

(11) Número de Publicação: **PT 1463493 E**

(51) Classificação Internacional:

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) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2001.12.14**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2004.10.06**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.10.03**
003/2008

(73) Titular(es):

LABORATOIRES SERONO SA
CENTRE INDUSTRIEL 1267 COINSINS, VAUDCH

(72) Inventor(es):

MARK TEPPER	US
SEAN MCKENNA	US
STEPHEN PALMER	US
MICHAEL C. MACNAMEE	GB
ALIZA ESHKOL	CH

(74) Mandatário:

MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA INDUZIR A OVULAÇÃO UTILIZANDO UM MODULADOR DE NÍVEL CAMP NÃO POLIPEPTÍDICO**

(57) Resumo:

RESUMO

"MÉTODO PARA INDUZIR A OVULAÇÃO UTILIZANDO UM MODULADOR DE NÍVEL cAMP NÃO POLIPEPTÍDICO"

A presente invenção relaciona-se com métodos para induzir a ovulação num hospedeiro feminino compreendendo a administração de um modulador de nível de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) não polipeptídico ao hospedeiro feminino. Noutro aspecto, a invenção providencia a administração específica do inibidor de fosfodiesterase antes da fase lútea do ciclo ovulatório do hospedeiro. Um modulador de nível de cAMP não polipeptídico preferido inclui inibidores de fosfodiesterase, particularmente inibidores de isoformas de fosfodiesterase 4.

DESCRIÇÃO

"MÉTODO PARA INDUZIR A OVULAÇÃO UTILIZANDO UM MODULADOR DE NÍVEL cAMP NÃO POLIPEPTÍDICO"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção relaciona-se com o aumento da fertilidade num hospedeiro feminino por indução da ovulação com a administração de um modulador de níveis de cAMP não polipeptídico, o qual é o inibidor de fosfodiesterase ácido *cis*-4-ciano-4-(3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A ovulação é o processo onde um óvulo ou óvulos são libertados a partir dos ovários. A sincronização da ovulação no ciclo menstrual é da maior importância para a fertilização. É bem reconhecido que os folículos adquirem a capacidade de sofrer ovulação após o crescimento e maturação estimulados pelas gonadotropinas pituitárias. A hormona estimulante folicular (FSH) é predominantemente responsável pelo crescimento folicular e a hormona luteinizante (LH) estimula a ovulação. Este processo coordenado de maturação do folículo estimulada por gonadotropina assegura a ministração de óvulos competentes na ovulação. O óvulo preparado adequadamente está em seguida disponível para fertilização por esperma nas horas após a ovulação.

A ovulação é um processo finamente sincronizado que é accionado por estimulação da gonadotropina pituitária do ovário, e modificado pelo crescimento e resposta bioquímica (e.g., esteroidogénica, inhibina secreção de, etc.) de

folículos à estimulação de gonadotropina. Durante o ciclo menstrual normal em mulheres estas hormonas exibem padrões cíclicos. O ciclo menstrual pode ser dividido funcionalmente em três fases; a fase folicular, a ovulatória e a lútea. O período folicular começa no final da fase lútea do ciclo não conceptivo precedente, antes de ou coincidente com o início da menstruação. O ciclo começa com um aumento transiente nos níveis de FSH no sangue que estimula o desenvolvimento de um coorte de folículos ovarianos. O tamanho dos folículos recrutados para crescer é cerca de 5 mm de diâmetro. Num ciclo menstrual natural, é usualmente estabelecido um folículo grande ou dominante durante a fase folicular, e fica comprometido a crescer até à maturação. Em seres humanos, o tamanho do folículo que é considerado pronto para sofrer ovulação é cerca de 15 mm ou mais de diâmetro.

O segundo evento crítico que ocorre no ovário durante a fase folicular é que as células granulosas nos folículos ovarianos adquirem receptores de LH e tornam-se crescentemente sensíveis à LH. A secreção de estradiol e estrona a partir do ovário aumenta primeiro lentamente, em paralelo com o diâmetro crescente do folículo e sensibilidade do folículo à LH. Os níveis relativamente crescentes de estrogénio e inhibina provocam a inibição de secreção da hormona libertadora de gonadotropina (GnRH) a partir do hipotálamo e de secreção de gonadotropina a partir da pituitária. A produção de estrogénio atinge um máximo no dia anterior ao pico de LH e a resposta neuroendócrina ao estrogénio aumentado e a concentrações gradualmente crescentes de progesterona é a libertação pré-ovulatória de gonadotropinas a qual é discutida adiante.

Durante a fase ovulatória existe uma variação na resposta neuroendócrina ao estrogénio e à progesterona. Neste ponto do ciclo, o estrogénio elevado faz surgir um aumento repentino pré-ovulatório nos níveis de FSH e LH no soro, devido a um retrocontrolo positivo no hipotálamo, o estrogénio estimula agora um aumento repentino nos níveis de GnRH e subsequentemente de libertação de FSH e LH a partir da pituitária. Este aumento repentino de gonadotropinas induz o completamento da maturação folicular e provoca ruptura do folículo dominante ou de Graafian e descarga do óvulo entre 16 a 24 horas após o pico de LH. Durante o período seguinte ao aumento repentino pré-ovulatório, os níveis de estradiol no soro decrescem temporariamente e os níveis de progesterona no plasma começam a aumentar.

Após a ovulação, as células de folículo ovariano pós-ovulatório sob a influência da LH são luteinizadas para formar um corpo lúteo - a fase lútea. Os marcadores de diagnóstico da fase lútea do ciclo menstrual são o aumento marcado na secreção de progesterona pelo corpo lúteo, e a transformação uterina que ocorre em resposta à progesterona. Associado à produção de progesterona lútea, existe um aumento menos pronunciado dos níveis de estrogénio no soro. À medida que a progesterona e os estrogénios aumentam, a LH e a FSH decrescem ao longo da maioria da fase lútea. Até ao fim da fase lútea, num ciclo menstrual não conceptivo, o corpo lúteo regredie e os níveis de FSH no soro começam a aumentar para iniciar o crescimento folicular para o próximo ciclo.

A FSH e a LH são distinguidas uma da outra pela sua capacidade de estimular o desenvolvimento folicular ou a

ovulação, respectivamente. Ambos os agentes são conhecidos por estimular um aumento nas concentrações de cAMP intracelular. Foram exibidos agentes que mimam o cAMP tais como forscolina ou análogos de cAMP estáveis, *in vitro*, para simular os efeitos da FSH nas células granulosas a partir de folículos imaturos, e para simular os efeitos da LH nas células de folículos maduros. Embora tenham sido propostas vias intracelulares alternativas para ambas a FSH e a LH, é bem aceite que o cAMP é estimulado em resposta a ambas as gonadotropinas. Se e quando as elevações nos níveis de cAMP estão associadas ao desenvolvimento e maturação folicular ou a indução de ovulação depende dos tipos de células e da presença ou ausência dos respectivos receptores. De facto, foi demonstrado que murganhos que são deficientes numa fosfodiesterase particular possuem ovulação danificada e sensibilidade diminuída das células granulosas às gonadotropinas.

Os tratamentos de infertilidade actualmente em utilização clínica incorporam alguns dos eventos reguladores descritos acima. Um agente que estimula o crescimento folicular e é utilizado para tratamento de anovulação é o clomifeno. Clomifeno é um antiestrogénio não esteróide que compete com os estrogénios nos seus locais de ligação. Crê-se que o clomifeno se liga aos receptores de estrogénio no hipotálamo e pituitária e bloqueia o retrocontrolo negativo exercido por estrogénios ovarianos. O resultado é a produção aumentada de gonadotropinas (FSH e LH) durante a primeira parte da fase folicular. O efeito do clomifeno é aumentar os níveis de FSH endógena no soro e melhorar o crescimento e a maturação de folículos. Subsequentemente quer a LH endógena ou a LH/CG exógena induzem a ovulação nestes pacientes.

A patente WO 01/47905 descreve derivados de Pirrolidina que são inibidores de fosfodiesterase 4 para o tratamento de, *inter alia*, infertilidade em ambos fêmeas e machos. Zussman et al., Journal of Clinical Pharmacology, Vol. 41, No. 9, 2001, páginas 950-958 descreve o inibidor de fosfodiesterase 4 Cilomilast.

