^{51,53}.

Las complicaciones cardiovasculares constituyen uno de los problemas clínicos más importantes de los pacientes con enfermedad renal, ya que, como se ha descrito en el apartado anterior, los trastornos metabólicos y hormonales resultantes de la progresión de ERC a ERT dan como resultado un ambiente propicio para el desarrollo de la CCV.

La ECV, según la definición de la Organización Mundial de la Salud, es un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos entre los que se encuentran la enfermedad coronaria (infarto de miocardio), la aterosclerosis aórtica y aneurismas torácico-abdominales, la hipertensión, la enfermedad vascular periférica, la enfermedad cerebrovascular (trombosis o derrame cerebral), la enfermedad valvular cardíaca, cardiopatías congénitas, arritmias cardíacas y muerte súbita. La ECV es la principal causa de muerte en todo el mundo y se prevé que lo siga siendo en un futuro⁵⁴. En la población con ERC, la ECV también es la causa más común de muerte y la CCV es uno de los predictores más importantes de riesgo⁵⁵.

El 40% de los pacientes que inician el tratamiento de diálisis ya presentan evidencia de enfermedad coronaria, y hasta el 80% de los pacientes presentan anomalías en la estructura y función del ventrículo izquierdo⁵². El desarrollo de CCV durante la ERC conduce a esta reducción en la función cardíaca mientras la enfermedad progresa hasta fase terminal, en la que los pacientes pueden sufrir insuficiencia cardíaca, arritmia y muerte súbita. La arritmia y el paro cardíaco son la forma más frecuente de mortalidad cardiovascular en esta población de pacientes³⁰.

Existen interrelaciones fisiopatológicas entre la ERC y la ECV. De hecho, por un lado, la enfermedad renal contribuye al desarrollo de la ECV y, por otro lado, la ECV facilita la aparición y la progresión de la primera⁵⁶. Esta interrelación se puede explicar en que ciertas complicaciones cardiovasculares son el resultado de alteraciones morfológicas como la **hipertrofia del ventrículo izquierdo (HVI)**, la **aterosclerosis** avanzada, las **calcificaciones valvulares y vasculares**, y la **calcifilaxis**.

- La **HVI** es muy prevalente en la ERC, y su prevalencia aumenta de manera directa con la disminución de la FG⁵⁷. Los factores de riesgo de la HVI son la hipertensión arterial, arteriosclerosis, estenosis aórtica, anemia y HPT^{2º}. El mecanismo de la HVI es la respuesta de adaptación del músculo cardíaco por sobrecarga de presión (HVI concéntrica en la que se produce un aumento del grosor de la pared ventricular), o por sobrecarga de volumen (HVI excéntrica, que provoca un aumento del tamaño de la cavidad ventricular). Ambas manifestaciones causan la pérdida de elasticidad y la posterior disfunción sistólica y diastólica, que acaba provocando insuficiencia cardíaca congestiva, cardiopatía isquémica y arritmias.

- La **aterosclerosis** es una enfermedad inmunoinflamatoria que se caracteriza por la presencia de placas de ateroma en la túnica íntima de las arterias de mediano (carótidas, coronarias e ilíacas) y gran calibre (aorta). Cabe destacar que la exposición prolongada a la hiperglucemia en los pacientes con diabetes mellitus es un factor importante en la patogénesis de la aterosclerosis, ya que induce una gran cantidad de alteraciones a nivel celular del tejido vascular que potencialmente aceleran el proceso aterosclerótico, incluida la calcificación^{58,59}. Por tanto, en pacientes con ERC y diabetes mellitus, el riesgo de CCV aumenta en comparación con los pacientes con ERC sin diabetes⁶⁰.
- Las **calcificaciones vasculares y valvulares** están asociadas a diversas enfermedades, incluyendo la ERC y la ECV. La deposición de fosfato de calcio en forma de HAP puede ocurrir en los vasos sanguíneos, el miocardio y en las válvulas cardíacas⁶¹. En los vasos sanguíneos se pueden distinguir dos tipos de calcificación, según afecte a la túnica íntima (lesiones ateroscleróticas⁶²) o a la túnica media, también conocida como esclerosis de Mönckeberg, y asociada a la rigidez vascular y arteriosclerosis que se observa con la edad, diabetes y ERC⁶³. Finalmente, la **calcifilaxis** o **arteriopatía urémica calcificante** (CUA) se caracteriza por fenómenos trombóticos e isquémicos que afectan sobre todo a las pequeñas arteriolas de la piel. Estas calcificaciones se explicarán con más detalle en el apartado 5.

4. Estructura vascular

El sistema cardiovascular es el sistema de transporte de sangre formado por el corazón y los vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares). El corazón bombea la sangre para que circule a los órganos a través del circuito cerrado de vasos sanguíneos de manera rápida y eficiente.

Las arterias son vasos que distribuyen la sangre del corazón a los tejidos y se ramifican disminuyendo su calibre y formando las arteriolas. En el interior de los tejidos las arteriolas se ramifican en múltiples vasos microscópicos o capilares que se distribuyen entre las células. Los capilares se unen en grupos formando venas pequeñas, llamadas vénulas, que se fusionan para dar lugar a venas de mayor calibre que retornan la sangre al corazón.

Las paredes de las arterias y venas están constituidas por tres capas o túnicas concéntricas (Figura I.5, fuente: Periódico de salud⁶⁴):

- a) La **túnica interna** o **íntima** está constituida por una monocapa de células endoteliales (epitelio escamoso simple), una membrana basal y una capa de fibras elásticas. En el caso de las arterias, entre la túnica íntima y la media se localiza una capa de fibras de elastina (lámina elástica interna).
- b) La **túnica media** está compuesta por capas concéntricas de células musculares lisas y fibras elásticas, de colágeno y proteoglicanos. Esta capa es la que difiere más, en cuanto a la proporción de fibras musculares y elásticas y su grosor, entre venas y arterias. Las arterias tienen predominio de fibras musculares y fibras elásticas en esta capa. Por ello, las principales características de las arterias son la elasticidad y la contractilidad. Según la proporción de fibras elásticas y musculares de la túnica media, se puede diferenciar entre *arterias elásticas* (la aorta y sus ramas), de un mayor calibre, mayor proporción de fibras

I. INTRODUCCIÓN

elásticas y con paredes relativamente delgadas en relación con su diámetro, y las *arterias musculares*, de calibre intermedio, con mayor contenido de músculo liso y menor contenido de fibras elásticas (arterias coronaria, femoral, tibial).

- c) La **túnica externa** o **adventicia** se compone principalmente de tejido conjuntivo con fibras de colágeno y fibroblastos como principal tipo celular.

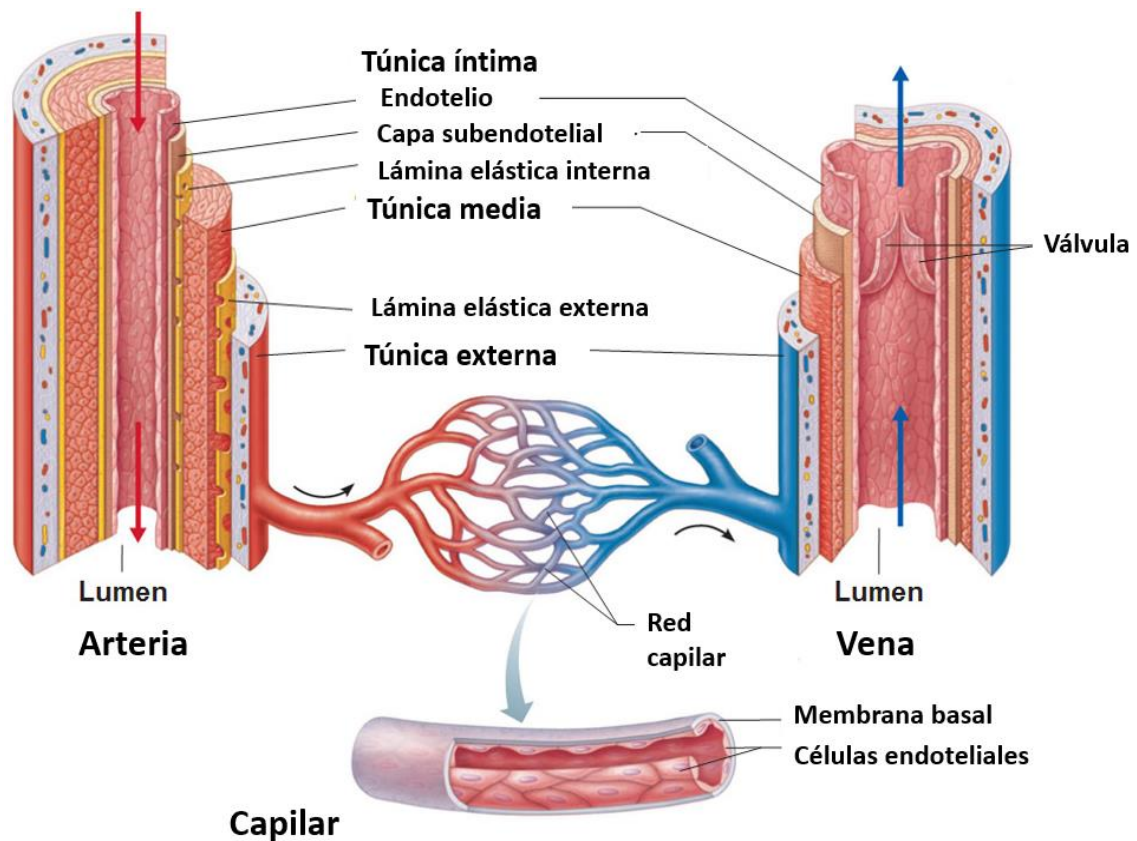


Figura I.5. Estructura de los vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares). Las arterias presentan una túnica media más desarrollada que las venas, mientras que en las venas la túnica adventicia es, frecuentemente, la capa más gruesa del vaso. Los capilares sólo presentan una túnica íntima formada por células endoteliales que se apoyan en su lámina basal. Fuente: Periódico de salud ⁶⁴.

5. Calcificaciones cardiovasculares

La calcificación de tejidos blandos es común en personas de edad avanzada. Existen múltiples calcificaciones extraóseas, destacando las CCVs. La CCV acelerada es común en los pacientes con ERC y contribuye sustancialmente a la alta mortalidad, especialmente en la etapa terminal. Es importante destacar que más del 80% de los pacientes en diálisis presentan CCV^{43,65}. Además, se ha demostrado que las personas con ERT tienen tendencia a presentar CCV incluso siendo jóvenes⁴⁶. De hecho, en un estudio de Goodman et al., se detectaron calcificaciones en las arterias coronarias en un 88% de los pacientes jóvenes en diálisis⁶⁶.

La CCV es un proceso complejo en el cual se forman depósitos de fosfato de calcio en tejidos blandos del aparato cardiovascular en forma de HAP ($\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$) como forma más común⁶⁷. La CCV puede afectar a los vasos sanguíneos, el miocardio y/o las válvulas cardíacas⁶⁸. Durante la CCV se producen procesos similares a los de la biomineralización del tejido óseo.

El proceso de calcificación de los vasos se puede clasificar según su estructura histológica, criterios etiológicos o su localización anatómica^{42,69}:

- a) Histológicamente, los depósitos pueden tener la estructura del tejido óseo o cartilaginoso, o pueden aparecer en forma amorfa.
- b) Etiológicamente, la CCV se puede clasificar según si es por causa **inflamatoria** (asociada a aterosclerosis y calcificación de la íntima), **metabólica** (asociada a ERC y diabetes mellitus, incluyendo calcificación de la íntima y media) o **causas genéticas**, como son el pseudoxantoma elástico, calcificación arterial generalizada de la infancia o calcificación arterial por deficiencia en CD73, entre otras.
- c) Dependiendo de la capa de la pared del vaso afectada, se puede distinguir entre la calcificación de la **túnica íntima**, especialmente relacionada con la aterosclerosis o placa aterosclerótica; y la calcificación de la **túnica media** (esclerosis de Mönckeberg). Este último tipo de calcificación incluye la arteriopatía urémica calcificante o calcifilaxis, donde las calcificaciones tienen lugar en las arteriolas.

La calcificación de la túnica íntima está estrechamente asociada con la progresión de la placa aterosclerótica. La calcificación aterosclerótica implica necrosis celular, inflamación, y deposición de lípidos^{45,70}. El proceso está caracterizado por la presencia de placas de ateroma principalmente en arterias de gran tamaño, como la arteria aorta, pero también de tamaño mediano, como las carótidas, coronarias e ilíacas⁵⁶. Este proceso es impulsado por estados inflamatorios y apoptóticos que provocan estrechamiento y disfunción de los vasos, aumentando la probabilidad de un evento trombótico⁷¹. En el mecanismo de formación de estas placas intervienen dos procesos. Primeramente, se produce un depósito de lipoproteínas en la túnica íntima, que son fagocitadas por macrófagos y células musculares lisas infiltradas que devienen en las denominadas células espumosas, dando lugar a la placa de ateroma inicial. Esta placa se encapsula para formar una placa estable mediante procesos de fibrosis y calcificación. En un estado inflamatorio, se liberan metaloproteasas que debilitan la cápsula fibrosa de la placa dando lugar a la placa inestable, que tras su ruptura provoca el contacto con las células sanguíneas y trombosis arterial.

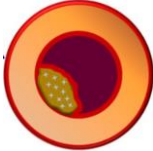
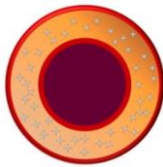
I. INTRODUCCIÓN

La calcificación de la túnica media, o esclerosis de Mönckeberg, con mecanismo de formación complejo, suele afectar a grandes arterias como la aorta, coronarias o ilíacas, así como también a las arterias de las piernas (femoral, tibial), y a las arteriolas. Inicialmente, se pensaba que el proceso era pasivo, causado únicamente por anomalías en concentraciones de calcio y fosfato y su precipitación en un microambiente apropiado⁴². Posteriormente se demostró que son procesos activos en los que las células musculares lisas vasculares (CMLV) transforman su fenotipo a células similares a osteoblastos⁷² y en los que intervienen determinados promotores de la calcificación. Esta calcificación está asociada a la matriz extracelular rica en elastina y colágeno. El análisis ultraestructural sugiere que las células apoptóticas pueden jugar un papel importante en los estadios iniciales de formación de las microcalcificaciones⁷³.

La esclerosis de Mönckeberg es un fenómeno patológico que provoca un mayor aumento de la rigidez arterial⁷⁴ en comparación con otras formas de CCV, promoviendo la HVI y las arritmias fatales⁷⁵. La acumulación de calcificación en la túnica media de los vasos sanguíneos es más prevalente en enfermedades como la diabetes y la ERC⁴⁵. En cambio, en la población general, la CCV se presenta de manera más común como aterosclerosis avanzada. Aun así, la calcificación asociada con el envejecimiento también puede ocurrir en la túnica media. En pacientes con ERC existe una combinación de los dos tipos de calcificaciones. De hecho, la calcificación media se desarrolla simultáneamente con aterosclerosis⁷⁶, que, a su vez, se acelera⁷⁷. Una evidencia de ello es que se ha observado que el proceso de CCV ocurre décadas antes en la población con ERC, especialmente en la etapa terminal, que en la población general⁵⁶. Los efectos sinérgicos entre ambos tipos de calcificación provocan una elevada mortalidad cardiovascular, particularmente muerte súbita⁷⁵.

En resumen, la calcificación de la túnica íntima ocurre en el contexto de la aterosclerosis, asociada con inflamación, necrosis, deposición de lípidos y macrófagos⁷⁸, mientras que la esclerosis de Mönckeberg puede existir independientemente de la aterosclerosis y está asociada con la elastina y el músculo liso vascular. La Tabla I.2. presenta las principales diferencias entre la aterosclerosis y la esclerosis de Mönckeberg.

Tabla I.2. Diferencias entre aterosclerosis y esclerosis de Mönckeberg (o calcificación de la túnica media) en la población general⁵⁰.

	Aterosclerosis	Esclerosis de Mönckeberg
Localización de la lesión	Túnica íntima 	Túnica media 
Tipo de lesión	Placa ateroma Posible calcificación	Calcificación de la capa muscular lisa (CMLV)
Mecanismo	Inflamatorio	Metabólico

I. INTRODUCCIÓN

	Aterosclerosis	Esclerosis de Mönckeberg
Aspectos moleculares	Osteogénesis y/o condrogénesis Liberación de vesículas de matriz	Nucleación en vesículas o elastina Cambio fenotipo de CMLVs a células tipo osteoblastos Osteogénesis
Factores regulatorios	Incremento de activadores Pérdida de inhibidores	Incremento de activadores Pérdida de inhibidores
Factores circulantes	Lípidos Citoquinas Fetuína	Fosfato Toxinas urémicas Glucosa Déficit de Fetuína Receptor de AGEs Fármacos como warfarina, quelantes de fosfato con calcio, vitamina D Déficit de vitamina K
Factores locales	Lípidos oxidados Citoquinas Metaloproteinasas	Elastina Proteasas Proteína Gla de matriz AGEs
Manifestación clínica	Vulnerabilidad de la placa aterosclerótica Oclusión isquémica	Rigidez arterial Hipertensión sistólica HVI
Factores de riesgo	Edad avanzada Enfermedad renal crónica Diabetes mellitus Hipercolesterolemia Dislipidemia Hipertensión arterial Tabaquismo Obesidad Sedentarismo Síndrome metabólico	Edad avanzada Enfermedad renal crónica Diabetes mellitus

CMLV: células de la musculatura lisa vascular. AGEs: productos finales de glicación. HVI: Hipertrofia ventricular izquierda

5.1. Calcificación vascular y valvular, su distribución y consecuencias clínicas

Las calcificaciones vasculares y valvulares se relacionan directamente con la edad o el envejecimiento, pero son más prevalentes y progresan más rápido en la población con ERC o diabetes mellitus^{79,80}.

En este apartado se explican los tipos de calcificación según su distribución central o periférica, y sus enfermedades o consecuencias clínicas asociadas (Figura I.6).

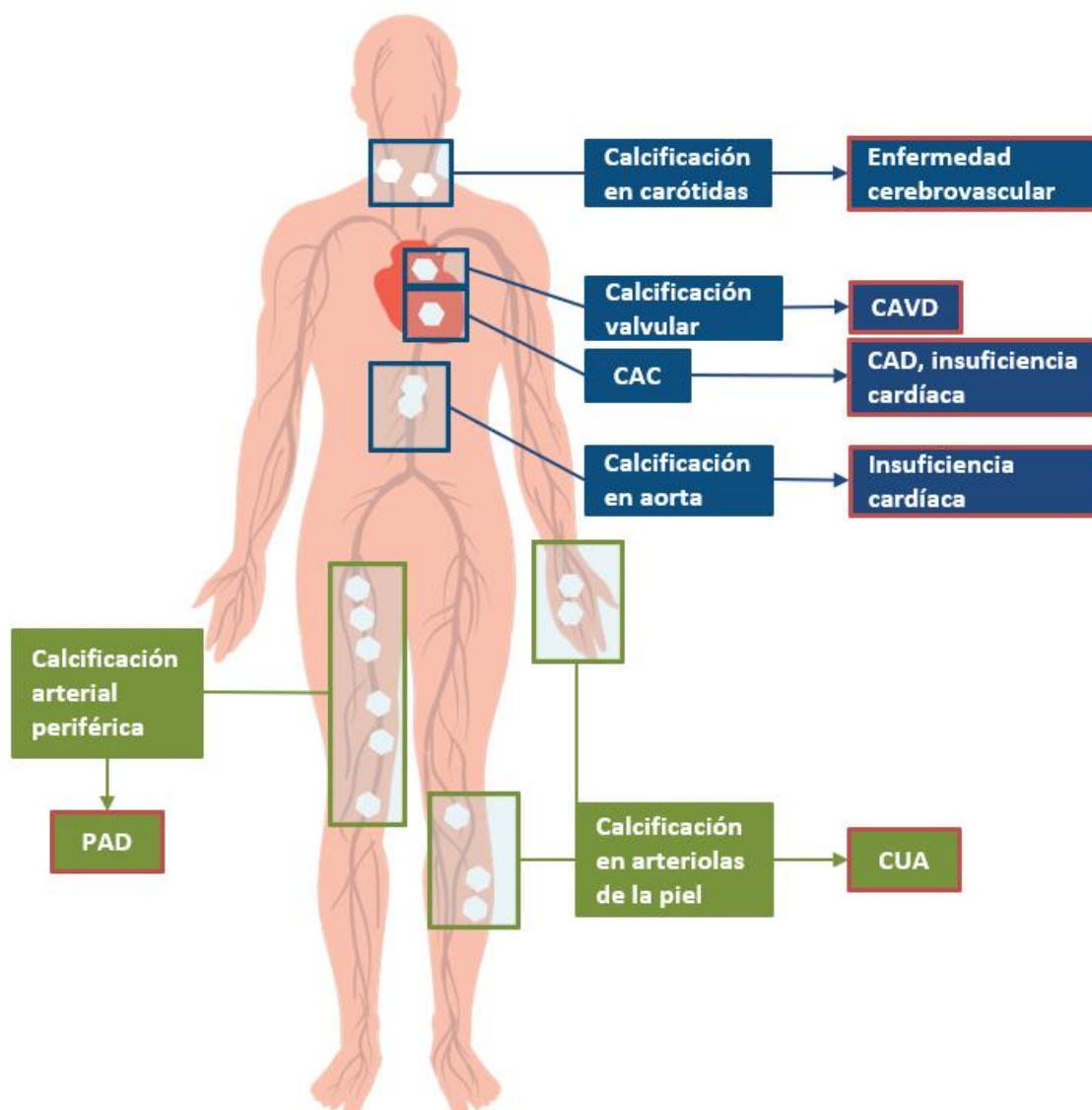


Figura I.6. Imagen representativa para los tipos de calcificación cardiovascular. Calcificación central (azul), calcificación periférica (verde) y sus enfermedades o consecuencias clínicas asociadas (encuadradas en rojo). La localización de la calcificación en la figura es con fines ilustrativos y no excluye su localización en otras regiones anatómicas. CAC: calcificación arterias coronarias, CAD: enfermedad arterial coronaria, CAVD: enfermedad de la válvula aórtica calcificada, CUA: calcifilaxis, PAD: enfermedad arterial periférica.

5.1.1. Calcificación cardiovascular periférica

5.1.1.1. Calcificación arterial periférica

La calcificación arterial periférica afecta a los vasos de las extremidades, generalmente las arterias de las piernas, y se caracteriza por un flujo sanguíneo insuficiente provocando, entre otros síntomas, dolor en las piernas al caminar (claudicación). La claudicación es un dolor isquémico causado al caminar debido a un flujo sanguíneo bajo. Se trata de un síntoma de la enfermedad arterial periférica (PAD), donde aumenta la rigidez de las arterias que suministran sangre a las extremidades de manera progresiva. Este incremento de rigidez arterial provoca una menor flexibilidad de éstas y la reducción del flujo sanguíneo. La PAD causa dolor en las extremidades inferiores, reducción de la movilidad (capacidad para caminar) y puede provocar isquemia crítica, gangrena y amputación⁸¹. La calcificación arterial periférica se asocia con rigidez, disminuyendo el flujo sanguíneo del tejido periférico y progresando a la formación difusa de trombos^{82,83}.

Los factores de riesgo para esta enfermedad incluyen edad avanzada, hipertensión, tabaquismo, ERC y diabetes, destacando las dos últimas y, especialmente, la ERT^{84,85}. Se observa una elevada prevalencia de PAD en fases terminales de la ERC, con un 37% de prevalencia en pacientes en tratamiento de HD²⁰, que se puede explicar debido a las anomalías metabólicas y hormonales en la ERT y la elevada prevalencia de CCV.

Se ha observado una correlación entre la calcificación arterial periférica y el CAC, destacando que ambas comparten muchos factores de riesgo y, a su vez, llevan asociadas elevadas tasas de mortalidad^{86,87}.

La calcificación de la media es la que se observa más comúnmente en la calcificación arterial periférica en enfermos con diabetes y ERC, especialmente en las arterias tibiales y las arterias del pie^{82,83,88}. De hecho, los resultados de las autopsias de sujetos con PAD revelaron que un 72% de las arterias de las extremidades inferiores presentaban calcificación de la media, frente a un 23% con aterosclerosis⁸⁹.

En la actualidad los tratamientos para PAD en la población general están enfocados a minimizar los factores de riesgo, o bien, a tratar la claudicación intermitente. La pentoxifilina⁹⁰ y el cilostazol⁹¹ son los únicos fármacos actualmente autorizados por la FDA para tratar la claudicación intermitente, siendo el último el más recomendado y extensamente utilizado⁹². Para la prevención secundaria de eventos cardiovasculares, se utilizan tratamientos antiagregantes (como el ácido acetilsalicílico), estatinas e inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina⁹². Es importante destacar que no se ha aprobado ningún tratamiento específico para PAD en la población con ERT. Los estudios clínicos aleatorizados para probar terapias para PAD han excluido a los pacientes con ERT al tratarse de un grupo difícil de tratar y con mayor mortalidad al de la población general con PAD⁹³.

5.1.1.2. Calcificación en las arteriolas de la piel

La calcificación acelerada en la túnica media de las arteriolas (<0.6 mm de diámetro) se suele desarrollar en la dermis y en el tejido subcutáneo adiposo, dando lugar a una enfermedad severa conocida como calcifilaxis, también llamada arteriopatía urémica calcificante (CUA).

Igual que en otros tipos de calcificación de la media, el desarrollo de calcificaciones en las arteriolas es un proceso activo mediado por células y regulado, que depende del equilibrio entre promotores e inhibidores de la calcificación (Figura I.7, fuente: Nigwekar et al.⁹⁴). Los depósitos de calcificación van acompañados de inflamación local y oclusión trombótica de las arteriolas, lo que conduce a isquemia y posterior necrosis de la grasa subcutánea, la piel, órganos internos o músculos⁹⁵. Las úlceras isquémicas son extremadamente dolorosas y representan un riesgo de infección local y sepsis generalizada.

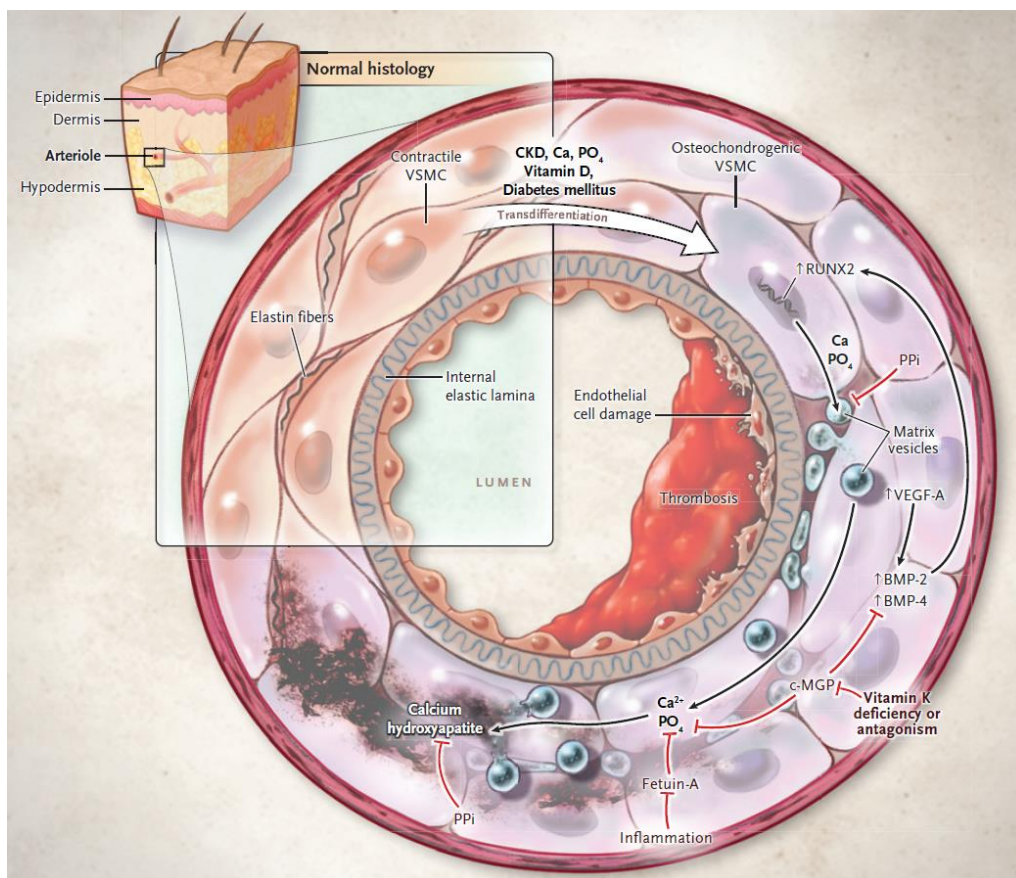


Figura I.7. Patogenia de la calcifilaxis propuesta por Nigwekar et al.⁹⁴ representada en una arteriola de una sección de la piel. Se propone una transdiferenciación de las células musculares lisas vasculares desde un fenotipo contráctil a uno osteocondrogénico con factores de transcripción sobrerregulados, un incremento de los promotores de la calcificación y un descenso de los inhibidores. El resultado final es la calcificación de las arteriolas junto con daño de las células endoteliales y trombosis. El cuarto superior izquierdo representa características histológicas normales, con un revestimiento endotelial intacto, lámina elástica interna, células de músculo liso vascular y fibras de elastina. BMP (proteína morfogénica ósea), VSMC (células de músculo liso vascular), MGP (proteína Gla de matriz), PPI (pirofosfato), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular).

La CUA es una enfermedad rara que puede ocurrir tanto en la población con función renal normal como en la población con ERC. Sin embargo, esta enfermedad es más prevalente en pacientes con ERT en tratamiento de diálisis, afectando alrededor del 1 al 4% de esta población^{94,96}. Las manifestaciones clínicas principales de la CUA son el dolor extremadamente intenso (que requiere frecuentemente el uso de opioides) y la formación de úlceras necróticas en la piel. Estas lesiones tienden a aparecer en las extremidades superiores e inferiores, aunque también se han descrito lesiones troncales. Estas úlceras no se recuperan de forma espontánea y son una fuente de frecuentes infecciones, que suelen evolucionar hacia septicemia, que en última instancia es responsable de más del 50% de la mortalidad asociada a esta enfermedad⁹⁷. La CUA es una enfermedad grave, con una tasa de mortalidad del 55% dentro del primer año de diagnóstico, y una tasa de supervivencia a 5 años del diagnóstico solo del 35%⁹⁸.

El tratamiento de la CUA es complejo, y el potencial efecto de los diferentes tratamientos se basa en publicaciones sobre casos, no existiendo estudios clínicos prospectivos controlados con ningún producto. Las opciones terapéuticas existentes son, por un parte preventivas, eliminando los factores de riesgo de la enfermedad, y por otra, el cuidado de heridas, el alivio del dolor y el tratamiento con agentes que eviten el proceso de calcificación cutánea. Adicionalmente, existen evidencias en las que se usa la cámara hiperbárica para mejorar la cicatrización y disminuir el riesgo de infección por especies reactivas de oxígeno⁹⁹. Respecto a los compuestos para el tratamiento de la CUA, debemos destacar que en la actualidad no existen terapias aprobadas para ello, por lo que es importante buscar nuevos fármacos para tratar una afección rara con elevada morbilidad y mortalidad.

5.1.2. Calcificación cardiovascular central

5.1.2.1. Calcificación de las válvulas cardíacas

La calcificación de las válvulas cardíacas se da como resultado de la acción prolongada del estrés mecánico y de factores proinflamatorios, y afecta con mayor frecuencia a la válvula aórtica, pero también a la mitral. El proceso de deposición de HAP en las válvulas provoca, primeramente, un leve endurecimiento y estrechamiento de la apertura de la válvula (esclerosis). A medida que progresa la calcificación se va reduciendo el flujo sanguíneo que pasa a través de la válvula, llegando a provocar estenosis severa (Figura 1.8, fuente: Mann et al.¹⁰⁰) y rotura de las valvas, dando lugar al fallo valvular⁶⁸. Por tanto, podemos concretar que la calcificación valvular aórtica progresa hacia la estenosis valvular aórtica calcificada, la lesión valvular más común en los EE. UU. y la mayor causa de remplazo valvular aórtico⁶⁸. Esta patología progresiva se asocia con un aumento de aproximadamente el 50% en el riesgo de muerte por causas cardiovasculares¹⁰¹.

Los factores de riesgo predictivos de calcificación de la válvula aórtica son similares a los de arterioesclerosis coronaria, e incluyen edad, sexo masculino, tabaquismo, colesterol elevado, lipoproteína(a), hipertensión, diabetes mellitus, síndrome metabólico y ERC con o sin diálisis¹⁰².

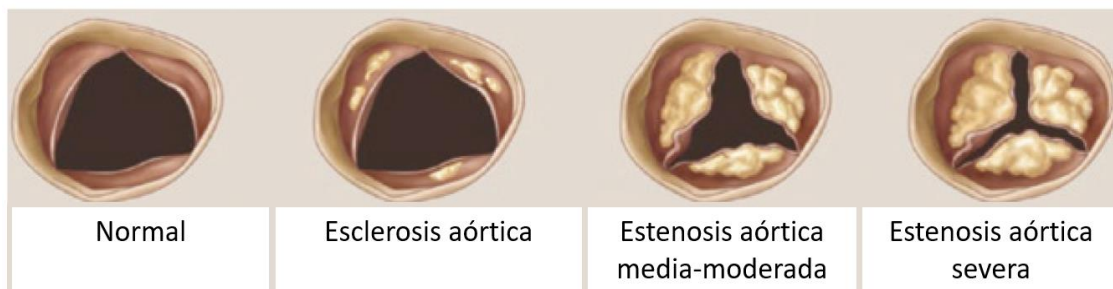


Figura I.8. Evolución del daño acumulado en la válvula aórtica tricúspide que muestra un depósito creciente de calcificación y una reducción del anillo aórtico. Fuente: Mann 2014 et al.¹⁰⁰.

Varios estudios poblacionales han demostrado una mayor prevalencia y progresión de la calcificación de la válvula aórtica en pacientes con ERC, especialmente en pacientes dializados, en comparación con la población con función renal normal¹⁰³. Esto se debe a que los mecanismos involucrados en dicha calcificación, que se explicarán más adelante, pueden verse amplificados en pacientes con función renal reducida¹⁰⁴. Estudios llevados a cabo en población dializada mostraron una prevalencia de anomalías en la válvula aórtica del 28 al 85%, incluyendo calcificación valvular aórtica, esclerosis y estenosis severa, siendo la prevalencia de esta última del 6-13% de los sujetos sometidos a HD^{103,105}. En cambio, la prevalencia de la estenosis aórtica calcificada se ha estimado en un 0.4% en la población general, en un 1.7% en la población con edad superior a 65 años, y en un 3% la estenosis severa en población con edad superior a 75 años¹⁰⁶.

La enfermedad valvular aórtica calcificada (CAVD) es una enfermedad progresiva, que se presenta inicialmente con esclerosis aórtica hasta avanzar a estenosis e insuficiencia aórtica valvar¹⁰⁷. La estenosis aórtica en fase final, resultado de una extensa calcificación de las valvas, es el tipo más común de enfermedad valvular y conduce a angina, síncope e insuficiencia cardíaca¹⁰⁷. Con la progresión de la enfermedad, la función ventricular se ve afectada, por lo que la esperanza de vida del 90% de los pacientes con estenosis aórtica severa es menor de 10 años¹⁰⁷.

En la actualidad no hay tratamientos farmacológicos que pueden prevenir la progresión o inhibir el desarrollo de la CAVD, por lo que se necesita investigar en enfoques terapéuticos para tratar dicha enfermedad.

5.1.2.2. Calcificación de las arterias coronarias

La calcificación de las arterias coronarias (CAC) se considera como parte integral de la aterosclerosis coronaria avanzada y se ha correlacionado con la carga de la placa. Se considera un predictor de riesgo para futuros eventos cardiovasculares¹⁰⁸. Esta patología se inicia con microcalcificaciones en la íntima (0.5 a 15.0 μm) que crecen hasta formar fragmentos mayores, resultando finalmente en depósitos laminares (> 3 mm). Las láminas calcificadas pueden fracturarse y provocar la formación de calcificación nodular. De acuerdo con la Asociación Estadounidense del Corazón, las placas ateroscleróticas coronarias constituyen la mayoría de las ECVs en la población general¹⁰⁹.

La fisiopatología de la CAC en la ERC es diferente a la que ocurre en condiciones de aterosclerosis, en la población general¹¹⁰. La CAC en la ERC está estrechamente asociada a trastornos minerales y óseos, que incluyen entre otros, el HPT2° y las elevadas concentraciones de calcio y fosfato en plasma, y la calcificación de la media. Por tanto, la CAC se acelera en la ERC como resultado de dos procesos patológicos distintos que dan como resultado depósitos en la túnica media (arteriosclerosis) e íntima (aterosclerosis).

Adicionalmente, la CAC se desarrolla de manera más temprana en el curso de la ERC y progresa más rápidamente a medida que la ERC avanza¹¹¹. Respecto a la prevalencia de la CAC en los pacientes con ERC, un metaanálisis publicado por Wang et al. la estimó en torno al 60%. Si nos referimos a los pacientes en HD, la prevalencia pudo llegar hasta el 93%¹¹². Adicionalmente, se ha observado elevada prevalencia y rápida progresión de la CAC en niños con ERT⁶⁶. El mismo estudio anterior asoció la CAC con un mayor riesgo de mortalidad por todas las causas. Además, se observó que los diferentes estadios de la ERC modificaron las estimaciones de riesgo entre CAC y mortalidad, los pacientes con ERT en diálisis presentaron mayor riesgo en comparación con etapas de prediálisis¹¹².

La enfermedad arterial coronaria (CAD) es un proceso patológico asociado a la CAC caracterizado bien por la acumulación de placa aterosclerótica en las arterias coronarias, ya sea obstructiva o no obstructiva, o por el aumento de rigidez de las coronarias. Este último caso puede debilitar el músculo cardíaco y contribuir a la insuficiencia cardíaca y las arritmias. Los factores de riesgo tradicionales de la CAD en la población general incluyen hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia y edad avanzada. En cambio, en la población con ERC y ERT se deben añadir otros factores como la disfunción endotelial, las alteraciones CKD-MBD (hiperfosfatemia, el HPT2° y calcificaciones vasculares), el aumento del estrés oxidativo y la inflamación^{113,114}. A medida que el FG decrece por debajo de 60 mL/min/1.73 m², la probabilidad de desarrollar CAD aumenta linealmente. Además, una vez los enfermos renales crónicos desarrollan CAD, presentan peor pronóstico que los pacientes con función renal normal. La muerte súbita es muy común en la ERT, tal vez debido a los cambios de volumen, electrolitos, y las concentraciones de fármacos que pueden desencadenar arritmias en pacientes con una enfermedad del miocardio (HVI e insuficiencia cardíaca)¹¹⁵.

5.1.2.3. Calcificación de las arterias carótidas

La calcificación de las arterias carótidas está relacionada con la existencia de aterosclerosis, pero también puede ocurrir la calcificación de la media, resultando en accidentes cerebrovasculares en ambos casos.

Sumida et al.¹¹⁶ analizaron la prevalencia en pacientes de HD de la calcificación arterial en carótidas y de la presencia de placa en las mismas, encontrando un 71% y un 65%, respectivamente. La primera se asoció con la edad, hipertensión y alteraciones en el metabolismo mineral. Por el contrario, únicamente el sexo masculino se determinó como factor para la segunda. Finalmente, este estudio sugirió que existe una fuerte relación entre la calcificación de las carótidas con la aterosclerosis en estos pacientes. Adicionalmente, en la población dializada se ha demostrado que la placa de la arteria carótida es un predictor de eventos cardiovasculares¹¹⁷, y otro estudio relacionó la rigidez de la arteria carótida (asociada a la calcificación de la media) con la mortalidad cardiovascular y por todas las causas¹¹⁸. Además,

se demostró que el aumento del grosor de la túnica íntima-media de la carótida es un predictor significativo de muerte cardiovascular¹¹⁹. Posteriormente se demostró que la calcificación en las arterias carótidas al inicio de la HD es un factor de riesgo independiente para posteriores eventos cardiovasculares en pacientes con ERT¹²⁰.

La calcificación en las arterias carótidas está asociada con un mayor riesgo de accidente cerebrovascular¹²¹. Hay dos tipos principales de accidente cerebrovascular, isquémico y hemorrágico. El isquémico se produce por un coágulo de sangre que bloquea el vaso sanguíneo; en cambio, el hemorrágico es causado por la rotura de un vaso sanguíneo. Ambos privan a parte del cerebro de sangre y oxígeno, lo que provoca la muerte de las células cerebrales. Las calcificaciones de la íntima se asocian principalmente con accidentes cerebrovasculares isquémicos, mientras que las calcificaciones de la media, con presión de pulso alta, contribuyen al accidente cerebrovascular hemorrágico¹²².

El riesgo de evento cerebrovascular, tanto isquémico como hemorrágico, en los pacientes con ERC es alto, de 5 a 30 veces mayor que en la población general, ya que tienen más factores de riesgo de aterosclerosis en combinación con la calcificación de la media frecuente en la enfermedad renal. La incidencia anual en la población general es del 2.6%, mientras que la de pacientes con ERC es del 9.6%, y si consideramos los que están en HD asciende hasta el 15.1%¹²³. Por tanto, el procedimiento de HD en sí mismo puede aumentar el riesgo de accidente cerebrovascular. Los cambios hemodinámicos, la alta variabilidad de la presión arterial, el uso de anticoagulantes, el acceso vascular, la calcificación vascular y los años en diálisis, entre otros factores, pueden desencadenar accidentes cerebrovasculares tanto isquémicos como hemorrágicos¹²⁴.

5.2. Técnicas de detección de calcificación vascular y valvular

Existen diversas técnicas diagnósticas no invasivas para valorar las calcificaciones vasculares, aportando cada técnica información diferente¹²⁵. Las técnicas que se describen a continuación, no invasivas, no permiten distinguir entre calcificación de la túnica media o íntima.

La radiología simple es la técnica de imagen por excelencia por su accesibilidad y bajo coste. En esta técnica tenemos dos índices semicuantitativos para evaluar la calcificación. El índice Kauppila, para la calcificación de la aorta abdominal, y el índice Adragao, para arterias periféricas (pelvis y manos). En el primero, la radiografía lateral de abdomen incluye desde la vértebra T-10 hasta las dos primeras vértebras sacras, analizando los segmentos de la aorta abdominal que están por delante de las vértebras lumbares L1-L4. Se asigna la puntuación de 0 a 3, según sea ausencia de calcificación (0), poca calcificación (1), moderada (2) o extensa (3). La puntuación final está entre 0 y 24 puntos¹²⁶. El segundo se determina por la suma de 0 a 2, según ausencia de calcificación (0 puntos), presencia unilateral (1 punto) o bilateral (2 puntos), de las calcificaciones lineales de cada sección. El valor estará entre 0 y 8 puntos¹²⁷. Por tanto, estos índices permiten medir el grosor de la línea calcificada en grandes arterias, como la aorta o las ilíacas. Sin embargo, es una técnica subjetiva y variable.

Otra técnica existente y accesible es la ecografía vascular, ampliamente utilizada por neurólogos para valorar oclusiones en la enfermedad cerebrovascular. Esta técnica utiliza la eco-Doppler (Ecografía bidimensional más efecto del Doppler) para visualizar la morfología y hemodinámica

vascular, evaluando también la presencia de estenosis. El ultrasonido no utiliza radiación ionizante, por lo que no tiene efectos dañinos conocidos. Sus limitaciones radican en que es dependiente del explorador y en el tiempo necesario para realizar una exploración completa (entre 30 y 60 minutos). La ecocardiografía es específica para detectar la presencia o ausencia de calcificaciones valvulares, aportando también información del tamaño, la forma y el movimiento del músculo cardíaco.

En la actualidad existen métodos radiológicos más sensibles, como la tomografía computarizada por haz de electrones (EBCT) o la más reciente tomografía computarizada multidetector (MDCT). Esta última se caracteriza por obtener cortes más delgados en menos tiempo, y permite cuantificar los depósitos minerales en tejidos blandos e informar sobre las características de la placa. La MDCT se utiliza para el diagnóstico de calcificaciones cardíacas, tanto valvulares como coronarias, y está considerada la técnica de diagnóstico por excelencia. Los resultados tradicionalmente se presentan con el índice Agatston para expresar la carga de placa calcificada, analizando y sumando todos los cortes individuales de las imágenes adquiridas. Así pues, se puede clasificar el índice CAC según:

- Índice CAC 0: sin presencia de placa y riesgo cardiovascular muy bajo.
- Índice CAC 1 - 10: mínima carga de placa y riesgo cardiovascular bajo.
- Índice CAC 11 - 100: ligera carga de placa y riesgo cardiovascular moderado (estenosis leve).
- Índice CAC 101 - 400: moderada carga de placa y riesgo cardiovascular moderado-alto (alta probabilidad de CAD).
- Índice CAC > 400: extensa carga de placa y riesgo cardiovascular alto (alta probabilidad de CAD).

6. Mecanismos de calcificación cardiovascular en la enfermedad renal crónica

La CCV es un proceso de mineralización patológica, por lo que seguirá los mecanismos generales explicados en el primer apartado de este capítulo. En general, para que tenga lugar la CCV debe existir la sobresaturación en el medio y un desequilibrio entre los factores promotores e inhibidores de la calcificación². En particular, la CCV es un proceso activo y regulado en el que intervienen numerosos componentes a nivel celular y plasmático no excluyentes entre ellos¹²⁸. Aun así, hasta principios del siglo XIX¹²⁹ se pensó que era un proceso pasivo consecuencia de la sobresaturación en plasma de calcio y fosfato y del aumento del producto calcio-fosfato, que culminaba en la deposición patológica de fosfato de calcio¹³⁰. Se puede afirmar que la hiperfosfatemia, la hipercalcemia y el aumento del producto calcio-fosfato son factores que contribuyen de manera importante a la CCV, pero para que ésta ocurra debe existir también un balance negativo de los inhibidores de la calcificación y un aumento de los niveles circulantes de promotores de la calcificación, condiciones presentes en la ERC. Estos inhibidores y promotores de la calcificación pueden ser proteínas que intervienen en el proceso de regulación de la CCV.

A principios del siglo XIX, Virchow¹²⁹ describió estructuras similares a huesos en los vasos, que proporcionaron la primera evidencia de que la calcificación vascular podía ser un proceso regulado. Estudios más recientes han descrito que existe matriz ósea, citoquinas, factores de transcripción, proteínas de matriz y vesículas de matriz características de osteoblastos maduros

y condrocitos terminales diferenciados dentro de las lesiones calcificadas, juntamente con HAP como material inorgánico¹³¹.

6.1. Proceso de nucleación

Algunas sustancias como el colágeno, la elastina, los fosfolípidos, los glicosaminoglicanos, las vesículas de matriz y las membranas mitocondriales presentes en los tejidos cardiovasculares pueden actuar como nucleantes heterogéneos promoviendo la calcificación¹³². Este proceso puede ocurrir tras algún tipo de lesión o muerte celular⁶⁸. En los tejidos, la relación de calcio extracelular/intracelular es mayor a 10000, y disminuye cuando la célula sufre una lesión, la bomba Ca/Na falla y, como consecuencia, se produce acumulación de calcio intracelular. Este aumento de la concentración de calcio, con la elevada concentración intracelular de fosfato y el exceso de ATP, junto con el déficit de inhibidores naturales, puede conducir a una nucleación rápida con la posterior formación de fosfato de calcio sobre los fragmentos celulares disponibles¹³².

Las vesículas de matriz unidas a membrana, liberadas de las CMLV vivas, y los cuerpos apoptóticos de las muertas, tienen un papel importante en el proceso inicial de la CCV como nucleantes heterogéneos de la mineralización^{133,134}. Un estudio de Reynolds¹³⁵ destaca el papel de las CMLV en el metabolismo de las vesículas matriciales unidas a membrana, donde las CMLV fagocitan a las vesículas a través de mecanismos dependiente de fetuína-A. Por lo tanto, la apoptosis de las CMLV en la ERT, promovida por la hiperfosfatemia y las toxinas urémicas, libera cuerpos apoptóticos que pueden actuar como nucleantes para el proceso de mineralización y, a la vez, reduce la posibilidad de eliminar las vesículas matriciales unidas a membrana y los cuerpos apoptóticos. La fisiología y la función de las CMLV, incluso en ausencia de transdiferenciación osteogénica, son críticas en la patogénesis de la calcificación urémica¹³⁵.

6.2. Hiperfosfatemia e hipercalcemia

El metabolismo alterado del calcio y el fosfato en condiciones urémicas es un factor importante de la elevada ocurrencia de la CCV en la ERC por mineralización de la matriz. Asimismo, el aumento del producto calcio-fosfato se relaciona con mayor mortalidad global, cardiopatía isquémica y muerte súbita⁴⁰. Por otra parte, el fosfato extracelular promueve la mineralización a través de mecanismos de señalización de las CMLV¹³⁶. En este mecanismo, el fosfato extracelular penetra en las CMLV a través del canal Pit-1 elevando los niveles intracelulares de fosfato, lo que conduce a la inducción de factores de diferenciación osteoblástica tales como core binding factor alfa 1 (Cbfa1/Runx2) y osteocalcina (OC)¹³⁷.

6.3. Toxinas urémicas

Adicionalmente a la hiperfosfatemia e hipercalcemia, hay numerosos estudios que sugieren que ciertas sustancias presentes en el plasma de pacientes con ERC pueden promover la calcificación¹³⁸. Estudios *in vitro* realizados con CMLV han demostrado que el suero urémico puede inducir la calcificación de las células de manera independiente de la concentración de fosfato^{138,139}. De hecho, las CMLV bovinas en presencia de suero urémico aumentan la expresión de proteínas relacionadas con el proceso de calcificación.

Se han identificado factores urémicos que pueden inducir genes osteogénicos, de transformación osteoblástica y de secreción de algunas proteínas de la matriz ósea en la pared de los vasos sanguíneos, promoviendo la expresión de moléculas fundamentales para la calcificación vascular. Algunos ejemplos son: factores de necrosis tumoral (TNF)¹⁴⁰, citoquinas inflamatorias¹⁴¹, fibronectina¹⁴², colágeno tipo I¹⁴² y 25-hidroxicolesterol¹⁴³.

El suero urémico también aumenta la secreción de un mediador crucial de la diferenciación osteoblástica, la proteína morfogenética ósea-2 (BMP2), que provoca la mineralización de las células¹³⁸. Así pues, tanto el fosfato como la proteína BMP2, presentes en suero urémico, pueden tener un papel como mediadores en la transformación del fenotipo de las CMLV a células similares a osteoblastos que inducen el proceso de mineralización de los vasos sanguíneos.

6.4. Proteínas implicadas en el proceso de calcificación

Hay proteínas en los tejidos de los mamíferos que pueden modular la calcificación a nivel celular, ya sea activando o desactivando diferentes procesos relacionados con ésta. Por ejemplo, pueden regular la actividad de los macrófagos (con actividad para reabsorber matriz ósea) y destruir los depósitos de HAP.

Actualmente se han descrito e identificado muchas proteínas con potencial participación en el proceso de calcificación, asignándoles una función en la inhibición o en la promoción de la calcificación. Estas asignaciones provienen de resultados de estudios *in vitro* o *in vivo* de modelos animales modificados genéticamente a partir de los cuales se puede deducir su funcionalidad. En los primeros se suelen utilizar concentraciones de calcio, fosfato y de la proteína a estudiar que se alejan de la realidad fisiológica de la ERC, por lo que se hace muy difícil extrapolar los resultados *in vitro* a la realidad^{144,145}. Sin embargo, los análisis mutacionales en ratones han permitido elaborar una lista más exacta de la funcionalidad de las proteínas que intervienen en los procesos de calcificación.

6.4.1. Proteínas promotoras de la calcificación

A continuación, se explican brevemente algunas de las principales proteínas relacionadas con el desarrollo de CCV. En general, su expresión se puede observar en la pared vascular calcificada, e *in vitro*, en cultivos de CMLV.

Core binding factor alpha 1

La proteína Cbfa1, también llamada Runx2, es un factor de transcripción clave para la diferenciación de osteoblastos y la osteogénesis, activando la expresión de genes de la línea osteoblástica como la OC, osteopontina (OP), la fosfatasa alcalina (ALP) o el colágeno tipo I. Los ratones deficientes en Cbfa1 muestran problemas de formación de cartílago y mineralización del hueso¹⁴⁶. A nivel vascular, el bloqueo de la actividad de Cbfa1 disminuye la expresión de ALP y OC en las CMLV. Adicionalmente, la expresión de Cbfa1 se identificó en arterias calcificadas de pacientes con ERC pero no en vasos normales¹⁴⁷, lo que sugiere un papel importante de Runx2 en la patología de la CCV asociada a la ERC.

Fosfatasa alcalina

Se trata de un marcador fenotípico de los osteoblastos y una proteína esencial en los procesos de osteogénesis y CCV. Su función fisiológica en el hueso es la promoción de la formación de HAP extracelular a través de la hidrólisis enzimática de pirofosfato, un potente inhibidor de la cristalización. En los humanos, la ALP se divide en dos grupos según sea enzima específica de tejido (intestinal, placentaria y de las células germinales) o no específica de tejido (por ejemplo la expresada en hígado, hueso o riñón), también llamada TNAP. Lomashvili et al. reportaron que el daño vascular puede inducir la expresión de TNAP¹⁴⁸. Además, se ha detectado su presencia en las calcificaciones vasculares y de válvulas cardíacas¹⁴⁹. Existen evidencias que relacionan directamente los niveles de ALP con la presencia de CAC en pacientes en HD¹⁵⁰.

Proteína morfogenética ósea-2

Esta proteína pertenece al grupo de proteínas morfogenéticas óseas (BMP). En el proceso de formación de hueso, BMP-2 actúa induciendo la expresión de factores de transcripción críticos, como Runx2, en las células mesenquimales para inducir su diferenciación a osteoblastos. Se ha detectado su expresión en placas ateroscleróticas y, en concreto, las BMP2, BMP4 y BMP6 en áreas de calcificación vascular¹⁵¹. En estudios *in vitro* se ha observado que estimula la captación de fosfato, el fenotipo osteoblástico y la calcificación.

Osteocalcina

La osteocalcina (OC) o proteína Gla ósea es una proteína no colagenosa y dependiente de vitamina K, sintetizada por los osteoblastos durante la formación de hueso, que tras sufrir procesos de carboxilación (de 0 a 2 grupos carboxilos) se incorpora a la matriz ósea, liberándose una pequeña parte al torrente sanguíneo¹⁵². La carboxilación de la OC es dependiente de vitamina K. En su forma no carboxilada, esta proteína tiene menor afinidad por la HAP, por lo que es más probable que sea liberada a circulación¹⁵³.

La OC es un marcador de formación ósea, pero cada vez más se reconoce su papel como hormona expandiendo la función endocrina del esqueleto con efectos extraóseos de largo alcance. La OC también podría actuar sobre los vasos sanguíneos induciendo angiogénesis y mineralización patológica, ya que es expresada por las CMLV que muestran un fenotipo similar a los osteoblastos¹⁵⁴. En esta línea, y en respuesta a las observaciones de que el mecanismo de CCV se parece al de la mineralización ósea, se buscó la asociación entre la OC y la calcificación vascular y la aterosclerosis. Los resultados de Millar et al. llevaron a resultados no concluyentes en la asociación entre OC y calcificación vascular o aterosclerosis¹⁵⁵. Posteriormente, un estudio de Rashdan et al. sugirió que la OC tiene un papel crucial en la calcificación vascular mediada por la señalización de Wnt/ β -catenina¹⁵⁶.

Ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B

El ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL) es una proteína expresada principalmente por osteoblastos y sus precursores maduros¹⁵⁷. Esta proteína activa a su receptor (RANK), expresado en los osteoclastos y sus precursores, promoviendo la formación de osteoclastos, su activación y supervivencia para que tenga lugar la resorción ósea¹⁵⁸ (Figura I.9). El paso final en la activación de RANK es la translocación nuclear del factor nuclear- κ B. Esta translocación modula la expresión de diferentes genes, como por ejemplo BMP4, explicando que RANKL sea un inductor de la CCV. Estudios *in vitro* de CMLVs confirman este mecanismo¹⁵⁹, observándose un incremento de la calcificación tras la incubación con RANKL dosis-dependiente. En este mismo estudio, se demostró que la incubación de las CMLVs con RANKL juntamente con OPN no provocó calcificación. Por tanto, el sistema RANKL/OPN, que explicaremos más adelante, sugiere unos efectos opuestos al sistema RANK/RANKL.

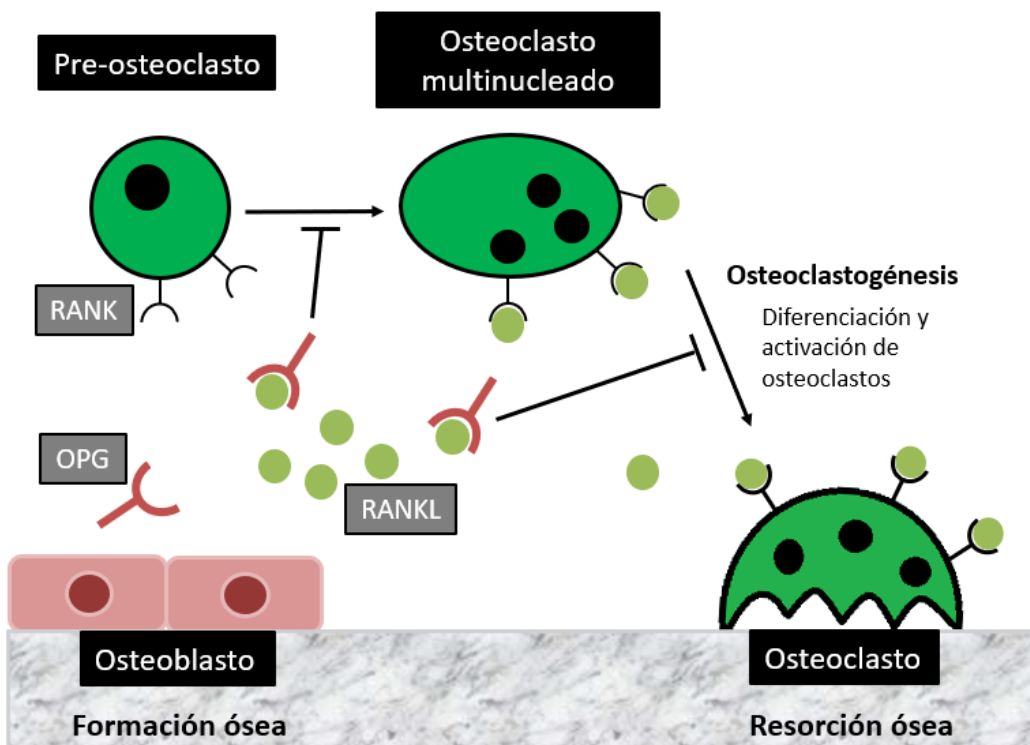


Figura I.1. Mecanismo de remodelación ósea del sistema RANK/RANKL/OPG. RANKL activa a su receptor (RANK), expresado en los osteoclastos y sus precursores para promover la osteoclastogénesis. La osteoprotegerina y el receptor RANK compiten por la unión con el ligando RANKL, regulando el proceso de osteoclastogénesis. OPG: osteoprotegerina, RANKL: ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B, RANK: receptor activador para el factor nuclear κ B.

6.4.2. Proteínas represoras de la calcificación cardiovascular

Las células de los vasos sanguíneos expresan de manera natural proteínas represoras de la calcificación. En condiciones urémicas se produce una pérdida de su expresión, por lo que se favorecen los procesos de CCV.

Proteína Gla de la matriz

La proteína Gla de la matriz (MGP) es un potente factor represor de la calcificación arterial¹⁶⁰. Esta proteína forma parte de la familia de proteínas N-terminal- γ -carboxiladas. Se trata de una proteína K-dependiente, ya que su funcionalidad depende de la γ -carboxilación de sus cinco residuos de ácido glutámico, proceso que tiene lugar por la acción de una carboxilasa que utiliza como cofactor la vitamina K (Figura I.10). Dicha carboxilación permite que la MGP pueda interactuar con mayor número de iones calcio¹⁶¹.

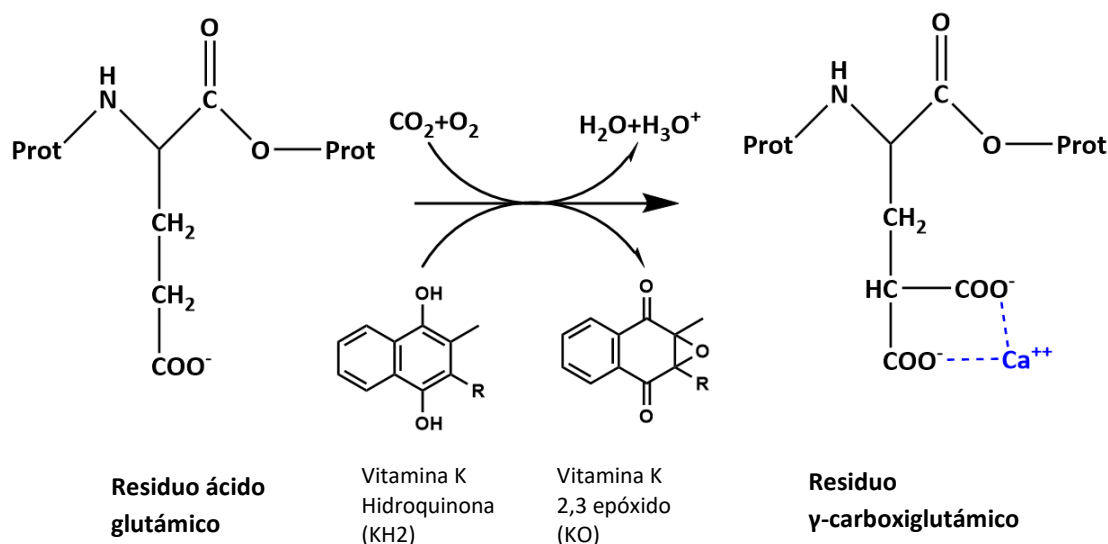


Figura I.10. γ -carboxilación de los residuos de ácido glutámico en una proteína. Este proceso tiene lugar por la acción de una carboxilasa que utiliza como cofactor la vitamina K y permite que los residuos carboxilados puedan interactuar con iones calcio.

La MGP se encuentra en el cartílago, la matriz ósea y la pared arterial^{162,163}. En los vasos sanguíneos, la MGP se expresa en CMLV y en células endoteliales de la túnica íntima de vasos sanos, aunque su expresión está reducida en arterias calcificadas¹⁶⁴.

Los ratones *knockout* para MGP (MGP^{-/-}) presentan gran calcificación de la media en la aorta y sus ramificaciones y fallecen por ruptura aórtica pocas semanas después de nacer¹⁶⁵. Además, la presencia de MGP no γ -carboxilada se ha asociado con calcificación vascular de la íntima y de la media. Esto puede indicar que la falta de vitamina K reducida a nivel local o sistémico puede influir directamente en la función de MGP como inhibidor de la calcificación ectópica¹⁶⁶. De hecho, estudios con modelos de ratón administrados con warfarina¹⁶⁷ y pacientes en tratamiento con cumarina¹⁶⁸, ambos antagonistas de vitamina K por inhibición de la vía de reciclaje a su forma reducida, se asociaron con mayores tasas de CCV, niveles menores de MGP y mayores de la forma no γ -carboxilada. Por tanto, estos datos podrían despertar el interés en la capacidad de la vitamina K como potencial terapia contra la CCV.

La bibliografía sugiere diversos mecanismos por los cuales la MGP inhibe la CCV, pudiendo:

- a) Inhibir la precipitación y el crecimiento de los cristales de fosfato de calcio. La carga negativa de los residuos γ -carboxiglutámicos presentes en la proteína pueden interactuar directamente con los iones calcio y con los cristales de fosfato de calcio¹⁶¹.

- b) Regular la transdiferenciación de las CMLV. La MGP se une a BMP-2 para bloquear la diferenciación a tipo osteoblástico de las CMLV e inhibe la actividad de BMP-2 en la diferenciación de las células mesenquimales¹⁶⁹. Estos hechos defienden que la MGP interviene en el mantenimiento del fenotipo normal de las CMLV.
- c) Regular las vesículas matriz derivadas de CMLV¹⁷⁰. Además, la MGP previene la apoptosis de las CMLV¹⁷¹, ya que, reduciendo los cuerpos apoptóticos se bloquean los núcleos de iniciación de la calcificación¹³³.

Osteoprotegerina

La osteoprotegerina (OPG) es una citoquina soluble perteneciente a la superfamilia de receptores de los factores de necrosis tumoral (TNF), que se expresa en osteoblastos, pero también en las células endoteliales, en las CMLV o en el corazón.

OPG es un receptor señuelo para RANKL, inhibiendo así la diferenciación y activación de los osteoclastos. Por tanto, la OPG soluble se une a RANKL e inhibe la osteoclastogénesis, por lo que contrarresta directamente todas las acciones mediadas por RANKL (Figura I.9)¹⁷². De esta manera, OPG y RANK compiten para unirse con RANKL creándose un sistema OPG/RANKL que es clave para la regulación de la osteoclastogénesis.

La prueba de la implicación de este sistema en el proceso de calcificación vascular se obtuvo en ratones deficientes en OPG (OPG^{-/-}), los cuales presentaron calcificaciones en aorta y arterias renales, juntamente con osteoporosis¹⁷³. En este sentido, RANKL promueve la CCV uniéndose a RANK aumentando la síntesis de BMP4 mediante la activación de la vía alternativa NF-κB, mientras que la OPG actuaría como un receptor señuelo de RANKL para bloquear este efecto¹⁵⁹ (Figura I.11).

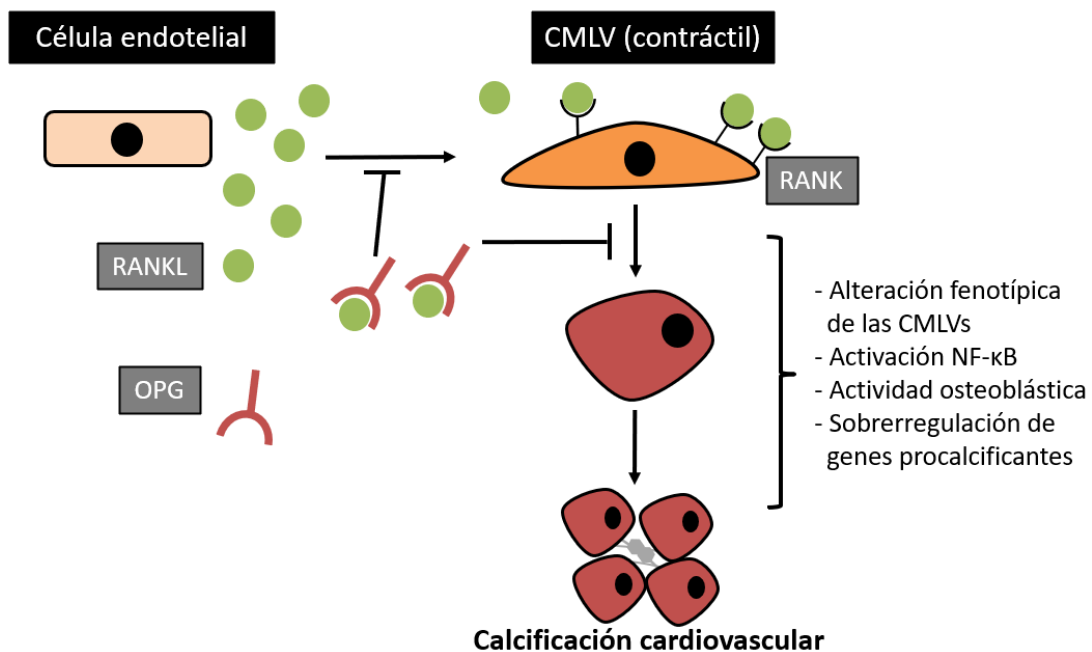


Figura I.11. Mecanismo de acción de la osteoprotegerina: sistema OPG/RANKL. La osteoprotegerina y el receptor RANK compiten por la unión con el ligando RANKL, regulando el proceso de calcificación cardiovascular. OPG: osteoprotegerina, RANKL: ligando del receptor activador para el factor nuclear κB, RANK: receptor activador para el factor nuclear κB.

Sin embargo, un estudio *in vitro* realizado en CMLV bovinas incubadas con suero urémico o suero normal, demostró que el primero indujo significativamente una mayor expresión de OPG¹⁷⁴. Además, en la población general, hay estudios que han demostrado que niveles altos de OPG se correlacionan con riesgo cardiovascular¹⁷⁵. Igualmente, estudios en pacientes con ERC estadio 5¹⁷⁴ y en pacientes en HD¹⁷⁶, demostraron que mayores niveles de OPG se asociaban con calcificación en coronarias y en aorta.

En definitiva, existen numerosas evidencias de que el sistema RANKL/OPG, además de desempeñar un papel esencial en la regulación del metabolismo óseo, también está involucrado en la calcificación extraósea. Se requiere más investigación para comprender la función fisiológica de OPG en la CCV, y más estudios para establecer la importancia pronóstica de estos biomarcadores como predictores de la presencia y gravedad de las CCVs en pacientes con ERC y de morbilidad y mortalidad cardiovascular. Además, se necesitan ensayos clínicos para aclarar si la inhibición de la actividad osteoclástica protegería de la CCV^{174,177}.

Osteopontina

La osteopontina (OPN) es una fosfoproteína ácida multifuncional que contiene varios dominios estructurales, incluyendo uno de unión a integrinas (RGD) y aminoácidos que presentan grupos carboxilo libres (ácido aspártico o glutámico) para unir iones calcio. Además, puede estar altamente fosforilada en los residuos de serina y treonina, aportándole capacidad para unirse también a iones calcio¹⁷⁸. Es probable que estas propiedades contribuyan a la capacidad de OPN para unirse a cristales de HAP y regular su crecimiento, tanto en huesos y dientes, como en sitios de calcificación ectópica.

La OPN es una de las proteínas óseas extracelulares y no colagenosas más importantes, es expresada por preosteoblastos, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Aunque la OPN no se expresa en vasos normales, está altamente expresada por los macrófagos en placas ateroscleróticas, CMLV y válvulas aórticas calcificadas, indicando que esta proteína está implicada en la regulación del proceso de CCV^{179,180}.

La OPN es un regulador natural de la calcificación ectópica. El papel de la OPN en la CCV *in vivo* se examinó por Speer et al. cruzando ratones OPN^{-/-}, que no mostraban calcificación vascular, con ratones MGP^{-/-}, que sí las desarrollan. En este experimento se observó que los ratones deficientes en ambas proteínas mostraban calcificación más severa que los segundos, indicando que OPN es un inhibidor inducible de la CCV *in vivo*¹⁸¹. Además, estudios *in vitro* han mostrado que la OPN es un potente inhibidor de la cristalización de HAP en cultivos de CMLV¹⁸².

Otros estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que OPN, producida por células mesenquimales o inflamatorias en sitios de mineralización ectópica, no solo inhibe la deposición y el crecimiento cristalino de HAP mediante mecanismos fisicoquímicos, sino que la interacción OPN-HAP promueve activamente su disolución induciendo la expresión de anhidrasa carbónica II (CAII) en células inflamatorias como macrófagos y células gigantes. Esta enzima cataliza la reacción de dióxido de carbono a ácido carbónico. Por tanto, esto conduce a un aumento del flujo de protones, promoviendo la acidificación local y disolución de los cristales de HAP. Finalmente, OPN favorece el reclutamiento mediado por receptores y la migración de macrófagos adicionales (Figura I.12, adaptada de Steiz et al¹⁸³).

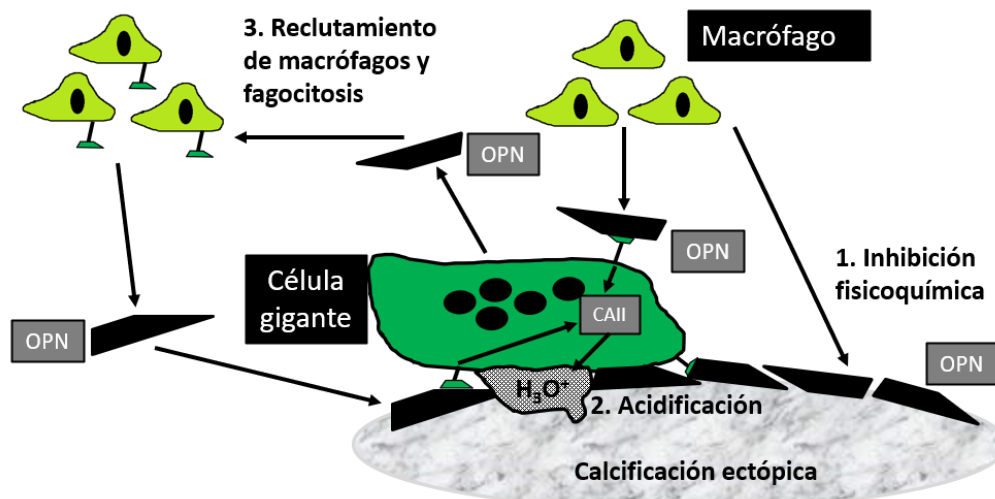


Figura I.12. Mecanismo de acción de la osteopontina en la regulación de la calcificación ectópica: 1. La osteopontina en sitios de mineralización ectópica se une a la hidroxiapatita e inhibe físicamente el crecimiento cristalino. 2. Esta unión proporciona un reconocimiento para células inflamatorias provocando la acumulación local y la regulación positiva de anhidrasa carbónica II a través de la superficie celular de receptores de osteopontina, aumentando el flujo de protones y provocando acidificación local y disolución de la hidroxiapatita. 3. La osteopontina favorece el reclutamiento mediado por receptores y la migración de macrófagos adicionales, mejorando así los mecanismos de la regresión de la calcificación. Fuente: adaptado de Steiz et al.¹⁸³. CAII: anhidrasa carbónica II, OPN: osteopontina.

Fetuína-A

Es una glicoproteína sérica que se sintetiza principalmente en el hígado. Su concentración sérica está entre 0.5 – 1 g/L, pero disminuye en situaciones de inflamación. Esta proteína es un importante factor represor de las calcificaciones en tejidos blandos.

Estudios en ratones *knockout* para fetuína-A desarrollaron calcificación masiva en pulmones, corazón, riñón y piel, acompañados por disfunción renal; sin embargo, no presentaron calcificación arterial^{184,185}. Además, estudios *in vitro* demostraron que la adición de fetuína-A en cultivos de CMLV bovinas con medio calcificante y suero urémico o normal, inhibía la mineralización¹⁷⁴. La evidencia clínica de la importancia de esta proteína se observó en estudios con humanos, donde se estableció una correlación entre las calcificaciones coronarias y aórticas con bajas concentraciones séricas de fetuína-A en pacientes en hemodiálisis¹⁸⁶.

Heiss et al. demostró que esta proteína es un potente inhibidor de la calcificación, ya que reduce la formación de los cristales de HAP mediante acción inhibitoria directa por formación transitoria de un complejo esférico coloidal soluble que contiene fetuína-A, calcio y fosfato¹⁸⁷, denominado partículas de calcpoteína (CPP), de 30-150 nm de diámetro. Por tanto, estas nanopartículas solubles sirven para transportar y eliminar los depósitos insolubles de fosfato cálcico que se forman en tejidos blandos. Mientras que MGP, OPN y OPG son factores inhibidores locales involucrados en la calcificación vascular (su función se desarrolla en el lugar de la calcificación), la fetuína-A es un inhibidor circulante de la calcificación vascular.

I. INTRODUCCIÓN

Después de todo lo explicado, podemos resumir que los mecanismos patogénicos de la CCV no están completamente dilucidados; aun así, hay numerosas evidencias que sugieren un vínculo entre el metabolismo óseo y el desarrollo y la progresión de las CCVs. En la Tabla I.3 se presenta un resumen de los factores involucrados en la CCV de la media.

Tabla I.3. Factores involucrados en la calcificación cardiovascular de la media.

Promotores	Represores
Apoptosis celular	ENPP1
Citoquinas inflamatorias	Fetúina-A
Fosfatasa alcalina	Magnesio
Hipercalcemia	Pirofosfato
Hiperfosfatemia	Proteína Gla de la matriz
Klotho y FGF-23	Osteopontina
Osteocalcina	Osteoprotegerina
Proteína <i>Core binding factor alpha 1</i>	
Toxinas urémicas	
Transdiferenciación fenotípica de CMLV	

CMLV: células musculares lisas vasculares; ENPP: enzima ecto-nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; FGF: factor de crecimiento fibroblástico

7. Enfoques terapéuticos y control de los factores relacionados con el complejo CKD-MBD

Hasta el momento no existen terapias aprobadas indicadas para el tratamiento o la reducción de la progresión de la CCV en los pacientes con ERC o ERT. Dado que la calcificación es un componente importante de la ECV en la población con ERT, la investigación de nuevas terapias para reducir la progresión de la CCV es importante para disminuir la morbilidad y mortalidad en esta población.

Durante muchos años se ha intentado buscar terapias enfocadas al manejo de las alteraciones del metabolismo óseo y mineral en la ERC, con el objetivo de normalizar los valores de calcio, fosfato y los niveles de PTH. Estos tratamientos incluyen los quelantes de fosfato, los derivados de la vitamina D, calcimiméticos y otros¹⁸⁸. Aunque algunos de estos tratamientos hayan demostrado que pueden influir de manera experimental sobre la CCV y apunten a que pueden reducir su progresión en clínica, incluso en pacientes dializados, no existe ninguna evidencia definitiva en ¹⁸⁹estudios clínicos aleatorizados, controlados con placebo y ciegos, que demuestren su efecto sobre las CCV y en la reducción de eventos cardiovasculares en pacientes con ERC.

Adicionalmente, hay un conjunto de terapias enfocadas específicamente al proceso de la calcificación a través de la inhibición directa de la cristalización de HAP. El pirofosfato^{190,191} y los bifosfonatos¹⁹² son dos ejemplos de los cuales hay evidencias en animales. Estudios abiertos en

pacientes con ERC o ERT han sugerido que el tratamiento con bifosfonatos puede, tanto retrasar la progresión de la CCV¹⁹³ como tratar la CUA¹⁸⁹, pero con algunos problemas de seguridad. Las terapias adicionales, como la vitamina K, están respaldadas por estudios en animales, pero aún no se han obtenido resultados de estudios clínicos aleatorizados que confirmen las observaciones en animales. Además, hay estudios con tiosulfato de sodio en animales¹⁹⁴ que muestran efectos beneficios en la prevención de la CCV y en humanos, tanto para tratar la CCV en pacientes en HD¹⁹⁵, como las lesiones cutáneas de la CUA¹⁹⁶. Como la composición mineral de las CCV es la misma que en hueso, los efectos potenciales sobre el hueso deben abordarse con cualquier terapia enfocada al tratamiento de la CCV.

El HPT2° es una consecuencia frecuente de la ERC y ha sido uno de los enfoques clínicos centrales de las alteraciones del metabolismo óseo y mineral. El manejo del HPT2° está orientado a reducir la hiperfosfatemia e hipocalcemia, así como los niveles de PTH. Estos efectos orientados a minimizar la CCV se pueden conseguir teóricamente con quelantes de fosfato, activadores del receptor de vitamina D y calcimiméticos, aunque esta hipótesis no se ha probado todavía en estudios clínicos aleatorizados, controlados con placebo y ciegos.

7.1. Quelantes de fosfato

Tal como se ha explicado con anterioridad, los niveles elevados de fosfato, así como de FGF-23 y PTH se han relacionado con la calcificación vascular¹³⁷. Además, la hiperfosfatemia contribuye al aumento de la mortalidad cardiovascular a través de la CCV en pacientes con ERC.

Los experimentos de Jono et al.¹³⁷ y Giachelli et al.¹⁹⁷, mostraron la necesidad de evitar la sobrecarga de fosfato por su efecto promotor del HPT2°, sus efectos sobre la CCV, así como sus efectos proinflamatorios¹⁹⁸ y oxidantes¹⁹⁹. Por ello, la reducción de los niveles de fosfato o su mantenimiento a niveles similares a los fisiológicos es un objetivo a perseguir en el tratamiento de los pacientes con ERC, ya que podría suponer resultados vasculares favorables. Para reducir los niveles de fosfato sérico se pueden utilizar quelantes de fosfato. Estos compuestos se utilizan como tratamiento en pacientes con ERC y ERT para reducir la absorción de fosfato de la dieta. Por tanto, se administran oralmente con las comidas para que se unan con el fosfato dietético en el tracto gastrointestinal, formando compuestos insolubles o compuestos que puedan ser excretados. Los quelantes de fosfato pueden ser: **con calcio**, como acetato de calcio o carbonato de calcio, o **sin calcio**, como sevelamer (un polímero de policlorhidrato de alilamina no absorbible), carbonato de lantano, sales de aluminio o de hierro. En general, los pacientes con ERC en estadios avanzados, que normalmente ya presentan hiperfosfatemia, son tratados con quelantes de fosfato si la reducción dietética de fosfato es inadecuada.

Durante muchos años ha habido un gran debate sobre el uso de los quelantes de fosfato con calcio o sin calcio, aunque la mayoría de los resultados de los estudios clínicos en pacientes en diálisis favorecen el uso de los segundos sobre los primeros²⁰⁰. Por ejemplo, hay varios estudios clínicos aleatorizados en esta población que han demostrado que la progresión de la CCV se reducía mediante el uso de quelantes de fosfato sin calcio, como sevelamer, mientras que la exposición a calcio exógeno debido a la administración de quelantes de fosfato con calcio se asoció a mayor progresión de la CCV²⁰¹⁻²⁰³. En cambio, los resultados del estudio clínico randomizado DCOR (*Dialysis Clinical Outcomes Revisited*) mostraron que el tratamiento con sevelamer vs. ligantes de fosfato con calcio no redujo significativamente la mortalidad

general^{204,205}. De nuevo, estudios más recientes confirmaron una reducción de la progresión de la CCV tratando, ya sea con sevelamer o con carbonato de lantano, vs. tratamiento con quelantes de fosfato con calcio en pacientes en diálisis²⁰⁶⁻²⁰⁸. Resultados de metaanálisis han demostrado que los quelantes de fosfato sin calcio se asocian a una reducción del riesgo de mortalidad en comparación con los que contienen calcio en pacientes con ERC²⁰⁹. Al no haber comparación con un grupo placebo, no está claro si este efecto se debe a un mayor riesgo del brazo comparador, por el exceso de carga de calcio, o si se debe a un beneficio absoluto del tratamiento de quelantes de fosfato sin calcio. Si a esto le añadimos que el grado de reducción de la fosfatemia ha sido similar en la mayoría de los ensayos, no está claro si el beneficio está directamente relacionado al control de la hiperfosfatemia, o a otros efectos específicos. En definitiva, en la población dializada se puede concluir que los resultados obtenidos hasta el momento sobre el uso de quelantes de fosfato no son uniformes y, además, en la actualidad no hay ninguna evidencia clínica que haya demostrado que su uso a largo plazo pueda reducir las consecuencias cardiovasculares de la ERT.

Respecto a la población no dializada, en un estudio clínico en pacientes con ERC en estadios 3-4 se comprobó el control del fosfato mediante el uso de quelantes de fosfato con (acetato de calcio) y sin calcio (sevelamer y carbonato de lantano), contra un grupo placebo²¹⁰. Este estudio mostró una reducción de fosfato (sérico y urinario) en los grupos tratados, pero un incremento en la progresión de la CCV en ambos grupos tratados en comparación con el placebo; aunque la progresión en el grupo tratado con quelantes de calcio fue mayor. Adicionalmente, los resultados del estudio clínico COMBINE (*CKD Optimal Management With Binders and Nicotinamide*), que evaluó pacientes con ERC en estadios 3-4 durante un año en tratamiento con carbonato de lantano como quelante de fosfato y/o nicotinamida como inhibidora del transporte activo del fosfato intestinal, mostraron un efecto mínimo no significativo en el cambio de los niveles de fosfato sérico y FGF-23 respecto a los niveles basales²¹¹. Dados los datos pocos convincentes obtenidos hasta ahora para la población con ERC prediálisis, se necesitan más estudios clínicos para confirmar los efectos de los quelantes de fosfato en fases previas al inicio de la diálisis. En este contexto, actualmente hay un estudio clínico, el IMPROVE-CKD (*Impact of Phosphate Reduction on Vascular Endpoints in Chronic Kidney Disease*) que comparará el carbonato de lantano vs. placebo en pacientes con ERC estadios 3-4. A las 96 semanas se evaluarán la rigidez arterial, como variable clínica primaria, y la calcificación aórtica, masa ventricular izquierda y marcadores de hueso y fosfato entre otras variables finales secundarias²¹².

7.2. Vitamina D y activadores del receptor de vitamina D

Los activadores del receptor de vitamina D (VDRA) se unen a los receptores intracelulares de vitamina D (VDR), activan su translocación al núcleo y actúan sobre los múltiples genes diana de la vitamina D. Los VDRA pueden ser la propia vitamina D natural (por ejemplo, calcidiol o 25-OH vitamina D y calcitriol o 1,25-OH₂ vitamina D), siendo el calcitriol unas 500-1000 veces más activo que su precursor calcidiol²¹³, o bien un grupo de análogos sintéticos de vitamina D, como alfacalcidol, doxercalciferol, paricalcitol o maxacalcitol. Estos últimos también pueden unirse al mismo receptor y provocar acciones similares a la vitamina D. Por tanto, los VDRA actúan como agonistas del VDR, y pueden ser no selectivos (calcitriol) o selectivos (Figura I.13). Los primeros

I. INTRODUCCIÓN

se transforman en calcitriol en el hígado antes de unirse al VDR; en cambio, los segundos (paracalcitol y maxacalcitol) no sufren esta transformación antes de la unión²¹⁴.

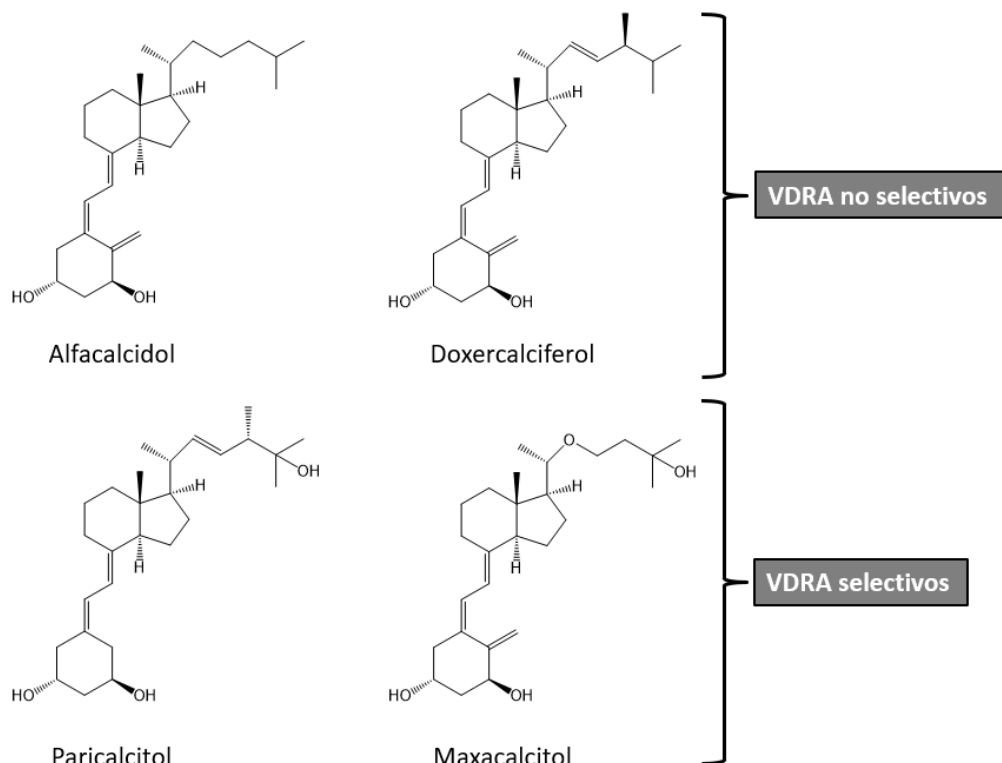


Figura I.13. Estructura de análogos de vitamina D, activadores del receptor de vitamina D (VDRA) selectivos y no selectivos.

Los VDR selectivos ofrecen la ventaja de activar de forma selectiva las vías metabólicas posteriores, disminuyendo el riesgo de hipercalcemia e hiperfosfatemia asociado con los no selectivos (calcitriol, alfacalcidol)²¹⁵.

La ERC es un factor de riesgo para la deficiencia de vitamina D, tanto en pacientes en estadios 2-5 pre-diálisis²¹⁶ como en pacientes en diálisis²¹⁷. Como se ha comentado en apartados anteriores, el déficit de vitamina D reduce la absorción intestinal de calcio y disminuye los niveles de VDR en el tejido paratiroideo, con lo que se libera más PTH y aparece la hiperplasia de la paratiroides. El HPT2° provoca la movilización de calcio y fosfato óseo, con la consecuente pérdida de masa ósea y facilita la CCV. Se sabe que los bajos niveles de vitamina D se han asociado con presencia y progresión de la CCV, por tanto, es un marcador de riesgo cardiovascular^{218,219}.

Tanto la vitamina D natural como los VDRA podrían ser útiles para tratar el HPT2°. Sin embargo, dosis normalmente altas de estos compuestos puede provocar efectos no deseados como el desarrollo de enfermedad ósea adinámica²²⁰, hipercalcemia y/o hiperfosfatemia²²¹, que favorecen el desarrollo de las CCV. Aun así, en estudios experimentales se ha demostrado que los VDRA selectivos de posterior generación, como paricalcitol, pueden reducir la secreción de PTH, provocando menores efectos hipercalcémicos e hiperfosfatémicos²²²⁻²²⁴. Adicionalmente, se ha observado que el paricalcitol reduce la activación de la vía Wnt/ β -catenina como vía de señalización para la transdiferenciación de CMLV a osteoblastos²²⁵. Además, en estudios

retrospectivos se relacionó la supervivencia de los pacientes en HD con la administración de VDRA selectivos (paricalcitol), especialmente a dosis bajas^{226,227}. Sin embargo, no hay ensayos aleatorizados y controlados que hayan demostrado que los análogos de vitamina D sean menos propensos que la vitamina D nativa a inducir CCV en pacientes con ERC.

En definitiva, son necesarios estudios clínicos aleatorizados para evaluar los efectos de la vitamina D nativa o los VDRA sobre la supervivencia en los pacientes con ERC y en diálisis, que permitan confirmar o refutar los resultados previos.

7.3. Calcimiméticos

Un calcimimético es un modulador alostérico del receptor sensible al calcio (CaR, *Calcium-ion-sensing receptor*). El CaR se expresa principalmente en las glándulas paratiroides, pero hay evidencias experimentales y clínicas que indican que también se puede expresar en tejidos como el riñón y las células vasculares (CMLV). Por tanto, el CaR puede ser una diana terapéutica para tratar el HPT² y los desórdenes del metabolismo mineral en los pacientes con ERT^{228,229}.

Los calcimiméticos se unen al CaR e incrementan alostéricamente la sensibilidad al calcio extracelular de la célula paratiroidea. Este hecho reduce la liberación de PTH, provocando una reducción del calcio sérico^{229,230}. Además, en pacientes con ERT, los calcimiméticos disminuyen el fosfato sérico a través de una reducción en la resorción ósea mediada por PTH, evitando así la liberación de fosfato óseo a la circulación (Figura I.14).

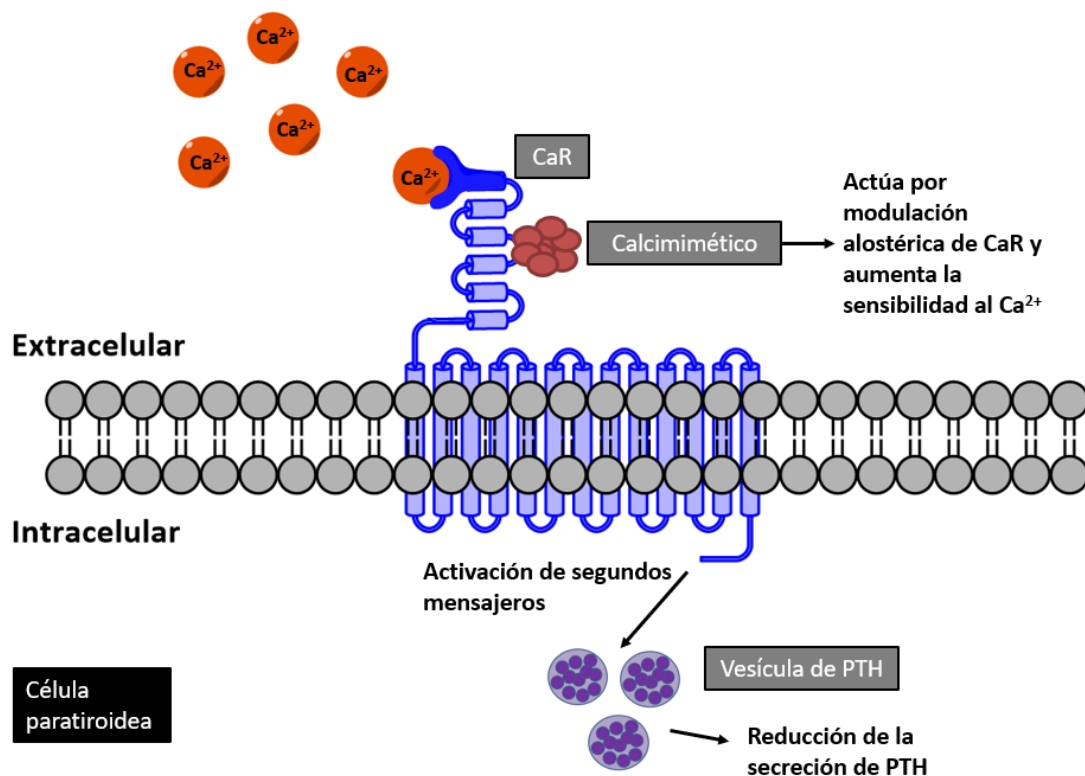


Figura I.14. Mecanismo de acción de los calcimiméticos sobre el receptor sensible al calcio en la célula paratiroidea. La unión de los calcimiméticos al receptor sensible al calcio induce un cambio conformacional en este último que aumenta su sensibilidad al calcio extracelular, disminuyendo la síntesis y secreción de la parathormona. CaR: receptor sensible al calcio, PTH: parathormona.

A parte de modular la liberación de PTH, experimentos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los calcimiméticos también pueden estimular directamente el CaR expresado en las CMLVs e incrementar la expresión del inhibidor endógeno de la calcificación MGP²³¹⁻²³³. Por tanto, la regulación positiva de la expresión local de MGP proporciona un potencial mecanismo por el cual los calcimiméticos previenen la CCV.

En un modelo animal de ratón urémico, los calcimiméticos retrasaron la progresión de la calcificación aórtica y la aterosclerosis²³⁴. Adicionalmente, en un modelo urémico de rata, los calcimiméticos atenuaron la calcificación de la media y la proliferación de las CMLV²³⁵. Por tanto, hay datos experimentales en animales que demuestran que estas sustancias tienen un efecto protector sobre la ateromatosis urémica o las CCVs²³⁶. En cambio, las evidencias clínicas de efectos positivos de los calcimiméticos en la CCV son más limitados.

Se han desarrollado y ejecutado dos estudios clínicos para evaluar el uso del cinacalcet como calcimimético oral. El primero, ADVANCE (*A Randomised Study to Evaluate the Effects of Cinacalcet Plus Low Dose Vitamin D on Vascular Calcification in Subjects with Chronic Kidney Disease Receiving Hemodialysis*) y el segundo, EVOLVE (*Evaluation of Cinacalcet Hydrochloride Therapy to Lower Cardiovascular Events*).

El ensayo clínico aleatorizado y abierto ADVANCE²³⁷ comparó durante 12 meses la progresión de la calcificación vascular y valvular en 360 pacientes de HD que presentaban HPT2°, aleatorizados a cinacalcet más dosis baja de vitamina D o a dosis alta de vitamina D (tratamiento estándar). Se observó una tendencia hacia una menor progresión de la CCV en el grupo de cinacalcet comparado con el tratamiento estándar, aunque sin ser significativo. Un análisis secundario por volumen de índice CAC en las coronarias y la válvula aórtica sugirió un efecto beneficioso. Sin embargo, este estudio no dejó claro si el tratamiento con bajas dosis de análogos de vitamina D podría haber enmascarado los beneficios de cinacalcet. Se trata además de un estudio no ciego.

En el segundo estudio clínico, EVOLVE²³⁸, se aleatorizaron 3883 pacientes en HD con HPT2° a los que se administró cinacalcet o la terapia convencional, ya sea quelantes de fosfato y calcitriol o análogos de vitamina D (grupo placebo). Los resultados, aunque mostraron una fuerte tendencia ($p = 0.11$), no demostraron una reducción significativa en el riesgo de muerte o en la aparición de eventos cardiovasculares (tiempo hasta la muerte, infarto de miocardio, evento vascular periférico, etc.) en pacientes en HD con HPT2° de moderado a severo. Sin embargo, un análisis secundario ajustando por edad u otros factores, sí encontró una reducción significativa en el riesgo de muerte o eventos cardiovasculares^{238,239}.

Finalmente, etelcalcetide, un calcimimético intravenoso, ha demostrado reducir eficazmente los niveles de PTH²⁴⁰ y FGF-23²⁴¹ en ensayos clínicos controlados con grupos placebo. Además, en un ensayo comparativo directo entre etelcalcetide y cinacalcet en pacientes en HD con HPT2°, el primero mostró que un 30% más de pacientes redujo más del 50% los niveles de PTH en comparación con los pacientes tratados con cinacalcet²⁴². Queda pendiente la evaluación en ensayos clínicos de los efectos de este calcimimético en la progresión de la CCV y en los eventos clínicos en estos pacientes.

Respecto al potencial efecto de los calcimiméticos en la CUA en pacientes en diálisis, un análisis post hoc del estudio EVOLVE observó una menor incidencia de CUA en el grupo de pacientes tratados con cinacalcet^{238,243}, pudiendo servir como elemento generador de hipótesis para un potencial efecto terapéutico.

7.4. Vitamina K

Como se ha explicado anteriormente, la vitamina K es necesaria como cofactor para convertir la MGP inactiva a la forma activa carboxilada que pueda ejercer su actividad como inhibidor de la calcificación en la pared vascular¹⁶⁵ y, asimismo, suprimir la actividad de las BMP-2 y 4²⁴⁴. La deficiencia de vitamina K puede perjudicar la activación de MGP, perdiendo su acción inhibitoria sobre el desarrollo y progresión de la CCV, hecho que se correlaciona con un mayor riesgo de mortalidad en pacientes con ERC²⁴⁵ y en tratamiento de HD²⁴⁶. Hay estudios que afirman que la mayoría de los pacientes en HD presentan niveles bajos de vitamina K comparados con los de la población general²⁴⁷. Otro aspecto importante que puede afectar a los niveles de esta vitamina es el uso de warfarina, un antagonista de la vitamina K usado habitualmente como tratamiento anticoagulante, ya que hay estudios que demuestran que su administración a largo plazo incrementa la CCV y la sobreexpresión de la forma inactiva de MGP²⁴⁸.

Para mejorar los niveles de vitamina K en paciente con ERC se podrían administrar suplementos de vitamina K²⁴⁹. De hecho, Westenfeld et al, observaron que la administración diaria de suplementos de vitamina K durante seis semanas, a la vez que fue segura, redujo significativamente los niveles de MGP inactiva en pacientes en HD²⁵⁰. Adicionalmente, se han registrado diversos ensayos clínicos relacionados con el efecto de los suplementos de vitamina K con la CCV y la ERC. El estudio europeo VitaVasK (*Vitamin K1 to Slow Progression of Vascular Calcification in Hemodialysis Patients*; NCT01742273)²⁵¹ reclutó 63 pacientes en HD a los que se administró suplemento oral de vitamina K1 o placebo durante 18 meses, siendo las variables clínicas primarias la progresión de la calcificación de la aorta torácica y la CAC. Adicionalmente, en Canadá se registró el estudio iPACK-HD (*Vitamin K to Attenuate Coronary Artery Calcification in Hemodialysis Patients*; NCT01528800)²⁵² con el objetivo de observar si la suplementación con vitamina K1 durante 12 meses reduce la progresión de la calcificación CAC en pacientes incidentes en HD, en comparación con placebo. No se han presentado todavía resultados para ambos estudios.

Finalmente, un estudio clínico doble ciego y placebo controlado evaluó el efecto de la filoquinona (vitamina K1) como suplemento oral (10 mg, tres veces por semana) en adultos con CUA en tratamiento de HD (NCT02278692)²⁵³. Este estudio reclutó 26 pacientes, 13 tratados y 13 placebos, y evaluó los cambios entre el inicio y la semana 12 en los niveles circulantes de la MGP como variable clínica principal, y el tamaño de las lesiones cutáneas y la intensidad de dolor como variables secundarias. Los resultados mostraron que la administración de vitamina K1 redujo significativamente los niveles de MGP no carboxilada y demostró eficacia en las demás variables clínicas frente al grupo placebo.

Por otra parte, otros estudios clínicos evalúan los efectos diferenciales sobre la CCV en pacientes que reciben anticoagulantes orales de acción directa en comparación con los antagonistas de la vitamina K. Siguiendo este objetivo, cabe destacar los ensayos clínicos *Effect on Vascular Calcification of Replacing Warfarin by Rivaroxaban With or Without VitK2 in Hemodialysis*

Patients (NCT02610933)²⁵⁴ que tiene como objetivo determinar si el reemplazo del antagonista de la vitamina K por rivaroxaban puede retrasar la progresión de la CCV, y si la adición de vitamina K2 al rivaroxaban puede ralentizar o detener dicha progresión en pacientes de HD. El ensayo clínico IRIVASC (*Rivaroxaban Compared to Vitamin K Antagonist Upon Development of Cardiovascular Calcification*; NCT02066662) en pacientes con fibrilación auricular o embolia pulmonar que requieren terapia con anticoagulantes orales, con el objetivo de investigar la asociación de rivaroxaban comparado con el tratamiento anticoagulante estándar coumarina/fenprocumon con el desarrollo y progresión de la CAC y la calcificación aórtica valvular.

En general, se precisa más información sobre los efectos potencialmente beneficiosos de los suplementos de vitamina K sobre el riesgo de CCV en la población con ERC, adicionalmente a la posible alternativa terapéutica de los nuevos anticoagulantes orales, utilizados en pacientes con fibrilación auricular, para la población con ERC y en tratamiento de HD²⁵⁵.

7.5. Magnesio

Varios estudios, tanto *in vitro* como en animales, apuntan hacia un papel protector del magnesio en los procesos de CCV a través de múltiples mecanismos moleculares. Estudios *in vitro* sugieren que el magnesio evita la regulación positiva de genes osteoblásticos, bloqueando la transdiferenciación de las CMLV a tipo osteogénico y, por tanto, la calcificación²⁵⁶⁻²⁶⁰. Además, se ha demostrado que el magnesio también tiene efectos inhibidores de cristalización en el medio extracelular, inhibiendo directamente la formación de núcleos cristalinos y la maduración de cristal²⁶⁰. Más recientemente, Diaz-Tocados et al. demostraron que la suplementación dietética con magnesio en ratas urémicas reducía la CCV y la mortalidad²⁶¹.

Estudios clínicos observacionales en pacientes dializados han demostrado una correlación inversa de los niveles circulantes de magnesio con la calcificación arterial periférica²⁶², el engrosamiento de la túnica íntima-media de la carótida²⁶³ y con la calcificación anular mitral²⁶⁴. Este conjunto de estudios sugiere que la deficiencia de magnesio ya sea por una dieta pobre en magnesio o por alteraciones en su metabolismo, podría ser clave entre los factores de riesgo cardiovascular y aterosclerosis. Además, otros estudios epidemiológicos en pacientes con ERC han asociado niveles bajos de magnesio sérico con menor supervivencia^{265,266}.

Dadas las evidencias de estudios observacionales sobre la posible implicación de niveles bajos de magnesio en la CCV, se han realizado pequeños estudios clínicos piloto en pacientes dializados que sugieren que la administración oral de magnesio por medio de quelantes de fosfato reducen la progresión de la CAC^{267,268}. Asimismo, se realizó un estudio en 47 pacientes en HD divididos en grupo control o tratados con citrato de magnesio. Los resultados de este estudio mostraron que el grupo que recibió suplemento de magnesio redujo tanto el grosor de la íntima-media de la carótida como los niveles de PTH de manera significativa frente al control²⁶⁹. También se realizó un estudio clínico en pacientes de HD donde se comparó el potencial de cristalización del suero mediante la prueba T₅₀ (tiempo de transformación de las CPPs primarias a secundarias en suero) en dos grupos, un grupo control con concentración de magnesio estándar en el baño de diálisis y otro en el que se incrementó dicha concentración de magnesio durante 28 días. Los resultados de T₅₀ al final del estudio mostraron una reducción del

potencial de cristalización del suero (incremento de T_{50}) al incrementar el magnesio en el baño de diálisis²⁷⁰.

En un estudio clínico abierto aleatorizado de dos años se evaluó el efecto de la administración de óxido de magnesio (MgO) y del carbón adsorbente oral (AST-120) en la progresión de la CAC en pacientes con ERC en estadios de 3 a 4. A pesar de interrumpirse el estudio de manera prematura, un análisis estadístico intermedio mostró que la progresión de la CAC en el grupo MgO fue significativamente menor al control (11.3% vs. 39.5%)²⁷¹. Cabe destacar que se necesitan más estudios clínicos aleatorizados y ciegos para confirmar estos resultados.

Finalmente, en un estudio clínico aleatorizado, doble ciego y controlado por placebo se estudia el efecto del magnesio (en forma de $Mg(OH)_2$) sobre la CCV en la ERC (MAGICAL-CKD; NCT02542319) durante 12 meses para investigar si es capaz de retrasar la progresión de la CAC²⁷². No se han presentado todavía resultados para este estudio.

7.6. Tiosulfato de sodio

El tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$, Figura I.15) es un agente con propiedades quelantes, antioxidantes²⁷³ y vasodilatadoras que se empezó a utilizar hace más de un siglo como antídoto para tratar la intoxicación por cianuro en humanos, aunque ya no sea el más deseado²⁷⁴.

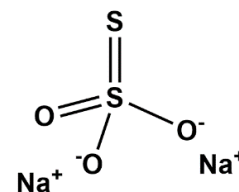


Figura I.15. Estructura del tiosulfato de sodio.

El tiosulfato de sodio se utiliza, aunque fuera de indicación (*off-label*), en pacientes con CUA. Hace unos 15 años Cicone et al. reportaron por primera vez la eficacia del tiosulfato de sodio intravenoso para tratar la CUA en humanos²⁷⁵. Desde entonces, posiblemente ha sido el compuesto más utilizado en estos pacientes, tanto en condiciones urémicas como no urémicas. Las dosis que se suelen utilizar son altas, 25 g por vía intravenosa tres veces por semana en las sesiones de HD. Hay numerosos reportes de casos sobre la mejoría de pacientes con CUA tratados con tiosulfato intravenoso^{276,277}. Algunos estudios han analizado un conjunto concreto de casos, observándose en uno de estos análisis de 53 pacientes una recuperación total de las lesiones cutáneas en el 26% de los pacientes tratados y una mejora significativa en un 19%¹⁹⁶, o una remisión completa en el 52% del total de 27 pacientes y una recuperación parcial en el 19%, después del tratamiento con tiosulfato de sodio intravenoso en otro de ellos²⁷⁸. Aun y la mejoría observada de los pacientes en estos dos estudios, la falta de un grupo control provoca que no se puedan sacar conclusiones definitivas sobre la eficacia del uso del tiosulfato de sodio intravenoso para tratar la CUA. Recientemente han finalizado dos ensayos clínicos de fase III para evaluar la eficacia y seguridad del tiosulfato de sodio intravenoso (25 g en las sesiones de HD) en el tratamiento del dolor agudo asociado a la CUA en pacientes en HD (CALISTA, NCT03150420 y OF-CALISTA, NCT03319914)⁹⁴ pero aún no se han reportado resultados.

Adicionalmente, se ha estudiado el posible beneficio del tiosulfato para prevenir las CCV en la ERC. En este contexto, Pasch et al.¹⁹⁴ demostraron que ratas urémicas tratadas con tiosulfato intraperitoneal (0.4 g/kg) no presentaban calcificación en la pared aórtica, tejido cardíaco y renal, frente a la evidente calcificación de las ratas urémicas no tratadas en estos tejidos. Este

estudio señala cuatro posibles mecanismos por los que el tiosulfato de sodio podría prevenir la CCV¹⁹⁴, algunos de los cuales podrían ocasionar problemas de seguridad (a, b):

- a) A través de propiedades quelantes de calcio, con la posterior hipercalcemia y un balance negativo en calcio.
- b) La inducción de acidosis, que produce un balance negativo en calcio.
- c) Modulando la disponibilidad de factores que afectan a la mineralización de la matriz extracelular, es decir, inhibidores locales de la calcificación como, fetuína-A, MGP, OPG.
- d) Finalmente, el tiosulfato por sus propiedades antioxidantes podría captar radicales libres de oxígeno y proteger el tejido CCV frente a la microinflamación y el estrés oxidativo involucrado en los procesos de calcificación.

Unos años más tarde, O'Neill et al. pusieron en duda estos mecanismos con un conjunto de ensayos *in vitro* para determinar el efecto del tiosulfato en la CCV y la formación de HAP²⁷⁹, pero a día de hoy todavía no se tiene claro su mecanismo de acción.

Los primeros resultados de los efectos de la administración del tiosulfato de sodio intravenoso sobre la CCV se pueden observar en dos estudios no aleatorizados en los que el compuesto se administró a 87 y 22 pacientes de HD durante cuatro y cinco meses, respectivamente. En estos estudios se observó una reducción de la progresión de la calcificación arterial después del tratamiento intravenoso con tiosulfato^{280,281}. Recientemente se ha realizado por primera vez un estudio doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo (n=29) para determinar el efecto del tiosulfato de sodio durante 6 meses sobre la progresión de la CCV en pacientes en HD (n=26)¹⁹⁵. Los resultados de este estudio no mostraron diferencias en la progresión de la calcificación de la aorta abdominal (variable clínica principal) en pacientes tratados y placebos. En cambio, los pacientes tratados presentaron menor progresión de calcificación en arterias ilíacas, válvulas cardíacas, menor grosor de la íntima-media de las carótidas y una velocidad de onda de pulso reducida comparados con el grupo placebo. Estos resultados podrían dar apoyo para iniciar ensayos clínicos más amplios para el tratamiento de tiosulfato de sodio en pacientes en diálisis, los cuales deberían integrar datos minerales óseos para analizar el riesgo-beneficio del uso de este compuesto en humanos.

Junto con todos los enfoques terapéuticos explicados hasta el momento, debemos incluir aquellos cuyo objetivo es atacar el último paso de la calcificación, previniendo la formación de los cristales de HAP, y evitando su progresión de forma independiente a su etiología.

7.7. Compuestos polifosforilados como inhibidores fisicoquímicos de la calcificación

Como se ha explicado hasta ahora, la fisiopatología de la CCV es compleja, siendo el resultado final y común del proceso, independientemente de la causa principal, la formación de los cristales HAP. Los inhibidores de la calcificación son sustancias que dificultan o impiden el desarrollo de cristales de fosfato de calcio, ya que se pueden adsorber al núcleo homogéneo o heterogéneo de cristalización y/o a las caras de los cristales en crecimiento²⁸². Por tanto, su uso podría estar indicado para tratar patologías relacionadas con la CCV.

Los compuestos polifosforilados tienen estas características debido a su elevada afinidad por los cristales de HAP. Algunos ejemplos son el pirofosfato, los bifosfonatos y el myo-inositol hexafosfato (InsP_6), los cuales han demostrado en numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* su eficacia previniendo o dificultando la formación de depósitos de HAP.

7.7.1. Pirofosfato

El pirofosfato es un compuesto endógeno presente en la sangre²⁸³ y la orina²⁸⁴, que posee dos ácidos fosfóricos unidos por esterificación a una molécula de oxígeno (P-O-P), Figura I.16.

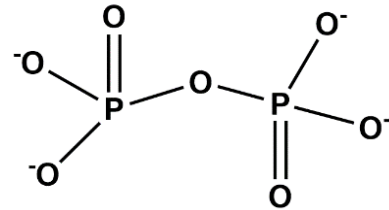


Figura I.16. Estructura de la molécula de pirofosfato.

El pirofosfato extracelular se genera como producto, juntamente con el monofosfato de adenosina (AMP), en la hidrólisis de trifosfato de adenosina (ATP) catalizada por la enzima ecto-nucleótido pirofosfatasa / fosfodiesterasa 1 (eNPP1), una glicoproteína unida a la membrana extracelular.

El pirofosfato se degrada a fosfato inorgánico por la enzima TNAP. Finalmente, la proteína transmembrana de múltiples pasos (ANK) es la responsable de la transferencia de pirofosfato del medio intracelular al extracelular (Figura I.17).

El pirofosfato es un inhibidor natural de la biomineralización, ya que puede prevenir la cristalización de fosfato de calcio para formar HAP y suprimir la propagación del cristal. Entonces, para que el proceso de mineralización normal ocurra en el hueso, se necesita un ajustado balance entre los niveles de pirofosfato y fosfato extracelular, regulados por las moléculas ANK, TNAP y eNPP1²⁸⁵⁻²⁸⁷.

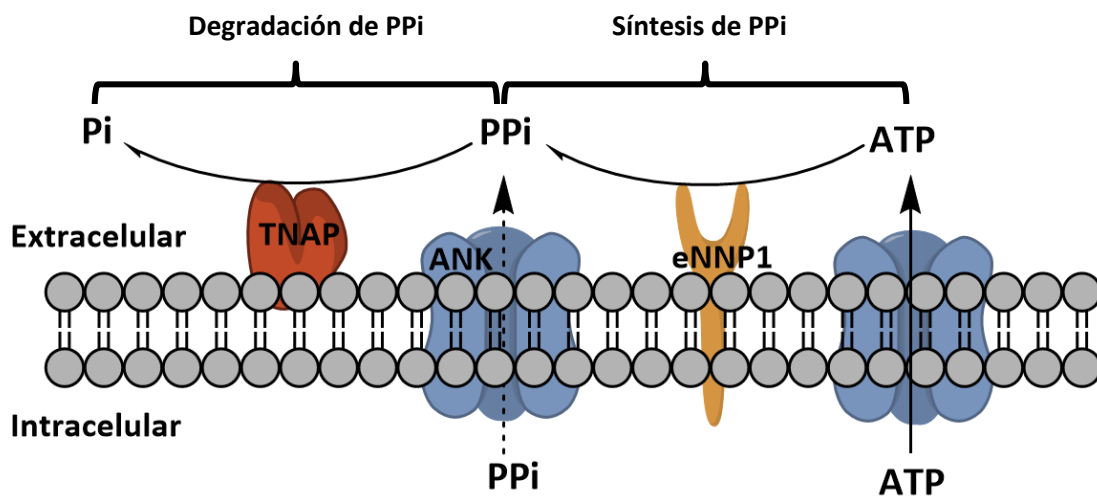


Figura I.17. Representación esquemática del metabolismo extracelular del pirofosfato. AMP: monofosfato de adenosina; ANK: proteína transmembrana de múltiples pasos; ATP: trifosfato de adenosina; Pi: fosfato inorgánico; PPI: pirofosfato; eNPP1: ecto-nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1; TNAP: fosfatasa alcalina no específica de tejido.

