

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 085**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/198** (2006.01)

**A61P 19/10** (2006.01)

**A61P 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2002 E 02791128 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 1446112**

54 Título: **Uso de glutamato, derivados o metabolitos de glutamato, análogos de glutamato o mezclas de los mismos para la fabricación de una composición para el tratamiento de osteoporosis**

30 Prioridad:

**23.11.2001 SE 0103932**

**21.12.2001 SE 0104385**

**06.06.2002 SE 0201713**

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

**25.11.2013**

73 Titular/es:

**PROTISTA BIOTECHNOLOGY AB (100.0%)**

**Ole Römers väg 12**

**223 70 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**STUDZINSKI, TADEUSZ;**

**VALVERDE PIEDRA, JOSE LUIS y**

**PIERZYNOWSKI, STEFAN**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

**ES 2 431 085 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**

Uso de glutamato, derivados o metabolitos de glutamato, análogos de glutamato o mezclas de los mismos para la fabricación de una composición para el tratamiento de osteoporosis

**Campo técnico**

5 Esta invención se refiere a la prevención, el alivio y el tratamiento de osteoporosis y la prevención y reparación de fracturas óseas,

**Antecedentes de la invención**

*El esqueleto*

10 El esqueleto es un sistema de órganos complejo que está en un estado de flujo constante. Sirve para funciones mecánicas, metabólicas y protectoras. Existen dos tipos de hueso; cortical y esponjoso. El hueso cortical se encuentra principalmente en las diáfisis de los huesos largos del esqueleto de las extremidades. También se encuentra en la capa externa de prácticamente todos los huesos. El hueso esponjoso se encuentra principalmente en los huesos del esqueleto axial y en los extremos de los huesos largos. El proceso celular de actividad ósea a través del que se mantienen tanto el hueso cortical como el esponjoso, se denomina remodelación ósea. Esta remodelación tiene lugar en superficies óseas en paquetes diferenciados conocidos como unidades multicelulares básicas (Parfitt *et al.*, (1987) Clin. Obstet. Gynecol. 30:786-811).

15 Existen numerosas hormonas sistémicas, tales como hormona paratiroidea y vitaminas tales como vitamina D, calcitonina, estrógenos, andrógenos, así como varios factores locales, tales como interleucinas, factores de crecimiento transformantes y prostaglandinas, que desempeñan un papel importante en la fisiología de la remodelación ósea.

*Trastornos esqueléticos*

20 Contribuyen muchos factores a la resistencia del esqueleto y su capacidad para soportar traumatismos sin fractura. El principal factor que representa al menos el 70% de la resistencia del hueso es la densidad mineral ósea (masa por volumen). Aproximadamente el 80% de la masa esquelética total es hueso cortical (compacto) con una baja razón superficie:volumen mientras que el 20% restante es hueso esponjoso (trabecular) con una razón superficie:volumen mucho mayor. Se consideran todas las alteraciones en la interrelación entre masa, volumen, superficie y arquitectura en la pérdida de la resistencia del hueso. Una pérdida de este tipo en la resistencia del hueso conducirá a un aumento del riesgo de fractura, que es uno de los distintivos de la osteoporosis.

25 Los trastornos esqueléticos conducen a una pérdida o debilitamiento en los huesos, un estado generalmente denominado osteoporosis.

*Osteoporosis*

La osteoporosis es un estado con disminución de la masa ósea y cambios en la microarquitectura del hueso, lo que conduce a una disminución de la resistencia y un aumento del riesgo para la fractura.

35 La osteoporosis es uno de los pocos estados médicos que afecta prácticamente a cada miembro de la especie humana que vive más de 35 años. Es un problema médico importante con consecuencias médicas, sociales y económicas crecientes. Más de 8 millones de americanos padecen fracturas osteoporóticas, aunque se estima que el número de individuos afectados es de 14-25 millones usando las nuevas definiciones de osteoporosis, que incluyen los que no han experimentado aún fracturas pero que tienen una masa ósea lo suficientemente baja como para situarlo en grupos de riesgo potencial.

40 La Fundación Nacional de Osteoporosis, EE.UU., ha proporcionado estimaciones de que el coste de tratar la osteoporosis en 1990 fue de 10 mil millones de \$. Con el envejecimiento de la población y la prevalencia creciente de la osteoporosis, se predice que sólo los costes médicos alcanzarán los 30-45 mil millones de \$ antes del año 2020 en los EE.UU. solamente. La Organización Mundial de la Salud ha proclamado la década 2000-2010 como la década de las enfermedades óseas y articulares.

45 Las terapias actuales para el tratamiento de osteoporosis actúan habitualmente mediante un mecanismo de aumento de la formación o disminución de la resorción de material óseo. Los efectos de tales tratamientos se resumen en la tabla 1. Otros medios propuestos de tratamiento de la osteoporosis incluyen calcio, ejercicio y hormonas de crecimiento.

**Tabla 1** Estrategias comunes para la terapia de osteoporosis

Estrategia	Disminuir la resorción	Aumentar la formación
Efecto sobre la masa ósea	Estabilizar	Aumentar

Efecto sobre las células óseas	Disminuir la actividad de osteoclastos	Aumentar la actividad de osteoblastos
Ejemplos	Estrógeno, calcitonina, bisfosfonatos	Fluoruro, vitamina D, hormona paratiroidea (PTH)

La solicitud de patente CN 1153634 propone efectos curativos para la osteoporosis a partir de un medicamento que comprende, entre otros, glutamina.

*Causas médicas de la osteoporosis*

5 Diferentes trastornos médicos también pueden conducir, como efecto secundario, a osteoporosis. Tales trastornos médicos se enumeran en la tabla 2.

**Tabla 2** Diferentes trastornos médicos causando osteoporosis

<i>Renales</i>	Mieloma múltiple	<i>Agentes farmacológicos</i>
Insuficiencia renal	Macroglobulinemia de Waldenström	Antiácidos que contienen aluminio
Hipercalciuria idiopática	Mastocitosis sistémica	Anticonvulsivos
Acidosis tubular renal	Anemias hemolíticas	Cisplatino
	Anemia drepanocítica	Ciclosporina
	Beta-talasemia	Glucocorticoides
<i>Endocrinos/metabólicos</i>	Tumores sólidos que secretan PTHrP (esp. escamosos) renales, de vejiga, de ovario)	Heparina
Diabetes mellitus tipo I		Metotrexato
Síndrome de Cushing'	<i>Gastrointestinales</i>	Plicamicina
Hipogonadismo - primario y secundario	Enfermedad inflamatoria del intestino	Exceso de hormonas tiroideas
Hiperparatiroidismo - primario y secundario	Celiacía	Diuréticos excepto tiazidas
Hipertiroidismo	Posgastrectomía	Alcohol
Homocistinuria	Cirrosis biliar primaria	<i>Otros</i>
Acromegalia	Insuficiencia hepática	Inmovilización
Hipovitaminosis D	Hemocromatosis	Osteogénesis imperfecta
Escorbuto	Enfermedad de Wilson	Inactividad/parálisis
<i>Hematológicos/oncológicos</i>	Desnutrición	Síndrome de Ehlers-Danlos
Leucemia	<i>Enfermedades inflamatorias crónicas</i>	Síndrome de Marfans
Linfoma	Artritis reumatoide	Postrasplante de órgano
		Embarazo
		Enfermedad de Gaucher

*Pérdida ósea posmenopáusica*

10 En la última década, se han identificado la significación y consecuencia de la pérdida ósea posmenopáusica y se han definido a nivel internacional. Las autoridades médicas y gubernamentales han reconocido la morbimortalidad en individuos no tratados así como la consecuencia financiera para la sociedad.

*Tratamiento conocido de la osteoporosis*

15 Actualmente se conocen pocos fármacos para aumentar la formación ósea. El fármaco usado más comúnmente y más estudiado es el fluoruro, que puede afectar tanto a la formación como a la resorción ósea. Por tanto, el fármaco se usa ampliamente en la fluoroterapia moderna (Farley *et al.*, Science, 222:330-332, (1983), y Gruber *et al.*, Clin. Orthop., 267:264-267), y el fluoruro de sodio es la forma más evaluada.

Varios estudios muestran un aumento en la masa ósea trabecular tras la administración a largo plazo de fluoruro y calcio. La combinación de fluoruro y calcio se considera un tratamiento establecido.

20 Los fármacos a base de fluoruro, en los que el monofluorofosfato representa el fármaco más avanzado para fluoroterapia, muestran varios inconvenientes y conducen a menudo a complicaciones en pacientes tratados, por ejemplo complicaciones gastrointestinales y reumáticas.

Affinito *et al.* han publicado en Gynecol. Endocrinol. (7:201-205, (1993)) un estudio que muestra un aumento del 4,25% en la densidad mineral ósea tras el tratamiento de mujeres posmenopáusicas con aún otra forma de un fármaco a base de fluoruro, es decir monofluorofosfato cálcico de L-glutamina.

25 *Problemas óseos en aves*

En pollos, gallinas y otros pollos de engorde, tales como pavos, la capacidad de soporte de carga de las patas es un problema. Específicamente, en varias líneas de pavos que ganan un peso corporal de más de 25 kilos, la fractura ósea es un problema. Para prevenir tales problemas que provocan un sufrimiento innecesario del animal así como

altos costes para el granjero, existe la necesidad de una mejor comprensión del crecimiento óseo, la formación ósea y la mineralización ósea.

*Profilaxis*

5 Las tendencias recientes en la profilaxis de las enfermedades esqueléticas demandan una mejor comprensión de los procesos fisiológicos de la formación, el desarrollo y la mineralización óseos durante la vida posnatal de un vertebrado, incluyendo mamífero y ave.

*Preocupaciones de desarrollo del esqueleto*

10 El parto, y las horas consecutivas después del mismo, son la principal fuente de estímulos que activan funciones del sistema digestivo, el sistema respiratorio y el sistema motor en función de la gravitación y carga dinámica sobre los huesos de las extremidades. Adicionalmente, existe una diferenciación durante el desarrollo referente a la ganancia de masa ósea, ganancia de masa muscular y ganancia de masa adiposa en diversas etapas de la vida.

15 El estado nutricional general, nutrientes específicos (por ejemplo, zinc, glutamina) y determinados factores de crecimiento trópicos (por ejemplo, hormona de crecimiento, factor de crecimiento similar a insulina I, factor de crecimiento de queratinocitos y péptido similar a glucagón-2) tienen importantes interacciones relevantes para el crecimiento y la función intestinales, que, a su vez, afectan al desarrollo de la extremidad. Un estado nutricional adecuado es crítico para la síntesis de factores de crecimiento endógenos en el intestino y otros tejidos y es un mediador importante de la capacidad de respuesta de órganos a la administración de factores de crecimiento exógenos.

20 Por tanto, es sumamente deseable a la luz de los problemas mencionados anteriormente que se desarrollen medios y métodos para tratar o prevenir cualquier estado asociado con la pérdida o el debilitamiento óseos, que también puedan evitar los problemas asociados con los medios y métodos de la técnica anterior. A este respecto, la presente invención trata esta necesidad e interés.

**Sumario de la invención**

25 En vista de las desventajas anteriores conocidas en la técnica de prevenir y aliviar una mala calidad ósea y los altos costes médicos para realizarlo, así como para corregir la fractura ósea asociada, por ejemplo, con osteoporosis, la presente invención proporciona composiciones nuevas y mejoradas para la prevención, el alivio y el tratamiento de osteoporosis y la prevención y reparación de fracturas óseas,

30 En un primer aspecto, se proporciona un uso de derivado(s), metabolito(s) o análogo(s) de glutamato, o mezclas de los mismos, para la fabricación de una composición para la prevención, el alivio o el tratamiento de osteoporosis, en el que el/los derivado(s), metabolito(s) o análogo(s) de glutamato se selecciona(n) del grupo que consiste en: alfa-cetoglutarato, mono y disales de metal de alfa-cetoglutarato, sales de aminoácido de alfa-cetoglutarato y Ala-Gln.

35 En un segundo aspecto, se proporciona un uso de derivado(s), metabolito(s) o análogo(s) de glutamato, o mezclas de los mismos, para la fabricación de una composición para la prevención o reparación de fracturas óseas en un vertebrado, incluyendo mamífero y ave, que lo necesita, en el que el/los derivado(s), metabolito(s) o análogo(s) de glutamato se selecciona(n) del grupo que consiste en: alfa-cetoglutarato, mono y disales de metal de alfa-cetoglutarato, sales de aminoácido de alfa-cetoglutarato y Ala-Gln.

La composición de los aspectos primero o segundo puede ser una composición farmacéutica con opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable y/o aditivos.

40 La composición de los aspectos primero o segundo puede ser un alimento o un suplemento de pienso, que puede ser un suplemento dietético y/o un componente en forma de alimento sólido y/o bebida.

El/los derivado(s), metabolito(s) o análogo(s) de glutamato, o mezclas de los mismos, en la composición fabricada, puede(n) estar en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad terapéuticamente eficaz puede ser 0,01-0,2 g/kg de peso corporal por dosis diaria.

45 En un tercer aspecto, se proporciona una composición que comprende un derivado, metabolito o análogo de glutamato seleccionado del grupo que consiste en: alfa-cetoglutarato, mono y disales de metal de alfa-cetoglutarato, sales de aminoácido de alfa-cetoglutarato y Ala-Gln, para su uso en la prevención, el alivio o el tratamiento de osteoporosis.

50 En un cuarto aspecto, se proporciona una composición que comprende un derivado, metabolito o análogo de glutamato seleccionado del grupo que consiste en: alfa-cetoglutarato, mono y disales de metal de alfa-cetoglutarato, sales de aminoácido de alfa-cetoglutarato y Ala-Gln, para su uso en la prevención o reparación de fracturas óseas en un vertebrado.

La composición de los aspectos tercero o cuarto puede ser una composición farmacéutica con opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable y/o aditivos.

La composición de los aspectos tercero o cuarto puede ser un alimento o un suplemento de pienso, que puede ser un suplemento dietético y/o un componente en forma de alimento sólido y/o bebida.

5 También se proporciona la composición de los aspectos tercero o cuarto, en la que el/los derivado(s), metabolito(s) o análogo(s) de glutamato, o mezclas de los mismos, en la composición puede(n) estar en una cantidad terapéuticamente eficaz.

También se proporciona la composición de los aspectos tercero o cuarto, en la que el derivado, metabolito o análogo de glutamato va a administrarse a 0,01-0,2 g/kg de peso corporal por dosis diaria.

### Breve descripción de los dibujos

10 La figura 1 es una figura que muestra un hueso con tres puntos marcados para su uso en un ensayo de flexión usando un aparato Instron 4302,

la figura 2 es una representación esquemática de los parámetros geométricos de la diáfisis de un hueso que muestra diámetro vertical externo B, diámetro vertical interno b, diámetro horizontal externo H y diámetro horizontal interno h,

la figura 3 muestra la resistencia a la rotura ósea ( $W_f$ ) del húmero y el fémur en lechones de 35 días de edad cuando se administra AKG y en la que se marca con un asterisco (\*)  $p < 0,05$ ,

15 la figura 4 muestra la resistencia elástica máxima ósea ( $W_y$ ) del húmero y el fémur en lechones de 35 días de edad cuando se administra AKG y en la que se marca con un asterisco (\*)  $p < 0,05$ ,

la figura 5 muestra el área de la sección transversal del húmero y el fémur en lechones de 35 días de edad cuando se administra AKG y en la que se marca con un asterisco (\*)  $p < 0,05$ ,

20 la figura 6 muestra el segundo momento de inercia del área de la sección transversal en relación con el eje horizontal ( $I_x$ ) del húmero y el fémur en lechones de 35 días de edad cuando se administra AKG y en la que se marca con un asterisco (\*)  $p < 0,05$ ,

la figura 7 muestra el grosor de pared relativo medio ( $MRWT$ , *mean relative wall thickness*) del húmero y el fémur en lechones de 35 días de edad cuando se administra AKG,

25 la figura 8 muestra el segundo momento de inercia del área de la sección transversal en relación con el eje horizontal ( $I_x$ ) las costillas en lechones de 35 días de edad cuando se administra AKG y en la que se marca con un asterisco (\*)  $p < 0,05$ ,

la figura 9 muestra el área de la sección transversal (A) de costillas en lechones de 35 días de edad cuando se administra AKG,

30 la figura 10 muestra la resistencia a la rotura ósea ( $W_f$ ) de costillas en lechones de 35 días de edad cuando se administra AKG y en la que se marca con un asterisco (\*)  $p < 0,05$ ,

la figura 11 muestra la carga de deformación permanente de la 5ª costilla en lechones de 35 días de edad cuando se administra AKG y en la que se marca con un asterisco (\*)  $p < 0,05$ ,

la figura 12 muestra el momento de resistencia a la rotura de costillas en lechones de 35 días de edad cuando se administra AKG y en la que se marca con un asterisco (\*)  $p < 0,05$ ,

35 la figura 13 muestra la DMO del cúbito para el ala derecha experimental de los pavos (barras de color gris) en grupo A tratado con AKG o solución salina fisiológica (PhS) y el ala izquierda de control de los pavos (barras en blanco),

la figura 14 muestra la DMO- $W_i$  del cúbito para el ala derecha experimental de los pavos (barras de color gris) en grupo A tratado con AKG o solución salina fisiológica (PhS) y el ala izquierda de control de los pavos (barras en blanco),

40 la figura 15 muestra la DMO en ratas intactas (INT), operadas de forma simulada (SHO) y sometidas a ovariectomía (OVX) alimentadas con (barras rellenas) o sin AKG (barras en blanco),

la figura 16 muestra el efecto de la administración oral de AKG sobre la ganancia de peso corporal entre los grupos tratados con AKG (barras en blanco) y tratados con Ala-Gln (barras rellenas) durante los primeros 47 días de vida posnatal. El grupo control no se muestra, pero es siempre menor que los grupos tratados con Ala-Gln en los diferentes puntos de tiempo medidos. En el día tres, la diferencia es de aproximadamente 96 g, en el día 14 de aproximadamente 690 g, en el día 21 de aproximadamente 419 g y en el día 35 de aproximadamente 313 g. El valor absoluto del peso corporal se muestra debajo de las barras en g.