Em adição ao clomifeno, as mulheres foram tratadas com regímenes de indução de ovulação que incluem preparações comerciais das gonadotropinas humanas, incluindo hormona estimulante de folículo (FSH) e hormona luteinizante (LH) ou gonadotropina coriônica (CG), todas as quais foram primeiro obtidas por purificação de urina a partir de mulheres grávidas e mais recentemente por tecnologia recombinante. Em geral, este tratamento é altamente efectivo na estimulação de génesis folicular e génesis de esteróides. As complicações deste tratamento resultam do facto que estas preparações e regímenes podem sobre-estimular o desenvolvimento folicular e a maturação de folículos. Num subgrupo de pacientes, o ovário pode tornar-se hiperestimulado, que poderá resultar em ovulações múltiplas e, consequentemente, nascimentos múltiplos. Não apenas a hiperestimulação ovariana pode ser ameaçadora da vida da mãe, resulta também tipicamente em recém nascidos com menor peso de nascimento, os quais subsequentemente requerem cuidado intensivo. Crê-se que as complicações principais atribuídas à hiperestimulação induzida pela gonadotropina e gravidezes múltiplas resultam provavelmente dos efeitos prolongados de hCG. Em adição, a utilização de gonadotropinas em regímenes de indução de ovulação pode resultar em reacções no local de injecção, tanto locais como sistémicas. Consequentemente, o desenvolvimento de

regímenes de indução de ovulação utilizando agentes activos oralmente com actividade do tipo gonadotropina moderada como oposto às terapias que utilizam injectáveis potentes seria um benefício substancial. Mais importantemente, seria uma vantagem significativa se pudessem ser desenvolvidos regimes de indução de ovulação que resultassem em menor hiper-estimulação ovariana e, consequentemente, apresentassem menos perigo para a mãe e produzissem recém-nascidos mais saudáveis.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Num primeiro aspecto, a invenção providencia a utilização do inibidor de PDE4 ácido (cis-4-ciano-4-(3-ciclopentiloxi)-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico para o fabrico de um medicamento para a indução de ovulação num paciente.

Noutro aspecto, a invenção providencia a utilização do inibidor de PDE4 ácido (cis-4-ciano-4-(3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico para o fabrico de um medicamento para a indução de ovulação numa paciente, num regímen através do qual é induzida a maturação folicular com clomifeno ou um inibidor de aromatase, seleccionado a partir de YM-511, Letrozole, Fadrozole, e Anastrozole, mais preferencialmente seleccionado a partir de Letrozole e Anastrozole, antes da indução da ovulação.

Noutro aspecto, a invenção providencia a utilização do inibidor de PDE4 como definido nas reivindicações.

DESCRICAÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção relaciona-se com a utilização de uma composição compreendendo o inibidor de fosfodiesterase

ácido cis-4-ciano-4-(3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico na preparação de um medicamento para melhorar a fertilidade num hospedeiro feminino. Noutro aspecto, a invenção providencia a utilização da referida composição para a preparação de um medicamento para induzir a ovulação do folículo maduro dominante antes da fase lútea de um ciclo ovulatório.

Embora tenham sido relatados efeitos de inibidores de PDE em génesis de esteróides estimulada por LH a partir de células granulosas, *in vitro*, a presente invenção descreve duas descobertas novas. Primeiro, os inibidores de PDE falham em intensificar o crescimento folicular estimulado por FSH *in vivo*, apesar do papel do cAMP aceite em ambas as vias celulares de FSH e LH. Além disso, é apresentada evidência de que os inibidores de PDE intensificam realmente a génesis de esteróides estimulada por gonadotropina *in vitro*, que exemplifica adicionalmente a nova actividade do inibidor de PDE na ovulação dependente da LH. Segundo, os inibidores de PDE aumentaram a taxa de ovulação, *in vivo*, na ausência de LH ou hCG adicionado. Considerando a actividade oral dos inibidores de PDE, esta segunda descoberta providencia a base para o primeiro potencial régimen isento de injecção para indução de ovulação, uma vez que os inibidores de PDE podem ser utilizados em conjunção com regímenes existentes como descrito adiante.

Também descrita aqui é estimulação do desenvolvimento folicular antes da administração de um modulador de nível de cAMP não polipéptido que compreende a administração de um agente que aumenta as concentrações de FSH durante a fase folicular do ciclo ovulatório do hospedeiro. O

objectivo em aumentar a FSH relaciona-se unicamente com o desenvolvimento e maturação folicular e não com a indução de ovulação. Agentes preferidos incluem a própria FSH, clomifeno, moduladores de receptor de estrogénio selectivos, inibidores de aromatase e moduladores selectivos da regulação neuroendócrina de produção de FSH.

Ainda noutro aspecto, a invenção providencia a utilização do referido primeiro aspecto em que a composição compreende adicionalmente a LH ou gonadotropina coriônica (CG) para administração antes da fase lútea do ciclo ovulatório do hospedeiro feminino. Em adição, a invenção providencia a utilização de concentrações de LH ou CG inferiores para administração ao hospedeiro que as concentrações que são utilizadas nos regímenes de indução de ovulação actuais e portanto diminuindo a probabilidade de hiperestimulação ovariana.

Adicionalmente, a presente invenção providencia a utilização do inibidor de fosfodiesterase ácido cis-4-ciano-4-(3-(cilopentiloxi)-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico para o fabrico de um medicamento, em que o medicamento é para administração num método de recolha de óócitos para fertilização *in vitro*.

Assim, a invenção providencia a utilização do referido primeiro aspecto para administração oral em vez de por injecção, a via de administração requerida para proteínas e o modo de administração nos regímenes de indução de ovulação actuais. A administração oral evita o efeito secundário agudo e sistémico associado a tais injecções. Em primeiro lugar, a utilização do referido primeiro aspecto é para induzir ovulações e pode ser para administração

sozinho ou com ou sem a LH ou CG e alternativamente, em concentrações de LH ou CG inferiores às utilizadas actualmente, e assim, reduzir a ocorrência de hiperestimulação ovariana e de seus riscos associados. Consequentemente, os nascimentos múltiplos e as complicações ameaçadoras da vida da mãe e dos recém nascidos podem ser evitados. Em adição, a presente invenção é útil porque proporciona a oportunidade de testar o diagnóstico de gravidez mais prematuramente que os regímenes de indução de ovulação actuais envolvendo a utilização de CG.

As utilizações da invenção como definido nas reivindicações serão úteis para tratamento de infertilidade em seres humanos, mas também noutros mamíferos (tais como cavalos e animais de criação e.g. gado, ovelhas, vacas e semelhantes) e noutras espécies tais como piscina (*i.e.*, peixe) e aviárias (*i.e.*, aves).

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é uma representação esquemática de um regímen de indução de ovulação generalizada em seres humanos.

A Figura 2 é uma representação em gráfico de barras do efeito de inibidores de fosfodiesterase *in vitro* (*i.e.*, Composto 1 e Composto 2 (referência)) no aumento de níveis de cAMP intracelular nas células granulosas.

A Figura 3 é uma representação em gráfico de barras do efeito de um inibidor de fosfodiesterase (*i.e.*, Composto 1) na maturação do folículo em ratos, *in vivo*.

A Figura 4 é uma representação em gráfico de barras do efeito de um inibidor de fosfodiesterase (*i.e.*, Composto 1) na ovulação com CG em ratos, *in vivo*.

A Figura 5 é uma representação em gráfico de barras do efeito de um inibidor de fosfodiesterase (*i.e.*, Composto 1) na ovulação com e sem CG em ratos, *in vivo*.

A Figura 6 é uma representação em gráfico de barras do efeito de um inibidor de fosfodiesterase (*i.e.*, Composto 2 (referência)) na ovulação com CG em ratos, *in vivo*.

A Figura 7 é uma representação em gráfico de barras do efeito de um inibidor de fosfodiesterase (*i.e.*, Composto 2 (referência)) na ovulação após administração oral e subcutânea.

A Figura 8 é uma representação em gráfico de barras do efeito do inibidor de PDE Composto 3 (referência) na ovulação *in vivo* após administração oral e subcutânea.

A Figura 9 é uma representação em gráfico de barras do efeito do inibidor de PDE Composto 4 (referência) na ovulação na presença ou ausência de uma dose sub-efectiva de hCG *in vivo*.

A Figura 10 é uma representação em gráfico de barras do efeito do inibidor de PDE Composto 2 (referência) na ovulação e fertilidade.

I. Definições

Em geral, as palavras ou frases seguintes possuem a definição indicada quando utilizadas na descrição, exemplos e reivindicações.

