

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 653**

51 Int. Cl.:

A61K 38/29 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.1999 E 10180447 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2266598**

54 Título: **Método para aumentar la tenacidad ósea y la rigidez y reducir las fracturas**

30 Prioridad:

19.08.1998 US 97151 P

10.09.1998 US 99746 P

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

04.07.2017

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**HOCK, JANET M.;
GAICH, GREGORY A. y
DERE, WILLARD H.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 621 653 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).

Método para aumentar la tenacidad ósea y la rigidez y reducir las fracturas**DESCRIPCIÓN**

5

Campo de la técnica

La presente invención se refiere a métodos para aumentar la tenacidad y/o rigidez del hueso y/o reducir la probabilidad y/o gravedad de la fractura ósea administrando una hormona paratiroidea. Más particularmente, la invención se refiere a un método para aumentar la tenacidad o rigidez del hueso en un sitio de traumatismo potencial o real, tal como la cadera o la columna vertebral, de una persona en riesgo de sufrir osteoporosis. Más particularmente, la invención se refiere a un método para la reducción de la incidencia de fracturas vertebrales, la reducción de la incidencia de fracturas vertebrales múltiples, la reducción de la gravedad de fracturas vertebrales y/o la reducción de la incidencia de fracturas no vertebrales.

15

Antecedentes de la invención

Los agentes existentes, tales como estrógenos, bisfosfonatos, fluoruro o calcitonina, pueden prevenir la pérdida ósea e inducir un aumento de un 3-5 % de masa ósea mediante rellenado del espacio de remodelación, pero no se estimula significativamente la formación ósea neta. La retención del hueso mediante la inhibición del recambio óseo puede no ser suficiente protección frente al riesgo de fracturas para pacientes que tienen ya una pérdida ósea significativa. Los agentes anabólicos que aumentan la resistencia ósea estimulando la formación de hueso pueden proporcionar, preferentemente, una mejor protección frente a fracturas en pacientes con osteoporosis establecida.

20

La hormona paratiroidea (PTH) es un producto de 84 aminoácidos secretado por la glándula paratiroidea de mamíferos que controla los niveles séricos de calcio mediante su acción sobre diversos tejidos, incluyendo el óseo. Los 34 aminoácidos N-terminales de la PTH bovina y humana (PTH(1-34)) se consideran biológicamente equivalentes a la hormona de longitud completa. Se ha demostrado que otros fragmentos amino-terminales de la PTH (incluyendo 1-31 y 1-38 por ejemplo) o la PTHrP (péptido/proteína relacionados con la PTH) o análogos de cualquiera o ambas, que activan el receptor de PTH/PTHrP (receptor PTH1) tienen efectos biológicos similares sobre la masa ósea, aunque la magnitud de dichos efectos puede variar.

25

30

En los estudios en seres humanos con diversas formas de PTH se ha demostrado un efecto anabólico sobre el hueso y han suscitado un interés significativo sobre su uso para el tratamiento de la osteoporosis y trastornos óseos relacionados. Los efectos anabólicos significativos de la PTH sobre el hueso, incluyendo la estimulación de la formación de hueso que da como resultado una ganancia neta de masa y/o resistencia ósea, se han demostrado en muchos modelos animales y en seres humanos.

35

Se cree habitualmente que la administración de PTH a seres humanos y a modelos animales relevantes tiene un efecto negativo sobre el hueso cortical. De hecho, los aumentos de origen natural de la PTH endógena que aparecen en el trastorno de hiperparatiroidismo dan como resultado un adelgazamiento del hueso cortical acompañado de un aumento de la conectividad y la masa del hueso trabecular. En estudios anteriores se ha sugerido que cuando se remodela el hueso cortical haversiano (encontrado en seres humanos y mamíferos superiores) bajo la influencia de la PTH, habrá una redistribución del hueso de tal modo que la masa y la resistencia del hueso cortical disminuyen, mientras que la masa y la resistencia del hueso trabecular aumentan. Por ejemplo, en estudios clínicos publicados de administración de PTH, la masa ósea cortical disminuyó después del tratamiento con PTH exógena, y estos descubrimientos han planteado la preocupación de que el tratamiento con PTH conducirá a una masa y resistencia óseas corticales reducidas. Una preocupación planteada por dichos estudios es que habría una pérdida de masa ósea esquelética total debida a la pérdida de hueso cortical. Esto es de alta relevancia clínica puesto que, en la osteoporosis, la mayor pérdida de hueso trabecular en comparación con la pérdida de hueso cortical significa que la carga mecánica es soportada predominantemente por el hueso cortical restante. La pérdida continuada de hueso cortical aumentaría el riesgo de fracturas. Por lo tanto, es importante que un agente terapéutico para la osteoporosis mantenga o aumente el hueso cortical residual de un sujeto.

40

45

50

Los efectos de la PTH sobre el hueso cortical se han investigado en animales no humanos con remodelación haversiana, tales como perros, hurones, ovejas y monos, pero los tamaños de muestra son típicamente demasiado pequeños para un análisis estadístico fiable. El impacto de los cambios inducidos por el tratamiento con PTH sobre las propiedades mecánicas del hueso cortical en dichos animales sigue siendo desconocido. Los estudios publicados sobre roedores han mostrado un aumento de la masa cortical durante la administración de PTH, pero una pérdida de su beneficio después de la retirada de la PTH. Sin embargo, el hueso cortical de roedor tiene una estructura claramente diferente del hueso cortical haversiano y se remodela mediante formación y resorción aposicional de superficie, en lugar de mediante remodelación intracortical de osteonas. Además, las limitaciones tecnológicas del ensayo biomecánico sobre los huesos relativamente cortos de roedores dan lugar a artefactos de medida cuando un agente, tal como una PTH, altera la geometría del hueso para reforzar el hueso. Dichos artefactos hacen extrapolaciones de las respuestas de hueso cortical de rata a aquellos de seres humanos u otros animales con remodelación de osteonas incierta. Por lo tanto, los datos existentes para animales, como los seres

60

65

humanos, que experimentan remodelación haversiana, indican que la PTH puede tener un impacto adverso sobre el hueso cortical, causando la pérdida neta de masa ósea mediante la merma del hueso cortical.

5 Como consecuencia, ha sido una creencia popular respecto a la acción de la PTH que los pacientes requieren el tratamiento simultáneo o posterior con un antirresortivo para minimizar la pérdida de hueso inducida por la PTH. Por ejemplo, en tres estudios clínicos se ha utilizado PTH en mujeres posmenopáusicas en tratamiento simultáneo con calcitonina o estrógeno (por ejemplo, Lindsay et al., 1997, The Lancet 350:550–5) o en mujeres premenopáusicas que tomaban el agonista de GnRH Synarel para la endometriosis. Los efectos opuestos del estrógeno y la PTH sobre el recambio de hueso cortical hacen particularmente difícil observar efectos de sólo la PTH durante la terapia de combinación con estos dos agentes.

15 Continúa existiendo la necesidad de un método para emplear una PTH para aumentar la resistencia y la rigidez óseas en seres humanos y otros animales que exhiben remodelación haversiana, y para reducir la incidencia de fracturas óseas en estos animales. Además, continúa existiendo la necesidad de un método para aumentar la calidad y cantidad del hueso cortical.

Sumario de la invención

20 La invención proporciona PTH (1–34) humana para su uso en la prevención o reducción de la incidencia de fractura vertebral y no vertebral en un ser humano con o en riesgo de progresar a osteoporosis, en el que la PTH (1-34) se administra por inyección subcutánea a una dosis de 20 µg/día, en la que el ser humano también recibe dosis eficaces de calcio y vitamina D.

25 El ser humano puede ser una mujer, tal como una mujer posmenopáusica.

La PTH (1-34) se puede administrar como una solución estabilizada que incluye un agente estabilizante, un agente tampón y un conservante.

30 Los aumentos de la tenacidad y/o la rigidez del hueso pueden persistir durante varios ciclos de remodelación o hasta varios años después de la última administración de la hormona paratiroidea.

Breve descripción de los dibujos

35 Las figuras 1A y 1B muestran que la BMD (densidad mineral ósea) y el BMC (contenido mineral óseo) en el eje femoral central (hueso cortical) (A) y en el fémur proximal (hueso esponjoso + hueso cortical) (B) fueron significativamente mayores en animales tratados con PTH que en los controles a ambas dosis.

Las figuras 2A a 2D muestran los efectos de la PTH sobre la resistencia mecánica y el momento de inercia en sección transversal (MIST) en el hueso cortical de la diáfisis media del fémur.

40 La figura 3 ilustra el cambio porcentual en las medidas de DXA del contenido mineral óseo entero en los grupos de control y de tratamiento.

Las figuras 4A-C ilustran el cambio porcentual en las medidas DXA de la columna vertebral para los grupos de control y de tratamiento en las vértebras lumbares 2-4 para la superficie ósea (A), el contenido mineral óseo (B) y la densidad mineral ósea (C).

45 Las figuras 5A y 5B ilustran el aumento de la masa ósea (A) y la resistencia ósea (B) en las vértebras lumbares de los primates tratados con una hormona paratiroidea.

Las figuras 6A y 6B ilustran el aumento de la fuerza del cuello del fémur (A) y la resistencia constante de la diáfisis media del húmero (B) en primates tratados con una hormona paratiroidea.

La figura 7 ilustra la activación de las tasas de formación de hueso en las superficies endosteica y perióstica de la diáfisis media del húmero.

50 La figura 8 ilustra el análisis de histograma del desplazamiento de las densidades de vóxeles óseos en las vértebras lumbares, resultante del tratamiento con PTH comparado con el control. Obsérvese el aumento de la densidad en el compartimento óseo cortical tras la retirada del tratamiento con PTH.

La figura 9 ilustra aumentos en la BMD de la columna lumbar a lo largo de 23 meses de tratamiento de pacientes con PTH, en comparación con los controles tratados con placebo.

55 La figura 10 ilustra aumentos en la BMD del cuello del fémur y la cadera a lo largo de 24 meses de tratamiento de pacientes con PTH, en comparación con los controles tratados con placebo.

Descripción detallada

60 La reducción de la incidencia de fractura generalmente incluye la reducción de la probabilidad o la incidencia real de fractura para un sujeto en comparación con una población control no tratada.

65 Como se usa en el presente documento, fuerza de rotura designa la fuerza máxima que soporta un espécimen óseo; rigidez se refiere a la pendiente de la porción lineal de una curva de carga-deformación; y esfuerzo de rotura se refiere el área bajo la curva de carga-deformación antes de la rotura. Cada uno de estos puede medirse y calcularse mediante métodos estándar en la técnica de estudio del hueso. Estos parámetros son propiedades estructurales que

dependen de las propiedades intrínsecas y la geometría del material, y pueden determinarse como se describe en Turner CH, Burr DB 1993 "Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial." Bone 14:595–608, que se incorpora en el presente documento por referencia. La fuerza última, la rigidez y el esfuerzo de rotura pueden normalizarse para obtener propiedades intrínsecas del material, tales como tensión de rotura, módulo elástico y tenacidad, que son independientes del tamaño y la forma. Como se utilizan en el presente documento, tensión de rotura se refiere a la tensión máxima que puede soportar un espécimen; módulo elástico se refiere a la rigidez intrínseca del material; y tenacidad se refiere a la resistencia a la fractura por unidad de volumen. Cada uno de estos puede determinarse mediante métodos conocidos en la técnica, id. La resistencia ósea femoral, como se designa en el presente documento, puede medirse en el cuello femoral o en la diáfisis, utilizando típicamente una flexión de tres o cuatro puntos en el último sitio.

Traumatismo óseo

La invención es beneficiosa para un sujeto que puede padecer o haber padecido traumatismos en uno o más huesos. Un ser humano puede sufrir cualquiera de diversos traumatismos óseos debidos, por ejemplo, a un accidente, intervención médica, enfermedad o trastorno. En los jóvenes, el traumatismo óseo se debe, probablemente, a la fractura, la intervención médica para reparar una fractura o la reparación de articulaciones o tejido conjuntivo dañado, por ejemplo, por el atletismo. Otros tipos de traumatismo óseo, tales como los producidos por osteoporosis, enfermedad degenerativa ósea (tal como artritis u osteoartritis), reemplazo de cadera o afecciones secundarias asociadas con terapia para otras afecciones sistémicas (por ejemplo, osteoporosis por glucocorticoides, quemaduras o trasplante de órganos) se encuentran más a menudo en personas mayores.

Los sujetos son seres humanos, preferentemente una mujer, en riesgo de sufrir osteoporosis o que sufren la misma. Los factores de riesgo para la osteoporosis son conocidos en la materia e incluyen afecciones de hipogonadismo en varones y mujeres, independientemente de la edad, las afecciones, las enfermedades o los fármacos que inducen hipogonadismo, los factores nutricionales asociados con la osteoporosis (siendo los niveles bajos de calcio o de vitamina D más frecuentes), tabaquismo, alcohol, fármacos asociados con la pérdida ósea (tales como glucocorticoides, tiroxina, heparina, litio, anticonvulsivos, etc.), pérdida de visión que predispone a caídas, viajes espaciales, inmovilización, hospitalización crónica o reposo en cama, y otras enfermedades sistémicas vinculadas a un mayor riesgo de osteoporosis. Las indicaciones de la presencia de osteoporosis son conocidas en la materia e incluyen signos radiológicos de al menos una fractura de compresión vertebral, masa ósea baja (típicamente al menos 1 desviación estándar por debajo de los valores normales en jóvenes) y/o fracturas atraumáticas.

La osteoporosis puede conducir, por ejemplo, a fracturas vertebrales y/o no vertebrales. Entre los ejemplos de fracturas no vertebrales se incluyen fractura de cadera, fractura de antebrazo distal, fractura de húmero proximal, fractura de muñeca, fractura de radio, fractura de tobillo, fractura de húmero, fractura de costilla, fractura de pie, fractura de pelvis o una combinación de estas. La invención puede utilizarse para reducir el riesgo de dichas fracturas o para tratar dichas fracturas. El riesgo de fractura está reducido y la curación de una fractura está estimulada por el aumento de la resistencia y/o la rigidez del hueso, por ejemplo de la cadera, de la columna o de ambas. Una mujer típica con riesgo de osteoporosis es una mujer posmenopáusica o una mujer premenopáusica con hipogonadismo. Un sujeto preferido es una mujer posmenopáusica y es independiente de la terapia de reemplazo hormonal concurrente (TRH), terapia con estrógenos o equivalentes, o terapia antirresortiva. La invención puede beneficiar a un sujeto en cualquier estadio de la osteoporosis, pero especialmente en los estadios tempranos y avanzados.

La invención es eficaz para prevenir o reducir la incidencia de fracturas vertebrales y no vertebrales en un sujeto con o en riesgo de progresar a osteoporosis. Por ejemplo, la presente invención puede reducir la incidencia de fracturas vertebrales y/o no vertebrales, reducir la gravedad de las fracturas vertebrales, reducir la incidencia de fracturas vertebrales múltiples, mejorar la calidad del hueso y similares. La invención puede beneficiar a pacientes con masa ósea baja o fractura previa que tienen el riesgo de futuras fracturas esqueléticas múltiples, tales como pacientes en los que la osteoporosis de columna puede progresar rápidamente.

Tenacidad y rigidez óseas

Generalmente, la tenacidad o rigidez óseas son el resultado de la masa y la resistencia del hueso cortical, trabecular y esponjoso. La invención puede proporcionar niveles de tenacidad, rigidez, masa y/o resistencia óseas dentro o por encima del intervalo de la población normal. Preferentemente, la invención proporciona niveles aumentados respecto de los niveles resultantes de traumatismo o que dan lugar a riesgo de traumatismo. Al aumentar la tenacidad, la rigidez o ambas, se reduce el riesgo o la probabilidad de fractura en comparación con una población de control no tratada.

Al aumentar ciertas características del hueso proporcionan una tenacidad y/o rigidez aumentadas. Dichas características incluyen la densidad mineral ósea (BMD), el contenido mineral óseo (BMC), la frecuencia de activación o la velocidad de formación de hueso, el número de trabéculas, el espesor de las trabéculas, la conectividad trabecular y otras, la formación de hueso perióstico y endocortical, la porosidad cortical, la superficie ósea transversal y la masa ósea, la resistencia a la carga y/o el esfuerzo de rotura. Un aumento en una o más de

estas características es un resultado preferido del método de la invención.

Ciertas características del hueso, tales como el espacio medular y el módulo elástico, al reducirse proporcionan una tenacidad y/o rigidez aumentada al hueso. El hueso más joven (más tenaz y rígido) tiene cristalitas que son, generalmente, menores que los cristalitas del hueso más viejo. Por tanto, generalmente al reducir el tamaño de los cristalitas óseos aumenta la tenacidad y la rigidez del hueso, y puede reducirse la incidencia de fracturas. Además, madurar los cristalitas de un hueso puede proporcionar características deseables adicionales al hueso, incluyendo una tenacidad y rigidez óseas aumentadas y/o pueden reducir la incidencia de fracturas. Una disminución en una o más de estas características puede ser un resultado preferido del método de la invención.

La invención es eficaz para aumentar la tenacidad y la rigidez de cualquiera de varios huesos. Por ejemplo, puede aumentar la tenacidad y/o la rigidez de los huesos, incluyendo un hueso de la cadera, tal como un ilion, un hueso de la pierna, tal como un fémur, un hueso de la columna, tal como una vértebra, o un hueso del brazo, tal como un hueso del antebrazo distal o un húmero proximal. Este aumento de la tenacidad y/o la rigidez puede encontrarse a lo largo del hueso o localizarse en ciertas porciones del hueso. Por ejemplo, la tenacidad y/o la rigidez de un fémur pueden aumentarse al aumentar la tenacidad y/o la rigidez del cuello femoral o de un trocánter femoral. La tenacidad y/o la rigidez de una cadera pueden aumentarse aumentando la tenacidad y/o la rigidez de una cresta iliaca o espina iliaca. La tenacidad y/o la rigidez de una vértebra pueden aumentarse aumentando la tenacidad y/o la rigidez de un pedículo, lámina o cuerpo. Ventajosamente, el efecto se produce sobre las vértebras en ciertas porciones de la columna, tales como vértebras cervicales, torácicas, lumbares, sacras y/o coccígeas. Preferentemente, el efecto es sobre una o más vértebras torácicas medias y/o lumbares superiores.