45

la figura 17 muestra la densidad mineral ósea (DMO) del fémur derecho en la metafisis proximal y distal a los 21 días de vida posnatal. El tratado con AKG se muestra en barras en blanco y el control en barras rellenas,

la figura 18 muestra la densidad mineral ósea (DMO) del fémur derecho en la metáfisis proximal y distal a los 35 días de vida posnatal. El tratado con AKG se muestra en barras en blanco y el control en barras rellenas,

5 la figura 19 muestra el efecto de la administración de AKG sobre el nivel de 17-β-estradiol en plasma sanguíneo de lechones medido tras 3 días, 28 días, 35 días. Los valores absolutos de 17-β-estradiol en pg/ml se muestran debajo de cada barra. El tratado con AKG se muestra en barras en blanco y el control en barras rellenas,

la figura 20 muestra el efecto de la administración de AKG sobre el nivel de osteocalcina en plasma sanguíneo de lechones medido tras 3 días, 28 días, 35 días, 56 días y 70 días. Los valores absolutos de osteocalcina en ng/ml se muestran debajo de cada barra. El tratado con AKG se muestra en barras en blanco y el control en barras rellenas,

10 la figura 21 muestra el efecto de la administración de Ala-Gln sobre el nivel de 17-β-estradiol en plasma sanguíneo de lechones medido tras 3 días, 28 días, 35 días. Los valores absolutos de 17-β-estradiol en pg/ml se muestran debajo de cada barra. El tratado con Ala-Gln se muestra en barras en blanco y el control en barras rellenas, y

15 la figura 22 muestra el efecto de la administración de Ala-Gln sobre el nivel de osteocalcina en plasma sanguíneo de lechones medido tras 3 días, 28 días, 35 días, 56 días y 70 días. Los valores absolutos de osteocalcina en ng/ml se muestran debajo de cada barra. El tratado con Ala-Gln se muestra en barras rellenas y el control en barras en blanco.

### Descripción detallada de la invención

#### *Definiciones*

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “calidad ósea” pretende significar características mecánicas, químicas y fisiológicas del hueso medidas mediante determinados parámetros usados según la invención. Tales parámetros los conoce el experto en la técnica y se definen adicionalmente con el uso en el texto.

Tal como se usa en el presente documento, “composición farmacéutica” significa composición terapéuticamente eficaz según la invención.

25 Una “cantidad terapéuticamente eficaz”, o “cantidad eficaz”, o “terapéuticamente eficaz”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad que proporciona un efecto terapéutico para un estado y régimen de administración dados. Esto es una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir un efecto terapéutico deseado en asociación con el aditivo y diluyente requeridos; es decir, un portador, o vehículo de administración. Además, pretende significar una cantidad suficiente para reducir y lo más preferiblemente prevenir, un déficit clínicamente significativo en la actividad, función y respuesta del huésped. Alternativamente, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para provocar una mejora en un estado clínicamente significativo en un huésped. Tal como aprecian los expertos en la técnica, la cantidad de un compuesto puede variar dependiendo de su actividad específica. Cantidades de dosificación adecuadas pueden contener una cantidad predeterminada de composición activa calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido; es decir, portador, o aditivo.

35 Tal como se usa en el presente documento, “tratamiento”, significa el tratamiento para curar que puede ser una cura completa o una cura parcial de un estado o estados asociados con la pérdida o el debilitamiento óseos.

Tal como se usa en el presente documento “alivio”, significa una disminución, es decir un estado o estados menores o más suaves asociados con la pérdida o el debilitamiento óseos.

Tal como se usa en el presente documento “prevención”, significa un bloqueo completo o parcial del desarrollo, o brote, de un determinado estado o estados asociados con la pérdida o el debilitamiento óseos.

40 El término “derivado” o “compuesto derivado” pretende significar en el presente documento una sustancia química derivada de otra sustancia o bien directamente o bien mediante modificación o sustitución parcial.

El término “análogo” o “compuesto análogo” pretende significar en el presente documento compuestos que son estructuralmente similares unos a otros, pero que no son necesariamente isómeros. Los análogos tienen función/funciones similar(es) pero difieren en la estructura o el origen evolutivo.

45 En los métodos y el uso para la fabricación de composiciones de la invención, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz del componente activo. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse por el trabajador médico o veterinario experto habitual basándose en características del paciente, tales como la edad, el peso, el sexo, el estado, complicaciones, otras enfermedades, etc., tal como se conoce en la técnica.

#### *Desarrollo óseo*

50 El rápido crecimiento y desarrollo del tracto gastrointestinal, GIT, y los huesos de las extremidades en vertebrados recién nacidos, incluyendo mamíferos, tales como seres humanos y lechones, y aves, tales como gallinas y pavos, está relacionado con el aumento de las necesidades intestinales y la demanda celular de energía metabólica

suministrada principalmente por los enterocitos y osteocitos.

Hasta la fecha, no se ha llevado a cabo ninguna investigación exhaustiva sobre los efectos nutricionales de fármacos a base de glutamato, derivado, metabolitos o análogos de glutamato sobre el crecimiento, el desarrollo y la mineralización del sistema esquelético durante el periodo posnatal.

5 Derivados, metabolitos o análogos de glutamato son por ejemplo ácido alfa-cetoglutarico (AKG), y derivados, metabolitos y análogos de AKG tal como se describen y ejemplifican en mayor detalle a continuación. Los fármacos a base de fluoruro, tales como monofluorofosfato cálcico de L-glutamina, que representan los fármacos usados actualmente para el tratamiento de la pérdida y el debilitamiento óseos, por ejemplo, en osteoporosis, no se incluyen por tanto en la presente invención. El efecto, así como los efectos secundarios, del fluoruro es parcialmente diferente de glutamato, derivados, metabolitos o análogos de glutamato.

10 Tal como se reveló anteriormente, la presente invención se refiere a medios para tratar, aliviar o prevenir la osteoporosis y para la prevención o reparación de fracturas óseas. Estados que están asociados con la pérdida o el debilitamiento óseos, tales como en osteoporosis, son, pero no se limitan a, renales, tales como insuficiencia renal, hipercalcemia idiopática, acidosis tubular renal; endocrinos o metabólicos, tales como diabetes mellitus tipo I, síndrome de Cushing hipogonadismo - primario y secundario, hiperparatiroidismo - primario y secundario, hipertiroidismo, homocistinuria, acromegalia, hipovitaminosis D, escorbuto; hematológicos/oncológicos, tales como leucemia, linfoma, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, mastocitosis sistémica, anemias hemolíticas, anemia drepanocítica, beta-talasemia, tumores sólidos que secretan PTHrP (por ejemplo escamosos, renales, de vejiga, de ovario); gastrointestinales, tales como enfermedad inflamatoria del intestino, celiaquía, posgastrectomía, cirrosis biliar primaria, insuficiencia hepática, hemocromatosis, enfermedad de Wilson, desnutrición; enfermedades inflamatorias crónicas, tales como artritis reumatoide; agentes farmacológicos, tales como antiácidos que contienen aluminio, anticonvulsivos, cisplatino, ciclosporina, glucocorticoides, heparina, metotrexato, plicamicina, exceso de hormonas tiroideas, diuréticos excepto tiazidas, alcohol; y otros, tales como inmovilización, osteogénesis imperfecta, inactividad/parálisis, síndrome de Ehlers-Danlos, síndrome de Marfans, postrasplante de órgano, embarazo y enfermedad de Gaucher.

#### *Fracturas óseas*

30 Las fracturas óseas pueden provocar la denominada osteoporosis funcional, no sólo en el sitio de la fractura sino en otros huesos en el cuerpo también. Todas las alteraciones en la interrelación entre masa, volumen, superficie y arquitectura se consideran factores en la pérdida de la resistencia del hueso. Una pérdida de este tipo en la resistencia del hueso conducirá a un aumento del riesgo de fractura, que es uno de los distintivos de la osteoporosis.

Otras situaciones que provocan cambios, por ejemplo pérdida, en la resistencia del hueso son la hospitalización como en la atención de larga permanencia; inmovilización involuntaria, tal como un ser humano en una silla de ruedas o que tiene una escayola; inmovilización voluntaria, tal como un trabajo sedentario o una vida sedentaria; cambios en el campo gravitatorio como para los astronautas, por ejemplo.

35 *Administración de glutamato, derivados o metabolitos de glutamato, análogos de glutamato o mezclas de los mismos*

40 Según la descripción en el presente documento, glutamato, derivados o metabolitos de glutamato, análogos de glutamato o mezclas de los mismos, se administran a un vertebrado, incluyendo mamífero y ave; un roedor, tal como un ratón, una rata, cobaya o un conejo; un ave, tal como un pavo, una gallina, un pollo u otros pollos de engorde; animales de granja, tales como una vaca, un caballo, un cerdo, lechón o animales de granja sueltos; o una mascota, tal como un perro o un gato.

Puede realizarse la administración de diferentes maneras dependiendo de qué especie de vertebrado que vaya a tratarse, el estado del vertebrado que necesita dichos métodos y la indicación específica que vaya a tratarse.

45 En una realización, la administración se realiza como un alimento o suplemento de pienso, tal como un suplemento dietético y/o un componente en forma de alimento sólido y/o bebida. Realizaciones adicionales pueden ser en forma de suspensiones o disoluciones, tales como una bebida descrita adicionalmente a continuación.

Además, las formas de dosificación pueden incluir cápsulas o comprimidos, tales como masticables o solubles, por ejemplo comprimidos efervescentes, así como polvo y otros formatos secos conocidos por el experto en la técnica, tales como gránulos, tales como microgránulos y granos.

50 La administración puede ser en forma de alimento o suplemento de pienso parenteral, rectal u oral, tal como se reveló anteriormente. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer dextrosa, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer-lactato o aceites fijos.

55 El alimento y el suplemento de pienso también pueden emulsionarse. El principio activo terapéutico puede mezclarse entonces con excipientes, que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similar y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades minoritarias de sustancias

auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH, que potencian la eficacia del principio activo.

5 Pueden suministrarse diferentes formatos del alimento o suplemento de pienso parenteral, tales como alimento sólido, líquidos o formulaciones liofilizadas o secadas de otro modo. Pueden incluir diluyentes de diversos tampones (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para impedir la absorción a superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácidos biliares), agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietilenglicerol), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, Thimerosal, alcohol bencílico, parabenos), sustancias de carga o modificadores de la tonicidad (por ejemplo, lactosa, manitol), unión covalente de polímeros tales como polietilenglicol a la composición, complejación con iones metálicos o incorporación del material en o sobre preparaciones 10 particuladas de compuestos poliméricos tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), hidrogeles, etc., o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas de eritrocitos o esferoplastos.

#### *Una bebida*

15 En una realización, el alimento o suplemento de pienso se administra en forma de una bebida, o una composición seca de la misma, en cualquiera de los métodos según la invención.

20 La bebida comprende una cantidad eficaz de glutamato, derivados o metabolitos de glutamato, análogos de glutamato o una sal inocua soluble en agua de los mismos, o mezclas de los mismos, junto con un portador soluble en agua nutricionalmente aceptable, tal como minerales, vitaminas, hidratos de carbono, grasas y proteínas. Todos estos componentes se suministran en una forma secada si la bebida se proporciona en una forma seca. Una bebida proporcionada lista para el consumo comprende además agua. La disolución de bebida final también puede tener una tonicidad y acidez controladas, por ejemplo como disolución tamponada según las sugerencias generales en el párrafo anterior.

25 El pH está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 2-5, y particularmente en de aproximadamente 2-4, para impedir el crecimiento bacteriano y fúngico. También puede usarse una bebida esterilizada, con un pH de aproximadamente 6-8.

La bebida puede suministrarse sola o en combinación con una o más composición/composiciones terapéuticamente eficaz/eficaces.

#### *Uso de glutamato, derivados o metabolitos de glutamato, análogos de glutamato o mezclas de los mismos*

30 Según la invención, se da a conocer un uso de glutamato, derivados o metabolitos de glutamato, análogos de glutamato o mezclas de los mismos, en el que el/los derivado(s), metabolito(s) o análogo(s) de glutamato se selecciona(n) del grupo que consiste en: alfa-cetoglutarato, mono y disales de metal de alfa-cetoglutarato, sales de aminoácido de alfa-cetoglutarato y Ala-Gln, para la fabricación de una composición para la prevención, el alivio o el tratamiento de osteoporosis.

35 Realizaciones adicionales de la invención incluyen un uso, en el que la composición es una composición farmacéutica. Esta composición farmacéutica puede estar junto con un portador farmacéuticamente aceptable y/o aditivos, tales como diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o portadores útiles en los métodos y el uso dados a conocer en la presente invención.

40 Además, tal como se usa en el presente documento "portadores farmacéuticamente aceptables" se conocen bien por los expertos en la técnica y pueden incluir, pero no se limitan a, tampón fosfato 0,01-0,05 M o solución salina al 0,8%. Adicionalmente, tales portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y 45 medios tamponados. Los vehículos parentales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer-lactato o aceites fijos. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares.

Realizaciones incluso adicionales de la invención incluyen un uso, en el que la composición es un suplemento dietético y/o un componente en forma de alimento sólido y/o bebida.

50 Una composición fabricada de este tipo, tal como una composición farmacéutica o un alimento o suministro de pienso, comprende el uso según la fabricación de una composición según la invención, y puede comprender opcionalmente un portador y/o una cantidad de un segundo principio activo o principio activo adicional que afecta a la osteoporosis.



*Dosis de la composición farmacéutica administrada*

5 Según la invención, el uso de uso de glutamato, derivados o metabolitos de glutamato, análogos de glutamato o mezclas de los mismos para la fabricación de una composición según la invención incluye administrar una cantidad eficaz terapéutica al vertebrado, tal como un ave o mamífero que lo necesita. Una cantidad terapéuticamente eficaz de este tipo es de aproximadamente 0,01-0,2 g/kg de peso corporal por dosis diaria.

*Dianas de administración*

10 Tal como puede apreciarse fácilmente por un experto habitual en la técnica, los métodos y las composiciones farmacéuticas de la presente invención son particularmente adecuadas para la administración a cualquier animal que lo necesite, particularmente un ave, incluyendo pero sin limitarse a, un pavo, una gallina o un pollo y otros pollos de engorde y animales sueltos, o un mamífero, incluyendo pero sin limitarse a, animales domésticos, tales como sujetos felinos o caninos, animales de granja, tales como, pero sin limitarse a, sujetos bovinos, equinos, caprinos, ovinos y porcinos, animales salvajes, ya sea en la naturaleza o en un parque zoológico, animales de investigación, tales como ratones, ratas, conejos, cabras, ovejas, cerdos, perros, gatos, etc., es decir para uso médico-veterinario.

15 Además, los seres humanos están incluidos como dianas de administración en el tratamiento de osteoporosis o fractura ósea.

*Uso de la invención para la prevención y reparación de fracturas óseas*

20 Según la invención, se da a conocer un uso de glutamato, derivados o metabolitos de glutamato, análogos de glutamato o mezclas de los mismos, en el que el/los derivado(s), metabolito(s) o análogo(s) de glutamato se selecciona(n) del grupo que consiste en: alfa-cetoglutarato, mono y disales de metal de alfa-cetoglutarato, sales de aminoácido de alfa-cetoglutarato y Ala-Gln, para la fabricación de una composición para la prevención o reparación de fracturas óseas en un vertebrado, incluyendo mamífero y ave, que lo necesita.

El uso para la prevención o reparación de fracturas óseas puede ser en el que la composición es una composición farmacéutica con opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable y/o aditivos.

25 Además, el uso para la prevención o reparación de fracturas óseas puede incluir una composición que es un alimento o un suplemento de pienso, o un suplemento dietético y/o un componente en forma de alimento sólido y/o bebida.

30 Realizaciones incluso adicionales incluyen el uso para la prevención o reparación de fracturas óseas, en el que glutamato, derivados o metabolitos de glutamato, análogos de glutamato o mezclas de los mismos, en la composición fabricada está en una cantidad terapéuticamente eficaz. En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de 0,01-0,2 g/kg de peso corporal por dosis diaria.

**Ejemplos**

Ejemplo 1 La influencia de L-alanil-L-glutamina (Ala-Gln) y ácido  $\alpha$ -ceto-glutárico (AKG) sobre el crecimiento, el desarrollo y la mineralización del sistema esquelético durante la vida posnatal en el cerdo

*Mantenimiento de animales*

35 Los lechones obtenidos de la piara de la Universidad, Czeslawice, Polonia se mantuvieron en las condiciones de cría en granja convencionales.

*Experimentos con animales*

40 Todos los lechones se amamantaron con leche de cerda antes del destete. Tras el destete a la edad de 28 días se alimentaron los lechones a voluntad con una mezcla convencional Premix prestarter (PP) (Planta alimentaria-Motycz, Polonia) y se permitió un libre acceso a agua. Se asignaron los lechones a tres ensayos experimentales:

- 1- Grupo control, que recibe solución salina (2 ml/kg de peso corporal (p.c.))
- 2- Segundo grupo, que recibe 0,4 g/kg/p.c. de L-alanil-L-glutamina (ala-gln), (2 ml de disolución/kg de p.c.)
- 3- Tercer grupo, que recibe 0,4 g/kg/p.c. de sal de sodio del ácido  $\alpha$ -ceto-glutárico, AKG, (2 ml de disolución/kg de p.c.) una vez al día desde el primer día hasta el día 35 de vida.

