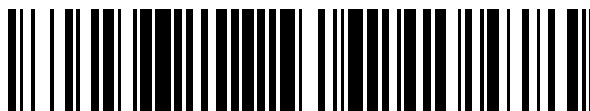


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 743**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/33** (2006.01)

**A61K 31/5685** (2006.01)

**A61K 31/569** (2006.01)

**C07J 1/00** (2006.01)

**A61P 3/00** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07863339 .3**

96 Fecha de presentación: **23.04.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2012773**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.01.2009**

54 Título: **Medicamentos y usos**

30 Prioridad:

22.04.2006 US 793792 P 08.09.2006 US 843112 P  
13.09.2006 US 825569 P 13.09.2006 US 825564 P  
17.10.2006 US 829848 P 17.11.2006 US 866395 P  
21.11.2006 US 866700 P 30.11.2006 US 868042 P  
15.01.2007 US 885003 P 02.02.2007 US 888058 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**31.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**31.10.2012**

73 Titular/es:

**HARBOR BIOSCIENCES, INC. (100.0%)**  
**9191 Towne Centre Drive Suite 409**  
**San Diego, CA 92122, US**

72 Inventor/es:

**FRINCKE, JAMES M. y**  
**READING, CHRISTOPHER L.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

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).

ES 2 389 743 T3

## DESCRIPCIÓN

Medicamentos y usos.

## Antecedentes de la invención

Una serie de factores contribuyen al establecimiento y mantenimiento de muchos trastornos autoinmunitarios e inflamatorios crónicos. A menudo, la etiología de dichos trastornos no se entiende bien. El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) es una citoquina que es liberada principalmente por fagocitos mononucleares en respuesta a una serie de inmunoestimuladores. Cuando se administra a animales o seres humanos, produce inflamación, fiebre, efectos cardiovasculares, hemorragia, coagulación y respuestas de fase aguda similares a las observadas durante infecciones agudas y estados de choque. La producción excesiva o no regulada del TNF $\alpha$  está implicada por lo tanto en una serie de estados patológicos. Estos incluyen la endotoxemia y/o síndrome de choque tóxico Tracey et al., *Nature* 330:662-664 (1987) y Hinshaw et al., *Circ. Shock* 30:279-292 (1990), la caquexia p. ej., Dezube et al., *Lancet*, 335(8690):662 (1990) y el ARDS (síndrome de dificultad respiratoria aguda) en el que se han detectado concentraciones altas de TNF $\alpha$  en aspirados pulmonares procedentes de pacientes de ARDS, p. ej. Millar et al., *Lancet* 2(8665):712-714 (1989).

Parece que el TNF $\alpha$  también está implicado en enfermedades de resorción ósea, incluyendo la artritis. Cuando se activan, los leucocitos pueden producir resorción ósea, una actividad a la que puede contribuir el TNF $\alpha$ , p. ej., Bertolini et al., *Nature* 319:516-518 (1986) y Johnson et al., *Endocrinology* 124(3):1424-1427 (1989). También se ha mostrado que el TNF $\alpha$  estimula la resorción ósea e inhibe la formación ósea in vitro e in vivo mediante la estimulación de la formación de osteoclastos y la activación combinada con inhibición de la función de osteoblastos. Se ha mostrado que el bloqueo del TNF $\alpha$  con anticuerpos monoclonales anti-TNF $\alpha$  es beneficioso en la artritis reumatoide (Elliot et al., *Int. J. Pharmac.* 17(2):141 - 145 1995) y en la enfermedad de Crohn (von Dulleman et al., *Gastroenterology*, 109(1):129 - 135, 2005).

La molécula factor nuclear kappaB (NF- $\kappa$ B) es un mediador de la inflamación en una serie de estados clínicos. Algunos agentes terapéuticos que se usan para tratar la inflamación, tales como la dexametasona, prednisona o hidrocortisol, son agonistas del receptor de glucocorticoides (GR) e inhiben indirectamente el NF- $\kappa$ B al aumentar la actividad del GR, p. ej., H. Harkonarson et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25:761-771, 2001. Sin embargo, los niveles elevados de agonistas de GR naturales y niveles farmacológicos de agonistas de GR sintéticos, normalmente ejercen toxicidades no deseadas que incluyen una supresión inmunitaria importante y la pérdida de masa ósea u osteopenia, p. ej., T.L. Popper et al., *Anti-inflammatory agents: Anti-inflammatory steroids*, RA. Scherer & M.W. Whitehouse, editors, Academic Press, New York, capítulo 9, volumen 1, páginas 245-294, 1974. Muchas de las toxicidades no deseadas asociadas con los glucocorticoides son causadas por la activación del GR. Por lo tanto, la identificación de compuestos que puedan inhibir la actividad del NF- $\kappa$ B, sin producir estas toxicidades mediante la activación del GR, representa una clase de agentes que se podrían usar para tratar la inflamación y los síntomas asociados tales como el dolor, fiebre o fatiga.

La inflamación no deseada o perjudicial se produce en una serie de afecciones crónicas o agudas, p. ej., ARDS, COPD y septicemia. Los monocitos y neutrófilos activados tienen una función en la mediación de la inflamación asociada a la patología. Son particularmente importantes los neutrófilos activados, que presentan una mayor acumulación en el núcleo del factor regulador de la transcripción NF- $\kappa$ B y una mayor producción de citoquinas proinflamatorias. Los neutrófilos también son una fuente de especies de oxígeno tóxicas, cuya generación media, al menos en parte, la secreción del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) por macrófagos activados, lo cual puede ser necesario para la lesión e insuficiencia orgánica vistos en la septicemia.

La señalización asociada con la inflamación se puede producir a través de diferentes rutas, y esto puede aumentar la actividad del NF- $\kappa$ B en las células afectadas. La activación del NF- $\kappa$ B por el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) empieza con la unión del TNF- $\alpha$  al receptor del TNF- $\alpha$  en la membrana celular, seguido de la activación de una serie de transductores de señales, incluyendo las MAP quinasas. La activación del NF- $\kappa$ B en el citoplasma conduce a su traslocación en el núcleo y activación de genes que contienen el elemento de respuesta del NF- $\kappa$ B en sus promotores. La activación del NF- $\kappa$ B citoplasmático por el lipopolisacárido bacteriano (LPS) empieza con la unión del LPS al receptor de tipo Toll 4 en la superficie celular y la posterior activación de los transductores de señales intracelulares, incluyendo la fosfatidilinositol-3-quinasa. Se sabe que tanto el TNF- $\alpha$  como el LPS inducen respuestas inflamatorias intensas in vivo y en las células in vitro. Las células que responden a dichas señales proinflamatorias incluyen macrófagos, monocitos y otros tipos de células inmunitarias.

Parece que varios subgrupos de linfocitos T tienen una función en el desarrollo de determinados estados patológicos. Se ha sugerido una función importante para diferentes poblaciones de linfocitos T incluyendo linfocitos T reguladores y/o supresores, en la mediación de diferentes aspectos de la inmunidad, p. ej., E. Suri-Payer et al., *J. Immunol.*, 160(3): 1212-1218, 1998; J. Shimizu et al., *J. Immunol.*, 163(10):5211-5218, 1999; M. Itoh et al., *J. Immunol.*, 162(9):5317-5326, 1999; A.M. Miller et al., *J. Immunol.*, 177: 7398-7405, 2006. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> pueden tener una función en la supresión de algunas respuestas inmunitarias.

Se ha descrito el estudio de algunos de estos subgrupos de linfocitos T en modelos animales, p. ej. patente de EE.UU. 6.593.511. Por ejemplo, se ha examinado una función para el estudio de afecciones autoinmunitarias humanas en el modelo de CD4<sup>+</sup> CD45Rb<sup>hi</sup> scid/scid. Este modelo animal se ha usado para estudiar las respuestas inmunitarias desreguladas tales como estados de inflamación y para evaluar fármacos experimentales y protocolos de tratamiento, p. ej., K. Hong et al., *J. Immunol.*, 162:7480-7491, 1999; Powrie et al., *J. Exp. Med.*, 183(6):2669-2674, 1996.

El gen Foxp3, que es inducido por el epitelio del timo, puede tener una función en la inducción de linfocitos T para desarrollar el fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (linfocito T regulador o Treg). El antígeno de superficie CD25 es la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-2. En algunos modelos animales de enfermedades autoinmunitarias, la deficiencia del gen Foxp3 está asociada con la aparición de enfermedades autoinmunitarias, p. ej., solicitud de patente de EE.UU. nº 2006/0111316. El restablecimiento de este gen parece que reduce las anomalías autoinmunitarias. Se han descrito diferentes reactivos o protocolos de ensayo para células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, p. ej., H. Yagi et al., *International Immunol.*, 16(11):1643-1656, 2004; W.R. Godfrey et al., *Blood*, 105(2):750-758, 2005.

La resistencia a la insulina en sujetos con intolerancia a la glucosa se ha reconocido desde hace tiempo. Reaven et al. (*American Journal of Medicine*, 60(1):80-88, 1976) usaron una infusión continua de glucosa e insulina (técnica de pinzamiento de insulina/glucosa) y ensayos de tolerancia a la glucosa oral para demostrar que existía la resistencia a la insulina en un grupo diverso de sujetos no obesos, no cetósicos. Estos sujetos iban desde intolerancia a la glucosa a hiperglucemia en ayunas manifiesta. Los grupos diabéticos en estos estudios incluían tanto sujetos dependiente de insulina (DMID) como no dependientes de insulina (DMNDI).

Coincidente con la resistencia a la insulina sostenida es la hiperinsulinemia más fácilmente determinada, que se puede medir mediante una determinación precisa de la concentración de insulina plasmática en la circulación en el plasma de los sujetos. La hiperinsulinemia puede estar presente como resultado de la resistencia a la insulina, como es el caso en sujetos obesos y/o diabéticos (DMNDI) y/o sujetos con intolerancia a la glucosa, o en sujetos con DMID, como consecuencia del exceso de inyección de insulina comparado con la liberación fisiológica normal de la hormona por el páncreas endocrino.

La asociación de la hiperinsulinemia con la obesidad y con enfermedades isquémicas de los grandes vasos sanguíneos (p. ej., aterosclerosis) se ha descrito mediante estudios experimentales, clínicos y epidemiológicos (Stout, *Metabolism*, 34:7, 1985; Pyorala et al., *Diabetes/Metabolism Reviews*, 3:463, 1987). Los aumentos de la insulina plasmática estadísticamente significativos 1 y 2 horas después de la carga de glucosa oral se correlacionan con un mayor riesgo de enfermedad cardíaca coronaria.

Un modelo de diabetes humana es el ratón *db/db*. Se ha descrito el modelo de ratón *db/db*, por ejemplo, en D. Koya et al., *The FASEB Journal*, 14:439-447, 2000; K. Kobayashi et al., *Metabolism*, 49(1): 22-31, 2000; J. Berger et al., *J. Biol. Chem.*, 274(10):6718-6725, 1999. El ratón *db/db* lleva una mutación en el gen que codifica el receptor de leptina, lo que le confiere un fenotipo caracterizado por hiperfagia, obesidad, resistencia a la insulina y diabetes al deteriorarse con el tiempo su masa de células  $\beta$  pancreáticas funcionales, en particular para animales en el contexto genético C57BL/Ks. Los ratones *db/db* típicamente se convierten en obesos identificables alrededor de las 3 a 4 semanas de edad y los aumentos de la insulina plasmática empiezan a los 10 a 14 días. Los aumentos de azúcar en la sangre se observan a las 4 a 8 semanas de edad con un aumento incontrolado de azúcar en la sangre, reducción grave de células  $\beta$  productoras de insulina de los islotes pancreáticos, y la muerte aproximadamente a los 10 meses de edad. Este modelo se ha usado para caracterizar la capacidad de los candidatos a fármacos para afectar a la aparición o a la velocidad de avance de parámetros, p. ej., la hiperglucemia y ganancia de peso, relacionado con el desarrollo y mantenimiento de la diabetes.

El tratamiento de la diabetes con agonistas del PPAR- $\gamma$  se ha asociado con la hipertrofia cardíaca, o un aumento del peso del corazón. El tratamiento con maleato de rosiglitazona, un agonista del PPAR- $\gamma$ , indica que los pacientes pueden experimentar acumulación de líquidos y sucesos relacionados con el volumen, tales como edema o insuficiencia cardíaca congestiva. La hipertrofia cardíaca relacionada con el tratamiento con agonista del PPAR- $\gamma$  típicamente se trata por interrupción del tratamiento.

Un efecto fisiológico del cortisol es su antagonismo a la insulina. Las concentraciones altas de cortisol en el hígado pueden reducir la sensibilidad a la insulina en este órgano, lo cual tiende a aumentar la gluconeogénesis y aumentar los niveles de azúcar en la sangre (M.F. Dallman et al. *Front Neuroendocrinol.*, 14:303-347, 1993). Este efecto agrava la intolerancia a la glucosa o la diabetes mellitus. En el síndrome de Cushing, que es producido por concentraciones excesivas de cortisol en la circulación, el antagonismo de la insulina puede provocar diabetes mellitus en individuos que son susceptibles (E.J. Ross et al., *Lancet*, 2:646-649, 1982).

El cortisol se puede convertir en cortisona en el cuerpo por la actividad de 11 $\beta$ -deshidrogenasa de enzimas 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. La reacción inversa, conversión de la cortisona inactiva en cortisol, la lleva a cabo en determinados órganos la actividad de 11 $\beta$ -reductasa de estas enzimas. Esta actividad también se conoce como actividad de corticoesteroide 11 $\beta$ -reductasa. Hay al menos dos isozimas diferentes de la 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. La expresión de la 11 $\beta$ -HSD de tipo 1 en una variedad de líneas celulares, genera una enzima bidireccional o una 11 $\beta$ -reductasa predominante, que puede regenerar la 11 $\beta$ -hidroxiesteroide a partir de la 11-

cetoesteroide pariente inerte.

La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa mitocondrial (también conocida como PEPCK mitocondrial, PEPCK-M, PCK2 y mtPEPCK) es expresada en una variedad de tejidos humanos, principalmente en el hígado, riñón, páncreas, intestino y fibroblastos (Modaressi et al., *Biochem. J.*, 333:359-366, 1998). La deficiencia de PEPCK mitocondrial, aunque no está bien documentada, se ha asociado con retraso en el desarrollo, hipoglucemia y anomalías hepáticas. A diferencia de la forma citosólica (PEPCK-C), la forma mitocondrial (PEPCK-mitocondrial) es expresada constitutivamente y no es regulada por estímulos hormonales (Hanson and Patel, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 69:203-281, 1994). Las dos formas se encuentran en cromosomas separados que se localizan en el cromosoma 14q11 y PEPCK-C reside en el cromosoma 20q11 (Stoffel et al., *Hum. Mol. Genet.*, 2:1-4, 1993).

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmunitaria que es una enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central (Bar-Or, A., *J. Neuroimmunol.* 100:252-259, 1999). Aunque recientemente se ha mejorado la evolución natural de la enfermedad mediante el tratamiento con compuestos inmunomoduladores-inmunosupresores tales como el interferón (IFN)-beta, copolímero, ciclofosfamida y mitoxantrona (Hafler, D.A. and Weiner, H.L., *Immunological Reviews* 144:75, 1995; Goodkin, D.E., *Lancet* 352: 1486, 1998), ninguno de estos fármacos puede bloquear el desarrollo de la enfermedad y algunos de ellos tienen efectos secundarios graves que limitan su uso prolongado. Además, un número sustancial de pacientes tanto con EM de recaída-remisión como con EM progresiva secundaria presentan una respuesta pobre al IFN-β. Por lo tanto, son necesarios nuevos compuestos que solos o en terapia de combinación mejoren la evolución de la EM, p. ej., ralentizando su avance.

Actualmente son necesarios agentes farmacéuticos o métodos de tratamientos baratos que sean más eficaces en el tratamiento de las afecciones descritas antes. La presente invención proporciona agentes terapéuticos y métodos de tratamiento para tratar una o más de estas afecciones. Por lo tanto, los agentes y los métodos son útiles para reducir uno o más síntomas asociados con las afecciones descritas en la presente memoria. Además, el uso de los agentes y métodos de la invención se puede combinar con uno o más tratamientos convencionales para estos trastornos.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

### Resumen de las realizaciones preferidas

De acuerdo con el objeto, la invención proporciona una composición para usar en la profilaxis o el tratamiento de la inflamación o una enfermedad autoinmunitaria, en la que la composición comprende el 17α-etinilandrost-5-eno-3β,7β,17β- triol y uno o más excipientes.

Opcionalmente, la inflamación o enfermedad autoinmunitaria es la artritis. De acuerdo con una realización opcional, la artritis es la artritis reumatoide, osteoartritis, fibromialgia, osteoartritis primaria, osteoartritis secundaria, artritis psicótica, artritis relacionada con lupus eritematoso, artritis asociada con la enfermedad inflamatoria del intestino aguda o crónica o colitis, artritis asociada con espondilitis anquilosante, inflamación de tejidos relacionada con artritis, dolor de las articulaciones, rigidez de las articulaciones, movimiento deteriorado de las articulaciones, hinchamiento de las articulaciones, inflamación de las articulaciones o inflamación sinovial.

Opcionalmente, la inflamación o enfermedad autoinmunitaria es la esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson. De acuerdo con una realización opcional, la inflamación o enfermedad autoinmunitaria es la esclerosis múltiple. Opcionalmente, la inflamación o enfermedad autoinmunitaria es un traumatismo o lesión tisular. De acuerdo con una realización opcional, el traumatismo o la lesión tisular son daño o lesión en la piel, mucosa, cartílago, hígado, tejido cardíaco, hueso o sistema nervioso central o tejido neural. De acuerdo con otra realización opcional, la lesión de la piel, mucosa, cartílago, hígado, tejido cardíaco, hueso o sistema nervioso central o tejido neural, es la hepatitis. De acuerdo con otra realización opcional, el traumatismo o lesión tisular es una herida, lesión por reperfundición, estenosis, reestenosis después de angioplastia o un infarto de miocardio o cerebral.

De acuerdo con una realización opcional, la inflamación o enfermedad autoinmunitaria es la enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis aguda o crónica o un trastorno renal, opcionalmente insuficiencia renal aguda o crónica o insuficiencia renal autoinmunitaria. De acuerdo con otra realización opcional, la inflamación o enfermedad autoinmunitaria es la fibrosis quística, asma agudo, asma crónico, asma resistente a esteroides, bronquitis aguda, bronquitis crónica, enfisema, psoriasis, eczema, síndrome de dificultad respiratoria agudo o enfermedad pulmonar obstructiva crónica. De acuerdo con otra realización opcional, la inflamación o enfermedad autoinmunitaria es una enfermedad ocular inflamatoria, uveítis o degeneración macular.

Otras realizaciones son las descritas en el resto de la memoria descriptiva incluyendo las realizaciones descritas en la presente memoria.

Definiciones. Como se usa en la presente memoria y salvo que se exponga otra cosa o esté implícito en el contexto, los términos que se usan en la presente memoria tienen los significados que se definen aquí. Las descripciones de realizaciones y ejemplos que se describen ilustran la invención y no se pretende que sean limitantes de ninguna forma. Salvo indicación contraria o que esté implícito, por ejemplo, cuando se incluyen elementos que se excluyen mutuamente u opciones, en estas definiciones y a lo largo de la memoria descriptiva, los términos "un" y "una" significan uno o más, y el término "o" significa y/o.

Una “formulación” o similar significa una composición que se puede administrar a un sujeto, por ejemplo, un ser humano o animal. Las formulaciones son adecuadas para aplicaciones humanas o veterinarias y típicamente tendrán las características esperadas para la formulación, p. ej., las formulaciones parenteral es para uso humano normalmente serán disoluciones o suspensiones estériles.

- 5 Un “excipiente”, “vehículo”, “vehículo farmacéuticamente aceptable” o expresiones similares significan uno o más componentes o ingredientes que son aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de las composiciones o formulaciones de la invención y no son excesivamente perjudiciales para el paciente, animal, tejidos o células a los que se va a administrar la formulación.

- 10 Un “sujeto” significa un ser humano o animal. Normalmente el animal es un mamífero tal como un primate no humano, roedor, lagomorfo, animal doméstico o animal de caza. Los primates incluyen chimpancés, macacos cangrejeros, monos araña y macacos, p. ej., *Rhesus* o *Pan*. Los roedores y lagomorfos incluyen ratones, ratas, marmotas, hurones, conejos y hámsteres.

- 15 Compuestos biodinámicos. El método (no reivindicado) para identificar o caracterizar un compuesto en biodinámico, se puede llevar a cabo como se describe más adelante. El método comprende además opcionalmente llevar a cabo un protocolo para determinar si el compuesto de ensayo modula la actividad o el nivel del mediador de la respuesta biológica aguda en aproximadamente 20% o aproximadamente 25% a aproximadamente 70% o aproximadamente 75% en un ensayo in vitro, en el que opcionalmente el compuesto de ensayo no activa o antagonista un receptor de glucocorticoides en más de aproximadamente 10%, aproximadamente 20% o aproximadamente 30%, cuando se compara con un activador o antagonista del receptor de glucocorticoides de referencia adecuado, p. ej., dexametasona o cortisol. En estas realizaciones, los estímulos agudos o las agresiones biológicas pueden ser la exposición del sujeto a una cantidad suficiente de radiación ionizante o una señal, compuesto o composición proinflamatorios, en las que la señal, compuesto o composición proinflamatorios son LPS bacteriano o  $\text{TNF}\alpha$  y/o en las que opcionalmente el mediador de la respuesta biológica aguda es  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  o  $\text{I}\kappa\text{B}$ .

- 25 Los estímulos agudos o la agresión biológica pueden ser la administración de suficiente LPS bacteriano a un número suficiente de ratones tratados con fármaco y un número suficiente de ratones de control tratados con vehículo y la medición del efecto del compuesto de ensayo sobre el mediador de la respuesta biológica aguda en el momento en el que (i) la respuesta aguda es máxima o cercana al máximo, opcionalmente aproximadamente a las 1,5 h, p. ej., aproximadamente 70-110 minutos o 75-105 minutos después de la administración del LPS bacteriano por inyección intraperitoneal, y (ii) en uno o dos tiempos de medición más antes y/o o después de la administración de suficiente LPS bacteriano, opcionalmente en un tiempo de medición antes de la administración de suficiente LPS bacteriano y en un tiempo de medición posterior después de que la respuesta aguda sea máxima o próxima al máximo, opcionalmente aproximadamente 2,0 ó 2,5 h después de la administración del LPS bacteriano por inyección intraperitoneal, y opcionalmente en el que el mediador de la respuesta biológica aguda es  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  o  $\text{I}\kappa\text{B}$ .

- 35 La administración de suficiente LPS bacteriano opcionalmente se puede llevar a cabo esencialmente de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria o una variación adecuada de los mismos y en los que opcionalmente, la capacidad del compuesto para modular parcialmente el nivel o la actividad del mediador de la respuesta biológica aguda se lleva a cabo esencialmente de acuerdo con un método descrito en la presente memoria o una variación adecuada del mismo.

- 40 Otros estímulos o agresiones biológicas que se pueden analizar incluyen la isquemia y reperfusión de uno o más tejidos isquémicos, quemaduras térmicas o químicas de gravedad relativamente leve, moderada o alta, o la exposición a otras toxinas o venenos. El efecto de la agresión biológica se puede evaluar en diferentes tejidos u órganos, por ejemplo, el bazo, sangre, médula ósea, pulmón, cerebro, hígado, intestino, colon o corazón.

- 45 Las variables que se pueden evaluar normalmente incluirán el tiempo o periodo de tiempo en el que el sujeto tiene la respuesta máxima a una agresión biológica dada. En general, las agresiones biológicas producirán una respuesta biológica máxima en los primeros 30 minutos a 48 horas después de la exposición del sujeto a la agresión. La respuesta máxima por una biomolécula dada a una agresión biológica aguda en general durará de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 2 horas, aunque algunas respuestas empezarán en un periodo de tiempo dado y después aumentarán a lo largo de un periodo de días o más tiempo. El periodo de tiempo de la respuesta biológica máxima es un periodo de tiempo conveniente en el que evaluar la eficacia o mecanismo de acción de un candidato a fármaco.

- 50 La capacidad del  $17\alpha$ -etinilandro-5-eno- $3\beta,7\beta,17\beta$ - triol para ejercer un efecto transitorio pero muy potente, que se desvanece y vuelve la función normal, se denomina en la presente memoria una respuesta biodinámica (véase el ejemplo 9). Una respuesta biodinámica producida por un “agente biodinámico” tal como el  $17\alpha$ -etinilandro-5-eno- $3\beta,7\beta,17\beta$ - triol contrasta con una “respuesta biostática” que produce un compuesto como la dexametasona hacia sus biomoléculas efectoras tales como el receptor de glucocorticoides o  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , al que inhibe indirectamente a través de la activación del receptor de glucocorticoides. La respuesta biostática es esencialmente una respuesta de “toda, todo el tiempo” con la potencia biológica de un “agente biostático” tal como la dexametasona que tiene una variación relativamente pequeña en una concentración dada en las células o tejidos diana.

Por lo tanto, el efecto farmacodinámico de un agente biostático varía principalmente con su concentración o propiedades farmacocinéticas. A diferencia de esto, los agentes biodinámicos tales como el  $17\alpha$ -etinilandro-5-eno- $3\beta,7\beta,17\beta$ - triol se caracterizan por un efecto farmacodinámico al que le afecta una combinación de su concentración en las células o tejidos diana y la naturaleza y la intensidad del estímulo biológico subyacente. Por lo tanto, un estímulo biológico producido, por ejemplo, por la exposición a una cantidad potencialmente letal de radiación ionizante tal como rayos  $\gamma$  o rayos X o exposición a LPS bacteriano,  $\text{TNF}\alpha$  u otro agente puede activar o inhibir mediadores de la inflamación tales como  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ,  $\text{IkB}$ , IL-6, proteína C reactiva. En relación con esto, los fármacos biodinámicos pueden presentar una correlación estadística débil, o no presentar correlación significativa, entre los efectos farmacocinéticos y farmacodinámicos comparado con lo que se observa en general para los fármacos biostáticos.

Un aspecto de los fármacos biodinámicos es su capacidad potencial para reducir la toxicidad sistémica asociada con los fármacos biostáticos que pueden actuar, al menos en parte, por la modulación de la misma o de similares biomoléculas diana. Los fármacos biostáticos tales como la dexametasona se pueden usar clínicamente para tratar una amplia variedad de afecciones de inflamación, pero la bioactividad de "toda, todo el tiempo" puede conducir a toxicidad. En el caso de inhibición del  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , la inhibición constante y relativamente completa de su actividad, por ejemplo, inhibición en aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o esencialmente 100% en la mayoría o en todos los tejidos, durante un periodo de tiempo prolongado, p. ej., durante más de 1, 2 ó 4 horas a aproximadamente 1, 2, 3 días o más, puede dar como resultado efectos secundarios indeseados observables, puesto que es necesario algún nivel base de actividad del  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  para la función biológica normal en la mayoría de los tejidos. Es probable que las toxicidades asociadas con el uso de glucocorticoides tales como la dexametasona surjan, al menos en parte, de la detención relativamente completa de las biomoléculas afectadas tales como el  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . A diferencia de estos, los fármacos biodinámicos pueden ejercer una respuesta más transitoria que puede conducir a una mejora o disminución de los efectos secundarios tóxicos observables.

Otro aspecto de los fármacos biodinámicos es su capacidad para ejercer potencialmente un efecto terapéutico de una forma específica del tejido. Por lo tanto, la respuesta de un animal a un estímulo tal como la exposición a una agresión biológica tal como una cantidad potencialmente mortal de LPS bacteriano o la reperusión de los tejidos afectados después de isquemia transitoria, se puede poner de manifiesto mediante diferentes grados de activación del  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  en diferentes tejidos. Un fármaco biodinámico podría actuar en tejidos en los que la respuesta del animal es relativamente grande, p. ej., el bazo o tejido cardíaco de ratón, mientras que deja la función del  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  relativamente sin afectar en otros tejidos, p. ej., el cerebro, en el que la respuesta a la agresión biológica es relativamente menor para la biomolécula diana que media al menos parcialmente la respuesta a la agresión biológica.

Los fármacos biodinámicos pueden actuar en parte por su capacidad para inhibir parcialmente biomoléculas diana. Como se describe en el ejemplo 7, el  $17\alpha$ -etinilandro-5-eno- $3\beta,7\beta,17\beta$ - triol y algunos otros compuestos descritos allí, inhiben parcialmente la activación del  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  en las células in vitro, pero la inhibición completa no se observó nunca en ninguna concentración. Esto contrastaba con la actividad del fármaco biostático dexametasona, que con una concentración suficientemente alta inhibía completamente la actividad del  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . Esta inhibición parcial del  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  in vitro parece estar parcialmente reflejada por su actividad descrita en este ejemplo. Por lo tanto, en al menos algunos casos, los fármacos biodinámicos se caracterizan por tener una capacidad para inhibir o activar parcialmente una biomolécula diana en un sistema tal como el ensayo in vitro descrito en el ejemplo 7. Parece que la inhibición del  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  es indirecta, puesto que en este momento no se cree que el  $17\alpha$ -etinilandro-5-eno- $3\beta,7\beta,17\beta$ - triol y los otros compuestos descritos aquí se unan directamente al  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  en el citoplasma o el núcleo.

El protocolo descrito en este ejemplo, o variaciones adecuadas del mismo, se puede usar para caracterizar otros compuestos por su capacidad para actuar como agentes biodinámicos o biostáticos modulando (activando de forma detectable o antagonizando o inhibiendo de forma detectable) moléculas tales como el  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  in vivo. Los compuestos también se pueden analizar en ensayos in vitro, tal como el ensayo descrito en el ejemplo 7, para caracterizar mejor su mecanismo de acción. Las variaciones adecuadas del protocolo in vivo descrito en este ejemplo, incluyen usar diferentes dosificaciones de los compuestos de ensayo y diferentes vías de administración, p. ej., un intervalo de dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 350 mg/kg administrada por vía oral, bucal, sublingual o parenteral tal como por inyección intradérmica, subcutánea, intravenosa o intramuscular o por vía intranasal o inhalación en los conductos nasales, órgano vomeronasal o alveolos pulmonares o vías respiratorias que conducen a los alveolos, p. ej., bronquios o bronquiolos. Las dosificaciones de ensayo adecuadas típicamente serán de aproximadamente 1-150 mg/kg. Las biomoléculas que se pueden medir in vivo son biomoléculas tales como  $\text{IkB}$ , quinasas tales como src quinasa, una map quinasa u otros mediadores de señales descritos en la presente memoria. Dichos métodos de caracterización se pueden llevar a cabo en una o más variedades de sujetos tales como roedores, p. ej., ratas, perros, primates no humanos tales como monos rhesus o macacos cangrejeros. Los grupos de animales que consisten en aproximadamente 3-12 animales por grupo, p. ej., 4-8 animales por grupo, se pueden usar con vehículos adecuados o controles con placebo, compuestos de ensayo que son fármacos potencialmente biodinámicos, controles de fármacos biodinámicos positivos como el  $17\alpha$ -etinilandro-5-eno- $3\beta,7\beta,17\beta$ - triol, controles de fármacos biostáticos positivos como la dexametasona, y grupos en los que la respuesta del compuesto de ensayo en poblaciones de células o tejidos diferentes se comparan frente a uno o más grupos de

referencia, p. ej., referencias con vehículo o referencias de fármaco biodinámico positivo o negativo o referencias de fármaco biostático positivo o negativo.

Cuando dichos análisis se aplican a seres humanos, la selección de opciones experimentales se reducirá de forma natural comparada con otros animales. Los tejidos o muestras humanas tales como sangre, médula ósea o líquido de lavado pulmonar son más fácilmente accesibles para el análisis que otros tipos de tejidos tales como el bazo o hígado, que hay que obtenerlos mediante técnicas invasivas. Por lo tanto, en general, los estudios con animales se llevarán a cabo antes o simultáneamente con la evaluación de la respuesta humana.

Tratamientos para la inflamación. Un aspecto de la actividad del compuesto de acuerdo con la invención es que puede reducir la inflamación afectando a los mediadores de la inflamación tales como NK- $\kappa$ B, IL-6 o TNF $\alpha$ . La molécula de NK- $\kappa$ B a menudo es un mediador importante de la inflamación. La mayor activación del NK- $\kappa$ B está asociada con una variedad de enfermedades inflamatorias y afecciones autoinmunitarias.

El compuesto de acuerdo con la invención se puede usar para tratar o mejorar síntomas asociados con la inflamación tales como el dolor, fiebre o fatiga; endometriosis; fiebre; fibromialgia; glomerulonefritis; enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplante de órgano o tejido, p. ej., trasplante de riñón, pulmón, médula ósea o hígado; choque hemorrágico; fibromialgia; hiperalgesia; enfermedad inflamatoria del intestino; gastritis; síndrome del intestino irritable; colitis ulcerativa; una úlcera péptica; una úlcera por estrés; una úlcera sangrante; hiperacididad gástrica; dispepsia; gastroparesis; enfermedad de reflujo gastroesofágico; afecciones inflamatorias de una articulación, incluyendo osteoartritis, artritis psoriásica y artritis reumatoide; enfermedad ocular inflamatoria, que puede estar asociada con, p. ej., trasplante de córnea; isquemia, incluyendo isquemia cerebral (p. ej., lesión cerebral como resultado de traumatismo, epilepsia, hemorragia o accidente cerebrovascular, cada uno de los cuales puede conducir a neurodegeneración); enfermedad de Kawasaki; deterioro del aprendizaje; enfermedades pulmonares (p. ej., ARDS); esclerosis múltiple; miopatías (p. ej., metabolismo proteico muscular, en especial en la septicemia); neurotoxicidad (p. ej., Inducida por VIH); osteoporosis; dolor, incluyendo dolor relacionado con el cáncer; enfermedad de Parkinson; enfermedad de Alzheimer; enfermedad periodontal; parto prematuro; psoriasis; lesión por reperfusión; choque séptico; efectos secundarios de la terapia con radiación; enfermedad de la articulación temporomandibular; lesión hepática inducida por el alcohol incluyendo cirrosis alcohólica; fiebre reumática; sarcoidosis; escleroderma; síndrome de fatiga crónica; afecciones e indicaciones coronarias, incluyendo insuficiencia cardíaca congestiva, reestenosis coronaria, infarto de miocardio, disfunción miocárdica (p. ej., relacionada con la septicemia) y revascularización coronaria; alteraciones del sueño; uveítis; poliartritis seronegativa; espondilitis anquilosante; síndrome de Reiter y artritis reactiva; enfermedad de Still; artritis psoriásica; polimiositis; dermatomiositis; escleroderma; esclerosis sistémica; vasculitis (p. ej. enfermedad de Kawasaki); inflamación resultante de, p. ej., torcedura, esguince o daño del cartílago; curación de heridas; piel fina o frágil; Petequias o equimosis; eritema; y traumatismo. El traumatismo incluye heridas, quemaduras químicas, quemaduras térmicas, quemaduras por radiación y daño de tejidos u órganos asociado con una cirugía tal como una cirugía ortopédica o una cirugía abdominal.

