



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 239 541**

② Número de solicitud: 200400619

⑤ Int. Cl.7: **A61K 31/568**

A61K 31/198

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **12.03.2004**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.2005**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.09.2005

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Murcia**
Avda. Teniente Flomesta
Edificio de la Convalecencia
30003 Murcia, ES

⑦ Inventor/es: **Cremades Campos, Asunción;**
Peñafiel García, Rafael y
Ruzafa López, Carolina

⑦ Agente: **Temño Cenicerros, Ignacio**

⑤ Título: **Potenciación de las acciones anabolizantes de los compuestos esteroideos por suplementos de arginina y/o sus precursores.**

⑤ Resumen:

Potenciación de las acciones anabolizantes de los compuestos esteroideos por suplementos de arginina y/o sus precursores.

Empleo de un compuesto seleccionado entra arginina, sus precursores, ornitina, citrulina, glutamina, sus sales y sus mezclas en la elaboración de una composición o un kit para potenciar, en un animal, la acción anabólica de un anabolizante administrado de forma conjunta o separada a dicho animal. En el caso de humanos tienen aplicación a individuos sanos que quieran aumentar su masa muscular, así como a pacientes con pérdida de masa muscular.

ES 2 239 541 A1

DESCRIPCIÓN

Potenciación de las acciones anabolizantes de los compuestos esteroideos por suplementos de arginina y/o sus precursores.

Campo de la invención

La invención se refiere al uso de compuestos para incrementar o modificar la masa muscular de un animal, especialmente para potenciar la acción de anabolizantes, y composiciones para tal fin.

Antecedentes de la invención

Los andrógenos son responsables del fenotipo masculino y de la regulación del crecimiento y diferenciación de diferentes tejidos extragenitales (Bardin y Catterall 1981). Los mecanismos moleculares por los que los andrógenos producen todos estos efectos no se conocen completamente (Sheffield-More 2000; Verhoeven and Swinmem 1999). Aunque se ha postulado que la unión de la hormona a su receptor en los tejidos diana es la responsable de los efectos a nivel génico producidos por la misma, otros factores como hormonas hipofisarias, factores de crecimiento tipo insulina, o otros moduladores de la fosforilación de proteínas pueden participar en la regulación de las acciones de los andrógenos (Brikman *et al* 1999; Jansson *et al* 1985; Hobbs *et al* 1993; Urban *et al* 1995.).

El crecimiento tisular está controlado por interacciones complejas de factores hormonales, genéticos y nutricionales, entre estos últimos los aminoácidos tienen un papel importante en la regulación de los genes implicados en el control del crecimiento corporal (Fafournoux *et al* 2000).

El incremento de la masa muscular tiene interés en la cría de animales, por ejemplo para aumentar el rendimiento físico o la producción de carne.

En el caso de humanos tiene interés para el tratamiento y recuperación de pacientes con atrofas, distrofias o pérdida de masa muscular, por ejemplo después de lesiones o intervenciones quirúrgicas o como consecuencia de la edad. También tiene aplicación en personas sanas como es el caso de deportistas que quieran aumentar capacidad.

La patente española ES 2096524 describe el uso de la N-gmonometil-l-arginina, para aumentar la capacidad de hacer ejercicio físico.

La solicitud de patente internacional WO 01 92330 describe el uso de la proteína ACRP30 para aumentar la masa muscular en pacientes o en personas sanas.

En ambos casos se trata de productos de difícil obtención. Aún subsiste la necesidad de proporcionar una composición con el efecto deseado sobre la masa muscular y que sea de fácil administración y producción.

Objeto de la invención

El objeto de esta invención es proporcionar una composición que aumente la masa muscular en un animal.

Sorprendentemente, hemos encontrado que la arginina y/o sus aminoácidos precursores (ornitina, citrulina y glutamina) potencian a nivel muscular los efectos anabólicos de un anabolizante (esteroideo).

Por lo tanto, se pueden emplear dichos compuestos (arginina y/o sus precursores + anabolizante esteroideo) en el tratamiento de pacientes con sepsis, traumas, quemaduras severas, SIDA y otras patologías que cursan con pérdidas severas de masa muscular y/o individuos sanos (deportistas, culturistas, etc.) para aumentar la masa muscular y/o para la recuperación muscular de dichos individuos.

Por lo tanto en un aspecto la invención comprende el empleo de un compuesto seleccionado entre arginina, ornitina, citrulina, glutamina y sus mezclas en la elaboración de una composición para potenciar, en un animal, la acción anabólica de un anabolizante administrado de forma conjunta o separada a dicho animal.

