

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI0618599-1 A2



(22) Data de Depósito: 15/11/2006
(43) Data da Publicação: 06/09/2011
(RPI 2122)

(51) Int.CI.:

A61K 31/194
A61K 31/198
A61P 19/02
A61P 19/10
A61K 38/03

(54) Título: USO DE UM ÁCIDO ALFA-CETOGLUTÁRICO OU DE UM SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL DE ÁCIDO ALFA-CETOGLUTÁRICO

(30) Prioridade Unionista: 15/11/2005 US 60/597172

(73) Titular(es): Entress AB

(72) Inventor(es): Stefan G. Pierzynowski

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT SE2006050479 de 15/11/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/058612 de 24/05/2007

(57) Resumo: USO DE UM ÁCIDO ALFA-CETOGLUTARICO OU DE UM SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL DE ÁCIDO ALFA-CETOGLUTÁRICO. Uso de uma substância para tratar de condições médicas das articulações, por exemplo artrose, artrite reumatóide e debilitação da cartilagem. O uso inclui o emprego de ácido alfa-cetoglutaríco, glutamina ou ácido glutâmico, assim como sais, amidas, di-ou tripeptídeos das substâncias mencionadas.

“USO DE UM ÁCIDO ALFA-CETOGLUTÁRICO OU DE UM SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL DE ÁCIDO ALFA-CETOGLUTÁRICO”

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se a composições médicas e usos das referidas composições para o tratamento, alívio e profilaxia das condições associadas com a debilitação da cartilagem e com a dor a isso relacionada, ou a profilaxia da artrose e da artrite reumatóide, e da dor a ela relacionada.

Fundamentos

10 Tanto quanto um dentre três adultos no mundo industrial pode presentemente sofrer de sintomas crônicos das articulações, ou de artrite. O sintoma mais comum, a dor persistente das articulações, pode aparecer como dor nos quadris, dor nos joelhos, dor na mão ou dor no pulso, bem como dor nas articulações em outras áreas do corpo. Os sintomas causam sofrimento e 15 perdas econômicas quando as pessoas são forçadas a parar de trabalhar ou a reduzir as horas de trabalho. Grandes somas são também gastas no tratamento médico. Obviamente, existe a necessidade de soluções eficazes quanto ao custo para alívio ou cura dos sintomas das articulações e da artrite.

Sumário da Invenção

20 As formas de realização da invenção incluem o uso de uma substância que inclui pelo menos um membro selecionado do grupo consistindo de ácido alfa-cetoglutárico, glutamina, ácido glutâmico e sais farmaceuticamente aceitáveis destes ácidos, amidas de ácido alfa-cetoglutárico e um aminoácido ou um di- ou tripeptídeo e dipeptídeos de 25 glutamina e outro aminoácido, tripeptídeos de glutamina e outros aminoácidos, dipeptídeos de ácido de glutamina e outros aminoácidos, tripeptídeos de ácido glutâmico e outros aminoácidos e sais farmaceuticamente aceitáveis dos referidos dipeptídeos e tripeptídeos, misturas físicas farmaceuticamente aceitas do ácido alfa-cetoglutárico ou um 30 seu sal farmaceuticamente aceitável, e pelo menos um aminoácido, para a fabricação de uma preparação farmacêutica para o tratamento ou profilaxia de

uma condição de debilitação inflamatória ou não inflamatória da cartilagem e dor relacionada ao acima.

5 Outras formas de realização incluem o uso como estabelecido acima, para o tratamento ou profilaxia da artrose e da artrite reumatóide e da dor relacionada ao acima.

Outras formas de realização incluem o uso como estabelecido acima, para o tratamento ou profilaxia da debilitação da cartilagem nas condições que envolvam a perda de peso e/ou a nutrição prejudicada, ou gastrectomia, gastrectomia parcial ou bandeamento gástrico.

10 Outras formas de realização incluem o uso conforme acima estabelecido para o tratamento ou profilaxia da debilitação da cartilagem em condições que envolvam a má nutrição.

15 Outras formas de realização incluem o uso como estabelecido acima, para abrandar a dor associada com a debilitação da cartilagem nas condições supramencionadas.

Outras formas de realização incluem o uso como estabelecido acima, para o tratamento ou a profilaxia da osteoporose relacionada à gastrectomia.

Breve Descrição dos Desenhos

20 A presente invenção será ainda explanada na descrição a seguir, com o auxílio das formas de realização preferidas, estudos dos exemplos e desenhos anexos, dentre os quais:

- a figura 1 é um diagrama que descreve o efeito do alfa-cetoglutarato dietético e da gastrectomia sobre os pesos corporais de ratos;

25 - a figura 2 apresenta quatro fotos de transiluminação da porção superior do crânio (calvária) de ratos experimentais;

- a figura 3 é um diagrama mostrando a área das lacunas, como encontradas nas fotos de transiluminação da calvária de ratos experimentais.

Descrição Detalhada

Assim, de acordo com um aspecto da presente invenção, é proporcionado o novo uso de pelo menos um membro selecionado do grupo consistindo de ácido alfa-cetoglutárico, glutamina, ácido glutâmico e sais farmaceuticamente aceitáveis destes ácidos, amidas de ácido alfa-cetoglutárico e um aminoácido ou um di- ou tripeptídeo e dipeptídeos de glutamina e outro aminoácido, tripeptídeos de glutamina e outros aminoácidos, dipeptídeos de ácido de glutamina e outros aminoácidos, tripeptídeos de ácido glutâmico e outros aminoácidos e sais farmaceuticamente aceitáveis dos referidos dipeptídeos e tripeptídeos, misturas físicas farmaceuticamente aceitas de ácido alfa-cetoglutárico ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, e pelo menos um aminoácido para a fabricação de uma preparação farmacêutica para o tratamento ou profilaxia de uma condição de artrose, artrite reumática e destruição da cartilagem, e dor relacionada aos distúrbios acima.

De acordo com uma forma de realização preferida da invenção, o ácido alfa-cetoglutárico da invenção ou um seu sal metal alcalino ou de metal alcalino-terroso ou uma combinação destes, são usados. Preferivelmente o alfa-cetoglutarato de sódio é usado.

Em conformidade com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um método para o tratamento ou profilaxia de uma condição de dor aumentada de pelo menos um membro selecionado do grupo consistindo de artrose em mamíferos, incluindo o homem, método este que compreende administrar a um paciente em necessidade de tal tratamento ou profilaxia de uma quantidade de dor efetiva de pelo menos um membro selecionado do grupo consistindo de ácido alfa-cetoglutárico, glutamina, ácido glutâmico e sais farmaceuticamente aceitáveis destes ácidos, amidas de ácido alfa-cetoglutárico e um aminoácido ou um di- ou tripeptídeo, dipeptídeos de glutamina e outro aminoácido, tripeptídeos de glutamina e outros

aminoácidos, dipeptídeos de ácido glutâmico e outros aminoácidos, tripeptídeos de ácido glutâmico e outros aminoácidos, e sais farmaceuticamente aceitáveis dos referidos peptídeos e tripeptídeos, misturas físicas farmaceuticamente aceitas de ácido alfa-cetoglutárico ou um seu sal farmaceuticamente aceitável e pelo menos um aminoácido.

