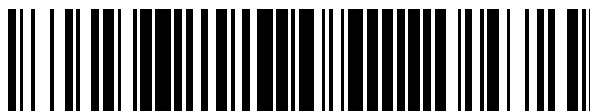


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 877**

51 Int. Cl.:

A61K 31/593 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2008 E 08785441 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014 EP 2173356**

54 Título: **Uso de 25-hidroxi vitamina D3 para incrementar la masa muscular en mamíferos**

30 Prioridad:

07.08.2007 EP 07015458

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

18.07.2014

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
HET OVERLOON 1
6411 TE HEERLEN, NL**

72 Inventor/es:

**CHUNG, THAU KIONG;
OLIVEROS, BENITO AVERION y
PENALBA, FRANCISCO FERANIL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 477 877 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 25-hidroxi vitamina D3 para incrementar la masa muscular en mamíferos

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere a un método para incrementar la masa muscular en mamíferos mediante la administración de 25-hidroxi vitamina D3.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Aunque se conocen los muchos beneficios de suplementar una dieta con vitamina D, especialmente con respecto a la salud ósea, se sabe poco sobre la vitamina D y su efecto de los derivados sobre otros sistemas corporales.

10 En muchos mamíferos, la masa muscular es una característica importante, tanto en términos de salud general como de bienestar del animal, así como por sus características económicas y/o agrícolas. De este modo, sería beneficioso proporcionar un mecanismo para incrementar no sólo la fuerza ósea, sino también la masa muscular.

DESCRIPCION DE ESTA INVENCION

Se ha encontrado, según esta invención, que la miogénesis se puede potenciar administrando prenatalmente a un mamífero una cantidad suficiente de 25-hidroxi vitamina D3.

15 Como se usa a lo largo de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, "25-OH D3" significa 25-hidroxi vitamina D3.

20 En mamíferos, el número de fibras musculares está determinado prenatalmente, y permanece constante a lo largo de la vida postnatal. Hay dos tipos de fibras musculares: las primarias y las secundarias. Durante la hiperplasia de las fibras musculares (un incremento en el número de células o fibras), primero se desarrollan mioblastos primarios, después los mioblastos primarios se fusionan para formar fibras primarias. A continuación sigue un período más largo de desarrollo de mioblastos secundarios (hiperplasia de fibras secundarias) sobre la superficie de estas fibras primarias. Como sería de esperar, mientras que todos los mamíferos siguen este plan general de desarrollo, cada especie tiene su propia línea de tiempo.

25 Por ejemplo, en cerdos, la hiperplasia de fibras primarias comienza a aproximadamente en el día 35 de gestación, y continúa hasta el día 60. La hiperplasia de fibras secundarias comienza a alrededor del día 50 de gestación, y dura hasta alrededor del día 90. En esencia, la formación de fibras del músculo esquelético está esencialmente terminada después del día 90 de gestación. De forma similar, la fibra muscular primaria aparece en el día 32 de gestación en ovejas, en el día 60 en bóvidos, y en el día 56 en seres humanos. La fibra muscular secundaria comienza a formarse en el día 38, 90 y 90 de gestación en ovejas, bóvidos y seres humanos, respectivamente.

30 El crecimiento del músculo esquelético postnatal en el cerdo se produce a través de hipertrofia de las fibras musculares (un incremento en el tamaño de la célula), y está asociado con un incremento en el contenido de ADN. Las miofibras terminalmente diferenciadas son incapaces de la mitosis, y por lo tanto los mionúcleos no retienen la capacidad para sintetizar ADN. Las células satélite, que son células precursoras miógenas presentes en las células del músculo esquelético, son la fuente postnatal de ADN que contribuyen al crecimiento de las fibras musculares. La acumulación ADN se produce a través de la proliferación de células satélite, seguido de la diferenciación y fusión con fibras musculares existentes, dando como resultado un drástico incremento en el tamaño de las células musculares y en el contenido nuclear.

35 El incremento en núcleos derivados de células satélite es proporcional a y es un requisito previo para la acumulación de proteína muscular, es decir, del crecimiento muscular. Las células satélite se ven comprometidas a su programa de desarrollo particular durante el desarrollo embrionario tardío. Situadas debajo de la lámina basal, las células satélite son capaces de proliferar, de diferenciarse y de unir fibras existentes para fusionarse entre sí para formar nuevas fibras. En el nacimiento, el músculo esquelético está constituido de alrededor de 10% de células satélite proliferantes; sin embargo, disminuyen rápidamente hacia el final del período de crecimiento.

