



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 274 252**

(51) Int. Cl.:

**A61K 31/565** (2006.01)

**A61P 19/02** (2006.01)

**A61P 17/06** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

(12)

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03741634 .4**

(86) Fecha de presentación : **11.06.2003**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1511496**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **09.03.2005**

(54) Título: **Método de tratamiento o prevención de desórdenes de mediación inmune y formulación farmacéutica para su uso en ellos.**

(30) Prioridad: **11.06.2002 EP 02077272**

(73) Titular/es: **Pantarhei Bioscience B.V.  
P.O. Box 464  
3700 AL Zeist, NL**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.05.2007**

(72) Inventor/es: **Bunschoten, Evert, Johannes;  
Coelingh Bennink, Herman, Jan, Tijmen y  
Holinka, Christian, Franz**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.05.2007**

(74) Agente: **Castellet i Torné, Mari Angels**

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

Método de tratamiento o prevención de desórdenes de mediación inmune y formulación farmacéutica para su uso en ellos.

5

### Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de desórdenes de mediación inmune en mamíferos mediante administración de una cantidad efectiva de un componente estrogénico a dicho mamífero.

10 El método es particularmente apropiado para el tratamiento o prevención de desórdenes mediados por linfocitos T y/o enfermedades inflamatorias crónicas, incluyendo, pero sin limitarse a estas, enfermedades auto-inmunes, como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, osteoartritis, diabetes insulinodependiente (diabetes tipo I), lupus eritematoso sistémico y soriasis, patologías inmunes inducidas por agentes infecciosos, como helminticos (por ejemplo, leishmaniasis) y ciertas infecciones víricas, incluyendo VIH, e infecciones bacterianas, incluyendo la enfermedad de Lyme, 15 tuberculosis y lepra lepromatosa, rechazo de trasplantes, enfermedad injerto versus huésped y condiciones atópicas como asma y alergia, incluyendo rinitis alérgica, alergias gastrointestinales, incluyendo alergias alimentarias, eosinofilia, conjuntivitis y nefritis glomerular.

Otro aspecto de la invención se refiere a la formulación farmacéutica para el uso en el método mencionado arriba, 20 comprendiendo la formulación un componente estrogénico, un agente inmunoterapéutico y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

### Bases de la invención

25 El papel de las hormonas sexuales femeninas en varios desórdenes de mediación inmune ha sido objeto de varias publicaciones científicas. Se ha reconocido que enfermedades auto-inmunes como la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide afectan preferentemente a mujeres (Jansson y col., Inflamm Res 1998 Jul; 47(7): 290-301). Además, se ha hecho la observación que durante el embarazo, cuando los niveles de hormonas femeninas son elevados, son comunes las remisiones clínicas de enfermedades auto-inmunes mediadas por células, con exacerbación de la enfermedad observada a menudo después del parto, cuando los niveles de hormonas sexuales son bajos (Kim y col., Neurology 1999 Apr 12; 52(6) 1230-1238).

Además se ha observado que una fracción de pacientes inusualmente elevada con esclerosis múltiple muestran valores reducidos de gonadotropina y estrógeno en la orina (Poser y col., Geburtshilfe Frauenhielkd 1981 May; 41(5): 35 353-358).

Además, estudios en ratones castrados han mostrado que la administración de estradiol y estriol en una cantidad que induce los niveles séricos vistos en la última etapa del embarazo retrasan el inicio de encefalomielitis auto-inmune experimental (EAE), una enfermedad auto-inmune dependiente de las células Th 1 usada como modelo de 40 la esclerosis múltiple (Jansson y col., Inflamm Res 1998 Jul; 47(7): 290-301). Los resultados de una evaluación del efecto del 17 $\beta$ -estradiol en la expresión génica en EAE usando microarrays de ADN implican un conjunto limitado de genes sensibles al estradiol conocidos y no sospechados previamente, que pueden ser cruciales para la inhibición de la EAE y potencialmente la enfermedad humana, la esclerosis múltiple (Matejuk y col., Endocrinology 2002 Jan; 143 (1): 313-319).

45 El documento WO 01/185154 se refiere a un método para mejorar una patología inmune mediada por Th 1 en un mamífero mediante administración de una dosis baja de estrógeno al mamífero, particularmente una dosis baja de 17 $\beta$ -estradiol, estriol o estrona. Se consideran necesarias dosis bajas de estos estrógenos para evitar los efectos adversos 50 potenciales de los niveles elevados de estrógeno en los sistemas reproductores y circulatorios y también para prevenir efectos secundarios indeseados en machos.

El documento DE 19917930 describe el uso de esteroides con una configuración 8 $\alpha$ -H, 9 $\beta$ -H, 10 $\alpha$ -H, 13 $\alpha$ -H, 14 $\beta$ -H en contextos farmacéuticos.

55 Los estrógenos arriba mencionados 17 $\beta$ -estradiol, estriol y estrona tienen en común que son endógenos al cuerpo femenino, es decir, son estrógenos biogénicos. Estos estrógenos biogénicos muestran serios déficits farmacocinéticas. Su bio-disponibilidad oral es muy baja y varía enormemente de persona a persona, indicando que no se pueden dar recomendaciones generales de dosificación. Otro problema relacionado es la rápida eliminación de la sangre de estos estrógenos. Por ejemplo, para el principal estrógeno biológico humano 17 $\beta$ -estradiol, la vida media es aproximadamente 1 hora. Como resultado, entre eventos de administración (diarios) separados, los niveles en suero sanguíneo de dichos estrógenos biogénicos tienden a fluctuar considerablemente. Así, poco después de la administración la concentración en suero es normalmente varias veces mayor que la concentración óptima. Además, si el segundo evento de administración se retrasa, las concentraciones en suero se reducirán rápidamente hasta un nivel en que el estrógeno ya no es fisiológicamente activo.

65 Además de los problemas farmacocinéticas, los estrógenos conocidos también muestran déficits farmacodinámicos. Después de la resorción del lumen intestinal, los ingredientes activos aplicados oralmente entran en el organismo vía hígado. Este hecho es de importancia específica para los agentes estrogénicos, ya que el hígado es un órgano ob-

jetivo para los estrógenos; la toma oral de estrógenos tiene como resultado un fuerte efecto estrogénico en el hígado. La actividad de secreción que es controlada por estrógenos en el hígado humano incluye el aumento de la síntesis de proteínas de transporte CBG, SHBG, TBG, varios factores que son importantes para la fisiología de la coagulación sanguínea, y lipoproteínas. Si los estrógenos biogénicos se introducen en el organismo femenino evitando el paso a través del hígado (por ejemplo, por aplicación transdérmica), las funciones del hígado permanecen invariables durante más tiempo.

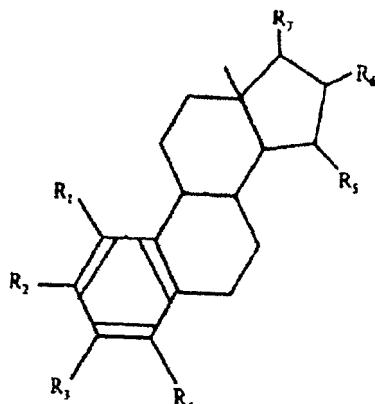
Las dosis terapéuticamente equivalentes de los estrógenos biogénicos comúnmente conocidos, cuando se aplican oralmente, tienen como resultado respuestas claras de los parámetros hepáticos, como incremento de SHBG, CBG, angiotensinógeno y HDL (lipoproteína de alta densidad).

Por consiguiente hay necesidad de sustancias estrógenas que:

- (a) sean más efectivas en un método para tratar enfermedades inmunológicas como los estrógenos biogénicos mencionados arriba y/o
- (b) tener una vida media significativamente más larga que los estrógenos biogénicos mencionados arriba y/o
- (c) se pueden administrar oralmente sin causar efectos hepáticos significativos y/o
- (d) producir menos efectos secundarios indeseables que los estrógenos biogénicos mencionados arriba

### Sumario de la invención

Los inventores han encontrado sorprendentemente que estos requerimientos se cumplen para sustancias estrógenas que se representan mediante la fórmula siguiente



en cuya fórmula R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> independientemente son un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo alcoxilo con 1-5 átomos de carbono; cada uno de R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> es un grupo hidroxilo; y no más de 3 de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> son átomos de hidrógeno; exhibiendo dichas sustancias una configuración 8β, 9α, 10α-H, 13β, 14α.

Un representante conocido de este grupo de sustancias estrógenas es 1,3,5 (10)-estratrien-3,15α,16α,17β-tetrol, también conocido por los nombres estetrol, oestetrol y 15α-hidroxiestriol. El estetrol es un estrógeno producido por el hígado fetal durante el embarazo humano. Los niveles de estetrol no conjugado en el pico de plasma materno son aproximadamente 1,2 ng/ml en la condición de embarazo y son aproximadamente 12 veces más elevados en el plasma fetal que en el materno (Tulchinsky y col., 1975. J. Clin. Endocrinol. Metab., 40, 560-567).

En 1970, Fishman y col., XXX, publicaron los resultados de un estudio en el que 15α-hidroxiestriol (estetrol) marcado con tritio se administró intravenosamente a dos mujeres adultas. Se encontró que el estetrol se excretó rápida y completamente en la orina como el glucosiduronato y que virtualmente no tuvo lugar ningún metabolismo excepto la conjugación.

Entre 1975 y 1985 varios investigadores han investigado las propiedades del estetrol y han informado de su potencia estrogénica y su actividad uterotrópica. Las publicaciones más relevantes que se publicaron durante este periodo se mencionan abajo:

- Levine y col., 1984. Uterine vascular effects of estetrol in nonpregnant ewes. Am. J. Obstet. Gynecol., 148:73, 735-738: "When intravenously administered in nonpregnant ewes, estetrol is 15 to 30 times less potent than estriol and 17b-estradiol in uterine vasodilation".

## ES 2 274 252 T3

- Jozan y col. 1981. Different effects of estradiol, ostriol, oestrol and of oestrone on human breast cancer cells (MCF-7) in long term tissue culture. Acta Endocrinologica, 98, 73-80: "Estetrol agonistic potency is 2% of the magnitude observed for 17 $\beta$ -estradiol in *in vitro* cell proliferation".
- 5 - Holinka y col., 1980. Comparison of effects of estetrol and tamoxifen with those of estriol and estradiol on the immature rat uterus. Biol. Reprod. 22, 913-926: "Subcutaneously administered estetrol has very weak uterotrophic activity and is considerably less potent than 17 $\beta$ -estradiol and estriol".
- 10 - Holinka y col., 1979. In vivo effects of estetrol on the immature rat uterus. Biol. Reprod. 20, 242-246: "Subcutaneously administered estetrol has very weak uterotrophic activity and is considerably less potent than 17 $\beta$ -estradiol and estriol".
- 15 - Tseng y col., 1978. HeteroCgeniUL Ly of saturable estradiol binding sites in nuclei of human endometrium. Estetrol studies. J. Steroid Biochem. 9, 1145-1148: "Relative binding of estetrol to estrogen receptors in the human endometrium is 1,5% of 17 $\beta$ -estradiol".
- 20 - Martucci y col., 1977. Direction of estradiol metabolism as control of its hormonal action-uterotrophic activity of estradiol metabolism as a control of its hormonal action-uterotrophic activity of estradiol metabolites. Endocrin. 101, 1709-1715: "Continuous administration of estetrol from a subcutaneous depot shows very weak uterotrophic activity and is considerably less potent than 17 $\beta$ -estradiol and estriol".
- 25 - Tseng y col., 1976. Competition of estetrol and ethynodiol with estradiol for nuclear binding in human endometrium. J. Steroid Biochem. 7, 817-822: "The relative binding constant of estetrol binding to the estrogen receptor in the human endometrium is 6,25% compared to 17 $\beta$ -estradiol (100%)".
- 30 - Martucci y col., 1976. Uterine estrogen receptor binding of catecholestrogens and of estetrol (1,3,5(19)-estreniene-3, 15alpha, 16alpha, 17beta-estetrol). Steroid, 27, 325-333: "Relative binding affinity of estetrol to rat uterine cytosol estrogen receptor is 0,5% of 17 $\beta$ -estradiol (100%). Furthermore, the relative binding affinity of estetrol to rat uterine nuclear estrogen receptor is 0,3% of 17 $\beta$ -estradiol (100%)".

Todas las publicaciones de arriba tienen en común que los autores han investigado la potencia estrogénica del estetrol. Sin excepción, todos ellos concluyen que el estetrol es un estrógeno débil. En varios de los artículos citados se ha encontrado que la potencia estrogénica del estetrol es menor que la del 17 $\beta$ -estradiol, estrógeno ampliamente usado y relativamente débil. Con estos hallazgos en mente, no es sorprendente que el interés en el estetrol haya disminuido desde el inicio de los ochenta y que desde entonces no se hayan publicado publicaciones sobre las propiedades del estetrol.

Sorprendentemente, los inventores han encontrado que, a pesar de su baja potencia, el estetrol así como las sustancias estrógenas relacionadas se puede usar ventajosamente en un método para el tratamiento de desórdenes de mediación inmune. Aunque los inventores no desean estar limitados por la teoría, se cree que la eficacia inesperada de las presentes sustancias similares al estetrol resulta de la combinación de las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas inesperadamente favorables de estas sustancias, así como su elevada afinidad relativa por el receptor estrógeno  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), comparado con el receptor estrógeno  $\beta$  (ER $\beta$ ). La última característica es un rasgo único de las sustancias estrógenas empleadas en el presente método.

Respecto a las propiedades farmacocinéticas de las sustancias estrógenas presentes, los inventores han descubierto que su vida media *in vivo* es considerablemente más larga que la de otros estrógenos biogénicos. Así, incluso aunque el estetrol y las sustancias similares al estetrol tengan una potencia estrogénica relativamente baja, se pueden emplear efectivamente en un método para el tratamiento de desórdenes de mediación inmune, porque su baja potencia es compensada por una estabilidad metabólica relativamente elevada, como demuestra mediante su larga vida media.

La afinidad relativamente elevada de las presentes sustancias estrógenas por el receptor ER $\alpha$ , o por el contrario la afinidad relativamente baja por el receptor ER $\beta$ , se cree que está asociada de algún modo con la elevada eficacia de las presentes sustancias en el tratamiento de desórdenes de mediación inmune. Sin embargo, como se hará evidente abajo, los mecanismos que gobiernan las rutas señalizadoras ER que son responsables de esta eficacia se entienden poco hasta ahora a pesar del considerable esfuerzo científico que tiene lugar en esta área.

Se sabe que la mayoría de estrógenos se unen a ambos ERs, las cuales en presencia de co-activadores y/o co-represores específicos del tejido, se unen a un elemento de respuesta estrógeno en la región reguladora de los genes o a otros factores de transcripción. Dada la complejidad de la señalización ER, junto con la expresión específica del tejido de ER $\alpha$  y ER $\beta$  y sus co-factores, ahora se reconoce que los ligandos ER pueden actuar como agonistas estrogénicos o incluso como antagonistas estrogénicos de forma específica según el tejido.

65 También se sabe que los receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$ , tienen secuencias de aminoácidos significativamente diferentes en el dominio de unión del ligando y los dominios de transactivación carboxi-terminal (aproximadamente el 56% de la identidad aminoácido), y tienen sólo el 20% de homología en su dominio de transactivación amino-terminal. Esto explica por qué algunos ligandos tienen una mayor afinidad por un receptor que por el otro. Además, la interacción

## ES 2 274 252 T3

con co-factores puede tener como resultado acciones biológicas muy diferentes de un solo ligando. En otras palabras, un ligando que actúa como un agonista en ER $\alpha$ , no es necesariamente también un agonista en ER $\beta$  y viceversa.

Además, ahora se sabe que los estrógenos modulan la farmacología celular a través de la expresión génica, y que

- 5 el efecto del estrógeno es mediado por los receptores estrogénicos. El efecto del receptor estrogénico en la regulación  
génica puede estar mediado por una unión directa de ER al elemento de respuesta estrogénica, uniendo ER a otros  
factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, C/EBP $\beta$  y a través de efectos no genómicos que involucran los receptores  
10 del canal iónico. El progreso a lo largo de los últimos años ha mostrado que ER se asocia con co-activadores (por  
ejemplo, SRC-1, CBP y SRA) y co-represores (por ejemplo, SRMT y N-CoR), los cuales también modulan la actividad  
trascipcional de ER de una forma específica del tejido y del ligando. Además, ahora la evidencia sugiere que la  
mayoría de genes regulados por estrógenos no tienen un elemento de respuesta estrógeno clásico. En tales casos, ER  
interacciona con los factores de transcripción críticos para la regulación de estos genes. Los factores de transcripción  
conocidos cuya actividad tiene que ser modulada por ER incluyen, por ejemplo, AP-1, NF- $\kappa$ B, C/EBP $\beta$  y Sp-1.

