



19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 166 377**

51 Int. Cl.⁷: A61K 31/59

A61K 31/56

A61K 31/66

12

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **94923484.3**

86 Fecha de presentación: **14.07.1994**

87 Número de publicación de la solicitud: **0 710 112**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.05.1996**

54 Título: **Uso de vitamina D y derivados de la misma en la fabricación de un medicamento para la protección contra la pérdida de neuronas.**

30 Prioridad: **15.07.1993 US 91976**

73 Titular/es: **BOARD OF TRUSTEES OF THE
UNIVERSITY OF KENTUCKY
442 Bowman Hall
Lexington, KY 40506-0058, US**

45 Fecha de la publicación de la mención BOPI:
16.04.2002

72 Inventor/es: **Landfield, Philip W.**

45 Fecha de la publicación del folleto de patente:
16.04.2002

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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).

DESCRIPCION

Uso de vitamina D y derivados de la misma en la fabricación de un medicamento para la protección contra la pérdida de neuronas.

5 Esta invención se refiere a la protección contra la pérdida de neuronas.

A diferencia de muchos otros tipos celulares, las neuronas no pueden reemplazarse en el cerebro adulto. De esta forma, la pérdida de neuronas en el cerebro adulto tiene consecuencias muy graves y generalmente irreversibles, ya sea debida a la edad, a enfermedades, a traumatismos o a combinaciones de tales circunstancias.

Aún no se conoce la causa de la pérdida de neuronas durante el envejecimiento. Además, cada vez hay más indicios que sugieren que casi todas las personas que viven lo suficiente pueden padecer enfermedades relacionadas con la edad, tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), la enfermedad de Parkinson (PD) y apoplejías, que generalmente están asociadas con una pérdida de neuronas en diferentes regiones del cerebro. La incidencia de muchas enfermedades neurodegenerativas aumenta rápidamente con el envejecimiento. Por ejemplo, el porcentaje de individuos con menos de sesenta y cinco años que tienen enfermedad de Alzheimer es menor del cinco por ciento, pero esta incidencia aumenta casi exponencialmente después de los sesenta y cinco, y hasta el cuarenta y siete por ciento de los individuos de más de ochenta y cinco años puede tener alguna forma de AD. **Katzman T y Saitoh, T. (1991) *FASEB J.* 5:278-286; Evans, D.A. y col. (1989) *JAMA* 262:2551-2556.** Además, los cerebros de esencialmente todos los individuos estudiados de más de ochenta años contienen al menos alguna pérdida de neuronas relacionada con la edad y/o con enfermedades. **Matsuyama, H. y col. (1966) *Proceedings of the Fifth International Congress of Neuropathology* (Excerpta Medica International Congress Series No. 100, eds. Luthy, F. y col.) 979-980.** De esta forma, el propio envejecimiento es el mayor factor de riesgo para varios tipos de enfermedades neurodegenerativas, lo que indica que el envejecimiento aumenta la susceptibilidad a la pérdida de neuronas. De hecho, hay una gran evidencia de que el envejecimiento, incluso en ausencia de enfermedades, también está asociado con la pérdida de neuronas y con la pérdida de memoria. **Crook, T. y col. (1986) *Devel. Neuropsych.* 2(4):261-276.**

Aunque sigue sin conocerse la causa de la pérdida de neuronas en el envejecimiento y en las enfermedades neurodegenerativas, se ha creado un modelo denominado la "hipótesis de la homeostasis de calcio alterada". Esta hipótesis plantea que la mala regulación o elevación de los niveles de calcio intracelulares es una "ruta final común" para muchas afecciones y enfermedades neurodegenerativas que finalmente conducen a la muerte neuronal. Esto se basa en gran medida en la evidencia de la existencia de una alteración de la regulación del calcio en el deterioro relacionado con la edad del sistema nervioso en modelos animales de envejecimiento. **Khachaturian, Z.S. (1984) *Handbook of Studies on Psychiatry and Old Age* (eds. Kay, D. y Buarrows, G.D., Elsevier, Amsterdam) 7-30; Khachaturian, Z.S. (1989) *Aging* 1: 17-34; Gibson, G.E. y Peterson, C. (1987) *Neurobiol. Aging* 8: 329-344; Landfield, P.W. (1987) *Neurobiol. Aging* 8: 346-347.** También se ha demostrado que la mala regulación o elevación del calcio intracelular puede producir una sobreactivación de enzimas tales como las proteasas y las endonucleasas dependientes de calcio, que pueden ser tóxicas para las células. **Siesjo, B.K. (1981) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1:155-185; Choi, D.W. (1987) *J. Neurosci.* 7:369-379.**

Aunque el envejecimiento parece afectar a la regulación del calcio en el cerebro, las investigaciones de la regulación del calcio periférico en relación con afecciones y enfermedades, por ejemplo, con la AD, una enfermedad marcada por una pérdida extensiva de neuronas, fundamentalmente en el hipocampo, generalmente han sido incongruentes. Varios estudios han descubierto que ni la hormona paratiroidea, ni la vitamina D, ni el calcio en suero difieren sistemáticamente entre los pacientes enfermos y los controles de edad similar **(Shore, D. y col. (1980) *J. Gerontol.* 35: 656-662; Singh, S. (1988) *Age Ageing* 17:21-28; Ferrier, I.N. y col. (1990) *Age Ageing* 19: 368-375),** aunque algunos han descubierto que en los pacientes enfermos están alterados algunos aspectos de la regulación del calcio. **Martyn, C.N. y col. (1989) *Gerontology* 35: 153-157; Ferrier, I.N. y col. (1990) *Age Ageing* 19: 368-375; Ogihara, T. y col. (1990) *Gerontology* 36 (Supp. 1) 25-30.**

También se han realizado estudios que intentaban encontrar alteraciones en las hormonas reguladoras del calcio periférico con el envejecimiento normal. Algunos de estos estudios encontraron cambios en la regulación del calcio y en las hormonas reguladoras del calcio tales como la vitamina D. **Orwoll, E.S. y Meier, D.E. (1986) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63:1262-1269.** Sin embargo, todos estos estudios de la regulación del calcio periférico en el envejecimiento e incluso en la AD han sido correlacionales, y ninguno ha demostrado ninguna asociación causal entre las hormonas reguladoras del calcio periférico y la pérdida de neuronas. De hecho, ninguno de estos estudios ha sugerido que la vitamina D pueda afectar

a la regulación del calcio en el cerebro o a la pérdida de neuronas cerebrales. Esto probablemente se debe a la creencia general de que las hormonas periféricas no modulan la regulación de calcio en el cerebro. De esta forma, el concepto de la regulación del calcio por la vitamina D no se ha relacionado con la hipótesis de la homeostasis de calcio alterada del envejecimiento cerebral.

5

De esta forma, la causa genética o ambiental del envejecimiento cerebral o de la muerte de las neuronas cerebrales sigue sin estar definida en su mayor parte. Claramente, sea cual sea la causa, es el efecto progresivo y acumulativo de la muerte neuronal durante un largo periodo de tiempo el que produce los cambios fisiológicos perceptibles. En estudios longitudinales se ha descubierto que la progresión de los síntomas cognitivos debidos a la AD es detectable a intervalos no menores de un mes y de hasta un año. **Morris, J. C. y col. (1989) *Neurology* 39: 1159-1165 (Tablas 3 y 6).** La pérdida de neuronas del hipocampo debida al envejecimiento normal del cerebro es incluso más gradual. **Ball, M.J. (1977) *Acta Neuropathol. (Berl.)* 37: 111-118; Coleman, P.D. y Flood, D.G. (1987) *Neurobiol. of Aging* 8:521-545.** De esta forma, se requiere el ensayo durante un periodo no menor de un mes, y quizás durante un periodo de varios años, para demostrar la evidencia de la reducción de la pérdida de neuronas tras el tratamiento de un sujeto con un fármaco que se haya considerado útil en el tratamiento de la neurodegeneración relacionada con la edad o con ciertas enfermedades.

