

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 761**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/593** (2006.01)

**A61K 31/59** (2006.01)

**A61P 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.02.2009 PCT/EP2009/051641**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2009 WO09101137**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2009 E 09710537 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2249842**

54 Título: **Uso de 25-hidroxi-vitamina D3 y vitamina D para afectar a la fisiología muscular humana**

30 Prioridad:

**13.02.2008 US 28510 P**

**26.02.2008 US 31671 P**

**14.03.2008 US 36924 P**

**15.03.2008 US 36928 P**

**06.06.2008 US 129139 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.02.2017**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)**

**Het Overloon 1**

**6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**BUCK, NEIL, ROBERT;**

**CLAERHOUT, WOUTER;**

**LEUENBERGER, BRUNO, H.;**

**STOECKLIN, ELISABETH;**

**URBAN, KAI y**

**WOLFRAM, SWEN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 599 761 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**

Uso de 25-hidroxi-vitamina D3 y vitamina D para afectar a la fisiología muscular humana

**CAMPO DE LA INVENCION**

- 5 La presente invención se refiere al uso de 25-hidroxitamina D3 (calcifediol, 25-OH D3) para aumentar o mantener la resistencia muscular, la función muscular, o ambas, en una persona de edad, una persona que sufre inmovilidad crónica o en una persona con deficiencia o insuficiencia de vitamina D. La vitamina D (colecalfiferol y/o ergocalciferol se utiliza junto con 25-OH D3.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

- 10 La vitamina D (p. ej., ergocalciferol y colecalfiferol) es un grupo de compuestos liposolubles definidos por su actividad biológica. Una deficiencia de vitamina D provoca raquitismo en niños y osteomalacia en adultos. Sin embargo, la toxicidad puede producirse después de la ingesta crónica de más de 100 veces la cantidad diaria recomendada (es decir, 5-15 µg o 200-600 UI de vitamina D) durante varios meses. Para la vitamina D, "El umbral de toxicidad es de 500 a 600 mcg/kg de peso corporal al día. En general, los adultos no deben consumir más de tres veces la RDA durante un periodo prolongado de tiempo" (Garrison y Somer, *The Nutrition Desk Reference, Tercera Ed.*, McGraw-Hill, pág. 82, 1997). La hipercalcemia puede producirse en una concentración en sangre de 25-  
15 hidroxivitamina D mayor que 375 nmol/L. Más recientemente, se identificó un nivel superior de seguridad de la vitamina D como al menos 250 µg/día (10.000 UI) (Hathcock et al. 85:6-18, 2007). La ingesta de un suplemento dietético de este tipo como ha demostrado dar como resultado una concentración en sangre de aproximadamente 200 nmol/L de 25-hidroxivitamina D.

- 20 La vitamina D es una prohormona que tiene que ser hidroxilada en el hígado para producir 25-hidroxivitamina D (calcifediol; 25-OH vitamina D, 25-OH D), que luego se somete a otra hidroxilación en el riñón y otros tejidos para producir 1,25-dihidroxivitamina D, la forma activa de la hormona de la vitamina D. 1,25-hidroxivitamina D se libera en la sangre, se une a la proteína de unión a vitamina D (DBP) y se transporta a los tejidos diana. La unión entre 1,25-  
25 dihidroxivitamina D y el receptor de la vitamina D permite que el complejo actúe como un factor de transcripción en el núcleo de la célula.

La deficiencia de vitamina D puede fomentar la resorción del hueso. También puede modular la función de los sistemas cardiovascular, inmunológico y muscular. Estudios epidemiológicos encuentran asociaciones entre la ingesta de vitamina D y su efecto sobre la presión arterial o el metabolismo de la glucosa. La actividad de la vitamina D está bajo el control de retroalimentación negativa por la hormona paratiroidea.

- 30 Tanto la vitamina D como 25-OH D3 se han administrado como productos farmacéuticos en el pasado. La vitamina D está, por supuesto, ampliamente disponible; 25-OH D3 se vendió previamente en los EE.UU. por Organon USA bajo el nombre de "CALDEROL", pero se encuentra actualmente en la lista de medicamentos de la FDA interrumpidos. Era una cápsula de gelatina que contiene aceite de maíz y 25-OH D3.

- 35 Una formulación líquida de 25-OH D3 se vende actualmente en España por FAES Farma bajo el nombre de "HIDROFEROL" en una disolución en aceite.

La combinación de vitamina D y 25-OH D3 se ha utilizado en la alimentación animal. 25-OH D3 para su uso en la alimentación está disponible comercialmente de DSM bajo el nombre "ROVIMIX HY-D".

- 40 Tritsch *et al.* (documento US 2003/0170324) describen una composición de premezcla de piensos de al menos 25-OH D3 en una cantidad entre 5% y 50% (p/p) disuelto en aceite y un antioxidante, un agente de encapsulación de gotitas de 25-OH D3 y aceite, y un aditivo nutricional (p. ej., la vitamina D3). La premezcla se puede añadir a los piensos para aves de corral, cerdos, animales caninos o felinos. Esta composición estabiliza 25-OH D3 frente a la oxidación.

- 45 Simoes-Nunes *et al.* (documento US 2005/0064018) describe la adición de una combinación de 25-OH vitamina D3 y vitamina D3 a piensos para animales. En particular, aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 100 µg/kg de 25-OH vitamina D3 y aproximadamente 200 UI/kg a aproximadamente 4.000 UI/kg de vitamina D3 se añaden a piensos para cerdos. Esta adición mejora la fortaleza de los huesos del cerdo.

Stark *et al.* (documento US 5.695.794) describen la adición de una combinación de 25-OH vitamina D3 y vitamina D3 a los piensos de aves de corral para mejorar los efectos de discondroplasia tibial.

5 Borenstein *et al.*, documento US 5.043.170 describe la combinación de vitamina D3 y 1-alfa-hidroxicolecalciferol o 1alfa, 25-dihidroxicolecalciferol para mejorar la resistencia del huevo y la resistencia de las patas en gallinas ponedoras y gallinas de mayor edad.

10 Chung *et al.*, documento WO 2007/059960 describe que cerdas alimentadas con una dieta que contiene tanto vitamina D3 como 25-hidroxivitamina D3 habían mejorado el estado general de salud, estructura corporal, el tamaño de la camada y la salud, y otros parámetros de producción. También se describe un complemento alimenticio humano 25-OH D3, pero su intervalo de dosificación, 5-15 microgramos por kg de peso corporal, que equivale a una dosificación diaria extremadamente alta de 300-900 microgramos por ser humano, es muy alto.

El documento PCT/EP08/006357 describe que la exposición prenatal de lechones a 25-OH D3 (por la alimentación de la cerda preñada) mejora el desarrollo muscular en la descendencia.

15 Sato *et al.* 2005 *Cerebrovasc Dis* 20:187-192 discute la terapia con vitamina D para la prevención de caídas en supervivientes de accidentes cerebrovasculares que eran deficientes en vitamina D. No hay mención alguna de la combinación de vitamina D con 25-OH D3.

Bischoff-Ferrari 2007 *Int. Congress Ser.* 1297:143-147 recomienda el uso de vitamina D para prevenir caídas y fracturas en última instancia, en los ancianos institucionalizados. No hay sugerencia alguna de la combinación de este con 25-OH D3.

20 Al leer y entender de los autores de la invención, la técnica anterior no enseña ni sugiere el uso de la combinación de 25-OH D3 y vitamina D como un medicamento para seres humanos para aumentar la resistencia muscular, la función muscular, o ambas. Otras ventajas y mejoras se describen a continuación o resultarán evidentes a partir de la descripción en esta memoria.

### **Sumario de la invención**

25 La invención proporciona el uso de 25-hidroxivitamina D3 ("25-OH D3") y vitamina D en la fabricación de un producto farmacéutico, producto nutracéutico, complemento alimentario o composición alimentaria para mantener o prevenir la pérdida de la función muscular o la resistencia muscular en un ser humano, en que el ser humano es una persona de edad, una persona que padece inmovilidad crónica independientemente de la edad, o una persona con deficiencia o insuficiencia de vitamina D.

30 Se ha encontrado, de acuerdo con esta invención, que el tratamiento diario o semanal con 25-OH D3 resulta sorprendentemente en mejoras de la resistencia y/o la función muscular en comparación con el consumo de dosis idénticas de vitamina D.

De acuerdo con la invención, 25-OH-D3 es útil como un medicamento para aumentar la resistencia y/o la función muscular en un ser humano. El medicamento comprende, además, vitamina D. También se describen formas y dosis de una composición farmacéutica, así como procedimientos para la fabricación de medicamentos.

35 Opcionalmente, la vitamina D3 se puede administrar junto con o por separado de 25-OH D3. Se puede administrar una vez al día, una vez a la semana o una vez al mes. Generalmente, el periodo de administración es de al menos un mes, preferiblemente de más de dos meses y más preferiblemente de al menos cuatro meses, de modo que se pueden observar claramente cambios en la resistencia muscular. La resistencia se puede medir utilizando ensayos reconocidos en la técnica tales como ensayos de resistencia del flexor y extensor de la rodilla.

40 En otro aspecto, se proporciona un método para aumentar la función del músculo mediante la administración de una cantidad eficaz de 25-OH D3 y vitamina D3. Opcionalmente, la vitamina D puede administrarse junto con o por separado de 25-OH D3. Se pueden administrar una vez al día, una vez a la semana o una vez al mes. La función muscular puede evaluarse mediante ensayos reconocidos en la técnica tales como la prueba repetida de postura sentada a postura de pie, y la prueba de levántate y anda.

45 En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica adecuada para uso humano, que comprende vitamina D3, 25-OH D3, y un soporte farmacéuticamente aceptable en cantidades de fortalecimiento muscular.

Además, se ha encontrado, de acuerdo con esta invención que la combinación de 25-OH D3 y vitamina D regula de forma sinérgica (ya sea regula al alza o regula a la baja) un cierto número sinérgico de genes del músculo esquelético que responden a la vitamina D, incluyendo un número alto de genes que no son sensibles a la presencia de vitamina D ni 25-OH D3 solo. Este es un resultado sorprendente, ya que no se explica por el actual modelo de metabolismo de la vitamina D, que postula que virtualmente toda la vitamina D se metaboliza en primer lugar en 25-OH D.

La combinación, de acuerdo con esta invención, proporciona dos ventajas significativas:

- 1) resulta en una respuesta rápida y sinérgica en plasma de 25-OH D
- 2) conduce a una meseta inesperadamente pronunciada y larga de los niveles en plasma de 25-OH D.

Estos son objetivos especialmente importantes del tratamiento de trastornos musculares que son la consecuencia de una deficiencia de vitamina D: una corrección rápida del estado de la vitamina D subóptima y una concentración en plasma larga y estable para garantizar un suministro suficiente de 25-OH a tejido muscular.

Otro aspecto de esta invención es un alimento, alimento funcional, nutracéutico o complemento alimenticio para su uso en el mantenimiento de la resistencia y la función muscular para el consumo humano que contiene una combinación de vitamina D y 25-OH D3.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1 muestra diagramas de Venn de conjuntos de sondas expresados diferencialmente para genes murinos para los grupos de extremidad posterior sin carga ("grupo HU") y de tratamiento (vitamina D3, 25-OH D3 o la combinación).

FIGURA 2 muestra diagramas de Venn de conjuntos de sonda expresados diferencialmente para genes entre el grupo de tratamiento 25-OH D3 y el grupo de tratamiento con la combinación de 25-OH D3 + vitamina D3.

FIGURA 3 muestra diagramas de Venn de conjuntos de sonda expresados diferencialmente para genes entre el grupo de tratamiento con vitamina D3 y el grupo de tratamiento con la combinación de 25-OH D3 + vitamina D3.