- 15 Dada la complejidad de la señalización ER, así como los varios tipos de tejido que expresan ER y sus co-factores,  
se cree comúnmente que los ligandos ER ya no se pueden clasificar simplemente como antagonistas o agonistas puros.  
Esta visión se apoya en los hallazgos de Paech y col. (Science 277, 1508-1510, 1997) que publicó que el 17b-estradiol  
20 activa un sitio AP-1 en presencia de ER $\alpha$ , pero inhibe el mismo sitio en presencia de ER $\beta$ . Por el contrario, los ligandos  
ER raloxifeno (Eli Lilly & Co.) y tamoxifeno e ICI-182,780 (Zeneca Pharmaceuticals) estimulan el sitio AP-1 a través  
de ER $\beta$ , pero inhibe este sitio en presencia de ER $\alpha$ .

Se sabe que ER $\alpha$  y ER $\beta$  tienen ambas distribuciones de tejidos diferentes y superpuestas, al analizar predominantemente por RT-PCR o hibridación *in situ*. Muy a menudo los tejidos expresan tanto ER $\alpha$  como ER $\beta$ , pero los receptores

- 25 están localizados en diferentes tipos de células. Además, algunos tejidos (como el riñón) contienen exclusivamente ER $\alpha$ , mientras otros tejidos (como el útero, la pituitaria y la epidermis) muestran una gran predominancia de ER $\alpha$   
(Course y col. Endocrinology 138, 4613-4621, 1997; Kuiper y col. Endocrinology 138, 863-870, 1997). El desarrollo  
de ratones fuera de combate ER $\alpha$  (Korach, Science 266, 1524-1527, 1994) y ER $\beta$  (Krege y col, Proc. Natl. Acad  
Sci. USA 95, 15677-82, 1998) ha producido otra evidencia de que cada uno de los ERs tiene funciones diferentes en  
diferentes tejidos.

- 30 En resumen, aunque aún se desconoce el mecanismo por el cuál las presentes sustancias estrógenas ejercen su  
efecto favorable, es evidente que estas sustancias difieren de otros estrógenos biogénicos en al menos 2 aspectos  
relevantes. En primer lugar, las presentes sustancias estrógenas exhiben un vida media *in vivo* sorprendentemente  
35 larga. En segundo lugar, la afinidad de estas sustancias por el receptor ER $\alpha$  en comparación con el receptor ER $\beta$  es  
mucho más elevada que la observada para otros estrógenos (biogénicos).

- Otra propiedad ventajosa de las presentes sustancias estrógenas reside en el hecho de que la globulina que se une  
40 a las hormonas sexuales (SHBG) apenas se une a estas sustancias estrógenas, significando esto que al contrario de la  
mayoría de estrógenos conocidos, los niveles en suero son representativos de la bioactividad e independientes de los  
niveles de SHBG.

- Otro beneficio importante de las presentes sustancias estrógenas deriva de su relativa insensibilidad a las interacciones  
45 con otros fármacos (interacciones fármaco-fármaco). Es bien sabido que ciertos fármacos pueden disminuir  
la efectividad de los estrógenos, como el etinil estradiol, y otros fármacos pueden incrementar su actividad, teniendo  
como resultado un posible incremento de los efectos secundarios. De forma similar, los estrógenos pueden interferir  
con el metabolismo de otros fármacos. En general, el efecto de otros fármacos en los estrógenos es debido a interfe-  
rencias con la absorción, el metabolismo o la excreción de estos estrógenos, mientras el efecto de los estrógenos en  
otros fármacos es debido a la competición por las rutas metabólicas.

- 50 El grupo clínicamente más significativo de interacciones estrógeno-fármaco tiene lugar con fármacos que pueden  
inducir enzimas microsómicas hepáticas los cuales pueden disminuir los niveles de estrógeno en plasma por debajo  
del nivel terapéutico (por ejemplo, agentes anticonvulsivos; fenitoína, primidona, barbituratos, carbamazepina, etosu-  
ximida, y metosuximida; fármacos anti-tuberculosis como rifampin; fármacos antifúngicos como griseofulvina). Las  
55 presentes sustancias estrógenas son menos dependientes de la regulación arriba y debajo de los enzimas microsómicas  
del hígado (por ejemplo, P450') y también son menos sensibles a la competición con otros sustratos P450. De forma  
similar, no interfieren significativamente en el metabolismo de otros fármacos.

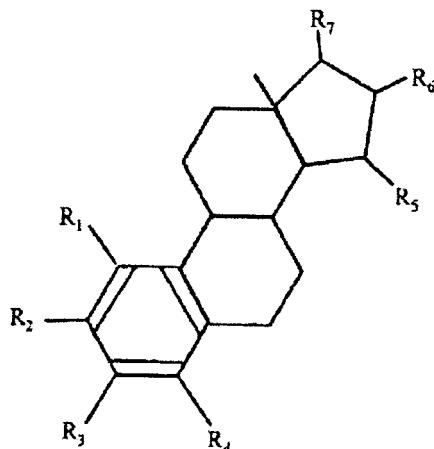
- Los conjugados de la mayoría de estrógenos, como se forman en el hígado, se excretan en la bilis y las bacterias  
los pueden romper bien en el colon para liberar la hormona activa que entonces puede ser reabsorbida (recirculación  
60 enterohepática). Hay informes clínicos que apoyan la visión de que la recirculación enterohepática de estrógenos  
disminuye en las mujeres que toman antibióticos como ampicilina, tetraciclina, etc. Las formas conjugadas de las  
presentes sustancias estrógenas apenas se excretan en la bilis, indicando esto que son sustancialmente insensibles a  
fármacos que influyen en la recirculación enterohepática de otros estrógenos.

- 65 Las observaciones de arriba sirven para explicar por qué las sustancias estrógenas de la invención apenas sufren  
interacciones fármaco-fármaco y producen así un impacto muy consistente, es decir, predecible.

**Descripción detallada de la invención**

Un aspecto de la presente invención se refiere a un método de tratamiento o prevención de un desorden de mediación inmune en un mamífero, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un componente estrogénico a dicho mamífero, en que el componente estrogénico se selecciona del grupo consistente en: sustancias representadas por la fórmula siguiente

10



15

20

25

30

35

en cuya fórmula  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  independientemente son un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo alcoxilo con 1-5 átomos de carbono; exhibiendo dichas sustancias una configuración  $8\beta$ ,  $9\alpha$ ,  $10\alpha$ -H,  $13\beta$ ,  $14\alpha$ , cada uno de  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  es un grupo hidroxilo; y no más de 3 de  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  son átomos de hidrógeno; precursores capaces de liberar una sustancia según la fórmula mencionada anteriormente cuando se usan en el presente método; y mezclas de una o varias de las sustancias y/o precursores mencionados anteriormente.

40

Las presentes sustancias estrógenas son distintas tanto de los estrógenos biogénicos como de los sintéticos que se aplican comúnmente en las formulaciones farmacéuticas en las que contienen al menos 4 grupos hidroxilo. Las presentes sustancias son particularmente especiales en que el anillo de 5 miembros en el esqueleto esteroide comprende 3 sustituyentes hidroxilo mejor que 0-2. Son ejemplos de estrógenos disponibles comercialmente que contienen al menos 4 grupos hidroxilo y sus precursores:

45

éter 1, 3, 5 (10)-estratrien-2, 3, 15 $\alpha$ , 16 $\alpha$ , 17 $\beta$ -pentol-2-metílico

50

éter 1, 3, 5 (10)-estratrien-2, 3, 15 $\beta$ , 16 $\alpha$ , 17 $\beta$ -pentol-2-metílico

55

1, 3, 5 (10)-estratrien-2, 3, 16 $\alpha$ , 17 $\beta$ -tetrol

éter 1, 3, 5 (10)-estratrien-3, 4, 16 $\alpha$ , 17 $\beta$ -tetrol-4-metílico

60

1, 3, 5 (10)-estratrien-3, 15 $\alpha$ , 16 $\alpha$ , 17 $\beta$ - tetrol

1, 3, 5 (10)-estratrien-3, 15 $\alpha$ , 16 $\alpha$ , 17 $\beta$ - tetrol tetra acetato

65

1, 3, 5 (10)-estratrien-3, 15 $\beta$ , 16R, 1713- tetrol tetra acetato.

Preferiblemente, el componente estrogénico aplicado como el componente activo en la presente composición es el llamado estrógeno biogénico, es decir, un estrógeno que sucede naturalmente en el cuerpo humano, un precursor de un estrógeno biogénico o una mezcla de ellos. Como los estrógenos biogénicos están presentes naturalmente en el cuerpo del feto y la mujer, no se espera que ocurran efectos secundarios, particularmente no si los niveles en suero resultantes de la administración exógena de tales estrógenos no excede sustancialmente las concentraciones que ocurren naturalmente. Los componentes estrogénicos que ocurren naturalmente muestran típicamente una configuración  $8\beta$ ,  $9\alpha$ ,  $13\beta$ ,  $14\alpha$  del esqueleto esteroide.

65

En una realización preferible de la presente invención, la sustancia estrogénica contiene 4 grupos hidroxilo. También en la fórmula mencionada anteriormente,  $R_1$  representa preferiblemente un átomo de hidrógeno. En dicha fórmula preferiblemente al menos 2, más preferiblemente al menos 3 de los grupos  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  representan un átomo de hidrógeno.

## ES 2 274 252 T3

Las sustancias estrógenas según la fórmula incluyen varios enantiómeros, al ser quiralmente activos los átomos de carbono que llevan sustituyentes hidroxilo R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>. En una realización preferible, la presente sustancia es trogénica está 15α-hidroxi sustituida. En otra realización preferible la sustancia está 16α-hidroxi sustituida. En otra realización aún preferible, la sustancia está 17β-hidroxi sustituida. Más preferiblemente, las sustancias estrógenas están 15α,16α,17β-trihidroxi sustituidas.

En una realización preferible de la presente invención R<sub>3</sub> representa un grupo hidroxilo o un grupo alcoxilo. En otra realización preferible de la invención los grupos R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> representan átomos de hidrógeno, en cuyo caso, si R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son grupos hidroxilo, la sustancia es 1, 3, 5 (10)-estratrien-3, 15, 16, 17-tetrol. Un isómero preferible de la última sustancia es 1, 3, 5 (10)-estratrien-3, 15α, 16α, 17β-tetrol (estetrol).

La invención también incluye el uso de precursores de las sustancias estrógenas que constituyen el componente activo en el presente método. Estos precursores son capaces de liberar las sustancias estrógenas mencionadas anteriormente cuando se usan en el presente método, por ejemplo, como resultado de la conversión metabólica y son preferiblemente seleccionadas del grupo de derivados de las presentes sustancias estrógenas, en que el átomo de hidrógeno de al menos uno de los grupos hidroxilo ha sido sustituido por un radical acilo de un hidrocarburo carboxílico, ácido sulfónico o ácido sulfámico de 1-25 átomos de carbono; tetrahidrofuranilo; tetrahidropiranilo; o un residuo glicosídico de cadena lineal o ramificada que contiene 1-20 unidades glicosídicas por residuo. Son ejemplos típicos de precursores que se pueden usar de forma apropiada de acuerdo con la invención, ésteres que se puede obtener por reacción de los grupos hidroxilo de las sustancias estrógenas con sustancias que contienen uno o varios grupos carboxi (M<sup>+</sup>-OOC-), en que M<sup>+</sup> representa un hidrógeno o catión (alcali)metal. Así, en una realización particularmente preferible, los precursores son derivados de las sustancias estrógenas, en que el átomo de hidrógeno de al menos uno de los grupos hidroxilo en dicha fórmula ha sido sustituido por -CO-R, en que R es un radical hidrocarburo que comprende de 1-25 átomos de carbono. Preferiblemente R es hidrógeno o un radical alquilo, alquenilo o arilo que comprende de 1-20 átomos de carbono.

El presente método es particularmente efectivo cuando se usa en el tratamiento o prevención de desórdenes de mediación inmune crónicos. Por consiguiente, en una realización preferible, el método comprende la administración ininterrumpida del componente estrogénico durante un periodo de al menos 5 días, preferiblemente de al menos 30 días.

El presente método puede emplear de forma apropiada la administración enteral o parenteral del componente estrogénico. El término "administración parenteral" como se usa aquí incluye la administración transdérmica, intravenosa, intranasal, intravaginal, pulmonar, bucal, subcutánea, intramuscular e intra-uterina. El término "administración enteral" incluye tanto administración oral como rectal.

Preferiblemente el modo de administración se selecciona del grupo que consiste en administración oral, transdérmica, intravenosa, intra-nasal, intravaginal, pulmonar, bucal, subcutánea, intramuscular o intra-uterina. Más preferiblemente el modo de administración se selecciona del grupo que consiste en administración oral, transdérmica, intravenosa, subcutánea, intra-nasal, pulmonar y vaginal. En una realización particularmente preferible el presente método emplea la administración oral, transdérmica, intranasal o subcutánea. De forma incluso más preferible, el presente método emplea administración oral o subcutánea.

Las administraciones oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intra-nasal, rectal, bucal y pulmonar son ideales para (al menos) una administración al día. La administración transdérmica se aplica de forma ventajosa a frecuencias entre una vez al día y una vez al mes. La administración intra-vaginal e intra-uterina se realizan ventajosamente para frecuencias de administración entre una vez a la semana y una vez al mes. La administración subcutánea e intramuscular se realizan apropiadamente en forma de inyecciones depósito a intervalos de 1 semana a 6 meses, preferiblemente a intervalos de 4 semanas a 3 meses.

Por razones de conveniencia el presente método utiliza preferiblemente la administración a intervalos de 1 día, 1 semana o 1 mes. Son particularmente preferibles los regímenes que emplean la administración una vez al día oral, subcutánea, intravenosa o intra-nasal, una vez a la semana transdérmica o una vez al mes intra-vaginal o subcutánea.

Respecto al modo de administración, el componente estrogénico se administra preferiblemente en una cantidad efectiva para conseguir una concentración en suero sanguíneo de al menos 5 nanogramos por litro, más preferiblemente de al menos 50 nanogramos por litro, más preferiblemente al menos 500 nanogramos por litro. Generalmente la concentración de componente estrogénico resultante en suero sanguíneo no excederá los 200 µg por litro, preferiblemente no excederá los 10 µg por litro, más preferiblemente no excederá los 50 µg por litro.

De acuerdo con el presente método, el componente estrogénico se administra usualmente en una cantidad de menos de 2 mg por kg de peso corporal por día, preferiblemente de menos de 0,8 mg por kg de peso corporal por día. Para conseguir un impacto significativo de la administración del componente estrogénico, es aconsejable administrar en una cantidad de al menos 5 µg por kg de peso corporal por día. Preferiblemente, la cantidad administrada es al menos 25 µg por kg de peso corporal por día.

La administración oral del componente activo se realiza preferiblemente en una cantidad de al menos 800 µg por kg de peso corporal por día, preferiblemente de menos de 400 µg por kg de peso corporal por día. Para conseguir

## ES 2 274 252 T3

un impacto significativo desde la administración del componente activo, es aconsejable administrar oralmente en una cantidad de al menos 10 µg por kg de peso corporal por día. Preferiblemente, la cantidad administrada oralmente es al menos 25 µg por kg de peso corporal por día. En el presente método, particularmente cuando se usa en humanos, el componente estrogénico se administra usualmente en una dosis promedio de al menos 0,25 mg al día, preferiblemente de al menos 0,5 mg al día. La dosis máxima se mantiene normalmente por debajo de 80 mg al día, preferiblemente por debajo de 40 mg al día.

El presente método de tratamiento comprende preferiblemente la administración a una persona necesitada de tal terapia, de una cantidad efectiva del componente estrogénico. Las cantidades necesarias para que sea efectivo diferirán de individuo a individuo y se determinan mediante factores como el nivel individual de deficiencia de estrógenos, el peso corporal, la ruta de administración y la eficacia de la sustancia estrogénica particular usada.

En el presente método, particularmente cuando se usa en humanos, el componente estrogénico se administra usualmente de forma oral en una dosis promedio de entre 0,05 y 40 mg al día, preferiblemente entre 0,25 y 20 mg al día. De forma similar, las dosis parenterales son preferiblemente al menos 0,25, preferiblemente 0,5 mg al día. La dosis promedio máxima parenteral se mantiene normalmente por debajo de 80 mg al día, preferiblemente por debajo de 40 mg al día.

En una realización especialmente preferible de la invención, el método emplea la administración oral del componente estrogénico activo. El término administración oral como se usa aquí también incluye la administración oral forzada. Sorprendentemente, los inventores han encontrado que a pesar de su baja potencia, el estetrol y las sustancias estrogénicas relacionadas se pueden administrar oralmente de forma ventajosa. Aunque los inventores no desean estar limitados por la teoría, se cree que la inesperada eficacia de las sustancias similares al estetrol administradas oralmente resulta de la combinación de propiedades especiales farmacocinéticas (ADME) y farmacodinámicas de estas sustancias.