De acordo com formas de realização preferidas destes aspectos, o ácido alfa-cetoglutárico ou um seu sal de metal alcalino ou alcalino-terroso ou uma combinação destes, são administrados. De maior preferência, o alfa-cetoglutarato de sódio é administrado.

As preparações farmacêuticas do princípio ou princípios ativos usadas de acordo com a presente invenção podem ser administradas a um vertebrado, incluindo mamíferos e pássaros, tais como roedores, um camundongo, rato, porquinho-da-índia, ou um coelho; um pássaro, tal como um peru, galinha ou frango e outras aves e animais de circulação livre; uma vaca, um cavalo, um porco ou leitão e outros animais de fazenda, um cão, um gato e outros animais de estimação, e, em particular, seres humanos.

A administração pode ser realizada de diferentes maneiras, dependendo de que espécie de vertebrado se trata, da condição do vertebrado em necessidade de tais métodos, e da indicação específica a ser tratada.

Em uma forma de realização, a administração é feita como um alimento ou suplemento alimentício, tal como um suplemento dietético e/ou um componente na forma de alimentação sólida e/ou bebida. Outras formas de realização podem ser apresentadas em suspensões ou soluções, tais como uma bebida mais descrita abaixo. Igualmente, as formas podem ser em cápsulas ou tabletes, tais como mastigáveis ou solúveis, por exemplo tabletes efervescentes, bem como pó e outras formas secas conhecidas da pessoa habilitada na técnica, tais como pelotas, micropelotas e grãos.

A administração pode ser como alimentação ou suplemento alimentício parenteral, retal ou oral, como descrito acima. Veículos

parenterais incluem a solução de cloreto de sódio, a dextrose de Ringer, cloreto de dextrose e sódio, óleos de Ringer lactados ou fixos.

O alimento ou suplemento alimentar podem também ser emulsificados. O ingrediente ou ingredientes terapêuticos ativos podem então ser misturados com excipientes, os quais sejam farmaceuticamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente ativo. Excipientes adequados são, por exemplo, a água, solução salina, dextrose, glicerol, etanol ou coisa parecida, e combinações destes. Além disso, se desejável, a composição pode conter quantidades menores de substâncias auxiliares, tais como agentes umectantes ou emulsificantes, agentes de tamponamento do pH, os quais intensificam a eficácia do ingrediente ativo.

Diferentes formas do alimento ou suplemento alimentar parenterais podem ser fornecidas, tais como formulações de alimentos sólidos, líquidos ou liofilizados ou de outra forma secados. Podem incluir diluentes de vários tampões (por exemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH e intensidade iônica, aditivos tais como albumina ou gelatina para impedir a absorção às superfícies, detergentes (por exemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sais de ácido biliar), agentes solubilizantes (por exemplo, glicerol, polietilenoglicerol), antioxidantes (por exemplo ácido ascórbico, metabissulfito de sódio), preservativos (por exemplo, Timerosal, álcool benzílico, parabenos), substâncias de massa ou modificadores da tonicidade (por exemplo, lactose, manitol), ligações covalentes de polímeros tais como o polietileno glicol à composição, complexação com íons de metal, ou incorporação do material dentro ou em preparações particuladas de compostos poliméricos, tais como o ácido poliláctico, o ácido poliglicólico, hidrogéis, etc., ou em lipossomas, microemulsões, micelas, fantasmas eritrocíticos, ou esferoplastos.

Em uma forma de realização, o alimento ou suplemento alimentar são administrados na forma de uma bebida, ou uma sua composição

seca, em qualquer dos métodos de acordo com a invenção.

A bebida compreende uma quantidade eficaz do ingrediente ativo ou seus ingredientes, junto com um portador solúvel em água aceitável do ponto de vista nutricional, tal como minerais, vitaminas, carboidratos, gorduras e proteínas. Todos estes componentes são fornecidos em uma forma seca se a bebida for fornecida em uma forma seca. Uma bebida fornecida pronta para o consumo ainda compreende água. A solução de bebida final pode também ter uma tonicidade e uma acidez controladas, por exemplo como uma solução tamponada de acordo com as sugestões gerais do parágrafo acima.

O pH é preferivelmente na faixa de cerca de 2 a 5, e em particular de cerca de 2 a 4, para prevenir o desenvolvimento bacteriano e fúngico. Uma bebida esterilizada pode também ser usada, com um pH de cerca de 6 a 8.

A bebida pode ser fornecida sozinha ou em combinação com uma ou mais composições terapeuticamente eficaz.

De acordo com uma outra forma de realização, as preparações farmacêuticas como medicamentos para uso oral e retal, podem ser na forma de tabletes, pastilhas, cápsulas, pós, suspensões aquosas ou oleosas, xaropes, elixires, soluções aquosas e outras contendo o ingrediente ou ingredientes ativos em mistura com um portador e/ou aditivos farmaceuticamente aceitáveis, tais como diluentes, preservativos, solubilizantes, emulsificantes, adjuvantes e/ou portadores úteis nos métodos e usos apresentados na presente invenção.

Além disso, como aqui usado, “portadores farmaceuticamente aceitáveis” são bem conhecidos daqueles versados na técnica e podem incluir, porém sem limitar, 0,01 a 0,05 M de tampão de fosfato ou 0,8% de solução salina. Adicionalmente, tais portadores farmaceuticamente aceitáveis podem ser soluções, suspensões e emulsões aquosas ou não aquosas. Exemplos de

solventes não aquosos são o propileno glicol, o polietileno glicol, óleos vegetais como o azeite, e ésteres orgânicos injetáveis tais como o oleato de etila. Portadores aquosos incluem a água, soluções alcoólicas/aquosas, emulsões ou suspensões, incluindo solução salina e meios tamponados.

5 Veículos parenterais incluem a solução de cloreto de sódio, a dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, óleos de Ringer ou fixos lactados. Preservativos e outros aditivos também podem estar presentes, tais como, por exemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, gases inertes e outros.

