

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 700**

51 Int. Cl.:

A61K 31/19 (2006.01)
A23L 33/10 (2006.01)
A23L 33/15 (2006.01)
A23L 33/155 (2006.01)
A23L 33/175 (2006.01)
A61K 31/59 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2009 PCT/US2009/067382**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.06.2010 WO10068696**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2009 E 09832494 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2381784**

54 Título: **Intervención nutricional para mejorar la función y resistencia muscular**

30 Prioridad:

09.12.2008 US 121065 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.11.2018

73 Titular/es:

**METABOLIC TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
2711 South Loop Drive Suite 4400
Ames, IA 50010, US**

72 Inventor/es:

**RATHMACHER, JOHN;
FULLER, JOHN;
BAIER, SHAWN;
NISSEN, STEVEN y
ABUMRAD, NAJI**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 689 700 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

Intervención nutricional para mejorar la función y resistencia muscular

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos núm.61/121,065 presentada el 9 de diciembre de 2008y en la presente descripción se incorpora la solicitud de patente provisional por referencia.

Antecedentes de la invención

10 1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición que comprende β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) y vitamina D, y a métodos para usar una combinación de HMB y vitamina D para mejorar la masa, la resistencia o la funcionalidad muscular.

15 2. Antecedentes

HMB

20 El único producto del metabolismo de la leucina es el cetoisocaproato (KIC). Un producto secundario del metabolismo del KIC es el β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB). Se descubrió que el HMB es útil en el contexto de una variedad de aplicaciones. Específicamente, en la Patente de Estados Unidos núm. 5,360,613 (Nissen), el HMB se describe como útil para reducir los niveles de colesterol total y colesterol de lipoproteínas de baja densidad en sangre. En la patente de Estados Unidos núm. 5,348,979 (Nissen y otros), el HMB se describe como útil para promover la retención de nitrógeno en humanos. La patente de Estados Unidos núm. 5,028,440 (Nissen) aborda la utilidad del HMB para aumentar el desarrollo de tejido magro en animales. Además, en la patente de Estados Unidos núm. 4,992,470 (Nissen), el HMB se describe como eficaz para potenciar la respuesta inmune de los mamíferos. La patente de Estados Unidos núm. 6,031,000 (Nissen y otros) describe el uso del HMB y al menos un aminoácido para tratar el desgaste asociado a la enfermedad.

30 Previamente se observó que el HMB solo o en combinación con otros aminoácidos es un complemento eficaz para restaurar la fuerza y la función muscular en atletas jóvenes. Además, se ha observado que el HMB en combinación con dos aminoácidos, glutamina y lisina, es eficaz para aumentar la masa muscular en personas de edad avanzada.

35 El HMB es un metabolito activo del aminoácido leucina. El uso del HMB para suprimir la proteólisis tiene su origen en las observaciones de que la leucina tiene características de preservación de proteínas (1-4). El aminoácido esencial leucina puede usarse para la síntesis de proteínas o transaminarse al α -cetoácido (a-cetoisocaproato, KIC)(1, 3). En una ruta, el KIC puede oxidarse a HMB. Aproximadamente el 5% de la oxidación de la leucina procede a través de la segunda ruta (5). El HMB es superior a la leucina en cuanto a la mejora de la masa y la resistencia muscular. Los efectos óptimos del HMB pueden lograrse utilizando 3,0 gramos por día, o 0,38 g/kg de peso corporal por día, mientras que los de la leucina requieren más de 30,0 gramos por día (3).

40 Una vez producido o ingerido, el HMB parece tener dos destinos. El primer destino es la excreción simple en la orina. Después de que se administra HMB, las concentraciones en orina aumentan, lo que conlleva a una pérdida del HMB en la orina de aproximadamente 20-50% (4, 6). Otro destino se relaciona con la activación del HMB a HMB-CoA (7-16). Una vez convertido a HMB-CoA, puede producirse un metabolismo posterior, ya sea deshidratación del HMB-CoA a MC-CoA, o la conversión directa del HMB-CoA a HMG-CoA (17), que proporciona sustratos para la síntesis de colesterol intracelular. Varios estudios demuestran que el HMB se incorpora a la ruta sintética del colesterol (12, 16, 18-20) y podría ser una fuente de nuevas membranas celulares que se utilizan para la regeneración de membranas celulares dañadas (3). Los estudios en humanos demuestran que el daño muscular después del ejercicio intenso, medido por la elevación de la CPK (creatina fosfoquinasa) plasmática, se reduce con la administración de suplementos de HMB en las primeras 48 horas. El efecto protector del HMB dura hasta tres semanas con el uso diario continuo (21-23).

50 Los estudios *in vitro* en músculo de rata aislado muestran que el HMB es un potente inhibidor de la proteólisis muscular (24) especialmente durante períodos de estrés. Estos hallazgos se han confirmado en humanos; por ejemplo, el HMB inhibe la proteólisis muscular en sujetos que participan en entrenamiento de resistencia (4). Los resultados se han duplicado en muchos estudios (25) (21-23, 26-28).

60 Recientemente se informó sobre los mecanismos moleculares por los cuales el HMB disminuye la degradación de proteínas y aumenta la síntesis de proteínas (29-31, 31-33). En ratones que portan el tumor inductor de caquexia MAC16, el HMB atenuó la degradación de proteínas a través de la regulación negativa de activadores clave de la ruta ubiquitina-proteosoma (30). Además, el HMB atenuó la activación del factor inductor de la proteólisis (PIF) y aumentó la expresión génica de la ruta ubiquitina-proteasoma en miotubos murinos, reduciendo de esta manera la degradación de proteínas (31). El PIF inhibe la síntesis de proteínas en miotubos murinos en un 50% y el HMB atenúa esta disminución en la síntesis de proteínas (29). Eley y otros demostraron que el HMB aumenta la síntesis de proteínas por varios mecanismos, incluyendo la regulación negativa de la fosforilación del factor 2 de inicio eucariótico (eIF2) mediante un efecto sobre la proteína quinasa dependiente de dsRNA (PKR) y la regulación positiva de la ruta del blanco de la rapamicina en mamíferos/proteína cinasa de 70-kDa de la proteína S6 (mTOR/p70^{S6k}). El resultado final es un aumento de la fosforilación

de la proteína de unión a 4E (4E-BP1) y un aumento en el complejo eIF4G·eIF4E activo. La leucina comparte muchos de estos mecanismos con el HMB, pero el HMB parece ser más potente para estimular la síntesis de proteínas (29).

5 El HMB también puede aumentar la síntesis de proteínas al atenuar la ruta común que media los efectos de otros factores catabólicos como lipopolisacárido (LPS), factor de necrosis tumoral- α /interferón- γ (TNF- α /IPN- γ) y angiotensina II (Ang II) (32, 33). El HMB actúa atenuando la activación de las caspasas-3 y -8, y la posterior atenuación de la activación de PKR y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la regulación a la baja de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (p38MAPK). Se conoce que el aumento de la formación de ROS induce la degradación de proteínas a través de la ruta ubiquitina-proteasoma. El HMB consigue esta atenuación a través de la autofosforilación de PKR y la posterior fosforilación del eIF2 α , y en parte, a través de la activación de la ruta mTOR.

10 Numerosos estudios demuestran que una dosis eficaz de HMB es 3.0 gramos por día como CaHMB (~38 mg/kg de peso corporal-día⁻¹). Esta dosificación aumenta la masa muscular y el incremento de resistencia asociado con el entrenamiento de resistencia, mientras que minimiza el daño muscular asociado con el ejercicio vigoroso (34) (4, 23, 26). La seguridad del HMB ha sido comprobada, mostrando que no muestra efectos secundarios en adultos jóvenes o adultos sanos (35-37). También se demostró la seguridad del HMB en combinación con L-arginina y L-glutamina cuando se suministra a pacientes con AIDS y cáncer (38).

15 Los estudios en humanos también demuestran que la suplementación dietética con 3 gramos de CaHMB por día más aminoácidos atenúa la pérdida de masa muscular en diversas enfermedades, como el cáncer y AIDS. (3, 4, 26, 34, 39, 40) Un meta-análisis de suplementos para aumentar la masa magra y la resistencia con entrenamiento con pesas mostró que el HMB es uno de los únicos 2 suplementos dietéticos que aumentan la masa magra y la resistencia con el ejercicio (34). Más recientemente, se demostró que el HMB y los aminoácidos arginina y lisina aumentaron la masa magra en una población anciana que no realiza ejercicio, en un estudio de un año.

25 Vitamina D

La vitamina D se asocia clásicamente con el metabolismo del calcio y el fósforo y la resistencia ósea. Hasta hace poco, se definió un nivel adecuado de vitamina D usando el raquitismo por deficiencia de vitamina D. Mientras que el 1,25OH₂-VitD₃ es el metabolito activo de la vitamina D, una medida del estado de la vitamina D ampliamente aceptada es el 25-OH VitD₃ que circula en el suero (sangre). Un nivel de sangre circulante entre 10 y 15 ng de 25-OH VitD₃/mL causará raquitismo en niños pequeños y se acepta como un nivel de deficiencia de la vitamina D. La vitamina D puede sintetizarse por humanos con una exposición adecuada al sol o puede obtenerse a través de la dieta y a través de suplementos dietéticos. Muchos factores influyen en la cantidad y efectividad de la vitamina D que se encuentra en el cuerpo. Estos factores incluyen la ingesta dietética, la exposición al sol, el número de receptores de vitamina D (VDR), la velocidad de conversión de colecalciferol a 25OHD y finalmente la conversión de 25-OH VitD₃ a 1,25OH₂-VitD₃.

30 La mayoría de la población de las latitudes septentrionales (la mayoría de los Estados Unidos) no produce vitamina D en el invierno independientemente de la exposición al sol porque los rayos ultravioleta B del sol no llegan a la tierra durante ese tiempo y, por lo tanto, la única fuente de vitamina D es dietética (42). Como la 25 hidroxilación ocurre en el hígado y la 1 hidroxilación ocurre principalmente en el riñón, estos dos órganos juegan un papel importante en la determinación de los niveles circulantes de vitamina D, y el funcionamiento de estos órganos y por lo tanto el estado de la vitamina D tiende a disminuir con la edad (42).

35 En una revisión reciente, Holick detalla investigaciones que muestran que los niveles circulantes de 25-OH VitD₃ deben alcanzar hasta 30-40 ng/ml antes de que los niveles de la hormona paratiroidea (PTH) comiencen a ser constantes (43). Otros investigadores encontraron que el aumento de 25-OH VitD₃ de 20 a 32 ng/ml aumenta el transporte intestinal de calcio (44). Ambos criterios apuntarían a que se requiere un nivel de 25-OH VitD₃ de 30 ng/ml o superior para una regulación óptima del metabolismo del calcio en el cuerpo. Una revisión reciente de Heaney que toma en cuenta varios aspectos además de la salud ósea y el metabolismo del calcio describe que el nivel óptimo de 25-OH VitD₃ es de 32 ng/ml o más para una salud óptima (45). Según estos estándares, del 40 al 100% de hombres y mujeres ancianos independientes tienen deficiencia de vitamina D (43).

40 La 1-alfa, 25-vitamina D hidroxilasa en el riñón se considera la principal fuente de síntesis del metabolito activo circulante de la vitamina D, 1,25OH₂-VitD₃. La actividad de esta enzima está regulada en todo el cuerpo por la hormona paratiroidea (PTH). La regulación del 1,25OH₂-VitD₃ a nivel de todo el cuerpo probablemente no proporciona los niveles óptimos de la vitamina activa para todos los tejidos corporales a la vez. Recientemente se identificaron 1-alfa, 25-vitamina D hidroxilasas relativamente específicas de tejido y se cree que median las respuestas autocrinas de la vitamina D a nivel específico de tejido (46, 47). El músculo liso vascular humano tiene actividad 1-alfa, 25-vitamina D hidroxilasa con una Km de 25 ng/ml. Esto significa que la enzima funciona a la mitad de su capacidad máxima a una concentración de 25-OH VitD₃ de 25 ng/ml (48). Por lo tanto, pueden ser necesarios niveles séricos de >25 ng/ml para producir la cantidad óptima de vitamina D activa para las células musculares lisas vasculares.

