



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 392**

51 Int. Cl.:
A61K 31/59 (2006.01)
A61K 31/66 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00971847 .9**
96 Fecha de presentación : **20.10.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1229917**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.08.2002**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas y preparaciones para el tratamiento de enfermedad ósea metabólica.**

30 Prioridad: **20.10.1999 KR 99-045623**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73 Titular/es: **YUYU Pharma, Inc.**
nº 983, Wangam-dong Jecheon-si
Chungcheongbuk-do 390-250, KR

72 Inventor/es: **Kang, Sung An;**
Lee, Kyung Hee;
Kwak, Chung Shil;
Kim, Chang Jong y
Lee, Yong, Oh

74 Agente: **Roeb Díaz-Álvarez, María**

ES 2 316 392 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

Composiciones farmacéuticas y preparaciones para el tratamiento de enfermedad ósea metabólica.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica compuesta para el tratamiento de enfermedad ósea metabólica y al procedimiento de preparación de la misma, en la que dicha composición se prepara en forma de un agente farmacéutico compuesto que comprende calcitriol, alendronato y una cantidad adecuada de otros aditivos. La composición farmacéutica según la presente invención puede inhibir la hipercalcemia causada cuando se administra calcitriol solo, compensar la actividad inhibidora de la remodelación ósea causada por el alendronato debido a la presencia de calcitriol y mejorar también el cumplimiento terapéutico, previniendo así eficazmente la aparición de osteoporosis.

Descripción de la técnica relacionada

La osteoporosis es una enfermedad ósea metabólica sistémica caracterizada por una reducción de la masa ósea así como un cambio microestructural en el hueso sin afectar a la composición química del hueso mismo que da como resultado una susceptibilidad aumentada a fracturas óseas. En particular, es conocido que los pacientes seniles son más vulnerables a las fracturas óseas, que a menudo son el resultado incluso de choques físicos menores; de hecho, es conocido que aproximadamente 1,3 millones de los 25 millones de pacientes de osteoporosis en los EE.UU. padecen fracturas óseas cada año, lo que da cuenta de casi un 10% de la población total de EE.UU.

La osteoporosis puede dividirse en tipo I y tipo II. La osteoporosis de tipo I aparece lo más frecuentemente en mujeres postmenopáusicas y se caracteriza por tener un aumento notable de la resorción ósea debido a la deficiencia de estrógeno. Es muy común observar que los pacientes de osteoporosis de tipo I pierden hueso trabecular y esto causa frecuentes fracturas vertebrales o de muñecas. Entre tanto, la osteoporosis de tipo II aparece habitualmente en ancianos o en hombres y se caracteriza por una reducción drástica de la capacidad de remodelación ósea en lugar de un aumento de la resorción ósea. Sin embargo, es conocido que el aumento de resorción ósea así como la reducción de absorción de calcio por los osteoclastos son comunes a ambos tipos de osteoporosis.

Los agentes terapéuticos empleados para tratar la osteoporosis en campos clínicos se dividen generalmente en dos grupos: un grupo que puede facilitar la remodelación ósea y otro que puede prevenir la resorción ósea. Los ejemplos de agentes terapéuticos activos que pueden promover la remodelación ósea rápida incluyen esteroides anabólicos, fluoruro, vitamina D y hormonas paratiroides. Con la reciente introducción del mecanismo de resorción ósea, los derivados de vitamina D han sido objeto de la atención pública debido a sus papeles en la mediación de una masa ósea equilibrada. El calcitriol, al ser uno de los derivados activos de vitamina D₃ expresado como 1,25-(OH)₂-D₃, es uno de los activadores de la remodelación ósea anteriormente mencionados, y es también una hormona que posibilita prevenir la osteoporosis porque no sólo puede aumentar la absorción de calcio del tracto intestinal, sino que también puede inhibir la reducción de masa ósea. Sin embargo, se ha mostrado también que el calcitriol causa hipercalcemia cuando se usa solo. La hipercalcemia, una enfermedad metabólica caracterizada por tener una concentración plasmática de calcio de 11,0 mg/dl o superior en la sangre, es una de las enfermedades con riesgo mortal más comunes, estrechamente relacionada con enfermedades mortales tales como un tumor. De hecho, el calcitriol induce un aumento de la concentración de calcio en la sangre así como el control anormal de la concentración de calcio por el metabolismo óseo, dando como resultado por tanto hipercalcemia. Los síntomas de hipercalcemia o adicción al calcio (un caso grave de hipercalcemia de duración prolongada) debido a los efectos secundarios del calcitriol y la sobredosis de vitamina D son muy similares a los mostrados en hipercalcemia. La hipercalcemia ocasionalmente comprende síntomas agudos tales como anorexia, dolor de cabeza, emesis, diarrea, y los síntomas crónicos de hipercalcemia incluyen distrofia, parestesia, pirexia con sed, hiperuresis, deshidratación, acedía, retardo en el crecimiento, infección urinaria, etc. Los pacientes con hipercalcemia experimentan a menudo complicaciones y esto añade dificultades al tratamiento de enfermedades tales como la osteoporosis.

Los agentes farmacéuticos convencionales usados en el tratamiento de osteoporosis como inhibidores de la resorción ósea incluyen estrógeno, calcitonina, bisfosfonato e ipriflavona. La publicación de patente japonesa n° 7-330613 da a conocer un activador de remodelación ósea que contiene alendronato, una clase de bisfosfonatos, como agente activo y que puede activar la calcificación de osteoblastos así como la formación de matriz ósea en presencia de dihidroxivitamina D₃.

La solicitud de patente europea n° 88-4628 da a conocer un agente farmacéutico para administración oral que usa bisfosfonato como sustrato y que contiene una cantidad adecuada de laurilsulfato de sodio.

La patente de EE.UU. n° 125.372 da a conocer comprimidos con recubrimiento entérico que contienen bisfosfonatos.

Sin embargo, los inhibidores de la resorción ósea anteriormente mencionados no han sido exitosos para mejorar suficientemente la masa ósea de pacientes con osteoporosis ya avanzada, y por tanto ha habido una necesidad largo tiempo esperada de desarrollo de activadores de la remodelación ósea muy eficaces.

Un artículo italiano reciente da a conocer un procedimiento de administración combinada de tanto alendronato como calcitriol [*Clinical Drug Investigation* (1988) marzo, 15 (3), 235-244]. En este artículo, no se administraron alendronato y calcitriol en forma de un comprimido compuesto, sino que se administraron independientemente. Por ejemplo, el alendronato se administró una vez al día, mientras que el calcitriol se administró dos veces al día con un cierto intervalo de tiempo permitido entre cada administración. Además, el alendronato debe administrarse antes de las comidas debido a que se ha mostrado que el efecto farmacéutico se reducía mucho debido a una mala absorción cuando se tomaba después de las comidas. Considerando que la mayoría de los pacientes de osteoporosis son ancianos y que la mayoría de ellos toma varias clases de medicamentos al día, parece muy plausible que los pacientes olviden a menudo tomar uno o dos medicamentos que se supone que toman debido a la naturaleza bastante complicada de la administración de los medicamentos anteriores, y por tanto los efectos de dicha administración permanecen también cuestionables.

El alendronato puede causar una estimulación local en membranas mucosas del tracto gastrointestinal superior y a menudo esto da como resultado unos pocos efectos secundarios en el esófago tales como esofagitis, úlcera esofágica y erosión esofágica. Por lo tanto, resulta necesario que los pacientes tomen una cantidad suficiente de agua cuando toman un medicamento que contiene alendronato, de modo que el medicamento que están tomando pueda pasar por el esófago lo más rápidamente posible manteniendo así la estimulación esofágica a un nivel mínimo. Y esto se ha considerado también un problema por la mayoría de pacientes que reduce el cumplimiento terapéutico.

En la conferencia de "Japanese and American Glaucoma Societies" mantenida en Vancouver, Canadá, en enero de 1997, se anunció que el objetivo final de desarrollar agentes farmacéuticos compuestos era mejorar el cumplimiento terapéutico. En la "Fifth Conference on Retroviruses and opportunistic infection", que se mantuvo en Chicago el 4 de febrero de 1998, se mostró que el efecto del combivir, un agente farmacéutico compuesto que contiene tanto lamivudina como zidovudina, en los que los mecanismos farmacéuticos difieren entre sí, tenía un efecto terapéutico mejorado de un 96% en comparación con un 72% del efecto obtenido cuando se administraban lamivudina y zidovudina independientemente como medicamentos separados, respectivamente, y en este caso se especula que el efecto terapéutico es debido a la mejora del cumplimiento terapéutico del paciente con el agente farmacéutico compuesto.

No ha habido estudios realizados sobre el tratamiento terapéutico de la osteoporosis con respecto a la preparación de comprimidos compuestos que contienen tanto calcitriol como alendronato, y en lugar de ello ha habido muchas líneas de estudio enfocadas sobre el efecto del alendronato como agente terapéutico que trata la hipercalcemia causada por la ingesta de vitamina D. Por lo tanto, tiene mucha demanda desarrollar agentes farmacéuticos compuestos con tecnologías de formulación avanzadas para el tratamiento de la osteoporosis que puedan no sólo minimizar los efectos secundarios tales como la hipercalcemia causada cuando se administra calcitriol solo, sino que puedan prevenir/tratar la osteoporosis con una dosis baja y potenciar el cumplimiento terapéutico, que es habitualmente bajo en medicamentos convencionales, al remediar el modo de administración bastante complicado y prevenir los efectos secundarios esofágicos.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedad metabólica y al procedimiento de preparación de la misma, y más particularmente, a una composición farmacéutica mejorada para el tratamiento terapéutico de enfermedad metabólica y al procedimiento de preparación de la misma, en la que dicha composición se prepara en forma de un agente farmacéutico compuesto que comprende (a) calcitriol que reduce la tasa de fracturas vertebrales y aumenta la densidad ósea; (b) alendronato, un inhibidor de la resorción ósea, como ingredientes activos en una relación de mezcla óptima para ejercer el mayor efecto terapéutico; y (c) una cantidad adecuada de aditivos tales como un reforzante de la resorción de alendronato, de modo que la composición resultante pueda reducir la hipercalcemia causada por el calcitriol, compensar la actividad inhibidora de la remodelación ósea causada por el alendronato debido al calcitriol, mejorar el cumplimiento terapéutico acompañado habitualmente debido a la dificultad de administración y a los efectos secundarios habituales en el esófago, previniendo así eficazmente la aparición de osteoporosis.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra vistas microscópicas (x40) de hueso trabecular de tibia después de dos meses de administración de alendronato y calcitriol, administrados independientemente o en forma de administración concomitante de ambos ingredientes, después de una ovariectomía.

La Fig. 2 es una gráfica que muestra el área de hueso trabecular observada usando un analizador de imágenes.

La Fig. 3 es una gráfica que muestra la concentración de calcio observada usando un autoanalizador Technicon.

La Fig. 4 es una gráfica que muestra la concentración de calcio/creatinina en orina observada usando un kit de calcio (Youngdong Pharmaceutical Co., Ltd., Corea).

La Fig. 5 es una gráfica que muestra la concentración de osteocalcina en suero observada mediante un kit que usa en procedimiento RIA.

ES 2 316 392 T3

La Fig. 6 es una gráfica que muestra la actividad fosfatasa alcalina observada usando un autoanalizador Technicon.

La Fig. 7 es una gráfica que muestra la concentración de telopéptido de colágeno de tipo I (NTx) en orina observada usando un autoanalizador Technicon, que se usa como índice de la velocidad de resorción ósea.

Para las Fig. 1-7, A-F representan grupos de ratas blancas Sprague-Dawley experimentales tratadas como se muestra a continuación.

A: sin tratamiento,

B: tratamiento único con excipientes,

C: tratamiento único con calcitriol (0,1 $\mu\text{g/kg}$)

D: tratamiento único con alendronato (1,0 mg/kg)

E: tratamiento compuesto 1 [calcitriol (0,1 $\mu\text{g/kg}$) + alendronato (0,5 mg/kg)]

F: tratamiento compuesto 2 [calcitriol (0,1 $\mu\text{g/kg}$) + alendronato (1,0 mg/kg)]

G: tratamiento compuesto 3 [calcitriol (0,1 $\mu\text{g/kg}$) + alendronato (2,0 mg/kg)].

La Fig. 8 es una gráfica que muestra el cambio de peso corporal observado durante 2 semanas de ratas blancas Sprague-Dawley que se trataron por vía oral con un agente farmacéutico compuesto que contenía tanto calcitriol como alendronato.

La Fig. 9 es una gráfica que muestra la ingesta dietética observada durante 2 semanas de ratas blancas Sprague-Dawley que se trataron por vía oral con un agente farmacéutico compuesto que contenía tanto calcitriol como alendronato.

Para las Fig. 8-9, 1-8 representan grupos de ratas blancas Sprague-Dawley experimentales tratadas como se muestra a continuación.

1: calcitriol (125 $\mu\text{g/kg}$) + alendronato (1250 mg/kg)

2: calcitriol (100 $\mu\text{g/kg}$) + alendronato (1000 mg/kg)

3: calcitriol (75 $\mu\text{g/kg}$) + alendronato (700 mg/kg)

4: calcitriol (50 $\mu\text{g/kg}$) + alendronato (500 mg/kg)

5: calcitriol (25 $\mu\text{g/kg}$) + alendronato (250 mg/kg)

6: calcitriol (5 $\mu\text{g/kg}$) + alendronato (50 mg/kg)

7: calcitriol (1 $\mu\text{g/kg}$) + alendronato (10 mg/kg)

8: calcitriol (0,2 $\mu\text{g/kg}$) + alendronato (2,0 mg/kg).

La Fig. 10 es una vista microscópica (H y E x100) que muestra el resultado de los hallazgos tisulares de bazo de ratas blancas Sprague-Dawley tratadas por vía oral con un agente farmacéutico compuesto que contiene 100 $\mu\text{g/kg}$ de calcitriol y 1.000 mg/kg de alendronato.

La Fig. 11 es una gráfica que muestra el cambio de peso corporal observado durante 7 semanas de ratas blancas Sprague-Dawley que se trataron por vía oral con un agente farmacéutico compuesto que contenía tanto calcitriol como alendronato.

La Fig. 12 es una gráfica que muestra la ingesta dietética observada durante 7 semanas de ratas blancas Sprague-Dawley que se trataron por vía oral con un agente farmacéutico compuesto que contenía tanto calcitriol como alendronato.

Para las Fig. 11-12, 1-4 representan grupos de ratas blancas Sprague-Dawley experimentales medicadas como se muestra a continuación.

