

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 744 828**

(51) Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/028832**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14144425**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14764671 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 2968159**

(54) Título: **Gestión de la osteoporosis con PEG APM**

(30) Prioridad:

15.03.2013 US 201361798481 P

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

26.02.2020

(73) Titular/es:

**MIDWAY PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)
2 Pump House Drive
Spring House, PA 19477, US y
BOARD OF TRUSTEES OF MICHIGAN STATE
UNIVERSITY (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**PAMUKCU, RIFAT y
MCCABE, LAURA, RAE**

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 744 828 T3

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

DESCRIPCIÓN

Gestión de la osteoporosis con PEG APM

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional EE. UU. n.º 61/798.481 presentada el 15 de marzo de 2013.

10 CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0002] La presente invención se refiere a materiales para uso en el tratamiento de trastornos asociados con cambios en la salud gastrointestinal, que incluyen trastornos de pérdida ósea tales como osteopenia u osteoporosis mediante la administración de composiciones de polietilenglicol de alto peso molecular (PEG APM).

15 ANTECEDENTES

[0003] Una proporción sustancial de la población de edad avanzada sufrirá fracturas asociadas con baja masa ósea. [Ch. 4. The Frequency of Bone Disease. En: Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Office of the Surgeon General (2004)]. Diez millones de estadounidenses de 50 años de edad y mayores ya tienen osteoporosis y otros 33 millones tienen osteopenia, se estima que la población total con baja masa ósea alcanzará los 61 millones para 2020 [Khosla, et al., Journal of Bone and Mineral Research 26: 2565 (2011)]. En 2005 se informó de casi 2 millones de fracturas relacionadas con la osteoporosis. Se espera que el número de tales fracturas supere los 3 millones para 2025 [Khosla, et al., (2011)].

[0004] Si bien la osteopenia y la osteoporosis son problemas comúnmente asociados con mujeres posmenopáusicas, también ocurren en hombres mayores y en hombres que sufren de testosterona baja [Riggs, et al., Endocr. Rev 23: 279 (2002)]. La baja masa ósea también es un problema importante en quienes padecen enfermedades del tracto gastrointestinal, como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII); incluyendo la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, pouchitis y colitis microscópica [revisado en Ali et al., Am. J. Med. 122: 599 (2009)]. Además, aquellos que se han sometido a una gastrectomía o resección del intestino delgado, así como los pacientes que se someten a la terapia con corticosteroides tienen un mayor riesgo de osteopenia u osteoporosis [Coates, et al., J. Clin. Endocrinol Metab. 89: 1061 (2004); Tirpitz et al., Eur. J. Gasteroenterol. Hepatol. 15 (8): 869-876 (2003); Ali et al., (2009)].

[0005] El proceso fisiológico normal de la remodelación ósea implica equilibrar las tasas de resorción ósea y síntesis ósea. La resorción ósea está mediada por osteoclastos, mientras que la síntesis ósea se realiza en gran medida mediante los osteoblastos. Típicamente, el hueso se mantiene y el hueso dañado se repara mediante las acciones coordinadas de los osteoclastos y los osteoblastos. El primer tipo celular facilita la resorción del hueso dañado y el segundo sintetiza hueso nuevo. La osteopenia y la osteoporosis ocurren cuando las tasas aceleradas de resorción ósea y las tasas decrecientes de síntesis de hueso nuevo alteran el contenido mineral, la densidad y la estructura del hueso [Ch. 2. The Basics of Bone in Health and Disease. En: Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General (2004)].

[0006] Se encuentra disponible un modelo de ratón para la osteoporosis inducida por la menopausia. Este modelo consiste en extirpar los ovarios de ratones jóvenes (de aproximadamente ocho a doce semanas de edad) para provocar deficiencia de estrógenos. A las pocas semanas de la ovariectomía, los ratones exhiben una masa ósea significativamente reducida y muestran todas las características morfológicas óseas de la osteoporosis, incluida una incidencia muy elevada de fracturas por traumatismos bajos [Seidlova-Wuttke, y col., Comp. Med. 62: 8 (2012)]. También se ha encontrado que otro modelo de ratón, destinado a inducir EII, produce osteopenia y osteoporosis. En este sistema, los ratones se tratan con dextrano sulfato sódico (DSS), generalmente proporcionando agua potable suplementada con un pequeño porcentaje de DSS durante un período de unos pocos días o semanas [Hamdani, et al., Bone 43: 945 (2008); Harris et al., Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 296: G1020 (2009)]. Los ratones que están expuestos al DSS en el agua potable desarrollarán una inflamación del colon, mostrando síntomas como diarrea, sangrado rectal y pérdida de peso. La colitis aguda puede ser inducida por un único ciclo de exposición al DSS que dura solo unos pocos días; la exposición prolongada o los ciclos múltiples de exposición pueden provocar colitis crónica.

[0007] Estos dos modelos de ratón brindan la oportunidad de examinar la génesis y el tratamiento de la pérdida ósea y los trastornos óseos en dos condiciones fisiológicas diferentes. El modelo de ratón ovariectomizado permite la investigación de la osteopenia y la osteoporosis en un sistema en el que la inflamación crónica asociada con la EII está ausente, mientras que el sistema DSS permite la investigación de la osteopenia y la osteoporosis en la cual la inflamación crónica del intestino, típica de la EII, es la causa directa, aunque distal, de pérdida ósea. Ambos modelos animales han demostrado ser herramientas útiles para comprender las consecuencias biológicas de las enfermedades relacionadas con la baja densidad ósea y para el desarrollo de tratamientos terapéuticos y profilácticos.

- [0008] La terapia de reemplazo hormonal (TRH) fue una vez el tratamiento principal para la osteopenia y la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas, porque reequilibra de manera eficaz la resorción ósea y la síntesis de hueso nuevo. Los compuestos de bifosfonatos, como el ácido risedrónico (Actonel®), el ácido alendrónico (Fosamax®) y el ácido pamidrónico (Aredia®), han reemplazado en gran medida a la TRH debido a la preocupación de que la TRH pueda aumentar el riesgo de cáncer. Los bifosfonatos conservan la densidad mineral ósea y reducen el riesgo de fractura al disminuir la tasa de resorción ósea; sin embargo, no estimulan la síntesis de hueso nuevo. El uso a largo plazo de los bifosfonatos puede ser perjudicial para la salud general de los huesos, ya que el proceso normal de remodelación ósea se inhibe y el hueso dañado no se repara de manera eficiente. Para una discusión general de los riesgos y beneficios de los bifosfonatos, consulte "Drug Treatment" de la National Osteoporosis Society [National Osteoporosis Society. "Drug Treatment" Camerton, Bath BA2 0PJ Reino Unido, revisado en junio de 2012 (2012); Ch. 9. Prevention and Treatment for Those Who Have Bone Diseases. In: Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General (2004))].
- [0009] El tratamiento de la EII frecuentemente implica el uso de glucocorticoides inmunosupresores, que se sabe que afectan negativamente la densidad ósea [Long, et al., Dig. Dis. Sci. 55: 2263 (2010)]. Sin embargo, la pérdida ósea severa es evidente en los pacientes con EII no tratados y, por lo tanto, no es una consecuencia del tratamiento con glucocorticoides en estos pacientes [Bjarnason, Rheumatology 38: 801 (1999)]. Diferentes tipos de EII producen pérdida ósea, lo que indica que la conexión entre las dos patologías es común a la EII en general y no es particular de la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa o cualquiera de las otras afecciones específicas generalmente clasificadas como EII.
- [0010] Curiosamente, los ratones tratados con DSS parecen desarrollar osteopenia por una reducción en la formación de hueso, en oposición a un aumento en la resorción ósea [Harris, et al., (2009)]. Se ha informado de que la EII inducida por DSS no solo reduce la actividad de los osteoblastos sino que simultáneamente aumenta el número de osteoclastos, la mayoría de los cuales parecen estar inactivos [Harris, et al., (2009)]. Estos hallazgos están respaldados por un enfoque alternativo para evaluar las afecciones asociadas a la inflamación sistémica crónica que no involucra a la DSS. En este caso, también se observó que los ratones knock-out que carecen de IL-10 antiinflamatoria exhiben osteopenia y osteoporosis, lo que confirma que la pérdida ósea en ratones tratados con DSS se debe en general a la inflamación crónica y, por lo tanto, no es probable que sea una consecuencia específica de la exposición al DSS a través de alguna otra ruta fisiológica [Dresner-Pollak, et al., Gastroenterology 127: 792 (2009)].
- [0011] El equilibrio entre la resorción ósea por osteoclastos y la formación ósea por osteoblastos está regulado por varias proteínas producidas por células osteoblásticas [revisado en Ghishan y Kiela, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 300: G191 (2010); ver también Ch. 2. En: Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General (2004) especialmente las figuras 2-6]. La producción osteoblástica del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el ligando Kappa B de factor nuclear activado por el receptor (RANKL) estimula el desarrollo y la actividad de los osteoclastos. Los osteoblastos también producen osteoprotegerina (OPG), que funciona como un receptor de señuelo soluble para RANKL y la proporción local de RANKL con respecto a OPG probablemente modula la actividad de los osteoclastos en los sitios de síntesis de hueso nuevo. La producción de RANKL es estimulada por varios factores, incluidas las citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α , y se sabe que RANKL se activa en pacientes que padecen EII [Franchimont, et al., Clin. Exp. Immunol. 138: 491 (2004); Moschen, et al., Gut 54: 479 (2005)]. Otros factores, tanto conocidos como desconocidos, sin duda juegan un papel importante en el equilibrio de la actividad de los osteoclastos y los osteoblastos y la invención descrita no está limitada por ningún modelo específico de regulación. Los efectos beneficiosos de las composiciones y tratamientos descritos aquí mejoran empíricamente el estado óseo sin tener en cuenta los mecanismos moleculares teóricos subyacentes.
- [0012] El control de la actividad de osteoblastos y osteoclastos mediante las citocinas proinflamatorias y la asociación de trastornos óseos con EII, sugiere que la interacción del sistema inmunitario del huésped y la microbiota intestinal puede desempeñar un papel importante en el metabolismo óseo. De hecho, Sjogren y sus colegas han descubierto que los ratones libres de gérmenes tienen una masa ósea significativamente mayor con un número reducido de osteoclastos en relación con los ratones convencionales criados en condiciones similares [Sjogren, et al., Journal of Bone and Mineral Research 27: 1357 (2012)]. Además, estos trabajadores descubrieron que la colonización de ratones libres de gérmenes con microbiota intestinal normal normalizó la masa ósea y los números de osteoclastos. Por lo tanto, parece que la interacción de la microbiota intestinal y el sistema inmunitario del huésped puede afectar directamente a la salud ósea.
- [0013] La interacción entre la microbiota intestinal y el sistema inmunitario depende en gran medida de las vías paracelulares, que están reguladas por las uniones apicales entre las células epiteliales. En ausencia de cualquier condición patológica, estas uniones no están completamente selladas, sino que permiten el transporte de agua y solutos. Estas uniones también son la ruta principal para el muestreo microbiano necesario para mantener la homeostasis inmunogénica. La pérdida de regulación de estas uniones puede dar como resultado cambios en el flujo de agua, pérdida del transporte coordinado de solutos y sobreestimulación del sistema inmunitario en respuesta a aumentos en el nivel de抗ígenos microbianos. Tal pérdida de regulación puede deberse a una variedad de factores, por ejemplo, el traumatismo o la ulceración de los epitelios intestinales

pueden provocar daños en las uniones apicales asociadas. También hay una creciente evidencia de que ciertos cambios hormonales en sujetos hembra pueden alterar la regulación de las uniones apicales, no solo en ciclos a corto plazo en respuesta a las hormonas sexuales como el estrógeno y la progesterona en el curso del ciclo estral, sino también en respuesta al cese postmenopáusico de dichos ciclos [Braniste, et al., J. Physiol 587: 3317 (2009)]. Pueden producirse alteraciones similares a largo plazo en hombres de edad avanzada a medida que los niveles de estrógenos circulantes disminuyen como resultado de la disminución de las cantidades de testosterona disponibles para la aromatización. Sin estar obligado por la teoría, un método para restaurar o preservar la función de barrera intestinal puede mejorar la salud ósea al mitigar la interacción de la microbiota intestinal y el sistema inmunitario del huésped. Tal efecto podría servir para minimizar la estimulación no deseada de la actividad osteoclástica y para promover la osteogénesis.

[0014] Además de modular los osteoclastos, los osteoblastos participan activamente en la formación de hueso nuevo. En este proceso de osteogénesis, los osteoblastos depositan una matriz proteica de colágeno tipo I y una proteína no colagenosa, la osteocalcina, en el sitio de la síntesis de hueso nuevo. Esta matriz proteica (el osteoide) se mineraliza con hidroxiapatita para formar hueso nuevo duro [Ch. 2. En: Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General (2004)]. La osteocalcina, aunque está localizada en gran medida en el osteoide, puede cuantificarse en muestras de sangre u orina y sirve como marcador para la formación activa de hueso anabólico [Lian y Gundeberg, Clin. Orthop Relat. Res. Enero (226): 267 (1988)].

[0015] Actualmente, el único compuesto aprobado por la FDA capaz de estimular la formación de hueso nuevo es la hormona paratiroides (PTH), disponible comercialmente como Forteo® (teriparatida), una proteína recombinante relativamente cara [Ch. 9. En: Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General (2004), pág. 226] Para ser eficaz, la PTH debe administrarse mediante inyección subcutánea con un horario estricto para imitar la acción pulsátil normal de la hormona en la diferenciación de osteoblastos [Dobnig y Turner, Endocrinology 138: 4607 (1997)]. La PTH puede no ser compatible con el tratamiento con bifosfonato y, por lo tanto, es problemático aumentar simultáneamente la síntesis de hueso nuevo con PTH mientras se ralentiza la resorción ósea mediante el tratamiento con bifosfonato. Gasser, et al., J. Musculoskeletal Neuronal Interact. 1:53 (2000)]. Además, la PTH puede producir efectos secundarios graves, como cálculos renales, ansiedad y depresión, y la duración del tratamiento generalmente se limita a no más de dos años debido a los riesgos de cáncer. Por lo tanto, existe una clara necesidad de nuevos agentes anabolizantes óseos simples y robustos, especialmente agentes capaces de ralentizar la resorción ósea mientras se promueve la síntesis de hueso nuevo.

[0016] Además de en la salud ósea, la interacción de la microbiota intestinal y el sistema inmunitario está implicada en otros aspectos del bienestar animal. Las prácticas agrícolas modernas inducen una gran cantidad de estrés que afecta al crecimiento, la producción, la reproducción y la susceptibilidad a las enfermedades en los animales de granja [ver J.C. Swanson, J. Animal Sci. 73: 2744 (1995) para revisión]. El efecto benéfico del tratamiento con antibióticos en el aumento del rendimiento del crecimiento y la producción de animales de granja está reconocido desde hace mucho tiempo, pero es muy controvertido ya que puede producir un reservorio de bacterias resistentes a los antibióticos que podrían comprometer la eficacia médica de estos medicamentos. La necesidad de alternativas a los antibióticos para promover el crecimiento y la producción de animales de granja es bien conocida y urgente.

RESUMEN

[0017] Las interacciones entre el epitelio intestinal, las bacterias endógenas y el sistema inmunitario animal afectan a múltiples aspectos de la fisiología animal. La PEG APM proporciona una forma simple y robusta de mejorar la síntesis ósea anabólica, al tiempo que reduce la resorción ósea. Otros beneficios del tratamiento con PEG APM incluyen la prevención, reducción o mejora de diversos trastornos asociados con la estimulación inmunológica crónica, ya sea debido a infección, cambios hormonales, lesiones, estrés ambiental o agotamiento de precursores metabólicos debido al rápido crecimiento. El HMG-PEG proporciona un tratamiento terapéutico y profiláctico simple, seguro y eficaz en situaciones que requieren tratamiento a largo plazo de enfermedades crónicas (como la osteoporosis o la enfermedad del intestino irritable), procesos de curación lentos (formación ósea después de una fractura traumática) y en la ganadería (mejora general salud y rendimiento del ganado).

