

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 473 040**

51 Int. Cl.:

A61K 31/565 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.1999 E 11174930 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014 EP 2399582**

54 Título: **Modulador selectivo del receptor de estrógenos en combinación con deshidroepiandrosterona (DHEA) o análogos**

30 Prioridad:

11.06.1998 US 96284

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

03.07.2014

73 Titular/es:

**ENDORECHERCHE INC. (100.0%)
2989 de la Promenade
Sainte-Foy, Quebec G1W 2J5, CA**

72 Inventor/es:

LABRIE, FERNAND

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 473 040 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

Modulador selectivo del receptor de estrógenos en combinación con deshidroepiandrosterona (DHEA) o análogos

Campo de la invención

La presente invención se refiere al tratamiento o reducción del riesgo de contraer sequedad vaginal utilizando un novedoso tratamiento combinado en animales de sangre caliente susceptibles, incluyendo seres humanos. En particular, la combinación incluye administrar un modulador selectivo de los receptores de estrógenos (SERM) y elevar el nivel de precursores de esteroides sexuales en el paciente, seleccionándose dichos precursores entre el grupo que consiste en deshidroepiandrosterona (DHEA), sulfato de deshidroepiandrosterona (DHEA-S) y androst-5-eno-3 β ,17 β -diol (5-diol).

Antecedentes de la técnica relacionada

El hombre es único, junto con algunos otros primates, en tener glándulas suprarrenales que secretan grandes cantidades de los precursores esteroides sulfato de deshidroepiandrosterona (DHEA-S) y deshidroepiandrosterona (DHEA) que se convierten en androstenodiona (4-diona) y a continuación en andrógenos y/o estrógenos activos en tejidos periféricos (Labrie y col., En: Important Advances in Oncology. Editado por V.T. de Vita, S. Hellman, S.A. Rosenberg. J.B. Lippincott, Filadelfia, 193-217, 1985; Labrie, Mol. Cell. Endocrinol., 78: C113-C118, 1991; Labrie y col., En Signal Transduction in Testicular Cells. Ernst Schering Research Foundation Workshop. Editado por V. Hansson, F.O. Levy, K Tasken Springer-Verlag, Berlín-Nueva York (Supl. 2), pp. 185-218, 1996; Labrie y col., Steroids, 62: 148-158, 1997). En un estudio reciente (Labrie y col., J. Clin. Endocrinol. Metab., 82: 2403-2409, 1997), los inventores han descrito un drástico declive en los niveles en circulación de deshidroepiandrosterona (DHEA), sulfato de DHEA (DHEA-S), androst-5-eno-3 β ,17 β -diol (5-diol), 5-diol-S, ésteres de ácidos 5-diol grasos y androstendiona en hombres y mujeres entre las edades de 20 y 80 años.

A pesar de la marcada caída en los andrógenos endógenos en las mujeres durante el envejecimiento, el uso de andrógenos en las mujeres postmenopáusicas se ha visto limitado principalmente debido al temor de un aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares basándose en estudios anteriores que mostraban un perfil lipídico desfavorable con los andrógenos. Recientes estudios, sin embargo, no han mostrado efectos significativos del tratamiento combinado con estrógenos y andrógenos sobre los niveles de colesterol, triglicéridos, HDL, LDL y la relación HDL/LDL en suero cuando se comparan con los estrógenos solos (Sherwin y col., Am. J. Obstet. Gynecol., 156: 414-419, 1987). De acuerdo con estas observaciones, los inventores han demostrado que DHEA, un compuesto que tiene una influencia predominantemente andrógena, no tiene aparentemente efectos perjudiciales sobre el perfil lipídico en suero (Diamond y col., J. Endocrinol., 150: S43-S50, 1996). De forma similar, no se han observado cambios en las concentraciones del colesterol, sus subfracciones o en los triglicéridos, durante un tratamiento solo con estradiol después de 6 meses de tratamiento con implantes de estradiol + testosterona (Burger y col., Br Med. J. Clin. Res. Ed., 294: 936-937, 1987). Debe mencionarse que un estudio en hombres ha demostrado una correlación inversa entre el DHEA-S en suero y las lipoproteínas de baja densidad (Parker y col., Science, 208: 512-514, 1980). De forma más reciente, se ha encontrado una correlación entre una proporción baja de testosterona en suero y DHEA y un aumento de la grasa visceral, un parámetro de mayor riesgo cardiovascular (Tchernof y col., Metabolism, 44: 513-519, 1995).

Cinco diol es un compuesto biosintetizado a partir de DHEA a través de la acción de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa reductora (17 β -HSD) y es un estrógeno débil. Tiene una afinidad 85 veces menor que el 17 β -estradiol (E₂) por los receptores de estrógenos en el citosol de la glándula pituitaria anterior de rata (Simard y Labrie, J. Steroid Biochem., 26: 539-546, 1987), confirmando además los datos obtenidos sobre el mismo parámetro en el tejido miometrial y de cáncer de mama humanos (Kreitmann y Bayard, J. Steroid Biochem., 11: 1589-1595, 1979; Adams y col., Cancer Res., 41: 4720-4926, 1981; Poulin y Labrie, Cancer Res., 46: 4933-4937, 1986). Sin embargo, a concentraciones comprendidas en el intervalo de los niveles en plasma que se encuentran en mujeres adultas, 5-diol potencia la proliferación celular y los niveles de los receptores de la progesterona en células ZR-75-1 de tumor de mama humano (Poulin y Labrie, Cancer Res., 46: 4933-4937, 1986) y aumenta la síntesis dependiente de estrógenos de la glucoproteína de 52 kDa en células MCF-7 (Adams y col., Cancer Res., 41: 4720-4926, 1981).

Como se ha mencionado anteriormente, se sabe que los niveles de DHEA, DHEA-S y 5-diol en suero disminuyen con la edad y, por tanto, existe una drástica reducción dependiente de la edad en la formación de andrógenos y estrógenos en los tejidos periféricos diana. Estos cambios en la secreción de DHEA-S y DHEA ocasionan una disminución marcada en las funciones bioquímicas y celulares estimuladas por los esteroides sexuales. Como resultado, DHEA y DHEA-S se han usado recientemente en el tratamiento de una variedad de dolencias que están asociadas con la disminución y/o el desequilibrio de los niveles de esteroides sexuales.

La osteoporosis, una afección que afecta a hombres y mujeres, se asocia con una disminución de los andrógenos y los estrógenos. Se ha demostrado que los estrógenos disminuyen la velocidad de degradación del hueso, mientras que se ha demostrado que los andrógenos construyen masa ósea. Sin embargo, el tratamiento de sustitución de estrógenos comúnmente utilizado contra la osteoporosis requiere la adición de progestinas para contrarrestar la proliferación endometrial y el riesgo de cáncer de endometrio inducido por estrógenos. Además, puesto que se cree

que tanto los estrógenos como la progestina aumentan el riesgo de cáncer de mama (Bardon y col., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 60: 692-697, 1985; Colditz y col., *N. Engl. J. Med.*, 332: 1589-1593, 1995), el uso de un tratamiento de sustitución con estrógenos-progestina solo es aceptado por un limitado número de mujeres y, normalmente, durante periodos de tiempo demasiado cortos.

5 Un número de estudios sugieren que la osteoporosis es una manifestación clínica de la deficiencia de andrógenos en el hombre (Baran y col., *Calcif. Tissue Res.* 26: 103-106, 1978; Odell y Swerdloff, *West J. Med.* 124: 446-475, 1976; Smith y Walker, *Calif. Tissue Res.* 22 (Suppl.): 225-228, 1976). Se ha encontrado que la terapia con andrógenos, tal como se ha observado con decanoato de nandrolona, aumenta la densidad mineral ósea de las
10 vértebras en las mujeres postmenopáusicas (Need y col., *Arch. Intern. Med.*, 149: 57-60, 1989). El tratamiento de mujeres postmenopáusicas con nandrolona aumentó el contenido mineral óseo cortical (Need y col., *Clin. Orthop.* 225: 273-278, 1987). Se registraron, sin embargo, efectos secundarios androgénicos en un 50% de pacientes. Dichos datos son de interés ya que mientras casi todos los tratamientos actuales se limitan a una reducción de la pérdida de hueso, se encontró un aumento en la masa de hueso con el uso de nandrolona esteroide anabólica. Se ha sugerido una estimulación similar de la formación de hueso por andrógenos en un macho hipogonadal (Baran y col., *Calcif.*
15 *Tissue Res.* 26: 103, 1978). Labrie y col. (*J. Clin. Endocrinol.* 82: 3498-3505, 1997), notificaron una estimulación similar de la formación de hueso en mujeres postmenopáusicas tratadas con DHEA durante 12 meses.

DHEA (450 mg/kg de peso corporal, 3 veces a la semana) retrasó marcadamente la aparición de tumores de mama en ratones C3H, que se habían engendrado genéticamente para desarrollar cáncer de mama (Schwartz, *Cancer Res.* 39: 1129-1132, 1979). Además, se encontró que el riesgo de desarrollar cáncer de vejiga aumentaba en
20 hombres que tenían menores niveles de DHEA en suero (Gordon y col., *Cancer Res.* 51:1366-1369, 1991).

La Solicitud de Patente de los Estados Unidos U.S. 5.550.107 se refiere a un procedimiento para tratar el cáncer de mama y de endometrio en animales de sangre caliente susceptibles que puede incluir la inhibición de la secreción hormonal ovárica por medios quirúrgicos (ovariectomía) o medios químicos (uso de un agonista de LHRH, por ejemplo (D-Trp⁶, des-Gly-NH₂¹⁰)]LHRH etilamida, o un antagonista) como parte de un tratamiento combinado. Se describen los antiestrógenos, andrógenos, progestinas, inhibidores de la formación de esteroides sexuales (especialmente de la formación de esteroides sexuales catalizada por la 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa o la 17β-hidroxiesteroide aromataza), inhibidores de la secreción de prolactina y secreción de hormona del crecimiento y secreción de ACTH. Se ha publicado uno de sus homólogos en la publicación internacional número WO 90/10462.

Además, se han asociado las enfermedades cardiovasculares con la disminución de los niveles en suero de DHEA y DHEA-S y se ha sugerido que DHEA y DHEA-S evitan o tratan estas dolencias (Barrett-Connor y col., *N. Engl. J. Med.* 315: 1519-1524, 1986).

En ratas Sprague-Dawley adultas, Schwartz (en Kent, *Geriatrics* 37: 157-160, 1982) ha observado que el peso corporal se redujo desde 600 a 550 g por DHEA sin afectar a la ingesta de alimento. Schwartz (*Cancer Res.* 39: 1129-1132, 1979) observó que ratones C3H a los que se había administrado DHEA (450 mg/kg, 3 veces a la semana) ganaron significativamente menos peso y se hicieron más viejos que los animales del control, que tenían menos grasa corporal y eran más activos. Se consiguió la reducción del peso corporal sin pérdida del apetito o restricción de alimento. Además, DHEA podría evitar la ganancia de peso en animales engendrados para convertirse en obesos en la edad adulta (en Kent, *Geriatrics* 37: 157-160, 1982).

La administración de DHEA a ratas Zucker magras disminuyó el peso corporal a pesar del aumento de la ingesta de alimento. Los animales tratados tuvieron de esta manera bolsas de grasa más pequeñas, sugiriendo, globalmente, que DHEA aumenta el metabolismo de los alimentos, dando como resultado una menor ganancia de peso y acumulación de grasa (Svec y col., *Proc. 2ª Int. Conf. Cortisol and Anti-Cortisols*, Las Vegas, Nevada, EE.UU., p. 56 abstr., 1997).

Se encontró que la obesidad aumentaba en ratones mutantes A^{vy} (Yen y col., *Lipids* 12: 409-413, 1977) y en ratas Zucker (Clearly y Zisk, *Fed. Proc.* 42: 536, 1983). Ratones CH3 tratados con DHEA tuvieron una apariencia más juvenil que la de los controles (Schwartz, *Cancer Res.* 39: 1129-1132, 1979).

DHEA redujo la incidencia de aterosclerosis en conejos alimentados con colesterol (Gordon y col., *J. Clin. Invest.* 82: 712-730, 1988; Arad y col., *Arteriosclerosis* 9: 159-166, 1989). Además, se han notificado que elevadas concentraciones de DHEA-S en suero protegen frente a la muerte originada por enfermedades cardiovasculares en el hombre (Barrett-Connor y col., *N. Engl. J. Med.* 315: 1519-1524, 1986). Se ha encontrado de esta manera que los niveles en circulación de DHEA y DHEA-S están correlacionados de forma inversa con la mortalidad originada por enfermedad cardiovascular (Barrett-Connor y col., *N. Engl. J. Med.* 315: 1519-1524, 1986) y que disminuyen en paralelo con una disminución en la inmunocompetencia (Thoman y Weigle, *Adv. Immunol.* 46: 221-222, 1989). Un estudio en hombres ha mostrado una correlación inversa entre los niveles de DHEA-S y lipoproteínas de baja densidad (LDL) en suero fetal (Parker y col., *Science* 208: 512, 1980).

Los usos de DHEA, así como los beneficios del tratamiento con andrógenos y estrógenos se discuten en la Publicación de Patente Internacional WO 94/16709.

No se cree que las correlaciones observadas en la técnica anterior sugieran que el tratamiento o los procedimientos

profilácticos sean eficaces, o que estén exentos de efectos secundarios indeseables, como lo son los tratamientos combinados dados a conocer en la presente memoria.

Sumario de la invención

5 En consecuencia, un objeto de la presente invención es proporcionar tratamientos eficaces para y la reducción del riesgo de contraer sequedad vaginal minimizando a la vez los efectos secundarios indeseables.

Otro objeto es proporcionar kits y composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso en los anteriores procedimientos.

10 También se desvela un tratamiento o reducción del riesgo de contraer osteoporosis que comprende aumentar los niveles de un precursor de los esteroides sexuales seleccionado entre el grupo que consiste en deshidroepiandrosterona (DHEA), deshidroepiandrosterona-sulfato (DHEA-S) y androst-5-eno-3 β ,17 β diol (5-diol), en un paciente que necesita dicho tratamiento o dicha reducción y que comprende además administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador selectivo de los receptores de estrógenos (SERM) como parte de un tratamiento combinado.

15 También se desvela un tratamiento o reducción del riesgo de contraer hipercolesterolemia que comprende aumentar los niveles de un precursor de los esteroides sexuales seleccionado entre el grupo que consiste en deshidroepiandrosterona, deshidroepiandrosterona-sulfato y androst-5-eno-3 β ,17 β -diol, en un paciente que necesita dicho tratamiento o dicha reducción y que comprende además administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador selectivo de los receptores de estrógenos como parte de un tratamiento combinado.

20 También se desvela un procedimiento para tratar o reducir el riesgo de contraer hiperlipidemia, que comprende aumentar los niveles de un precursor de los esteroides sexuales seleccionado entre el grupo que consiste en deshidroepiandrosterona, deshidroepiandrosterona-sulfato y androst-5-eno-3 β ,17 β -diol, en un paciente que necesita dicho tratamiento o dicha reducción y que comprende además administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador selectivo de los receptores de estrógenos como parte de un tratamiento combinado.

25 También se desvela un procedimiento para tratar o reducir el riesgo de contraer aterosclerosis que comprende aumentar los niveles de un precursor de los esteroides sexuales seleccionado entre el grupo que consiste en deshidroepiandrosterona, deshidroepiandrosterona-sulfato y androst-5-eno-3 β ,17 β -diol, en un paciente que necesita dicho tratamiento o dicha reducción y que comprende además administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador selectivo de los receptores de estrógenos como parte de un tratamiento combinado.

30 También se desvela un procedimiento para tratar o reducir el riesgo de contraer cáncer de mama que comprende aumentar los niveles de un precursor de los esteroides sexuales seleccionado entre el grupo que consiste en deshidroepiandrosterona, deshidroepiandrosterona-sulfato y androst-5-eno-3 β ,17 β -diol, en un paciente que necesita dicho tratamiento o dicha reducción y que comprende además administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador selectivo de los receptores de estrógenos como parte de un tratamiento combinado.

35 También se desvela un procedimiento para tratar o reducir el riesgo de contraer cáncer endometrial que comprende aumentar los niveles de un precursor de los esteroides sexuales seleccionado entre el grupo que consiste en deshidroepiandrosterona, deshidroepiandrosterona-sulfato y androst-5-eno-3 β ,17 β -diol, en un paciente que necesita dicho tratamiento o dicha reducción y que comprende además administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador selectivo de los receptores de estrógenos como parte de un tratamiento combinado.

40 También se desvela un procedimiento para tratar o reducir el riesgo de contraer cáncer de útero que comprende aumentar los niveles de un precursor de los esteroides sexuales seleccionado entre el grupo que consiste en deshidroepiandrosterona, deshidroepiandrosterona-sulfato y androst-5-eno-3 β ,17 β -diol, en un paciente que necesita de dicho tratamiento o dicha reducción y que comprende además administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador selectivo de los receptores de estrógenos como parte de un tratamiento combinado.

45 También se desvela un procedimiento para tratar o reducir el riesgo de contraer cáncer de ovario que comprende aumentar los niveles de un precursor de los esteroides sexuales seleccionado entre el grupo que consiste en deshidroepiandrosterona, deshidroepiandrosterona-sulfato y androst-5-eno-3 β ,17 β -diol, en un paciente que necesita dicho tratamiento o dicha reducción y que comprende además administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador selectivo de los receptores de estrógenos como parte de un tratamiento combinado.

50 En otra realización, la invención proporciona un kit que comprende un primer envase que contiene una cantidad

terapéuticamente eficaz de al menos un precursor de los esteroides sexuales seleccionado entre el grupo que consiste en deshidroepiandrosterona, deshidroepiandrosterona-sulfato, androst-5-eno-3 β ,17 β -diol y cualquier profármaco que se convierte *in vivo* en cualquiera de los anteriores precursores y que comprende además un segundo envase que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un modulador selectivo de los receptores de andrógenos para su uso en el tratamiento o reducción del riesgo de contraer sequedad vaginal.

En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende:

a) un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, b) una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un precursor de los esteroides sexuales seleccionado entre el grupo que consiste en deshidroepiandrosterona, deshidroepiandrosterona-sulfato, androst-5-eno-3 β ,17 β -diol y un profármaco que se convierte *in vivo* en cualquiera de los precursores de los esteroides sexuales anteriores y c) una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un modulador selectivo de los receptores de estrógenos para el mismo uso que el kit anterior.

Tal como se usa en el presente documento, un modulador selectivo de los receptores de estrógenos (SERM) es un compuesto que, bien directamente o a través de sus metabolitos activos, actúa como un antagonista de los receptores de estrógenos ("antiestrógeno") en tejido de la mama, pero proporcionando un efecto estrogénico o de tipo estrógeno sobre el tejido óseo y sobre los niveles de colesterol en suero (es decir, reduciendo el colesterol en suero). Es probable que los compuestos no esteroideos que actúan como antagonistas de los receptores de estrógenos *in vitro* o en tejido de mama humano o de rata (especialmente si el compuesto actúa como un antiestrógeno sobre células de cáncer de mama humano) actúen como un SERM. De forma inversa, los antiestrógenos esteroideos tienden a no actuar como SERM debido a que tienden a no mostrar ningún efecto beneficioso sobre el colesterol en suero. Los antiestrógenos no esteroideos que han ensayado los inventores y que se ha encontrado que actúan como SERM incluyen EM-800, EM-01538, raloxifeno, tamoxifeno y droloxifeno. Los inventores han ensayado el antiestrógeno esteroideo ICI 182.780 y han encontrado que no actúa como los SERM. Los SERM de acuerdo con la invención se pueden administrar en las mismas dosis que se conocen en la técnica cuando estos compuestos se usan como antiestrógenos.

Los inventores han señalado también una correlación entre los efectos beneficiosos que los SERM tienen sobre el colesterol en suero y los efectos beneficiosos estrogénicos o de tipo estrogénico sobre el hueso y sobre los lípidos en suero. Se ha demostrado en la investigación de los inventores que los SERM actúan de forma beneficiosa sobre todos estos parámetros, incluyendo la masa ósea, el colesterol y los niveles de triglicéridos. Sin desear quedar ligar a teoría alguna, se cree que los SERM, muchos de los cuales tienen preferentemente dos anillos aromáticos unidos por de uno a dos átomos de carbono, interactúan con los receptores de estrógenos en virtud de la porción anterior de la molécula, que es la mejor reconocida por el receptor. Los SERM preferidos tienen cadenas secundarias que pueden dar lugar selectivamente a propiedades antagonicas en el tejido de la mama sin tener propiedades antagonicas significativas en otros tejidos. De esta manera, los SERM pueden actuar deseablemente como antiestrógenos en la mama aunque funcionen de forma sorprendente y deseable como estrógenos (o proporcionen una actividad de tipo estrogénico) en el hueso y en la sangre (en los que las concentraciones de lípidos y colesterol están favorablemente afectadas). El efecto favorable sobre el colesterol y el lípido se traduce en un efecto favorable frente a la aterosclerosis que se sabe que está adversamente afectada por niveles inadecuados de colesterol y lípidos.

La enfermedad tratada por la presente invención que se describen en el presente documento responde favorablemente a los andrógenos. En vez de utilizar los andrógenos per se, los solicitantes utilizan precursores de los esteroides sexuales tales como DHEA, DHEA-S, 5-diol, o profármacos convertidos en cualquiera de dichos precursores de los esteroides sexuales. *In vivo*, DHEA-S se convierte a DHEA, que a su vez se convierte en 5-diol. Se cree probable que cualquier tejido que responda favorablemente a uno de ellos también lo hará favorablemente a los demás. Son bien conocidas en la técnica las formas de profármacos de metabolitos activos. Véase, por ejemplo, H. Bundgaard "Design and Application of Prodrugs" (En: A Textbook of Drug Design and Development. Editado por H. Bundgaard y P. Krosggaard-Larsen; Harwood Academic Publishers GmbH, Chur: Suiza, 1991). En particular, véanse las páginas 154-155 que describen diversos grupos funcionales de metabolitos activos y los correspondientes grupos de profármacos adecuados que se convierten *in vivo* en cada grupo funcional. Si los niveles de un paciente de precursores de los esteroides sexuales se aumentan de acuerdo con la invención, esto se puede llevar a cabo de forma típica administrando este precursor o administrando un profármaco de dicho precursor. Mediante el uso de precursores en vez de andrógenos, se reduce la actividad androgénica indeseable en los tejidos diferentes del tejido diana. Los tejidos convierten los precursores, tales como DHEA en andrógenos solo a través de un proceso natural y más regulado. Un gran porcentaje de andrógenos se producen localmente en tejidos periféricos y en diferentes cantidades en los diferentes tejidos.

Los cánceres tratados como se divulga en la presente memoria responden adversamente a la actividad estrogénica. Por otra parte, la osteoporosis, la hipercolesterolemia, la hiperlipidemia y la aterosclerosis responden favorablemente a la actividad estrogénica o de tipo estrogénico. Utilizando los SERM, se proporcionan efectos deseables en tejidos diana sin efectos indeseables en algunos otros tejidos. Por ejemplo, un SERM puede tener un efecto estrogénico favorable en el hueso (o sobre los lípidos o el colesterol) evitando a la vez un efecto estrogénico no favorable en la mama.

De esta manera, tanto los precursores como el SERM proporcionan un efecto favorable en los tejidos diana a la vez que minimizan los efectos desfavorables en algunos otros tejidos. Además, existen sinergias sustanciales en la utilización de ambos conjuntamente de acuerdo con la invención. Por ejemplo, los estrógenos y los andrógenos proporcionan un efecto beneficioso frente a la osteoporosis mediante mecanismos diferentes (los estrógenos reducen la resorción ósea, los andrógenos contribuyen a la formación del hueso). La combinación proporciona al hueso efecto estrogénico o de tipo estrogénico a través de la actividad de SERM y proporciona también andrógenos beneficiosos a través de la conversión local de precursor a andrógeno en el hueso. Se cree también que el precursor proporciona estrógenos. Lo mismo es correcto en lo que respecta al control de lípidos o el colesterol (útil para tratar o evitar la aterosclerosis). Se proporciona una sinergia similar frente al cáncer de mama, de endometrio, de ovario o de útero, en donde el SERM proporciona un efecto antiestrogénico deseable y el precursor proporciona un efecto androgénico deseable (mitigándose cualquier conversión incidental de precursor a estrógeno mediante el antiestrogénico). Los efectos indeseables se mitigan también de manera sinérgica mediante la combinación. Para todas las enfermedades descritas en el presente documento, cualquier otro efecto sobre los tejidos mamarios que pueda ser el resultado de estrógenos producidos por el precursor (cuando el precursor se utiliza para promover efectos androgénicos de acuerdo con la invención) se mitiga por el efecto antiestrogénico del SERM en el tejido mamario.

En algunas realizaciones, se añaden progestinas para proporcionar un efecto androgénico adicional. Se pueden utilizar progestinas a las bajas dosificaciones conocidas en la técnica sin afectar adversamente a otros receptores diferentes de los receptores andrógenos (por ejemplo, receptores glucocorticoides). También están relativamente exentos de efectos secundarios androgénicos no deseados (tales como vello facial en pacientes mujeres).