Las afecciones de inflamación pueden incluir inflamación asociada con lesión por reperfusión, reestenosis después de angioplastia, infarto de miocardio o cerebral. Las afecciones o síntomas de inflamación no deseados incluyen afecciones de inflamación pulmonar, p. ej., fibrosis quística, asma agudo, asma crónico, asma resistente a esteroides, bronquitis aguda, bronquitis crónica, enfisema, psoriasis, eczema, síndrome de dificultad respiratoria agudo (ARDS) o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).

Afecciones autoinmunitarias. El compuesto y las composiciones de acuerdo con la invención, se pueden usar para tratar, prevenir o ralentizar el avance de las afecciones autoinmunitarias tales como la diabetes de tipo 1, enfermedad de Crohn, artritis, dermatitis de contacto, afecciones de lupus y esclerosis múltiple (EM). Las afecciones de EM incluyen la EM de recaída-remisión y EM progresiva secundaria. Las afecciones de lupus incluyen lupus eritematoso sistémico, artritis relacionada con lupus eritematoso, cambios en la piel relacionados con lupus eritematoso, anomalías hematológicas relacionadas como lupus eritematoso, insuficiencia renal relacionada con lupus eritematoso, enfermedad cardíaca o pulmonar relacionada con lupus eritematoso, cambios neuropsiquiátricos relacionados con lupus eritematoso, inflamación de tejidos relacionada con lupus eritematoso, lupus eritematoso discoide, lupus eritematoso cutáneo subagudo y lupus eritematoso inducido por fármacos. La artritis y las afecciones relacionadas incluyen la artritis reumatoide, osteoartritis, fibromialgia, osteoartritis primaria, osteoartritis secundaria, artritis psoriásica, artritis relacionada con lupus eritematoso, artritis asociada con enfermedad inflamatoria del intestino aguda o crónica o colitis, artritis asociada con espondilitis anquilosante, inflamación de tejidos relacionada con artritis, dolor de las articulaciones, rigidez de las articulaciones, movimiento deteriorado de las articulaciones, hinchamiento de las articulaciones, inflamación de las articulaciones e inflamación sinovial.

El compuesto de acuerdo con la invención o las composiciones que contienen el compuesto de acuerdo con la invención y uno o más excipientes, se pueden usar para tratar, prevenir, retrasar el inicio o ralentizar el avance de afecciones tales como la espondilitis anquilosante, psoriasis, eczema, colitis, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino aguda o crónica, lesión renal autoinmunitaria y lesión hepática. El compuesto de acuerdo con la invención se puede usar para tratar afecciones pulmonares y de las vías respiratorias incluyendo afecciones de asma tales como asma independiente de esteroides, asma grave, asma atópico, asma agudo o asma crónico, rinitis alérgica, bronquitis crónica, bronquitis aguda, fibrosis quística, enfisema, fibrosis pulmonar, hiperreactividad de

las vías respiratorias pulmonares, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, edema pulmonar y síndrome de dificultad respiratoria agudo.

La encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) es una afección experimental en animales que tiene características clínicas, histopatológicas e inmunológicas similares a la EM humana, y como la EM humana presenta infiltración en el SNC de linfocitos T y monocitos. La EAE se puede inducir en ratones susceptibles mediante inmunización con lipoproteína proteolípida (PLP) en adyuvantes adecuados. El modelo animal de EAE es un modelo in vivo de EM humana usado para estudiar los mecanismos patógenos de la EM y para caracterizar nuevos agentes para tratar la EM.

Tratamiento de trastornos metabólicos. El compuesto de acuerdo con la invención se puede usar para tratar, prevenir o ralentizar el avance de trastornos metabólicos tales como la diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, síndrome X, hipercolesterolemia, hiperglucemia, resistencia a la insulina (p. ej., asociada con la obesidad), intolerancia a la glucosa, hipertrigliceridemia, hiperlipoproteinemia, una afección de lipodistrofia, síndrome X, arteriosclerosis, aterosclerosis y obesidad. El síndrome X (incluyendo el síndrome metabólico) se define como un conjunto de dos o más anomalías incluyendo hiperinsulinemia, obesidad, niveles elevados de triglicéridos, ácido úrico, fibrinógeno, partículas LDL densas pequeñas e inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) y niveles reducidos de HDL-c. Muchos pacientes que tienen resistencia a la insulina pero todavía no han desarrollado la diabetes de tipo 2, tienen también el riesgo de desarrollar el síndrome metabólico, denominado también síndrome X, síndrome de resistencia a la insulina o síndrome plurimetabólico. El síndrome X típicamente aparece cuando un paciente tiene dos o más de hiperlipidemia, hiperinsulinemia, obesidad, resistencia a la insulina, resistencia a la insulina que conduce a la diabetes de tipo 2 y complicaciones diabéticas de la misma, es decir enfermedades en las que la resistencia a la insulina es parte de la fisiopatología.

Los factores de riesgo independientes que se han asociado con la enfermedad cardiovascular asociada con trastornos metabólicos se pueden tratar con el compuesto de acuerdo con la invención. Estos factores de riesgo incluyen hipertensión, niveles de fibrinógeno aumentados, niveles altos de triglicéridos, colesterol LDL elevado, colesterol total elevado y niveles bajos de colesterol HDL. El tratamiento puede dar como resultado la estimulación de las células  $\beta$  pancreáticas para segregar más insulina y/o una menor velocidad de pérdida de células  $\beta$  pancreáticas que se puede producir a lo largo del tiempo en pacientes que tienen diabetes o que son obesos.

El tratamiento de los trastornos metabólicos con el compuesto de acuerdo con la invención se puede combinar con otros tratamientos. La diabetes se puede tratar con el compuesto de acuerdo con la invención y uno o más de una variedad de agentes terapéuticos incluyendo sensibilizadores de insulina, tales como agonistas de PPAR- $\gamma$  tales como glitazonas; biguanidas; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa 1B; inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV; insulina; miméticos de insulina; sulfonilureas; meglitinidas; inhibidores de la  $\alpha$ -glucósido hidrolasa; e inhibidores de la  $\alpha$ -amilasa. La metformina, fenformina, acarbose y rosiglitazona son agentes que se han usado para tratar algunos tipos de diabetes.

Como se ha indicado antes, las composiciones que contienen el compuesto de acuerdo con la invención se pueden usar para tratar, prevenir o ralentizar el avance de la resistencia a la insulina o sus síntomas. La resistencia a la insulina es la menor capacidad de la insulina para ejercer su acción biológica a lo largo de un amplio intervalo de concentraciones que producen menos efecto biológico del esperado. Las personas con resistencia a la insulina tienen una menor capacidad para metabolizar de forma adecuada la glucosa y responden mal, si lo hacen, a la terapia con insulina. Los síntomas de la resistencia a la insulina incluyen la insuficiente activación por la insulina de la captación de glucosa, oxidación y almacenamiento en los músculos e inadecuada represión por la insulina de la lipólisis en el tejido adiposo y de la producción y secreción de glucosa en las células. La resistencia a la insulina puede producir o contribuir al síndrome del ovario poliquístico, intolerancia a la glucosa, diabetes gestacional, hipertensión, obesidad y aterosclerosis. Las composiciones de acuerdo con la invención se pueden usar para reducir los niveles de triglicéridos en pacientes que son resistentes a la insulina.

Los compuestos de acuerdo con la invención se pueden usar para ralentizar el avance o retrasar el inicio de hiperglucemia o para aumentar la sensibilidad a la insulina en la resistencia a la insulina cuando existen o cuando se espera razonablemente que se desarrollen. Otros efectos de los compuestos incluyen una disminución de la intolerancia a la glucosa, ralentización del avance o de la velocidad de pérdida del número de células  $\beta$  de los islotes pancreáticos o de su capacidad para secretar insulina o mayor número de células  $\beta$  de islotes pancreáticos o de la capacidad para secretar insulina.

Afecciones de pérdida ósea. Las composiciones que contienen el compuesto de acuerdo con la invención y uno o más excipientes, se pueden usar para tratar, prevenir, retrasar el inicio o ralentizar el avance de la pérdida ósea o trastornos de osteopenia descritos en la presente memoria, p. ej., una afección de osteoporosis tal como osteoporosis primaria, osteoporosis postmenopáusica o de tipo 1, osteoporosis involutiva o de tipo 2, osteoporosis idiopática, una osteoporosis secundaria tal como una afección de pérdida ósea asociada a glucocorticoides y pérdida ósea asociada con un traumatismo tal como una quemadura térmica, química o por radiación de primer, segundo o tercer grado. Los tratamientos pueden mejorar la masa ósea, densidad ósea y/o resistencia ósea.

Productos farmacéuticos. En algunas realizaciones, la invención proporciona un producto farmacéutico para el



tratamiento de una afección inflamatoria. El producto farmacéutico típicamente comprende (a) el fármaco en una forma farmacéutica tal como una formulación sólida o líquida adecuada para, por ejemplo, la administración oral o parenteral. El envase del fármaco y/o un inserto o etiqueta en el envase tendrán información sobre la eficacia del fármaco, mecanismo de acción, población de pacientes a la que va dirigido, dosificación, régimen de dosis, vía de administración, toxicidad de la agresión biológica o la gravedad de la agresión que se puede tratar usando el fármaco, si se conoce. Cuando la agresión biológica es exposición a radiación, el inserto o etiqueta del envase puede contener información sobre la dosis de radiación o el intervalo de dosis para el que el medicamento se puede usar o está aprobado. El producto farmacéutico puede contener opcionalmente una agenda o instrucciones de uso para que el paciente recuerde cuándo o cómo usar el fármaco, o qué síntomas o efectos del fármaco experimenta el usuario del fármaco durante o después del uso del fármaco. Este se puede usar para ayudar en los análisis de fase IV o de postcomercialización sobre la eficacia del fármaco o los efectos secundarios. Otras realizaciones del producto farmacéutico se describen en otras realizaciones descritas en la presente memoria.

Un producto farmacéutico como se usa en la presente memoria, significa un producto que ha sido revisado y aprobado para la comercialización o venta, por una agencia o entidad reguladora con autoridad para revisar o aprobar solicitudes de venta o uso médico, por ejemplo, la Agencia de alimentos y medicamentos de EE.UU. o la Agencia de evaluación de medicamentos europea. Los usos de productos farmacéuticos incluyen su comercialización o ventas y ofertas para vender o comprarlo para su estudio. Estas actividades típicamente se adhieren a los términos de aprobación de la normativa que pueden afectar o controlar la comercialización, ventas, compras o manipulaciones del producto. El fármaco en un producto farmacéutico puede ser un nuevo fármaco, un fármaco genérico, un producto biológico, un dispositivo médico o un protocolo para usar cualquiera de estos. El producto farmacéutico normalmente resulta de la aprobación de comercialización por la Agencia de alimentos y medicamentos de EE.UU. o la Agencia de evaluación de medicamentos europea, de una nueva solicitud de fármaco de EE.UU. o no EE.UU., una solicitud de nuevo fármaco abreviada, una solicitud de licencia biológica o una solicitud para comercializar un dispositivo médico. Los usos para el producto farmacéutico incluyen su venta al público o compradores privados tales como el Departamento de Defensa de EE.UU., el Departamento de Energía de EE.UU., el Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU. o un comprador de fármacos privado o entidad distribuidora. Otros usos incluyen el uso del fármaco para tratar afecciones médicas indicadas o aprobadas y usos aprobados por el médico o usos fuera de lo indicado en la etiqueta. La aprobación previa de los productos farmacéuticos son otro aspecto de la invención, que pueden ser esencialmente los mismos que los productos farmacéuticos descritos en la presente memoria, pero se pueden usar para preparar un fármaco para la comercialización o la revisión reguladora antes de la aprobación de comercialización.

La población de pacientes a la que va dirigido identificada por el producto farmacéutico también puede especificar poblaciones excluidas, si las hay, lo que se puede aplicar por ejemplo a pacientes pediátricos o pacientes ancianos. La información sobre la dosificación típicamente especificará la dosis diaria del fármaco, mientras que el régimen de dosis describirá con qué frecuencia y durante cuánto tiempo se va a administrar o tomar el fármaco. La vía de administración identificará una o más vías que son adecuadas para usar el fármaco, aunque normalmente una formulación dada estará aprobada para una sola vía de administración. Las dosificaciones, regímenes de dosis y vías de administración que el envase o etiqueta pueden identificar se describen en otra parte en la presente memoria.

En una realización, el producto farmacéutico es para el tratamiento, prevención o mejora de una afección inflamatoria u otra afección descrita en la presente memoria y comprende o incluye una formulación que contiene el compuesto de acuerdo con la invención, formulado con 1, 2, 3, 4 o más excipientes para la administración oral o parenteral, p. ej. inyección intramuscular, subcutánea o subdérmica, con un inserto o etiqueta en el envase que describe la administración de una dosis diaria de, p. ej., 0,5 mg, 1 mg, 4 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg, 150 mg, 175 mg, 200 mg, 225 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg o 500 mg del compuesto de acuerdo con la invención durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más días consecutivos empezando después de haber diagnosticado u observado de otra forma la enfermedad o afección. La información que el inserto o etiqueta del envase pueden contener incluye información sobre las respuestas biológicas al fármaco o al régimen de tratamiento. La información puede incluir una descripción de uno o más de (a) una o más efectos secundarios o toxicidades asociadas con el uso del fármaco en seres humanos o mamíferos tales como primates no humanos, (b) su efecto en la inflamación u otra afección, (c) protocolos o instrucciones para el uso de agentes terapéuticos adicionales tales como dexametasona u otros glucocorticoides con el fármaco, y (d) el tiempo o el periodo de tiempo en el que debe iniciarse la administración del fármaco para el efecto terapéutico mejor o conocido.

Los métodos para analizar perfiles de subconjuntos de células tales como los perfiles de linfocitos T, se pueden obtener de cualquiera de una variedad de métodos, incluyendo la citometría de flujo (FACS), por ejemplo, Levy et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 35:328, 1985. En el análisis por FACS, los anticuerpos monoclonales contra una variedad de subconjuntos de células se unen e identifican antígenos de superficie fenotípicos que están presentes en las células. Existen anticuerpos disponibles en el comercio que pueden detectar la presencia de estos marcadores, de modo que en general no es necesaria la preparación de los anticuerpos. Se espera que los anticuerpos que identifican el mismo o un marcador antigénico estrechamente vinculado den resultados de diagnóstico similares. Por lo tanto, cuando se designa un marcador antigénico en la memoria descriptiva o las reivindicaciones por referencia a un anticuerpo monoclonal particular con el que se une, p. ej., CD4 o CD25, dicha designación incluye este marcador incluso si se usan anticuerpos monoclonales diferentes en la identificación. Los

marcadores fenotípicos de interés incluyen marcadores generales para diferentes tipos de subconjuntos de células, incluyendo CD3 para linfocitos T totales, CD4 para linfocitos T auxiliares/inductores, CD8 para linfocitos T supresores/citotóxicos, y CD16/56 para células NK; subconjunto de marcadores que expresan CD8 tales como CD11b para linfocitos T supresores, CD38 para linfocitos T supresores/citotóxicos activados, HLA-DR para linfocitos T supresores/citotóxicos activados y CD57; y marcadores que expresan CD4 tales como CD25 y HLA-DR para linfocitos T auxiliares/inductores activados, incluyendo células Treg.

Protocolos o métodos de dosificación. Cuando se trata cualquiera de las afecciones o síntomas descritos en la presente memoria, se puede administrar de forma continua (diaria) o de forma intermitente el compuesto de acuerdo con la invención, a un sujeto que padece o es susceptible de padecer la afección o síntoma. Cuando se trata una afección tal como una afección inflamatoria u otra afección descrita en la presente memoria con el compuesto de la invención, la dosificación intermitente podría evitar o mejorar algunos de los aspectos indeseados que normalmente están asociados con la suspensión de la dosificación. Dichos aspectos indeseados incluyen el fracaso del paciente o sujeto para adherirse a un régimen de dosificación diaria o la reducción de las dosificaciones de otros agentes terapéuticos tales como glucocorticoides y/o de sus efectos secundarios o toxicidades indeseados asociados tales como la pérdida ósea o la resorción.

En algunas realizaciones, la dosificación diaria continuará mientras la enfermedad o los síntomas sean evidentes, típicamente para afecciones crónicas. En otras realizaciones, la dosificación diaria continuará durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 días consecutivos y después le seguirá un periodo sin dosificación hasta que sea necesaria de nuevo, o si es necesaria. Estas realizaciones típicamente implican el tratamiento de afecciones agudas que pueden o no reaparecer de vez en cuando. El tratamiento de afecciones crónicas típicamente implicará la dosificación diaria continua durante periodos de tiempo prolongados.

En cualquiera de los regímenes de dosificación continuo (diario) o intermitente, o en el tratamiento de cualquiera de las enfermedades, afecciones o síntomas descritos en la presente memoria, el compuesto de acuerdo con la invención se puede administrar por una o más vías adecuadas, por ejemplo, por vía oral, bucal, sublingual, tópica, intramuscular, subcutánea, subdérmica, intravenosa, intradérmica o mediante un aerosol.

La dosis diaria normalmente es de aproximadamente 0,05 mg/kg/día a aproximadamente 200 mg/kg/día. Los intervalos de dosis típicos son de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/kg/día, incluyendo aproximadamente 0,2 mg/kg/día, 0,5 mg/kg/día, aproximadamente 1 mg/kg/día, aproximadamente 2 mg/kg/día, aproximadamente 4 mg/kg/día, aproximadamente 5 mg/kg/día, aproximadamente 6 mg/kg/día, aproximadamente 8 mg/kg/día, aproximadamente 10 mg/kg/día, aproximadamente 20 mg/kg/día, aproximadamente 40 mg/kg/día o aproximadamente 100 mg/kg/día. También se pueden usar dosificaciones mayores, p. ej. aproximadamente 250 mg/kg/día, aproximadamente 300 mg/kg/día o aproximadamente 350 mg/kg/día, por ejemplo en aplicaciones veterinarias. El compuesto de acuerdo con la invención se puede administrar por vía oral o parenteral usando de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 mg/kg/día o aproximadamente 2-40 mg/kg/día. Dicha dosificación dará típicamente un nivel en el suero del compuesto de acuerdo con la invención de aproximadamente 4 ng/ml o aproximadamente 8 ng/ml a aproximadamente 125 ng/ml o aproximadamente 250 ng/ml, p. ej., de aproximadamente 15 ng/ml a aproximadamente 120 ng/ml o de aproximadamente 20 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml. Dicho nivel en el suero puede ser transitorio, p. ej., que dure de aproximadamente 30 minutos o aproximadamente 60 minutos a aproximadamente 2 horas o aproximadamente 8 horas, lo cual puede ocurrir durante los días en que se administra el compuesto o durante un tiempo posterior para las formulaciones de depósito.

La dosificación diaria continua normalmente se usa para tratar las afecciones crónicas descritas en la presente memoria. Las dosis diarias normalmente se dan como una sola dosis, pero las dosis diarias se pueden dividir en 2 ó 3 subdosis. Los protocolos de dosificación intermitente incluyen la administración del compuesto de acuerdo con invención en días alternos o cada tercer día durante un periodo de tiempo adecuado. Cuando se tratan deficiencias de glóbulos rojos la dosificación normalmente empezará el mismo día que el sujeto experimenta un suceso mieloablativo de corta duración tal como la exposición a una radiación. Para sucesos de duración más prolongada, por ejemplo quimioterapia del cáncer, la dosificación con el compuesto de la invención puede empezar aproximadamente 12 horas, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días o aproximadamente 3 días después de haber administrado un agente de quimioterapia al sujeto. La dosificación diaria puede continuar durante periodos definidos seguidos de un periodo de tiempo fijo o variable sin dosificación. En estas realizaciones, una exacerbación de una enfermedad tal como una exacerbación de esclerosis múltiple, artritis, asma, colitis o enfermedad de Crohn, se pueden tratar con una dosificación diaria durante 3-14 días consecutivos o 5-10 días consecutivos, seguido de un periodo sin tratamiento hasta que se produzca o empiece otra exacerbación.

Afecciones y síntomas clínicos. El compuesto de acuerdo con la invención descrito en la presente memoria es útil para tratar, mejorar, prevenir o ralentizar el avance de afecciones descritas en la presente memoria y/o uno o más de sus síntomas. Dichos usos incluyen inhibir la resorción ósea, reducir los efectos secundarios indeseados asociados o causados por una quimioterapia, por ejemplo, glucocorticoides antiinflamatorios, tratar, prevenir o ralentizar la osteoporosis y las fracturas óseas, inhibir la reestenosis vascular y tratar la retinopatía diabética, degeneración macular, inflamación. Las afecciones o síntomas inflamatorios indeseados, tales como afecciones inflamatorias pulmonares, p. ej., fibrosis quística, asma agudo o crónico, asma bronquial, asma atópico, ARDS o COPD o trastornos autoinmunitarios tales como la osteoartritis, artritis reumatoide, una pancreatitis tal como

pancreatitis autoinmunitaria, lupus eritematoso sistémico, inflamación de tejidos relacionada con lupus eritematoso, artritis relacionada con lupus eritematoso, cambios de la piel relacionados con lupus eritematoso, anomalías hematológicas relacionadas con lupus eritematoso, insuficiencia renal relacionada con lupus eritematoso, enfermedad cardíaca o pulmonar relacionada con lupus eritematoso y cambios neuropsiquiátricos o neurológicos relacionados con lupus eritematoso.

Los síntomas de las afecciones que se pueden tratar incluyen fiebre, dolor en articulaciones (artralgias), artritis, y serositis (peluritis o pericarditis). También se puede usar la administración de otros agentes en los presentes tratamientos. Por lo tanto, el dolor se puede tratar usando fármacos antiinflamatorios no esteroideos, tales como aspirina, salicilatos, ibuprofeno, naproxeno, clinoril, oxaprozina y tolmetina. Las características cutáneas del lupus sistémico se pueden tratar con fármacos antimalaria, tales como hidroxiclороquina, cloroquina y quinacrina. Los retinoides tales como isotretinoína y etretinato también se pueden usar para tratar los síntomas de la piel en combinación con el compuesto de acuerdo con la invención. El daño de órganos se puede tratar con corticosteroides, normalmente administrados por vía oral o intravenosa. Los corticosteroides que se pueden usar incluyen hidrocortisona (cortisol), corticosterona, aldosterona, ACTH, triamcinolona y derivados tales como diacetato de triamcinolona, hexacetónido de triamcinolona, y acetónido de triamcinolona, betametasona y derivados tales como dipropionato de betametasona, benzoato de betametasona, fosfato de sodio y betametasona, acetato de betametasona, y valerato de betametasona, flunisolida, prednisona y sus derivados, fluocinolona y derivados tales como acetónido de fluocinolona, diflorasona y derivados tales como diacetato de diflorasona, halcinónida, dexametasona y derivados tales como dipropionato de dexametasona y valerato de dexametasona, desoximetasona, diflucortolona y derivados tales como valerato de diflucortolona), acetónido de flucorolona, fluocinónida, fluocortolona, fluprednidenol, flurandrenolida, clobetasol, clobetasona y derivados tales como butirato de clobetasona, alclometasona, flumetasona, y fluocortolona.

Cuando la administración oral de corticosteroides es insuficiente, se puede usar la terapia con pulsos de metilprednisolona intravenosa (dosis alta) para tratar la nefritis lúpica y otras manifestaciones no renales graves, tales como la anemia hemolítica, inflamación del sistema nervioso central (cerebritis), recuento bajo de plaquetas y pleuropericarditis grave.

El compuesto de acuerdo con la invención se puede usar para tratar, prevenir o ralentizar el avance de la osteoporosis o fracturas óseas. El tratamiento de los sujetos puede conducir al fortalecimiento de los huesos y/o a la menor pérdida de masa ósea o minerales, dando como resultado una mayor resistencia a las fracturas. Como se usan la presente memoria, "tratar" afecciones tales como las descritas en la presente memoria, significa que el tratamiento puede dar como resultado la mejora, prevención o el avance ralentizado de las afecciones, y/o la mejora, prevención o avance ralentizado de uno o más síntomas de dichas afecciones.

El compuesto de acuerdo con la invención se puede usar para tratar, prevenir o ralentizar el avance o un retrasar el inicio de enfermedades metabólicas tales como la diabetes tipo 1, la diabetes de tipo 2, hiperglucemia, el resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperlipoproteinemia, lipodistrofia, síndrome X y aterosclerosis.

Formulaciones y composiciones para preparar formulaciones. Las realizaciones de la invención incluyen formulaciones descritas aquí y en otras partes en esta descripción. Aunque se puede administrar el compuesto de acuerdo con la invención solo, es habitual presentarlo como formulaciones. Las formulaciones, tanto para uso veterinario como para uso humano, comprenden al menos el compuesto de acuerdo con la invención, junto con uno o más excipientes y opcionalmente uno o más ingredientes terapéuticos adicionales.

Las formulaciones incluyen composiciones que comprenden 1, 2, 3, 4 o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Las composiciones se usan para preparar formulaciones adecuadas para uso humano o animal. Las vías de administración adecuadas para las formulaciones incluyen la vía oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal, rectal y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal, intraocular y epidural). En general, se suministran formulaciones líquidas acuosas o no acuosas o cremas por una vía parenteral, oral o tópica. En otras realizaciones, como en los métodos de dosificación intermitentes de la invención, el compuesto de acuerdo con la invención puede estar presente en forma de una formulación líquida acuosa o no acuosa o una formulación sólida adecuadas para la administración por cualquiera de las vías descritas en la presente memoria, por ejemplo, por vía oral, tópica, bucal, sublingual, parenteral, aerosol inhalado o un depósito tal como un depósito subcutáneo o un depósito intraperitoneal o intramuscular. Se observará que la vía preferida puede variar, por ejemplo, con la afección patológica del sujeto o el peso o la respuesta del sujeto a la terapia con el compuesto de acuerdo con la invención u otra terapia que se usa o que es adecuada a las circunstancias.

Las formulaciones incluyen las adecuadas para las vías de administración anteriores. Las formulaciones se pueden presentar de forma conveniente en una forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica de la farmacia. Las técnicas, excipiente y formulaciones en general se encuentran, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA 1985, 17ª edición, Nema et al., *PDA J. Pharm. Sci. Tech.* 1997 51:166-171, G. Cole, et al., editors, *Pharmaceutical Coating Technology*, 1995, Taylor & Francis, ISBN 0 136628915, H.A. Lieberman, et al., editors, *Pharmaceutical Dosage Forms*, 1992, 2ª

edición revisada, volúmenes 1 y 2, Marcel Dekker, ISBN 0824793870, J.T. Carstensen. *Pharmaceutical Preformulation*, 1998, páginas 1-306, Technomic Publishing Co. ISBN 1566766907. Los excipientes de ejemplo para las formulaciones incluyen cera emulsionante, galato de propilo, ácido cítrico, ácido láctico, polisorbato 80, cloruro sódico, palmitato de isopropilo, glicerina, vaselina blanca y otros excipientes descritos en la presente memoria.

- 5 Las formulaciones o composiciones descritas en la presente memoria para usar para hacer formulaciones adecuadas para la administración por las vías descritas en la presente memoria, comprenden opcionalmente un tamaño medio de partículas en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 500 micrómetros, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 micrómetros o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 75 micrómetros. Los tamaños medios de partículas incluyen un intervalo entre 0,01 y 500 micrómetros en incrementos de 0,05 micrómetros o de 0,1 micrómetros u otros incrementos, por ejemplo, un tamaño medio de partículas de aproximadamente 0,05, 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 75, 85, 100, 120, etc. micrómetros). Cuando el compuesto de acuerdo con la invención o las composiciones que comprenden el compuesto de acuerdo con la invención se usan como productos intermedios para hacer una formulación, pueden comprender 1, 2, 3 o más de estos tamaños medios de partículas o intervalos de tamaños.
- 10 Cuando se prepara alguna de las composiciones o formulaciones que se describen en la presente memoria y que comprenden el compuesto de acuerdo con la invención (y uno o más excipientes), opcionalmente se puede moler, tamizar o granular de otra forma el compuesto o la composición para obtener un tamaño de partículas deseado.
- 15

En algunas realizaciones, el compuesto de acuerdo con la invención se caracteriza porque carece de androgenicidad apreciable. En estas realizaciones, el compuesto de acuerdo con la invención se caracteriza por tener aproximadamente 30% o menos, aproximadamente 20% o menos, aproximadamente 10% o menos o aproximadamente 5% o menos de la androgenicidad de un andrógeno tal como la testosterona, propionato de testosterona, dihidrotestosterona o propionato de dihidrotestosterona, medido en un ensayo adecuado usando referencias positivas y/o negativas adecuadas. Se han descrito ensayos adecuados para la androgenicidad de diferentes compuestos, p. ej., en J.R. Brooks, et al., *Prostate* 1991, 18:215-227, M. Gerrity et al., *Int. J. Androl.* 1981 4:494-504, S.S. Rao et al., *Indian J. Exp. Biol.* 1969 7:20-22, O. Sunami et al., *J. Toxicol. Sci.* 2000 25:403-415, G.H. Deckers et al., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2000 74:83-92. La androgenicidad del compuesto de acuerdo con invención se determina opcionalmente como se describe o esencialmente como se describe en uno o más de estos ensayos o en cualquier otro ensayo.

20

25

Por lo tanto, dicha realización comprende un método para tratar una afección descrita en la presente memoria, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la invención o suministrar a los tejidos del sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la invención, en el que el compuesto de acuerdo con la invención tiene aproximadamente 30% o menos, aproximadamente 20% o menos, aproximadamente 10% o menos o aproximadamente 5% o menos de la androgenicidad de un andrógeno tal como la testosterona, propionato de testosterona, dihidrotestosterona o propionato de dihidrotestosterona, medido en un ensayo adecuado, por ejemplo, como se describe en las citas anteriores. Cuando se llevan a cabo dichos métodos, opcionalmente se hace el seguimiento en los sujetos o mamíferos, p. ej. roedores, seres humanos o primates, de la mejora, prevención o una menor gravedad de la enfermedad, afección o síntoma. Dicho seguimiento puede incluir opcionalmente la medición de una o más citoquinas (p. ej.,  $TNF\alpha$ , IL-13, IL-1 $\beta$ ), WBC, plaquetas, granulocitos, neutrófilos, RBC, células NK, macrófagos u otros tipos de células inmunitarias, p. ej., como se describe en la presente memoria o en las referencias citadas, en la circulación en tiempos adecuados, p. ej., en el valor base antes de iniciar el tratamiento y en diferentes tiempos después del tratamiento con un compuesto de acuerdo con la invención, tal como aproximadamente 2-45 días después de finalizar el tratamiento con un compuesto de acuerdo con la invención.

30

35

40

Como se ha indicado antes, en algunas realizaciones se combina un tratamiento con un compuesto de acuerdo con la invención con un corticosteroide o glucocorticoide. Los corticosteroides se usan en una serie de situaciones clínicas, por ejemplo para disminuir la intensidad o la frecuencia de exacerbaciones o episodios de inflamación o reacciones autoinmunes en afecciones tales como la artritis reumatoide aguda o crónica, osteoartritis aguda o crónica, una afección de colitis tal como colitis ulcerativa, asma agudo o crónico, asma bronquial, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, hepatitis, fibrosis pulmonar, diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 o caquexia. Sin embargo, muchos corticosteroides tienen efectos secundarios o toxicidades significativos que pueden limitar su uso o eficacia. El compuesto de acuerdo con la invención es útil para contrarrestar dichos efectos secundarios o toxicidades sin anular toda la capacidad terapéutica deseada del corticosteroide. Esto permite el uso continuado o una dosificación modificada del corticosteroide, p. ej., una dosificación mayor, sin una intensificación de los efectos secundarios o toxicidades o una disminución de la dosificación de corticosteroide. Los efectos secundarios o toxicidades que se pueden tratar, prevenir, mejorar o reducir incluyen uno o más de la pérdida ósea, menor crecimiento óseo, resorción ósea potenciada, osteoporosis, inmunosupresión, mayor susceptibilidad a la infección, cambios de personalidad o estado de ánimo, depresión, cefalea, vértigo, presión sanguínea alta o hipertensión, debilidad muscular, fatiga, náuseas, malestar, úlceras pépticas, pancreatitis, piel fina o frágil, supresión del crecimiento en niños o sujetos preadultos, tromboembolia, cataratas y edema. Las dosificaciones, vías de administración y los protocolos de dosificación para el compuesto de acuerdo con la invención serían esencialmente como se describen en la presente memoria. Una dosis de ejemplo del compuesto de acuerdo con la invención de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 20 mg/kg/día, se administra durante el periodo durante el cual se administra un corticosteroide y

45

50

55

60

opcionalmente a lo largo de un periodo de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 6 meses o más después de finalizar la dosificación del corticosteroide. Los corticosteroides se administran esencialmente usando dosificaciones, vías de administración y protocolos de dosificación conocidos, véase, p. ej., *Physicians Desk Reference* 54ª edición, 2000, páginas 323-2781, ISBN 1-56363-330-2, Medical Economics Co., Inc., Montvale, NJ.

5 Sin embargo, la dosificación del corticosteroide se puede ajustar opcionalmente, por ejemplo, aumentada aproximadamente 10% a aproximadamente 300% por encima de la dosificación normal, sin un aumento correspondiente de todos los efectos secundarios o toxicidades asociados con el corticosteroide. Dichos aumentos se harían de forma gradual a lo largo de un periodo de tiempo suficiente y según sea adecuado para el estado clínico del sujeto, p. ej., la dosis de corticosteroide diaria aumenta de aproximadamente 10% a aproximadamente

10 20% a un máximo de aproximadamente 300% a lo largo de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 1 año.

El método de tratamiento se puede usar para tratar, prevenir o mejorar un traumatismo agudo tal como un infarto de miocardio, una hemorragia tal como una hemorragia cerebral o accidente cerebrovascular o una fractura ósea, osteoporosis o resorción o pérdida ósea en exceso o no deseada. Los tratamientos se pueden usar para facilitar la reparación del daño o lesión en la piel, mucosa, cartilago, hígado, tejido cardíaco, hueso o SNC o tejido neural, en

15 situaciones en las que hay daño, p. ej. quemaduras químicas o por calor, osteoartritis, artritis reumatoide, cirrosis hepática, osteoartritis, fractura ósea, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular o traumatismo craneal. Los tratamientos también se pueden usar para reducir la pérdida ósea debida a una terapia, p. ej., una terapia con glucocorticoides en una afección de lupus o en pacientes que tienen una enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis aguda o crónica o un trastorno renal tal como insuficiencia renal aguda o crónica o

20 lesión renal autoinmunitaria.

