

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 974 199**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/567** (2006.01)  
**A61K 31/19** (2006.01)  
**A61K 31/593** (2006.01)  
**A61K 33/06** (2006.01)  
**A61P 19/00** (2006.01)  
**A61K 31/201** (2006.01)  
**A61K 31/575** (2006.01)  
**A61K 31/592** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2019** **PCT/SE2019/050246**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2019** **WO19182501**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2019** **E 19770322 (6)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2023** **EP 3768274**

54 Título: **Composición que comprende una combinación de ácido glicocólico y ácido butírico o ácido oleico para su uso en el tratamiento de la osteoporosis**

30 Prioridad:

**19.03.2018 SE 1850304**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.06.2024**

73 Titular/es:

**EPICYT PHARMA AB (100.0%)**  
**Box 11072**  
**40422 Göteborg, SE**

72 Inventor/es:

**FÄNDRIS, LARS y**  
**WALLENIUS, VILLE**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 974 199 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

Composición que comprende una combinación de ácido glicocólico y ácido butírico o ácido oleico para su uso en el tratamiento de la osteoporosis

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición que comprende al menos un ácido biliar o una sal del mismo, y al menos un ácido graso o una sal del mismo. La composición puede comprender también calcio y vitamina D, y es para su uso como medicamento, especialmente para el tratamiento y/o la prevención de trastornos relacionados con la deficiencia de absorción de calcio intestinal.

Antecedentes de la invención

Se ha calculado que la epidemia de obesidad global afectaba a más de 1,5 billones de individuos en 2003 con una incidencia cada vez mayor a nivel global. El aumento en la prevalencia de la obesidad está asociado con aumentos en la prevalencia de comorbilidades de obesidad (por ejemplo, diabetes tipo 2, hiperlipidemia, hipertensión, enfermedad cardíaca isquémica, accidente cerebrovascular, asma, problemas degenerativos de espalda y de las articulaciones de las extremidades inferiores, varias formas de cáncer, depresión, etc.). Se estima que la obesidad mata a aproximadamente 320 000 personas al año en Europa Occidental. Por tanto, la pérdida de esperanza de vida debida a la obesidad es profunda. En comparación con un individuo de peso normal, un hombre mórbidamente obeso de 25 años de edad tendrá aproximadamente una pérdida media de 12 años de vida.

La cirugía bariátrica ha surgido en las últimas décadas como el único tratamiento efectivo a largo plazo para la obesidad mórbida. En revisiones sistemáticas, se consigue una pérdida de peso efectiva en pacientes mórbidamente obesos tras someterse a cirugía bariátrica. Una mayoría sustancial de pacientes con diabetes, hiperlipidemia, hipertensión y apnea obstructiva del sueño experimentan una mejorada marcada, y en ocasiones una resolución completa, tras la cirugía. La forma más común de cirugía bariátrica en Suecia es la cirugía de derivación gástrica en Y de Roux (RYGB) laparoscópica. Un nuevo método de cirugía bariátrica emergente es la gastrectomía en manga (GM).

Habitualmente, la recuperación posoperatoria tras cirugía bariátrica laparoscópica es rápida. Una pérdida de peso rápida se produce habitualmente durante los primeros 6 a 12 meses, estabilizándose a aproximadamente dos años tras la cirugía. La vida tras una derivación gástrica significa un patrón cambiado de consumo de alimentos, por comidas más pequeñas y más frecuentes. Debido al nuevo direccionamiento del tracto gastrointestinal, con exclusión en el tracto digestivo superior de paso de alimentos a través del estómago y duodeno, y el rápido suministro al tracto digestivo inferior de alimento no digerido al yeyuno, es decir ramificación alimentaria, se atenúa la absorción de micronutrientes. El estómago con derivación secreta menos ácido clorhídrico y factor intrínseco (FI), afectando negativamente a, por ejemplo, la absorción de hierro y vitamina B12. Por tanto, se recomienda una suplementación de vitamina B12, así como multivitamínica y de minerales traza para toda la vida a todos los pacientes tras RYGB. Se recomienda una suplementación de hierro a las mujeres antes de la menopausia, así como a otros pacientes con deficiencia de hierro.

La absorción de calcio inducida por vitamina D activa se produce normalmente en el intestino delgado proximal, es decir el duodeno y la primera mitad del yeyuno. Por tanto, se recomiendan suplementaciones de vitamina D y calcio para toda la vida a pacientes con RYGB. Debido al nuevo direccionamiento del intestino delgado tras RYGB, el duodeno se deriva del paso de nutrientes. Recientemente se ha mostrado que un coactivador del receptor de vitamina D, la proteína de choque térmico (Hsp) 90 $\beta$ , así como la proteína de transporte de calcio inducido por vitamina D más importante, TRPV6, están regulados por disminución en la mucosa de ramificación alimentaria tras RYGB (Elias *et al.*). En línea con esto, también se mostró que RYGB, a diferencia de los pacientes con gastroplastia vertical con banda (GVB), también tenía una disminución dependiente del procedimiento de densidad mineral ósea (DMO). Por tanto, parecería que una suplementación de calcio y vitamina D sería importante tras RYGB para evitar el riesgo de una disminución adicional de la DMO y de fracturas por osteoporosis futuras en estos pacientes.

La operación de GM (gastrectomía en manga) introducida recientemente es efectiva para tanto la pérdida de peso como mejoras metabólicas, pero la resección del estómago va seguida de una reducción drástica de la producción de ácido gástrico total y un tiempo acortado para el tránsito de contenidos luminales al intestino delgado distal. Funcionalmente, esta condición imita parcialmente el efecto de la derivación gástrica y por tanto disminuye la capacidad para la mucosa de reaccionar a la vitamina D y, a su vez, reduce la absorción de calcio. De hecho, el procedimiento de GM se ha asociado con signos de recambio mineral óseo cambiado lo que sugiere un riesgo para la desmineralización ósea a largo plazo (Crawford *et al.*).

Tras GM, como tras RYBP, a los pacientes se les prescribe suplementación de vitamina D y calcio. Sin embargo, no está probado si tal suplementación puede prevenir una pérdida de DMO. En realidad hay datos que indican que este puede no ser el caso. Por ejemplo, una gran fracción de pacientes con RYGB que recibieron suplementación de calcio y vitamina D desarrollaron hiperparatiroidismo secundario (HPTS), con HPT aumentado y niveles de calcio disminuidos, indicando que la absorción de calcio en el intestino puede ser todavía deficiente a pesar de la suplementación (Hewit S *et al.*). También se ha encontrado que los pacientes con suplementación tenían un aumento prominente de los niveles de telopeptidos C-

terminales (CTX) 18 meses tras la cirugía, lo que indica un recambio óseo aumentado. Hay también datos recientes que muestran que la absorción de calcio intestinal (absorción de calcio fraccional) se ve gravemente comprometida y disminuye en aproximadamente el 80% tras RYGB, incluso cuando se optimizaron los niveles de vitamina D (Schafer A L *et al.*). Por tanto, la suplementación de calcio y vitamina D mediante los regímenes actuales no es operativa.

Además, hay también otro grupo de pacientes con una disminución general de densidad mineral ósea (DMO) y/o que tienen una disminución general en la absorción de calcio y/o que tienen un estado óseo patológico, por ejemplo, osteoporosis provocada por deficiencia de calcio, que podrían beneficiarse de un aumento en la absorción de calcio inducida por vitamina D. Aparte de la suplementación de vitamina D y calcio, una enfermedad de mineralización ósea manifiesta actualmente se trata predominantemente con suplementación de HPT hormonal sistémica o con inhibidores de la resorción ósea farmacológicos (tales como bisfonfonatos, análogos de estrógenos, anticuerpos que seleccionan como diana mecanismos de resorción, etc.). Los regímenes de tratamiento que tienen como objetivo restaurar la capacidad de absorción de calcio intestinal son pocos o a menudo se encuentra que no son funcionales.

El documento US 8 563 053 que da a conocer una composición que comprende una nanoformulación de principios activos que comprende *Lepidium sativum*, calcio, vitamina D y un antioxidante para tratar un estado óseo. Otro ejemplo es el documento WO2013/049595 que da a conocer métodos y composiciones para el tratamiento de trastornos metabólicos modulando los niveles de ácido biliar.

El documento US 2014/030352 da a conocer nanodispersiones que comprenden mezclas de un derivado de taxano, ácidos grasos y polímero. En una realización, también se añade un ácido biliar. Las dispersiones se usan para la eficiencia antitumoral.