Adicionalmente, el pirofosfato es un potente inhibidor endógeno de las calcificaciones patológicas en general y en particular de la CCV, tanto *in vitro*¹⁴⁸ como *in vivo*^{288,289}. Su mecanismo de acción es el de unión a los núcleos de los cristales de HAP, previniendo su formación²⁹⁰ a concentraciones del orden micromolar. El pirofosfato circulante es el principal responsable endógeno en la inhibición de la calcificación²⁹¹; aun así, también se ha observado que hay producción local de este inhibidor en el músculo liso vascular²⁹². Inicialmente se demostró su capacidad para prevenir la calcificación vascular en un modelo animal de toxicidad por Vitamina D₃^{289,293} y, posteriormente, en cultivos de anillos aórticos y válvulas aórticas^{148,294}.

Los niveles endógenos de pirofosfato son suficientes para prevenir la calcificación ectópica en condiciones normales, pero en situaciones patológicas, por ejemplo, en condiciones de hiperfosfatemia, los niveles endógenos pueden resultar subóptimos. Además, los niveles circulantes de pirofosfato en los pacientes de HD son más bajos ya que éste se elimina durante la diálisis, teniendo niveles post-diálisis menores que a su inicio²⁹⁵.

Como se ha explicado, el pirofosfato es importante para la prevención de calcificaciones patológicas, por lo que podría representar una aproximación terapéutica para la prevención de la CCV. De hecho, la administración de pirofosfato exógeno por vía subcutánea o intraperitoneal demostró prevenir la calcificación en modelos animales urémicos sin inhibir la formación ósea¹⁹¹. Sin embargo, cabe destacar que el pirofosfato se hidroliza en el estómago y, por tanto, su aporte exógeno debe ser por vía parenteral, además su tiempo de vida media en plasma es corto, menor a 30 min¹⁹¹, y su efecto real sobre las calcificaciones patológicas no se ha estudiado de forma sistemática en ensayos clínicos controlados.

Este último problema llevó a desarrollar compuestos análogos al pirofosfato no hidrolizables y con características fisicoquímicas similares al pirofosfato para prevenir la calcificación ectópica. Estos compuestos son los bifosfonatos.

7.7.2. Bifosfonatos

Los bifosfonatos son compuestos sintéticos análogos a los pirofosfatos donde la molécula de oxígeno se ha sustituido por una de carbono (P-C-P) que le aporta resistencia a la degradación enzimática, pero a la vez manteniendo las propiedades fisicoquímicas inhibitorias de la cristalización de sales cálcicas. Su estructura (Figura 1.18) presenta dos grupos fosfonato unidos a un carbono central y dos cadenas adicionales con estructura variable, R₁ y R₂, siendo R₁ normalmente un grupo alcohol.

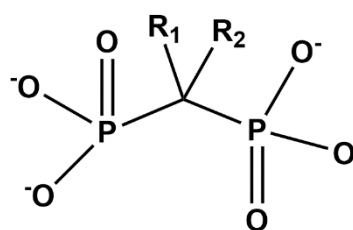


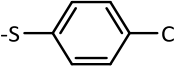

Figura 1.18. Estructura general de los bifosfonatos. En función de la cadena R₁ y R₂ de la molécula, podemos distinguir diferentes tipos de bifosfonatos.

La sustitución de las dos cadenas laterales da lugar a toda la familia de bifosfonatos, distinguiéndose dos clases en función de si la cadena R₂ contiene o no nitrógeno (Tabla I.4): los no nitrogenados (sin nitrógeno en la cadena lateral R₂, de primera generación) y los nitrogenados (cadena R₂ con nitrógeno), considerados de segunda y tercera generación. Adicionalmente a su papel en la inhibición de la cristalización de HAP, estos compuestos afectan la función osteoclástica, con un mecanismo de acción diferente según si contienen o no

I. INTRODUCCIÓN

nitrógeno en la cadena lateral R₂. Además, la afinidad de estos compuestos para unirse a los cristales de HAP e inhibir la calcificación depende de las cadenas laterales, modificándose así su potencia, sus propiedades farmacológicas y sus efectos secundarios. Así pues, los bifosfonatos nitrogenados son más potentes que los no nitrogenados; por ejemplo, el pamidronato, con una amina primaria, es 100 veces más potente que el etidronato. El ibandronato, con una amina terciaria, tiene una potencia de 1.000 respecto al etidronato²⁹⁶. Finalmente, los bifosfonatos más potentes son los nitrogenados heterocíclicos (risedronato y zolendronato), con una potencia de 5.000 respecto al etidronato²⁹⁷.

Tabla I.4. Tabla resumen de las diferentes estructuras de bifosfonatos existentes en función de la cadena R₁ y R₂. Se diferencian dos clases, no nitrogenados (sin nitrógeno en la cadena lateral R₂) y nitrogenados (la cadena R₂ contiene nitrógeno). i.v.: intravenosa.

Clase	Nombre del bifosfonato	R ₁	R ₂	Potencia relativa vs. etidronato	Ruta de administración
No nitrogenados	Etidronato	-OH	-CH ₃	1	Oral
	Clodronato	-Cl	-Cl	10	Oral
	Tiludronato	-H	-S- 	10	Oral
Nitrogenados, alquil-amino bifosfonatos	Pamidronato	-OH	-(CH ₂) ₂ -NH ₂	100	i.v.
	Neridronato	-OH	-(CH ₂) ₅ -NH ₂	100	
	Olpadronato	-OH	-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂	500	
	Alendronato	-OH	-(CH ₂) ₃ -NH ₂	1.000	Oral
	Ibandronato	-OH	-CH ₂ -CH ₂ -N ^{CH₃} _{(CH₂)₄-CH₃}	1.000	Oral/i.v.
Nitrogenados, heterocíclicos	Risendronato	-OH	-CH ₂ -CH ₂ - 	5.000	Oral
	Zolendronato	-OH	-CH ₂ -CH ₂ -N ^{CH₃} _{(CH₂)₄-CH₃}	>10.000	i.v.

Los bifosfonatos son análogos no biodegradables, por lo que son absorbidos, almacenados y excretados sin metabolizarse. Se pueden administrar por vía oral pero su biodisponibilidad por esta ruta es solo del 1 – 5%, presentando absorción en el tracto gastrointestinal baja debido a su baja lipofilia. La biodisponibilidad de una dosis intravenosa es del 100%, de la cual aproximadamente el 50-70% del bifosfonato disponible es captado por el hueso. El 30-50% restante se excreta en orina sin ser metabolizado²⁹⁸. Estos dos últimos aspectos presentan dos problemas. A nivel óseo, tienen elevada vida media sobre su superficie, de uno a diez años, pudiendo provocar en pacientes con ERC una enfermedad ósea adinámica²⁹⁹. El segundo problema se debe a que la excreción renal es la única ruta de eliminación de estos compuestos, por lo que su administración en pacientes con insuficiencia renal avanzada o que simultáneamente reciben otros fármacos nefrotóxicos, podría aumentar el riesgo de toxicidad renal^{300,301}.

I. INTRODUCCIÓN

Debido a su alta afinidad por los cristales de HAP y su rápida absorción en el hueso, es de esperar que la principal propiedad de los bifosfonatos sea el de inhibir la resorción ósea. El desarrollo de los bifosfonatos empezó entorno el 1960 por Fleisch et al³⁰²; en la práctica clínica el primer bifosfonato utilizado para inhibir la resorción ósea fue el etidronato administrado oralmente a pacientes con enfermedad de Paget³⁰³. Desde entonces han ido evolucionando y se ha conseguido determinar su indicación específica en distintas patologías que afectan al sistema óseo humano. Los bifosfonatos orales se han utilizado en el tratamiento y prevención de la osteoporosis^{304,305} pero con ciertas limitaciones debido a su baja biodisponibilidad por esta vía y a los efectos adversos sobre el tracto digestivo³⁰⁶. Los endovenosos se emplean en el tratamiento de la enfermedad de Paget³⁰⁷, y en indicaciones como en la prevención de la pérdida ósea posterior al trasplante de órganos³⁰⁸. En el campo de la oncología los bifosfonatos se emplean en el tratamiento de la hipercalcemia tumoral³⁰⁹ y en la prevención y tratamiento de los eventos óseos asociados a las metástasis óseas³¹⁰.

En plasma, los bifosfonatos tienen una vida más corta que en el tejido óseo, que puede oscilar entre 30 minutos y dos horas. Estos compuestos también evitan la formación de cristales de fosfato de calcio, por lo que también pueden tener aplicación para tratar procesos de calcificación ectópica. En este contexto, en estudios en animales, se ha descrito que son eficaces en la prevención de las calcificaciones vasculares, cardíacas, en riñón y pulmones^{311,312-314}, así como en el tratamiento en modelos de CUA³¹⁵.

Su mecanismo de acción en la prevención de este tipo de calcificación sigue siendo desconocido, podrían actuar directamente sobre los vasos sanguíneos o, indirectamente a través de la inhibición de la resorción ósea. En modelos animales de calcificación inducida por vitamina D, se ha demostrado que inhiben la calcificación de los tejidos blandos, como la arteria aorta y las arterias renales, así como otras formas de calcificación ectópica³¹³. Los bifosfonatos inhiben la calcificación vascular en animales urémicos a dosis mucho más bajas que las necesarias de pirofosfato³¹⁴. Aun así, las dosis necesarias de estos compuestos para inhibir dicha calcificación son similares a las que producen inhibición de la mineralización normal de tejidos como el hueso y el cartílago³¹⁶. Price et al. demostraron en estudios en animales que tanto el alendronato como el ibandronato inhiben la calcificación arterial y valvular a dosis comparables a las que inhiben la resorción del hueso³¹². Más tarde, Lomashvili et al. descubrieron que la inhibición de la calcificación aórtica y la mineralización ósea se daba a través de un mecanismo común, por lo que sugirieron que los bifosfonatos no podrían prevenir la CCV sin inhibir la formación de hueso en ratas urémicas³¹⁴.

El conocimiento sobre el posible uso de bifosfonatos para prevenir y tratar la CCV en pacientes con ERC y ERT en diálisis es limitado, los estudios realizados han contado con un número reducido de pacientes y han sido abiertos. Se han reportado algunos estudios en humanos sobre el uso de etidronato y sus efectos sobre la reducción de la progresión de las CCVs. Estos estudios, aunque han sido abiertos, sugieren que el etidronato podría proteger frente a la progresión de las calcificaciones coronarias o aórticas en pacientes en HD^{193,317,318}. Toussaint et al. publicaron el primer estudio aleatorizado controlado por placebo en pacientes con ERC pre-diálisis (24 tratados con 70 mg orales una vez por semana y 22 placebos) para evaluar el efecto del alendronato en la progresión de la CCV durante 18 meses³¹⁹. A diferencia de estudios previos de

pacientes en HD, el alendronato no disminuyó la progresión de calcificación vascular comparada con placebo.

Los bifosfonatos, como compuestos polifosforilados, dificultan o impiden el desarrollo de los cristales de fosfato de calcio, ya que se pueden adsorber al núcleo de cristalización y/o a las caras de los cristales en crecimiento. Adicionalmente, existen otros mecanismos que se postulan para esta actividad inhibitoria de la calcificación. Por una parte, que la inhibición de la resorción ósea por parte de estos compuestos disminuiría la concentración de calcio circulante, reduciendo la posibilidad de formar núcleos minerales de fosfato de calcio en el sistema vascular. Por otra parte, los bisfosfonatos podrían inhibir la secreción de citoquinas proinflamatorias en la pared vascular y mejorar el cuadro clínico de los pacientes con CUA³²⁰.

En este contexto, existen algunas evidencias con bifosfonatos para el tratamiento de la CUA tanto en humanos³²¹ como en modelos animales³²⁰. Price et al.³²⁰, en un modelo animal de CUA, demostró que el ibandronato previene la CUA a las mismas dosis que inhibe la resorción ósea. En algunos reportes individuales de casos de pacientes con calcifilaxis se han utilizado bifosfonatos con éxito, tanto el etidronato oral^{322,323} como el pamidronato intravenoso³²⁴. Adicionalmente, en una serie de 8 pacientes con CUA Torregrosa et al. observaron una reducción de la progresión de las úlceras cutáneas entre 2 y 4 semanas después del inicio del tratamiento con diferentes bifosfonatos (alendronato, risedronato y ibandronato), y su total recuperación a los 6 meses del inicio del tratamiento^{189,325}.

Dadas las numerosas evidencias que se han comentado anteriormente sobre la dificultad de separar los efectos positivos sobre el sistema vascular de una adecuada formación ósea, la administración de estos compuestos en pacientes con ERC se debe evaluar con precaución, dejando su uso a casos con una enfermedad ósea de alto recambio³²⁶, o en el contexto de una enfermedad potencialmente mortal como es la CUA¹⁸⁹. Aun así, cabe destacar que el posible uso de estos compuestos tanto para tratar las CCVs en HD y la CUA requieren de estudios clínicos aleatorizados, ciegos y controlados con placebo.

7.7.3. Myo-inositol hexafosfato

El InsP_6 o myo-inositol hexafosfato es un ácido orgánico altamente fosforado de peso molecular relativamente bajo. Fue descubierto en el año 1872 por Pfeffer en semillas de vegetales, donde se encontraba en forma de sal de calcio y magnesio (fitina). Más tarde, en 1914 Anderson³²⁷ estableció su estructura (Figura I.19).

El InsP_6 es una sustancia natural que se encuentra en cantidades importantes en los cereales integrales, legumbres, semillas, frutos secos y otros alimentos con alto contenido de fibra. Además, también está presente en concentraciones del rango micromolar en los fluidos fisiológicos (sangre y orina), células y tejidos de mamíferos³²⁸. El InsP_6 existe en los dos compartimentos biológicos principales, extracelular e intracelular, pero no hay evidencias de

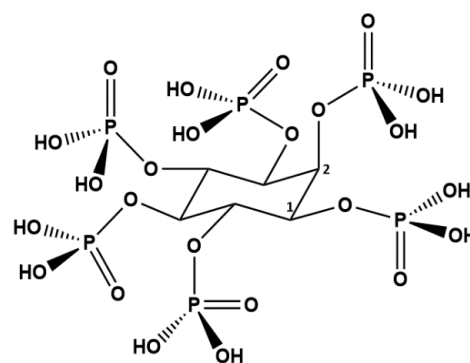


Figura I.19. Estructura del myo-inositol hexafosfato.

que exista intercambio significativo entre ellos³²⁹. El InsP₆ intracelular está presente de manera natural en concentraciones de 10 a 100 μM ^{330,331} y se forma a partir de InsP₃ y la posterior familia de polifosfatos de inositol (InsP₄, InsP₅). Su papel fisiológico intracelular no está bien dilucidado, podría ser relevante como cofactor, pero no es una señal celular³³². Respecto al InsP₆ extracelular, depende directamente de su aporte exógeno en la dieta y alcanza niveles fisiológicos en el rango de 0.2 a 0.3 μM ³³³.

El InsP₆ es muy polar y su absorción por vía oral es baja. Clásicamente, el InsP₆ se ha considerado un antinutriente ya que, por su estructura química, tiene propiedades quelantes de cationes polivalentes como el calcio, el magnesio, el cinc y el hierro. Luego, cuando se administran grandes dosis orales o en dietas vegetarianas pobres en carne y lácteos, el InsP₆ puede reducir la absorción en el tracto gastrointestinal de minerales traza. Cabe destacar que, en dietas equilibradas no hay evidencias de que el InsP₆ tenga ningún efecto perjudicial³³⁴⁻³³⁶.

Desde la detección de niveles de InsP₆ significativos en orina humana³³⁷, se estableció un vínculo entre el InsP₆ y la salud humana, particularmente en el contexto de enfermedades relacionadas con la calcificación, debido a sus propiedades inhibitorias de la cristalización de sales de calcio. Esta potente acción inhibitoria se debe a la afinidad fisicoquímica por las sales de calcio de los seis grupos fosfato que presenta. Se ha reportado su posible efecto beneficioso en la prevención de la litiasis renal^{333,338,339}, la osteoporosis³⁴⁰⁻³⁴², sialolitiasis³⁴³, el sarro dental³⁴⁴, así como en la CCV en una variedad de modelos animales³⁴⁵⁻³⁴⁷. Adicionalmente, sus propiedades beneficiosas incluyen el efecto antioxidante^{348,349} y algunos autores han descrito ciertos efectos beneficiosos en algunos tipos de cáncer, como el de colon³⁵⁰.

Actividad antioxidante

Se ha demostrado que el InsP₆ *in vitro* puede formar complejos muy estables con iones hierro, evitando que éstos puedan actuar como catalizadores de la reacción entre el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical superóxido (O₂⁻) para formar radical hidroxilo (OH[·])^{351,352}. Estos radicales libres pueden oxidar las biomoléculas de la célula y se han relacionado con el proceso de envejecimiento y los procesos de iniciación tumoral. Cabe destacar que se necesitan estudios *in vivo* para demostrar la posible relevancia del efecto antioxidante del InsP₆ en los organismos.

Actividad anticancerígena

Respecto a la actividad anticancerígena del InsP₆, se ha demostrado tanto *in vitro* como en modelos animales, el efecto beneficioso en cáncer de colon, hígado, pulmón, mama, próstata, piel y tejidos blandos³⁵⁰. Se observó que el InsP₆ reducía la proliferación celular y aumentaba la diferenciación de células malignas, hecho que a menudo resultaba en una reversión al fenotipo normal. Hay evidencias clínicas que los mejores resultados en la actividad anticancerígena se obtuvieron de la combinación de InsP₆ e inositol. En un estudio clínico piloto en pacientes de cáncer colorrectal avanzado donde se administró InsP₆ e inositol en combinación con la quimioterapia, se observó una disminución de los efectos secundarios provocados por la quimioterapia (disminución en el recuento de leucocitos y plaquetas, náuseas, vómitos y alopecia), mejorando la calidad de vida de los pacientes³⁵³. Adicionalmente, en otro estudio en pacientes con cáncer de mama tratados con quimioterapia se administró el inositol y InsP₆ como terapia complementaria. Los resultados mostraron que la terapia adyuvante mejoró los efectos

secundarios y la calidad de vida de los pacientes³⁵⁴. Dichos datos apoyan el uso de InsP_6 e inositol como terapia complementaria para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, la efectividad y seguridad de InsP_6 e inositol a dosis terapéuticas para prevenir y tratar el cáncer se debe comprobar en estudios clínicos en humanos.

Actividad en la osteoporosis

Se ha propuesto que la actividad del InsP_6 en la inhibición de los procesos patológicos de calcificación en tejidos blandos va acompañada por efectos positivos en hueso. Estudios en modelos animales, así como datos epidemiológicos, sugieren que el InsP_6 podría ser efectivo para tratar la osteoporosis, reduciendo la pérdida de densidad ósea. En modelos *in vivo* en ratas Wistar ovariectomizadas, los animales con una dieta rica en InsP_6 tuvieron menor pérdida de densidad ósea causada por la deficiencia de estrógenos³⁴⁰.

Un estudio retrospectivo con 180 mujeres posmenopáusicas, controladas con densitometría, se observó que las pacientes con niveles bajos de InsP_6 en orina (relacionado con un consumo bajo en InsP_6 en dieta) tenían mayor pérdida de densidad ósea en el cuello femoral y la columna lumbar que las pacientes con niveles altos³⁴². En otro estudio con 157 mujeres posmenopáusicas de 12 meses de duración se asoció un mayor consumo de InsP_6 , y niveles mayores en orina, con menor pérdida de masa ósea y una disminución del riesgo de fractura (columna lumbar y cuello femoral)³⁵⁵.

Asimismo, se ha demostrado que el InsP_6 inhibe la mineralización *in vitro* en cultivos de línea celular osteoblástica de ratón (MC3T3-E1)³⁵⁶. El supuesto mecanismo es a través de la unión directa a cristales en crecimiento a través de los grupos fosfato del inhibidor y por inducción de la expresión de OPN, pero sin afectar a la expresión de otros marcadores de diferenciación osteoblástica como ALP, sialoproteína ósea y OC. Por tanto, el InsP_6 podría regular la mineralización ósea fisiológica actuando extracelularmente y sirviendo como una señal específica a nivel celular para la regulación de la expresión de OPN³⁵⁶. Por el contrario, en otro estudio *in vitro* se observó que el InsP_6 inhibe la osteoclastogénesis en células madre mesenquimales humanas (pre-osteoclastos), por lo que el InsP_6 podría ser un nuevo inhibidor selectivo de OC, útil para el tratamiento de la osteoporosis³⁵⁷. Estos hechos concuerdan con la inhibición de la resorción ósea por InsP_6 encontrada en investigaciones previas, tanto en modelos animales³⁴⁰ como en estudios clínicos^{341,342}.

Inhibidor de las calcificaciones patológicas

Se ha demostrado que el InsP_6 inhibe la cristalización de sales de calcio como el oxalato de calcio y el fosfato de calcio en orina. De hecho, diferentes estudios mostraron que es un inhibidor mil veces más efectivo que el citrato en la litiasis cálcica^{358-360,282}. Adicionalmente, se ha demostrado su potente efecto inhibidor de la nucleación heterogénea y del crecimiento cristalino del oxalato de calcio^{359,360}, así como de la nucleación homogénea y heterogénea de fosfato cálcico^{282,361}.

Con respecto a la litiasis renal, también hay estudios en humanos en los que la ingesta de alimentos ricos en InsP_6 y los niveles fisiológicos de este compuesto se han correlacionado con menor incidencia o prevalencia de esta patología^{333,338}.

Finalmente, un análisis de 21 cálculos de los conductos salivales y la composición de la saliva de los correspondientes pacientes, correlacionó de manera inversa la concentración en saliva de InsP_6 con la incidencia de sialolitiasis³⁴³. Además, en un estudio clínico se demostró la eficacia del InsP_6 en la reducción de la formación de sarro dental³⁴⁴.

8. InsP_6 como inhibidor de las calcificaciones cardiovasculares

Como se ha comentado anteriormente, el InsP_6 es un polifosfato con una alta afinidad por las sales de calcio, por lo que su mecanismo de acción se basa en bloquear la formación y el crecimiento de cristales de HAP en los vasos sanguíneos. Las moléculas de InsP_6 se adsorben rápidamente sobre la superficie de núcleos y/o cristales de fosfato de calcio en crecimiento, impidiendo su posterior desarrollo. De esta manera, puede actuar como un inhibidor de la cristalización, uniéndose específicamente a los sitios de crecimiento (sin requerir toda la superficie del cristal) y bloqueando el proceso de calcificación (Figura I.20).

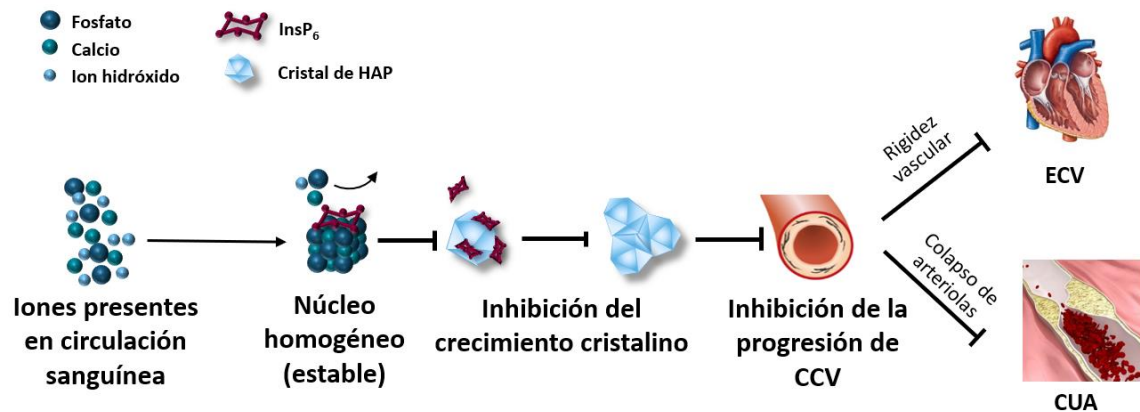


Figura I.20. Mecanismo de acción del myo-inositol hexafosfato en la inhibición de la calcificación cardiovascular por adsorción directa sobre la superficie de núcleos y/o cristales de fosfato de calcio en crecimiento. CCV: calcificación cardiovascular, CUA: calcifilaxis, ECV: enfermedad cardiovascular, HAP: hidroxiapatita, InsP_6 : myo-inositol hexafosfato.

Otro mecanismo plausible es que el InsP_6 desempeñe un papel en la prevención de la transformación de CMLV a un fenotipo osteogénico que interviene en el desarrollo de la CCV. Se ha observado que someter a las CMLV *in vitro* a concentraciones de calcio y/o fosfato elevados puede inducir un cambio fenotípico similar a hueso que las predispone a la calcificación^{137,362}.

Hay numerosos estudios publicados en modelos animales, así como algunos estudios epidemiológicos y estudios clínicos, que señalan un papel protector del InsP_6 sobre la CCV.

8.1. Evidencias del InsP_6 como inhibidor de las calcificaciones cardiovasculares en modelos animales

En un estudio de calcificación asociada al envejecimiento en ratas de 10 semanas a las que se hizo seguimiento durante 66 semanas, se demostró que el aporte dietético de InsP_6 (1%) reducía significativamente las calcificaciones en aorta y corazón asociadas al envejecimiento, comparadas con el grupo placebo (dieta sin InsP_6)³⁶³.

Adicionalmente, Grases et al. demostraron la eficacia del InsP_6 por diferentes vías de administración en modelos de rata con calcinosis cutis (depósitos de sales de calcio en la piel) inducida con permanganato de potasio (KMnO_4) subcutáneo en disolución al 0,1 %. En un primer estudio, se demostró que la administración de InsP_6 al 1% en la dieta, o bien como dieta enriquecida con germen de algarroba (rico en InsP_6), resultaba en concentraciones plasmáticas de 0.3-0.4 μM , e inhibió significativamente la formación de las placas calcificadas frente al grupo control con dieta estándar no enriquecida³⁶⁴. En un segundo estudio se observó que la administración por vía tópica de InsP_6 al 2% en crema redujo significativamente la formación de la placa calcificada en la piel respecto al grupo placebo administrado con crema no enriquecida³⁶⁵.

Para evaluar el efecto del InsP_6 sobre la CCV, se han utilizado dos modelos de calcificación en rata. En un primer modelo se induce la calcificación tisular por administración de sobredosis de vitamina D_3 ³¹³. En un segundo modelo urémico, se administra adenina y vitamina D parcialmente activa para inducir insuficiencia renal y calcificación tisular significativa, respectivamente, con una dieta rica en fosfato³⁶⁶.

Se ha podido comprobar el efecto de InsP_6 como inhibidor de la CCV en numerosos estudios de eficacia en modelos animales en los cuales la calcificación tisular se induce de manera más drástica por sobredosis de vitamina D_3 . El primer estudio, realizado por Van den Berg et al.³⁴⁷, demostró que el InsP_6 a dosis 10, 1 y 0.1 mg/kg inyectado por vía subcutánea podía prevenir la calcificación aórtica inducida por vit D_3 oral (x5 días consecutivos a 75000 UI/kg) entre un 30 y un 80%. Años más tarde, en un estudio con ratas Wistar se indujo la CCV mediante nicotina oral (25 mg/kg) y altas dosis de vit D_3 (300000 UI/kg)³⁶⁷ y se evaluó la capacidad de InsP_6 como inhibidor de la calcificación por vía tópica (2% de InsP_6)³⁶⁸. Los resultados mostraron una inhibición entono al 90% tanto en corazón como en aorta³⁴⁵. En otro estudio con ratas se indujo la calcificación con vitamina D_3 (x3 subcutánea a 500000 UI/kg). Los animales se administraron por vía subcutánea con InsP_6 a 0.825 $\mu\text{mol/kg}$ durante 8 días. El grupo tratado con InsP_6 , inhibió la calcificación en aorta un 66%, pero no en corazón³⁴⁶. En otro conjunto de estudios más recientes se indujo calcificación a ratas por vitamina D_3 (x5 oral a 75000 UI/kg) y se examinó el efecto del SNF472 (una formulación de InsP_6) por bolus intravenoso a 1 mg/kg en dos patrones diferentes de administración (diariamente o a días alternos). Las calcificaciones tisulares se inhibieron en aorta y corazón de manera similar en los dos patrones de administración, entorno a un 60 y un 70%, respectivamente³⁶⁹. Finalmente, se comprobó el efecto del InsP_6 por vía subcutánea en un modelo de progresión de la CCV inducida por vitamina D_3 (x3 subcutánea a 100000 UI/kg), donde el tratamiento con InsP_6 , a dosis de 10 y 60 mg/kg se inició el día 5, ya iniciada la calcificación tisular. Los resultados revelaron que ambas dosis inhibían completamente la progresión de la calcificación cardíaca³⁶⁹.

En modelos de rata urémicos de CCV acelerada, el tratamiento con InsP_6 también ha demostrado su eficacia. En una publicación reciente de Ferrer et al.³⁶⁹ la uremia se indujo por administración de adenina oral (x10 a 600 mg/kg), seguida de vitamina D (α -calcitol oral tres veces por semana a 300 ng/kg). Los tratamientos se realizaron diariamente mediante 4 horas de infusión intravenosa de 50 mg/kg de SNF472. La inhibición de la calcificación en la aorta y el corazón fue entorno al 80%.

8.2. Efectos del InsP_6 en el sistema cardiovascular humano

8.2.1. Consumo de InsP_6 para proteger el sistema cardiovascular

Hay diversos estudios prospectivos que relacionan inversamente el riesgo de ECV, la mortalidad (especialmente debido a causas relacionadas con la ECV) y el riesgo de cáncer (principalmente las neoplasias colorrectales, endometriales y pancreáticas), con el aumento del consumo de frutos secos³⁷⁰, una fuente importante de InsP_6 de la dieta. Los niveles urinarios de InsP_6 parecen ser un buen indicador del consumo de InsP_6 ³⁷¹. El análisis de los niveles urinarios de este analito se ha utilizado en diversos estudios epidemiológicos para evaluar el posible efecto del InsP_6 dietético sobre la salud.

En un estudio transversal se evaluó la relación entre los niveles fisiológicos en orina de InsP_6 provenientes de la dieta y la calcificación valvular en una población de 188 sujetos de edad avanzada (media de 68 años). La población de estudio se dividió en terciles según el nivel de InsP_6 urinario (bajo, intermedio y alto). Se observó una correlación inversa entre los niveles de InsP_6 y la calcificación valvular. Adicionalmente, el análisis multivariante desveló que factores independientes como la edad, el fosfato sérico, el recuento total de leucocitos y la excreción de InsP_6 urinario, predicen la presencia de calcificación valvular³⁷². Por tanto, estos resultados sugieren que el consumo de alimentos ricos en InsP_6 puede ayudar a prevenir la evolución de la CCV debida a la edad, tanto en humanos como en ratas (estudio explicado anteriormente³⁶³).

En un estudio prospectivo reciente se evaluó la relación entre los niveles urinarios de InsP_6 y la calcificación aórtica abdominal (CAA) en 69 pacientes con ERC en estadios 2 y 3. Se realizó un cuestionario dietético para estimar el consumo de InsP_6 y se analizaron los niveles de este analito en orina. Los pacientes se dividieron en dos grupos según los niveles de CAA (baja y de moderada a grave). Los resultados mostraron que los pacientes con baja CAA eran más jóvenes, consumían más InsP_6 y tenían mayores niveles urinarios. Además, la prevalencia de ECV previa fue significativamente menor. El análisis multivariante indicó que la edad, la ECV previa y el InsP_6 urinario (o consumo de InsP_6) se asocian de forma independiente a la CAA. Los resultados sugieren que el consumo adecuado de InsP_6 puede prevenir la CAA en pacientes con ERC en estadios tempranos. Aun así, se precisan más estudios prospectivos para dilucidar los beneficios de una dieta rica en InsP_6 y el riesgo asociado de biodisponibilidad de fosfato en estos pacientes³⁷³.

Estos estudios indican que la deficiencia de InsP_6 en la dieta es un factor clave que contribuye a la CCV relacionada con el envejecimiento, y sugieren que un incremento en su consumo podría tener un impacto en el riesgo CCV.

En las enfermedades como la ERC, la diabetes, la CUA, etc., donde se produce una calcificación agresiva en tejidos blandos, el tratamiento con InsP_6 como inhibidor de la CCV podría ser una opción terapéutica de interés. Joubert et al.³⁷⁴ propusieron que el InsP_6 a concentraciones suprafisiológicas, solo alcanzables por administración parenteral debido a su baja disponibilidad por vía oral, podría influir beneficiosamente en la mortalidad y la morbilidad en las enfermedades en las que ocurre una CCV agresiva. Para conseguir tales concentraciones de manera continuada, se consideró la administración de InsP_6 intravenoso en pacientes en HD durante las sesiones de diálisis, debido a la fácil disponibilidad de la vía intravascular.

Adicionalmente, cabe considerar que no hay terapias aprobadas para el tratamiento de la CCV en pacientes en HD.

En la actualidad el SNF472, una formulación intravenosa de InsP_6 , se encuentra en etapas avanzadas de desarrollo clínico para dos indicaciones: el tratamiento de la PAD y de la CUA en pacientes con ERT en tratamiento de HD. Hasta el momento se han realizado un total de cuatro estudios clínicos con el fármaco experimental SNF472, dos de fase 1 y dos de fase 2. Actualmente hay un estudio de fase 3 en marcha en pacientes con CUA. La administración de este fármaco en todos ellos fue por infusión intravenosa.

8.2.2. Desarrollo clínico del SNF472 para el tratamiento de la calcificación cardiovascular en pacientes en hemodiálisis

En un primer estudio clínico de fase 1a, doble ciego, aleatorizado y controlado por placebo (*A First Time in Human, Double Blind, Randomised, Placebo Controlled Phase I Study to Investigate the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of Single and Multiple Ascending Intravenous Doses of SNF472 in Healthy Male Volunteers, and a Single Intravenous Dose of SNF472 in Male Haemodialysis Patients*; número EudraCT 2013-005125-23)³⁷⁵, se investigó la seguridad, tolerabilidad y farmacocinética (PK) del SNF472 intravenoso en voluntarios sanos (n=20) y pacientes en HD (n=8) administrados con dosis únicas ascendentes y con una dosis única, respectivamente. La dosis inicial en voluntarios sanos fue de 0.5 mg/kg, y ascendió hasta 12.5 mg/kg. En los pacientes en HD se seleccionó una dosis de 9 mg/kg. Los resultados de PK mostraron que la concentración plasmática máxima (C_{max}) se obtuvo al final de la infusión (aproximadamente 4 horas), siendo inferior al LLOQ para la dosis más baja probada. Los parámetros de PK fueron similares en pacientes en HD y voluntarios sanos, mostrando baja dializabilidad del compuesto. Los niveles obtenidos de C_{max} para la dosis de 9 mg/kg fueron similares para los voluntarios sanos y pacientes en HD (37 y 44 μM , respectivamente). La administración intravenosa de SNF472 a todas las dosis probadas fue segura y tolerada, la mayoría de los eventos adversos emergentes del tratamiento fueron de intensidad leve y no se observaron efectos clínicamente significativos en signos vitales o pruebas de laboratorio.

En el segundo estudio de fase 1b doble ciego, aleatorizado y controlado por placebo (*A phase 1b randomized, placebo-controlled clinical trial with SNF472 in haemodialysis patients*; número EudraCT 2014-005076-29)³⁷⁶, se investigó de nuevo la seguridad, tolerabilidad y PK del SNF472 intravenoso en pacientes en HD administrados con dosis repetidas (ascendentes y fijas). Los pacientes se agruparon en dos cohortes, los de la primera recibieron múltiples dosis ascendentes de SNF472 (de 1 a 20 mg/kg) durante una semana. Los de la cohorte 2 se administraron con dosis de 10 mg/kg de SNF472 durante cuatro semanas. Igual que en el estudio anterior, no se observaron efectos clínicamente significativos en signos vitales o pruebas de laboratorio. En los resultados de PK la C_{max} se observó al final de las 4 horas de infusión, con valores de 12 a 101 μM para las dosis de 3 a 20 mg/kg, respectivamente. Después de la infusión, las concentraciones plasmáticas disminuyeron rápidamente con un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) entre 32 y 65 min. Las conclusiones de este segundo estudio de fase 1b, revelaron que el SNF472 en pacientes de HD es seguro y tolerado tanto después de dosis múltiples ascendentes durante una semana, como después de dosis repetidas de 10 mg/kg durante cuatro semanas, sin observarse acumulación del fármaco experimental después de un mes de dosificación.

La conclusión de los estudios clínicos de fase 1 fue que el fármaco experimental SNF472 presenta un perfil farmacocinético similar en voluntarios sanos y en pacientes con ERT, y, además fue bien tolerado. Por tanto, el balance beneficio-riesgo justificó futuros estudios en humanos para su desarrollo clínico.

Recientemente se han publicado los resultados del estudio CaLIPSO, un estudio de fase 2 doble ciego, aleatorizado y controlado por placebo (*A Double-blind, Randomised, Placebo-controlled Study to Assess the Effect of SNF472 on Progression of Cardiovascular Calcification on Top of Standard of Care in End-stage-renal-disease (ESRD) Patients on Hemodialysis (HD)*; NCT02966028)³⁷⁷, donde se evaluó el efecto del tratamiento intravenoso con SNF472 en la progresión de la CCV durante 52 semanas en pacientes con ERT en tratamiento de HD. Las dosis administradas de SNF472 fueron 300 mg (n = 92), 600 mg (n = 91) o placebo (n = 91), además de la terapia estándar. La variable clínica primaria estudiada fue la progresión en el índice de CAC en volumen entre el inicio y el final del estudio. Los resultados revelaron que el tratamiento intravenoso de SNF472 atenuó significativamente la progresión del índice de CAC en volumen en comparación con el grupo placebo (11% para el grupo de dosis combinadas de SNF472 y 20% para el grupo placebo).

Adicionalmente, el SNF472 se está estudiando para el tratamiento de la CUA en los pacientes con ERT en tratamiento de diálisis.

En 2019 se publicaron los resultados de un estudio de fase 2 abierto en pacientes con CUA en tratamiento de HD (*Phase 2 Open Label Single Arm Repeat Dose Study to Assess the Effect of SNF472 on Wound Healing in Uraemic Calciphylaxis Patients*; NCT02790073)³⁷⁸. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del SNF472 durante 12 semanas en 14 pacientes con CUA sometidos a tratamiento de HD. La variable clínica primaria fue la cicatrización de las úlceras evaluada por la escala Bates-Jensen (BWAT, *Bates-Jensen Wound Assessment Tool*). Como variables clínicas secundarias se evaluaron el dolor (VAS, *visual analog scale*) y la calidad de vida a partir de un cuestionario específico para úlceras (*wound quality of life*), entre otras.

Los resultados mostraron mejoras significativas desde el inicio hasta la semana 12 para la cicatrización de heridas (BWAT), el dolor (VAS) y la calidad de la vida. Los resultados de seguridad revelaron que el SNF472 se toleró bien y no se observaron eventos adversos graves relacionados con el tratamiento.

En 2020, se inició un ensayo clínico de fase 3 aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo para evaluar la eficacia de SNF472 en pacientes con CUA.

9. Referencias

- 1 Grases, F., Costa-Bauzá, A. & Söhel, O. *Cristalización en disolución - Conceptos Basicos*. Reverté edn, (2000).
- 2 Grases, F., Prieto, R. M. & Costa-Bauzá, A. Calcificaciones cardiovasculares: factores etiológicos implicados. *Cir Cardiov* **12**, 291-297, doi:10.1016/S1134-0096(05)70340-5 (2005).
- 3 Finlayson, B. Physicochemical aspects of urolithiasis. *Kidney Int.* **13**, 344-360, doi:10.1038/ki.1978.53 (1978).

I. INTRODUCCIÓN

- 4 Russell, R. G., Caswell, A. M., Hearn, P. R. & Sharrard, R. M. Calcium in mineralized tissues and pathological calcification. *Br. Med. Bull.* **42**, 435-446, doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a072163 (1986).
- 5 Nakamaru, R., Oe, H., Iwakura, K., Masai, T. & Fujii, K. Calcified amorphous tumor of the heart with mitral annular calcification: a case report. *Journal of medical case reports* **11**, 195, doi:10.1186/s13256-017-1337-9 (2017).
- 6 Lanzer, P. *et al.* Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *European Heart Journal* **35**, 1515-1525, doi:10.1093/eurheartj/ehu163 (2014).
- 7 Rivet, J. *et al.* Cutaneous calcification in patients with end-stage renal disease: a regulated process associated with in situ osteopontin expression. *Arch. Dermatol.* **142**, 900-906, doi:10.1001/archderm.142.7.900 (2006).
- 8 Evan, A. P. Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract. *Pediatr. Nephrol.* **25**, 831-841, doi:10.1007/s00467-009-1116-y (2010).
- 9 Levey, A. S. *et al.* Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int.* **72**, 247-259, doi:10.1038/sj.ki.5002343 (2007).
- 10 DuBose, T. D., Jr. American Society of Nephrology Presidential Address 2006: chronic kidney disease as a public health threat--new strategy for a growing problem. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**, 1038-1045, doi:10.1681/ASN.2006121347 (2007).
- 11 Levin A, D. O., Barrett B, Burgess E, Carlisle E, Ethier J, Jindal K, Mendelssohn D, Tobe S, Singer J, Thompson C. Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease: getting to the heart of the matter. *Am. J. Kidney Dis.* **38**, doi:1398-407 (2001).
- 12 Collins AJ, L. S., Gilbertson DT, Liu J, Chen SC, Herzog CA. Chronic kidney disease and cardiovascular disease in the Medicare population. *Kidney Int. Suppl.* **64(87): S24-S31** (2003).
- 13 (NKF-KDOQI), N. K. F. K. D. O. Q. I. *Clinical Practice Guidelines For Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification.* (2002).
- 14 KDIGO. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Supplements* **3** (2013).
- 15 Otero A, d. F. A., Gayoso P, Garcia F, EPIRCE Study Group. Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia* **30**, 78-86, doi:10.3265 (2010).
- 16 Gorostidi, M. *et al.* Prevalencia de enfermedad renal crónica en España: impacto de la acumulación de factores de riesgo cardiovascular. *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia* **38**, 606-615, doi:10.1016/j.nefro.2018.04.004 (2018).
- 17 Leehey, D. J., Kramer, H. J., Daoud, T. M., Chatha, M. P. & Isreb, M. A. Progression of kidney disease in type 2 diabetes - beyond blood pressure control: an observational study. *BMC Nephrol* **6**, 8, doi:10.1186/1471-2369-6-8 (2005).
- 18 Freedman, B. I. & Dubose, T. D., Jr. Chronic kidney disease: cause and consequence of cardiovascular disease. *Arch. Intern. Med.* **167**, 1113-1115, doi:10.1001/archinte.167.11.1113 (2007).
- 19 Kramer, A. *et al.* The ERA-EDTA Registry Annual Report 2017: a summary. *Clinical kidney journal* **13**, 693-709, doi:10.1093/ckj/sfaa048 (2020).

I. INTRODUCCIÓN

- 20 USRDS. 2018 United States Renal Data System Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. (National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2018).
- 21 Escobar, E., García, F. & Saracho, R. Informe 2006 de diálisis y trasplante renal en España. *Nefrología : publicación oficial de la Sociedad Española Nefrología* **29(6)**, 525-533 (2009).
- 22 Ritz, E., Rychlik, I., Locatelli, F. & Halimi, S. End-stage renal failure in type 2 diabetes: A medical catastrophe of worldwide dimensions. *Am. J. Kidney Dis.* **34**, 795-808, doi:10.1016/S0272-6386(99)70035-1 (1999).
- 23 Moe, S. *et al.* Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* **69**, 1945-1953, doi:10.1038/sj.ki.5000414 (2006).
- 24 Lucas, R. C. On a form of late rickets associated with albuminuria, rickets of adolescents. *Lancet* **1**, 993-994, doi:10.1016/S0140-6736(02)37965-0 (1883).
- 25 K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am. J. Kidney Dis.* **42**, S1-201 (2003).
- 26 London, G. M. *et al.* Arterial calcifications and bone histomorphometry in end-stage renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 1943-1951 (2004).
- 27 Torregrosa, J. V. *et al.* Spanish Society of Nephrology recommendations for controlling mineral and bone disorder in chronic kidney disease patients (S.E.N.-M.B.D.). *Nefrología : publicación oficial de la Sociedad Española Nefrología* **31 Suppl 1**, 3-32, doi:10.3265/Nefrologia.pre2011.Jan.10816 (2011).
- 28 Bover, J. *et al.* Desde las guías americanas KDOQI™ 2003 hasta las guías españolas 2011: desde el diagnóstico y evaluación hasta el tratamiento de las alteraciones del metabolismo mineral y óseo en la enfermedad renal crónica. *Dial Traspl.* **32**, 81-90, doi:10.1016/j.dialis.2012.12.002 (2013).
- 29 Block, G. A. *et al.* Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 2208-2218, doi:10.1097/01.ASN.0000133041.27682.A2 (2004).
- 30 2013 United States Renal Data System. Annual data report: Epidemiology of kidney disease in the United States. *Am. J. Kidney Dis.* **63** (2014).
- 31 Rodriguez, M. & Felsenfeld, A. J. PTH, FGF-23 and early CKD. *Nephrol. Dial. Transplant.* **23**, 3391-3393, doi:10.1093/ndt/gfn438 (2008).
- 32 Seiler, S., Heine, G. H. & Fliser, D. Clinical relevance of FGF-23 in chronic kidney disease. *Kidney Int. Suppl.*, S34-42, doi:10.1038/ki.2009.405 (2009).
- 33 Razzaque, M. S. FGF23-mediated regulation of systemic phosphate homeostasis: is Klotho an essential player? *American journal of physiology. Renal physiology* **296**, F470-476, doi:10.1152/ajprenal.90538.2008 (2009).
- 34 Aquiles-Jara, C. Disturbance in mineral and bone metabolism in chronic kidney disease. *Revista Médica Clínica Las Condes* **21**, 530-540, doi:10.1016/S0716-8640(10)70568-X (2010).
- 35 Gutierrez, O. *et al.* Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 2205-2215, doi:10.1681/ASN.2005010052 (2005).

- 36 Levin, A. *et al.* Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int.* **71**, 31-38, doi:10.1038/sj.ki.5002009 (2007).
- 37 Hruska, K. A., Mathew, S., Lund, R., Qiu, P. & Pratt, R. Hyperphosphatemia of chronic kidney disease. *Kidney Int.* **74**, 148-157, doi:10.1038/ki.2008.130 (2008).
- 38 Kestenbaum, B. *et al.* Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 520-528, doi:10.1681/ASN.2004070602 (2005).
- 39 Blacher, J., Guerin, A. P., Pannier, B., Marchais, S. J. & London, G. M. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension* **38**, 938-942 (2001).
- 40 Ganesh, S. K., Stack, A. G., Levin, N. W., Hulbert-Shearon, T. & Port, F. K. Association of elevated serum PO(4), Ca x PO(4) product, and parathyroid hormone with cardiac mortality risk in chronic hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 2131-2138 (2001).
- 41 Miller, P. D. The role of bone biopsy in patients with chronic renal failure. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **3 Suppl 3**, S140-150, doi:10.2215/CJN.02430508 (2008).
- 42 Demer, L. L. & Tintut, Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation* **117**, 2938-2948, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.743161 (2008).
- 43 Bellasi, A. *et al.* Correlation of simple imaging tests and coronary artery calcium measured by computed tomography in hemodialysis patients. *Kidney Int.* **70**, 1623-1628, doi:10.1038/sj.ki.5001820 (2006).
- 44 Cheung, A. K. *et al.* Cardiac diseases in maintenance hemodialysis patients: results of the HEMO Study. *Kidney Int.* **65**, 2380-2389, doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00657.x (2004).
- 45 Goodman, W. G. *et al.* Vascular calcification in chronic kidney disease. *Am. J. Kidney Dis.* **43**, 572-579, doi:10.1053/j.ajkd.2003.12.005 (2004).
- 46 Milliner, D. S., Zinsmeister, A. R., Lieberman, E. & Landing, B. Soft tissue calcification in pediatric patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.* **38**, 931-936, doi:10.1038/ki.1990.293 (1990).
- 47 Go, A. S., Chertow, G. M., Fan, D., McCulloch, C. E. & Hsu, C. Y. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *New Engl. J. Med.* **351**, 1296-1305, doi:10.1056/NEJMoa041031 (2004).
- 48 Eknoyan, G. *et al.* Effect of dialysis dose and membrane flux in maintenance hemodialysis. *New Engl. J. Med.* **347**, 2010-2019, doi:10.1056/NEJMoa021583 (2002).
- 49 Allon, M. Evidence-based cardiology in hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 1934-1943, doi:10.1681/ASN.2013060632 (2013).
- 50 Cannata-Andia, J. B. M., A.; Torregrosa, V. *Alteraciones del metabolismo óseo y mineral en la enfermedad renal crónica: avances en patogenia, diagnóstico y tratamiento* (2010).
- 51 Foley RN, P. P., Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **9(12 Suppl)** (1998).

- 52 Saran, R. *et al.* US Renal Data System 2015 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am. J. Kidney Dis.* **67**, Svii, S1-305, doi:10.1053/j.ajkd.2015.12.014 (2016).
- 53 de Jager DJ, G. D., Jager KJ, van Dijk PC, Tomas LM, Ansell D, Collart F, Finne P, Heaf JG, De Meester J, Wetzels JF, Rosendaal FR, Dekker FW. Cardiovascular and noncardiovascular mortality among patients starting dialysis. *JAMA* **302**, doi:10.1001 (2009).
- 54 Organization, W. H. *Cardiovascular diseases (CVDs)*, <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))> (2017).
- 55 Palit, S. & Kendrick, J. Vascular calcification in chronic kidney disease: role of disordered mineral metabolism. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 5829-5833, doi:10.2174/1381612820666140212194926 (2014).
- 56 Leonard, O., Spaak, J. & Goldsmith, D. Regression of vascular calcification in chronic kidney disease - feasible or fantasy? a review of the clinical evidence. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **76**, 560-572, doi:10.1111/bcp.12014 (2013).
- 57 Levin, A. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic kidney disease prior to dialysis. *Semin Dial* **16**, 101-105, doi:10.1046/j.1525-139x.2003.16025.x (2003).
- 58 Aronson, D. & Rayfield, E. J. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovasc Diabetol* **1**, 1 (2002).
- 59 Aronson, D. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Adv. Cardiol.* **45**, 1-16, doi:10.1159/000115118 (2008).
- 60 Anand, D. V. *et al.* Risk stratification in uncomplicated type 2 diabetes: prospective evaluation of the combined use of coronary artery calcium imaging and selective myocardial perfusion scintigraphy. *Eur. Heart J.* **27**, 713-721, doi:10.1093/eurheartj/ehi808 (2006).
- 61 Giachelli, C. M. Vascular calcification mechanisms. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 2959-2964, doi:10.1097/01.ASN.0000145894.57533.C4 (2004).
- 62 Hunt, J. L. *et al.* Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study. *Stroke* **33**, 1214-1219, doi:10.1161/01.str.0000013741.41309.67 (2002).
- 63 Edmonds, M. E., Morrison, N., Laws, J. W. & Watkins, P. J. Medial arterial calcification and diabetic neuropathy. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed).* **284**, 928-930, doi:10.1136/bmj.284.6320.928 (1982).
- 64 Salud, P. d. *Vasa vasorum – Qué es, definición, función, estructura, tipos*, <<https://periodicosalud.com/vasa-vasorum-que-es-definicion-funcion-estructura-tipos/>>
- 65 Raggi, P. *et al.* Cardiac calcification in adult hemodialysis patients. A link between end-stage renal disease and cardiovascular disease? *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 695-701, doi:10.1016/s0735-1097(01)01781-8 (2002).
- 66 Goodman, W. G. *et al.* Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1478-1483, doi:10.1056/NEJM200005183422003 (2000).
- 67 LeGeros, R. Z. Formation and transformation of calcium phosphates: relevance to vascular calcification. *Z. Kardiol.* **90 Suppl 3**, 116-124, doi:10.1007/s003920170032 (2001).

- 68 Farzaneh-Far, A., Proudfoot, D., Shanahan, C. & Weissberg, P. L. Vascular and valvar calcification: recent advances. *Heart* **85**, 13-17, doi:10.1136/heart.85.1.13 (2001).
- 69 Karwowski, W., Naumnik, B., Szczepanski, M. & Mysliwiec, M. The mechanism of vascular calcification - a systematic review. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* **18**, RA1-11, doi:10.12659/msm.882181 (2012).
- 70 Shroff, R. C. & Shanahan, C. M. The vascular biology of calcification. *Semin Dial* **20**, 103-109, doi:10.1111/j.1525-139X.2007.00255.x (2007).
- 71 Proudfoot, D. & Shanahan, C. M. Biology of calcification in vascular cells: intima versus media. *Herz* **26**, 245-251, doi:10.1007/pl00002027 (2001).
- 72 Ketteler, M., Rothe, H., Kruger, T., Biggar, P. H. & Schlieper, G. Mechanisms and treatment of extraosseous calcification in chronic kidney disease. *Nature reviews. Nephrology* **7**, 509-516, doi:10.1038/nrneph.2011.91 (2011).
- 73 Schlieper, G. *et al.* Ultrastructural analysis of vascular calcifications in uremia. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 689-696, doi:10.1681/ASN.2009080829 (2010).
- 74 Sigrist, M. K., Taal, M. W., Bungay, P. & McIntyre, C. W. Progressive vascular calcification over 2 years is associated with arterial stiffening and increased mortality in patients with stages 4 and 5 chronic kidney disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **2**, 1241-1248, doi:10.2215/CJN.02190507 (2007).
- 75 Shamseddin, M. K. & Parfrey, P. S. Sudden cardiac death in chronic kidney disease: epidemiology and prevention. *Nature reviews. Nephrology* **7**, 145-154, doi:10.1038/nrneph.2010.191 (2011).
- 76 London, G. M. *et al.* Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol. Dial. Transplant.* **18**, 1731-1740, doi:10.1093/ndt/gfg414 (2003).
- 77 Swaminathan, S. & Shah, S. V. Novel inflammatory mechanisms of accelerated atherosclerosis in kidney disease. *Kidney Int.* **80**, 453-463, doi:10.1038/ki.2011.178 (2011).
- 78 Berliner, J. A. *et al.* Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* **91**, 2488-2496, doi:10.1161/01.cir.91.9.2488 (1995).
- 79 Greenland, P. *et al.* 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* **122**, 2748-2764, doi:10.1161/CIR.0b013e3182051bab (2010).
- 80 Chen, W. & Melamed, M. L. Vascular calcification in predialysis CKD: common and deadly. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **10**, 551-553, doi:10.2215/CJN.01940215 (2015).
- 81 Farber, A. Chronic Limb-Threatening Ischemia. *New Engl. J. Med.* **379**, 171-180, doi:10.1056/NEJMcp1709326 (2018).
- 82 Ho, C. Y. & Shanahan, C. M. Medial arterial calcification: an overlooked player in peripheral arterial disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 1475-1482, doi:10.1161/ATVBAHA.116.306717 (2016).
- 83 Lanzer, P. *et al.* Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur. Heart J.* **35**, 1515-1525, doi:10.1093/eurheartj/ehu163 (2014).

I. INTRODUCCIÓN

- 84 Ohtake, T. *et al.* Impact of lower limbs' arterial calcification on the prevalence and severity of PAD in patients on hemodialysis. *J. Vasc. Surg.* **53**, 676-683, doi:10.1016/j.jvs.2010.09.070 (2011).
- 85 Chen, J. *et al.* Traditional and non-traditional risk factors for incident peripheral arterial disease among patients with chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **31**, 1145-1151, doi:10.1093/ndt/gfv418 (2016).
- 86 Shin, H. S. *et al.* Lower Extremity Arterial Calcification as a Predictor of Coronary Atherosclerosis in Patients with Peripheral Arterial Disease. *Iranian journal of radiology : a quarterly journal published by the Iranian Radiological Society* **13**, e33179, doi:10.5812/iranjradiol.33179 (2016).
- 87 Costacou, T., Huskey, N. D., Edmundowicz, D., Stolk, R. & Orchard, T. J. Lower-extremity arterial calcification as a correlate of coronary artery calcification. *Metabolism* **55**, 1689-1696, doi:10.1016/j.metabol.2006.08.012 (2006).
- 88 Shanahan, C. M. *et al.* Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* **100**, 2168-2176, doi:10.1161/01.cir.100.21.2168 (1999).
- 89 O'Neill, W. C., Han, K. H., Schneider, T. M. & Hennigar, R. A. Prevalence of nonatheromatous lesions in peripheral arterial disease. *Arterio. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 439-447, doi:10.1161/ATVBAHA.114.304764 (2015).
- 90 Ostergren, J. *et al.* Impact of ramipril in patients with evidence of clinical or subclinical peripheral arterial disease. *Eur. Heart J.* **25**, 17-24, doi:10.1016/j.ehj.2003.10.033 (2004).
- 91 Hiatt, W. R., Money, S. R. & Brass, E. P. Long-term safety of cilostazol in patients with peripheral artery disease: the CASTLE study (Cilostazol: A Study in Long-term Effects). *J. Vasc. Surg.* **47**, 330-336, doi:10.1016/j.jvs.2007.10.009 (2008).
- 92 Gerhard-Herman, M. D. *et al.* 2016 AHA/ACC Guideline on the Management of Patients with Lower Extremity Peripheral Artery Disease: Executive Summary. *Vasc. Med.* **22**, NP1-NP43, doi:10.1177/1358863X17701592 (2017).
- 93 Garimella, P. S. & Hirsch, A. T. Peripheral artery disease and chronic kidney disease: clinical synergy to improve outcomes. *Advances in chronic kidney disease* **21**, 460-471, doi:10.1053/j.ackd.2014.07.005 (2014).
- 94 Nigwekar, S. U., Thadhani, R. & Brandenburg, V. M. Calciphylaxis. *New Engl. J. Med.* **378**, 1704-1714, doi:10.1056/NEJMra1505292 (2018).
- 95 Hayashi, M. Calciphylaxis: diagnosis and clinical features. *Clinical and experimental nephrology* **17**, 498-503, doi:10.1007/s10157-013-0782-z (2013).
- 96 Angelis, M., Wong, L. L., Myers, S. A. & Wong, L. M. Calciphylaxis in patients on hemodialysis: a prevalence study. *Surgery* **122**, 1083-1089; discussion 1089-1090 (1997).
- 97 Weenig, R. H., Sewell, L. D., Davis, M. D., McCarthy, J. T. & Pittelkow, M. R. Calciphylaxis: natural history, risk factor analysis, and outcome. *J. Am. Acad. Dermatol.* **56**, 569-579, doi:10.1016/j.jaad.2006.08.065 (2007).
- 98 Nunley, J. R. Calciphylaxis: Background, Pathophysiology, Epidemiology. (2011). <<http://emedicine.medscape.com/article/1095481-overview#a4>>.

- 99 An, J. *et al.* Hyperbaric oxygen in the treatment of calciphylaxis: A case series and literature review. *Nephrology (Carlton)* **20**, 444-450, doi:10.1111/nep.12433 (2015).
- 100 Mann, D., Zipes, D., Libby, P. & Bonow, R. *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 10th Edition edn, (2014).
- 101 Hirsch, D., Azoury, R., Sarig, S. & Kruth, H. S. Colocalization of cholesterol and hydroxyapatite in human atherosclerotic lesions. *Calcif. Tissue Int.* **52**, 94-98, doi:10.1007/bf00308315 (1993).
- 102 *Cardiovascular Calcification and Bone Mineralization*. (2020).
- 103 Maher, E. R., Young, G., Smyth-Walsh, B., Pugh, S. & Curtis, J. R. Aortic and mitral valve calcification in patients with end-stage renal disease. *Lancet* **2**, 875-877, doi:10.1016/s0140-6736(87)91370-5 (1987).
- 104 Zentner, D. *et al.* Prospective evaluation of aortic stenosis in end-stage kidney disease: a more fulminant process? *Nephrol. Dial. Transplant.* **26**, 1651-1655, doi:10.1093/ndt/gfq596 (2011).
- 105 Straumann, E., Meyer, B., Misteli, M., Blumberg, A. & Jenzer, H. R. Aortic and mitral valve disease in patients with end stage renal failure on long-term haemodialysis. *Br. Heart J.* **67**, 236-239, doi:10.1136/hrt.67.3.236 (1992).
- 106 Nkomo, V. T. *et al.* Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet* **368**, 1005-1011, doi:10.1016/S0140-6736(06)69208-8 (2006).
- 107 Carabello, B. A. & Paulus, W. J. Aortic stenosis. *Lancet* **373**, 956-966, doi:10.1016/S0140-6736(09)60211-7 (2009).
- 108 Criqui, M. H. *et al.* Calcium density of coronary artery plaque and risk of incident cardiovascular events. *JAMA* **311**, 271-278, doi:10.1001/jama.2013.282535 (2014).
- 109 Antman, E. M. *et al.* ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of Patients with Acute Myocardial Infarction). *Circulation* **110**, e82-292 (2004).
- 110 Kalantar-Zadeh, K., Block, G., Humphreys, M. H. & Kopple, J. D. Reverse epidemiology of cardiovascular risk factors in maintenance dialysis patients. *Kidney Int.* **63**, 793-808, doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00803.x (2003).
- 111 Bundy, J. D. *et al.* Risk factors for progression of coronary artery calcification in patients with chronic kidney disease: The CRIC study. *Atherosclerosis* **271**, 53-60, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2018.02.009 (2018).
- 112 Wang, X. R., Zhang, J. J., Xu, X. X. & Wu, Y. G. Prevalence of coronary artery calcification and its association with mortality, cardiovascular events in patients with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Ren. Fail.* **41**, 244-256, doi:10.1080/0886022X.2019.1595646 (2019).
- 113 Parfrey, P. S. *et al.* Outcome and risk factors for left ventricular disorders in chronic uraemia. *Nephrol. Dial. Transplant.* **11**, 1277-1285 (1996).
- 114 Himmelfarb, J., Stenvinkel, P., Ikizler, T. A. & Hakim, R. M. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int.* **62**, 1524-1538, doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00600.x (2002).

- 115 Sarnak, M. J. *et al.* Chronic Kidney Disease and Coronary Artery Disease: JACC State-of-the-Art Review. *J. Am. Coll. Cardiol.* **74**, 1823-1838, doi:10.1016/j.jacc.2019.08.1017 (2019).
- 116 Sumida, Y. *et al.* Carotid artery calcification and atherosclerosis at the initiation of hemodialysis in patients with end-stage renal disease. *Clin. Nephrol.* **73**, 360-369, doi:10.5414/cnp73360 (2010).
- 117 Haraki, T. *et al.* Hyperhomocysteinemia, diabetes mellitus, and carotid atherosclerosis independently increase atherosclerotic vascular disease outcome in Japanese patients with end-stage renal disease. *Clin. Nephrol.* **56**, 132-139 (2001).
- 118 Blacher, J. *et al.* Carotid arterial stiffness as a predictor of cardiovascular and all-cause mortality in end-stage renal disease. *Hypertension* **32**, 570-574, doi:10.1161/01.hyp.32.3.570 (1998).
- 119 Nishizawa, Y. *et al.* Intima-media thickness of carotid artery predicts cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* **41**, S76-79, doi:10.1053/ajkd.2003.50090 (2003).
- 120 Nakayama, M. *et al.* Carotid artery calcification at the initiation of hemodialysis is a risk factor for cardiovascular events in patients with end-stage renal disease: a cohort study. *BMC Nephrol* **12**, 56, doi:10.1186/1471-2369-12-56 (2011).
- 121 Cardellini, M. *et al.* Chronic Kidney Disease Is Linked to Carotid Nodular Calcification, An Unstable Plaque Not Correlated to Inflammation. *Aging and disease* **10**, 71-81, doi:10.14336/AD.2018.0117 (2019).
- 122 Kockelkoren, R. *et al.* Computed Tomographic Distinction of Intimal and Medial Calcification in the Intracranial Internal Carotid Artery. *PloS one* **12**, e0168360, doi:10.1371/journal.pone.0168360 (2017).
- 123 Wang, H. H., Hung, S. Y., Sung, J. M., Hung, K. Y. & Wang, J. D. Risk of stroke in long-term dialysis patients compared with the general population. *Am. J. Kidney Dis.* **63**, 604-611, doi:10.1053/j.ajkd.2013.10.013 (2014).
- 124 Power, A. Stroke in dialysis and chronic kidney disease. *Blood Purif.* **36**, 179-183, doi:10.1159/000356086 (2013).
- 125 Salgueira, M. & Palma, A. Diagnóstico y seguimiento de calcificaciones vasculares en la insuficiencia renal crónica. *Nefrología : publicación oficial de la Sociedad Española Nefrología* **24**, 199-306 (2004).
- 126 Kauppila, L. I. *et al.* New indices to classify location, severity and progression of calcific lesions in the abdominal aorta: a 25-year follow-up study. *Atherosclerosis* **132**, 245-250, doi:10.1016/s0021-9150(97)00106-8 (1997).
- 127 Adragao, T. *et al.* A simple vascular calcification score predicts cardiovascular risk in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19**, 1480-1488, doi:10.1093/ndt/gfh217 (2004).
- 128 Speer, M. Y. & Giachelli, C. M. Regulation of cardiovascular calcification. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* **13**, 63-70, doi:10.1016/S1054-8807(03)00130-3 (2004).
- 129 Schoppet, M., Shroff, R. C., Hofbauer, L. C. & Shanahan, C. M. Exploring the biology of vascular calcification in chronic kidney disease: what's circulating? *Kidney Int.* **73**, 384-390, doi:10.1038/sj.ki.5002696 (2008).

- 130 Ibel, L. S. *et al.* Arterial calcification and pathology in uremic patients undergoing dialysis. *Am. J. Med.* **66**, 790-796, doi:10.1016/0002-9343(79)91118-5 (1979).
- 131 Shanahan, C. M. Mechanisms of vascular calcification in renal disease. *Clin. Nephrol.* **63**, 146-157, doi:10.5414/cnp63146 (2005).
- 132 Tomazic, B. B. Physiochemical principles of cardiovascular calcification. *Z. Kardiol.* **90 Suppl 3**, 68-80, doi:10.1007/s003920170046 (2001).
- 133 Proudfoot, D. *et al.* Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circul. Res.* **87**, 1055-1062, doi:10.1161/01.res.87.11.1055 (2000).
- 134 Reynolds, J. L. *et al.* Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 2857-2867, doi:10.1097/01.ASN.0000141960.01035.28 (2004).
- 135 Reynolds, J. L. *et al.* Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 2920-2930, doi:10.1681/ASN.2004100895 (2005).
- 136 Villa-Bellosta, R., Bogaert, Y. E., Levi, M. & Sorribas, V. Characterization of phosphate transport in rat vascular smooth muscle cells: implications for vascular calcification. *Arterio. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 1030-1036, doi:10.1161/ATVBAHA.106.132266 (2007).
- 137 Jono, S. *et al.* Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ. Res.* **87**, E10-17 (2000).
- 138 Moe, S. M., Duan, D., Doehle, B. P., O'Neill, K. D. & Chen, N. X. Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney Int.* **63**, 1003-1011, doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00820.x (2003).
- 139 Chen, N. X., O'Neill, K. D., Duan, D. & Moe, S. M. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* **62**, 1724-1731, doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00625.x (2002).
- 140 Tintut, Y., Patel, J., Parhami, F. & Demer, L. L. Tumor necrosis factor- α promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation* **102**, 2636-2642, doi:10.1161/01.cir.102.21.2636 (2000).
- 141 Stenvinkel, P. *et al.* IL-10, IL-6, and TNF- α : central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int.* **67**, 1216-1233, doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00200.x (2005).
- 142 Watson, K. E., Parhami, F., Shin, V. & Demer, L. L. Fibronectin and collagen I matrixes promote calcification of vascular cells in vitro, whereas collagen IV matrix is inhibitory. *Arterio. Thromb. Vasc. Biol.* **18**, 1964-1971, doi:10.1161/01.atv.18.12.1964 (1998).
- 143 Watson, K. E. *et al.* TGF- β 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J. Clin. Invest.* **93**, 2106-2113, doi:10.1172/JCI117205 (1994).
- 144 Hunter, G. K., Hauschka, P. V., Poole, A. R., Rosenberg, L. C. & Goldberg, H. A. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem. J.* **317**, 59 - 64 (1996).
- 145 Romberg, R. W., Werness, P. G., Riggs, B. L. & Mann, K. G. Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. *Biochemistry (Mosc).* **25**, 1176-1180, doi:10.1021/bi00353a035 (1986).

- 146 Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L. & Karsenty, G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **89**, 747-754, doi:10.1016/s0092-8674(00)80257-3 (1997).
- 147 Estepa, J. C. *et al.* Effect of phosphate on parathyroid hormone secretion in vivo. *J. Bone Miner. Res.* **14**, 1848-1854, doi:10.1359/jbmr.1999.14.11.1848 (1999).
- 148 Lomashvili, K. A., Cobbs, S., Hennigar, R. A., Hardcastle, K. I. & O'Neill, W. C. Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and osteopontin. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 1392-1401, doi:10.1097/01.ASN.0000128955.83129.9C (2004).
- 149 Shioi, A. *et al.* Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: roles of tumor necrosis factor- α and oncostatin M derived from macrophages. *Circul. Res.* **91**, 9-16, doi:10.1161/01.res.0000026421.61398.f2 (2002).
- 150 Shantouf, R. *et al.* Association of serum alkaline phosphatase with coronary artery calcification in maintenance hemodialysis patients. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **4**, 1106-1114, doi:10.2215/CJN.06091108 (2009).
- 151 Bostrom, K. I., Jumabay, M., Matveyenko, A., Nicholas, S. B. & Yao, Y. Activation of vascular bone morphogenetic protein signaling in diabetes mellitus. *Circ. Res.* **108**, 446-457, doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.236596 (2011).
- 152 Gundberg, C. M., Hauschka, P. V., Lian, J. B. & Gallop, P. M. Osteocalcin: isolation, characterization, and detection. *Methods Enzymol.* **107**, 516-544, doi:10.1016/0076-6879(84)07036-1 (1984).
- 153 Li, J., Zhang, H., Yang, C., Li, Y. & Dai, Z. An overview of osteocalcin progress. *J. Bone Miner. Metab.* **34**, 367-379, doi:10.1007/s00774-015-0734-7 (2016).
- 154 Evrard, S., Delanaye, P., Kamel, S., Cristol, J. P. & Cavalier, E. Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers. *Clin. Chim. Acta* **438**, 401-414, doi:10.1016/j.cca.2014.08.034 (2015).
- 155 Millar, S. A., Patel, H., Anderson, S. I., England, T. J. & O'Sullivan, S. E. Osteocalcin, Vascular Calcification, and Atherosclerosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Frontiers in endocrinology* **8**, 183, doi:10.3389/fendo.2017.00183 (2017).
- 156 Rashdan, N. A. *et al.* Osteocalcin Regulates Arterial Calcification Via Altered Wnt Signaling and Glucose Metabolism. *J. Bone Miner. Res.* **35**, 357-367, doi:10.1002/jbmr.3888 (2020).
- 157 Lacey, D. L. *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**, 165-176, doi:10.1016/s0092-8674(00)81569-x (1998).
- 158 Hsu, H. *et al.* Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3540-3545, doi:10.1073/pnas.96.7.3540 (1999).
- 159 Panizo, S. *et al.* RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circul. Res.* **104**, 1041-1048, doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.189001 (2009).
- 160 Murshed, M., Schinke, T., McKee, M. D. & Karsenty, G. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J. Cell Biol.* **165**, 625-630, doi:10.1083/jcb.200402046 (2004).

I. INTRODUCCIÓN

- 161 O'Young, J. *et al.* Matrix Gla protein inhibits ectopic calcification by a direct interaction with hydroxyapatite crystals. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 18406-18412, doi:10.1021/ja207628k (2011).
- 162 Wallin, R., Cain, D. & Sane, D. C. Matrix Gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells--a cell system which resembles the system in bone cells. *Thromb. Haemost.* **82**, 1764-1767 (1999).
- 163 Hauschka, P. V., Lian, J. B., Cole, D. E. & Gundberg, C. M. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol. Rev.* **69**, 990-1047, doi:10.1152/physrev.1989.69.3.990 (1989).
- 164 Tyson, K. L. *et al.* Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterio. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 489-494, doi:10.1161/01.ATV.0000059406.92165.31 (2003).
- 165 Luo, G. *et al.* Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* **386**, 78-81, doi:10.1038/386078a0 (1997).
- 166 Schurgers, L. J. *et al.* Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification. *Arterio. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1629-1633, doi:10.1161/01.ATV.0000173313.46222.43 (2005).
- 167 Kruger, T. *et al.* Warfarin induces cardiovascular damage in mice. *Arterio. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 2618-2624, doi:10.1161/ATVBAHA.113.302244 (2013).
- 168 Rennenberg, R. J. *et al.* Chronic coumarin treatment is associated with increased extracoronary arterial calcification in humans. *Blood* **115**, 5121-5123, doi:10.1182/blood-2010-01-264598 (2010).
- 169 Yao, Y., Shahbazian, A. & Bostrom, K. I. Proline and gamma-carboxylated glutamate residues in matrix Gla protein are critical for binding of bone morphogenetic protein-4. *Circul. Res.* **102**, 1065-1074, doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.166124 (2008).
- 170 Mazzaferro, S. *et al.* News on biomarkers in CKD-MBD. *Semin. Nephrol.* **34**, 598-611, doi:10.1016/j.semnephrol.2014.09.006 (2014).
- 171 Jia, G., Stormont, R. M., Gangahar, D. M. & Agrawal, D. K. Role of matrix Gla protein in angiotensin II-induced exacerbation of vascular calcification. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **303**, H523-532, doi:10.1152/ajpheart.00826.2011 (2012).
- 172 Boyle, W. J., Simonet, W. S. & Lacey, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**, 337-342, doi:10.1038/nature01658 (2003).
- 173 Bucay, N. *et al.* osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* **12**, 1260-1268, doi:10.1101/gad.12.9.1260 (1998).
- 174 Moe, S. M. *et al.* Role of calcification inhibitors in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease (CKD). *Kidney Int.* **67**, 2295-2304, doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00333.x (2005).
- 175 Kiechl, S. *et al.* Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease. *Circulation* **109**, 2175-2180, doi:10.1161/01.CIR.0000127957.43874.BB (2004).
- 176 Nitta, K. *et al.* Serum osteoprotegerin levels and the extent of vascular calcification in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19**, 1886-1889, doi:10.1093/ndt/gfh263 (2004).

- 177 Spartalis, M. & Papagianni, A. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoprotegerin axis and vascular calcifications in patients with chronic kidney disease. *World journal of nephrology* **5**, 1-5, doi:10.5527/wjn.v5.i1.1 (2016).
- 178 Chen, Y., Bal, B. S. & Gorski, J. P. Calcium and collagen binding properties of osteopontin, bone sialoprotein, and bone acidic glycoprotein-75 from bone. *J. Biol. Chem.* **267**, 24871-24878 (1992).
- 179 Hirota, S. *et al.* Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in atherosclerotic plaques. A possible association with calcification. *Am. J. Pathol.* **143**, 1003-1008 (1993).
- 180 Fitzpatrick, L. A., Severson, A., Edwards, W. D. & Ingram, R. T. Diffuse calcification in human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* **94**, 1597-1604, doi:10.1172/JCI117501 (1994).
- 181 Speer, M. Y. *et al.* Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J. Exp. Med.* **196**, 1047-1055, doi:10.1084/jem.20020911 (2002).
- 182 Wada, T., McKee, M. D., Steitz, S. & Giachelli, C. M. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. *Circul. Res.* **84**, 166-178, doi:10.1161/01.res.84.2.166 (1999).
- 183 Steitz, S. A. *et al.* Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am. J. Pathol.* **161**, 2035-2046, doi:10.1016/S0002-9440(10)64482-3 (2002).
- 184 Schafer, C. *et al.* The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J. Clin. Invest.* **112**, 357-366, doi:10.1172/JCI17202 (2003).
- 185 Schlieper, G., Westenfeld, R., Brandenburg, V. & Ketteler, M. Inhibitors of calcification in blood and urine. *Semin Dial* **20**, 113-121, doi:10.1111/j.1525-139X.2007.00257.x (2007).
- 186 Ketteler, M. *et al.* Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet* **361**, 827-833, doi:10.1016/S0140-6736(03)12710-9 (2003).
- 187 Heiss, A. *et al.* Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J. Biol. Chem.* **278**, 13333-13341, doi:10.1074/jbc.M210868200 (2003).
- 188 O'Neill, W. C. & Lomashvili, K. A. Recent progress in the treatment of vascular calcification. *Kidney Int.* **78**, 1232-1239, doi:10.1038/ki.2010.334 (2010).
- 189 Torregrosa, J. V. *et al.* Successful treatment of calcific uraemic arteriopathy with bisphosphonates. *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia* **32**, 329-334, doi:10.3265/Nefrologia.pre2012.Jan.11137 (2012).
- 190 de Oliveira, R. B. *et al.* Peritoneal delivery of sodium pyrophosphate blocks the progression of pre-existing vascular calcification in uremic apolipoprotein-E knockout mice. *Calcif. Tissue Int.* **97**, 179-192, doi:10.1007/s00223-015-0020-7 (2015).
- 191 O'Neill, W. C., Lomashvili, K. A., Malluche, H. H., Faugere, M. C. & Riser, B. L. Treatment with pyrophosphate inhibits uremic vascular calcification. *Kidney Int.* **79**, 512-517, doi:10.1038/ki.2010.461 (2011).

- 192 Price, P. A., Roublick, A. M. & Williamson, M. K. Artery calcification in uremic rats is increased by a low protein diet and prevented by treatment with ibandronate. *Kidney Int.* **70**, 1577-1583, doi:10.1038/sj.ki.5001841 (2006).
- 193 Ariyoshi, T., Eishi, K., Sakamoto, I., Matsukuma, S. & Odate, T. Effect of etidronic acid on arterial calcification in dialysis patients. *Clinical drug investigation* **26**, 215-222, doi:10.2165/00044011-200626040-00006 (2006).
- 194 Pasch, A. *et al.* Sodium thiosulfate prevents vascular calcifications in uremic rats. *Kidney Int.* **74**, 1444-1453, doi:10.1038/ki.2008.455 (2008).
- 195 Djuric, P. *et al.* Sodium thiosulphate and progression of vascular calcification in end-stage renal disease patients: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Nephrol. Dial. Transplant.* **35**, 162-169, doi:10.1093/ndt/gfz204 (2020).
- 196 Nigwekar, S. U. *et al.* Sodium thiosulfate therapy for calcific uremic arteriolopathy. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **8**, 1162-1170, doi:10.2215/CJN.09880912 (2013).
- 197 Giachelli, C. M. *et al.* Vascular calcification and inorganic phosphate. *Am. J. Kidney Dis.* **38**, S34-37, doi:10.1053/ajkd.2001.27394 (2001).
- 198 Yamada, S. *et al.* Phosphate overload directly induces systemic inflammation and malnutrition as well as vascular calcification in uremia. *American journal of physiology. Renal physiology* **306**, F1418-1428, doi:10.1152/ajprenal.00633.2013 (2014).
- 199 Al-Aly, Z. Phosphate, oxidative stress, and nuclear factor-kappaB activation in vascular calcification. *Kidney Int.* **79**, 1044-1047, doi:10.1038/ki.2010.548 (2011).
- 200 Floege, J. Calcium-containing phosphate binders in dialysis patients with cardiovascular calcifications: should we CARE-2 avoid them? *Nephrol. Dial. Transplant.* **23**, 3050-3052, doi:10.1093/ndt/gfn393 (2008).
- 201 Chertow, G. M., Burke, S. K. & Raggi, P. Sevelamer attenuates the progression of coronary and aortic calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int.* **62**, 245-252, doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00434.x (2002).
- 202 Raggi, P., Bommer, J. & Chertow, G. M. Valvular calcification in hemodialysis patients randomized to calcium-based phosphorus binders or sevelamer. *J. Heart Valve Dis.* **13**, 134-141 (2004).
- 203 Chertow, G. M. *et al.* Determinants of progressive vascular calcification in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19**, 1489-1496, doi:10.1093/ndt/gfh125 (2004).
- 204 Suki, W. N. *et al.* Effects of sevelamer and calcium-based phosphate binders on mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int.* **72**, 1130-1137, doi:10.1038/sj.ki.5002466 (2007).
- 205 St Peter, W. L., Liu, J., Weinhandl, E. & Fan, Q. A comparison of sevelamer and calcium-based phosphate binders on mortality, hospitalization, and morbidity in hemodialysis: a secondary analysis of the Dialysis Clinical Outcomes Revisited (DCOR) randomized trial using claims data. *Am. J. Kidney Dis.* **51**, 445-454, doi:10.1053/j.ajkd.2007.12.002 (2008).
- 206 Komaba, H. *et al.* Survival advantage of lanthanum carbonate for hemodialysis patients with uncontrolled hyperphosphatemia. *Nephrol. Dial. Transplant.* **30**, 107-114, doi:10.1093/ndt/gfu335 (2015).
- 207 Kakuta, T. *et al.* Effect of sevelamer and calcium-based phosphate binders on coronary artery calcification and accumulation of circulating advanced glycation end products in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* **57**, 422-431, doi:10.1053/j.ajkd.2010.10.055 (2011).

- 208 Toussaint, N. D., Lau, K. K., Polkinghorne, K. R. & Kerr, P. G. Attenuation of aortic calcification with lanthanum carbonate versus calcium-based phosphate binders in haemodialysis: A pilot randomized controlled trial. *Nephrology (Carlton)* **16**, 290-298, doi:10.1111/j.1440-1797.2010.01412.x (2011).
- 209 Jamal, S. A. *et al.* Effect of calcium-based versus non-calcium-based phosphate binders on mortality in patients with chronic kidney disease: an updated systematic review and meta-analysis. *Lancet* **382**, 1268-1277, doi:10.1016/S0140-6736(13)60897-1 (2013).
- 210 Block, G. A. *et al.* Effects of phosphate binders in moderate CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**, 1407-1415, doi:10.1681/ASN.2012030223 (2012).
- 211 Ix, J. H. *et al.* Effects of Nicotinamide and Lanthanum Carbonate on Serum Phosphate and Fibroblast Growth Factor-23 in CKD: The COMBINE Trial. *J. Am. Soc. Nephrol.* **30**, 1096-1108, doi:10.1681/ASN.2018101058 (2019).
- 212 Lioufas, N. *et al.* Can we IMPROVE cardiovascular outcomes through phosphate lowering in CKD? Rationale and protocol for the IMpact of Phosphate Reduction On Vascular End-points in Chronic Kidney Disease (IMPROVE-CKD) study. *BMJ open* **9**, e024382, doi:10.1136/bmjopen-2018-024382 (2019).
- 213 Dusso, A. S. Kidney disease and vitamin D levels: 25-hydroxyvitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D, and VDR activation. *Kidney Int Suppl (2011)* **1**, 136-141, doi:10.1038/kisup.2011.30 (2011).
- 214 Bover, J. *et al.* Clinical Uses of 1,25-dihydroxy-19-nor-vitamin D(2) (Paricalcitol). *Current vascular pharmacology* **12**, 313-323, doi:10.2174/15701611113119990028 (2014).
- 215 Bover, J. *et al.* Vitamin D, vitamin D receptor and the importance of its activation in patients with chronic kidney disease. *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia* **35**, 28-41, doi:10.3265/Nefrologia.pre2014.Sep.11796 (2015).
- 216 Craver, L. *et al.* Mineral metabolism parameters throughout chronic kidney disease stages 1-5--achievement of K/DOQI target ranges. *Nephrol. Dial. Transplant.* **22**, 1171-1176, doi:10.1093/ndt/gfl718 (2007).
- 217 Wolf, M. *et al.* Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients. *Kidney Int.* **72**, 1004-1013, doi:10.1038/sj.ki.5002451 (2007).
- 218 Naves-Diaz, M. *et al.* Low calcidiol levels and risk of progression of aortic calcification. *Osteoporosis Int.* **23**, 1177-1182, doi:10.1007/s00198-011-1550-0 (2012).
- 219 Matias, P. J. *et al.* 25-Hydroxyvitamin D3, arterial calcifications and cardiovascular risk markers in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **24**, 611-618, doi:10.1093/ndt/gfn502 (2009).
- 220 Goodman, W. G. *et al.* Development of adynamic bone in patients with secondary hyperparathyroidism after intermittent calcitriol therapy. *Kidney Int.* **46**, 1160-1166, doi:10.1038/ki.1994.380 (1994).
- 221 Quarles, L. D. *et al.* Prospective trial of pulse oral versus intravenous calcitriol treatment of hyperparathyroidism in ESRD. *Kidney Int.* **45**, 1710-1721, doi:10.1038/ki.1994.223 (1994).
- 222 Cardus, A., Panizo, S., Parisi, E., Fernandez, E. & Valdivielso, J. M. Differential effects of vitamin D analogs on vascular calcification. *J. Bone Miner. Res.* **22**, 860-866, doi:10.1359/jbmr.070305 (2007).

- 223 Mizobuchi, M., Finch, J. L., Martin, D. R. & Slatopolsky, E. Differential effects of vitamin D receptor activators on vascular calcification in uremic rats. *Kidney Int.* **72**, 709-715, doi:10.1038/sj.ki.5002406 (2007).
- 224 Lau, W. L. *et al.* Vitamin D receptor agonists increase klotho and osteopontin while decreasing aortic calcification in mice with chronic kidney disease fed a high phosphate diet. *Kidney Int.* **82**, 1261-1270, doi:10.1038/ki.2012.322 (2012).
- 225 Martinez-Moreno, J. M. *et al.* In vascular smooth muscle cells paricalcitol prevents phosphate-induced Wnt/beta-catenin activation. *American journal of physiology. Renal physiology* **303**, F1136-1144, doi:10.1152/ajprenal.00684.2011 (2012).
- 226 Teng, M. *et al.* Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. *New Engl. J. Med.* **349**, 446-456, doi:10.1056/NEJMoa022536 (2003).
- 227 Vervloet, M. G. & Twisk, J. W. Mortality reduction by vitamin D receptor activation in end-stage renal disease: a commentary on the robustness of current data. *Nephrol. Dial. Transplant.* **24**, 703-706, doi:10.1093/ndt/gfn492 (2009).
- 228 Nemeth, E. F. *et al.* Pharmacodynamics of the type II calcimimetic compound cinacalcet HCl. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **308**, 627-635, doi:10.1124/jpet.103.057273 (2004).
- 229 Nemeth, E. F. *et al.* Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 4040-4045, doi:10.1073/pnas.95.7.4040 (1998).
- 230 Hammerland, L. G., Garrett, J. E., Hung, B. C., Levinthal, C. & Nemeth, E. F. Allosteric activation of the Ca²⁺ receptor expressed in *Xenopus laevis* oocytes by NPS 467 or NPS 568. *Mol. Pharmacol.* **53**, 1083-1088 (1998).
- 231 Mendoza, F. J. *et al.* Effect of calcium and the calcimimetic AMG 641 on matrix-Gla protein in vascular smooth muscle cells. *Calcif. Tissue Int.* **88**, 169-178, doi:10.1007/s00223-010-9442-4 (2011).
- 232 Ivanovski, O. *et al.* The calcimimetic R-568 retards uremia-enhanced vascular calcification and atherosclerosis in apolipoprotein E deficient (apoE^{-/-}) mice. *Atherosclerosis* **205**, 55-62, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.10.043 (2009).
- 233 Alam, M. U. *et al.* Calcification is associated with loss of functional calcium-sensing receptor in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* **81**, 260-268, doi:10.1093/cvr/cvn279 (2009).
- 234 Joki, N. *et al.* Effects of calcimimetic on vascular calcification and atherosclerosis in uremic mice. *Bone* **45 Suppl 1**, S30-34, doi:10.1016/j.bone.2009.03.653 (2009).
- 235 Koleganova, N., Piecha, G., Ritz, E., Schmitt, C. P. & Gross, M. L. A calcimimetic (R-568), but not calcitriol, prevents vascular remodeling in uremia. *Kidney Int.* **75**, 60-71, doi:10.1038/ki.2008.490 (2009).
- 236 Lopez, I. *et al.* The effect of calcitriol, paricalcitol, and a calcimimetic on extraosseous calcifications in uremic rats. *Kidney Int.* **73**, 300-307, doi:10.1038/sj.ki.5002675 (2008).
- 237 Raggi, P. *et al.* The ADVANCE study: a randomized study to evaluate the effects of cinacalcet plus low-dose vitamin D on vascular calcification in patients on hemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **26**, 1327-1339, doi:10.1093/ndt/gfq725 (2011).
- 238 Chertow, G. M. *et al.* Effect of cinacalcet on cardiovascular disease in patients undergoing dialysis. *N. Engl. J. Med.* **367**, 2482-2494, doi:10.1056/NEJMoa1205624 (2012).

- 239 Parfrey, P. S. *et al.* The Effects of Cinacalcet in Older and Younger Patients on Hemodialysis: The Evaluation of Cinacalcet HCl Therapy to Lower Cardiovascular Events (EVOLVE) Trial. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **10**, 791-799, doi:10.2215/CJN.07730814 (2015).
- 240 Block, G. A. *et al.* Effect of Etelcalcetide vs Placebo on Serum Parathyroid Hormone in Patients Receiving Hemodialysis With Secondary Hyperparathyroidism: Two Randomized Clinical Trials. *JAMA* **317**, 146-155, doi:10.1001/jama.2016.19456 (2017).
- 241 Wolf, M. *et al.* Effects of etelcalcetide on fibroblast growth factor 23 in patients with secondary hyperparathyroidism receiving hemodialysis. *Clinical kidney journal* **13**, 75-84, doi:10.1093/ckj/sfz034 (2020).
- 242 Block, G. A. *et al.* Effect of Etelcalcetide vs Cinacalcet on Serum Parathyroid Hormone in Patients Receiving Hemodialysis With Secondary Hyperparathyroidism: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **317**, 156-164, doi:10.1001/jama.2016.19468 (2017).
- 243 Floege, J., Kubo, Y., Floege, A., Chertow, G. M. & Parfrey, P. S. The Effect of Cinacalcet on Calcific Uremic Arteriolopathy Events in Patients Receiving Hemodialysis: The EVOLVE Trial. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **10**, 800-807, doi:10.2215/CJN.10221014 (2015).
- 244 Wajih, N., Borrás, T., Xue, W., Hutson, S. M. & Wallin, R. Processing and transport of matrix gamma-carboxyglutamic acid protein and bone morphogenetic protein-2 in cultured human vascular smooth muscle cells: evidence for an uptake mechanism for serum fetuin. *J. Biol. Chem.* **279**, 43052-43060, doi:10.1074/jbc.M407180200 (2004).
- 245 Schurgers, L. J. *et al.* The circulating inactive form of matrix gla protein is a surrogate marker for vascular calcification in chronic kidney disease: a preliminary report. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **5**, 568-575, doi:10.2215/CJN.07081009 (2010).
- 246 Schlieper, G. *et al.* Circulating nonphosphorylated carboxylated matrix gla protein predicts survival in ESRD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 387-395, doi:10.1681/ASN.2010040339 (2011).
- 247 Cranenburg, E. C. *et al.* Vitamin K intake and status are low in hemodialysis patients. *Kidney Int.* **82**, 605-610, doi:10.1038/ki.2012.191 (2012).
- 248 Palaniswamy, C., Sekhri, A., Aronow, W. S., Kalra, A. & Peterson, S. J. Association of warfarin use with valvular and vascular calcification: a review. *Clin. Cardiol.* **34**, 74-81, doi:10.1002/clc.20865 (2011).
- 249 Krueger, T., Westenfeld, R., Ketteler, M., Schurgers, L. J. & Floege, J. Vitamin K deficiency in CKD patients: a modifiable risk factor for vascular calcification? *Kidney Int.* **76**, 18-22, doi:10.1038/ki.2009.126 (2009).
- 250 Westenfeld, R. *et al.* Effect of vitamin K2 supplementation on functional vitamin K deficiency in hemodialysis patients: a randomized trial. *Am. J. Kidney Dis.* **59**, 186-195, doi:10.1053/j.ajkd.2011.10.041 (2012).
- 251 Krueger, T. *et al.* Vitamin K1 to slow vascular calcification in haemodialysis patients (VitaVasK trial): a rationale and study protocol. *Nephrol. Dial. Transplant.* **29**, 1633-1638, doi:10.1093/ndt/gft459 (2014).
- 252 Holden, R. M. *et al.* Inhibiting the progression of arterial calcification with vitamin K in HemoDialysis patients (iPACK-HD) trial: rationale and study design for a randomized trial of vitamin K in patients with end stage kidney disease. *Canadian journal of kidney health and disease* **2**, 17, doi:10.1186/s40697-015-0053-x (2015).

I. INTRODUCCIÓN

- 253 Nigwekar, S. in *kidney Week - American Society of Nephrology* Vol. 30 (Journal of the American Society of Nephrology, Washington, DC., 2019).
- 254 Caluwe, R., Pyfferoen, L., De Boeck, K. & De Vriese, A. S. The effects of vitamin K supplementation and vitamin K antagonists on progression of vascular calcification: ongoing randomized controlled trials. *Clinical kidney journal* **9**, 273-279, doi:10.1093/ckj/sfv146 (2016).
- 255 Barrios, V. & Gorriz, J. L. Atrial fibrillation and chronic kidney disease: focus on rivaroxaban. *Journal of comparative effectiveness research* **4**, 651-664, doi:10.2217/cer.15.44 (2015).
- 256 Bai, Y. *et al.* Magnesium prevents beta-glycerophosphate-induced calcification in rat aortic vascular smooth muscle cells. *Biomedical reports* **3**, 593-597, doi:10.3892/br.2015.473 (2015).
- 257 Kircelli, F. *et al.* Magnesium reduces calcification in bovine vascular smooth muscle cells in a dose-dependent manner. *Nephrol. Dial. Transplant.* **27**, 514-521, doi:10.1093/ndt/gfr321 (2012).
- 258 Louvet, L., Metzinger, L., Buchel, J., Steppan, S. & Massy, Z. A. Magnesium Attenuates Phosphate-Induced Deregulation of a MicroRNA Signature and Prevents Modulation of Smad1 and Osterix during the Course of Vascular Calcification. *BioMed research international* **2016**, 7419524, doi:10.1155/2016/7419524 (2016).
- 259 Montes de Oca, A. *et al.* Magnesium inhibits Wnt/beta-catenin activity and reverses the osteogenic transformation of vascular smooth muscle cells. *PloS one* **9**, e89525, doi:10.1371/journal.pone.0089525 (2014).
- 260 Ter Braake, A. D., Tinnemans, P. T., Shanahan, C. M., Hoenderop, J. G. J. & de Baaij, J. H. F. Magnesium prevents vascular calcification in vitro by inhibition of hydroxyapatite crystal formation. *Scientific reports* **8**, 2069, doi:10.1038/s41598-018-20241-3 (2018).
- 261 Diaz-Tocados, J. M. *et al.* Dietary magnesium supplementation prevents and reverses vascular and soft tissue calcifications in uremic rats. *Kidney Int.* **92**, 1084-1099, doi:10.1016/j.kint.2017.04.011 (2017).
- 262 Ishimura, E. *et al.* Significant association between the presence of peripheral vascular calcification and lower serum magnesium in hemodialysis patients. *Clin. Nephrol.* **68**, 222-227, doi:10.5414/cnp68222 (2007).
- 263 Tzanakis, I. *et al.* Intra- and extracellular magnesium levels and atheromatosis in haemodialysis patients. *Magnes. Res.* **17**, 102-108 (2004).
- 264 Tzanakis, I. *et al.* Mitral annular calcifications in haemodialysis patients: a possible protective role of magnesium. *Nephrol. Dial. Transplant.* **12**, 2036-2037 (1997).
- 265 de Roij van Zuidewijn, C. L. *et al.* Serum Magnesium and Sudden Death in European Hemodialysis Patients. *PloS one* **10**, e0143104, doi:10.1371/journal.pone.0143104 (2015).
- 266 Kieboom, B. C. *et al.* Serum Magnesium and the Risk of Death From Coronary Heart Disease and Sudden Cardiac Death. *Journal of the American Heart Association* **5**, doi:10.1161/JAHA.115.002707 (2016).
- 267 Tzanakis, I. P. *et al.* Magnesium retards the progress of the arterial calcifications in hemodialysis patients: a pilot study. *Int. Urol. Nephrol.* **46**, 2199-2205, doi:10.1007/s11255-014-0751-9 (2014).

- 268 Spiegel, D. M. & Farmer, B. Long-term effects of magnesium carbonate on coronary artery calcification and bone mineral density in hemodialysis patients: a pilot study. *Hemodialysis international. International Symposium on Home Hemodialysis* **13**, 453-459, doi:10.1111/j.1542-4758.2009.00364.x (2009).
- 269 Turgut, F. *et al.* Magnesium supplementation helps to improve carotid intima media thickness in patients on hemodialysis. *Int. Urol. Nephrol.* **40**, 1075-1082, doi:10.1007/s11255-008-9410-3 (2008).
- 270 Bressendorff, I. *et al.* Oral Magnesium Supplementation in Chronic Kidney Disease Stages 3 and 4: Efficacy, Safety, and Effect on Serum Calcification Propensity-A Prospective Randomized Double-Blinded Placebo-Controlled Clinical Trial. *Kidney international reports* **2**, 380-389, doi:10.1016/j.ekir.2016.12.008 (2017).
- 271 Sakaguchi, Y. *et al.* A Randomized Trial of Magnesium Oxide and Oral Carbon Adsorbent for Coronary Artery Calcification in Predialysis CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **30**, 1073-1085, doi:10.1681/ASN.2018111150 (2019).
- 272 Bressendorff, I., Hansen, D., Schou, M., Kragelund, C. & Brandi, L. The effect of magnesium supplementation on vascular calcification in chronic kidney disease-a randomised clinical trial (MAGiCAL-CKD): essential study design and rationale. *BMJ open* **7**, e016795, doi:10.1136/bmjopen-2017-016795 (2017).
- 273 Karageuzyan, K. G. Oxidative stress in the molecular mechanism of pathogenesis at different diseased states of organism in clinics and experiment. *Current drug targets. Inflammation and allergy* **4**, 85-98, doi:10.2174/1568010053622939 (2005).
- 274 Baskin, S. I., Horowitz, A. M. & Nealley, E. W. The antidotal action of sodium nitrite and sodium thiosulfate against cyanide poisoning. *J. Clin. Pharmacol.* **32**, 368-375, doi:10.1002/j.1552-4604.1992.tb03849.x (1992).
- 275 Cicone, J. S., Petronis, J. B., Embert, C. D. & Spector, D. A. Successful treatment of calciphylaxis with intravenous sodium thiosulfate. *Am. J. Kidney Dis.* **43**, 1104-1108, doi:10.1053/j.ajkd.2004.03.018 (2004).
- 276 Guerra, G., Shah, R. C. & Ross, E. A. Rapid resolution of calciphylaxis with intravenous sodium thiosulfate and continuous venovenous haemofiltration using low calcium replacement fluid: case report. *Nephrol. Dial. Transplant.* **20**, 1260-1262, doi:10.1093/ndt/gfh825 (2005).
- 277 Brucculeri, M., Cheigh, J., Bauer, G. & Serur, D. Long-term intravenous sodium thiosulfate in the treatment of a patient with calciphylaxis. *Semin Dial* **18**, 431-434, doi:10.1111/j.1525-139X.2005.00082.x (2005).
- 278 Zitt, E. *et al.* Use of sodium thiosulphate in a multi-interventional setting for the treatment of calciphylaxis in dialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **28**, 1232-1240, doi:10.1093/ndt/gfs548 (2013).
- 279 O'Neill, W. C. & Hardcastle, K. I. The chemistry of thiosulfate and vascular calcification. *Nephrol. Dial. Transplant.* **27**, 521-526, doi:10.1093/ndt/gfr375 (2012).
- 280 Adirekkiat, S. *et al.* Sodium thiosulfate delays the progression of coronary artery calcification in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **25**, 1923-1929, doi:10.1093/ndt/gfp755 (2010).
- 281 Mathews, S. J. *et al.* Effects of sodium thiosulfate on vascular calcification in end-stage renal disease: a pilot study of feasibility, safety and efficacy. *Am. J. Nephrol.* **33**, 131-138, doi:10.1159/000323550 (2011).

I. INTRODUCCIÓN

- 282 Grases, F., Ramis, M. & Costa-Bauza, A. Effects of phytate and pyrophosphate on brushite and hydroxyapatite crystallization. Comparison with the action of other polyphosphates. *Urol. Res.* **28**, 136-140 (2000).
- 283 Fleisch, H. & Bisaz, S. Mechanism of calcification: inhibitory role of pyrophosphate. *Nature* **195**, 911, doi:10.1038/195911a0 (1962).
- 284 Fleisch, H. & Bisaz, S. Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. *Am. J. Physiol.* **203**, 671-675, doi:10.1152/ajplegacy.1962.203.4.671 (1962).
- 285 Hesse, L. *et al.* Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 9445-9449, doi:10.1073/pnas.142063399 (2002).
- 286 Ho, A. M., Johnson, M. D. & Kingsley, D. M. Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science* **289**, 265-270, doi:10.1126/science.289.5477.265 (2000).
- 287 Whyte, M. P. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr. Rev.* **15**, 439-461, doi:10.1210/edrv-15-4-439 (1994).
- 288 O'Neill, W. C., Sigrist, M. K. & McIntyre, C. W. Plasma pyrophosphate and vascular calcification in chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **25**, 187-191, doi:10.1093/ndt/gfp362 (2010).
- 289 Schibler, D., Russell, R. G. & Fleisch, H. Inhibition by pyrophosphate and polyphosphate of aortic calcification induced by vitamin D3 in rats. *Clin. Sci.* **35**, 363-372 (1968).
- 290 Meyer, J. L. Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? *Arch. Biochem. Biophys.* **231**, 1-8, doi:10.1016/0003-9861(84)90356-4 (1984).
- 291 Lomashvili, K. A., Narisawa, S., Millan, J. L. & O'Neill, W. C. Vascular calcification is dependent on plasma levels of pyrophosphate. *Kidney Int.* **85**, 1351-1356, doi:10.1038/ki.2013.521 (2014).
- 292 Villa-Bellosta, R., Wang, X., Millan, J. L., Dubyak, G. R. & O'Neill, W. C. Extracellular pyrophosphate metabolism and calcification in vascular smooth muscle. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **301**, H61-68, doi:10.1152/ajpheart.01020.2010 (2011).
- 293 Fleisch, H., Schibler, D., Maerki, J. & Frossard, I. Inhibition of aortic calcification by means of pyrophosphate and polyphosphates. *Nature* **207**, 1300-1301, doi:10.1038/2071300b0 (1965).
- 294 Rathan, S., Yoganathan, A. P. & O'Neill, C. W. The role of inorganic pyrophosphate in aortic valve calcification. *J. Heart Valve Dis.* **23**, 387-394 (2014).
- 295 Lomashvili, K. A., Khawandi, W. & O'Neill, W. C. Reduced plasma pyrophosphate levels in hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 2495-2500, doi:10.1681/ASN.2004080694 (2005).
- 296 Papapoulos, S. E., Hoekman, K., Lowik, C. W., Vermeij, P. & Bijvoet, O. L. Application of an in vitro model and a clinical protocol in the assessment of the potency of a new bisphosphonate. *J. Bone Miner. Res.* **4**, 775-781, doi:10.1002/jbmr.5650040518 (1989).
- 297 Green, J. R., Muller, K. & Jaeggi, K. A. Preclinical pharmacology of CGP 42'446, a new, potent, heterocyclic bisphosphonate compound. *J. Bone Miner. Res.* **9**, 745-751, doi:10.1002/jbmr.5650090521 (1994).

I. INTRODUCCIÓN

- 298 Lin, J. H. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone* **18**, 75-85, doi:10.1016/8756-3282(95)00445-9 (1996).
- 299 Liu, W. C., Yen, J. F., Lang, C. L., Yan, M. T. & Lu, K. C. Bisphosphonates in CKD patients with low bone mineral density. *TheScientificWorldJournal* **2013**, 837573, doi:10.1155/2013/837573 (2013).
- 300 Jamal, S. A. *et al.* Alendronate treatment in women with normal to severely impaired renal function: an analysis of the fracture intervention trial. *J. Bone Miner. Res.* **22**, 503-508, doi:10.1359/jbmr.070112 (2007).
- 301 Miller, P. D. *et al.* Safety and efficacy of risedronate in patients with age-related reduced renal function as estimated by the Cockcroft and Gault method: a pooled analysis of nine clinical trials. *J. Bone Miner. Res.* **20**, 2105-2115, doi:10.1359/JBMR.050817 (2005).
- 302 Fleisch, H., Russell, R. G., Bisaz, S., Casey, P. A. & Muhlbauer, R. C. The influence of pyrophosphate analogues (diphosphonates) on the precipitation and dissolution. *Calcif. Tissue Res., Suppl:*10-10a, doi:10.1007/bf02065192 (1968).
- 303 Smith, R., Russell, R. G. & Bishop, M. Diphosphonates and Page's disease of bone. *Lancet* **1**, 945-947, doi:10.1016/s0140-6736(71)91447-4 (1971).
- 304 Watts, N. B. Treatment of osteoporosis with bisphosphonates. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **27**, 197-214, doi:10.1016/s0889-857x(05)70194-0 (2001).
- 305 Boivin, G. Y., Chavassieux, P. M., Santora, A. C., Yates, J. & Meunier, P. J. Alendronate increases bone strength by increasing the mean degree of mineralization of bone tissue in osteoporotic women. *Bone* **27**, 687-694, doi:10.1016/s8756-3282(00)00376-8 (2000).
- 306 Cryer, B. & Bauer, D. C. Oral bisphosphonates and upper gastrointestinal tract problems: what is the evidence? *Mayo Clin. Proc.* **77**, 1031-1043, doi:10.4065/77.10.1031 (2002).
- 307 Delmas, P. D. & Meunier, P. J. The management of Paget's disease of bone. *New Engl. J. Med.* **336**, 558-566, doi:10.1056/NEJM199702203360807 (1997).
- 308 Rodino, M. A. & Shane, E. Osteoporosis after organ transplantation. *Am. J. Med.* **104**, 459-469, doi:10.1016/s0002-9343(98)00081-3 (1998).
- 309 Berenson, J. R. Treatment of hypercalcemia of malignancy with bisphosphonates. *Semin. Oncol.* **29**, 12-18, doi:10.1053/sonc.2002.37417 (2002).
- 310 Coleman, R. E. Bisphosphonates for the prevention of bone metastases. *Semin. Oncol.* **29**, 43-49, doi:10.1053/sonc.2002.37415 (2002).
- 311 Fleisch, H. A., Russell, R. G., Bisaz, S., Muhlbauer, R. C. & Williams, D. A. The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. *Eur. J. Clin. Invest.* **1**, 12-18, doi:10.1111/j.1365-2362.1970.tb00591.x (1970).
- 312 Price, P. A., Faus, S. A. & Williamson, M. K. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 817-824, doi:10.1161/01.ATV.21.5.817 (2001).
- 313 Price, P. A., Buckley, J. R. & Williamson, M. K. The amino bisphosphonate ibandronate prevents vitamin D toxicity and inhibits vitamin D-induced calcification of arteries, cartilage, lungs and kidneys in rats. *J. Nutr.* **131**, 2910-2915, doi:10.1093/jn/131.11.2910 (2001).

I. INTRODUCCIÓN

- 314 Lomashvili, K. A., Monier-Faugere, M. C., Wang, X., Malluche, H. H. & O'Neill, W. C. Effect of bisphosphonates on vascular calcification and bone metabolism in experimental renal failure. *Kidney Int.* **75**, 617-625, doi:10.1038/ki.2008.646 (2009).
- 315 Rosenblum, I. Y., Black, H. E. & Ferrell, J. F. The effects of various diphosphonates on a rat model of cardiac calciphylaxis. *Calcif. Tissue Res.* **23**, 151-159, doi:10.1007/bf02012781 (1977).
- 316 King, W. R., Francis, M. D. & Michael, W. R. Effect of disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate on bone formation. *Clin Orthop Relat Res* **78**, 251-270, doi:10.1097/00003086-197107000-00021 (1971).
- 317 Nitta, K. *et al.* Effects of cyclic intermittent etidronate therapy on coronary artery calcification in patients receiving long-term hemodialysis. *Am. J. Kidney Dis.* **44**, 680-688 (2004).
- 318 Hashiba, H., Aizawa, S., Tamura, K. & Kogo, H. Inhibition of the progression of aortic calcification by etidronate treatment in hemodialysis patients: long-term effects. *Ther Apher Dial* **10**, 59-64, doi:10.1111/j.1744-9987.2006.00345.x (2006).
- 319 Toussaint, N. D., Lau, K. K., Strauss, B. J., Polkinghorne, K. R. & Kerr, P. G. Effect of alendronate on vascular calcification in CKD stages 3 and 4: a pilot randomized controlled trial. *Am. J. Kidney Dis.* **56**, 57-68, doi:10.1053/j.ajkd.2009.12.039 (2010).
- 320 Price, P. A., Omid, N., Than, T. N. & Williamson, M. K. The amino bisphosphonate ibandronate prevents calciphylaxis in the rat at doses that inhibit bone resorption. *Calcif. Tissue Int.* **71**, 356-363, doi:10.1007/s00223-002-1006-9 (2002).
- 321 Torregrosa, J. & Ramos, A. Use of bisphosphonates in chronic kidney disease. *Nefrología : publicación oficial de la Sociedad Española Nefrología* **30**, 288-296 (2010).
- 322 Shiraishi, N. *et al.* Successful treatment of a patient with severe calcific uremic arteriopathy (calciphylaxis) by etidronate disodium. *Am. J. Kidney Dis.* **48**, 151-154, doi:10.1053/j.ajkd.2006.04.062 (2006).
- 323 Hanafusa, T. *et al.* Intractable wounds caused by calcific uremic arteriopathy treated with bisphosphonates. *J. Am. Acad. Dermatol.* **57**, 1021-1025, doi:10.1016/j.jaad.2007.06.029 (2007).
- 324 Monney, P., Nguyen, Q. V., Perroud, H. & Descombes, E. Rapid improvement of calciphylaxis after intravenous pamidronate therapy in a patient with chronic renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19**, 2130-2132, doi:10.1093/ndt/gfh305 (2004).
- 325 Torregrosa, J. V., Sanchez-Escuredo, A., Barros, X., Blasco, M. & Campistol, J. M. Clinical management of calcific uremic arteriopathy before and after therapeutic inclusion of bisphosphonates. *Clin. Nephrol.* **83**, 231-234, doi:10.5414/CN107923 (2015).
- 326 KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int. Suppl.*, S1-130, doi:10.1038/ki.2009.188 (2009).
- 327 Anderson, R. J. The chemistry of phytin. *Bull* **32**, 3-44 (1914).
- 328 March, J., Simonet, B., Grases, F. & Salvador, A. Indirect determination of phytic acid in urine. *Anal Chim Acta* **367(1-3)**, 63-68 (1998).
- 329 Grases, F., Costa-Bauza, A. & Prieto, R. M. Intracellular and extracellular myo-inositol hexakisphosphate (InsP6), from rats to humans. *Anticancer Res.* **25**, 2593-2597 (2005).

- 330 Perello, J., Isern, B., Costa-Bauza, A. & Grases, F. Determination of myo-inositol in biological samples by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **802**, 367-370, doi:10.1016/j.jchromb.2003.12.005 (2004).
- 331 Grases, F., Perello, J., Isern, B. & Prieto, R. M. Determination of myo-inositol hexakisphosphate (phytate) in urine by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **510**, 41-43, doi:10.1016/j.aca.2003.12.061 (2004).
- 332 Frederick, J. *et al.* An essential role for an inositol polyphosphate multikinase, Ipk2, in mouse embryogenesis and second messenger production. *Proc Natl Acad Sci USA* **102(24)**, 8454-8459, doi:10.1073/pnas.0503706102 (2005).
- 333 Grases, F. *et al.* Urinary phytate in calcium oxalate stone formers and healthy people--dietary effects on phytate excretion. *Scand. J. Urol. Nephrol.* **34**, 162-164, doi:10.1080/003655900750016526 (2000).
- 334 Miller, L. V., Hambidge, K. M. & Krebs, N. F. Zinc Absorption Is Not Related to Dietary Phytate Intake in Infants and Young Children Based on Modeling Combined Data from Multiple Studies. *J. Nutr.* **145**, 1763-1769, doi:10.3945/jn.115.213074 (2015).
- 335 Grases, F., Simonet, B. M., Prieto, R. M. & March, J. G. Dietary phytate and mineral bioavailability. *J. Trace Elem. Med Biol.* **15**, 221-228, doi:10.1016/S0946-672X(01)80037-7 (2001).
- 336 Grases, F., Simonet, B. M., Perello, J., Costa-Bauza, A. & Prieto, R. M. Effect of phytate on element bioavailability in the second generation of rats. *J. Trace Elem. Med Biol.* **17**, 229-234, doi:10.1016/S0946-672X(04)80023-3 (2004).
- 337 Grases, F. & Llobera, A. Determination of phytic acid in urine by ICP atomic emission spectrometry. *Anal Lett* **29**, 1193-1199, doi:10.1080/00032719608001468 (1996).
- 338 Curhan, G. C., Willet, W. C., Knight, E. L. & Stampfer, M. J. Dietary factors and the risk of incident kidney stones in younger women: Nurses! Health Study II. *Arch. Intern. Med.* **164**, 885-891, doi:10.1001/archinte.164.8.885 (2004).
- 339 Conte, A. *et al.* Urinary lithogen risk test: usefulness in the evaluation of renal lithiasis treatment using crystallization inhibitors (citrate and phytate). *Arch. Esp. Urol.* **52**, 305-310, doi:Not available (1999).
- 340 Grases, F., Sanchis, P., Prieto, R. M., Perello, J. & Lopez-Gonzalez, A. A. Effect of tetracalcium dimagnesium phytate on bone characteristics in ovariectomized rats. *J Med Food* **13**, 1301-1306, doi:10.1089/jmf.2009.0152 (2010).
- 341 Lopez-Gonzalez, A. A. *et al.* Phytate (myo-inositol hexaphosphate) and risk factors for osteoporosis. *J Med Food* **11**, 747-752, doi:10.1089/jmf.2008.0087 (2008).
- 342 Lopez-Gonzalez, A. A. *et al.* Phytate levels and bone parameters: a retrospective pilot clinical trial. *Front Biosci (Elite Ed)* **2**, 1093-1098, doi:10.2741/E167 (2010).
- 343 Grases, F., Santiago, C., Simonet, B. M. & Costa-Bauza, A. Sialolithiasis: mechanism of calculi formation and etiologic factors. *Clin. Chim. Acta* **334**, 131-136 (2003).
- 344 Grases, F. *et al.* Anticalculus effect of a triclosan mouthwash containing phytate: a double-blind, randomized, three-period crossover trial. *J. Periodontal Res.* **44**, 616-621, doi:10.1111/j.1600-0765.2008.01168.x (2009).
- 345 Grases, F. *et al.* Phytate (Myo-inositol hexakisphosphate) inhibits cardiovascular calcifications in rats. *Front. Biosci.* **11**, 136-142, doi:10.2741/1786 (2006).