Los SERM preferidos que se describen en la presente memoria se refieren a: (1) la enfermedad de la invención, (2) aplicaciones terapéuticas y profilácticas; y (3) a las composiciones y kits farmacéuticos preferidos.

En una realización, el precursor es DHEA.

En otra realización, el precursor es DHEA-S.

En otra realización, el precursor es 5-diol.

Un paciente que necesita el tratamiento o la reducción del riesgo del inicio de una enfermedad dada es aquel que ha sido diagnosticado con dicha enfermedad o aquel que es susceptible de contraer dicha enfermedad.

Excepto cuando se indica en contra, la dosificación preferida de los principios activos (concentraciones y modos de administración) de la presente invención es idéntica para los fines terapéuticos y profilácticos. La dosificación de cada componente activo descrito en el presente documento es la misma independientemente de la enfermedad que se está tratando (o de la enfermedad cuya probabilidad de inicio se está reduciendo).

Excepto cuando se indica en contra o cuando resulta evidente a partir del contexto, las dosificaciones en el presente documento se refieren al peso de los principios activos no afectado por los excipientes, diluyentes, vehículos u otros ingredientes farmacéuticos, aunque dichos ingredientes adicionales se incluyen deseablemente, tal como se muestra en los ejemplos en el presente documento. Cualquier forma de dosificación (cápsula, comprimido, inyección o similar) comúnmente utilizada en la industria farmacéutica es adecuada para el uso en el presente documento y los términos "excipiente", "diluyente", o "vehículo" incluyen dichos ingredientes no activos que se incluyen normalmente, junto con los principios activos en dichas formas de dosificación en la industria. Se pueden incluir, por ejemplo, cápsulas, píldoras, revestimientos entéricos, diluyentes o excipientes sólidos o líquidos, aromatizantes, conservantes típicos, o similares.

Todos los principios activos utilizados en cualquiera de los tratamientos descritos en el presente documento se pueden formular en composiciones farmacéuticas que incluyen también uno o más del resto de principios activos. De forma alternativa, cada uno se puede administrar por separado pero de forma suficientemente simultánea en el tiempo de tal manera que un paciente tenga eventualmente elevados niveles en sangre o que disfrute de otra forma de los beneficios de cada uno de los principios activos (o estrategias) simultáneamente. En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, por ejemplo, uno o más principios activos van a formularse en una única composición farmacéutica. En otras realizaciones de la presente invención, se proporciona un kit que incluye al menos dos envases separados en los que el contenido de al menos un envase difiere, de forma completa o en parte, del contenido de al menos un envase diferente con respecto a los principios activos contenidos en el primero.

Los tratamientos combinados descritos en el presente documento incluyen también el uso de un principio activo (de la combinación) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento (o la reducción del riesgo) de la enfermedad en cuestión en el que el tratamiento o la prevención incluye además otro principio activo de la combinación de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, en una realización, la presente invención proporciona el uso de SERM en la preparación de un medicamento para el uso, en combinación con un precursor de los esteroides sexuales seleccionado entre el grupo que consiste en DHEA, DHEA-S, 5-diol y los profármacos convertidos en cualquiera de los anteriores precursores del esteroides sexuales *in vivo*, en el tratamiento de o la reducción del riesgo de contraer sequedad vaginal. En otra realización, la presente invención proporciona el uso de un precursor de los esteroides sexuales seleccionado entre el grupo que consiste en DHEA, DHEA-S, 5-diol y los

profármacos convertidos en cualquiera de los anteriores precursores de los esteroides sexuales, *in vivo*, en la preparación de un medicamento para su uso, en combinación con un SERM, para el mismo tratamiento.

En una realización de la presente invención, DHEA no se utiliza como el precursor. En otra realización EM-800 no se usa como el SERM. En otra realización, la combinación de DHEA con EM-800 no se usa.

- 5 En una realización preferida, DHEA se utiliza en combinación con EM-1538.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1-10 no forman parte de la invención reivindicada.

10 La Figura 1 muestra el efecto del tratamiento con DHEA (10 mg, por vía percutánea, una vez al día) o EM-800 (75 µg, por vía oral, una vez al día) solo o en combinación durante 9 meses sobre la incidencia del carcinoma de mama inducido por DMBA en rata a lo largo de un periodo de observación de 279 días. Los datos se expresan como porcentaje del número total de animales de cada grupo.

15 La Figura 2 muestra el efecto del tratamiento con DHEA (10 mg, por vía percutánea, una vez al día) o EM-800 (75 µg, por vía oral, una vez al día) solo o en combinación durante 9 meses sobre un número promedio de animales por animal que porta el tumor (A) y sobre el tamaño promedio del tumor por rata que porta el tumor (B) a lo largo de un periodo de observación de 279 días. Los datos se expresan como los promedios ± EEM.

La Figura 3 muestra el efecto del tratamiento con DHEA (10 mg, por vía percutánea, una vez al día) o EM-800 (75 µg, por vía oral, una vez al día) solo o en combinación durante 9 meses sobre los niveles de triglicéridos en suero (A) y colesterol (B) en rata. Los datos se expresan como promedio ± EEM. **: P<0,01 experimental frente al control respectivo.

20 La Figura 4 muestra: A) el efecto de dosis crecientes de DHEA (0,3 mg, 1,0 mg o 3,0 mg) administradas por vía percutánea dos veces al día sobre el tamaño promedio del tumor ZR-75-1 en ratones lampiños sometidos a ovariectomía (OVX) suplementados con estrona. Los ratones OVX del control que recibieron el vehículo sólo se utilizaron como controles adicionales. El tamaño del tumor inicial se tomó como el 100%. DHEA se administró por vía percutánea (p.c.) en 0,02 ml de solución de 50% de etanol – 50% de propilenglicol sobre la piel del dorso. B) Efecto del tratamiento con dosis crecientes de DHEA o EM-800 solo o en combinación durante 9,5 meses sobre el peso del tumor ZR-75-1 en ratones lampiños OVX suplementados con estrona. **, p<0,01, tratados frente a los ratones OVX del control suplementados con estrona.

30 La Figura 5 muestra el efecto de dosis orales crecientes del antiestrógeno EM-800 (15 µg, 50 µg o 100 µg) (A) o de la administración por vía percutánea de dosis crecientes de DHEA (0,3, 1,0 o 3 mg) combinadas con EM-800 (15 µg) o EM-800 solo (B) durante 9,5 meses sobre el tamaño promedio del tumor ZR-75-1 en ratones lampiños sometidos a ovariectomía (OVX) suplementados con estrona. El tamaño del tumor inicial se tomó como el 100%. Los ratones OVX del control que recibieron el vehículo sólo se utilizaron como controles adicionales. Se administró estrona por vía subcutánea a la dosis de 0,5 µg una vez al día mientras que el DHEA se disolvió en 50% de etanol – 50% de propilenglicol y se aplicó sobre el área de la piel dorsal dos veces al día en un volumen de 0,02 ml. Se realizaron también comparaciones con animales OVX que recibieron el vehículo solo.

La Figura 6 muestra el efecto de un tratamiento de 12 meses con deshidroepiandrosterona (DHEA) sola o en combinación con flutamida o EM-800 sobre el volumen de hueso trabecular en ratas sometidas a ovariectomía. Se añadieron animales intactos como controles adicionales. Los datos se presentan como promedio ± EEM ** p<0,01 frente al control OVX.

40 La Figura 7 muestra el efecto de un tratamiento de 12 meses con deshidroepiandrosterona (DHEA) sola o en combinación con Flutamida o EM-800 sobre el número de trabéculas en ratas sometidas a ovariectomía. Se añadieron animales intactos como controles adicionales. Los datos se presentan como promedio ± EEM ** p < 0,01 frente al control OVX.

45 La Figura 8 muestra las metáfisis proximales de la tibia del control intacto (A), el control sometido a ovariectomía (B) y las ratas sometidas a ovariectomía tratadas con DHEA sola (C) o en combinación con flutamida (D) o EM-800 (E). Ha de señalarse la cantidad reducida de hueso trabecular (T) en animales del control sometidos a ovariectomía (B) y el significativo aumento en el volumen del hueso trabecular (T) inducido después de la administración de DHEA (C). La adición de flutamida a DHEA bloqueó parcialmente el efecto de DHEA sobre el volumen de hueso trabecular (D), mientras que la combinación de DHEA y EM-800 proporcionó protección completa frente a la pérdida de hueso asociada a ovariectomía. Tricoma de Masson-Goldner modificado, aumentos X80. T. Trabécula: GP: Placa de Crecimiento.

50 La Figura 9 muestra el efecto de dosis crecientes (0,01, 0,03, 0,1, 0,3 y 1 mg/kg) de EM-800, EM-1538 y raloxifeno (EM-1105) administradas por vía oral diariamente durante 4 días sobre el nivel del colesterol de una rata sometida a ovariectomía.

La Figura 10 muestra el efecto de un tratamiento de 34 semanas con deshidroepiandrosterona (DHEA) sola o en combinación con EM-1538 (EM-652.HCl) sobre la DMO de la columna dorsal en ratas sometidas a ovariectomía. Se añadieron animales intactos como controles adicionales. Los datos se presentan como promedio \pm EEM ** $p < 0,01$ frente al control OVX.

- 5 La Figura 11 muestra el efecto combinado del SERM (EM-652) y DHEA sobre los parámetros de la menopausia. No se esperaba efecto negativo.

La Figura 12 muestra la concentración en plasma de DHEA (ng/ml) (eje Y) en función del tiempo (eje X) después de una única absorción oral de los precursores de los esteroides sexuales preferidos de la presente invención (150 $\mu\text{mol/rata}$) en ratas macho. En el recuadro, se indica el AUC a 24 h de la DHEA inducida por estos compuestos.

EM-760	deshidroepiandrosterona
EM-900	androst-5-eno-3 β ,17 β -diol
EM-1304	androst-5-eno-3 β ,17 β -diol 3-acetato
EM-1305-CS	androst-5-eno-3 β ,17 β -diol diacetato
EM-1397	androst-5-eno-3 β ,17 β -diol 3 acetato 17 benzoato
EM-1400	androst-5-eno-3 β ,17 β -diol dibenzoato
EM-1410	androst-5-eno-3 β ,17 β -diol dipropionato
EM-1474-D	androst-5-eno-3 β ,17 β -diol dihemisuccinato

10

La Figura 13 muestra la concentración en plasma de androst-5-eno-3 β ,17 β -diol (ng/ml) (eje Y) en función del tiempo (eje X) después de una única absorción oral del precursor de los esteroides sexuales de la presente invención (150 $\mu\text{mol/rata}$) en ratas macho. En el recuadro, se indica el AUC a 24 h del androst-5-eno-3 β ,17 β -diol inducido por estos compuestos.

EM-760	deshidroepiandrosterona
EM-900	androst-5-eno-3 β ,17 β -diol
EM-1304	androst-5-eno-3 β ,17 β -diol 3-acetato
EM-1305-CS	androst-5-eno-3 β ,17 β -diol diacetato
EM-1397	androst-5-eno-3 β ,17 β -diol 3 acetato 17 benzoato
EM-1400	androst-5-eno-3 β ,17 β -diol dibenzoato
EM-1410	androst-5-eno-3 β ,17 β -diol dipropionato
EM-1474-D	androst-5-eno-3 β ,17 β -diol dihemisuccinato

15

Descripción detallada de la invención

Es bien conocido que los estrógenos estimulan la proliferación de células epiteliales mamarias y se piensa que la propia proliferación celular aumenta el riesgo de cáncer por la acumulación de errores genéticos aleatorios que pueden dar como resultado neoplasia (Preston Martin y col, Cancer. Res. 50: 7415-21, 1990). Basándose en este concepto, se han introducido antiestrógenos para evitar el cáncer de mama con el objetivo de reducir la velocidad de la división celular estimulada por estrógenos.

La pérdida de la ciclicidad ovárica que aparece en ratas Sprague-Dawley hembras a los 10 meses de edad está acompañada por el aumento de los niveles de estrógenos y prolactina en suero y la disminución de las concentraciones de andrógenos y progesterona en suero (Lu y col., 61^a Annual Meeting of the Endocrine Society 106 (abst n° 134), 1979; Tang y col., Biol Reprod. 31: 399-413, 1984; Russo y col, Monographs on Pathology of Laborator y Animals: Integument and Mammar y Glands 252-266, 1989; Sortino y Wise, Endocrinology 124: 90-96, 1989; Cardy, Vet Pathol. 28: 139-145, 1991). Estos cambios hormonales que se producen de forma espontánea en las ratas hembras adultas están asociados con la proliferación multifocal y el aumento de la actividad secretoria del tejido acinar/alveolar así como la dilatación del conducto de la glándula mamaria y la formación de quistes (Boorman y col., 433, 1990; Cardy, Vet Pathol. 28: 139-145, 1991). Debe mencionarse que los cambios hiperplásicos y neoplásicos de la glándula mamaria de rata están a menudo acompañados por niveles crecientes de estrógenos y prolactina (Meites, J. Neural. Transm. 48: 25-42, 1980). El tratamiento con EM-800, un SERM de la presente invención, induce la atrofia de la glándula mamaria que está caracterizada por una disminución en el tamaño y el número de las estructuras lobulares y no existen evidencias de actividad secretora, lo que indica la potente actividad antiestrogénica de EM-800 en la glándula mamaria (Luo y col. Endocrinology 138: 4435-4444, 1997).

El tratamiento con DHEA, un precursor de los esteroides sexuales de la presente invención, conduce a una elevación de DHEA y 5-diol en suero mientras que los niveles de 4-diona, testosterona, dihidrotestosterona y estradiol en suero aumentan sólo moderadamente, o más a menudo permanecen sin cambios, confirmando de esta manera la biotransformación intracelular de este precursor de esteroides en los tejidos periféricos (Labrie y col., Mol.

Cell. Endocrinol. 78: C113-C118, 1991). Sin embargo, el efecto estimulador de los DHEA administrados por vía oral sobre los andrógenos en suero, tales como testosterona y dihidrotestosterona, es de mayor amplitud que el efecto sobre los estrógenos en suero, sugiriendo de esta manera que DHEA se transforma predominantemente en andrógenos en estos animales. Esta observación está de acuerdo con los datos obtenidos en mujeres en las que la formación de andrógenos a partir de DHEA fue una ruta más importante que la conversión de DHEA en estrógenos (Morales y col., J. Clin. Endocrinol. Metab. 78: 1360-1367, 1994; Labrie y col., Ann. N. Y. Acad. Sci. 774: 16-28, 1995; Labrie y col., Steroids 62: 148-158, 1997).

Con el conocimiento de la potente actividad antiestrogénica anteriormente descrita que da como resultado la atrofia de la glándula mamaria y el efecto androgénico predominante de DHEA sobre la glándula mamaria, los cambios histomorfológicos observados en animales tratados con la combinación de un SERM y un precursor de los esteroides sexuales se explican mejor mediante una acción androgénica sin oposición de la DHEA en la glándula mamaria de rata.

De forma más importante, se ha observado que los andrógenos ejercen una actividad antiproliferativa directa sobre el crecimiento de células ZR-75-1 de cáncer de mama humano *in vitro* y que dicho efecto inhibitorio de los andrógenos es aditivo al de un antiestrógeno (Poulin y Labrie, Cancer Res. 46: 4933-4937, 1986; Poulin y col., Breast Cancer Res. Treat. 12: 213-225, 1988). Se han observado efectos inhibidores similares *in vivo* en xenoinjertos de ZR-75-1 en ratones lampiños (Dauvois y col., Cancer Res. 51: 3131-3135, 1991). Los andrógenos también han demostrado inhibir el crecimiento del carcinoma mamario inducido por DMBA en rata, invirtiéndose esta inhibición mediante la administración simultánea del antiandrógeno flutamida puro (Dauvois y col., Breast Cancer Res. Treat. 14: 299-306, 1989). Tomados en conjunto, los datos indican la implicación del receptor de andrógenos en la acción inhibitoria de DHEA sobre el cáncer de mama.

Debido a que los antiestrógenos y los precursores de los esteroides sexuales ejercen efectos inhibidores sobre el cáncer de mama mediante diferentes mecanismos, la presente invención muestra que la combinación de un SERM (EM-800) y un precursor de los esteroides sexuales (DHEA) ejerce un efecto inhibitorio más potente que cada compuesto utilizado solo sobre el desarrollo del carcinoma mamario de rata inducido por DMBA, tal como se ilustra en las Figuras 1 y 2. De hecho, al finalizar el experimento, no se encontró ningún tumor inducido por DMBA en animales que habían recibido DHEA y EM-800.

La presente divulgación describe que la combinación de un precursor de los esteroides sexuales (DHEA) y un SERM (EM-800) mantuvo el efecto estimulador de DHEA sobre la formación del hueso y potenció el efecto inhibitorio del SERM (EM-800) solo sobre la renovación y la resorción del hueso tal como se demostró por las disminuciones adicionales de hidroxiprolina en orina y la excreción de calcio cuando se combinaron ambos compuestos.

Los inventores han mostrado que DHEA tiene efectos beneficiosos sobre el hueso en ratas hembras (Luo y col., Endocrinology 138: 4435-4444, 1997) y mujeres postmenopáusicas (Labrie y col., J. Clin. Endocrinol. Metab. 82: 3498-3505, 1997). De esta manera, en ratas hembras intactas, el tratamiento con DHEA aumenta la densidad mineral ósea (DMO) del esqueleto total, la columna lumbar y el fémur (Luo y col., Endocrinology 138: 4435-4444, 1997).

Por otra parte, el tratamiento con EM-800 no tuvo efectos significativos sobre la DMO en animales intactos aunque se observaron potentes efectos estimuladores en las ratas sometidas a ovariectomía (Marbel y col., datos no publicados). Debido a que EM-800 ejerce dichos efectos estimuladores sobre la DMO de todo el esqueleto, la columna lumbar y el fémur en ratas sometidas a ovariectomía, la ausencia de efecto estimulador significativo de EM-800 en animales intactos podría deberse al hecho de que los esteroides sexuales presentes en ratas hembras intactas ejercen un efecto máximo sobre la DMO (Luo y col., Endocrinology 138: 4435-4444, 1997). De forma similar, la ausencia de efecto significativo de EM-800 en ratas sometidas a ovariectomía ya en tratamiento con DHEA se debe probablemente a los efectos estimuladores máximos ejercidos por los andrógenos (y posiblemente por los estrógenos) sintetizados en los osteocitos a partir de la DHEA exógena.

Los estrógenos son conocidos porque disminuyen el colesterol en suero pero aumentan o no tienen efecto sobre los niveles de triglicéridos en suero (Love y col., Ann. Intern. Med. 115: 860-864, 1991; Walsh y col., New Engl. J. Med. 325: 1196-1204, 1991; Barrett-Connor, Am. J. Med. 95 (Suppl 5A) : 40S-43S, 1993; Russell y col., Atherosclerosis 100: 113-122, 1993; Black y col., J. Clin. Invest. 93: 63-69, 1994; Dipippo y col., Endocrinology 136: 1020-1033, 1995; Ke y col., Endocrinology 136: 2435-2441, 1995). La Figura 3 muestra que EM-800 posee efectos hipocolesterolemiantes e hipotrigliceridemiantes en la rata, mostrando de esta manera su acción única sobre el perfil lípido en suero que es aparentemente diferente de otros SERM, tales como tamoxifeno (Bruning y col., Br. J. Cancer 58: 497-499, 1988; Love y col., J. Natl. Cancer Inst. 82: 1327-1332, 1990; Dipippo y col., Endocrinology 136: 1020-1033, 1995; Ke y col., Endocrinology 136: 2435-2441, 1995), droloxifeno (Ke y col., Endocrinology 136: 2435-2441, 1995) y raloxifeno (Black y col., J. Clin. Invest. 93: 63-69, 1994). La combinación de DHEA y EM-800 preservó los efectos hipocolesterolemiantes e hipotrigliceridemiantes de EM-800, sugiriendo de esta manera que dicha combinación podría ejercer efectos beneficiosos sobre los lípidos en suero.

Debe mencionarse que el perfil lípido en suero es marcadamente diferente entre ratas y seres humanos. Sin embargo, debido a que un mecanismo mediado por los receptores de estrógenos está implicado en el efecto

hipocolesterolemiante de los estrógenos así como de los antiestrógenos (Lundeen y col., Endocrinology 138: 1552-1558, 1997), la rata sigue siendo un modelo útil para estudiar el efecto de disminución del colesterol de los estrógenos y los "antiestrógenos" en seres humanos.

5 De forma breve, los datos anteriormente descritos demuestran claramente los efectos de combinar un SERM (EM800) y un precursor de los esteroides sexuales (DHEA) sobre el desarrollo del carcinoma mamario inducido por DMBA así como los efectos protectores de dicha combinación sobre la masa ósea y los lípidos en suero. Dichos datos sugieren los efectos beneficiosos adicionales de dicha combinación para el tratamiento y la prevención de la osteoporosis mejorando a la vez el perfil lipídico.

10 Los inventores han estudiado también la potencial interacción del efecto inhibitor del novedoso antiestrógeno (EM800) con la del precursor de los esteroides sexuales (DHEA) sobre el crecimiento de los xenoinjertos de cáncer de mama ZR-75-1 humano en ratones lampiños mediante la administración combinada de dos fármacos. Las Figuras 4 y 5 muestran que DHEA, por sí mismo, a las dosis utilizadas, produce de un 50 a un 80% de inhibición del crecimiento tumoral mientras que la inhibición casi completa del crecimiento tumoral alcanzada con una dosis baja del antiestrógeno no se vio afectada por la DHEA.

15 Se conocen bien las limitaciones de las medidas de la densidad mineral ósea (DMO). Como ejemplo, las medidas de la DMO no mostraron cambios en las ratas tratadas con el antiestrógeno esteroideo ICI 182780 (Wakeling, Breast Cancer Res. Treat. 25:1-9, 1993) mientras que se observaron cambios inhibitorios mediante histomorfometría (Gallagher y col., Endocrinology 133: 2787-2791, 1993). Se notificaron diferencias similares con tamoxifeno (Jordan y col., Breast Cancer Res. Treat. 10: 31-35, 1987; Sibonga y col., Breast Cancer Res. Treat 41: 71-79, 1996).

20 Debe indicarse que una reducción en la densidad mineral del hueso no es la única anomalía asociada con una resistencia reducida del hueso. (Directrices para la evaluación preclínica y clínica de los agentes utilizados en la prevención o el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica, División de metabolismo y Productos Farmacéuticos Endocrinos, FDA, Mayo de 1994). Es por ello importante analizar los cambios en los parámetros bioquímicos del metabolismo óseo inducidos por diversos componentes y tratamientos con el fin de adquirir un mejor conocimiento de su acción.

25 Es particularmente importante indicar que la combinación de DHEA y EM-800 ejerció efectos beneficiosos inesperados sobre importantes parámetros bioquímicos del metabolismo óseo. De hecho, DHEA solo no afecta a la relación de hidroxiprolina/creatinina en orina, un marcador de la resorción ósea. Además, no se ha podido detectar el efecto de DHEA sobre la excreción de calcio o fósforo urinario diaria (Luo y col., Endocrinology 138: 4435-4444, 1997). EM-800, por otra parte, disminuyó la relación de hidroxiprolina/creatinina de la orina en un 48%, mientras que, de forma similar a DHEA, no se observó efecto de EM-800 sobre la excreción de calcio o fósforo urinario. Más aún, EM-800 no tuvo efecto sobre la actividad de la fosfatasa alcalina en suero, como marcador de la resorción ósea mientras que DHEA aumentó el valor del parámetro en aproximadamente un 75% (Luo y col., Endocrinology 138: 4435-4444, 1997).

35 Uno de los efectos inesperados de la combinación de DHEA y EM-800 se refiere a la relación de hidroxiprolina/creatinina en orina, un marcador de la resorción ósea, que se redujo en un 69% cuando se combinaron DHEA y EM-800, siendo este valor estadísticamente diferente ($p < 0,01$) de la inhibición del 48% alcanzada por EM-800 solo mientras que DHEA solo no muestra ningún efecto. De esta manera, la adición de DHEA a EM-800 aumenta en un 50% el efecto inhibitor de EM-800 sobre la reabsorción del hueso. Lo más importante, otro efecto inesperado de la adición de DHEA a EM-800 fue una disminución de aproximadamente el 84% en el calcio urinario (desde $23,17 \pm 1,55$ a $3,71 \pm 0,75 \mu\text{mol}/24 \text{ h}/100 \text{ g}$ ($p < 0,01$)) y una disminución del 55% en el fósforo urinario (desde $132,72 \pm 6,08$ a $59,06 \pm 4,76 \mu\text{mol}/24 \text{ h}/100 \text{ g}$ ($p < 0,01$)) respectivamente, (Luo y col., Endocrinology 138: 4435-4444, 1997).

Tabla 1

GRUPO	ORINA			SUERO
	CALCIO ($\mu\text{mol}/24\text{h}/100\text{g}$)	FÓSFORO ($\mu\text{mol}/24\text{h}/100\text{g}$)	HP/Cr ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)	tALP (UI/l)
CONTROL	$23,17 \pm 1,55$	$132,72 \pm 6,08$	$13,04 \pm 2,19$	$114,25 \pm 14,04$
DHEA (10 mg)	$25,87 \pm 3,54$	$151,41 \pm 14,57$	$14,02 \pm 1,59$	$198,38 \pm 30,76^*$
EM-800 (75 μg)	$17,44 \pm 4,5$	$102,03 \pm 25,13$	$6,81 \pm 0,84^{**}$	$114,11 \pm 11,26$
HEA + EM-800	$3,71 \pm 0,75^{**}$	$59,06 \pm 4,76^{**}$	$4,06 \pm 0,28^{**}$	$204,38 \pm 14,20^{**}$

45 Es también de interés señalar que el potente efecto inhibitor de EM-800 sobre el colesterol en suero no se evita mediante el tratamiento simultáneo con DHEA (Luo y col., Endocrinology 138: 445-4444, 1997).

