



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 293 965**

⑮ Int. Cl.:

**A61K 31/00** (2006.01)

**A61K 31/277** (2006.01)

**A61K 31/44** (2006.01)

**A61K 31/519** (2006.01)

**A61K 31/502** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61P 15/08** (2006.01)

⑫

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **01274987 .5**

⑯ Fecha de presentación : **14.12.2001**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1463493**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **06.10.2004**

⑭ Título: **Método de inducir la ovulación utilizando un modulador no polipeptídico de los niveles de cAMP.**

⑬ Titular/es: **Laboratoires Serono S.A.  
Centre Industriel  
1267 Coinsins, Vaud, CH**

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.04.2008**

⑭ Inventor/es: **Palmer, Stephen;  
Tepper, Mark;  
McKenna, Sean;  
MacNamee, Michael, C. y  
Eshkol, Aliza**

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2008**

⑭ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

## DESCRIPCIÓN

Método de inducir la ovulación utilizando un modulador no polipeptídico de los niveles de cAMP.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la potenciación de la fertilidad en un huésped femenino induciendo la ovulación con la administración de un modulador no polipeptídico de los niveles de cAMP, que es el inhibidor de fosfodiesterasa ácido cis-4-ciano-4-(3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifénil)ciclohexano-1-carboxílico.

10 **Antecedentes de la invención**

La ovulación es el procedimiento por el que un óvulo o varios óvulos son liberados desde los ovarios. El momento de la ovulación dentro del ciclo menstrual tiene una gran importancia para la fertilización. Es bien conocido que los folículos adquieren la capacidad de ovular después del crecimiento y la maduración estimulados por las gonadotropinas pituitarias. La hormona estimulante del folículo (FSH) es predominantemente responsable del crecimiento folicular y la luteína (LH) estimula la ovulación. Este procedimiento coordinado de la maduración estimulada por gonadotropina del folículo asegura la liberación de los óvulos competentes en la ovulación. El óvulo adecuadamente preparado está entonces disponible para la fertilización por el esperma a las horas después de la ovulación.

25 La ovulación es un procedimiento estrictamente temporizado que es controlado por la estimulación de gonadotropinas pituitarias del ovario y que es modificada por el crecimiento y la respuesta bioquímica (por ejemplo, secreción de la inhibina, esteroidogénesis, etc.) de los folículos frente a la estimulación de la gonadotropina. Durante el ciclo menstrual normal en las mujeres estas hormonas exhiben modelos cíclicos. El ciclo menstrual puede ser dividido funcionalmente en tres fases; la fase folicular, ovulatoria y luteína. El período folicular comienza al final de la fase luteína del ciclo no conceptivo precedente, antes o coincidente con el inicio de la menstruación. El ciclo comienza con una subida transitoria de los niveles de FSH en sangre que estimula el desarrollo de una cohorte de folículos ováricos. El tamaño de los folículos reclutados que crecen es de aproximadamente 5 mm de diámetro. En un ciclo menstrual natural, por lo general, un folículo grande o dominante es establecido durante la fase folicular, y es comprometido desde el crecimiento a la maduración. En los seres humanos, el tamaño del folículo que es considerado listo para ovular es de aproximadamente 15 mm o más de diámetro.

35 El segundo acontecimiento crítico que ocurre en el ovario durante la fase folicular es que las células de la granulosa dentro de los folículos ováricos adquieren receptores para LH y se hacen cada vez más sensibles a la LH. La secreción de estradiol y estrona desde el ovario aumenta despacio al principio, en paralelo al diámetro creciente del folículo y la sensibilidad del folículo frente a la LH. Los niveles relativamente crecientes de estrógeno e inhibina causan la inhibición de la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) desde el hipotálamo y la secreción de la gonadotropina desde la glándula pituitaria. La producción de estrógenos alcanza un máximo el día antes del 40 pico de LH y la respuesta neuroendocrina al aumento de estrógenos y las concentraciones gradualmente crecientes de progesterona es la liberación preovulatoria de las gonadotropinas, como se discute más abajo.

50 Durante la fase ovulatoria hay un cambio de la respuesta neuroendocrina frente a los estrógenos y a la progesterona. En este momento en el ciclo, el aumento de estrógenos produce un pico de subida preovulatorio en los niveles de LH y FSH en suero, debido a una regeneración positiva en el hipotálamo, estimulando ahora los estrógenos un pico de subida en los niveles de GnRH y posteriormente la liberación de FSH y LH de la glándula pituitaria. Este pico de subida de gonadotropinas induce la terminación de la maduración folicular y causa la ruptura del folículo dominante o de Graaf y la descarga del óvulo aproximadamente de 16 a 24 horas después del pico de LH. Durante el período después del pico de subida preovulatorio, los niveles de estradiol en suero disminuyen temporalmente y los niveles de progesterona en plasma comienzan a elevarse.

55 Despues de la ovulación, las células del folículo ovárico post-ovulatorio bajo la influencia de LH son luteinizadas para formar un cuerpo lúteo - la fase luteína. Los marcadores diagnósticos de la fase luteína del ciclo menstrual son el aumento marcado de la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo, y la transformación uterina que ocurre en respuesta a la progesterona. Asociado con la producción de progesterona luteína, hay un aumento menos pronunciado de los niveles de estrógeno en suero. Cuando la progesterona y los estrógenos aumentan, la LH y FSH disminuyen en la mayor parte de la fase luteína. Hacia el final de la fase luteína, en un ciclo menstrual no conceptivo, el cuerpo lúteo retrocede y los niveles de FSH en suero comienzan a elevarse para iniciar el crecimiento folicular para el siguiente ciclo.

60 La FSH y la LH son distinguibles entre sí por su capacidad de estimular el desarrollo folicular o la ovulación, respectivamente. Se sabe que ambos agentes estimulan un aumento de las concentraciones del cAMP intracelular. Se ha demostrado que los agentes que imitan al cAMP, tales como la forskolina o los análogos estables de cAMP, *in vitro*, imitan los efectos de FSH en células de la granulosa a partir de folículos inmaduros e imitan los efectos de LH en células a partir de folículos maduros. Aunque se hayan propuesto rutas intracelulares alternativas tanto para FSH como para LH, está bien aceptado que el cAMP es estimulado en respuesta a ambas gonadotropinas. Siempre y cuando las subidas de los niveles de cAMP estén asociadas con el desarrollo folicular y la maduración o la inducción de la ovulación dependa de los tipos de células y la presencia o la ausencia de los receptores respectivos. De hecho, se

ha demostrado que ratones que son deficientes en una fosfodiesterasa particular tienen perjudicada la ovulación y una menor sensibilidad de células de la granulosa frente a gonadotropinas.

Los tratamientos de infertilidad actualmente en uso clínico incorporan algunos de los acontecimientos reguladores 5 descritos anteriormente. Un agente que estimula el crecimiento folicular y que se usa para el tratamiento de anovulación es el clomifeno. El clomifeno es un antiestrógeno no esteroideo que compite con los estrógenos en sus sitios de unión. Se piensa que el clomifeno se une a los receptores de estrógenos en el hipotálamo y la glándula pituitaria y bloquea la regeneración negativa ejercida por los estrógenos ováricos. El resultado es el aumento de la salida de 10 gonadotropinas (FSH y LH) durante la parte inicial de la fase folicular. El efecto del clomifeno es aumentar los niveles en suero de FSH endógeno y mejorar el crecimiento y la maduración de los folículos. Posteriormente, la LH endógena o LH/CG exógena inducen a la ovulación en estos pacientes.

