

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 356**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2009 PCT/US2009/039355**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2009 WO09124210**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2009 E 09729007 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2281058**

54 Título: **Métodos, composiciones, usos y kits útiles para la deficiencia de la vitamina D y trastornos relacionados**

30 Prioridad:

02.04.2008 US 41898 P
18.03.2009 US 161292 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.12.2016

73 Titular/es:

OPKO IRELAND GLOBAL HOLDINGS, LTD.
(50.0%)
Citywest Business Campus, 3013 Lake Drive
Dublin 24 , IE y
OPKO RENAL, LLC (50.0%)

72 Inventor/es:

PETKOVICH, P., MARTIN;
HELVIG, CHRISTIAN, F. y
MELNICK, JOEL, Z.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 593 356 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

Métodos, composiciones, usos y kits útiles para la deficiencia de la vitamina D y trastornos relacionados

5 Antecedentes

Campo de la divulgación

10 La divulgación se refiere en general a formulaciones farmacéuticas para su uso en métodos de tratamiento de enfermedades y trastornos. Más particularmente, la divulgación se refiere a formulaciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento o prevención de la deficiencia de la vitamina D relacionada con el catabolismo en un paciente que tiene enfermedad renal crónica y a inhibidores de CYP24 para su uso en el tratamiento o prevención de la deficiencia de vitamina D en un paciente que tiene enfermedad renal crónica.

15 Breve descripción de la tecnología relacionada

Los seres humanos adquieren la vitamina D de fuentes dietéticas y de la conversión dependiente de la luz ultravioleta del 7-dehidrocolesterol en vitamina D₃. La vitamina D₃ (o colecalciferol) y la vitamina D₂ (o ergocalciferol) se denominan colectivamente "vitamina D" y son precursores liposolubles de las hormonas de vitamina D activa. El metabolismo de la vitamina D₃ y la vitamina D₂ se produce principalmente en el hígado, para producir 25-hidroxitamina D₃ y 25-hidroxitamina D₂, Respectivamente (denominadas colectivamente en el presente documento "25-hidroxitamina D"), que son prohormonas de las respectivas hormonas activas de vitamina D. La posterior activación metabólica de estas prohormonas de la vitamina D se produce principalmente en los riñones por una enzima del citocromo P450, CYP27B. CYP27B también se expresa en muchos tejidos diana de la vitamina D extrarrenales y puede efectuar la activación local de 25-hidroxitamina D para producir respuestas hormonales autocrinas y/o paracrinas. Específicamente, la 25-hidroxitamina D₃ se metaboliza en la hormona activa 1,25-dihidroxitamina D₃ (o calcitriol) y la 25-hidroxitamina D₂ se metaboliza en la hormona activa 1,25-dihidroxitamina D₂ (denominada colectivamente en el presente documento "1,25-dihidroxitamina D").

30 Las hormonas de vitamina D regulan diversos procesos celulares a través de interacciones con los receptores de la vitamina D (VDR). En particular, las hormonas de la vitamina D regulan los niveles de calcio en sangre mediante el control de la absorción del calcio de la dieta en el intestino delgado y la reabsorción del calcio por los riñones. Los niveles excesivos de hormonas pueden conducir a niveles anormalmente elevados de calcio en orina (hipercalciuria), de calcio en la sangre (hipercalcemia) y de fósforo en sangre (hiperfosfatemia). La deficiencia de vitamina D, por otra parte, se asocia con hiperparatiroidismo secundario, hiperplasia de la glándula paratiroides, hipocalcemia, enfermedad renal crónica (ERC) y enfermedades metabólicas óseas, tales como osteítis fibrosa quística, osteomalacia, raquitismo, osteoporosis, y calcificación extraesquelética. Se ha notificado que la hormona de la vitamina D tiene muchos y diversos efectos biológicos "no clásicos" más allá de sus efectos "clásicos" sobre el sistema de la hormona paratiroidea. Tales efectos se han notificado en conexión con la proliferación celular, el sistema inmunológico y el sistema cardiovascular, incluyendo el sistema de renina-angiotensina, la presión arterial, el crecimiento y la diferenciación celular, antifibrosis, la formación de glóbulos rojos, el crecimiento del cabello, y la función muscular.

45 El catabolismo de las prohormonas, hormonas y análogos de vitamina D se lleva a cabo a través de la acción de las enzimas del citocromo P450. La enzima CYP24 del citocromo P450 cataliza la primera etapa en el catabolismo de diversos compuestos de vitamina D. En particular, por ejemplo, CYP24 lleva a cabo la conversión de la 25-hidroxitamina D₃ en 24,25-dihidroxitamina D₃ y la conversión de la 1,25-dihidroxitamina D₃ (calcitriol) en 1,24,25-trihidroxitamina D₃ que, en última instancia, da lugar a ácido calcitroico. CYP24 también puede hidroxilar en la posición 23, lo que da lugar a la producción del metabolito terminal 1,25-dihidroxitamina D₃- 26,23-lactona. El procesamiento posterior mediante enzimas catabólicas de fase II conduce, en última instancia, a la eliminación de compuestos de vitamina D del cuerpo.

Sumario

55 La presente invención reivindicada proporciona una formulación farmacéutica para su uso en un método de tratamiento o prevención de la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo en un paciente que tiene enfermedad renal crónica, definiéndose la deficiencia por un nivel total en suero de 25-hidroxitamina D por debajo de 30 ng/ml, comprendiendo la composición una cantidad eficaz de un inhibidor de CYP24. La presente invención reivindicada también proporciona el uso de un inhibidor de CYP24 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo en un paciente que tiene enfermedad renal crónica, definiéndose la deficiencia por un nivel total en suero de 25-hidroxitamina D por debajo de 30 ng/ml y proporciona un inhibidor de CYP24 para su uso en el tratamiento o la prevención de la deficiencia de vitamina D en un paciente que tiene enfermedad renal crónica, definiéndose la deficiencia por un nivel total en suero de 25-hidroxitamina D por debajo de 30 ng/ml. En cada caso, el inhibidor de CYP24 se selecciona del grupo que consiste en (R)-N-(2-(1H-imidazol-1-il)-2-fenilet)-4'-clorobifenil-4-carboxamida, ketoconazol, metronidazol, clometiazol, itraconazol, fluconazol, compuestos de 23,23-difluoro-24-sulfona vitamina D₃, compuestos de 25-sulfona

vitamina D₃, compuestos de 24,24-difluoro-25-sulfona vitamina D₃, compuestos de 24-sulfoximina vitamina D₃, compuestos de 16-eno-25-oxima vitamina D₃, compuestos de 16-eno-25-oxima éter vitamina D₃, compuestos de 24-sulfona vitamina D₃, compuestos de 24,24-difluoro vitamina D₃ y combinaciones de los mismos.

5 Un aspecto de la divulgación del presente documento, que no se reivindica, es un método de diagnóstico de la susceptibilidad de la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo en un paciente, incluyendo la medición de nivel de expresión y/o la actividad de CYP24, o de un sustituto indicativo de la misma, por ejemplo mediante la obtención de una muestra de tejido, sangre o de células de un paciente y analizar la muestra para determinar la expresión y/o la actividad de CYP24, o de un sustituto indicativo de la misma, en el que la expresión y/o la actividad anormalmente elevadas de CYP24 indica una susceptibilidad a la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo. En una realización, el paciente esta repleto de vitamina D y el método incluye, además, inhibir y/o prevenir la deficiencia de vitamina D mediante la administración al paciente de un inhibidor de CYP24 en respuesta a la expresión y/o actividad anormalmente elevadas de CYP24. En otra realización, el paciente es deficiente en vitamina D y el método incluye, además, tratar la deficiencia de vitamina D mediante la administración al paciente de un inhibidor de CYP24 en respuesta a la expresión y/o actividad anormalmente elevadas de CYP24.

Otro aspecto de la divulgación del presente documento, que no se reivindica, es un método de diagnóstico de la susceptibilidad a la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo en un paciente, incluyendo la medición del nivel de FGF23 de un paciente, por ejemplo mediante la obtención de una muestra de tejido, sangre o células de un paciente y analizando la muestra para determinar la concentración de FGF23, en el que la concentración de FGF23 anormalmente elevada indica una susceptibilidad a la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo. El método puede incluir además cualquiera de los métodos de tratamiento o prevención descritos en el presente documento.

25 Otro aspecto de la divulgación del presente documento, que no se reivindica, es un método de diagnóstico y tratamiento de un paciente, incluyendo la medición de la expresión de y/o actividad de CYP24 en un paciente, o de un sustituto indicativo de la misma y la administración de un inhibidor de CYP24 al paciente en respuesta a la expresión y/o la actividad anormalmente elevadas de CYP24. El método puede incluir, además, la obtención de una muestra de tejido, sangre o células del paciente y el análisis de la muestra para determinar la expresión y/o la actividad de CYP24, o de un sustituto indicativo de las mismas.

Preferiblemente, en el momento de la medición de la expresión y/o actividad de de CYP24 o el sustituto indicativo de las mismas, el paciente no está experimentando terapia con vitamina D activa.

35 Preferiblemente, el paciente es uno que no tiene cáncer.

El método puede incluir además la medición de los niveles de 25-hidroxivitamina D del paciente y el tratamiento de la deficiencia de vitamina D mediante la administración del inhibidor de CYP24 a un paciente con déficit de vitamina D.

40 El método puede incluir además la administración al paciente una o más de prehormonas, prohormonas y análogos de vitamina D de cualquiera de los anteriores, preferiblemente un compuesto seleccionado de colecalciferol, ergocalciferol, 25-hidroxivitamina D₂, 25-hidroxivitamina D₃ y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la terapia puede incluir la administración de 25-hidroxivitamina D₃. Preferiblemente, la terapia incluye la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de 25-hidroxivitamina D₃ para restaurar los niveles de 25-hidroxivitamina D del paciente a al menos 30 ng/ml.

50 El método puede incluir además la medición de los niveles de 25-hidroxivitamina D del paciente y la inhibición y/o la prevención de la deficiencia de vitamina D mediante la administración del inhibidor de CYP24 a un paciente repleto de vitamina D.

En un tipo de realización, el paciente tiene enfermedad renal crónica, por ejemplo seleccionada del estadio 1 y el estadio 2, o seleccionada del estadio 3 y el estadio 4.

55 En un tipo de realización, el paciente tiene hiperparatiroidismo. Por ejemplo, el nivel de PTH del paciente está por encima del intervalo objetivo para el estadio de ERC del paciente.

En un tipo de realización, el paciente tiene una deficiencia de 1,25-dihidroxivitamina D₃.

60 El método puede incluir, además, evitar la terapia activa con vitamina D o reducir el nivel u omitir la terapia activa con vitamina D si el paciente está sometido a terapia activa con de vitamina D.

El método puede incluir además la administración de 25-hidroxivitamina D al paciente en una cantidad suficiente para aumentar los niveles de 1,25-dihidroxivitamina D.

65 En una realización, el inhibidor de CYP24 es también un agonista del receptor de vitamina D.

- 5 El método puede incluir medir el nivel de FGF23 en el paciente como agente para el nivel de expresión y/o actividad de CYP24, en el que un nivel de FGF23 mayor que el valor superior del intervalo normal indica la expresión de CYP24 anormalmente elevada. Por ejemplo, un nivel de FGF23 al menos dos veces, al menos cuatro veces, al menos 10 veces, o al menos 40 veces mayor que el valor superior del intervalo normal indica expresión de CYP24 anormalmente elevada.
- 10 El método puede incluir la medición de la concentración de uno o más subproductos catabólicos de CYP24 en el suero u otro fluido corporal como un agente para la actividad de CYP24.
- 15 El método puede incluir además la medición de la concentración de uno o más precursores para los uno o más subproductos catabólicos de CYP24 en el suero u otro fluido corporal y el cálculo de una relación de concentraciones de uno o más subproductos catabólicos de CYP24 a concentraciones en suero de uno o más precursores correspondientes como sustitutos de la actividad de CYP24.
- 20 En una realización, los subproductos catabólicos de CYP24 incluyen uno o ambos de 24,25-dihidroxitamina D y 1,24,25-trihidroxitamina D.
- 25 En una realización, la medición de la actividad de CYP24 incluye la medición de una o más relaciones seleccionadas del grupo que consiste en 24,25-dihidroxitamina D a 25-hidroxitamina D y 1,24,25-trihidroxitamina D a 1,25-dihidroxitamina D.
- 30 En una realización, los subproductos catabólicos de CYP24 incluyen los subproductos catabólicos 24-hidroxiados y/o 23-hidroxiados de uno o más miembros seleccionados del grupo que consiste en paricalcitol, doxercalciferol, 22-oxacalcitriol, dihidrotaquisterol, y 26,26,26, 27,27,27-hexafluorocalcitril (falecalcitril).
- 35 En una realización, la medición de la expresión y/o actividad de CYP24, o sustituto indicativo de las mismas sigue la administración aguda o crónica de un sustrato de CYP24. En esta realización, preferiblemente, el sustrato de CYP24 no es un inhibidor de acción doble y agonista de VDR, como se describe a continuación.
- 40 En una realización, una o más mediciones comprenden las concentraciones séricas.
- 45 En una realización, la medición de la expresión de CYP24 incluye medir el ARNm de CYP24 en tejidos, plasma o células.
- 50 En una realización, la medición de la expresión de CYP24 incluye medir la proteína CYP24 en tejidos, plasma o células.
- 55 En una realización, la medición de la expresión de CYP24 incluye medir la actividad enzimática de CYP24 en tejidos, plasma o células.
- 60 En una realización, los tejidos o células se seleccionan del grupo que consiste en tejido renal, tejido hepático, tejido de la glándula paratiroides, células mononucleares de sangre periférica y células bucales.
- 65 En una realización, la expresión y/o actividad anormalmente elevadas de CYP24 es al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 10 veces o al menos 100 mayor que la expresión y/o actividad normal de CYP24.
- Otro aspecto de la divulgación, que no se reivindica, incluye un kit, que incluye un ensayo para medir los niveles de uno o más subproductos catabólicos de CYP24, e instrucciones para la práctica de un método descrito en el presente documento. El kit puede incluir además un ensayo para medir los niveles de uno o más precursores correspondientes.
- Otro aspecto de la divulgación, que no se reivindica, incluye un kit, que incluye un ensayo para medir el nivel de la proteína CYP24 e instrucciones para la práctica de un método descrito en el presente documento. El ensayo puede incluir un anticuerpo anti-CYP24 inmovilizado y un anticuerpo anti-CYP24 marcado.
- Otro aspecto de la divulgación incluye una formulación farmacéutica para tratar o prevenir la deficiencia de vitamina D que incluye una cantidad eficaz de un inhibidor de CYP24. La formulación puede incluir además una cantidad eficaz de 25-hidroxitamina D₃. Como se ha indicado anteriormente, a este respecto, la invención reivindicada proporciona una formulación farmacéutica para su uso en un método de tratamiento o prevención de la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo en un paciente que tiene enfermedad renal crónica, definiéndose la deficiencia por un nivel total en suero de 25-hidroxitamina D por debajo de 30 ng/ml, comprendiendo la composición una cantidad eficaz de un inhibidor de CYP24 como se ha definido anteriormente.
- Otro aspecto de la divulgación, que no se reivindica, incluye una formulación farmacéutica para tratar o prevenir el hiperparatiroidismo, que incluye una cantidad eficaz de un inhibidor de CYP24. La formulación puede incluir además una cantidad eficaz de 25-hidroxitamina D₃. La formulación farmacéutica puede ser para el tratamiento del

hiperparatiroidismo secundario a la enfermedad renal crónica, por ejemplo ERC en estadio 3 o estadio 4.

Otro aspecto de la divulgación incluye un inhibidor de CYP24 para su uso en el tratamiento o prevención de la deficiencia de vitamina D. Como se ha indicado anteriormente, a este respecto, la invención reivindicada proporciona un inhibidor de CYP24 para su uso en un método de tratamiento o prevención de la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo en un paciente que tiene enfermedad renal crónica, definiéndose la deficiencia por un nivel total en suero de 25-hidroxivitamina D por debajo de 30 ng/ml, en el que el inhibidor de CYP24 es como se ha definido anteriormente.

Otro aspecto de la divulgación, que no se reivindica, incluye un inhibidor de CYP24 para su uso en el tratamiento o prevención del hiperparatiroidismo, por ejemplo hiperparatiroidismo secundario a enfermedad renal crónica, por ejemplo ERC en estadio 3 o estadio 4.

Otro aspecto de la divulgación incluye el uso de un inhibidor de CYP24, para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la deficiencia de vitamina D. Como se ha indicado anteriormente, a este respecto, la invención reivindicada proporciona el uso de un inhibidor de CYP24 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo en un paciente que tiene enfermedad renal crónica, definiéndose la deficiencia por un nivel total en suero de 25-hidroxivitamina D por debajo de 30 ng/ml, en el que el inhibidor de CYP24 es como se ha definido anteriormente.

Otro aspecto de la divulgación, que no se reivindica, incluye el uso de un inhibidor de CYP24 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención del hiperparatiroidismo, por ejemplo hiperparatiroidismo secundario a enfermedad renal crónica, por ejemplo ERC en estadio 3 o estadio 4.

Para las composiciones, métodos, usos y kits descritos en el presente documento, las características preferidas, tales como componentes, intervalos de la composición de los mismos, sustituyentes, condiciones (por ejemplo, las características de las poblaciones de pacientes) y las etapas del método se pueden seleccionar de los diversos ejemplos proporcionados en el presente documento.

Otros aspectos y ventajas serán evidentes para los expertos habituales en la técnica a partir de una revisión de la siguiente divulgación detallada, tomada junto con los dibujos. Aunque el método es susceptible de realizaciones en diversas formas, la divulgación de aquí en adelante incluye realizaciones específicas con el entendimiento de que la divulgación es ilustrativa y no se pretende limitar la invención a las realizaciones específicas descritas en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

Para facilitar aún más la comprensión de la presente invención, se adjuntan figuras de los dibujos.

La Figura 1 muestra un gráfico de los niveles séricos de hormona paratiroidea (PTH) en el tiempo en ratas alimentadas con una dieta rica en adenina o una dieta control.

La Figura 2 muestra un gráfico de los niveles séricos de hormona paratiroidea (PTH) en ratas alimentadas con adenina tratadas con tres compuestos de vitamina D diferentes durante una semana.

La Figura 3 muestra un gráfico de los niveles de 1,25- (OH)₂-D₃ (calcitriol) en ratas alimentadas con adenina y ratas alimentadas con dietas control y en animales alimentados con adenina tratados con tres diferentes compuestos de vitamina D.

La Figura 4 muestra un gráfico de la expresión de CYP24 en tejido renal de ratas alimentadas con adenina y ratas alimentadas con dietas control y de animales alimentados con adenina tratados con tres diferentes compuestos de vitamina D. RFI indica la cantidad de inducción relativa.

La Figura 5 muestra un gráfico de la expresión de CYP24 en tejido de glándula paratiroidea de ratas alimentadas con adenina y ratas alimentadas con dietas control y de animales alimentados con adenina tratados con tres diferentes compuestos de vitamina D.

La Figura 6 muestra un gráfico de los niveles de FGF23) en suero en ratas alimentadas con adenina y ratas alimentadas con dietas control y en animales alimentados con adenina tratados con tres diferentes compuestos de vitamina D.

La Figura 7 muestra un gráfico de los niveles de FGF23 y niveles osteoclastina en tejido renal de ratas alimentadas con adenina y ratas alimentadas con dieta control.

La Figura 8 muestra un gráfico de la inducción relativa de CYP24 en ratas tratadas con vitamina D (25-hidroxivitamina D₂ y 25-hidroxivitamina D₃) durante 2 semanas.

La Figura 9 muestra los cambios de los niveles de 25-OH-D en seres humanos en respuesta a la administración de placebo y (5Z,7E,16Z,23E)-(1S,3R)-25-nor-25-t-butilsulfonil-9,10-seco-5,7,10(19),16,23-colestapentaeno-1,3-diol.

5 La Figura 10 muestra la inducción relativa de CYP24 en tejido renal en ratas urémicas inducidas con adenina que muestran la expresión basal de CYP24 (vehículo) y la expresión inducida de CYP24 por 1,25-dihidroxitamina D₃ (1 α , 25(OH)₂D₃).

10 La Figura 11 muestra la inducción relativa de CYP24 en tejido de glándula paratifoidea en ratas urémicas inducidas con adenina que muestran la expresión basal de CYP24 (vehículo) y la expresión inducida de CYP24 por 1,25-dihidroxitamina D₃ (1 α , 25(OH)₂D₃).

