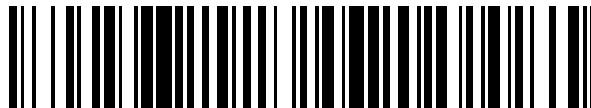


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 461 192**

51 Int. Cl.:

**C07C 235/74** (2006.01)

**A61K 31/167** (2006.01)

**A61P 5/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2008 E 12179423 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 2532648**

54 Título: **Antiandrógenos "suaves" localmente activos**

30 Prioridad:

**03.05.2007 US 927427 P**

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

**19.05.2014**

73 Titular/es:

**YALE UNIVERSITY (100.0%)  
Two Whitney Avenue  
New Haven, CT 06511, US**

72 Inventor/es:

**HOCHBERG, RICHARD**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 461 192 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Antiandrógenos "suaves" localmente activos

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a compuestos antiandrogénicos que se pueden administrar para el tratamiento del exceso de andrógenos en la piel y, como consecuencia, para el tratamiento del acné, la calvicie o el hirsutismo en un sujeto o paciente.

**Antecedentes de la invención**

10 La acción androgénica es el resultado de una secuencia fisiológicamente compleja controlada, en última instancia, por vías opuestas de biosíntesis y catabolismo de esteroides. Durante décadas se ha supuesto que el producto secretor de los testículos, la testosterona, es el andrógeno predominante, pero ahora se ha reconocido ampliamente que este esteroide de C<sub>19</sub> es un precursor androgénico, el producto de vías esteroideogénicas incompletas que conducen a las últimas señales hormonales. En un conjunto de estudios fisiológicos y patológicos se ha demostrado que la testosterona, secretada por los testículos y los ovarios (o sintetizada periféricamente a partir de la androstenodiona secretada por los ovarios) y en primates, por la glándula suprarrenal, es convertida por los tejidos diana en el andrógeno activo, la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) (1,2). La enzima 5 $\alpha$ -reductasa de tipo 2 produce el andrógeno activo convirtiendo la testosterona, una  $\Delta^4$ -3-cetona, en el correspondiente esteroide 5 $\alpha$ -reducido. La testosterona y la androstenodiona circulantes también sirven como precursores de los estrógenos mediante su conversión en estradiol (E<sub>2</sub>) y estrona por acción de la enzima aromatasa presente en muchos tejidos, especialmente en grasos (3). Por tanto, con independencia del sexo, estos C<sub>19</sub>- $\Delta^4$ -3-cetoesteroides secretados se convierten periféricamente en señales divergentes para 2 miembros diferentes de la familia de los receptores nucleares de hormonas esteroideas. Debido a la secreción en los ovarios, los estrógenos se asocian generalmente a las mujeres y, debido a la secreción testicular, los andrógenos se asocian a los varones. En realidad, cada uno desempeña un papel principal en ambos sexos. Como ejemplo, la necesidad de estrógenos en la maduración y mineralización ósea en varones se demostró en un varón resistente a estrógenos que tenía un receptor alfa de estrógenos (ER) mutado (4). Se sabe que los andrógenos desempeñan importantes papeles fisiológicos en mujeres y un síndrome de deficiencia androgénica en mujeres se reconoce como un importante síndrome clínico que implica defectos en el remodelado óseo, la función sexual y la calidad de vida (5).

30 Aunque hay obvios requisitos fisiológicos importantes de andrógenos en mujeres y varones, existe una serie de síndromes en los que se produce superproducción patológica de andrógenos, bien en órganos esteroideogénicos bien en tejidos diana. Quizá, el mejor conocido es el síndrome adrenogenital, principalmente la deficiencia de 21-hidroxilasa, que conduce a una sobreproducción de andrógenos por la glándula suprarrenal. Algunas formas de este síndrome solo se expresan sutilmente (no clásico), lo que conduce a formas más leves de la androgeneización de inicio tardío (hirsutismo, acné) (6). El trastorno más prevalente del exceso de andrógenos en mujeres es el síndrome de ovarios poliquísticos (PCOS), que afecta a más del 5% de las mujeres en edad reproductora (7). La intervención farmacológica varía en función del trastorno. El síndrome adrenogenital se trata con dexametasona, que reduce la secreción de ACTH, de modo que controla la síntesis suprarrenal de andrógenos (8). En mujeres, según la fuente de los andrógenos, el hiperandrogenismo a menudo responde a los anticonceptivos orales que reducen la LH y, de este modo, reduce la estimulación de la secreción de andrógenos por los ovarios y el componente estrogénico de los anticonceptivos aumenta los niveles de globulina de unión a hormonas sexuales, lo que disminuye los niveles de testosterona biodisponibles. El hirsutismo significativo a menudo se trata con antiandrógenos, tales como acetato de ciproterona, espironolactona o flutamida: el acetato de ciproterona es una progestina y un antiandrógeno que disminuye los niveles de gonadotropinas, por tanto los andrógenos circulantes, e inhibe la acción androgénica a nivel del receptor (9); la espironolactona es un antagonista de mineralocorticoides que también es un antagonista del receptor de andrógenos; la flutamida es un antagonista androgénico puro (10). Además de los antiandrógenos, se dispone de finasterida, el inhibidor específico de la "activación metabólica" de la testosterona (11). Este compuesto actúa sobre la enzima 5 $\alpha$ -reductasa de tipo 2, bloqueando la conversión periférica de testosterona en DHT en la mayoría de los órganos diana de los andrógenos.

50 Aunque la disponibilidad de este amplio conjunto de agentes terapéuticos hace posible tratar la mayoría de las formas de síndromes hiperandrogénicos, esta terapia sistémica no carece de inconvenientes. Por ejemplo, en varones, la terapia antiandrogénica con finasterida (Proscar) es habitual en el tratamiento de la hipertrofia prostática benigna, para evitar la progresión a cáncer de próstata. Aunque Proscar es eficaz en la disminución de la incidencia del cáncer de próstata de grado bajo, en realidad aumenta la incidencia de los cánceres de próstata de grado alto (12). Esto plantea el problema del uso de terapia antiandrogénica para prevenir un trastorno tan grave como el cáncer de próstata. También se ha cuestionado el uso de finasterida para el tratamiento de un problema mucho menos grave; la finasterida, en una formulación denominada Propecia, también se usa para el tratamiento de la calvicie. Aunque Propecia aporta una dosis más baja de finasterida que Proscar, tiene el mismo efecto sobre los niveles de DHT y testosterona en plasma y próstata (13). Esto ha planteado la posibilidad de que este gran número de varones jóvenes que tomarían Propecia durante la mayor parte de sus vidas para el tratamiento de la alopecia podrían tener un mayor riesgo de cáncer de próstata de grado alto (14). Como se ha tratado anteriormente, interferir con la acción de

5 los andrógenos tiene ramificaciones clínicas tanto para las mujeres como para los varones, ya que las mujeres también tienen procesos dependientes de andrógenos. Esto se ilustra mediante terapia de sustitución de andrógenos que se ha convertido en un tratamiento recomendado para mujeres con niveles bajos de andrógenos (15). Por tanto, producir un síndrome de deficiencia de andrógenos mediante inhibición farmacológica de la acción de los andrógenos conlleva riesgos significativos para la salud, tanto de varones como de mujeres.

10 Aunque es evidente que es eficaz la inhibición de la acción de los andrógenos para tratar el acné y la calvicie en varones y mujeres, y el hirsutismo en mujeres, puede conllevar graves riesgos. No obstante, este riesgo puede no ser necesario, ya que todas esas enfermedades se localizan en la piel, un órgano que se puede tratar directamente en lugar de sistémicamente. El antagonismo androgénico sistémico no es necesario si el antagonista se puede aplicar a la piel y quedar contenido en la misma. Aunque la piel es un órgano que responde a los fármacos aplicados por vía tópica, también es permeable a una amplia variedad de fármacos. Por tanto, muchos fármacos, por ejemplo estrógenos, y la nicotina, que se aplican con parches cutáneos entran en el cuerpo, circulan por la sangre y actúan de forma sistémica (16,17). Un antiandrógeno desarrollado para actuar localmente, únicamente en la piel, sin acción sistémica, aliviaría este problema. Es el objeto de esta solicitud el diseño y la síntesis de un antagonista de andrógenos localmente activo para ser aplicado a la piel en el tratamiento de acné, alopecia, seborrea, así como hirsutismo.

### Objetos de la invención

Es un objeto de la invención proporcionar nuevos compuestos y composiciones farmacéuticas para usar en el tratamiento de acné, alopecia (calvicie), seborrea (especialmente en mujeres) e hirsutismo.

20 No es otro objeto de la invención proporcionar métodos para tratar uno o más de acné, calvicie, seborrea e hirsutismo usando compuestos y composiciones de acuerdo con la presente invención.

Es otro objeto más de la presente invención proporcionar nuevos compuestos y composiciones que se puedan usar de forma profiláctica para reducir la probabilidad de la aparición o recurrencia de acné, calvicie, seborrea e hirsutismo.

25 Uno cualquiera de estos y/u otros objetos de la presente invención se pueden deducir fácilmente a partir de la siguiente descripción de la invención.

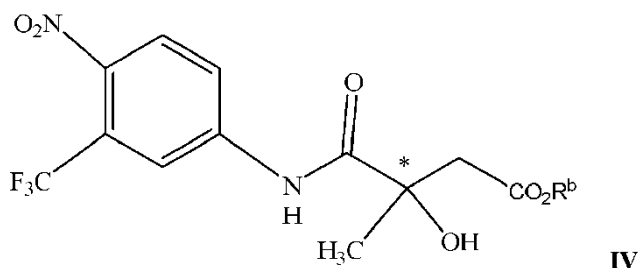
### Breve descripción de la invención

30 La Figura 1 muestra la unión al receptor de andrógenos (AR) del compuesto 18-éster y su correspondiente carboxilato. El potencial antiandrogénico del compuesto **18** ácido y su éster etílico en comparación con la clásica bicalutamida antiandrogénica no esteroidea se caracterizaron determinando 1): su afinidad por el AR en el citosol de próstata de rata (véase el apartado métodos); midiendo su competición por la unión de [<sup>3</sup>H]5α-DHT. El citosol se incubó con [<sup>3</sup>H]5α-DHT 1 nM durante una noche en presencia de los 3 compuestos y DHT. Después, el esteroide libre fue adsorbido por carbón y se midió por recuento la radiactividad unida al receptor. Como se puede ver en esta figura, el compuesto 18-éster etílico compite por la unión a AR con una RBA de aproximadamente 6%, esto se compara con -2% para la bicalutamida (Casodex). Los resultados muestran que el compuesto esterificado exhibe una actividad antiandrogénica significativa, mientras que el correspondiente carboxilato no se une al receptor de andrógenos, lo que conduce a la conclusión de que el éster es la especie activa mientras que la desesterificación al carboxilato libre da como resultado inactividad.

40 La Figura 2 muestra el efecto del compuesto 18-éster etílico sobre la estimulación con DHT de las células transfectadas con AR y un gen indicador de ARE-luciferasa. La acción antiandrogénica del compuesto 18-éster y el carboxilato se midió en cultivos primarios de osteoblastos derivados de huesos parietales de feto de rata transfectados con AR humanos y un gen indicador unido a ARE-luciferasa como se ha indicado previamente. Centrella, et al., Mol. Endocrinol., 18:1120-1130, 2004. Las células se trataron con DHT 0,1 nM o con vehículo solo como control (DMSO 0,1%) o DHT con uno de los siguientes: 18-éster etílico, 18-carboxilato o Casodex (bicalutamida). Los análogos no esteroideos se añadieron de forma simultánea con el DHT. Veinticuatro horas después, se analizó en las células la actividad de luciferasa.