El documento WO 01/47905 describe derivados de pirrolidina que son inhibidores de fosfodiesterasa 4 para el 15 tratamiento de, entre otras cosas, la infertilidad tanto en mujeres como en hombres. Zussman *et al.*, *Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 41, Nº. 9, 2001, páginas 950-958 describe el inhibidor de fosfodiesterasa 4 Cilomilast.

Además del clomifeno, se han tratado mujeres con regímenes de inducción de ovulación que incluyen preparativos 20 comerciales de las gonadotropinas humanas, incluyendo la hormona estimulante del folículo (FSH) y la lutropina (la LH) o la coriogonadotropina (CG), todas las cuales fueron obtenidas primero por la purificación de orina de mujeres embarazadas y más recientemente mediante tecnología recombinante. En general, este tratamiento es sumamente 25 eficaz en la estimulación de la foliculogénesis y la génesis de esteroides. Las complicaciones de este tratamiento son el resultado del hecho de que estos preparativos y regímenes pueden sobreestimular el desarrollo folicular y la maduración de folículos. En un subconjunto de pacientes, el ovario puede volverse hiperestimulado, lo que puede causar ovulaciones múltiples y, por consiguiente, nacimientos múltiples. No sólo puede la ser hiperestimulación ovárica una 30 amenaza para la vida de la madre, si no que también da lugar típicamente a recién nacidos con un peso de nacimiento inferior, que posteriormente requieren cuidados intensivos. Se cree que las complicaciones principales atribuidas a la hiperestimulación inducida por gonadotropina y los embarazos múltiples probablemente son el resultado de los efectos prolongados de hCG. Además, el uso de gonadotropinas en regímenes de inducción de ovulación puede causar reacciones 35 del sitio de inyección, tanto locales como sistémicas. Por consiguiente, el desarrollo de regímenes de inducción de ovulación usando agentes oralmente activos con una actividad del tipo gonadotropina más suave, a diferencia de las terapias que usan inyectables potentes, sería una ventaja sustancial. Lo que es más importante, sería una ventaja significativa si los regímenes de inducción de la ovulación pudieran ser desarrollados causando una menor hiperestimulación ovárica y, por consiguiente, presentando menos peligros para la madre y dando lugar a recién nacidos más sanos.

### 35 **Sumario de la invención**

En un primer aspecto, la invención proporciona un uso del inhibidor de PDE4 (ácido cis-4-ciano-4-(3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico para la fabricación de un medicamento para la inducción de la ovulación 40 en un paciente.

En otro aspecto, la invención proporciona un uso del inhibidor de PDE4 (ácido cis-4-ciano-4-(3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico para la fabricación de un medicamento para la inducción de la ovulación en un paciente, en un régimen por el que se induce la maduración folicular con clomifeno o un inhibidor de aromatasa, 45 seleccionado a partir de YM-511, letrozol, fadrozol y anastrozol, más preferiblemente, seleccionado a partir de letrozol y anastrozol, antes de la inducción de la ovulación.

En otro aspecto, la invención proporciona un uso del inhibidor de PDE4 como se define en las reivindicaciones.

### 50 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende el inhibidor de fosfodiesterasa ácido 55 cis-4-ciano-4-(3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico en la preparación de un medicamento para mejorar la fertilidad en un huésped femenino. En otro aspecto, la invención proporciona el uso de dicha composición para la preparación de un medicamento para inducir la ovulación del folículo maduro dominante antes de la fase luteínica de un ciclo ovulatorio.

Aunque los efectos de los inhibidores de PDE en la génesis de esteroides estimulada por LH a partir de células de la granulosa, *in vitro*, hayan sido publicados, la presente invención describe dos conclusiones nuevas. Primero, los 60 inhibidores de PDE fallan en realzar el crecimiento folicular estimulado por FSH *in vivo*, a pesar del papel aceptado de cAMP tanto en las rutas celulares de FSH como de LH. Además, son presentadas pruebas de que los inhibidores de PDE realmente realzaron la génesis de esteroides estimulada por gonadotropina *in vitro*, lo que además ejemplifica la nueva actividad del inhibidor de PDE en la ovulación dependiente de LH. Segundo, los inhibidores de PDE aumentaron la tasa de ovulación, *in vivo*, en ausencia de LH añadida o hCG. Considerando la actividad oral de los inhibidores de 65 PDE, este segundo hallazgo proporciona la base para el primer régimen potencial sin inyección para la inducción de la ovulación, ya que los inhibidores de PDE pueden ser usados junto con los regímenes existentes como se describe más abajo.

También se describe en este documento la estimulación del desarrollo folicular antes de la administración de un modulador del nivel de cAMP no polipeptídico que comprende la administración de un agente que aumenta las concentraciones de FSH durante la fase folicular del ciclo ovulatorio del huésped. El objetivo en el aumento de FSH se refiere únicamente al desarrollo folicular y a la maduración y no a la inducción de la ovulación. Los agentes preferidos 5 incluyen la FSH, por sí misma, el clomifeno, los moduladores del receptor de estrógeno selectivos, los inhibidores de aromatasa y los moduladores selectivos de la regulación neuroendocrina de la producción de FSH.

En todavía otro aspecto más, la invención proporciona el uso de dicho primer aspecto, en el que la composición además comprende LH o coriogonadotropina (CG) para su administración antes de la fase luteína del ciclo ovulatorio 10 en el huésped femenino. Además, la invención proporciona el uso de concentraciones inferiores de LH o CG para su administración al huésped que las concentraciones que son usadas en los regímenes de inducción de ovulación actuales y con ello reduciéndose la probabilidad de la hiperestimulación ovárica.

Además, la presente invención proporciona el uso del inhibidor de fosfodiesterasa ácido cis-4-ciano-4-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico para la fabricación de un medicamento, en el que el medicamento es 15 para la administración en un método para recolectar ovocitos para la fertilización *in vitro*.

Así, la invención proporciona el uso de dicho primer aspecto para la administración oral más bien que por inyección, la ruta requerida de administración para proteínas y el modo de administración en los regímenes de inducción de 20 ovulación actuales. La administración oral evita los efectos secundarios agudos y sistémicos asociados con tales inyecciones. Principalmente, el uso de dicho primer aspecto es para inducir ovulaciones y puede ser para la administración sola o con o sin LH o CG y, de forma alternativa, a las concentraciones inferiores de LH o CG que actualmente son usadas, y así, disminuyéndose la aparición de la hiperestimulación ovárica y sus riesgos asociados. Por consiguiente, 25 pueden ser evitados nacimientos múltiples y complicaciones que amenacen la vida para la madre y recién nacidos. Además, la presente invención es útil para la oportunidad de un examen diagnóstico complementario más precoz para el embarazo que los regímenes de inducción de ovulación actuales que implican el uso de CG.

Los usos de la invención como se define en las reivindicaciones serán útiles para el tratamiento de infertilidad en seres humanos, pero también en otros mamíferos (tales como caballos y ganadería, por ejemplo ganado, oveja, vacas 30 y similares) y otras especies tales como piscícolas (es decir, peces) y aviares (es decir, aves).

#### **Breve descripción de los dibujos**

• La figura 1 es una representación esquemática de un régimen de inducción de ovulación generalizado en seres 35 humanos.

• La figura 2 es una representación en un diagrama de barras del efecto de inhibidores de fosfodiesterasa *in vitro* (es decir, el Compuesto 1 y el Compuesto 2 (referencia)) al aumentar los niveles de cAMP intracelular en células de la granulosa.

• La figura 3 es una representación en un diagrama de barras del efecto de un inhibidor de fosfodiesterasa (es decir, el Compuesto 1) en la maduración del folículo en ratas, *in vivo*.