El documento EP 1 270 007 da a conocer microemulsiones que comprenden apomorfina, un cotensioactivo que puede ser un ácido butírico o ácido octanoico o ácido glicocólico, un antioxidante y aceite. Las microemulsiones son para su uso para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

El documento US 5 376 646 da a conocer una preparación micelar tópica que en una realización comprende, por ejemplo, ácido glicocólico y palmitato de vitamina A además de lecitina, etanol, propilenglicol, etc.

El documento EP 0 252 004 da a conocer formulaciones secas farmacéuticas. En fase acuosa, las composiciones farmacéuticas forman dispersiones de micelas mixtas que encapsulan la sustancia activa, por ejemplo, TPA. Formadores de micelas son fosfolípidos tales como lecitina y derivados de ácido biliar. Se menciona GCA así como diferentes ácidos grasos de cadena larga (AGCL).

Webbing DD *et al.*, "Bile salts and calcium absorption", Biochemical Journal. Vol. 100, n.º 3, 1 de septiembre de 1996, páginas 652-660, notifican el efecto de las sales biliares sobre el potenciamiento de la absorción de calcio en polluelos y ratas.

Lucas S *et al.*, "Short-chain fatty acids regulate systemic bone mass and protect from pathological bone loss", Nature communications, vol. 100, n.º 3, 2018, páginas 1-10, dan a conocer que el tratamiento de ratones con ácidos grasos de cadena corta (AGCC) así como la alimentación con una dieta rica en fibra aumenta significativamente la masa ósea.

En vista de lo anterior, hay una necesidad en el campo técnico de encontrar soluciones a los problemas mencionados anteriormente, especialmente la disminución en la absorción de calcio inducida por vitamina D y la disminución de densidad mineral ósea (DMO) en pacientes que han pasado por cirugía gástrica, por ejemplo, en pacientes con RYGB y GM.

#### Sumario de la invención

El objeto de la presente invención es solucionar el problema anterior y proporcionar una composición que comprende al menos un ácido biliar elegido de ácido glicocólico o una sal del mismo, y al menos un ácido graso elegido de ácido butírico y ácido oleico o una sal del mismo para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la osteoporosis. La composición puede contener también calcio, y vitamina D. La composición está prevista para su uso como medicamento.

Se ha mostrado sorprendentemente en relación con la presente invención que una composición que comprende al menos un ácido biliar elegido de ácido glicocólico o una sal del mismo, y al menos un ácido graso elegido de ácido butírico y ácido oleico, o una sal del mismo, induce de manera sinérgica la expresión del coactivador de receptor de vitamina D Hsp90 $\beta$  y va seguida de una absorción de calcio aumentada en comparación con los dos componentes individuales, ácido biliar y ácido graso, respectivamente, solos. Por tanto, se proporciona una composición que comprende los cuatro componentes, por tanto, al menos un ácido biliar o una sal del mismo, al menos un ácido graso, o una sal del mismo, calcio y vitamina D.

Se ha descrito previamente que la pérdida ósea puede atribuirse a una absorción de calcio alterada provocada por una activación disminuida de mecanismos de absorción de calcio dependiente de vitamina D mediados por proteína de choque térmico 90 $\beta$  (Elias *et al.*). Por tanto, los hallazgos de la presente invención serían beneficiosos para pacientes que se

hayan sometido a cirugía bariátrica y generalmente a cualquier paciente que sufra de estados que pueden verse ayudados por una absorción de calcio aumentada.

En un aspecto de la invención, el tratamiento y/o la prevención de deficiencia de absorción de calcio.

La deficiencia de absorción de calcio puede producirse, por ejemplo, tras una derivación gástrica en Y de Roux (RYGB). Para compensar esto, y mantener los niveles de calcio en plasma a niveles normales, un mecanismo de compensación que se observa comúnmente tras RYGB es la producción de hormona paratiroidea (HPT) aumentada (Hewitt *et al.*). La operación de la glándula tiroides es otro procedimiento quirúrgico que puede provocar una deficiencia de absorción de calcio afectando negativamente al funcionamiento de las glándulas paratiroides y a su producción de hormona paratiroidea (HPT). Hay informes en la bibliografía de que la combinación de estos dos procedimientos, RYGB y cirugía de la tiroides, puede conducir a niveles de calcio en plasma gravemente disminuidos y a síntomas de hipocalcemia. El mecanismo para esto parece ser la incapacidad de compensar la absorción de calcio intestinal disminuida mediante una producción de HPT aumentada. En algunos casos de RYGB y cirugía de la tiroides combinadas, ha resultado ser excesivamente difícil tratar la hipocalcemia (Goldenberg *et al.*). Administrando la composición como se define en el presente documento, pueden aumentarse los niveles de calcio. Esto es de particular interés en pacientes en los que una absorción de calcio disminuida provoca niveles de calcio disminuidos en plasma o una mineralización ósea disminuida.

En otro aspecto de la invención, en el tratamiento y/o la prevención de la osteoporosis provocada por deficiencia de calcio, estados de malabsorción provocados por deficiencia de calcio o trastornos óseos provocados por deficiencia de calcio en un mamífero. Además, la composición puede usarse para el tratamiento y/o la prevención de la osteoporosis previniendo la pérdida de densidad mineral ósea (DMO) provocada por deficiencia de calcio en un mamífero. La composición puede usarse también para el tratamiento de la osteoporosis previniendo la pérdida de densidad mineral ósea (DMO) en pacientes con derivación gástrica en Y de Roux (RYGB) o pacientes con gastrectomía en manga (GM).

La composición definida en el presente documento puede ser al menos un ácido biliar elegido de ácido glicocólico (GCA) y sales del mismo. El ácido biliar se selecciona con la condición de que el ácido biliar no sea ácido taurocólico o un derivado del mismo.

La composición puede ser al menos un ácido graso que es ácido butírico o ácido oleico.

En un aspecto de la invención, la composición para su uso comprende vitamina D, consistiendo la vitamina D principalmente en vitamina D3.

Otro aspecto de la invención es una composición en la que dicho calcio está presente como carbonato de calcio, citrato de calcio o fosfato de calcio, o una mezcla de los mismos.

En un aspecto de la invención, la cantidad de calcio y vitamina D en la composición está presente como la ingesta diaria recomendada (IDR) o menos. La composición puede comprender al menos uno de un vehículo, excipiente, lubricante, aroma, edulcorante, disgregante, aglutinante y disgregante.

La composición tal como se define en el presente documento está formulada para administración oral, administración parenteral, infusión intravenosa o inyección. La composición puede estar en una forma líquida o forma sólida; la composición puede estar formulada como comprimido masticable, comprimido efervescente, polvo, pastilla, comprimido o cápsula.

En un aspecto de la invención, la composición es un suplemento nutricional o dietético.

En un aspecto de la invención, la composición para su uso comprende un ácido graso que es ácido butírico o una sal del mismo, siendo dicho ácido biliar ácido glicocólico o una sal del mismo, y siendo la vitamina D vitamina D3.

#### Breve descripción de los dibujos

La invención se entenderá de manera más completa a partir de la siguiente descripción detallada tomada en combinación con los dibujos adjuntos, en los que:

La *Figura 1* da a conocer que la expresión de proteína de choque térmico (Hsp) 90 $\beta$ , un coactivador del receptor de vitamina D, se induce de manera sinérgica en cultivo de células Caco-2 mediante la adición del ácido biliar GCA y el butirato de ácido graso juntos durante 48 h, pero no mediante o bien GCA o bien butirato solos. El GCA se añadió a una concentración de  $1 \times 10^{-4}$  M y el butirato a una concentración de  $5 \times 10^{-4}$  M. \*\*\*  $P < 0,001$ ; GCA+butirato frente a control, prueba de la t no apareada.

La *Figura 2* da a conocer una inmunotransferencia de tipo Western, y que la vitamina D tiene un efecto para aumentar la expresión de la proteína claudina-2 en células Caco-2 cultivadas de un modo dependiente de la dosis, facilitando de ese modo una absorción de calcio "pasiva". La supresión del coactivador de vitamina D Hsp 90 $\beta$  mediante el inhibidor específico geldanamicina suprime también la expresión de claudina-2, obviamente por medio de la inhibición

de la actividad de vitamina D, demostrando de ese modo que Hsp 90 $\beta$  es importante también para la absorción de calcio "pasiva".

La *Figura 3* da a conocer el efecto de la presencia de vitamina D3 sobre la absorción de calcio.