1: calcitriol (25 $\mu\text{g/kg}$) + alendronato (250 mg/kg)

2: calcitriol (5 $\mu\text{g/kg}$) + alendronato (50 mg/kg)

3: calcitriol (1 $\mu\text{g/kg}$) + alendronato (10 mg/kg)

4: calcitriol (0,2 $\mu\text{g/kg}$) + alendronato (2 mg/kg).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedad ósea metabólica caracterizada por tener calcitriol y alendronato como dos ingredientes activos, en la que dicha composición farmacéutica contiene de 1.000 a 50.000 partes en peso de alendronato por 1 parte en peso de calcitriol.

La presente invención se refiere también a un procedimiento de preparación de dicha composición farmacéutica que contiene calcitriol y alendronato como agentes activos que comprende:

a) un procedimiento de obtención de gránulos de calcitriol mediante la adición de manitol a una mezcla de calcitriol y etanol, la posterior adición de etanol, antioxidante y aglutinante a dicha mezcla, la pulverización de dicha mezcla a tamaño de malla 14-35 y el secado de dicha mezcla pulverizada;

b) un procedimiento de obtención de gránulos de alendronato mediante el mezclado de manitol, un reforzante de resorción y alendronato, la posterior adición de etanol y aglutinante a dicha mezcla, la pulverización de dicha mezcla a tamaño de malla 14-35 y el secado de dicha mezcla pulverizada;

c) un procedimiento de preparación de comprimidos mediante el mezclado de dichos gránulos de calcitriol obtenidos a partir de dicha etapa a) y dichos gránulos de alendronato obtenidos a partir de dicha etapa b) con una relación 1:1 de partes en peso de relación de mezcla, seguido de la posterior adición de un agente disgregante y un lubricante a dicha mezcla y la formación de comprimidos con la mezcla.

Esta invención se explica con más detalle mediante los siguientes ejemplos, pero no deben considerarse limitantes del alcance de esta invención.

La presente invención se refiere a un procedimiento de fabricación de un agente farmacéutico compuesto que comprende calcitriol y alendronato como sus dos ingredientes activos a su relación de mezcla óptima, en el que el primer ingrediente es conocido por ser eficaz en la reducción de fracturas vertebrales y por aumentar la densidad ósea, mientras que el segundo es eficaz para inhibir la resorción ósea, seguido de la adición del reforzante de resorción.

Los dos ingredientes activos anteriores se elucidan adicionalmente como sigue.

En primer lugar, el calcitriol, expresado como 1,25-(OH)₂-D₃, es uno de los derivados activos de vitamina D₃ implicados en el transporte de calcio en el tracto intestinal y es ya conocido que puede activar la absorción de calcio intestinal así como que puede reducir la secreción de hormona paratiroidea, aliviando así la pérdida ósea de mujeres menopáusicas que padecen osteoporosis [Aloia J. F., *Am. J. Med.* (1988), 84, 401-8]. Además, el calcitriol es también conocido por activar la producción de osteocalcina, una proteína específica de hueso implicada en la mineralización de huesos con respecto a osteoblastos [Price P. A., *Calcif. Tissue Int.* (1990) abril, 46 (4), 270-9]. Sin embargo, el calcitriol como agente farmacéutico tiene también un problema, porque puede causar a menudo hipercalcemia cuando se administra solo, y por lo tanto ha habido muchas líneas de estudio para resolver este inconveniente.

En segundo lugar, el alendronato, expresado como 1,1-bisfosfonato de 4-aminohidroxibutilideno, es de una clase de bisfosfonatos desarrollada como agente terapéutico para el tratamiento de la osteoporosis y es conocido por prevenir la pérdida ósea al inhibir la actividad de los osteoclastos, ayudando así a mejorar la densidad ósea. De hecho, estudios clínicos han mostrado que había un aumento de aproximadamente 2-3% de la densidad ósea. Por ejemplo, un estudio clínico que se llevó a cabo sobre 994 mujeres postmenopáusicas de 16 países distintos mostró que había un aumento gradual de la densidad mineral del hueso vertebral y los huesos de los miembros inferiores. También la tasa de aparición de nuevas fracturas vertebrales en el grupo medicado con alendronato se redujo en aproximadamente un 48% en comparación con el de un grupo placebo.

En general, la densidad mineral de un hueso está estrechamente asociada a la densidad ósea y por tanto la tasa de aparición de fractura ósea se reduce drásticamente a medida que aumenta la densidad mineral. Cuando se administró alendronato 10 mg/día durante 3 años (se cree que 10 mg/día de alendronato tiene el efecto terapéutico más eficaz [Liberian, *N. Engl. J. Med.* (1995), 333, 1437-1443], las densidades minerales de hueso vertebral y huesos de los miembros inferiores aumentaron un 8,2% y un 7,2%, respectivamente, mientras que la densidad mineral en un grupo placebo cayó un 0,7% durante el mismo periodo de administración. Sin embargo, se ha mostrado que el alendronato afecta negativamente a los ciclos normales de metabolismo óseo reduciendo la velocidad de remodelación ósea, y por lo tanto se necesita un agente farmacéutico compuesto para compensar este problema.

Puesto que el alendronato puede prevenir la hipercalcemia, que es conocida como el efecto secundario más grave causado por el calcitriol, se ha postulado que la administración combinada tanto de alendronato como de calcitriol podría resolver la hipercalcemia y también posibilitar administrar una cantidad óptima de calcitriol, del que se ha limitado su dosis diaria debido a su estrecho margen de seguridad. Además, la actividad antagonista del alendronato contra la remodelación ósea se compensará también por la presencia de calcitriol.

Como un modo para desarrollar el agente farmacéutico compuesto más eficaz para el tratamiento de mujeres postmenopáusicas, se indujeron en primer lugar animales experimentales a desarrollar osteoporosis en la presente invención, y se dispusieron entonces en numerosos experimentos de administración de diversas concentraciones de mezclas de calcitriol y alendronato resultantes de diversas relaciones de mezcla entre calcitriol y alendronato, y se finalizó con su relación de mezcla óptima, que puede no sólo prevenir eficazmente la osteoporosis sin retardar la velocidad de remodelación ósea, sino que también puede controlar que la concentración de calcio en sangre se mantenga a un nivel normal. Los resultados mostraron que la relación de concentración óptima entre los dos ingredientes de un agente farmacéutico era contener 1.000-50.000 partes en peso de alendronato con respecto a 1 parte en peso de calcitriol. Si la cantidad de alendronato contenida en dicho agente farmacéutico es menor de 1.000 partes en peso por 1 parte en peso de calcitriol, la concentración plasmática de calcio resultante aumentará y habrá un alto riesgo de causar hipercalcemia cuando se administre el agente farmacéutico. Por otro lado, si la cantidad de alendronato contenida en dicho agente farmacéutico es más de 50.000 partes en peso por 1 parte en peso de calcitriol, afectará negativamente a los ciclos normales de metabolismo óseo al reducir la tasa de remodelación ósea.

Los agentes farmacéuticos según la presente invención pueden prepararse en diversas formas de dosificación tales como comprimidos no recubiertos, comprimidos con recubrimiento entérico, gránulos, gránulos con recubrimiento entérico, cápsulas y cápsulas con recubrimiento entérico. Adicionalmente, se recomienda para uso que cada ingrediente esté en el intervalo de 0,1-50 μg para calcitriol y 1-50 mg para alendronato por cada unidad de dosificación.

Se seleccionaron los aditivos después de una serie de experimentos de aquellos que han mostrado ya su eficacia en la preparación de agentes farmacéuticos. Se añadió entonces una cantidad adecuada de aditivos seleccionados a cada uno de los dos ingredientes activos anteriores respectivamente para preparar dos preparaciones preliminares, y se combinaron entonces conjuntamente para formar finalmente un agente farmacéutico compuesto. El agente farmacéutico compuesto así obtenido exhibía un cumplimiento terapéutico muy mejorado en comparación con los de medicamentos convencionales, que tienen un cumplimiento terapéutico relativamente bajo debido principalmente a la dificultad de administración y a los efectos secundarios en el esófago, previniendo así eficazmente la osteoporosis.

Los rasgos específicos de los procedimientos de fabricación empleados en la presente invención son como siguen.

Procedimiento A

En la presente invención, se añade manitol a una mezcla de calcitriol y etanol y entonces se mezclan, se añaden entonces etanol, un antioxidante y un aglutinante a la mezcla, y se mezclan. Se pulveriza entonces la mezcla resultante a un tamaño de malla de 14-35 y se seca entonces a 30-50°C, generando gránulos de calcitriol. En ese momento, si el tamaño de la mezcla es menor de malla 14, entonces los gránulos de calcitriol resultantes se vuelven no homogéneos, mientras que si el tamaño es mayor de malla 35, el rendimiento de producción se reduce y la procesabilidad en la formación de comprimidos empeora también.

Procedimiento B

En una etapa separada del procedimiento A anterior, se mezclan conjuntamente alendronato, manitol y un reforzante de la resorción y se añaden después etanol y un aglutinante. Se pulveriza entonces la mezcla resultante a un tamaño de malla de 14-35 y se seca entonces a 30-50°C, generando gránulos de alendronato. En ese momento, si el tamaño de la mezcla es menor de malla 14, entonces los gránulos de alendronato resultantes se vuelven no homogéneos, mientras que si el tamaño es mayor de malla 35, el rendimiento de producción se reduce y la procesabilidad en la formación de comprimidos empeora también.

Procedimiento C

Se mezclan conjuntamente los gránulos de calcitriol y los gránulos de alendronato obtenidos a partir de los procedimientos A y B anteriormente mencionados, respectivamente, se añaden un agente disgregante y un lubricante y se forman comprimidos con la mezcla resultante, produciendo finalmente el agente farmacéutico compuesto de la presente invención.

Los aditivos usados en la presente invención se describen a continuación en la presente memoria.

En primer lugar, se usa manitol como excipiente en los procedimientos A y B anteriores, y la cantidad de manitol usada en los procedimientos A y B está limitada de modo que la cantidad sea de un 50-60% en peso y un 40-60% en peso de la cantidad total de manitol contenida en la composición farmacéutica final, respectivamente.

Las razones de limitar la cantidad de manitol son las siguientes. El ensayo de miscibilidad entre calcitriol y alendronato mostró que la mezcla de los dos componentes daba como resultado el deterioro de la estabilidad del calcitriol. Sin embargo, en un ensayo de compatibilidad, cuando se mezclaba calcitriol con otros excipientes antes de mezclar con alendronato, el calcitriol en la mezcla resultante permanecía estable. Por lo tanto, para evitar el contacto directo entre calcitriol y alendronato, los inventores de la presente invención diluyeron en primer lugar calcitriol y alendronato independientemente con manitol para producir sus gránulos, y los mezclaron entonces después de ello. Con respecto a la cantidad de manitol usada en la preparación de dichos gránulos, se encontró que la cantidad de manitol es im-

portante para mantener la homogeneidad de dichos gránulos. Cuando se prepararon tanto gránulos de calcitriol como de alendronato usando 50% del manitol total, respectivamente, se observaron diferencias en los gránulos resultantes en términos de volumen específico, y los comprimidos obtenidos posteriormente después de mezclar y formar comprimidos con dichos gránulos no eran uniformes en la cantidad de dichos ingredientes. Por lo tanto, se realizaron
 5 numerosos experimentos para encontrar una cantidad óptima de manitol para producir un gránulo homogéneo, así como para contener una cantidad igual de cada ingrediente dado; como resultado, se encontró que usar aproximadamente 50-60% del manitol total es adecuado para la preparación de gránulos de calcitriol, y preferiblemente un 52%, aunque se recomienda aproximadamente 40-60% del manitol total, para la preparación de gránulos de alendronato, y preferiblemente un 48%. Los dos gránulos anteriores se ajustaron entonces para tener una cantidad igual antes de
 10 mezclarlos conjuntamente.

Los ejemplos de excipientes que pueden usarse en la presente invención incluyen azúcar blanco, celulosa y lactosa, así como manitol, y preferiblemente D-manitol. Se recomienda usar estos excipientes a 10-98% en peso, y preferiblemente a 70-97% en peso. Si la cantidad de manitol añadida está fuera del intervalo anterior, entonces la procesabilidad
 15 en la formación de comprimidos empeora.

Los antioxidantes que pueden usarse en la presente invención son uno o más seleccionados del grupo consistente en hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), DL-alfa-tocoferol y lecitina, y preferiblemente hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroxianisol butilado (BHA). Estos antioxidantes pueden usarse a 0,001-10% en peso de la composición farmacéutica total, y preferiblemente a 0,01-1,0% en peso. Si la cantidad de antioxidantes está fuera del intervalo anterior, entonces se creará un problema de estabilidad del calcitriol.
 20

Puede seleccionarse un aglutinante del grupo constituido por pirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y carboximetilcelulosa de sodio. La cantidad recomendada de aglutinante como aditivo es usar 0,1-20% en peso de la composición farmacéutica total, y preferiblemente 1-10% en peso. Si la cantidad de aglutinante está fuera del intervalo anterior, entonces la procesabilidad en la formación de comprimidos se deteriorará debido a una distribución granular no uniforme.
 25

Puede seleccionarse un agente disgregante del grupo constituido por croscarmelosa de sodio, hidroxipropilcelulosa poco sustituida y carboximetilcelulosa de calcio, y la cantidad recomendada de agente disgregante como aditivo es usar 0,1-20% en peso de la composición farmacéutica total, y preferiblemente 1-10% en peso. Si la cantidad de disgregante está fuera del intervalo anterior, entonces habrá un problema en la disgregación de comprimidos.
 30

Los ejemplos de lubricantes incluyen estearato de calcio, estearato de magnesio y talco, se recomienda usar 0,1-20% en peso de la composición farmacéutica total, y preferiblemente 1-10% en peso. Si la cantidad de un agente disgregante está fuera del intervalo anterior, entonces habrá un problema en la procesabilidad en la formación de comprimidos así como en el ensayo de ingredientes activos.
 35

El laurilsulfato de sodio puede usarse como reforzante de la resorción y su cantidad recomendada de uso es de 0,01-10% en peso de la composición farmacéutica total, y preferiblemente de 0,1-1% en peso.
 40

Además, pueden seleccionarse aditivos para una liberación sostenida del grupo constituido por hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y etilcelulosa.