• La figura 4 es una representación en un diagrama de barras del efecto de un inhibidor de fosfodiesterasa (es decir, el Compuesto 1) en la ovulación con CG en ratas, *in vivo*.

• La figura 5 es una representación en un diagrama de barras del efecto de un inhibidor de fosfodiesterasa (es decir, el Compuesto 1) en la ovulación con y sin CG en ratas, *in vivo*.

• La figura 6 es una representación en un diagrama de barras del efecto de un inhibidor de fosfodiesterasa (es decir, el Compuesto 2 (referencia)) en la ovulación con y sin CG en ratas, *in vivo*.

• La figura 7 es una representación en un diagrama de barras del efecto de un inhibidor de fosfodiesterasa (es decir, el Compuesto 2 (referencia)) en la ovulación después de la administración oral y subcutánea.

• La figura 8 es una representación en un diagrama de barras del efecto del inhibidor de PDE Compuesto 3 (referencia) en la ovulación *in vivo* después de la administración oral y subcutánea.

• La figura 9 es una representación en un diagrama de barras del efecto del inhibidor de PDE Compuesto 4 (referencia) en la ovulación en presencia o ausencia de una dosis subeficaz de hCG *in vivo*.

• La figura 10 es una representación en un diagrama de barras del efecto del inhibidor de PDE Compuesto 2 (referencia) en la ovulación y la fertilidad.

#### **65 I. Definiciones**

En general, los términos o expresiones siguientes tienen la definición indicada cuando se usan en la descripción, ejemplos y reivindicaciones.

# ES 2 293 965 T3

La “administración” se refiere al suministro de un agente terapéutico en un huésped femenino. En el contexto de la presente invención, ésta incluiría la liberación de un modulador del nivel de cAMP no polipeptídico y/o un agente que aumente las concentraciones de FSH. Este término se describe más ampliamente abajo en la sección titulada “Composiciones farmacéuticas” contenida en este documento.

5 La “ovulación”, para los objetivos de esta invención, se refiere al procedimiento en el que un óvulo o varios óvulos son liberados desde los ovarios. Cuando se aproxima la mitad del ciclo, hay una subida drástica de los estrógenos, seguido de un pico de subida de LH y, a un grado menor, de FSH. Esto provoca que el folículo dominante ovule. La ovulación consiste en un agrandamiento folicular rápido seguido de la salida del folículo de la superficie desde 10 la corteza ovárica. En última instancia, la ruptura del folículo causa la extrusión de un complejo ovocito-cúmulo. El remanente del folículo dominante entonces se reorganiza para volverse el cuerpo lúteo.

La “anovulación” se refiere a una falta de ovulación.

15 Un “modulador del nivel de cAMP no polipeptídico” se refiere a compuestos que no están compuestos de aminoácidos en su totalidad, independientemente de la glicosilación, y que actúan, directamente o indirectamente, para aumentar los niveles intracelulares de cAMP. Tales compuestos pueden aumentar los niveles de cAMP estimulando la síntesis de cAMP o inhibiendo su degradación, o ambos. Los ejemplos de moduladores que aumentan la síntesis de 20 cAMP incluyen los activadores de adenil-ciclasa, tal como la forskolina. Los ejemplos de moduladores que disminuyen la degradación de cAMP incluyen los inhibidores de fosfodiesterasas, tal como la teofilina.

Un “huésped femenino” significa un individuo de género femenino de una especie a la cual los agentes son administrados conforme a la presente invención. Seres humanos diferentes de mamíferos y otras especies tales como peces y aves son incluidas por definición en este documento.

25 Un “inhibidor de fosfodiesterasa” se refiere a compuestos químicos que bloquean o inhiben a las fosfodiesterasas (PDE) cuya acción es inactivar sus dianas de nucleótidos cílicos (es decir, el cAMP y el cGMP) por división hidrolítica del enlace 3'-fosfodiéster, causando una acumulación pasiva de nucleótidos cílicos específicos. Los inhibidores pueden ser no selectivos para todas las isoformas de fosfodiesterasa o selectivos para las isoformas específicas. Véanse 30 los compuestos citados en este documento.

35 Las “isoformas de fosfodiesterasa” se refieren a una familia de isozimas o isoformas responsables del metabolismo o la degradación de los segundos mensajeros intracelulares, cAMP y cGMP. Las isoformas específicas pueden tener localizaciones celulares y subcelulares altamente selectivas. Los ejemplos de las isoformas de fosfodiesterasa incluyen PDE3 y PDE4.

La “fase folicular” se refiere a la primera parte del ciclo menstrual y es caracterizada por un aumento progresivo de los niveles circulantes de estradiol e inhibina B por el desarrollo del folículo de Graaf.

40 “Antes de la fase luteínica” se refiere al período del ciclo menstrual antes del cambio desde la fase folicular dominada por los estrógenos a la fase luteínica dominada por la progesterona. Antes de la fase luteínica, los niveles de estrógeno son generalmente mayores o iguales a 150 pg/ml/folículo para un folículo de 16 mm de diámetro y el tamaño 45 del folículo no es generalmente menor de 14 mm de diámetro. Estos criterios no son absolutos y variarán de paciente a paciente. En el contexto de la presente invención y en los términos del momento de administración del modulador del nivel de cAMP no polipeptídico, el modulador del nivel de cAMP no polipeptídico puede ser administrado a un huésped femenino en el punto de tiempo de un régimen de inducción de la ovulación existente en el que hCG o LH normalmente son administrados a dicho huésped.

50 El “ciclo ovulatorio” o “ciclo menstrual” se refiere a una serie de acontecimientos cílicos durante un período de tiempo específico de cada especie que incluye el crecimiento folicular y el desarrollo, el reclutamiento, la selección, el predominio, la ovulación, y la formación del cuerpo lúteo y su muerte. Funcionalmente, el ciclo puede ser dividido en tres fases, la fase folicular, ovulatoria y luteínica. Este ciclo también puede referirse al ciclo menstrual.

55 La “inducción de la ovulación” se refiere al proceso en el que un(varios) polipéptido(s) y/o sustancia química sintética es usada para causar la ovulación en huéspedes femeninas que, sino serían anovulatorias, causando la inducción de la ruptura folicular y la ovulación de ovocitos fertilizables. La inducción de la ovulación no incluye los acontecimientos precedentes a tiempo durante el ciclo ovulatorio de maduración folicular y desarrollo.

60 La “hiperestimulación ovárica” se refiere a la intervención farmacológica de un ciclo menstrual ovulatorio o anovulatorio. Esto implica la maduración de múltiples folículos que causan codominancia de numerosos folículos y la disponibilidad de múltiples ovocitos fertilizables.

65 El “folículo” se refiere al saco lleno de fluido que rodea el óvulo, conteniendo el saco también células de la granulosa.

El “desarrollo folicular” se refiere al crecimiento progresivo y al desarrollo de folículos ováricos, particularmente durante la fase folicular del ciclo ovulatorio y que conducen al reclutamiento y al predominio de un folículo destinado a ovular.

La “hormona estimulante del folículo (FSH) e isoformas” se refiere a una hormona liberada por la glándula pituitaria que estimula el crecimiento de folículos ováricos e isoformas de FSH como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N°. 5.087.615.

5 Los “moduladores del receptor de estrógeno selectivos” se refieren a compuestos químicos o polipéptidos que actúan como un antagonista del receptor de estrógeno a nivel del hipotálamo y la glándula pituitaria, y como un agonista a nivel del útero. Los ejemplos de tales moduladores pueden incluir tamoxifen, raloxifen, toremifen, clomifeno y droloxifen. Referencia, *Endocrinology*, diciembre de 1999: **138** (12): 5476-5484.