10 Os aminoácidos que fazem parte das amidas com ácido alfa-cetoglutárico ou de peptídeos com glutamina ou ácido glutâmico ou tripeptídeos com glutamina e/ou ácido glutâmico, podem ser qualquer dos aminoácidos que ocorram como componentes nos peptídeos por natureza. O mesmo se aplica às misturas físicas farmaceuticamente aceitas de ácido alfa-cetoglutárico ou sais destes com pelo menos um aminoácido. Preferivelmente o aminoácido ou aminoácidos são selecionados do grupo consistindo de 15 arginina, ornitina, leucina, isoleucina e lisina.

Referidos aminoácidos são preferivelmente usados em sua configuração L.

20 Exemplos de amidas de ácido alfa-cetoglutárico com um aminoácido ou um di- ou tripeptídeo incluem, sem limitar, amidas de ácido alfa-cetoglutárico com um aminoácido selecionado do grupo consistindo de glutamina, ácido glutâmico, arginina, ornitina, lisina, prolina, isoleucina e leucina, e amidas de ácido alfa-cetoglutárico com um dipeptídeo de glutamina 25 e qualquer dentre ácido glutâmico, arginina, ornitina, lisina, prolina, isoleucina e leucina, e com um dipeptídeo de ácido glutâmico e qualquer dentre arginina, ornitina, lisina, prolina, isoleucina e leucina.

Exemplos de di- e peptídeos de glutamina e ácido glutâmico com outros aminoácidos incluem aqueles mencionados acima com relação às

amidas de ácido alfa-cetoglutárico com di- ou tripeptídeos.

Exemplos de misturas físicas de ácido a-cetoglutárico ou sais deste com pelo menos um aminoácido, incluem, porém sem limitar, as misturas físicas de pelo menos um membro selecionado do grupo consistindo de ácido alfa-cetoglutárico e os seus sais de sódio, potássio, cálcio e magnésio com qualquer dentre glutamina, ácido glutâmico, arginina, ornitina, leucina, isoleucina, lisina e prolina e quaisquer combinações dos referidos aminoácidos.

A relação molar do ácido alfa-cetoglutárico ou seus sais para o aminoácido ou aminoácidos das referidas misturas físicas, situar-se-á em geral dentro dos limites de 1:0,01 a 1:2, preferivelmente de 1:0,1 a 1:1,5, e o mais preferível de 1:0,2 a 1:1,0.

A dosagem a ser administrada variará dependendo do princípio ou princípios ativos a serem usados, da condição a ser tratada, da idade, sexo, peso etc. do paciente que esteja sendo tratado, mas situar-se-á geralmente dentro da faixa de 1 a 1000 mg/kg de peso corporal/dia, ou de 10 a 400 mg/kg de peso corporal e por dia, preferivelmente de 10 a 100 mg/kg de peso corporal/dia.

A invenção será agora ilustrada ainda por meio de exemplo, o qual não deve ser interpretado de modo a limitar o escopo da invenção.

EXEMPLO

Fundamento: A remoção cirúrgica do estômago (gastrectomia, Gx) leva à osteoporose em animais e nos seres humanos. A gastrectomia afeta principalmente a estrutura do osso trabecular. Não está claro se a Gx também afeta negativamente a placa epifisária. O α -cetoglutarato dietético (AKG) é um precursor da hidroxiprolina - o aminoácido mais abundante no pró-colágeno do osso e da cartilagem. O objetivo dos estudos foi elucidar o efeito do AKG sobre a gastrectomia dependente das perdas ósseas/cartilagens.

Métodos: 40 ratos Sprague-Dawley fêmeas foram usados.

Vinte ratos foram submetidos à gastrectomia e divididos entre 2 grupos: Gx+AKG e Gx+Placebo. Outros 20 ratos foram submetidos a operação fictícia e divididos entre outros 2 grupos: Fictício+AKG e Fictício+Placebo. 5 Após 8 semanas, os animais foram sacrificados e as calvárias, os fêmures e as tíbias foram coletados. A densidade de massa óssea (BMD) e a concentração mineral óssea (BMC) nos fêmures da direita e as tíbias foram estimadas e a histomorfometria dos ossos da esquerda foi estimada. As medições de transiluminação das calvárias foram também realizadas.

10 *Resultados:* O α -cetoglutarato dietético revelou um forte efeito protetor sobre as perdas ósseas das calvárias dos ratos submetidos à gastrectomia. O AKG apresentou um forte efeito antidestrutivo sobre as células das placas epifisárias, o volume ósseo trabecular e a forma das trabéculas dos ratos submetidos à gastrectomia.

15 *Conclusões:* O AKG minimiza a destruição óssea e da cartilagem desenvolvida após a ressecção do estômago nos ratos.

A remoção cirúrgica do estômago conduz à osteopenia e à artrite nos seres humanos, nos ratos e em outros animais experimentais. A 20 gastrectomia é associada com a osteopenia nos seres humanos. As disfunções gástricas também podem contribuir para o desenvolvimento da osteoporose na idade avançada. Por isso, a maior parte dos estudos concernentes à doença óssea lida com pacientes após a ressecção gástrica.

A gastrectomia afeta principalmente o osso trabecular e às vezes também o osso cortical, induzindo um efeito pronunciado da destruição do osso da calvária. A redução da massa óssea cortical e trabecular após a 25 gastrectomia tem sido relatada em ambos os sexos de seres humanos. O volume ósseo trabecular na tíbia e no fêmur é reduzido em 60% após 16 semanas da gastrectomia. As perdas ósseas aumentam o risco de fraturas dos quadris, vértebras e outros sítios entre os pacientes de gastrectomia, o que é um sério problema hoje em dia.

Postula-se que a perda óssea em pacientes submetidos à gastrectomia não é um resultado das deficiências dietéticas (por exemplo o cálcio) ou da falta de ácido gástrico ou Vitamina D. O mecanismo por trás da osteopenia originada pela gastrectomia é ainda desconhecido. Considera-se, 5 entretanto, que a causa primária da osteoporose seja as re-sínteses do colágeno ósseo após sua destruição maciça pelos osteoclastos. O principal componente no pró-colágeno ósseo é a prolina - os aminoácidos sintetizam-se no trato gastrintestinal a partir do AKG através do glutamato e através da prolina que, por sua vez, é transformada no pró-colágeno ósseo em 10 hidroxiprolina na presença de AKG, vitamina C e Fe2+. Foi recentemente mostrado que o AKG tem sido eficaz em prevenir a perda óssea em ratos submetidos à ovariectomia, e em ossos desnervados nos perus. Considerando-se tudo acima, o principal objetivo dos estudos foi investigar se a AKG dietética pode prevenir as perdas ósseas e das cartilagens em ratos submetidos 15 à gastrectomia.