La Patente de Estados Unidos No. 4.897.388, expedida en 1990 sobre una solicitud presentada en diciembre de 1988, describe un procedimiento de tratamiento de pacientes con la enfermedad de Alzheimer por medio de la administración de una cantidad segura y eficaz de un material de vitamina D₃ o D₂ biológicamente activo. Un paciente que padecía la enfermedad de Alzheimer se trató con calcitriol durante un periodo de siete días. Según se informó, la afección del paciente, cuyos síntomas no se definieron, mostró mejoría. Sin embargo, el periodo durante el que se realizó el ensayo es completamente insuficiente, por las razones indicadas anteriormente, para demostrar una reducción de la pérdida de neuronas. Además, la muestra, que constaba de un solo paciente, no es suficiente para determinar ninguna conclusión, incluso asumiendo que la mejoría se había determinado objetivamente. Finalmente, no hay ninguna explicación del tipo de mejoría observada, pero es probable que sólo sea el alivio de los síntomas de la AD debido a los efectos periféricos del material de vitamina D.

30

Se cree que la pérdida de neuronas del cerebro es una característica general del envejecimiento, que afecta prácticamente a toda la población. La pérdida progresiva de neuronas conduce, en muchas circunstancias, al inicio y progresión de enfermedades neurodegenerativas debilitantes, presentando de esta forma una carga sanitaria importante para la población. Por ejemplo, en 1991 se gastaron casi 90 billones de dólares sólo en el tratamiento de pacientes con la enfermedad de Alzheimer. (Asociación de Alzheimer, Chicago, Illinois). Éste sólo es un ejemplo de las muchas enfermedades que pueden producirse por la pérdida de neuronas. Cualquier remedio que pudiera tratar o, en el caso óptimo, prevenir la aparición de enfermedades neurológicas relacionadas con la edad previniendo la pérdida de neuronas, proporcionaría un inmenso ahorro sanitario así como una gran mejora desde el punto de vista sanitario para una gran parte de la población. Por lo tanto, es indispensable desarrollar terapias que puedan detener o ralentizar la progresión de la pérdida de neuronas. Tales terapias deberían actuar óptimamente durante un largo periodo de tiempo, ya que la pérdida de neuronas se produce durante un periodo prolongado, y deberían ser seguras en tales espacios de tiempo con dosificaciones eficaces. Por las razones anteriores, sigue existiendo la necesidad crítica de un procedimiento de tratamiento a largo plazo que prevenga o retrase la pérdida neuronal en un sujeto.

45

La presente invención proporciona el uso de un compuesto que es una forma biológicamente activa de la vitamina D o un precursor, metabolito o análogo de la vitamina D que actúa por medio del receptor de la vitamina D, para la fabricación de un medicamento para aplicación terapéutica en la protección contra la pérdida de neuronas en un sujeto.

50

El compuesto usado de acuerdo con la presente invención se administra en una cantidad y durante un periodo de tiempo eficaz para proteger contra la pérdida neuronal. Preferiblemente, el periodo de administración es un periodo prolongado, por ejemplo, mayor de dos semanas y preferiblemente de un mes o mayor.

55

Los compuestos usados de acuerdo con la presente invención protegen contra la pérdida neuronal actuando a través del receptor de la vitamina D. Algunos de estos compuestos pueden prevenir o retrasar la pérdida de neuronas regulando los niveles de calcio y fosfato intraneuronales y/o periféricos. Otros compuestos usados de acuerdo con la presente invención actúan por medio del receptor de la vitamina D para proteger contra la pérdida de neuronas por medio de mecanismos que no implican la regulación de calcio o fosfato. Preferiblemente, el compuesto usado es una forma biológicamente activa de la vitamina

60

D, un precursor, metabolito, o análogo de vitamina D (para facilitar la siguiente discusión, la expresión “compuesto de vitamina D” y “vitamina D, un precursor, metabolito o análogo de vitamina D” se usarán indistintamente), que puede o puede no regular los niveles de calcio y/o fosfato. Una forma preferida de vitamina D para uso en la presente invención es el calcitriol.

5

Haciendo referencia a los dibujos ilustrativos adjuntos:

Las Figuras 1A, 1B y 1C representan un diagrama esquemático del procedimiento usado para seccionar el hipocampo en la preparación para el recuento de neuronas CA1 en ratas tratadas con calcitriol, calcitonina o una sustancia de control. Se separó por disección el hipocampo extendido (Figura 1A). Los bloques del hipocampo se procesaron por técnicas convencionales para incluirse en bloques de plástico. Se cortaron secciones finas (de 1 μm de espesor) desde una cara del bloque (Figura 1B) y se contaron las neuronas del campo CA1 en seis secciones de cada animal (Figura 1C).

10

15

Las Figuras 2A y 2B son fotografías que ilustran la densidad de las neuronas CA1 en secciones del hipocampo de ratas de edad avanzada (de 26-27 meses de edad). La Figura 2A es una fotografía de una sección representativa del campo CA1 del hipocampo de una rata de control de edad avanzada. La Figura 2B es una fotografía de una sección representativa del campo CA1 del hipocampo de una rata de edad avanzada después de 8 meses de tratamiento con inyecciones de calcitriol.

20

25

Las Figuras 3A y 3B son gráficos de barras que representan el número medio de neuronas en la región CA1 del hipocampo en 100 μm de la longitud de la capa de células CA1, para ratas macho de edad avanzada tratadas con inyecciones durante un periodo de 8 meses (Figura 3A— la edad cuando se inició el tratamiento era de 19-20 meses) o durante un periodo de 12 meses (Figura 3B— la edad cuando se inició el tratamiento era de 9-11 meses) con calcitriol, calcitonina o una sustancia de control.

30

35

La presente invención hace uso del descubrimiento de que un sujeto puede protegerse contra la pérdida de neuronas por la administración al sujeto de un compuesto que actúe a través del receptor de la vitamina D para prevenir y/o retrasar la pérdida de neuronas. Como la alteración de los niveles de calcio se ha implicado en las lesiones de los tejidos neuronales, un mecanismo a través del cual algunos compuestos usados de acuerdo con la presente invención puede proteger contra la pérdida de neuronas es mediante la restauración de la homeostasis del calcio. Otros compuestos usados de acuerdo con la presente invención actúan a través del receptor de la vitamina D para proteger contra la pérdida de neuronas sin regular los niveles de calcio. Típicamente, el compuesto usado se administra durante un largo periodo de tiempo y en una cantidad suficiente para proteger contra la pérdida de neuronas.

40

La expresión “protección contra” pretende incluir la prevención, retraso y/o terminación del deterioro, alteración o muerte de las neuronas de un sujeto. Los compuestos descritos en este documento proporcionan protección contra la pérdida de neuronas.