45 La resistencia muscular disminuye con la edad y un síntoma de deficiencia de la vitamina D recientemente caracterizado es la debilidad del músculo esquelético (43). La deficiencia de vitamina D y su efecto hormonal sobre la masa muscular y la fuerza (sarcopenia) se describió como un factor de riesgo de caídas y fracturas óseas en los ancianos (49). La pérdida

de resistencia muscular se correlacionó con una pérdida de los receptores de vitamina D (VDR) en las células musculares (50). La vitamina D suplementaria de al menos 800 UI por día puede dar lugar a un aumento clínicamente significativo de los VDR en las células musculares, que puede ser en parte el mecanismo por el que otros estudios han demostrado una mejora en el equilibrio corporal, la resistencia muscular y el riesgo de caída con el suplemento de Vitamina D a este nivel (51). Si bien dicha debilidad muscular asociada con la vitamina D puede no ser sorprendente en los niveles clásicos de deficiencia de vitamina D (25OH-VitD₃ en sangre de <15 ng/ml), Bischoff-Ferrari y otros continuaron observando mejoría en el funcionamiento de la extremidad inferior hasta y con más de 40 ng de 25-OH VitD₃/mL los cuales son niveles muy superiores a los que previamente se creían necesarios para obtener el máximo beneficio (52). Esta observación se confirmó por otros investigadores y que, de hecho, los niveles mínimos de vitamina D necesarios para prevenir el raquitismo no permiten el máximo rendimiento físico (53). Un editorial reciente en *American Journal of Clinical Nutrition* declaró que toda la literatura disponible indicaría que un nivel de 25OH-VitD₃ de al menos 30 ng/ml es óptimo para la salud y la enfermedad (54).

Si bien el mecanismo exacto aún no es claro, está claro que tanto el metabolito activo, 1,25OH₂-VitD₃ como su precursor, 25-OH VitD₃, juegan un papel importante en el funcionamiento normal del músculo. El músculo contiene VDR para 1,25OH₂-VitD₃, que se encuentran tanto en el núcleo como en la membrana celular (55-57) y que también están implicados en la unión no específica 25-OH VitD₃ (58). Los estudios de Haddad y Birge, publicados en la década de 1970, muestran que el suministro de D₃ a ratas deficientes en vitamina D, 7 horas antes de la medición, aumentó la síntesis de proteínas medida por la incorporación de ³H - leucina en proteínas de células musculares. Sin embargo, cuando se extrajeron los músculos de las ratas deficientes en vitamina D y se estudiaron, solo 25-OH Vit D₃ actúa directamente en los músculos (58-60).

La evidencia clínica inicial apuntaba a una miopatía reversible asociada con la deficiencia de vitamina D (61). Los receptores de vitamina D se descubrieron en el tejido muscular, proporcionando así evidencia directa del efecto de la vitamina D sobre la función muscular (51, 62). Las biopsias musculares en adultos con deficiencia de vitamina D exhiben principalmente atrofia de fibras musculares tipo II (63). Las fibras tipo II son importantes porque son las que primero se inician para prevenir una caída. Un estudio aleatorizado controlado reciente encontró que la suplementación diaria de 1,000 UI de Vitamina D₂ en ancianos sobrevivientes de accidente cerebrovascular resultó en un incremento en el diámetro medio de la fibra tipo II y en el porcentaje de fibras tipo II (64). También hubo una correlación entre el nivel sérico de 25-OH VitD₃ y el diámetro de la fibra tipo II.

La vitamina D transmite su acción uniéndose a los VDR. Los VDR se expresan en etapas particulares de la diferenciación de mioblastos a miotubos (55, 65, 66). Se han descrito dos VDR diferentes. Uno se encuentra en el núcleo y actúa como un receptor nuclear y el otro se encuentra en la membrana celular y actúa como un receptor celular. Los ratones mutantes VDR se caracterizan por una reducción en el peso corporal y el tamaño, así como también por una coordinación motora deteriorada (67). El VDR nuclear es un factor de transcripción nuclear dependiente de ligando que pertenece a la superfamilia de genes de receptores de hormonas tiroideas esteroideas (68). Bischoff y otros (69) informaron la primera detección *in situ* de VDR en tejido muscular humano con tinción intranuclear asociada significativa para VDR. Una vez que 1,25OH₂-VitD₃ se une a su receptor nuclear, causa cambios en la transcripción del ARNm y la posterior síntesis de proteínas (70). Se sabe que la ruta genómica influye en la captación de calcio muscular, el transporte de fosfato a través de la membrana celular, el metabolismo de los fosfolípidos y la proliferación y diferenciación de las células musculares. El 1,25OH-VitD₃ regula la captación de calcio muscular al modular la actividad de las bombas de calcio en el retículo sarcoplasmático y el sarcolema (61). Las modificaciones de los niveles de calcio afectan la función muscular (71). *Los experimentos in vitro* respaldan estos hallazgos al demostrar un aumento en la captación de ⁴⁵Ca en células expuestas a niveles fisiológicos de 1,25OH₂-VitD₃ (72). La proteína de unión a calcio calbindina D-9K se sintetiza como resultado de la activación del VDR nuclear (62). El 1,25OH₂-VitD₃ desempeña un papel en la regulación del metabolismo del fosfato en los mioblastos al acelerar la absorción y acumulación de fosfato en las células. El 1,25OH₂-VitD₃ actúa rápidamente, presumiblemente a través de los VDR de membrana celular (56, 57). Mientras se une a estos receptores, hay una activación de las rutas de segundo mensajero (proteínas G, cAMP, inositol trifosfato, ácido araquidónico) (73-75) o la fosforilación de las proteínas intracelulares. Estos a su vez activarían la proteína quinasa C (PKC), lo que llevaría a la liberación de calcio en las células musculares y, finalmente, a un transporte activo de Ca al retículo sarcoplasmático por la Ca-ATPasa. Este proceso es importante para la contracción muscular. Adicionalmente, la PKC afecta el aumento de la síntesis de proteínas en las células musculares (76). Datos recientes (77) indican que el 1,25-OH VitD₃ tiene una activación rápida de las rutas de señalización de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), que a su vez envían señales a sus objetivos intracelulares que afectan el inicio de miogénesis, proliferación celular, diferenciación o apoptosis.

La vitamina D también puede regular la formación y regeneración de las uniones estrechas y las uniones neuromusculares. Estudios *in vitro* que encontraron que la vitamina D regula la expresión de VDR y el factor de crecimiento neuronal (NGF) en células de Schwann (78). Estudios recientes demostraron que la vitamina D aumenta el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF) en ratas y que esto puede tener efectos beneficiosos en la enfermedad neurodegenerativa (79). Por lo tanto, la vitamina D podría actuar a través de varios mecanismos de la función celular y la interacción neuronal para mejorar la resistencia y la función muscular generales.

Existe la necesidad de una composición y métodos para aumentar la masa y mejorar la función y la resistencia muscular. La presente invención comprende una composición y métodos para el uso de una combinación de Vitamina D y HMB que conlleva a un aumento de la masa muscular y una mejora en la resistencia y la función muscular.

Las composiciones que comprenden HMB y vitamina D para aumentar la masa o la resistencia muscular se describieron anteriormente en US 2005/215640A1, US 2007/142469A1 y US 2004/071825

5 Resumen de la invención

La invención se describe mejor mediante las reivindicaciones. Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición para aumentar la masa, la resistencia o la funcionalidad muscular.

10 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para administrar una composición para aumentar la masa muscular, la resistencia o la funcionalidad.

Estos y otros objetos de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica con referencia a la siguiente especificación, dibujos y reivindicaciones.

15 La presente invención pretende superar las dificultades encontradas hasta ahora. Para ese fin, se proporciona una composición que comprende HMB y vitamina D. La composición se administra a un sujeto que lo necesita para aumentar la masa, la resistencia y la funcionalidad muscular. Todos los métodos comprenden la administración al animal de HMB y vitamina D.

20 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1a es un gráfico que muestra los cambios en la masa muscular en el sujeto dependiendo del estado de la vitamina D.

25 La Figura 1b es un gráfico que muestra la resistencia total de la rodilla en función del estado de la vitamina D con la administración de HMB.

La Figura 2a es un gráfico que muestra los niveles séricos de vitamina D en sujetos.

La Figura 2b es un gráfico que muestra la resistencia a la extensión de la rodilla en sujetos.

La Figura 2c es un gráfico que muestra un índice de rendimiento de ocho semanas en sujetos.

30 La Figura 3 muestra la relación Proteína:ADN y la degradación de proteínas en células C₂C₁₂.

La Figura 4a es un gráfico que muestra los niveles séricos de vitamina D en sujetos.

La Figura 4b es un gráfico que muestra la excreción de HMB en orina en sujetos.

35 Descripción detallada de la invención

La presente invención comprende una combinación de HMB y vitamina D que tiene un efecto sinérgico y mejora la resistencia y la función muscular generales. La combinación de HMB y vitamina D da como resultado mejoras significativas en la masa muscular, la función y la resistencia generales. Esta combinación puede usarse en todos los grupos de edad buscando mejorar la masa muscular, la función y la resistencia generales. Los métodos a continuación describen y muestran un aumento de la masa muscular, la función y la resistencia generales incluso en animales sin ejercicio.

40 Un uso específico del HMB y la vitamina D es en la población anciana o de edad avanzada. Las estimaciones actuales colocan a una gran parte de la población de mayor edad en riesgo de caídas con posibles morbilidades asociadas significativas. La combinación de HMB y vitamina D se dirige específicamente a la masa, la resistencia y la función muscular y, en consecuencia, puede producir una mejora significativa en la salud, la calidad de vida y, en particular, la disminución de caídas y lesiones en este grupo.

45 La población más joven también se beneficia de la administración de HMB y vitamina D, en parte debido a la presencia generalizada de deficiencia de vitamina D. Las mujeres también se benefician de la administración de HMB y vitamina D ya que las mujeres son propensas a la deficiencia de vitamina D.

La presente invención proporciona una composición que comprende HMB y vitamina D. La composición se administra a un animal que necesita una mejora en la masa, la resistencia o la función muscular generales.

55 La composición de HMB y vitamina D se administra a un animal de cualquier manera adecuada. Las formas aceptables incluyen, pero no se limitan a, sólidos, tales como tabletas o cápsulas, y líquidos, tales como soluciones enterales o intravenosas. Además, la composición puede administrarse utilizando cualquier portador aceptable farmacéuticamente. Los portadores aceptables farmacéuticamente se conocen bien en la técnica y ejemplos de tales portadores incluyen diversos almidones y soluciones salinas. En la modalidad preferida, la composición se administra en una forma comestible.

60 El ácido β-hidroxi-β-metilbutírico o ácido β-hidroxi-isovalérico puede representarse en su forma de ácido libre como (CH₃)₂(OH)CCH₂CCOOH. El término "HMB" se refiere al compuesto que tiene la fórmula química anterior, tanto en sus formas de ácido libre como de sal, y los derivados de estos. Aunque puede usarse cualquier forma de HMB dentro del contexto de la presente invención, preferiblemente el HMB se selecciona del grupo que comprende un ácido libre, una sal, un éster y una lactona. Los ésteres de HMB incluyen ésteres metílicos y etílicos. Las lactonas de HMB incluyen

isovalaril lactona. Las sales de HMB incluyen sal de sodio, sal de potasio, sal de cromo, sal de calcio, sal de magnesio, sales de metales alcalinos y sales de metales térreos.

5 Los métodos para producir el HMB y sus derivados se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, el HMB puede sintetizarse por oxidación de diacetona alcohol. Un procedimiento adecuado se describe por Coffman y otros, J. Am. Chem. Soc. 80: 2882-2887 (1958). Como se describe en la presente descripción, el HMB se sintetiza mediante una oxidación alcalina con hipoclorito sódico de diacetona alcohol. El producto se recupera en forma de ácido libre, que puede convertirse en una sal. Por ejemplo, el HMB puede prepararse como su sal de calcio por un procedimiento similar al de Coffman y otros en el que el ácido libre de HMB se neutraliza con hidróxido de calcio y se recupera por cristalización en una solución acuosa de etanol. La sal de calcio de HMB está disponible comercialmente en Metabolic Technologies, Ames, Iowa.