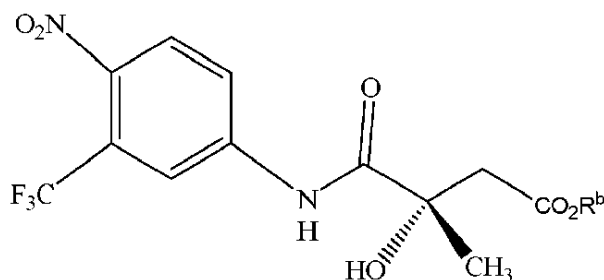
### Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de acuerdo con la estructura química:



en la que \* significa un centro quiral y R<sup>b</sup> es un grupo alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido (con alquilo o fluoroalquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), preferentemente un grupo etilo.

- 5 En determinados aspectos preferidos de la presente invención relacionados con el compuesto no esteroideo anterior, el compuesto es:



en donde R<sup>b</sup> es un grupo alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido (con alquilo o fluoroalquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), preferentemente un grupo etilo.

- 10 La presente invención se refiere también a composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención que comprenden una cantidad eficaz de al menos un compuesto como se ha descrito anteriormente en combinación con un vehículo, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se formulan en forma de dosificación tópica para la administración al paciente.

- 15 Un tratamiento terapéutico comprende administrar uno o más de los compuestos activos de acuerdo con la presente invención a un paciente que necesite la terapia para el tratamiento de acné, alopecia (calvicie), seborrea o hirsutismo. Aspectos profilácticos de la presente invención también se contemplan en la presente invención y se incorporan en el uso para tratamiento. Un aspecto profiláctico particularmente preferido de la presente invención se refiere al uso de los presentes compuestos para reducir la probabilidad de acné, calvicie, seborrea o hirsutismo.

#### Descripción detallada de la invención

- 20 Los siguientes términos se usarán a lo largo de la memoria descriptiva para describir la presente invención.

- 25 El término "paciente" se usa a lo largo de la memoria descriptiva para describir a un animal, preferentemente un ser humano, al que se proporciona el tratamiento, incluido el tratamiento profiláctico, con los compuestos de acuerdo con la presente invención. Para el tratamiento de la sintomatología, afecciones o estados de enfermedad específicos de un animal determinado, tal como un paciente humano, el término paciente hace referencia a dicho animal determinado. En la mayoría de los casos en la presente invención, el paciente es un ser humano con acné, algún grado de calvicie (incluyendo calvicie completa) o hirsutismo.

- 30 La expresión "cantidad eficaz" se usa a lo largo de la memoria descriptiva para describir concentraciones o cantidades de compuestos de acuerdo con la presente invención que se pueden usar para producir un cambio favorable en la sintomatología, enfermedad o afección tratada, ya sea dicho cambio una disminución o inversión de los efectos de la sintomatología o estado de enfermedad dependiendo del estado de enfermedad o afección tratada. En la presente invención, en aspectos preferidos, una cantidad eficaz es dicha cantidad que se usa para tratar la afección que se va a tratar, es decir acné, calvicie, seborrea o hirsutismo. Una cantidad eficaz para los fines de tratamiento de una o más de las afecciones anteriores incluye el momento y el modo en que se administra un compuesto activo a un paciente.

- 35 El término "compuesto" como se usa en el contexto de la presente memoria, a menos que se indique lo contrario, hace referencia a cualquier compuesto químico específico descrito en la presente memoria. Dentro de su uso en el contexto, el término generalmente hace referencia a un único compuesto pero, en determinados casos, puede hacer también referencia a estereoisómeros y/o isómeros ópticos (incluyendo mezclas racémicas), así como a enantióme-

ros específicos o mezclas enantioméricamente enriquecidas de los compuestos descritos. El uso del símbolo \* significa que el átomo de carbono más cercano a dicho símbolo es un centro quiral. Cuando está indicado un centro quiral, la presente invención está dirigida a todos los isómeros configuracionales alrededor del centro quiral, incluyendo mezclas enantioméricas y/o racémicas específicas (de proporción variable) de los compuestos.

5 El término "alquilo" se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva para describir un radical hidrocarbonado que contiene entre una y trece unidades de carbono, una y diez unidades de carbono, cinco y diez unidades de carbono, cuatro y nueve unidades de carbono, una y cinco unidades de carbono, una y cuatro unidades de carbono, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce y trece. Grupos alquilo para uso en la presente invención incluyen grupos de cadena lineal y ramificada y grupos cicloalquilo, tales como metilo, etilo, propilo, i-propilo, butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, neo-pentilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, etc. Los grupos alquilo pueden estar no sustituidos o sustituidos con grupos alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>.

10 El término "heterociclo" se usa para describir un anillo de cinco o seis miembros que contiene al menos un grupo nitrógeno y, opcionalmente, hasta dos heteroátomos (O, S, N) más dentro del anillo. Heterociclos para uso en la presente invención pueden incluir, en determinadas realizaciones y dentro del contexto, heteroarilos (heterociclos que contienen insaturación). Los heterociclos preferidos para uso en la presente invención incluyen piperidina, pirazina y morfolina, entre otros.

15 El término "sustituido" se usa para describir un sustituyente en un átomo de carbono en compuestos de acuerdo con la presente invención. En general, en el contexto, un sustituyente es un grupo halógeno (F, Cl, Br, I) o un grupo alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> que en sí mismo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos flúor (p. ej., CF<sub>3</sub>, CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>).

20 El término "acné" se usa para describir una afección de la piel que produce la inflamación localizada de la piel como resultado de la hiperactividad de las glándulas sebáceas en la base de los folículos pilosos. El acné se produce cuando las glándulas sebáceas se activan en la pubertad, momento en el cual estas glándulas son estimuladas por las hormonas masculinas que se producen en las glándulas suprarrenales de chicos y chicas. Las glándulas sebáceas, que están situadas justo debajo de la piel, producen y secretan aceite continuamente a través de orificios en la piel. El aceite lubrica y protege la piel. En determinadas circunstancias, las células que están cerca de los orificios de las glándulas sebáceas bloquean los orificios. Esto da lugar a una acumulación de aceite debajo de la piel. Las bacterias, omnipresentes en la piel, se sacian con el aceite, se multiplican y hacen que los tejidos adyacentes se inflamen. Si la inflamación está justo cerca de la superficie, se produce una pústula; si está más profunda, una pápula (grano); si está todavía más profunda se produce un quiste. Si el aceite se abre camino hasta la superficie, el resultado es una "espinilla". Si el aceite se oxida (es decir, reacciona con el oxígeno del aire), el aceite cambia de color de blanco a negro y el resultado es un "punto negro".

25 Los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden usar para resolver, reducir o controlar el acné. Los compuestos de la presente invención funcionan reduciendo la producción de sebo (mezcla compleja de aceite, grasas y colesterol producida por las glándulas sebáceas) y/o reduciendo la formación de comedones. Un comedón se describe dermatológicamente como un poro obstruido de partículas sebáceas (aceite) y piel muerta que están atascadas en el orificio de un folículo piloso, estos pueden ser espinillas, puntos negros o comedones solares.

30 El término "calvicie" o "alopecia" se usa para describir una afección en la que el pelo del cuero cabelludo de un hombre o una mujer es deficiente o inexistente. Aunque los presentes compuestos se pueden usar para tratar todas las formas de pérdida de cabello o calvicie, incluyendo áreas relativamente pequeñas de pérdida de cabello, los presentes compuestos son particularmente eficaces en el tratamiento de la "calvicie patrón" masculina y femenina.

35 El término "seborrea" se usa para describir una afección que da como resultado una piel excesivamente oleosa. Se debe a una producción hiperactiva de sebo (material oleoso que contiene aceites, grasas y colesterol) de las glándulas sebáceas y puede afectar tanto a varones como a hembras. Aunque la mayoría de las personas con seborrea no tienen otros problemas de salud, en ocasiones es un signo de la enfermedad de Parkinson o acromegalia subyacentes. En la seborrea, la piel se siente desagradable y parece ensuciarse rápidamente. La cara aparece brillante. El maquillaje puede correrse o apelmazarse. La seborrea también puede dar como resultado acné o dermatitis seborreica.

40 El término "hirsutismo" se usa para describir la presencia de un crecimiento excesivo de pelo terminal en zonas dependientes de andrógenos en el cuerpo de una mujer (como labios, barbilla, pecho, abdomen o espalda). Tiene que distinguirse de la hipertricosis, que normalmente es de naturaleza familiar y está asociada con una disfunción endocrina, tal como una disfunción tiroidea, o con medicamentos tales como fenitoína o minoxidilo.

45 El hirsutismo puede ser un signo de un trastorno médico significativo. El hirsutismo se produce por un incremento de la acción de los andrógenos sobre los folículos pilosos. Esto puede ser el resultado de un incremento de los niveles de andrógenos circulantes o un incremento de la sensibilidad de los folículos pilosos a niveles séricos normales de andrógenos. Los folículos empiezan a desarrollar pelo grueso y pigmentado (pelo terminal) frente al vello fino y no pigmentado (pelo vello) que normalmente se ve en estas zonas.

Las causas del hirsutismo incluyen una producción excesiva de andrógenos por las glándulas suprarrenales o los ovarios; el incremento de la sensibilidad de los folículos pilosos a los andrógenos (que puede deberse a una actividad exagerada de la 5 $\alpha$ -reductasa periférica y anomalías funcionales en los receptores de andrógenos. El hirsutismo a menudo es también una fuente de molestias psicológicas y la mayoría de las mujeres que buscan tratamiento para el hirsutismo lo hacen por motivos estéticos. Se ha observado que la presente invención no se limita al tratamiento del hirsutismo únicamente en mujeres, sino así mismo en hombres que deseen dicho enfoque estético al pelo excesivo.

Un aspecto terapéutico preferido de acuerdo con la presente invención se refiere a compuestos para tratar o resolver el acné (reducir el acné y permitir una limpieza significativa de la piel), la calvicie (alopecia, incluyendo la estimulación del crecimiento del pelo en zonas en las que el crecimiento del pelo ha disminuido o incluso se ha detenido), la seborrea (reducir la producción del sebo y hacer que la piel sea estéticamente más agradable) y el hirsutismo (principalmente, aunque no exclusivamente, en mujeres).

Los métodos terapéuticos incluyen la administración de cantidades eficaces de uno o más compuestos de acuerdo con la presente invención para tratar o reducir la probabilidad de aparición o reaparición del acné, la calvicie, la seborrea y/o el hirsutismo.

Las composiciones farmacéuticas basadas en estos nuevos compuestos químicos comprenden los compuestos descritos anteriormente en una cantidad eficaz para el tratamiento o profilaxis de la sintomatología de la menopausia o una afección o estado de enfermedad relacionada, incluyendo cáncer de mama sensible a estrógenos, opcionalmente en combinación con un aditivo, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas en forma de dosificación oral son particularmente preferidas y también se prefieren las formas de dosificación tópica para liberación local de los compuestos activos, en cremas, geles y lociones. Se contempla el uso en este aspecto de la presente invención de cantidades eficaces de los compuestos de acuerdo con la presente invención para uso en forma de dosificación farmacéutica, en particular una forma de dosificación tópica, en combinación con vehículo, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las modificaciones del compuesto activo pueden afectar a la solubilidad y la velocidad del metabolismo de la especie activa, de modo que proporcione control sobre la liberación de la especie activa. Además, las modificaciones pueden afectar a la actividad del compuesto, aumentando en algunos casos la actividad sobre la del compuesto precursor. Esto se puede evaluar fácilmente preparando el derivado y analizando su actividad de acuerdo con métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los compuestos de la presente invención se pueden incorporar a formulaciones para todas las vías de administración, incluyendo, por ejemplo, las vías oral y parenteral, incluyendo las vías intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intrabucal, transdérmica y en forma de supositorio. Claramente se prefieren las formas de dosificación tópicas e incluyen cremas, lociones, geles y supositorios que se pueden administrar en sitios específicos de la piel para liberar compuestos en la piel para que ejerzan el efecto farmacéutico. Los compuestos de la presente invención se usan preferentemente por vía tópica como antiandrógenos locales.