Aunque raloxifeno y los compuestos similares evitan la pérdida de hueso y disminuyen el colesterol en el suero

(como los estrógenos), debe mencionarse que cuando se comparó raloxifeno con premarina para la DMO, el efecto de raloxifeno sobre la DMO fue menos potente que el de premarina (Actas del Comité Consultor sobre fármacos y metabolismo, FDA, jueves, Reunión nº 68, 20 de noviembre de 1997). Como se conocen bien los efectos adversos sobre el cáncer de mama y de útero, la adición de un estrógeno a raloxifeno, EM-800 u otros compuestos similares, no es una solución aceptable.

Los presentes resultados obtenidos en la rata demuestran con claridad que DHEA puede proporcionar los efectos beneficiosos que están ausentes con el uso de un modulador selectivo de los receptores de estrógenos (SERM) solo, tal como EM-800, raloxifeno, etc. Aunque un SERM tiene efectos limitados sobre la inhibición de la resorción ósea, se cree que la adición de DHEA, 5-diol, DHEA-S estimula la formación del hueso (un efecto que no se encuentra con un SERM o un estrógeno) y reduce adicionalmente la resorción ósea por encima del efecto alcanzado con EM-800.

De forma importante, la combinación de EM-800 y DHEA en ratas sometidas a ovariectomía tratadas durante 12 meses tiene efectos beneficiosos sobre la morfometría ósea. El volumen del hueso trabecular es particularmente importante para la resistencia del hueso y para evitar las fracturas óseas. De esta manera, en el estudio anteriormente mencionado, el volumen del hueso trabecular de la tibia aumentó desde $4,1 \pm 0,7\%$ en ratas sometidas a ovariectomía a $11,9 \pm 0,6\%$ ($p < 0,01$) con DHEA solo, mientras que la adición de EM-800 a DHEA aumentó adicionalmente el volumen del hueso trabecular hasta $14,7 \pm 1,4\%$, un valor similar al que se encuentra en los controles intactos (Fig. 6).

A partir de un valor de $0,57 \pm 0,08$ por mm en ratas sometidas a ovariectomía, el tratamiento con DHEA dio como resultado un aumento del 137% en el número del hueso trabecular en comparación con los controles sometidos a ovariectomía. El efecto estimulador de DHEA alcanzó de esta manera $1,27 \pm 0,1$ por mm mientras que el tratamiento simultáneo con EM-800 y DHEA dio como resultado un aumento de un 28% adicional en el número del hueso trabecular ($p < 0,01$) en comparación con el alcanzado por DHEA solo (Fig. 7). De forma similar, la adición de EM800 al tratamiento con DHEA dio como resultado una disminución adicional del 15% ($p < 0,05$) en la separación del hueso trabecular, en comparación con la alcanzada con DHEA solo, conduciendo de esta manera a valores no diferentes de los observados en los controles intactos.

Como complemento de los datos numéricos presentados en las figuras 6 y 7, la figura 8 ilustra el aumento en el volumen del hueso trabecular en la metafisis proximal de la tibia inducido por DHEA en animales tratados sometidos a ovariectomía (C) en comparación con los controles sometidos a ovariectomía (B), así como la inhibición parcial del efecto estimulador de DHEA tras la adición de flutamida al tratamiento con DHEA (D). Por otra parte, la administración de DHEA en combinación con EM-800 dio como resultado una prevención completa de la osteopenia inducida por ovariectomía (E), siendo el volumen del hueso trabecular comparable al observado en los controles intactos (A).

Se cree que la pérdida de hueso observada durante la menopausia en mujeres está relacionada con un aumento en la velocidad de la resorción ósea que no está completamente compensado por el aumento secundario en la formación de hueso. De hecho, los parámetros de la formación de hueso y la resorción ósea están aumentados en la osteoporosis y la resorción y la formación de hueso quedan inhibidas por el tratamiento de sustitución de estrógenos. Se cree por tanto que el efecto inhibitorio de la sustitución de estrógenos sobre la formación del hueso es el resultado de un mecanismo acoplado entre la resorción ósea y la formación de hueso, de tal manera que la reducción primaria inducida por estrógeno en la resorción ósea entraña una reducción en la formación de hueso (Parfitt, *Calcified Tissue International* 36 Suppl. 1: S37-S45, 1984).

La resistencia del hueso esponjoso y la posterior resistencia a la fractura no dependen solo de la cantidad total de hueso esponjoso sino también de la microestructura trabecular, tal como se ha determinado por el número, tamaño y distribución de las trabéculas. La pérdida de la función ovárica en mujeres postmenopáusicas está acompañada por una significativa disminución en el volumen total del hueso trabecular (Melsen y col., *Acta Pathologica & Microbiologica Scandinavia* 86: 70-81, 1978; Vakamatsou y col., *Calcified Tissue International* 37: 594-597, 1985), relacionada principalmente con una disminución en el número y, en menor grado, en la anchura de las trabéculas (Weinstein y Hutson, *Bone* 8: 137-142, 1987).

En el presente estudio, se observó un efecto estimulador androgénico de DHEA para casi todos los parámetros histomorfométricos óseos estudiados. DHEA dio como resultado por tanto un aumento significativo en el volumen del hueso trabecular así como en el número de trabéculas, a la vez que disminuía el área intertrabecular.

Con el fin de facilitar el aspecto del tratamiento combinado de la presente invención, para la indicación descrita en el presente documento, la presente invención contempla composiciones farmacéuticas que incluyen el compuesto SERM y el precursor de los esteroides sexuales (DHEA, DHEAS, 5-diol) en una única composición para la administración simultánea. La composición puede ser adecuada para la administración de cualquier manera tradicional, incluyendo pero sin limitarse a la administración oral, la inyección subcutánea, la inyección intramuscular o la administración percutánea. En otras realizaciones, se proporciona un kit en el que el kit incluye uno o más SERM y precursores de los esteroides sexuales en envases separados o en el mismo envase. El kit puede incluir materiales adecuados para la administración oral, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, jarabes y similares y para la

administración transdérmica, por ejemplo, pomadas, lociones, geles, cremas, parches de liberación sostenida y similares.

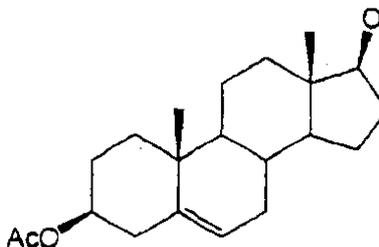
Los solicitantes creen que la administración de los SERM y de los precursores de los esteroides sexuales tiene utilidad en el tratamiento y/o la prevención del desarrollo de la osteoporosis, cáncer de mama, hipercolesterolemia, hiperlipidemia o aterosclerosis. Los principios activos (tanto el SERM como el precursor) pueden formularse y administrarse en una variedad de maneras.

El principio activo para la administración transdérmica o transmucosal está preferentemente presente de 0,5% a 20% en peso con respecto al peso total de la composición farmacéutica, de forma más preferible entre 2 y 10%. DHEA o 5-diol deben estar a una concentración de al menos 7% para la administración percutánea. De forma alternativa, el principio activo puede colocarse en un parche transdérmico que tiene las estructuras conocidas en la técnica, por ejemplo, estructuras tales como las que se muestran en la Patente E.P. N° 0279982.

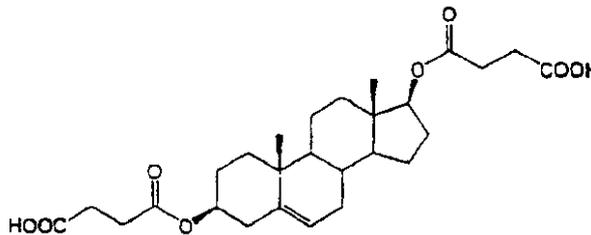
Cuando se formula como pomada, loción, gel o crema o similar, el principio activo se premezcla con un vehículo adecuado que es compatible con la piel o la mucosa humana y que potencia la penetración transdérmica del compuesto a través de la piel o la mucosa. Se conocen en la técnica vehículos adecuados e incluyen, pero no se limitan a Klucel HF y Glaxal base. Algunos están comercialmente disponibles, por ejemplo, Glaxal base está disponible de Glaxal Canada Limited Company. Se pueden encontrar otros vehículos adecuados en Koller y Buri, S.T.P. Pharma 3 (2), 115-124, 1987. El vehículo es preferentemente aquel en el que el principio o los principios activos son solubles a temperatura ambiente a la concentración en que se usa el principio activo. El vehículo debe tener viscosidad suficiente para mantener el inhibidor sobre una zona localizada de la piel o la mucosa a la cual se ha aplicado la composición, sin disiparse o evaporarse durante un periodo de tiempo suficiente para permitir una penetración sustancial del precursor a través de la zona localizada de la piel o la mucosa y hasta el torrente sanguíneo en el que producirá un efecto clínico deseable. El vehículo es normalmente una mezcla de varios componentes, por ejemplo, disolventes farmacéuticamente aceptables y un agente espesante. Una mezcla de disolventes orgánicos e inorgánicos puede ayudar a la solubilidad hidrófila y lipófila, por ejemplo, agua y un alcohol tal como etanol.

Los precursores de los esteroides sexuales preferidos son deshidroepiandrosterona (DHEA) (disponible de Diosynth Inc., Chicago, Illinois, EE.UU.), sus profármacos (disponibles de Steraloids, Wilton, New Hampshire, EE.UU.), 5androsteno-3 β ,17 β -diol y sus profármacos EM-1304 y EM-01474-D (disponibles de Steraloids, Wilton, New Hampshire EE.UU.)

EM-1304



EM-01474-D



Se prefiere que el precursor de los esteroides sexuales se formule como un gel alcohólico que contenga un 2,0 a un 10% de triglicérido caprílico cáprico (Neobee M-5), 10 a 20% de hexilenglicol; 2,0 a 10% de monometiléter de dietilenglicol (Transutol) ; 2,0 a 10% de cicloticona (Dow Corning 345); 1,0 a 2% de alcohol bencílico y 1,0 a 5,0 de hidroxipropilcelulosa (Klucel HF).

El vehículo puede incluir también diversos aditivos comúnmente utilizados en pomadas y lociones y bien conocidos en las técnicas cosméticas y médicas. Por ejemplo, pueden estar presentes fragancias, antioxidantes, perfumes, agentes gelificantes, agentes espesantes tales como carboximetilcelulosa, tensioactivos, emolientes, agentes colorantes y otros agentes similares. Cuando se usa para tratar enfermedades sistémicas, el sitio de la aplicación sobre la piel debe cambiarse a fin de evitar una concentración local en exceso del principio activo y una posible sobreestimulación de la piel y las glándulas sebáceas por los metabolitos androgénicos del precursor de los esteroides sexuales.

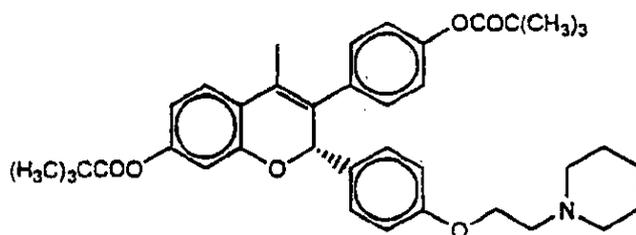
- 5 En una composición farmacéutica para la administración oral, DHEA u otro precursor está preferentemente presente en una concentración entre 5 y 98% en peso relativo al peso total de la composición, de forma más preferible entre 50 y 98 por ciento, especialmente entre 80 y 98 por ciento. Un único precursor tal como DHEA, puede ser el único precursor presente, o de forma alternativa, se puede utilizar una pluralidad de precursores y/o sus análogos (por ejemplo, una combinación de DHEA, DHEA-S, 5-diol, o una combinación de dos o más compuestos convertidos *in vivo* a DHEA, DHEA-S o 5-diol o una combinación de DHEA o 5-diol y uno o más de sus análogos que se convierten a DHEA o 5-diol *in vivo*, etc.). El nivel en sangre de DHEA es el criterio final de la dosificación adecuada que tiene en cuenta la variación individual en la absorción y el metabolismo.
- 10 Preferentemente, el médico a cargo del paciente vigilará, especialmente al comienzo del tratamiento, la respuesta global de un paciente individual y los niveles en suero de DHEA (en comparación con las concentraciones en suero preferida descritas anteriormente) y controlará la respuesta global del paciente al tratamiento, ajustando las dosificaciones según sea necesario cuando el metabolismo o la reacción al tratamiento de un paciente dado es atípica.
- 15 El tratamiento de acuerdo con la presente invención es adecuado para una continuación indefinida. Se espera que el tratamiento de DHEA y/o 5-diol mantendrá sencillamente los niveles de DHEA en un intervalo similar al que se produce naturalmente en mujeres antes de la menopausia (concentración en suero entre 4 y 10 microgramos por litro), o naturalmente en hombres adultos jóvenes (concentración en suero entre 4 y 10 microgramos por litro).
- 20 El compuesto SERM y/o el precursor de los esteroides sexuales se pueden administrar también por vía oral y se pueden formular con excipientes farmacéuticos convencionales, por ejemplo, lactosa seca por pulverización, celulosa microcristalina y estearato de magnesio en comprimidos o cápsulas para la administración oral.
- 25 El principio activo puede convertirse en comprimidos o núcleos de grageas, mezclándose con sustancias de vehículos sólidos o pulverulentos, tales como citrato de sodio, carbonato de calcio o fosfato dicálcico y aglutinantes tales como polivinilpirrolidona, gelatina o derivados de celulosa, posiblemente, añadiendo también lubricantes tales como estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio, "Carbowax" o polietilenglicol. Se pueden añadir, por supuesto, sustancias mejoradoras del sabor en el caso de formas de administración oral.
- 30 Como formas adicionales, se pueden usar cápsulas conectables, por ejemplo, de gelatina dura, así como cápsulas de gelatina blanda encerrada que comprenden un suavizante o plastificante, por ejemplo, glicerina. Las cápsulas conectables contienen preferentemente el principio activo en forma de granulado, por ejemplo, en una mezcla con cargas, tales como lactosa, sacarosa, manitol, almidones, tales como almidón de patata o amilopectina, derivados de celulosa o ácidos silícicos muy dispersos. En las cápsulas de gelatina blanda, el principio activo se disuelve o suspende preferentemente en líquidos adecuados, tales como aceites vegetales o polietilenglicoles líquidos.
- 35 La loción, pomada, gel o crema deben frotarse vigorosamente en la piel con el fin de que no exista un exceso evidente visible y la piel de esa región no se debe lavar hasta que se haya producido la mayor parte de penetración transdérmica preferentemente tras al menos 4 horas y, de forma más preferible, al menos 6 horas.
- 40 Se puede usar un parche transdérmico para administrar el precursor de acuerdo con técnicas conocidas. Se aplica normalmente durante un periodo mucho más largo, por ejemplo, 1 a 4 días, pero normalmente se pone en contacto el principio activo con un área superficial más pequeña, permitiendo una liberación del principio activo lenta y constante.
- 45 Numerosos sistemas transdérmicos de administración de fármacos que se han desarrollado y están en uso, son adecuados para administrar el principio activo de la presente invención. La velocidad de liberación está controlada normalmente por una matriz de difusión, o mediante el paso del principio activo a través de una membrana de control.
- 50 Los aspectos mecánicos de los dispositivos transdérmicos son bien conocidos en la técnica y se explican, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos 5.162.037. 5.154.922. 5.135.480. 4.666.441. 4.624.665. 3.742.951. 3.797.444. 4.568.343. 5.064.654. 5.071.644. 5.071.657. Se proporciona un antecedente adicional en la Patente Europea 0279982 y en la solicitud de patente británica 2185187.
- 55 El dispositivo puede ser cualquiera de los tipos generales conocidos en la técnica, incluyendo la matriz adhesiva y los dispositivos de administración transdérmica de tipo depósito. El dispositivo puede incluir matrices que contienen fármacos que incorporan fibras que absorben el principio activo y/o el vehículo. En un dispositivo de tipo depósito, el depósito puede definirse por una membrana polimérica impermeable para el vehículo y para el principio activo.
- En un dispositivo transdérmico, el propio dispositivo mantiene el principio activo en contacto con la superficie de la piel localizada deseada. En un dispositivo de ese tipo, la viscosidad del vehículo para el principio activo es de menos preocupación que con una crema o gel. Un sistema disolvente para un dispositivo transdérmico puede incluir, por ejemplo, ácido oleico, alcohol lactato lineal y dipropilenglicol, u otros sistemas disolventes conocidos en la técnica. El principio activo se puede disolver o suspender en el vehículo.
- Para la unión a la piel, se puede montar un parche transdérmico sobre una cinta adhesiva quirúrgica que tenga un

5 orificio perforado en el centro. El adhesivo está preferentemente cubierto por un revestimiento despegable para protegerlo antes del uso. El material típico adecuado para la liberación incluye polietileno y papel revestido de polietileno y preferentemente revestido de silicona para facilitar la retirada. Para aplicar el dispositivo, el revestimiento despegable simplemente se despega y el adhesivo se une a la piel del paciente. En la patente de los Estados Unidos 5.135.4800, Bannon y col. describen un dispositivo alternativo que tiene un medio no adhesivo para asegurar el dispositivo a la piel.

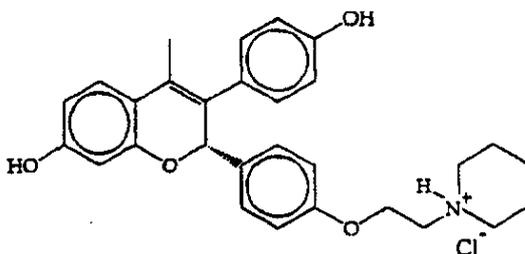
Se puede usar también el sistema de administración percutánea o transmucosal como un novedoso sistema de administración mejorado para la prevención y/o el tratamiento de la osteoporosis u otras enfermedades que responden favorablemente al tratamiento con andrógenos y/o estrógenos.

10 Un modulador selectivo de los receptores de estrógenos de la presente invención tiene una fórmula molecular con las siguientes características. a) dos anillos aromáticos separados por de 1 a 2 átomos de carbono intervinientes, pudiendo estar ambos anillos aromáticos sin sustituir o sustituidos por un grupo hidroxilo o un grupo convertido *in vivo* en hidroxilo; y b) una cadena secundaria que posee un anillo aromático y una función de amina terciaria o una sal de la misma.

15 Un SERM preferido de la invención es el EM-800 descrito en el documento PCT/CA96/00097 (documento WO 96/26201). La estructura molecular de EM-800 es:



El SERM de la presente invención es EM-01538:



20 EM-1538 (también denominado EM-652.HCl) es la sal de clorhidrato del potente antiestrógeno EM-652. En comparación con EM-800, EM-1538 es una sal más simple y más fácil de sintetizar. Fue también fácil de aislar, purificar, es cristizable y mostró una buena estabilidad en estado sólido. Se cree que la administración tanto de EM800 como de EM-1538 dará como resultado el mismo principio activo *in vivo*.

25 Siempre que se correspondan con la fórmula de SERM de la reivindicación 1, otros SERM preferidos de la invención incluyen Tamoxifen ((Z)-2-[4-(1,2-difenil-1-butenil)]-N,N-dimetiletanamina) (disponible de Zeneca, Reino Unido), Toremifene (disponible de Orion-Farmos PharmaceuticalL, Finlandia, o Schering-Plough), Droloxifene y CP-336, 156 (sal de cis-1R-[4'-pirrolidino-etoxifenil]-2S-fenil-6-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno D-(-)tartrato) (Pfizer Inc., EE.UU.), Raloxifene (Eli Lilly and Co., EE.UU.), LY 335563 y LY 353381 (Eli Lilly and Co., EE.UU.) Iodoxifene (SmithKline Beecham, EE.UU.), levormeloxifeno (3,4-trans-2,2-dimetil-3-fenil-4-[4-(2-(2(pirrolidin-1-il)etoxi)fenil]-7-
30 metoxicromano) (Novo Nordisk, A/S, Dinamarca) que se desvela por Shalmi y col. documentos WO 97/25034, WO 97/25035, WO 97/25037, WO 97/25038; y Korsgaard y col. documentos WO 97/25036). GW5638 (descrito por Willson y col., Endocrinology, 138(9), 3901-3911, 1997) y los derivados de indol (desvelados por Miller y col. documento EP 0802183A1) y TSE 424 desarrollado por Wyeth Ayers (EE.UU.) y dado a conocer en el documento JP10036347 (American Home Products Corporation) y los derivados de estrógenos no esteroideos descritos en el
35 documento WO 97/32837.

Las dosis de SERM adecuadas se conocen la técnica.

40 El SERM administrado de acuerdo con la presente invención se administra preferentemente en un intervalo de dosificación entre 0,01 y 10 mg/kg de peso corporal por día (preferentemente de 0,05 a 1,0 mg/kg), prefiriéndose 5 mg por día, especialmente 10 mg por día, en dos dosis igualmente divididas para una persona de peso corporal promedio cuando se administra por vía oral, o en un intervalo de dosificación entre 0,003 a 3,0 mg/kg de peso

corporal por día (preferentemente 0,015 a 0,3 mg/ml), prefiriéndose 1,5 mg por día, especialmente 3,0 mg por día, en dos dosis igualmente divididas para una persona de un peso corporal promedio cuando se administra por vía parenteral (es decir, administración intramuscular, subcutánea o percutánea). Preferentemente, los SERM se administran conjuntamente con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable tal como se describe a continuación.

Con respecto a todas las dosificaciones recomendadas en el presente documento, el médico a cargo del tratamiento deberá vigilar la respuesta individual del paciente y ajustar la dosificación en consecuencia.

Ejemplos

Ejemplo comparativo 1

10 Materiales y métodos

Animales

Se obtuvieron ratas Sprague-Dawley hembras [CrI:CD(SD)Br] de 44-46 días de edad de Charles River Canada Inc. (St. Constant, Quebec) y se alojaron a 2 por jaula en un ambiente controlado de luz (12 h de luz/día; las luces se encienden a las 07:15 h) y temperatura (22 ± 2 °C). Los animales recibieron pienso Purina para roedores y agua del grifo a voluntad. Los estudios con animales se llevaron a cabo en una instalación aprobada por el Canadian Council on Animal Care (CCAC) de acuerdo con la Guía del CCAC para el cuidado y la utilización de animales experimentales.

Inducción de tumores mamarios mediante DMBA

Se indujeron carcinomas mamarios mediante una única administración intragástrica de 20 mg de DMBA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en 1 ml de aceite de maíz a los 50-52 días de edad. Dos meses después, se llevó a cabo la medida del tumor cada dos semanas. Se registraron con calibres los dos diámetros perpendiculares más grandes de cada tumor para estimar el tamaño del tumor tal como se ha descrito (Asselin y col, Endocrinology 101: 666-671, 1977). Se registraron el sitio, el tamaño y el número de tumores.

Tratamiento

Los animales se dividieron de forma aleatoria en grupos que contenían cada uno 20 ratas con la excepción de 40 animales en el grupo control. Los animales se trataron durante 282 días con lo siguiente. (1) vehículos control, para DHEA y EM-800, (29 EM-800 ((+)-7-pivaloiloxi-3-(4'-pivaloiloxifenil)-4-metil-2-(4''-(2'''-piperidinoetoxi)fenil)-2H-benzopirano) (75 µg, por vía oral, una vez al día) en 0,5 ml de etanol al 4%, polietilenglicol-600 al 4%, gelatina al 1%, suspensión de NaCl al 0,9%; (3) DHEA (10 mg, por vía percutánea, una vez al día) en 0,5 ml de etanol al 50%, propilenglicol al 50%; y (4) EM-800 y DHEA. El tratamiento se inició 3 días antes de la administración oral de DMBA. Se sintetizó EM-800 en la División de Química médica del laboratorio de los inventores mientras que el DHEA se adquirió de Steraloids Inc., Wilton, NH.

Muchos de los animales del control y algunos de los animales tratados con EM-800 o DHEA se sacrificaron mediante dislocación cervical con anestesia inducida por isoflurano 6 meses después de la administración de la DMBA debido al tamaño demasiado grande de los tumores. Los valores del tamaño y el número de tumores de estas ratas en el sacrificio, junto con los medidos en los intervalos de tiempo posteriores de los animales que sobrevivieron, se utilizaron para el último análisis de la incidencia de tumores, el número promedio de tumores por rata portadora de tumor y el tamaño promedio del tumor por animal portador de tumor. Los animales restantes (9 ratas del control y 13-19 ratas de cada otro grupo) continuaron recibiendo el tratamiento durante otro periodo de 3 meses con el fin de observar la potencia preventiva a largo plazo de la DHEA y de EM-800 solos o en combinación. Las ratas se sacrificaron 279 días después de la administración de DMBA. Los úteros, vaginas y ovarios, se retiraron inmediatamente, exentos de tejido conectivo y adiposo y se pesaron.