15 La vitamina D está presente en la composición en cualquier forma. En la modalidad preferida, se administra Vitamina D₃ (colecalfiferol), pero la invención no se limita a esa forma de Vitamina D. Mientras que la Vitamina D₃ es la forma sintetizada y preferida de la vitamina D en los mamíferos, los mamíferos también pueden usar Vitamina D suplementaria. La vitamina D₂ puede ser menos potente que la vitamina D₃, por lo tanto, puede necesitarse D₂ adicional para aumentar los niveles de 25-OH VitD₂.

20 Cuando la composición se administra por vía oral en una forma comestible, la composición está preferiblemente en forma de un producto alimenticio o medio farmacéutico, con mayor preferencia en forma de un producto alimenticio. Cualquier producto alimenticio adecuado que comprenda la composición puede utilizarse dentro del contexto de la presente invención. Con el fin de preparar la composición como un producto alimenticio, la composición se mezclará normalmente con el producto alimenticio apropiado de tal manera que la composición se distribuya de forma sustancialmente uniforme en el producto alimenticio. Alternativamente, la composición puede disolverse en un líquido, tal como agua. Aunque puede usarse cualquier medio farmacéutico adecuado que comprenda la composición dentro del contexto de la presente invención, preferiblemente, la composición se mezcla con un portador farmacéutico adecuado, tal como dextrosa o sacarosa, y se tabula o encapsula subsecuentemente como se describió anteriormente.

30 Además, la composición puede administrarse por vía intravenosa de cualquier manera adecuada. Para la administración por infusión intravenosa, la composición está preferiblemente en una forma no tóxica soluble en agua. La administración intravenosa es particularmente adecuada para pacientes hospitalizados que están recibiendo terapia intravenosa (IV). Por ejemplo, la composición puede disolverse en una solución IV (por ejemplo, una solución salina o glucosa) que se administra al paciente. Además, la composición puede agregarse a soluciones IV nutricionales, que pueden incluir aminoácidos y/o lípidos. Las cantidades de la composición a administrar por vía intravenosa pueden ser similares a los niveles usados en la administración oral. La infusión intravenosa puede ser más controlada y precisa que la administración oral.

40 Los métodos para calcular la frecuencia con la que se administra la composición se conocen bien en la técnica y puede usarse cualquier frecuencia de administración adecuada dentro del contexto de la presente invención (por ejemplo, una dosis de 6g por día o dos dosis de 3g por día) y durante cualquier período de tiempo adecuado (por ejemplo, puede administrarse una sola dosis durante un período de tiempo de cinco minutos o durante un período de tiempo de una hora, o, alternativamente, pueden administrarse dosis múltiples durante un período de ocho semanas). La combinación de HMB y vitamina D puede administrarse durante un período de tiempo prolongado, como meses o años.

45 Un experto en la técnica entenderá que el HMB y la vitamina D no tienen que administrarse en la misma composición para realizar los métodos reivindicados. Dicho de otra manera, las cápsulas, píldoras, mezclas, etc. separadas de vitamina D y de HMB pueden administrarse a un sujeto para llevar a cabo los métodos reivindicados.

50 Los métodos para calcular dosis apropiadas se conocen bien en la técnica. La cantidad de dosificación de HMB puede expresarse en términos de la cantidad molar correspondiente de Ca-HMB. El intervalo de dosificación dentro del cual el HMB puede administrarse por vía oral o intravenosa está dentro del intervalo de 0,01 a 0,2 gramos de HMB (Ca-HMB) por kilogramo de peso corporal por 24 horas. Para adultos, asumiendo pesos corporales de aproximadamente 100 a 200 lbs., la cantidad de dosificación oral o intravenosa de HMB (base de Ca-HMB) puede variar de 0,5 a 30 gramos por sujeto por 24 horas.

55 La cantidad de vitamina D en la composición puede seleccionarse en una cantidad de vitamina D dentro del intervalo de más de 500UI, ya que los ejemplos a continuación indican que 500UI es el umbral más bajo para una cantidad eficaz en individuos con niveles inadecuados de vitamina D en su torrente sanguíneo, pero no demasiada vitamina D como para ser tóxica. Además, la composición incluye vitamina D en cantidades suficientes para elevar los niveles de vitamina D en sangre a al menos alrededor de 30 ng/ml.

60 En la modalidad preferida, la composición comprende HMB en forma de su sal de calcio y vitamina D en forma de 25-OH Vit D₃. Preferiblemente, una composición de acuerdo con la presente invención comprende HMB en una cantidad de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 30 g y 25-OH VitD en una cantidad superior a 500 UI, pero no en una cantidad suficientemente alta para ser tóxica. Un intervalo de vitamina D de acuerdo con esta invención es de aproximadamente 1000 UI a aproximadamente 4000 UI. Por ejemplo, 1001UI, 1002UI, 1003UI... 1995UI, 1996UI, 1997UI, 1998UI, 1999UI,

2000UI, 2001UI, 2002UI, 2003UI, 2004UI, 2005UI... 3997UI, 3998UI, 3999UI, y todos los números entre aproximadamente 1000 UI y 4000 UI y no especificados de cualquier otra manera.

5 En una modalidad adicional, la composición de acuerdo con la presente invención comprende HMB en una cantidad de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 30 g y vitamina D en una cantidad suficiente para aumentar los niveles circulantes en sangre de 25-OH VitD₃ o 25-OH VitD₂, en dependencia de la forma suplementada, a al menos aproximadamente 30 ng/ml. En general, se administra una cantidad de HMB y vitamina en niveles suficientes para mejorar la resistencia, la función y la masa muscular generales durante un período de tiempo efectivo.

10 La invención proporciona un método para administrar una composición de HMB y vitamina D a un animal de manera que la masa muscular del animal aumenta. El animal puede o no realizar ejercicio. Hacer ejercicio en conjunto con la administración de HMB y vitamina D da como resultado una mejora aún mayor en la resistencia y la función muscular, pero el ejercicio no es necesario para mejorar la resistencia y la función muscular. La cantidad de HMB y vitamina D en la composición administrada que son eficaces para aumentar la masa muscular del animal puede determinarse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. En una modalidad, la cantidad eficaz de HMB en la composición puede ser de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 30 g y la cantidad eficaz de vitamina D en la composición puede ser mayor a aproximadamente 500UI por un período de 24 horas. Dentro de la invención, la cantidad eficaz de HMB es la misma, y la cantidad eficaz de vitamina D es aquella suficiente para aumentar los niveles sanguíneos de vitamina D a al menos aproximadamente 30 ng/ml. La invención proporciona un método para administrar una composición de HMB y vitamina D a un animal de manera que la resistencia del animal aumenta. El animal puede o no realizar ejercicio. La cantidad de HMB y vitamina D en la composición administrada que son eficaces para aumentar la masa muscular del animal puede determinarse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. En una modalidad, la cantidad eficaz de HMB en la composición puede ser de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 30 g y la cantidad eficaz de vitamina D en la composición puede ser mayor a aproximadamente 500UI por un período de 24 horas. Dentro de la invención, la cantidad eficaz de HMB es la misma, y la cantidad eficaz de vitamina D es aquella suficiente para aumentar los niveles sanguíneos de vitamina D a al menos 30 ng/ml. La invención comprende además un método para administrar una composición de HMB y vitamina D en una cantidad eficaz para mejorar la función muscular. La cantidad de HMB y vitamina D en la composición administrada que son eficaces para aumentar la masa muscular del animal puede determinarse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. En una modalidad, la cantidad eficaz de HMB en la composición puede ser de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 30 g y la cantidad eficaz de vitamina D en la composición puede ser mayor a aproximadamente 500UI. Dentro de la invención, la cantidad eficaz de HMB es la misma, y la cantidad eficaz de vitamina D es aquella suficiente para aumentar los niveles sanguíneos de vitamina D a al menos aproximadamente 30 ng/ml.

EJEMPLOS

35 Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, pero no debe interpretarse que limitan su alcance de ningún modo. Por ejemplo, las cantidades de HMB y vitamina D administradas y la duración de la suplementación no están limitadas a lo que se describe en los ejemplos.

40 Estos ejemplos demuestran el sorprendente resultado de que la combinación de vitamina D y HMB mejora la resistencia y la función muscular. Anteriormente se conocía que la administración de suplementos de HMB aumenta la masa muscular, pero no se observó una mejora correspondiente en la resistencia y la función muscular con solo HMB. Los ejemplos demuestran que cuando los niveles séricos de vitamina D alcanzan niveles adecuados, la mayoría de las veces a través de la administración de suplementos, la resistencia y la función muscular mejoran.

Ejemplo 1

45 Se conoce que la administración de HMB y aminoácidos, específicamente arginina y lisina, administrados a la población que no realiza ejercicio da como resultado incrementos significativos en la masa magra y mejora en el recambio proteico. Debido a los aumentos en la masa magra y la mejora en el recambio proteico, se esperaba que la administración de HMB y aminoácidos también mejorara la resistencia y la función. La administración de HMB y aminoácidos solos, sin embargo, no da como resultado una mejora en la resistencia, la función o ambas. En cambio, se observa una pérdida gradual de la resistencia del puño y la pierna. El siguiente ejemplo demuestra que la cantidad de vitamina D en el torrente sanguíneo afecta si la administración de HMB muestra una mejora en la resistencia y/o función muscular. Los datos demuestran que la administración de HMB, arginina y lisina (HMB/ARG/LYS) y vitamina D es superior a la administración de HMB/ARG/LYS solo o de vitamina D sola. Estos resultados muestran un efecto sinérgico entre el HMB y la vitamina D para mejorar la resistencia y la función muscular.

Métodos

60 Se estudiaron los efectos de HMB, arginina y lisina (HMB/ARG/LYS) sobre la resistencia y la función muscular en ancianos hombres (n=38) y mujeres (n=39) con una edad promedio de 76,0 ± 1,6 años (80). Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a cualquiera de los tratamientos con HMB/ARG/LYS (n=40) o a un grupo de control isonitrógeno (n=37) para un estudio de un año. Los suplementos se tomaron una vez al día en la mañana con el desayuno y todos los suplementos suministraron 0,1 g de ácido ascórbico por día. El HMB/ARG/LYS contenía 2 g de CaHMB, 5 g de arginina y 1,5 g de lisina. El control contenía 5,6 g de alanina, 0,9 g de ácido glutámico, 3,1 g de glicina y 2,2 g de serina. Los

5 suplementos se suministraron como un polvo con sabor a naranja listo para mezclar. Los sujetos que pesaban más de 68 kg recibieron suplementos que contenían 1,5 veces la dosis anterior para mantener cerca de 38 mg/kg de peso corporal por día de ingesta de CaHMB, ya que se ha demostrado que es una ingesta eficaz de HMB por día. La masa de tejido magro se midió usando dos métodos independientes, el análisis de impedancia bioeléctrica (BIA) y la absorciometría de rayos X de energía dual (DXA). La resistencia se midió en las extremidades superiores e inferiores.

10 Se realizó el análisis retrospectivo de 25-OH VitD₃ en suero en el mismo cohorte y los datos se estratificaron en función del estado de vitamina D de los sujetos dentro de cada grupo original de tratamiento. Un "estado adecuado de vitamina D" se definió como el nivel sérico de 25-OH VitD₃ de ≥ 30 ng/ml (82-84). En consecuencia, se identificaron cuatro cohortes: (1) sujetos de control con un nivel de 25-OH VitD₃ <30 ng/ml (n=25); (2) sujetos HMB/ARG/LYS con un nivel de 25-OH VitD₃ <30 ng/ml (n=29); (3) sujetos de control con un nivel de 25-OH VitD₃ > 30 ng/ml (n=12); y (4) sujetos HMB/ARG/LYS con un nivel de 25-OH VitD₃ > 30 ng/ml (n=11).

15 Estadística

Los datos, los medios y los cambios en los medios durante el período de 12 meses se analizaron usando un procedimiento de modelos mixtos del Sistema de Análisis Estadístico para Windows (Versión 8.02, SAS Institute, Cary, NC). Un análisis de varianza de mediciones repetidas (ANOVA) que incluyó los valores iniciales de tiempo 0 para la variable medida como una covariable y los principales efectos del sitio, el género y el tratamiento. La masa corporal magra se analizó usando el tiempo lineal y cuadrático por los contrastes de tratamiento.