Las composiciones farmacéuticas basadas en estos nuevos compuestos químicos comprenden los compuestos descritos anteriormente en una cantidad eficaz para tratamiento, alivio y/o resolución de la sintomatología de las afecciones o estados morbosos que se han descrito anteriormente en la presente memoria, incluyendo especialmente acné, calvicie, seborrea y/o hirsutismo, opcionalmente en combinación con un aditivo, vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Un experto en la técnica reconocerá que una cantidad eficaz de uno o más compuestos de acuerdo con la presente invención variará con la afección o sintomatología que se ha de tratar o prevenir, su gravedad, el régimen de tratamiento que se ha de usar, la farmacocinética del agente usado, así como el paciente que se va a tratar.

En el aspecto farmacéutico de acuerdo con la presente invención, el compuesto de acuerdo con la presente invención se formula preferentemente mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En general, es preferible administrar la composición farmacéutica en forma de administración tópica, especialmente como crema, loción, gel, líquido o supositorio, pero se pueden contemplar otras vías de administración en determinados casos, por ejemplo por vía parenteral, intravenosa, intramuscular, transdérmica, bucal, subcutánea u otra vía. Por supuesto, un experto en la técnica puede modificar las formulaciones dentro de las enseñanzas de la memoria descriptiva para proporcionar numerosas formulaciones para una vía de administración concreta, si se desea, sin hacer que las composiciones de la presente invención sean inestables o sin comprometer su actividad terapéutica, observando que los grupos éster pueden ser algo lábiles. En concreto, la modificación de los presentes compuestos para hacerlos más solubles en agua o en otro vehículo, por ejemplo, se puede conseguir por pequeñas modificaciones que conocen bien los expertos en la técnica. También es bien conocido por los expertos en la técnica modificar la vía de administración y el régimen de dosificación de un compuesto concreto con el fin de manejar la actividad y la duración de la actividad de los presentes compuestos para un efecto beneficioso máximo para el paciente.

La cantidad de compuesto incluido en las formulaciones terapéuticamente activas de acuerdo con la presente invención es una cantidad eficaz para tratar el síntoma o afección. En sus realizaciones más preferidas, los presentes compuestos se administran por vía tópica para tratar, aliviar o resolver el acné, la calvicie, la seborrea y/o el hirsu-

tismo o para reducir la probabilidad de aparición o reaparición de estas afecciones. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto actualmente preferido en forma de dosificación normalmente varía desde ligeramente menos de aproximadamente 0,0005 mg/kg hasta aproximadamente 0,1 g/kg, preferentemente de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,1 mg/kg del paciente o considerablemente más dependiendo del compuesto usado, la afección o la sintomatología tratada y la vía de administración, aunque en la presente invención se pueden contemplar excepciones a este intervalo de dosificación y están dentro de las enseñanzas de la presente invención. En el caso específico de las formulaciones tópicas aplicadas a la piel de un paciente, que es la vía de administración preferida, la dosis tópica entra dentro de los intervalos anteriores y son dosis típicas (que se pueden administrar una o más veces al día) las que varían de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 500 mg o más, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 250 mg, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 225 mg, de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 0,0125 a aproximadamente 250 mg del principio activo, dependiendo de la actividad del compuesto y del tamaño de la zona de la piel a la que se han a aplicar los compuestos.

Para preparar las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, preferentemente se mezcla íntimamente una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos de acuerdo con la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable de acuerdo con técnicas de mezclado farmacéutico convencionales para producir una dosis. Un vehículo puede tomar una amplia variedad de formas según la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo tópica, oral o parenteral, preferentemente tópica. En la preparación de composiciones farmacéuticas en la forma de dosificación tópica preferida, se puede usar cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, incluidos espesantes, emolientes, emulsionantes, etc., para producir cremas, geles, bálsamos, pomadas y similares, para administración tópica al paciente. Como alternativa se puede usar un parche para administración transdérmica.

En el caso de las formas de dosificación oral, preparaciones orales líquidas, tales como suspensiones, elixires y soluciones, se pueden usar vehículos y aditivos adecuados incluyendo agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares. Para las preparaciones orales sólidas, tales como polvos, comprimidos, cápsulas, y para preparaciones sólidas, tales como supositorios, se pueden usar vehículos y aditivos adecuados, incluyendo almidones, vehículos azúcares, tales como dextrosa, manitol, lactosa, y vehículos relacionados, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares. Si se desea, los comprimidos o cápsulas pueden recubrirse con recubrimiento entérico o de liberación prolongada mediante técnicas estándares.

Para las formulaciones parenterales, el vehículo comprenderá normalmente agua estéril o solución acuosa de cloruro sódico, aunque se pueden añadir otros ingredientes incluyendo auxiliares de dispersión. Por supuesto, cuando se va a usar agua estéril y se ha de mantener la esterilidad, las composiciones y vehículos también deben esterilizarse. También se pueden preparar suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear vehículos líquidos, agentes de puesta en suspensión adecuados y similares.

Los presentes compuestos se pueden usar para tratar como pacientes animales y, en particular mamíferos, especialmente incluyendo seres humanos. Los pacientes se pueden tratar administrando al paciente una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos de acuerdo con la presente invención, opcionalmente en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, solo o en combinación con otros agentes farmacéuticos conocidos, en función de la afección o sintomatología que se va a tratar. Este tratamiento también se puede administrar junto con otras terapias convencionales, incluyendo la administración de otros agentes antiacné y otros agentes para el tratamiento y/o profilaxis de alopecia, hirsutismo y/o seborrea.

El compuesto activo está incluido en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz para la indicación deseada sin causar efectos tóxicos en el paciente tratado.

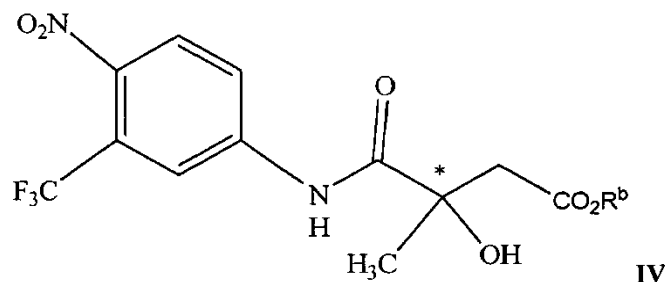
El compuesto se administra de modo conveniente en cualquier forma de dosificación unitaria adecuada en una cantidad eficaz incluyendo, aunque sin limitación, una que contenga menos de 1 mg (preferentemente al menos 1 mg) a 500 mg o más (normalmente muy por debajo del límite superior), preferentemente de 5 a 300 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria. Normalmente es conveniente una forma de dosificación tópica, incluyendo una dosificación por medio de un parche transdérmico que varíe de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 250 mg, de aproximadamente 7,5 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg, o cualquier cantidad entre cualquiera de los intervalos anteriores.

La concentración de compuesto activo en la composición del fármaco dependerá de las tasas de absorción, distribución, inactivación y excreción del fármaco, así como de otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Cabe destacar que los valores de las dosificaciones también variarán con la gravedad de la afección o sintomatología a tratar. Debe entenderse además que, para cualquier sujeto concreto, los regímenes de dosificación específicos de-

- ben ajustarse en el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración indicados en la presente memoria descriptiva son únicamente ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada. El ingrediente activo puede administrarse de una vez o puede dividirse en un número de dosis más pequeñas para ser administradas a intervalos variables de tiempo. En su aspecto más preferido de la presente invención, es decir en la administración tópica de compuestos de acuerdo con la presente invención al paciente que se va a tratar, el principio activo puede administrarse de forma tan infrecuente como de una vez cada varios días a varias veces al día, dependiendo de la actividad de los compuestos y otros factores bien conocidos en la técnica.
- Las composiciones orales, si se usan, generalmente incluirán un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina (duras o blandas) o comprimirse en comprimidos. Para el fin de la administración terapéutica oral, al compuesto activo se puede incorporar excipientes y usar en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Se pueden incluir como parte de la composición agentes aglutinantes y/o materiales coadyuvantes farmacéuticamente compatibles.
- El compuesto activo también se puede administrar como componente de un elixir, suspensión, jarabe, oblea, goma masticable o similares. Un jarabe puede contener, además de los compuestos activos, sacarosa y/o jarabe de maíz como agente edulcorante y ciertos conservantes, pigmentos y colorantes y saborizantes.
- El compuesto activo también se puede mezclar con otros materiales activos que no alteran la acción deseada o con materiales que complementan la acción deseada, tal como otros agentes hormonales, y, en otros casos, dependiendo de la terapia o diana deseada, otros compuestos farmacéuticamente activos.
- Las soluciones o suspensiones usadas principalmente para aplicación tópica y, en algunos casos, parenteral, intradérmica o subcutánea, pueden incluir los componentes siguientes: un diluyente estéril, tal como agua para soluciones inyectables, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabenes; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro sódico o dextrosa. La preparación parenteral se puede introducir en ampollas, jeringuillas desechables o viales multidosis de vidrio o de plástico. Si se administran por vía intravenosa, los vehículos preferidos incluyen, por ejemplo, solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En el caso de las composiciones farmacéuticas preferidas en formas de dosificación tópicas, se pueden usar como formas de administración vaginal cremas, geles y/o lociones viscosas. Las cremas, geles, lociones y supositorios se pueden formular usando procedimientos farmacéuticos convencionales.
- En una realización, los compuestos activos se pueden preparar con vehículos que protegerán al compuesto frente a la rápida eliminación del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como copolímero de etileno y acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico, entre otros. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones son bien conocidos y fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.
- Las suspensiones de liposomas también pueden ser vehículos farmacéuticamente aceptables. Estas se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las formulaciones en liposomas se pueden preparar disolviendo lípido(s) adecuado(s) en un disolvente inorgánico que después se evapora, dejando una película fina de lípido seco sobre la superficie del envase. Después, en el envase se introduce una solución acuosa del compuesto activo. Después, el envase se agita a mano para liberar el material lipídico de los laterales del envase y para dispersar los agregados lipídicos, de modo que se forme la suspensión de liposomas. En este aspecto de la presente invención también se pueden usar otros métodos de preparación bien conocidos por los expertos en la técnica.
- Los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden preparar fácilmente usando métodos químicos sintéticos que son bien conocidos en la técnica. Estas síntesis se ilustran en el presente texto y en los esquemas siguientes. Aunque la presentación es de química ilustrativa, se reconoce que un experto en la técnica puede usar las enseñanzas de la presente invención o modificar los procedimientos divulgados de otro modo en la presente memoria de un modo que permita la práctica habitual de la presente invención. Se pueden sintetizar fácilmente compuestos análogos adaptando la metodología específica descrita y aplicando métodos de química orgánica sintética bien conocidos en la técnica.