Animais e procedimentos cirúrgicos

Quarenta ratos Sprague-Dawley fêmeas, com 10 semanas de idade (220 a 230 g), foram alojados em gaiolas Macrolon® (2 ratos em cada gaiola) e lhes foi dada uma dieta de pelotas alimentícias padrão para ratos 20 (Lactamin, Vadstena, Suécia) e veículo ou AKG *ad libitum* (à vontade) dissolvidos em água (Tabela 1). O estudo durou por 8 semanas. Os ratos foram pesados a cada semana.

Os ratos beberam entre 25 e 50 mililitros por dia. No princípio, pôde ser verificado que os ratos bebiam entre 10 e 20% do peso corporal.

25 Os ratos do grupo AKG beberam aproximadamente 25 ml de bebida de AKG por dia. Em 25 ml de bebida existe 0,36 g de AKG, o que dá aproximadamente 1 a 1,4 g de AKG por quilograma de peso corporal dos ratos e por dia. Os ratos no grupo de placebo (controle) beberam aproximadamente 50 ml de bebida de placebo por dia.

Cirurgia

Vinte ratos foram submetidos a gastrectomia e divididos em 2 grupos: Gx+AKG e Gx+Placebo (10 ratos em cada grupo). A porção glandular do estômago (isto é, a parte produtora de ácido, o fundo e o antró 5 pilórico) foi submetida à ressecção, após o que a parte não glandular (estômago anterior) foi unida com o duodeno de ponta-a-ponta. 20 ratos foram operados de forma fictícia e divididos entre 2 grupos: fictício+AKG e Fictício+Placebo (10 ratos em cada grupo). A operação fictícia envolveu uma 10 incisão abdominal mediana, manipulação do estômago e fechamento da incisão. A anestesia foi obtida por injeção subcutânea de Ketalar® (50 mg/kg; Parke-Davis, Morris Plains, NJ, U.S.A.) e Stresnil® (40 mg/kg; Janssen-Cilag Pharma, Viena, Áustria). A analgesia foi obtida por injeção subcutânea de Temgesic® (0,18 mg/kg; Schering-Plough, Kenilworth, NJ, U.S.A.). O tratamento foi iniciado dos grupos Fictício+Placebo e Gx+Placebo com 15 veículo, enquanto Fictício+AKG e Gx+AKG foram tratados com AKG.

Ratos Gx receberam a injeção por via intramuscular uma vez 20 semana sim, semana não (iniciando na primeira semana após a cirurgia), com 0,4 mg/kg de vitamina B₁₂ [Betolvex® 1 mg/ml, Dumex, Copenhague, Dinamarca] para compensar pela perda do fator intrínseco o qual é essencial para a absorção da vitamina B₁₂ e 20 mg de Fe³⁺/kg do complexo de hidróxido férrico polimaltose (Ferrum® 50 mg de Fe³⁺/ml, Vifor (International) Inc., St. Gallen/Suíça) como um suplemento para a fraca absorção antecipada de ferro, por causa da perda de ácido gástrico. Estas suplementações não tiveram efeito 25 sobre o desenvolvimento do peso corporal dos ratos que não haviam sofrido procedimentos cirúrgicos.

Durante a experiência, 8 animais morreram. O número final de animais (n) foi de 7 no grupo Fictício+Placebo, 10 no Fictício+AKG, 8 no Gx+Placebo e 7 no Gx+AKG.

Todos os ratos foram sacrificados por exsanguinação da aorta

abdominal sob anestesia como mencionado acima.

Os estudos foram aprovados pelo Animal Welfare Committee local, Lund, Suécia.

Coleta e análise de tecidos

As calvárias foram retiradas de cada rato por dissecação e desprovidas do tecido macio pela remoção do periósteo cuidadosamente. A secagem foi evitada pela cobertura de cada calvária com gaze embebida em solução salina e armazenando-as em um recipiente impermeável ao ar em +4 °C até o exame. Cada calvária foi colocada sobre uma placa de vidro no topo de uma fonte de luz (tubo fluorescente comercial), emitindo luz de intensidade constante. As imagens de transiluminação resultantes foram fotografadas pelo uso de uma câmara conectada a um microscópio de operação, ampliação de 16 vezes. As imagens foram submetidas a análise de computador histomorfométrica realizada por ImageJ v. 1.33a. O percentual de perda óssea (como área de lacunas observadas) foi estimado.

Tanto os fêmures quanto as tibias foram coletadas e armazenadas em 70% de etanol até outra análise.

Os fêmures e as tibias direitas foram submetidas a análise de PIXIMUS®, a qual deu a BMD em g/cm² e a BMC em g/cm³.

Os fêmures e as tibias esquerdas fixadas em etanol foram descalcificadas em ácido de nitrogênio a 7% por 48 horas. Os espécimes de fêmur distal e de tibia proximal (consistindo em epífise com 8 mm da parte da metáfise) foram usados para outros processos histológicos. Os espécimes foram imersos em parafina. As seções longitudinais dos espécimes de fêmur e tibia (6 µm de espessura) foram cortadas por micrótomo automático Microm HM 360. Vinte fatias (com intervalo de 20 µm após cada 5) por 1 osso de 1 indivíduo, foram cortadas. As fatias foram manchadas com hematoxilina/eosina sob condições padrão. Imagens microscópicas foram tomadas de cada fatia manchada. As

fotografias usadas para avaliar o osso trabecular foram tiradas com o uso de um microscópio óptico Nikon Eclipse E800, ampliação de 40 x e uma câmara fotográfica digital Nikon D70. As imagens microscópicas das seções do fêmur e da tíbia foram submetidas a análise de computador

5 histomorfométrica. As trabéculas foram analisadas com o uso de ImageJ v. 1,33a. As fotos usadas para avaliar a placa epifisária foram obtidas por meio da técnica de contraste Nomarski e coletadas por AXIOVERT 200 M equipada com uma cabeça de varredura a laser LSM 5 Pascal, Zeiss, ampliação de 100 vezes, com comprimento de onda de laser de argônio de

10 514 nm. A placa epifisária foi analisada com o uso da Análise v. 3.0. As imagens da cartilagem articular foram capturadas com o uso do modo fluorescente de AXIOVERT 200 M equipado com uma cabeça de varredura a laser LSM 5 Pascal, Zeiss, ampliação de 100 vezes, com comprimento de onda de laser de argônio de 514 nm. As gravuras da

15 cartilagem articular foram avaliadas pelo Zeiss LSM Image Examiner v. 3.1.0.99. Os parâmetros considerados, com respeito às trabéculas abaixo da placa epifisária, foram: o volume do osso trabecular (BV/TV%), medido para se obter as características do osso esponjoso, e as dimensões fractais trabeculares (Método de Contagem de Caixa). Os parâmetros com respeito à placa epifisária foram: número de células da cartilagem dentro

20 da ROI (Região de Interesse) consistindo da zona de Repouso, zona Proliferativa e zona da cartilagem Hipertrófica. A estimativa do conteúdo relativo de colágeno da cartilagem articular foi feita pela medição da intensidade da fluorescência do colágeno manchado com a eosina na ROI

25 de escolha aleatória (a mesma área para cada fatia - 6 círculos com 83 µm de diâmetro cada um, ao longo da cartilagem articular), com o nível cinzento de 12 bits do detector da cabeça de varredura a laser LSM 5 Pascal como uma escala de medição. As medições foram tomadas exatamente nas mesmas condições padrão para cada fatia.