20 Resultados y análisis

25 La suplementación con HMB/ARG/LYS dio como resultado aumentos estadísticamente significativos en la masa muscular, independientemente del estado de vitamina D. El aumento de 12 meses en la masa magra dentro de las cohortes con 25-OH VitD₃ > 30 ng/ml fue de 0,9 kg, y 0,7 kg en las cohortes con < 30 ng/ml (Figura 1a, p=0,02), que no fueron significativamente diferentes. Sin embargo, independientemente del estado de vitamina D, hubo un aumento significativo en la masa magra durante el suplemento de un año (Figura 1a, p=0,02). Por otro lado, hubo una divergencia significativa en la resistencia muscular en función del estado de la vitamina D (Figura 1b). Las mediciones de "resistencia total de la rodilla" mostraron que el grupo suplementado con HMB/ARG/LYS con 25-OH VitD₃ nivel >30 ng/ml tuvo mejoras significativas en la resistencia muscular. Cuando se comparó este grupo con los otros tres cohortes, hubo un aumento lineal de 21% en la resistencia (p < 0,003).

35 Tomados en conjunto, estos resultados sugieren un efecto sinérgico entre el cóctel complementado con HMB y la vitamina D. Aunque la suplementación HMB/ARG/LYS aumentó la masa muscular (masa libre de grasa) independientemente del estado de la vitamina D, la resistencia solo aumentó con la suplementación HMB/ARG/LYS cuando los sujetos tenían un estado adecuado de vitamina D.

40 La combinación de HMB/ARG/LYS y el nivel adecuado de vitamina D es necesaria y superior a HMB/ARG/LYS solo o a la vitamina D adecuada sola basado en los controles con vitamina D adecuada para mejorar la resistencia y la funcionalidad del músculo. Estos resultados muestran un efecto sinérgico entre el HMB y la vitamina D para mejorar la resistencia y la función muscular.

45 Los estudios previos que examinaron el efecto del HMB en el aumento de la masa muscular no mejoraron significativamente en todos los diseños de estudio (publicados y no publicados). Se cree que el estado de la vitamina D puede no haber sido adecuado para maximizar las ganancias de masa muscular en estos estudios anteriores en los sujetos que recibieron suplementos de HMB. Esto puede ser especialmente cierto en las poblaciones donde el bajo nivel de vitamina D debido a la edad, la ubicación geográfica, la ingesta dietética o la enfermedad estaba en cuestión. En consecuencia, la suplementación con una combinación de HMB y vitamina D puede no solo aumentar la resistencia muscular y la funcionalidad sino también restaurar o aumentar la masa muscular en comparación con la suplementación de HMB solo.

50 Ejemplo 2

55 En este ejemplo, a los sujetos se les administró una combinación de HMB y suplementos vitamínicos.

60 Materiales y métodos: Ancianos mujeres (n=30) y hombres (n=16) se reclutaron en un estudio controlado doble ciego. Los adultos mayores se reclutaron de dos lugares en Dakota del Sur: Brookings y Sioux Falls. Los sujetos se sometieron a un cribado inicial y se asignaron al azar a los tratamientos. Las pruebas consistieron en una prueba inicial (0 semanas) y de seguimiento a las 4, 8 y 12 semanas en el transcurso del estudio de 12 semanas.

65 Antes del comienzo del período experimental, asignamos aleatoriamente suplementos nutricionales a cada sujeto usando números aleatorios generados por computadora de forma doble ciego. Los tratamientos se organizaron en un diseño factorial de 2x2 con dos niveles de HMB (0 y 3,0 g/d) y dos niveles de vitamina D (0 y 2.000 UI/d). Asignamos sujetos a uno de los siguientes cuatro tratamientos:

- (1) Control
- (2) HMB (sal de calcio), 3,0 g/día
- (3) 2.000 UI de vitamina D/día
- (4) HMB, 3,0 g/día + 2.000 UI de Vitamina D.

5

Los tratamientos se suministraron en cápsulas de igual tamaño y color y contenían cantidades iguales de calcio y fósforo. Los sujetos fueron instruidos para tomar tres cápsulas dos veces al día. A cada sujeto se le suministró un suministro del suplemento por una semana, asignado por número de sujeto y este regresó cada semana por un suministro adicional de 1 semana.

10

La sesión de entrenamiento y prueba de ejercicio fue supervisada por asociados de investigación capacitados. Se obtuvieron mediciones de la frecuencia cardíaca en reposo y de la presión sanguínea antes de las mediciones de la resistencia. Las personas inscritas participaron en un programa de entrenamiento que consiste en ejercicios de entrenamiento de resistencia con cuerdas de estiramiento Theraband® (entrenamiento de resistencia) y saltos. El equipo consistía en artículos que pueden usarse fácilmente en casa. Las sesiones de ejercicio fueron 3 veces por semana durante 12 semanas. Cada sesión de ejercicio fue de aproximadamente 45-60 minutos. Las sesiones de prueba se realizaron a las 0, 4, 8 y 12 semanas. Cada sesión de prueba duró ~60 minutos.

15

20

El programa de resistencia incorporó los siguientes ejercicios: flexiones de bíceps, extensiones de tríceps, sentadillas de silla, levantamiento de pantorrillas, dorsiflexión de tobillo, levantamientos de frente de hombro y levantamientos laterales, desplegable de dorsal ancho, press de pecho, hileras sentada, flexión y extensión de rodilla y flexión de cadera. Para cada uno de los 12 ejercicios, los participantes completaron 3 series de movimiento isotónico, 2 series de 20 repeticiones y una serie final para el fracaso. Cuando el conjunto 3^{er} podía realizarse por 20 repeticiones en buena forma, la resistencia se incrementó moviéndose al siguiente color de la banda de resistencia. Entre cada serie, los participantes realizaron un conjunto de saltos o pequeños saltos. Inicialmente, se realizaron 5 brincos/saltos después de cada serie. El número de saltos/saltos se incrementó en 5 cada 3 semanas hasta que se alcanzaron 25 brincos/saltos. Los sujetos se quedaron en 25 brincos/saltos entre series durante el resto del estudio. El número de brincos/saltos se redujo u omitió si había quejas con respecto al dolor en las articulaciones. Se ha demostrado que las bandas de resistencia aumentan de forma segura la resistencia y la funcionalidad cuando se usan en una población adulta mayor (87-90).

25

30

Las mediciones de la composición corporal se obtuvieron a las 0, 4, 8 y 12 semanas. Las mediciones de la resistencia de los cuádriceps (extensión/flexión) y los codos (extensión/flexión) se obtuvieron usando el Dinamómetro isocinético BIODEx. La resistencia del puño se midió usando un dinamómetro de puño. El torque máximo para la extensión y flexión de la rodilla se midió a 60, 90 y 120°/seg. El torque máximo para la extensión y flexión del codo se midió a 60 y 120°/seg.

35

Pruebas de funcionalidad incluidas: Rendimiento "Levántate-Anda" (velocidad y puerta) y rendimiento "Levántate". La prueba "Levántate-Anda" consistió en mediciones cronometradas del sujeto comenzando desde una posición sentada, de pie, caminando 3 metros hacia adelante, dando la vuelta, caminando hacia la silla y sentándose. La prueba de "Levántate" consistió en que el sujeto permaneciera de pie desde una posición sentada tantas veces como fuera posible en 30 segundos. Las descripciones completas y la estandarización de las pruebas se describen en *Dimensiones físicas del envejecimiento* de Waneen W. Spirduso (Human Kinetics, 1995).

40

45

Se calculó un índice de rendimiento muscular sumando el cambio porcentual desde el inicio para Levántate-Anda, Levántate, puño, torque máximo para extensión y flexión de la rodilla (60, 90 y 120 °/seg) y torque máximo para extensión y flexión del codo (60 °/seg).

50

A las 0, 4, 8 y 12 semanas, se tomaron muestras de sangre de una vena superficial del brazo en Vacutainers™ (Becton Dickinson, Vacutainer Systems, Rutherford, NJ) después de un ayuno durante toda la noche. Se recogió el suero y se usó para medir 25-OH VitD₃ usando un ensayo de quimioluminiscencia basado en anticuerpos completamente automático (DiaSorin Inc., Stillwater, MN).

55

El Mínimo Cuadrado Promedio ± SEM se calcularon los cambios de resistencia y funcionalidad en cada variable durante el período de 12 semanas. Se usó el procedimiento de modelos mixtos del Sistema de Análisis Estadístico para Windows (Versión 9.1, SAS Institute, Cary, NC) para analizar los datos. Se usó el análisis de covarianza con los efectos principales de la HMB, la vitamina D y la interacción HMB*Vitamina D. Los datos se ajustaron usando la concentración inicial de 25-OH VitD₃ sérica como covariable. La hipótesis fue que la combinación de suplementos de HMB y vitamina D resultaría en mayores mejoras en la resistencia y la funcionalidad en comparación con los sujetos tratados con control, HMB o vitamina D. Este efecto sinérgico se probó con una prueba t de una cola previamente planificada en un análisis post-hoc. La significación estadística se determinó para $p < 0,05$ y se determinó una tendencia para $0,05 < p < 0,10$.

60

65

Resultados y Discusión: Un total de 43 sujetos completaron las 12 semanas y un sujeto completó las 8 semanas del estudio y se incluyó en el análisis. Dos sujetos abandonaron el estudio antes de la visita de seguimiento de 4 semanas y no se utilizaron en el análisis. Los sujetos que abandonaron el estudio lo hicieron debido al exigente compromiso de un estudio de capacitación de 12 semanas y no debido a ningún evento adverso. Las características de los sujetos de los 44 sujetos usados en el análisis se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los sujetos

Parámetro	Control	HMB	VitD ₂₀₀₀	HMB+VitD ₂₀₀₀
n	11	11	11	11
Edad	73,4±2,6 (62-87)	73,5±3,0 (60-89)	72,1±2,8 (61-96)	68,5±2,5 (60-84)
M/F	3/8	4/7	4/7	4/7
+25OH-VitD ₃	29,2±3,0 (12,4-46,5)	25,4±3,0 (12,2-39,7)	24,0±2,0 (11,7-34,3)	27,4±32,0 (15,1-42,9)
#Resistencia de piernas, Extensión	73,9±9,6 (33-148)	64,1±7,4 (23-98,3)	74,8±10,0 (24,7-133)	83,1±10,6 (40,5-146,1)
Flexión	51,4±6,2 (23-95)	43,6±5,3 (14-61)	55,9±6,1 (13,8-83)	51,8±7,7 (18-99)

Los datos se expresan como el promedio ± EE (min-máx)

*Valor umbral

#Pico umbral del torque @60°/seg

La concentración promedio de 25-OH VitD₃ en la semana 0 fue de 26,5 ng/ml. Los sujetos tratados con 2000 UI de vitamina D por día aumentaron su nivel sérico de 25-OH VitD₃ en 10,7 ng/ml (Figura 2a). Sin embargo, los sujetos suplementados con un control o HMB solo disminuyeron su nivel sérico de 25-OH VitD₃ en 2,0 ng/ml. Se utilizó una muestra de orina limpia para evaluar el cumplimiento de los suplementos. Los sujetos suplementados con HMB tuvieron un aumento de 50 veces en la concentración urinaria de HMB, mientras que los sujetos que no consumieron un suplemento HMB no aumentaron la concentración urinaria de HMB.

Los efectos de la combinación de HMB y vitamina D en la resistencia de extensión de la rodilla (torque máximo, 60 °/seg. se presentan en la Figura 2b). La suplementación con HMB + Vitamina D (7,28 ± 5,03 nm) en adultos mayores resulta en un aumento estadísticamente mayor en la resistencia de extensión de la rodilla en ocho semanas en comparación con sujetos tratados con control, P <0,05 (-6,28 ± 5,02 nm). Ni los sujetos tratados con HMB solo ni los tratados con vitamina D aumentaron la resistencia de extensión de la rodilla en comparación con los sujetos tratados con control. Estos datos apoyan nuestra hipótesis de que la combinación de HMB + Vitamina D sería sinérgica en la resistencia muscular.

Aunque no es significativo, el índice de rendimiento tiende a respaldar estas observaciones (ver Figura 2c). El índice de rendimiento no solo incluye las mediciones de la resistencia de las piernas, sino también la funcionalidad, la resistencia del puño y la resistencia del codo. Estas medidas de resistencia y función se suman en un índice de rendimiento general. La combinación de HMB + Vitamina D resultó en un aumento del 146% en el índice de rendimiento sobre el control. Mientras que los suplementos de HMB y vitamina D resultaron en un aumento de solo 35 y 58%, respectivamente, en comparación con los adultos mayores suplementados con el tratamiento control.