- 346 Grases, F. *et al.* Effect of crystallization inhibitors on vascular calcifications induced by vitamin D: a pilot study in Sprague-Dawley rats. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **71**, 1152-1156, doi:10.1253/circj.71.1152 (2007).
- 347 Van den Berg, C. J., Hill, L. F. & Stanbury, S. W. Inositol phosphates and phytic acid as inhibitors of biological calcification in the rat. *Clin. Sci.* **43**, 377-383, doi:10.1042/cs0430377 (1972).
- 348 Graf, E., Empson, K. L. & Eaton, J. W. Phytic acid. A natural antioxidant. *J. Biol. Chem.* **262**, 11647-11650, doi:Not available (1987).
- 349 Graf, E. & Eaton, J. W. Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radical Biol. Med.* **8**, 61-69, doi:10.1016/0891-5849(90)90146-a (1990).
- 350 Vucenic, I. & Shamsuddin, A. M. Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP6) and inositol: from laboratory to clinic. *J. Nutr.* **133**, 3778S-3784S (2003).
- 351 Midorikawa, K., Murata, M., Oikawa, S., Hiraku, Y. & Kawanishi, S. Protective effect of phytic acid on oxidative DNA damage with reference to cancer chemoprevention. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 552-557, doi:10.1006/bbrc.2001.5808 (2001).
- 352 Hawkins, P. T. *et al.* Inhibition of iron-catalysed hydroxyl radical formation by inositol polyphosphates: a possible physiological function for myo-inositol hexakisphosphate. *Biochem. J.* **294 (Pt 3)**, 929-934, doi:10.1042/bj2940929 (1993).
- 353 Druzijanic, N., Juricic, J., Perko, Z. & Kraljevic, D. IP-6 & inositol: adjuvant to chemotherapy of colon cancer. A pilot clinical trial. *Rev. Oncologia* **4**, 171 (2002).
- 354 Bacic, I., Druzijanic, N., Karlo, R., Skific, I. & Jagic, S. Efficacy of IP6 + inositol in the treatment of breast cancer patients receiving chemotherapy: prospective, randomized, pilot clinical study. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **29**, 12, doi:10.1186/1756-9966-29-12 (2010).
- 355 Lopez-Gonzalez, A. A. *et al.* Protective effect of myo-inositol hexaphosphate (phytate) on bone mass loss in postmenopausal women. *Eur. J. Nutr.* **52**, 717-726, doi:10.1007/s00394-012-0377-6 (2013).
- 356 Addison, W. N. & McKee, M. D. Inositol hexakisphosphate inhibits mineralization of MC3T3-E1 osteoblast cultures. *Bone* **46**, 1100-1107, doi:10.1016/j.bone.2010.01.367 (2010).
- 357 Arriero Mdel, M., Ramis, J. M., Perello, J. & Monjo, M. Differential response of MC3T3-E1 and human mesenchymal stem cells to inositol hexakisphosphate. *Cell. Physiol. Biochem.* **30**, 974-986, doi:10.1159/000341474 (2012).
- 358 Grases, F. & March, P. A study about some phosphate derivatives as inhibitors of calcium oxalate crystal growth. *J. Cryst. Growth* **96**, 993-995 (1989).
- 359 Grases, F. & Costa-Bauzá, A. Potentiometric study of nucleation of calcium oxalate in presence of several additives. *Clinical Chemistry and Enzymology Communications* **3**, 319-328 (1991).
- 360 Grases, F., Kroupa, M. & Costa-Bauza, A. Studies on calcium oxalate monohydrate crystallization: influence of inhibitors. *Urol. Res.* **22**, 39-43, doi:10.1007/BF00431547 (1994).
- 361 Grases, F., Bernat, I., Sanchis, P., Torres, J. J. & Costa-Bauza, A. Phytate acts as an inhibitor in formation of renal calculi. *Front Biosci.* **1**, 2580-2587 (2007).

- 362 Yang, H., Curinga, G. & Giachelli, C. M. Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney Int.* **66**, 2293-2299, doi:10.1111/j.1523-1755.2004.66015.x (2004).
- 363 Grases, F. *et al.* Phytate reduces age-related cardiovascular calcification. *Front. Biosci.* **13**, 7115-7122, doi:10.2741/3214 (2008).
- 364 Grases, F., Perello, J., Prieto, R. M., Simonet, B. M. & Torres, J. J. Dietary myo-inositol hexaphosphate prevents dystrophic calcifications in soft tissues: a pilot study in Wistar rats. *Life Sci.* **75**, 11-19, doi:10.1016/j.lfs.2003.11.030 (2004).
- 365 Grases, F., Perello, J., Isern, B. & Prieto, R. M. Study of a myo-inositol hexaphosphate-based cream to prevent dystrophic calcinosis cutis. *Br. J. Dermatol.* **152**, 1022-1025, doi:10.1111/j.1365-2133.2005.06382.x (2005).
- 366 Terai, K. *et al.* Vascular calcification and secondary hyperparathyroidism of severe chronic kidney disease and its relation to serum phosphate and calcium levels. *Br. J. Pharmacol.* **156**, 1267-1278, doi:10.1111/j.1476-5381.2008.00108.x (2009).
- 367 Kieffer, P., Robert, A., Capdeville-Atkinson, C., Atkinson, J. & Lartaud-Idjouadiene, I. Age-related arterial calcification in rats. *Life Sci.* **66**, 2371-2381, doi:10.1016/s0024-3205(00)00567-1 (2000).
- 368 Grases, F., Isern, B., Perello, J., Sanchis, P. & Prieto, R. M. Absorption of myo-inositol hexakisphosphate (InsP6) through the skin: study of the matrix effects. mechanism of phytate topical absorption. *Front. Biosci.* **10**, 799-802, doi:10.2741/1573 (2005).
- 369 Ferrer, M. D. *et al.* Characterization of SNF472 pharmacokinetics and efficacy in uremic and non-uremic rats models of cardiovascular calcification. *PloS one* **13**, e0197061, doi:10.1371/journal.pone.0197061 (2018).
- 370 Grosso, G. *et al.* Nut consumption on all-cause, cardiovascular, and cancer mortality risk: a systematic review and meta-analysis of epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **101**, 783-793, doi:10.3945/ajcn.114.099515 (2015).
- 371 Prieto, R. M. *et al.* Effects of Mediterranean diets with low and high proportions of phytate-rich foods on the urinary phytate excretion. *Eur. J. Nutr.* **49**, 321-326, doi:10.1007/s00394-009-0087-x (2010).
- 372 Fernandez-Palomeque, C. *et al.* Relationship between Urinary Level of Phytate and Valvular Calcification in an Elderly Population: A Cross-Sectional Study. *PloS one* **10**, e0136560, doi:10.1371/journal.pone.0136560 (2015).
- 373 Sanchis, P. *et al.* Protective Effect of Myo-Inositol Hexaphosphate (Phytate) on Abdominal Aortic Calcification in Patients With Chronic Kidney Disease. *J. Ren. Nutr.* **26**, 226-236, doi:10.1053/j.jrn.2016.01.010 (2016).
- 374 Joubert, P., Ketteler, M., Salcedo, C. & Perello, J. Hypothesis: Phytate is an important unrecognised nutrient and potential intravenous drug for preventing vascular calcification. *Med. Hypotheses* **94**, 89-92, doi:10.1016/j.mehy.2016.07.005 (2016).
- 375 Perello, J. *et al.* First-time-in-human randomized clinical trial in healthy volunteers and haemodialysis patients with SNF472, a novel inhibitor of vascular calcification. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **84**, 2867-2876, doi:10.1111/bcp.13752 (2018).
- 376 Salcedo, C. *et al.* A phase 1b randomized, placebo-controlled clinical trial with SNF472 in haemodialysis patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **85**, 796-806, doi:10.1111/bcp.13863 (2019).

I. INTRODUCCIÓN

- 377 Raggi, P. *et al.* Slowing Progression of Cardiovascular Calcification With SNF472 in Patients on Hemodialysis: Results of a Randomized Phase 2b Study. *Circulation* **141**, 728-739, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044195 (2020).
- 378 Brandenburg, V. M. *et al.* Improvement in wound healing, pain, and quality of life after 12 weeks of SNF472 treatment: a phase 2 open-label study of patients with calciphylaxis. *Journal of nephrology* **32**, 811-821, doi:10.1007/s40620-019-00631-0 (2019).

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

La calcificación cardiovascular es un proceso activo y regulado que tiene como resultado final la acumulación de depósitos de calcio, normalmente en forma de hidroxapatita, en las paredes de los vasos sanguíneos y en las válvulas aórticas, incrementando así el riesgo de eventos cardiovasculares. La calcificación de tejidos blandos, particularmente la calcificación cardiovascular, tiene un papel importante en la manifestación clínica de la enfermedad cardiovascular, siendo ésta última la principal causa de muerte en todo el mundo, con mayor incidencia en pacientes de diálisis. La calcificación cardiovascular representa un factor clave que contribuye a la alta mortalidad y morbilidad observada en los pacientes en tratamiento de diálisis. Al menos el 80% de estos pacientes presenta algún tipo de calcificación cardiovascular. Existen diversas enfermedades relacionadas con esta calcificación, como son la enfermedad arterial coronaria, la calcifilaxis o la enfermedad arterial periférica, entre otras. En los pacientes en tratamiento de diálisis, tanto la calcificación cardiovascular como las enfermedades derivadas de ésta son más severas y progresan más rápidamente que en la población general, contribuyendo al elevado riesgo de mortalidad cardiovascular en estos pacientes, que es de 5 a 30 veces superior al de la población general.

En la actualidad no hay terapias aprobadas para prevenir o tratar la progresión de la calcificación cardiovascular en pacientes de diálisis. Hay algunas terapias orientadas a tratar los desajustes del metabolismo óseo y mineral en estos pacientes. Entre ellas, podemos encontrar los quelantes de fosfato (como el sevelamer) para reducir la hiperfosfatemia o los calcimiméticos (como el cinacalcet) para abordar el hiperparatiroidismo secundario. La existencia de tratamientos dirigidos a tratar directamente el último paso de la calcificación, la formación y el crecimiento de los cristales de hidroxapatita, sería de gran interés. Hay estudios que han sugerido un posible efecto beneficioso de los compuestos polifosforilados como inhibidores fisicoquímicos de la formación de hidroxapatita. Algunos ejemplos son los bifosfonatos o el myo-inositol hexafosfato. El SNF472, una formulación intravenosa de un inhibidor selectivo de la calcificación (myo-inositol hexafosfato), se está desarrollando como un fármaco para tratar las enfermedades relacionadas con la calcificación cardiovascular en pacientes en diálisis, como son la calcifilaxis y la enfermedad arterial periférica. Por todo lo expuesto, sería de gran utilidad disponer de biomarcadores para evaluar desde las primeras fases preclínicas y clínicas el potencial de nuevas terapias como inhibidores de la calcificación.

El objetivo general de esta tesis es desarrollar y validar una técnica espectrofotométrica *in vitro/ex vivo* para evaluar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en muestras de plasma y establecer una relación entre la inhibición de la calcificación cardiovascular *in vivo* y la inhibición de la cristalización *ex vivo* a nivel preclínico y clínico usando el SNF472 como inhibidor.

Este objetivo principal se puede dividir en los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar un ensayo espectrofotométrico *in vitro/ex vivo* para determinar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en plasma humano, y evaluar la respuesta de la técnica en muestras de plasma con diferentes inhibidores de la cristalización.
2. Validar el ensayo espectrofotométrico anterior en muestras de plasma de voluntarios sanos añadiendo el SNF472 *in vitro* como inhibidor para poder utilizarlo como biomarcador en estudios preclínicos y clínicos.

II. OBJETIVOS

3. Aplicar el ensayo espectrofotométrico *in vitro/ex vivo* a muestras de plasma de voluntarios sanos y pacientes en tratamiento de hemodiálisis, pre y post tratamiento, para evaluar el potencial de cristalización de fosfato de calcio de las dos poblaciones. Comparar el efecto de la adición de SNF472 en la inhibición de la cristalización en plasma de voluntarios sanos y pacientes en tratamiento de hemodiálisis.
4. Verificar el uso de dicha técnica en muestras de plasma de rata añadiendo SNF472 *in vitro* y *ex vivo*.
5. Determinar los parámetros farmacocinéticos del SNF472 por infusión intravenosa en modelos animales.
6. Evaluar la eficacia del SNF472 en la inhibición de la calcificación cardiovascular en modelos animales y buscar correlaciones entre la inhibición de la calcificación tisular *in vivo* y la cristalización *ex vivo* en plasma.
7. Aplicar el ensayo espectrofotométrico *ex vivo* a plasma de pacientes de calcifilaxis en hemodiálisis que forman parte de un ensayo clínico de fase 2, tratados con una formulación intravenosa de SNF472, y buscar correlaciones entre las concentraciones plasmáticas de SNF472, la eficacia clínica y la cristalización *ex vivo*.
8. Aplicar el ensayo espectrofotométrico *ex vivo* a plasma de pacientes con enfermedad renal terminal en tratamiento de hemodiálisis que forman parte de un ensayo clínico de fase 2b (estudio CaLIPSO), tratados con diferentes dosis de SNF472 o placebo, y buscar correlaciones entre las concentraciones plasmáticas de SNF472, la eficacia clínica y la cristalización *ex vivo en plasma*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ensayo de farmacodinamia *in vitro/ex vivo* para determinar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en plasma

El objetivo de este estudio fue poner a punto un método espectrofotométrico *in vitro/ex vivo* para determinar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en plasma y evaluar la inhibición de la cristalización por parte de compuestos potencialmente inhibidores añadidos a la matriz plasmática a diferentes concentraciones.

1.1. Reactivos y preparación de disoluciones

Los reactivos utilizados para este ensayo fueron cloruro de calcio (CaCl_2 , Sigma-Aldrich, Misuri, EE. UU.), cloruro de sodio (NaCl , Sigma-Aldrich, Misuri, EE. UU.) e hidrógeno fosfato de disodio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, Panreac Química, Barcelona, España).

La disolución de NaCl se preparó con agua ultrapura obtenida con un sistema de purificación de agua Milli-Q. Las disoluciones de CaCl_2 y Na_2HPO_4 se prepararon en NaCl 0.15 M y el pH final de cada una se ajustó a 7.4. Para realizar los ensayos de cristalización, todas las disoluciones se filtraron con filtros de 0.45 μm (FPA150045 Graphic Controls, Düren, Alemania).

1.2. Desarrollo del ensayo de farmacodinamia *in vitro/ex vivo*

1.2.1. Ensayos de cristalización en matriz acuosa de NaCl

Los primeros ensayos de cristalización se realizaron en matriz acuosa de NaCl 0.15 M a pH fisiológico (7.4). Para ello, se utilizaron placas de 12 pocillos de superficie plana, no adherente y fondo transparente (Falcon® 12-well multiwell Plate, Corning Life Sciences, Tewksbury, EE. UU.), a las que se añadieron concentraciones finales de Ca^{2+} y HPO_4^{2-} 2.5 y 5.5 mM, respectivamente, con un volumen final de 3 mL (pH 7.4). En estos ensayos se obtuvieron las curvas de cristalización representando la absorbancia a 550 nm obtenida cada 75 segundos frente al tiempo, durante 4 horas con agitación constante (espectrofotómetro de pocillos Powerwave XS, Biotek Instruments, Inc., Winooski, EE. UU.). A partir de dichas curvas se calculó el periodo de inducción o tiempo durante el cual la disolución saturada homogénea pasa a ser un sistema heterogéneo. Esta transición se puede observar a través de un cambio en una propiedad física del sistema como consecuencia de la cristalización. En nuestro caso, la propiedad física observada fue la absorbancia como medida de la dispersión del haz de luz por parte del sólido de fosfato que se va formando. Entonces, el periodo de inducción para la formación del cristal se calculó por intersección de los dos primeros tramos lineales de la curva de cristalización, definidos por la absorbancia basal (tramo 1) y la pendiente máxima de incremento de absorbancia (tramo 2) observados en la Figura III.1. El primer tramo se corresponde con la inducción o formación de núcleos. El tramo 2 es de crecimiento cristalino donde la absorbancia aumenta drásticamente con el tiempo. Finalmente, el tramo 3 es el de saturación donde los cristales chocan unos con otros (agregación secundaria).

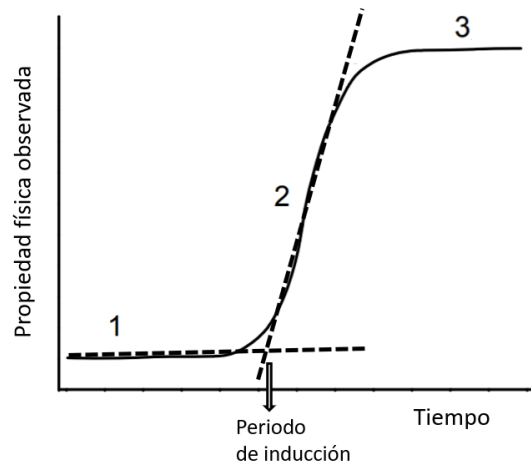


Figura III.1. Ejemplo de curva de cristalización dividida en 3 tramos. Tramo 1, de inducción o formación de núcleos. Tramo 2, de crecimiento cristalino. Tramo 3, de saturación donde los cristales chocan unos con otros (agregación secundaria).

Los cristales de fosfato de calcio formados en la cinética de cristalización se filtraron y se lavaron con agua básica. Después de 24 horas de secado en estufa, se realizó un análisis por espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) con el fin de determinar el tipo de fosfato de calcio formado durante el experimento. Para ello se utilizó un espectrofotómetro de infrarrojo Bruker IFS-66 con programa OPUS 6.5 (Massachusetts, EE. UU.) para el control del instrumento y el procesamiento de los espectros.

Una vez establecida la curva de cristalización de fosfato de calcio en medio NaCl, se comprobó el efecto del SNF472 para inhibir la formación de los cristales de fosfato de calcio. Para ello, se añadieron concentraciones crecientes de SNF472 hasta 61 μM (0.19, 0.38, 0.76, 1.14, 1.5, 3.8, 7.6, 11, 15, 30, 46, 61 μM) en las mismas condiciones experimentales del ensayo de cristalización en matriz acuosa de NaCl (2.5 mM de Ca^{2+} y 5.5 mM de HPO_4^{2-} , pH 7.4). Cada experimento de cristalización se realizó por duplicado.

1.2.2. Ensayos de cristalización en matriz plasmática

Para desarrollar el ensayo de farmacodinamia (PD) *ex vivo*, se sustituyó la matriz acuosa de NaCl por plasma humano, para poder determinar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en dicha matriz. Este estudio se desarrolló bajo las normas de la Declaración de Helsinki de Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Además, todos los procesos que involucraron la participación de muestras humanas fueron aprobados por el Comité de Ética de la Investigación de las Islas Baleares (IB 2245/14 PI). Los voluntarios sanos a los que se recogió sangre fueron informados sobre el objetivo y las características del estudio y firmaron un consentimiento informado (Anexo I).

Las muestras de sangre de voluntarios sanos se obtuvieron en condiciones de ayunas. La sangre se tomó de la vena mediana antecubital en tubos (BD Vacutainer® 367836 Plymouth, EE. UU.) con K_3EDTA como anticoagulante. El plasma sanguíneo se obtuvo por centrifugación a 3500 revoluciones por minuto (r.p.m.) a 4°C durante 10 min. Los volúmenes resultantes de plasma de cada voluntario se mezclaron para formar un *pool* que se utilizó para todo el desarrollo y validación del ensayo de PD.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Se prepararon diferentes concentraciones de Ca^{2+} y HPO_4^{2-} para obtener ratios finales de Ca/P en plasma que permitieran obtener elevada cristalización (absorbancia significativa) durante un período corto de tiempo. La cristalización de fosfato de calcio en plasma se siguió a temperatura ambiente y con agitación orbital (750 r.p.m.) con medidas de absorbancia a 550 nm cada cierto tiempo (entre 1.5 y 3 minutos). Para ello se utilizó un espectrofotómetro de pocillos Powerwave XS (Biotek Instruments, Inc., Winooski, Vt, EE. UU.). Las absorbancias obtenidas se representaron frente al tiempo y se calculó la pendiente resultante en el tramo lineal de la gráfica como medida del potencial de cristalización.

Los reactivos se añadieron en el siguiente orden y los volúmenes finales de cada disolución (X, Y, Z) se modificaron en función del volumen por pocillo, manteniendo una relación por volumen total de 0.3 para las disoluciones de Ca^{2+} y HPO_4^{2-} y, 0.4 para el plasma:

1. X mL de disolución de Ca^{2+}
2. Z mL de plasma
3. Y mL de disolución de HPO_4^{2-}

Las primeras pruebas se realizaron en placas de 12 pocillos de superficie plana, no adherente y fondo transparente (Falcon® 12-well multiwell Plate, Corning Life Sciences, Tewksbury, EE. UU.), a las que se añadió 0.8 mL de plasma (volumen total por pocillo 2 mL). Los experimentos se realizaron centrifugando el plasma a 10000 g durante 30 minutos¹ a temperatura ambiente antes de su adición a la placa. En la Tabla III.1 se resumen las diferentes concentraciones finales de Ca^{2+} y HPO_4^{2-} probadas (ratios Ca/P comprendidos entre 0.45 – 12.5), adicionadas a volúmenes iguales (0.6 mL).

Tabla III.1. Combinaciones finales de Ca^{2+} y HPO_4^{2-} testadas para desarrollar el ensayo de farmacodinamia en plasma humano.

Concentración Ca^{2+} (mM)	Concentración HPO_4^{2-} (mM)
2.5	5.5
5	10
7.5	5, 10
10	1, 2.5, 5
12.5	1, 1.5

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objetivo de reducir el volumen de muestra necesario para el método espectrofotométrico *in vitro/ex vivo* a desarrollar (o ensayo de PD), éste se realizó en microplacas de 96 pocillos (Brand pureGrade 350 µl, Wertheim, Alemania). El volumen total fue 200 µL y las concentraciones finales de Ca^{2+} y HPO_4^{2-} 12.5 y 1.5 mM, respectivamente. Por ello se añadieron 60 µL de disolución de HPO_4^{2-} 5 mM y 80 µL de plasma humano (centrifugado a 10000 g durante 30 minutos a temperatura ambiente). Finalmente, se añadieron 60 µL de disolución de Ca^{2+} 41.7 mM. Después de añadir todos los reactivos, se siguió la cristalización de fosfato de calcio en plasma durante 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación orbital de 750 r.p.m. Las medidas de absorbancia se realizaron cada 3 minutos a 550 nm (Figura III.2) y se representaron frente al logaritmo del tiempo para calcular la pendiente resultante en el tramo lineal comprendido entre el minuto 6 y el 24. La pendiente obtenida es la medida del potencial de cristalización en plasma humano.

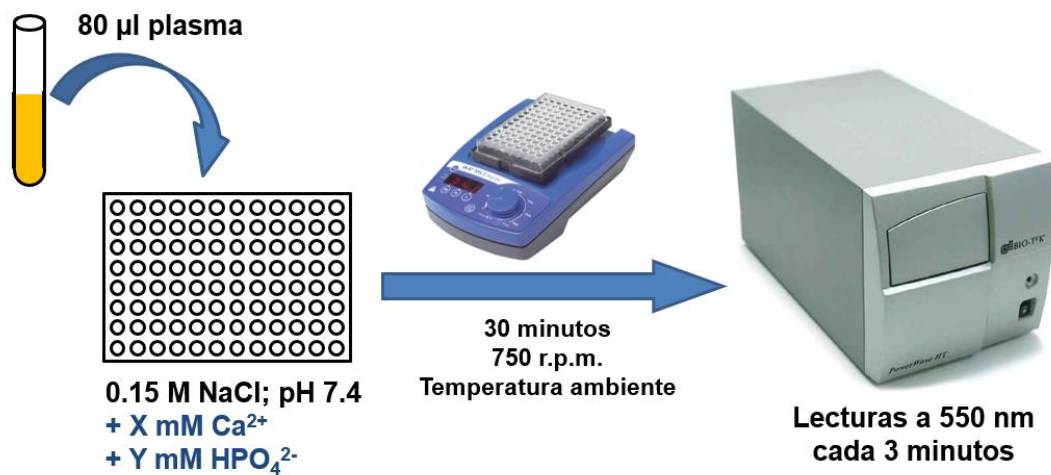


Figura III.1. Esquema de preparación del ensayo farmacodinámico para determinar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en plasma.

Primeramente, se evaluó la precisión del método de PD. Para ello, las placas de 96 pocillos se prepararon como se explicó anteriormente. Las concentraciones finales de Ca^{2+} y HPO_4^{2-} utilizadas para validar el método fueron 12.5 y 1.5 mM, respectivamente. Estas disoluciones se prepararon con disolución 0.15 M de NaCl, ajustando el pH a 7.4, y se filtraron con filtros de 0.45 µm (FPA150045 Graphic Controls, Düren, Alemania) antes de realizar el ensayo. Como medida de precisión del método o grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el ensayo de PD, se utilizó el coeficiente de variación (CV). El CV se obtuvo por el cociente entre la desviación estándar de las pendientes obtenidas y el valor medio de éstas, expresado en porcentaje, y se evaluó a dos niveles:

- a) **Precisión intradía.** La precisión intradía o repetibilidad expresa la dispersión de los resultados obtenidos bajo las mismas condiciones experimentales en un período corto de tiempo. Para determinar la precisión intradía, el ensayo se repitió tres veces el mismo día con 12 réplicas por ensayo. La precisión se calculó con la media de los tres CVs de las pendientes obtenidas en un mismo día.

- b) **Precisión interdía.** La precisión interdía o intermedia expresa las variaciones obtenidas en un mismo laboratorio bajo distintas condiciones (distintos días, analistas, etc.). En este trabajo la precisión interdía se determinó efectuando el ensayo tres días consecutivos con 12 réplicas por ensayo y calculando la media de los CVs de las pendientes obtenidas entre días.

1.2.3. Inhibición de la cristalización de fosfato de calcio en plasma humano

Una vez comprobada la repetibilidad y reproducibilidad del ensayo de PD en muestras de plasma humano, se procedió a evaluar la inhibición de la cristalización *in vitro* de siete compuestos potencialmente inhibidores para prevenir la formación de cristales de fosfato de calcio en plasma humano utilizando el ensayo de PD. La inhibición de la cristalización se calculó comparando las pendientes obtenidas en la muestra de plasma blanco (sin adición de inhibidor) y en la muestra de plasma con inhibidor. La siguiente ecuación define el cálculo utilizado para calcular dicha inhibición:

$$\text{Inhibición de la cristalización (\%)} = \frac{\text{pendiente}(\text{blanco}) - \text{pendiente}(\text{inhibidor})}{\text{pendiente}(\text{blanco})} \cdot 100 \quad [\text{Ec. III.1}]$$

Los inhibidores de la cristalización y los rangos de concentraciones en plasma que se evaluaron en el ensayo de PD están resumidos en la Tabla III.2. Se prepararon disoluciones de inhibidor en concentraciones crecientes en matriz 0.15 M de NaCl, pH 7.4. Estas disoluciones se prepararon 20 veces más concentradas que las concentraciones finales deseadas en plasma. Las disoluciones de inhibidor en plasma humano se prepararon añadiendo 1 volumen de disolución de inhibidor y 19 volúmenes de plasma. Las disoluciones resultantes se centrifugaron a 10000 g durante 30 minutos a temperatura ambiente y se preparó una microplaca de 96 pocillos para cada inhibidor realizando seis réplicas por concentración. Las placas de 96 pocillos se prepararon como se explicó en el apartado anterior 1.2.2. de este trabajo: se añadieron 60 µL de HPO₄²⁻ 5 mM y 80 µL de disolución de inhibidor en plasma. Se agitó 10 segundos la mezcla y, seguidamente, se añadieron 60 µL de disolución de Ca²⁺ (41.7 mM).

Tabla III.2. Inhibidores de la cristalización y rangos de concentración evaluados en el ensayo de farmacodinamia en plasma humano.

Inhibidor	Rango de concentración (µM)
SNF472 (InsP ₆)	0 a 30
Pirofosfato	0 a 200
Ibandronato	0 a 50
Pamidronato	0 a 50
Tiosulfato de sodio	0 a 100000
Citrato	0 a 25000
Fetúina-A	0 a 280

La eficacia en la inhibición de la cristalización en plasma de los diferentes inhibidores se evaluó calculando la IC₅₀ o concentración de inhibidor que se requiere para inhibir el 50% de la cristalización máxima de fosfato de calcio en plasma humano. Este parámetro se calculó con el software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.) mediante un ajuste no lineal de cuatro parámetros de la curva concentración-respuesta obtenida para cada inhibidor (Ecuación III.2). En este caso, las curvas concentración-respuesta son representaciones semilogarítmicas que describen la relación entre el incremento de la concentración del inhibidor y la respuesta de inhibición que éste provoca en el ensayo de cristalización.

$$Y = Y_{\min} + \frac{Y_{\max} - Y_{\min}}{1 + 10^{(\log IC_{50} - X) \cdot H}} \quad [\text{Ec. III.2}]$$

Dónde,

- Y: respuesta o inhibición de la cristalización de fosfato de calcio
- X: logaritmo de la concentración de inhibidor
- Y_{min}: parte basal de la curva o respuesta mínima
- Y_{max}: parte superior de la curva o respuesta máxima.
- IC₅₀: concentración de inhibidor que produce el 50% de efecto respecto a Y_{max}
- H: factor de la pendiente (factor Hill), mide la sensibilidad de la respuesta al rango de concentración de inhibidor determinando la inclinación de la curva concentración-respuesta (H>0).

1.3. Validación del ensayo de farmacodinamia para determinar la eficacia del SNF472 en la inhibición de la cristalización *in vitro/ex vivo* en plasma humano

El ensayo espectrofotométrico se validó utilizando el SNF472 como inhibidor. Los parámetros que se evaluaron fueron la linealidad, la precisión bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, el efecto de dilución de la muestra, y la estabilidad de conservación de las muestras tras la adición *ex vivo* de SNF472 a diferentes períodos de tiempo y bajo ciclos de congelación/descongelación. Dicha estabilidad se evaluó a largo tiempo, conservando las muestras a -20 y -80 °C, y a corto período, tanto a temperatura ambiente como a 4 °C. Todos los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la cristalización respecto al control (o pendiente obtenida en cada análisis sin adición de SNF472), calculado mediante la Ecuación III.1.

1.3.1. Linealidad

La linealidad o capacidad del método de PD para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración de SNF472 se evaluó en el rango de concentraciones de 0 a 30 µM en una microplaca con ocho réplicas por concentración. Las concentraciones finales de SNF472 tras la dilución 1/20 en plasma fueron: 0.5, 1, 1.25, 1.5, 2, 3, 4, 5, 7, 10 y 30 µM. Los resultados obtenidos en el ensayo de linealidad se utilizaron para calcular el límite de cuantificación (LLOQ, *lower limit of quantification*) según la Ecuación III.3 y, las concentraciones teóricas inhibitorias 30, 50, 80 y 95 (IC₃₀, IC₅₀, IC₈₀ y IC₉₅, respectivamente).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Estas concentraciones se calcularon con un ajuste no lineal de cuatro parámetros de la curva concentración-respuesta obtenida para el SNF472 (Ecuación III.2), utilizando el software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU).

$$\text{LOQ} = 10 \cdot \frac{\text{Desviación estándar de la respuesta}}{\text{Pendiente}} \quad [\text{Ec. III.3}]$$

1.3.2. Precisión intradía e interdía

La precisión del ensayo de PD se evaluó bajo condiciones de repetibilidad (precisión intradía) y reproducibilidad (precisión interdía). En ambos casos se prepararon las concentraciones finales en plasma correspondientes al LLOQ, IC₃₀, IC₅₀, IC₈₀ e IC₉₅ obtenidas en el apartado de linealidad con doce réplicas por concentración y ensayo. Se repitió el ensayo tres veces en un mismo día y una vez durante tres días consecutivos para evaluar la precisión intra- e interdía, respectivamente. La precisión se evaluó con la media de los valores obtenidos de los CVs para cada ensayo y concentración, bajo las condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.

1.3.3. Dilución de las muestras de plasma

Se estudió la posibilidad de diluir las muestras de plasma que presentaran concentración de SNF472 superiores al límite superior de la curva dosis-respuesta del tramo lineal obtenido, evaluando los factores de dilución 10x y 100x. Para ello se tuvieron que preparar disoluciones de SNF472 en plasma 10 y 100 veces más concentradas para poder obtener las concentraciones finales en plasma correspondientes al LLOQ, IC₃₀, IC₅₀, IC₈₀ e IC₉₅ una vez aplicado el factor de dilución 1/10 y 1/100, respectivamente. Para aplicar dichos factores de dilución se utilizó *pool* de plasma blanco (sin SNF472).

Se realizaron tres microplacas con seis réplicas por concentración, una placa control (sin dilución) y dos más correspondientes a las diluciones 1/10 y 1/100. La Tabla III.3 resume las concentraciones de SNF472 en NaCl 0.15 M a preparar para las muestras de analito en plasma (1 volumen de disolución de SNF472 y 19 volúmenes de plasma).

Tabla III.3. Concentraciones de SNF472 en NaCl 0.15 M necesarias para preparar las disoluciones de inhibidor en plasma humano (1 volumen de inhibidor y 19 volúmenes de plasma) correspondientes a la microplaca control y para aplicar el factor de dilución 10x y 100x. LLOQ: límite inferior de cuantificación.

Concentración SNF472 en plasma (μM)	Concentración preparada control (μM)	Concentración preparada 10x (μM)	Concentración preparada 100x (μM)
LLOQ	20 · LLOQ	200 · LLOQ	2000 · LLOQ
IC ₃₀	20 · IC ₃₀	200 · IC ₃₀	2000 · IC ₃₀
IC ₅₀	20 · IC ₅₀	200 · IC ₅₀	2000 · IC ₅₀
IC ₈₀	20 · IC ₈₀	200 · IC ₈₀	2000 · IC ₈₀
IC ₉₅	20 · IC ₉₅	200 · IC ₉₅	2000 · IC ₉₅

1.3.4. Estabilidad de SNF472 en muestras de plasma

La estabilidad del SNF472 en plasma se evaluó a las concentraciones finales en plasma correspondientes al LLOQ, IC₃₀, IC₅₀, IC₈₀ e IC₉₅ y bajo las siguientes condiciones:

a) Estabilidad de SNF472 en plasma almacenado a temperatura ambiente y en nevera (4 °C)

Se prepararon las muestras de plasma con SNF472 a las diferentes concentraciones y se ensayó la placa control (tiempo cero). El volumen restante de cada concentración se separó en alícuotas que se guardaron para evaluar la estabilidad durante cortos períodos de tiempo a estas dos temperaturas. Las muestras se conservaron a temperatura ambiente entre 1 y 8 horas, o a 4 °C durante tiempos comprendidos entre 2 y 24 horas. Pasado el tiempo de almacenaje bajo las condiciones especificadas (Tabla III.4), las muestras se procesaron con el ensayo de PD (seis réplicas por concentración).

b) Estabilidad de SNF472 en plasma almacenado en condiciones de congelación y ultracongelación (-20 y -80 °C, respectivamente)

Se prepararon las muestras de plasma con SNF472 a las diferentes concentraciones y se ensayó la placa control (tiempo cero). La estabilidad a largo plazo se evaluó congelando las alícuotas restantes a -20 y -80 °C, durante periodos comprendidos entre 2 y 24 semanas (-20 °C) y entre 2 y 48 semanas (-80 °C). Pasado el tiempo de almacenaje bajo las condiciones especificadas, se procesaron las muestras con el ensayo de PD (seis réplicas por concentración). La Tabla III.4 resume las condiciones de almacenaje que se utilizaron para evaluar la estabilidad durante cortos y largos períodos de tiempo.

Tabla III.4. Condiciones de temperatura y periodos de tiempo de almacenaje para las muestras de SNF472 en plasma preparadas a tiempo cero.

Temperatura (°C)	Tiempo
25	1, 2, 3, 4 y 8 horas
4	1, 2, 4, 8 y 24 horas
-20	2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 semanas
-80	2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 48 semanas

c) Estabilidad de SNF472 en plasma tras tres ciclos de congelación/descongelación en condiciones de ultracongelación (-80 °C)

Se prepararon las muestras de plasma con SNF472 a las diferentes concentraciones y se ensayó la placa control (cero ciclos de congelación/descongelación). Tres alícuotas de cada concentración se congelaron a -80 °C y se descongelaron hasta tres veces durante tres días consecutivos. En cada ciclo de descongelación las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora hasta su completa descongelación y se utilizaron para el ensayo de PD o se volvieron a congelar hasta el día siguiente para determinar su estabilidad en el siguiente ciclo.

1.4. Verificación del ensayo de farmacodinamia en muestras de plasma de rata

El objetivo de este apartado fue comprobar la aplicabilidad de dicho método al cambiar la especie de la matriz, utilizando plasma de rata sanas en lugar de humano. Adicionalmente, la verificación de dicho método en plasma de rata permitiría utilizarlo para buscar correlaciones entre la cristalización *ex vivo* y la inhibición de la calcificación tisular *in vivo* en rata en posteriores apartados.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de la Universitat de les Illes Balears (UIB) (2015/10/AEXP) y se desarrolló de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

La verificación del método espectrofotométrico de PD utilizando SNF472 como inhibidor se realizó en plasma de rata bajo las condiciones establecidas en el apartado anterior (concentraciones finales de Ca^{2+} y HPO_4^{2-} , 12.5 y 1.5 mM, respectivamente).

El primer ensayo *in vitro* se realizó para evaluar la linealidad del método de PD en plasma de rata y para determinar el LLOQ y la IC_{50} en dicha matriz. Para ello se anestesiaron tres ratas Sprague-Dawley machos (282 ± 4 g, Laboratorios Charles River, Francia) por inhalación continua de Isoflurano (IsoFlo® 100% p/p; Esteve, Barcelona, España) en vaporizador E-Z Anesthesia® (EZ-systems, Palmer, EE. UU.) con cámara de inducción (EZ-systems, Palmer, EE. UU.) al 3% de oxígeno, caudal de 1.5 l/min y se recogió la sangre por punción cardíaca (aproximadamente 8-10 mL) en tubos con K_3EDTA (BD Vacutainer®, Plymouth, EE. UU.) como anticoagulante. Después de la exanguinación, los animales se sacrificaron por sobredosis anestésica de isoflurano. La sangre obtenida se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos a 4 °C para obtener plasma y formar un *pool*. Se prepararon las correspondientes disoluciones (1 volumen de SNF472 y 19 volúmenes de plasma) a las siguientes concentraciones finales de SNF472: 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 7, 10 μM .

En el segundo ensayo se evaluó la eficacia en la inhibición de la cristalización *ex vivo* del SNF472. Con ese fin, se dividieron 15 ratas Sprague-Dawley machos (314 ± 4 g, Laboratorios Charles River, Francia) en cinco grupos de tres animales y se administró por vía subcutánea una de las siguientes dosis de SNF472: 0 (suero salino), 20, 40, 60 y 100 mg/kg. Transcurridos 20 minutos de la administración (tiempo necesario para conseguir la concentración máxima de SNF472 en sangre por esta vía de administración en rata²), se anestesiaron los animales siguiendo el mismo proceso anterior, por inhalación continua de isoflurano (IsoFlo® 100% p/p; Esteve, Barcelona, España) y, se extrajo la sangre por punción cardíaca en tubos con K_3EDTA (BD Vacutainer®, Plymouth, EE. UU.) como anticoagulante. Después de la exanguinación, los animales se sacrificaron por sobredosis anestésica de isoflurano. La sangre de cada animal se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos a 4 °C para obtener plasma, y éste se congeló a -80°C separado en dos alícuotas. Una alícuota se utilizó en el ensayo de PD para determinar la inhibición de la cristalización *ex vivo* de fosfato de calcio en plasma de rata (Ecuación III.4).

$$\text{Inhibición cristalización (\%)} = \frac{\text{pendiente}(\text{dosis } 0 \text{ mg/kg}) - \text{pendiente}(\text{SNF472})}{\text{pendiente}(\text{dosis } 0 \text{ mg/kg})} \cdot 100 \quad [\text{Ec. III.4}]$$

La segunda alícuota se usó para determinar los niveles de SNF472 en plasma por cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS) utilizando el método descrito por Tur et al.³. El método bioanalítico incluye un pretratamiento de la muestra por precipitación de proteínas con ácido tricloroacético 6,1N (Sigma-Aldrich, Misuri, EE. UU.) en presencia de Na₂EDTA 0.2M (Panreac Química, Barcelona, España). El sobrenadante se diluyó con tampón acetato de trietilamonio 50 mM a pH 9 (TEAA, Sigma-Aldrich, Misuri, EE. UU.) y se inyectó en el sistema UPLC®-MS (sistema Acquity UPLC®, Waters; detector de masas API4000™, AB Sciex). El SNF472 se analizó por cromatografía líquida de fase reversa en gradiente utilizando TEAA 50 mM a pH 9 y acetonitrilo 50:50 (v/v) (ACN, grado HPLC, Sigma-Aldrich, Misuri, EE. UU.) como fase móvil. La cuantificación del analito se realizó por espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray en selección negativa (ESI-) y se realizó el monitoreo del ion molecular con relación masa/carga (m/z) de 659 ([M*]).

1.5. Ensayo de farmacodinamia en pacientes de hemodiálisis

El objetivo de este apartado fue aplicar el ensayo de PD en muestras de plasma de voluntarios sanos y pacientes en tratamiento de hemodiálisis (HD), pre- y post-tratamiento, para evaluar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en plasma de las dos poblaciones. Un segundo objetivo fue comparar el efecto del SNF472 añadido *in vitro* sobre la inhibición de la cristalización en el plasma de estas dos poblaciones.

Este estudio se desarrolló bajo las normas de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Todos los procesos que involucraron participación de personas se aprobaron por el Comité de Ética de la Investigación de las Islas Baleares (IB 2245/14 PI). Los participantes del estudio fueron informados del objetivo y de las características de éste antes de firmar un consentimiento informado (Anexo I).

Los participantes del estudio fueron 13 voluntarios sanos no dializados y 12 pacientes del Hospital Son Llàtzer de Palma con ERC en tratamiento de HD. De los voluntarios no dializados se recogió una muestra de 20 mL de sangre de la vena mediana antecubital. De los pacientes de HD se recogieron dos muestras de sangre de la línea aferente del sistema de HD (utilizando para ello el puerto de muestreo del sistema), una antes de empezar el tratamiento de HD y la otra durante los últimos minutos de tratamiento. La sangre se recogió en tubos con K₃EDTA (BD Vacutainer®, Plymouth, EE. UU.) como anticoagulante y se obtuvo plasma sanguíneo tras la centrifugación de ésta a 3500 r.p.m., 4 °C durante 10 min. El plasma resultante se conservó a -20 °C hasta su uso.

Para evaluar la cristalización de fosfato de calcio en el plasma de voluntarios sanos y de pacientes de HD pre- y post-tratamiento se utilizó el ensayo espectrofotométrico de PD en las condiciones establecidas durante la validación (concentraciones de Ca²⁺ y HPO₄²⁻, 12.5 y 1.5 mM, respectivamente). Las medidas de absorbancia se realizaron cada 3 minutos a 550 nm y se representaron frente al logaritmo del tiempo. Se calculó la pendiente resultante en el tramo lineal comprendido entre el minuto 6 y el 24 como medida del potencial de cristalización.

Una vez ensayado el plasma blanco (plasma obtenido directamente del paciente) se realizó el ensayo de PD en las mismas muestras, pero tras la adición *in vitro* de concentraciones crecientes de SNF472 (1 volumen de SNF472 y 19 volúmenes de plasma). Entonces, se

obtuvieron las concentraciones finales en plasma correspondientes al LLOQ, IC₃₀, IC₅₀, IC₈₀ e IC₉₅ obtenidas en el apartado de linealidad en la validación del método (1.3.1.). Para cada muestra de plasma de paciente o voluntario sano se realizaron 6 réplicas por concentración.

1.6. Análisis estadístico

Los resultados de este primer apartado se expresaron como promedio \pm s. La normalidad de los datos se analizó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. En las variables con distribución normal la significación estadística se realizó con test de Análisis de la Varianza (ANOVA) de una vía o de dos vías, en función de si había uno o dos factores de estudio, respectivamente. Cuando se observaron diferencias significativas al nivel $p < 0.05$, se realizó una prueba Post-Hoc de *Tukey*. Para distribuciones no normales, se reportó la mediana \pm desviación cuartil (DQ) y se utilizó la prueba de *Kruskal-Wallis* como alternativa no paramétrica a la prueba ANOVA de una vía para datos no apareados. Si la prueba de *Kruskal-Wallis* fue significativa al nivel $p < 0.05$, se realizaron comparaciones entre grupos aplicando una prueba de comparación múltiple de *Dunn*. Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.).

2. Estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos de eficacia para la prevención y tratamiento de la progresión de la calcificación cardiovascular en modelos animales

El segundo apartado de este trabajo de tesis incluye cinco estudios *in vivo* en rata: un primer estudio de PK por infusión intravenosa de SNF472; un estudio para desarrollar y optimizar el modelo patológico animal para inducir la CCV por administración subcutánea de vitamina D₃; dos estudios de eficacia para evaluar el efecto del SNF472 en la prevención de la CCV inducida por vitamina D₃; y un último estudio de eficacia para evaluar la capacidad del SNF472 para inhibir la progresión de la CCV inducida por vitamina D₃.

2.1. Farmacocinética por infusión intravenosa de SNF472 en rata

El objetivo de este apartado fue caracterizar la farmacocinética en rata (evolución de los niveles de fármaco en sangre con el tiempo) a dos tiempos de infusión diferentes después de administrar una dosis única de SNF472 por infusión intravenosa a velocidad constante.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de la Universitat de Barcelona (UB) (FUE-2017-00543673) y se desarrolló de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

2.1.1. Experimento *in vivo*

El estudio se realizó con 10 ratas macho Sprague-Dawley (Laboratorios Charles River, Francia) de 275-300 g, a las que se administró una única dosis de 10 mg/kg de SNF472 por infusión intravenosa a razón constante de 4 mL·kg⁻¹·h⁻¹. Los tiempos de infusión fueron de 2.5 y 4 horas, siendo los volúmenes de administración 10 y 16 mL·kg⁻¹·día⁻¹, respectivamente.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Cada PK se desarrolló en un día, pero la infusión intravenosa requiere un proceso quirúrgico para implantar los catéteres, así como un proceso de recuperación de los animales. Por ello, la duración total del estudio fue de 12 días (Figura III.3). El proceso quirúrgico para el sistema de cateterismo de la vena yugular incluye implantar un catéter y conectarlo a un arnés con un sistema tether de unión. Este sistema se acopla a una configuración giratoria y se conecta a la bomba de infusión. En la Figura III.4 se puede observar el equipamiento necesario para realizar este proceso. Los arneses (VAH95T Instechlabs, Plymouth, EE. UU.) se colocaron a los animales 3 días antes de la cirugía para habituarlos. El primer día de estudio los animales se anestesiaron en vaporizador de isoflurano (IsoFlo® 100% p/p; Esteve, Barcelona, España) con cámara de inducción al 3% de oxígeno, caudal de 1.5 l/min y se implantaron los catéteres intravenosos de poliuretano (catéter vena yugular, C30PU-RJV1303 de 30cm, 0.62x1.02 mm, Instechlabs, Plymouth, EE.UU.) en la vena yugular derecha según describió Wyman et al⁴. El catéter se pasó por debajo de la piel del animal y se fijó al arnés por el otro extremo. El procedimiento se realizó bajo técnicas quirúrgicas asépticas. Las ratas se trataron con 5 mg/kg de enrofloxacin como antibacteriano y antimicoplásmico (solución inyectable BAYTRIL, Bayer Hispania, Barcelona, España) por vía subcutánea a lo largo del experimento, y recibieron analgesia (buprenorfina 0.03 mg/kg, Indivior Europe Limited, Dublín, Irlanda) por vía subcutánea en el momento de la cirugía y durante los siguientes dos días. Para evitar la coagulación y mantener la permeabilidad de los catéteres, se llenaron cada día con 0.2 mL de disolución salina heparinizada, 100 UI/mL (heparina sódica ROVI 5000 UI/mL, Laboratorios Farmacéuticos Rovi, Madrid, España). Cuatro días después de la implantación de los catéteres (día 5), se realizó la primera farmacocinética de 4 horas de infusión.

Los animales se sometieron a un período de lavado de 7 días, tras los cuales se realizó la segunda farmacocinética de 2.5 horas de infusión (día 12). Todos los animales se pesaron antes de empezar cada una de las farmacocinéticas para calcular el volumen de administración.

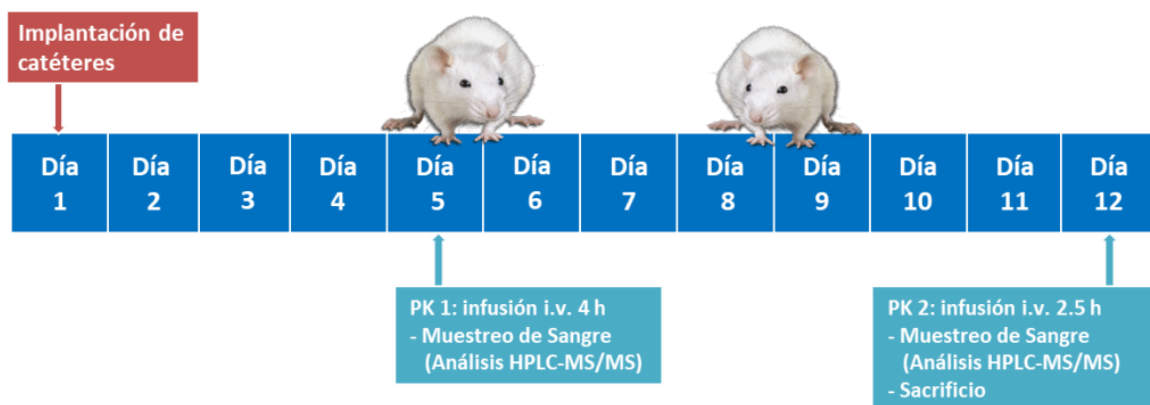


Figura III.3. Esquema del estudio farmacocinético en rata. El día 1 se procedió con la cirugía para implantar los catéteres. Los días 5 y 12 se realizaron las dos farmacocinéticas con un tiempo de lavado de siete días entre ellas. HPLC-MS/MS: Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem; i.v.: infusión intravenosa; PK: farmacocinética

III. MATERIALES Y MÉTODOS

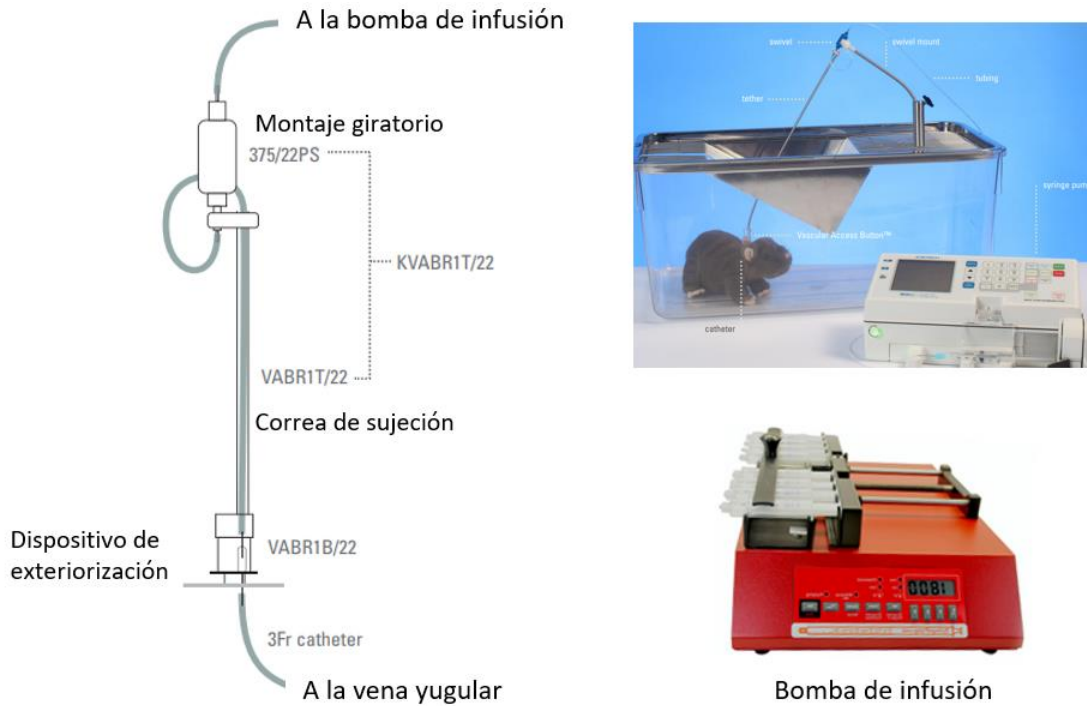


Figura III.4. Esquema del montaje y del material utilizado para el sistema de cateterismo de la vena yugular en rata. Adaptado del catálogo 2017-2018 Instechlabs *Rodent infusion and Sampling*.

Las muestras de sangre para la PK se obtuvieron por punción de la vena de la cola (vena caudal, aproximadamente 200 μL), y se recogieron en tubos *Microvette* para extracción de sangre capilar con K_2EDTA como anticoagulante (*Microvette CB300 K₂EDTA*, Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). La primera muestra se tomó a tiempo cero, inmediatamente antes de iniciar la administración, para obtener los niveles basales de SNF472 antes de la infusión. Los demás tiempos de muestreo se resumen en la Tabla III.5, donde se indican los animales utilizados en cada punto de recogida de muestra, de manera que no se realizaran más de tres extracciones por ensayo a cada animal. Debido a las limitaciones para obtener muestras de sangre de cada rata de manera secuencial, se obtuvieron solo tres muestras de sangre de cada animal del total de los nueve tiempos de muestreo. Los tubos *Microvette* se centrifugaron a 3500 r.p.m durante 10 min a 4°C para obtener el plasma. Cada muestra de plasma resultante se separó en alícuotas y se congeló a $-80 \pm 20^\circ\text{C}$ hasta analizarse.

Al acabar la última farmacocinética del día 12 los animales se anestesiaron con vaporizador E-Z Anesthesia® (EZ-systems, Palmer, EE. UU.) de isoflurano (IsoFlo® 100% p/p; Esteve, Barcelona, España) con cámara de inducción (EZ-systems, Palmer, EE. UU.) al 3% de oxígeno, caudal de 1.5 l/min. Se recogió la sangre (8-9 mL) por punción cardíaca en tubos con K_3EDTA (BD Vacutainer®, Plymouth, EE. UU.) como anticoagulante. La sangre se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C para obtener plasma. Después de la exanguinación, los animales se sacrificaron por sobredosis anestésica de isoflurano.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla III.5. Resumen de los tiempos de muestreo realizados a cada rata en las dos farmacocinéticas intravenosas.

Dosis	Tiempo de infusión	Tiempo de muestreo	Rata
10 mg/kg	4 horas	Basal	1,2,3
		15 min	4,5,6
		1 h	7,8,9
		2 h	1,2,3
		4 h	4,5,6
		4 h 10 min	7,8,9
		4 h 30 min	1,2,3
		5 h	4,5,6
10 mg/kg	2.5 horas	Basal	1,2,3
		15 min	4,5,6
		30 min	7,8,9
		1 h	1,2,3
		2 h 30 min	4,5,6
		2 h 40 min	7,8,9
		3 h	1,2,3
		3 h 30 min	4,5,6

2.1.2. Bioanálisis de SNF472 en plasma

Las determinaciones de SNF472 en plasma se realizaron por cromatografía líquida de alta eficacia con detector de espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS) con la metodología descrita por Tur et al.³ y resumida en el apartado anterior 1.4. Verificación del ensayo de farmacodinamia en muestras de plasma de rata.

2.1.3. Análisis farmacocinético y estadístico

Las concentraciones plasmáticas de SNF472 obtenidas se expresaron como promedio \pm s. Los valores de concentración menores al LLOQ (0.76 μ M) se consideraron cero para realizar la estadística.

El análisis farmacocinético se realizó mediante análisis no compartimental con el software Kinetica v5 (Alfasoft Limited, Luton, Reino unido). Los parámetros farmacocinéticos evaluados o calculados fueron los siguientes:

- a) Área bajo la curva (AUC) es la integral definida por la gráfica de concentración plasmática versus tiempo. Este parámetro describe la exposición a un fármaco. En la práctica experimental, el AUC se puede medir desde tiempo 0 al último tiempo de concentración plasmática cuantificable (AUC_{0-t}) y se calculó con la regla trapezoidal lineal-log. El AUC_{0-t} representa la exposición experimental observada. Debido a que no se tienen todos los puntos de muestreo para cada animal, no se pudo determinar el AUC de los animales individuales, sino que se utilizaron AUCs medias para evaluar la linealidad de la dosis. Para definir la exposición total con el tiempo, se debe calcular el área bajo la curva desde tiempo 0 a infinito (AUC_{inf}) mediante extrapolación del área bajo la curva desde el último tiempo cuantificable (t) a infinito.

$$AUC_{inf} = AUC_{0-t} + \frac{C_{t,ult}}{\lambda_z} \quad [Ec. III.5]$$

Donde,

- $C_{t,ult}$ es la última concentración cuantificable por encima del LLOQ;
- λ_z es la constante de velocidad terminal y se determina con la pendiente terminal obtenida a partir de la regresión lineal con transformación semilogarítmica de la curva concentración versus tiempo (t).

b) Volumen aparente de distribución (V_d): es un parámetro indicativo del grado de distribución del fármaco en el organismo. Se dice que el volumen de distribución es aparente porque el fármaco en el organismo no solo está disuelto en el líquido corporal, sino que puede estar unido a proteínas plasmáticas y a los tejidos. Por lo tanto, no se encuentra distribuido de manera uniforme y no se corresponde a un verdadero volumen fisiológico. Se calcula a partir de la siguiente ecuación.

$$V_d = \frac{\text{Dosis}}{\lambda_z} \quad [\text{Ec. III.6}]$$

c) Aclaramiento (Cl). Es el volumen de plasma que queda libre de fármaco por unidad de tiempo. También se define como velocidad a la que el compuesto se elimina del plasma.

$$Cl = V_d \cdot \lambda_z \quad [\text{Ec. III.7}]$$

d) Concentración máxima (C_{max}) obtenida en plasma. Es la concentración máxima del fármaco medida en sangre. Se obtuvo directamente de la curva de concentración versus tiempo.

e) Tiempo en el que se obtiene la C_{max} (t_{max}). Es el tiempo al que se alcanza la concentración máxima en plasma. Se obtuvo directamente de la curva de concentración versus tiempo.

f) Vida media o semivida de eliminación ($t_{1/2}$). Es el tiempo requerido para que la concentración plasmática máxima disminuya un 50%. La relación existente entre la semivida con el volumen de distribución y el aclaramiento es la siguiente:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda_z} = \frac{\ln 2 \times V_d}{Cl} \quad [\text{Ec. III.8}]$$

La semivida de eliminación se calculó según las siguientes reglas: (1) intervalo de tiempo igual al menos a $1.5 \times t_{1/2}$, (2) la línea de regresión (en la representación semi-log) tiene que contener al menos 3 puntos de tiempo diferentes en la fase terminal, incluyendo la última concentración cuantificable y excluyendo la C_{max} , y (3) el coeficiente de determinación (r^2) debe ser ≥ 0.85 . Si una de las tres condiciones no se cumple, la semivida terminal y otros parámetros que dependan de $t_{1/2}$ se deben considerar resultados no fiables.

g) Volumen de distribución aparente en el estado estacionario (V_{ss}): es el volumen de distribución aparente cuando se alcanza el estado estacionario (o de equilibrio), en el que la cantidad de fármaco eliminada por unidad de tiempo es igual a la dosis administrada. Es decir, la velocidad de entrada de fármaco al organismo es igual a la velocidad de salida, obteniendo valores de concentraciones plasmáticas asintóticas.

2.2. Estudios farmacodinámicos con SNF472 para prevenir e inhibir la progresión de la calcificación cardiovascular inducida por vitamina D₃ en modelos animales

La segunda parte de este apartado de estudios *in vivo* está orientada a estudios de eficacia utilizando el SNF472 como inhibidor de la CCV en modelos animales. Para ello, en primer lugar, se desarrolló y optimizó el modelo experimental de calcificación cardiovascular inducida por vitamina D₃. A continuación, se utilizó dicho modelo para (1) estudiar la eficacia del SNF472 tanto en la prevención de la aparición de CCV como (2) en la inhibición de su progresión, (3) establecer relaciones de dosis-respuesta y (4) buscar correlaciones entre la inhibición de la calcificación tisular *in vivo* y la inhibición de la cristalización *ex vivo* del plasma.

Estos estudios fueron aprobados por los respectivos Comités de Ética de Experimentación Animal (CEEA) según su localización; ya sea de la Universitat de les Illes Balears (UIB) (IB 2015/09/AEXP) o de la Universitat de Barcelona (UB) (FUE-2017-00543673), y se desarrollaron de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

2.2.1. Desarrollo y optimización de un modelo animal para la calcificación cardiovascular inducida por vitamina D₃

El modelo animal para la inducción de la CCV por administración subcutánea de vitamina D₃ o colecalciferol es un modelo bien establecido y optimizado⁵⁻⁸, pero debido a un cambio reciente en la fabricación de la vitamina D₃ utilizada se hizo necesario optimizar de nuevo el modelo animal. En este apartado, se evaluó el desarrollo de la CCV en función de la dosis de vitamina D₃ y el tiempo de progresión.

2.2.1.1. Experimento *in vivo*

El estudio tuvo una duración de 12 días y se llevó a cabo en 32 ratas macho Sprague-Dawley de 300 a 380 g de peso (Laboratorios Charles River, Francia). Los animales se distribuyeron homogéneamente en 4 grupos de 8 animales y la CCV se indujo por intoxicación de vitamina D₃ (Duphafrol® D₃ 1000 solución inyectable, Pfizer, España). Las dosis administradas de inductor a los grupos 1, 2, 3 y 4 fueron 25, 50, 75 y 100 kUI/kg, respectivamente. La vitamina D se administró diariamente durante los tres primeros días del estudio por vía subcutánea a razón de 2 mL/kg. Los animales se pesaron cada día del estudio para seguir la evolución de los pesos y calcular el volumen de inductor a administrar. La Figura III.5 muestra el diseño experimental. El último día del estudio (día 12) los animales se anestesiaron con vaporizador E-Z Anesthesia® (EZ-systems, Palmer, EE. UU.) de isoflurano (IsoFlo® 100% p/p; Esteve, Barcelona, España) con cámara de inducción (EZ-systems, Palmer, EE. UU.) al 3% de oxígeno, caudal de 1.5 l/min y se les extrajo sangre por punción cardíaca (aproximadamente 8-10 mL). Unos 6 mL de sangre se recogieron en tubos con K₃EDTA (BD Vacutainer®, Plymouth, EE. UU.) como anticoagulante y se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C para obtener plasma. El volumen restante se recolectó en tubos con activador de coagulación (BD Vacutainer®, Plymouth, EE. UU.) y se obtuvo el suero por centrifugación a 1300 g durante 10 min. Después de la exanguinación, los animales se sacrificaron por sobredosis anestésica de isoflurano y se recogió la arteria aorta y el corazón para determinar el contenido mineral de calcio en estos tejidos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS



Figura III.5. Diseño experimental para el desarrollo del modelo de calcificación cardiovascular inducida por vitamina D₃ en rata. Los días 1, 2 y 3 se administró el inductor por vía subcutánea a cuatro dosis diferentes. El día 12 se sacrificó a los animales y se recogieron los correspondientes tejidos y sangre. CCV: calcificación cardiovascular; UI: unidades internacionales.

2.2.1.2. Determinaciones analíticas

○ Cuantificación de la calcificación tisular

Los tejidos se liofilizaron durante dos días en un equipo liofilizador con bomba de vacío externa (Cryodos, Telstar, Terrassa, España) hasta su completa deshidratación a baja temperatura (-35 a -45°C). Se pesaron los tejidos secos y se colocaron en tubos de ensayo para su digestión con una mezcla 1:1 de ácido perclórico y nítrico utilizando un baño seco a 180 °C durante 2 h. Para la digestión de las arterias se añadió 1.4 mL de mezcla de ácidos; para el corazón se hicieron dos adiciones de 1.4 mL de la mezcla ácida. Una vez completada la digestión de los órganos, se llevaron a un volumen de 10 mL con agua Mili-Q y, seguidamente, se realizó una dilución 1/10 o 1/20 de las anteriores disoluciones para el análisis de las aortas y corazones, respectivamente. El contenido en calcio de estas disoluciones se determinó por espectrofotometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (IPC-OES, Espectrómetro Perkin-Elmer SL, Optima 5300DV)⁹ con sistema de lectura axial a la longitud de onda 317.93 nm. Características: generador de radiofrecuencia de estado sólido de 40 MHz. Detector simultáneo SCD. Inyector automático AS-93plus. Nebulizadores *GemCone high* sólidos. Sistema de introducción de la muestra *ESI OneFast*.

2.2.1.3. Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos se expresaron como promedio \pm s. Los valores atípicos se detectaron realizando un *boxplot* o bien aplicando el test de *Rout* fijando un error máximo de falso descubrimiento (Q) del 1%. Estos valores se excluyeron para realizar el análisis estadístico.

Para determinar si los resultados se distribuían de manera normal se aplicó la prueba de *Shapiro-Wilk*. La comparación entre grupos para detectar diferencias significativas en los niveles de calcio en los tejidos según la dosis de vitamina D₃, se realizó mediante ANOVA de

una vía. Valores de p para dos colas inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. Cuando se observaron diferencias significativas, se realizó una prueba Post-Hoc de *Tukey*. Para distribuciones no normales, se reportó la mediana \pm desviación cuartil (DQ) y se utilizó la prueba de *Kruskal-Wallis* como alternativa no paramétrica a la prueba ANOVA. Si la prueba de *Kruskal-Wallis* fue significativa al nivel $p < 0.05$, se realizaron comparaciones entre grupos aplicando un test de comparación múltiple de *Dunn*.

La correlación entre los resultados de calcificación obtenidos en aorta y corazón se estudió aplicando una correlación bivariada de *Pearson* (o de *Spearman*, análogo no paramétrico).

Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.) y el SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE. UU.).

2.2.2. Estudios de eficacia con SNF472 para estudiar la prevención y la inhibición de la progresión de la calcificación cardiovascular inducida por Vitamina D₃ en rata

Una vez caracterizado y optimizado el modelo de calcificación, se llevaron a cabo los estudios de eficacia para estudiar la inhibición de la CCV utilizando SNF472 como inhibidor. Este apartado se dividió en tres experimentos diferentes según la ruta de administración del SNF472 y la temporalización del tratamiento. En el primer y el segundo experimento se evaluó la farmacodinamia y la eficacia en la prevención de la CCV por administración subcutánea e intravenosa de SNF472, respectivamente. Finalmente, en el tercer experimento se caracterizó el perfil farmacológico del SNF472 administrado por vía intravenosa para inhibir la progresión de la CCV, administrándose el compuesto una vez iniciada la calcificación.

2.2.2.1. Experimentos *in vivo*

a) Experimento 1. Estudio de prevención de la CCV con administración de SNF472 por vía subcutánea

El estudio, de 12 días de duración, se realizó en 50 ratas macho Sprague-Dawley de 250 a 300 g de peso (Laboratorios Charles River, Francia). Los animales se distribuyeron homogéneamente en 5 grupos ($n=10$) y la CCV se indujo por administración subcutánea (2 mL/kg) de vitamina D₃ (Duphafal® D3 1000 solución inyectable, Pfizer, España) a una dosis diaria de 75000 UI/kg durante los tres primeros días del estudio. Los animales se trataron con suero salino (grupo 1, control) o con dosis crecientes de SNF472 (3, 10, 30 y 100 mg/kg para los grupos 2, 3, 4 y 5, respectivamente) mediante administración subcutánea (2 mL/kg). Los tratamientos se realizaron diariamente, desde el primer día del estudio (primera dosis de vitamina D), hasta el último (día 12). Los animales se pesaron cada día del estudio para calcular el volumen a administrar y para seguir la evolución de los pesos. La Figura III.6 resume el diseño experimental.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

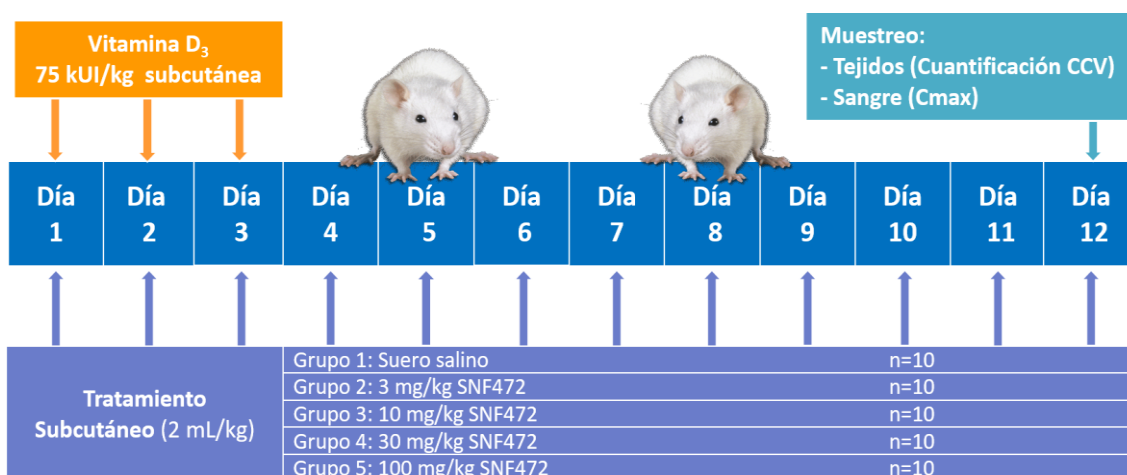


Figura III.6. Diseño experimental para estudiar la eficacia del SNF472 en la prevención de la calcificación cardiovascular inducida por vitamina D₃ en rata. Los días 1, 2 y 3 se administró el inductor (75 kUI/kg) por vía subcutánea. El tratamiento se inició el primer día y se administró diariamente hasta acabar el estudio. El día 12 se sacrificó a los animales y se recogieron los correspondientes tejidos y sangre. CCV: calcificación cardiovascular, C_{max}: concentración máxima.

El último día del estudio se administró el tratamiento a todos los animales 20 minutos antes del sacrificio para conseguir niveles próximos a C_{max} durante el muestreo². Los animales se anestesiaron en vaporizador E-Z Anesthesia® (EZ-systems, Palmer, EE. UU.) de isoflurano (IsoFlo® 100% p/p; Esteve, Barcelona, España) con cámara de inducción (EZ-systems, Palmer, EE. UU.) al 3% de oxígeno, caudal de 1.5 l/min, y se les extrajo sangre por punción cardíaca (aproximadamente 8-10 mL). Una fracción de sangre (6 mL) se recogió en tubos con K₃EDTA como anticoagulante (BD Vacutainer®, Plymouth, EE. UU.) para obtener plasma (centrifugación a 3500 rpm durante 10 minutos, 4°C). El volumen restante se recogió en tubos con activador de coagulación (BD Vacutainer®, Plymouth, EE. UU.) para obtener suero (centrifugación a 1300 g durante 10 min, temperatura ambiente). Después de la exanguinación, los animales se sacrificaron por sobredosis anestésica de isoflurano y se recogió la arteria aorta y el corazón.

b) Experimento 2. Estudio de prevención de la calcificación cardiovascular con administración de SNF472 por infusión intravenosa

El segundo estudio se realizó durante 12 días en 40 ratas macho Sprague-Dawley de 300 a 380 g (Laboratorios Charles River, Francia). Los animales se distribuyeron homogéneamente en 5 grupos de 9 o 10 animales y un grupo adicional formado por 2 ratas sanas que no recibieron inductor de la CCV ni tratamiento.

Durante los diez días previos al inicio del estudio se realizó el proceso de aclimatación de los animales y habituación a los arneses (tres días). La cirugía para implantar los catéteres en la vena yugular se realizó durante 2 días siguiendo el procedimiento descrito por Wyman et al.⁴ y que se ha resumido en el apartado 2.2.1 de este capítulo. Después de las cirugías, se dejaron cinco días para la recuperación de los animales durante los cuales se pasó diariamente suero heparinizado, 100 UI/mL (heparina sódica ROVI 5000 UI/mL, Laboratorios Farmacéuticos Rovi, Madrid, España) a través de los catéteres para evitar la coagulación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El día 1 del estudio se inició la inducción de la CCV a los grupos 2, 3, 4 y 5 mediante administración subcutánea (2 mL/kg) de vitamina (Duphafrol® D3 1000 solución inyectable, Pfizer, España) a una dosis de 75000 UI/kg, que se repitió en los dos días siguientes. Los animales se trataron durante 4 horas mediante infusión intravenosa a un volumen de 4 mL·kg⁻¹·h⁻¹ con suero salino (grupos 1 y 2, sham y salino, respectivamente) o con dosis crecientes de SNF472 (3, 10 y 30 mg/kg, grupos 2, 3 y 4, respectivamente). Los tratamientos se realizaron diariamente, empezando el primer día del estudio, hasta el último día. Para ello el catéter se conectó al sistema de liberación mediante un sistema *tether* de unión y una articulación giratoria (Instech Laboratories, Plymouth, EE. UU.), a la vez conectada a una bomba de infusión de 8 canales (New Era 1800, Farmingdale, Nueva York, EE. UU.). Los animales se pesaron cada día para calcular el volumen a administrar y para seguir la evolución de los pesos. La Figura III.7 muestra el diseño experimental.

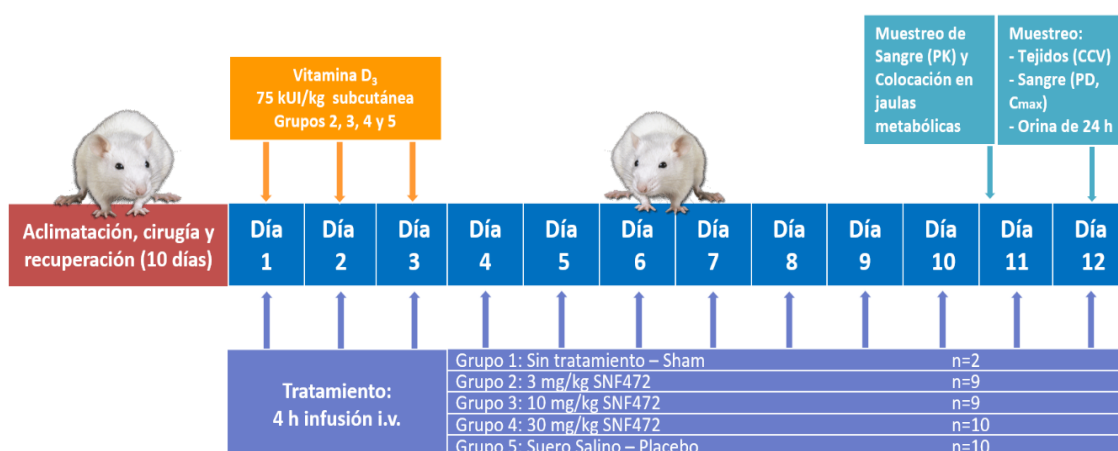


Figura III.7. Diseño experimental para determinar la eficacia del SNF472 administrado por infusión intravenosa en la prevención de la calcificación cardiovascular. Entre los días 1 y 3 se administró diariamente vitamina D₃ a los grupos 2, 3, 4 y 5. La infusión de suero salino o SNF472 se realizó cada día durante los 12 días de estudio. El día 11 se tomaron las muestras de sangre para farmacocinética y se colocaron los animales en jaulas metabólicas para la recolección de orina. El día 12 se procedió al muestreo de tejidos, sangre y orina, y se sacrificaron los animales. CCV: calcificación cardiovascular, C_{max}: concentración máxima, i.v.: intravenosa, PD: farmacodinamia, PK: farmacocinética.

El día 11 del estudio se realizó una farmacocinética. Los muestreos se realizaron a tiempo cero (antes de la infusión), y a los 60 y 240 minutos de haber empezado la infusión. La sangre (aproximadamente 200 µL) se obtuvo mediante punción de la vena de la cola, y se recogió en tubos *microvette* con K₂EDTA como anticoagulante (Microvette CB300 K2EDTA, Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) para obtener plasma tras centrifugación a 3500 rpm durante 10 min a 4°C. Durante las tomas de muestra la infusión no se interrumpió en ningún caso. Después de acabar la infusión los animales se colocaron en jaulas metabólicas para recolectar la orina de 24 horas.

El último día del estudio y 5 minutos antes de acabar las cuatro horas de infusión, los animales se anestesiaron en vaporizador E-Z Anesthesia® (EZ-systems, Palmer, EE. UU.) de isoflurano (IsoFlo® 100% p/p; Esteve, Barcelona, España) con cámara de inducción (EZ-systems, Palmer, EE. UU.) al 3% de oxígeno, caudal de 1.5 l/min, para extraerles sangre por punción cardíaca (aproximadamente 8-10 mL). Una primera alícuota de sangre (6 mL) se recogió en tubos con

K₃EDTA como anticoagulante (BD Vacutainer®, Plymouth, EE. UU.) para obtener plasma (centrifugación a 3500 rpm, 10 minutos, 4°C). El volumen restante se recogió en tubos con activador de coagulación (BD Vacutainer®, Plymouth, EE. UU.) para obtener suero (centrifugación a 1300 g, 10 min). Después de la exanguinación, los animales se sacrificaron por sobredosis anestésica de isoflurano y se recolectó la arteria aorta y el corazón para analizar el contenido de calcio tisular.

c) Experimento 3. Estudio de eficacia para el tratamiento de la progresión de la calcificación cardiovascular con SNF472 administrado por infusión intravenosa

Este último estudio se realizó en 28 ratas macho Sprague-Dawley de 300 a 380 g (Laboratorios Charles River, Francia) y tuvo una duración de 12 días. Los animales se distribuyeron homogéneamente en 3 grupos de 8 o 10 animales.

En los diez días previos al inicio del estudio se realizó el proceso de aclimatación de los animales y habituación a los arneses (tres días). Las cirugías para implantar los catéteres en la vena yugular se realizaron durante dos días según describió Wyman et al.⁴ y que se ha resumido en el apartado 2.1 de farmacocinética por infusión intravenosa de SNF472 en rata de este capítulo. Después de las cirugías, se dejaron cinco días para la recuperación de los animales y se pasó diariamente disolución salina de heparina, 100 UI/mL (heparina sódica ROVI 5000 UI/mL, Laboratorios Farmacéuticos Rovi, Madrid, España) en los catéteres para evitar la coagulación.

Los días 1, 2 y 3 del estudio se indujo la CCV a todos los grupos por administración subcutánea (2 mL/kg) de vitamina D₃ (Duphafral® D₃ 1000 solución inyectable, Pfizer, España) a una dosis diaria de 75000 UI/kg. El cuarto día se colocó a los animales del grupo 1 en jaulas metabólicas para recolectar la orina de 24 horas. Un día después (día 5) se anestesió a los animales del grupo 1 por inhalación continua de isoflurano (IsoFlo® 100% p/p; Esteve, Barcelona, España) en vaporizador E-Z Anesthesia® (EZ-systems, Palmer, EE. UU.) con cámara de inducción (EZ-systems, Palmer, EE. UU.) al 3% de oxígeno, caudal de 1.5 l/min, y se les extrajo sangre por punción cardíaca (aproximadamente 8-10 mL). Una primera alícuota de sangre se recogió en tubos con K₃EDTA como anticoagulante (BD Vacutainer®, Plymouth, EE. UU.) para obtener plasma (centrifugación 3500 rpm 10 minutos, 4°C). El volumen restante se recogió en tubos con activador de coagulación (BD Vacutainer®, Plymouth, EE. UU.) para obtener suero (centrifugación 1300 g, 10 min). Después de la exanguinación, los animales del grupo 1 (control a día 5) se sacrificaron y se obtuvo la arteria aorta y el corazón para evaluar el grado de CCV antes de empezar el tratamiento y así poder evaluar su progresión. Ese mismo día se inició el tratamiento de los grupos 2 y 3, a los que se administró suero salino (grupo 2, placebo) o 10 mg/kg de SNF472 (grupo 3) durante 4 horas de infusión intravenosa (4 ml·kg⁻¹·h⁻¹). Los tratamientos se realizaron diariamente, empezando el día 5 y hasta el último día del estudio (día 12). Para ello, el catéter se conectó al sistema de liberación mediante un sistema *tether* de unión y una articulación giratoria (Instech Laboratories, Plymouth, EE. UU.), a la vez conectada a una bomba de infusión de 8 canales (New Era 1800, Farmingdale, Nueva York, EE. UU.). Los animales se pesaron cada día para calcular el volumen a administrar y seguir la evolución de los pesos. La Figura III.8 muestra el diseño experimental.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

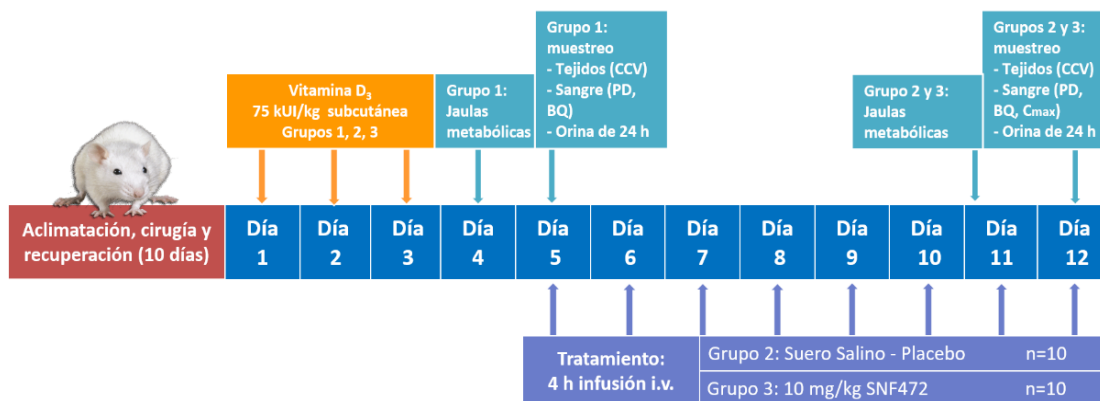


Figura III.8. Diseño experimental para determinar la eficacia del SNF472 para tratar la progresión de la CCV. Entre los días 1 y 3 se administró diariamente Vitamina D₃ a todos los grupos. El día 5 se sacrificó a los animales del grupo 1 para evaluar la CCV. La infusión i.v. de suero salino o SNF472 se inició el día 5 y continuó hasta el final del estudio. El día 11 se tomaron las muestras de sangre para la PK y se colocaron los animales en jaulas metabólicas para la recolección de orina. El día 12 se procedió al muestreo de tejidos, sangre y orina y se sacrificaron los animales del grupo 2 y 3. BQ: bioquímica, CCV: calcificación cardiovascular, C_{max}: concentración máxima, i.v.: intravenosa, PD: farmacodinamia, PK: farmacocinética.

El día 11 se colocaron los grupos 2 y 3 en jaulas metabólicas para recolectar la orina de 24 horas. El último día, cinco minutos antes de acabar las cuatro horas de infusión, los animales se anestesiaron en vaporizador E-Z Anesthesia® (EZ-systems, Palmer, EE. UU.) de isoflurano (IsoFlo® 100% p/p; Esteve, Barcelona, España) con cámara de inducción (EZ-systems, Palmer, EE. UU.) al 3% de oxígeno, caudal de 1.5 l/min, y se les extrajo sangre por punción cardíaca (aproximadamente 8-10 mL). Una alícuota de sangre (6 mL) se recogió en tubos con K₃EDTA como anticoagulante (BD Vacutainer®, Plymouth, EE. UU.) para obtener plasma (centrifugación a 3500 rpm, 10 minutos, 4°C). El volumen restante se recogió en tubos con activador de coagulación (BD Vacutainer®, Plymouth, EE. UU.) para obtener suero (centrifugación a 1300 g, 10 min). Después de la exanguinación, los animales se sacrificaron por sobredosis anestésica de isoflurano y se obtuvo la arteria aorta y el corazón para analizar el contenido de calcio tisular.

2.2.2.2. Determinaciones analíticas

○ Cuantificación de la calcificación tisular

La liofilización, digestión y análisis del contenido de calcio en los tejidos se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 2.2.1.2. de este capítulo.

○ Inhibición de la calcificación tisular en modelo de prevención en rata

Para determinar el efecto del SNF472 en la inhibición de la calcificación se calculó el porcentaje de inhibición para cada animal (experimentos 1 y 2 *in vivo*) expresado mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición calcificación (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{calcio grupo tratado con SNF472}}{\text{calcio grupo control (suero salino)}} \cdot 100 \right) \quad [\text{Ec. III.9}]$$

○ **Inhibición de la progresión de la calcificación tisular en rata**

Para evaluar el efecto del SNF472 en el tratamiento de la progresión de la CCV inducida por vitamina D₃ (experimento 3 *in vivo*) se calculó el porcentaje de inhibición de la progresión de la calcificación para cada animal expresado con la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{calcio grupo 3 [SNF472]} - \text{calcio grupo 1 [basal]}}{\text{calcio grupo 2 [control]} - \text{calcio grupo 1 [basal]}} \cdot 100 \right) \quad [\text{Ec. III.10}]$$

○ **Parámetros Bioquímicos**

Los parámetros bioquímicos en el suero obtenido el último día de los dos estudios de eficacia con SNF472 administrado por vía intravenosa se analizaron por espectrofotometría de absorción molecular con el analizador de bioquímica clínica *Atellica CH Solution* (Siemens Healthineers, Erlangen, Alemania). El nitrógeno ureico en sangre (BUN) se determinó mediante el ensayo *Atellica CH Urea Nitrogen (UN_c) 11097593* (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, EE.UU.), que se basa en la reacción enzimática de Roch-Ramel utilizando ureasa y glutamato deshidrogenasa¹⁰. La creatinina se analizó con el ensayo *Atellica CH Creatinine_2 (Crea_2) 11097596* (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, EE. UU.), basado en la reacción del ácido pícrico con la creatinina en un medio alcalino tal y como se describe en el procedimiento original de Jaffe¹¹. La actividad fosfatasa alcalina (total y fracción termoestable) se analizó mediante el ensayo *Atellica CH ALP_2c 11097600* (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, EE.UU.) según el método publicado por Bowers et al.¹². Finalmente, los niveles circulantes de calcio total y de fosfato sérico se analizaron mediante los ensayos *Atellica CH Calcium (Ca) 11097595* y *Atellica CH Inorganic Phosphorus (IP) 11097611* (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, EE. UU.), respectivamente. El ensayo para la determinación de calcio total está basado en el trabajo de Gitelman¹³ (o-cresolftaleína complexona sin desproteinización). El fosfato inorgánico se determinó según el procedimiento de Daly y Ertinghausen¹⁴, que depende de la formación de un complejo absorbente en el ultravioleta entre el fósforo y el molibdato.

La creatininuria y la proteinuria se analizaron en las orinas recolectadas el día 11 del estudio. Para determinar la proteinuria se utilizó la inmunoturbidimetría y el analizador utilizado también fue *Atellica CH Solution* (Siemens Healthineers, Erlangen, Alemania), con el kit *Atellica CH Urine Total Protein Calibrator (UPro CAL) 11099441* (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, EE. UU.). La creatinina en orina se determinó según se ha detallado anteriormente.

○ **Bioanálisis en plasma**

Las determinaciones de SNF472 en plasma se realizaron por HPLC-MS/MS con la metodología descrita por Tur et al.³ y resumida en el apartado anterior 1.4. Verificación del ensayo de farmacodinamia en muestras de plasma de rata.

○ **Ensayo de farmacodinamia *ex vivo***

El plasma obtenido el día del sacrificio en el experimento *in vivo* b) estudio de prevención de la calcificación cardiovascular con administración de SNF472 por infusión intravenosa, se utilizó para determinar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en dicha matriz mediante el ensayo *ex vivo* descrito y validado en el apartado 1.3 de este capítulo.

2.2.2.3. Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos se expresaron como promedio \pm s, para distribuciones normales, y como mediana \pm DQ para distribuciones no normales. Los valores atípicos se detectaron con el método de *ROUT*, estableciendo el estadístico Q (error máximo de falso descubrimiento) al 1%, y se excluyeron para realizar el análisis estadístico. La normalidad de los datos se analizó mediante la prueba de *Shapiro-Wilk*. La comparación entre grupos para detectar si existía efecto del tratamiento con SNF472 sobre los parámetros bioquímicos en suero y los niveles de calcio en los tejidos, se realizó mediante ANOVA de una vía. Valores de p para dos colas inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. Cuando se observaron diferencias significativas, se realizó un test Post-Hoc de *Tukey*. Para distribuciones no normales, se reportó la mediana \pm DQ y se utilizó la prueba de *Kruskal-Wallis* como alternativa no paramétrica al test ANOVA. Si la prueba de *Kruskal-Wallis* fue significativa al nivel $p < 0.05$, se realizaron comparaciones entre grupos aplicando un test de comparación múltiple de *Dunn*.

Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.) y el SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

○ Análisis de dosis-respuesta

Las curvas dosis-respuesta o concentración-respuesta describen la relación entre el incremento de la dosis o concentración de un fármaco, y el efecto que éste provoca en el organismo. En este caso, las respuestas consideradas fueron la inhibición de la calcificación tisular y la inhibición de la cristalización de fosfato de calcio *ex vivo*. Las concentraciones (PK) se refieren a los niveles circulantes de SNF472 determinados el día del sacrificio. Se realizaron las correspondientes representaciones semilogarítmicas obteniendo una curva sigmoidal y se aplicó un modelo no lineal simple de E_{max} , utilizado de manera frecuente para los análisis dosis-respuesta, y definido según la ecuación III.11. Las relaciones dosis-respuesta o concentración-respuesta estudiadas fueron las siguientes: dosis-inhibición de la CCV, PK-inhibición de la CCV, y PK-PD, y se determinaron los valores de ID_{50} y IC_{50} para cada una de ellas.

$$Y = Y_{\min} + \frac{Y_{\max} - Y_{\min}}{1 + 10^{(\log IC_{50} - X) \cdot H}} \quad [\text{Ec. III.11}]$$

Dónde,

- Y: respuesta, inhibición de la calcificación tisular o inhibición de la cristalización de fosfato de calcio *ex vivo*
- X: logaritmo de la dosis o concentración de fármaco
- Y_{\min} : parte basal de la curva o respuesta mínima
- Y_{\max} : parte superior de la curva o respuesta máxima.
- IC_{50} o ID_{50} : concentración o dosis de fármaco que produce el 50% de efecto respecto a Y_{\max}
- H: factor de la pendiente (factor Hill), mide la sensibilidad de la respuesta al rango de dosis de fármaco determinando la inclinación de la curva dosis- o concentración-respuesta ($H > 0$).

○ **Análisis de relación lineal entre variables analizadas**

La existencia de correlación lineal entre dos variables se estudió aplicando una correlación bivariada de *Pearson* (o de *Spearman*, análogo no paramétrico). Se buscó la existencia de correlaciones lineales entre los resultados del efecto PD *ex vivo* y la eficacia en la inhibición de la CCV *in vivo*, así como entre los resultados de inhibición de la calcificación en aorta y corazón.

Los valores de concentración plasmática de SNF472 menores al LLOQ (0.76 μM) se consideraron cero para realizar la estadística.

3. Ensayos clínicos con SNF472: análisis farmacocinético y farmacodinámico

El fármaco experimental SNF472 (una formulación intravenosa de InsP_6) está en desarrollo clínico para dos indicaciones. La primera es la calcifilaxis o arteriopatía urémica calcificante (CUA), donde el SNF472 se estudia como medicamento huérfano para tratar la calcificación en arteriolas de la piel, la reducción del flujo sanguíneo local, isquemia y el desarrollo de úlceras cutáneas necróticas¹⁵. Por otra parte, el SNF472 se está investigando como potencial tratamiento para la enfermedad arterial periférica en pacientes con ERT en tratamiento de HD.

En este último apartado se describen los análisis de PK y PD realizados en el marco de dos ensayos clínicos de fase 2 y la búsqueda de correlaciones entre las concentraciones plasmáticas de SNF472, la eficacia clínica observada y la inhibición de la cristalización *ex vivo* (efecto PD). El primer ensayo clínico evaluó los efectos de SNF472 en pacientes de CUA en tratamiento de HD. El segundo estudio clínico (estudio CaLIPSO) determinó los efectos del SNF472 en la progresión de la CCV en pacientes de ERT en tratamiento de HD.

3.1. Ensayo clínico de calcifilaxis

El ensayo clínico de CUA es un estudio abierto, de un solo brazo, en el que se administró SNF472 durante 12 semanas en 14 pacientes con CUA sometidos a tratamiento de HD. La variable clínica primaria fue la cicatrización de las úlceras epiteliales, cuantificada mediante el uso de la escala Bates-Jensen (BWAT, *Bates-Jensen Wound Assessment Tool*). Como variables clínicas secundarias se evaluaron el dolor isquémico (VAS, *visual analog scale*), la calidad de vida a partir de un cuestionario específico para úlceras (*wound quality of life*) y una revisión cualitativa de las úlceras epiteliales realizada por dos expertos independientes mediante fotografías de las lesiones. Los métodos completos, así como los resultados clínicos de seguridad y mejora en curación de heridas, dolor y calidad de vida relacionada con heridas, se publicaron en *Journal of Nephrology* en 2019¹⁵.

El SNF472 se administró por vía intravenosa tres veces por semana mediante infusión de 2.5 a 4 horas, durante la sesión de diálisis. Las dosis de SNF472 administradas fueron de 400, 450, 700 o 900 mg, con el fin de administrar una dosis objetivo alrededor de 7 mg/kg (rango 5.6-8.6mg/kg), en función del rango de peso de los pacientes (Tabla III.6.).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla III.6. Tabla de las dosis totales de SNF472 (mg) para cada paciente según clasificación por rango de peso.

Categoría	Rango de peso de los pacientes (kg)	Dosis total por paciente (mg)	Rango de dosis (mg/kg)
1	50 a < 66	400	6.1 – 8
2	66 a < 81	450	5.6 – 6.8
3	81 a <111	700	6.3 – 8.6
4	111 a 150	900	6.0 – 8.1

Los pacientes dieron su consentimiento informado (Anexo II) por escrito para participar en el estudio clínico. Este consentimiento reúne los tres elementos de voluntariedad, información y comprensión. El diseño del ensayo fue aprobado por el comité ético correspondiente, *New England Independent Review Board* para centros en los Estados Unidos y, *North West - Liverpool Central Research Ethics Committee* para centros en el Reino Unido. Además, se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue coherente con las Directrices del Consejo Internacional de Armonización sobre Buenas Prácticas Clínicas y requisitos reglamentarios. Acorde a la normativa, el ensayo clínico se registró como #NCT02790073 en ClinicalTrials.gov.

Para los ensayos de PK y PD, se recogieron dos muestras de 4 mL de sangre desde el puerto de diálisis en tubos de tereftalato de polietileno (PET) (BD Vacutainer®, Plymouth, EE. UU.) con K₃EDTA como anticoagulante. La recolección de las muestras de sangre se realizó antes de empezar la diálisis y justo antes de finalizar la infusión (tmax) de SNF472. Este muestreo se realizó en dos días, el de la primera dosis o línea base (día 1, semana 1 del estudio), y en la última dosis (día 5, semana 12 del estudio). Después del muestreo, los tubos se colocaron en hielo picado y se centrifugaron a 1900 g durante 10 minutos a 4°C dentro de los 30 minutos posteriores a la recolección. El plasma resultante para cada punto de tiempo se dividió en alícuotas en tubos de PET debidamente etiquetados para los ensayos de PK y PD, determinar los niveles circulantes de SNF472 y realizar el ensayo de cristalización *ex vivo*, respectivamente. Las alícuotas obtenidas se almacenaron bajo condiciones de ultracongelación hasta su análisis.

3.1.1. Bioanálisis en plasma

Las determinaciones de SNF472 en plasma se realizaron por HPLC-MS/MS con la metodología descrita por Tur et al.³ y resumida en el apartado 1.4. Verificación del ensayo de farmacodinamia en muestras de plasma de rata.

3.1.2. Ensayo de farmacodinamia *ex vivo* en plasma

Las muestras de plasma obtenidas a semana 1 (día 1) y semana 12 (día 5) del estudio clínico, recolectadas antes de empezar la infusión (pre-dosis) y al final de la infusión, se utilizaron para determinar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en dicha matriz mediante el ensayo *ex vivo* descrito y validado en el apartado 1.3. Validación del ensayo de PD en plasma humano de este capítulo.

En una misma placa de 96 pocillos, se ensayaron las dos muestras obtenidas de cada paciente (pre-dosis y final de infusión) para una semana determinada (1 o 12). Se calculó el porcentaje de inhibición de la cristalización según la fórmula siguiente:

$$\text{Efecto PD} = [\% \text{ Inhibición}] = \frac{\text{Pendiente (Pre)} - \text{pendiente (Post)}}{\text{Pendiente (Pre)}} \cdot 100 \text{ [Ec. III.12]}$$

Donde,

- Pendiente (Post): es la pendiente de la muestra de plasma del final de la infusión de SNF472, obtenida en el tramo lineal comprendido entre el minuto 9 y 30 de la representación semilogarítmica de la absorbancia frente al tiempo.
- Pendiente (Pre): es la pendiente obtenida en el tramo lineal comprendido entre el min 9 y 30 del ensayo de cristalización para la muestra obtenida antes de empezar la infusión de SNF472.

Por tanto, para cada paciente se obtuvieron dos valores de porcentaje de inhibición de la cristalización de fosfato de calcio, uno a la semana 1 y otro a semana 12.

Un resultado positivo representa que se obtuvo inhibición de la cristalización *ex vivo* después de la dosificación con SNF472. En cambio, un valor negativo indica incremento de la cristalización *ex vivo* después de la infusión.

3.1.3. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio \pm s para distribuciones normales, y como mediana \pm DQ para distribuciones no normales. La normalidad de los datos se analizó mediante la prueba de *Shapiro-Wilk*.

El porcentaje de inhibición obtenido a semana 1 y semana 12 se comparó con una prueba t de *Student* para muestras apareadas. Si la distribución de la población no fue normal se aplicó la prueba de los rangos con signo de *Wilcoxon* como alternativa de hipótesis estadística no paramétrica para dos muestras relacionadas. Se estableció un nivel de significación de 0.05.

Para estudiar la correlación PK/PD, se utilizó el efecto PD y los niveles plasmáticos determinados al final de la infusión (C_{\max}). Para realizar este análisis se incluyeron solo las muestras que tuvieron niveles circulantes de SNF472 por encima del LLOQ. Aplicando este criterio, seleccionamos 23 muestras, 14 de la semana 1 y 9 de la semana 12.

3.2. Estudio CaLIPSO: ensayo clínico de progresión de la calcificación cardiovascular

El estudio clínico CaLIPSO de fase 2b, aleatorizado, doble ciego y controlado por placebo se diseñó para comprobar si el tratamiento con SNF472 atenuaba la progresión de la CCV en pacientes que reciben HD con CCV preexistente. El diseño del ensayo y las características basales de los participantes fueron publicados por Bellasi et al.¹⁶

Este trabajo de tesis se centra en los análisis de PK y PD realizados en dicho ensayo clínico. Los objetivos del análisis estadístico PK/PD, así como la relación de la exposición al fármaco experimental SNF472 con la variable clínica principal (cambio en el logaritmo del índice CAC en volumen desde el inicio hasta el final del estudio) fueron los siguientes:

- a) Evaluar si se existían diferencias en los valores de C_{\max} de SNF472 o en la inhibición de la cristalización *ex vivo* por grupo de tratamiento y visita.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

- b) Evaluar la relación entre los valores de C_{max} en plasma y la inhibición de la cristalización *ex vivo* (análisis PK - PD).
- c) Evaluar la relación entre el porcentaje de progresión del índice CAC en volumen y los valores de C_{max} en plasma durante el período de tratamiento (análisis PK - progresión índice CAC).
- d) Evaluar la relación entre el porcentaje de progresión del índice CAC en volumen y la inhibición de la cristalización *ex vivo* durante el período de tratamiento (análisis PD - progresión índice CAC).

En el estudio participaron pacientes adultos (edades comprendidas entre 18 y 80 años) en tratamiento de HD que presentaron un índice CAC de Agatston inicial de 100 a 3500, evaluado mediante la técnica no invasiva de tomografía axial computarizada multidetector o multicorte (MDCT). Los pacientes dieron su consentimiento informado (Anexo III) por escrito para participar en el estudio clínico. El estudio clínico se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y, acorde a la normativa, se registró como #NCT02966028 en [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov).

Un total de 274 individuos se aleatorizaron con una ratio 1:1:1 para recibir placebo o SNF472 a dos dosis diferentes, 300 mg o 600 mg. La aleatorización se estratificó en base a 3 rangos de índice de calcificación de las arterias coronarias (por área): 100 - 3990, 400 - 1000 y 1001 - 3500. En la fase de tratamiento, los pacientes se administraron por infusión intravenosa de 2.5 horas (\pm 30 min) durante la sesión de HD tres veces por semana durante 52 semanas.

Para los ensayos de PK y PD, se recogieron dos muestras de sangre desde el puerto de diálisis en tubos PET (BD Vacutainer®, Plymouth, EE. UU.) con K_3EDTA como anticoagulante. La recolección de las muestras de sangre se realizó antes de empezar la diálisis (pre-dosis) y justo antes de finalizar la infusión (t_{max}). Estas muestras de sangre solo se recogieron en un subconjunto de pacientes a la semana 1 (día 1), semana 10 (día 64 ± 3), semana 22 (día 148 ± 3) y semana 52 (día 358 ± 3). El tratamiento de las muestras de sangre para obtener plasma fue el mismo que el descrito para el ensayo clínico de CUA. El plasma resultante para cada punto de tiempo se dividió en alícuotas en tubos de PET para determinar los niveles circulantes de SNF472 (ensayo de PK) y calcular la inhibición de la cristalización *ex vivo* en plasma (ensayo de PD). Las alícuotas obtenidas se almacenaron bajo condiciones de ultracongelación hasta su análisis.

A la semana 52, o el último día de tratamiento, se evaluó de nuevo mediante MDCT el índice CAC de las arterias coronarias, la aorta y la válvula aórtica, siendo la variable clínica primaria el cambio en el índice CAC en volumen entre el inicio (cribado) y la semana 52. La Figura III.9 muestra un diagrama de flujo para el estudio CaLIPSO.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

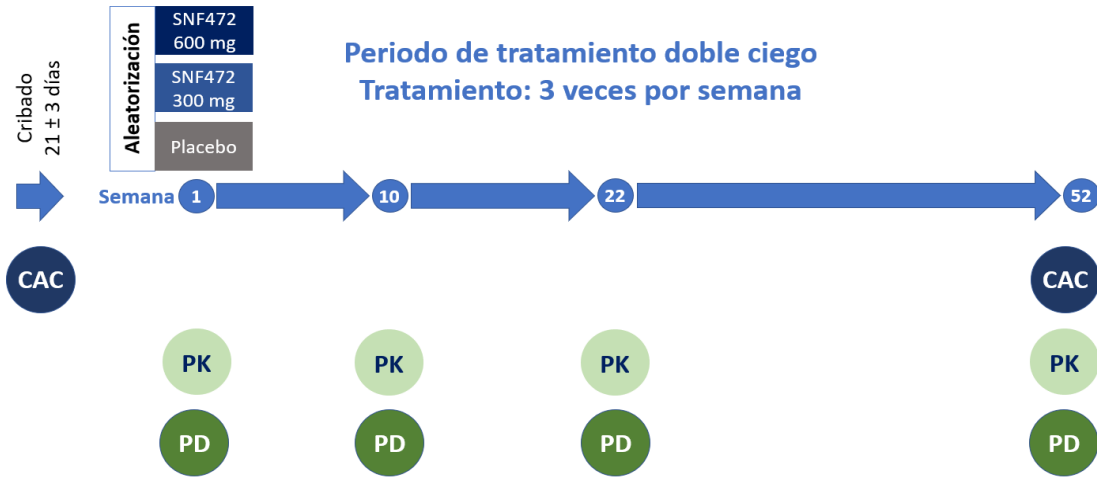


Figura III.9. Diagrama de flujo del estudio clínico CaLIPSO doble ciego y placebo controlado. En el estudio se realizó una fase de cribado inicial, en la que los posibles participantes que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión se sometieron a una evaluación por tomografía computarizada multidetector para determinar el índice CAC de Agatston. Los pacientes con CAC entre 100 y 3500 se aleatorizaron para iniciar el tratamiento correspondiente (placebo, SNF472 300 mg o SNF472 600 mg) tres veces por semana, durante 52 semanas. CAC: calcificación de la arteria coronaria, PD: farmacodinamia, PK: farmacocinética.

3.2.1. Bioanálisis en plasma y ensayo de farmacodinamia *ex vivo* en plasma

Los procedimientos para realizar el bioanálisis en plasma y ensayo de PD *ex vivo* en plasma son los mismos que los explicados anteriormente para el estudio de CUA (apartados 3.1.1 y 3.1.2). En este estudio clínico se dispuso de un mayor número de muestras para analizar (semana 1, 10, 22 y 52; pre-dosis y final de la infusión), sumando un total de ocho análisis por paciente.

3.2.2. Determinación del porcentaje de cambio del índice CAC

La obtención de imágenes de las arterias coronarias se realizó utilizando MDCT, tanto al inicio del estudio (cribado) como a la semana 52, con un mínimo de 64 cortes. En ausencia de las medidas de índice CAC a la semana 52, se arrastró y utilizó la última medida disponible llevada a cabo (LOCF, del inglés *Last Observation Carried Forward*). Se obtuvieron cortes tomográficos contiguos de 3 mm desde el arco aórtico hasta el diafragma, al final de la expiración, y se reconstruyeron durante la diástole o en el momento de menor movimiento. Todas las exploraciones se revisaron centralmente y cada área calcificada se cuantificó utilizando tanto el volumen como el índice de Agatston bajo los criterios de interpretación establecidos en los protocolos¹⁶. Como variable clínica principal, se utilizó el porcentaje de cambio del índice CAC en volumen desde el inicio (cribado) del estudio hasta su final. Para los análisis realizados en este trabajo de tesis se calculó el cambio relativo del índice CAC en volumen desde el inicio (cribado) hasta el final (semana 52) del estudio según la Ec. III.13. A continuación, se determinó el antilogaritmo y se expresó como porcentaje:

$$\text{Cambio relativo índice CAC} = \log \text{CAC}_{[\text{semana 52}]} - \log \text{CAC}_{[\text{inicio}]} \quad [\text{Ec. III.13}]$$

3.2.3. Análisis estadístico

Los pacientes que se encontraban dentro de los criterios de aceptación cuanto al muestreo de PK, PD y al análisis del índice CAC, se denominaron población disponible por protocolo y se incluyeron en el análisis estadístico. Estos criterios fueron los siguientes:

- a) Completar el estudio hasta la semana 52 y recibir al menos el 80% de los tratamientos programados.
- b) Tener disponible el resultado de la MDCT al inicio y la semana 52 (o última medida llevada a cabo, LOCF).
- c) Tener al menos un dato cuantificable, tanto de concentración de SNF472 (PK) como de porcentaje de inhibición de la cristalización (efecto PD) a cualquiera de las semanas de muestreo, siempre que la muestra se obtuviera durante los 10 minutos antes del final de la infusión.

El número de sujetos con resultados válidos de PK y PD se presentó por visita y grupo de tratamiento. El tratamiento de datos y análisis se realizó con el programa SAS® versión 9.4 (Carolina del Norte, EE. UU.).

Los resultados se expresaron como promedio \pm SE para distribuciones normales, y como mediana \pm DQ para distribuciones no normales. La normalidad de los datos se analizó mediante la prueba de *Shapiro-Wilk*.

Todas las concentraciones de plasma por debajo del LLOQ (0.76 μ M) fueron consideradas como LLOQ/2 (0.38 μ M) para los análisis de estadística descriptiva y los modelos estadísticos. Los resultados de las concentraciones plasmáticas y del efecto PD (% inhibición de la cristalización) que faltaban se omitieron para el cálculo de la estadística descriptiva y del modelado estadístico.

Los valores atípicos que se desviaron significativamente del resto de las observaciones, en un individuo en particular, se identificaron como aquellas que superaran las 3 desviaciones estándar intraindividuales respecto de la media (tanto para C_{max} como para el efecto PD) y se excluyeron del análisis.

Los análisis estadísticos de PK - PD, así como las relaciones PK - Progresión índice CAC y análisis PD - Progresión índice CAC, se realizaron con las concentraciones plasmáticas totales promedio (C_{max} , expresadas en forma de ácido libre) y con los resultados promedio del efecto PD (expresado como % de inhibición de la cristalización) entre las semanas 1, 10, 22 y 52.

○ **Acumulación de SNF472**

Los efectos de acumulación después de repetidas dosis de SNF472 se evaluaron comparando la diferencia de las C_{max} obtenidas entre las visitas (semana 1, 10, 22 y 52). Se consideró una acumulación relevante de SNF472 cuando el intervalo de confianza del 95% de la diferencia entre visitas no incluía el valor 0.

○ Efecto del tratamiento y visita

Para evaluar el efecto del tratamiento y la semana (visita) en los valores de PK (C_{max}) y en el efecto PD, se aplicaron modelos mixtos lineales para estudiar de manera simultánea el efecto de las dos variables sobre los resultados obtenidos de PK y PD.

○ Análisis relación PK - PD

Para la relación PK - PD entre los valores de C_{max} y el efecto PD se utilizó un modelo no lineal simple de E_{max} .

$$PD_i = E_0 + \frac{C_{max_i}^H * E_{max}}{C_{max_i}^H + IC_{50}^H} + \varepsilon_i \quad [Ec. III.14]$$

Dónde,

- i : paciente
- PD_i : efecto PD *ex vivo* obtenido para el paciente i
- C_{max} : concentración plasmática de SNF472 para el paciente i
- E_0 : efecto basal
- E_{max} : efecto máximo neto atribuido al fármaco
- IC_{50} : concentración de fármaco que produce el 50% de efecto respecto a E_{max}
- H : factor de la pendiente (factor Hill), mide la sensibilidad de la respuesta al rango de dosis de fármaco determinando la inclinación de la curva dosis-respuesta ($H > 0$).
- ε_i : término de error aleatorio para el paciente i . Se adoptó la suposición estándar que los términos ε_i son independientes, distribuidos idénticamente con una media de 0 y una varianza σ^2 . Una suposición estándar adicional es que los términos de error se distribuyen de manera normal.

○ Análisis PK - Progresión Índice CAC y análisis PD - Progresión Índice CAC

Para estos análisis se evaluó la relación del porcentaje de cambio del índice CAC en volumen, desde el inicio hasta la semana 52, tanto con la C_{max} promedio como con el efecto PD promedio (% inhibición de la cristalización) obtenidos para cada individuo, utilizando modelos no lineales (E_{max}) y lineales.

Los modelos no lineal simple de E_{max} (suponiendo una pendiente de Hill igual a 1) y sigmoide (con H variable) se evaluaron como se describe en la sección anterior del análisis PK - PD.

En cambio, el modelo de regresión lineal se describe mediante la ecuación:

$$Y = b_0 + b_1X + \varepsilon_i \quad [Ec. III.15]$$

Dónde,

- Y: valor de la respuesta
- b_0 : intercepción con el eje Y
- b_1 : pendiente o estimación del parámetro para la variable X
- ε_i : término de error aleatorio. Se adoptó la suposición estándar que los términos ε_i son independientes, distribuidos idénticamente con una media de 0 y una varianza σ^2 . Una suposición estándar adicional es que los términos de error se distribuyen de manera normal.

La bondad del ajuste del modelo lineal se evaluó por el valor del coeficiente de determinación obtenido (R^2).

4. Referencias

- 1 Pasch, A. *et al.* Nanoparticle-based test measures overall propensity for calcification in serum. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**, 1744-1752, doi:10.1681/ASN.2012030240 (2012).
- 2 Ferrer, M. D. *et al.* Characterization of SNF472 pharmacokinetics and efficacy in uremic and non-uremic rats models of cardiovascular calcification. *PloS one* **13**, e0197061, doi:10.1371/journal.pone.0197061 (2018).
- 3 Tur, F. *et al.* Validation of an LC-MS bioanalytical method for quantification of phytate levels in rat, dog and human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **928**, 146-154, doi:10.1016/j.jchromb.2013.03.023 (2013).
- 4 Wyman, J. F., Moore, T. J. & Buring, M. S. Simple Procedure for Jugular Vein Cannulation of Rats. *Toxicology Methods* **Vol 4. N°1**, 12-16 (1994).
- 5 Price, P. A., June, H. H., Buckley, J. R. & Williamson, M. K. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterio. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1610-1616, doi:10.1161/hq1001.097102 (2001).
- 6 Grases, F. *et al.* Phytate (Myo-inositol hexakisphosphate) inhibits cardiovascular calcifications in rats. *Front. Biosci.* **11**, 136-142, doi:10.2741/1786 (2006).
- 7 Kieffer, P., Robert, A., Capdeville-Atkinson, C., Atkinson, J. & Lartaud-Idjouadiene, I. Age-related arterial calcification in rats. *Life Sci.* **66**, 2371-2381, doi:10.1016/s0024-3205(00)00567-1 (2000).
- 8 Price, P. A., Faus, S. A. & Williamson, M. K. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 817-824, doi:10.1161/01.ATV.21.5.817 (2001).
- 9 Grases, F. *et al.* Phytate reduces age-related cardiovascular calcification. *Front. Biosci.* **13**, 7115-7122, doi:10.2741/3214 (2008).
- 10 Roch-Ramel, F. An enzymic and fluorophotometric method for estimating urea concentrations in nanoliter specimens. *Anal. Biochem.* **21**, 372-381, doi:10.1016/0003-2697(67)90312-0 (1967).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

- 11 Jaffe, M. Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure im normalen Harn erzeugt, und über eine neue Reaction des Kreatinins. *Zeitschrift für Physiologische Chemie* **10(5)**, 391-400 (1886).
- 12 Bowers, G. N., Jr. & McComb, R. B. A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. *Clin. Chem.* **12**, 70-89 (1966).
- 13 Gitelman, H. An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens. *Anal. Biochem.* **18**, 521-531, doi:10.1016/0003-2697(67)90110-8 (1967).
- 14 Daly, J. A. & Ertingshausen, G. Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the "CentrifiChem". *Clin. Chem.* **18**, 263-265 (1972).
- 15 Brandenburg, V. M. *et al.* Improvement in wound healing, pain, and quality of life after 12 weeks of SNF472 treatment: a phase 2 open-label study of patients with calciphylaxis. *Journal of nephrology* **32**, 811-821, doi:10.1007/s40620-019-00631-0 (2019).
- 16 Bellasi, A. *et al.* Trial design and baseline characteristics of CaLIPSO: a randomized, double-blind placebo-controlled trial of SNF472 in patients receiving haemodialysis with cardiovascular calcification. *Clinical kidney journal* **144**, 1-9, doi:10.1093/ckj/sfz144 (2019).

IV. RESULTADOS

1. Ensayo de farmacodinamia *in vitro/ex vivo* para determinar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en plasma

1.1. Desarrollo del ensayo de farmacodinamia

1.1.1. Ensayos de cristalización en matriz acuosa de NaCl

Los primeros ensayos de cristalización se realizaron en matriz acuosa de NaCl a pH fisiológico para establecer las condiciones adecuadas para inducir la cristalización *in vitro* de fosfato de calcio. Las curvas de cristalización de fosfato de calcio en placas de 12 pocillos en medio NaCl 0.15 M a pH fisiológico (7.4) con concentraciones de calcio (Ca^{2+}) e hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) de 2.5 y 5.5 mM, respectivamente, se representan en la Figura IV.1. Los experimentos se hicieron por duplicado en dos días consecutivos y se realizaron tres réplicas por día. Como se puede observar, al principio de la curva la absorbancia basal es aproximadamente constante con el tiempo ya que se están formando los núcleos de cristalización. A partir de un momento determinado (periodo de inducción) empieza el crecimiento cristalino en el cual la absorbancia aumenta drásticamente con el tiempo. Para cada curva de cristalización, se calculó el periodo de inducción de formación del cristal por intersección de los dos tramos lineales anteriormente definidos (capítulo III, sección 1.2.1). Los periodos de inducción obtenidos en las cinéticas realizadas en días consecutivos en condiciones control, sin adición de inhibidor, fueron de 9.4 y 6.6 minutos, resultando en un tiempo promedio para la formación de los cristales de fosfato de calcio de 8.0 ± 1.9 min (promedio \pm s).

Al finalizar la cristalización de la curva control sin inhibidor, los cristales de fosfato de calcio formados se analizaron por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), con el fin de caracterizar el tipo de sal inorgánica de fosfato de calcio obtenida *in vitro* bajo las condiciones experimentales ensayadas. Adicionalmente, se analizó por FTIR una muestra de HAP comercial, $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$, y los cristales de fosfato de calcio formados durante el experimento.