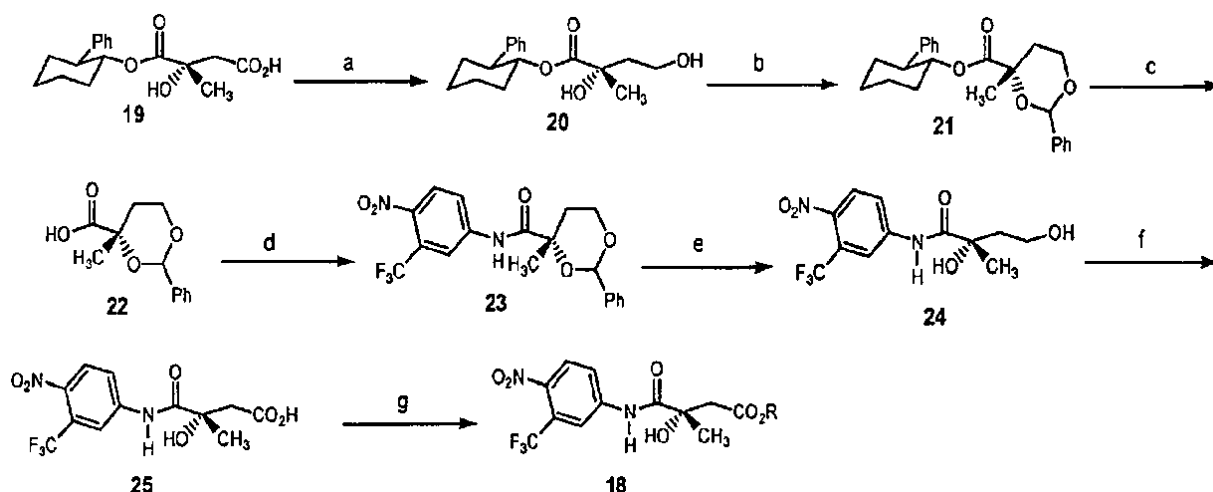
## Síntesis de compuestos de la estructura general IV:



IV

- La síntesis quiral del compuesto 4 anterior se muestra en el esquema 4 siguiente. Para el (S)-enantiómero, el grupo ácido carboxílico del (S)-citramalato de trans-2-fenilciclohexilo **19** (53) se reduce selectivamente (a) con  $\text{BH}_3\text{-THF}$  (54), dando el 1,3-diol **20**, que se protege (b) en forma de benciliden-acetal usando  $\text{PhCHO}$  y  $\text{TsOH}$  a reflujo con eliminación de  $\text{H}_2\text{O}$ , dando **21**. La hidrólisis (c) de **21** usando  $\text{KOH}$  en  $\text{THE}/\text{H}_2\text{O}$  (53) da el ácido **22** que se acopla (d) con 4-nitro-3-(trifluorometil)anilina, disponible comercialmente, a  $-20^\circ\text{C}$  (después del tratamiento de **22** con  $\text{SOCl}_2$  en dimetilacetamida a  $-20^\circ\text{C}$ ) (49), dando **23**. La eliminación del grupo protector (e) con  $\text{BCl}_3$  (55), seguida de la oxidación (f) del alcohol primario con  $\text{PDC}$ , como anteriormente, da **25**. La esterificación (g), como anteriormente, da **18**. El (R)-enantiómero se puede sintetizar por analogía a partir del material enantiomérico de partida.

## Esquema 4



## Actividad/Datos biológicos

- Como parte del análisis de la actividad biológica, se analizan la unión de los ésteres (preferentemente el éster etílico) y el ácido carboxílico precursor al receptor de andrógenos (AR) y la actividad antiandrogénica *in vitro* en las células transfectadas con el receptor de andrógenos/esterasa del receptor de andrógenos (AR/ARE) (que se describen más adelante). Para un buen antiandrogénico local, el éster debe mostrar una elevada afinidad por el AR y una elevada actividad antiandrogénica, mientras que el ácido carboxílico precursor debe ser muy débil o estar desprovisto de estas características. Uno de los puntos fuertes de este estudio es que la tasa de hidrólisis se puede modificar cambiando la porción de alcohol del éster, por tanto, si un análogo parece tener acciones sistémicas mayores de lo que los inventores esperan, la tasa de hidrólisis se puede aumentar o viceversa. Por ejemplo, para los ésteres que exhiben una buena unión a los receptores y buena actividad antiandrogénica, aunque el ácido carboxílico esté desprovisto de actividad, los inventores sintetizan una serie de ésteres con modificaciones estructurales de la porción alcohol del grupo éster, diseñada para aumentar o disminuir su hidrólisis por esterasa (por ejemplo, el éster de propilo y fluoroetilo para una mayor hidrólisis y ésteres estéricamente impedidos, tales como los ésteres de isopropilo y neopentilo, o menor lipofilidad, de metilo, para menor hidrólisis). Estos ésteres se analizan según su tasa de hidrólisis en el ensayo de esterasa hepática (más adelante). En estos ésteres adicionales se analiza la unión a los AR y la actividad antiandrogénica en las células transfectadas con AR/ARE. Dado que el ensayo de unión se realiza a  $0-2^\circ\text{C}$ , la hidrólisis por esterasa no es un factor significativo. No obstante, en el ensayo de las células transfectadas, se produce hidrólisis enzimática y la tasa de hidrólisis del grupo éster influye sobre la actividad biológica. Por tanto, después de la corrección por la unión al receptor, existe una correlación entre la actividad biológica y la hidrólisis enzimática; por ejemplo, compuestos con una unión al receptor similar exhiben una actividad biológica diferente que está correlacionada con la tasa de hidrólisis (estructura del éster). Esta correlación permitirá a los inventores elegir

candidatos para el análisis *in vivo*, ya que permite la optimización de la tasa de hidrólisis (estructura del éster) para la acción "local". La estructura del éster se puede modificar para disminuir la tasa de hidrólisis con el fin de maximizar la acción local o aumentar la tasa de hidrólisis con el fin de minimizar la acción sistémica. En los posteriores ensayos *in vivo*, el objeto es encontrar compuestos que muestren una buena actividad antiandrogénica local y una mínima acción sistémica, si hay alguna. Los resultados de estos estudios identifican al candidato inicial en cada familia para estudios *in vivo*. El resultado de este estudio inicial indica la dirección (mayor o menor hidrólisis) que se requiere y conduce al éster adecuado para la entidad clínica final.

Estos estudios demuestran la relación entre la hidrólisis por esterasa y la actividad biológica. Como se puede ver en las Figuras 1 y 2, el éster etílico **18** (esquema 4) fue menos potente en comparación con Casodex de lo que se predeciría en base a su unión a los AR. Esta aparente discordancia entre la unión y la acción se puede explicar por la hidrólisis por esterasa, que desactiva el éster 18-etílico pero no Casodex en las células cultivadas. Los inventores han analizado esta hipótesis comparando la tasa de hidrólisis de ésteres específicos en varias líneas celulares previamente transfectadas con gen indicador de AR-ARE o el ER y ERE. Los inventores han predicho que las células que exhiben la mayor esterasa deberían tener la proporción de actividad de Casodex/18-éster etílico más alta, por ejemplo la actividad más baja del éster análogo.

## Materiales y métodos

**Ensayos biológicos *in vitro*.** Los análogos de éster descritos anteriormente se criban primeramente para determinar su actividad antiandrogénica (así como androgénica) determinando su afinidad por los AR y para determinar su potencia para antagonizar la estimulación androgénica de un gen indicador sensible a los andrógenos en células en cultivo. Además, se determina la tasa a la cual estos análogos son hidrolizados por esterasa(s). Las potenciales reacciones cruzadas con otros sistemas receptores de esteroides (glucocorticoides y mineralocorticoides) se determinan por el espectro de actividad de algunos de los precursores (espironolactona y mifepristona): midiendo su unión a los receptores de mineralocorticoides y glucocorticoides y su inhibición de la acción de estos receptores en las células transfectadas con construcciones de genes indicadores.

**Análisis de los receptores de andrógenos.** Como cribado inicial de los compuestos de ensayo, el análisis de la afinidad de unión a los AR se determina en citosol preparado a partir de próstatas de rata. El ensayo de unión a andrógenos se realiza como han descrito anteriormente los autores en las referencias 37, 66, 67. Cada compuesto de ensayo no radiactivo se analiza sobre 6 órdenes logarítmicos,  $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  M, y se compara con 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT), R1881 y antiandrógenos conocidos, tal como hidroxiflutamida, para la competición de la unión de [<sup>3</sup>H]R1881 (~ 2 nM) a los AR. Las glándulas de la próstata se obtienen de ratas Sprague-Dawley que han sido castradas 48 horas antes del sacrificio. Las glándulas se ponen en suspensión y se homogeneizan en tampón TEGDMo (Tris 10 mM, Na<sub>2</sub>-EDTA 1,5 mM, glicerol al 10% (v/v), ditiotreitól 1,0 mM, molibdato sódico 25 mM a pH 7,4 a 4°C) enfriado con hielo a 1,5 mL/próstata y se centrifugan a 105.000 g durante 45 minutos a 4°C. El líquido sobrenadante (citosol) se congela en hielo seco y se conserva a -80°C hasta el ensayo. Para el análisis, se descongela el citosol en hielo, se diluye con tampón TEGDMo y se incuba con los análogos de ensayo durante una noche en hielo. Todos los materiales incubados contienen acetónido de triamcinolona 1 $\mu$ M para prevenir la potencial unión al receptor de progesterona. El radioligando unido se separa del libre por adsorción con carbón recubierto con dextrano y se cuantifica mediante recuento. Las curvas de desplazamiento se analizan por un método de ajuste de curvas usando el programa informático Prism. Normalmente, cada esteroide se analiza por duplicado en 3 experimentos separados.

**Activación de los genes androgénicos o antiandrogénicos.** Los análogos sintetizados se analizan para determinar las actividades androgénicas y antiandrogénicas en un bioensayo que usa células transfectadas con el receptor de andrógenos y un gen indicador sensible a andrógenos como se ha indicado anteriormente (37,67). La técnica es similar a los estudios realizados anteriormente para la actividad antiestrogénica en células transfectadas con plásmidos que contienen por separado ER y un elemento de respuesta a estrógenos fusionado con un gen indicador de la luciferasa (34). Los AR (68) y ARE de rata se obtuvieron de los Drs. Centrella y McCarthy de Yale, que crearon el plásmido indicador de la construcción 4XARE-luciferasa clonando cuatro elementos sensibles a andrógenos [5'-GGTTCTTGAGTACT-3'] derivados del promotor del gen de probasina de rata aguas arriba de un promotor mínimo del RSV(69). Células COS a una confluencia del 50-70% se exponen al plásmido indicador 4XARE a 30 ng por cm<sup>2</sup> y al plásmido de expresión de AR a 10 ng por cm<sup>2</sup> en medio suplementado con suero bovino fetal al 0,8% durante 16 horas. Después, los cultivos se suplementan para obtener una concentración final de suero al 5% y se cultivan durante un total de 48 horas. Después, las células se tratan durante 24 horas con los análogos solos (agonista) o los análogos + DHT 10<sup>-9</sup>M (antagonista). Además, se usan hidroxiflutamida y espironolactona como controles en los ensayos de agonistas y antagonistas. Los análogos se añaden en un intervalo de 10<sup>-12</sup> a 10<sup>-6</sup> M por duplicado y cada experimento se duplica en 3 experimentos por separado. Después de incubación, el medio se aclara, se lisa y se analiza la actividad del gen indicador (luciferasa).

La diferencia entre la unión a los AR y la actividad antiandrogénica relativa determinada en este ensayo proporciona información inicial y establece tendencias sobre cómo se debe modificar el grupo éster como se ha descrito anteriormente, en el efecto del apartado Modificación del éster, con el fin de aumentar o disminuir la tasa de hidrólisis enzimática y, por tanto, maximizar la acción antiandrogénica local *in vitro*.