Estatística

Os dados foram comparados com um meio de análise da variação (ANOVA), o teste-t de Student, e $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 Resultados

No final da experiência, a massa corporal dos animais cirurgicamente tratados foi 8% menos do que os operados ficticiamente. Não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 1).

10 *Transiluminação da calvária*

A transiluminação da calvária apresentou crescimento significativo, em percentual, das lacunas ósseas nos ratos Gx+placebo e Gx+AKG, em comparação com ratos Fictício+Placebo e Fictício+AKG (Figura 2). Os ratos Gx+AKG também apresentam um percentual significativamente menor das lacunas, em comparação com o grupo Gx+Placebo ($*p = 0,031$) (Figura 3). As diferenças entre Fictício+Placebo e Fictício+AKG não foram estatisticamente significativas.

Densidade Mineral Óssea (BMD) e/contendo de Mineral Ósseo (BMC) no fêmur e na tibia

20 A BMD e o BMC foram menores nos ratos Gx+Placebo e
Gx+AKG em comparação com os ratos Fictício+Placebo e Fictício+AKG
(dados não mostrados). Entretanto, a BMD no grupo Gx+AKG tendeu a ser
maior do que no Gx+Placebo ($p = 0,19$).

Histomorfometria

25 *Análise da cartilagem articular*

A quantidade de colágeno da cartilagem no grupo Gx+AKG foi semelhante àquela nos grupos de controle (operados por simulação) e foi significativamente mais elevada em comparação com o grupo Gx+Placebo (Tabela 2).

Análise da placa epifisária

A estimativa quantitativa das células da placa de crescimento epifisário apresentou um aumento no número de células no grupo Gx+AKG (tanto no fêmur quanto na tíbia) em comparação com Gx+Placebo. Além 5 disso o número de células da cartilagem no grupo Gx+AKG foi significativamente mais elevado do que em ambos os grupos Fictícios (Tabelas 3 e 4).

Volume do osso trabecular

O volume do osso trabecular decresceu nos ratos Gx+Placebo 10 e Gx+AKG, em comparação com os ratos Fictício+Placebo e Fictício+AKG. Entretanto, a redução da área das trabéculas no grupo Gx + AK foi menor do que no grupo Gx + Placebo (Tabelas 5 e 6).

Dimensão fractal das trabéculas ósseas

A dimensão fractal em Gx+AKG foi semelhante aos grupos de 15 controle e foi mais elevada do que no Gx+Placebo (Tabelas 7 e 8).

Discussão

O objetivo da experiência foi avaliar o efeito do α -cetoglutarato dietético sobre a perda óssea causada por gastrectomia. Os dados obtidos confirmam essa hipótese. De fato, o AKG dietético previu as 20 perdas dos ossos da cartilagem em ratos submetidos à gastrectomia. Nossos resultados acham-se de acordo com as experiências recentes mostrando que o AKG previne o desenvolvimento da osteoporose em ratos submetidos à ovariectomia e em mulheres pós-menopáusicas.

A gastrectomia causou a perda de colágeno da cartilagem e de 25 células da cartilagem nos ratos Gx+Placebo, mas não nos Gx+AKG. Mais 22% de células da cartilagem foram confirmados no grupo Gx+AKG do que no grupo Gx+Placebo. Isto indica que o AKG foi eficaz em prevenir a perda das células da cartilagem nos ratos submetidos à gastrectomia. A análise revelou um efeito protetor do AKG sobre o colágeno ósseo e da cartilagem. A

quantidade de colágeno no grupo Gx+AKG ficou dentro da faixa dos grupos de controle para a experiência e foi de cerca de 18% mais elevada do que nos ratos Gx+Placebo.

Um efeito protetor do AKG sobre o osso da calvária nos ratos 5 submetidos à gastrectomia foi observado. As calvárias dos ratos Gx+AKG apresentou 20% menos lesões do que aquelas dos ratos Gx+Placebo. Os valores da BMD e do BMC demonstraram que a gastrectomia causou osteopenia nos ratos Gx+Placebo e nos Gx+AKG, o que está de acordo com outras experiências. Entretanto, usando métodos histomorfométricos mais 10 sensíveis, nós mostramos que o AKG é possivelmente eficaz em prevenir a osteopenia nos ratos GX.

Além disso, o volume dos ossos trabeculares examinados apresentou 38% menos decréscimo nos ratos Gx+AKG em comparação com os animais Gx+Placebo. Além disso, a dimensão fractal das trabéculas no 15 grupo Gx+AKG apresentou quase o mesmo nível dos grupos operados por fictícios. Assim, o α -cetoflutarato de fato tem uma forte influência sobre a remodelação da estrutura das trabéculas ósseas.

A gastrectomia tem um forte efeito destrutivo sobre o esqueleto, causando osteopenia e artropatia. O AKG não pode interromper 20 totalmente estas lesões, mas ele definitivamente limitou as mudanças nos ossos e na cartilagem relacionadas à gastrectomia destrutiva profunda e, provavelmente, melhorou a remodelação do sistema esquelético. As implicações destas observações podem ser importantes para consideração clínica em seres humanos, por exemplo onde a gastrectomia parcial seja 25 recomendada para perda de peso em pacientes obesos. Todos estes pacientes desenvolvem osteoporoses e artropatia. Assim, pode-se considerar que o AKG dietético para estes pacientes pode interromper ou limitar estas mudanças ósseas destrutivas.

Tabela 1. Composição das bebidas de AKG e de placebo

Ingredientes	AKG (g/dm ³)	Placebo (g/dm ³)
AKG (α -ceto glutarato)	14,6	0
Ácido clorídrico HCl	0	3,32
Glicose C ₆ H ₁₂ O ₆	30,0	30,0
Sacarose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	15,0	15,0
Hidróxido de sódio NaOH	3,6	3,6
Hidróxido de potássio KOH	0,75	0,75
Hidróxido de cálcio Ca(OH) ₂	0,46	0,46
Hidróxido de magnésio Mg(OH) ₂	0,18	0,18
pH	4,6	4,6

Para se obter o mesmo nível de pH em cada solução, a bebida de Placebo foi titulada com HCl 0,1 M a pH 4,6 (o nível de pH da bebida de AKG).