45

50

La pérdida de neuronas puede ser el resultado de cualquier condición de una neurona en la que está comprometida su función normal. El deterioro neuronal puede ser el resultado de cualquier condición que comprometa la función de una neurona y que probablemente conduzca a la pérdida neuronal. La función de las neuronas puede estar comprometida, por ejemplo, por una alteración bioquímica, por la fisiología o por la anatomía de una neurona. El deterioro de una neurona puede incluir cambios en la membrana, en las dendritas o en las sinapsis, que sean perjudiciales para el funcionamiento neuronal normal. La causa del deterioro, alteración y/o muerte neuronal puede ser desconocida. Como alternativa, puede ser el resultado de cambios relacionados con la edad y/o con enfermedades que se producen en el sistema nervioso central de un sujeto.

55

Cuando la pérdida de neuronas se describe en este documento como “relacionada con la edad”, pretende incluir la pérdida de neuronas debida a cambios corporales conocidos y desconocidos de un sujeto, que están asociados con el envejecimiento. Cuando la pérdida de neuronas se describe en este documento como “relacionada con una enfermedad” pretende incluir la pérdida de neuronas debida a cambios corporales conocidos y desconocidos de un sujeto, que están asociados con una enfermedad. Sin embargo, debe entenderse que estos términos no son mutuamente exclusivos y que, de hecho, muchas afecciones que producen la pérdida de neuronas están relacionadas con la edad y con enfermedades.

60

Algunas de las enfermedades relacionadas con la edad más comunes asociadas con la pérdida de neuronas y con los cambios en la morfología de las neuronas incluyen, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Pick, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad vascular, la enfermedad de Huntington y la Pérdida de Memoria Asociada con la Edad. En pacientes con Alzheimer, la pérdida

de neuronas es más notable en el hipocampo, en las cortezas frontal, parietal y temporal anterior, en la amígdala y en el sistema olfativo. Las zonas del hipocampo afectadas más prominentemente incluyen la región CA1, el subículo y la corteza entortinal. La pérdida de memoria se considera el cambio cognitivo más temprano y representativo, porque es bien conocido que el hipocampo juega un papel crucial en la memoria. La enfermedad de Pick se caracteriza por una degeneración neuronal grave en el neocórtex de los lóbulos temporales frontal y anterior, que algunas veces va acompañada por la muerte de neuronas en el cuerpo estriado. La enfermedad de Parkinson puede identificarse por la pérdida de neuronas en la sustancia nigra y en el locus ceruleus. La enfermedad de Huntington se caracteriza por la degeneración de las neuronas colinérgicas y GABA-érgicas intraestriatales y corticales. La enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington normalmente están asociadas con trastornos del movimiento, pero a menudo también muestran lesiones cognitivas (pérdida de memoria).

La pérdida de Memoria Asociada con la Edad (AAMI) es otro trastorno asociado con la edad que se caracteriza por la pérdida de memoria en individuos sanos de edad avanzada en las últimas décadas de la vida. **Crook, T.** y col. (1986) *Devel. Neuropsych.* 2(4):261-276. Actualmente, no está definida de forma precisa la base neuronal de AAMI. Sin embargo, se ha publicado la existencia de muerte neuronal con el envejecimiento en muchas especies en regiones cerebrales implicadas en la memoria, incluyendo la corteza, el hipocampo, la amígdala, los ganglios basales, el prosencéfalo colinérgico basal, el locus ceruleus, los núcleos rafe y el cerebelo. **Crook, T.** y col. (1986) *Devel. Neuropsych.* 2(4): 261-276.

Los sujetos que pueden tratarse por medio de esta invención incluyen organismos vivos, por ejemplo, mamíferos, susceptibles a la pérdida de neuronas relacionada con la edad y/o con enfermedades. Los ejemplos de sujetos incluyen los seres humanos, perros, gatos, ratas y ratones. Pueden usarse modelos de mamíferos inferiores, por ejemplo, ratas o ratones, para predecir los modos de envejecimiento cerebral generales y la pérdida de neuronas asociada en mamíferos superiores tales como los seres humanos.

Los cerebros de los roedores en envejecimiento no desarrollan placas seniles ni marañas neurofibrilares. Sin embargo, la mayoría de los estudios recientes sugieren que la pérdida o contracción de las neuronas, dendritas y/o sinapsis está más relacionada con la demencia o el envejecimiento que las placas y marañas. **Terry, R.D.** y col. (1987) *Ann. Neurol.* 21: 530-539; **Terry, R.D.** y col. (1990) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 49: 335; **Bruell, S.J.** y **Coleman, P.D.** (1981) *Brain Res.* 214: 23-41; **Scheff, S.W.** y col. (1990) *Neurobiol. Aging* 11: 29-37. Las ratas en envejecimiento presentan pérdida de células neuronales en las células piramidales del hipocampo, especialmente en el campo CA1, (**Landfield, P.W.** y col. (1981) *Science* 214: 581-584; **Landfield, P.W.** (1987) *Prog. Brain Res.* 72: 279-300; **Kerr, D.S.** y col. (1991) *J. Neurosci.* 11: 1316-1324), así como pérdidas de células o cambios dendríticos/sinápticos en algunas otras regiones cerebrales. **Coleman, P.D.** y **Flood, D.G.** (1987) *Neurobiol. Aging* 8: 521-545; **Geinisman, Y.** y col. (1986) *Brain Res.* 398: 266-275. Además, los roedores en envejecimiento muestran una hipertrofia extensiva de los astrocitos del hipocampo (**Landfield, P.W.** y col. (1977) *J. Gerontol.* 32: 3-12; **Landfield, P.W.** y col. (1978) *Science* 202: 1098-1102; **Geinisman, Y.** y col. (1978) *Am. J. Anat.* 153: 537-544) de la misma forma que los seres humanos en envejecimiento. **Wisniewski, H.M.** y **Terry, R.D.** (1973) *Progress in Brain Research* (ed. Ford, D.M. Elsevier, Amsterdam) 40: 167-186; **Hansen, L.A.** y col. (1987) *Neurobiol. Aging* 8: 1-6. Además, la pérdida de neuronas del campo CA1 del hipocampo es una correlación constante del envejecimiento entre las especies, y también es prominente en enfermedades neurodegenerativas humanas tales como la AD. Por estas razones, el estudio de la pérdida de neuronas en ratas en envejecimiento, por ejemplo, es predictivo de los mecanismos generales del envejecimiento cerebral y de la pérdida de neuronas asociada en los seres humanos.

Debido a la gran dificultad asociada con la medición de la pérdida de neuronas cerebrales en los seres humanos vivos o incluso en materiales de autopsia, que es muy variable y a menudo muestra cambios masivos debidos al intervalo postmortem previo a la fijación, muchas invenciones neuroprotectoras se han basado en sistemas de cultivo de tejidos *in vitro* de neuronas de embriones de roedores (véase la Patente de Estados Unidos No. 5.179.109-cultivo de tejido fetal de rata) o de otros mamíferos (Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 5.089.517- cultivo de tejido fetal de ratón), o en modelos de animales no mamíferos. Estas invenciones se han realizado para la protección de neuronas periféricas así como del sistema nervioso central en modelos animales o en modelos de cultivo de tejidos de isquemia, apoplejía, traumatismo, aplastamiento de nervios, AD, PD, etc. El deterioro de las neuronas en estos sistemas modelo a menudo se demuestra por traumatismo o intervención experimental (por ejemplo, aplicación de toxinas, aplastamiento de nervios, interrupción del suministro de oxígeno, etc.). Por ejemplo, para demostrar que ciertos antagonistas del N-metil-D-aspartato (NMDA), un receptor de neurotransmisores de aminoácidos excitadores, eran útiles como agentes anticonvulsivos y neuroprotectores, los inventores de la Patente de Estados Unidos No. 4.957.909 emplearon un modelo en el que ratones Swiss-albinos y neuronas del hipocampo de rata se sometieron a una sobre-estimulación de receptores de aminoácidos