Recogida y procesamiento de las muestras

Se recogieron muestras de la orina de 24 horas al final del experimento procedentes de las primeras 9 ratas de cada grupo tras la transferencia a jaulas metabólicas (Allentown Caging Equipment Co., Allentown, NJ). Se recogieron dos muestras de la orina y se analizaron en diferentes días para cada animal con el fin de minimizar la influencia de la variación diaria. Por tanto, cada valor que se muestra representa la media de las dos medidas llevadas a cabo en dos días diferentes. Se añadieron 0,5 ml de tolueno en los tubos de recogida de la orina para evitar la evaporación de la orina y el crecimiento bacteriano y se registró el volumen de la orina. Se recogió sangre del tronco arterial en el sacrificio y se dejó coagular a 4 °C durante la noche antes de la centrifugación a 3000 rpm durante 30 min.

Análisis de los parámetros bioquímicos de la orina y el suero

Se utilizaron muestras recientes para el ensayo de la creatinina, el calcio y el fósforo en orina así como la actividad de la fosfatasa alcalina (tALP), el colesterol y los triglicéridos totales en suero. Estos parámetros bioquímicos se midieron automáticamente con un Monarch 2000 Chemistry System (Instrumentation Laboratory Co. Lexington, MA)

en condiciones de Buenas Prácticas de Laboratorio. Se midió la hidroxiprolina de la orina tal como se ha descrito (Podenphant y col., Clinica Chimica Acta 142: 145-148, 1984).

Medidas de la masa ósea

5 Se anestesiaron las ratas con una inyección i.p. de clorhidrato de ketamina y diazepam a dosis de 50 y 4 mg/kg de peso corporal, respectivamente. El esqueleto completo y el fémur derecho se escanearon utilizando absorciometría de rayos X de doble energía (DEXA; QDR 2000-7.10C, Hologic, Waltham, MA) equipada con un software de alta resolución regional. Los tamaños del campo de barrido fueron de 28,110 x 17,805 cm y 5,0 x 1,902 cm, las resoluciones fueron de 0,1511 x 0,0761 cm y 0,0254 x 0,0127 cm, mientras que las velocidades de barrido fueron de 0,3608 y 0,0956 mm/s para el esqueleto total y el fémur, respectivamente. El contenido mineral del hueso (CMH) y la densidad mineral ósea (DMO) del esqueleto total, la columna lumbar y el fémur, se midieron sobre las imágenes de barrido del esqueleto total y el fémur.

Análisis estadístico

15 Se midió la significancia estadística de acuerdo con un test de intervalo múltiple de Duncan-Kramer (Biometrics 12: 307-310, 1956). Se llevó a cabo el análisis de la incidencia de desarrollo de tumores mamarios utilizando el test exacto de Fisher (Conover, Practical nonparametric statistics, 2ª Edición 153-170, 1980). Los datos se presentan como medias \pm EEM.

Resultados

Efecto sobre el desarrollo de carcinoma mamario inducido por DMBA

20 Tal como se ilustra en la figura 1, el 95% de los animales del control desarrollaron tumores mamarios palpables en los 279 días después de la administración de DMBA. El tratamiento con DHEA o EM-800 evitó parcialmente el desarrollo del carcinoma mamario inducido por DMBA y la incidencia se redujo de esta manera a un 57% ($p < 0,01$) y 38% ($p < 0,01$), respectivamente. De manera interesante, la combinación de los dos compuestos condujo a un efecto inhibitorio significativamente mayor que el alcanzado por cada compuesto solo ($p < 0,01$ frente a DHEA o EM800 solo). De hecho, los únicos dos tumores que se desarrollaron en el grupo de animales tratado con ambos compuestos desaparecieron antes de finalizar el experimento.

25 El tratamiento con DHEA o EM-800 disminuyó el número promedio de tumores por animal portador de tumores de $4,7 \pm 0,5$ tumores en los animales del control a $3,4 \pm 0,7$ (N.S.) y $1,4 \pm 0,3$ ($p < 0,01$) tumores/animal, respectivamente, mientras que no se encontraron tumores al final del experimento en los animales que recibieron ambos fármacos ($p < 0,01$ frente a los otros tres grupos) (Fig. 2A). Uno de los dos tumores que desapareció posteriormente estuvo presente desde el día 79 al día 201 tras la administración de DMBA mientras que el otro tumor fue palpable desde el día 176 al día 257. Se puede observar en la Fig. 2B que DHEA o EM-800 solos disminuyeron el área promedio del tumor por animal portador del tumor desde $12,8 \pm 1,3$ cm² al final del experimento hasta $10,2 \pm 2,1$ cm² (N.S.) y $7,7 \pm 1,8$ cm² (N.S.), respectivamente, mientras que el tratamiento combinado dio como resultado un valor cero ($p < 0,01$ frente a los otros tres grupos). Los dos tumores que se desarrollaron en el grupo de animales tratados con DHEA y EM-800 no creció más de 1 cm². Debe mencionarse que los valores reales del área promedio del tumor así como del número promedio de tumores por animal portador de tumor en el grupo del control debe ser mayor que los valores presentados en la Figura 2 ya que hubo que sacrificar muchas ratas antes del final del experimento debido al excesivo tamaño de los tumores. Los valores medidos en el momento del sacrificio fueron por tanto incluidos como tales en los cálculos realizados en intervalos de tiempo posteriores con el fin de minimizar un sesgo en el grupo control que, en ningún caso, permaneció significativamente por encima de los otros grupos.

Efecto sobre el hueso

45 La administración percutánea a largo plazo de DHEA a las ratas hembra indujo un aumento del 6,9% ($p < 0,01$), 10,6% ($p < 0,05$) y 8,2% ($p < 0,01$) en la densidad mineral ósea (DMO) del esqueleto total, la columna lumbar y el fémur, respectivamente (Tabla 2). Por otra parte, no se encontraron cambios significativos en los animales tratados con EM-800. Además, cuando ambos compuestos se administraron simultáneamente, los valores obtenidos fueron comparables a los alcanzados con DHEA solo.

50 El tratamiento con DHEA aumentó la actividad de la fosfatasa alcalina total en suero (tALP) en un 74% ($p < 0,05$), pero no hubo efecto sobre la excreción de calcio y fósforo diario en orina ni sobre la relación de hidroxiprolina a creatinina de la orina (Tabla 3). Por otra parte, el tratamiento con EM-800 disminuyó la relación de hidroxiprolina a creatinina en orina en un 48% ($p < 0,01$), pero no hubo influencia estadísticamente significativa sobre la excreción de calcio o fósforo y la actividad de la tALP en orina. La combinación de DHEA y EM-800 condujo a un aumento de la actividad de la tALP en suero ($p < 0,01$) similar al alcanzado con DHEA sola y redujo la relación de hidroxiprolina a creatinina en orina en un 69%, un valor significativamente inferior ($p < 0,01$) que el alcanzado con EM-800 solo. Además, la combinación de los dos fármacos redujo significativamente la excreción de calcio y fósforo diaria en orina en un 84% ($p < 0,01$) y 56% ($p < 0,01$), respectivamente, aunque no se observó cambio significativo con cada fármaco solo (Tabla 3).

Efecto sobre el nivel de lípidos en el suero

El tratamiento a largo plazo con EM-800 disminuyó los niveles de triglicéridos y colesterol en suero en un 72% ($p < 0,01$) y en un 45% ($p < 0,01$), respectivamente, mientras que la administración a largo plazo de DHEA disminuyó los niveles de triglicéridos en suero en un 60% ($p < 0,01$), sin afectar a los niveles de colesterol en suero. Además, se midieron disminuciones del 42% ($p < 0,01$) y del 52% ($p < 0,01$) en las concentraciones de triglicéridos y colesterol en suero en los animales tratados con EM-800 y DHEA (Fig. 3).

Tabla 2. Efecto del tratamiento con DHEA (10 mg, por vía percutánea, una vez al día) o EM-800 (75 µg, por vía oral, una vez al día) solo o en combinación durante 9 meses sobre la densidad mineral ósea (DMO) del fémur, la columna lumbar y el esqueleto total en la rata hembra. Se llevaron a cabo las medidas en 9 ratas por grupo. *: $p < 0,05$;

** : $p < 0,01$ experimental frente a control

GRUPO	DMO (g/cm ²)		
	ESQUELETO TOTAL	COLUMNA LUMBAR	FÉMUR
CONTROL	0,1371 ± 0,0025	0,1956 ± 0,0067	0,3151 ± 0,0063
DHEA (10 mg)	0,1465 ± 0,0010**	0,2163 ± 0,0049*	0,3408 ± 0,0038**
EM-800 (75 µg)	0,1356 ± 0,0017	0,1888 ± 0,0045	0,3097 ± 0,0047
HEA + EM-800	0,1498 ± 0,0019**	0,2108 ± 0,0061	0,3412 ± 0,0056**

Tabla 3. Efecto del tratamiento con DHEA (10 mg, por vía percutánea, una vez al día) o EM-800 (75 µg, por vía oral, una vez al día) solo o en combinación durante 9 meses sobre los parámetros del metabolismo óseo en la rata: excreción de calcio y fósforo en la orina diariamente, relación de hidroxiprolina a creatinina en la orina (HP/Cr) y actividad de la fosfatasa alcalina total en suero (tALP). Se obtuvieron las muestras de 9 animales por grupo. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ experimental frente a control

GRUPO	ORINA			SUERO
	CALCIO (µmol/24h/100g)	FÓSFORO (µmol/24h/100g)	HP/Cr (µmol/mmol)	tALP (U/l)
CONTROL	23,17 ± 1,55	132,72 ± 6,08	13,04 ± 2,19	114,25 ± 14,04
DHEA (10 mg)	25,87 ± 3,54	151,41 ± 14,57	14,02 ± 1,59	198,38 ± 30,76*
EM-800 (75 µg)	17,44 ± 4,5	102,03 ± 25,13	6,81 ± 0,84**	114,11 ± 11,26
HEA + EM-800	3,71 ± 0,75**	59,06 ± 4,76**	4,06 ± 0,28**	204,38 ± 14,20**

Ejemplo comparativo 2**Resumen**

En la glándula mamaria, los andrógenos se forman a partir del precursor esteroide deshidroepiandrosterona (DHEA). La evidencia clínica indica que los andrógenos tienen efectos inhibidores sobre el cáncer de mama. Los estrógenos, por otra parte, estimulan el desarrollo y el crecimiento del cáncer de mama. Los inventores han estudiado el efecto de DHEA sola o en combinación con el antiestrógeno puro recientemente descrito, EM-800, sobre el crecimiento de xenoinjertos tumorales formados por la línea de células ZR-75-1 de cáncer de mama humano en ratones lampiños sometidos a ovariectomía.

Los ratones recibieron inyecciones subcutáneas diarias de 0,5 µg de estrona (una hormona estrogénica) inmediatamente después de la ovariectomía. Se proporcionó EM-800 (15, 50 o 100 µg) por vía oral una vez al día. Se aplicó DHEA dos veces diarias (dosis total de 0,3, 1,0 o 3,0 mg) a la piel dorsal tanto sola como en combinación con una dosis oral diaria de 15 µg de EM-800. Se evaluaron periódicamente los cambios en el tamaño del tumor en respuesta a los tratamientos en relación con las medidas realizadas en el primer día. Al final de los experimentos, los tumores se diseccionaron y pesaron.

Se observó un aumento de 9,4 veces en el tamaño del tumor en 9,5 meses en los ratones sometidos a ovariectomía que recibieron estrona sola en comparación con los ratones que no recibieron estrona. La administración de 15, 50 o 100 µg en ratones sometidos a ovariectomía suplementados con estrona condujo a inhibiciones del 88%, 93% y 94% en el tamaño del tumor, respectivamente. DHEA, por otra parte, a dosis de 0,3, 1,0 o 3,0 mg inhibió el peso del tumor terminal en un 67%, 82% y 85%, respectivamente. Se obtuvieron inhibiciones comparables en el tamaño del tumor con una dosis oral diaria de 15 µg de EM-800 con o sin diferentes dosis de DHEA percutánea.

DHEA y EM-800 suprimieron de manera independiente el crecimiento de tumores en xenoinjertos ZR-75-1 en ratón estimulados con estrona en ratones lampiños. La administración de DHEA a las dosis definidas no altera el efecto

inhibidor de EM-800.

Materiales y procedimientos

Células ZR-75-1

5 Se obtuvieron células ZR-75-1 de cáncer de mama humano de la American Type Culture Collection (Rockville, MD) y se cultivaron de forma rutinaria como monocapas en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, 100 UI de penicilina/ml, 100 µg de estreptomina/ml y suero bovino fetal al 10%, en una atmósfera humidificada de 95% de aire/5% de CO₂ a 37 °C tal como se ha descrito (Poulin y Labrie, Cancer Res. 46: 4933-4937, 1986; Poulin y col., Breast Cancer Res. Treat. 12: 213-225, 1988). Se pasaron las células semanalmente tras el tratamiento con tripsina al 0,05%:EDTA al 0,2% (p/v). Los cultivos celulares utilizados para los experimentos descritos en este informe se derivaron del pase 93 de la línea de células ZR-75-1.

Animales

15 Se obtuvieron ratones atómicos Harlan Sprague-Dawley homocigóticos (nu/nu) hembra (28 a 42 días de edad) de HSD (Indianápolis, Indiana, EE.UU.). Los ratones se alojaron en jaulas de vinilo con partes superiores provistas de filtro del aire en una cabina de aire de flujo laminar y se mantuvieron en condiciones limitadas de patógenos. Las jaulas, camas y el alimento se introdujeron en el autoclave antes del uso. El agua se introdujo en el autoclave, se acidificó a pH 2, 8 y se proporcionó a voluntad.

Inoculación de células

20 Se sometieron los ratones a ovariectomía bilateral (OVX) una semana antes de la inoculación del tumor bajo anestesia conseguida por inyección intraperitoneal de 0,25 ml/animal de Avertin (alcohol amílico: 0,8 g/100 ml de NaCl al 0,9%; y tribromo etanol: 2 g/100 ml de NaCl al 0,9%). Se obtuvieron 1,5 x 10⁶ células ZR-75-1 en fase logarítmica de crecimiento tras el tratamiento de la monocapa con tripsina al 0,05%/EDTA al 0,02% (p/v), se suspendieron en 0,1 ml de medio de cultivo que contenía Matrigel al 25% y se inocularon por vía subcutánea en ambos flancos de los animales utilizando una aguja de calibre 20 de 1 pulgada (2,54 cm) de longitud tal como se ha descrito anteriormente (Dauvois y col., Cancer Res. 51: 3131-3135, 1991). Con el fin de facilitar el crecimiento de los tumores, cada animal recibió diariamente una inyección subcutánea de 10 µg de estradiol (E₂) en un vehículo compuesto por NaCl al 0,9%, etanol al 5%, gelatina al 1% durante 5 semanas. Tras la aparición de tumores ZR-75-1 palpables, se midió el diámetro de los tumores con calibre y se seleccionaron para este estudio los ratones que tenían un diámetro del tumor entre 0,2 y 0,7 cm.

Tratamiento hormonal

30 Todos los animales, excepto aquellos en el grupo OVX control, recibieron inyecciones subcutáneas diarias de 0,5 µg de estrona (E₁) en 0,2 ml de NaCl al 0,9%, etanol al 5%, gelatina al 1%. En los grupos indicados, DHEA se administró por vía percutánea dos veces al día a las dosis de 0,3, 1,0 o 3,0 mg/animal aplicadas en un volumen de 0,02 ml en la zona dorsal de la piel fuera del área de crecimiento del tumor. Se disolvió DHEA en 50% de etanol y 50% de propilenglicol. EM-800, ((+)-7-pivaloiloxi-3-(4'-pivaloiloixifenil)-4-metil-2-(4''-(2'''-piperidinoetoxi)fenil)-2H-benzopiran), se sintetizó tal como se ha descrito anteriormente (Gauthier y col., J. Med. Chem. 40: 2117-2122, 1997) en la división de química médica del laboratorio de Endocrinología molecular del CHURL Research Center. EM-800 se disolvió en etanol al 4% (v/v), polietilenglicol (PEG) 600 al 4% (v/v), gelatina al 1% (p/v), NaCl al 0,9% (p/v). Los animales de los grupos indicados recibieron dosis orales diarias de 15 µg, 50 µg o 100 µg de EM-800 solo o en combinación con DHEA mientras que los animales del grupo OVX recibieron el vehículo (0,2 ml de etanol al 4%, PEG 600 al 4%, gelatina al 1%, NaCl al 0,9%) solo. Los tumores se midieron una vez a la semana con calibres Vernier. Se registraron dos diámetros perpendiculares en cm (L y W) y se calculó el área del tumor (cm²) utilizando la fórmula: L/2xW/2 x π (Dauvois y col., Cancer Res. 51: 3131-3135, 1991). El área medida durante el primer día de tratamiento se tomó como el 100% y los cambios en el tamaño del tumor se expresaron como porcentaje del área inicial del tumor. En el caso de tumores subcutáneos en general, no es posible acceder de forma precisa al volumen tridimensional del tumor. Por tanto, solo se midieron las áreas del tumor. Después de 291 (o 9,5 meses) de tratamiento, los animales se sacrificaron.

50 Se evaluaron las categorías de respuestas tal como se ha descrito (Dauvois y col., Breast Cancer Res. Treat. 14: 299-306, 1989; Dauvois y col., Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 25: 891-897, 1989; Labrie y col., Breast Cancer Res. Treat. 33: 237-244, 1995). En resumen, la regresión parcial corresponde a los tumores que tuvieron una regresión igual o superior al 50% de su tamaño original; una respuesta estable se refiere a los tumores que tuvieron una regresión de menos del 50% del tamaño original o que progresaron hasta menos del 50% de su tamaño original, mientras que la regresión completa se refiere a los tumores que no fueron detectables al final del tratamiento. La progresión se refiere a los tumores que progresaron más del 50% en comparación con su tamaño original. Al final del experimento, todos los animales se sacrificaron mediante decapitación. Los tumores, úteros y vaginas, se retiraron inmediatamente, exentos de tejidos conectivos y adiposos y se pesaron.

Análisis estadístico

Se evaluó el significado estadístico de los efectos de los tratamientos sobre el tamaño de los tumores utilizando un análisis de la varianza (ANOVA) que evaluaba los efectos debidos a DHEA, EM-800 y el tiempo y con medidas repetidas en los mismos animales llevadas a cabo al inicio y al final del tratamiento (sujetos comprendidos en un factor de grupo). Las medidas repetidas en el tiempo 0 y después de 9,5 meses de tratamiento constituyen bloques aleatorizados de animales. El tiempo se analiza de esta manera como un efecto comprendido dentro del bloque mientras que ambos tratamientos se evaluaron como efectos entre bloques. Todas las interacciones entre los efectos principales se incluyeron en el modelo. Se analizaron la significancia de los factores del tratamiento y sus interacciones utilizando los sujetos comprendidos en el grupo como el término de error. Los datos se transformaron aplicando logaritmos. Las hipótesis que son subyacentes al ANOVA supusieron la normalidad de los elementos residuales y la homogeneidad de la varianza

Se llevaron a cabo posteriormente comparaciones por parejas utilizando el test de Fisher para la diferencia menos significativa. Se analizaron los efectos principales y la interacción de los tratamientos sobre el peso corporal y el peso del órgano utilizando un ANOVA bidireccional normalizado con interacciones. Todos los ANOVA se llevaron a cabo utilizando el programa SAS (SAS Institute, Cary, NC, EE.UU.). Se declaró la significancia de las diferencias utilizando un test bilateral con un nivel global del 5%.

Se analizaron los datos de clasificación con un test Kruskal-Wallis para variables ordenadas de respuestas de clasificación (respuesta completa, respuesta parcial, respuesta estable y progresión del tumor). Después de la evaluación global de los efectos del tratamiento, los subconjuntos de resultados presentados en la Tabla 4 se analizaron ajustando el valor p crítico para comparaciones múltiples. Se calcularon los valores p exactos utilizando el programa StatXact (Cytel, Cambridge, MA, EE.UU.).

Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM) de 12 a 15 ratones en cada grupo.

Resultados

Tal como se ilustra en la Fig. 4A, los tumores ZR-75-1 humanos aumentaron en 9,4 veces a lo largo de 291 días (9,5 meses) en ratones lampiños sometidos a ovariectomía tratados con una dosis diaria de 0,5 μ g administrada por vía subcutánea de estrona mientras que, en ratones OVX control que recibieron el vehículo solo, el tamaño del tumor disminuyó hasta 36,9% del valor inicial durante el curso del estudio.

El tratamiento con dosis crecientes de DHEA por vía percutánea produjo una progresiva inhibición del crecimiento de los tumores ZR-75-1 estimulados con E_1 . Se alcanzaron inhibiciones del 50,4%, 76,8% y 80,0% a los 9,5 meses de tratamiento con dosis diarias de 0,3 mg, 1,0 mg y 3,0 mg de DHEA por animal, respectivamente (Fig. 4A). De acuerdo con la disminución en la carga total del tumor, el tratamiento con DHEA condujo a una marcada disminución del peso promedio de los tumores que permanecían al final del experimento. De hecho, el peso promedio del tumor disminuyó desde 1,12 \pm 0,26 g en los ratones lampiños sometidos a ovariectomía suplementados con E_1 a 0,37 \pm 0,12 g ($P = 0,005$), 0,20 \pm 0,06 g ($P=0,001$) y 0,17 \pm 0,06 g ($P = 0,0009$) en los grupos de animales que recibieron las dosis diarias de 0,3, 1,0 y 3,0 mg de DHEA, respectivamente (Fig. 4B).

A las dosis diarias de 15 μ g, 50 μ g y 100 μ g, el antiestrógeno EM-800 inhibió el tamaño de los tumores estimulados con estrógeno en un 87,5% ($p<0,0001$), 93,5% ($p<0,0001$) y 94,0% ($P = 0,0003$), respectivamente (Fig. 5A) cuando se comparó con el tamaño de los tumores en los animales del control a los 9,5 meses. Las reducciones en el tamaño de los tumores conseguidas con las tres dosis de EM-800 no son significativamente diferentes entre sí. Tal como se ilustra en la Fig. 4B, el peso de los tumores al final de los 9,5 meses del estudio disminuyó desde 1,12 \pm 0,26 g en los ratones OVX suplementados con E_1 del control a 0,08 \pm 0,03 g, 0,03 \pm 0,01 g y 0,04 \pm 0,03 en animales tratados con las dosis de 15 μ g, 50 μ g y 100 μ g diarias de EM-800, respectivamente ($p<0,0001$ en todas las dosis de EM-800 frente a los ratones OVX suplementados con E_1).

Tal como se ha mencionado anteriormente, el antiestrógeno EM-800, a la dosis oral diaria de 15 μ g, produjo una inhibición del 87,5% del crecimiento de los tumores estimulados con estrona medidos a los 9,5 meses. La adición de DHEA a las tres dosis utilizadas no tuvo un efecto significativo sobre la inhibición ya señalada del tamaño de los tumores conseguida con la dosis de 15 μ g diarios del antiestrógeno EM-800 (Fig. 5B). De esta manera, el peso promedio de los tumores se redujo drásticamente desde 1,12 \pm 0,26 g en los ratones suplementados con estrona del control hasta 0,08 \pm 0,03 g ($p<0,0001$), 0,11 \pm 0,04 ($P = 0,0002$), 0,13 \pm 0,07 g ($P=0,0004$) y 0,08 \pm 0,05 g ($p<0,0001$) en los animales que recibieron la dosis diaria de 15 μ g del antiestrógeno solo o en combinación con las dosis de 0,3, 1,0 y 3,0 mg de DHEA, respectivamente (no se señalaron diferencias significativas entre los 4 grupos) (Fig. 4B).

Fue también de interés examinar las categorías de respuestas conseguidas con los tratamientos anteriormente indicados. De esta manera, el tratamiento con dosis crecientes de DHEA disminuyó, aunque no a un nivel de significancia estadística ($P=0,088$), el número de tumores en progresión fue desde el 87,5% en los animales OVX del control suplementados con estrona hasta valores del 50,0%, 53,3% y 66,7% en los animales tratados con las dosis diarias de 0,3, 1,0 o 3,0 mg de DHEA (Tabla 4). Las respuestas completas, por otra parte, aumentaron desde 0% en los ratones suplementados con estrona hasta 28,6%, 26,7% y 20,0% en los animales que recibieron las dosis diarias

de 0,3, 1,0 y 3,0 mg de DHEA administrada por vía percutánea. Las respuestas estables, por otra parte, se midieron a 12,5%, 21,4%, 20,0% y 13,3% en los ratones del control suplementados con E₁ y en los tres grupos de animales que recibieron las dosis anteriormente indicadas de DHEA, respectivamente. En los animales del control sometidos a ovariectomía, las tasas de las respuestas completas, parciales y estables se midieron a 68,8%, 6,2% y 18,8%, respectivamente, mientras que se observó progresión en sólo el 6,2% de los tumores (Tabla 4).

Se consiguieron respuestas completas o la desaparición de los tumores en el 29,4%, 33,3%, 26,7% y 35,3% de los tumores en los animales que recibieron el antiestrógeno EM-800 (P=0,0006) solo (15 µg) o en combinación con 0,3 mg, 1,0 mg o 3,0 mg de DHEA, respectivamente (Tabla 4). Se observó progresión, por otra parte, en el 35,3%, 44,4%, 53,3% y 17,6% de los tumores, en los mismos grupos de animales, respectivamente. No hubo diferencias significativas entre los grupos tratados con EM-800, tanto solo como en combinación con DHEA.