Implicaciones: Estos datos de un estudio prospectivo en adultos mayores apoyan la hipótesis de que la combinación de suplementos de HMB y vitamina D es sinérgica, y dio lugar a mejoras significativas en la resistencia muscular de la rodilla y el índice de rendimiento general. Estos datos respaldan la observación de nuestro estudio retrospectivo en una población de ancianos complementada con HMB, Arginina y Lisina. Los aumentos de resistencia muscular solo ocurren con HMB, Arginina y Lisina en adultos mayores con adecuada vitamina D. En conclusión, la combinación de HMB y vitamina D es superior a la HMB o la vitamina D sola y, por lo tanto, es sinérgica. Estos hallazgos son importantes ya que el estado de la vitamina D en aproximadamente el 66% de la población de edad avanzada es baja y conduce a una disminución de la resistencia muscular y la función. La pérdida de resistencia y función conduce a un aumento de las caídas y las fracturas, la mala calidad de vida y, en última instancia, tendrá un impacto en los costos de atención médica.

Ejemplo 3

En este ejemplo, se realizaron estudios de cultivo celular para analizar los efectos del HMB y la vitamina D sobre el recambio de proteínas, ADN y proteínas en cultivos de células musculares.

Estudios recientes *in vitro* demostraron que el HMB disminuye la degradación de proteínas. En un estudio el HMB atenuó la activación del factor inductor de proteólisis (PIF) y aumentó la expresión génica de la ruta ubiquitina-proteosoma en miotubos murinos, reduciendo así la degradación de proteínas (91). Otros estudios también sugieren que el HMB puede influir en la síntesis de proteínas a través de la ruta mTOR (92). Los primeros estudios también sugieren que la vitamina D afecta el metabolismo de las proteínas (93). La vitamina D también se une a un VDR que se encuentra en el núcleo de las células musculares y regula la expresión génica (94). Nuestra hipótesis es que el HMB y la vitamina D tienen efectos en las células musculares y que si actúan a través de mecanismos independientes podría haber un efecto sinérgico en el recambio de proteínas, ADN o proteínas en las células.

Métodos

Los mioblastos de células de músculo esquelético C2C12 de ratón se cultivaron en cultivo en condiciones estándar y se fusionaron en miotubos siguiendo los métodos de Menconi y otros. (95). Cuatro estudios separados se llevaron a cabo durante diferentes semanas. Los primeros 3 estudios consistieron en 4 placas replicadas por tratamiento y el cuarto estudio consistió en 6 placas replicadas por tratamiento. Los tratamientos se aplicaron a las células durante el período de medición de 24 h. Los tratamientos aplicados fueron control, 25-OH VitD₃ (200 ng/ml), HMB (200 μM HMB como Ca (HMB)₂, y la combinación de HMB y 25-OH VitD₃. Se añadió dexametasona (100 nM) al medio de cultivo durante el período de tratamiento/medición para estimular la degradación de proteínas. Se añadió calcio en forma de cloruro de calcio a los tratamientos control y 25-OH VitD₃ para que todos los tratamientos se equilibraran para el calcio. Para la medición de la degradación de proteínas durante el período de tratamiento, se obtuvo medio libre de leucina al cual se añadió ²H₃-leucina para que los isótopos de leucina (leucina natural y -leucina) pudieran medirse a medida que se liberaron en el medio a través del proceso de degradación de proteínas. El medio de medición se muestreó a las 2 y 24 h y las muestras se almacenaron a -80 °C hasta que se analizaron. Las muestras se analizaron para leucina usando cromatografía de gases (modelo 6890, Hewlett Packard, Palo, CA) espectrometría de masas (modelo 5973, Hewlett Packard, Palo, CA) y la columna de cromatografía de gases utilizada para el análisis fue Zebron ZB-5. (Phenomenex, Torrence, CA). Leucina natural, -leucina y -leucina se analizaron a 302, 303 y 305 AMU, respectivamente. Se realizaron correcciones para el muestreo a las 2 h y para la utilización de leucina del medio de medición. La cantidad de isótopos de leucina liberados también se corrigió para su utilización (transaminación y/o síntesis de proteínas) (96). Las concentraciones de proteínas se analizaron siguiendo las instrucciones del ensayo de microplacas usando un kit de ensayo de proteínas BCA Pierce (Thermo Scientific, Rockford, IL). El ADN se midió fluorométricamente usando el kit de ensayo de dsDNA Quant-iT™ de Invitrogen (Carlsbad, CA).

Estadística

Cada placa de cultivo celular se consideró una unidad experimental para el análisis. Los datos presentados son promedios mínimos cuadrados y los datos se analizaron usando Modelos lineales generales en el Sistema de análisis estadístico para Windows (Versión 8.02, SAS Institute, Cary, NC). Los principales efectos del experimento, HMB, vitamina D y la interacción de HMB y vitamina D se incluyeron en el modelo. Se realizó un análisis de promedios mínimos cuadrados post hoc para los medios de tratamiento individuales.

Resultados y análisis

Después del período de tratamiento de 24 h no hubo efectos importantes del tratamiento sobre el contenido total de proteína en las placas de cultivo. No hubo efectos importantes significativos del tratamiento para el contenido de ADN. La relación proteína:ADN con la combinación de HMB y 25-OH VitD₃ (Figura 3) fue significativamente mayor que el grupo control o el grupo de tratamiento solo y la interacción fue significativa (p <0,003). Esta respuesta de interacción significativa para los efectos principales indicaría una respuesta sinérgica de HMB y 25-OH VitD₃ en la relación proteína:ADN. Las medidas de degradación de proteínas y síntesis de proteínas no mostraron efectos importantes significativos del tratamiento sobre la degradación de proteína medida por liberación natural o de leucina en el medio de las células. Hubo, sin embargo, una fuerte tendencia para la interacción entre HMB y 25-OH VitD₃ en la degradación de proteínas medida por -leucina (p <0,08, Figura 3). El análisis promedio de mínimo cuadrado post-hoc de los efectos de HMB solo mostró una disminución significativa en la degradación de proteínas de 7,6 y 6,3%, medida por leucina natural y -leucina, respectivamente (p <0,06). El tratamiento de combinación HMB y 25-OH VitD₃ también disminuyó la degradación proteica, pero la falta de una interacción significativa ni un efecto principal del tratamiento con 25OH-VitD₃ indicaría que el efecto se debió principalmente a HMB. La síntesis de proteínas y la utilización de leucina, medida por la desaparición de -leucina de los medios, no mostraron diferencias entre los tratamientos. La serie actual de estudios muestra que la combinación de HMB y 25-OH VitD₃ aumenta la relación proteína:ADN y que el HMB disminuye la degradación de proteínas. Ambos son indicios de que la célula está produciendo más proteínas, posiblemente de naturaleza funcional. Los datos también muestran que el HMB disminuye la degradación de proteínas estimulada por dexametasona, en depósitos de proteína de renovación más lenta o más rápida naturales o con leucina marcada, respectivamente. La vitamina D tendió a disminuir la degradación de proteínas estimulada por dexametasona solo en el grupo de proteína de renovación más rápida. Esto podría indicar que la vitamina D afecta la síntesis de proteínas funcionales ya que se ha demostrado en otros tipos celulares que la vitamina D aumenta las proteínas de adhesión celular (97, 98). En conclusión, la combinación HMB + vitamina D fue sinérgica en el aumento de la relación proteína:ADN en las células y es compatible con nuestra hipótesis.

Ejemplo 4

La cantidad de vitamina D administrada con HMB debe estar en una cantidad eficaz para elevar el nivel sanguíneo de vitamina D. En este ejemplo, se demuestra que 500UI de vitamina D no aumenta suficientemente el nivel sanguíneo de vitamina D.

Los sujetos con niveles adecuados de vitamina D (niveles de 25-OH VitD₃ en plasma > 30 ng/ml) mostraron mejoras significativas en la función muscular, mientras que aquellos con evidencia bioquímica de deficiencia de vitamina D (niveles de 25OH-VitD₃ <30 ng/ml) no mostraron mejoras en la resistencia y funcionalidad muscular. Si bien la debilidad muscular asociada con la vitamina D puede no ser sorprendente en los niveles de deficiencia de vitamina D clásica (25-OH VitD₃

en sangre de <15 ng/ml), Bischoff-Ferrari y otros continuaron observando mejoría en el funcionamiento de la extremidad inferior hasta y más allá de 40 ng 25-OH VitD₃/mL que son niveles muy superiores a los que previamente se creían necesarios para obtener el máximo beneficio (11). Por lo tanto, la suplementación de vitamina D debería ser adecuada para aumentar 25-OH VitD₃. La Figura 4a muestra la respuesta de 25-OH VitD₃ en sangre cuando se administró un control o suplemento que contenía 500 o 2000 UI de Vitamina D durante 12 semanas en un adulto mayor de más de 65 años. Los sujetos suplementados con el control o con 500 UI de Vitamina D durante 12 semanas no aumentaron la cantidad 25-OH VitD₃ en sangre. Mientras que los sujetos suplementados con 2000 UI de vitamina D aumentaron los niveles sanguíneos en más de 10 ng/ml en 12 semanas. Esta suplementación estableció un nivel en sangre de 25-OH VitD₃ > 30 ng/ml. La Figura 4b muestra los niveles de HMB en la orina en estos sujetos. En conclusión, 2000 UI de vitamina D es suficiente para elevar los niveles sanguíneos 25-OH VitD₃, donde 500 UI es inadecuado. Cuando los niveles de vitamina D se elevan adecuadamente, el uso de HMB produce un aumento en la resistencia y la función muscular.

La descripción y los dibujos anteriores comprenden modalidades ilustrativas de la presente invención. Las modalidades anteriores y los métodos descritos en la presente descripción pueden variar en función de la capacidad, experiencia y preferencia de los expertos en la técnica. El solo hecho de enumerar las etapas del método en un cierto orden no constituye ninguna limitación en el orden de las etapas del método. La descripción y los dibujos anteriores simplemente explican e ilustran la invención, y la invención no se limita a la misma, excepto en la medida en que las reivindicaciones son muy limitadas. Los expertos en la técnica que tengan la descripción ante ellos podrán realizar modificaciones y variaciones sin apartarse del alcance de la invención.