FIGURA 4 es un análisis de enriquecimiento (realizado con GeneGo MetaCore) de los 1745 conjuntos de sonda para genes expresados diferencialmente entre el grupo HU y el grupo que recibió un tratamiento de combinación de 25-OH D3 y vitamina D3.

FIGURA 5 muestra diagramas de Venn de conjuntos de sonda expresados diferencialmente en los conjuntos del grupo de tratamiento y de sonda 25-OH D3 + vitamina D3 para los genes seleccionados del músculo esquelético.

FIGURA 6 muestra diagramas de Venn de conjuntos de sonda expresados diferencialmente en los conjuntos del grupo de tratamiento y de sonda 25-hidroxivitamina D3 de los genes seleccionados del músculo esquelético.

FIGURA 7 muestra diagramas de Venn de los conjuntos de sonda expresados diferencialmente en los conjuntos del grupo de tratamiento y la sonda de vitamina D3 para genes seleccionados del músculo esquelético.

Tal como se utiliza en toda la memoria y las reivindicaciones, se aplican las siguientes definiciones:

"Vitamina D" significa cualquiera de vitamina D3 (colecalfiferol) y/o vitamina D2 (ergocalciferol). Los seres humanos son incapaces de producir vitamina D2 (ergocalciferol), pero son capaces de utilizarla como una fuente de vitamina D. La vitamina D2 puede ser sintetizada por diversas plantas y se utiliza a menudo en la vitamina D en complementos como un equivalente a la vitamina D.

"Metabolito de vitamina D" significa cualquier metabolito de la vitamina D que no sea 25-hidroxi-vitamina D3.

"25-OH D3" se refiere específicamente a 25-hidroxivitamina D3.

"25-OH D" se refiere al metabolito 25-hidroxilado de cualquiera de vitamina D2 o vitamina D3, que es la principal forma circulante en el plasma.

"Prevenir" se entiende que incluye mejora de la enfermedad, disminución de la gravedad de los síntomas, intervención temprana y el alargamiento de la duración del brote de la enfermedad, y no pretende limitarse a una situación en la que el paciente ya no es capaz de contraer la enfermedad ni experimentar síntoma alguno.

5 En otra realización, se proporciona un kit que se compone de múltiples dosis, separadas de la vitamina D o vitamina D3 junto con una dosis de 25-OH D3. Pueden estar encerradas en un recipiente: p. ej., una botella, blíster o soporte para viales. Además, se proporcionan en el kit instrucciones para administrar la composición como una dosis a un ser humano.

10 En otra realización, la 25-OH D3, sola o en combinación con vitamina D es el ingrediente activo para preservar la resistencia o función muscular sana en un alimento, alimento funcional, nutracéutico o complemento alimenticio adecuado para el consumo humano. Las dosificaciones de la 25-OH y/o D3 pueden ser las mismas que las presentes en el producto farmacéutico, pero preferiblemente tenderán hacia las zonas más bajas. Los complementos alimenticios y los productos nutracéuticos pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas u otras formas de dosificación convenientes. El alimento puede ser una bebida o comida y, si se desea, puede contener también otros compuestos nutricionalmente eficaces tales como otras vitaminas, minerales y similares.

15 La deficiencia de vitamina D es una afección especialmente frecuente en la población de edad avanzada y aquellos que padecen inmovilidad crónica independientemente de su edad. Esto puede ser debido a la falta general de exposición a la luz solar, una capacidad reducida del cuerpo para la fabricación de vitamina D o metabolizarla de manera eficiente, o un cierto número de otras causas. Una de las consecuencias de la deficiencia de vitamina D es una pérdida de resistencia y/o función muscular. Por lo tanto, un aspecto de esta invención es el uso de la combinación de vitamina D y 25-OH D3 en una población anciana para mantener, evitar la pérdida de y/o restablecer la resistencia y/o función muscular saludable. Tal como se usa a lo largo de esta memoria, la expresión "personas mayores" pretende abarcar aquellas personas que tienen más de 65 años de edad, preferentemente más de 70, e incluso más de 80.

25 En otra realización, esta combinación de 25-OH D3 y vitamina D es adecuado para mantener, evitar la pérdida de y/o restablecer la resistencia y función muscular saludable en personas que estén en riesgo de desarrollar condiciones de resistencia y/o función muscular caracterizadas por la deficiencia o insuficiencia vitamina D. Éstas incluirían especialmente los adultos, incluidas las mujeres post-menopáusicas (es decir, aproximadamente de 45 años de edad y mayores) y los hombres de aproximadamente 45 años de edad y mayores. Es especialmente adecuado para individuos que no reciben una gran cantidad de exposición a la luz solar natural tales como para las personas que tradicionalmente utilicen ropa larga, no salgan de casa regularmente, o que utilicen filtros solares cuando están expuestos a la luz solar, o vivan en zonas geográficas de manera significativa al norte o al sur del ecuador, en donde la luz solar es menos intensa.

35 La invención es útil en un método para mantener, evitar la pérdida de y/o restablecer la resistencia y función muscular saludable en un ser humano con un síndrome de mala absorción (p. ej., afectado por la enfermedad celíaca, esprúe o síndrome de intestino corto) y, con ello, están en riesgo de deficiencia de vitamina D mediante la administración de la combinación de vitamina D y 25-OH D3.

40 La invención es útil en un método para mantener, evitar la pérdida de y/o restablecer la resistencia y función muscular saludable en un ser humano con la función hepática deteriorada, en el que el ser humano no puede procesar la vitamina D en 25-hidroxivitamina D de manera eficiente, proporcionando al ser humano una combinación de vitamina D y 25-hidroxivitamina D3.

Las composiciones para uso de acuerdo con la invención también son beneficiosas para la retención de masa muscular en las personas de edad (de hasta 80 años) y los muy ancianos (de 80 o más años de edad), sobre todo los que están en los centros de atención institucionales (p. ej., hospital, asilo, clínica de rehabilitación, atención domiciliaria de mayores), o aquellos con atrofia muscular.

45 En otra realización, 25-OH D3 y vitamina D3 para uso de acuerdo con la invención mantienen o previenen la pérdida de la resistencia muscular en los ancianos. La pérdida de resistencia muscular es también una causa principal de caídas en los ancianos y puede contribuir al elevado número de caídas que se producen en el hospital. Para una persona mayor que ha disminuido las reservas fisiológicas, pero aún puede realizar las actividades diarias (tales como caminar, bañarse y funciones para ir al baño), las pérdidas aceleradas de la resistencia muscular después de incluso unos pocos días de reposo en cama pueden resultar en una pérdida prolongada de la función independiente. Incluso si esta pérdida es finalmente invertida, la rehabilitación requiere una intervención extensa y costosa porque el reacondicionamiento de los músculos lleva considerablemente más tiempo que el proceso de pérdida de acondicionamiento.

Las composiciones para uso de acuerdo con la invención también son beneficiosas para la retención y/o el aumento de la masa muscular en personas que pueden no ser de edad, pero que pierden masa muscular debido a que están inmovilizados debido a otra afección. Según se explica por el *Merck Manual of Geriatric*, 2ª Ed: (págs. 316-318): con una inactividad completa, la resistencia muscular disminuye un 5% al día. Incluso los hombres jóvenes en reposo en cama pierden resistencia muscular a un ritmo de 1,0% a 1,5% al día (o alrededor del 10% a la semana).

Por lo tanto, las composiciones para uso de acuerdo con esta invención son beneficiosas para las personas que están sujetas a una pérdida de masa muscular debido a la disminución de la movilidad, o incluso que son inmóviles. La causa de la disminución de la movilidad no importa en la práctica de esta invención, ya que el objetivo aquí es el de proteger contra la pérdida de masa muscular. Por ejemplo, la pérdida de movilidad puede ser desde trauma, apoplejía, estar escayolado, la enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, miastenia grave, o incluso la enfermedad de Creutzfeldt-Jacobs. Así, otro aspecto es administrar los compuestos para uso de acuerdo con esta invención a un individuo parapléjico, o a un individuo tetrapléjico.

La composición para uso de acuerdo con esta invención también es beneficiosa para los que sufren de caquexia o sarcopenia. La caquexia es un síndrome de "pérdida de cuerpo" que es una co-morbilidad con el cáncer y el SIDA. Otros síndromes o afecciones que pueden inducir una atrofia del músculo esquelético son la enfermedad cardíaca congestiva, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad del hígado, el hambre, quemaduras, etc. La sarcopenia es otra afección (distinta de la caquexia y atrofia), que se refiere a una disminución relacionada con la edad en la función del músculo. La causa exacta es desconocida.

Esta invención se refiere también a beneficiar a aquellos con debilidad muscular. La debilidad muscular es la parte física de la fatiga (médica). Los puntos de debilidad muscular son centrales, neurales y periféricos. La debilidad muscular central es un agotamiento general del cuerpo entero, mientras que la debilidad periférica es un agotamiento de los músculos individuales. La debilidad neural es en algún punto entremedia.

La debilidad muscular puede ser debida a problemas con el suministro de los nervios o problemas con el músculo en sí. La última categoría incluye polimiositis y otros trastornos musculares, p. ej., esclerosis lateral amiotrófica, botulismo, miopatía centronuclear, miopatía miotubular, disautonomía, Charcot-Marie-Tooth, hipocalcemia, enfermedad de las neuronas motoras, distrofia muscular, distrofia miotónica, miastenia grave, atrofia muscular progresiva, atrofia muscular espinal, parálisis cerebral, mononucleosis infecciosa, herpes zoster, deficiencia de vitamina D, fibromialgia, enfermedad celíaca, hipercortisolismo (síndrome de Cushing), hipocortisolismo (enfermedad de Addison), hiperaldosteronismo primario (síndrome de Conn), y diarrea.

### 30 Formas de Dosificación

La vitamina D y 25-OH D3 se pueden obtener de cualquier fuente, y una composición de las mismas se puede preparar utilizando una tecnología conveniente. En general, cristales de vitamina D3, 25-OH D3, o ambos (por separado o juntos) se disuelven en un aceite con calentamiento y agitación. Preferiblemente, el aceite se transfiere a un recipiente y se calienta. Después de ello, la vitamina D3, 25-OH D3, o ambos se añaden al recipiente, mientras que se mantiene la temperatura del aceite o se aumenta con el tiempo. La composición se agita para disolver los cristales de vitamina D3, 25-OH D3, o ambos. Antes de la adición al aceite, los cristales pueden reducirse en tamaño mediante molienda y/o tamizado, para mejorar la disolución. La composición puede ser agitada por agitación, rotación del recipiente, mezcladura, homogeneización, recirculación o tratamiento con ultrasonidos. Preferiblemente, el aceite se puede calentar en el recipiente a una temperatura de aproximadamente 80°C a aproximadamente 85°C, los cristales de tamaño se introducen en el recipiente y los contenidos se agitan para disolver los cristales en el aceite.

El "aceite" puede ser cualquier aceite comestible, lípidos, o grasas: p. ej., aceite babasu, aceite de coco, aceite de corozo, sebo de murumuru, aceite de almendra de palma o aceite de tucum. El aceite puede ser natural, sintético, semisintético, o cualquier combinación de los mismos. El aceite natural puede derivarse de cualquier fuente (p. ej., animal, vegetal, hongos, marino); aceite sintético o semisintético puede ser producido mediante una tecnología conveniente. Preferiblemente, el aceite es una mezcla de triglicéridos de cadena media de vegetales, principalmente ácidos caprílico y cáprico. La composición puede contener opcionalmente uno o más de otros ingredientes adecuados tales como, p. ej., un antioxidante farmacéuticamente aceptable, conservantes, agentes de disolución, tensioactivos, agentes de ajuste del pH o tampones, humectantes, y cualquier combinación de los mismos. Los anteriores son ejemplos de soportes farmacéuticamente aceptables.