**Actividad de hidrólisis por esterasa.** La tasa relativa de hidrólisis de cada compuesto éster, junto con el éster de estrógeno E16-1,2 para comparación, se determina usando microsomas hepáticos de rata en las condiciones previamente descritas (32). El hígado obtenido de ratas Sprague-Dawley se lava con solución salina tamponada con fosfato y se homogeneiza en 3 volúmenes de sacarosa 0,25 M fría y se centrifuga a 700 x g durante 10 minutos y después a 10.000 x g durante 20 minutos. El líquido sobrenadante resultante se centrifuga a 105.000 x g durante 60 minutos. El sedimento resultante se pone en suspensión en tampón de fosfato 0,1 M a pH 7,4 y se lava de nuevo por centrifugación a 105.000 x g durante 60 minutos. El sedimento lavado se pone en suspensión en Tris-HCl 0,1 M a pH 8,0 a una concentración de ~13 mg de proteína/mL y se congela a -80°C. Para el ensayo, los sedimentos se descongelan y se diluyen con el mismo tampón. La mezcla de incubación consiste en la preparación enzimática microsómica, 0,28 mg de proteína/mL, los ésteres esteroideos, 50 µM, añadidos en 10 µL de etanol, todo en un volumen final de 1 mL del tampón Tris a pH 8,0. Dado que los inventores esperan que las tasas de reacción puedan ser ampliamente diferentes para los diversos ésteres, los tiempos de incubación se varían en consecuencia para obtener una cinética lineal. En varios momentos adecuados se extraen partes alícuotas de 100 pL y la reacción se inactiva por extracción con disolvente orgánico (que normalmente contiene un patrón interno de absorción de UV de movilidad similar). El extracto se evapora y se analiza para determinar el producto de hidrólisis por esterasa (el correspondiente ácido carboxílico) con HPLC de fase inversa y detección por UV (todos los análogos con excepción del compuesto **33** absorben fuertemente en la región UV). La hidrólisis del compuesto **33** se analiza de forma similar, a excepción de que el patrón interno es un carboxilato de esteroide y el producto de hidrólisis y el patrón interno son derivatizados con N-clorometil-4-nitroftalimida, antes de la HPLC y la detección por UV a 254 nm (70). La absorbancia de UV se convierte en moles de producto por comparación con curvas estándares y se corrige para la recuperación del patrón interno. La velocidad de la reacción para cada éster, en nmol de producto/min/mL, se normaliza para el patrón del éster de estrógeno, El 6-1,2 como actividad hidrolítica relativa (RHA). Todos los compuestos se analizan por duplicado en 3 experimentos por separado.

**Actividad de hidrólisis por esterasa en células transfectadas en cultivo.** Los inventores esperan que diferentes líneas celulares transfectadas con AR/ARE darán diferentes estimaciones de potencia antiandrogénica cuando los análogos que contienen éster se compararon con bicalutamida (Casodex) y que esta relación (éster/bicalutamida) esté relacionada de forma inversa con la tasa de la hidrólisis por esterasa. Los inventores analizarán la potencia antiandrogénica relativa en las células que se han usado previamente en transfecciones dobles con receptores hormonales y sus elementos de respuesta para estudiar la potencia hormonal, incluyendo COS, JAR, SaOS-2, CV1 y osteoblastos primarios de rata (34,35,37,67). Son probables diferentes niveles de actividad de la esterasa, ya que estas células proceden de diferentes tejidos y 4 especies diferentes (71). La relación entre la potencia antiandrogénica de los análogos de éster y la bicalutamida se compara con la actividad de esterasa de las células.

La actividad de esterasa se determina cinéticamente de modo directo para obtener la velocidad lineal en células transfectadas que se incuban a varios intervalos de hasta, e incluyendo, los usados para la actividad biológica (androgénica) (normalmente 6 horas o durante una noche). Los productos de esterasa, los ácidos carboxílicos, se extraen de los medios y se miden por HPLC como se describe anteriormente en 2c. Para obtener material suficiente para una medición precisa, la incubación se modifica aumentando el volumen hasta 10 mL y la concentración del análogo del éster hasta al menos 1 pM a 10 pM. Por tanto, a la concentración más baja, 1 pM, un rendimiento que varía de 10% a 30% produce de 10 a 30 nmoles del producto. Con las  $\Delta^4$ -3-cetonas, los inventores pueden detectar con precisión > 0,1 nmol y los productos aromáticos aproximadamente 10 veces menos. Por tanto, con este método los inventores pueden medir fácilmente los productos esperados en estos experimentos.

**Reactividad cruzada con otros sistemas receptores.** Dos de estas familias de análogos proceden de antihormonas que muestran actividad con sistemas receptores de esteroideos distintos del sistema AR. Estas incluyen los ésteres 7- $\alpha$ -carboxialquílicos, análogos de espironolactona que también son antimineralocorticoide (72) y los ésteres 11 [3-carboxialquílicos, generalmente basados en la antiprogestina/antiglucocorticoide, mifepristona. Es improbable que los análogos 1113 interactúen con dichos sistemas de receptores, ya que los 11 (i-alcanos relacionados no lo hacen (36). Dado que estos compuestos están diseñados para actuar localmente, cualquier interacción con estos otros sistemas receptores puede no ser un aspecto importante. No obstante, proporcionará una amplia visión del espectro de sus acciones biológicas.

**Receptor de mineralocorticoides.** La unión a los mineralocorticoides se determina como los inventores han descrito (73) midiendo la unión de [ $^3$ H]aldosterona a MR en el citosol de riñón obtenido de ratas adrenalectomizadas en presencia de RU 28362 200 nM (74). Como alternativa, se puede usar arsenito  $10^{-4}$  (¡sic!) M para eliminar la unión a GR, dado que bloquea de forma selectiva y completa la unión a GR de rata pero no a MR (75). El citosol preparado de riñones de ratas adrenalectomizadas se incuba con [ $^3$ H]aldosterona 2 nM  $\pm$  aldosterona 200 nM no radiactiva + concentraciones variables de los análogos en el intervalo de concentraciones de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  M en tampón DMF-TEDM durante 2 horas a 22°C. El tampón DMF-TEDM contiene: Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1,5 mM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7,5, con el esteroide añadido en DMF al 10% (concentración final de DMF = 1 %). Después, el esteroide libre es absorbido (sic) por carbón en un baño de hielo y se centrifuga. El líquido sobrenadante se decanta y el esteroide unido se determina por recuento (76). La afinidad de unión relativa (RBA) en comparación con la aldosterona se calcula usando el programa informático de ajuste de curvas Prism.

**Receptor de glucocorticoides:** La unión a los GR se determina como han descrito los autores (76,77) en citosol

hepático preparado a partir de ratas adrenalectomizadas. [<sup>3</sup>H]Dexametasona 2 nM y concentraciones variables de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-6</sup> M de los análogos no radiactivos de competencia (y dexametasona, etc.) se incuban con citosol en tampón DMF-TEDM (anterior) a temperatura ambiente durante 2 horas (o durante una noche en un baño de hielo). El esteroide unido se determina en la fracción del líquido sobrenadante tras la adsorción con carbón y la RBA se calcula como se ha descrito anteriormente.

**Inhibición de la activación de genes por mineralocorticoides.** Los inventores analizaron cualquiera de los análogos que se unen al receptor de mineralocorticoides para determinar la acción mineralocorticoide o antimineralocorticoide en células transfectadas con el receptor de mineralocorticoides y un gen indicador sensible a mineralocorticoides. El ensayo se realiza de un modo similar al procedimiento anterior con los AR, a excepción de que se transfectan células JAR con el receptor de mineralocorticoides humano y el gen indicador MMTV-Luc sensible a mineralocorticoides como se ha descrito (78). Las células JAR se transfectan y se eligen fácilmente, ya que están desprovistas del receptor de glucocorticoides (79) que evita resultados falsos a través de este sistema receptor. Estos vectores de expresión en plásmidos han sido suministrados por el Dr. Ron Evans (80). Para analizar la acción agonista, las células transfectadas se cultivan en presencia de una amplia serie de los análogos de ensayo solos. Los controles se cultivan con aldosterona con fines comparativos. Para analizar la acción antagonista, las células se tratan con aldosterona 1 nM más los compuestos de ensayo. Los controles positivos se analizan con otros antagonistas, tal como espironolactona. Después de incubación, el medio se aclara, se lisa y se analiza la actividad del gen indicador (luciferasa).

**Inhibición de la activación de gen por glucocorticoides.** Cualquiera de los análogos que se unen al receptor de glucocorticoides se analiza para determinar la acción glucocorticoide y antiglucocorticoide. También se determina su efecto sobre la estimulación de la actividad de fosfatasa alcalina en células HeLa. La actividad de fosfatasa alcalina endógena en las células HeLa es un excelente marcador de la estimulación de glucocorticoides (81). Además, las células HeLa están desprovistas de receptores de mineralocorticoides (requieren transfección con este receptor con el fin de responder a los mineralocorticoides (82)) y, por tanto, se evita una respuesta a través del receptor de mineralocorticoides. Se ha usado estimulación de fosfatasa alcalina en células HeLa para desarrollar un ensayo en placa de 96 pocillos (79). Como se ha descrito, las células se cultivan durante 3 días en presencia de un gran intervalo de dosis de los análogos de ensayo solos para determinar la actividad agonista. Los controles se analizan con dexametasona y cortisol con fines comparativos. Para analizar la acción antagonista, las células se tratan con dexametasona 1 nM más los compuestos de ensayo. Los controles positivos se analizan con otros antagonistas, tal como mifepristona (RU486). Después, las células se lavan, se congelan y se determina la actividad de fosfatasa alcalina como se ha descrito previamente (83).

**Acción androgénica y antiandrogénica sistémica y local *in vivo* en hámster.** Dichos análogos de éster que muestran las propiedades requeridas para una actividad antiandrogénica local (unión a AR, actividad antiandrogénica en células COS, hidrólisis por esterasa) se analizan como antiandrógenos *in vivo* en el ensayo de la glándula sebácea del hámster sirio. Las glándulas sebáceas sensibles a andrógenos se localizan en el lado interno del pabellón auditivo y son útiles para medir los compuestos androgénicos y antiandrogénicos que se aplican directamente a la glándula (84). Es importante el hecho de que este ensayo se puede usar para medir la acción tanto sistémica como local. El pabellón auditivo al que se aplica el compuesto de ensayo sirve para determinar la actividad local, mientras que el órgano contralateral sirve para determinar la acción sistémica (85). Es evidente que mediante una elección cuidadosa y limitada de las dosis, cualquier fármaco sistémico podría parecer un fármaco local o "suave", por ejemplo una dosis mínimamente activa de un antiandrógeno aplicado directamente a la piel donde actúa no alcanzaría concentraciones suficientes en el cuerpo como para que pueda actuar de forma sistémica. Estos experimentos evitan dicho tipo de efecto "local" de artefacto. En consecuencia, estos compuestos se aplican en un gran intervalo de dosis, intentando determinar la cantidad que produce tanto un efecto local como sistémico (si existe). La diferencia en el nivel de dosis que convierte un efecto antiandrogénico local en sistémico se compara con la de los antiandrógenos sistémicos clásicos, flutamida, espironolactona, etc.

Este ensayo se realiza usando el procedimiento descrito anteriormente (85) en hámsteres hembras tratadas con testosterona, que tiene la ventaja de antecedentes androgénicos consistentes. En hámsters sirios hembras de diez semanas se inyecta s.c. diariamente 4 pg de propionato de testosterona en aceite de cacahuete. Los antiandrógenos de ensayo (incluyendo flutamida y espironolactona) se aplican dos veces al día en la superficie ventral del pabellón auditivo derecho en 25 pL de acetona durante de 3 a 4 semanas. La actividad androgénica se analiza de un modo similar en animales que no se tratan con propionato de testosterona. Después, se sacrifican los animales y cada oreja se corta en la base proximal y la piel ventral de la oreja se separa manualmente del cartílago. La piel se tiñe con negro Sudán, se lava y se fija. Las muestras se cortan sagitalmente y el tamaño de cada glándula sebácea se cuantifica microscópicamente usando un sistema informático de análisis de imagen.

Los resultados de estos estudios acoplados con las tendencias estructurales obtenidas en el ensayo de esterasa y el sistema de indicador antiandrogénico proporcionarán la información necesaria para sintetizar ésteres (véase el apartado Efecto de la modificación de éster) que producen una actividad "local" óptima.