[0018] La presente descripción satisface al menos una necesidad en la técnica al proporcionar una composición de polietilenglicol de alto peso molecular (PEG APM) que proporciona protección eficaz contra trastornos de pérdida ósea, donde el trastorno óseo está asociado con infección crónica y estrés inmunológico. La presente invención satisface al menos una necesidad en la técnica al proporcionar una composición de polietilenglicol de alto peso molecular (PEG APM) que proporciona protección eficaz contra trastornos de pérdida ósea, donde el trastorno óseo está asociado a una afección anormal seleccionada entre enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, menopausia, andropausia, hipogonadismo, osteopenia y osteoporosis, y en donde dicho polietilenglicol tiene un peso molecular promedio de al menos 5000 daltons. La presente invención también proporciona usos de PEG APM para revertir la baja masa ósea existente y para mejorar diversos parámetros del estado óseo tales como contenido mineral óseo, densidad mineral ósea, fracción de volumen óseo, número trabecular, grosor y espaciado y áreas cortical y medular. También se proporcionan usos del PEG APM para mejorar la osteogénesis y reducir la resorción ósea. El PEG APM mejora la función de barrera epitelial intestinal

- mediante un mecanismo desconocido, lo que da lugar a una reducción de la pérdida ósea concomitante asociada a la inflamación intestinal y al mismo tiempo aumenta la osteogénesis. Las mejoras en el estado óseo se producen si la inflamación es el resultado directo de patologías del intestino, como la enfermedad de Crohn o la colitis, o indirectamente como resultado de cambios en los niveles hormonales que pueden comprometer la integridad inmunológica del intestino. En el método de la divulgación, el compuesto PEG APM puede tener un peso molecular promedio de al menos 3500 daltons. De acuerdo con la invención, el compuesto PEG APM puede tener un peso molecular promedio seleccionado del grupo que consta de al menos 5000 daltons, al menos 8000 daltons, al menos 12 000 daltons y al menos 15 000 daltons. También se prefieren los derivados de PEG APM tales como MDY-1001, que tienen un peso molecular promedio entre 15 000 y 20 000 daltons. Se contempla una variedad de estructuras de PEG APM que cumplen con el criterio de peso molecular promedio mínimo establecido anteriormente, incluido un compuesto de PEG APM que comprende al menos dos cadenas de hidrocarburos unidas a un núcleo hidrofóbico, en donde cada cadena de hidrocarburo tiene un peso molecular promedio de al menos el 40 por ciento del compuesto de PEG APM, y en donde el núcleo hidrofóbico comprende una estructura de anillo.
- [0019] Se han descrito composiciones similares de PEG APM como agentes eficaces para prevenir o tratar trastornos epiteliales inducidos por radiación y mediados por microbios en la solicitud de patente EE. UU., n.º 13/259.313, así como sistemas de administración terapéutica para el tratamiento de diversas enfermedades epiteliales en la solicitud de patente EE. UU. n.º 11/578.388.
- [0020] Una cantidad terapéuticamente eficaz de PEG APM variará dependiendo de variables conocidas como la edad, el peso, la salud general del paciente o sujeto animal, y una cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar fácilmente usando procedimientos de rutina, como se sabría en la técnica. El método comprende la administración de PEG APM que tiene los pesos moleculares promedio mínimos definidos anteriormente, y comprende una realización en la que se administra el PEG APM que tiene al menos dos cadenas de hidrocarburos y un núcleo hidrofóbico, como se describió anteriormente. A lo largo de la solicitud, el polietilenglicol según la descripción es para uso en el tratamiento de sujetos con riesgo de trastornos de pérdida ósea, en donde el trastorno óseo está asociado con infección crónica y estrés inmunológico. A lo largo de la solicitud, el polietilenglicol de acuerdo con la invención se usa en el tratamiento de sujetos con riesgo de trastornos de pérdida ósea, en donde el trastorno óseo está asociado con una afección anormal seleccionada entre enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, menopausia y andropausia, hipogonadismo, osteopenia y osteoporosis, y en donde dicho polietilenglicol tiene un peso molecular promedio de al menos 5000 daltons.
- [0021] Otro aspecto según la divulgación es el polietilenglicol para proteger a un animal de la pérdida ósea, que comprende administrar una cantidad profilácticamente eficaz de un compuesto de PEG de alto peso molecular a un animal en riesgo de desarrollar un trastorno de pérdida ósea. Nuevamente, el compuesto PEG APM puede tener un peso molecular promedio seleccionado del grupo que consta de al menos 3500 daltons, al menos 5000 daltons, al menos 8000 daltons, al menos 12 000 daltons y al menos 15 000 daltons. También se prefieren los derivados de PEG APM tales como MDY-1001, que tienen un peso molecular promedio entre 15 000 y 20 000 daltons.
- [0022] Otro aspecto más de la divulgación es el polietilenglicol para usar en un método para proteger a un animal de la pérdida ósea, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de PEG de alto peso molecular a un animal que actualmente padece un trastorno de pérdida ósea, en el que el trastorno óseo se asocia con infección crónica y estrés inmunológico. En otro aspecto de la invención, el polietilenglicol se usa en un método para proteger a un animal de la pérdida ósea, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de PEG de alto peso molecular a un animal que actualmente padece un trastorno de pérdida ósea, en el que el trastorno óseo se asocia con una afección anormal seleccionada entre enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, menopausia, andropausia, hipogonadismo, osteopenia y osteoporosis, y en donde dicho polietilenglicol tiene un peso molecular promedio de al menos 5000 daltons. El compuesto de PEG APM según la divulgación puede tener un peso molecular promedio de al menos 3500 daltons, al menos 5000 daltons, al menos 8000 daltons, al menos 12 000 daltons y al menos 15 000 daltons. También se prefieren los derivados de PEG APM tales como MDY-1001, que tienen un peso molecular promedio entre 15 000 y 20 000 daltons.
- [0023] Otro aspecto más es el polietilenglicol para su uso en un método para prevenir la pérdida ósea en un animal, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de PEG APM en el intestino del animal. En algunas realizaciones, el PEG APM se administra antes de la pérdida ósea real; en otras realizaciones, el PEG APM se administra a continuación de la detección de pérdida ósea. En algunas realizaciones, el PEG APM se administra de manera continua o en varios lotes. El tratamiento con PEG APM puede consistir en una administración o un número limitado de ellas, o puede implicar un concurso de muchas administraciones separadas que tienen lugar durante días, semanas, meses o años.
- [0024] Otros aspectos de la divulgación se basan en métodos para aumentar el rendimiento de crecimiento de un animal. El rendimiento del crecimiento puede significar un aumento en la tasa de crecimiento, una disminución en la masa muscular magra o un aumento en la producción de los productos animales deseados, como la leche en el caso de las vacas lecheras, los huevos en el caso de los pollos (ponedores) o la carne como en el caso de

ganado vacuno, cerdos, ovejas, pollos (incluidos, entre otros, pollos de engorde y para cocinar), pavos, patos y otros animales para carne domesticados

5 [0025] Otro aspecto más de la divulgación se basa en un método para disminuir la frecuencia y la gravedad de la enfermedad diarreica en humanos y otros animales. Dichas enfermedades diarreicas incluyen diarrea inflamatoria y no inflamatoria, como la causada por enfermedad inflamatoria intestinal, intoxicación alimentaria, infección o estrés ambiental. Las infecciones pueden ser el resultado de una invasión bacteriana o parasitaria. Los factores estresantes ambientales incluyen cualquier condición como el hacinamiento, el confinamiento o el manejo físico de un animal que afectan directa o indirectamente el estado inmunitario del animal.

10 15 [0026] En cada uno de los aspectos anteriores de acuerdo con la divulgación y la invención, el PEG APM puede administrarse por cualquier vía conocida en la técnica, tal como administración entérica o administración parenteral. Más particularmente, cualquiera de los métodos anteriores puede implicar la administración de PEG APM por vía oral, por sonda de alimentación gástrica, por sonda de alimentación duodenal, por gastrostomía, por enema, por lavado gástrico, por lavado colónico, por inyección directa en el tracto gastrointestinal o por infusión quirúrgica . Además, en cada uno de los aspectos anteriores de acuerdo con la divulgación, el PEG APM puede tener al menos dos cadenas de hidrocarburos en las que cada cadena tiene un peso molecular promedio de al menos el 40 por ciento del compuesto de PEG APM, y un núcleo hidrofóbico, donde el núcleo hidrofóbico puede incluir uno o más anillos aromáticos o no aromáticos.

20 25 [0027] Un aspecto adicional de la invención proporciona un kit que comprende material de envasado, una cantidad eficaz de PEG APM y medios para la entrega, donde el material de envasado comprende una etiqueta o un prospecto que indica que el PEG APM puede usarse para tratar, mejorar o prevenir una afección caracterizada como un trastorno de pérdida ósea.

30 35 [0028] Otras características y ventajas de la presente invención se entenderán mejor con referencia a la siguiente descripción detallada, que incluye el dibujo y los ejemplos.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

40 45 [0029] FIG. 1 es una visualización gráfica de tomografías microcomputarizadas representativas de fémures de ratones no tratados (control), ratones de control tratados con PEG APM (control + PEG), ratones ovariectomizados (OVX) y ratones OVX tratados con PEG APM (OVX + PEG). La comparación del panel de control con el panel OVX ilustra el grado de pérdida ósea postmenopáusica resultante de la ovariectomía. La comparación del panel OVX con el panel OVX + PEG ilustra el efecto de mejora que el tratamiento con PEG APM tiene sobre la pérdida ósea postmenopáusica. La comparación del panel de control + PEG con el panel de control indica que incluso los animales que carecen de un trastorno de pérdida ósea subyacente pueden obtener algún beneficio en el estado óseo a partir del tratamiento con PEG APM.

50 55 FIG. 2 representa el contenido mineral relativo de hueso trabecular (mg) en ratones de control, control + PEG, OVX y OVX + PEG. En este y todos los gráficos posteriores, la desviación estándar dentro de cada grupo de sujetos se muestra como barras de error verticales. Las **barras** horizontales indican la calidad estadística entre los grupos de sujetos como valor p derivado de la prueba t de Student. NS denota p > 0.05, considerado aquí como un resultado estadísticamente no significativo.

60 65 La comparación de los grupos de muestra de control y OVX indica una reducción estadísticamente significativa en el contenido mineral óseo debido a la pérdida ósea postmenopáusica. La comparación de los grupos de muestra tratados con PEG APM con sus compañeros no tratados muestra que estos animales se beneficiaron de niveles más altos de contenido mineral óseo trabecular como consecuencia del tratamiento con PEG APM.

FIG. 3 representa la densidad mineral ósea trabecular relativa (mg/cc) en ratones de control, control + PEG, OVX y OVX + PEG. La comparación de los grupos de muestra control y OVX indica una reducción estadísticamente significativa en el contenido mineral óseo debido a la pérdida ósea postmenopáusica. El tratamiento de los animales OVX con PEG APM como resultado una mejora estadísticamente significativa en la densidad mineral ósea trabecular (compárese OVX y OVX + PEG). Del mismo modo, el tratamiento con PEG APM parece haber mejorado también la densidad mineral ósea trabecular de los animales de control, aunque el efecto es menos pronunciado y sin tanta certeza estadística.

FIG. 4 representa el contenido mineral óseo cortical relativo (mg) en ratones de control, control + PEG, OVX y OVX + PEG. Hay poca diferencia entre los animales de control y OVX, lo que indica que el hueso cortical puede ser menos sensible a los efectos postmenopáusicos sobre la pérdida ósea. Sin embargo, el tratamiento con PEG APM aumenta el contenido mineral óseo cortical tanto en animales sanos como postmenopáusicos.

FIG. 5 representa la densidad mineral ósea cortical relativa (mg/cc) en ratones de control, control + PEG, OVX y OVX + PEG. Como en la figura 4, hay poca diferencia entre los animales de control y OVX, sin embargo, hay una clara mejora con el tratamiento con PEG APM en animales sanos y postmenopáusicos.

FIG. 6 representa la fracción de volumen óseo relativo (VH/VT) en ratones de control, control + PEG, OVX y OVX + PEG. La comparación de los grupos de muestra de control y OVX indica una reducción estadísticamente significativa en la fracción de volumen óseo debido a la pérdida ósea postmenopáusica. El tratamiento con PEG APM proporciona una mejora grande y estadísticamente significativa en la fracción de volumen óseo en animales

- que sufren pérdida ósea postmenopáusica. También se produce una mejora en animales sanos tratados con PEG APM, aunque de forma menos drástica y con un nivel de certeza mucho menor.
- FIG. 7 representa el espesor trabecular relativo (μm) en ratones de control, control + PEG, OVX y OVX + PEG. La pérdida ósea postmenopáusica se refleja en la reducción del grosor trabecular promedio en los animales OVX en relación con los animales del grupo de control. Tanto los animales sanos como los que sufren pérdida ósea postmenopáusica se benefician del tratamiento con PEG APM, con los animales postmenopáusicos restaurados a casi el mismo nivel de grosor trabecular promedio que los animales sanos.
- FIG. 8 representa el número trabecular (Tb.N.) en ratones de control, control + PEG, OVX y OVX + PEG. La pérdida ósea postmenopáusica también se refleja en la reducción del número trabecular promedio en los animales OVX en relación con los animales del grupo de control. El tratamiento con PEG APM de animales postmenopáusicos mejora significativamente el número trabecular, mientras que el tratamiento con PEG APM parece impartir algún beneficio a los animales sanos, pero no de manera tan significativa.
- FIG. 9 representa el espaciado trabecular (mm) en ratones de control, control + PEG, OVX y OVX + PEG. La diferencia en el espaciado trabecular debido a la pérdida ósea postmenopáusica es evidente al comparar los animales del grupo de control con los del grupo OVX. El tratamiento con PEG APM disminuye significativamente el espaciado trabecular en animales OVX hasta casi el mismo nivel que el observado en animales sanos. De manera menos significativa, el tratamiento con PEG APM también parece reducir el espaciado trabecular en animales sanos.
- FIG. 10 representa el área de la médula cortical (mm^2) en ratones de control, control + PEG, OVX y OVX + PEG. Hay poca diferencia aparente entre los animales sanos y los animales postmenopáusicos en el área de la médula cortical. Del mismo modo, hay pocos cambios significativos en animales sanos tratados con PEG APM. Hay una disminución significativa en el área de la médula ósea cortical en los animales postmenopáusicos tratados con PEG APM, lo que sugiere la acumulación de hueso nuevo a expensas del área de la médula cortical.
- FIG. 11 representa el área cortical (mm^2) en ratones de control, control + PEG, OVX y OVX + PEG. Los perfiles del área cortical de los grupos de animales sanos y postmenopáusicos tratados con PEG APM son consistentes con el patrón del área de la médula cortical en la figura 10. Hay poca diferencia significativa entre animales sanos y postmenopáusicos, pero el tratamiento con PEG APM aumenta el área del hueso cortical aunque sea ligeramente, lo que indica la acumulación de hueso nuevo.
- FIG. 12 representa la concentración relativa de osteocalcina en suero (ng/ml) en ratones OVX, OVX + PEG, OVX + DSS y OVX + DSS + PEG. La comparación del grupo de control + DSS con los animales OVX + DSS muestra que incluso en animales que padecen EII inducida por DSS, existe un efecto adicional de pérdida ósea postmenopáusica (OVX). El tratamiento con PEG APM aumenta significativamente el nivel de osteocalcina sérica, que como marcador de osteogénesis, indica que la síntesis de hueso nuevo aumenta en animales con riesgo de EII y pérdida ósea postmenopáusica. También es evidente una mejora en los animales que padecen EII tratados con PEG APM, aunque con menos certeza estadística. Significativamente, el tratamiento con PEG APM parece aumentar este marcador de síntesis anabólica de hueso nuevo en ambos grupos de animales al mismo nivel.
- FIG. 13 representa la concentración relativa de osteocalcina en suero en (ng/ml) en ratones de control, control + PEG, control + DSS y control + DSS + PEG. La comparación de animales sanos con animales que sufren pérdida ósea por EII (control frente a control + DSS) sugiere que los animales con EII pueden tener niveles más bajos de síntesis de hueso nuevo (osteogénesis), de acuerdo con los informes publicados previamente [Harris, et al., (2009)]. El tratamiento con PEG APM de animales sanos y animales con EII (control + PEG y control + DSS + PEG) aumenta los niveles de osteocalcina sérica, lo que sugiere que dicho tratamiento aumenta la osteogénesis.
- La comparación de los animales sanos con el grupo de animales con EII tratado con PEG APM muestra que el tratamiento con PEG APM restaura la osteogénesis en animales con EII al mismo nivel que el encontrado en animales sanos.
- FIG. 14 representa las concentraciones relativas de osteocalcina sérica en ratones de control, control + PEG, OVX + DSS y OVX + DSS + PEG. La comparación de animales sanos con animales que padecen EII y pérdida ósea postmenopáusica (control frente a OVX + DSS) indica que los animales con EII y postmenopáusicos tienen niveles significativamente más bajos de síntesis ósea, lo que es consistente con la pérdida ósea postmenopáusica que reduce la síntesis de hueso nuevo además de la pérdida ósea debida a EII. La comparación de animales sanos con animales que padecen EII y pérdida ósea posmenopáusica (control + PEG frente a OVX + DSS + PEG) muestra que el tratamiento con HMW PEG restaura la osteogénesis de animales en riesgo de EII y pérdida ósea posmenopáusica al mismo nivel que el encontrado en animales sanos.
- FIG. 15 representa la tasa de conversión alimenticia (TCA) de pollos de engorde sanos e infectados. Las aves en este estudio fueron segregadas en múltiples corrales (15 aves por corral) y tratadas como cuatro grupos experimentales (8 corrales por grupo). El grupo de control negativo estaba compuesto por aves sanas que no recibían ningún tratamiento especial. El grupo MDY (1-21) del 0.33 % representa las aves tratadas con el PEG APM MDY-1001. Las aves del grupo de control SE se infectaron con *Salmonella Enteritidis*, pero no recibió ningún otro tratamiento especial. Las aves en el grupo MDY (1 - 21) + SE del 0.33 % se infectaron con *Salmonella Enteritidis* y se trataron con PEG APM. La TCA se determina dividiendo el aumento de peso corporal de cada corral dentro del grupo por el alimento total consumido por cada corral dentro del grupo evaluado a los veinte días.
- FIG. 16 informa del efecto del PEG APM en la recuperación de bacterias de pollos de engorde infectados. Todas las aves en este estudio se infectaron con *Salmonella Enteritidis* y la cantidad de S. Enteritidis presente en el intestino ciego de cada ave se determinó al final del período de tratamiento. Las aves en el grupo de control no

