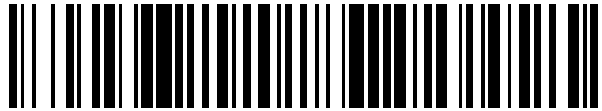


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 095**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/56 (2006.01)

A61K 31/592 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

A61P 21/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2010 E 10747526 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 2470214**

54 Título: **Método de tratamiento de la fragilidad**

30 Prioridad:

24.08.2009 EP 09168522

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

11.10.2013

73 Titular/es:

**ORGANEXT RESEARCH B.V. (100.0%)
Jansbuitensingel 7
6811 AA Arnhem, NL**

72 Inventor/es:

**PRINS, MARJANNA y
KLOOSTERBOER, HELENIUS JAN**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 425 095 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

Método de tratamiento de la fragilidad

5 **Sector de la invención**

La presente invención se refiere a la prevención y el tratamiento de la fragilidad en un paciente anciano. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica para su utilización en dicho método. La presente invención se refiere, particularmente, a una terapia de refuerzo de la recuperación para personas ancianas frágiles.

10

Antecedentes de la invención

La fragilidad es un síndrome clínico con síntomas tales como bajo peso corporal debido a pérdida involuntaria de peso, agotamiento, debilidad, lentitud al caminar y baja actividad física. La fragilidad se caracteriza por una reducida reserva y resistencia a factores estresantes, que a su vez resultan del empeoramiento acumulativo en múltiples sistemas fisiológicos, y que causan una vulnerabilidad a desenlaces adversos. Resistencia a insulina aumentada, síndrome metabólico y osteoporosis se cuentan entre estos.

15

Una definición utilizada ampliamente de este complejo síndrome geriátrico, según lo propuesto por Fried y otros, (2001) *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56: M146-M156, se basa en una evaluación de cinco características distintas. Se considera que un individuo es frágil si posee, como mínimo, tres de las siguientes cinco características: pérdida de peso involuntaria en el último año; debilidad de la fuerza de agarre; poca resistencia/agotamiento; lentitud; y bajo nivel de actividad física.

20

La fragilidad se ha asociado con cambios en biomarcadores como IL-6, CRP, 25-OH-vitamina-D, IGF-1, dímeros D y es, en particular, prominente en personas ancianas. En el contexto de la presente invención, los ancianos tienen particularmente una edad de 60 o más y, más particularmente, de 65 o más.

25

La fragilidad está asociada con una pérdida gradual de metabolismo de proteínas eficaz. A su vez, esto afecta a las tasas metabólicas, conduciendo a síndromes tal como los que se han mencionado anteriormente.

30

Un aspecto fundamental de la fragilidad es que afecta a la masa muscular y a la fuerza, conduciendo a una mayor incidencia de caídas y lesiones asociadas, como fracturas y movilidad alterada. Junto con la inmunidad reducida relacionada con la masa muscular, velocidades de cicatrización reducidas y deterioro mental, esto conduce a una pérdida de independencia.

35

Actualmente, no se ha registrado ningún tratamiento específicamente para el tratamiento de la fragilidad. Se han realizado ciertas investigaciones clínicas sobre el efecto de diversos tratamientos sobre síntomas individuales de fragilidad. Esto incluye, por ejemplo, el efecto de esteroides anabolizantes sobre la masa muscular, que es bien conocido por el experto en la materia.

40

Una referencia sobre el efecto del esteroide anabolizante oxandrolona sobre la masa muscular en hombres ancianos, es el documento Schroeder y otros, 2005 *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60: 1586-1592.

45

Bajas concentraciones de 25-OH-vitamina-D en suero, que es un marcador de la escasez de calcitriol, se encuentra habitualmente en ancianos y se ha descubierto que acompañan al desarrollo de síntomas de la fragilidad.

Una referencia que aboga por la terapia con vitamina D es el documento Campbell y Szoeki, *Journal of Pharmacy Practice and Research*, vol. 39, no. 2, junio de 2009, 147-151 que da a conocer una visión global de tratamientos farmacológicos alternativos de la fragilidad en ancianos. Un dicho tratamiento es aquel con vitamina D, al que se hace referencia con respecto a sus efectos sobre los huesos, músculos y el equilibrio. Otro dicho tratamiento es con hormonas anabólicas, pero se dice que este tratamiento no presenta ningún beneficio claro en ancianos frágiles. (Hedström y otros, 2002; Lyritis y otros, 1994).

50

Una referencia sobre terapias emergentes para tratar el síndrome de la fragilidad en ancianos, es el documento Cherniack y otros, *Alternative Medicine Review Volumen 12, Número 3 2007*, páginas 246-258. En este documento, el foco está sobre la suplementación nutricional con, por ejemplo, vitaminas, carotenoides, creatina, DHEA, o beta-hidroxi-beta-metilbutirato, y sobre modalidades de ejercicio (tai chi y caminar sobre adoquines). La suplementación con vitamina D se cita como un medio prometedor para aliviar componentes del síndrome de la fragilidad. Además, en referencia a las deficiencias de vitamina D que se producen frecuentemente en ancianos, se formula la hipótesis de que la suplementación con vitamina D podría prevenir la fragilidad.