5 **Tabela 2. Efeito do AKG e da gastrectomia sobre o conteúdo relativo de colágeno da cartilagem articular**

Tratamento	fluorescência	SD
Gx+AKG	2363 ^a	623
Gx+Placebo	1928 ^b	647
Fictício+AKG	2475 ^a	457
Fictício+Placebo	2171 ^a	374

Uma letra diferente fornecida com um resultado em uma coluna descreve diferença significativa quando $p < 0,05$

10 $n = 7$ em Gx+AKG, $n = 8$ em Gx+Placebo, $n = 10$ em Fictício+AKG, $n = 7$ em Fictício+Placebo

Tabela 3. Efeito do AKG e da gastrectomia sobre o número de condrócitos da placa epifisária dos fêmures

Tratamento	Número de células/mm ²	SD
Gx+AKG	2220 ^a	490
Gx+Placebo	1760 ^b	360
Fictício+AKG	1890 ^b	330
Fictício+Placebo	1850 ^b	220

Uma letra diferente fornecida com um resultado em uma coluna descreve diferença significativa quando $p < 0,05$

$n = 7$ em Gx+AKG, $n = 8$ em Gx+Placebo, $n = 10$ em Fictício+AKG, $n = 7$ em Fictício+Placebo

5 Tabela 4. Efeito do AKG e da gastrectomia sobre o número de condrócitos da placa epifisária das tibias

Tratamento	Número de células/mm ²	SD
Gx+AKG	2470 ^a	470
Gx+Placebo	1950 ^b	330
Fictício+AKG	1840 ^b	410
Fictício+Placebo	2110 ^b	340

Uma letra diferente fornecida com um resultado em uma coluna descreve diferença significativa quando $p < 0,05$

$n = 7$ em Gx+AKG, $n = 8$ em Gx+Placebo, $n = 10$ em Fictício+AKG, $n = 7$ em Fictício+Placebo

15 Tabela 5. Efeito do α -cetoglutarato e da gastrectomia sobre o volume do osso trabecular dos fêmures

Tratamento	Área das trabéculas (%)	SD
Gx+AKG	18,8 ^a	3,7
Gx+Placebo	11,2 ^b	2,1
Fictício+AKG	25,5 ^c	7,8
Fictício+Placebo	24,5 ^c	5,9

Uma letra diferente fornecida com um resultado em uma coluna descreve diferença significativa quando $p < 0,05$

25 $n = 7$ em Gx+AKG, $n = 8$ em Gx+Placebo, $n = 10$ em Fictício+AKG, $n = 7$ em Fictício+Placebo

Tabela 6. Efeito do α -cetoglutarato e da gastrectomia sobre o volume do osso trabecular das tibias

Tratamento	Área das Trabéculas (%)	SD
Gx+AKG	16,7 ^a	3,4
Gx+Placebo	10,5 ^b	2,5
Fictício+AKG	24,9 ^c	5,3
Fictício+Placebo	21,1 ^c	5,7

Uma letra diferente fornecida com um resultado em uma coluna descreve diferença significativa quando $p < 0,05$

10 $n = 7$ em Gx+AKG, $n = 8$ em Gx+Placebo, $n = 10$ em Fictício+AKG, $n = 7$ em Fictício+Placebo

Tabela 7. Efeito do α -cetoglutarato e da gastrectomia sobre a dimensão fractal das trabéculas dos fêmures

Tratamento	Dimensão Fractal [D]	SD
Gx+AKG	1,22 ^b	0,02
Gx+Placebo	1,19 ^a	0,03
Fictício+AKG	1,24 ^b	0,04
Fictício+Placebo	1,25 ^b	0,03

Uma letra diferente fornecida com um resultado em uma coluna descreve diferença significativa quando $p < 0,05$

20 $n = 7$ em Gx+AKG, $n = 8$ em Gx+Placebo, $n = 10$ em Fictício+AKG, $n = 7$ em Fictício+Placebo

Tabela 8. Efeito do α -cetoglutarato e da gastrectomia sobre a dimensão fractal das trabéculas das tibias

Tratamento	Dimensão Fractal [D]	SD
Gx+AKG	1,22 ^b	0,02
Gx+Placebo	1,17 ^a	0,02
Fictício+AKG	1,22 ^b	0,03
Fictício+Placebo	1,21 ^b	0,04

Uma letra diferente fornecida com um resultado em uma coluna descreve diferença significativa quando $p < 0,05$

$n = 7$ em Gx+AKG, $n = 8$ em Gx+Placebo, $n = 10$ em Fictício+AKG, $n = 7$ em Fictício+Placebo

5 Legenda das Figuras

Figura 1. Efeito do α -cetoglutarato dietético e da gastrectomia sobre os pesos corporais de ratos. Grupos de controle: Grupos Experimentais FICTÍCIO+PLAC, GX+PLAC: FICTÍCIO+AKG, GX+AKG (FICTÍCIO - ratos operados de forma simulada, GX - ratos submetidos à gastrectomia).

Figura 2: Fotos da calvária selecionadas dos animais analisados. Grupos de controle: FICTÍCIO+PLAC, GX+PLAC: FICTÍCIO+AKG, GX+AKG (FICTÍCIO - ratos operados de forma simulada, GX - ratos submetidos à gastrectomia).

Figura 3. Efeito do α -cetoglutarato dietético e da gastrectomia sobre a transiluminação da calvária. Grupos de controle: Grupos Experimentais FICTÍCIO+PLAC, GX+PLAC: FICTÍCIO+AKG, GX+AKG (FICTÍCIO - ratos operados de forma simulada, GX - ratos submetidos à gastrectomia).

$*p = 0,0288$

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um ácido alfa-cetoglúrico ou de um sal farmaceuticamente aceitável de ácido alfa-cetoglúrico, caracterizado pelo fato de ser para a manufatura de uma preparação farmacêutica para o tratamento ou profilaxia de debilitação da cartilagem em condições envolvendo perda de peso e/ou nutrição debilitada; má nutrição; gastrectomia, a gastrectomia parcial ou o bandeamento gástrico.
5
2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o ácido alfa-cetoglúrico ou um sal farmaceuticamente aceitável de ácido alfa-cetoglúrico é em uma mistura física farmacêuticamente aceita com pelo menos um aminoácido.
10
3. Uso de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o aminoácido é selecionado de: glutamina, ácido glutâmico, arginina, ornitina, leucina, isoleucina, lisina, prolina, isoleucina e
15 combinações dos mesmos.
4. Uso de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o sal farmaceuticamente aceitável do ácido alfa-cetoglúrico é um sal de álcali ou um sal de metal alcalino terroso ou uma combinação dos mesmos.
20
5. Uso de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o sal farmaceuticamente aceitável do ácido alfa-cetoglúrico é alfa-cetoglutarato de sódio.
6. Uso de amidas de ácido alfa-cetoglúrico e de um aminoácido, um dipeptídeo ou um tripeptídeo, caracterizado pelo fato de ser para a manufatura de uma preparação farmacêutica para o tratamento ou profilaxia de debilitação da cartilagem em condições envolvendo perda de peso e/ ou nutrição debilitada; má-nutrição; gastrectomia; gastrectomia parcial ou bandeamento gástrico.
25
7. Uso de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo

fato de que o aminoácido que forma a amida com o ácido alfa-cetoglutárico é selecionado de: glutamina, ácido glutâmico, arginina, ornitina, lisina, prolina, isoleucina e leucina.