10 Los “inhibidores de aromatasa” se refieren a compuestos químicos o polipéptidos que bloquean o inhiben la actividad de aromatasa que es una enzima que convierte los andrógenos en estrógenos. Los ejemplos de inhibidores de aromatasa incluyen letrozol, anastrozol y vorozol. Referencias, 1) *Journal of Endocrinology*, febrero de 2000: **164** (2): 225-238; y 2) *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, abril de 1997: **61** (3-6): 157-166.

15 Las “enzimas relacionadas con la génesis de esteroides” se refieren a cualquier enzima que está implicada con la catálisis de reacciones bioquímicas que conducen a la síntesis de estrógenos y progesterona incluyendo la 3-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa y los inhibidores de esta enzima incluyen daidzein, genistein, biochanin A y formononetin. Referencia, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, abril de 1996: **58** (1): 95-101.

20 “Clomifeno” se refiere a 2-[4-(2-cloro-1,2-difeniletenil)fenoxi]-N,N-dietiletanamina y sus sales.

La “hormona lutenizante” se refiere a una hormona liberada por la glándula pituitaria que tiene el objetivo dual de hacer que un folículo dominante libere su huevo y estimular el cuerpo lúteo para secretar la progesterona.

25 “Concentraciones reducidas” se refieren a concentraciones inferiores de un agente administrado cuando se compara con niveles estándar de agentes administrados. En el contexto de la presente invención, las concentraciones inferiores de LH o CG son administradas de modo que son administradas en los regímenes de inducción de ovulación existentes.

30 “Regímenes de inducción de ovulación existentes” se refieren a métodos actuales para inducir la ovulación incluyendo el uso de clomifeno, gonadotropinas (es decir, FSH, LH y CG) o una combinación de estos agentes para promover la foliculogénesis y la ovulación inducida en hembras anovulatorias. Los regímenes varían en términos del momento, la frecuencia y la concentración de los agentes administrados. Esta definición incluye las modificaciones de los regímenes actuales que todavía requieren la administración de hCG o LH en un punto de algún momento durante el régimen de inducción de la ovulación. Los tratados siguientes son sobre infertilidad femenina, inducción de la ovulación y foliculogénesis estimulada. “Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology”, Volúmenes 1 y 2; Editores: E. Y. Adashi, J. A. Rock y Z. Rosenwaks; Ediciones Lippincott-Raven, Filadelfia, 1996 y “Female Infertility Therapy Current Practice”; Editores: Z. Shoham, C. M. Howles y H. S. Jacobs; Martin Dunitz Ltd, Londres, 1999.

40 La “coriogonadotropina” se refiere a una hormona glicoproteica que es biológicamente e inmunológicamente similar a la LH de la glándula pituitaria. En el embarazo normal, la CG es producida por la placenta y puede ser usada como un marcador diagnóstico del embarazo por los elevados niveles en la concentración en suero. Las siglas hCG se refieren a la coriogonadotropina humana.

45 Un “agente que aumenta las concentraciones de FSH” se refiere a cualquier composición de materia, proteína o sustancia química sintética, que cuando se administra a un huésped femenino aumenta las concentraciones del nivel en suero de FSH, directamente o indirectamente, administrando FSH en sí mismo, o un agente que estimula su producción endógena o inhibe su degradación endógena. La definición de esta expresión y agente incluye los compuestos que no pueden aumentar las concentraciones de FSH, pero que tienen la función biológica y la actividad hormonal estimulante del folículo.

## II Principios de inducción de la ovulación

55 Los problemas con los niveles de gonadotropina inadecuados o inapropiados han sido reconocidos como causas de la disfunción ovulatoria desde los años 60. La eficacia clínica de varios preparativos de gonadotropina usados era proporcional a la cantidad de la FSH administrada. Las pruebas iniciales sugirieron que no se requiera la LH exógena para una foliculogénesis adecuada durante la inducción de la ovulación. Se hizo evidente, sin embargo, que las mujeres a las que sólo se les había proporcionado FSH exógena fallaban en producir el estradiol folicular adecuado para la inducción de la ovulación. La presencia de al menos alguna cantidad de LH exógena o endógena para la inducción de la ovulación en seres humanos parece ser importante. La figura 1 ilustra una representación esquemática de un régimen de inducción de ovulación generalizado. Se proporciona una preparación de FSH a 75 UI/día durante los 7 primeros días. Al final de los 7 días, es tomada una exploración por ultrasonidos para evaluar el diámetro folicular y es medido el estradiol en suero. Si el folículo es menor de 12 mm, la dosis de FSH es doblada, y una exploración subsecuente es tomada en otros 5 - 7 días. Los pacientes con folículos  $\geq 15$  mm de diámetro reciben una dosis de bolo ovulatorio de hCG.

**III. Régimen de inducción de ovulación generalizado**

La inducción de la ovulación es tanto una técnica como una ciencia. A pesar de una serie notable de protocolos de tratamiento, ningún enfoque simple o método específico es únicamente el adecuado. Ciertos principios se aplican 5 realmente, sin embargo, y proporcionan la base para un tratamiento seguro y eficaz. Sin embargo, debe ser apreciado que el grupo de criterios expuestos en adelante para inducir la ovulación se proporciona, por ejemplo, para sus objetivos sólo y puede variar considerablemente por la clínica, el paciente y el objetivo del tratamiento.

El primer ciclo por lo general implica la administración de FSH diariamente comenzando del día 4 al 7 de la 10 retirada del sangrado. El crecimiento del folículo y la respuesta son controlados tanto por los niveles de estrógeno como por ultrasonido. La estimulación del folículo adecuado es alcanzada por lo general a los 7 a 14 días desde la administración continua de FSH. El tratamiento con FSH durante menos de 8 días está asociado con mayores tasas de aborto espontáneo entre las embarazadas.

Una vez que ha sido alcanzado un desarrollo del folículo suficiente (dos folículos de 16 a 18 mm junto con una 15 subida progresiva del estrógeno en suero de 500 a 1.000 pg/mL), se administra hCG (5.000 o 10.000 UI). El momento de la administración de hCG es importante porque las complicaciones principales atribuidas a la hiperestimulación inducida por gonadotropina y los embarazos múltiples probablemente son el resultado de los efectos prolongados de la hCG. Aunque la semivida de hCG sea aproximadamente 8 horas, puede ser detectable en la sangre del paciente a 20 los 7 a 10 días después de la inyección y puede haber un diagnóstico erróneo de un embarazo de tratamiento con éxito. Después de la administración de hCG, la pareja es instruida para que tenga relaciones en esa misma noche y un par de veces más durante las 48 horas siguientes.

La regla fundamental en cuanto a la administración de gonadotropina consiste en que todos y cada uno de los ciclos 25 de tratamiento deben ser individualizados, controlados y ajustados de manera apropiada. El control es necesario no sólo para potenciar la ovulación y las tasas de embarazo, sino que también para reducir el riesgo de una hiperestimulación ovárica severa y sus potenciales consecuencias y embarazos múltiples.

Esto es logrado por las determinaciones frecuentes de los niveles de estradiol en plasma/suero y por la inspección 30 de los ovarios por ultrasonido. Los niveles de estradiol generalmente tienen correlación con el número de folículos crecientes, pero no necesariamente con el número de folículos maduros. La confianza sobre los niveles de estradiol como marcador para la madurez del folículo puede sugerir erróneamente la madurez del folículo en presencia de pequeños folículos múltiples, causando una administración prematura de hCG. Como el crecimiento folicular tiene 35 correlación directamente con la maduración del óvulo, la evaluación con ultrasonidos del diámetro folicular promedio puede ser un mejor indicador en la evaluación de la madurez y el momento de la administración de hCG. Los niveles de estrógeno deben ser usados por lo tanto para evaluar el desarrollo folicular inicial como un indicador de la respuesta de gonadotropina, y el ultrasonido debería ser usado para evaluar el número y el tamaño de los folículos que maduran.