recibieron tratamiento especial. Las aves en el grupo de 0.1 % -T se trataron con PEG APM MDY-1001. Las aves en el grupo de 0.1 % -P se trataron con un profiláctico común en aves de corral. Se retiró y pesó el intestino ciego de cada pollo y se determinó el número de unidades formadoras de colonias de *S. Enteritidis* de cada intestino ciego por métodos microbiológicos estándar.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0030] La presente invención proporciona polietilenglicol para usar en métodos para tratar trastornos de pérdida ósea y afecciones asociadas con pérdida ósea. La presente invención se basa en el descubrimiento de que la administración de una composición que comprende polietilenglicol de alto peso molecular (PEG APM) a animales con baja densidad ósea y perfiles óseos fisiológicos característicos de osteoporosis u osteopenia provoca un aumento en la masa ósea y la densidad concomitante con una mejora en los perfiles óseos trabeculares y corticales. La administración de PEG APM no solo disminuye la resorción ósea, sino que también aumenta la osteogénesis, como se muestra al aumentar los niveles de osteocalcina sérica. Por lo tanto, las composiciones que comprenden PEG APM son sorprendentemente útiles en el tratamiento de la pérdida ósea y los trastornos asociados. El descubrimiento es inesperado en vista de la eficacia del tratamiento para los trastornos de pérdida ósea causados por afecciones no directamente relacionadas con la salud gastrointestinal, como los cambios hormonales en la salud ósea como resultado de la osteoporosis postmenopáusica. Además, el tratamiento con PEG APM también mejora varios parámetros de salud ósea en un animal sano que carece de cualquier trastorno que afecte directa o indirectamente la salud gastrointestinal.

[0031] Además de tratar la pérdida ósea y los trastornos asociados, la administración de PEG APM puede mejorar la reparación ósea en humanos y otros animales con perfiles óseos normales que pueden haber sufrido una lesión que requiere la curación de hueso nuevo, como una rotura o fractura por esfuerzo.

[0032] El tratamiento con PEG APM también mejorará la integridad ósea en animales que experimentan otras formas de esfuerzo relacionadas con la formación fisiológica del hueso. Por ejemplo, la enfermedad de los huesos blandos en los pollos ocurre en las capas de producción como consecuencia del agotamiento de la vitamina D, calcio u otros factores involucrados en la formación de la cáscara del huevo. Del mismo modo, los pavos y pollos domesticados (incluidos, entre otros, los pollos de engorde y para cocinar) con frecuencia sufren enfermedades óseas como la necrosis bacteriana de la cabeza del fémur (complejo de osteomielitis) debido a una infección y a la dificultad del cartílago tibial para osificarse (discondroplasia tibial) como consecuencia de las rápidas tasas de crecimiento de las cepas de producción. Los animales más grandes también son susceptibles al daño óseo, especialmente aquellos criados para una alta capacidad reproductiva, tasas de crecimiento rápidas y aquellos criados en lugares cerrados. Por ejemplo, los cerdos padecen osteomalacia como resultado de la alta demanda de lactancia en cerdas reproductoras, enfermedades óseas metabólicas como el raquitismo y enfermedades óseas no metabólicas debido a la infección como consecuencia del estrés y la contaminación con materia fecal en instalaciones de producción porcina de alta densidad.

[0033] También se mejora el rendimiento de crecimiento de los animales tratados con PEG APM. El rendimiento del crecimiento puede significar una producción mejorada de leche en el caso del ganado lechero, o huevos en el caso de pollos (ponedores), así como una mejora en la producción de masa muscular magra en el caso de animales criados para la producción de carne. El rendimiento del crecimiento proporciona una evaluación general de la salud global de un animal y los trastornos óseos siempre tienen un impacto negativo en la salud global de un organismo. Independientemente de si se manifiesta un trastorno óseo como consecuencia de trastornos en la salud gastrointestinal, se ha encontrado que el tratamiento con PEG APM mejora el rendimiento de crecimiento de los animales tratados.

[0034] "Animal" tiene su significado convencional de un ser vivo que no es vegetal y ni protista. Un animal preferido es un animal vertebrado, como un mamífero, una ave o un pez. Los mamíferos preferidos incluyen, entre otros, humanos, así como mamíferos domesticados, tales como ganado vacuno, cerdos, ovejas, caballos, perros o gatos. Las aves preferidas incluyen, entre otras, aves domesticadas, como pollos, pavos y patos. Los peces preferidos incluyen, entre otros, peces cultivables como el salmón, la tilapia, el bagre, el mero, la dorada y la lubina.

[0035] Se entiende que el término "trastorno de pérdida ósea" se refiere a afecciones tales como osteoporosis u osteopenia, según lo define el Cirujano General [Ch. 3. En: Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General (2004)] o la Organización Mundial de la Salud [WHO Scientific Group on the Burden of Musculoskeletal Conditions at the Start of the New Millennium. The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium: Report of a scientific group. Ginebra, Suiza: serie de informes técnicos de la Organización Mundial de la Salud 919; 2003 : p. 27] Operativamente, estas autoridades definen la osteoporosis como una densidad mineral ósea (DMO) de menos de 2.5 de desviación estándar por debajo de la DMO media promedio de las mujeres adultas jóvenes (puntuación T de DMO <-2.5). La osteopenia se define operativamente como una desviación estándar de DMO de 1 a 2.5 por debajo de la DMO media promedio de las mujeres adultas jóvenes (-2.5 <puntuación T de DMO> -1.0). Clínicamente, la osteoporosis generalmente se reconoce mediante fracturas características por traumatismo leve en la muñeca, las vértebras y la cadera. Además, tal como se usa

en este documento, el "trastorno de pérdida ósea" también se refiere a afecciones en las que las características físicas del hueso que no son la DMO indican que se ha producido una pérdida ósea significativa. Por ejemplo, el contenido mineral óseo reducido, la fracción de volumen óseo reducida, las reducciones en el grosor trabecular y el número trabecular, los aumentos en el espaciado trabecular, los aumentos en el área de la médula cortical o la

5 disminución del área ósea cortical pueden indicar una progresión hacia la osteopenia o la osteoporosis. También se entiende que cuando se usa el término "trastorno de pérdida ósea" en este documento se refiere a cualquier patología que dé lugar a una disminución de la calidad ósea mediante cualquiera de estos indicadores de pérdida ósea.

10 [0036] Es probable que solo ciertas formulaciones de PEG APM sean eficaces para mejorar el rendimiento del crecimiento o tratar el trastorno de pérdida ósea. Las composiciones de polietilenglicol (PEG) se usan comúnmente para purgar el contenido intestinal antes de la colonoscopia o los procedimientos quirúrgicos que involucran al tracto gastrointestinal. En general, las formas de PEG utilizadas para la limpieza intestinal tienen pesos moleculares de 3350 kilodaltons o menos (*p. ej.*, MiraLAX® o MoviPrep®), lo cual es sustancialmente más

15 corto que las composiciones de PEG APM proporcionadas por la presente invención. Además, el fuerte efecto laxante de estas formulaciones de PEG de bajo peso molecular las hace inadecuadas para la aplicación a largo plazo como tratamiento terapéutico. Además, Alverdy y sus colaboradores informaron de que la administración de PEG APM proporciona una protección significativa contra la sepsis inducida por radiación en ratones, mientras que un PEG de 3.35 kilodaltons proporciona poca o ninguna protección [Valuckaitė, et al., Am. J.

20 Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 297: G1041 (2009); solicitud de patente EE. UU. n.º 11/578.388] Estos resultados indican una diferencia cualitativa en las interacciones entre los epitelios intestinales y el PEG APM y los epitelios intestinales y los compuestos de PEG de bajo peso molecular. La presente invención describe que la interacción de PEG APM con epitelios intestinales también reduce la pérdida ósea en animales con riesgo de un trastorno de pérdida ósea.

25 [0037] "PEG APM" se refiere al PEG de peso molecular relativamente alto definido con un peso molecular promedio mayor de 3.5 kilodaltons. Preferiblemente, el PEG APM tiene un peso molecular promedio mayor que 1 kilodalton y, en realizaciones particulares de la invención, PEG APM tiene un peso molecular promedio que es al menos 5 kilodaltons, al menos 8 kilodaltons, al menos 12 kilodaltons, al menos 15 kilodaltons y entre 15 y 20 kilodaltons (MDY-1001). En una realización, el PEG APM tiene al menos dos cadenas de hidrocarburos, cada cadena con un peso molecular promedio de al menos el 40 por ciento del PEG APM y un núcleo hidrófobo que tiene una estructura de anillo, tal como de 1-4 anillos, cada uno de ellos con 5 o 6 carbonos e incluye, entre otros, anillos aromáticos.

35 [0038] Además, los compuestos de "PEG APM" incluyen derivados del PEG APM en donde cada uno de dichos compuestos derivados contiene un compuesto de PEG APM como fracción al que está unido al menos un grupo funcional adicional. Por lo tanto, los compuestos de "PEG APM" incluyen compuestos de PEG APM no derivatizados y compuestos derivados de PEG APM. Los derivados de PEG APM preferidos son polímeros catiónicos. Esta definición de un compuesto de "PEG APM" evita la confusión al caracterizar moléculas tales

40 como la molécula de la realización preferida descrita en el párrafo anterior, donde un compuesto de "PEG APM" que comprende al menos dos cadenas de hidrocarburos y un núcleo hidrófobico puede denominarse compuesto de PEG APM o compuesto derivado de PEG APM dependiendo de la perspectiva. Tal como se define en el presente documento, dicha molécula es un compuesto de PEG APM, independientemente de si se considera derivatizado o no. Los grupos funcionales de ejemplo incluyen cualquiera de las series alcoxi, preferiblemente de

45 C1 (metoxi) a C10 (caproxi), cualquiera de las series ariloxi, grupos fenilo y fenilo sustituido. Dichos grupos funcionales se pueden unir en cualquier punto a una molécula de PEG APM, incluso en los extremo o en el medio; también se incluyen grupos funcionales, por ejemplo, fenilo y sus sustituyentes, que sirven para unirse a moléculas de PEG más pequeñas o derivados de las mismas en un solo compuesto similar al PEG APM. Además, las moléculas similares al PEG APM que tienen un grupo funcional adicional pueden tener uno varios de tales grupos; cada molécula también puede tener una mezcla de grupos funcionales adicionales, siempre que dichas moléculas sean útiles para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad, trastorno o afección o para estabilizar al menos un agente terapéutico durante el suministro del mismo.

55 [0039] "Formulación" se refiere a una composición adecuada para la administración terapéutica a un animal vivo, por ejemplo, un paciente humano. Las formulaciones preferidas de acuerdo con la invención comprenden una solución equilibrada en viscosidad, perfil electrolítico y osmolalidad, que comprende un electrolito y PEG APM.

60 [0040] En una realización de la presente invención, el polietilenglicol se usa para tratar un trastorno de pérdida ósea, que comprende administrar una dosis eficaz a un sujeto que lo necesita, donde el trastorno óseo está asociado con una afección anormal seleccionada entre enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, menopausia, andropausia, hipogonadismo, osteopenia y osteoporosis, donde el polietilenglicol tiene un peso molecular promedio de al menos 5000 daltons. En otra realización de la divulgación, la administración de una composición que comprende una cantidad eficaz de PEG APM se usa para aumentar el rendimiento de crecimiento de un animal.

65 [0041] "Administración" significa la introducción del material terapéutico en el tracto gastrointestinal de un paciente animal o humano. La introducción del material terapéutico puede ser oral, rectal o enteral por inyección

directa o irrigación quirúrgica. Se pueden usar dispositivos tales como una sonda de alimentación, una sonda duodenal, un enema o una sonda de colon como medio para administrar PEG APM.

