



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 707**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/56** (2006.01)  
**A61P 15/18** (2006.01)  
**A61P 15/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01900503 .2**  
86 Fecha de presentación : **11.01.2001**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1248626**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2002**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que contienen estructuras esteroideas y su utilización.**

30 Prioridad: **14.01.2000 GB 0000792**  
**28.01.2000 GB 0002115**  
**17.07.2000 US 218730 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2007**

73 Titular/es: **Sterix Limited**  
**190 Bath Road**  
**Slough, Berkshire SL1 3XE, GB**

72 Inventor/es: **Potter, Barry, Victor, Lloyd;**  
**Reed, Michael, John;**  
**Elger, Walter;**  
**Roddersen, Gudrun y**  
**Proske, Henrich-Thomas**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 267 707 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**

Composiciones farmacéuticas que contienen esteroides y su utilización.

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la utilización de una composición.

En particular, la presente invención se refiere a la utilización de una composición farmacéutica en la preparación de un medicamento en el que la composición farmacéutica comprende un compuesto en una cantidad que proporciona una dosis no superior a 200 µg/día. El compuesto es un compuesto cíclico que comprende un sistema de anillo y un grupo sulfamato.

**Antecedentes de la invención**

Los estrógenos desempeñan un papel importante en la anticoncepción hormonal, en la terapia de sustitución hormonal (HRT) en la menopausia, y en el tratamiento de enfermedades ginecológicas (por ejemplo el carcinoma mamario) y las enfermedades andrológicas (por ejemplo el carcinoma prostático). Para la HRT y la anticoncepción, los estrógenos se utilizan principalmente conjuntamente con un gestágeno, por ejemplo levonorgestrel, desogestrel, noretisterona, acetato de ciproterona, acetato de clomadinona, dienogest.

Cuando se utilizan para la anticoncepción, los estrógenos resultan necesarios para suprimir con seguridad la maduración del folículo y la ovulación, pero además sustituyen la secreción ovárica endógena de estradiol, que resulta suprimida en un grado elevado. Esta sustitución resulta importante para mantener un ciclo menstrual artificial y otras funciones genitales, que no podrían realizarse de manera satisfactoria sin utilizar un gestágeno.

Además, los estrógenos endógenos y exógenos cumplen funciones del sistema nervioso central y metabólicas importantes en el organismo femenino: los niveles normales de estrógenos contribuyen decisivamente al bienestar de la mujer. Su presencia en el sistema contrarresta el desarrollo de enfermedades cardiovasculares a través de diversos mecanismos: la generación de patrones “favorables” de lipoproteínas en la sangre, la inhibición de los depósitos de lípidos en las paredes de los vasos sanguíneos, la reducción de la presión sanguínea al influir favorablemente sobre el tono muscular, la reducción de la resistencia a la perfusión en sectores vasculares esenciales y la atenuación de los estímulos contráctiles en el músculo vascular. Las tónicas íntimas, al verse influidas por los estrógenos, liberan factores que contrarrestan la formación de trombos. Los estrógenos también resultan indispensables para conservar la estructura ósea en las mujeres. Su ausencia puede resultar en la destrucción del hueso (osteoporosis). Estos últimos efectos “en el sistema nervioso central” y “metabólicos” de los estrógenos son un aspecto principal de la HRT. Puede considerarse que los estrógenos presentan funciones análogos en el organismo masculino, y que su retirada resulta en trastornos similares a los que se producen en las mujeres. Una diferencia entre los dos sexos es que la producción de hormona en el hombre cesa menos regularmente y a una edad más tardía que en las mujeres.

A pesar de todos los aspectos positivos de la terapia de estrógenos, existen problemas sin resolver también, que restringen la utilización terapéutica de los estrógenos o que comportan efectos no deseados.

Los estrógenos conocidos muestran déficits farmacocinéticos. Los estrógenos naturales (estradiol, estrona, sulfato de estrona, ésteres de estradiol, estriol) sólo se encuentran disponibles en un grado muy reducido cuando se administran oralmente. Este grado puede variar tanto de persona a persona que no pueden proporcionarse recomendaciones de dosificación generales. La eliminación rápida de las sustancias de la sangre es otro problema. La sustitución de estrógenos bajo la HRT con frecuencia debe adaptarse al individuo.

Lo mismo resulta aplicable a los estrógenos sintéticos. El esteroide estrogénico alterado sintéticamente más importante es el etinil estradiol (EE). Este estrógeno es dominante en la anticoncepción hormonal oral. Aparte del EE, se utiliza el mestranol en unos cuantos casos; éste es un “profármaco” que resulta metabolizado a EE en el organismo. Cuando se aplica oralmente a seres humanos, el EE presenta una biodisponibilidad mucho mejor que los estrógenos naturales indicados anteriormente, pero su biodisponibilidad oral varía en gran medida de individuo a individuo. Varios autores han señalado esto, así como el hecho de que las concentraciones en la sangre resultan altamente irregulares tras la aplicación oral de esta sustancia (Goldzieher, J.W., 1989, Goldzieher, J.W., 1990; Humpel, M., 1987; Kuhn, 1993).

Además, los estrógenos conocidos muestran déficits farmacocinéticos. Tras la resorción desde el lumen intestinal, los ingredientes activos aplicados oralmente entran en el organismo por el hígado. Este hecho resulta de importancia específica para los agentes estrógenos, debido a que el hígado es un órgano diana para los estrógenos; la ingesta oral de estrógenos resulta en fuertes efectos estrogénicos en el hígado. La actividad de secreción controlada por los estrógenos en el hígado humano incluye la síntesis de las proteínas de transferencia CBG, SHBG, TBG, angiotensinógeno, varios factores que resultan importantes para la fisiología de la coagulación sanguínea, y lipoproteínas. Si se introducen estrógenos naturales en el organismo femenino evitando el paso por el hígado (por ejemplo mediante la aplicación transdérmica), las funciones hepáticas indicadas prácticamente no cambian. Las dosis terapéuticamente equivalentes de los estrógenos naturales (ver la definición anteriormente), cuando se aplican oralmente, resultan en respuestas claras de los parámetros hepáticos: incremento de SHBG, CBG, angiotensinógeno, HDL (lipoproteína de alta densidad).

## ES 2 267 707 T3

Estos efectos hepáticos del estrógeno resultan claramente más fuertes cuando, en lugar de los estrógenos naturales, se utilizan las formulaciones de estrógeno equino (denominadas estrógenos conjugados) (Campbell, S. *et al.*, 1981). El etinil estradiol y DES presentan una estrogénicidad hepática incluso mayor.

5 Con referencia a las propiedades antigonadotrópicas, el EE es aproximadamente 4 a 18 veces más estrogénico en el hígado que los estrógenos naturales aplicados oralmente (Campbell, S. *et al.*, 1981). Ésta es una disociación muy desfavorable de propiedades.

10 Estos déficits resultan de considerable significación clínica cuando deben aplicarse estrógenos conocidos naturales y sintéticos.

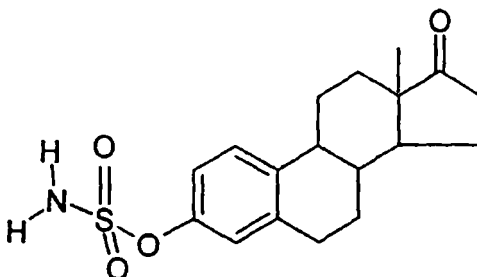
15 Una complicación conocida que puede producirse tras aplicar dosis elevadas de estrógenos a varones que sufren de carcinoma prostático es el tromboembolismo fatal. El potencial del EE de producir efectos secundarios en el hígado determina, aunque en una forma algo debilitada, la estrategia de la anticoncepción hormonal por vía oral. Con vistas a producir efectos anticonceptivos deseados y el mantenimiento del proceso menstrual por una parte, y la necesidad de tener en cuenta el considerable potencial de efecto secundarios, por la otra, el control de los niveles de EE puede compararse a caminar por la cuerda floja. Resulta bastante posible que un porcentaje elevado de mujeres no puedan tomar anticonceptivos orales debido a que las anomalías del sangrado menstrual o los efectos secundarios relacionados con los estrógenos exceden el umbral de tolerancia.

20 La evidencia sugiere que los estrógenos son los mitógenos principales implicados en promover el crecimiento de tumores en los tejidos endocrino-dependientes, tales como las mamas y el endometrio. Aunque las concentraciones en plasma de estrógenos son similares en mujeres con o sin cáncer de mama, los niveles de estrona y de estradiol en los tumores de mama son significativamente más elevados que en tejido mamario normal o que en la sangre. La síntesis *in situ* de estrógeno se cree que podría presentar una contribución importante a los niveles elevados de estrógenos en los tumores y, por lo tanto, los inhibidores, en particular los inhibidores específicos, de la biosíntesis de los estrógenos resultan de valor potencial en el tratamiento de los tumores endocrino-dependientes.

30 A lo largo de las últimas dos décadas ha existido un interés considerable en el desarrollo de inhibidores de la ruta de la aromatasa, que convierte el precursor de los andrógenos llamado androstenediona en estrona. Sin embargo, en la actualidad existe evidencia de que la ruta de la estrona sulfatasa (E1-STS), es decir, la hidrólisis del sulfato de estrona en estrona (E1S en E1), por contra a la ruta de la aromatasa, sea la fuente principal de estrógenos en los tumores de mama. Esta teoría se apoya en la modesta reducción de la concentración en plasma de estrógenos en las mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama tratadas con inhibidores de la aromatasa, tales como la aminoglutetimida y la 4-hidroxiandrostenediona, y también por el hecho de que la concentración en plasma de E1S en estos pacientes tratados con estos inhibidores de aromatasa sigue siendo relativamente elevada. La prolongada vida media de E1S en la sangre (10 a 12 horas) en comparación con los estrógenos no conjugados (20 minutos) y los niveles elevados de actividad de esteroide sulfatasa en el hígado y en tejidos mamaros normales y malignos, también apoya esta teoría.

40 El documento PCT GB92/01587 da a conocer nuevos inhibidores de la esteroide sulfatasa y composiciones farmacéuticas que contienen los mismos para la utilización en el tratamiento de los tumores estrona-dependientes, especialmente del cáncer de mama. Estos inhibidores de la esteroide sulfatasa son ésteres de sulfamato, tales como el N,N-dimetil estrona-3-sulfamato y, preferentemente, el estrona-3-sulfamato (también conocido como "EMATE"). Se dan a conocer ésteres de sulfamato adicionales en los documentos WO n° 96/05216 y n° 96/05217. Entre estos ésteres de sulfamato se incluyen el estradiol-3-sulfamato (denominado en la presente memoria J995).

EMATE (estrona-3-O-sulfamato) presenta la estructura siguiente:



60 Es conocido que EMATE es un potente inhibidor de E1-STS debido a que manifiesta una inhibición superior al 99% de la actividad de E1-STS en células MCF-7 intactas a una concentración de 0,1 mM. EMATE también inhibe el enzima E1-STS de una manera dependiente de la concentración y del tiempo, indicando que actúa como un inactivador dirigido a sitios activos. Aunque EMATE se diseñó originalmente para la inhibición de E1-STS, también inhibe la deshidroepiandrosterona sulfatasa (DHA-STS), que es un enzima que se cree que presenta un papel crucial en la regulación de la biosíntesis del esteroide estrogénico llamado androstenediol. Además, en la actualidad existe evidencia que sugiere que el androstenediol puede ser de importancia incluso mayor como promotor del crecimiento de los tumores de mama. EMATE también resulta activo *in vivo*, ya que resultó una inhibición casi completa de

## ES 2 267 707 T3

las actividades de E1-STS de hígado de rata (99%) y de DHA-STS (99%) al administrarlo oral o subcutáneamente. Además, se ha demostrado que EMATE presenta un efecto potenciador de la memoria en ratas. Los estudios realizados con ratas sugieren que existe una asociación entre la actividad de DHA-STS y la regulación de parte de la respuesta inmunológica. Se cree que esto también puede producirse en el ser humano. El átomo puente de O del grupo sulfamato en EMATE resulta importante para la actividad inhibitoria. De esta manera, cuando se sustituye el átomo 3-O por otros heteroátomos, tal como en el estrona-3-N-sulfamato y el estrona-3-S-sulfamato, estos análogos son inactivadores no dependientes del tiempo más débiles.

Aunque la potencia óptima para la inhibición de E1-STS puede haberse alcanzado en EMATE, resulta posible que se libere estrona durante la inhibición de la sulfatasa y que EMATE y su congénere estradiol posean actividad estrogénica.

Ahmed *et al.* (Biochem. Biophys. Res. Commun. 254(3):811-5, 27 de enero de 1999) informan de un estudio sobre la relación estructura-actividad de los inhibidores esteroideos y no esteroideos de STS.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar composiciones adecuadas para la terapia de sustitución hormonal protectora de los huesos sin estimulación endometrial, la inhibición de E1-STS, así como en otras aplicaciones terapéuticas.

### 20 Aspectos de sumario de la presente invención

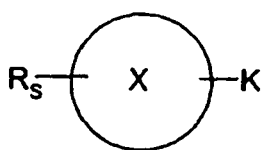
La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que las composiciones que proporcionan un compuesto cíclico, el cual comprende un sistema de anillo y un grupo sulfamato ("un compuesto sulfamato") en una cantidad que proporciona una dosis no superior a 200  $\mu\text{g}/\text{día}$ , pueden proporcionar una terapia de sustitución hormonal protectora de los huesos sin estimulación endometrial, y/o la inhibición de E1-STS. A la dosis proporcionada por la composición para la utilización en la presente invención, los compuestos administrados muestran una relación más favorable entre efectos deseados y terapéuticamente no deseados.

Los compuestos sulfamato comprenden por lo menos un componente de anillo. El componente de anillo comprende por lo menos 4 átomos en el anillo. Típicamente estos 4 átomos son átomos de carbono. De esta manera, típicamente, el componente de anillo es un grupo hidrocarbilo. El compuesto cíclico también incluye un grupo sulfamato como sustituyente o sustituyentes adicionales en el sistema de anillo. El grupo sulfamato es un sustituyente en el componente de anillo.

### 35 Aspectos detallados de la presente invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona la utilización de una composición farmacéutica en la preparación de un medicamento para la terapia de sustitución hormonal protectora de los huesos sin estimulación endometrial, en la que la composición farmacéutica comprende:

(i) un compuesto de Fórmula (I):



Fórmula I

en la que X es un anillo hidrocarbilo que presenta por lo menos 4 átomos en el anillo; K es un grupo hidrocarbilo; R es un grupo sulfamato;

(ii) opcionalmente mezclado con un portador, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable,

en el que el compuesto se encuentra presente en una cantidad que proporciona una dosis no superior a 200  $\mu\text{g}/\text{día}$ .

En un aspecto alternativo, la composición farmacéutica comprende un compuesto, en la que el compuesto se encuentra presente en una cantidad de manera que el compuesto indicado anteriormente o un metabolito del mismo se proporciona al plasma sanguíneo del sujeto que debe tratarse en una cantidad no superior a 200  $\mu\text{g}/\text{día}$ .

La dosis máxima indicada anteriormente y todas las dosis indicadas en la presente memoria se refieren a una dosis para un sujeto de 70 kg, a menos que se indique lo contrario. Un experto en la materia será fácilmente capaz de modificar las dosis indicadas para un sujeto que presente una masa diferente de 70 kg.

La dosis por día se calcula dividiendo la dosis que debe administrarse al sujeto por el periodo de dosificación previsto en días. El periodo de dosificación previsto típicamente será el periodo hasta la siguiente administración, el periodo a lo largo del cual la dosis debe presentar un efecto o el periodo a lo largo del cual se requiere que la dosis presente el efecto.

## ES 2 267 707 T3

Para facilitar la referencia, dicho aspecto y otros aspectos de la presente invención se comentan posteriormente bajo los títulos de sección correspondientes. Sin embargo, las enseñanzas en cada sección no se limitan necesariamente a cada sección particular.

### 5 Aspectos preferidos

Preferentemente, el compuesto se encuentra presente en la composición en una cantidad que proporciona una dosis comprendida entre 10 y 200  $\mu\text{g}/\text{día}$ .

10 Preferentemente, el compuesto se encuentra presente en la composición en una cantidad que proporciona una dosis comprendida entre 50 y 200  $\mu\text{g}/\text{día}$ .

Preferentemente, el compuesto se encuentra presente en la composición en una cantidad que proporciona una dosis comprendida entre 20 y 50  $\mu\text{g}/\text{día}$ .

15 En otro aspecto, el compuesto se encuentra presente en una cantidad que proporciona una dosis no superior a 100  $\mu\text{g}/\text{día}$  o inferior a la misma.

20 La composición puede formularse de manera que la administración diaria, semanal o mensual proporcionará la dosis diaria deseada. Por ejemplo, la presente invención puede proporcionar la utilización de una composición que comprende el compuesto sulfamato en una cantidad no superior a 200  $\mu\text{g}/\text{dosis}$  (para la dosis diaria), no superior a 1,4 mg/dosis (dosis semanal) o no superior a 5 mg/dosis (dosis mensual). Se apreciará que la composición también puede formularse para la administración más o menos frecuentemente que diariamente, semanalmente o mensualmente.

25 Preferentemente, X en combinación con K imita una estructura esteroidea.

Preferentemente, K es un grupo cíclico.

30 Preferentemente, X es un anillo de seis elementos.

Preferentemente, el anillo X presenta seis átomos de carbono en el anillo.

35 Preferentemente, el compuesto de Fórmula I presenta la fórmula presentada como Fórmula II, en la que cada uno de  $R_s$ , X y K presenta los significados anteriormente indicados.



Fórmula II

45 Preferentemente, el grupo K y el anillo X contienen conjuntamente, incluyendo todos los sustituyentes, un máximo de aproximadamente 50 átomos de carbono, más habitualmente no más de aproximadamente 30 a 40 átomos de carbono.

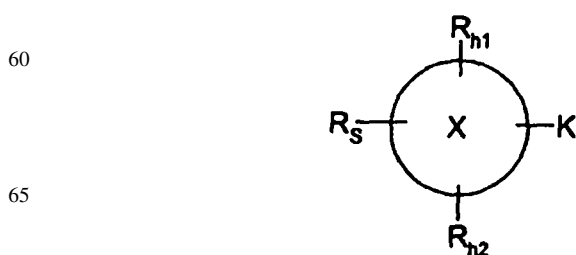
Preferentemente, X en combinación con K es una estructura de anillo esteroidea.

50 Preferentemente, el grupo K y el anillo X son una estructura de anillo esteroide o un derivado sustituido del mismo.

Preferentemente, el grupo  $R_s$  se encuentra en la posición 3 del anillo X.

Preferentemente,  $R_s$  es un grupo sulfamato.

55 Preferentemente, el compuesto es de Fórmula III:



Fórmula III

65

## ES 2 267 707 T3

en la que X, K y R<sub>s</sub> son tal como se ha definido anteriormente, y en la que R<sub>h1</sub> es un grupo halo opcional; R<sub>h2</sub> es un grupo halo opcional; y se encuentra presente por lo menos uno de entre R<sub>h1</sub> y R<sub>h2</sub>.