Los fosfatos de calcio se pueden formar en disolución a pH ligeramente básico, destacando en primer lugar la familia de las apatitas, de fórmula general $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_{2-x} \cdot x \text{H}_2\text{O}$, donde $0 \leq x \leq 2$, definiendo el grado de deficiencia del mineral. Como términos extremos tenemos la HAP ($x=0$) y el fosfato octacálcico (OCP, $x=2$). La HAP puede unir átomos de hidrógeno adicionales sobre los grupos OH para formar H_2O o bien, sobre los grupos fosfato (PO_4^{3-}) para transformarse en HPO_4^{2-} , generando las HAP no estequiométricas. Estas últimas se caracterizan por vibraciones adicionales del H_2O (3420 y 1630 cm^{-1}) y de los grupos HPO_4^{2-} (868 cm^{-1} , banda ancha).

En la Figura IV.2.A, se puede observar la banda a 3572 cm^{-1} que se atribuye al modo de estiramiento del grupo hidroxilo (OH). Este pico junto con el pico del modo de flexión de 632 cm^{-1} , son característicos en muestras de HAP. Las tres bandas observadas a 474 , 571 y 602 cm^{-1} son propias de la flexión simétrica y asimétrica de los grupos PO_4^{3-} de HAP. Además, también se pueden observar las bandas a 963 , 1044 y 1091 cm^{-1} correspondientes a la flexión.

IV. RESULTADOS

El estudio del espectro de infrarrojo del mineral de fosfato de calcio obtenido *in vitro* (Figura IV.2.B) se realizó comparando dicho espectro con los espectros estándares de fosfato de calcio amorfo (ACP), OCP, HAP y HAP no estequiométrica. Primeramente, la presencia de cristales de ACP se puede descartar ya que el espectro FTIR de los fosfatos de calcio no cristalinos se caracteriza por singletes simétricos y bandas anchas en las regiones $1130-1030\text{ cm}^{-1}$ y $600-560\text{ cm}^{-1}$. En cambio, los minerales cristalinos de fosfato de calcio muestran división de banda, particularmente en la región de $600-560\text{ cm}^{-1}$. Como se puede observar, en el espectro obtenido se definen dos bandas en 562 y 603 cm^{-1} características de la región de PO_4^{3-} que se dobla en formas cristalinas más típicas de HAP. Sin embargo, la falta de resolución en la región $1130-1030\text{ cm}^{-1}$ define el mineral de fosfato de calcio obtenido como una HAP no estequiométrica con la fórmula $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_{2-x} \cdot x\text{H}_2\text{O}$, donde $0 < x < 2$. Además, las bandas observadas a 3439 cm^{-1} y 1639 cm^{-1} se atribuyen al agua y confirman esta conclusión.

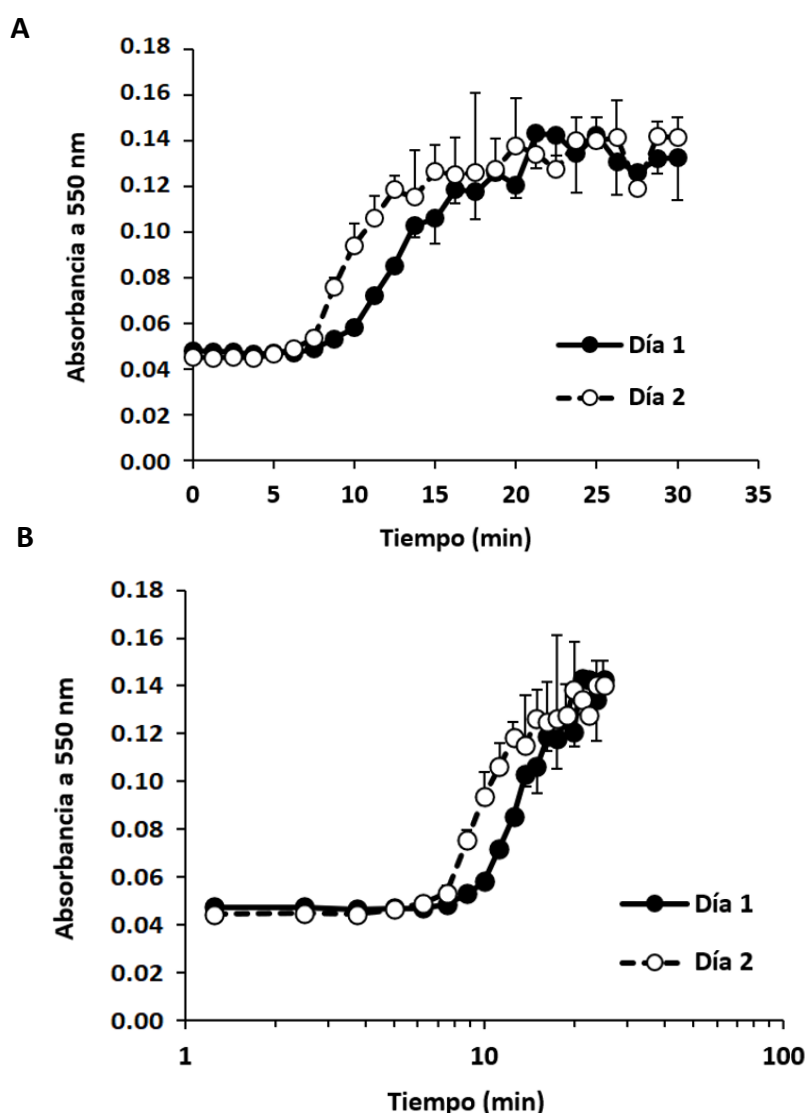


Figura IV.1. Curvas de cristalización de fosfato de calcio en medio acuoso de NaCl 0.15 M (pH 7.4) y concentraciones de Ca^{2+} y HPO_4^{2-} de 2.5 y 5.5 mM, respectivamente. **(A)** Representación de absorbancia frente al tiempo y **(B)** representación semilogarítmica. Los resultados de absorbancia se representan como promedio \pm desviación estándar (3 réplicas por tiempo).

IV. RESULTADOS

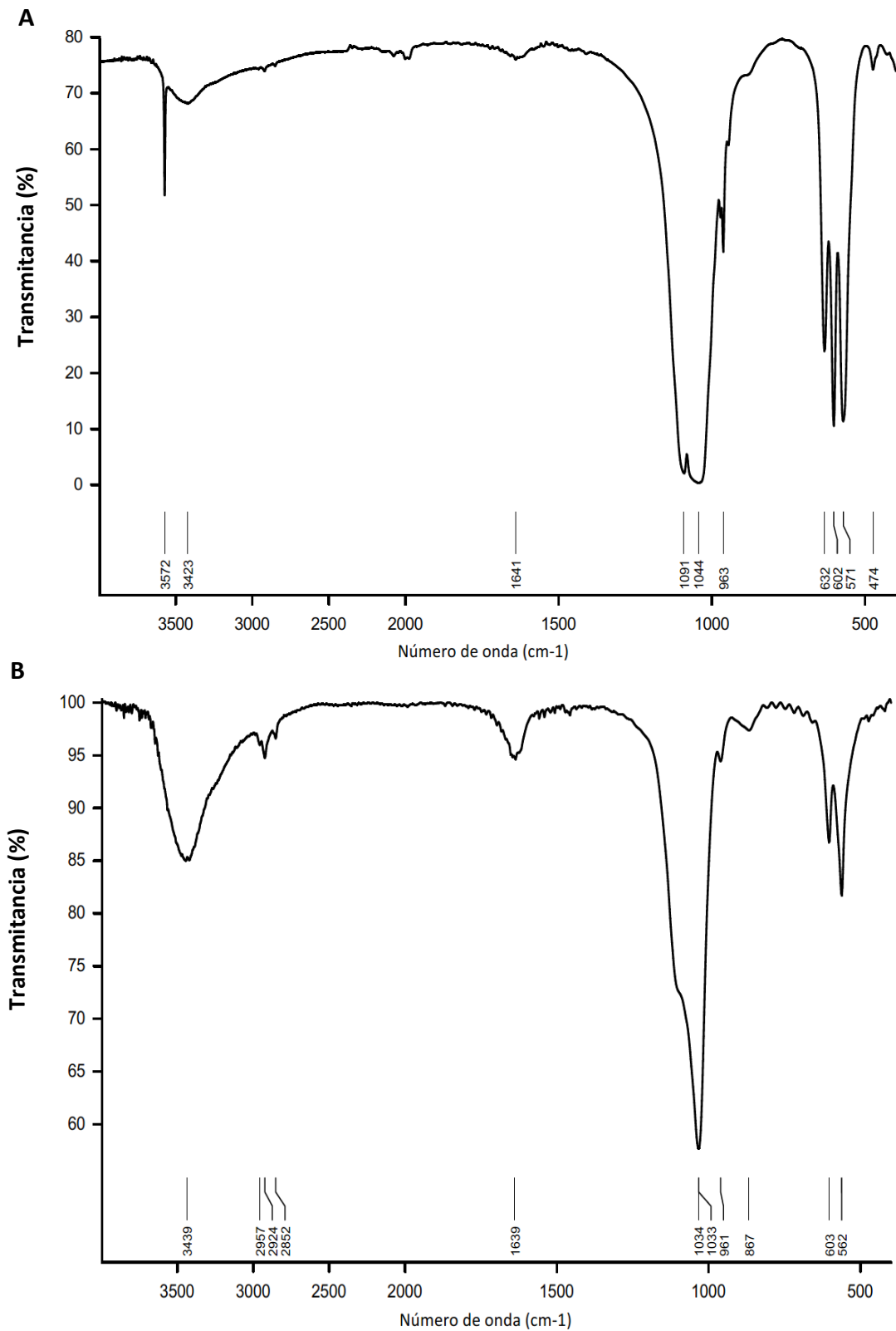


Figura IV.2. Espectros de infrarrojo de la transmittancia en función del número de onda para **(A)** la hidroxiapatita comercial y **(B)** los cristales de fosfato de calcio formados en el experimento *in vitro* de cristalización control en medio NaCl 0.15 M (pH 7.4) y concentraciones de Ca²⁺ y HPO₄²⁻ de 2.5 y 5.5 mM, respectivamente.

IV. RESULTADOS

Una vez caracterizados los cristales de HAP generados en este ensayo, se procedió a evaluar el efecto inhibitor del SNF472 bajo las mismas condiciones experimentales, en el rango de concentraciones 0.19 a 61 μM .

Las curvas de cristalización obtenidas añadiendo SNF472 como inhibidor en el rango de concentraciones 0.19 a 61 μM , se muestran en la Figura IV.3. Las tres concentraciones más altas de SNF472 (30, 46 y 61 μM) inhibieron totalmente la cristalización y se han omitido de la gráfica por motivos de claridad. Como se puede observar, la adición de concentraciones crecientes de SNF472 desplazó las curvas de cristalización hacia la derecha respecto de la curva control sin inhibidor, incrementando el periodo de inducción necesario para la formación de los cristales de HAP de manera dependiente de la concentración.

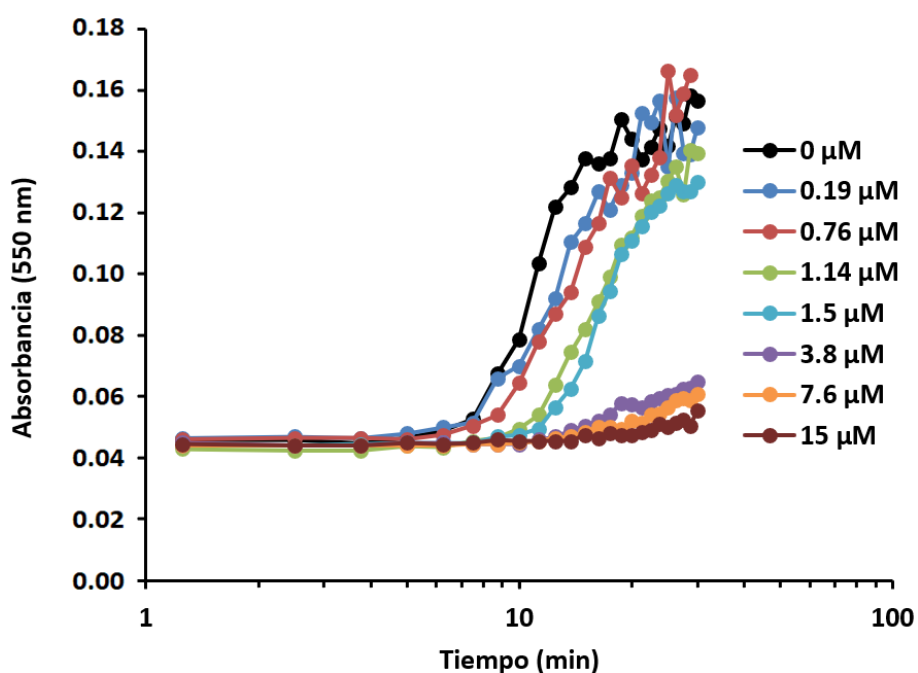


Figura IV.3. Representación semilogarítmica de las curvas de cristalización obtenidas *in vitro* en matriz NaCl 0.15 M (pH 7.4), inducidas por concentraciones de Ca^{2+} y HPO_4^{2-} de 2.5 y 5.5 mM, respectivamente, en presencia de diferentes concentraciones de SNF472 como inhibidor de la cristalización. Los datos representan el promedio de 2 réplicas por concentración (la desviación estándar se ha omitido por claridad).

La Tabla IV.1. recoge los periodos de inducción para cada concentración probada en los dos experimentos de cristalización realizados durante dos días consecutivos. Para la concentración de 3.8 μM de SNF472, el periodo de inducción aumentó hasta 2.4 veces respecto de la curva de cristalización control (sin inhibidor). Tal como se ha comentado, las concentraciones de SNF472 mayores a 15 μM (30, 46 y 61 μM) inhibieron totalmente la formación de cristales de HAP a lo largo de las 4 horas del experimento, por lo que el tiempo de inducción del cristal se consideró superior a los 240 min. Al representar los resultados de los periodos de inducción obtenidos frente a la concentración de SNF472 añadida (Figura IV.4), se observó que la relación entre el incremento del periodo de inducción y la concentración de inhibidor seguía un crecimiento exponencial en el rango de las concentraciones probadas.

IV. RESULTADOS

Tabla IV.1. Periodo de inducción (t_{ind}) de la formación de cristales de fosfato de calcio *in vitro* inducida por adición de calcio 2.5 mM e hidrogenofosfato 5.5 mM en matriz de NaCl 0.15 M a pH 7.4 en presencia de concentraciones crecientes de SNF472. Resultados promedio con desviación estándar, n=2.

SNF472 (μM)	Periodo de inducción (min)	% de incremento respecto al t_{ind} del control
0	8.0 ± 1.9	NC
0.19	7.6 ± 0.3	-5
0.38	8.6 ± 0.2	8
0.76	10.0 ± 1.2	26
1.14	11 ± 3	40
1.5	11.0 ± 0.6	38
3.8	19 ± 8	144
7.6	21 ± 6	160
11	28 ± 9	253
15	35 ± 11	336
30	>240	>2000
46	>240	>2000
61	>240	>2000

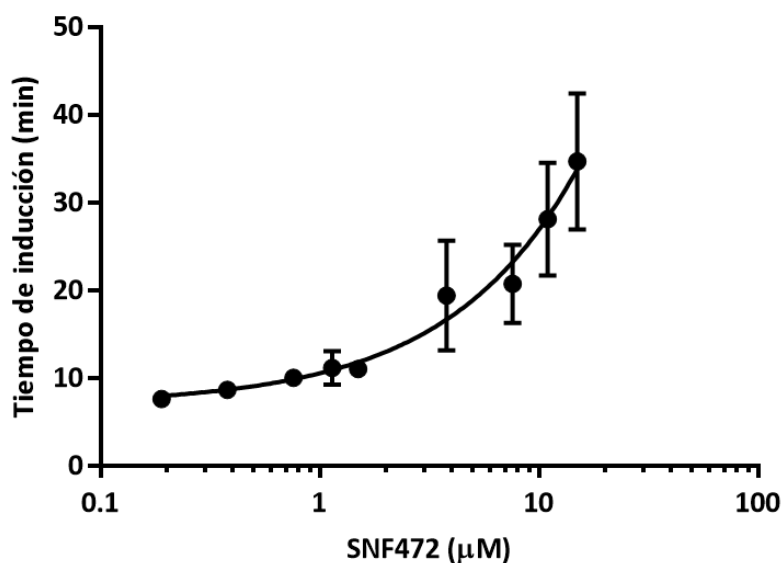


Figura IV.4. Representación de los periodos de inducción obtenidos frente a la concentración de SNF472 añadida (transformación semilogarítmica) en los experimentos *in vitro* de cristalización inducidos por concentraciones de Ca^{2+} y HPO_4^{2-} de 2.5 y 5.5 mM, respectivamente, en matriz NaCl 0.15 M (pH 7.4). Las concentraciones de SNF472 superiores a 15 μM evitaron completamente la inducción de la cristalización en los 240 minutos del ensayo y, por ello, no se representan.

1.1.2. Ensayos de cristalización en matriz plasmática

Para desarrollar el ensayo de farmacodinamia (PD) *in vitro/ex vivo*, se reemplazó la matriz acuosa de NaCl por plasma humano para poder determinar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en dicha matriz.

El conjunto de experimentos de cristalización a diferentes concentraciones de Ca^{2+} y HPO_4^{2-} realizados en matriz plasmática, previa centrifugación a temperatura ambiente, se muestran en la Figura IV.5. En estos experimentos la cristalización empezó casi inmediatamente después de añadir la disolución de calcio, entorno al minuto 6 de incubación. Para cada una de las curvas de cristalización obtenidas se calculó la pendiente en el tramo lineal comprendido entre el minuto 6 (periodo de inducción) y 30.

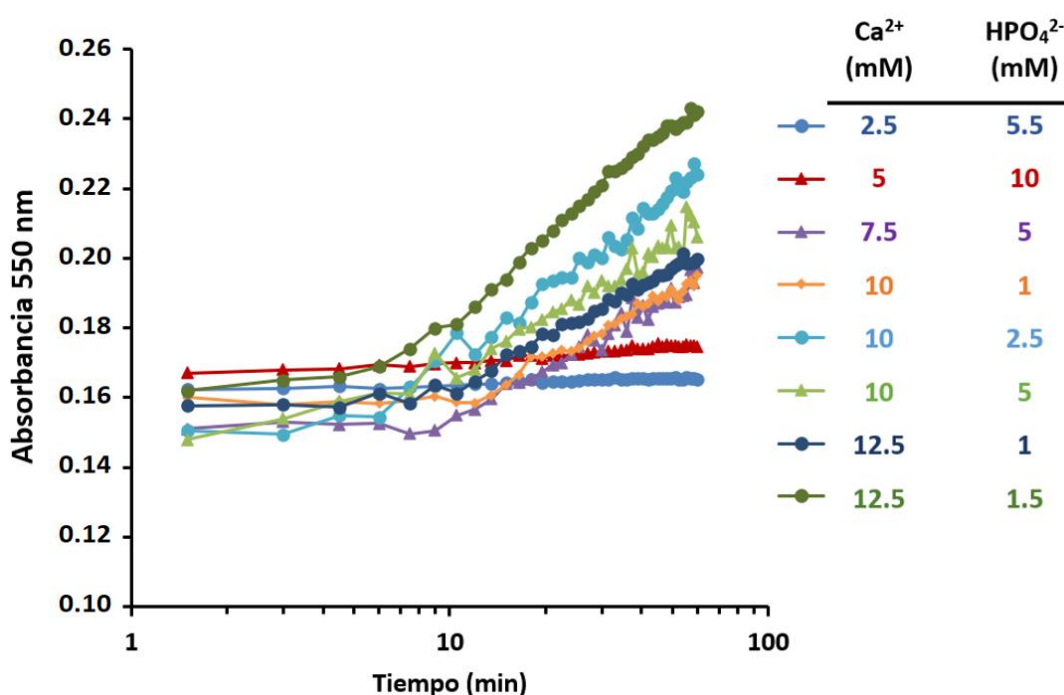


Figura IV.5. Representación semilogarítmica de las curvas de cristalización de fosfato de calcio en plasma blanco variando las concentraciones de Ca^{2+} y HPO_4^{2-} (pH 7.4). Los datos representan el promedio de 3 réplicas (la desviación estándar se ha omitido por claridad).

A partir de las representaciones semilogarítmicas de la Figura IV.5., se calcularon las pendientes que se recogen en la Tabla IV.2. Como se puede observar, las condiciones experimentales que permitieron conseguir mayor pendiente en un tiempo de cristalización de 30 minutos fueron las correspondientes a una mayor sobresaturación, con un aparente mayor impacto de la concentración de calcio, ya que debido a la estequiometría de la HAP $(\text{Ca})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ la sobresaturación del medio es más sensible a la concentración de calcio que la de fosfato.

IV. RESULTADOS

Tabla IV.2. Pendientes calculadas en el tramo lineal comprendido entre los minutos 6 y 30 de las curvas de cristalización de fosfato de calcio obtenidas al incubar diferentes concentraciones de Ca^{2+} y HPO_4^{2-} en matriz plasmática. ^a Promedio \pm desviación estándar (tres réplicas), ^b Coeficiente de determinación (R^2). *NC: pendiente no calculada (no se indujo cristalización).

Ca^{2+} (mM)	HPO_4^{2-} (mM)	Ratio Ca/P	Pendiente ^a (Abs/logmin)	R^2 ^b
2.5	5.5	0.45	0.0038 ± 0.0010	0.91
5	10	0.5	0.0063 ± 0.0006	0.94
7.5	5	1.5	0.041 ± 0.007	0.93
7.5	10	0.75	NC*	NC*
10	1	10	0.055 ± 0.004	0.96
10	2.5	4.0	0.065 ± 0.007	0.94
10	5	2.0	0.042 ± 0.010	0.90
12.5	1	12.5	0.050 ± 0.003	0.98
12.5	1.5	8.3	0.080 ± 0.009	0.99

De las combinaciones de Ca^{2+} y HPO_4^{2-} probadas, se obtuvo una cristalización mayor (mayor pendiente: 0.080 ± 0.009 Abs/logmin) para las concentraciones de calcio 12.5 mM y de fosfato 1.5 mM, con una ratio Ca/P correspondiente a 8.3. Si bien es cierto que esta proporción se aleja de la relación de calcio y fosfato de los fosfatos cálcicos biológicos como la HAP (relación calcio/fosfato de 1.7), nos permitió obtener una cristalización significativa para desarrollar el ensayo de PD en un tiempo de análisis de 30 minutos. Por tanto, a partir de los resultados obtenidos en estos apartados se realizaron los experimentos en microplacas de 96 pocillos con el fin de obtener un método de PD *in vitro/ex vivo* para determinar el potencial de cristalización en plasma humano, fijando las concentraciones finales de Ca^{2+} y HPO_4^{2-} a 12.5 y 1.5 mM, respectivamente.

El cálculo de la precisión intra- e interdía para los valores de pendiente obtenidos en el ensayo de PD en placas de 96 pocillos se resume en la Tabla IV.3. Para cada ensayo por separado, el CV fue inferior al 15%. Para evaluar la repetibilidad y la precisión intermedia se calculó el promedio de los tres valores de CV obtenidos en un mismo día o en tres días consecutivos, respectivamente. En ambos casos el promedio fue menor al 15%, por tanto, el ensayo de PD en muestras de plasma humano fue a la vez repetible y reproducible.

Tabla IV.3. Precisión intra- e interdía del método espectrofotométrico de farmacodinamia por determinación de los coeficientes de variación (CV). Las pendientes se calcularon en el rango lineal comprendido entre el min 6 y 24 de la curva de absorbancia frente al logaritmo de tiempo. ^a Promedio \pm desviación estándar (s) (12 réplicas).

Intradía			
	Pendiente ^a (Abs/logmin)	CV (%)	Promedio CV (%)
Ensayo 1	0.133 ± 0.012	9.1	7.9
Ensayo 2	0.126 ± 0.011	8.8	
Ensayo 3	0.143 ± 0.008	5.8	
Interdía			
	Pendiente ^a (Abs/logmin)	CV (%)	Promedio CV (%)
Día 1	0.090 ± 0.012	13	12
Día 2	0.108 ± 0.010	9.6	
Día 3	0.108 ± 0.014	13	

1.1.3. Inhibición de la cristalización de fosfato de calcio en plasma humano

Una vez comprobado que el ensayo de PD en muestras de plasma humano fue a la vez repetible y reproducible, se procedió a comprobar su posible uso para evaluar la actividad de diferentes inhibidores de la calcificación.

La eficacia en la inhibición de la cristalización de fosfato de calcio en plasma humano tras la adición *in vitro* de siete inhibidores/represores de la cristalización (ya sea SNF472, pirofosfato, ibandronato, pamidronato, tiosulfato de sodio, citrato o fetuína-A) se muestra en la Figura IV.6.

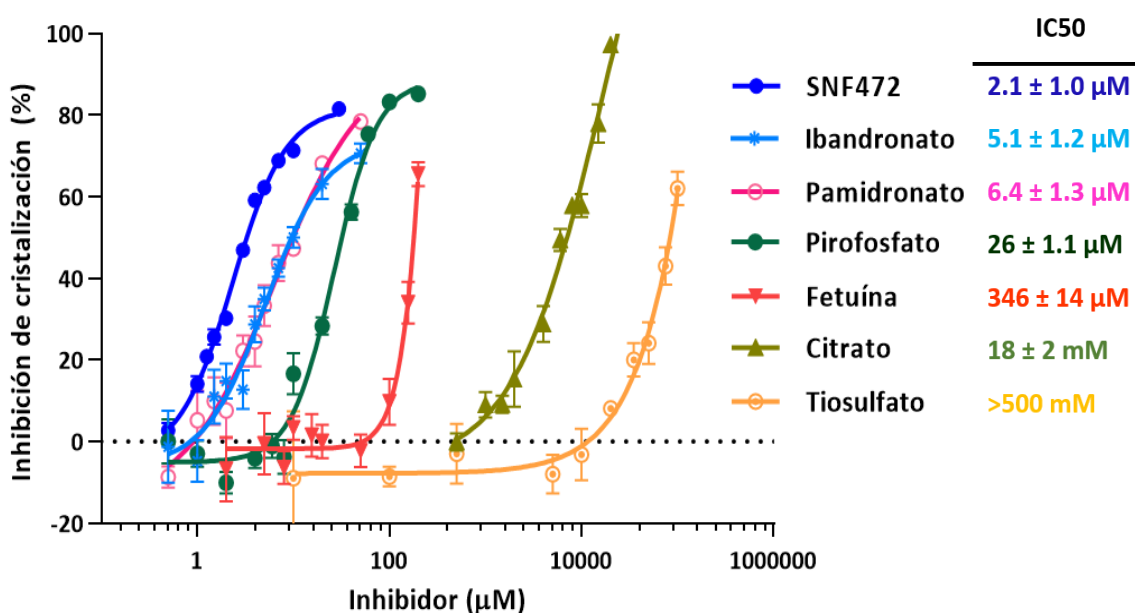


Figura IV.6. Curva concentración-respuesta de inhibición de la cristalización de fosfato de calcio tras la adición *in vitro* de concentraciones crecientes de inhibidores de la cristalización a plasma humano. La cristalización fue inducida por concentraciones de Ca²⁺ y HPO₄²⁻ de 12.5 y 1.5 mM, respectivamente, en matriz plasmática (pH 7.4). Los resultados están expresados como promedio ± desviación estándar (6 réplicas).

Como se observa en la curva de actividad obtenida con el método de PD, el SNF472, con un valor de IC₅₀ de 2.1 ± 1.0 µM, presentó la mayor potencia en la inhibición de la cristalización de fosfato de calcio en plasma. Los dos bifosfonatos evaluados, el ibandronato y el pamidronato, con IC₅₀ de 5.1 ± 1.2 y 6.4 ± 1.3 µM, respectivamente, también fueron eficaces en dicha inhibición, pero menos potentes que el SNF472. El pirofosfato presentó 12 veces menos potencia que el SNF472 en la inhibición de la cristalización (IC₅₀ = 26 ± 1.1 µM). Los resultados para la fetuína-A (IC₅₀ = 346 ± 14 µM) demostraron que el SNF472 es 160 veces más potente que dicha proteína en la inhibición de la cristalización *in vitro*. El citrato y el tiosulfato fueron los compuestos menos potentes, presentando valores de IC₅₀ de 18 ± 2 mM y mayor a 500 mM, respectivamente.

1.2. Validación del ensayo de farmacodinamia para determinar la eficacia del SNF472 en la inhibición de la cristalización *in vitro/ex vivo* en plasma humano

Después de comprobar que el ensayo espectrofotométrico *in vitro/ex vivo* de PD permitió evaluar y discriminar la actividad de diferentes inhibidores de la calcificación, se procedió a validarlo para el SNF472 como inhibidor.

Los parámetros que se evaluaron fueron: linealidad, precisión bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, efecto de dilución de la muestra y estabilidad de conservación de las muestras tras la adición *ex vivo* de SNF472 a diferentes períodos de tiempo y bajo ciclos de congelación / descongelación.

Los resultados obtenidos para evaluar la linealidad del ensayo de PD para el SNF472 como inhibidor en el rango de concentraciones de 0.5 a 30 μM se muestran en la Figura 3.7. En la Figura IV.7A se puede observar la curva concentración-respuesta obtenida para el SNF472 en dicho rango de concentraciones. Al aplicar un ajuste no lineal a la curva de concentración-respuesta, se determinaron las concentraciones teóricas para inhibir la cristalización *in vitro* de fosfato de calcio un 30, 50, 80 y 95%. Estas concentraciones fueron 1.17, 2.1, 5.6 y 16.7 μM , respectivamente. En el rango de concentraciones hasta 4 μM se obtuvo una relación directamente proporcional entre la inhibición de la cristalización y la concentración de SNF472 en plasma, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.99. Esta porción lineal de la curva concentración-respuesta se utilizó para calcular el límite inferior de cuantificación (LLOQ) para el método de PD, obteniendo un valor de 0.77 μM de SNF472 (Figura IV.7B).

El perfil de precisión de la Figura IV.7C se obtuvo con la representación del CV (%) (relación entre la desviación estándar y el promedio de inhibición obtenido para cada concentración, $n=6$) frente a la concentración de SNF472 en escala logarítmica. Como se puede observar en la figura, a medida que aumenta progresivamente la concentración, la dispersión de las medidas en la inhibición de la cristalización decrece exponencialmente (menor valor de CV). Las líneas punteadas delimitan el rango de trabajo que se establece con un límite de CV del 20%.

Los resultados obtenidos para calcular la precisión (CV%) intra- e interdía del método de PD para determinar la eficacia del SNF472 en la inhibición de la cristalización *in vitro/ex vivo* de fosfato de calcio en plasma humano se resumen en la Tabla IV.4. La precisión intradía (repetibilidad) fue baja en el LLOQ, con un valor de CV del 62%. En cambio, a partir de concentraciones de SNF472 en plasma iguales a la IC_{30} (1.17 μM), los valores de CV fueron menores al 20%, obteniéndose valores de precisión aceptables. La precisión interdía (reproducibilidad) fue baja para las concentraciones de SNF472 en plasma iguales a LLOQ y IC_{30} (109 y 38%, respectivamente), pero a partir de la IC_{50} , los valores de precisión fueron aceptables (CV<20%), aumentando progresivamente con la concentración de SNF472 en plasma.

IV. RESULTADOS

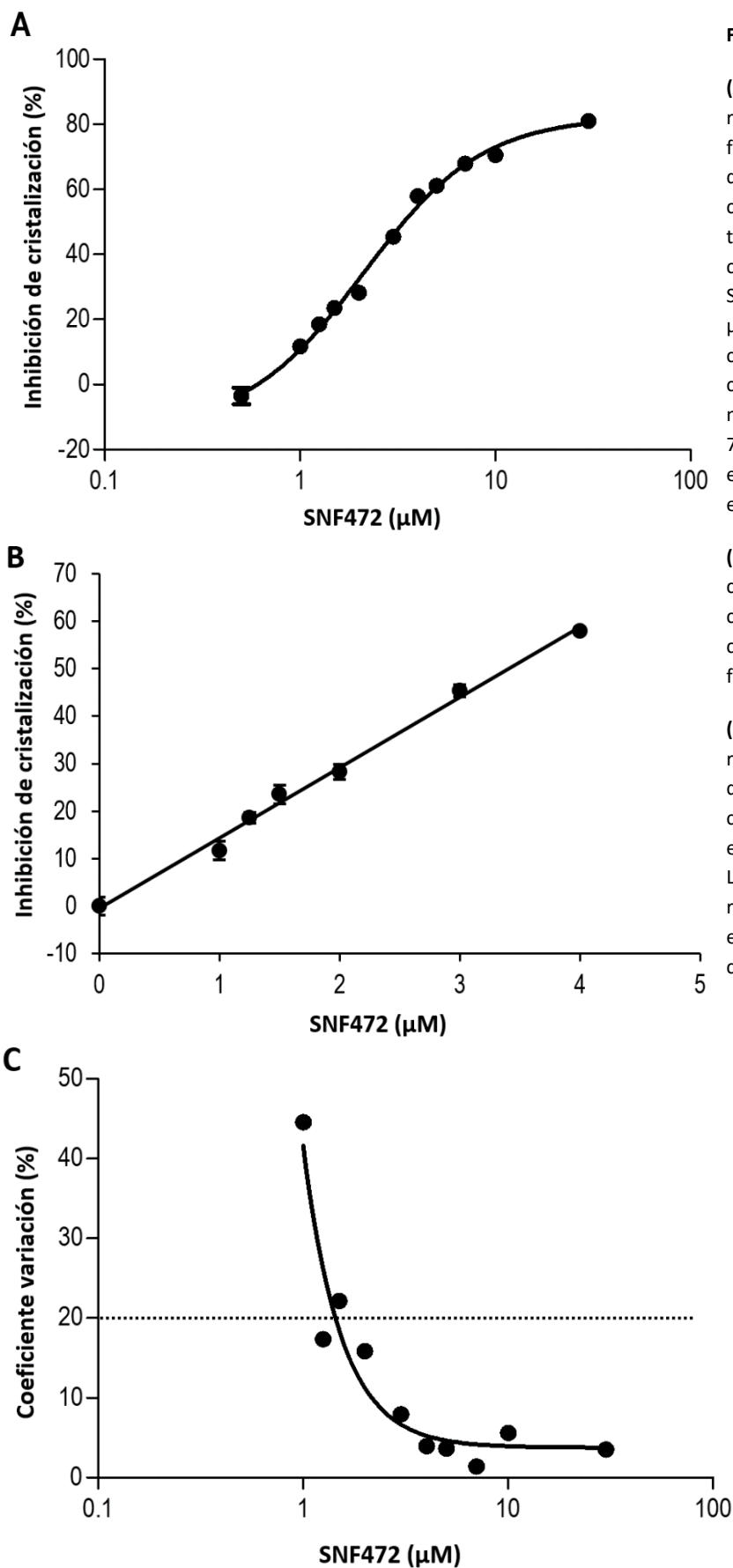


Figura IV.7.

(A) Curva concentración-respuesta del ensayo de farmacodinamia para determinar la inhibición de la cristalización de fosfato de calcio tras la adición *in vitro* de concentraciones crecientes de SNF472 en el rango de 0.5-30 μM en plasma humano. La cristalización fue inducida por concentraciones de Ca²⁺ 12.5 mM y de HPO₄²⁻ 1.5 mM (pH 7.4). Los resultados están expresados como promedio ± error estándar de la media (n=6).

(B) Porción lineal de la curva de concentración-respuesta para calcular el límite inferior de cuantificación para el método de farmacodinamia.

(C) Perfil de precisión, representación del coeficiente de variación frente a la concentración de SNF472 expresada en escala logarítmica. Las líneas punteadas delimitan el rango de trabajo que se establece con un límite de coeficiente de variación del 20%.

IV. RESULTADOS

Tabla IV.4. Precisión intra- e interdía para el método de farmacodinamia para determinar la eficacia del SNF472 en la inhibición de la cristalización *in vitro/ex vivo* de fosfato de calcio en plasma humano. La cristalización fue inducida por concentraciones de Ca^{2+} y HPO_4^{2-} de 12.5 y 1.5 mM, respectivamente, en matriz plasmática (pH 7.4). ^a Promedio \pm s (tres ensayos en un mismo día). ^b Promedio \pm s (tres ensayos en tres días consecutivos). CV: coeficiente de variación. S: desviación estándar.

Precisión intradía (repetibilidad)		
SNF472 (μM)	Inhibición cristalización ^a (%)	Precisión (CV%)
0.77	9.9 \pm 1.4	62
1.17	21.1 \pm 1.7	17
2.1	43.4 \pm 1.6	7.2
5.6	69.6 \pm 1.9	3.6
16.7	78 \pm 2	3.0
Precisión interdía (reproducibilidad)		
SNF472 (μM)	Inhibición cristalización ^b (%)	Precisión (CV%)
0.77	9 \pm 5	109
1.17	17 \pm 8	38
2.1	40 \pm 8	8.7
5.6	65 \pm 4	3.1
16.7	77 \pm 3	2.8

La Figura IV.8A muestra los resultados obtenidos para evaluar el efecto de la dilución de muestras de plasma con SNF472. Las muestras diluidas 1/10 y 1/100 con plasma blanco presentaron valores similares de inhibición de la cristalización de fosfato de calcio a las muestras control sin diluir con la misma concentración final. Los valores de precisión fueron aceptables para las concentraciones finales en plasma iguales o superiores al IC_{50} (2.1 μM). Por tanto, las muestras de plasma se pueden diluir hasta un factor de 100 para obtener valores de SNF472 en plasma en el rango lineal del método espectrofotométrico de PD.

La estabilidad del SNF472 en plasma a -80°C tras tres ciclos de congelación-descongelación se representa en la Figura IV.8B. La inhibición de la cristalización obtenida en muestras de plasma congeladas y descongeladas al día siguiente presentó valores semejantes a las muestras control para todas las concentraciones analizadas, sin observarse diferencias significativas en ninguna de las actividades inhibitorias. En el segundo y tercer ciclos de congelación/descongelación, solo las muestras de plasma con concentraciones finales de SNF472 correspondientes a la IC_{80} y IC_{95} , (5.6 y 16.7 μM , respectivamente) fueron estables, mostrando actividades inhibitorias similares a los respectivos controles. Por consiguiente, las muestras de plasma con concentraciones de SNF472 iguales o superiores a 5.6 μM (IC_{80}) y guardadas a -80°C , pueden congelarse y descongelarse hasta tres veces antes de realizar el ensayo de PD.

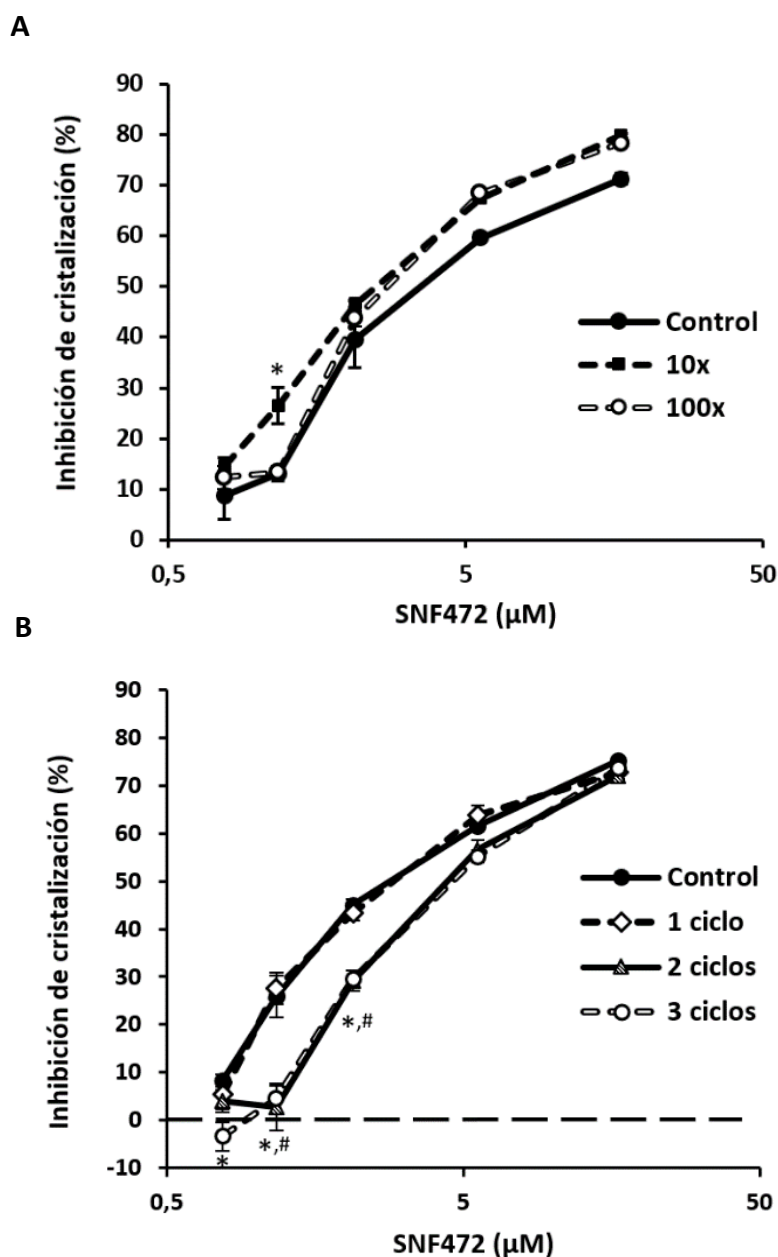


Figura IV.8. Efecto de dilución 1/10 y 1/100 en muestras de plasma con SNF472 y evaluación de la estabilidad de las muestras de plasma con SNF472 bajo ciclos de congelación/descongelación. **(A)** Inhibición de la cristalización en muestras de plasma no diluidas (control) y diluidas con plasma blanco (1/10 y 1/100) a concentraciones finales de SNF472 0.77, 1.17, 2.1, 5.6 y 16.7 µM. **(B)** Inhibición de la cristalización en muestras de plasma para evaluar su estabilidad a -80°C tras uno, dos o tres ciclos de congelación/descongelación en días consecutivos. Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición de la cristalización respecto al valor obtenido sin adición de SNF472. Los resultados se presentan como promedio ± desviación estándar (n=6 por concentración). (*) Diferencias significativas vs. muestras control, (#) Diferencias significativas vs. un ciclo de congelación/descongelación, P<0.05.

IV. RESULTADOS

Los resultados de estabilidad del SNF472 en plasma para el ensayo de PD durante diferentes periodos de tiempo y variando las condiciones de temperatura, ya sea temperatura ambiente, nevera, congelación o ultracongelación, se recogen en la Figura IV.9A-D.

El ensayo de estabilidad a temperatura ambiente demostró que las muestras de plasma con SNF472 inhiben la cristalización de manera similar a las muestras control (ensayadas inmediatamente tras su preparación) durante un periodo de hasta 2 horas a todas las concentraciones probadas (Figura IV.9A).

Los resultados de la estabilidad en nevera (4°C) mostraron que todas las concentraciones probadas de SNF472 en plasma fueron estables durante 4 horas de almacenamiento en nevera, obteniendo resultados del potencial inhibitorio de la cristalización de fosfato de calcio similares a las muestras control directamente ensayadas (Figura IV.9B). A las 8 horas de almacenamiento, las concentraciones iguales a la IC₅₀ o superiores ($\geq 2.1 \mu\text{M}$) fueron estables. Sin embargo, después de 24 horas solo las concentraciones correspondientes a la IC₈₀ y IC₉₅, (5.6 y 16.7 μM , respectivamente) mantuvieron su estabilidad.

La estabilidad de las muestras de SNF472 en plasma conservadas en condiciones de congelación y ultracongelación (-20 y -80°C, respectivamente) fue el último parámetro estudiado en la validación del ensayo de PD. En la Figura IV.9C se puede observar que el SNF472 en plasma conservado a -20°C es estable durante 4 semanas a concentraciones iguales a la IC₃₀ o superiores ($\geq 1.17 \mu\text{M}$). Los resultados para la estabilidad del SNF472 conservado a -80°C durante un periodo máximo de 48 semanas se pueden observar en la Figura IV.9D, y demuestran que la eficacia de SNF472 en la inhibición de la cristalización de fosfato de calcio en plasma conservado a -80°C no muestra diferencias significativas respecto a las muestras control ensayadas a tiempo inicial a todas las concentraciones testeadas. Por tanto, la actividad en la inhibición de la cristalización del SNF472 en plasma es estable durante 48 semanas si se conserva a -80°C.

IV. RESULTADOS

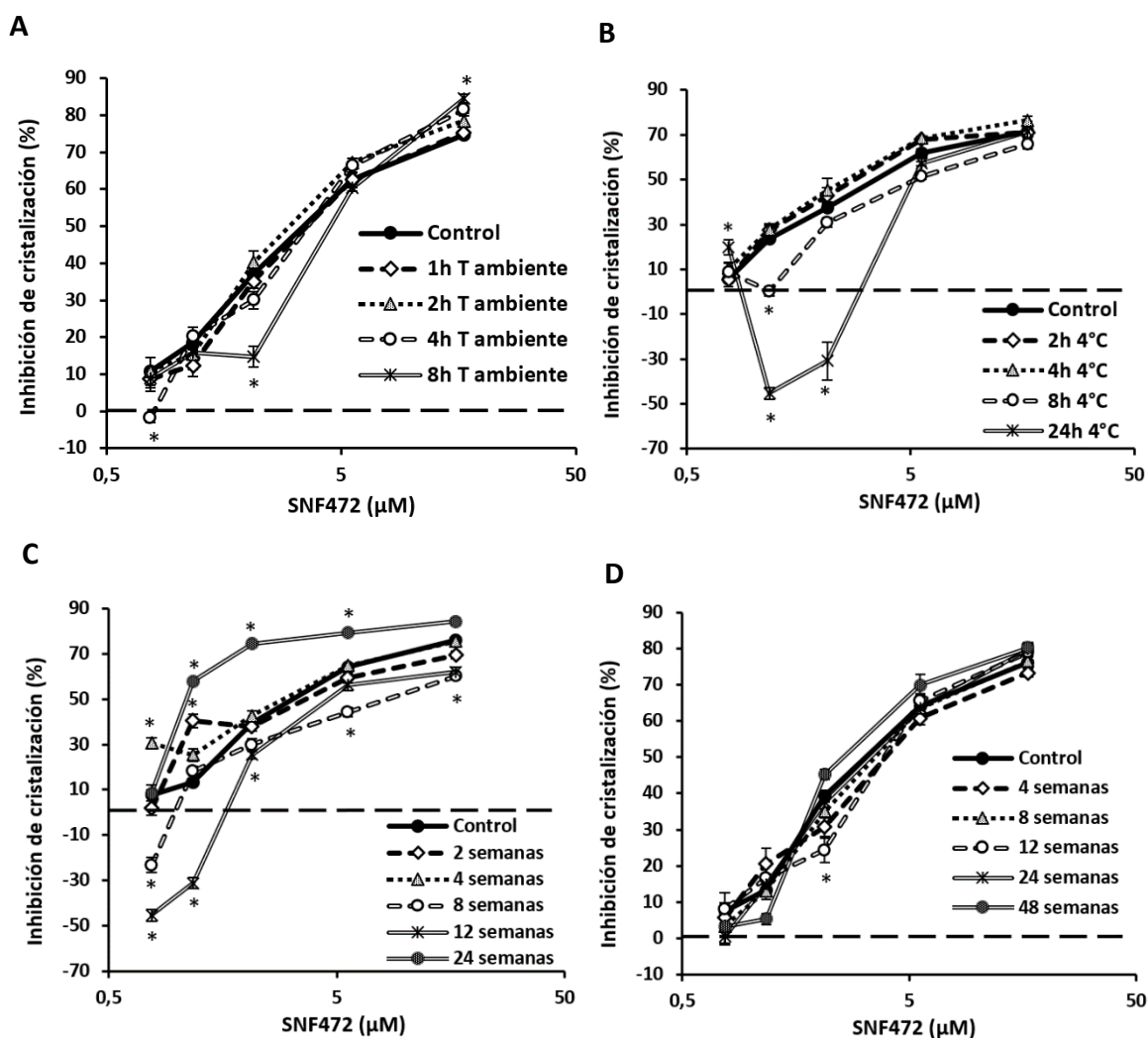


Figura IV.9. Estabilidad de almacenamiento de muestras de plasma con SNF472 (concentraciones 0.77, 1.17, 2.1, 5.6 y 16.7 μM) a diferentes condiciones de temperaturas y durante diversos periodos de tiempo. **(A)** Estabilidad de las muestras de plasma conservadas a temperatura ambiente durante un periodo de hasta 8 horas. **(B)** Estabilidad de las muestras de plasma conservadas a 4°C durante un máximo de 24 horas. **(C)** Estabilidad de las muestras de plasma con SNF472 en condiciones de congelación (-20°C) durante un tiempo de hasta 24 semanas. **(D)** Estabilidad del SNF472 en plasma en condiciones de ultracongelación (-80°C) durante 48 semanas. Todos los resultados se expresan en porcentaje de inhibición de la cristalización respecto a la pendiente sin adición de SNF472 (promedio \pm desviación estándar, n=6 por concentración). (*) Diferencias significativas vs. muestra control, ensayada a tiempo cero, $p < 0.05$.

1.3. Verificación del ensayo de farmacodinamia en muestras de plasma de rata

Después de validar el método espectrofotométrico de PD en plasma humano utilizando el SNF472 como inhibidor, se verificó la aplicabilidad de dicho método en plasma de rata con el fin de buscar correlaciones entre la cristalización *ex vivo* en plasma y la inhibición de la calcificación tisular *in vivo* en futuros estudios con animales.

Los resultados del primer ensayo de PD para evaluar la linealidad del método en plasma de rata tras la adición *in vitro* de SNF472 a las concentraciones 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 7 y 10 μM se representan en la Figura IV.10A, donde se define la curva dosis-respuesta en dicha matriz. Como se puede observar, el intervalo de respuesta lineal de la cristalización de fosfato de calcio en plasma de rata se obtuvo en el rango de concentración 1 - 10 μM (líneas verticales discontinuas), con un R^2 de 0.96. La adición *in vitro* de SNF472 a las muestras de plasma de rata redujo la cristalización de fosfato de calcio en plasma de manera dependiente a la concentración, alcanzando una inhibición máxima del 75%. Después de aplicar un ajuste no lineal a la curva de concentración-respuesta obtenida, se determinó que la concentración teórica para inhibir la cristalización de fosfato de calcio un 50% (IC_{50}) era de $5.2 \pm 1.1 \mu\text{M}$.

En el segundo ensayo se evaluó la eficacia del SNF472 *ex vivo* administrando el inhibidor de la cristalización a diferentes dosis por vía subcutánea. En la Figura IV.10B se representan las dosis administradas a los animales y los valores de concentración máxima de SNF472 en plasma (analizados por HPLC-MS/MS) obtenidos para estas dosis 20 minutos después de la administración (tres animales por dosis). Los resultados muestran una relación directamente proporcional entre las concentraciones de SNF472 en plasma y las dosis administradas *in vivo* a los animales. Las concentraciones obtenidas de SNF472 van desde una concentración de 14 μM para la dosis más baja de 20 mg/kg, hasta 176 μM para la dosis más alta administrada (100 mg/kg). Por consiguiente, para realizar el ensayo *ex vivo* de PD, dichas muestras de plasma se diluyeron 10 veces con plasma blanco de rata para situarlas dentro del rango lineal obtenido en la curva dosis-respuesta anterior.

Los resultados del ensayo *ex vivo* de PD en estas muestras diluidas se recogen en la Figura IV.10C, donde se observa que la administración subcutánea de SNF472 redujo el potencial de cristalización en plasma hasta un 66%. Además, la inhibición de la cristalización *ex vivo* de fosfato de calcio incrementó proporcionalmente con la concentración de SNF472 en plasma ($R^2 = 0.92$).

IV. RESULTADOS

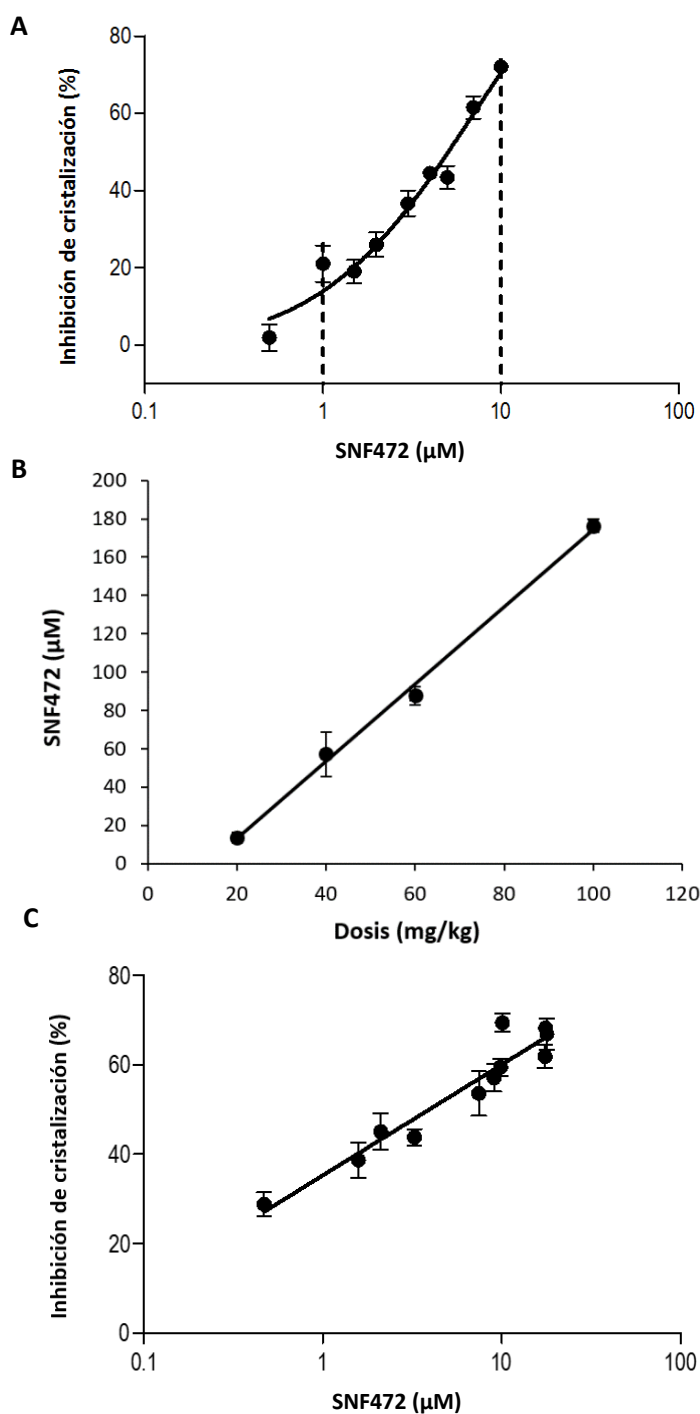


Figura IV.10. Verificación del ensayo *ex vivo* de PD en muestras de plasma de rata con diferentes concentraciones de SNF472 añadido *in vitro* al plasma o administrado *in vivo* por vía subcutánea. **(A)** Curva concentración-respuesta de la inhibición de la cristalización de fosfato de calcio tras la adición *in vitro* de concentraciones crecientes de SNF472 en el rango de 0.5-10 μM a plasma. Las líneas discontinuas representan el intervalo en que la respuesta de inhibición es proporcional a la concentración de SNF472. Los resultados están expresados como promedio \pm SE, 8 réplicas. **(B)** Niveles de SNF472 en plasma obtenidos a los 20 minutos de administrar dosis subcutáneas de 20, 40 60 o 100 mg/kg a las ratas. Los resultados representan el promedio de concentración plasmática \pm SE, n=3. **(C)** Ensayo *ex vivo* de PD para determinar la inhibición de la cristalización en muestras de plasma de rata a las que se administró el SNF472 *in vivo* por vía subcutánea. Los resultados se expresan como promedio \pm SE, n=3.

IV. RESULTADOS

En la Tabla IV.5 se recogen los valores promedio obtenidos de los niveles circulantes de SNF472 en plasma analizados por HPLC-MS/MS y los de la inhibición de la cristalización *ex vivo* obtenidos aplicando el ensayo de PD a las muestras diluidas, para cada dosis administrada en rata.

Tabla IV.5. Niveles de SNF472 en plasma de rata obtenidos 20 minutos después de la administración subcutánea de diferentes dosis e inhibición de la cristalización tras la dilución 1/10 de estas muestras. ^a Promedio \pm SE, n=3. LLOQ: límite inferior de cuantificación (0.76 μ M).

Dosis (mg/kg)	Concentración de SNF472 (niveles circulantes) (μ M) ^a	Concentración de SNF472 (dilución 1/10) (μ M) ^a	Inhibición cristalización (%) ^a
0	<LLOQ	<LLOQ	0.0 \pm 1.9
20	14 \pm 3	1.4 \pm 0.3	38 \pm 3
40	57 \pm 12	5.7 \pm 1.2	44 \pm 5
60	88 \pm 5	8.8 \pm 0.5	57 \pm 2
100	176 \pm 3	17.6 \pm 0.3	65.7 \pm 1.6

1.4. Ensayo de farmacodinamia en pacientes de hemodiálisis

Después de validar el método espectrofotométrico de PD en plasma humano utilizando el SNF472 como inhibidor y verificar su uso en plasma de rata nos propusimos aplicar el ensayo de PD a muestras de plasma de voluntarios sanos y pacientes en tratamiento de hemodiálisis (HD), pre y post tratamiento, para evaluar y comparar el potencial de cristalización de fosfato de calcio de las dos poblaciones. Adicionalmente, nos propusimos comparar el efecto del SNF472 añadido *in vitro* en la inhibición de la cristalización en plasma de estas dos poblaciones.

Los resultados del ensayo de PD realizado con las muestras de plasma de voluntarios no dializados y de pacientes de HD pre- y post-tratamiento se recogen en la Figura IV.11A. Como se puede observar, el potencial de cristalización de los tres grupos de muestras no presentó diferencias significativas, obteniéndose en los diferentes grupos un valor de pendiente alrededor de 0.10 (Abs/logmin).

Después de la adición *in vitro* de las concentraciones 0.77, 1.17, 2.1, 5.6 y 16.7 μ M finales de SNF472 al plasma de cada individuo se realizó en ensayo de PD (Figura IV.11B). El potencial de cristalización se redujo de manera dependiente a la concentración de inhibidor añadida para los tres grupos de individuos, consiguiendo inhibiciones máximas del 85, 88 y 78% en voluntarios sanos, pacientes de pre- y post-diálisis, respectivamente. La respuesta a la inhibición de la cristalización de fosfato de calcio fue significativamente mayor ($p < 0.05$) a las concentraciones 0.77, 1.17, 2.1 μ M para el grupo de voluntarios sanos. Esta tendencia se observó hasta concentraciones 5 μ M de SNF472. En cambio, a mayores concentraciones, la inhibición de la cristalización *in vitro* del plasma fue similar para el grupo de voluntarios no dializados y pacientes pre-diálisis. En este rango de concentraciones de inhibidor probadas (5.6 y 16.7 μ M), el plasma de pacientes post-diálisis siguió inhibiendo la cristalización en un porcentaje significativamente menor ($p < 0.05$).

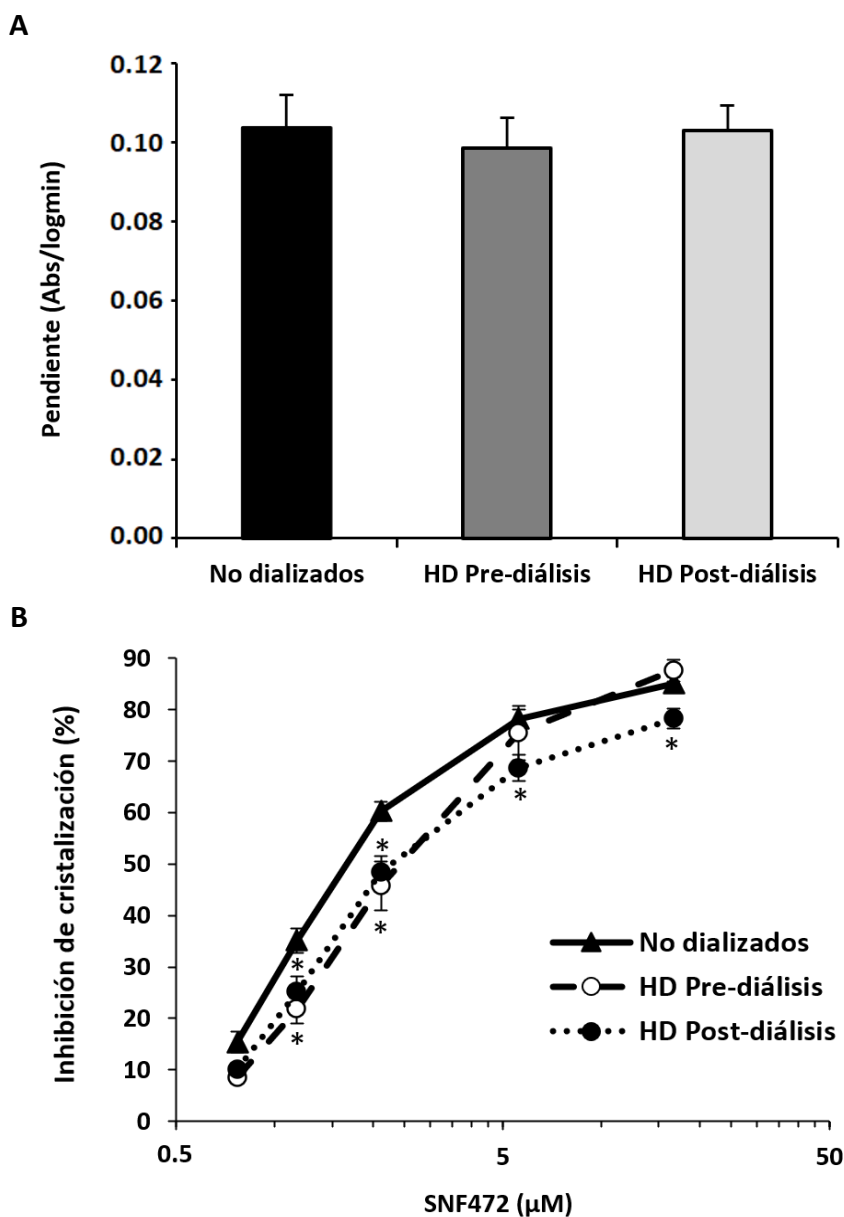


Figura IV.11. Potencial de cristalización obtenido en muestras de plasma de voluntarios no dializados y de pacientes de hemodiálisis (HD) pre- y post-tratamiento, sin adición de SNF472 y tras la adición *in vitro* del inhibidor. **(A)** Valores de las pendientes (absorbancia frente al logaritmo del tiempo) obtenidas en el ensayo de farmacodinamia para cada grupo. Los resultados se expresan como promedio \pm SE (13 voluntarios no dializados y 12 pacientes de HD). **(B)** Curva dosis-respuesta de inhibición de la cristalización tras la adición *in vitro* de concentraciones 0.77, 1.17, 2.1, 5.6 y 16.7 μ M de SNF472 a las muestras de plasma de los tres grupos de estudio. Los resultados se expresan como promedio \pm SE (13 voluntarios no dializados y 12 pacientes de HD, pre- y post-diálisis). Análisis estadístico: ANOVA de un factor, (*) diferencias significativas vs. voluntarios no dializados.

2. Estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos de eficacia para la prevención y tratamiento de la progresión de la calcificación cardiovascular en modelos animales

El segundo apartado de resultados de este trabajo de tesis incluye cinco estudios *in vivo* en rata. El primero es un estudio de PK por infusión intravenosa de SNF472. Un segundo estudio se llevó a cabo para desarrollar y optimizar el modelo experimental de CCV por sobredosis de vitamina D₃ para poder realizar los posteriores estudios de eficacia con SNF472. El efecto del SNF472 en la prevención de la CCV inducida por vitamina D₃ se evaluó en dos estudios de eficacia. Finalmente, se realizó un último estudio de eficacia para evaluar la capacidad del SNF472 para inhibir la progresión de la CCV inducida por vitamina D₃.

2.1. Farmacocinética por infusión intravenosa de SNF472 en rata

Las Tablas IV.6 y IV.7 muestran los niveles de SNF472 en plasma obtenidos por HPLC-MS/MS a los diferentes tiempos de muestreo de cada PK (10 mg/kg de SNF472, dosis única). Como se puede observar en las tablas, a tiempo cero no se obtuvieron niveles cuantificables de SNF472 en plasma. Durante la infusión intravenosa, los niveles de SNF472 en sangre aumentaron gradualmente hasta llegar a la máxima concentración, que se alcanzó al final de la infusión, es decir, a las 2.5 o 4 horas.

Tabla IV.6. Niveles de SNF472 en plasma de rata obtenidos en la farmacocinética intravenosa de 2.5 horas de infusión a una dosis de 10 mg/kg de SNF472. ^a Promedio \pm s, n=3; ^b Promedio \pm s, n=2; **Valor excluido. Los valores menores al límite inferior de cuantificación (LLOQ = 0.76 μ M) se consideraron cero para los cálculos. NC: no calculado.

Tiempo (h)	Concentración SNF472 por rata (μ M)			SNF472 (μ M) ^a	CV (%)
0	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	NC
0.25	6.28	9.87	6.99	7.7 \pm 1.9	25
0.5	14.18	8.38	13.33	12 \pm 3	26
1	0.89**	13.42	18.64	16 \pm 4 ^b	23
2.5	27.21	23.23	14.17	22 \pm 7	31
2.67	33.54	8.66	7.30	17 \pm 15	90
3	0.76	0.99	4.16	2.0 \pm 1.9	96
3.5	<LLOQ	3.65	<LLOQ	1.2 \pm NC	NC

Tabla IV.7. Niveles de SNF472 en plasma de rata obtenidos en la farmacocinética intravenosa de 4 horas de infusión a una dosis de 10 mg/kg de SNF472. ^a Promedio \pm s, n=3; ^b Promedio \pm s, n=2; **Valor excluido. Los valores menores al LLOQ (0.76 μ M) se consideraron cero para los cálculos. NC: no calculado.

Tiempo (h)	Concentración SNF472 por rata (μ M)			SNF472 (μ M) ^a	CV (%)
0	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	NC
0.25	4.42	4.21	<LLOQ **	4.31 \pm 0.14 ^b	3.3
1	6.59	5.89	6.68	6.4 \pm 0.4	6.8
2	14.48	9.73	10.56	12 \pm 3	22
4	23.34	21.92	<LLOQ **	22.6 \pm 1.0 ^b	4.4
4.17	11.84	2.50	11.96	9 \pm 5	62
4.5	2.40	1.85	2.51	2.3 \pm 0.4	16
5	1.90	1.49	<LLOQ **	1.7 \pm 0.3 ^b	17

IV. RESULTADOS

Los perfiles farmacocinéticos para los tiempos de infusión 2.5 y 4 horas se muestran en las Figuras IV.12 y IV.13, respectivamente. La concentración plasmática aumentó rápidamente al inicio de la infusión, de manera más acentuada para el tiempo de infusión corto. Esta tendencia inicial cambió y se ralentizó entorno a la concentración 7.5 y 5 μM , para la infusión de 2.5 y 4 horas, respectivamente.

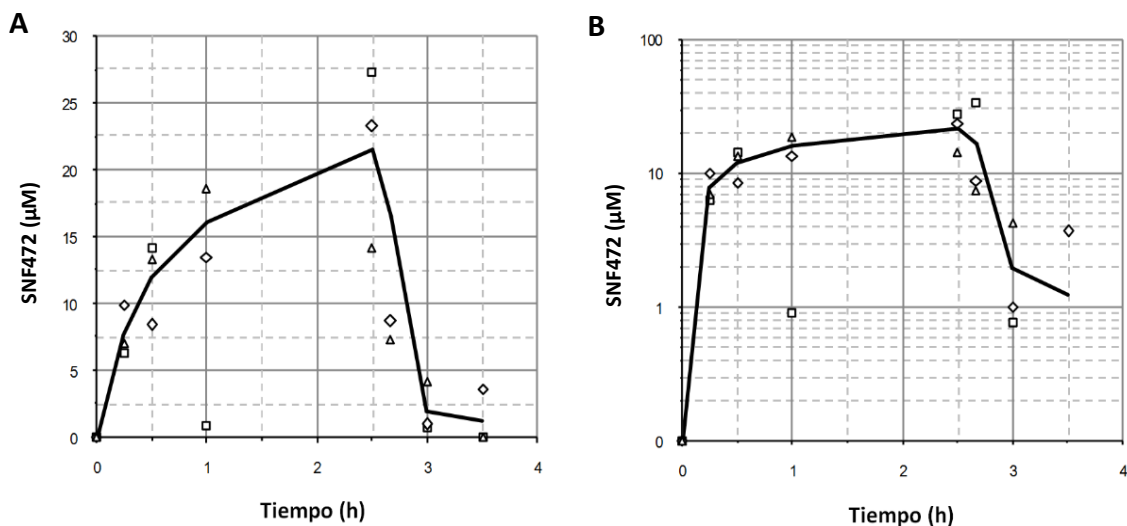


Figura IV.12. Perfil de concentración plasmática en función del tiempo después de una administración única de SNF472 por infusión intravenosa de 2.5 horas (dosis 10 mg/kg). (A) Curva de concentración plasmática frente al tiempo. (B) Representación semilogarítmica. Las figuras geométricas (cuadrado, rombo y triángulo) representan los niveles individuales de SNF472 obtenidos en cada animal.

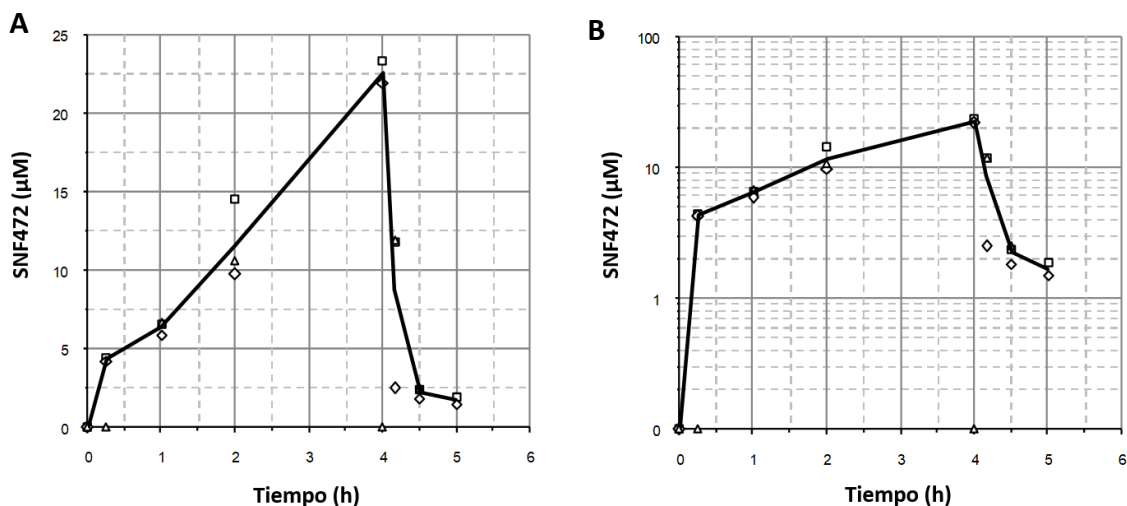


Figura IV.13. Perfil de concentración plasmática en función del tiempo después de una administración única de SNF472 por infusión intravenosa de 4 horas (dosis 10 mg/kg). (A) Curva de concentración plasmática frente al tiempo. (B) Representación semilogarítmica. Las figuras geométricas (cuadrado, rombo y triángulo) representan los niveles individuales de SNF472 obtenidos en cada animal.

Como se puede observar en las dos figuras, no se alcanzó el estado estacionario durante la infusión continua del compuesto para ninguno de los dos tiempos de infusión evaluados. Después del pico de concentración máxima, la concentración de SNF472 descendió rápidamente al interrumpir la administración. Esto indica que el SNF472 se elimina de la circulación con rapidez, con lo que tiene un tiempo de vida corto en sangre. Al observar las

IV. RESULTADOS

curvas de las Figuras IV.12 y IV.13, se intuye que la eliminación plasmática para el SNF472 podría responder a un modelo bicompartimental. Sin embargo, la falta de puntos al final de la curva no permite sacar una conclusión definitiva.

Los resultados de los parámetros farmacocinéticos para los dos tiempos de infusión se resumen en la Tabla IV.8, y se calcularon con ajuste a un modelo no compartimental, como es habitual.

Tabla IV.8. Parámetros farmacocinéticos obtenidos después de una única infusión intravenosa de SNF472 de 2.5 y 4 horas a una dosis de 10 mg/kg. ^a Promedio \pm s, n=3. ^b Promedio \pm s, n=2.

Parámetro	2.5 h de infusión	4 h de infusión
C_{max} (μM)	22 \pm 7 ^a	22.6 \pm 1.0 ^b
t_{max} (h)	2.5	4.0
t_{1/2} (h)	0.234	0.373
AUC_{0-t} (μmol·h/L)	45.7	53.2
AUC_{inf} (μmol·h/L)	46.0	54.0
Cl (L/h/kg)	0.329	0.281
V_d (L/kg)	0.111	0.151
V_{ss} (L/kg)	0.569	0.825

C_{max}: concentración máxima; t_{max}: tiempo en el que se obtiene la C_{max}; t_{1/2}: semivida; AUC: área bajo la curva; Cl: aclaramiento; V_d: volumen de distribución; V_{ss}: volumen de distribución en el estado estacionario

Como se puede observar en la tabla, el valor promedio de C_{max} obtenido para el tiempo de infusión de 2.5 horas (22 \pm 7 μM) fue similar al alcanzado para el régimen de infusión de 4 horas (22.6 \pm 1.0 μM). Al acabar la infusión, los niveles de SNF472 en sangre decrecieron drásticamente para los dos períodos de infusión, obteniéndose tiempos de vida media cortos de 14 y 22 minutos para la infusión de 2.5 y 4 horas, respectivamente (R² <0.85; valores orientativos).

El área bajo la curva desde tiempo 0 al último tiempo de concentración cuantificable (AUC_{0-t}) calculada para los dos períodos de infusión fue similar, obteniéndose valores de 45.7 μmol·h/L y 53.2 μmol·h/L para la infusión de 2.5 y 4 horas, respectivamente. Por tanto, la exposición de los animales al SNF472 a lo largo del tiempo fue un 14% mayor durante el período de infusión de 4 horas. Con respecto a la exposición total (AUC_{inf}) se calcularon unos valores de 46.0 y 54.0 μmol·h/L para la infusión de 2.5 y 4 horas, respectivamente. Los valores obtenidos para AUC_{0-t} y AUC_{inf} son muy similares, confirmándose que la diferencia entre el valor de AUC observado y el valor extrapolado es menor al 20%, por lo que el valor de AUC_{inf} calculado puede considerarse fiable.

En cuanto al resto de parámetros farmacocinéticos de excreción, para el tiempo de infusión de 2.5 horas, el aclaramiento (Cl) fue de 0.329 L/h/kg y el volumen de distribución (V_d) de 0.111 L/kg. En la infusión de 4 horas se obtuvieron valores de 0.281 L/h/kg y 0.151 L/kg para el aclaramiento y volumen de distribución, respectivamente. Aunque no se llegó al estado estacionario, se pudo estimar el volumen de distribución aparente en el estado estacionario (V_{ss}) de 0.569 y 0.825 L/kg para el tiempo de infusión de 2.5 y 4 horas, respectivamente.

2.2. Estudios farmacodinámicos con SNF472 para prevenir e inhibir la progresión de la calcificación cardiovascular inducida por Vitamina D₃ en modelos animales

La segunda parte de este apartado de resultados incluye tres estudios *in vivo* de eficacia utilizando el SNF472 como inhibidor de la CCV en modelos animales, tras el desarrollo y optimización del modelo experimental de CCV inducida por vitamina D₃ en rata.

2.2.1. Desarrollo y optimización de un modelo animal para la calcificación cardiovascular inducida por vitamina D₃

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en la optimización de un modelo de inducción de la CCV en rata por administración subcutánea de vitamina D₃, donde se evaluó el desarrollo de la CCV en función de la dosis de vitamina D₃ y el tiempo de progresión.

La evolución del peso en los animales se vio influenciada por las dosis de vitamina D₃ (Figura IV.14A). Como se puede observar, los grupos que recibieron dosis de 50, 75 y 100 KUI/kg de vitamina D₃ empezaron a perder peso a partir del tercer día. En cambio, el grupo con la dosis más baja mantuvo su peso constante hasta el día 6, a partir del cual fue ganando peso y acabó el estudio con un peso corporal un 20% superior al que tenía al inicio. Desde el día 6 del estudio, el grupo con dosis de 50 KUI/kg se fue recuperando y ganando peso de manera proporcional al grupo de menor dosis y, a partir del día 9 superó el peso con el que había empezado el estudio, ganando un 8% al final del estudio. Los grupos con las dosis más altas de vitamina D₃ perdieron peso de manera similar hasta el día 8 (15% de pérdida de peso corporal). A partir de este punto, el grupo de 75 KUI/kg se estabilizó. Sin embargo, los animales con dosis de 100 KUI/kg siguieron perdiendo peso hasta el final del estudio, alcanzándose una pérdida de un 24% respecto al peso inicial. La Figura IV.14B muestra la curva de supervivencia para los cuatro grupos tratados con diferentes dosis de vitamina D₃. No se observó mortalidad en los grupos administrados con 25 y 50 KUI/kg de inductor. En cambio, la mortalidad hallada en los animales tratados con 75 y 100 kUI/kg fue del 12.5% (1 rata de 8) y del 37.5% (3 ratas de 8), respectivamente.

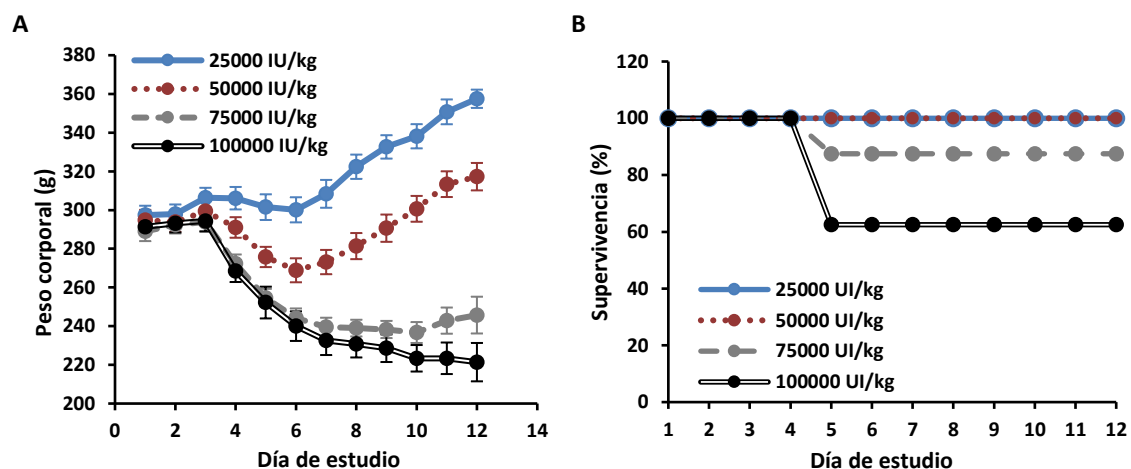


Figura IV.14. Efecto de la dosis de vitamina D₃ administrada sobre el peso corporal y la supervivencia en ratas Sprague Dawley. **(A)** Evolución del peso corporal (Promedio ± s) durante 12 días para los cuatro grupos de estudio. **(B)** Curva de supervivencia Kaplan Meier para los cuatro grupos de estudio. Dosis de vitamina D₃ administrada (UI/kg): 25000 (n=8), 50000 (n=8), 75000 (n=7) y 100000 (n=5).

IV. RESULTADOS

La calcificación en la arteria aorta y en el corazón se evaluó mediante la determinación del contenido total de calcio por mg de tejido seco. En los resultados de calcio presentados se omiten los valores de calcificación de los animales que no sobrevivieron hasta el final del estudio. Como se puede observar en la Figura IV.15, la calcificación obtenida en ambos tejidos presenta una relación dosis-respuesta con la dosis de vitamina D₃ administrada. La dosis más baja ensayada (25 kUI/kg) no indujo calcificación significativa en ninguno de los dos tejidos (0.89 ± 0.19 y 0.17 ± 0.01 mg Ca/g en aorta y corazón, respectivamente) comparada con la calcificación de ratas sanas de la misma edad (de 0.1 a 0.3 mg Ca/g tejido seco). A partir de la dosis de 50 kUI/kg, el contenido de calcio en aorta (6.3 ± 1.6 mg Ca/g) incrementó con una tendencia lineal en función de la dosis de vitamina D₃. En cambio, para esta misma dosis, no se observó calcificación significativa en el corazón. Este hecho indica que la calcificación de la arteria aorta fue más sensible a la dosis de vitamina D₃ que la calcificación del corazón. Para aumentar el contenido de calcio en el corazón, fue necesaria la dosis de 75 kUI/kg (1.3 ± 0.3 mg Ca/g). A esa misma dosis, la calcificación en aorta (22 ± 8 mg Ca/g) fue significativamente ($p < 0.05$) mayor a la observada para la dosis de 25 kUI/kg. Los mayores depósitos de calcio tisular se alcanzaron con la dosis más alta de vitamina D₃, y fueron de 34 ± 4 y 4.4 ± 1.3 mg de calcio/mg de tejido seco para la aorta y el corazón, respectivamente.

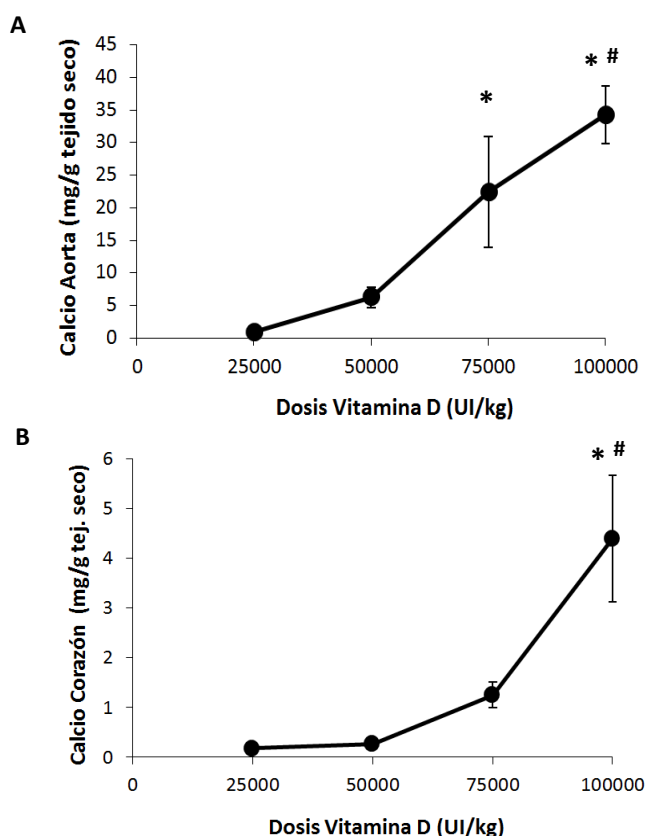


Figura IV.15. Niveles de calcio total por mg de tejido seco transcurridos 12 días desde la primera administración de dosis crecientes de vitamina D₃ en ratas Sprague Dawley. (A) Calcificación en arteria aorta. (B) Calcificación en corazón. Los resultados representan el promedio \pm desviación estándar de la media, $n=8$ (25 y 50 kUI/kg vitamina D₃), $n=7$ (75 kUI/kg vitamina D₃) y $n=5$ (100 kUI/kg vitamina D₃). Análisis estadístico: ANOVA de una vía. (*) indica diferencias significativas vs. 25 kIU/kg; (#) indica diferencias significativas vs. 50 kIU/kg, $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

Al considerar conjuntamente los resultados de calcio total en ambos tejidos, se observó una correlación positiva significativa ($p < 0.0001$) de los datos, con un coeficiente de correlación de Spearman (r) de 0.86 (Figura IV.16). Luego, aunque la calcificación en aorta fuera más sensible a las dosis de vitamina D_3 administradas, se observó una asociación entre la calcificación en aorta y corazón.

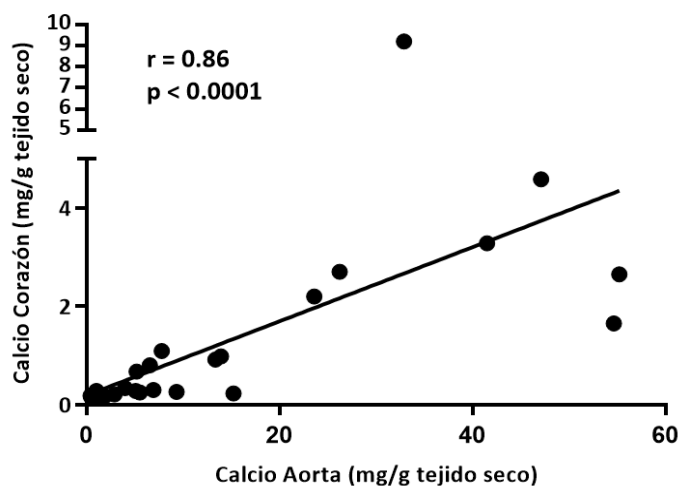


Figura IV.16. Correlación entre la calcificación obtenida en la arteria aorta y el corazón en ratas Sprague Dawley administradas con dosis crecientes de vitamina D_3 . Los resultados representan los valores individuales de calcio por animal, $n=28$. Análisis estadístico: correlación no-paramétrica de Spearman.

Los resultados de calcificación tisular obtenidos muestran que la administración subcutánea de vitamina D_3 durante tres días consecutivos indujo calcificación en aorta y corazón de manera dependiente a la dosis administrada. La dosis de 25000 UI/kg de vitamina D_3 no indujo calcificación significativa en aorta y corazón durante los 12 días de estudio. Lo mismo ocurrió con la dosis de 50000 UI/kg de vitamina D_3 para la calcificación cardíaca, donde se obtuvieron niveles bajos de calcio en ratas después de 12 días, sin afectar a la supervivencia, pero sí a la pérdida de peso corporal. La administración de la dosis más alta (100000 UI/kg) de vitamina D_3 indujo la mayor calcificación tisular después de 12 días, pero con una mayor tasa de mortalidad (37.5%). Por tanto, la dosis de vitamina D_3 que se seleccionó para inducir calcificación en el modelo de CCV en rata fue la de 75000 UI/kg, ya que indujo calcificación tisular significativa en aorta y corazón después de 12 días con una menor tasa de mortalidad (12.5%).

2.2.2. Estudios de eficacia con SNF472 para estudiar la prevención y la inhibición de la progresión de la calcificación cardiovascular inducida por vitamina D_3 en rata

Una vez presentados los resultados de la optimización del modelo animal y seleccionada la dosis de 75000 IU/kg de vitamina D_3 para inducir la CCV, se utilizó dicho modelo para (1) estudiar la eficacia del SNF472 tanto en la prevención de la aparición de CCV como (2) en la inhibición de su progresión, (3) establecer relaciones de dosis-respuesta y (4) buscar correlaciones entre la inhibición de la calcificación tisular *in vivo* y la inhibición de la cristalización *ex vivo* del plasma.

IV. RESULTADOS

Los resultados presentados en este apartado recogen el efecto farmacológico del SNF472 administrado por dos rutas diferentes (subcutánea e infusión intravenosa) en la prevención de la CCV inducida por sobredosis de vitamina D₃ (3 administraciones subcutáneas de 75 kUI/kg), así como la actividad de dicho inhibidor en la progresión de la CCV aplicando la misma dosis de inductor y empezando a administrar el SNF472 intravenoso al quinto día del estudio.

a) Experimento 1. Estudio de prevención de la calcificación cardiovascular con administración de SNF472 por vía subcutánea

Como se puede observar en la Figura IV.17 de la evolución del peso corporal a lo largo del estudio, todos los animales comenzaron a perder peso a partir del día 3. Esta pérdida de peso fue más pronunciada en el grupo control que recibió suero salino (grupo control), en comparación con los grupos de tratamiento. Los grupos tratados con las dosis más altas de SNF472 (30 y 100 mg/kg) se estabilizaron a partir del día 6, un día antes que los otros dos grupos tratados. El grupo tratado con SNF472 a 30 mg/kg recuperó peso más rápidamente y finalizó el estudio con un incremento de peso del 4%. Todos los grupos tratados terminaron el período de estudio con mayor peso que el grupo no tratado (grupo control).

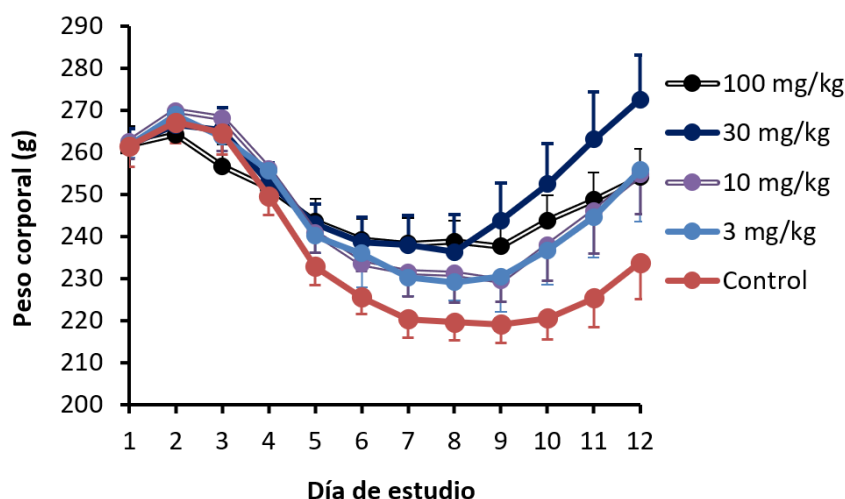


Figura IV.17. Evolución del peso corporal de los animales tratados con 3 dosis consecutivas de Vitamina D₃ (75000 UI/kg) como inductor de la calcificación cardiovascular y efecto de las diferentes dosis de SNF472 administradas sobre el peso de los animales. Los resultados representan el promedio \pm s, n=10 (Salino, 3 y 100 mg/kg), n=9 (10 mg/kg) y, n=6 (30 mg/kg).

Cinco animales murieron el día 6 del estudio entre los grupos de 10 mg/kg y 30 mg/kg. La mortalidad hallada en los animales tratados con estas dosis fue del 10% (1 rata de 10) y del 40% (4 ratas de 10), respectivamente. Al no registrarse mortalidad en el grupo de 100 mg/kg no se pudo establecer una relación entre la dosis del SNF472 y la mortalidad. Tomando todos los grupos de tratamiento en su conjunto, la mortalidad fue de 5 animales de un total de 40, lo que representa un 12.5% y coincide exactamente con la mortalidad obtenida para esta dosis de vitamina D en el estudio de optimización del modelo. Esta baja tasa de mortalidad inducida por la vitamina D, unida a un tamaño de muestra relativamente pequeño por grupo,

IV. RESULTADOS

provocaría que en ciertos grupos (control, SNF472 a 3 y 100 mg/kg) no se observara mortalidad.

Los niveles circulantes de SNF472 a los 20 minutos desde la administración y determinados por HPLC-MS/MS, se recogen en la Tabla IV.9. Como se puede observar, la concentración plasmática de SNF472 promedio en torno a t_{max} fue menor al límite inferior de cuantificación para el grupo de 10 mg/kg, ya que en 4 de las 9 ratas se obtuvieron niveles menores de 0.76 μ M. Para los tres grupos restantes, tratados con 3, 30 y 100 mg/kg de SNF472, las concentraciones plasmáticas fueron cuantificables y crecientes en función de la dosis administrada. Los bajos niveles en sangre de SNF472 encontrados en el grupo tratado con 10 mg/kg se pueden explicar por razones técnicas en el proceso de extracción de sangre. Los tiempos de muestreo en 4 ratas se realizaron más tarde de lo planificado (t_{max}), por lo que los niveles circulantes de SNF472 ya no fueron cuantificables a la dosis de 10 mg/kg.

Tabla IV.9. Niveles plasmáticos de SNF472 obtenidos 20 minutos después de la administración subcutánea de SNF472 en ratas Sprague Dawley. Los resultados representan el promedio \pm s, n=10 (grupos 3 y 100 mg/kg), n=9 (10 mg/kg), n=6 (30 mg/kg). Los resultados individuales menores al límite inferior de cuantificación (LLOQ = 0.76 μ M) se consideraron cero para calcular el promedio.

Dosis administrada	SNF472 en plasma (μ M)
3 mg/kg	1.4 \pm 0.6
10 mg/kg	<LLOQ
30 mg/kg	14 \pm 6
100 mg/kg	123 \pm 36

La calcificación promedio aórtica y mediana en el corazón del grupo control (salino) fue de 37 \pm 6 y 2.0 \pm 1.0 mg de calcio por gramo de tejido seco, respectivamente (Figura IV.18). Por tanto, la administración subcutánea de vitamina D₃ tres días consecutivos a 75000 UI/kg indujo calcificación en aorta y corazón en el grupo control a niveles ligeramente superiores a los obtenidos en el estudio anterior de optimización del modelo animal de CCV (22 \pm 8 y 1.3 \pm 0.3 mg Ca/g de tejido seco en aorta y corazón, respectivamente) (Figura IV.15).

En los grupos tratados se observó que la administración subcutánea diaria de SNF472 inhibió la calcificación en ambos tejidos de manera dependiente a la dosis (Figura IV.18 y Figura IV.19). El contenido en calcio en aorta para las dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg fue de 35 \pm 6, 26 \pm 5, 12 \pm 5 y 4.6 \pm 1.2 mg Ca/g de tejido seco, respectivamente. Esta calcificación para los dos grupos tratados con mayor dosis (30 y 100 mg/kg) fue significativamente ($p < 0.05$) menor a la de los grupos control y 3 mg/kg de SNF472 (Figura IV.18A).

La calcificación obtenida en el corazón también fue disminuyendo a medida que la dosis administrada de inhibidor aumentó, obteniéndose unas medianas de 1.7 \pm 0.6, 1.3 \pm 0.5, 0.7 \pm 0.4 y 0.53 \pm 0.06 mg Ca/g tejido seco, para las dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg, respectivamente. Para este tejido, el contenido en calcio determinado en los grupos con mayor dosis (30 y 100 mg/kg) fue significativamente ($p < 0.05$) menor al obtenido en los grupos control y tratado con 3 mg/kg de SNF472 (Figura IV.18B).

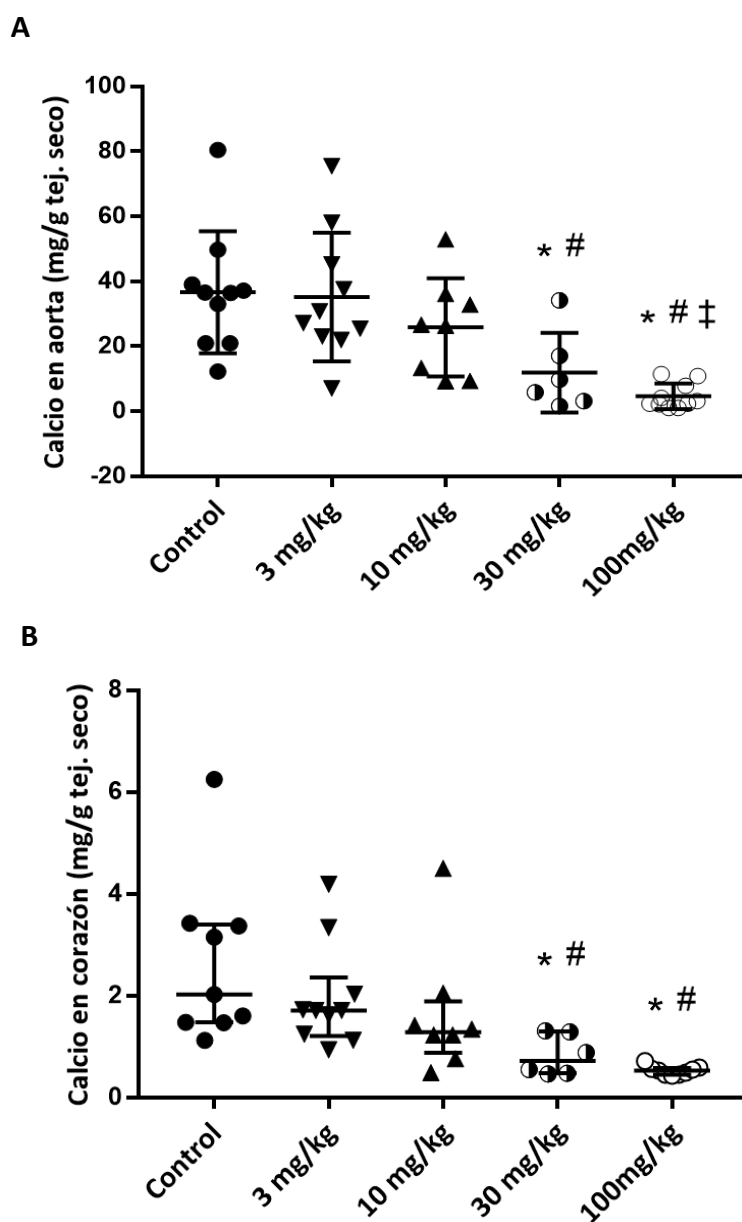


Figura IV.18. Calcificación en aorta y corazón expresada en mg de calcio total por g de tejido seco transcurridos 12 días desde la primera administración de vitamina D₃ (75 kUI/kg) en ratas Sprague Dawley. **(A)** Calcio en arteria aorta. Los resultados siguen una distribución normal y representan el promedio \pm s, n=10 (control, 3 y 100 mg/kg de SNF472), n=8 (10 mg/kg SNF472) y n=6 (30 mg/kg SNF472). Análisis estadístico: ANOVA de una vía. **(B)** Calcio en corazón. Los resultados siguen una distribución no normal y se representa la mediana \pm rango intercuartil, n=9 (control y 100 mg/kg de SNF472), n=10 (3 mg/kg), n=8 (10 mg/kg de SNF472) y n=6 (30 mg/kg SNF472). Análisis estadístico: Prueba de Kruskal-Wallis. (*) indica diferencias significativas vs. control; (#) vs. 3 mg/kg, (‡) vs. 10

IV. RESULTADOS

En términos de inhibición, se observó una respuesta similar en el corazón y la aorta a las tres dosis más altas, obteniendo inhibiciones del 31%, 68% y 87% en aorta, y 36%, 64% y 74% en corazón para las dosis de 10, 30 y 100 mg/kg, respectivamente (Figura IV.19). Las dos dosis mayores inhibieron significativamente la CCV con respecto al grupo control y al de dosis de 3 mg/kg ($p < 0.05$). La inhibición de la calcificación tisular para las dosis de 3 y 10 mg/kg no presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto a la calcificación obtenida en el grupo control tratado con suero salino.

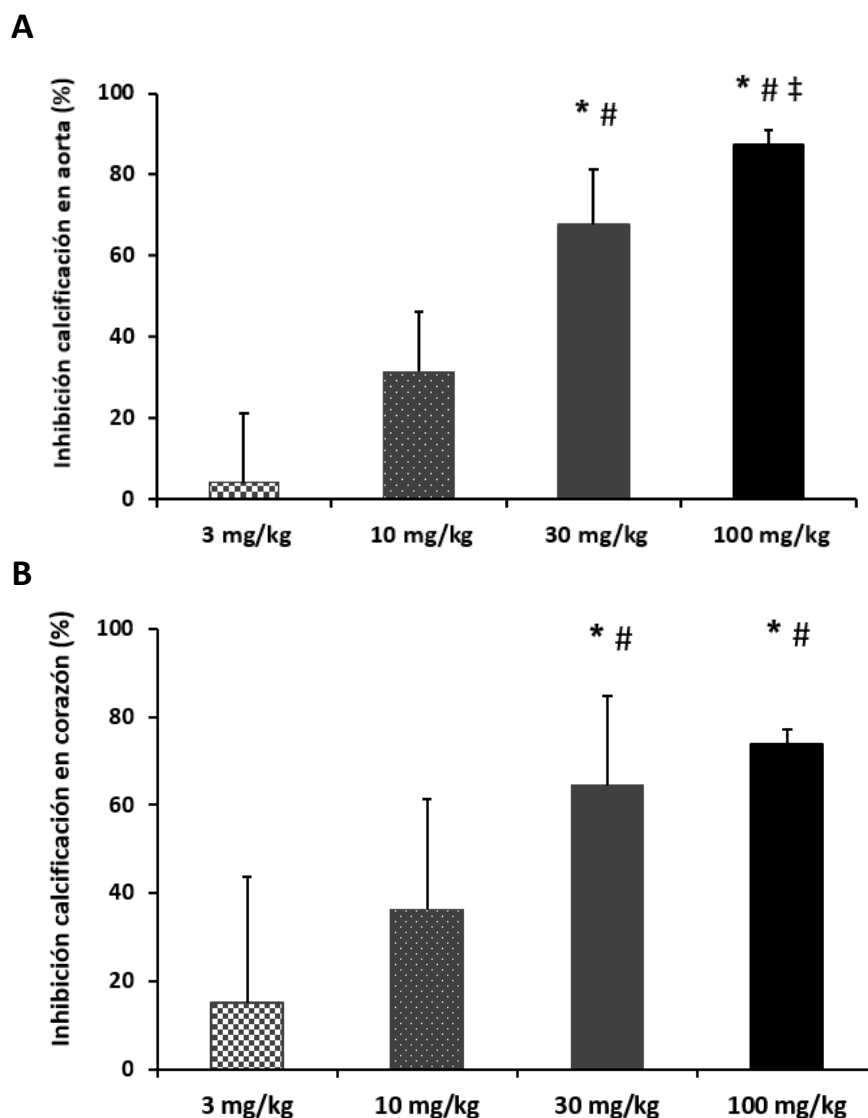


Figura IV.19. Inhibición de la calcificación en aorta y corazón a dosis crecientes de SNF472 subcutáneo transcurridos 12 días desde la primera administración de vitamina D₃ (75 kUI/kg) en ratas Sprague Dawley. **(A)** Inhibición promedio \pm SE en aorta, $n=10$ (3 y 100 mg/kg), $n=8$ (10 mg/kg) y $n=6$ (30 mg/kg SNF472). Análisis estadístico: ANOVA de una vía. La prueba de Tukey se utilizó para análisis post-hoc. **(B)** Inhibición en corazón expresada como mediana \pm desviación cuartil, $n=10$ (3 mg/kg), $n=8$ (10 mg/kg), $n=6$ (30 mg/kg) y $n=9$ (100 mg/kg). Análisis estadístico: Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de Dunn para análisis post-hoc. (*) indica diferencias significativas vs. control; (#) vs. 3 mg/kg, (‡) vs. 10 mg/kg, $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

Al considerar para cada animal los resultados de inhibición en ambos tejidos, se observó una correlación positiva significativa ($p < 0.0001$) de los datos, con un coeficiente de correlación de Spearman (r) de 0.75. En la Figura IV.20 se puede observar que para inhibiciones mayores al 70% (parte superior derecha de la gráfica), los dos tejidos respondieron de manera similar en la prevención de la calcificación. Esta respuesta se observó para los dos grupos tratados con las mayores dosis de SNF472 (30 y 100 mg/kg).

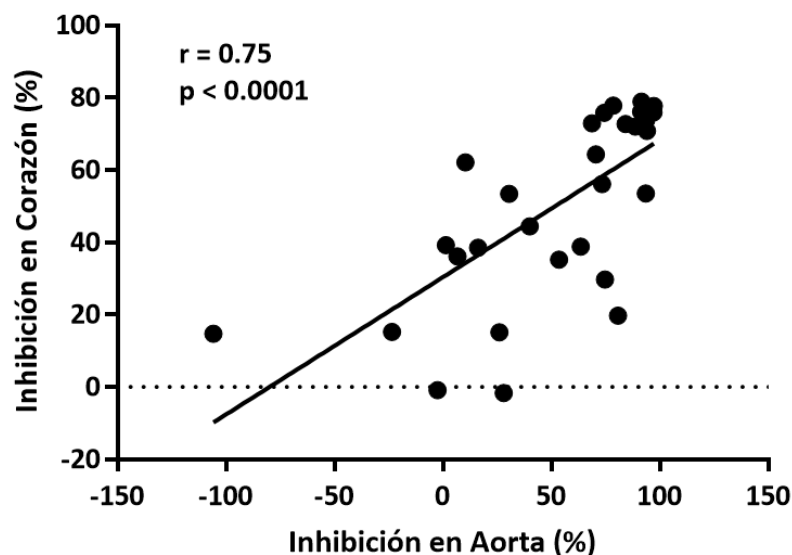


Figura IV.20. Correlación entre la inhibición de la calcificación en la arteria aorta y en el corazón obtenidas el día 12 (final del estudio). Los resultados representan los valores individuales de inhibición, expresados en porcentaje, para cada animal tratado con SNF472, $n=30$. Análisis estadístico: correlación no-paramétrica de Spearman.

El porcentaje de inhibición de la calcificación en la arteria aorta y el corazón se relacionó con los niveles circulantes de SNF472 entorno a t_{max} , mediante un modelo no lineal simple de E_{max} . En general, se observó que a niveles circulantes de SNF472 mayores a $15 \mu\text{M}$ las eficacias de inhibición fueron altas (mayores al 50%). Aplicando dicho modelo, se obtuvo la curva de concentración-respuesta para ambos tejidos (Figura IV.21), y se determinó una IC_{50} de $5.6 \mu\text{M}$ (3700 ng/mL) y $3.8 \mu\text{M}$ (2500 ng/mL) para la arteria aorta y el corazón, respectivamente. Los valores de concentración menores al LLOQ se descartaron para el análisis.

Además, se relacionó el porcentaje de inhibición de la calcificación tisular con la dosis de SNF472 administrada para obtener la curva dosis-respuesta aplicando el modelo no lineal simple de E_{max} (Figura IV.22). Después de aplicar dicha regresión, se determinó una ID_{50} de $15.3 \pm 1.8 \text{ mg/kg}$ y $16.8 \pm 1.8 \text{ mg/kg}$ para la aorta y el corazón, respectivamente.

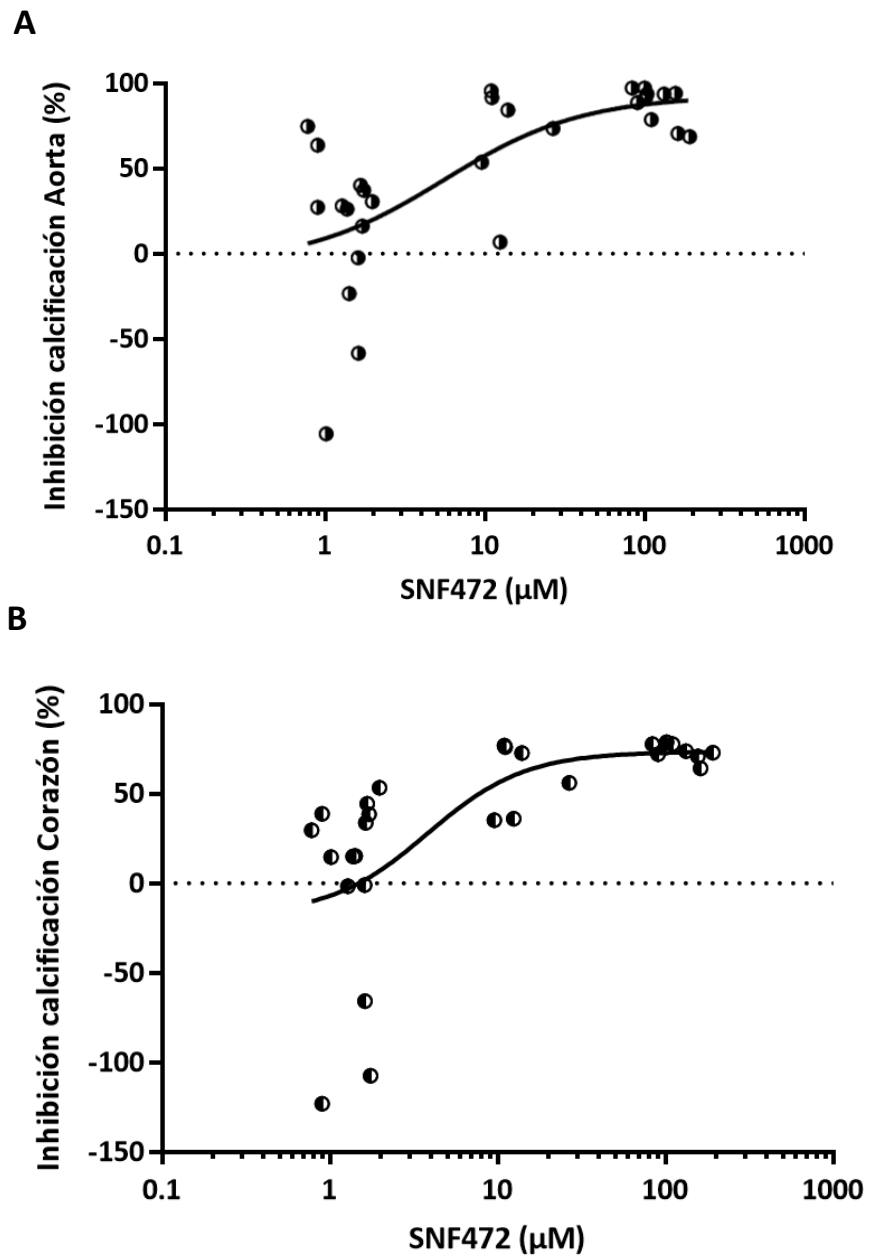


Figura IV.21. Curvas concentración-respuesta de inhibición de calcificación tisular en ratas administradas con dosis crecientes de SNF472 subcutáneo. Los resultados representan los valores individuales de inhibición y concentración de SNF472 entorno a t_{max} (20 minutos tras la administración) por animal. **(A)** Curva obtenida para la aorta, $n=29$. **(B)** Curva obtenida para el corazón, $n=29$. Análisis estadístico: regresión semilogarítmica no lineal simple de E_{max} .

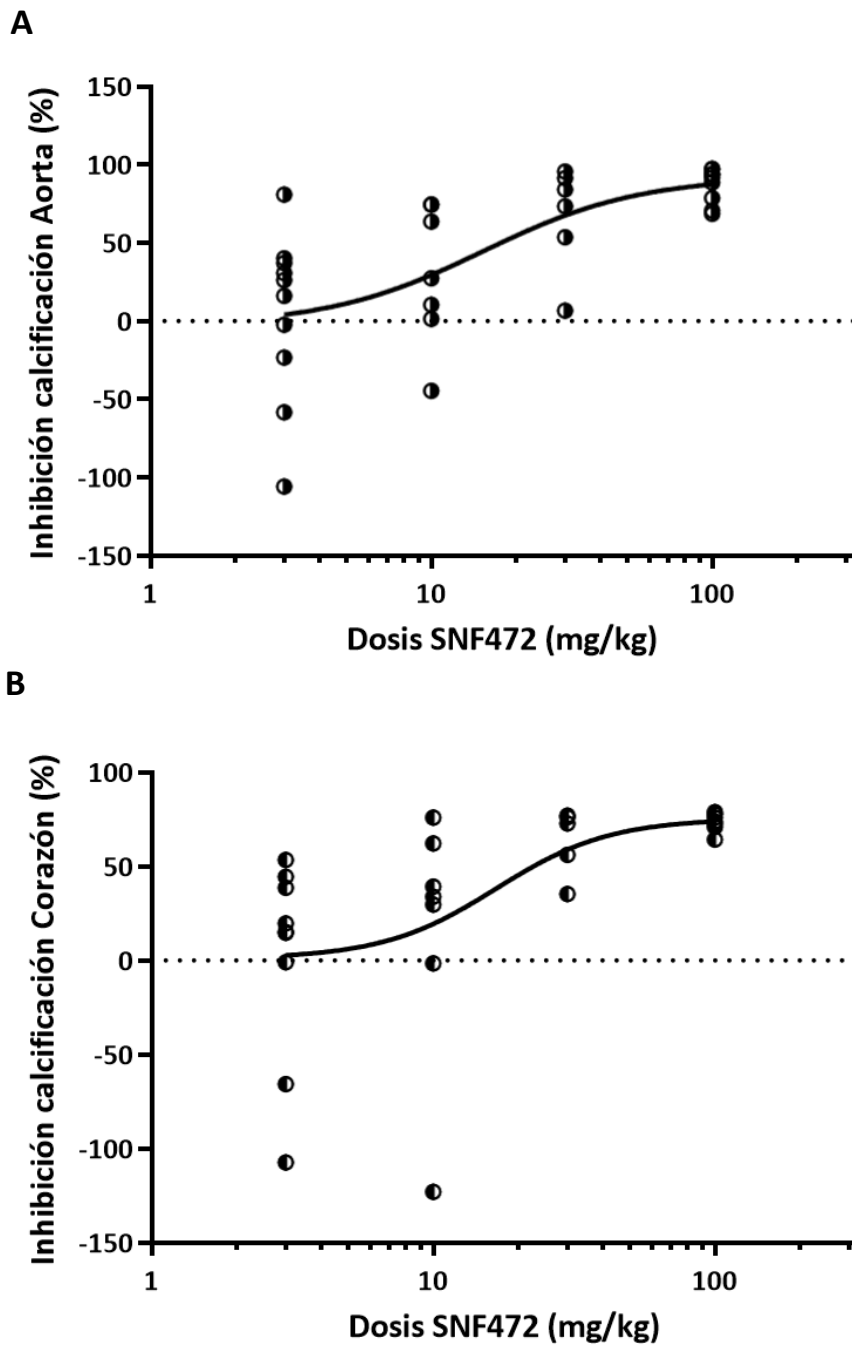


Figura IV.22. Curvas dosis-respuesta de inhibición de calcificación tisular en ratas administradas con dosis crecientes de SNF472 subcutáneo. Los resultados representan los valores individuales de inhibición y dosis de SNF472 (3, 10 30 y 100 mg/kg) administrada por animal. **(A)** Curva obtenida para la aorta, n=34. **(B)** Curva obtenida para el corazón, n=33. Análisis estadístico: regresión semilogarítmica no lineal simple de E_{max} .

b) Experimento 2. Estudio de prevención de la calcificación cardiovascular con administración de SNF472 por infusión intravenosa

La evolución de peso de las ratas (n = 38) a lo largo de los 12 días de estudio se muestra en la Figura IV.23A. Cada rata recibió solución salina (n = 10) o SNF472 a 3 mg/kg (n = 9), 10 mg/kg (n = 9) y 30 mg/kg (n = 10) desde el principio hasta el final del estudio. Debido a la administración de vitamina D₃ como inductor de la calcificación, las ratas de todos los grupos, menos el sham (grupo sano), empezaron a perder peso a partir del día 4 del estudio. La pérdida de peso prosiguió hasta el día 6 para los grupos tratados y hasta el día 7 para el grupo control (tratado con salino). Este último grupo sufrió la mayor pérdida de peso, acabando el estudio con un 15% menos de peso que al inicio. Los dos grupos tratados con 10 y 30 mg/kg de SNF472 empezaron a recuperarse a partir del día 7 y acabaron el estudio con peso similar al del inicio. La Figura IV.23B muestra la curva de supervivencia para los cinco grupos de estudio. La mortalidad total durante el estudio fue del 13%. En el grupo control y en el de 10 mg/kg se murieron un 10 y 11% de los animales, respectivamente, que se corresponde con un animal por grupo. En el grupo de 30 mg/kg la mortalidad fue mayor, registrándose tres muertes durante el estudio (un 30%). Las causas de la muerte se atribuyeron a la intoxicación por vitamina D₃, y se mantuvieron dentro de los porcentajes esperados para el modelo.