Ejemplos. Los siguientes ejemplos ilustran mejor la invención y no se pretende que la limiten de ninguna forma.

**Ejemplo 1.** Tratamiento de inflamación pulmonar. Se usaron tres compuestos de referencia, 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxi-17-oxoandrostando, 3 $\alpha$ ,16 $\beta$ ,17 $\beta$ -trihidroxiandrostando y 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -trihidroxiandrostando para tratar la inflamación en ratones, esencialmente como se ha descrito (D. Auci et al., *Ann. New York Acad. Sci.* 1051:730-742 2005, cita

25 nueva). Para el estudio se usaron ratones macho CD1 de 5 a 8 semanas de edad (Charles River, Calco, Italia). Los animales se alojaron en un entorno controlado y se les proporcionó alimento para roedores convencional y agua. El cuidado de los animales estaba conforme con la normativa aplicable en protección de animales. Los ratones se asignaron a uno de los siguientes grupos: (1) ratones tratados con  $\lambda$ -carragenano al 2% en disolución salina (grupo de referencia tratado con  $\lambda$ -carragenano), (2) ratones tratados con 0,1 mg, 0,01 mg o 0,001 mg de 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxi-17-oxoandrostando por inyección subcutánea (s.c.) 24 h y 1 h antes de la administración de  $\lambda$ -carragenano, (3)

30 ratones tratados con 0,1 mg, 0,01 mg o 0,001 mg de 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -trihidroxiandrostando por inyección s.c. 24 y 1 h antes del carragenano; (4) ratones tratados con 0,1 mg, 0,01 mg o 0,001 mg de 3 $\alpha$ ,16 $\beta$ ,17 $\beta$ -trihidroxiandrostando por inyección s.c. 24 h y 1 h antes de la administración de  $\lambda$ -carragenano; (5) ratones tratados con vehículo (carboximetilcelulosa al 0,1%, disolución salina al 0,9%, tween 80 al 2%, fenol al 0,05%) por vía s.c. 24 h y 1 h antes

35 de la administración de  $\lambda$ -carragenano; (6) ratones tratados con anticuerpo policlonal de conejo anti-TNF $\alpha$  anti-ratón (200  $\mu$ g) administrado como un bolo intraperitoneal 24 h y 1 h antes de la administración de  $\lambda$ -carragenano (grupo de referencia positivo); y (7) ratones con operación simulada que no se trataron con  $\lambda$ -carragenano. Cada grupo consistía en 10 ratones. Todos los tratamientos se dieron en un volumen final de 100  $\mu$ l. La inflamación pulmonar (cavidad pleural) se indujo como sigue. Los ratones se anestesiaron con isoflurano y se hizo una incisión en la piel al nivel del sexto espacio intercostal izquierdo. El músculo subyacente se diseccionó y se inyectó en la cavidad pleural

40 0,1 ml de disolución salina (referencia) o 0,1 ml de disolución salina que contenía  $\lambda$ -carragenano al 2%. El  $\lambda$ -carragenano es un potente inductor de inflamación, que en este protocolo se pone de manifiesto por la acumulación de líquido y neutrófilos en la cavidad pleural. La incisión se cerró con una sutura y se dejó que los animales se recuperaran.

A las 4 h después de la inyección de  $\lambda$ -carragenano, los animales se sacrificaron por exposición a CO<sub>2</sub>. Se abrió con cuidado el pecho y la cavidad pleural se lavó con 1 ml de disolución salina que contenía heparina (5 U/ml) e indometacina (10  $\mu$ g/ml). El exudado y la disolución de lavado se retiraron por aspiración y se midió el volumen total. Se descartó cualquier exudado contaminado con sangre. La cantidad de exudado se calculó restando el volumen de 1 ml inyectado al volumen total que se recuperó de la cavidad pleural. Los neutrófilos en el exudado se suspendieron

50 en disolución salina tamponada con fosfato y se contaron con un microscopio óptico en una cámara Burkner después de tinción con azul de trypan. Los resultados se analizaron por ANOVA de un factor seguido de un ensayo posterior por el método de Bonferroni para comparaciones múltiples. Un valor *p* menor de 0,05 se consideró significativo. Para el análisis estadístico, cada grupo se comparó con el grupo de ratones de referencia que fueron estimulados con  $\lambda$ -carragenano y no recibieron otro tratamiento.

Todos los ratones que se estimularon con  $\lambda$ -carragenano y se dejaron sin tratar, desarrollaron una pleuritis aguda, produciendo un exudado turbio y número mayor de neutrófilos pleurales. El aumento del volumen de los exudados y del número de leucocitos en la pleura de los ratones tratados con el vehículo era similar al observado en los ratones de referencia que se estimularon con  $\lambda$ -carragenano y no recibieron tratamiento. Con respecto a estos dos grupos de ratones de referencia, los animales tratados con 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxi-17-oxoandrostando, presentaron una reducción

60 significativa del número de neutrófilos en la pleura, el volumen de los exudados pleurales, con dosis de 0,1 mg y

0,01 mg, mientras que la dosis inferior de 0,001 mg era inactiva. El volumen del exudado pleural se redujo significativamente con la dosis de 0,1 mg en los animales tratados con 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxi-17-oxoandrostano, pero no con las dosis inferiores de 0,01 mg y 0,001 mg. Los animales tratados con el 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -trihidroxiandrostano mostraron una reducción significativa del número de neutrófilos en la pleura con las dosis de 0,1 mg y 0,01 mg. El tratamiento con 3 $\alpha$ ,16 $\beta$ ,17 $\beta$ -trihidroxiandrostano también mostró una reducción significativa del número de neutrófilos en la pleura con dosis de 0,1 mg y 0,01 mg. Las potencias del 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -trihidroxiandrostano y del 3 $\alpha$ ,16 $\beta$ ,17 $\alpha$ -trihidroxiandrostano eran similares a las observadas con el anticuerpo policlonal anti-TNF $\alpha$  de referencia, mientras que el 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxi-17-oxoandrostano era menos potente.

La siguiente tabla describe el número de neutrófilos de los grupos de animales tratados con respecto a los animales de referencia no tratados que fueron expuestos al  $\lambda$ -carragenano pero no se trataron con nada más (grupo de referencia negativo). El número de neutrófilos para el grupo de referencia negativo se estableció en 100% y los otros grupos se compararon con este. El grupo de animales que se trató con el anticuerpo anti-TNF $\alpha$  (grupo de referencia positivo) tenía el 29% del número de neutrófilos que tenía el grupo de referencia negativo, lo que indicaba que el anticuerpo tenía un efecto antiinflamatorio contra la exposición al  $\lambda$ -carragenano. El grupo de referencia con vehículo no tuvo un número significativamente reducido de neutrófilos (91%) comparado con el grupo de referencia negativo, que no presentó efecto antiinflamatorio significativo debido al vehículo solo.

3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxi-17-oxoandrostano		3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -trihidroxiandrostano		3 $\alpha$ ,16 $\beta$ ,17 $\beta$ -trihidroxiandrostano	
0,001 mg	97%	0,001 mg	103%	0,001 mg	95%
0,01 mg	73%	0,01 mg	45%	0,01 mg	50%
0,1 mg	73%	0,1 mg	30%	0,1 mg	42%

Otros compuestos que tenían actividad antiinflamatoria estadísticamente significativa en este modelo eran el 17 $\alpha$ -etinilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol (1 mg y 0,1 mg administrado por alimentación oral por sonda) y el 17 $\beta$ -aminoandro-5-en-3 $\beta$ -ol (40 mg/kg administrado por alimentación oral por sonda, aproximadamente 0,5 mg/ratón). Estos compuestos eran activos comparados con los grupos de ratones que se usaron como referencias de vehículo.

**Ejemplo 2.** Análisis de la respuesta inmunitaria. Se encontró que el compuesto de referencia 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -trihidroxiandrostano tenía propiedades biológicas que hacen al compuesto superior como un agente para tratar una afección inflamatoria tal como el asma. Específicamente, al uso del compuesto de referencia no le acompañó un efecto de rebote en la IL-13, que es un efecto secundario conocido de los compuestos antiinflamatorios glucocorticoides tales como la dexametasona. El efecto de rebote de la IL-13 después del glucocorticoide hace que un paciente con asma sea más propenso a tener una posterior exacerbación aguda, por lo tanto un agente antiinflamatorio que no produjera esto sería ventajoso. Esta falta de efecto de rebote de la IL-13 fue inesperada.

La capacidad del 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -trihidroxiandrostano para limitar la carga de eosinófilos y reducir los mediadores inflamatorios clave (IL-5, IL-3, cisteinil leucotrienos) se observó en el modelo de asma de ratón sensibilizado con ovoalbúmina (OVA). Se sensibilizaron ratones BALB/c por inyección intraperitoneal con OVA (en adyuvante de alumbre) los días 1 y 12. Las vías respiratorias se estimularon con OVA los días 28 y 30 por suministro de OVA al pulmón o con disolución salina. El día 31, se sacrificaron 6 ratones del grupo de disolución salina y 6 ratones estimulados con OVA, y se analizó el tejido pulmonar. El resto de los animales se dividió en 6 grupos (6 ratones por grupo). Los grupos de ratones se trataron una vez al día por inyección subcutánea como sigue. Grupo 1, referencia con vehículo (carboximetilcelulosa al 0,1%, disolución salina al 0,9%, tween 80 al 2%, fenol al 0,05%). Grupo 2, dexametasona (5 mg/kg). Grupo 3, 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -trihidroxiandrostano (1 mg/ratón). Se sacrificaron 3 animales en los grupos 1-3 el día 35, 1 h después del tratamiento final, y los 3 animales restantes de los grupos 1-3 se sacrificaron el día 38.

Como se muestra en la siguiente tabla, el 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -trihidroxiandrostano no generó un aumento de IL-13, que se observó con animales que se habían tratado con dexametasona.

Tratamiento	IL-13 (pg/ml)
referencia con disolución salina	220
ovoalbúmina	230
vehículo (día 35)	220
dexametasona (día 35)	340
3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -trihidroxiandrostano (día 35)	195
vehículo (día 38)	190
dexametasona (día 38)	390
3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -trihidroxiandrostano (día 38)	210

Además de una reducción el día 38 del efecto rebote de la IL-13 después de estimulación, los animales tratados con 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -trihidroxiandrostano tenían un nivel reducido de IL-5 en el tejido pulmonar (90 pg/ml) comparado con el

grupo tratado con dexametasona (145 pg/ml). El nivel de IL-5 en el grupo de referencia con vehículo era 75 pg/ml el día 38. Se usaron de esta manera otros compuestos descritos en la presente memoria para identificar su capacidad para tratar o mejorar la inflamación sin un efecto rebote de la IL-13 y/o IL-5, incluyendo el 3 $\beta$ ,16 $\beta$ 17 $\beta$ -trihidroxiandrostano, 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ 17 $\alpha$ -trihidroxiandrostano, 3 $\beta$ ,16 $\beta$ 17 $\alpha$ -trihidroxiandrostano, androst-5-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol, androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol y 17 $\alpha$ -etnilandrost-5-eno- 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol. Estos resultados muestran que el compuesto de acuerdo con la invención se puede usar para tratar la inflamación pulmonar o el asma in vivo.

En otro protocolo, se cultivó una población de mastocitos de médula ósea murina, como sigue. Brevemente, las médulas óseas de ratones Balb/C se lavaron del fémur usando PBS y una aguja 27 g. Las células se cultivaron en una mezcla de RPMI-1640 con FBS al 19% 2/3, y células que secretaban IL-3. Se dejó que las células de la médula ósea se diferenciaron durante 18-25 días en la mezcla que contenía IL-3 antes de usarlas para experimentos. Las células de la médula ósea cultivadas de esta manera tienen un fenotipo similar a los mastocitos de mucosa y se denominan mastocitos derivados de médula ósea (BMMC).

Se comprobó la homogeneidad de los mastocitos multiplicados in vitro mediante técnicas convencionales de citometría de flujo y se tiñeron los marcadores específicos de célula. Entre los días 14 y 21 de la multiplicación, los mastocitos maduros se recogieron y se prepararon para los cultivos de ensayo. El objetivo era evaluar el efecto de compuestos tales como la deshidroepiandrosterona en la desgranulación de mastocitos acoplada a estímulo. Los mastocitos preparados se dispensaron en pocillos de cultivo de ensayo con una densidad de  $1 \times 10^7$  células/ml. En los cultivos de referencia, los mastocitos se indujeron para la desgranulación después de reacción entrecruzada de receptores de IgE con complejos de antígeno-anticuerpo IgE. En grupos paralelos de cultivo, los mastocitos se preincubaron con deshidroepiandrosterona con diferentes dosis seguido de activación usando un anticuerpo anti-IgE. No hubo desgranulación detectable de los mastocitos, medida por la liberación de  $\beta$ -glucuronidasa de los gránulos de almacenamiento citosólicos de las células en ausencia de estímulo. La introducción de anticuerpo anti-receptor de IgE en los cultivos produjo una liberación significativa de  $\beta$ -glucuronidasa. Cuando los mastocitos se expusieron a la deshidroepiandrosterona sola, no hubo desgranulación medible. Sin embargo, los mastocitos previamente expuestos a dosis de deshidroepiandrosterona 100  $\mu$ M durante 5 a 10 minutos antes de la activación con complejos de antígeno-anticuerpo anti-IgE, presentaron aproximadamente 70% de inhibición de la desgranulación. Niveles inferiores de deshidroepiandrosterona mostraron proporcionalmente una menor capacidad para inhibir la desgranulación. En protocolos similares, el 17 $\alpha$ -etnilandrost-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol, androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol o androst-5-eno-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol eran 10-1000 veces más potentes que la deshidroepiandrosterona.

**Ejemplo 3.** Tratamiento de inflamación/choque mortal. Se usaron dos compuestos de referencia, la 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterona (3 $\beta$ -hidroxi-16 $\alpha$ -bromoandrostano-17-ona) y 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxi-17-oxoandrostano, en un protocolo de choque mortal. En un protocolo, se administraron 3 mg de 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterona a un grupo de animales por alimentación oral por sonda, mientras que otro grupo recibió 3 mg de 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterona por inyección subcutánea. Un grupo de animales de referencia recibió una referencia de placebo. En este protocolo, la 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterona se administró a ratones 24 h antes y 1 h después de la administración de una cantidad mortal de lipopolisacárido bacteriano (LPS). Al final del periodo de observación, 72 h después de la administración de LPS, ninguno de los animales de referencia de placebo tratados con vehículo había sobrevivido, mientras que 65% de los animales que habían recibido la 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterona por administración oral sobrevivieron. 50% de los animales que recibieron 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterona por inyección subcutánea sobrevivieron. Los animales que sobrevivieron durante 72 h se recuperaron todos de la exposición al LPS.

En un segundo ensayo, se administró por alimentación oral por sonda 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterona o 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxi-17-oxoandrostano a ratones, 24 h antes y 1 h después de la administración de una cantidad mortal de LPS. Se usó un grupo de animales tratados con vehículo como referencia de placebo. A las 72 h, sobrevivía el 25% de los ratones de referencia de placebo, sobrevivía el 50% de los ratones tratados con 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxi-17-oxoandrostano y sobrevivía el 80% de los ratones tratados con 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterona.

En otro ensayo, se mostró la capacidad de la 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterona y el 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxi-17-oxoandrostano de proteger frente a la lesión pulmonar inducida por exposición a una cantidad inferior a la mortal de LPS, en ratones. En este ensayo, los compuestos de referencia, la disolución salina estéril (referencia negativa) o el vehículo (referencia de vehículo) se administraron a grupos de 5 ratones por alimentación oral por sonda 24 h antes y 1 h después de la administración de 100  $\mu$ g de LPS en la tráquea y pulmones de animales con anestesia ligera. A las 48 h los animales se sacrificaron y se obtuvieron muestras de los pulmones de los animales por lavado broncoalveolar (LBA). Se contó el número de células en el líquido del LBA, mostrando los números altos de células inflamación y daño pulmonar. En este ensayo, las células que median la inflamación y el daño pulmonar se infiltran en los pulmones en respuesta a la presencia del LPS. En los grupos de referencia negativa y referencia de vehículo, el líquido del LBA contenía aproximadamente  $6 \times 10^7$  células/ml. El número de células en los grupos de animales que se trataron con 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterona ( $p = 0,02$ ) o 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxi-17-oxoandrostano ( $p = 0,04$ ) tenían recuentos de células significativamente reducidos en el líquido de LBA (aproximadamente  $4,4 \times 10^7$  células/ml). Este resultado muestra que el compuesto de acuerdo con la invención tiene actividad en afecciones clínicas tales como el asma o la COPD en las que la lesión o daño pulmonar están asociados con la inflamación en exceso o no

controlada. Otros compuestos, p. ej., el 17 $\alpha$ -etnilandrost-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol o el 17 $\beta$ -aminoandrost-5-en-3 $\beta$ -ol, se pueden caracterizar de una forma similar.

**Ejemplo de referencia 4.** Eliminación bacteriana del tejido pulmonar. La capacidad de la 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterona para eliminar una infección por *Pseudomonas aeruginosa* del tejido pulmonar se mostró usando un protocolo publicado previamente, A. van Heeckeren et al., *J. Clin. Invest.*, 100(11):2810-2815 1977; A. van Heeckeren et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 161: 271-279 2000. El protocolo se llevó a cabo en ratones CFTR, que se usan como un modelo animal para la fibrosis quística humana, S.D. Freedman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(24):13995-14000 1999; W. Zeng et al., *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 273:C442-C455 1997. El establecimiento de infección crónica por *P. aeruginosa* usando perlas de agarosa que contienen bacterias (50  $\mu$ l contienen aproximadamente 6,1 x 10<sup>4</sup> UFC/animal) se ha publicado previamente, J.R. Starke et al., *Pediatr. Res.*, 22:698-702 1987. Se trataron dos grupos de ratones (n=9 para cada grupo) con 40 mg/kg de 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterona o vehículo (referencia) y se determinó la carga bacteriana en los pulmones de los animales 10 días después de introducir perlas de agarosa en el pulmón. El día 10, la carga bacteriana en los pulmones de los animales de referencia con vehículo era aproximadamente 6 x 10<sup>6</sup> UFC/animal, mientras que los animales tratados con 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterona tenían una carga bacteriana menor (p = < 0,04). Este resultado muestra que la 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterona no solo es antiinflamatoria, sino que también se puede usar para tratar o reducir la infección pulmonar, lo cual es una propiedad deseable para los agentes que se usan para tratar afecciones tales como la fibrosis quística, en la que pueden coexistir la inflamación y la infección.

**Ejemplo de referencia 5.** Actividad antiinflamatoria en células humanas in vitro. La capacidad de la 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterona y el 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxi-17-oxoandrostano para reducir la inflamación en células humanas in vitro, se demostró usando sangre entera humana que se había expuesto a LPS. Se observó una menor producción de interferón  $\gamma$  por las células en presencia de 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterona (100 ng/ml) y de 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxi-17-oxoandrostano comparado con células expuestas solo a LPS (referencia positiva) o vehículo (dimetilsulfóxido) sin compuesto de referencia (referencia de vehículo). Se midió la cantidad de interferón  $\gamma$  en el medio de crecimiento cuando las células se habían incubado en presencia de LPS durante 24 horas.

**Ejemplo de referencia 6.** Tratamiento de la degeneración autoinmunitaria. Se caracterizaron 3 compuestos de referencia, el 17 $\beta$ -aminoandrost-5-en-3 $\beta$ -ol, 17 $\beta$ -dimetilaminoandrost-5-en-3 $\beta$ -ol y 17 $\beta$ -metilaminoandrost-5-en-3 $\beta$ -ol por su capacidad para mejorar la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) en ratones. Esta afección desmielinizante se usa ampliamente como modelo para la esclerosis múltiple en seres humanos y para ensayar nuevas terapias para tratar la esclerosis múltiple, p. ej., B.F. Bebo Jr. et al., *J. Neurosci. Res.* 52:420-426 1998; R.R. Voskuhl et al., *Neuroscientist*, 7:258- 270 2001; H. Offner et al., *J. Neuroimmunol.*, 130:128-139 2002. La actividad en este modelo muestra la capacidad de los compuestos de referencia de prevenir o ralentizar la velocidad de muerte neuronal que está asociada con el avance de la enfermedad de EAE.

En este protocolo, los compuestos de referencia se administraron a ratones SJL/J hembra por alimentación oral por sonda al empezar los síntomas de la enfermedad. Se usó un antígeno para iniciar la afección de EAE en los ratones. El antígeno que se usó para la inmunización activa era proteólípido proteína (PLP) de ratón 139-151 (HCLGKWLGHDPKF). La inmunización con este antígeno peptídico inicia una enfermedad autoinmunitaria desmielinizante del sistema nervioso central mediada por Th1. El antígeno se preparó por síntesis en fase sólida y se purificó por cromatografía líquida de alto rendimiento. La afección de EAE se inició en los ratones SJL/J hembra por inmunización con 150  $\mu$ g del péptido PLP 139-151 en adyuvante completo de Freund que contenía 200  $\mu$ g de *Mycobacterium tuberculosis*. El protocolo de inmunización era inyección subcutánea en 4 sitios en el flanco trasero el día 0. Después de inmunización, se evaluó diariamente en los ratones los signos clínicos de EAE usando la siguiente escala: 0 = no hay signos clínicos o síntomas; 1 = cola floja; 2 = leve debilidad del limbo posterior y cola floja; 3 = debilidad moderada del limbo posterior y cola floja o ataxia leve; 4 = debilidad grave del limbo posterior y leve debilidad de extremidades anteriores con ataxia moderada; 5 = paraplejia con debilidad de limbo posterior no más que moderada; 6 = paraplejia con debilidad de limbo posterior grave o ataxia grave o estado moribundo.

Los ratones en el grupo de referencia con vehículo empezaron a mostrar síntomas observables de EAE aproximadamente 10-11 días después de inmunización con el antígeno PLP, que es típico para el modelo de enfermedad de EAE. Se administró diariamente a los animales 17 $\beta$ -aminoandrost-5-en-3 $\beta$ -ol, 17 $\beta$ -dimetilaminoandrost-5-en-3 $\beta$ -ol y 17 $\beta$ -metilaminoandrost-5-en-3 $\beta$ -ol por alimentación oral por sonda empezando el día 1, que era 1 día después de inmunización. Los 3 compuestos eran activos con una dosis de 5 mg/kg y redujeron la gravedad clínica de los síntomas que se observaron hasta el día 26 cuando terminó el periodo de observación. La actividad terapéutica de los compuestos se observó en los niveles en la sangre de aproximadamente 10 ng/ml en los ratones. Estos resultados mostraban que los compuestos de referencia eran biológicamente activos en el tratamiento de esta enfermedad de neurodegeneración crónica autoinmunitaria.

**Ejemplo 7.** Inhibición de NK- $\kappa$ B in vitro. Se usó una serie de compuestos para inhibir la activación de NF- $\kappa$ B por el TNF $\alpha$  o LPS en células humanas in vitro. La activación de NF- $\kappa$ B aumenta la expresión de una serie de genes que median la inflamación. Este protocolo usaba células THP-1 humanas, que son células sanguíneas mononucleares humanas con un fenotipo de monocito. La línea celular denominada NF- $\kappa$ B-bla THP-1, contenía un gen indicador de  $\beta$ -lactamasa bajo el control del elemento de respuesta de NF- $\kappa$ B (Invitrogen, CellSensor™, producto N° K1176). En



esta línea celular, el gen indicador de  $\beta$ -lactamasa se integra establemente en las células THP-1. Esta línea celular se usó para detectar agonistas o antagonistas de la ruta de señalización de NF- $\kappa$ B. Estas células NF- $\kappa$ B-bla THP-1 responden a la presencia del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) o lipopolisacárido bacteriano (LPS) mediante la expresión aumentada del gen indicador de  $\beta$ -lactamasa. El nivel de actividad de la enzima  $\beta$ -lactamasa se midió por

5 detección radiométrica de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia. Tanto el TNF $\alpha$  como el LPS son potentes agentes inductores de la inflamación que activan el NF- $\kappa$ B en las células THP-1. En este ensayo, los compuestos que disminuyen la actividad de NF- $\kappa$ B, y por lo tanto la  $\beta$ -lactamasa, en presencia de TNF $\alpha$  o LPS están ejerciendo una actividad antiinflamatoria.

Las células NF- $\kappa$ B-bla THP-1 se mantuvieron mediante pases o con alimentación según fuera necesario. Las

10 células, que se desarrollan en suspensión, se mantuvieron con una densidad entre  $2 \times 10^5$  células por ml y  $2 \times 10^6$  células/ml. Las células se cultivaron en placa con 20.000 células/pocillo en placas de ensayo de fondo transparente, paredes negras, de 384 pocillos (Costar nº 3712-TC placas de baja fluorescencia de fondo) aproximadamente 24 h antes de añadir 10 ng/ml de TNF $\alpha$  o 0,2 ng/ml de LPS para activar el NF- $\kappa$ B. En los ensayos de referencia positiva para la activación de NF- $\kappa$ B, la concentración CE<sub>50</sub> para el TNF $\alpha$  era 0,20 ng/ml después de 1 h de incubación del

15 sustrato con  $\beta$ -lactamasa. La dosis de CE<sub>50</sub> para el LPS era 0,15 ng/ml. La concentración CE<sub>50</sub> para el TNF $\alpha$  o LPS en este ensayo se refiere a 50% de la concentración de TNF $\alpha$  o LPS que produce una activación máxima del NF- $\kappa$ B. El glucocorticoide sintético dexametasona (un potente fármaco antiinflamatorio) disminuyó el efecto del TNF $\alpha$  con una CE<sub>50</sub> de 0,47 nM (media de 5 ensayos) en este ensayo. Se ha descrito una actividad biológica similar para la dexametasona en otros ensayos celulares in vitro con inhibición completa de la activación de NF- $\kappa$ B observada con

20 una CI<sub>50</sub> de aproximadamente 1 nM (M.K.A. Bauer et al., *Eur. J. Biochem.* 243:726-731, 1977).

Usando este ensayo, la CI<sub>50</sub> de los compuestos para inhibir la activación de NF- $\kappa$ B en células NF- $\kappa$ B-bla THP-1 después de estimulación con LPS se muestra a continuación. La concentración CI<sub>50</sub> para los compuestos usados en este ensayo se refiere a la concentración de compuesto que produce un 50% de la inhibición máxima de la

25 activación de NF- $\kappa$ B que puede inducir el compuesto. Los ensayos se llevaron a cabo normalmente 2-4 veces para cada compuesto y los valores mostrados a continuación son las medias de cada compuesto. Los datos de la siguiente tabla 1 muestran que niveles muy bajos de muchos de estos compuestos pueden inhibir el NF- $\kappa$ B en esta células macrófagos humanos.

TABLA 1

Cl <sub>50</sub> *	compuesto
0,47 nM ± 0,11	dexametasona (referencia positiva de antiinflamación)
> 10 μM	estradiol (referencia negativa de antiinflamación)
8,2 fM ± 7,4	3β,7β,16α,17β-tetrahidroxiandrost-5-eno
84,5 fM ± 65	3α,7β,16α,17β-tetrahidroxiandrost-5-eno
> 10 μM	3β,7α,16α,17β-tetrahidroxiandrost-5-eno
> 10 μM	16α-acetoxi-3β,7β,17β-trihidroxiandrost-5-eno
0,4 fM	3β,4β,16α,17β-tetrahidroxiandrost-5-eno
0,01 fM	4β-acetoxi-3β,16α,17β-trihidroxiandrost-5-eno
2,0 fM	3β-acetoxi-7β,11 β,17β-trihidroxiandrost-5-eno
> 10 μM	3β,7 β,11 β,17β-tetrahidroxiandrost-5-eno
10 fM	3β,7β,17β-trihidroxi-11-oxoandrost-5-eno
0,1 pM	17α-metil-3β,11α,17β-trihidroxiandrost-5-eno
> 10 μM	3β,11α-dihidroxi-17-oxoandrost-5-eno
2,0 fM	2α,3β,17β-trihidroxiandrostano
14 pM ± 12	3β,17β-dihidroxiandrost-5-eno
1,2 fM ± 0,28	3β,7β,17β-trihidroxiandrost-5-eno
> 10 μM	3β,7α,17β-trihidroxiandrost-5-eno
19 fM ± 11	3β,7β,17β-trihidroxi-17α-etinilandrost-5-eno
> 10 μM	3β,7β,17β-trihidroxi-17α-trifluorometilandrost-5-eno
6,8 fM ± 5,6	3β,7β,17β-trihidroxi-17α-etinilandrost-5-eno
12 fM ± 9,8	3β,7β,17β-trihidroxi-17α-vinilandrost-5-eno
50,3 fM ± 13,9	3β,7β,17β-trihidroxi-17α-metilandrost-5-eno
64 fM ± 36	3β,7α,17β-trihidroxi-17α-metilandrost-5-eno
30 pM ± 29	16α-fluoroandrost-5-en-17-ona
1,9 nM ± 0,8	16α-yodoepiandrosterona
8,8 μM ± 1,3	16α-bromoepiandrosterona
0,6 μM ± 0,2	16β-bromoepiandrosterona
> 10 μM	16α-hidroxiapiandrosterona
7,2 fM ± 4,7	3β,17β-dihidroxi-17α-metilandrost-5-eno
11,5 fM ± 3,5	3β,17β-dihidroxi-7-oxo-17α-etinilandrost-5-eno
> 10 μM	3β,17β-dihidroxi-7-oxo-17α-metilandrost-5-eno

\*μM = 10<sup>-6</sup> M; nM = 10<sup>-9</sup> M; pM = 10<sup>-12</sup> M; fM = 10<sup>-15</sup> M

Otros compuestos de referencia que presentaron actividad antiinflamatoria en este protocolo fueron el 3α-pentafluoroetilandrost-4-eno-3β,17β-diol (Cl<sub>50</sub> 3,1 nM), 3α-pentafluoroetilandrost-5-eno-3β,17β-diol (Cl<sub>50</sub> 17 nM; la inhibición máxima de NF-κB era 50%), 3α/β,17α-etinilandrostano-3α/β,17β-diol (Cl<sub>50</sub> 200 pM), 17α-trifluorometilandrostano-3α,17β-diol (Cl<sub>50</sub> 190 nM), 17β-glicilandrostan-3β-ol (Cl<sub>50</sub> 0,42 pM), 3β-glicilandrostan-17β-ol (Cl<sub>50</sub> 1 nM), 17-oxima de androstano-3β,16β-diol (Cl<sub>50</sub> 1,9 fM), 17α-etinilandrost-4-en-3-on-17β-ol (Cl<sub>50</sub> 2,9 fM; la inhibición máxima de NF-κB era 80%), 16α-fluoroandrost-5-en-17-ona (Cl<sub>50</sub> 30 pM), 16β-fluoroandrost-5-en-7β-ol-17-ona (Cl<sub>50</sub> 1,5 nM), androstano-3α,16α,17β-triol (Cl<sub>50</sub> 6,9 fM), androstano-3α,16β,17β-triol (Cl<sub>50</sub> 19 fM), éster 17β-succinílico del androst-5-en-3β-ol (Cl<sub>50</sub> 0,2 nM), 3β-acetoxi-7β,17β-dihidroxi-11-oxoandrost-5-eno (Cl<sub>50</sub> 1 fM; la inhibición máxima de NF-κB era 65%). La inhibición máxima de NF-κB de estos compuestos de referencia era aproximadamente de 25% a 80%, que difiere de la inhibición de 100% de la activación de NF-κB por el glucocorticoide sintético dexametasona de este protocolo.

Dos compuestos de referencia aumentaron la actividad del NF-κB en este protocolo, el androst-5-eno-3β,7α,16α-triol-17-ona (Cl<sub>50</sub> 1,3 nM; actividad de NF-κB 140% comparado con las células de control) y el 3β,17α-dimetilandrostano-3α,17β-diol (Cl<sub>50</sub> 40 nM).

Los compuestos de referencia que no presentaron actividad antiinflamatoria en este protocolo fueron el 3α,17α-metilandrostan-3β,17β-diol, 3β-acetoxiandrost-5-eno-3β,17β-diol, 17α-metilandrost-5-eno-3β,17β-diol-7-ona, 16α-fluoroandrost-5-eno-7β-ol-17-ona, 16α-fluoroandrost-5-en-7α-ol-17-ona, 17α-metilandrostan-3β,7α,17β-triol, androst-5-eno-3β,11β,17β-triol, 16α-fluoroandrost-5-en-17-ona, androst-5-eno-3α,17β-diol, androstano-2β,3α,16α,17β-tetrol y androstano-3α,16α,17α-triol, los cuales tenían todos una Cl<sub>50</sub> > 10 μM.

La capacidad de los compuestos de referencia para disminuir la actividad del NF-κB a niveles bajos indica que se pueden usar para tratar la inflamación, en particular en afecciones en las que los niveles en exceso de actividad de transcripción nuclear mediada por el NF-κB tienen una función importante en la patología de la enfermedad o afección.

En el ensayo descrito antes, la inhibición máxima del NF- $\kappa$ B por la dexametasona, 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterona y 16 $\beta$ -bromoepiandrosterona era 100% y no había activación detectable del NF- $\kappa$ B en concentraciones de estos compuestos por encima de la  $Cl_{50}$  para estos compuestos. A diferencia de esto, la inhibición máxima del NF- $\kappa$ B por los otros compuestos de referencia, p. ej., 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrahidroxiandrost-5-eno, 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrahidroxiandrost-5-eno o 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -trihidroxi-17 $\alpha$ -metilandrost-5-eno era menor de aproximadamente 80%, y las cantidades mayores de los compuestos por encima de sus niveles de  $Cl_{50}$  no proporcionaban actividad inhibitoria adicional significativa frente a la activación del NF- $\kappa$ B. Para la mayoría de estos compuestos de referencia, el grado máximo de inhibición del NF- $\kappa$ B en este ensayo era aproximadamente 25-80%, principalmente aproximadamente 30-65% o aproximadamente 30-70%. Estos resultados indicaban que los compuestos de referencia tales como el 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrahidroxiandrost-5-eno inhibían la activación de NF- $\kappa$ B por un mecanismo que no podía prevenir completamente su actividad biológica.