El aumento de la tenacidad y/o la rigidez puede encontrarse en cada uno de los tipos de hueso, o predominantemente en un tipo de hueso. Los tipos de hueso incluyen hueso esponjoso (esponjoso, trabecular o lamelar) y compacto (cortical o denso) y el callo de fractura. El método de la invención aumenta, preferentemente, la tenacidad y la rigidez mediante sus efectos sobre el hueso esponjoso y cortical, o sobre hueso cortical solo. El hueso trabecular, hueso al que está unido el tejido conjuntivo, puede endurecerse y/o fortalecerse mediante la presente invención. Por ejemplo, resulta ventajoso proporcionar una tenacidad adicional a un sitio de unión para un ligamento, un tendón y/o un músculo.

El aumento de la tenacidad o la rigidez puede reducir la incidencia de fracturas. En este aspecto, el aumento de la tenacidad o la rigidez puede incluir la reducción de la incidencia de fracturas vertebrales, la reducción de la incidencia de fracturas graves, la reducción de la incidencia de fracturas moderadas, la reducción de la incidencia de fracturas no vertebrales, la reducción de la incidencia de fracturas múltiples o una combinación de las mismas.

Hormona paratiroidea

La hormona puede obtenerse mediante métodos recombinantes o sintéticos conocidos, tal como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.086.196.

La invención utiliza PTH humana (1-34), también conocida como teriparatida. Se pueden usar soluciones estabilizadas de PTH (1-34) humana, tales como PTH (1-34) humana recombinante rhPTH (1-34), formas cristalinas de PTH(1-34) humana.

Administración de la hormona paratiroidea

La hormona paratiroidea puede administrarse típicamente por vía parenteral, preferentemente mediante inyección subcutánea, mediante métodos y en formulaciones bien conocidos en la materia. Las formulaciones estabilizadas de PTH (1-34) humana pueden usarse ventajosamente. Una solución estabilizada de una hormona paratiroidea puede incluir un agente estabilizante, un agente de tampón, un conservante y similares.

El agente estabilizante incorporado a la solución o composición incluye un poliol que incluye un sacárido, preferentemente un monosacárido o disacárido, por ejemplo glucosa, trehalosa, rafinosa o sacarosa; un alcohol de tipo azúcar, tal como, por ejemplo, manitol, sorbitol o inositol, y un alcohol polihidroxílico tal como glicerina o propilenglicol o mezclas de los mismos. Un poliol preferido es manitol o propilenglicol. La concentración de poliol puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 % en peso, preferentemente de 3 a aproximadamente 10 % en peso de la solución total.

El agente tampón empleado en la solución o la composición de la presente invención puede ser cualquier combinación de ácido o sal que sea farmacéuticamente aceptable y capaz de mantener la solución acuosa en un intervalo de pH de 3 a 7, preferentemente de 3-6. Los sistemas tampón útiles son, por ejemplo, fuentes de acetato, tartrato o citrato. Los sistemas tampón preferidos son fuentes de acetato o tartrato, el más preferido es una fuente de acetato. La concentración de tampón puede estar en el intervalo de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 500 mM, preferentemente de aproximadamente 2 mM a 100 mM.

La solución o composición estabilizada de la presente invención puede incluir también un conservante aceptable por

vía parenteral. Dichos conservantes incluyen, por ejemplo, cresoles, alcohol bencílico, fenol, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, clorobutanol, alcohol feniletílico, metilparabén, propilparabén, timerosal y nitrato y acetato fenilmercúrico. Un conservante preferido es m-cresol o alcohol bencílico; el más preferido es m-cresol. La cantidad de conservante empleada puede variar de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2 % en peso, preferentemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 1,0 % en peso de la solución total.

Por tanto, la solución estabilizada de teriparatida puede contener manitol, acetato y m-cresol con una vida útil de más de 15 meses a 5 °C.

Las composiciones de hormona paratiroidea pueden proporcionarse, si se desea, en forma de un polvo que contiene no más de un 2 % de agua en peso como resultado de la liofilización de una solución acuosa estéril de la hormona preparada mezclando la hormona paratiroidea seleccionada, un agente tampón y un agente estabilizante como se han descrito anteriormente. Es especialmente útil como agente tampón cuando se preparan polvos liofilizados una fuente de tartrato. Los agentes estabilizantes particularmente útiles incluyen glicina, sacarosa, trehalosa y rafinosa.

Además, la hormona paratiroidea puede formularse con tampones y excipientes típicos empleados en la materia para estabilizar y solubilizar proteínas para administración parenteral. Los vehículos farmacéuticos reconocidos en la técnica y sus formulaciones se describen en Martin, "Remington's Pharmaceutical Sciences," 15ª Ed.; Mack Publishing Co., Easton (1975). Una hormona paratiroidea puede administrarse también a través de los pulmones, la boca, la nariz, mediante supositorio o mediante formulaciones orales.

La hormona paratiroidea se formula para administrar una dosis eficaz para aumentar la tenacidad y/o la rigidez de uno o más huesos de un sujeto y/o para reducir la probabilidad y/o la gravedad de una fractura ósea. Preferentemente, una dosis eficaz proporciona una mejora de la estructura, masa y/o resistencia ósea cortical. Preferentemente, una dosis eficaz reduce la incidencia de fracturas vertebrales, reduce la incidencia de fracturas vertebrales múltiples, reduce la gravedad de fracturas vertebrales y/o reduce la incidencia de fracturas no vertebrales. Preferentemente, un sujeto que recibe hormona paratiroidea recibe también dosis eficaces de calcio y vitamina D, que pueden potenciar los efectos de la hormona.

Los beneficios de la administración de una hormona paratiroidea persisten durante un periodo de administración. Los beneficios de varios meses de administración pueden persistir durante un año o dos, o más, sin administración adicional.

Una composición farmacéutica que incluye una formulación de PTH humana (1-34) es adecuada para administración parenteral. Por ejemplo, una formulación líquida o sólida se puede fabricar de varias maneras, usando técnicas convencionales. Puede prepararse una formulación líquida disolviendo PTH humana (1-34), en un disolvente adecuado, tal como agua, a un pH apropiado, incluyendo tampones u otros excipientes, por ejemplo para formar una de las soluciones estabilizadas descritas anteriormente en el presente documento.

Los ejemplos siguientes son ilustrativos de la invención y no se pretende que sean limitantes.

Ejemplos

Ejemplo de referencia 1 - Resistencia y densidad óseas aumentadas tras la administración de rhPTH(1-34) a conejos

Procedimientos experimentales

Se clasificaron conejos hembras blancos intactos New Zealand (HRP Inc. Denver, Pa.), uno de los animales más pequeños que forman osteonas por remodelado intracortical, de aproximadamente 9 meses de edad y de 3,25-3,75 kg de peso por peso corporal medio en 3 grupos de 6 animales cada uno. Dos grupos experimentales recibieron PTH(1-34) biosintética a dosis de 10 o 40 µg/ml/kg/día. El grupo control recibió 1,0 ml/kg/día de solución salina 0,9M acidificada que contenía 2 % de suero de conejo inactivado por calor. Se inyectó PTH(1-34) o vehículo mediante inyecciones subcutáneas una vez al día 5 días a la semana durante 140 días. Se alimentó a los conejos con comida de laboratorio para conejo que contenía 0,5 % de Ca y 0,41 % de P, y se les dio agua *ad libitum*.

La selección de dosis se basó en una serie de estudios preliminares en los que se demuestra que (1) después de una sola inyección de PTH (1-34) a 100 µg/kg, el calcio sérico aumentó y no retornó a los valores basales en 24 horas, mientras que tras una sola dosis de 50 µg/kg, los valores séricos de calcio retornaron al valor basal en 24 horas. (2) inyecciones repetidas de 20 µg/kg de PTH (1-34) produjeron un aumento transitorio de los niveles séricos de calcio con retorno a los valores basales en 6-24 horas, y (3) PTH (1-34) a 5 µg/kg no alteró la histomorfometría de las superficies óseas.

Se administró un conjunto de marcadores dobles de alizarina (Sigma, St. Louis) i.m. a 20 mg/kg los días 55 y 63, y se administró un conjunto de marcadores dobles de calceína (Sigma, St. Louis) s.c. a 5 mg/kg los días 15 y 7, antes del sacrificio. Se anestesió a los conejos mediante CO₂ en una secuencia de orden aleatorio, aproximadamente 3-6

horas después de la última inyección, para obtener sangre mediante punción cardiaca y después se les sacrificó con pentobarbital sódico (100 mg/kg) i.p. Se extrajeron el húmero derecho, ambos fémures, las vértebras lumbares (L3-L5) y la tibia derecha.

5 Bioquímica sanguínea

Se midieron los niveles séricos de calcio, fosfato, fosfatasa alcalina, creatinina y nitrógeno ureico mediante análisis de suero multicanal computarizado.

10 Histomorfometría

Se realizaron mediciones histomorfométricas en el hueso cortical de la diáfisis tibial y en el hueso esponjoso de L3. Después del sacrificio, se extrajeron estos huesos de cada animal y se fijaron en formol tamponado neutro al 10 % durante 24 horas. Los tejidos se deshidrataron en una serie graduada de alcoholes (70-100%, 2 cambios por grado, cada uno durante 4 horas al vacío). Los especímenes se colocaron después en xileno y se infiltraron con metilmetacrilato al vacío a 20 psi en un programa de infiltración de 2 horas/etapa y 24 horas en un procesador automático Shandon Hypercenter (Shandon Lipshaw, Pittsburgh, PA). Los especímenes se incrustaron en DDK-plast al 2 % con 0,2 % de iniciador (Delaware Diamond Knives, Wilmington, DE). Se cortaron secciones transversales de tibia a 80 μm usando una sierra de alambre de diamante (Delaware Diamond Knives, Inc., DE) y se tiñeron con tricrómico de Goldner. Se procesaron secciones transversales no teñidas de aproximadamente 80 μm de espesor para la histomorfometría dinámica de marcadores fluorocromáticos. Se cortaron secciones sagitales de L3 con un microtomo Reichert-Jung 2050 (Magee Scientific Inc., Dexter, MI) a μm y se tiñeron con tetracrómico de McNeal o se dejaron sin manchar para la histomorfometría dinámica.

25 La histomorfometría se realizó con un aumento de 150x, utilizando un microscopio de fluorescencia Nikon (Optiphot, Nikon, Tokio, Japón) y un sistema de digitalización semiautomático (Bioquant IV, R & M Biometrics, Nashville, TN). La formación y reabsorción óseas en las envolturas periósteas, endocortical e intracortical se midieron en la totalidad de la superficie transversal de las secciones de la diáfisis media de la tibia. Las mediciones en el hueso esponjoso se realizaron dentro de una superficie de 6 mm^2 en el centro de la vértebra lumbar, a 0,5 mm del margen de la cubierta cortical circundante. La nomenclatura se efectuó de acuerdo con el Comité ASBMR sobre nomenclatura histomorfométrica (Parfitt AM, Drezner MK, Florieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR 1987 "Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee". J. Bone Miner. Res. 2:595-610.) Los parámetros dinámicos se midieron basándose en el marcador calceína.

35 Mediciones de la masa ósea

La diáfisis del fémur y la cuarta vértebra lumbar en 50 % de etanol/solución salina se escanearon en sección transversal mediante tomografía computerizada cuantitativa (QCT o pQCT) usando un 960A pQCT y se analizaron con el software Dichte versión 5.1 (Norland/Stratec, Ft. Atkinson, WI). Se midieron los parámetros del tejido entero, incluyendo la densidad mineral ósea volumétrica (BMDv, mg/cm^3), la superficie de la sección transversal (superficie X, mm^2) y el contenido mineral óseo (BMC, mg), utilizando dimensiones de vóxel de 148 x 148 x 1200 μm . El volumen se puede calcular multiplicando la superficie X por el grosor de corte de 1,2 mm. Se escaneó el cuello femoral completo del fémur extirpado en un baño de etanol al 50 %, solución salina utilizando una absorciometría de energía dual periférica (pDEXA, Norland/Stratec). Específicamente, se midieron la densidad mineral ósea aparente (BMDa, g/cm^2), la superficie proyectada (cm^2) y el contenido mineral óseo (BMC, g) usando etapas de barrido de 0,5 x 1,0 mm y umbral de 0,04.

50 Pruebas biomecánicas

Las propiedades mecánicas óseas se midieron en la diáfisis del fémur derecho y en el cuerpo de L5. Los huesos se resecaron, se limpiaron de tejido conjuntivo, se envolvieron en gasa empapada en solución salina isotónica y se congelaron a -20 °C hasta la prueba. Antes de la prueba, los especímenes se descongelaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Todos los especímenes se analizaron hasta el fallo en un baño de agua circulante a 37 °C usando una máquina de ensayo servohidráulica MTS 810 (MTS Corp., Minneapolis, MN). Las curvas de deformación de carga se registraron usando el sistema de representación de medidas HP 7090A (Hewlett Packard, Camas, WA). Se midió la fuerza de rotura (fuerza máxima que soportan los especímenes), la rigidez (la pendiente de la porción lineal de la curva carga-deformación) y el esfuerzo de rotura (área bajo la curva carga-deformación antes del fallo) mediante un sistema de digitalización (Jandel Scientific, Corte Madera, CA). Estos parámetros son propiedades estructurales que dependen de las propiedades intrínsecas y la geometría del material. Turner CH, Burr DB 1993 "Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial." Bone 14:595-608. Los datos se normalizaron para obtener propiedades intrínsecas del material, tales como tensión de rotura (tensión máxima que soportan los especímenes), módulo elástico (rigidez intrínseca del material) y tenacidad (resistencia a la fractura por unidad de volumen), que son independientes del tamaño y la forma. Id.

65 La resistencia ósea femoral se midió en la diáfisis utilizando una flexión de tres puntos. El fémur se colocó sobre un

aparato con el lado anterior orientado hacia el cargador. La carga se aplicó en el punto medio entre dos soportes separados 54 mm. La célula de carga se desplazó a una velocidad de 1 mm/s hasta que se produjo el fallo. Para normalizar los datos obtenidos a partir de la curva carga-deformación, la tensión de rotura a la flexión se calculó a partir de la fuerza de rotura mediante

$$\sigma_r = F_u L r / 8 I \quad (1)$$

en la que σ_r es la tensión de rotura por flexión, F_u es la fuerza de rotura, L es la longitud entre soportes, r es el radio en dirección antero-posterior e I es el momento de inercia. Se calculó el valor para el momento de inercia, suponiendo que las secciones transversales femorales eran elípticas.

El espesor cortical promedio se calculó a partir de las mediciones del espesor realizadas en cada uno de los cuatro cuadrantes de la sección transversal femoral con un par de calibradores digitales, precisos a 0,01 mm con una precisión de $\pm 0,005$ mm (Mitutoyo, Japón).

El módulo elástico del fémur (E_f) se calculó usando la siguiente ecuación:

$$E_f = (\text{rigidez}) * (L^3 / 48 I) \quad (2)$$

La tenacidad del fémur (Tenacidad_f) también se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Tenacidad}_f = 3 * (\text{esfuerzo de rotura}) * r^2 / L I \quad (3)$$

Para el ensayo mecánico de la quinta vértebra lumbar (L5), ambas placas terminales del cuerpo vertebral se cortaron en paralelo utilizando una sierra de velocidad lenta Buehler Isomet (Buehler LTD, Evanston, IL). Después de la resección de los procesos posteriores, la resistencia mecánica de L5 se midió en compresión. La carga de compresión se aplicó en control de carrera, con una velocidad de cruce de 1 mm/s a través de un plato pivotante para corregir la alineación no paralela de las caras del cuerpo vertebral. Para normalizar los datos obtenidos a partir de la curva carga-deformación y para evaluar las propiedades intrínsecas del material que son independientes de la geometría ósea, se calculó la tensión de rotura como la fuerza de rotura dividida por la superficie transversal bruta.

La superficie de corte transversal (CSA) se calculó mediante

$$CSA = \pi ab / 4 \quad (4)$$

en la que a y b son la anchura en las direcciones antero-posterior y medial-lateral, respectivamente).

El módulo elástico de la vértebra (E_v) se calculó mediante

$$E_v = (\text{rigidez}) / (CSA / h) \quad (5)$$

en la que h es la altura cráneo-caudal del cuerpo vertebral.

La tenacidad de la vértebra (Tenacidad_v) se calculó mediante

$$\text{Tenacidad}_v = (\text{esfuerzo de rotura}) / (CSA * h) \quad (6)$$

Microscopia acústica

Se cortaron secciones transversales de 500 μ m de grosor a partir de la diáfisis del húmero derecho usando una sierra de alambre de diamante. El espesor preciso de cada espécimen se midió usando un micrómetro (Mitutoyo, Japón) con una resolución de 1 μ m. Las mediciones de la velocidad acústica se realizaron usando un microscopio acústico de barrido (UH3, Olympus, Japón) por el método descrito anteriormente por Hasegawa K, Turner CH, Recker RR, Wu E, Burr DB 1995 "Elastic properties of osteoporotic bone measured by scanning acoustic microscopy". Bone 16:85-90. Mediante esta técnica se pueden medir propiedades mecánicas intrínsecas detalladas en un punto focal seleccionado. Se usó un transductor de 50 MHz (V-390, Panametrics, Waltham, MA) para generar ondas acústicas en modo de eco de pulsos. La lente de 50 MHz produjo un haz acústico de aproximadamente 60 μ m de diámetro. Los especímenes se fijaron en el fondo de una cámara llena de agua a temperatura constante (22 °C). Se midió el tiempo de retardo entre las ondas acústicas reflejadas desde la parte superior de los especímenes y los reflejados desde la parte inferior de los especímenes usando un osciloscopio digital (TDS 620, Tektronix, Beaverton, OR). Los tiempos de retardo se midieron en cinco localizaciones diferentes, de modo que cada sitio estaba separado por más de 300 μ m en la corteza anterior del húmero. La velocidad acústica se calculó como el doble del espesor de los especímenes, dividido por el tiempo de retardo promedio. El peso en húmedo (Ph) y el peso sumergido (Ps) en alcohol etílico al 100 % se midieron usando una báscula (AJ100, Mettler Instrument Corp., Heightstown, NJ). La densidad húmeda (ρ) se calculó usando el principio de Arquímedes:

$$\rho = \{Ph / (Ph - Ps)\} * \rho_{\text{ETOH}} \quad (7)$$

en la que ρ_{ETOH} es la densidad de alcohol ($0,789 \text{ g/cm}^3$). Suponiendo que la vía de la onda acústica en el hueso es homogénea, se calcula el coeficiente elástico (C) que representa la rigidez intrínseca de los especímenes:

$$C = \rho * v^2 \quad (8)$$

en la que ρ es la densidad húmeda y v es velocidad acústica.