40 El desarrollo de músculo esquelético en mamíferos comienza durante etapas embrionarias tempranas, y continúa durante sus vidas. La miogénesis esquelética se inicia en el embrión como resultado de moléculas señalizadoras de tejidos circundantes que especifican el destino de las células miógenas. La familia génica del factor regulador muscular (MRF), incluyendo Myf5, MyoD, Miogenina y MRF4, que son expresados específicamente en células del músculo esquelético, desempeña papeles importantes a la hora de regular el desarrollo y crecimiento del músculo esquelético. MyoD y Myf5 determinan a las células precursoras hacia destinos de células miógenas y la formación de mioblastos durante la embriogénesis. Miogenina y MRF4, están implicadas en la diferenciación terminal de mioblastos en miotubos.

45 Las células satélites son manifiestas primeramente hacia el final de la embriogénesis, y sirven como una fuente principal para las células miógenas requeridas para el crecimiento muscular postnatal, reparación y mantenimiento del músculo esquelético. Normalmente son quiescentes, situadas entre el sarcolema y la membrana basal de fibras

del músculo esquelético maduras terminalmente diferenciadas. En respuesta a estímulos tales como crecimiento muscular postnatal (hipertrofia muscular) y miotrauma, las células satélite se activan, proliferan y se diferencian. Tanto los factores reguladores musculares como los factores de crecimiento (FGs) están implicados en la activación, proliferación y diferenciación de células satélite. Los factores de crecimiento incluyen el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento semejantes a insulina, miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF) (miostatina y TGF- β 1) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).

Aunque no se desea estar atados por la teoría, parece que la suplementación dietética de 25-hidroxi vitamina D3 comienza un "enriquecimiento de la cascada de vitamina D", permitiendo que la vitamina D opere a través de mecanismo genómico (vía el receptor de vitamina D, un factor de transcripción nuclear) y/o rutas de transducción de señales no genómicas para regular directa e indirectamente la expresión génica de proteínas reguladoras miógenas (MRFs) y factores de crecimiento (GFs) a la hora de potenciar prenatalmente la hiperplasia muscular y postnatalmente la hipertrofia muscular. La 25-hidroxi vitamina D3, que actúa a través de MRFs y GFs, puede influir de forma prenatal en la etapa de determinación para el compromiso de las células somáticas proliferantes a desarrollarse en estirpes miógenas específicas de células precursoras de mioblastos (mioblastos embrionicos, mioblastos fetales y, en particular, las células satélites) y convertirse en mioblastos de "memoria de vitamina D". Los mioblastos de memoria de vitamina D son "encendidos" mediante 25-hidroxi vitamina D3 para amplificar su proliferación, diferenciación y fusión con fibras musculares existentes durante el crecimiento muscular postnatal.

De este modo, un aspecto de esta invención es un método para promover la miogénesis en un mamífero, que comprende administrar de forma prenatal una cantidad suficiente de 25-hidroxi vitamina D3 al mamífero durante un período de hiperplasia de fibras musculares. En realizaciones preferidas de esta invención, el método de administrar de forma prenatal la 25-OH D3 es mediante administración oral a la madre gestante del mamífero, tal como incorporando 25-OH en la alimentación de la madre. Se ha encontrado que este tipo de administración puede afectar a la masa muscular en el mamífero embrionario. Otro aspecto de esta invención es el uso de 25-OH D3 para incrementar la hiperplasia de fibras musculares en un mamífero embrionario.

El mamífero de esta invención puede ser cualquier especie. Los mamíferos preferidos según esta invención son seres humanos, cerdos, bóvidos, equinos, cánidos, felinos, conejos, cápridos (cabras) y óvidos. Preferiblemente, el mamífero es un cerdo.

Para cerdas preñadas, la dosis puede oscilar desde alrededor de 10 μ g hasta alrededor de 100 μ g por kg de dieta de pienso de cerdo, preferiblemente de alrededor de 50 a alrededor de 80 μ g de 25-OH D3 por kg de dieta. Para otros mamíferos, las cantidades son similares, y se pueden basar en la cantidad de alimento dado por día. Para resultados óptimos, la suplementación con 25-OH D3 debería ser parte de una dieta que contenga un suministro adecuado de nutrientes, que generalmente se sabe que son beneficiosos para el organismo. Por ejemplo, en el cerdo, las vitaminas del grupo B son esenciales, y por lo tanto se suministran normalmente para asegurarse de que todos los otros nutrientes, como agua, hidratos de carbono, proteínas, grasas, otras vitaminas, y minerales, se utilizan de forma eficaz para funciones de producción y mantenimiento.