excitadores después del tratamiento con los antagonistas de NMDA. Se realizó un estudio similar en el que se demostró la utilidad de ciertos antagonistas de NMDA como agentes que previenen la neurodegeneración, mediante el tratamiento de ratones con NMDA después del tratamiento con antagonistas de NMDA. Patente de Estados Unidos No. 5.168.103. En otro modelo experimental, los inventores, para demostrar la capacidad de los compuestos de indolactama V de prevenir la destrucción de neuronas neocorticales, expusieron cultivos *in vitro* de neuronas y células de glía fetales de ratón a diversos agonistas de glutamato, tales como kainato, NMDA y α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpronato (AMPA). Patente de Estados Unidos No. 5.089.517. Véanse también la Patente de Estados Unidos No. 5.170.109 (tratamiento de cultivos de neuronas de corteza/hipocampo de rata con glutamato antes del tratamiento con un compuesto neuroprotector); y las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.163.196 y 5.196.421 (los antagonistas de receptores de aminoácidos excitadores neuroprotectores inhiben la unión al receptor de glicina, kainato y AMPA en ratas).

Sin embargo, el presente modelo animal representa una mejora en el modelo para la neuroprotección asociada con la edad porque utiliza un animal intacto, que generalmente se prefiere a los modelos de cultivo de tejidos, y emplea una cepa de ratas que se desarrolló por el Instituto Nacional de Envejecimiento como modelo principal de envejecimiento en mamíferos. La cepa de ratas particular (ratas cruzadas Brown Norway/Fischer 344 F1) se seleccionó como tal modelo debido a su modelo normal de envejecimiento, con pocas indicaciones de patología anormal. Esta cepa también pierde neuronas en el campo CA1 del hipocampo con el envejecimiento y presenta pérdida de memoria. Este sistema representa uno de los modelos animales más naturales de degeneración y/o deterioro neuronal, porque refleja una pérdida gradual de neuronas. Además, la pérdida de neuronas no se provoca por ninguna intervención experimental ni por ninguna patología anormal. Su modelo de envejecimiento cerebral también es muy análogo a los modelos de envejecimiento cerebral de los seres humanos y de otras especies de mamíferos.

El compuesto usado de acuerdo con la presente invención se administra por medio de una vía que permite que el compuesto realice su función de proteger contra la pérdida de neuronas en un sujeto. Los ejemplos de las vías de administración que pueden usarse en este procedimiento incluyen la vía parenteral (subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intraperitoneal, intratecal, intracardiaca e intraesternal), la administración entérica (es decir, la administración a través del tracto digestivo), la administración mucosa y la administración percutánea. Dependiendo de la vía de administración, el compuesto usado puede recubrirse con o en un material para protegerlo de las condiciones naturales que pueden afectar perjudicialmente a su capacidad de realizar la función para la que está destinado. Un procedimiento particularmente conveniente de administración de un compuesto usado de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, un compuesto de vitamina D, es la administración percutánea.

De acuerdo con la invención, la administración del compuesto usado se realiza a dosis y durante periodos de tiempo eficaces para proteger contra la pérdida de neuronas en un sujeto. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para mejorar la respuesta terapéutica al compuesto. Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del día o la dosis puede reducirse proporcionalmente si así lo indican las exigencias de la situación terapéutica.

Los compuestos usados de acuerdo con la presente invención protegen contra la pérdida de neuronas actuando a través del receptor de la vitamina D. Es bien conocido que los receptores de la vitamina D existen en la periferia, pero también se han encontrado en el cerebro, particularmente en el hipocampo y en el neocortex. Algunos de estos compuestos pueden prevenir o retrasar la pérdida de neuronas regulando los niveles de calcio y fosfato intraneuronales y/o periféricos. Otros compuestos usados de acuerdo con la invención actúan a través del receptor de la vitamina D para proteger contra la pérdida de neuronas por medio de mecanismos que no implican la regulación del calcio o fosfato. Los compuestos que actúan regulando los niveles de calcio y/o fosfato modulan la homeostasis de calcio y/o fosfato periférico o intraneuronal o restauran los niveles de calcio alterados a los niveles normales, con lo que proporcionan protección contra la pérdida de neuronas.

Una forma en la que un compuesto puede proteger contra la pérdida de neuronas actuando a través del receptor de la vitamina D es mediante la modulación de la actividad biológica de un compuesto de vitamina D. Esto puede conseguirse modulando la cantidad de compuesto de vitamina D que está disponible para proteger contra la pérdida de neuronas. Generalmente, el compuesto aumentará la cantidad de compuesto de vitamina D que está disponible para proteger contra la pérdida de neuronas al aumentar la síntesis o expresión del compuesto de vitamina D. Por ejemplo, se ha descubierto que el bifosfonato YM175 (metileno-1,1-bifosfonato) estimula la producción renal de 1,25 dihidroxi-vitamina D mediante la estimulación de la actividad 1-hidroxilasa renal en ratas. Nagao, Y. y col (Nov. 1991) *Biochem. Biophys. Res Comm.* 180(3): 1127-1178. La 1-hidroxilasa renal es una enzima que hidroliza

la 25 dihidroxi vitamina D para producir 1,25 dihidroxi vitamina D, o calcitriol, que se considera uno de los metabolitos más activos de la vitamina D. Se ha demostrado que otro bifosfonato, HPeBP (1-hidroxipentano-1,1-bifosfonato), induce la estimulación de la 1,25 dihidroxi-vitamina D. **Bonjour, J-P.** y col. (1988) *Am. J. Physiol.* 254-E260-E264. Los agonistas del receptor de la vitamina D también contribuyen a la regulación de la cantidad de compuesto de vitamina D que está disponible para proteger contra la pérdida de neuronas.

Otra forma en la que un compuesto usado de acuerdo con la presente invención puede proteger contra la pérdida de neuronas mediante la actuación por medio del receptor de la vitamina D es alterando la capacidad del compuesto de vitamina D de proteger contra la pérdida de neuronas. Tales compuestos incluyen proteínas de unión, tales como proteínas de unión a la vitamina D. Estas proteínas pueden actuar aumentando la estabilidad del compuesto de vitamina D. Además hay otros compuestos neuroprotectores, tales como otros esteroides o compuestos relacionados, que no pueden actuar por medio del receptor de la vitamina D, pero pueden regular, directa o indirectamente, los niveles de calcio y/o fosfato de una forma similar a la de la vitamina D (por ejemplo, por un proceso post-receptor que modula los niveles de calcio intraneuronales en una dirección similar a la de la vitamina D). Tales compuestos incluyen, por ejemplo, antagonistas del receptor de glucocorticoides tales como mifepristona, derivados de mifepristona (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4.386.085) y deshidroepiandrosterona (DHEA).