"Administração" refere-se à ministração de um agente terapêutico num hospedeiro feminino. No contexto da presente invenção, isto incluiria a ministração de um modulador de nível de cAMP não polipeptídico e/ou de um agente que aumenta concentrações de FSH. Este termo é descrito mais completamente sob a secção intitulada, "Composições Farmacêuticas" contida aqui.

"Ovulação" para os fins daqui refere-se ao processo onde um óvulo ou óvulos são libertados a partir dos ovários. À medida que o meio do ciclo se aproxima, existe um aumento dramático no estrogénio, seguido por um aumento repentino de LH e com menor extensão de FSH. Isto acciona o folículo dominante para sofrer ovulação. A ovulação consiste na ampliação folicular rápida seguida por protrusão do folículo a partir da superfície do córtex ovariano. Finalmente, a ruptura do folículo resulta na extrusão de um complexo de cúmulo de oócito. O resíduo do folículo dominante reorganiza-se em seguida para se tornar o corpo lúteo.

"Anovulação" refere-se à ausência de ovulação.

"Modulador de nível de cAMP não polipeptídico" refere-se a compostos que não são compostos por aminoácidos na sua totalidade, independentemente da glicosilação, e actuam, directamente ou indirectamente, para aumentar os níveis de cAMP intracelulares. Tais compostos podem aumentar os níveis de cAMP por estímulo da síntese de cAMP ou por inibição da sua degradação, ou ambos. Exemplos de

moduladores que aumentam a síntese de cAMP incluem activadores de adenilciclase tais como a forscolina. Exemplos de moduladores que reduzem a degradação de cAMP incluem inibidores de fosfodiesterases tais como a teofilina.

"Hospedeiro Feminino" significa um indivíduo de sexo feminino de uma espécie ao qual são administrados agentes de acordo com a presente invenção. Os seres humanos, outros mamíferos e outras espécies tais como peixes e aves são aqui incluídos por definição.

"Inibidor de fosfodiesterase" refere-se a compostos químicos que bloqueiam ou inibem as fosfodiesterases (PDE's) cuja acção é inactivar os seus alvos nucleótidos cíclicos (*i.e.*, cAMP e cGMP) por quebra hidrolítica da ligação 3'-fosfodiéster, resultando em acumulação passiva de nucleótidos cíclicos específicos. Os inibidores podem ser não selectivos para todas as isoformas de fosfodiesterase ou selectivos para isoformas específicas. Ver os compostos citados aqui.

"Isoformas de fosfodiesterase" refere-se a uma família de isozimas ou isoformas responsáveis pelo metabolismo ou degradação dos mensageiros secundários intracelulares, cAMP e cGMP. As isoformas específicas podem possuir localizações celulares e subcelulares altamente selectivas. Exemplos de isoformas de fosfodiesterase incluem PDE3 e PDE4.

"Fase Folicular" refere-se à primeira parte do ciclo menstrual e é caracterizada por um aumento progressivo nos níveis circulantes de estradiol e inhibina B pelo desenvolvimento do folículo de Graafian.

"Antes da Fase Lútea" refere-se ao período do ciclo menstrual antes da mudança da fase folicular dominada por estrogénio para a fase lútea dominada pela progesterona. Antes da Fase Lútea, os níveis de estrogénio são geralmente superiores ou iguais a 150 pg/ml/folículo para um folículo de 16 mm de diâmetro e o tamanho do folículo não é geralmente inferior a 14 mm de diâmetro. Estes critérios não são absolutos e irão variar de paciente para paciente. No contexto da presente invenção e nos termos da sincronização da administração do modulador de nível de cAMP não polipeptídico, o modulador de nível de cAMP não polipeptídico pode ser administrado a um hospedeiro feminino na altura de um regímen de indução de ovulação existente no qual é normalmente administrado hCG ou LH ao referido hospedeiro.

"Ciclo Ovulatório" ou "ciclo menstrual" refere-se a uma série de eventos cíclicos sobre uma espécie durante um período de tempo específico incluindo crescimento e desenvolvimento folicular, recrutamento, selecção, dominância, ovulação, e formação de corpo lúteo e extinção. Funcionalmente, o ciclo pode ser dividido em três fases, a fase folicular, a ovulatória e a lútea. Este ciclo pode também ser referido como o ciclo menstrual.

"Indução de Ovulação" refere-se ao processo em que um polipéptido(s) e/ou químico sintético é utilizado para que ocorra ovulação em hospedeiros femininos que são de outro modo anovulatórios, resultando na indução de ruptura folicular e ovulação de oócitos fertilizáveis. A indução de ovulação não inclui os eventos precedentes no tempo

durante o ciclo ovulatório de maturação e desenvolvimento folicular.

"Hiperestimulação Ovariana" refere-se à intervenção farmacológica de um ciclo menstrual ovulatório ou anovulatório. Implica a maturação de folículos múltiplos resultando na co-dominância de numerosos folículos e na disponibilidade de oócitos fertilizáveis múltiplos.

"Folículo" refere-se ao saco cheio de fluido que cerca o óvulo, contendo o saco também células granulosas.

"Desenvolvimento Folicular" refere-se ao crescimento e desenvolvimento progressivo de folículos ovarianos, particularmente durante a fase folicular do ciclo ovulatório e conduzindo ao recrutamento e dominância de um folículo destinado a sofrer ovulação.

"Hormona Estimulante de Folículo (FSH) e isoformas" refere-se a uma hormona libertada pela pituitária que estimula o crescimento de folículos ovarianos e isoformas de FSH como descrito, por exemplo, na Patente U.S. No. 5 087 615.

"Moduladores do Receptor de Estrogénio Selectivos" refere-se a compostos químicos ou polipéptidos que actuam como um antagonista de receptor de estrogénio ao nível do hipotálamo e da glândula pituitária, e como um agonista ao nível do útero. Exemplos de tais moduladores podem incluir tamoxifeno, raloxifeno, toremifeno, clomifeno e droloxitifeno. Referência, Endocrinology, 1999 December: 138 (12) : 5476-5484.

"Inibidores de Aromatase" refere-se a compostos químicos ou polipéptidos que bloqueiam ou inibem a actividade de aromatase que é uma enzima que converte androgénios em estrogénios. Exemplos de inibidores de aromatase incluem Letrozole, Anastrozole e Vorozole. Referências, 1) Journal of Endocrinology, 2000 Feb: 164(2): 225-238; e 2) Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1997 April: 61(3-6): 157-166.

"Enzimas Esteroidogénicas Relacionadas" refere-se a qualquer enzima que esteja envolvida na catálise de reacções bioquímicas conduzindo à síntese de estrogénio e progesterona incluindo 3-β-hidroxiesteróide desidrogenase e inibidores desta enzima incluem daidzeina, genisteina, biochanina A e formononetina. Referência, Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1996 April: 58(1): 95-101.

"Clomifeno" refere-se a 2-[4-(2-cloro-1,2-difeniletenil)fenoxi]-N,N-dietiletanamina e seus sais.

"Hormona Lutenizante" refere-se a uma hormona libertada pela pituitária que serve o propósito dual de provocar que um folículo dominante liberte o seu ovo e de estimular o corpo lúteo para segregar progesterona.

"Concentrações reduzidas" refere-se a concentrações inferiores de um agente administrado quando comparadas com os níveis padrão de agentes administrados. No contexto da presente invenção, são administradas concentrações de LH ou CG inferiores às que são administradas nos regímenes de indução de ovulação existentes.

"Regímenes de Indução de Ovulação Existentes" refere-se aos métodos actuais de induzir ovulação incluindo a utilização de clomifeno, gonadotropinas (*i.e.*, FSH, LH e CG) ou uma combinação destes agentes para promover a géneze folicular e ovulação induzida em fêmeas anovulatórias. Os regímenes são variados em termos da sincronização, frequência e concentração dos agentes administrados. Esta definição inclui modificações de regímenes actuais que ainda requerem a administração de hCG ou LH na mesma altura durante o regímen de indução de ovulação. Os tratados seguintes são sobre infertilidade feminina, géneze folicular estimulada e indução de ovulação. *Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology*, Volumes 1 and 2; Editors: E.I. Adashi, J.A. Rock and Z. Rosenwaks; Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996 and *Female Infertility Therapy Current Practice*; Editors: Z. Shoham, C.M. Howles and H.S. Jacobs; Martin Dunitz Ltd, London, 1999.