Literatura Citada

1. Krebs, H. A. & Lund, P. (1977) Aspects of the regulation of the metabolism of branched-chain amino acids. *Advan. Enzyme Regul.* 15: 375-394.
2. Harper, A. E., Benevenga, N. J. & Wohlhueter, R. M. (1970) Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiol. Rev.* 53: 428-558.
3. Nissen, S. L. & Abumrad, N. N. (1997) Nutritional role of the leucine metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB). *J. Nutr. Biochem.* 8: 300-311.
4. Nissen, S., Sharp, R., Ray, M., Rathmacher, J. A., Rice, J., Fuller, J. C., Jr., Connelly, A. S. & Abumrad, N. N. (1996) The effect of the leucine metabolite β -hydroxy β -methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. *J. Appl. Physiol.* 81(5): 2095-2104.
5. Nissen, S., Van Koeveering, M. & Webb, D. (1990) Analysis of β -hydroxy- β -methyl butyrate in plasma by gas chromatography and mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 188: 17-19.
6. Frexes-Steed, M., Warner, M. L., Bulus, N., Flakoll, P. & Abumrad, N. N. (1990) Role of insulin and branched-chain amino acids in regulating protein metabolism during fasting. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 258: E907-E917.
7. Robinson, W. G., Bachhawat, B. K. & Coon, M. J. (1954) Enzymatic carbon dioxide fixation by senecieryl coenzyme A. *Fed. Proc.* 13: 281.
8. Rudney, H. & Farkas, T. G. (1955) Biosynthesis of branched chain acids. *Fed. Proc.* September: 757-759.
9. Rabinowitz, J. L., Dituri, F., Cobey, F. & Gurin, S. (1955) Branched chain acids in the biosynthesis of squalene and cholesterol. *Fed. Proc.* 14: 760-761.
10. Coon, M. J. (1955) Enzymatic synthesis of branched chain acids from amino acids. *Fed. Proc.* 14: 762-764.
11. Gey, K. F., Pletsher, A., Isler, O., Ruegg, R. & Wursch, J. (1957) The influence of isoprenic C5 and C6 compounds upon the acetate incorporation into cholesterol. *Helvetica Chim. Acta* 40: 2369 (abs.).
12. Gey, K. F., Pletsher, A., Isler, O., Ruegg, R. & Wursch, J. (1957) Influence of isoprenoid C5 and C6 compounds on the incorporation of acetate in cholesterol. *Helvetica Chim. Acta* 40: 2354-2368.
13. Isler, O., Ruegg, R., Wursch, J., Gey, K. F. & Pletsher, A. (1957) Biosynthesis of cholesterol from β , γ -dihydroxy- β -methylvaleric acid. *Helvetica Chim. Acta* 40: 2369 (abs.).
14. Zabin, I. & Bloch, K. (1951) The utilization of butyric acid for the synthesis of cholesterol and fatty acids. *J. Biol. Chem.* 192: 261-266.
15. Plaut, G. W. E. & Lardy, H. A. (1951) Enzymatic incorporation of C14-bicarbonate into acetoacetate in the presence of various substrates. *J. Biol. Chem.* 192: 435-445.
16. Bloch, K., Clark, L. C. & Haray, I. (1954) Utilization of branched chain acids in cholesterol synthesis. *J. Biol. Chem.* 211: 687-699.
17. Rudney, H. (1954) The synthesis of β -hydroxy- β -methylglutaric acid in rat liver homogenates. *J. Am. Chem. Soc.* 76: 2595.
18. Bachhawat, B. K., Robinson, W. G. & Coon, M. J. (1955) The enzymatic cleavage of beta-hydroxy-beta-methylglutaryl coenzyme A to aceto-acetate and acetyl coenzyme A. *J. Biol. Chem.* 216: 727-736.
19. McAllan, A. B. & Smith, R. H. (1984) The efficiency of microbial protein synthesis in the rumen and the degradability of feed nitrogen between the mouth and abomasum in steers given different diets. *Br. J. Nutr.* 51: 77-83.
20. Adamson, L. F. & Greenberg, D. M. (1957) The significance of certain carboxylic acids as intermediates in the biosynthesis of cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* 23: 472-479.
21. Jówko, E., Ostaszewski, P., Jank, M., Sacharuk, J., Zieniewicz, A., Wilczak, J. & Nissen, S. (2001) Creatine and β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) additively increases lean body mass and muscle strength during a weight training program. *Nutr.* 17: 558-566.
22. Knitter, A. E., Pantoni, L., Rathmacher, J. A., Petersen, A. & Sharp, R. (2000) Effects of β -hydroxy- β -methylbutyrate on muscle damage following a prolonged run. *J. Appl. Physiol.* 89(4): 1340-1344.

23. Gallagher, P. M., Carrithers, J. A., Godard, M. P., Schulze, K. E. & Trappe, S. W. (2000) β -Hydroxy- β -methylbutyrate ingestion, Part I: Effects on strength and fat free mass. *Med Sci Sports Exerc* 32(12): 2109-2115.
24. Ostaszewski, P., Kostiuk, S., Balasinska, B., Jank, M., Papet, I. & Glomot, F. (2000) The leucine metabolite 3-hydroxy-3-methylbutyrate (HMB) modifies protein turnover in muscles of the laboratory rats and domestic chicken in vitro. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Swiss)* 84: 1-8.
- 5 25. Rathmacher, J. A., Zachwieja, J. J., Smith, S. R., Lovejoy, J. L. & Bray, G. A. (2001) The effect of the leucine metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate on lean body mass and muscle strength during prolonged bedrest. *FASEB J* 13: A909.
26. Panton, L. B., Rathmacher, J. A., Baier, S. & Nissen, S. (2000) Nutritional supplementation of the leucine metabolite β -hydroxy β -methylbutyrate (HMB) during resistance training. *Nutr.* 16(9): 734-739.
- 10 27. Slater, G., Jenkins, D., Logan, P., Lee, H., Vukovich, M. D., Rathmacher, J. A. & Hahn, A. G. (2001) β -hydroxy β -methylbutyrate (HMB) supplementation does not affect changes in strength or body composition during resistance training in trained men. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab* 11: 384-396.
28. Vukovich, M. D., Stubbs, N. B. & Bohlken, R. M. (2001) Body composition in 70-year old adults responds to dietary β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) similar to that of young adults. *J. Nutr.* 131(7): 2049-2052.
- 15 29. Eley, H. L., Russell, S. T., Baxter, J. H., Mukherji, P. & Tisdale, M. J. (2007) Signaling pathways initiated by β -hydroxy- β -methylbutyrate to attenuate the depression of protein synthesis in skeletal muscle in response to cachectic stimuli. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 293: E923-E931.
30. Smith, H. J., Mukerji, P. & Tisdale, M. J. (2005) Attenuation of proteasome-induced proteolysis in skeletal muscle by β -hydroxy- β -methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. *Cancer Res.* 65: 277-283.
- 20 31. Smith, H. J., Wyke, S. M. & Tisdale, M. J. (2004) Mechanism of the attenuation of proteolysis-inducing factor stimulated protein degradation in muscle by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. *Cancer Res.* 64: 8731-8735.
32. Eley, H. L., Russell, S. T. & Tisdale, M. J. (2008) Mechanism of Attenuation of Muscle Protein Degradation Induced by Tumor Necrosis Factor Alpha and Angiotensin II by beta-Hydroxy-beta-methylbutyrate. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 295: E1417-E1426.
- 25 33. Eley, H. L., Russell, S. T. & Tisdale, M. J. (2008) Attenuation of depression of muscle protein synthesis induced by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor and angiotensin II by β -hydroxy- β -methylbutyrate. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 295: E1409-E1416.
34. Nissen, S. L. & Sharp, R. L. (2003) Effect of dietary supplements on lean mass and strength gains with resistance exercise: a meta-analysis. *J Appl. Physiol* 94: 651-659.
- 30 35. Kreider, R., Ferreira, M., Wilson, M. & Almada, A. (1999) Effects of calcium beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation during resistance-training on markers of catabolism, body composition and strength. *Int J Sports Med* 20: 503-509.
36. Gallagher, P. M., Carrithers, J. A., Godard, M. P., Schutze, K. E. & Trappe, S. W. (2000) β -Hydroxy- β -methylbutyrate ingestion, Part II: Effects on hematology, hepatic, and renal function. *Med Sci Sports Exerc* 32(12): 2116-2119.
- 35 37. Nissen, S., Panton, L., Sharp, R. L., Vukovich, M., Trappe, S. W. & Fuller, J. C., Jr. (2000) β -Hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) supplementation in humans is safe and may decrease cardiovascular risk factors. *J Nutr* 130: 1937-1945.
38. Rathmacher, J. A., Nissen, S., Panton, L., Clark, R. H., Eubanks, M. P., Barber, A. E., D'Olimpio, J. & Abumrad, N. N. (2004) Supplementation with a combination of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB), arginine, and glutamine is safe and could improve hematological parameters. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 28: 65-75.
- 40 39. Eubanks May, P., Barber, A., Hourihane, A., D'Olimpio, J. T. & Abumrad, N. N. (2002) Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of β -hydroxy- β -methylbutyrate, arginine, and glutamine. *Am. J. Surg.* 183: 471-479.
40. Clark, R. H., Feleke, G., Din, M., Yasmin, T., Singh, G., Khan, F. & Rathmacher, J. A. (2000) Nutritional treatment for acquired immunodeficiency virus-associated wasting using β -hydroxy- β -methylbutyrate, glutamine and arginine: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 24(3): 133-139.
- 45 41. Baier, S., Johannsen, D., Abumrad, N. N., Rathmacher, J. A., Nissen, S. L. & Flakoll, P. J. (2009) Year-long changes in lean body mass in elderly men and women supplemented with a nutritional cocktail of β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB), arginine, and lysine. *JPEN* 33: 71-82.
42. Webb, A. R., Kline, L. & Holick, M. F. (1988) Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin. *J Clin. Endocrinol. Metab* 67: 373-378.
- 50 43. Holick, M. F. (2007) Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* 357: 266-281.
44. Heaney, R. P., Dowell, M. S., Hale, C. A. & Bendich, A. (2003) Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J. Am. Coll. Nutr.* 22: 142-146.
- 55 45. Heaney, R. P. (2008) Vitamin D in Health and Disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 3: 1535-1541.
46. Jones, G. (2007) Expanding role for vitamin D in chronic kidney disease: importance of blood 25-OH-D levels and extra-renal 1 α -hydroxylase in the classical and nonclassical actions of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3). *Semin. Dial.* 20: 316-324.
47. Zehnder, D., Bland, R., Williams, M. C., McNinch, R. W., Howie, A. J., Stewart, P. M. & Hewison, M. (2001) Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 α -hydroxylase. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 86: 888-894.
- 60 48. Somjen, D., Weisman, Y., Kohen, F., Gayer, B., Limor, R., Sharon, O., Jaccard, N., Knoll, E. & Stern, N. (2005) 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is upregulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds. *Circulation* 111: 1666-1671.
49. Nieuwenhuijzen Kruseman, A. C., van der Klauw, M. M. & Pijpers, E. (2005) . *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 149: 1033-1037.
- 65

