



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 142**

51 Int. Cl.:
A61K 31/194 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07460015 .6**
96 Fecha de presentación : **03.07.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1917959**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2008**

54 Título: **Nuevo uso médico de alfa-cetoglutarato.**

30 Prioridad: **03.07.2006 PL 380103**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2011

73 Titular/es: **Danuta Kruszewska**
Al. Wilanowska 43M5
02-765 Warszawa, PL

72 Inventor/es: **Kruszewska, Danuta**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 360 142 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevo uso médico de alfa-cetoglutarato.

5 Este invento se refiere a nuevas aplicaciones médicas de alfa-cetoglutarato para la producción de preparados terapéuticos y profilácticos a utilizar en medicina humana y veterinaria de vertebrados, incluyendo mamíferos, aves, peces y anfibios.

Antecedentes de la invención

Alfa-cetoglutarato – sales de ácido alfa-cetoglutámico

El alfa-cetoglutarato está presente en los organismos vivos como una molécula endógena.

10 Las sales del ácido alfa-cetoglutámico se conocen desde al menos 60 años, desde que se descubrió el ciclo de Krebs. Las sales del ácido alfa-cetoglutámico desempeñan un papel fundamental en los organismos humanos y animales, participando junto a las sales de ácidos oxaloacético y pirúvico en el ciclo del ácido cítrico. Como resultado de reacciones reproducibles se sintetizan ácidos grasos, esteroides, colesterol (con actuación de citrato), porfirina, hemo, clorofila (actividad de succinil CoA), glutamato, aminoácidos, bases de nucleótidos (actividad de sales de ácido alfa-cetoglutámico).

15 El anión del ácido alfa-cetoglutámico desempeña un papel clave en el metabolismo, principalmente en organismos aeróbicos. El alfa-cetoglutarato resulta del proceso de descarboxilación oxidativa con la participación de la enzima celular de isocitrato deshidrogenasa y también de otro proceso metabólico, la desaminación oxidativa del glutamato catalizada por glutamato deshidrogenasa.

20 El alfa-cetoglutarato, siendo un compuesto intermedio en el ciclo vital básico, más concretamente en el ciclo del ácido tricarbónico, por ej.: ciclo de Krebs, está sometido a constantes transformaciones intracelulares y sus pequeñas concentraciones se presentan en la sangre periférica en forma de anión debido a su completa metabolización en el organismo.

25 Al mismo tiempo, el alfa-cetoglutarato desempeña, dentro del organismo, el papel de un secuestrante natural –un descontaminante, transportando el nitrógeno, mediante transaminación de los grupos de aminos procedentes de aminoácidos catabolizados. Este proceso tiene lugar en el hígado y se denomina el ciclo de ornitina o ciclo de urea.

30 El alfa-cetoglutarato puede ser sometido a la transaminación junto con la glutamina, durante tal proceso se forma un neurotransmisor denominado glutamato. El glutamato puede ser descarboxilado en presencia de la vitamina B6 resultando en un compuesto denominado GABA (ácido gamma-aminobutírico) que actúa como inhibidor del neurotransmisor (bloquea ese neurotransmisor).

También se ha demostrado que las enzimas de alfa-cetoglutarato participan en la eliminación del organismo de radicales libres – compuestos muy tóxicos – productos no metabolizados por completo.

Además, una de las oxigenasas dependientes del alfa-cetoglutarato es un sensor molecular de oxígeno, o sea, es un indicador del nivel de oxígeno en el ambiente.

35 El alfa-cetoglutarato puede ser suministrado al organismo a través de vías conocidas de suministro, por ejemplo: vía oral, por inhalaciones, vía intravenosa u otras vías.

La dieta diaria, tanto en humanos como animales, no incluye el alfa-cetoglutarato.

40 En el mercado, particularmente en América, están disponibles a la venta suplementos nutricionales que contienen sales de ácido alfa-cetoglutámico, principalmente sales de arginina, piridoxina, ornitina, creatina, histidina y citrulina, en forma de productos hechos para humanos y animales domésticos. También están disponibles sales sódicas, potásicas y cálcicas del ácido alfa-cetoglutámico.

45 La lista de suplementos alimenticios preparada por la Asociación Nacional de Alimentos Nutritivos (NNFA) incluía tanto el ácido alfa-cetoglutámico como el ácido alfa-cetoglutámico combinado con piridoxina (vitamina B6) en el grupo de productos bioquímicos ya antes del 15 septiembre de 1994. Una presencia tan larga en el mercado da como resultado una abundante cantidad de suplementos nutritivos que contienen estos compuestos químicos. La razón principal de que todos los productos disponibles contengan derivados o sales del ácido alfa-cetoglutámico es que el ácido alfa-cetoglutámico – al ser un compuesto intermedio en el ciclo de Krebs – es una de las sustancias responsables de la respiración celular y por lo tanto se considera que mejora la calidad de vida.

50 El grupo más numeroso de productos mencionados anteriormente es aquel que abarca los productos que contienen L-arginina combinada con alfa-cetoglutarato. Estos productos, según declaraciones de los fabricantes, facilitan la obtención de energía durante o después de actividades físicas, mejoran la síntesis del

óxido de nitrógeno, además – en combinación con óxido de nitrógeno, incrementan los niveles de este óxido en el organismo facilitando el transporte de nutrientes, así mismo mejoran el metabolismo en los músculos. Combinados con otras sustancias, incrementan el nivel de energía y facilitan el metabolismo de aminoácidos.

5 El siguiente grupo más numeroso de productos comercializados contiene la ornitina combinada con el ácido alfa-cetoglutarico. En tal forma, el alfa-cetoglutarato no solamente incrementa la producción de energía, sino que también protege a los músculos contra la descomposición de aminoácidos ramificados, con el fin de generar glutamina, molécula que incrementa la energía. Además es el componente que refuerza la secreción de la hormona del crecimiento y optimiza el metabolismo muscular. Incrementa, de forma segura para la salud, la actividad de la insulina y las poliaminas. Refuerza también la neurotransmisión que ayuda a mantener un buen estado mental del organismo, incrementa la resistencia muscular maximizando las actividades atléticas, aumenta la capacidad del organismo para quemar grasas, aumenta la libido, influye positivamente en el sistema inmunológico y reduce el estrés de oxígeno.

15 El siguiente grupo de preparados alimenticios utilizados como suplementos nutritivos contienen piridoxina y piridoxilo combinados con el alfa-cetoglutarato. Los componentes de estos productos mejoran el metabolismo intracelular, equilibran el esfuerzo del organismo por producir energía y protegen al hígado.

En el mercado están también disponibles productos que contienen creatina combinada con alfa-cetoglutarato. Estos productos actúan como precursores de glutamina y participan en la síntesis de proteínas.

Otras, no especificadas, sales del ácido alfa-cetoglutarico estimulan la reducción de grasa del organismo y condicionan la integridad del tejido muscular.

20 El ácido alfa-cetoglutarico es, por otra parte, el componente de un preparado que desempeña la función de un desintoxicante natural. Se recomienda su uso en estado de cansancio crónico, en deficiencias metabólicas resultantes durante el análisis de aminoácidos. El suministro de este tipo de preparados aumenta la resistencia y la energía. Un producto interesante, perteneciente a este grupo, es la sal de calcio o magnesio del ácido alfa-cetoglutarico. Debido a que el ácido alfa-cetoglutarico pertenece al grupo de ácidos orgánicos fuertes, puede irritar el esófago y el estómago si se suministra por vía oral. El uso de calcio o magnesio permite obtener un producto bicomponente de ácido alfa-cetoglutarico tamponado que no provoca la desagradable sensación de la acidez en exceso.

30 Numerosas patentes y solicitudes de patentes muestran que el alfa-cetoglutarato puede ser administrado también en disfunciones metabólicas del cerebro, desórdenes del sistema nervioso, circulación sanguínea, sistema muscular esquelético, para reforzar las funciones mitocondriales celulares.

También están disponibles bebidas que contienen sales del ácido alfa-cetoglutarico, destinadas a suministrar energía al organismo, especialmente antes, durante y después del esfuerzo físico. Tales bebidas – como fuente de energía – pueden ser suministradas también en situaciones de rápida o prolongada demanda de energía, tanto en humanos como otros mamíferos.

35 Otros usos del alfa-cetoglutarato lo convierten en un producto anabólico, no esteroide, para aumentar la masa muscular sin transformarla en grasa. El efecto de este suplemento nutritivo es similar al efecto obtenido con esteroides anabolizantes sintéticos, pero sin efectos secundarios desfavorables.

40 Por vía oral también puede ser suministrado un suplemento que contiene tiamina soluble en grasas, derivados de creatina y L-arginina con alfa-cetoglutarato. Este suplemento dietético está destinado a bajar los niveles de glucosa en sangre, así como mantener bajos los niveles de glucosa en sangre durante el tratamiento de neuropatías diabéticas, mejorar la circulación sanguínea y el rendimiento muscular.

Las sales del ácido alfa-cetoglutarico tienen otra interesante aplicación, sirviendo como agentes reductores de la emisión de nitrógeno en humanos y animales y para mantener la síntesis de proteínas, se utilizan también en microbiología alimenticia.

45 Se ha revelado el uso del ácido alfa-cetoglutarico y sus sales como componentes de sustancias antisépticas destinadas a la industria alimenticia. Véase: DATABASE WPI, Sección Ch, Semana 1974, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D13, AN 1974-44619V XP002472373 "Antiseptic agent contg. a ketoglutaric acid - esp. useful in the food ind." y el documento JP 49 01 9855 B - (UENO PHARMACEUTICAL), 1974. La actividad antibacteriana del ácido alfa-cetoglutarico y otros ácidos orgánicos tales como el ácido ascórbico o propiico o sus sales – demostrado por los resultados de experimentos en *Bacillus subtilis*, consiste más bien en la prevención del crecimiento de cultivos que en el exterminio de estos microorganismos. En este contexto hay que destacar, que la sal (NaCl) por sí sola – presente en los alimentos analizados, tiene la misma cualidad antibacteriana. Finalmente, la concentración del ácido alfa-cetoglutarico o sus sales en los productos alimenticios analizados, conservados con estas sustancias, varía desde 0,05 hasta el 1,00%. Tal concentración no puede ser utilizada en organismos vivos.