"Gonadotropina Coriônica" refere-se a uma hormona glicoproteína que é biologicamente e imunologicamente semelhante à LH pituitária. Na gravidez normal, a CG é produzida pela placenta e pode ser utilizada como um marcador de diagnóstico de gravidez por níveis elevados de concentração no soro. O acrónimo hCG refere-se à gonadotropina coriônica humana.

"Agente que aumenta as concentrações de FSH" refere-se a qualquer composição de matéria, proteína ou químico sintético, que quando administrado a um hospedeiro feminino aumenta os níveis de concentração de FSH no soro, quer directamente ou indirectamente, por administrar a própria FSH, ou um agente que estimula a sua produção endógena ou inibe a sua degradação endógena. A definição desta frase e

agente inclui compostos que poderão não aumentar as concentrações de FSH mas que possuem hormona estimulante de folículo função e actividade biológica.

II. Princípios de Indução de Ovulação

Os problemas de níveis de gonadotropina inadequados ou inapropriados foram reconhecidos como provocadores de disfunção ovulatória desde os anos 1960. A efectividade clínica das várias preparações de gonadotropina utilizadas foi proporcional à quantidade de FSH administrada. A evidência inicial sugeriu que a LH exógena não fosse requerida para adequar a génese folicular durante a indução da ovulação. Tornou-se claro, no entanto, que as mulheres ministradas apenas com FSH exógena falhavam em produzir estradiol folicular adequado para a indução de ovulação. A presença de pelo menos alguma quantidade de LH exógena ou endógena para a indução de ovulação no ser humano parece ser importante. A Figura 1 ilustra uma representação esquemática de um regímen de indução de ovulação generalizado. É dada uma preparação de FSH a 75 IU/dia durante os primeiros 7 dias. No final de 7 dias, é efectuado um varrimento com ultra-sons para avaliar o diâmetro folicular e é medido o estradiol no soro. Se o folículo for inferior a 12 mm, a dose de FSH é duplicada, e é efectuado um varrimento subsequente noutros 5 - 7 dias. As pacientes com folículos ≥ 15 mm de diâmetro receberam uma dose de bolo ovulatório de hCG.

III. Regimen de Indução de Ovulação Generalizado

A indução de ovulação é muito mais uma arte do que uma ciência. Apesar da existência de uma série considerável de protocolos de tratamento, nenhuma abordagem única ou método específico é unicamente correcto. Certos princípios

aplicam-se, no entanto, e providenciam a base para o tratamento seguro e efectivo. No entanto, deverá ser notado que os critérios estabelecidos adiante para induzir ovulação são dados apenas com o fim de exemplos e poderão variar significativamente pelo clínico, paciente e pelo objectivo do tratamento.

O primeiro ciclo envolve usualmente a administração de FSH diariamente começando no dia 4 a 7 de uma hemorragia por supressão. O crescimento e a resposta do folículo são monitorizados por ambos os níveis de estrogénio e ultra-sons. A adequada estimulação de folículo é usualmente conseguida por administração contínua de FSH durante 7 a 14 dias. O tratamento com FSH durante menos de 8 dias está associado às taxas aumentadas de aborto espontâneo entre as pacientes grávidas.

Uma vez que tenha sido atingido o desenvolvimento de folículo suficiente (dois folículos de 16 a 18 mm juntamente com um aumento progressivo de estrogénio no soro para 500 a 1,000 pg/m L), é administrada hCG (5 000 ou 10 000 IU). A sincronização da administração de hCG é importante porque as principais complicações atribuídas à hiper-estimulação induzida por gonadotropina e gravidezes múltiplas resultam provavelmente dos efeitos prolongados de hCG. Embora o tempo de semi-vida da hCG seja aproximadamente de 8 horas, poderá ser detectável no sangue da paciente durante 7 a 10 dias após a injecção e mal diagnosticada como uma gravidez de tratamento com sucesso. Após a administração de hCG, o casal é instruído para ter uma relação sexual nessa noite e uma ou duas vezes mais durante as próximas 48 horas.

A regra fundamental com respeito à administração de gonadotropina é que cada e todo o ciclo de tratamento tem que ser individualizado, monitorizado, e ajustado adequadamente. Monitorizar é necessário não apenas para intensificar as taxas de ovulação e de gravidez mas também para reduzir o risco de hiperestimulação ovariana grave e as suas potenciais consequências e gravidezes múltiplas.

Isto é conseguido por determinações frequentes dos níveis de estradiol no plasma/soro e por inspecção dos ovários por ultra-sons. Os níveis de estradiol correlacionam-se geralmente com o número de folículos em crescimento mas não necessariamente com o número de folículos maduros. A confiança nos níveis de estradiol como o marcador para a maturidade do folículo poderá erroneamente sugerir a maturidade do folículo na presença de folículos pequenos múltiplos, resultando na administração prematura de hCG. Porque o crescimento folicular se correlaciona directamente com a maturação do óvulo, a avaliação por ultra-sons do diâmetro médio folicular poderá ser um indicador melhor na avaliação da maturidade e sincronização da administração de hCG. Os níveis de estrogénio deverão portanto ser utilizados para avaliar o desenvolvimento folicular prematuro como um indicador da resposta à gonadotropina, e os ultra-sons deverão ser utilizados para avaliar o número e o tamanho de folículos em maturação.

O objectivo da maioria dos tratamentos é maximizar o potencial for uma gravidez única enquanto reduz o risco do sindroma de hiperestimulação. Os níveis de estradiol entre 1000 e 1500 pg/ mL parecem ser óptimos, mas os níveis reais poderão variar dependendo do laboratório utilizado e da experiência do médico. O risco de hiperestimulação aumenta

com níveis de estradiol superiores. Em geral, quando o estradiol no soro excede 2000 pg/mL, a hCG deverá ser administrada com muito cuidado ou detida para permitir a recessão dos folículos. No hipogonadismo hipogonadotrópico, o risco de hiperestimulação grave para valores superiores a 2400 pg/mL é 5 % em ciclos de gravidez e 1 % em ciclos sem gravidez. Adicionalmente, porque a hiperestimulação tende a se correlacionar com o número de folículos presente, a decisão de deter hCG poderá ser também baseada numa descoberta de ultra-sons de 10 ou mais folículos em desenvolvimento.

Os tratados seguintes são sobre infertilidade feminina, génesis folicular estimulada e indução de ovulação *Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology*, Volumes 1 and 2; Editors: E.Y. Adashi, JA. Rock and Z. Rosenwaks; Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996 and *Female Infertility Therapy Current Practice*; Editors: Z. Shoham, C.M. Howles and H.S. Jacobs; Martin Dunitz Ltd, London, 1999.

Crê-se que as principais complicações atribuídas à hiperestimulação ovariana induzida pela gonadotropina e consequentes gravidezes múltiplas resultam provavelmente dos efeitos prolongados de hCG. A invenção é útil porque permite a utilização de concentrações de LH ou CG administradas ao hospedeiro menores que as concentrações que são utilizadas nos regímenes de indução de ovulação existentes e portanto reduzindo a probabilidade de hiperestimulação ovariana, e consequentemente evitando os efeitos adversos associados a essa condição: nascimentos múltiplos, recém nascidos de baixo peso e complicações para a saúde da mãe.

Deverá ser notado que a administração de moduladores de nível de cAMP não polipeptídicos não tem efeito terapêutico na maturação e no desenvolvimento folicular durante o ciclo ovulatório.

Assim, a presente invenção relaciona-se com a utilização do referido primeiro aspecto. Os moduladores de nível de cAMP não polipeptídicos actuam, directamente ou indirectamente, para aumentar os níveis intracelulares de cAMP. Tais compostos podem aumentar os níveis de cAMP por estímulo da síntese de cAMP ou por inibição da sua degradação, ou ambos. Exemplos de moduladores que aumentam a síntese de cAMP incluem os activadores de adenilciclase tais como a forscolina. Exemplos de moduladores que reduzem a degradação de cAMP incluem os inibidores de fosfodiesterases tais como a teofilina. Os moduladores de nível de cAMP não polipeptídicos incluem inibidores de fosfodiesterase, particularmente inibidores de isoformas de fosfodiesterase 4.