En otro aspecto la invención comprende el empleo de un compuesto seleccionado entre arginina, sus precursores y sus mezclas junto con un anabolizante esteroideo, preferentemente testosterona, en la preparación de un kit para el tratamiento de patologías que cursen con alteraciones del metabolismo de la arginina.

En un tercer aspecto, la invención comprende el empleo de un compuesto seleccionado entre arginina, ornitina, citrulina, glutamina y sus mezclas en la elaboración de una composición para aumentar o recuperar la masa muscular de un animal, en combinación con un anabolizante administrado de forma conjunta o separada a dicho animal.

Descripción detallada de la invención

L- Arginina es un aminoácido que participa en la regulación de múltiples procesos bioquímicos en los mamíferos. Además de estar implicada en el ciclo de la urea y la síntesis de proteínas, sirve como precursor de la síntesis de

aminoácidos, óxido nítrico, poliaminas, creatinina, agmatina y otros compuestos de tipo guanidino (Morris 1992; Morris 2002; Reyes *et al* 1994; Wu and Morris 1998; Barbul 1986).

5 En la mayoría de los mamíferos la arginina es considerada un aminoácido no esencial en individuos sanos adultos, ya que puede ser sintetizada en las células tubulares de riñón a partir de la citrulina generada a nivel intestinal (Dahanakati *et al* 1990). Sin embargo arginina puede considerarse un aminoácido esencial en mamíferos adultos en determinadas condiciones, así como en animales jóvenes o durante el crecimiento, cuando la síntesis endógena es inadecuada para los requerimientos titulares (Rose *et al* 1954; Visek 1986; Cynober *et al* 1995; Wu y Meininger 2002). Además, se ha demostrado que suplementos de arginina en la dieta pueden ser beneficiosos ya que este aminoácido
10 acelera el proceso de cicatrización de heridas, estimula al sistema inmunitario, aumenta el anabolismo proteico y puede mejorar a los pacientes con alteraciones cardiovasculares (Barbul 1986; Cui *et al* 1999; Shi *et al* 2000; Adjei *et al* 1995).

15 Los niveles de arginina en plasma están regulados por la arginina de la dieta, el turnover de proteínas, transporte, síntesis y catabolismo de arginina. La importancia relativa de estos procesos depende de diversos factores tales como la edad, especie o contenido de sal en la dieta. (Cynober *et al* 1995; Visek 1986; Kitiyakara *et al* 2001; Boger and Bode-Boger 2001). Mientras, la síntesis de arginina endógena tiene un papel importante en la regulación de la homeostasis de este aminoácido en algunos mamíferos durante el periodo neonatal y el crecimiento, el contenido de arginina en la dieta parece ser el principal regulador de los niveles de arginina en humanos (Wu and Knabe 1995; Castillo *et al*
20 1994). En roedores, se ha demostrado que la alimentación de animales adultos con una dieta deficiente en arginina disminuye sus concentraciones plasmáticas (Gross *et al* 1991). En un estudio reciente, nosotros hemos encontrado que en los ratones existe un marcado dimorfismo en los niveles de arginina en plasma, riñón y músculo esquelético, teniendo unos niveles más altos las hembras que los machos (Ruzafa *et al* 2003).

25 La presente invención demuestra la relación existente entre las acciones anabólicas producidas por un anabolizante como la testosterona a nivel muscular y su dependencia con las concentraciones de arginina en plasma. Tanto una disminución de arginina producida por restricción de este aminoácido en la dieta como una disminución de su síntesis endógena debida a una insuficiencia renal tienen capacidad para inhibir las acciones anabólicas de testosterona a nivel muscular.

30 Por lo tanto el empleo de citrulina, ornitina, glutamina o arginina asociadas a testosterona u otros anabolizantes en tratamientos de pacientes con quemaduras severas, sepsis, traumas u otras patologías donde se sepa que existen alteraciones del metabolismo de este aminoácido y requieran tratamiento con anabolizantes potencia la acción de dichos anabolizantes. El uso de esta asociación también será útil para potenciar las acciones anabólicas de testosterona y otros anabolizantes en deportistas y culturistas. Finalmente tiene interés en el caso de animales para incrementar la
35 producción de carne.

Así pues en un aspecto la invención consiste en el empleo de un compuesto seleccionado entre arginina, ornitina, citrulina, glutamina, sus sales y sus mezclas en la elaboración de una composición para potenciar, en un animal, la acción anabólica de un anabolizante administrado de forma conjunta o separada a dicho animal.