Los componentes farmacéuticos según la presente invención pueden prepararse en forma de comprimidos con recubrimiento entérico mediante recubrimiento con una disolución de recubrimiento entérico, y puede prepararse también en forma de cápsulas rellenando con una composición farmacéutica dada un tipo de cápsulas convencional. La disolución de recubrimiento entérico consiste en un agente de recubrimiento entérico, un plastificante y un disolvente. Son ejemplos de agentes entéricos hidroxipropilmetilcelulosa ftalato, polímero de ácido metacrílico y celulosa acetato ftalato, y los ejemplos de plastificantes incluyen citrato de trietilo, polietilenglicol y propilenglicol. Los disolventes usados en la presente invención son dos o más seleccionados del grupo constituido por cloruro de metileno, etanol, acetona y agua destilada.
 45
 50

Los agentes farmacéuticos así preparados han mostrado efectos terapéuticos superiores en el tratamiento de enfermedades óseas metabólicas tales como osteoporosis, enfermedad de Paget, raquitismo, osteomalacia, osteodistrofia renal de pacientes de insuficiencia renal, hipoparatiroidismo e hiperparatiroidismo.
 55

Esta invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no deben considerarse limitantes del alcance de esta invención en modo alguno.
 60

Ejemplo de referencia

Se calculó la relación de concentración óptima como sigue, mediante la que no sólo puede prevenirse eficazmente la progresión de la osteoporosis, sino que puede mantenerse la concentración plasmática de calcio así como la cantidad de excreción de calcio por la orina a un nivel normal sin inhibir la velocidad de remodelación ósea.
 65

1) *Inducción de osteoporosis*

Se suministraron ratas blancas Sprague-Dawley hembras maduras de 12 semanas de edad por Daehan Biolink Co., Ltd. (Seúl, Corea) y se criaron en una cámara limpia de un laboratorio de experimentación animal en una escuela médica de la Universidad Nacional de Seúl. Se dio a las ratas blancas una semana para adaptarse alimentándolas con alimento normal (Purina, dieta de pienso) y se dividieron entonces en 6 grupos diferentes, estando constituido cada grupo por 10 ratas blancas con similar distribución de peso, y se realizaron ovariectomías a todas ellas. Se permitió a las ratas blancas beber agua y alimentarse libremente en condiciones estandarizadas de 22°C, 50% de humedad, ciclo de oscuridad/luz de 12 h.

2) *Medicación*

Después de las ovariectomías, se dejaron reposar las ratas blancas durante 2 días y se les administró entonces por vía oral por la mañana durante 5 días por semana durante 2 meses de duración una medicación que contiene cierta cantidad de calcitriol y alendronato individualmente o en combinación, que se disolvieron independientemente en 0,5 ml de aceite de palma purificado y disolución salina fisiológica, respectivamente. Se muestra la cantidad de medicación administrada en cada grupo en la tabla 1 siguiente, y al grupo de control se le administró sólo una cantidad igual del aceite de palma y la disolución salina fisiológica usados en los grupos experimentales.

TABLA 1

Clasificación	Calcitriol (µg/kg)	Alendronato (mg/kg)	Aceite de palma purificado (ml)	Disolución salina fisiológica (ml)
Grupo de control	-	-	0,5	0,5
Grupo administrado con calcitriol	0,1	-	0,5	0,5
Grupo administrado con alendronato	-	1,0	0,5	0,5
Grupo administrado tanto con calcitriol como con alendronato	1 0,1	0,5	0,5	0,5
	2 0,1	1,0	0,5	0,5
	3 0,1	2,0	0,5	0,5

3) *Recogida de muestras y pretratamiento*

Después de 2 meses desde el inicio de las medicaciones anteriores, se recogieron muestras de orina de 24 h de las ratas blancas usando una jaula metabólica, se centrifugaron y se almacenaron entonces a -70°C. Se hicieron ayunar durante una noche a las ratas blancas bajo experimentación, se decapitaron y se recogieron sus muestras de sangre. Se obtuvieron los sueros de ratas blancas centrifugando esas muestras de sangre y se almacenaron a -70°C. Se separaron las tibias mediante ablación y se fijaron con formalina al 4% a pH 7,4.

4) *Datos estadísticos y evaluación*

Se representa el resultado de cada experimento mediante el valor medio $\pm$ error estándar, y se determinó la significación usando ANOVA, ensayo de rango múltiple de Duncan al nivel $p < 0,05$.

Ejemplo experimental 1

Histomorfometría ósea

5 Para la descalcificación de tibias fijadas en el ejemplo de referencia anterior, se dispuso cada tibia en una disolución de ácido nítrico al 10% durante 6 h y se deshidrató entonces pasando por 10 concentraciones de alcohol diferentes en el intervalo de 80% a 100%. Se embebió entonces dos veces en xileno y parafina, se cortó la tibia proximal usando una microsierra de corte óseo en trozos de 4 cm de grosor y se tiñó con hematoxilina-eosina. Se observaron las tibias proximales anteriores a 40x aumentos de un microscopio, se calculó la relación entre el área de hueso trabecular en un
10 área estándar de $2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ y se calculó al área estándar después de medir el área de trabécula usando un sistema de análisis cuantitativo de imágenes. Los resultados de la histomorfometría ósea son los siguientes.

Aproximadamente un 2-3% del hueso cortical en seres humanos se reemplaza anualmente, en contraposición, el hueso trabecular se reemplaza a una velocidad mucho mayor de un 25% al año, y por tanto la velocidad de desarrollo
15 de hueso trabecular puede usarse como un modo directo así como exacto de discernir el estado de salud ósea, y por tanto se ha usado ampliamente en experimentos animales. En el presente experimento, se administraron alendronato y calcitriol individualmente o en combinación durante 2 meses después de una ovariectomía, y la observación microscópica del hueso trabecular de tibia mostró que el área de hueso trabecular estaba muy reducido en comparación con el de un grupo normal (véase la Fig. 1). Las observaciones de los grupos experimentales usando el analizador
20 de imágenes revelaron que el área de hueso trabecular aumentaba drásticamente en el grupo tratado con alendronato solo y los grupos 1, 2 y 3 que se trataron con un medicamento compuesto, mientras que no aumentaba en un grupo medicado con calcitriol solo (véase la Fig. 2). Por ejemplo, en términos del área de hueso trabecular, el grupo tratado con un medicamento compuesto que contenía alendronato y calcitriol mostró el mismo efecto que el grupo tratado con alendronato solo, y no había tampoco diferencia entre los grupos 1, 2 y 3, que se trataron con una medicación
25 compuesta, respectivamente.

Ejemplo experimental 2

30 *Ensayo bioquímico*

Los reactivos usados fueron aquellos obtenidos del ejemplo de referencia anterior.

1) *Medida de la concentración sérica de calcio*

35 Se midió la concentración sérica de calcio usando un autoanalizador Technicon, y el resultado se muestra a continuación.

Había un aumento significativo de la concentración sérica de calcio en el grupo tratado con calcitriol solo, mientras
40 que el grupo tratado con alendronato solo mostró una reducción significativa de la concentración sérica de calcio. Esto es debido a que el calcitriol aumenta la absorción de calcio en el intestino, mientras que el alendronato inhibe la resorción ósea al reducir la hormona paratiroidea, que previene entonces la liberación de calcio del hueso a la corriente sanguínea e inhibe la síntesis de calcitriol [$1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$] en riñón, reduciendo así la absorción de calcio en el intestino. Por lo tanto, las concentraciones séricas de calcio en los grupos 1, 2 y 3 administrados con un medicamento
45 compuesto se mantuvieron a niveles intermedios entre la concentración del grupo tratado con calcitriol solo y la del grupo tratado con alendronato solo, como se esperaba (véase la Fig. 3).

2) *Medida de la excreción de calcio en orina*

50 Para estudiar el efecto de la medicación sobre la relación entre la concentración sérica de calcio y la excreción de calcio en orina resultante, se midió la relación de concentración de calcio/creatina de una muestra de orina de 24 h usando un kit de calcio (Yeongdong Pharmaceutical Co., Ltd., Corea), y el resultado se muestra en la Fig. 4. Según la Fig. 4, la excreción de calcio aumentó notablemente cuando se medicaba con calcitriol, mientras que no se observaba diferencia cuando se medicaba con alendronato. La cantidad de excreción de calcio aumentó en los grupos 1 y 3 con
55 un medicamento compuesto que contenía tanto calcitriol como alendronato, mientras que la del grupo 2 permaneció a un nivel comparable con la de un grupo de control (Fig. 4).

3) *Medida del índice de remodelación ósea*

60 Se midió el nivel de actividad fosfatasa alcalina sérica usando un autoanalizador Technicon, y se midió la concentración de osteocalcina usando un kit (test OSCA, Brahams, Berlín, Alemania) que usa el procedimiento RIA.

Como índice de la velocidad de remodelación, se midieron la concentración sérica de osteocalcina y la actividad fosfatasa alcalina. Había un ligero aumento tanto en la concentración de osteocalcina como en la actividad fosfatasa
65 alcalina cuando se medicaba con calcitriol solo, mientras que se redujeron cuando se medicaba con alendronato, aunque no a un nivel significativo (Fig. 5 y 6). No se observó cambio de la concentración de osteocalcina en todos los grupos tratados con una medicación compuesta. La actividad fosfatasa alcalina se redujo significativamente en el grupo 3 con una medicación compuesta, sin embargo, los grupos 1 y 2 no mostraron ningún cambio observable de

ES 2 316 392 T3

actividad fosfatasa alcalina, implicando por tanto que la velocidad de remodelación ósea no se reducía en los grupos 1 y 2.

4) Medida del índice de resorción ósea

Se calculó la relación de NTx/creatina en orina midiendo la concentración de N-telopéptido (NTx) de una muestra de orina de 24 h, un subproducto de colágeno de tipo I, usando un kit (Osteomark, Ostex, EE.UU.). El resultado mostró que no había un cambio significativo de la velocidad de resorción ósea debido a las medicaciones (véase la Fig. 7).

A partir de los ejemplos experimentales 1 y 2 anteriores, se mostró que el grupo 2 con una medicación compuesta (0,1 µg/kg de calcitriol + 1,0 mg/kg de alendronato) era la relación de concentración óptima para una preparación farmacéutica compuesta, debido a que se prevenía eficazmente la progresión de la osteoporosis sin inhibir la velocidad de remodelación ósea, y también la concentración sérica de calcio y la excreción de calcio en orina se mantenían a un nivel normal. Se evaluó la seguridad de las preparaciones farmacéuticas compuestas así obtenidas según los ensayos de toxicidad aguda y subaguda estándar descritos en *Korea Food & Drug Administration* 98-56, expedido el 29 de abril de 1998, como en los siguientes ejemplos experimentales 3 y 4, y en consecuencia se confirmó su seguridad.

Ejemplo experimental 3

Ensayo de toxicidad aguda de un agente farmacéutico compuesto que contiene tanto calcitriol como alendronato

Se examinó la toxicidad de una dosis única de un agente farmacéutico compuesto que contiene calcitriol y alendronato mediante administración oral a animales experimentales para evaluar la seguridad del agente farmacéutico compuesto anterior. En este experimento, se administró el agente farmacéutico compuesto anterior a ratas blancas Sprague-Dawley para estudiar la toxicidad oral aguda mediante DL₅₀, condiciones generales, peso corporal y cantidad de ingesta dietética, y se examinó adicionalmente mediante autopsia.

Condiciones de cría

Se criaron 180 ratas blancas Sprague-Dawley de 4-5 semanas de edad (90 machos y 90 hembras) en una cámara SPF diseñada por Techniplast Co. en Italia, situada anexa al centro de cuidado animal del Departamento de Farmacología de la Universidad Choong-Ang en Corea, en condiciones de 23±2°C, humedad relativa del 60±2%, 13-15 ventilaciones de aire/h, iluminación de 12 h/día (de 7 a.m. a 7 p.m.). Se dispusieron las ratas blancas experimentales anteriores en una jaula y se les permitió ingerir libremente alimento sólido (pienso Hanil: Greenpia Co., Ltd., Corea) esterilizado mediante irradiación con rayos X y bebida (agua corriente esterilizada térmicamente).

Preparación de reactivos de muestra

Se pesó 1,0 mg de calcitriol almacenado en un envase resistente a la luz en un congelador a -20°C y se añadió a un matraz marrón. Se prepararon recientemente disoluciones 1,0 µg/ml y 10 g/ml añadiendo un disolvente (100% de etanol:MCT= 5:95) cuando fuera necesario, y se mezclaron con una disolución acuosa al 0,5% de CMC-Na en la que se había suspendido ya alendronato monosódico.

Determinación de la cantidad de medicación

Se determinó que la relación de mezcla entre la cantidad de medicación para calcitriol y alendronato era de 0,5 µg:5 mg basándose en la cantidad administrada a seres humanos. Se dividieron proporcionalmente los animales en 8 grupos diferentes basados en los valores de DL₅₀ y se determinó un total de 9 grupos, incluyendo un grupo de control, como se muestra en la tabla 2. Se administró la medicación por vía oral después de completar el volumen a 1 ml. Basándose en la relación entre el peso corporal humano y la cantidad administrada a ratas blancas, se fijó que las dosis mínimas fueran 0,2 µg/kg y 2,0 mg/kg para calcitriol y alendronato, respectivamente.

TABLA 2

Grupo	1	2	3	4	5	6	7	8	Control
Calcitriol (µg/kg)	125	100	75	50	25	5	1	0,2	0,0
Alendronato (mg/kg)	1250	1000	750	500	250	50	10	2,0	0,0

*Componentes experimentales*1) *Medida de DL_{50}*

Para medir los valores de LD_{50} de ratas blancas tanto macho como hembra, se dividieron los animales bajo experimentación en 8 grupos de medicación y un grupo de control, estando constituido cada grupo por 10 ratas blancas, y administrado por vía oral. Se contó entonces el número de animales muertos a las dos semanas después de la medicación y se calcularon sus valores de DL_{50} usando el procedimiento de Brehrens-Karber.

Las LD_{50} resultantes de ratas blancas administradas con el medicamento compuesto que contiene calcitriol y alendronato son las siguientes.

Se muestran las mortalidades de ratas blancas tanto macho como hembra, tratadas con una administración oral única con la medicación compuesta constituida por calcitriol y alendronato ($1 \mu\text{g/kg}$; 10 mg/kg) en la tabla 3 siguiente.

TABLA 3

Administración oral (calcitriol + alendronato)		Mortalidad	
Calcitriol ($\mu\text{g/kg}$)	Alendronato (mg/kg)	Hembras	Machos
125	1250	10/10	10/10
100	1000	9/10	9/10
75	750	6/10	5/10
50	500	0/10	0/10
25	250	0/10	0/10
5	50	0/10	0/10
1	10	0/10	0/10
0,2	2,0	0/10	0/10

Se calcularon los valores de DL_{50} del medicamento compuesto de calcitriol y alendronato según el procedimiento de Brehrens-Karber. El resultado mostró que la LD_{50} de la rata macho era de $77,5 \mu\text{g/kg}$ para calcitriol y de 775 mg/kg para alendronato, mientras que la de rata hembra era de $75,0 \mu\text{g/kg}$ para calcitriol y de 750 mg/kg para alendronato.