A

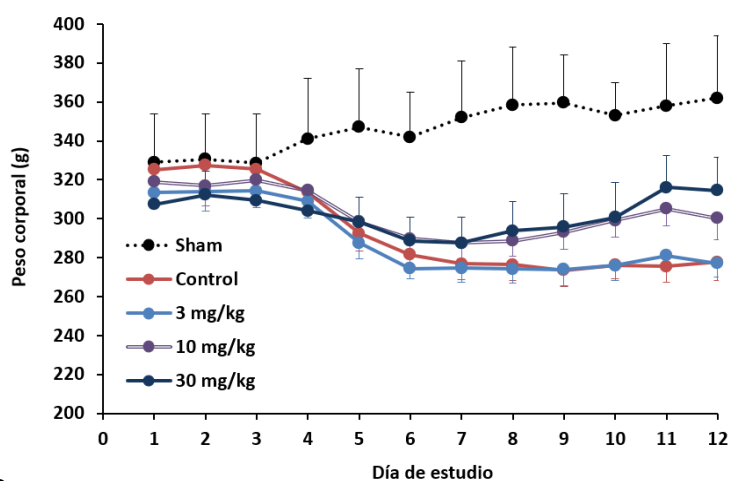
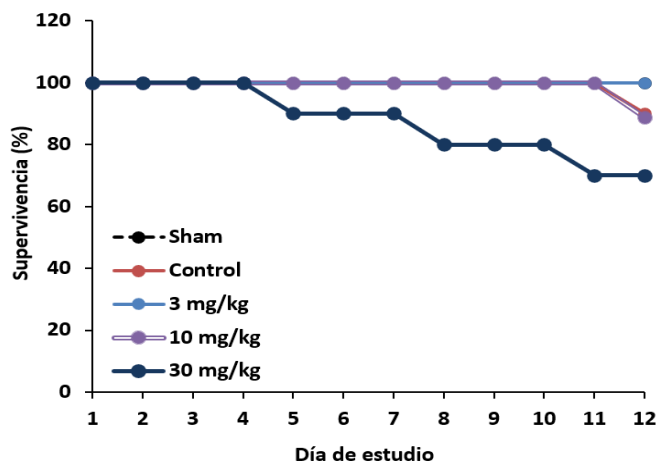


Figura 3.23. (A) Evolución del peso corporal en ratas Sprague Dawley a lo largo de los 12 días de estudio tras tres administraciones de vitamina D₃ consecutivas (75 kUI/kg) y efecto de las diferentes dosis de SNF472 administradas por infusión intravenosa sobre la recuperación de la pérdida de peso de los animales.

B



(B) Curva de supervivencia Kaplan Meier para los cinco grupos de estudio. Sham (n=2), grupo control (n=9), SNF472 3, 10, 30 mg/kg (n=9, 8, 7, respectivamente).

IV. RESULTADOS

Los resultados de la bioquímica en suero se muestran en la Tabla IV.10. Todos los grupos a los que se indujo CCV por administración subcutánea de vitamina D₃ presentaron niveles de calcio total en suero significativamente superiores al grupo sham. Por tanto, el aumento de los niveles de calcio en suero es consecuencia de la administración de vitamina D₃ como inductor de la calcificación. Cabe destacar que este aumento se atenuó de manera significativa en los animales tratados con SNF472 a la dosis más alta. No se observaron otros efectos relevantes en los demás parámetros bioquímicos estudiados: nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina, ALP tanto total como termoestable y fósforo total.

Tabla IV.10. Parámetros bioquímicos obtenidos en suero de ratas a las que se indujo la calcificación cardiovascular con sobredosis de vitamina D₃ (3 administraciones consecutivas de 75000 UI/kg). Los resultados representan el promedio ± SE. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y prueba de Dunn para análisis post-hoc. ^a n=1; (*) indica diferencias significativas vs. sham (grupo sano); (#) vs. grupo control, p<0.05. BUN: nitrógeno ureico en sangre; Crea: creatinina; ALP: fosfatasa alcalina.

Grupo	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	ALP total (U/L)	% ALP termoestable	Calcio total (mg/dL)	Fosfato (mg/dL)
Sham	13.0 ± 0.0	0.36 ± 0.01	179 ± 38	4 ^a	10.3 ± 0.0	10.9 ± 1.7
Control	16.3 ± 0.9	0.30 ± 0.02	181 ± 14	3.3 ± 0.6	13.3 ± 0.2 *	9.0 ± 0.7
3 mg/kg	14.4 ± 1.8	0.29 ± 0.02	166 ± 11	6.4 ± 1.2	12.3 ± 0.3 *	8.6 ± 0.3
10 mg/kg	16.7 ± 2.6	0.35 ± 0.03	159 ± 17	13.5 ± 7.2	12.3 ± 0.3 *	9.1 ± 0.5
30 mg/kg	10.9 ± 0.9	0.28 ± 0.03	147 ± 18	6.5 ± 2.5	11.6 ± 0.4 #	8.4 ± 0.4

Los parámetros urinarios analizados en orina recogida durante 24 horas se muestran en la Tabla IV.11. En general, se observó una mayor diuresis con respecto al grupo sano (sham) en todos los grupos administrados con vitamina D₃; aunque esta tendencia no fue significativa. Los niveles de creatinina en orina fueron significativamente menores (p<0.05) en todos los animales tratados con vitamina D₃. Los resultados de proteína en orina fueron bajos para el grupo control. Para los grupos tratados se obtuvo gran variabilidad de resultados sin poder extraer ninguna conclusión relevante. En general, no se observó ningún efecto significativo del tratamiento con SNF472 frente al grupo control en los tres parámetros urinarios estudiados. De hecho, el modelo de calcificación por vitamina D₃ no induce enfermedad renal, por lo que no cabría esperar ningún cambio relevante en ellos.

Tabla IV.11. Parámetros urinarios obtenidos en ratas durante 24 horas a las que se indujo la calcificación cardiovascular con Vitamina D₃ (3 administraciones consecutivas de 75000 IU/kg). Los resultados representan el promedio ± SE. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y la prueba de Tukey para análisis post-hoc. (*) indica diferencias significativas vs. Sham (grupo sano), p<0.05.

Grupo	Diuresis (mL)	Creatininuria (mg/dL)	Proteinuria (mg/dL)
Sham	7 ± 2	165 ± 49	1461 ± 37
Control	17.8 ± 1.7	54 ± 4 *	505 ± 50
3 mg/kg	15 ± 3	73 ± 10 *	1013 ± 179
10 mg/Kg	15 ± 6	76 ± 10 *	1056 ± 188
30 mg/Kg	17 ± 3	51 ± 3 *	562 ± 246

IV. RESULTADOS

Los niveles circulantes de SNF472 de la PK realizada el día 11 del estudio se analizaron por HPLC-MS/MS. Como se puede observar en la Figura IV.24A, para la dosis más baja (3 mg/kg), los niveles circulantes de SNF472 fueron bajos, cercanos a 1.5 μM o inferiores al límite inferior de cuantificación (LLOQ=0.76 μM) tanto a los primeros 60 minutos de infusión, como al final de ésta, a las 4 horas (240 min, t_{max}). En los grupos tratados con dosis de 10 y 30 mg/kg se alcanzaron niveles cuantificables a los dos tiempos de muestreo realizados (60 minutos y 4 horas tras el inicio de la infusión). A los 60 minutos se encontraron niveles promedio de 8 ± 2 y 49 ± 10 μM , para las dosis de 10 y 30 mg/kg, respectivamente. Al final de la infusión, se obtuvieron niveles de 21 ± 7 y 100 ± 29 μM , respectivamente. Al representar la C_{max} frente a la dosis, se observó que los niveles circulantes fueron proporcionales a la dosis administrada (Figura IV.24B, $R^2=0.996$).

El último día del estudio se recogió sangre para determinar los niveles plasmáticos de SNF472 en torno a t_{max} por HPLC-MS/MS. El promedio de estos resultados se recoge en la Tabla IV.12. Para la dosis de 3 mg/kg, los niveles de SNF472 fueron cercanos a 1.5 μM o inferiores al límite inferior de cuantificación (0.76 μM). Para las dosis de 10 y 30 mg/kg, se obtuvieron valores promedio de 15 ± 5 y 79 ± 32 μM , respectivamente. Estos resultados fueron aproximadamente un 25% más bajos que los obtenidos en la PK del día anterior.

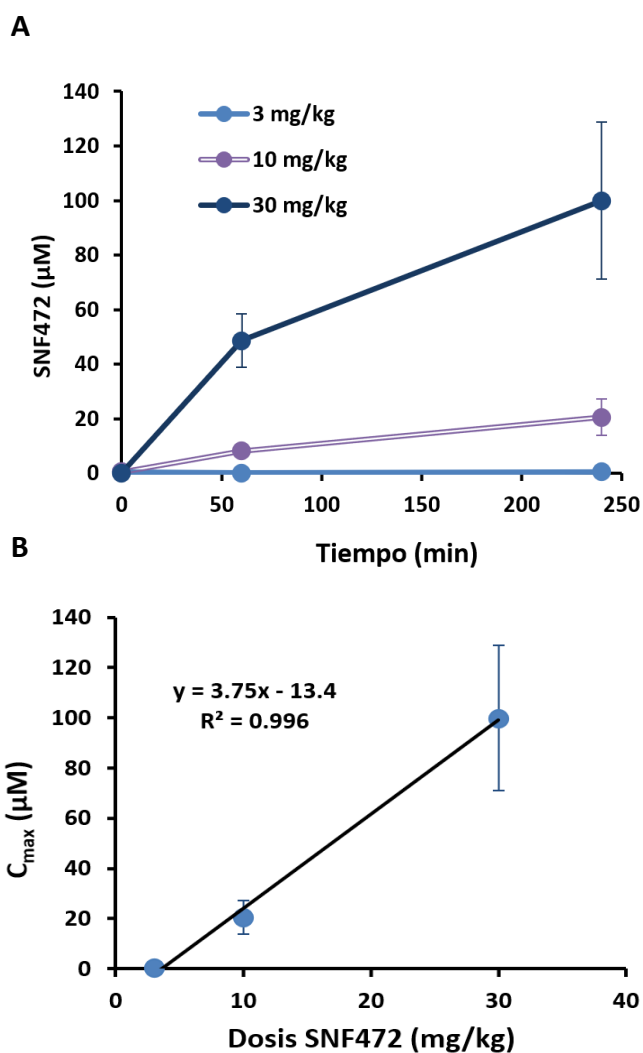


Figura IV.24. Farmacocinética de SNF472 realizada el día 11 de estudio en ratas administradas con tres dosis diferentes de SNF472 por infusión intravenosa de 4 horas. Las muestras de plasma por debajo del límite de cuantificación se consideraron cero para calcular el promedio. **(A)** Promedio \pm desviación estándar, $t=0$ niveles basales, $t=60$ minutos desde el comienzo de la infusión y $t=240$ minutos (4 horas o final de la infusión, t_{max}). **(B)** Relación lineal entre la dosis administrada y la concentración máxima de SNF472 después de 4 horas de infusión. Los resultados individuales menores al límite inferior de cuantificación (0.76 μM) se consideraron cero para calcular el promedio. C_{max} : concentración máxima.

IV. RESULTADOS

Para la dosis de 3 mg/kg los niveles esperados estarían entre el LLOQ y 3 μM . Sin embargo, por razones técnicas en el proceso analítico por HPLC-MS/MS no se pudo establecer el límite de cuantificación del método validado por Tur et al.² (0.75 μM), y en un conjunto de muestras se reportaron los resultados como menores a 1.5 μM . Este hecho afectó en general a las muestras tomadas antes de la infusión a día 11 (tiempo 0) y a todas las muestras pertenecientes a la dosis de 3 mg/kg. Por tanto, los niveles circulantes de SNF472 promedio para esta dosis se establecieron reportaron como menores a 1.5 μM .

Tabla IV.12. Niveles plasmáticos obtenidos el día 12 tras 4 horas de infusión intravenosa de SNF472 (t_{max}). Los resultados representan el promedio \pm SE, n=9 (grupo 3 mg/kg), n=8 (10 mg/kg), n=7 (30 mg/kg). Los resultados individuales menores al LLOQ se consideraron cero para calcular el promedio.

Dosis administrada	SNF472 en plasma (μM)
3 mg/kg	<1.5 μM
10 mg/kg	15 \pm 5
30 mg/kg	79 \pm 32

El contenido de calcio cuantificado en el grupo de ratas sanas (sham) fue indetectable en ambos tejidos estudiados (la señal fue inferior a la línea base del blanco). En el grupo control (tratado con suero salino), la vitamina D₃ administrada durante los tres primeros días del estudio a dosis de 75000 UI/kg indujo calcificación en aorta (Figura IV.25A) y corazón (Figura IV.25B) con valores promedio de 48 \pm 24 y 1.8 \pm 0.4 mg de Ca/g de tejido seco, respectivamente. Igual como en el estudio anterior, la calcificación en aorta fue superior a la del corazón; en este caso, unas 25 veces mayor. Por tanto, se verificó que la aorta es un tejido más sensible en cuanto a calcificación por sobredosis de vitamina D₃.

Las ratas tratadas con infusión intravenosa de SNF472 durante 12 días calcificaron significativamente menos ($p < 0.05$) que el grupo control a todas las dosis probadas, tanto en aorta como en corazón. La prevención de la calcificación fue dependiente de la dosis administrada, en mayor intensidad en el corazón que en la aorta. Los resultados de calcificación en aorta fueron de 15 \pm 4, 11 \pm 4 y 10 \pm 5 mg/g de tejido seco para las dosis de SNF472 3, 10 y 30 mg/kg, respectivamente (Figura IV.25A). El calcio promedio obtenido en el corazón fue de 0.96 \pm 0.16, 0.29 \pm 0.11 y 0.36 \pm 0.14 mg de Ca/g de tejido seco para las dosis de SNF472 3, 10 y 30 mg/kg, respectivamente (Figura IV.25B). En este último tejido, la calcificación obtenida para los dos grupos tratados con mayor dosis (10 y 30 mg/kg) fue significativamente ($p < 0.05$) menor comparada el grupo tratado con 3 mg/kg de SNF472.

Los resultados de calcificación anteriormente descritos se corresponden con una inhibición significativa de la CCV tras la administración de SNF472 a 3 mg/kg de un 65% en aorta y un 44% en el corazón (Figura IV.26A y B, respectivamente). Las dosis de 10 y 30 mg/kg de SNF472 lograron la máxima inhibición de la calcificación (aproximadamente el 80%), tanto en aorta como en corazón. En el caso del corazón, estas dos dosis presentaron una inhibición de la calcificación significativamente mayor ($p < 0.05$) a la dosis de 3 mg/kg (Figura IV.26B).

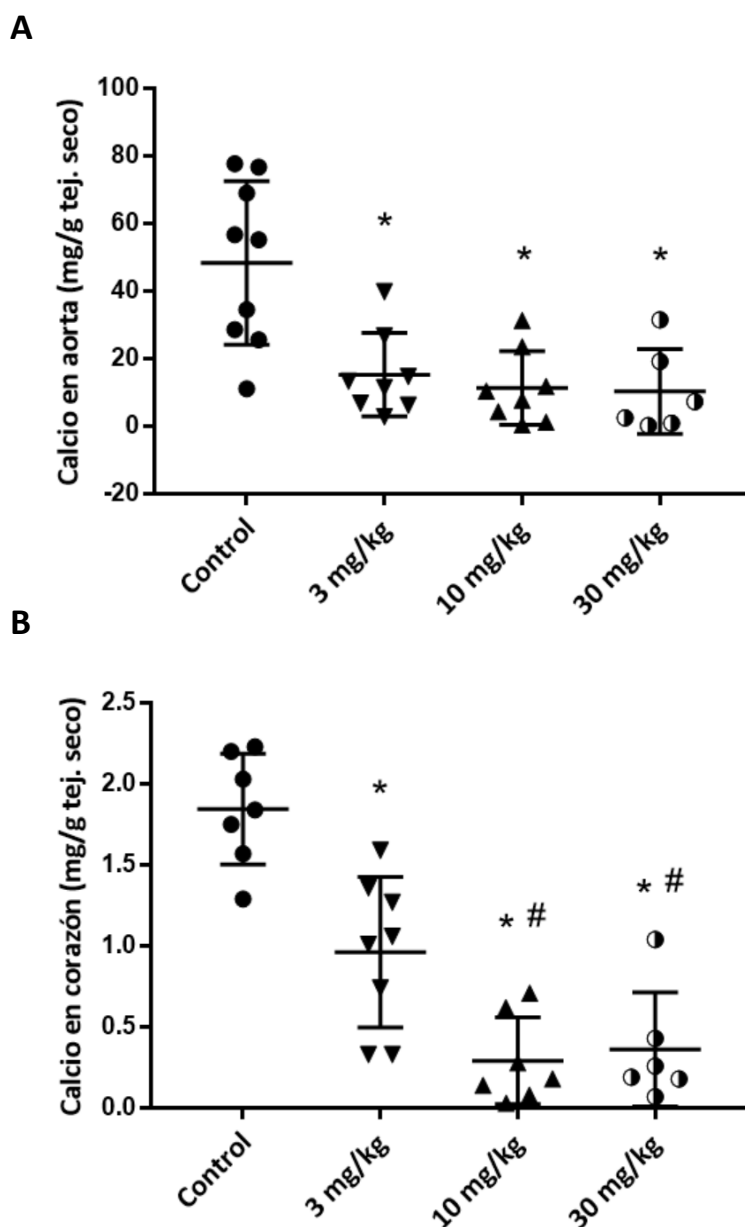


Figura IV.25. Calcificación en aorta y corazón expresada en mg de calcio total por g de tejido seco transcurridos 12 días desde la primera dosis de vitamina D₃. Los grupos con SNF472 recibieron diariamente 4 horas de infusión intravenosa a las dosis 3, 10 y 30 mg/kg. Los resultados siguen una distribución normal y representan el promedio \pm s. **(A)** Calcio en arteria aorta, n=9 (control), n=8 (3 y 10 mg/kg de SNF472) y n=6 (30 mg/kg SNF472). **(B)** Calcio en corazón, n=7 (control y 10 mg/kg de SNF472), n=8 (3 mg/kg), n=6 (30 mg/kg de SNF472). Los resultados atípicos se excluyeron para realizar los cálculos. En aorta, dos valores: 102 mg Ca/g (3 mg/kg) y 95 mg Ca/g (30 mg/kg). En el corazón se excluyeron cinco valores: 5, 2.4 y 10 mg Ca/g para las dosis 3, 10 y 30 mg/kg, respectivamente; 9 y 5 mg Ca/g (grupo control). Análisis estadístico: ANOVA de una vía. (*) indica diferencias significativas vs. control; (#) vs. 3 mg/kg, p<0.05.

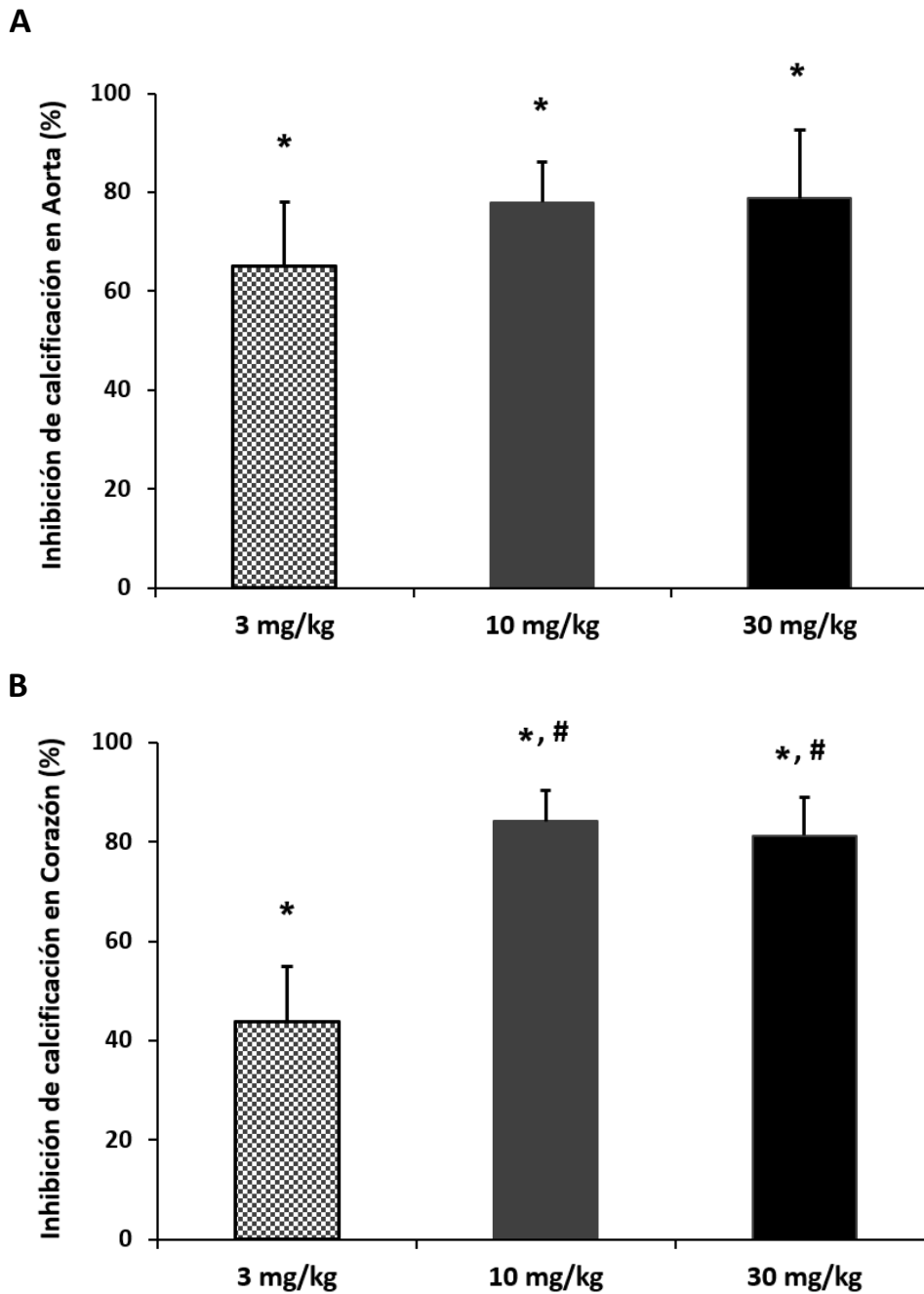


Figura IV.26. Inhibición de la calcificación en aorta y corazón a dosis crecientes de SNF472 administrado diariamente por infusión intravenosa de 4 horas. Los resultados de inhibición siguen una distribución normal y se representan como promedio \pm SE. **(A)** Inhibición en aorta, n=8 (3 y 10 mg/kg de SNF472) y n=6 (30 mg/kg SNF472). Se seleccionaron dos resultados atípicos en la inhibición en la aorta, uno en cada grupo de 3 mg/kg y 30 mg/kg de SNF472. **(B)** Inhibición en corazón, n=8 (3 mg/kg), n=7 (10 mg/kg de SNF472) y n=6 (30 mg/kg de SNF472). Los resultados atípicos en el corazón fueron tres, uno en cada grupo tratado con SNF472. Análisis estadístico: ANOVA de una vía. La prueba de Tukey se utilizó para análisis post-hoc. (*) indica diferencias significativas vs. control (promedio de 0% de inhibición); (#) vs. 3 mg/kg, $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

Tomando en conjunto los resultados de inhibición para cada animal en ambos tejidos, se observó una correlación positiva significativa ($p < 0.0001$) de los datos. El coeficiente de correlación de Spearman (r) obtenido fue de 0.78 (Figura IV.27). Igual como en el estudio de prevención por administración subcutánea de SNF472 presentado en este capítulo, se observó que para inhibiciones mayores al 70% (parte superior derecha de la gráfica), los dos tejidos respondieron de manera similar en la prevención de la calcificación tras 12 días de infusión intravenosa de SNF472. Esta tendencia fue más marcada para los dos grupos tratados con las mayores dosis de SNF472 (10 y 30 mg/kg).

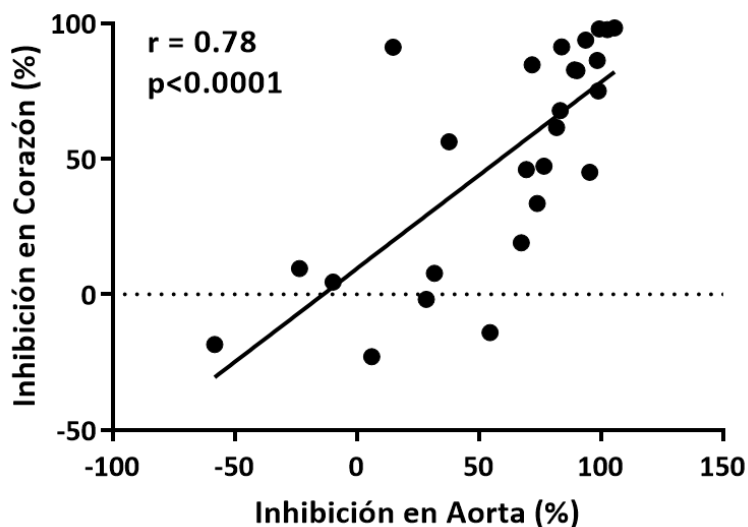


Figura IV.27. Correlación entre la inhibición de la calcificación en la arteria aorta y el corazón obtenida el día 12 (final del estudio). Los resultados representan los valores individuales de inhibición expresados en porcentaje para cada animal, $n=26$. Análisis estadístico: correlación no-paramétrica de Spearman.

La inhibición de la calcificación obtenida en la arteria aorta y en el corazón se relacionó con los niveles circulantes de SNF472 en entorno a t_{max} . En ambos tejidos se realizó un ajuste no lineal simple de E_{max} con el software GraphPad Prism (Figura IV.28). En el caso de la aorta (Figura IV.28A), no se pudo calcular la IC_{50} ya que los animales respondieron con elevada inhibición de la calcificación a la dosis más baja de SNF472 (3 mg/kg), dosis en la que los niveles circulantes de SNF472 estuvieron en torno a $1.5 \mu M$ o fueron inferiores al LLOQ. En el corazón, se obtuvo un buen ajuste de la curva de concentración-respuesta (Figura IV.28B) y se determinó una IC_{50} de $4.7 \mu M$ (3100 ng/mL).

Al relacionar el porcentaje de inhibición de la CCV con la dosis de SNF472 administrada mediante un modelo no lineal simple de E_{max} con el software GraphPad Prism, se calculó una ID_{50} de 1.6 mg/kg y 2.7 mg/kg para la aorta y el corazón, respectivamente (Figura IV.29). Debido a la falta de dosis menores a 3 mg/kg, para poder realizar el ajuste no lineal se añadieron los resultados del grupo control.

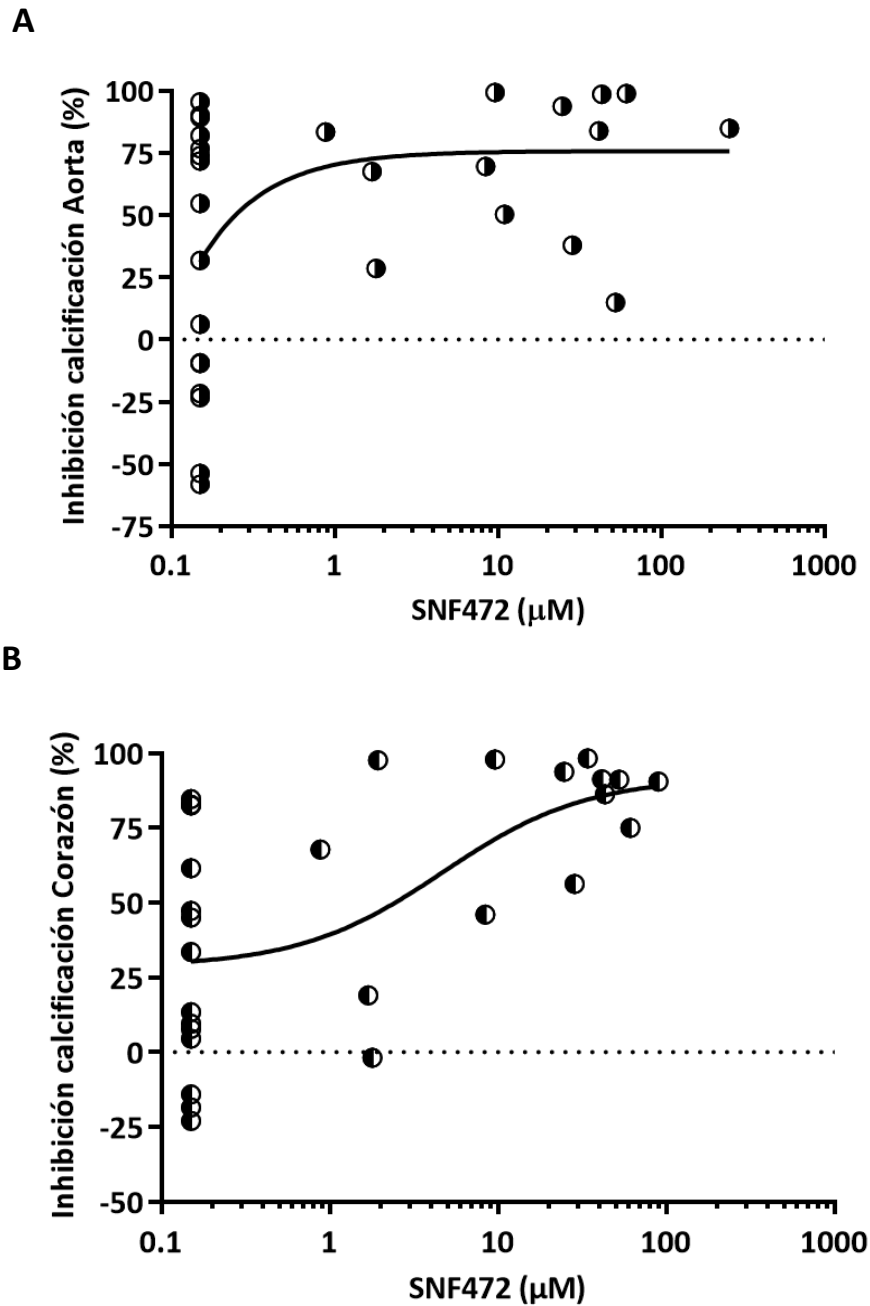


Figura IV.28. Curvas concentración-respuesta en la inhibición de calcificación tisular en ratas Sprague Dawley transcurridos 12 días desde la primera de las tres dosis de vitamina D_3 y tratadas diariamente con dosis crecientes de SNF472 durante 4 horas de infusión intravenosa. Los resultados representan los valores individuales de inhibición y concentración plasmática de SNF472 entorno a t_{max} por animal. **(A)** Curva obtenida para la aorta, $n=31$. **(B)** Curva obtenida para el corazón, $n=28$. Análisis estadístico: regresión semilogarítmica no lineal simple de E_{max} .

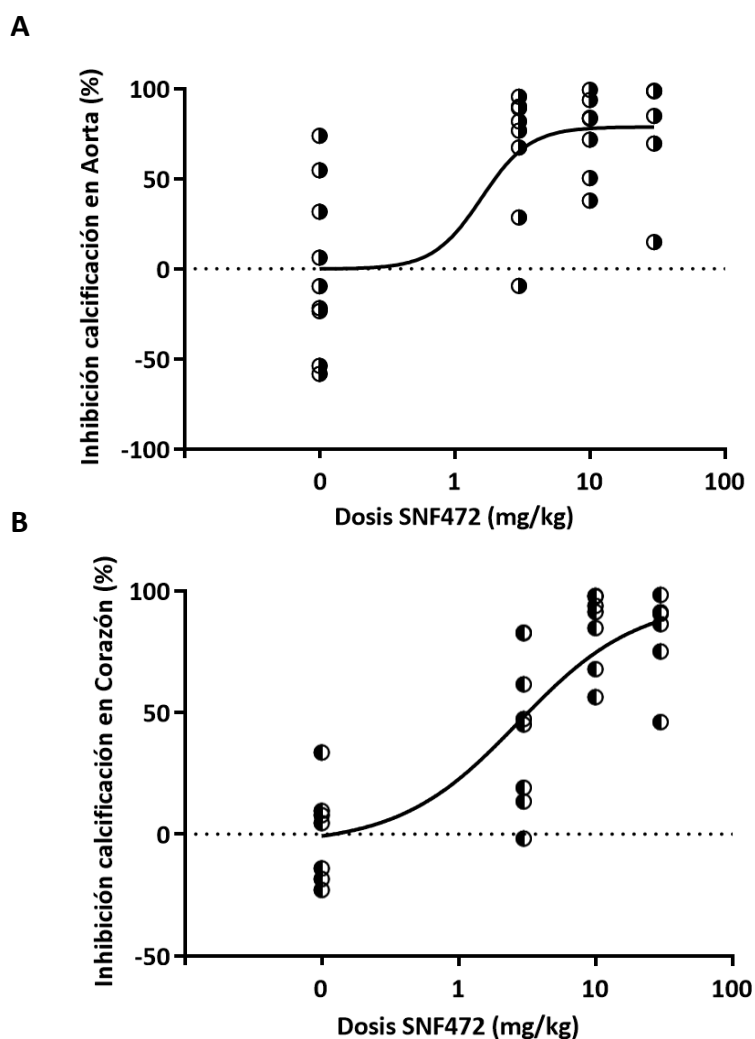


Figura IV.29. Curvas dosis-respuesta en la inhibición de calcificación tisular en ratas Sprague Dawley transcurridos 12 días desde la primera de las tres dosis de vitamina D₃ y tratadas diariamente con dosis crecientes de SNF472 durante 4 horas de infusión intravenosa. Los resultados representan los valores individuales de inhibición tisular y dosis diaria por infusión intravenosa de SNF472. **(A)** Curva obtenida para la aorta, n=31. **(B)** Curva obtenida para el corazón, n=28. Análisis estadístico: regresión no lineal con modelo E_{max}.

El plasma obtenido a t_{max} el día del sacrificio se utilizó para realizar el ensayo de PD validado en esta memoria de tesis (capítulo IV, sección 1.2). Con ello, se determinó el potencial de cristalización de fosfato de calcio en dicha matriz en los tres grupos tratados, así como en el grupo control. Los resultados mostraron que el SNF472 inhibió, significativamente ($p < 0.05$) y dosis dependiente, la formación de cristales de fosfato de calcio en plasma, con una ID₅₀ de 5.4 mg/kg (Figura IV.30A). Al relacionar los resultados de PD *ex vivo* en plasma con los niveles circulantes de SNF472 a t_{max} mediante un modelo no lineal simple de E_{max}, se obtuvo una relación concentración-respuesta con una IC₅₀ de 17 μ M y una IC₈₀ de 30 μ M (Figura IV.30B). Para este cálculo se fijó la parte superior de la curva al 66% (grado máximo de inhibición obtenido en la verificación del método *ex vivo* en muestras de rata, sección 1.3 de este capítulo). Finalmente, se observó una correlación significativa ($p = 0.005$) entre la inhibición de la cristalización plasmática *ex vivo* (ensayo de PD) y la inhibición de la calcificación cardiovascular *in vivo* (Figura IV.30C).

IV. RESULTADOS

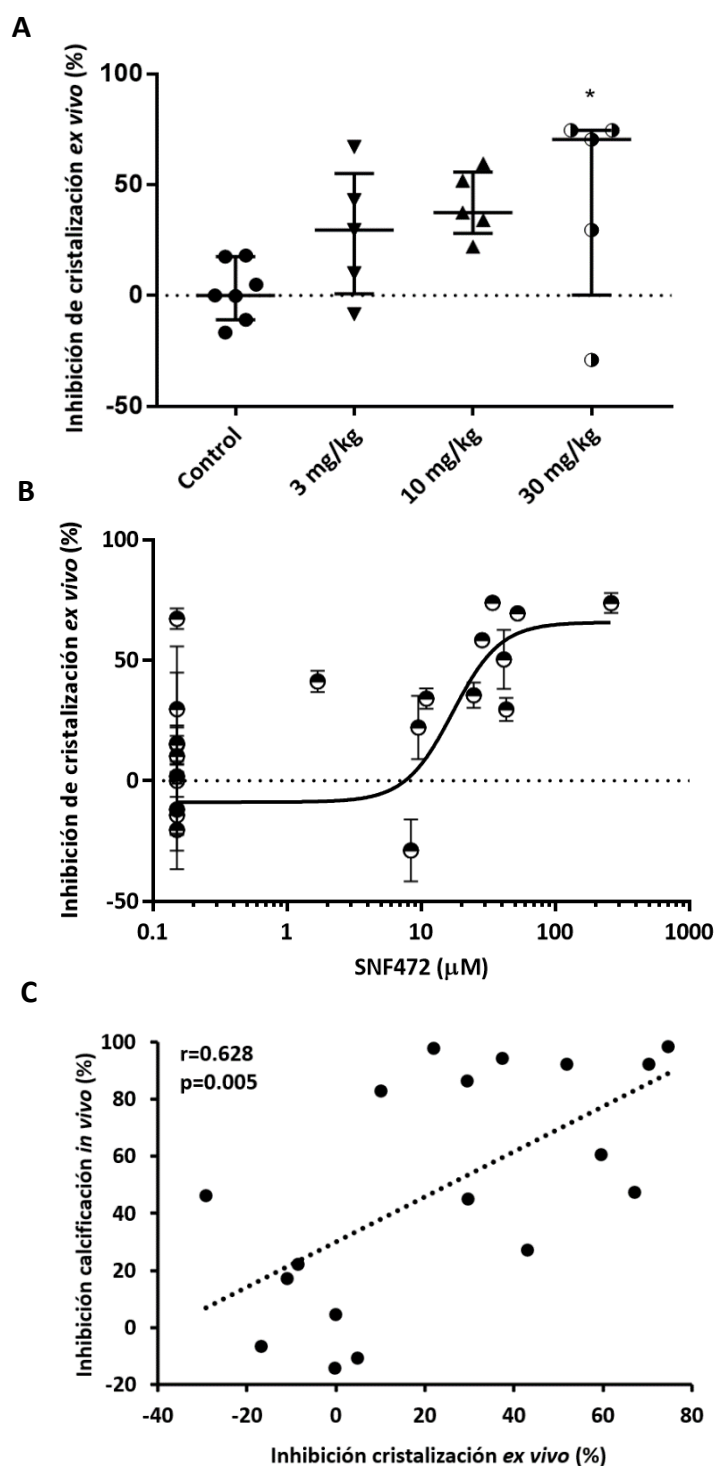


Figura IV.30. Inhibición de la cristalización *ex vivo* en plasma y su relación con la inhibición de la calcificación cardiovascular en ratas tratadas con SNF472 intravenoso a 3 dosis diferentes. **(A)** Porcentaje de inhibición de cristalización en plasma de rata, expresado como mediana \pm rango intercuartílico, $n=7$ (control), $n=5$ (3, 10 y 30 mg/kg de SNF472). Análisis estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis, prueba de Dunn para análisis post-hoc. (*) indica diferencias significativas vs. control, $p<0.05$. **(B)** Relación entre los niveles circulantes de SNF472 entorno a t_{\max} y la inhibición de la cristalización de fosfato de calcio en plasma. Promedio \pm SE, 6 réplicas. **(C)** Correlación entre la inhibición de la calcificación cardiovascular *in vivo* y la inhibición de la cristalización *ex vivo* de fosfato de calcio en plasma. Los resultados representan los valores individuales de inhibición para cada animal, $n=18$. Análisis estadístico: correlación no paramétrica de Spearman ($p<0.05$).

c) Experimento 3. Estudio de eficacia para el tratamiento de la progresión de la calcificación cardiovascular con SNF472 administrado por infusión intravenosa

La evolución de peso de las ratas (n = 28) a lo largo de los 12 días de estudio se muestra en la Figura IV.31. El grupo control de 5 días no recibió tratamiento, los demás grupos recibieron solución salina (grupo control, n = 10) o 10 mg/kg de SNF472 (n = 10) durante ocho días, empezando el día 5 y hasta el final del estudio. Debido a la administración de vitamina D₃ a 75000 UI/kg como inductor de la calcificación, las ratas de todos los grupos empezaron a perder peso a partir del día 2. La pérdida de peso prosiguió hasta el día 6, y, a partir de ese día se estabilizó. Al final del estudio la pérdida de peso total para los dos grupos salino y tratado fue del 19%. Respecto a mortalidad, en este estudio no se observó mortalidad en ninguno de los tres grupos.

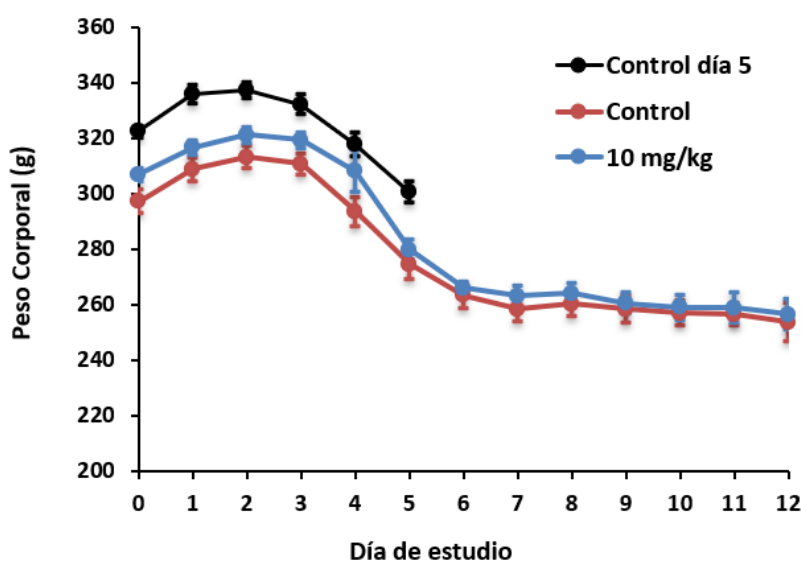


Figura IV.31. Evolución del peso corporal de los animales a lo largo del estudio. Promedio \pm s, n=8 grupo control día 5, n=10 grupo control (tratamiento salino), n=10 grupo administrado con infusión intravenosa de SNF472 a 10 mg/kg.

La Tabla IV.13. recoge los resultados de la bioquímica en suero. El grupo control de día 5 presentó niveles de nitrógeno ureico en sangre el doble que el grupo control (tratado con suero salino) y el grupo tratado con SNF472. En cambio, los niveles de ALP total determinados en este mismo grupo fueron la mitad de los grupos control y tratado. Los demás parámetros séricos estudiados, fueron similares para los tres grupos, y consistentes con los valores obtenidos en los estudios anteriores con vitamina D₃. Si comparamos los resultados de calcio total sérico con respecto a los grupos sanos (sham) de los estudios anteriores (10 mg/dL de calcio sérico), se puede observar que en este estudio también incrementaron los niveles séricos de calcio total en todos los grupos como consecuencia de la administración de vitamina D₃, inductor de la calcificación. En el grupo tratado con SNF472 no se observaron diferencias significativas en los niveles de calcio y fosfato totales en suero respecto del grupo control.

IV. RESULTADOS

Tabla IV.13. Parámetros bioquímicos obtenidos en suero de ratas a las que se indujo la calcificación cardiovascular con sobredosis de vitamina D₃ (tres administraciones consecutivas de 75000 UI/kg). Los resultados representan el promedio ± SE. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y prueba de Dunn para análisis post-hoc. (*) indica diferencias significativas vs. grupo control día 5, p<0.05. BUN: Nitrógeno ureico en sangre; Crea: creatinina; ALP: fosfatasa alcalina.

Grupo	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	ALP total (U/L)	% ALP termo-estable	Calcio total (mg/dL)	Fosfato (mg/dL)
Control día 5	38 ± 2	0.48 ± 0.02	79 ± 7	13 ± 4	13.6 ± 0.3	9.5 ± 0.4
Control	19.7 ± 0.9*	0.32 ± 0.02*	176 ± 8	1.9 ± 0.3	13.2 ± 0.2	8.8 ± 0.3
10 mg/kg	19 ± 2*	0.31 ± 0.03*	155 ± 7	2.7 ± 0.5	12.5 ± 0.5	9.2 ± 0.3

La Tabla IV.14. recoge los parámetros urinarios obtenidos en orina recogida durante 24 horas. En general, se observó una diuresis ligeramente inferior en el grupo tratado; aunque esta tendencia no fue significativa. Los niveles de creatinina y proteína en orina fueron significativamente más bajos para los grupos control y tratado con SNF472, con respecto al grupo control de día 5. En general, no se observó ningún efecto significativo del tratamiento con SNF472 en los tres parámetros urinarios estudiados.

Tabla IV.14. Parámetros urinarios obtenidos en ratas durante 24 horas a las que se indujo la calcificación cardiovascular con vitamina D₃ (tres administraciones consecutivas de 75000 IU/kg). Los resultados representan el promedio ± SE. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y la prueba de Tukey para análisis post-hoc. (*) indica diferencias significativas vs. grupo control día 5, p<0.05.

Grupo	Diuresis (mL)	Creatininuria (mg/dL)	Proteinuria (mg/dL)
Control día 5	17.3 ± 1.7	63 ± 3	1397 ± 248
Control	17.7 ± 2.2	44 ± 7*	626 ± 138*
10 mg/Kg	14.9 ± 1.4	39 ± 5*	681 ± 108*

Los niveles circulantes de SNF472 entorno a t_{max} del último día del estudio se analizaron por HPLC-MS/MS. Los resultados se recogen en la Figura IV.32. Del total de 10 ratas, cuatro tuvieron valores alrededor de 20 µM, un animal llegó a niveles circulantes de 31 µM, y los cuatro restantes presentaron niveles inferiores a 5 µM. De estos, se descartó uno con niveles inferiores al LLOQ (0.75 µM), ya que se reportaron problemas durante el periodo de infusión. Los valores obtenidos en este estudio de dosis única fueron de 21 ± 10 µM (mediana ± DQ), similares al estudio de prevención anterior para la dosis de 10 mg/kg (15 ± 5 µM).

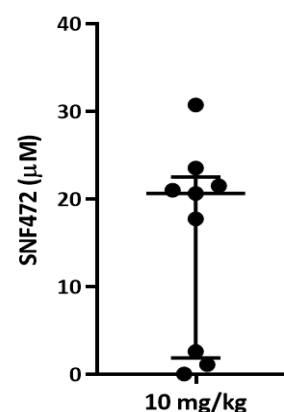


Figura IV.32. Niveles de SNF472 en plasma obtenidos al final de las 4 horas de infusión intravenosa (t_{max}) a 10 mg/kg (n=9).

IV. RESULTADOS

Los resultados de la calcificación tisular obtenida durante el estudio (grupo control de día 5) y al final del estudio (día 12) para todos los grupos se muestra en la Figura IV.33. Como se puede observar, el contenido de calcio tisular determinado a día 5 (6 ± 3 y 0.9 ± 0.2 mg de Ca/g tejido seco, en aorta y corazón, respectivamente) fue significativamente menor ($p < 0.05$) que el obtenido al final del estudio para ambos tejidos, lo que permitió estudiar la progresión de la CCV en los grupos control (tratamiento salino) y SNF472. La calcificación tisular en aorta y corazón aumentó en mayor magnitud en el grupo tratado con suero salino que en el grupo tratado con SNF472, cosa que se puede observar en la progresión de calcio depositado en ambos tejidos a partir de día 5 hasta el final del estudio. En la arteria aorta, la calcificación progresó un 370 % para el grupo salino y un 240 % para el grupo tratado con infusión intravenosa de SNF472 a 10 mg/kg. Sin embargo, la progresión de la calcificación en corazón fue mayor, de un 700 % para el grupo salino y un 350 % en el grupo tratado con SNF472.

Los valores de calcio obtenidos en aorta para el grupo salino (29 ± 4 mg de Ca/g tejido seco; Figura IV.33A) indujeron calcificación similar a la obtenida en el primer estudio de optimización de vitamina D₃ para la dosis de 75000 UI/kg (22 ± 8 mg de Ca/g de tejido seco). En cambio, en el corazón (Figura IV.33B) se obtuvieron valores de calcificación con elevada dispersión (valores mínimos-máximos de 2.4-19 mg de Ca/g de tejido seco) y seis veces mayores que los obtenidos en el estudio de optimización de vitamina D₃ (8 ± 4 vs. 1.3 ± 0.3 mg de Ca/g, respectivamente), por lo que la dosis administrada de SNF472 para inhibir la progresión de la calcificación en corazón pudo ser subóptima para este estudio.

En términos de inhibición, la progresión de la calcificación del tejido cardiovascular se inhibió un 34 ± 17 % y un 54 ± 19 %, en aorta y corazón, respectivamente, aunque esta inhibición no fue estadísticamente significativa frente al grupo tratado con suero salino. Como se ha comentado anteriormente, en cuatro animales se obtuvieron niveles de SNF472 inferiores a 5 μ M y, en dos de éstos los niveles fueron inferiores al LLOQ. Si se descartan estos dos animales, el promedio de inhibición en aorta es de un 54 ± 17 % ($n=7$), significativamente inferior al grupo control ($p < 0.05$).

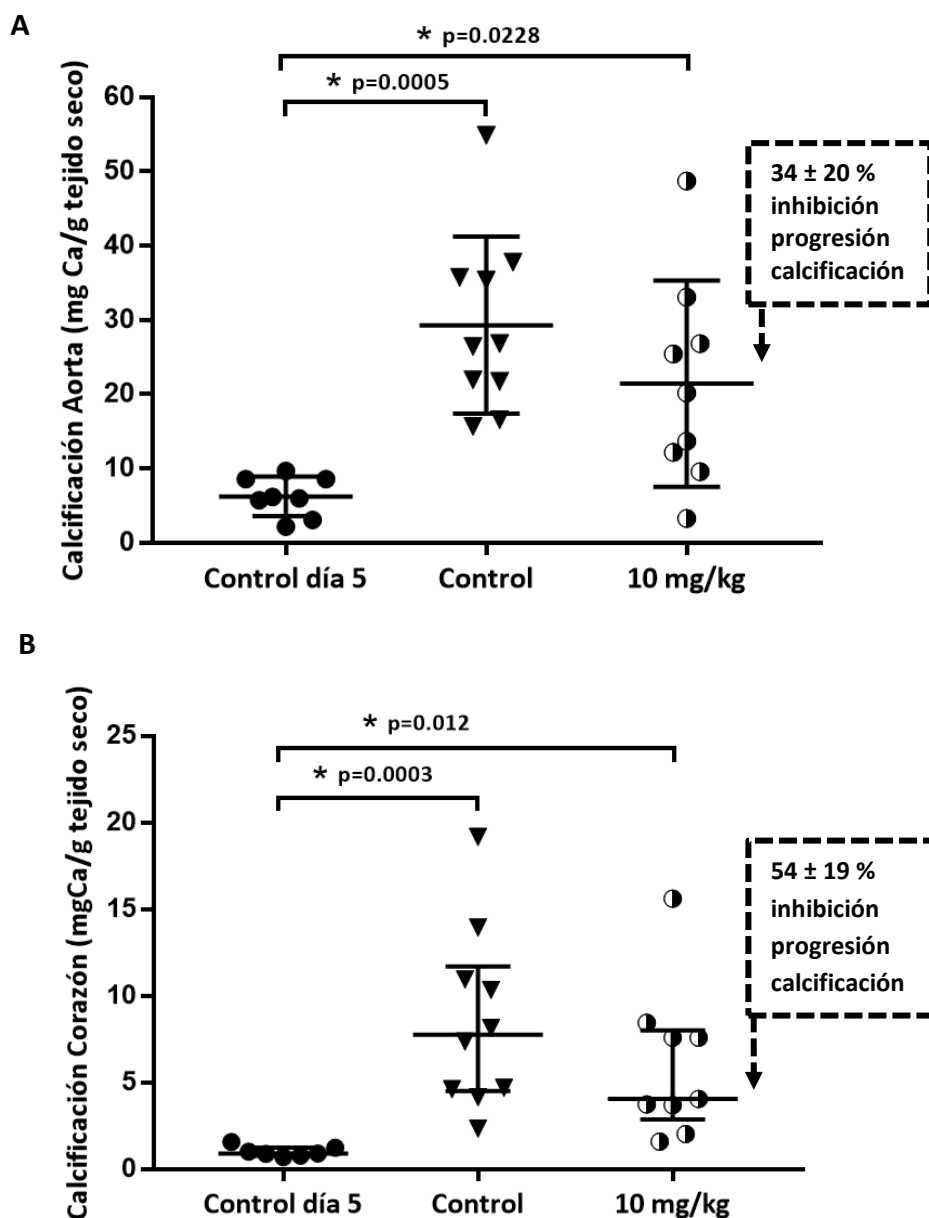


Figura IV.33. Calcificación en aorta y corazón expresada en mg de calcio total por g de tejido seco transcurridos 12 días desde la primera de las tres dosis (75000 UI/kg) de vitamina D₃. Los dos grupos tratados recibieron, a partir del día 5 del estudio, suero salino o SNF472 (10 mg/kg) por infusión intravenosa de 4 horas. Los resultados siguen una distribución normal en el caso de la aorta y no normal para el corazón. **(A)** Calcio en arteria aorta, promedio ± s, n=8 (control día 5), n=10 (control) y n=9 (10 mg/kg SNF472, una muestra perdida durante la digestión). Análisis estadístico: ANOVA de una vía. La prueba de Tukey se utilizó para análisis post-hoc. (*) indica diferencias significativas vs. control de día 5, p<0.05. **(B)** Calcio en corazón, mediana con rango intercuartil, n=7 (control día 5), n=10 (control) y 9 (10mg/kg de SNF472). Análisis estadístico: Kruskal-Wallis. La prueba de Dunn se utilizó para análisis post-hoc. (*) indica diferencias significativas vs. control día 5; p<0.05. Los resultados atípicos se excluyeron para el análisis estadístico. En corazón se excluyó un valor del grupo control día 5 (10 mg Ca/g) y otro en el grupo con SNF472 (30 mg Ca/g).

3. Ensayos clínicos con SNF472: análisis farmacocinético y farmacodinámico

En este último apartado se presentan los resultados de PK y PD de dos ensayos clínicos de fase 2 con SNF472 y de las correlaciones entre las concentraciones plasmáticas de SNF472, la eficacia clínica observada y la inhibición de la cristalización *ex vivo* (efecto PD). Para ello se aplicó el ensayo espectrofotométrico *ex vivo* validado en el apartado 1.2. de este capítulo. Las muestras ensayadas fueron muestras de plasma de pacientes de CUA en tratamiento de HD que formaban parte de un ensayo clínico de fase 2 tratados con una formulación intravenosa de SNF472, y muestras de pacientes con ERT en tratamiento de HD que en el marco de otro ensayo clínico de fase 2 (estudio CaLIPSO) también recibieron tratamiento intravenoso con SNF472.

3.1. Ensayo clínico de calcifilaxis

En el estudio clínico de CUA de fase 2 abierto, multicéntrico, con un único brazo de tratamiento, se reclutaron 14 pacientes con CUA de un rango de edades comprendidas entre 34 y 90 años. Los pacientes reclutados llevaban una media de 3.8 años en tratamiento de HD. Del total inicialmente incluido en el estudio, solo 11 pacientes completaron el tratamiento de 12 semanas con SNF472 tres veces por semana.

En el análisis primario, se reportaron 21 mejoras estadísticamente significativas desde el inicio hasta la semana 12 del tratamiento con SNF472 para las úlceras epiteliales y el dolor isquémico. Estos resultados del análisis primario del ensayo clínico han sido publicados³ y se comentan con más detalle en el capítulo de discusión.

Respecto a los análisis de PK, se determinó la concentración máxima de SNF472 en plasma al final de la infusión intravenosa (rangos de dosis de 5.6 mg/kg a 8.6 mg/kg), tanto en la primera semana (día 1) como en la última (semana 12, día 5) del estudio. Las concentraciones individuales obtenidas para cada paciente en la primera y la última infusión se recogen en la Tabla IV.15. Estas concentraciones fueron cuantificables y comparables para todos los pacientes, excepto en una muestra de semana 12, en la que, por razones desconocidas, se obtuvieron niveles por debajo del LLOQ (0.76 μ M). Por ello, los resultados de PK y PD para el paciente a quien correspondía dicha muestra de semana 12 se omitieron para realizar los cálculos de estadística descriptiva. Adicionalmente, no se recogió muestra de plasma de un paciente al final de la infusión a semana 12, por lo que no se pudo obtener la C_{max} ni determinar el efecto *ex vivo* de PD para este paciente y punto de tiempo.

La misma Tabla IV.15 reúne los valores obtenidos del efecto de PD (porcentaje de inhibición de la cristalización de fosfato de calcio en plasma aplicando el ensayo *ex vivo*). Los valores de inhibición obtenidos siguieron una distribución normal y fueron similares para los días 1 y 5 de la semana 1 y 12, respectivamente. Se obtuvo un valor promedio de $65 \pm 14\%$ (mediana, 69%; rango, 39% – 80%) después de la primera infusión, y un promedio del $68 \pm 12\%$ (mediana, 68%; rango, 49% – 86%) después de la última infusión.

IV. RESULTADOS

Tabla IV.15. Resultados de los ensayos farmacocinéticos y farmacodinámicos del estudio clínico de Fase II realizado en pacientes con calcifilaxis durante los tratamientos de hemodiálisis (tres veces por semana), al final de la primera infusión (semana 1, día 1) de SNF472 y al final de la última infusión (semana 12, día 5).

Paciente	Semana 1 (Día 1)		Semana 12 (Día 5)		Rac C _{max}	ΔC _{max} (μM) [‡]	ΔEfecto PD (%) [‡]
	Plasma C _{max} * (μM)	Efecto PD (%) [†]	Plasma C _{max} * (μM)	Efecto PD (%) [†]			
1	14.5	65.1	23.9	86.3	1.6	9.4	21.2
2	2.8	66.9	6.8	65.4	2.5	4.1	-1.5
3	29.0	38.7	NA	NA	NC	NC	NC
4	21.0	79.5	4.3	59.0	0.20	-16.7	-20.5
5	36.8	51.0	NA	NA	NC	NC	NC
6	9.4	61.7	20.7	75.7	2.2	11.3	14.0
7	15.8	74.5	<LLOQ [§]	-15.0 [§]	NC	NC	NC
8	12.9	46.7	ND	ND	NC	NC	NC
9	61.6	80.2	18.8	49.0	0.31	-42.7	-31.2
10	22.1	78.6	48.5	78.8	2.2	26.4	0.20
11	62.4	77.0	15.2	67.7	0.24	-47.3	-9.3
12	42.9	45.2	60.9	56.9	1.4	18.0	11.7
13	25.9	72.2	ND	ND	NC	NC	NC
14	50.8	71.0	54.1	76.4	1.1	3.3	5.4
N	14	14	9	9	9		
Promedio	29	65	28	68	1.3		
SD	19	14	21	12	0.9		
CV (%)	66	22	75	18	69		
Mediana	24	69	21	68	1.4		
Min-Max	2.8–62.4	38.7–80.2	4.3–60.9	49.0–86.3	0.20–2.5		

<LLOQ: menor al límite inferior de cuantificación (0.76 μM); ND: muestra no disponible; C_{max}: concentración máxima; NC: no cuantificable; PD: farmacodinamia; Rac C_{max}: factor de acumulación, determinado según el cálculo: C_{max,semana12día5}/C_{max,semana1día1} ; *concentración plasmática obtenida al final de la infusión, † efecto PD: % inhibición cristalización, ‡ diferencias individuales entre valores obtenidos a semana 12 y semana 1; § valores no considerados (concentración plasmática menor al LLOQ al final de la infusión).

IV. RESULTADOS

El promedio de las C_{max} a semana 1 (n=14) y semana 12 (n=9) fue de $29 \pm 19 \mu\text{M}$ y $28 \pm 21 \mu\text{M}$ (Figura IV.34A), respectivamente. Al analizar los resultados de C_{max} como muestras apareadas, no se observaron diferencias significativas entre ambas semanas (Figura IV.34B). La mediana de la C_{max} al final de la primera y la última infusión fue de $24 \mu\text{M}$ (rango 2.8-62 μM) y $21 \mu\text{M}$ (rango, 4.3-61 μM), respectivamente. Respecto al factor de acumulación de la concentración ($Rac C_{max}$) osciló entre 0.20 y 2.46, con un valor promedio de 1.3 ± 0.9 y un coeficiente de variación del 69%.

La Figura IV.34C muestra el diagrama de puntos de dispersión de los datos obtenidos para el ensayo de PD para cada paciente y día. En valores promedio, la inhibición de la cristalización de fosfato de calcio en plasma se mantuvo constante entre el inicio y la última semana (semana 12) de tratamiento con SNF472. Al analizar los resultados de inhibición *ex vivo* de la cristalización como muestras apareadas, no se observaron diferencias significativas entre las semanas 1 y 12 de tratamiento (Figura IV.34D).

La inhibición *ex vivo* de la cristalización de fosfato de calcio fue superior al 50% en el 83% de las muestras de plasma analizadas (19 de las 23 muestras), con una concentración promedio de SNF472 de $29 \pm 21 \mu\text{M}$ (mediana, 22 μM ; rango, 2.8–62.4 μM) en este conjunto de muestras. En la última administración del estudio (semana 12, día 5), en ocho de los nueve pacientes con muestra de plasma disponible para su análisis se obtuvo una inhibición de la cristalización superior al 50%, con una concentración promedio de $29 \pm 22 \mu\text{M}$ (mediana, 22 μM ; rango, 4.3–60.9 μM) de SNF472 en plasma. Por tanto, con estos resultados se demuestra que la actividad se concentró en la parte alta de la curva concentración-respuesta del efecto de PD previamente definido en estudios preclínicos y clínicos con SNF472³⁻⁵. Además, las concentraciones plasmáticas de SNF472 en los pacientes de CUA analizados dieron valores localizados en la zona de plató del ensayo de PD, por lo que la relación entre PK y PD no se puede establecer (Figura IV.35A).

Para pacientes individuales, se observó una correlación positiva estadísticamente significativa ($r=0.75$; $p<0.05$) del cambio en el efecto de PD entre la semana 1 y la semana 12 con el cambio en las concentraciones plasmáticas de SNF472 durante el mismo intervalo (Figura IV.35B).

IV. RESULTADOS

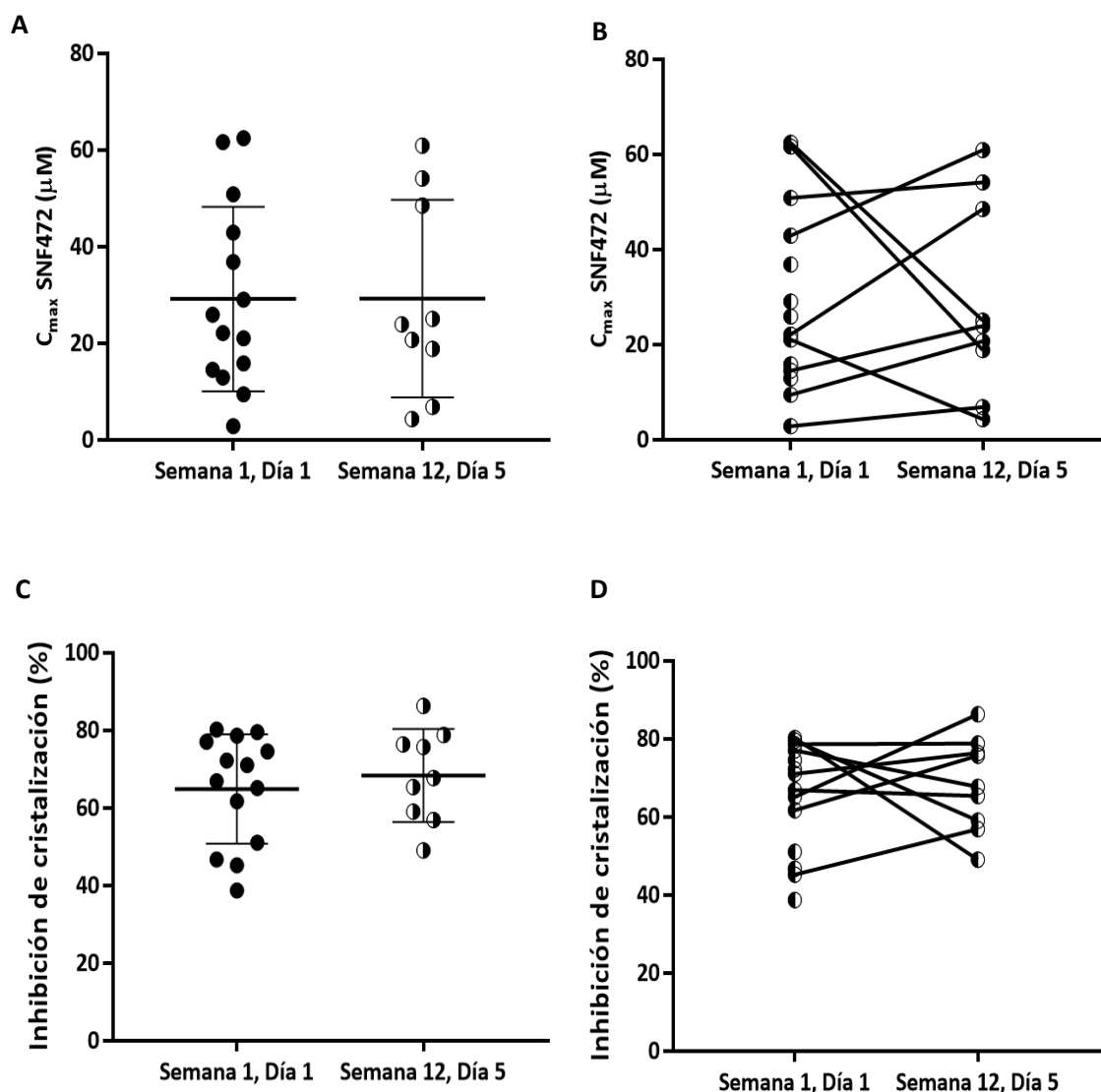


Figura IV.34. Diagrama de puntos de dispersión de los resultados farmacodinámicos y farmacocinéticos realizados en el estudio clínico de fase 2 en pacientes con calcifilaxis tratados con SNF472 durante 12 semanas en las sesiones de hemodiálisis (3 veces por semana). **(A, B)** Concentración máxima obtenida en plasma al final de la infusión de SNF472. Los valores representan los resultados individuales de farmacodinamia y farmacocinética para cada paciente a semana 1, día 1 (n=14) y a semana 12, día 5 (n=9). **(C, D)** Efecto farmacodinámico expresado como % de inhibición de la cristalización *ex vivo* de fosfato de calcio en plasma. Se representa el promedio \pm s. Análisis estadístico: Prueba t de muestras apareadas. No se obtuvieron diferencias significativas entre grupos en ninguno de los parámetros analizados.

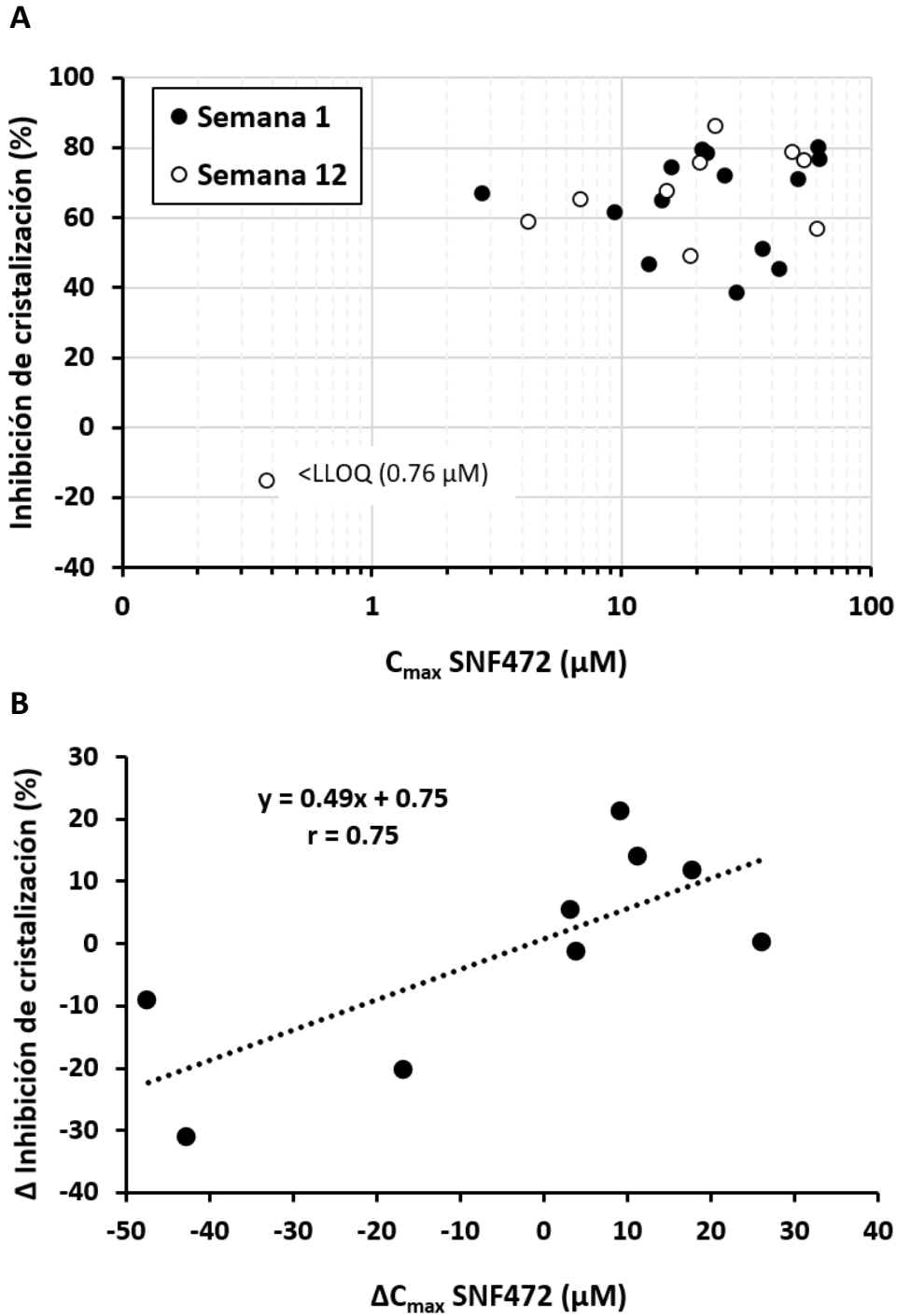


Figura IV.35. Relación entre farmacodinamia (PD) y farmacocinética (PK) en pacientes con calcifilaxis tratados con infusión intravenosa de SNF472 en la sesión de hemodiálisis, tres veces por semana, durante 12 semanas. **(A)** Relación total para las dos semanas evaluadas. Los resultados representan los valores individuales de PD y PK para cada paciente a semana 1, día 1 (n=14) y a semana 12, día 5 (n=10). **(B)** Cambios para cada individuo calculados como incremento de los resultados de PD y C_{max} (n=9) entre la semana 1 y la semana 12. Análisis estadístico: correlación paramétrica de Pearson ($p < 0.05$). LLOQ: límite inferior de cuantificación (0.76 µM).

3.2. Estudio CaLIPSO: ensayo clínico de progresión de la calcificación cardiovascular

El estudio clínico CaLIPSO de fase 2b incluyó 274 pacientes de edad promedio 64 ± 9 años con ERT en tratamiento de HD. Estos pacientes fueron aleatorizados 1:1:1 para ser tratados con placebo (n = 91), SNF472 300 mg (n = 92) o SNF472 600 mg (n = 91). Durante el estudio se suspendió el tratamiento del 14%, 29% y 20% de los pacientes que recibían 300 mg, 600 mg de SNF472 y placebo, respectivamente. Adicionalmente, algunos pacientes murieron durante el estudio, representando el 6% del grupo placebo (n=5) y el 4% entre los pacientes tratados con SNF472 (n=7). Por tanto, al final del estudio hubo 49, 61 y 50 pacientes de los grupos de tratamiento con placebo, 300 mg y 600 mg de SNF472, respectivamente, con resultados de índice CAC disponibles para las semanas 1 y 52. De éstos, el subconjunto de pacientes incluidos por protocolo según los criterios de aceptación en cuanto al muestreo de PK, PD y al análisis del índice CAC, se resume en la tabla IV.16.

Tabla IV.16. Pacientes disponibles del estudio clínico CaLIPSO. La población de análisis incluye los pacientes aleatorizados, la población por protocolo incluye los pacientes que cumplieron los criterios de aceptación en cuanto al muestreo de PK, PD y al análisis del índice CAC.

Población de análisis	Grupo de tratamiento			Total (n = 274)
	Placebo (n = 91)	300 mg (n = 92)	600 mg (n = 91)	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Población PP con índice CAC	49 (53.8)	61 (66.3)	50 (54.9)	160 (58.4)
Población PP para PK	15 (42.9%)	21 (58.3%)	20 (48.8%)	56 (50.0%)
Población PP para PD	15 (42.9%)	20 (55.6%)	20 (48.8%)	55 (49.1%)
Población PP para PK/PD	15 (42.9%)	20 (55.6%)	20 (48.8%)	55 (49.1%)

PP: por protocolo; PK: farmacocinética; PD: farmacodinamia; CAC: calcificación arteria coronaria

3.2.1. Farmacocinética y acumulación de SNF472

Los resultados del análisis de PK en los que se determinó la C_{max} en plasma al final de la infusión de SNF472 a la semana 1 (día 1), semana 10 (día 64 ± 3), semana 22 (día 148 ± 3) y semana 52 (día 358 ± 3) se muestran en la Figura IV.36. El promedio de C_{max} en el grupo placebo fue inferior al LLOQ en todas las semanas de tratamiento analizadas. Los valores de C_{max} promedio en el grupo de 300 mg fueron de $13 \mu\text{M}$ (n = 13), $14 \mu\text{M}$ (n = 12), $16 \mu\text{M}$ (n = 11) y $15 \mu\text{M}$ (n = 11), a la semana 1, 10, 22 y 52, respectivamente. En el grupo de 600 mg se obtuvieron valores promedio de $39 \mu\text{M}$ (n = 9), $44 \mu\text{M}$ (n = 9), $44 \mu\text{M}$ (n = 15) y $63 \mu\text{M}$ (n = 6) a la semana 1, 10, 22 y 52, respectivamente. Por tanto, los niveles promedio de C_{max} fueron generalmente consistentes entre las diferentes semanas de tratamiento dentro del mismo grupo de dosis, con valores promedio de C_{max} entre $13 - 16 \mu\text{M}$ y $39 - 63 \mu\text{M}$, y con CV entorno al 39 y 77%, para las dosis de SNF472 300 y 600 mg, respectivamente. Sin embargo, el promedio de C_{max} obtenido a semana 52 para el grupo de dosis 600 mg ($63 \mu\text{M}$) fue más alta que la determinada a las semanas 1, 10 y 22. Aun así, cabe destacar que el número de pacientes disponibles para el grupo de 600 mg a semana 52 fue menor (n=6) en comparación con el resto de semanas (n = 9 - 15), y la mayoría de estos pacientes presentaron valores elevados de C_{max} desde el inicio y durante todo el estudio. Teniendo en cuenta este aspecto, se realizó un análisis individual del factor de

IV. RESULTADOS

acumulación durante las 52 semanas para los seis pacientes disponibles en el grupo de 600 mg. Los resultados mostraron que la acumulación promedio para éstos fue de 1.2 ± 0.2 , lo que puede considerarse poco relevante.

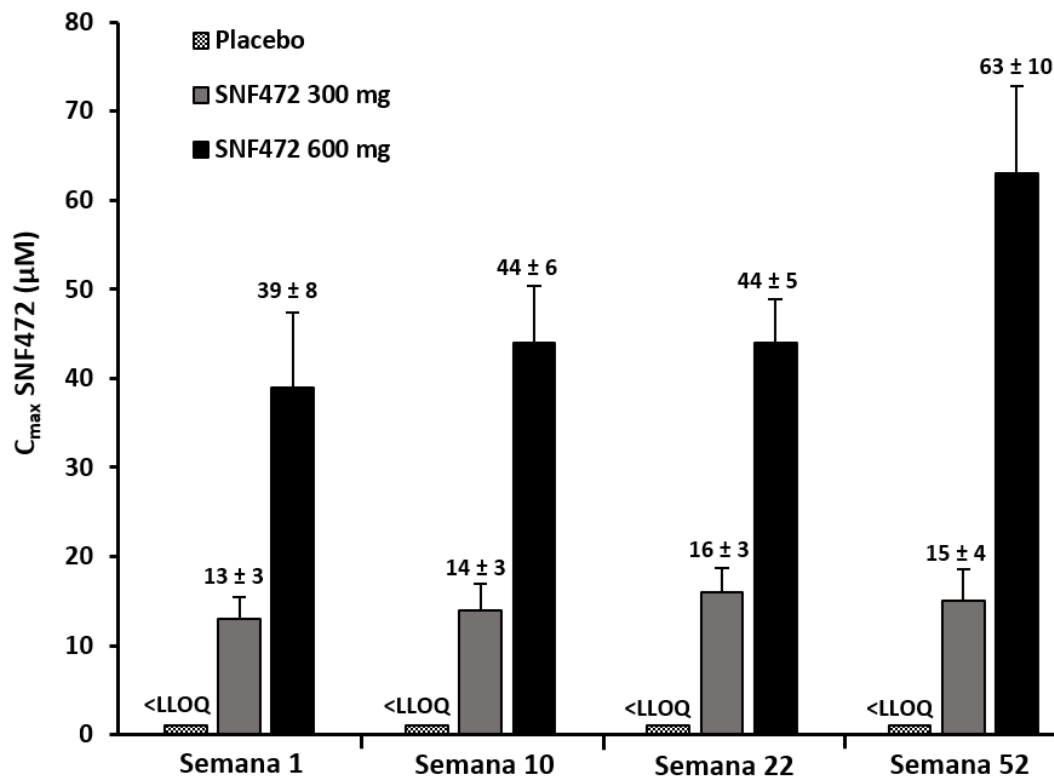


Figura IV.36. Promedio de los resultados de concentración máxima (C_{max}) obtenidos en plasma al final de la infusión en pacientes con enfermedad renal terminal tratados tres veces por semana en la hemodiálisis con placebo o SNF472 a dosis de 300 o 600 mg durante 52 semanas. Los valores representan el promedio \pm SE a semana 1, 10, 22 y 52 del estudio clínico de CaLIPSO, placebo, $n = 8, 9, 10$ y 8 ; SNF472 300 mg, $n = 13, 12, 11$ y 11 ; SNF472 600 mg, $n = 9, 9, 15$ y 6 para la semana 1, 10, 22, y 52, respectivamente.

El análisis estadístico para evaluar el efecto del tratamiento y la semana de visita mostró diferencias significativas para los valores de C_{max} entre los grupos de tratamiento (placebo, SNF472 300 mg y 600 mg ($p < 0.001$)). En cambio, no se observaron diferencias significativas en los valores de C_{max} entre las semanas de tratamiento ($p = 0.631$).

Por tanto, los resultados de PK en las diferentes semanas de visita se tomaron en conjunto para calcular el promedio de C_{max} ($\pm s$) en los grupos de tratamiento con SNF472. Los valores promedio obtenidos fueron de 15 ± 10 y 46 ± 22 μM , para la dosis de 300 mg y 600 mg, respectivamente, observándose diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los grupos de tratados con SNF472 y placebo (valores promedio <LLOQ) (Tabla IV.17).

Para los grupos tratados con SNF472 se calculó el efecto de acumulación después de las dosis repetidas de SNF472 desde la semana 1 a la 52, calculado como diferencia de C_{max} obtenida entre visitas. El IC del 95% del factor de acumulación incluyó el valor cero, por lo que se concluyó que no hubo acumulación significativa de SNF472 en ambos grupos de tratamiento

(300 y 600 mg) después de la administración repetida tres veces por semana durante 52 semanas.

En cuanto a la proporcionalidad de las dosis administradas, los ratios promedio de C_{max} entre los grupos de 600 y 300 mg fueron de 3.0, 3.1, 2.7 y 4.2 en las semanas 1, 10, 22 y 52, respectivamente. Estos resultados confirman una proporcionalidad de dosis superior a la esperada, con un ratio promedio de C_{max} entorno a 3.

3.2.2. Ensayo de farmacodinamia *ex vivo*

Los resultados del ensayo de PD para determinar la inhibición de la cristalización *ex vivo* de fosfato de calcio en muestras de plasma (efecto PD) para los tres grupos de tratamiento (placebo, SNF472 dosis de 300 o 600 mg) y semanas de muestreo (semana 1, 10, 22 y 52) se presenta en la Figura IV.37.

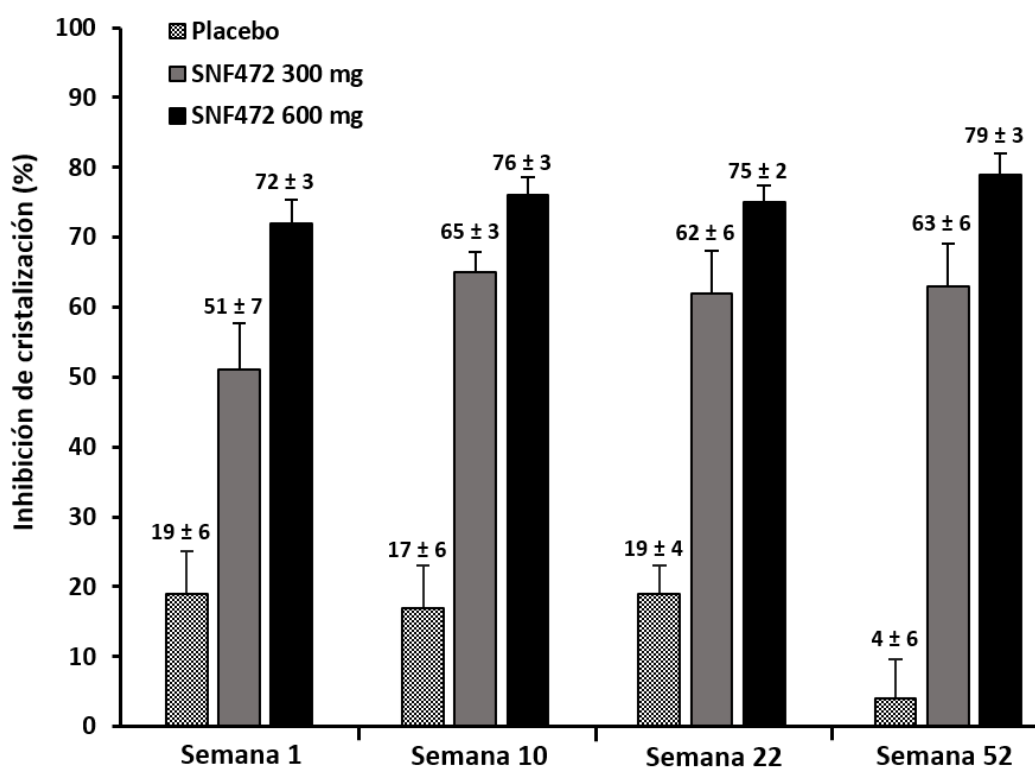


Figura IV.37. Resultados del ensayo farmacodinámico de cristalización *ex vivo* en plasma de los pacientes del estudio CaLIPSO, tratados durante 52 semanas con placebo o SNF472 a dosis de 300 mg o 600 mg durante la hemodiálisis. Placebo, n = 9, 10, 9 y 8; SNF472 300 mg, n = 11, 12, 11 y 10; SNF472 600 mg, n = 9, 9, 15 y 7 para la semana 1, 10, 22, y 52, respectivamente. Los valores representan el promedio ± SE (%).

Para el grupo placebo el efecto PD promedio representó un 19% (n = 9), 17% (n = 10), 19% (n = 9) y 4% (n = 8) en la semana 1, 10, 22 y 52, respectivamente. El CV osciló entre 61% y 473% en este grupo. Para el grupo de tratamiento de 300 mg de SNF472 el efecto PD promedio representó un 51% (n = 11), 65% (n = 12), 62% (n=11) y 63% (n = 10) en la semana 1, 10, 22 y 52, respectivamente. En este caso la variabilidad entre sujetos expresada como CV fue comparable entre semanas de tratamiento con un rango de 15 - 44%. Finalmente, para el

IV. RESULTADOS

grupo de 600 mg de SNF472, el efecto PD promedio observado fue 72% (n = 9), 76% (n = 9), 75% (n = 15) y 79% (n = 7) en la semana 1, 10, 22 y 52, respectivamente. El CV para este grupo fue inferior al encontrado en el grupo de dosis inferior y osciló entre el 10% y el 13%. Por tanto, con estos resultados, se puede observar que la mayor variabilidad observada a lo largo de las semanas fue la encontrada en el grupo placebo.

El análisis estadístico para estudiar el efecto del tratamiento y visita mostró diferencias significativas para los resultados obtenidos del efecto PD entre los diferentes grupos de tratamiento (placebo, SNF472 300 mg y 600 mg ($p < 0.001$)). En cambio, no se observaron diferencias significativas en dichos valores de inhibición de la cristalización entre las semanas de tratamiento dentro de un mismo grupo ($p = 0.652$). Por tanto, se tomaron de manera conjunta todos los resultados del efecto PD en las diferentes semanas de visita para calcular el promedio del efecto PD ($\pm s$) en los grupos placebo, 300 mg y 600 mg de SNF472. Los resultados de inhibición obtenidos fueron de $15 \pm 17\%$, $61 \pm 19\%$ y $75 \pm 9\%$, respectivamente, observándose diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los grupos de tratamiento (Tabla IV.17).

Tabla IV.17. Resultados promedio de los ensayos farmacocinéticos, farmacodinámicos del estudio clínico CaLIPSO realizado en pacientes en hemodiálisis y tratados con placebo, SNF472 300 o 600 mg tres veces por semana, durante 52 semanas. n = Número de muestras para el análisis PK, PD disponibles por protocolo; *Concentración plasmática obtenida al final de la infusión (promedio $\pm s$); † % de inhibición de la cristalización *ex vivo* en plasma (promedio $\pm s$). ^a Diferencias significativas frente a placebo ($p < 0.001$). ^b Diferencias significativas entre grupos de tratamiento con SNF472 ($p < 0.001$, modelo mixto lineal).

Parámetro	Grupos de tratamiento					
	Placebo	n	SNF472 300 mg	n	SNF472 600 mg	n
PK (C_{max} , μM) *	<LLOQ	35	15 ± 10^a	47	$46 \pm 22^{a,b}$	39
Efecto PD (%) †	15 ± 17	36	61 ± 19^a	44	$75 \pm 9^{a,b}$	40

<LLOQ: menor al límite inferior de cuantificación (0.76 μM); C_{max} : concentración máxima; CAC: calcificación de arterias coronarias; PK: farmacocinética; PD: farmacodinamia

El mayor efecto PD se observó en el grupo de dosis de SNF472 más alta. Además, el promedio del efecto PD en los grupos de 300 mg y 600 mg fue 3.9 veces y 4.6 veces superior en comparación con el grupo placebo, respectivamente.

3.2.4. Análisis de la relación PK - PD

Para el análisis PK - PD se utilizaron los valores individuales obtenidos de cada grupo de tratamiento aplicando un modelo simple no lineal de E_{max} . Dado que en el análisis estadístico anterior no se observaron diferencias significativas tanto para los resultados de C_{max} como para el efecto PD dentro de cada grupo de tratamiento, se calculó el promedio de C_{max} y efecto PD de cada paciente en las diferentes semanas (1, 10, 22 y 52). Los pacientes con al menos un valor medido de concentración de SNF472 y de efecto PD se incluyeron en este análisis, siendo el número de pacientes totales 55. Los resultados del análisis PK/PD para los tres grupos de tratamiento (placebo, SNF472 300 mg y 600 mg) se muestra en la Figura IV.38.

IV. RESULTADOS

El modelo simple de E_{max} para el efecto PD vs. C_{max} , consideró el factor de pendiente (H) constante e igual a 1, obteniendo un valor de ajuste r^2 de 0.843. Se observó una buena correlación entre los valores observados versus los estimados que proporcionó valores estimados \pm SE (intervalo de confianza del 95%) para el efecto basal, E_0 de $9 \pm 4\%$ (IC 95%, 1.1 – 16) y el efecto máximo neto, E_{max} de $76 \pm 5\%$ (IC 95%, 66 – 86). El valor de IC_{50} estimado según el modelo fue de $5.5 \pm 1.8 \mu M$ (IC 95%, 2.0 – 9.0) y la IC_{80} fue de $22 \mu M$ (IC 95%, 7.8 – 36) (Tabla IV.18).

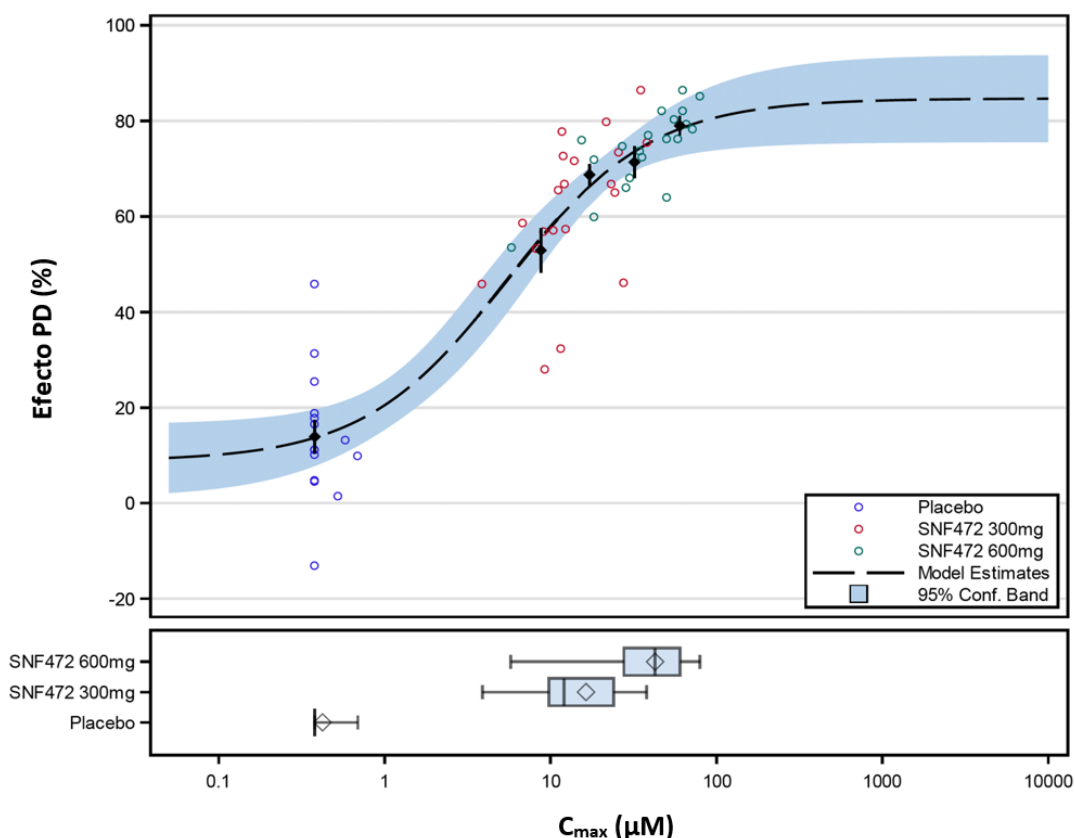


Figura IV.38. Curva concentración-respuesta obtenida del análisis PK/PD del estudio CaLIPSO mediante aplicación de un modelo simple no lineal de E_{max} y considerando el factor de pendiente constante (H) e igual a 1. Se representan los valores individuales de C_{max} (μM) y efecto PD (%) por grupo de tratamiento agrupando todas las semanas de visita de un mismo paciente (semanas 1, 10, 22 y 52), $n = 55$. Placebo ($n = 15$), SNF472 300 mg ($n = 20$) y SNF472 600 mg ($n = 20$). Los valores $<LLOQ$ se tomaron como $LLOQ/2$ ($0.38 \mu M$) para el análisis. Los rombos negros y las líneas verticales representan el promedio ($\pm SE$) para el efecto PD por cuartil de C_{max} . En la parte inferior de la curva concentración-respuesta, se representan los diagramas de cajas y bigotes de los valores de C_{max} (μM) obtenidos por grupo de tratamiento. C_{max} : concentración máxima; PD: farmacodinamia; PK: farmacocinética.

Tabla IV.18. Resumen de los resultados estimados de la relación PK/PD del estudio clínico CaLIPSO realizado en pacientes en hemodiálisis y tratados con placebo, SNF472 300 o 600 mg tres veces por semana, durante 52 semanas.

Parámetro	Estimación \pm SE	IC 95%
E_0 (Efecto PD (%))	9 ± 4	1.1 - 16
E_{max} (Efecto PD (%))	76 ± 5	66 - 86
IC_{50} (μM)	5.5 ± 1.8	2.0 - 9.0
IC_{80} (μM)	22	7.8 - 36

Efecto PD: % inhibición cristalización; IC 95%: intervalo de confianza del 95%; E_0 : efecto basal de inhibición de la cristalización; E_{max} : efecto máximo neto de inhibición de la cristalización atribuido al SNF472; IC_{50} : concentración de SNF472 que inhibe el 50% de la cristalización respecto a E_{max} ; IC_{80} : concentración de SNF472 que inhibe el 80% de la cristalización respecto a E_{max} ; PD: farmacodinamia; PK: farmacocinética.

3.2.5. Análisis de la relación PK - Progresión Índice CAC

Para el análisis PK - Porcentaje de cambio (o progresión) del índice CAC en volumen se consideraron los valores promedio de C_{max} de cada paciente, ya que las diferencias de C_{max} entre visitas no fueron significativas y que no hubo acumulación del SNF472 después de las 52 semanas. Por tanto, se consideró que el valor promedio de C_{max} describía mejor la exposición real al fármaco para cada paciente durante el tratamiento de 52 semanas. El análisis del porcentaje de cambio del índice CAC en volumen desde el inicio al final del estudio vs. C_{max} se realizó con un modelo simple no lineal de E_{max} , incluyendo un total de 56 sujetos.

El mejor ajuste ($p < 0.001$) se obtuvo asumiendo que el efecto máximo (E_{max}) esperado supone que no existe ninguna progresión en el índice CAC durante el período de tratamiento ($E_0 = -E_{max}$). En la Figura IV.39 se puede observar la curva E_{max} simple obtenida, donde se representan los valores individuales (Figura IV.39A) o el promedio \pm SE por cuartiles (Figura IV.39B) de las dos variables experimentales consideradas. Este modelo proporcionó los siguientes valores estimados \pm SE (intervalo de confianza del 95%): el efecto mínimo estimado (E_0) correspondiente a la progresión de CAC en volumen desde el inicio hasta la semana 52 para el placebo fue del $16.9 \pm 4.7\%$ (6.6 a 28). Respecto a la E_{max} , se estimó un $-14.5 \pm 4.7\%$ (-22 a -6.2), lo que es consistente con el supuesto tomado en el modelo de $E_0 = -E_{max}$. Por tanto, el modelo estima, en base a los datos experimentales, que el efecto máximo del tratamiento durante 52 semanas con SNF472 es de un 2.4% de progresión de CAC. Adicionalmente, la IC_{50} se estimó en $12 \mu\text{M}$ (-12 a 37) y la IC_{80} fue de $49 \mu\text{M}$ (Tabla IV.19).

Tabla IV.19. Resumen de los resultados estimados de la relación PK/porcentaje de cambio índice CAC en volumen del estudio clínico CaLIPSO realizado en pacientes en hemodiálisis y tratados con placebo, SNF472 300 o 600 mg tres veces por semana, durante 52 semanas. ^a Este valor se representa como un 2.4% (16.9 - 14.5%), que representa el máximo efecto de SNF472 de acuerdo con el modelo simple E_{max} en términos de progresión de CAC; ^b Porcentaje de cambio índice CAC: $\ln CAC_{semana52} - \ln CAC_{cribado}$.

Parámetro	Estimación \pm SE	IC 95%
E_0 (% de cambio índice CAC ^b)	16.9 ± 4.7	6.6 a 28
E_{max} (% de cambio índice CAC ^b)	$-14.5^a \pm 4.7$	-22 a -6.2
IC_{50} (μM)	12	-12 a 37
IC_{80} (μM)	49	-48 a 146

CAC: calcificación de la arteria coronaria; IC 95%: intervalo de confianza del 95%; E_0 : efecto mínimo estimado; E_{max} : efecto máximo estimado; IC_{50} : concentración de SNF472 asociada con el 50% del efecto máximo; IC_{80} : concentración de SNF472 asociada con el 80% del efecto máximo.

IV. RESULTADOS

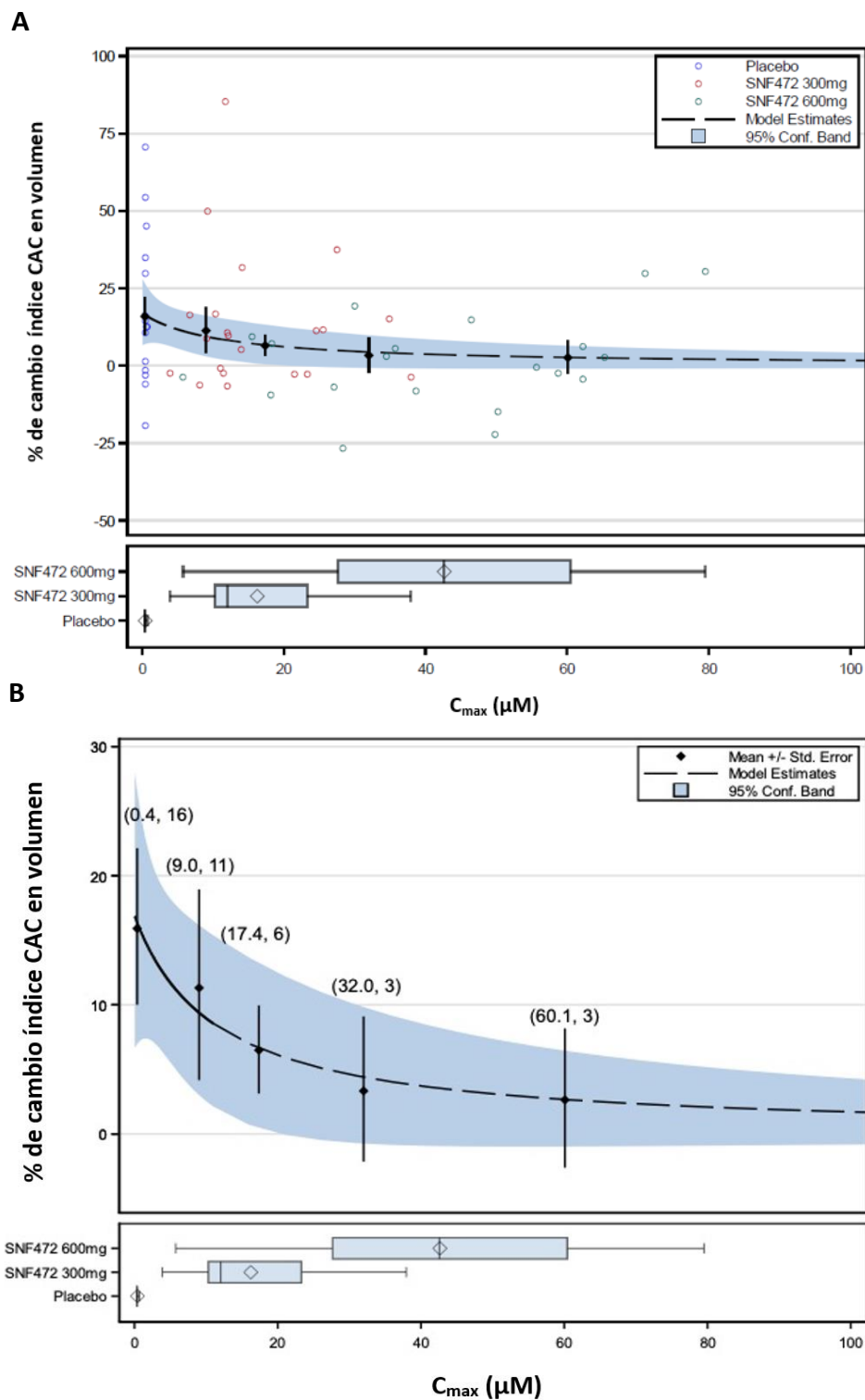


Figura IV.39. Relación obtenida mediante un ajuste no lineal simple de E_{max} del porcentaje de cambio del índice CAC en volumen desde el inicio hasta el final del tratamiento con el promedio de la concentración máxima (C_{max}) del estudio CaLIPSO. **(A)** Valores individuales. **(B)** Promedio \pm SE. Los valores entre paréntesis representan (promedio de C_{max} por cuartiles, % de cambio CAC). Placebo ($n=15$), SNF472 300 mg ($n=21$) y 600 mg ($n=20$). En la parte inferior de la relación E_{max} , se representan los diagramas de cajas y bigotes de los valores de C_{max} obtenidos por grupo de tratamiento. En el gráfico, el % de cambio máximo representa E_0 (16.5%) + E_{max} (-14.5%) = 2.4%, que representa el efecto máximo ejercido por el tratamiento con SNF472 en términos de progresión de CAC. CAC: calcificación en arterias coronarias; C_{max} : concentración máxima; E_0 : progresión del índice CAC en volumen desde el inicio hasta la semana 52 para el placebo; E_{max} : efecto máximo del tratamiento durante 52 semanas con SNF472.

IV. RESULTADOS

La Tabla IV.20 recoge los valores promedio de C_{max} para el placebo (indicado como 0) y cada uno de los cuartiles. Esta tabla también incluye el número de pacientes por dosis de SNF472 (300 o 600 mg) incluido en cada cuartil o placebo y los valores estimados del porcentaje de cambio de índice CAC en volumen calculados a partir del modelo no lineal simple de E_{max} aplicado en la Figura IV.39.

Tabla IV.20. Valores promedio de C_{max} por cuartiles, población tratada con SNF472 incluida en cada cuartil y valores estimados del porcentaje de progresión de índice CAC en volumen calculados a partir del modelo de E_{max} simple utilizado en la Figura 3.39. ^a promedio \pm SE; ^b Número de pacientes (y porcentaje) para cada grupo de dosis con una C_{max} correspondiente a un cuartil determinado.

Cuartil de C_{max}	C_{max} (μ M) ^a	Número de pacientes, (%) ^b		% de cambio de CAC en volumen (IC 95%)
		300 mg	600 mg	
0	<LLOQ	0 (0.0%)	0 (0.0%)	15.9 (10.0 a 22.1)
1	9.0 \pm 0.8	10 (47.6%)	1 (5.0%)	11.3 (4.2 a 18.9)
2	17.4 \pm 1.4	7 (33.3%)	3 (15.0%)	6.4 (3.1 a 9.9)
3	32.0 \pm 1.5	4 (19.0%)	6 (30.0%)	3.3 (-2.1 a 9.1)
4	60 \pm 3	0 (0.0%)	10 (50.0%)	2.6 (-2.6 a 8.1)

C_{max} : concentración máxima de SNF472 al final de la infusión definida por cuartiles (promedio \pm SE); IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

3.2.6. Análisis de la relación PD - Progresión Índice CAC

Para describir la relación entre el porcentaje de cambio del índice CAC en volumen, desde el inicio hasta la semana 52, y el efecto de PD, expresado como porcentaje de inhibición de la cristalización de fosfato de calcio en plasma, se utilizó el modelo lineal descrito según la Ec. III.15, al ser el mejor modelo de ajuste ($p = 0.003$ y $r = 0.401$).

La relación entre los resultados del efecto PD y cambio porcentual desde el inicio hasta la semana 52 en el índice CAC en volumen fue lineal e inversa (Figura IV.40), es decir, los pacientes con mayor inhibición de la cristalización presentaron menor progresión de CAC. El cambio porcentual estimado desde el inicio hasta la semana 52 en el volumen de CAC proporcionó una intersección en el eje X promedio (\pm SE) del $22 \pm 5\%$ (IC 95%: 11 a 33%) y una pendiente estimada de -0.238 (IC 95%: -0.389 a 0.086). Como anteriormente, debido a que en el análisis estadístico del efecto PD no se observaron diferencias significativas entre las semanas de visita para un mismo grupo de tratamiento, se agruparon los datos individuales de las diferentes semanas (1, 10, 22 y 52) como un único valor promedio para realizar el ajuste del modelo lineal con los datos experimentales.

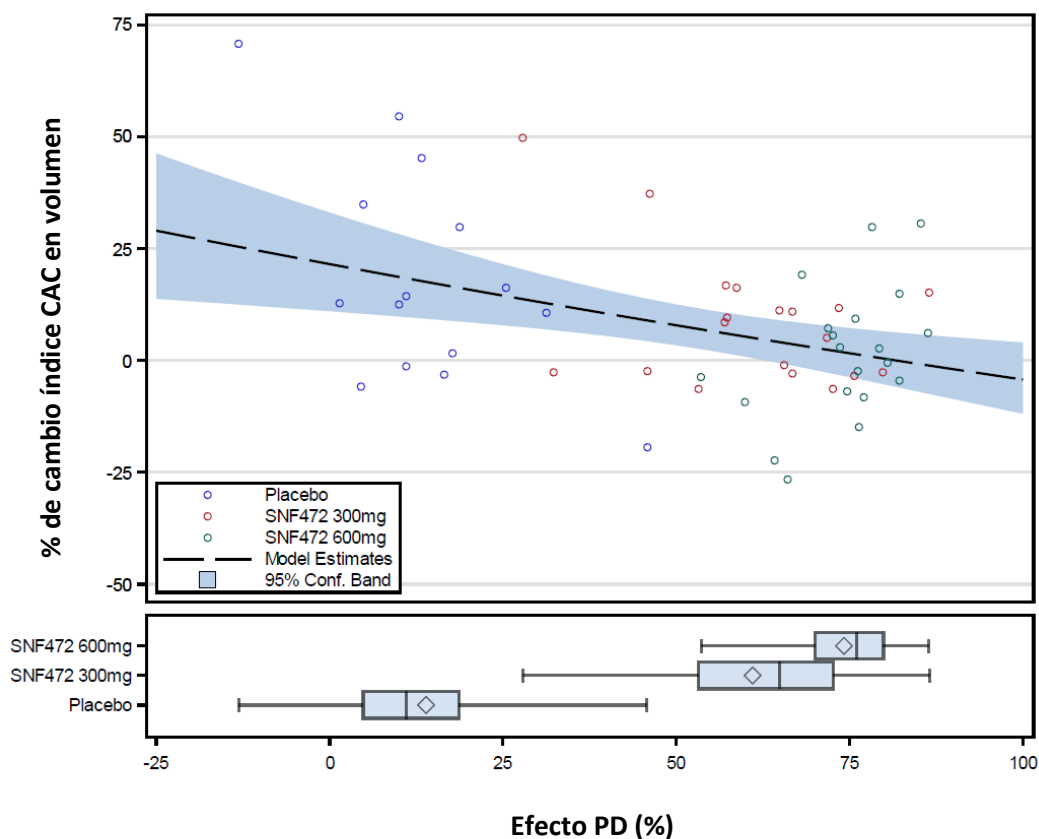


Figura IV.40. Relación obtenida del análisis del porcentaje de cambio del índice CAC en volumen frente a la inhibición de la cristalización o efecto PD (%) del estudio CaLIPSO aplicando un modelo lineal. Se representan los valores individuales de % de cambio del índice CAC en volumen y del efecto PD (%) por grupo de tratamiento: Placebo (n = 15), SNF472 300 mg (n = 19) y SNF472 600 mg (n = 20). En la parte inferior de la relación lineal, se representan los diagramas de cajas y bigotes de los valores del Efecto PD (%) obtenidos por grupo de tratamiento.

4. Referencias

- 1 Sauer, G. R. & Wuthier, R. E. Fourier transform infrared characterization of mineral phases formed during induction of mineralization by collagenase-released matrix vesicles in vitro. *J. Biol. Chem.* **263**, 13718-13724 (1988).
- 2 Tur, F. *et al.* Validation of an LC-MS bioanalytical method for quantification of phytate levels in rat, dog and human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **928**, 146-154, doi:10.1016/j.jchromb.2013.03.023 (2013).
- 3 Brandenburg, V. M. *et al.* Improvement in wound healing, pain, and quality of life after 12 weeks of SNF472 treatment: a phase 2 open-label study of patients with calciphylaxis. *Journal of nephrology* **32**, 811-821, doi:10.1007/s40620-019-00631-0 (2019).
- 4 Perello, J. *et al.* First-time-in-human randomized clinical trial in healthy volunteers and haemodialysis patients with SNF472, a novel inhibitor of vascular calcification. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **84**, 2867-2876, doi:10.1111/bcp.13752 (2018).
- 5 Salcedo, C. *et al.* A phase 1b randomized, placebo-controlled clinical trial with SNF472 in haemodialysis patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **85**, 796-806, doi:10.1111/bcp.13863 (2019).

V. DISCUSIÓN

La CCV es un proceso activo y regulado a nivel sistémico, celular y molecular¹. Adicionalmente, la CCV involucra tanto alteraciones en el metabolismo mineral de los iones calcio y fosfato como otros procesos en los cuales se reducen los niveles fisiológicos de algunos inhibidores de la calcificación^{2,3} (fetuina A, pirofosfato, MGP) y aumentan varios de los factores promotores de ésta. Los procesos fisiopatológicos de CCV se han comparado con los que ocurren en la biomineralización de los huesos. En los pacientes en tratamiento de diálisis, las CMLV tienen un papel fundamental en este proceso. Este desajuste entre los promotores e inhibidores de la calcificación conduce a una rediferenciación de las CMLV a un fenotipo similar a osteoblastos y, juntamente con el exceso de iones calcio y fosfato, se produce la calcificación de la matriz extracelular formando depósitos de HAP en la túnica media de las arterias (esclerosis de Mönckeberg)⁴. La calcificación avanzada de la media se ha relacionado con un mayor riesgo de arritmias, insuficiencia cardíaca, muerte súbita y amputación de miembros inferiores debido a insuficiencia vascular⁵⁻⁷. En pacientes con ERT en tratamiento de diálisis, la CCV es una complicación progresiva y un predictor de los eventos cardiovasculares y mortalidad^{8,9}. La muerte súbita es el factor principal que contribuye a esta mortalidad, representando al menos una cuarta parte de las causas de muerte en los pacientes en HD¹⁰. La CUA se caracteriza por la presencia de ulceración necrótica de la piel debida a la calcificación de la media en arteriolas, capilares de la dermis y del tejido adiposo subcutáneo, y posterior isquemia cutánea por trombosis¹¹. Esta enfermedad es especialmente prevalente en pacientes con ERT en diálisis^{12,13} y conlleva una alta morbilidad y mortalidad, con una supervivencia estimada del 50% a los seis meses de su diagnóstico¹³. En general, en pacientes con ERT, la CCV contribuye al desarrollo y la progresión de las diferentes enfermedades cardiovasculares como son la CUA, la PAD o la enfermedad de las arterias coronarias, siendo el nexo común en todas ellas la formación de HAP a nivel cardiovascular. Dada la complejidad de los procesos que regulan la CCV, los enfoques terapéuticos orientados directamente a prevenir la formación de la calcificación o a evitar su progresión pueden suponer un beneficio para las enfermedades relacionadas con ésta. Hasta la fecha no se han aprobado terapias para el tratamiento o la prevención de la CCV, ni existe ningún fármaco autorizado para el tratamiento de la CUA, la PAD o la ECV en pacientes con ERT en diálisis. Las estatinas han demostrado una elevada eficacia en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares en diversos segmentos de población. Sin embargo, hasta tres estatinas se han estudiado en grandes estudios de eventos cardiovasculares en pacientes de diálisis, y no consiguieron demostrar un beneficio clínico. El motivo principal es que los factores de riesgo cardiovascular tradicional no explican completamente por qué la prevalencia y la severidad de las enfermedades cardiovasculares es mayor en pacientes con ERT en diálisis que en la población general. En estos pacientes, la formación y progresión de la CCV representa uno de los principales factores de riesgo que deben ser abordados. En consecuencia, es necesario el desarrollo de nuevos biomarcadores para evaluar la potencial actividad de nuevas intervenciones terapéuticas en ensayos clínicos.

El SNF472 es una formulación intravenosa de InSP_6 que se encuentra en etapas avanzadas de desarrollo clínico para el tratamiento de dos enfermedades relacionadas con la CCV en pacientes con ERT en HD. Estas enfermedades son la PAD y la CUA. El mecanismo de acción del SNF472 es la inhibición de la formación y la progresión de los cristales de HAP, el componente principal y común de los procesos de CCV.

Se ha demostrado en estudios clínicos de fase 1 aleatorizados, con doble ciego y controlados por placebo que la administración intravenosa de SNF472 es segura y bien tolerada^{14,15}. Adicionalmente, en un estudio clínico de fase 2 en pacientes de HD (aleatorizado, doble ciego y controlado por placebo) se demostró que el tratamiento con SNF472 durante 52 semanas atenúa significativamente la progresión del índice de CAC en comparación con el grupo placebo¹⁶. Finalmente, en un ensayo de fase 2 abierto se observó que en pacientes de HD con CUA tratados con SNF472 durante 12 semanas se produce una mejora en la cicatrización de úlceras necróticas, el dolor y la calidad de la vida¹⁷. Estos resultados apoyan la investigación del SNF472 en futuros estudios clínicos para el tratamiento de la CUA y de otras enfermedades relacionadas con la CCV, como la PAD. En la actualidad se está llevando a cabo un estudio clínico de fase 3 aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo para evaluar la eficacia de SNF472 en pacientes con CUA en HD.

En este contexto, el objetivo general de esta tesis fue desarrollar y validar una técnica espectrofotométrica *in vitro/ex vivo* para evaluar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en muestras de plasma y establecer una relación entre la inhibición de la CCV *in vivo* y la inhibición de la cristalización *ex vivo* a nivel preclínico y clínico usando el SNF472 como inhibidor. Los resultados presentados se han organizado en tres apartados diferentes y confirman que se han conseguido los objetivos planteados al inicio de este trabajo de tesis.

En el primer apartado, mayoritariamente *in vitro*, se ha presentado el desarrollo y validación de una técnica espectrofotométrica *in vitro/ex vivo* para evaluar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en muestras de plasma humano, así como su verificación para utilizarlo en plasma de rata. También se ha evaluado la respuesta de la técnica con diferentes inhibidores de la cristalización y se ha validado para el inhibidor de la calcificación SNF472.

En el segundo apartado se han realizado estudios farmacocinéticos en modelos animales para caracterizar la PK del SNF472 trabajando con diferentes tiempos de infusión intravenosa, así como estudios farmacodinámicos de eficacia para la prevención y tratamiento de la progresión de la CCV mediante tratamiento con SNF472.

Finalmente, el último apartado recoge los datos obtenidos del análisis farmacocinético, farmacodinámico y de eficacia clínica de dos ensayos de fase 2. En el primero se administró SNF472 a pacientes en HD para tratar la calcifilaxis, mientras que en el segundo se evaluó el efecto del tratamiento sobre la progresión de la CAC.

