



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 864583 E**

(51) Classificação Internacional:
C07J 31/00 (2006.01) **A61P 9/10** (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1993.02.19**

(30) Prioridade(s): **1992.02.26 US 0841694**

(43) Data de publicação do pedido: **1998.09.16**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.10.17**
001/2007

(73) Titular(es):

WYETH
FIVE GIRALDA FARMS, MADISON NEW JERSEY
07940-0874 **US**

(72) Inventor(es):

PANOLIL CHIRUKANDOTH RAVEENDRANATH **US**
JOHN ANTHONY WICHTOWSKI **US**

(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **SAIS DE METAIS ALCALINOS DE ÉSTERES SULFATO DE 8,9-DESIDROESTRONA**

(57) Resumo:

RESUMO

**"SAIS DE METAIS ALCALINOS DE ÉSTERES
SULFATO DE 8,9-DESIDROESTRONA"**

Esta invenção apresenta sais de metais alcalinos de 8,9-desidroestrona, sais do seu éster sulfato, e composições estáveis com estes compostos, bem como processos para a sua produção e utilização em terapia de substituição de estrogéneo e na protecção cardiovascular.

DESCRIÇÃO

"SAIS DE METAIS ALCALINOS DE ÉSTERES SULFATO DE 8,9-DESIDROESTRONA"

Estado dos Conhecimentos à Data da Invenção

A 8,9-desidroestrone é um composto conhecido que é útil como intermediário na produção sintética de estrone pela isomerização à insaturação em 9,11 (U.S. 3.394.153), e como intermediário na produção de derivados de 3-ciclopentiloxi-17-etinilo (Exemplo XXVIII na U.S. 3.649.621). Para além disto, sabe-se que a 8,9-desidroestrone possui actividade estrogénica e baixa os teores lipídicos no sangue (Exemplos 11 e 12; US 3.391.169).

Descrição da Invenção

De acordo com esta invenção, proporciona-se a utilização de 8,9-desidroestrone no fabrico de um medicamento para o tratamento da aterosclerose e para a remoção de lesões arteriais que ocorrem no desenvolvimento da aterosclerose.

Os exemplos de referência seguintes ilustram a preparação de sais de 8,9-desidroestrone por metalação

directa com NaH, KH ou n-butil-lítio, em tetra-hidrofurano, sob uma atmosfera inerte a cerca de 0°C. Utiliza-se directamente a solução contendo o metal alcalino na reacção de sulfatação. Também se ilustra a introdução de tris(hidroximetil)aminometano em diversas alturas do processo. Os exemplos 6 e 7 ilustram a influência estabilizadora do tris(hidroximetil)aminometano.

Exemplo de Referência 1

8,9-Desidroestrone-3-sulfato de sódio

Adicionou-se a uma suspensão agitada de hidreto de sódio (0,24 g, 10 mmol) em tetra-hidrofurano (20 mL), a 0°C, sob azoto, uma solução de 8,9-desidroestrone (2,68 g, 10 mmol) em tetra-hidrofurano (30 mL). Passados 10 minutos, removeu-se o banho de arrefecimento para se permitir que a mistura reaccional atingisse a temperatura ambiente. Adicionou-se à mistura complexo de trimetilamina com trióxido de enxofre (1,39 g, 10 mmol). Depois de se agitar durante mais 10 minutos, adicionou-se tris(hidroximetil)aminometano (1,79 g, 15 mmol) e continuou-se a agitar de um dia para o outro. Retirou-se o solvente por evaporação e retomou-se o resíduo em água (180 mL) e lavou-se com éter dietílico (2 x 50 mL). Filtrou-se a solução aquosa através de um funil em vidro sinterizado (porosidade média) e submeteu-se o filtrado a uma liofilização para se obterem 5,2 g de um material sólido.

Perfil Analítico

Pureza do 8,9-desidroestrона-3-sulfato de sódio por HPLC - 96,3%.