Los inventores han descubierto que la bio-disponibilidad oral de las sustancias similares al estetrol es sorprendentemente elevada y que su vida media *in vivo* es considerablemente más larga que la de los estrógenos biogénicos usados comúnmente. Así, incluso aunque es estetrol y las sustancias similares al estetrol tengan una potencia estrogénica relativamente baja, se pueden administrar oralmente de forma efectiva.

Otra ventaja importante de la administración oral del estetrol y las sustancias similares al estetrol reside en el hecho de que los efectos hepáticos de estas sustancias se consideran mínimos al ser apenas metabolizadas durante el llamado “primer paso”. El efecto del primer paso del fármaco administrado oralmente se refiere al proceso de la degradación del fármaco por el hígado durante una transición del fármaco desde la ingestión inicial hasta la circulación en la corriente sanguínea. Tras la resorción del lumen intestinal, los ingredientes activos aplicados oralmente entran en el organismo vía el hígado. Este hecho es de importancia específica para los agentes estrogénicos, ya que el hígado es un órgano objetivo para los estrógenos; la toma oral de estrógenos tiene como resultado un fuerte efecto estrogénico en el hígado. Las dosis terapéuticamente equivalentes de los estrógenos biogénicos usados comúnmente cunado se aplican oralmente, tienen como resultado respuestas claras de los parámetros hepáticos, como incremento de SHBG, CBG, angiotensinógeno y HDL (lipoproteína de alta densidad).

El presente método se puede usar de forma apropiada en el tratamiento (profiláctico) de una amplia variedad de desórdenes de mediación inmune. El término “desorden de mediación inmune” como se usa aquí se refiere a cualquier reacción o patología inmune no deseada que es mediada o parcialmente mediada por una célula del linaje linfoide (incluyendo linfocitos T, linfocitos B) o del linaje mieloide (incluyendo granulocitos, macrófagos y monocitos) y que es perjudicial para el mamífero en el que tiene lugar. Tales reacciones o patologías inmunes no deseadas pueden estar mediadas por linfocitos T o son multifactoriales, por ejemplo, enfermedades inflamatorias crónicas, incluyendo enfermedades auto-inmunes, patologías inmunes inducidas por agentes infecciosos, reacciones inmunes por o contra aloinjertos, respuestas atópicas, reacciones alérgicas y desórdenes inmuno-proliferativos.

El presente método es particularmente apropiado para tratar enfermedades inflamatorias crónicas y/o mediadas por linfocitos T, incluyendo, pero sin limitarse a estas, enfermedades auto-inmunes, como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, osteoartritis, diabetes insulinodependiente (diabetes tipo I), lupus eritematoso sistémico y soriasis, patologías inmunes inducidas por agentes infecciosos, como helminticos (por ejemplo, leishmaniasis) y ciertas infecciones víricas, incluyendo VIH, e infecciones bacterianas, incluyendo la enfermedad de Lyme, tuberculosis y lepra lepromatosa, rechazo de transplantes, enfermedad injerto versus huésped y condiciones atópicas como asma y alergia, incluyendo rinitis alérgica, alergias gastrointestinales, incluyendo alergias alimentarias, eosinofilia, conjuntivitis y nefritis glomerular.

Muchos desórdenes de mediación inmune son multifactoriales, caracterizados por la activación de múltiples tipos de células inflamatorias, particularmente células del linaje linfoide (incluyendo linfocitos Th1, linfocitos Th2, linfocitos B) o del linaje mieloide (incluyendo granulocitos, macrófagos y monocitos). Los mediadores (pro)inflamatorios, incluyendo citoquinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina-1 (IL-1) son producidos por estas células activadas y son comunes los anticuerpos y respuestas complementarias. En una realización particularmente preferible de la invención el presente método se usa para tratar los desórdenes de mediación inmune mediados por Th-1 (“Th1 mediated disorders”). Los desórdenes mediados por Th-1 son patologías en que la respuesta inmune perjudicial es principalmente o parcialmente una respuesta inmune tipo T ayudante 1 (Th1). Una respuesta inmune Th1 se

## ES 2 274 252 T3

caracteriza por la secreción de citoquinas (pro)inflamatorias como IL-2, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Los desórdenes mediados por Th1 incluyen la mayoría de enfermedades auto-inmunes, muchos desórdenes de mediación aloinmune, ciertas condiciones alérgicas, ciertas condiciones inflamatorias crónicas y ciertas patología inmunes inducidas por agentes infecciosos. Un desorden de mediación inmune puede mediarse de forma alternativa a través de una respuesta inmune

- 5 Th2. Al contrario de la respuesta mediada por Th1, la respuesta mediada por Th2 se caracteriza por la secreción de citoquinas anti-inflamatorias, como IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- $\beta$ .

El presente método es particularmente apropiado para el tratamiento o prevención de desórdenes de mediación inmune seleccionados del grupo consistente en patologías auto-inmunes y respuestas inflamatorias crónicas. Los ejemplos de patologías auto-inmunes que se pueden tratar efectivamente incluyen esclerosis múltiple (células nerviosas),

- 10 artritis reumatoide (cartílago, capas de las articulaciones), osteoartritis (cartílago), diabetes tipo I (páncreas), lupus eritematoso sistémico (múltiples tejidos), soriasis (piel), enfermedad de Alzheimer (sistema nervioso central), miastenia grave (unión neuromuscular), enfermedad de Crohn (intestino), epididimitis (epididimis), glomerulonefritis (riñones), enfermedad de Grave (tiroides), síndrome de Guillain-Barre (células nerviosas), enfermedad de Hashimoto (tiroides),  
15 anemia hemolítica (células rojas sanguíneas), pemfigus (piel primaria), fiebre reumática (corazón y articulaciones), sarcoidosis (múltiples tejidos y órganos), dermatomiositis (múltiples tejidos y órganos), escleroderma (piel y tejidos conjuntivos), síndrome de Sjogren (glándulas exocrinas y otros tejidos), espondiloartropatías (esqueleto axial y otros tejidos), tiroiditis (tiroides), vasculitis (vasos sanguíneos), vitíligo (piel), enfermedad de Addison (glándula adrenal). Los ejemplos de respuestas inflamatorias crónicas que pueden ser tratadas de forma apropiada con el presente método  
20 incluyen respuestas inflamatorias asociadas con enfermedades cardiovasculares, enfermedades coronarias, cirrosis, enfermedades artríticas, colestasis, tuberculosis, lepra, sífilis, periodontitis, fibrosis, glomerulonefritis y ciertos cánceres, así como respuestas inflamatorias crónicas a agentes infecciosos como bacterias, virus, hongos, protozoos, gusanos y priones.

- 25 El método de la invención se considera que es particularmente apropiado para el tratamiento de desórdenes de mediación inmune resultantes de patologías neurológicas, por ejemplo, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, miastenia grave, síndrome de Guillain-Barre, esclerosis amiotrópica lateral.

El presente método también se considera muy apropiado para el tratamiento de desórdenes de mediación inmune que tienen como resultado patologías músculo-esqueléticas, por ejemplo, artritis reumatoide, osteoartritis, y enfermedades inflamatorias relacionadas, que comprenden gota, espondilartropatías, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter, artropatía soriática, espondilitis enteropática, artropatía juvenil o espondilitis anquilosante juvenil, artropatía reactiva, artritis infecciosa o post-infecciosa, artritis gonocócica, artritis tuberculosa, artritis vírica, artritis fúngica, artritis sifilítica, enfermedad de Lyme, artritis asociada con "síndromes vasculíticos", poliarteritis nodosa, vasculitis hipersensitiva, granulomatosis de Luegenec, polimialgia reumática, arteritis de las células de articulaciones, artropatía de deposición de cristal de calcio, pseudogota, reumatismo no articular, bursitis, tenosiomitis, epicondilitis, síndrome del túnel carpiano, lesión de uso repetitivo, formas misceláneas de artritis, enfermedad neuropática articular (Charcot y articulación), hermatrosis (hermatróxica), Púrpura Henoch-Schonlein, osteoartropatía hipertrófica, reticulohistiocitosis multicéntrica, artritis asociada con ciertas enfermedades, como surcoílosis, hemocromatosis, enfermedad de las células falciformes u otras hemoglobinopatías, hiperlipoproteinemias, hipogammaglobulinemias, hiperparatiroidismo, acromegalia, fiebre mediterránea familiar, enfermedad de Behat, lupus eritematoso sistémico o policondritis recidivante.

45 El método de la invención se considera particularmente ventajoso cuando se usa en el tratamiento (profiláctico) de un desorden de mediación inmune seleccionado del grupo consistente en esclerosis múltiple, artritis reumatoide, osteoartritis, diabetes insulinodependiente (diabetes tipo I), lupus eritematoso sistémico y soriasis. Más ventajosamente el presente método se emplea en el tratamiento de la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide o la osteoartritis.

Para reforzar la acción del componente estrogénico puede ser ventajoso co-administrar el agente inmunoterapéutico que es capaz de inhibir profilácticamente o terapéuticamente una respuesta inmune y/o de mejorar una patología inmune. Tales agentes son conocidos por la técnica y comprenden agentes inmunosupresores, inmunomoduladores, inmunobloqueantes y/o anti-inflamatorios y pueden ser administrados en combinación con el componente estrogénico, es decir, en una forma de dosificación única, o de forma alternativa estos principios activos pueden administrarse separadamente, especialmente si los modos de administración son diferentes.

55 En una realización preferible, el componente estrogénico de la presente invención se administra en combinación con uno o varios fármacos inmunoterapéuticos a un mamífero que tiene o es susceptible a esclerosis múltiple. La administración del componente estrogénico de la presente invención en combinación con uno o varios fármacos inmunoterapéuticos puede incrementar la efectividad del tratamiento. Además, tal combinación puede generar fiebre o efectos secundarios menos pronunciados, y/o puede hacer posible administrar una pequeña dosis del fármaco inmunoterapéutico conocido o del componente estrogénico para producir el mismo efecto que una dosis sustancialmente superior de cualquiera de los componentes solos. El fármaco inmunoterapéutico para el uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple puede ser de forma apropiada: (1) un agente anti-inflamatorio esteroideo, como cortisol o dexametasona (2) un agente anti-inflamatorio no esteroideo, como acetilsalicílico (aspirina), ibuprofeno, o naproxeno; (3) D-pencilamina; (4) un agente 4-aminoquinolina como hidroxicloroquinona; (5) azatioprina; (6) metotrexato; (7) ciclosporina; (8) anticuerpos monoclonales de linfocitos T; (9) anticuerpos monoclonales de moléculas de adhesión; (10) anticuerpos monoclonales de citoquinas y factores de crecimiento; (11) Receptor del factor de la Necrosis Tumoral (TNFR)-IgG; (12) receptores antagonistas IL-1; (13) inhibidores ICE, (14) betaferon y/o (15) vitamina D, 1 $\alpha$ ,25-di-

## ES 2 274 252 T3

hidroxivitamina D<sub>3</sub> y 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D<sub>2</sub>, (16) agentes que unen específicamente una molécula seleccionada del grupo consistente en un receptor de célula T, un antígeno y una molécula HLA.

En otra realización específica, el componente estrogénico de la presente invención se administra en combinación

- 5 con uno o varios fármacos inmunoterapéuticos a un mamífero que tiene o es susceptible a artritis reumatoide. La administración del componente estrogénico de la presente invención en combinación con uno o varios fármacos inmunoterapéuticos puede incrementar la efectividad del tratamiento de las enfermedades artríticas como artritis reumatoide y osteoartritis. Además, tal combinación puede provocar menos efectos secundarios y/o permitir la administración de  
10 una dosis menor del fármaco inmunoterapéutico conocido o del componente estrogénico produciendo el mismo efecto que una dosis sustancialmente superior de cualquiera de los componentes solos. El fármaco inmunoterapéutico para el uso en el tratamiento de la artritis reumatoide puede ser de forma apropiada: (1) un agente anti-inflamatorio esteroideo, como cortisol o dexametasona (2) un agente anti-inflamatorio no esteroideo, como acetilsalicílico (aspirina), ibuprofeno, o naproxeno; (3) un derivado orgánico de oro, como tiomalato sódico de oro, aurotioglucosa, o aurano-fin (4) D-pencilamina; (5) un agente 4-aminoquinolina como hidroxicloroquinona; (6) azatioprina; (7) metotrexato;  
15 (8) ciclosporina; (9) un inhibidor de la angiogénesis como AGM-1470 (Ingber y col., 1990, Nature 348, 555); (10) anticuerpos monoclonales de linfocitos T; (11) anticuerpos monoclonales de moléculas de adhesión; (12) anticuerpos monoclonales de citoquinas y factores de crecimiento; (13) Receptor del factor de la Necrosis Tumoral (TNFR)-IgG; (14) receptores antagonistas IL-1; (15) inhibidores ICE y/o (16) agentes que unen específicamente una molécula seleccionada del grupo consistente en un receptor de célula T, un antígeno y una molécula HLA.

20 En otra realización preferible de la invención, el presente método comprende la co-administración de progesterona, particularmente si el método se emplea en el tratamiento de mamíferos hembra. La administración de estrógenos se ha asociado con la proliferación endometrial en mujeres y ahora se acepta ampliamente que la administración de estrógenos "no opuestos" durante un periodo de tiempo prolongado (terapia de estrógenos) aumenta sustancialmente el riesgo de cáncer endometrial (Cushing y col., 1998. Obstet. Gynecol. 91, 35-39; Tavani y col., 1999. Drugs Aging, 14, 347-357). También hay evidencia de un incremento significativo del cáncer de mama con el uso a largo plazo (10-25 15 años) de terapia de estrógenos (Tavani y col., 1999. Drugs Aging, 14, 347-357; Pike y col., 2000. Steroids, 65, 659-664).

30 Para contrarrestar los efectos negativos de la terapia prolongada de estrógenos no opuestos, actualmente se aplica de forma común el tratamiento adjunto con progesterona en terapia de sustitución hormonal en mujeres peri y post-menopáusicas. Se cree que la administración regular de progesterona inhibe la estimulación continua de estrógenos del endometrio a través de un efecto anti-proliferativo y parece reducir la incidencia de carcinoma endometrial en mujeres post-menopáusicas que reciben terapia sustitutiva de estrógenos (Beral y col., 1999. J. Epidemiol. Biostat., 4, 191-35). Para contrarrestar cualquier efecto negativo de la administración de estrógenos no opuestos en el presente método, particularmente en el caso de administración continua prolongada, es preferible co-administrar un componente progestogénico para inhibir la estimulación de estrógeno del endometrio o administrar un componente progestogénico al menos durante un periodo de diez días, al menos cada tres meses.

40 Otro aspecto de la invención se refiere a la formulación farmacéutica que comprende el componente estrogénico y el agente inmunoterapéutico como se ha definido antes aquí, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. La presente formulación farmacéutica contiene preferiblemente al menos 10  $\mu$ g del componente estrogénico, más preferiblemente al menos 25  $\mu$ g de dicho componente estrogénico. Incluso más preferiblemente la cantidad de componente estrogénico en la formulación es al menos 50  $\mu$ g, más preferiblemente será al menos 150  $\mu$ g. La cantidad del componente estrogénico en la formulación normalmente no excederá 1000 mg. Preferiblemente la cantidad no excederá 600 mg, más preferiblemente no excederá 400 mg.

50 El agente inmunoterapéutico está presente de forma apropiada en la formulación en una cantidad de al menos 10  $\mu$ g, preferiblemente al menos 10  $\mu$ g. Usualmente la cantidad de agente inmunoterapéutico en la formulación no excederá 50 mg, preferiblemente no excederá 25 mg.

La formulación farmacéutica según la invención puede ser de forma apropiada una forma de dosificación sólida o semi-sólida, como comprimidos, cápsulas, cachets, pellets, píldoras, polvos y gránulos, así como formas de dosificación fluidas, como disoluciones, emulsiones, suspensiones, pomadas, pastas, cremas, geles, jaleas y espumas.

55 La unidad de dosificación oral según la invención es preferiblemente una forma de dosificación sólida o semi-sólida, como comprimidos, cápsulas, cachets, pellets, píldoras, polvos y gránulos. El término "forma de dosificación sólida o semi-sólida", incluye también cápsulas que contienen un líquido, por ejemplo, un aceite, en las que el componente estrogénico presente está disuelto o dispersado. Los comprimidos y formas de dosificación sólida o semi-sólida 60 pueden contener de forma apropiada materiales como aglutinantes (por ejemplo, hidroxipropilmetil celulosa, polivinil pirrolidina, otros materiales celulosicos y almidón), diluyentes (por ejemplo, lactosa u otros azúcares, almidón, fosfato dicálcico y materiales celulosicos), agentes desintegrandes (por ejemplo, polímeros de almidón y materiales celulosicos) y agentes lubricantes (por ejemplo, estearato y talco).