1. Ensayo de farmacodinamia *in vitro/ex vivo* para determinar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en plasma

Los primeros experimentos de este apartado describen la inhibición de la formación de cristales de HAP en condiciones fisiológicas de calcio (2.5 mM) y suprafisiológicas de fosfato (5.5 mM) tras la incubación en presencia de concentraciones crecientes de SNF472 en medio NaCl a pH 7.4. Este primer estudio de cristalización demostró que el SNF472 inhibe la formación de cristales de HAP de manera dependiente a la concentración, observándose un incremento del periodo de inducción de formación de los cristales a medida que se aumenta la concentración de SNF472. La concentración de 7.6 μM aumentó el periodo de inducción 2.6 veces en comparación con el tiempo de inducción sin adición de inhibidor, mientras que las concentraciones de SNF472 superiores a 15 μM inhibieron totalmente la formación de cristales de HAP durante las 4 h de duración del experimento. De manera similar, en un estudio publicado recientemente para examinar el papel de SNF472 en la inhibición de la cristalización de HAP en fluido biológico simulado, con concentraciones de calcio variables (1.0 - 6.4 mM) y constantes de fosfato (1.0 mM), se observó que la misma concentración de 7.6 μM de SNF472 incrementaba al doble la concentración de calcio iónico requerida para inducir cristalización¹⁸. En este mismo conjunto de experimentos publicados por Perelló et al. se observó que el SNF472 inhibía la cristalización de HAP de manera dependiente de la concentración, observándose además para una misma concentración de calcio una reducción significativa de la E_{max} en las curvas de cristalización obtenidas a medida que se aumentó la concentración de SNF472. Estos resultados sugieren que la unión del SNF472 sobre la HAP es muy rápida y fuerte, y su disociación muy lenta, mediante una interacción entre la HAP y el SNF472 que es estrictamente fisicoquímica¹⁸. Este conjunto de resultados denota que, en estas condiciones, las concentraciones de SNF472 superiores a 7 μM serían suficientes para frenar de manera eficaz del crecimiento del cristal de HAP.

En los experimentos posteriores se reemplazó la matriz acuosa por matriz biológica de plasma humano y se obtuvo que las concentraciones de calcio y fosfato de 12.5 y 1.5 mM, respectivamente, permiten obtener una cristalización significativa en 30 minutos. Si bien es cierto que esta proporción se aleja de la relación de calcio y fosfato de los fosfatos cálcicos biológicos, como la HAP (relación Ca/P de 1.7), nos permitió obtener una cristalización significativa para desarrollar el ensayo de PD *in vitro/ex vivo* en un tiempo de ensayo corto. Por tanto, éstas son las concentraciones que se fijaron para desarrollar el ensayo de PD como medida del potencial de cristalización de plasma humano mediante espectrofotometría. Primeramente, comprobamos que el método de PD es a la vez repetible y reproducible (CV menor al 15%). Posteriormente, realizamos ensayos donde confirmamos la efectividad del método para distinguir entre la actividad de diferentes inhibidores de la cristalización (SNF472, pirofosfato, ibandronato, pamidronato, tiosulfato de sodio, citrato o fetuína-A). Existen numerosas publicaciones de inhibidores de la cristalización, tales como bifosfonatos^{19,20}, pirofosfato²¹⁻²⁴ y el myo-inositol hexafosfato²⁵⁻²⁷, que los postulan como posibles tratamientos para prevenir la CCV. El mecanismo de acción de estos compuestos consiste en prevenir la formación y progresión de cristales de HAP. Todos ellos poseen similitudes estructurales, son compuestos polifosforilados e impiden que la cristalización de HAP progrese o la previenen desde sus inicios por uniones fisicoquímicas a los iones de calcio del cristal. El método de PD

nos permitió discriminar entre la potencia y eficacia de los inhibidores anteriormente mencionados. Entre ellos, el SNF472 mostró la mayor potencia en la inhibición de la formación de cristales de fosfato de calcio en muestras de plasma (IC_{50} de 2.1 μ M). Los bifosfonatos (ibandronato, pamidronato) y el pirofosfato exhibieron valores de IC_{50} que estaban en el rango micromolar (5.1, 6.4 y 26 μ M, respectivamente), resultando menos potentes que el SNF472. Estos resultados son consistentes con estudios previos en los que los bifosfonatos (análogos no hidrolizables de pirofosfato) mostraron una mayor potencia en la inhibición de la cristalización de fosfato de calcio que el pirofosfato, tanto en estudios *in vivo*²⁰ como *in vitro*²⁸. En términos de potencia de la inhibición de la cristalización de fosfato de calcio en plasma, el SNF472 fue alrededor de 3 y 12 veces más potente que los bifosfonatos y el pirofosfato, respectivamente. La diferente potencia de estos compuestos polifosforilados en la inhibición de la cristalización puede estar relacionada con el número de grupos fosfato o fosfonato presentes en la estructura química, así como con su capacidad de interactuar con la superficie del cristal de HAP; mientras que el SNF472 presenta seis fosfatos en su estructura, los demás solo presentan dos. De hecho, resultados de estudios teóricos sobre la adsorción de un conjunto de inhibidores de la cristalización sobre la superficie de HAP revelaron unos resultados similares. Las energías de adsorción aumentaron en la secuencia: pirofosfato < ibandronato y pamidronato < etidronato < citrato << myo-inositol hexafosfato (SNF472), y esto se correlacionó con un mayor número de grupos funcionales que podían establecer interacciones electrostáticas con la superficie de la HAP, así como una mayor carga negativa del inhibidor^{29,30}. La potencia en la inhibición del crecimiento cristalino de HAP se relaciona directamente con la energía de adsorción, por lo que el myo-inositol hexafosfato también fue el inhibidor más potente en este modelo teórico. Por otra parte, la fetuína-A, la glicoproteína sérica circulante a la que se le atribuye un papel como inhibidor de la calcificación sistémica³¹, mostró menor potencia (IC_{50} de 346 μ M) en la inhibición de la cristalización en el ensayo de PD que el grupo de compuestos polifosforilados. Las diferencias obtenidas entre los compuestos polifosforilados y la fetuína-A podrían explicarse porque los polifosforilados presentan mayor afinidad de unión en los primeros pasos de la formación del cristal, mientras que la fetuína-A interfiere en los pasos posteriores del proceso. La acción inhibitoria de esta última se consigue formando los complejos coloidales solubles de fosfato de calcio y fetuina-A (formación de CPP) que pueden transportar y eliminar los pequeños precipitados de fosfato de calcio del cuerpo^{32,33}. El citrato es un agente quelante de iones metálicos di y trivalentes. A diferencia de los otros compuestos analizados, su mecanismo de acción para inhibir la cristalización es a través de la unión al calcio iónico para formar complejos solubles. Este mecanismo implica una reducción del calcio libre para que pueda precipitar con otras sustancias como, por ejemplo, el fosfato o el oxalato. En el ensayo *in vitro* de PD se observó que se requieren mayores cantidades de este compuesto (IC_{50} de 18 mM, 8000 veces mayor que SNF472) para inhibir la formación de cristales de fosfato de calcio en las condiciones de sobresaturación de calcio (12.5 mM). Esta menor potencia en la inhibición de la cristalización del citrato se podría explicar por la elevada concentración de calcio utilizada para inducir la cristalización (casi 10 veces mayor a la de fosfato). En estas condiciones un compuesto que inhiba la cristalización mediante quelación del calcio libre será menos potente que un inhibidor que previene la formación de cristales de fosfato de calcio directamente. Es importante destacar que el ensayo de PD se realiza en plasma, obtenido con EDTA como anticoagulante. El EDTA es un agente quelante de calcio³⁴ que podría unir parte del calcio añadido en el ensayo. Este hecho

puede ser la razón por la que la concentración de calcio tuvo que incrementarse para inducir la cristalización en plasma humano en el ensayo de PD. Por otra parte, los resultados obtenidos en el ensayo de cristalización *in vitro* de PD para el citrato no están en concordancia con los resultados obtenidos en estudios teóricos de la deposición y adsorción sobre la superficie (001) de la HAP comentados anteriormente^{29,30}, ya que éstos mostraron que la energía de absorción relativa del citrato era superior tanto a la de los bifosfonatos como a la del pirofosfato. En este modelo teórico las energías de adsorción se correlacionan directamente con el número de grupos funcionales cargados negativamente capaces de interactuar con la superficie de la HAP, más que el tipo de interacción generada. Luego, el citrato, con tres grupos ácido carboxílico, muestra mejor energía de adsorción que los bifosfonatos y el pirofosfato, con solo dos fosfatos disponibles para interactuar. Respecto al tiosulfato, el compuesto menos potente en el ensayo de PD, también tiene la capacidad de unirse al calcio libre, pero no es un quelante de calcio fuerte. De acuerdo con estudios *in vitro* en matriz acuosa sobre la quelación del tiosulfato y del SNF472 en condiciones fisiológicas (concentración de calcio 2.5 mM), se observó que el SNF472 es más potente que el tiosulfato en cuanto a la afinidad al calcio libre circulante (IC_{50} de la curva de quelación de 539 y 54300 μM , respectivamente)¹⁸. Aun así, en nuestro ensayo *in vitro* el tiosulfato actuaría por mecanismos de quelación ya que se han requerido concentraciones cercanas a 50 mM para observar un efecto en la inhibición de la cristalización *in vitro* en plasma. No se puede descartar que este conocido represor de la CCV³⁵, en el rango milimolar, actúe a través de mecanismos diferentes a la quelación de calcio libre y a la inhibición de la cristalización de HAP, pudiendo estar relacionados con sus propiedades antioxidantes³⁶. En el estudio comentado, la quelación del 50% del calcio iónico para SNF472 ocurrió a concentraciones unas 50 veces mayores a las concentraciones que inhibían la formación de HAP en fluido biológico simulado¹⁸ y, a unas 250 veces mayores que la IC_{50} obtenida en el ensayo de PD desarrollado. Por tanto, se confirma que el SNF472 previene la formación y progresión de los cristales de HAP a través de interacciones fisicoquímica y no por quelación de calcio libre.

Estos resultados demuestran la utilidad del ensayo espectrofotométrico de PD como un nuevo método *in vitro* para predecir la actividad inhibidora de la cristalización de fosfato de calcio en plasma humano en tan solo 30 minutos. En 2012 Pasch et al.³⁷ desarrollaron dos métodos para evaluar la tendencia de la sangre a calcificar. El primero de los métodos, conocido como CPP-fetuina-A, consiste en la determinación de la cantidad de fetuina-A sedimentable, mientras que el segundo, prueba T_{50} , está basado en el tiempo de transformación (T_{50}) de las CPPs primarias a secundarias como medida de la tendencia del suero a calcificar. Por tanto, ambos métodos están basados en el análisis de las CPPs en matriz sérica. En cambio, en nuestro ensayo de PD validado en este trabajo, el tipo de partículas formadas son de fosfato de calcio, y la señal analítica que se sigue es la velocidad de cristalización en matriz plasmática. Adicionalmente, los métodos basados en las CCPs no son apropiados para evaluar el efecto de inhibidores de la cristalización aniónicos, como es el caso de los compuestos polifosforilados, ya que utilizan tampones catiónicos (HEPES). Estos tampones podrían interactuar con las cargas negativas de los inhibidores e impedir su acción normal. Sin embargo, el ensayo de PD *in vitro/ex vivo* desarrollado en este trabajo se ha optimizado para usarse en NaCl, considerando que la matriz plasmática (38% del volumen total) y el fosfato añadido (30% del volumen total) mantienen el pH a niveles cercanos a 7.4, lo que facilita la actividad de los inhibidores aniónicos. En cambio, una ventaja que ofrecen los métodos basados en las CCPs es que se ha observado su asociación

con algunas variables clínicas. Por ejemplo, la rigidez aórtica se relacionó con mayores cantidades de CPP-fetuína-A en suero de pacientes con ERC pre-diálisis³⁸, o el aumento de T₅₀ en suero de pacientes con trasplante renal se relacionó con diabetes, elevado fosfato sérico y albúmina baja³⁹. La Tabla V.1. presenta una comparativa entre el método desarrollado en este trabajo de tesis con los desarrollados previamente y que fueron revisados por Pasch⁴⁰. Otra gran diferencia entre la prueba T₅₀ y el ensayo PD son la temperatura y el tiempo de ensayo. Mientras que la prueba T₅₀ se debe realizar con una incubación de 37°C y durante unas 10 horas, el ensayo de PD se puede realizar a temperatura ambiente y en media hora. Por tanto, este último es un ensayo más accesible para poderse utilizar en cualquier laboratorio de investigación.

Una vez comprobado que el ensayo espectrofotométrico *in vitro/ex vivo* de PD permitía evaluar y discriminar entre la actividad de diferentes inhibidores de la cristalización, y dado que el SNF472 ya se estaba desarrollando como inhibidor para el tratamiento de la CCV y la CUA en pacientes en tratamiento de HD, se procedió a validar dicho ensayo para el SNF472 como inhibidor. El objetivo de esta validación fue utilizar el ensayo de PD como biomarcador en estudios preclínicos y clínicos con SNF472. En este apartado demostramos que la parte lineal de la curva dosis-respuesta (hasta 4 µM) prácticamente se correspondió con el rango de trabajo correcto (concentraciones de SNF472 > 1.5 µM y CV < 20%) obtenido según la curva de precisión a concentraciones bajas de inhibidor. En cambio, a concentraciones superiores a 4 µM, la eficacia en la inhibición de la cristalización ya estaba entorno al 60%, siendo el CV también menor al 20%. Las concentraciones teóricas para inhibir la cristalización *in vitro* de fosfato de calcio un 30, 50, 80 y 95% fueron de 1.17, 2.1, 5.6 y 16.7 µM, respectivamente. Adicionalmente, se comprobó que el ensayo de PD muestra una buena repetibilidad a concentraciones de SNF472 iguales o superiores al valor correspondiente de IC₃₀ (1.17 µM). Por el contrario, el análisis de la precisión intermedia (interdía) indicó que el ensayo de PD es reproducible a concentraciones de inhibidor cercanas o superiores al valor de IC₅₀ (2.1 µM). La alta variabilidad a bajas concentraciones de SNF472 puede explicarse por la fuerte respuesta que presenta el compuesto (pendiente de Hill > 1), lo que dificulta la evaluación de su actividad por debajo de IC₅₀. No esperamos que este hecho sea un problema para utilizarlo como ensayo de PD en estudios clínicos, ya que se prevé que los niveles terapéuticos en humanos sean superiores a 15 µM. Por tanto, a estas concentraciones, la actividad *ex vivo* del SNF472 en el ensayo de PD se encontraría en la zona superior de saturación de la curva dosis-respuesta, donde hemos demostrado que el ensayo es reproducible. Adicionalmente, si fuera necesario, las muestras de plasma que contienen SNF472 se podrían diluir hasta 100 veces con plasma blanco para que los valores de inhibición de cristalización cayeran dentro del intervalo de linealidad definido del ensayo de PD.

V. DISCUSIÓN

Tabla V.1. Comparación de los métodos existentes para determinar el potencial de cristalización en sangre.

	Test CPP-fetuína-A⁴⁰	Test T₅₀⁴⁰	Ensayo PD
Señal analítica	Cambios en la concentración de fetuína-A (mg/L)	T ₅₀ : tiempo de transformación de las CPPs primarias a CPPs secundarias (min)	% Inhibición de la cristalización (velocidad de cristalización)
Técnica analítica	a. ultracentrifugación (16000 x g) y b. cuantificación proteica	Nefelometría	Espectrofotometría (turbidimetría)
Partículas formadas	CPPs	CPPs	Fosfato de calcio (ausencia de CPPs)
Temperatura	4°C	37°C	Temperatura ambiente (20-25°C)
Matriz	Suero	Suero	Plasma
Tiempo	120 min (a.) 240 min (b.)	600 min	30 min
Agitación	No	No	Orbital a 750 r.p.m
Medio	--	140 mM NaCl 10 mM calcio 6 mM fosfato 50 mM tampón HEPES pH = 7.4	150 mM NaCl 12.5 mM calcio 1.5 mM fosfato pH = 7.4
Modificación del resultado	Humano (<i>in vivo</i>): Recambio plasmático Cinacalcet Paratiroidectomía STS intradialítico HD	Humano (<i>in vivo</i>): Magnesio oral (+) HD y hemodiafiltración (-) Humano (<i>in vitro</i>): Magnesio (+) Calcio (-) Fosfato (-) PPi (+) Fetuína-A (+) Albúmina (+) Lisozima (-) Bicarbonato (+) Animal (<i>in vivo</i>): Ratones deficientes en fetuína-A (-)	Humano (<i>in vivo</i>): SNF472 (+) Humano (<i>in vitro</i>): SNF472 (+) Ibandronato (+) Pamidronato (+) PPi (+) Fetuína-A (+) Citrato (+) STS (+) Animal (<i>in vivo</i>): SNF472 (+)

(+) efecto inhibidor y (-) efecto promotor; CPPs: partículas de calciproteína; HD: hemodiálisis; PPi: pirofosfato; STS: tiosulfato de sodio.

Respecto a la estabilidad de las muestras de plasma que contienen SNF472, se pueden mantener en condiciones de ultracongelación (-80°C) durante 48 semanas, y realizar como máximo un ciclo de congelación/descongelación antes de su análisis. Una vez descongeladas, las muestras se pueden mantener a temperatura ambiente hasta 2 horas, y hasta 4 horas en frigorífico antes de su análisis. Así pues, siguiendo estas indicaciones se ha comprobado que la actividad del SNF472 en la inhibición de la cristalización de fosfato de calcio en plasma es estable entre las concentraciones de 0.77 y 16.7 μM . Cabe destacar que para aplicar el ensayo de PD de manera rutinaria a plasma con otros compuestos polifosforilados se deberían validar de nuevo estos parámetros.

En otro estudio evaluamos el potencial de cristalización de fosfato de calcio en plasma procedente de voluntarios sanos y de pacientes en tratamiento de HD. No observamos diferencias significativas en la cristalización del plasma obtenido en estas dos poblaciones, como tampoco entre el plasma obtenido pre y post diálisis de los pacientes de HD. Esto es una limitación de nuestro ensayo de PD frente al ensayo desarrollado previamente por Pasch et al.^{37,40}, el cual permite discriminar entre la tendencia a calcificar (medida como T_{50}) de suero de pacientes en HD y voluntarios sanos. Este resultado indica que las condiciones de sobresaturación de calcio (12.5 mM) y fosfato (1.5 mM) presentes en el ensayo *in vitro/ex vivo* desarrollado en esta tesis provocan que el método no sea lo suficientemente sensible para diferenciar entre estas dos poblaciones. En estas condiciones de sobresaturación en las que se induce la cristalización de fosfato de calcio en 30 minutos, pequeños cambios en la concentración de calcio y fosfato endógeno no provocan cambios en el potencial de cristalización *in vitro*. Por tanto, la utilidad y novedad de nuestro ensayo se basa en su uso para evaluar los efectos de diferentes inhibidores de la cristalización y para comparar sus diferentes potencias. En este contexto, después de realizar la adición *in vitro* de SNF472 al plasma de voluntarios sanos y pacientes de HD pre y post tratamiento se observó que a las concentraciones más bajas de SNF472 (menores o iguales a 2.1 μM) la inhibición de la cristalización de fosfato de calcio fue significativamente menor en la población dializada que en el de voluntarios sanos. Así pues, se demostró que el plasma de los pacientes en HD es más resistente al efecto inhibitorio del SNF472, especialmente a bajas concentraciones.

Posteriormente, verificamos la aplicabilidad del método *in vitro/ex vivo* de PD en plasma de rata. La adición *in vitro* de SNF472 a muestras de plasma de rata redujo la cristalización de fosfato de calcio de manera dependiente a la concentración, obteniéndose una IC_{50} de 5.2 μM (2.5 veces superior a la obtenida en plasma humano), y hasta un 75% de inhibición a concentraciones de 10 μM . Además, SNF472 administrado por vía subcutánea a ratas inhibió la cristalización *ex vivo* de fosfato de calcio en plasma hasta un 70%. Se observó que dicha inhibición era dependiente tanto de la concentración plasmática como de la dosis de SNF472 administrada, obteniéndose una relación directamente proporcional entre estos dos últimos parámetros. Es importante destacar que las concentraciones plasmáticas de SNF472, obtenidas después de la administración subcutánea del compuesto, proporcionaron valores de inhibición de la cristalización máximas similares a las obtenidas en el ensayo *in vitro* previo, hecho que puso de manifiesto la potencial utilidad de nuestro ensayo de PD como biomarcador en estudios de eficacia. Para poder extrapolar las observaciones de inhibición de cristalización *in vitro/ex vivo*

a resultados de inhibición de CCV *in vivo*, se realizaron el conjunto de estudios en animales para buscar relaciones entre la inhibición de la CCV *in vivo* con los resultados de inhibición de la cristalización *ex vivo* (ensayo de PD).

En conclusión, en el primer apartado de este trabajo de tesis se ha presentado el desarrollo de un nuevo ensayo espectrofotométrico *in vitro/ex vivo* para determinar la actividad de diferentes inhibidores de la cristalización de fosfato de calcio en plasma en 30 minutos, lo que permite su aplicación de forma rutinaria en cualquier laboratorio de investigación. Entre los inhibidores ensayados, el SNF472 fue el más potente, mostrando una potencia 2 y 12 veces mayor que los bifosfonatos y el pirofosfato, respectivamente. Asimismo, hemos validado y verificado el método en muestras de plasma humano y de rata, respectivamente, que contengan SNF472.

La evaluación de la eficacia de posibles fármacos para tratar la CCV requiere ensayos clínicos de larga duración con gran número de pacientes⁴¹, lo que genera altos costes de investigación. En este contexto, el ensayo de PD podría emplearse como una herramienta de detección/evaluación rápida de la potencial eficacia de un fármaco experimental para tratar la CCV. La validación del ensayo de PD para el SNF472 en muestras de plasma humano brinda la posibilidad de utilizarlo como herramienta para evaluar el efecto PD en ensayo clínicos. De hecho, en un ensayo clínico de fase 1b con SNF472 (dosis de 1 a 20 mg/kg) en pacientes dializados, se utilizó el ensayo de PD para analizar el plasma obtenido antes y al final de la infusión para cada paciente, demostrándose que la infusión de SNF472 durante la HD inhibía la cristalización *ex vivo* de fosfato de calcio de manera dosis dependiente¹⁵. Los valores de ID₅₀ e ID₈₀ (dosis que inhiben el 50 y 80% de la cristalización de fosfato de calcio) fueron de 2.2 y 5.6 mg/kg, respectivamente. Estos resultados estuvieron en concordancia con los resultados de inhibición de la cristalización obtenidos en el desarrollo y validación del ensayo de PD y confirman la aplicabilidad del método desarrollado en esta tesis en ensayos clínicos con nuevos compuestos inhibidores de la calcificación.

2. Estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos de eficacia para la prevención y tratamiento de la progresión de la calcificación cardiovascular en modelos animales

2.1. Farmacocinética por infusión intravenosa de SNF472 en rata

Los estudios llevados a cabo en este trabajo de tesis han permitido caracterizar la PK por infusión intravenosa del SNF472 a la misma dosis a dos tiempos de infusión diferentes, 2.5 y 4 horas. Estos estudios de PK se plantearon por temas prácticos para cubrir diferentes tiempos de infusión con SNF472 en los ensayos clínicos de fases 2 y 3. El SNF472 se administra durante las sesiones de diálisis, por lo que los tiempos de infusión del fármaco experimental podrían ir desde 2.5 a 4 horas. En este trabajo, hemos demostrado que los perfiles farmacocinéticos en rata para ambos tiempos de infusión fueron semejantes y bioequivalentes.

En el estudio de PK para evaluar la exposición sistémica de SNF472 tras administrar 10 mg/kg por infusión intravenosa de 2.5 y 4 h, la concentración plasmática aumentó rápidamente al inicio de la infusión, de manera más acentuada para el tiempo de infusión corto, ya que se administró la misma dosis en un menor tiempo. Esta tendencia inicial cambió y se ralentizó debido a que la

velocidad de eliminación aumenta con la concentración plasmática. Las C_{max} se observaron inmediatamente después de acabar la infusión de 2.5 o 4 horas, y fueron similares (alrededor de 20 μM) en ambos regímenes de infusión. Igualmente, los valores de AUC_{0-t} para los tiempos de infusión de 2.5 y 4 horas fueron semejantes, con valores de 46 y 53 $\mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$, respectivamente. En este estudio, la C_{max} de SNF472 fue 2.5 veces mayor a la reportada por Ferrer et al.⁴², donde se caracterizó la PK de SNF472 en ratas sanas por infusión intravenosa de 4 horas, y a la misma dosis. Del mismo modo, se observaron diferencias entre los valores de AUC_{0-t} obtenidas en este trabajo frente a los previamente publicados (24 $\mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$). Una vez confirmado que el método analítico para cuantificar los niveles de SNF472 en plasma fue el mismo en ambos casos, estas desemejanzas encontradas entre la PK realizada en este trabajo y la previamente publicada, se podrían explicar por dos motivos: o bien por la realización de los experimentos en diferentes cepas de rata (Sprague-Dawley o Wistar⁴²) o por diferencias metodológicas en la canulación de los animales.

Los niveles plasmáticos de SNF472 no alcanzaron el estado estacionario durante su infusión continua en ninguno de los períodos infusión. Este resultado está en concordancia con el trabajo comentado previamente en el que la infusión de la misma dosis de SNF472 durante 4 horas no llevó al estado estacionario⁴². Al finalizar las infusiones (t_{max}) se observó que las concentraciones plasmáticas de SNF472 decrecieron rápidamente, como ya se había reportado en anteriores estudios farmacocinéticos en modelos murinos por diferentes rutas de administración, entre las que se incluyen la subcutánea y la intravenosa por bolo^{42,43}. De hecho, el tiempo de vida media fue de 14 y 22 min para las infusiones de 2.5 y 4 h, respectivamente. La disminución en las concentraciones plasmáticas parecía seguir una curva bifásica, que se pudo observar por la presencia de una primera pendiente de eliminación muy pronunciada y una segunda menos inclinada, aunque la falta de puntos experimentales al final de la curva de eliminación y el valor del límite inferior de cuantificación del método bioanalítico no permitieron llegar a una conclusión clara. Además, al aplicarse un modelo monocompartimental solo fue posible definir un tiempo de vida media. Aun así, se estimó que la vida media terminal en ambos regímenes de infusión sería menor de 75 minutos, conclusiones similares a las encontradas en estudios de PK previos⁴².

El aclaramiento plasmático y volumen de distribución para el SNF472 administrado en los dos regímenes de infusión de 2.5 y 4 horas fueron bajos, con unos valores de 0.33 L/h/kg y 0.28 L/h/kg para el aclaramiento, y de 0.11 L/kg y 0.15 L/kg para el volumen de distribución, respectivamente. El bajo volumen de distribución se explica por una unión a proteínas plasmáticas relativamente elevada (entorno al 70%, datos no publicados) y una elevada carga (polaridad) del SNF472 que le confieren una alta hidrofilia y tendencia a acumularse en el compartimento farmacocinético central. Estos resultados no se pudieron comparar con los resultados reportados por Ferrer et al., ya que en dicho estudio no se caracterizó la fase de eliminación de la PK. Aun así, cabe destacar que los resultados obtenidos para el volumen de distribución y el aclaramiento de otros estudios farmacocinéticos en bolo intravenoso también fueron bajos⁴² y de orden similar a los aquí reportados.

En conclusión, los resultados de los parámetros farmacocinéticos obtenidos para los dos regímenes de infusión probados fueron semejantes. Así, el perfil farmacocinético para ambos se considera bioequivalente, ya que los IC del 90% de los cocientes de AUC_{0-t} y C_{max} entre los dos

tiempos de infusión se encontraron dentro de los límites de $\pm 20\%$ (rango de 80 - 120%) fijados por las Administraciones Sanitarias⁴⁴.

2.2. Estudios farmacodinámicos con SNF472 para prevenir e inhibir la progresión la calcificación cardiovascular de inducida por Vitamina D₃ en modelos animales

El SNF472 está en desarrollo clínico para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la CCV, como la PAD y la CUA. La ruta de administración es por infusión intravenosa durante las sesiones de HD, por lo que es importante tener caracterizada la PK, pero también la PD y la eficacia de este compuesto a través de esta ruta de administración en modelos animales.

2.2.1. Desarrollo y optimización de un modelo animal para la calcificación cardiovascular inducida por Vitamina D₃

Desde hace décadas se sabe que la vitamina D administrada a altas dosis favorece el desarrollo de la CCV en humanos con ERT^{45,46}, en ratas y en otros modelos animales⁴⁷⁻⁵¹. También se ha reportado que la calcificación vascular inducida por vitamina D₃ en modelos animales afecta a la túnica media, por lo que sería un modelo patológico similar a la esclerosis de Mönckeberg observada en pacientes de ERT sometidos a tratamiento de HD^{23,51}.

En torno a 1960 ya se demostró que la administración de un exceso de vitamina D juntamente con colesterol y nicotina inducía calcificación vascular y trombosis en ratas. De hecho, en conejos, la combinación de hiperlipidemia moderada con hipervitaminosis y nicotina también produce aterosclerosis y calcificación vascular⁵². Más tarde, se demostró que la administración de vitamina D₂ (ergocalciferol) acelera la calcificación vascular en monos Rhesus con arteriosclerosis experimental generada por nicotina y colesterol alto en dieta⁵³.

Esta inducción de la calcificación vascular de la media por hipervitaminosis se ha reproducido sistemáticamente en diferentes estudios en animales administrando diferentes formas de vitamina D (colecalfiferol, calcitriol, análogos de vitamina D, etc.) como único inductor, o junto a modelos con otras patologías. Por ejemplo, en ratas con nefrectomía de 5/6 se administró calcitriol o paracalcitol para observar el efecto de ambas formas de vitamina D en la calcificación vascular de la media en aorta⁵⁴. Los resultados mostraron que el tratamiento con calcitriol incrementaba la calcificación arterial de los animales y aumentaba su presión de pulso, efectos que no se observaron con el paracalcitol. Adicionalmente, hay publicaciones que demostraron los efectos sinérgicos de la administración de colecalfiferol con Warfarina (un antagonista de la vitamina K) para inducir mayor calcificación vascular en rata⁵⁵.

En este trabajo de tesis, la optimización del modelo animal para inducir la CCV por administración subcutánea de vitamina D₃ nos permitió encontrar una dosis óptima (75000 UI/kg, 3 días consecutivos) para alcanzar un nivel de calcificación relevante y significativa a día 12, tanto en el tejido vascular como en el corazón, con una baja tasa de mortalidad. El modelo animal para inducir CCV por administración de vitamina D₃ o colecalfiferol (el precursor inactivo de la vitamina D) es un modelo extensamente conocido. Hay numerosas publicaciones en las que se utiliza como modelo patológico para inducir la CCV de la túnica media y evaluar la eficacia de diferentes compuestos o fármacos experimentales en la inhibición de ésta²³. Cabe destacar que, aunque sea un modelo bien establecido y optimizado, la bibliografía disponible es muy

diversa en cuanto a las rutas de administración, las dosis administradas y la duración de los estudios^{19,25,56,57}. Las dosis administradas pueden oscilar entre 75000 y 500000 UI/kg. Respecto a la ruta de administración, ésta puede ser oral, subcutánea o intramuscular, siendo las dos primeras las más habituales. En este contexto, Price et al.⁵⁵ demostraron que los niveles de calcificación arterial obtenidos al cuarto día de estudio después de 3 administraciones consecutivas de vitamina D por vía oral (sonda gástrica) o por vía subcutánea fueron similares. Por tanto, la vitamina D se absorbe de manera similar a través del intestino y por inyección subcutánea. Respecto a la duración de los estudios, éstos oscilan entre 4 y 14 días, siendo mayores las dosis requeridas para inducir calcificación cuanto más cortos sean los estudios. En nuestro caso, debido a un cambio en el proveedor de fabricación de la vitamina D₃ utilizada en estudios previos de eficacia con SNF472 para prevenir la CCV, se hizo necesario optimizar de nuevo el modelo animal con la nueva vitamina D disponible. Los resultados de dicha optimización (dosis 25000 a 100000 UI/kg de vitamina D₃) concluyeron que la administración subcutánea de vitamina D₃ durante tres días consecutivos indujo calcificación en aorta y corazón de manera dependiente a la dosis administrada. Las dos dosis más bajas (25000 y 50000 UI/kg) no presentaron mortalidad, pero tampoco indujeron calcificación significativa en corazón durante los 12 días de estudio. En cambio, la administración de la dosis más alta de vitamina D₃ indujo la mayor calcificación tisular después de 12 días, pero con una tasa de mortalidad elevada 37.5%. Finalmente, la mortalidad observada con la dosis de 75000 UI/kg fue menor, solo del 12.5%, y se obtuvo una calcificación en aorta (22 mg Ca/g) y corazón (1.3 mg Ca/g) similar a las obtenidas en estudios previos en los que se utilizaron dosis mayores de vitamina D₃^{42,58}. Por tanto, el modelo de rata desarrollado y optimizado en este trabajo de tesis fue de 3 administraciones subcutáneas consecutivas de 75000 UI/kg de vitamina D₃ y la duración fue de 12 días.

2.2.2. Estudios de eficacia con SNF472 para estudiar la prevención y la inhibición de la progresión de la calcificación cardiovascular inducida por Vitamina D₃ en rata

Hay varias publicaciones con modelos animales que confirman el efecto del myo-inositol hexafosfato en la inhibición de la CCV, ya sea relacionada con la edad (administración oral del compuesto)⁵⁹, o en modelos patológicos de calcificación por sobredosis de vitamina D (con administración tópica²⁵ o subcutánea^{26,27}). En este trabajo examinamos los efectos farmacodinámicos del SNF472 para prevenir y para tratar la progresión de la CCV inducida por vitamina D mediante la administración del fármaco experimental por vía subcutánea y por infusión intravenosa, y establecimos las relaciones entre dosis de tratamiento, niveles circulantes de SNF472, efecto *ex vivo* en la inhibición de la cristalización de fosfato cálcico en plasma e inhibición de la calcificación tisular *in vivo* en el modelo de calcificación en rata inducida por vitamina D.

En todos los estudios en animales se obtuvieron muestras de sangre para poder determinar los niveles circulantes de SNF472 cerca de la C_{max}. Los niveles de SNF472 obtenidos al final de la infusión intravenosa de una dosis de 10 mg/kg fueron similares tanto en el estudio de prevención como en el de tratamiento de la progresión de la calcificación, con valores en torno a 20 µM. Adicionalmente, en el estudio de prevención de la calcificación donde el SNF472 se administró mediante infusión intravenosa, se observó que los niveles fueron proporcionales a las dosis administradas, así como se había observado en estudios farmacocinéticos previos con

SNF472 por diferentes rutas de administración⁴². Sin embargo, en este estudio los niveles de SNF472 para la dosis de 3 mg/kg fueron menores a 1.5 a μM , ya que por razones técnicas en el proceso analítico por HPLC-MS/MS del plasma no se pudo establecer el LLOQ del método validado por Tur et al. (0.75 μM)⁶⁰. Finalmente, los niveles de SNF472 entorno a t_{max} observados el último día del estudio de prevención tras su administración subcutánea fueron unas 3-6 veces menores a los reportados en un estudio previo de PK con SNF472 para las mismas dosis y ruta de administración⁴². En nuestro estudio, los niveles de SNF472 no cuantificables (<LLOQ) en sangre para el grupo de 10 mg/kg se pueden explicar por el retraso en el proceso de extracción de sangre en algunos animales, que resultó en un promedio menor al LLOQ.

Respecto a la eficacia en la inhibición de la calcificación en los estudios de prevención, donde el SNF472 se administró el mismo día que el inductor de la calcificación, se observó que el tratamiento con SNF472 genera un perfil de dosis-respuesta en la inhibición de la CCV tanto por vía subcutánea (dosis de 3 a 100 mg/kg) como por infusión intravenosa (dosis de 3 a 30 mg/kg). Tras la administración subcutánea de SNF472 se obtuvo una inhibición de la calcificación tisular en aorta y corazón con valores de ID_{50} de 15 y 17 mg/kg. Tras la infusión intravenosa de SNF472 los valores de ID_{50} en corazón fueron de 2.7 mg/kg. En cambio, la inhibición en aorta a la dosis más baja ya fue superior al 60%, por lo que el cálculo de la ID_{50} en este tejido fue menor de lo esperado y se debe tomar como aproximado (≈ 1.6 mg/kg). Considerando los niveles circulantes entorno a t_{max} para inhibir la calcificación tisular, fueron similares para las dos rutas de administración. Las IC_{50} tras la administración subcutánea de SNF472 fueron de 5.6 y 3.8 μM , para aorta y corazón, respectivamente, valores muy similares a la IC_{50} obtenida para la inhibición en corazón 4.7 μM tras 4h de infusión intravenosa de SNF472 durante 12 días. Para la aorta, no se obtuvo un buen ajuste concentración-respuesta y no se pudo calcular la IC_{50} ya que la dosis más baja (3 mg/kg), con niveles circulantes de SNF472 menores a 1.5 μM , provocó una elevada inhibición (65%) de la calcificación.

Los resultados obtenidos de calcificación tisular en este conjunto de estudios confirman que el SNF472 previene el desarrollo de la calcificación de la arteria aorta y del corazón inducida por sobredosis de vitamina D en rata. Además, teniendo en cuenta que la biodisponibilidad del SNF472 por vía subcutánea está entorno al 20% (datos no publicados), las ID_{50} obtenidas en ambos estudios son coherentes entre sí y con los datos de eficacia del SNF472 en rata previamente publicados⁴².

En el primer estudio de prevención con administración subcutánea de SNF472 (dosis de 3 a 100 mg/kg) se obtuvo un perfil dosis-respuesta en la inhibición de la calcificación tisular en aorta y corazón con valores de ID_{50} de 15 y 17 mg/kg, respectivamente. Considerando los valores circulantes de SNF472 entorno a t_{max} , las IC_{50} fueron de 5.6 y 3.8 μM , respectivamente.

En el segundo estudio de prevención, en el que el SNF472 se administró por infusión intravenosa durante 4 horas (dosis 3, 10 y 30 mg/kg), se obtuvo un perfil de dosis-respuesta para el corazón con una ID_{50} de 2.7 mg/kg. En cambio, los valores de inhibición obtenidos en aorta a la dosis más baja ya fueron superiores al 60%, por lo que el cálculo de la ID_{50} en este tejido fue menor de lo esperado y se debe tomar como aproximado (≈ 1.6 mg/kg). Considerando los valores circulantes de SNF472 entorno a t_{max} , la IC_{50} en corazón fue de 4.7 μM , valor muy similar al obtenido en el primer estudio de prevención.

Estudios en humanos han relacionado el grado de calcificación y su progresión con una baja supervivencia y con un mayor riesgo de eventos cardiovasculares^{8,61}. Las terapias enfocadas al tratamiento de la calcificación deberían tanto prevenir su formación como reducir su progresión. En este sentido, se ha demostrado que el SNF472 administrado diariamente por vía subcutánea a dosis mayores a 10 mg/kg puede inhibir totalmente una progresión moderada de la calcificación en corazón inducida por vitamina D en rata⁴². Adicionalmente, en este trabajo hemos observado que el SNF472 administrado diariamente por infusión intravenosa a dosis mayores o iguales a 10 mg/kg previene el desarrollo de la CCV entorno al 80%. Conforme a los resultados previamente obtenidos en los estudios de prevención, nos planteamos estudiar el efecto de esta única dosis de SNF472 administrada por infusión intravenosa de 4h para el tratamiento de la progresión de la CCV en el mismo modelo de rata desarrollado y optimizado, empezando el tratamiento a partir del día 5 de inducción de la calcificación. Los resultados concluyeron que el SNF472, administrado por infusión intravenosa de 4 h y dosis de 10 mg/kg, inhibe la progresión de la calcificación entorno a un 50%, tanto en aorta como en corazón, aunque esta inhibición solo fue significativa para la aorta. En este sentido, cabe destacar que la inhibición en la calcificación cardíaca fue inferior a la previamente reportada por Ferrer et al.⁴² Esta diferencia de resultados se puede explicar por la progresión de la calcificación obtenida en ambos estudios: mientras que en nuestro caso la calcificación en corazón para el grupo control (sin tratamiento) progresó un 700%, la obtenida por Ferrer et al. fue solo del 100%. Por tanto, se podría considerar que la dosis de 10 mg/kg administrada en nuestro estudio fue subóptima para observar una inhibición completa de la progresión de la calcificación. A la vista de estos resultados, una dosis de 30 mg/kg podría haber sido más adecuada para obtener este mayor grado de inhibición de la progresión. Aun así, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el tratamiento con SNF472 es capaz de reducir la progresión de la calcificación una vez ésta se ha iniciado, confirmando la potencial utilidad del compuesto en patologías humanas, en que el tratamiento empieza cuando ya existe la calcificación.

El modelo patológico de calcificación por vitamina D utilizado no induce enfermedad renal, por lo que no cabría esperar ningún cambio relevante en los parámetros urinarios analizados. Sin embargo, en los grupos a los que se administró vitamina D se observó un descenso significativo en los niveles de creatinina en orina. Además, la proteinuria fue baja para el grupo control, y se observó también una tendencia a la bajada para los grupos tratados con SNF472, aunque sin poder extraer ninguna conclusión relevante por la elevada variabilidad según la dosis administrada. Estos resultados podrían explicarse por la tendencia a una mayor diuresis observada en los grupos a los que se indujo la CCV con vitamina D respecto al grupo sham.

Las determinaciones bioquímicas en suero de los estudios de eficacia demostraron niveles superiores de calcio total en suero en los grupos a los que se indujo la calcificación por vitamina D. Este incremento fue de un 20 – 30% respecto a los valores obtenidos en los grupos no tratados (sham). Según publicaciones anteriores con modelos patológicos de calcificación inducida por hipervitaminosis, las dosis de vitamina D que provocan calcificación tisular inducen también un incremento en los niveles de calcio séricos cercanos al 30-40%, dependiendo de la dosis^{27,55,62}. De hecho, estas publicaciones establecen un estrecho paralelismo entre la hipercalcemia y la calcificación arterial sugiriendo que la calcificación en la rata tratada con vitamina D puede

darse, entre otros factores, como consecuencia de la sobresaturación y la posterior deposición de los cristales de HAP.

¹⁴El mecanismo de acción de SNF472 para inhibir la calcificación es diferente a los mecanismos indirectos descritos para otros compuestos como los calcimiméticos, los quelantes de fosfato o los quelantes de calcio ⁶³. El SNF472, al igual que otros compuestos polifosforilados, inhibe la calcificación tisular a través de un mecanismo fisicoquímico que implica la interacción por adsorción de éste sobre los cristales de HAP en formación y/o crecimiento¹⁸. Además, los niveles terapéuticos de SNF472 necesarios para inhibir la cristalización de HAP están en relación sub-estequiométrica con el calcio libre, por lo que a niveles de concentración terapéuticos no es probable una disminución en los niveles de calcio séricos. De hecho, la mayoría de las dosis de SNF472 administradas en los experimentos de eficacia *in vivo* no afectaron a los niveles de calcio obtenidos tras la inducción de la hipercalcemia por vitamina D. Solo se observó una reducción significativa de los niveles de calcio con el tratamiento con 30 mg/kg por infusión intravenosa. A esta dosis los niveles de SNF472 en sangre estuvieron alrededor de 100 µM, concentración a la cual se espera un porcentaje de quelación entorno al 20%, según datos previamente publicados del estudio *in vitro* de afinidad de SNF472 al calcio iónico circulante¹⁸. Adicionalmente, cabe destacar que no se observó hipocalcemia como efecto adverso en el conjunto de estudios clínicos de fase 1 realizados con SNF472 en pacientes de HD, en los que las C_{max} promedio para las dosis más altas administradas no superaron los niveles circulantes de 100 µM^{14,15}. Luego, los datos experimentales apoyan la tesis de que las propiedades inhibitorias de la calcificación de SNF472 *in vivo*, observadas en el rango micromolar bajo, no están relacionadas con la quelación del calcio circulante, que se inicia a concentraciones superiores a las terapéuticas. Por este motivo, en estudios clínicos donde se evaluó el efecto del SNF472 para tratar la CCV¹⁶ o la CUA¹⁷ no se observaron cambios por quelación del calcio iónico circulante.

En resumen, hemos desarrollado y optimizado un modelo de CCV inducida por sobredosis de vitamina D₃ que nos ha permitido estudiar y demostrar que el tratamiento con SNF472, tanto por vía subcutánea como por infusión intravenosa, inhibe esta calcificación de manera dosis dependiente. Asimismo, hemos demostrado que el tratamiento por infusión intravenosa de SNF472 también puede atenuar la progresión de la calcificación tisular inducida por sobredosis de vitamina D. Por tanto, el siguiente objetivo fue comprobar la utilidad del ensayo PD, desarrollado y validado en las primeras fases de este trabajo, para ser utilizado como biomarcador en estudios preclínicos. Por ello buscamos relaciones entre el efecto *ex vivo* en la inhibición de la cristalización de fosfato cálcico en plasma (ensayo PD) y la inhibición de la calcificación tisular *in vivo*.

El ensayo de PD se ha utilizado para estudiar los efectos del SNF472 en la inhibición de la cristalización *ex vivo* de fosfato de calcio tanto en animales sanos como en pacientes de HD (estudios clínicos de fase 1 comentados anteriormente)^{14,15}. Adicionalmente, para conseguir uno de los objetivos de la tesis se buscaron correlaciones entre la inhibición de la calcificación tisular *in vivo* y la cristalización *ex vivo* en plasma. En este sentido, aplicamos el ensayo de PD a las muestras de plasma obtenidas al final del estudio de prevención de la CCV inducida por vitamina D en rata con tratamiento de SNF472 por infusión intravenosa. Obtuvimos una relación dosis dependiente entre los efectos *ex vivo* de SNF472 en plasma y las dosis de SNF472 administradas, con una ID₅₀ de (5.4 mg/kg). Esta dosis estuvo en concordancia con la ID₅₀ obtenida en la

inhibición de la calcificación tisular de este mismo estudio. Además, los resultados de inhibición de la cristalización *ex vivo* de fosfato de calcio obtenidos a través del ensayo PD correlacionaron directa y significativamente con la inhibición de la calcificación *in vivo* en corazón. Finalmente, la IC₅₀ obtenida al expresar la relación existente entre los niveles de SNF472 a C_{max} y los resultados del ensayo *ex vivo* de PD en plasma, fue de 17 µM, unas tres veces superior a lo esperado según los resultados *ex vivo* previos en ratas sanas.

Por consiguiente, hemos aplicado el ensayo PD, previamente validado en plasma humano y verificado en plasma de rata, a muestras de plasma de rata a las que se indujo la CCV por sobredosis de vitamina D, y hemos demostrado que el SNF472 inhibe la cristalización de fosfato de calcio de manera dependiente de la dosis también en este modelo animal experimental. Además, se ha observado que el efecto *ex vivo* de SNF472 para inhibir la cristalización de fosfato de calcio correlaciona directa y significativamente con la inhibición de la calcificación tisular en rata.

En resumen, los resultados de los efectos del SNF472 para prevenir y para tratar la progresión de la CCV aquí presentados son prometedores, aunque los mecanismos para inducir la calcificación por hipervitaminosis no tienen por qué ser los mismos que ocurren bajo condiciones de uremia. Ésta podría ser una limitación de estos estudios; si bien, cabe destacar que existen evidencias de la actividad del SNF472 en la prevención de la CCV inducida por uremia en rata, con valores de inhibición de la calcificación tisular entre el 80 y 85%, tras 19 días de infusión intravenosa (50 mg/kg)⁴². Por tanto, estos estudios han ayudado a entender la farmacodinamia del compuesto por infusión intravenosa (ruta de administración clínica), tanto en la prevención como en la inhibición de la progresión de la CCV. Además, se logró alcanzar el objetivo destacado de este apartado de buscar correlaciones entre la inhibición de la calcificación tisular *in vivo* y la cristalización *ex vivo*. Se encontró una correlación directa y significativa entre la inhibición de la calcificación en corazón y la inhibición de la cristalización *ex vivo* del plasma, demostrando la validez de este nuevo método farmacodinámico para evaluar la actividad y la potencial eficacia de nuevos compuestos inhibidores de la calcificación en estudios preclínicos.

3. Ensayos clínicos con SNF472: análisis farmacocinético y farmacodinámico

3.1. Ensayo clínico de calcifilaxis

Este estudio clínico de fase 2 abierto en pacientes con CUA en HD se observaron mejoras en las úlceras epiteliales y el dolor isquémico en pacientes tratados durante 12 semanas con SNF472 (rangos de dosis de 5.6 mg/kg a 8.6 mg/kg). Estos resultados fueron reportados previamente por Brandenburg et al.¹⁷ y se resumen a continuación.

En el análisis primario, se reportaron 21 mejoras estadísticamente significativas desde el inicio hasta la semana 12 del tratamiento con SNF472 para las úlceras y el dolor. La puntuación total promedio para la evaluación de cicatrización de úlceras *Bates-Jensen* (BWAT), que incluía 13 ítems y podía variar de 13 a 65 (de mejor a peor, respectivamente), mejoró significativamente de 34 ± 10 al inicio del estudio a 26 ± 7 en la semana 12, para un cambio promedio de -8.1 ± 8.5

(IC del 95%: -12.7 a -3.4). La puntuación promedio para el dolor en una escala analógica visual de 0 a 100 (sin dolor o peor dolor, respectivamente) mejoró significativamente de 72 ± 29 mm al inicio del estudio a 48 ± 29 mm en la semana 12, para un cambio promedio de -24 ± 30 mm (IC 95%, - 43 a - 5). La puntuación promedio para el cuestionario de calidad de vida específico para úlceras (*wound quality of life*) en una escala de 5 puntos mejoró de 2.4 ± 0.9 al inicio del estudio a 1.5 ± 0.9 en la semana 12, para un cambio promedio desde el inicio a la semana 12 de -0.9 ± 0.9 (IC 95% - 1.49 a - 0.31; $p = 0.003$). La revisión de la imagen de las úlceras de los pacientes que completaron el tratamiento mostró una mejora en siete de los nueve pacientes que al inicio del estudio presentaban lesiones ulceradas.

Los investigadores no observaron ningún efecto adverso relacionado con el tratamiento de SNF472, con lo que el tratamiento fue bien tolerado durante las 12 semanas. Los efectos adversos más comunes fueron infecciones, que ocurren con frecuencia en pacientes en HD.

En relación con los análisis de PK realizados en el marco del ensayo clínico de fase 2 de CUA los valores de C_{max} promedio al final de la infusión intravenosa de SNF472 estuvieron alrededor de $30 \mu\text{M}$ (tomando los valores del análisis a semana 1 y semana 12). Además, no se observó acumulación del fármaco experimental a lo largo de las 12 semanas de tratamiento. Estos resultados están en concordancia con los previamente reportados en anteriores estudios de fase 1 con SNF472, tanto a dosis únicas como a repetidas^{14,15}.

Cuando aplicamos el ensayo *ex vivo* de PD a las muestras de plasma de estos pacientes, se observó que el SNF472 administrado en la sesión de HD inhibía la cristalización de fosfato de calcio alrededor del 70% tanto al inicio como al final del tratamiento con SNF472. El estudio no incluía pacientes tratados con placebo, por lo que el efecto PD, a las dosis administradas, se concentró en la zona de saturación de la curva dosis-respuesta del ensayo. Debido a que todas las observaciones del efecto PD estaban en la zona de saturación del ensayo no se pudo obtener una correlación entre el efecto *ex vivo* de PD y la eficacia clínica observada al final del estudio. Una posible explicación sería por el bajo número de pacientes y la ausencia tanto de placebo como de diferentes dosis de SNF472, especialmente por debajo de la zona de saturación del ensayo. Aun así, considerando el cambio individual del efecto PD con el de la variable C_{max} entre las semanas 1 y 12 analizadas, se obtuvo una correlación directa y significativa entre estas dos variables.

Finalmente, la relación entre la eficacia clínica (mejora en las úlceras epiteliales y del dolor isquémico) y la inhibición de la cristalización *ex vivo* (efecto PD) no se pudo establecer debido a ciertas limitaciones, como por ejemplo el reducido número de pacientes o que el estudio fuera de dosis única.

Las limitaciones del análisis llevado a cabo en este trabajo se pueden relacionar con las propias del estudio clínico: el pequeño número de pacientes incluidos, la ausencia de grupo placebo y que fuera un estudio abierto¹⁷. La CUA es una enfermedad rara, con elevada morbilidad y mortalidad con lo cual es difícil el reclutamiento de pacientes. El estudio se diseñó para evaluar principalmente los cambios en la mejora de las heridas con el tratamiento de SNF472. Los resultados obtenidos en este primer estudio permitieron diseñar e iniciar un segundo estudio, aleatorizado y controlado con placebo, en pacientes de CUA tratados con SNF472, actualmente

en proceso. Pese a las limitaciones comentadas, se pudo demostrar que el tratamiento con SNF472 en pacientes con CUA durante 12 semanas fue tolerado, con niveles de C_{max} alrededor de 30 μM y un efecto PD cercano a la zona de saturación del ensayo. Además, el tratamiento de 12 semanas supuso se asoció con una mejora en las úlceras epiteliales, el dolor isquémico y la calidad de vida de los pacientes respecto al inicio.

3.2. Estudio CaLIPSO (ensayo clínico de progresión de la calcificación cardiovascular)

El estudio CaLIPSO, un estudio de fase 2 doble ciego, aleatorizado y controlado por placebo, evaluó el efecto del tratamiento intravenoso con SNF472 en la progresión de la CCV durante 52 semanas en pacientes con ERT en tratamiento de HD. La variable clínica primaria estudiada fue la progresión en el índice de CAC en volumen entre el inicio y el final del estudio. Los resultados previamente publicados por Raggi et al.¹⁶ revelaron que el tratamiento intravenoso con SNF472 en las sesiones de HD atenuó significativamente la progresión del índice de CAC en volumen en comparación con el grupo placebo (11% para el grupo de dosis combinadas de SNF472 y 20% para el grupo placebo). Además, el tratamiento con SNF472 también disminuyó significativamente la progresión de la calcificación en la válvula aórtica respecto al grupo placebo (14% vs. 98%).

En este trabajo de tesis, se examinaron los resultados de PK y de PD de un subconjunto de pacientes (población por protocolo) del estudio CaLIPSO, a las semanas 1, 10, 22 y 52 del tratamiento. Adicionalmente, analizamos las relaciones entre la PK, la PD y la eficacia clínica principal entre el inicio y el final del estudio.

En el estudio CaLIPSO, el número de pacientes aleatorizados a placebo, SNF472 300 mg y SNF472 600 mg fue de 91, 92, y 91, respectivamente. Este número de pacientes se vio reducido al final del estudio (población por protocolo) incluyendo 49, 61 y 50 pacientes para los grupos de tratamiento con placebo, 300 mg y 600 mg, respectivamente. Adicionalmente, de estos pacientes, solamente un subconjunto de ellos fue incluido en los análisis de PK y PD, que según los criterios de aceptación de población disponible por protocolo fueron: 15 para placebo, 20 para SNF472 300 mg y 20 para SNF472 600 mg. Luego, este último conjunto de pacientes se incluyó en el análisis estadístico.

Los niveles de SNF472 alrededor de C_{max} para el grupo placebo fueron menores al LLOQ mientras que el promedio para el grupo de 300 mg y de 600 mg fue de 15 μM y 46 μM , respectivamente. No se observó acumulación de SNF472 durante las 52 semanas de tratamiento, igual como en estudios previos de fase 1 en pacientes de HD tratados con infusión intravenosa de SNF472 durante 4 semanas¹⁵, o durante 12 semanas en el estudio clínico de fase 2 de CUA. Respecto al ratio promedio de C_{max} entre los grupos de 600 mg y 300 mg, éste fue de aproximadamente 3, lo que sugiere una saturación del aclaramiento de SNF472 a la dosis más alta, seguramente provocada por una saturación del metabolismo.

En el estudio CaLIPSO, utilizamos el método validado en los primeros apartados de este trabajo para evaluar el efecto PD *ex vivo* del tratamiento con SNF472 a diferentes dosis. El efecto PD en las diferentes semanas consideradas fue similar dentro de cada grupo de tratamiento y, en cambio, estadísticamente diferente entre los diferentes grupos tratados. Los porcentajes de inhibición de la cristalización de fosfato de calcio promedio fueron de 15%, 61% y 75% en los

grupos de placebo, 300 mg y 600 mg, respectivamente; destacando que los valores por debajo del 20% se consideran ruido de fondo para el ensayo de PD. En comparación con el grupo placebo, el promedio del efecto PD en los grupos de 300 mg y 600 mg fue aproximadamente 4 y 5 veces superior, respectivamente.

En resumen, la exposición a SNF472 y los efectos de PD observados fueron consistentes desde la primera hasta la última semana del estudio de 52 semanas, sin diferencias significativas entre las visitas.

Los datos observados de PK y PD se ajustan bien a un modelo simple de E_{max} . Este ajuste mostró que las concentraciones plasmáticas de SNF472 superiores a $5.5 \mu\text{M}$, valor estimado para la IC_{50} , estarían asociadas a una inhibición de la cristalización *ex vivo* de fosfato de calcio superior al 50%. Entonces, el valor promedio observado para C_{max} se acercó a este umbral en el grupo de 300 mg ($15 \mu\text{M}$) y fue muy superior en el grupo de 600 mg ($46 \mu\text{M}$), encontrándose en la zona de saturación del efecto PD, según resultados previos de estudios clínicos^{14,15}. La E_{max} estimada del efecto PD (76%) se correspondió con el valor promedio de este mismo efecto obtenido para el grupo de 600 mg (75%). Además, este valor fue similar a datos clínicos previamente publicados del efecto PD¹⁵ y a los resultados del ensayo *in vitro* de PD anteriormente validado, confirmando que se encontraban en la zona de saturación de la curva PK-PD. En cambio, la inhibición promedio de fosfato de calcio para el grupo de 300 mg produjo un efecto subóptimo en la eficacia clínica, por debajo de la IC_{80} , como se esperaba según los datos clínicos previos¹⁵.

La relación entre la progresión del índice CAC en volumen y el efecto de PD, expresado como porcentaje de inhibición de la cristalización de fosfato de calcio *ex vivo* en plasma, se describió mediante un modelo lineal. La intercepción con el eje X en este modelo lineal (progresión en índice CAC correspondiente a efecto PD cero) fue del 20%. Este valor estuvo acorde con el porcentaje de progresión del índice CAC en volumen para el grupo placebo en el análisis primario de eficacia previamente publicado¹⁶, tanto para la población modificada por intención de tratar (20%) como para la población incluida por protocolo (24%)¹⁶.

Respecto a la relación PK-eficacia, o lo que sería lo mismo, exposición al fármaco experimental con la progresión del índice CAC en volumen desde el inicio hasta la semana 52, se ajustó a un modelo simple de E_{max} . Los valores de IC_{50} y IC_{80} para la reducción de la progresión de CAC fueron de $12 \mu\text{M}$ y $49 \mu\text{M}$ de SNF472, respectivamente. Estos valores se acercaron a los niveles promedios de C_{max} obtenidos para los grupos de dosis de 300 y 600 mg de SNF472, respectivamente. El modelo de ajuste mostró saturación en la reducción de la progresión del índice CAC a partir del tercer cuartil de C_{max} , con una concentración promedio de $32 \mu\text{M}$. Teniendo en cuenta este modelo de ajuste, valores de C_{max} iguales o superiores a $32 \mu\text{M}$, se podrían considerar niveles plasmáticos a partir de los cuales no se observaría un aumento significativo de la eficacia clínica. El porcentaje de pacientes con valores promedios de C_{max} por encima del umbral de $32 \mu\text{M}$ fue del 9.5% y del 65% para las dosis de 300 y 600 mg, respectivamente. Por tanto, con la dosis de 300 mg, menos del 10% de los pacientes en HD alcanzaron una concentración superior a $32 \mu\text{M}$. En cambio, el 65% de los pacientes tratados con la dosis de 600 mg, presentaron valores de C_{max} promedio por encima del umbral de $32 \mu\text{M}$. De esta manera, se puede considerar que la mayoría de los pacientes que recibieron SNF472 en una dosis de 600 mg lograron una exposición dentro del rango requerido para tener la máxima

eficacia terapéutica. Adicionalmente, este modelo predijo una progresión máxima del 16.9% en CAC, sin exposición a SNF472. Este valor se aproximó a los valores observados en el grupo placebo en el análisis primario de eficacia previamente publicado, donde se reportó un 20% de progresión en la población modificada por intención de tratar y un 24% en la población incluida por protocolo¹⁶. El modelo también predijo un efecto máximo del fármaco de -14.5% con respecto a la progresión sin exposición a SNF472, lo que representa sólo un 2.4% de progresión de CAC en exposiciones óptimas a SNF472. Los cambios promedio observados para la progresión del índice CAC en volumen desde el inicio hasta la semana 52 para el grupo de 600 mg de SNF472 en el análisis primario fueron del 10% en la población modificada por intención de tratar y del 6% en la población por protocolo¹⁶. Por tanto, podemos confirmar un buen ajuste del modelo elegido.

Estos análisis de los resultados del ensayo clínico de CaLIPSO presentaron diferentes limitaciones, entre las cuales podemos destacar la disponibilidad de pocos pacientes al final del estudio con muestras evaluables, ya que solo se dispuso de seis pacientes en el grupo de 600 mg en la semana 52. Debido al tiempo de vida media corto del SNF472 en sangre, la ventana de muestreo para el correcto análisis de C_{max} fue limitada (últimos 10 minutos de infusión), sumado a que solo se recolectaron muestras de sangre para PK y PD de un subconjunto de pacientes. Aun así, el análisis final de la relación PK/PD y de PK/progresión del índice CAC incluyó 116 muestras para las mediciones de PK y de PD, distribuidas de manera homogénea entre los grupos de tratamiento. Además, los efectos observados en las semanas 1, 10, 22 y 52 de este estudio, así como en pacientes individuales dentro de cada grupo de dosis, son consistentes. Este hecho sugiere que una población más grande hubiera generado resultados similares a los obtenidos en los análisis realizados para el estudio CaLIPSO.

En conclusión, los modelos simples de E_{max} para el análisis de la relación PK/PD y PK/progresión índice CAC o lineales para la relación PD/progresión índice CAC mostraron relaciones sólidas entre las concentraciones plasmáticas de SNF472, la inhibición de la cristalización *ex vivo* de fosfato de calcio y la eficacia clínica (progresión de CAC), después de 52 semanas de tratamiento con SNF472 en pacientes dializados. Una mayor exposición a SNF472 se correlacionó con una mayor inhibición de la cristalización *ex vivo*, y con una mayor reducción en la progresión del índice CAC. La exposición a 300 mg de SNF472 estuvo ligeramente por debajo del umbral para el efecto máximo de PD y la eficacia clínica máxima. En cambio, la exposición a 600 mg de SNF472 estuvo por encima de estos umbrales. Aun así, sería necesario seguir investigando para confirmar si estas relaciones de PK, PD y eficacia clínica para SNF472 en pacientes que reciben diálisis con calcificación coronaria también se podrían aplicar a otras poblaciones de pacientes, incluidos pacientes con otras formas de calcificación vascular.

Los resultados de los estudios incluidos en esta tesis nos han permitido obtener un ensayo de farmacodinamia *in vitro/ex vivo* para determinar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en plasma humano y de rata. Además, hemos demostrado la correlación de los resultados del ensayo *ex vivo* tanto con la inhibición de la calcificación *in vivo* en rata como con la eficacia clínica en pacientes en tratamiento de diálisis. Por tanto, este método no invasivo podría ser utilizado para evaluar desde fases preclínicas y clínicas muy tempranas los potenciales efectos terapéuticos de inhibidores de la calcificación, como el SNF472, en enfermedades relacionadas con la CCV.

4. Referencias

- 1 Sallam, T., Cheng, H., Demer, L. L. & Tintut, Y. Regulatory circuits controlling vascular cell calcification. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 3187-3197, doi:10.1007/s00018-012-1231-y (2013).
- 2 Schurgers, L. J. *et al.* The circulating inactive form of matrix gla protein is a surrogate marker for vascular calcification in chronic kidney disease: a preliminary report. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **5**, 568-575, doi:10.2215/CJN.07081009 (2010).
- 3 Villa-Bellosta, R. & O'Neill, W. C. Pyrophosphate deficiency in vascular calcification. *Kidney Int.* **93**, 1293-1297, doi:10.1016/j.kint.2017.11.035 (2018).
- 4 Karwowski, W., Naumnik, B., Szczepanski, M. & Mysliwiec, M. The mechanism of vascular calcification - a systematic review. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* **18**, RA1-11, doi:10.12659/msm.882181 (2012).
- 5 Okuno, S. *et al.* Presence of abdominal aortic calcification is significantly associated with all-cause and cardiovascular mortality in maintenance hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* **49**, 417-425, doi:10.1053/j.ajkd.2006.12.017 (2007).
- 6 London, G. M. *et al.* Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol. Dial. Transplant.* **18**, 1731-1740, doi:10.1093/ndt/gfg414 (2003).
- 7 Nelson, R. G. *et al.* Lower-extremity amputations in NIDDM. 12-yr follow-up study in Pima Indians. *Diabetes Care* **11**, 8-16, doi:10.2337/diacare.11.1.8 (1988).
- 8 Shantouf, R. S. *et al.* Total and individual coronary artery calcium scores as independent predictors of mortality in hemodialysis patients. *Am. J. Nephrol.* **31**, 419-425, doi:10.1159/000294405 (2010).
- 9 Schiffrin, E. L., Lipman, M. L. & Mann, J. F. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation* **116**, 85-97, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.678342 (2007).
- 10 Saran, R. *et al.* US Renal Data System 2015 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am. J. Kidney Dis.* **67**, Svii, S1-305, doi:10.1053/j.ajkd.2015.12.014 (2016).
- 11 Nigwekar, S. U., Thadhani, R. & Brandenburg, V. M. Calciphylaxis. *New Engl. J. Med.* **378**, 1704-1714, doi:10.1056/NEJMra1505292 (2018).
- 12 Brandenburg, V. M. *et al.* Calcific uraemic arteriolopathy (calciphylaxis): data from a large nationwide registry. *Nephrol. Dial. Transplant.* **32**, 126-132, doi:10.1093/ndt/gfv438 (2017).
- 13 McCarthy, J. T. *et al.* Survival, Risk Factors, and Effect of Treatment in 101 Patients With Calciphylaxis. *Mayo Clin. Proc.* **91**, 1384-1394, doi:10.1016/j.mayocp.2016.06.025 (2016).
- 14 Perello, J. *et al.* First-time-in-human randomized clinical trial in healthy volunteers and haemodialysis patients with SNF472, a novel inhibitor of vascular calcification. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **84**, 2867-2876, doi:10.1111/bcp.13752 (2018).
- 15 Salcedo, C. *et al.* A phase 1b randomized, placebo-controlled clinical trial with SNF472 in haemodialysis patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **85**, 796-806, doi:10.1111/bcp.13863 (2019).

- 16 Raggi, P. *et al.* Slowing Progression of Cardiovascular Calcification With SNF472 in Patients on Hemodialysis: Results of a Randomized Phase 2b Study. *Circulation* **141**, 728-739, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044195 (2020).
- 17 Brandenburg, V. M. *et al.* Improvement in wound healing, pain, and quality of life after 12 weeks of SNF472 treatment: a phase 2 open-label study of patients with calciphylaxis. *Journal of nephrology* **32**, 811-821, doi:10.1007/s40620-019-00631-0 (2019).
- 18 Perello, J. *et al.* Mechanism of action of SNF472, a novel calcification inhibitor to treat vascular calcification and calciphylaxis. *Br. J. Pharmacol.*, doi:10.1111/bph.15163 (2020).
- 19 Price, P. A., Faus, S. A. & Williamson, M. K. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 817-824, doi:10.1161/01.ATV.21.5.817 (2001).
- 20 Lomashvili, K. A., Monier-Faugere, M. C., Wang, X., Malluche, H. H. & O'Neill, W. C. Effect of bisphosphonates on vascular calcification and bone metabolism in experimental renal failure. *Kidney Int.* **75**, 617-625, doi:10.1038/ki.2008.646 (2009).
- 21 O'Neill, W. C., Lomashvili, K. A., Malluche, H. H., Faugere, M. C. & Riser, B. L. Treatment with pyrophosphate inhibits uremic vascular calcification. *Kidney Int.* **79**, 512-517, doi:10.1038/ki.2010.461 (2011).
- 22 Lomashvili, K. A., Cobbs, S., Hennigar, R. A., Hardcastle, K. I. & O'Neill, W. C. Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and osteopontin. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 1392-1401, doi:10.1097/01.ASN.0000128955.83129.9C (2004).
- 23 Schibler, D., Russell, R. G. & Fleisch, H. Inhibition by pyrophosphate and polyphosphate of aortic calcification induced by vitamin D3 in rats. *Clin. Sci.* **35**, 363-372 (1968).
- 24 Alfrey, A. C. & Ibels, L. S. Role of phosphate and pyrophosphate in soft tissue calcification. *Adv. Exp. Med. Biol.* **103**, 187-193, doi:10.1007/978-1-4684-7758-0_20 (1978).
- 25 Grases, F. *et al.* Phytate (Myo-inositol hexakisphosphate) inhibits cardiovascular calcifications in rats. *Front. Biosci.* **11**, 136-142, doi:10.2741/1786 (2006).
- 26 Grases, F. *et al.* Effect of crystallization inhibitors on vascular calcifications induced by vitamin D: a pilot study in Sprague-Dawley rats. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **71**, 1152-1156, doi:10.1253/circj.71.1152 (2007).
- 27 Van den Berg, C. J., Hill, L. F. & Stanbury, S. W. Inositol phosphates and phytic acid as inhibitors of biological calcification in the rat. *Clin. Sci.* **43**, 377-383, doi:10.1042/cs0430377 (1972).
- 28 Villa-Bellosta, R. & Sorribas, V. Prevention of vascular calcification by polyphosphates and nucleotides- role of ATP. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **77**, 2145-2151, doi:10.1253/circj.CJ-13-0016 (2013).
- 29 Fernandez, D., Ortega-Castro, J. & Frau, J. Theoretical study of the HAP crystal growth inhibition potency of pyrophosphate, etidronate, citrate and phytate. Deciphered the adsorbed conformation of phytate on the HAP (001) surface. *Appl. Surf. Sci.* **408**, 110-116, doi:10.1016/j.apsusc.2017.03.008 (2017).
- 30 Fernández, D. O.-C., J.; Frau, J. Theoretical study of the deposition and adsorption of bisphosphonates on the 001 hydroxyapatite surface: Implications in the pathological crystallization inhibition and the bone antiresorptive action. *Appl. Surf. Sci.* **392**, 204-214, doi:10.1016/j.apsusc.2016.09.029 (2017).

- 31 Schafer, C. *et al.* The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J. Clin. Invest.* **112**, 357-366, doi:10.1172/JCI17202 (2003).
- 32 Heiss, A. *et al.* Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J. Biol. Chem.* **278**, 13333-13341, doi:10.1074/jbc.M210868200 (2003).
- 33 Heiss, A., Jahnen-Dechent, W., Endo, H. & Schwahn, D. Structural dynamics of a colloidal protein-mineral complex bestowing on calcium phosphate a high solubility in biological fluids. *Biointerphases* **2**, 16-20, doi:10.1116/1.2714924 (2007).
- 34 Keowmaneechai, E. & McClements, D. J. Influence of EDTA and citrate on physicochemical properties of whey protein-stabilized oil-in-water emulsions containing CaCl₂. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 7145-7153, doi:10.1021/jf020489a (2002).
- 35 Pasch, A. *et al.* Sodium thiosulfate prevents vascular calcifications in uremic rats. *Kidney Int.* **74**, 1444-1453, doi:10.1038/ki.2008.455 (2008).
- 36 O'Neill, W. C. & Hardcastle, K. I. The chemistry of thiosulfate and vascular calcification. *Nephrol. Dial. Transplant.* **27**, 521-526, doi:10.1093/ndt/gfr375 (2012).
- 37 Pasch, A. *et al.* Nanoparticle-based test measures overall propensity for calcification in serum. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**, 1744-1752, doi:10.1681/ASN.2012030240 (2012).
- 38 Smith, E. R. *et al.* Phosphorylated fetuin-A-containing calciprotein particles are associated with aortic stiffness and a procalcific milieu in patients with pre-dialysis CKD. *Nephrol. Dial. Transplant.* **27**, 1957-1966, doi:10.1093/ndt/gfr609 (2012).
- 39 Dahle, D. O. *et al.* Serum Calcification Propensity Is a Strong and Independent Determinant of Cardiac and All-Cause Mortality in Kidney Transplant Recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **16**, 204-212, doi:10.1111/ajt.13443 (2016).
- 40 Pasch, A. Novel assessments of systemic calcification propensity. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **25**, 278-284, doi:10.1097/MNH.000000000000237 (2016).
- 41 Chertow, G. M. *et al.* Effect of cinacalcet on cardiovascular disease in patients undergoing dialysis. *N. Engl. J. Med.* **367**, 2482-2494, doi:10.1056/NEJMoa1205624 (2012).
- 42 Ferrer, M. D. *et al.* Characterization of SNF472 pharmacokinetics and efficacy in uremic and non-uremic rats models of cardiovascular calcification. *PLoS one* **13**, e0197061, doi:10.1371/journal.pone.0197061 (2018).
- 43 Eiseman, J., Lan, J., Guo, J., Joseph, E. & Vucenic, I. Pharmacokinetics and tissue distribution of inositol hexaphosphate in C.B17 SCID mice bearing human breast cancer xenografts. *Metabolism* **60**, 1465-1474, doi:10.1016/j.metabol.2011.02.015 (2011).
- 44 Morais, J. A. & Lobato Mdo, R. The new European Medicines Agency guideline on the investigation of bioequivalence. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **106**, 221-225, doi:10.1111/j.1742-7843.2009.00518.x (2010).
- 45 Qunibi, W. Y., Nolan, C. A. & Ayus, J. C. Cardiovascular calcification in patients with end-stage renal disease: a century-old phenomenon. *Kidney Int. Suppl.*, S73-80, doi:10.1046/j.1523-1755.62.s82.15.x (2002).
- 46 Andress, D. L. Vitamin D treatment in chronic kidney disease. *Semin Dial* **18**, 315-321, doi:10.1111/j.1525-139X.2005.18408.x (2005).

- 47 Takeo, S. *et al.* Alterations in cardiac function and subcellular membrane activities after hypervitaminosis D3. *Mol. Cell. Biochem.* **107**, 169-183, doi:10.1007/BF00225520 (1991).
- 48 Takeo, S. *et al.* Functional changes of aorta with massive accumulation of calcium. *Atherosclerosis* **77**, 175-181, doi:10.1016/0021-9150(89)90079-8 (1989).
- 49 Kitagawa, S., Yamaguchi, Y., Kunitomo, M., Imaizumi, N. & Fujiwara, M. Altered vasoconstrictor responsiveness in vitamin D-induced arteriosclerotic rat aortas. *Jap. J. Pharmacol.* **61**, 283-289, doi:10.1254/jjp.61.283 (1993).
- 50 Kitagawa, S., Yamaguchi, Y., Kunitomo, M., Imaizumi, N. & Fujiwara, M. Impairment of endothelium-dependent relaxation in aorta from rats with arteriosclerosis induced by excess vitamin D and a high-cholesterol diet. *Jap. J. Pharmacol.* **59**, 339-347, doi:10.1254/jjp.59.339 (1992).
- 51 Fleckenstein-Grun, G., Thimm, F., Frey, M. & Matyas, S. Progression and regression by verapamil of vitamin D3-induced calcific medial degeneration in coronary arteries of rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26**, 207-213, doi:10.1097/00005344-199508000-00005 (1995).
- 52 Hass, G. M., Landerholm, W. & Hemmens, A. Production of calcific athero-arteriosclerosis and thromboarteritis with nicotine, vitamin D and dietary cholesterol. *Am. J. Pathol.* **49**, 739-771 (1966).
- 53 Liu, L. B., Taylor, C. B., Peng, S. K. & Mikkelsen, B. Experimental arteriosclerosis in Rhesus monkeys induced by multiple risk factors: cholesterol, vitamin D, and nictotine. *Paroi Arterielle* **5**, 25-37 (1979).
- 54 Cardus, A., Panizo, S., Parisi, E., Fernandez, E. & Valdivielso, J. M. Differential effects of vitamin D analogs on vascular calcification. *J. Bone Miner. Res.* **22**, 860-866, doi:10.1359/jbmr.070305 (2007).
- 55 Price, P. A., Faus, S. A. & Williamson, M. K. Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D. *Atertio. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 317-327, doi:10.1161/01.atv.20.2.317 (2000).
- 56 Price, P. A., June, H. H., Buckley, J. R. & Williamson, M. K. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Atertio. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1610-1616, doi:10.1161/hq1001.097102 (2001).
- 57 Kieffer, P., Robert, A., Capdeville-Atkinson, C., Atkinson, J. & Lartaud-Idjouadiene, I. Age-related arterial calcification in rats. *Life Sci.* **66**, 2371-2381, doi:10.1016/s0024-3205(00)00567-1 (2000).
- 58 Perello, J. *et al.* SNF472 inhibits the progression of vitamin D induced cardiovascular calcification in rats. *Nephrology Dialysis Transplantation* **30**, doi:10.1093/ndt/gfv199.02 (2015).
- 59 Grases, F. *et al.* Phytate reduces age-related cardiovascular calcification. *Front. Biosci.* **13**, 7115-7122, doi:10.2741/3214 (2008).
- 60 Tur, F. *et al.* Validation of an LC-MS bioanalytical method for quantification of phytate levels in rat, dog and human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **928**, 146-154, doi:10.1016/j.jchromb.2013.03.023 (2013).
- 61 Russo, D. *et al.* Coronary Artery Calcification and Outcomes in Diabetic Patients with and without Chronic Kidney Disease. *Blood Purif.* **36**, 17-20, doi:10.1159/000350580 (2013).
- 62 Kingma, J. G., Jr. & Roy, P. E. Ultrastructural study of hypervitaminosis D induced arterial calcification in Wistar rats. *Artery* **16**, 51-61 (1988).

- 63 O'Neill, W. C. & Lomashvili, K. A. Recent progress in the treatment of vascular calcification. *Kidney Int.* **78**, 1232-1239, doi:10.1038/ki.2010.334 (2010).

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un nuevo método espectrofotométrico *in vitro/ex vivo* para evaluar y discriminar entre la actividad de diferentes inhibidores de la cristalización de fosfato de calcio en plasma humano en 30 minutos. De los inhibidores evaluados, la potencia en la inhibición de la cristalización decrece en el orden: SNF472 > ibandronato > pamidronato > pirofosfato > fetuína-A >> citrato > tiosulfato.
2. El método espectrofotométrico se ha validado *in vitro* para el SNF472 como inhibidor en el rango de concentraciones 0.5 - 30 μM , obteniendo unos valores de IC_{50} e IC_{80} de 2.1 y 5.6 μM , respectivamente, y un rango lineal de respuesta hasta 4 μM . El ensayo de farmacodinamia (PD) es repetible y reproducible a concentraciones superiores a 2.1 μM . Las muestras de plasma que contienen SNF472 se pueden diluir hasta 100 veces para estar en el intervalo de linealidad del ensayo. Las pruebas de estabilidad indican que las muestras de plasma con SNF472 se pueden almacenar bajo condiciones de ultra baja temperatura durante 48 semanas, y realizar un máximo de un ciclo de congelación/descongelación antes de su análisis. Las muestras de plasma con SNF472 se pueden conservar 2 horas a temperatura ambiente y durante 4 horas a 4°C, antes del análisis de PD. La validación de este ensayo espectrofotométrico de PD permite utilizarlo como biomarcador en estudios clínicos con SNF472.
3. El ensayo de PD validado no permite diferenciar entre el potencial de cristalización de plasma de voluntarios sanos no dializados y de pacientes en tratamiento de hemodiálisis, como tampoco entre el plasma obtenido pre y post diálisis en estos últimos. Sin embargo, el plasma de los pacientes en hemodiálisis es más resistente al efecto inhibitorio *in vitro* del SNF472, especialmente a concentraciones bajas del compuesto.
4. La adición de SNF472 *in vitro* a plasma de rata reduce el potencial de cristalización de fosfato de calcio de manera dependiente a la concentración, con una IC_{50} de 5.2 μM , y un 75% de inhibición a 10 μM . El SNF472 administrado por vía subcutánea a ratas inhibe la cristalización *ex vivo* de fosfato de calcio en plasma hasta un 70%. Esta inhibición es dependiente de la concentración plasmática y de la dosis de SNF472 administrada, con una relación directamente proporcional entre ambos parámetros. Por tanto, se ha verificado la aplicabilidad del método *in vitro/ex vivo* de PD en plasma de rata, validando su uso en estudios preclínicos.
5. Los niveles plasmáticos de SNF472 tras la infusión de 2.5 y 4 horas a una dosis única de 10 mg/kg no alcanzan el estado estacionario. Los niveles de SNF472 decrecen rápidamente al finalizar la infusión en ambos regímenes, con tiempos de vida media alrededor de los 20 min. El aclaramiento plasmático y el volumen de distribución para el SNF472 son bajos para los dos tiempos de infusión. En resumen, los parámetros farmacocinéticos de SNF472 para los dos regímenes de infusión son semejantes, y los valores de exposición para ambos se pueden considerar bioequivalentes.
6. Se ha re-optimizado un modelo patológico de calcificación cardiovascular en rata por administración subcutánea de vitamina D utilizando una administración diaria de 75000 UI/kg durante tres días y una duración total de 12 días de estudio.

VI. CONCLUSIONES

7. La administración diaria subcutánea de SNF472 inhibe de manera dosis dependiente la calcificación tisular en aorta y corazón inducida por vitamina D en rata con unas ID_{50} alrededor de 15-17 mg/kg de SNF472. Considerando los valores circulantes de SNF472 entorno al tiempo máximo, las IC_{50} de la calcificación tisular se encuentran alrededor de 5 μ M.
8. La infusión diaria de 4 horas de SNF472 inhibe la calcificación tisular inducida por vitamina D en rata de manera dosis dependiente con una ID_{50} entre 2 y 3 mg/kg en corazón. Considerando los valores circulantes de SNF472 entorno al tiempo máximo, las IC_{50} para inhibir la calcificación tisular estuvieron alrededor de 5 μ M. Adicionalmente, el ensayo de PD aplicado a muestras de plasma de rata con niveles de SNF472 entorno al tiempo máximo muestra una reducción de la cristalización *ex vivo* de fosfato de calcio dosis y concentración dependiente, con una IC_{50} de 17 μ M. Además, se ha demostrado la existencia de una correlación directa significativa entre la inhibición de la cristalización plasmática *ex vivo* (ensayo de PD) y la inhibición de la calcificación cardiovascular *in vivo*.
9. En el estudio *in vivo* de progresión en el que el SNF472 se administra con la calcificación ya iniciada, la infusión intravenosa durante 4 horas a dosis de 10 mg/kg reduce la progresión de la calcificación en aorta y corazón alrededor de un 50%, con niveles circulantes máximos de SNF472 alrededor de 20 μ M.
10. En el estudio clínico abierto de fase 2 en pacientes de calcifilaxis, el tratamiento con SNF472 a rangos de dosis de 5.6 mg/kg a 8.6 mg/kg, durante 12 semanas inhibe la cristalización *ex vivo* de fosfato de calcio en plasma (efecto PD) entorno al 70% para una concentración circulante máxima alrededor de 30 μ M. Este efecto se encuentra en la zona de saturación de la curva dosis-respuesta del ensayo de PD. Por tanto, no se pudo establecer correlación entre el efecto PD, la PK y la eficacia clínica en el estudio clínico de fase 2 de calcifilaxis.
11. En el estudio CaLIPSO (estudio de fase 2 doble ciego, aleatorizado y controlado por placebo para evaluar el efecto del tratamiento intravenoso con SNF472 en la progresión de la calcificación cardiovascular durante 52 semanas en pacientes en tratamiento de HD) se confirma que el SNF472 inhibe la cristalización *ex vivo* de fosfato de calcio en plasma humano (efecto PD) siguiendo un patrón dosis-respuesta, después de regímenes de dosificación de 300 y 600 mg. Los niveles de SNF472 promedio para el grupo de 300 mg y de 600 mg fueron de 15 μ M y 46 μ M, respectivamente, por lo que la relación dosis-concentración máxima de SNF472 fue mayor a la relación proporcional, sin observarse acumulación después de 52 semanas de tratamiento. Para un mismo tratamiento, no se observan diferencias significativas entre los valores del efecto PD ni de la concentración máxima durante las 52 semanas de estudio.
12. La relación entre la concentración máxima y el efecto PD en el estudio CaLIPSO se describe según un modelo simple de E_{max} , estimándose una IC_{50} de 5.5 μ M, y un efecto mínimo (E_0) y máximo (E_{max}) de 8.8% y 76%, respectivamente.
13. En el estudio CaLIPSO, la relación encontrada entre la inhibición de la cristalización *ex vivo* (efecto PD) y la variable clínica principal para medir la eficacia del SNF472 (progresión del índice CAC en volumen) durante 52 semanas de tratamiento fue lineal e inversa, por lo que


VI. CONCLUSIONES

un mayor efecto PD correlaciona con una menor progresión de CAC. Por otra parte, la relación entre la exposición (PK) y la eficacia clínica principal se describe según un modelo simple de E_{max} . El efecto mínimo (E_0) correspondiente a la progresión de CAC en el placebo estimada desde el inicio hasta la semana 52, es del 16.9%. En cambio, el modelo estima que el efecto máximo del tratamiento con SNF472 resulta en una progresión de CAC de un 2.4%, con una IC_{50} y IC_{80} de 12 μ M y un 49 μ M de SNF472, respectivamente. Por tanto, la exposición a 300 mg de SNF472 se encuentra ligeramente por debajo del umbral para el efecto máximo de PD y la eficacia clínica máxima. Sin embargo, la exposición a 600 mg de SNF472 se encuentra por encima del rango requerido para tener la máxima eficacia terapéutica.

En definitiva, los resultados obtenidos en esta tesis han permitido desarrollar y validar una técnica espectrofotométrica *in vitro/ex vivo* para evaluar el potencial de cristalización de fosfato de calcio en muestras de plasma, así como establecer una relación directa entre la inhibición de la cristalización *ex vivo* y la inhibición de la calcificación cardiovascular *in vivo*, tanto a nivel preclínico en modelos animales como a nivel clínico en pacientes con insuficiencia renal terminal tratados con hemodiálisis.

VII. ARTÍCULOS PUBLICADOS

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

A novel pharmacodynamic assay to evaluate the effects of crystallization inhibitors on calcium phosphate crystallization in human plasma

M. D. Ferrer¹, M. M. Pérez¹, M. M. Cànaves¹, J. M. Buades², C. Salcedo¹ & J. Perelló^{1,3}

Cardiovascular calcification (CVC) is a progressive complication of chronic kidney disease and a predictor of CV events and mortality. The use of biomarkers to predict CV risk and activities of potential or current treatment drugs in these patients could have a crucial impact on therapeutic approaches. Our aim was to develop a novel assay for measurement of the rate of calcium phosphate crystallization in human plasma and provide a tool to evaluate the effects of crystallization inhibitors. The efficacy of inhibitors was determined by adding inhibitory compounds (polyphosphates, fetuin-A, sodium thiosulfate or citrate) to control samples. The assay was additionally validated for SNF472, an experimental formulation of phytate being developed for the treatment of calciphylaxis and CVC in patients with end-stage renal disease (ESRD) undergoing hemodialysis (HD). The method was repeatable and reproducible. The plasma crystallization rate was reduced up to 80% in a concentration-dependent manner following treatment with inhibitors *in vitro*, among which SNF472 was the most potent. This method appears beneficial in evaluating and discriminating between inhibitory activities of compounds such as polyphosphates on calcium phosphate crystallization, which present a novel therapeutic approach to treat CVC in ESRD patients.

Calcification is the normal process of calcium salt deposition in body tissues occurring due to the presence of supersaturated or metastable salt solutions in biological fluids^{1,2}. This process is usually represented by calcium phosphate mineralization in the form of hydroxyapatite (HAP), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, and controlled by thermodynamic conditions as well as the local concentrations of proteins in biological fluids. This inorganic mineralization mainly occurs in bones and teeth under physiological conditions. However, pathologic ectopic formations, such as calcification in soft tissue and cardiovascular calcification (CVC), are common in calcium-related disorders. CVC is recently described to be not only a passive physicochemical process, as explained above, but also an active cell-mediated process of artery calcification including both atherosclerotic (intimal artery layer) and medial calcification that involves multiple factors and mechanisms with a final common step of ectopic HAP accumulation.

Chronic kidney disease (CKD) and calciphylaxis are disorders that develop as a consequence of disturbances in calcium and phosphate metabolism, and involve inflammatory processes in which levels of circulating calcification inhibitors, such as fetuin-A³, matrix-Gla protein^{4,5}, pyrophosphate and osteopontin, are reduced while promoters of calcification are increased. This imbalance between circulating levels of promoters and inhibitors of calcification results in osteogenic transformation and HAP precipitation. In patients with advanced and end-stage renal disease (ESRD), CVC is a normal progressive complication and a predictor of cardiovascular events and mortality^{6,7}. These patients can also suffer from calciphylaxis, resulting in accelerated medial calcification of cutaneous arteries and arterioles^{8–11} and associated with high mortality rates^{12,13}.

¹Laboratoris Sanifit SL, 07121, Palma, Spain. ²Departament de Nefrologia, Hospital Son Llàtzer, 07198, Palma, Spain. ³Laboratory of Renal Lithiasis Research, IUNICS, University of the Balearic Islands, 07122, Palma, Spain. M.D. Ferrer and M.M. Pérez contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.P. (email: joan.perello@sanifit.com)

	Slope \pm SD ^a (Abs/logmin)	CV (%)	Mean CV (%)
Intra-day			
Assay 1	0.133 \pm 0.012	9.1	
Assay 2	0.126 \pm 0.011	8.8	7.9
Assay 3	0.143 \pm 0.008	5.8	
Inter-day			
Day 1	0.090 \pm 0.012	13.4	
Day 2	0.108 \pm 0.010	9.6	11.9
Day 3	0.108 \pm 0.014	12.7	

Table 1. Intra-day and inter-day precision of the spectrophotometric assay evaluated by determining the average coefficients of variation (CV). ^aMean \pm standard error (twelve replicates).

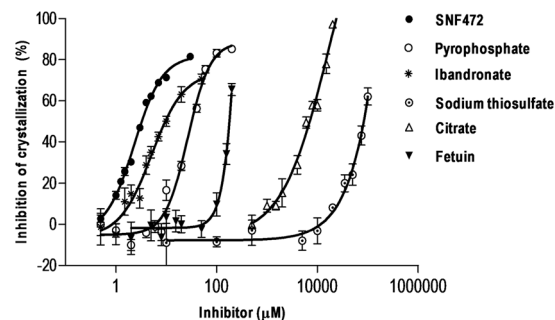


Figure 1. Inhibition of calcium phosphate crystal formation by crystallization inhibitors added *in vitro* to blank human plasma samples. Crystallization was induced by the addition of 12.5 mM calcium and 1.5 mM phosphate, and monitored spectrophotometrically in the linear range between 6 and 24 min. Experiments were performed with six replicates per concentration. Results represent means \pm SEM.

Although no approved therapies are currently available for the treatment or reduction of HAP accumulation in CVC, there are evidences from randomized clinical trials of decreasing the progression of CVC in ESRD. These treatments include non-calcium-based phosphate binders to reduce hyperphosphatemia¹⁴, as well as calcimimetics to treat sHPT¹⁵. Moreover, other studies demonstrated the efficacy of physicochemical inhibitors of HAP crystal formation, such as bisphosphonates^{16,17} in the reduction of CVC progression. Therapeutic agents for calciphylaxis additionally include bisphosphonates owing to their anti-inflammatory properties¹⁸, non-calcium phosphate binders¹⁹ and sodium thiosulfate (STS), an antioxidant and vasodilator agent^{8,20,21}. However, none of these compounds have been approved for calciphylaxis and their use is off-label. Several studies have presented evidence supporting the utility of phytate in calcification-related diseases, such as renal calculi^{22–24}, osteoporosis^{25,26} and CVC in animal models^{27–30}. SNF472, an intravenous (i.v.) formulation of myo-inositol hexaphosphate (phytate) that binds to the growing sites of HAP crystal, is currently being developed for the treatment of calciphylaxis and CVC in patients with ESRD undergoing HD.

Since calcification is a slow process and no specific biomarkers have been defined to date, evaluation of new therapeutic interventions in clinical trials is an arduous and challenging task. The search for novel biomarkers for effectively assessing the risk of CVC progression has been the major focus of scientific interest in recent years. Assessment of blood crystallization potential in patients with calcium-related disorders may be a relevant parameter to estimate the risk of CVC. Originally, a nanoparticle-based test was developed to measure the propensity for calcification in serum³¹. Subsequent clinical studies demonstrated associations of this nanoparticle marker with CVC and mortality, graft failure after renal transplantation and aortic stiffness^{32–34}. However, this method lacked the ability to evaluate the effectiveness of potential therapeutic agents, such as polyphosphates (pyrophosphate, bisphosphonates or phytate). No assays are currently available to assess blood crystallization tendency in the presence of calcification inhibitors. Since polyphosphates protect against crystallization and are the mainstay of CVC treatments^{27,29,35–37}, the key objective of this study was to develop a novel and rapid *in vitro/ex vivo* method to evaluate of calcium phosphate crystallization in plasma samples containing calcification inhibitors and validate its potential as a pharmacodynamic assay for use in both non-clinical and clinical settings.

Results

Validation of the spectrophotometric PD assay in human plasma. Intra-day and Inter-day precision were evaluated by calculating %CV and presented as the average of three determinations (Table 1). For both parameters, CV was below 15%, signifying that the assay is both repeatable and reproducible with human plasma samples.

Reduction in the crystallization rate in human plasma samples was tested by spiking different concentrations of seven calcification inhibitors into blank plasma samples. As observed in Fig. 1, SNF472 showed the

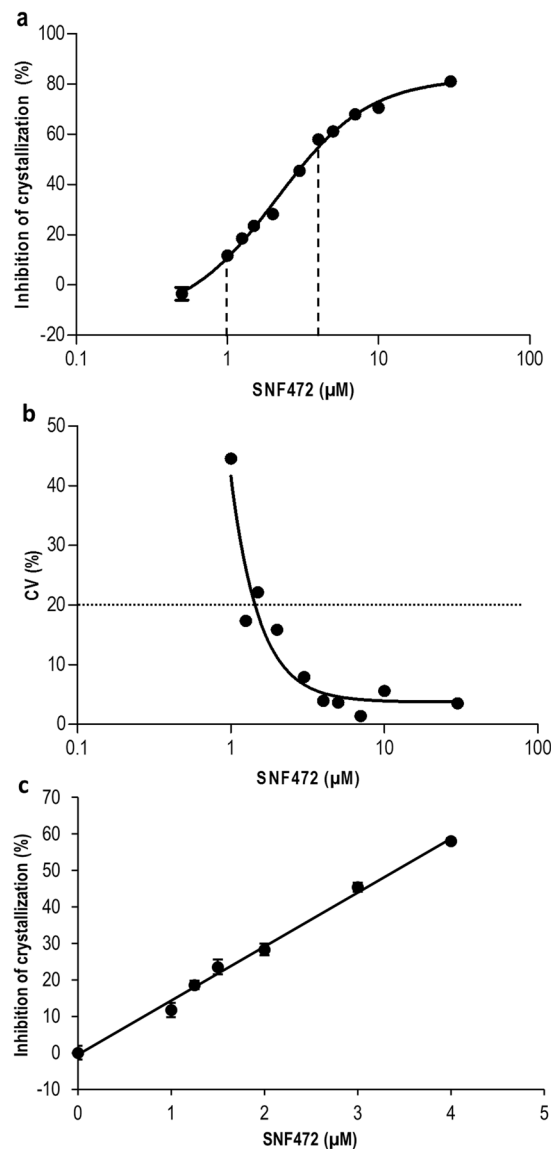


Figure 2. Dose-response curve of the PD assay for SNF472 as a crystallization inhibitor in human plasma samples and precision profile in the range of concentrations tested. **(a)** Dose-response curve. Human plasma samples were spiked with SNF472 in the range of 0.5–30 μM. Crystallization was induced by the addition of 12.5 mM calcium and 1.5 mM phosphate and monitored spectrophotometrically in the linear range between 6 and 24 min. Results are presented as means ± SEM, n = 6. Dashed lines represent the linear portion of the curve (1–4 μM). **(b)** Precision profile. Plot of the coefficient of variation (CV), calculated as the ratio of the standard deviation to inhibition mean, versus the concentration of SNF472 on a log scale. The dotted line represents the initial working range established by a threshold of 20% CV. **(c)** The linear portion of the dose-response curve was used to calculate the lower limit of quantification (LLOQ) for the PD assay in SNF472-spiked human plasma samples (0.77 μM).

highest potency in inhibiting calcium phosphate crystallization with an IC_{50} value of 2.12 μM. Ibandronate (IC_{50} = 5.13 μM) and pamidronate (IC_{50} = 6.42 μM) were additionally very effective but not as potent as SNF472 (data for pamidronate not shown in Fig. 1 for clarity purposes). Pyrophosphate showed lower inhibitory potency (IC_{50} = 25.97 μM) as well as fetuin (IC_{50} = 545.80 μM). IC_{50} values of citrate and STS were 17.5 mM and >500 mM, respectively.

To validate the PD assay, the method was applied to evaluate the crystallization inhibition potential in rat and human plasma samples containing SNF472. Linearity, inter-day and intra-day precision, integrity of dilution and stability of phytate spiked in plasma were analyzed. The data obtained for these parameters are presented in Figs 2 and 3 and Table 2.

A dose-response curve in the defined range (0–30 μM) of SNF472 was obtained, as shown in Fig. 2a. A directly proportional relationship between inhibition of crystallization and concentration of SNF472 was observed within the interval of 1–4 μM (dashed lines) with a correlation coefficient (R^2) of 0.98. Figure 2b presents the precision

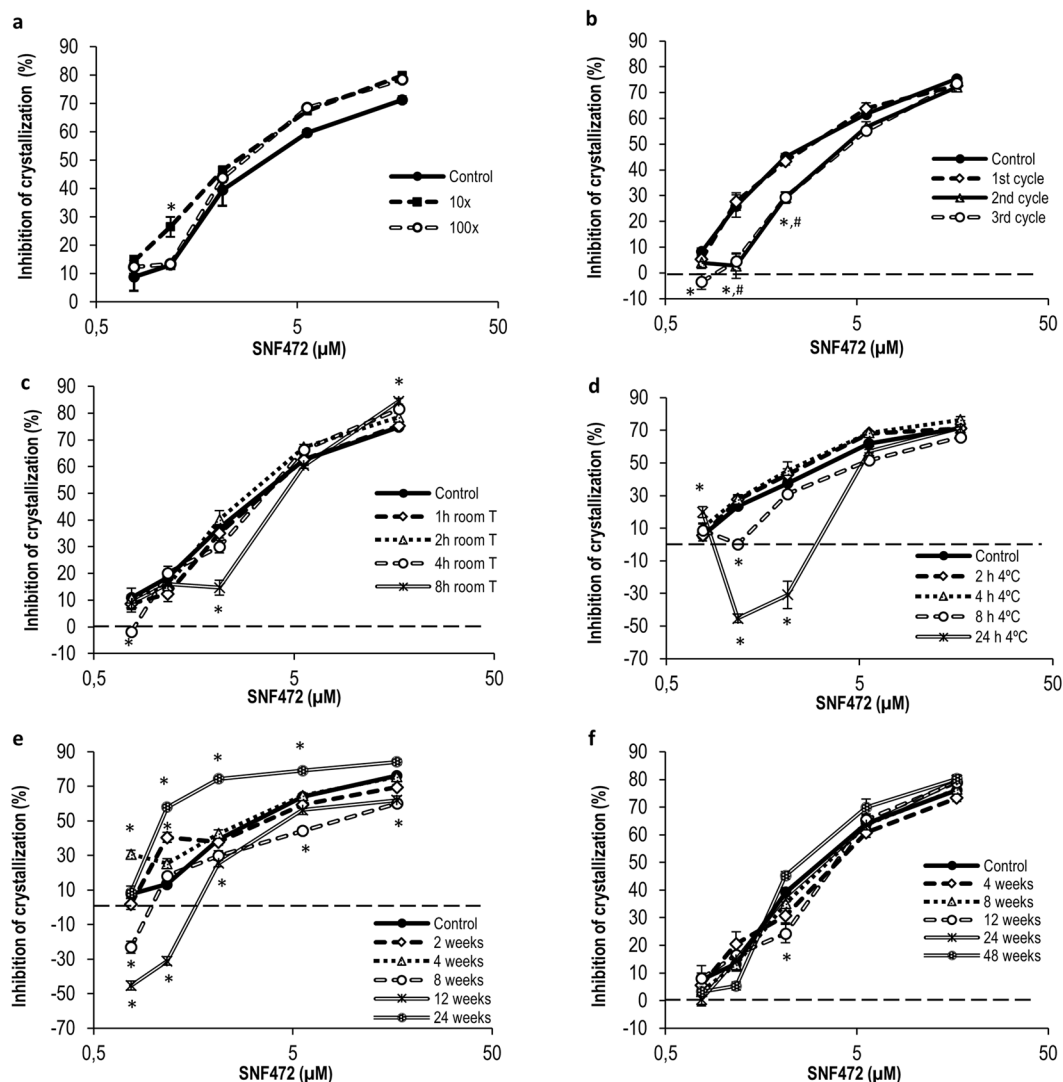


Figure 3. Dilution ability of SNF472 in plasma samples that are above the upper limit of the calibration curve and stability in plasma samples under different storage and temperature conditions. **(a)** *Ex vivo* inhibition of crystallization in undiluted (control) and diluted (1/10 and 1/100) plasma samples (dilution in blank plasma). Results are presented as means \pm SEM, $n = 6$. Statistical analysis (*) of significant differences vs. control samples, $P < 0.05$. **(b)** Stability of SNF472-spiked plasma samples stored at -80°C and subjected to one, two or three freeze/thaw cycles. Results are presented as means \pm SEM, $n = 6$. Statistical analysis (*, #) of significant differences vs. control samples, $P < 0.05$. **(c)** Stability of SNF472-spiked plasma samples maintained for up to 8 h at room temperature. Results are presented as means \pm SEM, $n = 6$. Statistical analysis (*) of significant differences vs. control samples, $P < 0.05$. **(d)** Stability of SNF472-spiked plasma samples maintained for up to 24 h at 4°C . Results are presented as means \pm SEM, $n = 6$. Statistical analysis (*) of significant differences vs. control samples, $P < 0.05$. **(e, f)** Stability of SNF472-spiked plasma samples stored at -20 or -80°C for up to 24 or 48 weeks. Results are presented as means \pm SEM, $n = 6$. Statistical analysis (*) of significant differences vs. control samples, $P < 0.05$.

profile (CV versus concentration on the log scale) of the method in the calibration range. The dotted line represents the initial working range established by a threshold of 20% CV. A LLOQ value of $0.77\ \mu\text{M}$ was obtained with Eq. (2) applied to the lower portion of the curve defined between 0 and $4\ \mu\text{M}$ SNF472, $R^2 = 0.99$ (Fig. 2c). The theoretical concentrations to attain 30%, 50%, 80% and 95% inhibition were calculated via nonlinear regression analysis of the dose-response curve as $1.17\ \mu\text{M}$, $2.12\ \mu\text{M}$, $5.59\ \mu\text{M}$ and $16.65\ \mu\text{M}$, respectively.

The intra-day and inter-day precision of the spectrophotometric assay data used to determine the efficacy of crystallization inhibition in human plasma samples spiked with five different concentrations of SNF472 (LLOQ, IC_{30} , IC_{50} , IC_{80} and IC_{95}) are presented in Table 2. Intra-day precision was low at LLOQ with CV of 61.9%, whereas within-day precision (CV $< 20\%$) was acceptable at concentrations of SNF472 in plasma from IC_{30} onwards, with values between 17.4% and 3.0%. Inter-day results showed low precision at LLOQ and IC_{30} levels (108.8% and 38.3%, respectively), but CV of $< 20\%$ from IC_{50} onwards.

SNF472 (μM)	Efficacy \pm SD (%)	Precision CV (%)
Intra-day^a		
0.77	9.9 \pm 1.4	61.9
1.17	21.1 \pm 1.7	17.4
2.12	43.4 \pm 1.6	7.2
5.59	68.6 \pm 1.9	3.6
16.65	78.3 \pm 2.2	3.0
Inter-day^b		
0.77	9.1 \pm 5.1	108.8
1.17	17.2 \pm 7.6	38.3
2.12	40.1 \pm 7.5	8.7
5.59	64.8 \pm 3.8	3.1
16.65	76.8 \pm 2.6	2.8

Table 2. Intra-day and inter-day precision of the spectrophotometric assay in determining the efficacy of SNF472 in inhibiting crystallization of calcium phosphate in human plasma. ^aMean \pm standard error (three within-day assays). ^bMean \pm standard error (three assays in three consecutive days).

The ability to dilute samples with concentrations above the upper limit of the calibration curve was assessed (Fig. 3a). Samples diluted 1/10 and 1/100 in blank plasma displayed similar activity values as control non-diluted samples with the same final concentration, with acceptable precision. Data on the stability of SNF472 in plasma samples after storage for different periods of time and under varying temperature conditions are presented in Fig. 3b–f. Samples containing higher concentrations of SNF472 (IC₈₀ and IC₉₅) were stable after three freeze/thaw cycles. However, significantly lower activities were observed at the IC₃₀ concentration in samples exposed to two and three freeze/thaw cycles (Fig. 3b). PD activity did not change in samples maintained for up to 2 h at room temperature, compared to fresh samples as the control (Fig. 3c). Samples were stable for 4 h at 4 °C at all SNF472 concentrations, as shown in Fig. 3d. In addition, samples with SNF472 concentrations around the IC₅₀ level or above were stable for up to 8 h at 4 °C while only those with concentrations at the IC₈₀ level or above were stable for 24 h under these conditions. Stability of SNF472 spiked in human plasma samples after storage at –20 °C or –80 °C was the last parameter evaluated for assay validation. As shown in Fig. 3e, after four weeks of storage at –20 °C, SNF472 spiked in human plasma remained stable at IC₃₀ or higher. Results obtained with samples stored at –80 °C for up to 48 weeks are shown in Fig. 3f. We observed no significant influence of the time of storage at this low temperature on efficacy values.

Preclinical revalidation of the PD assay in rat plasma. The dose-response curve for SNF472 in rat plasma is shown in Fig. 4a. The linear response of inhibition of calcium phosphate crystals is presented as dashed lines, and observed from 1 up to 10 μM SNF472 ($R^2 = 0.96$). As observed in Fig. 4b, total levels of SNF472 in plasma samples obtained 20 min after s.c. injection and analyzed via UPLC[®]-MS were proportional to the administered dose and ranged between a mean of 13.6 μM in rats treated with 20 mg/kg SNF472 and 176 μM in rats treated with 100 mg/kg SNF472. Consequently, rat plasma samples were diluted 1/10 with blank plasma prior to the PD assay to fall within or near the linearity range obtained in the dose-response curve (Fig. 4a). PD results in Fig. 4c showed that s.c. administration of SNF472 to rats effectively reduces crystallization potential in plasma. In addition, inhibition of crystallization was increased in proportion to the SNF472 concentration found in plasma. Table 3 presents the mean SNF472 levels and mean inhibition of crystallization values obtained from the PD assay for each dose administered to rats. Good correlation was observed among doses, plasma levels and crystallization inhibition.

Implementation of the PD assay in HD patients. As shown in Fig. 5a, plasma obtained from non-dialyzed healthy volunteers and HD patients (pre- and post-dialysis) did not present significant differences in crystallization rate. Data obtained on inhibition of crystallization after *in vitro* addition of SNF472 at final concentrations of 0.77, 1.17, 2.12, 5.59 and 16.65 μM into plasma samples are presented in Fig. 5b. Addition of SNF472 to plasma obtained from non-dialyzed volunteers as well as pre-dialysis and post-dialysis patients reduced the crystallization rate in a concentration-dependent manner (maximum inhibition of 85%, 88% and 78%, respectively). SNF472 suppressed plasma crystallization to a higher extent in healthy volunteers than HD patients at concentrations lower than 5 μM . At higher SNF472 concentrations, similar maximum inhibition rates were estimated in plasma samples from non-dialyzed volunteers and pre-dialysis patients while inhibition in samples from post-dialysis patients was significantly lower.

Discussion

CVC, a prevalent problem in CKD, is associated with high risk of adverse cardiovascular events and death³⁸. Determination of a combination of biomarkers that can be clinically used as a predictor of cardiovascular risk and concomitant therapy for CKD patients is therefore a topic of significant research interest. However, clinical implementation of these markers is limited in some cases, given the need to standardize and validate assay reproducibility. Moreover, clinical applicability of the current cardiovascular biomarkers is more focused on risk of calcification than used as a guide to therapy³⁹. Here, we have presented a rapid, repeatable and reproducible *in vitro*/ *ex vivo* spectrophotometric assay that facilitates evaluation of the activities of potential calcification inhibitors

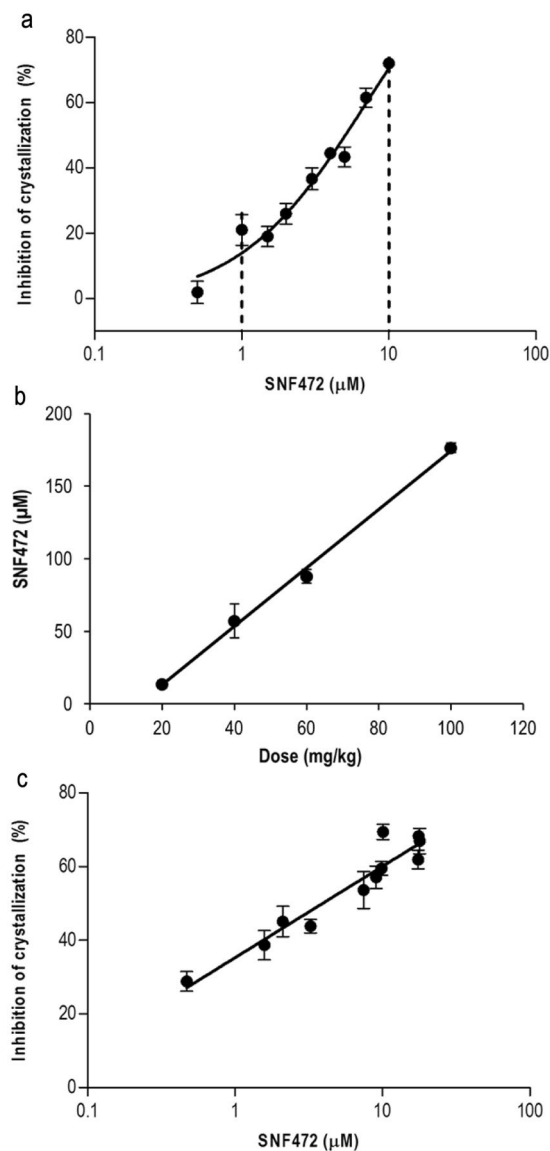


Figure 4. Preclinical validation of the efficacy of crystallization inhibition in rat plasma samples with different concentrations of SNF472 added *in vitro* or *in vivo* and SNF472 plasma levels after 20 min of subcutaneous administration. **(a)** Dose–response curve of the PD assay after *in vitro* addition of SNF472 to rat plasma samples in the range of 0.5–10 μM . Dashed lines represent the interval where inhibition of HAP crystallization is linear in relation to the SNF472 concentration. Results are presented as means \pm SEM, $n = 8$. **(b)** SNF472 levels analyzed using UPLC[®]-MS in rat plasma samples obtained 20 min after subcutaneous administration. Results are presented as means \pm SEM, $n = 3$. **(c)** Efficacy of SNF472 subcutaneously administered to rats in inhibiting crystallization. Results are presented as means \pm SEM, $n = 6$.

Dose (mg/kg)	SNF472 ^a (μM)	Inhibition of crystallization (%)
0	<LLOQ	0.0 \pm 1.9
20	13.6 \pm 2.8	37.5 \pm 2.6
40	57.2 \pm 11.6	44.4 \pm 5.3
60	87.8 \pm 4.8	56.8 \pm 2.0
100	176.4 \pm 3.3	65.7 \pm 1.6

Table 3. Inhibition of rat plasma crystallization rate by SNF472 at four different doses quantified after 20 min of subcutaneous administration. ^aMean \pm SEM (six replicates).

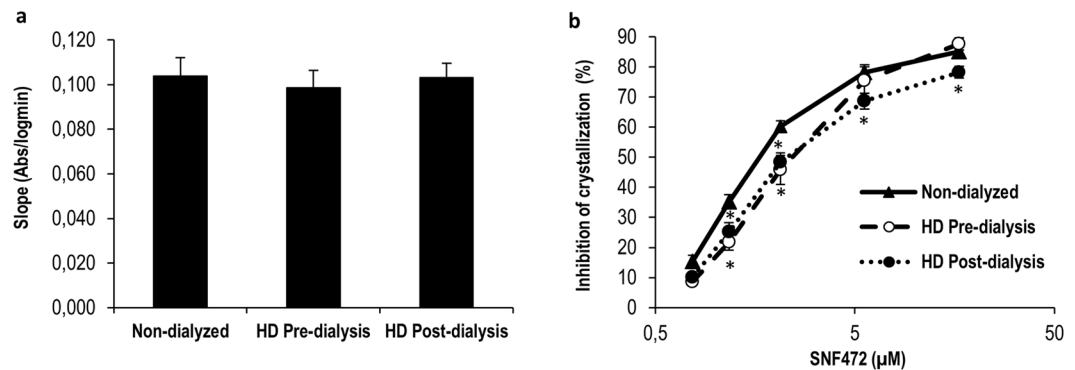


Figure 5. Crystallization potential in blood plasma from pre- and post- dialysis patients and non-dialyzed volunteers before and after *in vitro* addition of SNF472. **(a)** Slopes obtained as a plot of absorbance versus logarithm of time between 6 and 24 minutes. Results are presented as means \pm SEM (13 non-dialyzed volunteers and 12 HD patients). **(b)** Dose-response curve of inhibition of crystallization after *in vitro* addition of SNF472 at final concentrations of 0.77, 1.17, 2.12, 5.59, 16.65 μ M into plasma. Results are presented as means \pm SEM (13 non-dialyzed and 12 HD patients). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. (*) significant differences vs. non-dialyzed healthy volunteers.

of calcium phosphate crystallization in human plasma samples. Our results confirmed the effectiveness of physicochemical inhibitors that target the crystal formation process, such as bisphosphonates^{40,41}, pyrophosphate⁴² and phytate^{27–29} as potential treatments to prevent soft tissue calcification. These are compounds with structural similarities (polyphosphates) that impede further progression of crystallization by binding to HAP crystals and inhibiting vascular calcification. Among the inhibitors tested, SNF472 (an i.v. formulation of phytate) showed the highest potency in inhibiting formation of calcium phosphate crystals in plasma samples ($IC_{50} = 2.12 \mu$ M). Bisphosphonates and pyrophosphate exhibited IC_{50} values that were in the micromolar range (5.13 and 25.97 μ M, respectively), but higher than phytate. These results are consistent with previous studies in which bisphosphonates (non-hydrolysable analogs of pyrophosphate) showed higher efficiency in inhibiting crystallization than pyrophosphate⁴³. Moreover, the different crystallization inhibition rates between polyphosphates may be related to the number of phosphates in the chemical structure. While phytate contains six phosphate groups, both bisphosphonates and pyrophosphate contain two groups. Fetuin-A, a well-known circulating serum glycoprotein and potent systemic calcification inhibitor, exhibited lower potency in inhibiting calcium phosphate crystals in the *in vitro* assay (IC_{50} of 545.80 μ M). The different inhibitory activities obtained with polyphosphates and fetuin-A may be explained by the fact that polyphosphates present higher binding affinity in the first steps of calcium phosphate formation, while fetuin-A interferes with later steps of the process, including the formation of colloidal (calciprotein) particles, CPP^{44,45}. Citrate does not significantly bind the HAP crystals, but rather chelates calcium. Therefore, greater amounts of this compound are required to start inhibiting crystal formation (IC_{50} 8,000-fold higher than phytate) under these *in vitro* supersaturated calcium conditions. The fact that the calcium concentration is almost 10-fold that of phosphate might explain this lower efficacy shown by citrate. However, it must be noted that the assay is performed in plasma obtained with EDTA, which in fact is chelating part of the added calcium and this might be the reason why calcium concentration had to be pushed so high in order to induce crystallization. Although STS also has the ability to bind free calcium, it is not a strong calcium chelator. In accordance with previously reported *in vitro* observations, we confirm that free calcium is only slightly affected by STS suggesting that STS inhibits vascular calcification at the millimolar range through different mechanisms from both calcium complexation and calcium phosphate crystallization inhibition^{46–48}. These collective findings support the utility of our assay as a novel and rapid predictor of crystallization inhibitor activity. This is an important achievement because currently available assays³¹ are not appropriate for use with anionic crystallization inhibitors, such as polyphosphates, since cationic buffers (HEPES) interact with the negative charges of the inhibitors and impede their normal action. Our assay has been optimized for use with NaCl as the matrix and relies on the plasma and phosphate solution to maintain pH near 7.40, facilitating anionic inhibitor activity. Table 4 compares this novel method to those previously developed and that were properly reviewed by Pasch³².