2) *Observación del estado normal*

Se hicieron diariamente observaciones de todas las ratas blancas bajo experimentación durante las 2 semanas de duración de tal manera que cada ratón se observó cada 30 min durante las primeras 6 h después de la medicación y se observó entonces una vez al día en un momento predeterminado a partir del segundo día. Los resultados de las observaciones de ratas blancas en estado normal son los siguientes.

Para las primeras 6 h después de la medicación, el grupo de ratas blancas hembra medicado con más de la DL_{50} mostró el comportamiento peculiar de que se rascaron las cabezas usando sus patas, y el comportamiento resultó ser un síntoma debido a la estimulación esofagagástrica. Entonces, esas ratas blancas mostraron convulsión y disnea al cabo de 1 h desde la medicación. Mostraron una reducción de la autopatía después de 2 h desde la medicación, un ligero grado de flexibilidad de comportamiento, estado letárgico mantenido y tuvieron estrés respiratorio. Casi todas las ratas blancas medicadas con no menos de $100 \mu\text{g/kg}$ de calcitriol y 1.000 mg/kg de alendronato murieron al cabo de 24 h desde la medicación. En el grupo de ratas blancas medicadas con $75 \mu\text{g/kg}$ de calcitriol y 750 mg/kg de alendronato, un 60% de las hembras y un 50% de los machos murieron, mientras que en el grupo medicado con $50 \mu\text{g/kg}$ de calcitriol y 500 mg/kg de alendronato, estaban todas vivas. En el grupo de ratas blancas medicadas con $50 \mu\text{g/kg}$ de calcitriol y 500 mg/kg de alendronato, 3 de 10 mostraron el síntoma de estimulación esofagagástrica anteriormente mencionado, pero se recuperaron del síntoma el primer día de convalecencia.

3) *Medida del peso corporal y la ingesta de alimento*

Se midieron diariamente en todas las ratas blancas bajo experimentación sus pesos y sus ingestas de alimento en momentos predeterminados antes y después de cada medicación durante 2 semanas. Los resultados mostraron que no había un cambio significativo de ingesta de alimento así como de peso corporal en ratas blancas macho y hembra, excepto aquellas que murieron (Fig. 8-9).

4) Autopsia

Se obtuvieron los hallazgos macroscópicos a partir de ratas blancas muertas así como de todas las ratas blancas vivas después de sacrificarlas por anestesia con éter. Los órganos o tejidos anormales detectados a simple vista se fijaron con formalina neutra al 10% y se prepararon entonces como muestras de tejido estándar. Se tiñeron entonces con hematoxilina y eosina para obtener los hallazgos tisulares, y los resultados son los siguientes.

Las autopsias de ratas blancas tratadas con un medicamento compuesto que contiene no menos de 75 µg/kg de calcitriol y 750 mg/kg de alendronato no mostraron hallazgos anormales excepto hemostasia de bazo. Las autopsias se realizaron para ratas blancas de control y las vivas al final de la convalecencia de 14 días después de tratar con un medicamento compuesto que contiene calcitriol y alendronato, y no había hallazgos anormales excepto una hipertrofia menor del bazo. Las autopsias titulares de las ratas blancas que se encontraron muertas después de tratar con 100 µg/kg de calcitriol y 1.000 mg/kg de alendronato mostraron que había una hemostasia y hemorragia graves del bazo (Fig. 10).

Ejemplo experimental 4

Ensayo de toxicidad subaguda de un agente farmacéutico compuesto que contiene tanto calcitriol como alendronato

Se examinó la toxicidad subaguda de una dosis repetida 5 semanas de un agente farmacéutico compuesto que contenía calcitriol y alendronato mediante administración oral a ratas blancas experimentales para evaluar la seguridad del agente farmacéutico compuesto anterior. Se examinaron las ratas blancas bajo experimentación una vez al día durante las 5 semanas de duración de medicaciones orales repetidas y durante las 2 semanas de duración de la convalecencia. Para evaluar la toxicidad subaguda del agente farmacéutico compuesto, se realizaron experimentos tales como estado normal, cambio de peso corporal, ingesta dietética, examen oftalmológico, acumetría, ensayo de orina, ensayo hematológico, ensayo hematoquímico y ensayo patológico después de tratar con una medicación dada.

Animales experimentales y condiciones de cría

Se criaron ratas blancas Sprague-Dawley en las mismas condiciones que se describen en el ensayo de toxicidad aguda del ejemplo experimental 3, con la excepción de que se dispusieron en una jaula metabólica un día antes de la terminación del experimento. Cada grupo experimental consistía en 20 machos y 20 hembras, y se trataron durante 5 semanas. Después de 2 semanas de convalecencia, se seleccionaron 10 machos y 10 hembras de cada grupo y se examinaron.

Preparación de reactivos de muestra y determinación de la cantidad de medicación

Se prepararon reactivos de muestra igual que se describe en el ensayo de toxicidad aguda del ejemplo experimental 3. Se determinó que la relación de mezcla entre la cantidad de medicación de calcitriol y alendronato era de 0,5 µg:5 mg basándose en la cantidad de medicación para seres humanos, los valores de DL₅₀ ya reseñados y la cantidad de medicación conocida por ser eficaz en el tratamiento clínico y la prevención de osteoporosis. Se seleccionaron 5 grupos mediante azeotropía con 4 grupos de medicación diferente y un grupo de control, como se muestra en la Tabla 4.

TABLA 4

Grupo	1	2	3	4	Control
Calcitriol (µg/kg)	25	5	1	0,2	0,0
Alendronato (mg/kg)	250	50	10	2,0	0,0

Componentes experimentales

1) Examen de la mortalidad

No se observó mortalidad, sino que tanto las ratas blancas macho como hembra tratadas con un medicamento compuesto que contiene calcitriol y alendronato estaban todas vivas tanto en el momento de terminación de la medicación como en la convalecencia.

2) *Observación del estado normal*

Se observó el estado normal de las ratas blancas (a) 3 veces al día durante el tratamiento, antes de la medicación, inmediatamente después de la medicación y 2 h después de la medicación, (b) 2 veces al día durante las vacaciones, antes de la medicación e inmediatamente después de la medicación, y (c) una vez al día durante la convalecencia. Se observaron el síntoma estimulante esofagogástrico y estado letárgico hasta el día 3 después de la medicación, pero esos síntomas desaparecieron después del día 5. Todos los demás grupos experimentales no mostraron ningún cambio particular del estado normal que parezca ser debido a la medicación.

3) *Cambio de peso corporal e ingesta de agua*

Se midió el peso corporal una vez cada 3 días durante la medicación y durante la convalecencia. Se midió la cantidad acumulada de agua ingerida durante un periodo de 7 días una vez por semana, y se estimó a partir de esto la cantidad de ingesta diaria para cada ratón. El resultado mostró que no había un cambio significativo en el peso corporal (Fig. 11) ni en la ingesta de agua (Fig. 12) en todos los grupos experimentales tratados con el agente farmacéutico compuesto que contiene calcitriol y alendronato hasta la terminación de la medicación y la convalecencia.

4) *Autopsia oftalmológica*

Se ejecutaron autopsias oftalmológicas en todas las ratas blancas bajo experimentación durante la inspección, y la 5ª semana del experimento se examinaron sólo 5 machos y 5 hembras seleccionados de cada grupo. Mientras se observaba el estado oftalmológico externo, se instiló atropina y se examinaron el segmento anterior del ojo, el cuerpo transmisor intermedio del ojo y el fondo de ojo.

Cuando no se observaban cambios debidos a una medicación dada en el examen de la 5ª semana, se omitía el examen posterior en convalecencia. El resultado mostró que no había un cambio oftalmológico significativo en todos los grupos experimentales tratados con el agente farmacéutico compuesto de calcitriol y alendronato hasta la terminación de la medicación y convalecencia.

5) *Acumetría*

Se examinó el reflejo acústico la 5ª semana de medicación mediante un dispositivo Gaidan Boizuru (aproximadamente 600 Hz) para 10 machos y 10 hembras de cada grupo experimental. Cuando no se observaban cambios debido a una medicación dada en el examen de la 5ª semana, se omitía el examen posterior en convalecencia. El resultado mostró que no había un cambio acumétrico significativo en todos los grupos experimentales tratados con el agente farmacéutico compuesto de calcitriol y alendronato hasta la terminación de la medicación y convalecencia.

6) *Ensayo de orina*

La 5ª semana de medicación y la 2ª semana de convalecencia, se seleccionaron 10 machos y 10 hembras de cada grupo experimental y se forzaron a ayunar, pero se les permitió beber agua, y se recogieron muestras de orina después de 4 h de ayuno. Se les permitió entonces ingerir libremente tanto alimento como agua, y se recogieron muestras de orina después de 20 h de su dieta libre. Se analizaron las muestras de orina obtenidas de las primeras 4 h con respecto a leucocitos, nitrito, urobilinógeno, pH, proteínas, cuerpos cetónicos, azúcar en la orina, sangre oculta, peso específico, bilirrubina (papel de ensayo de orina AMES, N-Nultistix SG-L: Japan Bayer, Samkong Co., Ltd.), colores y sedimentos. Se usaron las muestras de orina obtenidas a las 20 h para estimar Na, K y Cl (medida de la cantidad total). El resultado mostró que no había cambios significativos en las orinas obtenidas de todos los grupos experimentales tratados con el agente farmacéutico compuesto de calcitriol y alendronato hasta la terminación de la medicación y convalecencia, sino que todas permanecieron en el intervalo normal.

7) *Examen hematológico*

Se hicieron ayunar a ratas blancas durante una noche durante aproximadamente 16 antes de sacrificarlas, y se diseccionaron a lo largo de la línea media después de anestesarlas con éter. Se recogieron muestras de sangre de las arterias abdominales y se almacenaron en tubos Vacutainer (Becton Dickinson Vacutainer Systems Europe England) que contenían anticoagulante (7,5% de EDTA-2K). Se usaron entonces las muestras de sangre para analizar el recuento de eritrocitos (RBC) (detección de cambios de la resistencia eléctrica), la cantidad de hemoglobina (procedimiento de cianometahemoglobina), valor de hematocrito (recuento de RBC estimado y volumen de hematocrito medio), volumen corpuscular medio (detección del cambio de resistencia eléctrica), hemoglobina corpuscular media (estimación a partir de la cantidad de hemoglobina y el valor de hematocrito), recuento de plaquetas (detección de cambios en la resistencia eléctrica), (instrumento analizador automático de anormalidades: Cell-Dyne 3000, Abbot Co.), reticulocitos (procedimiento de Brecher) y recuento leucocítico diferencial (procedimiento de May-Giemsa). En este caso, se usó el plasma sanguíneo obtenido mediante centrifugación (10 min a 3.000 rpm) de muestras de sangre tratada con citrato sódico al 3,8% para estimar los ensayos anteriormente mencionados mediante el tiempo de protrombina (procedimiento Quick), y los resultados son los siguientes.

A la terminación de la medicación

No se observaron cambios significativos en todos los grupos experimentales tratados con el agente farmacéutico compuesto de calcitriol y alendronato.

A la terminación de la convalecencia

No se observaron cambios significativos en todos los grupos experimentales tratados con el agente farmacéutico compuesto de calcitriol y alendronato.

8) *Examen hematoquímico*

Se recogieron muestras de sangre de venas abdominales como en el caso del examen hematológico y se trataron con heparina. Se obtuvieron los sueros sanguíneos mediante centrifugación (10 min a 3.000 rpm) de las muestras de sangre y se usaron para analizar GPT y GOT (procedimiento de velocidad UV anormal, instrumento analizador automático de anormalidades, CH16, Texas International INC.), ALP (procedimiento de Bessey-Lowry), colesterol total (procedimiento CEH-COD-POD), bilirrubina total, glucosa en sangre (procedimiento de hexocinasa PD), urea-nitrógeno (procedimiento de urea-GL PC), fósforo inorgánico (procedimiento de ácido molíbdico) y proteína total (procedimiento de Biuret) (procedimiento de velocidad UV anormal, instrumento analizador automático de anormalidades, Monach, Instrumentation Laboratory). Los reactivos usados en los exámenes anteriores se adquirieron en Stanbio Laboratory Inc. (Tejas, EE.UU.) y los resultados son los siguientes.

A la terminación de la medicación

Había un pequeño aumento de la actividad GPT en ratas blancas macho tratadas con 25 $\mu\text{g/kg}$ de calcitriol y 250 $\mu\text{g/kg}$ de alendronato, y aquellas tratadas con 5 $\mu\text{g/kg}$ de calcitriol y 50 mg/kg de alendronato. La actividad GPT aumentó en todas las ratas blancas experimentales. Sin embargo, no había un cambio dependiente de la dosis significativo y el nivel de actividad GPT era relativamente alto incluso en un grupo de control tratado con disolvente, implicando así que el pequeño aumento de la actividad GPT era debido a una ligera hemólisis ocurrida mientras se recogían las muestras de sangre. El nivel de glucosa en sangre aumentó un poco en todas las ratas blancas experimentales macho y hembra, sin embargo, no se observó una dependencia significativa del volumen. Había un pequeño aumento en un grupo de control tratado con disolvente y la glucosa en orina no se detectó en las orinas, sugiriendo que el pequeño aumento en el nivel de glucosa no era debido a la diabetes, sino un aumento temporal debido al estrés. Por lo tanto, puede concluirse de los resultados anteriores que no había un cambio dependiente de la dosificación significativo en ambos grupos experimentales y un grupo de control debido a las medicaciones, con las excepciones de un pequeño aumento de la actividad GOT y el nivel de glucosa.

A la terminación de la convalecencia

La actividad GPT se volvió normal a la terminación de la convalecencia en ratas blancas macho tratadas con 25 $\mu\text{g/kg}$ de calcitriol y 250 mg/kg de alendronato, y aquellas tratadas con 5 $\mu\text{g/kg}$ de calcitriol y 50 mg/kg de alendronato. La actividad GOT se redujo en todos los grupos experimentales en comparación con aquella a la terminación de la medicación. Sin embargo, no había un cambio dependiente de la dosificación significativo y el nivel de actividad GPT era relativamente alto incluso en un grupo de control tratado con disolvente, implicando así que el pequeño aumento de la actividad GPT era debido a una ligera hemólisis ocurrida mientras se recogían muestras de sangre. Por lo tanto, puede concluirse por los resultados anteriores que no había un cambio dependiente de la dosis significativo tanto en grupos experimentales como en un grupo de control debido a medicaciones, con las excepciones de un pequeño aumento de la actividad GOT y del nivel de glucosa, como es el caso a la terminación de la medicación.