No se observaron efectos significativos del tratamiento con DHEA o EM-800 en el peso corporal ajustado para el peso del tumor. El tratamiento de ratones OVX con estrona aumentó el peso de los úteros desde 28 ± 5 mg en ratones OVX del control hasta 132 ± 8 mg (p<0,01) mientras que el aumento de las dosis de DHEA dio lugar a una inhibición progresiva, pero relativamente pequeña del efecto estimulador de la estrona, que alcanzó el 26% (P=0,0008) a la dosis más alta de DHEA utilizada. Se puede observar en la misma figura que el peso de los úteros en los animales estimulados con estrona disminuyó desde 132 ± 8 mg en los ratones del control suplementados con estrona hasta 49 ± 3 mg, 36 ± 2 mg y 32 ± 1 mg (p<0,0001 en todas las dosis frente al control) con las dosis orales diarias de 15 µg, 50 µg, o 100 µg de EM-800 (de forma global P<0, 0001), respectivamente. Quince microgramos (15 µg) de EM-800 en combinación con las dosis diarias de 0,3 mg, 1,0 mg o 3,0 mg de DHEA, se determinó el peso del útero a 46 ± 3 mg, 59 ± mg y 69 ± 3 mg, respectivamente.

Por otra parte, el tratamiento con estrona aumentó el peso de las vaginas desde 14 ± 2 mg en animales OVX hasta 31 ± 2 mg (p<0,01) mientras que la adición de DHEA no tuvo efectos significativos. A continuación, el peso de las vaginas se redujo hasta 23 ± 1 mg, 15 ± 1 mg y 11 ± 1 mg tras el tratamiento con dosis diarias de 15 µg, 50 µg o 100 µg de EM-800, respectivamente (p global y por parejas P<0,0001 en todas las dosis frente al control). En combinación con las dosis de 0,3 mg, 1,0 mg o 3,0 mg de DHEA y de EM-800, se determinó el peso de las vaginas en 22 ± 1 mg, 25 ± 2 mg y 23 ± 1 mg, respectivamente (N.S. para todos los grupos frente a 15 µg de EM-800). Debe mencionarse que para las dosis más altas utilizadas, concretamente 100 µg diarios, EM-800 disminuyó el peso de los úteros en los animales OVX suplementados con estrona hasta un valor no diferente del de los controles OVX mientras que el peso de las vaginas se redujo hasta un valor por debajo del medido en los controles OVX (p<0,05). DHEA, probablemente debido a sus efectos androgénicos, contrarrestó parcialmente el efecto de EM-800 sobre el peso de los úteros y de las vaginas.

Tabla 4. Efecto de la administración percutánea de DHEA o la administración oral de EM-800 solo o en combinación durante 9,5 meses sobre las respuestas (completas, parciales, estables y progresión) de los xenoinjertos de tumores de mama ZR-75-1 humanos en ratones lampiños.

GRUPO	NÚMERO TOTAL DE ANIMALES	CATEGORÍA DE LA RESPUESTA							
		Completa		Parcial		Estable		Progresión	
		Número y (%)							
ovx	16	11	(68,8)	1	(6,2)	3	(18,8)	1	(6,2)
OVX + E1 (0,5 µg)	16	0	(0)	0	(0)	2	(12,5)	14	(87,5)
OVX + E1 0,3 mg (0,5 µg) + DHEA	14	4	(28,6)	0	(0)	3	(21,4)	7	(50,0)
1,0 mg	15	4	(26,7)	0	(0)	3	(20,0)	8	(53,3)
3,0 mg	15	3	(20,0)	0	(0)	2	(13,3)	10	(66,7)
OVX + E1 15 µg (0,5 µg) + EM-800	17	5	(29,4)	1	(5,9)	5	(29,4)	6	(35,3)
50 µg	16	4	(25,0)	3	(18,8)	5	(31,2)	4	(25,0)
100 µg	16	8	(50,0)	0	(0)	3	(18,8)	5	(31,2)
OVX + E1 0,3 mg (0,5 µg) + EM-800 + DHEA	18	6	(33,3)	0	(0)	4	(22,2)	8	(44,4)
1,0 mg	15	4	(26,7)	0	(0)	3	(20,0)	8	(53,3)
3,0 mg	17	6	(35,3)	0	(0)	8	(47,1)	3	(27,6)

E₁ = Estrona; DHEA = deshidroepiandrosterona; OVX = animales sometidos a ovariectomía

Ejemplo comparativo 3**Efecto del compuesto preferido de la presente invención sobre los niveles de colesterol de ratas hembras sometidas a ovariectomía**Animales y tratamiento

5 Se utilizaron ratas Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)Br) hembra de 50 a 60 días de edad (Charles River Laboratory, St-Constant, Canadá) que pesaban aproximadamente 190 g en el momento de la ovariectomía. Los animales se aclimataron a las condiciones del ambiente (temperatura: 22 ± 3 °C, humedad: $50 \pm 20\%$; ciclos de 12 h de luz – 12 h de oscuridad, encendido de las luces a las 07:15 h) durante 1 semana antes de la cirugía. Se alojaron tres animales por jaula y se les permitió acceso libre al agua de grifo y a pienso para roedores certificado en forma de briquetas (Lab Diet 5002, Ralston Purina, St-Louis, MO). El experimento se llevó a cabo en una instalación aprobada por el Canadian Council on Animal de acuerdo con la Guía CCAC para el cuidado y la utilización de animales experimentales.

10 Se sometieron a ovariectomía ciento treinta y seis ratas hembras bajo anestesia de isoflurano en el día 0 del estudio y se distribuyeron de forma aleatoria en 17 grupos de animales para llevar a cabo el estudio que se reseña a continuación:

Grupo 1: OVX CONT

Grupo 2: OVX + EM-800 (0,01 mg/kg, po, ID)

Grupo 3: OVX + EM-800 (0,03 mg/kg, po, ID)

Grupo 4: OVX + EM-800 (0,1 mg/kg, po, ID)

20 **Grupo 5:** OVX + EM-800 (0,3 mg/kg, po, ID)

Grupo 6: OVX + EM-800 (1 mg/kg, po, ID)

Grupo 7: OVX + EM-01538 (0,01 mg/kg, po, ID)

Grupo 8: OVX + EM-01538 (0,03 mg/kg, po, ID)

Grupo 9: OVX + EM-01538 (0,1 mg/kg, po, ID)

25 **Grupo 10:** OVX + EM-01538 (0,3 mg/kg, po, ID)

Grupo 11: OVX + EM-01538 (1 mg/kg, po, ID)

Grupo 12: OVX + Raloxifeno (EM-1105) (0,01 mg/kg, po, ID)

Grupo 13: OVX + Raloxifeno (EM-1105) (0,03 mg/kg, po, ID)

Grupo 14: OVX + Raloxifeno (EM-1105) (0,1 mg/kg, po, ID)

30 **Grupo 15:** OVX + Raloxifeno (EM-1105) (0,3 mg/kg, po, ID)

Grupo 16: OVX + Raloxifeno (EM-1105) (1 mg/kg, po, ID)

Grupo 17: INT CONT

35 La administración de los tratamientos se inició en el día 10 del estudio y se administraron mediante sonda nasogástrica una vez al día hasta el día 13 del estudio. Se prepararon suspensiones de la dosificación en metilcelulosa al 0,4% y la concentración se ajustó de acuerdo con el peso corporal promedio registrado en el día 10 del estudio con el fin de administrar 0,5 ml de suspensión de la dosificación por rata. Aproximadamente 24 horas después de la última dosificación, los animales a los que se había sometido a ayuno durante la noche se sacrificaron mediante desangrado en la aorta abdominal bajo anestesia de isoflurano y las muestras de sangre se procesaron para la preparación del suero. Se retiraron los úteros, se limpiaron de la grasa restante y se pesaron.

40 Ensayos de colesterol y de triglicéridos en suero

Se determinaron los niveles totales de colesterol y de triglicéridos en suero utilizando los medios de Boehringer Mannheim Diagnostic Laborator y Systems.

Ejemplo comparativo 4

45 Androsteno-3 β ,17 β -diol (5-diol) posee actividad estrogénica intrínseca. Además, como precursor de los esteroides sexuales, se puede transformar en andrógenos activos y/u otros estrógenos en los tejidos intacrinicos periféricos. Con el fin de evaluar la importancia relativa de los componentes androgénicos y estrogénicos de la acción de 5-diol sobre la masa ósea, ratas de 21 semanas de edad se sometieron a ovariectomía y se trataron percutáneamente una vez al día con 2, 5 o 12,5 mg de 5-diol solo o en combinación con el antiestrógeno flutamida (FLU, 10 mg, s.c., una vez al día) y/o el antiestrógeno EM-800 (100 μ g, s.c., una vez al día) durante 12 meses. Se midió la densidad mineral ósea (DMO) después de 11 meses de tratamiento. Los animales sometidos a ovariectomía (OVX) experimentaron una disminución del 12,8% en la DMO femoral ($p < 0,01$) mientras que el tratamiento con la dosis más alta de 5-diol restauró un 34,3% de la pérdida de la DMO femoral en los 11 meses posteriores a la ovariectomía ($p < 0,01$). La administración simultánea de FLU evitó completamente el efecto estimulador de 5-diol sobre la DMO femoral mientras que la adición de EM-800 dio como resultado una estimulación adicional del 28,4% en comparación con el efecto de 5-diol solo. La administración simultánea de 5-diol, FLU y EM-800 mostró solo el efecto de EM-800 (27%)

debido a que el efecto del 5-diol fue completamente bloqueado por FLU. Se obtuvieron resultados comparables sobre la DMO de la columna lumbar aunque la DMO de la columna lumbar en ratas sometidas a ovariectomía que recibieron 12,5 mg de 5-diol solo, 12,5 mg de 5-diol + EM-800 o 5-diol + FLU + EM-800 se restauró hasta valores no significativamente diferentes de los de los animales intactos. El análisis histomorfométrico muestra que los efectos estimuladores de 5-diol sobre el volumen del hueso, el número de trabéculas y el efecto inhibitor sobre la separación de trabéculas de la sustancia esponjosa secundaria del área metafisaria de la tibia proximal están eliminados por FLU, pero además potenciados por EM-800. La marcada estimulación de la actividad de la fosfatasa alcalina en suero obtenida tras el tratamiento con 5-diol se invirtió en un 57% ($p < 0,01$ frente a 12,5 mg de 5-diol solo) por administración simultánea de FLU. El tratamiento con 5-diol no tuvo un efecto inhibitor estadísticamente significativo sobre la relación de calcio a creatinina en la orina. La dosis más elevada de 5-diol dio lugar a una reducción significativa del 23% ($p < 0,01$) del colesterol en suero mientras que la adición de EM-800 disminuyó el colesterol en suero en un 62% ($p < 0,01$).

Los presentes datos muestran claramente el efecto estimulador de 5-diol sobre la formación del hueso y sugieren que aunque 5-diol es un estrógeno débil, su efecto estimulador sobre la formación del hueso está predominantemente mediado por un efecto androgénico. Además, los efectos estimuladores aditivos de EM-800 y 5-diol sobre la masa del hueso demuestran el efecto de conservación del hueso del antiestrógeno EM-800 en la rata. La actividad de disminución del colesterol de 5-diol y EM-800 podría tener una interesante utilidad para la prevención de las enfermedades cardiovasculares.

Ejemplo 5

Grupo	Fosfatasa alcalina sérica	OH-prolina/creatinina urinaria	LH	Concentraciones de ARNm de GnRH	Colesterol	Triglicéridos
	UI/l	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	ng/ml	granos de plata por célula	mmol/l	mmol/l
Control Intacto	$30 \pm 3^{**}$	$15,4 \pm 1,3$	$0,09 \pm 0,03^{**}$	$33,7 \pm 0,7^{**}$	$2,28 \pm 0,12$	$1,4 \pm 0,2$
Control OVX	51 ± 4	$11,7 \pm 1,2$	$3,55 \pm 0,50$	$44,0 \pm 0,9$	$2,29 \pm 0,16$	$1,1 \pm 0,1$
OVX + MPA	57 ± 4	$11,7 \pm 1,2$	$2,51 \pm 0,20^*$	$35,5 \pm 0,7^{**}$	$2,55 \pm 0,14$	$1,3 \pm 0,1$
OVX + E ₂	41 ± 5	$9,2 \pm 0,9$	$2,37 \pm 0,45^*$	$40,4 \pm 0,8^{**}$	$2,02 \pm 0,15$	$0,8 \pm 0,1$
OVX + DHT	56 ± 5	$7,8 \pm 0,7^*$	$1,55 \pm 0,27^{**}$	$38,8 \pm 0,7^{**}$	$2,44 \pm 0,16$	$0,9 \pm 0,1$
OVX + DHEA	$201 \pm 25^{**}$	$7,3 \pm 1,0^*$	$0,02 \pm 0,01^{**}$	$34,5 \pm 0,7^{**}$	$1,78 \pm 0,16^*$	$0,8 \pm 0,1$
OVX + DHEA + FLU	$103 \pm 10^{**}$	$14,5 \pm 1,2$	$1,13 \pm 0,24^{**}$	$41,5 \pm 0,7^*$	$2,27 \pm 0,15$	$0,8 \pm 0,1$
OVX + DHEA + EM-800	$202 \pm 17^{**}$	$6,4 \pm 1,0^{**}$	LD ^{**}	$39,2 \pm 0,7^{**}$	$0,63 \pm 0,09^{**}$	$1,0 \pm 0,2$

LD: Límite de detección: 0,01 ng/ml

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ frente al control OVX

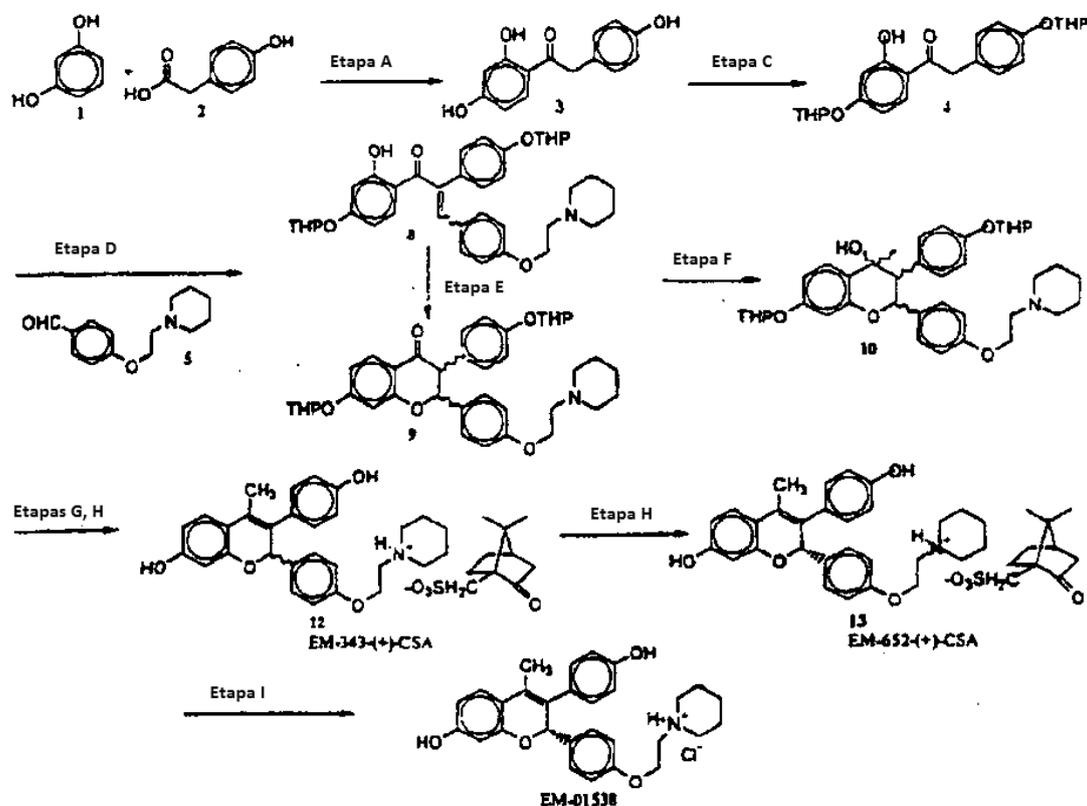
20

Ejemplo 6

Ejemplo de síntesis del compuesto preferido de la invención

Síntesis del clorhidrato de (S)-(+)-7-hidroxi-3-(4'-hidroxifenil)-4-metil-2-(4''-(2'''-piperidinoetoxi)fenil)-2H-1-benzopirano EM-01538 (EM-652, HCl).

Esquema 1



Etapa A: $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, tolueno; 100 °C; 1 hora.

Etapa C: 3,4-dihidropirano, ácido p-toluensulfónico monohidrato, acetato de etilo; 25 °C bajo atmósfera de nitrógeno, 16 horas y a continuación cristalización en isopropanol.

5 **Etapas D, E y F:**

- (1) piperidina, tolueno, aparato Dean & Stark, reflujo bajo atmósfera de nitrógeno, (2) 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno, DMF, reflujo durante 3 horas;
- (3) CH_3MgCl , THF, -20 a 0 °C y a continuación a temperatura ambiente durante 24 horas;

Etapas G, H: Ácido (1S)-(+)-10-alcanforsulfónico, acetona, agua, tolueno, temperatura ambiente, 48 horas

10 **Etapa HH:** etanol al 95%, 70 °C, a continuación a temperatura ambiente durante 3 días.

Etapa HHR: Recirculación del licor madre y lavado de la etapa HH ácido (S)-10-alcanforsulfónico, reflujo; 36 horas, a continuación a temperatura ambiente durante 16 horas.

Etapa I:

- (1) Solución acuosa de DMF, Na_2CO_3 , acetato de etilo;
- (2) Etanol, HCl diluido;
- (3) agua.

15 **Síntesis de 2-tetrahidropiraniloxi-4-hidroxi-2'-(4"-tetrahidropiraniloxifenil) acetofenona (4).** Una suspensión de 2,4-dihidroxi-2'-(4"-hidroxifenil) acetofenona 3 (97,6 g, 0,4 moles) (disponible de Chemsyn Science Laboratories, Lenexa, Kansas) en 3,4-dihidropirano (218 ml, 3,39 moles) y acetato de etilo (520 ml) se trató con ácido p-toluensulfónico monohidrato (0,03 g, 0,158 mmoles) a aproximadamente 25 °C. La mezcla de reacción se agitó con nitrógeno sin calentamiento externo durante aproximadamente 16 horas. A continuación la mezcla se lavó con una solución de bicarbonato de sodio (1 g) y cloruro de sodio (5 g) en agua (100 ml). Se separaron las fases y la fase orgánica se lavó con salmuera (20 ml). Cada lavado se extrajo posteriormente con 50 ml de acetato de etilo. Todas las fases orgánicas se combinaron y se filtraron a través de sulfato de sodio.

El disolvente (aproximadamente 600 ml) se eliminó mediante destilación a presión atmosférica y se añadió isopropanol (250 ml). Se destiló más solvente (aproximadamente 300 ml) a presión atmosférica y se añadió isopropanol (250 ml). Se destiló más disolvente (aproximadamente 275 ml) a presión atmosférica y se añadió isopropanol (250 ml). La solución se enfrió a aproximadamente 25 ° C con agitación y después de aproximadamente 12 horas, se filtró el sólido cristalino, se lavó con isopropanol y se secó (116,5 g, 70%).

Síntesis de 4-hidroxi-4-metil-2-(4'-[2"-piperidino]etoxi)fenil-3-(4"-tetrahidropiraniloxi)fenil-7-tetrahidropiraniloxicromano (10). Una solución de 2-tetrahidropiraniloxi-4-hidroxi-2'-(4"-tetrahidropiraniloxifenil)acetofenona 4 (1 kg, 2,42 moles), 4-[2-(1-piperidino)etoxi]benzaldehído 5 (594 g, 2,55 moles) (disponible de Chemsyn Science Laboratories, Lenexa, Kansas) y piperidina (824 g, 0,97 moles) (disponible de Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, Wis.) en tolueno (8 l) se mantuvo a reflujo con nitrógeno con un aparato Dean & Stark hasta que se recogió un equivalente de agua (44 ml).

Se eliminó el tolueno (6,5 l) de la solución mediante destilación a presión atmosférica. Se añadieron dimetilformamida (6,5 l) y 1, 8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno (110,5 g, 0,726 moles). Se agitó la solución durante aproximadamente 8 horas a temperatura ambiente para isomerizar la calcona 8 a cromanona 9 y a continuación se añadió a una mezcla de agua y hielo (8 l) y tolueno (4 l). Se separaron las fases y la capa de tolueno se lavó con agua (5 l). Se extrajeron las fases acuosas combinadas con tolueno (3 x 4 l). Los extractos combinados de tolueno se lavaron finalmente con salmuera (3 x 4 l), se concentraron a presión atmosférica hasta 5,5 l y a continuación se enfriaron a -10° C.

Con enfriamiento y agitación externos continuados con nitrógeno, se añadió una solución de cloruro de metilmagnesio 3 M en THF (2,5 l, 7,5 moles (disponible de Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, Wis.), manteniendo la temperatura por debajo de 0 °C. Tras añadir todo el reactivo de Grignard, se retiró el enfriamiento externo y se dejó calentar la mezcla a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a esta temperatura durante aproximadamente 24 horas.

La mezcla se enfrió de nuevo a aproximadamente -20° C y con enfriamiento y agitación continuados externos, se añadió lentamente una solución saturada de cloruro de amonio (200 ml), manteniendo la temperatura por debajo de 20 °C. La mezcla se agitó durante 2 horas a continuación se añadió la solución saturada de cloruro de amonio (2 l) y tolueno (4 l) y se agitó durante cinco minutos. Las fases se separaron y se extrajo la capa acuosa con tolueno (2 x 4 l). Los extractos combinados de tolueno se lavaron con ácido clorhídrico diluido hasta que la solución fue homogénea y a continuación con salmuera (3 x 4 l). La solución de tolueno se concentró finalmente a la presión atmosférica a 2 l. Esta solución se utilizó directamente en la siguiente etapa.

Síntesis de la sal del ácido (2R,S)-7-hidroxi-3-(4'-hidroxifenil)-4-metil-2-(4"-[2"-piperidino]etoxi)fenil)-2H-1benzopiran (1S)-10-alcanforsulfónico (± 12). A la solución en tolueno de 4-hidroxi-4-metil-2-(4'-[2"-piperidino]etoxi)fenil-3-(4"-tetrahidropiraniloxi)fenil-7-tetrahidropiraniloxicromano (10) se añadió acetona (6 l), agua (0,3 l) y ácido (S)-10-alcanforsulfónico (561 g, 2,42 más) (disponible de Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, Wis.). La mezcla se agitó con nitrógeno durante 48 horas después de este tiempo la sal del ácido (2R,S)-7-hidroxi-3-(4'-hidroxifenil)-4-metil-2-(4"-[2"-piperidino]etoxi)fenil)-2H-1-benzopirano (1S)-10-alcanforsulfónico (12) se filtró, se lavó con acetona y se secó (883 g). Este material se utilizó en la siguiente etapa (HH) sin purificación adicional.

Síntesis de la sal del ácido (2S)-7-hidroxi-3-(4'-hidroxifenil)-4-metil-2-(4"-[2"-piperidino]etoxi)fenil)-2H-1benzopiran (1S)-10-alcanforsulfónico (13, sal de (+)-EM-652 (1S)-CSA). Una suspensión de la sal del ácido (2R,S)-7-hidroxi-3-(4'-hidroxifenil)-4-metil-2-(4"-[2"-piperidino]etoxi)fenil)-2H-benzopiran (1S)-10-alcanforsulfónico ± 12 (759 g) en etanol al 95% se calentó con agitación a aproximadamente 70 °C hasta que el sólido se hubo disuelto. La solución se dejó enfriar a temperatura ambiente con agitación, a continuación se sembró con unos pocos cristales de la sal del ácido (2S)-7-hidroxi-3-(4'-hidroxifenil)-4-metil-2-(4"-[2"-piperidino]etoxi)fenil)-2H-1-benzopiran (1S)-10-alcanforsulfónico 13. La solución se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente tres días en total. Los cristales se filtraron, se lavaron con etanol al 95% y se secaron (291 g, 76%). La de del producto fue del 94,2% y la pureza del 98,8%.