A invenção também é útil porque permite a estimulação do desenvolvimento folicular antes da administração do modulador de nível de cAMP não polipeptídico como definido nas reivindicações para induzir a ovulação que compreende a administração de um agente que aumenta as concentrações de hormona estimulante folicular (FSH) durante a fase folicular do ciclo ovulatório do hospedeiro. Os referidos agentes são definidos nas reivindicações. Assim, a administração dos agentes descritos aqui numa sincronização prescrita relativamente ao crescimento e à maturação do folículo são reivindicados melhorar o processo de ovulação

e que tem que se efectuar fertilização subsequente se for para ocorrer concepção.

Deverá ser notado que quando o modulador de nível de cAMP não polipeptídico como definido nas reivindicações é administrado sozinho e não co-administrado com hCG, a presente invenção providencia a oportunidade de testar o diagnóstico de gravidez mais prematuramente que os regímenes de indução de ovulação actuais envolvendo a utilização de CG.

V. Inibidor de Fosfodiesterase

Os inibidores de fosfodiesterase utilizados na invenção são Ariflo® (SmithKline Beecham), Cilomilast (SmithKline Beecham).

Numa concretização, a invenção providencia a utilização do referido primeiro aspecto, para accionar a ovulação após o crescimento e a maturação folicular terem sido induzidos com FSH, Letrozole (Novartis), Anastrozole (AstraZeneca) ou Fadrozole (Novartis). Num regímen de tecnologias reprodutivas assistidas (ART), no qual é desejado obter óócitos múltiplos para fertilização *in vitro*, as pacientes são administradas com um inibidor de aromatase (e.g. 2,5-5 mg/dia de Letrozole, ou Anastrozole) desde o ou cerca do dia 3 até ao ou cerca do dia 7, ou desde o ou cerca do dia 3 até ao ou cerca do dia 8 do ciclo menstrual, juntamente com 50-225, preferível 50-150 IU FSH/dia, iniciando no ou cerca do dia 3 até ao dia 7 do ciclo menstrual, continuando a FSH até que existam pelo menos dois folículos dominantes possuindo um diâmetro médio superior ou igual a cerca de 16 mm. Neste ponto, o inibidor de PDE como definido nas

reivindicações é administrado numa dose suficiente para accionar a ovulação.

Alternativamente, o inibidor de aromatase poderá ser utilizado como o único agente estimulante do crescimento de folículo (*i.e.* na ausência de FSH), por utilização de uma dose superior de inibidor de aromatase (*e.g.* 2-10 mg/dia de Letrozole ou Anastrozole) e/ou por prolongamento da administração (*e.g.* dias 3 a 8, 3 a 9, ou 3 a 10). Quando a maturação folicular é julgada suficiente por sonografia, é dada uma dose accionadora da ovulação de inibidor de PDE como definido nas reivindicações. Este regímen permite a recolha de oócitos múltiplos, enquanto evita injecções, uma vez que todos os agentes utilizados estão disponíveis oralmente.

Na indução de ovulação, é desejável provocar a libertação de apenas um óvulo. Isto pode ser conseguido, de acordo com a invenção, utilizando a FSH para estimular o crescimento e a maturação folicular, seguida de administração do inibidor de PDE definido nas reivindicações para accionar a ovulação. Também no objectivo da invenção estão regímenes de indução de ovulação nos quais o crescimento e a maturação folicular são induzidos com um substituinte de FSH, por exemplo um inibidor de aromatase, como definido nas reivindicações.

Num regímen preferido de indução de ovulação, uma paciente é administrada com uma dose de inibidor de aromatase (*e.g.* 2,5-5 mg/dia de Letrozole ou Anastrozole) desde o ou cerca do dia 3 até ao ou cerca do dia 7, ou desde o ou cerca do dia 5 até ao ou cerca do dia 9 do ciclo menstrual (na ausência de FSH). Alternativamente, poderá ser dada uma

única dose de inibidor de aromatase (e.g. 5-30 mg de Letrozole ou Anastrozole, preferencialmente 10 ou 20 mg), no ou cerca do dia 3 ou dia 4 do ciclo menstrual. A ovulação é accionada com uma dose accionadora de ovulação do inibidor de PDE como definido nas reivindicações. Este regímen providencia um protocolo de indução de ovulação que não requer injecções.

VI. Composições Farmacêuticas

O modulador de nível de cAMP não polipeptídico como definido nas reivindicações e agentes que aumentam as concentrações de FSH num hospedeiro feminino como definido nas reivindicações (também referidos aqui como "compostos activos") da invenção, podem ser incorporados em composições farmacêuticas adequadas para administração. Tais composições compreendem tipicamente os compostos activos e um veículo farmaceuticamente aceitável. Como utilizado aqui, o "veículo farmaceuticamente aceitável" pretende incluir qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes anti-bacterianos e anti-fúngicos, agentes isotónicos e retardadores de absorção, compatíveis com administração farmacêutica. Os veículos adequados são descritos na maioria das edições recentes de Remington's Pharmaceutical Sciences, um texto de referência comum no campo. Exemplos preferidos de tais veículos ou diluentes incluem água, salina, soluções de Ringer, solução de dextrose, e albumina de soro humano a 5%. Poderão também ser utilizados liposomas e veículos não aquosos tais como óleos fixados. A utilização de tais meios e agentes para substâncias farmaceuticamente activas é bem conhecida na técnica. Excepto na medida em que qualquer meio convencional ou agente seja incompatível com o composto activo, é contemplada a sua utilização nas composições.

Compostos activos suplementariamente podem também ser incorporados nas composições.

Uma composição farmacêutica da invenção é formulada para ser compatível com a sua via de administração pretendida. Exemplos de vias de administração incluem administração parentérica, (e.g., intravenosa, intradérmica, subcutânea), oral, inalação, transdérmica (tópica), transmucosa, e rectal. As soluções ou suspensões utilizadas para aplicação parentérica, intradérmica, ou subcutânea podem incluir os componentes seguintes: um diluente estéril tal como água para injecção, solução salina, óleos fixados, polietilenoglicóis, glicerina, propilenoglicol ou outros solventes sintéticos; agentes anti-bacterianos tais como álcool benzílico ou metilparabenos; antioxidantes tais como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes tais como ácido etilenodiaminotetraacético; tampões tais como acetatos, citratos ou fosfatos, e agentes para o ajuste de tonicidade tais como cloreto de sódio ou dextrose. O pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, tais como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A preparação parentérica pode estar contida em ampolas, seringas descartáveis ou vials de dose múltipla feitos de vidro ou de plástico.

As composições farmacêuticas adequadas para utilização injectável incluem soluções (quando solúveis em água) ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injectáveis estéreis. Para administração intravenosa, os veículos adequados incluem salina fisiológica, água bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) ou salina tamponada com fosfato (PBS). Em todos os casos, a

composição tem que ser estéril e deverá ser fluida numa extenção de modo que exista fácil seringabilidade. Tem que ser estável sob as condições de fabrico e armazenagem e tem que ser preservada da acção contaminante de microrganismos tais como bactérias e fungos. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol, e polietilenoglicol líquido, e semelhantes), e suas misturas adequadas. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pela utilização de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pela utilização de surfactantes. A prevenção da acção de microrganismos pode ser conseguida por vários agentes anti-bacterianos e anti-fúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal. Em muitos casos, será preferível incluir na composição agentes isotónicos, por exemplo, açúcares, polialcoois tais como manitol, sorbitol, cloreto de sódio. A absorção prolongada das composições injectáveis pode ser conseguida por inclusão na composição de um agente que retarda a absorção, por exemplo, monostearato de alumínio e gelatina.

As soluções injectáveis estéreis podem ser preparadas por incorporação do composto activo na quantidade requerida num solvente adequado com um ou uma combinação de componentes enumerados acima, como requerido, seguida por esterilização filtrada. Geralmente, as dispersões são preparadas por incorporação do composto activo num veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros componentes requeridos daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injectáveis estéreis, os métodos de preparação são secagem em vácuo e

liofilização que origina um pó do componente activo mais qualquer componente adicional desejado a partir de uma sua solução previamente filtrada em condições estéreis.