- 5 [0042] Una "cantidad eficaz" o "dosis eficaz" es la cantidad de una sustancia que proporciona un efecto beneficioso sobre el organismo que recibe la dosis y puede variar según el tamaño y el estado del organismo que recibe la dosis y otras variables reconocidas como relevantes en la técnica para la determinación de una dosis eficaz. El proceso para determinar una cantidad eficaz implica procedimientos rutinarios de optimización que se encuentran dentro de la habilidad en la técnica.
- 10 [0043] En un aspecto de la invención, se administra PEG APM a un animal con una condición anormal en riesgo de desarrollar un trastorno de pérdida ósea para mejorar la pérdida ósea al disminuir la velocidad de resorción ósea y aumentar la tasa de osteogénesis.
- 15 [0044] Una "condición anormal" se define ampliamente para incluir enfermedades animales, trastornos animales y cualquier estado anormal de salud animal que se caracterice por un riesgo de desarrollar un trastorno gastrointestinal o de pérdida ósea.
- [0045] "Mejorar" significa reducir el grado o la gravedad, de acuerdo con su significado común y corriente.
- 20 [0046] Se entiende que "osteogénesis" se refiere a la síntesis anabólica de hueso nuevo.
- [0047] En un aspecto de la invención, se administra PEG APM a un animal que padece una enfermedad inflamatoria intestinal para mejorar la pérdida ósea o restaurar la salud ósea.
- 25 [0048] "Enfermedad inflamatoria intestinal" describe un espectro de enfermedades intestinales, incluida la enfermedad de Crohn, que puede ocurrir en cualquier parte del tracto gastrointestinal, y la colitis ulcerosa, que se localiza principalmente en el colon y el intestino grueso. Otras afecciones que provocan inflamación crónica o episódica del intestino también constituyen una enfermedad inflamatoria intestinal, independientemente de su origen idiopático o específico.
- 30 [0049] En otro aspecto de la invención, el PEG APM se administra a un animal que sufre pérdida ósea debido a la menopausia o la andropausia para mejorar dicha pérdida ósea o restaurar la salud ósea.
- 35 [0050] La "menopausia", tal como se usa en este documento, se refiere a la disminución en el nivel de estrógeno y progesterona circulantes debido al envejecimiento, la enfermedad, el trauma o la extirpación quirúrgica de ambos ovarios, denominada en este documento ovariectomía, aunque también conocida comúnmente como ooforectomía.
- 40 [0051] La "andropausia", tal como se usa en este documento, se refiere a la disminución de los niveles circulantes de testosterona debido al envejecimiento, la enfermedad, el trauma o la extirpación quirúrgica de ambos testículos.
- 45 [0052] "Carga bacteriana" significa la cantidad de bacterias recuperables de un animal. La carga bacteriana es una medida de la capacidad de un animal para dejar bacterias en su entorno y potencialmente contaminar a otros animales en sus inmediaciones. Bajo condiciones de confinamiento en espacio reducido, un solo animal infectado con alta carga bacteriana puede transmitir la infección más fácilmente que uno con baja carga bacteriana. La capacidad del PEG APM para reducir la carga bacteriana es un factor importante para mejorar el rendimiento del crecimiento.
- 50 [0053] Un aspecto relacionado de la invención es un kit para usar en el tratamiento de un animal en riesgo de desarrollar un trastorno óseo, dicho kit comprende una dosis eficaz de PEG APM, medios para administrar la dosis eficaz y un protocolo que describe el uso del PEG APM y cómo debe administrarse, donde el trastorno óseo está asociado con una condición anormal seleccionada entre enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, menopausia, andropausia, hipogonadismo, osteopenia y osteoporosis, donde el tratamiento comprende administrar la dosis eficaz de polietilenglicol a un animal que lo necesita, y donde el polietilenglicol tiene un peso molecular promedio de al menos 5000 daltons. Los protocolos adecuados incluyen cualquiera de los métodos descritos en este documento o conocidos en la técnica relacionados con la administración, entrega o aplicación del PEG APM. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, el kit comprende además compuestos terapéuticos adicionales.
- 60 [0054] En una realización preferida de la presente invención, una composición que comprende una cantidad eficaz de PEG APM que comprende además antiinflamatorios, otros moduladores del sistema inmunitario, un antibiótico, un agente anticancerígeno, un agente antiulceroso, un factor de crecimiento, una citocina, bifosfonatos, una hormona proteica y mezclas de los mismos. Las terapias de ejemplo incluyen un 5-amino salicilato, un compuesto que comprende una fracción de 5-amino salicilato, un corticosteroide, metotrexato, 6-mercaptopurina, ciclosporina, vancomicina, metronidazol, una cefalosporina, taxano, un compuesto que comprende una fracción de taxano, camptotecina, un compuesto que comprende una fracción de camptotecina,

5-fluorouracilo, un compuesto que comprende una fracción de 5-fluorouracilo, un compuesto antiandrógeno, un compuesto antiestrógeno, alendronato, risedronato, un factor de crecimiento epidérmico, factor trefoil intestinal, insulina, somatostatina, teriparatida, un interferón y mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es una bacteria probiótica, o un compuesto o composición derivados de una bacteria probiótica.

- 5 [0055] Los siguientes ejemplos ilustran realizaciones de la invención. El ejemplo 1 describe las mejoras en varios parámetros de salud ósea mediante PEG APM en un modelo de ratón con osteoporosis postmenopáusica. El ejemplo 2 describe la mejora por PEG APM de un marcador para la síntesis ósea anabólica en un modelo de ratón con osteoporosis inducida por el SII. El ejemplo 3 describe la mejora de la síntesis ósea anabólica en un grupo de sujetos sanos que no sufren ningún trastorno de pérdida ósea tras el tratamiento con PEG APM. Los siguientes ejemplos ilustran realizaciones de la divulgación. El ejemplo 4 describe el uso de PEG APM para mejorar la eficiencia metabólica de pollos infectados con patógenos entéricos. El ejemplo 5 describe el uso de PEG APM para reducir la carga de bacterias patógenas en pollos infectados. El ejemplo 6 demuestra el uso de PEG APM para mejorar el aumento de peso y reducir el malestar gastrointestinal en lechones criados en condiciones de producción simulada.

EJEMPLOS

- 20 [0056] Los siguientes ejemplos están destinados a ser ilustrativos de la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención tal como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLO 1

- 25 [0057] Se obtuvieron veinticuatro ratones BALB/c hembra jóvenes de Jackson Laboratories (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Los ratones se dividieron en dos conjuntos iguales y los ratones de un conjunto se ovariectomizaron a las diez semanas de edad. Cada conjunto se subdividió en dos grupos de seis ratones ovariectomizados (OVX) y dos grupos de seis ratones fértiles. Un grupo de OVX y un grupo de ratones fértiles recibieron PEG a través de una sonda (3 veces por semana con 2 g/kg de peso corporal de PEG APM). A lo largo del trabajo presentado aquí, la formulación de PEG APM fue MDY-1001, que se compone de un 10 % de PEG APM de 15 K PM promedio y hasta un 2 % de pesos moleculares más altos de PEG con el PEG PM restante de 8K.

- 30 [0058] Estos animales también recibieron un 1 % de PEG APM en dextrosa al 5 % en agua (D5W), proporcionado ad libitum para mantener una cantidad eficaz de PEG APM entre tratamientos de alimentación forzada. Los otros dos grupos se alimentaron por sonda con volúmenes equivalentes de agua en el mismo horario y se les suministró D5W. Esto dio como resultado cuatro grupos, un grupo de control de ratones fértiles no expuestos a PEG (control), un grupo de ratones fértiles expuestos a PEG (control + PEG), un grupo de ratones OVX no expuestos a PEG (OVX) y un grupo de ratones OVX expuestos a PEG (OVX + PEG). A lo largo del experimento, los animales recibieron alimento estándar y agua ad libitum y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Estatal de Michigan.

- 35 [0059] Los animales se recolectaron a las 14 semanas de edad. La sangre se recogió de manera esterilizada en el momento de la recolección mediante punción cardíaca, se dejó coagular a temperatura ambiente durante 5 minutos y luego se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Se retiró el suero, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C. Los fémures también se retiraron y procesaron como se describe a continuación.

1. Tomografía microcomputarizada de ratones fértiles y OVX tratados con PEG APM.

- 40 [0060] La estructura ósea se analizó mediante tomografía microcomputarizada (μ CT). Los fémures (fijados en formalina tamponada al 10 % durante 24 horas y luego conservados en etanol al 70 %) se escanearon utilizando un sistema de μ CT Explore Locus de GE a una resolución de vóxels de 20 μ m obtenida a partir de 720 vistas. El ángulo de incremento del haz fue de 0.5, y la resistencia del haz se ajustó a 80 kV de pico y 450 μ A. El tiempo de integración para cada exploración fue de 2000 ms. Cada ejecución constó de huesos de cada grupo y un cuerpo de calibración para estandarizar los valores de escala de grises y mantener la consistencia. Sobre la base de los análisis de umbral automático e isosuperficie de múltiples muestras de hueso, se usó un umbral fijo (835) para separar el hueso de la médula ósea. La precisión se verificó mediante la comparación de los cortes de imagen originales y segmentados. Los análisis óseos se hicieron sin prestar atención a la condición de los huesos. Los análisis de hueso trabecular se realizaron en una región de hueso trabecular definida a ~0.15 mm (~1 % de la longitud total) distal a la placa de crecimiento del fémur proximal que se extiende 1.5 mm (el 10 % de la longitud de hueso) hacia la diáfisis, excluyendo el hueso cortical externo. El contenido mineral óseo trabecular, la densidad mineral ósea, la fracción de volumen óseo, el grosor, el espacio y los valores numéricos se calcularon mediante la aplicación de software Healthcare MicroView de GE para la visualización y análisis de datos de imágenes volumétricas. Las mediciones corticales se realizaron en un cubo de 2 X 2 X 2 mm centrado en la mitad del hueso utilizando un umbral de 1430 para separar el hueso de la médula.

- 45 [0061] En la figura 1 se muestran cuatro imágenes μ CT representativas de hueso trabecular de cada grupo. El

panel marcado como "control" representa la estructura ósea de un ratón normal no tratado, mientras que el panel marcado como "OVX" muestra la estructura ósea equivalente en un ratón que experimenta osteoporosis postmenopáusica. El panel marcado "control + PEG" representa la estructura ósea de un ratón tratado con PEG APM. La comparación de este panel con el panel de control indica un aumento relativo en la cantidad de hueso.

5 El panel marcado "OVX + PEG" representa la estructura ósea que se da en un ratón que sufre osteoporosis postmenopáusica tratada con PEG APM. La comparación con el panel OVX revela un aumento muy obvio en la cantidad de hueso. Estos datos indican que el tratamiento con PEG APM puede aumentar la cantidad de hueso presente en sujetos que padecen osteoporosis postmenopáusica.

10 2. Contenido mineral óseo trabecular de ratones fértiles y OVX tratados con PEG APM.

[0062] El contenido mineral óseo trabecular (CMO) es representativo de la cantidad de mineral óseo presente en una región dada de hueso trabecular. Se sabe que el CMO disminuye en las mujeres a las que se les extirparon ambos ovarios, y esto se refleja en el modelo de ratón OVX que se muestra en la figura 2. La comparación del grupo de muestra de OVX con el grupo de control presenta una disminución promedio estadísticamente significativa ($p = 0.0265$) en el CMO de casi el 62 %. Esto es muy similar al grado de disminución en el CMO presentado por Harris *et al.*, en el modelo de ratón inducido por DSS de EII (57 %) [Harris, *et al.*, (2008) ver tabla 2, col 1, línea 1].

20 [0063] Aunque menos estadísticamente significativas, las diferencias entre los grupos tratados con PEG y sus respectivos controles no tratados son consistentes con un patrón de tratamiento con PEG APM que generalmente mejora el CMO. El tratamiento con PEG APM de ratones fértiles (control + PEG) dio como resultado un nivel de CMO del 129 % de los ratones fértiles no tratados (control). Esto es similar al nivel de mejora del 123 % observado en los ratones OVX tratados con PEG APM (OVX + PEG) en relación con sus homólogos no tratados (OVX). Lo más significativo es que los datos muestran que, en promedio, el tratamiento con PEG APM restauró el CMO de OVX al 76 % del valor de control. Por lo tanto, parece que el tratamiento con PEG APM generalmente puede aumentar el CMO, pero también puede aumentar el CMO en la osteoporosis postmenopáusica. Además, esta mejora es consistente con un aumento en la síntesis de hueso nuevo, ya que el aumento absoluto en CMO parece depender de cuánto hueso comienza el sujeto animal y no de la disminución de la resorción del hueso existente.

30 3. Densidad mineral ósea trabecular de ratones fértiles y OVX tratados con PEG APM

[0064] El contenido de densidad mineral ósea trabecular (DMO) es representativo de la cantidad de mineral óseo presente en un volumen dado de hueso trabecular. Se sabe que las mujeres a las que se les extirparon ambos ovarios tienen una DMO más baja, y esto también se muestra en el modelo de ratón OVX de la figura 3. La comparación del grupo de muestra de OVX con el grupo de control presenta una disminución promedio estadísticamente significativa ($p = 0.0012$) de poco más del 62 %. Esto es consistente con el grado de disminución de la DMO presentado por Harris *et al.* en el modelo de ratón inducido por DSS de SII (59 %) [Harris, *et al.*, (2008) ver tabla 2, col 1, línea 2].

[0065] La diferencia entre el grupo de control y el grupo de control tratado con PEG APM no es estadísticamente significativa; sin embargo, es consistente con la idea de que el tratamiento con PEG APM mejora la DMO. Aquí, en promedio, el tratamiento con PEG APM dio como resultado densidades minerales óseas de aproximadamente el 115 % de los controles no tratados. La mejora en los ratones OVX no solo es estadísticamente significativa ($p = 0.0005$), sino que también es mayor, ya que el tratamiento con PEG APM da como resultado una mejora del 131 % en la DMO en relación con el grupo OVX no tratado. Los ratones OVX tratados con PEG APM tenían, en promedio, DMO de aproximadamente el 82 % de los ratones fértiles no tratados. Por lo tanto, el tratamiento con PEG APM aumenta significativamente la DMO en animales que sufren osteoporosis postmenopáusica.

50 4. Contenido mineral de hueso cortical de ratones fértiles y OVX tratados con PEG APM.

[0066] El contenido mineral óseo cortical (CMOC) es una medida de la cantidad de mineral óseo presente en una región determinada del hueso cortical. Aunque la figura 4 muestra poca diferencia estadística o aparente entre el promedio del grupo de control y el promedio del grupo OVX en términos de CMOC, el tratamiento con PEG APM de cualquiera de los grupos produce aumentos en CMOC. En el caso de los grupos control y control + PEG, el tratamiento con PEG APM dio como resultado aproximadamente un 115 % de CMOC sobre el control. Sin embargo, este valor está más allá del umbral estadístico de fiabilidad ($p = 0.0593$). Se observa una mejora similar y estadísticamente más sólida en el CMOC cuando se compara el grupo OVX tratado con PEG APM con los ratones OVX. En este caso, el tratamiento con PEG APM dio como resultado un 118 % de CMOC sobre el grupo OVX ($p = 0.0022$). Por lo tanto, el tratamiento con PEG APM mejora el CMOC.

60 5. Densidad mineral ósea cortical de ratones fértiles y OVX tratados con PEG APM.

[0067] La densidad mineral ósea cortical (DMOC) es una medida de la cantidad de mineral óseo presente en una región determinada del hueso cortical.

[0068] Al igual que con el CMOC, hay poca diferencia en la DMOC entre el grupo de control y el grupo OVX que se muestra en la figura 5. Sin embargo, el tratamiento de cada grupo con PEG APM resulta en un aumento de la DMOC. Una mejora estadísticamente significativa ($p = 0.0110$) de hasta el 104 % del grupo de control es evidente en el grupo de control + PEG. También es evidente una mejora estadísticamente menos significativa ($p = 0.0831$), pero un poco mayor de hasta el 105 % del grupo OVX + PEG APM en relación con el grupo OVX. Estas son pequeñas diferencias en relación con los cambios observados en el hueso trabecular, pero se sabe que el hueso cortical es mucho menos dinámico, aunque la tendencia es consistente con que el PEG APM mejore la DMOC.

10 6. Fracción de volumen óseo de ratones fértiles y OVX tratados con PEG APM.

[0069] Quizás el indicador más fiable de los cambios en el estado óseo es la fracción de volumen óseo (VH/VT), que es la cantidad de hueso mineralizado por unidad de volumen de muestra.

15 [0070] La figura 6 muestra las diferencias significativas en VH/VT entre los grupos OVX y de control, con el VH/VT promedio de OVX disminuido hasta solo un 38 % aproximadamente del promedio de control ($p = 0.0008$). El tratamiento con PEG APM mejora la VH/VT tanto en ratones de control como en ratones OVX. En el caso de los ratones de control, PEG APM aumenta VH/VT hasta aproximadamente el 130 % del grupo no tratado ($p = 0.0984$). En el caso de los ratones OVX, PEG APM aumenta VH/VT hasta el 189 % del grupo no tratado ($p = 0.0017$). Esta es una mejora enorme y el aumento general de VH/VT en el grupo OVX tratado con PEG APM representa aproximadamente el 71 % del promedio del grupo de control. Por lo tanto, el tratamiento con PEG APM aumenta VH/VT en animales que sufren osteoporosis postmenopáusica.

20 25 7. Espesor trabecular de ratones fértiles y OVX tratados con PEG APM.

[0071] Las trabéculas individuales dentro del hueso trabecular varían en tamaño y longitud dentro de límites relativamente estrechos. En general, cuanto más gruesa es la trabécula individual, más fuerte es el hueso. Por lo tanto, los aumentos en el espesor trabecular (Tb.Th.) promedio representan una mejora en el estado óseo.

30 [0072] La figura 7 muestra las diferencias en el Tb.Th. entre los grupos OVX y de control. En relación con el promedio del grupo de control, el grupo OVX tiene un Tb.Th. promedio de aproximadamente el 80 %. Al igual que con los otros marcadores de salud ósea discutidos aquí, el tratamiento con PEG APM mejora el Tb.Th. En el caso de los ratones de control, el tratamiento con PEG APM dio como resultado un Tb.Th. promedio de alrededor del 113 % del promedio del grupo de control. En el caso de los ratones OVX, el tratamiento con PEG APM dio como resultado un Tb.Th. promedio de alrededor del 122 % del promedio del grupo OVX. De hecho, el tratamiento de ratones OVX con PEG APM restaura completamente el Tb.Th. a lo visto en los ratones de control (proporción relativa de 1.00). Por lo tanto, el tratamiento con PEG APM puede aumentar el Tb.Th. en animales que sufren osteoporosis postmenopáusica.