45 El protocolo experimental se resume en la tabla 3.

*Parámetros para medir la calidad ósea*

Se usan diferentes parámetros para definir y medir la calidad ósea según la invención. El experto en la técnica conoce los parámetros usados y se explican a continuación:

- 1) La resistencia elástica máxima mide la carga, en Newton (N), a la fractura.
- 2) La resistencia a la rotura mide la carga, en Newton (N), a la fractura del hueso.
- 3) El área de la sección transversal es la medida del área de hueso en la sección transversal, en mm<sup>2</sup>.
- 4) El segundo momento de inercia es la medición de la eficacia de la geometría de la sección transversal para resistir la fuerza de flexión, expresado en mm<sup>4</sup>.
- 5) El grosor de pared relativo medio es el grosor de pared del hueso hasta su luz.
- 6) La densidad mineral ósea (DMO) expresa el contenido mineral del hueso expresado en g/cm<sup>2</sup>.

**Tabla 3** Protocolo experimental

	Tratamiento	Grupo control (solución salina)	L-alanil-L-glutamina (grupo de Ala-Gln)	α-Cetoglutarato (AKG)
1-28 días	Leche de cerda +	2 ml de solución /kg de p.c. admin. oral	0,4 g/kg/p.c. (2 ml de solución /kg de p.c.) admin. oral	0,4 g/kg/p.c. (2 ml de solución /kg de p.c.) oral admin.
<b>Destete</b>				
28-35 días	Premix prestarter (PP) + agua a voluntad +	2 ml de solución /kg de p.c. admin. oral	0,4 g/kg/p.c. de Ala-gln (2 ml de solución/kg de p.c.) admin. oral	0,4 g/kg/p.c. (2 ml de solución /kg de p.c.) admin. oral
n=		8	8	7

10 Se monitorizó la ganancia de peso de animal cada día antes de la administración oral de solución salina, ala-gln o AKG. A la edad de 35 días, se sacrificaron los lechones, se evisceraron y se tomaron muestras de los huesos.

Se estimaron las propiedades arquitectónicas y geométricas del hueso basándose en mediciones de sección transversal horizontal y vertical así como el diámetro interior y exterior del hueso.

15 Usando el aparato Instron 4302 y aplicando un ensayo de flexión de tres puntos tal como se presenta en la figura 1, se determinaron las siguientes propiedades de los huesos a partir de curvas que muestran la relación entre carga y deflexión:

- 1) resistencia elástica máxima,  $W_y$
- 2) resistencia a la rotura,  $W_f$
- 3) rigidez ósea
- 4) deflexión elástica máxima.

## 20 *Resultados*

### *Propiedades del hueso*

Se analizaron la resistencia a la rotura ósea, la resistencia elástica máxima, la deflexión elástica máxima, la rigidez ósea y el grosor de pared relativo medio (MRWT).

La figura 2 muestra una representación esquemática de los parámetros geométricos de la diáfisis del hueso.

25 El grosor de pared relativo medio (MRWT) expresa la razón de medidas de pared con respecto a luz y sirve como indicador en el proceso de adaptación arquitectónica del hueso a estrés fisiológico durante el crecimiento del cuerpo. Cuando la luz aumenta con un grosor de pared inalterado, disminuye el MRWT pero aumenta la resistencia a la deformación del hueso.

### *Resistencia a la rotura ósea*

30 La resistencia a la rotura ósea ( $W_f$ ) del húmero no difirió significativamente entre el grupo control y el grupo de Ala-Gln, mientras que este parámetro fue significativamente mayor en el grupo de AKG en comparación tanto con los lechones de los grupos control como de Ala-Gln (tabla 4 y figura 3).

La resistencia a la rotura del fémur fue la menor en los lechones del grupo control. Estaban presentes valores

significativamente mayores de este parámetro en ambos grupos experimentales en comparación con los del control (tabla 9 y figura 3).

**Tabla 4.** Resistencia a la rotura ósea ( $W_f$ ) del húmero y el fémur de lechones control y experimentales a la edad de 35 días de vida posnatal

35 días	Resistencia a la rotura ósea ( $W_f$ ) [N]	
	húmero media $\pm$ EEM	fémur media $\pm$ EEM
Control	747,4 $\pm$ 3,89	930,5 $\pm$ 70,23
Ala-Gln	743,0 $\pm$ 15,71 $\nabla$	1075,0 $\pm$ 28,16 *
AKG	857,6 $\pm$ 45,42 *	1123,0 $\pm$ 75,09 *

\* $p < 0,05$  AKG frente a control,  $\nabla p < 0,05$  AKG frente a Ala-Gln

5 *Resistencia elástica máxima ósea*

La resistencia elástica máxima ósea ( $W_y$ ) del húmero y el fémur tanto del grupo de Ala-Gln como de AKG fueron significativamente mayores en comparación con la del control (tabla 5 y figura 4)

**Tabla 5.** Resistencia elástica máxima ósea ( $W_y$ ) del húmero y el fémur de lechones control y experimentales a los 35 días de vida posnatal

35 días	Resistencia elástica máxima ósea ( $W_y$ ) [N]	
	Húmero media $\pm$ EEM	Fémur media $\pm$ EEM
Control	604,2 $\pm$ 26,25	921,1 $\pm$ 62,53
Ala-Gln	638,7 $\pm$ 9,91 *	1016,8 $\pm$ 46,68 *
AKG	726,0 $\pm$ 37,73 *	1042,9 $\pm$ 73,66 *

\* $p < 0,05$  experimental frente a control

10 *Área de la sección transversal*

El área de la sección transversal (A) del húmero y el fémur fueron significativamente mayores en los lechones de ambos grupos experimentales en comparación con la del control (tabla 6 y figura 5).

**Tabla 6.** Área de la sección transversal (A) del húmero y el fémur de lechones control y experimentales a los 35 días de vida posnatal

35 días	Área de la sección transversal (A) [mm <sup>2</sup> ]	
	Húmero media $\pm$ EEM	Fémur media $\pm$ EEM
Control	42,7 $\pm$ 3,52	49,9 $\pm$ 3,38
Ala-Gln	52,2 $\pm$ 2,48 *	60,1 $\pm$ 2,59 *
AKG	52,7 $\pm$ 4,1 *	64,7 $\pm$ 3,82 *

\* $p < 0,05$  experimental frente a control

15 *Segundo momento de inercia*

El segundo momento de inercia del área de la sección transversal en relación con el eje horizontal ( $I_x$ ) de húmero fue significativamente mayor tanto en el grupo de Ala-Gln como de AKG en comparación con el grupo control (tabla 7 y figura 6). El segundo momento de inercia del fémur fue significativamente diferente en el grupo de AKG en comparación tanto con los grupos control como de Ala-Gln (tabla 7 y figura 6).

**Tabla 7.** Segundo momento de inercia [mm<sup>4</sup>] del húmero y el fémur de lechones control y experimentales a los 35 días de vida posnatal

35 días	Segundo momento de inercia ( $I_x$ ) [mm <sup>4</sup> ]	
	Húmero media $\pm$ EEM	Fémur media $\pm$ EEM
Control	287,5 $\pm$ 24,65	452,3 $\pm$ 49,28
Ala-Gln	368,4 $\pm$ 24,31 *	492,8 $\pm$ 12,81 $\nabla$
AKG	459,4 $\pm$ 59,42 *	696,5 $\pm$ 48,7 *

\* $p < 0,05$  AKG frente a control,  $\nabla p < 0,05$  AKG frente a Ala-Gln

*Grosor de pared relativo medio*

El grosor de pared relativo medio (MRWT) del húmero y el fémur de los huesos de los lechones que recibieron Ala-Gln y AKG mostró una tendencia hacia mayores valores; sin embargo, las diferencias no fueron significativas (tabla 8 y figura 7).

5 **Tabla 8.** Grosor de pared relativo medio (MRWT) del húmero y el fémur de lechones control y experimentales a los 35 días de vida posnatal

35 días	Grosor de pared relativo medio (MRWT)	
	Húmero media ± EEM	Fémur media ± EEM
Control	0,52 ± 0,09	0,62 ± 0,06
Ala-Gln	0,64 ± 0,07	0,88 ± 0,12
AKG	0,57 ± 0,08	0,70 ± 0,07

*Segundo momento de inercia (I<sub>x</sub>) del área de la sección transversal en relación con el eje horizontal de las costillas*

10 El segundo momento de inercia (I<sub>x</sub>) del área de la sección transversal en relación con el eje horizontal de costillas fue significativamente mayor en el grupo de AKG en comparación tanto con el grupo control como de Ala-Gln. El área de la sección transversal de las costillas en el grupo de AKG también fue significativamente diferente en comparación con el grupo control. El grosor de pared relativo medio (MRWT) fue el menor en las costillas de lechones que recibieron AKG, intermedio para el grupo control y el mayor para el grupo de Ala-Gln (tabla 9 y figura 8).

15 **Tabla 9.** Segundo momento de inercia (I<sub>x</sub>), área de la sección transversal (A), grosor de pared relativo medio (MRWT) de las costillas (4-9) de lechones a la edad de 35 días de vida posnatal

	Segundo momento de inercia [mm <sup>4</sup> ] (costillas 4-9) Media ± EEM	Área de la sección transversal (A) [mm <sup>2</sup> ] (costillas 4-9) Media ± EEM	MRWT (costillas 4-9) Media ± EEM
Control	10,46 ± 0,66	9,43 ± 0,34	0,65 ± 0,037
Ala-Gln	10,88 ± 0,55	9,62 ± 0,33	0,70 ± 0,038
AKG	15,42 ± 0,93 *	10,52 ± 0,35 *	0,60 ± 0,026

\* p < 0,05

*Resistencia a la rotura ósea (W<sub>f</sub>), resistencia elástica máxima y momento de resistencia a la rotura de costillas*

La resistencia a la rotura ósea (W<sub>f</sub>) de las costillas de la 4<sup>a</sup> a la 9<sup>a</sup> fue la mayor en los lechones tratados con AKG y significativamente diferente de la del grupo control (tabla 10 y figura 10).

20 El momento de resistencia a la rotura fue significativamente mayor en el grupo de AKG en comparación con los valores tanto control como de Ala-Gln, lo que se muestra en la figura 12 así como en la tabla 10.

La resistencia elástica máxima (W<sub>y</sub>) fue significativamente mayor en el grupo de AKG en comparación con el grupo control (tabla 10).

25 El área de la sección transversal (A) de las costillas (de la 4<sup>a</sup> a la 9<sup>a</sup>) de lechones control y experimentales a la edad de 35 días de vida posnatal se muestra en la figura 9, en la que los animales tratados con AKG mostraron el mayor cambio en el área con una p < 0,05.

**Tabla 10.** Resistencia a la rotura ósea (W<sub>f</sub>), momento de resistencia a la rotura y resistencia elástica máxima ósea (W<sub>y</sub>) de las costillas 4<sup>a</sup> a 9<sup>a</sup> de lechones a la edad de 35 días de vida posnatal

	Resistencia a la rotura (W <sub>f</sub> ) [N] (costillas 4-9) Media ± EEM	Momento de resistencia a la rotura [N] costillas (4-9) Media ± EEM	Resistencia elástica máxima ósea (W <sub>y</sub> )[N] (costillas 4-9) Media ± EEM
Control	463,1 ± 23,5	612,86 ± 32,37	423,6 ± 18,97
Ala-Gln	450,2 ± 22,1	625,24 ± 1,5 ∇	442,9 ± 15,32
AKG	585,1 ± 18,5*	737,445 ± 23,85*	522,5 ± 17,97*

p < 0,05

*Carga de deformación permanente*

Se midió la carga de deformación permanente de la 5ª costilla y los resultados para lechones de 35 días de edad de grupos control y experimentales se facilitan en la figura 11, que muestra un aumento significativo en el grupo tratado con AKG. Por tanto, los huesos son más resistentes.

5 Ejemplo 2 El efecto de AKG sobre la mineralización del cúbito, propiedades mecánicas y geométricas tras fractura y neurectomía del nervio radial y mediano-cubital en el pavo

*Objetivo*

El objetivo de este ejemplo es estudiar los efectos de AKG sobre las propiedades mecánicas y geométricas de huesos y la formación de callo y la influencia del sistema nervioso sobre el crecimiento óseo basándose en el análisis de hueso de ala de pavo (cúbito).

10 *Mantenimiento de animales*

Se mantuvieron los pavos en jaulas comunes, 10 pavos/jaula. Los pavos tienen libre acceso a agua y se alimentan a voluntad.

*Diseño experimental*

15 Se dividió un total de 160 pavos a la edad de 6 semanas en cuatro grupos experimentales, cada uno con un tratamiento diferente según la tabla 11.

**Tabla 11** Diseño experimental

Grupo A	Derecha	Sometido a neurectomía – derecha n. radial, mediano-cubital	PhS <sup>a</sup>
	Izquierda	Fractura del cúbito	AKG
Grupo B	Derecha <sup>b</sup>	Control intacto	PhS
	Izquierda <sup>b</sup>	Fractura del cúbito	AKG
Grupo C	Derecha	Sometido a neurectomía – derecha n. radial, mediano-cubital	PhS
	Izquierda	Control intacto	AKG
Grupo D	Derecha	Operado de forma simulada	PhS
	Izquierda	Control intacto	AKG

<sup>a</sup> PhS, solución salina fisiológica

<sup>b</sup> Ala izquierda y derecha

*Rendimiento experimental*

20 Durante la cirugía con anestesia general, se rompe el cúbito y opcionalmente se denerva. El primer día tras la operación se administra por vía oral solución salina, AKG o Ala-Gln a una dosis de 0,8 g/kg de peso corporal en 2 ml.

Tras el periodo experimental, los pavos se pesarán y sacrificarán con el fin de medir la densidad mineral ósea (DMO).

25 Se analizó la densidad mineral ósea (DMO) mediante DEXA (*dual energy X-ray absorptiometry*, absorciometría de rayos X de doble energía) usando el aparato LUNAR. Se realiza el método según Hansen *et al.* en "Dual-energy x-ray absorptiometry: a precise method of measuring bone mineral density in the lumbar spine (J. Nucl. Med. (1990) 31: 1156-1162), incorporado al presente documento como referencia.

*Resultados*

30 En la figura 13, se muestra la DMO del cúbito para el ala derecha experimental de los pavos del grupo A, y el control de ala izquierda. El tratamiento con AKG en el grupo control de ala izquierda proporciona una diferencia del 25% ( $p < 0,01$ ) en comparación con los pavos tratados con solución salina, en la DMO. En el grupo experimental de ala derecha, el efecto de AKG es de aproximadamente el 11% ( $p < 0,055$ ) en comparación con los pavos tratados con solución salina.

35 En la figura 14, se muestra DMO - Vi (índice volumétrico) en el cúbito para el ala derecha experimental de los pavos

del grupo A, y el control de ala izquierda. El tratamiento con AKG en el grupo control (ala izquierda) proporciona una diferencia del 14,8% ( $p < 0,01$ ) en comparación con los pavos tratados con solución salina en la DMO. En la experimental (ala derecha) del grupo, el efecto de AKG es de aproximadamente el 35,7% ( $p < 0,01$ ) en comparación con los pavos tratados con solución salina.

5 *Conclusiones*

Los resultados muestran la influencia de AKG sobre el proceso de mineralización ósea del cúbito cuando se administra al pavo. Además, permanece el efecto de AKG tras la denervación del cúbito.

Ejemplo 3 El efecto de AKG sobre la mineralización ósea en ratas hembra osteopénicas

*Objetivo*

10 El objetivo de este ejemplo es estudiar el efecto de AKG tras la pérdida ósea posmenopáusica en ratas. Se usan ratas sometidas a ovariectomía como modelo animal preclínico para osteoporosis posmenopáusica humana, tal como recomienda la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE.UU. (FDA).

*Animales y su mantenimiento*

Se usan 60 ratas Wistar hembra a la edad de 2 meses y con un peso corporal inicial de 200 g.

15 Se mantienen los animales en condiciones controladas de razón de luz/oscuridad de 12/12 h a  $22^{\circ}\text{C} \pm 2$  y a una humedad del  $55\% \pm 2$  con libre acceso a alimento y agua.

*Diseño experimental*

Se dividen las ratas en tres grupos ( $n=20$ ), en los que el grupo 1 se opera de manera simulada, el grupo 2 se somete a ovariectomía y el grupo 3 está intacto, es decir no se opera en absoluto.

20 *Rendimiento experimental*

El día de la cirugía, se anestesian todas las ratas con una inyección intramuscular de ketamina y xilalina.

Se operan de manera simulada (SHO) 20 de las ratas, donde se exteriorizan los ovarios y se vuelven a colocar de forma intacta.

Se somete el segundo grupo de ratas sometidas a ovariectomía (OVX) a ovariectomía desde un enfoque dorsal.

25 Seis meses tras la ovariectomía, se dividen los animales de los grupos 1 y 2, en dos subgrupos adicionales; un grupo de placebo y uno experimental.

El contenido de placebo y agua potable experimental se muestra en la tabla 12.

**Tabla 12** Contenido de placebo y agua potable experimental

Componentes de la bebida <sup>c</sup>	Bebida placebo <sup>a</sup>	Bebida experimental <sup>b</sup>
AKG	-	146 g
Glucosa	300 g	300 g
Sacarosa	150 g	150 g
NaOH	36 g	36 g
KOH	7,5 g	7,5 g
Ca(OH)2	4,6 g	4,6 g
Mg(OH)2	1,8 g	1,8 g
HCl	75 ml	-

<sup>a</sup> sin AKG

<sup>b</sup> con AKG

<sup>c</sup> se disuelven todos los componentes en 10 l de agua destilada, pH 4,6

30 Tras 60 días con agua potable placebo y experimental, se anestesian las ratas en CO<sub>2</sub> y se aísla el fémur para análisis adicional de la densidad mineral ósea.

*Resultados*

35 La figura 15 muestra la densidad mineral ósea en ratas intactas (INT), operadas SHO y operadas OVX alimentadas con o sin AKG usando el agua potable descrita en la tabla 12. En los tres grupos experimentales (INT, SHO, OVX), los animales tratados con AKG muestran una mayor DMO tras el tratamiento con AKG con una diferencia de aproximadamente el 10% entre las ratas tratadas con AKG y las ratas tratadas con placebo tratado ( $p < 0,01$  en todos los grupos).