55

60

El tratamiento combinado con decanoato de nandrolona, colecalciferol oral (Vitamina D₃), y suplementación con calcio en mujeres que se recuperaban de fractura de cadera demostró mejorar la DMO (densidad mineral ósea), la masa muscular y valores de marcha (Hedström y otros, *J Bone Joint Surg Br* 2002; 84: 497-503). El documento no aborda la fragilidad. Además, los sujetos vivían de forma independiente y tenían un estatus de IMC (índice de masa

65

corporal) promedio de 23 que indicaba que los sujetos en este estudio no eran frágiles. Aunque el estudio proporciona vitamina D junto con el esteroide anabolizante, la divulgación, diferente, por ejemplo, de la referencia Campbell y otros, anterior, refleja el conocimiento convencional de hacer hincapié en el papel de la vitamina D en relación con el hueso, y el papel del esteroide anabolizante en relación con el hueso y el músculo.

5 El tratamiento eficaz de los síntomas de la fragilidad es una necesidad médica insatisfecha real, dada la manera en la que se desarrolla la patofisiología y en la que el coste de atención sanitaria asociada aumenta.

10 En el alivio y la prevención de los síntomas de la fragilidad, se desea que más de los síntomas puedan ser tratados o prevenidos al mismo tiempo. En el tratamiento de la fragilidad, se desea proporcionar una única terapia que realmente trate la afección, y aspira particularmente a una capacidad funcional e independencia mejoradas, que son los criterios de valoración clínicos preferentes para pacientes ancianos. Una consecuencia típica de la fragilidad es que los pacientes están sometidos a una espiral descendente de empeoramiento, y se verán abocados de forma casi inevitable al ingreso en un centro de asistencia de larga duración. Se desea prevenir e invertir el, en caso contrario inevitable, empeoramiento adicional y permitir a los pacientes vivir independientemente durante un periodo de tiempo más largo. Esto es particularmente crítico para pacientes que se están recuperando después de una hospitalización, dado que esto es frecuentemente un punto de inflexión, en los ancianos frágiles, que conduce a estancias prolongadas en una residencia geriátrica (y empeoramiento adicional), en lugar de conservar la independencia (y recuperar actividad física y mental, conduciendo a una salud mejorada). Por lo tanto, se necesita intervención médica.

Características de la invención

25 Para abordar mejor uno o más de los deseos indicados, la presente invención, en un aspecto es el tratamiento o la prevención de la fragilidad en un paciente anciano, que tiene particularmente una edad de 60 o más, que comprende la administración parenteral concomitante de una dosis eficaz de una combinación de un esteroide anabolizante y un compuesto de vitamina D.

30 En otro aspecto, la presente invención presenta una composición que comprende un esteroide anabolizante y un compuesto de vitamina D para su utilización en el tratamiento de la fragilidad en un paciente anciano, que tiene particularmente una edad de 60 o más, que comprende la administración parenteral concomitante de dosis eficaces de un esteroide anabolizante y un compuesto de vitamina D.

35 En un aspecto adicional más, la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un esteroide anabolizante y un compuesto de vitamina D en un vehículo líquido adecuado para administración parenteral.

40 En otro aspecto más, la presente invención incluye un dispositivo de inyección para administración intramuscular de un líquido, en el que el líquido comprende un esteroide anabolizante y un compuesto de vitamina D en un vehículo líquido adecuado para administración parenteral.

Breve descripción de los dibujos

45 La figura 1 es un diagrama de barras que muestra el efecto de nandrolona y 1 α ,25-dihidroxitamina D3 (DHVD3) sobre el cambio en el porcentaje de células con expresión positiva del receptor de andrógenos (AR) en células de músculo esquelético humanas (células satélite), lote hSkMC2, después de 5 días de tratamiento con nandrolona y/o DHVD3. Se utilizó testosterona como referencia.

50 La figura 2 es análoga a la figura 1, mostrando los efectos sobre la expresión positiva del receptor de vitamina D (VD3R).

La figura 3 (a) y (b) son diagramas de barras que muestran el efecto de dos concentraciones de nandrolona y 1 α ,25-dihidroxitamina D3 (DHVD3) solas y el de sus combinaciones sobre la proliferación de células de músculo esquelético humanas (lotes hSkMC1 y 2) que se utiliza como medición para la masa muscular.

Descripción detallada de realizaciones

55 La presente invención se refiere al tratamiento de la fragilidad. El término “fragilidad” se define en el presente documento particularmente con referencia a la definición mencionada anteriormente (Fried y otros, 2001). Los pacientes a tratar serán generalmente seres humanos ancianos, tanto varones como mujeres, que habitualmente tienen una edad de 60 o más. Más particularmente, los pacientes tratados son ancianos que tienen una edad de 65 o más.