Preferentemente, el R<sub>h1</sub> se encuentra en la posición 2 del anillo X.

Preferentemente, el R<sub>h2</sub> se encuentra en la posición 4 del anillo X.

Para algunas aplicaciones, los compuestos presentan preferentemente un efecto estrogénico nulo o mínimo.

Para algunas aplicaciones, los compuestos presentan preferentemente un efecto estrogénico.

### Algunas ventajas

Entre las ventajas cruciales de la presente invención se incluyen una farmacocinética y farmacodinámica mejoradas de la composición para la utilización en la presente invención.

Una ventaja crucial de la presente invención es que, a la dosis administrada, los compuestos sulfamato presentan un metabolismo hepático reducido. Se cree que los compuestos para la utilización en la presente invención, tales como EMATE y J995, presentan una afinidad elevada para los eritrocitos, hasta el 99% del compuesto en la sangre se encuentra unido a los mismos. El paso por el hígado del compuesto en este compartimiento evita su extracción, metabolismo y acción en el primer pase hepático. De esta manera, los compuestos sulfamato administrados presentan una elevada biodisponibilidad.

Una ventaja crucial adicional de la presente invención es que los compuestos sulfamato muestran una variación reducida de la concentración en plasma entre individuos. La reducción de la variación entre individuos de los niveles de estrógeno en la sangre permite particularmente la provisión de un monoproducto para sujetos tanto histerectomizados como no histerectomizados sin la necesidad de desarrollar productos separados.

Una ventaja crucial adicional de la presente invención es que los compuestos sulfamato muestran una eliminación lenta del sujeto. La composición para la utilización en la presente invención proporciona niveles plasmáticos estables de estrona (E1) y de estradiol (E2).

Una ventaja crucial de la presente invención es que, a la dosis administrada, los compuestos sulfamato presentan una acción hormonal reducida. Por lo tanto, los riesgos de trombosis venosa profunda son reducidos.

Una ventaja crucial de la presente invención es que, a la dosis administrada, se proporciona protección a los huesos, aunque la dosis se encuentra por debajo del umbral de proliferación/estimulación endometrial. Tal como se ha indicado anteriormente, los estrógenos resultan indispensables para conservar la estructura ósea en mujeres. Su ausencia puede resultar en la destrucción del hueso (osteoporosis). Sin embargo, en la HRT típica, se administra una estrona a una dosis que proporciona, además de los efectos beneficiosos, la proliferación endometrial. La composición para la utilización en la presente invención proporciona una terapia de sustitución hormonal para la protección ósea sin estimulación endometrial.

De esta manera, tal como se ha indicado anteriormente, la presente invención proporciona la utilización de un compuesto tal como se define en la presente memoria, preferentemente una composición tal como se define en la presente memoria, en la preparación de un medicamento para la terapia de sustitución hormonal protectora de los huesos sin estimulación endometrial.

Otra ventaja es que la composición puede formularse sin la incorporación de progestinas.

Otra ventaja es que la composición puede formularse sin la incorporación de gestágenos.

Otra ventaja es que algunos de los compuestos pueden no ser capaces de ser metabolizados a compuestos que muestren o induzcan actividad hormonal.

Algunos de los compuestos para la utilización en la presente invención también resultan ventajosos en que pueden ser oralmente activos.

De esta manera, algunos de los compuestos para la utilización en la presente invención también se cree que presentan usos terapéuticos diferentes del tratamiento de los cánceres endocrino-dependientes, tales como el tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias.

### *Terapia de sustitución hormonal*

La composición para la utilización en la presente invención puede formularse para proporcionar una terapia de sustitución hormonal. La composición se formula para contener el compuesto sulfamato en una cantidad que, dependiendo de la frecuencia prescrita de administración, proporciona la dosis diaria requerida de compuesto sulfamato.

## ES 2 267 707 T3

En un aspecto, la composición se formula para permitir la administración diaria. Esta composición puede formularse en combinación con progestinas.

5 En todos los aspectos de la presente invención, incluyendo la administración oral diaria, la terapia de sustitución hormonal se consigue de una manera más conveniente que con la aplicación de un parche transdérmico, una ruta de administración típica para la HRT.

### *Diariamente*

10 Cuando se proporciona un régimen diario de, por ejemplo, una administración de 100  $\mu\text{g}/\text{día}$ , se observan particularmente las ventajas cruciales siguientes:

- reducción de la variación entre individuos de los niveles de estrógeno en la sangre del sujeto,
- 15 - niveles plasmáticos estables de E1 y de E2

Cuando se proporciona un régimen diario de una administración de 20 a 50  $\mu\text{g}/\text{día}$ , se observan particularmente las ventajas cruciales siguientes:

- 20 - no se observa ningún sangrado uterino
- no se produce ningún impacto sobre la glándula mamaria.

### *Semanalmente*

25 En un aspecto, la composición se formula para permitir la administración semanal. Puede proporcionarse una dosis semanal de 0,5 a 2 mg/semana, por ejemplo 1 mg/semana.

30 Una dosis semanal resultará ventajosa por motivos de conveniencia respecto a parches y a la administración diaria de la composición para la utilización en la presente invención.

### *Mensualmente*

35 También se contempla una composición de la presente invención para la HRT mensual, en la que se proporciona una sola dosis mensual de 2 a 4 mg, o hasta 5 mg/dosis del compuesto.

### *Esteroide sulfatasa*

40 La esteroide sulfatasa, que en ocasiones se denomina esteroide sulfatasa o esteril sulfatasa o "STS" abreviadamente, hidroliza varios esteroides sulfatados, tales como el sulfato de estrona, el sulfato de deshidroepiandrosterona y sulfato de colesterol. A STS se ha sido asignado al número de enzima E.C. 3.1.6.2.

45 STS ha sido clonada y expresada. Por ejemplo ver Stein *et al.* (J. Biol. Chem. 264:13865-13872, 1989) y Yen *et al.* (Cell 49:443-454, 1987).

STS es un enzima que ha sido implicado en varias condiciones de enfermedad.

50 A título de ejemplo, algunos trabajadores han descubierto que una deficiencia total de STS produce ictiosis. De acuerdo a algunos trabajadores, la deficiencia en STS es bastante prevalente en Japón. Los mismos trabajadores (Sakura *et al.*, J. Inherit. Metab. Dis. 20(6):807-10, noviembre de 1997) también han informado de que las enfermedades alérgicas, tales como el asma bronquial, la rinitis alérgica, o la dermatitis atópica, pueden encontrarse asociadas a una deficiencia en esteroide sulfatasa.

55 Además de los estados de enfermedad producidos a través de una falta total de actividad de STS, un nivel incrementado de actividad de SSTS también puede llevar a condiciones de enfermedad. A título de ejemplo, y tal como se ha indicado anteriormente, existe evidencia fuerte que apoya que STS presente un papel en el crecimiento y metástasis del cáncer de mama.

60 STS también ha sido implicada en otras condiciones de enfermedad. A título de ejemplo, Le Roy *et al.* (Behav. Genet. 29(2):131-6, marzo de 1999) han determinado que podría existir una correlación genética entre la concentración de la esteroide sulfatasa y el inicio del comportamiento de ataque en los ratones. Los autores concluyen que la sulfatación de los esteroides podría ser el motor principal de una compleja red, que incluiría genes que se ha demostrado que se encuentran implicados en la agresión mediante la mutagénesis.

65

## ES 2 267 707 T3

### *Inhibición de STS*

Se cree que algunas condiciones de enfermedad asociadas con la actividad de STS se deben a la conversión de la estrona sulfatada no activa en una estrona no sulfatada activa. En las condiciones de enfermedad asociadas con la actividad de STS, resultaría deseable inhibir la actividad de STS.

En la presente memoria, el término “inhibe” incluye reducir y/o eliminar y/o enmascarar y/o prevenir la acción perjudicial de la STS.

### 10 *Inhibidor de STS*

De acuerdo con la presente invención, el compuesto para la utilización en la presente invención es capaz de actuar como un inhibidor de STS.

15 En la presente memoria, el término “inhibidor” tal como se utiliza en la presente memoria con respecto al compuesto para la utilización en la presente invención se refiere a un compuesto que puede inhibir la actividad de STS, tal como reducir y/o eliminar y/o enmascarar y/o prevenir la acción perjudicial de STS. El inhibidor de STS puede actuar como un antagonista.

20 La capacidad de los compuestos de inhibir la actividad de sulfatasa puede evaluarse utilizando células MCF-7 de cáncer de mama intactas o microsomas placentarios. Además, puede utilizarse un modelo animal. Se presentan detalles sobre los protocolos de ensayo adecuados en las secciones posteriores. También se indica que podrían utilizarse otros ensayos para determinar la actividad de STS y, de esta manera, la inhibición de STS. Por ejemplo, también se hace referencia a las enseñanzas del documento WO A-99/50453.

25 Preferentemente, para algunas aplicaciones, el compuesto se caracteriza además por la característica de que si el grupo sulfamato se sustituyese por un grupo sulfato para formar un derivado sulfato, el derivado sulfato sería hidrolizable por un enzima con actividad de esteroide sulfatasa (E.C. 3.1.6.2), es decir, al incubarlo con esteroide sulfatasa EC 3.1.6.2 a pH 7,4 y 37°C.

30 En una forma de realización preferida, si el grupo sulfamato del compuesto se sustituyese con un grupo sulfato para formar un compuesto sulfato, el compuesto sulfato sería hidrolizable por un enzima con actividad de esteroide sulfatasa (E.C. 3.1.6.2) y rendiría un valor de Km inferior a 200 mmolar, preferentemente inferior a 150 mmolar, preferentemente inferior a 100 mmolar, preferentemente inferior a 75 mmolar, preferentemente inferior a 50 mmolar, al incubarlo con esteroide sulfatasa EC 3.1.6.2 a pH 7,4 y a 37°C.

### *Grupo K*

40 El grupo K no es necesariamente una estructura cíclica. A este respecto, el grupo K puede ser una estructura lineal que puede presentar la capacidad de conformarse en una estructura similar a un anillo cuando se encuentra *in vivo*.

En un aspecto preferido, el grupo K es cíclico, de manera que forma el grupo cíclico K.

45 El grupo cíclico K no necesariamente se encuentra fusionado al anillo X. A este respecto, pueden encontrarse separados por un grupo espaciador adecuado, que puede ser un grupo hidrocarbilo.

En un aspecto preferido, el grupo cíclico K se encuentra fusionado al anillo X.

50 El grupo K puede ser un grupo policíclico, que no necesariamente es un policiclo fusionado.

De esta manera, en un aspecto preferido, el grupo K y el anillo X forman un compuesto policíclico. Tal como se ha indicado, en la presente memoria el término “policíclico” incluye las estructuras de anillo fusionadas y no fusionadas, incluyendo las combinaciones de las mismas.

55 Por lo menos uno de los grupos cíclicos K y X puede ser un grupo heterocíclico (un heterociclo) o un grupo no heterocíclico.

60 Por lo menos uno de los grupos cíclicos K y X puede ser una estructura de anillo saturado o una estructura de anillo insaturado (tal como un grupo arilo).

Preferentemente, por lo menos uno de los grupos cíclicos es un anillo arilo.

65 Si el grupo cíclico es policíclico, alguno o todos los componentes del anillo del compuesto pueden encontrarse fusionados entre sí o unidos a través de uno o más grupos espaciadores adecuados.

El compuesto policíclico puede comprender varios anillos fusionados. En este aspecto, los anillos fusionados pueden comprender cualquier combinación de anillos de diferente tamaño, tal como 3 anillos de seis elementos (6,6,6),

## ES 2 267 707 T3

un anillo de seis elementos, un anillo de siete elementos y un anillo de seis elementos (6,7,6), un anillo de seis elementos y dos anillos de ocho elementos (6,8,8), etc.

5 En un aspecto, la presente invención se refiere a compuestos en los que los compuestos policíclicos son diferentes de anillos (6,6,7). En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a compuestos en los que los compuestos policíclicos sólo contienen anillos que contienen un número de elementos diferente de 7.

10 Preferentemente, el compuesto policíclico contiene, incluyendo todos los sustituyentes, no más de aproximadamente 50 átomos de carbono, más habitualmente no más de aproximadamente 30 a 40 átomos de carbono.

El compuesto policíclico puede comprender por lo menos dos componentes de anillo, o por lo menos tres componentes de anillo, o por lo menos cuatro componentes de anillo.

15 Preferentemente, el compuesto policíclico comprende cuatro componentes de anillo.

Los compuestos policíclicos preferidos presentan un componente esteroideo de anillo, o bioisómeros del mismo.

### *Hidrocarbilo*

20 La expresión “grupo hidrocarbilo” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo que comprende por lo menos C y H y puede opcionalmente comprender uno o más sustituyentes adecuados diferentes. Entre los ejemplos de estos sustituyentes pueden incluirse halo, alcoxi, nitro, un grupo alquilo, un grupo cíclico, etc. Además de la posibilidad de que los sustituyentes sean un grupo cíclico, una combinación de sustituyentes puede formar un grupo cíclico. Si el grupo hidrocarbilo comprende más de un C, los carbonos no necesariamente deben unirse entre sí.  
25 Por ejemplo, pueden unirse por lo menos dos de los carbonos por medio de un elemento o grupo adecuado. De esta manera, el grupo hidrocarbilo puede contener heteroátomos. Los heteroátomos adecuados resultan evidentes para los expertos en la materia, y entre ellos se incluyen, por ejemplo, azufre, nitrógeno y oxígeno. Un ejemplo no limitativo de un grupo hidrocarbilo es un grupo acilo.

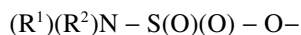
30 Un grupo hidrocarbilo típico es un grupo hidrocarburo. En la presente memoria, el término “hidrocarburo” se refiere a cualquiera de entre un grupo alquilo, un grupo alqueno, un grupo alquino, grupos que pueden ser lineales, ramificados o cíclicos, o un grupo arilo. El término hidrocarburo también incluye dichos grupos, pero que han sido opcionalmente sustituidos. Si el hidrocarburo es una estructura ramificada que presenta uno o más sustituyentes en la misma, la sustitución puede encontrarse en el esqueleto hidrocarburo o en la rama; alternativamente, las sustituciones  
35 pueden encontrarse en el esqueleto hidrocarburo o en la rama.

### *Grupo sulfamato*

40 En una forma de realización, el anillo X presenta un grupo sulfamato como sustituyente. El término “sulfamato” tal como se utiliza en la presente memoria incluye un éster de ácido sulfámico, o un éster de un derivado N-sustituido de ácido sulfámico, o una sal del mismo.

Si  $R_s$  es un grupo sulfamato, el compuesto para la utilización en la presente invención se denomina compuesto sulfamato.

45 Típicamente, el grupo sulfamato presenta la fórmula:



50 en la que  $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan independientemente de entre H, alquilo, cicloalquilo, alqueno y arilo, o combinaciones de los mismos, o conjuntamente representan alqueno, en el que el alquilo o cicloalquilo o alqueno, o cada uno de ellos, contiene opcionalmente uno o más heteroátomos o grupos.

55 Cuando se encuentran sustituidos, los compuestos N-sustituidos para la utilización en la presente invención pueden contener uno o dos sustituyentes N-alquilo, N-alqueno, N-cicloalquilo o N-arilo, que contienen preferentemente, o cada uno de los cuales contiene, un máximo de 10 átomos de carbono. Cuando  $R^1$  y/o  $R^2$  es alquilo, los valores preferidos son en los que  $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan cada uno independientemente de entre los grupos alquilo inferiores que contienen entre 1 y 6 átomos de carbono, es decir, metilo, etilo, propilo, etc.  $R^1$  y  $R^2$  pueden ser ambos metilo.  
60 Cuando  $R^1$  y/o  $R^2$  es arilo, los valores típicos son fenilo y toliilo ( $PhCH_2$ ; o). Cuando  $R^1$  y  $R^2$  representan cicloalquilo, los valores típicos son ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, etc. Cuando se encuentran unidos entre sí,  $R^1$  y  $R^2$  representan típicamente un grupo alqueno que proporciona una cadena de 4 a 6 átomos de carbono, opcionalmente interrumpida por uno o más heteroátomos o grupos, por ejemplo proporcionando un heterociclo de 5 elementos, por ejemplo morfolino, piperidino o piperidino.  
65

Dentro de los valores alquilo, cicloalquilo, alqueno y arilo, se incluyen grupos sustituidos que contienen como sustituyentes en los mismos uno o más grupos que no interfieren con la actividad inhibidora de sulfatasa del compuesto en cuestión. Entre los sustituyentes no interferentes ejemplares se incluyen hidroxi, amino, halo, alcoxi, alquilo y arilo.

## ES 2 267 707 T3

En algunas formas de realización, el grupo sulfamato puede formar una estructura de anillo mediante la fusión (o asociación) a uno o más átomos en o sobre el grupo X.

En algunas formas de realización, puede existir más de un grupo sulfamato. A título de ejemplo, pueden existir dos sulfamatos (es decir, compuestos bi-sulfamato). Si estos compuestos se basan en un núcleo esteroideo, preferentemente el segundo grupo sulfamato (o por lo menos uno de los grupos sulfamato adicionales) se encuentra localizado en la posición 17 del núcleo esteroideo. Estos grupos no son iguales necesariamente.

En algunas formas de realización, por lo menos uno de entre  $R^1$  y  $R^2$  es H.

En algunas formas de realización preferidas adicionales, cada uno de entre  $R^1$  y  $R^2$  es H.

### Mimético

En un aspecto, X y K pueden ser un mimético de una estructura de anillo esteroidea.

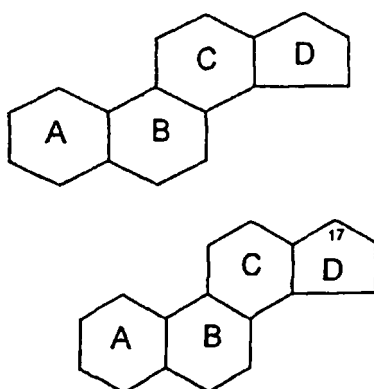
El término “mimético” tal como se utiliza en la presente memoria significa que presenta una estructura similar o diferente pero con un efecto funcional similar. En otras palabras, el grupo K y el anillo X conjuntamente pueden ser un bioisómero de los anillos de un esteroide, o una parte activa del mismo.

En un aspecto preferido, el grupo K y el anillo X conjuntamente pueden ser un bioisómero de los anillos de estrona, o de una parte de la misma.

### Estructura de anillo esteroide

En un aspecto preferido, X e K forman una estructura de anillo esteroidea, es decir, un esqueleto ciclopentanofenantreno, o bioisómeros del mismo.

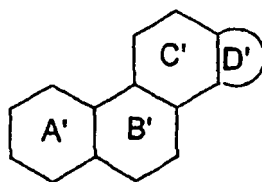
Tal como es bien conocido en la materia, una estructura de anillo esteroidea clásica presenta la fórmula genérica siguiente:



En la fórmula anterior, los anillos se han etiquetado de la manera convencional.