Algunos compuestos de referencia de la tabla 1 tenían una capacidad no detectable para ejercer una actividad antiinflamatoria en el ensayo celular in vitro. Otros compuestos que se ensayaron y que no tenían actividad en el ensayo ( $Cl_{50} > 10 \mu M$ ) incluían el 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxiandrost-5-eno, deshidroepiandrosterona (3 $\beta$ -hidroxiandrost-5-en-17-ona), 3 $\beta$ -hidroxiandrostano-7,17-diona, 16 $\alpha$ -bromo-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroxiandrost-5-eno y 16 $\beta$ -bromo-3 $\beta$ -hidroxiandrost-5-en-17-ona. No obstante, algunos de los compuestos de referencia que eran inactivos en este ensayo celular in vitro, por ejemplo, la 16 $\alpha$ -hidroxiepandrosterona, se encontró que sin embargo eran antiinflamatorios en animales in vivo. Este resultado muestra que los compuestos pueden actuar por diferentes mecanismos o que su actividad requiere más que células de una sola línea celular. La actividad antiinflamatoria de dichos compuestos in vivo puede proceder, por ejemplo, de inducir la síntesis de prostaglandinas y otra actividad en el hígado, conduciendo a una respuesta antiinflamatoria sistémica. Alternativamente, la actividad antiinflamatoria para dichos compuestos puede proceder de la capacidad de los compuestos para inhibir la estimulación de la actividad del NF- $\kappa$ B que procede de fuentes distintas del LPS. Una serie de materiales diferentes pueden activar la actividad del NF- $\kappa$ B, incluyendo el LPS, TNF- $\alpha$ , IL-1, la presencia de determinados productos génicos víricos o bacterianos, la activación de linfocitos B o linfocitos T, o la exposición de las células a la radiación ultravioleta. No todos los tipos de células pueden responder a cada uno de estos estímulos, puesto que no todas las células expresan la maquinaria de señalización que es necesaria para responder a cada uno de estos estímulos. La mayoría de los tipos de células pueden responder a uno o a unas pocas de estas señales, pero raramente un tipo de célula dada puede responder a todos. En el ensayo usado aquí, la activación del NF- $\kappa$ B procede de la estimulación inducida por el LPS bacteriano y por lo tanto, se esperaría que los compuestos que tengan una capacidad limitada para inhibir la ruta de señalización del LPS, tuvieran una capacidad limitada para reducir la actividad del NF- $\kappa$ B en este ensayo.

Los métodos para modular el NF- $\kappa$ B que se han descrito y que se pueden incorporar o usar en la práctica de la presente invención, incluyen los descritos en las siguientes publicaciones. Patentes de EE.UU. nº 5.989.835, 6.410.516, 6.545.027, 6.831.065 y 6.998.383. Otros aspectos de la actividad del NF- $\kappa$ B se han descrito, y también se pueden incorporar en los métodos de la invención, por ejemplo, en A.S. Baldwin, *Annual Rev. Immunol.* 14:649-683 1996; M. Muller et al., *Mol. Cell. Biol.* 22(4):1060-1072 2002; P.A. Baeuerle, *Cell* 95:729-731 1998.

**Ejemplo de referencia 8.** La capacidad de compuestos de referencia seleccionados para tratar el choque/inflamación inducidos por LPS en ratones se examinó mediante un protocolo similar al protocolo descrito antes. Se trató cada uno de 5 grupos de 3 ratones ICR que pesaban aproximadamente 30 g, por inyección intraperitoneal con 120  $\mu$ l de vehículo (éter sulfobutílico-ciclodextrina al 30% en agua), androst-5-eno-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol en vehículo, androst-5-eno-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol en vehículo o 4 $\beta$ -acetoxiandrost-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol en vehículo. Todas las formulaciones de fármaco y vehículo eran disoluciones, no suspensiones. El éter sulfobutílico-ciclodextrina se obtuvo en el comercio (Captisol™, www.cydexinc.com). Había dos grupos de referencia con vehículo, un grupo recibió solo vehículo y el otro recibió vehículo más LPS. El vehículo o fármaco se administró 24 h antes y 1 h antes del LPS (aproximadamente una dosis  $DL_{50/24}$ , es decir letal para 50% 24 h después de la administración de LPS) a los ratones mediante inyección intraperitoneal. Se administraron aproximadamente 40 mg/kg de fármaco (1,2 mg de fármaco/animal para cada administración de los fármacos). Se recogieron los bazo de los animales 1,5 h después de la inyección de LPS y las células de bazo se lisaron y se ensayó el NF- $\kappa$ B activado mediante aislamiento de los núcleos de las células de bazo y midiendo el NF- $\kappa$ B de los núcleos lisados. Los resultados indicaban que los tres compuestos de referencia disminuían el nivel de activación del NF- $\kappa$ B comparado con el grupo de referencia de LPS + vehículo, en aproximadamente 50%. El nivel de NF- $\kappa$ B activado en células de bazo de los animales que se trataron con vehículo y sin LPS era esencialmente el mismo que el NF- $\kappa$ B activado en células de bazo de animales tratados con fármaco. Estos resultados indicaban un potente efecto antiinflamatorio en los animales, mostrado por una disminución del NF- $\kappa$ B activado en los animales tratados con fármaco comparados con los animales de referencia.

Otros compuestos de referencia que se usaron en un protocolo similar con análisis del NF- $\kappa$ B o del TNF- $\alpha$  1,5 horas después de la estimulación con LPS, eran el androstano-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol, androstano-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol-16-ona, 17 $\alpha$ -trifluorometilandrost-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, androst-5-eno-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, androst-5-eno-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol, 3 $\alpha$ -trifluorometilandrost-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, 16-oxima del androstano-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol y androst-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol-7-ona. Todos estos compuestos de referencia se administraron en forma de una disolución (no una suspensión) del compuesto de referencia con éter sulfobutílico-ciclodextrina en agua. Estos compuestos de referencia se

administraron a los animales 24 h antes de la estimulación con LPS y al mismo tiempo que la estimulación con LPS (en lugar de 1 h después de la estimulación con LPS como se ha descrito antes), y después se hizo el análisis del NF- $\kappa$ B en los bazo o del TNF $\alpha$  en la sangre 1,5 h después de la estimulación con LPS. Se administraron 40 mg/kg de los compuestos de referencia y para el 3 $\alpha$ -trifluorometilandro-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol también 4 mg/kg, 0,1 mg/kg y 0,05 mg/kg. Se observó la inhibición del NF- $\kappa$ B y del TNF $\alpha$  para todos estos compuestos de referencia comparados con las referencias con vehículo. Para el 3 $\alpha$ -trifluorometilandro-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, la inhibición máxima del NF- $\kappa$ B y del TNF $\alpha$  se observó en animales que se habían tratado con un nivel de dosis de 0,1 mg/kg.

**Ejemplo 9.** Análisis cinético de la inhibición del NF- $\kappa$ B in vivo. Se examinó la cinética de la inhibición del NF- $\kappa$ B después de inyección de LPS bacteriano en ratones para probar mejor el mecanismo de acción de compuestos tales como el 17 $\alpha$ -etinilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol, que inhibían solo parcialmente la activación del NF- $\kappa$ B que es inducida por el LPS o TNF $\alpha$  en células inmunitarias (macrófagos o monocitos) in vitro, como se describe en el ejemplo 7. En este estudio, los ratones se trataron con 17 $\alpha$ -etinilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol (aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 1,2 mg/animal) por inyección intraperitoneal de una disolución (no una suspensión) del compuesto en el vehículo descrito en el ejemplo 8. El fármaco se inyectó 24 h antes de la inyección intraperitoneal del LPS bacteriano (aproximadamente una DL<sub>50/24</sub>). El estudio usó dos grupos de 12 animales, referencia con vehículo o fármaco administrados 24 h antes de la estimulación con LPS. Se recogieron los bazo de 3 animales de ambos grupos justo antes de la estimulación con LPS y 1,5, 2,0 y 2,5 h después de administración del LPS. Se recogieron las células de bazo y se midió el nivel de NF- $\kappa$ B activado mediante el ensayo del NF- $\kappa$ B en núcleos esencialmente como se ha descrito en el ejemplo 8.

La activación máxima de NF- $\kappa$ B después de administración de LPS se produjo a las 1,5 h en los grupos de referencia con vehículo, que era un aumento de 4 veces frente al nivel de NF- $\kappa$ B activado previo al LPS. Los resultados se muestran a continuación. Los valores para los animales de referencia con vehículo y tratados con fármaco son las unidades de densidad óptica relativa de las mediciones por ELISA del NF- $\kappa$ B en los núcleos de las células de bazo.

Tiempo (horas)	Referencia con vehículo	Tratado con fármaco
0	18	22
1,5	72	2
2,0	10	7
2,5	10	9

La profunda inhibición del NF- $\kappa$ B en el tiempo de medición de 1,5 h y los niveles relativamente normales de actividad del NF- $\kappa$ B en los otros tiempos de medición, indicaba que el compuesto ejercía una inhibición transitoria pero potente del traumatismo inducido por el LPS en un periodo crítico después de la exposición a LPS. Ensayos similares en otros estudios mostraron que el nivel de NF- $\kappa$ B activado a los 30 min y 60 min después de inyección de LPS en ratones de referencia con vehículo, era similar al tiempo de medición previo al LPS en este estudio. Este resultado indica que en este modelo el efecto del LPS en la activación del NF- $\kappa$ B en células de bazo es máximo aproximadamente 1,5 h después de estimulación con LPS. Este tiempo de medición pone de manifiesto un tiempo o ventana de tiempo convenientes en los que se puede evaluar la actividad de los candidatos a fármacos antiinflamatorios in vivo, es decir, de aproximadamente 75 min a aproximadamente 105 min después de estimulación con LPS. La ventana puede variar dependiendo de la vía de administración de la agresión biológica, por ejemplo, el LPS o TNF $\alpha$  administrados por inyección intraperitoneal frente al LPS o TNF $\alpha$  administrados por inyección subcutánea o intramuscular. Igualmente, la agresión biológica puede ser otra cosa, por ejemplo, la exposición de los sujetos a radiación ionizante de aproximadamente 50-60 cGy/min frente a la exposición de sujetos a radiación ionizante de aproximadamente 500-1000 cGy/min o aproximadamente 5-10 cGy/min.

El análisis de la expresión de TNF $\alpha$  inducida por el LPS en ratones mostró que los niveles de TNF $\alpha$  eran máximos 1,5 h después de la estimulación con LPS (500  $\mu$ g de LPS administrados por inyección intraperitoneal) con los niveles más altos de TNF $\alpha$  observados 1-2 h después de estimulación con LPS. Los niveles de TNF $\alpha$  30 min después del LPS y a las 2,5 h eran inferiores.

Otros compuestos de referencia en los que se puede analizar su capacidad para actuar como fármacos biodinámicos incluyen el androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol, androst-5-eno-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol, androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol, androst-5-eno-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol, androst-5-eno-3 $\beta$ ,4 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol, androst-5-eno-3 $\alpha$ ,4 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol, 17 $\alpha$ -etinilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol, 17 $\alpha$ -etinilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol, 17 $\alpha$ -etinilandro-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol-7-ona y análogos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de estos compuestos de referencia, por ejemplo, análogos que son ésteres de hidroxilo o derivados de éter en 1, 2 o más grupos hidroxilo. Los ésteres y éteres adecuados incluyen acetato, n-propionato, i-propionato, succinato, -O-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>R, -O-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>R, -O-C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>R, aminoácidos tales como glicina y alanina (-O-C(O)-CHCH<sub>3</sub>-COOH), hidroxiésteres y éteres de metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>R, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OCH<sub>2</sub>R (p. ej., -O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>), en los que n es 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 y R es -H, -F, -Cl, -Br, -I, -OH, -C(O)OH (o una sal aceptable, p. ej., sal de

sodio o potasio),  $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{OC}_2\text{H}_5$ .

**Ejemplo 10.** La capacidad del compuesto de acuerdo con la invención para afectar a la evolución de la artritis en un modelo de artritis pasiva inducida por colágeno, se examinó esencialmente como se ha descrito previamente (E. Simelyte et al., *Arthritis & Rheumatism*, 52(6):1876-1884, 2005; Z. Han et al., *Arthritis & Rheumatism* 46(3):818-823, 2002; H. Miyahara et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 69(1):69-76, 1993). En este protocolo, la artritis pasiva inducida por colágeno se indujo en ratones DBA/1 por administración de anticuerpos anti-colágeno de tipo II, que inducían una respuesta inmunitaria contra los tejidos de articulaciones en los animales. La eficacia en este modelo de artritis muestra eficacia principalmente contra la inflamación, que se evalúa de forma aislada de los efectos celulares que operan en la artritis. La gravedad de la artritis se evaluó usando un sistema de puntuación clínico semicuantitativo. Se trataron grupos de 8 animales por grupo con  $17\alpha$ -etinilandrost-5-eno- $3\beta$ , $7\beta$ , $17\beta$ -triol con 40 mg/kg/día durante 14 días o vehículo durante 14 días por alimentación oral por sonda. El vehículo era ciclodextrina-éter sulfobutílico al 30% en agua y la disolución de fármaco era vehículo con fármaco de concentración 20 mg/ml.

Los animales se examinaron mediante la medición del grosor del tobillo y la puntuación de la artritis (4 puntos/pata), indicando la puntuación mayor una artritis más grave. El experimento terminó después de aproximadamente 14 días, y se llevaron a cabo mediciones de expresión de genes y análisis histológico. Para el análisis histológico, se recogió la pata posterior izquierda, se fijó en formalina al 10% durante 24 h, se descalcificó y se sumergió en parafina. Las secciones de tejido se tiñeron con hematoxilina y eosina para safranina O-verde rápido para determinar el contenido de proteoglicanos. Se usó un sistema de puntuación semicuantitativo para obtener la inflamación sinovial, inflamación extraarticular, erosión y pérdida de proteoglicanos.

El tratamiento con el compuesto empieza después de la administración de los anticuerpos. El protocolo permite observar los efectos del tratamiento en el avance de la artritis. Los resultados mostraron que la artritis inducida por colágeno en el grupo 1 se redujo en los animales del grupo 1 comparados con los animales del grupo 4 y los días 7-14. La puntuación clínica máxima en los animales tratados con vehículo era 10,2 el día 8 comparado con una puntuación clínica máxima de 5,1 en los animales del grupo 1 el día 7. Al final del protocolo el día 14, la puntuación clínica del grupo tratado con vehículo era 7,8 comparado con la puntuación del grupo de referencia que era 4,1. Las diferencias en la puntuación clínica los días 7-14 eran evidentes en los animales tratados, mostrando un nivel reducido de inflamación presente en los animales tratados comparados con el grupo de animales de referencia con vehículo. El efecto del tratamiento con el  $17\alpha$ -etinilandrost-5-eno- $3\beta$ , $7\beta$ , $17\beta$ -triol era similar al tratamiento con dexametasona, que también inhibe la inflamación y reduce la gravedad de la artritis en este modelo animal. La capacidad del  $17\alpha$ -etinilandrost-5-eno- $3\beta$ , $7\beta$ , $17\beta$ -triol para reducir la gravedad de la artritis contrasta con supresores de la inmunidad mediada por células tales como el metotrexato o agentes anti-TNF $\alpha$ , que tienen poca eficacia en este modelo de artritis.

**Ejemplo de referencia 11.** Se investigó la capacidad de los compuestos de referencia para afectar a la lesión pulmonar inducida por LPS en ratones. Los modelos de lesión pulmonar inducida por LPS se han usado previamente para evaluar los tratamientos para la lesión pulmonar aguda (ALI), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) y septicemia o choque por endotoxinas (Metz et al., C., *Chest* 100(4): 1110-9, 1991; Windsor, A.C. et al., *Ann. J. Med. Sci.* 306(2): 111-6, 1993; Brigham K.L. et al., *Am. Rev. Respir. Dis.* 133(5): 913-27, 1986).

El protocolo llevado a cabo era esencialmente como se describe en Su, X. et al., *Intensive Care Med.* 30:133-140, 2004. Ratones C57/BL6 hembra de 6-8 semanas de edad (peso corporal medio de 25 g) obtenidos de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) se distribuyeron aleatoriamente en grupos de 7 animales y se mantuvieron en alojamiento y con alimentación estándar. Los grupos eran (1) ratones tratados con disolución salina y LPS, (2) ratones tratados con vehículo y LPS, (3) ratones tratados con 125  $\mu\text{g}$  de dexametasona, (4) ratones tratados con androst-5-eno- $3\beta$ , $7\beta$ , $16\alpha$ , $17\beta$ -tetrol 40 mg/kg y LPS, (5) ratones tratados con  $5\alpha$ -androstano- $3\beta$ , $16\alpha$ -diol-17-ona 40 mg/kg y LPS, (6) ratones tratados con  $5\alpha$ -androstano- $3\beta$ , $17\beta$ -dihidroxi-16-oxima 40 mg/kg y (7) ratones tratados con androst-5-eno- $3\alpha$ , $7\beta$ , $16\alpha$ , $17\beta$ -tetrol 40 mg/kg.

El día -1 los ratones se trataron previamente con el compuesto de referencia o vehículo. El día 0 los ratones se trataron con una segunda dosis de compuesto o vehículo. El día 0 + 60 min los ratones se estimularon con 100  $\mu\text{g}$  de LPS de *E. coli* (Sigma) con visualización directa de la tráquea con anestesia ligera. El día 2 (es decir, punto de medición de 48 h después de estimulación con LPS) los ratones se sacrificaron y se obtuvieron los LBA (en los que se contaron las células y se midieron los niveles de TNF $\alpha$ /IL6). Se recogieron los pulmones, se picaron y se usaron para estudios de mieloperoxidasa (MPO). La inflamación pulmonar aguda inducida por LPS se llevó a cabo mediante instilación de 50 mg de LPS (*E. Coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich) en 100 ml de PBS en las tráqueas con anestesia ligera (isoflurano) con visualización directa. En el tiempo de medición de 48 h los ratones se sacrificaron. Después de esto, se establece una traqueotomía después de exposición de la tráquea en la parte inferior del cuello. Se inserta una aguja de calibre 20 con extremo romo en la tráquea expuesta, que después se une y se usa para obtener el lavado broncoalveolar (LBA). Para minimizar la hemorragia y traumatismo de las vías respiratorias, el LBA se realiza usando 0,5 ml de PBS estéril x 3. Típicamente se recuperan un total de 1300 ml de este procedimiento. Los recuentos celulares diferenciales de leucocitos se determinan en el líquido del LBA (LLBA) usando un hemacitómetro. Los recuentos diferenciales se realizan en 80-100 células. Después de obtener el LBA, la cavidad del pecho se abre y el corazón/pulmones se perfunden con 3 ml de disolución salina estéril a través de una punción

ventricular R. Después se recoge todo el tejido pulmonar y se prepara para el ensayo de MPO. Para este ensayo, los pulmones se homogeneizan individualmente en tampón de fosfato de potasio (pH 6,0 que contiene bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 0,5%). Después de centrifugación (14.000 X g, 10 min 4°C) se añadieron 50 µl de líquido sobrenadante a 950 µl de tampón de fosfato de potasio que contiene dihidrocloruro de o-dianisidina 0,2 mg/ml (Sigma-Aldrich) y peróxido de hidrógeno al 0,00002%. Los cambios en la absorbancia se miden a 460 nm. Los niveles de citoquinas se determinan en el líquido sobrenadante exento de células del LLBA (200 X g, 10 min, 4°C) por análisis de ELISA para el TNF $\alpha$ , IL-6 (R&D Systems) usando análisis de ELISA disponibles en el comercio. Son particularmente llamativos los resultados para el androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol, para el que se encontró que los animales tratados por vía oral con este compuesto tenían niveles reducidos de MPO, TNF $\alpha$  e IL-6 en el LBA comparado con los animales tratados con vehículo. El efecto en la MPO, que es una medida de la carga de neutrófilos en el pulmón, y la citoquina proinflamatoria TNF $\alpha$ , era particularmente profundo. Esto sugiere la capacidad del compuesto de referencia para bloquear la migración de células proinflamatorias a tejido inflamado, así como para reducir la señalización de citoquinas proinflamatorias. En este modelo, la inflamación aguda probablemente es dirigida por la estimulación con LPS de elementos de la inmunidad innata. Muchos de estos mismos mediadores están en un nivel más elevado y se cree que están implicados en la inflamación pulmonar asociada con diferentes trastornos, incluyendo la fibrosis quística, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, bronquitis aguda y crónica, e incluso algunas enfermedades infecciosas como la tuberculosis. La observación de que el tratamiento con el androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol reduce notablemente los niveles de MPO y de citoquinas proinflamatorias en el LLBA a las 48 h, está en consonancia con las actividades antiinflamatorias descritas en la presente memoria para el androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol en modelos específicos de enfermedad de inflamación crónica, incluyendo la EAE.

**Ejemplo 12.** Reacción mixta de linfocitos (MLR) humanos. La capacidad del 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxi-17-oxoandrostano, 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroxi-16-oxoandrostano, 17 $\alpha$ -etinilandrost-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol, y 17 $\beta$ -aminoandrost-5-eno-3 $\beta$ -ol para afectar a la estimulación específica de antígenos en la que los linfocitos T humanos responden a un antígeno extraño específico (complejo de histocompatibilidad principal). La MLR se usa como un modelo in vitro de respuestas de hipersensibilidad de tipo retrasado y muestra el efecto que puede tener un compuesto en las respuestas de linfocitos T específicos de antígeno humano in vivo. La inhibición de la MLR por un compuesto muestra un efecto de supresión inmunitaria del compuesto en los linfocitos. Los compuestos que no inhiben la MLR no son supresores inmunitarios para la activación específica de antígeno de los linfocitos que responden.

Se obtuvieron muestras de sangre de 3 (2 hombres, 1 mujer) voluntarios humanos sanos, en ayunas, de 23-31 años de edad. Los sujetos no usaron fármacos antialérgicos inmunomoduladores o antibióticos los tres meses antes del estudio. Se extrajo sangre de los sujetos a las 9 y 10 am para limitar las posibles fluctuaciones en los niveles en la circulación de hormonas o citoquinas que podrían haber influido en las respuestas in vitro de sus linfocitos. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron por centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque (densidad 1,077, Biochrom AG, Berlín, Alemania) y se volvieron a suspender en medio de cultivo (RPMI 1640 complementado con L-glutamina 2 mM, penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 mg/ml) (Invitrogen s.r.l., Milan, Italia). Se usó plasma inactivado autólogo (respondedor) al 10%. Se mezclaron 500.000 PBMC respondedoras (PBMCr) y 500.000 PBMC estimuladoras (PBMCs) alogénicas irradiadas (30 Gy) en una relación 1:1 en 200 µl de medio y se cultivaron durante 6 días en placas de fondo plano de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en una concentración de 300 nM o 30 nM para cada uno de los 4 compuestos. Los compuestos se disolvieron en etanol y después se diluyeron a la concentración deseada con medio de cultivo, dando una disolución final que contenía etanol al 0,01%. Este vehículo se usó como referencia. Los controles también incluían PBMCr y PBMCs cultivadas por separado. Durante las últimas 8 horas del periodo de cultivo las PBMC se pulsaron con [<sup>3</sup>H]-timidina 1 µCi/pocillo (Amersham, Milán, Italia). Después las células se recogieron y se midió la incorporación de radiactividad con un contador de células beta. Se calcularon las cpm medios de los pocillos por cuadruplicado. La proliferación de linfocitos T se expresó como un índice de estimulación: SI=cpm (PBMCs xPBMCr)/ cpm (PBMCr) +cpm (PBMCs). Se llevaron a cabo análisis estadísticos usando el ensayo t de Student. Las cpm obtenidas por cuadruplicado de cada compuesto de ensayo, se compararon con las respuestas proliferativas obtenidas en PBMCr y PBMCs de referencia cultivadas en presencia del vehículo. Las diferencias se consideraron significativas con p<0,05.

Los resultados no mostraban inhibición de la MLR por ninguno de los 4 compuestos excepto el 17 $\beta$ -aminoandrost-5-en-3 $\beta$ -ol 300 nM. Esto indicaba que el 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxi-17-oxoandrostano, 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroxi-16-oxoandrostano y 17 $\alpha$ -etinilandrost-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol, no eran inmunosupresores apreciables en este ensayo en concentraciones de 300 nM o 30 nM (p>0,05), mientras que el 17 $\beta$ -aminoandrost-5-en-3 $\beta$ -ol 300 nM era moderadamente inmunosupresor (p<0,05) comparado con las reacciones de referencia. Estos resultados muestran que el 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxi-17-oxoandrostano, 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroxi-16-oxoandrostano y 17 $\alpha$ -etinilandrost-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol no serían inmunosupresores para los linfocitos en seres humanos in vivo. Estos resultados están de acuerdo con la capacidad del compuesto de acuerdo con la invención de ser agente antiinflamatorio (véase, p. ej. el ejemplo 7) sin ser inmunosupresores.

**Ejemplo 13.** Análisis de la inmunosupresión. Los esteroides glucocorticoides tales como la dexametasona o hidrocortisona típicamente son inmunosupresores y tienen toxicidades significativas asociadas con su uso. Se examinó la inmunosupresión en un ensayo de ganglios linfáticos poplíteos de antígeno indicador en ratones,

esencialmente como se ha descrito previamente (C. Goebel et al., *Inflamm. Res.*, 45(Suppl. 2):S85-S90, 1996; R. Pieters et al., *Environmental Health Perspectives* 107(Suppl. 5): 673-677, 1999). Este protocolo se usó para analizar la actividad del  $17\alpha$ -etinilandrost-5-eno- $3\beta,7\beta,17\beta$ -triol en el ensayo de ganglios linfáticos poplíteos (PLN) para mostrar que el compuesto no tiene una actividad inmunosupresora apreciable in vivo. En este protocolo, el vehículo era carboximetilcelulosa al 0,1%, disolución salina al 0,9%, tween 80 al 2% y fenol al 0,05%, que contenía  $17\alpha$ -etinilandrost-5-eno- $3\beta,7\beta,17\beta$ -triol en suspensión, en los animales tratados con fármaco. La evaluación de la actividad incluía (1) medir la supresión del número de linfocitos totales, células secretoras de anticuerpos IgM, IgG1 e IgG2a (ASC) específicos de antígeno (ensayo ELISPOT) en células de ganglios linfáticos poplíteos; (2) análisis de la expresión de marcadores de superficie celular (CD4, CD8, CD19, F480, CD80, CD86) por citometría de flujo de células vivas en suspensión; y (3) producción de IL-4, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  por linfocitos in vitro (ELISA).

Se usaron grupos (n = 5 por grupo) de ratones BALB/C exentos de patógenos específicos. El grupo de referencia positiva se trató con vehículo (alimentación oral por sonda) y 5  $\mu$ g/día de dexametasona por inyección subcutánea para inducir inmunosupresión. Los animales de referencia con vehículo (referencia negativa) se trataron solo con vehículo (alimentación oral por sonda). Un grupo de animales se trató con 0,1 mg/día de  $17\alpha$ -etinilandrost-5-eno- $3\beta,7\beta,17\beta$ -triol por alimentación oral por sonda. Otro grupo se trató con 1 mg/día de  $17\alpha$ -etinilandrost-5-eno- $3\beta,7\beta,17\beta$ -triol administrado a los animales por alimentación oral por sonda. Los resultados se analizaron por el ensayo t de Student de dos colas con varianzas iguales. Se inyectó a los animales en la almohadilla de la pata posterior derecha 50  $\mu$ l de dosis de sensibilización recién preparada de TNP-OVA. Se administró dexametasona (inyección de fosfato de decádrón; fosfato sódico de dexametasona) por inyección subcutánea en la nuca diariamente, inmediatamente después de la sensibilización con TNP-OVA. El  $17\alpha$ -etinilandrost-5-eno- $3\beta,7\beta,17\beta$ -triol se administró inmediatamente después por alimentación oral por sonda. Cinco días después de inyección de TNP-OVA, se extrajo sangre por punción orbital, y los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se extirparon los ganglios linfáticos poplíteos y se separaron del tejido graso adherente. Se prepararon suspensiones de células solas, se volvieron a suspender en 1 ml de PBS-BSA (1%) y se contaron. Se contaron las células y se midieron la IL-4, IL-5 e IFN $\gamma$ .

El número medio de linfocitos en los PLN del grupo de referencia con vehículo era  $7,8 \times 10^6$  por ganglio linfático comparado con  $2,9 \times 10^6$  por ganglio linfático en el grupo de animales tratado con dexametasona. Este menor recuento de linfocitos mostraba claramente la notable inmunosupresión que se observa típicamente con el uso de dexametasona y otros compuestos glucocorticoides. A diferencia de esto, el grupo tratado con 1 mg/día de  $17\alpha$ -etinilandrost-5-eno- $3\beta,7\beta,17\beta$ -triol tenía  $8,2 \times 10^6$  linfocitos por ganglio linfático y el grupo tratado con 0,1 mg/día de  $17\alpha$ -etinilandrost-5-eno- $3\beta,7\beta,17\beta$ -triol tenía  $11,1 \times 10^6$  linfocitos por ganglio linfático. Los resultados mostraban que el  $17\alpha$ -etinilandrost-5-eno- $3\beta,7\beta,17\beta$ -triol no era inmunosupresor, sino que era potenciador inmunitario. El tratamiento con 1,0 mg/día y 0,1 mg/día de  $17\alpha$ -etinilandrost-5-eno- $3\beta,7\beta,17\beta$ -triol aumentó los niveles de IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-5 comparado con el grupo de referencia con vehículo, indicando también la potenciación inmunitaria. El efecto del  $17\alpha$ -etinilandrost-5-eno- $3\beta,7\beta,17\beta$ -triol con 0,1 mg/día en los niveles de IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-5 era mayor que en el grupo que se trató con 1,0 mg/día. A diferencia de esto, los niveles de IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-5 eran menores en el grupo tratado con dexametasona comparado con el grupo de referencia con vehículo o con cualquiera de los grupos tratados con fármaco.

**Ejemplo 14.** Análisis de la inmunosupresión. Se caracterizaron varios compuestos por su capacidad para afectar a las respuestas inmunitarias. Este protocolo examinada los efectos inmunitarios de los compuestos en un ensayo inmunitario convencional. El ensayo de respuesta inmunitaria específica a la ovoalbúmina (OVA) es un sistema bien establecido para medir las respuestas inmunitarias anamnésicas (tanto mediadas por célula como mediadas por anticuerpo). Se inmunizaron ratones BALB/c por inyección intraperitoneal (volumen total 200  $\mu$ l) los días 0 y 7 con 100  $\mu$ g de OVA precipitada con alumbre (25 mg/ml) en disolución salina. Los ratones (n = 5 por grupo) se trataron diariamente (alimentación oral por sonda de 40 mg/kg, aproximadamente 1 mg/animal) durante 20 días con compuesto. El día 20, se extrajo sangre y se ensayaron por ELISA los títulos de anticuerpos contra la OVA. Los compuestos que se ensayaron fueron el  $3\beta,16\alpha$ -dihidroxi-17-oxoandrostando,  $16\alpha$ -bromoepiandrosterona,  $17\alpha$ -etinilandrost-5-eno- $3\beta,7\beta,17\beta$ -triol, 17-oxima de  $3\beta,16\alpha$ -dihidroxiandrostando,  $17\beta$ -aminoandrostando-5-eno- $3\beta$ -ol y  $3\alpha,16\alpha,17\beta$ -trihidroxiandrostando. Ninguno de estos compuestos era profundamente inmunosupresor, con títulos de anticuerpo contra OVA similares a los del grupo de referencia con vehículo.

**Ejemplo 15.** Disminución de glucosa y mejora de la resistencia a la insulina. Se evaluaron los efectos de disminución de la glucosa y la mejora de la resistencia a la insulina en el modelo de ratón diabético db/db de diabetes humana y resistencia a la insulina. En estos estudios, ratones C57BL/Ks *db/db* de aproximadamente 8 a 10 semanas de edad se dividieron en grupos de 10 cada uno y después se trataron con una referencia con vehículo (sin fármaco) o con  $17\alpha$ -etinilandrost-5-eno- $3\beta,7\beta,17\beta$ -triol por alimentación oral por sonda. El compuesto se administró dos veces al día con 20 mg/kg/día (dosis de 10 mg/kg administrada dos veces al día), 40 mg/kg/día (dosis de 20 mg/kg administrada dos veces al día) u 80 mg/kg/día (dosis de 40 mg/kg administrada dos veces al día) durante hasta 28 días. Se hizo el seguimiento de los niveles de glucosa en la sangre dos veces por semana durante el periodo de administración, usando una cantidad mínima de sangre (sangrados de muesca de la cola) para medir la concentración de glucosa mediante tiras de glucómetro. En momentos de tiempo específicos durante el periodo de administración (día 14 y día 28), también se realizó una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) por

administración de una dosis oral convencional de 1 g/kg de glucosa (aproximadamente 40 mg en un ratón de 40 mg) y después se hizo el seguimiento de la fluctuación de los niveles de glucosa en la sangre rápidamente después de 15, 30, 60 y 120 minutos después de la dosis de glucosa. En el grupo tratado con fármaco, se observó una disminución de los niveles hiperglucémicos de glucosa en la sangre de aproximadamente 40% en ratones *db/db*. La glucosa en la sangre alcanzó 380 mg/dl en el grupo de referencia con vehículo y era <230 mg/ml después de al menos 10 días de administración en el grupo tratado con fármaco. El tratamiento con dos dosis diarias de 80 mg/kg de fármaco dos veces al día durante 28 días redujo notablemente la variación máxima de la glucemia de aproximadamente 400 mg/dl 30 min después de administración de glucosa oral observado en los animales tratados con vehículo a <200 mg/dl en el grupo tratado con fármaco.

**Ejemplo 16.** Tratamiento de la hiperglucemia en ratones con obesidad inducida por la dieta (OID). El efecto de un fármaco para potenciar la sensibilidad periférica a la insulina se puede estudiar en un modelo de ratón en el que se alcanza un estado de resistencia a la insulina mediante alimentación de los animales con una dieta enriquecida en grasas (60% de la ingestión calórica total) durante al menos 6 semanas. Este modelo se ha descrito, por ejemplo, en J. N. Thupari et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(14):9498-9502, 2002, H. Xu et al., *J. Clin. Invest.*, 112:1821-1830, 2003, H. Takahashi et al., *J. Biol. Chem.*, 278(47):46654-46660, 2003. En estas condiciones de dieta, los ratones presentaron un peso corporal aumentado (+35 g) y un estado de intolerancia a la glucosa, que se pone de manifiesto como un retraso significativo en el tiempo de depuración de la glucosa administrada por vía oral durante una PTOG (prueba de tolerancia oral a la glucosa) convencional.

Para estos estudios, animales de aproximadamente 4 semanas de edad se dividieron en grupos de 10 animales cada uno y después se trataron con una referencia con vehículo (sin fármaco) o con 17 $\alpha$ -etinilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol por alimentación oral por sonda. Se administraron 20 mg/kg, 40 mg/kg u 80 mg/kg de 17 $\alpha$ -etinilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol dos veces al día durante hasta 28 días. El día 14 y el día 28 durante el periodo de administración, se llevó a cabo una PTOG. En este modelo de OID de resistencia a la insulina, el 17 $\alpha$ -etinilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol redujo notablemente la intolerancia a la glucosa comparado con los animales de referencia con vehículo, indicado por una mejora significativa de la variación glucémica en la PTOG. Estos descubrimientos mostraron que el tratamiento con el 17 $\alpha$ -etinilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol potenciaba la sensibilidad o captación de insulina periférica, lo cual mejoraba la intolerancia a la glucosa en estos animales.