Antioxidantes adecuados incluyen tocoferol, tocoferoles mixtos, tocoferoles de fuentes naturales o sintéticas, hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), antioxidantes naturales tales como extracto de romero, galato de propilo y cualesquiera otros que se utilizan en la fabricación de productos farmacéuticos para seres

humanos. Preferiblemente, el antioxidante es tocoferol. Conservantes adecuados incluyen metilparabeno, propilparabeno, sorbato de potasio, benzoato de sodio, ácido benzoico y cualquier combinación de los mismos. Agentes de disolución adecuados incluyen disolventes inorgánicos u orgánicos: p. ej., alcoholes, hidrocarburos clorados, y cualquier combinación de los mismos. Los tensioactivos adecuados pueden ser aniónicos, catiónicos o no iónicos: p. ej., palmitato de ascorbilo, polisorbatos, polietilenglicoles, y cualquier combinación de los mismos. Agentes o tampones de ajuste del pH adecuados incluyen ácido cítrico-citrato de sodio, ácido fosfórico-fosfato de sodio, ácido acético-acetato de sodio, y cualquier combinación de los mismos. Humectantes adecuados incluyen glicerol, sorbitol, polietilenglicol, propilenglicol, y cualquier combinación de los mismos.

Una vez formada, la composición de aceite se puede incorporar en otras diversas composiciones útiles, algunas de las cuales se discuten a continuación. Por ejemplo, pueden formarse emulsiones que pueden estar opcionalmente encapsuladas o secadas por pulverización. Se puede preparar una diversidad de emulsiones mediante la combinación de las composiciones no acuosas descritas anteriormente con una composición acuosa. La emulsión puede ser de cualquier tipo. Emulsiones adecuadas incluyen emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, emulsiones anhidras, emulsiones sólidas y microemulsiones. Las emulsiones se pueden preparar por cualquier tecnología conveniente. La emulsión contiene una composición acuosa y una composición no acuosa (p. ej., aceite), en donde esta última comprende vitamina D3, 25-OH D3, o ambas (por separado o juntas) disueltas en un aceite en una cantidad de entre aproximadamente 3% y aproximadamente 50% en peso basado en el peso total de la composición de aceite. Tal como se utiliza en esta memoria, "composición acuosa" y "fase acuosa" se utilizan indistintamente. En general, la emulsión puede contener de aproximadamente 20% a aproximadamente 95% de una composición acuosa, y de aproximadamente 5% a aproximadamente 80% de una composición no acuosa. Preferiblemente, sin embargo, la emulsión contiene de aproximadamente 85% a aproximadamente 95% (vol./vol.) de una composición acuosa, y de aproximadamente 5% a aproximadamente 15% (vol./vol.) de una composición no acuosa. Convenientemente, la composición no acuosa se puede dispersar en forma de gotitas en la composición acuosa. Por ejemplo, las gotitas pueden tener un diámetro medio de menos de aproximadamente 500 nm en la composición acuosa. Convenientemente, las gotitas tienen un diámetro medio de entre aproximadamente 150 nm y aproximadamente 300 nm.

En una realización particularmente ventajosa, la emulsión contiene un agente de encapsulación, que facilita la encapsulación de la composición de aceite tras el procesamiento posterior de la emulsión (p. ej., mediante secado por pulverización). El agente encapsulante puede ser cualquier sustancia comestible capaz de encapsular la composición de aceite. Preferiblemente, el agente de encapsulación es predominantemente un material coloidal. Tales materiales incluyen almidones, proteínas de fuentes animales (incluyendo gelatinas), proteínas de fuentes vegetales, caseína, pectina, alginato, agar, maltodextrinas, lignosulfonatos, derivados de celulosa, azúcares, sacáridos, sorbitoles, gomas y cualquier combinación de los mismos.

Almidones adecuados incluyen: almidones vegetales (p. ej., CAPSUL® o HI-CAP® de National Starch & Chemical Corp., Nueva York, NY), otros almidones alimenticios modificados, y cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, el almidón es almidón vegetal modificado CAPSUL®. Proteínas adecuadas de fuentes animales incluyen: gelatinas (p. ej., gelatinas bovinas, gelatinas porcinas (Tipo A o B) con diferentes índices de Bloom, gelatinas de pescado), proteína de la leche desnatada, caseinato, y cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, la proteína animal es una gelatina. Proteínas adecuadas procedentes de fuentes vegetales incluyen: proteína de patata (p. ej., ALBUREX® de Roquette Preres Societe Anonyme, Lestrem, Francia), proteína de guisante, proteína de soja, y cualquier combinación de las mismas. Preferiblemente, la proteína vegetal es proteína de patata ALBUREX®. Maltodextrinas adecuadas con un equivalente de dextrosa diferente incluyen: maltodextrina 5, maltodextrina 10, maltodextrina 15, maltodextrina 20, maltodextrina 25, y cualquier combinación de las mismas. Preferiblemente, la maltodextrina es maltodextrina 15. Derivados de celulosa adecuados incluyen: etilcelulosa, metiletilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, y cualquier combinación de las mismas. Sacáridos adecuados incluyen lactosa, sacarosa, o cualquier combinación de las mismas. Preferiblemente, el sacárido es sacarosa. Gomas adecuadas incluyen: acacia, algarroba, carragenano, y cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, la goma es goma de acacia.

Cuando la emulsión contiene un agente encapsulante, el agente encapsulante puede dispersarse en agua mediante cualquier tecnología conveniente para formar una fase acuosa. La fase acuosa puede ser una disolución o una mezcla, dependiendo de las propiedades de los componentes seleccionados. Los componentes seleccionados se pueden dispersar por cualquier tecnología conveniente, incluyendo: homogeneización, mezclado, emulsión, recirculación, mezclado estático, ultrasonidos, agitación, calentamiento, o cualquier combinación de los mismos. La viscosidad de la fase acuosa resultante se puede ajustar entonces, según se desee, por la adición de agua. La composición acuosa de la emulsión puede contener opcionalmente cualquier otro material adecuado incluyendo, pero no limitado a los descritos anteriormente en referencia a la composición no acuosa. Preferiblemente, la composición acuosa puede incluir un agente encapsulante, un agente formador de película, un plastificante, un conservante, un antioxidante, o cualquier combinación de los mismos. Conservantes adecuados incluyen

metilparabeno, propilparabeno, ácido sórbico, sorbato de potasio, benzoato de sodio, y cualquier combinación de los mismos. Antioxidantes adecuados incluyen ascorbato de sodio, ácido ascórbico, ácido cítrico y cualquier combinación de los mismos.

5 Preferiblemente, la fase acuosa contiene un almidón modificado tal como almidón de octenil-succinilo (CAPSUL®), maltodextrina y ascorbato de sodio. Otra fase acuosa preferida contiene proteína de patata (ALBUREX®), maltodextrina 20 y ascorbato de sodio. Los componentes seleccionados se pueden disolver en agua por cualquier tecnología conveniente, preferiblemente con agitación. Preferentemente, la mezcla se homogeneiza hasta que sea uniforme y sin grumos. Preferiblemente, la homogeneización se lleva a cabo a una temperatura entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 75°C. La viscosidad final de la fase acuosa resultante se puede ajustar a la viscosidad deseada, preferiblemente de aproximadamente 250 cp a aproximadamente 450 cp, más preferiblemente de aproximadamente 300 cp a aproximadamente 400 cp, incluso más preferiblemente a aproximadamente 385 cp.

15 La emulsión puede formarse mediante la emulsión de la composición no acuosa y la fase acuosa por cualquier medio, incluyendo homogeneización, cizallamiento rotor-estator, cizallamiento a alta presión y cavitación, "boquillas" de alta velocidad o agitación con cizallamiento, y cualquier combinación de los mismos. El volumen y la viscosidad de la emulsión se pueden ajustar preferentemente mediante la adición de agua después de la emulsificación. Preferiblemente, las composiciones no acuosas y acuosas se emulsionan por homogeneización. Preferiblemente, la emulsión no debe contener mineral, metal de transición o peróxido alguno.

20 Tal como se señaló anteriormente, la emulsión se puede incorporar o emplear en la producción de otras composiciones útiles, especialmente aceites encapsulados, p. ej., polvos secados por pulverización. Generalmente, el aceite encapsulado comprende una composición de aceite y un agente de encapsulación que encapsula la composición de aceite, en donde la composición de aceite contiene vitamina D3, 25-OH D3, o ambos disueltos en el aceite en una cantidad entre aproximadamente 3% y aproximadamente 50% en peso, basado en el peso total de la composición de aceite. El aceite encapsulado se puede producir mediante cualquier tecnología conveniente: p. ej., secado de una emulsión descrito anteriormente mediante cualquier tecnología convencional, incluyendo secado por pulverización, liofilización, secado en lecho fluido, secado en bandeja, adsorción y cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, el aceite encapsulado se produce mediante secado por pulverización de una emulsión que tiene una fase acuosa que contiene un agente de encapsulación; los parámetros de secado por pulverización vienen dictaminados por las características físicas deseadas en el aceite encapsulado final. Tales parámetros físicos incluyen el tamaño de las partículas, la forma y el flujo de polvo y el contenido de agua. Preferiblemente, el aceite está en una cantidad de menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 10%, o menos de aproximadamente 5% en peso, basado en el peso total del aceite encapsulado. El aceite encapsulado debería tener una buena capacidad de flujo y la vitamina D3 y/o 25-OH D3 debería ser distribuida homogéneamente por toda la composición. Convenientemente, el aceite encapsulado es un polvo. Puede añadirse cualquier otro aditivo adecuado al aceite encapsulado. Uno de tales aditivos puede ser un agente de flujo tal como dióxido de silicio, para aumentar la fluidez del aceite encapsulado.

La composición puede proporcionarse en forma de un comprimido, cápsula (p. ej., dura o blanda), o inyección (p. ej., aceite o emulsión). Se puede envasar en una dosificación diaria única.

#### Dosificaciones

40 *Diarias.* Una composición de acuerdo con esta invención en la que los dos ingredientes activos se han de administrar por separado, contiene vitamina D o 25-OH D3 en una cantidad de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 50 µg, preferiblemente de aproximadamente 5 µg a 25 µg. Alternativamente, una dosificación diaria única que tiene tanto vitamina D como 25-OH D3 contiene cada uno de los ingredientes activos en una cantidad de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 50 µg, preferiblemente de aproximadamente 5 µg y 25 µg.

45 La relación de dosificación de vitamina D a 25-OH D3 puede ser de aproximadamente 50: 1 a aproximadamente 1:50, más preferiblemente de aproximadamente 25: 1 a aproximadamente 1:25, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 1:6.

50 Dosificaciones múltiples separadas se pueden envasar en un solo kit (o recipiente). Por ejemplo, el kit puede estar compuesto de treinta dosificaciones diarias separadas de los dos principios activos por separado (es decir, 60 dosificaciones separadas), o combinadas (es decir, 30 dosis que contienen los dos ingredientes activos). Las instrucciones para administrar las dosificaciones a un ser humano pueden ser incluidas en el kit.

5 *Semanal.* Una dosificación única semanal contiene vitamina D o 25-OH D3 en una cantidad de aproximadamente 7 µg a aproximadamente 350 µg, y preferiblemente de aproximadamente 35 a 175 µg. Alternativamente, una única dosificación semanal puede contener tanto vitamina D como 25-OH D3, cada una en una cantidad de aproximadamente 7 µg a aproximadamente 350 µg, y preferiblemente de aproximadamente 35 a 175 µg. La relación de dosis de vitamina D a 25-OH D3 puede ser de aproximadamente 50:1 a aproximadamente 1:50, más preferiblemente de aproximadamente 25:1 a aproximadamente 1:25, y aún más preferiblemente de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 1:6.