La *Figura 4* da a conocer el efecto del ácido biliar, del ácido graso, de la vitamina D3 sobre la absorción de calcio (sin gradiente).

La *Figura 5* da a conocer el efecto del ácido biliar, del ácido graso, de la vitamina D3 sobre la absorción de calcio (con gradiente).

La *Figura 6* da a conocer el efecto del ácido biliar, del ácido graso, de la vitamina D3 sobre la absorción de calcio.

#### Descripción detallada de la invención

Ahora se describirán ciertas realizaciones a modo de ejemplo para proporcionar una comprensión global de los principios y el funcionamiento de la invención. Los expertos en la técnica entenderán que las realizaciones a modo de ejemplo descritas no son limitativas y que el alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones.

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención se refiere en una realización a una composición que comprende

- a) al menos un ácido biliar elegido de ácido glicocólico o una sal del mismo,
- b) al menos un ácido graso elegido de ácido butírico y ácido oleico o una sal del mismo,
- c) calcio, y
- d) vitamina D

para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la osteoporosis.

La composición está prevista para su uso como medicamento.

Se ha encontrado sorprendentemente según la presente invención que una composición que comprende ácido glicocólico (GCA) o una sal del mismo, al menos un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en ácido butírico, o una sal del mismo, o ácido oleico, o una sal del mismo, vitamina D y calcio, induce de manera sinérgica la expresión de coactivador de receptor de vitamina D Hsp90 $\beta$ .

Induciendo la expresión de coactivador de receptor de vitamina D, el transporte de calcio inducido por vitamina D puede aumentarse sustancialmente, es decir normalizarse en pacientes que sufren de deficiencia de calcio tal como en pacientes con RYGB y pacientes con GM.

Hsp90 $\beta$  tiene una acción estimulante ampliamente conocida sobre la proteína TRPV6, que es una proteína implicada en el transporte activo transcelular de calcio. Sin embargo, el transporte de calcio activo no debe ser sensible a las composiciones de interés. En su lugar, según la presente invención, Hsp90 $\beta$  activa un aumento dependiente de vitamina D en el paso de calcio pasivo (paracelular). Esta es una característica importante de la presente invención: aparte de vitamina D, también tiene que incluirse calcio como tal en la composición para obtener el gradiente de concentración transepitelial necesario para el transporte paracelular.

En vista de la inducción descrita anteriormente de coactivador de receptor de vitamina D Hsp90 $\beta$ , las composiciones de la invención pueden usarse en el tratamiento de cualquier paciente que sufra de estados que puedan verse ayudados por una absorción de calcio aumentada. En tales estados patológicos, por ejemplo, osteoporosis, que pueden estar provocados por deficiencia de calcio debido a malabsorción, hay una necesidad de prevenir la pérdida de densidad mineral ósea (DMO). En mamíferos, hay individuos que son susceptibles a tales estados. Por ejemplo, las composiciones de la invención serían adecuadas en el tratamiento de pacientes tales como personas ancianas que sufren de osteoporosis provocada por deficiencia de calcio.

Las composiciones de la invención son en una realización adecuadas para el tratamiento y/o la prevención de la osteoporosis previniendo la pérdida de densidad mineral ósea (DMO) en pacientes con derivación gástrica en Y de Roux (RYGB) o pacientes con gastrectomía en manga (GM).

Las composiciones según la invención comprenden al menos un "ácido biliar", que es ácido glicocólico (GCA), o una sal del mismo, al menos un "ácido graso" que se selecciona de ácido butírico o ácido oleico, o una sal del mismo, así como calcio y vitamina D.

La frase "ácido biliar" tal como se usa en el presente documento incluye tanto aquellos que se producen de manera natural en organismos vivos así como aquellos que son ácidos biliares sintéticos. Los ácidos biliares que se producen de manera natural pueden ser tanto ácidos biliares primarios, que se sintetizan en el hígado, como ácidos biliares secundarios, que son los resultados de acciones bacterianas en el intestino. Los ácidos biliares que se producen de manera natural pueden ser también ácidos biliares conjugados, lo que significa que el ácido biliar está conjugado en el grupo carboxílico con un resto o bien glicina o bien taurina, y lo que puede ser el caso para los ácidos biliares tanto primarios como secundarios.

A los ácidos biliares primarios pertenecen ácido cólico (CA) y ácido quenodesoxicólico (CDCA), y sus formas conjugadas correspondientes son ácido glicocólico (GCA) y ácido taurocólico (TCA) así como ácido glicokenocólico (GCDCA) y ácido tauroquenodesoxicólico (TCDCA), respectivamente. Especialmente, los ácidos biliares primarios de interés para la presente invención es ácido glicocólico (GCA).

A los ácidos biliares secundarios pertenecen ácido desoxicólico (DCA), ácido litocólico (LCA), ácido ursodesoxicólico (UDCA) y ácido hiodesoxicólico (HDCA), y sus formas conjugadas correspondientes son ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA), ácido glicolitocólico (GLCA), ácido turolitocólico (TLCA), ácido glicoursodesoxicólico (GUDCA), ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA), ácido glicohiodesoxicólico (GHDCa) y ácido taurohiodesoxicólico (THDCA), respectivamente. Especialmente, el ácido desoxicólico (DCA), ácido litocólico (LCA), ácido ursodesoxicólico (UDCA) y ácido hiodesoxicólico (HDCA), y sus formas conjugadas correspondientes son ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido glicolitocólico (GLCA), ácido glicoursodesoxicólico (GUDCA), y, ácido glicohiodesoxicólico (GHDCa), respectivamente, se describen en el presente documento.

Los ácidos biliares conjugados son más ácidos que los ácidos biliares no conjugados y por tanto con frecuencia se denominan "sales biliares". Los diferentes ácidos biliares son los constituyentes principales de la "bilis" en los diversos organismos, pero la abundancia de los diferentes ácidos biliares particulares, por ejemplo, en diferentes animales, puede variar dentro de intervalos grandes. Un ácido biliar sintético es, por ejemplo, ácido obeticólico (OCA) (ácido 6-alfa-etil-quenodesoxicólico).

Cualquier referencia a un ácido biliar tal como se usa en el presente documento incluye la referencia a un ácido biliar o una sal del mismo. El término "ácido biliar" puede usarse también de manera intercambiable con "ácidos biliares", "sal biliar", "sales biliares" y "ácido/sal biliar". Se entiende que las composiciones comprenden al menos un ácido biliar y podrían, por ejemplo, comprender dos o más ácidos biliares. El al menos un ácido biliar que debe usarse podría elegirse de ácidos biliares primarios y ácidos biliares secundarios y sales de los mismos. Durante condiciones fisiológicas, las grasas dietéticas se degradan en la luz del tracto digestivo superior para dar ácidos grasos y monoglicerol que entonces se absorben mediante la mucosa. Tras cirugía bariátrica, y durante otros estados con baja capacidad de degradación lipídica luminal, la concentración de ácidos grasos libres será baja de manera no fisiológica en el tracto digestivo superior.

Resulta que la composición según la invención comprende al menos un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en ácido butírico o ácido oleico, o sales de los mismos. Los ácidos grasos insaturados descritos pero no reivindicados pueden tener una configuración *cis* o *trans*. Dicho al menos un ácido graso es, por ejemplo, un ácido graso de cadena corta (AGCC < 6 carbonos en la cola alifática), por ejemplo, butirato, un ácido graso de cadena medida (AGCM, 6-12 átomos de carbono en la cola alifática, lineal o ramificado), por ejemplo, ácido caprílico saturado (8 átomos de carbono) y ácido láurico (12 carbonos), un ácido graso de cadena larga (AGCL; 13-21 carbonos), por ejemplo, ácido palmitoleico insaturado, ácido oleico, ácido linoleico y ácido palmítico saturado y ácido esteárico, o un ácido graso de cadena muy larga (AGCML, >21 átomos de carbono). Se entiende que las composiciones comprenden al menos un ácido graso y podrían, por ejemplo, comprender dos o más ácidos grasos. El al menos un ácido graso o una sal del mismo usado en la composición podría ser cualquiera disponible y conocido por un experto en la técnica.

La composición descrita en el presente documento comprende vitamina D. La vitamina D es un grupo de vitaminas e incluye colecalciferol (vitamina D3), alfacalcidol, calcitriol. La composición descrita en el presente documento incluye vitamina D que está presente como vitamina D3, o al menos consiste principalmente en vitamina D3. En otro aspecto de la invención, el calcio está presente como sal, como sal de  $\text{Ca}^{2+}$ , por ejemplo, como citrato de calcio, carbonato de calcio o cualquier sal de fosfato de calcio.