40 45 8. Número trabecular de ratones fértiles y OVX tratados con PEG APM.

[0073] Otra medida de la salud del hueso trabecular es el número trabecular Tb.N., que refleja el número de trabéculas dentro de un área determinada. Cuanto mayor es el número de trabéculas individuales, más fuerte es el hueso. Por lo tanto, los aumentos en el Tb.N promedio representan una mejora en el estado óseo.

50 [0074] La figura 8 muestra las diferencias en el Tb.N entre los grupos OVX y de control. En relación con el promedio del grupo de control, el grupo OVX tiene un Tb.N. promedio de aproximadamente el 44 %. El tratamiento con PEG APM mejoró el Tb.N. de los ratones de control hasta el 117 % del Tb.N. de ratones de control no tratados. El tratamiento con PEG APM de ratones OVX aumentó el Tb.N. hasta el 161 % del grupo OVX no tratado. El Tb.N. de ratones OVX tratados con PEG APM representa el 71 % del Tb.N. de los ratones de control no tratados. Por lo tanto, el tratamiento con PEG APM puede aumentar el Tb.N. en animales que sufren osteoporosis postmenopáusica.

55 9. Espaciado trabecular de ratones fértiles y OVX tratados con PEG APM.

[0075] El espaciado trabecular (Tb.Sp.) es una medida de los espacios vacíos dentro del hueso trabecular. En general, cuanto mayor es el Tb.Sp. más débil es el hueso. Por lo tanto, a diferencia de otras medidas del estado del hueso trabecular discutidas aquí, la disminución de Tb.Sp. representan una mejora en el estado óseo.

60 [0076] La figura 9 muestra las diferencias en el Tb.Sp. entre los grupos OVX y de control. El Tb.Sp. de los ratones OVX es más del doble (242 %) que el de los ratones de control no tratados. El tratamiento con PEG APM reduce el Tb.Sp. tanto en el control como en los grupos OVX. El grupo de control tratado con PEG APM tiene un Tb.Sp. del 71 % del grupo no tratado, sin embargo, estos datos no son estadísticamente fiables ($p = 0.2356$). La diferencia entre los grupos OVX tratados y sin tratar con PEG APM es más pronunciada, así como estadísticamente significativa ($p = 0.0039$). En este caso, los ratones OVX tratados con PEG APM tienen un Tb.Sp. de aproximadamente el 139 % de los ratones de control no tratados, lo que representa una mejora

significativa sobre los ratones OVX no tratados. Por lo tanto, el tratamiento con PEG APM puede disminuir el Tb.Sp. en animales que sufren osteoporosis postmenopáusica.

10. Área de la médula cortical de ratones fértiles y OVX tratados con PEG APM.

- 5 [0077] El área de la médula cortical (AMC) es una medida del área dentro del hueso cortical que contiene la médula. Al igual que con Tb.Sp., cuanto mayor es la AMC, más débil es el hueso. Por lo tanto, las disminuciones en el AMC representan una mejora en el estado óseo.
- 10 [0078] La figura 10 muestra las diferencias en el AMC entre los grupos OVX y de control. Hay poca diferencia estadística entre el grupo de control no tratado y los ratones OVX no tratados, los ratones OVX tienen un AMC de aproximadamente el 107 % de la del grupo de control ($p = 0.5881$). El tratamiento del grupo de control con PEG APM en realidad parece aumentar el AMC, ya que el grupo de control tratado tiene un AMC del 114 % en relación con el control no tratado ($p = 0.2846$). Sin embargo, ninguna de estas proporciones es particularmente significativa dada la alta varianza dentro del grupo de control no tratado, lo que da lugar a estadísticas de grupo pobres sobre las cuales basar una comparación. Por otro lado, el tratamiento de ratones OVX con PEG APM da lugar a una disminución estadísticamente significativa ($p = 0.0419$) en el AMC. En este caso, el tratamiento con PEG APM da como resultado ratones OVX con un AMC del 88 % del grupo OVX no tratado. Por lo tanto, el tratamiento con PEG APM puede mejorar el AMC en animales que sufren osteoporosis postmenopáusica.
- 15

20 11. Área cortical de ratones fértiles y OVX tratados con PEG APM.

[0079] El área cortical (AC) es una medida del área de hueso de una sección transversal del hueso cortical. En general, cuanto mayor es el AC más fuerte es el hueso. Por lo tanto, los aumentos en el CA promedio representan una mejora en el estado óseo.

[0080] La figura 11 muestra que la diferencia entre OVX y el control no tratado es pequeña, una relación del 98 %, y no significativa estadísticamente ($p = 0.8095$). La diferencia entre los ratones de control tratados con PEG APM y el grupo no tratado es del 111 %, pero también tiene una significación estadística baja ($p = 0.1529$). Al igual que con las mediciones de AC, esto se debe principalmente a grandes desviaciones dentro del grupo de control no tratado. Se produce una mayor confianza estadística ($p = 0.0029$) en la comparación de los ratones OVX tratados con PEG APM con el grupo OVX no tratado, lo que indica que el tratamiento con PEG APM mejora el AC en relación con los ratones no tratados hasta el 112 %, similar a la mejora observada entre ratones de control tratados y no tratados. Por lo tanto, el tratamiento con PEG APM puede aumentar el AC en animales que sufren osteoporosis postmenopáusica.

[0081] Tomados en conjunto, estos datos demuestran que el tratamiento con PEG APM mejora muchos parámetros diferentes del estado óseo cortical y trabecular en sujetos que sufren pérdida ósea postmenopáusica. Sin embargo, estas mediciones no diferencian entre los cambios en la resorción ósea y la síntesis de hueso nuevo.

EJEMPLO 2

Efectos del PEG APM sobre la osteocalcina sérica en DSS y ratones OVX + DSS tratados

45 [0082] Para determinar si el efecto beneficioso del tratamiento con PEG APM se debió a la inhibición de la resorción ósea o a la inducción de osteogénesis, se determinaron los niveles de osteocalcina sérica en ratones con osteoporosis derivada de diferentes afecciones subyacentes tratados y no tratados.

50 [0083] Se obtuvieron diecisésis ratones BALB/c hembra de Jackson Laboratories (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Los ratones se dividieron en dos conjuntos iguales y los ratones de un conjunto se ovariectomizaron a las diez semanas de edad. Cada conjunto se subdividió en dos grupos de cuatro ratones ovariectomizados (OVX) y dos grupos de cuatro ratones fértiles. Un grupo de OVX y un grupo de ratones fértiles recibieron PEG APM a través de una sonda (3 veces por semana con 2 g/kg de peso corporal de PEG APM).

55 Estos animales también recibieron un 1 % de PEG APM en D5W, proporcionado ad libitum para mantener una cantidad eficaz de PEG APM entre tratamientos de alimentación forzada. Los otros dos grupos se alimentaron por sonda con volúmenes equivalentes de agua en el mismo horario y se les suministró D5W. Los cuatro grupos recibieron DSS al 1 % a través del agua potable, comenzando 15 días antes del final del experimento. Esto dio como resultado cuatro grupos, un grupo de control de ratones fértiles no expuestos a PEG (control + DSS), un grupo de ratones fértiles expuestos a PEG (control + DSS + PEG), un grupo de ratones OVX no expuestos a PEG (OVX + DSS) y un grupo de ratones OVX expuestos a PEG (OVX + DSS + PEG). A lo largo del experimento, los animales recibieron alimento estándar y agua y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Estatal de Michigan.

60 65 [0084] Los animales se sacrificaron a las 14 semanas de edad. La sangre se recogió de manera esterilizada en el momento de la recolección mediante punción cardíaca, se dejó coagular a temperatura ambiente durante 5

minutos y luego se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Se retiró el suero, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C. Los niveles de osteocalcina sérica se midieron usando un kit de ensayo de OC de ratón (BT-470, Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

- 5 [0085] La figura 12 muestra que el grupo OVX + DSS combinado tenía niveles de osteocalcina sérica sustancialmente más bajos que cualquier otro grupo de ratones tratados con DSS, lo que sugiere que la disminución en la síntesis ósea anabólica debido a la ovariectomía fue aditiva a cualquier disminución causada solo por DSS. El tratamiento con PEG APM restauró la osteocalcina sérica al mismo nivel que el de los ratones control + DSS tratados con PEG APM. Los niveles séricos de osteocalcina del grupo de control + DSS son menores que los de los grupos tratados con PEG, pero más que los del grupo OVX + DSS. El hecho de que la osteocalcina sérica aumente en respuesta al tratamiento con PEG APM sugiere que los sujetos tratados con PEG APM tienen una mayor capacidad de síntesis ósea anabólica.
- 10

EJEMPLO 3

- 15 Efectos del PEG APM sobre la osteocalcina sérica en ratones de control, DSS y OVX + DSS tratados

[0086] Para examinar si el efecto beneficioso del tratamiento con PEG APM sobre la osteocalcina sérica se extendió a ratones sanos, y para proporcionar una medida del grado de aumento de PEG APM en la osteocalcina sérica en ratones tratados con DSS y OVX + DSS, se representaron los datos de los sujetos del ejemplo 1 y el ejemplo 2 relativos los unos a los otros.

[0087] La figura 13 compara los niveles de osteocalcina sérica de los grupos de control y de control + PEG sanos del ejemplo 1 con los grupos de control + DSS y de control + DSS + PEG del ejemplo 2. Claramente, el grupo de control tratado con PEG APM tiene un nivel promedio aumentado de osteocalcina sérica, aunque no dentro del nivel de confianza estadística deseado debido a la varianza dentro del grupo. Del mismo modo, el grupo de control + DSS + PEG parece haber sido restaurado al mismo nivel promedio de osteocalcina sérica que el grupo control sano, pero nuevamente sin el nivel deseado de confianza estadística. Aunque no es estadísticamente cuantificable, el beneficio del tratamiento con PEG APM sobre la osteocalcina sérica es claramente evidente en estos datos. Significativamente, el tratamiento con HMW PEG aumenta la osteocalcina sérica incluso en ratones sin patología subyacente.

[0088] La figura 14 compara los grupos de control y de control + PEG del ejemplo 1 con los grupos OVX + DSS y OVX + DSS + PEG del ejemplo 2. Aquí, como en las comparaciones anteriores, el tratamiento con PEG restaura los niveles de osteocalcina sérica en el grupo OVX + DSS al mismo nivel que el promedio del grupo de control sano.

[0089] A la luz de los informes de que la pérdida ósea del SII inducida por DSS se debe en gran parte a una disminución en la actividad osteogénica de los osteoblastos [Harris, et al., (2009); Hamdani et al., (2008)], estos datos sugieren que la pérdida ósea debido a factores postmenopáusicos también se debe a reducciones en la osteogénesis osteoblástica. El rebote en la osteocalcina sérica en sujetos que padecen osteoporosis inducida por EII (mostrado en la figura 13) e incluso en sujetos que sufren de osteoporosis inducida por EII y postmenopáusica (mostrado en la figura 14), después del tratamiento con PEG APM indica un aumento en la formación de hueso anabólico por osteoblastos.

EJEMPLO DE REFERENCIA 4

Efectos del PEG APM en la tasa de conversión alimenticia de pollos sanos e infectados.

[0090] Se examinó el efecto del rendimiento de crecimiento del tratamiento con PEG APM de pollos de engorde criados en condiciones de producción típicas. Cuatrocientos ochenta pollos se colocaron aleatoriamente en 4 grupos experimentales, con 15 aves por cada corral. Todas las aves se criaron desde el día de la eclosión en condiciones estándar de alimentación, agua, luz, aire y temperatura durante 20 días. Las aves en el grupo de control negativo no recibieron tratamiento especial. A las aves en el grupo del MDY (1-21) del 0.33 % se les dio PEG APM MDY-1001 ad libitum como aditivo alimenticio del 0.33 %. Las aves del grupo de control SE se infectaron con *Salmonella Enteritidis*, para provocar el trastorno gastrointestinal, pero no recibieron ningún otro tratamiento especial. Las aves en el grupo del MDY (1 - 21) + SE del 0.33 % se infectaron con *S. Enteritidis* y se les dio PEG APM (MDY-1001) ad libitum como aditivo alimenticio del 0.33 %. El consumo de alimento y el aumento de peso corporal de cada grupo se evaluaron a los veinte días.

[0091] La figura 15 indica que, aunque existe poca diferencia estadística entre las cantidades de alimento consumidas por cualquiera de los grupos, hay una mejora significativa en el peso corporal de los pollos infectados con *S. Enteritidis* tratados con PEG APM en comparación con los no tratados. Por lo tanto, el tratamiento con PEG APM mejora la tasa de conversión alimenticia de animales que experimentan un trastorno gastrointestinal.

EJEMPLO DE REFERENCIA 5

Efectos del PEG APM en la recuperación de bacterias de pollos infectados.

[0092] Se examinó el efecto del tratamiento con PEG APM sobre la capacidad de la *Salmonella Enteritidis* para persistir en pollos infectados. Los pollos se colocaron en 4 grupos y se criaron bajo inflamación gastrointestinal del rendimiento de crecimiento de los pollos criados en las condiciones básicas descritas en el ejemplo 4. Sin embargo, en este experimento todas las aves se infectaron con *S. Enteritidis* desde el principio y la cantidad de bacterias recuperadas de las aves se midió después del período de tratamiento. Las aves en el grupo de control no recibieron tratamiento especial. A las aves del grupo de 0.1 % -T se les administró PEG APM ad libitum como aditivo alimenticio del 0.1 %. Las aves en el grupo de 0.1 % -P recibieron un profiláctico ad libitum como aditivo alimenticio del 0.1 %. El número de unidades formadoras de colonias recuperadas del intestino ciego de cada pollo se determinó al final del período de tratamiento.

[0093] La figura 16 indica que el tratamiento con PEG APM redujo significativamente la carga bacteriana de los pollos infectados en relación con los pollos no infectados. De hecho, el tratamiento con HMG-PEG parece haber sido más efectivo que el profiláctico comercial para reducir la carga bacteriana. Por lo tanto, el tratamiento con PEG APM reduce la carga bacteriana de los animales expuestos a bacterias infecciosas.

EJEMPLO DE REFERENCIA 6

Efectos del PEG APM sobre el rendimiento de crecimiento acumulativo de lechones destetados expuestos a una prueba fecal no específica.

[0094] El efecto del tratamiento con PEG APM sobre el rendimiento de crecimiento de los lechones destetados se probó mediante exposición a una prueba fecal no específica en los días 2-4 y 7 (postdestete), pintando un lodo de materia fecal recolectado de un vivero de producción (1100 cerdos) hasta el interior de la bandeja de alimentación en cada corral. Se pesaron ciento sesenta lechones en el destete, se colocaron dos en un corral, con 20 corrales replicados en cada grupo experimental, se alimentaron con dietas experimentales durante veinte días y luego se volvieron a pesar. El grupo de control positivo no fue sometido a la prueba fecal no específica, mientras que el grupo de control negativo y los dos grupos de tratamiento fueron sometidos a la prueba fecal. Los grupos de tratamiento incluyeron un grupo que recibió 35 g/ton de Denagard® (antibiótico de fumarato de tiamulina al 12.5 %) y un grupo que recibió PEG APM del 2 % mezclado directamente en la comida. La frecuencia de incidentes (de diarrea) en cada grupo también se evaluó determinando la puntuación de incidencia. La puntuación de incidencia es el número de eventos de diarrea dividido por el número total de corrales en cada grupo experimental multiplicado por cien.

Tabla I.

Rendimiento de crecimiento acumulativo de lechones destetados expuestos a una prueba fecal no específica.