65 En un sentido amplio, la presente invención se basa en el reconocimiento de que los actuales estudios fragmentados orientados a síntomas individuales de fragilidad no son suficientes para conducir a un tratamiento real. La presente invención aborda la provisión de dicho tratamiento mediante una vía de administración específica de una combinación juiciosa de sustancias activas. Sin desear quedar vinculados por la teoría, los inventores creen que la

eficacia de la administración parenteral combinada de un esteroide anabolizante, preferentemente decanoato de nandrolona, y un compuesto de vitamina D, preferentemente vitamina D₃ (colecalfiferol) se basa en un efecto sinérgico entre los dos compuestos, particularmente sobre la masa muscular y la función muscular. Esta creencia se basa en la acción molecular de los receptores para los dos compuestos, y las rutas que los dos compuestos pueden activar en mioblastos/células satélite. Tanto el receptor de andrógenos como el receptor de vitamina D pertenecen a la familia de factores de transcripción nucleares, pero su modo de acción respectivo es bastante diferente. Se sabe que el receptor de vitamina D está implicado en la proliferación y la diferenciación celular. El receptor de andrógenos está implicado en el crecimiento celular. En combinación, por lo tanto, se cree que conducen a una estimulación más óptima del crecimiento de células musculares. Además, se cree que la administración de un esteroide anabolizante, de forma concomitante con un compuesto de vitamina D, afecta positivamente a la actividad del receptor de vitamina D. Y la vitamina D afecta positivamente al sistema neuromuscular.

La presente invención implica la administración parenteral concomitante de dosis eficaces de un esteroide anabolizante y un compuesto de vitamina D. La expresión "administración concomitante" se entiende bien en la técnica y generalmente se refiere a la administración de dos sustancias activas al mismo tiempo, o casi al mismo tiempo. En la presente invención, esto significa que ambos compuestos se administran en el mismo intervalo de tiempo. Por lo tanto, si uno de los compuestos es administrado cada día, el otro compuesto también es administrado cada día, el mismo día. Si uno de los compuestos es administrado cada semana, el otro compuesto también es administrado cada semana, en la misma semana. Si uno de los compuestos es administrado cada mes, el otro compuesto también es administrado cada mes, el mismo mes. Se entenderá que los términos "día", "semana" y "mes" no se refieren necesariamente a un día, semana o mes del calendario, sino a los intervalos de tiempo que tienen las longitudes respectivas. Preferentemente, ambos compuestos son administrados directamente uno detrás de otro y, más preferentemente, son administrados simultáneamente. De la forma más preferente, la administración simultánea se realiza a través de una única composición que comprende ambos compuestos.

La expresión "administración parenteral" se entiende bien en la técnica y, generalmente, se refiere a todas las vías de administración diferentes de a través del tracto gastrointestinal incluyendo, aunque sin limitarse a, administración intramuscular, intravenosa, subcutánea, transdérmica, transmucosal o por inhalación. En la presente invención, la administración parenteral es, preferentemente, inyección intramuscular o subcutánea.

En vista del grupo de pacientes tratados, los ancianos, la vía de administración más preferente es mediante inyección subcutánea. Los ancianos frecuentemente se caracterizan por tener poco músculo (particularmente si padecen fragilidad). Por otro lado, tienden a tener relativamente mucha piel, con muchos pliegues. Por lo tanto, especialmente en el tratamiento de la fragilidad, la inyección subcutánea presente una ventaja particular de ser mucho más fácil, y menos dolorosa para el paciente, que la inyección intramuscular.

Los compuestos se administran en dosis eficaces. La expresión "dosis eficaz" se entiende bien en la técnica. En farmacología, la dosis eficaz es la dosis media que produce el efecto deseado de un fármaco. La dosis eficaz se determina a menudo en base al análisis de la relación dosis-respuesta específica para el fármaco. La dosificación que produce un efecto deseado en la mitad de la población de ensayo se denomina como la DE-50, y esto se reconoce generalmente como una dosis eficaz. En el contexto de la presente invención, se considera que la dosis es eficaz si sirve para aliviar una pluralidad (es decir, dos o más) de los síntomas de la fragilidad. Las dosis eficaces preferentes sirven para tratar la afección de fragilidad, tal como puede evaluarse a través de biomarcadores adecuados y/o criterios de valoración clínicos adecuados. En el contexto de la presente invención, la expresión "dosis eficaz" se refiere a la dosis combinada de las dos sustancias activas. La dosis eficaz y el intervalo de la dosis a veces pueden seleccionarse de forma diferente entre pacientes varones y mujeres. Por ejemplo, las dosis de esteroides andrógenos anabolizantes pueden ser más elevadas en varones. Además, las mujeres tienden a padecer fragilidad a una edad inferior a los varones, y pueden requerir una terapia prolongada de dosis regulares, mientras que un varón que se vuelve frágil a una edad más avanzada puede requerir una terapia de refuerzo de la recuperación de corta duración y mayor potencia.