Análisis estadístico

Se usó análisis de Bartlett para verificar la homogeneidad de la varianza. Cuando la varianza era homogénea, se aplicó un ANOVA unidireccional con pruebas de PLSD de Fisher para la comparación post-hoc. Cuando la varianza no era homogénea, se aplicó el análisis de la varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, con análisis post-hoc utilizando las pruebas U de Mann-Whitney. La significación estadística se atribuyó a $p < 0,05$. Los resultados se presentan como la media \pm SEM.

Resultados

Peso corporal y bioquímica

Los conejos tratados con PTH(1-34) vehículo a 10 mg/kg/día presentaron incrementos menores en el peso corporal durante 140 días. Los conejos que recibieron PTH(1-34) a 40 µg/kg/día presentaron una pequeña disminución de 51 g del peso corporal, lo que representa una pérdida de peso corporal de $1,4 \pm 1,6 \%$ durante el experimento (Tabla 1). Las medidas en suero estaban dentro de la respuesta fisiológica normal para conejos, aunque se observaron pequeños aumentos en el calcio sérico y el nitrógeno ureico. La fosfatasa alcalina sérica se duplicó a la dosis más alta de PTH(1-34) (Tabla 2).

Tabla 1 - Efectos de la PTH(1-34) sobre el peso corporal

	Control	PTH(1-34) 10 µg/kg/día	PTH(1-34) 40 µg/kg/día
Peso corporal inicial (kg)	$3,43 \pm 0,08$	$3,42 \pm 0,08$	$3,42 \pm 0,08$
Peso corporal final (kg)	$3,70 \pm 0,05$	$3,51 \pm 0,05$	$3,37 \pm 0,10$
Ganancia de peso corporal (kg)	$0,26 \pm 0,09$	$0,09 \pm 0,05$	$-0,05 \pm 0,05^*$

Los datos se expresan como la media \pm SEM para 6 conejos por grupo. * $P < 0,05$ comparado con el control.

Tabla 2 - Efectos de la PTH(1-34) sobre la bioquímica en suero

	Control	PTH(1-34) 10 µg/kg/día	PTH(1-34) 40 µg/kg/día
Calcio (mg/dl)	$12,1 \pm 0,3$	$12,6 \pm 0,2$	$13,5 \pm 0,3^*$
Fosfato (mg/dl)	$4,7 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,3$
Fosfatasa alcalina (ui/l)	$24,7 \pm 4,1$	$41,0 \pm 8,1$	$49,8 \pm 7,1^*$
Creatinina (mg/dl)	$1,9 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$
Nitrógeno ureico (mg/dl)	$18,3 \pm 0,3$	$18,1 \pm 0,8$	$23,9 \pm 1,9$

Los datos se expresan como la media \pm SEM para 6 conejos por grupo. * $P < 0,05$ comparado con el control.

Histomorfometría

La formación ósea en las superficies periósticas (Ps.MSBS) y endocortical (Ec.MSBS) de la diáfisis de la tibia aumentó en los grupos tratados con PTH(1-34) (Tabla 3). La Ps.MS/BS en el grupo de dosis más alta fue significativamente mayor que en los otros 2 grupos ($p < 0,001$) y la Ec.MS/SB en el grupo de dosis más alta fue significativamente mayor que en el grupo de control ($p < 0,05$). Compatible con el aumento de la fosfatasa alcalina

sérica, las tasas de formación de hueso en cada superficie (Ps.BFR/BS y Ec.BFR/BS) fueron significativamente mayores en el grupo con dosis más altas que en los otros 2 grupos ($p < 0,05$). La tasa de aposición mineral (TAM) no cambió en las cubiertas del periostio y endocortical.

5 Intracorticalmente, el número de sitios de reabsorción (Rs.N/Ct.Ar) en conejos que recibieron PTH(1-34) a 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ fue significativamente mayor, multiplicándose 7, que en los otros 2 grupos ($p < 0,05$) (Tabla 4). El número de osteonas marcadas (L.On.N/Ct.Ar) en conejos que recibieron PTH(1-34) a 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ también aumentó significativamente en comparación con los otros 2 grupos ($p < 0,01$ frente al grupo control, $p < 0,05$ frente a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$). La TAM fue significativamente mayor en ambos grupos de tratamiento con respecto al grupo control ($p < 0,01$), pero no hubo diferencias significativas entre los grupos tratados con PTH. La tasa de formación ósea (BFR/BV) y la frecuencia de activación (Ac.F) aumentaron ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente) con ambas dosis.

15 Aunque la superficie ósea (B.Ar) aumentó en ambas dosis, solo se encontró una diferencia significativa entre el grupo con dosis más alta y el grupo control ($p < 0,01$). La superficie de la médula (Ma.Ar) disminuyó después del tratamiento, pero no fue significativamente diferente entre los tres grupos. Sin embargo, la superficie cortical (Ct.Ar) en el grupo de dosis más alta fue significativamente mayor que en los otros 2 grupos ($p < 0,0001$ frente al grupo control, $p < 0,05$ frente al grupo de dosis más baja). La Ct.Ar en el grupo de dosis más baja también fue significativamente mayor que la del grupo control ($p < 0,05$). Se encontraron resultados similares en el % de la Ct.Ar.

20 La porosidad cortical (Ct.Po) en conejos que recibieron PTH(1-34) a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ fue el doble que en el grupo control ($p < 0,05$), mientras que la Ct.Po en conejos que recibieron PTH(1-34) a 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ fue 6 veces mayor que en el grupo control ($p < 0,01$). Sin embargo, las porosidades se encuentran en el compartimento endocortical y, en ese lugar, es poco probable que contribuyan a la fuerza biomecánica, ya que la PTH también aumentó la superficie ósea cortical, en consonancia con un aumento del momento de inercia de la sección transversal.

25

Tabla 3 - Efectos de la PTH(1-34) sobre la remodelación ósea perióstica y endocortical de la diáfisis tibial

Parámetros	Abreviatura	Control	PTH(1-34) 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$	PTH(1-34) 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$
30 Superficie osteoide endocortical	Ec.OSBS (%)	8,8 \pm 6,0	13,7 \pm 10,5	20,2 \pm 5,8
Espesor osteoide endocortical	Ec.O.Th (μm)	7,4 \pm 2,4	3,7 \pm 2,3	8,1 \pm 0,9
Tasa de aposición mineral perióstica	Ps.MAR ($\mu\text{m}/\text{día}$)	0,33 \pm 0,17	0,38 \pm 0,08	0,66 \pm 0,14
35 Tasa de aposición mineral endocortical	Ec.MAR ($\mu\text{m}/\text{día}$)	1,33 \pm 0,22	0,79 \pm 0,16	1,32 \pm 0,15
Superficie de mineralización perióstica	Ps.MSBS (%)	3,8 \pm 1,9	8,2 \pm 2,1	22,3 \pm 2,7* [‡]
Superficie de mineralización endocortical	Ec.MS/BS (%)	26,4 \pm 6,6	32,6 \pm 8,2	57,7 \pm 10,4*
40 Tasa de formación ósea perióstica	Ps.BFR/BS ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{año}$)	0,02 \pm 0,02	0,03 \pm 0,01	0,16 \pm 0,05* [‡]
Tasa de formación ósea endocortical	Ec.BFR/BS ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{año}$)	0,40 \pm 0,10	0,31 \pm 0,10	0,72 \pm 0,12* [‡]

45

Los datos se expresan como la media \pm SEM para 6 conejos por grupo. * $P < 0,05$ comparado con el control. [‡] $P < 0,05$ en comparación con PTH(1-34) 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$.

50

55

60

65

Tabla 4 - Efectos de la PTH(1-34) sobre la remodelación ósea intracortical de la diáfisis tibial

Parámetros	Abreviatura	Control	PTH(1-34) 10 µg/kg/día	PTH(1-34) 40 µg/kg/día	
5	Número de cavidad de resorción	Rs.N/Ct.Ar (n.º/mm ²)	0,014 ± 0,013	0,013 ± 0,004	0,097 ± 0,036*‡
	Número de osteonas marcadas	L.On.N/Ct.Ar (n.º/mm ²)	0,011 ± 0,006	0,027 ± 0,006	0,215 ± 0,094*‡
10	Espesor osteoide	O.Th (µm)	4,92 ± 0,59	5,42 ± 0,30	5,16 ± 0,27
	Tasa de aposición mineral	MAR (µm/día)	1,19 ± 0,20	1,56 ± 0,13*	1,60 ± 0,12*
15	Tasa de formación ósea	BFR/BV (%/año)	0,5 ± 0,3	8,5 ± 2,9*	21,4 ± 3,8*
	Frecuencia de activación	Ac.F (n.º/mm ² /año)	1,8 ± 1,0	15,1 ± 5,0*	43,8 ± 10,5*‡
	Superficie ósea	B.Ar (mm ²)	29,1 ± 1,3	33,3 ± 1,9	37,8 ± 2,7*
	Superficie de la médula	Ma.Ar (mm ²)	12,7 ± 0,7	11,9 ± 1,0	10,7 ± 1,0
20	Superficie cortical	Ct.Ar (mm ²)	16,4 ± 0,9	21,3 ± 1,2*	27,1 ± 2,0*‡
	% de la superficie cortical	%Ct.Ar (%)	56,4 ± 1,5	64,2 ± 1,6*	71,6 ± 1,5*‡

25 Los datos se expresan como la media ± SEM para 6 conejos por grupo. * P < 0,05 comparado con el control. ‡P < 0,05 en comparación con PTH(1-34) 10 µg/kg/día.

Tabla 5 - Efectos de la PTH(1-34) sobre la remodelación de hueso esponjoso de la tercera vértebra lumbar

Parámetros	Abreviatura	Control	PTH(1-34) 10 µg/kg/día	hPTH(1-34) 40 µg/kg/día	
30	Volumen del hueso	BV/TV (%)	27,5 ± 1,4	30,5 ± 3,4	27,9 ± 3,2
	Espesor trabecular	Tb.Th (µm)	124,8 ± 7,3	147,4 ± 12,7	126,4 ± 13,7
35	Superficie erosionada	ESBS (%)	0,5 ± 0,3	1,4 ± 0,3	2,6 ± 0,7*
	Superficie de osteoclastos	Oc.SBS (%)	0,4 ± 0,2	0,9 ± 0,3	1,3 ± 0,3
	Superficie osteoide	OSBS (%)	5,2 ± 1,3	7,2 ± 1,2	27,7 ± 3,8*‡
40	Superficie osteoblástica	Ob.SBS (%)	1,4 ± 0,6	1,3 ± 0,6	15,3 ± 5,6*‡
	Espesor osteoide	O.Th (µm)	5,2 ± 0,5	5,3 ± 0,5	4,4 ± 0,2
	Volumen del osteoide	OV/TV (%)	0,10 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,46 ± 0,07*‡
45	Tasa de aposición mineral	MAR (µm/día)	1,3 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1
	Superficie de mineralización	MSBS (%)	4,4 ± 1,4	7,4 ± 1,9	24,2 ± 1,5*‡
50	Tasa de formación ósea	BFR/BS (µm ³ /µm ² /año)	19,7 ± 5,3	38,5 ± 8,9	153,0 ± 15,6*‡

Los datos se expresan como la media ± SEM para 6 conejos por grupo. * P < 0,05 comparado con el control. ‡P < 0,05 en comparación con PTH(1-34) 10 µg/kg/día.

55 En el hueso esponjoso, la mayoría de los parámetros de formación (OSBS, Ob.SBS, OV/TV y MSBS) aumentaron con el tratamiento con PTH(1-34) (Tabla 5). Los de los conejos que recibieron PTH(1-34) a 40 µg/kg/día fueron significativamente mayores que en los otros 2 grupos (p < 0,01 frente al grupo control y 10 µg/kg/día en todos los parámetros). La tasa de formación de hueso (BFR/BS) también aumentó significativamente en conejos que recibieron PTH(1-34) a 40 µg/kg/día en comparación con los otros 2 grupos (p < 0,0001 frente a los grupos control y 10 µg/kg/día). Aunque la resorción (ESBS y Oc.SBS) aumentó en ambos grupos tratados con PTH (1-34), solo la superficie erosionada (ESBS) en el grupo de dosis más alta fue significativamente mayor que el grupo de control (p < 0,001). No hubo diferencias en el espesor osteoide (O.Th) entre los tres grupos. A pesar de la evidencia de un recambio óseo acelerado, el volumen fraccional de hueso (BV/TV) no cambió después del tratamiento con PTH (1-34). No se observó reabsorción en túnel y fibrosis peritrabecular en ninguno de los grupos.

65

Mediciones de la masa ósea

La vBMD y el BMC en la diáfisis del fémur evaluados mediante pQCT en el grupo tratado con 40 µg/kg/día fueron significativamente mayores que en los otros 2 grupos ($p < 0,001$ en la vBMD y $p < 0,0001$ en el BMC frente al grupo de control, $p < 0,05$ en la vBMD y $p < 0,01$ en el BMC frente al grupo de dosis más baja) (figura 1A). La vBMD y el BMC en el grupo tratado con 10 µg/kg/día también fueron significativamente mayores que en el grupo de control ($p < 0,05$ tanto en la vBMD como el BMC). Aunque la superficie ósea de la diáfisis del fémur también aumentó de forma dependiente de la dosis, solo aumentó significativamente en el grupo tratado con 40 µg/kg/día ($p < 0,05$).

La aBMD y el BMC en el fémur proximal, medidos mediante absorciometría dual de rayos X (DXA o pDXA), aumentó de forma dependiente de la dosis. Hubo diferencias significativas tanto en la aBMD como en el BMC entre el grupo control y el grupo tratado con 10 µg/kg/día ($p < 0,05$), así como entre el grupo control y el grupo tratado con 40 µg/kg/día ($p < 0,001$) (figura 1B). No se encontraron diferencias significativas en la superficie ósea entre los tres grupos.

En general, la figura 1 muestran que la BMD (densidad mineral ósea) y el BMC (contenido mineral óseo) en el eje femoral central (hueso cortical) (A) y en el fémur proximal (hueso esponjoso + hueso cortical) (B) fueron significativamente mayores en animales tratados con PTH que en los controles a ambas dosis. La superficie ósea cortical en la diáfisis femoral en conejos tratados con la dosis más alta fue significativamente mayor que los controles. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la superficie ósea del fémur proximal. Los datos se expresan como la media \pm SEM. * $P < 0,05$ comparado con el control. † $P < 0,05$ en comparación con PTH 10 µg/kg/día.

No hubo diferencias significativas en la vBMD, el BMC o la superficie ósea de la vértebra lumbar (L4) evaluados mediante pQCT, entre los tres grupos.

Pruebas biomecánicas

Las propiedades estructurales de la diáfisis del fémur, tales como la fuerza de rotura, la rigidez y el esfuerzo de rotura aumentaron de forma dependiente de la dosis (figura 2). La figura 2 muestran los efectos de la PTH sobre la resistencia mecánica y el momento de inercia en sección transversal (MIST) en el hueso cortical de la diáfisis media del fémur. Las propiedades mecánicas estructurales (barras abiertas) y CSMI aumentaron significativamente en el grupo de dosis más alta, mientras que la rigidez también aumentó significativamente en el grupo de dosis más baja. De las propiedades intrínsecas del material (barras oscuras), solo el módulo elástico aumentó significativamente en el grupo de dosis más baja en comparación con los controles. El módulo elástico en el grupo de dosis más alta disminuyó significativamente cuando se comparó con el grupo de dosis más baja. En la figura 2: los datos se expresan como la media \pm SEM; * indica $P < 0,05$ en comparación con el control; y † indica $P < 0,05$ en comparación con 10 µg/kg/día.

En este estudio y los resultados mostrados en la figura 2, todos los parámetros fueron significativamente mayores en conejos que recibieron PTH(1-34) a 40 µg/kg/día que en el grupo control ($p < 0,01$ para la fuerza de rotura y el esfuerzo de rotura, $p < 0,05$ para rigidez). La rigidez en el grupo de dosis más baja también fue significativamente mayor que la del grupo control ($p < 0,05$). De las propiedades intrínsecas del material, el módulo elástico fue significativamente menor en conejos que recibieron 40 µg/kg/día que los que recibieron 10 µg/kg/día ($p < 0,01$).

En el cuerpo vertebral lumbar, no se encontraron diferencias significativas en las propiedades mecánicas entre los tres grupos.

Microscopia acústica

No hubo diferencias significativas en la velocidad acústica o el coeficiente elástico entre los tres grupos.

Discusión

La respuesta esquelética del hueso cortical a la PTH(1-34) biosintética implicó tanto una regulación directa de las propiedades del material como una regulación compensatoria de las propiedades biomecánicas en los huesos largos de conejos hembra maduros intactos. La PTH(1-34) aumentó el recambio óseo y la porosidad cortical y, a la dosis de 40 µg/kg, redujo el módulo elástico material del hueso cortical. Sin embargo, el módulo elástico disminuido fue más que compensado por el aumento de la aposición ósea en las superficies periósticas y endocorticales, lo que dio como resultado una mejora significativa en la resistencia estructural, la rigidez y el esfuerzo de rotura del hueso cortical en conejos.

En este estudio utilizando conejos intactos, el volumen del hueso esponjoso de la vértebra lumbar no cambió después del tratamiento con PTH (1-34), a pesar de la evidencia de aumento del recambio óseo. El uso previo como modelo osteopénico, la presencia de remodelación intracortical y el corto periodo de remodelación, junto con el rápido crecimiento del conejo y la maduración esquelética precoz (6-9 meses), sentaron la base para la selección del conejo como modelo en el cual probar los efectos de la PTH(1-34). Administrada de forma intermitente.