En la industria alimenticia, las sales se utilizan como componentes que mejoran y aumentan el aroma y el

- sabor de productos de la fermentación (por ej. vinagre) y productos lácteos como el queso, entre otros. Las sales del ácido alfa-cetoglutarico influyen en el proceso de fermentación inducido por bacterias del ácido láctico, modificando el metabolismo de aminoácidos, los niveles de catabolitos y la actividad de aminotransferasas. En la práctica, esto se traduce en el acortamiento del periodo de curación de los quesos, mediante la acelerada formación de compuestos que garanticen la alta calidad comercial de alimentos. Véase: Williams AG, Noble J, Banks JM., "The effect of alpha-ketoglutaric acid on amino acid utilization by nonstarter *Lactobacillus* spp. isolated from Cheddar cheese". *Lett. Appl. Microbiol.* 2004; **38**: 289-295.
- Numerosas patentes y solicitudes de patente se refieren al uso del alfa-cetoglutarato como producto farmacéutico o componente de tales productos.
- La publicación WO 2007/058612 ilustra el uso del ácido alfa-cetoglutarico, glutamina, ácido glutámico, sus sales, así como sus amidas, di- y tripéptidos como componentes de preparados farmacéuticos para el tratamiento y profiláctica de artrosis, artritis reumatoide, lesiones de cartilago debidas a inflamación u otras causas.
- La publicación WO 2005/123056 muestra el uso del ácido alfa-cetoglutarico, glutamina, ácido glutámico, sus sales aceptadas farmacéuticamente, así como sus amidas, di- y tripéptidos como aditivos alimenticios y aditivos para piensos, para el tratamiento y profiláctica en caso de excesivos niveles en plasma de al menos uno de los siguientes parámetros: colesterol, LDL, glicéridos. Estos preparados también pueden ser utilizados para incrementar los niveles de HDL.
- La publicación EP 0 922 459 revela que el ácido alfa-cetoglutarico con D-galactosa y ornitina, así como las sales del ácido alfa-cetoglutarico como la sódica, potásica, magnésica, de calcio y zinc, en dosis definidas, suministradas en forma de comprimidos, polvos, infusiones, siropes, puede incrementar el perfil de aminoácidos en sangre, particularmente en pacientes sometidos a situaciones de estrés metabólico. Los preparados indicados pueden ser utilizados en terapias de enfermedades hepáticas, terapia y prevención de enfermedades hepáticas en adictos al alcohol, tanto para mantener las funciones y estructura del hígado como para regenerarlo.
- La publicación WO 2006/016143 revela que un producto consistente del alfa-cetoglutarato y sus derivados fue utilizado para activar la HIFa hidroxilasa para incrementar los niveles de alfa-cetoglutarato y ahora está siendo utilizado en tratamientos del cáncer y la angiogénesis.
- Según la publicación WO 2006/062424 también es posible utilizar el 3-hidroxi-3 metilbutirato combinado con el alfa-cetoglutarato y otros derivados, en el proceso de crecimiento y mineralización del esqueleto en estados fisiológicos y osteocondropatía en adultos y animales. Este mismo producto puede ser añadido a alimentos ordinarios y alimentos que contienen medicamentos.
- La publicación WO 2006/016828 indica el uso de alfa-cetoglutarato y sus derivados como producto farmacéutico y aditivo de alimentos y piensos que mejora el funcionamiento de células nerviosas y del sistema nervioso, minimizando y previniendo la apoptosis de las células nerviosas y protegiendo frente a enfermedades del sistema nervioso en adultos y fetos.
- La piridoxina alfa-cetoglutarato es un conocido agente utilizado en la profiláctica de la acidosis tanto en medicina como veterinaria, en la profiláctica de todos los estados que llevan a la acidosis, así como en todas las patologías donde se utilicen medicamentos para reducir los niveles de ácido láctico en sangre.
- El alfa-cetoglutarato se utiliza también en la medicina como agente desintoxicante en caso de intoxicación del organismo. Las cualidades desintoxicantes del alfa-cetoglutarato se utilizaban en caso de envenenamientos con cianuro. El alfa-cetoglutarato como agente antitóxico previene el catabolismo muscular postoperatorio y también se puede utilizar en hospitales para pacientes a los que se prescribe alimentación parenteral, donde uno de los componentes del bolo suministrado es el alfa-cetoglutarato. El alfa-cetoglutarato también es recomendado para pacientes que hayan sufrido un accidente cerebrovascular, heridas por quemadura, hipoxia, irradiados con rayos X o en caso de cataratas provocadas por envenenamiento con selenio.
- El alfa-cetoglutarato combinado con la ornitina protege eficazmente el organismo después del trasplante de intestino delgado, contra la traslocación de bacterias, algo que se analizó en nódulos linfáticos mesentéricos, el hígado y el bazo. Véase: de Oca J, Bettonica C, Cuadrado S, Vallet J, Martin E, García A, Montanes T, Jaurrieta E. "Effect of oral supplementation of ornithine-alpha-ketoglutarate on the intestinal barrier after orthotopic small bowel transplantation". *Transplantation.* 1997; **63**:636-639.
- El suministro de ornitina-alfa-cetoglutarato en ratas en estado post-traumático inducido con fines experimentales, reduce la expansión de *E.coli* y la destrucción de tejidos por LPS. Se asume que en seres humanos sometidos a traumas, el suministro de este producto puede prevenir la sepsis y sus consecuencias. Véase: Schlegel L, Coudray-Lucas C, Barbut F, Le Boucher J, Jardel A, Zarrabian S, Cynober L. "Bacterial dissemination and metabolic changes in rats induced by endotoxemia following intestinal *E. coli* overgrowth are reduced by ornithine alpha-ketoglutarate administration". *J Nutr.* 2000; **130**: 2897-2902.

El alfa-cetoglutarato se utiliza también en la cría de animales para mejorar la absorción de aminoácidos. También se utiliza en la cría de cochinillos para acelerar la absorción de iones de hierro.

Bacteria Ureolítica.

5 La cantidad de bacterias que asimilan nitrógeno es muy grande: desde comensales no patógenos, tales como bacterias que colonizan la piel, pasando por simbióticas no patógenas que habitan las membranas mucosas del tracto gastrointestinal, hasta bacterias patógenas, incluyendo la *Helicobacter pylori* y las bacterias que causan infecciones del sistema urogenital.

La infección más común causada por bacterias ureolíticas es la infección por *H. pylori*.

10 La característica común para las bacterias ureolíticas es el aprovechamiento, por medio de la ureasa, de la urea presente en su entorno – como fuente principal de nitrógeno necesario para su supervivencia. La ureasa bacteriana (aminohidrolasa de urea E.C. 3.5.1.5) es una enzima dependiente del níquel, múltimero compuesto de 2 o 3 subunidades. Se ha descubierto la estructura cristalográfica 3-D de algunas ureasas bacterianas (*H. pylori*, *Klebsiella aerogenes*, *Bacillus pasteurii*). Una gran similitud en la secuencia de aminoácidos indica que todos los tipos de ureasa parten de una misma proteína originaria, disponen de una parecida estructura tridimensional y que mantienen la actividad catalítica durante la hidrólisis de urea en amonio y dióxido de carbono.

15 Un ejemplo de bacterias presentes en la cavidad bucal que asimilan nitrógeno a través de sus propias ureasas son *Streptococcus salivarius* y *Actinomyces naeslundii*, bacterias que forman biocapas.

20 La mayor concentración de bacterias ureolíticas está presente en el tracto gastrointestinal. Los microorganismos, incluyendo los ureolíticos, colonizan permanentemente la superficie del epitelio y son reconocidos como la microflora intestinal natural. Esto significa que el acceso a la urea es uno de los factores críticos que condicionan la ecología de los microorganismos del tracto gastrointestinal, influyendo en la cantidad y calidad de bacterias en dicha zona. Manteniendo la integridad del tejido, el acceso a la urea es uno de los factores condicionantes de la salud del macroorganismo. La misma norma de mantenimiento del equilibrio se aplica a los microorganismos que colonizan la superficie del cuerpo.

25 La urea es también importante como sustrato para la ureasa de patógenos durante la estabilización de la fase inflamatoria en infección por *H. pylori*.

30 Una ruta común de acceso de patógenos en el organismo humano o animal es el tracto gastrointestinal al que acceden con el alimento, independientemente del lugar donde se desarrolle una posterior infección. Las infecciones por microorganismos ureolíticos a través del tracto gastrointestinal muestran que la ureasa desempeña un papel clave en la patogénesis de estas infecciones. Se ha demostrado que algunas cepas bacterianas, por ejemplos las cepas de *Brucella* productoras de ureasa, resultan resistentes, en presencia de urea, a las cualidades biocidas del jugo gástrico en el cual se presentan condiciones de fuerte acidez. Las mutaciones de esta bacteria que no producen ureasa resultan muy susceptibles a tales condiciones, hecho que resulta en la reducción de su cantidad al pasar por el estómago. Se puede concluir, que en tales condiciones, la ureasa protege a la brucella contra los efectos del jugo gástrico cuando ésta penetre en el organismo por vía oral. Habiendo pasado la barrera del estómago, la bacteria puede invadir libremente el sistema respiratorio y urogenital, causando los síntomas propios de la brucelosis.

40 Las bacterias ureolíticas, a pesar de no ser el factor etiológico principal de infecciones del sistema urinario en organismos sanos, a menudo están relacionadas con infecciones en personas con enfermedades del sistema urinario. La consecuencia de infecciones del sistema urinario causadas por microorganismos productores de ureasa es la litiasis coraliforme acompañada de supersaturación de orina con sales de magnesio, amonio y fósforo (struvite) y sales de fosfato de calcio, así como procesos patológicos en riñones. En condiciones fisiológicas normales, la orina no contiene esas sales.

45 Otro interesante mecanismo en la patogénesis de infecciones del sistema urogenital es el mantenimiento de infecciones causadas por bacterias productoras de ureasa, tales como *Ureaplasma ureolyticum* y otras bacterias alcalófilas, como *Bacillus pasteurii*. En un ambiente de urea, los patógenos utilizan la ureolisis para generar su propio ATP y de esa forma reproducirse permanentemente. A pesar de que la bacteria *U. urealyticum* y otros micoplasmas son relativamente raras, pueden causar también infecciones peligrosas y difíciles de erradicar en el sistema respiratorio humano y animal, incluyendo en peces.

50 Se ha descubierto también, que la bacteria *Yersinia enterocolica* que utiliza la ureasa, un patógeno del tracto gastrointestinal puede causar artritis reactiva en personas genéticamente propensas. Esta reactividad está relacionada con la estructura química de la enzima – su subunidad UreB.

55 Cabe destacar que muchas bacterias capaces de trasladarse son organismos ureolíticos responsables de generar la biocapa protectora y de la mineralización de depósitos en catéteres y otros implantes médicos.