40 En otro aspecto la invención comprende el empleo de un compuesto seleccionado entre arginina, sus sales, sus precursores y sus mezclas junto con un anabolizante esteroideo, preferentemente testosterona, en la preparación de un kit para el tratamiento de patologías que cursen con alteraciones del metabolismo de la arginina. Detalles sobre la forma y administración del anabolizante y la arginina o sus precursores se comentan más adelante.

45 En un tercer aspecto, la invención comprende el empleo de un compuesto seleccionado entre arginina, ornitina, citrulina, glutamina, sus sales y sus mezclas en la elaboración de una composición para aumentar o recuperar la masa muscular de un animal, en combinación con un anabolizante administrado de forma conjunta o separada a dicho animal.

50 En una variante, el animal es un humano. En este caso puede ser un individuo sano (deportista o culturista) con el fin de aumentar su masa muscular. Los anabolizantes esteroideos presentan efectos secundarios y adversos. En este caso el uso de la arginina y sus precursores tiene la ventaja de potenciar la acción del anabolizante que podrá ser utilizado en concentraciones menores que si se administrara sólo.

55 Alternativamente puede ser un paciente, para recuperar, modificar o aumentar su masa muscular. Por ejemplo un paciente con sepsis, traumas, quemaduras severas, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, o condiciones patológicas que llevan asociada pérdida de masa muscular. También se puede tratar de un individuo con una concentración de arginina inferior a la de un individuo sano, por ejemplo como consecuencia un fallo renal.

60 En otra variante se trata de un animal no humano, para aumentar el rendimiento físico o para incrementar la producción de carne. La invención también permite reducir la cantidad de anabolizantes esteroideos utilizada habitualmente.

65 El anabolizante que se administra conjuntamente con la arginina, ornitina, citrulina, glutamina y sus mezclas puede ser administrado de forma subcutánea, intradérmica, implantes cutáneos, intramuscular u oral.

ES 2 239 541 A1

De forma preferente el anabolizante es testosterona. En una variante la testosterona se administra en una cantidad comprendida entre 25 - 600 mg de esteres de testosterona de acción prolongada semanalmente durante 3, 6, 8, 10, 20 y 32 semanas. Oxandrolona se administra en una cantidad comprendida entre 5-80 mg día durante 3,6,8,10, 20 y 32 semanas.

Preferiblemente el anabolizante se administra a intervalos. El intervalo depende del anabolizante utilizado pudiendo ser desde 48h -7-15 y 30. Para los implantes cutáneos puede ser de más días.

La composición que comprende un compuesto seleccionado entre arginina, ornitina, citrulina, glutamina y sus mezclas se administra de forma preferente por vía oral. En una variante forma parte de una composición farmacéutica.

Para la administración se prefieren cantidades diarias de hasta 15 g de arginina o el equivalente de sus precursores. Los suplementos de aminoácidos pueden estar comprendidos entre 0.1- 0.6 g/kg día durante los mismos periodos de la administración de los anabolizantes.

Ejemplos

Animales

Se utilizaron ratones Swiss jóvenes y adultos de ambos sexos mantenidos a 21-22°C y con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Los animales se alimentaron con dieta estándar y agua "ad libitum" excepto en los experimentos con dieta deficiente en arginina (ICN). Los animales se sacrificaron bajo anestesia con éter, obteniéndose la sangre por punción cardíaca, y los tejidos obtenidos se mantuvieron a -70°C hasta su análisis bioquímico. En todos los experimentos se cumplieron las normas del Real Decreto 223/1988 de 14 de marzo y la Orden del 13 de 1989 sobre protección de animales en la experimentación científica.

Los ratones hembras fueron nefrectomizados bajo anestesia con pentobarbital sódico (80 mg/kg, i.p) mediante una incisión dorsal de la piel y el peritoneo, accediendo al riñón izquierdo y seccionándolo.

Tratamientos

Administración de arginina o citrulina

La influencia de arginina y citrulina en las acciones anabólicas de testosterona se estudió mediante la administración de un pienso deficiente en arginina (ICN) suplementando el agua de bebida con arginina o citrulina (1 al 5%). El tratamiento se mantuvo durante 20 días. En animales alimentados con pienso estándar también se suplementó con arginina o citrulina al 2-5% el agua de bebida.

Administración de testosterona

Ratones Swiss CD1 de ambos sexos fueron tratados con propionato de testosterona (100mg/kg) mediante inyección subcutánea de la hormona disuelta en aceite de girasol. El tratamiento se realizó de forma crónica administrando la hormona cada 48 horas a lo largo de 15 o 20 días. Los animales controles fueron inyectados con vehículo sólo.