9) *Autopsia*

Se obtuvieron los hallazgos macroscópicos de las ratas blancas muertas así como de todas las ratas blancas vivas después de sacrificarlas por anestesia con éter. Se fijaron los órganos o tejidos anormales a simple vista con formalina neutra al 10% y se prepararon entonces muestras de tejido estándar. Se tiñeron entonces con hematoxilina, obteniéndose hallazgos titulares, y los resultados son los siguientes.

A la terminación de la medicación

Las autopsias de ratas blancas tratadas con una medicación compuesta de 25 $\mu\text{g/kg}$ de calcitriol y 250 mg/kg de alendronato mostraron un nivel significativo de hipertrofia de bazo, pero no había hallazgos anormales en ratas blancas tratadas con menos de la dosificación anteriormente mencionada. No había hallazgos tisulares que mostraran cambios significativos debidos a la medicación distintos del bazo.

A la terminación de la convalecencia

Las autopsias de ratas blancas tratadas con una medicación compuesta de 25 $\mu\text{g/kg}$ de calcitriol y 250 mg/kg de alendronato mostraron un nivel significativo de hipertrofia de bazo, pero no había hallazgos anormales en las ratas blancas tratadas con menos de la dosificación mencionada anteriormente. No había hallazgos tisulares que mostraran cambios significativos debidos a la medicación distintos del bazo.

10) Examen patológico

Tras recoger muestras de sangre, se sacrificaron todas las ratas blancas experimentales mediante exanguinaciones. Después de observar las anormalidades de todos los órganos a simple vista, se extirparon cerebro, hipotálamo, glándula tiroidea incluyendo paratiroidea, glándula salivar (glándula submaxilar y glándula sublingual), timo, corazón, pulmones incluyendo bronquios, hígado, bazo, riñón, testículo, glándula suprarrenal, ovario, glándula prostática, vesícula seminal, útero y esternón y se pesaron, respectivamente. Se hicieron ayunar a las ratas blancas experimentales el día de la autopsia y se estimó el peso relativo de cada órgano mencionado anteriormente respecto a 100 g de peso corporal, respectivamente. Se extirparon también las regiones anormales de médula espinal, nervio isquiático, aorta torácica, tráquea, lengua, esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto, páncreas y mesenterio y se fijaron con formalina al 10% con tampón fosfato, y los cerebros y médulas espinales (esternón y fémur) se fijaron con disolución de Bouin y se embebieron con parafina. Se tiñeron especímenes de todos los tejidos y órganos obtenidos de las ratas blancas durante la medicación y convalecencia de todos los grupos experimentales y el grupo de control de disolvente con hematoxilina y eosina (H y E) y se observaron bajo microscopio. Los resultados no mostraron cambios aparentes debidos a la medicación.

Conclusión de los ejemplos experimentales 3-4

Se administraron por vía oral a ratas blancas Sprague-Dawley macho y hembra un medicamento compuesto que contiene tanto calcitriol como alendronato con una relación de mezcla de 1:10.000 una vez o repetidamente durante las 5 semanas de duración de los ensayos de toxicidades aguda y subaguda, y los resultados fueron los siguientes.

En primer lugar, los resultados del ensayo de toxicidad aguda de la medicación compuesta anterior son los siguientes.

Se calcularon los valores de DL_{50} para la medicación oral del medicamento compuesto de calcitriol y alendronato usando el procedimiento de Brehrens-Karber. El resultado mostró que la DL_{50} de las ratas blancas macho era de 77,5 $\mu\text{g/kg}$ para calcitriol y de 775 mg/kg para alendronato, mientras que la de ratas blancas hembra era de 75,0 $\mu\text{g/kg}$ para calcitriol y de 750 mg/kg para alendronato, respectivamente. Todas las ratas blancas experimentales estaban vivas cuando se trataron por vía oral una vez con la medicación compuesta de 50 $\mu\text{g/kg}$ de calcitriol y 500 mg/kg de alendronato, y no se observaron anormalidades en el estado normal, excepto el síntoma estimulante esofagogástrico y letargia. El peso corporal, la cantidad de ingesta dietética y el resultado del ensayo de orina mostraron ser todos normales.

Las autopsias de ratas blancas muertas por el tratamiento oral del medicamento compuesto de no menos de 75 $\mu\text{g/kg}$ de calcitriol y no menos de 750 mg/kg de alendronato revelaron que había una hemostasia y hemorragia grave del bazo, sin embargo, no se observaron otras lesiones particulares debido a la medicación.

En segundo lugar, los resultados del ensayo de toxicidad subaguda para la medicación anterior son los siguientes.

A la terminación de la medicación repetida

Todas las ratas blancas experimentales estaban vivas después del tratamiento oral repetido durante 5 semanas con la medicación compuesta por 25 $\mu\text{g/kg}$ de calcitriol y 250 mg/kg de alendronato, y no se observaron anormalidades en el estado normal, la cantidad de ingesta dietética, el examen oftalmológico, el examen acúmetrico, el examen hematológico y el examen hematoquímico.

Las autopsias de las ratas blancas anteriores revelaron que no había hallazgos anormales en el peso de cada órgano excepto hipertrofia de bazo, sin embargo, se observó también un nivel moderado de septo pulmonar local y una ligera hemostasia en bazo, hígado, riñón y edema mucoso esofagogástrico y extravasación de células inflamatorias. Sin embargo, estas lesiones se observaron también en un grupo experimental tratado con una dosificación baja de medicación compuesta por menos de 5 $\mu\text{g/kg}$ de calcitriol y menos de 50 mg/kg de alendronato, así como en un grupo de control, y por tanto estas lesiones no se consideraron debidas a la medicación. No había hallazgos anormales en cerebro, médula ósea, glándulas sexuales ni glándula péptica.

A la terminación de la convalecencia

Las ratas blancas experimentales a la terminación de la convalecencia de 2 semanas después de la administración oral repetida de medicamento compuesto por 25 $\mu\text{g/kg}$ de calcitriol y 250 mg/kg de alendronato durante 5 semanas estaban todas vivas y no se observaron anormalidades en el estado normal, la cantidad de ingesta dietética, el examen oftalmológico, el examen acúmetrico, el examen hematológico y el examen hematoquímico.

Las autopsias de las ratas blancas anteriores revelaron que no había hallazgos anormales en el peso de cada órgano excepto hipertrofia de bazo, sin embargo, se observaron también un nivel moderado de sepsis pulmonar local y una ligera hemostasia en bazo, hígado, riñón y edema mucoso esofagogástrico y extravasación de células inflamatorias. Sin embargo, estas lesiones se observaron también en un grupo experimental tratado con una baja dosificación de medicación compuesta de menos de 5 µg/kg de calcitriol y menos de 50 mg/kg de alendronato, así como en un grupo de control, y por tanto estas lesiones no se consideraron debidas a la medicación. La ligera inflamación esofagogástrica observada no parece un cambio peculiar, sino que se considera una lesión reversible en roedores al evaluar la toxicidad de una medicación dada. No había hallazgos anormales en cerebro, médula ósea, glándula sexual ni glándula péptica.

Como se menciona anteriormente, la administración oral individual de un medicamento compuesto por calcitriol y alendronato con una relación de mezcla de 1:10.000 mostró que la DL₅₀ mostraba ser mayor de 75 µg/kg y 750 mg/kg para calcitriol y alendronato, respectivamente, probando así que es un medicamento poco tóxico. La administración oral repetida durante 5 semanas de un medicamento compuesto que contiene 25 µg/kg de calcitriol y 250 mg/kg de alendronato no causó tampoco ninguna toxicidad subaguda observable a la terminación de la convalecencia, así como a la terminación de la administración y, considerando que la presunta dosificación humana (basada en 60 kg de peso corporal medio de una persona) es sólo equivalente a 1/3.000 de la administrada a ratas blancas (concretamente, 0,5 µg de calcitriol y 5 mg de alendronato), se cree por tanto que el medicamento compuesto que contiene calcitriol y alendronato según la presente invención es seguro.

Ejemplo experimental 5

Ensayos de un medicamento compuesto que contiene calcitriol y alendronato para diversas relaciones de mezcla entre calcitriol y alendronato

1) Miscibilidad entre una mezcla de calcitriol y alendronato y aditivos tales como un excipiente. Se añadieron excipientes a la mezcla anterior de calcitriol y alendronato (5 µg:50 mg) en una cierta relación como se muestra en las siguientes tablas 5 y 6.

2) Se añadió entonces un 5% de contenido de agua a la mezcla resultante de 1) y se almacenó a 40°C durante 14 días.

Se examinó la estabilidad de la mezcla anterior mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), y los resultados se muestran en las tablas 5 y 6 siguientes.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 316 392 T3

TABLA 5

Estabilidad de calcitriol (% de velocidad residual)			
Clasificación	Relación de mezcla	Seco	Contenido de agua (%)
Calcitriol + alendronato	-	80,1	79,6
Manitol	9:1	101,9	101,6
Azúcar blanco	9:1	94,7	95,0
Celactosa	9:1	64,5	63,5
β -ciclodextrina	9:1	97,5	96,3
Povidona	9:1	98,3	99,1
Hidroxipropilmetilcelulosa	3,6:1	95,4	93,5
Hidroxipropilcelulosa	3,6:1	91,8	92,2
Laurilsulfato de sodio	3,6:1	83,9	83,4
Hidroximetilcelulosa poco sustituida	3,6:1	95,4	94,3
Croscarmelosa de sodio	3,6:1	93,5	92,0
Carboximetilcelulosa de sodio	3,6:1	75,2	73,5
Crospovidona	3,6:1	88,5	89,7
Hidroxitolueno butilado	3,6:1	27,7	14,4
Hidroxianisol butilado	3,6:1	84,6	78,3
DL- α -tocoferol	3,6:1	86,4	86,2
Estearato de calcio	3,6:1	101,7	101,1
Estearato de magnesio	3,6:1	100,3	98,9
Dióxido de silicio coloidal	3,6:1	99,8	98,5

TABLA 6

Estabilidad de alendronato (% de velocidad residual)			
Clasificación	Relación de mezcla	Seco	Contenido de agua (%)
Calcitriol + alendronato	-	99,0	100,2
Manitol	1:1	96,2	99,3
Azúcar blanco	1:1	100,8	97,8
Celactosa	1:1	95,4	97,3
β -ciclodextrina	1:1	100,2	98,4
Povidona	1:1	97,7	99,9
Hidroxipropilmetilcelulosa	1:1	98,2	96,1
Hidroxipropilcelulosa	1:1	75,7	85,2
Laurilsulfato de sodio	5:2	100,4	99,7
Hidroximetilcelulosa poco sustituida	5:2	98,1	98,7
Croscarmelosa de sodio	5:2	100,0	97,4
Carboximetilcelulosa de sodio	5:2	98,0	97,1
Crospovidona	5:2	100,2	97,6
Hidroxitolueno butilado	5:2	100,6	99,1
Hidroxianisol butilado	5:2	97,9	97,2
DL- α -tocoferol	5:2	94,2	99,0
Estearato de calcio	5:2	95,4	98,3
Estearato de magnesio	5:2	97,7	98,4
Dióxido de silicio coloidal	5:2	99,0	100,1

Los resultados de las tablas 5 y 6 anteriores mostraron que el manitol como excipiente, la povidona como aglutinante y el estearato de calcio o estearato de magnesio como lubricante tienen unas propiedades excelentes en su campo designado, respectivamente. El hidroxitolueno butilado e hidroxianisol butilado como antioxidantes se pensó que afectaban a la estabilidad del calcitriol al principio, sin embargo, experimentos adicionales confirmaron que sólo afectan al calcitriol al nivel de su análisis, y considerando que se usan sólo cantidades traza, no causarían ningún problema. Como resultado, los aditivos que se incorporan al agente farmacéutico se seleccionaron del modo siguiente: manitol como excipiente, povidona como aglutinante, estearato de calcio como lubricante, hidroxitolueno butilado e hidroxianisol butilado como antioxidantes y laurilsulfato de sodio como reforzante de la resorción.

Ejemplo preparativo

Se prepararon los agentes farmacéuticos según la presente invención en forma de comprimidos no recubiertos, comprimidos con recubrimiento entérico, gránulos, gránulos con recubrimiento entérico, cápsulas y cápsulas con recubrimiento entérico.

ES 2 316 392 T3

Ejemplos preparativos 1-3

Preparación de comprimidos no recubiertos

5 Se prepararon comprimidos no recubiertos según la composición y los contenidos mostrados en la tabla 7 siguiente.

En primer lugar, se añadió D-manitol a una mezcla constituida por calcitriol y etanol, y se añadieron entonces etanol, antioxidantes y un aglutinante.

10 Aparte del procedimiento de preparación de calcitriol, se mezclaron otros ingredientes de alendronato, manitol y reforzante de la resorción y se añadieron entonces etanol y un aglutinante. Se mezclaron entonces calcitriol y alendronato y se añadieron un agente disgregante y un lubricante y se formaron así comprimidos.

15 TABLA 7

Clasificación		Ejemplos de preparación (mg)		
		1	2	3
20 Ingredientes principales	Alendronato	6,53	6,53	6,53
	Calcitriol	0,0005	0,0005	0,0005
25 Excipiente	D-Manitol	103,23	102,78	37,23
30 Antioxidante	Hidroxitolueno butilado	0,12	0,12	0,12
	Hidroxianisol butilado	0,12	0,12	0,12
35 Aglutinante	Povidona	3	3	3
Disolvente	Etanol	Adecuado	Adecuado	Adecuado
40 Agente de liberación sostenida	Hidroxipropil-metilcelulosa	-	-	24
	Metilcelulosa	-	-	48
45 Agente disgregante	Croscarmelosa de sodio	6	6	-
50 Reforzante de la resorción	Laurilsulfato de sodio	-	0,45	-
55 Lubricante	Estearato de calcio	1	1	1

ES 2 316 392 T3

Ejemplos preparativos 4-6

Preparación de comprimidos con recubrimiento entérico

- 5 Se prepararon comprimidos con recubrimiento entérico igual que en los ejemplos de preparación 1-3 anteriores, con la excepción de que los comprimidos sin recubrimiento preparados en los ejemplos de preparación 1-3 se recubrieron con disolución de recubrimiento entérico para tener los ingredientes y contenidos mostrados en la tabla 8 siguiente.