10 *Mensual.* Una dosificación única mensual contiene vitamina D o 25-OH D3 en una cantidad de 30 µg a aproximadamente 1500 µg, preferiblemente de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 500 µg. Alternativamente, una dosificación única mensual puede contener tanto vitamina D como 25-OH D3, cada uno en una cantidad de 30 µg a aproximadamente 1500 µg, preferiblemente de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 500 µg. Un kit puede estar compuesto de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce dosificaciones semanales o mensuales.

15 Relaciones de dosificación de vitamina D a 25-OH D3 deberían oscilar entre 50:1 y aproximadamente 1:50, más preferiblemente de aproximadamente 25:1 a aproximadamente 1:25, y aún más preferiblemente de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 1:6.

### ANÁLISIS DE GENES

20 Para demostrar la bioactividad incrementada de la combinación, se realizó un análisis de chips de genes de tejido muscular expuesto a vitamina D, 25-OH D3 y la combinación. Detalles se dan en el Ejemplo 2, utilizando un modelo de suspensión en pata trasera murino. Como se puede ver, existe un aumento espectacular en el número de genes activados o regulados (ya sea regulados al alza o regulados a la baja) cuando se suministra la combinación de los dos en comparación con la administración individual. Dado que se cree actualmente que la gran mayoría de la vitamina D se convierte en 25-OH D después de la ingestión y el procesamiento en el hígado, este es un resultado sorprendente.

25 Se describe en esta memoria un procedimiento de activación o regulación de genes relacionados con la musculatura humanos que responden a la vitamina D y 25-OH D, que comprende la administración a una persona de una combinación de vitamina D y 25-OH D3.

Los siguientes Ejemplos no limitativos se presentan para ilustrar mejor la invención.

### EJEMPLOS

30 Ejemplo 1

#### Ensayo Clínico

#### *Formulación*

#### *Materiales y Métodos*

35 Se proporcionó una formulación secada por pulverización de 25-OH D3 en forma de un polvo. En resumen, 25-OH D3 y DL-α-tocoferol se disolvieron en un aceite de triglicéridos de cadena media, luego se emulsionaron en una disolución acuosa de almidón modificado, sacarosa y ascorbato de sodio. La emulsión se atomizó en un secador por pulverización en presencia de dióxido de silicio. Se recogió el polvo resultante cuando el contenido de agua (LDO) era menor que 4% y se tamizó a través de 400 µm. Se envasó y selló en bolsas de aluminio, luego se almacenó en una zona seca por debajo de 15°C y se utilizó en el espacio de 12 meses de su fabricación.

40 Se fabricaron tres lotes separados. En detalle, se produjo una matriz mezclando durante 120 minutos en una unidad de procesamiento FRYMIX con un agitador de ancla a 70°C bajo vacío y que consiste en:

- 17.300 kg de agua (WBI)
- 13.460 kg de almidón modificado (CAPSUL HS)
- 3,270 kg de sacarosa
- 45 ▪ 0,730 kg de ascorbato de sodio

## ES 2 599 761 T3

Se preparó una fase en aceite mezclando durante 35 min en un recipiente de doble pared con un agitador de hélice a 82°C y que consiste en:

- 0,550 kg de aceite BERGABEST MCT 60/40
- 0,049 kg de calcifediol (HY-D USP)
- 0,183 kg de DL- $\alpha$ -tocoferol

La fase oleosa se transfirió a la matriz en la unidad de procesamiento FRYMIX y se pre-emulsionó con su molino coloidal interno (60 min, 70°C). La pre-emulsión se hizo circular a través de un homogeneizador de alta presión (20 min). La emulsión con una viscosidad de 60 mPa·s a 90 mPa·s a 70°C se transfirió a través de la bomba de alta presión a la boquilla de pulverización. Como agente de fluidización, dióxido de silicio (SIPERNAT 320 DS) se alimentó a la torre. Los parámetros de pulverización y secado se enumeran a continuación.

Parámetro	Pulverización	Secado
Posición de entrada de aire	parte superior de la torre	parte superior de la torre
Alimentación de aire de entrada	1500 m <sup>3</sup> /h	1400 m <sup>3</sup> /h
Temperatura del aire de entrada	170°C	desconexión del calentador
Alimentación de aire de entrada de IFB	500 m <sup>3</sup> /h	500 m <sup>3</sup> /h
Temperatura del aire de entrada de IFB	65°C	50°C
Posición de aire de escape	parte inferior de la torre	parte inferior de la torre
Reciclaje de polvo fino	a IFB	a IFB
Velocidad de alimentación de emulsión	50 kg/h	alimentación de emulsión detenida
Posición de la alimentación de SiO <sub>2</sub>	parte superior de la torre	alimentación de SiO <sub>2</sub> detenida
Velocidad de alimentación de ácido SiO <sub>2</sub>	100 g/h	alimentación de SiO <sub>2</sub> detenida

Para cada uno de los tres lotes de 25-OH D3, se obtuvo una media de 8,4 kg de polvo secado por pulverización con un contenido de aproximadamente 0,25% de 25-OH D3. Los otros componentes de la formulación son: 73,2% de almidón alimentario modificado, 17,6% de sacarosa, 4,0% de ascorbato de sodio, 3,0% de triglicéridos de cadena media, 1,0% de dióxido de silicio y 1,0% de DL- $\alpha$ -tocoferol.

- 15 La formulación de vitamina D3 secada por pulverización se proporcionó en forma de un polvo. En resumen, la vitamina D3 y DL- $\alpha$ -tocoferol se disolvieron en un aceite de triglicéridos de cadena media, después se emulsionaron en una disolución acuosa de almidón modificado, sacarosa y ascorbato de sodio. La emulsión se atomizó en un secador por pulverización en presencia de dióxido de silicio. Se recogió el polvo resultante cuando el contenido de agua (LOD) fue de menos de 4% y se tamizó para separar grandes grumos. Se almacenó en una zona seca por debajo de 15°C y se utilizó en el espacio de 12 meses de su fabricación.

### Ensayo Clínico

#### Sujetos

- 25 Mujeres post-menopáusicas sanas (50 a 70 años de edad) fueron reclutadas mediante consentimiento informado y fueron seleccionadas utilizando los siguientes criterios: suero 25-OH D3 entre 20 nmol/L y 50 nmol/L, índice de masa corporal entre 18 kg/m<sup>2</sup> y 27 kg/m<sup>2</sup>, presión arterial, menor que 146/95 mm de Hg, calcio en suero menor que 2,6 nmol/L, glucosa en ayunas inferior a 100 mg/dl, sin ejercicio de alta intensidad, más de tres veces por semana, ningún tratamiento de la hipertensión, ningún uso de altas dosis de vitamina D o complementos de calcio o el metabolismo óseo que afecta a fármacos (p. ej., bifosfonatos, calcitonina, modulador del receptor de estrógeno, terapia de reemplazo de hormonas, hormona paratiroidea), y sin visitar un lugar "soleado" durante el estudio.
- 30 Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a uno de siete grupos de tratamiento (es decir, diariamente, semanalmente, en bolo como dosis única, y en bolo como dosis de combinación). Cada uno de los grupos incluía cinco sujetos. Ello fue seguido por cuatro meses en Zürich, Suiza durante el invierno.

#### Estudio Clínico

- 35 El objetivo era estudiar y comparar las características farmacocinéticas de la vitamina D3 y 25-OH D3 administradas a seres humanos. Se investigaron cantidades equimolares de ambas sustancias. El régimen se basa en 20  $\mu$ g/día (o su equivalente en una base semanal) de 25-OH D3. Dado que la concentración de línea de referencia máxima pre-existente de 25-OH D3 será 50 nmol/L, no se prevé que los sujetos se acercarán al intervalo en el que se ha observado una perturbación en la homeostasis de Ca<sup>2+</sup>. Para fines comparativos, es necesario administrar cantidades equimolares de vitamina D3 o 25-OH D3. Con respecto a la administración de la vitamina D3, la dosis se

## ES 2 599 761 T3

considera que es suficiente para superar la variabilidad de fondo y proporcionar una dosis eficaz para los participantes.

Diario: 120 administraciones

1. 25-OH D3 20 µg
2. Vitamina D3 20 µg (800 UI)

Semanal: 16 administraciones

3. 25-OH D3 140 µg
4. Vitamina D3 140 µg (5600 UI)

5 Bolo: administración única

5. 25-OH D3 140 µg
6. Vitamina D3 140 µg (5600 UI)

Bolo: administración combinada

7. D3 y 25 (OH) D3 140 µg (5600 UI) + 140 µg

10 Cápsulas de gelatina dura, que se envasan en frascos, contienen, por cápsula, 20 µg o 140 µg de vitamina D3 o 25-OH D3 secada por pulverización. Cada una de las dosificaciones se consume por vía oral en el desayuno. La duración del estudio es de cuatro meses para los grupos "Semanal" y "Diario". Sujetos incluidos en el grupo de "bolo" consumen por vía oral una dosificación única en la segunda visita de estudio.

15 Las concentraciones en plasma de 25-OH D3 (p. ej., el pico y el estado estacionario) se determinan mediante la obtención de muestras de los sujetos en diversos momentos después de ingerir la dosificación. Para fines de rastreo y para establecer los valores basales, se obtiene una muestra de sangre antes de la inscripción en el estudio y el laboratorio clínico mide vitamina D3, 25-OH D3, calcio, creatinina, albúmina y glucosa en ayunas en el suero. El lunes de la Semana 1 del estudio, se evalúan a lo largo de 24 horas la farmacocinética de vitamina D3, 25-OH D3 y vitamina 1,25-dihidroxi D3; marcadores en suero (es decir, la vitamina D3, 25-OH D3, calcio, creatinina, albúmina, PTH, GOT, GPT, ALP, triglicéridos, HDL, LDL, colesterol total, bALP y glucosa en ayunas); y los marcadores en orina (es decir, calcio, creatinina, y DPD). Se tomaron muestras diarias durante los días restantes de la Semana 1 y lunes de la Semana 2 para evaluar la vitamina D3 en suero y 25-OH D3, los marcadores en suero (p. ej., calcio, creatinina, albúmina) y los marcadores en orina (p. ej., calcio, creatinina). Las evaluaciones continúan el lunes de las Semanas 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15. El lunes de la Semana 16 se toman muestras para evaluar la farmacocinética de vitamina en suero D3, 25-OH D3 y vitamina 1,25-dihidroxi D3; marcadores en suero (es decir, vitamina D3, 25-OH D3, calcio, creatinina, albúmina, PTH, GOT, GPT, ALP, triglicéridos, HDL, LDL, colesterol total, bALP y glucosa en ayunas); y los marcadores en orina (es decir, calcio, creatinina y DPD).

25 La resistencia y la función muscular se evaluaron mediante los siguientes ensayos de comportamiento estándar: resistencia flexora y extensora de la rodilla, la prueba repetida de postura sentada a postura de pie, y la prueba de levántate y anda (TUG) en la Semana 1 en la visita 2 (línea de referencia) y al final del estudio en la visita de 15. La resistencia muscular se midió como extensor y flexor de la rodilla en Newton (kilopondios). TUG es una medida de la movilidad funcional, incluyendo la resistencia muscular, velocidad de marcha y el equilibrio y se evalúa en segundos.

30 La prueba repetida de postura sentada a postura de pie es una prueba funcional y se mide en segundos.

### Resultados:

35 La Tabla 1 muestra el cambio en la resistencia muscular después de tratamiento diario y semanal con 25-OH D3 (20 µg al día; 140 µg a la semana, respectivamente) o el tratamiento diario o semanal con vitamina D3 (20 µg al día; 140 µg a la semana, respectivamente). La duración del tratamiento fue de 4 meses. Los valores se dan como el cambio después de 4 meses frente a la línea de referencia (antes del inicio del tratamiento).