Por acidificação de uma solução aquosa de 8,9-desidroestrона-3-sulfato de sódio para se obter o éster sulfato livre, seguida por uma extracção com n-butanol e uma neutralização do ácido com hidróxido de cálcio, obtém-se o 8,9-desidroestrона-3-sulfato de cálcio. A reacção análoga com hidróxido de magnésio ou com hidróxido de amónio permite obter, respectivamente, o 8,9-desidroestrона-3-sulfato de magnésio e o 8,9-desidroestrона-3-sulfato de amónio.

Exemplo de Referência 2

8,9-Desidroestrона-3-sulfato de sódio

Adicionou-se a uma suspensão agitada de hidreto de sódio (0,24 g, 10 mmol) em tetra-hidrofurano (20 mL), a 0°C, sob azoto, uma solução de 8,9-desidroestrона (2,68 g, 10 mmol) em tetra-hidrofurano (30 mL). Passados 30 minutos sob agitação à temperatura ambiente, adicionou-se à mistura tris(hidroximetil)aminometano (1,79 g, 15 mmol), e findos mais 30 minutos, adicionou-se complexo de trimetilamina com trióxido de enxofre (1,39 g, 10 mmol), e agitou-se a

mistura de um dia para o outro. Retirou-se o solvente por evaporação e retomou-se o resíduo em água (40 mL). Lavou-se a fase aquosa com éter dietílico (2 x 20 mL), e depois liofilizou-se para se obterem 5,1 g de um material sólido.

Perfil Analítico

Pureza do 8,9-desidroestrone-3-sulfato de sódio por HPLC - 96,2%.

Passou-se uma solução aquosa de 8,9-desidroestrone-3-sulfato de sódio através de uma coluna de Amberlite IRC-50 para se obter o éster sulfato livre sob a forma do ácido, o qual se trata com etilamina para se obter o sal de etilamina do 8,9-desidroestrone-3-sulfato de por liofilização do produto. Com dimetilamina, obtém-se o sal de dimetilamina do 8,9-desidroestrone-3-sulfato.

Exemplo de Referência 3

8,9-Desidroestrone-3-sulfato de sódio

Adicionou-se a uma suspensão agitada de hidreto de sódio (0,24 g, 10 mmol) em tetra-hidrofurano (20 mL), a 0°C, sob azoto, uma solução de 8,9-desidroestrone (2,68 g, 10 mmol) em tetra-hidrofurano (30 mL). Depois de se deixar a mistura reaccional aquecer até à temperatura ambiente, agitou-se durante 30 minutos e adicionou-se-lhe complexo de

trimetilamina com trióxido de enxofre (1,39 g, 10 mmol). Continuou-se a agitação de um dia para o outro. Retiraram-se os solventes por evaporação e retomou-se o resíduo em água (50 mL), lavou-se a fase aquosa com éter dietílico (2 x 20 mL), e depois adicionou-se-lhe tris(hidroximetil)aminometano (1,79 g, 15 mmol). Liofilizou-se a solução límpida resultante para se obterem 5,04 g de um material sólido.

Perfil Analítico

Pureza do 8,9-desidroestrone-3-sulfato de sódio por HPLC - 96,2%.

Exemplo de Referência 4

8,9-Desidroestrone-3-sulfato de lítio

Adicionou-se n-butil-lítio (solução 2,5 M em hexanos, 1,4 mL), a uma mistura de tris(hidroximetil)aminometano (0,63 g, 5,2 mmol) e 8,9-desidroestrone (0,94 g, 3,5 mmol) em tetra-hidrofurano (14 mL), a -70°C. Depois de se agitar a mistura reaccional a essa temperatura durante 10 minutos, retirou-se o banho de arrefecimento. A 0°C adicionou-se-lhe complexo de trimetilamina com trióxido de enxofre (0,49 g, 3,5 mmol), deixou-se atingir a temperatura ambiente, e continuou-se a agitação de um dia para o outro. Retiraram-se os solventes por evaporação e retomou-

se o resíduo em água (150 mL). Lavou-se esta solução aquosa com éter dietílico (3 x 35 mL), e depois liofilizou-se para se obterem 1,11 g de um material sólido.