Determinaciones analíticas

1. - *Análisis de aminoácidos.* La determinación de los aminoácidos plasmática y tisular se realizó por medio de un autoanalizador de aminoácidos Rank Hilger Chromaspeck, equipado con una columna de intercambio iónico y detector de fluorescencia. La derivatización post-columna de los aminoácidos se realizó por reacción con oftaldialdehído. Las muestras se desproteinizaron con ácido tricloroacético al 5% y Norleucina se utilizó como estándar interno.

2. - *Determinación de testosterona.* La determinación de esta hormona se realizó mediante un método inmunoenzimático (ELISA/ competición con tecnología de estreptavidina).

Ejemplo 1

La disponibilidad de arginina en el ratón depende de su capacidad biosintética del eje intestino-renal como del aporte de dicho aminoácido por la dieta. En la tabla 1 mostramos cómo la limitación de arginina de la dieta produce una clara disminución del peso corporal en los machos (10%) y del peso renal (22%), lo que determina una disminución del cociente entre el peso de los riñones (peso relativo renal) de aproximadamente un 15%. Este mismo tratamiento no afecta al peso corporal ni renal en las hembras.

ES 2 239 541 A1

TABLA 1

Efecto de la arginina de la dieta en el peso corporal y renal del ratón macho

Tratamiento	Peso Corporal Inicial (g)	Final (g)	Δ Peso (g)	Peso Renal (mg)	Peso Relativo Renal	N
Control (macho)	40.8 ± 3.0	41.2 ± 3.2	0.3 ± 0.5	332 ± 35	16.3 ± 1.7	12
Deficiencia Arginina (macho)	42.0 ± 1.7	38.7 ± 3.2 ^a	-3.3 ± 0.7 ^b	260 ± 43	13.2 ± 1.6	12
Control (hembra)	29.4 ± 3.7	29.5 ± 3.5	0.1 ± 0.1	170 ± 23	10.9 ± 2.3	15
Deficiencia Arginina (hembra)	27.2 ± 2.7	28.1 ± 4.1	0.8 ± 0.6	159 ± 8.4	11.8 ± 0.3	12

Los valores se expresan como media ± DS; N = Número de animales. a) p<0.01 vs peso inicial; b) p<0.001 vs control.

Ejemplo 2

La deficiencia en arginina también produce una disminución significativa en las concentraciones plasmáticas y titulares de arginina en ambos sexos, mientras que únicamente produce una disminución significativa de ornitina y citrulina en las hembras (tabla 2) La alimentación con una dieta deficiente en arginina suplementada con 1% de arginina o citrulina revierte todos los cambios producidos por la deficiencia en arginina o citrulina revierte todos los cambios producidos por la deficiencia en arginina (datos no mostrados).

TABLA 2

Influencia de la arginina de la dieta en las concentraciones plasmáticas de aminoácidos

Aminoácido (mM)	Macho		Hembra		N
	Control	DA	Control	DA	
Arginina	0.108 ± 0.014	0.045 ± 0.003 ^a	0.152 ± 0.015 ^c	0.043 ± 0.005 ^a	8
Ornitina	0.081 ± 0.024	0.060 ± 0.016	0.116 ± 0.034 ^c	0.058 ± 0.006 ^b	8
Citrulina	0.064 ± 0.016	0.055 ± 0.012	0.123 ± 0.015 ^c	0.091 ± 0.009 ^b	8

Resultados son la media ± S.D. a) p<0.001 vs control; b) p<0.05 vs control c)p<0.01 vs machos DA; DA= Deficiencia en arginina; N= Número de animales

Ejemplo 3

La tabla 3 muestra como la alimentación con una dieta deficiente en arginina suplementada con 1% de arginina o citrulina revierte todos los cambios producidos por la deficiencia en arginina.

TABLA 3

Influencia de la arginina y citrulina de la dieta en el peso corporal y renal de ratones machos deficientes en arginina

Tratamiento	Peso Corporal		Δ Peso (g)	Peso Renal (mg)	Peso Relativo Relativo	N
	Inicial	Final				
Control	40.8 ± 3	41.2 ± 3.2	0.3 ± 0.5	332 ± 35	16.3 ± 1.7	12
DA	42.0 ± 1.7	38.7 ± 3.2 ^a	-3.3 ± 0.7 ^b	260 ± 43 ^b	13.2 ± 1.6 ^b	12
DA + 1% Arginina	37.0 ± 1.5	39.7 ± 0.9	2.7 ± 0.6	305 ± 32	16.2 ± 1.7	6
DA + 1% Citrulina	39.0 ± 2.2	42.0 ± 1.4	3.0 ± 0.5	357 ± 33	17.1 ± 0.9	6

Los animales después de 15 días de deficiencia en arginina fueron alimentados con el 1% de arginina citrulina en el agua de bebida durante 15 días. DA= Deficiencia en Arginina Los valores se expresan como la media ± .D.S a) p<0.01 vs peso inicial; b) p<0.001 vs control.