TABLA 1

	Resistencia muscular (Cambio frente a línea de referencia en Newton)	
	Vitamina D3 diaria/semanal	25-OH D3 diaria/semanal
Extensión de la rodilla (valor medio)	-23,7	13,0

Extensión de la rodilla (mejor valor)	-24,8	13,6
Flexión de la rodilla (valor medio)	3,6	7,9
Flexión de la rodilla (mejor valor)	2,4	7,2

5 La Tabla 2 muestra el cambio relativo en la resistencia muscular después de tratamiento diario y semanal con 25-OH D3 (20 µg al día; 140 µg a la semana, respectivamente) en comparación con el tratamiento diario y semanal con vitamina D3 (20 µg al día; 140 µg a la semana, respectivamente). La duración del tratamiento fue de 4 meses. Los valores son medias de mínimos cuadrados de GLM (modelo lineal general) dados como % de mejora ajustado por la resistencia de línea de referencia, la edad y el índice de masa corporal de 25-OH D3 frente a vitamina D3.

TABLA 2

	<b>Resistencia muscular (Cambio frente a vitamina D3 diaria/semanal en %)</b>	
	<b>25-OH D3 diaria/semanal</b>	
Extensión de la rodilla (valor medio)	17,0	
Extensión de la rodilla (mejor valor)	17,6	
Flexión de la rodilla (valor medio)	3,1	
Flexión de la rodilla (mejor valor)	4,7	

10 La Tabla 3 muestra el cambio en la función muscular después de tratamiento diario y semanal con 25-OH D3 (20 µg al día; 140 µg a la semana, respectivamente) o tratamiento diario y semanal con vitamina D3 (20 µg al día; 140 µg a la semana, respectivamente). La duración del tratamiento fue de 4 meses. Los valores se dan como el tiempo (en segundos) que se necesita para completar la tarea después de 4 meses frente a la línea de referencia (antes del inicio del tratamiento).

TABLA 3

	<b>Función muscular (Cambio frente a línea de referencia en Segundos)</b>	
	<b>Vitamina D3 diaria/semanal</b>	<b>25-OH D3 diaria/semanal</b>
	Postura sentada a postura de pie repetida	0,30
Levántate y anda	-0,46	0,27

15 La Tabla 4 muestra el cambio relativo en función de los músculos después de tratamiento diario y semanal con 25-OH D3 (20 µg al día; 140 µg a la semana, respectivamente) en comparación con el tratamiento diario y semanal con vitamina D3 (20 µg al día; 140 µg a la semana, respectivamente). La duración del tratamiento fue de 4 meses. Los valores son medias de mínimos cuadrados de GLM (modelo lineal general) dados como % de tiempo necesario para completar la tarea ajustada para la función de la línea de referencia, la edad y el índice de masa corporal para 25-OH D3 frente a vitamina D3.

TABLA 4

	<b>Resistencia muscular (Cambio frente a vitamina D3 diaria/semanal en %)</b>	
	<b>25-OH D3 diaria/semanal</b>	
Postura sentada a postura de pie repetida	13,9	
Levántate y anda	8,4	

20 Estos datos demuestran que tratamiento diario o semanal con 25-OH D3 resulta sorprendentemente en mejoras mucho más fuertes de la resistencia y la función muscular en comparación con el consumo de dosificaciones idénticas de vitamina D3. Después del tratamiento con 25-OH D3, los sujetos eran capaces de realizar extensiones y flexiones de la rodilla más intensas en comparación con antes del tratamiento y en comparación con el tratamiento con vitamina D3. La mejora relativa de la resistencia muscular en los sujetos tratados con 25-OH D3 frente a  
 25 vitamina D3 fue de entre 3 a 18%, una magnitud del efecto que es clínicamente relevante y representa un beneficio significativo para sujetos de todos los grupos de edad y especialmente para las mujeres post-menopáusicas.

La función muscular determinada por pruebas de rendimiento estándar (postura sentada a postura de pie repetida, levántate y anda) fue mejor en sujetos tratados con 25-OH D3 en comparación con el tratamiento con dosificaciones

idénticas de vitamina D3. Después del tratamiento con 25-OH D3, los sujetos tratados completaron las pruebas de rendimiento más rápidamente en comparación con antes del tratamiento y en comparación con el tratamiento con vitamina D3. Mejoras relativas de la función muscular después del tratamiento con 25-OH D3 frente a vitamina D3 fue de entre 8 y 14%, un tamaño del efecto que es clínicamente relevante y representa un beneficio significativo para sujetos de todas las edades y especialmente para las mujeres post-menopáusicas.

Además de ello, un análisis no ajustado a través de las cuatro pruebas de las extremidades inferiores (extensión de la rodilla, flexión de la rodilla, postura sentada a postura de pie repetida, levántate y anda) revelaron que los sujetos tratados con 25-OH D3 tienen una posibilidad 2,8 veces mayor de mantener o mejorar la resistencia y la función de las extremidades inferiores en comparación con sujetos tratados con dosis idénticas de vitamina D3. Este efecto es estadísticamente significativo y clínicamente relevante e indica que 25-OH D3 es adecuada para tratamientos destinados a mantener o mejorar la resistencia y la función del músculo esquelético.

## EJEMPLO 2

### Datos del chip de genes

El objetivo de este estudio era evaluar los efectos de la vitamina D3, 25-OH D3, y la combinación de vitamina D3 y 25-OH D3 en un modelo de atrofia del músculo esquelético utilizando ratones BalbC, en que la suspensión por la cola conduce a la atrofia del músculo esquelético en las extremidades posteriores descargadas de los animales. Inicialmente, este modelo fue establecido en ratas para la simulación del vuelo espacial en los seres humanos y se utiliza comúnmente en otros campos científicos para estudiar la pérdida de masa del músculo esquelético o hueso. Los resultados se consideran indicativos de las condiciones humanas tales como sarcopenia (pérdida degenerativa de masa del músculo esquelético y resistencia durante el proceso de envejecimiento) o la inmovilización del músculo esquelético (p. ej., después de reposo en cama prolongado debido a fracturas, cirugía o trauma).

*Métodos* Para el estudio de los autores de la invención, ratones BalbC hembras de nueve meses de edad se asignaron al azar al comienzo del estudio a cuatro grupos con 10 animales por grupo

1. Grupo control: extremidad posterior descargada (HU)
2. Grupo de vitamina D3: HU + tratamiento con vitamina D3
3. Grupo de 25-OH D3: HU + tratamiento con 25-OH D3
4. Grupo de vitamina D + 25-OH D3: HU + tratamiento con vitamina D3 y 25-OH D3 (combinación)

Los animales se colocaron en jaulas especiales durante un tiempo de siete días; todos los ratones fueron alojados por separado y tenían libre acceso al alimento y agua ad libitum. Todos los animales se trataron dos veces por sonda esofágica al comienzo del experimento y 3 horas antes de seccionar:

1. El grupo de control recibió vehículo (gelatina)
2. El grupo D3 recibió vitamina D3 (50 µg/kg/peso corporal),
3. El grupo 25-OH D3 recibió 25-OH D3 (50 µg/kg/peso corporal)
4. El grupo de combinación recibió vitamina D3 + 25-OH D3 (50 + 50 µg/kg/peso corporal)

Al final del estudio se retiró el músculo gastrocnemio y directamente se congeló en nitrógeno líquido para su posterior análisis. Para identificar los cambios en la expresión génica y analizar desplazamientos en los niveles de ARNm en el músculo gastrocnemio se utilizaron chips Affymetrix Mouse 430-2 junto con archivos de anotación versión 27 (diciembre de 2008) de Affymetrix para este tipo de chip. El chip contiene "45.000 conjuntos de sonda para analizar el nivel de expresión de más de 39.000 transcripciones y variantes de más de 34.000 genes de ratón bien caracterizados y racimos UniGene" (Affymetrix, 2009).

El ARN total se aisló utilizando el protocolo Trizol comúnmente utilizado. El ARN se cuantificó utilizando el análisis espectrofotométrico. La integridad de muestras de ARN total también se evaluó cualitativamente en un bioanizador Agilent 2100. El ARN se preparó entonces para la síntesis de ADNc de un ciclo. Un control de ARN poli-A se utiliza para esta etapa para proporcionar controles positivos exógenos para controlar todo el proceso de marcaje diana eucariota. Se realiza la síntesis del primer ADNc, y después de la síntesis de la segunda hebra de ADNc, el ADNc se limpia de cDNA de doble cadena. A continuación se sintetiza un ARNc marcado con biotina, se limpia y se cuantifica utilizando un espectrofotómetro a 260/280 nm. Es importante que la diana de ARNc se fragmente antes de la hibridación sobre chips de sondas GeneChip para obtener una sensibilidad del ensayo óptima. Después de la fragmentación, las sondas se hibridan en los chips (chips Affymetrix Mouse 430-2). Los chips se lavan y se tiñen en la estación de fluidos de Affymetrix y se exploran en el escáner de chips de genes. Los datos se transfieren luego desde el escáner para su posterior análisis utilizando el software de Genedata (Expressionist 5.0: Chip Refinador y Analizador). La interpretación de los datos y el análisis de las vías se hicieron con la versión en línea del paquete GeneGo MetaCore (V5.2 build 17389).

El Chip Refinador evalúa los datos de chips para los aspectos de calidad y marca mediciones problemáticas. Proporciona un conjunto de algoritmos de normalización y métodos de condensación validados para pre-procesar de forma automática y resumir los datos en bruto de los chips para su posterior análisis estadístico.

5 El análisis de los datos de chips reveló genes (ARNm), que eran expresados diferencialmente entre el grupo HU y los grupos HU más tratamiento (vitamina D3, 25-OH D3 o combinación).

Los hallazgos clave de los autores de la invención son

1. Una combinación de 25-OH D3 y vitamina D3 cambia más conjuntos de sondas para genes que 25-OH D3; la cual, a su vez, cambia más conjuntos de sondas para los genes que la vitamina D3 (Tabla).
  - 10 a. en comparación con el grupo de control HU, el grupo que recibió un tratamiento de combinación (D3 + 25-hidroxivitamina D3) tiene significativamente más conjuntos de sondas para genes modificados (1745) que el grupo que recibió un tratamiento con sólo el 25-OH D3 (1263)
  - 15 b. en comparación con el grupo de control HU, el grupo que recibió un tratamiento con 25-OH D3 tiene significativamente más conjuntos de sondas para genes modificados (1263) que el grupo que recibió un tratamiento con vitamina D3 (385) Error! Fuente de referencia no se encuentra.)
2. Un tratamiento de combinación de 25-OH D3 + vitamina D3 tiene más conjuntos de sondas expresados diferencialmente comunes para genes con tratamiento con 25-OH D3 que con tratamiento con vitamina D3.
  - 20 a. ~61% de los conjuntos de sondas para genes expresados diferencialmente expresados en el grupo de 25-OH D3 también se expresaban diferencialmente en el grupo de 25-OH D3 + vitamina D3 (769 de 1263, Figura 2)
  - 25 b. ~46% de los conjuntos de sondas para genes expresados diferencialmente expresados en el grupo de vitamina D3 también se expresaban diferencialmente en el grupo de 25-OH D3 + vitamina D3 (177 de 385, Figura 3)
  - 30 c. Un tratamiento de combinación de 25-OH D3 y vitamina D3 tiene el impacto más significativo sobre los genes del proceso de desarrollo muscular, tal como se ilustra en las Figuras 4, 6 y 7.
  - 35 d. Los genes implicados son parte de las siguientes categorías principales en el músculo esquelético: contracción muscular, desarrollo muscular y mantenimiento muscular. (Tabla).
3. Para los conjuntos de sondas de genes seleccionados del músculo esquelético, un tratamiento de combinación de 25-OH D3 y vitamina D3 muestra expresiones más altas que los tratamientos solamente con vitamina D3 o sólo el 25-OH D3 (Tabla)

Tabla 5: Conjuntos de sondas diferencialmente expresados de genes entre HU y los grupos de tratamiento HU + vitamina D3, 25-OH D3, o combinación.