**Acción *in vivo* en rata.** Los estudios sobre respuestas a corticoides indican que los compuestos que son promotores en el ensayo con hámster tienen una actividad (anti)corticoides significativa y su acción *in vivo* en mineralocor-

ticoides y glucocorticoides se analiza en ratas, el modelo clásico para el estudio de la acción de corticoides. Aunque no habrá dosis en la línea base de antiandrógenos en ratas con fines comparativos, sin embargo se permitirá determinar si estos compuestos producen efectos anticorticoides a dosis muy grandes. Este ensayo se realiza administrando primero los compuestos por inyección subcutánea para maximizar el efecto. Después, si es activo, el análogo se aplica por vía tópica con el fin de determinar el efecto del tránsito a través de la piel (acción de esterasa).

**Actividad mineralocorticoide *in vivo*.** Los compuestos principales analizados en el ensayo con hámster que demuestran unión al receptor de mineralocorticoides y actividad mineralocorticoide o antimineralocorticoide en células JAR transfectadas se analizan adicionalmente *in vivo* como describen Sekihara and Yazaki, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 45:235-238, 1993. Se adrenalectomizan bilateralmente ratas machos de doce semanas y se les deja en ayunas durante una noche. Al día siguiente, a los animales se les inyectan por vía intraperitoneal 3 mL de solución salina y 0,2 pg de aldosterona. Además, a los animales se les inyectan por vía subcutánea dosis graduadas de los compuestos (un gran intervalo cuya cantidad más alta supera la concentración más alta usada en el ensayo de hámster anterior). Las dosis que son activas también se aplican por vía tópica (en los dorsos rasurados) con el fin de determinar si el paso a través de la piel aumenta la tasa de inactivación. La acción agonista se determina en animales que no reciben aldosterona. Tres horas después se sacrifican las ratas y se aspira la orina de las vejigas. La concentración de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> se determina con un fotómetro de llama. Dependiendo del ensayo, la retención de Na<sup>+</sup> se compara con controles adrenalectomizados que reciben vehículo solo y/o aldosterona. La espironolactona se analiza con fines comparativos como antimineralocorticoide sistémico.

**Actividad glucocorticoide *in vivo*.** Los compuestos principales analizados en el ensayo con hámster que demuestran unión al receptor de glucocorticoides y actividad glucocorticoide o antiglucocorticoide en células HeLa transfectadas se analizan *in vivo* para determinar la inducción de la tirosina-aminotransferasa usando el modelo previamente descrito por Petrazzuoli, et al., *Endocrinology*, 127, 555-559, 1990. Se adrenalectomizan bilateralmente ratas machos de doce semanas y se les dejó en ayunas durante una noche. Al día siguiente, a los animales se les inyectan por vía subcutánea 2,2 mg de corticosterona (elegida como glucocorticoide débil) y se administran dosis graduadas de los análogos en un gran intervalo (como antes) por vía subcutánea dos veces al día. Todas las dosis que son activas también se aplican por vía tópica sobre los dorsos rasurados con el fin de determinar el efecto del tránsito a través de la piel. La acción agonista se determina en animales que no reciben corticosterona. Se sacrifica los animales 12 horas después y se extraen los hígados, se lavan, se homogeneizan, se centrifugan a 31.000 x g. La actividad de tirosina-aminotransferasa se determina en la fracción soluble monitorizando la conversión de ácido p-hidroxifenilpirúvico en p-hidroxibenzaldehído a 331 nM como han descrito anteriormente Rosner and Hochberg, *Endocrinology*, 91, 626-632, 1972. Dependiendo del ensayo, la actividad enzimática se compara con la de controles adrenalectomizados que reciben vehículo solo y/o corticosterona. La mifepristona se analiza con fines comparativos como antiglucocorticoide sistémico.

**Efectos antihormonales en la rata *fuzzy*.** El problema en el ensayo con ratas es que no es posible interpretar los resultados de los ensayos con corticoides con respecto al ensayo de antiandrógenos considerando la diferencia en cuanto a la especie (hámster y rata). Una posibilidad probable es que podría no haber actividad corticoide en absoluto (ni agonista ni antagonista) y, entonces, esta cuestión es irrelevante. No obstante, si hay una ligera actividad (anti)corticoide a dosis muy altas, existe la necesidad de comparar la dosis de corticoide con la dosis requerida para la acción antiandrogénica "local". Esto podría conseguirse realizando todos los ensayos en la rata "fuzzy" (WF/PmWp-"fz"). Esta rata es un mutante genético entre ratas albinas sin pelo y peludas y está disponible comercialmente (Harlan Sprague Dawley). La rata *fuzzy* se usa para estudiar la absorción percutánea de fármacos y es especialmente útil como modelo de acné inducido por andrógenos. Sus glándulas sebáceas son sexualmente dimórficas, con una piel clara normal en hembras, mientras que los machos exhiben lóbulos glandulares hiperplásicos y sus dorsos contiene un grueso recubrimiento seboreico pardo. Esto es dependiente de andrógenos, es reversible por castración y se restablece en machos castrados con testosterona (89). En este modelo se ha demostrado que la finasterida aplicada tópicamente a dosis que son localmente eficaces también tiene un efecto sistémico significativo (próstata) (89). La fisiología de la rata "fuzzy", incluida la glándula suprarrenal, parece ser similar a la de la rata normal (90). Este animal ha sido útil para estudiar los antiandrógenos aplicados tópicamente (89) y permitirá la medición simultánea de los efectos antiandrógenos locales (piel) y sistémicos (próstata) junto con cualquier acción anticorticoide (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> en orina y tirosina-aminotransferasa hepática).

Ratas *fuzzy* de veinticinco días intactas o castradas se tratan por administración tópica de varias dosis (el intervalo se determina en los experimentos anteriores) de compuestos de acuerdo con la presente invención disueltos en un vehículo de propilenglicol, etanol y H<sub>2</sub>O. Como se ha descrito, el análogo en 0,5 mL de solución se aplica una vez al día a una zona de 4 x 4 cm de la parte inferior, 5 días a la semana (89). En los animales castrados se inyectan una vez al día 200 pg de testosterona en aceite de sésamo. Un grupo control castrado no se tratará con testosterona. Con fines comparativos, las concentraciones ajustadas según la dosis de espironolactona también se administrarán tópicamente. Los animales se alojan por separado para evitar que se laman el área tratada. Después de 8 semanas de tratamiento, los animales se adrenalectomiza y, al día siguiente, se tratan con corticosterona o aldosterona como se ha descrito anteriormente, además de antiandrógenos. Tras 3 horas (mineralocorticoides) o 12 horas (glucocorticoides) se sacrifica los animales y se analiza la orina para determinar Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> y el hígado para determinar la tirosina-aminotransferasa, como se ha descrito anteriormente. En una subpoblación, se determina la actividad agonista de corticoides en los animales a los que se han administrado los compuestos de ensayo pero a los que no se ha inyec-

tado ninguno de los corticoides.

5 Para la acción antiandrogénica sistémica, se extraen la próstata y las vesículas seminales y se pesan. En todos los animales se evalúa la actividad antiandrogénica "local" por inhibición del crecimiento de la glándula sebácea inducido por andrógenos medido por el área de los lóbulos glandulares. Pequeñas muestras de piel perforada aleatoriamente en el área en la que se aplicaron los compuestos de ensayo se congelan y láminas de 40 µm de espesor se cortan horizontalmente respecto a la superficie epidérmica (criostato Leica CM 3050S) y se introducen en pocillos rellenos de agua. Se seleccionan los cortes que flotan libres que contienen los lóbulos glandulares sebáceos y se tiñen con solución de osmio al 1% y de dicromato potásico al 2,5% durante 2 minutos. Después de lavar con agua destilada, los cortes se montan sobre portaobjetos y el más grande de los lóbulos glandulares teñidos de oscuro en cada imagen glandular se mide con un aparato de microimágenes asistido por ordenador (sistema informático de análisis de imágenes Openlab de Improvision, Lexington, MA) que incluye la calibración con un micrómetro ocular sobre el microscopio para análisis morfométrico (34). Todos estos análisis se realizan de forma ciega. Los compuestos antiandrogénicos producen una gran disminución fácilmente medible de los lóbulos.

15 **Medición de la testosterona en plasma.** Resultados conflictivos han indicado que la espironolactona puede ser un inhibidor esteroideogénico, que actúa específicamente en la 17α-hidroxilasa (91), aunque esto es controvertido y en muchos estudios no se han encontrado efectos sobre los niveles de testosterona en plasma (9,92). Aunque la evidencia parece indicar que no hay efectos sobre la síntesis de andrógenos, con independencia y dada esta incertidumbre, se miden los niveles de testosterona en plasma en todas las ratas no castradas comparando todas las ratas tratadas con los compuestos de ensayo con los controles que no reciben los análogos. Los niveles séricos de testosterona se miden por RIA como se ha descrito previamente (93) para ratas macho mediante extracción del suero con éter que contiene una cantidad traza de [<sup>3</sup>H]testosterona como patrón interno. Después del análisis del suero, los resultados se corrigen para la recuperación del [<sup>3</sup>H]-patrón interno determinado en una parte alícuota del extracto.

20 **Requisito de antiandrógeno local.** Como se ha mencionado anteriormente, si se produce un efecto sistémico con los compuestos de la presente invención, debería haber una diferencia muy grande entre la dosis que produce un efecto antiandrogénico local sobre la piel y un efecto sistémico en la próstata o en el pabellón auditivo contralateral. De un modo similar, para que un análogo sea particularmente útil en la presente invención, cualquier acción anticorticoide sistémica debe producirse también únicamente con una dosis muy superior a la requerida para una acción antiandrogénica local. En estos ensayos, los antiandrógenos sistémicos (espironolactona, flutamida) también se analizarán mediante aplicación en la piel. Los inventores definen un antiandrógeno como localmente activo o "suave" como uno que no produce un efecto sistémico o uno en el que la diferencia en la dosis requerida para la acción local frente a una acción sistémica supera con mucho esta diferencia con los antiandrógenos clásicos.

25 Además, cuando las características o aspectos de la invención se describen en términos de los grupos de Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la invención también se describe de este modo en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush.

35

**Bibliografía**

1. Bruchovsky N, Wilson JD 1968 The intranuclear binding of testosterone and 5-alpha-androstan-17-beta-ol-3-one by rat prostate. *J Biol.Chem* 243:5953-5960.
2. Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, Peterson RE 1974 Steroid 5alpha-reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science* 186:1213-1215.
3. Cleland WH, Mendelson CR, Simpson ER 1985 Effects of aging and obesity on aromatase activity of human adipose cells. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 60:174-177.
4. Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS 1994 Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N.Engl.J.Med.* 331:1056-1061.
5. Snyder PJ 2001 The role of androgens in women. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 86:1006-1007.
6. Speiser PW, New MI 1987 Genotype and hormonal phenotype in nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Clin.Endocrinol.Metab* 64:86-91.
7. Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R 1998 Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J Clin.Endocrinol.Metab* 83:3078-3082.
8. Avgerinos PC, Cutler GB, Jr., Tsokos GC, Gold PW, Feuillean P, Gallucci WT, Pillemer SR, Loriaux DL, Chrousos GP 1987 Dissociation between cortisol and adrenal androgen secretion in patients receiving alternate day prednisone therapy. *J Clin.Endocrinol.Metab* 65:24-29.
9. Cumming DC, Yang JC, Rebar RW, Yen SS 1982 Treatment of hirsutism with spironolactone. *JAMA* 247:1295-1298.
10. Cusan L, Dupont A, Gomez JL, Tremblay RR, Labrie F 1994 Comparison of flutamide and spironolactone in the treatment of hirsutism: a randomized controlled trial. *Fertil.Steril.* 61:281-287.
11. Rittmaster RS 1994 Finasteride. *N.Engl.J Med* 330:120-125.
12. Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Miller GJ, Ford LG, Lieber MM, Cespedes RD, Atkins JN, Lippman SM, Carlin SM, Ryan A, Szczepanek CM, Crowley JJ, Coltman CA, Jr. 2003 The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *N.Engl.J Med* 349:215-224.