15 La Figura 12 muestra la expresión relativa de CYP24 y CYP27B1 en ratas normales, ratas urémicas inducidas con adenina y ratas urémicas de adenina inducidas con adenina tratadas con 1,25-dihidroxitamina D₃, con la exacerbación resultante de la deficiencia de vitamina D.

20 La Figura 13 muestra la expresión relativa de CYP24 y CYP27B1 en ratas normales frente a ratas normales con una dieta deficiente en vitamina D, y entre ratas urémicas inducidas con adenina con una dieta normal y con una dieta deficiente en vitamina-D.

La Figura 14 muestra la inducción relativa de la expresión CYP24 en células HEK incubadas con 1,25-dihidroxitamina D₃ solo o con un inhibidor de CYP24.

25 La Figura 15 muestra la incorporación de ³H-timidina(%) en células HEK tratadas con 1,25-dihidroxitamina D₃ solo o en combinación con un inhibidor de CYP24 en diversas concentraciones.

La Figura 16 muestra la expresión relativa de CYP24 en células HPK1a-ras tratadas con 1,25-dihidroxitamina D₃ sola o en combinación con FGF23.

30 La Figura 17 muestra la inducción relativa de CYP24 en ratas normales frente a ratas normales alimentadas con una dieta deficiente en vitamina D, y ratas normales alimentadas con una dieta deficiente en vitamina D que se trataron con varias concentraciones de 25-hidroxitamina D₃.

35 La Figura 18 muestra la inducción relativa de CYP24 en ratas alimentadas con una dieta normal suplementada con adenina ("vehículo de adenina") frente a una dieta deficiente en vitamina D suplementada con adenina y frente a ratas alimentadas con una dieta deficiente en vitamina D suplementada con adenina y tratadas con diversas concentraciones de 25-hidroxitamina D₃.

40 La Figura 19 muestra el efecto de 25-hidroxitamina D₃ sobre la concentración de 1,25-dihidroxitamina D₃ en ratas urémicas deficientes en vitamina D frente a ratas con deficiencia de vitamina D por lo demás normales.

Descripción detallada

45 "La deficiencia de vitamina D" se define, generalmente, como una afección en un paciente humano u otro mamífero en el que los niveles séricos de 25-hidroxitamina D están por debajo de 30 ng/ml (véanse las guías de National Kidney Foundation, NKF, Am. J. Kidney Dis. 42:S1-S202 (2003), que se incorpora en el presente documento por referencia). "Deficiencia de vitamina D" incluye "insuficiencia de vitamina D", definida como niveles séricos de 25-hidroxitamina D de al menos 16 ng/ml y menos de 30 ng/ml, deficiencia "leve" de vitamina D, que se define como niveles séricos de 25-hidroxitamina D de 5 -15 ng/ml y deficiencia de vitamina D "grave", que se define como niveles séricos de 25-hidroxitamina D por debajo de 5 ng/ml.

50 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "repleto de vitamina D" se define como una afección en un paciente humano u otro mamífero en el que los niveles séricos de 25-hidroxitamina D son iguales o superiores a 30 ng/ml.

55 El término "riesgo", como se usa en el presente documento, generalmente se refiere a aquellas poblaciones de pacientes que tienen características o enfermedades asociadas con la deficiencia de vitamina D. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, sujetos con enfermedad renal crónica en estadios 1, 2, 3, 4 o 5; bebés, niños y adultos que no beben leche reforzada con vitamina D (por ejemplo, sujetos intolerantes a la lactosa, los sujetos con alergia a la leche, vegetarianos que no consumen leche, y bebés alimentados con leche materna); sujetos con raquitismo; sujetos con piel oscura (por ejemplo, en Estados Unidos, el 42 % de las mujeres afroamericanas de entre 15 y 49 años de edad eran deficientes en vitamina D en comparación con el 4 % de las mujeres blancas); ancianos (que tienen una capacidad reducida para sintetizar vitamina D y también son más propensos a permanecer en el interior); adultos graves con enfermedad crónica o aguda (que son propensos a permanecer en el interior, en hospitales, en centros de cuidados intensivos, instalaciones institucionales y de atención asistida que incluyen sujetos con enfermedad de Alzheimer o enfermos mentales); sujetos que cubren toda

la piel expuesta (tales como, miembros de ciertas religiones o culturas); sujetos que siempre usan protector solar (por ejemplo, la aplicación de protector solar con un factor de protección solar (SPF) de 8 reduce la producción de vitamina D en un 95 %, y los valores de FPS más altos pueden reducir aún más la vitamina D); sujetos con síndromes de mala absorción de grasas (incluyendo, pero no limitados a, fibrosis quística, enfermedad hepática colestásica, otra enfermedad del hígado, enfermedad de la vesícula, deficiencia de enzima pancreática, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal, esprú o enfermedad celíaca, o la extirpación quirúrgica de parte o la totalidad del estómago y/o los intestinos); sujetos con enfermedad inflamatoria del intestino; sujetos con enfermedad de Crohn; sujetos que han sufrido resecciones de intestino delgado; sujetos con enfermedad de las encías; sujetos que toman medicamentos que aumentan el catabolismo de la vitamina D, incluyendo fenitoína, fosfenitoína, fenobarbital, carbamazepina y rifampicina; sujetos que toman medicamentos que reducen la absorción de la vitamina D, incluyendo colestiramina, colestipol, orlistat, aceite mineral, y sustitutos de la grasa; sujetos que toman medicamentos que inhiben la activación de la vitamina D, incluyendo ketoconazol; sujetos que toman medicamentos que disminuyen la absorción de calcio, incluyendo corticosteroides; sujetos con obesidad, diabetes mellitus, síndrome de resistencia a la insulina, disfunción endotelial (la vitamina D depositada en depósitos de grasa corporal está menos biodisponible); sujetos con osteoporosis; mujeres posmenopáusicas; individuos con enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, y/o insuficiencia cardíaca; y/o sujetos hospitalizados en estado crítico y/o con insuficiencia cardíaca.

En una realización, el paciente no tiene cáncer. Un "cáncer" se refiere a la presencia de células que poseen características típicas de células causantes de cáncer, tales como proliferación incontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, crecimiento rápido y velocidad de proliferación, y ciertas características morfológicas típicas. A menudo, las células cancerosas estarán en forma de un tumor, pero dichas células pueden también existir solas en un ser humano o animal o puede ser una célula cancerosa no tumorigénica, tal como una célula de leucemia. Los cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de bronquios, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de cerebro o del sistema nervioso central, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer de esófago, cáncer de cuello de útero, un melanoma, cáncer de útero o de endometrio, cáncer de la cavidad oral o de la faringe, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de testículo, cáncer del tracto biliar, cáncer del intestino delgado o del apéndice, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, osteosarcoma, y un condrosarcoma.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "hiperparatiroidismo" se refiere a uno o más de hiperparatiroidismo primario, hiperparatiroidismo secundario, hiperparatiroidismo secundario a enfermedad renal crónica (estadio p 3, 4 o 5) e hiperparatiroidismo secundario a la deficiencia de vitamina D.

Los términos "sujeto" y "paciente" como se utilizan en el presente documento generalmente incluyen seres humanos, mamíferos (por ejemplo, perros, gatos, roedores, ovejas, caballos, vacas, cabras), animales veterinarios y animales de zoológico, preferiblemente seres humanos.

La expresión "expresión y/o actividad de CYP24 " como se usa en el presente documento generalmente incluye la transcripción para producir ARNm de CYP24, la traducción para producir la proteína CYP24 y la combinación de transcripción y traducción para producir la proteína CYP24, así como la actividad de la enzima CYP24 directamente o por cálculo de la relación de los productos de CYP24 y los sustratos de CYP24.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "compuesto de vitamina D" generalmente incluye prohormonas de vitamina D (por ejemplo, colecalciferol y ergocalciferol), prohormonas de vitamina D (por ejemplo, 1 α hidroxivitamina D₃, 1 α -hidroxivitamina D₃, 25-hidroxivitamina D₃ y 25-hidroxivitamina D₂), hormonas activas de vitamina D, análogos de los anteriores, y combinaciones de cualquiera de los anteriores. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, vitamina D₃ (colecalfiferol), vitamina D₂ (ergocalciferol), 25-hidroxivitamina D₃, 25-hidroxivitamina D₂, 1 α ,25-dihidroxivitamina D₃, 1 α ,25-dihidroxivitamina D₂, 1 α ,25-dihidroxivitamina D₄ y análogos de la vitamina D (incluyendo todas las formas hidroxí y dihidroxí), incluyendo la 1,25-dihidroxí-19-nor-vitamina D₂, 22-oxacalcitriol, dihidrotaquisterol, y 26,26,26,27,27,27-hexafluorocalcitril (falecalcitril).

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "vitamina D activa" y "vitamina D activada" se refieren a un compuesto de vitamina D que está hidroxilado por lo menos en la posición 1 α . Los compuestos de vitamina D activa incluyen calcitriol, 1,25-hidroxivitamina D₂, alfacalcidol, doxercalciferol, 22-oxacalcitriol, y paricalcitol.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de agente terapéutico o profiláctico (por ejemplo, un inhibidor de CYP24 o inhibidor de CYP24 de doble acción y agonista de VDR) que sería apropiado para una realización de la presente invención, y que provocaría el efecto o la respuesta terapéutica o profiláctica deseada cuando se administra de acuerdo con el régimen de tratamiento deseado. Más específicamente, una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad eficaz para prevenir el desarrollo de, eliminar, corregir, o retardar la progresión de la afección relevante, por ejemplo, deficiencia de vitamina D. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz entra bien en de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de los ingredientes activos que consigue lograr el efecto deseado. La eficacia terapéutica y la toxicidad de dichos ingredientes activos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, que se expresa como la relación entre DL₅₀ y DE₅₀. Se prefiere un índice terapéutico alto. Los datos obtenidos se pueden utilizar para formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. Las dosis de los ingredientes activos están, preferentemente, dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE₅₀ con poca o nula toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración usada.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "que comprende" indica la posible inclusión de otros agentes, elementos, etapas o características, además de los especificados.

Un aspecto de la divulgación, que no se reivindica, proporciona un método para diagnosticar la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo. El método incluye medir la expresión y/o la actividad de CYP24 en un paciente deficiente en vitamina D y la correlación de la expresión de CYP24 y/o actividad de CYP24 anormalmente elevada con la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo. En respuesta a la expresión y/o actividad anormalmente elevada de CYP24, el método puede incluir además la administración de un inhibidor de CYP24 al paciente deficiente en vitamina D.

Otro aspecto de la divulgación, que no se reivindica, proporciona un método para diagnosticar la susceptibilidad a la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo. El método incluye medir la expresión y/o la actividad de CYP24 en un paciente y la correlación de la expresión de CYP24 y/o actividad de CYP24 anormalmente elevada con la susceptibilidad de deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo. En respuesta a la expresión y/o actividad anormalmente elevada de CYP24 en un paciente repleto de vitamina D, el método puede incluir, además, inhibir y/o prevenir la deficiencia de vitamina D mediante la administración de un inhibidor de CYP24 al paciente repleto de vitamina D. En respuesta a la expresión y/o actividad anormalmente elevada de CYP24 en un paciente con deficiencia en vitamina D, el método puede incluir, además, tratar la deficiencia de vitamina D mediante la administración de un inhibidor de CYP24 al paciente con deficiencia de vitamina D.

Todavía otro aspecto de la divulgación, que no se reivindica, proporciona un método para tratar o prevenir la deficiencia de vitamina D y/o el hiperparatiroidismo. El método incluye medir en un paciente la expresión y/o la actividad de CYP24, o de un sustituto del mismo, y la administración al paciente de un inhibidor de CYP24 en respuesta a la expresión y/o actividad anormalmente elevada de CYP24. El método puede incluir el tratamiento de la deficiencia de vitamina D mediante la administración del inhibidor de CYP24 a un paciente con deficiencia en vitamina D que tiene la expresión y/o actividad de CYP24 anormalmente elevada. El método puede incluir además la inhibición y/o prevención de la deficiencia de vitamina D mediante la administración del inhibidor de CYP24 al paciente repleto de vitamina D que tiene la expresión y/o actividad de CYP24 anormalmente elevada. El método puede incluir la inhibición y/o prevención del hiperparatiroidismo mediante la administración a un paciente del inhibidor de CYP24 que tiene la expresión y/o actividad de CYP24 anormalmente elevada. El método puede incluir también la inhibición y/o prevención de una deficiencia de 1,25-hidroxivitamina D mediante la administración a un paciente del inhibidor de CYP24 que tiene la expresión y/o actividad de CYP24 anormalmente elevada.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un inhibidor de CYP24 para su uso en el tratamiento o la prevención de la deficiencia de vitamina D en un paciente que tiene enfermedad renal crónica, definiéndose deficiencia como un nivel sérico total de 25-hidroxivitamina D por debajo de 30 ng/ml. Por consiguiente, el inhibidor de CYP24 se utiliza en un método para tratar o prevenir la deficiencia de vitamina D en un paciente. El método puede incluir medir la expresión y/o la actividad de CYP24 en un paciente y la administración de un inhibidor de CYP24 al paciente en respuesta a la expresión y/o actividad anormalmente elevada de CYP24. El método puede incluir, además, evitar la exacerbación de los niveles aumentados de CYP24 y la deficiencia de vitamina D en el paciente en respuesta a la expresión y/o actividad anormalmente elevada de CYP24, por ejemplo, reduciendo, evitando (omitiendo), o cesando la activación del receptor de unión a la vitamina D (VDR) por influencias externas, por ejemplo, reduciendo, evitando (omitiendo), o cesando la administración de compuestos activos de vitamina D. El método puede incluir además la administración de un suplemento de vitamina D al paciente, tal como mediante la administración al paciente de 25-hidroxivitamina D (por ejemplo, 25-hidroxivitamina D₃). El método puede incluir además la medición de los niveles de hormona paratiroidea intacta (PTH) y los niveles de 25-hidroxivitamina D en el paciente. En una realización, el paciente tiene niveles de PTH anormalmente elevados y niveles de 25-hidroxivitamina D normales. En otra realización, el paciente tiene niveles de PTH anormalmente elevados y niveles de 25-hidroxivitamina D anormalmente disminuidos (por ejemplo, deficiencia de vitamina D). En otra realización, el paciente tiene niveles de PTH normales y niveles de 25-hidroxivitamina D anormalmente disminuidos. El método puede incluir además la medición de la tasa de filtración glomerular (TFG) en el paciente para determinar el estadio de la enfermedad renal crónica. En una realización, el paciente tendrá una ERC seleccionado de los estadios 1-5. En otra realización, el paciente tendrá una ERC seleccionado de los estadios 1 y 2. En otra realización, el paciente tendrá una ERC seleccionada de los estadios 3 y 4.

Una realización de la divulgación proporciona medir la actividad de CYP24 midiendo el nivel del factor de crecimiento de fibroblasto 23 (FGF23) en un paciente. Otra realización proporciona medir la expresión y/o la actividad de CYP24 midiendo el nivel de uno o más subproductos catabólicos de CYP24 (incluyendo, pero no limitados a, 24,25-dihidroxitamina D₃, 25-hidroxitamina D₃-26,23-lactona, 1,24,25-trihidroxitamina D₃, 24,25-dihidroxitamina D₂ o 1,24,25-trihidroxitamina D₂ o los productos terminales de la actividad de CYP24 en metabolitos de la vitamina D₃, incluyendo ácido calcitrico o 1,25-(OH)₂D₃-26,23-lactona). Otra realización proporciona medir la actividad de CYP24 mediante las relaciones de uno o más subproductos catabólicos de CYP24 y uno o más precursores correspondientes (por ejemplo, la relación de 24,25-dihidroxitamina D y 25-hidroxitamina D, o la relación de 1,24,25 D –trihidroxitamina D y 1,25-dihidroxitamina D). Aún otras realizaciones proporcionan medir la expresión de CYP24 midiendo el nivel de ARNm de CYP24 en un paciente, el nivel de proteína CYP24 en un paciente y/o el nivel de actividad de la enzima CYP24 en un paciente. Otra realización proporciona medir la actividad de CYP24 mediante la medición de metabolito o metabolitos de CYP24 de otros sustratos de CYP24 que podrían introducirse (por ejemplo, mediante inyección), metabolizados por CYP24, y después medirlos.

Otro aspecto de la divulgación, que no se reivindica, proporciona un kit para diagnosticar la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo. En una realización, el kit incluye un ensayo u otro aparato para la medición de ARNm, proteína o la actividad enzimática de de CYP24, e instrucciones de uso, por ejemplo de acuerdo con un método divulgados en el presente documento.

Se contempla que el kit de diagnóstico y métodos divulgados en el presente documento incluye realizaciones que incluyen cualquier combinación de uno o más de los elementos, características y etapas opcionales adicionales descritos más adelante (incluyendo los que se muestran en las figuras), a menos que se indique lo contrario

También se entiende específicamente que cualquier valor numérico citado en el presente documento incluye todos los valores desde el valor inferior al valor superior, es decir, todas las combinaciones posibles de valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto enumerados han de considerarse que se indican expresamente en este solicitud. Por ejemplo, si un intervalo de concentración o un intervalo de efecto beneficioso se establece como de 1 % a 50 %, se pretende que los valores tales como de 2 % a 40 %, de 10 % a 30 %, o de 1 % a 3 %, etc., se enumeran expresamente en esta memoria descriptiva. Estos son solo ejemplos de lo que se pretende específicamente.

En un aspecto de la divulgación, que no se reivindica, la presente divulgación proporciona un método para diagnosticar la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo. El método incluye medir la expresión y/o la actividad de CYP24 en un paciente deficiente en vitamina D y la correlación de la expresión de CYP24 y/o actividad de CYP24 anormalmente elevada con la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo. En respuesta a la expresión y/o actividad anormalmente elevada de CYP24, el método puede incluir además la administración de un inhibidor de CYP24 al paciente deficiente en vitamina D.

En otro aspecto de la divulgación, que no se reivindica, la presente divulgación proporciona un método para diagnosticar la susceptibilidad a la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo. El método incluye medir la expresión y/o la actividad de CYP24 en un paciente y la correlación de la expresión de CYP24 y/o actividad de CYP24 anormalmente elevada con la susceptibilidad de deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo. En respuesta a la expresión y/o actividad anormalmente elevada de CYP24 en un paciente repleto de vitamina D, el método puede incluir, además, inhibir y/o prevenir la deficiencia de vitamina D mediante la administración de un inhibidor de CYP24 al paciente repleto de vitamina D. En respuesta a la expresión y/o actividad anormalmente elevada de CYP24 en un paciente con deficiencia en vitamina D, el método puede incluir, además, tratar la deficiencia de vitamina D mediante la administración de un inhibidor de CYP24 al paciente con deficiencia de vitamina D.

Como se ha indicado anteriormente, un aspecto de la invención reivindicada se refiere a un inhibidor de CYP24 para su uso en el tratamiento o la prevención de la deficiencia de vitamina D en un paciente que tiene enfermedad renal crónica, definiéndose deficiencia como un nivel sérico total de 25-hidroxitamina D por debajo de 30 ng/ml. Por consiguiente, el inhibidor de CYP24 se utiliza en un método para tratar o prevenir la deficiencia de vitamina D. El método puede incluir medir en un paciente la expresión y/o la actividad de CYP24, o de un sustituto del mismo, y la administración de un inhibidor de CYP24 al paciente en respuesta a la expresión y/o actividad anormalmente elevada de CYP24. El método puede incluir el tratamiento de la deficiencia de vitamina D mediante la administración del inhibidor de CYP24 a un paciente con deficiencia en vitamina D que tiene la expresión y/o actividad de CYP24 anormalmente elevada. El método puede incluir la inhibición y/o prevención de la deficiencia de vitamina D mediante la administración del inhibidor de CYP24 a un paciente repleto de vitamina D que tiene la expresión y/o actividad de CYP24 anormalmente elevada. El método puede incluir la inhibición y/o prevención del hiperparatiroidismo mediante la administración del inhibidor de CYP24 a un paciente que tiene la expresión y/o actividad de CYP24 anormalmente elevada. El método puede incluir también la inhibición y/o prevención de una deficiencia de 1,25-hidroxitamina D mediante la administración del inhibidor de CYP24 a un paciente que tiene la expresión y/o actividad de CYP24 anormalmente elevada.