El mamífero recibe preferiblemente una dosis prenatal de 25-hidroxi vitamina D3 durante el período de miogénesis. También se ha encontrado, según esta invención, que si este animal que se ha expuesto prenatalmente a 25-OH D3 se alimenta entonces con una dieta que también contiene una suplementación de 25-hidroxi vitamina D3, entonces su masa muscular aumenta con respecto a animales similares que fueron alimentados con una dieta de 25-OH D3, pero que no recibieron la dosificación prenatal de 25-hidroxi vitamina D3. De este modo, en realizaciones particularmente preferidas de esta invención, el mamífero, preferiblemente un cerdo, recibe tanto un suplemento prenatal de 25-OH D3 (al alimentar a la madre) como a su vez es alimentado continuamente durante su vida (tras el destete) con una dieta suplementada con 25-OH D3.

Los siguientes Ejemplos no limitantes se presentan para definir mejor la invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Comportamiento del crecimiento del cerdo

Estudio A. En todos los estudios se usaron dos grupos de tratamiento. El grupo de control contenía cerdos de números de parto primero a quinto (cerdas y progenies) alimentados con raciones sin suplementación de 25-OH D3. El grupo experimental estaba formado por cerdos de números de parto primero a quinto alimentados con raciones suplementadas con 50 mcg de 25-OH D3/kg de dieta), y cerdos amamantados a cerdas alimentados con raciones suplementadas con 25-OH D3 desde los 6 meses. El Estudio A sólo cubrió la etapa de preiniciación hasta el acabado (41-150 días de vida) para los cerdos de los números de parto primero a tercero, mientras que cubrió la etapa de refuerzo hasta el acabado (7-150 días de vida) para los cerdos de números de parto cuarto y quinto.

Estudio B. En este estudio también se usaron dos grupos de tratamiento. Los cerdos se seleccionaron al azar a partir de cerdas de números de parto mixtos alimentadas con raciones que no contienen 25-OH suplementario en la misma granja. El grupo de control se alimentó con raciones sin 25-OH D3, mientras que al grupo experimental se le

administraron raciones suplementadas con 25-OH D3 (50 mcg de 25-OH D3/kg de dieta). El Estudio B cubrió la etapa de preiniciación hasta el acabado (41-150 días de vida).

Número de cerdos y réplicas: Hubo 8-11 réplicas por tratamiento y 4 cerdos por réplica.

5 Distribución al azar y asignación de los cerdos: Los cerdos se agruparon según el tamaño y sexo, y se distribuyeron al azar en cada tratamiento. El número de réplicas masculinas para los dos tratamientos se igualó.

Raciones: Las raciones implicadas en todos los estudios fueron raciones de gestación y de lactancia para las cerdas. A las progenies se les dieron raciones de refuerzo, de preiniciación, de iniciación, de crecimiento y de acabado. Alimentación: Los cerdos experimentales fueron alimentados *ad libitum* con piensos secos. Los cerdos de refuerzo (lactantes) se alimentaron comenzando cuando tenían 7 días de vida. Los piensos se colocaron en un comedero lineal diseñado para cerditos. Durante unos pocos días, sólo se dio una pequeña cantidad de pienso a los cerdos, pero cuando estuvieron comiendo, la cantidad requerida siempre estaba en el comedero. Las cantidades de los piensos se pesaron y registraron apropiadamente. Los cerdos de preiniciación se alimentaron durante 30 días usando comederos lineales mientras estaban confinados en corrales de listones y elevados. Los cerdos de crecimiento-acabado se alimentaron usando comederos de hormigón durante 80 días mientras estaban confinados en corrales con un suelo de cemento. Se alimentaron las siguientes raciones a los cerdos correspondientes a su edad.

Tipo de ración	Edad (días)
Refuerzo	7-40
Preiniciación	41-70
Iniciación	71-100
Crecimiento	101-130
Acabado	131-150

20 Otras prácticas de manipulación: Todos los animales experimentales se sometieron a un procedimiento de operación estándar en la granja en la que se llevaron a cabo estos estudios. Recogida de datos: Se recogieron los siguientes datos:

1. Peso de cerditos a los 7 días de vida
2. Peso de cerditos a los 28 días de vida
3. Peso de cerdos a los 41, 70, 100, 130, y 150 días de vida
4. Consumo de pienso durante los siguientes períodos:

- 25
- a) período de refuerzo (7-28 días de vida; 29-40 días de vida)
 - b) período de preiniciación (41-70 días de vida)
 - c) período de iniciación (71-100 días de vida)
 - d) período de crecimiento (101-130 días de vida)
 - e) período de acabado (131-150 días de vida)

30 RESULTADOS:

A lo largo de los números de partos, los cerdos destetados de cerdas alimentadas con 25-OH D3 se alimentaron con 50 µg de 25-OH D3/kg de dieta, y aquellos destetados de cerdas de control se alimentaron con la dieta de control (que no contiene 25-OH D3). Las Tablas 1-5 a continuación muestran el comportamiento del crecimiento de los cerdos desde el preinicio hasta el acabado para los números de parto 1 a 5. Consistentemente a lo largo de los tres números de parto, los cerdos alimentados con 25-OH D3 ganaron peso de forma más rápida (un delta medio de 3,9 kg) y convirtieron pienso en ganancia (un delta medio de 7 puntos) de forma más eficiente que aquellos alimentados con la dieta de control.

TABLA 1

Efectos de 25-OH D3 sobre el comportamiento del crecimiento de cerdos de número de parto primero de 41 a 150 días de vida (preinicio a acabado) amamantados a cerdas alimentadas con 25-OH D3.							
Tratamiento	Réplica	Peso corporal inicial, kg.	Peso corporal final, kg.	Ganancia total de peso, kg	Ganancia diaria de peso, kg	Ingesta total de pienso, kg	Pienso: Ganancia
Control	11	7,60	82,06	74,47	0,68	183,74	2.47
25-OH D3	11	8,24	87,78	79,55	0,72	184,60	2.32
25-OH D3 frente a control (δ)		0,64	5,72	5,08	0,04	0,86	-0,15
Valor <i>P</i>		0,17	0,05	0,07	0,07	0,89	0,02

TABLA 2

Efectos de 25-OH D3 sobre el comportamiento del crecimiento de cerdos de número de parto segundo de 41 a 150 días de vida (preinicio a acabado) amamantados a cerdas alimentadas con 25-OH D3.							
Tratamiento	Réplica	Peso corporal inicial, kg.	Peso corporal final, kg.	Ganancia total de peso, kg	Ganancia diaria de peso, kg	Ingesta total de pienso, kg	Pienso: Ganancia
Control	8	8,81	88,44	79,63	0,72	184,49	2.32
25-OH D3	10	10,56	95,78	85,22	0,78	193,74	2.28
25-OH D3 frente a control (δ)		1,67	7,34	5,59	0,06	9,25	-0,04
Valor <i>P</i>		0,02	0,01	0,03	0,02	0,07	0,62

5

TABLA 3

Efectos de 25-OH sobre el comportamiento del crecimiento de cerdos de número de parto tercero de 41 a 150 días de vida (preinicio a acabado) amamantados a cerdas alimentadas con 25-OH D3							
Tratamiento	Réplica	Peso corporal inicial, kg.	Peso corporal final, kg.	Ganancia total de peso, kg	Ganancia diaria de peso, kg	Ingesta total de pienso, kg	Pienso: Ganancia
Control	9	8,13	86,51	78,39	0,71	178,83	2,29
25-OH D3	9	8,88	92,39	83,51	0,76	179,35	2,16
25-OH D3 frente a control (δ)		0,75	5,88	5,12	0,05	0,52	-0,13
Valor <i>P</i>		0,04	0,11	0,13	0,14	0,86	0,11

TABLA 4

Efectos de 25-OH sobre el comportamiento del crecimiento de cerdos de número de parto cuarto de 41 a 150 días de vida (preinicio a acabado) amamantados a cerdas alimentadas con 25-OH D3							
Tratamiento	Réplica	Peso corporal inicial, kg.	Peso corporal final, kg.	Ganancia total de peso, kg	Ganancia diaria de peso, kg	Ingesta total de pienso, kg	Pienso: Ganancia
Control	10	8,28	88,36	80,09	0,73	168,79	2,12
25-OH D3	10	8,43	89,57	81,15	0,74	166,93	2,07
25-OH D3 frente a control (δ)		0,15	1,21	1,06	0,01	-1,86	-0,05
Valor P		0,71	0,76	0,76	0,76	0,34	0,43