En un aspecto de la invención se proporciona una composición, en la que la cantidad de calcio y vitamina D en la composición está presente como la ingesta diaria recomendada (IDR), menos o más. La ingesta diaria recomendada de calcio es de 1000 mg/día (miligramos/día) para un adulto, y se recomiendan niveles de hasta 1300-2500 mg/día para algunas personas, por ejemplo, ancianos y jóvenes, y la ingesta diaria recomendada de vitamina D es de 600 UI/día que corresponde a 15 (µg) para un adulto y se recomiendan niveles de hasta 800 UI/día (20 µg) para personas ancianas. La composición de la invención puede comprender la ingesta diaria recomendada de vitamina D o comprender menos o más, y hasta 50.000 UI/día, que corresponde a 1250 µg/día dependiendo del propósito de la composición, es decir dependiendo de cuánta veces al tenga que administrarse la composición.

La cantidad de calcio puede estar presente en la composición en el intervalo de 100-2500 mg, por ejemplo, en el intervalo de 200-2000, por ejemplo, en el intervalo de 300-1500 mg, por ejemplo, en el intervalo de 400-1000 mg, por ejemplo, de 400-800 mg o de 400-600 mg. La cantidad de calcio puede estar presente en la composición en la cantidad de aproximadamente 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000,

2100, 2200, 2300, 2400, 2500 mg. La cantidad de vitamina D, por ejemplo, vitamina D3, puede estar presente en una cantidad de 5-1250 µg, por ejemplo, en el intervalo de 10-1000, o 20-800, tal como 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 µg, y en el intervalo inferior de aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 µg. La cantidad de vitamina D y calcio en la composición puede ajustarse para proporcionar una respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica).

La cantidad de dicho al menos un ácido biliar en la composición está presente en un intervalo que proporciona una concentración intrainestinal de aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$  a  $1 \times 10^{-3}$  M, que corresponde a de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, por ejemplo, de 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, por ejemplo, 2 - 40 mg/kg, por ejemplo, 4 - 30 mg/kg, por ejemplo, 6-20 mg/kg, por ejemplo, 8-15 mg/kg, por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18 mg/kg. En cuanto a la vitamina D y al calcio, la composición puede ajustarse con referencia a dicho al menos un ácido biliar para proporcionar una respuesta deseada óptima en una única dosis o múltiples dosis.

La cantidad de dicho al menos un ácido graso en la composición está presente en una cantidad suficiente en el intervalo de 0,5 g a aproximadamente 20 g/día, por ejemplo, 1-18, por ejemplo, 3-15 g, por ejemplo, 5-12 g, 7-10. Los intervalos facilitados están en línea con la ingesta recomendada de ácidos grasos esenciales. La composición puede ajustarse con referencia a la cantidad de ácido(s) graso(s) para proporcionar una respuesta deseada óptima en una única dosis o múltiples dosis. Varios aspectos deben considerarse en la selección de las sales biliares y los ácidos grasos, por ejemplo, solubilidad, posible toxicidad y efectos secundarios adversos, palatabilidad en composiciones perorales, así como su estado en cuanto a si se consideran aditivos alimenticios o productos farmacéuticos. En un aspecto de la invención, una composición que comprende

a. ácido glicocólico (GCA), o una sal del mismo, en una cantidad para proporcionar una concentración intrainestinal de aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$  a  $1 \times 10^{-3}$  M;

b. al menos un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en ácido butírico o ácido oleico o una sal del mismo, en una cantidad de 0,5 g a aproximadamente 20 g;

c. calcio, en una cantidad de 100-2500 mg; y

d. vitamina D, en una cantidad de 800-2500 mg.

Un ejemplo de la composición comprende:

a) el ácido biliar ácido glicocólico (GCA) en una cantidad para proporcionar una concentración intrainestinal de aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$  a  $1 \times 10^{-3}$  M;

b) al menos un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en ácido butírico o una sal del mismo o ácido oleico o una sal del mismo, en una cantidad de 0,5 g a aproximadamente 20 g;

c) calcio, en una cantidad de 100-2500 mg; y

d) vitamina D, tal como vitamina D3, en una cantidad de 800-2500 mg.

Esta composición está prevista para una administración una vez al día. Pueden hacerse ajustes adecuados para proporcionar una composición para su administración dos veces, tres veces, etc. al día. La composición tal como se definió anteriormente es para su uso como medicamento.

En un aspecto de la invención, la composición está formulada para administración oral. La composición no está limitada a estar formulada para administración oral y podría también estar formulada para administración parenteral, infusión intravenosa o inyección. Cuando está formulada para administración oral, la composición puede administrarse antes de la ingesta de alimento, preprandial, y/o tras la ingesta de alimento, posprandial. Por ejemplo, la composición puede administrarse antes de, durante y/o después de una comida.

En un aspecto de la invención, la composición está en una forma líquida o forma sólida. Cuando la composición está formulada como una forma sólida, puede estar formulada como comprimido masticable, comprimido efervescente, polvo, pastilla, líquido, gel, comprimido o cápsula. Con el fin de formular las formas sólidas mencionadas anteriormente, otros portadores ampliamente conocidos pueden incorporarse a tales formas sólidas. Tales portadores son ampliamente conocidos para un experto en la técnica e incluyen, por ejemplo, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, aromas, agentes antibacterianos y antifúngicos, y agentes isotónicos y similares que sean fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de tales portadores incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares así como combinaciones de los mismos. A menudo es preferible usar agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende el ácido biliar ácido glicocólico (GCA), o una sal del mismo, y al menos un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en ácido butírico, o una sal del

5 mismo, o ácido oleico, o una sal del mismo, para su uso en un método para la prevención y/o el tratamiento de la osteoporosis provocada por deficiencia de calcio, estados de malabsorción provocados por deficiencia de calcio o estados óseos patológicos provocados por deficiencia de calcio o pérdida de densidad mineral ósea provocada por deficiencia de calcio o para el tratamiento de la osteoporosis previniendo la pérdida de densidad mineral ósea (DMO) en individuos con derivación gástrica en Y de Roux (RYGB) o individuos con gastrectomía en manga (GM) en un mamífero, por ejemplo, un individuo humano, para un individuo que lo necesite. Administrando una composición tal como se indicó anteriormente, se induce la expresión de coactivador de receptor de vitamina D Hsp90 $\beta$ , para aumentar la absorción de calcio inducida por vitamina D.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un suplemento dietético o nutricional que comprende una composición que comprende el ácido biliar ácido glicocólico (GCA), o una sal del mismo, y al menos un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en ácido butírico, o una sal del mismo, o ácido oleico, o una sal del mismo, y opcionalmente calcio y vitamina D. Otros componentes convencionales para suplementos dietéticos o nutricionales también pueden añadirse naturalmente a un suplemento de este tipo.

15 En un aspecto de la invención, el suplemento dietético comprende otros micronutrientes tales como hierro, magnesio, cinc, cobre, y vitaminas, por ejemplo, vitamina A, vitamina D o vitamina E, y otros ingredientes convencionales. Tales componentes convencionales los conoce un experto en la técnica y ejemplos son cargas, aglutinantes, humectantes, agentes disgregantes, agentes de tamponamiento, excipientes, adyuvantes, antioxidantes, conservantes.

20 En un aspecto de la invención, la composición comprende

a) al menos un ácido biliar o una sal del mismo;

25 b) al menos un ácido graso o una sal del mismo;

c) calcio;

30 d) vitamina D; y opcionalmente,

e) uno más componentes seleccionados del grupo de micronutrientes, por ejemplo, componentes seleccionados del grupo que consiste en hierro, magnesio, cinc, cobre y vitaminas, por ejemplo, vitamina A, vitamina D o vitamina E; y opcionalmente,

35 f) uno o más componentes seleccionados de cargas, aglutinantes, humectantes, agentes disgregantes, agentes de tamponamiento, excipientes, adyuvantes, antioxidantes, conservantes.

En una realización de la invención, la composición comprende

40 a) ácido glicocólico (GCA), como el al menos un ácido biliar o una sal del mismo;

b) ácido oleico o ácido butírico, como el al menos un ácido graso o una sal del mismo;

45 c) calcio;

d) vitamina D; y opcionalmente,

50 e) uno más componentes seleccionados del grupo de micronutrientes, por ejemplo, componentes seleccionados del grupo que consiste en hierro, magnesio, cinc, cobre, y vitaminas, por ejemplo, vitamina A, vitamina D o vitamina E; y opcionalmente,

f) uno o más componentes seleccionados de cargas, aglutinantes, humectantes, agentes disgregantes, agentes de tamponamiento, excipientes, adyuvantes, antioxidantes, conservantes.