In view of the efficacy shown by SNF472 and its current development for treatment of CVC and calciphylaxis in ESRD patients, we validated the utility of our assay in obtaining PD clinical measurements for this compound. The linear portion of the calibration curve nearly corresponded to the correct working range (SNF472 $> 1.5 \mu$ M) at low inhibitor concentrations while at concentrations higher than 4 μ M, efficacy reached a plateau and coefficient of variation (CV) was still lower than 20%. Similarly, intra-day precision experiments showed that this *in vitro/ex vivo* assay is repeatable with SNF472 concentrations at the IC_{30} value (1.17 μ M) or above. In contrast, analysis of inter-day precision indicated that the PD assay is reproducible when inhibitor concentrations are nearly at IC_{50} or higher (2.12 μ M). The high variability at low SNF472 concentrations can be explained by the steep response generated by the compound (Hill slope > 1), which makes assessment of its activity below IC_{50} difficult. This is not expected to be a problem, as the final therapeutic levels in humans are expected to be around 14 μ M (at T_{max} after intravenous infusion), and therefore PD activity is within the plateau interval where the assay is highly reproducible. If required, SNF472-containing plasma samples can be diluted up to 100-fold in

	CPP-fetuin-A-test (reviewed in Pasch 2016)	T ₅₀ -test (reviewed in Pasch 2016)	PD-test
Analytical signal	Changes in Fetuin-A concentration (mg/l)	T ₅₀ : time of transformation from primary CPPs to secondary CPPs (min)	% Calcium phosphate crystallization inhibition based on speed of crystallization
Analytical technique	Ultracentrifugation (16000 × g) and protein quantification	Nephelometry	Spectrophotometry (turbidimetry)
Particles formed	CPPs	CPPs	Calcium phosphate crystals (no protein content, no CPPs)
Temperature	4 °C	37 °C	Room temperature
Matrix	Serum	Serum	Plasma
Time	120 min (Ultracentrifugation) 240 min (protein quantification)	600 min	30 min
Agitation	No Agitation	No agitation	Orbital plate shaker at 750 rpm
Media	—	140 mM NaCl	150 mM NaCl
		10 mM calcium	12.5 mM calcium
		6 mM phosphate	1.5 mM phosphate
		50 mM HEPES buffer	pH = 7.4
		pH = 7.4	
Modification of test result	Human (<i>in vivo</i>):	Human (<i>in vivo</i>):	
	Plasma exchange	HD and hemodiafiltration (–)	
	Cinacalcet	Magnesium Perorally (+)	
	Parathyroidectomy		
	Intradialytic STS		
	HD		
		Human (<i>in vitro</i>):	Human (<i>in vitro</i>):
		Magnesium (+)	SNF472 (+)
		Calcium (–)	Ibandronate (+)
		Phosphate (–)	Pamidronate (+)
		PPi (–)	PPi (+)
		Fetuin-A (+)	Fetuin-A (+)
		Albumin (+)	Citrate (+)
		Lysozyme (–)	STS (+)
		Gelatin (–)	
		Bicarbonate (+)	
		Animal (<i>in vivo</i>):	Animal (<i>in vivo</i>):
		Fetuin-A deficient mice (–)	SNF472 (+)

Table 4. Comparison of the currently available methods to test blood calcification propensity. (+) Delay/decrease and (–) increase of the measure.

blank plasma to obtain values in the linear range of the assay. In terms of the stability, plasma samples containing SNF472 could be maintained at 4 °C between blood collection and plasma separation. Plasma samples could be successfully frozen at –80 °C over a long storage period (up to one year) and thawed samples maintained at 4 °C for a maximum of 4 h before analysis. The parameters obtained for samples containing SNF472 may be extrapolated to samples containing other polyphosphates.

The validity of the test was confirmed in rat plasma, both *in vitro* and *ex vivo*, as well as in human plasma *ex vivo*. The addition of SNF472 to rat plasma samples reduced the HAP crystallization rate in a concentration-dependent manner up to 80%. Moreover, SNF472 administered subcutaneously to rats suppressed the *ex vivo* HAP crystallization potential of plasma up to 70%. This reduction was dose- and concentration-dependent. Therefore, the plasma concentration of SNF472 reached following s.c. administration has the same maximum efficacy as that *in vitro*, highlighting the utility of our novel PD assay in human studies. Additional non-clinical studies linking the PD assay results with inhibition of cardiovascular tissue calcification should confirm this potential association *in vivo*.

On the other hand, application of the assay to plasma samples obtained from healthy, non-dialyzed volunteers and HD patients revealed no significant differences between the basal plasma crystallization potential of patient and volunteer groups, suggesting that *in vitro* supersaturated conditions lead to loss in sensitivity of the method. This is a significant difference between our new method and the assay previously developed by Pasch *et al.*^{31,32}, which could differentiate the calcification propensity between HD patients and controls. The reason for this discrepancy may lie in the supersaturated calcium and phosphate concentrations used in the current assay. In these conditions, the calcium phosphate crystallization is forced to an extent that higher endogenous calcium or phosphate concentrations might not interfere. Thus, the novelty of our assay relies on its utility in testing the effects of

inhibitors on crystallization and comparing their potencies. In this instance, after *in vitro* addition of SNF472 to blood of controls and HD patients, the *in vitro* concentrations required to normalize crystallization potential were higher in HD patients than healthy volunteers, highlighting slight resistance of the blood of HD patients to the inhibitory effects of SNF472, especially at low concentrations. However, maximum inhibition of crystallization (70–80%) could also be achieved in these patients.

In conclusion, we have developed a novel and rapid (30 min) assay to determine the *in vitro/ex vivo* inhibition potential of calcium phosphate crystallization inhibitors and validated its efficacy in rat and human plasma samples. Since evaluation of the impact of drug candidates on vascular calcification progression requires long-term clinical trials with hundreds of patients⁴⁹, leading to high research costs, this assay may be effectively employed as a screening tool for rapid evaluation of potential efficacy in suppression of vascular calcification progression. Among the inhibitors tested in the current study, SNF472 (or phytate) was the most powerful, showing 2- and 12-fold higher potency than bisphosphonates and pyrophosphate, respectively. Further validation of results obtained with SNF472 in human samples highlights the potential utility of this assay as a PD measurement tool in the clinical setting.

Materials and Methods

A spectrophotometric pharmacodynamics (PD) assay for *in vitro/ex vivo* determination of crystallization potential in plasma. The spectrophotometric assay was performed in 96-well plates. Plasma (80 μ L) was centrifuged at 10,000 g for 30 min at room temperature and subsequently mixed with 60 μ L of 5 mM hydrogen phosphate and 60 μ L of 41.67 mM calcium to attain final concentrations of 1.5 mM phosphate and 12.5 mM calcium, respectively. All reagent solutions were filtered and pH adjusted to 7.4. Crystallization of calcium phosphate was monitored spectrophotometrically for 30 min at room temperature via increase in absorbance at 550 nm using the Biotek Powerwave XS Microplate spectrophotometer. The plate was incubated at room temperature in an orbital shaker (750 rpm) and absorbance measured every 3 min. Plasma crystallization potential was assessed based on slope measurement in the linear range between 6 and 24 min from plots of increase in absorbance versus logarithm of time.

Validation of the spectrophotometric PD assay in human plasma. *Sample collection.* This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki. All procedures involving human subjects/patients were approved by the Ethical Committee of Clinical Investigation of the Balearic Islands (IB 2245/14 PI). Participants were informed of the purpose and characteristics of the study before providing written consent.

Venous blood samples were obtained from the antecubital vein of healthy volunteers under fasting conditions and collected in tubes with K₂EDTA as anticoagulant. Plasma was obtained after centrifugation of blood at 3,500 rpm at 4 °C for 10 min and mixed to form a pool.

Intra-day and inter-day precision under repeatability and reproducibility conditions. The spectrophotometric PD assay was repeated with three runs in the same day (intra-day precision) and three consecutive days (inter-day precision) in a 96-well plate (12 replicates per run). Intra-day precision refers to the repeatability of the assay while inter-day precision indicates between-day precision (reproducibility). Both parameters were evaluated by determining the within-day and between-day average coefficients of variation (CV) of the slopes obtained.

Inhibition of HAP crystallization in plasma samples. The efficacy of different calcification inhibitors in preventing *in vitro* formation of calcium phosphate crystals was assessed in human plasma samples using the spectrophotometric PD assay. Inhibition of crystallization was measured by comparing the slopes of the control sample (blank) with those of samples containing the crystallization inhibitor as shown below:

$$\% \text{ Inhibition of crystallization} = \frac{\text{slope}(\text{blank plasma}) - \text{slope}(\text{inhibitor})}{\text{slope}(\text{blank plasma})} \cdot 100 \quad (1)$$

Human plasma was spiked with increasing concentrations of inhibitors. Solutions of inhibitors were prepared by dilution in 0.15 M NaCl and pH adjusted to 7.40. The inhibitors and final concentration ranges tested in plasma were as follows: SNF472 (0–30 μ M), pyrophosphate (PPi, 0–200 μ M), ibandronate (0–50 μ M), pamidronate (0–50 μ M), STS (0–100000 μ M), citrate (0–25000 μ M) and fetuin-A (0–208 μ M). To compare the potency of inhibition, half-maximal inhibition concentrations (IC₅₀) were calculated using GraphPad Prism 5.0 software.

Validation of the spectrophotometric PD assay in determining the efficacy of SNF472 on inhibition of crystallization in human plasma. The spectrophotometric method was validated through evaluation of linearity, intra- and inter-day precision, integrity of dilution and stability of plasma samples spiked with SNF472 under long-term (–20 and –80 °C) and benchtop (room temperature and 4 °C) conditions and following freeze/thaw cycles.

Linearity was evaluated using solutions of SNF472 to attain final concentrations of 0.5, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.0, 10 and 30 μ M in plasma. The calibration curve generated in the linearity assay was applied to calculate the lower limit of quantification (LLOQ), IC₃₀, IC₅₀, IC₈₀ and IC₉₅ values. LLOQ was determined using Eq. (2) and IC₃₀, IC₅₀, IC₈₀ and IC₉₅ values calculated with GraphPad Prism 5.0 software.

$$\text{LLOQ} = 10 \times \frac{\text{Standard deviation of the response}}{\text{Slope}} \quad (2)$$

The assay was repeated with three runs per day for three consecutive days (12 replicates for LLOQ, EC₃₀, EC₅₀, EC₈₀ and EC₉₅ of SNF472 in plasma per run) to assess intra-day and inter-day precision, respectively, under

repeatability and reproducibility conditions. Repeatability and reproducibility of the PD assay were evaluated by determining intra- and inter-day CV.

The ability to dilute samples that were originally above the upper limit of the calibration curve was studied by diluting SNF472-concentrated samples in blank plasma. LLOQ, EC₃₀, EC₅₀, EC₈₀ and EC₉₅ values of SNF472 in plasma per dilution factor (10x and 100x) were assayed in one run with six replicates.

The stability of SNF472 in plasma samples was evaluated at final LLOQ, IC₃₀, IC₅₀, IC₈₀ and IC₉₅ concentrations in plasma. Plasma samples were immediately assayed in one run with six replicates before and after storage for different time-periods and temperature conditions. For long-term storage, plasma samples were frozen at -20 or -80 °C after SNF472 spiking and stored between 2 weeks and 12 months. In terms of benchtop stability, plasma samples were stored on the bench at room temperature between 1 and 8 h or at 4 °C between 2 and 24 h. For freeze/thaw cycles, plasma samples were frozen at -80 °C, thawed and refrozen up to three times in consecutive days. Once completely thawed, plasma samples were used for assay or refrozen for a further freeze/thaw cycle.

Preclinical revalidation of the PD assay in rat plasma samples. A preliminary assay was performed *in vitro* by adding increasing concentrations of SNF472 to blank rat plasma to obtain the linear range for inhibition of crystallization and calculate LLOQ and IC₅₀ values. Blood from three Sprague-Dawley male rats (282 ± 4 g, Charles River Laboratories, France) was collected in tubes with K₂EDTA as anticoagulant. Plasma was obtained after centrifugation at 3,500 rpm for 10 min at 4 °C and mixed to obtain a pool. Nine SNF472 concentrations were prepared within a range of 0.5 to 10 μ M.

In the second assay, five groups of three male Sprague-Dawley rats (314 ± 4 g, Charles River Laboratories, France) were subcutaneously administered 0 (saline), 20, 40, 60 or 100 mg/kg SNF472. Blood was collected after 20 min in tubes with K₂EDTA, and plasma separated via centrifugation at 3,500 rpm for 10 min at 4 °C. The crystallization potential of plasma samples was measured using the spectrophotometric PD assay.

In parallel, SNF472 levels in the same rat plasma samples were determined by means of phytic acid quantification. Phytic acid was quantified via LC-MS using a method previously described by Tur *et al.*⁵⁰.

Implementation of the PD assay in HD patients. *Sample collection.* Experiments were conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki. All procedures involving human subjects/patients were approved by the Ethical Committee of Clinical Investigation of the Balearic Islands (IB 2245/14 PI). All participants were informed of the purpose and characteristics of the study before providing written consent.

A total of 13 healthy volunteers and 12 ESRD patients undergoing HD treatment in Hospital Son Llàtzer (Palma, Spain) participated in the study. One (volunteers) or two (HD patients) venous blood samples were obtained from the antecubital vein (volunteers) or the afferent line (using the sample port in HD patients), and collected in tubes with K₂EDTA as anticoagulant. Two blood samples were obtained from HD patients before and after dialysis treatment. Blood was centrifuged at 3,500 rpm at 4 °C for 10 min to separate plasma.

Assessment of crystallization potential in plasma samples obtained from healthy volunteers and HD patients. The PD assay was performed on blank plasma samples and after *in vitro* addition of variable concentrations of SNF472 to attain LLOQ, IC₃₀, IC₅₀, IC₈₀ and IC₉₅ values of SNF472 in plasma.

Statistical analysis. Results are expressed as means \pm SEM. Analyses were performed using the statistical software package GraphPad Prism 5.0. Statistical significance of data was analyzed using two-way ANOVA. In cases where significant effects were observed, a post-hoc Bonferroni test was applied. *P*-values < 0.05 were considered statistically significant.

References

- Jahnen-Dechent, W., Heiss, A., Schafer, C. & Ketteler, M. Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circ Res* **108**, 1494–1509, doi:10.1161/circresaha.110.234260 (2011).
- Sandim, K., Hegbrant, J. & Kloof, L. A theoretical investigation of the supersaturation of basic calcium phosphate in serum of dialysis patients. *Journal of applied biomaterials & biomechanics: JABB* **4**, 80–86 (2006).
- Ketteler, M. *et al.* Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet* **361**, 827–833, doi:10.1016/S0140-6736(03)12710-9 (2003).
- Rennenberg, R. J. *et al.* Calcium scores and matrix Gla protein levels: association with vitamin K status. *Eur J Clin Invest* **40**, 344–349, doi:10.1111/j.1365-2362.2010.02275.x (2010).
- Schurgers, L. J. *et al.* The circulating inactive form of matrix gla protein is a surrogate marker for vascular calcification in chronic kidney disease: a preliminary report. *Clin J Am Soc Nephrol* **5**, 568–575, doi:10.2215/cjn.07081009 (2010).
- Mizobuchi, M., Towler, D. & Slatopolsky, E. Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **20**, 1453–1464, doi:10.1681/asn.2008070692 (2009).
- London, G. M. *et al.* Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol. Dial. Transplant.* **18**, 1731–1740, doi:10.1093/ndt/gfg414 (2003).
- Araya, C. E., Fennell, R. S., Neiberger, R. E. & Dharnidharka, V. R. Sodium thiosulfate treatment for calcific uremic arteriopathy in children and young adults. *Clin J Am Soc Nephrol* **1**, 1161–1166, doi:10.2215/CJN.01520506 (2006).
- Adrogue, H. J., Frazier, M. R., Zeluff, B. & Suki, W. N. Systemic calciphylaxis revisited. *Am J Nephrol* **1**, 177–183 (1981).
- Kent, R. B. 3rd & Lyerly, R. T. Systemic calciphylaxis. *South Med J* **87**, 278–281 (1994).
- Janigan, D. T., Hirsch, D. J., Klassen, G. A. & MacDonald, A. S. Calcified subcutaneous arterioles with infarcts of the subcutis and skin (“calciphylaxis”) in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* **35**, 588–597, doi:10.1016/S0272-6386(00)70003-5 (2000).
- Sowers, K. M. & Hayden, M. R. Calcific uremic arteriopathy: pathophysiology, reactive oxygen species and therapeutic approaches. *Oxid Med Cell Longev* **3**, 109–121, doi:10.4161/oxim.3.2.11354 (2010).
- Mazhar, A. R. *et al.* Risk factors and mortality associated with calciphylaxis in end-stage renal disease. *Kidney Int* **60**, 324–332, doi:10.1046/j.1523-1755.2001.00803.x (2001).
- Chertow, G. M., Burke, S. K. & Raggi, P. Sevelamer attenuates the progression of coronary and aortic calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int.* **62**, 245–252, doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00434.x (2002).

15. Raggi, P. *et al.* The ADVANCE study: a randomized study to evaluate the effects of cinacalcet plus low-dose vitamin D on vascular calcification in patients on hemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **26**, 1327–1339, doi:10.1093/ndt/gfq725 (2011).
16. Ariyoshi, T., Eishi, K., Sakamoto, I., Matsukuma, S. & Odate, T. Effect of etidronic acid on arterial calcification in dialysis patients. *Clin Drug Investig* **26**, 215–222, doi:10.2165/00044011-200626040-00006 (2006).
17. Hashiba, H., Aizawa, S., Tamura, K. & Kogo, H. Inhibition of the progression of aortic calcification by etidronate treatment in hemodialysis patients: long-term effects. *Ther Apher Dial* **10**, 59–64, doi:10.1111/j.1744-9987.2006.00345.x (2006).
18. Torregrosa, J. V. *et al.* Successful treatment of calcific uraemic arteriopathy with bisphosphonates. *Nefrologia: publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia* **32**, 329–334, doi:10.3265/Nefrologia.pre2012.Jan.11137 (2012).
19. Chan, M. R., Yevzlin, A. S., Hinshaw, M. & Jaffery, J. B. Calciphylaxis responsive to lanthanum carbonate (FOSRENOL) therapy. *WMJ* **107**, 335–338, doi:10.1053/j.ajkd.2008.02.049 (2008).
20. Brucculeri, M., Cheigh, J., Bauer, G. & Serur, D. Long-term intravenous sodium thiosulfate in the treatment of a patient with calciphylaxis. *Semin Dial* **18**, 431–434, doi:10.1111/j.1525-139X.2005.00082.x (2005).
21. Cicone, J. S., Petronis, J. B., Embert, C. D. & Spector, D. A. Successful treatment of calciphylaxis with intravenous sodium thiosulfate. *Am. J. Kidney Dis.* **43**, 1104–1108, doi:10.1053/j.ajkd.2004.03.018 (2004).
22. Grases, F. *et al.* Urinary phytate in calcium oxalate stone formers and healthy people—dietary effects on phytate excretion. *Scand. J. Urol. Nephrol.* **34**, 162–164, doi:10.1080/003655900750016526 (2000).
23. Curhan, G. C., Willett, W. C., Knight, E. L. & Stampfer, M. J. Dietary factors and the risk of incident kidney stones in younger women: Nurses' Health Study II. *Arch Intern Med* **164**, 885–891, doi:10.1001/archinte.164.8.885 (2004).
24. Conte, A. *et al.* Urinary lithogen risk test: usefulness in the evaluation of renal lithiasis treatment using crystallization inhibitors (citrate and phytate). *Arch Esp Urol* **52**, 305–310 (1999).
25. Lopez-Gonzalez, A. A. *et al.* Phytate (myo-inositol hexaphosphate) and risk factors for osteoporosis. *J Med Food* **11**, 747–752, doi:10.1089/jmf.2008.0087 (2008).
26. Lopez-Gonzalez, A. A. *et al.* Phytate levels and bone parameters: a retrospective pilot clinical trial. *Front Biosci (Elite Ed)* **2**, 1093–1098, doi:10.2741/E167 (2010).
27. Grases, F. *et al.* Phytate (Myo-inositol hexakisphosphate) inhibits cardiovascular calcifications in rats. *Front. Biosci.* **11**, 136–142, doi:10.2741/1786 (2006).
28. Grases, F. *et al.* Effect of crystallization inhibitors on vascular calcifications induced by vitamin D: a pilot study in Sprague-Dawley rats. *Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society* **71**, 1152–1156, doi:10.1253/circj.71.1152 (2007).
29. Van den Berg, C. J., Hill, L. F. & Stanbury, S. W. Inositol phosphates and phytic acid as inhibitors of biological calcification in the rat. *Clin. Sci.* **43**, 377–383, doi:10.1042/cs0430377 (1972).
30. Grases, F. *et al.* Phytate reduces age-related cardiovascular calcification. *Front. Biosci.* **13**, 7115–7122, doi:10.2741/3214 (2008).
31. Pasch, A. *et al.* Nanoparticle-based test measures overall propensity for calcification in serum. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**, 1744–1752, doi:10.1681/ASN.2012030240 (2012).
32. Pasch, A. Novel assessments of systemic calcification propensity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **25**, 278–284, doi:10.1097/mnh.0000000000000237 (2016).
33. Keyzer, C. A. *et al.* Calcification Propensity and Survival among Renal Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol* **27**, 239–248, doi:10.1681/asn.2014070670 (2016).
34. Smith, E. R. *et al.* Serum calcification propensity predicts all-cause mortality in predialysis CKD. *J Am Soc Nephrol* **25**, 339–348, doi:10.1681/asn.2013060635 (2014).
35. Riser, B. L. *et al.* Daily peritoneal administration of sodium pyrophosphate in a dialysis solution prevents the development of vascular calcification in a mouse model of uraemia. *Nephrol Dial Transplant* **26**, 3349–3357, doi:10.1093/ndt/gfr039 (2011).
36. Tamura, K. *et al.* Prevention of aortic calcification by etidronate in the renal failure rat model. *Eur. J. Pharmacol.* **558**, 159–166, doi:10.1016/j.ejphar.2006.12.006 (2007).
37. Hashiba, H., Aizawa, S., Tamura, K., Shigematsu, T. & Kogo, H. Inhibitory effects of etidronate on the progression of vascular calcification in hemodialysis patients. *Ther Apher Dial* **8**, 241–247, doi:10.1111/j.1526-0968.2004.00136.x (2004).
38. Schiffrin, E. L., Lipman, M. L. & Mann, J. F. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation* **116**, 85–97, doi:10.1161/circulationaha.106.678342 (2007).
39. D'Marco, L., Bellasi, A. & Raggi, P. Cardiovascular biomarkers in chronic kidney disease: state of current research and clinical applicability. *Dis Markers* **2015**, 586569, doi:10.1155/2015/586569 (2015).
40. Lomashvili, K. A., Monier-Faugere, M. C., Wang, X., Malluche, H. H. & O'Neill, W. C. Effect of bisphosphonates on vascular calcification and bone metabolism in experimental renal failure. *Kidney Int* **75**, 617–625, doi:10.1038/ki.2008.646 (2009).
41. Price, P. A., Faus, S. A. & Williamson, M. K. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 817–824, doi:10.1161/01.ATV.21.5.817 (2001).
42. Lomashvili, K. A., Cobbs, S., Hennigar, R. A., Hardcastle, K. I. & O'Neill, W. C. Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and osteopontin. *J Am Soc Nephrol* **15**, 1392–1401, doi:10.1097/01.ASN.0000128955.83129.9C (2004).
43. Villa-Belosta, R. & Sorribas, V. Prevention of vascular calcification by polyphosphates and nucleotides—role of ATP. *Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society* **77**, 2145–2151, doi:10.1253/circj.CJ-13-0016 (2013).
44. Heiss, A. *et al.* Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J Biol Chem* **278**, 13333–13341, doi:10.1074/jbc.M210868200 (2003).
45. Westendorf, R., Jahnke-Dechent, W. & Ketteler, M. Vascular Calcification and Fetuin-A Deficiency in Chronic Kidney Disease. *Trends in Cardiovascular Medicine* **17**, 124–128, doi:10.1016/j.tcm.2007.02.005 (2007).
46. O'Neill, W. C. & Hardcastle, K. I. The chemistry of thiosulfate and vascular calcification. *Nephrol. Dial. Transplant.* **27**, 521–526, doi:10.1093/ndt/gfr375 (2012).
47. Pasch, A. *et al.* Sodium thiosulfate prevents vascular calcifications in uremic rats. *Kidney Int.* **74**, 1444–1453, doi:10.1038/ki.2008.455 (2008).
48. Asplin, J. R. *et al.* Thiosulfate reduces calcium phosphate nephrolithiasis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 1246–1253, doi:10.1681/ASN.2008070754 (2009).
49. Chertow, G. M. *et al.* Effect of cinacalcet on cardiovascular disease in patients undergoing dialysis. *N. Engl. J. Med.* **367**, 2482–2494, doi:10.1056/NEJMoa1205624 (2012).
50. Tur, F. *et al.* Validation of an LC-MS bioanalytical method for quantification of phytate levels in rat, dog and human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **928**, 146–154, doi:10.1016/j.jchromb.2013.03.023 (2013).

Acknowledgements

This work was supported by RETOS COLABORACIÓN RTC-2014-2460-1 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and a grant from CDTI IDI-20150233 co-funded by “Programa Operativo Plurirregional de Crecimiento Inteligente 2014-2020” from “Fondo Europeo de Desarrollo Regional” (FEDER).

Author Contributions

M.D.F. has participated in the design of the study, the performance of laboratory determinations, analysis and interpretation of the data and writing of the article. M.M.P. has participated in the design of the study, the performance of laboratory determinations, analysis and interpretation of the data and writing of the article. M.M.C. has participated in the design of the study, the performance of laboratory determinations, analysis of the data and revision of the article. J.M.B. has participated in the conception and design of the study, interpretation of the data and revision of the article. C.S. has participated in the conception and design of the study, interpretation of the data and writing of the article. J.P. has participated in the conception and design of the study, interpretation of the data and revision of the article. All authors have provided intellectual content of critical importance to the work described and have approved the version to be published.

Additional Information

Competing Interests: M.F., M.M.P., C.S. and J.P. are employees or receive honoraria from Laboratoris Sanifit S.L. J.P. is shareholder at Laboratoris Sanifit S.L., M.M.C. and J.M.B. declare no conflict of interest.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.




Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

RESEARCH PAPER

Mechanism of action of SNF472, a novel calcification inhibitor to treat vascular calcification and calciphylaxis

Joan Perelló^{1,2}  | Miquel D. Ferrer^{1,2} | Maria del Mar Pérez¹ | Nadine Kaesler³ | Vincent M. Brandenburg⁴ | Geert J. Behets⁵ | Patrick C. D'Haese⁵ | Rekha Garg⁶ | Bernat Isern¹ | Alex Gold⁶ | Myles Wolf⁷ | Carolina Salcedo¹

¹Sanifit Therapeutics, Palma, Spain

²University of the Balearic Islands, Palma, Spain

³University Hospital of the RWTH, Aachen, Germany

⁴Rhein-Maas Klinikum, Würselen, Germany

⁵Laboratory of Pathophysiology, Department of Biomedical Sciences, University of Antwerp, Antwerp, Belgium

⁶Sanifit Therapeutics, San Diego, CA, USA

⁷Division of Nephrology, Department of Medicine and Duke Clinical Research Institute, Duke University School of Medicine, Durham, NC, USA

Correspondence

Carolina Salcedo, Sanifit Therapeutics, Parc Bit, Europa Building, 2nd floor, 07121 Palma de Mallorca, Spain.
Email: carolina.salcedo@sanifit.com

Funding information

Sanifit Therapeutics

Background and Purpose: No therapy is approved for vascular calcification or calcific uraemic arteriopathy (calciphylaxis), which increases mortality and morbidity in patients undergoing dialysis. Deposition of hydroxyapatite (HAP) crystals in arterial walls is the common pathophysiologic mechanism. The mechanism of action of SNF472 to reduce HAP deposition in arterial walls was investigated.

Experimental Approach: We examined SNF472 binding features (affinity, release kinetics and antagonism type) for HAP crystals *in vitro*, inhibition of calcification in excised vascular smooth muscle cells from rats and bone parameters in osteoblasts from dogs and rats.

Key Results: SNF472 bound to HAP with affinity (K_D) of 1–10 μM and saturated HAP at 7.6 μM . SNF472 binding was fast (80% within 5 min) and insurmountable. SNF472 inhibited HAP crystal formation from 3.8 μM , with complete inhibition at 30.4 μM . SNF472 chelated free calcium with an EC_{50} of 539 μM . Chelation of free calcium was imperceptible for SNF472 1–10 μM in physiological calcium concentrations. The lowest concentration tested in vascular smooth muscle cells, 1 μM inhibited calcification by 67%. SNF472 showed no deleterious effects on bone mineralization in dogs or in rat osteoblasts.

Conclusion and Implications: These experiments show that SNF472 binds to HAP and inhibits further HAP crystallization. The EC_{50} for chelation of free calcium is 50-fold greater than a maximally effective SNF472 dose, supporting the selectivity of SNF472 for HAP. These findings indicate that SNF472 may have a future role in the treatment of vascular calcification and calcific uraemic arteriopathy in patients undergoing dialysis.

KEYWORDS

calcific uraemic arteriopathy, calciphylaxis, inositol hexaphosphate, IP6, peripheral arterial calcification, SNF472, vascular calcification

1 | INTRODUCTION

Mortality in patients undergoing dialysis is approximately 8 times higher than in the general population (de Jager et al., 2009) and 2–4 times higher than in patients with other chronic conditions such as diabetes, cancer or cardiovascular diseases (United States Renal Data System, 2018). Patients under 80 years of age who are undergoing dialysis live less than one-third as long as age-matched patients not undergoing dialysis (United States Renal Data System, 2018). For example, life expectancy among adults 30–34 years of age is 45.6 years for men and 49.8 years for women in the general population, compared with 14.1 years for men and 12.7 years for women who are undergoing dialysis. Mortality rates are highest in the first year of dialysis (17%) and half of the deaths in patients undergoing dialysis are due to cardiovascular disease (United States Renal Data System, 2018). Conventional therapies for cardiovascular disease such as lipid-lowering drugs do not reduce mortality or morbidity in patients undergoing dialysis (Wanner et al., 2005).

Cardiovascular calcification of the coronary arteries, heart valves or aorta has been identified as a major contributor to increased mortality and morbidity in patients undergoing dialysis (Mizobuchi, Towler, & Slatopolsky, 2009). Progression of cardiovascular calcification, which predicts increased risk of future cardiovascular events and mortality (Budoff et al., 2010; Noordzij et al., 2011), is more aggressive in patients undergoing dialysis than in non-dialysis patients (Sarnak et al., 2003). In patients undergoing dialysis, vascular calcification occurs when calcium and phosphate aggregate into hydroxyapatite crystals and deposit into the media layer of blood vessels, leading to medial calcification (Mönckeberg's medial sclerosis) (Lanzer et al., 2014; Yiu, Callaghan, Sultana, & Bandyopadhyay, 2015). Osteogenic mechanisms also play a role. Some cells and especially vascular smooth muscle cells in the vessels undergo changes into bone and cartilage-like phenotypes and calcify when exposed to elevated calcium and phosphorus (Jono et al., 2000; Yang, Curinga, & Giachelli, 2004).

Calcification of small peripheral arteries can also result in painful, necrotic skin ulcers, known as calciphylaxis or calcific uraemic arteriopathy, a rare disease predominantly observed in the dialysis population with a prevalence of 1–4% (Angelis, Wong, Myers, & Wong, 1997; Budisavljevic, Cheek, & Ploth, 1996; Nigwekar, Thadhani, & Brandenburg, 2018). One-year mortality for calcific uraemic arteriopathy has been reported to be between 45% and 80% and ulcerated lesions are associated with higher mortality than non-ulcerated lesions (Nigwekar et al., 2018).

There are several exogenously administered compounds that may affect vascular calcification, including bisphosphonates, sodium thiosulfate, vitamin K, phosphate binders and calcimimetics (O'Neill & Lomashvili, 2010). None of these selectively target hydroxyapatite crystal formation and none have been approved for the treatment of cardiovascular calcification or calcific uraemic arteriopathy. Myo-inositol hexaphosphate (IP₆, phytate), a naturally

What is already known

- Central and peripheral arterial calcification contribute to increased mortality and morbidity in patients undergoing dialysis.
- No therapy is approved for the treatment of vascular calcification or calcific uraemic arteriopathy (calciphylaxis).

What does this study add

- This series of experiments examined the mechanism of action of the calcification inhibitor, SNF472.
- SNF472, 1–10 μ M, selectively inhibited calcification by binding to hydroxyapatite crystals without chelating free calcium.

What is the clinical significance

- These findings support the clinical investigation of SNF472 for the treatment of vascular calcification.

occurring substance in foods with high fibre content, binds to hydroxyapatite crystals and can thus prevent calcification (Cao, Dong, & Chen, 2011; Chen, Chen, Ma, Cao, & Chen, 2007; Grases et al., 2000; Grases et al., 2001; Grases, Simonet, Prieto, & March, 2001; López-González et al., 2013; Muñoz, López-Mesas, & Valiente, 2010; Muñoz & Valiente, 2003). While phytate provides natural protection against cardiovascular calcification related to aging, phytate is not absorbed well from dietary sources and parenteral administration is required to achieve supraphysiologic levels with a potential to treat cardiovascular calcification (Joubert, Ketteler, Salcedo, & Perello, 2016). SNF472, the hexasodium salt of phytate, is being developed as an intravenously administered form of phytate for clinical use. Results from phase 1 clinical studies (Perelló et al., 2018; Salcedo et al., 2019) and phase 2 clinical studies (Brandenburg et al., 2019; Raggi et al., 2020) support the continued investigation of SNF472 in patients receiving dialysis with either cardiovascular calcification or calcific uraemic arteriopathy. In a previous report, we used *in vivo* animal models to show that SNF472 inhibited development of cardiovascular calcification by 60–70% in non-uraemic rats and by 80% in uraemic rats and SNF472 completely inhibited further progression of cardiovascular calcification in rats with established cardiovascular calcification (Ferrer et al., 2018). This report describes a series of *in vitro* and *in vivo* experiments conducted to examine the mechanism of action of SNF472.

2 | METHODS

For each experiment, we prepared SNF472 using lot DS1 (Azopharma, Miramar, FL, USA) for non-clinical use. To quantify bound SNF472 to hydroxyapatite, we recovered hydroxyapatite via filtration and dissolved it in 0.08% HNO₃ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). We transferred the solution to a chromatographic column containing an AG 1-X8 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) anion exchange resin to separate SNF472 from inorganic phosphate (Grases, Perelló, Isern, & Prieto, 2004). We quantified SNF472 using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES; Optima 5300DV spectrometer, Perkin-Elmer SL, Waltham, MA, USA). Concentrations of SNF472 for each experiment are reported in μM ($660 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1} = 1 \mu\text{M}$). Animal studies are reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Kilkenny et al., 2010) and with the recommendations made by the *British Journal of Pharmacology*.

2.1 | Affinity of SNF472 to hydroxyapatite

To examine affinity of SNF472 for hydroxyapatite, we incubated different hydroxyapatite concentrations (25, 75, 130 and 300 mg) in a final volume of 400 ml each of 0.05-M Tris buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), pH 7.4, for 8 h at 37°C with constant agitation using a magnetic stirrer in the presence of SNF472 at 0.076, 0.15, 0.76, 1.5, 7.6 and 15 μM . We quantified the amount of SNF472 attached to hydroxyapatite for each combination. We prepared curves for SNF472 bound to hydroxyapatite with a non-linear fitting program (GraphPad Prism; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The values were adjusted with a one-site binding hyperbola analysis to calculate K_D (SNF472 concentration that binds to half the hydroxyapatite at equilibrium) and B_{max} (maximum adsorption to hydroxyapatite) for each hydroxyapatite concentration, with the following equation:

$$Y = \frac{B_{\text{max}} \times X}{(K_D + X)}$$

We performed each experiment for binding of SNF472 to hydroxyapatite in duplicate.

2.2 | Release kinetics of SNF472 from hydroxyapatite

To examine release kinetics of SNF472, we incubated hydroxyapatite 130 mg in 400 ml of 0.05-M Tris buffer, pH 7.4, at 37°C with constant agitation using a magnetic stirrer, with SNF472 at 7.6 μM for 2 h. After this period, we recovered hydroxyapatite by filtration and started a new incubation with the recovered material in fresh 0.05-M Tris buffer at pH 7.4 for 15 or 30 min, 1, 2, 4 or 8 h and 1, 2, 3 or 7 days. At each time point, we measured the amount of remaining SNF472 bound to hydroxyapatite. We performed each experiment for release kinetics in triplicate.

2.3 | SNF472 inhibition of hydroxyapatite crystal formation

To examine inhibition of hydroxyapatite crystal formation, we induced hydroxyapatite crystal formation using physiological calcium (2.5-mM CaCl₂, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) and supraphysiologic phosphate (5.5-mM Na₂HPO₄·12H₂O, Panreac Quimica, Barcelona, Spain) concentrations in 0.15-M NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) at pH 7.4 (Grases et al., 2008). We measured hydroxyapatite crystal formation by turbidimetry in 12-well plates by reading absorbance at 550 nm every 75 s, with constant agitation in a plate spectrophotometer (PowerWave XS; Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) for 4 h. We incubated each solution for 4 h at room temperature with SNF472 concentrations of 0 (control), 0.19, 0.38, 0.76, 1.14, 1.52, 3.79, 7.58, 11.36, 15.15, 30.3, 45.5 and 60.6 μM , adjusted at pH 7.4. For each crystallization curve, two linear equations were obtained: one line representing the basal absorbance with a slope near to 0 and a second line representing the maximum slope of increase in absorbance. Induction time for each sample was calculated as the intersection between these two lines (basal absorbance and maximum slope of increase in absorbance), thus representing the time needed for hydroxyapatite crystals to form in these conditions. The induction time for each SNF472 concentration was measured and compared with the control induction time. We prepared curves for hydroxyapatite with a non-linear fitting program (GraphPad Prism; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). We performed each experiment for inhibition of hydroxyapatite crystal formation in duplicate.

2.4 | SNF472 inhibition of hydroxyapatite crystallization

To examine inhibition of hydroxyapatite crystallization, we induced hydroxyapatite crystal formation using a physiological concentration of phosphate (1-mM Na₂HPO₄·12H₂O, Panreac Quimica, Barcelona, Spain) and variable concentrations of calcium (1.0- to 6.4-mM CaCl₂, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in adapted synthetic fluid containing 2-mM MgCl₂ (Panreac Quimica, Barcelona, Spain), 8-mM KCl (Panreac Quimica, Barcelona, Spain), 32-mM NaHCO₃ (Panreac Quimica, Barcelona, Spain), 28-mM Na₂CO₃ (Probus, Barcelona, Spain) and 91-mM NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) at pH 7.4. Each solution of phosphate and calcium was incubated for 10 min at room temperature with SNF472 concentrations of 0 (control), 0.76, 1.5, 3.8, 7.6, 22.7 or 30.3 μM . Crystallization was assessed by turbidimetry at 550 nm in 24-well plates in an orbital plate shaker at 300 g. We prepared calcium concentration curves with a non-linear fitting program (GraphPad Prism; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and semi-logarithmic concentration response curves to determine half-maximal effective concentration (EC₅₀). We determined the concentration ratio (CR) from pEC₅₀ in the presence or absence of SNF472. Antagonist potency (pA₂) was defined as the negative logarithm base 10 of the molar concentration of antagonist necessary to double the concentration of agonist needed to elicit the

original submaximal response, determined from the x-axis intercept from a Schild plot with the following equations:

$$CR = \frac{EC'_{50}}{EC_{50}}$$

$$pA_2 = -\log(CR)$$

We expressed pA_2 as mean with 95% confidence interval (CI) and performed each experiment for inhibition of hydroxyapatite crystallization in duplicate.

2.5 | Effect of SNF472 on calcification, apoptosis and gene expression in vascular smooth muscle cells

To examine calcium deposition in vascular smooth muscle cells, we killed Wistar rats (body weight 250–300 g, both sexes) by an overdose of isoflurane and exsanguination. We perfused the thoracic aortas with PBS, excised the aortas, removed the adventitia under a microscope and cut the aortas into rings to produce cell cultures. The control medium was DMEM/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) with 10% fetal calf serum (FCS). We prepared fresh aqueous stock solutions of $CaCl_2$ and Na_2HPO_4 filtered on a 0.22- μ M sterile filter, added calcium ($CaCl_2$ at 3 mM) and phosphate (Na_2HPO_4 at 3 mM) to generate $Ca_3(PO_4)_2$ to initiate calcification and then added nothing, SNF472 (1, 10, 30, or 100 μ M) or sodium thiosulfate (sodium thiosulfate; 25, 50, or 100 mM; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). After 3, 5, 7 and 10 days, we assayed cell cultures for calcium concentration. After 3 and 5 days, we examined cell cultures for apoptosis with TUNEL staining using a cell death detection kit (Roche #11684795910) according to the manufacturer's instructions. Apoptosis was analysed after 3 and 5 days of treatment by TUNEL staining (POD Cell Death Detection Kit; Roche, Basel, Switzerland). Cells were counterstained with DAPI (10 μ g·ml⁻¹; Roche, Basel, Switzerland). Images were taken on a KEYENCE BZ Analyzer microscope. Aortas of rats were harvested in accordance with the German law on animal welfare (Tierschutzgesetz §4 (1a)) organ harvest for scientific purpose (Institute of Laboratory Animal Science, RWTH Aachen, Germany).

We used real-time PCR to measure up-regulation of gene expression indicating a switch from contractile cells to osteoblast-like cells. We isolated RNA by the Qiagen RNeasy Kit, following the manufacturers' instructions. We synthesized cDNA by the RT core kit (RT-RTCK-05; Eurogentec, Liège, Belgium). For qPCR, we used the qPCR Core Kit for SYBR Green I (RT SN10-05; Eurogentec, Liège, Belgium) and measured in duplicates on the 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). The primers we used were alpha smooth muscle actin (SMA): sense 5'-CCCGCTGTCTCTAGCAC-3' antisense 5'-CACACGAGTAACAAATCAAAGC-3'; GAPDH: sense 5'-ACAGATGGTGAAGTCCGTA-3' antisense 5'-AGAAGGCAGCCCT

GGTAACC-3'; alkaline phosphatase (ALP): sense 5'-CCTTGAA AAATGCCCTGAAA-3' antisense 5'-CTTGGAGAGAGCCACAAAGG-3'; core-binding factor alpha 1 (cbfa1): sense 5'-AGACACAGAGCC TGTGGG-3' antisense 5'-CTTGGAGAGAGCCACAAAGG-3'.

We performed each vascular smooth muscle cell experiment in six replicates. We performed statistical analyses using a one-way ANOVA with Bartlett's method. We analysed differences between groups with Tukey's multiple comparison method and performed D'Agostino and Pearson normality tests to check for Gaussian distribution. We set the level for significance at $P < 0.05$.

2.6 | Binding of SNF472 to free calcium

To examine chelation of free calcium, we exposed a physiological calcium (2.5-mM $CaCl_2$, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) concentration in 0.15-M NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) solution at pH 7.4 to increasing concentrations of SNF472 (0.15 to 75.8 μ M) or sodium thiosulfate (0.63 to 575 μ M; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). We measured ionized calcium with a selective calcium electrode (DX240-Ca; Mettler Toledo, Columbus, OH, USA) and a potentiometer (micropH 2002; Crisson, Barcelona, Spain), quantified using a calibration curve. We calculated chelated calcium by subtracting the concentration of ionized calcium in the presence of chelator (SNF472 or sodium thiosulfate) from the experimental concentration of ionized calcium without chelator. Ionized calcium curves were analysed by using a non-linear fitting program (GraphPad Prism; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). We used a semi-logarithmic concentration–response curve to determine EC_{50} , hillslope and maximum response (E_{max}) with the following equation:

$$Y = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + 10^{(x - \log[EC_{50}]) \times \text{Hillslope}}}$$

where “Bottom” was the baseline, “Top” was the E_{max} and “hillslope” was a measure of the steepness of the curve. We performed each experiment for binding of SNF472 to free calcium in duplicate.

2.7 | Effects of SNF472 on bone

In a repeated-dose toxicology study, we administered SNF472 (0 or 25 mg·kg⁻¹) using 15 min intravenous infusion three times weekly for 9 months in two groups of eight (4 male and 4 female) healthy Beagle dogs (Beijing Marshall Biotechnology, Co. Ltd., Beijing, China). Previous toxicology studies (14-day, 28-day and 3-month toxicology studies in dogs) examined the effects of 3, 10 or 25 mg·kg⁻¹, which cover the expected therapeutic concentrations in humans. In this 9 month study, results from the control group and the highest dose tested were sent for histomorphometry evaluation. If an effect on bone had been detected at the highest dose of 25 mg·kg⁻¹, then we would have tested the lower doses in

sequence (10 mg·kg⁻¹ then 3 mg·kg⁻¹). We analysed femur samples by histomorphometry for trabecular parameters, including thickness, separation and number and cortical parameters including cortical area fraction and thickness. We performed tartrate-resistant acid phosphatase staining to highlight osteoclasts and evaluated mineralized tissue on slides with Von Kossa staining. Pharmaron's Institutional Animal Care and Use Committee reviewed the protocol and approved the animal care and use application.

Bone samples were fixed and preserved in 10% neutral buffered formalin for at least 1 week prior to microtomographic analysis. We performed microtomographic analysis using a SkyScan 1076 Desktop X-ray Microtomograph (Bruker, Kontich, Belgium) with SkyScan, NRecon, DataViewer and CTAn software. For histological analyses, we sectioned samples using a RM 2255 microtome (Leica, Wetzlar, Germany) and analysed them using an Eclipse 80i fluorescence microscope (Nikon, Minato, Tokyo, Japan) and NIS-Elements D (Nikon, Minato, Tokyo, Japan) and ImageJ software.

We washed bone samples in PBS solution and performed micro-CT analysis of architectural variables at room temperature using the SkyScan-1076. We set the X-ray source to a tube voltage of 100 kV and a tube current of 100 μ A, using an isotropic voxel size of 18 μ m. We obtained acquisition files with a rotation of 0.50°, two frames averaging and using an aluminium filter (1 mm). After scanning, we transferred image data to a workstation and reconstructed the full data set for each sample as a series of 2D binarized cross-sections (reconstruction step), which we then used for the calculations using the SkyScan analysis system.

For the analysis of the trabecular properties of the femurs, we calculated the distance between the epiphysis and the end of femoral trochlea and determined the reference slice to be located at three-quarters of this distance, proximally. We used 50 transverse axial-cut slices in both sides of the reference slice for calculations. On the 50 slices, we determined a region of interest including only the trabeculae. For the evaluation of cortical properties, we chose 100 transverse axial-cut slices on both sides of the midpoint of the bone.

We dehydrated the samples in an ascending alcohol series at room temperature, then embedded samples in a resin specifically developed for mineralized tissues (Technovit 9100, Kulzer, Hanau, Germany). We pre-permeated specimens before the permeation step at 4°C, embedded in resin at -11°C. We cut 5- μ m sagittal sections (six sections per sample) using a Leica RM2255 sawing microtome (Leica, Wetzlar, Germany), stretched the sections on slides by immersion in an alcohol solution and covered them with polyethylene films. We deplasticized sections and performed the following staining protocols:

- tartrate-resistant acid phosphatase staining procedure: We post-fixed sections in 4% formalin solution. After washing, we immersed sections in tartrate-resistant acid phosphatase solution and washed them again. We counterstained with haematoxylin solution and mounted sections in aqueous mounting solution.

- Von Kossa staining procedure: We incubated sections in 1% silver nitrate solution under UV light, then washed out unspecific staining by 5% sodium thiosulfate solution. We counterstained sections with Van Gieson picrofuschin stain. After the washing step, we dehydrated sections with ethanol and xylene solutions and mounted them with resin mounting solution.

For each group, we calculated the median values and 95% confidence intervals per dose (total: females + males, $n = 8$) and per dose and sex ($n = 4$). We used a statistical test (Kruskall–Wallis followed by Dunn's post hoc test) to compare median values between groups, using PRISM software (GraphPad Prism; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

2.8 | Effects of SNF472 on in vitro osteoblast calcification

Primary rat osteoblasts were cultured according to a previously optimized procedure (Verberckmoes, De Broe, & D'Haese, 2003). In short, we collected the femur, tibia and humerus of healthy 10-week old Wistar rats and put them into cell culture medium (α -MEM with 10% fetal bovine serum, 10⁻⁸ M dexamethasone, 1% penicillin/streptomycin and 50 mg·L⁻¹ ascorbic acid) at 4°C. We removed the epiphyses and collected bone marrow cells by spurting sterile cell culture medium through the diaphysis with a sterile syringe. The collected cells were cultured in the same culture medium in 75 cm² flasks at 37°C and 5% CO₂. Cell culture medium was replaced three times weekly until confluence was reached. After confluence, cells were trypsinized and plated onto 12-well plates at a density of 5 to 10 $\times 10^4$ cells·cm⁻². Again, cell culture medium was replaced three times weekly until confluence.

When confluence was reached in the 12-well plates, we replaced the medium with calcifying medium (same as above +0.59 g·L⁻¹ β -glycerolphosphate), supplemented with SNF472 at concentrations of 0, 1, 10 and 30 μ M. Three times per week, we replaced cell culture medium with the calcifying medium containing SNF472. We stored samples of replaced cell culture medium at -20°C pending further analysis. We measured calcium content of the cell medium with flame atomic absorption spectrometry (FAAS) using methods developed in-house. When osteoblasts calcified, calcium is removed from the medium and assumed to be incorporated into hydroxyapatite crystals. Hence, the proportion of calcium removed is used as a measure of hydroxyapatite deposition (Verberckmoes et al., 2003). After 2 weeks, we processed cell cultures for Von Kossa and alkaline phosphatase staining. We extracted mRNA using the PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher) and stored extracts at -80°C until further processing. Each parameter was quantified in at least three wells per condition and obtained from three separate experiments.

Real-time qPCR was performed using the TaqMan assay with commercially available primers on a QuantStudio 3 system (Applied Biosystems). We analysed the following genes: *GAPDH*, *alkaline*

phosphatase, **bone sialoprotein (BSP)**, *Osterix*, **RANK ligand (RANKL)**, **sclerostin (SOST)**, **osteoprotegerin (OPG)**, osteocalcin, **osteopontin**, *Bax* and *Bcl2*. Using the software provided by the manufacturer and the $\Delta\Delta C_t$ method, we calculated relative expression levels and corrected for *GAPDH*.

The study was approved by the Ethical Committee for Animal Testing from the University of Antwerp (approval number 2017-72). The animals were obtained from Charles River (France).

2.9 | Data and analysis

Studies were designed to generate groups of equal size, using randomization and blinded analysis. Statistical analysis was undertaken for studies where each group size was at least $n = 5$, except for bone parameters in dogs, in which $n = 4$ after splitting the treatment groups by sex. The declared group size for each experiment or study is the number of independent values and statistical analysis was done using these independent values (i.e. not treating technical replicates as independent values). In multigroup studies with parametric variables, post hoc tests were conducted only if *F* in ANOVA achieved statistical significance ($P < 0.05$) and there was no significant variance in homogeneity. The threshold for statistical significance for determining whether groups differed was $P < 0.05$. We selected all group sizes based on previously published data for similar experiments; we did not conduct sample size calculations for these experiments. No outliers were removed in these experiments. The data and statistical analysis comply with the recommendations of the *British Journal of Pharmacology* on experimental design and analysis in pharmacology (Curtis et al., 2018).

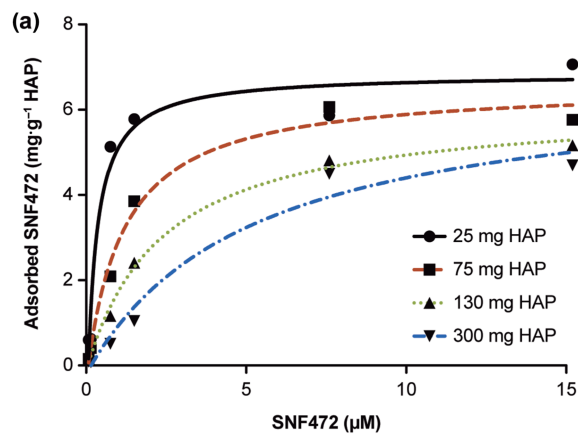
2.10 | Nomenclature of targets and ligands

Key protein targets and ligands in this article are hyperlinked to corresponding entries in <http://www.guidetopharmacology.org>, the common portal for data from the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY (Harding et al., 2018) and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2019/20 (Alexander et al., 2019).

3 | RESULTS

3.1 | Affinity of SNF472 for hydroxyapatite

SNF472 binding to hydroxyapatite was concentration-dependent and was found to be saturated when hydroxyapatite was incubated with SNF472 at concentrations above $7.6 \mu\text{M}$ for 8 h (Figure 1a). The amount of SNF472 required to bind 50% of hydroxyapatite binding sites was linear with hydroxyapatite concentration, with a K_D of 0.45, 1.18, 2.20 and $5.20 \mu\text{M}$ for 25, 75, 130 and 300 mg hydroxyapatite, respectively (Figure 1b). Calculated values for B_{max} were between 6 and $7 \mu\text{M}$ in all cases. These data show that SNF472 binds



Hydroxyapatite (mg)	B_{max} ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	K_D (μM)
25	7.09	0.45
75	6.62	1.18
130	6.04	2.2
300	6.72	5.2

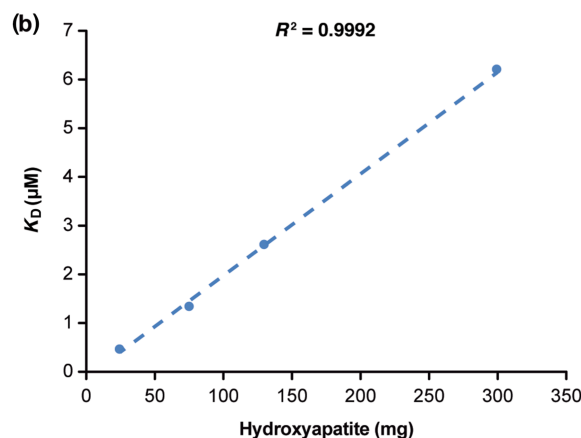


FIGURE 1 Affinity of SNF472 to hydroxyapatite (HAP) crystals after incubation for 8 h. (a) Adsorption of HAP 25, 75, 130 or 300 mg was saturated at a SNF472 concentration of $7.6 \mu\text{M}$. Calculated values for maximum adsorption to HAP (B_{max}) were between 6 and $7 \mu\text{M}$ in all cases. (b) The calculated K_D for adsorption was linear for HAP

hydroxyapatite concentration-dependently and that binding is saturated at approximately $7 \mu\text{M}$.

3.2 | Release kinetics of SNF472 from hydroxyapatite

After incubating SNF472 and hydroxyapatite (130 mg) for 2 h, followed by filtration to fresh Tris buffer, the amount of SNF472 still bound to hydroxyapatite was evaluated up to 7 days. No SNF472 release from hydroxyapatite through day 7 (Figure 2) was observed. These data show that SNF472 binds to hydroxyapatite crystals for at least 7 days.

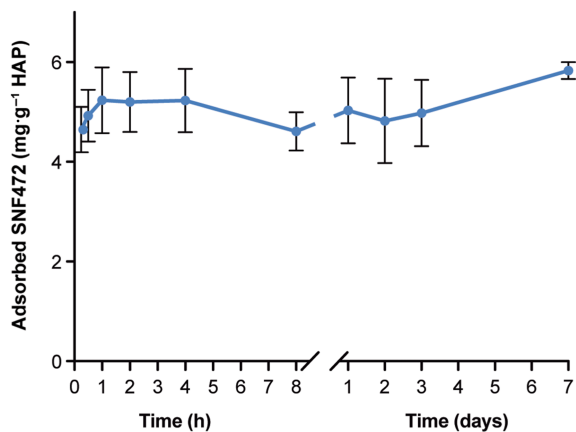


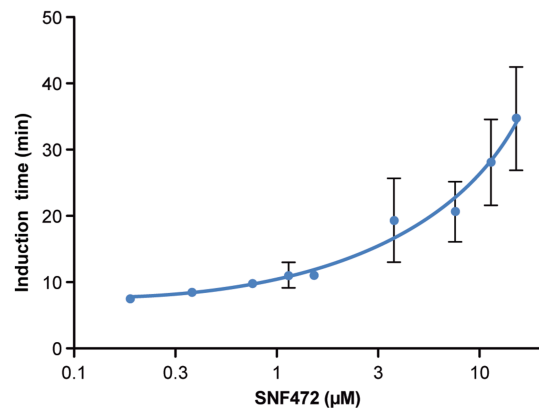
FIGURE 2 Kinetics of SNF472 adsorption to hydroxyapatite (HAP) crystals after incubation for 2 h in the initial solution, followed by up to 7 days in fresh Tris buffer. Results are mean \pm SE

3.3 | SNF472 inhibition of hydroxyapatite crystal formation

In control conditions, without SNF472, hydroxyapatite crystals formed after 7.96 min, which was considered the control induction time (Figure 3). SNF472 concentration-dependently increased the induction time to form hydroxyapatite crystals. SNF472 at 7.6 μ M increased hydroxyapatite crystal induction time 2.6-fold mean of the control, while SNF472 concentrations greater than 15.2 μ M totally inhibited hydroxyapatite crystal formation throughout the 4-h duration of the experiment. These data show that SNF472 inhibits the formation of hydroxyapatite crystals concentration-dependently.

3.4 | SNF472 inhibition of hydroxyapatite crystallization

In a control solution, hydroxyapatite crystals were formed by increasing the calcium concentration from 1.0 to 6.4 mM in a fixed phosphate concentration of 1 mM (Figure 4). The EC_{50} of calcium required to produce hydroxyapatite crystal formation was 3.57 mM. As the concentration of SNF472 increased, a higher calcium concentration was required to obtain the same effect. The calcium curves in the presence of SNF472 were concentration-dependently displaced to the right. SNF472 at 7.6 μ M almost doubled the calcium EC_{50} required to obtain hydroxyapatite crystal formation. SNF472 also affected the E_{max} concentration-dependently (Figure 4). These data show that SNF472 inhibits hydroxyapatite crystallization concentration-dependently. Substantial decreases in E_{max} suggest that binding of SNF472 to hydroxyapatite is insurmountable and when the calcium concentration is increased, SNF472 is not displaced from hydroxyapatite. Although the binding profile was insurmountable, we calculated the pA_2 of SNF472 by using a variation of adjustment for competitive and reversible antagonism. The pA_2 of SNF472 for



SNF472 (μ M)	Induction time, min mean (SEM)
0	7.96 (1.44)
0.19	7.60 (0.25)
0.38	8.63 (0.04)
0.76	10.01 (0.82)
1.14	11.14 (1.91)
1.52	11.01 (0.44)
3.79	19.4 (6.25)
7.58	20.7 (4.46)
11.36	28.0 (6.42)
15.15	34.7 (7.77)
30.3	>240 (-)*
45.5	>240 (-)*
60.6	>240 (-)*

FIGURE 3 Effect of SNF472 on in vitro hydroxyapatite (HAP) crystal formation. Induction time for HAP crystals in a solution of 2.5-mM calcium and 5.5-mM phosphate at pH 7.4 in the presence of SNF472 at various concentrations. The final measurement was at 240 min; standard error (SE) was not determined for these values

in vitro hydroxyapatite crystal formation in synthetic fluid, pH 7.4, with 1-mM phosphate is 9.29 μ M. The Schild plots were linear with slopes around 4–5.

3.5 | Effect of SNF472 on calcification, apoptosis and gene expression in vascular smooth muscle cells

Using TUNEL staining, no significant increase in apoptosis was seen with exposure to SNF472 for 5 days (Figure 5a). Exposure to sodium thiosulfate at 50 or 100 mM was associated with high levels of apoptosis (77%).

After incubation of rat vascular smooth muscle cells with $Ca_3(PO_4)_2$ to initiate calcification, incubation with SNF472 at 1, 10, 30 or 100 μ M for 5 days significantly inhibited calcification (Figure 5b). At the first concentrations tested of 1 μ M, SNF472 already inhibited calcification by 67%. Calcification levels with $Ca_3(PO_4)_2$ and SNF472 at 30 or 100 μ M were similar to those for the

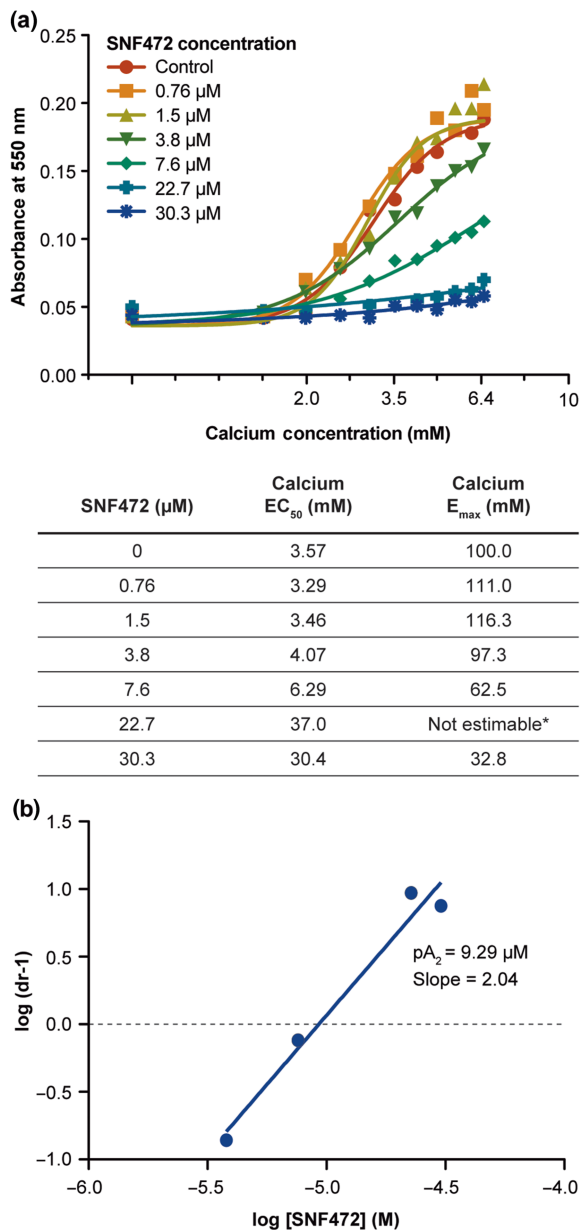


FIGURE 4 Effect of SNF472 on hydroxyapatite (HAP) crystal formation. (a) Absorbance of 550 nm after 10 min of incubation is shown for a range of calcium concentrations and a range of SNF472 concentrations (or control), with a fixed, physiological phosphate concentration. (b) After plotting the logarithm of (dose ratios $[\text{dr}] - 1$) versus the log of SNF472, pA_2 was calculated as the x-intercept of the fitted regression line. *Due to the asymptotic shape of the curve for SNF472 at 22.7 μM , maximum response (E_{max}) could not be estimated for this concentration. EC_{50} , half-maximal effective concentration for HAP crystal formation; E_{max} , concentration required for maximal HAP crystal formation

control, which was not exposed to $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Exposure to sodium thiosulfate at 50 or 100 mM significantly inhibited calcification; exposure to sodium thiosulfate at 25 mM had only a small effect on calcification.

Expression of alpha smooth muscle actin, a marker of muscle phenotype, decreased in vascular smooth muscle cells that were exposed

to $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Figure 5c). SNF472 prevented this down-regulation. Markers for the osteoblast phenotype, such as core-binding factor alpha 1 and alkaline phosphatase, were not up-regulated in calcified vascular smooth muscle cells. Genetic changes were not summarized in the sodium thiosulfate group, which had only two pooled samples for real-time PCR after apoptosis of a majority of sodium thiosulfate-treated cells.

These data show that SNF472 significantly inhibits calcium deposition in vascular smooth muscle cells and normalizes genetic expression of alpha smooth muscle actin at concentrations that do not induce cell death. sodium thiosulfate also inhibits calcification in vascular smooth muscle cells, but at concentrations that are associated with substantial cell death.

3.6 | Binding of SNF472 to free calcium

A semi-logarithmic dose-response curve showed a sigmoid profile for chelation of ionized calcium by SNF472 (Figure 6). Statistically significant chelation occurred with SNF472 at 379 μM or greater and was saturated at 3,788 μM , with an EC_{50} of 539 μM . For sodium thiosulfate, 15.8 mM was required for significant chelation and saturation was attained from 253 mM, with an EC_{50} of 54.3 mM. These data show that the SNF472 concentrations required for chelation of free calcium in saline solution are approximately 50-fold greater than the concentrations of SNF472 that maximally inhibit formation and growth of hydroxyapatite crystals in adapted synthetic fluid.

3.7 | Effects of SNF472 on bone

To evaluate the potential effects of SNF472 on bone, we exposed healthy dogs to SNF472 by 15-min intravenous infusion three times weekly for 9 months. Bone histomorphometry and histological analyses after exposure to SNF472 at 25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (maximum concentration, 384 μM) showed comparable trabecular and cortical parameters to the control group (Figure 7, Table 1). We did not observe tartrate-resistant acid phosphatase-positive cells on the edge of trabeculae in any specimen (Figure 8), suggesting that bone resorption by osteoclasts was not enhanced by SNF472. The mineralized tissue fraction was similar between tissue specimens in the SNF472 and control groups (Figure 9), confirming that SNF472 did not have an adverse effect on bone mineralization in dogs.

3.8 | Effects of SNF472 on in vitro osteoblast calcification

Fresh, unused cell culture medium (with all supplements) contained 94.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Ca. After 1 day of incubation with the calcifying medium, $74.0 \pm 0.97\%$ of the Ca was removed from the medium in control cultures, indicating a rapid onset of calcification. Cultures

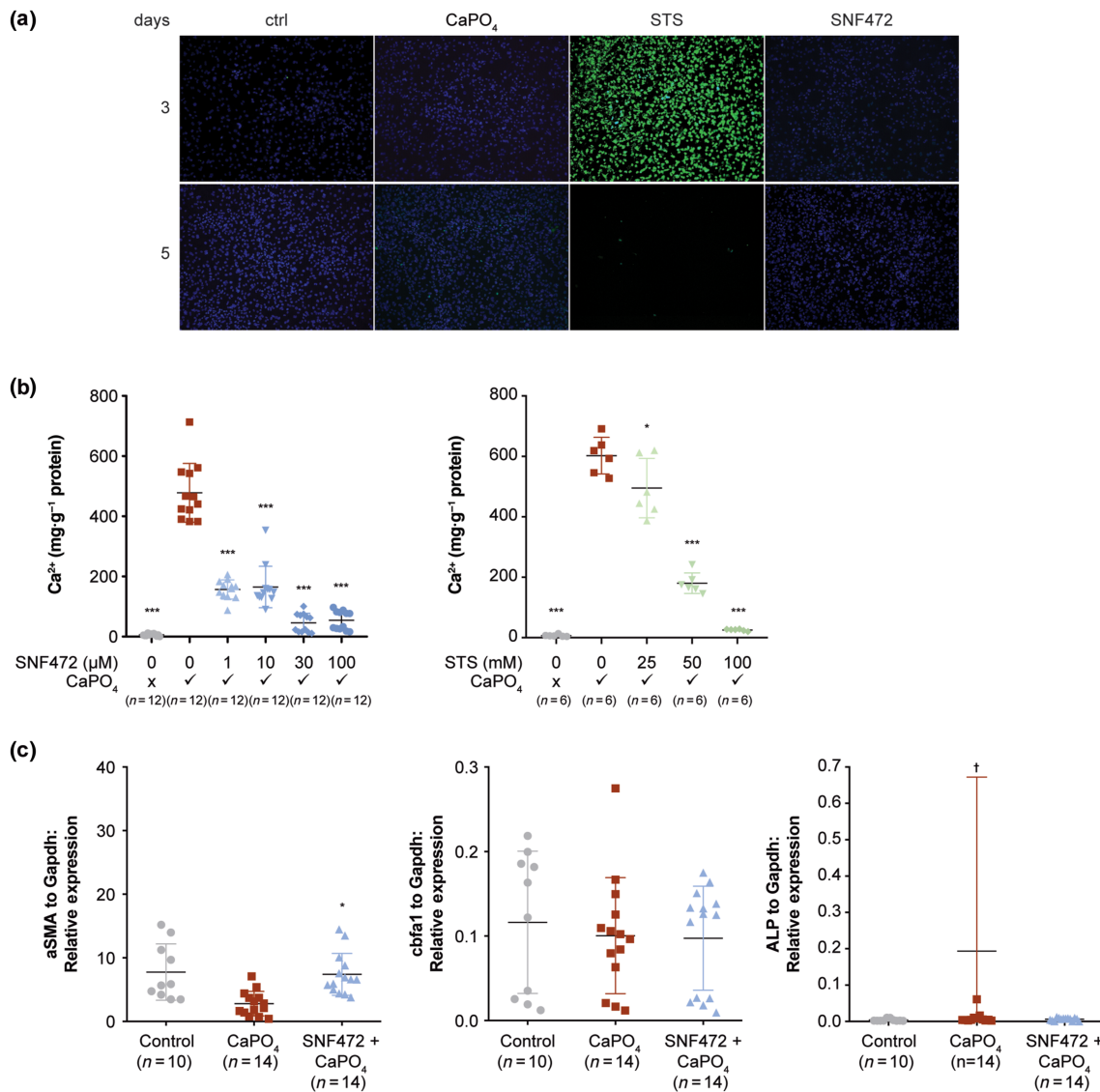


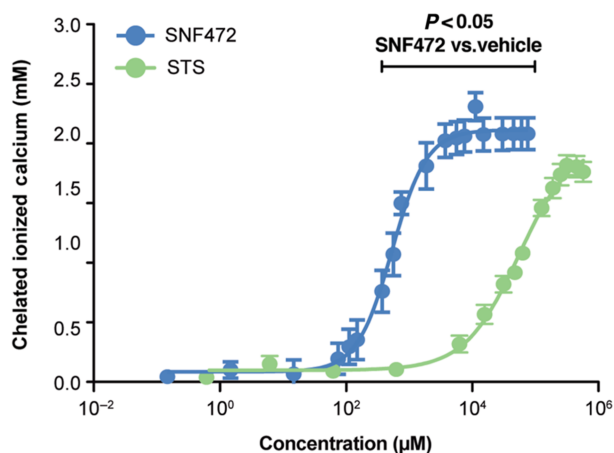
FIGURE 5 Effect of SNF472 on calcification, apoptosis and gene expression in vascular smooth muscle cells. Cell cultures containing rat aorta sections in DMEM/Nutrient Mixture F-12 with 10% fetal calf serum were exposed to calcium (CaCl₂ at 3 mM) and phosphate (Na₂HPO₄ at 3 mM) to generate Ca₃(PO₄)₂ to initiate calcification, then exposed to nothing (control [ctrl]), SNF472 (1, 10, 30 or 100 μM), or sodium thiosulfate (STS; 25, 50 or 100 mM). (a) Apoptosis, shown by green staining, of TUNEL-stained cells after 3 and 5 days. (b) Calcification, shown as the ratio of calcium (Ca²⁺) to protein, after 5 days. (c) Markers for gene expression, relative to GAPDH, including smooth muscle actin (SMA), core-binding factor alpha 1 (Cbfa1) and alkaline phosphatase (ALP). Gene expression was not summarized in the STS group, which provided only two pooled samples after apoptosis of STS-treated cells. **P* < 0.05, compared with Ca₃(PO₄)₂ alone. ****P* < 0.001, compared with Ca₃(PO₄)₂ alone. †One value at 1.6 is not shown in the plot

containing SNF472 showed no statistically significant difference in Ca removal (74.7 ± 3.67%, 74.4 ± 1.57% and 73.1 ± 2.06% from the cultures containing 1, 10 and 30 μM, respectively). From day 5 onward, only 5% to 10% of the Ca was removed from the medium, indicating that no further calcification occurred. No statistically significant differences were found between the different SNF472 concentrations nor compared with vehicle during the 14-day follow-up period (Figure 10).

After 2 weeks of incubation with calcifying medium containing SNF472, cultures were used to stain for calcification (Von Kossa) and osteoblast activity (ALP). No differences were noted

between the controls and the various SNF472 concentrations used (Figure 11).

Using a one-way ANOVA with Bonferroni correction, *SOST*, *TNAP*, *Osteocalcin* and *Bax* genes did not show any statistically significant differences between groups (Figure 12). *OPG* and *Bcl2* both showed a similar pattern, an increase versus controls at the lowest dose of SNF472, followed by a steady decline towards control levels for SNF472 10 and 30 μM. *Osterix* showed an increase for SNF472 10 and 30 μM versus controls. *RANKL* showed an increase up to the SNF472 10 μM dose versus controls. *Osteopontin* showed a decrease for SNF472 1 and 10 μM versus control.



Compound	EC ₅₀ (µM)	Hillslope	E _{max} (mM)
SNF472	539	1.57	2.13
STS	54299	1.02	2.03

FIGURE 6 Chelation of ionized calcium by SNF472 and by sodium thiosulfate (STS). We added increasing concentrations of SNF472 or STS to a physiological (2.5 mM) calcium solution in 0.15-M NaCl at pH 7.4 and recorded ionized calcium levels. Chelation is shown as the concentration of ionized calcium in the absence of chelator minus the observed concentration in the presence of chelator. A semi-logarithmic concentration–response curve was used to determine EC₅₀, hillslope and maximum response (E_{max})

4 | DISCUSSION

Calcification is an active and complex process that involves numerous mechanisms responsible for calcium and phosphate deposition in arterial walls (Karwowski, Naumnik, Szczepanski, & Mysliwiec, 2012). The initiation of this calcification requires the presence of triggers that can vary but share a common pathway:– hydroxyapatite crystals build from calcium and phosphate aggregation and the crystals are deposited into the media layer of blood vessels, leading to medial calcification (Mönckeberg’s medial sclerosis) (Lanzer et al., 2014; Yiu et al., 2015). In patients undergoing dialysis, vascular smooth muscle cells also have been described as responsible for hydroxyapatite formation in the vessels. These vascular smooth muscle cells can undergo changes into bone and cartilage-like phenotypes and calcify when exposed to elevated calcium and phosphate by releasing hydroxyapatite into the extracellular space or in vesicles or exosomes containing hydroxyapatite-like material (Jono et al., 2000; Kapustin et al., 2015; Schurgers et al., 2007; Yang et al., 2004).

In this series of *in vitro* experiments, we examined the mechanism of action of SNF472 to inhibit hydroxyapatite formation and growth as a new therapeutic target to treat calcification disorders. Calcification is especially relevant for cardiovascular calcification and calcific ureaemic arteriopathy in patients undergoing dialysis and hydroxyapatite formation is the common pathophysiologic mechanism for both.

The experiments included in this report show that SNF472 is able to block the formation and growth of hydroxyapatite crystals and

SNF472 inhibits calcification in cells that are induced to calcify. These experiments also show that SNF472 binds to hydroxyapatite in a physicochemical interaction not a membrane-receptor interaction. Thus, although we applied pharmacological concepts to evaluate this interaction, these should be interpreted with caution.

SNF472 showed high affinity for hydroxyapatite crystals, with a K_D ranging from 1 to 10 µM. The amount of SNF472 bound to hydroxyapatite was linear versus hydroxyapatite concentrations in the milligram range, which is the range that was observed in uraemic animal models with administration of adenine and vitamin D to induce vascular calcification (Ferrer et al., 2018). This is the expected behaviour for a physicochemical interaction, without the effect of membrane-receptor features such as spare receptor effect or cross-binding to other receptors. Binding of hydroxyapatite was saturated by SNF472 at approximately 7 µM, regardless of the hydroxyapatite concentration, which could mean that hydroxyapatite was always in excess in these preparations, even at the lower concentration of 25 mg and SNF472 was then able to block hydroxyapatite binding sites maximally. In another experiment, we showed that SNF472 was bound to the surface of hydroxyapatite very rapidly (within 5 min) and with a long-lasting effect (for up to 7 days, the last measurement in the assay). In a previous publication with similar findings, binding of SNF472 to hydroxyapatite occurred quickly, reaching nearly 80% by 1 min and more than 90% by 15 min and adsorption was insurmountable for 3 days (the last measurement reported) (Ferrer et al., 2018). Based on both reports, the inhibitory profile of SNF472 for hydroxyapatite is compatible with fast association to the crystal and slow or even insurmountable dissociation. However, the observed lack of release of SNF472 from the hydroxyapatite crystals might also be related to a situation of equilibrium reached in the assayed conditions. A total of 130 mg of hydroxyapatite contained 0.78 mg of SNF472 in a volume of 400 ml. If SNF472 was totally free, a concentration of approximately 3 µM would be found, which is a concentration above the K_D of SNF472 for these conditions and so the equilibrium is displaced towards binding of SNF472 to hydroxyapatite.

In other experiments in this report, SNF472 inhibited both the formation and growth of hydroxyapatite crystals. SNF472 at 7.6 µM delayed time to hydroxyapatite crystal formation by 2.6-fold and doubled the calcium concentration required to induce crystal formation. On the other hand, SNF472 at 7.6 to 22.7 µM inhibited hydroxyapatite crystallization concentration-dependently and SNF472 increased up to 10-fold the concentration of calcium needed to induce hydroxyapatite crystal formation. Moreover, the E_{max} was significantly decreased, showing a profile of SNF472 compatible with an insurmountable antagonist as calcium was not able to displace SNF472 from its binding site. These findings, together with the results showing binding of SNF472 to hydroxyapatite until the maximum time point evaluated at 7 days, could confirm the insurmountable interaction. These results suggest that SNF472 concentrations greater than 7 µM ensure effective “sealing” of the hydroxyapatite crystal to stop its growth.

We also examined the effects of SNF472 in a cell model for medial calcification induced by high concentrations of calcium and

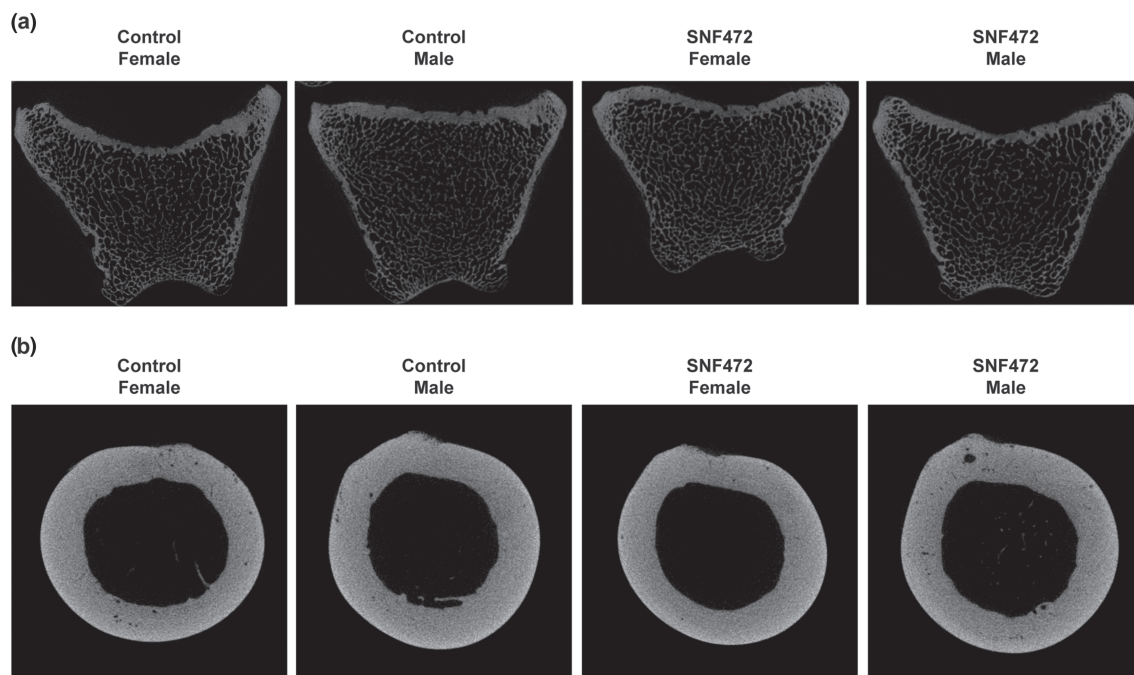


FIGURE 7 Representative images of bone samples from dogs treated with 25 mg·kg⁻¹ intravenous SNF472 for up to 9 months. (a) Trabecular bone samples. (b) Cortical bone samples

TABLE 1 Trabecular and cortical parameters in bones from dogs treated with 25 mg·kg⁻¹ intravenous SNF472 for up to 9 months

		Control (N = 4 male/4 female)	SNF472 (N = 4 male/4 female)
Trabecular parameters			
Bone volume fraction (%)	Female	18.7 (15.39–23.21)	19.8 (16.7–22.9)
	Male	19.3 (15.9–23.8)	19.3 (16.5–24.4)
Trabecular thickness (mm)	Female	0.123 (0.111–0.140)	0.122 (0.107–0.134)
	Male	0.119 (0.107–0.136)	0.128 (0.118–0.137)
Trabecular separation (mm)	Female	0.425 (0.397–0.455)	0.403 (0.362–0.450)
	Male	0.390 (0.350–0.453)	0.416 (0.349–0.486)
Trabecular number (mm ⁻¹)	Female	1.49 (1.34–1.73)	1.67 (1.48–1.81)
	Male	1.68 (1.39–1.87)	1.57 (1.34–1.88)
Cortical parameters			
Cortical area fraction (%)	Female	61.9 (55.1–69.9)	67.0 (57.5–75.5)
	Male	60.2 (52.1–64.8)	62.8 (58.2–67.4)
Cortical thickness (mm)	Female	1.19 (1.06–1.31)	1.29 (0.97–1.50)
	Male	1.27 (1.11–1.41)	1.24 (1.04–1.37)

Note: Results are presented as median (95% confidence interval) per dose and sex ($n = 4$). A Kruskal–Wallis followed by Dunn's post hoc test was used to compare median values between groups. No significant differences were evident between groups ($P > 0.05$).

phosphate. SNF472 concentrations ranging from 1 to 100 μM decreased calcium deposition in rodent vascular smooth muscle cells without inducing apoptosis and SNF472 restored expression of genes that maintain the contractile phenotype of these cells. SNF472 at 1 μM was able to block >50% of the calcification. The lack of apoptosis with exposure to SNF472 in this experiment is important because previous research has shown that apoptosis is linked to calcification of vascular smooth muscle cells (Leopold, 2015), but in this case,

SNF472 blocked the calcification process without affecting cell survival. sodium thiosulfate was included in this study as a comparator due to its well-known anti-calcification properties *in vitro* and *in vivo* (O'Neill & Hardcastle, 2012; Pasch et al., 2008). Our results demonstrated that sodium thiosulfate is also effective in reducing mineralization of vascular smooth muscle cells (at higher concentrations than SNF472), but at the same time, it induces apoptosis in vascular smooth muscle cells, which was not observed when cells were treated

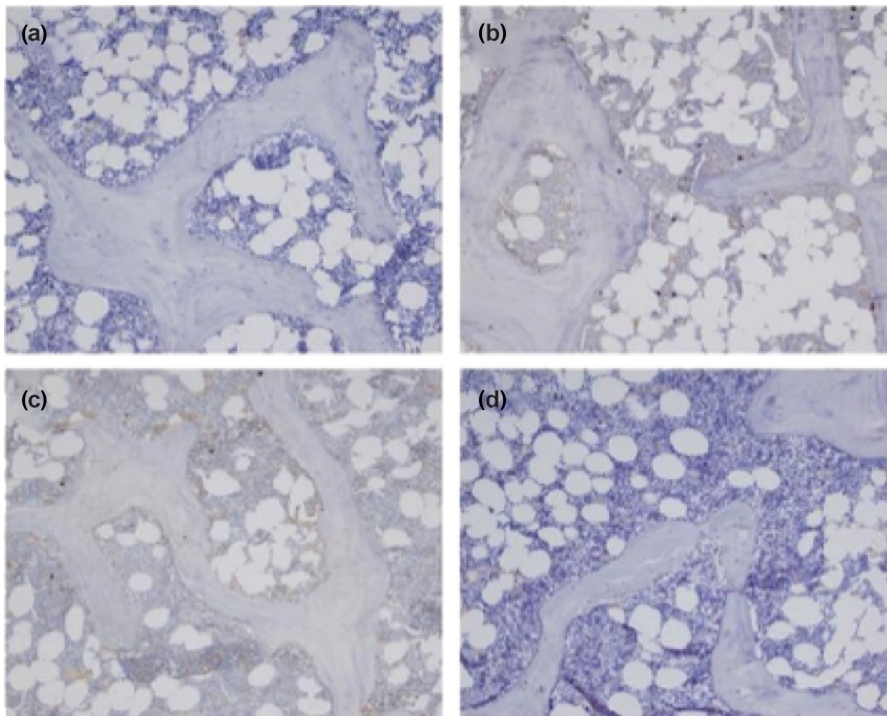


FIGURE 8 Representative images of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining in trabecular bone samples from dogs treated with $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ intravenous SNF472 for up to 9 months. (a) Control female. (b) Control male. (c) SNF472 female. (d) SNF472 male

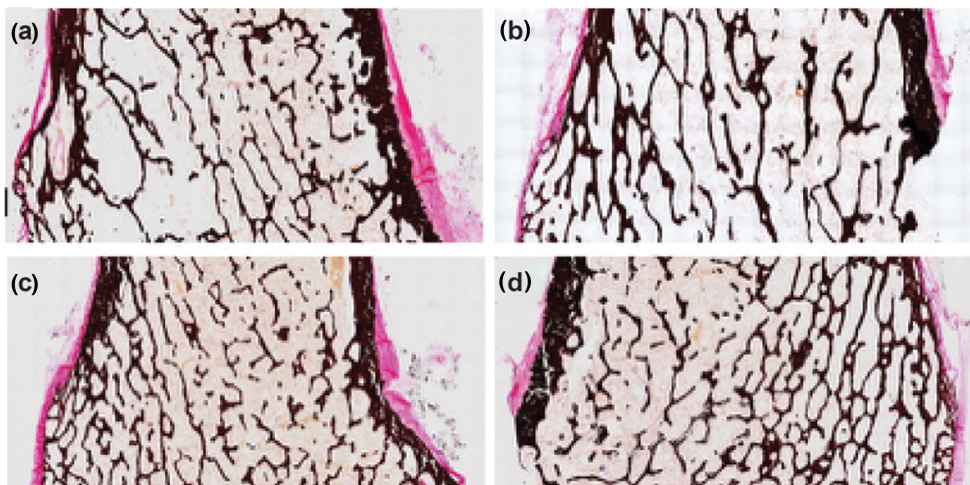


FIGURE 9 Representative images of Von Kossa staining in bone samples from dogs treated with $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ intravenous SNF472 for up to 9 months. (a) Control female. (b) Control male. (c) SNF472 female. (d) SNF472 male

with SNF472. When we exposed vascular smooth muscle cells to $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, expression of alpha smooth muscle actin, a marker of muscle phenotype, decreased; adding SNF472 prevented this down-regulation to normalize genetic expression of alpha smooth muscle actin. We cannot interpret from the current data if SNF472 has other effects that may influence expression of alpha smooth muscle actin mRNA. Our experiment was not designed to investigate whether alpha smooth muscle actin levels were reduced by exposure to increased concentrations of ionic calcium or phosphate or if it was due to formation of hydroxyapatite crystals in the culture medium. This question deserves investigation in future research. Previous evidence from animal models of vascular calcification also showed that SNF472 inhibited calcification in the aorta and the heart. SNF472 between 8.5 and $20 \mu\text{M}$ (free concentration) completely inhibited

cardiovascular calcification in rats (Ferrer et al., 2018), which is consistent with SNF472 concentrations associated with significant inhibition of hydroxyapatite crystal formation in this report (between 3.8 to $30.4 \mu\text{M}$).

Concentrations of SNF472 required to inhibit hydroxyapatite crystal formation in these experiments were evaluated in early clinical studies. In a phase 1 dose-finding study, healthy volunteers received a single dose of SNF472 at 5 , 9 or $12.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ resulting in a mean maximum SNF472 concentration of 17.6 , 37.1 and $64.1 \mu\text{M}$, respectively (Perelló et al., 2018). In the same study, the mean maximum SNF472 concentration in patients undergoing dialysis receiving a single dose of SNF472 at $9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ was $44.1 \mu\text{M}$ ($11.6 \mu\text{M}$ free concentration) (Perelló et al., 2018). Using a pharmacodynamic assay to measure the crystal formation potential of blood (Ferrer et al., 2017),

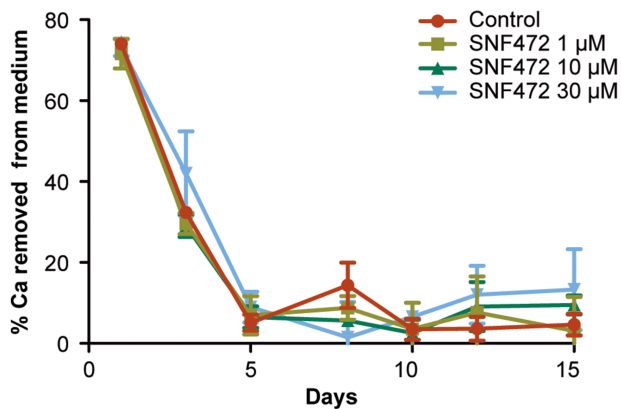


FIGURE 10 Percentage of calcium removed from the cell culture medium. After confluency, β -glycerolphosphate and SNF472 were added to osteoblast culture medium and Ca levels were analysed in spent medium

SNF472 at $9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ inhibited hydroxyapatite formation by 80.2% in the plasma of patients undergoing dialysis. In a phase 1b trial, eight patients undergoing dialysis received ascending SNF472 doses from 1 to $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and then eight patients received SNF472 at $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, infused over 4 h, during dialysis, three times per week for 1 month (Salcedo et al., 2019). Maximum SNF472 concentration was $101 \mu\text{M}$ for a single dose of $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $62.9 \mu\text{M}$ after 12 doses of $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Salcedo et al., 2019). Thus, concentrations of SNF472 that were associated with rapid, selective and insurmountable binding of hydroxyapatite to prevent formation and growth of hydroxyapatite crystals in our experiments were achieved by SNF472 doses that were well tolerated in phase 1 trials.

Given the high affinity of SNF472 for hydroxyapatite crystals, we examined the affinity of SNF472 for circulating ionized calcium. Chelation of ionized calcium by 50% in saline occurred at SNF472 concentrations of $539 \mu\text{M}$, nearly 50-fold greater than concentrations that inhibited hydroxyapatite crystallization in adapted synthetic fluid and >40-fold greater than free concentrations of SNF472 associated

with a single dose of $9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in the phase 1 clinical trial described above (Perelló et al., 2018). Doses of SNF472 in clinical development to treat cardiovascular calcification or calcific uraemic arteriolopathy (Brandenburg et al., 2019; Raggi et al., 2020) are not expected to chelate circulating calcium and hypocalcaemia was not reported in the phase 1b trial (Salcedo et al., 2019).

Previously published studies for phytate suggest that SNF472 is unlikely to have a negative effect on bone health and may even show a positive effect on bone restoration (del Mar Arriero, Ramis, Perello, & Monjo, 2012a; del Mar Arriero, Ramis, Perello, & Monjo, 2012b; López-González et al., 2013). In cell cultures, phytate decreased gene expression of osteoblast markers and mineralization in osteoblast cells without negatively affecting cell viability (del Mar Arriero et al., 2012a). Other cell cultures showed that phytate inhibited primary osteoclasts and non-committed osteoclast precursors but did not inhibit committed, mature osteoclasts (del Mar Arriero et al., 2012b). In 157 postmenopausal women, those with low ($\leq 0.76 \mu\text{M}$) phytate concentrations had significantly greater bone mass loss in the lumbar spine than those with high ($\geq 1.42 \mu\text{M}$) phytate concentrations (López-González et al., 2013). In our experiments, the 9-month repeated dosing toxicology study in dogs showed no differences in full bone histomorphology or tartrate-resistant acid phosphatase, an osteoclast biomarker, between control animals and animals treated with SNF472.

In the experiment using primary rat osteoblasts, SNF472 was added at the same time that β -glycerolphosphate was started. This latter compound induces mineralization by acting as a phosphate source. Thus, effects of SNF472 on mineralization would most likely be seen at this time (i.e. during development of calcification). However, in our cultures, we did not observe any significant effect of SNF472 on the mineralization process (as shown by the Von Kossa stain) and osteoblast activity (as shown by alkaline phosphatase staining). Furthermore, SNF472 was present in the cultures for 2 weeks following the start of mineralization and no toxic effects or overt effects on cell viability were seen in any of the doses tested. Changes in gene expression were minor and point to a neutral to slightly positive effect as

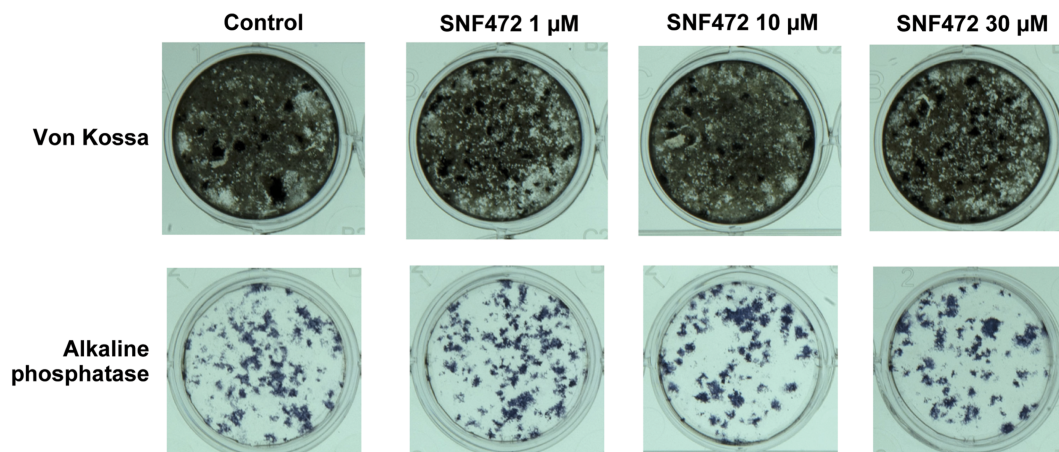


FIGURE 11 Representative images of Von Kossa staining and alkaline phosphatase staining of rat primary osteoblast cultures after 2 weeks of treatment with β -glycerolphosphate and SNF472

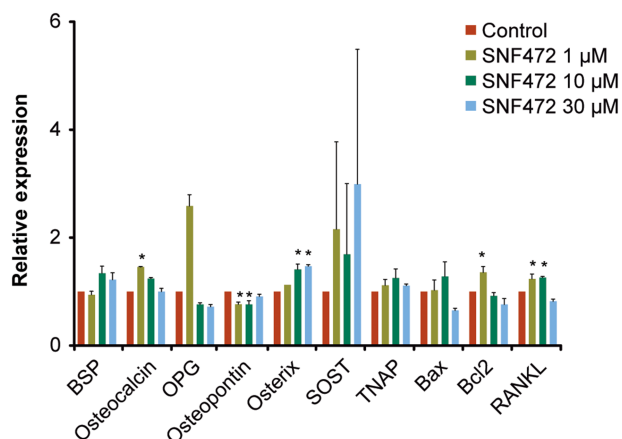


FIGURE 12 Relative mRNA expression of various osteoblast marker/function genes using real time qPCR, after 2 weeks of treatment with β -glycerolphosphate and SNF472. BSP, bone sialoprotein; OPG, osteoprotegerin; RANKL, receptor activator for NF- κ B ligand; SOST, sclerostin; TNAP, tissue non-specific alkaline phosphatase

reflected by markers of bone formation. Additional studies of SNF472 in animal models for a dynamic bone disease would be needed to examine the effects of SNF472 on diseased bone.

Medications such as bisphosphonates, sodium thiosulfate, vitamin K, phosphate binders and calcimimetics have been used experimentally in patients with calcifications (O'Neill & Lomashvili, 2010), but they do not selectively target hydroxyapatite crystallization. SNF472, was specifically developed for this purpose. Another experimental approach that has been examined is nanoparticle-based EDTA chelation therapy (Karamched, Nosoudi, Moreland, Chowdhury, & Vyavahare, 2019). Conjugating EDTA-loaded albumin nanoparticles with elastin antibody is designed to deliver the nanoparticles to the site of injury, where EDTA can resorb mineral deposits. Injection of EDTA-loaded albumin nanoparticles in rats reversed calcification; injection of blank nanoparticles or systemic EDTA without nanoparticles was not effective.

We acknowledge the following potential limitations of our experiments. The analysis used was based on the accepted pharmacology theory for drug-receptor interaction, but SNF472 does not target a membrane or intracellular receptor. The mechanism of action of SNF472 is to block the formation and growth of the inorganic crystal hydroxyapatite in the extracellular compartment. To examine binding of SNF472 to hydroxyapatite, we agitated the solutions for 8 h; to examine release kinetics, we agitated the solutions for 2 h. This was determined based on another study of binding kinetics for SNF472 to hydroxyapatite in which we showed that maximum binding is attained by 2 h (Ferrer et al., 2018). We examined SNF472 chelation of free calcium in saline, which provided a controlled environment for the experiment and allowed us to examine the relative binding of hydroxyapatite crystals or free calcium in solution. The experiment did not provide direct evidence about chelation of free calcium in human blood, but phase 1 clinical studies have shown no evidence that SNF472 chelates free calcium.

In summary, these experiments show that SNF472 has high affinity for hydroxyapatite but not for free calcium. SNF472 quickly binds the face of a growing hydroxyapatite crystal on the surface of a forming hydroxyapatite nucleus to inhibit calcification specifically. This inhibitory effect is observed when the crystal is being formed or after it is already formed, preventing further growth. At doses selected for clinical investigation, SNF472 inhibits the final common pathway in cardiovascular calcification and calcific uraemic arteriopathy by binding to hydroxyapatite, without binding appreciably to ionized calcium. SNF472 acts independently of calcium or phosphate plasma levels and is not expected to affect calcium and phosphate homeostasis. These experimental results describe the mechanism of action of SNF472 based on selective physicochemical inhibition of its extracellular target, hydroxyapatite. The data provide a scientific rationale for the ongoing clinical investigation of SNF472 as a potential treatment for cardiovascular calcification and calcific uraemic arteriopathy in patients undergoing dialysis, for which SNF472 has shown potential efficacy in clinical studies (Brandenburg et al., 2019; Raggi et al., 2020).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Sanifit Therapeutics. The authors thank Ayshe Hyusein for her contributions to the examination of calcium deposition in vascular smooth muscle cells. Medical writing support from Jonathan Latham of PharmaScribe, LLC was funded by Sanifit.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.P., V.B., P.D.H., B.I., and C.S. conceived and designed the study. M.D.F., M.dM.P., N.K. and G.J.B. did the experiments. M.D.F. and C.S. wrote the manuscript. All authors interpreted the data. All authors reviewed and revised the manuscript and approved the final manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

J.P. and B.I. are founders, employees and stockholders of Sanifit Therapeutics and co-inventors of patents owned or controlled by Sanifit Therapeutics. M.D.F. has received research grants and travel support from Sanifit Therapeutics, is a stockholder of Sanifit Therapeutics and is a co-inventor of a patent owned or controlled by Sanifit Therapeutics. M.dM.P. and A.G. are employees and stockholders of Sanifit Therapeutics. N.K. has no conflicts of interest to declare for this work. V.B. has received consulting fees from Pharmacosmos, Vifor and FMC; lecture fees from Amgen, Pfizer, Bayer, Pharmacosmos, Vifor, FMC, Servier, Novartis, Daiichi-Sankyo and Cardiobridge; and research grants from Amgen, Pfizer, Bayer, Sanifit Therapeutics, Pharmacosmos, Vifor, FMC, Servier, Novartis, Daiichi-Sankyo and Cardiobridge. G.J.B. has no conflict of interest to declare for this work. P.D.H. received research grants from Vifor Pharma, Cycle Pharma, Sanifit, Shire (Takeda), Inositec, Merck KGaA, Fresenius Kabi and Fresenius Medical Care. R.G. was an employee and stockholder of Sanifit Therapeutics at the time this work was done. M.W. has received consulting fees from Akebia, Amag, Amgen, Ardelyx, Diasorin, Luitpold, and Pharmacosmos; and research grants from

SHIRE. C.S. is an employee and stockholder of Sanifit Therapeutics and a co-inventor of patents owned or controlled by Sanifit Therapeutics.

DECLARATION OF TRANSPARENCY AND SCIENTIFIC RIGOUR

This Declaration acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research as stated in the *BJP* guidelines for [Design and Analysis](#) and [Animal Experimentation](#) and as recommended by funding agencies, publishers and other organisations engaged with supporting research.

ORCID

Joan Perelló  <https://orcid.org/0000-0003-2671-3386>

REFERENCES

- Alexander, S. P. H., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Armstrong, J. F., ... CGTP Collaborators. (2019). The concise guide to pharmacology 2019/20: Introduction and other protein targets. *British Journal of Pharmacology*, 176(Suppl 1), S1–S20. <https://doi.org/10.1111/bph.14747>
- Angelis, M., Wong, L. L., Myers, S. A., & Wong, L. M. (1997). Calciphylaxis in patients on hemodialysis: A prevalence study. *Surgery*, 122, 1083–1089. discussion 1089–1090. [https://doi.org/10.1016/S0039-6060\(97\)90212-9](https://doi.org/10.1016/S0039-6060(97)90212-9)
- Brandenburg, V. M., Sinha, S., Torregrosa, J. V., Garg, R., Miller, S., Canals, A. Z., ... Perelló, J. (2019). Improvement in wound healing, pain, and quality of life after 12 weeks of SNF472 treatment: A phase 2 open-label study of patients with calciphylaxis. *Journal of Nephrology*, 32, 811–821. <https://doi.org/10.1007/s40620-019-00631-0>
- Budisavljevic, M. N., Cheek, D., & Ploth, D. W. (1996). Calciphylaxis in chronic renal failure. *Journal of American Society of Nephrology*, 7, 978–982.
- Budoff, M. J., Hokanson, J. E., Nasir, K., Shaw, L. J., Kinney, G. L., Chow, D., ... Raggi, P. (2010). Progression of coronary artery calcium predicts all-cause mortality. *JACC: Cardiovascular Imaging*, 3, 1229–1236. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2010.08.018>
- Cao, S., Dong, N., & Chen, J. (2011). Synchronous fluorescence determination of phytic acid in foodstuffs and urine based on replacement reaction. *Phytochemical Analysis*, 22, 119–123. <https://doi.org/10.1002/pca.1254>
- Chen, Y., Chen, J., Ma, K., Cao, S., & Chen, X. (2007). Fluorimetric determination of phytic acid in urine based on replacement reaction. *Analytica Chimica Acta*, 605, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.10.041>
- Curtis, M. J., Alexander, S., Cirino, G., Docherty, J. R., George, C. H., Giembycz, M. A., ... Ahluwalia, A. (2018). Experimental design and analysis and their reporting II: Updated and simplified guidance for authors and peer reviewers. *British Journal of Pharmacology*, 175, 987–993. <https://doi.org/10.1111/bph.14153>
- de Jager, D. J., Grootendorst, D. C., Jager, K. J., van Dijk, P. C., Tomas, L. M., Ansell, D., ... Dekker, F. W. (2009). Cardiovascular and noncardiovascular mortality among patients starting dialysis. *JAMA*, 302, 1782–1789. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1488>
- del Mar Arriero, M., Ramis, J. M., Perello, J., & Monjo, M. (2012a). Differential response of MC3T3-E1 and human mesenchymal stem cells to inositol hexakisphosphate. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 30, 974–986. <https://doi.org/10.1159/000341474>
- del Mar Arriero, M., Ramis, J. M., Perello, J., & Monjo, M. (2012b). Inositol hexakisphosphate inhibits osteoclastogenesis on RAW 264.7 cells and human primary osteoclasts. *PLoS ONE*, 7, e43187. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043187>
- Ferrer, M. D., Ketteler, M., Tur, F., Tur, E., Isern, B., Salcedo, C., ... Perelló, J. (2018). Characterization of SNF472 pharmacokinetics and efficacy in uremic and non-uremic rats models of cardiovascular calcification. *PLoS ONE*, 13, e0197061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197061>
- Ferrer, M. D., Perez, M. M., Canaves, M. M., Buades, J. M., Salcedo, C., & Perello, J. (2017). A novel pharmacodynamic assay to evaluate the effects of crystallization inhibitors on calcium phosphate crystallization in human plasma. *Scientific Reports*, 7, 6858. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07203-x>
- Grases, F., March, J. G., Prieto, R. M., Simonet, B. M., Costa-Bauza, A., Garcia-Raja, A., & Conti, A. (2000). Urinary phytate in calcium oxalate stone formers and healthy people—Dietary effects on phytate excretion. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 34, 162–164. <https://doi.org/10.1080/003655900750016526>
- Grases, F., Perelló, J., Isern, B., & Prieto, R. M. (2004). Determination of myo-inositol hexakisphosphate (phytate) in urine by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 510, 41–43.
- Grases, F., Sanchis, P., Costa-Bauza, A., Bonnin, O., Isern, B., Perello, J., & Prieto, R. M. (2008). Phytate inhibits bovine pericardium calcification in vitro. *Cardiovascular Pathology*, 17, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2007.08.005>
- Grases, F., Simonet, B. M., Prieto, R. M., & March, J. G. (2001). Phytate levels in diverse rat tissues: Influence of dietary phytate. *The British Journal of Nutrition*, 86, 225–231. <https://doi.org/10.1079/bjn2001389>
- Grases, F., Simonet, B. M., Vucenik, I., Prieto, R. M., Costa-Bauza, A., March, J. G., & Shamsuddin, A. M. (2001). Absorption and excretion of orally administered inositol hexaphosphate (IP(6) or phytate) in humans. *BioFactors*, 15, 53–61. <https://doi.org/10.1002/biof.5520150105>
- Harding, S. D., Sharman, J. L., Faccenda, E., Southan, C., Pawson, A. J., Ireland, S., ... NC-IUPHAR. (2018). The IUPHAR/BPS guide to pharmacology in 2018: Updates and expansion to encompass the new guide to immunopharmacology. *Nucleic Acids Research*, 46, D1091–D1106. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1121>
- Jono, S., McKee, M. D., Murry, C. E., Shioi, A., Nishizawa, Y., Mori, K., ... Giachelli, C. M. (2000). Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circulation Research*, 87, E10–E17. <https://doi.org/10.1161/01.res.87.7.e10>
- Joubert, P., Ketteler, M., Salcedo, C., & Perello, J. (2016). Hypothesis: Phytate is an important unrecognised nutrient and potential intravenous drug for preventing vascular calcification. *Medical Hypotheses*, 94, 89–92. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2016.07.005>
- Kapustin, A. N., Chatrou, M. L., Drozdov, I., Zheng, Y., Davidson, S. M., Soong, D., ... Shanahan, C. M. (2015). Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circulation Research*, 116, 1312–1323. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305012>
- Karamched, S. R., Nosoudi, N., Moreland, H. E., Chowdhury, A., & Vyavahare, N. R. (2019). Site-specific chelation therapy with EDTA-loaded albumin nanoparticles reverses arterial calcification in a rat model of chronic kidney disease. *Scientific Reports*, 9, 2629. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39639-8>
- Karwowski, W., Naumnik, B., Szczepanski, M., & Mysliwiec, M. (2012). The mechanism of vascular calcification—A systematic review. *Medical Science Monitor*, 18, RA1–RA11.
- Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010). Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. *British Journal of Pharmacology*, 160, 1577–1579.
- Lanzer, P., Boehm, M., Sorribas, V., Thiriet, M., Janzen, J., Zeller, T., ... Shanahan, C. (2014). Medial vascular calcification revisited: Review

- and perspectives. *European Heart Journal*, 35, 1515–1525. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu163>
- Leopold, J. A. (2015). Vascular calcification: Mechanisms of vascular smooth muscle cell calcification. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 25, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2014.10.021>
- López-González, A. A., Grases, F., Monroy, N., Marí, B., Vicente-Herrero, M. T., Tur, F., & Perelló, J. (2013). Protective effect of myo-inositol hexaphosphate (phytate) on bone mass loss in postmenopausal women. *European Journal of Nutrition*, 52, 717–726. <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0377-6>
- Mizobuchi, M., Towler, D., & Slatopolsky, E. (2009). Vascular calcification: The killer of patients with chronic kidney disease. *Journal of American Society of Nephrology*, 20, 1453–1464. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008070692>
- Muñoz, J. A., López-Mesas, M., & Valiente, M. (2010). Minimum handling method for the analysis of phosphorous inhibitors of urolithiasis (pyrophosphate and phytic acid) in urine by SPE-ICP techniques. *Analytica Chimica Acta*, 658, 204–208. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.11.003>
- Muñoz, J. A., & Valiente, M. (2003). Determination of phytic acid in urine by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 75, 6374–6378. <https://doi.org/10.1021/ac0345805>
- Nigwekar, S. U., Thadhani, R., & Brandenburg, V. M. (2018). Calciphylaxis. *The New England Journal of Medicine*, 378, 1704–1714. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1505292>
- Noordzij, M., Cranenburg, E. M., Engelsman, L. F., Hermans, M. M., Boeschoten, E. W., Brandenburg, V. M., ... for the NECOSAD Study Group. (2011). Progression of aortic calcification is associated with disorders of mineral metabolism and mortality in chronic dialysis patients. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 26, 1662–1669. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq582>
- O'Neill, W. C., & Hardcastle, K. I. (2012). The chemistry of thiosulfate and vascular calcification. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 27, 521–526. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr375>
- O'Neill, W. C., & Lomashvili, K. A. (2010). Recent progress in the treatment of vascular calcification. *Kidney International*, 78, 1232–1239. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.334>
- Pasch, A., Schaffner, T., Huynh-Do, U., Frey, B. M., Frey, F. J., & Farese, S. (2008). Sodium thiosulfate prevents vascular calcifications in uremic rats. *Kidney International*, 74, 1444–1453. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.455>
- Perelló, J., Joubert, P. H., Ferrer, M. D., Canals, A. Z., Sinha, S., & Salcedo, C. (2018). First-time-in-human randomized clinical trial in healthy volunteers and haemodialysis patients with SNF472, a novel inhibitor of vascular calcification. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 84, 2867–2876. <https://doi.org/10.1111/bcp.13752>
- Raggi, P., Bellasi, A., Bushinsky, D., Bover, J., Rodriguez, M., Ketteler, M., ... Chertow, G. M. (2020). Slowing progression of cardiovascular calcification with SNF472 in patients on hemodialysis: Results of a randomized Phase 2b study. *Circulation*, 141, 728–739. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044195>
- Salcedo, C., Joubert, P. H., Ferrer, M. D., Canals, A. Z., Maduell, F., Torregrosa, V., ... Perelló, J. (2019). A phase 1b randomized, placebo-controlled clinical trial with SNF472 in haemodialysis patients. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 85, 796–806. <https://doi.org/10.1111/bcp.13863>
- Sarnak, M. J., Levey, A. S., Schoolwerth, A. C., Coresh, J., Culleton, B., Hamm, L. L., ... American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. (2003). Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: A statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Hypertension*, 42, 1050–1065. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000102971.85504.7c>
- Schurgers, L. J., Spronk, H. M., Skepper, J. N., Hackeng, T. M., Shanahan, C. M., Vermeer, C., ... Proudfoot, D. (2007). Post-translational modifications regulate matrix Gla protein function: Importance for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5, 2503–2511. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02758.x>
- United States Renal Data System. (2018). 2018 USRDS annual data report: Epidemiology of kidney disease in the United States. <https://www.usrds.org/2018/view/Default.aspx>. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases: Bethesda, MD.
- Verberckmoes, S. C., De Broe, M. E., & D'Haese, P. C. (2003). Dose-dependent effects of strontium on osteoblast function and mineralization. *Kidney International*, 64, 534–543. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00123.x>
- Wanner, C., Krane, V., Marz, W., Olschewski, M., Mann, J. F., Ruf, G., & Ritz, E. (2005). Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *The New England Journal of Medicine*, 353, 238–248. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043545>
- Yang, H., Curinga, G., & Giachelli, C. M. (2004). Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney International*, 66, 2293–2299. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.66015.x>
- Yiu, A. J., Callaghan, D., Sultana, R., & Bandyopadhyay, B. C. (2015). Vascular calcification and stone disease: A new look towards the mechanism. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 2, 141–164. <https://doi.org/10.3390/jcdd2030141>

How to cite this article: Perelló J, Ferrer MD, del Mar Pérez M, et al. Mechanism of action of SNF472, a novel calcification inhibitor to treat vascular calcification and calciphylaxis. *Br J Pharmacol*. 2020;1–16. <https://doi.org/10.1111/bph.15163>



OPEN

A novel assay to measure calcification propensity: from laboratory to humans

M. Mar Perez¹, Miguel D. Ferrer^{1,2}, Marta Lazo-Rodriguez^{3,4}, Ana Zeralda Canals¹, Elisenda Banon-Maneus^{3,4}, Josep M. Campistol^{3,4}, Stephan Miller⁵, Rekha Garg^{5,8}, Alex Gold^{5,6}, Carolina Salcedo¹✉ & Joan Perelló^{1,7}

Cardiovascular calcification (CVC) contributes to morbidity and mortality in patients undergoing dialysis. We examined the pharmacodynamic effects of SNF472, a calcification inhibitor, on plasma calcium phosphate crystallization using spectrometric measurements, and its correlations with effects on CVC in rats or humans. Rats (N = 38) injected with vitamin D (days 1–3) to induce CVC were infused with saline or SNF472 (days 1–12). Inhibition of CVC was 50–65% with SNF472 3 mg/kg and ~ 80% with SNF472 10 or 30 mg/kg. SNF472 dose-dependently inhibited calcium phosphate crystallization, which correlated with inhibition of CVC ($r = 0.628$, $P = 0.005$). In patients with calciphylaxis (N = 14), infusion of SNF472 (~ 7 mg/kg) during hemodialysis for 12 weeks inhibited calcium phosphate crystallization by nearly 70%. In patients with CVC (N = 274), infusion of SNF472 during hemodialysis for 52 weeks inhibited calcium phosphate crystallization (placebo: 15%; 300 mg: 61%; 600 mg: 75%), which correlated with inhibition of CVC ($r = 0.401$, $P = 0.003$). These findings show a direct correlation between inhibition of calcium phosphate crystallization in plasma and inhibition of CVC both in a rat model and in humans, supporting the use of the pharmacodynamic assay in clinical trials as a potentially predictive tool to evaluate the activity of calcification inhibitors.