La deficiencia de vitamina D se asocia con una serie de enfermedades y trastornos adicionales, incluyendo el hiperparatiroidismo secundario, hiperplasia de la glándula paratiroidea, hipocalcemia, psoriasis, enfermedad renal crónica (ERC), y enfermedades metabólicas óseas, tales como fibrogénesis imperfecta ósea, osteítis fibrosa quística, osteomalacia, raquitismo, osteoporosis, osteopenia, osteosclerosis, osteodistrofia renal y calcificación extraesquelética. Los métodos de acuerdo con la presente divulgación también son útiles para tratar o prevenir enfermedades o trastornos asociados con la deficiencia de vitamina D.

El tratamiento de referencia actual para los pacientes con estadios de ERC indica que se debe medir en los pacientes los niveles de PTH y de 25-hidroxivitamina D. En los pacientes en estadio 3 y estadio 4, si el nivel de hormona paratiroidea intacta en plasma (PTH) está elevado (por ejemplo, por encima del intervalo objetivo para el estadio de ERC) y la 25-hidroxivitamina D está reducida (<30 ng/ml), se trata al paciente con un suplemento de (ergocalciferol). Véase "Guideline 7: Prevention And Treatment Of Vitamin D Insufficiency And Vitamin D Deficiency In People With CKD (Algorithm 1)" de la National Kidney Foundation K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease, Am J Kidney Dis 42:S1–S202, 2003 (Supl. 3), Incorporado en el presente documento por referencia. Para ERC en estadio 3 (intervalo de la TFG 30-59 ml/min/1,73 m²), el nivel de PTH objetivo 35-70 pg/ml (3,85 a 7,7 pmol/l). Para ERC en estadio 4 (intervalo de la TFG 15-29 ml/min/1,73 m²), el nivel de PTH objetivo 70-110 pg/ml (7,7–12,1 pmol/l).

Por otra parte, si el nivel de PTH está por encima del intervalo objetivo para el estadio de la ERC y los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D son > 30 ng/ml, se trata al paciente con una hormona activa de vitamina D (por ejemplo, calcitriol, alfacalcidol o doxercalciferol). Véase " Guideline 8A: Active Vitamin D Therapy In Stages 3 And 4 CKD ((Algorithm 2)" de la National Kidney Foundation K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease, Am J Kidney Dis 42:S1–S202, 2003 (Supl. 3), Incorporado en el presente documento por referencia.

Sin pretender estar ligado a teoría particular alguna, la figura 12 muestra que si el nivel de 25-hidroxivitamina D es normal, el tratamiento con una hormona activa de vitamina activa según las pautas incrementará los niveles de CYP24, y, por lo tanto, exacerbará la deficiencia de vitamina D a pesar de la reducción de los niveles de PTH. En los pacientes con enfermedad renal crónica y niveles elevados de PTH, la hiperactividad de CYP24 debe tratarse mediante (a) el uso de un inhibidor de CYP24 y/o (b) evitando una mayor exacerbación del aumento de los niveles de CYP24 y la deficiencia de vitamina D.

Por consiguiente, otro aspecto de la divulgación, que no se reivindica, proporciona un método para tratar o prevenir el hiperparatiroidismo secundario a la enfermedad renal crónica (preferiblemente, los estadios 3 y 4) en un paciente. El método incluye medir la expresión y/o la actividad de CYP24 en un paciente y la administración de un inhibidor de CYP24 al paciente en respuesta a la expresión y/o actividad anormalmente elevada de CYP24. El método incluye además, preferiblemente, evitar la exacerbación de aumento de los niveles CYP24 y deficiencia de vitamina D, si está presente, evitando la administración de vitamina D activa. El método puede incluir además la administración de suplementos de vitamina D para el paciente, preferiblemente con 25-hidroxivitamina D (por ejemplo, 25 hidroxivitamina D₃). El método puede incluir además la medición de nivel de 25-hidroxivitamina D en el paciente. En una realización, el paciente tiene niveles de PTH anormalmente elevados y niveles de 25-hidroxivitamina D normales. En otra realización, el paciente tiene niveles de PTH anormalmente elevados y niveles de 25-hidroxivitamina D anormalmente disminuidos. En otra realización más, el paciente tiene niveles de PTH normales y niveles de 25-hidroxivitamina D anormalmente disminuidos. El método puede incluir además la medición de la tasa de filtración glomerular (TFG) en el paciente para determinar el estadio de la enfermedad renal crónica.

En una realización, y sin la intención de estar ligado a teoría alguna, el nivel de FGF23 se utiliza como sustituto de la expresión y/o la actividad de CYP24. En otra forma de realización, y sin la intención de quedar ligado a teoría alguna en particular, los niveles elevados de FGF23 en sí es un marcador de la susceptibilidad a la deficiencia de vitamina D, sin respecto a cualquier mecanismo particular de causalidad (es decir, ya sea mediante el catabolismo de CYP24, o no). El nivel de FGF23 en una muestra biológica obtenida de un paciente puede determinarse mediante diversas técnicas conocidas para un experto en la técnica. Por ejemplo, las concentraciones de FGF-23 intacta (iFGF23) y la mediana de FGF-23 en C-terminal (cFGF23) se puede medir usando kits de ELISA disponibles de IMMUTOPICS (San Clemente, CA, EE.UU.). Las mediciones de las especies anteriores se hacen, preferiblemente, en forma de concentraciones en suero, aunque las concentraciones se pueden medir en plasma, suero u otros fluidos corporales (por ejemplo, saliva) o tejidos. Los niveles de iFGF23 normales están en el intervalo de 0 a 90 pg/ml para los seres humanos adultos sanos (Fliser et al. J. Am. Soc. Nephrol. 18:2601–2608 (2007), Ibrahim et al. Int. Urol. Nephrol. 41(1):163–169 (2009)). Los niveles normales cFGF23 están en el intervalo de 0 a 85 unidades de referencia (UR)/ml para los seres humanos adultos sanos (Tebbin et al. Mayo Clin. Proc. 80(6):745–751 (2005)). Un nivel de FGF23 mayor que el valor superior del intervalo normal sería indicativo de la expresión de CYP24 anormalmente elevada. Cuando más alejado está el nivel de de FGF23 del extremo superior del intervalo normal, mayor es la correlación con la expresión de CYP24 anormalmente elevada. Los niveles elevados de FGF23 de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento será al menos 2 veces mayor de lo normal, por ejemplo 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, o 1.000 veces mayor.

En otra realización, la actividad de CYP24 se mide midiendo el nivel de uno o más subproductos catabólicos de CYP24. El nivel de subproductos catabólicos de CYP24 en una muestra biológica obtenida de un paciente puede determinarse mediante diversas técnicas conocidas para un experto en la técnica. Por ejemplo, los subproductos catabólicos de CYP24 pueden medirse mediante inmunoensayos, tales como ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), ensayos de inmunofluorescencia, y similares. Otro enfoque para medir los subproductos CYP24, tales como 25-hidroxivitamina D₃-26,23-Lactona o 1,25-dihidroxivitamina D₃-26,23-Lactona aprovechará su alta afinidad por las proteínas de unión natural a la vitamina D, tales como la proteína de unión a vitamina D (DBP) o el receptor de la vitamina D. Tales proteínas también se pueden modificar por métodos conocidos por un experto en la técnica de modo que tengan mayor afinidad o selectividad por dichos productos de vitamina D. Los anticuerpos o proteínas sintéticos que tienen afinidad por metabolitos de la vitamina D de interés también podrían generarse usando técnicas tales como presentación en fagos o presentación en levaduras y podrían incorporarse en un kit para determinar la concentración de los metabolitos de vitamina D y de los subproductos catabólicos de CYP24. Otras técnicas para medir los subproductos catabólicos de CYP24 incluyen cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) en combinación con espectroscopia de UV-visible, espectroscopia de fluorescencia, espectrometría de masas, y similares. La actividad de CYP24 también se puede medir mediante la medición de las proporciones de uno o más subproductos catabólicos de CYP24 y uno o más precursores correspondientes. Los subproductos catabólicos de CYP24 incluyen compuestos de vitamina D 24 hidroxilados naturales y sintéticos. Los ejemplos de subproductos catabólicos de CYP24 naturales incluyen 24,25-dihidroxivitamina D₃, 1,24,25-trihidroxivitamina D₃, 24,25-dihidroxivitamina D₂, y 1,24,25-trihidroxivitamina D₂. Los productos adicionales de CYP24 también pueden estar 23-hidroxilados, tales como 25-hidroxivitamina D₃-26,23-Lactona o 1,25-dihidroxivitamina D₃-26,23-Lactona. Ejemplos adicionales de los subproductos catabólicos de CYP24 incluyen los productos obtenidos mediante 24-hidroxilación de compuestos sintéticos de vitamina D. Los compuestos sintéticos de vitamina D incluyen paricalcitol (ZEMPLAR®), doxercalciferol (HECTOROL®), 22-oxacalcitriol, alfalcidol y 26,26,26,27,27,27-hexafluorocalcitril (falecalcitril). Las mediciones de las especies anteriores se hacen, preferiblemente, en forma de concentraciones en suero, aunque las concentraciones se pueden medir en suero u otros fluidos corporales (por ejemplo, saliva). Las mediciones pueden realizarse después de la administración aguda o crónica de un sustrato de CYP24.

Los compuestos precursores correspondientes de los subproductos catabólicos de CYP24 incluyen, por ejemplo, 25-hidroxivitamina D₃, 1,25-hidroxivitamina D₃, 25-hidroxivitamina D₂ y 1,25-hidroxivitamina D₂. El nivel de los compuestos precursores correspondientes se puede medir junto con los subproductos catabólicos de CYP24 y las relaciones de uno o más subproductos catabólicos de CYP24 y uno o más precursores correspondientes se pueden usar para obtener un valor de la actividad de CYP24. Por ejemplo, las relaciones que incluyen 24,25-dihidroxivitamina D a 25-hidroxivitamina D y 1,24,25-trihidroxivitamina D a 1,25-dihidroxivitamina D se pueden medir y usar para obtener la actividad de CYP24. Las mediciones de las especies anteriores se hacen, preferiblemente, en forma de concentraciones en suero, aunque las concentraciones se pueden medir en suero u otros fluidos corporales (por ejemplo, saliva). Las mediciones pueden realizarse después de la administración aguda o crónica de un sustrato de CYP24.

En otra realización, la expresión de CYP24 se determina midiendo el nivel de ARNm de CYP24 en un paciente. El nivel de ARNm en una muestra biológica obtenida de un paciente puede determinarse mediante diversas técnicas conocidas para un experto en la técnica. En la transferencia de tipo Northern, por ejemplo, los niveles de ARNm pueden cuantificarse mediante la hibridación de sondas marcadas radiactivamente o con fluorescencia con muestras de ARNm que se han separado por electroforesis y/o unido a una membrana u otro soporte sólido. Las tecnologías de micromatrices de ADN proporcionan otro medio para la cuantificación de los niveles de ARNm, con lo que se permite que una muestra de ARNm marcada fluorescentemente ARNm hibride con decenas a cientos de miles de oligonucleótidos de ADN fijados a un soporte sólido en un patrón definido. Las técnicas que proporcionan amplificación de la señal son particularmente útiles cuando hay niveles bajos de ARNm presentes. Por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) proporciona la cuantificación del ARNm mediante la conversión del ARNm diana en la molécula de ADN correspondiente, seguido de la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Mediante el uso de un cebador marcado con fluorescencia, los niveles de ARNm se pueden monitorizar en tiempo real durante el proceso de amplificación.

En otra realización, la expresión de CYP24 se determina midiendo el nivel de proteína CYP24 en un paciente. El nivel de proteína en una muestra biológica obtenida de un paciente puede determinarse mediante diversas técnicas conocidas para un experto en la técnica. En la transferencia de tipo Western, por ejemplo, los niveles de proteína pueden cuantificarse mediante la detección de la unión de un anticuerpo específico a la proteína diana con muestras de proteína que se han separado por electroforesis y/o unido a una membrana u otro soporte sólido. Los ensayos que se basan en la unión de un anticuerpo específico a un antígeno diana (por ejemplo, CYP24) pueden tomar diversas formas, y, además de la transferencia Western (inmunotransferencia), los ejemplos de tales ensayos incluyen ensayos de inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), ensayos de inmunofluorescencia, y similares. Los niveles de proteína también se pueden medir mediante diversas técnicas de detección por tinción, espectroscópicas, y espectrometría, opcionalmente en combinación con diversas técnicas de separación. Los ejemplos de técnicas de detección incluyen tinción de Coomassie, tinción con plata, espectroscopia de UV-visible, espectroscopia de fluorescencia, espectrometría de masas, y similares. Estas técnicas de detección se pueden combinar con técnicas de separación, tales como electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía

líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía líquida de líquidos de proteínas rápida (FPLC), cromatografía en capa fina (TLC), tecnología de multiplexación Luminex® xMAP® para la cuantificación de genes, y similares.

5 En otra realización, la actividad de CYP24 se mide mediante la medición del nivel de actividad enzimática de CYP24 en un paciente. El nivel de actividad enzimática en una muestra biológica obtenida de un paciente puede determinarse mediante diversas técnicas conocidas para un experto en la técnica. En el caso de CYP24, la actividad enzimática se puede medir mediante la medición de la conversión de 25-hidroxivitamina D₃ en el producto 24-hidroxilado correspondiente. Por ejemplo, la conversión de 25-hidroxivitamina D₃ en 24,25-dihidroxivitamina D₃ puede evaluarse mediante la incubación de una muestra biológica de un paciente con un sustrato de 25-hidroxivitamina D₃ marcada radiactivamente, separando los productos de reacción por HPLC, y midiendo la radiactividad del pico de 24,25-dihidroxivitamina D₃ en comparación con la radiactividad total.

15 En una realización, la expresión y/o actividad de CYP24 se puede medir en uno o más de tejidos, plasma y células de un paciente con deficiencia de vitamina D o repleto de vitamina D. La expresión y/o la actividad de CYP24 se puede medir en los tejidos obtenidos por una biopsia de tejido y pueden incluir tejidos, tales como, pero no limitados a, tejido de la piel, tejido renal, tejido hepático, tejido de la glándula paratiroides, y similares. En una realización, se prefiere el tejido renal. En una realización, se prefiere tejido de la glándula paratiroidea. La expresión y/o la actividad de CYP24 también pueden medirse en células, incluyendo células obtenidas de la sangre, tales como células mononucleares de sangre periférica, y células obtenidas a partir de hisopos de tejidos, tales como células bucales.

20 En una realización de los métodos en el presente documento, la expresión y/o la actividad de CYP24 se mide mediante un indicador sistémico (por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica o suero), con preferencia a una medición basada en el tejido de la sobreexpresión, que puede ocurrir en el crecimiento tumoral.

25 En una realización, la expresión y/o actividad de CYP24 es anormalmente elevada. Los niveles normales de expresión y/o la actividad de CYP24 se definen como 1 unidad relativa (UR), medida sobre la base del valor medio de expresión y/o la actividad de CYP24 de 50-100 donantes "normales" donde el ARNm de CYP24 se ha preparado y utilizado como referencia.

30 El nivel basal de CYP24 se puede establecer a partir de muestras (por ejemplo, riñón, piel, sangre, suero, plasma, saliva, hisopo bucal) recogidas de individuos normales de diversos grupos de poblaciones basadas, por ejemplo, en el sexo, origen étnico, y/o la edad. El nivel de ARN de CYP24 puede establecerse a partir de tejidos (por ejemplo, riñones o biopsia de piel) o células (por ejemplo, frotis bucal) por PCR en tiempo real, tecnología de multiplexación Luminex® xMAP® u otra técnica. El nivel de proteína CYP24 se medirá en estos tejidos mediante el uso de técnicas tales como la tecnología de multiplexación Luminex® xMAP® y transferencia de tipo Western. El valor medio para el nivel de ARN de CYP24 o el nivel de proteínas CYP24 se registrará como 1 UR.

40 Los niveles normales compuestos de vitamina D de 24-hidroxilados naturales y sintéticos, tales como 24,25-dihidroxivitamina D₃, 1, 24,25-trihidroxivitamina D₃ o lactonas, se pueden establecer a partir de muestras (por ejemplo, sangre, plasma, saliva) en cantidad absoluta basada en una curva estándar usando técnicas tales como HPLC, cromatografía de gases, espectrometría de masas, y los métodos citados anteriormente. Los valores absolutos de los compuestos de vitamina D naturales y sintético 24-hidroxilados serán utilizados como los niveles normales por el médico.

45 Si el nivel de ARN de CYP24, el nivel de proteína CYP24, o el valor absoluto de un compuesto de vitamina D natural o sintético 24-hidroxilado en un paciente cae fuera del intervalo "normal", el paciente tiene expresión y/o actividad anormalmente elevada de CYP24. Por ejemplo la expresión y/o actividad de CYP24 puede ser al menos 2 veces mayor sobre la expresión y/o actividad normal de CYP24, al menos 3 veces mayor, al menos 4 veces mayor, al menos 5 veces mayor, o al menos 10 veces mayor que la expresión y/o actividad normal de CYP24. Se contempla que la expresión y/o actividad anormalmente elevada de CYP24 podrían ser de incluso cientos o miles de veces mayor sobre la expresión y/o actividad normal de CYP24 (por ejemplo, 100x, 500x, 1000x, 5000x, etc.).

50 En una realización, un médico determinará si un paciente tiene expresión y/o la actividad anormalmente elevada de CYP24 mediante la obtención de al menos una muestra (por ejemplo, sangre, plasma, saliva, suero, hisopo bucal) del paciente y midiendo el nivel de ARN de CYP24, el nivel de proteína de CYP24 o el valor absoluto de un compuesto de vitamina D natural o sintético 24-hidroxilado. Si uno o varios parámetros de medida cae fuera del intervalo "normal", y preferiblemente está incrementado por al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, etc., como se ha descrito anteriormente, el médico diagnosticará al paciente con 4 expresión y/o actividad anormalmente elevada y pueden prescribir un inhibidor de CYP24.

60 Como se ha indicado anteriormente, en la presente invención reivindicada, el inhibidor de CYP24 se selecciona del grupo que consiste en (R)-N-(2-(1H-imidazol-1-il)-2-feniletíl)-4'-clorobifenil-4-carboxamida, ketoconazol, metronidazol, clometiazol, itraconazol, fluconazol, compuestos de 23,23-difluoro-24-sulfona vitamina D₃, compuestos de 25-sulfona vitamina D₃, compuestos de 24,24-difluoro-25-sulfona vitamina D₃, compuestos de 24-sulfoximina vitamina D₃, compuestos de 16-eno-25-oxima vitamina D₃, compuestos de 16-eno-25-oxima éter vitamina D₃, compuestos de 24-sulfona vitamina D₃, compuestos de 24,24-difluoro vitamina D₃ y combinaciones de los mismos.

65 En una realización, el inhibidor de CYP24 comprende el compuesto divulgados como la Fórmula IX (Compuesto 1),

en la patente de Estados Unidos n.º 6.380.408 (col. 6), que es ácido (5Z, 7E, 16Z, 23E) - (1S, 3R) -25-nor-25-t-butilsulfonil-9,10-seco-5,7,10 (19), 16, 23-colestapentaeno-1,3-diol. En otra realización, el inhibidor de CYP24 comprende un compuesto azol seleccionado de (R)-N(2-(1H-imidazol-1-il) -2-feniletíl) -4'-clorobifenil-4-carboxamida, ketoconazol, metronidazol, clometiazol, itraconazol y fluconazol.

Una clase de inhibidores de molécula orgánica de CYP24 incluye análogos de compuestos de vitamina D. Los ejemplos de análogos de 1 α , 25-dihidroxitamina D₃ que tienen actividad de inhibición de CYP-24 se divulgan en las patentes de Estados Unidos n.º 6.380.408; 7.101.865; 7.166.585; y 6.982.258 y la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 10/738.248. En una realización, el inhibidor de CYP24 comprende dichos análogos de 1 α , 25-dihidroxitamina D₃ que tiene actividad de inhibición de CYP-24, seleccionados de compuestos de vitamina D₃ 23,23-difluoro-24-sulfona, compuestos de vitamina D₃ 25-sulfona, compuestos de vitamina D₃ 24,24-difluoro-25-sulfona, compuestos de vitamina D₃ 24 sulfoximina, compuestos de vitamina D₃ 16-eno-25-oxima y compuestos de vitamina D₃ éter 16-eno-25-oxima, compuestos de vitamina D₃ 24-sulfona y compuestos de vitamina D₃ 24,24-difluoro. En un aspecto de la invención reivindicada, la molécula puede seleccionarse de inhibidores de CYP24 puros, por ejemplo, puede ser ácido (5Z, 7E) - (1S, 3R) -24- (S) -fenilsulfoximina-25-nor-9,10 -seco-5,7,10 (19) -colestatrieno-1,3-diol (véase la patente de Estados Unidos n.º 7,101,865, Compuesto I (a)). En otro aspecto de la invención reivindicada, la molécula se puede seleccionar de compuestos que inhibidores de CYP24 y agonistas de vitamina D, por ejemplo, puede ser ácido (5Z, 7E, 16Z, 23E) -25-nor-25-t-butilsulfonil- 9,10-seco-5,7,10 (19), 16,23-colestapentaeno-1,3 β -diol (véase la patente de Estados Unidos n.º 6,380.408, la Fórmula IX, el compuesto 1) o puede ser (5Z, 7E, 16Z) - (1S, 3R) -25- (O-alilo) -Nt-butiloxima-9,10-seco-5,7,10 (19) 16-colestatetraeno-1,3 β -diol (véase la patente de Estados Unidos n.º 6.982.258, Compuesto I (g)).