*Conclusiones*

AKG tiene un efecto sobre las ratas sometidas a ovariectomía y aumenta la DMO en un grado similar que en ratones intactos u operados de manera simulada.

Ejemplo 4 El efecto de AKG sobre el crecimiento y la mineralización ósea

5 *Objetivo*

El objetivo de este ejemplo es estudiar el efecto de AKG sobre el crecimiento y la mineralización ósea del sistema esquelético durante la vida posnatal del cerdo.

*Animales y su mantenimiento*

Como en el ejemplo 1.

10 *Diseño experimental*

Como en el ejemplo 1.

*Rendimiento experimental*

15 Se analizó la densidad mineral ósea (DMO) mediante DEXA (absorciometría de rayos X de doble energía) usando el aparato LUNAR. Se realiza el método según Hansen *et al.* en "Dual-energy x-ray absorptiometry: a precise method of measuring bone mineral density in the lumbar spine (J. Nucl. Med. (1990) 31: 1156-1162), incorporado al presente documento como referencia.

Se midieron 17-beta-estradiol y calcitonina usando RIA (radioinmunoanálisis) usando kits disponibles comercialmente de Orion (Finlandia), y Diagnostic Systems Laboratories (Webster, TX, EE.UU.) respectivamente.

*Resultados*

20 La figura 16 muestra el efecto de la administración oral de AKG sobre la ganancia de peso corporal entre el AKG tratado y Ala-Gln tratado grupos durante los primeros 47 días de vida posnatal. El grupo control no se muestra, pero es siempre menor que los grupos tratados con Ala-Gln en los diferentes puntos de tiempo medidos. En el día tres, la diferencia es de aproximadamente 96 g, en el día 14 de aproximadamente 690 g, en el día 21 de aproximadamente 419 g y en el día 35 de aproximadamente 313 g. Los valores absolutos del peso corporal en g se muestran debajo de las barras.

25 La figura 17 muestra la densidad mineral ósea (DMO) del fémur derecho en la metafisis proximal y distal a los 21 días de vida posnatal.

La figura 18 muestra la densidad mineral ósea (DMO) del fémur derecho en la metafisis proximal y distal a los 35 días de vida posnatal.

30 La figura 19 muestra el efecto de la administración de AKG sobre el nivel de 17-β-estradiol en plasma sanguíneo de lechones medido tras 3 días, 28 días, 35 días, 56 días y 70 días. Los valores absolutos de 17-β-estradiol en pg/ml se muestran debajo de cada barra.

35 La figura 20 muestra el efecto de la administración de AKG sobre el nivel de osteocalcina en plasma sanguíneo de lechones medido tras 3 días, 28 días, 35 días, 56 días y 70 días. Los valores absolutos de osteocalcina en ng/ml se muestran debajo de cada barra.

La figura 21 muestra el efecto de la administración de Ala-Gln sobre el nivel de 17-β-estradiol en plasma sanguíneo de lechones medido tras 3 días, 28 días, 35 días, 56 días y 70 días. Los valores absolutos de 17-β-estradiol en pg/ml se muestran debajo de cada barra.

40 La figura 22 muestra el efecto de la administración de Ala-Gln sobre el nivel de osteocalcina en plasma sanguíneo de lechones medido tras 3 días, 28 días, 35 días, 56 días y 70 días. Los valores absolutos de osteocalcina en ng/ml se muestran debajo de cada barra.

*Conclusiones*

El peso corporal de los lechones que recibían AKG fue más drástico ( $p > 0,01$  en comparación con Ala-Gln), que el del grupo control así como el del grupo que recibía Ala-Gln.

45 Además, la mineralización ósea en lechones que recibían AKG fue mayor que en lechones que recibían placebo.

17-β-estradiol y osteocalcina es una medida de la maduración y la formación ósea.

Ejemplo 5 El efecto de AKG sobre la mineralización ósea en seres humanos

*Objetivo*

El objetivo de este ejemplo es estudiar el efecto de AKG sobre la mineralización ósea del sistema esquelético en mujeres posmenopáusicas con disminución de la densidad mineral ósea (osteopenia).

5 *Grupo de estudio de mujeres posmenopáusicas*

64 mujeres posmenopáusicas con una edad comprendida entre 45-60 años con disminución de la densidad mineral ósea (osteopenia).

*Diseño experimental*

10 El grupo de estudio se aleatoriza en un grupo doble ciego, paralelo. Las pacientes se aleatorizan a dos grupos en los que en A) se administra AKG + Ca y en B) se administra placebo + Ca tal como se muestra en la tabla 13.

Se administran comprimidos cada 24 semanas y la dosis es estable durante el tiempo del estudio, es decir 6 g de AKG + 1,68 g de Ca diariamente o placebo + 1,68 g de Ca diariamente.

15 Todas las pacientes tomarán comprimidos masticables tres veces al día; durante el desayuno, el almuerzo y la cena, en los que cada comprimido comprende 1 g de AKG + 0,28 g de Ca o placebo + 0,28 g de Ca. Los comprimidos deben masticarse y tomarse justo antes de la ingesta de la comida.

Tabla 13

Grupo de estudio	Dosificación de fármaco diaria (cantidad)
A	AKG (6 g) + Ca (1,68 g) <sup>a</sup>
B	Placebo + Ca (1,68 g) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Vehículo: almidón de maíz y celulosa microcristalina

*Resultados*

20 Se usan los niveles séricos de osteocalcina y CTX como marcadores del recambio óseo medidos mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). La densidad mineral ósea se mide mediante la técnica de absorciometría de rayos X de doble energía (DEXA, DPX, LUNAR Corp., EE.UU.) en columna vertebral lumbar.

El diseño experimental expuesto anteriormente ha demostrado en el presente documento ser satisfactorio en seres humanos.

25



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de derivado(s), metabolito(s) o análogo(s) de glutamato, o mezclas de los mismos, para la fabricación de una composición para la prevención, el alivio o el tratamiento de osteoporosis, en el que el/los derivado(s), metabolito(s) o análogo(s) de glutamato se selecciona(n) del grupo que consiste en: alfa-cetoglutarato, mono y disales de metal de alfa-cetoglutarato, sales de aminoácido de alfa-cetoglutarato y Ala-Gln.
- 10 2. Uso de derivado(s), metabolito(s) o análogo(s) de glutamato, o mezclas de los mismos, para la fabricación de una composición para la prevención o reparación de fracturas óseas en un vertebrado, incluyendo mamífero y ave, que lo necesita, en el que el/los derivado(s), metabolito(s) o análogo(s) de glutamato se selecciona(n) del grupo que consiste en: alfa-cetoglutarato, mono y disales de metal de alfa-cetoglutarato, sales de aminoácido de alfa-cetoglutarato y Ala-Gln.
3. El uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que la composición es una composición farmacéutica con opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable y/o aditivos.
4. El uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que la composición es un alimento o un suplemento de pienso.
- 15 5. El uso según la reivindicación 4, en el que el alimento o suplemento de pienso es un suplemento dietético y/o un componente en forma de alimento sólido y/o bebida.
6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el/los derivado(s), metabolito(s) o análogo(s) de glutamato, o mezclas de los mismos, en la composición fabricada está en una cantidad terapéuticamente eficaz.
- 20 7. El uso según la reivindicación 6, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz es de 0,01-0,2 g/kg de peso corporal por dosis diaria.
8. Una composición que comprende un derivado, metabolito o análogo de glutamato seleccionado del grupo que consiste en: alfa-cetoglutarato, mono y disales de metal de alfa-cetoglutarato, sales de aminoácido de alfa-cetoglutarato y Ala-Gln, para su uso en la prevención, el alivio o el tratamiento de osteoporosis.
- 25 9. Una composición que comprende un derivado, metabolito o análogo de glutamato seleccionado del grupo que consiste en: alfa-cetoglutarato, mono y disales de metal de alfa-cetoglutarato, sales de aminoácido de alfa-cetoglutarato y Ala-Gln, para su uso en la prevención o reparación de fracturas óseas en un vertebrado.
- 30 10. La composición según la reivindicación 8 ó 9, para su uso según la reivindicación 8 ó 9, en la que la composición es una composición farmacéutica con opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable y/o aditivos.
11. La composición según la reivindicación 8 ó 9, para su uso según la reivindicación 8 ó 9, en la que la composición es un alimento o un suplemento de pienso.
- 35 12. La composición según la reivindicación 11, para su uso según la reivindicación 11, en la que el alimento o suplemento de pienso es un suplemento dietético y/o un componente en forma de alimento sólido y/o bebida.
13. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 8-12, para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en la que el/los derivado(s), metabolito(s) o análogo(s) de glutamato, o mezclas de los mismos, en la composición está en una cantidad terapéuticamente eficaz.
- 40 14. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 8-13, para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 8-13, en la que el derivado, metabolito o análogo de glutamato va a administrarse a 0,01-0,2 g/kg de peso corporal por dosis diaria.

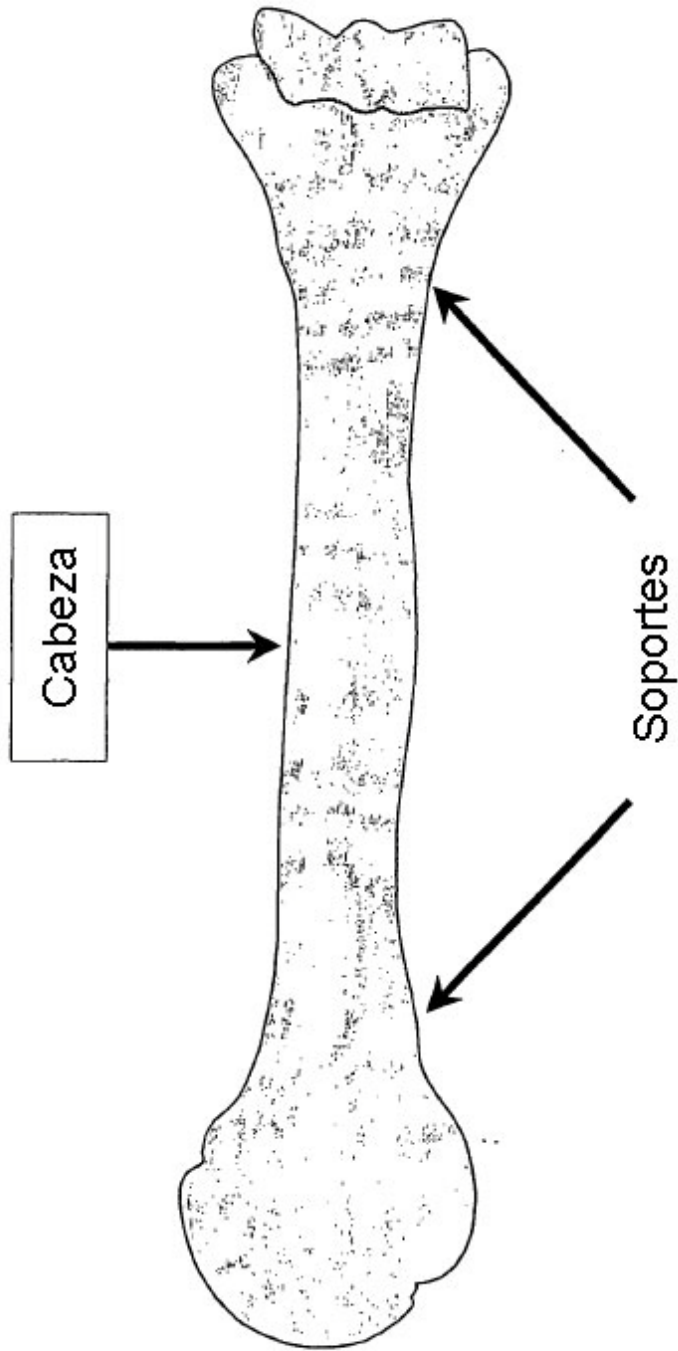


Figura 1 (22)

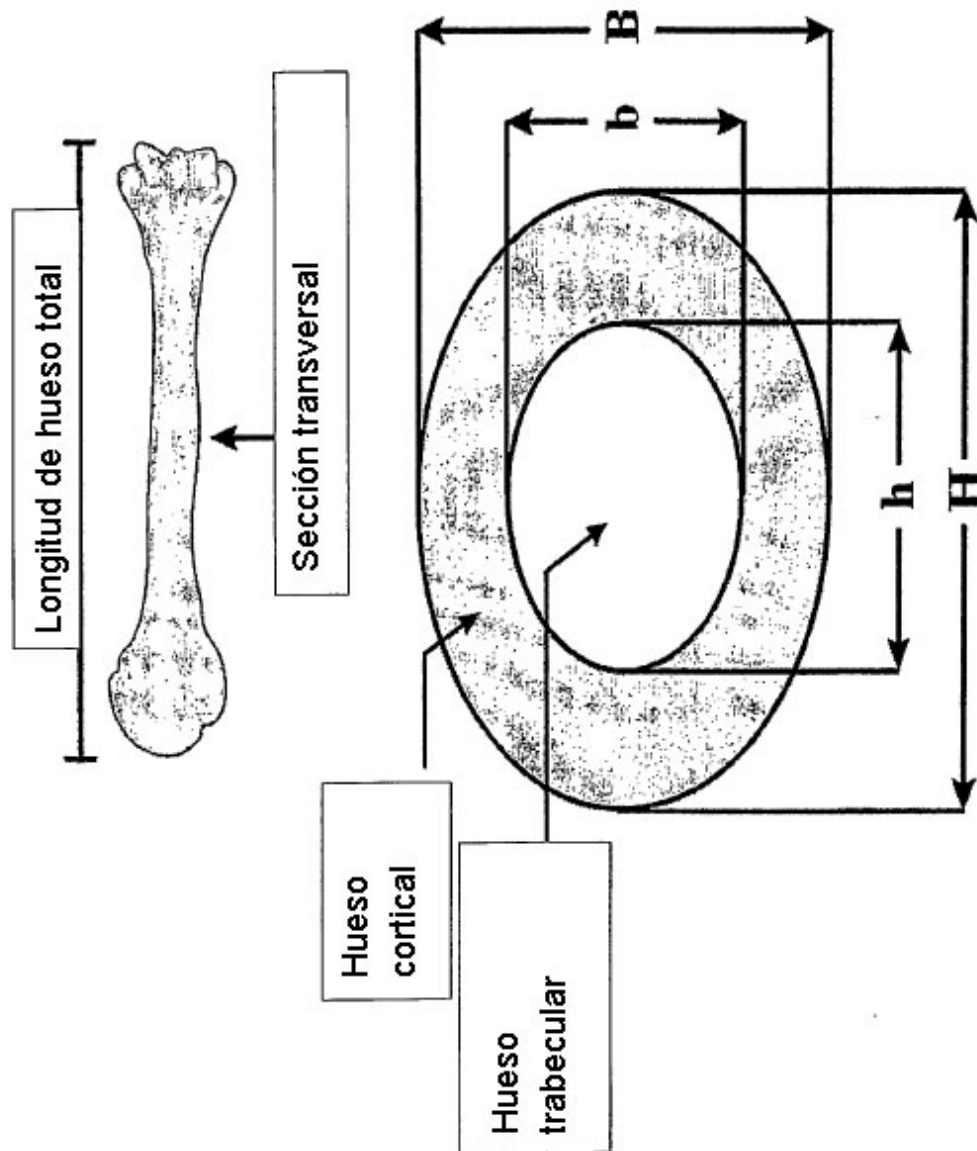


Figura 2 (22)

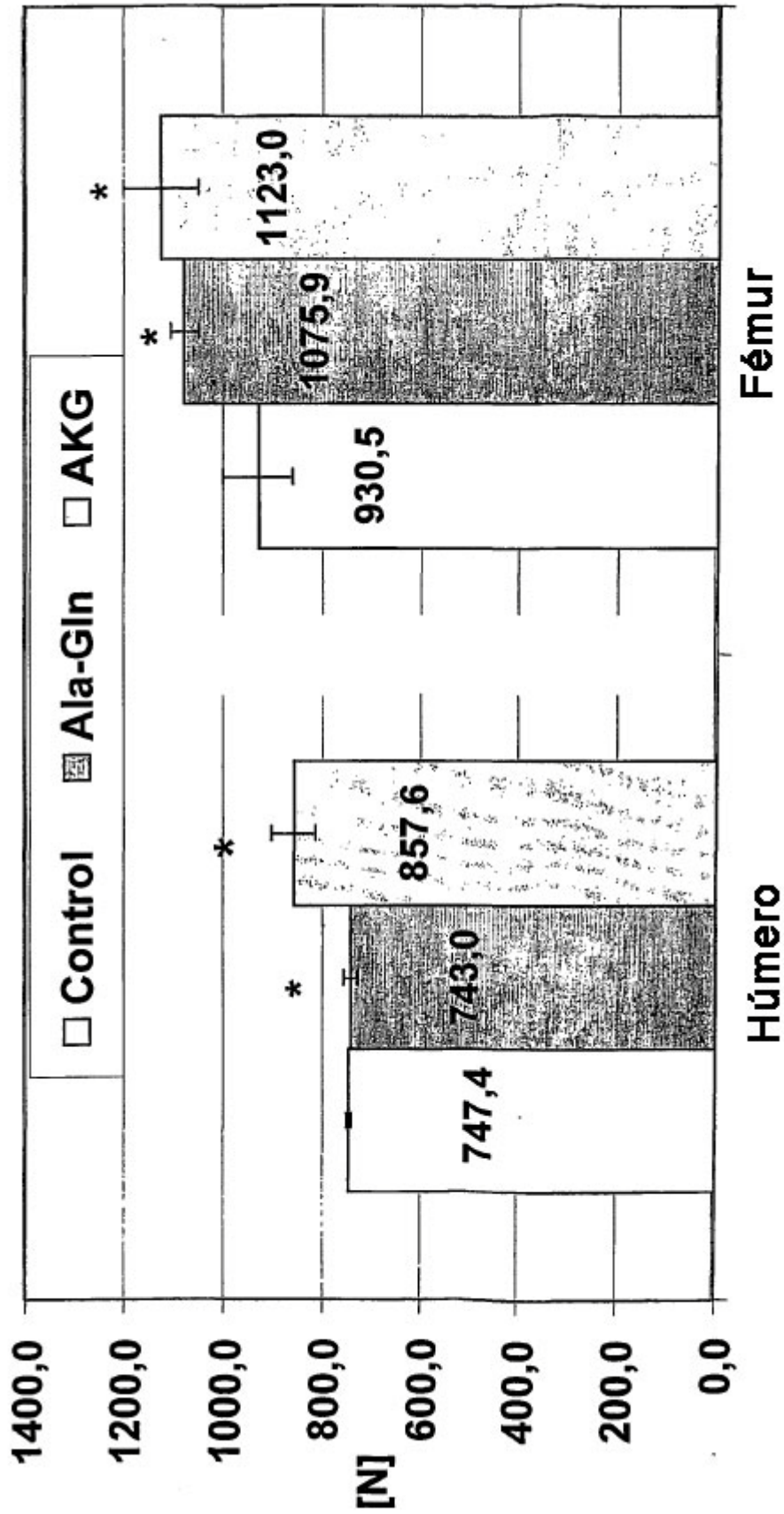


Figura 3 (22)