Los conejos pueden presentar una amplia variación en los niveles séricos de calcio (10-16 mg/dl), pero estos niveles no están directamente influenciados por la cantidad de calcio en la dieta, otra ventaja del modelo. Aunque se registraron aumentos transitorios significativos de aproximadamente 1 mg/ml en conejos tratados con PTH (1-34) a 40 µg/kg, los valores reales estaban siempre dentro del intervalo fisiológico conocido.

- 5 En el presente estudio, la hPTH(1-34) for biosintética durante 140 días aumentó la tasa de formación ósea intracorticalmente, así como en las superficies periólicas y endocorticales. El Ac.F intracortical aumentó en el grupo de dosis más baja por 8 veces y en el grupo de dosis más alta 20 veces. Esto condujo a un aumento de 2 veces en la porosidad cortical en la tibia en el grupo de dosis más baja y un aumento de 6 veces en el grupo de dosis más alta. Los datos de la microscopia acústica muestran que las propiedades elásticas del propio material óseo en el húmero no se vieron afectadas, lo que indica que la calidad intrínseca del hueso cortical es normal. Por lo tanto, la mayor porosidad debe explicar la ligera reducción del módulo elástico, una medida de las propiedades del material que incluye los espacios en la corteza.
- 10
- 15 Sin embargo, el aumento de la porosidad cortical fue más que compensado por el aumento significativo de MS/BS y BFR/BS en ambas superficies periólica y endocortical en la diáfisis de la tibia en el grupo de dosis más alta, lo que dio como resultado un aumento significativo de la superficie ósea. Esto aumentaría el momento de inercia de la sección transversal, que es proporcional a la rigidez a la flexión del hueso, como en la diáfisis femoral (figura 2). La consecuencia de estos cambios en la forma y las propiedades del material fue la mejora de la resistencia mecánica y la rigidez de la diáfisis femoral en comparación con los controles, compensando así los efectos mecánicos potencialmente perjudiciales del aumento de la porosidad cortical.
- 20

Conclusión

- 25 En conclusión, los incrementos en el recambio óseo y la porosidad cortical después del tratamiento con PTH(1-34) se acompañaron de por aumentos simultáneos en el hueso en las superficies periólica y endocortical. La combinación de estos fenómenos dio lugar a una mejora de la tenacidad, la tensión de rotura y el esfuerzo de rotura del fémur.
- 30 **Ejemplo de referencia 2 - Resistencia y densidad óseas aumentadas tras la administración de rhPTH(1-34) a monos**

Procedimientos experimentales

35 Aspectos generales

La fase *in vivo* del estudio utilizó primates cynomolgus (*Macaca fascicularis*) salvajes adultos (con placas de crecimiento cerradas) de 2,77 ± 0,03 kg de peso (media ± error típico de la media [SEM]). Los monos se mantuvieron en cuarentena durante 3 meses, después se empezó una dieta que contenía un 0,3 % de calcio, un 0,3 % de fosfato y 250 UI de vitamina D3/100 g de dieta, y se les administró agua fluorada (1 ppm de fluoruro) a demanda. El contenido de calcio correspondía a 1734 mg de calcio/2000 calorías. Después de 1 mes de dieta, se clasificó a los animales en grupos de 21 o 22, fueron operados de forma simulada o fueron ovariectomizados. Se iniciaron inyecciones subcutáneas de vehículo una vez al día (controles simulados y ovariectomizados) o de rhPTH(1-34) a 1 µg/kg (PTH1) o 5 µg/kg (PTH5) 24 horas después de la ovariectomía. Se trató a los animales durante 18 meses (PTH1 y PTH5) o durante 12 meses, seguidos de la retirada del tratamiento (PTH1-W y PTH5-W).

40

45

Los grupos de estudio se dividieron como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6 – Grupos de estudio para el estudio de primates

Grupo	Abreviatura	Monos de partida (n=128)	Monos en el análisis final (n = 121)
Ovariectomizados de forma simulada, 18 meses con vehículo	Simulado	21	21
Ovariectomizados, 18 meses con vehículo	OVX	22	20
Ovariectomizados, 18 meses con 1 µg de rhPTH(1-34)/kg/día	PTH1	21	19
Ovariectomizados, 12 meses con 1 µg de rhPTH(1-34)/kg/día 6 meses con vehículo	PTH1-W	21	20
Ovariectomizados, 18 meses con 5 µg de rhPTH(1-34)/kg/día	PTH5	22	21
Ovariectomizados, 12 meses con 5 µg de rhPTH(1-34)/kg/día 6 meses con vehículo	PTH5-W	21	20

50

55

60

65

Se tomaron muestras de suero y orina 24 horas después de la inyección de vehículo o rhPTH(1-34) en intervalos de 3 meses. Se utilizó un diseño de toma de muestras disperso de 5 monos en cada grupo tratado con rhPTH(1-34) para la farmacocinética, con toma de muestras (que abarca de 0 a 240 minutos cada vez) en el momento basal, a 7, 11 y 17 meses. A tiempo 0 y en intervalos de 6 meses, se evaluó la masa ósea esquelética total y de la columna (L-2 a L-4) mediante absorciometría de rayos X de energía dual (DXA); se utilizó tomografía de rayos X computerizada cuantitativa periférica (pQCT) para evaluar la masa ósea en los radios de la diáfisis y distal, y la tibia proximal. Se realizaron biopsias iliacas a los 6 y 15 meses para histomorfometría. Se sacrificó a todos los animales después de 18 meses.

Las pruebas biomecánicas se realizaron en las vértebras lumbares L-3 a L-4, el cuello femoral, la diáfisis del húmero y en un espécimen de hueso cortical obtenido a partir de la diáfisis femoral (medidas definidas en la tabla 7). Se realizó histomorfometría estática y dinámica convencional (medidas descritas en la tabla 1) en la diáfisis del húmero, la vértebra lumbar L-2, el cuello femoral, la diáfisis del fémur, la diáfisis del radio y el radio distal. Los análisis estadísticos iniciales compararon todos los grupos con los controles ovariectomizados tratados con vehículo. Los datos son adecuados para análisis exploratorios adicionales para examinar la dependencia de la dosis, los efectos de la retirada, las interacciones entre resultados y los cambios con el tiempo mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Todos los ensayos se realizaron y determinaron mediante métodos conocidos en la materia.

Para ciertos sujetos experimentales, el hueso cortical del húmero se examinó mediante histomorfometría y mediante microscopia de infrarrojos polarizada de transformada de Fourier. La microscopia de infrarrojos de transformada de Fourier se realizó mediante una adaptación de métodos conocidos para dicha microscopia.

Estudios de modelación de elementos finitos tridimensionales

Estos estudios determinaron los datos de modelación de elementos finitos tridimensionales en vértebras de los monos del estudio dosificados con PTH durante 18 meses. La vértebra L-5 extraída con 50 % de etanol/solución salina de los grupos de animales ovariectomizados (n= 7) y PTH (n= 7) se barriaron en serie en etapas de 500 µm mediante tomografía computerizada cuantitativa (QCT, Norland, Ft Atkinson, WI), utilizando píxeles de 70x70 µm. En cada una de las secciones transversales de 500 µm se analizó la densidad mineral ósea volumétrica (BMD, mg/cm³), el contenido mineral óseo (BMC, mg), la superficie transversal (superficie X), el volumen de hueso esponjoso (BV/TV), el espesor trabecular (Tb.Th) y la conectividad (densidad nodal, análisis de soportes). Los píxeles en cada barrido en serie se promediaron para crear vóxeles de 490 x 490 x 500 µm. Los barridos en serie se apilaron después y se generó una malla de superficie triangular para cada hueso utilizando el algoritmo de los "cubos antiguos" (véase, por ejemplo, Lorensen y Cline 1987 "Marching cubes, a high resolution 3D surface construction algorithm." Computer Graphics 21, 163–169). Una versión suavizada de cada malla de superficie se utilizó después para generar una trama tetraédrica para modelación de elementos finitos tridimensionales.

El módulo de Young para cada elemento tetraédrico se derivó de las densidades en vóxel originales y de las propiedades del material a partir de un haz de hueso cortical laminado de la diáfisis femoral de los monos. Cada malla tetraédrica se rotó de modo que la superficie inferior de cada vértebra se alineara con un plano. A continuación, se realizó el análisis de tensión elástica lineal para cada modelo de L-5 en los que se aplicó una carga distribuida de 100 N a la superficie superior del centro, perpendicular al plano inferior, mientras la superficie inferior se fijaba en la dirección de la carga. Se evaluaron los contornos de la tensión axial resultante, así como las distribuciones de la BMD, y se compararon entre los animales tratados con PTH y ovariectomizados. A esta resolución, la densidad de cada vóxel depende de la extensión en que cada vóxel se ha llenado con hueso en oposición a tejido blando.

Resultados

Los informes de las diferencias en el texto son estadísticamente significativas, $p < 0,05$. Todos los animales ganaron de 4 % a 9 % de peso corporal inicial durante el estudio independientemente del tratamiento.

Medidas de suero y orina

Los niveles séricos de estradiol a los 3 y 18 meses eran menores que 5 pg/ml en todos los monos ovariectomizados. Cuando se compararon las medidas de homeostasis del calcio con los controles simulados, los controles ovariectomizados tenían niveles séricos menores de calcio y fosfato y de 1,25-dihidroxitamina D, pero no diferían en cuando a PTH endógena, adenosín monofosfato cíclico (AMPc) urinario, calcio urinario, creatinina urinaria o nitrógeno ureico sérico medidos 24 horas después de la última inyección. Los animales tratados con rhPTH(1-34) tenían niveles menores de fosfato sérico, menos PTH endógena y más 1,25-dihidroxitamina D y AMPc urinario en comparación con los animales ovariectomizados. Los ensayos de marcadores séricos de formación de hueso mostraron que los monos ovariectomizados tenían niveles bajos de fosfatasa alcalina (ALP) total y de osteocalcina en comparación con los simulados y se restauraron los niveles de rhPTH(1-34) de nuevo a los valores de los

simulados. La excreción del C-telopéptido urinario (CrossLaps), utilizado como marcador bioquímico de la resorción ósea, no estaba alterada por la rhPTH(1-34) en comparación con los controles ovariectomizados.

Masa ósea

5 La masa ósea esquelética total, expresada como el BMC corporal total, aumentó significativamente por la PTH(1-34) (Fig. 3). La densidad mineral ósea (BMD) de columna vertebral permaneció estable en los controles ovariectomizados durante 18 meses, mientras que los controles simulados ganaron aproximadamente un 5 % por encima del valor basal (figuras 4A-4C y 5A). La rhPTH(1-34) aumentó la BMD de la columna vertebral en un 7 % a un 14 % y el contenido mineral óseo (BMC, figura 3) de todo el cuerpo hasta un 6 % en comparación con el valor basal (figuras 4A-4C y 5A). El contenido mineral óseo de la columna vertebral aumentó también (Fig. 5A). En primates tratados con rhPTH(1-34), la magnitud de estos aumentos era significativamente mayor que la de los controles ovariectomizados e igualaba (PTH1) o superaba (PTH5) la de los simulados. La rhPTH(1-34) no alteró la BMD de la diáfisis o el radio distal. La superficie transversal de la diáfisis aumentó en un 7 % en el grupo de PTH5. El la tibia proximal, no hubo aumento de la superficie transversal, pero la rhPTH(1-34) aumentó el BMC y la BMD en comparación con los controles ovariectomizados. Seis meses después de la retirada del tratamiento, la BMD y el BMC en la columna vertebral y el cuello femoral permanecieron mayores que en los controles ovariectomizados, sin cambios en la diáfisis cortical del húmero.

Resistencia ósea

La rhPTH(1-34) aumentó la resistencia (F_y) en las vértebras hasta un 43 % (Tablas 7 y 8, figura 5B). La rhPTH(1-34) mejoró la resistencia del cuello femoral (f_u) hasta un 12 % (Tablas 7 y 9, figura 6A). La rhPTH(1-34) no alteró las medidas de la diáfisis cortical del húmero medio (Tablas 7 y 10) ni las propiedades materiales de los especímenes de haz maquinados de la diáfisis femoral (Tablas 7 y 9, Fig. 6B) en comparación con los controles ovariectomizados. En animales tratados con rhPTH(1-34) durante 12 meses y después retirados del tratamiento durante 6 meses, las medidas de resistencia ósea permanecieron significativamente mayores que en los controles ovariectomizados (Tablas 7-10, figuras 5B y 6A).

Tabla 7 Variables indicadas para especímenes de la tercera y cuarta vértebras lumbares (L-3 y L-4), diáfisis del húmero, cuello femoral proximal y haz femoral

Variable	Unidades	Descripción
Vértebras lumbares, L-3 y L-4		
A	mm ²	Superficie transversal
F _v	N	La fuerza de fluencia es la fuerza para un alargamiento del 0,2 %
S	N/mm	Pendiente de la porción lineal de la curva de fuerza-desplazamiento (rigidez)
	Mpa	Límite elástico
E	Mpa	Módulo de Young
Diáfisis del húmero		
t	mm	Espesor cortical promedio
F _u	N	La fuerza de rotura es la fuerza máxima que puede soportar el espécimen
S	N/mm	Pendiente de la porción lineal de la curva de fuerza-desplazamiento (rigidez), aquí es rigidez
mJ/U	N-mm	Área bajo la curva de carga-desplazamiento (U=esfuerzo de rotura)
Cuello femoral proximal		
F _u	N	La fuerza de rotura es la fuerza máxima que puede soportar el espécimen
Especímenes del haz de la diáfisis del fémur		
_u	Mpa	Tensión de rotura
E	Gpa	Módulo de Young
_u	J/m ³	Tenacidad
_u		Tensión de rotura

ES 2 621 653 T3

Tabla 8 Medidas biomecánicas de la resistencia de la columna vertebral (vértebras lumbares L-3 y L-4 combinadas) de primates ovariectomizados a los 18 meses

Variable (unidades) ^a	Simulado	Control OVX	PTH1	PTH1-W	PTH5	PTH5-W
A (mm ²)	90,5 ± 2,1 ^b	86,7 ± 2,3	88,3 ± 2,0	90,9 ± 2,3	87,3 ± 2,7	82,8 ± 2,1
F _v (N)	1738 ± 52	1499 ± 94 ⁵	1915 ± 105°	1899 ± 73°	2113 ± 77 ^{s,°}	1792 ± 59°
S (N/mm)	7312 ± 319	5805 ± 476 ⁵	7701 ± 474°	7401 ± 452°	8012 ± 367°	7074 ± 314°
v (Mpsa)	19,4 ± 0,6	17,3 ± 1,0	21,9 ± 1,3°	21,1 ± 0,8°	24,6 ± 1,1 ^{s,°}	21,9 ± 0,9°
E(Mpa)	650 ± 32	546 ± 49	717 ± 48°	659 ± 42	759 ± 36°	698 ± 41°

Abreviaturas: OVX=ovariectomizado; PTH1: rhPTH(1-34) 1 µg/kg durante 18 meses; PTH1-W= retirada durante 6 meses después del tratamiento con rhPTH(1-34) 1 m µg/kg durante 12 meses; PTH5= rhPTH(1-34) 5 µg/kg durante 18 meses; PTH5-W= retirada durante 6 meses después del tratamiento con rhPTH(1-34) 5 µg/kg durante 12 meses.

^aVéase la tabla 4.1 para la descripción de las variables

^bDatos expresados como media ± error típico de la media (SEM) por grupo.

[°]Estadísticamente significativo en comparación con los controles OVX (p < 0,05).

^{5s}Estadísticamente significativo en comparación con los controles simulados (p < 0,05).

Tabla 9 Medidas biomecánicas de las propiedades del material de especímenes de haz de tamaño equivalente de diáfisis femoral y medida biomecánica de la resistencia del cuello femoral de primates ovariectomizados a los 18 meses

Variable (unidades) ^a	Simulado	Control OVX	PTH1	PTH1-W	PTH5	PTH5-W
b (Mpa)	222 ± 5 ^b	216 ± 5	222 ± 4	214 ± 6	206 ± 6	208 ± 6
E(Gpa)	17,2 ± 0,6	16,4 ± 0,4	17,1 ± 0,4	16,6 ± 0,6	15,4 ± 0,6 ^s	15,3 ± 0,6 ^s
u (mJ/m ³)	5,9 ± 0,3	5,8 ± 0,4	6,1 ± 0,4	5,5 ± 0,4	5,4 ± 0,4	6,1 ± 0,4
b	0,035 ± 0,001	0,035 ± 0,002	0,036 ± 0,002	0,034 ± 0,002	0,034 ± 0,002	0,038 ± 0,002
Cuello femoral proximal						
F _u	1288 ± 41	1105 ± 53 ^s	1235 ± 45°	1258 = 52°	1362 ± 30°	1213 ± 42

Abreviaturas: OVX=ovariectomizado; PTH1: rhPTH(1-34) 1 µg/kg durante 18 meses; PTH1-W= retirada durante 6 meses después del tratamiento con rhPTH(1-34) 1 m µg/kg durante 12 meses; PTH5= rhPTH(1-34) 5 µg/kg durante 18 meses; PTH5-W= retirada durante 6 meses después del tratamiento con rhPTH(1-34) 5 µg/kg durante 12 meses.

^aVéase la tabla 4.1 para la descripción de las variables

^bDatos expresados como media ± error típico de la media (SEM) por grupo.

[°]Estadísticamente significativo en comparación con los controles OVX (p < 0,05).

^{5s}Estadísticamente significativo en comparación con los controles simulados (p < 0,05).