El compuesto usado de acuerdo con la presente invención es una forma biológicamente activa de vitamina D, o un precursor, metabolito o análogo de vitamina D. La vitamina D generalmente se clasifica como una hormona esteroidea a causa de su relación de tipo hormonal con el metabolismo del calcio y el fosfato, su vía de modificación molecular para producir metabolitos activos y su mecanismo de acción, que es similar a los de otras hormonas esteroideas. La expresión "vitamina D, precursor, metabolito o análogo de vitamina D" pretende incluir la vitamina D o un análogo de la misma en cualquier fase de su metabolismo. Esta expresión también pretende incluir mezclas de diferentes formas metabólicas de vitamina D o de un análogo de vitamina D. Los compuestos de vitamina D pueden conservar o restaurar la homeostasis del calcio por interferencia con mecanismos que producen niveles neurotóxicos de calcio y/o fosfato. Como alternativa, los compuestos de vitamina D pueden proteger contra la pérdida de neuronas por medio de mecanismos que no implican la regulación de calcio. Generalmente, en la mayoría de los mamíferos hay dos fuentes de vitamina D. Una fuente es la vitamina D producida en la piel por la irradiación ultravioleta (D_3 o colecalciferol). Otra fuente es la vitamina D ingerida en la dieta (D_2 o ergocalciferol). La D_2 y la D_3 tienen acciones biológicas idénticas. Los compuestos de vitamina D_2 y D_3 incluyen, por ejemplo, dihidrotaquisterol₂, dihidrotaquisterol₃, 5,6-trans-colecalciferol, 25-hidroxi-5,6-trans-colecalciferol, 1α -hidroxi ergocalciferol (1α -OHD₂), 25-hidroxi ergocalciferol (25-OHD₂), $1\alpha,25$ -dihidroxi ergocalciferol ($1\alpha,25$ -(OH)₂D₂), $1\alpha,25$ -dihidroxi colecalciferol ($1\alpha,25$ -(OH)₂D₃), $1\alpha,24,25$ -trihidroxi colecalciferol ($1\alpha,24,25$ -(OH)₃D₃), 24,25-dihidroxi colecalciferol ($24,25$ -(OH)₂D₃), $1\alpha,24$ -dihidroxi-25-fluoro colecalciferol ($1\alpha,24$ -(OH)₂ 25-FD₃), 25-hidroxi colecalciferol (25-OHD₃) y 1α -hidroxi colecalciferol (1α -OHD₃).

Los precursores y metabolitos de la vitamina D_2 y D_3 también son biológicamente activos. Los precursores y metabolitos de la vitamina D_2 y D_3 incluyen, por ejemplo, 1α 25-dihidroxi-B 7-deshidrocolesterol ($1\alpha,25$ -(OH)₂ProD₃), $1\alpha,24,25$ -trihidroxi-7-deshidrocolesterol ($1\alpha,24,25$ -(OH)₃ProD₃), 24,25-dihidroxi-7-deshidrocolesterol ($24,25$ -(OH)₂-ProD₃), 1α -hidroxi-7-deshidrocolesterol (1α -OH-ProD₃), $1\alpha,24$ -dihidroxi-25-fluoro-7-deshidrocolesterol ($1\alpha,24$ -(OH)₂-25F proD₃), 25,26-dihidroxi-7-deshidrocolesterol (25,26-(OH)₂-ProD₃), 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol (25-OH proD₃), 25-hidroxi ergosterol (25-OH proD₂), $1\alpha,25$ -dihidroxi ergosterol ($1\alpha,25$ -(OH)₂ proD₂), $1\alpha,25$ -dihidroxi precolecalciferol ($1\alpha,25$ -(OH)₂ preD₃), $1\alpha,24,25$ -trihidroxi precolecalciferol ($1\alpha,24,25$ -(OH)₃ preD₃), 24,25-dihidroxi precolecalciferol ($24,25$ -(OH)₂-preD₃), 1α -hidroxi precolecalciferol (1α -OH preD₃), $1\alpha,24$ -dihidroxi-25-fluoro-precolecalciferol ($1\alpha,24$ -(OH)₂-25F preD₃), 25-hidroxi-precolecalciferol (25-OH preD₃), 1α -hidroxi-previtamina D_2 (1α -OH preD₂), 25-hidroxi-previtamina D_2 (25-OH preD₂) y $1\alpha,25$ -dihidroxi-previtamina D_2 ($1\alpha,25$ -(OH)₂ PreD₂).

Un metabolito de la vitamina D_3 que es particularmente útil en la presente invención es el 1,25 dihidroxicolecalciferol ($1,25$ (OH)₂- D_3 o calcitriol). Se cree que el calcitriol es una de las formas más activas de la vitamina D_3 . Actualmente está disponible en el mercado en forma de cápsulas (ROCALTROL[®], Roche Laboratories) o en forma de inyección (CALCIJEX[®], Abbott Laboratories, Inc.).

El término "biológicamente activo" pretende incluir una actividad para la vitamina D, precursor, metabolito o análogo de vitamina D, que permita realizar la función deseada. En la técnica se sabe que los compuestos de vitamina D presentan grados variables de actividad y se contempla que, de acuerdo con la presente invención, puede usarse cualquiera de las formas biológicamente activas de la vitamina D.

El compuesto usado de acuerdo con la presente invención se administra durante un periodo de tiempo eficaz para proteger contra la pérdida de neuronas en un sujeto. Típicamente, el periodo de tratamiento será prolongado. La expresión “prolongado”, como se usa en este documento, es un periodo de tiempo de tal duración que un sujeto tratado con el compuesto, en comparación con un sujeto no tratado de esta forma, esté protegido contra la pérdida de neuronas. Generalmente, los cambios del número de neuronas no son evidentes hasta aproximadamente dos semanas de tratamiento. De esta forma, la administración “prolongada” del compuesto se refiere a un periodo de administración mayor de dos semanas, y normalmente de aproximadamente un mes, o mayor. Preferiblemente, a administración se realiza durante un periodo de tiempo de aproximadamente seis meses a un año o mayor.

Una cantidad del compuesto usado que es eficaz para proteger contra la pérdida de neuronas en un sujeto es la cantidad de compuesto suficiente para prevenir, retrasar y/o terminar el deterioro, lesión y/o muerte de una neurona. La dosis de compuesto usada suficiente para proteger contra la pérdida de neuronas depende tanto de la actividad específica del compuesto como de su concentración. La elección de una dosis apropiada puede determinarse en una base individual y se basará, al menos en parte, considerando la gravedad de los síntomas a tratar y la actividad del compuesto específico usado. Además, las cantidades eficaces del compuesto usado pueden variar de acuerdo con la edad, sexo y peso del sujeto a tratar. De esta forma, una cantidad eficaz del compuesto usado puede determinarse por un especialista habitual en la técnica empleando factores tales como los descritos anteriormente y sin usar procedimientos distintos de la experimentación rutinaria.

La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes Ejemplos.

25 *Animales*

Las ratas usadas en este experimento fueron ratas macho híbridas cruzadas Brown Norway x Fischer 344 F1 que se obtuvieron del National Center for Toxicology Research (Jefferson, Arkansas). Estas ratas híbridas cruzadas F1 se mantuvieron en un medio sin gérmenes (sin patógenos específicos) y tienen una longevidad media, cuando se mantienen en tal medio controlado, de aproximadamente 29-30 meses. Los animales se mantuvieron, a lo largo de todo el periodo de inyección, en barreras de filtros de aire de flujo laminar en instalaciones animales y se alimentaron *ad libitum* con una dieta a base de pienso para roedores y agua. Los animales se pesaron semanalmente para controlar cualquier efecto de los fármacos sobre el peso corporal y la salud. Se realizó un estudio del alimento y del agua durante los primeros meses para controlar el efecto de los fármacos sobre su consumo de alimento. Todos los animales que presentaron problemas físicos de salud se sometieron a necropsias y a análisis de sangre. Durante la necropsia, se anotaron el estado de los órganos y las patologías.