Perfil Analítico

Pureza do 8,9-desidroestrone-3-sulfato de lítio por HPLC - 90,4%.

Exemplo de Referência 5

8,9-Desidroestrone-3-sulfato de potássio

Adicionou-se a uma suspensão agitada de hidreto de potássio (0,14 g, 3,5 mmol) em tetra-hidrofurano (14 mL), a 0°C, sob azoto, tris(hidroximetil)aminometano (0,63 g, 3,5 mmol), e em seguida uma solução de 8,9-desidroestrone (0,94 g, 3,5 mmol) em tetra-hidrofurano (14 mL). Passados 15 minutos, adicionou-se-lhe complexo de trimetilamina com trióxido de enxofre (0,48 g, 3,5 mmol). Depois de se deixar a mistura reaccional atingir a temperatura ambiente, adicionou-se-lhe mais uma porção de tetra-hidrofurano (15 mL), e continuou-se a agitação de um dia para o outro. Retiraram-se os solventes por evaporação e retomou-se o resíduo em água (150 mL). Lavou-se esta fase aquosa com éter dietílico (3 x 35 mL), e depois liofilizou-se para se obterem 1,63 g de um material sólido.

Perfil Analítico

Pureza do 8,9-desidroestrone-3-sulfato de potássio por HPLC - 91,3%.

Passou-se uma solução aquosa de 8,9-desidroestrone-3-sulfato de potássio através de uma coluna permuta iónica contendo de Amberlite IRP-64, utilizando como eluente uma solução concentrada de hidróxido de cálcio para se obter o 8,9-desidroestrone-3-sulfato de cálcio. Obtiveram-se do mesmo modo os sais de magnésio e de amónio.

Destes procedimentos pode verificar-se que o processo desta invenção decorre facilmente para se obter produto com elevado grau de pureza.

Exemplo de Referência 68,9-Desidroestrone-3-sulfato de sódio

Adicionou-se a uma suspensão agitada de hidreto de sódio (0,57 g, 24 mmol) em tetra-hidrofurano (50 mL), a 0°C, sob azoto, uma solução de 8,9-desidroestrone (5,36 g, 20 mmol) em tetra-hidrofurano (100 mL), ao longo de um período de 10 minutos. Deixou-se a mistura reaccional aquecer até à temperatura ambiente e adicionou-se-lhe complexo de trimetilamina com trióxido de enxofre (3,34 g, 24 mmol). Continuou a agitar-se durante 24 horas. Retirou-se o solvente por evaporação e retomou-se o sólido residual

por suspensão em éter etílico, extraindo-se com água (100 mL). Separou-se a fase aquosa e liofilizou-se para se obterem 5,65 g de um material sólido.

Perfil Analítico

Conteúdo em 8,9-desidroestrone-3-monossulfato de sódio por HPLC - 73,8%.

Conteúdo em 8,9-desidroestrone-3-monossulfato de sódio por HPLC - 33% (testado passadas duas semanas).

Exemplo de Referência 7

8,9-Desidroestrone-3-sulfato de sódio

Adicionou-se a uma suspensão agitada de hidreto de sódio (0,72 g, 30 mmol) em tetra-hidrofurano (50 mL), a 0°C, sob azoto, tris(hidroxi-metil)aminometano (5,38 g, 44 mmol), e em seguida uma solução de 8,9-desidroestrone (8,04 g, 30 mmol) em tetra-hidrofurano (110 mL). Depois de se deixar a mistura reaccional aquecer até à temperatura ambiente, adicionou-se-lhe o complexo de trimetilamina com trióxido de enxofre (4,21 g, 30 mmol), e continuou a agitar-se durante 24 horas. Purificou-se a mistura reaccional tal como no Exemplo 6, para se obterem 15,2 g de um material sólido.