La combinación de sustancias activas de la presente invención comprende un esteroide anabolizante. La expresión "esteroide anabolizante" se entiende bien en la técnica como que es una clase de hormonas esteroideas relacionadas con la hormona testosterona. Para una revisión de esteroides anabolizantes, se hace referencia al documento A.T. Kicman, British Journal of Pharmacology (2008) 154, 502-521. Los esteroides anabolizantes generalmente tienen efectos anabolizantes y andrógenos solapantes y, por lo tanto, a menudo se denominan esteroides anabolizantes andrógenos (EAA). La relación andrógeno:anabolizante de un EAA es un factor importante cuando se determina la aplicación clínica de estos compuestos. Se entenderá que, en la presente invención, se desea que el efecto anabolizante (miotrófico), que promueve el crecimiento de células musculares, tenga preferencia sobre el efecto andrógeno. A este respecto, el esteroide anabolizante se selecciona preferentemente entre el grupo que comprende norboletona, oximetolona, oxandrolona, oximetolona, nandrolona y ésteres de las mismas. El esteroide anabolizante preferente para su utilización en la presente invención es nandrolona o un éster de la misma, de la forma más preferente decanoato de nandrolona.

Según la presente invención, se administra preferentemente decanoato de nandrolona (preferentemente mediante inyección intramuscular y más preferentemente mediante inyección subcutánea) una vez al mes, más

preferentemente una vez cada tres semanas, y de la forma más preferente cada semana. La cantidad de dosificación total administrada por intervalo de tiempo puede variar generalmente entre 15 mg, preferentemente 25 mg al mes y 600 mg, preferentemente 400 mg al mes. En el tratamiento de la fragilidad según la presente invención, es preferente que la dosis no sea demasiado baja. En vista de los inevitables efectos andrógenos, también es preferente que la dosis no sea demasiado alta. Las dosificaciones preferentes que son lo más bajas posible, y tan altas como sea necesario, varían a la semana entre 5 mg, preferentemente entre 10 mg y 150 mg, preferentemente 50 mg, o al mes entre 20 mg, preferentemente 40 mg y 600 mg, preferentemente 200 mg.

Si se utiliza otro esteroide anabolizante, los intervalos de dosificación preferentes son equivalentes a aquellos mencionados para decanoato de nandrolona. El experto en la materia está al tanto de cómo calcular las conversiones de dosificación entre diversos esteroides anabolizantes.

La combinación de sustancias activas de la presente invención comprende un compuesto de vitamina D. En el contexto de la presente invención, la expresión "compuesto de vitamina D" se refiere a vitamina D y las diversas formas de la misma, así como precursores y análogos de vitamina D. Esta clase de compuestos es bien conocida en la técnica. Preferentemente, el compuesto de vitamina D es una de las formas comunes de vitamina D, y se selecciona entre el grupo que comprende ergocalciferol, colecalciferol, calcidiol, calcitriol, doxercalciferol y calcipotrieno. La forma más preferente de vitamina D para su utilización en la presente invención es colecalciferol (vitamina D₃).

En la presente invención, es preferente administrar la vitamina D a una concentración de la dosis que conduce a un nivel en plasma por encima del asociado con carencia de vitamina D. La carencia de vitamina D se define, en general, como una concentración en plasma de 25-hidroxivitamina D de menos de 20 ng/ml (50 nmol/l). Las concentraciones en plasma > 140 nmol/l han sido asociadas con efectos adversos. Por lo tanto, la dosificación preferente del compuesto de vitamina D se selecciona para proporcionar un nivel en plasma de entre 50 y 70 nmol/l y 140 nmol/l.

Según la presente invención, el compuesto de vitamina D preferente colecalciferol se administra preferentemente (de la forma más preferente mediante inyección intramuscular) una vez al mes, más preferentemente una vez cada tres semanas, y de la forma más preferente cada semana. La dosificación para colecalciferol varía entre el equivalente parenteral de una dosis oral de 100-4000 IU/día o las dosis correspondientes por semana o mes. Sin embargo, sin posibles cantidades de dosificación parenteral de hasta 600000 IU (15 mg) de colecalciferol intramuscular.

Los compuestos mencionados anteriormente están comprendidos, preferentemente, en una única composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. Más preferentemente, esto se refiere a una composición farmacéutica que comprende un esteroide anabolizante y un compuesto de vitamina D, preferentemente la combinación de decanoato de nandrolona y colecalciferol, en un vehículo líquido adecuado para administración parenteral. El vehículo líquido preferentemente es un aceite, más preferentemente seleccionado entre el grupo que comprende aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón y aceite de sésamo.