**Ejemplo 17.** Se llevó a cabo un protocolo de tratamiento similar al descrito en el ejemplo 15 con ratones *db/db* que eran más jóvenes que los animales descritos en el ejemplo 15. Los animales (n = 8 a 10 por grupo) se trataron con 17 $\alpha$ -etinilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol o vehículo por alimentación oral por sonda dos veces al día con 40 mg/kg/día (dosis de 20 mg/kg administrada dos veces al día) y 80 mg/kg/día (dosis de 40 mg/kg administrada dos veces al día). Al inicio de la administración, los animales tenían 6 semanas de edad, antes del inicio de los niveles elevados de glucosa o hiperglucemia. La administración de vehículo o de fármaco se mantuvo durante 32 días para determinar el efecto de los tratamientos en el inicio y la velocidad de avance de la hiperglucemia en los animales. En el grupo de referencia, el inicio de la hiperglucemia se observó después de 25 días de administración y continuó empeorando, es decir los niveles de glucosa en la sangre subieron de normales a hiperglucemia manifiesta al final del periodo de administración de 32 días. A diferencia de esto, los niveles de glucosa en ambos grupos de tratamiento no subieron por encima de niveles normales al final del periodo de administración de 32 días, mostrando que el tratamiento con el fármaco retrasaba el inicio de la hiperglucemia a lo largo del transcurso del protocolo.

La administración de 17 $\alpha$ -etinilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol a ratones macho diabéticos *db/db* de 8 semanas de edad suprimió notablemente los niveles hiperglucémicos de glucosa basal en la sangre, un efecto que era evidente después de 10 días de administración y que se mantuvo durante 18 días adicionales de tratamiento continuo de dos veces al día en el grupo de dosis de 40 mg/kg. En ratones macho *db/db* más jóvenes, de 6 semanas de edad, el tratamiento con 40 mg/kg de 17 $\alpha$ -etinilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol bloqueó completamente el avance de los animales al estado hiperglucémico que se observó en el grupo tratado con vehículo después de 25 días de administración. Los animales tratados mantuvieron niveles de glucosa en la sangre que eran comparables a los de las crías de la misma camada *db/+* delgadas. Además, los resultados de las PTOG realizadas en el modelo de animales tratados mostró una mejora significativa de la intolerancia a la glucosa comparado con los animales de referencia con vehículo.

**Ejemplo 18.** Disminución de la glucosa en ratones diabéticos *db/db* de 8 semanas de edad. Se llevó a cabo el protocolo de pinzamiento hiperinsulinémico-normoglucémico para medir la sensibilidad a la insulina in vivo. En este procedimiento, se administró insulina para elevar la concentración de insulina mientras que se infundía glucosa para mantener la normoglucemia o un nivel de glucosa en sangre normal, fijo (aproximadamente 180 mg/dl). La velocidad de infusión de la glucosa (VIG) necesaria para mantener la normoglucemia mostraba la acción de la insulina en estos animales. El objetivo de este protocolo era investigar la capacidad del 17 $\alpha$ -etinilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol y el androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol para mejorar la resistencia a la insulina sistémica y mejorar la eliminación de glucosa de todo el cuerpo en el modelo de pinzamiento hiperinsulinémico-normoglucémico. También se evaluaron el grado de sensibilidad de la insulina del músculo esquelético y hepática y la captación de glucosa específica de tejido. La administración a los animales fue diaria por alimentación oral por sonda durante 14 días. El día 10 de tratamiento, se implantaron catéteres en la arteria carótida y en la vena yugular. El día del pinzamiento (día 14) se administró el compuesto a las 7:30 am.



Se evaluaron el peso corporal y la concentración de glucosa el día 0, 7 y el día 14 de tratamiento. El día 14 se realizó un pinzamiento normoglucémico-hiperinsulinémico. Se retiró el alimento a las 7:30 am y a las 10:30 una infusión continua cebada de  $[3\text{-}^3\text{H}]\text{-glucosa}$  (0,05  $\mu\text{Ci}/\text{min}$ ). Se tomó una muestra de sangre base a las 12:50 (-10 min) y a la 1:00 (0 min) se inició un pinzamiento normoglucémico-hiperinsulinémico por administración de 10 mU/kg/min de insulina. La glucosa se infundió a una velocidad variable para pinzar la concentración de glucosa en ~180 mg/dl. Se administró un bolo de  $[^{14}\text{C}]\text{-2-desoxiglucosa}$  al final del estudio para evaluar la captación de glucosa específica de tejido. Se evaluó la  $[^{14}\text{C}]\text{-2-desoxiglucosa}$  en el plasma a los 122, 125, 130, 135, 145 min. Después los animales se anestesiaron con una infusión intravenosa de pentobarbital sódico y se extirparon tejidos seleccionados, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a  $-70^\circ\text{C}$  hasta el análisis.

El análisis se llevó a cabo como sigue. Se desproteinizaron muestras de plasma con  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  (0,3 N) y  $\text{ZnSO}_4$  (0,3 N), se secaron y se evaluó la radiactividad en un contador de centelleo (Packard TRICARB 2900 TR, Meriden, CT). Las muestras de tejido congeladas se homogeneizaron en ácido perclórico al 0,5%, se centrifugaron y se neutralizaron. Se hizo el recuento directamente en un líquido sobrenadante para determinar la radiactividad tanto de  $[^{14}\text{C}]\text{-DG}$  como de  $[^{14}\text{C}]\text{-DGP}$ . Una segunda parte alícuota se trató con  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  y  $\text{ZnSO}_4$  para separar el  $^{14}\text{C}\text{-DGP}$  y cualquier trazador incorporado en el glucógeno y después se hizo el recuento para determinar la radiactividad del  $[^{14}\text{C}]\text{DG}(2)$  libre. Se calculó el  $[^{14}\text{C}]\text{DGP}$  como la diferencia entre las dos partes alícuotas. La acumulación de  $[^{14}\text{C}]\text{DGP}$  se normalizó respecto al peso de tejido y el bolo de trazador. Se calculó  $R_g$ , un índice de captación de glucosa específico de tejido, como se ha descrito previamente (E.W. Kraegen et al., *Am. J. Physiol.*, 248:E353-E362, 1985). El recambio de glucosa de todo el cuerpo se calculó como la relación de la velocidad de infusión de  $^3\text{H}\text{-glucosa}$  (dpm/kg/min) y la actividad específica de la glucosa plasmática arterial (dpm/mg). La producción endógena de glucosa se calculó como la diferencia entre el recambio de glucosa de todo el cuerpo y la velocidad de infusión de glucosa exógena (R.N. Bergman et al., *Endocr. Rev.*, 6:45-86, 1985). Los grupos de tratamiento se resumen en la tabla mostrada a continuación.

Grupo	Tratamiento	Volumen de dosificación y concentración de la disolución de dosificación	N
A - referencia con vehículo*	vehículo 8 ml/kg, v.o., dos veces al día durante 13 días, una vez al día el día 14	8 ml/kg	10
B - compuesto 1**	40 mg/kg, v.o., dos veces al día durante 13 días, una vez al día el día 14	4 ml/kg de disolución madre 10 mg/ml en vehículo	10
C - compuesto 1**	80 mg/kg, v.o., dos veces al día durante 13 días, una vez al día el día 14	8 ml/kg de disolución madre 10 mg/ml en vehículo	10
D - compuesto 2**	40 mg/kg, v.o., dos veces al día durante 13 días, una vez al día el día 14	4 ml/kg de 10 mg/ml en vehículo	10
E - referencia positiva***	25 mg/kg, v.o., dos veces al día durante 13 días, una vez al día el día 14	5 ml/kg of 5 mg/ml en agua + CMC al 1%	10

\*vehículo: éter sulfobutílico al 30% en agua (20 mg/ml de fármaco en disolución para los grupos B-D)

\*\*compuesto 1:  $17\alpha\text{-etinilandrost-5-eno-3}\beta,7\beta,17\beta\text{-triol}$

compuesto de referencia 2:  $\text{andros-5-eno-3}\beta,7\beta,16\alpha,17\beta\text{-tetrol}$

\*\*\*maleato de rosiglitazona (31493r, AApin Chemicals Limited (Reino Unido)),

CMC - Carboximetilcelulosa (calidad media, C4888, Sigma)

La dosis de insulina era 10 mU/kg/min. En un animal normal, esta dosis de insulina requeriría una infusión de ~90 mg/kg/min de glucosa para mantener el nivel de glucosa pinzado en ~150 mg/dl. El requisito medio de glucosa en todos los grupos de tratamiento era ~50% el normal. Los resultados mostraban que tanto el  $17\alpha\text{-etinilandrost-5-eno-3}\beta,7\beta,17\beta\text{-triol}$  como el  $\text{andros-5-eno-3}\beta,7\beta,16\alpha,17\beta\text{-tetrol}$  aumentaron la velocidad de infusión de glucosa comparado con la referencia con vehículo, lo que significa que mejoró la acción de la insulina en los grupos B, C, D y E.

Usando el trazador  $3\text{-}^3\text{H}\text{-glucosa}$ , se calculó la velocidad de producción de glucosa del hígado durante el periodo basal y la capacidad de la insulina para suprimir la producción de glucosa en el hígado durante el pinzamiento. En animales resistentes a la insulina graves, la producción de glucosa endógena se reduciría en aproximadamente 50% con la dosis de insulina que se usó. En los grupos C, D y E la insulina suprimió completamente la producción de glucosa endógena ( $p < 0,05$ ), lo cual mostró una mejora en la acción de la insulina hepática.

Para evaluar la acción de la insulina periférica, se evaluó la captación de glucosa específica de tejido durante el pinzamiento normoglucémico-hiperinsulinémico usando  $^{14}\text{C}\text{-2-desoxiglucosa}$ . Se administró un bolo de  $^{14}\text{C}\text{-2-desoxiglucosa}$  a los 120 min. Los tejidos se recogieron 25 min después. Se analizó en los tejidos la acumulación total de fosfato de  $^{14}\text{C}\text{-2-desoxiglucosa}$ . En este protocolo, la captación de glucosa del cerebro no es afectada por la mayoría de los regímenes de tratamiento y por lo tanto sirve como un control interno. Los resultados mostraron que la captación de glucosa del cerebro era comparable entre todos los grupos. En el corazón y el diafragma, la captación de glucosa era mayor en los grupos tratados comparado con el grupo de referencia con vehículo. Tanto el  $\text{andros-5-eno-3}\beta,7\beta,16\alpha,17\beta\text{-tetrol}$  como la rosiglitazona eran más eficaces ( $p < 0,05$ ) en el aumento de la captación de glucosa muscular en el músculo gastrocnemio. En el músculo vasto lateral, que es un grupo muscular no

oxidativo, no se detectaron diferencias excepto entre el androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol y la rosiglitazona.

**Ejemplo 19.** Las ratas se alimentaron a voluntad con una comida de laboratorio convencional que contenía androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol al 0,45% en p/p durante 6 días, seguido de análisis del tejido hepático el día 6 de los niveles de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa ("PEPCK") y 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ("11 $\beta$ -HSD") en el hígado. Los animales de referencia se alimentaron con comida normal y se examinaron los niveles de PEPCK y 11 $\beta$ -HSD en los hígados el día 6, mediante medición del ARN mensajero (ARNm) por RT-PCR. Tanto los animales de referencia como los tratados tenían acceso a agua. Se encontró que la administración del compuesto en la comida durante 6 días disminuía los niveles de 11 $\beta$ -HSD de tipo 1 ("11 $\beta$ -HSD1") y PEPCK en el tejido hepático como se muestra a continuación. Los niveles de ARNm de PPAR $\alpha$  en estos animales no se vieron afectados por la alimentación con androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol.

	ARNm 11 $\beta$ -HSD1	ARNm PEPCK	ARNm PPAR $\alpha$
referencia (sin compuesto)	100%	100%	100%
androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol	45%	30%	105%

En otro estudio, se encontró que la administración a los ratones del compuesto 17 $\alpha$ -etnilandrost-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol disminuía la expresión de la 11 $\beta$ -HSD1 en osteoblastos en aproximadamente 50%, lo cual está de acuerdo con la observación de que el compuesto tiene efectos de ahorro de hueso en ratones tratados con dexametasona, un glucocorticoide que induce pérdida ósea in vivo.

En otro estudio, el ARN total de tejido graso perigonadal de ratones db/+ delgados o db/db diabéticos, tratado con 20 mg/kg de 17 $\alpha$ -etnilandrost-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol se aisló y se procesó para la RT/PCR cuantitativa usando cebadores específicos para la proteína-1 quimioattractora de monocitos (MCP-1) usando un sistema de detección en tiempo real multicolor iCycler iQ (Bio-Rad). Los niveles de expresión del ARN se normalizaron con respecto a la referencia con vehículo. Se encontró que el compuesto disminuía los niveles de proteína-1 quimioattractora de monocitos (MCP-1) en aproximadamente 50%. Para este estudio, también se administró vehículo a un grupo de referencia de ratones db/+ heterocigotos delgados de edades correspondientes (n = 7).

En otros compuestos tales como el 17 $\alpha$ -etnilandrost-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol, androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol, androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol, androst-5-eno-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol, androst-5-eno-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -tetrol, androst-5-eno-3 $\alpha$ ,4 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol o monoésteres o diésteres de estos compuestos, p. ej. compuestos que contienen uno o dos ésteres acetato o propionato en las posiciones 3 ó 17, se examinó de una forma similar su capacidad para disminuir el nivel o la actividad de PEPCK o una 11 $\beta$ -HSD tal como la 11 $\beta$ -HSD de tipo 1 o la 11 $\beta$ -HSD de tipo 2, en hepatocitos o células derivadas del hígado o en otros tejidos o células tales como el riñón, músculo, tejido o células óseas, tejido o células adiposas o tejido o células del SNC, p. ej. neuronas o gliales.

**Ejemplo 20.** Inhibición de la generación de linfocitos T reguladores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T o su actividad in vivo. Linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> purificados (5 x 10<sup>6</sup> células) de ratones congénicos B6.SJL (CD45.1) se transfirieron por adopción a cada uno de cinco ratones B6 (CD45.2). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> purificados se obtuvieron por separación de células activadas por fluorescencia (FACS) de las células donantes al menos dos veces. Se inyectó vehículo (carboximetilcelulosa al 0,1%, disolución salina al 0,9%, tween 80 al 2%, fenol al 0,05%) o 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterona en vehículo (1 mg/animal/día en 100  $\mu$ l de vehículo) por vía subcutánea antes de la transferencia de las células de los animales donantes CD45.1, y las inyecciones se continuaron diariamente durante 14 días. Se recogieron el timo, los ganglios linfáticos y el bazo de los animales el día 15. Se obtuvieron muestras de timo, ganglios linfáticos y bazo de los individuos, y las células se marcaron con anticuerpo de fluorescencia que se unía a CD4, CD25, CD103 o Foxp3. Después, las células se analizaron por citometría de flujo para el recuento de los diferentes tipos de células. El resto de las células de los ganglios linfáticos y los bazos de cada grupo de tratamiento se mezclaron, se enriquecieron previamente para las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y después se analizaron los CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que provenían de las células huésped (células CD45.2 endógenas) y de las células donantes (células CD45.1 que se convertían del fenotipo donante CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> al fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> después de residir in vivo durante 15 días). Las células se analizaron por separación celular. Para ensayar la función reguladora, se cocultivaron diferentes números de células CD45.1 convertidas o CD45.2 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> endógenas purificadas con 2000 células respondedoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, 1 x 10<sup>5</sup> células de bazo irradiadas como células presentadoras de antígeno, y 0,5 mg/ml de anticuerpo anti-CD3. Se usaron células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> recientes como referencia. La proliferación se determinó por medición de la captación de <sup>3</sup>H-timidina 4 días después de inicio del cultivo.

Los resultados mostraban que el número de linfocitos Treg CD45.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> donantes en los bazos de los animales tratados con fármaco, es menor que el número de linfocitos Treg CD45.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en bazos de animales tratados con referencia con vehículo. El número medio de células CD45.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en la referencia con vehículo era 1,97 x 10<sup>5</sup> células comparado con una media de 0,62 x 10<sup>5</sup> células CD45.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en los animales tratados con fármaco.

El número de linfocitos Treg CD45.2 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> endógenos en los bazos de los animales tratados con fármaco también era menor que el número de linfocitos Treg CD45.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en los bazos de los animales de referencia

con vehículo. El número medio de células CD45.2 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de la referencia con vehículo era  $9,54 \times 10^5$  células comparado con un número medio de células CD45.2 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de  $5,49 \times 10^6$  de los tratados con fármaco.

El número medio de células CD45.2 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> endógenas en el timo de los animales de referencia con vehículo era  $3,10 \times 10^5$  comparado con  $1,59 \times 10^5$  en los animales tratados con fármaco.

- 5 El porcentaje de células CD45.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> donantes comparado con las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> donantes totales en los bazo de animales tratados con fármaco era menor que el número de linfocitos Treg CD45.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> comparado con las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> donantes totales en los bazo de los animales de referencia con vehículo. La proporción de linfocitos Treg CD45.2 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> endógenos era aproximadamente la misma en los bazo de los animales de referencia con vehículo (13,85%) comparado con los animales tratados con fármaco (13,40%). La media de células CD45.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> donantes para las referencias con vehículo era 29,06% comparado con una media de 9,63% en los animales tratados con fármaco. El antígeno de superficie CD103 es expresado por linfocitos Treg activados. Estos indica que la proporción relativa de células CD45.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> activadas era menor en los animales tratados con fármaco que en las referencias con vehículo, lo cual está de acuerdo con la inhibición de la actividad de los linfocitos Treg para las células donantes in vivo.

- 15 Las variaciones adecuadas de este protocolo incluyen (1) el uso de un número mayor de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> donantes por animal, p. ej.,  $1 \times 10^6$ /animal,  $1,5 \times 10^6$ /animal o  $2 \times 10^6$ /animal, (2) diferentes dosificaciones diarias del fármaco, (3) una vía diferente de administración del fármaco, (4) un compuesto diferente como fármaco, y (5) inclusión de grupos adicionales de animales, p. ej., un grupo que recibe otro agente terapéutico tal como un glucocorticoide antiinflamatorio o supresor inmunitario tal como dexametasona o cortisol. Algunas de estas variaciones se pueden aplicar a los protocolos del ejemplo 3 o algunas de las referencias citadas.

**Ejemplo 21.** Aumento de linfocitos T reguladores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> o de su actividad in vivo. El compuesto 17 $\alpha$ -etinilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol se administró a ratones esencialmente como se ha descrito en un modelo animal de artritis inducida con colágeno H. Offner et al., *Clin. Immunol.*, 110:181-190, 2006.

- 25 Se usaron ratones DBA/1Lac/J para el estudio. Los ratones se obtuvieron de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Harbor, MA) y se alojaron de acuerdo con las recomendaciones institucionales aplicables. Se usó colágeno bovino de tipo II (bCII) para inducir la artritis inducida por colágeno (CIA) inmunizando ratones de 8 semanas de edad con 200  $\mu$ g de bCII emulsionado 1:1 con CFA que contenía 200  $\mu$ g de *Mycobacterium tuberculosis* (100  $\mu$ l; Difco, Detroit, MI). El antígeno se inyectó por vía intradérmica en la base de la cola. Se hizo el seguimiento de los animales durante 4-7 semanas para observar el inicio y el avance de la enfermedad después de inmunización. La gravedad artrítica se evaluó con un sistema de calificación para cada pata de acuerdo con la siguiente escala: 0 = no hay enrojecimiento ni hinchamiento; 1 = ligero hinchamiento en el tobillo o enrojecimiento en la pata; 2 = hinchamiento e inflamación avanzados y enrojecimiento desde el tobillo a la mitad de la pata; 3 = hinchamiento e inflamación de toda la pata; 4 = hinchamiento e inflamación de toda la pata incluyendo la punta de los dedos.
- 35 Después de inmunización, los ratones se trataron con el fármaco con 40 mg/kg/día en vehículo por alimentación oral por sonda empezando al inicio de la enfermedad clínica observable (inicio aproximadamente 26-27 días después de inmunización). El vehículo que se usó para el protocolo era ciclodextrina-éter sulfobutílico al 30% en agua. La ciclodextrina-éter sulfobutílico se obtuvo en el comercio (Captisol™ disponible en cydexinc.com). La formulación del fármaco era 20 mg de fármaco/ml en el vehículo.
- 40 Los resultados obtenidos de los animales tratados con fármaco indicaban que la administración del 17 $\alpha$ -etinilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol aumentaba la frecuencia de células que expresan Foxp3<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> en esplenocitos enteros como se muestra a continuación.

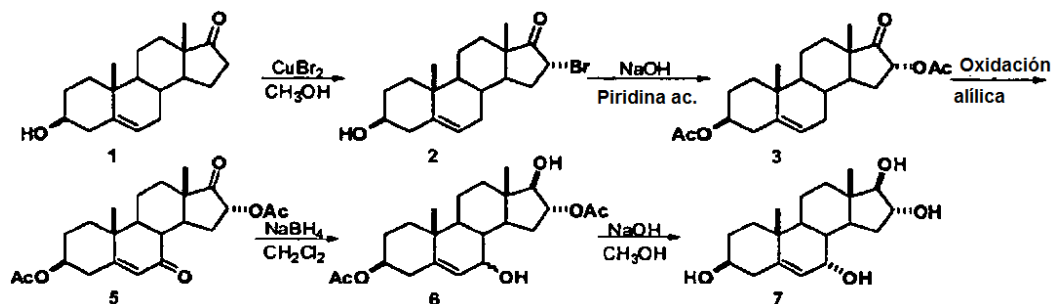
	Vehículo (n = 3)	fármaco (n = 3)	valor p
Foxp3 <sup>+</sup> total	1,6% $\pm$ 0,16	2,39% $\pm$ 0,16	0,00001
CD4 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup>	1,1% $\pm$ 0,09	1,34% $\pm$ 0,05	<0,00001

- 45 El análisis en el separador celular mostró un aumento de las células Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> en animales tratados con fármaco (1,4%) con respecto a los animales de control (1,0%). La proteína Foxp3 está asociada con la diferenciación o conversión de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en linfocitos Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y un aumento del número de células que expresan Foxp3 indicaba mayor desarrollo de linfocitos Treg a partir de sus células precursoras. Después de inmunización, los ratones se trataron con 40 mg/kg/día de fármaco en vehículo por alimentación oral por sonda empezando al inicio de la enfermedad clínica observable (inicio aproximadamente 26-27 días después de inmunización). Los resultados obtenidos de los animales tratados con fármaco indicaban que la administración del 17 $\alpha$ -etinilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol aumentaba la frecuencia de células que expresan Foxp3<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> en esplenocitos enteros como se muestra a continuación. Estaba de acuerdo con esto la puntuación clínica estadísticamente mejorada en los animales tratados con fármaco comparado con las referencias con vehículo, los días 44-49 después de inmunización. Entre los días 34-49 los animales de referencia con vehículo tenían una puntuación clínica media de aproximadamente 6,8-8, mientras que los animales tratados con fármaco tenían una

puntuación clínica media máxima de aproximadamente 5 el día 34, con un lento retroceso a una puntuación media de aproximadamente 3 el día 49. Estos resultados indicaban que el compuesto de acuerdo con la invención ralentizaba el avance de la artritis y reducía su gravedad máxima comparado con los animales de referencia con vehículo.

5 **Ejemplo 22.** Los principios para la síntesis del compuesto de acuerdo con la invención se describen a continuación.

Androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol (7).

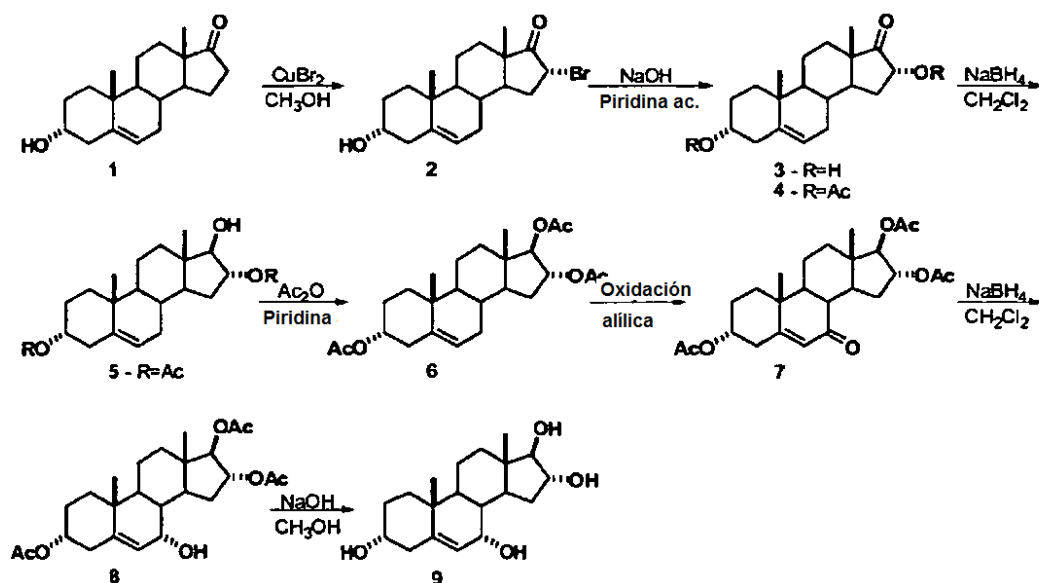


Diacetato de 5-androsteno-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -diol-17-ona (3). La 16 $\alpha$ -bromodeshidroepiandrosterona 2 se preparó mediante calentamiento a reflujo de DHEA (1) en metanol con bromuro de cobre (II). A 15,0 g del compuesto 2 (40,8 mmol) en piridina (129 ml) y agua (309 ml) se añadieron 120 ml de hidróxido sódico acuoso 1 N y la mezcla se agitó en aire durante 15 minutos. La mezcla de reacción se vertió en hielo/agua saturada con cloruro sódico y que contenía exceso de ácido clorhídrico. El producto bruto se filtró, se lavó con agua hasta neutralidad y se secó a vacío sobre cloruro de calcio anhidro a 55-60°C. La recrystalización en metanol proporcionó 8,21 g de 16 $\alpha$ -hidroxi-DHEA (P.f. 194,4-195,1°C). Después, este producto se convirtió en el diacetato 3 por tratamiento con exceso de ácido acético en piridina y se purificó por cromatografía ultrarrápida.

5-Androsteno-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -diol-7,17-diona (5). A una disolución del compuesto 3 (20,1 g, 51,7 mmol) en benceno que contenía celite (60 g) y dicromato de piridinio (75 g) se añadieron 22 ml de hidroperóxido de *tert*-butilo al 70%. Después de 2 días de agitación a temperatura ambiente, se añadió éter dietílico (600 ml) y el precipitado se filtró y se lavó con éter dietílico (2 x 100 ml). El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (acetato de etilo en hexanos al 60%) y se recrystalizó para dar 16,0 g (39,8 mmol, 77%) del compuesto 5 en forma de prismas. P.f. 205,6-206,2°C.

5-Androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol (7). A una disolución del compuesto 5 (10,0 g, 24,8 mmol) en diclorometano (75 ml) y metanol (255 ml) a 0°C se añadieron 1,5 g de borohidruro de sodio y la mezcla se agitó a 0°C durante 1 h. Después de inactivación con ácido acético (3,5 ml) la mezcla de reacción se repartió entre diclorometano y agua. La capa orgánica se concentró hasta una mezcla de diacetato de tetroles 7 $\alpha$  y 7 $\beta$ . La mezcla se purificó por cromatografía ultrarrápida y HPLC para dar 2,90 g del epímero 7 $\beta$  (9,5 mmol, 38%). P.f. 216,8-220,8°C. La saponificación en metanol (100 ml) con hidróxido de sodio 1 N (60 ml) durante 2 días a temperatura ambiente y purificación por HPLC dio el compuesto 7 (1,41 g, 4,4 mmol, 46%) en forma de agujas finas del acetonitrilo acuoso. P.f. 202,1-206,4°C; [a]<sub>D</sub> +1,35 (metanol, c=1). Picos de RMN <sup>1</sup>H seleccionados (CD<sub>3</sub>OD): d 0,77 (s, 3H), 1,01 (s, 3H), 3,39 (d, 1H), 3,46 (m, 1H), 3,74 (t, 1H), 4,04 (m, 1H), 5,55 (dd, 1H).

3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -Triacetoxiandrost-5-eno-16 $\alpha$ -ol (8), androst-5-eno-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,7 $\beta$ -tetrol (9).



**16 $\alpha$ -Bromo-5-androsten-3 $\alpha$ -ol-17-ona (2).** Una disolución de 5-desidroandrosterona (1) (17,8 g, 61,7 mmol) en metanol (1,35 litros) se calentó a reflujo con bromuro de cobre (II) (36,4 g, 163 mmol) con agitación durante 19 h. A la mezcla de reacción enfriada se añadió agua (1,35 litros) y diclorometano (1,5 litros). La capa orgánica se filtró a través de sulfato de sodio anhidro y el producto cristalizó en metanol en forma de agujas finas (16,7 g, 45,5 mmol, 74%). P.f. 195-207°C.

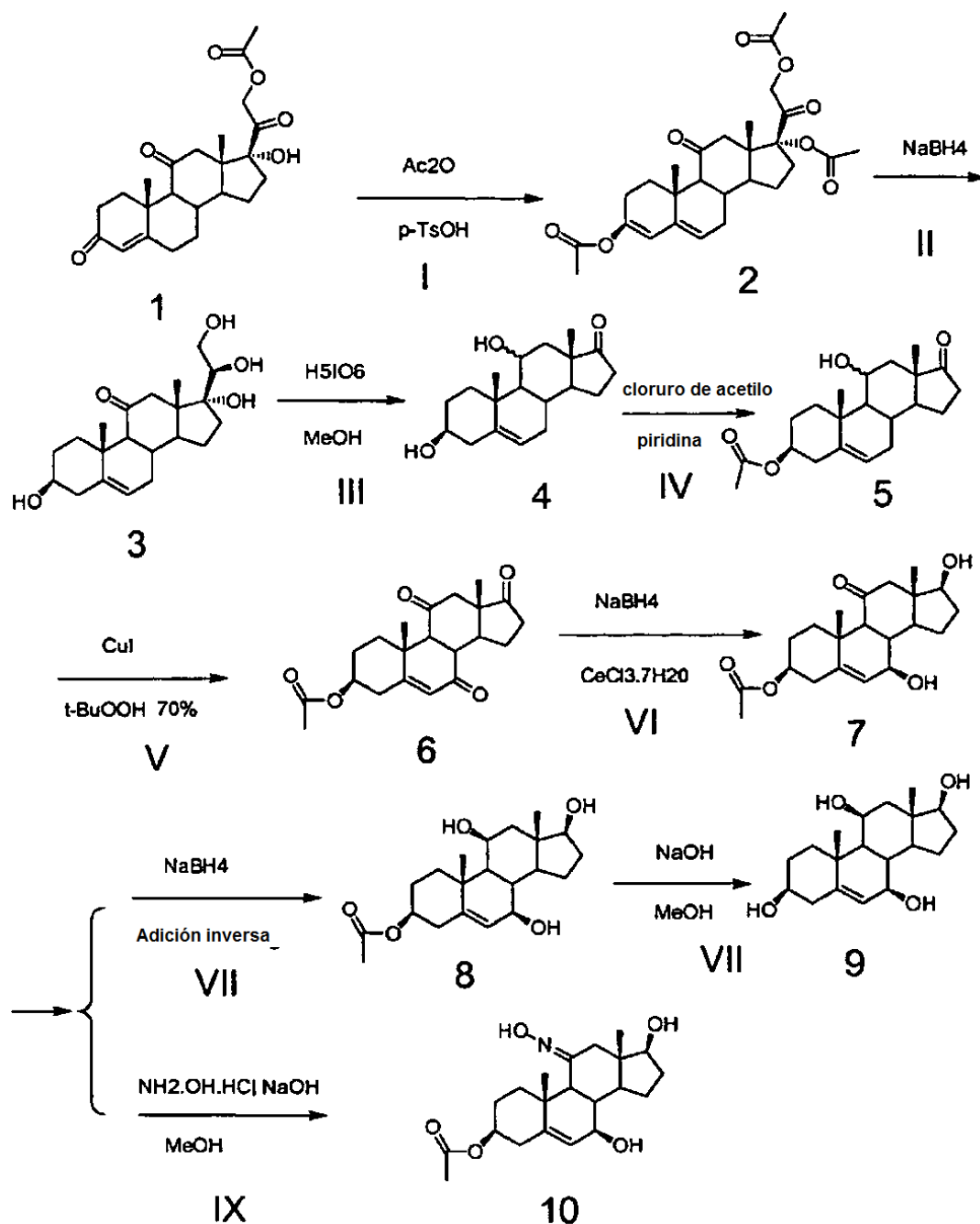
**3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -Diacetoxi-5-androsten-17-ona (4).** A una disolución del compuesto 2 (12,0 g, 32,7 mmol) en piridina (1,032 litros) y agua (0,247 litros) en aire se añadió hidróxido sódico acuoso 1 N (90 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 min. La mezcla de reacción se añadió a una mezcla de hielo/agua que contenía 1,2 litros de ácido clorhídrico 1 N. Después de saturación de la disolución con cloruro sódico, se extrajo con acetato de etilo (2 x 1 litros). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (250 ml), se filtraron a través de sulfato sódico anhidro y se concentraron. El 5-androsteno-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -diol-17-ona (3) se trató con exceso de anhídrido acético en piridina a temperatura ambiente durante la noche y se purificó por columna para dar el compuesto 4 (7,46 g, 19,2 mmol, 59%) en forma de prismas en metanol. P.f. 172,7-173,7°C.

**3,16-Diacetato de 5-androsteno-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol (5).** A una disolución de diacetato de la enodiolona 4 (7,46 g, 19,2 mmol) en diclorometano (45 ml) y metanol (120 ml) a 0°C se añadió borohidruro sódico (950 mg). La disolución se agitó a 0°C durante 1 h. Después de adición de exceso de ácido acético, la mezcla de reacción se repartió entre diclorometano y agua. La capa orgánica se filtró a través de sulfato de sodio anhidro y se concentró para dar una mezcla de los epímeros 17 $\alpha$  (minoritario) y 17 $\beta$  (mayoritario). Esta mezcla se purificó por cromatografía ultrarrápida (acetato de etilo en hexanos al 25%) para dar 6,1 g (15,6 mmol, 81%) del epímero 17 $\beta$  5. P.f. 126,9-128,6°C. El triacetato 6 se hizo a partir del compuesto 5 tratado con exceso de anhídrido acético en piridina a temperatura ambiente durante la noche, y se purificó por columna para dar 6,0 g (13,9 mmol, 89%).