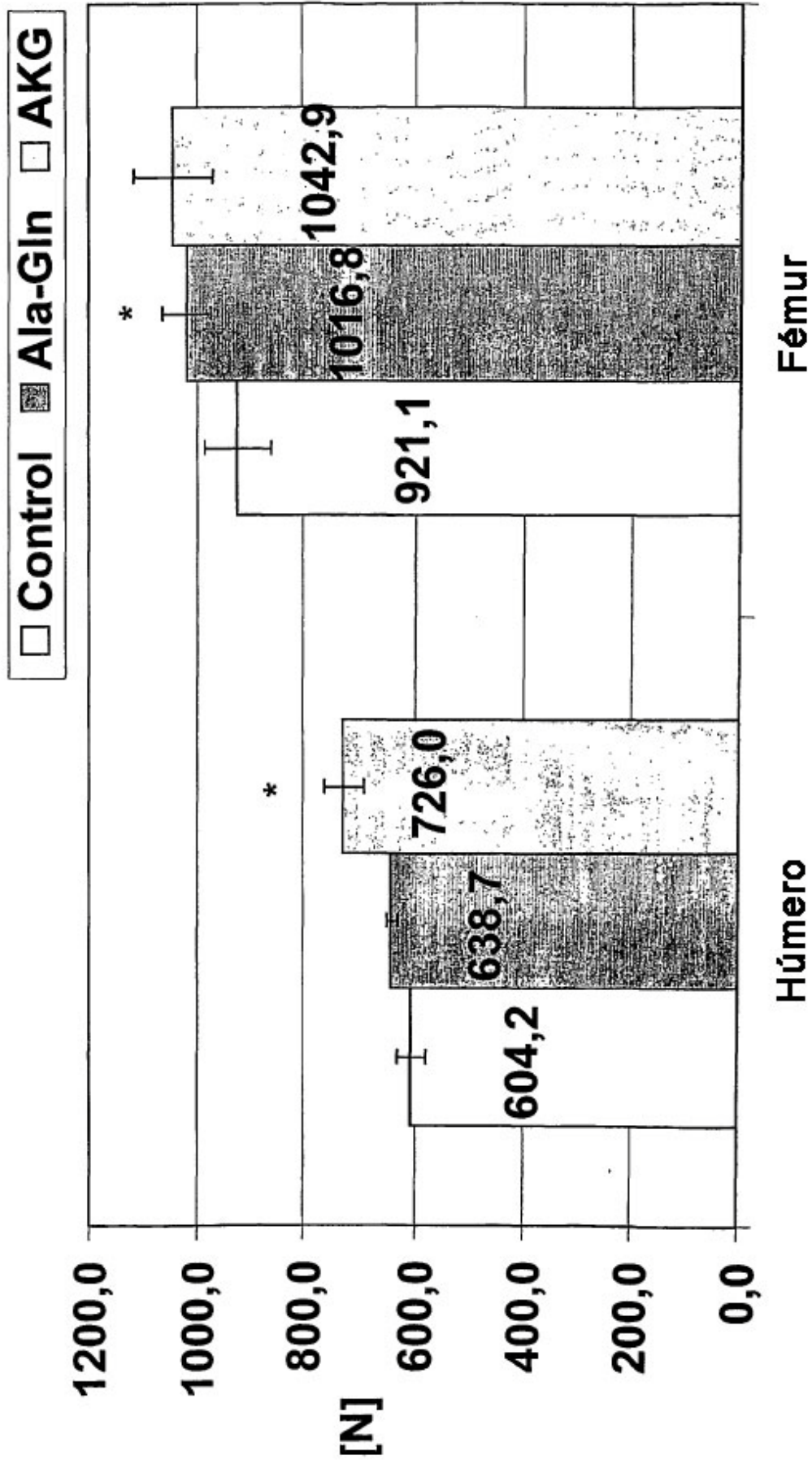


Figura 4 (22)

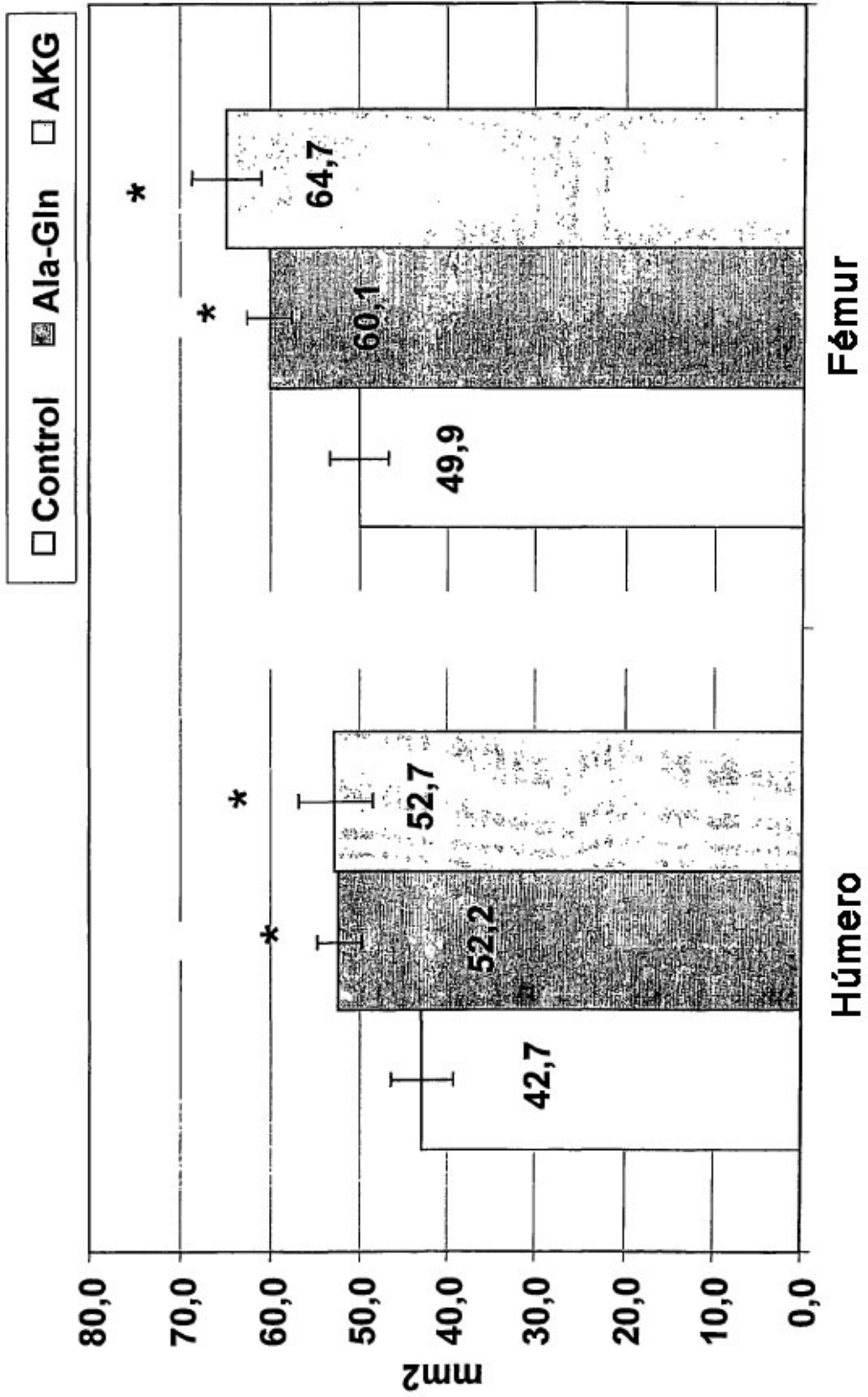


Figura 5 (22)



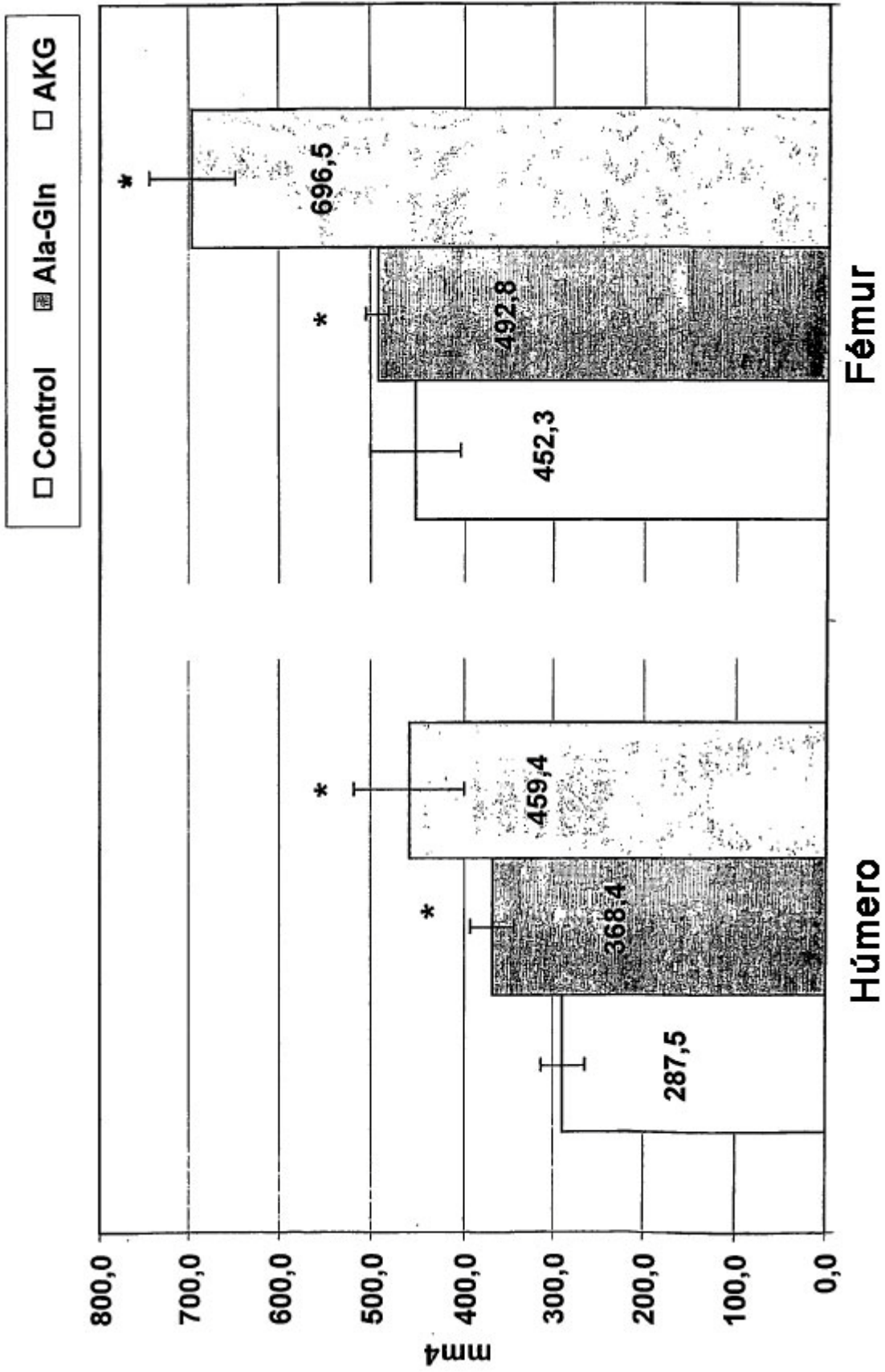


Figura 6 (22)

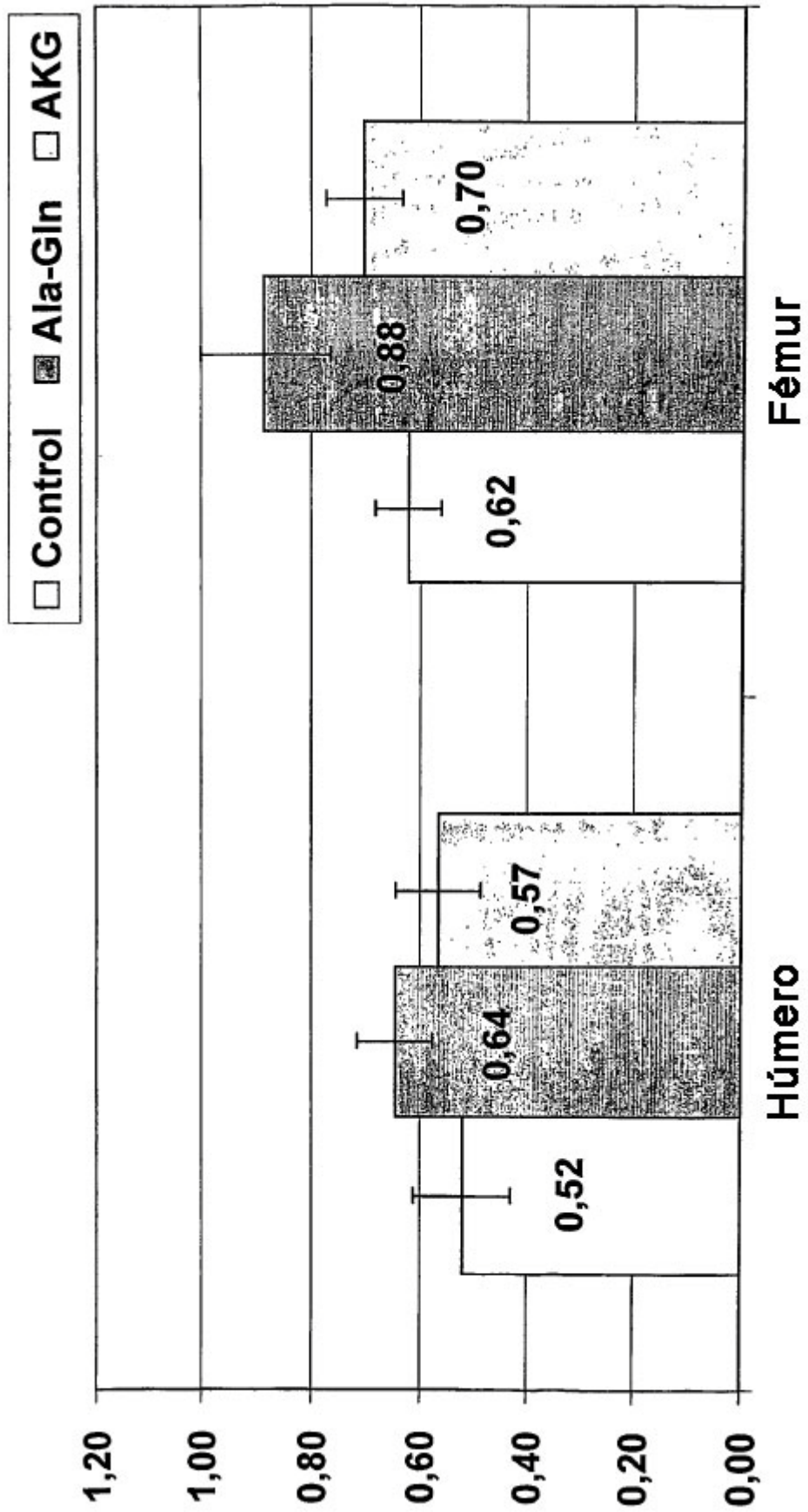


Figura 7 (22)