Perfil Analítico

Conteúdo em 8,9-desidroestrone-3-monossulfato de sódio por HPLC - 55,8%.

Conteúdo em 8,9-desidroestrone-3-monossulfato de sódio por HPLC - 55,3% (testado passadas duas semanas).

Conteúdo em tris(hidroximetil)aminometano por HPLC - 30,9%.

Caracterização Espectral

RMN de ^1H e de ^{13}C - consistentes.

O RMN de ^1H também indicava que a razão entre estrogéneo conjugado e tris(hidroximetil)aminometano era de cerca de 1:1,5.

Do Exemplo 6, observa-se que na ausência de estabilização, o éster sulfato se degrada rapidamente, enquanto que o tris(hidroximetil)aminometano proporciona uma protecção contra a degradação hidrolítica tal como se ilustra no Exemplo 7, em que o conteúdo em éster sulfato continua substancialmente constante ao longo de um período de duas semanas, demonstrando desta forma um melhor controlo do produto do que o obtido na ausência de tris(hidroximetil)aminometano. Isola-se o produto estabilizado no

estado sólido, com um grau de pureza elevado, e possuindo as propriedades pretendidas de solubilidade em água a um pH neutro ou próximo desse valor, em conjunto com a sua actividade farmacêutica estrogénica.

Estabeleceu-se a actividade estrogénica dos compostos desta invenção administrando-os quer por via oral, quer por via parentérica (subcutânea) a ratos e a ratinhos, ao longo de, respectivamente, períodos de 7 dias e de 3 dias, e medindo o aumento da massa uterina em comparação com o verificado no veículo de controlo. Os resultados destes procedimentos experimentais eram como se segue.

TABELA I

Estrogenicidade do 8,9-desidroestrone-3-sulfato de sódio -
Massa Uterina no Rato

<u>Tratamento</u> ^a	<u>Dose</u> ^b (µg)	<u>Via</u>	<u>Massa (mg)</u>
Veículo (óleo)	-	s.c.	46,3±2,7
Veículo (dH ₂ O)	-	s.c.	43,4±3,5
8,9-desidroestrone-3-sulfato de sódio	0,1	s.c.	39,8±2,1
	0,3	s.c.	46,1±2,4
	1,0	s.c.	50,3±2,7
	3,0	s.c.	71,9±1,2
	10,0	s.c.	92,2±5,7

^a Seis ratos por grupo

^b Dose diária ao longo de 7 dias

TABELA I

Estrogenicidade do 8,9-desidroestrone-3-sulfato de sódio -
Massa Uterina no Ratinho

<u>Tratamento^a</u>	<u>Dose^b (µg)</u>	<u>Via</u>	<u>Massa (mg)</u>
Veículo (dH ₂ O)	0,3 mL	s.c.	11,2±0,3
8,9-desidroestrone-3- sulfato de sódio	0,1	s.c.	17,9±3,0
	0,3	s.c.	18,9±2,3
	1,0	s.c.	21,3±2,6
	3,0	s.c.	23,1±3,2
	10,0	s.c.	22,7±0,8
8,9-desidroestrone-3- sulfato de sódio	0,1	oral	18,4±1,4
	0,3	oral	14,6±1,7
	1,0	oral	17,8±0,4
	3,0	oral	19,1±0,9
	10,0	oral	24,1±1,1