Sin desear quedar vinculados por la teoría, los inventores creen que el hecho de que tanto el esteroide anabolizante como el compuesto de vitamina D (y particularmente tanto decanoato de nandrolona como colecalciferol) son solubles en aceite, puede contribuir a un efecto mutuamente beneficioso sobre la estabilidad de una preparación para inyección basada en aceite. Además, la combinación, en una única preparación para inyección, de los dos compuestos facilita la administración concomitante, es menos invasiva para el paciente, y sirve para abordar un mejor cumplimiento con el régimen de administración de ambos fármacos.

Se entenderá que las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender excipientes adicionales como se utilizan normalmente en dichas preparaciones. Los excipientes, aditivos, adyuvantes y similares para su utilización en formas de dosificación parenteral son conocidos por el experto en la materia, y no requieren elucidación en el presente documento.

En el tratamiento de la fragilidad, la composición de la presente invención se administrará generalmente durante un periodo, como mínimo, de 3 meses a 12 meses, preferentemente de 4 a 8 meses, y de la forma más preferente durante 6 meses. La presente invención da a conocer una nueva intervención médica en el tratamiento de la fragilidad en pacientes ancianos.

Aunque este tratamiento de la fragilidad no tiene precedentes, los inventores creen (sin desear quedar limitados por la teoría), que la intervención médica de la presente invención presenta beneficios adicionales.

Esto se refiere particularmente al punto de inflexión mencionado anteriormente, en el que un paciente anciano, que padece fragilidad, después de la hospitalización puede ya no ser capaz de conservar su independencia. Estancias prolongadas en residencias geriátricas, también con terapias físicas y mentales apropiadas, privan de forma inherente a estos pacientes de una importante herramienta en la prevención de una espiral descendente, en concreto, la independencia de vivir sus propias vidas, con actividad física y mental habitual en el día a día.

A este respecto, la presente invención se basa en el concepto de que la intervención médica adecuada en un paciente en dicho punto de inflexión, puede no solamente tratar la afección o fragilidad *per se*, sino que sirve para apoyar al paciente a conservar la independencia, y recuperar la actividad física y mental. Para apoyar de este modo a estos pacientes hacia una salud mejorada, la presente invención también proporciona una terapia de refuerzo de la recuperación para personas ancianas frágiles, particularmente después de la hospitalización o cirugía. En este aspecto de la presente invención, una dosificación relativamente alta de las dos sustancias activas, preferentemente decanoato de nandrolona y colecalciferol, se administra a una frecuencia relativamente alta, preferentemente cada semana, durante un periodo de tiempo que es lo suficientemente largo para proporcionar la acción farmacológica requerida, aunque lo suficientemente corto para considerarlo una terapia de refuerzo a corto plazo (para recuperar la independencia) en lugar de una medicación permanente (que reflejaría una dolencia crónica). Una duración preferente del tratamiento de refuerzo es de 4-8 meses, preferentemente 6 meses.

La presente invención también se refiere a la prevención de la fragilidad en pacientes que son propensos a volverse frágiles después de la hospitalización. Generalmente, estos pacientes estarán más allá de un estado de sarcopenia, y padecen una función inmunitaria reducida.

Es preferente que la terapia de refuerzo mencionada anteriormente se realice utilizando, durante cada administración, una única composición farmacéutica que comprende ambos compuestos.

Los dispositivos para la administración parenteral de los compuestos utilizados en la presente invención son conocidos por los expertos en la materia. En base a los equipos conocidos, la presente invención también se refiere a un dispositivo de inyección para administración intramuscular de un líquido, en el que el líquido es una composición según la presente invención, tal como se ha descrito anteriormente.

La presente invención se ilustra adicionalmente en lo sucesivo en el presente documento en referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, y las figuras adjuntas.

Los ejemplos son estudios *in vitro* que demuestran que la nandrolona y la $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 tienen un efecto sinérgico sobre la proliferación de células satélite musculares y, por lo tanto, sobre la masa muscular. La presente invención, apunta, por consiguiente, a dosis inferiores de decanoato de nandrolona utilizadas en seres humanos para conseguir el mismo efecto sobre la masa y/o la función muscular con la combinación como con decanoato de nandrolona solo. Esto sirve para abordar un mejor perfil de seguridad.

Ejemplo 1

Materiales y Métodos

Se obtuvieron dos lotes diferentes de células de músculo esquelético humanas o células satélite (hSkMC1 - obtenido de una mujer sana de 33 años de edad - y hSkMC2 - obtenido de una mujer sana de 64 años de edad) de PromoCell (Heidelberg, Alemania) y se cultivaron en matraces según las instrucciones del proveedor. Las células se recogieron y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta que se utilizaron para los experimentos. Las células no se utilizaron en un número de pase superior a 15. Para los experimentos, las células se cultivaron a 37°C y CO₂ al 5% a una densidad de 3.500-7.000 células/cm² en medio basal (PromoCell) más la adición de suero fetal bovino (FBS) (PAA, Alemania) tratado con carbón vegetal al 5% (Sigma-Aldrich) utilizando placas de 24 pocillos (Costar) hasta aproximadamente el 80% de confluencia. La nandrolona, testosterona y $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 se adquirieron de Sigma-Aldrich.