As composições orais incluem geralmente um diluente inerte ou um veículo edível. Podem estar contidas em cápsulas de gelatina ou comprimidas em comprimidos. Para o fim de administração terapêutica oral, o composto activo pode ser incorporado com excipientes e utilizado na forma de comprimidos, trociscos, ou cápsulas. As composições orais podem também ser preparadas utilizando um veículo fluído para utilizar como um colutório, em que o composto no veículo fluído é aplicado oralmente e bochechado e expectorado ou deglutido. Podem ser incluídos agentes aglutinantes farmaceuticamente compatíveis, e/ou materiais adjuvantes como parte da composição. Os comprimidos, pílulas, cápsulas, trociscos podem conter qualquer um dos seguintes componentes, ou compostos de uma natureza semelhante: um aglutinante tal como celulose microcristalina, goma tragacanta ou gelatina; um excipiente tal como amido ou lactose, um agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel, ou amido de milho; um lubrificante tal como estearato de magnésio ou Sterotes; um deslizante tal como dióxido de silício coloidal; um agente adoçante tal como sacarose ou sacarina; ou um agente aromatizante tal como hortelã-pimenta, salicilato de metilo, ou aromatizante de laranja.

Para administração por inalação, os compostos são ministrados na forma de um pulverizador de aerossol a partir de um contentor ou distribuidor pressurizado que contenha um propelante adequado, e.g., um gás tal como dióxido de carbono, ou um nebulizador. A administração

sistémica pode também ser por meios transmucósicos ou transdérmicos. Para administração transmucosa ou transdérmica, são utilizados na formulação penetrantes adequados à barreira a ser permeada. Tais penetrantes são geralmente conhecidos na técnica, e incluem, por exemplo, para administração transmucosa, detergentes, sais biliares, e derivados do ácido fusídico. A administração transmucosa pode ser acompanhada através da utilização de pulverizadores nasais ou supositórios. Para administração transdérmica, os compostos activos são formulados em ungamentos, salvas, géis, ou cremes como geralmente conhecido na técnica.

A via de administração preferida para o modulador de nível de cAMP não polipeptídico como definido nas reivindicações assim como para o clomifeno, moduladores de receptor de estrogénio selectivos, inibidores de aromatase e inibidores de enzimas esteroidogénicas como definidos nas reivindicações é por administração oral. Estes compostos activos também podem ser administrados subcutaneamente por injecção, intravenosamente ou trans-vaginalmente (para administração local). A via de administração preferida de FSH, LH ou hCG é por injecção subcutânea, mas poderiam também ser administradas intravenosamente.

Os compostos podem também ser preparados na forma de supositórios (e.g., com bases de supositório convencionais tais como manteiga de cacau e outros glicéridos) ou enemas de retenção para ministração rectal ou vaginal.

Os compostos activos podem ser preparados com veículos que irão proteger o composto de eliminação rápida a partir do corpo, tal como uma formulação de libertação controlada,

incluindo implantes e sistemas de ministração microencapsulados. Podem ser utilizados polímeros biodegradáveis, biocompatíveis, tais como acetato de etilenovinilo, polianidridos, ácido poliglicólico, colagénio, poliortoésteres, e ácido poliláctico. Os métodos de preparação de tais formulações serão aparentes para aqueles peritos na técnica. Os materiais podem também ser obtidos comercialmente a partir de Alza Corporation e Nova Pharmaceuticals, Inc.

Os compostos da invenção podem ser empregues, quer sozinhos ou em combinação com um ou mais de outros agentes terapêuticos como discutido acima, como uma composição farmacêutica em mistura com excipiente convencional, *i.e.*, substâncias veículo orgânicas ou inorgânicas farmaceuticamente aceitáveis adequadas para aplicação oral, parentérica, entérica ou tópica que não reagem deleteriamente com os compostos activos e não são deletérios para o seu recipiente. Veículos farmaceuticamente aceitáveis adequados incluem água, soluções de sais, álcool, óleos vegetais, polietilenoglicois, gelatina, lactose, amilose, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, óleo de perfume, monoglicéridos e diglicéridos de ácido gordo, ésteres de ácido gordo solúveis em éter de petróleo, hidroximetilcelulose, polivinilpirrolidona, etc. As preparações farmacêuticas podem ser esterilizadas e se desejado misturadas com agentes auxiliares, *e.g.*, lubrificantes, conservantes, estabilizantes, agentes humificadores, emulsionantes, sais para influenciar a pressão osmótica, tampões, colorantes, aromatizantes e/ou substâncias aromáticas que não reagem deleteriamente com os compostos activos.

É especialmente vantajoso formular composições orais ou parentéricas numa forma unitária de dosagem para administração fácil e uniformidade da dosagem. A forma unitária de dosagem como utilizada aqui refere-se a unidades fisicamente discretas situadas como dosagens unitárias para o sujeito a ser tratado; cada unidade contém uma quantidade pré-determinada de composto activo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico requerido. A especificação para as formas unitárias de dosagem da invenção são ditadas por e directamente dependentes das características únicas do composto activo e do efeito terapêutico particular a ser conseguido, e das limitações inerentes à técnica de composição de um tal composto activo para o tratamento de indivíduos.

Entender-se-á que as quantidades realmente preferidas de compostos activos utilizadas numa determinada terapia irão variar de acordo com o composto específico sendo utilizado, as composições particulares formuladas, o modo de aplicação, o local particular de administração, etc. As taxas de administração óptimas para um dado protocolo de administração podem ser prontamente constatadas por aqueles peritos na técnica utilizando testes de determinação de dosagem convencional conduzidos com vista às directrizes precedentes. Ver também Remington's Pharmaceutical Sciences. Em geral, uma dose efectiva adequada de um ou mais compostos da invenção, particularmente quando se utiliza o(s) composto(s) mais potente(s) da invenção, estará na gama de desde 0,01 a 100 miligramas por quilograma de peso corporal de recipiente por dia, preferencialmente na gama de desde 0,01 a 20 miligramas por quilograma de peso corporal de recipiente por dia, mais

preferencialmente na gama de 0,05 a 4 miligramas por quilograma de peso corporal de recipiente por dia. A dose desejada é adequadamente administrada uma vez por dia, ou várias sub-doses, e.g. 2 a 4 sub-doses, são administradas a intervalos adequados ao longo do dia, ou outro horário adequado. Tais sub-doses poderão ser administradas como formas de dosagem unitárias, e.g., contendo desde 0,05 a 10 miligramas de composto(s) da invenção, por unidade de dosagem.

As composições farmacêuticas podem estar incluídas num contentor, embalagem, ou distribuidor juntamente com as instruções para administração.

Os exemplos seguintes são ilustrativos da invenção, e/ou comparativos.

VII. Exemplificação:

Foi desenvolvido um modelo de ovulação *in vivo* no qual a FSH é administrada a ratas imaturas *bid* x 2 ou 3 dias para induzir a maturação folicular, seguida por uma dose ovulatória única de hCG. Uma injeção única de moduladores de nível de cAMP não polipeptídicos (e.g., Composto 1, Composto 2, etc.) co-administrada com uma dose subovulatória de hCG ou injectados sozinhos resultou numa indução de ovulação. Estes resultados são consistentes com um modelo no qual níveis de cAMP aumentados intensificam ou substituem hCG mas não FSH. O papel de FISH em qualquer regímen de indução de ovulação é promover o desenvolvimento e a maturação folicular, não a indução de ovulação.

Os Compostos dos Exemplos 1 até 9 são identificados como se segue:

O Composto 1 é o Ácido *cis*-4-ciano-4-(3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico; O Composto 2 é a 3-(Ciclopentiloxi)-N-(3,5-dicloropiridin-4-il)-4-metoxibenzamida; O Composto 3 é o Cloridrato de 2-(4-(6,7-diethoxi-2,3-bis(hidroximetil)naftalen-1-il)piridin-2-il)-4-(3-piridil)ftalazin-1(2H)-ona; e o Composto 4 é a 7-Benzilamino-6-cloro-2-piperazino-4-pirrolidinopteridina.

Os Compostos 2, 3 e 4 são para comparação. Os exemplos 5, 6, 7, 8 e 9 são exemplos comparativos.

Exemplo 1: Efeito dos Compostos 1 e Compostos 2 nos níveis de cAMP de Célula Granulosa Ovariana de Rata, sozinhos ou com gonadotropinas *in vitro*.