Se considera que el metabolismo de la urea también está relacionado con infecciones de la membranas mucosas de la cavidad bucal, incluyendo enfermedades gingivales, la formación del caries dentales y sarro.

La formación de cálculos infecciosos está relacionada con infecciones del sistema urinario causadas por bacterias del siguiente género: *Proteus*, *Ureaplasma*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Providencia*, *Corynebacterium*. La causa más común de la formación de cálculos infecciosos es la bacteria *P. mirabilis*. Otro factor de formación de cálculos son los micoplasmas normalmente relacionados con infecciones del tracto genital, particularmente su parte inferior (principalmente la vagina). En hombres, se aíslan de la uretra los siguientes organismos: *Mycoplasma hominis* y *U. urealyticum*. La colonización del sistema urogenital en hombres y mujeres, por bacterias, lleva a las infecciones del sistema urinario acompañadas con la aparición de cálculos infecciosos en la vejiga.

Infecciones por *Helicobacter pylori*

Las espirales del *H. pylori*, en humanos, se encuentran aislados desde el estómago al duodeno. Esta bacteria espiral, gram-negativa, ureolítica conocida anteriormente con el nombre de *Campylobacter pylori* es uno de los factores etiológicos de la gastritis y la formación de úlceras de estómago y duodeno. En 1983, Warren y Marshall, galardonados en el 2005 con el Premio Nobel, demostraron la relación causa-efecto entre la presencia de la bacteria *H. pylori* en el tracto gastrointestinal con gastritis crónica. Véase: Marshall BJ, Warren JR. Los bacilos curvados no identificados en el estómago de pacientes con gastritis y úlcera péptica. *Lancet*. 1984; 1:1311-1315.

Debido al hecho de que las infecciones duraderas incrementan sensiblemente el riesgo del adenocarcinoma intestinal, en los últimos años, la bacteria *H. pylori* fue declarada por la Organización Mundial de la Salud como factor cancerígeno ("IARC. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*." IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 de Junio 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 1994; 61:1-241.).

Más aún, se ha descubierto la relación entre infección por *H. pylori* y patologías de tejidos y órganos diferentes al estómago, por ejemplo el corazón.

Durante mucho tiempo se ha considerado que el estómago se encuentra libre de bacterias, ya que la colonización permanente de su membrana mucosa resulta difícil por su pH que es demasiado bajo para el crecimiento de la mayoría de microorganismos. No obstante, la ureasa producida por *H. pylori* permite a este organismo formar colonias permanentes en el estómago e intestino, siendo la ureolisis el factor principal causante de patologías relacionadas con infecciones por *H. pylori*. Los depósitos de ureasa fuera de la célula bacteriana pueden constituir hasta el 20% de la proteína bacteriana. La encima protege a la bacteria contra el entorno ácido y previene la destrucción letal de las membranas protectoras de la bacteria. Adicionalmente, durante las infecciones por *H. pylori* se liberan iones de amonio debido a la descomposición de la urea por la ureasa. Estos iones tienen efectos citotóxicos sobre las células epiteliales del estómago. En presencia de leucocitos y urea, la ureasa bacteriana genera monocloramina que puede provocar mutaciones del DNA, uno de los factores cancerígenos de las infecciones crónicas por *H. pylori*.

Se han descubierto nuevas especies de bacterias ureolíticas espirales tanto en humanos como en animales. Hasta ahora no se ha conseguido aclarar cómo otras especies de *Helicobacter* presentes en humanos pueden estar conectadas con enfermedades estomacales (por ejemplo *H. heilmannii*), intestinales (por ejemplo *H. cinaed*, *H. canadensis*), hepáticas (por ejemplo *H. hepaticus*, *H. bilis*) o infecciones sistémicas (por ejemplo *H. pullorum*, *Helicobacter* spp. *flexispira* taxon 8 "*F. rappini*").

Recientemente se ha descubierto que el tracto gastrointestinal (intestinos, estómago, hígado y páncreas) de animales de laboratorio puede ser colonizado naturalmente por bacterias del género *Helicobacter*: *H. bilis*, *H. ganmani*, *H. hepaticus*, *H. muridarum*, *H. mastomyrinus*, *H. rappini*, *H. rodentium*, *H. typhlonius*. Los animales – tanto domésticos como salvajes, colonizados permanentemente por estos microorganismos, no presentan síntomas de infecciones y tampoco procesos inflamatorios en sus órganos internos, algo que se constató en autopsias. Los microorganismos susceptibles a condiciones ambientales se mantienen en el entorno debido a la transmisión directa entre individuos, a través de la saliva y heces.

Se ha descubierto que, en humanos, la infección por *H. pylori* está presente en el 50% de la población y parece estar relacionada con el estatus económico y edad de la sociedad. Los niveles aumentan en adultos, incluyendo a poblaciones enteras en países pobres. La bacteria *H. pylori* se encuentra en 90-100% de casos de gastritis. A menudo, la infección crónica se transforma en inflamación atrófica. El 10% de los infectados desarrolla patologías graves. La infección por *H. pylori* afecta tanto a niños como adultos. Frecuentemente, la infección con *H. pylori* se produce durante la infancia y la colonización de las membranas mucosas del estómago puede mantenerse durante toda la vida.

Es conocido que los factores tales como malnutrición, falta de vitaminas, tabaquismos favorecen la infección.

En el 10% de pacientes, la terapia aplicada no es eficaz debido a la resistencia existente o adquirida de la

bacteria con la medicina estándar. Algunos pacientes han sido reinfectedos con cepas resistentes a los medicamentos. Otro 10% de pacientes no toleran los medicamentos del grupo de inhibidores de la bomba de protones. En estos pacientes se aprecian efectos secundarios del tratamiento.

5 Debido a la sistemática disminución de eficacia del tratamiento y su complicación, las sociedades gastroenterológicas regionales en Europa, siguiendo las recomendaciones recogidas en el informe "Maastricht 2-2000", recomiendan aplicar métodos apropiados de diagnóstico para detectar *H. pylori* e iniciar el tratamiento solamente cuando se confirmen los síntomas de la enfermedad, tales como: gastritis, úlceras de estómago y duodeno, úlceras pépticas confirmadas en exploraciones, cirugía debida a úlcera péptica, cambios pre-cancerígenos (inflamación atrófica, metaplasia, displasia), resección del estómago debido al
10 cáncer, cáncer de estómago en la familia (hasta 2º nivel de consanguinidad), pólipos adenomatosos hiperplásicos del colon (después de eliminación), linfoma MALT, tratamiento prolongado con AINE.

Se aprecia que la infección por *H. pylori* en humanos está acompañada con ciertas enfermedades, tales como úlceras pépticas, linfomas gástricos, gastritis atrófica crónica con metaplasia intestinal y cáncer de estómago.

15 La primera fase de infección por *H. pylori* en humanos produce la inflamación de la membrana del estómago y duodeno. En esta fase la infección puede ser erradicada por completo con medidas farmacológicas. El tratamiento de la infección por *H. pylori* sigue basada en el suministro de sustancias que reducen la secreción del jugo gástrico y aumentan el pH del estómago. Estas sustancias incluyen los inhibidores de la bomba de protones y ciertos antibióticos que eliminan la bacteria – claritromicina, amoxicilina y compuestos químicos –
20 mitronidazol (del grupo de derivado de nitrimidazol).

En Europa, la lista de recomendaciones recogidas en el informe "Maastricht 2-2000" publicado en el año 2002 no incluye ninguna terapia para *H. pylori* que no contenga medida antibacterianas tales como antibióticos y en cuanto a compuestos quimioterapéuticos – sustancias diferentes a derivados de nitroimidazol. Esta terapia es compleja, costosa, a veces malamente tolerada y no siempre efectiva. Según recomendaciones de las
25 Asociaciones Gastroenterológicas Regionales en Europa, el tratamiento puede estar basado en antibióticos y derivado quimioterapéuticos (claritromicina (2x500) y amoxicilina (2x1 g) o metronidazol (2x500 mg) e inhibidores de la bomba de protones.

Por ejemplo:

Primera terapia. Ciclo de tratamiento de siete días:

- 30
1. Medicamento para reducir la secreción de jugo gástrico, doble dosis del compuesto perteneciente al grupo de inhibidores de la bomba de protones (PPI) – por ejemplo omeprazol 2 x día, 20 mg.
 2. Antibiótico I – por ejemplo amoxicilina, 2 x día 1g.
 3. Antibiótico II – por ejemplo claritromicina, 2 x día 0,5g.

Segunda terapia.

- 35
1. Medicamento para reducir la secreción de jugo gástrico, doble dosis del compuesto perteneciente al grupo de inhibidores de bomba de protones (PPI) – por ejemplo lansoprazol 2 x día, 30 mg.
 2. Antibiótico I – por ejemplo mantener amoxicilina, 2 x día 1g.
 3. Antibiótico II – otro antibiótico o compuesto químico – por ejemplo metronidazol 2 x día 0,5 g.
 4. Compuesto de bismuto (citrato)

40 Debido a la expansión epidémica de *H. pylori* en diferentes partes del mundo, existe una gran y permanente demanda de productos que reducen las patologías relacionadas con la infección, existe también una fuerte presión sobre la comunidad médica para identificar tales productos.

45 El objetivo principal del invento es suministrar un nuevo producto para el tratamiento y profiláctica de enfermedades causadas por bacterias ureolíticas, que puede ser utilizado especialmente en la regulación de la flora intestinal ureolítica, para regular la flora ureolítica de la cavidad bucal, para imposibilitar el paso de bacterias patógenas ureolíticas a través del estómago durante procesos digestivos, para prevenir la formación de depósitos y cálculos infecciosos en el sistema urinario – tanto en humanos como animales, especialmente perros y gatos y otros animales domésticos.

50 El objetivo del invento es proporcionar un nuevo agente de control del crecimiento indeseado de bacterias ureolíticas en humanos y animales.

El objetivo específico del invento es proporcionar un nuevo producto para el tratamiento y profiláctica de

enfermedades causadas por *H. pylori*.

Otro objetivo del invento es proporcionar un nuevo producto para inhibir el crecimiento de bacterias ureolíticas, particularmente *Ureoplasma* y otros micoplasmas causantes de enfermedades en peces, a ser utilizado en la profiláctica de inflamaciones de branquias causadas por bacterias ureolíticas en carpas y crías de carpas y otros peces de agua dulce y salada.

Otro objetivo del invento es proporcionar un nuevo producto para prevenir la formación de biocapas y mineralización de depósitos en catéteres y otros instrumentos médicos.

Es también objetivo de este invento, el proporcionar un nuevo producto para reducir la formación de sarro y frenar el desarrollo de caries.