El objetivo de la mayor parte de los tratamientos es maximizar el potencial para un embarazo de gestación única 40 reduciéndose el riesgo del síndrome de la hiperestimulación. Niveles de estradiol entre 1000 y 1500 pg/mL parecen ser los niveles óptimos, pero los reales pueden variar dependiendo del laboratorio usado y la experiencia del médico. El riesgo de la hiperestimulación aumenta con niveles de estradiol más altos. En general, cuando el estradiol en suero excede los 2000 pg/mL, la hCG debería ser administrada con gran precaución o ser retenida para 45 permitir el retroceso de los folículos. En el hipogonadismo hipogonadotrópico, el riesgo de una hiperestimulación severa para valores mayores que 2400 pg/mL es del 5% en ciclos de embarazo y del 1% en ciclos de no embarazo. Además, debido a que la hiperestimulación tiende a tener correlación con el número de folículos presentes, la decisión de retener la hCG puede estar también basada en un hallazgo por ultrasonido de 10 o más folículos que se desarrollen.

50 Los tratados siguientes son sobre la infertilidad femenina, la foliculogénesis estimulada y la inducción de la ovulación: "Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology", Volúmenes 1 y 2; Editores: E. Y. Adashi, J. A. Rock y Z. Rosenwaks; Ediciones Lippincott-Raven, Filadelfia, 1996 y "Female Infertility Therapy Current Practice"; Editores: Z. Shoham, C. M. Howles y H. S. Jacobs; Martin Dunitz Ltd, Londres, 1999.

55 Se cree que las complicaciones principales atribuidas a la hiperestimulación ovárica induida por gonadotropina y los embarazos múltiples consiguientes probablemente son el resultado de los efectos prolongados de la hCG. La invención es útil porque tiene en cuenta el uso de concentraciones inferiores de LH o CG administradas a un huésped, que las concentraciones que son usadas en regímenes de inducción de ovulación existentes y reduciéndose, 60 por lo tanto, la probabilidad de hiperestimulación ovárica, y por consiguiente evitando los efectos adversos asociados con aquella condición: nacimientos múltiples, recién nacidos de peso bajo y complicaciones de la salud para la madre.

Debe ser apreciado que la administración de moduladores del nivel de cAMP no polipeptídico no tiene ningún 65 efecto terapéutico sobre la maduración folicular y el desarrollo durante el ciclo ovulatorio.

Así, la presente invención se refiere al uso de dicho primer aspecto. Los moduladores del nivel de cAMP no polipeptídico actúan, directamente o indirectamente, para aumentar los niveles intracelulares de cAMP. Tales com-

5 puestos pueden aumentar los niveles de cAMP estimulando la síntesis de cAMP o inhibiendo su degradación, o ambos. Los ejemplos de los moduladores que aumentan la síntesis de cAMP incluyen los activadores de adenil-ciclase, tal como la forskolina. Los ejemplos de los moduladores que disminuyen la degradación de cAMP incluyen los inhibidores de fosfodiesterasas, tal como teofilina. Los moduladores del nivel de cAMP no polipeptídico incluyen inhibidores de fosfodiesterasa, particularmente los inhibidores de las isoformas de fosfodiesterasa 4.

10 La invención también es útil porque permite la estimulación del desarrollo folicular antes de la administración del modulador del nivel de cAMP no polipeptídico como se define en las reivindicaciones para inducir a la ovulación que comprende la administración de un agente que aumenta las concentraciones de la hormona de estimulación folicular (FSH) durante la fase folicular del ciclo ovulatorio del huésped. Dichos agentes son definidos en las reivindicaciones. Así, la administración de los agentes descritos en este documento en un momento prescrito en relación con el crecimiento y la maduración del folículo es reivindicada para mejorar el procedimiento de ovulación y la fertilización 15 subsecuente que debe ocurrir si la concepción se da.

15 20 Debe ser apreciado que cuando el modulador del nivel de cAMP no polipeptídico, como se define en las reivindicaciones, es administrado solo y no co-administrado con hCG, la presente invención proporciona la oportunidad de un examen diagnóstico complementario más precoz para el embarazo que los regímenes de inducción de ovulación actuales que implican el uso de CG.

25 *V. Inhibidor de fosfodiesterasa*

20 Los inhibidores de fosfodiesterasa usados en la invención son Ariflo® (SmithKline Beecham), Cilomilast (SmithKline Beecham).

25 En una realización, la invención proporciona el uso de dicho primer aspecto, para provocar la ovulación después de que se haya inducido el crecimiento folicular y la maduración con FSH, letrozol (Novartis), anastrozol (AstraZeneca) o fadrozol (Novartis). En un régimen para tecnologías de reproducción asistida (TRA), en el que se desea obtener 30 múltiples ovocitos para la fertilización *in vitro*, a los pacientes se les administra un inhibidor de aromatasa (por ejemplo 2,5-5 mg/día de letrozol, o anastrozol) desde o aproximadamente el día 3 a o aproximadamente el día 7, o desde o 35 aproximadamente el día 3, o a aproximadamente el día 8 del ciclo menstrual, junto con 50-225, preferible 50-150 UI FSH/día, comenzando desde o aproximadamente el día 3 hasta el día 7 del ciclo menstrual, siguiendo con la FSH hasta que haya al menos dos folículos principales que tengan un diámetro promedio mayor o igual a aproximadamente 16 mm. En este punto, el inhibidor de PDE como se define en las reivindicaciones se administra en una dosis suficiente para provocar la ovulación.

40 De forma alternativa, el inhibidor de aromatasa puede ser usado como el único agente estimulante del crecimiento del folículo (es decir, en ausencia de FSH), usando una dosis más alta de inhibidor de aromatasa (por ejemplo 2-10 mg/día de letrozol o anastrozol) y/o prolongando la administración (por ejemplo los días de 3 a 8, de 3 a 9, o de 3 a 10). Cuando la maduración folicular es juzgada suficiente por sonografía, se proporciona una dosis que provoca 45 la ovulación de inhibidor de PDE como se define en las reivindicaciones. Este régimen permite la recolección de múltiples ovocitos, evitando inyecciones, ya que todos los agentes usados están disponibles para la administración oral.

50 55 En la inducción de la ovulación, es deseable causar la liberación de sólo un óvulo. Esto puede ser logrado, de acuerdo con la invención, usando FSH para estimular el crecimiento folicular y la maduración, seguido de la administración del inhibidor de PDE definido en las reivindicaciones para provocar la ovulación. También en la amplitud de la invención están los regímenes de inducción de ovulación en los cuales se induce el crecimiento folicular y la maduración con un substituto de FSH, por ejemplo, un inhibidor de aromatasa, como se define en las reivindicaciones.

En un régimen preferido para la inducción de la ovulación, se le administra a un paciente una dosis de inhibidor de aromatasa (por ejemplo 2,5-5 mg/día de letrozol o anastrozol) desde o aproximadamente el día 3 a aproximadamente el día 7, o desde o aproximadamente el día 5 a aproximadamente el día 9 del ciclo menstrual (en ausencia de FSH). De forma alternativa, se puede dar una dosis sola de inhibidor de aromatasa (por ejemplo 5-30 mg de letrozol o anastrozol, preferiblemente 10 ó 20 mg), el o aproximadamente el día 3 o el día 4 del ciclo menstrual. La ovulación es provocada con una dosis que provoca la ovulación del inhibidor de PDE como se define en las reivindicaciones. Este régimen proporciona un protocolo de inducción de la ovulación que no requiere ninguna inyección.