Los inhibidores de CYP24 opcionalmente se pueden administrar en combinación con otros agentes que aumentan los niveles de vitamina D en el cuerpo. Agentes conocidos en la técnica para aumentar los niveles de vitamina D en el cuerpo están abarcados por la presente divulgación e incluyen, por ejemplo, vitamina D₂, 25-hidroxitamina D₂, 1,25-hidroxitamina D₂, vitamina D₃, 25-hidroxitamina D₃ y 1,25-hidroxitamina D₃. Preferiblemente, los compuestos activos de la vitamina D se evitan a favor de las prohormonas de vitamina D, prohormonas de vitamina D y análogos de los mismos.

Tanto colecalciferol como ergocalciferol se metabolizan en prohormonas mediante enzimas localizadas principalmente en el hígado del cuerpo humano. El colecalciferol se metaboliza en una prohormona 25-hidroxitamina D₃ y ergocalciferol se metaboliza en dos prohormonas, 25-hidroxitamina D₂ y 24 (S) hidroxitamina D₂. Colecalciferol y ergocalciferol también pueden metabolizarse en prohormonas fuera del hígado en ciertas células, tales como enterocitos, mediante enzimas que son idénticas o similares a las encontradas en el hígado. La elevación de las concentraciones de cualquiera de precursor aumenta la producción de prohormona; del mismo modo, la reducción de las concentraciones de precursores disminuye la producción de la hormona. Los aumentos repentinos en los niveles sanguíneos de colecalciferol y/o ergocalciferol ("colecalciferol/ergocalciferol") puede elevar transitoriamente las concentraciones intracelulares de vitamina D, lo que acelera la producción de prohormona y la elevación de las concentraciones intracelulares y prohormonas en la sangre.

Los niveles en sangre de 1,25-dihidroxitamina D están regulados con precisión por un mecanismo de retroalimentación que implica PTH. La 1 α -hidroxilasa renal (o CYP27B1) es estimulada por PTH e inhibida por la 1,25-dihidroxitamina D. Cuando los niveles sanguíneos de 1,25-hidroxitamina disminuyen, las glándulas paratiroides captan este cambio a través de los receptores intracelulares de vitamina D y secretan PTH. La PTH secretada estimula la expresión de CYP27B1 renal y, por tanto, aumenta la producción de hormonas de vitamina D. A medida que las concentraciones en sangre de 1,25-dihidroxitamina D suben de nuevo, las glándulas paratiroides atenúan aún más la secreción de PTH. A medida que los niveles de PTH en sangre caen, la producción renal de las hormonas de la vitamina D disminuye. El aumento de los niveles en sangre de 1,25-dihidroxitamina D también inhibe directamente aún más la producción de hormonas de vitamina D por CYP27B1.

Picos sustanciales en los niveles sanguíneos de colecalciferol, ergocalciferol, y 25-hidroxitamina D también pueden causar la sobrerregulación de CYP24 como respuesta, a catabolizar el exceso transitorio de sustratos de vitamina D. mismo modo, el aumento de los niveles en sangre de 1,25-dihidroxitamina D puede causar la sobrerregulación de la actividad de CYP24.

Sin pretender estar vinculado por cualquier modo de operación particular, se cree que la sobreexpresión de CYP24 es la causa de al menos algunas formas de deficiencia de vitamina D, que operan independientemente de, pero potencialmente complicado por, las deficiencias en sustratos y/o la luz solar-

Por consiguiente, en un tipo de realización de la invención reivindicada, se administrará un inhibidor de CYP24 solo, o sin la administración de un compuesto de vitamina D (por ejemplo, colecalciferol, ergocalciferol, prohormona de vitamina, hormona de vitamina D, o análogos de la misma), lo más preferentemente sin la administración de una hormona de la vitamina D activa o análogo de la misma. En otra realización de la invención reivindicada, se administrará un inhibidor de CYP24 solo, o cuando un compuesto de vitamina D (por ejemplo, colecalciferol, ergocalciferol, prohormona de vitamina D, hormona de vitamina D, o análogos de la misma) también se administra, el compuesto de vitamina D se administrará en una formulación de liberación modificada para evitar aumentos

repentinos en los niveles en sangre del compuesto (por ejemplo, una formulación de liberación sostenida o prolongada), o por medio de un método de administración i.v. de pulsos lentos.

5 En un aspecto de la divulgación, que no se reivindica, la presente divulgación proporciona un kit para diagnosticar la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo. Los kits de acuerdo con la presente divulgación proporcionan una medida de la expresión y/o la actividad de CYP24, e incluyen kits que miden una o más propiedades, incluyendo niveles de subproductos catabólicos de CYP24 o precursores de los subproductos catalíticos, los niveles de ARNm de CYP24, los niveles de proteína de CYP24, y/o los niveles de actividad de la enzima CYP24. En una realización, el kit incluye un anticuerpo anti-CYP24 inmovilizado, un anticuerpo anti-CYP24
10 marcado e instrucciones de uso, por ejemplo de acuerdo con un método divulgado en el presente documento. Otros kits que implican la detección basada en anticuerpos también se contemplan en la presente divulgación. Por ejemplo, los kits para medir la expresión CYP24 pueden medir el nivel de subproductos catabólicos de CYP24. Los kits pueden incluir un ensayo para medir los niveles de uno o más precursores correspondientes a los subproductos catalíticos. Un kit de este tipo puede incluir un anticuerpo (o fragmentos funcionales del mismo) específico de un subproducto catabólico de CYP24, y un anticuerpo específico de los compuestos de vitamina D, incluyendo los subproductos catabólicos de CYP24. Las proteínas con alta afinidad por los metabolitos de la vitamina D y los subproductos catabólicos de CYP24, tales como DBP o VDR o proteínas o macromoléculas derivadas sintéticamente también se pueden contemplar para su uso en lugar del anticuerpo en tales kits. Se contempla que uno de los anticuerpos mencionados anteriormente se inmoviliza a un soporte sólido y el otro anticuerpo posee un marcador para la detección. En otro ejemplo, un kit para medir la expresión de CYP24 puede incluir un subproducto catabólico de CYP24 inmovilizado, y un anticuerpo anti-CYP24. La actividad de CYP24 se mide con el kit mencionado anteriormente mediante la medición de la capacidad de subproductos catabólicos de CYP24 para competir con el subproducto catabólico de CYP24 inmovilizado para la unión al anticuerpo anti-CYP24.

25 En otro aspecto, la divulgación incluye una formulación farmacéutica para tratar o prevenir la deficiencia de vitamina D que incluye una cantidad eficaz de un inhibidor de CYP24. La formulación puede incluir además una cantidad eficaz de 25-hidroxivitamina D₃. Como se ha indicado anteriormente, a este respecto, la invención reivindicada proporciona una formulación farmacéutica para su uso en un método de tratamiento o prevención de la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo en un paciente que tiene enfermedad renal crónica, definiéndose la deficiencia por un nivel total en suero de 25-hidroxivitamina D por debajo de 30 ng/ml, comprendiendo la composición una cantidad eficaz de un inhibidor de CYP24 como se ha definido anteriormente.
30

En otro aspecto más, que no se reivindica, la divulgación incluye una formulación farmacéutica para tratar o prevenir el hiperparatiroidismo, que incluye una cantidad eficaz de un inhibidor de CYP24. La formulación puede incluir además una cantidad eficaz de 25-hidroxivitamina D₃. La formulación farmacéutica puede ser para el tratamiento del hiperparatiroidismo secundario a la enfermedad renal crónica, por ejemplo ERC en estadio 1 o estadio 2.
35

El médico individual determina la formulación exacta, la vía de administración y la dosis según la afección del paciente. Las cantidades de dosificación y los intervalos se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles de los ingredientes activos que son suficientes para mantener los efectos terapéuticos o profilácticos.
40

Tales formulaciones pueden estar en forma de, por ejemplo, gránulos, polvos, comprimidos, cápsulas, jarabe, supositorios, inyecciones, emulsiones, elixires, suspensiones o soluciones. Las presentes formulaciones se pueden formular para diversas vías de administración, por ejemplo, mediante administración oral, mediante administración nasal, mediante administración rectal, inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyecciones intramusculares o inyección intraperitoneal. Las siguientes formas de dosificación se dan a modo de ejemplo y no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.
45

Para administración oral, bucal, y sublingual, polvos, suspensiones, gránulos, comprimidos, píldoras, cápsulas, cápsulas de gel y comprimidos oblongos son formas de dosificación sólidas aceptables. Estos se pueden preparar, por ejemplo, mediante la mezcla de uno o más de los inhibidores de CYP24 o inhibidor de CYP24 de acción doble y VDR agonista de la presente invención con al menos un aditivo, tal como un almidón u otro aditivo. Los aditivos adecuados son sacarosa, lactosa, azúcar de celulosa, manitol, maltitol, dextrano, almidón, agar, alginatos, quitinas, quitosanos, pectinas, goma de tragacanto, goma arábiga, gelatinas, colágenos, caseína, albúmina, polímeros sintéticos o semisintéticos o glicéridos. Opcionalmente, las formas de dosificación oral pueden contener otros ingredientes para ayudar en la administración, tales como un diluyente inactivo, o lubricantes tales como estearato de magnesio, o conservantes tales como parabeno o ácido sórbico, o antioxidantes tales como ácido ascórbico, tocoferol o cisteína, un agente disgregante, aglutinantes, espesantes, tampones, edulcorantes, agentes aromatizantes o agentes perfumantes. Los comprimidos y las píldoras se pueden tratar adicionalmente con materiales de recubrimiento adecuados conocidos en la técnica.
50
55
60

Las formas de dosificación líquidas para administración oral pueden estar en forma de emulsiones, jarabes, elixires, suspensiones y soluciones farmacéuticamente aceptables, que pueden contener un diluyente inactivo, como agua. Las formulaciones farmacéuticas y medicamentos se pueden preparar como suspensiones o soluciones líquidas utilizando un líquido estéril, tal como, pero no limitado a, un aceite, agua, un alcohol, y combinaciones de estos. Se pueden añadir tensioactivos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes farmacéuticamente adecuados para la
65

administración oral o parenteral

Como se señaló anteriormente, las suspensiones pueden incluir aceites. Tales aceites incluyen, pero no se limitan a, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz y aceite de oliva. La preparación en suspensión también puede contener ésteres de ácidos grasos tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo, glicéridos de ácidos grasos y glicéridos de ácidos grasos acetilados. Las formulaciones de suspensiones pueden incluir alcoholes, tales como, pero sin limitaciones, etanol, alcohol isopropílico, alcohol hexadecílico, glicerol y propilenglicol. También se puede usar éteres, tales como, pero no limitados a los mismos, poli(etilenglicol), hidrocarburos de petróleo tales como aceite mineral y vaselina; y agua, en formulaciones en suspensión.

Para la administración nasal, las formulaciones farmacéuticas y medicamentos pueden ser una pulverización o aerosol que contiene uno o más disolventes apropiados y, opcionalmente, otros compuestos tales como, pero no limitados a los mismos, estabilizantes, agentes antimicrobianos, antioxidantes, modificadores del pH, tensioactivos, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de estos. Un propelente para una formulación de aerosol puede incluir aire comprimido, nitrógeno, dióxido de carbono, o un disolvente basado en hidrocarburo de bajo punto de ebullición.

Las formas de dosificación inyectables generalmente incluyen suspensiones acuosas o suspensiones oleosas, que pueden prepararse usando un dispersante o agente humectante adecuado y un agente de suspensión. Las formas inyectables pueden estar en fase de solución o en forma de una suspensión, que se prepara con un disolvente o diluyente. Los disolventes o vehículos aceptables incluyen agua esterilizada, solución de Ringer, o una solución salina acuosa isotónica. Como alternativa, se pueden usar aceites estériles como disolventes o agentes de suspensión. Preferiblemente, el aceite o ácido graso no es volátil, incluyendo aceites naturales o sintéticos, ácidos grasos, monoglicéridos, diglicéridos o triglicéridos.

Para la inyección, la formulación farmacéutica y/o medicamento también puede ser un polvo adecuado para reconstitución con una solución apropiada como se ha descrito anteriormente. Ejemplos de estos incluyen, pero no se limitan a, secado por congelación, polvos desecados por rotación o desecados por pulverización, polvos amorfos, gránulos, precipitados o partículas. Para la inyección, las formulaciones pueden contener opcionalmente estabilizantes, modificadores del pH, tensioactivos, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de estos.

Para la administración rectal, las formulaciones farmacéuticas y medicamentos pueden estar en la forma de un supositorio, una pomada, un enema, un comprimido o una crema para liberación del compuesto en los intestinos, la flexura sigmoidea y/o el recto. Los supositorios rectales se preparan mezclando uno o más compuestos de la presente invención, o sales o tautómeros farmacéuticamente aceptables del compuesto, con vehículos aceptables, por ejemplo, manteca de cacao o polietilenglicol, que está presente en una fase sólida a temperaturas de almacenamiento normales, y presente en una fase líquida a las temperaturas adecuadas para liberar un fármaco dentro del cuerpo, tal como en el recto. Los aceites también se pueden emplear en la preparación de formulaciones del tipo de gelatina blanda y supositorios. Se pueden usar agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcares relacionados, y gliceroles en la preparación de formulaciones en suspensión que también pueden contener agentes de suspensión, tales como pectinas, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa o carboximetilcelulosa, así como tampones y conservantes.

Las formulaciones de la invención pueden diseñarse de modo que fueran de acción corta, de liberación rápida, de acción prolongada, y de liberación sostenida, como se describe más adelante. Por lo tanto, las formulaciones farmacéuticas también se pueden formular para liberación controlada o para liberación lenta.

Las presentes composiciones pueden comprender también, por ejemplo, micelas o liposomas, o alguna otra forma encapsulada, o pueden administrarse en una forma de liberación prolongada para proporcionar un almacenamiento prolongado y/o efecto de liberación. Por lo tanto, las formulaciones farmacéuticas y medicamentos pueden comprimirse en gránulos o cilindros e implantarse intramuscularmente o subcutáneamente como inyecciones de depósito o como implantes tales como endoprótesis vasculares. Tales implantes pueden emplear materiales inertes conocidos tales como siliconas y polímeros biodegradables.

Las dosificaciones específicas pueden ajustarse dependiendo de las condiciones de la enfermedad, la edad, peso corporal, las condiciones generales de salud, el sexo y la dieta del sujeto, los intervalos de dosis, las vías de administración, la tasa de excreción y las combinaciones de fármacos. Cualquiera de las formas de dosificación anteriores que contienen cantidades eficaces están bien dentro de los límites de la experimentación de rutina y, por lo tanto, bien dentro del alcance de la presente invención.

Además de estas formas de dosificación representativas descritas anteriormente, excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables generalmente son conocidos por los expertos en la técnica, y por lo tanto, están incluidos en la presente invención. Tales excipientes y vehículos se describen, por ejemplo, en "Remingtons Pharmaceutical Sciences" Mack Pub Co., New Jersey (1991), que se incorpora en el presente documento por referencia.

Las formulaciones de liberación modificada adecuadas para los compuestos de vitamina D se describen en la solicitud PCT/US2008/061579, publicada como publicación de la OMPI WO 2008/134512 (6 de noviembre de 2008) y la divulgación de los mismos se incorpora en el presente documento por referencia. Se contempla que tales formulaciones también pueden incluir inhibidores de CYP24 compatibles e inhibidores de CYP23 de acción doble y agonistas de VDR.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustración y no están destinados a limitar la invención.

Los ejemplos a continuación avalan las siguientes conclusiones.

La expresión del gen CYP24 está fuertemente inducida por 1,25-dihidroxitamina D₃ en tejidos de ratas normales y urémicas.

La expresión constitutiva de CYP24 es relativamente más alta en riñones sanos en comparación con otros tejidos. En ratas urémicas, sin embargo, la expresión basal de CYP24 está marcadamente elevada. Esto sugiere que los mecanismos asociados con el estado urémico pueden estar involucrados en la regulación de la expresión de CYP24.

CYP24 se induce de manera significativa mediante 1,25-dihidroxitamina D₃ en glándulas paratiroides de animales urémicos en comparación con los de los animales normales, lo que sugiere que la administración repetida puede conducir a una mayor resistencia.

La expresión de CYP27B1 en ratas urémicas no se correlaciona con los niveles disminuidos de 1,25-dihidroxitamina D₃, lo que sugiere un papel más prominente para CYP24 en la reducción de los niveles de vitamina D en la uremia.

En animales normales, la expresión de CYP24 depende de los niveles de vitamina D; la deficiencia de vitamina D disminuye marcadamente los niveles de expresión CYP24. Los animales urémicos muestran mayores niveles basales de expresión de CYP24 que no cambian en un estado de deficiencia de vitamina D. Esto sugiere que en la uremia, los mecanismos independientes de la vitamina D regulan los niveles de CYP24. Esto puede tener un impacto en el estado de vitamina D en la uremia.

La expresión basal elevada de CYP24 en el riñón urémico puede ser un mecanismo importante que contribuye a la deficiencia subyacente de 25(OH)D₃ y 1,25-hidroxitamina D₃ y la resistencia a la terapia de reemplazo con hormona de vitamina D. Los compuestos que inhiben CYP24 pueden ser útiles en el mantenimiento del estado de la vitamina D y la superación de la resistencia a la terapia de CYP24.

FGF23 sinergia con 1,25-hidroxitamina D para inducir la producción de ARN CYP24. En una situación urémica, un nivel alto de FGF23 podría contribuir a elevar aún más los niveles de CYP24, que hace que un paciente sea resistente al tratamiento con vitamina D.

Los niveles de CYP24 disminuyen en animales con deficiencia de vitamina D y aumentan a niveles normales o mayores después del tratamiento con 25-hidroxitamina D.

Los niveles de CYP24 no cambian en ratas urémicas con deficiencia de vitamina D y no aumentan después del tratamiento con 25-hidroxitamina D, lo que sugiere una pérdida de control de la vitamina D en ratas urémicas.

En ratas urémicas con deficiencia de vitamina C, los niveles de ARN de CYP24 son elevados en comparación con los animales con deficiencia de vitamina D. Esto puede explicar por qué, tras la administración de 25-hidroxitamina D₃ durante dos semanas, los niveles de 1,25-dihidroxitamina D₃ son más bajos en ratas urémicas con deficiencia de vitamina D en comparación con los animales con deficiencia de vitamina D.

Ejemplo 1

Modelo animal de deficiencia de vitamina D

Para obtener un modelo animal de deficiencia de vitamina D, se alimentó a las ratas con una dieta rica en adenina. Después de 7 días, se observaron niveles elevados de hormona paratiroidea (PTH) mediante un kit de Elisa de PTH intacta (iPTH) en animales alimentados con dieta rica en adenina en comparación con los animales alimentados con la dieta control y, después de 29 días, se había desarrollado hiperparatiroidismo secundario en animales alimentados con adenina, pero no en los animales que recibieron la dieta de control (Fig. 1). El nivel de TPI se redujo significativamente mediante el tratamiento de los animales alimentados con de adenina con compuestos de vitamina D. Como se muestra en la Figura 2, el nivel de iPTH en los animales alimentados con adenina fue restaurado a un nivel similar al de los animales alimentados con control mediante el tratamiento de los animales alimentados con

adenina con 1,25-(OH)₂-D₃ (calcitriol o 1,25-dihidroxitamina D₃), 25-OH-D₃ (calcidiol o 25-hidroxitamina D₃), o 1,25-(OH)₂-D₂ (1, 25-dihidroxitamina D₂).