Un ejemplo de un bioisómero es cuando uno o más cualesquiera de entre los anillos A, B, C y D es un anillo heterocíclico y/o cuando uno o más cualesquiera de entre los anillos A, B, C y D ha sido sustituido y/o cuando uno o más cualesquiera de entre los anillos A, B, C y D ha sido modificado, pero en el que el bioisómero en ausencia del grupo sulfamato presenta propiedades esteroideas.

A este respecto, la estructura de una estructura policíclica preferida puede presentarse como:



en la que cada anillo A', B', C' y D' representa independientemente un anillo heterocíclico o un anillo no heterocíclico, anillos que pueden encontrarse sustituidos independientemente o no sustituidos, ser saturados o insaturados.

## ES 2 267 707 T3

A título de ejemplo, uno o más cualesquiera de entre los anillos A', B', C' y D' puede sustituirse independientemente con grupos adecuados, tales como un grupo alquilo, un grupo arilo, un grupo hidroxilo, un grupo halo, un grupo hidrocarbilo, un grupo oxihidrocarbilo, etc.

5 Un ejemplo de D' es un anillo no heterocíclico de cinco o seis elementos que presenta por lo menos un sustituyente.

En una forma de realización preferida, el anillo D' se sustituye con un grupo etinilo.

10 Si cualquiera de los anillos A', B', C' y D' es un anillo heterocíclico, preferentemente ese anillo heterocíclico comprende una combinación de átomos de C y por lo menos un átomo de N y/o por lo menos un átomo de O. Pueden encontrarse presentes otros átomos heterocíclicos en el anillo.

15 Entre los ejemplos de anillos A'-D' de núcleos esteroideos preferidos de los compuestos para la utilización en la presente invención se incluyen los anillos A-D de la deshidroepiandrosterona y los estrógenos, incluyendo la estrona. Entre los estrógenos preferidos se incluyen los estrógenos naturales, tales como estrona, estradiol, estratriol, epiatriol, y los estrógenos conjugados (derivados de equilenina).

20 En un aspecto de la presente invención, resulta preferido que el compuesto para la utilización en la presente invención sea un profármaco de un estrógeno natural, preferentemente un estrógeno natural seleccionado de entre estrona, estradiol, estratriol y epiestriol.

Entre los anillos A'-D' de núcleos esteroideos de los compuestos para la utilización en la presente invención se incluyen los anillos A-D de:

25 estronas y estronas sustituidas, viz :

estrona

4-OH-estrona

30

6 $\alpha$ -OH-estrona

7 $\alpha$ -OH-estrona

35

16 $\alpha$ -OH-estrona

16 $\beta$ -OH-estrona

40

17-desoxiestrona

estrona

45 estradiolos y estradiolos sustituidos, viz :

4-OH-17 $\beta$ -estradiol

6 $\alpha$ -OH-17 $\beta$ -estradiol

50

7 $\alpha$ -OH-17 $\beta$ -estradiol

4-OH-17 $\alpha$ -estradiol

55

6 $\alpha$ -OH-17 $\alpha$ -estradiol

7 $\alpha$ -OH-17 $\alpha$ -estradiol

16 $\alpha$ -OH-17 $\alpha$ -estradiol

60

16 $\alpha$ -OH-17 $\beta$ -estradiol

16 $\beta$ -OH-17 $\alpha$ -estradiol

16 $\beta$ -OH-17 $\beta$ -estradiol

65

17 $\alpha$ -estradiol

17 $\beta$ -estradiol

## ES 2 267 707 T3

17 $\alpha$ -etnil-17 $\alpha$ -estradiol

17 $\beta$ -etnil-17 $\alpha$ -estradiol

5 17-desoxiestradiol

estrioles y estrioles sustituidos, viz :

10 estriol

4-OH-estriol

6 $\alpha$ -OH-estriol

15 7 $\alpha$ -OH-estriol

17-desoxiestriol

20 deshidroepiandrosteronas y deshidroepiandrosteronas sustituidas, viz :

deshidroepiandrosteronas

25 6 $\alpha$ -OH-deshidroepiandrosterona

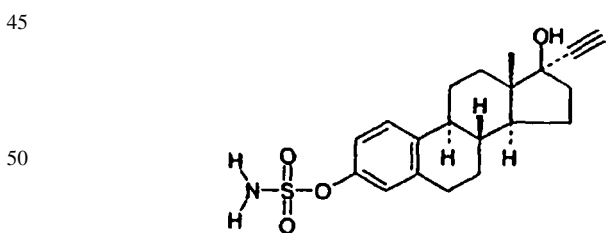
7 $\alpha$ -OH-deshidroepiandrosterona

16 $\alpha$ -OH-deshidroepiandrosterona

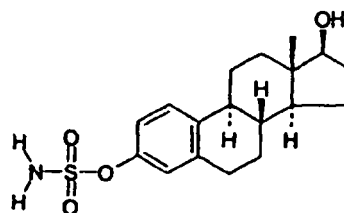
30 16 $\beta$ -OH-deshidroepiandrosterona

35 En términos generales, el sistema de anillos A'B'C'D' puede contener una diversidad de sustituyentes no interferentes. En particular, el sistema de anillos A'B'C'D' puede contener uno o más de entre hidroxilo, alquilo, especialmente alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) inferior, por ejemplo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo y otros isómeros pentilo, y n-hexilo y otros isómeros hexilo, alcoxi, especialmente alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) inferior, por ejemplo metoxi, etoxi, propoxi, etc., alquilino, por ejemplo etinilo, o halógeno, por ejemplo sustituyentes fluoro.

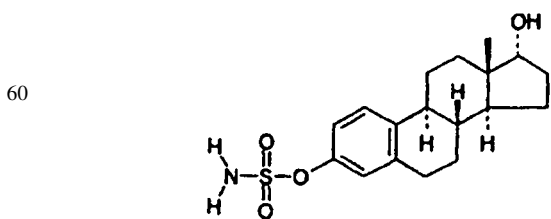
40 En un aspecto altamente preferido, una estructura de anillo esteroidea se combina con sustituyentes preferidos de la presente invención, de manera que el compuesto para la utilización en la presente invención se selecciona de entre los compuestos de fórmulas:



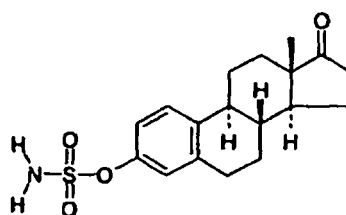
50 17 $\alpha$  etnil-17 $\beta$  estradiol-3-sulfamato



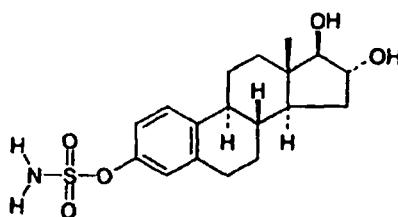
55 17- $\beta$  estradiol-3-sulfamato



65 17 $\alpha$ -estradiol-3-sulfamato



estrona-3-sulfamato (EMATE)



estriol-3-sulfamato

*Estructuras no esteroideas*

En una forma de realización alternativa, el compuesto para la utilización en la presente invención puede no contener o basarse en un núcleo esteroide. A este respecto, el compuesto policíclico puede contener o basarse en un sistema de anillos no esteroideos, tal como dietilestilboestrol, estilboestrol, coumarinas, flavonoides, combrestatina y otros sistemas de anillos. Otros compuestos no esteroideos adecuados para la utilización en la composición de la presente invención, o como la misma, pueden encontrarse en la patente US nº A-5.567.831.

*Otros sustituyentes*

El compuesto para la utilización en la presente invención puede presentar sustituyentes diferentes de Rh1, Rh2 y R<sub>s</sub>. A título de ejemplo, estos otros sustituyentes pueden ser uno o más de entre: uno o más grupos sulfamato, uno o más grupos fosfonato, uno o más grupos tiosfosfonato, uno o más grupos sulfonato, uno o más grupos sulfonamida, uno o más grupos halo, uno o más grupos O, uno o más grupos hidroxilo, uno o más grupos amino, uno o más grupos que contienen azufre, uno o más grupos hidrocarbilo, tales como un grupo oxihidrocarbilo.

*Oxihidrocarbilo*

El término "oxihidrocarbilo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo que comprende por lo menos C, H y O, y opcionalmente puede comprender uno o más sustituyentes adecuados diferentes. Entre los ejemplos de estos sustituyentes se incluyen halo, alcoxi, nitro, un grupo alquilo, un grupo cíclico, etc. Además de la posibilidad de que los sustituyentes sean un grupo cíclico, una combinación de sustituyentes puede formar un grupo cíclico. Si el grupo oxihidrocarbilo comprende más de un C, esos carbonos no necesariamente deben encontrarse unidos entre sí. Por ejemplo, por lo menos dos de los carbonos pueden encontrarse unidos por medio de un elemento o grupo adecuado. De esta manera, el grupo oxihidrocarbilo puede contener heteroátomos. Los heteroátomos adecuados resultarán evidentes para los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, azufre y nitrógeno.

En una forma de realización de la presente invención, el grupo oxihidrocarbilo es un grupo oxihidrocarburo.

En la presente memoria, el término "oxihidrocarburo" significa cualquiera de entre un grupo alcoxi, un grupo oxialquenoilo, un grupo oxialquinilo, grupos que pueden ser lineales, ramificados o cíclicos, o un grupo oxiarilo. El término oxihidrocarburo también incluyen los grupos en los que han sido opcionalmente sustituidos. Si el oxihidrocarburo es una estructura ramificada que presenta uno o más sustituyentes en la misma, entonces la sustitución puede encontrarse en el esqueleto hidrocarburo o en la rama; alternativamente, las sustituciones pueden encontrarse en el esqueleto hidrocarburo y en la rama.

Típicamente, el grupo oxihidrocarbilo es de la fórmula C<sub>1-6</sub>O (tal como un C<sub>1-3</sub>O). El contenido de <sup>14</sup>C del residuo se determina mediante espectrometría de centelleo. La masa de estrona-3-sulfato hidrolizada se calculó a partir de los pulsos de <sup>3</sup>H obtenidos (corregidos para los volúmenes del medio y de la fase orgánica utilizados, y para la recuperación de [<sup>14</sup>C]estrona añadida) y la actividad específica del sustrato. Cada lote de experimentos incluye incubaciones de microsomas preparadas a partir de una placenta humana positiva para sulfatasa (control positivo) y matraces sin células (para evaluar la hidrólisis no enzimática aparente del sustrato). El número de núcleos celulares por matraz se determinó utilizando un contador Coulter tras el tratamiento de monocapas celulares con Zaponin. Un matraz en cada lote se utilizó para evaluar el estado de la membrana celular y la viabilidad utilizando el procedimiento de exclusión de azul de tripán (Phillips, H.J., 1973, en: Tissue culture and applications, editores: Kruse, D.F. y Patterson, M.K.; páginas 406-108, Academic Press, New York).

Los resultados de actividad de esteroide sulfatasa se expresan como medias ± 1 S.D. del producto total (estrona + estradiol) formado durante el periodo de incubación (20 horas) calculado para 106 células y, para valores con significancia estadística, como reducción (inhibición) en porcentaje respecto a las incubaciones que no contienen estrona-3-sulfamato. Se utilizaron pruebas de t de Student no apareadas para analizar la significancia estadística de los resultados.

## ES 2 267 707 T3

### *Ensayo para determinar la actividad de STS utilizando microsomas placentarios (Protocolo 2)*

#### *Inhibición de la actividad de esteroide sulfatasa en microsomas placentarios*

5 Se trituraron intensamente con tijeras placentas humanas sulfatasa-positivas procedentes de embarazos a término normales, se lavaron una vez con tampón fosfato frío (pH 7,4, 50 mM), después se resuspendieron en tampón fosfato frío (5 ml/g de tejido). La homogeneización se consiguió con un homogeneizador Ultra-Turrax, utilizando tres pulsos de 10 segundos separados por 2 periodos de enfriamiento de un minuto en hielo. Los núcleos y los residuos celulares se separaron mediante centrifugación (4°C) a 2.000 g durante 30 minutos y se almacenaron partes (2 ml) del sobrenadante a 20°C. La concentración de proteína de los sobrenadantes se determinó mediante el procedimiento de Bradford (Anal. Biochem. 72:248-254, 1976).

15 Las incubaciones (1 ml) se llevaron a cabo utilizando una concentración de proteínas de 100 mg/ml, una concentración de sustrato de 20 mM [6,7-3H]estrón-3-sulfato (actividad específica: 60 Ci/mmol, de New England Nuclear, Boston, Mass., U.S.A.) y un tiempo de incubación de 20 minutos.

#### *Modelo de ensayo animal para determinar la actividad estrogénica (Protocolo 4)*

##### *Falta de estrogenicidad in vivo*

20 Los compuestos para la utilización en la presente invención pueden utilizarse utilizando un modelo animal, en particular en ratas ovariectomizadas. En este modelo, los compuestos que son estrogénicos estimulan el crecimiento uterino.

25 El compuesto (0,1 mg/kg/día durante cinco días) se administró oralmente a ratas, recibiendo otro grupo únicamente vehículo (propilenglicol). Al final del estudio, se obtuvieron úteros y se pesaron, expresando los resultados como peso uterino/peso corporal total x 100.

30 Los compuestos que no presentaban ningún efecto significativo sobre el crecimiento uterino no son estrogénicos.

#### *Informadores*

35 Puede utilizarse una amplia diversidad de informadores en los procedimientos de ensayo (así como cribados) de la presente invención, proporcionando los informadores preferidos señales convenientemente detectables (por ejemplo mediante espectroscopía). A título de ejemplo, un gen informador puede codificar un enzima que cataliza una reacción que altera las propiedades de absorción de la luz.

40 Otros protocolos incluyen el ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA) y la separación celular activada por fluorescencia (FACS). Incluso se puede utilizar un inmunoensayo de dos sitios de base monoclonal utilizando anticuerpos monoclonales reactivos a dos epítopos no interferentes. Éste y otros ensayos se describen, entre otros sitios, en Hampton, R. *et al.* (1990, Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St. Paul, MN) y Maddox, D.E. *et al.* (1983, J. Exp. Med. 15 8:121 1).

45 Entre los ejemplos de moléculas informadoras se incluyen, aunque sin limitarse a ellos,  $\beta$ -galactosidasa, invertasa, proteína fluorescente verde, luciferasa, cloranfenicol, acetiltransferasa, (-glucuronidasa, exoglucanasa y glucoamilasa. Alternativamente, pueden incorporarse nucleótidos marcados radioactivamente o marcados con etiquetas fluorescentes en los transcritos nacientes que se identifican a continuación al unirse a sondas de oligonucleótidos.

50 A título de ejemplo adicional, varias compañías, tales como Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI) y US Biochemical Corp. (Cleveland, OH), suministran kits y protocolos comerciales para los procedimientos de ensayo. Entre las moléculas informadoras o marcajes adecuados se incluyen dichos radionucleidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Entre las patentes que enseñan la utilización de dichos marcajes se incluyen los documentos 55 US-A-3.817.837, US-A-3.850.752, US-A-3.939.350, US-A-3.996.345, US-A-4.277.437, US-A-4.275.149 y US-A-4.366.241.

#### *Células huésped*

60 La expresión "célula huésped" en relación a la presente invención incluye cualquier célula que podría comprender la diana para el agente de la presente invención.

65 De esta manera, otra forma de realización de la presente invención proporciona células huésped transformadas o transfectadas con un polinucleótido que es la diana de la presente expresión o que la expresa. Preferentemente, dicho polinucleótido se transporta en un vector para la replicación y la expresión de polinucleótidos que serán la diana o que expresarán la diana. Las células se seleccionan para que resulten compatibles con dicho vector y pueden ser, por ejemplo, procarióticas (por ejemplo bacterianas), fúngicas, de levaduras o células vegetales.

La bacteria gram-negativa *E. coli* se utiliza ampliamente como huésped para la expresión de genes heterólogos. Sin embargo, tienden a acumularse grandes cantidades de proteína heteróloga en el interior de la célula. La purificación posterior de la proteína deseada a partir del conjunto de proteínas intracelulares de *E. coli* en ocasiones puede resultar difícil.

5

En contraste con *E. coli*, las bacterias del género *Bacillus* resultan muy adecuadas como huéspedes heterólogos debido a su capacidad para segregar proteínas hacia el medio de cultivo. Otras bacterias adecuadas como huésped son las de los géneros *Streptomyces* y *Pseudomonas*.

10

Dependiendo de la naturaleza del polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención, y/o la conveniencia del procesamiento adicional de la proteína expresada, pueden resultar preferidos huéspedes eucarióticos, tales como levaduras u otros hongos. En general, las células de levadura resultan preferidas sobre las células fúngicas debido a que resultan más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas se segregan poco desde la célula de levadura, o en algunos casos no son correctamente procesadas (por ejemplo la hiperglucosilación en las levaduras). En estos casos, debe seleccionarse un organismo huésped fúngico diferente.

15

Son ejemplos de huéspedes de expresión adecuados dentro del alcance de la presente invención algunos hongos, tales como las especies de *Aspergillus* (tales como las indicadas en los documentos EP-A-0 184 438 y EP-A-0 284 603), las especies de *Streptomyces* y las especies de *Pseudomonas*; y levaduras tales como las especies de *Kluyveromyces* (tales como las indicadas en los documentos EP-A-0 096 430 y EP-A-0 301 670 y las especies de *Saccharomyces*. A título de ejemplo, pueden seleccionarse huéspedes de expresión típicos de entre *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger var. tubigenis*, *Aspergillus niger var. awamori*, *Aspergillus aculeatis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kluyveromyces lactis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

25

La utilización de células huésped adecuadas, tales como células huésped de levadura, fúngicas y vegetales, puede permitir la realización de modificaciones post-traduccionales (por ejemplo la miristoilación, la glucosilación, el truncado, la lapidación y la fosforilación de tirosinas, serinas o treoninas) según resulte necesario para proporcionar una actividad biológica óptima de los productos de expresión recombinantes de la presente invención.

30

#### Organismo

El término “organismo” en relación a la presente invención incluye cualquier organismo que podría comprender la diana de acuerdo con la presente invención y/o productos obtenidos a partir de la misma. Entre los ejemplos de organismos pueden incluirse un hongo, una levadura o una planta.

35

La expresión “organismo transgénico” en relación a la presente invención incluye cualquier organismo que comprende la diana de acuerdo con la presente invención y/o los productos obtenidos.

40

#### Transformación de células huésped/Organismos huésped

Tal como se ha indicado anteriormente, el organismo huésped puede ser un organismo procariótico o eucariótico. Entre los ejemplos de huéspedes procarióticos adecuados se incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Las enseñanzas sobre la transformación de los huéspedes procarióticos se encuentran bien documentadas en la técnica, por ejemplo ver Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1995.

45

Si se utiliza un huésped procariótico, puede resultar necesario que la secuencia de nucleótidos se modifique convenientemente antes de la transformación, tal como mediante la extracción de los intrones.