Ejemplo 4

Todos los datos obtenidos acerca de la influencia de la arginina de la dieta sobre el peso corporal y renal de los animales indican que este aminoácido ejerce un efecto anabolizante en el macho, lo que nos hizo pensar en una posible interacción entre arginina dietética y testosterona. En primer lugar especulamos con la posibilidad de que la arginina de la dieta pudiera estar disminuyendo la síntesis o liberación de testosterona por el testículo. Sin embargo la determinación de las concentraciones plasmáticas de testosterona entre machos y hembras con dieta conteniendo arginina o sin ella mostró que los niveles de testosterona, dentro de la gran variabilidad de este parámetro en ratón, no son afectados significativamente por la arginina de la dieta (7.1 ± 2.4 ng/ml para los controles frente a 6.4 ± 2.0 ng/ml para los machos deficientes en arginina).

La influencia de la arginina dietética sobre las acciones anabólicas de la testosterona fue estudiada mediante la administración de testosterona a ratones machos y hembras. La tabla 4 nos muestra como la arginina ejerce una clara influencia sobre el aumento del peso corporal y renal promovido por testosterona tanto en ratones machos como hembras. Tanto unos como otros, al ser alimentados con arginina y tratados con testosterona, aumenta significativamente su peso corporal y su peso renal. Estos resultados indican por tanto que la arginina exógena incrementa significativamente los efectos anabólicos de testosterona sobre el peso renal y corporal tanto en machos como en hembras. Esta tabla también nos muestra que la administración de testosterona y 1% de arginina o citrulina a animales alimentados con un pienso deficiente en arginina produce los mismos efectos anabólicos que los obtenidos cuando la testosterona fue dada a los animales alimentados con el pienso control.

TABLA 4

Influencia de la arginina de la dieta y de testosterona en el peso corporal y renal de ratones adultos

Tratamiento	Peso Corporal		Δ Peso (g)	Peso Renal (mg)	Peso Relativo Renal	N
	Inicial (g)	Final (g)				
Control (H)	29.7 ± 1.6	32.9 ± 1.5	3.2 ± 1.2	265 ± 15	16.0 ± 1.7	12
DA (H)	29.2 ± 1.3	28.8 ± 1.6	0.3 ± 0.7	233 ± 16	16.3 ± 1.7	8
DA + 1% Arg (H)	31.0 ± 2.2	33.8 ± 1.7	$3.4 \pm 1.1a$	319 ± 17.8	18.8 ± 0.5	5
DA + 1% Citr (H)	29.8 ± 0.8	32.7 ± 1.3	$2.9 \pm 1a$	314 ± 33	18.7 ± 2.1	5
Control (M)	36.4 ± 1.1	40.5 ± 2	4.1 ± 2	485 ± 56	23.9 ± 3	6
DA + (M)	38.5 ± 3.4	39.2 ± 4.5	0.7 ± 0.6	362 ± 84	17.7 ± 2.4	6
DA + 1% Arg (M)	36.4 ± 1.1	40.6 ± 1.2	$4.2 \pm 0.8a$	485 ± 80	23.9 ± 3.0	6

Todos los grupos excepto los controles fueron tratados con testosterona (T) 100 mg /Kg. s.c. cada 48 horas durante 15 días; Arg = Arginina al 1% en el agua de bebida durante 15 días; Citr= Citrulina al 1% en el agua de bebida durante 15 días; DA= Deficiencia en arginina; H= Hembras; M= Machos. Los valores se expresan como la media \pm D.S. a $p < 0.001$ vs deficiencia en arginina.