5 El estado de vitamina D de los animales alimentados con adenina y control se evaluó midiendo el nivel de 1,25-(OH)₂-D₃ (calcitriol o 1,25-dihidroxitamina D₃), la forma activa de la vitamina D, por espectrometría de masas. Los animales alimentados con adenina mostraron una reducción en el estado de la hormona de la vitamina D en comparación con los animales alimentados con una dieta de control (Figura 3). El estado de la vitamina D en los animales alimentados con adenina se restableció al nivel de los animales alimentados con la dieta control mediante el tratamiento de los animales alimentados con adenina con 1,25-(OH)₂-D₃. En contraste, el tratamiento de los animales alimentados con adenina con 25-OH-D₃ (calcidiol o 25-hidroxitamina D₃) o 1,25-(OH)₂-D₂ (1,25-dihidroxitamina D₂) no afectó significativamente a los niveles de 1,25-(OH)₂-D₃ de estos animales (Figura 3).

Ejemplo 2

15 Expresión de CYP24 en la deficiencia de vitamina D

Para determinar la relación entre la deficiencia de vitamina D y el nivel de CYP24, se midió la expresión de mediante cRT-PCR en ratas alimentadas con adenina y los animales alimentados con la dieta control. En el tejido renal de animales alimentados con adenina, la expresión de CYP24 era anormalmente elevada, de aproximadamente 7 veces más, en comparación con el tejido renal de los animales alimentados con la dieta control (Figura 4). El tratamiento de animales alimentados con adenina con compuestos de vitamina D indujo más CYP24. Como se muestra en la Figura 4, el tratamiento de las ratas alimentadas con adenina con 1,25-(OH)₂-D₃ (calcitriol o 1,25-dihidroxitamina D₃), 25-OH-D₃ (calcidiol o 25-hidroxitamina D₃) o 1,25-(OH)₂-D₂ (1, 25-dihidroxitamina D₂) dio como resultado una elevación de 2 veces 25 veces la actividad de expresión de CYP24. En el tejido de glándula paratiroidea de animales alimentados con adenina, la actividad de la expresión de CYP24 era anormalmente elevada, de aproximadamente 3 veces más, en comparación con el tejido de glándula paratiroidea de los animales alimentados con la dieta control (Figura 5). El tratamiento de animales alimentados con adenina con compuestos de vitamina D indujo drásticamente CYP24. Como se muestra en la Figura 5, el tratamiento de las ratas alimentadas con adenina con 1,25-(OH)₂-D₃ (calcitriol o 1,25-dihidroxitamina D₃), 25-OH-D₃ (calcidiol o 25-hidroxitamina D₃) o 1,25-(OH)₂-D₂ (1, 14.000-dihidroxitamina D₂) dio como resultado una elevación de 50 veces 25 veces la actividad de expresión de CYP24.

Ejemplo 3

35 Expresión de FGF23 en la deficiencia de vitamina D

Para determinar la relación entre la deficiencia de vitamina D y el nivel del factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23), el nivel de FGF23 en suero se midió en las ratas alimentadas con adenina y los animales alimentados con la dieta control. En los animales alimentados con adenina, el nivel de FGF23 en suero fue anormalmente elevado al menos 53 veces más que en los animales alimentados con dieta control (Figura 6). Los animales alimentados con adenina tratados con compuestos de vitamina D también mostraron niveles elevados de FGF23. Como se muestra en la Figura 6, el tratamiento de las ratas alimentadas con adenina con 1,25-(OH)₂-D₃ (calcitriol o 1,25-dihidroxitamina D₃), 25-OH-D₃ (calcidiol o 25-hidroxitamina D₃) o 1,25-(OH)₂-D₂ (1, 25-dihidroxitamina D₂) dio como resultado una elevación de al menos 74 veces los niveles de expresión de actividad de expresión de FGF23 en comparación con los animales alimentados con la dieta control.

Los niveles de FGF23 y osteocalcina, un biomarcador para la formación de hueso, se midieron en el tejido renal de ratas alimentadas con adenina y los animales alimentados con la dieta control. Los niveles de FGF23 estaban elevados, aproximadamente por 55 veces, y la osteocalcina estaba elevada, por aproximadamente 1,5 veces, en los animales alimentados con adenina en comparación con los animales alimentados con la dieta control (Figura 7).

Ejemplo 4

55 Expresión de CYP24 en el tratamiento con 25-Hidroxitamina

La Figura 8 muestra un gráfico de la inducción relativa de CYP24 en ratas tratadas con vitamina D (25-hidroxitamina D₂ y 25-hidroxitamina D₃) durante 2 semanas. A ratas normales se les administró por vía intravenosa 16 µg/kg de 25-hidroxitamina D₂, 25-hidroxitamina D₃ y un vehículo de control durante 2 semanas. Se extrajo sangre y la expresión de CYP24 se midió mediante PCR en tiempo real.

Ejemplo 5

El efecto de 5Z,7E,16Z,23E)-(1S,3R)-25-nor-25-t-butilsulfonil-9,10-seco-5,7,10(19),16,23-colestapentaeno-1,3-diol sobre los niveles de 25-hidroxitamina D se evaluó en sujetos humanos. Se administró a los sujetos placebo o el compuesto los días 1, 3, 5, 8 y 10. Veinticuatro horas después de la última dosis del compuesto, se midió el nivel de 25-hidroxitamina D. El porcentaje de cambio en los niveles séricos de 25-hidroxitamina D se muestra en la

Figura 9 ($p = 0,1$ para 90 mcg y 180 mcg).

Ejemplo 6

5 Se trató a ratas Sprague-Dawley i.v. diariamente con vehículo o con 0,5 mcg/kg de 1,25-hidroxivitamina D₃ durante 1 semana. Los órganos se extrajeron 24 horas después de la última dosificación. La expresión del gen CYP24 se determinó mediante PCR en tiempo real. Los resultados se muestran en la Figura 10.

10 Se alimentó a las ratas Sprague-Dawley con una dieta estándar (normal) o una dieta inductora de uremia que contiene 0,75 % de adenina (urémicas) durante 4 semanas. Se trató a los animales i.v. diariamente con vehículo o con 0,5 mcg/kg de 1,25-hidroxivitamina D₃ durante 7 días. Los órganos se extrajeron 24 horas después de la última dosificación. La expresión del gen CYP24 se determinó mediante PCR en tiempo real y se normalizó conforme a los niveles de GAPDH. Los valores relativos de expresión relativa se normalizan para el grupo tratado con vehículo (expresión relativa = 1). Los resultados se muestran en la Figura 11.

15 Las figuras 10 y 11 muestran que la expresión basal de CYP24 es significativamente elevada en el riñón (Figura 10), pero no en la glándula paratiroides (Figura 11), en la rata urémica en comparación con la rata normal. Sin embargo, la expresión de CYP24 inducida por 1,25-dihidroxivitamina D₃ (1 α , 25(OH)₂D₃) es notablemente mayor en la glándula paratiroidea de los animales urémicos en comparación con los animales normales. "*" Denota una diferencia significativa en la expresión de CYP24 entre el tratamiento con vehículo y la 1,25-dihidroxivitamina D₃ en ratas normales y urémicas. "****" representa una diferencia significativa entre las ratas normales y urémicas tratadas con vehículo. "+" indica una diferencia significativa en los niveles de inducción de CYP24 entre las ratas normales y urémicas tratadas con 1,25-dihidroxivitamina D₃. Significación se fijó en un valor de corte de $p < 0,05$. Los datos se presentan como media \pm SEM. Los números encima de cada barra significan la inducción relativa con respecto al vehículo normal.

Ejemplo 7

30 La expresión CYP24 y CYP27B1 se midió utilizando el mismo protocolo descrito anteriormente en el Ejemplo 6 con respecto a la Figura 11. Los niveles séricos de 25(OH)D₃ y 1,25-hidroxivitamina D₃ se midieron mediante CL-EM. Los niveles de PTH en suero se midieron mediante ELISA IMMUTOPICS (San Clemente, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras de suero se enriquecieron con [26,27-²H₆] 25(OH)D₃ o [25,26-²H₆] 1,25-hidroxivitamina D₃ y se disolvieron en acetonitrilo para servir como patrón interno. La 1,25-dihidroxivitamina D₃ o 25(OH)D₃ y los patrones internos se extrajeron del suero usando cartuchos Accubond II ODS-C18 100 mg, 1 ml SPE (Agilent Technologies). Las fracciones recogidas se evaporaron hasta sequedad bajo una corriente constante de gas nitrógeno, y los residuos se reconstituyeron en 50 μ l de metanol/H₂O (80/20; v/v) y se analizaron mediante CL-EM/EM (espectrómetro de masas Waters Alliance HPLC-Waters Quattro Ultima). Los valores relativos de expresión relativa se normalizan para el grupo tratado con vehículo (expresión relativa = 1). Los resultados se muestran en la Figura 12.

40 La Figura 12 muestra que el aumento de la expresión basal de CYP24 basal, en ausencia de cambios en CYP27B1, puede contribuir a niveles más bajos de 1,25-dihidroxivitamina D₃ en ratas urémicas. El tratamiento con 1,25-dihidroxivitamina D₃ causa una reducción de los niveles séricos de 25- (OH)D₃. El tratamiento con 1,25-dihidroxivitamina D₃ causa una reducción de la PTH, pero también induce drásticamente la expresión de CYP24. El asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos normales y urémicos para CYP27B1 (*) y CYP24 (**). En el panel superior, (*) indica una diferencia significativa en los niveles de vitamina D entre las ratas normales y las urémicas. La significación estadística se determinó a través de una prueba *t* de student independiente con un valor *p* de corte de $< 0,05$. Los datos se presentan como la media \pm SEM.

50 Ejemplo 8

La deficiencia de vitamina D se indujo en ratas Sprague-Dawley mediante la alimentación de una dieta carente de vitamina D durante 6 semanas. Se alimentó a las ratas normales con una dieta estándar que contenía vitamina D. La uremia se indujo mediante la administración oral (sonda) de la solución de adenina al 0,2 % durante las 2 últimas semanas. Las ratas no urémicas de control recibieron vehículo mediante sonda oral. Los sueros y los órganos se recogieron 24 horas después de la última dosis de adenina. La expresión génica se determinó mediante PCR en tiempo real. La medición de los niveles séricos de 25(OH)D₃ y 1,25-hidroxivitamina D₃ se detalla anteriormente con respecto al Ejemplo 7. Los resultados se muestran en la Figura 13.

60 La figura 13 muestra que el aumento de la expresión basal de CYP24 no depende de los niveles de metabolitos de vitamina D en las ratas urémicas. "*" Denota una diferencia significativa entre los grupos con respecto a lo normal sin uremia. "****" Representa una diferencia significativa entre la dieta CYP27B1 normal y la CYP27B1 con deficiencia de vitamina D (Def. VD). La significación estadística se determinó a través de una prueba *t* de student independiente con un valor *p* de corte de $< 0,05$. Los datos se presentan como la media \pm SEM. Los niveles no detectables se designan "ND".

Ejemplo 9

Se sembraron células HEK a 25.000 células por pocillo (placa de 24 pocillos) y se incubaron con 1,25-dihidroxitamina D₃ (10 nM) sola o con un inhibidor de CYP24 (MK-24 (S) -S (O) (NH) Ph-1, véase la patente de Estados Unidos n.º 7.101.865, compuesto 1 (a)) (10 nM) durante 6, 24, 48 y 72 horas. Las células se recogieron y el ARN se preparó usando el reactivo TRIZOL®. El CYP24 se cuantificó mediante PCR en tiempo real. Los resultados se muestran en la Figura 14.

Los resultados muestran que la inducción CYP24 está marcadamente extendida mediante 1,25-dihidroxitamina D₃ en presencia de inhibidor de CYP24 MK-24 (S)-S(O)(NH)-Ph-1.

Ejemplo 10

Las células HEK se transfirieron a placas de 96 pocillos a una densidad de 2.000 células/pocillo. Después de 2 días de crecimiento en placas de 96 pocillos, las células fueron tratadas con 1,25-dihidroxitamina D₃ a las concentraciones finales 10⁻⁶-10⁻¹¹ M en combinación con el compuesto MK-24 (S)-S(O) (NH) Ph-1 con la concentración final variable de 0, 1, 10 y 50 nM. Después del tratamiento durante la noche se añadió [³H]-timidina a las células, 0,2 mCi/pocillo en medio KGM durante 16 horas. La incorporación de radiactividad se contó usando un contador de centelleo después de la adición de 25 ml de líquido de centelleo. Los resultados se muestran en la Figura 15. Los datos se representaron como una incorporación de timidina en cpm dependiendo de la concentración de 1,25-hidroxitamina D₃. Cada punto de datos representa al menos 4 ensayos independientes.

Los resultados muestran que la inhibición de la actividad de CYP24 aumenta los efectos antiproliferativos de la 1,25-dihidroxitamina D₃ en las células HEK cultivadas aproximadamente 3 órdenes de magnitud.

Ejemplo 11

Las células HPK1a-ras se trataron con 0, 1, 10, y 100 nM de 1,25-dihidroxitamina D₃ (calcitriol), con o sin 100 ng/ml de FGF23, y la expresión del ARN de CYP24 se midió después de 8 horas. Los resultados muestran que la presencia de FGF23 sinergiza con la 1,25-dihidroxitamina D₃ para inducir la producción de ARN de CYP24 (Figura 16).

Ejemplo 12

Se alimentaron ratas Sprague Dawley con una dieta normal o una dieta deficiente en vitamina D durante un período de cuatro semanas. A continuación se inyectó diariamente a los animales dos semanas 25-hidroxitamina D₃ a 0,6, 3, o 18 mcg/kg o vehículo de acuerdo con la lo indicado en el eje en la figura 17. Los riñones se extrajeron 24 horas después de la última inyección y los niveles de ARNm de CYP24 se midieron mediante PCR en tiempo real. Los resultados se muestran en la Figura 17.

Ejemplo 13

Se alimentaron ratas Sprague Dawley con una dieta normal (grupo de vehículo adenina) o una dieta deficiente en vitamina D (def. VD/grupo vehículo de adenina) durante un período de 4 semanas. Después de este tratamiento, se administró a los animales por vía oral, diariamente durante dos semanas, 100 mg de adenina. A continuación se inyectó diariamente a los animales durante otras dos semanas 25-hidroxitamina D₃ a 0,6, 3, o 18 mcg/kg o vehículo de acuerdo con la lo indicado en el eje en la figura 18. Los riñones se extrajeron 24 horas después de la última inyección y los niveles de ARNm de CYP24 se midieron mediante PCR en tiempo real. Los resultados se muestran en la Figura 18.

Ejemplo 14

La Figura 19 muestra los niveles de 1,25-dihidroxitamina D₃ en ratas urémicas con deficiencia de vitamina D en comparación con ratas con deficiencia de vitamina D a las que se administraron 6 o 18 mcg/kg de 25-hidroxitamina D durante dos semanas.

La descripción anterior se proporciona en aras de la claridad de la comprensión solamente y no debe entenderse que hay limitaciones innecesarias de la misma, dado que modificaciones dentro del alcance de la invención pueden ser evidentes para los expertos en la técnica.

A lo largo de la memoria descriptiva, en la que se describe que las composiciones incluyen componentes o materiales, se contempla que las composiciones también pueden consistir esencialmente en, o consistir en, cualquier combinación de los componentes o materiales citados, a menos que se describa lo contrario.

La práctica de un método divulgado en el presente documento y las etapas individuales del mismo pueden llevarse a cabo manualmente y/o con la ayuda de equipos electrónicos. Aunque se han descrito procesos con referencia a

realizaciones particulares, un experto en la materia apreciará fácilmente que pueden usarse otras realizaciones de los actos asociados con los métodos. Por ejemplo, el orden de varias de las etapas puede modificarse sin apartarse del alcance del método, a menos que se describa lo contrario. Además, algunos de los pasos individuales pueden combinarse, omitirse, o subdividirse en etapas adicionales.

5 En las jurisdicciones que prohíben las patentes de métodos que se practiquen en el cuerpo humano, el significado de "administración" de una composición a un sujeto humano se limitará a la prescripción de una sustancia controlada que un sujeto humano se autoadministre mediante cualquier técnica (por ejemplo, por vía oral, inhalación, aplicación tópica, por inyección, inserción, etc.). Se pretende la interpretación razonable más amplia que sea consistente con
10 las leyes o reglamentos que definen la materia patentable. En las jurisdicciones que no prohíben las patentes de métodos que se practican en el cuerpo humano, la "administración" de las composiciones incluye tanto los métodos practicados en el cuerpo humano como también las actividades antes mencionadas.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica para su uso en un método de tratamiento o prevención de la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo, en un paciente que tiene enfermedad renal crónica, definiéndose la deficiencia por un nivel sérico total de 25-hidroxivitamina D por debajo de 30 ng/ml, comprendiendo la composición una cantidad eficaz de un inhibidor de CYP24 seleccionado del grupo que consiste en (R)-N-(2-(1H-imidazol-1-il)-2-feniletil)-4'-clorobifenil-4-carboxamida, ketoconazol, metronidazol, clometiazol, itraconazol, fluconazol, compuestos de 23,23-difluoro-24-sulfona vitamina D₃, compuestos de 25-sulfona vitamina D₃, compuestos de 24,24-difluoro-25-sulfona vitamina D₃, compuestos de 24-sulfoximina vitamina D₃, compuestos de 16-eno-25-oxima vitamina D₃, compuestos de 16-eno-25-oxima éter vitamina D₃, compuestos de 24-sulfona vitamina D₃, compuestos de 24,24-difluoro vitamina D₃ y combinaciones de los mismos.
2. La formulación farmacéutica para el uso de la reivindicación 1, que comprende además una cantidad eficaz de 25-hidroxivitamina D₃.
3. Uso de un inhibidor de CYP24, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo, en un paciente que tiene enfermedad renal crónica, definiéndose la deficiencia por un nivel sérico total de 25-hidroxivitamina D por debajo de 30 ng/ml, en el que el inhibidor de CYP24 es un inhibidor de CYP24 puro o un inhibidor de CYP24 de doble acción y agonista del receptor de vitamina D.
4. Un inhibidor de CYP24 para su uso en el tratamiento o la prevención de la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo, en un paciente que tiene enfermedad renal crónica, definiéndose la deficiencia por un nivel sérico total de 25-hidroxivitamina D por debajo de 30 ng/ml, en el que el inhibidor de CYP24 es un inhibidor de CYP24 puro o un inhibidor de CYP24 de doble acción y agonista del receptor de vitamina D.
5. El inhibidor para su uso de la reivindicación 4, en el que el inhibidor de CYP24 se utiliza para tratar a un paciente que tiene enfermedad renal crónica, en un método que comprende las etapas de:
- medir en el paciente la expresión y/o actividad de CYP24 o de un sustituto indicativo de las mismas; y administrar al paciente el inhibidor de CYP24 en respuesta a la expresión y/o actividad anormalmente elevada de CYP24.
6. El inhibidor para su uso de la reivindicación 5, en el que el método comprende además la obtención de una muestra de tejido, sangre o células del paciente y el análisis de la muestra para determinar la expresión y/o la actividad de CYP24, o de un sustituto indicativo de las mismas.
7. El inhibidor para su uso de la reivindicación 5 o 6 en el que el paciente no tiene cáncer.
8. El inhibidor para su uso de la reivindicación 5 o 6, en el que el método comprende además medir los niveles de 25-hidroxivitamina D del paciente y el tratamiento de la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo mediante la administración del inhibidor de CYP24 a un paciente humano con deficiencia de vitamina D que tiene enfermedad renal crónica, definidos por el suero total de 25-hidroxivitamina D inferior a 30 ng/ml.
9. El inhibidor para su uso de la reivindicación 8, en el que el método comprende además:
- (a) administrar al paciente una o más de prehormonas, prohormonas y análogos de vitamina D de cualquiera de los anteriores, en el que dicha terapia comprende la administración de un compuesto seleccionado de colecalciferol, ergocalciferol, 25-hidroxivitamina D₂, 25-hidroxivitamina D₃ y combinaciones de los mismos, o
- b) administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de calcifediol (25-hidroxivitamina D₃), Para restaurar el nivel sérico total de 25-hidroxivitamina D del paciente a al menos 30 ng/ml.
10. El inhibidor para su uso de la reivindicación 5 o 6, en el que el método comprende además medir el nivel sérico total de 25-hidroxivitamina D e inhibir y/o prevenir la deficiencia de vitamina D relacionada con el catabolismo mediante la administración del inhibidor de CYP24 a un paciente que está repleto de vitamina D, definiéndose por un nivel sérico total de 25-hidroxivitamina D en o por encima de 30 ng/ml, teniendo dicho paciente enfermedad renal crónica.
11. El inhibidor para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en el que la enfermedad renal crónica es
- (a) estadio 1 o estadio 2, o
- (b) estadio 3 o estadio 4.