55 Particularmente, el al menos un ácido biliar (a) es ácido glicocólico (GCA) y el al menos un ácido graso (b) es ácido butírico, junto con componentes c) a f).

Particularmente, el al menos un ácido biliar (a) es ácido glicocólico (GCA) y el al menos un ácido graso (b) es ácido oleico, junto con componentes c) a f).

60 La composición puede estar prevista para su uso como suplemento dietético. Un suplemento dietético o nutricional puede contener además de la composición descrita anteriormente otras vitaminas y micronutrientes que tengan un efecto beneficioso sobre la salud humana.

65 Los aspectos descritos anteriormente en relación con la composición de la invención, tal como se dan a conocer también en las reivindicaciones, son también aplicables al aspecto del suplemento dietético y nutricional.



Un experto en la técnica apreciará características y ventajas adicionales de la invención basándose en las realizaciones descritas anteriormente. Por consiguiente, la invención no debe limitarse a lo que se ha mostrado y descrito particularmente en los ejemplos o las figuras.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona el uso del ácido biliar ácido glicocólico (GCA), o una sal del mismo, y al menos un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en ácido butírico, o una sal del mismo, o ácido oleico, o una sal del mismo, una o más vitaminas D, y calcio, o una sal del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la osteoporosis provocada por deficiencia de calcio, estados inflamatorio y de malabsorción que provocan deficiencia de calcio, trastornos óseos provocados por deficiencia de calcio o pérdida de densidad mineral ósea (DMO) provocada por deficiencia de calcio, o para el tratamiento de la osteoporosis previniendo la pérdida de densidad mineral ósea (DMO) en individuos con derivación gástrica en Y de Roux (RYGB) o individuos con gastrectomía en manga (GM), o individuos tratados mediante otras técnicas quirúrgicas similares. Los efectos y las características del aspecto anterior de la presente invención son análogos a los descritos anteriormente. Las composiciones descritas en el presente documento están previstas para su uso como medicamento en el tratamiento de las enfermedades y los trastornos dados a conocer anteriormente.

Según otro aspecto de la invención, se proporcionan composiciones que comprenden el ácido biliar ácido glicocólico (GCA), o una sal del mismo, y al menos un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en ácido butírico o ácido oleico, o sales de los mismos,

#### Parte experimental

El objetivo de los experimentos es investigar maneras para mejorar la absorción de calcio inducida por vitamina D en el intestino delgado proximal, por ejemplo, en pacientes que se han sometido a cirugía de RYGB o GM. Lo anterior se somete a prueba mediante la adición de un ácido biliar específico (o bilis humana) y un ácido graso con el fin de inducir la expresión del coactivador de receptor de vitamina D Hsp 90 $\beta$ . Induciendo Hsp 90 $\beta$ , expresión del transporte de calcio inducido por vitamina D puede aumentarse sustancialmente, es decir normalizarse en cualquier clase de paciente que necesite absorción de calcio aumentada, por ejemplo, en pacientes con RYGB, y posiblemente también pacientes con GM.

#### Línea de células Caco-2

La línea de células Caco-2 es una línea continua de células de adenocarcinoma colorrectal epiteliales humanas heterogéneas desarrollada por el Sloan-Kettering institute for Cancer Research. Las células se derivan del colon, o intestino grueso, con carcinoma, pero cuando estas células se cultivan en condiciones específicas se diferencian y polarizan haciendo que su fenotipo se asemeje morfológica y funcionalmente a los enterocitos que revisten el intestino delgado.

Se encuentra que las células Caco-2 expresan uniones estrechas, microvellosidades, y un número de enzimas así como transportadores que normalmente son característicos de tales enterocitos: peptidasas, esterases, P-glicoproteína, transportadores de absorción para aminoácidos, ácidos biliares, ácidos carboxílicos, etc. Microscópicamente, los cultivos de células Caco-2 son heterogéneos y esta teoría está soportada por las características de las células que muestran resultados significativos divergentes a partir de diferentes investigaciones alrededor del mundo. Las células Caco-2 se usan comúnmente no como células individuales, sino como una monocapa confluyente sobre un filtro de inserto de cultivo celular. Esta forma de cultivo conduce a que las células se diferencien para formar una monocapa de células epiteliales polarizadas que proporciona una barrera física y bioquímica al paso de iones y moléculas pequeñas. El cultivo en monocapa de Caco-2 es un modelo *in vitro* ampliamente usado de la mucosa de intestino delgado humana para investigar la absorción de fármacos administrados por vía oral.

#### Cultivo de células Caco-2

Células Caco-2 con un paso o aproximadamente 45 (número de veces que se han dividido) (Sigma-Aldrich Estocolmo Suecia) se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (Life Technologies Invitrogen AB, Lidingo, Suecia), con un 10% de suero bovino fetal (SBF) (Life Technologies), un 1% de aminoácido no esencial (AANE) (Life Technologies), 100 UI/ml de penicilina-estreptomicina (Pen-Strep) (Life Technologies). Las células se incubaron a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> y se cultivaron en un matraz de cultivo celular (BD Falcon®, VWR Internationals, Estocolmo, Suecia) y el medio se cambió los lunes, miércoles y viernes cada semana.

Las células se cultivaron durante aproximadamente 1 semana antes de que se desprendieran (0,25% de tripsina-EDTA, Life Technologies) y se sembraron en placas de 6 pocillos con insertos de filtro semipermeables (tamaño de poro total, BD Biosciences, Le Pont de Claix, Francia), 200 000 células/pocillo. A la confluencia, el medio de cultivo se cambió a libre de SBF en el compartimento tanto superior como inferior, y al compartimento inferior se le añadió también una mezcla de 10  $\mu$ l/ml de insulina, 0,55  $\mu$ g/ml de transferencia y 6,7 ng/ml de selenio (ITS, Life Technologies) para establecer polaridad celular y diferenciación estructural (6-7). Las monocapas de células se dejaron cultivando durante 14 días antes de los experimentos.

Las células se estimularon entonces durante 24 h o 48 h con 10 mM con ácido graso y bilis o ácidos biliares humanos, o una combinación de ambos, en los compartimentos "luminales" superiores (células tratadas) y otras se dejaron como control (células sin tratar). Los ácidos biliares están presentes como componentes de bilis.

#### 5 Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

10 Para la recogida de proteínas, las células se rasparon en tampón de lisis en disolución de bloqueo de proteína cinasa (1% de Triton x-100, EDTA; ácido etilendiaminotetraacético) que contenía tampón inhibidor de proteína cinasa (tampón fosfato de potasio 10 mM pH 6,8, sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano 10 mM (CHAPS: Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) y comprimido de cóctel de inhibidor de proteasa complete (Roche Diagnostics AB, Estocolmo, Suecia). Tras agitar varias veces sobre hielo, el residuo celular se retiró mediante centrifugación (10000 x g durante 10 min a 4°C) y el contenido de proteína del sobrenadante se analizó usando el método de Bradford.

15 Las muestras se diluyeron en tampón SDS y se calentaron a 70°C durante 10 min antes de cargarse en un gel de Bis-Tris al 10% de NuPage, y se ejecutó una electroforesis usando un tampón MOPS (Invitrogen AB, Lidingo, Suecia). Un carril de cada gel se cargó con patrones de peso molecular teñidos previamente (SeeBlue, NOVEX, San Diego, CA, EE. UU.). Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de poli(difluoruro de vinilo) (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido), que se incubó con anticuerpo de Hsp 90β (abcam; ab80159, Cambridge, Reino Unido), y se usaron un anticuerpo anti-IgG de conejo de cabra conjugado con fosfatasa alcalina secundaria (Santa Cruz) y CDP-Star (Tropix, Bedford, MA, EE. UU.) como sustrato para identificar proteínas inmunorreactivas por medio de quimioluminiscencia. Se capturaron imágenes mediante una cámara CCD enfriada Chemidox XRS y se analizaron con software Quantity One (BioRad laboratories, Hercules, CA, EE. UU.).

#### 25 Absorción y transporte de Ca<sup>2+</sup>

Las células Caco-2 se cultivaron en sobre un soporte permeable durante 11-14 días, ligeramente modificado según Giuliano A. R., y Wood R.J. El día de los experimentos se midió la resistencia eléctrica transepitelial y solo se contaron las preparaciones con valores entre 400 y 900 ohmios x cm<sup>2</sup>. Las sustancias sometidas a prueba se facilitaron en el compartimento superior y el efecto se leyó tras de 24 a 48 h. El flujo de Ca<sup>2+</sup> se midió usando centelleo de líquido, comparando el compartimento inferior con el superior.