Además, el objetivo de este invento es proporcionar un nuevo suplemento dietético, alimentos especialmente medicados, aditivos en alimentos y piensos para prevenir y/o evitar la colonización por parte de bacterias ureolíticas de vertebrado incluyendo humanos, mamíferos, aves, anfibios y peces. Particularmente, para prevenir la colonización de *H. pylori* en humanos y animales domésticos.

Estos objetivos fueron alcanzados utilizando soluciones que concuerdan con el invento y que fueron presentadas en la reivindicación de patente adjunta a este documento.

La obtención de los objetivos mencionados anteriormente fue posible gracias al invento, utilizando el alfa-cetoglutarato como sustancia activa en dosis efectivas terapéutica- o profilácticamente para producir una solución terapéutica o profiláctica o bien para obtener un suplemento dietético, alimento especialmente medicado o aditivo de alimento/pienso, también para obtener productos de higiene personal de uso diario.

El efecto terapéutico o profiláctico efectivo se obtiene con dosis que oscila entre 0,001 hasta 0,2 g/kg de masa corporal/día cuando es suministrado por vía oral o intragástrica.

Hasta ahora, las sales del ácido alfa-cetoglutarico nunca habían sido utilizados en humanos o animales para el tratamiento de infecciones bacterianas, incluyendo infecciones por *H. pylori*.

La ventaja de este invento es la disponibilidad de alfa-cetoglutarato, sus conocidas actividades en organismos y el hecho de que esta sustancia está aprobada para uso en otras aplicaciones médicas o profilácticas.

El invento se explica detalladamente en la descripción adjunta junto con diagramas.

El diagrama mostrado en Fig. 1 muestra el esquema del modelo de infección de ratones con *H. pylori*, utilizado para el estudio de la relación entre el nivel de infestación de la mucosa estomacal por *H. pylori* (n=28) y los ratones tratados con sales de ácido alfa-cetoglutarico suministrado intragástricamente.

La Fig. 2 muestra el esquema del modelo de infección de ratones con *H. pylori*, utilizado para el estudio de la relación entre el nivel de infestación de la mucosa estomacal por *H. pylori* (n=48) y los ratones tratados con sales de ácido alfa-cetoglutarico suministrado intragástricamente.

La Fig. 3 muestra la movilidad de productos PCR relacionados con el fragmento 16S rDNA de bacterias del género *Helicobacter* en campo eléctrico, ensayado con técnica DGGE.

Los términos utilizados en la descripción y en la adjunta reivindicación de patente tienen el siguiente significado:

El término "alfa-cetoglutarato" utilizado en este documento (a veces como AKG) se refiere al compuesto que libera el anión activo de ácido conocido como 2 – oxopentanedioico, 2 – oxoglutarico, alfa-oxoglutarico, alfa-oxopentanedioico, 2 – cetoglutarico, 2 – oxo -1, 5 – pentanedioico, 2 – oxopentanedioico o 2 – oxo-glutarico. Ejemplos de tales compuestos son sales, aditivos de sales, ésteres, amidas, imidas del ácido alfa-cetoglutarico y otros profármacos. El alfa-cetoglutarato tiene efectos inhibidores de la colonización y previenen la colonización de mucosas por bacterias ureolíticas en vertebrados, incluyendo humanos, mamíferos, aves, anfibios y peces.

La expresión "preparado médico" se utiliza para referirse a un compuesto que contiene cantidades terapéuticamente eficaces del alfa-cetoglutarato para ser usado en nuevas indicaciones medicamente y profilácticamente abarcadas por este invento.

La expresión "terapéuticamente eficaz" indica una cantidad específica del derivado, particularmente de sal del ácido alfa-cetoglutarico, que en las condiciones *in vivo* descritas en este documento tiene un efecto terapéutico, por ejemplo reduce e inhibe la colonización de membranas mucosas por bacterias ureolíticas en vertebrados, incluyendo humanos, mamíferos, aves, anfibios y peces. La efectividad terapéutica o profiláctica se logra suministrando el producto médico mencionado, en forma sólida o líquida, con o sin medio portador, diluido, en forma de aditivo, o bien en forma de componente de un compuesto farmacéutico, en el organismo

vertebrado, incluyendo humanos, mamíferos, aves, anfibios y peces. El producto es suministrado en cantidades suficientes para reducir y prevenir las infecciones por bacterias ureolíticas. Alternativamente, la cantidad terapéuticamente eficaz del producto médico cura las infecciones causadas por bacterias ureolíticas.

5 Dependiendo de los efectos deseados, la cantidad del producto puede variar según las necesidades específicas de actuación sobre la bacteria ureolítica en el lugar determinado. La dosis del producto puede abarcar la cantidad definida de sustancia calculada con el fin de obtener el resultado terapéutico deseado. La dosis es suministrada dependiendo del cálculo de sustancia activa pura, teniendo en cuenta la estructura química y la presencia de sustancias adicionales tales como sustancia portante, diluyente, adyuvantes y otros aditivos aceptables farmacéuticamente. Los efectos terapéuticos deseados y en consecuencia la dosis recomendada pueden ser determinados por métodos conocidos al trabajador farmacéutico o veterinario, principalmente basados en parámetros tales como la edad, peso, sexo del paciente, otras infecciones y enfermedades acompañantes, siguiendo todos los preceptos de la buena práctica médica.

10 La expresión “suministro del producto médico” se refiere a la respuesta profiláctica o terapéutica frente a las enfermedades mencionadas, a través de las vías adecuadas de suministro, teniendo en cuenta el lugar, tipo e intensidad de infección, así como la vía de entrada de las bacterias ureolíticas indeseadas en el organismo.

15 La expresión “limitación de colonización” se refiere a la reducción del alcance y/o intensidad de la infección de membranas mucosas u otros tejidos, causadas por bacterias ureolíticas, o la completa erradicación del facto infeccioso – llevando a la reducción y/o prevención del posterior desarrollo de infección en el organismo de vertebrados, incluyendo humanos, mamíferos, aves, anfibios y peces.

20 La expresión “prevención de colonización” se refiere a la prevención del desarrollo de bacterias ureolíticas nocivas, cuando la bacteria entra en contacto con la membrana mucosa de un vertebrado. En el caso de una prevención de colonización eficaz, la infección no tiene lugar o las membranas mucosas de vertebrados - incluyendo humanos, mamíferos, aves, anfibios y peces, son infectadas con notable retraso en comparación con un escenario sin prevención.

25 La expresión “suplemento dietético” se refiere a una fuente concentrada de nutrientes u otras sustancias con efecto nutritivo o fisiológico, cuyo uso contribuye a suplir las deficiencias de la dieta diaria con ciertos componentes beneficiosos. Los suplementos dietéticos se suministran como productos de fácil uso, tales como comprimidos, cápsulas o líquidos monodosis.

30 La expresión “producto alimenticio medicado” se refiere a productos alimenticios con forma y envase típico para el producto, que contiene la sustancia adicional con específico valor terapéutico o profiláctico.

La expresión “aditivo para alimentos/piensos” se refiere a un producto que contiene la sustancia activa, pura o en compuesto, en forma sólida o líquida, con o sin portantes, tampones, detergentes, solubilizadores, antioxidantes, conservantes y otras sustancias añadidas que concuerden con el perfil de la sustancia activa, aprobados para uso en alimentos.

35 Descripción detallada de la invención

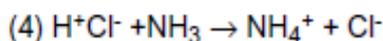
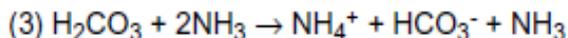
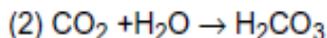
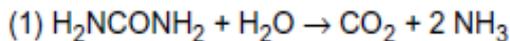
El invento se refiere al uso del alfa-cetoglutarato en forma de compuesto simple o mezcla de varios compuestos, para la producción de productos médicos utilizados en la profiláctica y/o tratamiento de enfermedades causadas por bacterias ureolíticas patógenas en vertebrados, incluyendo humanos, mamíferos, aves, anfibios y peces.

40 Los efectos terapéuticos y profilácticos del suministro de productos fabricados según este invento se alcanzan cuando la cantidad de alfa-cetoglutarato suministrado varía desde 0, 001 g hasta 0, 2 g por 1 kilogramo de masa corporal por día.

Este invento está basado en la observación de que la bacteria *Helicobacter pylori* puede sobrevivir en un entorno altamente ácido presente en los estómagos de los seres vivos superiores.

45 La capacidad generalmente conocida de *H. pylori* es su habilidad para sobrevivir en entornos de bajo pH gracias a la actividad de la ureasa que hidroliza la urea presente en la membrana mucosa del estómago y en el jugo gástrico (Saidijam M, Psakis G, Clough JL, Meuller J, Suzuki S, Hoyle CJ, Palmer SL, Morrison SM, Pos MK, Essenberg RC, Maiden MC, Abu-bakr A, Baumberg SG, Neyfakh AA, Griffith JK, Sachs G, Scott D, Weeks D, Melchers K. “Gastric habitation by *Helicobacter pylori*: insights into acid adaptation”. *Trends Pharmacol Sci.* 2000; **21**:413-416, Sachs G, Weeks DL, Melchers K, Scott DR. “The gastric biology of *Helicobacter pylori*”. *Annu Rev Physiol.* 2003; **65**:349-369, Sidebotham RL, Worku ML, Karim QN, Dhir NK, Baron JH. « How *Helicobacter pylori* urease may affect external pH and influence growth and motility in the mucus environment: evidence from in-vitro studies”. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003; **15**:395-401.).

El esquema de reacciones individuales es el siguiente:



El resultado del proceso de descomposición de la urea es la formación de amonio que reacciona inmediatamente con el ácido clorhídrico de tal forma, que el pH del microentorno de tejido (membrana mucosa del estómago) se incrementa localmente. Como ya es sabido, en circunstancias normales, la membrana mucosa del estómago es ácida, debido a la producción del HCl en células parietales.