Ejemplo 5

Hemos estudiado la influencia de la restricción de arginina en la hipertrofia renal compensatoria inducida por la nefrectomía unilateral. La tabla muestra que el incremento de la masa relativa renal después de 15 días de nefrectomía en ratones hembras alimentados con 1% o 0% de arginina fue de 27% y 19% respectivamente. La administración de testosterona, inmediatamente después de la nefrectomía produce un incremento muy significativo de la masa renal que alcanza en ambos grupos valores del 76% y 69% respectivamente. Esta tabla también nos muestra que el incremento relativo de la masa renal fue mayor cuando testosterona fue administrada quince días después de la nefrectomía independiente de la cantidad de arginina en la dieta. Sin embargo en los animales nefrectomizados la administración de testosterona únicamente produce un aumento del peso corporal cuando la arginina estaba presente en la dieta y la hormona se administró quince días después de la nefrectomía, no encontramos aumento del peso corporal cuando testosterona se administró inmediatamente después de la nefrectomía. Estos resultados obtenidos en animales nefrectomizados ponen de manifiesto que las acciones anabólicas de testosterona a nivel muscular también se van a ver alteradas cuando la síntesis de arginina endógena se vea comprometida como consecuencia de una disminución de la masa renal. Nuestros resultados también demuestran que esta falta de efecto a nivel muscular en los animales nefrectomizados es transitoria y limitada al periodo durante el cual tiene lugar los mecanismos de hipertrofia en el riñón remanente o se normalizan los niveles de arginina en plasma por mecanismo no clarificados.

ES 2 239 541 A1

TABLA 5

Influencia de la nefrectomía en los efectos producidos por testosterona en ratones hembras

Tratamiento	Dieta	Peso Relativo Renal		Δ Peso (g)	N
		1st	2nd		
NF15	Estándar	11.3 \pm 1.1	14.4 \pm 2.2	0.2 \pm 0.6	12
NF15	DA	11.2 \pm 1.3	13.8 \pm 1.6	-1.1 \pm 0.8	12
(NF+T) 15	Estándar	11.7 \pm 0.8	20.5 \pm 1.5	0.1 \pm 0.1	6
(NF+T) 15	DA	11.6 \pm 0.7	19.5 \pm 1.6	-1.0 \pm 0.5	6
NF30+T15	Estándar	12.0 \pm 0.6	22.5 \pm 2.0	3.8 \pm 0.5	6
NF30+T15	DA	11.9 \pm 0.8	24.3 \pm 1.3	0.7 \pm 1.3a	6
Sham + T15	Estándar	-----	16.4 \pm 1.8	3.3 \pm 0.5	6

Los resultados se expresan como la media \pm DS, NF15=15 días después de la nefrectomía unilateral; DA= deficiencia en arginina; (NF+T) 15 = Testosterona 100 mg/Kg s.c cada 48 horas inmediatamente después de la nefrectomía durante 15 días; (NF30 + T) 15 = Testosterona 100 mg/kg s.c. cada 48 horas 15 días después de la nefrectomía durante 15 días; N= número de animales, a) $p < 0.01$ vs NF30+T15 y Sham +T15.

Ejemplo 6

En la tabla 6 puede observarse como cuando los animales son tratados con dosis farmacológicas de testosterona los efectos anabólicos máximos producidos por el andrógeno se obtienen con una concentración del 3% de arginina. Esta misma tabla nos muestra que los suplementos con arginina o citrulina a la hembra control en ausencia de testosterona no modifica el peso renal ni el corporal.

TABLA 6

Efectos de la suplementación con aminoácidos en el peso corporal y renal de ratones hembras

Tratamiento	Peso Corporal		Δ Peso (g)	Peso Renal (mg)	Peso Relativo Renal	N
	Inicial (g)	Final (g)				
Control	29.4 \pm 3.7	29.5 \pm 3.5	0.1 \pm 0.5	170 \pm 23	10.9 \pm 2.3	15
Control + 1% Citrulina	30.1 \pm 2.1	29.5 \pm 3.8	0.6 \pm 0.16	170.0 \pm 13	11.4 \pm 0.5	6
Control + 1% Arginina	30.2 \pm 2.7	29.8 \pm 3.2	0.4 \pm 0.2	169 \pm 25	11.1 \pm 1.3	6
Control + 2% Arginina	30.2 \pm 2.3	31.2 \pm 3.3	1.0 \pm 1.0	200 \pm 20	12.7 \pm 0.6	6
Control + Testosterona	29.7 \pm 1.6	32.9 \pm 1.5	3.2 \pm 0.44a	265 \pm 15	16.0 \pm 1.5	11
Control T + 2% Arginina	33.2 \pm 1.9	38.2 \pm 1.9	5.0 \pm 0.57a,b	321 \pm 29	17.3 \pm 2	6
Control + T + 5% Arginina	33.0 \pm 2.2	35.2 \pm 2.2	3.0 \pm 1a	295.5 \pm 28	17.8 \pm 2	6
Control + T + 2% Ornitina	33.6 \pm 1.5	36.8 \pm 0.8	3.2 \pm 0.83a	306.3 \pm 14	16.2 \pm 1	6

Ejemplo 7

Con la finalidad de comprobar si la interacción entre arginina y testosterona ocurría en otra especie, se realizaron una serie de experimentos en ratas Sprague Dawley hembras. Un grupo de ratas se trataron con testosterona a la misma

ES 2 239 541 A1

dosis que la utilizada en ratones y a otro grupo se les administró la hormona asociado a 1% de citrulina en el agua de bebida. Los resultados obtenidos que mostramos en la tabla 7 demuestran que también en esta especie la arginina aumenta las acciones anabólicas producidas por testosterona.