50

En otra forma de realización el organismo transgénico puede ser una levadura. A este respecto, las levaduras también se han utilizado ampliamente como vehículo para la expresión de genes heterólogos. La especie *Saccharomyces cerevisiae* presenta una larga historia de uso industrial, incluyendo su utilización para la expresión de genes heterólogos. La expresión de genes heterólogos en *Saccharomyces cerevisiae* ha sido revisada por Goodey *et al.* (1987, Yeast Biotechnology, D.R. Berry *et al.*, editores, páginas 401-429, Allen y Unwin, London) y por King *et al.* (1989, Molecular and Cell Biology of Yeasts, E.F. Walton and G.T. Yarronton, editores, páginas 107-133, Blackie, Glasgow).

55

Por varios motivos *Saccharomyces cerevisiae* resulta muy adecuado para la expresión de genes heterólogos. En primer lugar, es no patogénico para el ser humano y es incapaz de producir determinadas endotoxinas. En segundo lugar, presenta una larga historia de utilización segura tras siglos de explotación comercial para diversos fines. Esto ha llevado a una amplia aceptación por el público. En tercer lugar, la utilización comercial extensiva y la investigación dedicada al organismo han resultado en que se conoce mucho sobre la genética y la fisiología, así como sobre las características de la fermentación a gran escala de *Saccharomyces cerevisiae*.

60

E. Hinchcliffe, E. Kenny proporcionan una revisión de los principios de expresión de genes heterólogos en *Saccharomyces cerevisiae* y la secreción de productos génicos (1993, “Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes”, Yeasts, vol. 5, Anthony H. Rose y J. Stuart Harrison, editores, 2a edición, Academic Press Ltd.).

65

## ES 2 267 707 T3

Se encuentran disponibles varios tipos de vectores levadura, incluyendo vectores integrativos, que requieren la combinación con el genoma del huésped para su mantenimiento, y los vectores plásmido de replicación autónoma.

5 Con el fin de preparar *Saccharomyces* transgénico, se preparan constructos de expresión mediante la inserción de secuencias de nucleótidos en un constructo diseñado para la expresión en las levaduras. Se han desarrollado varios tipos de constructos utilizados para la expresión heteróloga.

10 Los constructos contienen un promotor activo en la levadura fusionado con la secuencia de nucleótidos, habitualmente se utiliza un promotor de origen levadura, tal como el promotor GAL 1. Habitualmente se utiliza una secuencia de señal de origen levadura, tal como la secuencia codificante del péptido de señal SUC2. Un terminador activo en la levadura se encuentra en el extremo del sistema de expresión.

15 Para la transformación de la levadura se han desarrollado varios protocolos de transformación. Por ejemplo, puede prepararse un *Saccharomyces* transgénico de acuerdo con la presente invención siguiendo las enseñanzas de Hinnen *et al.* (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75, 1929); Beggs, J.D. (1978, Nature, London, 275:104) e Ito, H. *et al.* (1983, J. Bacteriology 153:163-168).

20 Las células de levadura transformadas se seleccionan utilizando diversos marcadores de selección. Entre los marcadores utilizados para la transformación se encuentran varios marcadores auxotróficos, tales como LEU2, HIS4 y TRP1, y marcadores dominantes de resistencia a antibióticos, tales como los marcadores de antibiótico aminoglucósido, por ejemplo G418.

25 Otro organismo huésped es una planta. El principio básico en la construcción de plantas genéticamente modificadas es insertar información genética en el genoma de la planta de manera que se obtenga un mantenimiento estable del material genético insertado. Existen varias técnicas para insertar la información genética, siendo los dos principios más importantes la introducción directa de la información genética y la introducción de la información genética mediante la utilización de un sistema vector. Puede encontrarse una revisión de las técnicas general en los artículos por Potrykus (Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42:205-225, 1991) y Christou (Agro-Food Industry Hi-Tech marzo/abril de 1994, 17-27). Pueden encontrarse enseñanzas adicionales sobre la transformación de plantas en el documento EP-A-0 449 375.

30 De esta manera, la presente invención también proporciona un procedimiento para la transformación de una célula huésped con una secuencia de nucleótidos que debe ser la diana o que debe expresar la diana. Las células huésped transformadas con la secuencia de nucleótidos pueden cultivarse bajo condiciones adecuadas para la expresión de la proteína codificada. La proteína producida por una célula recombinante puede expresarse sobre la superficie de la célula. Si se desea, y como entenderán los expertos en la materia, los vectores de expresión que contienen secuencias codificantes pueden diseñarse con secuencias de señal que dirijan la secreción de las secuencias codificantes a través de una membrana célula procariótica o eucariótica particular. Otras construcciones recombinantes pueden unir la secuencia codificante a la secuencia de nucleótidos codificante de un dominio de polipéptido que facilitará la purificación de las proteínas solubles (Kroll, D.J. *et al.*, DNA Cell Biol. 12:441-53, 1993).

### Variantes/Homólogos/Derivados

45 Además de las secuencias de aminoácidos específicas y secuencias de nucleótidos indicadas en la presente memoria, la presente invención comprende asimismo la utilización de variantes, homólogos y derivados de las mismas. En la presente memoria, el término "homología" puede ser equivalente a "identidad".

50 En el presente contexto, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos que puede ser idéntica por lo menos al 75%, 85% o 90%, preferentemente idéntica por lo menos al 95% o al 98%. Aunque la homología también puede considerarse en términos de similitud (es decir, residuos aminoácidos que presentan propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención resulta preferido expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

55 Las comparaciones de homología pueden llevarse a cabo visualmente, o más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias disponibles con facilidad. Estos programas informáticos disponibles comercialmente pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

60 El % de homología puede calcularse a lo largo de secuencias contiguas, es decir, se alinea una secuencia con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondientes en la otra secuencia, un residuo cada vez. Esto se denomina alineación "sin huecos". Típicamente, estas alineaciones sin huecos se llevan a cabo sólo a lo largo de un número relativamente reducido de residuos.

65 Aunque éste es un procedimiento muy simple y consistente, no tiene en cuenta que, por ejemplo, en un par de secuencias de otro modo idénticas, una inserción o una delección causarían que los residuos aminoácidos siguientes se encuentren desalineados, resultando potencialmente de esta manera en una gran reducción del % de homología al llevar a cabo la alineación global. En consecuencia, la mayoría de procedimientos de comparación de secuencias se diseñan para producir alineaciones óptimas que tienen en cuenta posibles inserciones y delecciones sin penalizar indebidamente

## ES 2 267 707 T3

la puntuación global de homología. Esto se consigue mediante la inserción de “huecos” en la alineación de secuencia para intentar maximizar la homología local.

Sin embargo, estos procedimientos más complejos asignan “penalizaciones de hueco” a cada hueco que se produce en la alineación, de manera que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una alineación de secuencia con el mínimo número de huecos posible, que refleja un nivel más elevado de relación entre las dos secuencias que se comparan, conseguirá una puntuación más alta que una con muchos huecos. Se utilizan “costes de hueco afín” que cargan un coste relativamente elevado a la existencia de un hueco y una penalización más reducida a cada residuo posterior en el hueco. Éste es el sistema de puntuación de huecos utilizado con más frecuencia. Las penalizaciones de hueco elevadas evidentemente producirán alineaciones optimizadas con menos huecos. La mayoría de programas de alineación permiten modificar las penalizaciones de hueco. Sin embargo, resulta preferido utilizar los valores por defecto cuando se utiliza este software para las comparaciones de secuencias. Por ejemplo, al utilizar el paquete GCG Wisconsin Bestfit (ver posteriormente), la penalización de hueco por defecto para las secuencias de aminoácidos es de -12 para un hueco y de -4 para cada extensión.

El cálculo del % máximo de homología, por lo tanto, requiere en primer lugar la producción de una alineación óptima, teniendo en cuenta las penalizaciones de hueco. Un programa informático adecuado para llevar a cabo esta alineación es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux *et al.*, Nucleic Acids Research 12:387, 1984). Entre los ejemplos de otro software que puede llevar a cabo las comparaciones entre secuencias se incluye, aunque sin limitarse a ellos, el paquete BLAST (ver Ausubel *et al.*, 1999, *ibid.*, capítulo 18), FASTA (Atschul *et al.*, J. Mol. Biol., 403-410, 1990) y el conjunto GENWORKS de herramientas de comparación. Tanto BLAST como FASTA se encuentran disponibles para la búsqueda fuera de línea y en línea (ver Ausubel *et al.*, 1999, *ibid.*, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, resulta preferido utilizar el programa GCG Bestfit.

Otra referencia útil es la que se encuentra en FEMS Microbiol. Lett 174(2):247-50, 15 de mayo de 1999 (y una fe de errata publicada que aparece en FEMS Microbiol. Lett. 177(1):187-8, 1 de agosto de 1999).

Aunque el % final de homología puede medirse en términos de identidad, el procedimiento de alineación mismo no se basa típicamente en una comparación de pares todo-o-nada. Por el contrario, generalmente se utiliza una matriz de puntuación de similitud escalada que asigna puntuaciones a cada comparación de parejas basándose en la similitud química o en la distancia evolutiva. Un ejemplo de este tipo de matriz, utilizada con frecuencia, es la matriz BLO-SUM62, la matriz por defecto para el conjunto de programas BLAST. Los programas GCG Wisconsin generalmente utilizan los valores por defecto públicos o una tabla de comparación de símbolos individualizados si ésta se suministra (ver el manual del usuario para más detalles). Resulta preferido utilizar los valores por defecto públicos para el paquete GCG, o en el caso de otro software, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

Tras producir el software una alineación óptima, resulta posible calcular el % de homología, preferentemente el % de identidad de secuencia. El software típicamente lleva a cabo esto como parte de la comparación entre secuencias, y genera un resultado numérico.

Las secuencias también pueden presentar deleciones, inserciones o sustituciones de residuos aminoácidos que producen un cambio silencioso y resultan en una sustancia funcionalmente equivalente. Las sustituciones de aminoácidos deliberadas pueden realizarse basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos, con la condición de que se conserve la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, entre los aminoácidos cargados negativamente se incluyen el ácido aspártico y el ácido glutámico; entre los aminoácidos cargados positivamente se incluyen la lisina y la arginina, y entre los aminoácidos con grupos de cabeza polares con valores de hidrofiliidad similares, se incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

Pueden realizarse sustituciones conservativas, por ejemplo de acuerdo con la Tabla siguiente. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre sí:

55	Alifático	No polar	G A P
			I L V
60		Polar - sin carga	C S T M
			N Q
65		Polar cargado	D E
			K R
	Aromático		H F W Y

*Vectores de expresión*

La secuencia de nucleótidos para la utilización como diana o para expresar la diana puede incorporarse a un vector replicable recombinante. El vector puede utilizarse para replicar y expresar la secuencia de nucleótidos en y/o de una célula huésped compatible. La expresión puede controlarse utilizando secuencias de control que incluyan promotores/intensificadores y otras señales de regulación de la expresión. Pueden utilizarse promotores procarióticos y promotores funcionales en las células eucarióticas. Pueden utilizarse promotores específicos de tejido o de estímulos. También pueden utilizarse promotores quiméricos que comprenden elementos de secuencia de dos o más promotores diferentes indicados anteriormente.

La proteína producida por una célula recombinante del huésped mediante la expresión de la secuencia de nucleótidos puede secretarse o puede contenerse intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o del vector utilizado. Las secuencias codificantes pueden diseñarse con secuencias de señal que dirigen la secreción de las secuencias codificantes de la sustancia a través de una membrana celular procariótica o eucariótica particular.

*Proteínas de fusión*

La secuencia de aminoácidos diana puede producirse como proteína de fusión, por ejemplo para ayudar en la extracción y purificación. Entre los ejemplos de parejas de proteína de fusión se incluyen la glutatión-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de unión a ADN y/o de activación transcripcional) y (-galactosidasa). También puede resultar conveniente incluir un sitio de corte proteolítico entre la pareja de la proteína de fusión y la secuencia de la proteína de interés para permitir la extracción de las secuencias de la proteína de fusión. Preferentemente la proteína de fusión no impedirá la actividad de la diana.

La proteína de fusión puede comprender un antígeno o un determinante antigénico fusionado a la sustancia de la presente invención. En la presente forma de realización, la proteína de fusión puede ser una proteína de fusión de origen no natural que comprende una sustancia que puede actuar como adyuvante en el sentido de que proporcione una estimulación generalizada del sistema inmunológico. El antígeno o determinante antigénico puede unirse al extremo amino-terminal o carboxi-terminal de la sustancia.

En otra forma de realización de la invención, la secuencia de aminoácidos puede ligarse a una secuencia heteróloga para codificar una proteína de fusión. Por ejemplo, para el cribado de bibliotecas de péptidos para agentes capaces de afectar a la actividad de la sustancia, puede resultar útil codificar una sustancia quimérica que exprese un epítipo heterólogo que sea reconocido por un anticuerpo disponible comercialmente.

*Terapia*

Los compuestos para la utilización en la presente invención pueden utilizarse como agentes terapéuticos, es decir, en aplicaciones de terapia.

El término "terapia" incluye efectos curativos, efectos de alivio y efectos profilácticos.

La terapia puede ser de seres humanos o de animales, preferentemente hembra, más preferentemente seres humanos de sexo femenino.

*Composiciones farmacéuticas*

La presente invención proporciona la utilización de una composición farmacéutica en la preparación de un medicamento en el que la composición comprende un compuesto de acuerdo con la presente invención y opcionalmente un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable (incluyendo las combinaciones de los mismos).

Las composiciones farmacéuticas pueden ser para el uso humano o animal en medicina humana y veterinaria, y típicamente comprenden uno o más cualesquiera de un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los portadores o diluyentes aceptables para la utilización terapéutica son bien conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro, edit., 1985). La elección de portador, excipiente o diluyente farmacéutica puede seleccionarse con respecto a la vía de administración pretendida y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como portador, excipiente o diluyente, o además del mismo, cualquier ligante o ligantes, lubricante o lubricantes, agente o agentes de suspensión, agente o agentes de recubrimiento y agente o agentes de solubilización adecuados.

Los conservantes, estabilizantes, pigmentos e incluso agentes saborizantes pueden proporcionarse en la composición farmacéutica. Entre los ejemplos de conservantes se incluyen benzoato sódico, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También pueden utilizarse antioxidantes y agentes de suspensión.

Pueden existir diferentes requisitos de composición/formulación dependiendo de los diferentes sistemas de administración. A título de ejemplo, la composición farmacéutica para la utilización en la presente invención puede formularse para la administración con una minibomba o por una vía mucosal, por ejemplo en forma de pulverizador nasal o aerosol para la inhalación o solución ingerible, o parenteralmente, en la que la composición se formula en una forma

inyectable, para la administración por vía, por ejemplo, intravenosa, intramuscular o subcutánea. Alternativamente, la formulación puede diseñarse para la administración por ambas vías.

5 En el caso de que el agente deba administrarse mucosalmente a través de la mucosa gastrointestinal, debe ser capaz de permanecer estable durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal; por ejemplo, debe ser resistente a la degradación proteolítica, debe ser estable a pH ácido y resistente a los efectos detergentes de la bilis.

10 En caso apropiado, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante inhalación, en la forma de un supositorio o pesario, como sistema intrauterino, tópicamente en la forma de una loción, solución, crema, pomada o polvos secantes, mediante la utilización de un parche en la piel, oralmente en la forma de tabletas que contengan excipientes, tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos, sea solos o mezclados con excipientes, o en la forma de elixires, soluciones o suspensiones que contienen agentes saborizantes o colorantes, o pueden inyectarse parenteralmente, por ejemplo intravenosamente, intramuscularmente o subcutáneamente. Para la administración parenteral, las composiciones pueden utilizarse mejor en la forma de una solución acuosa estéril, que puede contener 15 otras sustancias, pro ejemplo suficientes sales o monosacáridos para que la solución sea isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse en la forma de comprimidos o pastillas que pueden formularse de una manera convencional.

#### 20 *Combinación farmacéutica*

El compuesto para la utilización en la presente invención puede utilizarse en combinación con uno o más agentes activos diferentes, tales como uno o más agentes farmacéuticamente activos diferentes.

25 A título de ejemplo, los compuestos para la utilización en la presente invención pueden utilizarse en combinación con otros inhibidores de STS y/o otros inhibidores, tales como un inhibidor de aromatas (tal como, por ejemplo, 4-hidroxiandrostenediona (4-OHA)) y/o esteroides, tales como los esterneuroesteroides de origen natural sulfato de deshidroepiandrosterona (DHEAS) y sulfato de pregnenolona (PS) y/o otros compuestos orgánicos estructuralmente similares.

30 Los compuestos para la utilización en la invención pueden utilizarse solos o en combinación con una progestina. Preferentemente los compuestos para la utilización en la invención se utilizan en ausencia de una progestina. De esta manera, en un aspecto preferido la composición de la presente invención se encuentra sustancialmente libre de progestinas.

35 Además, o alternativamente, el compuesto para la utilización en la presente invención puede utilizarse en combinación con un modificador de la respuesta biológica.

40 La expresión modificador de la respuesta biológica ("BRM") incluye citoquinas, moduladores inmunológicos, factores de crecimiento, factores reguladores de la hematopoyesis, factores estimulantes de colonias, factores quimiotácticos, hemolíticos y trombolíticos, receptores de superficie celular, ligandos, moléculas de adhesión a leucocitos, anticuerpos monoclonales, vacunas preventivas y terapéuticas, hormonas, componentes de matriz extracelular, fibronectina, etc. Para algunas aplicaciones, preferentemente, el modificador de la respuesta biológica es una citoquina. Entre los ejemplos de citoquinas se incluyen: interleuquinas (IL), tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-19; factores de necrosis tumoral (TNF), tales como TNF- $\alpha$ ; interferones alfa, beta y gamma; TGF- $\beta$ . Para algunas aplicaciones, preferentemente la citoquina es factor de necrosis tumoral (TNF). Para algunas aplicaciones, el TNF puede ser cualquier tipo de TNF, tal como TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , incluyendo los derivados o las mezclas de los mismos. Más preferentemente, la citoquina es TNF- $\alpha$ . Las enseñanzas sobre TNF pueden encontrarse en la literatura, tal como en los documentos WO-A-98/08870 y WO-A-98/13348.

#### 50 *Administración*

Típicamente, un médico determinará la dosis real que resulta más adecuada para un sujeto individual, y variará con la edad, el peso y la respuesta del paciente particular. Las dosis indicadas posteriormente son ejemplares del caso medio. Evidentemente pueden existir casos individuales que merezcan intervalos de dosis más altos o más bajos.

55 Las composiciones para la utilización en la presente invención pueden administrarse mediante inyección directa. La composición puede formularse para la administración parenteral, mucosal, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular o transdérmica.

60 El nivel de dosis y la frecuencia de dosificación específicos para cualquier paciente particular puede variarse y dependerá de una diversidad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico utilizado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción del compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, la severidad de la condición particular, y el huésped sometido a terapia.

65 Aparte de los modos típicos de administración, indicados anteriormente, el término "administrado" también incluye la administración mediante técnicas tales como la transfección mediada por lípidos, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, anfífilos faciales catiónicas (CFA) y las combinaciones de los mismos. Entre las vías para estos mecanismos

## ES 2 267 707 T3

de administración se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las vías mucosa, nasal, oral, parenteral, gastrointestinal, tópica o sublingual.