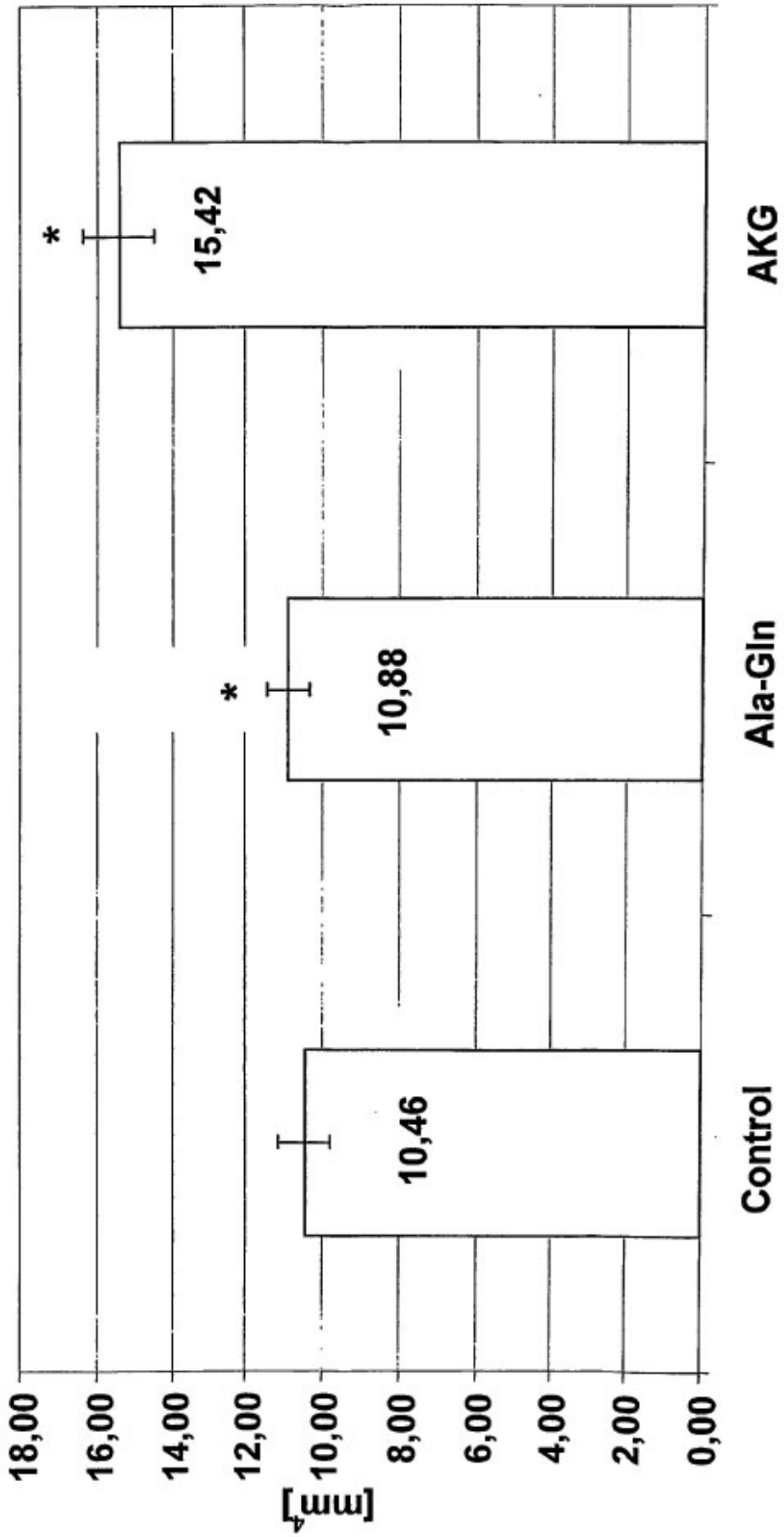


Figura 8 (22)

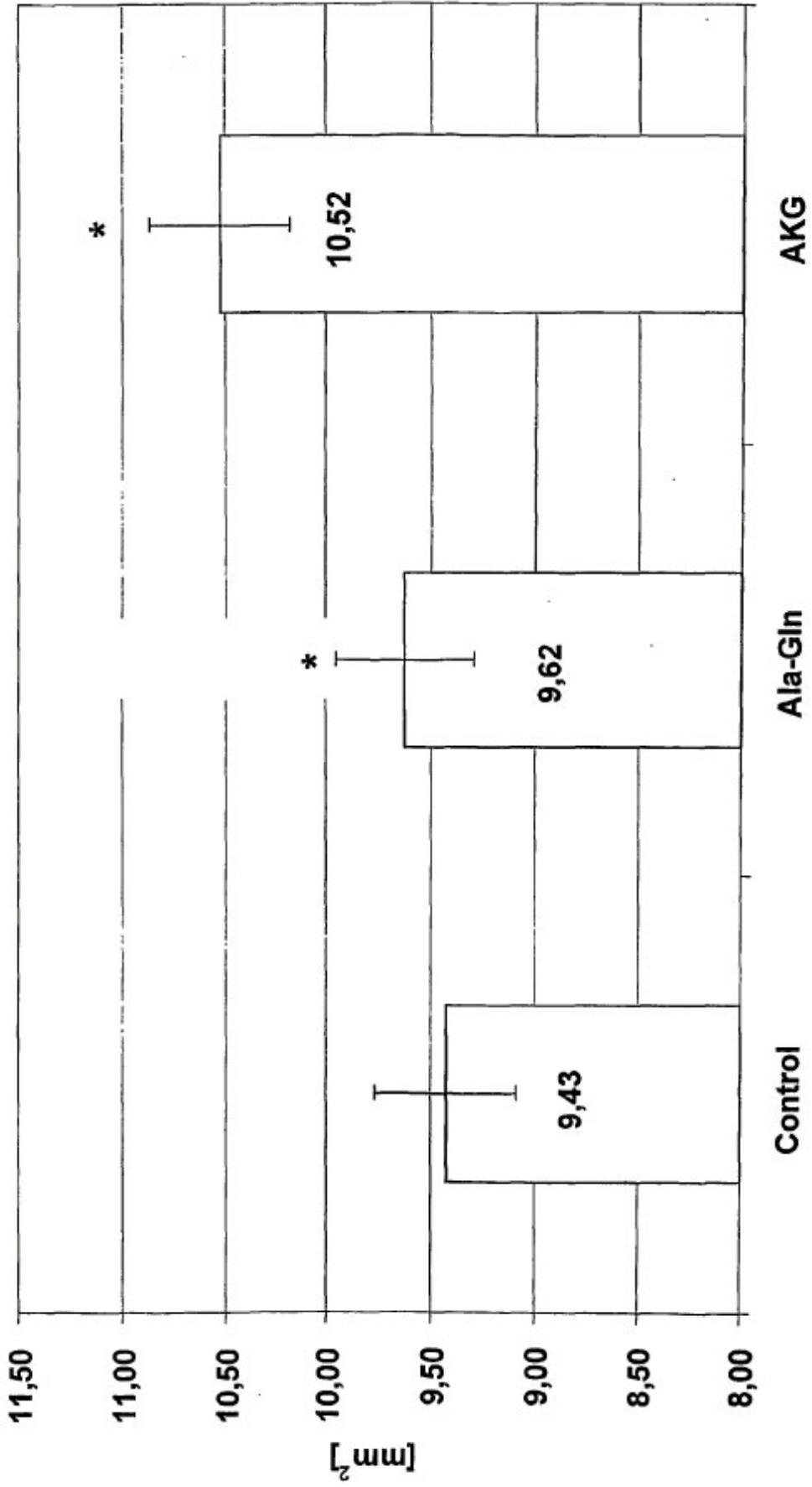


Figura 9 (22)

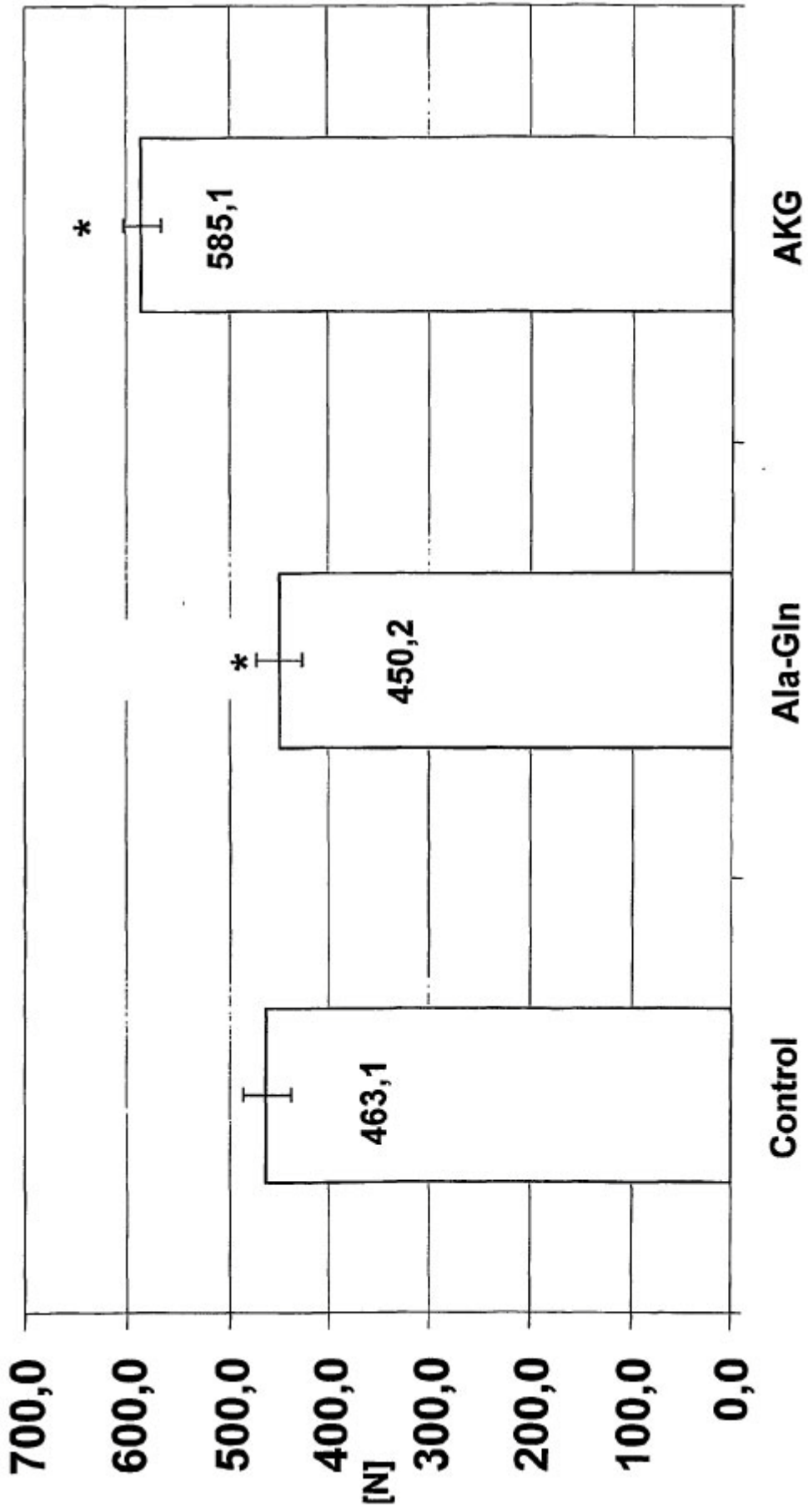


Figura 10 (22)

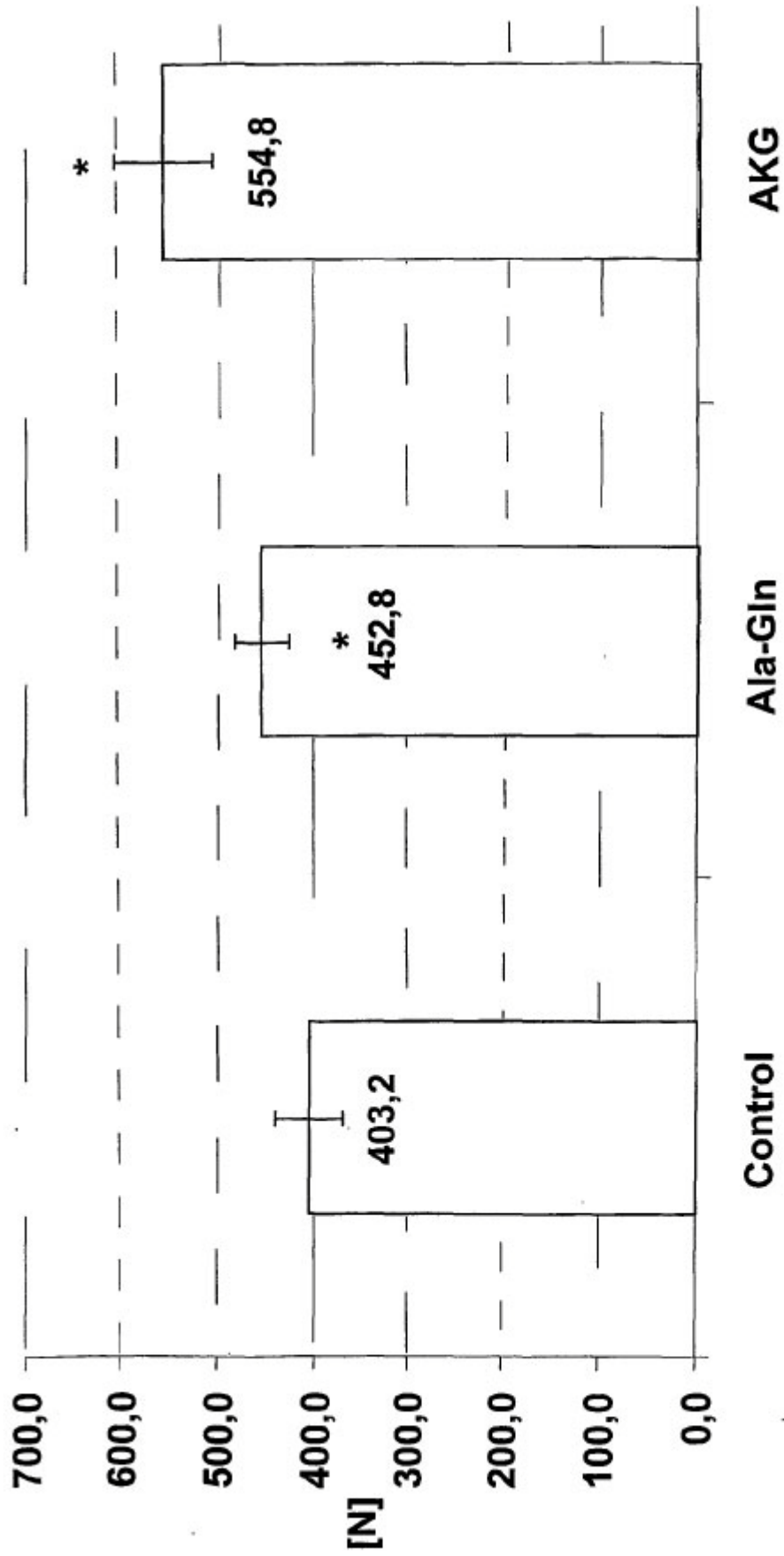


Figura 11 (22)

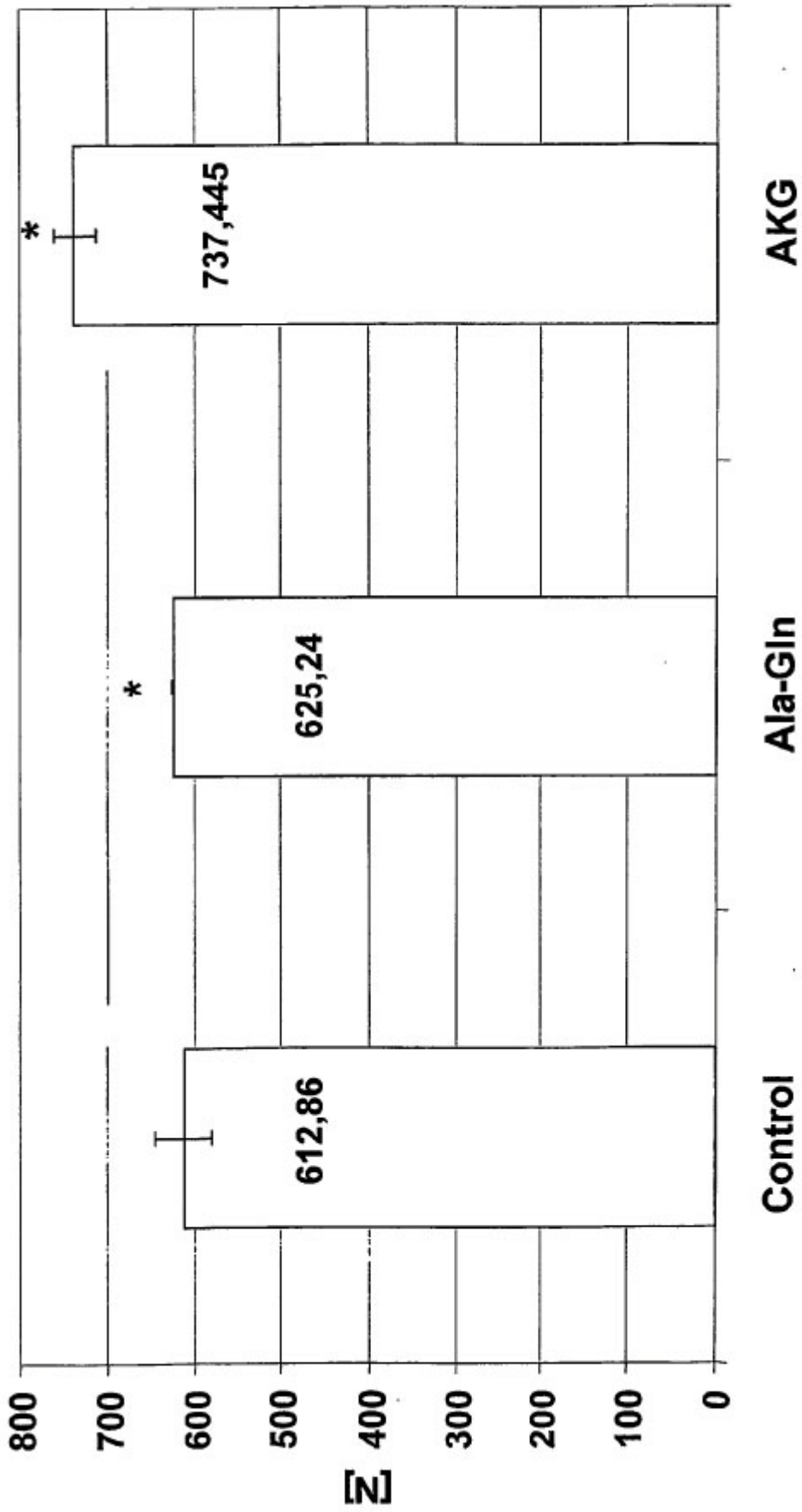


Figura 12 (22)