12. El inhibidor para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en el que el nivel de hormona paratiroidea del paciente está por encima del intervalo objetivo para el estadio de la enfermedad renal crónica del paciente.
- 5 13. El inhibidor para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que el paciente tiene hiperparatiroidismo.
14. El inhibidor para su uso de la reivindicación 5 o 6, en el que el método comprende, además, evitar la terapia con vitamina D activa o reducir el nivel de o la omisión de la terapia con vitamina D activa si el paciente está sometido a terapia con vitamina D activa, en el que la terapia con vitamina D activa es la terapia que utiliza un compuesto de vitamina D que está hidroxilado en al menos la posición 1-alfa.
- 10 15. El inhibidor para uso de la reivindicación 14, en el que el método comprende además la administración al paciente de la prohormona de la vitamina D 25-hidroxivitamina, en una cantidad suficiente para aumentar los niveles de 1,25-dihidroxivitamina D.
- 15 16. El inhibidor para su uso de la reivindicación 5 o 6, en el que dicha expresión y/o actividad anormalmente elevada de CYP24 es:
- 20 (a) al menos 2 veces mayor que expresión y/o actividad normal de CYP24 o,
 (b) al menos 3 veces mayor que expresión y/o actividad normal de CYP24; o
 (c) al menos 4 veces mayor que expresión y/o actividad normal de CYP24.
17. El inhibidor para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 16, en el que el método comprende medir el nivel de FGF23 en el paciente como un sustituto del nivel de expresión y/o de la actividad de CYP24, en el que
- 25 (a) un nivel de FGF23 mayor que el valor superior del intervalo normal indica la expresión CYP24 anormalmente elevada; o
 (b) un nivel de FGF23 al menos dos veces mayor que el valor superior del intervalo normal indica la expresión CYP24 anormalmente elevada.
- 30 18. El inhibidor para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 16, en el que el método comprende la medición de la concentración de uno o más subproductos catabólicos de CYP24 en el suero u otro fluido corporal como un sustituto de la actividad de CYP24.
- 35 19. El inhibidor para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el método comprende además la medición de la concentración de uno o más precursores para los uno o más subproductos catabólicos de CYP24 en el suero u otro fluido corporal y el cálculo de una relación de concentraciones de uno o más subproductos catabólicos de CYP24 a concentraciones en suero de uno o más precursores correspondientes como sustitutos de la actividad de CYP24.
- 40 20. El inhibidor para uso de la reivindicación 18 o 19, en el que:
- 45 (i) los subproductos catabólicos de CYP24 incluyen uno o ambos de 24,25-dihidroxivitamina D y 1,24,25-trihidroxivitamina D; o
 (ii) los subproductos catabólicos de CYP24 incluyen uno o ambos de 24,25-dihidroxivitamina D y 1,24,25-trihidroxivitamina D; y la medición de la actividad de CYP24 comprende medir una o más relaciones seleccionadas del grupo que consiste de 24,25-dihidroxivitamina D a 25-hidroxivitamina D y 1,24,25-trihidroxivitamina D a 1,25-dihidroxivitamina D; o
 50 (iii) los subproductos catabólicos de CYP24 incluyen los subproductos catabólicos 24-hidroxilados y/o 23-hidroxilados de uno o más miembros seleccionados del grupo que consiste en paricalcitol, doxercalciferol, 22-oxacalcitriol, dihidrotaquisterol, y 26,26,26, 27,27,27-hexafluorocalcitril (falecalcitril).
21. El inhibidor para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en el que la medición sigue la administración aguda o crónica de un sustrato de CYP24.
- 55 22. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el inhibidor de CYP se selecciona del grupo que consiste en: (5Z,7E,16Z,23E)-(1S,3R)-25-nor-25-t-butilsulfonil-9,10-seco-5,7,10(19),16,23-colestapentaeno-1,3-diol; (5Z,7E)-(1S,3R)-24-(S)-fenilsulfoximina-25-nor-9,10-seco-5,7,10(19)-colestatrieno-1,3-diol; (5Z,7E,16Z,23E)-25-nor-25-t-butilsulfonil-9,10-seco-5,7,10(19),16,23-colestapentaeno-1,3β-diol; and (5Z,7E,16Z)-(1S,3R)-25-(O-allyl)-N-t-butiloxima-9,10-seco-5,7,10(19),16-colestatetraeno-1,3β-diol.
- 60

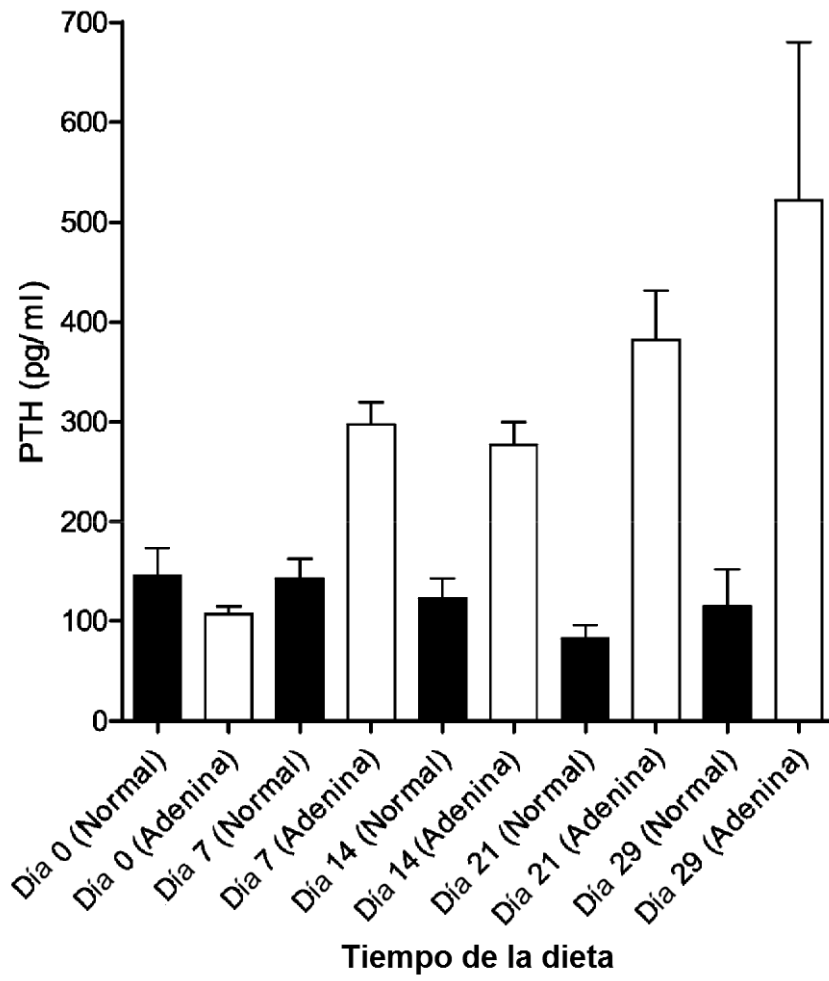


FIG. 1

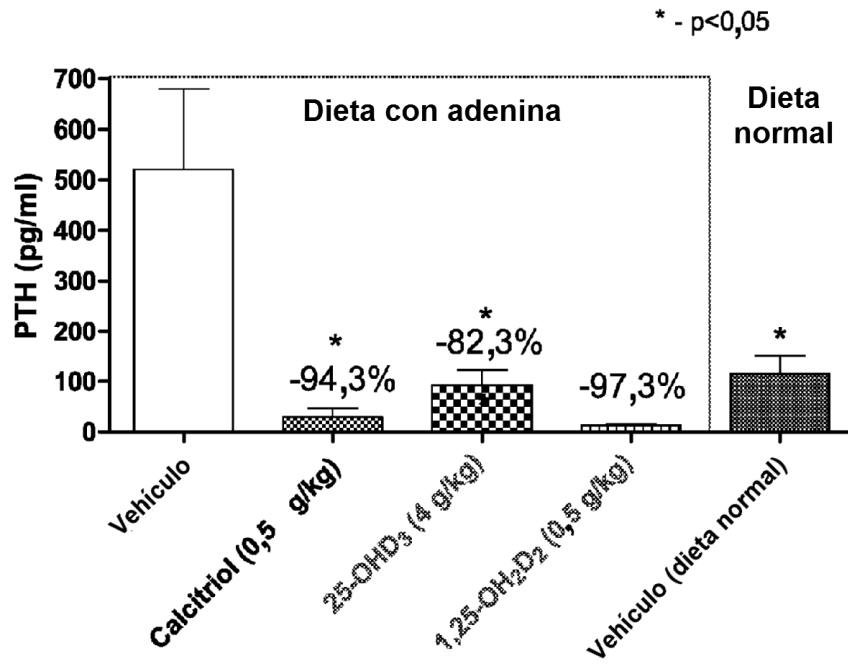


FIG. 2

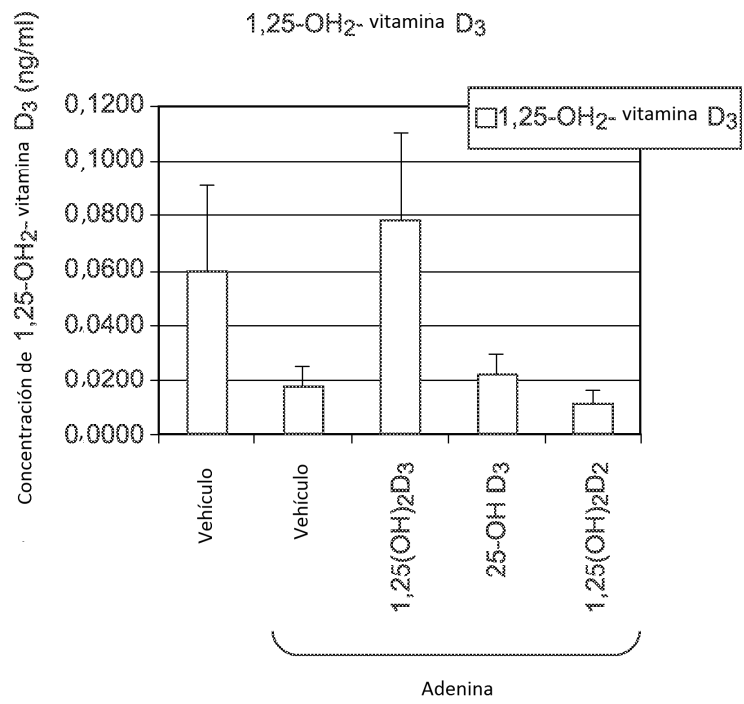
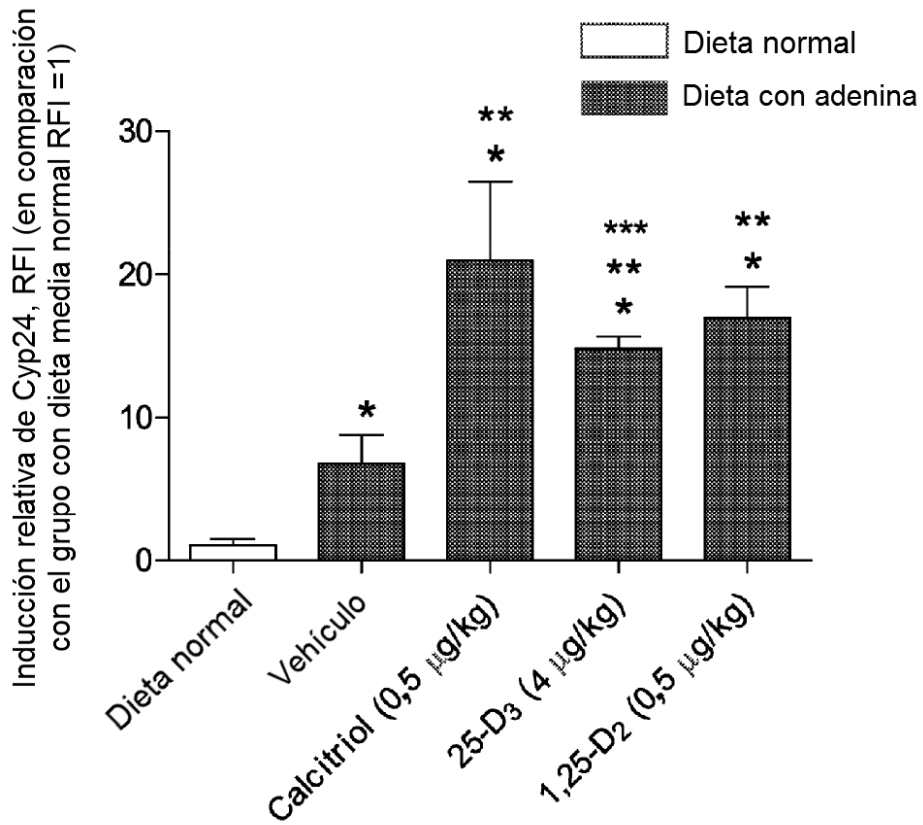


FIG. 3



* p<0,05 en comparación con el grupo de dieta normal
 ** p<0,05 en comparación con el grupo de vehículo
 *** p<0,05 en comparación con el grupo de calcitriol