5 El término “administrado” incluye, aunque sin limitarse a ellos, la administración por una vía mucosal, por ejemplo, en forma de pulverización nasal o aerosol para la inhalación o como solución ingerible; una vía parenteral en la que la administración es mediante una forma inyectable, tal como, por ejemplo, una vía intravenosa, intramuscular o subcutánea.

10 De esta manera, para la administración farmacéutica, los inhibidores de STS para la utilización en la presente invención pueden formularse de cualquier manera adecuada utilizando técnicas de formulación farmacéutica convencionales y portadores farmacéuticos, adyuvantes, excipientes, diluyentes, etc. y habitualmente para la administración parenteral. Las dosis pueden administrarse en regímenes de dosis única, regímenes de dosis dividida y/o en regímenes de dosis múltiple a lo largo de varios días. Para la administración oral pueden formularse en tabletas, cápsulas, solución o suspensión. Alternativamente, los compuestos se formulan para la administración parenteral en un portador parenteralmente administrable adecuado y que proporcione tasas de dosificación de una vez al día. Sin embargo, las dosis diarias efectivas varían dependiendo de la actividad inherente del ingrediente activo y del peso corporal del paciente, encontrándose estas variaciones dentro de los conocimientos y criterio del médico. Las células y células musculares estriadas no se dividen en absoluto; otras, tales como los fibroblastos que ayudan en las heridas en cicatrización, crecen según demanda pero en caso contrario son quiescentes.

20 De todas maneras, todas las células eucarióticas que se dividen deben estar preparadas para donar una cantidad igual de material genético a las dos células hijas. La síntesis de ADN en eucariotas no se produce mediante el ciclo de división celular sino que se encuentra restringida a una parte del mismo antes de la división celular.

25 La relación entre la síntesis eucariótica de ADN y la división celular ha sido analizada extensivamente en cultivos de células de mamífero en los que todas las células eran capaces de crecer y dividirse. En contraste con las bacterias se ha descubierto que las células eucarióticas dedican sólo parte del tiempo a la síntesis del ADN, y la completan horas antes de la división celular (mitosis). De esta manera, se produce un hueco de tiempo tras la síntesis del ADN y antes de la división celular; se ha descubierto que se produce otro hueco tras la división y antes de la siguiente ronda de síntesis de ADN. Este análisis ha llevado a la conclusión de que el ciclo de la célula eucariótica consiste en una fase M (mitótica), una fase  $G_1$  (el primer hueco), la fase S (síntesis de ADN), una fase  $G_2$  (el segundo hueco), y de nuevo M. Las fases entre las mitosis ( $G_1$ , S y  $G_2$ ) se conocen colectivamente como interfase.

30 Muchas células que no se dividen en los tejidos (por ejemplo todos los fibroblastos quiescentes) suspenden su ciclo tras la mitosis e inmediatamente antes de la síntesis del ADN; estas células “en reposo” se dice que han salido del ciclo celular y se encuentran en el estado  $G_0$ .

35 Resulta posible identificar células cuando se encuentran en una de las tres fases de la interfase del ciclo celular utilizando un separador celular activado por fluorescencia (FACS) para medir su contenido relativo de ADN: una célula que se encuentra en  $G_1$  (antes de la síntesis de ADN) presenta una cantidad definida  $x$  de ADN; durante S (replicación del ADN), presenta entre  $x$  y  $2x$ , y cuando se encuentra en  $G_2$  (o en M), presenta  $2x$  de ADN.

Las etapas de mitosis y citoquinesis en una célula animal transcurren de la manera siguiente:

45 (a) Interfase. La fase  $G_2$  de la interfase precede inmediatamente al inicio de la mitosis. El ADN cromosómico ha sido replicado y se ha unido a proteínas durante la fase S, pero todavía no se observan los cromosomas como estructuras diferenciadas. El nucleolo es la única subestructura nuclear que resulta visible bajo el microscopio óptico. En una célula diploide antes de la replicación del ADN existen dos cromosomas morfológicos de cada tipo, y la célula se dice que es  $2n$ . En  $G_2$ , tras la replicación del ADN, la célula es  $4n$ . Existen cuatro copias de cada ADN cromosómico. Debido a que los cromosomas hermanos todavía no se han separado uno de otro, se denominan cromátidas hermanas.

50 (b) Profase temprana. Los centriolos, cada uno con un centriolo hijo recién formado, empiezan a moverse hacia polos opuestos de la célula; los cromosomas se observan como filamentos largos. La membrana nuclear empieza a desagregarse formando vesículas pequeñas.

55 (c) Profase intermedia y tardía. Se ha completa la condensación cromosómica; cada estructura cromosómica visible está compuesta de dos cromátidas que se mantienen juntas por sus centrómeros. Cada cromátida contiene una de las dos moléculas de ADN hijas replicadas. El huso microtubular empieza a radiar desde las regiones inmediatamente contiguas a los centriolos, que se acercan a sus polos. Algunas fibras del huso conectan un polo con el otro polo; la mayoría van a las cromátidas y se unen en los cinetocoros.

(d) Metafase. Los cromosomas se desplazan hacia el ecuador de la célula, donde se alinean en el plano ecuatorial. Las cromátidas hijas todavía no se han separado.

65 (e) Anafase. Las dos cromátidas hermanas se separan en cromosomas independientes. Cada una contiene un centrómero que se encuentra unido por una fibra del huso a un polo, hacia el cual se mueve. De esta manera, se dona una copia de cada cromosoma a cada célula hija. Simultáneamente, la célula se alarga, al igual que los husos que van de polo a polo. Se inicia la citoquinesis, a medida que el surco de división empieza a formarse.

## ES 2 267 707 T3

(f) Telofase. Se forman nuevas membranas alrededor de los núcleos hijos; los cromosomas se desenrollan y se desdiferencian, el nucleolo nuevamente se vuelve visible, y se forma la membrana nuclear alrededor de cada núcleo hijo. La citoquinesis casi se ha completado, y el huso desaparece a medida que los microtúbulos y otras fibras se despolimerizan. Durante toda la mitosis el centriolo “hijo” en cada polo crece hasta ser de longitud completa. En la telofase se completa la duplicación de cada uno de los centriolos originales, y se generan nuevos centriolos hijo durante la siguiente interfase.

(g) Interfase. Tras completar la citoquinesis, la célula entra en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular y nuevamente experimenta el ciclo.

Se apreciará que el ciclo celular es un proceso celular extremadamente importante. Las desviaciones respecto al ciclo celular normal pueden resultar en varios trastornos médicos. El ciclo celular incrementado y/o no restringido puede resultar en cáncer. El ciclo celular reducido puede resultar en condiciones degenerativas. La utilización del compuesto tal como se describe en la presente memoria proporciona un medio para tratar estos trastornos y condiciones.

De esta manera, el compuesto para la utilización en la presente invención puede resultar adecuado para la utilización en el tratamiento de los trastornos del ciclo celular, tales como cánceres, incluyendo los cánceres dependientes de hormonas e independientes de hormonas.

Además, el compuesto para la utilización en la presente invención puede resultar adecuado para el tratamiento de cánceres, tales como el cáncer de mama, el cáncer de ovario, el cáncer de endometrio, sarcomas, melanomas, cáncer de próstata, cáncer pancreático, etc., y otros tumores sólidos.

Para algunas aplicaciones, el ciclo celular resulta inhibitorio y/o evitado y/o bloqueado, preferentemente en las que el ciclo celular resulta prevenido y/o bloqueado. En un aspecto, el ciclo celular puede inhibirse y/o prevenir y/o bloquearse en la fase G<sub>2</sub>/M. En un aspecto, el ciclo celular puede prevenirse y/o inhibirse y/o bloquearse irreversiblemente, preferentemente en el que el ciclo celular se previene y/o se bloquea irreversiblemente.

La expresión “prevenido y/o inhibitorio y/o bloqueado irreversiblemente” se refiere a que después de la aplicación de un compuesto para la utilización en la presente invención, tras la retirada del compuesto, los efectos del compuesto, es decir la prevención y/o inhibición y/o bloqueo del ciclo celular, todavía resultan observables. Más particularmente, la expresión “prevenido y/o inhibido y/o bloqueado irreversiblemente” se refiere a que, cuando se someten a ensayo de acuerdo con el protocolo de ensayo del ciclo celular presentado en la presente memoria, las células tratadas con un compuesto de interés manifiestan un crecimiento menor tras la Etapa 2 del protocolo I que las células de control. Se presentan a continuación los detalles de este protocolo.

De esta manera, la presente invención proporciona la utilización de compuestos que: causan la inhibición del crecimiento de las células de cáncer de mama positivas para el receptor de estrógenos (ER<sup>+</sup>) y ER negativas (ER<sup>-</sup>) *in vitro* mediante la prevención y/o inhibición y/o bloqueo del ciclo celular; y/o causan la regresión de tumores mamarios inducidos por nitroso-metil urea (NMU) en animales intactos (es decir, no ovariectomizados) y/o previenen y/o inhiben y/o bloquean el ciclo celular; y/o actúan *in vivo* previniendo y/o inhibiendo y/o bloqueando el ciclo celular y/o actúan como un agonista del ciclo celular.

### *Ensayo de ciclo celular (Protocolo 6)*

#### *Procedimiento*

##### *Etapas*

Se siembran células de cáncer de mama MCF-7 en placas de cultivo multipocillo a una densidad de 105 células/pocillo. Las células se permite que se enganchen y que crezcan hasta una confluencia de aproximadamente el 30%, momento en el que se tratan de la manera siguiente:

Control: sin tratamiento

Compuesto de interés (CDI): 20  $\mu$ M

Las células se cultivan durante 6 días en medio de crecimiento que contiene el CDI con cambios de medio/CDI cada 3 días. Al final de este periodo, se realiza un recuento celular utilizando un contador celular Coulter.

##### *Etapas*

Tras el tratamiento de las células durante un periodo de 6 días con el CDI, las células se siembran nuevamente a una densidad de 10<sup>4</sup> células/pocillo. No se añade ningún tratamiento adicional. Las células se deja que continúen creciendo durante 6 días adicionales en presencia del medio de crecimiento. Al final de este periodo, nuevamente se realiza un recuento de las células.

*Cáncer*

Tal como se ha indicado, los compuestos para la utilización en la presente invención puede resultar útiles en el tratamiento de un trastorno del ciclo celular. Un trastorno particular del ciclo celular es el cáncer.

El cáncer sigue siendo una causa principal de mortalidad en la mayoría de los países occidentales. Entre las terapias del cáncer desarrolladas hasta el momento se incluyen el bloqueo de la acción o de la síntesis de hormonas para inhibir el crecimiento de los tumores dependientes de hormona. Sin embargo, en la actualidad se utiliza quimioterapia más agresiva para el tratamiento de los tumores independientes de hormona.

Por lo tanto, el desarrollo de un fármaco para el tratamiento anticáncer de los tumores dependientes de hormona y/o independientes de hormona, pero que careciese de algunos o todos los efectos secundarios asociados a la quimioterapia, representaría un avance terapéutico importante.

Es conocido que los estrógenos experimentan varias reacciones de hidroxilación y de conjugación tras su síntesis. Hasta recientemente se creía que estas reacciones eran parte de un proceso metabólico que finalmente proporcionaba estrógenos solubles en agua y potenciaba su eliminación del cuerpo. Ahora resulta evidente que algunos metabolitos hidroxilados (por ejemplo 2-hidroxilados y 16alfa-hidroxilados) y conjugados (por ejemplo sulfato de estrona, E1S) son importantes para determinar algunas de las complejas acciones que presentan los estrógenos en el cuerpo.

Se ha investigado la formación de estrógenos 2-hidroxilados y 16-hidroxilados en relación a las condiciones que alteran el riesgo de cáncer de mama. En la actualidad existe evidencia de que los factores que incrementan la actividad de la 2-hidroxilasa se asocian a un riesgo de cáncer reducido, mientras que los que incrementan la 16alfa-hidroxilación pueden incrementar el riesgo de cáncer de mama. La creciente evidencia de que el 2-metoxiestradiol es un metabolito endógeno con propiedades antimitóticas ha incrementado el interés en el papel biológico de los metabolitos del estrógeno. El 2-metoxiestrona-3-O-sulfamato (2-MeOE2) se forma a partir de 2-hidroxil estradiol (2-OHE2) mediante catecol-estrógeno metiltransferasa, un enzima ampliamente distribuido por todo el cuerpo.

Se ha demostrado que 2-MeOE2 *in vivo* inhibe el crecimiento de tumores que surgen por la inyección subcutánea de sarcoma Meth A, melanoma B16 o células MDA-MB-435 de cáncer de mama negativas para el receptor de estrógenos (ER<sup>-</sup>). También inhibe la proliferación y la migración de las células endoteliales, y la angiogénesis *in vitro*. Se ha sugerido que la capacidad de 2-MeOE2 de inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* podría deberse a su capacidad de inhibir la angiogénesis inducida por el tumor y no por la inhibición directa de la proliferación de las células tumorales.

El mecanismo por el que 2-MeOE2 ejerce sus potentes efectos antimitogénicos y antiangiogénicos todavía se está investigando. Existe evidencia de que a concentraciones elevadas puede inhibir la polimerización de los microtúbulos y actuar como inhibidor débil de la unión de la colchicina a la tubulina. Sin embargo, recientemente a concentraciones que bloquean la mitosis, los filamentos de tubulina en las células.

*Terapia que incide en los estrógenos*

Los presentes inventores creen que algunos de los compuestos para la utilización en la presente invención pueden resultar útiles en el control de los niveles de estrógenos en el cuerpo, en particular en mujeres. De esta manera, algunos de los compuestos puede resultar útil al proporcionar un medio de control de la fertilidad, tal como una tableta, píldora, solución o pastilla anticonceptiva oral. Alternativamente, el compuesto podría encontrarse en forma de un implante o en forma de parche.

De esta manera, los compuestos para la utilización en la presente invención pueden resultar útiles en el tratamiento de las condiciones hormonales asociadas con el estrógeno, en particular en el tratamiento de las condiciones hormonales asociadas a la deficiencia de estrógenos.

Además, o alternativamente, el compuesto para la utilización en la presente invención puede resultar útil en el tratamiento de condiciones hormonales además de las asociadas con el estrógeno. Por lo tanto, el compuesto para la utilización en el presente invención también puede ser capaz de afectar a la actividad hormonal y también puede ser capaz de afectar a la respuesta inmunológica

de: autoinmunidad, incluyendo, por ejemplo, la artritis reumatoide, la diabetes de tipo I y de tipo II, el lupus eritematoso sistémico, la esclerosis múltiple, la miastenia grave, la tiroiditis, la vasculitis, la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, los trastornos de la piel, por ejemplo la soriasis y la dermatitis por contacto; la enfermedad de injerto contra huésped, eccema, asma y rechazo de órgano trasplantado.

A título de ejemplo, se cree que los inhibidores de STS podrían prevenir el efecto fisiológico normal de DHEA o esteroides relacionados sobre las respuestas inmunológicas y/o inflamatorias.

Los compuestos para la utilización en la presente invención pueden resultar útiles en la preparación de un medicamento para revelar un efecto endógeno similar a glucocorticoide.

*Otras terapias*

También debe entenderse que el compuesto/composición para la utilización en la presente invención puede presentar otras importantes implicaciones médicas.

5

Por ejemplo, el compuesto o composición para la utilización en la presente invención puede resultar útil en el tratamiento de los trastornos indicados en el documento WO-A-99/52890, *viz.*

10

Además, o alternativamente, el compuesto o composición para la utilización en la presente invención puede resultar útil en el tratamiento de los trastornos indicados en el documento WO-A-98/05635. Para facilitar la referencia, parte de esta lista se proporciona a continuación: cáncer, inflamación o enfermedad inflamatoria, trastornos dermatológicos, fiebre, efectos cardiovasculares, hemorragia, coagulación y respuesta de fase aguda, caquexia, anorexia, infección aguda, infección por VIH, estados de choque, reacciones de injerto contra huésped, enfermedad autoinmunitaria, lesión de reperfusión, meningitis, migraña y antitrombosis dependiente de aspirina; crecimiento, invasión y extensión tumorales, angiogénesis, metástasis, ascites maligno y efusión pleural maligna; isquemia cerebral, enfermedad cardíaca isquémica, osteoartritis, artritis reumatoide, osteoporosis, asma, esclerosis múltiple, neurodegeneración, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, ictus, vasculitis, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; periodontitis, gingivitis; soriasis, dermatitis atópica, úlceras crónicas, epidermolisis bullosa; ulceración corneal, retinopatía y cicatrización de heridas quirúrgicas; rinitis, conjuntivitis alérgica, eccema, anafilaxis; restenosis, insuficiencia cardíaca congestiva, endometriosis, aterosclerosis y endoesclerosis.

20

Además, o alternativamente, el compuesto o composición para la utilización en la presente invención puede resultar útil en el tratamiento de los trastornos citados en la patente WO-A-98/07859. Para facilitar la referencia, parte de esta lista se proporciona a continuación: actividad de citoquina y de proliferación/diferenciación celular; actividad inmunosupresora o inmunoestimuladora (por ejemplo para tratar una deficiencia inmunológica, incluyendo la infección por virus de la inmunodeficiencia humana; regulación del crecimiento de linfocitos; tratamiento del cáncer y de muchas enfermedades autoinmunitarias, y para prevenir el rechazo del trasplante o inducir la inmunidad tumoral); regulación de la hematopoyesis, por ejemplo el tratamiento de las enfermedades mieloides o linfoides; promover el crecimiento de hueso, cartílago, tendón, ligamento y tejido nervioso, por ejemplo para cicatrizar heridas, el tratamiento de quemaduras, úlceras y enfermedad periodontal y neurodegeneración; inhibición o activación de la hormona folículo-estimulante (modulación de la fertilidad); actividad quimiotáctica/quimocinética (por ejemplo para movilizar tipos celulares específicos a sitios de lesión o de infección); actividad hemostática y trombolítica (por ejemplo para tratar la hemofilia y el ictus); actividad antiinflamatoria (para tratar, por ejemplo el choque séptico o enfermedad de Crohn); como antimicrobianos; moduladores de, por ejemplo, el metabolismo o el comportamiento; como analgésicos; en el tratamiento de trastornos de deficiencia específicos; en el tratamiento de, por ejemplo, la soriasis en medicina humana o veterinaria.