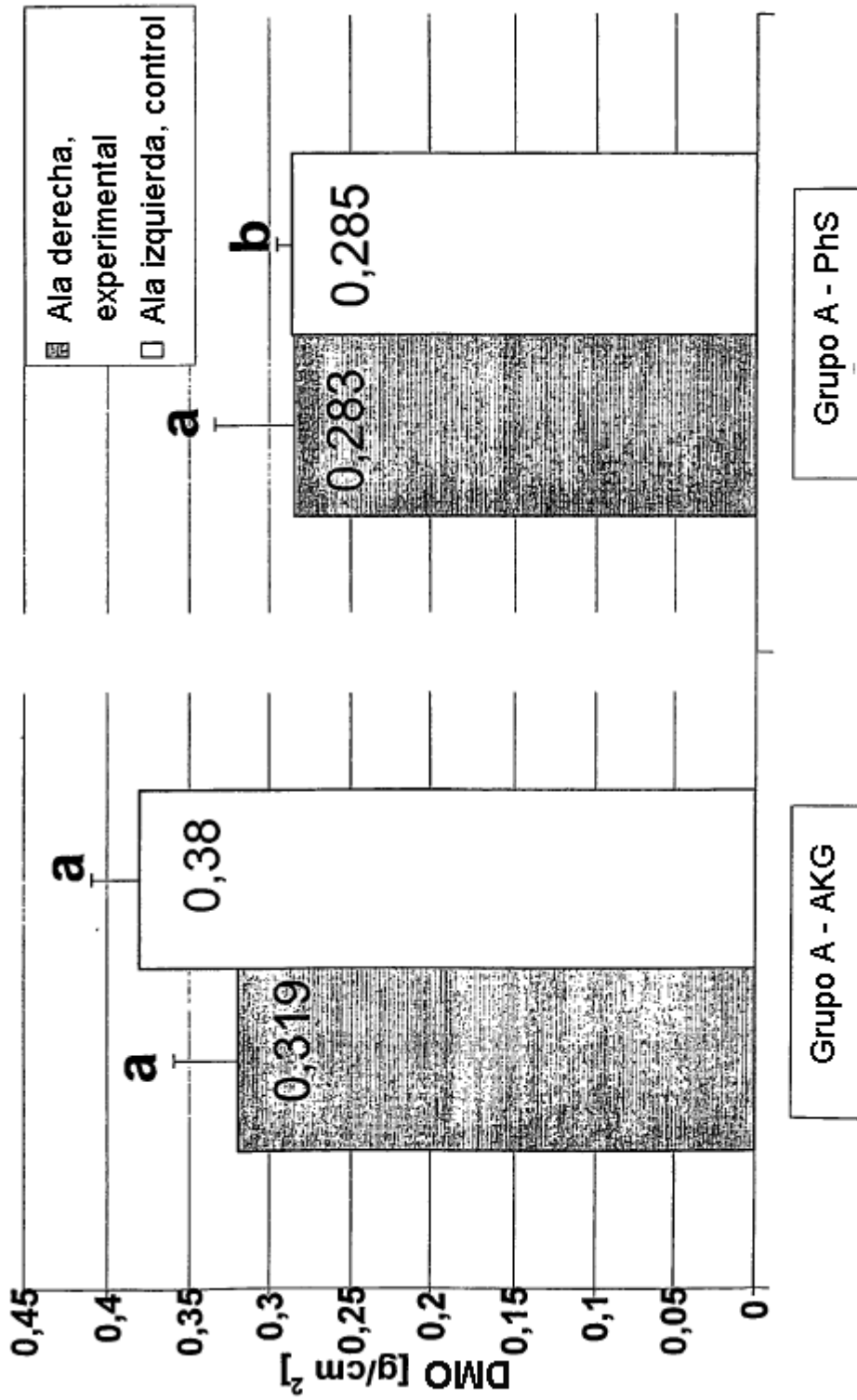


Figura 13 (22)

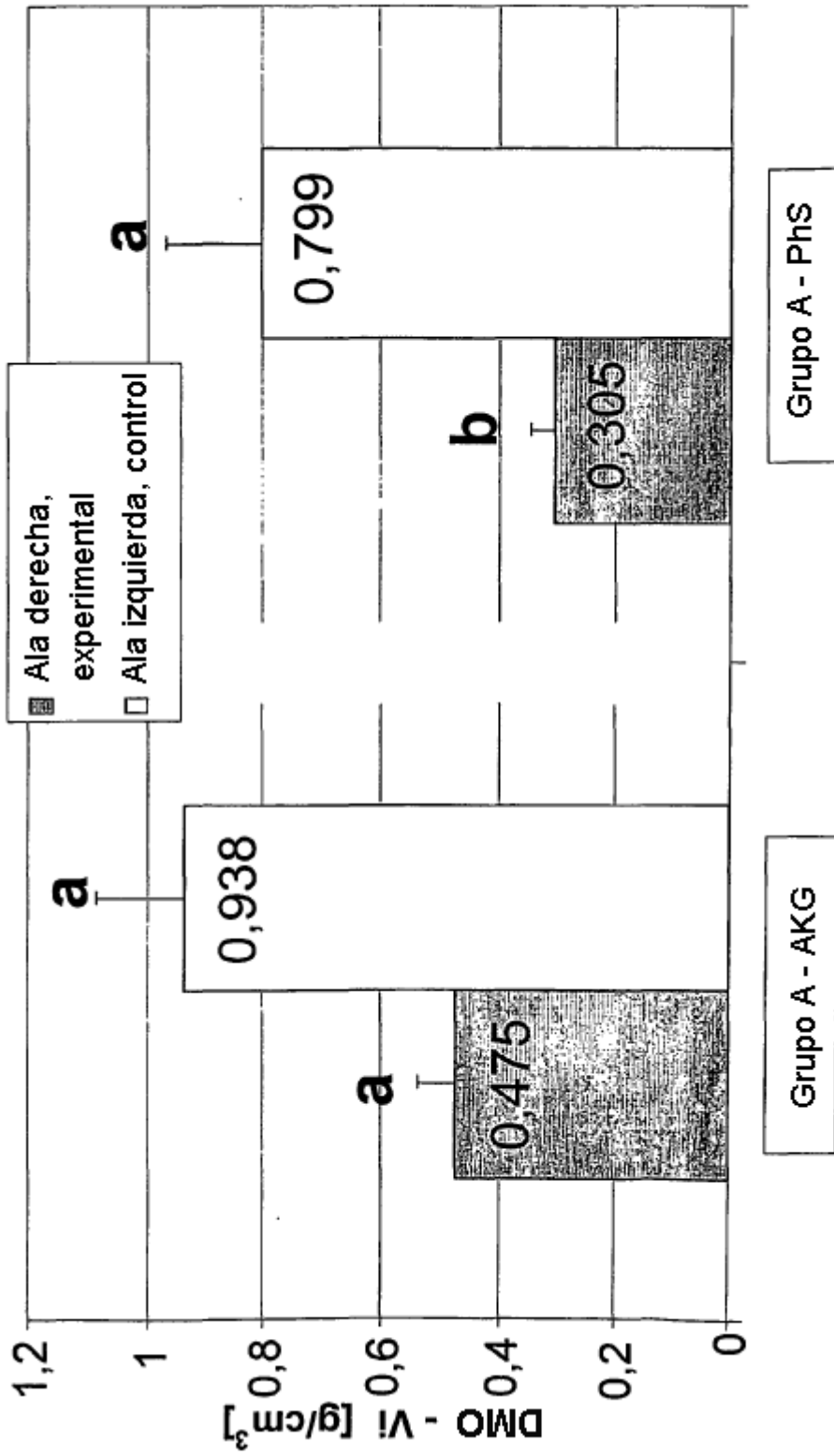


Figura 14 (22)

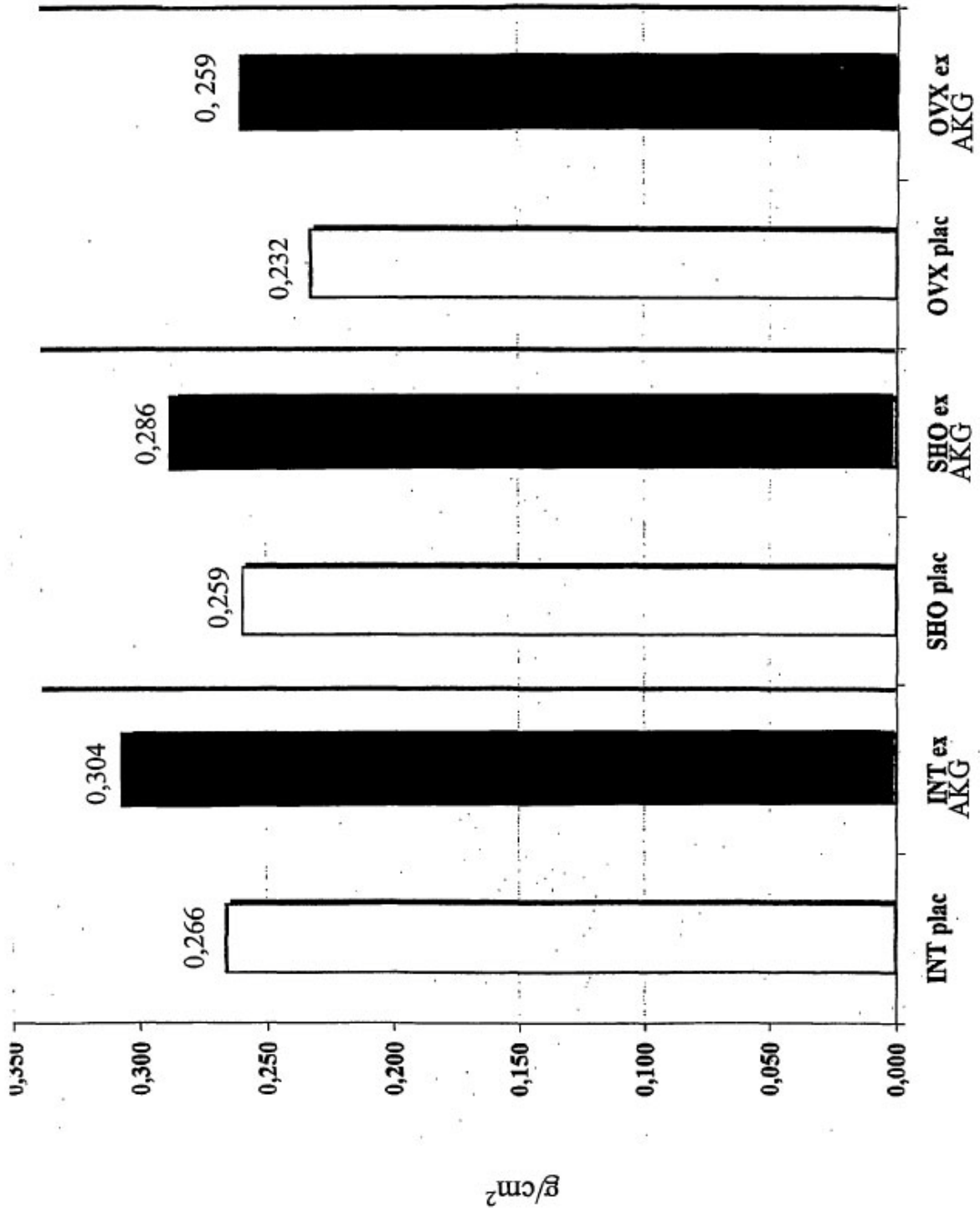


Figura 15 (22)



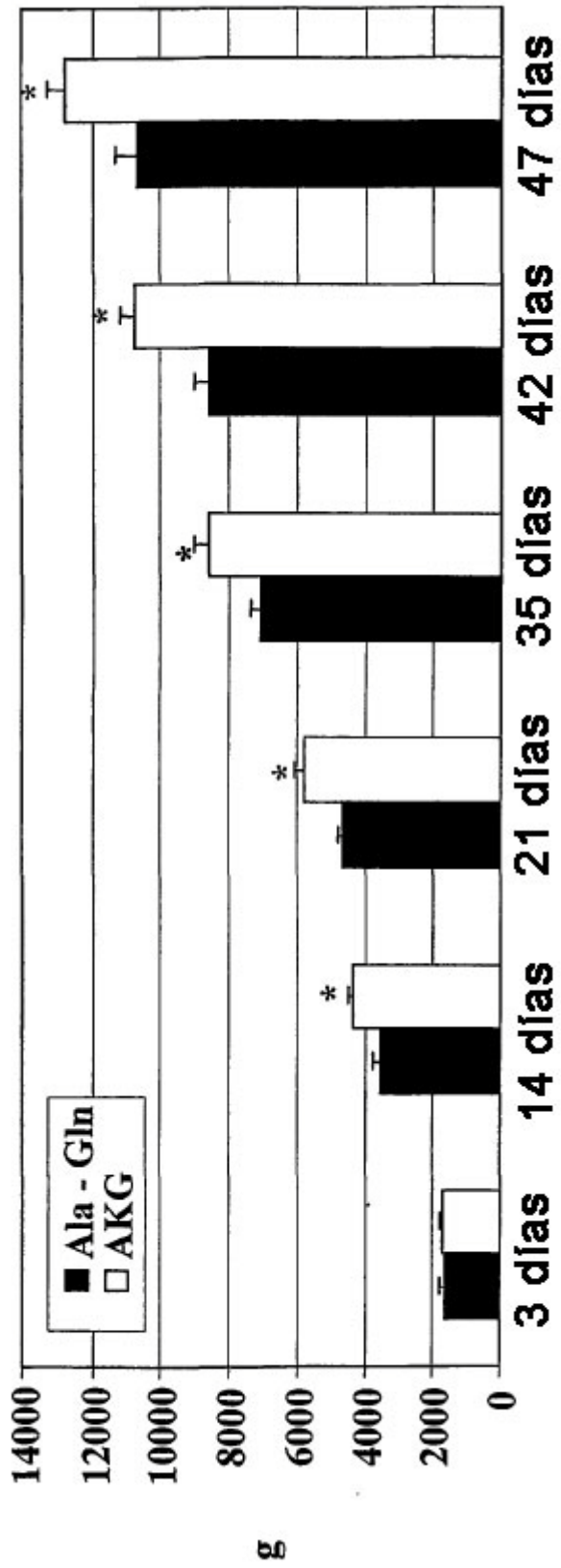


Figura 16 (22)

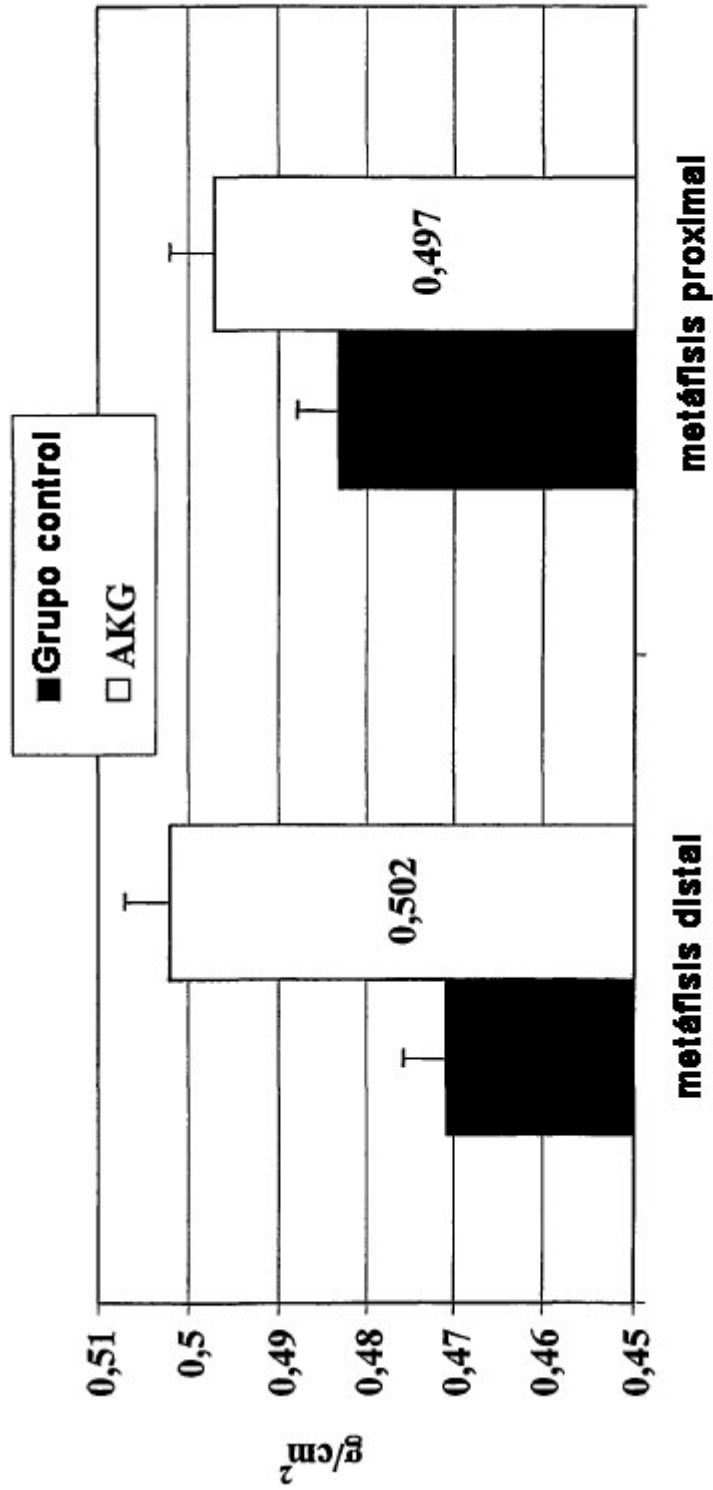


Figura 17 (22)