A pesar que de la bacteria *H. pylori* es un organismo sensible, difícil de criar *in vitro*, el bajo nivel del pH del estómago, letal para otras bacterias, paradójicamente resulta ideal para la colonización por *H. pylori*. Esto se debe principalmente a la presencia de urea endógena, descompuesta por la ureasa bacteriana (una enzima producida por *H. pylori*) para formar amonio que incrementa a su vez el pH del microentorno de la bacteria. En consecuencia, la influencia letal del entorno ácido sobre *H. pylori* queda eliminada. Se cree incluso (Nakazawa T. "Growth cycle of Helicobacter pylori in gastric mucous layer". *Keio J Med.* 2002; **51**, S2:15-19.) que el ciclo de crecimiento de *H. pylori* en la capa mucosa gástrica estimula las propiedades ureolíticas de los microorganismos. Se ha demostrado que a nivel celular el mRNA de la ureasa se estabiliza y desestabiliza dependiendo del pH de entorno. Se asume que la bacteria utiliza nutrientes de células degradadas para crecer y colonizar zonas donde el pH ya ha sido modificado. La activación de ureasa viene acompañada por la apertura del canal Urel dependiente del pH en la célula bacteriana, algo que facilita la hidrólisis de la urea (Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, Sachs G. "A H⁺-gated urea channel: the link between Helicobacter pylori urease and gastric colonization". *Science.* 2000; **287**:482-485, Weeks DL, Sachs G. "Sites of pH regulation of the urea channel of Helicobacter pylori". *Mol Microbiol.* 2001; **40**:1249-1259.). Se ha apreciado también que *H. pylori* tiene la habilidad de desplazarse hacia mayores concentraciones de urea y esta quimiotaxis acelera el proceso de hidrólisis de urea. Este hecho explica la segunda ronda del ciclo de crecimiento y la subsiguiente estabilización de la infección en el estómago (Scott DR, Marcus EA, Weeks DL, Sachs G. "Mechanisms of acid resistance due to the urease system of Helicobacter pylori". *Gastroenterology.* 2002; **123**:187-195, Scott DR, Marcus EA, Weeks DL, Lee A, Melchers K, Sachs G. "Expression of the Helicobacter pylori urel gene is required for acidic pH activation of cytoplasmic urease". *Infect Immun.* 2000; **68**:470-477, Volland P, Weeks DL, Marcus EA, Prinz C, Sachs G, Scott D. "Interactions among the seven Helicobacter pylori proteins encoded by the urease gene cluster". *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003; **284**: 96-106.).

Por otro lado, es conocido que durante el curso de la degradación de aminoácidos, como resultado de la desaminación oxidativa, los grupos α-aminos son transferidos a ácidos α-ceto, acompañado por la liberación de iones amonio. Los iones amonio producidos por la descomposición del aminoácido participan parcialmente en la biosíntesis de compuestos de nitrógeno, mientras que los restantes son eliminados fuera del organismo después de su transformación en urea. Uno de los átomos de nitrógeno presentes en la urea proviene directamente de un ion amonio.

En condiciones naturales, la urea puede difundirse libremente desde el lugar donde se genera, por ejemplo los hepatocitos, por todo el sistema digestivo, esto se debe a la baja masa molecular del compuesto (Mr 60). Debido a la fuerte toxicidad del ion amonio, el organismo se protege utilizando este ion en la síntesis de componentes de baja toxicidad, tal como la urea (organismos ureolíticos – mamíferos). Los organismos ureolíticos no pueden almacenar nitrógeno: algo que se refiere a proteínas, aminoácidos y amonio.

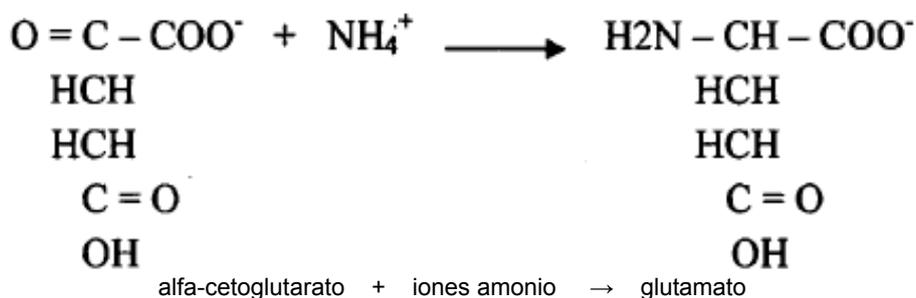
En un organismo, el amonio libre se genera en cantidades insignificantes a pesar de la continua deaminación de aminoácidos. Parte de este amonio queda inmediatamente vinculado al glutamato y asparaginato. Otra parte del amonio queda eliminada a través de los riñones en forma de iones amonio. La mayoría del amonio tóxico queda convertida en urea, algo que ocurre en el hígado en el ciclo de la ornitina.

Recientemente y de forma inesperada, se ha descubierto que suministrando alfa-cetoglutarato al estómago, la población de *Helicobacter pylori* disminuye. En las condiciones de un experimento *in vitro*, el nivel de iones amonio es relativamente bajo y su eliminación mediante alfa-cetoglutarato (unión inmediata con glutamato y asparaginato), a pesar del mejor transporte de aniones hacia la capa de células de la mucosa gástrica (a través del transportador DC), lleva a la muerte de la bacteria ureolítica. La producción de iones amonio a partir de urea, necesaria para la supervivencia de *H. pylori* en el estómago, no cubre las necesidades de la bacteria, porque el ion amonio es utilizado inmediatamente, en un entorno con alfa-cetoglutarato, en la síntesis de glutamato u otros compuestos de aminoácido.

Aún no está claro el porqué de la excesiva producción, en relación al sustrato, de ureasa por parte de *H. pylori*. La ureasa bacteriana es una enzima dependiente del níquel con un catión bivalente de níquel incorporado de forma posttransaccional. Se asume, que para mantener una cantidad apropiada de enzima activa, *H. pylori* acumula esta enzima para salvaguardar la actividad ureolítica de nuevas células que crecen en condiciones de escasez de níquel. Debido a la intensiva absorción de sales del ácido alfa-cetoglutarico en el estómago, *H. pylori* puede competir también por acceder a dichas sales, algo que causa una intensiva producción de ureasa bacteriana en la primera etapa de la infección.

Debido al crecimiento epidemiológico de infecciones por *H. pylori*, la búsqueda de productos que limiten los resultados patológicos de tales infecciones es tema de numerosas publicaciones. Véase: El-Omar EM. "Mechanisms of increased acid secretion after eradication of Helicobacter pylori infection". *Gut*. 2006; **55**:144-146., Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. "Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma". *Lancet*. 1991; **338**:1175-1176.

El alfa-cetoglutarato participa, junto con los iones amonio, en la síntesis de ciertos aminoácidos, tales como el ácido glutámico y la glutamina, en la siguiente reacción:



Fue precisamente esta habilidad del alfa-cetoglutarato para capturar iones amonio, la que inspiró las investigaciones para buscar nuevas aplicaciones médicas de esta sustancia bien conocida.

Se asume que la reacción mencionada anteriormente es la ruta competitiva para capturar iones amonio para sintetizar urea, que es fuente imprescindible de nitrógeno para *H. pylori* en el entorno gástrico, o también para otras bacterias ureolíticas, por ejemplo en el sistema urogenital.

Debido a la falta de publicaciones referentes a acciones nocivas del alfa-cetoglutarato en la membrana mucosa del estómago y del intestino delgado, en voluntarios sanos, se han realizado una serie de experimentos en animales de laboratorio sanos, para establecer la influencia del alfa-cetoglutarato sobre la colonización de *H. pylori* en estómago e intestino delgado en animales de laboratorio sanos.

Inesperadamente, los resultados confirmaron las presunciones mencionadas anteriormente, que se muestran a continuación:

1. No hubo cambios morfológicos en el grosor de la mucosa del estómago en ratones infectados con *H. pylori* y posterior inoculación con alfa-cetoglutarato, o en el grosor de mucosas del intestino delgado, en la longitud de las vellosidades intestinales o la profundidad de las criptas intestinales, en los animales sometidos a ensayo.

2. No hubo cambios en la cantidad de bacterias de ácido láctico aisladas de la mucosa estomacal obtenida (parte atrial) en los animales ensayados, incluyendo aquellas muestras tomadas de ratones infectados con *H. pylori* después de suministrar alfa-cetoglutarato.

3. Se observó una reducción del 17% ($p < 0,01$) en el número de células productoras de gastrina – hormona gástrica – en la zona pilórica de las glándulas estomacales, en animales infectados con *H. pylori* después de suministrar alfa-cetoglutarato, en comparación con el grupo de control (al que se le suministró tampón fosfato – PBS). En animales infectados con *H. pylori*, después de suministrar alfa-cetoglutarato, se observó una disminución de gastrina en sangre (de 21,8 pM – 24,7 pM hasta 12,8 pM – 15,6 pM) ($p < 0,05$) probablemente debido a la reducción del número de células productoras de gastrina en la mucosa estomacal. Este hecho indica una interacción inhibitoria indirecta (a través de histamina) entre alfa-cetoglutarato y la actividad de la bomba de protones. Su hiperactividad se aprecia en enfermedades de reflujo.

4. Se ha apreciado cierta tendencia a la disminución de cantidad de células productoras de colecistoquinina (CCK) en el intestino delgado de animales tratados con alfa-cetoglutarato. Hay una disminución del 30% de la cantidad de estas células (sin diferencias estadísticas, $p = 0,1$), con comparación con el mismo tramo de intestino en ratones no infectados, inoculados solamente con PBS.

No se han apreciado importantes diferencias en la cantidad de células productoras de CCK en el intestino delgado de ratones infectados con *H. pylori* e inoculados con alfa-cetogluturato, en comparación con ratones solamente inoculados con alfa-cetogluturato ($p=0,25$). Un bajo nivel de CCK en sangre (de 3,1 pM – 4,0 pM hasta 1,9 pM – 2,5 pM) ($p < 0,05$) en animales infectados con *H. pylori* e inoculados con alfa-cetogluturato, puede estar relacionado con la disminución de células productoras de CCK dentro del intestino delgado. Así, el bajo nivel de CCK puede estimular la frecuencia del vaciamiento de estómago que es un factor constatado médicamente para evitar la futura colonización por *H. pylori* y el desarrollo de la infección.

Efecto bactericida del alfa-cetogluturato sobre los bastones de *H. pylori*

Recientemente y de forma inesperada, se ha descubierto que las sales del ácido alfa-cetoglutárico detienen el proceso de colonización por *H. pylori* del tracto gastrointestinal en mamíferos. Los estudios propios realizados muestran, que la cantidad media de colonias aisladas de mucosa en la parte pilórica del estómago en ratones infectados con *H. pylori* – en el decimotercer día después de suministrar la primera dosis de suspensión de células de esta bacteria ascendía a $7,8 \times 10^2 \pm 5,0 \times 10^1$. En el grupo de animales de laboratorio que después de 14 días desde la infección recibieron un dosis intragástrica de sales del ácido alfa-cetoglutárico durante 9 días consecutivos, la cantidad media de colonias aisladas ascendía a tan solo $3,8 \times 10^2 \pm 5,0 \times 10^1$. El suministro intragástrico de nueve dosis de alfa-cetogluturato durante nueve días consecutivos, que empezaron a los 14 días desde la última dosis infecciosa de *H. pylori*, tuvo como resultado una reducción de 49% de colonias bacterianas en la mucosa gástrica. El resultado demuestra que las sales de ácido alfa-cetoglutárico frenan la colonización del estómago por parte de *H. pylori*.