8. Uso de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo
5 fato de que o dipeptídeo que forma a amida com ácido alfa-cetoglutárico é
dipeptídeo de glutamina e qualquer de: ácido glutâmico, arginina, ornitina,
lisina, prolina, isoleucina e leucina.

9. Uso de acordo com as reivindicações 1 a 8, caracterizado
pelo fato de que a dosagem dada a um paciente situa-se no intervalo de 1 a
10 1000 mg/kg de peso corporal/dia da substância.

10. Uso de acordo com as reivindicações 1 a 8, caracterizado
pelo fato de que a dosagem dada a um paciente situa-se no intervalo de 10 a
400 mg/kg de peso corporal/dia da substância.

11. Uso de acordo com as reivindicações 1 a 8, caracterizado
15 pelo fato de que a dosagem dada aos pacientes situa-se no intervalo de 10 a
100 mg/kg de peso corporal/dia da substância.

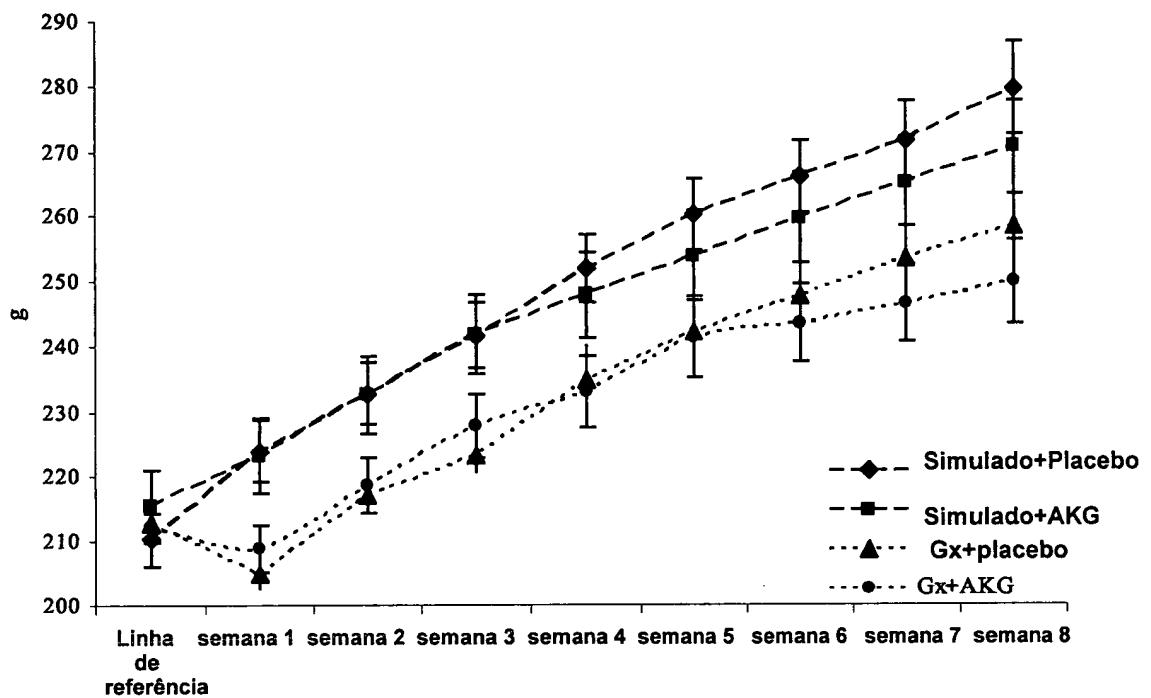


FIG 1.