Los animales se mantuvieron en soportes de animales de seis pies (182,88 cm) y cada grupo de fármaco tuvo el mismo número de animales en cada posición al inicio del estudio. La colocación de las ratas para igualar la cantidad de luz a la que se expusieron fue importante, porque los niveles de vitamina D en suero pueden verse influenciados por la cantidad de luz que reciben las ratas.

Se seleccionaron cuidadosamente tres grupos, cada uno con entre ocho y trece ratas, distribuidos con pesos corporales y edades similares, al inicio de cada estudio. En el primer estudio, se sometieron ratas entre 18 y 19 meses de edad a inyecciones del fármaco durante un periodo de 8 meses. Al final del periodo de inyección, las ratas tenían entre 26 y 27 meses. En el segundo estudio, se sometieron ratas entre 9 y 11 meses de edad a inyecciones del fármaco durante un periodo de 12 meses. Al final del periodo de inyección, las ratas tenían entre 21 y 23 meses.

50 *Fármacos*

El calcitriol (CALCIJEX[®]), en viales de 2 mg/ml, se obtuvo en Abbott Laboratories, Inc (Abbott Park, Illinois). Un grupo de ratas recibió inyecciones subcutáneas de calcitriol diariamente en la proporción de 20 ng/rata/día durante cinco días consecutivos por semana. Para las ratas de 18-19 meses de edad, las inyecciones se continuaron durante un periodo de 8 meses. Para las ratas de 9-11 meses de edad, las inyecciones se continuaron durante un periodo de 12 meses.

La calcitonina de salmón se obtuvo en Bachem (Torrance, CA) o Calbiochem (San Diego, CA) en viales de 1 mg. El péptido se mantuvo en forma de alícuotas en condiciones sin luz en un congelador a -40°C y se diluyó diariamente para las inyecciones. El diluyente constaba de una solución filtrada y esterilizada en autoclave de los siguientes componentes: 20 mg de polisorbato, 45 mg de NaCl, 300 mg de

ácido ascórbico, 228 mg de tampón fosfato dibásico, 54 mg de tampón monofosfato y 30 mg de EDTA. Este diluyente se usó para imitar el vehículo en el que el calcitriol está disponible en el mercado. Un segundo grupo de ratas recibió inyecciones subcutáneas a una dosis de 2 IU/rata/día (5 días/semana) de calcitonina. Un grupo de ratas de control recibió inyecciones subcutáneas de una solución de control
 5 que constaba de los mismos ingredientes en las mismas cantidades que las soluciones de CALCIJEX[®], menos el calcitriol o la calcitonina, en la misma proporción. Para las ratas de 18-19 meses de edad, las inyecciones de calcitonina y de la sustancia de control se continuaron durante un periodo de 8 meses. Para las ratas de 9-11 meses de edad, las inyecciones de calcitonina y de sustancia de control se continuaron durante un periodo de 12 meses.

10 Para asegurar que los fármacos eran biológicamente activos y para determinar que no se habían producido efectos secundarios tóxicos por los fármacos, los animales que se usaron para las mediciones de la densidad de células del hipocampo en el estudio de inyección de 8 meses también se sometieron a análisis de sangre. (Tabla I) Se extrajo sangre después de la inyección de pentobarbital sódico y justo antes de
 15 la perfusión intracardial, usando un vacutainer para recoger las muestras.

Preparación de los Tejidos

20 Tras finalizar los periodos de inyección de 8 y 12 meses, los animales de los grupos tratados con calcitriol, tratados con calcitonina y tratados con control se inyectaron con una dosis letal de pentobarbital sódico. Se dejó que los animales alcanzaran un nivel profundo de anestesia antes de iniciar la perfusión. Se recogió sangre del ventrículo izquierdo justo antes de la perfusión del fijador. La Tabla 1 ilustra los efectos del calcitriol y la calcitonina sobre los niveles de calcio en la sangre de las ratas de 18-19 meses de edad al inicio de las inyecciones y después de 8 meses de inyecciones. Como era de esperar, el tratamiento
 25 con calcitriol produjo un nivel de calcio y fósforo en sangre significativamente mayor que el observado en la sangre de los controles. El tratamiento con calcitonina produjo niveles de calcio en sangre ligeramente, pero no significativamente superiores a los encontrados en la sangre de los controles. Los datos mostrados son medias ± S.E.M.

30 TABLA 1
Resumen de sangre para ratas brown norway x f344 después de 8 meses de inyección

	Control	Calcitriol	Calcitonina	
35	Peso corporal	574,4	529,2	559,7
	(p = 0,2171)	± 26,9	± 13,11	± 14,93
	Sodio	144,6	146,2	146,4
	(p = 0,2831)	± 1,32	± 0,48	± 0,62
40	Potasio	5,15	5,46	5,13
	(p = 0,5890)	± 0,328	± 0,272	± 0,195
	Cloruro	100,73	98,42	93,60
	(p = 0,5403)	± 1,01	± 0,489	± 6,966
	CO2	29,00	29,75	29,66
	(p = 0,7400)	± 0,735	± 0,657	± 0,744
45	Urea	19,91	15,92	18,86
	(p = 0,3365)	± 1,237	± 0,983	± 2,595
	Glucosa	168,82	183,75	166,20
	(p = 0,4467)	± 14,100	± 8,776	± 9,643
50	Calcio	10,282	11,10**	10,314
	(p = 0,0003)**	± 0,13772	± 0,13236	± 0,16127
	Fósforo	4,336	4,842**	4,100
	(p = 0,0065)**	± 0,15954	± 0,1727	± 0,1607
	Creatinina	0,555	0,4667	0,5933
	(p = 0,0963)	± 0,0389	± 0,02346	± 0,0529
55	Ácido úrico	0,6545	0,9833	0,9600
	(p = 0,5229)	± 0,2471	± 0,2219	± 0,2077
	Colesterol	101,727	90,250	89,733
	(p = 0,1464)	± 5,0737	± 4,814	± 4,516
60	Proteína	6,100	6,2250	6,0467
	(p = 0,6626)	± 0,1697	± 0,0814	± 0,1653

TABLA 1 (Cont.)

	Control	Calcitriol	Calcitonina	
5	Albúmina	2,918	3,0500	2,8733
	(p = 0,5839)	± 0,1902	± 0,302	± 0,127
	Bilirrubina Total	0,200	0,208	0,213
10	(p = 0,9095)	± 0,245	± 0,0239	± 0,0199
	Alcalino	127,636	99,00	87,333
	(p = 0,1386)	± 27,47	± 5,5402	± 6,9324
	Transaminasa de	116,091	103,167	110,987
15	Glut. Oxaloacético	± 15,653	± 17,779	± 14,398
	(p = 0,8486)			
	Lactato	277,818	284,00	377,600
	Deshidrogenasa	± 74,7116	± 70,393	± 87,925
	(p = 0,5820)			
20	Hierro	171,546	195,083	187,533
	(p = 0,766)	± 26,899	± 13,266	± 24,778
	Magnesio	1,813	1,725	1,7091
	(p = 0,4625)	± 0,0426	± 0,0670	± 0,0574
25	Corticosterona	302,143	280,273	283,364
	(p = NS)	± 55,019	± 32,364	± 48,163

Posteriormente, los animales se sometieron a perfusión con una solución de fijador de 2% de glutaraldehído-2% de paraformaldehído a 4°C durante 30 minutos. Después de finalizar la perfusión, se diseccionó el cerebro de cada animal y se puso en el fijador de 2% de glutaraldehído-2% de paraformaldehído durante una noche a 4°C.