TABLA 8

Clasificación		Ejemplos de preparación (mg)		
		4	5	6
Ingredientes principales	Alendronato	6,53	6,53	6,53
	Calcitriol	0,0005	0,0005	0,0005
Excipiente	D-Manitol	103,23	102,78	37,23
Antioxidante	Hidroxitolueno butilado	0,12	0,12	0,12
	Hidroxianisol butilado	0,12	0,12	0,12
Aglutinante	Povidona	3	3	3
Disolvente	Etanol	Adecuado	Adecuado	Adecuado
Agente de liberación sostenida	Hidroxipropil-metilcelulosa	-	-	24
	Metilcelulosa	-	-	48
Agente disgregante	Croscarmelosa de sodio	6	6	-
Reforzante de la resorción	Laurilsulfato de sodio	-	0,45	-
Lubricante	Estearato de calcio	1	1	1
Agente de recubrimiento entérico	Hidroxipropil-metilcelulosa ftalato	9,5	9,5	9,5
Plastificante	Citrato de trietilo	0,5	0,5	0,5

ES 2 316 392 T3

Ejemplos preparativos 7-9

Preparación de gránulos

Se prepararon gránulos como se muestra en la siguiente tabla 9.

En primer lugar, se añadió D-manitol a una mezcla constituida por calcitriol y etanol, y se añadieron entonces etanol, antioxidantes y un aglutinante. Se pulverizó entonces toda la mezcla usando un pulverizador convencional a un tamaño de malla de 14-35 y se secó entonces a 40°C, obteniendo gránulos de calcitriol.

Aparte del procedimiento de preparación de calcitriol, se mezclaron otros ingredientes de alendronato, manitol y reforzante de la resorción, se añadieron de nuevo etanol y un aglutinante a la mezcla anterior y se pulverizó entonces usando un pulverizador convencional a un tamaño de malla de 14-35, y se secó a 40°C, obteniéndose gránulos de alendronato. Se mezclaron entonces los gránulos de calcitriol y gránulos de alendronato, se añadieron un agente disgregante y un lubricante y se formaron así comprimidos.

TABLA 9

Clasificación		Ejemplos de preparación (mg)		
		7	8	9
Ingredientes principales	Alendronato	6,53	6,53	6,53
	Calcitriol	0,0005	0,0005	0,0005
Excipiente	D-Manitol	961,47	961,02	361,47
Antioxidante	Hidroxitolueno butilado	1	1	1
	Hidroxianisol butilado	1	1	1
Aglutinante	Povidona	25	25	25
Disolvente	Etanol	Adecuado	Adecuado	Adecuado
Agente de liberación sostenida	Hidroxipropil-metilcelulosa	-	-	200
	Metilcelulosa	-	-	400
Reforzante de la resorción	Laurilsulfato de sodio	-	0,45	-
Lubricante	Estearato de calcio	5	5	5

ES 2 316 392 T3

Ejemplos preparativos 10-12

Preparación de gránulos con recubrimiento entérico

- 5 Se prepararon gránulos con recubrimiento entérico igual que en los ejemplos de preparación 7-9 anteriores, con la excepción de que los gránulos preparados en los ejemplos de preparación 7-9 anteriores se recubrieron con una disolución de recubrimiento entérico para tener los ingredientes y contenidos mostrados en la tabla 10 siguiente.

TABLA 10

Clasificación		Ejemplos de preparación (mg)		
		10	11	12
Ingredientes principales	Alendronato	6,53	6,53	6,53
	Calcitriol	0,0005	0,0005	0,0005
Excipiente	D-Manitol	751,87	751,42	271,87
Antioxidante	Hidroxitolueno butilado	0,8	0,8	0,8
	Hidroxianisol butilado	0,8	0,8	0,8
Aglutinante	Povidona	40	40	40
Disolvente	Etanol	Adecuado	Adecuado	Adecuado
Agente de liberación sostenida	Hidroxipropil-metilcelulosa	-	-	160
	Metilcelulosa	-	-	320
Reforzante de la resorción	Laurilsulfato de sodio	-	0,45	-
Agente de recubrimiento entérico	Hidroxipropil-metilcelulosa ftalato	146,4	146,4	146,4
Plastificante	Glicérido de ácido graso	24,4	24,4	24,4
Lubricante	Talco	29,2	29,2	29,2

ES 2 316 392 T3

Ejemplos preparativos 13-15

Preparación de cápsulas

Se prepararon las cápsulas como se muestra en la tabla 11 siguiente.

En primer lugar, se añadió D-manitol a una mezcla constituida por calcitriol y etanol, y se añadieron entonces etanol, antioxidantes y un aglutinante. Se pulverizó entonces toda la mezcla usando un pulverizador convencional a un tamaño de malla de 14-35 y se secó entonces a 40°C, obteniendo gránulos de calcitriol.

Aparte del procedimiento de preparación de calcitriol, se mezclaron otros ingredientes de alendronato, manitol y reforzante de la resorción, se añadieron de nuevo etanol y un aglutinante a la mezcla anterior y se pulverizó entonces usando un pulverizador convencional a un tamaño de malla de 14-35 y se secó a 40°C, obteniéndose gránulos de alendronato. Se mezclaron entonces los gránulos de calcitriol y gránulos de alendronato, se añadieron un agente disgregante y un lubricante y se rellenaron finalmente cápsulas.

TABLA 11

Clasificación		Ejemplos de preparación (mg)		
		13	14	15
Ingredientes principales	Alendronato	6,53	6,53	6,53
	Calcitriol	0,0005	0,0005	0,0005
Excipiente	D-Manitol	182,07	181,62	67,07
Antioxidante	Hidroxitolueno butilado	0,2	0,2	0,2
	Hidroxianisol butilado	0,2	0,2	0,2
Aglutinante	Povidona	5	5	5
Disolvente	Etanol	Adecuado	Adecuado	Adecuado
Agente de liberación sostenida	Hidroxipropil-metilcelulosa	-	-	40
	Metilcelulosa	-	-	80
Agente disgregante	Croscarmelosa de sodio	5	5	-
Reforzante de la resorción	Laurilsulfato de sodio	-	0,45	-
Lubricante	Estearato de calcio	1	1	1
Cápsula	Cápsula vacía n° 2 ¹⁾	64	64	64

¹⁾ Producto de SEOHEUNG Capsule Co., Ltd (Corea)

ES 2 316 392 T3

Ejemplos preparativos 16-18

Preparación de cápsulas con recubrimiento entérico

- 5 Se prepararon cápsulas con recubrimiento entérico igual que en los ejemplos de preparación 13-15 anteriores, con la excepción de que los ingredientes se recubrieron con una disolución de recubrimiento entérico y finalmente se rellenaron cápsulas con los ingredientes y contenidos mostrados en la tabla 12 siguiente.

TABLA 12

Clasificación		Ejemplos de preparación (mg)		
		16	17	18
Ingredientes principales	Alendronato	6,53	6,53	6,53
	Calcitriol	0,0005	0,0005	0,0005
Excipiente	D-Manitol	178,07	177,62	63,07
Antioxidante	Hidroxitolueno butilado	0,2	0,2	0,2
	Hidroxianisol butilado	0,2	0,2	0,2
Aglutinante	Povidona	10	10	10
Disolvente	Etanol	Adecuado	Adecuado	Adecuado
Agente de liberación sostenida	Hidroxipropil-metilcelulosa	-	-	40
	Metilcelulosa	-	-	80
Agente disgregante	Croscarmelosa de sodio	5	5	-
Reforzante de la resorción	Laurilsulfato de sodio	-	0,45	-
Agente de recubrimiento entérico	Hidroxipropil-metilcelulosa ftalato	36,6	36,6	36,6
Plastificante	Glicérido de ácido graso	6,1	6,1	6,1
Lubricante	Talco	7,3	7,3	7,3
Cápsula	Cápsula vacía n° 1 ²⁾	77	77	77
²⁾ Producto de SEOHEUNG Capsule Co., Ltd (Corea)				

ES 2 316 392 T3

Ejemplo experimental 6

Ensayo de estabilidad de comprimidos con recubrimiento entérico

Se almacenaron comprimidos con recubrimiento entérico preparados según el ejemplo de preparación 5 durante dos meses en condiciones acelerantes (40°C, humedad relativa de 75%), se examinó la estabilidad de los comprimidos tres veces, y el resultado está en la tabla 13 siguiente.

Al evaluar la estabilidad de los comprimidos, se evaluaron las propiedades observando a simple vista y se confirmaron mediante HPLC. Los contenidos de tanto calcitriol como alendronato se midieron también mediante HPLC.

TABLA 13

Componentes de ensayo	Primer ensayo		Segundo ensayo		Tercer ensayo	
	Inicial	Después de dos meses	Inicial	Después de dos meses	Inicial	Después de dos meses
Descripción	Comprimido recubierto con película blanca de forma redonda	Comprimido recubierto con película blanca de forma redonda	Comprimido recubierto con película blanca de forma redonda	Comprimido recubierto con película blanca de forma redonda	Comprimido recubierto con película blanca de forma redonda	Comprimido recubierto con película blanca de forma redonda
Identificación	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Contenido de calcitriol (%)	109,6	109,5	110,8	109,1	109,8	109,8
Contenido de alendronato (%)	99,8	98,9	100,3	99,3	100,0	99,8

Los resultados mostrados en la tabla 13 anterior revelaron que los comprimidos eran estables en el ensayo de estabilidad durante 2 meses tanto a temperatura ambiente como en condiciones acelerantes.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de enfermedad ósea metabólica que comprende una
mezcla de primeros gránulos y segundos gránulos, en la que dichos primeros gránulos comprenden una cantidad de
calcitriol como ingrediente activo, y al menos un excipiente, y dichos segundos gránulos comprenden una cantidad de
alendronato como ingrediente activo y excipiente(s); y en la que dicha composición contiene aproximadamente 1.000-
50.000 partes en peso de alendronato por una parte en peso de calcitriol; y adicionalmente en la que dicho excipiente
en ambos gránulos comprende manitol, comprendiendo dicho manitol de aproximadamente 70 a 98% en peso de la
composición total, y en la que aproximadamente 50-60% en peso del manitol total está combinado con dicho calcitriol,
y aproximadamente 40-60% en peso del manitol total está combinado con dicho alendronato.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicha composición está en forma de comprimidos
sin recubrimiento, comprimidos con recubrimiento entérico, gránulos con recubrimiento entérico, cápsulas o cápsulas
con recubrimiento entérico.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente como reforzante de la
resorción un aditivo que comprende aproximadamente 0,01 a 10% en peso de laurilsulfato de sodio basado en el peso
de la composición total.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que al menos uno de dichos gránulos comprende
adicionalmente etanol.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, que es gránulos con recubrimiento entérico.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho manitol es D-manitol.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente estearato de calcio en una
cantidad de 0,1 a 20% en peso basada en la composición total.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente estearato de magnesio en
una cantidad de 0,1 a 20% en peso basada en la composición total.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho manitol y dicho calcitriol y alendronato
tienen una relación de mezcla de manitol:(calcitriol+alendronato) de 9:1.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un aditivo de liberación
sostenida seleccionado del grupo constituido por hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y
etilcelulosa.
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente hidroxitolueno butilado o
hidroxianisol butilado.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente povidona, estearato de
calcio, hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado y laurilsulfato de sodio.
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicha enfermedad ósea metabólica comprende
osteoporosis, enfermedad de Paget, raquitismo, osteomalacia, osteodistrofia renal, hiperparatiroidismo e hipoparati-
roidismo.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho mamífero es un ser humano.
15. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, en la que dicha enfermedad metabólica es osteoporosis.