Síntesis del clorhidrato de (S)-(+)-7-hidroxi-3-(4'-hidroxifenil)-4-metil-2-(4"-[2"-piperidino]etoxi)fenil)-2H-1benzopiran EM-01538 (EM-652, HCl). Una suspensión del compuesto 13 (sal de EM-652-(+)-CSA, 500 mg, 0,726 mmol) en dimetilformamida (11 µl, 0,5 mmol) se trató con una solución acuosa de carbonato de sodio 0,5 M (7,0 ml, 3,6 mmol) y se agitó durante 15 min. La suspensión se trató con acetato de etilo (7,0 ml) y se agitó durante 4 h. La fase orgánica se lavó a continuación con una solución saturada acuosa de carbonato de sodio (2 x 5 ml) y salmuera (1 x 5 ml), se secó con sulfato de magnesio y se concentró. Una solución de la espuma de color rosa resultante (EM-652) en etanol (2 ml) se trató con ácido clorhídrico 2 N (400 µl, 0,80 mmol), se agitó durante 1 h, se trató con agua destilada (5 ml) y se agitó durante 30 min. La suspensión resultante se filtró, se lavó con agua destilada (5 ml), se secó al aire y a vacío elevado (65 °C) para dar un polvo cremoso (276 mg, 77%), polvo blanquecino fino; Calorimetría de barrido, comienzo del pico de fusión a 219 °C, ΔH = 83 J/g; [α]²⁴_D = 154° en metanol 10 mg/ml; RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 1,6 (amplio, 2H, H-4"), 1,85 (amplio, 4H, H-3" y 5"), 2,03 (s, 3H, CH₃), 3,0 y 3,45 (amplio, 4H, H-2" y 6"), 3,47 (t, J=4, 9Hz, 2H, H-3"), 4,26 (t, J=4,9Hz, 2H, H-2"), 5,82 (s, 1H, H-2), 6,10 (d, J=2,3Hz, 1H, H-8), 6,35 (dd, J=8,4, 2,43 Hz, 1H, H-6), 6,70 (d, J=8, 6 Hz, 2H, H-3' y H-5'), 6,83 (d, J=8, 7Hz, 2H, H-3" y H-5"), 7,01 (d, J=8,5 Hz, 2H, H-2' y H-6'), 7,12 (d, J=8,4Hz, 1H, H-5), 7,24 (d, J=8, 6Hz, 2H, H-2" y H-6") ; RMN

de ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) δ ppm 14,84, 22,50, 23,99, 54,78, 57,03, 62,97, 81,22, 104,38, 109,11, 115,35, 116,01, 118,68, 125,78, 126,33, 130,26, 130,72, 131,29, 131,59, 134,26, 154,42, 157,56, 158,96, 159,33, Composición Elemental: C, H, N, Cl: Teoría : 70,51, 6,53, 2,84, 7,18, %, Encontrado : 70,31, 6,75, 2,65, 6,89%.

Ejemplo 7

5 **Ensayos de biodisponibilidad in vivo de los profármacos de androst-5-eno-3 β ,17 β -diol**

1) Principio

Se llevaron a cabo los ensayos de la biodisponibilidad de los profármacos de los precursores de los esteroides sexuales en ratas Sprague Dawley macho midiendo las concentraciones en plasma de los compuestos después de la administración oral individual de los compuestos.

10 a) **Animales y tratamiento**

Se obtuvieron ratas Sprague-Dawley [CrI:CD(SD)Br] macho que pesaban 275-350 g de Charles-River Canada Inc y se alojaron a 2 por jaula durante el periodo de aclimatación e individualmente durante el periodo de estudio. Los animales se mantuvieron en un régimen de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (encendido de las luces a las 8:00 h). Los animales recibieron pienso para roedores certificado (Lab Diet n° 5002, briquetas) y agua del grifo a voluntad. Las ratas se sometieron a ayuno (sólo acceso a agua) comenzando desde la tarde anterior a la dosificación.

Cada compuesto a probar se administró a tres animales en forma de suspensión en metilcelulosa al 0,4% mediante sonda nasogástrica a una dosis de 150 $\mu\text{g}/\text{rata}$. Se recogió una muestra de sangre de 0,7 ml procedente de la vena yugular de las ratas con anestesia inducida por isoflurano a 1, 2, 3, 4 y 7 horas tras la sonda nasogástrica. Las muestras de sangre se transfirieron inmediatamente a un Microtainer de 0,75 ml refrigerado que contenía EDTA y se mantuvieron en un baño de agua con hielo hasta la centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos. Se llevó a cabo la separación del plasma rápidamente (menos de 50 minutos) tras la recogida de sangre. A continuación se transfirió una alícuota de 0,25 ml de plasma a un tubo de borosilicato (13 x 100) y se congeló rápidamente en hielo seco. Las muestras de plasma se mantuvieron a -80°C hasta la medida de la concentración en plasma del esteroide sexual o de los precursores de los esteroides sexuales mediante GC-MS.

Resultados:

En la figura 12 y 13 se muestran la absorción oral y las AUC.

Ejemplos de composición farmacéutica

Se muestran a continuación, por medio de ejemplo, diversas composiciones farmacéuticas que utilizan SERM EM-800 o EM1538 activo preferido y un precursor de los esteroides sexuales activo preferido DHEA, EM-1304 o EM-01474-D. Se pueden utilizar otros compuestos de la presente invención o sus combinaciones, en lugar de (o además de) EM-800 or EM-1538, DHEA, EM-1304 o EM-01474-D. Se puede variar la concentración de principio activo en un amplio intervalo tal como se ha descrito en el presente documento. Se conocen bien en la técnica las cantidades y los tipos de los diferentes ingredientes que se pueden incluir.

35 **Ejemplo A**

Comprimido

Ingrediente	% en peso (en peso de la composición total)
EM-800	5,0
DHEA	15,0
Gelatina	5,0
Lactosa	58,5
Almidón	16,5

Ejemplo B

Cápsula de gelatina

Ingrediente	% en peso (en peso de la composición total)
EM-800	5,0
DHEA	15,0
Lactosa hidratada	65,0
Almidón	4,8
Celulosa microcristalina	9,8
Estearato de magnesio	0,4

Ejemplos de kits

Se muestran a continuación, por medio de ejemplo, algunos kits que utilizan SERM EM-800 o EM-1538 activo preferido y los precursores de los esteroides sexuales activos DHEA, EM-1304 o EM-01474-D. Se pueden utilizar otros compuestos de la presente invención o sus combinaciones en lugar de (o además de) EM-800 o EM-1538, DHEA, EM-1304 o EM-01474-D. Se puede variar la concentración del principio activo en un amplio intervalo tal como se ha descrito en el presente documento. Se conocen bien en la técnica las cantidades y los tipos de los diferentes ingredientes que se pueden incluir,

Ejemplo A

El SERM se administra por vía oral mientras que el precursor de los esteroides sexuales se administra por vía percutánea

Composición de SERM para la administración oral (cápsulas)

Ingrediente	% en peso (en peso de la composición total)
EM-800	5,0
Lactosa hidratada	80,0
Almidón	4,8
Celulosa microcristalina	9,8
Estearato de magnesio	0,4

Composición de precursor de los esteroides sexuales para la administración tópica (gel)

Ingrediente	% en peso (en peso de la composición total)
DHEA	10,0
Triglicéridos caprílico-cáprico (Neobee M-5)	5,0
Hexilenglicol	15,0
Transcutol (dietilenglicol monometil éter)	5,0
Alcohol bencílico	2,0
Ciclometicona (Dow Corning 345)	5,0
Etanol (absoluto)	56,0
Hidroxipropilcelulosa (1500 cps) (KLUCCEL)	2,0

Ejemplo B

El SERM y el precursor de los esteroides sexuales se administran por vía oral.

Composición de antiestrógeno no esteroideo para la administración oral (cápsulas)

Ingrediente	% en peso (en peso de la composición total)
EM-800	5,0
Lactosa hidratada	80,0
Almidón	4,8
Celulosa microcristalina	9,8
Estearato de magnesio	0,4

Composición de precursor de los esteroides sexuales para la administración oral (Cápsula de gelatina)

Ingrediente	% en peso (en peso de la composición total)
DHEA	15,0
Lactosa hidratada	70,0
Almidón	4,8
Celulosa microcristalina	9,8
Estearato de magnesio	0,4

Otros SERM se pueden sustituir por EM-800 o EM-01538 en las anteriores formulaciones, además otros inhibidores de los esteroides sexuales se pueden sustituir por DHEA, EM-1304 o EM-01474-D. Puede estar incluido más de un SERM o más de un precursor, en cuyo caso, el porcentaje en peso combinado es preferentemente el del porcentaje en peso de un único precursor dado en los anteriores ejemplos.

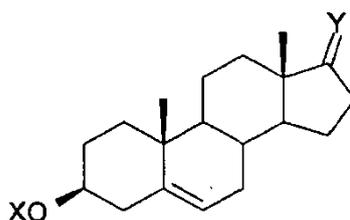
La presente invención se ha descrito en términos de las realizaciones y ejemplos preferidos. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que la aplicabilidad y alcance más amplios de la presente invención están limitados solamente por las reivindicaciones de patente dadas a continuación.

REIVINDICACIONES

1. Composición para su uso como un medicamento en una terapia de combinación para tratar o reducir el riesgo de contraer sequedad vaginal, comprendiendo la composición:

- 5 a) un precursor de los esteroides sexuales seleccionado entre el grupo que consiste en deshidroepiandrosterona, deshidroepiandrosterona sulfato, androst-5-eno-3 β ,17 β -diol, 4-androsteno-3,17-diona y un profármaco que se convierte in vivo en cualquiera de los anteriores precursores de los esteroides sexuales y
- 10 b) una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador selectivo del receptor de estrógenos que es un derivado benzopirano

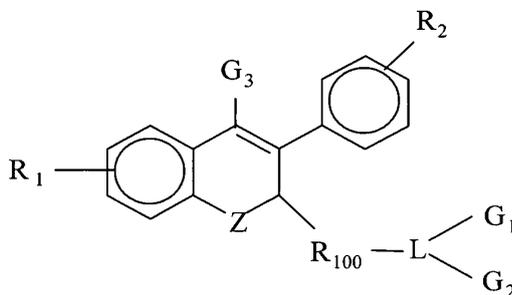
en la que el profármaco convertido in vivo en un precursor de los esteroides sexuales tiene la fórmula general:



15 en la que X se selecciona entre el grupo que consiste en H-, ROC-, RCO₂CHR_a- y R_bSO₂- (seleccionándose R entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C1-C18) de cadena lineal o ramificada, alqueno (C2-C18) de cadena lineal o ramificada, arilo, furilo, alcoxilo (C1-C18) de cadena lineal o ramificada, alquenoiloxilo (C2-C18) de cadena lineal o ramificada, alquenoiloxi (C2-C18) de cadena lineal o ramificada, ariloxi, furiloxi y halógeno o análogos de carboxilo de los anteriores; siendo R_a hidrógeno o alquilo (C1-C6) y seleccionándose R_b entre el grupo que consiste en hidroxilo (o sus sales), metilo, fenilo y p-toluido);

20 en la que Y es el oxígeno del carbonilo o Y representa un β -OX (teniendo X el mismo significado que anteriormente) y α -H

y en la que el modulador selectivo del receptor de estrógenos tiene la siguiente fórmula:

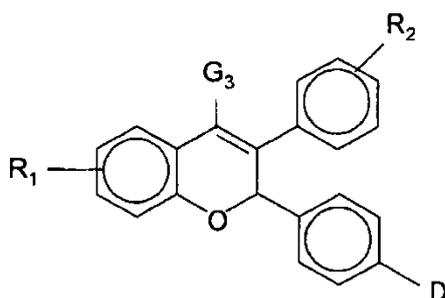


25 en la que R₁ y R₂ son independientemente hidrógeno, hidroxilo o un resto que se convierte en hidroxilo in vivo; en la que Z es un resto de cierre bivalente; en la que R₁₀₀ es un resto bivalente que separa L del anillo B por 4-10 átomos que intervienen; en la que L es un resto polar bivalente o trivalente seleccionado del grupo -SO-, -CON-, -N< y -SON<;

30 en la que G₁ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un hidrocarburo C1 a C5 o un resto bivalente que une G₂ con L para formar un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros y halo o derivados insaturados de los anteriores, en la que G₂ está ausente o se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un hidrocarburo C1 a C5 o un resto bivalente que une G₁ y L para formar un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros y halo o derivados insaturados de los anteriores,

en la que G₃ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metilo y etilo,

en la que el derivado benzopirano tiene la siguiente estructura general:



en la que D es $-OCH_2CH_2N(R_3)R_4$ (R_3 y R_4 o están independientemente seleccionados del grupo que consiste en alquilo C1-C4 o R_3 , R_4 y el átomo de nitrógeno al que está unido forman juntos una estructura seleccionada del grupo que consiste en anillo pirrolidino, dimetil-1-pirrolidino, metil-1-pirrolidinilo, piperidino, hexameteniminio, morfolino);

en la que R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: hidrógeno, hidroxilo y un resto convertido in vivo en hidroxilo;

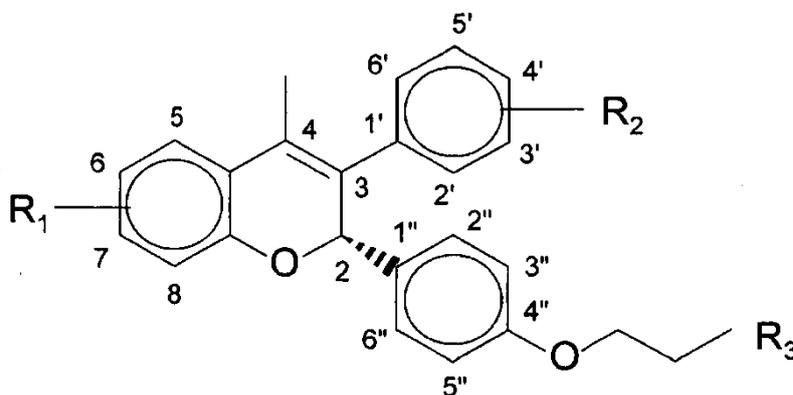
en la que G_3 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metilo y etilo.

2. Un kit que comprende un primer envase que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un precursor de los esteroides sexuales definidos en la reivindicación 1 y que comprende además un segundo envase que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un modulador selectivo del receptor de estrógenos definido en la reivindicación 1, para su uso en un tratamiento combinado para tratar o reducir el riesgo de sequedad vaginal.

3. La composición para su uso de la reivindicación 1, que comprende además una cantidad terapéuticamente eficaz de una progestina.

4. La composición o kit para su uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el precursor no es 4-androsteno-3,17-diona.

5. La composición o kit para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el derivado benzopirano es un compuesto ópticamente activo que tiene una configuración absoluta S en el carbono 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, teniendo dicho compuesto la estructura molecular



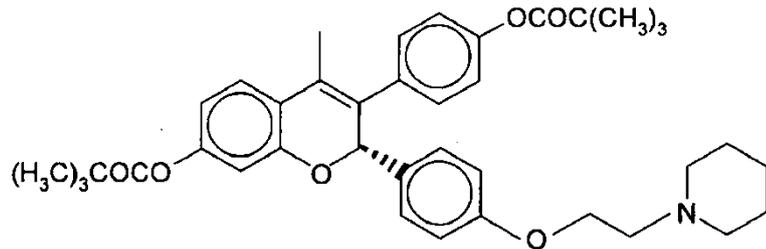
en la que R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidroxilo y un resto que se puede convertir in vivo en hidroxilo;

en la que R_3 es una especie seleccionada del grupo que consiste en un resto pirrolidinilo saturado, insaturado o sustituido, piperidino saturado, insaturado o sustituido, piperidinilo saturado, insaturado o sustituido, morfolino saturado, insaturado o sustituido, un resto cíclico que contiene nitrógeno, un resto policíclico que contiene nitrógeno y NR_aR_b , (R_a y R_b siendo independientemente hidrógeno, alquilo C1-C6 de cadena lineal o ramificada, alquenilo C2-C6 de cadena lineal o ramificada y alquinilo C2-C6 de cadena lineal o ramificada).

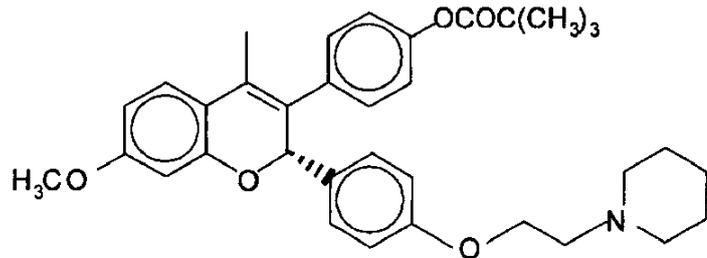
6. La composición o kit para su uso de la reivindicación 5, en la que dicho compuesto o sal sustancialmente carece del enantiómero (2R).

7. La composición o kit para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho modulador selectivo del receptor de estrógenos se selecciona del grupo que consiste en:

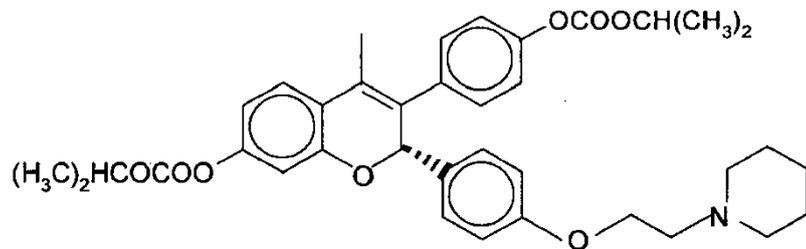
EM-800



EM-01520

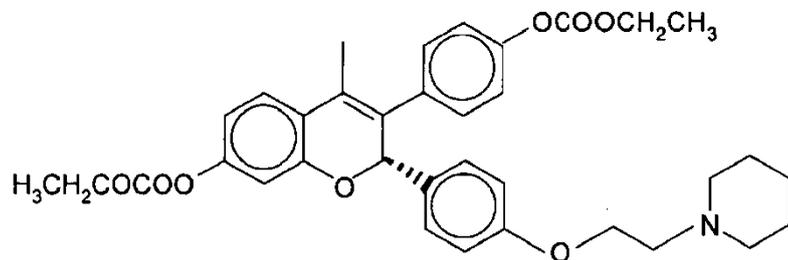


EM-01533



5

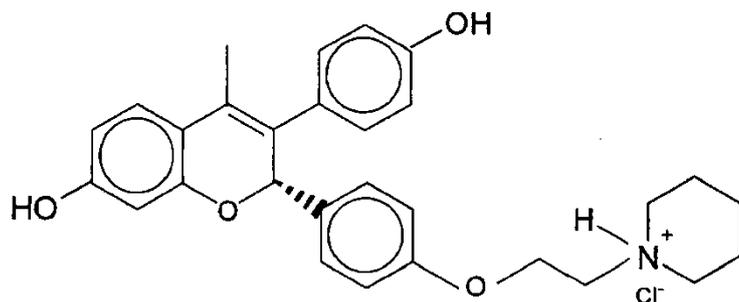
EM-01518



8. La composición o kit para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el derivado benzopirano es una sal de un ácido seleccionado del grupo que consiste en ácido acético, ácido adípico, ácido benenosulfónico, ácido benzoico, ácido canforsulfónico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido hidroyódico, ácido hidrobromico, ácido hidrocloreico, ácido hidroclorotiazida, ácido hidroxinaftoico, ácido láctico, ácido maleico, ácido metanosulfónico, ácido metilsulfúrico, ácido 1,5-naftalendisulfónico, ácido nítrico, ácido palmítico, ácido piválico, ácido fosfórico, ácido propiónico, ácido succínico, ácido sulfúrico, ácido tartárico, ácido tereftálico, ácido p-toluenosulfónico y ácido valérico.

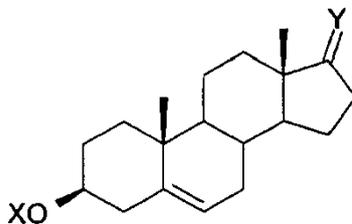
9. La composición o kit para su uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 4, en la que en dicho modulador selectivo del receptor de estrógenos es:

EM-1538



y el precursor de los esteroides sexuales se selecciona del grupo que consiste en deshidroepiandrosterona, deshidroepiandrosterona sulfato, androst-5-eno-3 β ,17 β -diol.

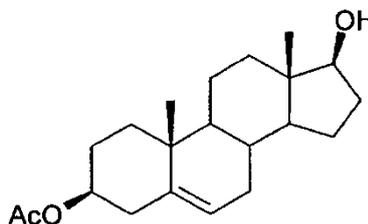
5 10. La composición o kit para su uso en las reivindicaciones 1 o 2, en la que el compuesto convertido in vivo en un precursor de los esteroides sexuales tiene la fórmula general:



10 en la que X se selecciona entre el grupo que consiste en H-, ROC-, RCO₂CHR_a- y R_bSO₂- (seleccionándose R entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C1-C18) de cadena lineal o ramificada, alquenilo (C2-C18) de cadena lineal o ramificada, alquinilo (C2-C18) de cadena lineal o ramificada, arilo, furilo, alcoxilo (C1-C18) de cadena lineal o ramificada, alqueniloxilo (C2-C18) de cadena lineal o ramificada, alquiniloxilo (C2-C18) de cadena lineal o ramificada, ariloxi, furiloxi y halógeno o análogos de carboxilo de los anteriores; siendo R_a hidrógeno o alquilo (C1-C6) y seleccionándose R_b entre el grupo que consiste en hidroxilo (o sus sales), metilo, fenilo y p-toluilo);
 15 en la que Y es el oxígeno del carbonilo o Y representa un β -OX (teniendo X el mismo significado que anteriormente) y α -H.

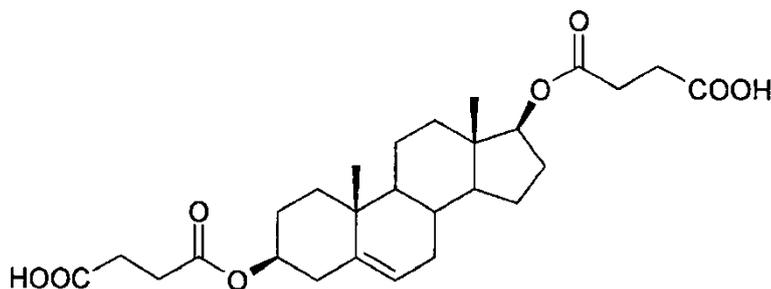
11. La composición o kit para su uso en las reivindicaciones 1, 2 o 6, en la que el compuesto convertido in vivo en un precursor de los esteroides sexuales se selecciona del grupo que consiste en:

EM-1304



20

EM-01474-D



25

12. La composición para su uso de la reivindicación 1, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, una cantidad terapéuticamente eficaz de