30

35

Además, o alternativamente, la composición para la utilización en la presente invención puede resultar útil en el tratamiento de los trastornos citados en la patente WO-A-98/09985. Para facilitar la referencia, parte de esta lista se proporciona a continuación: actividad inhibidora de macrófagos y/o de células T y, de esta manera, actividad antiinflamatoria; actividad antiinmunitaria, es decir efectos inhibitorios contra una respuesta inmunológica celular y/o humoral, incluyendo una respuesta no asociada con la inflamación; inhibición de la capacidad de los macrófagos y de las células T de adherirse a componentes de la matriz extracelular y la fibronectina, así como de regular positivamente la expresión del receptor fas en las células T; inhibición de una reacción inmunológica no deseada y de la inflamación, incluyendo artritis, incluyendo artritis reumatoide, inflamación asociada a hipersensibilidad, reacciones alérgicas, asma, lupus sistémico eritematoso, enfermedades del colágeno y otras enfermedades autoinmunitarias, inflamación asociada a la aterosclerosis, arterioesclerosis, enfermedad cardíaca aterosclerótica, lesión por reperfusión, paro cardíaco, infarto de miocardio, trastornos inflamatorios vasculares, síndrome del estrés respiratorio u otras enfermedades cardiopulmonares, inflamación asociada a úlcera péptica, colitis ulcerosa y otras enfermedades del tracto gastrointestinal, fibrosis hepática, cirrosis hepática u otras enfermedades hepáticas, tiroiditis u otras enfermedades glandulares, glomerulonefritis u otras enfermedades renales y urológicas, otitis u otras enfermedades otorrinolaringológicas, dermatitis u otras enfermedades dérmicas, enfermedades periodontal u otras enfermedades dentales, orquitis o epidídimo-orquitis, infertilidad, traumatismo orquidal u otras enfermedades testiculares relacionadas inmunológicamente, disfunción placentaria, insuficiencia placentaria, aborto habitual, eclampsia, preeclampsia y otras enfermedades ginecológicas inmunológicas y/o relacionadas con inflamación, uveitis posterior, uveitis intermedia, uveitis anterior, conjuntivitis, corioretinitis, uveoretinitis, neuritis óptica, inflamación intraocular, por ejemplo retinitis o edema macular cistoide, oftalmia simpática, escleritis, retinitis pigmentosa, componentes inmunológicos e inflamatorios de la enfermedad degenerativa del fondus, componentes inflamatorios del traumatismo ocular, inflamación ocular causada por infección, vítreo-retinopatías proliferativas, neuropatía óptica isquémica aguda, cicatrización excesiva, por ejemplo tras una operación de filtración de glaucoma, reacción inmunológica y/o de inflamación contra implantes oculares y otras enfermedades oftálmicas inmunológicas y relacionadas con inflamación, inflamación asociada con enfermedades o condiciones o trastornos autoinmunitarios en los que, tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en cualquier otro órgano, la supresión inmunológica y/o de la inflamación resultaría beneficiosa, enfermedad de Parkinson, complicación y/o efectos secundarios del tratamiento de la enfermedad de Parkinson, complejo de demencia relacionada con el SIDA-encefalopatía relacionada con el VIH, enfermedad de Devic, corea de Sydenham, enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades, condiciones o trastornos degenerativos del SNC, componentes inflamatorios del ictus, síndrome postpolio, componentes inmunológicos e inflamatorios de trastornos psiquiátricos, mielitis, encefalitis, panencefalitis esclerosante subaguda, encefalomyelitis, neuropatía aguda, neuropatía subaguda, neuropatía crónica, síndrome de

65

Guillain-Barre, corea de Sydenham, miastenia grave, pseudotumores cerebrales, síndrome de Down, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, componentes inflamatorios de la compresión del SNC o traumatismo del SNC o de infecciones del SNC, componentes inflamatorios de las atrofas y distrofas musculares, y enfermedades inmunológicas e inflamatorias, condiciones o trastornos de los sistemas nervioso central y periférico, inflamación post-traumática, choque séptico, enfermedades infecciosas, complicaciones o efectos secundarios inflamatorios de la cirugía, trasplante de médula ósea u otras complicaciones y/o efectos secundarios del trasplante, complicaciones y efectos secundarios inflamatorios y/o inmunológicos de la terapia génica, por ejemplo debidos a infección con un portador vírico, o inflamación asociada a SIDA, para suprimir o inhibir una respuesta inmunológica humoral y/o celular, para tratar o mejorar las enfermedades proliferativas de monocitos o de leucocitos, por ejemplo leucemia, mediante la reducción de la cantidad de monocitos o de linfocitos, para la prevención y/o el tratamiento del rechazo del injerto en casos de trasplante de células naturales o artificiales, de tejido y de órganos, tales como córnea, médula ósea, órganos, lentes, marcapasos, tejido de piel natural o artificial.

#### Preparación de compuesto

Los compuestos para la utilización en la presente invención pueden prepararse haciendo reaccionar un alcohol apropiado con un cloruro adecuado. A título de ejemplo, los compuestos sulfamato para la utilización en la presente invención pueden prepararse haciendo reaccionar un alcohol apropiado con un cloruro de sulfamoilo adecuado, de fórmula  $R^1R^2NSO_2Cl$ .

Las condiciones típicas para llevar a cabo la reacción son las siguientes.

Se añaden hidruro sódico y un cloruro de sulfamoilo a una solución agitada del alcohol en dimetil formamida anhidra a 0°C. Posteriormente, la reacción se deja calentar hasta la temperatura ambiente, siguiendo la agitación durante 24 horas adicionales. La mezcla de reacción se vierte sobre una solución saturada fría de bicarbonato sódico y la fase acuosa resultante se extrae con diclorometano. Los extractos orgánicos agrupados se secan sobre  $MgSO_4$  anhidra. La filtración, seguido de la evaporación del solvente en el vacío y la coevaporación con tolueno proporciona un residuo crudo que se purifica adicionalmente mediante cromatografía flash.

Preferentemente, el alcohol se derivatiza, según resulte apropiado, previamente a la reacción con el cloruro de sulfamoilo. En caso necesario, pueden protegerse los grupos funcionales en el alcohol de manera conocida y el grupo o grupos protectores eliminarse al final de la reacción.

Preferentemente, los compuestos sulfamato se preparan de acuerdo con las enseñanzas de Page *et al.* (1990, Tetrahedron 46:2059-2068). Alternativamente, los compuestos sulfamato pueden prepararse de acuerdo con los documentos WO 96/05216 o WO 96/05217.

#### Sumario

En resumen, la presente invención proporciona composiciones adecuadas para la terapia de sustitución hormonal protectora de los huesos sin estimulación endometrial.

#### Ejemplos

A continuación, se describe la presente invención únicamente a título de ejemplo haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

la figura 1 presenta un gráfico de flujo;

la figura 2 presenta un gráfico;

la figura 3 presenta un gráfico;

la figura 4 presenta un gráfico;

la figura 5 presenta un gráfico;

la figura 6 presenta un gráfico;

la figura 7 presenta gráficos;

la figura 8 presenta un gráfico;

la figura 9 presenta un gráfico;

la figura 10 presenta un gráfico;

la figura 11 presenta gráficos;

## ES 2 267 707 T3

Se preparó el compuesto o los compuestos siguientes para la utilización en la invención.

### Preparación de estrona-3-sulfamato

5 Se añadieron hidruro sódico (dispersión al 60%; 2 eq.) y cloruro de sulfamoilo (2 eq.) a una solución agitada de estrona (1 eq.) en dimetil formamida anhidra a 0°C. Después, la reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente, continuando la agitación durante 24 horas adicionales.

10 La mezcla de reacción se vertió sobre una solución saturada fría de bicarbonato sódico y la fase acuosa resultante se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos agrupados se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. La filtración seguida de la evaporación del solvente en el vacío y la coevaporación con tolueno proporcionó un residuo crudo que se purificó adicionalmente mediante cromatografía flash.

El análisis proporcionó los resultados siguientes:

15  $\delta^1\text{H}$  (270 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0,91 (s, 3H, C<sub>18</sub>-Me), 1,40-2,55 (serie de m, 13H), 2,90-2,92 (m, 2H), 7,04 (br d, 2H, J=10,44 Hz), 7,33 (br d, 1H, J=8,42 Hz)

20  $\delta^{13}\text{C}$  (67,8 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 14,53 (q, C<sub>18</sub>-Me), 22,80 (t), 27,24 (t), 27,73 (t), 30,68 (t), 33,05 (t), 37,01 (t), 39,76 (d), 45,73 (s, C<sub>18</sub>), 51,86 (d), 120,76 (d), 123,54 (d), 127,89 (d), 139,83 (s), 150,27 (s), 223,87 (s, C=O)

25 m/z (%): 349(9) (m<sup>+</sup>), 270 (100), 213 (26), 185 (43), 172 (31), 159 (21), 146 (36), 91 (33), 69 (37), 57 (73), 43 (56), 29 (24).

### Microanálisis:

	C	H	N
30 Teórico:	61,87%	6,63%	4,01%
Observado	61,90%	6,58%	3,95%

### 35 Estudios con sulfamato de estradiol (J995)

#### Tecnología

40 Se investigó el sulfamato de estradiol (J995) con respecto a sus propiedades hormonales *in vitro* e *in vivo*. Los estudios *in vitro* incluyeron la evaluación de su unión específica a receptores de estrógeno utilizando preparaciones citosólicas de tejido uterino de ratas y ratones y células tumorales MCF-7. Los estudios *in vivo* se llevaron a cabo en varias especies animales, incluyendo ratas intactas y ovariectomizadas y monos cinomolgus. Estas especies sirvieron para estudios farmacodinámicos y farmacocinéticos detallados de la administración parenteral y oral del compuesto.

45 Los estudios en el ser humano se llevaron a cabo con la administración oral del compuesto en mujeres postmenopáusicas. Se evaluaron varias dosis con administración única y múltiple. Los estudios *in vitro* se llevaron a cabo con soluciones en vehículos aceitosos para la administración parenteral. El tratamiento oral se llevó a cabo con suspensiones de J995 cristalino en vehículos acuosos. Los estudios clínicos se llevaron a cabo con sustancia farmacológica amorfa formulada galénicamente con una mezcla de ingredientes convencionales como cápsulas o comprimidos.

50 Los estudios *in vitro* revelaron que J995 *per se* no presenta afinidad por el receptor de estrógenos. No se observó unión específica de J995 marcado radioactivamente al receptor de estrógenos de ratones, ratas y del ser humano. Un exceso enorme de J995 fue incapaz de desplazar estradiol marcado radioactivamente unido específicamente. Ambos resultados constituyen una clara evidencia de que J995 ejerce efectos estrogénicos tras la transformación de una molécula hormonalmente inactiva en una hormonalmente activa. El profármaco J995, o su metabolito principal sulfamato de estrona (EMATE) se hidroliza en ácido sulfámico y las hormonas estrogénicas naturales estradiol y estrona, respectivamente (fig. 1).

60 Debido al transporte preferido en eritrocitos, el profármaco y J995 presentan propiedades farmacocinéticas peculiares. J995 no circula en la fracción de plasma de la sangre de la misma manera que los estrógenos convencionales, aunque una cantidad de 98% a 99% de J995 circula en el compartimiento de los eritrocitos. Este transporte en eritrocitos conduce a una acción y extracción hormonal hepática muy reducida en el primer paso hepático y a una liberación de larga duración de J995 desde los eritrocitos, que funcionan como depósito.

65

## ES 2 267 707 T3

### *Ventajas de J995 con respecto a la terapia oral con estrógenos*

- *Reducción de la variación individual de los niveles en sangre (figs. 2 y 3)*

5 El estándar de oro para la terapia oral de estrógenos es el etinil estradiol. Este compuesto no conduce a niveles bien definidos en sangre (fig. 4). La desventaja de esta variación individual es la necesidad de administrar dosis más altas de lo necesario en la mayoría de individuos con el fin de alcanzar una tasa aceptable de tratamientos con éxito.

- *Reducción de dosis y carga de estrógenos de metabolitos activos que se sospecha que estimulan el crecimiento de algunos tumores hormono-dependientes*

15 La terapia convencional de sustitución oral de estrógenos con los denominados estrógenos conjugados, estradiol, valerato de estradiol o sulfato de estrona conducen a un reservorio grande de sulfato de estrona en la circulación. La hidrólisis de alguno de los metabolitos conduce a los niveles sanguíneos terapéuticamente relevantes de estrona y de estradiol. Sin embargo, el sulfato de estrona presenta la desventaja de que resulta hidrolizado de manera particularmente activa por la sulfatasa en el tejido tumoral mamario, lo que puede generar estrógenos potencialmente estimuladores del crecimiento. J995, en relación a su dosis, conduce a niveles de estradiol más altos y de mucha mayor duración que el valerato de estradiol a la misma dosis (figs. 6 y 7). El metabolito sulfato de estrona, que aparece a continuación, sigue presentando valores establemente inferiores en un factor de por lo menos 10 a los obtenidos bajo el tratamiento con valerato de estradiol (fig. 5).

- *Reducción de los efectos estrogénicos hepáticos*

25 Una dosis elevada de estrógenos resulta esencial para la terapia oral convencional de estrógenos para compensar la pérdida sustancial hepática de la hormona. La desventaja de esta dosis elevada es un efecto desfavorable sobre las funciones hepáticas reguladas por estrógenos. Entre éstas se incluyen un efecto sobre factores del sistema hemostático y trastornos tromboembólicos relacionados, elevación del angiotensinógeno en la circulación y efectos posteriores sobre las funciones adrenales, renales y vasculares, cambios en la secreción de bilis y en el metabolismo de los lípidos. El mecanismo de acción de J995, que evita el hígado, y la estrategia de una dosis ultrabaja de acuerdo con la presente invención evita los efectos no deseados correspondientes del tratamiento climatérico con estrógenos. J995 administrado oralmente alcanza el reservorio de los eritrocitos casi al 100%. Mucho más del 50% de este profármaco aparece como estrona y estradiol en la circulación (fig. 11). Esto permite utilizar una dosis muy reducida en comparación con la terapia oral convencional de estrógenos por unidad de tiempo.

- *Consecución de niveles en sangre constantes*

40 Los niveles en sangre de los estrógenos fluctúan de día en día bajo el tratamiento oral diario convencional de estrógenos (figs. 5, 6 y 7), mientras que J995 conduce a niveles en sangre muy constantes y duraderos (figs. 5, 6, 7, 8, 9 y 10). La figura 9 muestra niveles casi constantes de sulfato de estrona, que reflejan la producción anterior de estradiol y de estrona tras 14 días de tratamiento con J995 a una dosis muy reducida de 100 µg al día en la etapa de lavado a lo largo de 144 horas.

- *Efectos del sulfamato de estradiol en huesos deficientes en estrógenos*

45 Los niveles en sangre constantes y bien definidos tal como se describen en la presente memoria no pueden alcanzarse con la terapia oral establecida de estrógenos. J995 permite un tratamiento osteoprotector preciso justo por debajo del umbral que conduce al crecimiento endometrial. La ausencia de efectos endometriales permite, en un aspecto preferido, la utilización de J995 sin la administración simultánea de progestinas.

### *Mejoras que pueden alcanzarse con una preparación de sólo estrógenos para la terapia de sustitución de estrógenos basada en J995*

- *Terapia libre de hemorragias*

50 La justificación de un tratamiento combinado de estrógenos/progestina es el control de la proliferación endometrial, que representa un riesgo de desarrollo de cáncer de endometrio. El precio de este efecto esencial protector es bastante sustancial. El tratamiento tanto cíclico como continuo combinado conducen a hemorragias uterinas que probablemente son el motivo más importante para interrumpir la terapia de sustitución de estrógenos.

- *Efectos sobre el bienestar*

65 Otra aspecto negativo establecido de este tratamiento es una alteración de los efectos positivos que ejercen los estrógenos sobre el bienestar de las mujeres climatéricas.

## ES 2 267 707 T3

- *Mamas*

Los efectos proliferativos de las progestinas en las mamas, en analogía a los efectos de la progesterona en el embarazo, plantean cuestiones. La preocupación con estos efectos se relaciona con su papel potencial en el desarrollo del cáncer mamario.

- *Efectos secundarios metabólicos*

Las progestinas, al igual que la progesterona, presenta importantes efectos sobre un amplio espectro de funciones metabólicas. Entre éstos se incluyen la secreción de insulina y la resistencia a la insulina, que se encuentra reducida, y los efectos sobre el metabolismo de los lípidos. Los efectos correspondientes representan los efectos no deseados en el contexto de la terapia de sustitución de estrógenos.

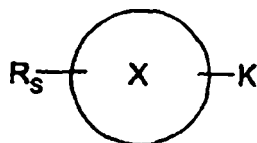
*Significación de la terapia de sustitución de estrógenos*

Las mujeres experimentan una pérdida constante de masa ósea tras el cese de la secreción ovárica de estrógenos tras la menopausia. Debido al hecho de que la esperanza de vida de las mujeres es muy elevada y sigue creciendo, resulta necesario evitar la pérdida ósea y la fragilidad esquelética resultante. Éste es, por mucho, el factor de riesgo más importante de discapacidad y también de morbilidad y mortalidad a edades elevadas.

## REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de una composición farmacéutica en la preparación de un medicamento para la terapia de sustitución hormonal protectora de los huesos sin la estimulación endometrial, en la que la composición farmacéutica comprende:

(i) un compuesto de Fórmula (I):



Fórmula I

10

15

en la que: X es un anillo hidrocarbilo con por lo menos 4 átomos en el anillo; K es un grupo hidrocarbilo; R<sub>s</sub> es un grupo sulfamato;

20

(ii) mezclado opcionalmente con un portador, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable,

en la que el compuesto se encuentra presente en una cantidad para proporcionar una dosis no superior a 200 μg/día.

25

2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el compuesto se encuentra presente en una cantidad para proporcionar una dosis de 10 a 200 μg/día.

3. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el compuesto se encuentra presente en una cantidad para proporcionar una dosis de 50 a 200 μg/día.

30

4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el compuesto se encuentra presente en una cantidad para proporcionar una dosis de 20 a 50 μg/día.

5. Utilización según la reivindicación 1, en la que el compuesto se encuentra presente en una cantidad no superior a 200 μg/dosis.

35

6. Utilización según la reivindicación 1, en la que el compuesto se encuentra presente en una cantidad no superior a 1 mg/dosis.

40

7. Utilización según la reivindicación 1, en la que el compuesto se encuentra presente en una cantidad no superior a 4 mg/dosis.

8. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que X en combinación con K imita una estructura esteroidea.

45

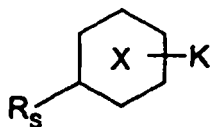
9. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que K es un grupo cíclico.

10. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que X es un anillo de seis elementos.

50

11. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el anillo X presenta seis átomos de carbono en el anillo.

12. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el compuesto es de Fórmula II:



Fórmula II

55

60

en la que cada uno de entre R<sub>s</sub>, X y K es tal como se define en la reivindicación 1, 2 ó 3.

13. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que X en combinación con K es una estructura de anillo esteroidea.

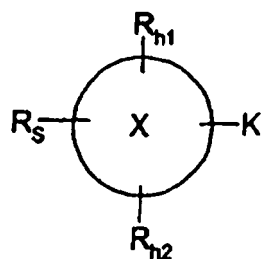
65

14. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el grupo K y el anillo X son una estructura de anillo esteroide o un derivado sustituido de la misma.

15. Utilización según la reivindicación 14, en la que el grupo  $R_s$  se encuentra en la posición 3 del anillo X.

16. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que  $R_s$  es un grupo sulfamato.

5 17. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el compuesto es de Fórmula III:



Fórmula III

10

15

en la que X, K y  $R_s$  son tal como se ha definido en la reivindicación 1, 2 ó 3; y en la que  $R_{h1}$  es un grupo halo opcional;  $R_{h2}$  es un grupo halo opcional; por lo menos uno de entre  $R_{h1}$  y  $R_{h2}$  se encuentra presente.