50. Bischoff-Ferrari, H. A., Borchers, M., Gudat, F., Durmuller, U., Stahelin, H. B. & Dick, W. (2004) Vitamin D receptor expression in human muscle tissue decreases with age. *J. Bone Miner. Res.* 19: 265-269.
51. Bischoff, H. A., Stahelin, H. B., Dick, W., Akos, R., Knecht, M., Salis, C., Nebiker, M., Theiler, R., Pfeifer, M. et al. (2003) Effects of vitamin D and calcium supplementation on falls: a randomized controlled trial. *J. Bone Miner. Res.* 18: 343-351.
52. Bischoff-Ferrari, H. A., Giovannucci, E., Willett, W. C., Dietrich, T. & wson-Hughes, B. (2006) Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am. J. Clin. Nutr.* 84: 18-28.
53. Wicherts, I. S., van Schoor, N. M., Boeke, A. J., Visser, M., Deeg, D. J., Smit, J., Knol, D. L. & Lips, P. (2007) Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 92: 2058-2065.
- 10 54. Vieth, R., Bischoff-Ferrari, H., Boucher, B. J., wson-Hughes, B., Garland, C. F., Heaney, R. P., Holick, M. F., Hollis, B. W., Lamberger-Allardt, C. et al. (2007) The urgent need to recommend an intake of vitamin D that is effective. *Am. J. Clin. Nutr.* 85: 649-650.
55. Simpson, R. U., Thomas, G. A. & Arnold, A. J. (1985) Identification of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors and activities in muscle. *J. Biol. Chem.* 260: 8882-8891.
- 15 56. Capiati, D., Benassati, S. & Boland, R. L. (2002) 1,25(OH)₂-vitamin D₃ induces translocation of the vitamin D receptor (VDR) to the plasma membrane in skeletal muscle cells. *J. Cell Biochem.* 86: 128-135.
57. Nemere, I., Dormanen, M. C., Hammond, M. W., Okamura, W. H. & Norman, A. W. (1994) Identification of a specific binding protein for 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ in basal-lateral membranes of chick intestinal epithelium and relationship to transcaltachia. *J. Biol. Chem.* 269: 23750-23756.
- 20 58. Haddad, J. G., Jr. & Birge, S. J. (1971) 25-Hydroxycholecalciferol: specific binding by rachitic tissue extracts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45: 829-834.
59. Birge, S. J. & Haddad, J. G. (1975) 25-hydroxycholecalciferol stimulation of muscle metabolism. *J. Clin. Invest* 56: 1100-1107.
60. Haddad, J. G. & Birge, S. J. (1975) Widespread, specific binding of 25-hydroxycholecalciferol in rat tissues. *J. Biol. Chem.* 250: 299-303.
- 25 61. Boland, R. (1986) Role of vitamin D in skeletal muscle function. *Endocr. Rev.* 7: 434-448.
62. Zanello, S. B., Boland, R. L. & Norman, A. W. (1995) cDNA sequence identity of a vitamin D-dependent calcium-binding protein in the chick to calbindin D-9K. *Endocrinology* 136: 2784-2787.
63. Snijder, M. B., van Schoor, N. M., Pluijm, S. M., van Dam, R. M., Visser, M. & Lips, P. (2006) Vitamin D status in relation to one-year risk of recurrent falling in older men and women. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 91: 2980-2985.
- 30 64. Sato, Y., Iwamoto, J., Kanoko, T. & Satoh, K. (2005) Low-dose vitamin D prevents muscular atrophy and reduces falls and hip fractures in women after stroke: a randomized controlled trial. *Cerebrovasc. Dis.* 20: 187-192.
65. Boland, R., Norman, A., Ritz, E. & Hasselbach, W. (1985) Presence of a 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ receptor in chick skeletal muscle myoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128: 305-311.
- 35 66. Costa, E. M., Blau, H. M. & Feldman, D. (1986) 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors and hormonal responses in cloned human skeletal muscle cells. *Endocrinology* 119: 2214-2220.
67. Burne, T. H., McGrath, J. J., Eyles, D. W. & kay-Sim, A. (2005) Behavioural characterization of vitamin D receptor knockout mice. *Behav. Brain Res.* 157: 299-308.
68. DeLuca, H. F. (1988) The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB J.* 2: 224-236.
- 40 69. Bischoff, H. A., Borchers, M., Gudat, F., Duermueller, U., Theiler, R., Stahelin, H. B. & Dick, W. (2001) In situ detection of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in human skeletal muscle tissue. *Histochem. J.* 33: 19-24.
70. Freedman, L. P. (1999) Transcriptional targets of the vitamin D₃ receptor-mediating cell cycle arrest and differentiation. *J. Nutr.* 129: 581S-586S.
- 45 71. Boland, R., De Boland, A. R., Marinissen, M. J., Santillan, G., Vazquez, G. & Zanello, S. (1995) Avian muscle cells as targets for the secosteroid hormone 1,25-dihydroxy-vitamin D₃. *Mol. Cell Endocrinol.* 114: 1-8.
72. De Boland, A. R. & Boland, R. (1985) In vitro cellular muscle calcium metabolism. Characterization of effects of 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ and 25-hydroxy-vitamin D₃. *Z. Naturforsch.* 40: 102-108.
- 50 73. Morelli, S., Boland, R. & De Boland, A. R. (1996) 1,25(OH)₂-vitamin D₃ stimulation of phospholipases C and D in muscle cells involves extracellular calcium and a pertussis-sensitive G protein. *Mol. Cell Endocrinol.* 122: 207-211.
74. Vazquez, G., De Boland, A. R. & Boland, R. L. (1997) 1 alpha,25-(OH)₂-vitamin D₃ stimulates the adenylyl cyclase pathway in muscle cells by a GTP-dependent mechanism which presumably involves phosphorylation of G alpha i. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234: 125-128.
75. Boland, R., De Boland, A. R., Buitrago, C., Morelli, S., Santillan, G., Vazquez, G., Capiati, D. & Baldi, C. (2002) Non-genomic stimulation of tyrosine phosphorylation cascades by 1,25(OH)₂D₃ by VDR-dependent and -independent mechanisms in muscle cells. *Steroids* 67: 477-482.
- 55 76. Selles, J. & Boland, R. (1991) Rapid stimulation of calcium uptake and protein phosphorylation in isolated cardiac muscle by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Mol. Cell Endocrinol.* 77: 67-73.
77. Wu, Z., Woodring, P. J., Bhakta, K. S., Tamura, K., Wen, F., Feramisco, J. R., Karin, M., Wang, J. Y. & Puri, P. L. (2000) p38 and extracellular signal-regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps. *Mol. Cell Biol.* 20: 3951-3964.
- 60 78. Cornet, A., Baudet, C., Neveu, I., Baron-Van, E. A., Brachet, P. & Naveilhan, P. (1998) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ regulates the expression of VDR and NGF gene in Schwann cells in vitro. *J Neurosci. Res.* 53: 742-746.
79. Sanchez, B., Relova, J. L., Gallego, R., Ben-Batalla, I. & Perez-Fernandez, R. (2009) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ administration to 6-hydroxydopamine-lesioned rats increases glial cell line-derived neurotrophic factor and partially restores tyrosine hydroxylase expression in substantia nigra and striatum. *J Neurosci. Res.* 87: 723-732.
- 65

80. Baier, S., Johannsen, D., Abumrad, N. N., Rathmacher, J. A., Nissen, S. L. & Flakoll, P. J. (2009) Year-long changes in lean body mass in elderly men and women supplemented with a nutritional cocktail of β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB), arginine, and lysine. *JPEN* 33: 71-82.
- 5 81. Holick, M. F. (2007) Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* 357: 266-281.
82. Heaney, R. P. (2008) Vitamin D in Health and Disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 3: 1535-1541.
83. Heaney, R. P. (2007) Vitamin D endocrine physiology. *J. Bone Miner. Res.* 22 Suppl 2: V25-V27.
84. Vieth, R., Bischoff-Ferrari, H., Boucher, B. J., Wason-Hughes, B., Garland, C. F., Heaney, R. P., Holick, M. F., Hollis, B. W., Lamberg-Allardt, C. et al. (2007) The urgent need to recommend an intake of vitamin D that is effective. *Am. J. Clin. Nutr.* 85: 649-650.
- 10 85. Nieuwenhuijzen Kruseman, A. C., van der Klauw, M. M. & Pijpers, E. (2005) . *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 149: 1033-1037.
86. Holick, M. F. (2007) Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* 357: 266-281.
87. Rogers, M. E., Sherwood, H. S., Rogers, N. L. & Bohlken, R. M. (2002) Effects of dumbbell and elastic band training on physical function in older inner-city African-American women. *Women Health* 36: 33-41.
- 15 88. Zion, A. S., De, M. R., Diamond, B. E. & Bloomfield, D. M. (2003) A home-based resistance-training program using elastic bands for elderly patients with orthostatic hypotension. *Clin. Auton. Res.* 13: 286-292.
89. Heislein, D. M., Harris, B. A. & Jette, A. M. (1994) A strength training program for postmenopausal women: a pilot study. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 75: 198-204.
- 20 90. Krebs, D. E., Jette, A. M. & Assmann, S. F. (1998) Moderate exercise improves gait stability in disabled elders. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 79: 1489-1495.
91. Smith, H. J., Wyke, S. M. & Tisdale, M. J. (2004) Mechanism of the attenuation of proteolysis-inducing factor stimulated protein degradation in muscle by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. *Cancer Res.* 64: 8731-8735.
92. Eley, H. L., Russell, S. T. & Tisdale, M. J. (2008) Attenuation of depression of muscle protein synthesis induced by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor and angiotensin II by β -hydroxy- β -methylbutyrate. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 295: E1409-E1416.
- 25 93. Birge, S. J. & Haddad, J. G. (1975) 25-hydroxycholecalciferol stimulation of muscle metabolism. *J. Clin. Invest* 56: 1100-1107.
94. DeLuca, H. F. (1988) The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB J.* 2: 224-236.
- 30 95. Menconi, M., Gonnella, P., Petkova, V., Lecker, S. & Hasselgren, P. O. (2008) Dexamethasone and corticosterone induce similar, but not identical, muscle wasting responses in cultured L6 and C2C12 myotubes. *J Cell Biochem.* 105: 353-364.
96. Fuller, J. C., Jr., Nissen, S. L. & Huiatt, T. W. (1993) Use of ^{18}O -labelled leucine and phenylalanine to measure protein turnover in muscle cell cultures and possible futile cycling during aminoacylation. *Biochem. J.* 294: 427-433.
- 35 97. Xu, H., McCann, M., Zhang, Z., Posner, G. H., Bingham, V., El-Tanani, M. & Campbell, F. C. (2009) Vitamin D receptor modulates the neoplastic phenotype through antagonistic growth regulatory signals. *Mol. Carcinog.* 48: 758-772.
98. Gniadecki, R., Gajkowska, B. & Hansen, M. (1997) 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates the assembly of adherens junctions in keratinocytes: involvement of protein kinase C. *Endocrinology* 138: 2241-2248.

40

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición que comprende de 0,5 g a 30 g de ácido β -hidroxi- β -metilbutírico (HMB) y vitamina D en una cantidad suficiente para elevar los niveles sanguíneos de vitamina D a al menos 30 ng/ml.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la vitamina D está presente en una cantidad de 500UI a 4000UI.
- 10 3. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho HMB se selecciona del grupo que consiste en su forma de ácido libre, su sal, su éster y su lactona.
4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha sal se selecciona del grupo que consiste en una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de magnesio, una sal de cromo, y preferiblemente una sal de calcio.
- 15 5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho éster se selecciona del grupo que consiste en ésteres de metilo y ésteres de etilo.
6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho HMB es una HMB isovaril lactona.
- 20 7. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha Vitamina D es Vitamina D₃ o Vitamina D₂.
8. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en forma de un producto alimenticio
- 25 9. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 formulada para administración intravenosa.
10. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en el aumento de la masa muscular de un animal.
- 30 11. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en el incremento de la resistencia de un animal.
- 35 12. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en la mejora de la función muscular de un animal.

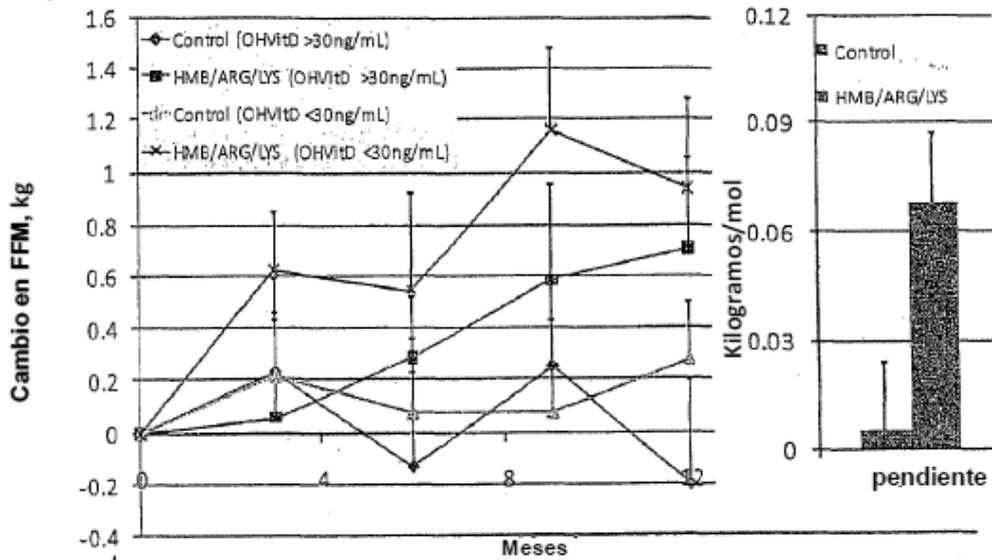


Figura 1a Cambios en la masa muscular a lo largo de un año separado por el estado de 25OH-VitD₃ (gráfico de línea) en ancianos del grupo control y del grupo suplementado con HMB/ARG/LYS. Cambio general por mes (gráfico de barras) en sujetos ancianos del grupo control y del grupo suplementado con HMB/ARG/LYS.

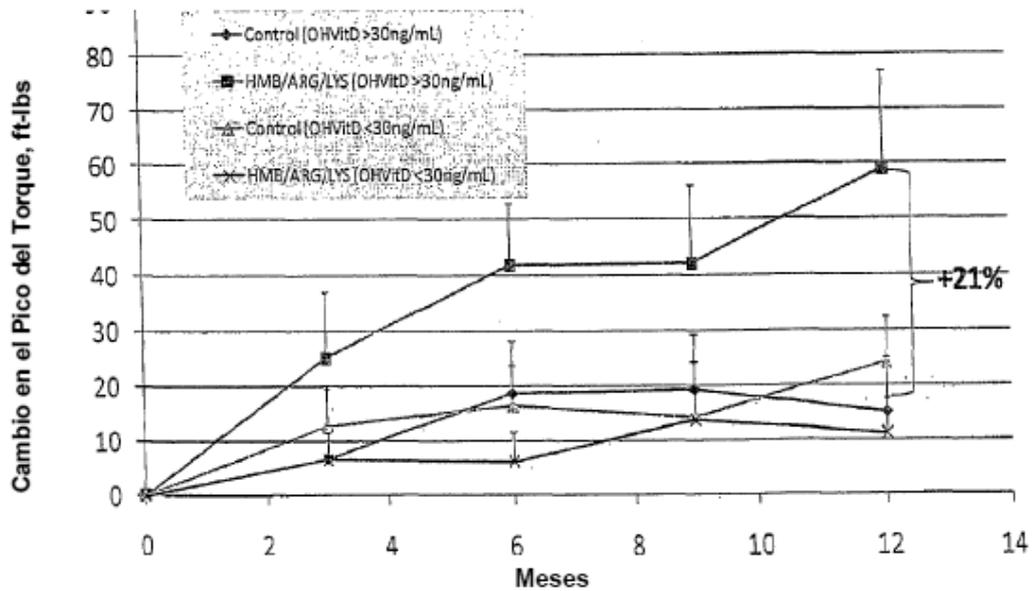


Figura 1b Cambio general en la resistencia de la rodilla separado por el estado de 25OH-VitD₃ en ancianos del grupo control y del grupo suplementado con HMB/ARG/LYS.