Para estudios del receptor, las células se cultivaron durante 5 días con la adición de nandrolona 1 μ M y 10 μ M (el metabolito activo de decanoato de nandrolona) o $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 1, 10 y 100 nM. Los protocolos de tinción del receptor de andrógenos y de vitamina D con la posterior visualización mediante métodos de citometría de flujo se derivaron de las publicaciones de Krishan y otros (2000) y Folgueira y otros (2000). El método que produjo los mejores patrones de tinción incluía fijación con formalina seguida por permeabilización con Tween 20 y tinción doble con anticuerpos primarios no marcados (anti-receptor de andrógenos (Epitomics) y anti-receptor de vitamina D (GeneTex) y anticuerpos secundarios marcados con fluoróforo (IgG de cabra anti-rata, conjugada con PE para teñir el receptor de vitamina D y de cabra anti-conejo, conjugada con FITC para teñir el receptor de andrógenos ambos de Rockland). La tinción con los dos anticuerpos secundarios solamente se utilizó como fondo. Los receptores Fc se bloquearon mediante incubación con tampón que contenía suero. Todas las soluciones contenían además Tween 20 (Sigma Aldrich) como detergente para mantener el estado permeabilizado de las células durante todo el experimento de tinción. La tinción en células no estimuladas y estimuladas se comparó determinando la intensidad de la tinción en las células así como la tinción en el % de células. Las mediciones se realizaron con un citómetro de flujo de dos colores (de tipo FC500 Cytomics de Beckman Coulter). El incremento del % de células teñidas más allá del punto establecido del marcador (en el 1% para la tinción de fondo) se determinó con y sin tratamiento hormonal.

Para estudios de proliferación, las células se cultivaron durante 8 días con nandrolona 100 y 1000 nM sola o $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 10 y 100 nM y las combinaciones de nandrolona y $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3. El medio y las

hormonas se sustituyeron el día 1, 4 y 7. La proliferación se midió utilizando el ensayo de la resazurina (Stern-Straeter y otros, 2008). El análisis estadístico de los datos de proliferación se realizó con el test t de Student.

Ejemplo 2

Estudios del receptor

La acción tanto de nandrolona como de 1 α ,25-dihidroxitamina D3 sobre las células depende de la presencia de sus receptores específicos. Los inventores investigaron, por lo tanto, la presencia tanto del receptor de andrógeno como el de vitamina en las células de músculo esquelético humanas utilizadas. Las figuras 1 y 2 muestran el efecto de nandrolona y 1 α ,25-dihidroxitamina D3 sobre el porcentaje de células en las que la expresión del receptor de andrógenos y vitamina D cambia en comparación con la tinción con anticuerpo secundario solo. En las células hSkMC2 se observan incrementos en el número de células con recepción de andrógenos y de vitamina D positivo, después de la exposición a nandrolona así como a 1 α ,25-dihidroxitamina D3. Los histogramas muestran también un incremento de la intensidad de la tinción en las células, lo que indica un incremento del número de receptores por célula, cuando ya contenían el receptor antes del tratamiento con hormonas. Estos resultados indican que más células se vuelven positivas al receptor de andrógenos y que también el número de receptores por célula se incrementa cuando eran positivas para el receptor antes del tratamiento. Los efectos en células hSkMC1 fueron menos pronunciados (no se muestran los datos).

Estos estudios del receptor muestran que tanto el receptor de andrógeno como el de vitamina D están presentes en células de músculo esquelético humanas y que la nandrolona y la 1 α ,25-dihidroxitamina D3 estimulan la expresión del receptor de la otra.

Ejemplo 3

Estudios de proliferación

El incremento del porcentaje de células positivas al receptor de andrógeno y al receptor de vitamina D mediante los dos compuestos, tal como se muestra en el ejemplo 1, indica que más células pueden responder potencialmente al tratamiento.

La proliferación de células de músculo esquelético humanas se utilizó como parámetro de respuesta para ensayar si la combinación de nandrolona y 1 α ,25-dihidroxitamina D3 tiene un efecto sinérgico sobre la masa muscular.

La figura 3 muestra (a) para células hSkMC1 ningún efecto sobre la proliferación mediante los compuestos individuales, pero cuando se combinó 1 α ,25-dihidroxitamina D3 con nandrolona se observó un efecto significativo para las 4 combinaciones ensayadas (P< 0,001 excepto para nandrolona 100 nM más 1 α ,25-dihidroxitamina D3 100 nM, que es significativo a P< 0,05). Para células (b) hSkMC2 las concentraciones más altas de 1 α ,25-dihidroxitamina D3 muestran un incremento de la proliferación y de nuevo las 4 combinaciones muestran un efecto significativo comparado con el control (P<0,05 excepto para nandrolona 100 nM más 1 α ,25-dihidroxitamina D3 10 nM, que es significativo a P< 0,001). Los incrementos de porcentaje sobre el control para los diversos tratamientos se presentan en la Tabla 1 a continuación. Para células hSkMC1 los incrementos para todas las combinaciones superan la suma de los incrementos para los compuestos individuales en la combinación. Esto demuestra el efecto sinérgico de la combinación de nandrolona más 1 α ,25-dihidroxitamina D3 sobre células de músculo esquelético humanas. Para células hSkMC2, se observan efectos sinérgicos en tres de las cuatro combinaciones ensayadas.