Cardiovascular calcification (CVC) is a major contributor to increased morbidity and mortality in patients undergoing dialysis¹. CVC results in the deposition of calcium in vessel walls and the aortic valve, increasing the risk of cardiovascular events². In calciphylaxis, an extreme form of CVC in small peripheral blood vessels leads to progressive, painful, necrotic skin ulcers resulting from occlusion of microvessels, due to deposition of calcium in the subcutaneous adipose tissue and dermis³. CVC is also a unique feature of coronary artery disease (CAD) and peripheral artery disease (PAD) in end stage kidney disease (ESKD). Medial calcification in these patients is associated with vascular stiffening and arteriosclerosis⁴. The most common type of medial calcification, Monckeberg's sclerosis, occurs with greater frequency in patients undergoing dialysis than in those who are not undergoing dialysis⁴. While intimal and medial calcification may each occur independently, patients undergoing dialysis often exhibit both types⁵. Numerous complex mechanisms for cardiovascular calcification have been proposed⁶. Hyperphosphatemia, hypercalcemia, hyperparathyroidism, and abnormal vitamin D metabolism are known risk factors⁷, but the final common pathway is the deposition of hydroxyapatite crystals containing calcium, phosphate, and hydroxide $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ ^{6,8}.

There are currently no approved therapies to prevent or treat the progression of CVC and CVC related diseases like calciphylaxis or PAD in patients with ESKD. Supportive therapies include phosphate binders to reduce hyperphosphatemia⁶ and calcimimetics to address hyperparathyroidism⁹, thereby reducing hypercalcemia. However, these treatments do not directly target the formation and growth of hydroxyapatite crystals. SNF472, a selective calcification inhibitor, is in development to address these unmet medical needs in patients with ESKD on dialysis. SNF472 is an intravenous formulation of *myo*-inositol hexaphosphate (IP6 or phytate), which directly inhibits hydroxyapatite crystallization by binding selectively to the surface of the crystal. By inhibiting the final

¹Sanifit Therapeutics, Parc Bit - Europa Building, 2nd Floor, 07121 Palma de Mallorca, Spain. ²Department of Fundamental Biology and Health Sciences, University of the Balearic Islands, Palma, Spain. ³Laboratori Experimental de Nefrologia i Trasplantament (LENIT), Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica, Barcelona, Spain. ⁴Spanish Kidney Research Network, ISCIII-RETIC REDinREN RD016/0 009, Madrid, Spain. ⁵Sanifit Therapeutics, San Diego, CA, USA. ⁶Department of Medicine, Stanford University, Palo Alto, CA, USA. ⁷Laboratory of Renal Lithiasis Research, University of the Balearic Islands, Palma, Spain. ⁸Present address: PharmaDRS Consulting, LLC, San Diego, USA. ✉email: carolina.salcedo@sanifit.com

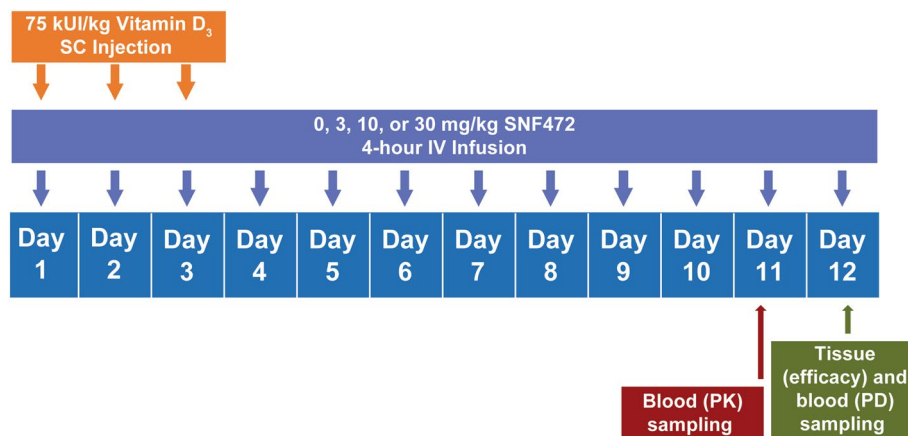


Figure 1. Animal study: experimental design. N = 10 for 0 mg/kg (saline) and 30 mg/kg groups; N = 9 for 3 and 10 mg/kg groups. IV = intravenous; SC = subcutaneous; PD = pharmacodynamics; PK = pharmacokinetics.

common pathway, the formation and growth of hydroxyapatite crystals, the efficacy of SNF472 is independent of the etiology of vascular calcification^{10,11}. In vitro studies showed that at a concentration of 30 mg/L (45.5 μ M) or above, SNF472 concentrations increase in blood while infused, reach a plateau, and remain nearly constant during dialysis¹². Phase 1 and 2a clinical trials also showed that SNF472 was not dialyzable when it was infused during the dialysis session at doses ranging from 3 to 20 mg/kg^{13,14}.

As described in other publications^{15,16}, previously available tests for calcification, such as the T50 test to follow the transition of primary calciprotein particles (CPP) to secondary CPP or the determination of the levels of circulating fetuin-A-containing CPP might not be adequate to evaluate the effectiveness of potential therapeutic agents such as SNF472, which act directly on the hydroxyapatite crystal at the vessel walls. Therefore, as a translational step from basic science to clinical development, we prepared and validated a pharmacodynamic (PD) biomarker assay to measure inhibition of calcium phosphate crystallization in plasma samples¹⁵. Results from plasma samples in rats and humans (with or without dialysis) validated the assay to measure inhibition of crystallization in the presence of polyphosphates, fetuin-A, sodium thiosulfate, and SNF472¹⁵. A phase 1b trial of SNF472 in patients undergoing dialysis provided further evidence supporting the ability of the assay to detect inhibition of calcium phosphate crystallization¹⁴.

A single-arm, open-label phase 2 trial to evaluate efficacy and safety in 14 patients with calciphylaxis showed improvement in wound healing and pain during 12 weeks of SNF472 treatment at a dose of approximately 7 mg/kg¹⁷. In a double-blind, placebo-controlled randomized phase 2b trial in patients on hemodialysis, SNF472 treatment for 52 weeks significantly attenuated the progression of coronary artery calcium and aortic valve calcification¹⁸. In this report, we evaluated the correlation between the PD assay and cardiovascular (heart and aorta) calcification in rats and the association between the PD assay and efficacy measures in patients who participated in these clinical trials.

Results

Animal study. Rats (N = 38) received vitamin D from day 1 to day 3. Each rat received saline (n = 10) or SNF472 at 3 mg/kg (n = 9), 10 mg/kg (n = 9), or 30 mg/kg (n = 10) over a 4-h infusion period once daily from day 1 to day 12 (Fig. 1). Five animals died before day 12 in the 10 mg/kg (n = 1), 30 mg/kg (n = 3), and saline (n = 1) groups. We attributed the causes of death to vitamin D intoxication.

Vitamin D injections for 3 days induced cardiovascular calcification in the heart and aorta. Administering SNF472 at 3 mg/kg for 12 days significantly ($P < 0.05$ vs saline) inhibited cardiovascular calcification by 65% in the aorta (Fig. 2a) and by 44% in the heart (Fig. 2b). Administering the 10 mg/kg and 30 mg/kg doses of SNF472 for 12 days achieved statistically significant ($P < 0.05$ vs saline), maximum inhibition of calcification (approximately 80%) in both the aorta and heart. Using a non-linear regression model, the mean dose of SNF472 required for 50% inhibition of calcification (ID_{50}) was 1.6 mg/kg for the aorta and 2.7 mg/kg for the heart.

Pharmacokinetic (PK) analysis at steady state on day 11 showed that SNF472 concentrations corresponded to the administered dose (Fig. 3a). SNF472 plasma concentrations were below the limit of quantification (LLOQ) of the validated bioanalytical method (0.76 μ M) in rats receiving 3 mg/kg and dose-dependent in rats receiving 10 or 30 mg/kg. Mean C_{max} (the concentration at the end of the 4-h infusion) was 21 μ M for a dose of 10 mg/kg and 100 μ M for a dose of 30 mg/kg. Using a non-linear regression model, the mean concentration of SNF472 required for 50% inhibition of calcification (IC_{50}) was 4.8 μ M for the heart (Fig. 3b). The IC_{50} was not calculable for the aorta because of the high activity (65% inhibition of calcification) at the lowest dose of SNF472 tested.

Using the PD assay, SNF472 significantly and dose-dependently inhibited the formation of calcium phosphate crystals (Fig. 4a). Using a non-linear regression model, inhibition of calcium phosphate crystallization had a concentration–response relationship with SNF472 plasma levels at C_{max} , showing an IC_{50} of 17 μ M and an IC_{80} of 30 μ M (Fig. 4b). We observed a direct correlation ($r = 0.628$, $P = 0.005$) between the PD assay results and the inhibition of cardiovascular calcification (Fig. 4c).

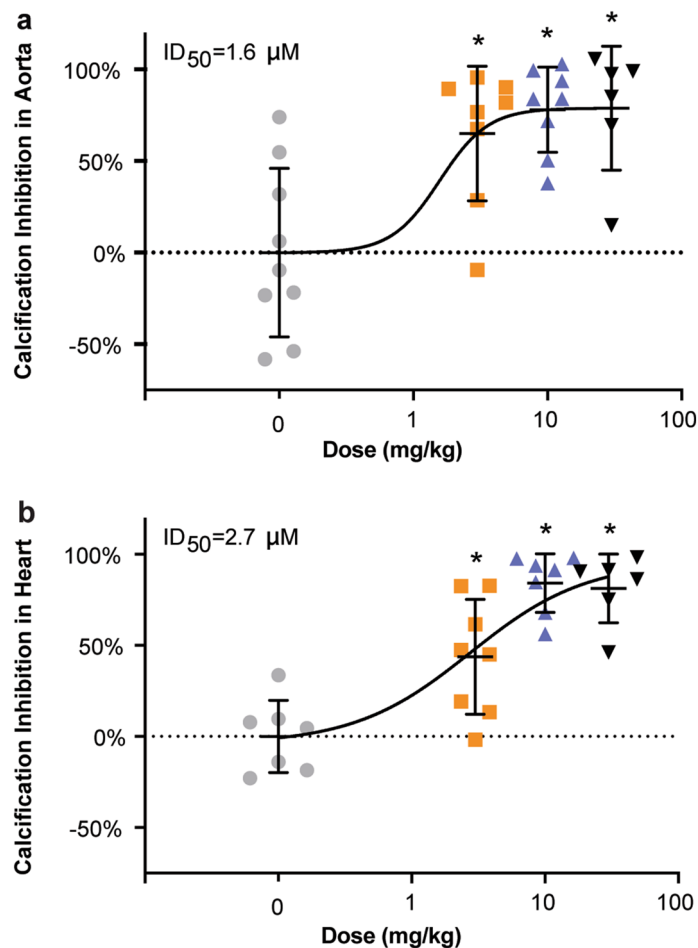


Figure 2. Inhibition of cardiovascular calcification in (a) aorta and (b) heart with SNF472 treatment in rats. Calcification was induced with daily subcutaneous injections of vitamin D (75,000 IU/kg) on day 1 to day 3. Rats were treated with 4-h intravenous infusions of saline (0 mg/kg) or SNF472 (3, 10, or 30 mg/kg) daily on day 1 to day 12. On day 12, animals were anesthetized, and the aorta and heart were excised for examination. Results are shown as percent inhibition of cardiovascular calcification relative to the control group that received saline infusions. Values are plotted as the mean, standard deviation, and individual points. Outlier results are excluded for two aortas (one each in the 3 mg/kg and 30 mg/kg groups) and five hearts (one in each SNF472 dosing group and two in the saline group). * $P < 0.05$ versus saline by one-way ANOVA.

Calciphylaxis clinical trial. The phase 2 open-label, single-arm clinical trial enrolled 14 patients with calciphylaxis lesions, with 11 patients completing 12 weeks of SNF472 treatment, at a dose of approximately 7 mg/kg, infused during each dialysis session. Efficacy and safety results from this study were reported previously¹⁷.

One patient's plasma concentration of SNF472 was below the LLOQ (0.76 μM) at the end of the last infusion for unknown reasons. This patient's SNF472 concentration at the end of the first infusion was similar to the values observed for the other patients in the study. PK and PD results for this patient after the last infusion were omitted from the summary statistics. The mean C_{max} at the end of the first (week 1 day 1) and last (week 12 day 5) infusions were 29 μM and 28 μM , respectively (Table 1). Median C_{max} at the end of the first and last infusions was 24 μM (range 3–62) and 21 μM (range 4–61), respectively. The accumulation factor ($\text{Rac } C_{\text{max}}$) ranged from 0.2 to 2.5, with a mean value of 1.3 and a coefficient of variation of 69%.

For the PD assay, the crystallization inhibition values were similar on the first and last days of SNF472 administration, with a mean of 65% (median, 69%; range 39–80%) after the first infusion and a mean of 68% (median, 68%; range 49–86%) after the last infusion (Fig. 5 and Table 1). Thus, inhibition of calcium phosphate crystallization in plasma was consistent across 12 weeks of SNF472 treatment and was in the plateau phase of the previously described PD effect of this compound^{13,14,17}.

Because the SNF472 plasma concentrations were higher than the anticipated PD plateau, the PK-PD relationship could not be clearly established (Fig. 6a). Greater than 50% inhibition of calcium phosphate crystallization was observed in 83% (19 of 23) of end-of-infusion measurements at either visit, with median SNF472 concentrations of 22 μM (3–62 μM). At week 12 day 5, 8 of 9 patients with end-of-infusion measurements had greater than 50% inhibition of calcium phosphate crystallization with median SNF472 end-of-infusion concentrations

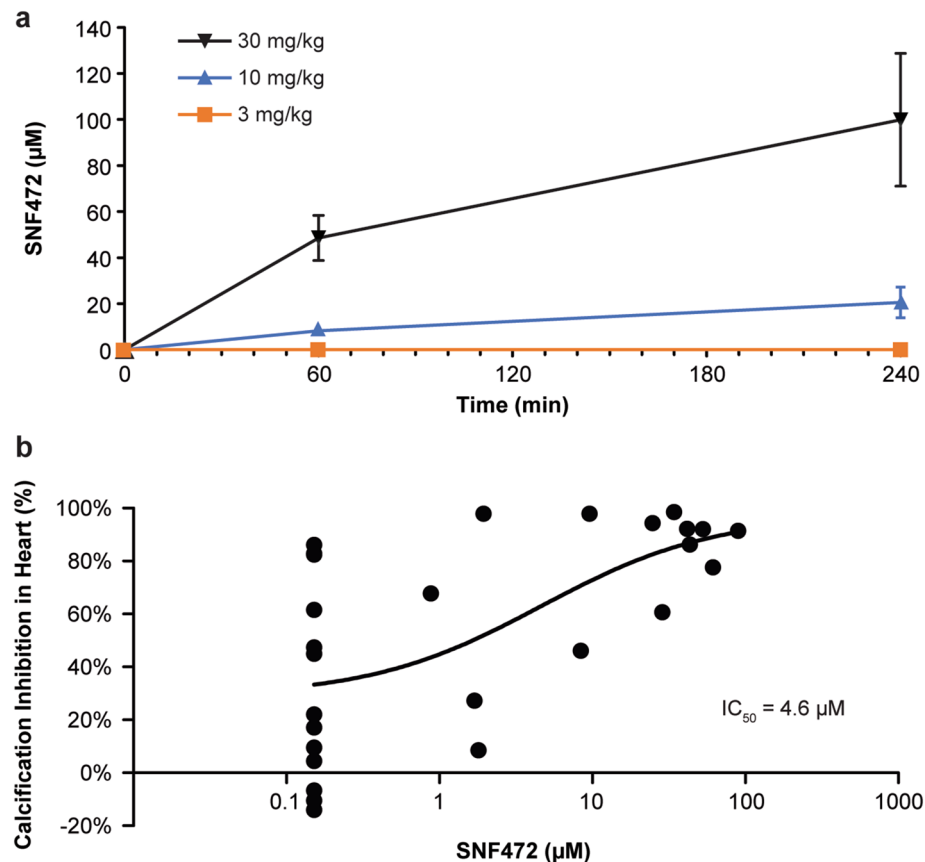


Figure 3. (a) Pharmacokinetics of SNF472 in rats treated with vitamin D to induce cardiovascular calcification. (b) Non-linear regression between calcification inhibition in heart and SNF472 plasma levels in rats. The mean concentration of SNF472 required for 50% inhibition of calcification (IC_{50}) was 4.6 μM for the heart and was not calculable for the aorta because of the high activity (65%) at the lowest dose of SNF472 tested. Calcification was induced with daily subcutaneous injections of vitamin D (75,000 IU/kg) on day 1 to day 3. Rats were treated with 4-h intravenous infusions of saline or SNF472 (3, 10, or 30 mg/kg) daily on day 1 to day 12. Plasma samples for SNF472 concentrations (mean \pm SE) were obtained on day 11 of treatment with saline or SNF472. Plasma samples with concentrations below 1.5 μM (due to problems in the batch analysis) were not considered to calculate arithmetic mean. Plasma samples with concentrations below the limit of quantification (0.76 μM) were considered as zero to calculate the arithmetic mean.

of 21 μM (4–61 μM). For individual patients, the change in PD effect from week 1 to week 12 showed a positive correlation ($r = 0.753$) with the change in SNF472 plasma concentrations during the same interval (Fig. 6b).

The relationship between PD results and efficacy measures (changes in wound scores or in pain scores) could not be explored in this trial due to several limitations: only one dose level was used in a limited number of patients, there was no placebo group, and plasma concentrations were above the plateau of the PD assay for most of the samples.

Cardiovascular calcification clinical trial (CaLIPSO Study). The phase 2b randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial enrolled 274 patients with coronary artery calcification and assigned them to 52 weeks of treatment with placebo ($n = 91$), SNF472 300 mg ($n = 92$), or SNF472 600 mg ($n = 91$). CT Scans to determine calcium volume scores were conducted at baseline and week 52. Efficacy and safety results from this study were reported previously¹⁸.

The results of the PD assay for inhibition of calcium phosphate crystallization across the visits at week 1, 10, 22, and 52 were 15% \pm 17% for placebo, 61% \pm 19% for SNF472 300 mg, and 75% \pm 9% for SNF472 600 mg (mean \pm SD). There was an inverse correlation between the results of the PD assay and the primary efficacy endpoint (percent change from baseline to Week 52 in the coronary artery calcification score by volume [CAC volume]). Patients with greater inhibition of calcium phosphate crystallization had lower progression of CAC. A linear model fitted with the experimental data showed $r = 0.401$ with $P = 0.003$ and (Fig. 7). The estimated percent change from baseline to week 52 in CAC volume had an X-axis intercept of 22% (95% CI 11% to 33%) and slope of -0.238 (95% CI -0.389 to 0.086). Interestingly, the X-axis intercept for no inhibition of crystallization in this analysis coincided with the observed progression rate in CAC volume for the placebo group in the CaLIPSO study using either the modified intent-to-treat population (20%) or the per protocol population (24%)¹⁸.

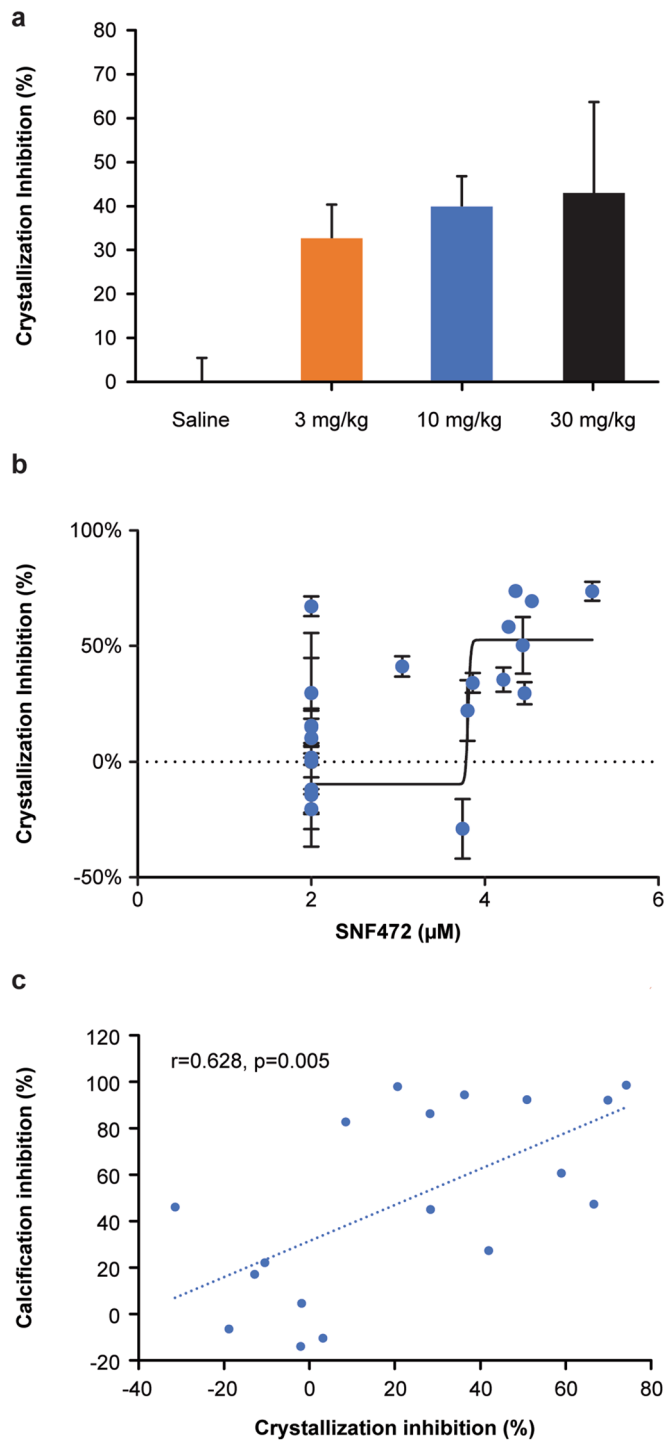


Figure 4. Results for inhibition of plasma crystallization and cardiovascular calcification in rats treated with vitamin D and SNF472. **(a)** Percent inhibition of plasma calcium phosphate crystallization by dose of SNF472 (median, interquartile range, and individual points). **(b)** Relationship between SNF472 circulating levels and inhibition of plasma calcium phosphate crystallization. Mean (\pm SEM) of 6 replicates assayed per sample. **(c)** Correlation between inhibition of cardiovascular calcification and inhibition of plasma calcium phosphate crystallization. To measure calcification, rats were treated with daily subcutaneous injections of vitamin D (75,000 IU/kg) on day 1 to day 3. To measure pharmacodynamic effects, rats were treated with 4-h intravenous infusions of saline or SNF472 (3, 10, or 30 mg/kg) daily on day 1 to day 12, then plasma calcium phosphate crystallization was induced ex vivo on day 12 by adding ionized calcium (12.5 mM) and phosphate (1.5 mM) to plasma samples, followed by spectrophotometric measurements at 550 nm every 3 min for 30 min.

Patient	Week 1 day 1		Week 12 Day 5		Rac C _{max}	ΔC _{max} (μM) ^c	ΔPD effect (%) ^c
	Plasma C _{max} ^a (μM)	PD effect (%) ^b	Plasma C _{max} ^a (μM)	PD effect (%) ^b			
1	14.5	65.1	23.9	86.3	1.6	9.4	21.2
2	2.8	66.9	6.8	65.4	2.5	4.1	-1.5
3	29.0	38.7	NA	NA	NQ	NQ	NQ
4	21.0	79.5	4.3	59.0	0.2	-16.7	-20.5
5	36.8	51.0	NA	NA	NQ	NQ	NQ
6	9.4	61.7	20.7	75.7	2.2	11.3	14.0
7	15.8	74.5	<LLOQ ^d	-15.0 ^d	NQ	NQ	NQ
8	12.9	46.7	NA	NA	NQ	NQ	NQ
9	61.6	80.2	18.8	49.0	0.3	-42.7	-31.2
10	22.1	78.6	48.5	78.8	2.2	26.4	0.2
11	62.4	77.0	15.2	67.7	0.2	-47.3	-9.3
12	42.9	45.2	60.9	56.9	1.4	18.0	11.7
13	25.9	72.2	NA	NA	NQ	NQ	NQ
14	50.8	71.0	54.1	76.4	1.1 s	3.3	5.4
N	14	14	9	9	9		
Mean	29	65	28	68	1.3		
SD	19	14	21	12	0.9		
CV (%)	66	22	75	18	69		
Median	24	69	21	68	1.4		
Min–Max	3–62	39–80	4–61	49–86	0.2–2.5		

Table 1. Summary of pharmacokinetic and pharmacodynamic results at the end of the first and last infusion of SNF472 during hemodialysis in the phase 2 clinical trial of patients with calciphylaxis. <LLOQ, below limit of quantification (0.76 μM); NA, sample not available; C_{max}, maximum concentration; CV, coefficient of variation; NQ, not quantifiable; PD, pharmacodynamic; Rac C_{max}, accumulation factor calculated as C_{max,week12day5}/C_{max,week1day1}. ^aPlasma concentration obtained at the end of infusion. ^bPD effect = -[inhibition]. ^cIndividual difference between values obtained in week 12 day 5 and week 1 day 1. ^dValues not considered in summary statistics because plasma concentration was below the limit of quantification at the end of infusion.

Discussion

Increased CVC in patients with ESKD undergoing dialysis is associated with higher morbidity and mortality than the general population¹⁹. Therefore, targeting vascular calcification directly could have a beneficial role in CVC-related diseases including calciphylaxis, PAD, and coronary disease. However, clinical trials to assess the potential effects of anti-calcification compounds on CVC, and how this translates to decreased risk of events, require a long period of study. Therefore, new biomarkers are needed to assess the potential activity of new inhibitors of calcification.

We previously described our development and validation of a PD assay to measure calcium phosphate crystallization by spectrophotometry under standard temperature and agitation conditions that simulate crystallization¹⁵. In vitro, the PD assay showed concentration-dependent inhibition of calcium phosphate crystallization by up to 80% with addition of SNF472 to control rat plasma. In healthy rats, subcutaneous administration of SNF472 inhibited calcium phosphate crystallization in blood with a steep dose–response relationship and a narrow range between initial evidence of activity and asymptotic maximal inhibition of up to 70%.

In a phase 1b clinical study, we previously used the PD assay to show that infusion of SNF472 during hemodialysis dose-dependently inhibited calcium phosphate crystallization¹⁴. In that study, one cohort of patients received SNF472 doses ranging from 3 to 20 mg/kg for 1 week, and another cohort received SNF472 at a fixed dose of 10 mg/kg for 4 weeks. Mean ID₅₀ and ID₈₀ for SNF472 (doses associated with 50% and 80% inhibition of calcium phosphate crystallization) were 2.2 and 5.6 mg/kg, respectively.

Each of our previous studies examined the effects of SNF472 on calcium phosphate crystallization in healthy animals or in human volunteers without calcification disorders at study entry. In this paper, we showed that effects of SNF472 on the PD assay correlated with reduction in progression of pre-existing CVC. In rats, we administered vitamin D to induce CVC and showed significant inhibition of plasma calcium phosphate crystallization and heart calcification in a dose-dependent manner when we administered SNF472. Results obtained in the PD assay correlated directly with inhibition of calcification in the heart.

We then applied the PD assay in an open-label phase 2 trial, which showed that SNF472 treatment for 12 weeks in 14 patients with calciphylaxis on hemodialysis improved wound healing and pain¹⁷. In this study, the PD assay showed that SNF472 inhibited calcium phosphate crystallization by nearly 70% from the start to the end of treatment. The study had no placebo group and the PD effect reached the plateau of the dose–response. Therefore, a correlation between PD effect and efficacy measures could not be established in the calciphylaxis clinical trial.

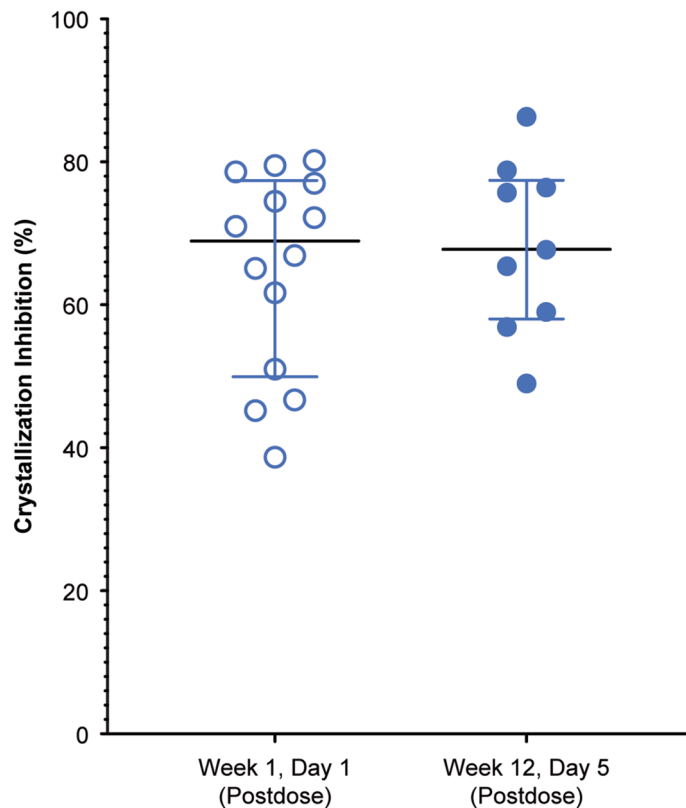


Figure 5. Pharmacodynamic results in the phase 2 clinical trial of SNF472 treatment during hemodialysis in patients with calciphylaxis. Values are plotted as the median, interquartile range, and individual points. Patients with calciphylaxis undergoing hemodialysis (N = 14) received SNF472 at a weight-based dose corresponding to 7 mg/kg during dialysis sessions for 12 weeks. Crystallization inhibition was measured at the end of the infusion for the first dose (week 1 day 1) and the last dose (week 12 day 5). One value for the last dose was not considered in summary statistics because the patient's plasma concentration was below the limit of quantification at the end of infusion.

We overcame this limitation when we applied the PD assay again in a phase 2b, randomized, placebo-controlled trial evaluating the efficacy and safety of SNF472 in 274 patients with CVC on hemodialysis. The primary report from the CVC study showed that SNF472 administered for 52 weeks was well tolerated and significantly inhibited progression of CVC¹⁸. The PD assay showed at least 50% inhibition of calcium phosphate crystallization for most of the patients who received SNF472. The inclusion of a placebo group and two SNF472 treatment groups (300 mg and 600 mg) allowed us to build a model showing a linear relationship between the PD assay effect and a decrease in CVC progression over 52 weeks in humans¹⁸. The correlation between PD effect and inhibition of CVC (progression of CAC volume) in this clinical trial was similar to the correlation that we observed in our animal models.

In conclusion, in this report we used our previously validated PD assay for calcium phosphate crystallization to show that SNF472 substantially and consistently inhibits calcium phosphate crystallization with repeated dosing, and that this PD effect correlates with reduction in CVC progression in rats and in clinical effect in patients with ESKD on hemodialysis. This translational, noninvasive tool may be used in future research to assess the potential therapeutic effects of calcification inhibitors such as SNF472 in CVC and related diseases like calciphylaxis, CAD, or PAD.

Methods

PD assay. In a previous report we described the development and validation of the PD assay for inhibition of calcium phosphate crystallization¹⁵. For this assay, we added ionized calcium 12.5 mM and phosphate 1.5 mM to plasma samples *ex vivo* to induce calcium phosphate crystallization, and agitated the samples at 750 rpm for 30 min. We obtained spectrophotometric measurements at 550 nm every 3 min and plotted the increase in absorbance versus the logarithm of time to calculate the slope for the linear interval. Each plasma sample generated one value for the slope. We calculated inhibition of calcification induction as the percentage change in the slope for the linear interval between pre-dose and post-dose (end of infusion) samples Eq. (1):

$$\% \text{ change (inhibition)} = [(\text{slope post-dose} - \text{slope pre-dose}) \div \text{slope pre-dose}] \times 100. \quad (1)$$

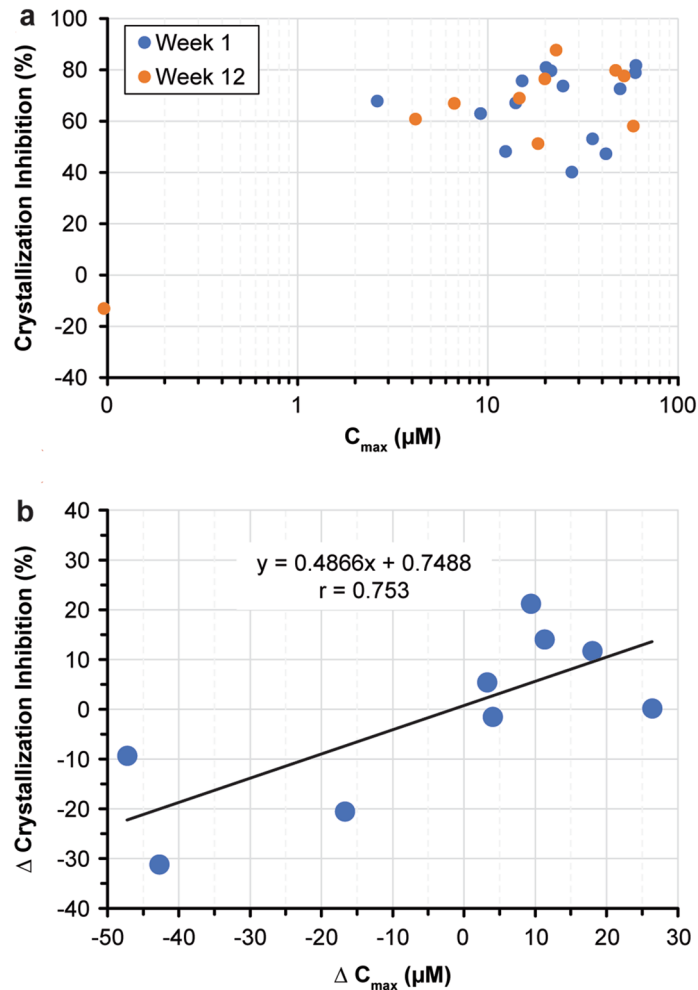


Figure 6. (a) Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for SNF472. (b) Individual changes of the pharmacodynamic effect with plasma concentrations of SNF472 (week 12 vs. week 1). Patients undergoing hemodialysis with calciphylaxis (N = 14) received SNF472 at a weight-based dose corresponding to 7 mg/kg during dialysis for 12 weeks. Plasma crystallization inhibition was measured at the end of the infusion for the first dose (week 1 day 1) and the last dose (week 12 day 5). Plasma samples with concentrations below the limit of quantification (0.76 μM) were considered zero.

Animal study. Animals were kept at constant temperature, humidity, and on a 12-h light/dark cycle with free access to water and rat chow. The study was approved by and conducted according to the guidelines of the local animal ethics committee (Comitè ètic d'experimentació animal, Catalunya, Spain; Decree 214/97). The experimental design for the animal study is summarized in Fig. 1. We divided 38 Sprague Dawley rats into four groups of 9 or 10 animals each. We implanted an intravenous polyurethane catheter (0.62 \times 1.02 mm, Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA) into the jugular vein of each animal during the acclimatization period, which lasted 6 to 8 days before the start of treatment and calcification induction. We externalized the catheter through an incision in the interscapular region and attached it to a delivery system via a tether system with a harness and a swivel joint (Instech Laboratories). We connected this system to an 8-channel infusion pump (New Era 1800, Farmingdale, NY, USA). Each day we filled the catheter with fresh heparinized saline to avoid coagulation.

We induced cardiovascular calcification in all rats by administering vitamin D 75,000 IU/kg subcutaneously daily from day 1 to day 3. In the 4 groups, we administered saline or SNF472 at 3, 10, 30 mg/kg daily from day 1 to day 12 by 4-h intravenous infusion. We weighed each animal daily.

On day 11, before infusion and 60 and 240 min after the infusion start, we collected approximately 200 μL of blood from each animal in a K_2EDTA vacuette tube without interrupting the infusion. We quantified SNF472 levels in blood by liquid chromatography-mass spectroscopy²⁰.

On day 12, we anesthetized each animal with isoflurane at the end of the 4-h infusion and performed cardiac puncture to extract total blood (8–10 mL) into collection tubes for plasma (K_3EDTA , 6 mL) and serum (2–3 mL). We used the PD assay to measure calcium phosphate crystallization in the plasma samples. After exsanguination, we sacrificed the animals and performed necropsy, collecting the aorta, heart, right kidney, and

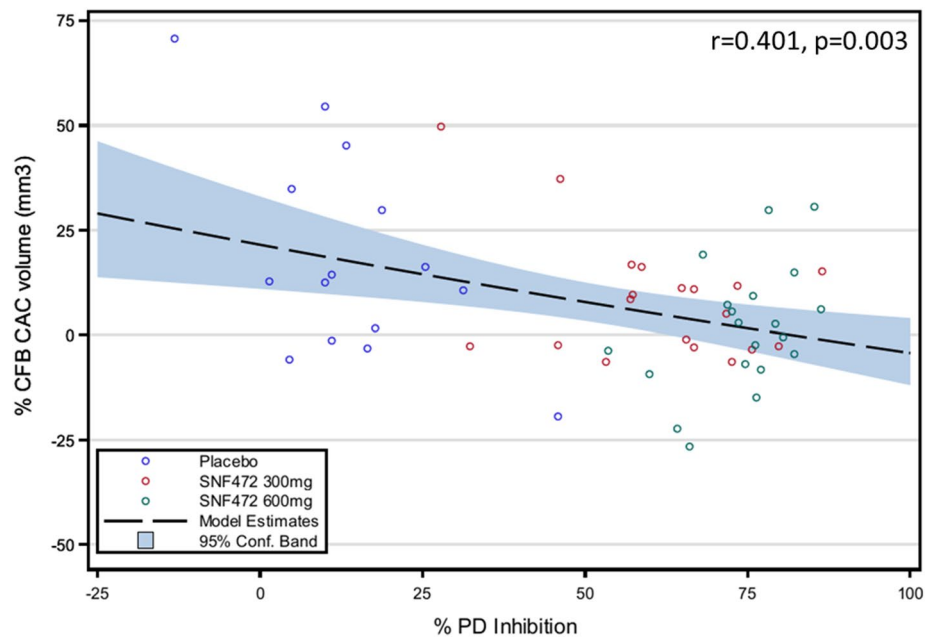


Figure 7. Linear model for the relationship of % change from baseline in coronary artery calcium (CAC) volume at week 52 versus average PD effect (%). Patients undergoing hemodialysis ($N = 55$) received placebo or SNF472 at doses of 300 or 600 mg/kg during dialysis, thrice weekly, for 52 weeks. Plasma crystallization inhibition was measured at the end of the infusion at weeks 1, 10, 22 and 52, and the average % inhibition of calcium phosphate crystallization found in these 4 sampling times was calculated and used in the model, as a read-out for the entire treatment of 52 weeks.

femurs for calcium content measurement by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after acidic digestion²¹.

We used a boxplot assay to detect outliers, which we discarded from the statistical analysis, and summarized the remaining results by treatment group. Outliers were defined as the observations that were below first quartile minus 3 times the Interquartile range (IQR) or above third quartile plus 3 times the IQR. In each group, we calculated the mean ID_{50} and the mean IC_{50} in the heart and aorta using a non-linear fitting program (GraphPad Prism; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and semi-logarithmic concentration response curves. We performed a one-way ANOVA to detect the effect on tissue calcification of each dose of SNF472 compared with saline. When significant effects were observed ($P < 0.05$ vs saline), we applied a post-hoc least significant difference test to identify differences between groups. For PD analysis, we performed a Kruskal–Wallis analysis for non-normally distributed data. We conducted a bivariate Pearson correlation test between PD assay results and cardiovascular calcification results and a four-parameter variable slope non-linear regression fixing the top at 65.7% (maximum degree of inhibition obtained in the validation of the method in rat ex vivo samples¹⁵) between PD assay results and SNF472 plasma levels at C_{max} .

Calciphylaxis clinical trial. The design of the calciphylaxis clinical trial has been published in detail¹⁷. In this open-label, single-arm clinical trial, we added SNF472 to standard care for 12 weeks in 14 patients undergoing hemodialysis with calciphylaxis. This report includes the results of PK and PD assessments. Clinical results for safety and effectiveness (wound healing, pain, and wound-related quality of life), were reported separately¹⁷. Eligible patients were ≥ 18 years of age and had clinically diagnosed calciphylaxis, which could include either newly diagnosed calciphylaxis or recurrent calciphylaxis that had been dormant with no skin lesion involvement for at least 90 days before study start. We administered SNF472 intravenously three times per week for 2.5 to 4 h, during each dialysis session, using an SNF472 dose of 400, 450, 700 or 900 mg for patients with a dry body weight of 50 to < 66 kg, 66 to < 81 kg, 81 to < 111 kg, or 111 to 150 kg, respectively, to achieve a weight-based dose of approximately 7 mg/kg.

We collected blood samples (4 mL), using the dialysis tubing so the patient was not disturbed, into polyethylene terephthalate tubes containing potassium (K_3 EDTA) before hemodialysis and at the end of SNF472 infusion for the first dose (baseline; day 1 of week 1) and last dose (day 5 of week 12). We measured SNF472 concentrations with a validated liquid chromatography-mass spectrometry method²⁰. We used another aliquot of plasma from the blood sample for the PD assay to measure calcium phosphate crystallization.

Each patient had two values for the percentage change in calcium phosphate crystallization (ie, percent inhibition): one at week 1 and one at week 12. We compared percent inhibition at week 1 and week 12 using a Wilcoxon signed-rank test as a non-parametric statistical hypothesis test, with an alpha level of 0.05 to compare the two related samples. We used percent inhibition and end-of-infusion plasma levels (C_{max}) to evaluate the potential PK-PD correlation. Available samples were included in the analysis for pharmacokinetic/pharmacodynamic

correlation if the SNF472 concentration was above the limit of detection. A total of 23 samples met these criteria: 14 samples at week 1 day 1, and 9 samples at week 12 day 5.

Patients gave written informed consent to participate. An ethics committee for each site (New England Independent Review Board for centers in the USA and the North West—Liverpool Central Research Ethics Committee for centers in the UK) approved the trial design, which was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was consistent with International Council for Harmonisation Guidelines on Good Clinical Practice and regulatory requirements. The clinical trial was registered at ClinicalTrials.gov as #NCT02790073.

Cardiovascular calcification clinical trial (CaLIPSO Study). The design of the cardiovascular calcification trial has been published in detail¹⁸. Briefly, we randomized 274 adult patients (18–80 years of age) on hemodialysis with a baseline CAC Agatston score of 100 to 3500 units on a screening non-contrast multi-detector computed tomography (MDCT) to receive placebo, SNF472 300 mg, or SNF472 600 mg, infused thrice weekly during hemodialysis for 52 weeks. MDCT imaging was repeated at week 52. Collection of blood samples at weeks 1, 10, 22, and 52, and treatment of blood samples to perform the PD assay were as described for the calciphylaxis clinical trial. A linear model was used to evaluate the relationship between PD and percent change from baseline to week 52 for CAC volume. This model is described by the formula:

$$Y = b_0 + b_1X + \varepsilon_i$$

where Y, value of the response; b_0 , intercept; b_1 , parameter estimate for variable X; ε_i , random error term. A standard assumption, adopted here, is that the ε_i terms are independent identically distributed with a mean of 0 and variance σ^2 . An additional standard assumption is that the error terms are normally distributed.

Linear model fitting was summarized by the value of the adjusted coefficient of correlation (R).

The average PD value for each particular patient was calculated as the mean value of individual PD values found in weeks 1, 10, 22, and 52 of treatment included in the per protocol population.

The study was approved by the research ethics committee of each participating institution and the trial was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. The clinical trial was registered at ClinicalTrials.gov as #NCT02966028.

Received: 12 November 2019; Accepted: 10 August 2020

Published online: 16 October 2020

References

- Mizobuchi, M., Towler, D. & Slatopolsky, E. Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 1453–1464. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008070692> (2009).
- New, S. E. & Aikawa, E. Cardiovascular calcification: an inflammatory disease. *Circ. J.* **75**, 1305–1313. <https://doi.org/10.1253/circ.j.75-11-0395> (2011).
- Nigwekar, S. U., Thadhani, R. & Brandenburg, V. M. Calciphylaxis. *N. Engl. J. Med.* **378**, 1704–1714. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1505292> (2018).
- Lanzer, P. *et al.* Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur. Heart J.* **35**, 1515–1525. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu163> (2014).
- Johnson, R. C., Leopold, J. A. & Loscalzo, J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ. Res.* **99**, 1044–1059. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000249379.55535.21> (2006).
- Giachelli, C. M. Vascular calcification mechanisms. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 2959–2964. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000145894.57533.C4> (2004).
- Mazhar, A. R. *et al.* Risk factors and mortality associated with calciphylaxis in end-stage renal disease. *Kidney Int.* **60**, 324–332. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00803.x> (2001).
- Joubert, P., Ketteler, M., Salcedo, C. & Perello, J. Hypothesis: Phytate is an important unrecognised nutrient and potential intravenous drug for preventing vascular calcification. *Med Hypotheses* **94**, 89–92. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2016.07.005> (2016).
- Savica, V., Santoro, D., Monardo, P., Mallamace, A. & Bellinghieri, G. Sevelamer carbonate in the treatment of hyperphosphatemia in patients with chronic kidney disease on hemodialysis. *Ther. Clin. Risk Manag.* **4**, 821–826. <https://doi.org/10.2147/tcrm.s3075> (2008).
- Grases, F. *et al.* Phytate inhibits bovine pericardium calcification in vitro. *Cardiovasc. Pathol.* **17**, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2007.08.005> (2008).
- Grases, F. & Costa-Bauza, A. Phytate (IP6) is a powerful agent for preventing calcifications in biological fluids: usefulness in renal lithiasis treatment. *Anticancer Res.* **19**, 3717–3722 (1999).
- Perelló, J. *et al.* SNF472, a novel inhibitor of vascular calcification, could be administered during hemodialysis to attain potentially therapeutic phytate levels. *J. Nephrol.* **31**, 287–296. <https://doi.org/10.1007/s40620-018-0471-9> (2018).
- Perelló, J. *et al.* First-time-in-human randomized clinical trial in healthy volunteers and haemodialysis patients with SNF472, a novel inhibitor of vascular calcification. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **84**, 2867–2876. <https://doi.org/10.1111/bcp.13752> (2018).
- Salcedo, C. *et al.* A phase 1b randomized, placebo-controlled clinical trial with SNF472 in haemodialysis patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **85**, 796–806. <https://doi.org/10.1111/bcp.13863> (2019).
- Ferrer, M. D. *et al.* A novel pharmacodynamic assay to evaluate the effects of crystallization inhibitors on calcium phosphate crystallization in human plasma. *Sci. Rep.* **7**, 6858. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07203-x> (2017).
- Pasch, A. Novel assessments of systemic calcification propensity. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* **25**, 278–284. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000237> (2016).
- Brandenburg, V. M. *et al.* Improvement in wound healing, pain, and quality of life after 12 weeks of SNF472 treatment: a phase 2 open-label study of patients with calciphylaxis. *J. Nephrol.* **32**, 811–821. <https://doi.org/10.1007/s40620-019-00631-0> (2019).
- Raggi, P. *et al.* Slowing progression of cardiovascular calcification with SNF472 in patients on hemodialysis: results of a randomized Phase 2b study. *Circulation* **141**, 728–739. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044195> (2020).
- Schiffman, E. L., Lipman, M. L. & Mann, J. F. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation* **116**, 85–97. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.678342> (2007).
- Tur, F. *et al.* Validation of an LC-MS bioanalytical method for quantification of phytate levels in rat, dog and human plasma. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **928**, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.03.023> (2013).

21. Ferrer, M. D. *et al.* Characterization of SNF472 pharmacokinetics and efficacy in uremic and non-uremic rats models of cardiovascular calcification. *PLoS ONE* 13, e0197061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197061> (2018).

Acknowledgements

This study was supported by a RETOS COLABORACIÓN: RTC-2014-2460-1 ISCIII grant (Ministerio de Economía y Competitividad. Government of Spain). Jonathan Latham (PharmaScribe, LLC) provided medical writing support, with funding from Sanifit Therapeutics.

Author contributions

M.M. Pérez, M.D. Ferrer, C. Salcedo, A-Z. Canals, A. Gold, R. Garg, and J. Perelló designed the research. M.D. Ferrer, M.M. Pérez, M. Lazo-Rodriguez, A-Z. Canals, and E. Banon-Maneus collected data. M. Lazo-Rodriguez and E. Banon-Maneus performed the animal model. J.M. Campistol led the animal model study. C. Salcedo, J. Perelló, M.D. Ferrer and M.M. Pérez performed the data analyses. S. Miller, A. Gold, and R. Garg managed the clinical trial. M.D. Ferrer and C. Salcedo wrote the initial manuscript. All authors contributed to the discussion of the results, the revision of the manuscript, and approval of the final manuscript.

Competing interests

M.D. Ferrer, J.M. Campistol, M. Lazo-Rodriguez, and E. Banon-Maneus received funding from Sanifit Therapeutics to perform this research. The rest of the authors are employees or former employees of Sanifit Therapeutics. M. Mar Perez, Miguel D. Ferrer, Ana Zeralda Canals, Stephan Miller, Alex Gold, Rekha Garg, Carolina Salcedo, and Joan Perelló are stockholders of Sanifit Therapeutics.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.S.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020



OPEN

Author Correction: A novel assay to measure calcification propensity: from laboratory to humans

M. Mar Perez, Miguel D. Ferrer, Marta Lazo-Rodriguez, Ana Zeralda Canals, Elisenda Banon-Maneus, Josep M. Campistol, Stephan Miller, Rekha Garg, Alex Gold, Carolina Salcedo & Joan Perelló

Correction to: *Scientific Reports* <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74592-x>, published online 16 October 2020

This Article contains errors in Figure 4, where an incorrect version of the figure file was published. The correct Figure 4 appears below as Figure 1.

Published online: 16 February 2021

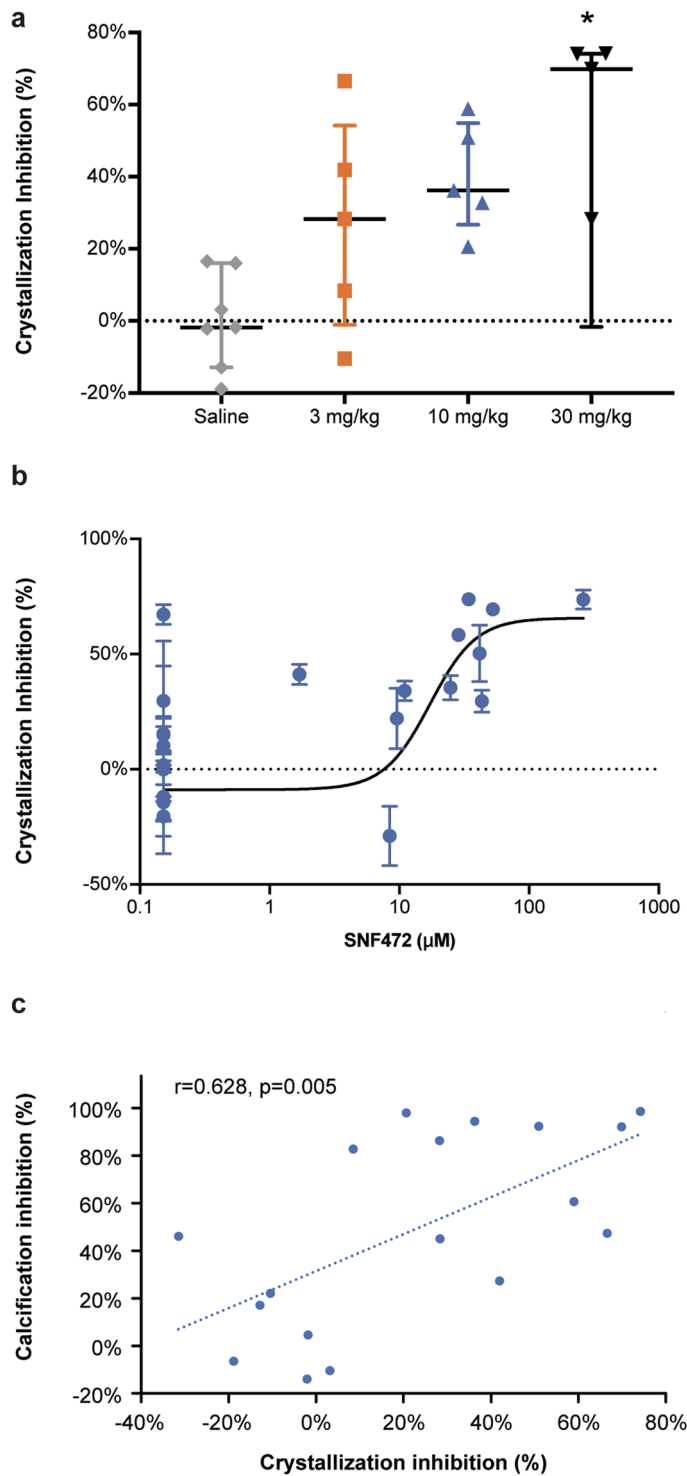


Figure 1. A correct version of the original Figure 4.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

VIII. ANEXO 1

STUDY PROTOCOL

SNF472 – Ex vivo study
SNF_BA2013_28

**ASSESSMENT OF HYDROXYAPATITE
CRYSTALLIZATION POTENTIAL IN BLOOD FROM
HEMODIALYSIS PATIENTS AND NON-DIALYZED
VOLUNTEERS THROUGH AN EX VIVO
SPECTROPHOTOMETRIC ASSAY**

	Number	Date of edition
Current version	2	06-02-2014
Replaces version:	1	15-01-2014

This Study Protocol is property of SANIFIT S.L.

CONFIDENTIAL

CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

Título del proyecto: **Proyecto de investigación para la evaluación del potencial de cristalización de hidroxiapatita (fosfato cálcico) en sangre de pacientes de hemodiálisis y voluntarios no dializados mediante un ensayo espectrofotométrico ex vivo**

Código del estudio: SNF_BA2013_28

Yo,..... (Nombre y apellidos)

- He leído y comprendido la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el proyecto.
- He recibido suficiente información sobre el proyecto.
- He hablado con (Nombre del investigador)
- Comprendo que mi participación es voluntaria.
- Comprendo que puedo retirarme del proyecto:
 - 1º Cuando quiera.
 - 2º Sin tener que dar explicaciones.
 - 3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.
- Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto.
- Comprendo que tengo los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición a mis datos de carácter personal de acuerdo con lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999 de protección de datos de carácter personal.
- Acepto libremente que se me extraigan aproximadamente un total de 40 ml de sangre a través del mismo circuito de diálisis (pacientes de hemodiálisis) o por punción venosa (controles no dializados).

Fecha (por el participante)

Firma del participante

Este documento se firmará por duplicado quedándose una copia el investigador y otra el paciente

IX. ANEXO 2

A study to assess if the drug SNF472 improves wound healing in patients with calciphylaxis

Full Study Title: Phase 2 Open Label Single Arm Repeat Dose Study to Assess the Effect of SNF472 on Wound Healing in Uraemic Calciphylaxis Patients

Protocol number: SNFCT2015_04

EudraCT: 2015-004313-25

Sponsor: Laboratoris SANIFIT

Edificio Europa, Parc Bit, Palma Mallorca, SPAIN

Phone: +34 971 439 925

Principal Investigator: Prof Vincent Brandenburg, University Hospital RWTH Aachen, Germany

Phone: +49 241 80-85709

Investigator: «FirstName» «LastName», «Degree»

Phone: «PhoneNumber», «ERPhone» (after hours)

Invitation to take part in research

We invite you to take part in a research study. Before you decide to take part, it is important for you to understand why we are doing the research and what it will involve. Please take time to read the following information carefully and discuss it with the Study Doctor, friends, relatives, and/or your primary care physician if you wish. Ask us if there is anything that is not clear or if you would like more information. Take time to decide whether you wish to take part in the study or not.

This study will take place at a local Fresenius Medical Care dialysis unit. LABORATORIS SANIFIT is the Sponsor conducting this study. Most of the study will be conducted at a dialysis unit.

In this Study, all participants will receive 1 dose of SNF472, 3 times a week for 12 weeks (36 administrations) at the same time as your scheduled dialysis sessions. The study drug, SNF472, will be administered to you through the tubing of the dialysis machine. There is no need for extra injections (needles placed in your arm) to receive the study drug.

What is the purpose of the study?

Before a new medicine is approved for use in humans, it is necessary to confirm that it is safe and effective. This is done by conducting research studies such as this one.

The new medicine tested in this study is a compound called SNF472 (hereafter referred to as the "study drug" throughout the remainder of this document). Laboratoris Sanifit is developing the study drug for the prevention of the progression of cardiovascular calcification, potentially stopping the build-

PARTICIPANT INFORMATION SHEET

up of calcium into the blood vessels and the heart itself in patients with end-stage kidney disease undergoing hemodialysis and in calciphylaxis patients.

The main purpose of the study is to see how the drug can potentially help heal the calciphylaxis wounds quicker. We will also study how safe the study drug is and how well it is tolerated after dosing. The study will also investigate how the study drug is absorbed, broken down, distributed through the body and released from the body.

Why have I been invited?

You were identified as a potential study patient because you have been diagnosed with calciphylaxis and have indicated that you are willing to consider taking part in this research study to examine the potential benefits of a new therapeutic drug.

This study will recruit calciphylaxis patients on dialysis between the ages of 18 and 80 years. There will be 15 participants in the study.

Do I have to take part?

No. It is entirely up to you to decide whether or not to take part in this study. If you prefer not to take part, you do not have to give a reason. Once you are satisfied that you have been given enough information about the study and if you do decide to take part, you will be asked to sign the informed consent form at the back of this information sheet. We will give you a copy of the signed and dated information sheet and consent form to keep. You should not sign this consent form if all of your questions have not been answered.

It is important that you are honest with the study doctor about your health history or it may not be safe to be on this study.

If you decide to take part, you are still free to withdraw from the study at any time and without giving a reason. This will not affect the standard of care you receive or your legal rights.

Should you decide to stop your participation during the study, the Study Doctor will explain the best way for you to withdraw from the study. Likewise, the Study Doctor may decide that continuing participation in the study is no longer in your best interest and that you may have to be withdrawn.

If you stop taking part in the study, it is highly recommended to go through study withdrawal procedures that are necessary for your safety. These procedures may include a physical examination, ECG (measures the performance of your heart), laboratory evaluations. You may also be asked to complete the following: pain score, lesion score and Quality of Life questionnaire.

If you withdraw from the study, your identifiable blood samples will be destroyed, but we will need to use the data collected up to the time of your withdrawal. After your withdrawal, no new data from you will be entered into the clinical study database.

Your participation in the study may be stopped at any time for any of the following reasons:

- If at any time you feel that you no longer want to take part;
- Failure to comply with the Study Doctor's instructions
- A serious medical event, which may require treatment or observation
- The Study Doctor decides it is in the best interest of your health and welfare to withdraw from the study
- The study sponsor stops development of the study drug

PARTICIPANT INFORMATION SHEET

What is the drug that is to be tested?

The study drug does not yet have a market name and it is not yet approved by the Food and Drug Administration. It is an investigational drug and it is known by the name SNF472. The study drug is being developed for the potential use in the prevention of the progression of cardiovascular calcification in patients with end-stage renal disease undergoing hemodialysis and for calciphylaxis patients. SNF472 is composed of a naturally-occurring substance called inositol hexaphosphate (IP6). This IP6 is found in beans, brown rice, corn, sesame seeds, wheat bran, and other high-fiber foods. The calcium salt of IP6 is listed by the Food and Drug Administration as generally recognized as safe (GRAS). Beneficial properties have been attributed to IP6 in oncology and calcium-related diseases [e.g., prevention of kidney stones, osteoporosis, cardiovascular calcification, salivary stones, and dental tartar]. So, humans are exposed continuously to IP6 as it comes from our diet. SNF472 is an intravenous formulation (a liquid for administration into a vein) of IP6, so higher dosage levels will be reached in your body. Therefore it may be more effective than taking it in food alone.

SNF472 has been tested in 28 people during a Phase I clinical trial and 19 people during a Phase 1b/2 clinical trial.

All patients in this study will receive the study drug.

You will receive the study drug in the form of an intravenous (iv) infusion into tubing already connected to the dialysis machine, during your scheduled dialysis visit over the duration of your dialysis session. It is important for the study drug to be in your body as long as possible, and thus it is important that you stay for the full duration of the dialysis session while you are participating in this study. The study drug will not be directly injected into your veins.

This study is for research purposes. We cannot guarantee that taking part in the study will result in medical benefits for you.

What will happen to me if I take part?

The Study consists of one Screening Visit, a Treatment Period lasting 12 weeks, and 1 Follow-up Visit after the Treatment Period.

If you decide to take part in the Study, you will be asked to attend the Screening Visit between 1 and 2 weeks before you receive the first dose of the study drug. The study staff / personnel will take pictures of your calciphylaxis wounds. The pictures will help the study Doctor and the Sponsor assess how the wounds are doing throughout the duration of the study.

After the Screening Visit, 1 Treatment Period will follow, which consists of administration of the study drug during your 3 dialysis sessions per week (Day 1, Day 3, and Day 5; i.e. Monday, Wednesday, and Friday or Tuesday, Thursday, and Saturday) for 12 weeks for a total of up to 36 administrations. One Follow-up Visit, 7 (\pm 2) days later, follows the Treatment Period.

At each Day of dosing, you will be asked to stay in the Dialysis Unit for the entire duration of dialysis. You will be dosed on Day 1 for up to 4 hours, during your dialysis session. After your dialysis session, if required, safety assessments will be performed including blood samples drawn, ECGs and you may have to complete a questionnaire to tell us how you are feeling and how much pain the calciphylaxis lesion gives you.

You will continue with your usual dialysis sessions for the next 3 months, receiving the study drug at each dialysis session, as you did on Day 1. You will be asked to complete a questionnaire on how you are feeling 6 weeks after the study has started and at the end of the study. You will also be asked to rate your lesion pain on a scale of 1 to 10. Pictures of your calciphylaxis wounds will be taken at regular intervals in order to study how the wound is doing.

PARTICIPANT INFORMATION SHEET

Once the 3 months Treatment Period is over, approximately one week (7 + 2 days) later, you will have the Follow-up Visit, in which the research staff will perform safety assessments and blood samples will be drawn.

Therefore,

The total duration of the Study for each participant (including Screening) will be approximately 15 weeks.

During the conduct of the study a number of tests will be performed. These tests could reveal a pre-existing medical condition (that was present before the study), which might prevent you from taking part in the study. If this happens, the Study Doctor will discuss it with you in private and with your consent; you will be referred back to your primary care physician or a specialist for appropriate medical management.

Study Overview

You can read a detailed description of the Screening Visit, Study Visits during the Treatment Period, Follow up Visit and the volume of blood withdrawals in the APPENDIX, attached at the end of this document.

What do I have to do?

Your personal safety during the study and especially while you are taking part in the clinical study, is of primary importance to us. It is also important that we meet the requirements of the protocol (study plan). To ensure your safety, the study doctor and his staff will need to check certain things when you are screened for the study during the study.

- If you have taken part in a study testing other medications within the last 90 days (**3 months**), either here or at other research sites, you will not be eligible to participate in this study.
- Before taking any new **medications**, apart from the medication prescribed by your nephrologist or physician regarding your **renal** condition, you should check with the Study Doctor or one of his research staff from the time you sign this consent form and until the Follow-up Visit.
- You have to agree to use **effective contraception methods** to prevent pregnancy, of a female participant or a female partner of a male participant, from the day of dosing and for 3 months after your follow-up visit. Please see contraception guidelines on page 6.
- You need to carry a small **information card** (about the size of a credit card) that states the study you are taking part in. The card also lists a 24-hour contact telephone number for advice about the study and your treatment.

Also please:

- Notify a Study Doctor or a member of his research staff if you are unable, in any way, to follow the study procedures.
- Notify a Study Doctor or a member of his research staff if you feel at all unwell at any time during the study. If this occurs while you are not in the Dialysis Facility, you must make every effort to contact the Study Doctor or one of his designees.
- Notify a Study Doctor or one of his designees if you are required to take any other medication during the study, for example if your own doctor prescribes antibiotics for an infection. You should of course also remind any doctors treating you that you are currently taking part in a clinical study.
- Honestly answer all study questions (including medical history), disclose all medications that you are currently taking, and report any side effects.

PARTICIPANT INFORMATION SHEET

- Female patient: If you have missed your period or think you might be pregnant, you must notify the study staff immediately. A pregnancy test will be carried out during Screening and every month until the end of the study. If you become pregnant during the course of the study, you will be withdrawn from the study, referred to appropriate obstetrical care and your pregnancy will be tracked until you have your baby.
- Male patient: If your partner misses her period or thinks she may be pregnant, you must notify the study staff immediately. Your partners' pregnancy will be requested to be tracked until they have your baby.
- You are not allowed to participate in any other research study while you are taking part in this study

What are the side effects of any treatment received when taking part?

SNF472 has been tested before in a Phase I study in 20 healthy volunteers, who received single rising doses between 0.2 to 5.7 mg/lb (0.5 to 12.5 mg/kg) of study drug or placebo (inactive drug); in 8 hemodialysis patients, who received a 4mg/lb (9 mg/kg) single dose of the study drug or placebo; and in a Phase 1b/2 study in 19 hemodialysis patients, who received multiple doses from 0.4 up to 9.1 mg/lb (1 up to 20 mg/kg) of the study drug or placebo for up to 4 weeks. You will be receiving an infusion of either 400 mg, 450 mg, 700 mg or 900 mg over the duration of your dialysis session.

The study drug being tested may cause some side effects. You may experience none, some or all of those given below because drugs and their possible side effects can affect individual people in different ways. In addition, the study drug may involve risks that are currently unknown.

Adverse events observed in the 20 healthy subjects dosed with the study drug/placebo:

The healthy subjects in the clinical study had the study drug administered via intravenous infusion into a forearm vein over 4 hours. Approximately 15 of the 20 subjects-dosed experienced infusion site pain and/or tenderness. Five of the 20 subjects had, in addition to the pain, a local reaction in the form of redness that appeared to be along the blood vessel line where the infusion was given. Two subjects reported numbness of the infused arm. These events all resolved.

We do not expect that you will experience similar events, as the study drug will be given to you via the hemodialysis catheter in a much bigger vein than the veins of the arms, and it will be diluted in the tubing, together with your blood, before it enters your body.

Animal studies

Based on the available information on SNF472, the main finding in animals is **hypocalcaemia** (low calcium levels in the blood) and changes in ECG (electrocardiogram, which measures the performance of your heart).

- The following are symptoms associated with hypocalcaemia:
 - Tingling, numbness or "pins and needles" sensation in and around the mouth and lips, and in the extremities of the hands and feet.
 - Muscle cramps, particularly in the back and lower extremities (neuromuscular irritability).
 - More serious symptoms include:
 - Voice changes from laryngospasm (an uncontrolled/involuntary muscular contraction of the vocal folds)
 - Wheezing (from bronchospasm)
 - Irregular heartbeat
 - Fatigue
 - Seizures

In the clinical studies performed prior to this study a single subject had a brief episode of tingling around the mouth which disappeared quickly. No other symptoms of hypocalcaemia have been observed so far.

PARTICIPANT INFORMATION SHEET

Extensive animal experiments and dosing in people, so far, have suggested that the study drug should be safe given in the doses proposed in this study and no major medical side effects are expected. Animal experiments, however, are not always exact indicators of what will happen when the product is given to a person, so you will be monitored closely during the study for any sign of side effects. Some effects may be unpredictable.

As with all drugs, there is a risk that a rare or previously unknown side effect will occur and we cannot rule out the possibility that an unknown side effect may be life-threatening.

During the study, we will be monitoring you closely and taking safety blood samples. You will be informed if any clinically important changes are seen and if it is required, we may need to stop the study or withdraw you from further participation.

Please be aware that many drugs can cause a serious allergic reaction in certain individuals. For example, penicillin and even aspirin can be life-threatening to some people. It is essential for this reason that you are honest regarding your past medical history, to allow the Study Doctors to keep this study as safe as possible.

*** Please tell the staff immediately if you do experience any "side effects" while participating in this clinical study, however minor. ***

What are the other possible disadvantages and risks of taking part?

Venous blood samples: You will have blood taken from your dialysis tubing, so you are not expected to feel any discomfort.

Electrocardiogram: You may experience slight skin irritation from the adhesive on the ECG electrodes, but this is generally mild and clears up within a few days.

Anaphylactic (serious allergic) reaction: In extremely rare cases an anaphylactic reaction (a severe allergic reaction throughout the body that is recognized by difficulty in breathing, fainting, itching, and wheals) may develop after a few seconds or minutes. For this reason, an emergency kit with a 'ready for use' adrenalin syringe will always be available. Tell the Study Doctor or nurse immediately if you feel any of the above-mentioned reactions.

Biopsy materials: If a biopsy of the calciphylaxis wound were to be taken, the biopsy sites could lead to new ulceration and infection.

Harm to the unborn child

At this point, the risks to the fetus or infant to take the study drug are unknown. You must be willing to follow the contraception (birth control) guidelines provided below in order to take part in this study.

Male patients:

- If you have not had a vasectomy and have a female partner of childbearing potential, you must use a condom with spermicide when having heterosexual intercourse, from the time you sign the consent form until 3 months after your last dose of study drug.
- If your partner becomes pregnant while you are participating in this study, there may be risks to the unborn baby. There may also be risks associated with your partner nursing (breastfeeding) a baby while you are participating in this study, as the related reproductive toxicity studies have not yet been performed to evaluate the exact risks. Nobody knows what these risks are and some drugs can cause babies to be born prematurely (earlier than they should be) or to have birth defects. You must notify the research staff if your partner becomes pregnant while you are participating in this study. Your partner's pregnancy will be requested to be tracked until they have your baby.

PARTICIPANT INFORMATION SHEET

- Please share this information with your partner if it is appropriate.
- It is not known if the study drug will affect sperm or semen and therefore you must not father a child during this study or for a safety period of 3 months after the last dose of study drug.
- If your partner is of childbearing potential (able to have children) or if she has had a tubal ligation without having had her ovaries taken out and she is taking a hormonal contraceptive, she may choose to continue taking the hormonal contraceptive but between the two of you, we strongly recommend you add 1 non-hormonal method of contraception (i.e., male condom with spermicide, female condom, diaphragm with spermicidal jelly or a cervical cap). You, and we strongly recommend your partner, must use reliable forms of contraception during the study and for 3 months after the last dose of study drug. You should also use a condom when having sexual intercourse with pregnant or breastfeeding women.

Effective contraceptive methods are:

- Oral contraceptive + condom with spermicide
- Coil or intra uterine device (IUD) + condom with spermicide
- Diaphragm with spermicide + condom with spermicide
- Injectable progesterone + condom with spermicide
- Subdermal implants + condom with spermicide
- True abstinence: When this is in line with your preferred and usual lifestyle. Periodic abstinence (e.g., calendar, ovulation, symptothermal (monitoring of your body temperature), post-ovulation methods) and withdrawal are NOT acceptable methods of contraception.
- Male sterilization (with the appropriate post-vasectomy documentation of the absence of sperm in the ejaculate).

Female patients:

You must be in one of the cases described below:

- Absence of menstruation for 12 consecutive months (menopause) and your doctor says you are postmenopausal
- Both ovaries and uterus have been removed by surgery
- Your ovaries do not work and cannot get pregnant (confirmed by your doctor)
- If you are of childbearing potential, you and your partner have to use reliable forms of contraception (see above) during the study and for 3 months after the last dose of study drug
- If you become pregnant during the course of the study, you will be withdrawn from the study, referred to appropriate obstetrical care and your pregnancy will be tracked until you have your baby.

What happens to any blood samples I give?

The collected blood samples will be sent to different central laboratories for analysis (Spectra Research in the USA, B&C Group SA, Watson & Crick Hill, Rue Granbonpré 11 (Gate C), 1435 Mont-Saint-Guibert, Belgium or Harlan Laboratories S.A., Ctra. de Castellar a Sentmenat C-1415, km 29,300, 08211-Castellar del Vallès, Barcelona Spain) and the study doctor will be informed of the results. The samples will be identified by a code number and not by name and therefore it will not be possible for anyone other than the Study Doctor or other authorized study staff to find out whom the sample belongs to. Blood samples collected for routine safety tests will be destroyed after they have been analyzed.

PARTICIPANT INFORMATION SHEET

What if there is a problem?

As SNF472 is a new drug, there may be side effects that have not yet been recognized.

Sometimes during the course of a research project, new information becomes available about the treatment/drug that is being studied. If this happens, the study staff will tell you about new information that may be relevant to your participation in the study. If you decide to continue in the study, you will be asked to sign an updated consent form, which will document any new information.

Please inform the study doctor if you believe you have suffered an illness or injury related to the study, so that he can provide the necessary medical care. If you become ill or suffer an injury as a direct result of this research, the costs of reasonable and necessary medical care will be covered in accordance with applicable law. The data about these events will be identified by patient number and not by name and will be to the sponsor and to the appropriate regulatory authority, which will transfer it to the European database.

In the event of you suffering any bodily injury caused directly by your participation in the study, compensation will be paid to you by Laboratoris Sanifit (the Sponsoring Company) without you having to prove that the injury arose through negligence or that the study drug was defective.

What are the alternatives for diagnosis or treatment?

You do not have to participate in the study to receive treatment for your disease. Before signing the informed consent, the study doctor will discuss with you if other treatments are available. At present, there are no approved treatments to treat calciphylaxis, although they may be under investigation in different studies. It is important to talk to the study doctor about the benefits and risks of all treatment options.

What are the possible benefits of taking part?

This study is for research purposes only and, we cannot guarantee that you will receive any benefit from taking part in this study. However, the information that we get from this study may be helpful for calciphylaxis patients in the future.

Compensation for Participation

You will be compensated up to \$480.00 if you complete this study. Your compensation will be prorated based upon how many study visits you complete.

Voluntary Participation

Your participation in this study is voluntary. Your refusal to participate or your withdrawal from the study will involve no penalty or loss of benefits to which you are entitled. You may stop your participation at any time without affecting your ongoing medical care.

What happens when the research study stops?

Once the study is finished, you will continue with your usual treatment and will not receive the study drug.

PARTICIPANT INFORMATION SHEET

Will my taking part in this study be kept confidential?

We will follow ethical and legal practices, and all information about you will be handled in confidence.

If you authorize the study doctor to contact your primary care physician about your intention to participate in this study, they may also be asked to provide us with information about your past medical history. Apart from this exception, all the information about your participation in this study will be kept confidential. If you do not wish to have your primary care physician contacted, you may still participate in this study.

The Dialysis Unit staff will collect personal information about you. This will include information about your health and your demographic details (such as your date of birth, your sex and your ethnic origin). The Sponsoring Company and the Dialysis Unit are legally obliged to inform you of the following:

1. All data from the study will be processed without your name, or any information that could identify you. Your data will be coded. The list that correlates codes and names is kept only for the authorized personnel. And this list will be kept for 15 years in the hospital.
2. Throughout this study, the Study Doctors and nurses will record information about you in a database known as an "electronic case report form" or "eCRF". Sometimes, case report forms can be paper. All information entered into the eCRF may be identified by using a participant number, not by your full name. However, your full name will be stored in the Clinical Unit recruitment database.
3. Information collected about you for the study will be processed by us and may be included in reports which will be submitted to authorities (either in the USA or in any other country in the world), so that one day the study drug may be available to all patients suffering from the illness this drug treats. As part of the data processing, your information may also be passed to authorized personnel within:
 - Laboratoris Sanifit
 - Fresenius Medical Services including Frenova Renal Research
 - Other authorized companies involved in reviewing or processing study data
 - Regulatory authorities
 - Ethics Review Committee/IRBs
 - The Food and Drug Administration (FDA)

The study results will be presented to the regulatory agencies, in meetings, and publications. However, your name or any information that can identify you will never be mentioned in any of these presentations.

4. Your data will be sent outside the EU. Some of the countries to which your information may be passed may not have the same level of data protection as the USA, in accordance with the applicable laws. All reasonable steps will be taken by us to protect your information and all data will be pseudonymized/coded. The procedures for handling, processing, storage and destruction of your data are compliant with the
USA: FDA Clinical Practice Guidelines and HIPAA
5. Your information will only be used for the purposes stated above as explained to you by the Study Doctor or his research staff, and will be kept no longer than necessary and (unless required by law) will not be disclosed to people other than those mentioned above.
6. You have certain rights, which may allow you to have access to data held about you, and to object

PARTICIPANT INFORMATION SHEET

or prevent certain processing of your information if it will cause you damage or distress. To exercise your rights described above, you should contact the study doctor or one of his research staff at, «PhoneNumber» (contact details provided in this document). For further details on your rights and how you can enforce them, you should contact the

USA: New England Independent Review Board +1 800 232 9570

7. If you leave or interrupt the study (see the relevant sections), all data collected during participation in the study will remain part of the database of the study; they are kept and may be included in the final results of the study. These data will be needed to determine the effect of the study drug and to ensure that your interests warranting protection will not be affected.
8. Data management of all data documented will be performed under the responsibility of the Department of Medical Informatics, University Hospital RWTH Aachen, Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen, GERMANY.
9. A description of this clinical study will be available on <http://www.ClinicalTrials.gov>. This Web site will not include information that can identify you. At most, the website will include a summary of the results. You can search this website at any time.

Contact details for further information

In case of a study-related injury or whenever you have questions about the study or the study drug, please contact:

24 Hour Emergency Contact: + «ERPhone» (24 hours; medical emergencies)

(For Medical Emergencies)

«FirstName» «LastName», «Degree» (Principal Investigator)

+«PhoneNumber» (Monday to Friday 08:00-17:00)

(Main Study Doctor)

* If there is no answer, you should wait until you are connected to the voice-mail system and leave a message (including a contact number). Your call will be returned as soon as possible.

Who is organising and funding the research study?

The study is funded by:

1. A pharmaceutical company named Laboratoris Sanifit (they are the sponsors of this research) funds this research. The Sponsoring Company will pay for the costs of the research, for example, supply of study drug and the costs of laboratory tests to be performed. They will also pay the Study Doctor for conducting this study. The Study Doctor has no financial interest in the Sponsoring Company or in the outcome of this study.

Who has reviewed the study?

USA: The Food and Drug Administration (FDA – www.fda.gov) and New England IRB.

PARTICIPANT INFORMATION SHEET

APPENDIX. Study Overview for Participants. 3 MONTH DOSE

Study Overview

Screening Visit

You will schedule a screening visit with the study doctor within the 2 weeks (14 days) before you receive the first dose of study drug. The following samples will be taken and assessments performed to determine if you are suitable to take part in the study:

- You will be seen by a Study Doctor who will discuss the study fully, answering any questions that you may have. If you still want to take part, the Study Doctor will then ask you to sign the **Consent Form**
- We will take some **personal details** from you
- A Study Doctor will take a full **medical history**, including all medications that you are currently taking, and perform a **physical examination**
- You will have an **electrocardiogram (ECG)** (recording of your heart's electrical activity).
- Blood samples for routine blood testing as a blood count, and chemistry panel will be taken
- For female patients, you will have a blood **pregnancy test**
- Review of how you are **feeling** and any **medications** you have taken
- **Images** (several pictures) will be taken of your **lesions**
- In some instances the doctor will discuss with you if **biopsy of your lesion (s)** should be taken. You can discuss with your doctor if you want to have a biopsy taken or not

Should any of the test results be out of the normal range as specified for this study, you may be asked to return to the research facility and provide an additional sample for repeat testing.

The Screening Visit will take place during your regularly scheduled dialysis treatment sessions. This visit is designed to assess all potential study participants and to ensure that the study is as safe as possible; therefore, it is important that you be in good health at this visit.

If all of your screening results are acceptable, you may be invited to take part in the Study. If you are eligible we will contact you (not less than 1 day before your scheduled admission date) to confirm whether you want to proceed to the next phase of the study.

Study Visits

Treatment Period (Week 1 to Week 12)

You will arrive at the Dialysis Unit to have your routine dialysis session at the arranged time on the day you receive the dose of study drug (Day 1). You will receive the study drug during your normal dialysis visits. You will be released from the Clinical Unit 1 hour later than your usual time. You will have to return to the Dialysis Unit following your usual schedule of three times a week. At each dialysis session, you will receive the study drug. During your time in the Dialysis Unit, the following samples will be taken and assessments performed during the Treatment Period (unless otherwise specified):

- You will have an **ECG** before dosing and at various time-points thereafter
- On Day 1, Day 3, and Day 5 each week during 3 months, you will receive the **study drug** in the form of an infusion using the dialysis machine over the dialysis session. It is important for the drug to stay in your system as long as possible, so we ask you not to cut the dialysis session short. The study drug will not be injected directly into your blood system
- Routine **blood samples** will be taken at week 1 and 12

PARTICIPANT INFORMATION SHEET

- **Blood samples** will be collected on one day in the last treatment week, to monitor certain parameters in your blood
- Blood samples will be collected once in the first and last treatment week to measure the amount of the study drug in your bloodstream at various time-points
- Urine pregnancy tests at weeks 4, 8, and 12
- Review of how you are **feeling** and any **medications** you have taken
- You will have to fill in **questionnaires** at different time points. These questionnaires will help the Study Doctor and the Sponsor understand how much pain you are feeling, if the drug is working and how you are feeling while you are receiving the drug
- **Images** (several pictures) will be taken of your **lesions every other week**

Follow-up Visit

You will return to the Dialysis Unit approximately 7 days after the treatment period for a Follow-up Visit. The following samples will be taken and assessments performed:

- You will have a **physical examination**
- You will have an **ECG**
- **Routine blood samples** will be taken
- You will have to complete **questionnaires** about how much pain you are feeling at your lesion site as well as how you are feeling in general
- Review of how you are **feeling** and any **medications** you have taken

CONSENT FORM

Participant's SNFCT2015_04 ID Number:

Grid for ID number: 6 empty boxes

Participant's Initials:

Grid for initials: 3 empty boxes

Participant's Date of Birth:

Date format: ___/___/___ (day/month/year)

Study Title: Phase 2 Open Label Single Arm Repeat Dose Study to Assess the Effect of SNF472 on Wound Healing in Uraemic Calciphylaxis Patients
Protocol number: CT2015_04; EudraCT : 2015-004313-25

Name of Study Doctor:

Dr. «LastName» I confirm that:

- I have read and understand the above participant information sheet for this study.
I have had the opportunity to consider the information, ask questions and have had these answered satisfactorily.
I understand the possible side effects and risks of the drug(s) and procedures being tested in this study.
I understand that all blood samples for safety tests collected from me during the study will be destroyed after they have been analysed.
I have read and understand the information on the contraception requirements and I agree to follow these measures during this study and for the required safety period after my last dose of study drug.
I understand that having signed the consent form, my participation is voluntary and that I am free to withdraw at any time without giving a reason, and without my medical care or legal rights being affected.
I agree with the transfer of personal data, including confidential data, in the conditions explained in the information sheet to the patient, the Sponsor and regulatory authorities, both inside and outside the USA.
I agree to take part in the above study, which is being conducted on behalf of Laboratoris Sanifit (who is the Sponsor of this study).

I authorize that my primary care doctor is informed about my participation in the study:

___Yes ___No

Name of Participant

Signature

___/___/20___
Date (day/month/year)

CONSENT FORM

I explained the purpose of this study and procedures, identifying those who are experimental, potential risks and discomforts and its potential benefits. I have answered all the questions about the study in the best way possible.

Name of Study Doctor or designee
Taking Consent

Signature

____/____/20____
Date (day/month/year)

X. ANEXO 3

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del protocolo:	Estudio doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo para evaluar el efecto de SNF472 en la progresión de la calcificación cardiovascular además del tratamiento de referencia en pacientes con nefropatía terminal (NT) sometidos a hemodiálisis (HD)
Código del protocolo:	SNFCT2015-05
Promotor:	Laboratoris Sanifit SL ("Sanifit"), Palma de Mallorca, España
Número EudraCT:	2016-002834-59
US IND no.:	116437
Investigador:	[Nombre del investigador]
Dirección:	[Dirección del investigador]
Teléfono:	[Números de contacto del centro]

Se le ha invitado a participar en un estudio de investigación porque se le ha diagnosticado una enfermedad renal avanzada que requiere diálisis. Una persona que participa en un estudio de investigación se denomina sujeto de investigación o de estudio. El investigador mencionado anteriormente, también denominado "Médico del estudio", está a cargo del estudio.

El objetivo de esta hoja de información al participante del estudio y del formulario de consentimiento informado es ayudarle a decidir si desea participar en el estudio de investigación.

En este documento pueden aparecer términos con los que no esté familiarizado. Pídale al médico o al personal del estudio que le expliquen cualquier cosa que no entienda claramente. Puede llevarse a casa una copia sin firmar de este formulario de consentimiento para poder pensarlo con calma o comentarlo con su familia o amigos antes de tomar una decisión. No debe aceptar participar en este estudio de investigación hasta que no le hayan respondido a todas sus preguntas.

Qué debe saber antes de tomar la decisión de participar en un estudio de investigación:

- No podemos prometer que el estudio le ayudará, pero la información que obtengamos puede ayudar a mejorar el futuro tratamiento de otras personas que sufran la misma enfermedad.

- El objetivo principal de la atención médica habitual es ayudar a cada paciente.
- Su participación en este estudio es voluntaria. Puede decidir no participar en este estudio en cualquier momento y el Médico del estudio continuará tratándole.
- La decisión de participar o no en el estudio de investigación no afectará en ningún modo a su relación con el equipo médico y su posterior tratamiento.
- Este estudio incluye un fármaco experimental (en investigación) que se está probando. Un producto en investigación es el que no ha sido autorizado por la FDA (Dirección Federal de Fármacos y Alimentos de EE.UU.), no ha recibido un dictamen favorable por parte de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) o no ha sido autorizado por ninguna otra agencia de autorización de fármacos. Eso quiere decir que aún no está comercializado, que está en fase de investigación.

Si decide participar en este estudio, se le solicitará que lea y firme este formulario de consentimiento informado para confirmar que fue informado de forma clara sobre el estudio y que ha aceptado participar. Recibirá una copia del formulario de consentimiento firmado.

¿CUÁL ES EL OBJETIVO DE ESTE ESTUDIO?

El objetivo principal de este estudio de investigación es averiguar si el fármaco en investigación, SNF472, tendrá algún efecto en personas cuyos riñones no funcionan con normalidad y necesitan hemodiálisis o "diálisis" de forma periódica (proceso de purificar la sangre mediante una máquina. El Médico y el personal del estudio desean disponer de más información sobre los efectos secundarios que pueda experimentar mientras se le administra el medicamento del estudio.

Uno de los efectos que puede experimentar cuando los riñones no funcionan de forma correcta es la acumulación de calcio en los vasos sanguíneos, lo cual los vuelve más rígidos, especialmente aquellos cercanos al corazón. Esta acumulación de calcio aumenta el riesgo de sufrir problemas cardíacos graves. Se cree que SNF472 puede ralentizar o evitar la acumulación de más calcio en los vasos sanguíneos.

Los sujetos incluidos recibirán SNF472 o placebo. El placebo tiene un aspecto similar a SNF472 pero no contiene el principio activo (contiene únicamente una solución salina). Tanto SNF472 como el placebo recibirán el nombre de "**medicamento del estudio**" en este documento.

Se invitará a participar hasta 450 pacientes de unos 75 centros de estudio de Estados Unidos y Europa. Si Ud. reúne los requisitos, su participación en el estudio durará aproximadamente 59 semanas, incluido un período de selección de 3 semanas durante el cual el médico del estudio confirmará si usted cumple los criterios para participar en este estudio. Después del período de selección empezará un período de tratamiento de 52 semanas, durante el cual se le administrará el medicamento del estudio a través de la máquina de diálisis durante sus visitas de diálisis. Acudirá a una visita de seguimiento unas 4 semanas después de la última dosis del medicamento del estudio.

¿QUÉ SUCEDERÁ DURANTE EL ESTUDIO?

Si decide participar en el estudio, se someterá a un **período de selección** en dos etapas para determinar su idoneidad. Durante la **primera etapa** se llevarán a cabo los siguientes procedimientos:

- Recibirá la hoja de información al paciente y se le pedirá que firme el formulario de consentimiento informado.
- Se le asignará un **número de sujeto** para identificarle y proteger su información personal.
- Se le realizará una **tomografía computarizada (TAC)** para medir la puntuación de calcio. El TAC es un tipo indoloro de radiografía en la que se obtienen imágenes de los vasos sanguíneos, y, en algunos casos, los huesos. Durante la prueba, tendrá que permanecer tumbado boca arriba dentro del escáner, que puede tener un espacio muy reducido, lo cual puede provocarle ansiedad o nerviosismo. También estará expuesto a una pequeña cantidad de radiación, equivalente a unos 2 años de la radiación de fondo a la que todo el mundo está expuesto, con muy poco riesgo de daño para el organismo. Si tuviera cualquier pregunta al respecto, consulte al Médico del estudio.

- Se realizará una **radioabsorciometría de doble energía (DEXA)** para medir la fortaleza de los huesos, también conocida como densitometría ósea. Durante el procedimiento, le pedirán que se tumbe en la camilla mientras el equipo de rayos X explora su columna vertebral y cadera. Se trata de un procedimiento indoloro y, en general, los riesgos de una DEXA son muy reducidos. Las dosis de radiación utilizadas son extremadamente pequeñas y significativamente inferiores a las utilizadas en las radiografías normales.

El Médico del estudio podrá determinar su idoneidad para continuar en la etapa 2 del período de selección una vez revisados los resultados del TAC. Si se le considera que no cumple los criterios, no se realizarán más pruebas. Si se le considera que cumple los criterios, en la **segunda etapa** se llevarán a cabo los siguientes procedimientos:

- Se le realizarán preguntas personales sobre sus **características demográficas**, como su nombre, edad y raza. También se le preguntará por sus **antecedentes médicos y de salud** y qué **medicación recetada** está tomando y ha estado tomando en los últimos 30 días.
- Se le realizará una **exploración física** general. El Médico del estudio puede explorar su piel, cabeza, cuello, tórax, pulmones, corazón, abdomen, brazos y piernas. También se determinarán su estatura y peso.
- Se tomarán sus **constantes vitales** (tensión arterial, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y temperatura). Para medir la tensión arterial, se le colocará una banda alrededor del brazo que le apretará durante un minuto aproximadamente.
- Si es usted una mujer en edad fértil, se le realizará una **prueba de embarazo en sangre** para asegurarse de que no está embarazada. Se extraerán unos 5 ml de sangre de la vía de diálisis para esta prueba, lo que le puede provocar un mareo.
- Se le realizará un **electrocardiograma (ECG)** para medir la actividad eléctrica de su corazón y comprobar que late con normalidad. En un ECG se colocan unos electrodos adhesivos en la piel mientras se registra la actividad eléctrica del corazón. Los electrodos pueden estar fríos en la primera aplicación. Puede sufrir alguna irritación o dolor en la piel al quitarle los electrodos del ECG.

Una vez completadas las pruebas del período de selección y si se le considera que es idóneo, pasará al **período de tratamiento** del estudio. Es posible que, tras la revisión de los resultados de estas pruebas, no cumpla los requisitos para participar en el estudio. Si no resulta idóneo para recibir el medicamento del estudio, el Médico del estudio le comentará los motivos.

Al inicio del período de tratamiento, un ordenador le asignará aleatoriamente a recibir SNF472 o placebo. "Aleatoriamente" significa que es parecido a sacar un número de un sombrero. Hay una probabilidad de 2 entre 3 de que reciba dosis 1 (300 mg) de SNF472 o dosis 2 (600 mg) de SNF472 frente a un placebo. Ni usted ni el Médico del estudio sabrán qué tratamiento se le está administrando. En caso de emergencia, se facilitará esta información al médico del estudio.

El **medicamento del estudio** se administrará tres veces por semana en las sesiones de diálisis habituales. Se le administrará a través de la máquina de diálisis unos 30 minutos después del inicio de la diálisis y tardará unas dos horas y media en finalizar.

Las pruebas realizadas durante el período de selección se repetirán durante el período de tratamiento. Las pruebas siguientes también se realizarán únicamente en visitas clave durante el período de tratamiento:

Se le extraerán **muestras de sangre** para las pruebas habituales de hemograma (recuento de cada tipo de célula sanguínea) y bioquímica (prueba que examina la presencia de varias sustancias en

la sangre indicativas de su estado de salud general). También se le realizarán pruebas para analizar los niveles de calcio y hierro en sangre, así como la coagulación. Si es usted una mujer en edad fértil, se le realizará una prueba de embarazo para comprobar que no está embarazada. Se extraerán unos 10 ml de sangre de la vía de diálisis para estas pruebas, lo que le puede provocar mareo.

Se le estará tratando con **hemodiálisis ("diálisis")** de forma habitual para poder participar en este estudio. La diálisis es un procedimiento que filtra la sangre circulante para eliminar los productos de desecho. La diálisis que se le realiza no se modificará durante este estudio y forma parte de la atención médica habitual para su salud.

Después de completar la sesión de diálisis, se tomarán sus constantes vitales, incluido su temperatura.

También se medirá su **peso** de forma periódica (en la cama o de pie en una báscula).

Se le preguntará sobre cualquier medicación recetada nueva que haya estado tomando o sobre cualquier cambio en la medicación.

Le preguntarán si está experimentando algún **problema de salud, síntoma o efecto secundario** nuevos.

Además de recibir el medicamento del estudio tres veces por semana junto con las sesiones de diálisis habituales, se le realizarán las siguientes pruebas durante las **visitas principales** del período de tratamiento:

Día 1

Se revisarán los criterios de idoneidad para la participación en el estudio y se le asignará el medicamento del estudio de forma aleatoria (dosis 1 de SNF472, dosis 2 de SNF472 o placebo)

Se le realizarán análisis de sangre, incluida una prueba de embarazo si es usted una mujer que puede quedarse embarazada.

Se tomarán su peso y sus constantes vitales.

Se le preguntará sobre cualquier medicación recetada nueva que haya estado tomando, o sobre cualquier cambio en la medicación.

Le preguntarán si está experimentando algún síntoma o efecto secundario nuevo.

Semana 2

Se medirán sus constantes vitales.

Le preguntarán si está experimentando algún síntoma o efecto secundario nuevo.

Semana 4

Se le preguntará sobre cualquier medicación recetada nueva que haya estado tomando, o sobre cualquier cambio en la medicación.

Le preguntarán si está experimentando algún síntoma o efecto secundario nuevo.

Semana 6

Si es usted una mujer en edad fértil, le realizarán una prueba de embarazo.

Se medirán sus constantes vitales.

Le preguntarán si está experimentando algún síntoma o efecto secundario nuevo.

Semana 10

Se le realizarán análisis de sangre rutinarios, incluida una prueba de embarazo si es usted una mujer que en edad fértil.

Se realizará un electrocardiograma (ECG).

Se medirá su peso.

Se le preguntará sobre cualquier medicación recetada nueva que haya estado tomando, o sobre cualquier cambio en la medicación.

Le preguntarán si está experimentando algún síntoma o efecto secundario nuevo.

Semana 16

Si es usted una mujer en edad fértil, le realizarán una prueba de embarazo.

Se medirán sus constantes vitales.

Le preguntarán si está experimentando algún síntoma o efecto secundario nuevo.

Semana 22

Si es usted una mujer en edad fértil, le realizarán una prueba de embarazo.

Le preguntarán si está experimentando algún síntoma o efecto secundario nuevo.

Semana 28

Se le realizarán análisis de sangre rutinarios, incluida una prueba de embarazo si es usted una mujer en edad fértil.

Se realizará un electrocardiograma (ECG).

Se tomarán su peso y sus constantes vitales.

Se le preguntará sobre cualquier medicación recetada nueva que haya estado tomando, o sobre cualquier cambio en la medicación.

Le preguntarán si está experimentando algún síntoma o efecto secundario nuevo.

Semana 34

Si es usted una mujer en edad fértil, le realizarán una prueba de embarazo.

Le preguntarán si está experimentando algún síntoma o efecto secundario nuevo.

Semana 40

Se le realizarán análisis de sangre rutinarios, incluida una prueba de embarazo si es usted una mujer que puede quedarse embarazada.

Se realizará un electrocardiograma (ECG).

Se tomarán su peso y sus constantes vitales.

Le preguntarán si está experimentando algún síntoma o efecto secundario nuevo.

Semana 46

Si es usted una mujer en edad fértil, le realizarán una prueba de embarazo.

Le preguntarán si está experimentando algún síntoma o efecto secundario nuevo.

Semana 52 / Final del tratamiento

El último día de administración del medicamento del estudio, se le pedirá la realización de otra tomografía computarizada (TAC) y otra radioabsorciometría de doble energía (DEXA). Se trata de pruebas muy importantes que ayudarán a determinar el efecto del medicamento estudiado. En esta visita, también se realizarán los siguientes procedimientos:

Se realizará una exploración física, incluyendo la medición del peso.

Se le realizarán análisis de sangre rutinarios, incluida una prueba de embarazo si es usted una mujer en edad fértil.

Se realizará un electrocardiograma (ECG).

Se medirán sus constantes vitales.

Se le preguntará sobre cualquier medicación recetada nueva que haya estado tomando, o sobre cualquier cambio en la medicación.

Le preguntarán si está experimentando algún síntoma o efecto secundario nuevo.

Semana 56 ó 1 mes después de la última dosis

Un mes después de la última dosis del medicamento del estudio, se le pedirá que vuelva para una visita de seguimiento. En esta visita le preguntarán si está experimentando algún problema de salud, síntoma o efecto secundario nuevo y grave.

¿CUÁLES SON LOS RIESGOS DE ESTE ESTUDIO?

Hasta la fecha, 40 sujetos (21 pacientes de diálisis y 19 voluntarios sanos) han recibido el medicamento del estudio en dos estudios clínicos previos, y los efectos secundarios más frecuentes del medicamento del estudio (entre el 1 % y el 10 % de las personas que recibieron el medicamento del estudio) son:

- Dolor en el lugar de infusión (la zona en la que la aguja penetra en la piel para acceder a los vasos sanguíneos) *
- Enrojecimiento en el lugar de infusión (eritema)*
- Entumecimiento en el lugar de infusión (hipoestesia)*

- Inflamación en el lugar de infusión*
- Hematoma en el lugar de infusión*
- Cefalea
- Mareos
- Dolor en los brazos o en las piernas (dolor en las extremidades)
- Dolor muscular (mialgia)

*No se observaron efectos secundarios en el lugar de infusión en ningún paciente de diálisis.

Podrían aparecer efectos secundarios que todavía se desconocen. La enfermedad que padece podría no mejorar o empeorar durante este estudio.

Las mujeres embarazadas o en período de lactancia no pueden participar en este estudio. Antes de participar en el estudio, deberá acordar con el Médico del estudio el método anticonceptivo que utilizará durante el estudio y durante 30 días después de la última dosis del medicamento del estudio. No se conoce el efecto del medicamento del estudio sobre el feto o el bebé en período de lactancia.

Los métodos anticonceptivos válidos para entrar en el estudio son:

- Abstinencia sexual desde antes de empezar la primera dosis del medicamento del estudio y hasta 30 días después de la última dosis del medicamento del estudio. La abstinencia periódica (por ejemplo, los métodos como el calendario de ovulación, sintotérmico, posteriores a la ovulación) y la retirada NO son métodos anticonceptivos aceptables.
- Las mujeres con probabilidad de quedarse embarazadas deben utilizar anticonceptivos hormonales orales o inyectables, parche anticonceptivo, dispositivos intrauterinos, anillos vaginales hormonales, diafragma vaginal o capuchones cervicales: desde antes de la primera dosis del medicamento del estudio hasta 30 días después de la última dosis del medicamento del estudio.
- Los hombres deberán usar un condón, además de que su pareja use otro método válido de contracepción (véase el punto anterior).
- Los hombres no deben tener relaciones sexuales sin protección con una mujer que está embarazada o en periodo de lactancia durante el ensayo clínico.
- La pareja femenina de un paciente masculino no tiene el potencial de tener hijos, es decir, esta después de la menopausia o esterilizada quirúrgicamente (por ejemplo, ligadura de trompas, histerectomía en la historia medica).

Si cree que se ha quedado embarazada durante el estudio, deberá comunicárselo inmediatamente al Médico del estudio. No se le administrará más medicamento del estudio, y no podrá permanecer en el estudio debido a que no se le podrán realizar los procedimientos del ensayo tal y como se han programado, puesto que las pruebas radiológicas están contraindicadas durante el embarazo. Se le podrá solicitar su permiso para recopilar información sobre su embarazo, la cual podría ayudar a proporcionar información sobre la toxicidad del medicamento durante la gestación. El Médico del estudio le pedirá permiso para obtener información sobre la evolución y el desenlace del embarazo, y para proporcionar esta información al Promotor o a su representante.

Los varones incluidos en este estudio de investigación no deberán concebir un bebé durante la administración del medicamento del estudio y los 30 días posteriores a la última dosis de dicho medicamento. No se conoce el efecto del medicamento del estudio sobre los espermatozoides.

¿CUÁLES SON LOS BENEFICIOS DE ESTE ESTUDIO?

No existe ninguna garantía de que usted obtenga un beneficio médico por participar en este estudio. Según los datos limitados disponibles, se cree que SNF472 podría reducir la acumulación de calcio y por lo tanto podría reducir los problemas circulatorios y cardíacos relacionados.

¿QUÉ OTRAS OPCIONES TERAPÉUTICAS EXISTEN?

Antes de tomar la decisión de participar o no en este estudio, el Médico del estudio le comentará otras opciones de tratamiento disponibles. Algunas de estas opciones son:

- No participar en este estudio.
- Participar en otro estudio.
- Continuar con el tratamiento actual o los cuidados complementarios para su enfermedad sin participar en un estudio.

El Médico del estudio le explicará los posibles riesgos y beneficios de estas opciones. Se le comunicará cualquier información nueva que pueda cambiar su decisión de participar en este estudio. En ese caso, es posible que deba firmar un formulario de consentimiento nuevo.

¿CUÁLES SON MIS OBLIGACIONES COMO PARTICIPANTE?

Como participante de un estudio acepta:

- Seguir las indicaciones del Médico del estudio.
- Proporcionar información correcta sobre su estado de salud al médico del estudio.
- Responder de la forma más exacta posible a las preguntas del médico del estudio.
- Informar al médico del estudio si decide suspender su participación.

¿ME SUPONDRÁ ALGÚN COSTE MI PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO?

Se le proporcionarán el medicamento del estudio y todos los procedimientos del estudio sin coste alguno.

Si presenta una reacción al medicamento del estudio, su participación podrá suspenderse en cualquier momento por decisión del Médico del estudio o del Promotor sin su consentimiento.

Si se suspende el estudio, se le comunicará y el Médico del estudio organizará la continuación de su tratamiento.

¿ME PAGARÁN POR PARTICIPAR?

Participar en el estudio no le supondrá ningún coste. Se le proporcionarán todos los medicamentos del estudio, pruebas y cuidados médicos relacionados con el estudio sin ningún coste para usted.

Con respecto a su participación en este ensayo clínico, no recibirá ningún pago por participar en el mismo, sin embargo, el Promotor le reembolsará los costes de los desplazamientos relacionados con su participación en el estudio para las visitas para la realización de pruebas que no coincidan con la práctica clínica habitual, como por ejemplo para la realización de pruebas radiográficas, mientras proporcione los recibos correspondientes, de acuerdo con las condiciones de pago determinadas por el Promotor.

¿QUIÉN FINANCIA ESTE ESTUDIO?

Este estudio de investigación está financiado por el Promotor, Sanifit. Sanifit es una empresa biotecnológica privada, lo que significa que el Médico del estudio o su centro recibirán pagos de Sanifit o de su representante para financiar las actividades necesarias para la realización del estudio.

¿QUÉ SUCEDERÁ SI SUFRO ALGÚN DAÑO POR PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?

Póngase en contacto con el médico del estudio si cree que ha sufrido una enfermedad o lesión relacionadas con el estudio, para que pueda proporcionarle la atención médica necesaria. Si se pone enfermo o sufre algún daño como resultado directo de este estudio, los costes de la atención médica razonable y necesaria estarán cubiertos de conformidad con la legislación correspondiente.

En el caso de que sufra una lesión provocada directamente por la participación en el estudio, Sanifit (la empresa promotora) le pagará una indemnización sin que tenga que probar que la lesión ha surgido por alguna negligencia o que el medicamento del estudio es defectuoso.

El Promotor ha firmado una póliza de seguros que cumple con lo dispuesto en el Real Decreto 1/2015, de 24 de julio, y el Real Decreto 1090/2015, de 4 de diciembre, sobre indemnizaciones en caso de daño a la salud o lesión que se puedan producir en relación con su participación en el ensayo clínico.

Nombre de la empresa: CHUBB Insurance Company of Europe SE

Número de póliza: 99502392

¿QUÉ OCURRIRÁ CON LAS MUESTRAS RECOGIDAS DURANTE EL ESTUDIO?

Se le podrán extraer muestras de sangre como parte de este estudio. Estas muestras se etiquetarán con su número de sujeto para proteger su identidad.

Las muestras solamente se utilizarán y analizarán para los fines originales de este estudio. No se realizará ningún análisis nuevo sin su consentimiento.

Las muestras de sangre para comprobar su estado de salud se enviarán a un laboratorio central para su análisis.

Durante y después del estudio, usted será el propietario de las muestras biológicas. Si decide retirarse del ensayo, no se obtendrán nuevas muestras de usted. Usted tiene derecho a retirar cualquiera de las muestras biológicas restantes o solicitar su destrucción. Las muestras biológicas recogidas por motivos de investigación durante el estudio serán manipuladas de acuerdo con las directrices detalladas en la Ley de Investigación Biomédica 14/2007.

¿DE QUÉ FORMA SE PRESERVARÁ LA CONFIDENCIALIDAD DE MI INFORMACIÓN?

Al firmar este documento, usted acepta que el Médico del estudio y el personal del estudio del centro proporcionen información médica personal al Promotor o a sus representantes, con el fin de recopilar datos, verificar que los datos son correctos y comprobar que el estudio se realiza de forma correcta.

La información médica personal puede incluir datos de las exploraciones físicas, así como resultados de los análisis de sangre, radiografías y otros procedimientos médicos.

El equipo del estudio protegerá su privacidad y mantendrá sus datos personales y su información médica de forma estrictamente confidencial. Su identidad y datos de contacto no se divulgarán a menos que lo exija la ley. Para mayor protección, toda la información que pudiera identificarle

SNFCT2015-05 ESP ICF v1.1 Spanish 3Nov2016, based on CORE ICF version 1.0, 17AUG2016

(por ejemplo, su nombre) será sustituida por un número de sujeto. Sólo el personal del estudio autorizado sabrá que el número le corresponde a Ud.

La información obtenida sobre usted para este estudio se mantendrá confidencial en la medida exigida por la legislación aplicable. Sin embargo, la información de la investigación que le identifique podrá compartirse con:

- El Médico y el personal del estudio.
- El Promotor y/o sus representantes y terceros que trabajen para el Promotor.
- El Comité Ético de Investigación Clínica.
- Las Autoridades sanitarias.

Se podrá acceder a una descripción de este estudio clínico en <http://www.clinicaltrials.gov> tal y como exige la legislación estadounidense, en www.clinicaltrialsregister.eu conforme a la legislación europea y en <https://reec.aemps.es> conforme al Real Decreto español. Estos sitios web no contendrán información que permita identificarle. Como máximo, las páginas web incluirán un resumen de los resultados. Podrá acceder a esta web en cualquier momento.

¿EXISTE ALGÚN TIPO DE PROTECCIÓN ADICIONAL PARA MI INFORMACIÓN MÉDICA?

Durante el transcurso de este estudio, se recopilará alguna de la información médica presente en su historia clínica y todos los datos resultantes de su participación en este estudio. La información médica personal puede incluir datos de las exploraciones físicas, así como resultados de los análisis de sangre y de otros procedimientos médicos.

Su información médica personal se utilizará con fines de investigación clínica. También se podrá utilizar en informes del estudio o presentaciones científicas, pero de forma que no se le identifique por su nombre. Su información médica personal se mantendrá confidencial y no pasará a ser de dominio público.

Las únicas personas con acceso a su información médica personal de forma identificable serán el Médico del estudio, el personal que ayuda al Médico del estudio en la realización del estudio en el centro, los representantes del Promotor que comprueban que el estudio se esté realizando de forma correcta, el Comité Ético y las Autoridades Sanitarias locales y extranjeras.

Algunas de estas organizaciones pueden estar localizadas fuera del país o de la región donde usted vive, incluidos países en los que los requisitos de protección de datos pueden ser diferentes o menos restrictivos que en su país o región de residencia. Sin embargo, el Promotor tomará medidas razonables para mantener la confidencialidad de su información médica personal, comprometiéndose a que como mínimo se cumplirán los requisitos de la LOPD 15/1999 de 13 de diciembre sobre protección de datos de carácter personal. Con la firma de este documento, acepta la transferencia de su información médica personal a estos países, incluidos los Estados Unidos de América.

Según la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, el Real Decreto 1090/2015 y el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, de datos almacenados en España, podrá ejercer su derecho de acceso, corrección de errores, oposición y cancelación de sus datos. Usted podrá realizar copias de sus registros médicos y/o del estudio clínico, según lo permitido por la legislación civil nacional aplicable. Podrá solicitar ver sus registros al Médico del estudio o en el centro en el que se realiza el estudio. No obstante, para asegurar la validez de los

resultados del estudio, usted acuerda que no podrá revisar ni hacer copias de algunos de los expedientes relacionados con el estudio hasta después de que el estudio se haya completado.

El Médico del estudio informará a su médico de cabecera de su participación en el estudio y le solicitará información médica sobre usted.

¿A QUIÉN PUEDO DIRIGIRME EN CASO DE DUDAS?

Si tiene alguna pregunta sobre este estudio y sus derechos como participante, póngase en contacto con el Médico del estudio en el número de teléfono mencionado en la primera página.

¿Y SI DECIDO RETIRARME DEL ESTUDIO?

Podrá retirarse del estudio indicándole al equipo del estudio que ya no tiene interés en seguir participando en el mismo o enviando una carta de retirada.

Si decide abandonar el estudio de forma prematura, coméntelo con el Médico o el personal del estudio para que puedan informarle sobre cómo retirarse de forma segura y sobre los procedimientos necesarios.

La decisión de no firmar este documento no afectará a su tratamiento ni a la atención prestada por el profesional sanitario, ni a ninguno de los beneficios a los que usted tenga derecho.

Sin embargo, no podrá participar en el estudio.

Si firma este documento:

- Autoriza el uso de su información médica personal para este estudio.
- Su firma y este documento no expirarán siempre y cuando usted desee participar en el estudio.
- Podrá cambiar de opinión posteriormente y no permitir al equipo de investigación que utilice o comparta su información (puede revocar su autorización).

Si revoca su autorización:

- El Médico del estudio solo podrá utilizar y compartir la información obtenida hasta ese momento para el estudio.
- No se recopilarán datos nuevos sobre usted.
- Su información podrá seguir utilizándose o compartiéndose si resulta necesario por motivos de seguridad.
- No podrá continuar su participación en el estudio.

Su participación en el estudio puede ser interrumpida en cualquier momento por cualquiera de las siguientes razones:

- Si en cualquier momento usted siente que ya no desea participar
- El incumplimiento de las instrucciones del médico del estudio
- Un cuadro clínico grave, que puede requerir tratamiento u observación
- El médico del estudio decide que es en el mejor interés de su salud y el bienestar retirarse del estudio

Laboratoris Sanifit detiene el desarrollo del fármaco de estudio

¿RECIBIRÉ INFORMACIÓN NUEVA SOBRE EL ESTUDIO DURANTE MI PARTICIPACIÓN EN EL MISMO?

Si durante el estudio se dispusiera de cualquier información nueva, se le comunicaría inmediatamente para darle la oportunidad de decidir si desea continuar o retirar su participación de forma prematura. La información se proporcionará oralmente y por escrito, este último implica la firma de un nuevo consentimiento informado.

¿PUEDE ALGUNA PERSONA MÁS FINALIZAR MI PARTICIPACIÓN EN ESTE ESTUDIO?

En determinadas circunstancias, el Promotor o el Médico del estudio podrían decidir finalizar su participación en este estudio de investigación antes de lo previsto. El Médico del estudio podrá retirarle del estudio si:

- Permanecer en el estudio sería perjudicial para usted.
- Necesita recibir un tratamiento no permitido en este estudio.
- Incumple las instrucciones.
- Se ha quedado embarazada.
- Se cancela el estudio.

¿QUIÉN HA REVISADO EL ESTUDIO?

Todos los estudios clínicos son revisados por un grupo independiente de personas denominado Comité Ético de Investigación Clínica, para proteger su seguridad, derechos, bienestar y dignidad. Este estudio ha sido revisado con dictamen favorable, de conformidad con el Real Decreto 1090/2015 y la legislación aplicable, el Comité Ético de Investigación Clínica, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, y las normas de Buena Práctica Clínica / Comité de Medicamentos de Uso Humano / Conferencia Internacional de Armonización.

El Promotor, las Autoridades reguladoras o el Comité Ético de Investigación Clínica pueden detener el estudio en cualquier momento si hay una razón que lo justifique.

Consentimiento informado del paciente

Título del protocolo: Estudio doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo para evaluar el efecto de SNF472 en la progresión de la calcificación cardiovascular además del tratamiento de referencia en pacientes con nefropatía terminal (NT) sometidos a hemodiálisis (HD)

Código del protocolo: SNFCT2015-05

Promotor: Laboratoris Sanifit SL (“Sanifit”), Palma de Mallorca, España

Investigador: [Nombre del investigador]

Confirmando lo siguiente:

- He leído y comprendido la hoja de información relativa al estudio indicado y he tenido tiempo suficiente para considerar mi decisión de participar en el mismo.
- Se ha dado respuesta satisfactoria a todas mis preguntas.
- Accedo de manera voluntaria a participar en este estudio clínico, seguir los procedimientos del estudio y proporcionar la información que me soliciten el Médico, personal de enfermería u otro personal del estudio.
- Comprendo que soy libre de abandonar el estudio en cualquier momento, sin tener que explicar el motivo y sin que esto afecte a la asistencia médica habitual que recibo ni a mis derechos.
- He recibido una copia de esta hoja de información y del formulario de consentimiento para que la conserve.
- Acepto, si el Médico del estudio no es mi médico de cabecera, que se informe a mi médico de cabecera sobre mi participación en este estudio y se le solicite información médica sobre mí, si es necesario.
- Acepto que se me tomen muestras y se usen según lo descrito en esta hoja de información.
- Autorizo que mi información personal recogida como parte de este estudio clínico sea:
 - Identificable únicamente con mi número de identificación de paciente;
 - Revisada, procesada y transferida por y al promotor y sus representantes autorizados para los fines descritos en el protocolo del estudio;
 - Revisada o auditada por representantes autorizados apropiados;
 - Publicada y enviada a autoridades reguladoras en mi país y otros países; y
 - Transferida, en caso necesario, a cualquier país donde las leyes de protección de datos podrían ser menos estrictas. No obstante, el Promotor se compromete a que el nivel de protección de datos sea, como mínimo, el que establece la legislación Española (LOPD 15/1999 de 13 Diciembre sobre protección de datos de carácter personal).
- Comprendo que se me podrá contactar en el futuro para que otorgue un nuevo consentimiento en relación con este estudio o cualquier subestudio relacionado.

Al firmar este documento acepto participar en este estudio conforme a lo dispuesto en esta hoja de información y formulario de consentimiento.

Nombre del paciente

Firma del paciente

Fecha

Investigador:

- He explicado completa y detenidamente el estudio a la persona nombrada anteriormente y confirmo que, a mi entender, comprende claramente la naturaleza, los riesgos y los beneficios del estudio.
- Confirmando que tuvo oportunidad de hacer preguntas sobre el estudio y que respondí correctamente a todas las preguntas que hicieron lo mejor que pude.
- Confirmando que no ha sido coaccionada/o a dar su consentimiento, y que ha otorgado su consentimiento de manera libre y voluntaria.
- Confirmando que ha recibido una copia firmada de esta hoja de información y formulario de consentimiento.

Nombre del investigador

Firma del Investigador

Fecha