^a Quatro ratinhos por grupo

^b Dose diária ao longo de 3 dias

O tratamento da aterosclerose é em geral dirigido para a atenuação das sequelas (*angina pectoris*, enfarte do miocárdio, arritmias, insuficiência cardíaca, insuficiência renal, apoplexia, oclusão arterial periférica, e estados de doença relacionados) pela administração de fármacos antilipidêmicos, diminuindo-se da tensão sanguínea entre 10 e 20% e aumentando os teores de lípidos de alta densidade no sangue pela dieta e pelo exercício. Estas medidas são em geral concebidas para diminuir a taxa de progressão do

estado de doença, mais do que para inverter a sua direcção. administram-se frequentemente agentes contra a aterosclerose em conjunto com outros medicamentos habitualmente utilizados para o tratamento desse estado de doença, tais como agentes antilipidémicos, agentes antiarrítmicos, bloqueadores beta, e outros semelhantes. As propriedades de diminuição dos lípidos no sangue dos compostos utilizados nesta invenção proporcionam portanto uma vantagem adicional para a sua utilização no tratamento da aterosclerose.

De acordo com o elemento de protecção cardiovascular desta invenção, proporciona-se um método para o fabrico de um medicamento para o tratamento da aterosclerose, incluindo uma administração por via oral ou parentérica. É claro que a 8,9-desidroestrone, metabolito putativo ou produto de hidrólise *in vivo* dos seus sais de ésteres sulfato, exhibe a mesma influência protectora cardiovascular que os seus sais de ésteres sulfato, e pode ser utilizada ela própria caso se encontre disponível, e a sua utilização seja realizável numa dada situação. Estes esteróide pode reduzir significativamente tanto as áreas das lesões das superfícies arteriais, como o conteúdo arterial em colesterol, de uma forma relacionada com a dose.

Quando o esteróide desta invenção é utilizado como agente estrogénico ou como único agente protector cardiovascular em animais de sangue quente, ele pode ser administrado por si só ou em combinação com veículos farmacologicamente aceitáveis, cujas proporções são determinadas

pela solubilidade e pela natureza química do composto, pela via de administração escolhida, e pela prática farmacêutica habitual. Por exemplo, ele pode ser administrado por via oral sob a forma de comprimidos ou cápsulas, contendo excipientes tais como amido, leite, açúcar, determinados tipos de argila, e outros semelhantes. Ele também pode ser administrado por via oral sob a forma de soluções que podem conter agentes corantes e saborizantes, ou pode ser injectado por via parentérica. Para administração por via parentérica, ele pode ser utilizado sob a forma de uma solução estéril contendo outros solutos; por exemplo, soro salino ou glucose para tornar a solução isotónica.

A dosagem do agente terapêutico presente variará de acordo com a forma de administração e com o composto especificamente escolhido. Para além disto, ele variará consoante o sujeito específico que recebe o tratamento. Em geral, está indicado o tratamento com dosagens pequenas, substancialmente inferiores à dose óptima do composto. Em seguida, aumenta-se a dosagem com pequenos incrementos até se obter o efeito óptimo, para aquelas circunstâncias. Em geral, é preferido administrarem-se os compostos desta invenção em teores de concentração que permitam obter resultados eficazes, sem causar quaisquer efeitos colaterais nocivos ou inconvenientes, e de preferência a um teor que se encontre na gama de entre cerca de 0,02 mcgm e cerca de 500 mcgm, por quilograma e por dia, embora tal como se mencionou acima possam ocorrer variações baseadas na idade, no sexo, na massa corporal, na severidade do estado de

doença, no regime profilático, etc. Em qualquer dos casos, é necessário assegurar observação detalhada e uma vigilância continuada por parte do médico assistente, para se conseguir uma reacção terapêutica pretendida, num determinado paciente.

Lisboa, 24 de Novembro de 2006

REIVINDICAÇÕES

1. A utilização de 8,9-desidroestrna para a preparação de um medicamento para o tratamento da aterosclerose.

2. A utilização da 8,9-desidroestrna para a preparação de um medicamento para remover as lesões arteriais ocorridas no desenvolvimento da aterosclerose

Lisboa, 24 de Novembro de 2006