#### Experimento 1

35 En este experimento, las células Caco-2 se sometieron a prueba con el ácido graso ácido butírico (denominado alternativamente: butirato), el ácido biliar ácido glicocólico (GCA), o una combinación de ácido butírico y GCA.

40 Las células se hicieron crecer hasta confluencia y entonces se incubaron con vehículo, ácido butírico, ácido biliar, o una combinación de ácido biliar y ácido butírico, durante 48 h. Entonces se recogieron las células y se extrajeron las proteínas celulares totales y se analizaron usando inmunotransferencia de tipo Western. La expresión de Hsp 90β se presenta normalizada con respecto a la expresión de la proteína control no regulada GAPDH. El efecto del ácido biliar conjugado GCA, con y sin la adición del ácido graso ácido butírico, sobre la expresión de Hsp 90β en células Caco-2 cultivadas se presenta en la *Figura 1*.

45 Los resultados muestran que GCA no tuvo ningún efecto por sí mismo sobre Hsp 90β, sino solo junto con ácido butírico hubo un aumento prominente y altamente significativo de la expresión de la proteína Hsp 90β en comparación con las células control tratadas con vehículo.

#### Experimento 2

50 La claudina-2 es una proteína de unión estrecha permisiva que aumenta la absorción de calcio en el intestino delgado distal mediante la ruta paracelular, denominada habitualmente absorción de calcio "pasiva". La *Figura 2* muestra que la vitamina D tiene un efecto para aumentar la expresión de la proteína claudina-2 en células Caco-2 de un modo dependiente de la dosis, facilitando de ese modo la absorción de calcio "pasiva". La supresión del coactivador de vitamina D Hsp 90β mediante el inhibidor específico geldanamicina suprime también la expresión de claudina-2, obviamente por medio de la inhibición de actividad de vitamina D, demostrando de ese modo que Hsp 90β es importante también para una absorción de calcio "pasiva". Por tanto, la facilitación de la expresión de Hsp 90β en el intestino delgado debería tener un efecto beneficioso también sobre la absorción de calcio pasiva en el intestino delgado humano. Las células Caco-2 se cultivaron en las mismas condiciones experimentales que en los experimentos 1. La vitamina D se añadió a concentraciones de 10 μM (dosis baja) o 100 μM (dosis alta). La geldanamicina se añadió a una concentración de 0,5 μM.

#### Experimento 3

65 En el presente experimento, las células Caco-2 se cultivaron y se hicieron crecer hasta confluencia con forma de epitelio a lo largo de 14 días. Se realizaron los siguientes experimentos según Giuliano A. R., y Wood R.J. El efecto de 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamina D3 10 nM sobre el transporte de calcio se sometió a prueba durante las últimas 48 horas. El flujo se sometió a

prueba sin gradiente de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), la concentración de calcio era de 1,8 mM a cada lado de la capa de células. Por tanto se confirmó el transporte activo de vitamina D. El resultado se presenta en la *Figura 3*.

#### Experimento 4

En el presente experimento, las células Caco-2 se cultivaron y se hicieron crecer hasta confluencia con forma de epitelio a lo largo de 12 días. Las células se hicieron crecer entonces en otros 4 días en presencia de GCA 0,1 mM, o en presencia de butirato 0,5 mM, o en presencia del GCA y butirato en combinación.

El efecto de 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamina D3 10 nM sobre el transporte de calcio se sometió a prueba durante las últimas 48 horas. El flujo se sometió a prueba sin un gradiente de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), la concentración de calcio era de 1,8 mM a cada lado de la capa de células. El resultado se presenta en la *Figura 4* (en la que se indican medias $\pm$ EEM). El experimento muestra el transporte activo a través de la capa de epitelio de Caco-2. Puede concluirse que la tasa de transporte está en el mismo orden de magnitud que con 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamina D3 sola y que no hay ningún efecto adicional de combinar un ácido biliar junto con un ácido graso en ausencia de un gradiente de calcio.

#### Experimento 5

En el presente experimento, las células Caco-2 se cultivaron y se hicieron crecer hasta confluencia con forma de epitelio a lo largo de 12 días. Las células se hicieron crecer entonces en otros 4 días en presencia de la vitamina D3 sola, o en combinación con butirato 0,5 mM, o en combinación con GCA 0,1 mM, o en combinación con tanto GCA como butirato, o TCA 0,1 mM, o en combinación con tanto TCA como butirato.

El efecto de 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamina D3 10 nM sobre el transporte de calcio se sometió a prueba durante las últimas 48 horas. El flujo se sometió a prueba un gradiente de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), con 40 mM en el lado apical y 1,8 mM en el lado basolateral.

El efecto se midió con la prueba de Kruskal-Wallis, contrastada con la prueba de comparación múltiple de Dunn. El resultado se presenta en la *Figura 5* (en la que se indican medias  $\pm$  intervalos de confianza del 95%). En el presente documento, puede concluirse que se consigue una absorción aumentada de calcio con la combinación de vitamina D, GCA y butirato. Sin embargo, también puede concluirse que no se consiguió ninguna absorción con vitamina D, TCA y butirato.

#### Experimento 6

En el presente experimento, las células Caco-2 se cultivaron y se hicieron crecer hasta confluencia con forma de epitelio a lo largo de 12 días. Las células se hicieron crecer entonces en otros 4 días en presencia de vit. D3 sola, o en combinación con butirato 0,5 mM, o en combinación con GCA 0,1 mM, o en combinación con tanto GCA como butirato, o en combinación con GCA y ácido oleico.

El efecto de 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamina D3 10 nM sobre el transporte de calcio se sometió a prueba durante las últimas 48 horas. El flujo se sometió a prueba con un gradiente de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), con 40 mM en el lado apical y 1,8 mM en el lado basolateral.

El efecto se midió con la prueba de Kruskal-Wallis, contrastada con la prueba de comparación múltiple de Dunn. El resultado se presenta en la *Figura 6* (medias  $\pm$  intervalos de confianza del 95%). En el presente documento, puede concluirse que se consigue una absorción aumentada de calcio con la combinación de vitamina D, GCA y butirato, también se consiguió una absorción aumentada con vitamina D, GCA y ácido oleico.

#### Referencias:

Elias *et al.*, Bone Mineral Density and expression of vitamin D receptor-dependent calcium uptake mechanisms in the proximal small intestine after bariatric surgery, Br J Surg. Noviembre de 2014; 101 (12):1566-75).

Crawford *et al.* "Increased bone turnover in type 2 diabetes patients randomized to bariatric surgery vs. medical therapy at 5 years", Endocrine practice, 2018, DOI:10.4158/EP-2017-0072).

Hewit S *et al.*, Secondary hyperparathyroidism, vitamin D sufficiency and serum calcium 5 years after gastric bypass and duodenal switch, Obes Surg. 2013, marzo; 23(3):384-90).

Schafer A L, *et al.*, Intestinal Calcium Absorption Decreases Dramatically After Gastric Bypass Surgery Despite Optimization of Vitamin D Status. J Bone Miner Res. 2015, agosto; 30(8):1377-85).

Giuliano A. R., y Wood R.J. ("Vitamin D-regulated calcium transport in Caco-2 cells: unique in vitro model", Am. J. Physiol. 260 (Gastrointest. Liver Physiol. 23): G207-G212, 1991).