Tabla 10 Medidas biomecánicas del hueso cortical de la diáfisis del húmero de primates ovariectomizados a los 18 meses

Variable (unidades) ^a	Simulado	Control OVX	PTH1	PTH1-W	PTH5	PTH5-W
t(mm)	1,74 ± 0,04 ^b	1,63 ± 0,03 ^s	1,68 ± 0,03	1,66 ± 0,04	1,80 ± 0,04 ^o	1,72 ± 0,05
F _u (N)	725 ± 26	636 ± 26	654 ± 23	689 ± 23	680 ± 15 ^s	707 ± 24
S(N/mm)	601 ± 23	520 ± 26	544 ± 23	573 ± 20	548 ± 18	573 ± 24
U(mJ)	1797 ± 85	1542 ± 92	1641 ± 137	1751 ± 84	1804 ± 99	1775 ± 113

Abreviaturas: OVX=ovariectomizado; PTH1: rhPTH(1-34) 1 µg/kg durante 18 meses; PTH1-W= retirada durante 6 meses después del tratamiento con rhPTH(1-34) 1 µg/kg durante 12 meses; PTH5= rhPTH(1-34) 5 µg/kg durante 18 meses; PTH5-W= retirada durante 6 meses después del tratamiento con rhPTH(1-34) 5 µg/kg durante 12 meses.

^aVéase la tabla 4.1 para la descripción de las variables

^bDatos expresados como media ± error típico de la media (SEM).

^oEstadísticamente significativo en comparación con los controles OVX (p < 0,05).

^sEstadísticamente significativo en comparación con los controles simulados (p < 0,05).

20 Histomorfometría ósea

Aunque las velocidades de recambio eran mayores en los controles ovariectomizados que en los simulados, no hubo una pérdida significativa de volumen óseo en la cresta iliaca. Ya que el marcaje de tetraciclina administrado a los 6 meses no era detectable en muchos animales, se midieron sólo parámetros estáticos en ese momento. Los datos histomorfométricos estáticos y dinámicos a los 15 meses mostraron que el tratamiento con rhPTH(1-34) aumentaba la superficie de hueso esponjoso en comparación con los ovariectomizados, y aumentaba la formación de hueso sin aumentar las medias de resorción por encima de las medidas en los controles ovariectomizados. La velocidad de formación de hueso aumentó progresivamente por dosis mayores de rhPTH(1-34). Aunque el hueso esponjoso permaneció aumentado en comparación con los controles ovariectomizados después de la retirada de la rhPTH(1-34) después de 12 meses de tratamiento, la formación y resorción óseas revirtieron a las observadas en controles ovariectomizados, y el recambio óseo permaneció mayor que en los controles simulados. La rhPTH(1-34) no afectó la mineralización, la frecuencia de activación ni los periodos de remodelación. No hubo diferencias en el equilibrio óseo basado en la unidad multicelular ósea individual (BMU) entre la resorción y la formación. En resumen, la rhPTH(1-34) aumentó el hueso esponjoso mediante la estimulación selectiva de la formación de hueso.

En el hueso cortical del húmero, en que la rhPTH(1-34) no modificó significativamente la BMD ni las medidas de resistencia ósea, la rhPTH(1-34) estimuló cambios en los compartimentos perióstico, endóstico e intracortical (Tablas 11 y 12). Aunque no hubo diferencias en la superficie total o superficie medular entre grupos, la rhPTH(1-34) aumentó la superficie cortical, y los grupos PTH5 y PTH5-W tuvieron significativamente más hueso cortical, lo que sugiere un momento de inercia transversal aumentado, una medida de la resistencia. El aumento de la superficie podría atribuirse a un aumento de la formación tanto de superficies perióstica como endóstica (figura 7).

Los controles simulados y los grupos tratados con PTH5-W tenían superficies de mineralización perióstica reducidas en comparación con los controles ovariectomizados y los demás grupos tratados con rhPTH(1-34). Las superficies de mineralización endocorticales eran significativamente mayores en controles ovariectomizados en comparación con los simulados y la rhPTH(1-34) no aumentó por encima de los valores de los controles ovariectomizados. En la remodelación intracortical, hubo más espacios de resorción en los animales ovariectomizados y la frecuencia de activación fue mayor en los grupos ovariectomizado, PTH1 y PTH5 que en los controles simulados o en cualquiera de los grupos de retirada. Hubo significativamente más osteonas marcadas por unidad de superficie en los ovariectomizados en comparación con los controles simulados y la rhPTH(1-34) no aumentó estas significativamente por encima de los valores de los controles ovariectomizados.

La porosidad intracortical fue mayor en los animales ovariectomizados en comparación con los simulados, pero no diferente entre los controles ovariectomizados y los tratados con PTH1. PTH5 y PTH5-W aumentaron la porosidad por encima de la observada en controles ovariectomizados. Los datos de estudios de conejos sugerían la hipótesis de que el aumento de porosidad, acompañado del aumento de hueso cortical, puede ser una respuesta estructural para mantener las propiedades biomecánicas del hueso tratado con rhPTH(1-34). No hubo diferencias entre los grupos ovariectomizado y los otros grupos en el periodo de formación, anchura del osteoide, anchura de la pared o maduración del osteoide a los 18 meses.

En resumen, no hubo diferencias en las velocidades de recambio entre los controles ovariectomizados y cualquier dosis de rhPTH(1-34). Los controles simulados tuvieron una velocidad de recambio menor que cualquiera de los controles ovariectomizados o animales tratados con rhPTH(1-34). Cuando se retiró la rhPTH(1-34) durante 6 meses, las velocidades de recambio se redujeron significativamente, pero las medidas de BMD y resistencia biomecánica permanecieron mayores que en los controles ovariectomizados. Los valores normales para anchura del osteoide y tiempo de maduración intracortical para todos los grupos indican que el tratamiento no causó ningún defecto en la

cadencia del proceso de mineralización. Los valores normales de anchura de pared indican que el tratamiento no alteró el equilibrio normal entre resorción y formación al nivel de la BMU individual.

Tabla 11 Variables histomorfométricas para las medidas de hueso cortical del húmero

Variable ^a	Unidades	Descripción
Ac.F	Ciclos/año	Frecuencia de activación
BFR/BS.Ec	µm/día	Velocidad de formación ósea, referente de la superficie endocortical
BFR/BS.Ps	µm/día	Velocidad de formación ósea, referente de la superficie perióstica
BFR/BV	%/año	Velocidad de formación ósea, referente del volumen óseo
FP	días	Periodo de formación
L.On.N/CtA	#/mm ²	Número de osteonas marcadas con fluorocromo por unidad de superficie cortical
MAR	µm/día	Tasa de aposición mineral, intracortical
MAR.Ec	µm/día	Tasa de aposición mineral, superficie endocortical
MAR.Ps	µm/día	Tasa de aposición mineral, superficie perióstica
MS/BS.Ec	%	Superficie de mineralización endocortical normalizada con respecto a la superficie endocortical total
MS/BS.Ps	%	Superficie de mineralización perióstica normalizada con respecto a la superficie perióstica total
O.Wi	µm	Anchura del osteoide
Rs.N/Ct.A	n.º/mm ²	Número de espacios de resorción por unidad de superficie cortical
W.Wi	µm	Anchura de la pared osteonal
omt	días	Tiempo de maduración del osteoide
Po	%	Porosidad, porcentaje de la superficie ósea ocupado por espacios
B.Ar	mm ²	Superficie ósea, la superficie total dentro de la superficie perióstica
Ct. Ar	mm ²	Superficie cortical, superficie de hueso dentro de la superficie perióstica (incluye porosidades)
Mc.Ar	mm ²	Superficie de la cavidad medular

^aNomenclatura recomendada por el Journal of Bone and Mineral Research, 1987.

40

45

50

55

60

65

Tabla 12 Histomorfometría cortical de la diáfisis del húmero de primates ovariectomizados a 18 meses (n=121)

Variable ^b	Simulado	OVX	PTH1	PTH1-W	PTH5	PTH5-W
Ac.F	1,85 ± 1,87 ^{a,c}	6,06 ± 3,31	7,69 ± 4,96	3,05 ± 2,15 ^a	8,70 ± 3,97	2,05 ± 1,46 ^a
BFR/BS.Ec	7,08 ± 3,80	20,93 ± 19,23	18,14 ± 13,95	14,89 ± 10,32	34,04 ± 19,01	12,73 ± 16,33 ^a
BFR/BS.Ps	3,79 ± 3,07	9,12 ± 7,58	8,53 ± 10,54	3,60 ± 3,84 ^a	8,99 ± 5,81	5,79 ± 4,05
BFR/BV	2,13 ± 2,06 ^a	9,16 ± 5,37	9,23 ± 5,93	4,39 ± 3,48 ^a	12,93 ± 5,94 ^a	2,21 ± 1,73 ^a
FP	82,73 ± 41,06	65,94 ± 19,79	63,44 ± 10,02	64,94 ± 11,99	81,97 ± 95,63	88,63 ± 52,90
L.On.N/Ct.A	0,28 ± 0,27 ^a	1,03 ± 0,52	1,26 ± 0,71	0,50 ± 0,36 ^a	1,45 ± 0,47 ^a	0,38 ± 0,26 ^a
MAR	0,91 ± 0,33 ^a	1,07 ± 0,19	0,98 ± 0,12 ^a	1,06 ± 0,27	1,03 ± 0,23	0,85 ± 0,28 ^a
MAR.Ec	0,48 ± 0,19 ^a	0,75 ± 0,25	0,66 ± 0,15	0,66 ± 0,16	0,75 ± 0,14	0,63 ± 0,17
MAR.Ps	0,62 ± 0,24	0,69 ± 0,23	0,89 ± 0,95	0,54 ± 0,152 ^a	0,66 ± 0,17	0,82 ± 0,15
MSBS.Ec	3,09 ± 6,49 ^a	20,99 ± 18,04	25,19 ± 17,14	11,74 ± 14,41 ^a	40,47 ± 24,68 ^a	8,93 ± 15,39 ^a
MSBS.Ps	1,81 ± 3,59 ^a	10,03 ± 10,49	8,59 ± 5,73	3,86 ± 4,83 ^a	11,00 ± 9,63	2,30 ± 3,76 ^a
O.Wi	3,77 ± 0,92	4,04 ± 0,91	3,66 ± 0,67	3,96 ± 0,83	3,94 ± 1,13	3,76 ± 0,83
Rs.N/Ct.A	0,12 ± 0,17 ^a	0,21 ± 0,13	0,28 ± 0,18	0,12 ± 0,07 ^a	0,43 ± 0,26 ^a	0,19 ± 0,18
W.Wi	63,23 ± 13,61	68,63 ± 15,09	61,36 ± 7,79	63,12 ± 17,35	65,28 ± 9,43	63,82 ± 8,31
omt	4,58 ± 1,26	3,87 ± 1,04	3,76 ± 0,70	3,86 ± 0,74	6,45 ± 13,85	5,07 ± 2,65
Po	1,32 ± 0,60 ^a	2,61 ± 1,40	4,65 ± 4,78	2,23 ± 1,60	6,78 ± 4,23 ^a	6,40 ± 4,22 ^a
B.Ar	53,12 ± 5,50	52,82 ± 7,09	54,22 ± 5,97	54,94 ± 6,55	55,81 ± 6,24	58,16 ± 8,79 ^a
Ct.Ar	37,40 ± 3,75	35,35 ± 5,04	37,61 ± 3,86	38-10 ± 4,83	40,96 ± 4,30 ^a	40,83 ± 5,80 ^a
Me.Ar	15,72 ± 4,07	17,47 ± 4,22	16,61 ± 3,77	16,84 ± 3,74	14,85 ± 4,72 ^a	17,34 ± 6,05

Abreviaturas: OVX=ovariectomizado; PTH1: rhPTH(1-34) 1 µg/kg durante 18 meses; PTH1-W= retirada durante 6 meses después del tratamiento con rhPTH(1-34) 1 m µg/kg durante 12 meses; PTH5= rhPTH(1-34) 5 µg/kg durante 18 meses; PTH5-W= retirada durante 6 meses después del tratamiento con rhPTH(1-34) 5 µg/kg durante 12 meses.

^aEstadísticamente significativo en comparación con los controles OVX (p < 0,05).

^bVéase la tabla 4.2 para la descripción de las variables

^cDatos expresados como media ± error típico de la media (SEM).

Los análisis mediante histomorfometría y microscopia de infrarrojos polarizada de transformada de Fourier revelaron que la administración de PTH mejoraba la calidad ósea al reemplazar el hueso viejo (cristalitos grandes) con hueso joven (intervalo de tamaño de cristalitos con tendencia a un tamaño menor). Además, tras la retirada de la PTH de monos administrados a dosis bajas, existe un beneficio adicional, ya que la matriz se mineraliza óptimamente y los cristalitos maduran. Los datos derivados de histomorfometría y microscopia infrarroja de transformada de Fourier muestran un inesperado beneficio sobre la calidad ósea del hueso cortical, ya que al aparecer la mineralización óptima, la fase mineral madura.

Estudios de modelación de elementos finitos tridimensionales

El examen de la lámina media de 500 µm de L-5 mostró un aumento de un 21 % de la BMD para PTH en comparación con ovariectomizados que era debido a un aumento del 27 % del BMC sin cambios en la superficie transversal. El análisis del centro de los grupos de PTH mostró un aumento de un 73 % de BV/TV que era debido a un aumento de un 30 % de Tb.Th y un Tb.N un 37 % mayor en comparación con los animales ovariectomizados. Los análisis de conectividad para esta región mostraron una densidad nodal mayor que un 140 % (volumen de nodo/tejido) y un 286 % más de soportes nodo a nodo para las vértebras del grupo de PTH.

El análisis de distribución de histograma de las densidades de vóxel óseo para PTH mostró una reducción de la proporción de densidades bajas (0-355 mg/cm³), un aumento de las densidades medias (356-880 mg/cm³), con poco efecto sobre los vóxeles de densidad alta (887-1200 mg/cm³) en comparación con los animales ovariectomizados (Fig. 8). Lo más notable fue el desplazamiento a una mayor densidad de vóxel óseo en el compartimiento de hueso cortical después de la retirada del tratamiento durante 6 meses (figura 8).

Se calculó la proporción de elementos óseos vertebrales (vóxeles) que entraba dentro de un cierto intervalo de valores de BMD. Los intervalos de BMD elegidos fueron los siguientes: BMD baja, 0-300 mg/cm³; BMD media, 300-700 mg/cm³; BMD alta, 700-1000 mg/cm³; y BMD cortical > 1000 mg/cm³ (Tabla 13). En comparación con los controles ovariectomizados, el tratamiento con PTH redujo significativamente el volumen óseo de BMD baja y

aumentó el volumen óseo de la BMD media. Después de la retirada de la PTH, hubo una reducción del hueso de BMD media y un aumento del hueso de BMD alta, indicando que el hueso de BMD media se hizo más denso.

Tabla 13. Porcentajes de volumen vertebral de L5 agrupados por valores de BMD (media ± SEM)

Tratamiento	BMD baja (%)	BMD media (%)	BMD alta (%)	BMD cortical (%)
ovariectomizados	30,4±2,2	48,7±1,6	19,9±1,2	0,9±0,3
PTH	17,7±1,6*	58,9±1,9*	22,8±2,7	0,6±0,3
PTH-W	22,4±1,3*	49,7±1,2	27,0±1,6*	0,8±0,2

Tabla 14. BMC al nivel medio de la vértebra L5 y tensión eficaz de la vértebra

Tratamiento	BMC (mg)	Tensión eficaz (sin tensión)
ovariectomizados	37,2±1,6	701±64
PTH	47,4±1,5*	447±36*
PTH-W	44,2±1,2*	539±34*
*Estadísticamente diferente (p < 0,05 mediante la prueba PLSD de Fisher).		

Los datos resumidos en la figura 8 muestran que la vértebra L5 de monos cynomolgus tratados durante 18 meses con PTH responden con aumentos significativos de la masa ósea, el espesor trabecular y la conectividad trabecular, con efectos marginales sobre las dimensiones externas (superficie X) de la vértebra. El análisis de la distribución de los elementos óseos en L5 mostró que las regiones óseas fuertemente mineralizadas cambian mínimamente sin evidencia de esclerosis ósea. En su lugar es el hueso trabecular poroso el que más respondía a la PTH. El desplazamiento de la BMD condujo a una reducción sustancial de la deformación axial, indicando una mejora mecánica. Como se muestra claramente en los histogramas de PTH y BMD de ovariectomía, la PTH convirtió los vóxteles óseos de densidad baja en vóxteles óseos de densidad media sin efecto significativo sobre los vóxteles de densidad alta.

Los datos resumidos en la tabla 2 muestran que el BMC en la parte central de las vértebras aumentó significativamente con el tratamiento con PTH y un efecto beneficioso de PTH permaneció a los 6 meses de la retirada. La tensión mecánica promedio en la vértebra se redujo un 36 % mediante el tratamiento con PTH y se mantuvo un 23 % por debajo de los OVX después de la retirada de PTH. Este estudio indica que el retiro del tratamiento con PTH durante 6 meses no condujo a la reabsorción del hueso recién formado, sino que en cambio hubo una redistribución beneficiosa del hueso de densidad media en hueso de densidad más baja y más alta. Esta redistribución condujo a una reducción continuada de la deformación en las vértebras y, por tanto, a una función mecánica mejorada.

Discusión

Este estudio en primates indica que la PTH, administrada en ausencia de otros medicamentos que podrían afectar al hueso, beneficia tanto al hueso cortical como trabecular aumentando la masa ósea esquelética total. Además, la retirada de la PTH no dio como resultado una pérdida significativa de los beneficios asociados al tratamiento con PTH durante un periodo de al menos 2 ciclos de remodelación.

Se han utilizado marcadores sustitutos en los demás ensayos para indicar la actividad en hueso, y se supone que los cambios de valor reflejan cambios en la masa ósea. Aunque existen publicados datos de seres humanos y primates que muestran que aumentan tanto los marcadores de formación como de resorción consistentemente con la activación del recambio óseo, por ejemplo durante el inicio de la menopausia o en estados patológicos activos, el recambio alto es considerado indicativo de pérdida ósea. En la adolescencia, se ha estudiado menos un recambio alto durante la maduración del esqueleto humano, pero está acompañado por una ganancia anabólica de masa ósea. Dicho fenómeno sería totalmente inesperado en la terapia con fármacos de la osteoporosis, según la técnica actual. Por tanto, el aumento de los marcadores de recambio óseo es inconsistente con el efecto anabólico conocido de la PTH de aumentar la masa y resistencia óseas, como muestran los datos en el presente estudio.