Fig. 1

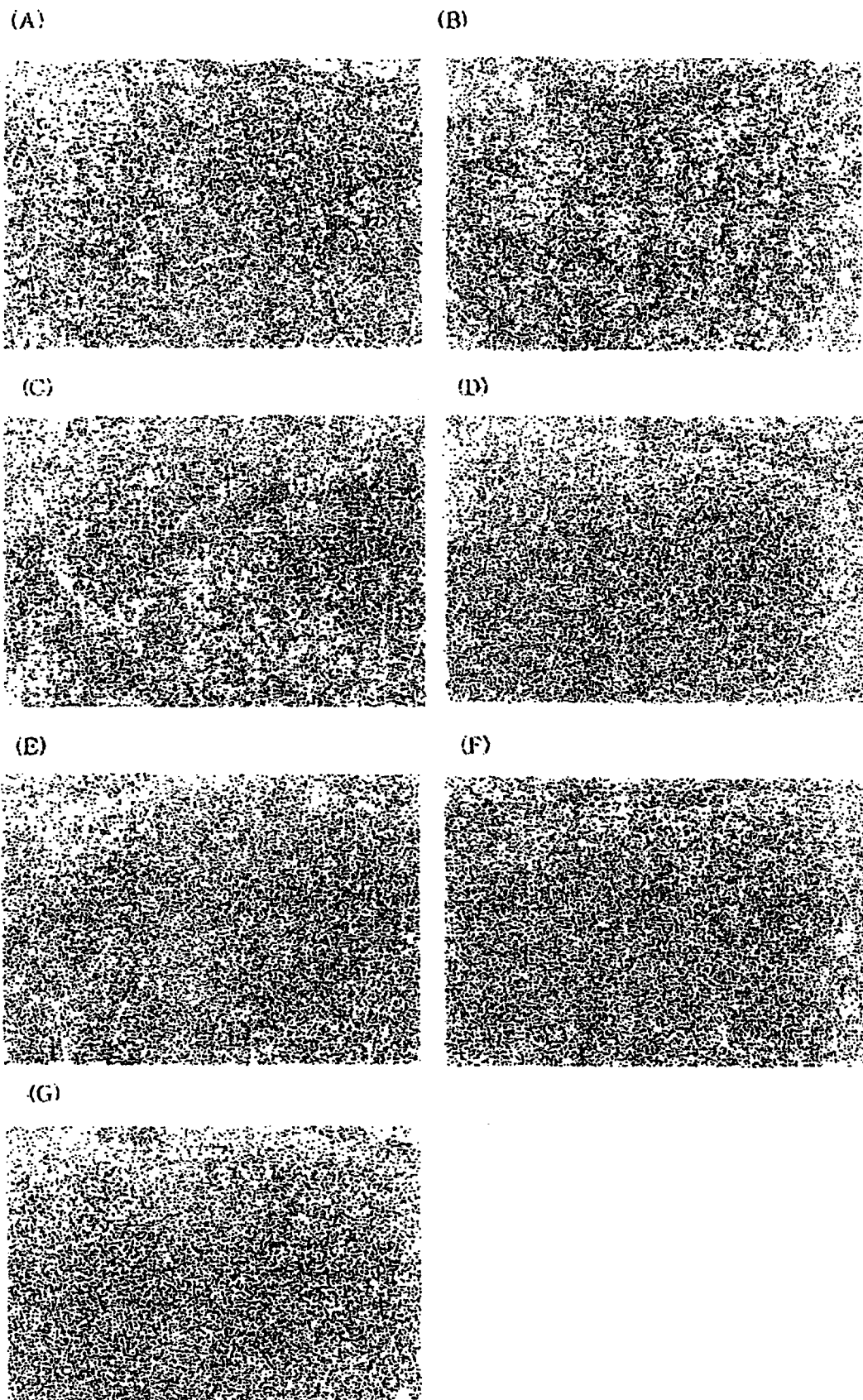


Fig. 2

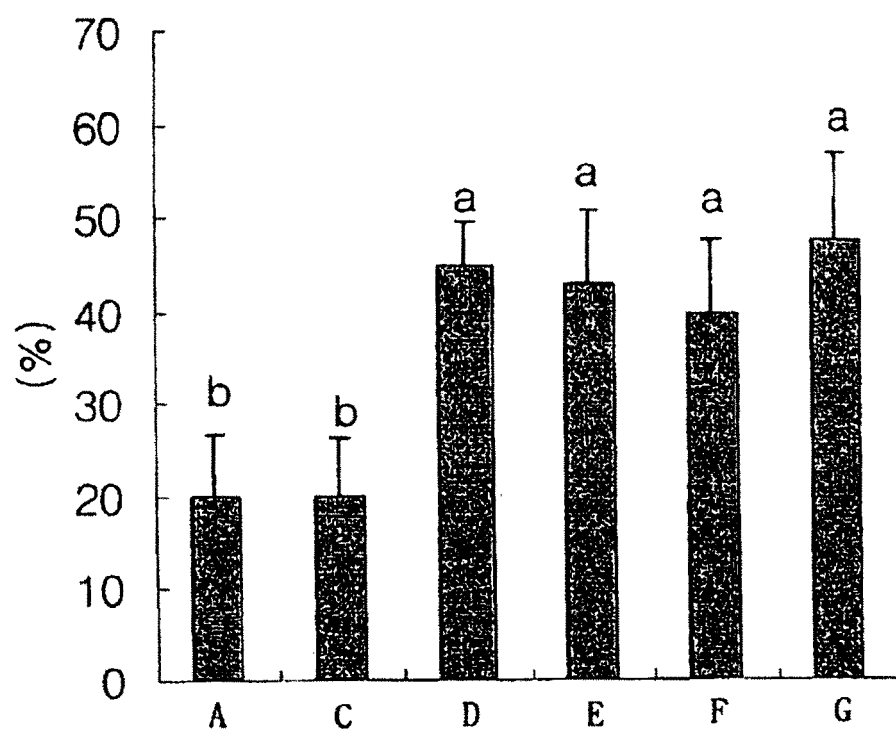


Fig. 3

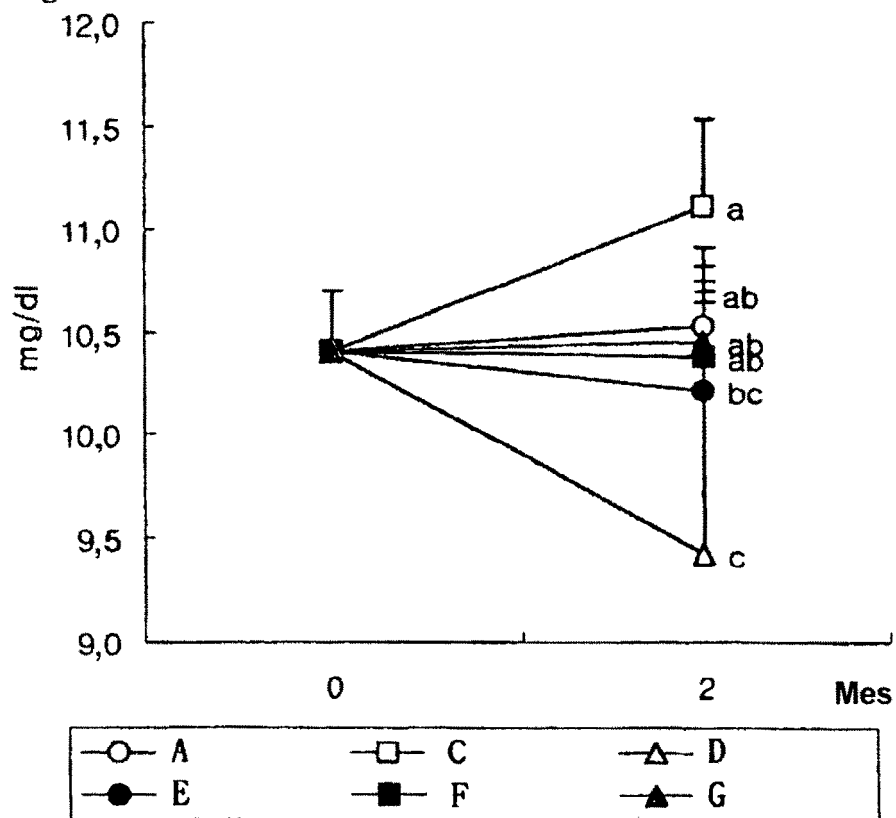


Fig. 4

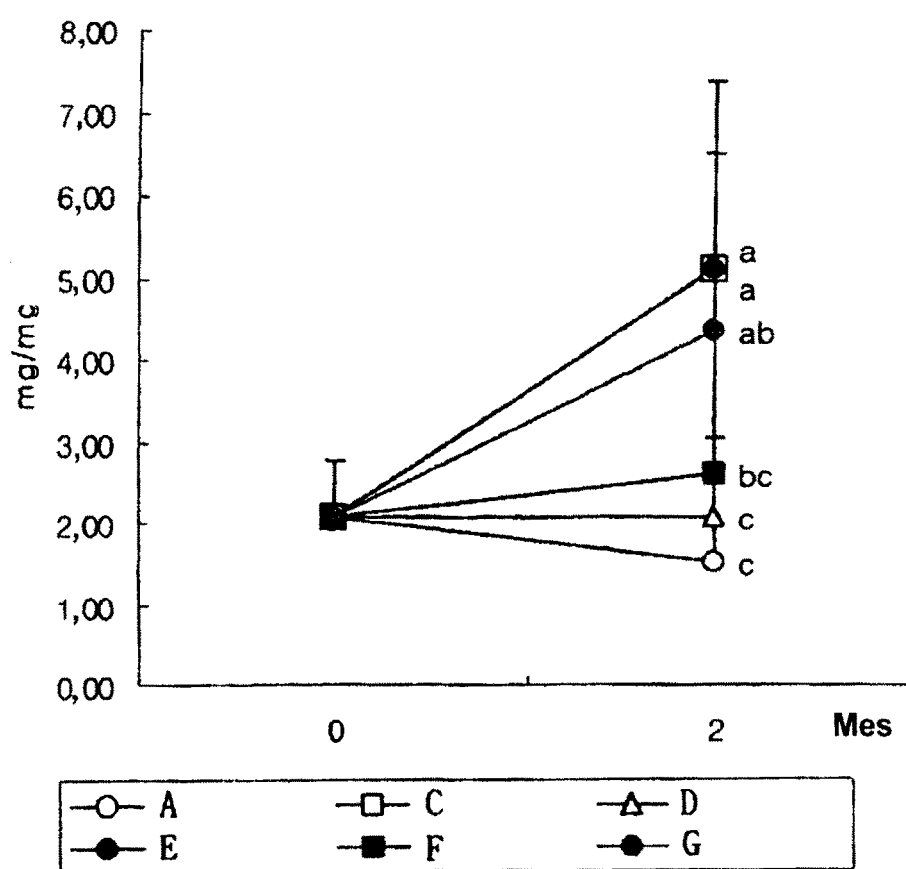


Fig. 5

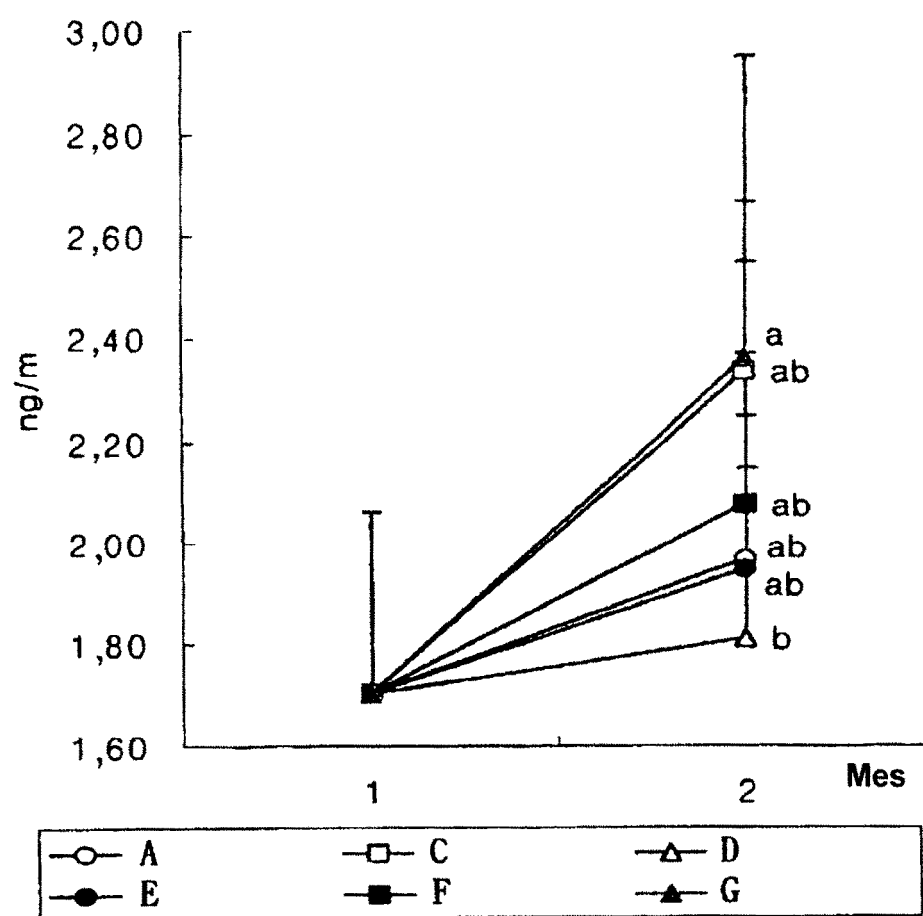


Fig. 6

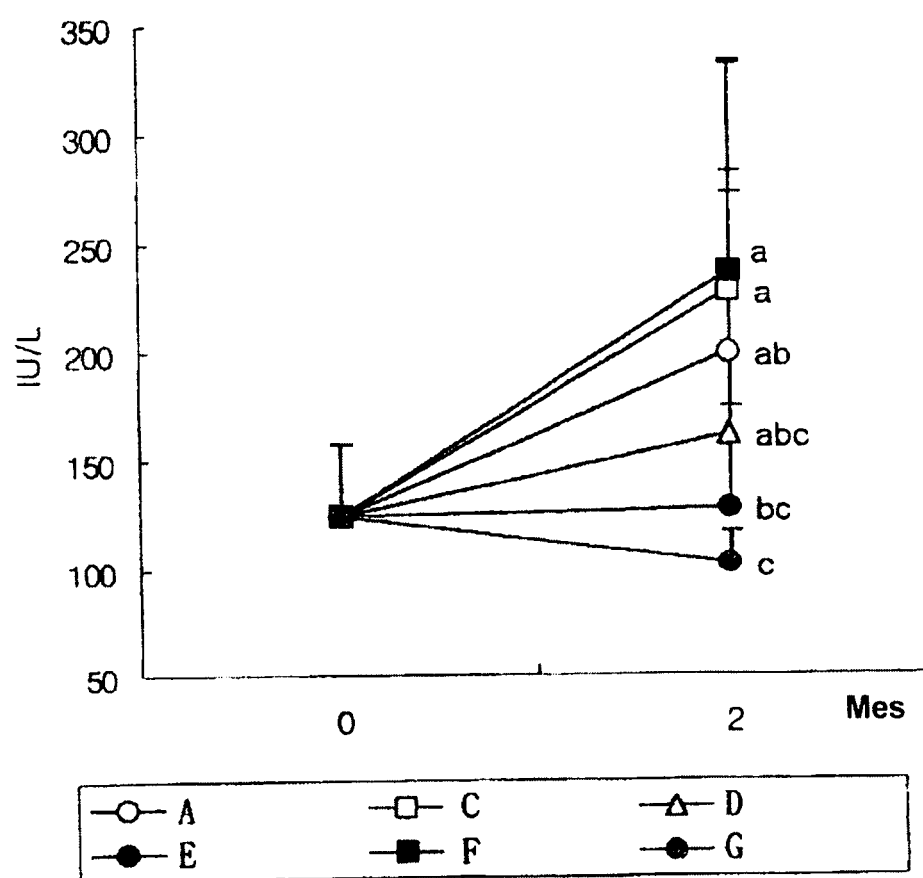