FIG. 4

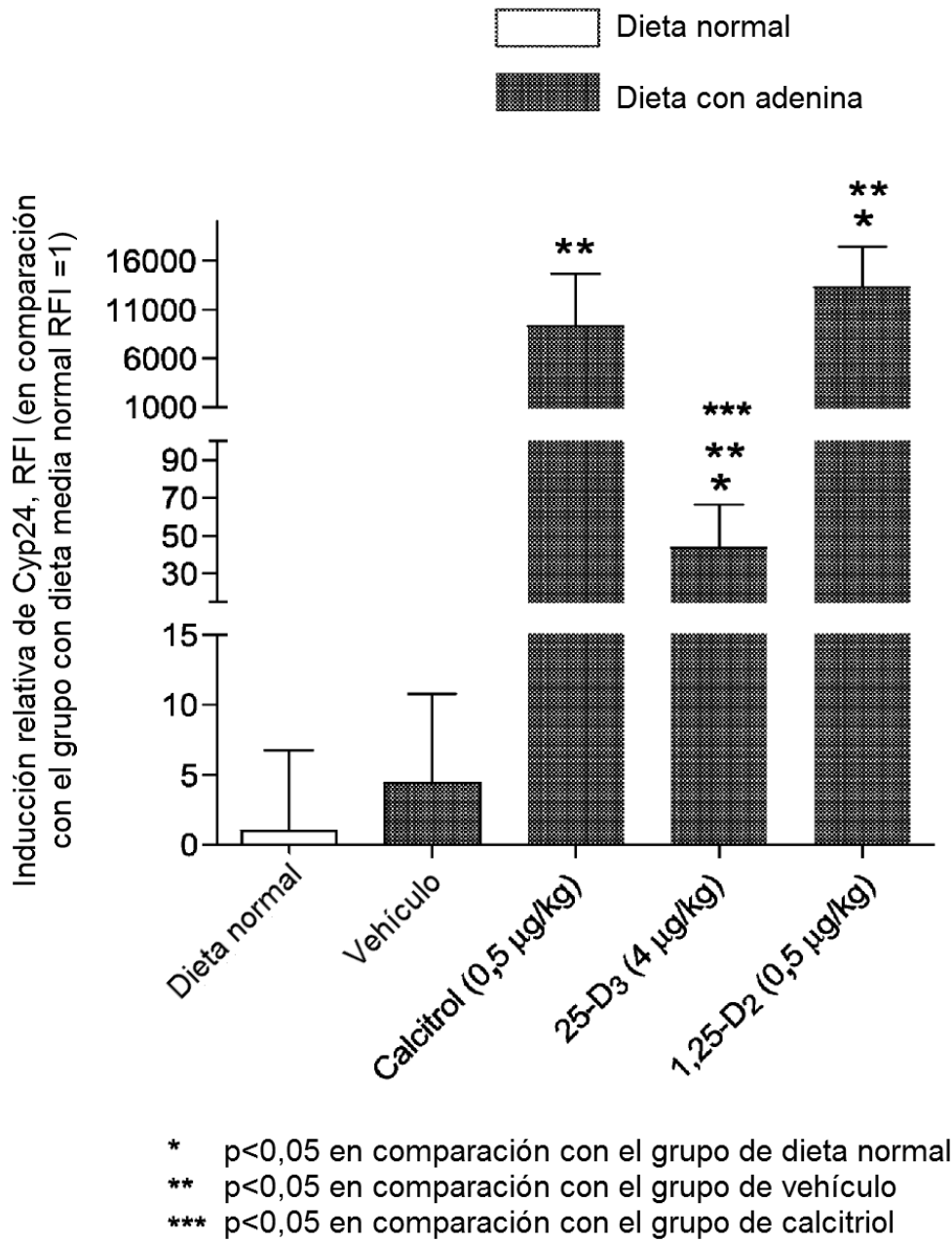


FIG. 5

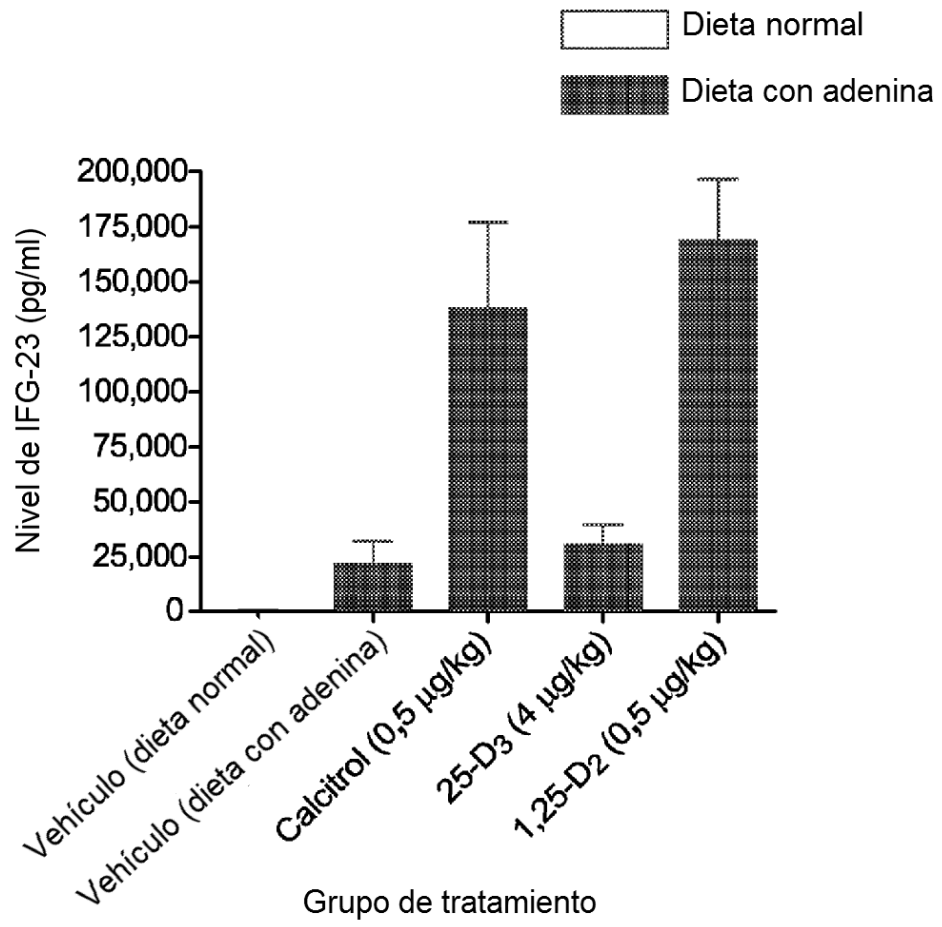


FIG. 6

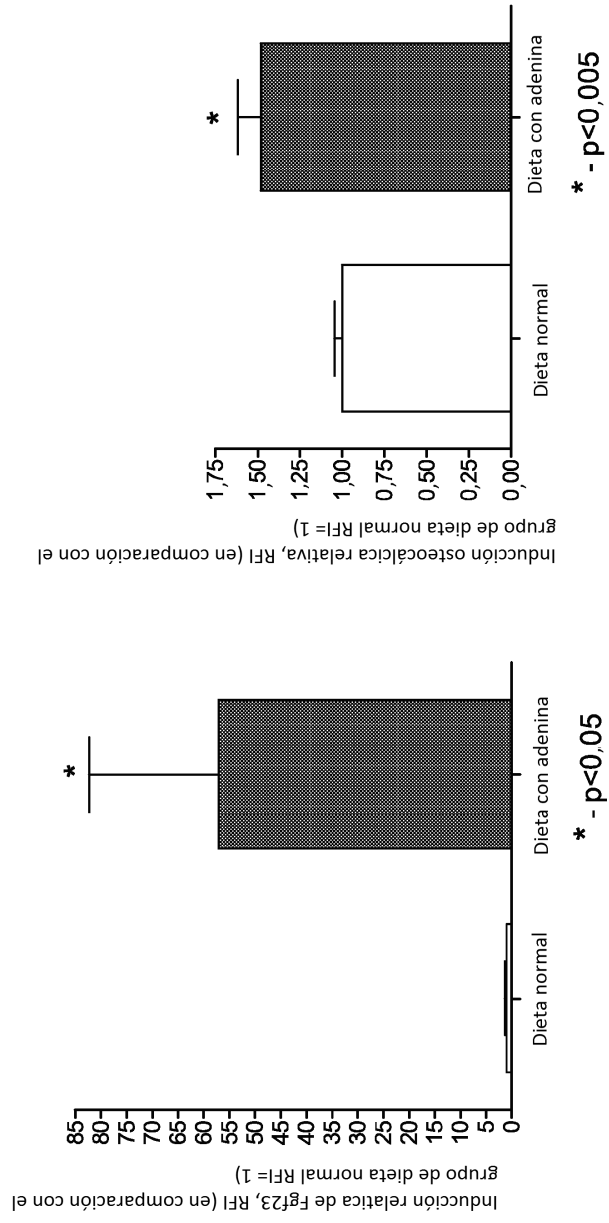


FIG. 7

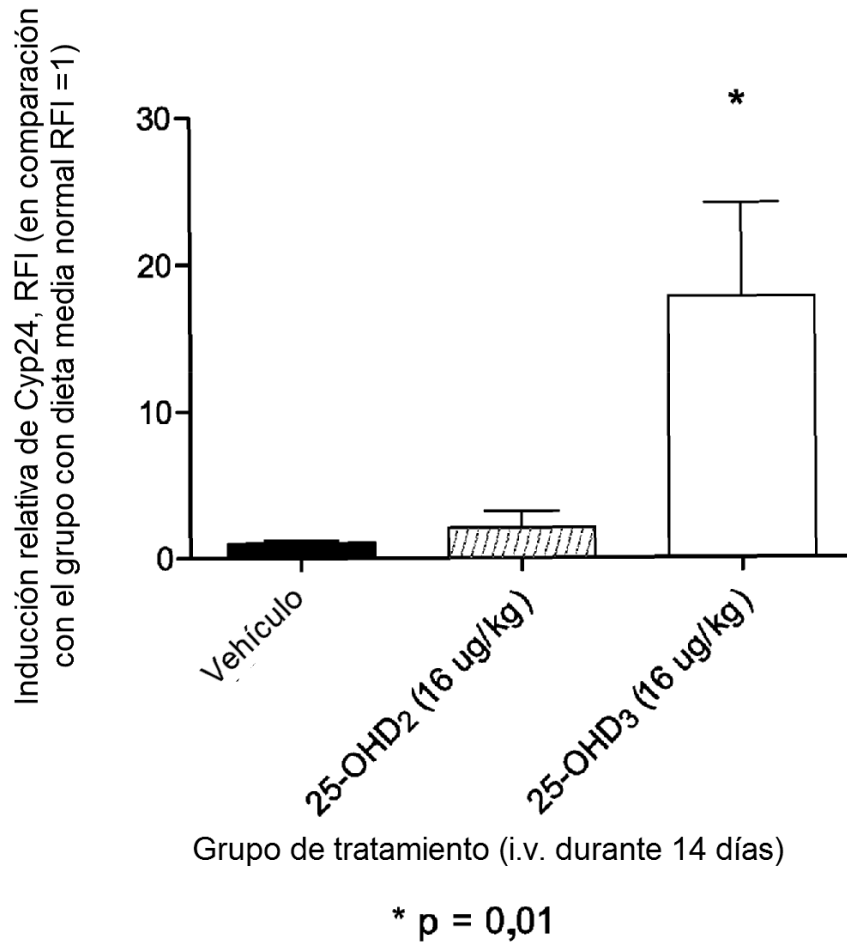


FIG. 8

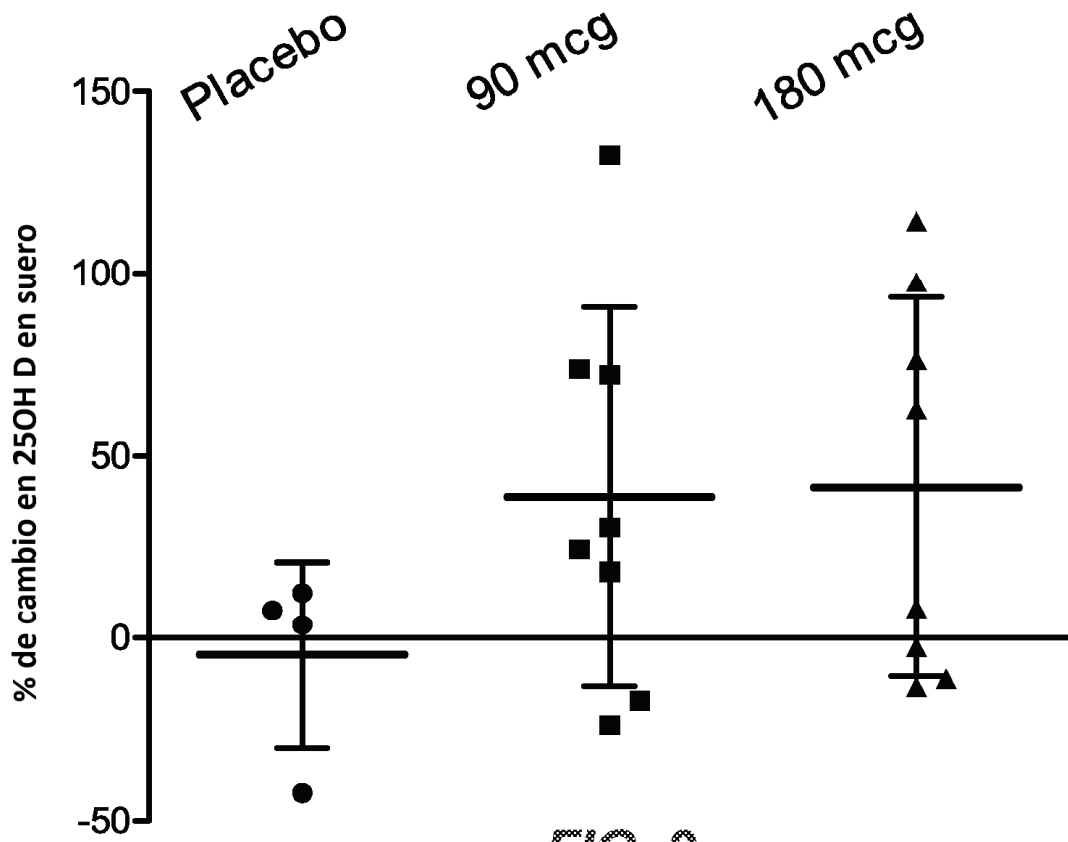
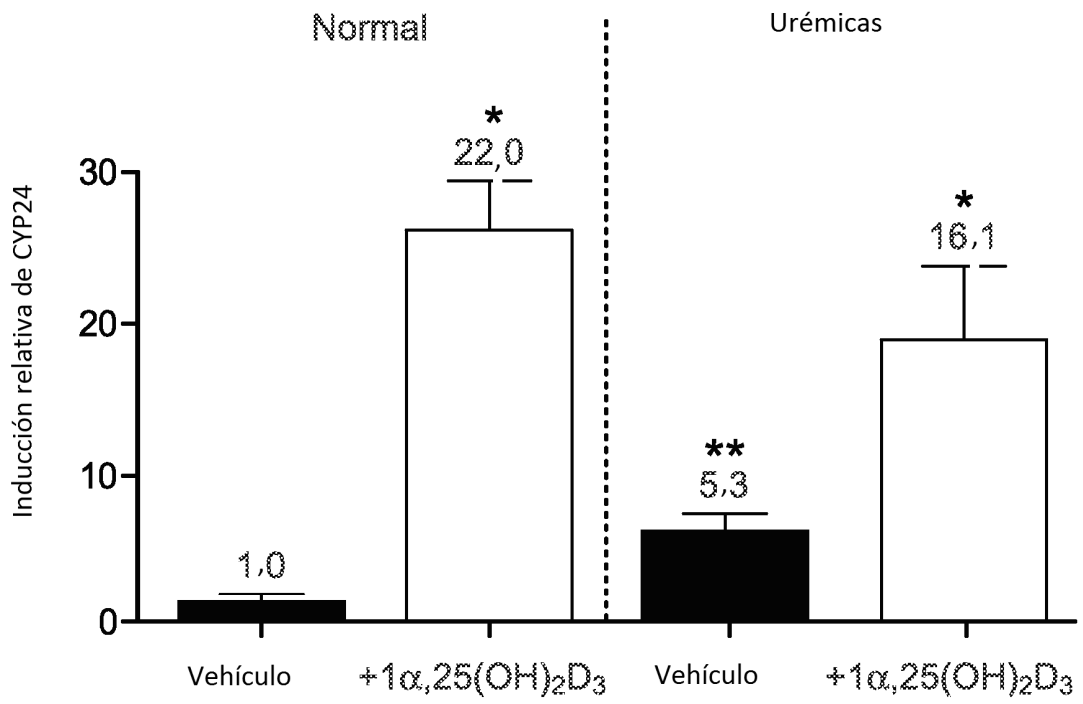