13. McConnell JD, Wilson JD, George FW, Geller J, Pappas F, Stoner E 1992 Finasteride, an inhibitor of 5 alpha-reductase, suppresses prostatic dihydrotestosterone in men with benign prostatic hyperplasia. *J Clin.Endocrinol.Metab* 74:505-508.
14. Rosner W 2004 Proscar and propecia--a therapeutic perspective. *J Clin.Endocrinol.Metab* 89:3096-3098.
15. Davis S 1999 Androgen replacement in women: a commentary. *J Clin.Endocrinol.Metab* 84:1886-1891.
16. Youngkin EQ 1990 Estrogen replacement therapy and the estraderm transdermal system. *Nurse Pract.* 15:19-26, 31.
17. Fant RV, Henningfield JE, Shiffman S, Strahs KR, Reitberg DP 2000 A pharmacokinetic crossover study to compare the absorption characteristics of three transdermal nicotine patches. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 67:479-482.
18. Bodor N 1982 Designing safer drugs based on the soft drug approach. *Trends Pharmac Sci* 3:53-56.
19. Graffner-Nordberg M, Sjodin K, Tunek A, Hallberg A 1998 Synthesis and enzymatic hydrolysis of esters, constituting simple models of soft drugs. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 46:591-601.
20. Lee HJ, Bradlow HL, Moran MC, Sherman MR 1981 Binding of glucocorticoid 21-OIC acids and esters to molybdate-stabilized hepatic receptors. *J.Ster.Biochem.* 14:1325-1335.
21. Lee HJ, Soliman MRI 1982 Anti-inflammatory steroids without pituitary adrenal suppression. *Science* 215:989-991.
22. Laurent H, Gerhards E, Wiechert R 1975 New biologically active pregnan-21-oic acid esters. *J Steroid Biochem* 6:185-192.
23. Druzgala P, Hochhaus G, Bodor N 1991 Soft drugs--10. Blanching activity and receptor binding affinity of a new type of glucocorticoid: loteprednol etabonate. *J Steroid Biochem Mol Biol* 38:149-154.
24. Szelenyi I, Hochhaus G, Heer S, Kusters S, Marx D, Poppe H, Engel J 2000 Loteprednol etabonate: a soft steroid for the treatment of allergic diseases of the airways. *Drugs Today (Barc.)* 36:313-320.
25. Sarrel PM 1990 Sexuality and Menopause. *Obstetrics and Gynecology* 75:26S-30S.
26. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators 2002 Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288:321-333.



27. Schiff I, Tulchinsky D, Ryan KJ 1977 Vaginal absorption of estrone and 17 $\beta$ -estradiol. *Fertility and Sterility* 28:1063-1066.

28. Rigg LA, Hermann H, Yen SSC 1978 Absorption of estrogens from vaginal creams. *N.Engl.J.Med.* 298:195-197.

29. Martin PL, Yen SSC, Burnier AM, Hermann H 1979 Systemic absorption and sustained effects of vaginal estrogen creams. *JAMA* 242:2699-2700.

30. Schiff I, Tulchinsky D, Ryan KJ, Kadner S, Levitz M 1980 Plasma estriol and its conjugates following oral and vaginal administration of estriol to postmenopausal women: correlations with gonadotropin levels. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 138:1137-1141.

31. Bucourt R, Vignau M, Torelli V 1978 New biospecific adsorbents for the purification of estradiol receptor. *J.Biol.Chem* 253:8221-8228.

32. Labaree DC, Reynolds TY, Hochberg RB 2001 Estradiol-16 $\alpha$ -carboxylic Acid Esters as Locally Active Estrogens. *J Med Chem* 44:1802-1814.

33. Labaree DC, Zhang J, Harris HA, O'Connor C, Reynolds TY, Hochberg RB 2003 The Synthesis and Evaluation of B-, C-, and D-ring Substituted Estradiol Carboxylic Acid Esters as Locally Active Estrogens. *J Med Chem* 46:1886-1904.

34. Zhang J, Labaree DC, Mor G, Hochberg RB 2004 Estrogen to Antiestrogen with a Single Methylene Group Resulting in an Unusual Steroidal SERM. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 89:3527-3535.

35. Zhang JX, Labaree DC, Hochberg RB 2005 Nonpolar and short sidechain groups at C-11 of estradiol result in antiestrogens. *J Med Chem* 48:1428-1447.

36. Muddana SS, Price AM, MacBride MM, Peterson BR 2004 11 $\beta$ -Alkyl-4 $\alpha$ -19-nortestosterone derivatives: high-affinity ligands and potent partial agonists of the androgen receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* 47:4985-4988.

37. Centrella M, McCarthy TL, Wei-Zhong C, Labaree DC, Hochberg RB 2004 Estren (4-Estren-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol) Is a prohormone that can regulate estrogen- and androgen-like effects through the androgen receptor. *Mol.Endocrinol.* 18:1120-1130.

38. He Y, Yin D, Perera M, Kirkovsky L, Stourman N, Li W, Dalton JT, Miller DD 2002 Novel nonsteroidal ligands with high binding affinity and potent functional activity for the androgen receptor. *Eur.J Med Chem* 37:619-634.

39. Nirde P, Terouanne B, Gallais N, Sultan C, Auzou G 2001 Antimineralocorticoid 11 $\beta$ -substituted spiro-lactones exhibit androgen receptor agonistic activity: a structure function study. *Molecular Pharmacology* 59:1307-1313.

40. Pannatier A, Testa B, Etter J 1981 Enzymatic hydrolysis by mouse skin homogenates: structure-metabolism relationships of para-nitrobenzoate esters. *International Journal of Pharmaceutics* 8:167-174.
41. Loozen HJJ, Schoonen WGEJ 2000 Estrogenic estra-1,3,5(10)-trienes with differential effects on the alpha and beta estrogen receptors, having a linear hydrocarbon of from 5-9 carbon atoms in position 11. Akzo Nobel Patent WO 00/31112:
42. Hanson RN, Napolitano E, Fiaschi R, Onan KD 1990 Synthesis and estrogen receptor binding of novel 1113-substituted estra-1,3,5(10)-triene-3,17(3-diols. *J. Med. Chem.* 33:3155-3160.
43. Corey EJ, Schmidt G 1979 Useful procedures for the oxidation of alcohols involving pyridinium dichromate in aprotic media. *Tetrahedron Letters* :399-402.
44. Guindon Y, Yoakim C, Morton HE 1983 Cleavage of carbon-oxygen bonds. Dimethylboron bromide. A new reagent for ether cleavage. *Tetrahedron Letters* 24:2969-2972.
45. Guindon Y, Yoakim C, Morton HE 1984 Dimethylboron bromide and diphenylboron bromide: cleavage of acetals and ketals. *J. Org. Chem.* 49:3912-3920.
46. Monti H, Leandri G, Klos-Ringuet M, Corriol C 1983 An efficient deprotective method for allylic alcohols protected as methoxyethoxymethyl (MEM) and methoxymethyl (MOM) ethers. *Synthetic Communications* 13:1021-1026.
47. Sogani PC, Whitmore WF, Jr. 1988 Flutamide and other antiandrogens in the treatment of advanced prostatic carcinoma. *Cancer Treat. Res.* 39:131-145.
48. Morris JJ, Hughes LR, Glen AT, Taylor PJ 1991 Non-steroidal antiandrogens. Design of novel compounds based on an infrared study of the dominant conformation and hydrogen-bonding properties of a series of anilide antiandrogens. *Journal of Medicinal Chemistry* 34:447-455.
49. Tucker H, Crook JW, Chesterson GJ 1988 Nonsteroidal antiandrogens. Synthesis and structure-activity relationships of 3-substituted derivatives of 2-hydroxypropionanilides. *Journal of Medicinal Chemistry* 31:954-959.
50. Yin D, He Y, Perera MA, Hong SS, Marhefka C, Stourman N, Kirkovsky L, Miller DD, Dalton JT 2003 Key structural features of nonsteroidal ligands for binding and activation of the androgen receptor. *Molecular Pharmacology* 63:211-223.
51. Seligson AL, Campion BK, Brown JW, Terry RC, Kucerova R, Bienova M, Hajduch M, Sovak M 2003 Development of fluridil, a topical suppressor of the androgen receptor in androgenetic alopecia. *Drug Dev. Res.* 59:292-306.

52. Poujol N, Wurtz JM, Tahiri B, Lumbroso S, Nicolas JC, Moras D, Sultan C 2000 Specific recognition of androgens by their nuclear receptor. A structure-function study. *J Biol.Chem* 275:24022-24031.
53. Whitesell JK, Nabona K, Deyo D 1989 Observations on the reactions of chiral pyruvates. Synthesis of (-)- and (+)-citramalic acid. *J.Org.Chem.* 54:2258-2260.
54. Wuensch B, Diekmann H, Hoefner G 1993 Homochiral 2,4-disubstituted 1,3-dioxanes from (S)-(-)-malic acid: stereoselective synthesis and investigation of the NMDA receptor affinity of all four stereoisomers. *Liebigs Annalen der Chemie* :1273-1278.
55. Bonher TG, Bourne EJ, McNally S 1960 Dealkylation and deacylation of carbohydrate derivatives with boron trichloride and boron tribromide. *Journal of the Chemical Society, Abstracts* :2929-2934.
56. Steelman SL, Brooks JR, Morgan ER, Patanelli DJ 1969 Anti-androgenic activity of spironolactone. *Steroids* 14:449-450.
57. Sobbrío GA, Granata A, Panacea A, Trimarchi F 1989 Effectiveness of short term canrenone treatment in idiopathic hirsutism. *Minerva Endocrinol.* 14:105-108.
58. Cutler GB, Jr., Sauer MA, Loriaux DL 1979 SC 25152: a potent mineralocorticoid antagonist with decreased antiandrogenic activity relative to spironolactone. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 209:144-146.
59. Nedelec L, Torelli V, Philibert D 1983 3-Oxo-4-unsaturated, or 1,4-unsaturated steroid derivatives substituted at position seven, their utilization as pharmaceutical compositions and compositions containing them. (Roussel-UCLAF, Fr. Patent 81-401994:
60. Kaiho S, Ohizumi I, Tamura K, Kato N, Yoneya T, Tachibana K 20010301 Preparation of androstane derivatives as antiandrogen agents. (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha, Japan Patent 2000-J P5636:
61. Nickisch K, Laurent H 1988 Stereoselective synthesis of 7 $\alpha$ -allyl- and 7 $\alpha$ -propylsteroids. *Tetrahedron Letters* 29:1533-1536.
62. Solo AJ, Caroli C, Darby MV, McKaya T, Slaunwhite WD, Hebborn P 1982 7 $\alpha$ -Alkyltestosterone derivatives: synthesis and activity as androgens and as aromatase inhibitors. *Steroids* 40:603-614.
63. Choe YS, Lidstrom PJ, Chi DY, Bonasera TA, Welch MJ, Katzenellenbogen JA 1995 Synthesis of 11 [3-[18F]fluoro-5 $\alpha$ -dihydrotestosterone and 11 [3-[18F]fluoro-19-nor-5 $\alpha$ -dihydrotestosterone: Preparation via halofluorination-reduction, receptor binding, and tissue distribution. *J.Med.Chem.* 38:816-825.