Tabla 1:

Incremento del porcentaje (% Δ) en la proliferación de células de músculo esquelético humanas (hSkMC1 y hSkMC2) mediante nandrolona y 1 α ,25-dihidroxitamina D3 (dhvit D3) solas y combinaciones de los dos compuestos comparadas con el control. Σ representa: la suma del % Δ de nandrolona sola más el % Δ de dhvit D3 sola tal como se utilizan en las diversas combinaciones.

	hSkMC1 % Δ	Σ	hSkMC2 % Δ	Σ
Nandrolona 100 nM	3		4	
Nandrolona 1000 nM	1		1	
dhvit D3 10 nM	1		1	
dhvit D3 100 nM	-5		8	
nandrolona 100 nM + dhvit D3 10 nM	12	4	11	5
nandrolona 100 nM + dhvit D3 100nM	11	-2	13	12
nandrolona 1000 nM + dhvit D3 10 nM	13	2	13	2
nandrolona 1000 nM + dhvit D3 100 nM	10	-4	15	9

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende un esteroide anabolizante y un compuesto de vitamina D en un vehículo líquido adecuado para administración parenteral.
2. Composición farmacéutica, según la reivindicación 1, en la que el esteroide anabolizante se selecciona entre el grupo que comprende oximetolona, oxandrolona, nandrolona y ésteres de las mismas, y preferentemente es decanoato de nandrolona.
- 10 3. Composición farmacéutica, según la reivindicación 1 ó 2, en la que el compuesto de vitamina D se selecciona entre el grupo que comprende ergocalciferol, colecalciferol, calcidiol, calcitriol, doxercalciferol y calcipotrieno.
4. Composición farmacéutica, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende de 5 a 600 mg de decanoato de nandrolona, y de 17,5 µg a 15 mg de colecalciferol.
- 15 5. Composición farmacéutica, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el vehículo líquido se selecciona entre el grupo que comprende aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón y aceite de sésamo.
- 20 6. Composición farmacéutica, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su utilización en la prevención de la fragilidad, particularmente como refuerzo de la recuperación en personas que están en un estado que supera la sarcopenia sin tener fragilidad.
7. Dispositivo de inyección para administración intramuscular de un líquido, que comprende un líquido que es una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 25 8. Composición que comprende un esteroide anabolizante y un compuesto de vitamina D para su utilización en el tratamiento de la fragilidad en un paciente anciano, que tiene particularmente 60 años o más, que comprende la administración parenteral concomitante de una dosis eficaz de una combinación de un esteroide anabolizante y un compuesto de vitamina D.
- 30 9. Composición para su utilización, según la reivindicación 8, en la que la administración se realiza, como mínimo, cada mes y, preferentemente, cada semana.
- 35 10. Composición para su utilización, según la reivindicación 8 ó 9, en la que la administración se realiza durante un periodo, como mínimo, de 3 meses, preferentemente de 6 meses.
- 40 11. Composición para su utilización, según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que el esteroide anabolizante se selecciona entre el grupo que comprende oximetolona, oxandrolona, nandrolona y ésteres de las mismas, y preferentemente es decanoato de nandrolona.
- 45 12. Composición para su utilización, según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en la que el compuesto de vitamina D se selecciona entre el grupo que comprende ergocalciferol, colecalciferol, calcidiol, calcitriol, doxercalciferol y calcipotrieno.
- 50 13. Composición para su utilización, según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en la que la administración se realiza mediante inyección parenteral de una formulación única que comprende tanto el esteroide anabolizante como el compuesto de vitamina D, preferentemente la combinación de decanoato de nandrolona y colecalciferol.
14. Composición para su utilización, según la reivindicación 13, en la que la formulación única comprende una dosificación de 5 a 600 mg de decanoato de nandrolona, y de 17,5 µg a 15 mg de colecalciferol.
- 55 15. Composición para su utilización, según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, como refuerzo de la recuperación en personas ancianas frágiles, particularmente después de hospitalización o cirugía.