Peso (libras)				
		Control negativo + ...		
	Control positivo	Control negativo	35 g/ton Denagard®	HMG-PEG 2.0 %
día 0	14.7	14.3	14.9	14.8
día 20	24	21.6	22.2	23.1
Conversión alim. (libras/libras)				
	1.13	1.31	1.40	1.44
Puntuación de incidencia				
	1.05	1.19	1.13	1.06

[0095] Los resultados, que se muestran en la tabla 1, indican que el PEG APM fue ligeramente mejor que Denogard® para la protección de los lechones de la exposición fecal no específica en términos de la cantidad absoluta de peso ganado por los lechones, la tasa de conversión de alimento (lb de alimento/lb lechón) y la puntuación de incidencia. Los lechones de control ganaron aproximadamente 4.7 lbs/día, mientras que los lechones de control negativo solo aumentaron su peso aproximadamente 3.7 lbs/día. Los lechones sometidos a prueba y tratados con Denagard® también aumentaron su peso aproximadamente 3.7 lbs/día, mientras que los lechones tratados con PEG APM aumentaron en casi 4.3 lbs/día. Más importante aún, el tratamiento con HMG-PEG redujo la incidencia de diarrea al nivel de control positivo, lo que indica que HMG-PEG proporciona protección contra la diarrea asociada con el estrés del confinamiento y la contaminación fecal comúnmente presente en las operaciones porcinas de alta densidad.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polietilenglicol para usar en el tratamiento de un animal en riesgo de desarrollar un trastorno de pérdida ósea seleccionado entre osteopenia y osteoporosis o en el que el trastorno de pérdida ósea se asocia con una afección anormal seleccionada entre enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, menopausia, andropausia e hipogonadismo, que incluye la administración de una dosis eficaz a un animal que lo necesite, donde el polietilenglicol tiene un peso molecular promedio de al menos 5000 daltons.
- 10 2. Polietilenglicol para usar según la reivindicación 1, donde el animal se selecciona del grupo que consiste en perro, gato, caballo, oveja, cabra, vaca, cerdo, pollo, pavo y humano.
- 15 3. Polietilenglicol para usar según la reivindicación 1 o 2, donde la dosis eficaz se administra por vía oral o rectal o directamente en el intestino mediante inyección o mediante irrigación quirúrgica.
- 20 4. Polietilenglicol para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la dosis eficaz es suficiente para aumentar la osteogénesis y/o reducir la resorción ósea.
- 25 5. Polietilenglicol para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el polietilenglicol es MDY-1001.
- 30 6. Kit que comprende una dosis eficaz de polietilenglicol para usar en el tratamiento de un animal en riesgo de desarrollar un trastorno de pérdida ósea seleccionado entre osteopenia y osteoporosis o donde el trastorno de pérdida ósea está asociado con una afección anormal seleccionada entre enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, menopausia, andropausia e hipogonadismo, que comprende administrar la dosis eficaz de polietilenglicol a un animal que lo necesite, donde el polietilenglicol tiene un peso molecular promedio de al menos 5000 daltons.
- 35 7. Kit para usar según la reivindicación 6, donde el polietilenglicol es MDY-1001.
- 40 8. Kit para usar según las reivindicaciones 6 o 7, que comprende medios para administrar dicha dosis a un animal que lo necesite.