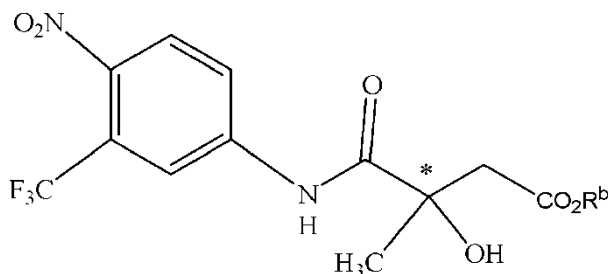
64. Wang WB, Roskamp EJ 1992 Tin(II) amides: new reagents for the conversion of esters to amides. *J. Org. Chem.* 57:6101-6103.
65. Mukaiyama T, Usui M, Shimada E, Saigo K 1975 Convenient method for the synthesis of carboxylic esters. *Chemistry Letters* :1045-1048.
66. Hoyte RM, Borderon K, Bryson K, Allen R, Hochberg RB, Brown TJ 1994 Synthesis and evaluation of 7 $\alpha$ -iodo-5 $\alpha$ -dihydrotestosterone as a potential radioligand for androgen receptor. *J. Med. Chem.* 37:1224-1230.
67. Labaree DC, Hoyte RM, Nazareth LV, Weigel NL, Hochberg RB 1999 7 $\alpha$ -iodo and fluoro steroids as androgen receptor mediated imaging agents. *J. Med. Chem.* 42:2021-2034.
68. Chang CS, Kokontis J, Liao ST 1988 Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* 240:324-326.
69. McCarthy TL, Chang WZ, Liu Y, Centrella M 2003 Runx2 integrates estrogen activity in osteoblasts. *J Biol. Chem* 278:43121-43129.
70. Lindner W 1980 N-chloromethyl-4-nitrophthalimide as derivatization reagents for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 198:367-372.
71. Lund-Pero M, Jeppson B, Arneklo-Nobin B, Sjogren H-O, Holmgren K, Pero RW 1994 Nonspecific steroidal esterase activity and distribution in human and other mammalian tissues. *Clinica Chimica Acta* 224:9-20.
72. Corvol P, Claire M, Oblin ME, Geering K, Rossier B 1981 Mechanism of the antiminerocorticoid effects of spiro lactones. *Kidney Int.* 20:1-6.
73. Brown TJ, MacLusk r NJ, Toran-Allerand CD, Zielinski JE, Hochberg RB 1989 Characterization of 11 [3-methoxy-16 $\alpha$ -[<sup>3</sup>H]iodoestradiol binding: neuronal localization of estrogen binding sites in the developing rat brain. *Endocrinology* 124:2074-2088.
74. Moguilewsky M, Raynaud JP 1980 Evidence for a specific mineralocorticoid receptor in rat pituitary and brain. *J. Steroid Biochem.* 12:309-314.
75. Lopez S, Miyashita Y, Simons SS, Jr. 1990 Structurally based, selective interaction of arsenite with steroid receptors. *J Biol. Chem* 265:16039-16042.
76. Hoyte RM, Labaree DC, Fede JM, Harris C, Hochberg RB 1998 Iodinated and fluorinated steroid 2'-aryl-[3,2-c] pyrazoles as potential glucocorticoid receptor imaging agents. *Steroids* 63:595-602.
77. Petrazzuoli M, Pahuja SL, Larner JM, Hochberg RB 1990 Biological activity of the fatty acid ester metabolites of corticoids. *Endocrinology* 127:555-559.

78. Quinkler M, Meyer B, Bumke-Vogt C, Grossmann C, Gruber U, Oelkers W, Diederich S, Bahr V 2002 Agonistic and antagonistic properties of progesterone metabolites at the human mineralocorticoid receptor. *Eur.J Endocrinol.* 146:789-799.
79. Chambers SK, Ivins CM, Kacinski BM, Hochberg RB 2004 An unexpected effect of glucocorticoids on stimulation of c-fms proto-oncogene expression in choriocarcinoma cells expressing little glucocorticoid receptor. *Am J Obstet Gynecol* 190:974-985.
80. Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, Evans RM 1987 Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: Structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 237:268-275.
81. Littlefield BA, Cidlowski NB, Cidlowski JA 1980 Modulation of glucocorticoid effects and steroid receptor binding in butyrate-treated HeLa S3 cells. *Arch.Biochem.Biophys.* 201:174-184.
82. Jausons-Loffreda N, Balaguer P, Auzou G, Pons M 1994 Development of specific bioluminescent in vitro assays for selecting potential antimineralocorticoids. *J Steroid Biochem.Mol.Biol.* 49:31-38.
83. Littlefield BA, Gurside E, Markiewicz L, McKinley B, Hochberg RB 1990 A simple and sensitive microtiter plate estrogen bioassay based on stimulation of alkaline phosphatase in Ishikawa cells: Estrogenic action of A5 adrenal steroids. *Endocrinology* 127:2757-2762.
84. Luderschmidt C, Eiermann W, Jawny J, Bidlingmaier F, Ring J 1984 17 alpha-Propylmesterolone (SH 434): an antiandrogenic sebosuppressive substance not influencing circulating testosterone concentrations. Experimental studies in Syrian hamsters. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 328:214-218.
85. Matias JR, Malloy VL, Orentreich N 1988 Synergistic antiandrogenic effects of topical combinations of 5 alpha-reductase and androgen receptor inhibitors in the hamster sebaceous glands. *J Invest Dermatol.* 91:429-433.
86. Gaunt R, Gisoldi E, Smith N 1971 Refractoriness to renal effects of aldosterone in the golden hamster. *Endocrinology* 89:63-69.
87. Sekihara H, Yazaki Y 1993 5 alpha-Dihydro-11-deoxycorticosterone as a mineralocorticoid agonist and antagonist: evidence for a weak mineralocorticoid as an antagonist of potent mineralocorticoids. *J Steroid Biochem.Mol.Biol.* 45:235-238.
88. Rosner W, Hochberg RB 1972 Corticosteroid-binding globulin in the rat: Isolation and studies of its influence on cortisol action in vivo. *Endocrinology* 91:626-632.

89. Ye F, Imamura K, Imanishi N, Rhodes L, Uno H 1997 Effects of topical antiandrogen and 5-alpha-reductase inhibitors on sebaceous glands in male fuzzy rats. *Skin Pharmacol.* 10:288-297.
90. Marit GB, Young SM, Hadick CL 1995 Anatomic and physiologic characterization of the WF/PmWp-"fz" (fuzzy) rat. *Lab Anim Sci* 45:184-190.
91. Menard RH, Guenther TM, Kon H, Gillette JR 1979 Studies on the destruction of adrenal and testicular cytochrome P-450 by spironolactone. Requirement for the 7alpha-thio group and evidence for the loss of the heme and apoproteins of cytochrome P-450. *J Biol.Chem* 254:1726-1733.
92. Rey FO, Valterio C, Locatelli L, Ramelet AA, Felber JP 1988 Lack of endocrine systemic side effects after topical application of spironolactone in man. *J.Endocrinol.Invest* 11:273-278.
93. Borg W, Shackleton CHL, Pahuja SL, Hochberg RB 1995 Endogenous Long-Lived Esters of Testosterone in the Rat. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92:1545-1549.

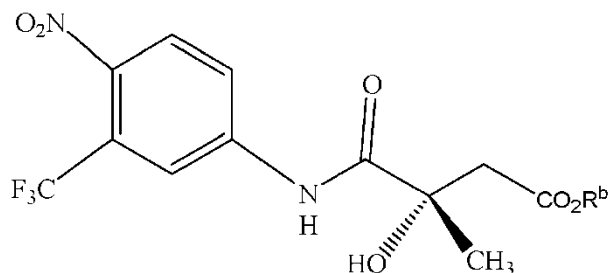
## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de acuerdo con la estructura química:



en la que  $R^b$  es un grupo alquilo de  $C_1$ - $C_6$  opcionalmente sustituido (con alquilo o fluoroalquilo de  $C_1$ - $C_3$ ).

- 5 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es



en el que  $R^b$  es un grupo etilo.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que  $R^b$  es un grupo alquilo de  $C_2$  o  $C_3$  opcionalmente sustituido.
- 10 4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que  $R^b$  es un grupo alquilo de  $C_2$  opcionalmente sustituido.
5. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en combinación con un vehículo, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 6. La composición de acuerdo con la reivindicación 5, en forma de dosificación tópica.
7. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del acné en un paciente.
8. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la calvicie en un paciente.
- 20 9. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del hirsutismo en un paciente.
10. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la seborrea en un paciente.
- 25 11. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del exceso de andrógenos en la piel de un paciente.
12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho exceso de andrógenos da como resultado la afección de acné, calvicie, hirsutismo o seborrea en la piel de dicho paciente.

FIGURA 1

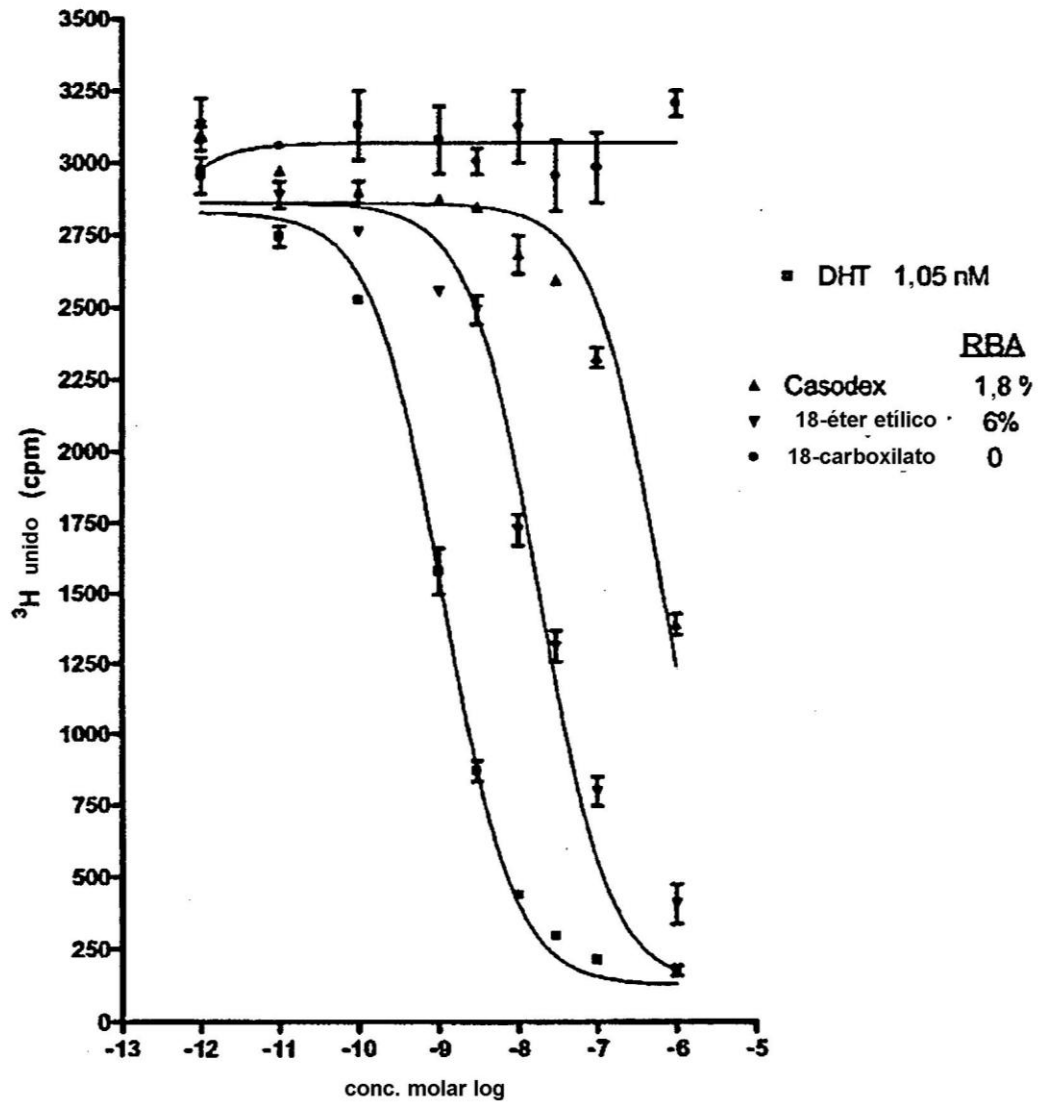




FIGURA 2