5

TABLA 7

Efectos de testosterona y citrulina en el peso corporal y renal de ratas hembras

Tratamiento	Peso Corporal			Peso Renal	Peso Relativo	N
	Inicial (g)	Final (g)	Δ Peso (g)	(mg)	Renal	
Control	278 ± 5	284 ± 6	6.6 ± 1.5	706 ± 32	5.06 ± 0.32	
Testosterona	255 ± 4	268 ± 2	11.0 ± 2a	925 ± 10	7.2 ± 04	
Testosterona + 1% Citrulina	275 ± 5	290 ± 6	15.3 ± 2.3 a b	1085 ± 93	7.8 ± 0.25	

10

15

20

Testosterona 100mg/kg s.c. cada 48 horas durante 15 días; Citrulina al 1% en el agua de bebida durante 15 días. Los resultados se expresan como la media la media ± DS a p<0.001 vs control; b p<0.05 testosterona.

25

Bibliografía

25

1. - **Adjei AA, et al.** Arginine supplemented diets inhibit endotoxin induced bacterial translocation in mice. *Nutrition*. 1995. 11:371 - 374.

30

2. - **Barbul A.** Arginine; biochemistry, physiology and therapeutic implications. *J. Paren. Ent. Nutr.* 1986. 10:227 - 238

3. - **Bardin CW, Catterall JF.** Testosterone. A major determinant of extragenital sexual dimorphism. *Science*. 1981. 211: 1285-1294

35

4. - **Boger RH, Bode-Boger SM.** The clinical pharmacology of L-arginine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001. 41: 79-99.

40

5. - **Brinkman AO, et al.** Mechanism of androgen receptor activation and function. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1999. 69:88-91.

6. - **Castillo L, et al.** Plasma arginine kinetics in adult man: response to an arginina-free diet *Metabolism*. 1994. 43:114-122.

45

7. - **Cui XL, et al.** Effects of dietary arginine supplementation on protein turnover and tissue protein synthesis in scald-burn rats. *Nutrition* 1999. 15:563-569.

8. - **Cynober L, et al.** Arginine metabolism in mammals. *J. Nutr. Biochem*. 1995.6:402-413.

50

9. - **Dhanakati SN et al.** Renal arginine synthesis: studies *in vitro* and *in vivo*. *Am .J. physiol. Endocrinol. Metab*. 1990. 259: E437-E442.

10. - **Fafournoux P, et al.** Amino acid regulation of gene expression. *Biocem J* 2000. 251:1.

55

11. - **Gross KL, et al.** Arginine-deficient diets alter plasma and tissues amino acids in young and aged rats. *J Nutr*. 1991. 121:1591 - 1599.

12. - **Hobbs CJ, et al.** Testosterone administration increase insulin-like growth factor-I levels in normal men. *J Cli Endocrinol Metab*. 1993. 77: 776-779.

60

13. - **Jansson JO, et al.** Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocr Rev*. 1985. 6: 128-150.

14. - **Kitiyakara C, et al.** Effects of dietary salt intake on plasma arginine. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp Physiol*. 2001. 280: R1069-R1075.

65

15. - **Morris SM. Jr.** Regulation of enzymes of urea and arginine synthesis. *Ann.Rev.Nutr.* 1992. 12:81 - 101.

ES 2 239 541 A1

16. - **Morris SM. Jr.** Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Ann. Rev. Nutr.* 2002;22:87-105.

17. - **Reyes AA, et al.** Role of arginine in health and renal disease. *Am. J. Physiol; Renal. Physiol*; 1994. 22:61-86

18. - **Rose WC, et al.** The amino acid requirements of man: the role of lysine, arginine and tryptophan. *J. Biol. Chem.* 1954. 206:421-430.

19. - **Ruzafa C et al.** Sexual dimorphism of arginine metabolism in mice: influence of dietary arginine. *J. Nutr. Biochem.* 2003. 14: 333-341.

20. - **Sheffield - Moore M.** Androgens and the control of skeletal muscle protein synthesis. *Ann Med* 2000;32:181-186.

21. - **Shi HP, et al.** Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Surgery* 2000. 128:374-378.