FIG. 9

**FIG. 10**

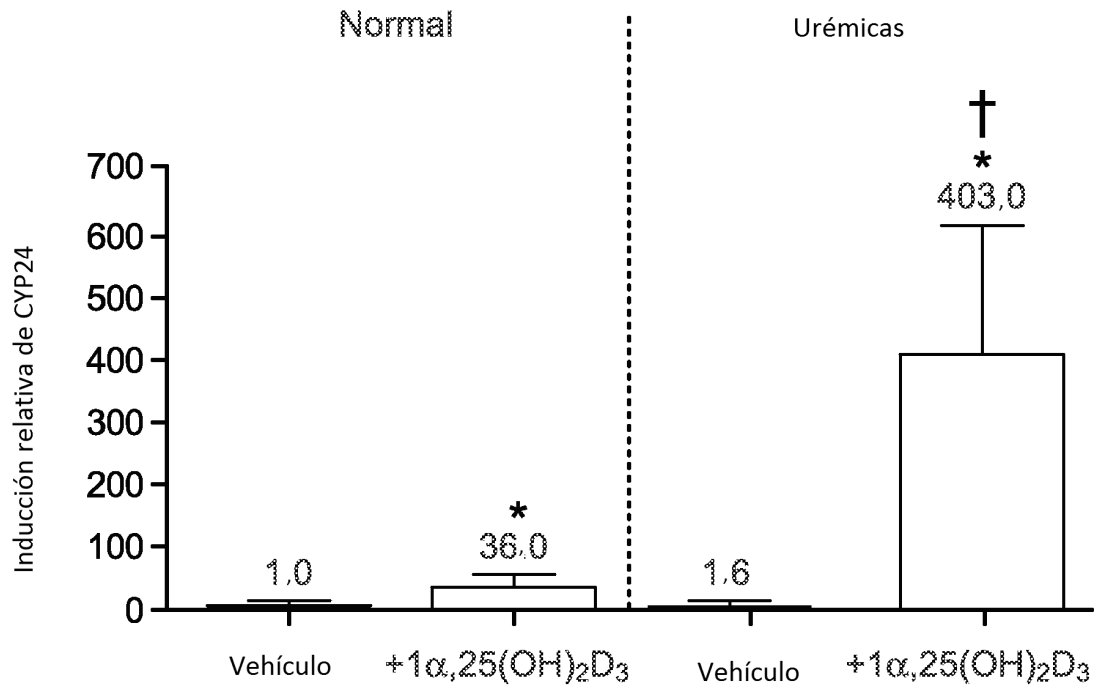


FIG. 11

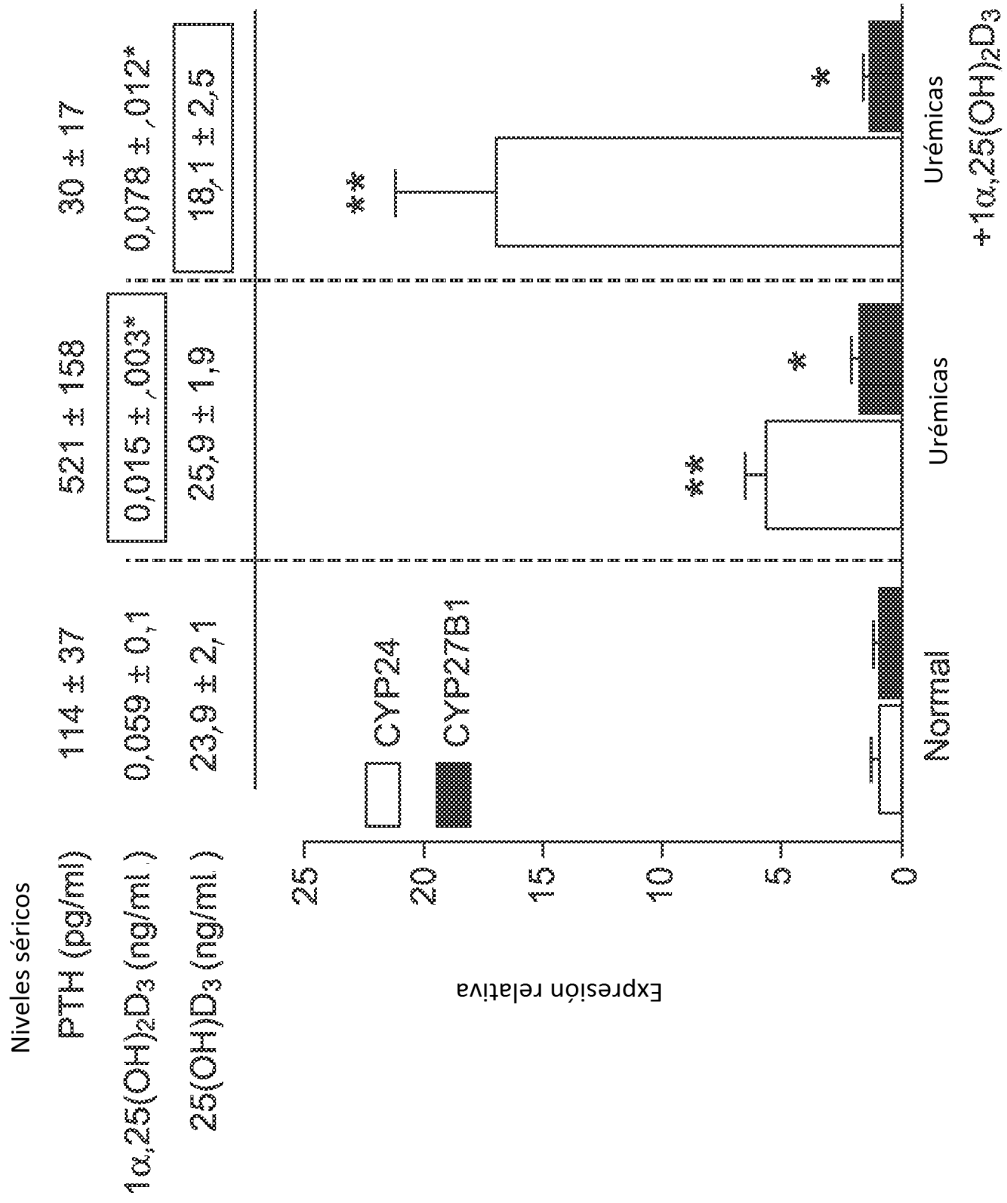


FIG. 12

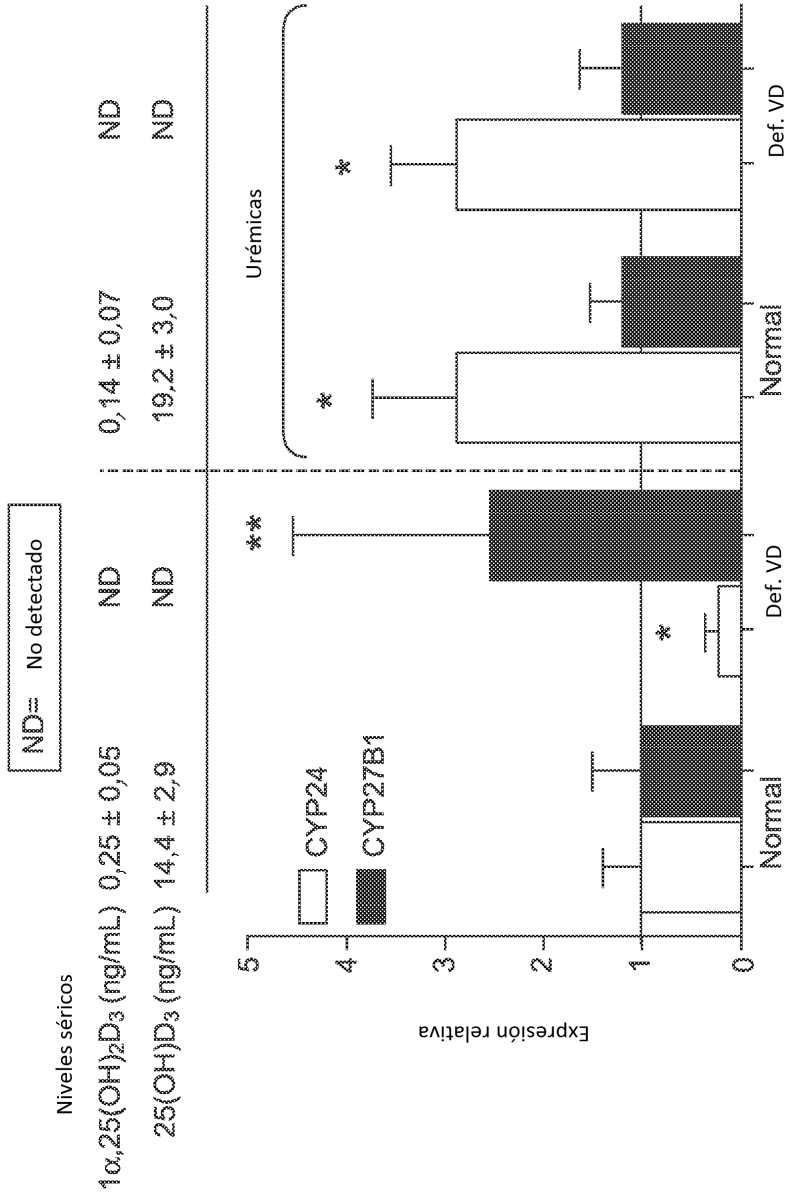


FIG. 13

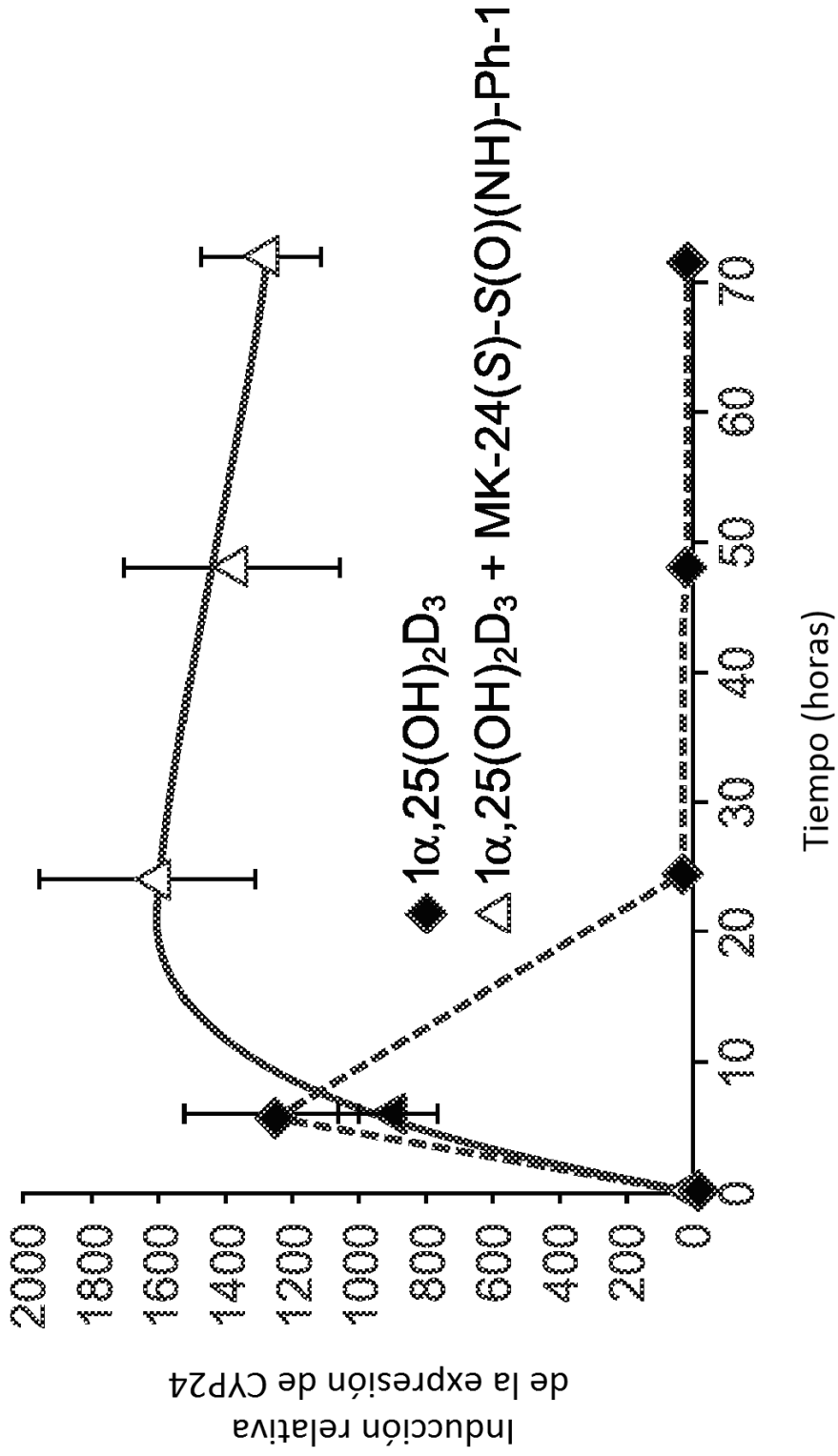


FIG. 14

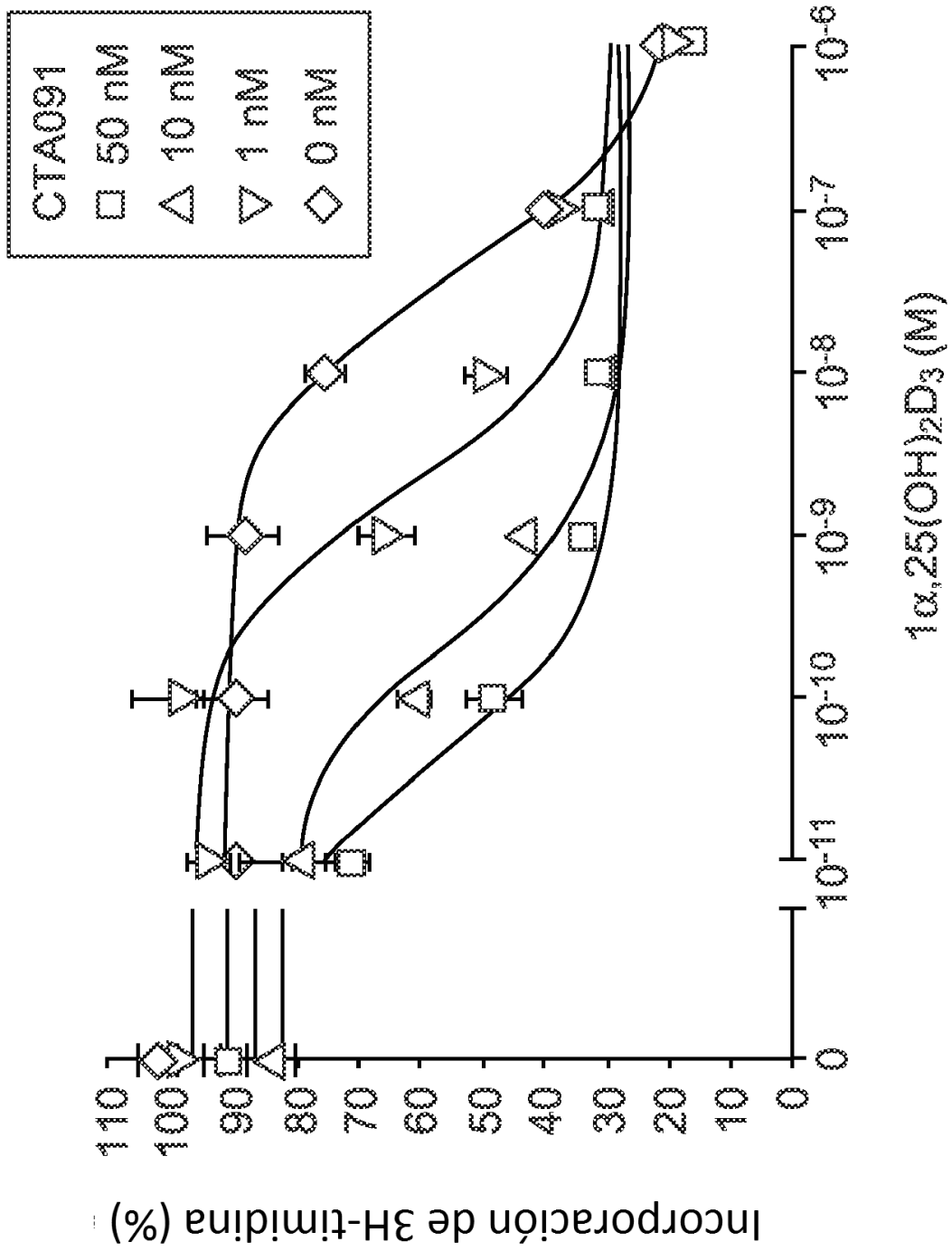


FIG. 15

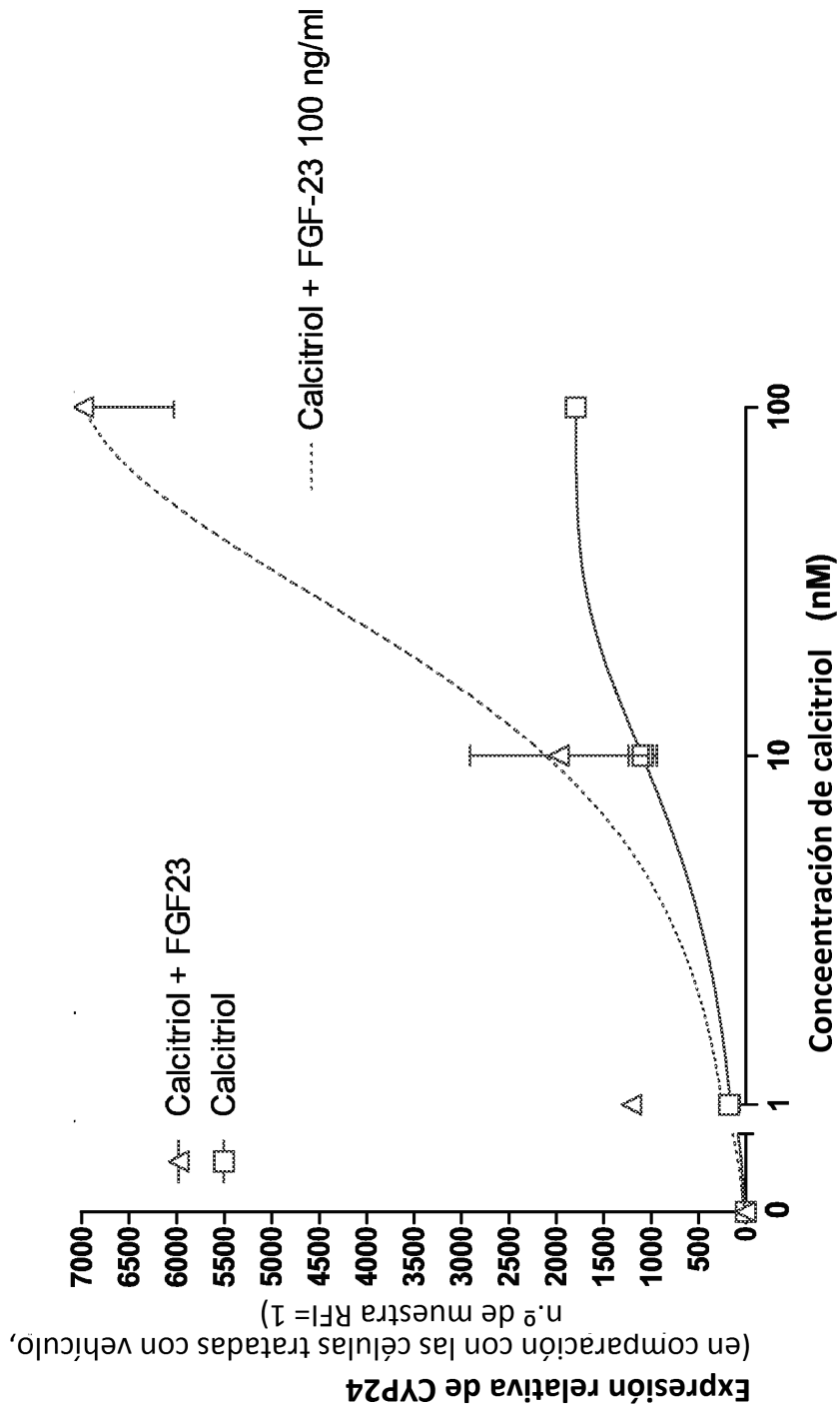
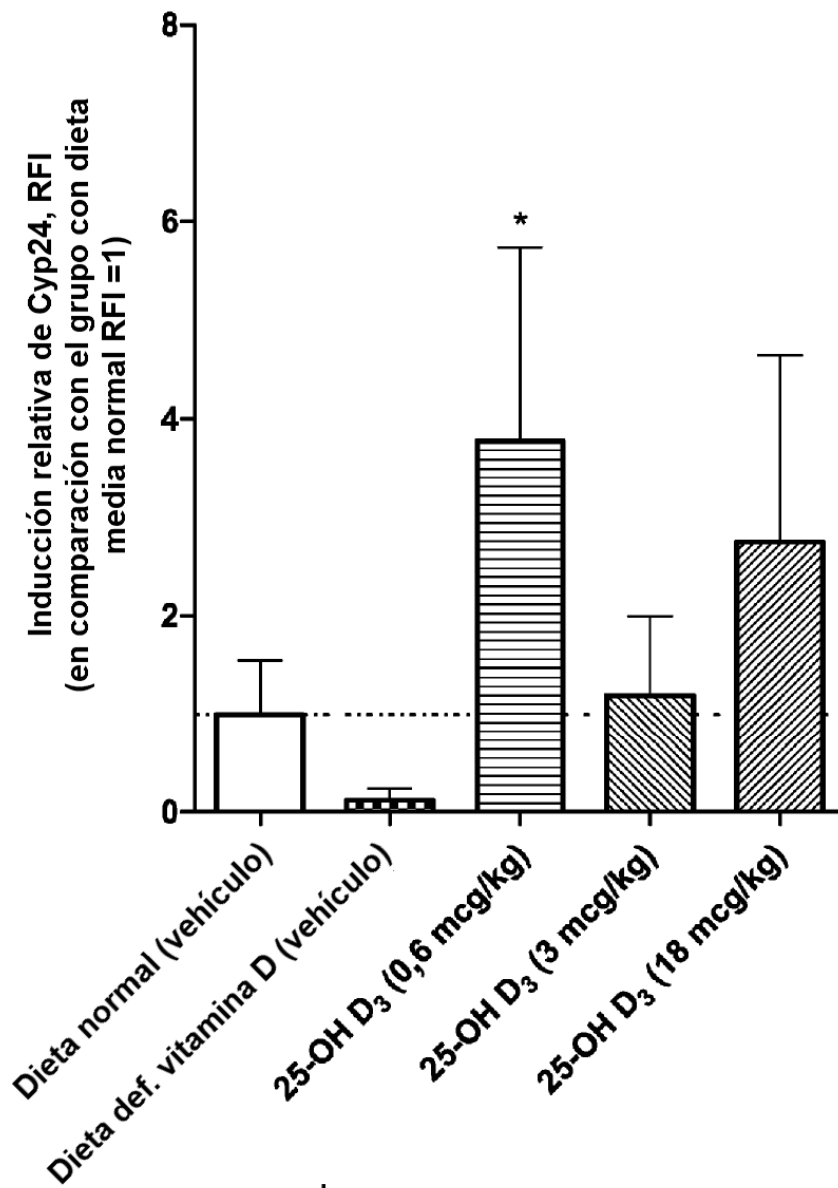
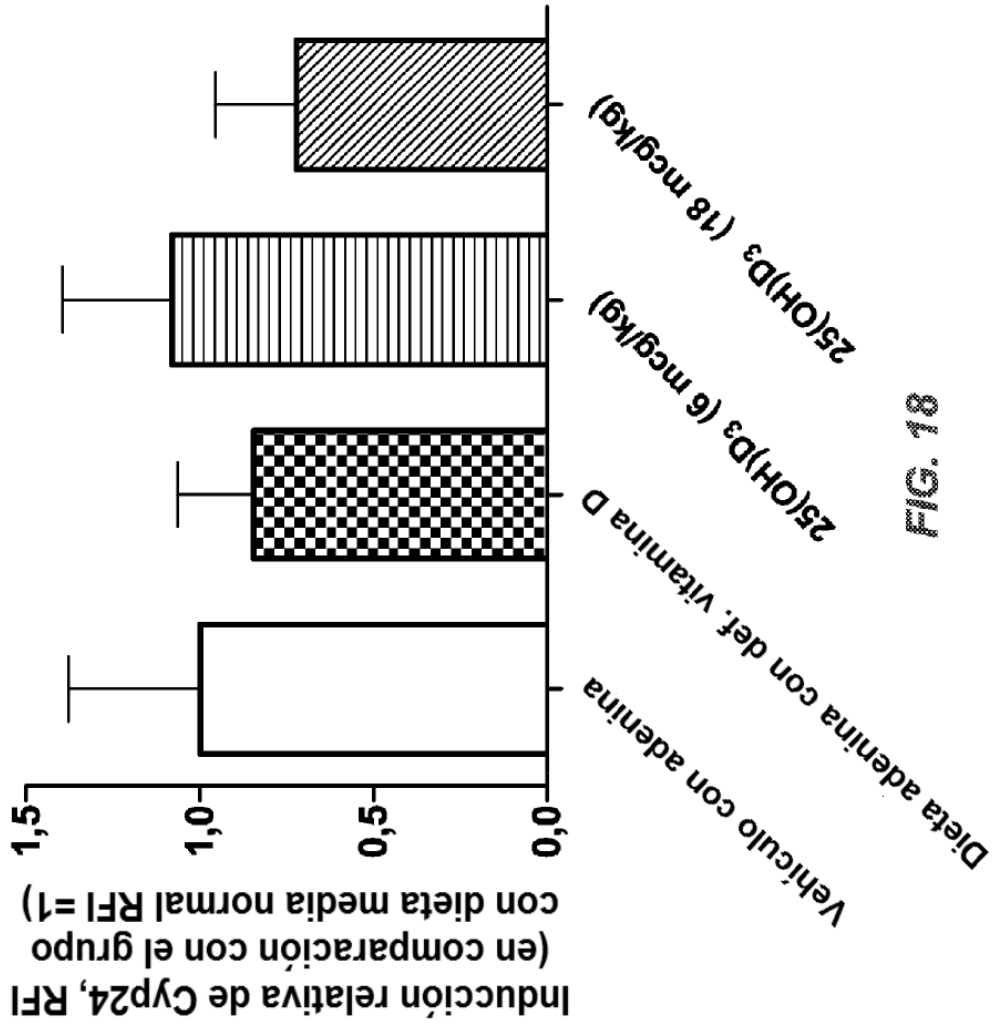


FIG. 16



* p<0,05 frente vehículo con def. de vitamina D

FIG. 17



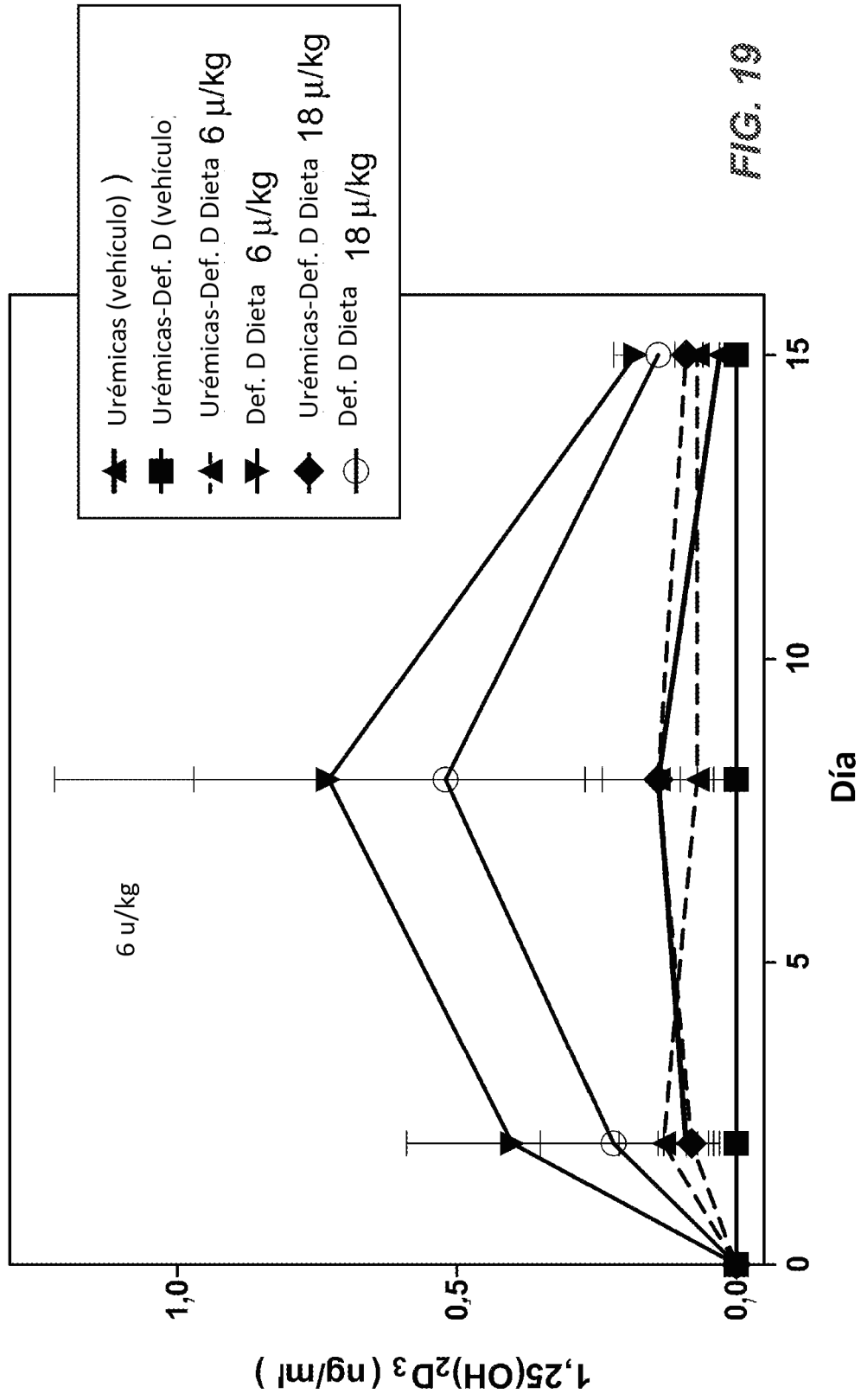


FIG. 19