Goldenberg D *et al.*, Thyroidectomy in patients who have undergone gastric bypass surgery. Head Neck. Junio de 2018; 40(6):1237-1244.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende el ácido biliar ácido glicocólico (GCA), o una sal del mismo, y al menos un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en ácido butírico, o una sal del mismo, o ácido oleico, o una sal del mismo, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la osteoporosis.  
5
2. Una composición para su uso según la reivindicación 1, en el tratamiento y/o la prevención de la osteoporosis provocada por deficiencia de calcio, estados de malabsorción provocados por deficiencia de calcio o trastornos óseos provocados por deficiencia de calcio en un mamífero; o para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la osteoporosis previniendo la pérdida de densidad mineral ósea (DMO) provocada por deficiencia de calcio en un mamífero; o para el tratamiento de la osteoporosis previniendo la pérdida de densidad mineral ósea (DMO) en pacientes con derivación gástrica en Y de Roux (RYGB) o pacientes con gastrectomía en manga (GM).  
10
3. Una composición para su uso según la reivindicación 1 o 2, en la que dicha composición comprende además vitamina D, preferiblemente la vitamina D consiste principalmente en vitamina D3.  
15
4. Una composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha composición comprende además calcio, preferiblemente el calcio está presente como carbonato de calcio, citrato de calcio o fosfato de calcio, o una mezcla de los mismos.  
20
5. Una composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4, en la que la cantidad de calcio y vitamina D en la composición está presente como la ingesta diaria recomendada (IDR) o menos.
6. Una composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición comprende al menos uno de un vehículo, excipiente, lubricante, aroma, edulcorante, aglutinante y disgregante.  
25
7. Una composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición está formulada para administración oral, administración parenteral, infusión intravenosa o inyección.
8. Una composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la composición está en una forma líquida o forma sólida.  
30
9. Una composición para su uso según la reivindicación 8, en la que la composición está formulada como comprimido masticable, comprimido efervescente, polvo, pastilla, comprimido o cápsula.  
35
10. Una composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicha composición es un suplemento nutricional o dietético.