60 *VI. Composiciones farmacéuticas*

65 El modulador de los niveles de cAMP no polipeptídico como se define en las reivindicaciones y los agentes que aumentan las concentraciones de FSH en un huésped femenino como se define en las reivindicaciones (también denominado en este documento como "compuestos activos") de la invención, puede ser incorporado en composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración. Tales composiciones comprenden típicamente los compuestos activos y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en este documento, el "vehículo farmacéuticamente aceptable" es requerido para incluir cualquier y todos los disolventes, el medio de dispersión, revestimientos, agente antibacteriano y agentes antimicóticos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, compatibles con la

- administración farmacéutica. Los vehículos adecuados son descritos en la edición más reciente del "Remington's Pharmaceutical Sciences", un texto de referencia estándar en el campo. Los ejemplos preferidos de tales vehículos o diluyentes incluyen agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa, y albúmina de suero humano del 5%. Los liposomas y los vehículos no acuosos tales como aceites fijos también pueden ser usados.
- 5 El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio convencional o agente sean incompatibles con el compuesto activo, su uso en las composiciones es contemplado. También pueden ser incorporados compuestos activos suplementarios en las composiciones.
- 10 Una composición farmacéutica de la invención es formulada para que sea compatible con su ruta pretendida de administración. Los ejemplos de las rutas de administración incluyen la administración parenteral, (por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea), oral, inhalación, transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir los componentes siguientes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparaben; anti-oxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetracético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ser ajustado con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede ser incluida en ampollas, jeringuillas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.
- 15 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o su dispersión. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina de fosfato tamponada (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluido al grado de que exista una fácil aplicación con jeringuilla. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenaje y debe ser conservada contra la acción de la contaminación de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido y similares) y sus mezclas adecuadas. La fluidez apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, por el uso de un revestimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de una dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ser alcanzada mediante varios agentes antibacterianos y agentes antimicóticos, por ejemplo, paraben, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal. En muchos casos, será preferible incluir a agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser causada por la inclusión en la composición de un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.
- 20 Pueden ser preparadas soluciones inyectables incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con una o una combinación de ingredientes enumerada anteriormente, como se requiera, seguido de la esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y liofilización que proporciona un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado desde su solución previamente esterilizada-filtrada.
- 25 Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Pueden ser incluidas en cápsulas de gelatina o pueden ser comprimidas en comprimidos. Para el objetivo de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede ser incorporado con excipientes y ser usado en forma de comprimidos, pastillas o cápsulas. Las composiciones orales también pueden ser preparadas usando un vehículo fluido para su uso como un enjuague bucal, en el que el compuesto en el vehículo fluido es aplicado oralmente y enjuagado y expectorado o tragado. Agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes pueden ser incluidos como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas pueden contener cualquiera de los ingredientes siguientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglomerante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente de desintegración tal como ácido algínico, primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como hierbabuena, salicilato de metilo o condimento de naranja.
- 30 35 40 45 Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Pueden ser incluidas en cápsulas de gelatina o pueden ser comprimidas en comprimidos. Para el objetivo de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede ser incorporado con excipientes y ser usado en forma de comprimidos, pastillas o cápsulas. Las composiciones orales también pueden ser preparadas usando un vehículo fluido para su uso como un enjuague bucal, en el que el compuesto en el vehículo fluido es aplicado oralmente y enjuagado y expectorado o tragado. Agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes pueden ser incluidos como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas pueden contener cualquiera de los ingredientes siguientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglomerante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente de desintegración tal como ácido algínico, primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como hierbabuena, salicilato de metilo o condimento de naranja.
- 50 55 60 65 La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, son usados en la formulación penetrantes apropiados a la barrera que se impregna. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales de bilis, y derivados de ácidos fusídicos. La administración transmucosa puede ser

lograda por el uso de pulverizaciones nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos son formulados en ungüentos, bálsamos, geles o cremas tales como las generalmente conocidas en la técnica.

5 La ruta preferida de administración para el modulador del nivel de cAMP no polipeptídico como se define en las reivindicaciones así como para clomifeno, los moduladores del receptor de estrógeno selectivos, los inhibidores de aromatasa y los inhibidores de enzimas esteroidogénicas, como se define en las reivindicaciones, es mediante la administración oral. Estos compuestos activos también pueden ser administrados subcutáneamente por inyección, 10 intravenosamente o vía vaginal (para la administración local). La ruta preferida de administración de FSH, LH o hCG es por inyección subcutánea, pero también podría ser administrada intravenosamente.

Los compuestos también pueden ser preparados en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de suppositorio convencionales tales como mantequilla de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para el suministro rectal o vaginal.

15 Los compuestos activos pueden ser preparados con vehículos que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden ser usados polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilenivinilo, 20 polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también pueden ser obtenidos comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc.

25 Los compuestos de la invención pueden ser empleados, solos o en combinación con uno o varios otros agentes terapéuticos como se discute anteriormente, como una composición farmacéutica en mezcla con el excipiente convencional, es decir, sustancias vehículo farmacéuticamente aceptables orgánicas o inorgánicas adecuadas para la aplicación oral, parenteral, enteral o tópica que no reaccionan deletéreamente con los compuestos activos y no son deletéreas para su receptor. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, soluciones salinas, 30 alcohol, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido sílico, parafina viscosa, aceite de perfume, monoglicéridos de ácidos grasos y diglicéridos, ésteres de ácidos grasos de petroetral, hidroximetil-celulosa, polivinilpirrolidona, etc. Los preparativos farmacéuticos pueden ser esterilizados y, de ser deseado, ser mezclados con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, condimentos y/o sustancias aromáticas que no reaccionen deletéreamente con los compuestos activos.

35 Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en una forma de dosificación unitaria para su facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria como se usa en este documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se trata; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de un compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas 40 de dosificación unitaria de la invención es dictada y es directamente dependiente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que se logre, y las limitaciones inherentes en la técnica para componer tal compuesto activo para el tratamiento de individuos.

45 Será apreciado que las cantidades reales preferidas de compuestos activos usados en una terapia dada variarán de acuerdo con el compuesto específico que se utilice, las composiciones particulares formuladas, el modo de aplicación, el sitio particular de administración, etc. Las tasas de administración óptimas para un protocolo dado de administración pueden ser averiguadas fácilmente por los expertos en la técnica usando los análisis de la determinación de la dosificación convencional llevados a cabo con respeto a las directrices precedentes. Véase también el "Remington's Pharmaceutical Sciences". En general, una dosis eficaz adecuada de uno o varios compuestos de la 50 invención, particularmente usando el(es) compuesto(s) más potente(s) de la invención, estará en el intervalo de 0,01 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal del paciente por día, preferiblemente en el intervalo de 0,01 a 20 miligramos por kilogramo de peso corporal del paciente por día, más preferiblemente en el intervalo de 0,05 a 4 miligramos por kilogramo de peso corporal del paciente por día. La dosis deseada es administrada adecuadamente una vez diariamente, o varias subdosis, por ejemplo de 2 a 4 subdosis, son administradas en intervalos apropiados 55 durante el día, u otro programa apropiado. Tales subdosis pueden ser administradas como formas de dosificación unitarias, por ejemplo, que contienen de 0,05 a 10 miligramos del(de los) compuesto(s) de la invención, por dosificación unitaria.

60 Las composiciones farmacéuticas pueden ser incluidas en un recipiente, paquete o dispensador junto con las instrucciones para la administración.

Los ejemplos siguientes son ilustrativos de la invención y/o comparativos.