65 Los sistemas de liberación transdérmica incluyen parches, geles, bandas y cremas, y pueden contener excipientes como solubilizantes, potenciadores de la permeación (por ejemplo, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholos grasos y aminoácidos), polímeros hidrófilos (por ejemplo, policarbofil y polivinil pirrolidina) y agentes pegajosos (por ejemplo, polisobutilenos, adhesivos basados en silicona, acrilatos y polibuteno).

# ES 2 274 252 T3

Los sistemas de liberación transmucosal (notablemente rectal e intravaginal) incluyen parches, comprimidos, supositorios, pesarios, geles y cremas, y pueden contener excipientes como solubilizantes y potenciadores (por ejemplo, propilenglicol, sales biliares o aminoácidos) y otros vehículos (por ejemplo, polietilenglicol, ésteres de ácidos grasos y derivados, y polímeros hidrófilos como hidroxipropilmel celulosa y ácido hialurónico).

5 Las preparaciones de depósitos inyectables o implantables incluyen fluidos inyectables y comprimidos de implantación. Los componentes apropiados como vehículo de fluidos son diluyentes fisiológicamente compatibles en los que los agentes activos pueden estar disueltos, suspendidos. Un ejemplo de diluyente es el agua, con o sin adición de sales de electrolitos o espesantes. Así, la formulación depósito puede ser, por ejemplo, una suspensión acuosa micro-  
10 cristalina. Los aceites son particularmente apropiados como diluyentes, con o sin la adición de un solubilizante, o de un surfactante, o de una suspensión o agente emulsionante. Los ejemplos de aceites apropiados incluyen aceite araquídico, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de semillas de algodón, aceite de semillas de soja, aceite de castor y aceite de sésamo. Los ejemplos de solubilizantes incluyen alcohol bencílico y benzoato bencílico. Las preparaciones depósito ofrecen la ventaja de que una sola inyección o implantación basta para uno o varios meses. La duración del  
15 efecto depósito depende de la naturaleza del componente estrogénico (siendo preferibles los precursores éster porque presentan una liberación más lenta), de la cantidad del componente estrogénico así como del tipo de sustancia portadora que libera el agente activo. Generalmente, la duración estará en el intervalo de 10-30 días, pero también se pueden alcanzar tiempos más cortos o más largos.

20 Otros sistemas de liberación que se pueden usar para la administración de la composición farmacéutica incluyen sistemas de liberación intra-nasal y pulmonar, como pulverizadores y micro-partículas.

Otro aspecto preferible de la presente invención se refiere a una forma de dosificación de unidad oral que comprende al menos 50 µg, preferiblemente al menos 250 µg del componente estrogénico y al menos 1 µg del agente  
25 inmunoterapéutico como se define aquí anteriormente, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplo, que sin embargo no resultan limitantes. Las características reveladas en la siguiente descripción, en los ejemplos siguientes y en las reivindicaciones pueden, tanto por separado como en cualquier combinación de ellas, ser material para realizar la invención en diversas formas  
30 de ella.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

35 La cornificación vaginal se escogió como tejido específico y punto final sensible al estrógeno para determinar la estrogenicidad del estetrol (E4), tras la administración oral y subcutánea, en ratas hipoestrogénicas. 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE), 17 $\beta$ -etinilestradiol (E2) y el vehículo (10% etanol/aceite de sésamo) sirvieron como controles en estos bio-ensayos.

40 El aumento del peso uterino en la rata se usa más comúnmente como una medida de estrogenicidad. Sin embargo, el peso uterino también responde a progesterona, testosterona y otros agentes que no son contemplados característicamente como estrógenos. Al inicio de los años 20 se descubrió que el fluido folicular del ovario del cerdo contenía un factor(es) que causaba la cornificación/queratinización del epitelio vaginal en la rata (Allen y Doisy, 1923, JAMA, 81, 819-821; Allen y Doisy, 1924, Am. J. Physiol, 69, 577-588). La llamada respuesta de cornificación vaginal en ratas proporcionó por consiguiente un bio-ensayo para el estudio de la estrogenicidad. La cornificación/queratinización epitelial vaginal en ratas ovariectomizadas sólo puede ser producido por compuestos considerados verdaderos estrógenos (Jones y col., 1973, Fert. Steril. 24, 284-291). La cornificación/queratinización epitelial vaginal representa, por tanto, un punto final altamente selectivo para determinar la potencia de estrógenos (Reel y col., 1996, Fund. Appl. Toxicol. 34, 288-305).

55 Las hembras adultas intactas de ratas CD fueron ovariectomizadas para inducir deficiencia de estrógenos. Se realizaron diariamente lavados vaginales durante siete días, para asegurar que las ratas mostraban frotis vaginal castrado (predominancia de leucocitos en el frotis vaginal, y similar en apariencia a un frotis vaginal diéstrico). Los frotis vaginales castrados son indicativos de que se consiguió una ovariectomía completa. El tratamiento comenzó a continuación de completar los siete días de frotis (día 0 = primer día de dosis). Los animales fueron dosificados, una vez al día durante 7 días consecutivos. Los lavados vaginales diarios se continuaron obteniendo durante 7 días después de iniciar la dosificación, para detectar cornificación vaginal, como indicación de una respuesta estrogénica. Una gota de lavados vaginales se situó en un portaobjetos de vidrio y se examinó al microscopio óptico para detectar la presencia  
60 o ausencia de células epiteliales cornificadas. Los lavados vaginales se obtuvieron antes de la dosis de los días 0-6 y antes de la necropsia el día 7.

65 El bio-ensayo de cornificación vaginal se realizó para determinar el perfil estrogénico de E4 al administrarlo subcutáneamente (sc) a ratas adultas ovariectomizadas. E2 se usó como control positivo. El vehículo (10% etanol/aceite de sésamo) sirvió como control negativo. Los esteroides se disolvieron en etanol absoluto y después se llevaron a las concentraciones finales con aceite de sésamo (10% etanol en aceite de sésamo). Se produjo una respuesta estrogénica vaginal en 8/8 ratas el día 2 y persistió hasta el día 7 en ratas inyectadas con 50 µg/kg/día de E2 durante 7 días (Tabla 1). Los animales tratados con el vehículo no mostraron cornificación epitelial vaginal (Tabla 1). El inicio de la corni-

# ES 2 274 252 T3

fificación epitelial vaginal fue dependiente de la dosis en ratas inyectadas sc con 0,1, 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg/día de E4 y se inició el mismo día del tratamiento (día 2) que el observado para E2 (Tabla 1). A 0,1 mg/kg/día de E4 4/8 ratas ya mostraron una respuesta vaginal estrogénica el día 7 y a 0,3 mg/kg/día de E4 incluso 7/8 ratas. A 1,0 y 3,0 mg/kg/día de E4 todas las ratas mostraron una respuesta vaginal estrogénica el día 7 (Tabla 1).

5

TABLA 1

*Respuesta vaginal estrogénica en ratas ovariectomizadas tratadas subcutáneamente (sc) con 17 $\beta$ -etinilestradiol (E2) 10 o estetrol (E4). Los datos se expresan como el número de ratas que muestran cornificación vaginal sobre el número de ratas tratadas (relación)*

15	Grupo de tratamiento	Vía de dosificación	Número de ratas que muestran respuesta estrogénica/ Número de ratas tratadas							
			Día del estudio							
			Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
20	0,05 mg/kg/día E2	sc	0/8	0/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
25	Vehículo control	sc	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
30	0,1 mg/kg/día E4	sc	0/8	0/8	0/8	1/8	1/8	4/8	3/8	4/8
35	0,3 mg/kg/día E4	sc	0/8	0/8	1/8	5/8	7/8	6/8	7/8	7/8
40	1,0 mg/kg/día E4	sc	0/8	0/8	1/8	6/8	8/8	7/8	8/8	8/8
	3,0 mg/kg/día E4	sc	0/8	0/8	3/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8

45 El bio-ensayo de cornificación vaginal se realizó para determinar el perfil estrogénico de E4 al administrarlo oralmente (po) a ratas adultas ovariectomizadas. EE se usó como control positivo. El vehículo (10% etanol/aceite de sésamo) sirvió como control negativo. Los esteroides se disolvieron en etanol absoluto y después se llevaron a las concentraciones finales con aceite de sésamo (10% etanol en aceite de sésamo). Se produjo una respuesta estrogénica vaginal en todas las ratas (8/8) a las que se administraron 50  $\mu$ g/kg/día de EE po el día 7 (Tabla 2). De forma similar, se observó cornificación epitelial vaginal en todas las ratas (8/8) tratadas po con 0,1, 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg/día de E4 el día 7 (Tabla 2), mientras los animales tratados con el vehículo no mostraron cornificación epitelial vaginal (0/8). Sorprendentemente, incluso en ratas a las que se administró bajas dosis de E4 (por ejemplo, 0,1 mg/kg/día), el inicio de la cornificación vaginal (definido como la cantidad de animales que responden a los días 1-3 del estudio) fue más rápido en los animales tratados po que en los tratados sc, demostrando las magníficas características de biodisponibilidad del estetrol después de la administración oral.

50

60

65

# ES 2 274 252 T3

TABLA 2

*Respuesta vaginal estrogénica en ratas ovariectomizadas tratadas oralmente (po) con 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE) o estetrol (E4). Los datos se expresan como el número de ratas que muestran cornificación vaginal sobre el número de ratas tratadas (relación)*

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Grupo de tratamiento	Vía de dosificación	Número de ratas que muestran respuesta estrogénica/ Número de ratas tratadas							
		Día del estudio							
		Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
0,05 mg/kg/día EE	po	0/8	1/8	3/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
Vehículo control (2 mg/kg/día)	po	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
0,1 mg/kg/día E4	po	0/8	0/8	1/8	7/8	8/8	8/8	8/8	8/8
0,3 mg/kg/día E4	po	0/8	0/8	1/8	7/8	8/8	8/8	8/8	8/8
1,0 mg/kg/día E4	po	0/8	0/8	4/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
3,0 mg/kg/día E4	po	0/8	0/8	6/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8

## Ejemplo 2

50

Para evaluar la biodisponibilidad oral (po) y subcutánea (sc) del estetrol (E4) y para determinar la vida media de eliminación, se realizaron estudios de dosis única en ratas Sprague Dawley hembra seguido de muestreo de sangre frecuente a lo largo de intervalos de 24 horas.

55

Las ratas Sprague Dawley se equiparon con un catéter cardíaco silálico permanente, como se describe en Kuipers y col. (1985, Gastroenterology, 88, 403-411). Se permitió que las ratas se recuperaran de la cirugía durante 5 días y después se administraron 0,05, 0,5 o 5 mg/kg E4 en 0,5 ml de aceite araquídico. Para la administración sc, E4 se injectó en el área del cuello usando una jeringa de 1 ml y aguja de 20 g. Para la administración po de E4, las ratas se anestesieron ligeramente con haloteno/N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> y E4 se aplicó directamente intragástricamente usando un intubador de estómago de plástico. Las muestras de sangre se recogieron a continuación vía catéter cardíaco en tubos heparinizados a las 0,5, 1, 2, 4, 8 y 24 horas. Se eliminaron los eritrocitos por centrifugación a 5000xg durante 10 minutos a 4°C y el plasma sanguíneo se guardó a -20°C. Despues de descongelar las muestras de plasma, se empleó la extracción líquido-líquido (hexano y éter dietílico) para preparar las muestras de plasma que contienen E4 para el análisis por HPLC (Perkin Elmer 200) y tandem con espectrometría de masas usando un PE Sciex 3000 espectrómetro de masas tandem e interfaz APCI. Con cada lote de muestras, se registró una curva de calibración con 6 calibradores. La curva de calibración se calculó usando regresión lineal (coeficiente de correlación > 0,98), lo que permitió la cuantificación de las concentraciones de plasma. Se recogieron datos del plasma de cada rata, muestreado a diferentes intervalos de tiempo.

## ES 2 274 252 T3

Los datos de concentración de plasma se analizaron con “WinNonLin, edición 3.1” e involucraron parámetros farmacocinéticas para  $C_{max}$ , vida media y  $AUC_{0-24}$ . Especialmente usando los niveles de dosis menor e intermedio de 0,05, 0,5 mg/kg, E4 demostró una biodisponibilidad oral igual a la biodisponibilidad obtenida con la administración sc (80-100%). Al nivel de dosis más alto ensayado, 5 mg/kg de E4, la cinética de absorción dio lugar a una biodisponibilidad oral aproximadamente 30-60% de E4 administrado sc. De forma interesante, E4 demostró una vida media relativamente larga de 2-3 horas, permitiendo la detección de niveles bioactivos de E4 no conjugado en todos los instantes de tiempo a lo largo de un intervalo de 24 horas en los experimentos de dosificación sc y po.

### Ejemplo 3

Para determinar la bio-disponibilidad y la vida media de eliminación del estetrol después de la dosificación oral en humanos, se realizó un estudio de dosis única en voluntarias sanas post-menopáusicas. A las voluntarias ( $n = 6$ ) se les asignó aleatoriamente 0,1, 1 ó 10 mg de estetrol y se tomaron muestras de sangre (18 por voluntaria) durante un periodo de 72 horas.

Después de descongelar las muestras de plasma, se empleó la extracción líquido-líquido (hexano y éter dietílico) para preparar las muestras de plasma que contienen E4 para el análisis por HPLC (Perkin Elmer 200) y tandem con espectrometría de masas usando un PE Sciex 3000 espectrómetro de masas tandem e interfaz APCI. Con cada lote de muestras, se registró una curva de calibración con 6 calibradores. La curva de calibración se calculó usando regresión lineal (coeficiente de correlación  $> 0,98$ ), lo que permitió la cuantificación de las concentraciones de plasma.

Se observó buena tolerancia al incrementar la dosis oral de estetrol de 0,1 a 1 e incluso a 10 mg. Los valores AUC demostraron buena linealidad de la dosis, indicando esto que a lo largo de todo el rango de dosis, el estetrol administrado oralmente fue bien absorbido. De forma interesante, el estetrol demostró una larga vida media de eliminación de más de 15 horas, por ejemplo 15-50 horas en sujetos humanos post-menopáusicos.

### Ejemplo 4

Se usaron ensayos establecidos de unión esteroide competitiva para determinar la afinidad de unión relativa del estetrol (E4), comparado con el  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE) y el  $17\beta$ -etinilestradiol (E2), a las formas  $\alpha$  y  $\beta$  humanas del Receptor de Estrógeno (ER).

El método empleado se adaptó de la literatura científica y fue descrito en detalle por Ousbourn y col. (1993, Biochemistry, 32, 6229-6236). Las proteínas  $Era$  y  $ER\beta$  recombinantes humanas se purificaron de células Sf9 transfeccionadas. Los ensayos *in vitro* involucraron el uso tanto de las proteínas  $Era$  como  $ERP$  y [ $^3H$ ]E2, a una concentración fija de 0,5 nM, como ligando marcado. Las proteínas  $Era$  y  $ER\beta$  recombinantes humanas se disolvieron en tampón de unión (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, glicerol 10%, DTT 1 mM, BSA 1 mg/ml) y se incubaron alícuotas por duplicado con [ $^3H$ ]E2 a una concentración final de 0,5 nM, junto con un vehículo control (DMSO 0,4%), o la misma cantidad de vehículo que contiene concentraciones crecientes de ligandos esteroide no marcados como competidores. Después de la incubación durante 2 h a 25°C, los ligandos no unidos se eliminaron y se midieron las cantidades de [ $^3H$ ]E2 unido tanto a las proteína  $Era$  como las  $ER\beta$ . Las cantidades promedio de [ $^3H$ ]E2 unido tanto a las proteína  $Era$  como las  $ER\beta$  a cada concentración de competidor se usaron para realizar curvas de inhibición. A continuación se determinaron los valores IC<sub>50</sub> mediante análisis de regresión no lineal de mínimos cuadrados. Se calcularon las constantes de inhibición (Ki) usando la ecuación de Cheng y Prusoff (Cheng y col., 1973, Biochem. Pharmacol., 22, 3099-3108), usando el IC<sub>50</sub> medido de los compuestos ensayados, la concentración de radioligando empleada en el ensayo, y los valores históricos para Kd del radioligando, los cuales se establecieron como 0,2 nM y 0,13 nM para  $Era$  y  $ER\beta$  respectivamente.

Los resultados del ensayo bioquímico para E4 se presentan como el porcentaje de inhibición de la unión específica en tres experimentos separados (Tabla 3). Para comparar las afinidades de unión de E4, EE y E2 a las proteínas  $Era$  y  $ER\beta$  humanas, los valores de Ki observados experimentalmente se muestran en la Tabla 4. Comparado con EE y E2, E4 muestra un perfil de unión único con fuerte preferencia (400%) por la unión con la proteína  $Era$  (Tabla 4). En contraste, los valores Ki para la proteína  $ER\beta$  son más pronunciados para los ligandos esteroides EE y E2 (Tabla 4).