Foram removidos os ovários de ratas Sprague-Dawley imaturas com 25 dias, hipofisectomizadas, tratadas com dietilestilbesterol. Os ovários foram picados repetidamente com agulhas de calibre 27 para libertar as células granulosas dos folículos. As células foram lavadas e resuspensas em meios McCoys 5A + 0,1 % de BSA + 2 μ M de androstenodiona. As células viáveis em número de 100 000 foram colocadas em placas de cultura de tecido de 6 poços num volume de 1,0 ml (com o Composto 1 e o Composto 2 numa concentração de 25 micromolar, quer sozinhos ou em conjunção com uma dose de gonadotropina baixa, de 0,1 pM). As placas foram incubadas num incubador a 37 °C, 100% de humidade, 5,0 % de CO₂ durante 48 horas. Os meios condicionados foram ensaiados num RIA específico para cAMP. Os resultados são expressos como a média mais ou menos os desvios padrão. Como observado na Figura 2, os Compostos 1 e 2 provocam um aumento significativo nos níveis de cAMP na presença de concentrações sub-efectivas de gonadotropina.

Exemplo 2: Efeito do inibidor de PDE Composto 1 na maturação do folículo, *in vivo*.

Foram gerados folículos ovarianos maduros em ratos fêmeas imaturos por tratamento com uma dose sub-óptima de FSH (1,08 IU/rato/injecção; *bid* x 3 dias) com e sem co-administração de Composto 1 (0,1, 1, 10, e 50 mg/kg/injecção: *bid* x 3 dias). Foi administrada uma única injecção de uma dose ovulatória de hCG (20 IU) com a injecção de FSH final. Os inibidores de PDE foram dados em conjunção com doses sub-óptimas de FSH. Todas as injecções foram administradas subcutaneamente. A ovulação foi determinada 18 horas após a administração de hCG por contagem dos oócitos no oviducto. Os resultados são expressos como a média mais ou menos os desvios padrão. Como observado na Figura 3, os dados representam o número médio de oócitos nos oviductos de todos os ratos em cada grupo e a frequência de ratos a sofrer ovulação. Como também notado na Figura 3, um inibidor de PDE (Composto 1) inibiu (em vez de estimular) ambas as ovulações administradas a 50 mg/kg. Os resultados demonstram que doses crescentes de inibidor de PDE falharam em aumentar a capacidade de uma dose sub-óptima de FSH para preparar folículos para sofrer ovulação.

Exemplo 3: Efeito do Inibidor de PDE Composto 1 na ovulação, na presença de uma dose efectiva de hCG *in vivo*.

Os folículos ovarianos maduros gerados em ratos fêmeas imaturos por tratamento com uma dose efectiva de FSH (2,16 IU/rato/injecção; *bid* x 2 dias) foram induzidos para sofrer

ovulação com uma injecção única de hCG. A hCG foi administrada numa dose sub-efectiva (3 IU) com e sem uma única injecção de Composto 1 (50, 10 e 1 mg/kg) na altura da injecção de FSH final. A ovulação foi determinada 18 horas após a administração de hCG por contagem do número de óvulos no oviducto. Como observado na Figura 4, uma única injecção de Composto 1 co-administrado com uma dose sub-ovulatória de hCG resultou numa indução de ovulação. Todas as injecções foram subcutâneas. Os resultados são expressos como a média mais ou menos os desvios padrão. Estes dados demonstram que um modulador de nível de cAMP não polipeptídico, neste caso um inibidor de PDE intensifica a ovulação estimulada por hCG quando é administrada uma dose sub-óptima de hCG. São mostrados os efeitos do Composto 1, um inibidor de PDE conhecido.

Exemplos 4: Efeito do inibidor de PDE Composto 1 na ovulação na presença ou ausência de uma dose sub-efectiva de hCG *in vivo*.

Após maturação folicular induzida por FSH (2,16 IU/rato/injecção; bid X 2dias) foi injectado Composto 1 com e sem uma dose sub-efectiva de hCG. A ovulação foi determinada 18 horas após a administração de hCG/Composto 1 por contagem dos oócitos no oviducto. Os dados representam o número médio de oócitos nos oviductos de todos os ratos em cada grupo e a frequência de ratos a sofrer ovulação.

Como observado na Figura 5, uma única injecção de Composto 1 administrado sozinho, sem uma dose sub-ovulatória de hCG, resultou numa indução de ovulação em ratos pré-tratados com FSH. Os resultados são expressos como a média mais ou menos os desvios padrão. Estes dados demonstram que um modulador

de nível de cAMP não polipeptídico, neste caso um inibidor de PDE, Composto 1, é capaz de induzir ovulação na ausência de qualquer hCG injectada. Experiências prévias, e aquelas apresentadas aqui demonstraram que os folículos preparados com estas doses de FSH não sofrem ovulação espontaneamente, mas requerem subsequente administração de hCG.

Exemplo 5: Efeito do inibidor de PDE Composto 2 na ovulação na presença ou ausência de uma dose sub-efectiva de hCG *in vivo*.

Após maturação folicular induzida por FSH (2,16 IU/rato/injecção; bid X 2dias) foi injectado Composto 2 com e sem uma dose sub-efectiva de hCG. A ovulação foi determinada 18 horas após a administração de hCG/Composto 2 por contagem dos oócitos no oviducto. Os dados representam o número médio de oócitos nos oviductos de todos os ratos em cada grupo e a frequência de ratos a sofrer ovulação. Os resultados são expressos como a média mais ou menos os desvios padrão. Como observado na Figura 6, uma única injecção de Composto 2 administrado sozinho, sem uma dose sub-ovulatória de hCG, resultou numa indução de ovulação em ratos pré-tratados com FSH. Estes dados demonstram que um modulador de nível de cAMP não polipeptídico, neste caso um inibidor de PDE, Composto 2, é capaz de induzir ovulação na ausência de qualquer hCG injectada.

Exemplo 6: Efeito do inibidor de PDE Composto 2 na ovulação *in vivo* após administração oral e subcutânea.

Após maturação folicular induzida por FSH (2,16 IU/rato/injecção; bid X 2 dias) o Composto 2 foi injectado subcutaneamente (*subcutis*) ou administrado por sonda oral.

A ovulação foi determinada 18 horas após a administração do Composto 2 por contagem dos oócitos no oviducto. Os dados representam o número médio de oócitos nos oviductos de todos os ratos em cada grupo e a frequência de ratos a sofrer ovulação. Os resultados são expressos como a média mais ou menos os desvios padrão. Como observado na Figura 7, a administração de Composto 2 quer por via subcutânea ou oral resultou numa indução de ovulação em ratos pré-tratados com FSH. Estes dados demonstram que um modulador de nível de cAMP não polipeptídico, neste caso um inibidor de PDE, Composto 2, é capaz de induzir ovulação quando administrado oralmente.

Exemplo 7: Efeito do inibidor de PDE Composto 3 na ovulação *in vivo* após administração oral e subcutânea.

Após maturação folicular induzida por FSH (2,16 IU/rato/injecção; *bid* X 2 dias) o Composto 3 foi injectado subcutaneamente (*subcutis*) ou administrado por sonda oral. A ovulação foi determinada 18 horas após a administração do Composto 3 por contagem dos oócitos no oviducto. Os dados representam o número médio de oócitos nos oviductos de todos os ratos em cada grupo e a frequência de ratos a sofrer ovulação. Os resultados são expressos como a média mais ou menos os desvios padrão. Como observado na Figura 8, a administração de Composto 3 quer por via subcutânea ou oral resultou numa indução de ovulação em ratos pré-tratados com FSH. Estes dados demonstram que um modulador de nível de cAMP não polipeptídico, neste caso um inibidor de PDE, Composto 3, é capaz de induzir ovulação quando administrado oralmente.

Exemplo 8: Efeito do inibidor de PDE Composto 4 na ovulação na presença ou ausência de uma dose sub-efectiva de hCG *in vivo*.

Após maturação folicular induzida por FSH (2,16 IU/rato/injecção; *bid* X 2 dias) o Composto 4 foi injectado subcutaneamente com e sem uma dose sub-efectiva de hCG. A ovulação foi determinada 18 horas após a administração do Composto 3 por contagem dos oócitos no oviducto. Os dados representam o número médio de oócitos nos oviductos de todos os ratos em cada grupo e a frequência de ratos a sofrer ovulação. Como observado na Figura 9, uma única injecção de Composto 4 administrado com uma dose sub-ovulatória de hCG resultou numa indução de ovulação em ratos pré-tratados com FSH. O Composto 4 administrado sozinho induziu pouca ou nenhuma ovulação. Os resultados são expressos como a média mais ou menos os desvios padrão. Estes dados demonstram que um modulador de nível de cAMP não polipeptídico, neste caso um inibidor de PDE, Composto 4, o qual é insuficiente para induzir a ovulação sozinho, é capaz de induzir ovulação na presença de uma dose sub-efectiva de hCG.