**Triacetato de 5-androsteno-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol-7-ona (7).** Una disolución del triacetato 6 (6,0 g, 13,9 mmol) en benceno (255 ml) se trató con celite (25,5 g), dicromato de piridinio (31,5 g) e hidropéroxido de *tert*-butilo al 70% (9,0 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 19 h. Se añadió éter dietílico anhidro (255 ml) y la mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo durante 1 h. El sólido resultante se separó por filtración y se lavó con éter dietílico (2 x 50 ml). Las porciones orgánicas combinadas se concentraron y se purificaron por cromatografía ultrarrápida (acetato de etilo en hexanos al 29%) para dar 3,45 g del compuesto 7 (7,7 mmol, 55%).

**5-Androsteno-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol (9).** A una disolución del compuesto 7 (3,45 g, 7,7 mmol) en diclorometano (15 ml) y metanol (30 ml) a 0°C se añadió borohidruro sódico (1,0 g) y la disolución se agitó a 0°C durante 2 h. Después de añadir ácido acético en exceso (1,5 ml), la mezcla de reacción se repartió entre diclorometano y agua. La capa orgánica se filtró a través de sulfato sódico anhidro y se concentró para dar una mezcla de los epímeros 17 $\alpha$  (minoritario) y 17 $\beta$  (mayoritario). Esta mezcla se saponificó en metanol (100 ml) con hidróxido sódico 1 N (60 ml) durante la noche a temperatura ambiente. Los tetroles brutos se recuperaron por reparto de la mezcla de saponificación entre acetato de etilo y salmuera. Los epímeros se separaron por HPLC para dar 220 mg del compuesto 9 (0,68 mmol, 9%). P.f. 243-248,3°C. Picos de RMN  $^1\text{H}$  seleccionados ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  0,77 (s, 3H), 1,02 (s, 3H), 2,11 (m, 1H), 2,57 (m, 1H), 3,34 (s, 1H), 3,44 (d, 1H), 3,70 (t ancho, 1H), 4,04 (m, 2H), 5,55 (dd, 1H). Los epímeros de 8 se separan por HPLC para obtener el compuesto 8 purificado y su epímero 7 $\beta$ -acetato.

3 $\beta$ -Acetato de androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,11 $\beta$ ,17 $\beta$ -tetrol (8), androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,11 $\beta$ ,17 $\beta$ -tetrol (9), 3 $\beta$ -acetato-11-oxima de androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -tetrol (10).



**I:** A una disolución del compuesto **1** (4 g) en 150 ml de  $\text{Ac}_2\text{O}$ , se añadieron 2,8 g de  $p\text{-TsOH}$  a temperatura ambiente, durante la noche, después se trató por adición de 700 ml de agua helada, agitando durante 1 h hasta que se formó un sólido, y se filtró para dar el producto sólido blanco **2**, 4,55 g.

**II:** A una disolución de 1,5 g de  $\text{NaBH}_4$  en 35 ml de  $\text{EtOH}$  y 5 ml de  $\text{MeOH}$ , se añadió lentamente una disolución del compuesto **2** (1,2 g) en 30 ml de  $\text{EtOH}$  y 10 ml de cloroformo a  $0^\circ\text{C}$ . La disolución se continuó agitando durante 2 h a  $0^\circ\text{C}$ , y después a temperatura ambiente 2 h. Después de este tiempo se añadieron 4 ml de ácido acético para inactivar el  $\text{NaBH}_4$ , y después 50 ml de agua. El producto se aisló por extracción con  $\text{EtOAc}$  50 ml x 3, y separación del disolvente a vacío para dar el producto bruto. La purificación se llevó a cabo por cromatografía en columna para dar el compuesto **3**, 250 mg.

**III:** A una disolución del compuesto **3** (200 mg) en 8 ml de  $\text{MeOH}$ , se añadió una disolución de 0,36 g de  $\text{H}_5\text{IO}_6$  en 2 ml de agua, agitando durante 1 h a temperatura ambiente, se separó el disolvente a vacío, se añadió agua y se extrajo con diclorometano. La purificación usando cromatografía en columna dio el producto **4**, 60 mg.

**IV:** A una disolución del compuesto **4** (0,4 g) en 5 ml de piridina, se añadieron 0,5 ml de cloruro de acetilo, lentamente a  $0^\circ\text{C}$ , y se continuó agitando durante 15 min a  $0^\circ\text{C}$ , y después a temperatura ambiente durante 30 min.

La reacción se inactivó por adición de 20 ml de agua, se extrajo con EtOAc 15 ml x 3, se lavó con HCl 1 N, disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, salmuera, y después se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La concentración a vacío dio el compuesto **5**, 520 mg.

5 **V:** A una disolución del compuesto **5** (0,5 g) y 0,13 g de CuI en 15 ml de acetonitrilo, se añadieron lentamente 3 ml de t-BuOOH al 70%, agitando durante 1 h y después a 50°C durante 2 h. Se añadieron 12 ml de disolución de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> al 10%, se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se separó el disolvente, y se llevó a cabo una columna para dar el compuesto **6**, 80 mg.

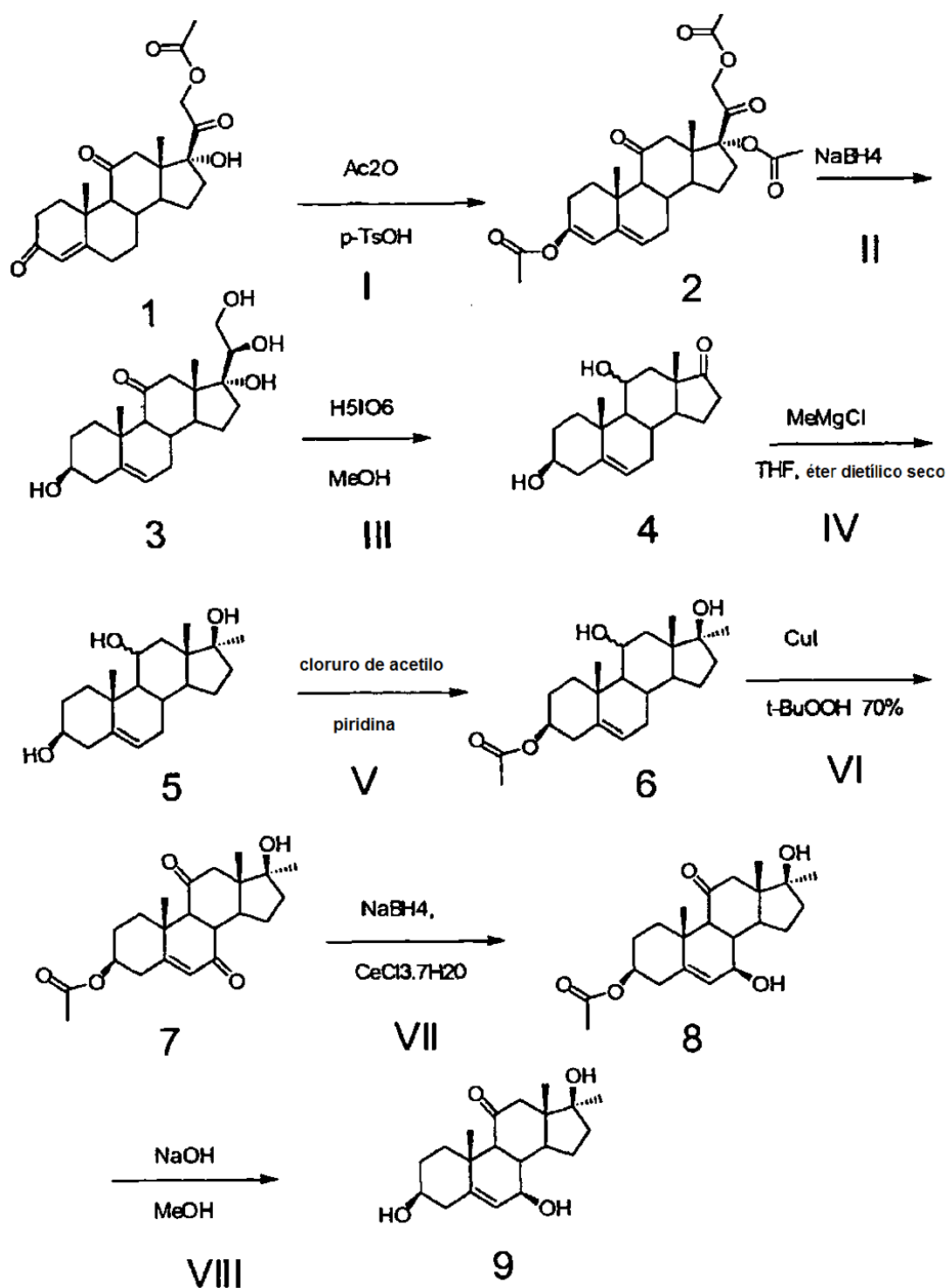
10 **VI:** A una disolución del compuesto **6** (50 mg) en 1,5 ml de THF y 3 ml de MeOH, se añadieron 260 mg de CeCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O, después se añadieron lentamente 75 mg de NaBH<sub>4</sub> a 0°C, agitando durante 30 min, se añadieron 0,5 ml de HCl 1 N y 5 ml de agua, se extrajo con EtOAc 5 ml x 3, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se separó el disolvente para dar el compuesto **7**, 49 mg.

15 **VII:** A una disolución de 300 mg de NaBH<sub>4</sub> en 4 ml de EtOH y 1 ml de MeOH, se añadió una disolución del compuesto **7** (40 mg) en 0,5 ml de EtOH y 0,5 ml de cloroformo agitando durante 8 h a 0°C, y después en un refrigerador durante la noche. Se añadió ácido acético para inactivar la reacción, se añadió agua y se extrajo con EtOAc para dar el compuesto **8**, 30 mg. P.f. >250°C; RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ 0,86 (s, 3H), 1,35 (s, 3H), 1,95 (s, 3H), 3,55 (t, 1H, J = 7,5 Hz), 3,71 (dd, 1H, J = 7 Hz, J = 2,5 Hz), 4,32 (d, 1H, J = 2,7 Hz), 4,55 (m, 1H), 5,21 (s, 1H)

20 **VIII:** A una disolución del compuesto **8** (30 mg) en 1 ml de MeOH, se añadió una disolución de 50 mg de NaOH en 0,25 ml de agua. Se agitó durante 15 min a 50°C, después se añadió 1 ml de HCl 1 N, 5 ml de agua, se extrajo con EtOAc 5 ml x 3, y se separó el disolvente para dar el compuesto **9**, 20 mg. P.f. 170-172°C; RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ 0,95 (s, 3H), 1,32 (s, 3H), 3,41 (m, 1H), 3,51 (t, 1H, J = 8,0 Hz), 3,78 (dd, 1H, J = 7,1 Hz, J = 2,5 Hz), 4,31 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 5,15 (s, 1H) .

25 **IX:** A una disolución de 29 mg de NH<sub>2</sub>OH·HCl y 17 mg de NaOH en 1 ml de EtOH caliente, se añadió una disolución del compuesto **9** (50 mg) en 1 ml de EtOH caliente, calentando a reflujo durante 2 h a 100°C, se separó la sal por filtración, y se recristalizó en EtOH/H<sub>2</sub>O para dar el compuesto **10**, 40 mg. P.f. > 250°C; RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ 0,72 (s, 3H), 1,02 (s, 3H), 2,03 (s, 3H), 3,86 (t, 1H, J = 8,5 Hz), 4,08 (dd, 1H, J = 8,0 Hz, J = 2,6 Hz), 4,60 (m, 1H), 5,19 (s, 1H).

17α-Metilandro-5-eno-3β,17β-diol-3β-acetato-7,11-diona (7), 17α-metilandro-5-eno-3β,7β,17β-triol-3β-acetato-11-ona (8), metilandro-5-eno-3β,7β,17β-triol-11-ona (9).



I: A una disolución del compuesto 1 (4 g) en 150 ml de  $\text{Ac}_2\text{O}$ , se añadieron 2,8 g de  $p\text{-TsOH}$ , T.a., durante una noche, se trató por adición de 700 ml de hielo-agua, agitando durante 1 h, y se filtró el sólido para dar un producto blanco 2, 4,55 g.

5 II: A una disolución de 1,5 g de  $\text{NaBH}_4$  en 35 ml de  $\text{EtOH}$  y 5 ml de  $\text{MeOH}$ , se añadió una disolución del compuesto 2 (1,2 g) en 30 ml de  $\text{EtOH}$  y 10 ml de cloroformo a  $0^\circ\text{C}$ , lentamente, y se continuó agitando durante 2 h a  $0^\circ\text{C}$ , y a t.a. 2 h, se añadieron 4 ml de ácido acético para inactivar el  $\text{NaBH}_4$ , se añadieron 50 ml de agua, se extrajo con  $\text{EtOAc}$  50 ml x 3, y después se separó el disolvente para dar el producto bruto. La columna dio el compuesto 3, 250 mg.

10 III: A una disolución del compuesto 3 (200 mg) en 8 ml de  $\text{MeOH}$ , se añadió una disolución de 0,36 g de  $\text{H}_5\text{IO}_6$  en 2 ml de agua, se agitó durante 1 h a t.a., se separó el disolvente, se añadió agua y se extrajo con  $\text{DCM}$ , y después se



trató en una columna para dar el producto **4**, 60 mg.

**IV:** A una disolución del compuesto **4** (250 mg) en 1,5 ml de THF y 3,5 ml de éter dietílico a -78°C en atmósfera de N<sub>2</sub>, se añadió lentamente 1 ml de MeMgCl al 22% en THF, agitando durante 1,5 h a -78°C, después a t.a. durante 1 h, y después calentando a reflujo durante 1 h a 75°C. Se añadieron 4 ml de HCl 1 N y 10 ml de agua a 0°C. La extracción con EtOAc, y separación del disolvente dio el producto bruto, 249 mg. La separación en columna dio el compuesto **5**, 46 mg.

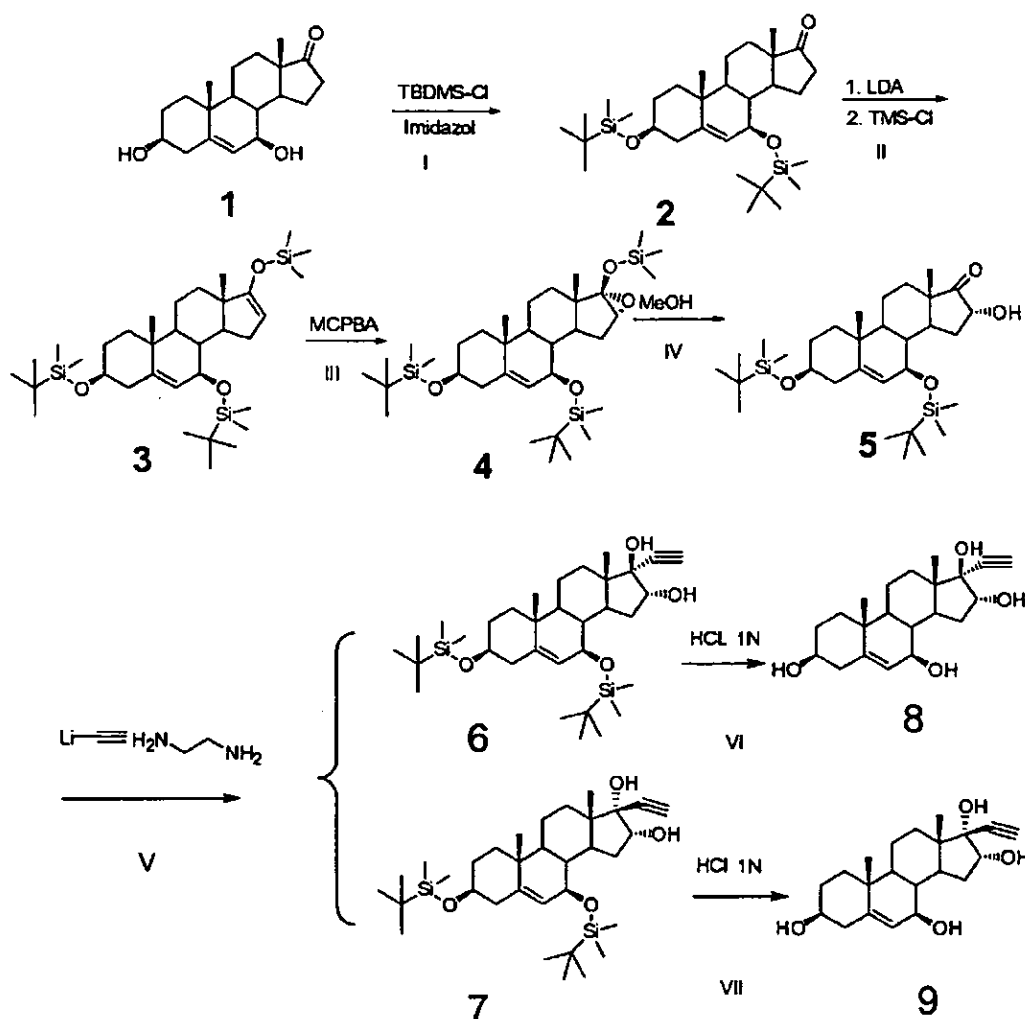
**V:** A una disolución del compuesto **5** (1,0 g) en 15 ml de piridina, se añadieron lentamente 1,1 ml de cloruro de acetilo a 0°C, agitando durante 15 min a 0°C, después a T.a. durante 30 min. Se añadieron 50 ml de agua, se extrajo con EtOAc 50 ml x 3, se lavó con HCl 1 N, disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La separación del disolvente dio el compuesto **6**, 1,02 g.

**VI:** A una disolución del compuesto **6** (1,0 g) y 0,3 g de CuI en 40 ml de acetonitrilo, se añadieron lentamente 6 ml de t-BuOOH al 70%, agitando durante 1 h a t.a. y después a 50°C durante 2 h. Se añadieron 24 ml de disolución de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> al 10%, se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se separó el disolvente y se separó por columna para dar el compuesto **7**, 285 mg. P.f. > 250°C; RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>Cl) δ 0,82 (s, 3H), 1,29 (s, 3H), 2,05 (s, 3H), 4,70 (m, 1H), 5,75 (s, 1H).

**VII:** A una disolución del compuesto **7** (45 mg) en 1,5 ml de THF y 3 ml de MeOH, se añadieron 150 mg de CeCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O, después se añadieron lentamente 30 mg de NaBH<sub>4</sub> a 0°C, agitando durante 10 min, se añadieron 0,5 ml de HCl 1 N y 5 ml de agua, se extrajo con EtOAc 5 ml x 3, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se separó el disolvente para dar el compuesto **8**, 41 mg. P.f. 108-110°C; RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ 0,725 (s, 3H), 1,25 (s, 3H), 2,01 (s, 3H), 4,02 (dd, 1H, J = 8,2 Hz, J = 2,4 Hz), 4,53 (m, 1H), 5,29 (s, 1H).

**VIII:** A una disolución del compuesto **8** (22 mg) en 1 ml de MeOH, se añadió una disolución de 23 mg de NaOH en 0,1 ml de agua. Se agitó durante 10 min a 50°C, y después se añadieron 1 ml de HCl 1 N, 5 ml de agua, y EtOAc 5 ml x 3 para la extracción. La separación del disolvente dio el compuesto **9**, 10 mg. P.f. > 250°C; RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ 0,75 (s, 3H), 1,24 (s, 3H), 3,41 (m, 1H), 3,99 (dd, 1H, J = 8,2 Hz, J = 2,5 Hz), 5,23 (s, 1H).

17α-Etinilandro-5-eno-3β,7β,16α,17β-tetrol (8), 17β-etinilandro-5-eno-3β,7β,16α,17α-tetrol (9),



I: A una disolución del compuesto **1** (1,0 g) y 0,56 g de imidazol en 15 ml de DMF, se añadieron 1,24 g de TBDMS-Cl, t.a., durante una noche, se trató por adición de 50 ml de agua, se formó un sólido, y se separó por filtración para dar un producto sólido blanco **2**, 1,75 g.

5 II: A una disolución del compuesto **2** (1,64 g) en 50 ml de THF enfriada a  $-78^{\circ}\text{C}$ , se añadieron 2,3 ml de LDA, 30 min después se añadieron lentamente 0,62 ml de TMS-Cl, agitando durante 30 min a  $-78^{\circ}\text{C}$ , después se calentó a t.a. agitando durante 1 h, el análisis por TLC mostró que la reacción se había completado, y la extracción con éter dietílico 150 ml x 2, lavado con agua y salmuera, y secado sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  dieron el producto amarillo **3**, 1,87 g.

10 III y IV: A una disolución del compuesto **3** (10 g) en 250 ml de THF enfriada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se añadieron 4,2 g de m-CPBA, agitando durante 3 h para formar el compuesto **4**, después se añadieron lentamente 250 ml de MeOH, agitando durante 30 min a  $-20^{\circ}\text{C}$ , después se añadieron lentamente 200 ml de disolución de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  a  $-20^{\circ}\text{C}$ , agitando durante 1 h. Se calentó a t.a., se extrajo con éter 150 ml x 3, se lavó con disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , salmuera, y después se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para dar 11 g de producto bruto. Con el fin de separar algo de mCPBA extra en el producto, se pasó por una columna corta, hexano al 100% 50 ml x 5, y después Hex/EtOAc al 50% 100 ml x 5, para recoger el producto bruto **5**, 8,5 g.

15 V: A una disolución de 10 g de complejo de acetiluro de litio y etilendiamina al 90% en 250 ml de THF seco, se añadió una disolución del compuesto **5** (5 g) en 50 ml de THF seco mediante una bomba con jeringa, tardándose aproximadamente 8 h. Se dejó agitar durante una noche a t.a. Se añadieron 500 ml de agua a  $0^{\circ}\text{C}$ , se extrajo con EtOAc 150 ml x 3, se lavó con 200 ml de HCl 0,1 N, 150 ml de disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , 100 ml de salmuera, se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , y se separó el disolvente para dar 5,5 g de producto bruto, y se separó en columna para recoger dos isómeros, 17- $\beta$ -OH, **6** (1,5 g) y 17- $\alpha$ -OH, **7** (1,2 g).

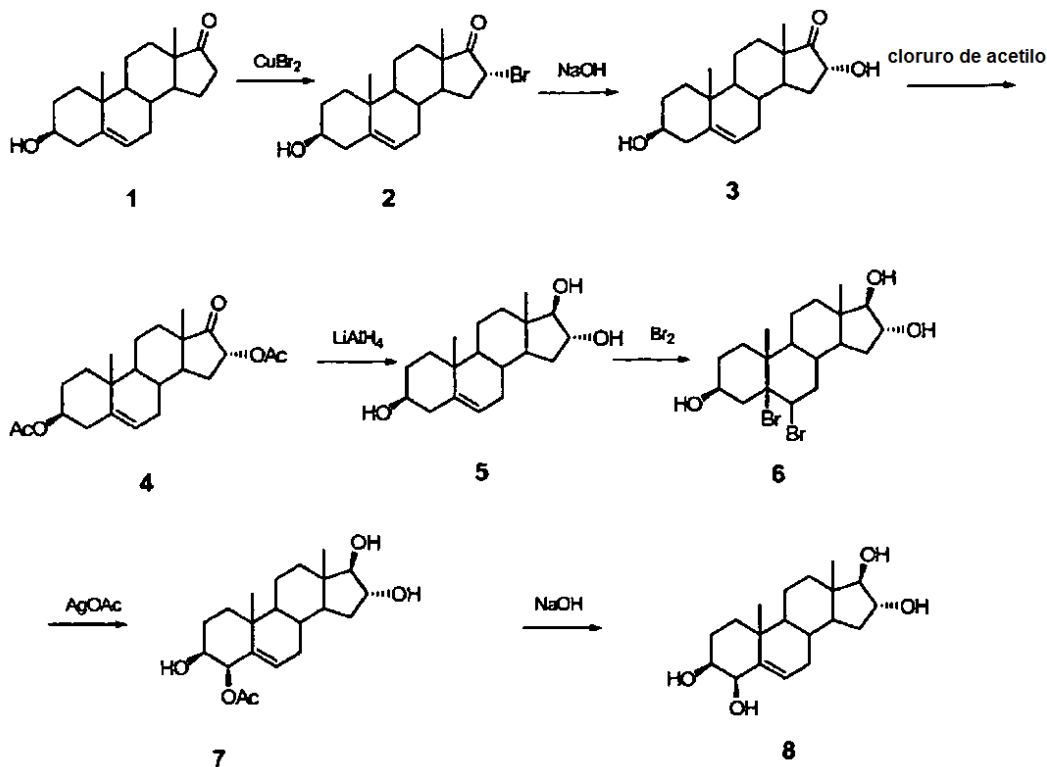
20 VI: A una disolución del compuesto **6** (265 mg) en 4 ml de MeOH y 3 ml de THF, se añadieron 4 ml de HCl 1 N a t.a., 1,5 h. Se añadieron 10 ml de disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , se separó el disolvente orgánico a t.a., se añadieron 10 ml de agua, se almacenó en el refrigerador durante la noche para separar el agua, se añadió THF al sólido, se filtró, se separó el THF para dar un producto sólido blanco **8**, 130 mg. P.f.  $214-216^{\circ}\text{C}$ ; RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0,92 (s,

25

3H), 1,06 (s, 3H), 2,99 (s, 1H), 3,42 (m, 1H), 3,72 (dt, 1H,  $J = 7,2$  Hz,  $J = 2,5$  Hz), 4,17 (dd, 1H,  $J = 8,2$  Hz,  $J = 2,7$  Hz), 5,24 (d, 1H,  $J = 1,0$  Hz).

- VII: A una disolución del compuesto **7** (500 mg) en 8 ml de MeOH y 6 ml de THF, se añadieron 8 ml de HCl 1 N a t.a. durante 1,5 h. Se añadió disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  para neutralizar la disolución a pH = 8. Se añadieron 50 ml de agua para obtener un sólido blanco, se filtró, se lavó con agua, se secó a vacío para dar el producto sólido blanco **9**, 225 mg. P.f.  $>250$  °C; RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0,90 (s, 3H), 1,06 (s, 3H), 2,75 (s, 1H), 3,42 (m, 1H), 3,72 (dt, 1H,  $J = 7,0$  Hz,  $J = 2,0$  Hz), 4,37 (dd, 1H,  $J = 8,1$  Hz,  $J = 2,6$  Hz), 5,24 (t, 1H,  $J = 2,0$ ,  $J = 1,0$  Hz).

4 $\beta$ -Acetilandro-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol (**7**), andro-5-eno-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol (compuesto **8**).



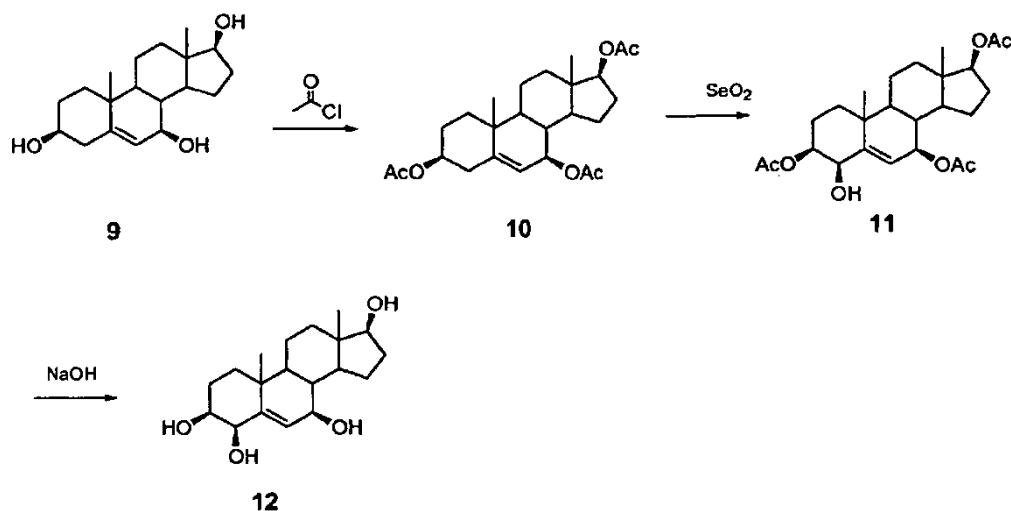
- 10 Etapa 1: Una mezcla del compuesto **1** (24,0 g, 0,0832 mol) y bromuro de cobre (56,0 g, 0,20 mol) en metanol anhidro (800 ml) se calentó a reflujo durante 16 h. La mayor parte del disolvente se separó a vacío y se añadió agua (500 ml). El precipitado resultante se recogió por filtración y se lavó con agua. El sólido se recrystalizó en metanol dos veces para dar el compuesto **2** en forma de un sólido amarillo pálido (19,7 g).
- 15 Etapa 2: A una disolución en agitación del compuesto **2** (22,0 g, 0,060 mol) en 200 ml de N,N-dimetilformamida se añadió una disolución acuosa de hidróxido sódico 1 N (66 ml, 0,066 mol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadieron ácido clorhídrico acuoso 1 N (8 ml) y 400 ml de agua. El precipitado resultante se recogió por filtración y se lavó con agua. La purificación de este producto bruto por recrystalización en metanol dio el compuesto **3** en forma de un sólido blanco.
- 20 Etapa 3: A una disolución del compuesto **3** (11,8 g, 0,0387 mol) en piridina (50 ml) se añadió cloruro de acetilo (11,8 g, 0,128 mol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 1 h. La mezcla resultante se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h más. Se añadió agua. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con agua. El sólido se secó a vacío para dar el compuesto **4** (12,6 g) con el que se continuó sin más purificación.
- 25 Etapa 4: Se añadió hidruro de litio y aluminio (1,13 g, 0,030 mol) a una disolución fría (0°C) del compuesto **2** (3,10 g, 0,00916 mol) en 80 ml de éter anhidro en atmósfera de nitrógeno. Se retiró el baño de hielo y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 h y después se calentó a reflujo durante 1 h. La reacción se inactivó por la adición de ácido clorhídrico acuoso 6 N. Se separó el éter dietílico a presión reducida. El sólido resultante se filtró y se lavó con agua. El producto bruto se recrystalizó en metanol para dar el compuesto **5** (1,1 g) en forma de un sólido blanco.
- 30 Etapa 5: A la disolución del compuesto **5** (914 mg, 2,98 mmol) en 20 ml de cloroformo se añadió bromo (303 mg, 3,16 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 min. Se separó el disolvente a presión reducida para dar el compuesto **6** con el que se continuó sin más purificación.

Etapa 6: Preparación del 4 $\beta$ -acetilandro-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol (**7**).

El compuesto **6** se disolvió en 30 ml de éter dietílico anhidro y 10 ml de piridina anhidra. Se añadió una disolución de acetato de plata (1,03 g, 1(914 mg, 2,98 mmol) en 5 ml de piridina anhidra. La mezcla de reacción se agitó en la oscuridad durante 0,5 h. Se depositó un precipitado verdoso pesado. Se añadió éter (50 ml) y el precipitado se separó por filtración. El filtrado se llevó a sequedad a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice eluida con acetato de etilo:hexanos 50:50 para dar el compuesto del título **7** (124 mg) en forma de un sólido blanco. Datos seleccionados de RMN  $^1\text{H}$ : ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz):  $\delta$  5,78 (d, 1 H,  $J = 2,2$  Hz), 5,34 (ancho, 1 H), 4,02 (t, 1 H,  $J = 4,5$  Hz), 3,52 (dt, 1 H,  $J = 7,7$  Hz, 3,0 Hz), 3,37 (d, 1H,  $J = 4,9$  Hz), 2,03 (s, 3 H), (1,12 (s, 3H), 0,75 (s, 3H). Punto de fusión: 152-153°C.

Etapa 7: Preparación del androst-5-eno-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol (**8**). El compuesto **7** (50 mg, 0,137 mmol) se disolvió en hidróxido sódico acuoso 1 N (1 ml) y metanol (5 ml) y la disolución resultante se calentó a reflujo durante 1 h. El metanol se separó a vacío y el residuo se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 ml). Los extractos combinados se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron y se concentraron a vacío para dar un sólido. El producto bruto se purificó por recristalización en metanol para dar el compuesto del título **8** (23 mg) en forma de un sólido blanco. Datos seleccionados de RMN  $^1\text{H}$ : ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz):  $\delta$  5,62 (d, 1 H,  $J = 3,2$  Hz), 4,05 (d, 1 H,  $J = 2,4$  Hz), 4,02 (m, 1 H), 3,43 (dt, ancho, 1 H,  $J = 11,7$  Hz, 3,6 Hz), 3,36 (d, 1H,  $J = 4,2$  Hz), 1,197 (s, 3H), 0,76 (s, 3H). Punto de fusión: 238-241°C.

Androst-5-eno-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -tetrol (**12**) (método 2), androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triacetoxi-4 $\beta$ -ol (**11**).

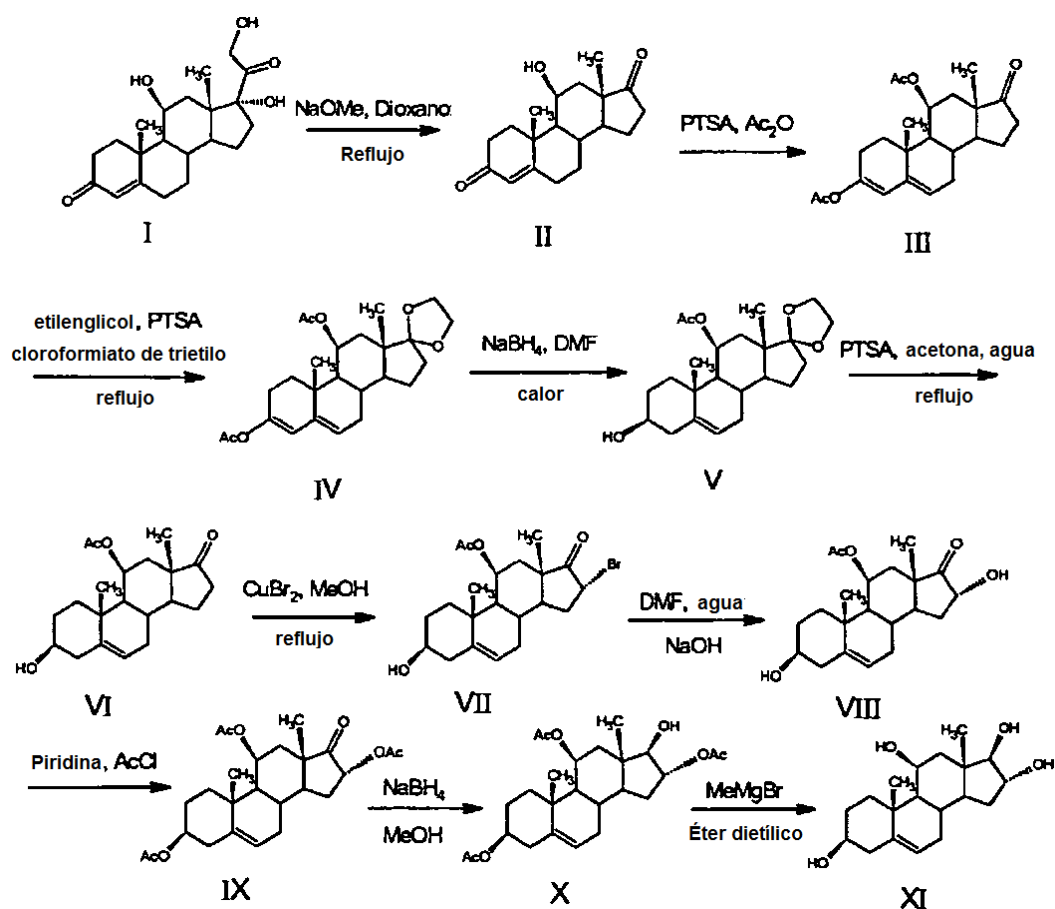


Etapa 1: A una disolución del compuesto **9** (5,0 g, 0,0138 mol) en piridina (20 ml) se añadió cloruro de acetilo (11,8 g, 0,128 mol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 5 h y después se separó a vacío la mayor parte del disolvente. El sedimento residual se repartió entre acetato de etilo (80 ml) y agua (20 ml). La capa orgánica se lavó con ácido clorhídrico acuoso 1 N, disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico, después se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y se evaporó hasta un sólido. El producto bruto se recristalizó en acetato de etilo y hexano para dar el compuesto **10** (4,8 g) en forma de un sólido blanco.