TABLA 5

Efectos de 25-OH sobre el comportamiento del crecimiento de cerdos de número de parto quinto de 41 a 150 días de vida (preinicio a acabado) amamantados a cerdas alimentadas con 25-OH D3							
COMPORTAMIENTO DEL CRECIMIENTO							
Tratamiento	Réplica	Peso corporal inicial, kg.	Peso corporal final, kg.	Ganancia total de peso, kg	Ganancia diaria de peso, kg	Ingesta total de pienso, kg	Pienso: Ganancia
Control	8	8,73	89,43	80,70	0,73	179,59	2,22
25-OH D3	8	8,66	91,94	83,27	0,76	184,63	2,22
25-OH D3 frente a control (δ)		-0,07	2,51	2,57	0,03	5,04	0,00
Valor P		0,85	0,24	0,19	0,17	0,24	0,38

5 **EJEMPLO 2**

En este estudio, los cerdos que se usaron se destetaron de cerdas que no se alimentaron con 25-OH D3. Estos cerdos se observaron para la ganancia de peso a una velocidad similar a aquellos alimentados sin 25-OH D3, pero los primeros convirtieron el pienso en ganancia de peso de una forma más eficaz que estos últimos, como se puede ver en la Tabla 6, más abajo.

10

Tabla 6

Efecto de 25-OH D3 sobre el comportamiento del crecimiento de cerdos de número de parto mixto de 41 a 150 días de vida, de preinicio a acabado, amamantados a cerdas alimentadas con 25-OH D3							
Tratamiento	Réplica	Peso corporal inicial, kg.	Peso corporal final, kg.	Ganancia total de peso, kg	Ganancia diaria de peso, kg	Ingesta total de pienso, kg	Pienso: Ganancia
Control	10	8,33	88,61	80,27	0,730	190,94	2,40
25-OH D3	10	8,44	89,59	81,15	0,74	190,05	2,34

Efecto de 25-OH D3 sobre el comportamiento del crecimiento de cerdos de número de parto mixto de 41 a 150 días de vida, de preinicio a acabado, amamantados a cerdas alimentadas con 25-OH D3							
Tratamiento	Réplica	Peso corporal inicial, kg.	Peso corporal final, kg.	Ganancia total de peso, kg	Ganancia diaria de peso, kg	Ingesta total de pienso, kg	Pienso: Ganancia
25-OH D3 frente a control (δ)		0,11	0,98	0,88	0,01	-0,89	-0,06
Valor <i>P</i>		0,84	0,67	0,69	0,69	0,67	0,52

5 Los cerdos destetados de cerdas alimentadas con 25-OH D3, pero a los que no se les alimentó con 25-OH D3, se observaron en cuanto a la ganancia de peso de forma más lenta que aquellos alimentados con 25-OH D3 (datos procedentes de registros de la granja, n = 23 cerdos; peso medio corporal = 80,90 kg); véase la Tabla 1. También ganaron peso a un peso similar a los cerdos del control (de Tabla 1) y aquellos destetados de cerdas no alimentadas con 25-OH D3 (Tabla 6).

REIVINDICACIONES

1. Uso de 25-hidroxi vitamina D3 para promover de forma no terapéutica la miogénesis en un mamífero al administrar de forma prenatal una cantidad suficiente de 25-hidroxi vitamina D3 al mamífero durante el período de hiperplasia de fibras musculares.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1, en el que la administración prenatal comprende la administración a la madre gestante.
3. Uso según la reivindicación 2, en el que la administración prenatal es oral.
4. Uso según la reivindicación 1, en el que la administración prenatal se realiza incorporando 25-hidroxi vitamina D3 en el pienso de la madre.
- 10 5. Uso según la reivindicación 1, en el que el mamífero se selecciona del grupo que consiste en: seres humanos, cerdos, bóvidos, équidos, cánidos, félidos, cápridos, conejos, y óvidos.
6. Uso según la reivindicación 5, en el que el mamífero es un cerdo.
7. Uso según la reivindicación 5, en el que la cantidad de 25-hidroxi vitamina D3 administrada a la cerda preñada es de alrededor de 10 µg a alrededor de 100 µg por kg de pienso.
- 15 8. Uso según la reivindicación 7, en el que la cantidad es de alrededor de 50 µg a alrededor de 80 µg por kg de pienso.
9. Uso según la reivindicación 7, en el que la cerda se alimenta con 25-hidroxi vitamina D3 comenzando a los 6 meses de vida.
- 20 10. Uso de 25-hidroxi vitamina D3 para promover de forma no terapéutica la miogénesis en un mamífero mediante la administración de forma prenatal de una cantidad suficiente de 25-hidroxi vitamina D3 alimentando la madre y alimentando una dieta suplementada con 25-hidroxi vitamina D3 después del destete.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que el mamífero es un cerdo.