## VII. Ejemplificación

65 Un modelo de ovulación *in vivo* fue desarrollado en el que la FSH fue administrada a ratas inmaduras dos veces al día x 2 ó 3 días para inducir la maduración folicular, seguido de una dosis ovulatoria sola de hCG. Una inyección sola de moduladores del nivel de cAMP no polipeptídico (por ejemplo, Compuesto 1, Compuesto 2, etc.) co-administrada

# ES 2 293 965 T3

con una dosis subovulatoria de hCG o inyectada sola causó una inducción de la ovulación. Estos resultados son compatibles con un modelo en el cual el aumento de los niveles de cAMP realzan o sustituyen la hCG, pero no la FSH. El papel de FISH en cualquier régimen de inducción de ovulación es para promover el desarrollo folicular y la maduración, no la inducción de la ovulación.

- 5 Los Compuestos de los Ejemplos 1 a 9 son identificados como sigue:
- Compuesto 1 es ácido cis-4-ciano-4-(3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico;
  - 10 ■ Compuesto 2 es 3-(ciclopentiloxi)-N- (3,5-dicloropiridin-4-il)-4-metoxibenzamida;
  - Compuesto 3 es el hidrocloruro de 2-(4-(6,7-dietoxi-2,3-bis(hidroximetil)naftalen-1-il)piridin-2-il)-4-(3-piridil)ftalazin-1(2H)-ona; y
  - 15 ■ Compuesto 4 es 7-bencilamino-6-cloro-2-piperazino-4-pirrolidinpteridina.

Los Compuestos 2, 3 y 4 son para comparación. Los ejemplos 5, 6, 7, 8 y 9 son ejemplos comparativos.

## 20 Ejemplo 1

*Efecto del Compuesto 1 y Compuesto 2 en los niveles de cAMP de células de la granulosa ováricas de rata, solos o con gonadotropinas in vitro*

25 Fueron retirados los ovarios de ratas Sprague-Dawley de 25 días inmaduras, hipofisectomizadas, tratadas con die-  
tilestilbesterol. Los ovarios fueron pinchados repetidamente con agujas de calibre 27 para liberar las células de la  
30 granulosa de los folículos. Las células fueron lavadas y resuspendidas en medio McCoys 5A + 0,1% de BSA + an-  
drostenediona 2  $\mu$ M. Células viables en un número de 100.000 fueron puestas en placas de cultivo de tejido de 6  
35 pocillos en un volumen de 1,0 ml (con el Compuesto 1 y el Compuesto 2 a una concentración de 25 micromolar, solo  
o en conjunción con una dosis de gonadotropina 0,1 pM baja). Las placas fueron incubadas en una incubadora a 37°C,  
humedad del 100%, 5,0% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. El medio acondicionado fue analizado en un RIA específico de  
cAMP. Los resultados son expresados como el promedio más o menos la desviación típica. Como se observa en la Fi-  
gura 2, los Compuestos 1 y 2 causan un aumento significativo de los niveles de cAMP en presencia de concentraciones  
subeficaces de gonadotropina.

35

## Ejemplo 2

*Efecto del inhibidor de PDE Compuesto 1 en la maduración del folículo, in vivo*

40 Folículos ováricos maduros generados en ratas femeninas inmaduras por el tratamiento con una dosis subóptima  
de FSH (1,08 UI/rata/inyección; dos veces al día x 3 días) con y sin coadministración del Compuesto 1 (0,1, 1,  
10, y 50 mg/kg/inyección: dos veces al día X 3 días). Una inyección sola de una dosis ovulatoria de hCG (20 UI)  
45 fue administrada con la inyección final de FSH. Fueron proporcionados los inhibidores de PDE junto con las dosis  
subóptimas de FSH. Todas las inyecciones fueron administradas subcutáneamente. La ovulación fue determinada 18  
horas después de la administración de hCG contando ovocitos en el oviducto. Los resultados son expresados como  
el promedio más o menos la desviación típica. Como se observa en la Figura 3, los datos representan el número  
50 promedio de ovocitos en los oviductos de todas las ratas en cada grupo y la frecuencia de ratas ovulantes. Como  
también se aprecia en la Figura 3, un inhibidor de PDE (Compuesto 1) inhibió (más que estimulado) tanto la ovulación  
administrada a 50 mg/kg. Los resultados demuestran que el aumento de las dosis del inhibidor de PDE falló en realzar  
la capacidad de una dosis subóptima de FSH para preparar folículos que ovulen.

## 55 Ejemplo 3

*Efecto del inhibidor de PDE Compuesto 1 en la ovulación, en presencia de una dosis subeficaz de hCG in vivo*

Folículos ováricos maduros generados en ratas femeninas inmaduras por el tratamiento con una dosis eficaz de  
FSH (2,16 UI/rata/inyección; dos veces al día x 2 días) se les indujo ovular con una inyección sola de hCG. hCG fue  
60 administrada en una dosis subeficaz (3 UI) con y sin una inyección sola del Compuesto 1 (50, 10 y 1 mg/kg) en el  
momento de la inyección de FSH final. La ovulación fue determinada 18 horas después de la administración de hCG  
contando el número de óvulos en el oviducto. Como se observa en la Figura 4, una inyección sola del Compuesto 1 co-  
administrado con una dosis subovulatoria de hCG causó una inducción de la ovulación. Todas las inyecciones fueron  
65 subcutáneas. Los resultados son expresados como el promedio más o menos la desviación típica. Estos datos demues-  
tran que un modulador del nivel de cAMP no polipeptídico, en este caso un inhibidor de PDE realza la ovulación  
estimulada por HCG cuando se administra una dosis subóptima de hCG. Son mostrados los efectos del Compuesto 1,  
un inhibidor de PDE conocido.

Ejemplos 4

*Efecto del inhibidor de PDE Compuesto 1 en la ovulación en presencia o ausencia de una dosis subeficaz de hCG in vivo*

5      Despues de la maduración folicular inducida por FSH (2,16 UI/rata/inyección; dos veces al día X 2 días) el Compuesto 1 fue inyectado con y sin una dosis sub-eficaz de hCG. La ovulación fue determinada 18 horas después de la administración de hCG/Compuesto 1 contando ovocitos en el oviducto. Los datos representan el número promedio de ovocitos en los oviductos de todas las ratas en cada grupo y la frecuencia de ratas ovulantes. Como se observa en la Figura 5, una sola inyección del Compuesto 1 administrado solo, sin una dosis subovulatoria de hCG, causó una inducción de la ovulación en ratas pretratadas con FSH. Los resultados son expresados como el promedio más o menos la desviación típica. Estos datos demuestran que un modulador del nivel de cAMP no polipeptídico, en este caso un inhibidor de PDE, el Compuesto 1, es capaz de inducir la ovulación en ausencia de cualquier hCG inyectado. Los experimentos anteriores, y los presentados en este documento han mostrado que los folículos preparados con estas 10     dosis de FSH no hacen ovular espontáneamente, sino que requieren la administración subsecuente de hCG.  
15

Ejemplo 5

20     *Efecto del inhibidor de PDE Compuesto 2 en la ovulación en presencia o ausencia de una dosis subeficaz de hCG in vivo*

25      Despues de la maduración folicular inducida por FSH (2,16 UI/rata/inyección; dos veces al día X 2 días) el Compuesto 2 fue inyectado con y sin una dosis sub-eficaz de hCG. La ovulación fue determinada 18 horas después de la administración de hCG/Compuesto 2 contando ovocitos en el oviducto. Los datos representan el número promedio de ovocitos en los oviductos de todas las ratas en cada grupo y la frecuencia de ratas ovulantes. Los resultados son expresados como el promedio más o menos la desviación típica. Como se observa en la Figura 6, una sola inyección 30     del Compuesto 2 administrado solo, sin una dosis subovulatoria de hCG, causó una inducción de la ovulación en ratas pretratadas con FSH. Estos datos demuestran que un modulador del nivel de cAMP no polipeptídico, en este caso un inhibidor de PDE, el Compuesto 2, es capaz de inducir la ovulación en ausencia de cualquier hCG inyectado.