Parámetro	Conjuntos de sondas para genes expresados diferencialmente
Grupo de extremidad posterior descargada (HU - control)	-
Contra HU + vitamina D3	385
Contra HU + 25-OH D3	1263
Contra HU + vitamina D3 + 25-OH D3	1745

Tabla 6: Conjuntos de sondas diferencialmente expresados para los genes del músculo esquelético seleccionados entre HU y los grupos de tratamiento

Parámetro	Genes musculares expresados diferencialmente en comparación con HU
HU + vitamina D3	desmina; mioneurina; tropomiosina 1, alfa; tropomiosina 2, beta; gen 1 de miopatía miotubular ligado al cromosoma X
HU + 25-OH D3	desmina; distonina; factor potenciador de miocitos 2A; mioneurina; miosina VIIIb; miosina, polipéptido ligero 6, álcali, músculo liso y no músculo; miosina, polipéptido ligero de quinasa; proteína 2 relacionada con miotubularina; proteína 4 relacionada con miotubularina; proteína 6 relacionada con miotubularina; tropomiosina 2, beta; gen 1 de miopatía miotubular ligado al cromosoma X
HU + vitamina D3 + 25-OH	calsecustrina 2; desmina; distonina; distrofina, distrofia muscular; factor 2A potenciador de miocitos; factor 2C potenciador de miocitos factor 2D potenciador de miocitos; miomesina 1;

D3	mioneurina; miosina X; miosina, polipéptido pesado 6; miosina, polipéptido pesado 8; miosina, polipéptido ligero 6; proteína 1 relacionada con miotubularina; proteína 2 relacionada con miotubularina; proteína 4 relacionada con miotubularina; proteína 6 relacionada con miotubularina; nebulin; sarcoglicano, beta; similar a miosina, polipéptido pesado 4; titina; tropomiosina 2, beta; troponina C; troponina I; gen 1 de miopatía miotubular ligado al cromosoma X
----	--

Tabla 7: Patrón de expresión para genes seleccionados del músculo esquelético

	HU	Vitamina D3	25-OH D3	25-OH D3 + Vitamina D3
Tropomiosina 1 (Tpm1)	1179	2199	2110	2456
Miosina, quinasa de cadena ligera (Myk)	749	786	994	1022
Miomesina 1 (Miom 1)	84697	99099	105393	114398
Titina (Tnt)	11353	11354	13786	15647

**DISCUSIÓN CON RESPECTO A GENES ESPECÍFICOS SELECCIONADOS**

5 Durante un periodo de la vida, los músculos esqueléticos se adaptan permanentemente a diferentes estímulos, tales como el ejercicio y el entrenamiento físico, pero también a la inmovilización. El músculo esquelético responde con hipertrofia o atrofia. El desarrollo y la adaptación del músculo esquelético es un proceso complejo. Brevemente, las células satélite - las denominadas células madre del músculo esquelético - reciben estímulos y forman mioblastos indiferenciados que se someten a la fusión para formar miotubos - nuevas fibras musculares.

10 Para los movimientos y la adaptación del músculo esquelético, la contracción es importante. La contracción del músculo esquelético es un deslizamiento mutuo de las dos principales fibras del músculo esquelético miosina (filamentos gruesos) y actina (filamentos finos) que se organizan en sarcómeros. Dan a los músculos esqueléticos su aspecto estriado transversal en el microscopio.

15 Además de filamentos finos y gruesos, el músculo esquelético se compone de titina y nebulina y proteínas también sarcoméricas tales como tropomiosina. La función del músculo esquelético depende de una alineación precisa de los filamentos de actina y miosina y las proteínas accesorias tales como  $\alpha$ -actinina, miomesina, proteína M, titina, desmina y proteínas de unión a miosina.

20 Se ha sugerido que miomesina y proteína M pueden conectar sistemas de filamentos de titina y de miosina y que miomesina juega un papel en la integración de los filamentos gruesos en sarcómeros de ensamblaje. La titina, que es una proteína enorme, forma un sistema de filamentos continuo en miofibrillas. La proteína de filamentos intermedios predominante del músculo estriado es desmina, y contribuye a mantener la integridad y la alineación de las miofibrillas.

Las mutaciones en varios componentes de la proteína (p. ej., cadena pesada de miosina, actina, tropomiosina, etc.) y también proteínas sarcomeras (p. ej., titina, desmina, etc.) se asocian con enfermedades musculares/miopatías.

Tropomiosina 1, alfa (Tpm1):

25 Tal como se establece en WIKIPEDIA,

30 "Tropomiosina es una proteína de unión a actina que regula la mecánica de actina. Es importante, entre otras cosas, para la contracción muscular. Tropomiosina, junto con el complejo de troponina, se asocia con actina en las fibras musculares y regula la contracción muscular mediante la regulación de la unión de miosina. En reposo muscular, tropomiosina recubre los sitios en la actina de unión a miosina y está "bloqueada" en esta posición por parte de troponina T (troponina de unión a tropomiosina) y troponina I (troponina inhibidora). Después de la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, el calcio se une a troponina C (troponina de unión a calcio). Éste "desbloquea" la tropomiosina de actina, permitiendo que se aleje de la ranura de unión. Las cabezas de miosina pueden ahora acceder a los sitios de unión en la actina. Una vez que se une una cabeza de miosina, ésta desplaza totalmente tropomiosina y permite que las cabezas de miosina adicionales se unan, iniciando un acortamiento del músculo y la contracción. Una vez que el calcio es bombeado fuera del citoplasma y los niveles de calcio vuelven a la normalidad, la tropomiosina se une de nuevo a la actina, evitando la unión de miosina".

5 Tropomiosina 1 alfa es un gen que se requiere para el desarrollo y la función muscular (p. ej., la contracción muscular). En general los tropomiosinas específicas para los músculos regulan interacciones actina-miosina y, por lo tanto, la contracción. La proteína codificada es un tipo de cadena alfa helicoidal que forma la tropomiosina predominante de músculo estriado, en donde también funciona en asociación con el complejo de troponina para regular la interacción dependiente de calcio de la actina y la miosina durante la contracción muscular. (NCBI)

Patrón de expresión (Tpm1):

HU	HU + VitD3	HU + 25-hidroxitamina D3	HU + VitD3 + 25-hidroxitamina D 3
1179	2199	2110	2456

**Ejemplo del grupo tratado con 25-hidroxitamina D3:**

Miosina, quinasa de cadena ligera (MYLK):

10 Wikipedia:

15 "Myk es un gen humano. Este gen, un miembro de músculo de la superfamilia de genes de inmunoglobulina, codifica la cadena quinasa ligera de la miosina que es una enzima dependiente de calcio/calmodulina. Esta quinasa fosforila cadenas ligeras reguladora de la miosina para facilitar la interacción de miosina con los filamentos de actina para producir una actividad contráctil. Este gen codifica isoformas tanto del músculo liso como no musculares. Además, el uso de un promotor separado en un intrón en la región 3', codifica telokina, una pequeña proteína idéntica en la secuencia al extremo C de la cadena de quinasa ligera de la miosina que se expresa de forma independiente en el músculo liso y funciona para estabilizar filamentos de miosina no fosforilados. Un pseudogen está localizado en el brazo p del cromosoma 3. Se han identificado cuatro variantes de transcripción que producen cuatro isoformas de la enzima dependiente de calcio/calmodulina, así como dos transcripciones que producen dos isoformas de telokina. Se han identificado variantes adicionales, pero carecen de transcripciones de longitud completa".

Patrón de expresión (MYLK):

HU	HU + VitD3	HU + 25-hidroxitamina D3	HU + VitD3 + 25-hidroxitamina D 3
749	786	994	1022

25 **Ejemplo del grupo tratado con vitamina D3 + 25-hidroxitamina D3:**

Wikipedia:

Miomesina es una proteína de línea extrema que forma parte de la línea M. Une los filamentos gruesos de miosina en la línea M.

Patrón de expresión (Miomesina 1 - Miom1):

30

HU	HU + VitD3	HU + 25-hidroxitamina D3	HU + VitD3 + 25-hidroxitamina D 3
84697	99099	105393	114398

Wikipedia:

35 "Titina, también conocida como conectina, es una proteína que es importante en la contracción de los tejidos musculares estriados. Titina es una proteína grande abundante del músculo estriado. La proteína se divide en dos regiones:  
Banda I N-terminal - es la parte elástica de la molécula, contiene dos regiones de dominios de inmunoglobulina en tándem a cada lado de una región PEVK que es rica en prolina, glutamato, valina y lisina  
Banda A C-terminal – se piensa que actúa como un controlador de proteínas, contiene una mezcla de repeticiones de inmunoglobulina y fibronectina, y posee actividad de quinasa. Una región de disco Z N-terminal y una región de línea de M C-terminal se unen a la línea Z y la línea M del sarcómero respectivamente, de modo que una sola molécula de titina se extiende por la mitad de la longitud de un

40

5 sarcómero. Titina también contiene sitios de unión para las proteínas asociadas al músculo, por lo que sirve como un molde de adhesión para el ensamblaje de la maquinaria contráctil de las células musculares. También se ha identificado como una proteína estructural de cromosomas. Existe una variabilidad considerable en la banda I, la línea M y las regiones de disco Z de la titina. La variabilidad en la región de la banda I contribuye en las diferencias en la elasticidad de diferentes isoformas de titina y, por lo tanto, en las diferencias en la elasticidad de los diferentes tipos de músculos. De las muchas variantes de titina identificadas, se describen cinco para las cuales está disponible una información completa de la transcripción".

10 La titina interactúa con muchas proteínas sarcoméricas incluyendo:  
 región de la línea Z: teletonina y alfa-actinina  
 región de la banda I: calpaína-3 y obscurina  
 región de la línea M: proteína de unión a miosina C, calmodulina 1, CAPN3 y MURF1

Patrón de expresión (titina - Tnt):

HU HU + VitD3 HU + 25-hidroxitamina D3 HU + VitD3 + 25-hidroxitamina D 3  
 11353 11354 13786 15647

15 **Ejemplo 3**

**Modelo de Ratón**

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de 25-OH D3 en un modelo de hipertrofia muscular y en una prueba de la capacidad de ejercicio de resistencia en ratones C57BL/6J. Se reconoce en la técnica que la separación del músculo gastrocnemio induce la hipertrofia compensatoria en los músculos sóleo y plantar por múltiples mecanismos que conducen a la mejora de la resistencia muscular y potencia de las patas.

25 Dos grupos de 10 animales fueron anestesiados y se fijó la extremidad posterior izquierda de los animales. Todos los animales recibieron un analgésico. Se practicó una pequeña incisión a través de la piel sobre el músculo gastrocnemio. El músculo gastrocnemio completo y los tendones quedaron expuestos. Las dos cabezas del músculo gastrocnemio se diseccionaron cuidadosamente de los músculos subyacentes intactos y se tuvo cuidado de no romper los nervios ni los vasos. La piel se cerró con una sutura de seda, y los animales fueron devueltos a las jaulas. Después de recuperarse de la anestesia, los animales podían moverse directamente y sin problemas en sus jaulas. Los animales fueron tratados durante tres semanas mediante sonda esofágica con 25-OH D3 a una dosificación diaria de 50 µg/kg y el grupo control recibió vehículo. Al final del estudio se testó la capacidad de ejercicio de resistencia de todos los animales en una cinta de roedores.