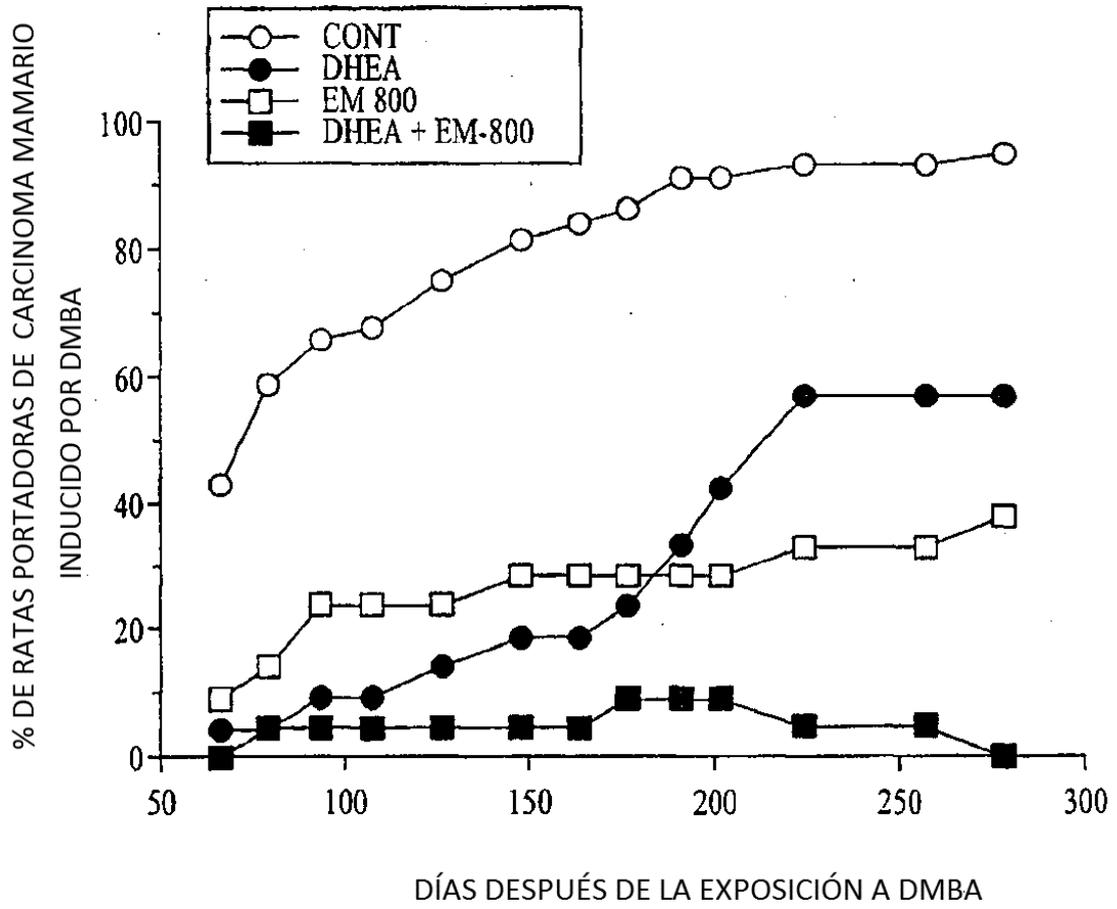


FIG. 1

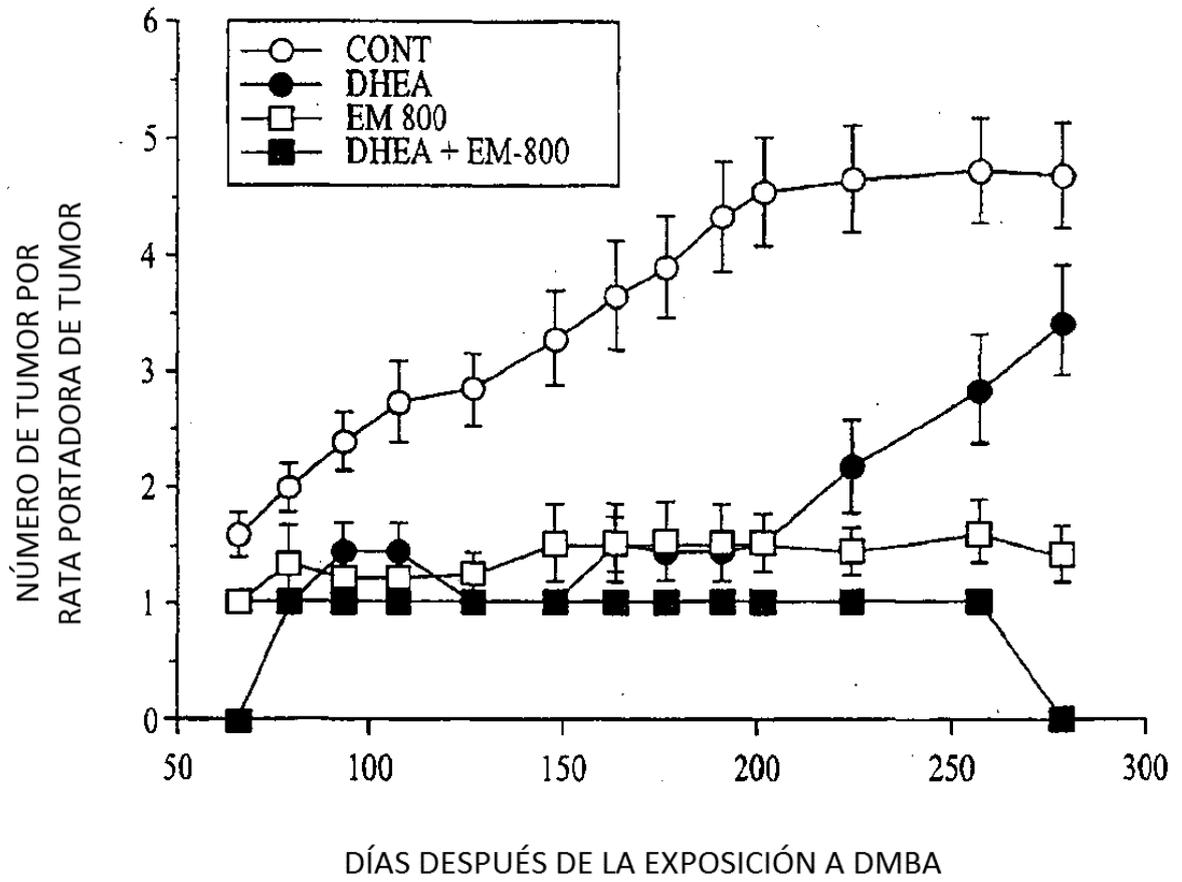


FIG. 2A

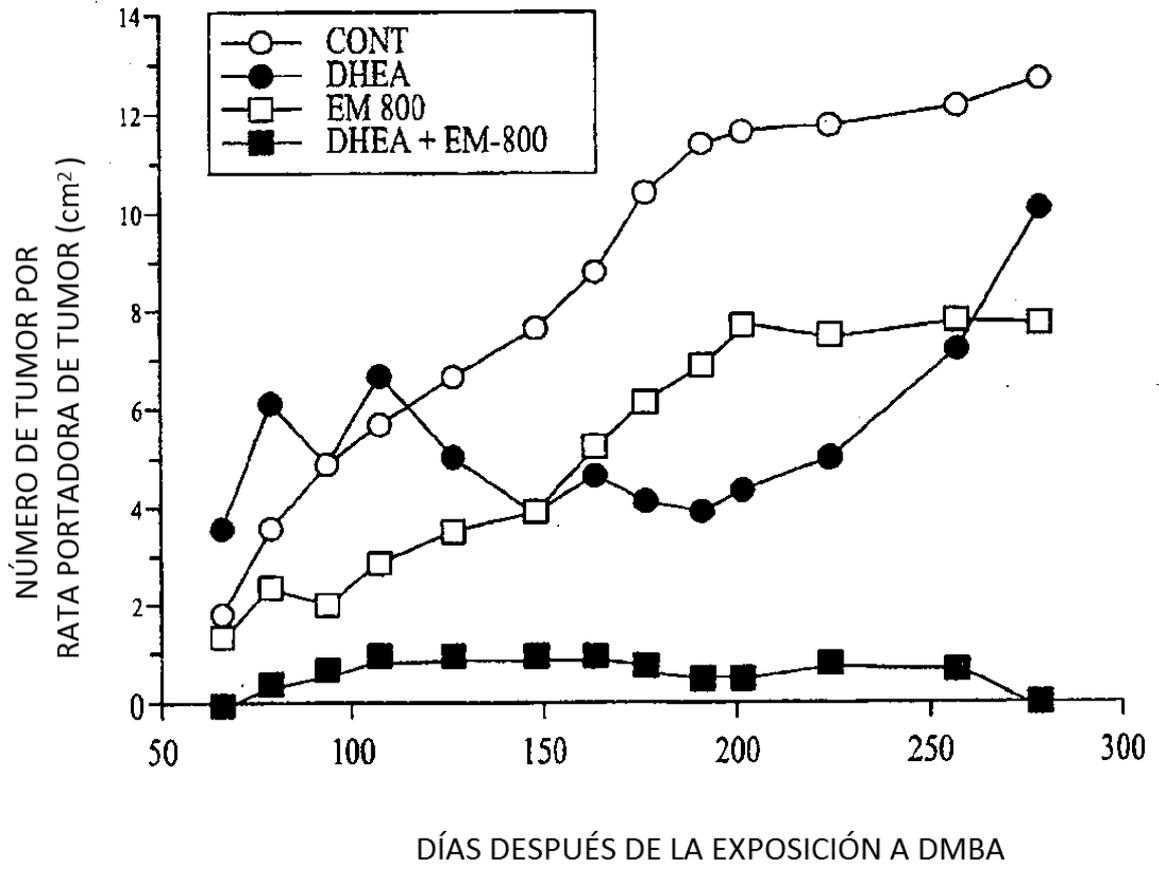


FIG. 2B

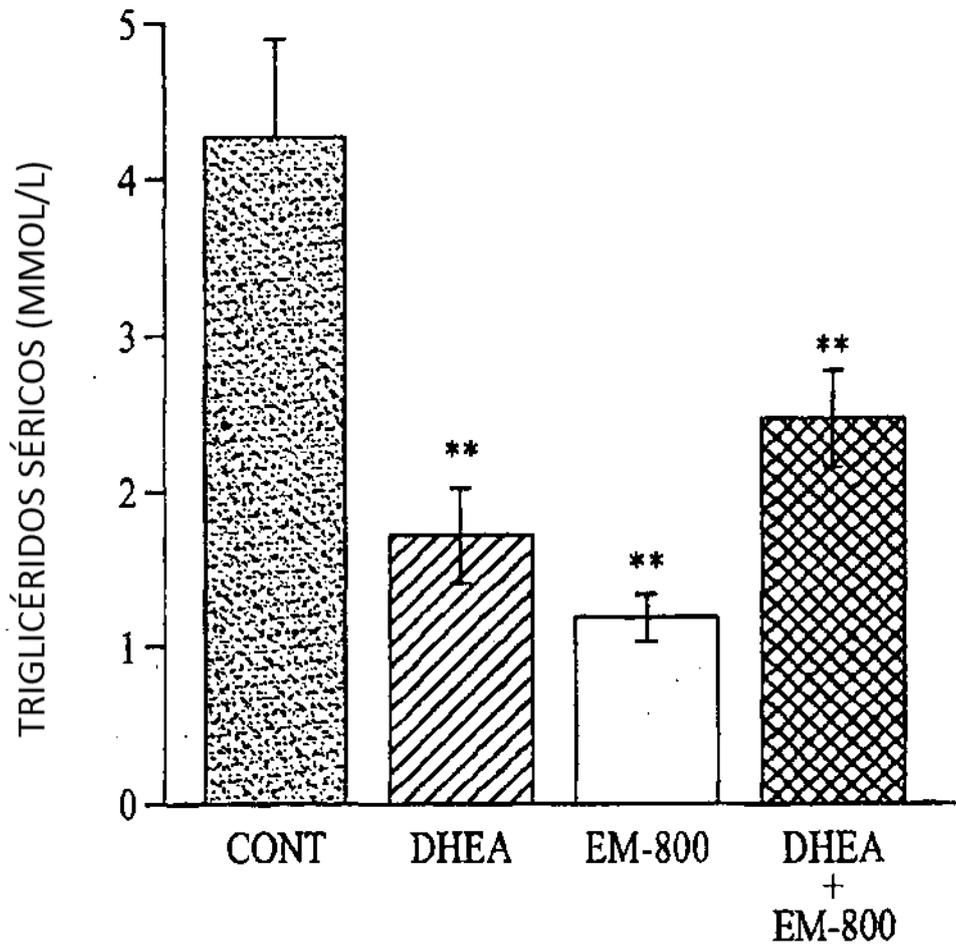


FIG. 3A

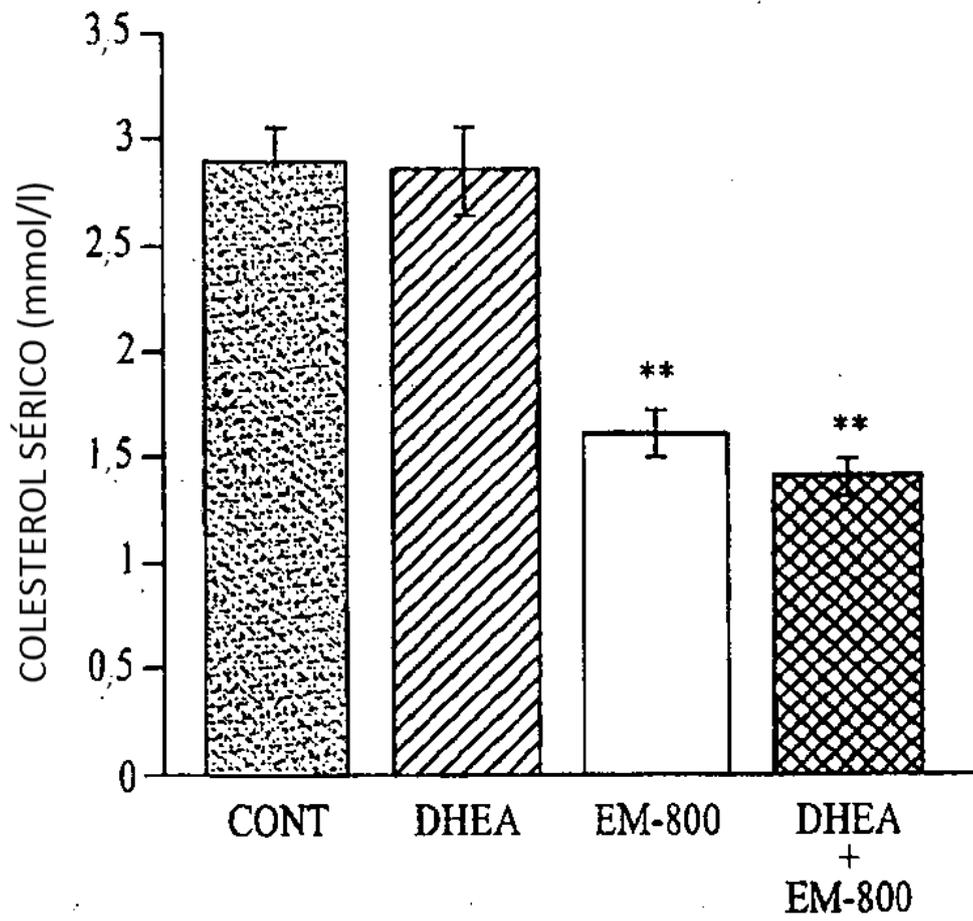


FIG. 3B

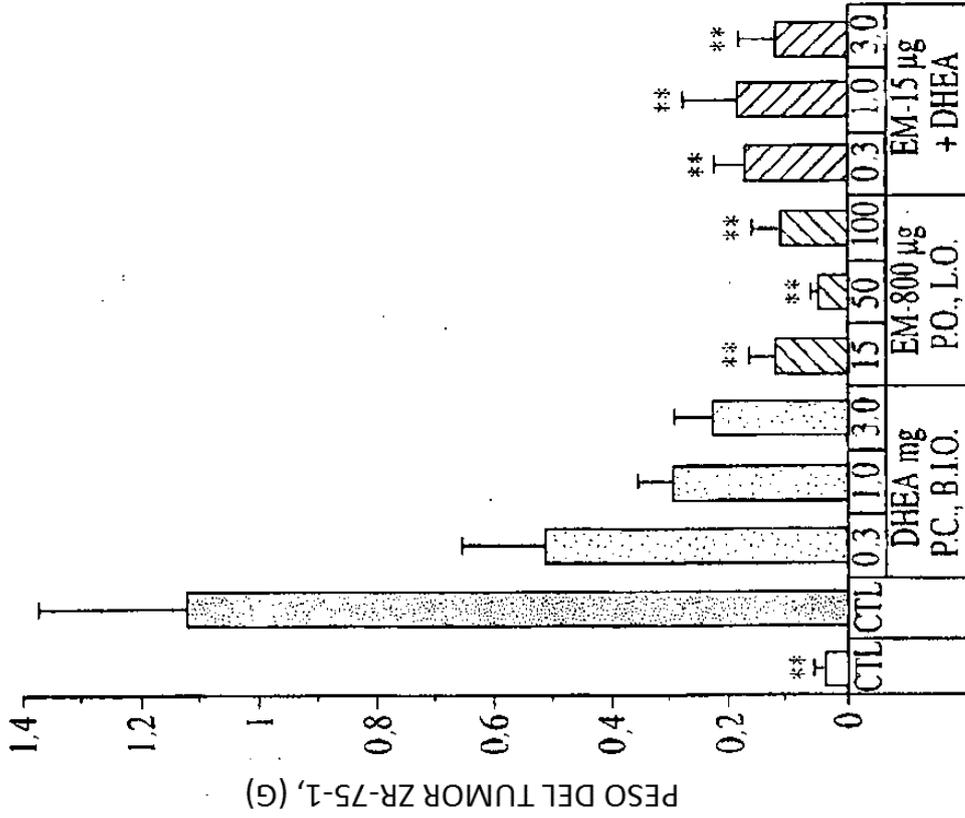


FIG. 4B

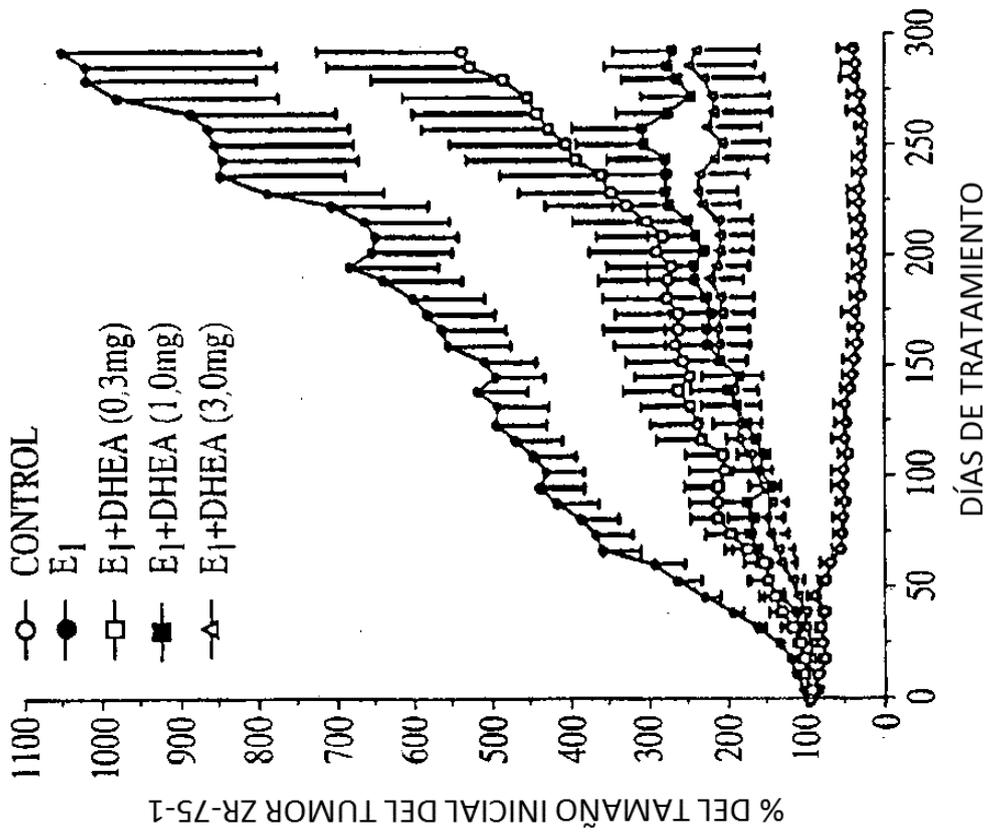


FIG. 4A

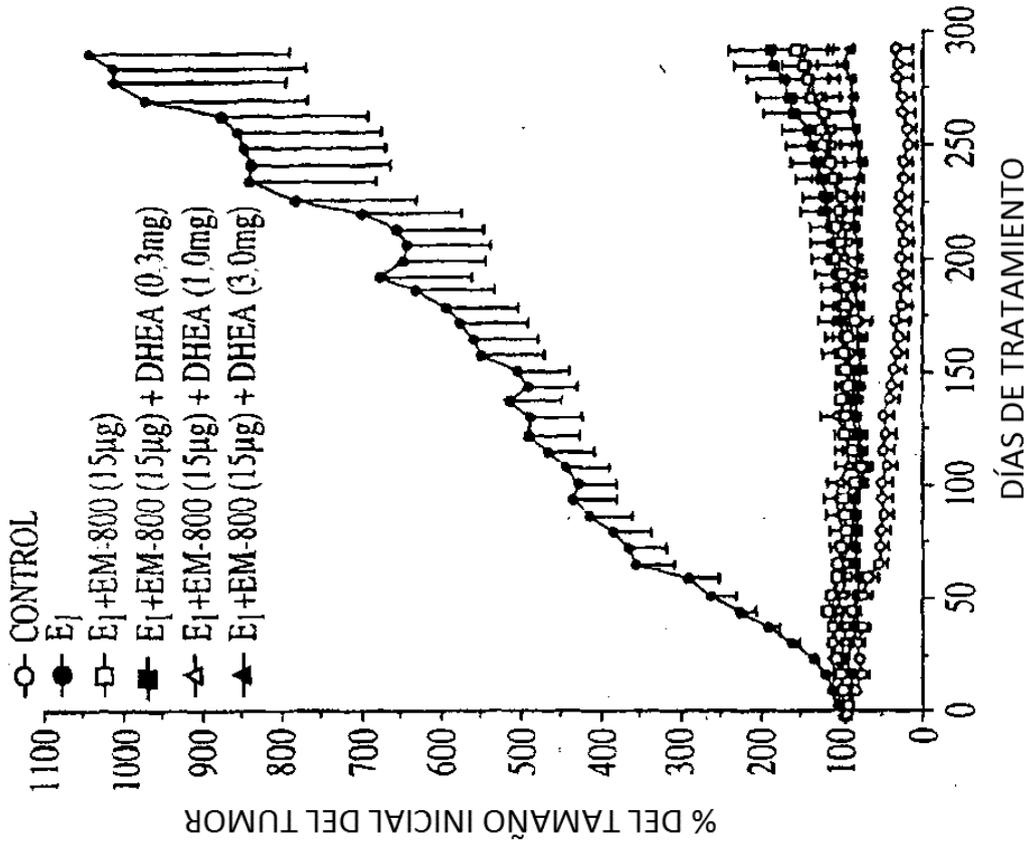


FIG. 5B

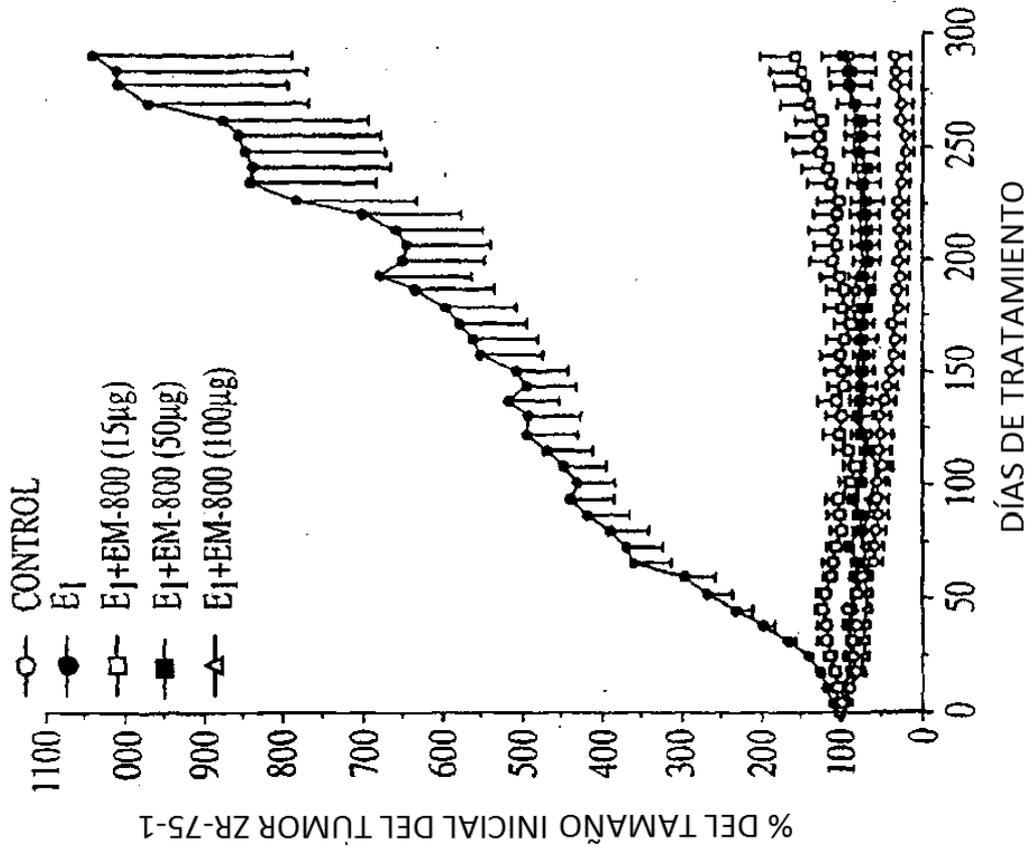


FIG. 5A