Ejemplo 6

35     *Efecto del inhibidor de PDE Compuesto 2 en la ovulación in vivo después de la administración oral y subcutánea*

40      Despues de la maduración folicular inducida por FSH (2,16 UI/rata/inyección; dos veces al día X 2 días) el Compuesto 2 fue inyectado subcutáneamente (*subcutis*) o administrado por cebado oral. La ovulación fue determinada 18 horas después de la administración del Compuesto 2 contando ovocitos en el oviducto. Los datos representan el 45     número promedio de ovocitos en los oviductos de todas las ratas en cada grupo y la frecuencia de ratas ovulantes. Los resultados son expresados como el promedio más o menos la desviación típica. Como se observa en la Figura 7, la administración de Compuesto 2 por la vía oral o por subcutánea causó una inducción de la ovulación en ratas pretratadas con FSH. Estos datos demuestran que un modulador del nivel de cAMP no polipeptídico, en este caso un inhibidor de PDE, el Compuesto 2, es capaz de inducir la ovulación cuando se administra oralmente.

45

Ejemplo 7

50     *Efecto del inhibidor de PDE Compuesto 3 en la ovulación in vivo después de la administración oral y subcutánea*

55      Despues de la maduración folicular inducida por FSH (2,16 UI/rata/inyección; dos veces al día X 2 días) el Compuesto 3 fue inyectado subcutáneamente (*subcutis*) o administrado por cebado oral. La ovulación fue determinada 18 horas después de la administración del Compuesto 3 contando ovocitos en el oviducto. Los datos representan el 60     número promedio de ovocitos en los oviductos de todas las ratas en cada grupo y la frecuencia de ratas ovulantes. Los resultados son expresados como el promedio más o menos la desviación típica. Como se observa en la Figura 8, la administración de Compuesto 3 por vía oral o por subcutánea causó una inducción de la ovulación en ratas pretratadas con FSH. Estos datos demuestran que un modulador del nivel de cAMP no polipeptídico, en este caso un inhibidor de PDE, el Compuesto 3, es capaz de inducir la ovulación cuando se administra oralmente.

60

Ejemplo 8

65     *Efecto del inhibidor de PDE Compuesto 4 en la ovulación en presencia o ausencia de una dosis subeficaz de hCG in vivo*

65      Despues de la maduración folicular inducida por FSH (2,16 UI/rata/inyección; dos veces al día X 2 días) el Compuesto 4 fue inyectado subcutáneamente con y sin una dosis sub-eficaz de hCG. La ovulación fue determinada 18 horas después de la administración de hCG/Compuesto 4 contando ovocitos en el oviducto. Los datos representan el

## ES 2 293 965 T3

número promedio de ovocitos en los oviductos de todas las ratas en cada grupo y la frecuencia de ratas ovulantes. Como se observa en la Figura 9, una sola inyección del Compuesto 4 administrada con una dosis subovulatoria de hCG causó una inducción de la ovulación en ratas pretratadas con FSH. El Compuesto 4 administrado solo indujo poca o ninguna ovulación. Los resultados son expresados como el promedio más o menos la desviación típica. Estos datos

5 demuestran que un modulador del nivel de cAMP no polipeptídico, en este caso un inhibidor de PDE, el Compuesto 4, que es insuficiente para inducir la ovulación solo, es capaz de inducir la ovulación en presencia de una dosis subeficaz de hCG.

10 Ejemplo 9

### *Efecto del inhibidor de PDE Compuesto 2 en la ovulación y la fertilidad*

15 Fue inducida la maduración folicular en ratas inmaduras con FSH (4,33 UI/rata/inyección; dos veces al día X 2 días) y gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) (1,5 UI/rata/inyección; dos veces al día X 2 días). Esta combinación fue encontrada previamente que inducía la maduración folicular y promovía el comportamiento de acomplamiento manteniendo una tasa de ovulación espontánea baja en ausencia de una inyección adicional de hCG. Ratas inducidas con FSH y PMSG entonces fueron tratadas con tanto el Compuesto 2 (12 ratas) como con vehículo (12 ratas) por la administración subcutánea. En una cohorte de ratas (6 ratas por tratamiento), la ovulación fue determinada 18

20 horas después de la administración del Compuesto 2 o de vehículo contando ovocitos en el oviducto. Para evaluar la fertilidad, otra cohorte de ratas (6 ratas por tratamiento) fueron colocadas individualmente de la noche a la mañana en una jaula juntas con una rata sola adulta masculina de fertilidad probada. Al día siguiente, las ratas masculinas fueron retiradas y las hembras fueron encerradas juntas por grupo hasta el día del parto. El número de crías llegadas a fin vivas observadas en el momento del parto fue registrado. Como se observa en la Figura 10, una sola inyección del

25 Compuesto 2 causó una inducción de ovulación en ratas pretratadas con FSH/PMSG. Además, las ratas tratadas con el Compuesto 2 tenían un número mayor de crías vivas en el momento del parto. Los resultados tanto para la ovulación como para las crías vivas son expresados como el promedio más o menos la desviación típica. Estos datos demuestran que un modulador del nivel de cAMP no polipeptídico, en este caso un inhibidor de PDE, el Compuesto 2, induce la ovulación de los ovocitos que son capaces de la fertilización *in vivo*.

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5        1. El uso de una composición que comprende el inhibidor de fosfodiesterasa ácido cis-4-ciano-4-(3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico en la preparación de un medicamento para inducir la ovulación en un huésped femenino.
- 10      2. El uso de una composición que comprende el inhibidor de fosfodiesterasa ácido cis-4-ciano-4-(3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno de anovulación.
- 15      3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición además comprende la coriogonadotropina humana o la lutropina.
- 20      4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el medicamento es una solución, un comprimido o una cápsula.
- 25      5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medicamento es para la administración antes de la fase luteínica del ciclo ovulatorio de dicho huésped.
- 30      6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el medicamento es para la administración como parte de un tratamiento combinado para estimular el desarrollo folicular y la ovulación en un huésped femenino que comprende la administración de un agente que aumenta las concentraciones hormonales estimulantes del folículo en dicho huésped durante la fase folicular del ciclo ovulatorio del huésped, en el que dicho agente es seleccionado a partir del grupo que consiste en: hormona estimulante del folículo; clomifeno; tamoxifen; raloxifen; toremifen; droloxifen; letrozol; fadrozol; anastrozol; vorozol; daidzein; genistein; biochanin A y formononetin.
- 35      7. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la composición además comprende la lutropina.
- 40      8. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la composición además comprende la coriogonadotropina.
- 45      9. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la concentración de lutropina es reducida comparada con los regímenes existentes.
- 50      10. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la concentración de coriogonadotropina es reducida comparada con los regímenes existentes.
- 55      11. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medicamento es para la administración en el momento de un régimen de inducción de ovulación existente en el que la coriogonadotropina humana o lutropina son administradas a dicho huésped.
- 60      12. El uso del inhibidor de fosfodiesterasa ácido cis-4-ciano-4-(3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico para la fabricación de un medicamento, en el que el medicamento es para la administración en un método para recuperar ovocitos para la fertilización *in vitro*.

45

50

55

60

65

**Figura 1**  
**Protocolo convencional**



