Durante otro experimento se constató que la cantidad de colonias medias aisladas de la mucosa de la parte pilórica del estómago de ratones infectados solamente con *H. pylori*, a los veintiuno días desde la primer suministro de la suspensión con células bacterias, alcanzaba $4,3 \times 10^2 \pm 5,0 \times 10^1$. En el grupo de animales de laboratorio que recibieron alfa-cetogluturato de forma intragástrica durante 3 días consecutivos, 8 días después de la infección, no se hallaron colonias de *H. pylori*. Tres suministros intragástrico de alfa-cetogluturato continuados durante 3 días consecutivos, a los 8 días desde la última dosis infectada de *H. pylori*, pararon completamente la colonización y erradicaron por completo *H. pylori* de la mucosa gástrica en ratones.

Durante la observación, ha sido modificada la microflora gástrica y en ratones infectado con *H. pylori* se encontró también el ADN de *H. billis*; en ratones adicionalmente inoculados con alfa-cetogluturato se halló solamente ADN de *H. rodentium*, *H. billis*, *H. hepaticus*; en el grupo de control de ratones, a los que se suministró sales del ácido alfa-cetoglutárico, se identificó el ADN de *H. hepaticus* y *H. rodentium*. En ratones tratados con PBS no se encontró ADN de bacterias *Helicobacter*.

Los resultados fueron obtenidos por medio de métodos diagnósticos rutinarios apoyados en técnicas clásicas, que suponen el cultivo de microorganismos vivos para confirmar la presencia de bacterias en tejido (cumplimiento de postulados de Koch). Adicionalmente, los estudios se basaron en métodos de detección de ADN para *H. pylori* y otras bacterias no patógenas del grupo *Helicobacter*. La PCR seguido de la separación por electroforesis de productos PCR mediante la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) y la secuenciación de productos para examinar la composición de ADN es un método para detectar cambios que fueron descritos en este documento. En la práctica, durante la secuenciación no se encontró ADN de *H. pylori* (nivel de sensibilidad: tinción con bromuro de etidio) en ratones tratados con alfa-cetogluturato.

El alfa-cetogluturato resulta ser una sustancia activa ideal para un gran y variado grupo de paciente que requieran profiláctica y tratamiento contra *H. pylori* así como infecciones del sistema urogenital causadas por bacterias ureolíticas.

El mecanismo de la acción bactericida del alfa-cetogluturato contra bacterias ureolíticas – muy diferente a los mecanismos conocidos hasta ahora, permite una segura erradicación de estos microorganismos sin miedo a inducir y aumentar la resistencia a fármacos de bacterias ureolíticas. En la práctica, resultará en la reducción de reinfecciones, superinfecciones y dificultades en el tratamiento con antibióticos.

Tal y como se estableció hasta ahora, el alfa-cetogluturato permite, o bien es una alternativa, al tratamiento antibiótico estándar. También, en casos de caquexia, permite mantener el equilibrio natural de la microflora ureolítica.

En concordancia con el invento, se utiliza el alfa-cetogluturato y/o los precursores adecuados que liberan en condiciones *in vivo* los aniones del ácido alfa-cetoglutárico a utilizar en medios médicos para la profiláctica y/o el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias ureolíticas.

Los productos obtenidos en concordancia con este invento son muy útiles especialmente para prevenir y/o detener la colonización por *Helicobacter pylori*.

Como alfa-cetogluturato se pueden utilizar las sales mono y disustituídas del ácido alfa-cetoglutárico, sales de

metales alcalinos y/o sales de metales alcalinotérreos y/o chitosán. Las sales preferidas son las sales de sodio y/o sales de calcio.

5 El alfa-cetoglutarato, en concordancia con este invento, puede ser utilizado en humanos y animales como producto médico, suplemento dietético, productos alimenticio especial medicado y/o aditivo para alimentos y/o piensos, dependiendo de las condiciones, para detener la colonización por *H. pylori* en humanos y animales, para prevenir la infección por *H. pylori* y en consecuencia, para aliviar las infecciones por *H. pylori* y sus consecuencias.

10 El alfa-cetoglutarato puede ser suministrado junto con portantes conocidos y aditivos aprobados para uso farmacéutico y compatibles con los precursores de alfa-cetoglutarato escogidos. Los aditivos apropiados incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas, dextrosa, glicerol, etanol u otras sustancias similares o sus combinaciones. Más aún, si resulta deseable, el producto puede contener sustancias adicionales tales como agentes hidratantes, emulgentes, reguladores de pH, tampones y otros.

En concordancia con el invento, los productos que contienen alfa-cetoglutarato pueden ser sólidos y/o líquidos, dependiendo de la vía de suministro.

15 El invento se refiere también al uso de alfa-cetoglutarato para la fabricación de productos para el tratamiento o la profiláctica de infecciones causadas por otras bacterias ureolíticas. Ejemplos de futuras aplicaciones médicas del alfa-cetoglutarato incluyen su uso para la producción de productos inhibidores de paso de bacterias ureolíticas patógenas a través del estómago, productos para prevenir la formación de depósitos y cálculos infecciosos en el sistema urinario, productos para reducir la formación de biocapas y la mineralización de depósitos en catéteres y otros equipos médicos, y también para productos inhibidores del crecimiento de bacterias ureolíticas patógenas en el sistema urogenital, que se pueden utilizar en forma de infusiones uretrales, comprimidos, líquidos de irrigación, cápsulas intravaginales.

25 En concordancia con este invento, el alfa-cetoglutarato puede ser también utilizado en perros, gatos y animales domésticos, en forma de infusiones para vejiga durante infecciones bacterianas causadas por bacterias ureolíticas.

Otro ejemplo del nuevo uso de alfa-cetoglutarato es la producción de productos para regular la flora ureolítica en la cavidad bucal, reduciendo la formación de sarro e impidiendo el desarrollo de caries. Este producto puede también tener la forma de chicle o pasta de dientes.

30 El alfa-cetoglutarato puede tener otras aplicaciones en concordancia con el invento, para la producción de productos inhibidores del crecimiento de bacterias ureolíticas, especialmente de *Ureoplasmas* y otros micoplasmas causantes de infecciones en peces. En este aspecto, el nuevo uso del alfa-cetoglutarato puede ser aprovechado en productos para la profiláctica de inflamaciones de branquias causadas por bacterias ureolíticas en carpas y crías de carpas y otros peces de agua dulce y salada.

35 Este invento abarca también el uso del alfa-cetoglutarato como suplemento dietético, para alimentos especialmente medicados, aditivos en alimentos y piensos para prevenir y/o evitar la colonización por parte de bacterias ureolíticas de vertebrados incluyendo humanos, mamíferos, aves, anfibios y peces.

Los ejemplos mostrados a continuación proporcionan una mejor explicación de este invento.

Ejemplo 1

40 Animales para experimentos de laboratorio con edad de 6 semanas, raza BALB/cA (hembras) ratones, con peso 25 ± 2 g (fig. 1). A catorce ratones se les suministró por sonda (diámetro externo de 1,3 mm) 3 veces con un día de intervalo, 0,2 ml de una suspensión con *H. pylori*, cepa 119/95 con concentración de 10^9 cfu/ml. Dos semanas después del último suministro, siete ratones fueron inoculados intragástricamente, durante nueve días sucesivos, con una solución de sal de calcio o sodio del ácido alfa-cetoglutarico (0,2 ml con concentración 30 mM) (grupo I A). Los siete ratones restantes fueron tratados de la misma forma con 0,01 M de tampón fosfato – PBS (grupo I B).

50 Otros catorce ratones del grupo II A y II B fueron tratados con 0,2 ml de PBS según el esquema operativo para infecciones de animales con *H. pylori*. Dos semanas después, este mismo tratamiento fue suministrado a siete ratones inoculados continuamente con PBS (0,2 ml) durante tres días consecutivos. Los siete ratones restantes fueron tratados con una solución de sales del ácido alfa-cetoglutarico (0,2 ml, con concentración 30 mM) (grupo II A).

55 En el día 30 del experimento, todos los ratones fueron sacrificados utilizando CO₂. Se tomaron muestras de sangre y estómago, para análisis posteriores, de ratones infectados con *H. pylori* con y sin inoculaciones con sales del ácido alfa-cetoglutarico. El esquema del modelo experimental de infección de ratones con la bacteria *H. pylori* ha sido presentado en la Fig. 1. En este experimento se ha estudiado, siguiendo el régimen temporal indicado anteriormente, la relación entre el nivel de colonización de la mucosa estomacal de ratones

(n=28) por *H. pylori* y los ratones tratados intragástricamente con sales del ácido alfa-cetoglutárico.

En la Fig. 1 se utilizan las siguientes abreviaturas. Los ratones de grupos experimentales (n=28) fueron inoculados intragástricamente con los siguientes productos: suspensión de células de *H. pylori*: #; solución de sales del ácido alfa-cetoglutárico: ♦; solución PBS: ●. El nombre de la cepa, la concentración y volumen de inoculaciones (*H. pylori*) y la concentración y dosis de: sales del ácido alfa-cetoglutárico y PBS, corresponden a la información mencionada. Las figuras en negrita acompañadas de la letra S indican los días de autopsia. Las autopsias fueron realizadas en concordancia con estándares aplicables.

Las muestras de sangre de los animales ensayados fueron colocadas sobre placas de agar GAB-CAMP e incubadas a una temperatura de 37°C, bajo condiciones microaerofílicas durante 7-10 días. A partir de la mitad del antrum, se han tomado muestras de la mucosa gástrica que fue mezclada con 500 µl de PBS esterilizado. Después de pesar los homogeneizados se ha apreciado que la mucosa tomada pesaba entre 40 µg y 50 µg. Para calcular la cantidad de células de *H. pylori*, se colocaron 100 µl de mucosa gástrica homogeneizada en placas de agar GAB-CAMP. Seguidamente se incubó a temp. 37°C durante 5-10 días, en condiciones microaerofílicas. Las muestras homogeneizadas de la mucosa tomadas de un ratón se analizaron por triplicado. Los resultados se presentan como valor principal ± DE. La presencia de *H. pylori* fue identificada por la morfología de la colonia, pruebas de ureasa, oxidasa y catalasa y también por el examen morfológico de células por tinción gram.