20

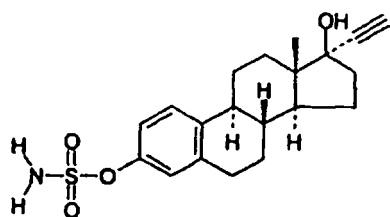
18. Utilización según la reivindicación 17, en la que  $R_{h1}$  se encuentra en la posición 2 del anillo X.

19. Utilización según la reivindicación 17 ó 18, en la que  $R_{h2}$  se encuentra en la posición 4 del anillo X.

25

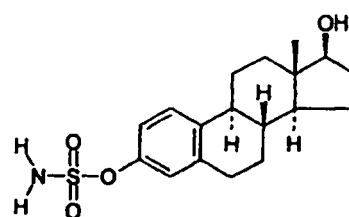
20. Utilización según la reivindicación 1, en la que el compuesto de Fórmula I se selecciona de entre los compuestos:

30



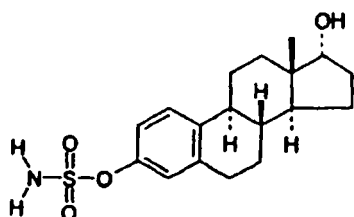
17 $\alpha$  etinil-17 $\beta$  estradiol-3-sulfamato

35



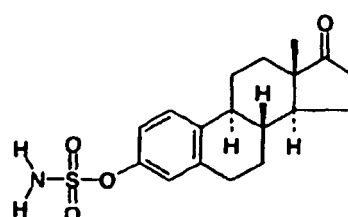
17- $\beta$  estradiol-3-sulfamato

40



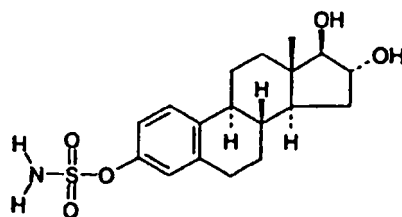
17 $\alpha$ -estradiol-3-sulfamato

45



estrona-3-sulfamato (EMATE)

50



estriol-3-sulfamato

55

60

65

Rutas principales de biotransformación del valerato de estradiol frente al sulfamato de estradiol (J995)

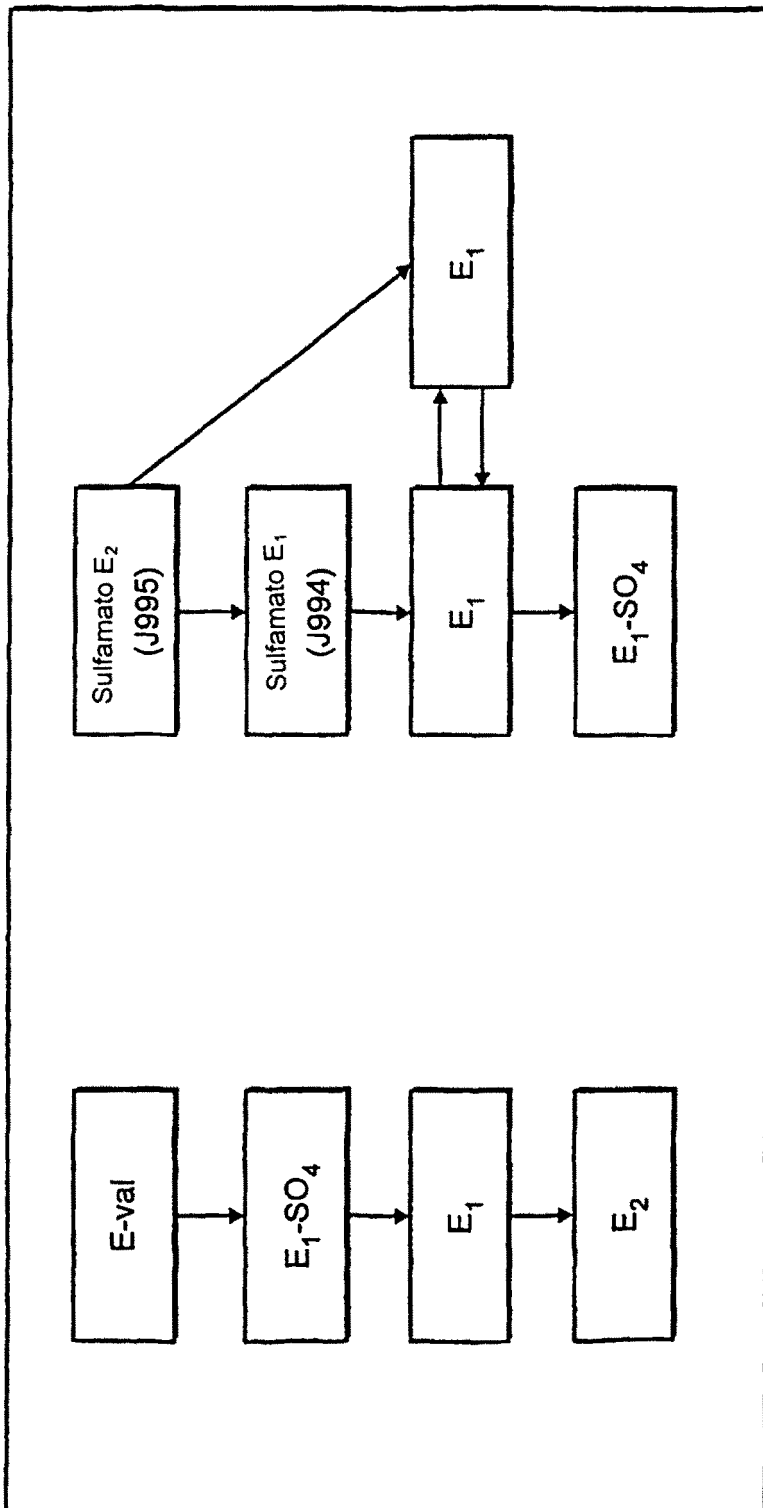


FIG.1

Curso de estrona plasmática en mujeres menopáusicas (n=6) tras una sola dosis oral de 1 mg de sulfamato de estradiol (J995)

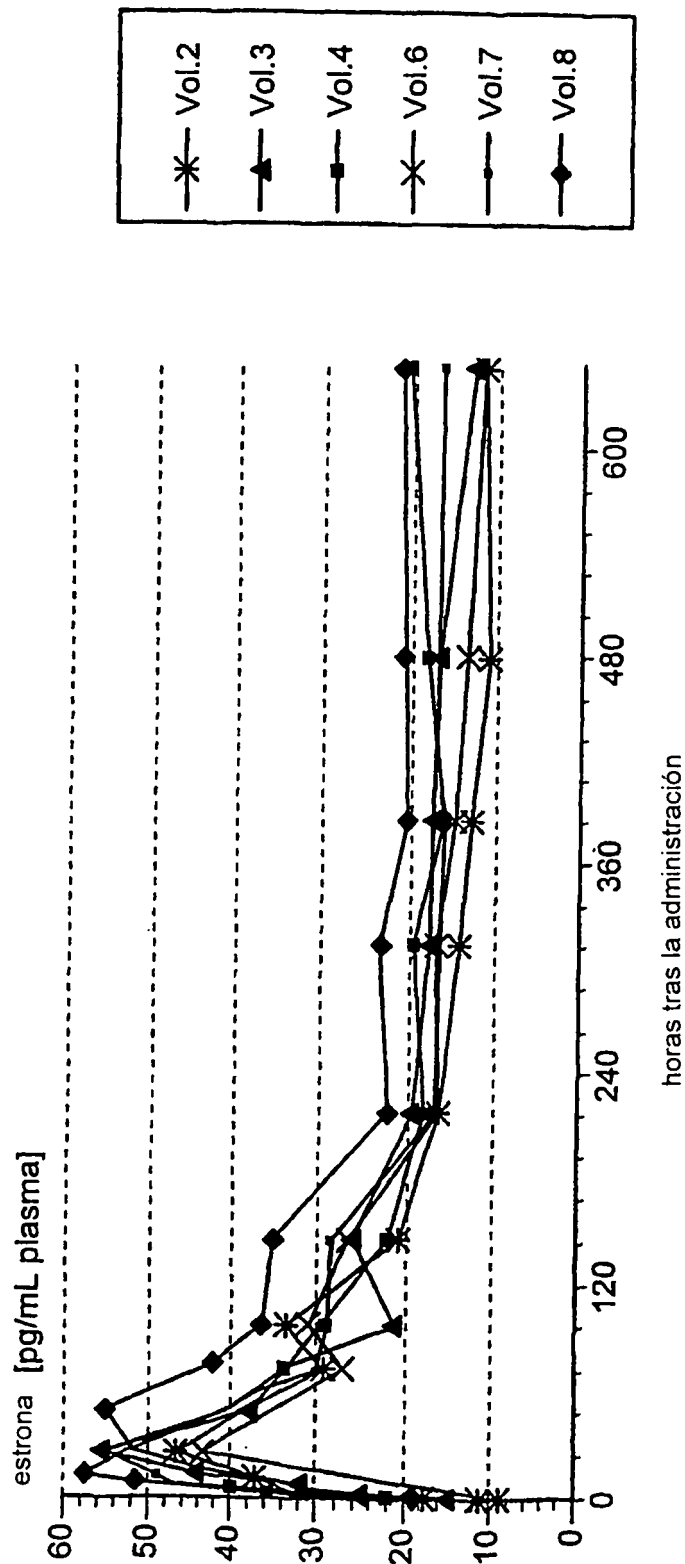


FIG.2

Curso de estrona plasmática en mujeres menopáusicas (n=6) tras una sola dosis oral de 1 mg de sulfamato de estradiol (J995)

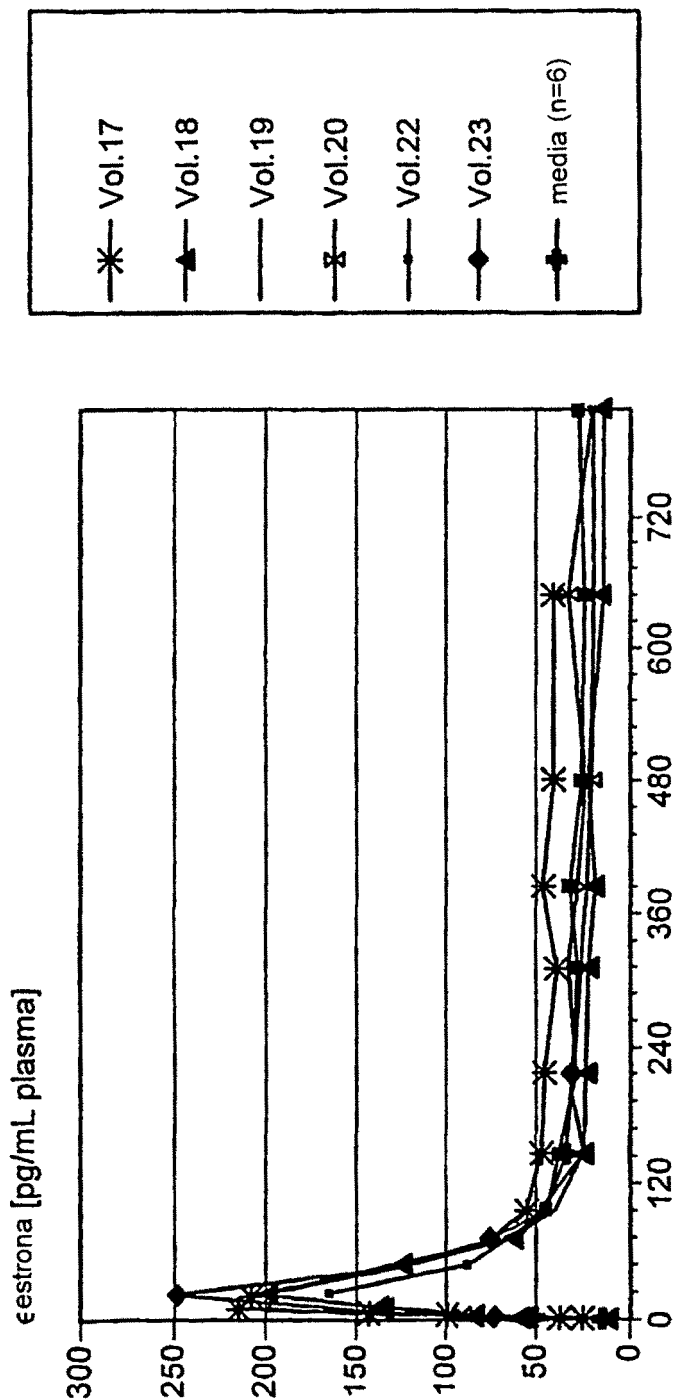
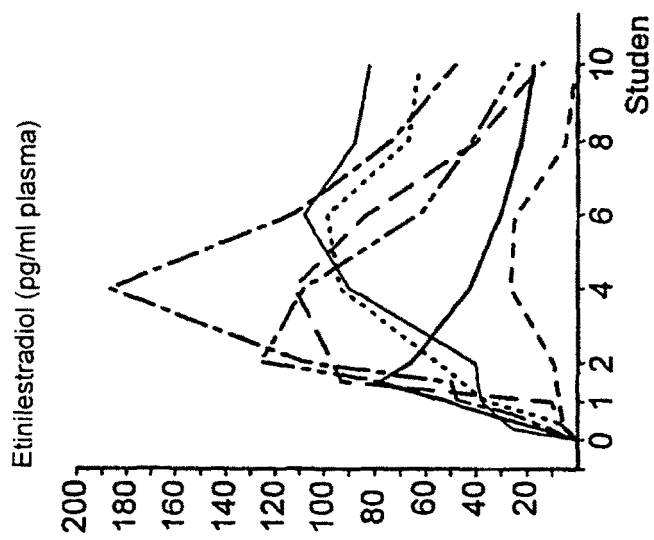


FIG.3

Variación individual de los niveles plasmáticos tras una sola dosis (50 µg) de etinilestradiol administrado bajo condiciones rígidamente estandarizadas



Goldzieher JHW et al., Am Obst Gyn 160/5 (1989) 1260-1264

FIG.4

Sulfato de estrona plasmático en mujeres menopáusicas: comparación entre una sola dosis de 2 mg de sulfamato de estradiol (J995) y múltiples dosis orales de 2 mg de valerato de estradiol

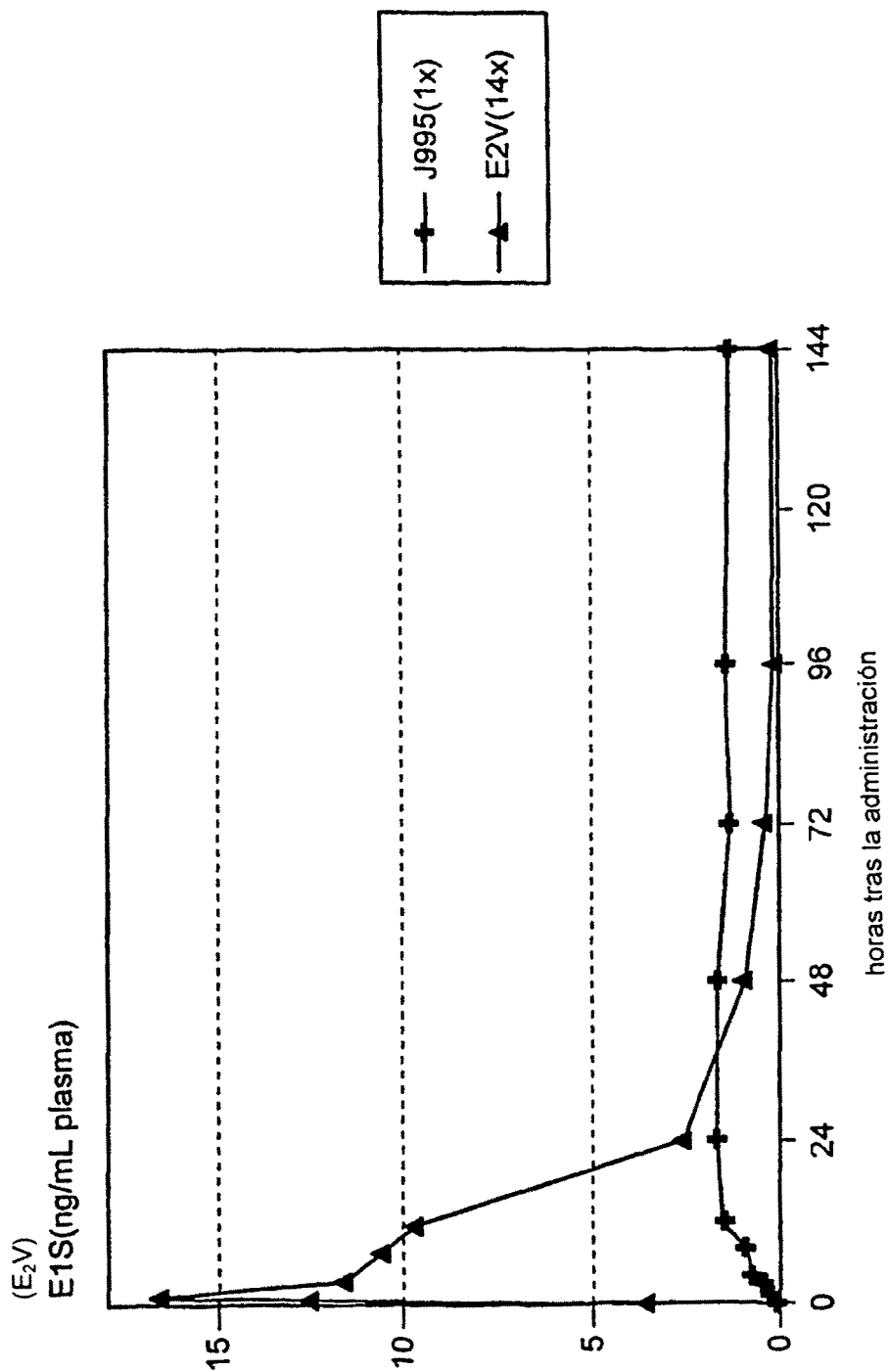


FIG.5

Curso de sulfato de estrona plasmático en mujeres menopáusicas (n=6)  
 tras diversas dosis orales de sulfamato de estradiol (J995) y 2 mg de  
 valerato de estradiol (E<sub>2</sub>V)