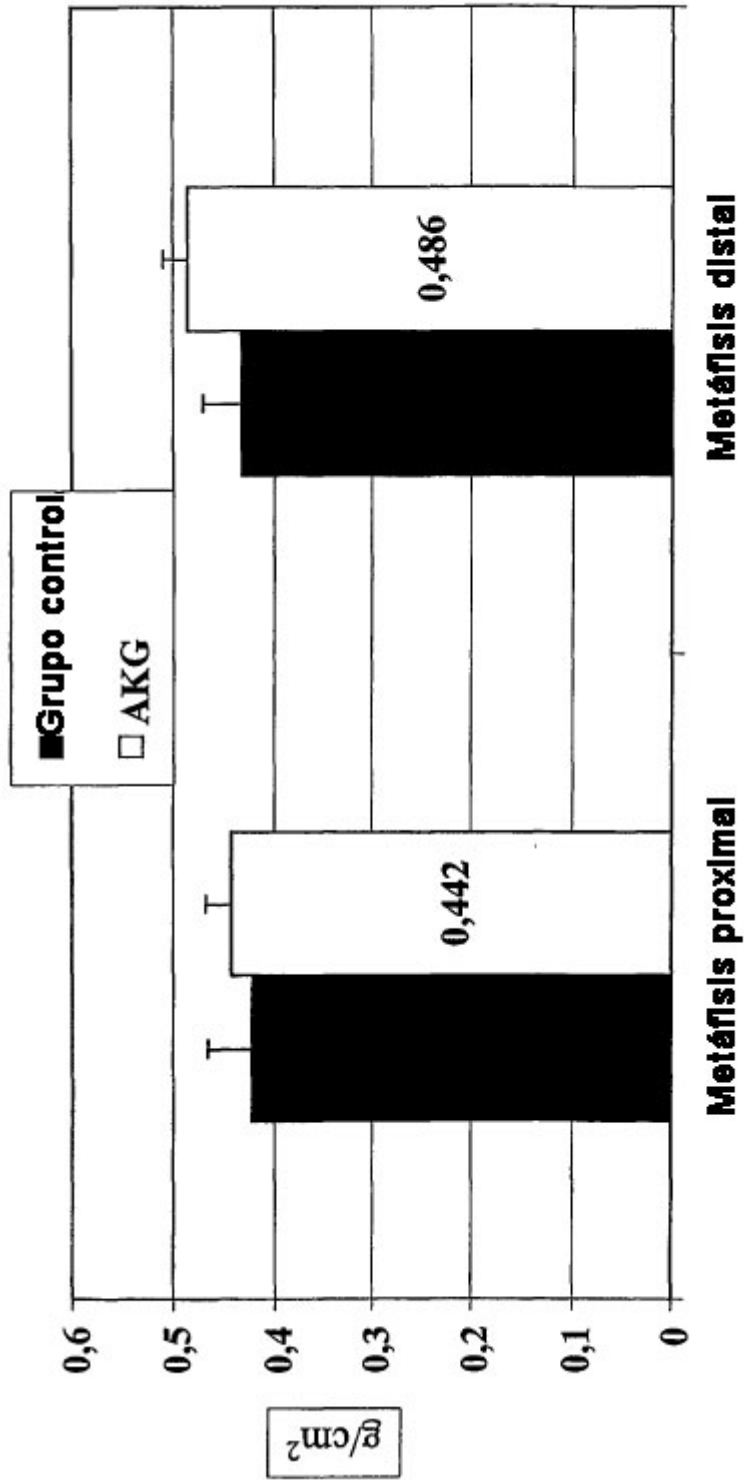


Figura 18 (22)

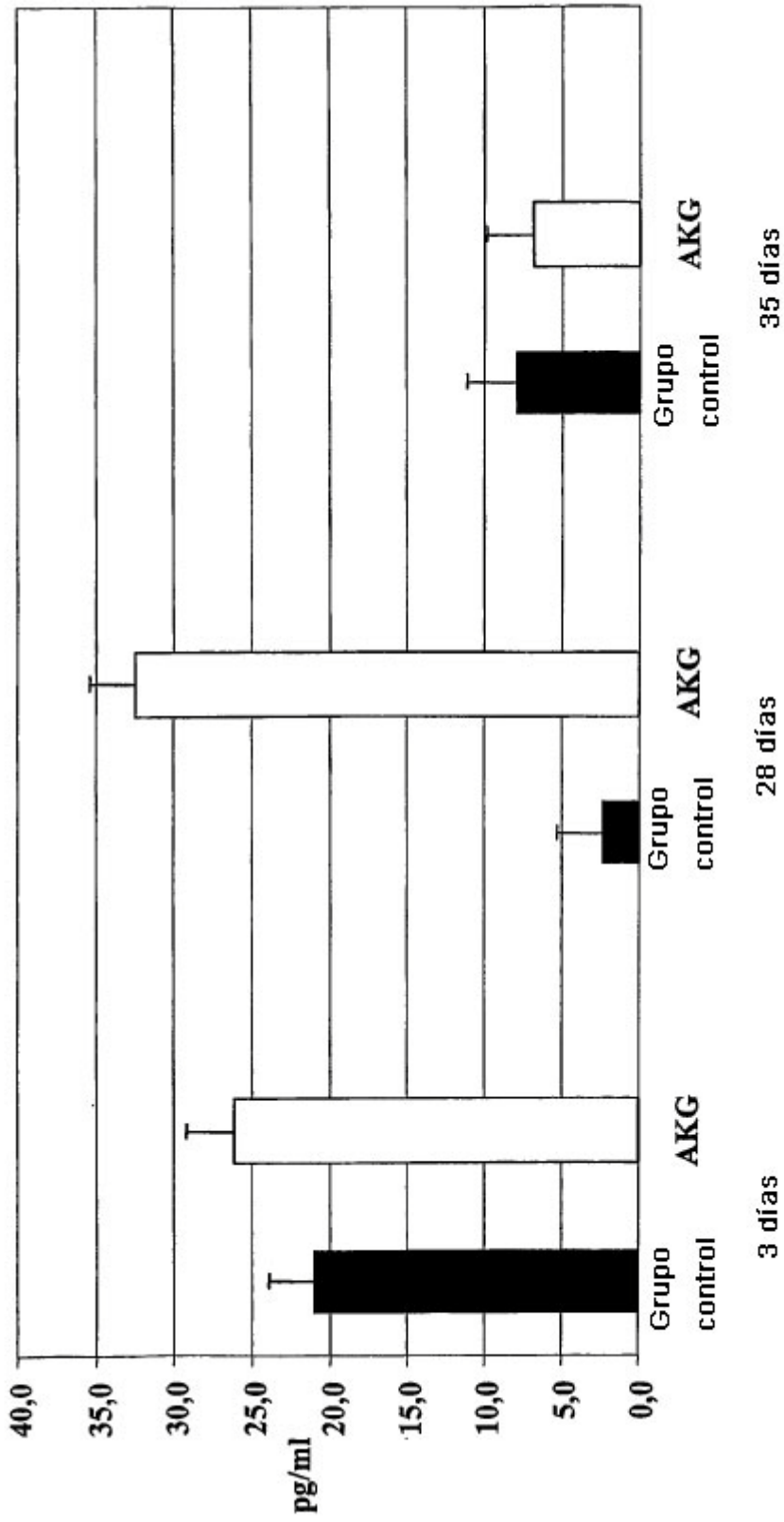


Figura 19 (22)

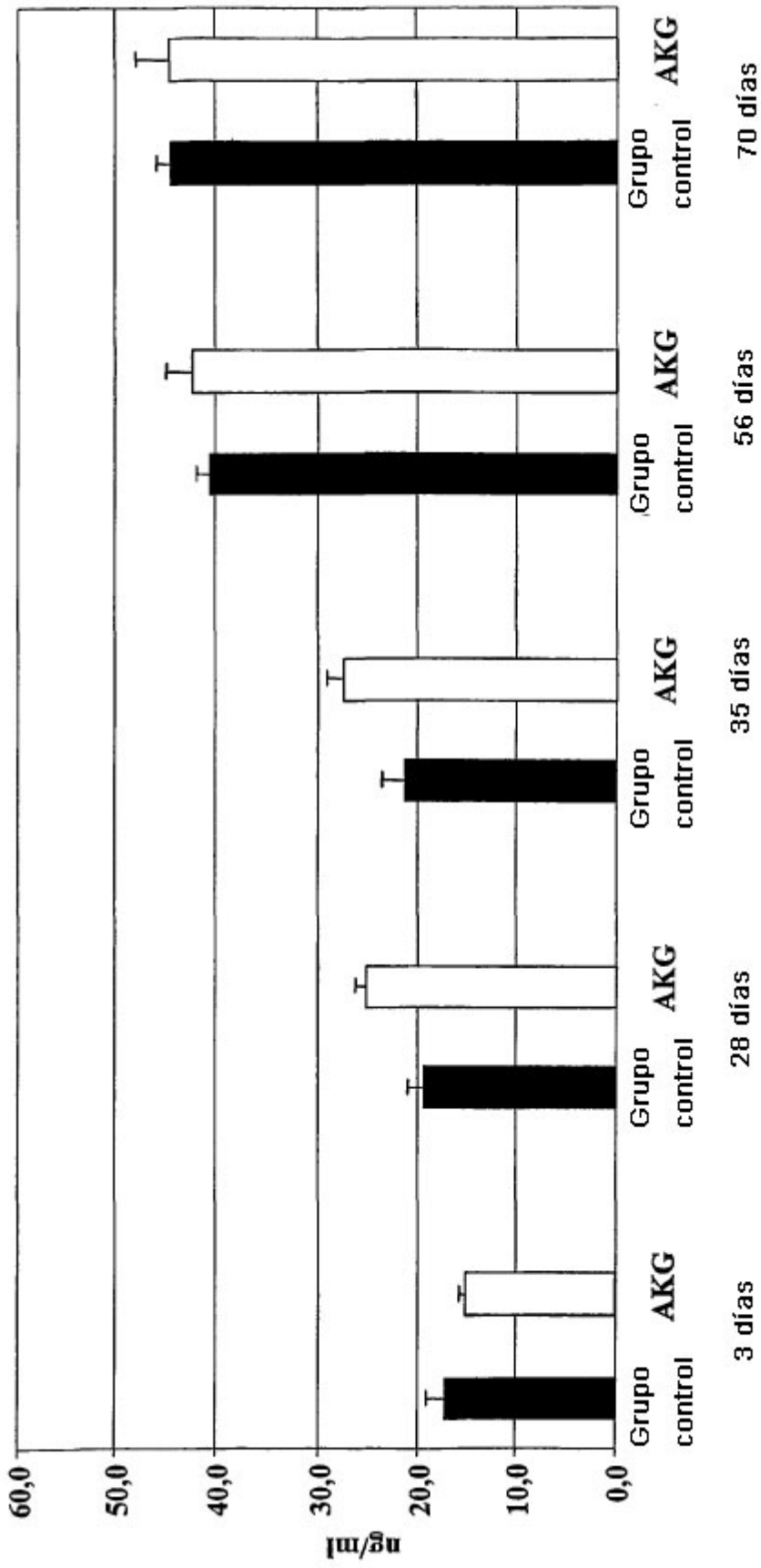


Figura 20 (22)

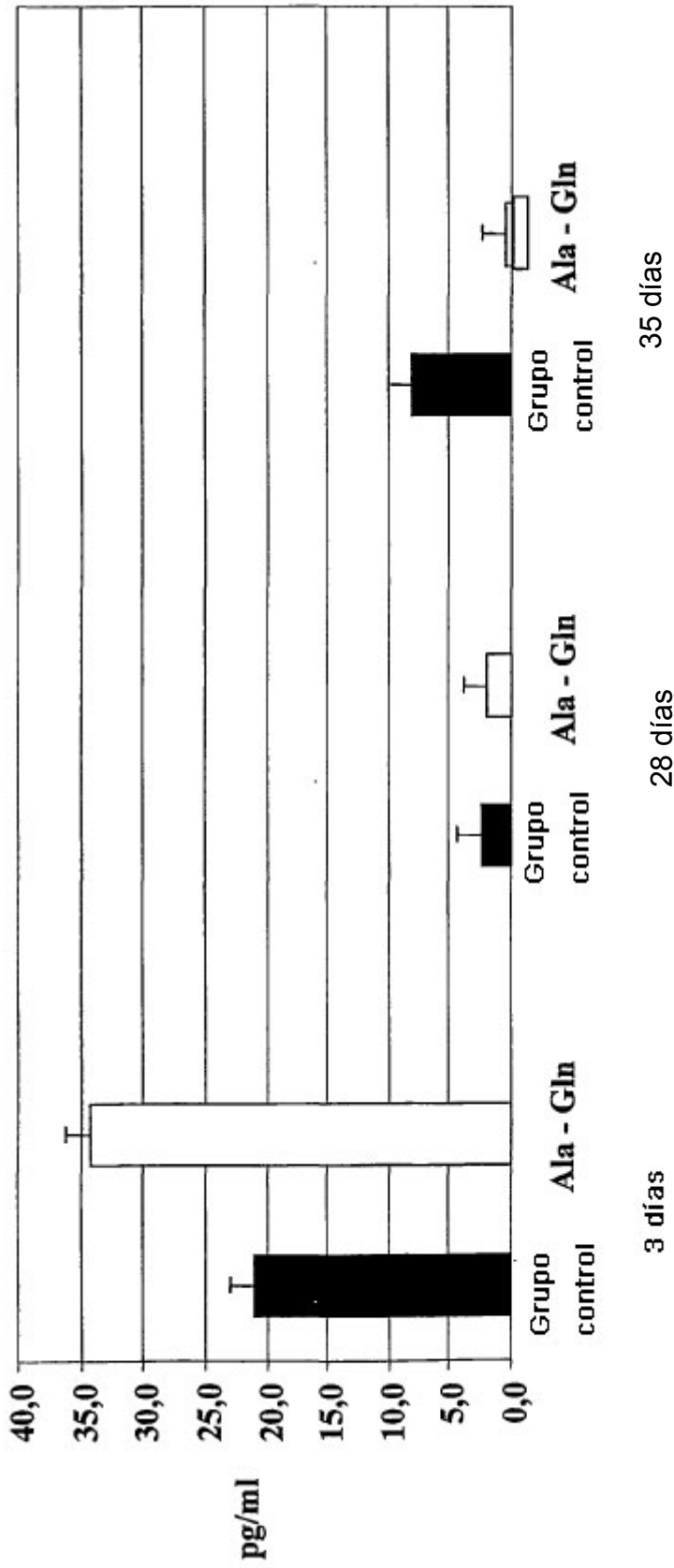


Figura 21 (22)

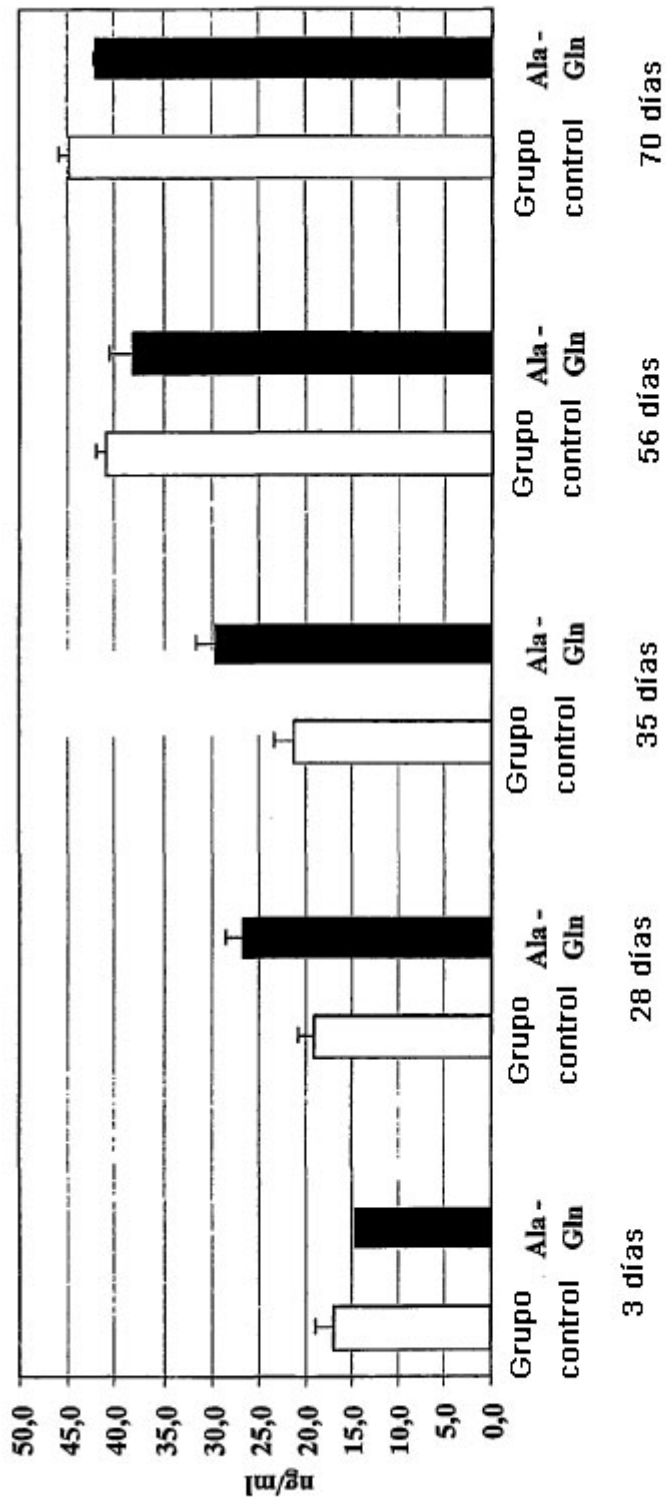


Figura 22 (22)