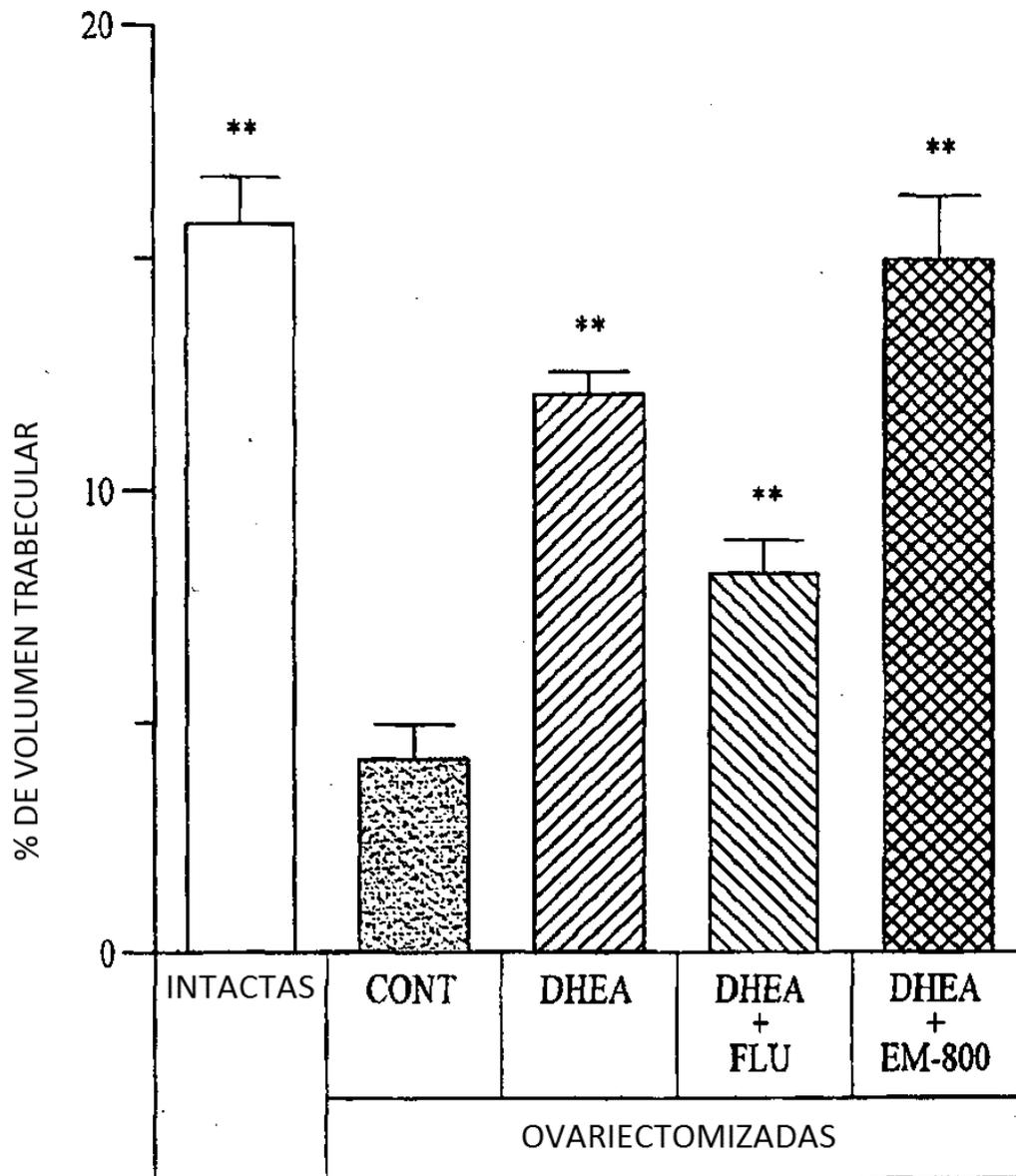


FIG. 6

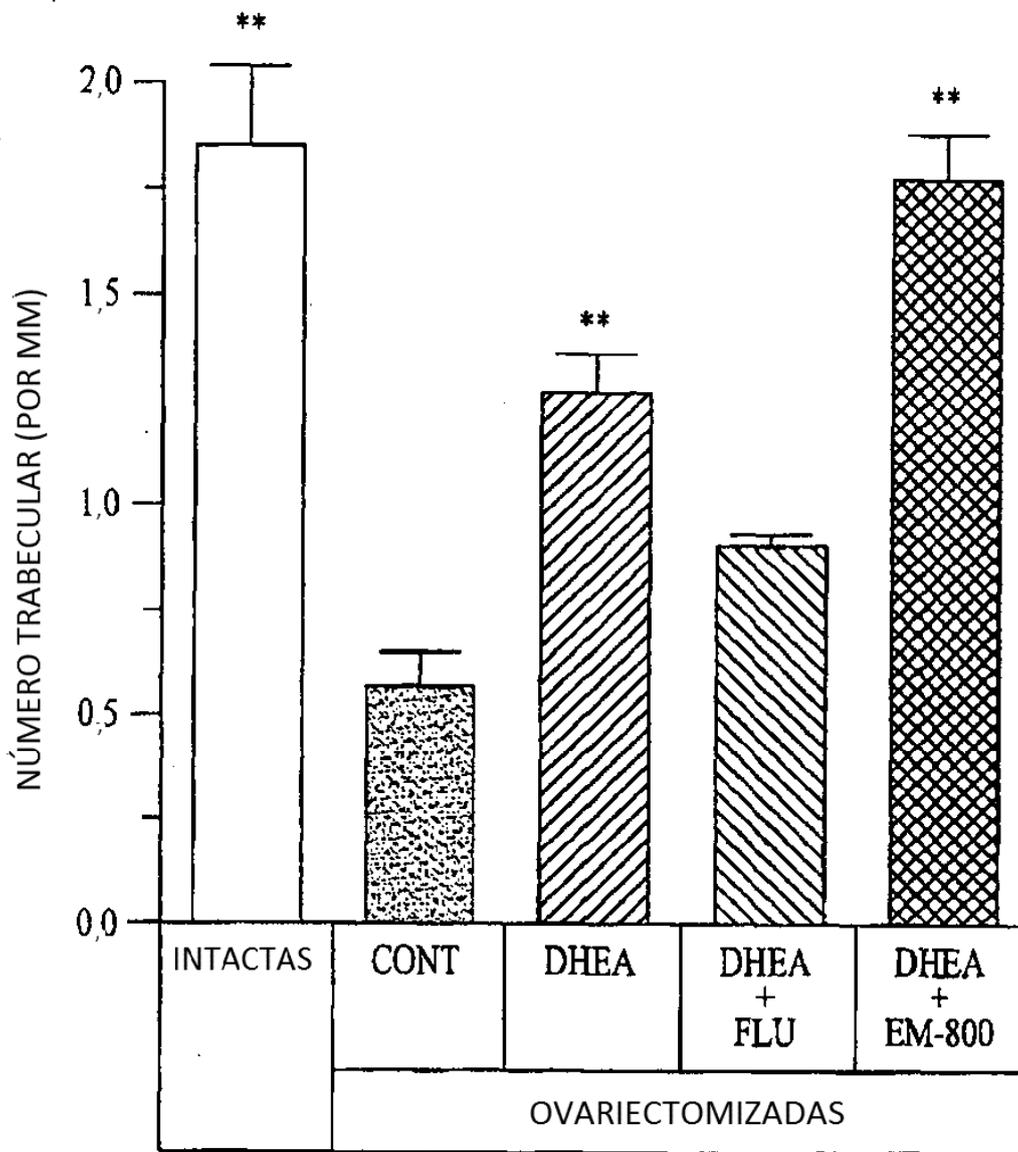


FIG. 7



FIG. 8B

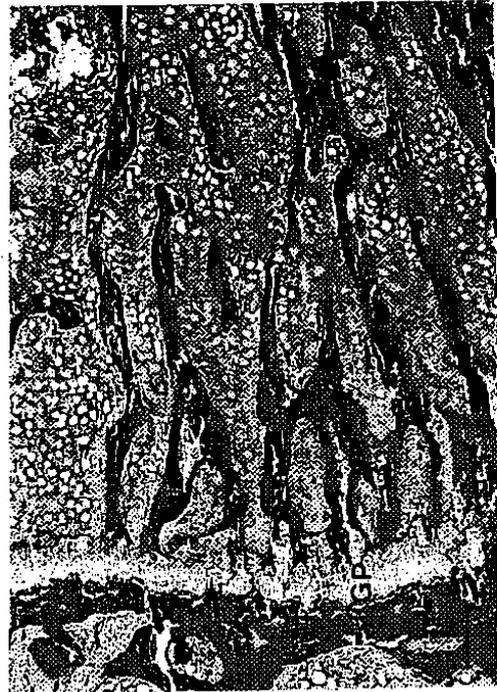


FIG. 8A



FIG. 8D



FIG. 8C

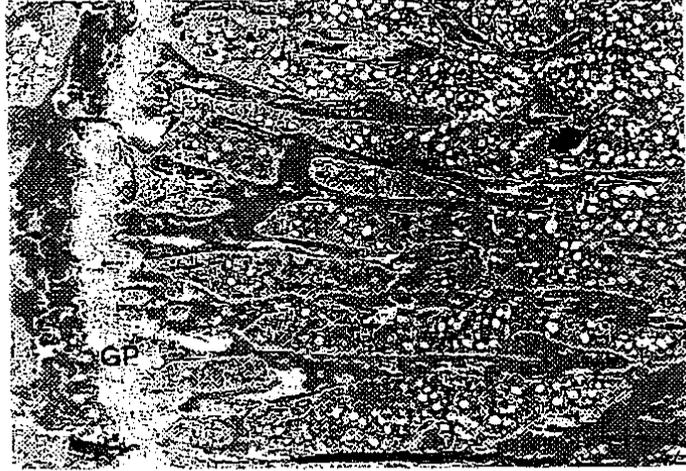


FIG. 8E

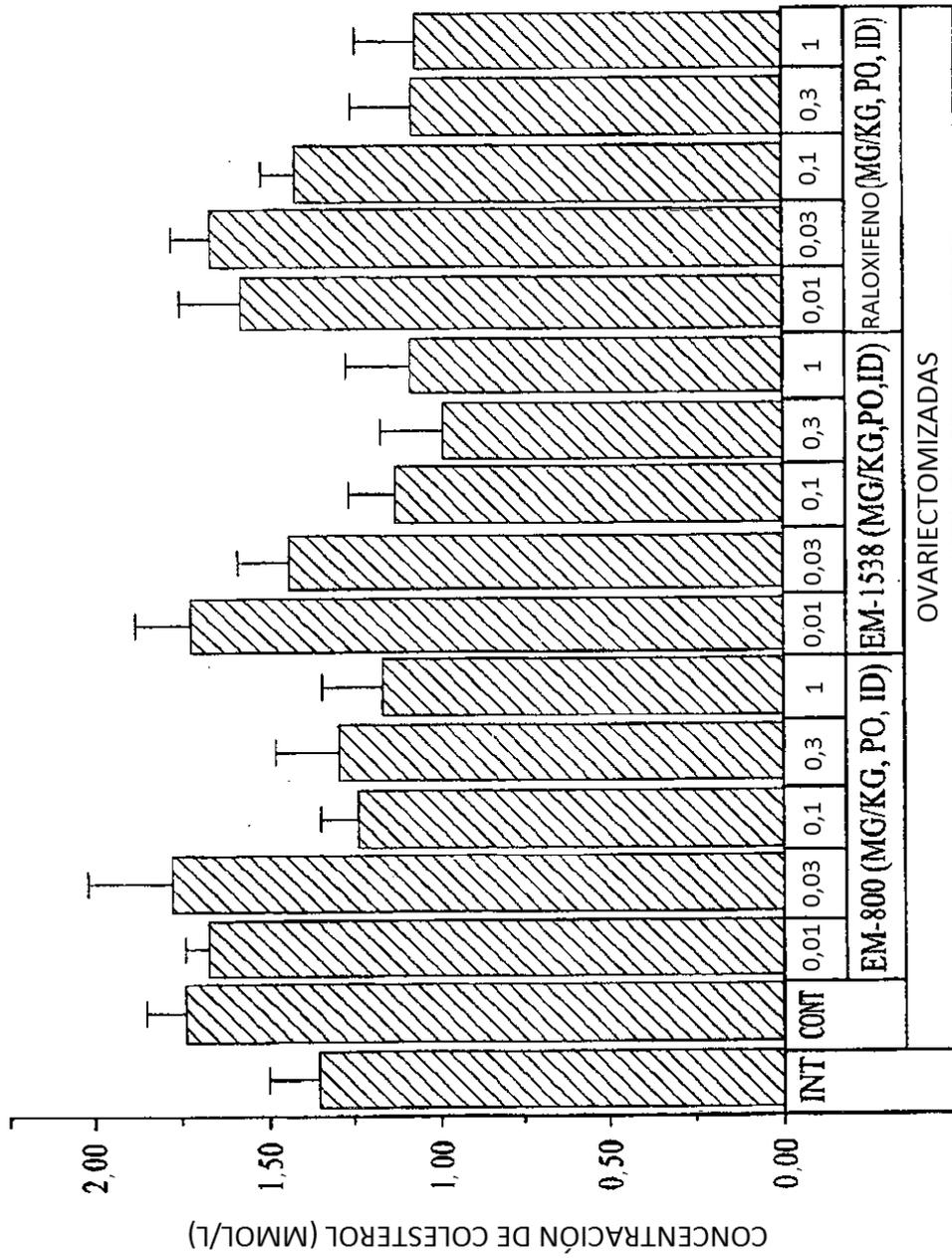


FIG. 9

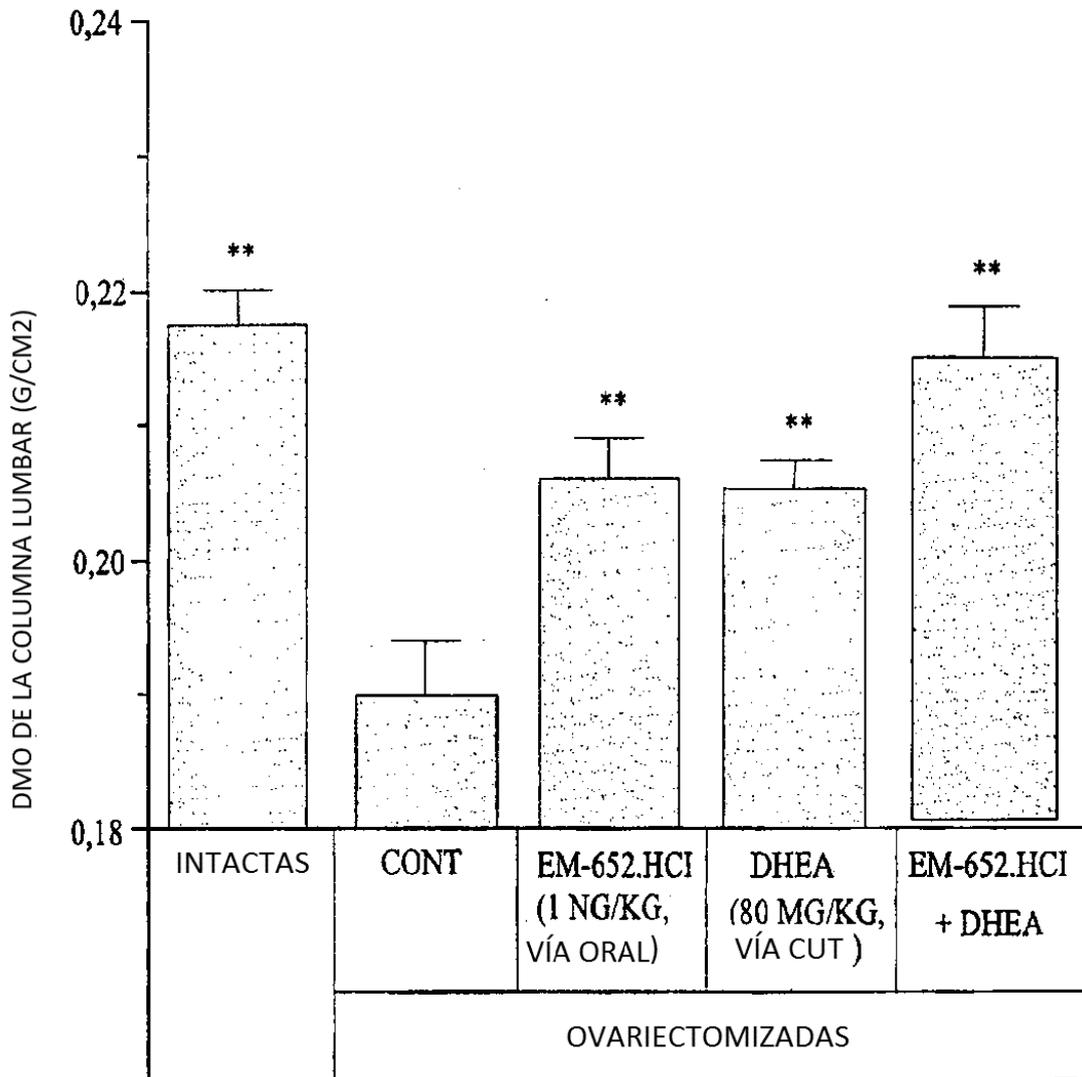


FIG. 10

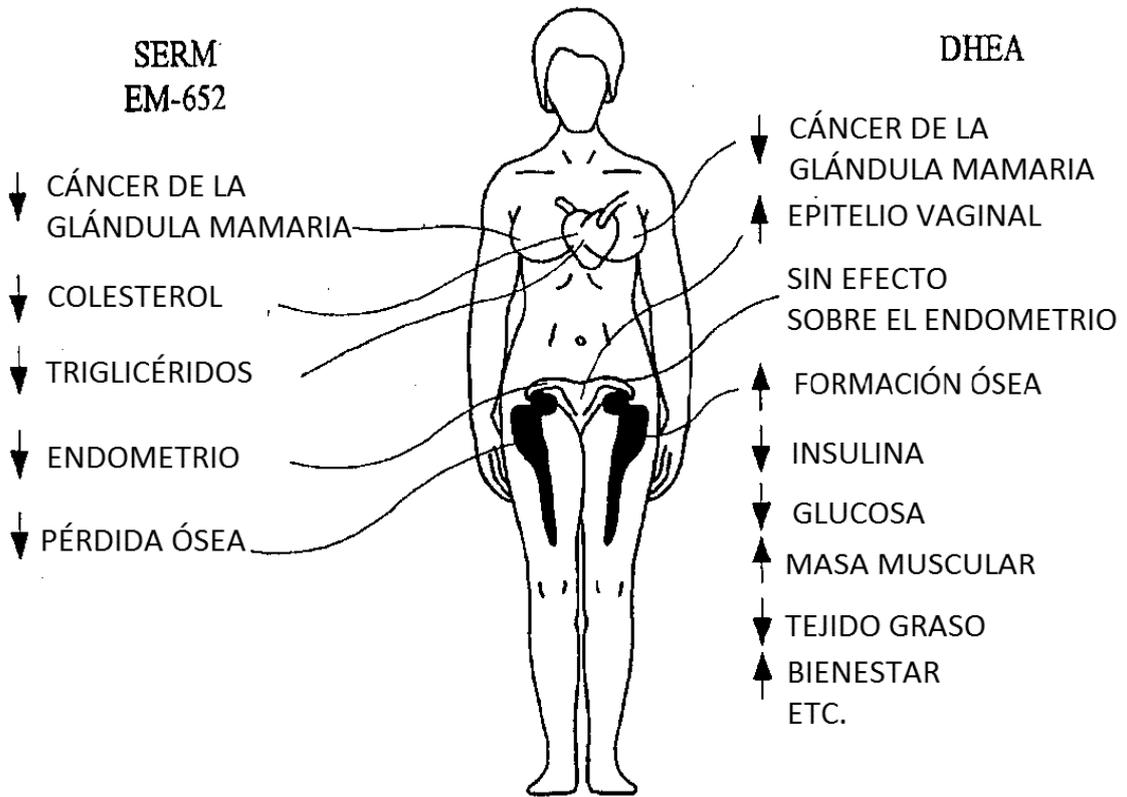


FIG. 11

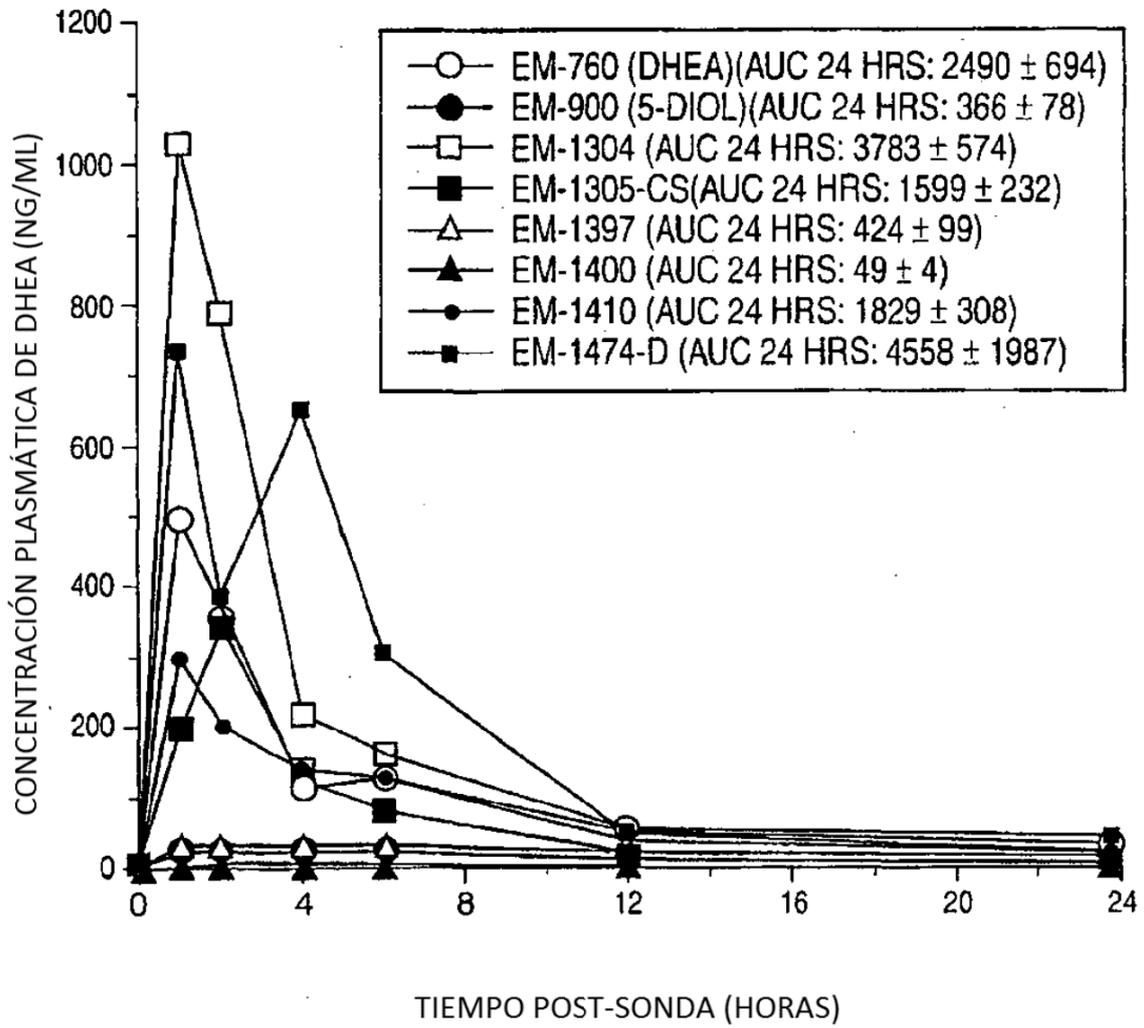


FIG. 12

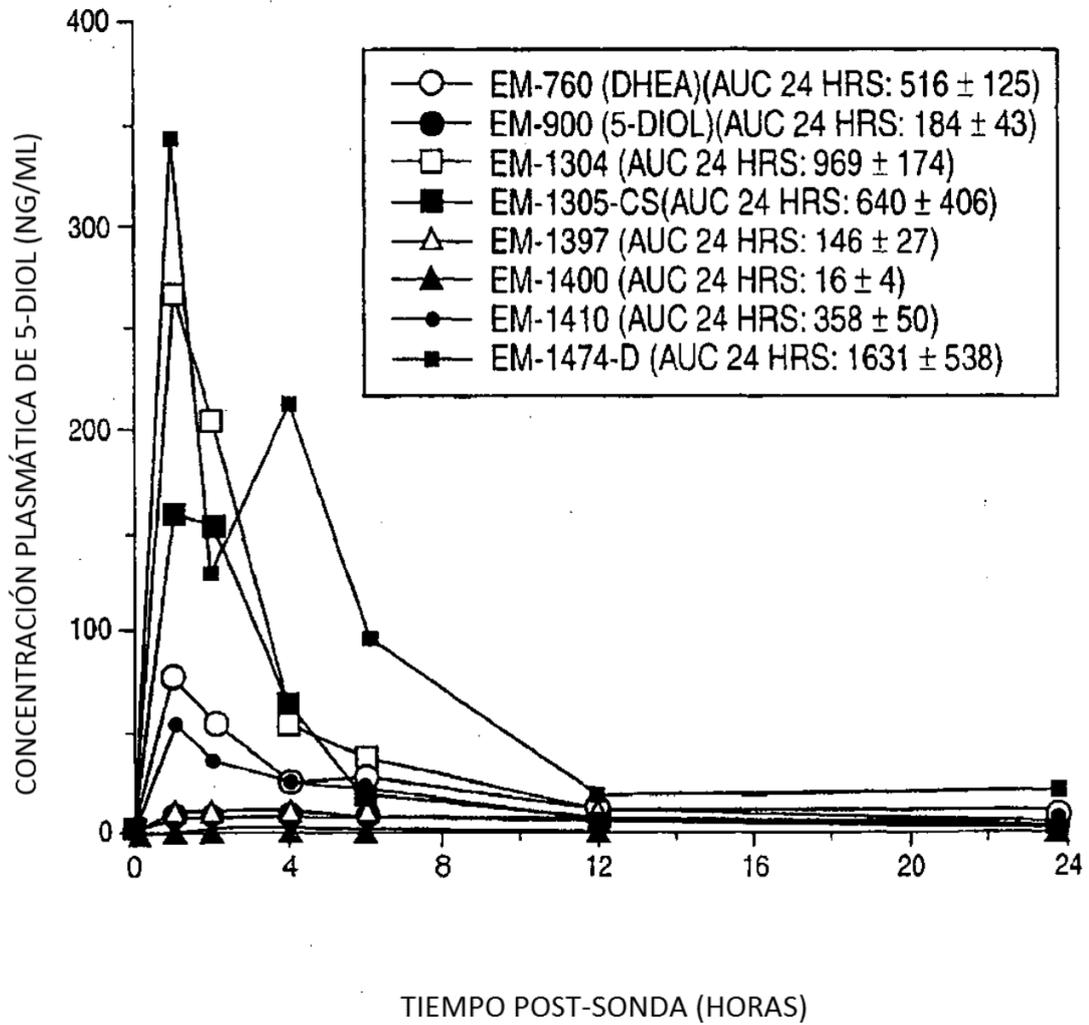


FIG. 13