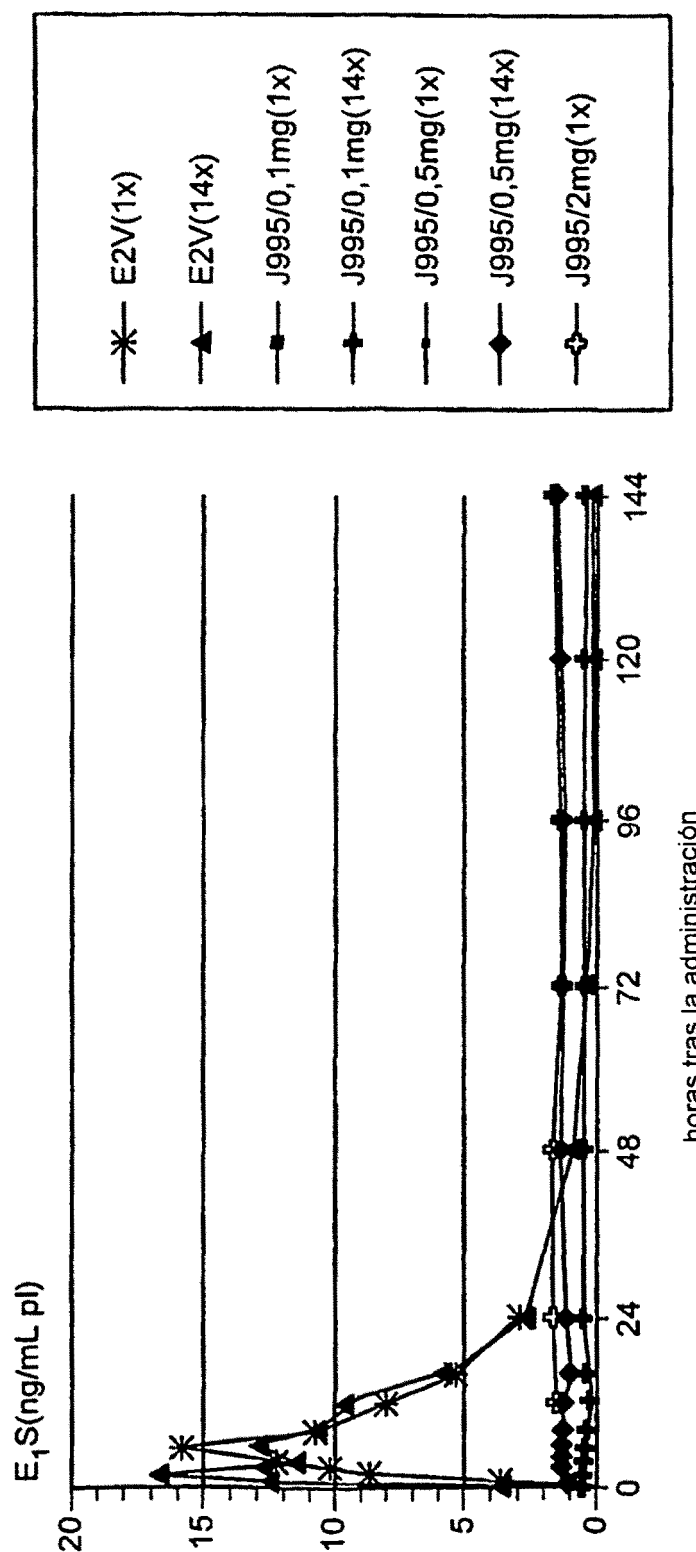
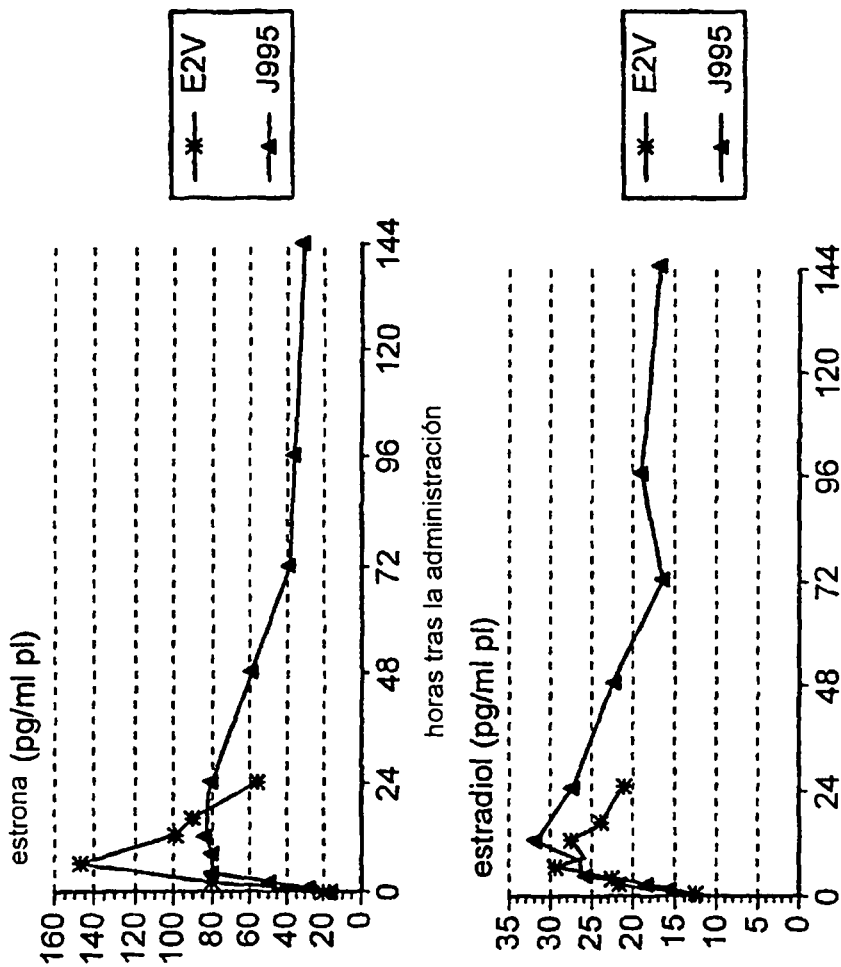


FIG.6

Curso de sulfato de estrona plasmático en mujeres menopáusicas (n=6) tras diversas dosis orales de sulfamato de estradiol (J995) y 2 mg de valerato de estradiol (E<sub>2</sub>V)



horas tras la administración

FIG.7

Curso de estrona y de estradiol plasmáticos en mujeres menopáusicas (n=6) tras una sola dosis oral de placebo, 0,5 mg, 1 mg, 2 mg, 4 mg, 8 mg de sulfamato de estradiol (J995)

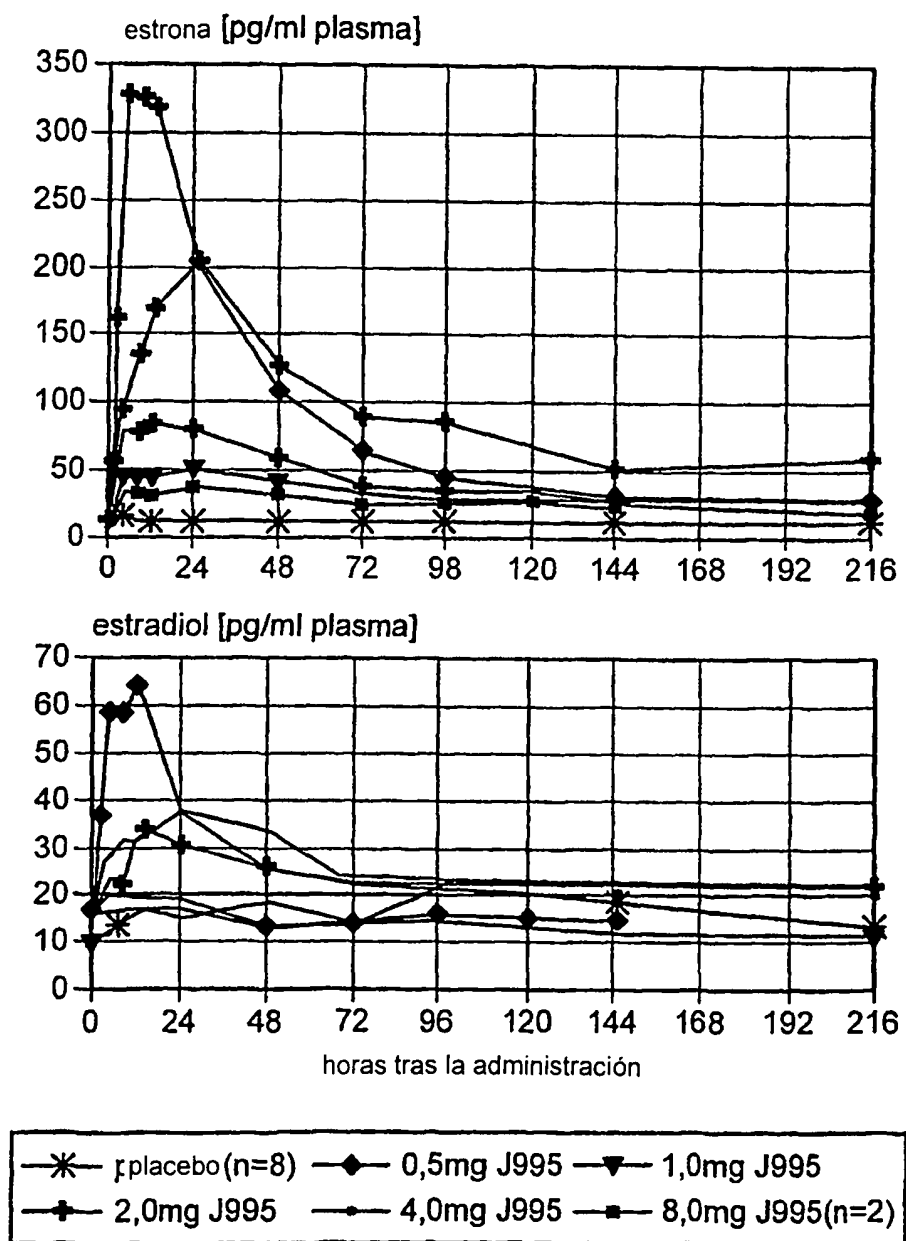
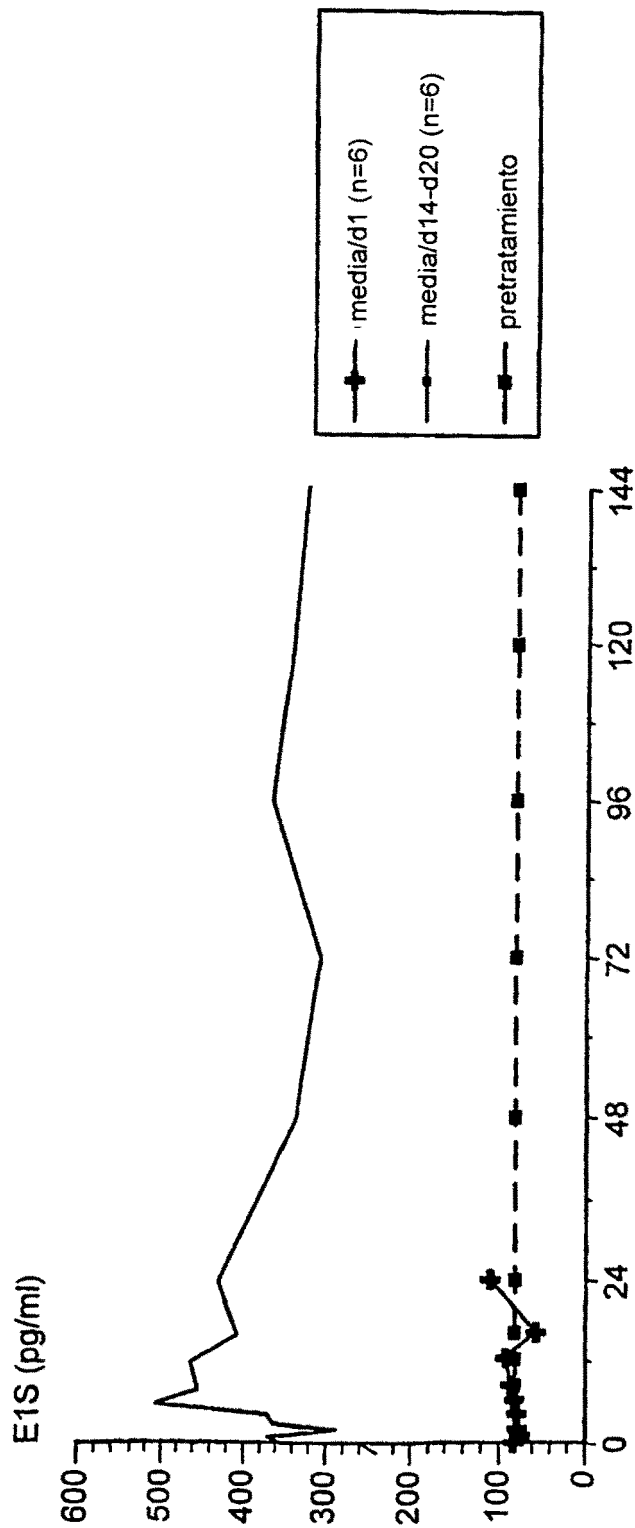


FIG.8

Curso de sulfato de estrona plasmático (E1S) en mujeres menopáusicas (n=6) tras múltiples dosis orales de 100 µg de sulfamato de estradiol (J995)



horas tras la administración

FIG.9

Curso de sulfato de estrona plasmático (E1S) en mujeres menopáusicas (n=6) tras múltiples dosis orales de 100 µg de sulfamato de estradiol (J995)

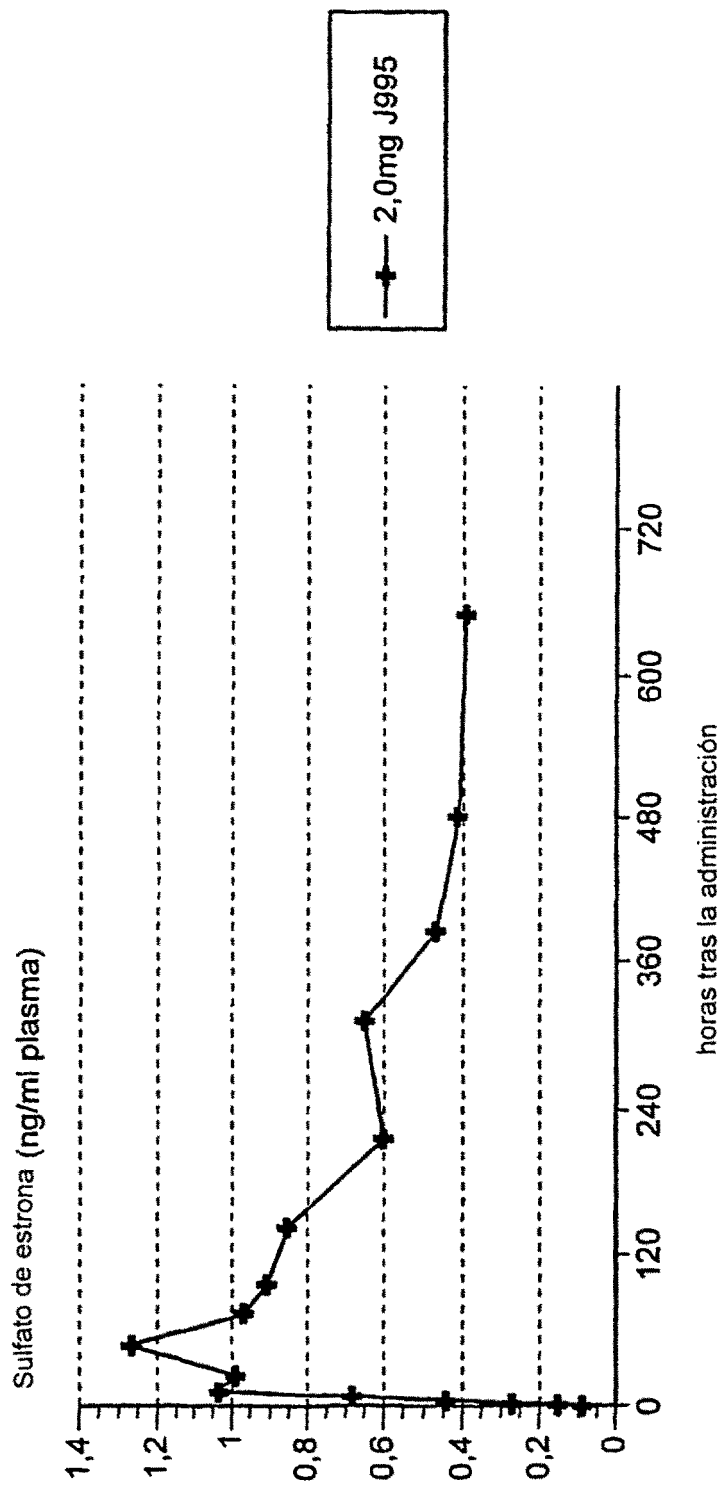
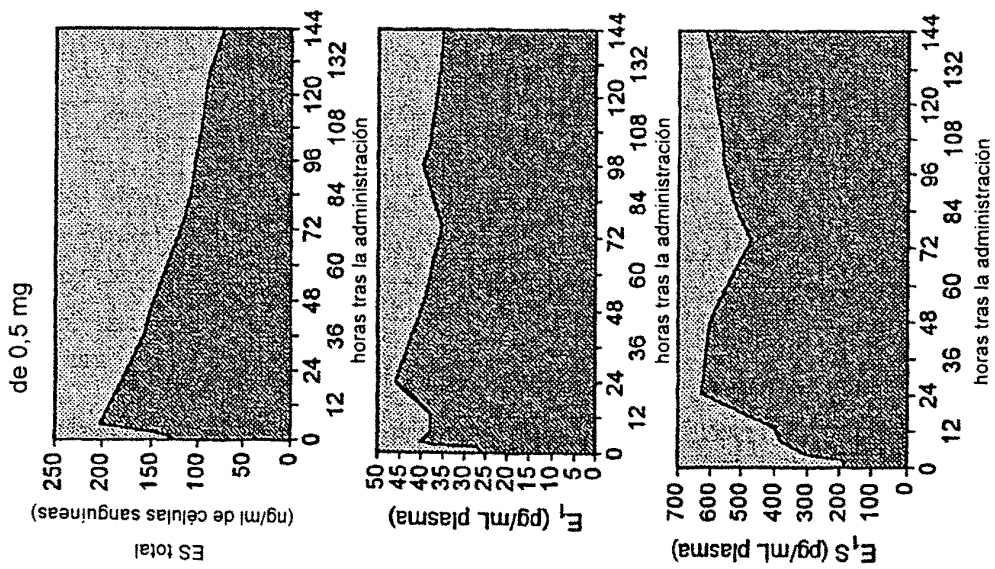


FIG.10

Estimación de la biodisponibilidad oral del sulfamato de estradiol (J995) con una sola dosis oral



Conc. de eritrocitos : Aprox. 200 ng/ml de eritrocitos/aprox.  
100 µg/litro de sangre  
≈ 500 µg/5 litros de sangre

Eliminación de E1 : 40 pg/ml a lo largo de 5 días  
40 ng/l a lo largo de 5 días  
1870l x 40 ng//días  
374 µg/ 5 días

Clearance of E<sub>1</sub>S: 700 pg/l a lo largo de 5 días  
700 ng/l a lo largo de 5 días  
110l x 40 ng//días  
385 µg/ 5 días

\*Longcope C and Williams KH:  
J Clin Endocrinol Metab 38 (1974) 602-607

FIG.11