55

60

65

# ES 2 274 252 T3

TABLA 3

*Porcentaje de inhibición de la unión específica a las proteínas Era y ER $\beta$  usando E4 como ligando esteroide no marcado y [ $^3$ H] 0,5 nM como competidor marcado. Se muestran los resultados de tres experimentos separados*

5

Concentración final de E4	Porcentaje de inhibición de unión específica en					
	Ensayo de unión esteroide ER $\alpha$			Ensayo de unión esteroide ER $\beta$		
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
1 $\mu$ M	98	nd	nd	87	90	95
0,3 $\mu$ M	92	94	101	74	74	77
0,1 $\mu$ M	83	85	86	56	54	50
0,03 $\mu$ M	64	66	63	19	25	30
10 nM	43	32	28	nd	nd	nd
3 nM	26	17	11	nd	nd	nd

nd: no determinado

30

TABLA 4

*Constantes de inhibición (Ki) determinadas experimentalmente para el estetrol (E4), 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE) y el 17 $\beta$ -etinilestradiol (E2), a proteínas humanas Era y ER $\beta$ . Se muestra también la preferencia relativa por la unión a la proteína Era*

35

Ligandos esteroideos	Ki Era (nM)	Ki Er $\beta$ (nM)	Preferencia relativa Era/Er $\beta$ (%)
EE	0,23	0,025	11
E2	0,21	0,015	7
E4	4,9	19	400

50

## Ejemplo 5

Se usó un ensayo establecido de unión esteroide competitiva (Hammond y Lahteenmaki. 1983. Clin Chem Acta 132:101-110) para determinar la afinidad de unión relativa del estetrol (E4), el 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2), 17 $\beta$ -estradiol (E2), testosterona (T) y 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) para la hormona sexual humana de unión de la globulina (SHBG).

La SHBG humana se purificó de suero de ratón transgénico, como se describió previamente (Avvakumov GV y col., 2000. J. Biol Chem 275:25920-25925). A la SHBG humana preparada de esta manera se le determinó > 99% de pureza por gel de electroforesis de poliacrilamida bajo condiciones de desnaturización. Sus características de unión de esteroide son indistinguibles de SHBG en suero humano (Avvakumov GV y col., 2000. J. Biol Chem 275:25920-25925). El ensayo *in vitro* involucró el uso de SHBG humana purificada y [ $^3$ H]DHT o [ $^3$ H]estradiol como ligandos marcados. La SHBG humana fue tratada durante 30 min a temperatura ambiente con una suspensión de charco al recubierto de dextrano (DCC) en salino tamponado con fosfato (PBS) para eliminar cualquier ligando esteroide. Tras la centrifugación (2000 x g durante 10 min) para sedimentar el DCC, el sobrenadante conteniendo la SHBG humana se diluyó en PBS a una concentración de 1 nM basada en su capacidad de unión a esteroide.

## ES 2 274 252 T3

Las alícuotas ( $100 \mu\text{l}$ ) por duplicado de esta disolución de SHBG humana se incubaron entonces con un volumen igual de [ $^3\text{H}$ ]DHT o [ $^3\text{H}$ ]estradiol a  $10 \text{ nM}$ , junto con  $100 \mu\text{l}$  de PBS sólo para la misma cantidad de PBS que contiene concentraciones crecientes de ligandos esteroide no marcados como competidores, en tubos de ensayo de poliestireno. Tras la incubación durante 1 h a temperatura ambiente, las mezclas de reacción se situaron en un baño de hielo durante otros 15 minutos. Entonces se añadieron a cada tubo alícuotas ( $600 \mu\text{l}$ ) de una suspensión helada de DCC y tras una breve mezcla de 2 segundos, se incubó cada tubo en un baño de hielo durante 10 min o 5 min dependiendo de si se había usado [ $^3\text{H}$ ]DHT o [ $^3\text{H}$ ]estradiol como ligandos marcados, respectivamente. Los ligandos no unidos adsorbidos en DCC se eliminaron entonces por centrifugación ( $2000 \times g$  durante 15 min a  $4^\circ\text{C}$ ), y las cantidades de ligandos [ $^3\text{H}$ ]marcados unidos a SHBG se contaron en 2 ml de cóctel de escintilación ACS usando un espectrofotómetro de escintilación líquida. Las cantidades promedio de ligandos [ $^3\text{H}$ ]marcados unidos a SHBG a cada concentración de competidor B) se expresaron como un porcentaje de las cantidades promedio de ligandos [ $^3\text{H}$ ]marcados unidos a SHBG en ausencia del competidor ( $B_0$ ), y se representaron frente a la concentración de competidor en cada tubo de ensayo. Los resultados de los ensayos de unión competitiva se representan en la figura 1.

15

20

25

30

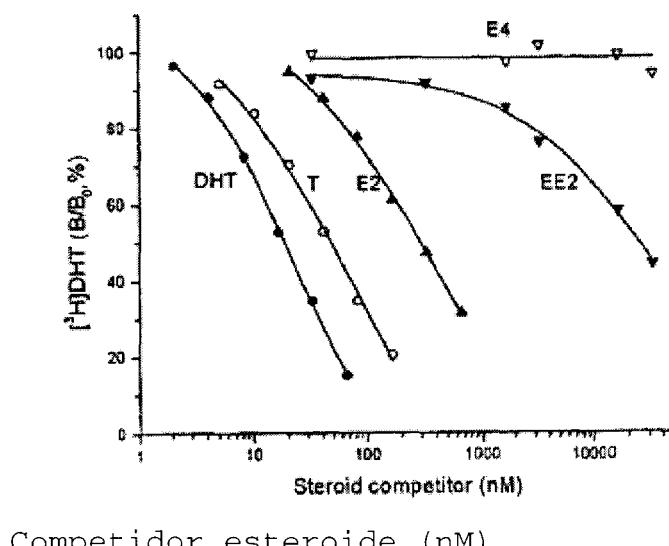
35

40

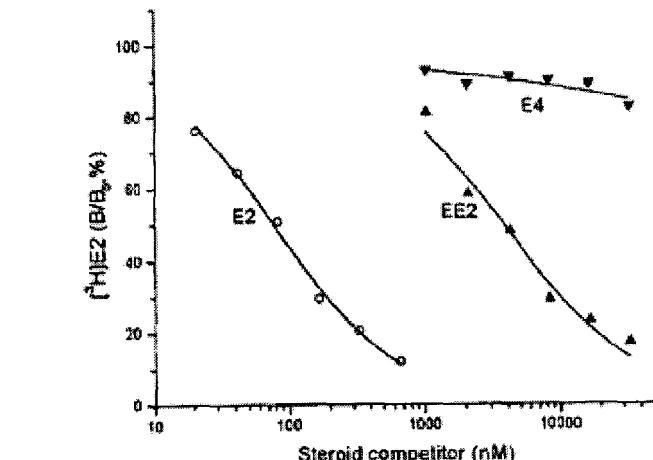
45

50

55



Competidor esteroide (nM)



Competidor esteroide (nM)

60

Figura 1: Desplazamiento competitivo de [ $^3\text{H}$ ]DHT (panel A) y [ $^3\text{H}$ ]estradiol (panel B) del sitio de unión de la hormona sexual humana que se une a la globulina. Los ligandos esteroide no marcados usados como competidores fueron los siguientes: estetrol (E4),  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE2),  $17\beta$ -estradiol (E2), testosterona (T) y  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) para la hormona sexual humana de unión de la globulina (SHBG).

65

Como es claramente aparente a partir de estos ensayos de unión competitiva, el estetrol no se une a todas las SHBG humanas cuando se estudia con [ $^3\text{H}$ ] DHT o [ $^3\text{H}$ ] estradiol como ligandos marcados. Esto está en marcado contraste con los esteroides de referencia etinilestradiol,  $17\beta$ -estradiol, testosterona y  $5\alpha$ -dihidrotestosterona, las cuáles, por este

## ES 2 274 252 T3

orden, muestran una afinidad de unión relativa incrementada por la SHBG humana. De forma importante, la unión del estetrol a SHBG fue negligible comparada con los otros estrógenos ensayados, etinilestradiol y  $17\beta$ -estradiol.

### Ejemplo 6

5 La encefalomielitis auto-inmune experimental (EAE) se usa ampliamente como modelo animal de la esclerosis múltiple (MS), una enfermedad caracterizada por procesos inflamatorios dentro del sistema nervioso central. Aparte de su valor para identificar terapias para la esclerosis múltiple, es útil como modelo de inflamación en general. La ventaja es que la respuesta inflamatoria está localizada dentro del sistema nervioso central, lo que permite una apreciación adecuada de la magnitud de la reacción inflamatoria en relación con los síntomas clínicos. Además, la inducción de la enfermedad se controla de forma precisa porque se establece por inmunización con una proteína o un péptido sintético. Es necesario el seguimiento clínico de los animales durante un periodo de tiempo de no más de 4 a 6 semanas y por lo tanto es posible un screening rápido de los potenciales compuestos anti-inflamatorios.

10 15 La esclerosis múltiple se caracteriza por el incremento de la discapacidad debida a la disrupción del revestimiento de mielina que rodea los axones y por consiguiente la pérdida de la conductividad nerviosa. Las lesiones inflamatorias muestran una relación con los linfocitos y macrófagos responsables de la destrucción de los tejidos vía secreción de una variedad de mediadores inflamatorios.

20 25 La EAE se puede establecer en linajes de animales susceptibles por inmunización con mielina entera o proteínas y péptidos derivados de la mielina. En los ratones SJL/J la EAE puede inducirse de forma reproducible por inmunización subcutánea con un péptido de proteína proteolipídica, por ejemplo PLP<sub>139-151</sub>, en adyuvante de Freund completo. Después de 3 días los ratones reciben (i.v.) 10<sup>9</sup>+ organismos *Bordetella pertussis* inactivados por calor, para incrementar la permeabilidad de la barrera sanguínea cerebral. Esto tiene como resultado la inactivación de células T antígeno específicas que secretan citoquinas pro-inflamatorias como linfotoxina e interferona  $\gamma$ . El desarrollo de la enfermedad es conocido, para comprender los siguientes eventos:

- 30 1. Activación de células T por macrófagos y células dendríticas que presentan PLP<sub>139-151</sub>.
2. Expresión elevada de interleucina 12 en macrófagos y células dendríticas.
3. Diferenciación de células T en células efector que secretan células pro-inflamatorias y expresan receptores quemoquina únicos.
- 35 4. Incremento de la permeabilidad de la barrera sanguínea cerebral.
5. Migración de células efector y monolitos en la parenquima cerebral frente a un gradiente de quemoquinas.
- 40 6. (Re)-activación local de las células inflamatorias
7. Liberación de mediadores de la inflamación y destrucción de oligodendrocitos y mielina.

Típicamente, entre 70 a 90% de los ratones SJL/J tratados con vehículo desarrollan un primer episodio de la enfermedad entre los días 10 y 20 post-inmunización con PLP<sub>139-151</sub>. De forma interesante, aproximadamente un 50% de los animales afectados desarrollan también un segundo episodio de EAE (relapso) entre los días 28 y 42.

45 50 El efecto del tratamiento oral con estetrol en EAE se evaluó en un diseño de estudio de 42 días usando la severidad clínica de EAE (puntuación de discapacidad) como parámetro resultante. El sistema de puntuación clínica desarrollado por Kono y col. (J Exp Med 168, 213-227, 1998) se usó para monitorizar el grado de discapacidad de el modelo SJL/J EAE: 0: sin enfermedad; 0,5: paresis de la cola o parálisis parcial; 1: parálisis completa de la cola; 2: paraparesis, debilidad en las extremidades y parálisis de la cola; 2,5: parálisis parcial de las extremidades; 3: parálisis completa de las extremidades delanteras y traseras; 3,5: paraplejia; 4: tetraplejia, moribundo; 5: muerte por EAE. Grupos consistentes en 9 a 10 hembras de ratón SJL/J se trataron una vez al día oralmente con cuatro dosis diferentes de estetrol, de 3 mg/kg, 1 mg/kg, 0,3 mg/kg y 0,1 mg/kg tras la inducción de la enfermedad por inmunización subcutánea con PLP<sub>139-151</sub> y continuando durante todo el periodo de seguimiento de 42 días. Un grupo tratado con el vehículo (Cavasol; hidroxipropil-beta-ciclodextrina) sirvió como control negativo.

60 65 Hembras de ratón SJL/L de 7 semanas de edad se obtuvieron de Harlan (Francia). Antes de empezar el estudio, los ratones se trataron y aclimataron durante un periodo de dos semanas y se escogieron aleatoriamente los grupos de tratamiento. Los ratones se inmunizaron por inyección subcutánea de 50  $\mu$ g de un péptido sintético de proteína proteolipídica, por ejemplo, PLP<sub>139-151</sub> (Isogen Bioscience B.V.), emulsionado en adyuvante de Freund completo (CFA, H37Ra lote 2116643, Disco Laboratorios, EEUU). La emulsión se distribuyó a lo largo de 4 sitios en los flancos. El día 3 los ratones recibieron una inyección intravenosa de I09 bacterias *Bordetella pertussis* (National Institute for Public Health, Bilthoven, Holanda). Del día 0 (tras la inmunización con PLP<sub>139-151</sub>) hasta el día 42, los ratones se trataron oralmente (por alimentación forzada) con 0,2 ml de disolución de estetrol o vehículo (hidroxipropil-beta-ciclodextrina en una disolución 20% p/v en agua) según el programa siguiente: Grupo A: vehículo (n=10); Grupo B: estetrol, 3 mg/kg/día (n=9); Grupo C estetrol, 1 mg/kg/día (n=10); Grupo D estetrol, 0,3 mg/kg/día (n=10) y Grupo E: estetrol, 0,1 mg/kg/día (n=10). Si era necesario, la dosis se ajustó al peso de los animales, que se determinó diariamente. Para

## ES 2 274 252 T3

los ratones individuales, la puntuación de discapacidad EAE se realizó diariamente. Al final del tratamiento y periodo de seguimiento se sacrificaron los ratones.

Se realizaron análisis estadísticos por análisis de varianza (ANOVA) para analizar la diferencia significativa entre los grupos de tratamiento y el grupo vehículo en los parámetros de discapacidad resultantes. Cada parámetro que mostró una diferencia significativa por ANOVA se ensayó a continuación mediante un ensayo post-hoc LSD (Least Significant Difference) para determinar qué grupos fueron diferentes ( $P \leq 0,05$  indica diferencias estadísticamente significativas;  $P > 0,05$  se consideró no significativo). Todos los análisis estadísticos se realizaron usando un programa de software estadístico SPSS 11.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU).

En el estudio no se observaron síntomas clínicos distintos de los relacionados con EAE, indicando que el estetrol no induce efectos secundarios significativos. Los ratones se consideraron afectados por EAE cuando alcanzaron la puntuación acumulativa de al menos 3 en un periodo de tres días consecutivos. Correspondientemente, el 70% de los ratones tratados con vehículo desarrollaron EAE (Figura 2). El tratamiento con 3 mg/kg y 1 mg/kg de estetrol redujo la incidencia de EAE y tuvo como resultado EAE en un 40% y 33% de ratones respectivamente (Figura 2). De los ratones tratados con 0,3 y 0,1 mg/kg de estetrol el 80% y 70% respectivamente desarrollaron EAE.