FIG. 1

Tomografía microcomputarizada de fémures de ratón

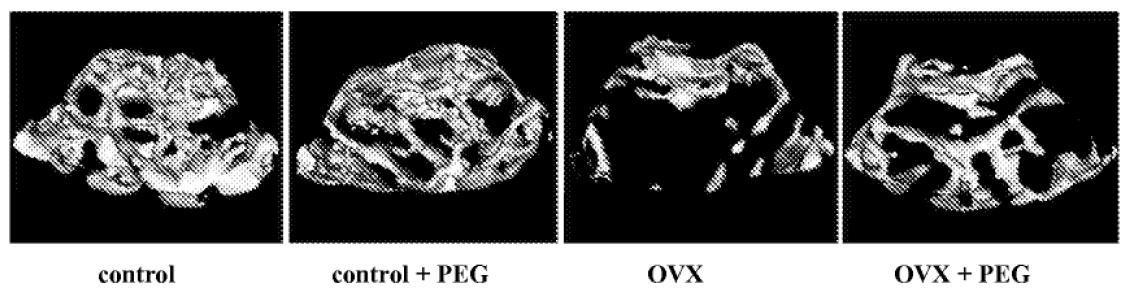


FIG. 2

Contenido mineral de hueso trabecular

p = 0.0265

NS, p = 0.0981

NS, p = 0.0766

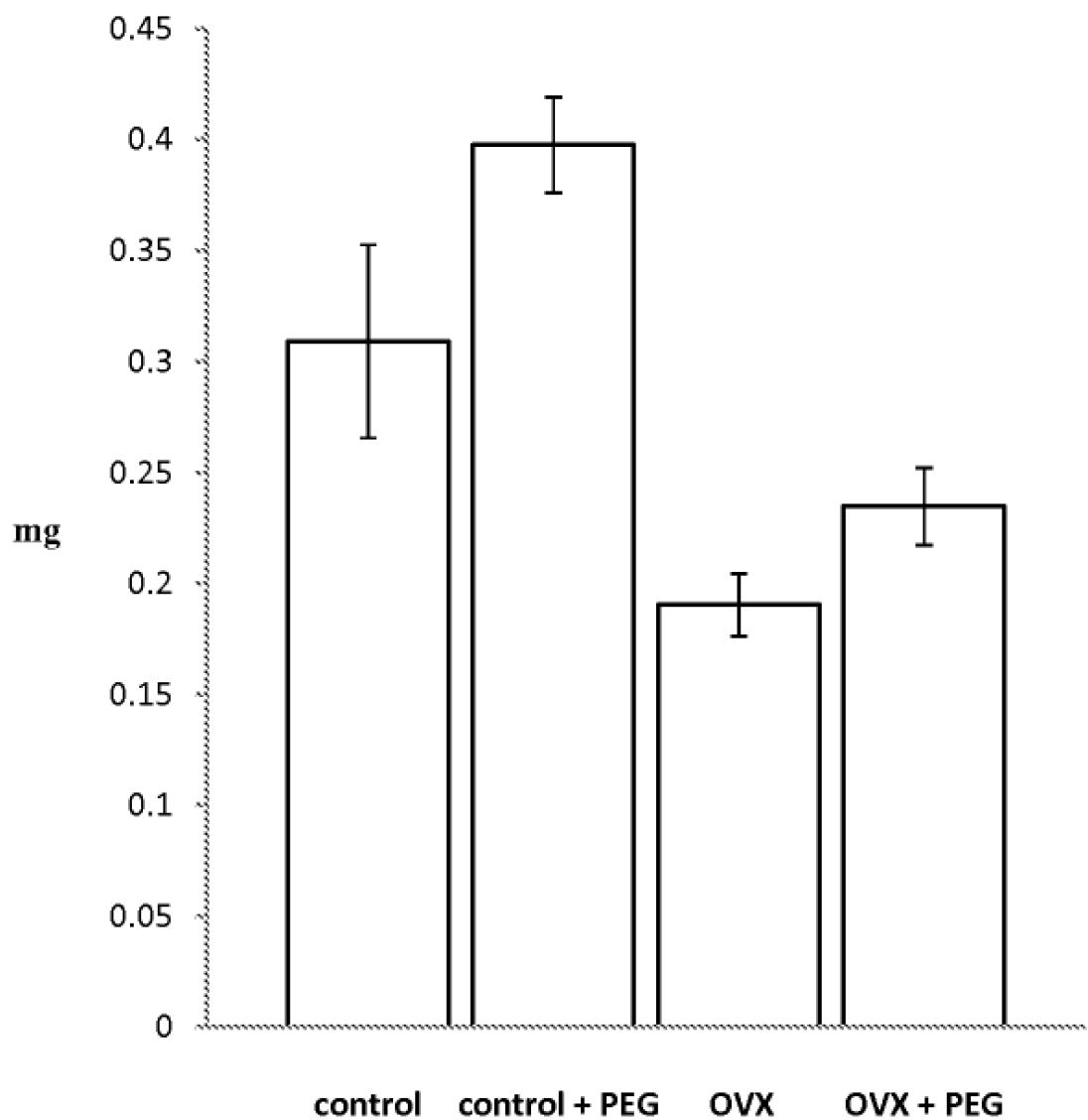


FIG. 3

Densidad mineral de hueso trabecular

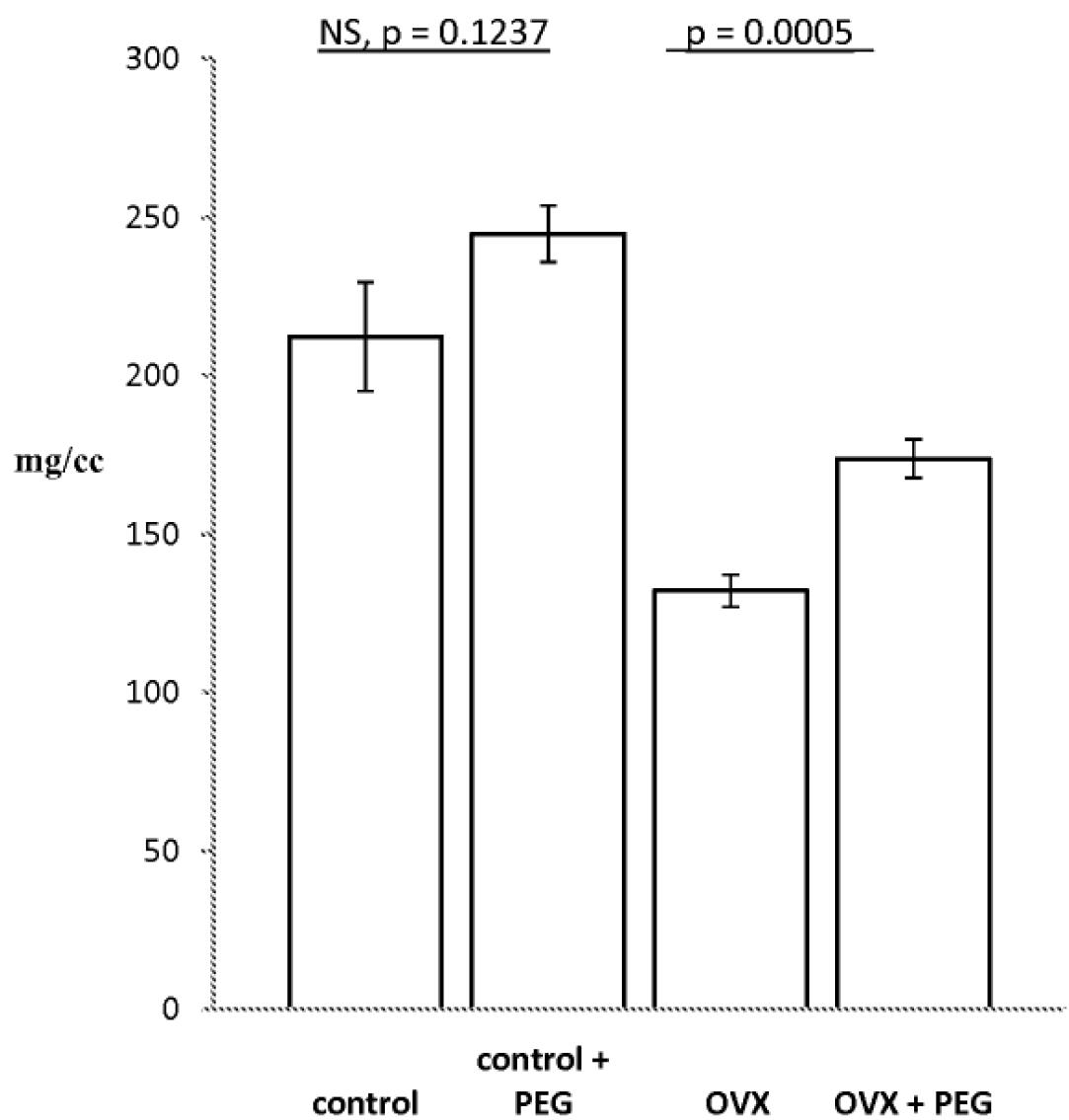
p = 0.0012

FIG. 4

Contenido mineral de hueso cortical

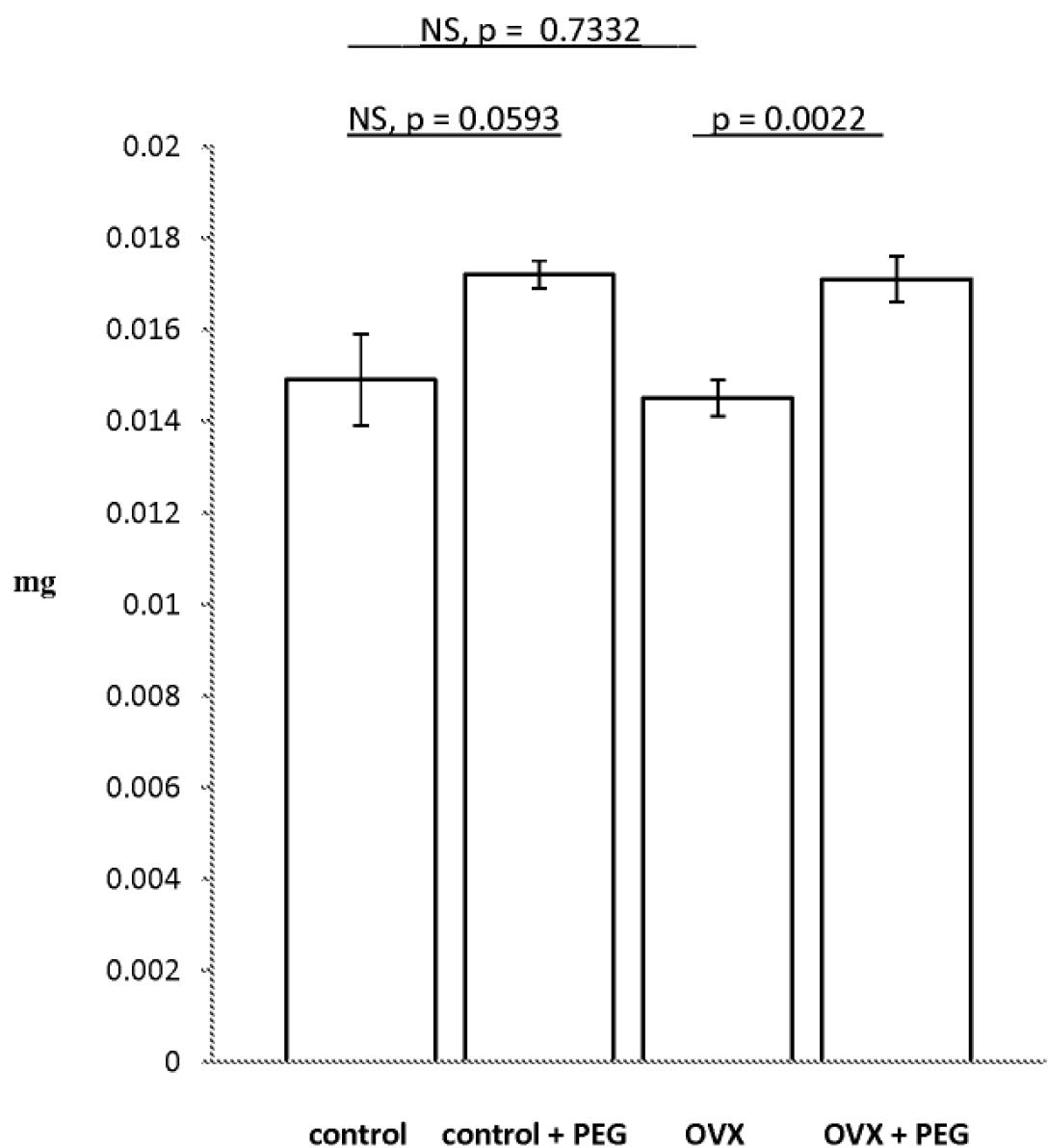


FIG. 5

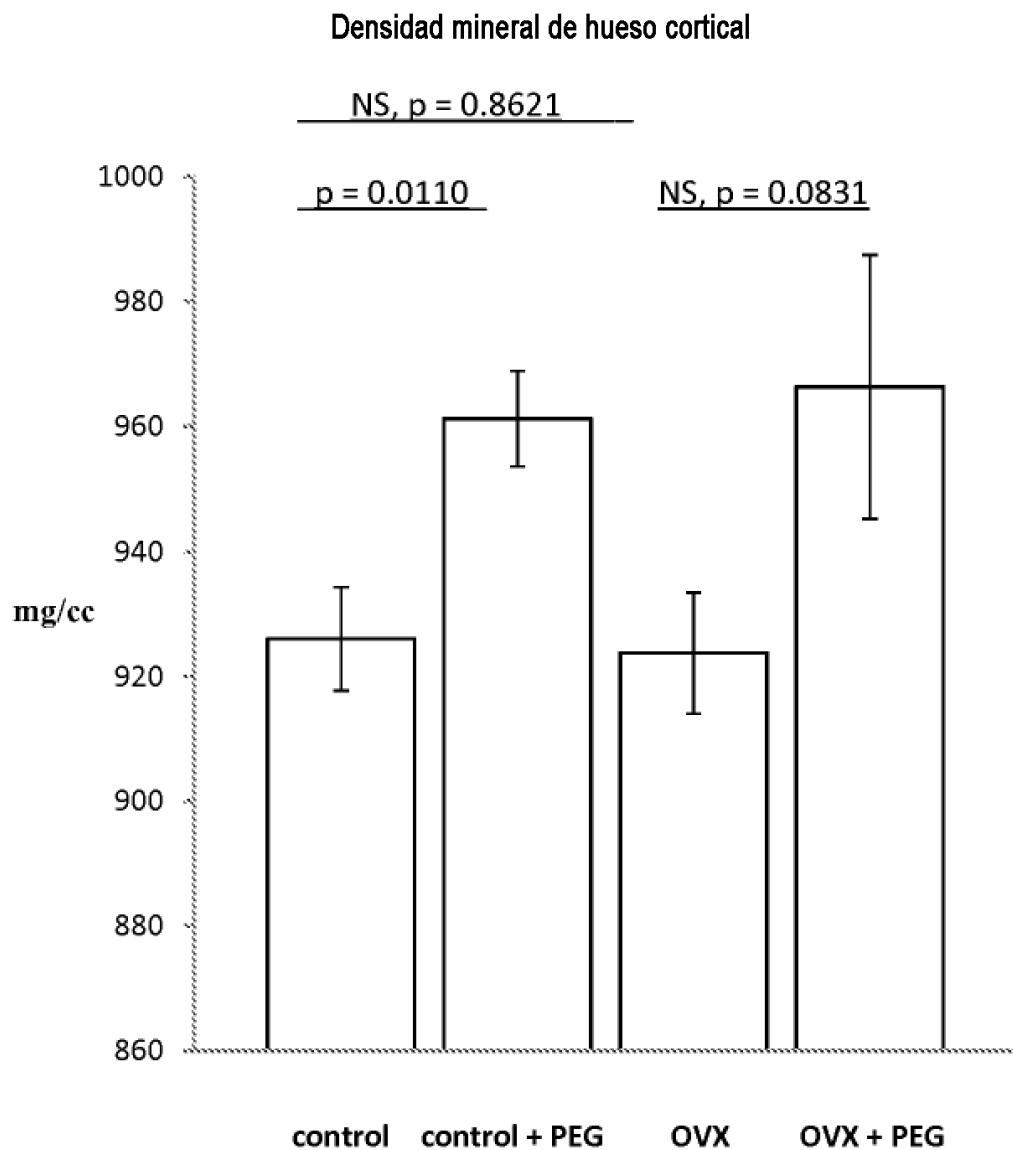


FIG. 6

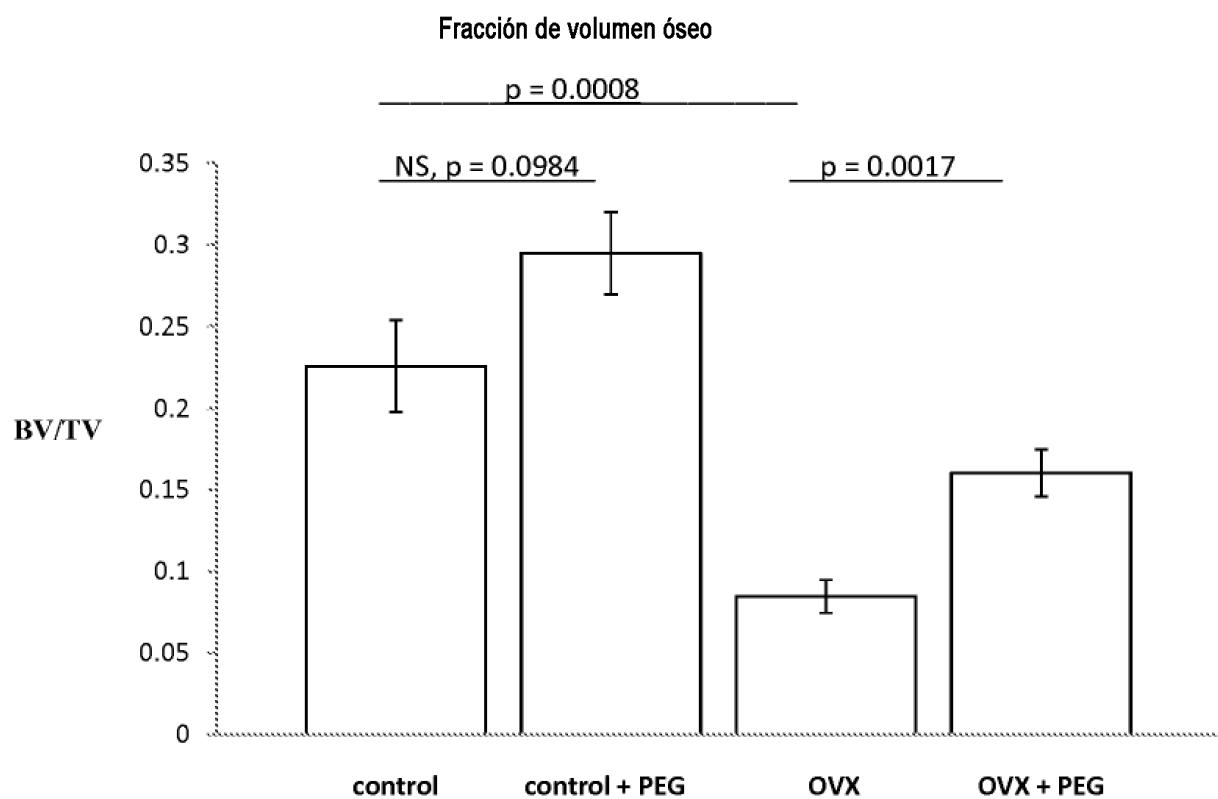


FIG. 7

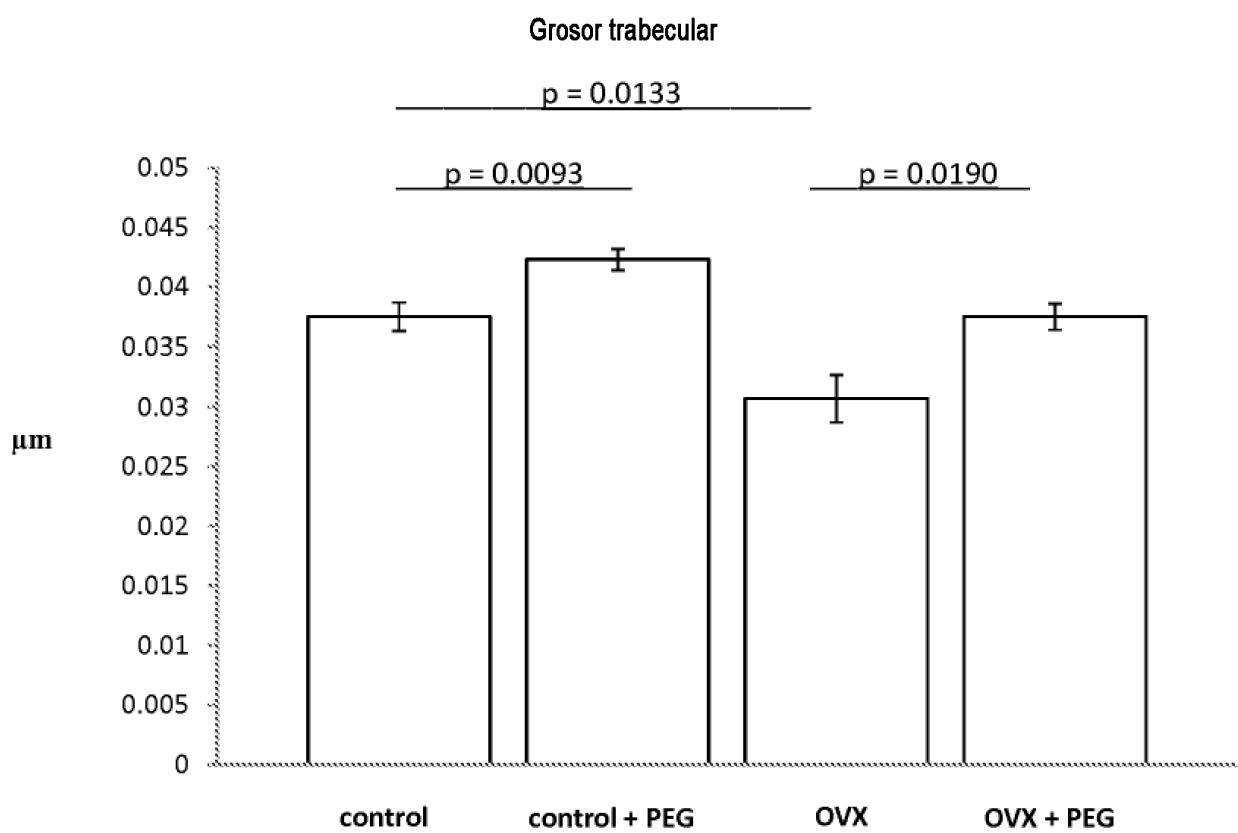


FIG. 8

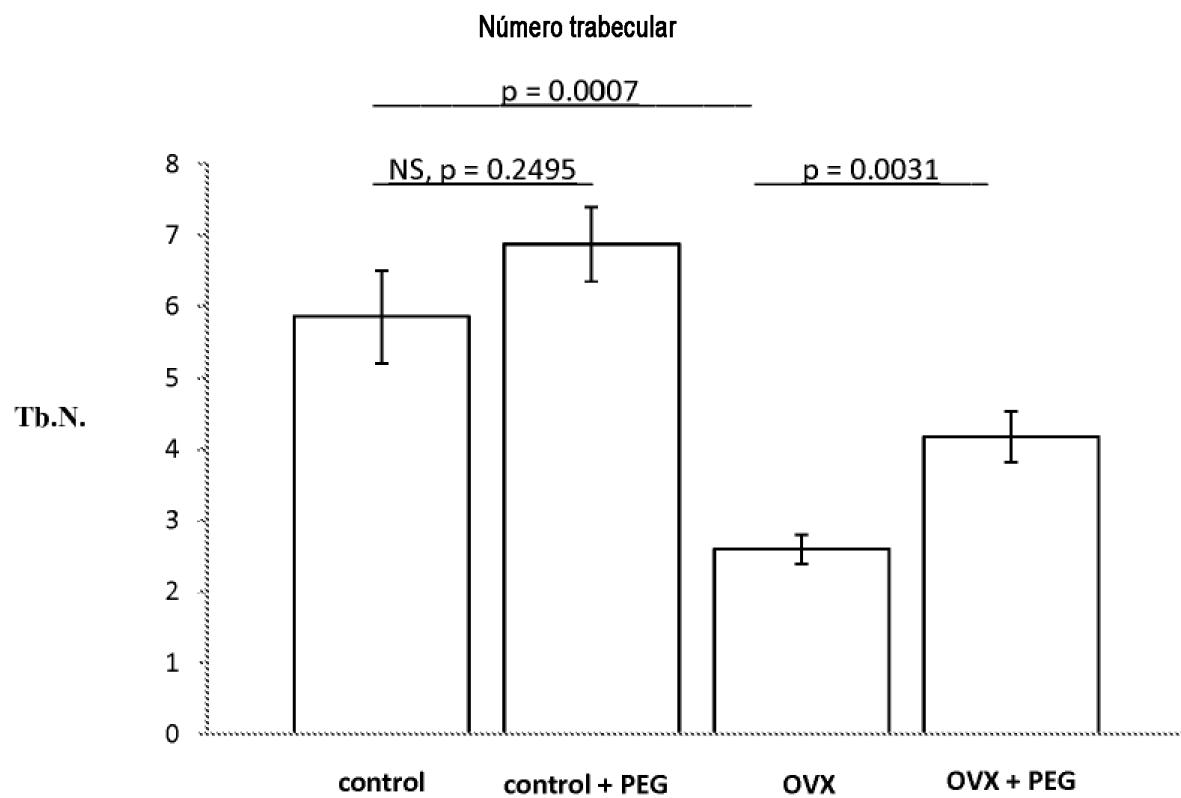