30 El peso en húmedo de los músculos sóleo y plantar aumentó en los animales tratados con 25-OH D3 en comparación con los animales control (Tabla 8). Además, cuando los pesos de los músculos se normalizaron a los pesos corporales de los ratones en comparación con el peso corporal, los animales tratados con 25-OH D3 demostraron un aumento de la relación peso del músculo sóleo-plantar/peso corporal (Tabla 8). Mediciones de la tomografía computarizada de la zona del músculo y total de la pata confirmaron que el tratamiento con 25-OH D3 aumenta la masa esquelética (Tabla 8). Los animales que recibieron 25-OH D3 mostraron una mayor capacidad de ejercicio de resistencia en comparación con los ratones control, demostrada por una mayor distancia recorrida y tiempo de marcha (Tabla 8).

40 La Tabla 8 muestra los pesos del músculo, las relaciones peso muscular/peso corporal, las áreas en sección transversal totales de patas y músculos, la distancia recorrida y el tiempo de marcha de ratones tratados con 25-OH D3 a una dosificación de 50 µg/kg/día o placebo (control) durante 3 semanas.

TABLA 8

Parámetros	Control (n = 10)	25-OH D3 (n = 10)
Sóleo peso húmedo (mg)	5,25	6,37
Plantar peso húmedo (mg)	31,68	33,24
Músculo sóleo-plantar / peso corporal (mg/g)	1,82	1,94
Área en sección transversal total de la pata (mm <sup>2</sup> )	22,78	24,04

## ES 2 599 761 T3

Área en sección transversal del músculo(mm <sup>2</sup> )	19,90	20,98
Distancia recorrida (m)	986,0	1078,4
Tiempo de marcha (min)	37,6	41,0

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de 25-hidroxivitamina D3 ("25-OH D3") y vitamina D en la fabricación de un producto farmacéutico, producto nutracéutico, complemento alimentario o composición alimentaria para mantener o prevenir la pérdida de la función muscular o la resistencia muscular en un ser humano, en que el ser humano es una persona de edad, una persona que padece inmovilidad crónica independientemente de la edad, o una persona con deficiencia o insuficiencia de vitamina D.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la 25-OH D3 y vitamina D están presentes en unidades de dosificación separadas.
- 10 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde la 25-OH D3 y vitamina D se utilizan una vez al día, una vez a la semana o una vez al mes.
4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el uso es para al menos un mes, preferiblemente para más de dos meses y más preferiblemente para al menos cuatro meses.
5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la relación de vitamina D a 25-OH-D3 es de 6:1 a 1:6.