Se retiraron por disección los lóbulos frontales y los cerebelos, y el hipocampo y la corteza restantes se cortaron en secciones de 250 μm de espesor desde la porción más anterior del hipocampo. Las secciones resultantes se recogieron en serie en tampón de cacodilato sódico. Para la comparación entre los tres grupos de animales se usaron las secciones que estaban a 2250 μm en el primer experimento y las secciones que estaban a 1750 μm en el segundo experimento.

40 *Microscopía óptica*

Las secciones de 250 μm de espesor se procesaron como se indica mediante la técnica de inclusión convencional para microscopía electrónica o para la preparación de secciones "semifinas" usadas en microscopía óptica. **Peters, A. y Palay, S.L.**, *The Fine Structure of the Nervous System* (Harper & Row, New York, 1970); **Landfield, P.W.** y col., (1981). *Neurobiol Aging* 2:265-275. Los bloques se infiltraron con Epon 812 de Ted Pella (Redding, CA).

Después de la inclusión, se cortaron secciones semifinas de 1 μm de espesor que contenían al menos varios cientos de μm de la capa de neuronas CA1, de la cara de la sección de 250 μm de espesor. (Véanse las Figuras 1A, 1B y 1C). Los primeros cinco pocillos de un portaobjetos de vidrio se rellenaron con secciones semifinas adyacentes y después se desecharon los siguientes 50 μm del bloque de sección. Después se cortaron en serie cinco secciones semifinas adicionales y se incluyeron en otros cinco pocillos. Al desecar los 50 μm , se permitía el muestreo de una mayor región del hipocampo. Después, las secciones semifinas se tiñeron con azul de Toluidina y se cubrieron con cubreobjetos para el análisis.

Para cada animal, se fotografiaron tres pares de secciones adyacentes. Se contaron las células que tenían la "parte superior" del inicio de una neurona en una fotografía pero no en la otra sección adyacente del par para cada animal. Este es un nuevo método estereológico que proporciona un índice fiable del número de neuronas en una sección, no sometido a las desviaciones debidas a la forma o al tamaño de las neuronas. **Pakkenberg, B. y Gundersen, H.J.G.** (1989) *APMIS* 97:677-681; **West, M. y Gundersen, H.** (1990) *J. Comp. Neurol.* 296:1-22. La longitud de la capa celular de cada sección se midió usando un sistema de formación de imágenes calibrado (Sigma Scan) y se obtuvo el número medio de neuronas CA1/100 μm de la longitud de la capa de células CA1. Las figuras 2A y 2B muestran

fotografías que ilustran las neuronas CA1 en el hipocampo de ratas con edades comprendidas entre los 26 y los 27 meses, después de haber recibido inyecciones de una sustancia de control (Figura 2A) o calcitriol (Figura 2B) durante un periodo de 8 meses. Después del periodo de inyección, el tejido del hipocampo se incluyó en bloques, se seccionó ($1 \mu\text{m}$) y se tiñó con azul de Toluidina. Después del tratamiento con calcitriol (Figura 2B), en la sección del hipocampo aparece una mayor densidad de neuronas. Después del tratamiento con la sustancia de control (Figura 2A), se observan huecos y regiones vacías en las que han muerto las neuronas del hipocampo.

Los números medios de neuronas CA1/ $100 \mu\text{m}$ de la longitud de la capa de células CA1 para los grupos de calcitriol, de calcitonina y de control de los dos experimentos se muestran en las Figuras 3A y 3B. Las Figuras 3A y 3B muestran gráficos de barras que ilustran el número de neuronas CA1/ $100 \mu\text{m}$ de la longitud de la capa de células CA1 en secciones del hipocampo de ratas tratadas con calcitriol, tratadas con calcitonina y tratadas con la sustancia de control, después de 8 y 12 meses de inyección. Se usaron ratas de dos grupos de edad diferentes, siendo el grupo tratado durante 8 meses sustancialmente mayor (18-19 meses) que el grupo tratado durante 1 año (9-11 meses) al inicio del estudio. La pérdida de neuronas en las ratas que se trataron con calcitriol se previno, inhibió y/o retrasó en comparación con las ratas tratadas con la inyección de control. El número medio de neuronas CA1/ $100 \mu\text{m}$ de la longitud de la capa de células CA1 en las secciones del hipocampo del grupo tratado con calcitriol durante 12 meses (Figura 3A) fue de aproximadamente 1,65, mientras que el número medio de neuronas CA1/ $100 \mu\text{m}$ en el grupo de control fue de aproximadamente 1,4. El grupo de ratas tratadas con calcitonina tuvo el menor número medio de neuronas CA1/ $100 \mu\text{m}$, con aproximadamente 1,3 neuronas CA1/ $100 \mu\text{m}$.

El número medio de neuronas CA1/ $100 \mu\text{m}$ de la longitud de la capa de células CA1 en las secciones del hipocampo del grupo tratado con calcitriol durante 8 meses (Figura 3B) fue de aproximadamente 1,4, mientras que el número medio de neuronas CA1/ $100 \mu\text{m}$ en el grupo de control fue de aproximadamente 1,2. El grupo de ratas tratadas con calcitonina tuvo el menor número medio de neuronas CA1/ $100 \mu\text{m}$, con aproximadamente 1,1 neuronas CA1/ $100 \mu\text{m}$. Estos resultados demuestran claramente que el tratamiento prolongado con calcitriol previene y/o retrasa la pérdida de neuronas en ratas en envejecimiento.

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto que es una forma biológicamente activa de la vitamina D, o un precursor, metabolito o análogo de la vitamina D, que actúa a través del receptor de la vitamina D, para la fabricación de un medicamento para aplicación terapéutica en la protección contra la pérdida de neuronas en un sujeto.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto regula los niveles intraneuronales y/o periféricos de calcio y/o fosfato.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el precursor, metabolito o análogo de vitamina D se selecciona entre dihidrotaquisterol₂, dihidrotaquisterol₃, 5,6-trans-colecalciferol, 25-hidroxi-5,6-trans-colecalciferol, 1 α -hidroxi ergocalciferol, 25-hidroxi ergocalciferol, 1 α ,25-dihidroxi ergocalciferol, 1 α ,25-dihidroxi colecalciferol, 1 α ,24,25-trihidroxi colecalciferol, 24,25-dihidroxi colecalciferol, 1 α ,24-dihidroxi-25-fluoro colecalciferol, 25-hidroxi colecalciferol, 1 α -hidroxi colecalciferol, 1 α 25-dihidroxi-B 7-deshidrocolesterol, 1 α ,24,25-trihidroxi-7-deshidrocolesterol, 24,25-dihidroxi-7-deshidrocolesterol, 1 α -hidroxi-7-deshidrocolesterol, 1 α ,24-dihidroxi-25-fluoro-7-deshidrocolesterol, 25,26-dihidroxi-7-deshidrocolesterol, 25-hidroxi-7-deshidrocolesterol, 25-hidroxi ergosterol, 1 α ,25-dihidroxi ergosterol, 1 α ,25-dihidroxi precolecalciferol, 1 α ,24,25-trihidroxi precolecalciferol, 24,25-dihidroxi precolecalciferol, 1 α -hidroxi precolecalciferol, 1 α ,24-dihidroxi-25-fluoro-precolecalciferol, 25-hidroxi-precolecalciferol, 1 α -hidroxi-previtamina D₂, 25-hidroxi-previtamina D₂ y 1 α ,25-dihidroxi-previtamina D₂.
4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el metabolito de vitamina D es calcitriol.
5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el periodo de administración es de dos semanas a seis meses.
6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la pérdida de neuronas está relacionada con la edad y/o con una enfermedad.
7. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el sujeto padece una enfermedad seleccionada entre la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Pick, la enfermedad de Parkinson, una enfermedad vascular, Pérdida de Memoria Asociada con la Edad y la enfermedad de Huntington.
8. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el compuesto se administra al sujeto por vía parenteral o entérica.