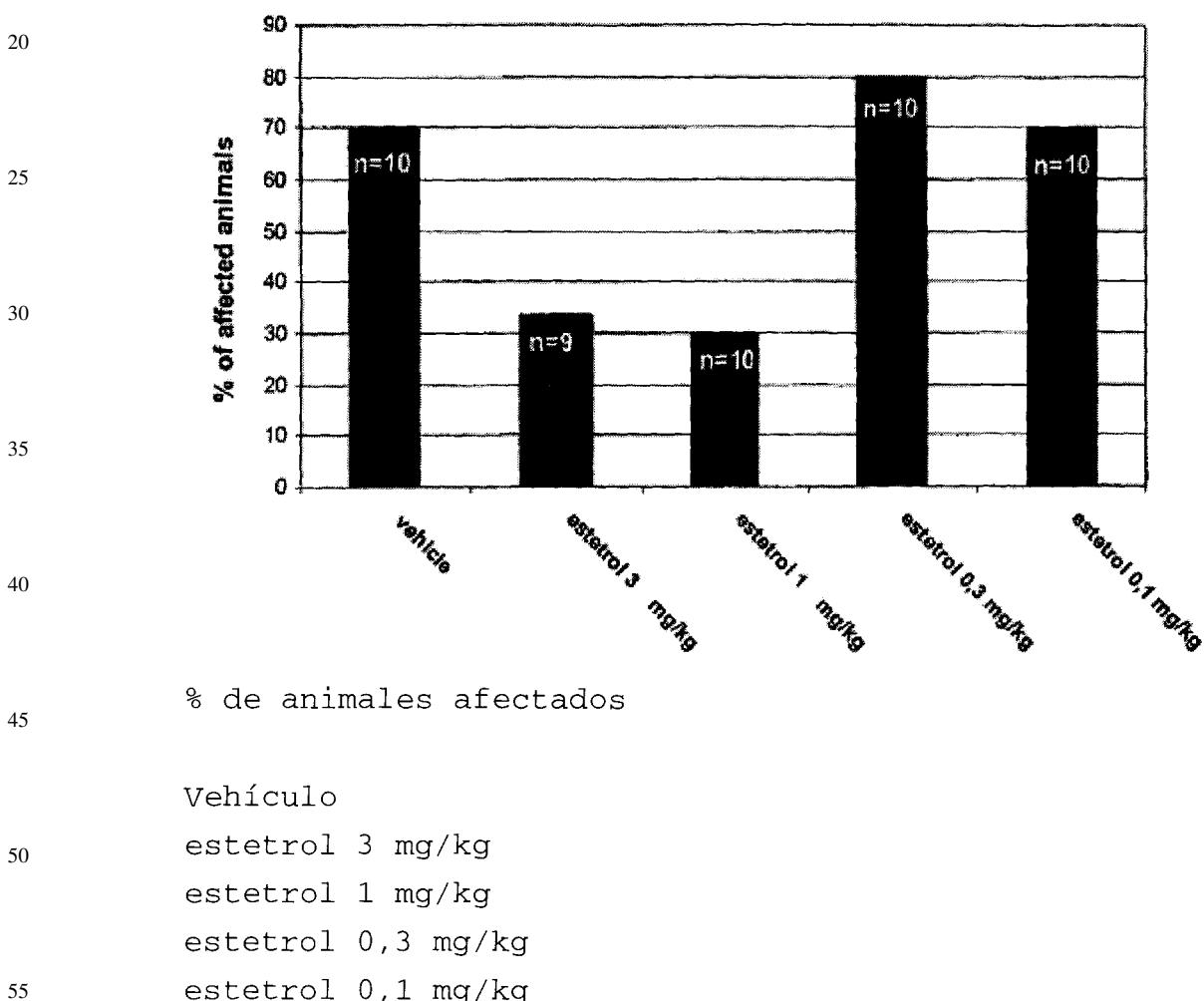


Figura 2: Efecto del tratamiento con estetrol en la incidencia de EAE en ratones SJL/J.

Los síntomas clínicos de EAE se hicieron aparentes el día 12 después de la inmunización en los ratones tratados con vehículo. De los ratones tratados con las dosis más altas de estetrol (3 y 1 mg/kg) el día promedio de inicio se retrasó 15,7 y 14,7 días, respectivamente. El tratamiento con las dos dosis más bajas de estetrol (0,3 y 0,1 mg/kg) también mostró una tendencia a retrasar el inicio de la enfermedad comparado con los ratones tratados con vehículo, pero no fue estadísticamente significativo.

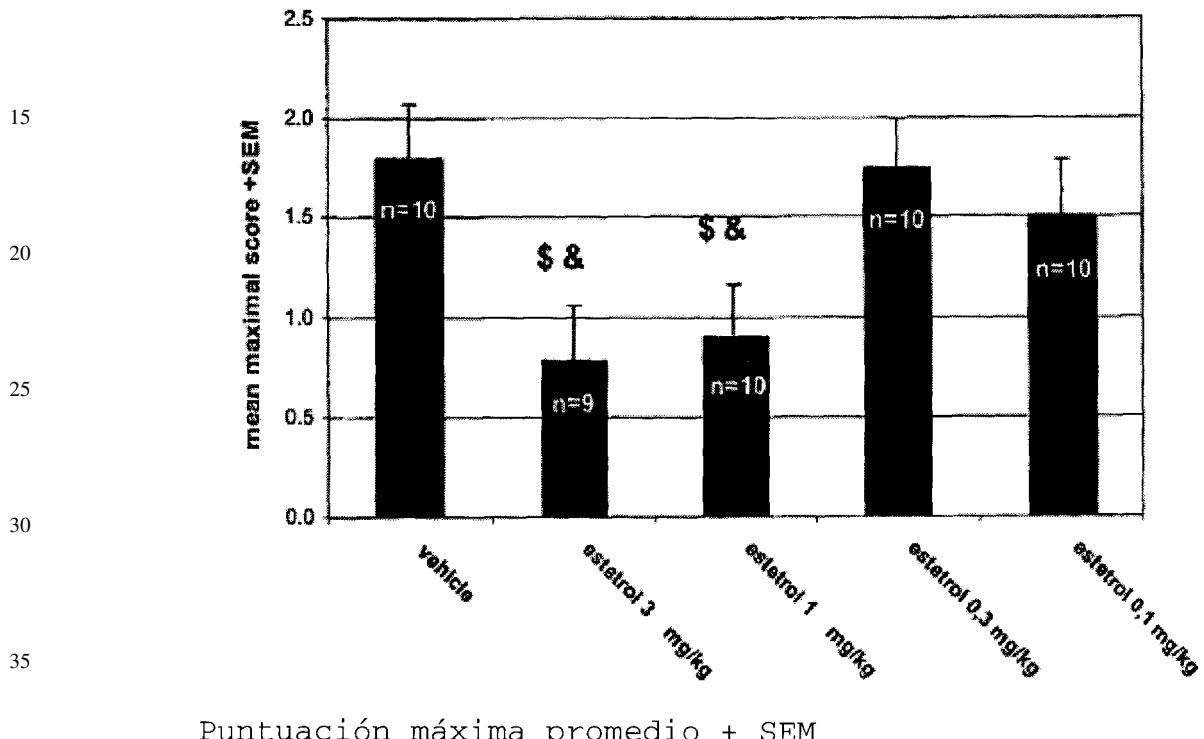
Para cada ratón individual se evaluó la puntuación clínica máxima durante todo el periodo de seguimiento, después de lo que se incluyeron los datos individuales en los promedios del grupo (Figura 3). La puntuación clínica máxi-

## ES 2 274 252 T3

ma promedio para ratones tratados con vehículo fue  $1,8 \pm 0,3$ . El tratamiento con 3 y 1 mg/kg de estetrol redujo la puntuación de discapacidad máxima promedio y tuvo como resultado puntuaciones de  $0,8 \pm 0,3$  y  $0,9 \pm 0,3$ , respectivamente. El tratamiento con las dos dosis más bajas de estetrol (0,3 y 0,1 mg/kg) no mostró diferencia estadísticamente significativas comparado con ratones tratados con vehículo. En base a la comparación por ANOVA entre grupos de

5 tratamiento y análisis post-hoc LSD, se concluye que el tratamiento oral con estetrol tiene como resultado una inhibición estadísticamente significativa de la puntuación de discapacidad máxima de EAE en una tendencia dependiente de la dosis, comparado con los ratones tratados con vehículo ( $P=0,011$  y  $P=0,021$  para 3 mg/kg y 1 mg/kg de estetrol, respectivamente).

10



35

40

45

50

- Vehículo
- estetrol 3 mg/kg
- estetrol 1 mg/kg
- estetrol 0,3 mg/kg
- estetrol 0,1 mg/kg

Figura 3: Efecto del tratamiento con estetrol en la puntuación máxima de EAE en ratones SJL/J

\$  $P=0,011$  (estetrol 3 mg/kg) y  $P=0,021$  (estetrol 1 mg/kg) comparado con el vehículo.

&  $P=0,016$  (estetrol 3 mg/kg) y  $P=0,029$  (estetrol 1 mg/kg) comparado con estetrol 0,3 mg/kg.

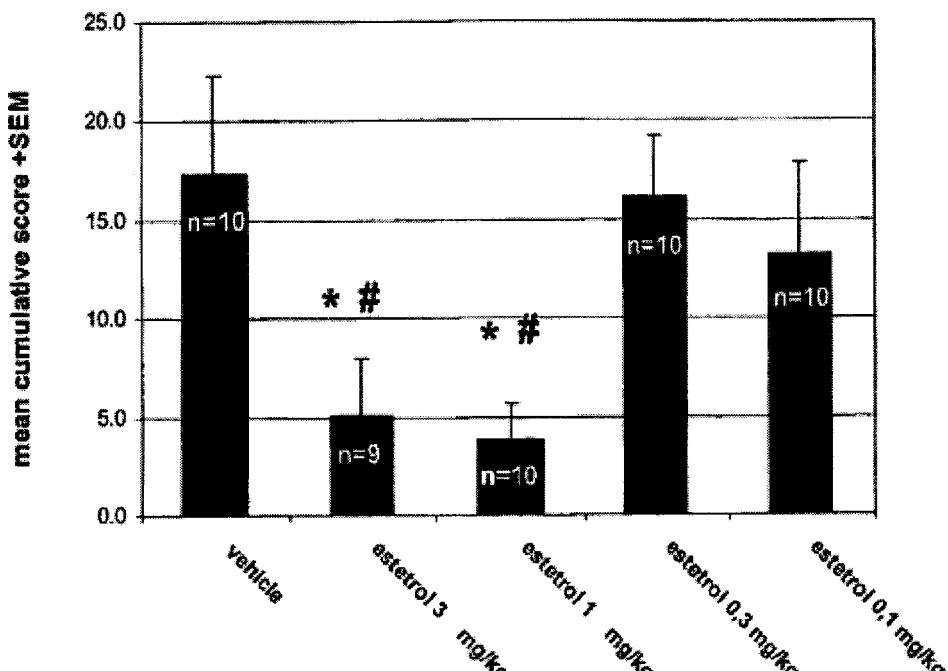
55

60

65

El resultado clínico más relevante del estudio, es decir, las puntuaciones de discapacidad cumulativa de los ratones individuales se presentan como promedios de grupo en la Figura 4 para el periodo completo de seguimiento (día 0-42). Cuando se analiza a lo largo de todo el tratamiento y periodo de seguimiento, los ratones tratados con vehículo desarrollaron un promedio cumulativo EAE de  $17,4 \pm 5,0$ , mientras el tratamiento con 3 y 1 mg/kg de estetrol redujo el promedio cumulativo de EAE a  $5,8 \pm 2,9$  y  $3,9 \pm 1,8$ , respectivamente (Figura 3). El tratamiento con las dos dosis más bajas de estetrol (0,3 y 0,1 mg/kg) no mostró diferencia estadísticamente significativas comparado con ratones tratados con vehículo. En base a la comparación por ANOVA entre grupos de tratamiento y análisis post-hoc LSD, se concluye que el tratamiento oral con estetrol tiene como resultado una inhibición estadísticamente significativa de la puntuación de discapacidad cumulativa de EAE en una tendencia dependiente de la dosis, comparado con los ratones tratados con vehículo ( $P=0,025$  y  $P=0,012$  para 3 mg/kg y 1 mg/kg de estetrol, respectivamente).

## ES 2 274 252 T3



Puntuación cumulativa promedio + SEM

Vehículo

estetrol 3 mg/kg  
estetrol 1 mg/kg  
estetrol 0,3 mg/kg  
estetrol 0,1 mg/kg

Figura 4: Efecto del tratamiento con estetrol en la puntuación cumulativa clínica de EAE (día 0-42) en ratones SJL/J.

\* P=0,025 (estetrol 3 mg/kg) y P=0,012 (estetrol 1 mg/kg) comparado con el vehículo.

# P=0,042 (estetrol 3 mg/kg) y P=0,022 (estetrol 1 mg/kg) comparado con estetrol 0,3 mg/kg.

Como es típico del modelo PLP<sub>139-151</sub> EAE en ratones SJL/J, una cantidad sustancial de ratones control que sólo fueron tratados con el vehículo desarrollaron un segundo episodio de la enfermedad (relapso). La evaluación de la segunda fase de actividad de la enfermedad, es decir, la puntuación clínica de EAE del día 26 al 42, mostró que los ratones tratados con 3 mg/kg y 1 mg/kg de estetrol mostraron pocas evidencias de la actividad de la enfermedad, al contrario de los ratones tratados con vehículo y los otros grupos de tratamiento (Figura 5). En base a la comparación por ANOVA entre grupos de tratamiento y análisis post-hoc LSD, se concluye que el tratamiento oral con estetrol muestra una inhibición estadísticamente significativa de relapses de EAE en una tendencia dependiente de la dosis, comparado con los ratones tratados con vehículo (P=0,045 y P=0,023 para 3 mg/kg y 1 mg/kg de estetrol, respectivamente).

## ES 2 274 252 T3

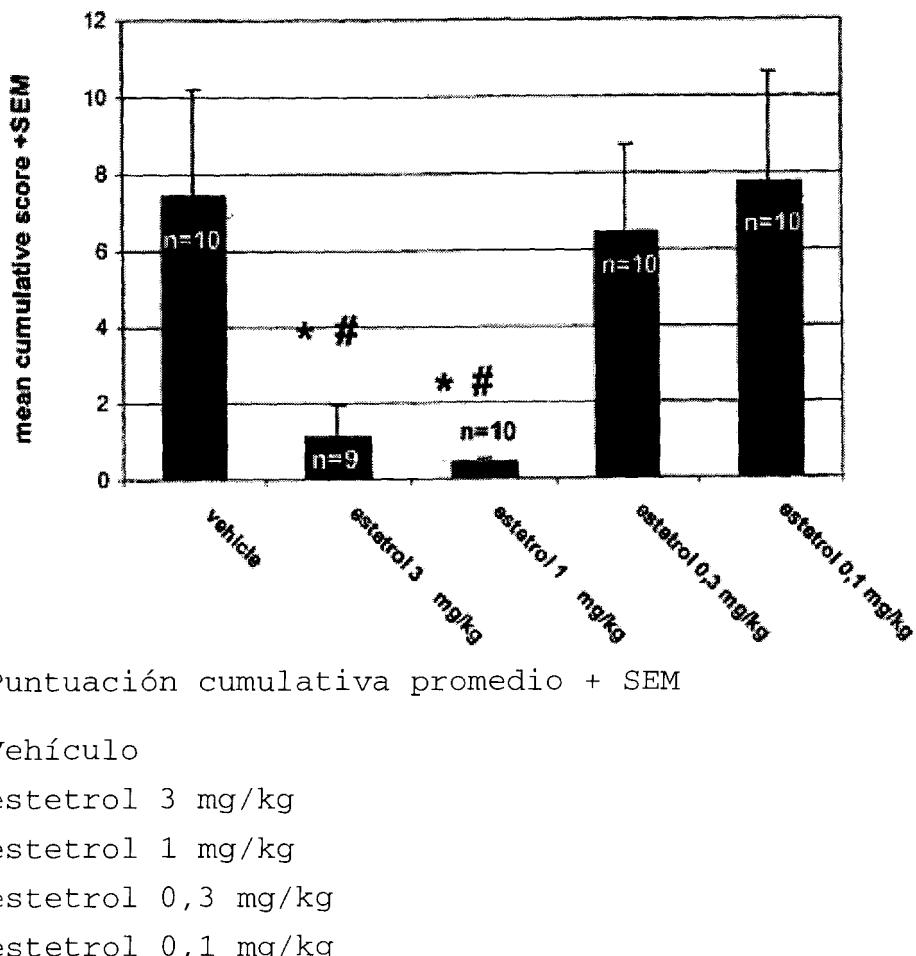


Figura 5: Efecto del tratamiento con estetrol en la puntuación cumulativa clínica de EAE en la fase de relapso (día 26-42) en ratones SJL/J.

\* P=0,045 (estetrol 3 mg/kg) y P=0,023 (estetrol 1 mg/kg) comparado con el vehículo.

# P=0,050 (estetrol 3 mg/kg) y P=0,018 (estetrol 1 mg/kg) comparado con estetrol 0,3 mg/kg.

Estos datos muestran que el estetrol, administrado oralmente en una cantidad efectiva para modificar también los parámetros endocrinos (especialmente la cronificación vaginal), reduce sorprendentemente el desarrollo clínico de EAE. Además, el estetrol alivia los síntomas en animales afectados de EAE y evita que los animales desarrollen un relapso de la enfermedad con síntomas severos de la enfermedad.

### 50 Ejemplo 7

La capacidad del estetrol (E4) de aliviar los síntomas y la severidad de los desórdenes de mediación inmune se evalúa en ratones B10.PL con encefalomielitis auto-inmune experimental (EAE), una enfermedad inflamatoria que se dispara por la inducción de linfocitos T auto-reactivos y se ha estudiado ampliamente como modelo de la esclerosis múltiple (MS) en humanos.

Se obtuvieron ratones hembra B10.PL de 8-12 semanas de edad de Jackson Laboratorios (Bar Harbor, Me.) y se dividieron en grupos de tratamiento de 12 ratones. Tres días antes de la inducción de la enfermedad EAE se anestesiaron los animales usando una mezcla anestésica de quetamina/xilazina y se ovariectomizaron. Se quitaron los ovarios tras una sola incisión a través de la piel de la espalda y una incisión en el flanco bilateral a través del peritoneo.