Figura 1

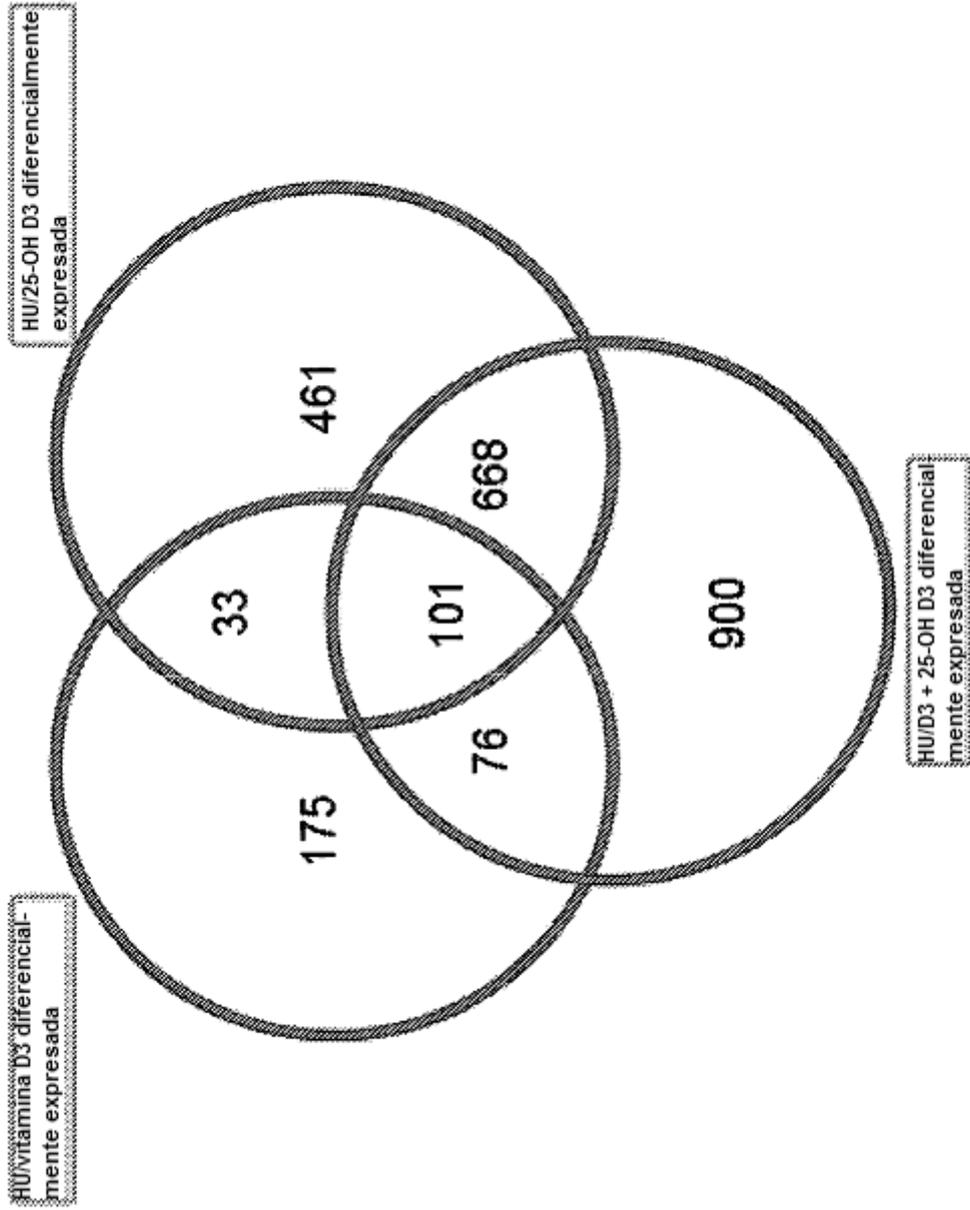


Figura 2

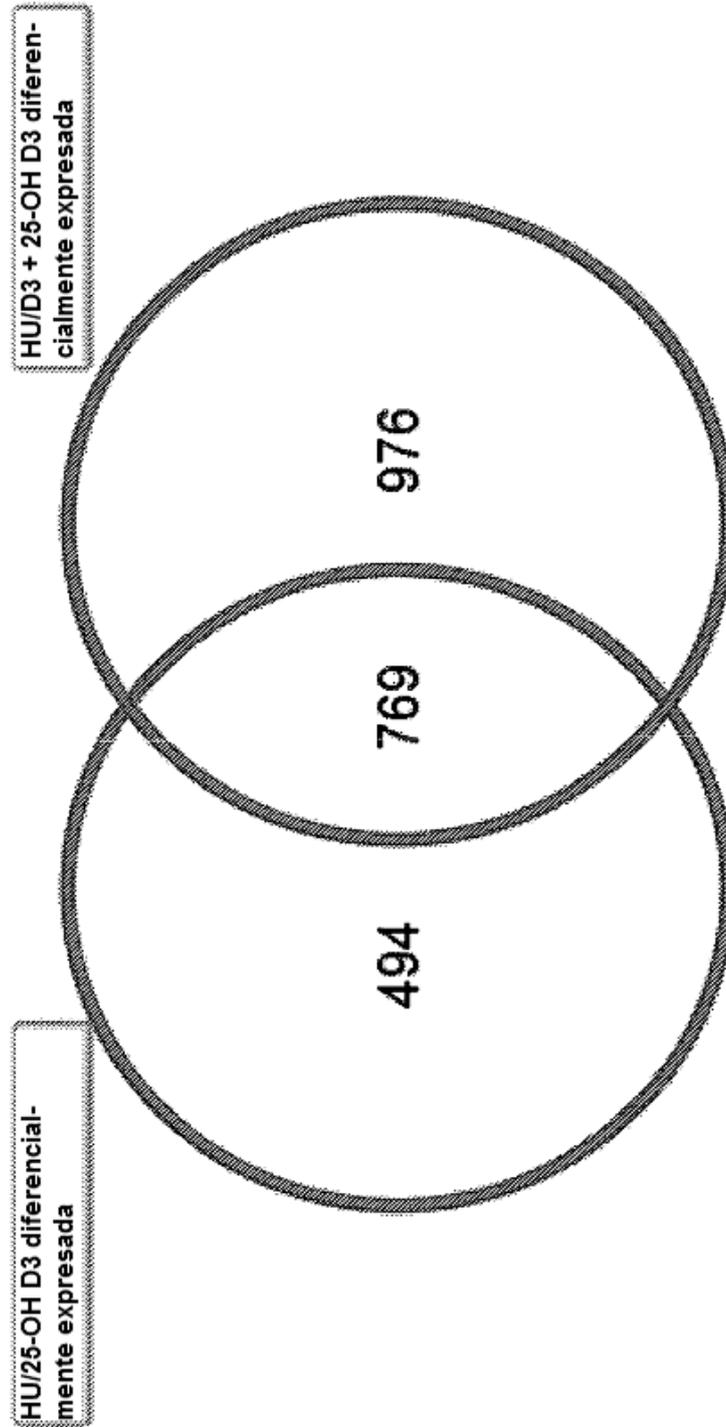


Figura 3

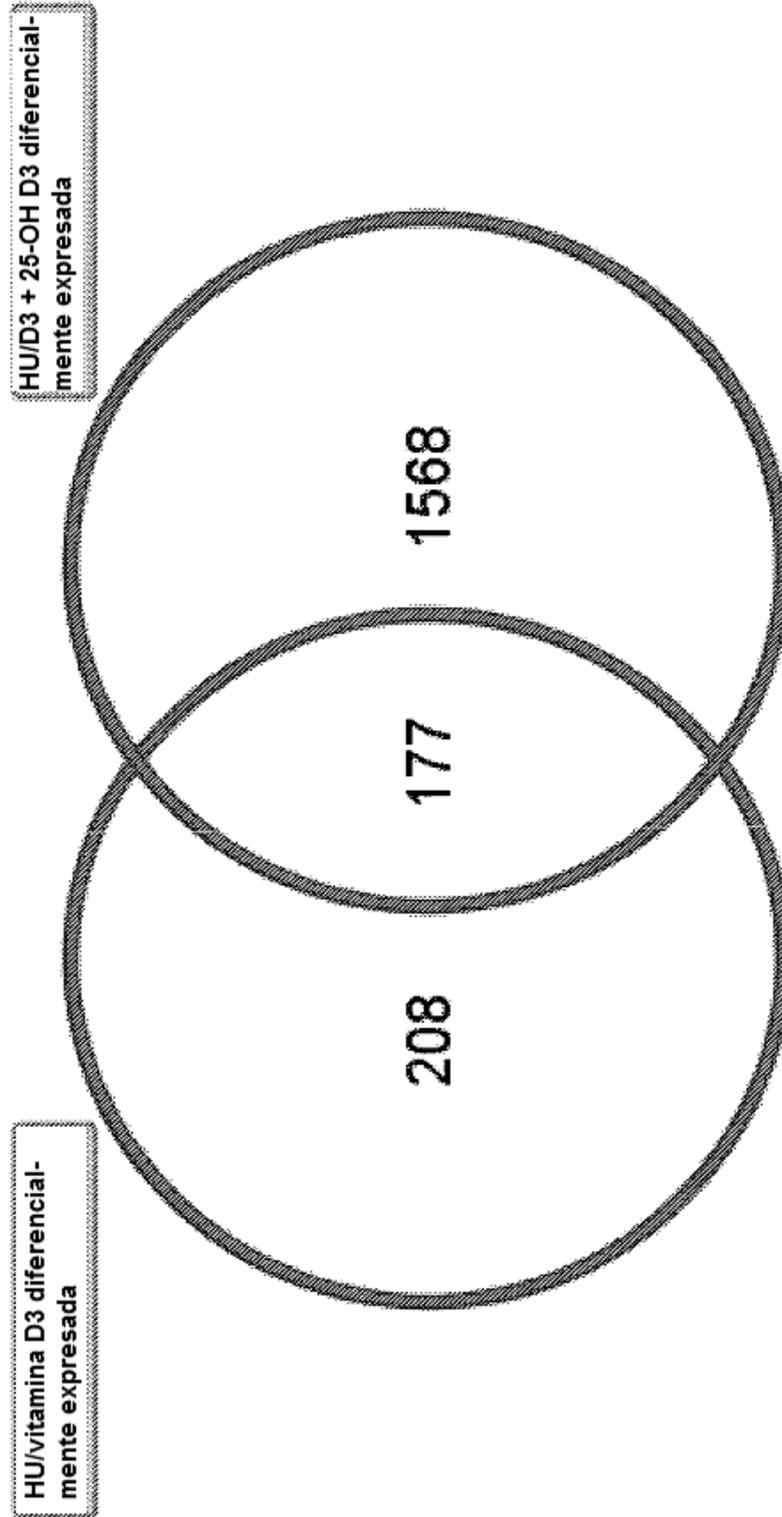


Figura 4

Redes de Proceso GeneGo

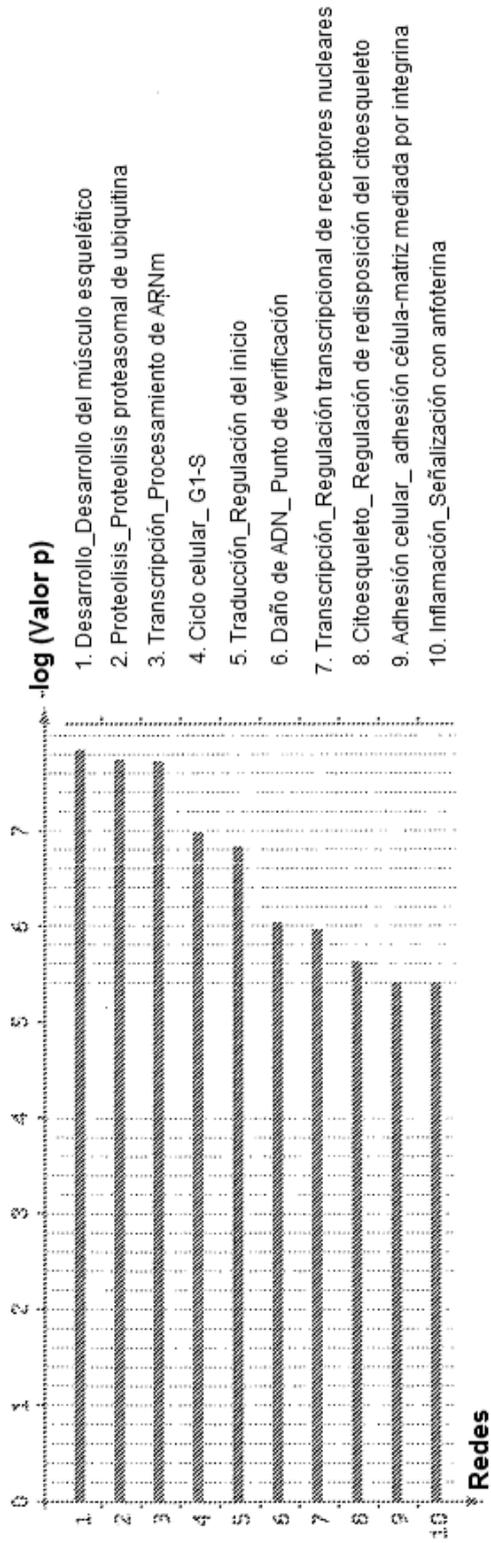


Figura 5

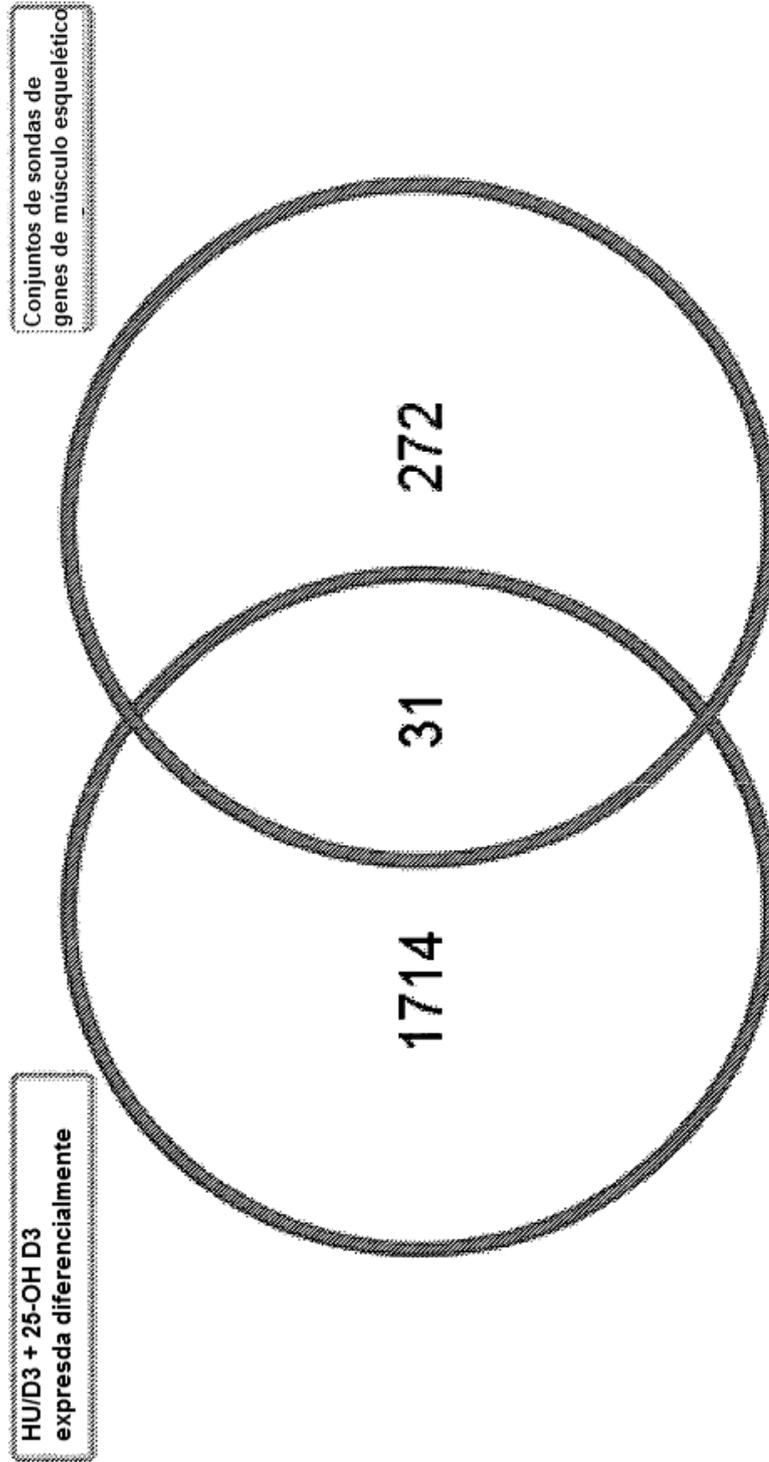


Figura 6

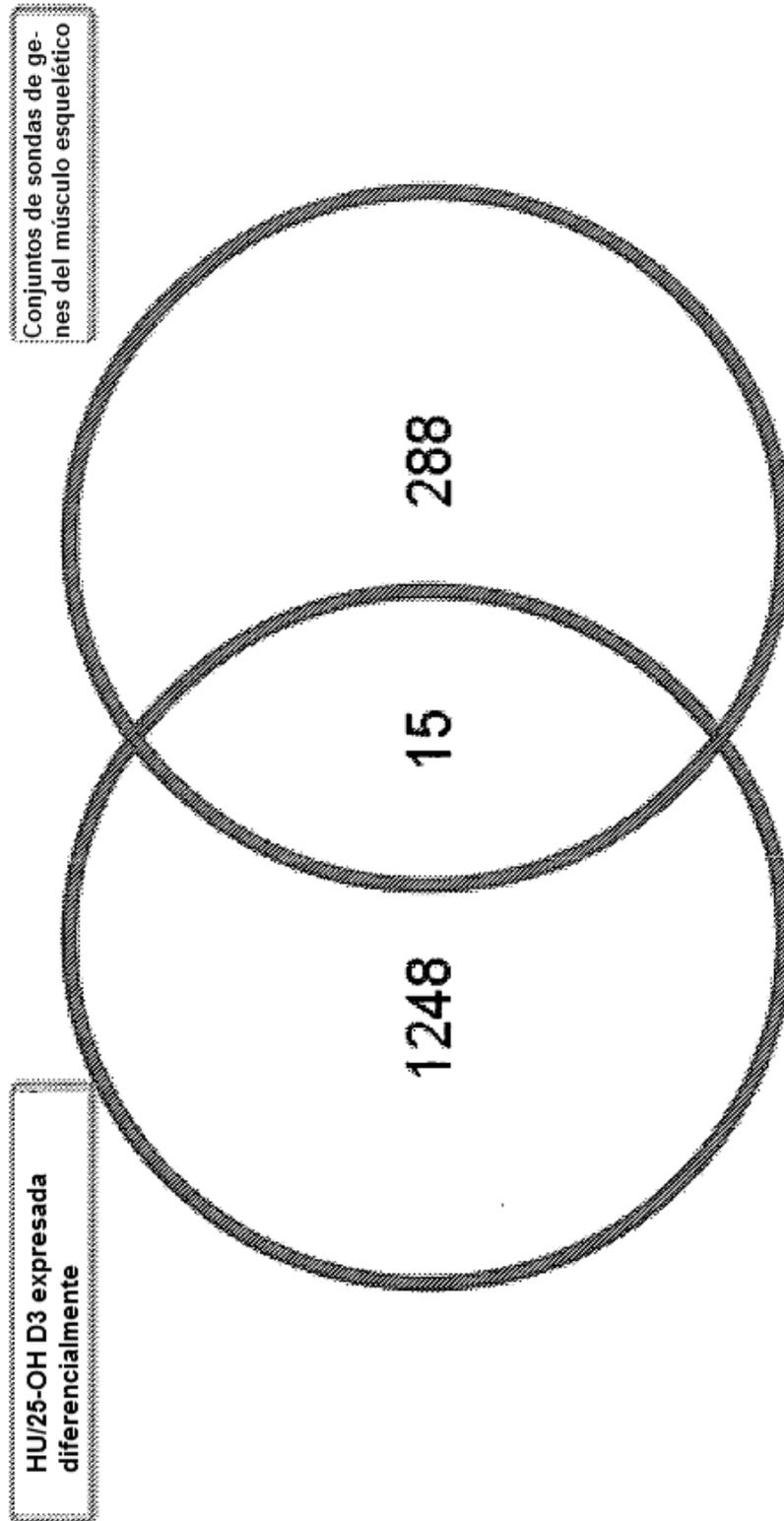


Figura 7