No se aisló *H. pylori* procedente de tejido de animales inoculados intragástricamente con PBS y con sales del ácido alfa-cetoglutárico (Grupo II A en Fig. 1) o con PBS (Grupo II B en Fig. 1).

A partir de las muestras de estómago de animales inoculados con *H. pylori* y seguidamente con sales del ácido alfa-cetoglutárico (Grupo I A en Fig. 1) o PBS (Grupo I B en Fig. 1) se han aislado bacterias entre el 5 y 10 día de incubación. El número de colonias (principal ± DE) aisladas en parte antral de la mucosa gástrica tomada de ratones infectados exclusivamente con *H. pylori*, era de $7,8 \times 10^2 \pm 5,0 \times 10^1$, mientras que después del tratamiento intragástrico de ratones con sales del ácido alfa-cetoglutárico, según protocolo presente – el número de colonias (principal ± DE) aisladas era de $3,8 \times 10^2 \pm 5,0 \times 10^1$ (fig. 3). Nueve veces, durante 9 días consecutivos, se suministró sales del ácido alfa-cetoglutárico, el tratamiento empezó 14 días desde la última dosis infecciosa de *H. pylori* a ratones, causando una reducción del 49% en el grado de colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori*. El resultado demuestra que las sales de ácido alfa-cetoglutárico frenan la colonización del estómago por parte de *H. pylori*.

A partir de las muestras de sangre tomadas de ratones no se ha podido aislar bacterias de *H. pylori*.

Los resultados obtenidos se muestran la Tabla 1.

Tabla 1. Bacteria *H. pylori* aislada de homogeneizados de mucosa estomacal de ratones no infectados e infectados con *H. pylori*, con o sin inoculaciones de sales del ácido alfa-cetoglutárico.

Inoculaciones *	<i>H. pylori</i> cultivada **	
	Cantidad de ratones del grupo inoculados	Número de bacterias (cfu)/ratón
<i>H. pylori</i> + PBS (Grupo I B)	7/7	$7,8 \times 10^2 \pm 5,0 \times 10^1$
PBS (Grupo II B)	0/7	0
<i>H. pylori</i> + AKG (Grupo I A)	7/7	$3,8 \times 10^2 \pm 5,0 \times 10^1$
PBS + AKG (Grupo II A)	0/7	0

*/ según esquema de fig. 1. **/ bacterias cultivadas en placas sólidas GAB-CAMP. Animales infectados exclusivamente con *H. pylori* (*H. pylori* + PBS), infectados con *H. pylori* con inoculaciones seguidas de sales del ácido alfa-cetoglutárico (*H. pylori* + AKG) y grupos de control de animales no infectados, inoculados solamente con PBS o con PBS y sales del ácido alfa-cetoglutárico (PBS + AKG).

Ejemplo 2

Animales para experimentos de laboratorio con edad de 6 semanas, raza BALB/cA (hembras) ratones, con peso 25 ± 2 g (fig. 1). A veinte ratones del grupo III B y III se les suministró por sonda, 3 veces con un día de intervalo, 0,2 ml de una suspensión con *H. pylori*, cepa 119/95 con concentración de 10^9 cfu/ml. Ocho días después del último suministro, dieciséis ratones fueron inoculados intragástricamente, a través de sonda, durante tres días sucesivos, con una solución de sal de calcio o sodio del ácido alfa-cetoglutárico, 0,2 ml con concentración 30 mM (grupo III B). Los ocho ratones restantes fueron tratados de la misma forma con 0,01 M

de PBS (grupo III).

Los veinticuatro ratones restantes (Fig. 2) fueron inoculados intragástricamente, 3 veces con un día de intervalo, con 0,2 ml de PBS 0,01 M. Ocho días después de este tratamiento, dieciséis ratones fueron inoculados, a través de la sonda, durante tres días consecutivos, con sales del ácido alfa-cetoglutarico (0,2 ml con concentración 30 mM) (Grupo IV B). Los ocho ratones restantes fueron tratados con 0,2 ml de PBS 0,01 M (grupo IV).

En el día 20 del experimento, todos los ratones fueron sacrificados con CO2. Se tomaron muestras de sangre y estómagos, para análisis posteriores.

En la Fig. 2 se utilizan las siguientes abreviaturas. Los ratones de grupos experimentales (n=76) fueron inoculados intragástricamente con los siguientes productos: suspensión de células de *H. pylori*: #; solución de sales del ácido alfa-cetoglutarico: ♦; solución PBS: ●. El nombre de la cepa, la concentración y el volumen de inoculaciones (*H. pylori*) y la concentración y la dosis de: sales del ácido alfa-cetoglutarico y PBS, corresponden a la información mencionada. Las figuras en negrita acompañadas de la letra S indican los días de autopsia. Las autopsias fueron realizadas en concordancia con los estándares aplicables.

A partir de muestras recogidas, tal y como se explica en el ejemplo 1, se han cultivado bacterias de *H. pylori* en placas de agar GAB-CAMP. También se aisló el ADN para realizar el PCR con cebadores (5'-CTATGACGGGTATCCGGC-3', N16S1R: 5'-CT-CACGACACGAGCTGAC-3') reconociendo el fragmento 16S rDNA en el ADN de la bacteria, a partir del género *Helicobacter*. Los productos resultantes del PCR con tamaño 470 bp fueron separados mediante la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) y posteriormente se secuenciaron. El análisis DGGE fue realizado en el gel de poliacrilamida del 9% (acrilamida/solución bisacrilamida en la proporción 37,5:1). La electroforesis fue realizada a temp. 60°C a 125 V durante 16 horas.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Bacterias del género *Helicobacter*, incluyendo *H. pylori*, en homogeneizados de mucosa estomacal (parte antral) de ratones infectados con *H. pylori*, con o sin siguientes inoculaciones con sales del ácido alfa-cetoglutarico.

Inoculaciones *	<i>H. pylori</i> cultivada		PCR 16S rDNA – <i>Helicobacter</i> spp.	
	Cantidad de ratones infectados	Cantidad de bacterias (cfu)/ratón	Cantidad de ratones	
	en grupo		con ADN de <i>H.pylori</i> en grupo	con ADN distinto de <i>H.pylori</i> en grupo
<i>H. pylori</i> + PBS (Grupo III)	8/8	$4,3 \times 10^2 \pm 5,0 \times 10^1$	8/8	2/8
<i>H. pylori</i> + AKG (Grupo III B)	0/16	0	0/16	5/16
PBS + AKG (Grupo IV B)	0/16	0	0/16	3/16
PBS (Grupo IV)	0/8	0	0/8	0/8

*/ Según el esquema en la figura 2.

Los animales exclusivamente infectados con *H. pylori* (*H. pylori* + PBS), infectados con *H. pylori* con la siguiente inoculación de sales del ácido alfa-cetoglutarico (*H. pylori* + AKG) y grupos de control de animales no infectados, inoculados solo con PBS o con PBS y sales del ácido alfa-cetoglutarico (PBS + AKG).

La bacteria *H. pylori* fue aislada de 8 muestras de estómago de 8 ratones infectados con *H. pylori* + PBS (Grupo III en Fig. 2) (Tabla 2). En el ADN aislado de las muestras de estómago, se ha identificado el fragmento específico de 16S rDNA de *H. pylori* y se ha identificado con PCR.

A partir de muestras de estómago tomadas de 16 ratones infectados con *H. pylori* y tratados con sales del ácido alfa-cetoglutarico (Grupo III B en Fig. 2) no se han encontrado cultivos de *H. pylori* y tampoco secuencias específicas para *H. pylori* en productos PCR (Tabla 2).

No se han cultivado bastones de *H. pylori* a partir de muestras de sangre tomadas de estos animales. Partiendo de cebadores elegidos, el aislamiento de ADN a partir de muestras de sangre y estómago de 87 ratones tratados con PBS (Grupo IV en Fig. 2) no dio resultados.

En la Fig. 3 se muestra la movilidad de productos PCR típicos para el segmentos 16S rDNA de bacterias del género *Helicobacter* en el campo de corriente eléctrica evaluados con técnicas DGGE. A: *H. muridorum*, B: *H. bilis*, C: *H. pullorum*, D: *H. pylori*, E: *Helicobacter* spp. flexispira taxon 8 "F. rappini", F: *H. hepaticus*, G: *H. bizzozeronii* sirvió como marcador.

5 Las flechas indican el ADN de *H. bilis*. Letras de 1 a 8 estiman las rutas de migración de los productos PCR de este ejemplo 2.

10 En 16 productos PCR extraídos de la parte antral del estómago de ratones infectados con *H. pylori* y posteriormente tratados o no tratados con sales del ácidos alfa-cetoglutárico o desde ratones no infectados, se han detectado 19 fragmentos de ADN con tamaño de 470 bp. Los resultados se muestran en la Fig. 3 y la Tabla 3. La secuenciación de los segmentos de ADN (n=19) hallados en estos 16 fragmentos de ADN (separados previamente con DGGE) corresponde a *H. pylori* (n=8) y también a *H. rodentium* (n=4), *H. bilis* (n=3) y *H. hepaticus* (n=4) (fig. 3).

Tabla 3. Secuenciación de productos PCR obtenidos después de la amplificación de homogeneizados del muestras de mucosa estomacal (parte antral)

Inoculados*	Productos PCR	<i>Helicobacter</i> spp.
<i>H. pylori</i> + PBS (Grupo III)	1.	<i>H. pylori</i>
	2.	<i>H. pylori</i>
	3.	<i>H. pylori</i>
	4.	<i>H. pylori</i>
	5.	<i>H. pylori</i> , <i>H. bilis</i>
	6.	<i>H. pylori</i>
	7.	<i>H. pylori</i> , <i>H. bilis</i>
	8.	<i>H. pylori</i>
<i>H. pylori</i> + AKG (Grupo III B)	1.	<i>H. rodentium</i> , <i>H. bilis</i>
	2.	<i>H. hepaticus</i>
	3.	<i>H. rodentium</i>
	4.	<i>H. hepaticus</i>
	5.	<i>H. rodentium</i>
PBS + AKG (Grupo IV B)	1.	<i>H. hepaticus</i>
	2.	<i>H. hepaticus</i>
	3.	<i>H. rodentium</i>
*/ según esquema de fig. 2. Animales infectados exclusivamente con <i>H. pylori</i> (<i>H. pylori</i> + PBS), infectados con <i>H. pylori</i> con inoculaciones seguidas de sales del ácido alfa-cetoglutárico (<i>H. pylori</i> + AKG) y animales no infectados, inoculados con sales del ácido alfa-cetoglutárico (PBS + AKG).		