Fig.1

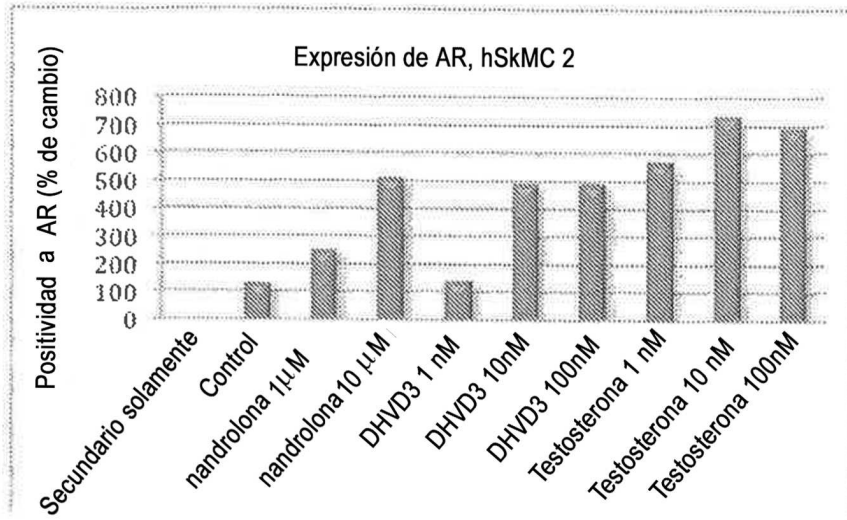


Fig.2

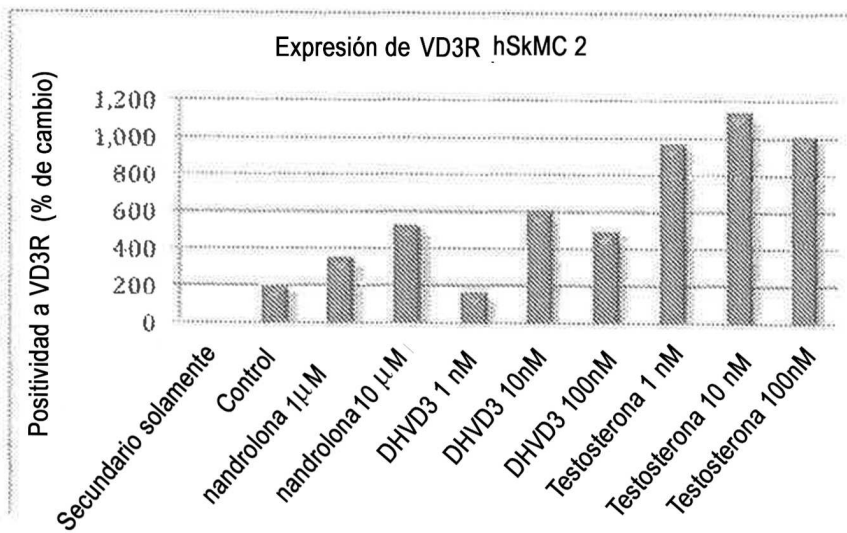
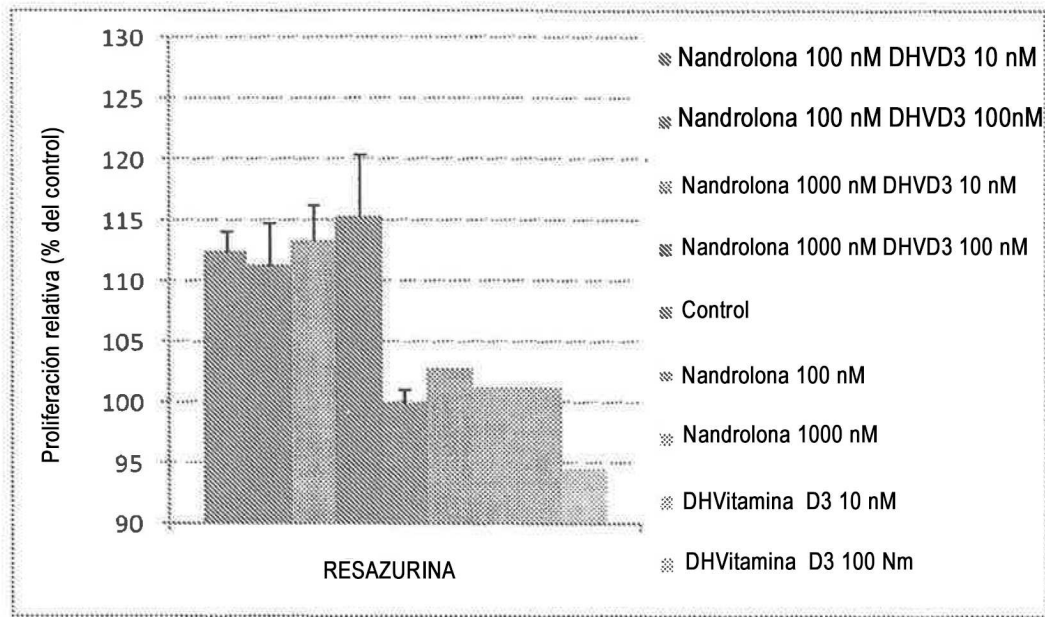


Fig. 3

(a)



(b)