22. - **Urban RJ, et al.** Testosterone administration to elderly men increases skeletal muscle strength and protein synthesis. *Am J Physiol.* 1995 269 (Endocrinol Metab. 32): E820-E826.

23. - **Wu G. Knabe DA.** Arginine synthesis in enterocytes of neonatal pigs. *Am j Physiol* 1995. 269:R621 - R629.

24. - **Wu G, Morris SM Jr.** Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 1998;336:1-17.

25. - **Wu G, Meininger CJ.** Regulation of nitric oxide synthetase by dietary factors. *Ann. Rev. Nutr.* 2002. 22:61-86.

26. - **Verhoeven G, Swinnem JV.** Indirect mechanisms and cascades of androgen action. *Mol Cell Endocr* 1999. 151:205-212.

27. - **Vissek WJ.** Arginine needs, physiological state and usual diets; a reevaluation. *J. Nutr.* 1986. 116:36-46

ES 2 239 541 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Empleo de un compuesto seleccionado entre arginina, ornitina, citrulina, glutamina, sus sales y sus mezclas en la elaboración de una composición para potenciar, en un animal, la acción anabólica de un anabolizante administrado de forma conjunta o separada a dicho animal.
2. Empleo según la reivindicación 1, en el que el individuo es un humano.
- 10 3. Empleo según la reivindicación 2, en el que el individuo es un individuo sano, preferiblemente deportista o culturista, para aumentar su masa muscular.
4. Empleo según la reivindicación 2, en el que el individuo es un individuo con una concentración de arginina inferior a la de un individuo sano.
- 15 5. Empleo según la reivindicación 2, en el que el individuo es un individuo con deficiencia en masa muscular.
6. Empleo según la reivindicación anterior en el que el individuo es un paciente con sepsis, traumas, quemaduras severas, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, o condiciones patológicas que llevan asociada pérdida de masa muscular.
- 20 7. Empleo según la reivindicación 1, en el que el anabolizante es administrado de forma subcutánea, intradérmica, implantes cutáneos, intramuscular u oral.
- 25 8. Empleo según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el anabolizante es testosterona.
9. Empleo según la reivindicación 8, en el que la testosterona se administra a intervalos de tiempo de 48 horas o superiores.
- 30 10. Empleo según la reivindicación 8, en el que la testosterona se administra en una cantidad comprendida entre 25 - 600 mg de esteres de testosterona de acción prolongada semanalmente durante 3, 6, 8, 10, 20 y 32 semanas.
11. Empleo según las reivindicaciones 1-7, en el que el anabolizante es la oxandrolona u otros anabolizantes sintéticos.
- 35 12. Empleo según la reivindicación 11, en el que la oxandrolona se administra en una cantidad comprendida entre 5-80 mg día durante 3,6,8,10, 20 y 32 semanas.
- 40 13. Empleo según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la composición que comprende un compuesto seleccionado entre arginina, ornitina, citrulina, glutamina, sus sales y sus mezclas se administra por vía oral.
14. Empleo según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que la composición que comprende un compuesto seleccionado entre arginina, ornitina, citrulina, glutamina sus sales y sus mezclas es una composición farmacéutica.
- 45 15. Empleo según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que la composición que comprende un compuesto seleccionado entre arginina, ornitina, citrulina, glutamina, sus sales y sus mezclas es una composición seleccionada entre una composición alimenticia, un suplemento dietético y un líquido bebible.
- 50 16. Empleo de un compuesto seleccionado entre arginina, sus precursores, sus sales y sus mezclas junto con un anabolizante esteroideo, preferentemente testosterona, en la preparación de un kit para el tratamiento de patologías que cursen con alteraciones del metabolismo de la arginina.
- 55 17. Empleo de un compuesto seleccionado entre arginina, ornitina, citrulina, glutamina, sus sales y sus mezclas en la elaboración de una composición para aumentar o recuperar la masa muscular de un animal, en combinación con un anabolizante administrado de forma conjunta o separada a dicho animal.
- 60 18. Empleo según la reivindicación 1 o 17 en el que el animal es no humano.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 239 541

② Nº de solicitud: 200400619

③ Fecha de presentación de la solicitud: **12.03.2004**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: A61K 31/568, 31/198

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 20030119888 A1 (ALLEN) 26.06.2003	
A	US 5726146 A (ALMADA et al.) 10.03.1998	
A	US 5888553 A (GRANT et al.) 30.03.1999	
A	WO 02055020 A1 (TESTOCREME LLC) 18.07.2002	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

14.06.2005

Examinador

J. López Nieto

Página

1/1