La proteína básica de la mielina (MBP) se aisla de la médula espinal del cerdo de guinea siguiendo el procedimiento de Deibler, y col. (Deibler, G.E., y col., Prep. Biochem. 2:139, 1972). MBP se almacena liofilizada a -20°C y se disuelve antes de su uso en ácido acético 0,1 M a una concentración de 8 mg/ml. Para la inmunización se emulsiona MBP en un volumen igual de adyuvante completo de Freund (CFA) que contiene *Mycobacterium tuberculosis* H.sub.37 Ra (4 mg/ml).

## ES 2 274 252 T3

Para inducir la EAE los ratones se inmunizaron en la piel de la base de la cola con 400 µg de MBP en una emulsión de CFA (0,1 ml), conteniendo *Mycobacterium tuberculosis* H.sub.37 Ra. Inmediatamente tras la inmunización MBP y 48 más tarde, los ratones son adicionalmente inyectados intraperitonealmente con 200 ng de toxina *pertussis* (Sigma, St. Louis, MO). Se examinan diariamente en los ratones los síntomas clínicos de EAE durante 40 días y los

5 síntomas de la enfermedad se puntúan según Clayton y col. (J. Exp. Med. 169:1681, 1989): 0: sin parálisis, 1: cola débil/lento/ojos apagados, 2: parálisis trasera parcial o debilidad de extremidades, 3: giro con dificultad, debilidad severa de las extremidades o ligera parálisis; 4: parálisis total o severa, 5: moribundo/muerto.

10 El estudio comprende un protocolo combinado preventivo/terapéutico, en el que se administran a los ratones varias cantidades de E4, empezando el día 1 del estudio (día de la inmunización MBP) hasta el día 40 inclusive. Cuatro grupos de ratones se tratan oralmente una vez al día con E4 (0,1, 0,3, 1,0 o 3,0 mg/kg/día) y un grupo de ratones reciben tratamiento oral una vez al día con vehículo (hidroxipropil-beta-ciclodextrina 20% p/v) como control negativo. De forma similar, el estudio comprende también 4 grupos de ratones se tratan subcutáneamente una vez al día con E4 (0,1, 0,3, 1,0 o 3,0 mg/kg/día) y un grupo de ratones que reciben tratamiento subcutáneo una vez al día con vehículo (hidroxipropil-beta-ciclodextrina 20% p/v) como control negativo.

15 Ni el tratamiento oral ni el subcutáneo con vehículo es efectivo en la prevención del desarrollo de la enfermedad EAE en ratones MBP inmunizados. Típicamente, los animales muestran un rápido inicio de los síntomas de la enfermedad y desarrollan progresivamente más signos de enfermedad auto-inmune a lo largo del periodo de evaluación. A 20 los 40 días la mayoría de animales sufren de formas severas de EAE (típicamente de clasificación 3 o más). De forma interesante, el tratamiento oral y subcutáneo con E4 muestra efectos dependientes de la dosis en el retraso del inicio de los síntomas de la enfermedad EAE y previene un desarrollo severo de la enfermedad auto-inmune a lo largo de los 40 días del periodo de evaluación. La comparación de los grupos de tratamiento con los grupos control revela que el número de animales afectado y/o la severidad de los síntomas de EAE se reducen con dependencia de la dosis a lo 25 largo del rango de dosis ensayado en los ratones tratados con E4.

30 El estudio se repite separadamente con ratones hembra B10.PL no castrados y ratones macho B10.PL demostrando de nuevo la capacidad de E4 dependiente de la dosis de mejorar los síntomas y la severidad de la EAE tras la administración oral y/o subcutánea diaria.

### Ejemplo 8

35 La capacidad del estetrol de aliviar la severidad de los desórdenes de mediación inmune y sus posibles efectos secundarios se evalúa y se compara con la dexametasona en ratones que desarrollan una artritis inducida por colágeno (CIA), que es otro sistema experimental de enfermedad inflamatoria crónica y auto-inmune, que representa las enfermedades artísticas humanas, particularmente la artritis reumatoide (RA).

40 La artritis se indujo en ratones DBA/1 macho usando un protocolo de inmunización de dos pasos (Joosten y col., "Dual role of IL-12 in early and late stages of murine collagen type II arthritis". J Immunol 1997; 159:4094-4102; Joosten y col. "IL-1 $\beta$  blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis whereas TNF $\alpha$  blockade only ameliorates joint inflammation", J Immunol 1999; 163:5049-55). Este linaje es altamente susceptible a CIA inducida con. El día 0 los ratones se inmunizaron con colágeno tipo II bovino (100 µg) emulsionado en adyuvante completo de Freund (cuatro inyecciones subcutáneas en la espalda). El día 21 los ratones se reforzaron con una inyección i.p. de 100 µg de colágeno tipo II bovino diluido en PBS.

45 El efecto del tratamiento oral con estetrol de la artritis inducida por colágeno se estudió en un diseño de ensayo de 6 semanas. Desde el día 22 hasta el fin del estudio (día 42), los animales se trataron una vez al día con vehículo (hidroxipropil-beta-ciclodextrina en una disolución en agua al 20% p/v) sirviendo como control negativo de cuatro dosis diferentes de estetrol (3 mg/kg, 1 mg/kg, 0,3 mg/kg y 0,1 mg/kg). La dexametasona (1 mg/kg) se escogió como control positivo porque es un costicosteroide bien estudiado que reduce la hinchazón y la inflamación y se usa en una variedad de desórdenes como enfermedades de la piel (psoriasis, urticaria), condiciones alérgicas, problemas respiratorios, cáncer, desórdenes sanguíneos (anemia), problemas digestivos, desórdenes oculares y para el tratamiento de la artritis. Aunque es efectivo como agente anti-inflamatorio, la dexametasona también es conocida por inducir un número de efectos secundarios, entre los cuáles se incluye en humano la inducción de la osteoporosis, función adrenal reducida, vértigo, náuseas, indigestión, aumento del apetito, ganancia de peso debido al incremento de retención de agua, debilidad y/o perturbaciones del sueño. Además, el tratamiento sistémico con dexametasona en roedores tiene como resultado fuertes efectos catabólicos que se pueden observar fácilmente, como pérdida de peso (Orzechowski y col. 2002, "Rats with a glucocorticoid-induced catabolic state show symptoms of oxidative stress and spleen atrophy: the effects of age and recovery". J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med; 49: 256-63).

60 Todos los grupos usados en el estudio consistieron en 13 ratones. Durante el estudio los animales fueron pesados y monitorizados los signos clínicos de artritis. La puntuación de la severidad de la enfermedad (puntuación clínica de la artritis) se realizó siguiendo el sistema de puntuación descrito por Joosten y col. 1997 (J. Immunol., 159:4094-4102) y Joosten y col. 1999 (J. Immunol., 163:5049-55).

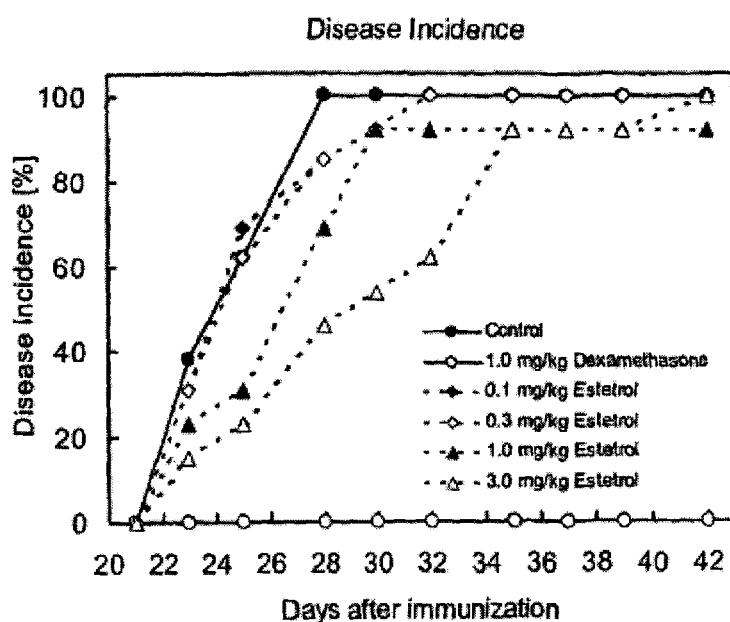
65 Los análisis estadísticos básicos se realizaron como sigue: Las diferencias significativas entre todos los grupos de tratamiento en los principales parámetros clínicos de resultados se estudiaron usando análisis de varianza (ANOVA). Cada ANOVA significativa fue seguida por ensayos *post hoc* Tukey para determinar las diferencias significativas entre

## ES 2 274 252 T3

cada grupo de tratamiento y el grupo control. Además, se usó el análisis de regresión lineal para estudiar la dependencia de la dosis de los efectos del tratamiento con estetrol. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando un programa de software estadístico SPSS 11.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU).

5 Los animales tratados con vehículo (controles) desarrollaron todos artritis justo después de la segunda inmunización con colágeno tipo II el día 21. El día promedio de inicio de la enfermedad para los ratones tratados con vehículo fue  $25,4 \pm 0,64$  días, alcanzando una incidencia de la enfermedad del 100% el día 28 (Figura 6). A continuación del refuerzo del día 21, ninguno de los animales tratados con dexametasona (control positivo) desarrollaron artritis antes del fin del estudio. Para este grupo de tratamiento la incidencia de la enfermedad fue 0% hasta el día 42 (Figura 6). El 10 tratamiento con estetrol dependiente de la dosis retrasó el día promedio del inicio de la enfermedad al día 25,8, 26,0, 28,2 y 30,7 para los grupos de tratamiento de 0,1, 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg de estetrol. Este efecto también se ve en la figura 6, en que el aumento de incidencia de la enfermedad se retraza claramente en los grupos de tratamiento de 1,0 mg y 3,0 mg/kg de estetrol en comparación con el grupo control de animales tratados con vehículo.

15



40 Incidencia de la enfermedad

45 Incidencia de la enfermedad [%]

50 Días tras la inmunización

Control

55 Dexametasona 1,0 mg/kg

estetrol 0,1 mg/kg

estetrol 0,3 mg/kg

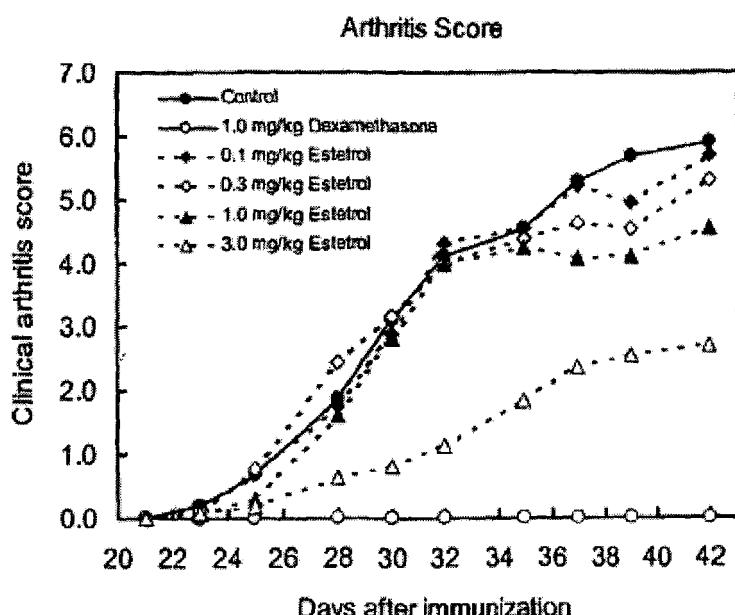
60 estetrol 1,0 mg/kg

estetrol 3,0 mg/kg

65 Figura 6: Efecto del tratamiento con estetrol en la incidencia de la enfermedad en ratones CIA, mostrando la incidencia de la enfermedad para todos los grupos de tratamiento estudiados frente al tiempo. "Enfermedad" se definió como una puntuación >0 de artritis macroscópica.

## ES 2 274 252 T3

La puntuación de artritis macroscópica aumenta constantemente con el tiempo en los ratones tratados con vehículo, alcanzando una puntuación media de  $5,90 \pm 0,38$  el día 42 (Figura 7). A lo largo de todo el periodo de seguimiento, la puntuación cumulativa promedio de artritis (día 21 a 42) en los ratones tratados con vehículo fue  $31,4 \pm 1,73$  (Figura 8). Como no se desarrolló la enfermedad en los animales tratados con dexametasona, la puntuación de artritis macroscópica permaneció 0 hasta el día 42 (Figura 7). Pro consiguiente, la puntuación cumulativa promedio de artritis (día 21 a 42) en los ratones tratados con dexametasona fue también 0 (Figura 8). También en la línea del retraso de la incidencia de artritis, el desarrollo de la puntuación de artritis macroscópica también se redujo con dependencia de la dosis en los ratones que recibieron estetrol (Figura 7). De forma similar, la puntuación cumulativa promedio de artritis (día 21 a 42) en los ratones tratados con estetrol se redujo con dependencia de la dosis y fue significativamente diferente comparada con la de los animales tratados con vehículo (Figura 8A y 8B).



Puntuación de la artritis

Puntuación de la artritis clínica

Días tras la inmunización

Control

Dexametasona 1,0 mg/kg

estetrol 0,1 mg/kg

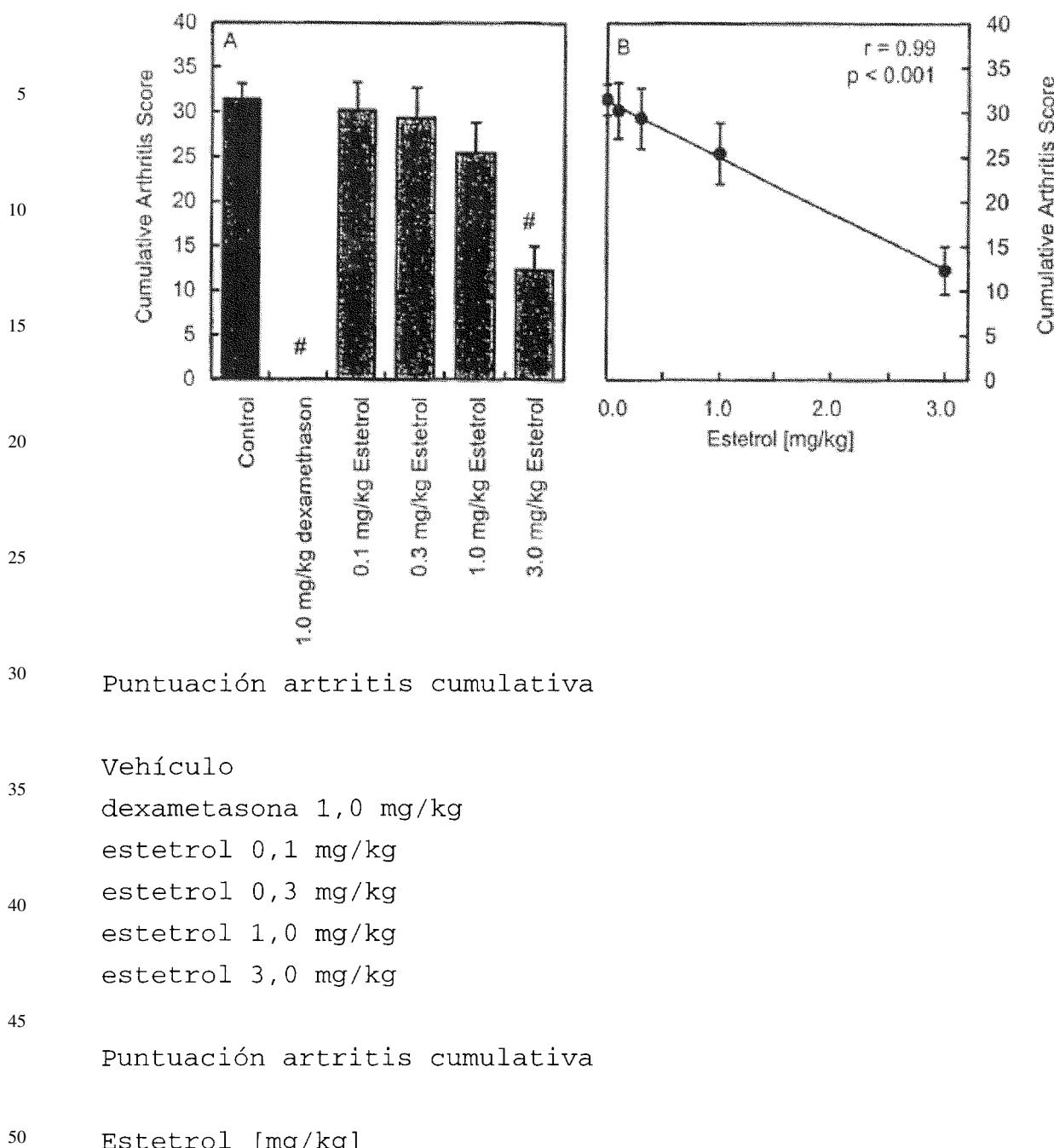
estetrol 0,3 mg/kg

estetrol 1,0 mg/kg

estetrol 3,0 mg/kg

Figura 7: Efecto del tratamiento con estetrol en la puntuación de artritis macroscópica en ratones CIA. Cada punto representa el promedio del grupo ( $n = 13$ ).