Los datos de este estudio de 18 meses en monos cynomolgus apoyan los siguientes inesperados descubrimientos:

- Aumento significativo general de la masa esquelética total
- Aumento significativo de la masa y la resistencia óseas en el cuello femoral.
- Ninguna evidencia de "robo" de hueso cortical para aumentar el hueso trabecular. El aumento de la masa y la resistencia óseas fue estadísticamente significativo en los sitios enriquecidos por hueso cortical (cuello femoral) o hueso trabecular (vértebras lumbares). En los sitios de hueso puramente cortical (diáfisis media femoral), hubo una tendencia de la PTH a estabilizar o aumentar ligeramente la masa y resistencia óseas, en comparación con

los controles ovariectomizados.

- Los cambios en los marcadores óseos en monos ovariectomizados (y seres humanos) no reflejan los efectos anabólicos beneficiosos de la PTH sobre el esqueleto. uso de fluidos corporales de primates en el presente estudio permite el desarrollo de nuevos y más válidos marcadores sustitutos.
- 5 • La retención de la ganancia de masa y resistencia óseas durante al menos 2 ciclos de remodelación después de la retirada del tratamiento.

Este estudio de PTH en primates difiere de los estudios publicados sobre monos Rhesus y cynomolgus en que se utiliza un gran tamaño de muestra para proporcionar una apropiada potencia estadística para detectar diferencias que pueden no haber sido evidentes en estudios mucho menores anteriores; los controles incluían tanto primates ovariectomizados (utilizados en estudios publicados) como primates operados simuladamente, pero intactos. El último grupo de control no se ha reseñado anteriormente en este tipo de estudio, de modo que algunos de los beneficios de la PTH y el restablecimiento de ciertas medidas a los niveles del control simulado, en comparación con los valores para animales ovariectomizados, se evaluaron por primera vez.

Conclusiones

Este estudio de 18 meses en monos *Cynomolgus* maduros silvestres ovariectomizados (OVX), *Macaca fascicularis*, aseguró la eficacia y seguridad en el hueso después del tratamiento con rhPTH(1-34) durante 12 meses seguidos de retirada del tratamiento durante 6 meses, o tratamiento durante 18 meses. La rhPTH(1-34) aumentó significativamente la masa y resistencia óseas de la columna y el cuello femoral por encima de los controles ovariectomizados hasta niveles equivalentes o mayores a los de los controles simulado. En monos ovariectomizados tratados con rhPTH(1-34), las medidas de homeostasis de calcio (calcio, fosfato y 1,25-dihidroxitamina D séricos) se restablecieron a las de los controles simulados. Las medidas de suero, orina e histomorfometría utilizadas para evaluar el recambio óseo mostraron que la rhPTH(1-34) mantenía velocidades de formación equivalentes o mayores a las de los controles ovariectomizados, mientras que los marcadores bioquímicos de la resorción ósea permanecían equivalentes a los de los controles simulados. En todos los animales tratados con rhPTH(1-34) durante hasta 18 meses, las medidas farmacocinéticas no cambiaron con el tiempo, y no hubo acumulación de rhPTH(1-34). No hubo evidencia de hipercalcemia sostenida ni patología renal después de 18 meses de tratamiento. No hubo cambios en los periodos de mineralización o remodelación. La ganancia neta de contenido mineral óseo esquelético observada con rhPTH(1-34) puede explicarse por el aumento de la velocidad de formación de hueso y la superficie de formación de hueso con poco o ningún efecto sobre la resorción ósea. Hubo aumentos significativos del contenido mineral óseo, la densidad mineral ósea y las medidas biomecánicas de resistencia, incluyendo tenacidad y rigidez, en sitios clínicamente relevantes tales como la columna, el cuello femoral y la tibia proximal.

La rhPTH(1-34) aumentó la velocidad de recambio en el hueso cortical del húmero y del radio medios, pero no alteró significativamente la masa ósea ni las medidas biomecánicas de resistencia en comparación con los controles ovariectomizados o simulados. Sin embargo, el aumento de la anchura cortical y/o superficie ósea cortical es consistente con un aumento del momento de inercia transversal, una medida de resistencia y rigidez. La rhPTH(1-34) no tuvo efectos significativos sobre las propiedades intrínsecas del material de hueso cortical. La formación de hueso endocortical se estimuló, aumentando así la anchura cortical y la porosidad intracortical. Parece que estos cambios de porosidad son responsables del mantenimiento de la elasticidad del hueso.

En monos, los 12 meses de tratamiento con rhPTH(1-34) seguidos de retirada durante 6 meses estuvieron asociados a ganancias de masa y resistencias óseas menores, pero todavía significativas, en la columna y cuello femoral. Después de la retirada, no se observaron efectos significativos sobre la diáfisis de hueso cortical del húmero y radio. Los marcadores óseos y la histomorfometría mostraron tendencias a volver a los valores de recambio medidos en los controles simulados.

Los estudios mecanísticos in vivo en roedores mostraron que los genes asociados a los resultados anabólicos de la rhPTH(1-34) están estimulados a las 1 a 6 horas, y el aumento de las superficies de formación de hueso puede detectarse a las 24 horas después de la primera dosis en ausencia de efectos detectables sobre la resorción. La rhPTH(1-34) parece agrupar osteoprogenitores en fase S, y estimular su diferenciación en osteoblastos, aumentando así rápidamente el porcentaje de superficies de formación de hueso. Pueden administrarse inyecciones únicas o múltiples de rhPTH(1-34) en un periodo de 1 hora para inducir el efecto anabólico en el hueso. Sin embargo, cuando se administra la dosis equivalente a ratas jóvenes en forma de inyecciones múltiples durante 6 u 8 horas, el efecto anabólico se anuló, sugiriendo que es necesaria una exposición breve limitada a rhPTH(1-34) para inducir el efecto anabólico.

En resumen, la rhPTH(1-34) es anabólica en el hueso de monos y conejos, aumentando la masa ósea y las medidas de resistencia biomecánica en sitios clínicamente relevantes tales como la columna lumbar y el cuello femoral mediante la estimulación selectiva de la formación de hueso. Los aumentos del recambio óseo, la formación de superficie endocortical y la porosidad, detectados mediante histomorfometría en los sitios corticales, no alteró la masa ósea ni las medidas biomecánicas de resistencia ósea, pero aumentó el momento de inercia transversal al aumentar la superficie y/o la anchura ósea cortical.

Estos estudios demuestran que la administración de activadores de receptor de hormona paratiroidea, tales como PTH(1-34) recombinante humana, mejora la calidad ósea tanto durante como después del tratamiento. De hecho, la administración de PTH una vez al día durante 18 meses, o a las mismas dosis durante 12 meses seguidos de una fase de retirada de 6 meses, mostró una notable mejora de la calidad del hueso cortical del húmero analizado mediante histomorfometría y microscopia de infrarrojos polarizada de transformada de Fourier (FTIR). Este análisis reveló que la administración de PTH mejoraba la calidad ósea al reemplazar el hueso viejo (cristalitos grandes) con hueso joven (intervalo de tamaño de cristalitos con tendencia a un tamaño menor). Por tanto, la administración de PTH puede aumentar la calidad ósea cortical, mejorar la mineralización y acelerar la mineralización y el reemplazo de hueso viejo con hueso nuevo.

Además, tras la retirada de la PTH de monos administrados a dosis bajas, existe un beneficio adicional, ya que la matriz se mineraliza más óptimamente y los cristalitos maduran. Es decir, a dosis bajas la PTH puede tener beneficios adicionales durante la fase de retirada del tratamiento potenciando la mineralización. Estos datos indican los beneficios de un régimen finito de tratamiento con PTH seguido de un periodo de retirada para conseguir el beneficio potenciado. Las definiciones actuales de calidad ósea no incluyen estos aspectos de la mineralización mejorada.

En los estudios iniciales de una fase de tratamiento con PTH seguida de una fase de no tratamiento, la fase de tratamiento era de menos de 1 mes. La fase de tratamiento prolongado pero finito de 18-24 meses seguida por un periodo de al menos 2 ciclos de remodelación no se ha explorado previamente. El beneficio continuado en primates después de la retirada del tratamiento está en marcado contraste con los resultados conseguidos en roedores tras dosificación con PTH. Los estudios en ratas han mostrado uniformemente que el hueso se pierde rápidamente después de la retirada del tratamiento. Gunness-Hey, M. y Hock, J. M. (1989) Bone 10: 447-452; Shen, V. et al. (1993) J. Clin Invest 91: 2479-2487; Shen, V. et al. (1992) Calcif. Tissue Int. 50: 214-220; and Mosekilde, L. et al. (1997) Bone 20: 429-437.

Dicho procedimiento de potenciar la mineralización ósea no se ha observado anteriormente y es inesperado, revelando un nuevo procedimiento mediante el cual la PTH refuerza y endurece el hueso y puede prevenir fracturas. Este nuevo procedimiento incluye potenciar y regular la mineralización para proporcionar hueso más tenaz, más rígido y más resistente a la fractura. Dichos efectos beneficiosos requieren más que una nueva formación de matriz. Estos descubrimientos indican que la PTH tiene beneficios en pacientes con huesos o esqueletos inmovilizados o en esqueletos deficientes en mineral, con la condición de que exista también un suplemento adecuado de calcio y vitamina D.

Ejemplo 3 - Resistencia y densidad ósea aumentadas y fracturas reducidas tras la administración de rhPTH(1-34) a seres humanos

40	Número de sujetos	rhPTH(1-34): 1093 inscritos, 848 terminaron. Placebo: 544 inscritos, 447 terminaron.
45	Criterios de diagnóstico e inclusión:	Mujeres de 30 a 85 años de edad, posmenopáusicas durante un mínimo de 5 años, con un mínimo de una fractura vertebral traumática moderada o dos leves.
50	Dosificación y administración:	<u>Producto de análisis (ciego)</u> rhPTH(1-34): 20 µg/día, administrado por vía subcutánea rhPTH(1-34): 40 µg/día, administrado por vía subcutánea Terapia de referencia (ciego)
55	Duración del tratamiento:	Material de estudio placebo para inyección rhPTH(1-34): 17-23 meses (excluyendo la fase de preinclusión de 6 meses)
60	Criterios de evaluación:	Placebo: 17-23 meses (excluyendo la fase de preinclusión de 6 meses) Rayos X de la columna; marcadores biológicos séricos (calcio, fosfatasa alcalina específica de hueso, propéptido carboxi-terminal de procólágeno I); marcadores de orina (calcio, N-telopéptido, desoxipiridinolina libre); 1,25-dihidroxitamina D; densidad mineral ósea: columna, cadera, muñeca y cuerpo entero; altura; farmacocinética de la población; biopsia ósea (sitios de estudio seleccionados).
65		

Características de los pacientes

		Placebo (N=544)	PTH-20 (N=541)	PTH-40 (N=552)	Valor p
	Caucásicos	98,9 %	98,9 %	98,4 %	0,672
	Edad	69,0±7,0	69,5±7,1	69,9±6,8	0,099
5	Años en menopausia	20,9±8,5	21,5±8,7	21,8±8,2	0,273
	Histerectomizadas	23,8 %	23,1 %	21,6 %	0,682
	Útero + 0 o 1 ovario	57	51	58	
10	Útero + 2 ovarios	61	57	51	
	Desconocido	11	17	10	
	Uso previo de fármacos para la osteoporosis	14,9 %	15,5 %	13,0 %	0,479
15	BMD basal de la columna	0,82±0,17	0,82±0,17	0,82±0,17	>0,990
	N.º basal de fc. vertebral				>0,990
	0	54 (10,4 %)	45 (8,8 %)	54 (10,1 %)	
20	1	144 (27,8 %)	159 (31,1 %)	169 (31,6 %)	
	2	128 (24,7 %)	128 (25,0 %)	125 (23,4 %)	
	3	75 (14,5 %)	67 (13,1 %)	81 (15,1 %)	
	4	59 (11,4 %)	49 (9,6 %)	45 (8,4 %)	
25	5	28 (5,4 %)	31 (6,1 %)	21 (3,9 %)	
	6	13 (2,5 %)	20 (3,9 %)	25 (4,7 %)	
	7	6 (1,2 %)	7 (1,4 %)	10 (1,9 %)	
30	8	9 (1,7 %)	5 (1,0 %)	3 (0,6 %)	
	9	1 (0,2 %)	0	2 (0,4 %)	
	10	1 (0,2 %)	1 (0,2 %)	0	
35	Sin especificar	26	29	17	

Resultados

Los datos de este ensayo clínico se indican en las tablas 15–19.

La Tabla 15 ilustra datos que muestran la reducción tras el tratamiento con PTH del número y la gravedad de fracturas vertebrales. Comparando todos los pacientes tratados con PTH con el placebo, la reducción total en el número de pacientes con fracturas vertebrales fue del 67 % ($p < 0,001$), con una reducción del 65 % ($p < 0,001$) con PTH 20 m g/día en comparación con el placebo y una reducción del 69 % con PTH 40 m g/día en comparación con el placebo (Tabla 15). Comparando todos los pacientes tratados con PTH con el placebo, la reducción total en el número de pacientes con fracturas vertebrales múltiples fue del 81 % ($p < 0,001$), con una reducción del 77 % ($p < 0,001$) con PTH 20 m g/día en comparación con el placebo y una reducción del 86 % con PTH 40 m g/día en comparación con el placebo. Comparando todos los pacientes tratados con PTH con el placebo, la reducción total en el número de pacientes con fracturas vertebrales moderadas o graves fue del 84 % ($p < 0,001$), con una reducción del 90 % ($p < 0,001$) con PTH 20 m g/día en comparación con el placebo y una reducción del 78 % con PTH 40 m g/día en comparación con el placebo (Tabla 15).

Tabla 15. Efecto del tratamiento con PTH sobre el número y la gravedad de las fracturas vertebrales.

	Placebo (n*=448)	20 µg/día de PTH (n=444)	40 µg/día de PTH (n=434)	
5	Número y porcentaje de pacientes con fracturas vertebrales nuevas	64 (14,3 %)	22 (5,0 %)	19 (4,4 %)
	Número y porcentaje de pacientes con 2 o más fracturas vertebrales nuevas	22 (4,9 %)	5 (1,1 %)	3 (0,7 %)
10	Número y porcentaje de pacientes con fracturas moderadas o graves**	42 (9,4 %)	4 (0,9 %)	9 (2,1 %)
15	*n = número de pacientes con radiografías basales y de punto final **La fractura moderada da como resultado una pérdida de más del 25 % de la altura vertebral (o una medida equivalente). La fractura grave da como resultado una pérdida de más del 40 % de la altura vertebral (o una medida equivalente). Las fracturas son como definen Genant et al. (1993) Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique; J. Bone & Min Res 81137–1148.			

20 La tabla 16 ilustra el efecto del tratamiento con PTH sobre el número de fracturas en diversos huesos no vertebrales en todo el cuerpo. El número de fracturas se reduce aparentemente en cada uno de los sitios de cadera, radio, tobillo húmero, costillas, pie, pelvis y otros (Tabla 16). La reducción es estadísticamente significativa cuando se observa como la reducción del número total de fracturas entre los pacientes tratados con PTH en comparación con los pacientes tratados con placebo. La reducción es aún más significativa cuando se considera como la reducción del número total de fracturas de cadera, radio, tobillo, húmero, costillas, pie y pelvis entre los pacientes tratados con PTH en comparación con los pacientes tratados con placebo (Tabla 16).

Tabla 16. Efecto del tratamiento con PTH sobre el número de fracturas no vertebrales.

	Placebo (N=544)	PTH-20 (N=541)	PTH-40 (N=552)	Valores p				
				Global	PTH-pbo*	20-pbo	40-pbo	
30	Cadera	4	2	3	0,718	0,474	0,417	0,690
	Radio	13	7	10	0,404	0,236	0,180	0,504
35	Tobillo	4	2	2	0,601	0,313	0,417	0,403
	Húmero	5	4	3	0,767	0,534	0,744	0,465
	Costillas	10	5	5	0,277	0,109	0,197	0,184
40	Pie	4	1	4	0,374	0,474	0,181	0,983
	Pelvis	3	1	0	0,171	0,076	0,319	0,081
	Otros	16	14	9	0,338	0,296	0,723	0,146
	Total	53	34	32	0,024	0,007	0,036	0,015
45	Total sin "Otras"	41	21	24	0,013	0,003	0,010	0,025
	*Placebo (pbo)							

50 El efecto de la PTH sobre el contenido mineral (BMC), la densidad mineral ósea (BMD) y la superficie ósea se determinaron mediante absorciometría de energía dual (DEXA), y los resultados se indican en la Tablas 17-19. La administración de PTH causó aumentos aparentes del BMC en la columna, el fémur, la cadera y la muñeca del paciente y en el cuerpo entero del paciente (Tabla 17). El tratamiento con PTH causó aumentos significativos de la BMD del paciente en la columna, el fémur y la cadera (Tabla 18). Los aumentos en la columna, el fémur y la cadera eran estadísticamente significativos, con $p < 0,001$ (Tabla 18). La superficie ósea aumentó aparentemente tras el tratamiento con PTH para la columna, el fémur y la cadera del paciente (Tabla 19). Los aumentos fueron significativamente estadísticos para la columna lumbar y el cuello de la cadera (Tabla 19).

60 El efecto de la PTH sobre el cuerpo entero, la medida de la cantidad y calidad ósea BMC, es particularmente significativo. Este efecto sobre el cuerpo entero indica que la cantidad de hueso en el cuerpo del paciente está aumentando. La PTH no da como resultado únicamente el movimiento de masa ósea de una parte del cuerpo a otra. En su lugar, el tratamiento con PTH aumenta la cantidad y calidad de hueso en el cuerpo del paciente.

65 Las figuras 9 y 10 ilustran los aumentos con el tiempo de la BMD de la columna lumbar y la BMD del cuello femoral/de cadera, respectivamente, para pacientes tratados con PTH y pacientes control tratados con placebo. La

BMD de columna lumbar del paciente aumenta continuamente durante al menos 18 meses, sin aumento o menos significativo durante los meses posteriores. La BMD del fémur/cadera del paciente aumenta aparente-mente durante al menos 18 meses, y puede aumentar tras la duración adicional del tratamiento con PTH.