Etapa 2: A una disolución del compuesto **10** (720 mg, 1,66 mmol) en dioxano (15 ml) y ácido acético (10 ml) se añadió dióxido de selenio (185 mg, 1,66 mmol) en agua (1,5 ml) y dioxano (5 ml). La mezcla de reacción se calentó a 95°C durante 36 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo, y se lavó secuencialmente con agua, disolución saturada de bicarbonato sódico y salmuera, y después se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y se concentró a vacío hasta sequedad. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice eluida con hexano:acetato de etilo 3:2 para dar el compuesto **11** (174 mg) en forma de un sólido blanco.

Etapa 3: El compuesto **11** (148 mg, 0,33 mmol) se disolvió en hidróxido sódico acuoso 1 N (3 ml) y metanol (10 ml) y la disolución resultante se calentó a reflujo durante 1 h. La mayor parte del metanol se separó a vacío. Se añadió agua y la mezcla se trató con ultrasonidos y se filtró. El sólido recogido se secó a vacío para dar el compuesto **12** (82 mg) en forma de un sólido blanco. Datos seleccionados de RMN  $^1\text{H}$ : ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta$  5,48 (d, 1 H,  $J = 2,8$  Hz), 4,04 (d, 1 H,  $J = 2,7$  Hz), 3,74 (dd,  $J = 8,3$  Hz,  $J = 2,5$  Hz), 3,56 (t, 1 H,  $J = 8,5$  Hz), 3,43 (dt, 1 H,  $J = 7,6$  Hz,  $J = 4,2$  Hz), 1,25 (s, 3H), 0,75 (s, 3H). Punto de fusión: 144-147°C.

(VI). 16 $\alpha$ -Bromoandro-5-en-3 $\beta$ -ol-11 $\beta$ -acetoxi-17-ona (VII), (VIII), androst-5-eno-3 $\beta$ ,11 $\beta$ ,16 $\alpha$ -triacetoxi-17-ona (IX), androst-5-eno-3 $\beta$ ,11 $\beta$ ,16 $\alpha$ -triacetoxi-17 $\beta$ -ol (X), androst-5-eno-3 $\beta$ ,11 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol (XI).



II. El compuesto I (4,0 g, 11,4 mmol) se disolvió en 100 ml de 1,4-dioxano anhidro. Se añadió metóxido sódico (3,0 g, 55,2 mmol) y la mezcla se calentó a refluxo en condiciones anhidras durante 3 horas con seguimiento por HPLC. Se separó el disolvente hasta 1/3 del volumen y la mezcla se acidificó con  $\text{HCl}$  en agua 2 N hasta  $\text{pH} = 5-6$ . La mezcla se extrajo con  $\text{DCM}$  3 x 50 ml. Las capas orgánicas se volvieron a combinar y se lavaron con 50 ml de disolución saturada de bicarbonato sódico y 50 ml de salmuera. Después de secado sobre sulfato sódico y evaporación del disolvente, se aislaron 3,56 g de producto 95% puro.

III. El compuesto II (13,5 g) y ácido p-toluenosulfónico (2,45 g) se agitaron durante 18 h en 175 ml de anhídrido acético anhidro. Después, la mezcla se vertió en 800 g de hielo y se agitó durante 1 h. La filtración a través de un tapón corto de gel de sílice dio 3,14 g de compuesto III.

IV. El compuesto III (100 mg) se disolvió en 1,55 ml de etilenglicol, seguido de la adición de ortoformiato de trietilo (3,77 ml) y ácido p-toluenosulfónico (50 mg). Después la mezcla se calentó a refluxo durante 1,5 h y después se vertió en una mezcla caliente de 6 ml de metanol y 0,08 ml de piridina. La mezcla se enfrió y se añadieron 15 ml de agua. La mezcla se extrajo con 3 x 30 ml de acetato de etilo y se lavó con disolución saturada de bicarbonato sódico (20 ml) y salmuera (20 ml). El secado sobre sulfato sódico y la evaporación del disolvente dieron 50 mg de compuesto V 97% puro.

V. A una disolución de 50 mg del compuesto IV en 2 ml de  $\text{DMF}$  se añadió una disolución de 27 mg de borohidruro sódico disuelto en 0,5 ml de agua a temperatura ambiente. La disolución se calentó a  $100^\circ\text{C}$  con agitación vigorosa durante 15 min, seguido de enfriamiento a temperatura ambiente. La reacción se vertió en 18 ml de agua seguido de 0,2 ml de ácido acético. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x 10 ml) y se lavó con disolución saturada de bicarbonato sódico (10 ml) y salmuera (10 ml). El secado sobre sulfato sódico y la evaporación del disolvente dieron 39 mg del compuesto V.

VI. El compuesto V (50 mg) y ácido p-toluenosulfónico (2 mg) se suspendieron en una mezcla de 2 ml de acetona y 0,21 ml de agua y se calentaron a refluxo durante 1,5 h. Después de evaporación de la acetona, se añadieron 10 ml de agua y el producto precipitó en la disolución. La filtración dio 42 mg del producto deseado 95% puro.

VII. Se añadieron el compuesto VI (315 mg) y  $\text{CuBr}_2$  (611 mg) a 7 ml de metanol anhidro y se calentaron a refluxo durante 24 h. La mezcla de reacción después se enfrió y se vertió en 15 ml de agua caliente y el producto bruto se filtró. Después el producto bruto se disolvió en 25 ml de metanol/THF (1:1) y después se añadieron 200 mg de carbón activado. La disolución se hirvió durante 10 min y el carbón se separó por filtración. El producto bruto se

recristalizó en metanol para dar 426 mg de producto de 75% de pureza.

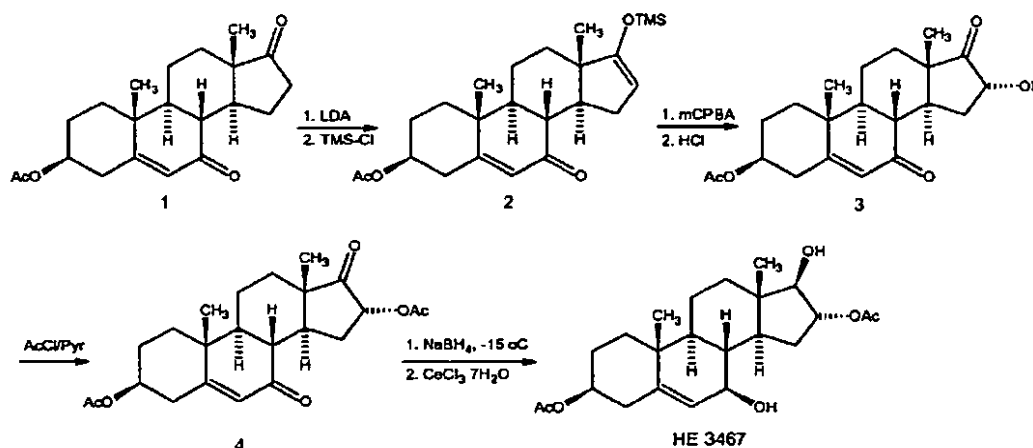
**VIII.** El compuesto **VII** (420 mg) se disolvió en una mezcla de 18 ml de DMF y 7 ml de agua. Se añadió hidróxido sódico acuoso mientras se agitaba (1 N, 1,31 ml). Después de 10 min, la disolución se vertió en una mezcla de hielo/agua que contenía 1,5 ml de HCl 1 M. La disolución se saturó con NaCl y se extrajo con acetato de etilo 2 x 5 ml. Después de secado sobre sulfato sódico y evaporación del disolvente, el producto bruto se purificó por cromatografía en columna para dar 300 mg del compuesto **VIII** 95% puro.

**IX.** El compuesto **VIII** (300 mg) se disolvió en 6 ml de piridina, seguido de la adición de 0,34 ml de cloruro de acetilo. La reacción se agitó durante 18 h y después se vertió en 30 ml de hielo-agua. El producto bruto se separó por filtración, y después se purificó por columna para dar 180 mg de producto bruto.

**X.** El compuesto **IX** (120 mg) se disolvió en 5 ml de metanol y se enfrió en un baño de hielo. Se añadió borohidruro sódico (11,5 mg) a lo largo de 5 min y se retiró el baño de hielo. Después de 1 h la reacción se inactivó con 0,2 ml de ácido acético y se añadieron 15 ml de agua. La mezcla se extrajo con 3 x 20 ml de acetato de etilo y se lavó con disolución saturada de bicarbonato sódico (20 ml) y salmuera (20 ml). El secado sobre sulfato sódico seguido de cromatografía en columna dio 86 mg del producto deseado.

**XI.** El compuesto **X** (180 mg) se disolvió en 5 ml de éter etílico seco y se enfrió a -78°C. Se añadió gota a gota bromuro de metilmagnesio (1,2 ml, 1 M en éter dietílico). La reacción se calentó a temperatura ambiente, y después se calentó a reflujo durante 3 h. Después la reacción se enfrió y neutralizó con HCl 1 M. El producto precipitado se separó por filtración y se recristalizó 3 veces en metanol/agua para dar 36 mg del compuesto **XI** puro. Punto de fusión = 220,3-221,6°C. Desplazamientos seleccionados de RMN: RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD): 5,20 ppm (s ancho, 1H). 4,26 ppm (dd, J=3Hz, 5Hz, 1H), 3,88 ppm (m, 1H), 3,32 ppm (m, 1H), 3,19 ppm (d, J=8Hz, 1H), 1,24 ppm (s, 3H), 0,92 ppm (s, 3H).

Androst-5-eno-3β,16α-diacetoxi-7,17-diona (4), androst-5-eno-3β,16α-diacetoxi-7β,17β-diol (HE3467).



**Síntesis del compuesto 2.** A una disolución del compuesto **1** (3,44 g, 10 mmol) y TMS-Cl (2,15 ml, 16,5 mmol) en THF (100 ml) enfriada a -78°C se añadió gota a gota LDA 2,0 M (7,5 ml, 15 mmol). La disolución se agitó durante 30 min y se calentó a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se repartió entre 100 ml de hexano/éter 1:1 y 100 ml de agua. La capa orgánica se lavó con salmuera (3 x 30 ml) y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se obtuvo un aceite amarillo después de separar el disolvente. El producto bruto se cromatografió en gel de sílice con EtOAc/hexano al 5-20% para recuperar 1,9 g del compuesto **1** y **2** en forma de un sólido blanco (600 mg, 1,54 mmol), 31% de rendimiento.

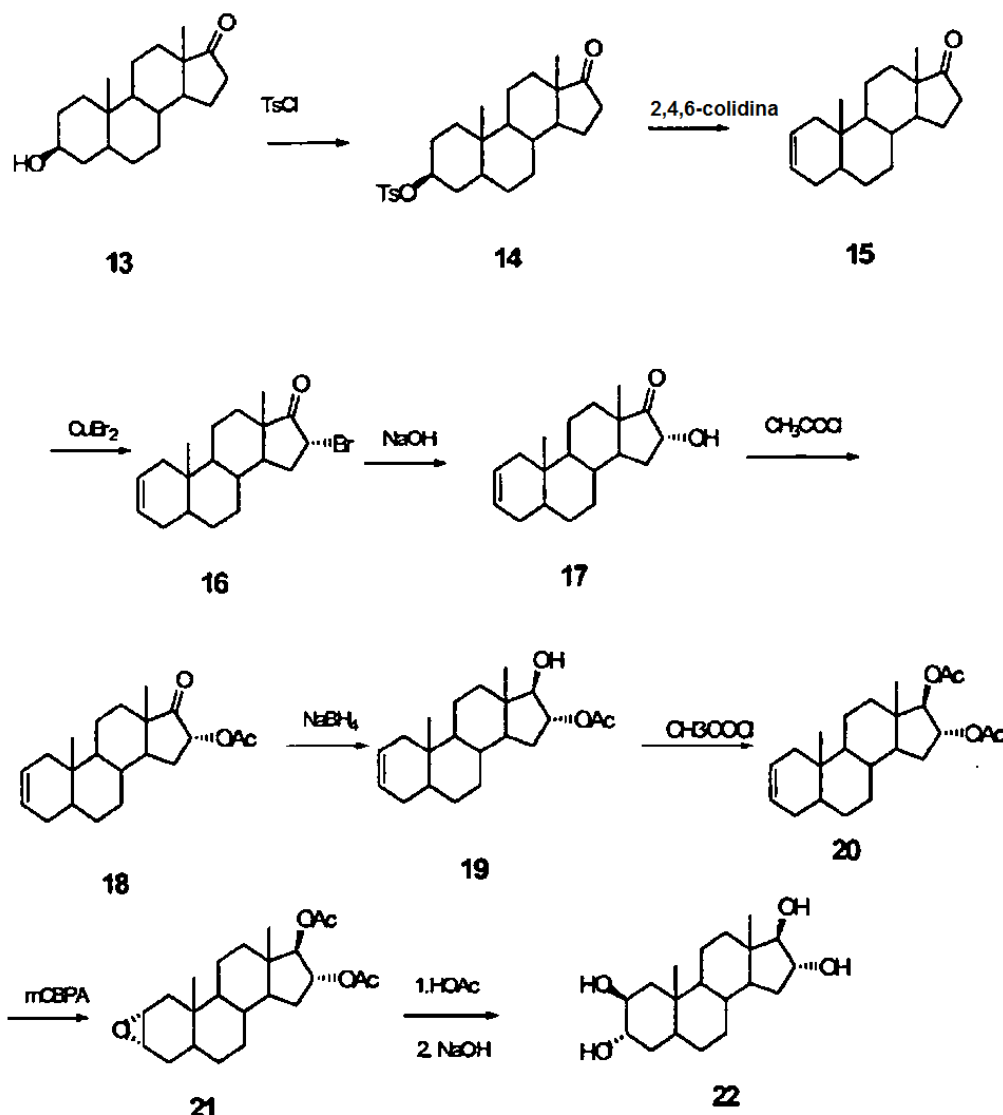
**Síntesis del compuesto 3.** A una disolución del compuesto **2** (100 mg, 0,26 mmol) en THF (3 ml) enfriada a 0°C, se añadió mCPBA (77%, 62,2 mg, 0,27 mmol) y se calentó a temperatura ambiente. Se añadió HCl 0,5 N (3 ml), se agitó durante 20 min, y se extrajo con éter. Los extractos se lavaron con disolución saturada de bicarbonato sódico, salmuera, y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El producto **3** se obtuvo después de separar el disolvente (90 mg, 0,26 mmol), 100% de rendimiento.

**Síntesis del compuesto 4.** A una disolución del compuesto **3** (721 mg, 2,0 mmol) en piridina (10 ml) enfriada a 0°C se añadió gota a gota cloruro de acetilo y se agitó a 0°C durante 2 h. La reacción se inactivó con agua (300 ml) y se agitó durante 15 min. Se formó un sólido y se recogió por filtración. El sólido se lavó con agua, HCl 1 N y agua y se secó a vacío para dar un sólido blanquecino del compuesto **4** (737 mg), 90% de rendimiento.

**Síntesis del compuesto HE3467.** A una disolución del compuesto **4** (300 mg, 0,75 mmol) en MeOH/THF 1:1 (15 ml) enfriada a -15°C se añadió NaBH<sub>4</sub> (42,5 mg, 1,12 mmol) a lo largo de 15 min. Se añadió una disolución de cloruro de cerio (300 mg, 0,81 mmol) en MeOH enfriada a -15 °C y se agitó durante 2 min. La reacción se inactivó con HCl 1 N

y después se vertió en 90 ml de agua. Se formó un sólido y se recogió por filtración. El sólido se lavó con HCl 1 N y agua, y se secó a vacío para dar el compuesto HE3467 (183 mg, 0,45 mmol), 60% de rendimiento. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  5,29 (s, 1H), 4,89 (m, 1H), 4,55 (m, 1H), 3,74 (d, 1H,  $J=6,52$ ), 3,60 (d, 1H,  $J=4,76$ ), 2,36 (d, 2H,  $J=1,27$ ), 2,15-2,18 (m, 2H), 2,05 (s, 3H), 2,01 (s, 3H), 1,9-1,1 (m, 11H), 1,11 (s, 3H), 0,82 (s, 3H).

5 5 $\alpha$ -Androstano-2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol (22).



Etapa 1: A una disolución del compuesto 13 (50,0 g, 0,172 mol) en piridina (150 ml) se añadió cloruro de p-toluenosulfonilo (47,0 g, 0,24 mol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 2 h y después se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua. El precipitado resultante se recogió por filtración y se lavó con agua. El producto bruto se purificó por recristalización en metanol para proporcionar el compuesto 14 (75,2 g) en forma de un sólido blanco.

Etapa 2: Una mezcla del compuesto 14 (75 g, 0,169 mol) en 2,4,6-colidina (200 ml) se calentó a reflujo durante 5 h. Después de enfriar, se añadió agua (500 ml) y el precipitado resultante se recogió por filtración y se lavó con agua. El sólido se recristalizó en metanol para dar un producto bruto (42,5 g). El producto bruto (20,0 g) se disolvió en cloroformo (113 ml) y anhídrido del ácido acético (37 ml). A esta disolución se añadió una disolución de ácido sulfúrico concentrado (3 ml) en cloroformo (37 ml) y 13 ml de anhídrido de ácido acético a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 0,5 h, después se añadieron 700 ml de agua y se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. El precipitado resultante se recogió por filtración y se lavó con agua, y se secó a vacío para dar el compuesto 15 (17,2 g) en forma de un sólido blanco.

Etapa 3: La mezcla del compuesto 15 (8,17 g, 0,030 mol) y bromuro de cobre (10,8 g, 0,046 mol) en metanol anhidro (220 ml) se calentó a reflujo durante 18 h. Después de enfriar, se separó la mayor parte del disolvente a vacío y se

añadió agua (150 ml). El precipitado resultante se recogió por filtración y se lavó con agua. El sólido se recrystalizó en metanol para dar el compuesto **16** en forma de un sólido blanco (6,76 g).

Etapa 4: A la disolución con agitación del compuesto **16** (6,69 g, 0,019 mol) en N,N-dimetilformamida (180 ml) se añadió disolución acuosa de hidróxido sódico 1 N (22 ml, 0,022 mol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 h. Se añadieron ácido clorhídrico acuoso 1 N (3 ml) y 100 ml de agua. La disolución resultante se extrajo con acetato de etilo (3 X 250 ml). Los extractos combinados se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron y se concentraron a vacío para dar el compuesto **17** (4,37 g) en forma de un sólido céreo.

Etapa 5: A una disolución del compuesto **17** (3,74 g, 0,013 mol) en piridina (20 ml) se añadió cloruro de acetilo (2,18, 0,028 mol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 1 h. La mezcla resultante se calentó a temperatura ambiente y se agitó 1 h más. Se añadió agua. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con agua. El sólido se secó a vacío para dar el compuesto **18** (4,25 g) en forma de un sólido blanco.

Etapa 6: A una disolución del compuesto **18** (2,4 g, 0,0072 mol) en metanol (80 ml) se añadió borohidruro sódico (1,2 g, 0,031 mol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 1 h. La reacción se inactivó por la adición de ácido acético (6 ml) y agua (15 ml). Se separó la mayor parte del metanol a presión reducida. El sedimento residual se repartió entre acetato de etilo (80 ml) y agua (20 ml). La capa orgánica se lavó con ácido clorhídrico acuoso 1 N, se neutralizó con disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico y después se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y se evaporó para dar el producto bruto **19** (1,92 g) en forma de un sólido blanco.

Etapa 7: A una disolución del compuesto **19** (1,9 g, 0,0057 mol) en piridina (20 ml) se añadió cloruro de acetilo (1 ml, 0,014 mol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 1 h. La mezcla resultante se calentó a temperatura ambiente y se agitó 1 h más y después se separó a vacío la mayor parte del disolvente. El sedimento residual se repartió entre acetato de etilo (80 ml) y agua (20 ml). La capa orgánica se lavó con ácido clorhídrico acuoso 1 N, disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico, después se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y se evaporó para dar un producto bruto. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice y se eluyó con acetato de etilo:hexano 1:10 para dar el compuesto **20** (1,4 g) en forma de un sólido blanco.

Etapa 8: A una disolución del compuesto **20** (980 mg, 2,61 mmol) en cloroformo (25 ml) se añadió ácido *m*-cloroperoxisbenzoico (3,6 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La capa orgánica se lavó con disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico, se lavó con agua y después se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y se evaporó para dar un producto bruto. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice eluida con acetato de etilo:hexano 1:10 para dar el compuesto **21** (780 mg) en forma de un sólido céreo blanco.

Etapa 9: La disolución del compuesto **21** (625 mg, 1,61 mmol) en ácido acético (8 ml) se calentó a reflujo durante 5 h. Después de enfriar, el disolvente se separó a vacío para dar un aceite, que se secó más a vacío durante la noche. El sólido céreo resultante se disolvió en hidróxido sódico acuoso 2 N (8 ml) y metanol (15 ml) y la reacción se calentó a reflujo durante 1 h. Se separó el metanol a vacío y se añadió agua. El precipitado resultante se recogió por filtración y se lavó con agua y acetona caliente. El sólido recogido se secó a vacío para dar el androstano-2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol o compuesto **22** (295 mg) en forma de un sólido blanco. Datos seleccionados de RMN <sup>1</sup>H: (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)  $\delta$  3,98(d, 1 H, J = 4,8 Hz), 3,79 (ancho, 1 H), 3,74 (ancho, 1 H), 3,35 (d, 1 H, 3,6 Hz), 0,99 (s, 3H), 0,77 (s, 3H). P.f.: 260-263°C.

Como será evidente, los compuestos descritos antes se pueden usar para preparar otros compuestos de referencia, p. ej., otros ésteres y éteres de estos compuestos.

**Ejemplo de referencia 23.** Se evaluó la capacidad de los compuestos de referencia para tratar la esclerosis múltiple (EM) en la encefalomielitis autoinmunitaria experimental (EAE) esencialmente como se ha descrito en el ejemplo 6 anterior. El protocolo para llevar a cabo el modelo animal de EAE se ha descrito en (D. Auci et. al., *Ann. NY. Acad. Sci. USA*, 1051:730-42, 2005). Ratones hembra SJL (6-8 semanas de edad, peso corporal medio de 25 g) obtenidos de Charles-River se mantuvieron en condiciones de laboratorio convencionales (exentos de gérmenes patógenos no específicos) con alimento y agua a voluntad y se dejó que se adaptaran una semana a su entorno antes de empezar el estudio. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 6 grupos de 7 animales cada uno: (1) ratones tratados con vehículo, (2) ratones tratados con SU5416 (Z-3-[(2,4-dimetilpirrol-5-il)metilidenil]-2-indolinona), (3) ratones tratados con 17 $\beta$ -etinilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\alpha$ -triol, (4) ratones tratados con androst-5-eno-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol, (5) ratones tratados con androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol, (6) ratones tratados con 3 $\alpha$ -trifluorometilandro-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, (7) ratones tratados con 17 $\alpha$ -trifluorometil-androst-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol y (8) ratones tratados con 16-oxima de 5 $\alpha$ -androstano-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol. La EAE se indujo con 200  $\mu$ l de una emulsión 1:1 de 75  $\mu$ g de proteína proteolípídica (PLP) y 6 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA en adyuvante completo de Freund (CFA). La inyección de 200  $\mu$ l se dividió entre cuatro sitios que drenaban en los ganglios linfáticos axilares e inguinales. Se usó la toxina Pertussis como coadyuvante y se administraron 200 ng/ratón por vía i.p. el día cero y el día 2 después de inmunización. Los grupos se trataron con 0,1 mg de compuesto en 100  $\mu$ l de vehículo, o con vehículo solo, una vez al día p.o. (alimentación oral por sonda), empezando en el inicio clínico de la enfermedad y continuando hasta el día 30 después de inmunización. El inicio clínico se define como el momento en el que los síntomas clínicos de la enfermedad alcanzan una clasificación entre 2-3 en 25% de los ratones. La clasificación clínica la llevó a cabo un



observador que desconocía el tratamiento: 0 = no hay enfermedad, 1 = cola flácida, 2 = paraparesia moderada, 3 = paraparesia grave, 4 = estado moribundo, 5 = muerte. El análisis estadístico de las diferencias significativas en las puntuaciones clínicas se llevó a cabo por ANOVA para datos no pareados y el ensayo de Mann-Whitney no paramétrico. Un valor  $P < 0,05$  se consideró que era estadísticamente significativo. Para el análisis estadístico, a los ratones que sucumbieron a la EAE se les asignó 5 solo el día de la muerte y después se suprimieron del grupo experimental.

Como se esperaba, se desarrollaron los signos clínicos de la EAE en 8/8 (100%) de los ratones tratados con vehículo en los siguientes 19 días después de inmunización. El día medio de inicio era  $15,5 \pm 3,9$  (ET). En este grupo de animales la duración de la enfermedad era  $12,3 \pm 4,3$  días. La puntuación media acumulada desde el día 1 al 30 era  $24,8 \pm 7,8$ , y desde el día 31 al día 54 (después de tratamiento) era  $22,7 \pm 15,8$ . Se observó una evolución de la EAE muy similar a la observada en los ratones tratados con vehículo, en los animales tratados con SU5416, androst-5-eno-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol y 16-oxima de 5 $\alpha$ -androstano-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, los ratones así tratados presentaron una incidencia acumulada de la enfermedad, duración de la enfermedad e inicio acumulado medio comparable a los de los ratones de referencia. A diferencia de esto, los ratones tratados con androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol, 3 $\alpha$ -trifluorometilandro-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol o 17 $\alpha$ -trifluorometilandro-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol presentaron una evolución de la EAE significativamente mejorada comparado con los ratones tratados con vehículo que implicaba una reducción significativa de una o ambas de la puntuación media acumulada y la duración. Y otro contraste más, es que ninguno de estos 3 compuestos influyó significativamente en la incidencia acumulada de la EAE o la letalidad. Finalmente, aunque el 17 $\beta$ -etilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\alpha$ -triol solo presentaba una tendencia hacia una menor puntuación acumulada y duración frente a los ratones tratados con vehículo, los efectos parecían ser biológicamente importantes ( $14,9 \pm 17,6$  y  $7 \pm 7,9$  frente a  $24,8 \pm 7,8$  y  $12,3 \pm 4,3$ ). La falta de significancia estadística con este compuesto se debe probablemente al gran número de ratones a los que se asignó la puntuación 0 a lo largo del periodo de observación, que por lo tanto produjo una desviación típica importante.

Al final del tratamiento el día 30, se hizo el seguimiento de los ratones durante hasta 24 días adicionales. Se pudo observar la enfermedad convirtiéndose en crónica en los ratones tratados con vehículo con puntuaciones acumuladas comparables a las del periodo de tratamiento. Se observó un aumento sustancial de la puntuación acumulada durante el periodo de seguimiento comparado con el periodo de tratamiento con SU5416, que pasó de una puntuación media acumulada de  $25,5 \pm 8,9$  a  $35,5 \pm 13,2$  y de forma más modesta con el 17 $\beta$ -etilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\alpha$ -triol que pasó de una puntuación media acumulada de  $14,9 \pm 17,6$  a  $18,4 \pm 20,6$ . En los ratones tratados con el 17 $\beta$ -etilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\alpha$ -triol también se pudo observar un aumento de la incidencia de la EAE de 57,1% al final del periodo de tratamiento a 85,6% al final del periodo de seguimiento. Por otra parte, los otros compuestos parecían que mantenían una puntuación acumulada similar en el periodo de seguimiento y en el periodo de tratamiento. Esto era particularmente notable para el 3 $\alpha$ -trifluorometilandro-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol que pasó de una puntuación media acumulada de  $11,2 \pm 4,8$  durante el periodo de tratamiento a  $10,8 \pm 10,3$  al final del periodo de seguimiento.

Estos resultados muestran que el 17 $\beta$ -etilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\alpha$ -triol, androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol, 3 $\alpha$ -trifluorometilandro-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, y 17 $\alpha$ -trifluorometilandro-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, ejercían propiedades antiinflamatorias potentes en el modelo de EAE inducido por PLP en ratones SJL. Tienen un interés particular para la traducción de estos descubrimientos al marco clínico, las observaciones de que los compuestos son activos en este modelo de EAE incluso cuando se administran en un protocolo que empieza el día 12 después de inmunización, cuando 24% de los ratones ya habían desarrollado signos clínicos de la EAE. De particular interés es el descubrimiento de que SU5416 es ineficaz en este marco. Se había descrito previamente que SU5416 era eficaz en la EAE (L. Bouerat et al., *J. Med. Chem.* 48: 5412-5414, 2005). Sin embargo, para obtener este resultado, el compuesto SU5416 se administró al mismo tiempo al que eran inmunizados los animales. A diferencia de esto, en este protocolo, los compuestos tales como el 17 $\beta$ -etilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\alpha$ -triol no se administraron a los animales hasta después de que los síntomas de la enfermedad fueran evidentes, lo que muestra que los compuestos se pueden usar para tratar de forma eficaz la enfermedad existente y para prevenir o retrasar el inicio de la enfermedad.

**Ejemplo de referencia 25.** Tratamiento de la exposición a radiación ionizante. Se comparó el efecto de los compuestos de referencia seleccionados en la supervivencia de ratones hembra B6D2F1 mortalmente irradiadas con animales de referencia tratados solo con vehículo. Los animales se expusieron a 10 Gy de irradiación corporal total a 2,5 Gy/min usando una fuente de  $^{137}\text{Cs}$ . Se usaron grupos de 12 animales en un total de 5 grupos. Para los grupos 1, 2, 3 y 5 se administró el artículo de ensayo en un volumen de 100  $\mu\text{l}$ , por inyección subcutánea, durante 3 días consecutivos, administrándose la primera dosis 2 a 4 horas después de la exposición a la radiación. Para el grupo 4, el artículo de ensayo se administró en un volumen de 50  $\mu\text{l}$ , por inyección intramuscular, durante 3 días consecutivos. La formulación era una suspensión que contenía carboximetilcelulosa al 0,1% en p/v, cloruro sódico al 0,9% en p/v y fenol al 0,05% en v/v. Las formulaciones se agitaron para volver a suspender de forma uniforme los compuestos de referencia antes de aplicarlos a la jeringa e inyectarlos a los animales en los minutos siguientes de aplicar a la jeringa para prevenir la sedimentación en la jeringa.

Los grupos de animales se trataron como sigue. El grupo 1 recibió solo vehículo por inyección subcutánea diaria durante 3 días consecutivos. El grupo 2 recibió 0,6 mg en 100  $\mu$ l de una suspensión de 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroxiandrost-5-eno por inyección subcutánea diaria durante 3 días consecutivos. El grupo 3 recibió 3,0 mg en 100  $\mu$ l de una suspensión de 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroxiandrost-5-eno por inyección subcutánea diaria durante 3 días consecutivos. El grupo 4 recibió 0,6 mg en 50  $\mu$ l de una suspensión de 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroxiandrost-5-eno por inyección intramuscular diaria durante 3 días consecutivos. El grupo 5 recibió 0,6 mg en 100  $\mu$ l de una suspensión de 3 $\beta$ -hidroxi-17 $\beta$ -aminoandrost-5-eno por inyección subcutánea diaria durante 3 días consecutivos. Se hizo el seguimiento de la supervivencia de los animales durante 21 días después de irradiación y se obtuvieron los siguientes resultados. Se muestra el número de animales que sobreviven el día 6, 7, 12 y 21.

Grupo		Día			
		6	7	12	21
1	referencia con vehículo	12	11	4	1
2	0,6 mg s.c.	12	11	10	7
3	3,0 mg s.c.	12	12	9	7
4	0,6 mg i.m.	12	12	11	9
5	0,6 mg s.c.	12	12	12	11

**Ejemplo 25.** Tratamiento de la inflamación gastrointestinal. La capacidad del compuesto de acuerdo con la invención para limitar o inhibir la inflamación o los síntomas de inflamación, se mostró usando un modelo animal para la enfermedad inflamatoria del intestino. Se usaron grupos de 3 ratas macho Wistar (180  $\pm$  20 gramos) en ayunas durante 24 h antes de la estimulación con ácido 2,4-dinitrobencenosulfónico (DNBS) o disolución salina. Se indujo colitis distal por instilación intracolónica de 0,5 ml de una disolución de DNBS en etanol (30 mg en 0,5 ml de una disolución de etanol al 30% en disolución salina) después de lo cual se inyectaron 2 ml de aire a través de la cánula para asegurar que la disolución permanecía en el colon. El volumen usado fueron 0,1 ml por inyección de 2 y 20 mg/ml de compuesto tal como el androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\alpha$ -triol en una formulación líquida, que se administró por inyección subcutánea una vez al día durante 6 días (0,2 mg/animal/día o 2,0 mg/animal/día). La formulación contenía 100 mg/ml de compuesto en una suspensión no acuosa, p. ej., alcohol bencílico al 2% en p/v, Brij 96 al 0,1% en p/v y volúmenes iguales de PEG 300 y propilenglicol. Se obtuvieron concentraciones de 2 mg/ml y 20 mg/ml diluyendo la formulación de 20 mg/ml con vehículo que carecía de compuesto.