# ES 2 274 252 T3



Figuras 8A y 8B: Efecto del tratamiento con estetrol en la puntuación de artritis cumulativa en ratones CIA. Para cada ratón la puntuación cumulativa se calculó sumando las puntuaciones obtenidas en cada uno de los 10 instantes de tiempo. Panel A: los datos del grupo se presentan como promedio  $\pm$  SEM ( $n = 13$ ). Panel B: regresión lineal de la dosis de estetrol *versus* la puntuación de artritis cumulativa. # indica  $p < 0,001$  versus control, basado en ensayos de ANOVA y Tukey *post hoc*.

Como punto final clínico adicional para la severidad de la enfermedad y/o los efectos secundarios inducidos por el fármaco se midieron los pesos corporales en una base semanal. El peso corporal de los animales tratados con vehículo (control negativo) disminuyó a 94%, 85,7% y 87,9% de su peso inicial (el día 21) en los días 28, 35 y 42 respectivamente (Figura 9). Siguiendo el tratamiento con dexametasona, el peso corporal de los ratones también disminuyó al 91,5%, 91,4% y 94,0% de su peso inicial (el día 21) en los días 28, 35 y 42 respectivamente (Figura 9). La pérdida de peso en los ratones tratados con estetrol fue comparable a los grupos de animales de los controles negativo y positivo para las dosis menores (0,1, 0,3 y 1,0 mg/kg). Sin embargo, la dosis más elevada de estetrol (3,0 mg/kg) protegió a los ratones de la pérdida de peso: el peso corporal de los ratones de este grupo sólo disminuyó al 99,3%, 96,7% y 97,9% de su peso inicial (el día 21) en los días 28, 35 y 42 respectivamente (Figura 9), indicando

## ES 2 274 252 T3

que ni la artritis ni los efectos secundarios inducidos por el fármaco (como por ejemplo los vistos con dexametasona) afectaron negativamente a los animales tratados con la dosis de 3,0 mg/kg.

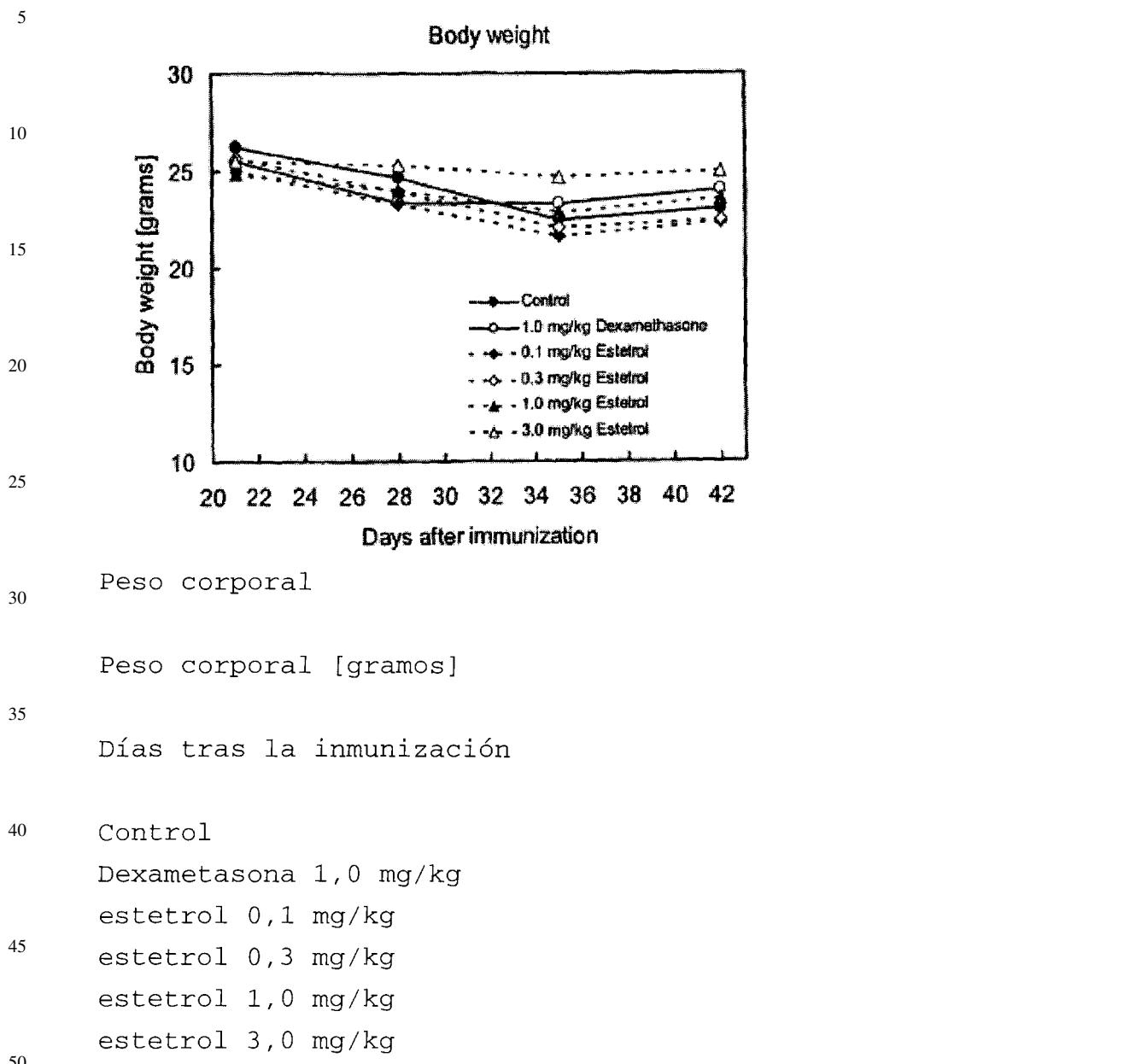


Figura 9: Efecto del tratamiento con estetrol en el peso corporal en ratones CIA. Los ratones se pesaron por grupos los días 21, 28, 35 y 42.

55 En conclusión, estos datos muestran que el estetrol administrado oralmente en una cantidad efectiva para modificar también los parámetros endocrinos (por ejemplo, la cronificación vaginal) sorprendentemente suprime el desarrollo de la artritis así como la severidad de la artritis en CIA. Como tal, el estetrol puede ser una modalidad terapéutica para el tratamiento de la artritis sin mostrar los efectos secundarios que se observan con los fármacos que existen actualmente, por ejemplo, la dexametasona.

### Ejemplo 9

65 La capacidad del estetrol (E4) de aliviar los síntomas y la severidad de los desórdenes de mediación inmune se evalúa en ratones ovariectomizados que desarrollan artritis inducida por colágeno (CIA).

Ratones hembra DBA-1 de 8-12 semanas de edad se dividieron en grupos de tratamiento de 12 ratones al inicio del tratamiento. Tres días antes de la inducción de la enfermedad CIA los animales se anestesiaron usando una mezcla

## ES 2 274 252 T3

anestésica de quetamina/xilazina y se ovariectomizaron. Se quitaron los ovarios tras una sola incisión a través de la piel de la espalda y una incisión en el flanco bilateral a través del peritoneo.

- El colágeno tipo II bovino (CII) se aisló y purificó según le protocolo de Wooley y col. (J. Exp. Med. 154: 688-700, 1981). Antes del uso, CII se disuelve primero en ácido acético 0,1 M a una concentración de 2 mg/ml y después se emulsiona 1:1 con adyuvante completo de Freund (CFA) que contiene *Mycobacterium tuberculosis* H.sub.37 Ra (4 mg/ml) o para la inmunización de refuerzo, emulsionado con adyuvante incompleto de Freund (IFA).

- Para inducir la CIA, los ratones se inmunicaron con 0,1 ml de la emulsión preparada en CFA en la base de la cola. Veintiún días después los animales recibieron una inyección de refuerzo de 0,1 ml de la emulsión preparada en IFA. Se examinan diariamente en los ratones los síntomas clínicos de CIA desde el inicio del experimento hasta el fin el día 60 tras la primera inmunización. Los signos clínicos de la CIA se puntuán según Wooley y col. (J. Exp. Med. 154: 688-700, 1981), usando una escala de 0 a 3 para cada pata: 0: sin artritis, 1: enrojecimiento e hinchazón en la pata delantera o trasera, 2: hinchazón severa o deformidad en la pata y 3: anquilosis. Se obtiene una puntuación artrítica para cada ratón sumando las puntuaciones de todas las patas. Para cada ratón, la posible severidad medida por la puntuación artrítica puede ir de 0 a 12.

- Se usa un protocolo combinado preventivo/terapéutico, en el que se administran a los ratones varias cantidades de E4, empezando el día 1 del estudio (día de la primera inmunización CII) hasta el día 60 inclusive. Cuatro grupos de ratones se tratan oralmente una vez al día con E4 (0,1, 0,3, 1,0 ó 3,0 mg/kg/día) y un grupo de ratones reciben tratamiento oral una vez al día con vehículo (hidroxipropil-beta-ciclodextrina 20% p/v) como control negativo. De forma similar, el estudio comprende también 4 grupos de ratones se tratan subcutáneamente una vez al día con E4 (0,1, 0,3, 1,0 ó 3,0 mg/kg/día) y un grupo de ratones que reciben tratamiento subcutáneo una vez al día con vehículo (hidroxipropil-beta-ciclodextrina 20% p/v) como control negativo.

- Ni el tratamiento oral ni el subcutáneo con vehículo es efectivo en la prevención del desarrollo de la enfermedad CIA en ratones CII inmunicados. Típicamente, los animales tratados con vehículo muestran un rápido inicio de los síntomas de la enfermedad y desarrollan más signos de CIA a lo largo del periodo de evaluación. A los 60 días la mayoría de animales sufren de formas severas de CIA (típicamente de clasificación 4 o más). De forma interesante, el tratamiento oral y subcutáneo con E4 muestra efectos dependientes de la dosis en el retraso del inicio de los síntomas de CIA y previene un desarrollo progresivo a formas más severas de destrucción de articulaciones a lo largo de los 60 días del periodo de evaluación. La comparación de los grupos de tratamiento con los grupos control muestra que el número de animales afectados y/o la severidad de los síntomas de CIA se reducen con dependencia de la dosis en los ratones tratados con E4.

- El estudio se repite separadamente con ratones hembra DBA-1 no castrados demostrando de nuevo la capacidad de E4 dependiente de la dosis de mejorar los síntomas y la severidad de la CIA tras la administración oral y/o subcutánea diaria.

### Ejemplo 10

*Preparación de 100 cápsulas que contienen 2 mg de estetrol y 2 mg de dexametasona por cápsula*

- Se mezclan 200 mg de estetrol, 200 mg de dexametasona (como sal disódica de fosfato) y 75 mg de dióxido de silicio coloidal (Aerosil® 200V). La mezcla de polvo resultante se transfiere a un vaso con indicación de volumen. El volumen se ajusta a 37 ml con celulosa microcristalina (Avicel® PH102). A continuación la mezcla de polvo se introduce en 100 cápsulas de gelatina dura de dos piezas.

### Ejemplo 11

*Preparación de 100 cápsulas que contienen 2 mg de estetrol y 3 mg de metotrexato por cápsula*

- Se mezclan 200 mg de estetrol, 300 mg de metotrexato (como sal disódica) y 75 mg de dióxido de silicio coloidal (Aerosil® 200V). La mezcla de polvo así obtenida se transfiere a un vaso con indicación de volumen. El volumen se ajusta a 37 ml con celulosa microcristalina (Avicel® PH102). La mezcla de polvo obtenida se introduce en 100 cápsulas de gelatina dura de dos piezas (Capsugel® 2).

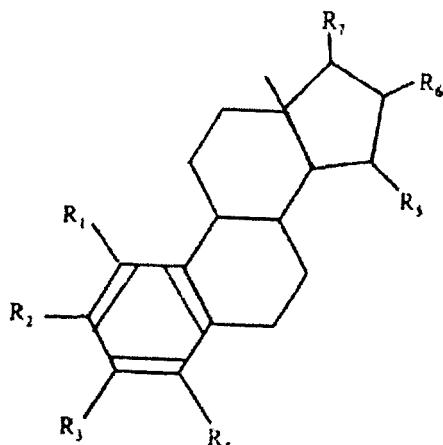
60

65

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un componente estrogénico seleccionado del grupo consistente en:

5



10

15

20

25

en cuya fórmula  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  independientemente son un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo alcoxilo con 1-5 átomos de carbono; cada uno de  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  es un grupo hidroxilo; y no más de 3 de  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  son átomos de hidrógeno;

30

precursos capaces de liberar una sustancia según la fórmula mencionada anteriormente cuando se usan en el presente método, cuyos precursores son derivados de las sustancias estrogénicas, en las que el átomo de hidrógeno de al menos uno de los grupos hidroxilo ha sido sustituido por un radical acilo de un hidrocarburo carboxílico, ácido sulfónico o ácido sulfámico de 1-25 átomos de carbono; tetrahidrofuranilo; tetrahidropiranilo; o un residuo glicosídico de cadena lineal o ramificada que contiene 1-20 unidades glicosídicas por residuo; y

mezclas de una o varias de las sustancias y/o precursores mencionados anteriormente; mostrando dichos componentes estrogénicos una configuración  $8\beta$ ,  $9\alpha$ ,  $13\beta$ ,  $14\alpha$  del esqueleto esteroide,

40

en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un desorden de mediación inmune en un mamífero, seleccionándose dicho desorden de mediación inmune del grupo consistente en enfermedades auto-inmunes; artritis reumatoide; osteoartritis; diabetes insulinodependiente (diabetes tipo I); lupus eritematoso sistémico; soriasis; patologías inmunes inducidas por agentes infecciosos, infecciones víricas o infecciones bacterianas; tuberculosis, lepra lepromatosa; rechazo de transplantes; enfermedad injerto versus huésped; condiciones atópicas; eosinofilia, conjuntivitis y nefritis glomerular, comprendiendo dicho uso la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva del componente estrogénico a dicho mamífero.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que  $R_3$  representa un grupo hidroxilo o un grupo alcoxilo.

50 3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que  $R_3$  al menos 3 de los grupos  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  representan átomos de hidrógeno.

4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en que el uso comprende la administración ininterrumpida del componente estrogénico durante un periodo de al menos 5 días, preferiblemente al menos 30 días.

55 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en que el uso comprende la administración oral o subcutánea del componente estrogénico.

60 6. Uso según la reivindicación 5, en que el uso comprende la administración oral.

7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en que el componente estrogénico se administra en una cantidad de al menos 1  $\mu$ g por kg de peso corporal al día, preferiblemente al menos 5  $\mu$ g por kg de peso corporal al día.

65 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en que el desorden de mediación inmune es un desorden mediado por linfocitos T y/o una enfermedad inflamatoria crónica.

# ES 2 274 252 T3

9. Uso según la reivindicación 8, en que el desorden de mediación inmune es un desorden mediado por Th1.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en que el desorden de mediación inmune se selecciona del grupo consistente en esclerosis múltiple, artritis reumatoide, osteoartritis, diabetes insulinodependiente (diabetes tipo I), lupus eritematoso sistémico y soriasis.
11. Una formulación farmacéutica que comprende el componente estrogénico como se define en la reivindicación 1, un agente inmunoterapéutico y un excipiente farmacéuticamente aceptable, excluyendo una composición farmacéutica que contenga el componente estrogénico como se define en la reivindicación 1 y un agente inmunoterapéutico único en forma de progesterona.
12. La formulación farmacéutica según la reivindicación 11, en que la formulación comprende al menos 10 µg del componentes estrogénico.
13. La formulación farmacéutica según la reivindicación 11 ó 12, en que la formulación comprende al menos 10 µg del agente inmunoterapéutico.
14. La formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en que el agente inmunoterapéutico se selecciona del grupo consistente en agentes anti-inflamatorios; D-pencilamina; agentes 4-aminoquinolina; azatioprina; metotrexato; ciclosporina; anticuerpos monoclonales de linfocitos T; anticuerpos monoclonales de citokininas; Receptor del factor de la Necrosis Tumoral (TNFR)-IgG; receptor antagonista IL-1; inhibidores ICE; betaferon; vitamina D; 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> y 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D<sub>2</sub>; agentes que unen específicamente una molécula seleccionada del grupo consistente en un receptor de célula T, un antígeno y una molécula HLA; derivados orgánicos de oro como tiomalato sódico de oro, aurotioglucosa, o auranoftin; o un inhibidor angiogénico.
15. Una forma de dosificación unitaria oral que comprende una formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 11-14.

30

35

40

45

50

55

60

65