5 Tabla 17. Efecto de la PTH sobre el contenido mineral óseo expresado como % de cambio en el punto final (SD) con respecto al valor basal

	Placebo	PTH-20	PTH-40	Valor p
10 Columna lumbar	1,60 (6,92)	11,85 (8,83)	16,62 (11,1)	< 0,001
Fémur/Cadera				
Total	-0,38 (5,18)	3,50 (6,26)	4,78 (6,70)	< 0,001
Cuello	-0,51 (7,06)	2,99 (7,26)	5,80 (8,71)	< 0,001
15 Trocánter	0,98 (14,97)	5,68 (15,58)	6,53 (15,33)	< 0,001
Intertrocánter	-0,23 (6,28)	3,59 (7,32)	4,99 (7,79)	< 0,001
Triángulo de Ward	0,01 (14,75)	5,36 (14,78)	8,86 (17,02)	< 0,001
20 Muñeca				
Ultradistal	-1,67 (7,44)	-0,25 (6,53)	-1,88 (7,97)	0,184
1/3 radio	-1,19 (6,12)	-1,37 (4,51)	-3,04 (6,09)	0,025
25 Cuerpo entero	-0,74 (4,76)	1,30 (4,48)	2,28 (5,44)	< 0,001

30 Tabla 18. Efecto de la PTH sobre la densidad mineral ósea expresado como % de cambio en el punto final (SD) con respecto al valor basal

	Placebo	PTH-20	PTH-40	Valor p
30 Columna lumbar	1,13 (5,47)	9,70 (7,41)	13,7 (9,69)	< 0,001
Fémur/Cadera				
35 Total	-1,01 (4,25)	2,58 (4,88)	3,60 (5,42)	< 0,001
Cuello	-0,69 (5,39)	2,79 (5,72)	5,06 (6,73)	< 0,001
Trocánter	-0,21 (6,30)	3,50 (6,81)	4,40 (7,45)	< 0,001
Intertrocánter	-1,29 (4,53)	2,62 (5,52)	3,98 (5,96)	< 0,001
40 Triángulo de Ward	-0,80 (11,73)	4,19 (11,93)	7,85 (13,24)	< 0,001
Muñeca				
Ultradistal	-1,89 (7,98)	-0,05 (7,14)	-1,76 (7,20)	0,108
45 1/3 radio	-1,22 (3,37)	-1,94 (4,07)	-3,17 (4,62)	0,001

50 Tabla 19. Efecto de la PTH sobre la superficie ósea expresado como % de cambio en el punto final (SD) con respecto al valor basal

	Placebo	PTH-20	PTH-40	Valor p
50 Columna lumbar	0,46 (2,97)	2,52(3,52)	3,34 (3,72)	< 0,001
Fémur/Cadera				
55 Total	0,54 (3,02)	0,84(3,16)	1,05 (2,98)	0,144
Cuello	0,04 (4,60)	0,27(4,91)	0,81 (5,56)	0,035
Trocánter	0,95 (12,75)	1,99 (12,16)	1,92 (11,30)	0,197
Intertrocánter	1,01 (5,17)	1,01 (4,99)	1,01 (4,89)	0,964
60 Triángulo de Ward	0,44 (7,60)	1,13(7,34)	0,99 (8,06)	0,309
Muñeca				
Ultradistal	0,25 (6,40)	-0,25 (6,00)	-0,39 (4,80)	0,653
65 1/3 radio	-0,02 (5,73)	0,52(3,40)	0,01 (4,42)	0,586

En resumen, los datos presentados anteriormente indican que los pacientes tratados con PTH tienen fracturas reducidas. Específicamente, el tratamiento con PTH redujo en más de un 66 % el número de pacientes con fracturas vertebrales anteriores que padeció nuevas fracturas vertebrales. El tratamiento con PTH redujo también en más de un 78 % el número de pacientes con fracturas vertebrales anteriores que padeció nuevas fracturas vertebrales múltiples. Además, la PTH redujo la gravedad de las fracturas vertebrales, con una significativa reducción del 78 % del número de pacientes con fracturas moderadas o graves. Los pacientes que recibieron PTH se beneficiaron de una significativa reducción de todas las fracturas no vertebrales (incluyendo fracturas de cadera, radio, muñeca, pelvis, pie, húmero, costillas o tobillo) con una significación al nivel de $p < 0,007$. La calidad ósea aumenta también. Los pacientes con fractura anterior se beneficiaron de un aumento significativo del contenido mineral óseo de la cadera, la columna y el cuerpo entero. Este aumento indica que la reducción de fracturas en estos sitios puede aparecer tan temprano como después de 12 meses de terapia.

Discusión

Estos datos sobre fracturas son los primeros datos sobre reducción de fracturas por PTH en seres humanos. Estos descubrimientos demuestran una mejora de la calidad ósea y la resistencia ósea, como los datos preclínicos reseñados anteriormente en el presente documento. Estos resultados muestran también los beneficios en la calidad y resistencia óseas en sitios no vertebrales. Los descubrimientos de una reducción del número de fracturas sostenida durante el periodo de 18-23 meses de tratamiento no se ha observado anteriormente en estudios clínicos o preclínicos.

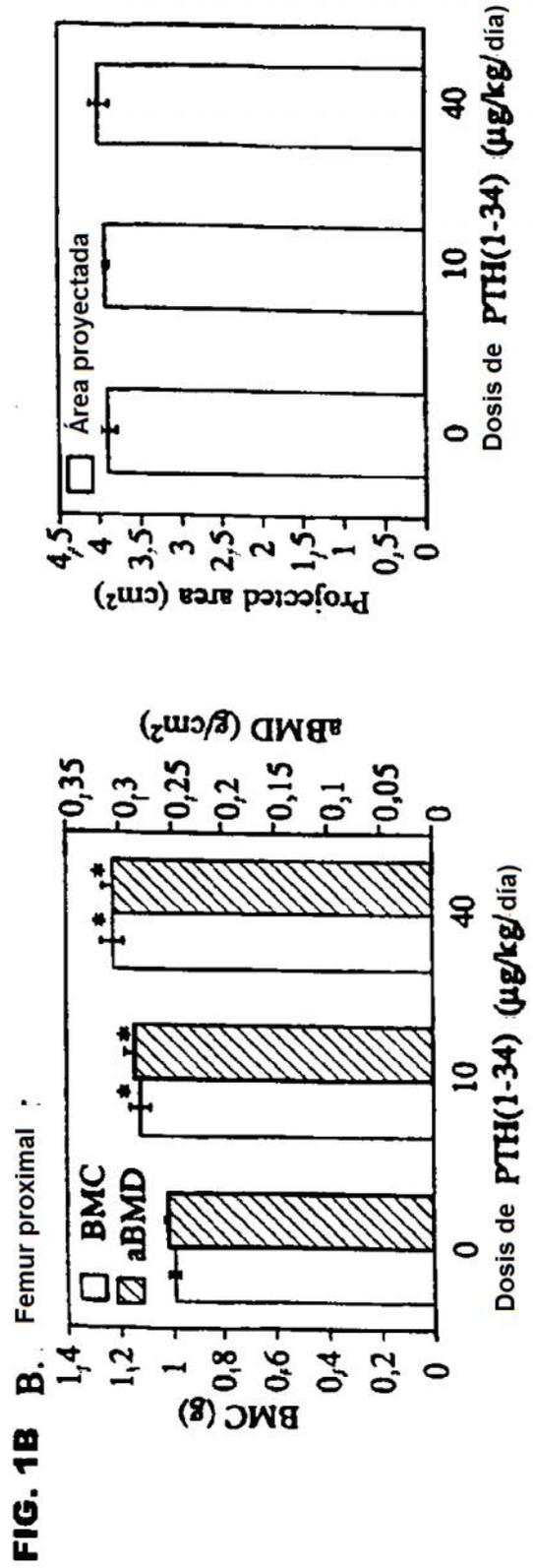
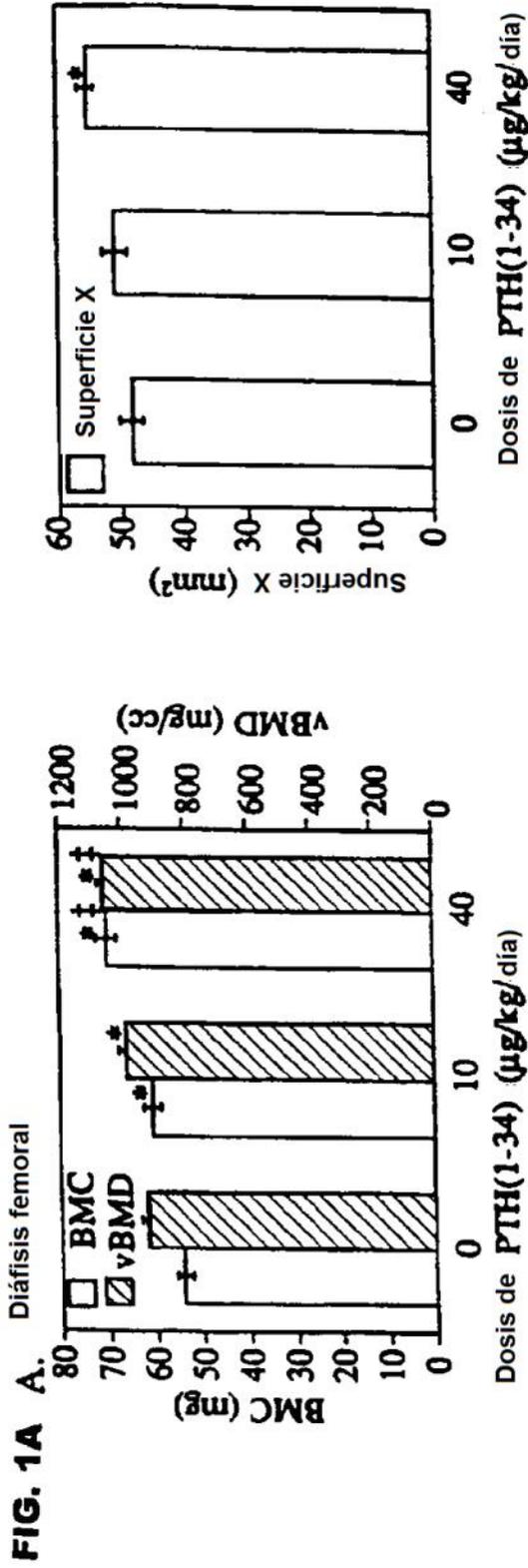
La cuestión de si la PTH sola aumenta la tenacidad y resistencia del hueso para mejorar la resistencia a la fractura no se ha ensayado anteriormente en seres humanos. La bibliografía publicada ha sugerido consistentemente que la PTH debe administrarse en combinación con un antirresortivo o estrógeno. Los ensayos clínicos publicados anteriormente incluían poblaciones de pacientes demasiado pequeñas para determinar una reducción significativa de las fracturas. En un estudio, los beneficios de la PTH no pudieron evaluarse porque no había controles de placebo. En un segundo estudio, empleando la definición habitualmente aceptada de fractura, no se observó reducción de las fracturas.

Los descubrimientos de una reducción de las fracturas en sitios no vertebrales combinados es particularmente inesperada a la vista de la creencia común de que la PTH tiene efectos negativos en estos sitios. El dogma común sostiene que la PTH aumentará la porosidad cortical y, por lo tanto, debilitará el hueso, especialmente al inicio de la terapia. Además, este dogma afirma que los sitios de hueso cortical son de alto riesgo de fractura y que la PTH no ofrecerá beneficios en la reducción de fracturas en sitios no vertebrales. El dogma sostiene también que la PTH sola es improbable que sea eficaz, y que requerirá terapia antirresortiva simultánea para bloquear los efectos negativos sobre el hueso cortical. Los presentes datos demuestran los beneficios anteriormente no observados de la PTH administrada a pacientes que reciben suplementos de vitamina D y calcio. Inesperadamente, la PTH refuerza el hueso reduciendo el número de nuevas fracturas en un paciente con riesgo de fracturas múltiples de la columna, con riesgo de fracturas no vertebrales adicionales o con riesgo de fracturas moderadas a graves de la columna o similares.

Este estudio clínico en mujeres posmenopáusicas mostró los beneficios particulares de tratar pacientes con dosis bajas (20 $\mu\text{g}/\text{día}$), puesto que se redujo la dosis de PTH (que a dosis altas podría mostrar efectos secundarios en algunos pacientes), pero se retuvo una prevención y reducción de fracturas similares a las observadas a la dosis alta (40 $\mu\text{g}/\text{día}$). Los datos FT-IR de monos proporcionan una posible explicación mecánica, pero no limitante. El estudio en monos muestra que la PTH en dosis bajas aumentó la formación de cristales y aceleró la mineralización en el hueso cortical. Además, los monos con dosis bajas mostraron beneficios adicionales después de la retirada, ya que la PTH potenció el contenido mineral óseo. Los presentes datos demuestran el nuevo descubrimiento de que la PTH administrada a dosis bajas a pacientes que reciben suplementos de vitamina D y calcio es eficaz en la prevención tanto de fracturas vertebrales como no vertebrales. Al contrario que la creencia popular, la PTH refuerza el hueso en los sitios no vertebrales previniendo nuevas fracturas o reduciendo la gravedad de las fracturas, aparentemente mejorando la mineralización y el contenido mineral óseo.

Reivindicaciones

- 5 1. PTH(1-34) humana para su uso en la prevención o reducción de la incidencia de fractura vertebral y no vertebral en un ser humano con o en riesgo de progresar a osteoporosis, en el que la PTH(1-34) se administra por inyección subcutánea a una dosis de 20 µg/día, en la que el ser humano también recibe dosis eficaces de calcio y vitamina D.
- 10 2. PTH(1-34) humana para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el ser humano es una mujer.
- 10 3. PTH(1-34) humana para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la mujer es una mujer posmenopáusica.
- 15 4. PTH(1-34) humana para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la PTH(1-34) se administra como una solución estabilizada que incluye un agente estabilizante, un agente tampón y un conservante.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65



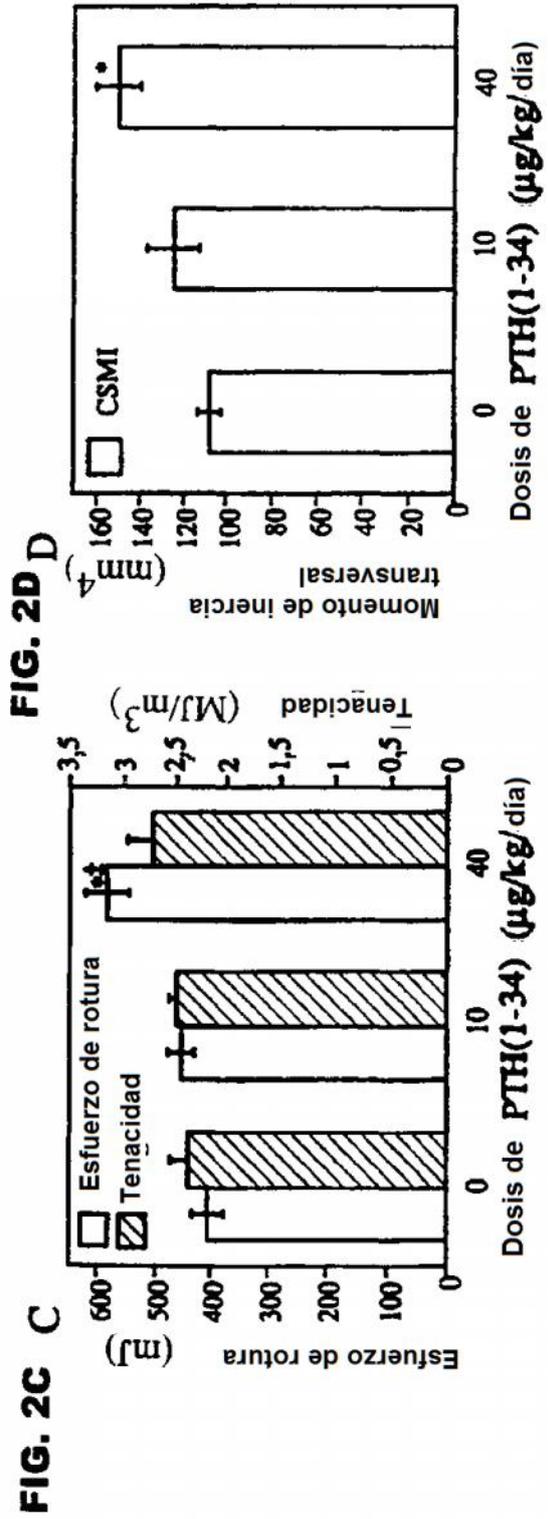
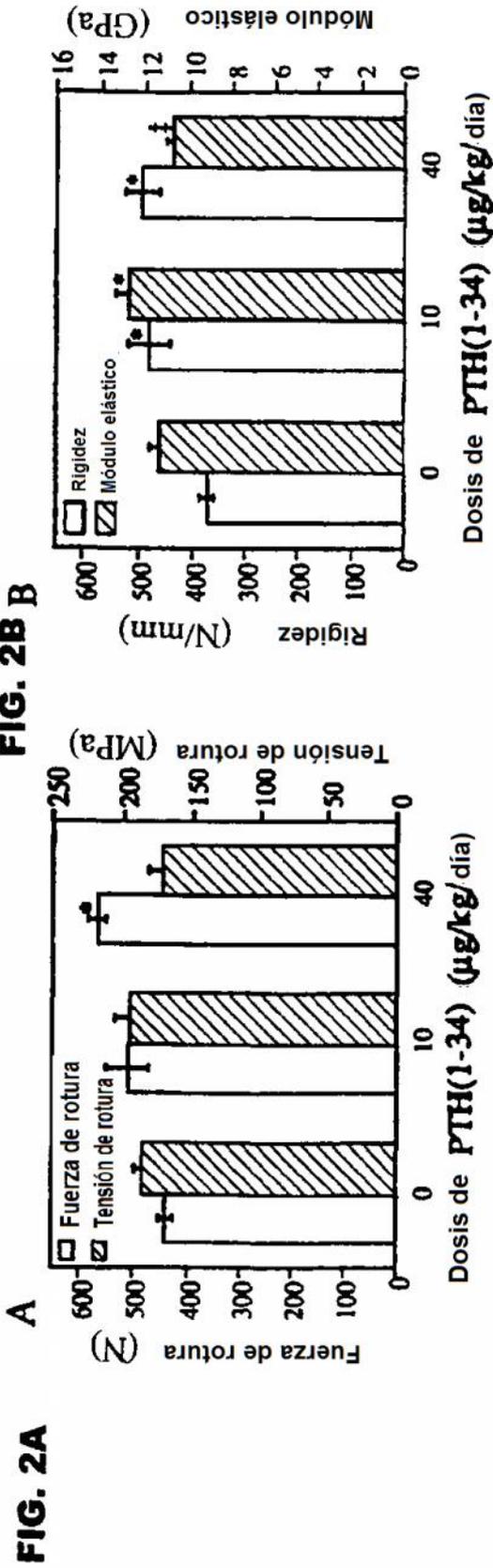