15 Tal como se muestra en la Tabla 3. Se ha detectado ADN de dos especies de *Helicobacter*: *H. pylori* y *H. bilis*, y también *H. rodentium* y *H. bilis* en 3 ratones diferentes. Las muestras de estómago de 2 ratones del grupo III (*H. pylori* + PBS) mostraron la presencia de *H. pylori* y *H. bilis*. En las muestras de estómago de un ratón del grupo III B (*H. pylori* + sales del ácido alfa-cetoglutárico) se detectaron *H. rodentium* y *H. bilis* (Tabla 3). El ADN de *H. hepaticus* fue detectado en 4 animales del grupo III B (*H. pylori* + sales del ácido alfa-cetoglutárico) y en dos ratones inoculados con PBS + sales del ácido alfa-cetoglutárico (Grupo IV B) (Tabla 3).

20 El ADN de *H. bilis* no apareció separadamente en ningún producto PCR, mientras que el ADN de *H. rodentium* estuvo presente en 3 muestras sin secuencias acompañantes y en una muestra junto con ADN de *H. bilis* (Fig. 3 Tabla 3).

25 En resumen, el número de colonias (principal \pm DE) aisladas a partir de muestras de mucosa estomacal tomada de la parte antral, de ratones infectados exclusivamente con *H. pylori* (grupo III) fue de $4,3 \times 10^2 \pm 5,0$

5 x 10¹ mientras que después del tratamiento intragástrico de ratones con sales del ácido alfa-cetoglutarico (grupo III B) no se han cultivado colonias de *H. pylori* (Tabla 2). Tres veces durante 3 días consecutivos, se han suministrado sales del ácido alfa-cetoglutarico, a partir del día 8 desde la última dosis infectiva de *H. pylori* suministrada al ratón, causando un efecto totalmente inhibitor de la colonización bacteriana y la total erradicación de la bacteria *H. pylori* de la mucosa gástrica.

10 Más aún, durante el tiempo del experimento, la composición de la microflora ureolítica del estómago había sido cambiada y en ratones infectados con *H. pylori* (Grupo III) se ha identificado también el ADN de *H. bilis*, mientras que en ratones inoculados con sales del ácido alfa-cetoglutarico (Grupo III B) se encontró exclusivamente ADN de *H. rodentium*, *H. bilis*, *H. hepaticus*, en ratones de control tratados con sales del ácido alfa-cetoglutarico (Grupo IV B) fue identificado el ADN de *H. hepaticus* y *H. rodentium*.

Ejemplo 3

Soluciones acuosas de sales de calcio y sodio del ácido alfa-cetoglutarico como mezclas o por separado, fueron preparadas y utilizadas como aditivos en productos lácteos y bebidas.

15

Sal del ácido alfa-cetoglutarico:	0,001 g – 0,2 g
Glucosa	20 g
Agua hasta	100 g

La cantidad terapéutica y/o profilácticamente eficaz oscila de 0,001 g hasta 0,2 g/kg de masa corporal por día.

20 Utilizando modelos animales (ratones) y con la participación de voluntarios, se ha demostrado que el suministro intragástrico u oral del sodio y/o calcio de alfa-cetoglutarato en forma de solución acuosa, tiene efectos profilácticos, alivia la infección y disminuye la colonización del tracto gastrointestinal por parte de *H. pylori*.

25 Los ejemplos mostrados ilustran cómo las bacterias ureolíticas, en este caso *H. pylori*, compiten contra las células del organismo huésped para acceder al sustrato, por ejemplo urea. El suministro intragástrico de sales del ácido alfa-cetoglutarico facilita el uso de la urea descompuesta del amonio por bacterias ureolíticas para las necesidades del macroorganismo, por ejemplo, la síntesis de glutamato con alfa-cetoglutarato como uno de los agentes. A pesar de la actividad de la ureasa bacteriana, el pH ácido del entorno gástrico fue mantenido previniendo la formación de micro-nichos para *H. pylori*. Así se consiguió reducir y frenar la colonización de la membrana mucosa del macroorganismo por parte de bacterias ureolíticas. El uso del alfa-cetoglutarato previene también las infecciones causadas por bacterias ureolíticas.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso del alfa-cetoglutarato para fabricar productos médicos para la profiláctica y el tratamiento de estados indeseados relacionados con la presencia y/actividad de bacterias ureolíticas en vertebrados, incluyendo humanos, mamíferos, aves, anfibios y peces, en formulaciones ajustadas al suministro en lugares donde aparecen las bacterias ureolíticas.
- 10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, cuando las condiciones médicas indeseadas sean condiciones relacionadas con la presencia y/o actividad en el tracto gastrointestinal, sistema respiratorio y/o urogenital de bacterias ureolíticas del grupo que incluye *Helicobacter pylori*, cepas bacterianas del género *Brucella*, bacterias positivas de ureasa tales como *Ureoplasma urealyticum* y otras bacterias alcalófilas, tales como *Bacillus pasteurii*, bastones productores de ureasa de *Yersinia enterocolica*, bacterias ureolíticas participantes en la formación de biocapas y la mineralización de depósitos en catéteres y otros equipos médicos, bacterias ureolíticas causantes de infecciones en membranas mucosas de la cavidad bucal, enfermedades gingivales, caries dental, formación de sarro, bacterias ureolíticas responsables de la formación de cálculos infecciosos en infecciones del sistema urinario por los géneros: *Proteus*, *Ureaplasma*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Providencia*, *Corynebacterium*, en particular *P. mirabilis*, y micoplasmas causantes de infecciones en la parte baja del tracto genital, *Mycoplasma hominis* y *U. urealyticum*.
- 15 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 y 2, cuando se fabriquen productos para prevenir la colonización por *H. pylori* y sus consecuencias, particularmente enfermedades tales como úlceras de estómago y duodeno, linfomas gástricos, gastritis crónica atrófica con metaplasia intestinal y cáncer gástrico.
- 20 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 y 2, cuando se fabriquen productos para regular la flora intestinal ureolítica, para estabilizar la integridad del sistema y para equilibrar la flora intestinal después de enfermedades infecciosas y caquexias.
- 25 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 y 2, cuando se fabriquen productos, en forma de pasta de dientes y chicles, para regular la flora ureolítica de la cavidad bucal, reducir la formación de sarro y detener la caries dental.
- 30 6. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 y 2, cuando se fabriquen productos para inhibir el paso de bacterias ureolíticas patógenas a través del estómago.
- 35 7. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 y 2, cuando se fabriquen productos para prevenir la formación de depósitos y cálculos infecciosos en el sistema urinario.
- 40 8. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 y 2, cuando se fabriquen productos para inhibir el crecimiento de bacterias ureolíticas, particularmente *Ureoplasmas* y otros micoplasmas causantes de infecciones en peces.
- 45 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, cuando se fabriquen productos para la profiláctica de inflamaciones de branquias en carpas y crías de carpas y otros peces de agua dulce y salada, causadas por ciertas bacterias ureolíticas.
- 50 10. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 y 2, cuando se fabriquen productos para reducir la formación de biocapas y la mineralización de depósitos en catéteres y otros equipos médicos.
- 55 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 al 10, cuando se fabriquen productos que contengan cantidades de alfa-cetoglutarato ajustadas a dosis efectivas terapéuticamente, en particular a dosis desde 0,001 hasta 0,2 g/kg de masa corporal/día.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 a la 11, cuando se fabriquen productos en formulación con suministro por vía oral, en forma de infusiones, líquidos de irrigación, cápsulas intravaginales y en otras formulaciones ajustadas a las vías de suministro.

13. Alfa-cetoglutarato para uso como agente antibacteriano contra bacterias ureolíticas cuando es suministrado al lugar de presencia de bacterias ureolíticas en vertebrados, incluyendo humanos, mamíferos, aves, anfibios y peces.
- 5 14. Un producto médico, fabricado de acuerdo con alguna de las reivindicaciones de 1 a 12, para uso en la profiláctica y el tratamiento de condiciones médicas no deseadas relacionadas con la presencia y/o actividad de bacterias ureolíticas en vertebrados, incluyendo humanos, mamíferos, aves, anfibios y peces, en formulaciones ajustadas al suministro en lugares de presencia de bacterias ureolíticas.
- 10 15. El uso de alfa-cetoglutarato para producir suplementos dietéticos para prevenir condiciones médicas no deseadas relacionadas con la presencia y/o actividad de bacterias ureolíticas en vertebrados, incluyendo humanos, mamíferos, aves, anfibios y peces.
- 15 16. El uso de alfa-cetoglutarato para producir productos alimenticios medicados, para prevenir condiciones médicas no deseadas relacionadas con la presencia y/o actividad de bacterias ureolíticas en vertebrados, incluyendo humanos, mamíferos, aves, anfibios y peces.
- 20 17. El uso de alfa-cetoglutarato para fabricar aditivos para alimentos/piensos, que actúan de forma profiláctica, previniendo la colonización por *H. pylori* en vertebrados, incluyendo humanos, mamíferos, aves, anfibios y peces.

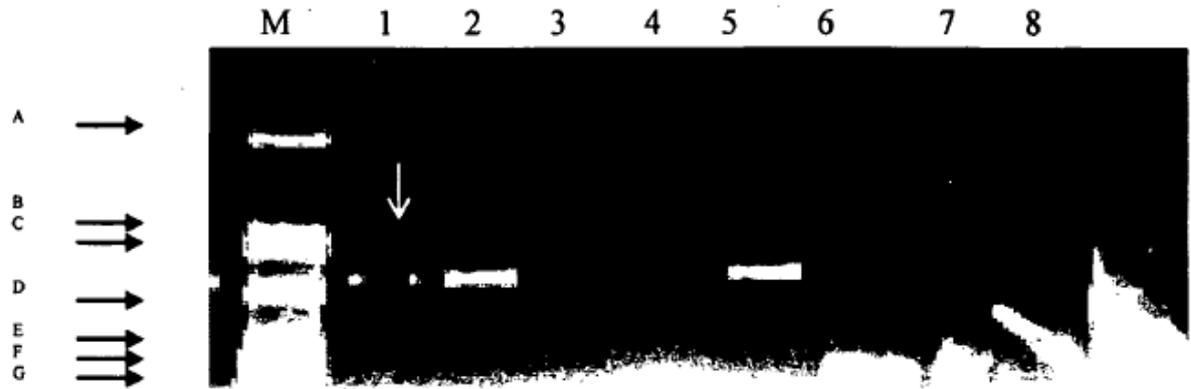


FIG. 3