Fig. 7

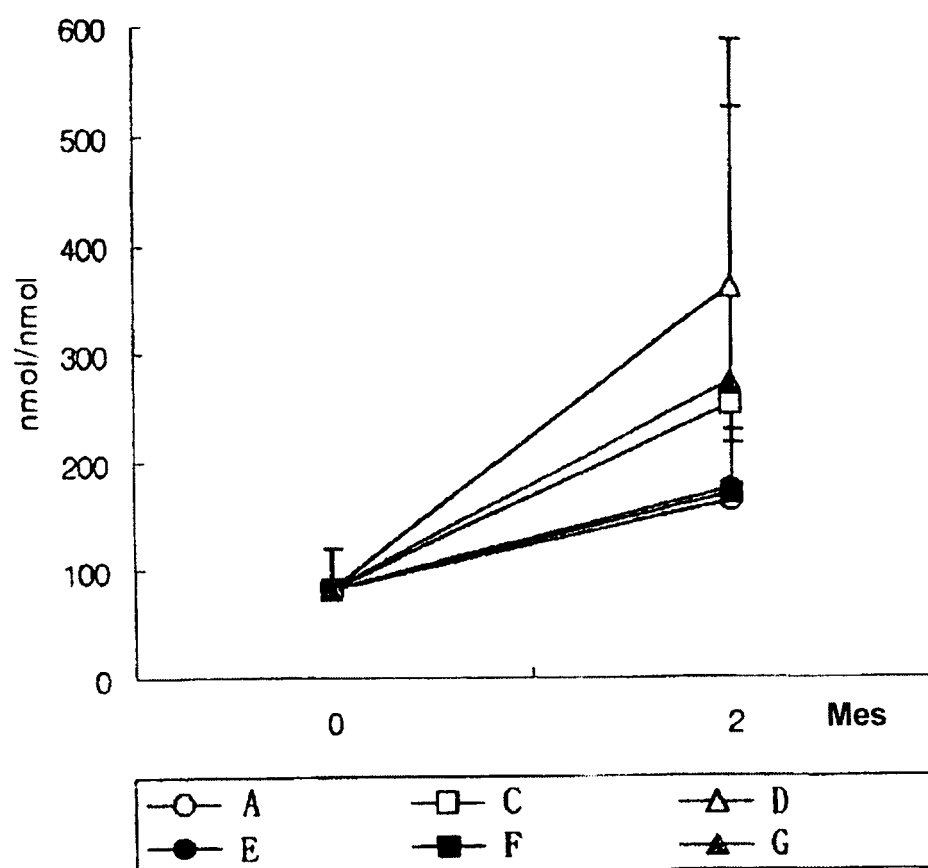


Fig. 8

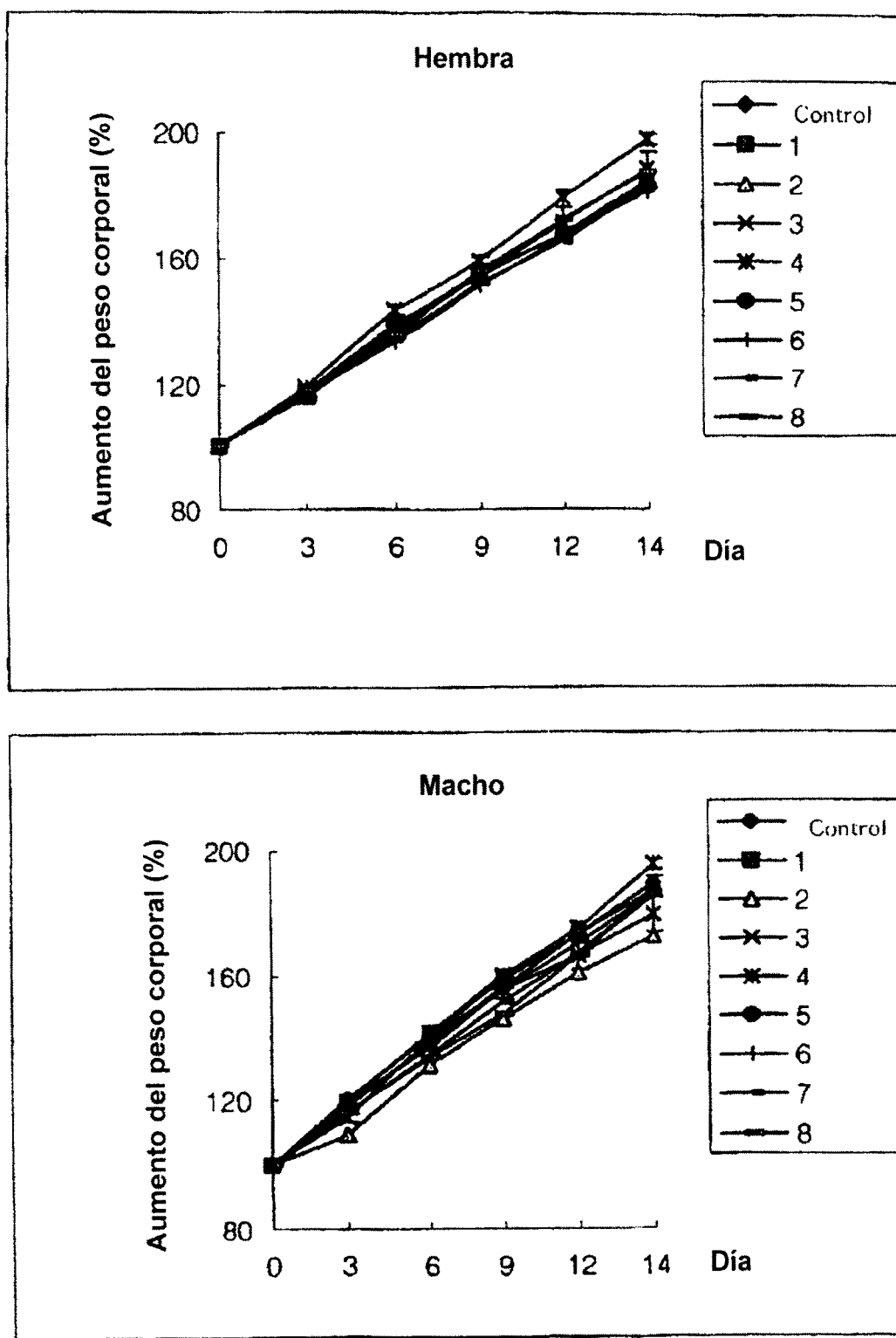


Fig. 9

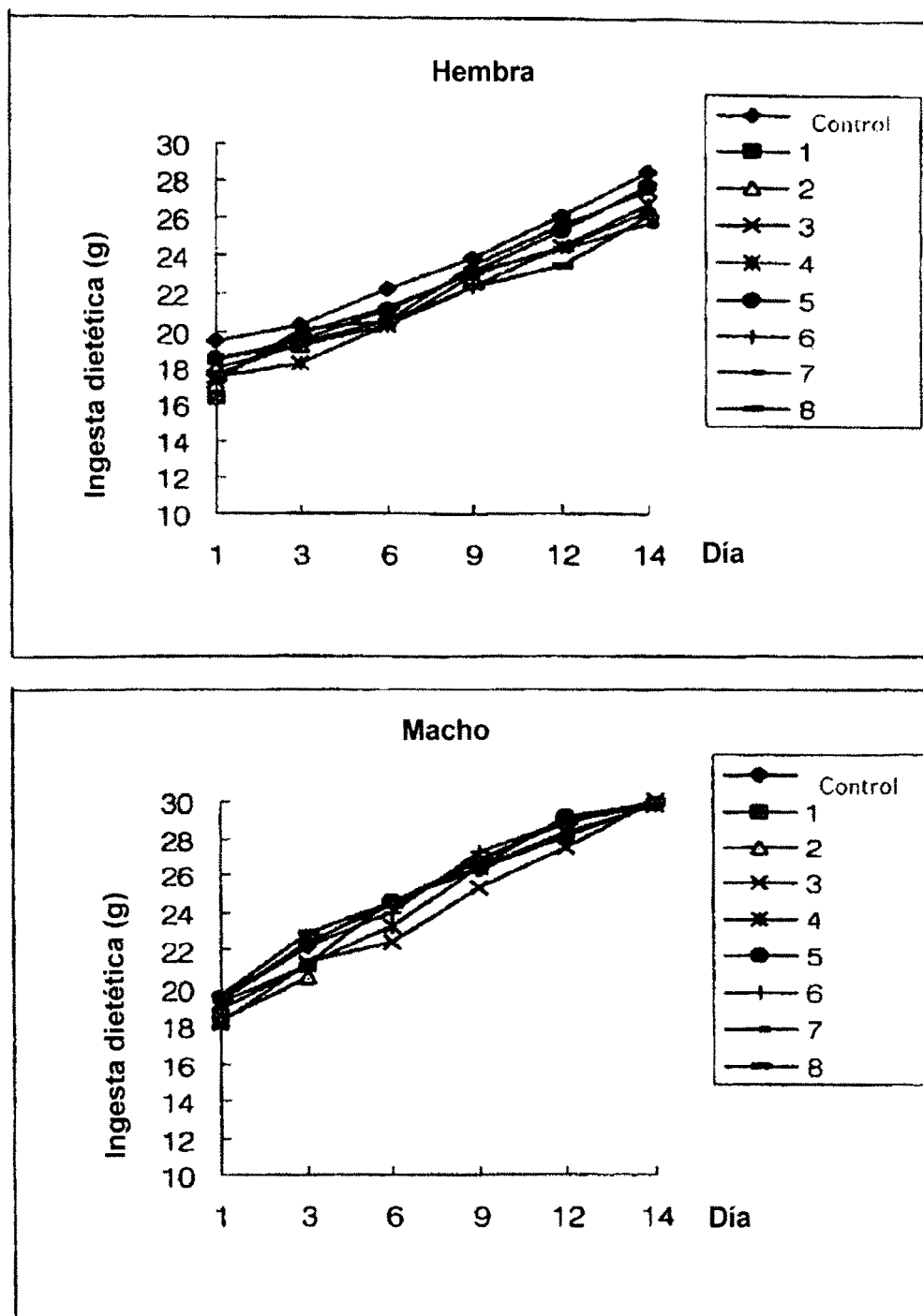


Fig. 10

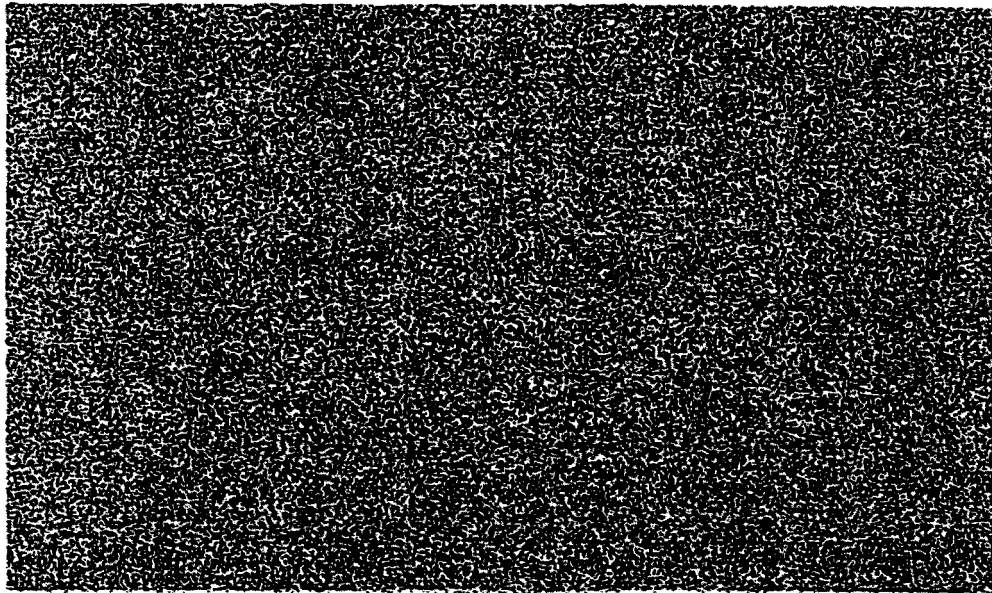


Fig. 11

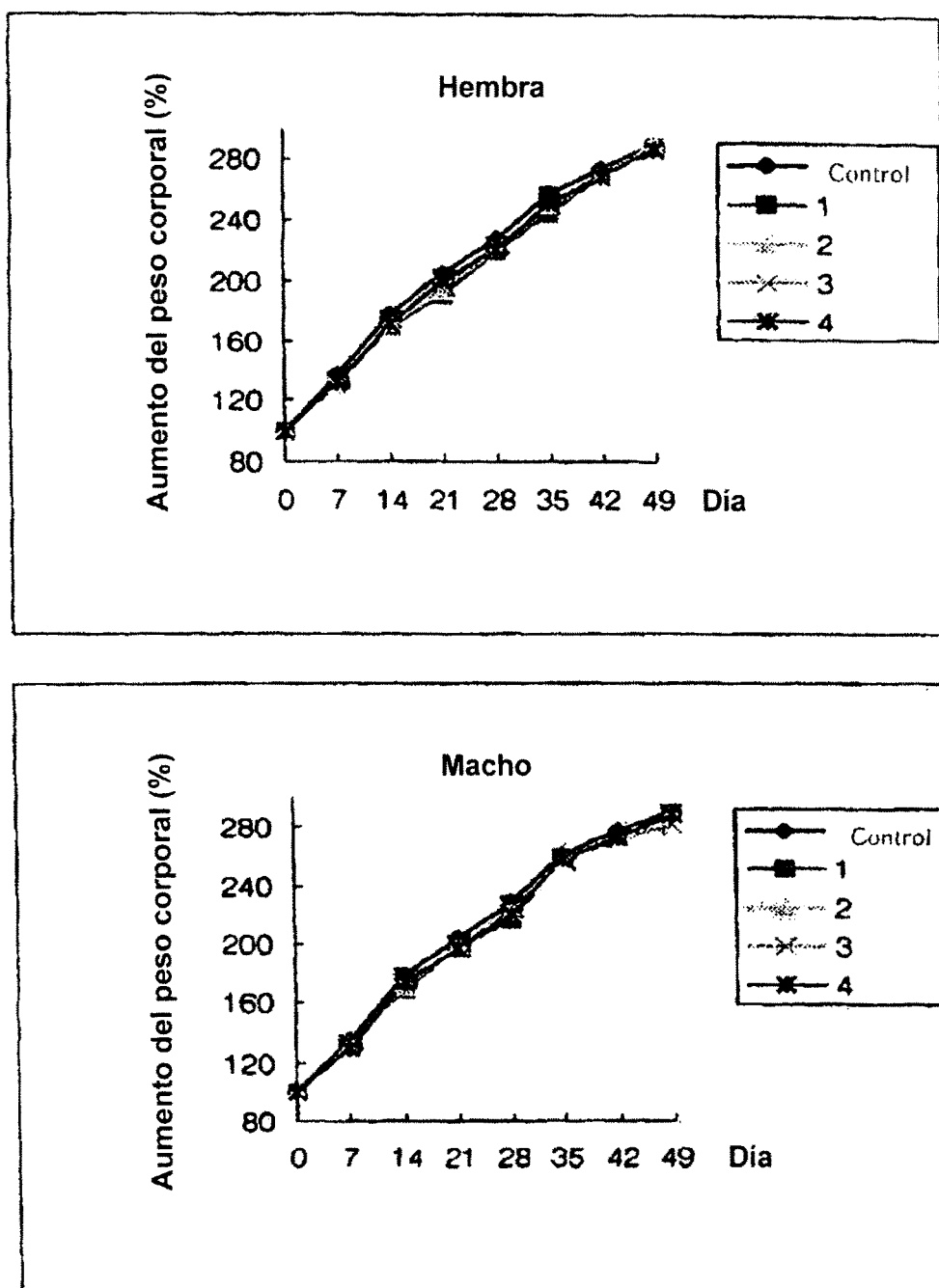


Fig. 12