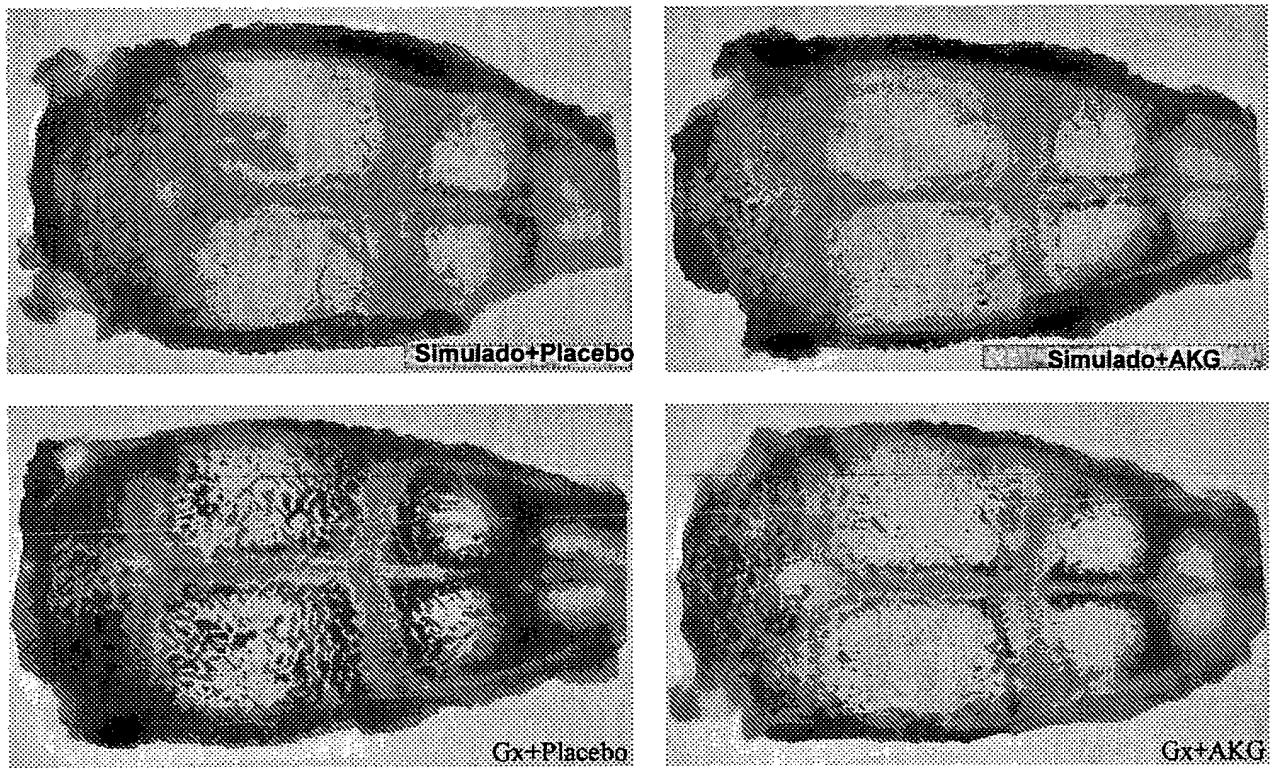


FIG. 2

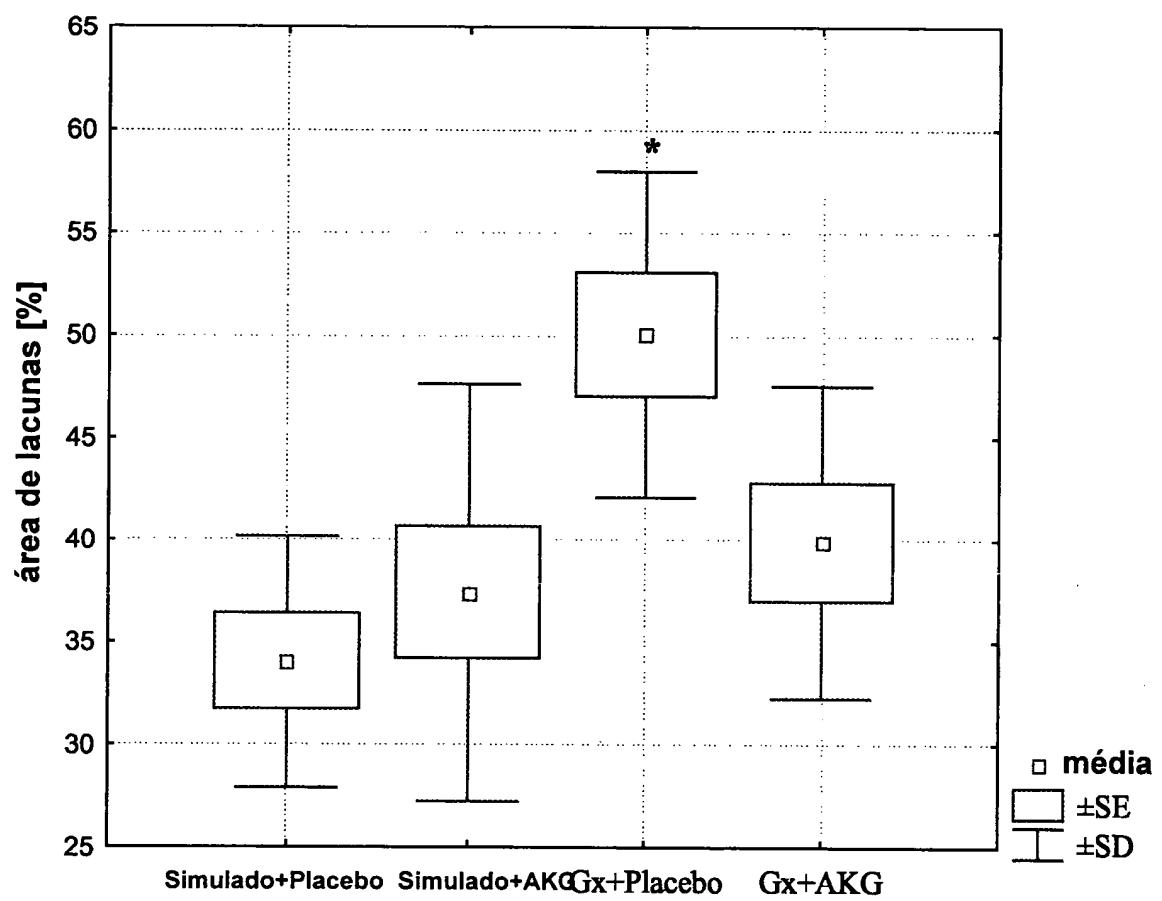


FIG. 3

RESUMO

“USO DE UM ÁCIDO ALFA-CETOGLUTÁRICO OU DE UM SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL DE ÁCIDO ALFA-CETOGLUTÁRICO”

5 Uso de uma substância para tratar de condições médicas das articulações, por exemplo artrose, artrite reumatóide e debilitação da cartilagem. O uso inclui o emprego de ácido alfa-cetoglutárico, glutamina ou ácido glutâmico, assim como sais, amidas, di- ou tripeptídeos das substâncias mencionadas.

A requerente apresenta novas vias das reivindicações para conformar o pedido com o Relatório Preliminar Internacional sobre Patenteabilidade.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma substância que inclui pelo menos um membro selecionado do grupo consistindo em ácido alfa-cetoglutárico, sais farmaceuticamente aceitáveis de ácido alfa-cetoglutárico e amidas de ácido alfa-cetoglutárico, misturas físicas farmaceuticamente aceitas de ácido alfa-cetoglutárico ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e pelo menos um aminoácido, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de uma preparação farmacêutica para o tratamento ou profilaxia de uma condição de debilitação inflamatória ou não inflamatória da cartilagem, ou outra condição articular.
5
2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido pelo menos um membro é selecionado do grupo consistindo em ácido alfa-cetoglutárico e sal do ácido alfa-cetoglutárico.
10
3. Uso de acordo com as reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo fato de ser para o tratamento ou profilaxia da artrose.
15
4. Uso de acordo com as reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo fato de ser para o tratamento ou profilaxia da artrite reumatóide.
20
5. Uso de acordo com as reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo fato de ser para o tratamento ou profilaxia da debilitação da cartilagem em condições que envolvam a perda de peso e/ou a nutrição debilitada.
25
6. Uso de acordo com as reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo fato de ser para o tratamento ou profilaxia da debilitação da cartilagem em condições que envolvam a gastrectomia, a gastrectomia parcial ou o bandeamento gástrico.
30
7. Uso de acordo com as reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo fato de ser para o tratamento ou profilaxia da debilitação da cartilagem em condições que envolvam a má nutrição.
35
8. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a dosagem dada a um paciente situa-
40

se no intervalo de 1 a 1000 mg/kg de peso corporal/dia da substância.

9. Uso de acordo com as reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a dosagem dada a um paciente situa-se no intervalo de 10 a 400 mg/kg de peso corporal/dia da substância.

5 10. Uso de acordo com as reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a dosagem dada aos pacientes situa-se no intervalo de 10 a 100 mg/kg de peso corporal/dia da substância.