Figura 2a Niveles de 25-OH-Vit D en suero

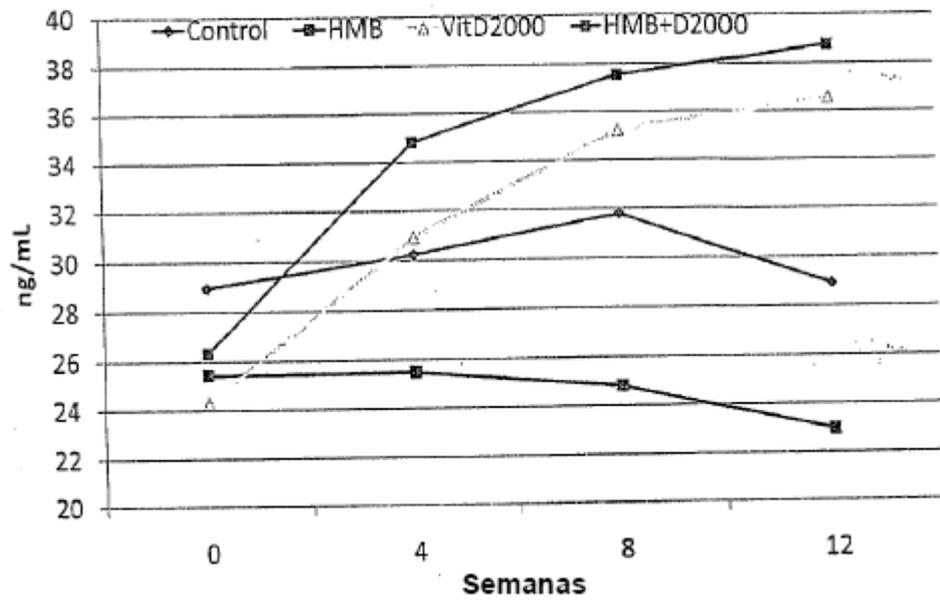
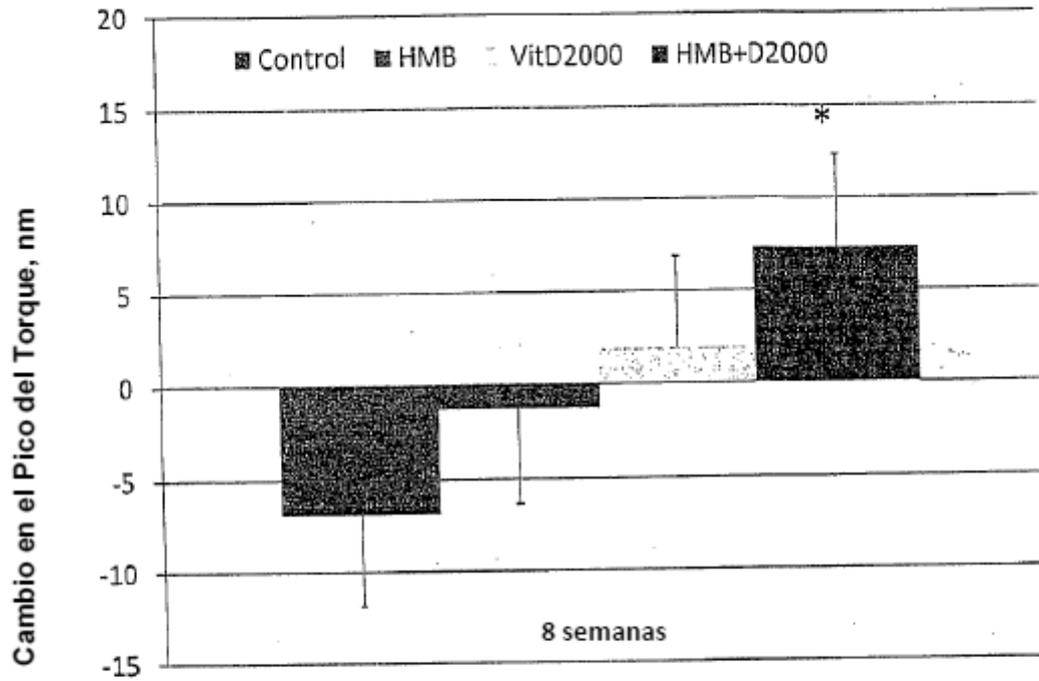
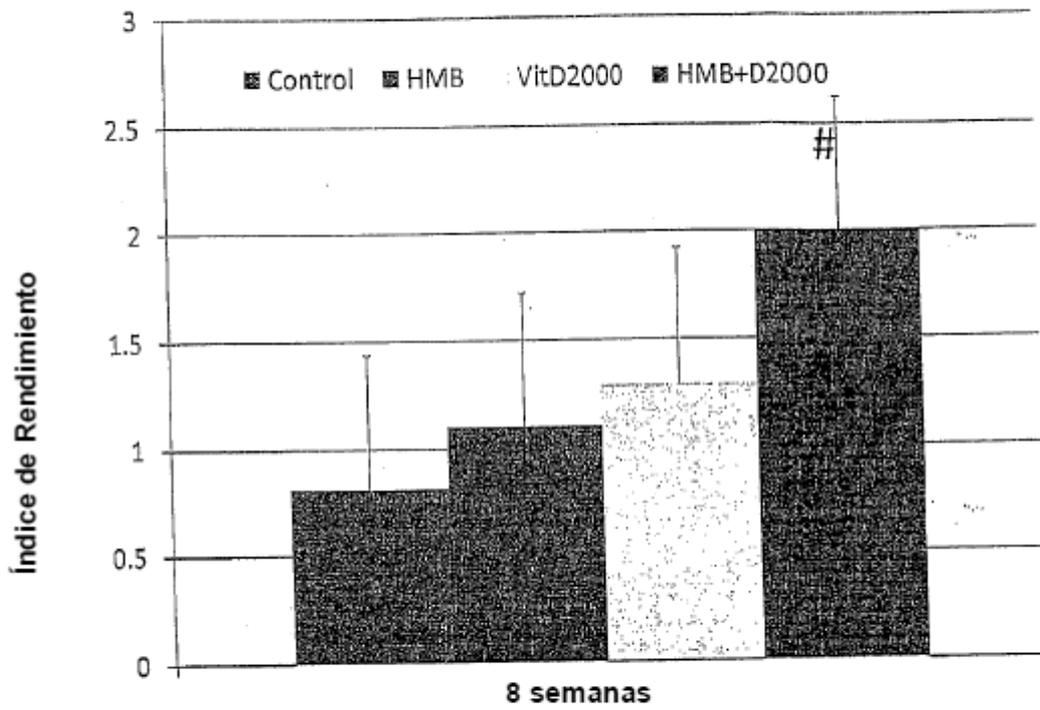


Figura 2b Resistencia de extensión de la rodilla, 60°/seg



*Comparado con el Control, $p < 0,05$

Figura 2c Índice de Rendimiento 8 semanas



#Comparado con el Control, P < 0,10

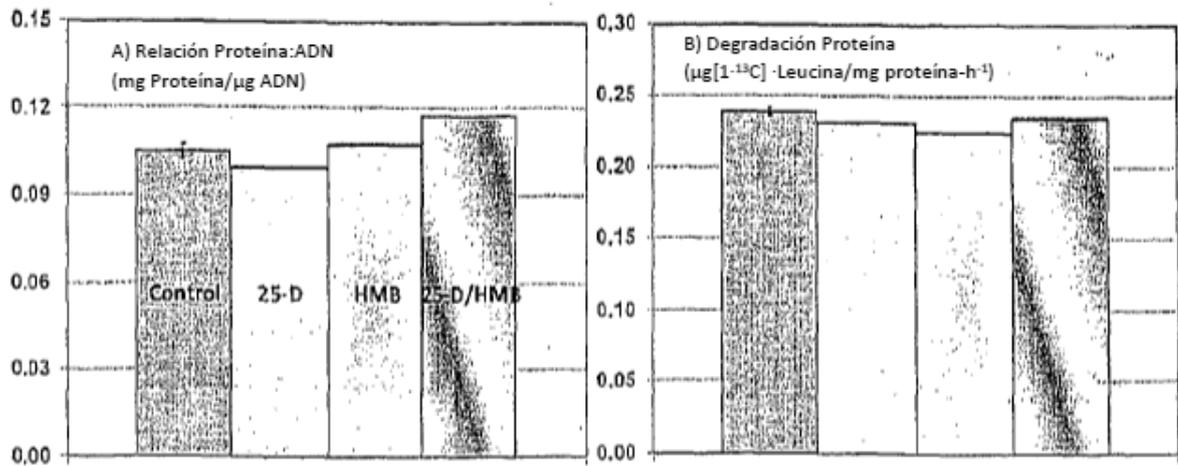


Figura 3. Relación Proteína:ADN (A) y Degradación de Proteínas (B) en células C2C12 tratadas con Control, 25-OH-VitD₃ (200 ng/mL), HMB (200 μM como Ca(HMB)₂) o la combinación. Los resultados representados son promedios de los mínimos cuadrados de 4 estudios replicados. Tres estudios consistieron de 4 placas replicadas por tratamiento y el cuarto estudio consistió de 6 placas replicadas por tratamiento para un total de 18 placas por tratamiento promedio. La concentración de Proteínas y ADN se midió y se calculó la relación. Se midió la degradación de proteínas a través de la determinación de la ¹³C-Leucina liberada al medio a partir de células premarcadas. El efecto promedio y los valores p de interacción se calcularon usando Modelos Lineales Generales. Para la relación proteína:ADN los valores p fueron 25OH-VitD₃=0,34; CaHMB=0,0001; y CaHMB*25OH-VitD₃=0,003 y para la degradación de proteínas los valores p fueron 25OH-VitD₃=0,78; CaHMB=0,33; y CaHMB*25OH-VitD₃=0,08.

Figura 4a 25-OH-Vit D

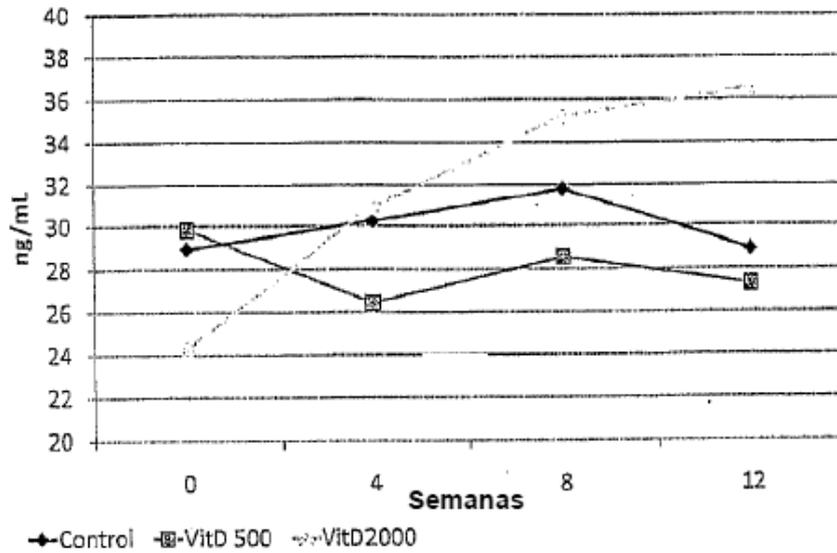


Figura 4b Excreción de HMB en orina