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

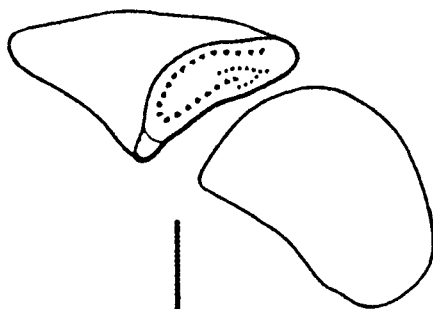


FIG. IA

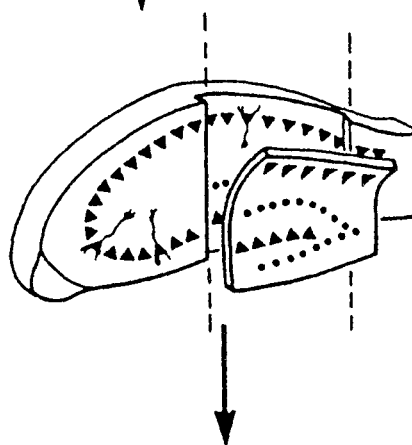


FIG. IB

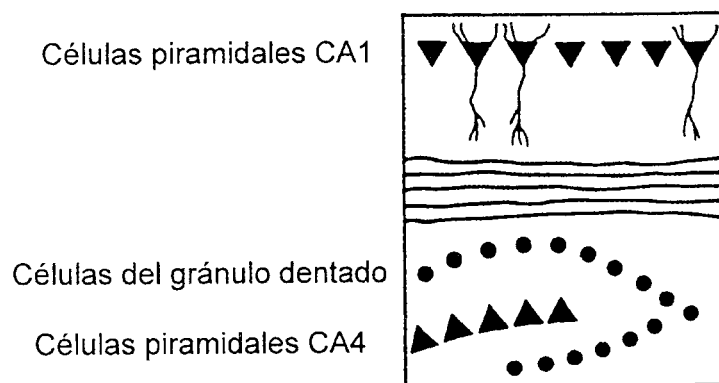


FIG. IC

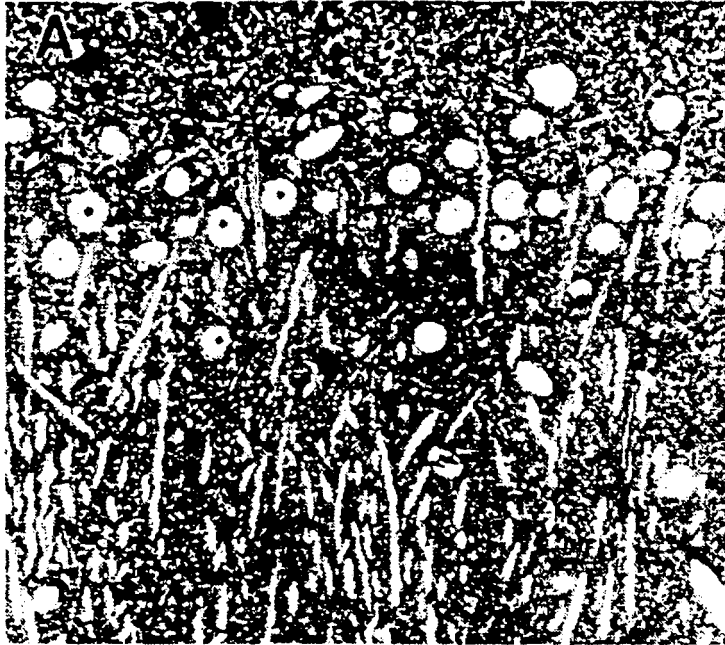


FIG.2A



FIG.2B

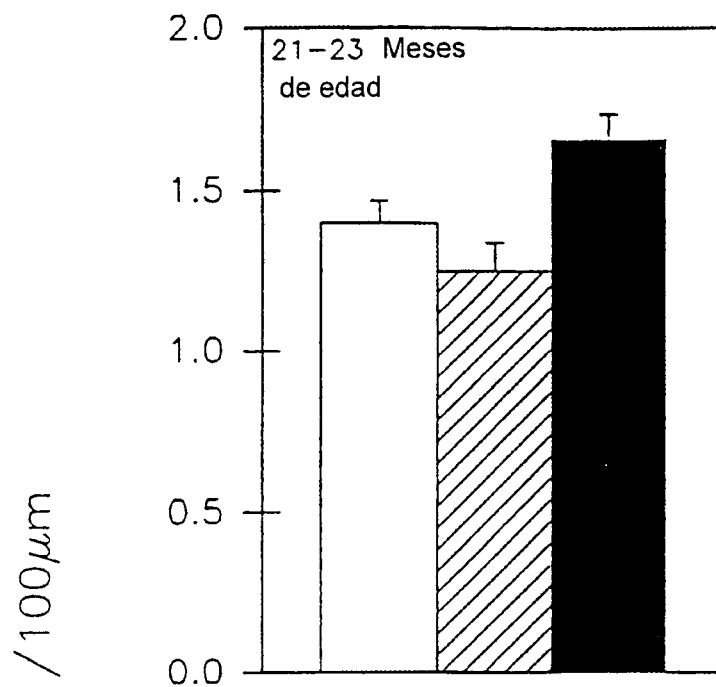


FIG. 3A

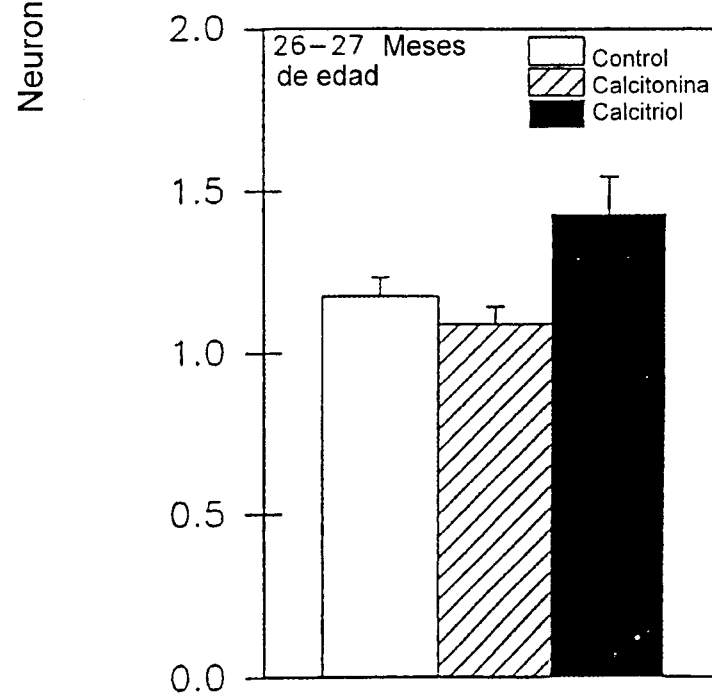


FIG. 3B