La primera dosis se administró 30 min después de la estimulación con DNBS. Se administró por vía oral (p.o.) sulfasalazina (30 mg/ml en Tween 80 al 2% en agua destilada) una vez al día (10 ml/kg/día) durante 7 días, empezando las dos primeras dosis 24 h y 2 h antes de la estimulación con DNBS. Se registró diariamente la presencia de diarrea examinando el área anal. Los animales se dejaron en ayunas 24 h antes del sacrificio. Los animales se sacrificaron el día 7 o el día 8 y se sacó y pesó el colon. Antes de extirpar el colon, se registran los signos de adherencia entre el colon y los otros órganos. También se anotó la presencia de ulceraciones después de pesar cada colon. El cambio "neto" de la relación de peso de colon a peso corporal (PC) se normaliza con respecto al grupo base estimulado con disolución salina. Se consideró significativa una disminución de 25-30% en la relación "neta" de peso de colon a peso corporal. Los resultados mostraron que el androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol tenía un efecto moderado en la evolución de la enfermedad (aproximadamente 15-20% de disminución en la relación neta de peso de colon a peso corporal), mientras que los tratamientos con 17 $\alpha$ -etnilandrost-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol o androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -tetrol eran eficaces (aproximadamente 25-35% de disminución en la relación neta de peso de colon a peso corporal).

Las variaciones de este protocolo incluyen la administración de compuestos en una disolución acuosa de éter sulfobutílico-ciclodextrina al 30% en agua, usando niveles de dosis descritos antes y/o uno o más de 0,05 mg/animal/día, 0,1 mg/animal/día, 0,5 mg/animal/día y 1,0 mg/animal/día.

**Ejemplo 26.** Tratamiento de la pérdida neuronal asociada con traumatismo y osteoporosis o afecciones de pérdida ósea. La competencia inmunitaria es una función compleja que puede estar extremadamente deteriorada después de elevaciones de los niveles de glucocorticoides (GC) endógeno inducidas por traumatismo. Se usó el compuesto de referencia 5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol para preservar esta función inmunitaria ejerciendo una actividad trófica o anabólica. En un modelo animal de accidente cerebral isquémico agudo consecutivo a una oclusión carotídea bilateral en jerbos, el tratamiento con 5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol mejoró significativamente las capacidades cognitivas cuando se comparó con el accidente cerebrovascular solo (p = 0,03). Así pues, el periodo de latencia de búsqueda de comida medido en cada grupo era 6,9  $\pm$  0,9 segundos (s) para el caso simulado, 46,9  $\pm$  13,6 s para el accidente cerebrovascular solo y 14,8  $\pm$  4,8 s para el accidente cerebrovascular tratado con el 5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol. Al mismo tiempo, la pérdida en el recuento de neuronas de la zona CA1 del hipocampo inducida por el accidente cerebrovascular se anuló significativamente con el 5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol (caso simulado = 362,247  $\pm$  6,839; accidente cerebrovascular = 152,354  $\pm$  11,575; y accidente cerebrovascular + 5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol = 207,854  $\pm$  47,334).

En las afecciones de pérdida ósea, el 5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol afectaba a las estructuras óseas principales, es decir, las capas cortical y trabecular y la placa epifisaria. En los ratones lesionados térmicamente (20% de la superficie corporal total) tratados con 5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol, la pérdida cortical (fémur) y la masa ósea trabecular/esponjosa (tibia), así como la supresión de la proliferación de condrocitos en la placa epifisaria de la tibia proximal se previnieron todos significativamente ( $p < 0,01$ ) por el tratamiento con 5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol. La histomorfometría del hueso cortical en el fémur sugería un aumento de la tasa de formación de hueso. Se observó protección parcial frente a la pérdida de contenido de hueso mineral medido por absorciometría dual de rayos X. El peso de las cenizas del fémur era significativamente mayor ( $p < 0,01$ ) que el de los ratones quemados tratados con vehículo, mostrando que el 5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol preservaba el contenido de mineral óseo. Los efectos proinflamatorios de los niveles de GC crónicamente altos en el cerebro, sugiere que los niveles elevados de GC empeoran el resultado de las agresiones neurológicas. El esteroide suprarrenal DHEA (5-androsten-3 $\beta$ -hidroxi-17-ona), un precursor metabólico corriente arriba del 5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol, ha demostrado que previene la involución tímica inducida por dexametasona en ratones (K.L. Blauer et al., *Endocrinology*, 129:3174, 1991). Considerados juntos, estos descubrimientos mostraban que el 5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol suprimía la pérdida del tejido nervioso funcional inducida por los GC y conservaba la estructura ósea después de lesión térmica.

La capacidad de compuestos que incluyen el 5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol, 17 $\alpha$ -etnil-5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol y 4-estreno-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol para invertir los efectos adversos de los glucocorticoides en el crecimiento óseo, también se mostró en la línea celular humana de osteosarcoma MG-63. Las células MG-63 son osteoblastos, que son células que median el crecimiento óseo. Esta línea celular se ha usado ampliamente para estudiar la biología del hueso y caracterizar la actividad biológica de compuestos para el tratamiento de las afecciones de pérdida ósea (p. ej., B.D. Boyan et al., *J. Biol. Chem.*, 264(20):11879-11886, 1989; L.C. Hofbauer et al., *Endocrinology*, 140(10):4382-4389, 1999). Las toxicidades adversas asociadas con los niveles elevados de glucocorticoides incluyen una disminución en la producción de IL-6 e IL-8 por los osteoblastos, incluyendo la línea celular MG-63, y un aumento de la expresión de la enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 1 (11 $\beta$ -HSD). El aumento de la enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 1 produce niveles aumentados de la actividad de glucocorticoides endógenos, convirtiendo la cortisona endógena en cortisol activo, que inhibe el crecimiento óseo. La enzima 11 $\beta$ -HSD es expresada en el hígado, tejido adiposo, cerebro y tejidos óseos. El cortisol generado por la 11 $\beta$ -HSD-1 contribuye a la osteoporosis, resistencia a la insulina, diabetes de tipo 2, dislipidemia, obesidad, trastornos del sistema nervioso central tales como el accidente cerebrovascular, muerte neuronal, depresión y enfermedad de Parkinson. Las disminuciones de IL-6, IL-8 y osteoprotegerina están asociadas con el menor crecimiento óseo por los osteoblastos. Estudios piloto mostraron que la  $CI_{50}$  para la inhibición de la IL-6 de células MG-63 por dexametasona era 10 nM y la  $CI_{50}$  para la inhibición del crecimiento de células MG-63 por la dexametasona era 15,3 nM.

En este protocolo, las células MG-63 se desarrollaron en presencia o ausencia del glucocorticoide sintético dexametasona en una concentración 30 nM y en presencia o ausencia del compuesto de fórmula 1 10 nM. El compuesto 1 en la siguiente tabla era el 5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol, el compuesto 2 era el 17 $\alpha$ -etnil-5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol y el compuesto 3 era el 4-estreno-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol. Los resultados para estos compuestos se muestran a continuación.

condiciones de crecimiento de MG-63	IL-6 pg/ml	IL-8 unidades	ARNm de 11 $\beta$ -HSD unidades	osteoprotegerina pmol/l
referencia con vehículo	6,2	0,90	0,25	445
dexametasona	1,3	0,12	1,0	280
compuesto de referencia 1	4,0	0,53	0,73	-
compuesto 2	2,8	0,50	0,54	-
compuesto 2 (1 nM)	-	-	-	455
compuesto de referencia 3	4,1	0,55	0,75	-

Estos resultados mostraban que los compuestos en concentración 10 nM invertían parcialmente los efectos adversos de la dexametasona 30 nM, lo cual muestra que los compuestos pueden invertir las múltiples toxicidades asociadas con niveles elevados de glucocorticoides en osteoblastos, que son las células que median el crecimiento óseo. En un protocolo relacionado, el compuesto 17 $\alpha$ -etnil-5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol 1 nM también invirtió completamente la disminución de la síntesis de osteoprotegerina por las células MG-63 después de crecimiento de las células durante 7 h en presencia de dexametasona 30 nM como se muestra en la tabla anterior. La osteoprotegerina es un factor asociado con el crecimiento óseo y la síntesis reducida de osteoprotegerina está asociada con la pérdida ósea. Otros compuestos de referencia que invertían completa o parcialmente la síntesis de osteoprotegerina por las células MG-63 en presencia de dexametasona 30 nM eran el 17 $\alpha$ -trifluorometil-5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol (niveles de osteoprotegerina normales o basales con el compuesto 1  $\mu$ M comparado con la referencia con vehículo sin compuesto ni dexametasona), 5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol (niveles de osteoprotegerina normales con 0,1  $\mu$ M), 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrahidroxiandrost-5-eno (niveles de osteoprotegerina casi normales con 10 nM), 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrahidroxiandrost-5-eno (niveles de osteoprotegerina normales con 10 nM), 17 $\alpha$ -metilandrost-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol-7-ona (niveles de osteoprotegerina aumentados con 100 nM), 17 $\alpha$ -metilandrost-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (niveles de osteoprotegerina normales con 10 nM). Otros compuestos de referencia que

invertían parcialmente la disminución de la osteoprotegerina en presencia de dexametasona 30 nM incluían la 7-oxima del androst-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol.

En protocolos similares, el compuesto de referencia 3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihidroxiandrost-4-eno mostró inversión estadísticamente significativa de la supresión de IL-6 e IL-8 por las células MG-63 inducida por dexametasona y una disminución del ARNm de 11 $\beta$ -HSD inducida por la dexametasona.

Para mostrar que se podían obtener efectos importantes in vivo, el compuesto 17 $\alpha$ -etnil-5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol se administró a ratones que también se habían tratado también diariamente con dexametasona durante 23 días, para reducir los niveles de osteoprotegerina en los animales. Los niveles de osteoprotegerina en los ratones que se trataron con vehículo y dexametasona, con 10  $\mu$ g/día (grupo de referencia positivo) eran de 3,3 pmol/l de osteoprotegerina, mientras que en los animales tratados con vehículo, dexametasona y 17 $\alpha$ -etnil-5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol con 4 mg/kg/día eran de 6,4 pmol/l de osteoprotegerina ( $p < 0,05$ ).

Se examinó el grado de apoptosis de los osteoblastos y osteocitos en el hueso vertebral murino como función de la deficiencia de estrógenos. Se realizó una ovariectomía a ratones swiss-webster (4 meses de edad). 28 días más tarde, los animales se sacrificaron, se aislaron las vértebras, se fijaron y se sumergieron y después se descalcificaron en metacrilato. La prevalencia de la apoptosis de osteoblastos y osteocitos se determinó por el método TUNEL con potenciación con CuSO<sub>4</sub> y se encontró que había aumentado después de la pérdida de estrógenos. Se encontró que el tratamiento con un compuesto de referencia tal como el 17 $\beta$ -estradiol y con 4-estreno-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol y/o 17 $\alpha$ -etnil-5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol reducía la apoptosis, lo cual está de acuerdo con la menor pérdida ósea.

De forma conjunta, los resultados descritos en este ejemplo son la prueba de que el compuesto de la invención, el 17 $\alpha$ -etnil-5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol, afecta al tejido óseo tanto aumentando el crecimiento óseo como inhibiendo la pérdida ósea. Los compuestos tales como el 17 $\alpha$ -etnil-5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol y el 5-androsteno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol no interaccionan con el receptor de andrógenos, receptor  $\alpha$  de estrógenos o receptor  $\beta$  de estrógenos, lo cual está de acuerdo con su capacidad para tratar las afecciones de pérdida ósea sin ejercer una actividad de las hormonas sexuales indeseada.

**Ejemplo de referencia 27.** Se usó un modelo de lesión térmica usando tejido de oreja de ratón para caracterizar los compuestos de referencia por su capacidad para tratar la inflamación asociada con el traumatismo térmico. Las afecciones eran la mínima lesión por quemadura que evoluciona a necrosis tisular en la oreja expuesta de los ratones sin tratar a las 24-72 h después de la quemadura. Se dio a los grupos de ratones Balb/c, de aproximadamente 9 semanas de edad, una marca identificadora y después se dividieron en los subgrupos de referencia y tratado. Se registró el grosor de la oreja que se iba a sumergir en agua caliente, y después la oreja entera del ratón anestesiado se sumergió en agua a 52°C durante 24 s. Se devolvió cada ratón a su jaula después de una inyección del vehículo propilenglicol (referencia) o 100 mg de compuesto en propilenglicol. Se hizo el seguimiento de los cambios en el hinchamiento de la oreja en los ratones individuales antes de la quemadura, y en diferentes tiempos después de la lesión térmica. Se hizo el seguimiento de los cambios en el hinchamiento de la oreja en ratones individuales antes de la lesión y 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 y 48 h después de la lesión térmica. Los animales se trataron con 100 mg de deshidroepiandrosterona (DHEA) disuelta en propilenglicol. El análisis de la formación de edema y la resolución en los ratones de referencia y los tratados con DHEA mostró un hinchamiento máximo de la oreja, como una medida del edema, en los ratones quemados tanto tratados con DHEA como en los no tratados, 6 h después de la lesión.

En el grupo de referencia no tratado, la extensión del hinchamiento empezó a disminuir en las siguientes 12 h, y continuó disminuyendo rápidamente a lo largo del siguiente periodo de 12 h. Entre las 24 y 48 h después de quemadura, el tejido de la oreja mostró pérdida y oclusión microvascular de la zona original de estasis. Los compuestos de referencia androst-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol y 16 $\alpha$ -bromodeshidroepiandrosterona, protegieron a los animales tratados frente a la mayor parte de las consecuencias isquémicas de la lesión térmica de la oreja. El compuesto de referencia 16 $\alpha$ -hidroxideshidroepiandrosterona era menos protector, es decir, redujo la extensión, pero no previno totalmente la evolución de la isquemia, y la 16 $\alpha$ -clorodeshidroepiandrosterona era solo ligeramente protectora frente a la isquemia progresiva.

Se examinó el efecto de los compuestos de referencia en el choque hemorrágico y la isquemia en otro protocolo. Los ratones CF-1 con una edad de 6-8 meses se anestesiaron usando metoxifluorotano y se prepararon para la cirugía abdominal. Se ensayó en cada ratón el nivel de respiración, la respuesta de parpadeo y la respuesta a un pellizco en la piel, para asegurar un nivel de anestesia adecuado para la cirugía. La duración de la cirugía abdominal era aproximadamente 2 h, y durante este tiempo se extrajo 35-40% del volumen sanguíneo de los animales a lo largo de un periodo de 30 minutos. La extracción de sangre de una forma controlada simula el efecto del choque hemorrágico. Se hizo una infusión intravenosa lenta de la sangre extraída y un volumen 2X de líquido de reanimación (disolución de Ringer lactato) en una vena central. El líquido de reanimación se complementó con 2 mg de deshidroepiandrosterona-3 $\beta$ -sulfato o el excipiente como placebo. Se suturaron por separado el peritoneo y la piel de recubrimiento. Los animales se mantuvieron a 38°C-39°C hasta la recuperación completa. En estas condiciones, la mayoría de los animales tratados con placebo murieron en las siguientes 24-48 h. Cuatro horas

después de cirugía, se realizó un ensayo de unidades formadoras de colonia (UFC) para bacterias y se ensayó el malondialdehído en el hígado usando técnicas convencionales. Se extirparon los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y se cultivaron en placas de agar sangre y se contó el número de UFC después de cultivo. Se extrajo el hígado y se midió la cantidad de malonaldehído. El tratamiento de deshidroepiandrosterona-3 $\beta$ -sulfato dio como resultado la supervivencia de 15/15 ratones mientras que con la referencia con vehículo sobrevivieron 1/15 animales.

Se examinó el efecto del tratamiento en un modelo de rata de traumatismo hemorrágico. Se sometieron 24 ratas a una pérdida de 40% del volumen de sangre total, que consistía en la cateterización y laparotomía (lesión del tejido blando) para simular el traumatismo y la hemorragia. Una hora después del inicio de la hemorragia, los animales se resucitaron con líquido cristaloide y glóbulos rojos empaquetados (PRBC). 12 animales recibieron una inyección subcutánea de androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol en una suspensión de metilcelulosa con una concentración de 40 mg/kg de peso corporal en 100  $\mu$ l/kg de peso corporal, 1 h después de inicio de la hemorragia, pero antes del líquido de reanimación. 12 animales recibieron 100  $\mu$ l/kg de peso corporal de inyección subcutánea de referencia de metilcelulosa. Tres días después de inducción de la hemorragia, los 12 animales que habían recibido androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol tenían una tasa de supervivencia de 100%; mientras que la tasa de mortalidad era de 25% en el grupo no tratado ( $P < 0,04$ , prueba para superioridad de Barnard sin condiciones usando la diferencia de dos proporciones binomiales).

También se llevó a cabo un protocolo de traumatismo hemorrágico de presión sanguínea reducida como un segundo modelo del traumatismo hemorrágico. En este protocolo, se produjo hemorragia en 15 ratas como se ha descrito antes a una presión arterial media de aproximadamente 35-40 mm de Hg y se reanimaron 1 h desde el inicio de la hemorragia con cristaloide y PRBC. 7 animales recibieron inyección subcutánea de androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol en una suspensión de metilcelulosa en una concentración de 40 mg/kg de peso corporal en 100  $\mu$ l/kg de peso corporal, 1 h después del inicio de la hemorragia, pero antes del líquido de reanimación. 8 animales recibieron inyección subcutánea de 100  $\mu$ l/kg de peso corporal de referencia con metilcelulosa. Dos días después de inducir la hemorragia, la mortalidad en el grupo no tratado ( $n = 8$ ) era 75%. La tasa de mortalidad en los animales tratados con androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol era 43%, demostrando que el compuesto era protector en casos de traumatismo hemorrágico con presión sanguínea reducida.

**Ejemplo 28.** Estabilidad metabólica. Se examinó la estabilidad metabólica del compuesto de acuerdo con la invención in vitro usando microsomas obtenidos de tejido hepático, de acuerdo con el siguiente protocolo. Los microsomas en este protocolo son capaces de dar reacciones de hidroxilación y reacciones redox que interconvierten hidroxilos y cetonas en las moléculas de esteroides. Los microsomas no median reacciones de conjugación, p. ej., sulfatación de grupos 3 $\beta$ -hidroxilo o glucuronidación de grupos 3 $\alpha$ -hidroxilo.

El protocolo se llevó a cabo como sigue. (1) Se preparó el compuesto en concentración 0,5 mM en acetonitrilo/agua 35:65. Para el androst-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol se preparó una concentración de 0,145 mg/ml o 29,0  $\mu$ l de una disolución madre de 1 mg/ml más 171  $\mu$ l de disolvente. Para las diluciones para la curva patrón se usó una disolución madre 0,5 mM para obtener concentraciones finales del androst-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol de 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 1  $\mu$ M. (2) Se prepararon las muestras como sigue. Cada ensayo consistía en una referencia de androst-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol y 1-8 compuestos desconocidos. Los tubos para cada compuesto eran los siguientes: 1-0' 2-0' 3-0' 4-0' 5-0' 6-5  $\mu$ M 7-1  $\mu$ M 8-30' 9-30' 10-30', en los que el \* designa los tubos de reacción de referencia negativa de microsomas desnaturalizados. Para los compuestos adicionales la numeración se inició en 11, 21, 31, etc. (3) Se añadieron 315  $\mu$ l de PBS (pH 7,3-7,5) a cada tubo. Se añadieron 10  $\mu$ l de la disolución del artículo de ensayo adecuado a cada tubo. (4) La disolución de referencia interna/acetonitrilo. (5) El sistema de regeneración de NADPH (NRS) era 125  $\mu$ l por tubo. Se añadieron al PBS NADP 1,7 mg/ml, glucosa-6-fosfato 7,8 mg/ml, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 6 unidades/ml. El NRS reciente para cada experimento se mantuvo en hielo hasta su uso. (6) Cada reacción usaba 125  $\mu$ l de NRS en cada tubo. (7) Se sacó la preparación de microsomas hepáticos del refrigerador a -80°C, y se descongeló en un baño de agua a temperatura ambiente. La preparación de microsomas tenía una concentración de 20 mg/ml. Cada reacción usaba 0,25 mg/tubo y se diluyó a una concentración de 5 mg/ml en PBS (es decir, dilución de 4 veces) y se mantuvo en hielo. (8) Para los tubos de referencia con microsomas desnaturalizados y de tiempo cero, se añadieron 500  $\mu$ l de acetonitrilo a -20°C. Los tubos de tiempo cero se transfirieron a hielo y los de referencia con microsomas desnaturalizados se preincubaron a 37°C durante 5 min. (9) Los tubos de ensayo que contenían la preparación de microsomas también se preincubaron durante 5 min a 37°C. (10) Para cada tubo de incubación, la reacción se inició por adición de 50  $\mu$ l de la preparación de microsomas y se mezcló con mezcla vortical. (11) Cada reacción se terminó por adición de 500  $\mu$ l de acetonitrilo a -20°C y mezcla vortical. (12) Tras terminarse la reacción, se transfirieron 100  $\mu$ l de cada tubo de reacción a un nuevo tubo y se añadieron a cada tubo 200  $\mu$ l de agua y 1400  $\mu$ l de éter de *t*-butilo y metilo. Los tubos se mezclaron con mezcla vortical y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 min en una microcentrífuga. Los tubos después se pusieron en un baño de hielo seco-metanol hasta que la capa acuosa se había congelado formando un sólido. (13) Se transfirió el éter de *t*-butilo y metilo de cada tubo a un nuevo tubo y el disolvente se evaporó en atmósfera de nitrógeno y después el precipitado se volvió a suspender en 100  $\mu$ l de acetonitrilo/agua 35:65 y se analizó por LCMS. Los resultados se muestran en la siguiente tabla para los tiempos de incubación mostrados a continuación.

Compuesto	microsomas restantes originales	humanos microsomas de ratón restantes originales
androst-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol	39% (10 min)	25% (10 min)
androst-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol	30% (90 min)	-
androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol	86% (90 min)	89% (10 min)
17 $\alpha$ -etinilandro-5- eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ , 17 $\beta$ -triol	-	86%* (30 min)
androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol	100% (10 min)	100% (10 min)
androst-5-eno-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol	100% (10 min)	100% (10 min)
androst-5-eno-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol	100% (10 min)	100% (10 min)
androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol	100% (10 min)	100% (10 min)

\*microsomas de rata en lugar de preparación de ratón

Los resultados muestran que el compuesto tetrol de referencia era resistente a las reacciones rédox, lo cual está de acuerdo con un grado muy reducido de metabolismo comparado con el compuesto de referencia androst-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol. Esta observación era bastante inesperada porque cada uno de los 4 grupos hidroxilo podría ser potencialmente reducido a una cetona, pero de hecho ninguno era afectado. Otros compuestos de referencia que se examinaron incluían el androst-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol, androstano-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -diol-17-ona y androstano-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -triol, los cuales eran todos metabolizados por los microsomas a una velocidad similar al compuesto de referencia androst-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol.

**Ejemplo 29.** Medición de la absorción de fármaco con células CaCo-2. Este protocolo se usó para medir el influjo del compuesto de acuerdo con la invención a través de una monocapa de células CaCo-2. Las células CaCo-2 son células humanas de una línea celular muy diferenciada, polarizada, lo que demuestra un fenotipo celular de absorción intestinal (J. Hunter et al., J. Biol. Chem., 268 (20):14991-14997, 1993). Esta línea celular se usa para estudiar la velocidad a la que diferentes compuestos cruzan la monocapa celular. Típicamente, se usan monocapas confluentes de células Caco-2 como modelo de epitelio intestinal y para obtener coeficientes de permeabilidad del flujo en estado de equilibrio de los compuestos de ensayo. Esto puede proporcionar información sobre el potencial de un compuesto para ser biodisponible por vía oral.

En este protocolo, las células se mantuvieron en medio a 37°C usando 100  $\mu$ l por pocillo de medio caliente en un tubo estéril de 50 ml. Las células se cultivaron en placas estériles de 24 pocillos con 600  $\mu$ l de medio de diferenciación por pocillo. Los pocillos contenían un inserto Transwell para permitir dos compartimentos por pocillo. Se añadieron con cuidado 100  $\mu$ l de medio de diferenciación en cada pocillo, tocando con la punta de la pipeta el lateral del pocillo. Las células se incubaron a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%, humedad de saturación durante 48 h para formar una monocapa. Para cada placa, se numeraron tubos como tubos 1-24 para el tampón basolateral para que sirvieran como tiempo de medición cero basolateral (T<sub>0</sub>). Los tubos 26 a 49 eran tampón apical que contiene el artículo de ensayo para que sirvieran como T<sub>0</sub> apical. Los tubos 51-74 eran el punto de medición T<sub>20</sub> (20 min), 76-99 eran el punto de medición T<sub>40</sub>, 101-124 eran el punto de medición T<sub>80</sub>, 126-149 eran el punto de medición T<sub>120</sub>, y 151-174 eran las muestras apicales T<sub>120</sub> para la determinación del equilibrio de masas. Los tubos 175-179 eran la curva patrón de 5 puntos para el compuesto de referencia 1, los tubos 180-184 eran la curva patrón para el compuesto 2 etc. hasta los tubos 230-234 para el compuesto de referencia 12. Los tubos 1-49 se pusieron en 4 filas en la rejilla 1, 51-99 en la rejilla 2, 101-149 en la rejilla 3, 151-174 en la rejilla 4, y 175-234 en las rejillas 5 y 6.

Los tampones se prepararon separando 150 ml de tampón de transporte de una nueva botella de 1000 ml (a pH 7,4 con HCl 1 N). Este tampón es "basolateral". El pH de los 850 ml restantes se ajustó a 6,5 con HCl 1 N para el tampón "apical". Se pusieron 150 ml de tampón apical en un recipiente separado, y los 700 ml restantes se usaron para el lavado. Los tampones se almacenaron a 4°C pero se usaron a temperatura ambiente para el protocolo.

Después de que el medio de diferenciación alcanzara la temperatura ambiente, se vertieron aproximadamente 20 ml en un vaso de precipitados pequeño. La sonda se equilibró en este medio durante 15 min. Se sacaron las placas de 24 pocillos del incubador y se dejó que alcanzaran la temperatura ambiente. Se hizo la medición en cada pocillo mediante la sonda, insertando la sonda en el pocillo sin tocar la monocapa celular, se presionó el botón TEST cuando la sonda estaba cerca de la superficie del medio y las lecturas iban de 0000 a un número cuando la sonda toca la superficie; una lectura de >1000  $\Omega$  era aceptable. Después, se decantó el tampón apical del inserto Transwell y la placa entera se lavó en un vaso de precipitados de 1000 ml que contenía tampón de lavado para separar todo el tampón de diferenciación. Los Transwell se pusieron en placas T20. Se añadieron el compuesto de ensayo y las referencias 10  $\mu$ M (carbamazapina PM 236; hidroclorotiazida PM 351) en tapón apical, añadiendo 0,1  $\mu$ mol (p. ej. 29  $\mu$ l de una disolución de referencia de 1 mg/ml de androst-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol) a 10 ml de tampón apical. Después se añadieron 0,6 ml de tampón basolateral a todos los pocillos.

Se hizo una disolución de 50  $\mu$ g/ml de 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrahydroandro-5-eno como una referencia interna por adición de 150  $\mu$ l del compuesto (1 mg/ml en etanol) a 10 ml de acetonitrilo/agua (25:75). Las curvas de referencia se hicieron en tampón basolateral para cada compuesto. El tampón apical 10  $\mu$ M se diluyó 6 veces cuando pasaba al compartimento basolateral, de modo que la curva patrón se preparó con una concentración 6 veces inferior.

Concentración	TA apical (10 $\mu$ M)	Tampón Baso.
2 $\mu$ M	120	480
1 $\mu$ M	60	540
0,5 $\mu$ M	30	570
0,2 $\mu$ M	12	588
0,05	3	597

Se pusieron 600  $\mu$ l de tampón basolateral en los tubos 1-24 para las referencias de  $T_0$ . Se añadieron 100  $\mu$ l de tampón apical más artículo de ensayo más 500  $\mu$ l de tampón apical (de modo que la concentración estuviera en el intervalo de la curva patrón) a los tubos 26-49 para que sirvieran de  $T_0$  apical. Se pusieron 100  $\mu$ l de tampón apical más compuesto en el lado apical. El tiempo en el que el Transwell se puso en la placa se tomó como tiempo cero ( $T_0$ ). En  $T = 20$  los Transwell se movieron a la placa T40 y se añadieron 600  $\mu$ l de muestra desde la placa T20 al tubo adecuado. En  $T = 40$ , el Transwell se movió a la placa T80 y se recogieron 600  $\mu$ l de muestra de la placa T40 y se añadieron al tubo adecuado. En  $T = 80$ , se movió el Transwell a la placa T120. Se añadieron mediante pipeta 600  $\mu$ l de muestra de la placa T80 en el tubo adecuado y de la misma forma para el resto de los puntos de medición. Se añadieron 100  $\mu$ l de tampón apical al tubo adecuado para el equilibrio de masas. Las muestras se extrajeron inmediatamente y se pusieron inmediatamente en un refrigerador.

Se transfirieron 300  $\mu$ l de cada muestra desde el tubo de ensayo a un tubo de 2 ml etiquetado, excepto para los tubos 151-174 (que contenían solo 100  $\mu$ l); se transfirieron 50  $\mu$ l de estas muestras y se añadieron a 250  $\mu$ l de tampón basolateral (dando como resultado una dilución de 6 veces). Se añadieron 20  $\mu$ l de la referencia interna 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrahydroxiandrost-5-eno a cada tubo y se añadieron 1500  $\mu$ l de éter de *t*-butilo y metilo a cada tubo. Los tubos se mezclaron con mezcla vortical, se centrifugaron en una microcentrífuga durante 10 min y se pusieron en un baño de metanol/hielo seco hasta congelación. Se marcaron nuevos tubos y se decantó el éter de *t*-butilo y metilo de cada tubo congelado en el tubo nuevo. Después se evaporó el éter de *t*-butilo y metilo en atmósfera de nitrógeno y se reconstituyó en 120  $\mu$ l de acetonitrilo/agua (35:65) y se analizó por LCMS. En la siguiente tabla, el compuesto de referencia 1 era el 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrahydroxiandrost-5-eno, el compuesto 2 era el 17 $\alpha$ -etinilandrost-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol, el compuesto de referencia 3 era el 3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihidroxi-17 $\alpha$ -etinilandrostanano, el compuesto de referencia 4 era el 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrahydroxiandrost-5-eno, el compuesto de referencia 5 era el 2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrahydroxiandrostanano, el compuesto de referencia 6 era el 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -diacetoxi-7 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroxiandrost-5-eno, el compuesto de referencia 7 era el 3 $\beta$ -acetoxi-17 $\alpha$ -etinilandrost-5-7 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, el compuesto de referencia 8 era el 3 $\beta$ -acetoxiandrost-5-7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol y el compuesto de referencia 9 era el 17 $\alpha$ -etinilandrost-5-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol.

Compuesto	Conc. ( $\mu$ M) apical a $T_0$	Conc. basolateral% apical transportada en% total transportado acumulada ( $\mu$ M) en 8080 min	
1	2,195	0,017	0,008 0,8%
2	1,911	0,470	0,246 24,6%
3	2,727	0,411	0,151 15,1%
4	1,664	0,019	0,012 1,2%
5	1,817	0,162	0,089 8,9%
6	1,776	0,185	0,104 17,8%
7	1,710	0,195	0,114 31,4%
8	1,724	0,123	0,071 15,9%
9	1,773	0,531	0,299 29,9%

Los estudios con la línea celular CaCo-2 indicaban que los compuestos tetrol de referencia tales como el androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol no eran muy permeables y por lo tanto no se esperaba que fueran biodisponibles por vía oral. A pesar de esto, el compuesto de referencia androst-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol era activo como se ha descrito antes, cuando se administró por vía oral a ratones en un modelo de tratamiento de la diabetes. Otros protocolos mostraron que el grado de sulfatación y el grado de glucuronidación de los compuestos tetrol de referencia tales como el 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrahydroxiandrost-5-eno y el 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrahydroxiandrost-5-eno, era bajo para los compuestos tetrol de referencia comparado con los diol. Esta actividad puede surgir al menos parcialmente del bajo metabolismo de los compuestos tetrol de referencia in vivo.

# REIVINDICACIONES

- 1.- Una composición para usar en la profilaxis o el tratamiento de la inflamación o una enfermedad autoinmunitaria, en la que la composición comprende  $17\alpha$ -etinilandro-5-eno-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol y uno o más excipientes.
- 5 2.- Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la inflamación o la enfermedad autoinmunitaria es la artritis.
- 3.- Composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la artritis es artritis reumatoide, osteoartritis, fibromialgia, osteoartritis primaria, osteoartritis secundaria, artritis psoriásica, artritis relacionada con lupus eritematoso, artritis asociada con enfermedad inflamatoria del intestino aguda o crónica o colitis, artritis asociada con  
10 espondilitis anquilosante, inflamación de tejidos relacionada con artritis, dolor de las articulaciones, rigidez de las articulaciones, movimiento deteriorado de las articulaciones, hinchamiento de las articulaciones, inflamación de las articulaciones o inflamación sinovial.
- 4.- Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la inflamación o la enfermedad autoinmunitaria es la esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson.
- 15 5.- Composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la inflamación o la enfermedad autoinmunitaria es la esclerosis múltiple.
- 6.- Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la inflamación o la enfermedad autoinmunitaria es un traumatismo o lesión tisular.
- 7.- Composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el traumatismo o lesión tisular es daño o lesión en la  
20 piel, mucosa, cartílago, hígado, tejido cardíaco, hueso o tejido del sistema nervioso central o neural.
- 8.- Composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la lesión en la piel, mucosa, cartílago, hígado, tejido cardíaco, hueso o tejido del sistema nervioso central o neural es hepatitis.
- 9.- Composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el traumatismo o lesión tisular es una herida, lesión por reperusión, estenosis, reestenosis después de angioplastia o un infarto de miocardio o cerebral.
- 25 10.- Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la inflamación o la enfermedad autoinmunitaria es la enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis aguda o crónica, o un trastorno renal, opcionalmente insuficiencia renal aguda o crónica o lesión renal autoinmunitaria.
- 11.- Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la inflamación o la enfermedad autoinmunitaria es la fibrosis quística, asma agudo, asma crónico, asma resistente a esteroides, bronquitis aguda, bronquitis crónica,  
30 enfisema, psoriasis, eczema, síndrome de dificultad respiratoria agudo o enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
- 12.- Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la inflamación o la enfermedad autoinmunitaria es una enfermedad ocular inflamatoria.
- 13.- Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la inflamación o la enfermedad autoinmunitaria es la uveítis.
- 35 14.- Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la inflamación o la enfermedad autoinmunitaria es la degeneración macular.