FIG. 3

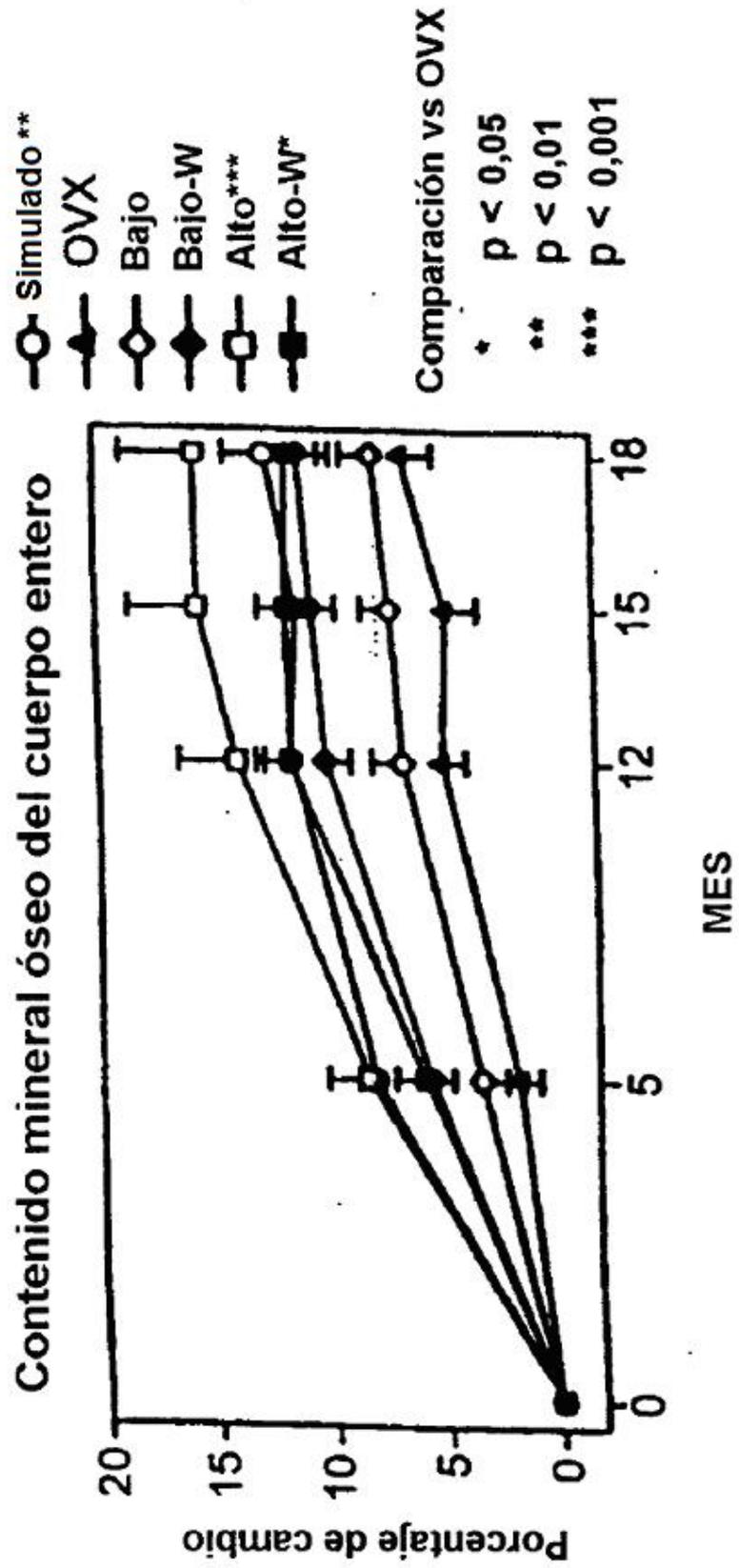


FIG. 4 A

Porcentaje de cambio en las medidas de DXA de la columna vertebral

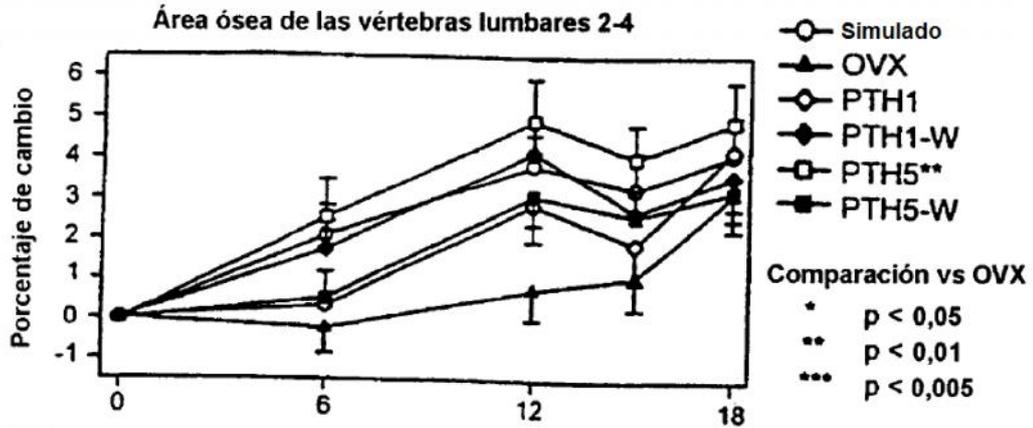


FIG. 4 B

Contenido mineral óseo de las vértebras lumbares 2-4

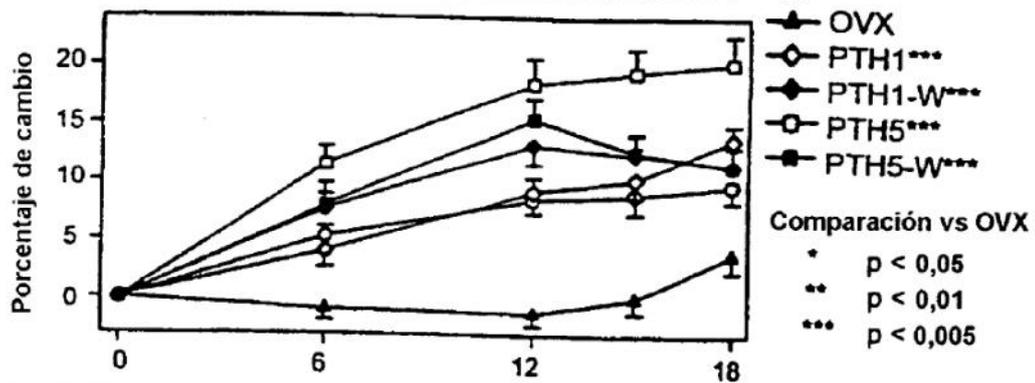
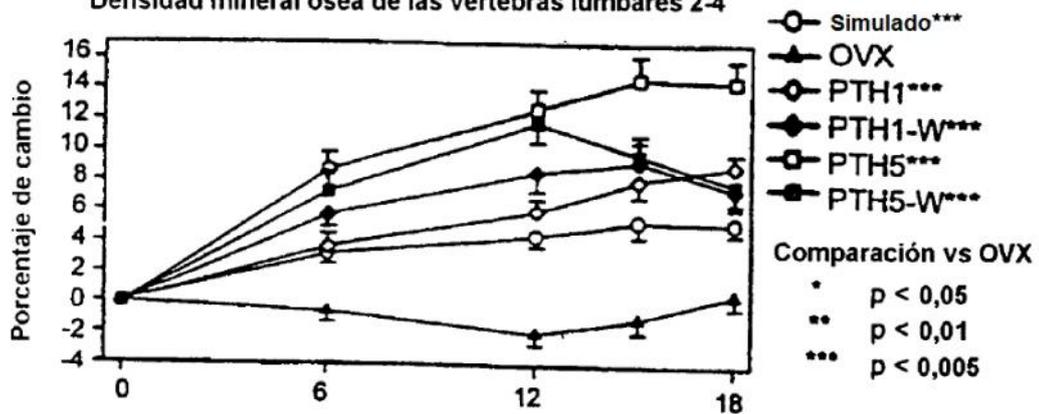


FIG. 4 c

Densidad mineral ósea de las vértebras lumbares 2-4



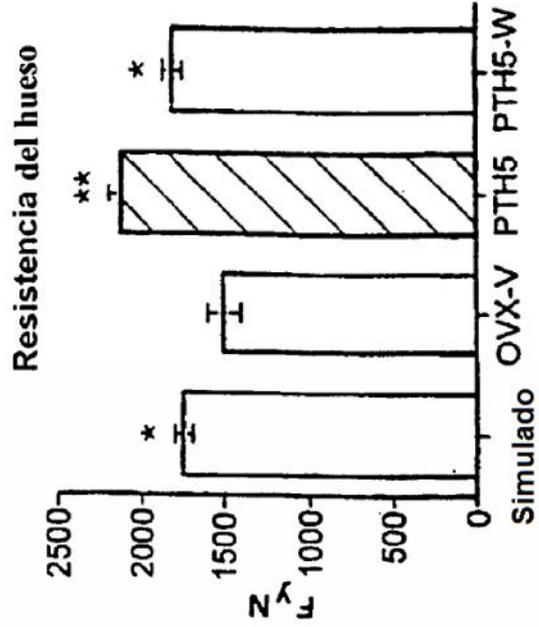


FIG. 5 B

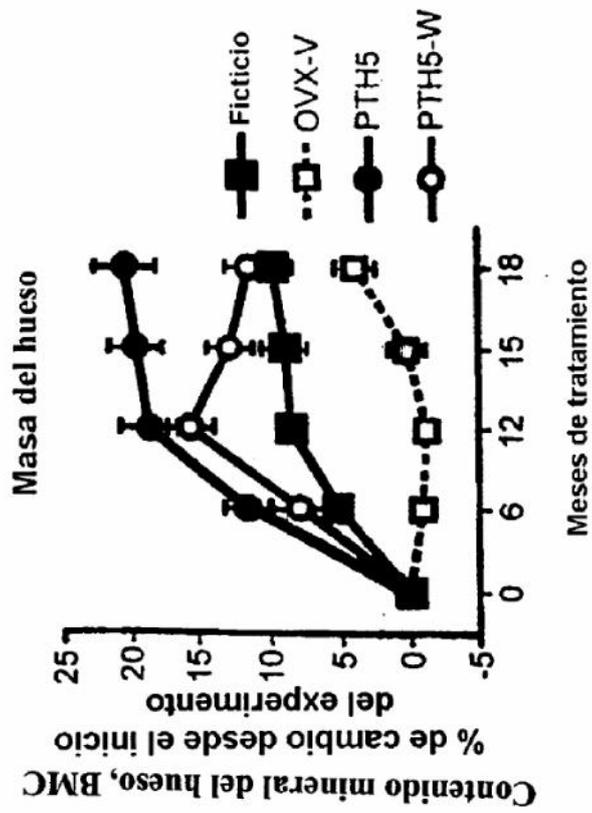


FIG. 5 A

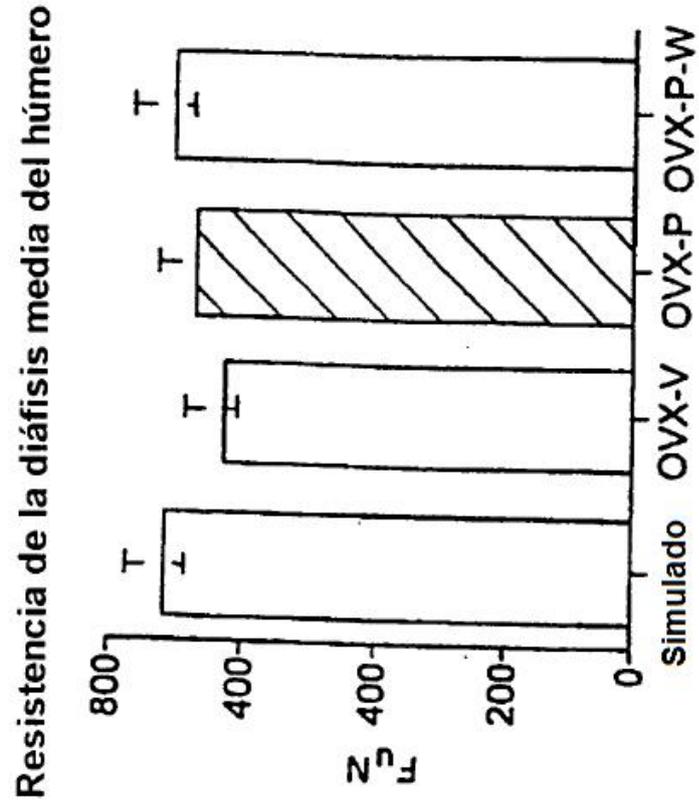


FIG. 6B

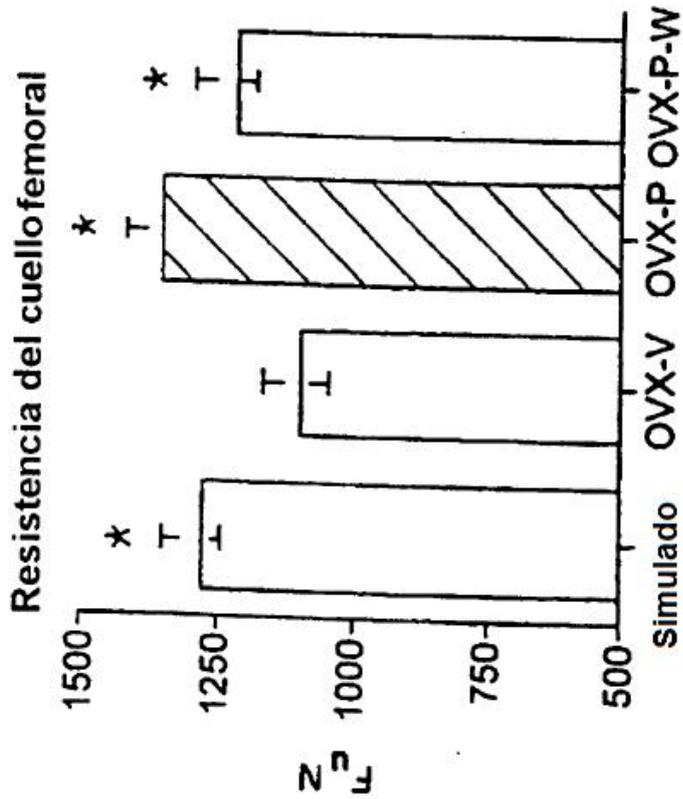
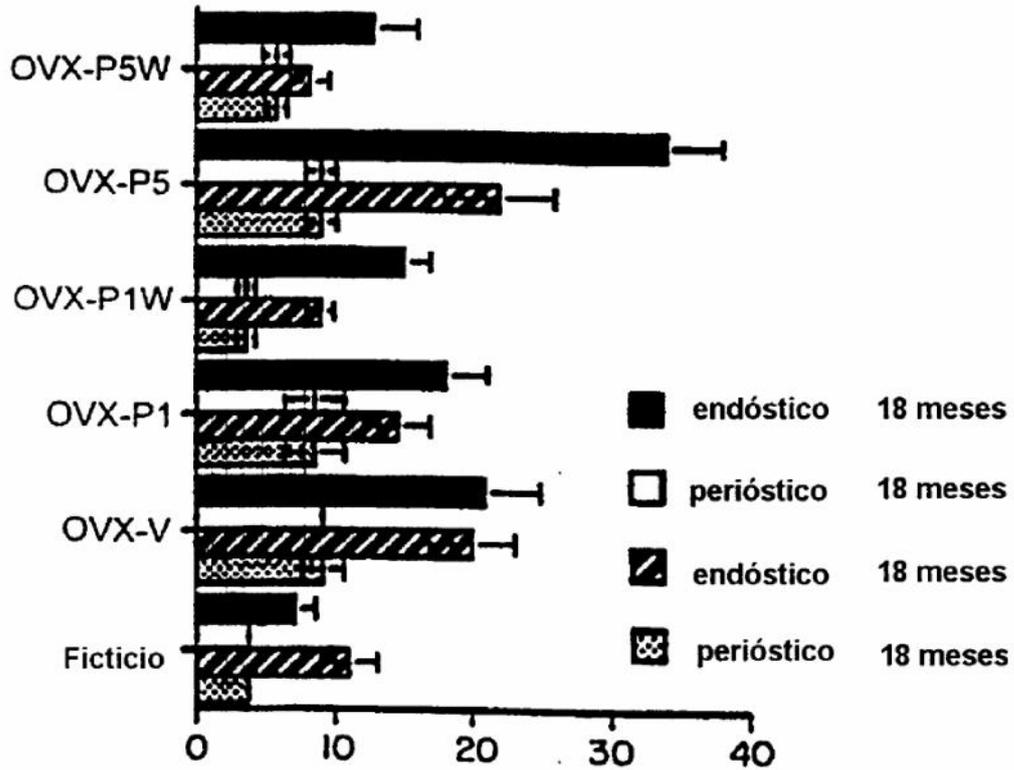


FIG. 6A

FIG. 7

Formación de superficies óseas corticales: diáfisis humeral



Velocidad de formación del hueso, BFR/BS