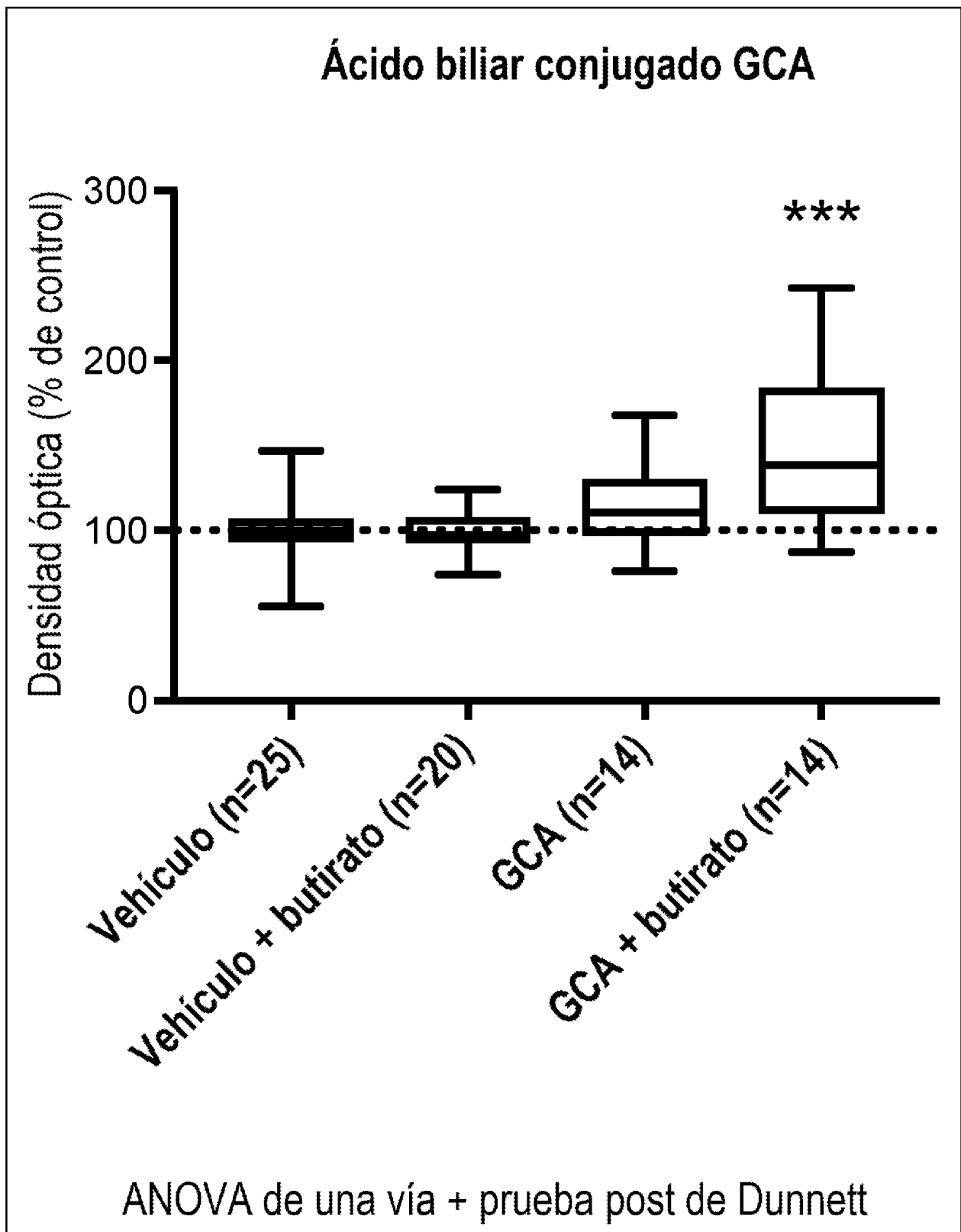


Figura 1

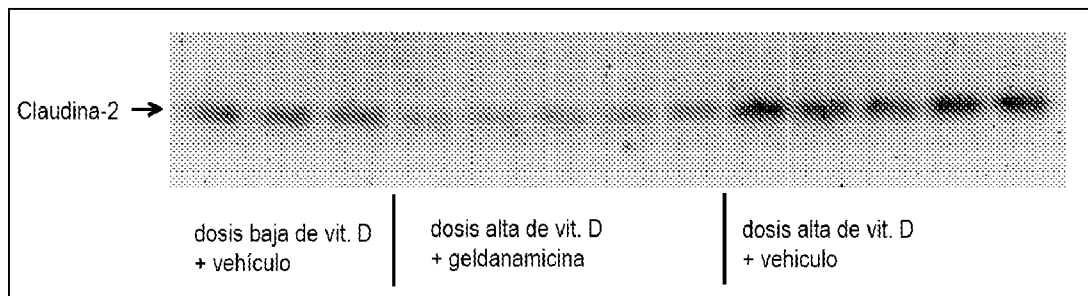


Figura 2

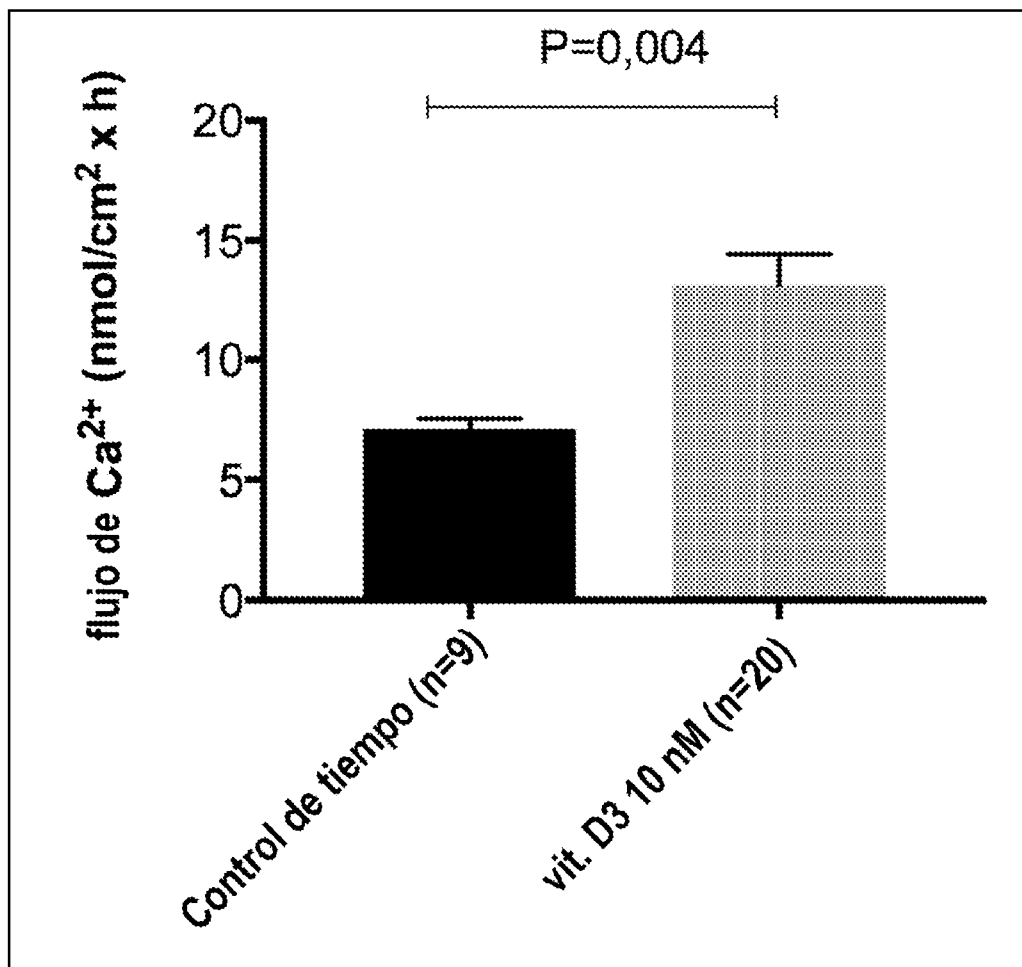


Figura 3

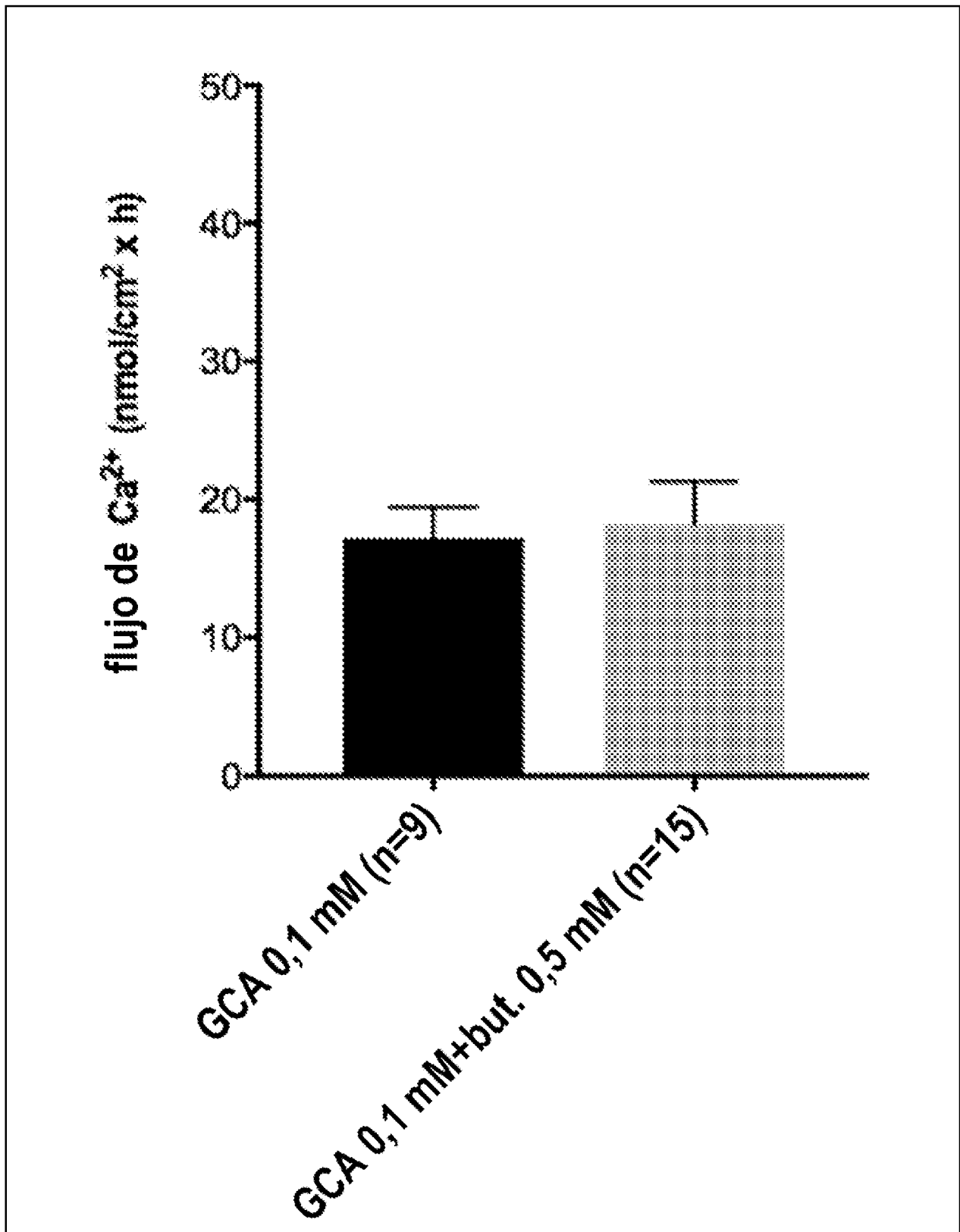


Figura 4

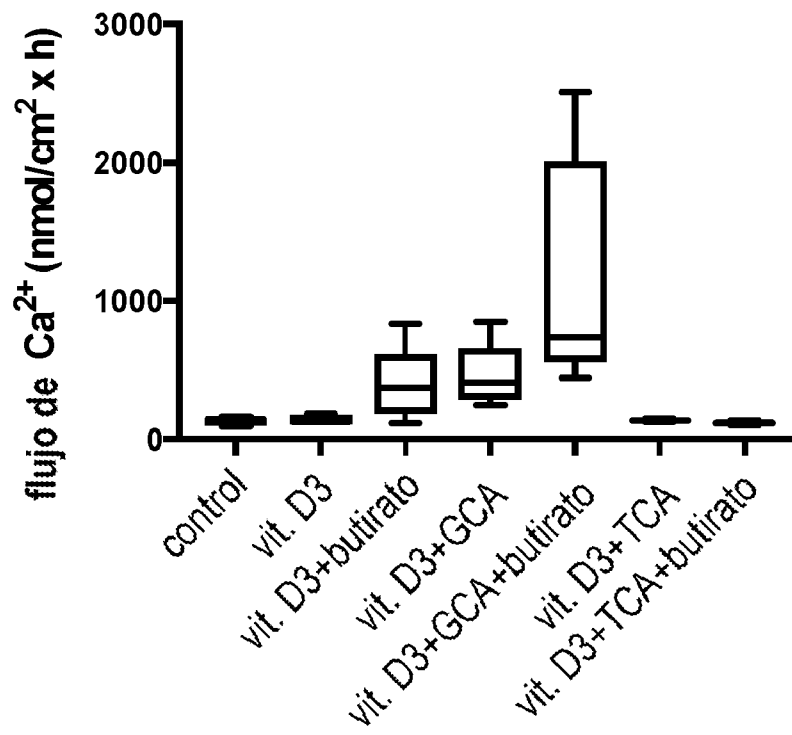


Figura 5

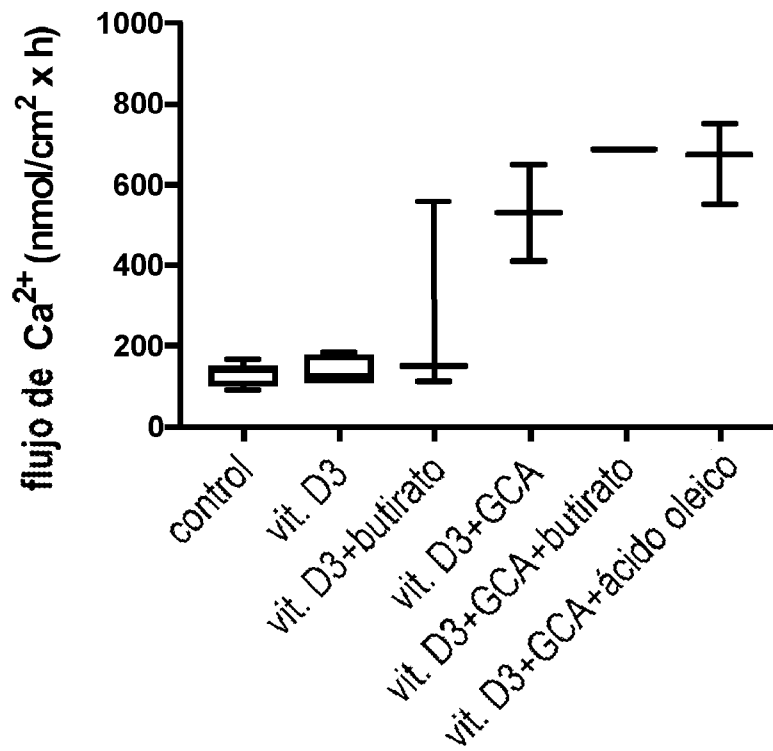


Figura 6