FIG. 9

ESPACIADO TRABECULAR

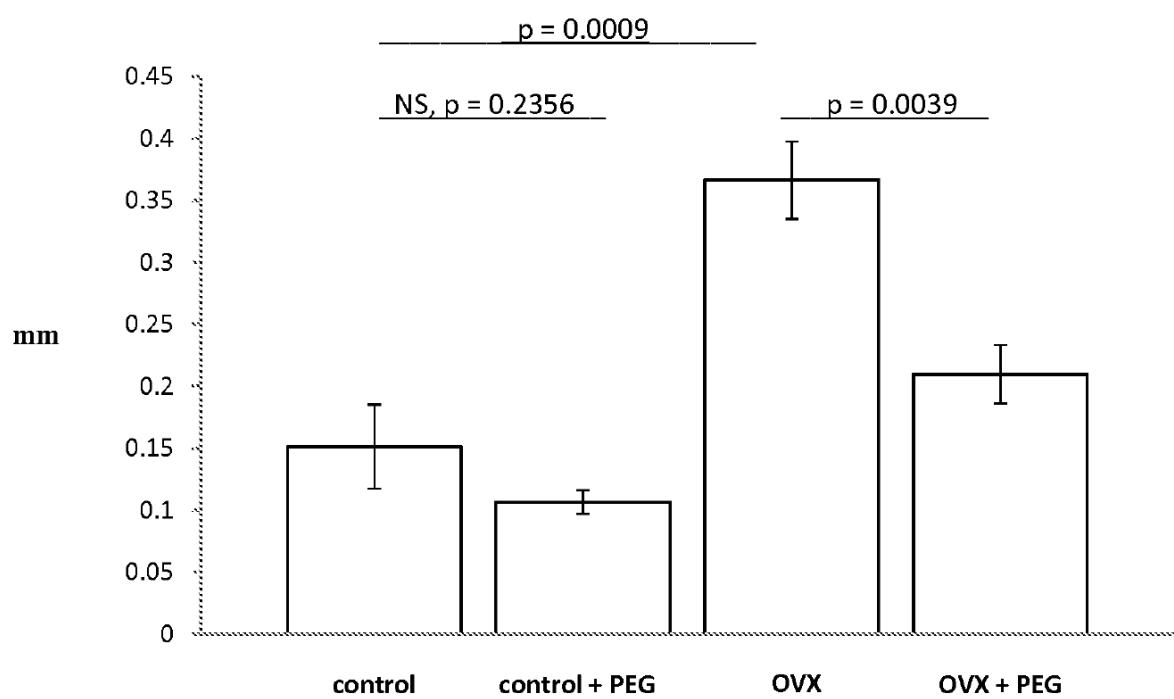


FIG. 10

Área de la médula cortical

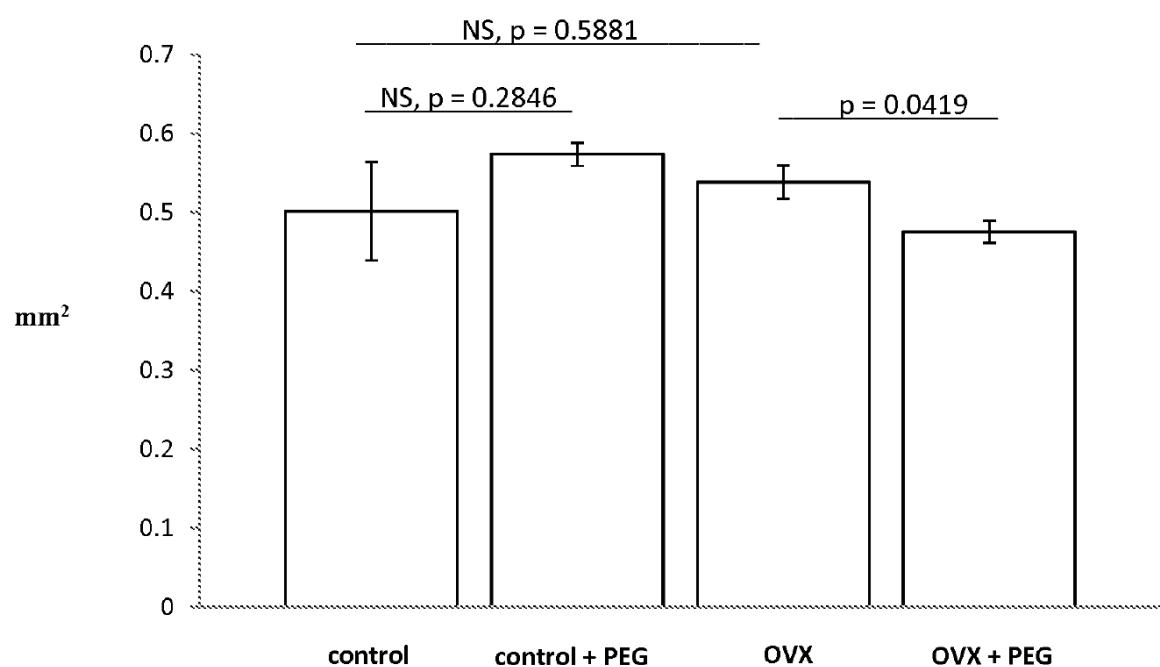


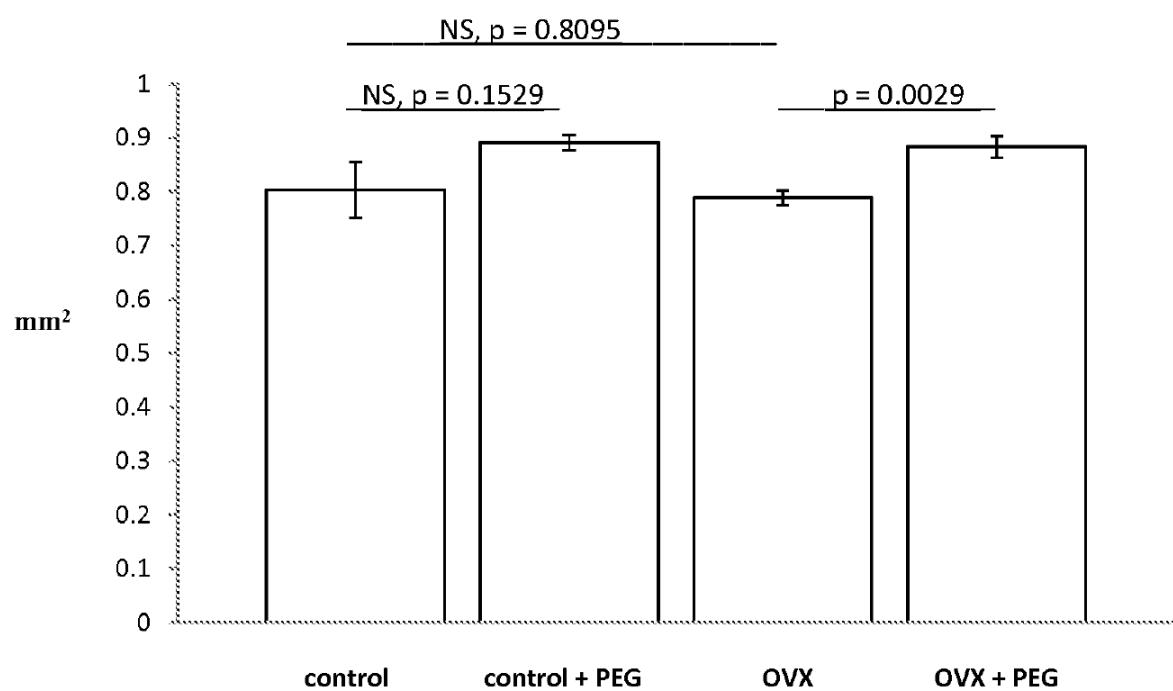
FIG. 11**Área cortical**

FIG. 12

Osteocalcina en suero

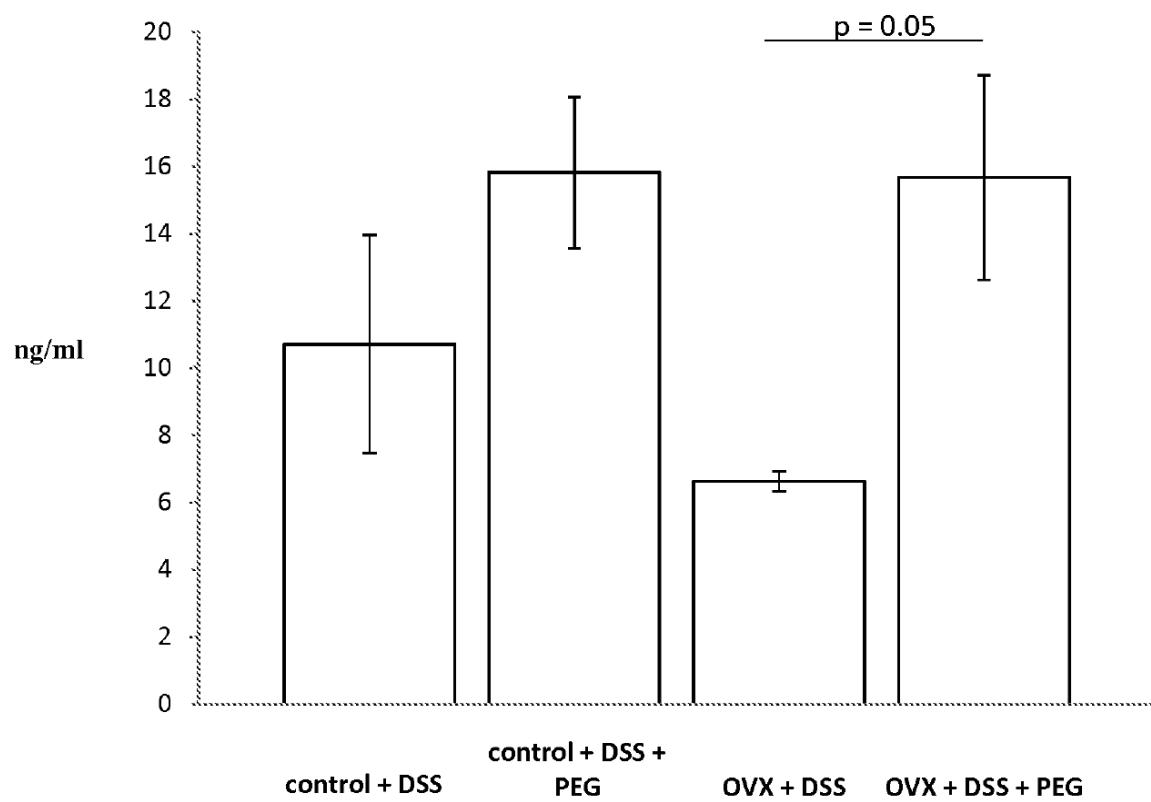


FIG. 13

Osteocalcina en suero

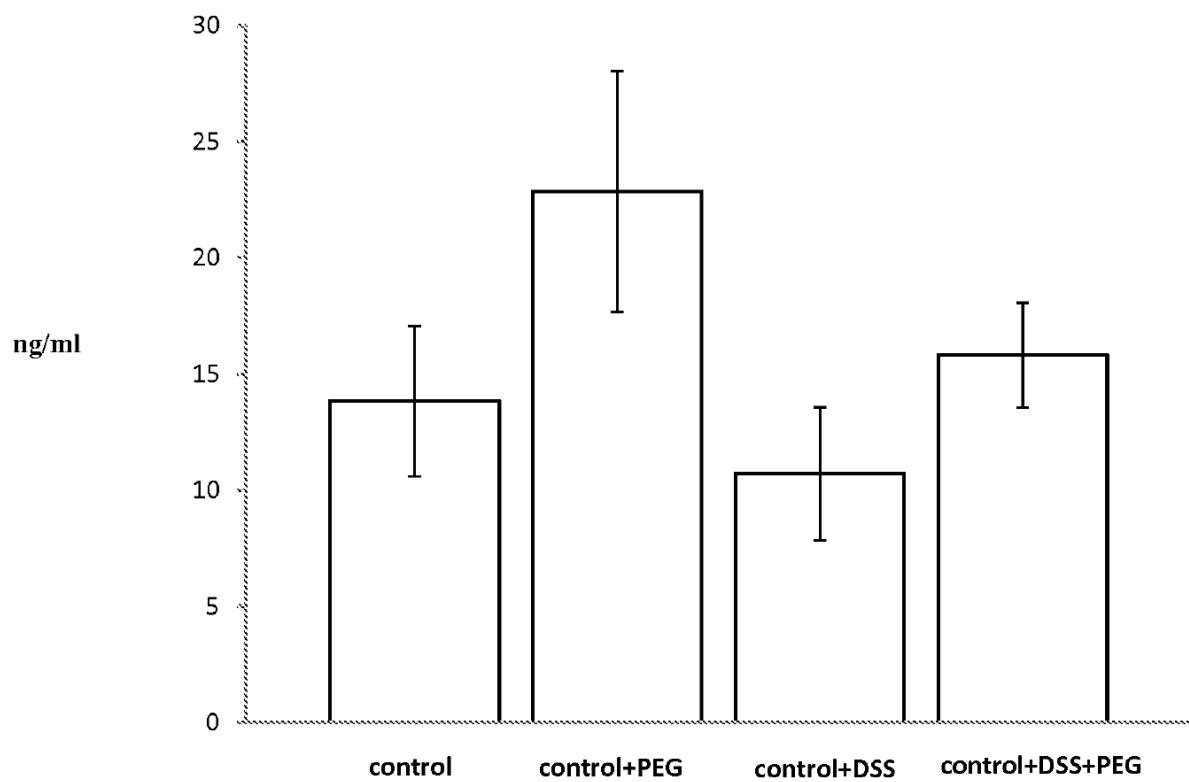


FIG. 14

Osteocalcina en suero

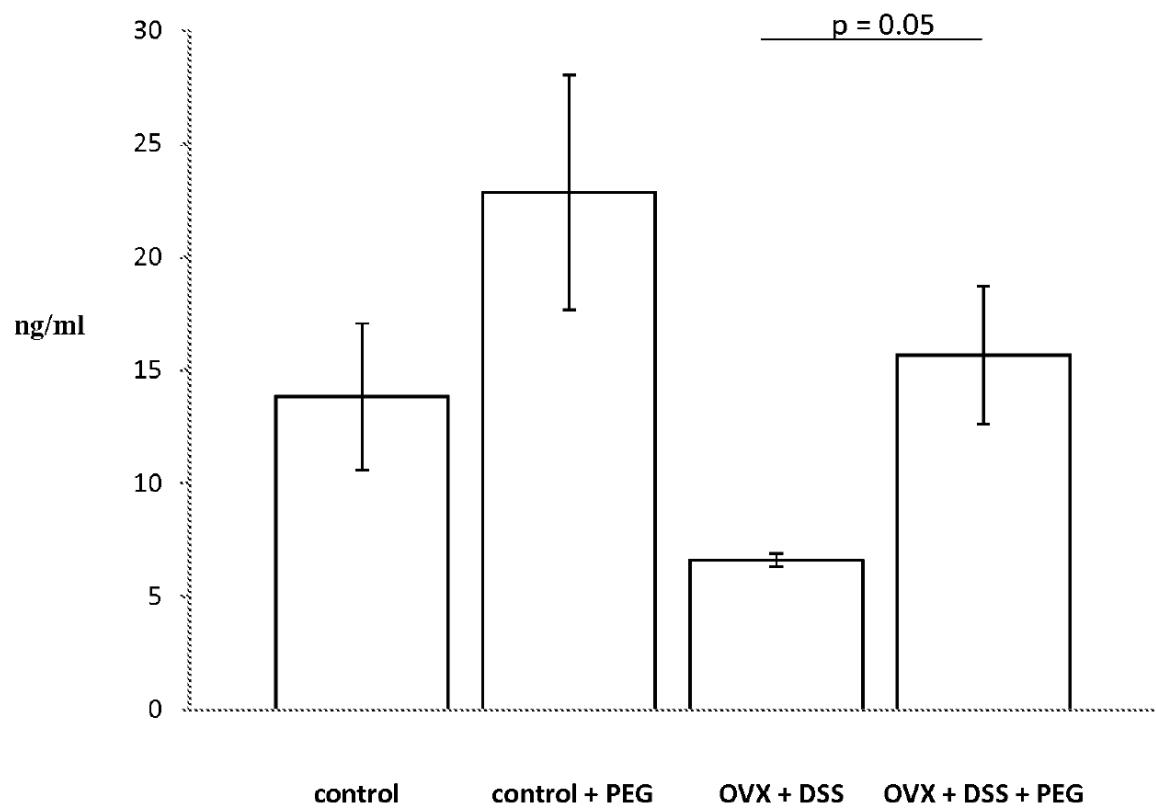


FIG. 15

Tasa de conversión alimenticia de pollos sanos e infectados (TCA)

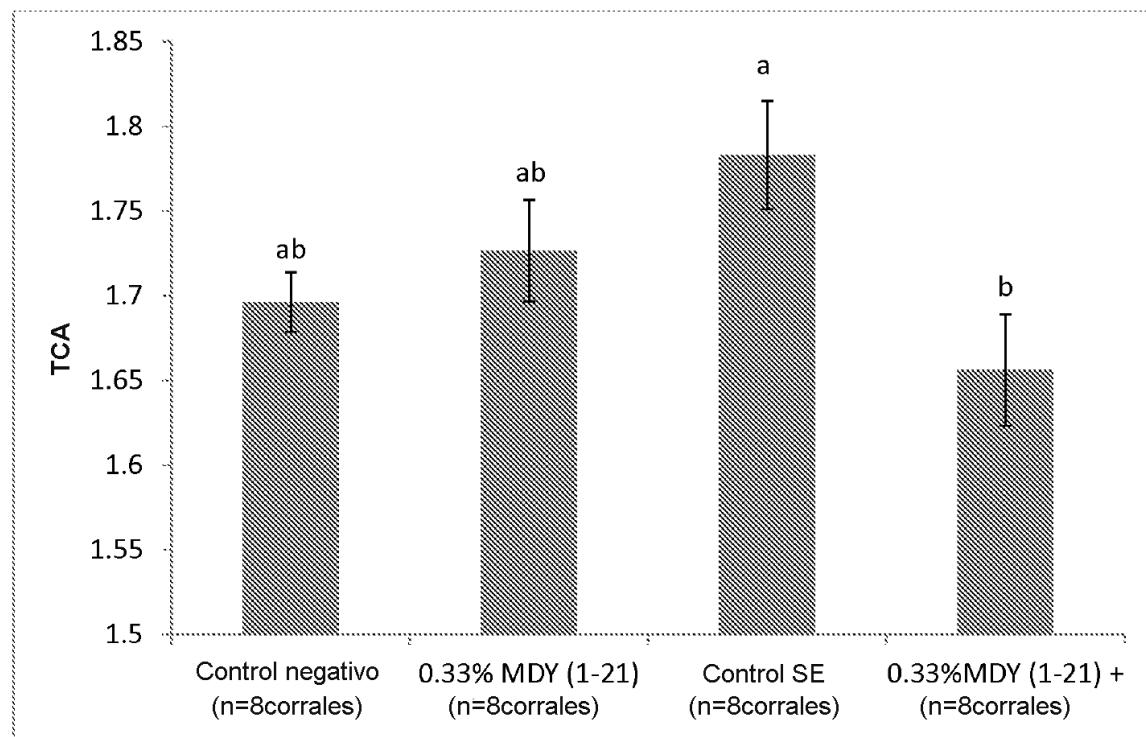


FIG. 16

PEG APM y recuperación de bacterias de pollos infectados