Exemplo 9: Efeito do inibidor de PDE Composto 2 na ovulação e fertilidade.

Foi induzida maturação folicular em ratas imaturas com FSH (4,33 IU/rata/injecção; *bid* X 2 dias) e Gonadotropina do Soro de Mare Grávida (PMSG) (1,5 IU/rato/injecção; *bid* X 2 dias). Foi descoberto previamente que esta combinação induz a maturação folicular e promove o comportamento de acasalamento enquanto mantém uma taxa de ovulação espontânea baixa na ausência de uma injecção adicional de

hCG. As ratas induzidas com FSH e PMSG foram em seguida tratadas com Composto 2 (12 ratas) ou com veículo (12 ratas) por administração subcutânea. Num coorte de ratas (6 ratas por tratamento), a ovulação foi determinada 18 horas após a administração de Composto 2 ou de veículo por contagem de oócitos no oviducto. Para se avaliar a fertilidade, outro coorte de ratas (6 ratas por tratamento) foram individualmente colocadas durante a noite numa gaiola juntamente com um único rato macho adulto de fertilidade provada. No dia seguinte, os ratos machos foram removidos e os femininos foram engaiolados juntamente por grupo até ao dia do parto. Foi registado o número de recém-nascidos de gestação completa vivos observados na altura do parto. Como observado na Figura 10, uma única injecção de Composto 2 resultou numa indução de ovulação em ratas pré-tratadas com FSH/PMSG. Em adição, as ratas tratadas com Composto #2 tiveram um número aumentado de recém-nascidos vivos na altura do parto. Os resultados para ambos ovulação e recém-nascidos vivos são expressos como a mais ou menos os desvios padrão. Estes dados demonstram que um modulador de nível de cAMP não polipeptídico, neste caso um inibidor de PDE, Composto 2, induz a ovulação de oócitos que são capazes de ser fertilizados *in vivo*.

Lisboa, 21 de Dezembro de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de uma composição compreendendo o inibidor de fosfodiesterase ácido cis-4-ciano-4-(3-(cilopentiloxi)-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico na preparação de um medicamento para induzir a ovulação num hospedeiro feminino.
2. Utilização de uma composição compreendendo o inibidor de fosfodiesterase ácido cis-4-ciano-4-(3-(cilopentiloxi)-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico na preparação de um medicamento para tratamento de uma patologia de anovulação.
3. A utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a composição compreende adicionalmente gonadotropina coriónica humana ou hormona luteinizante.
4. A utilização de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que o medicamento é uma solução, um comprimido ou uma cápsula.
5. A utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o medicamento é para administração antes da fase lútea do ciclo ovulatório do referido hospedeiro.
6. A utilização de acordo com a reivindicação 5, em que o medicamento é para administração como parte de um tratamento combinado para estimular o desenvolvimento folicular e a ovulação num hospedeiro feminino compreendendo a administração de um agente que aumenta as concentrações de hormona estimulante folicular no referido hospedeiro durante a fase folicular do ciclo ovulatório do hospedeiro, em que o referido agente é seleccionado a partir do grupo constituído por: hormona estimulante

folicular; clomifeno; tamoxifeno; raloxifeno; toremifeno; droloxitifeno; Letrozole; Fadrozole; Anastrozole; Vorozole; daidzeina; genisteina; biocanina A; e formononetina.

7. A utilização de acordo com a reivindicação 5, em que a composição compreende adicionalmente a hormona luteinizante.

8. A utilização de acordo com a reivindicação 5, em que a composição compreende adicionalmente a gonadotropina coriónica.

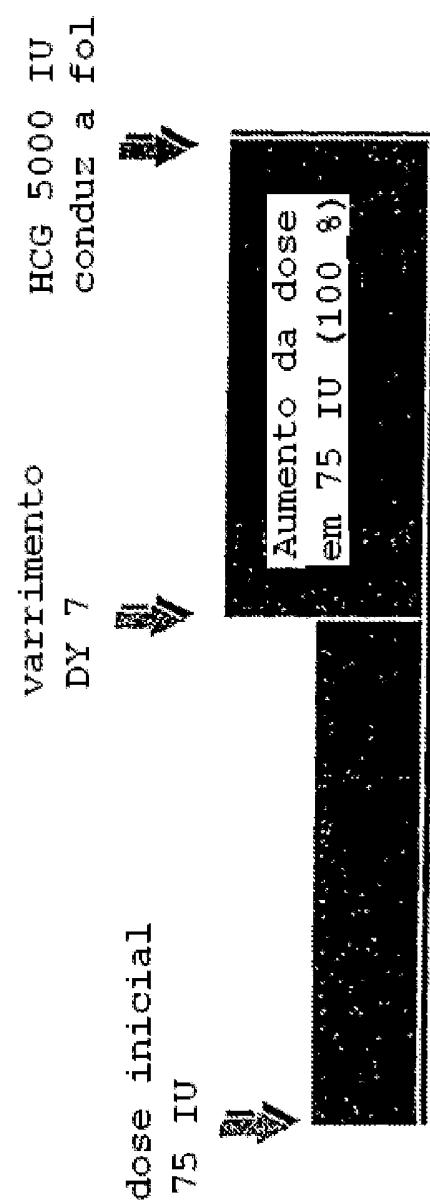
9. A utilização de acordo com a reivindicação 7, em que a concentração de hormona luteinizante é reduzida comparada com os regímenes existentes.

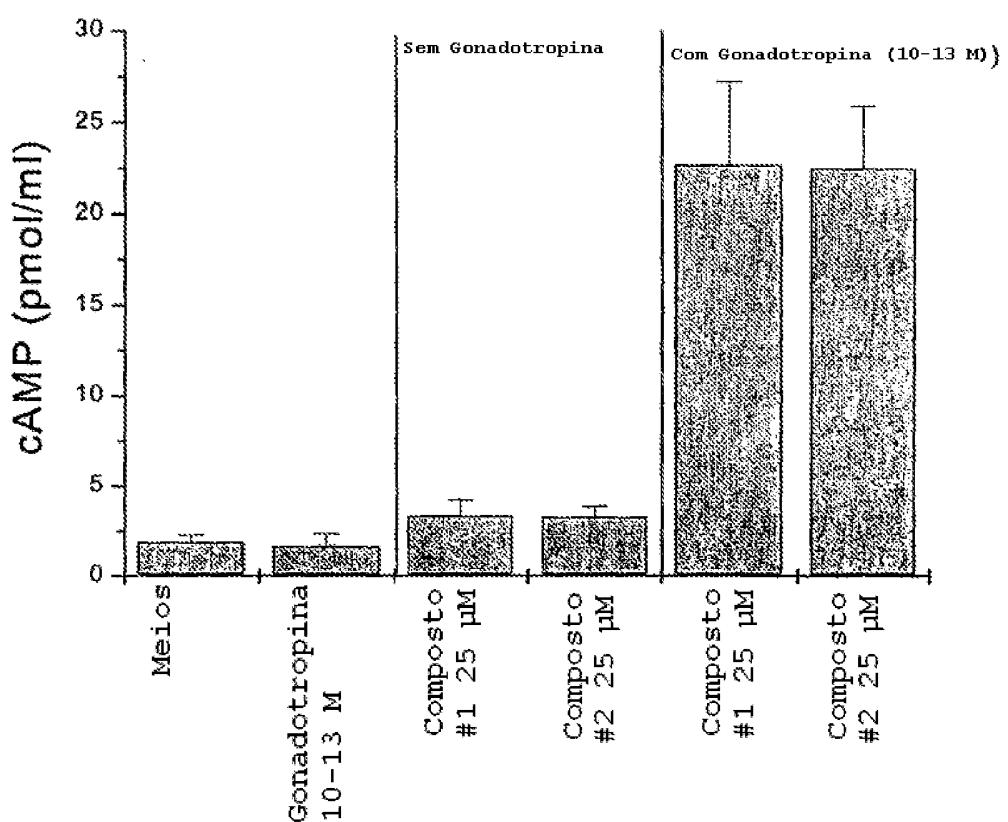
10. A utilização de acordo com a reivindicação 8, em que a concentração de gonadotropina coriónica é reduzida comparada com os regímenes existentes.

11. A utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o medicamento é para administração na altura de um regímen de indução de ovulação existente no qual é administrada gonadotropina coriónica humana ou hormona luteinizante ao referido hospedeiro.

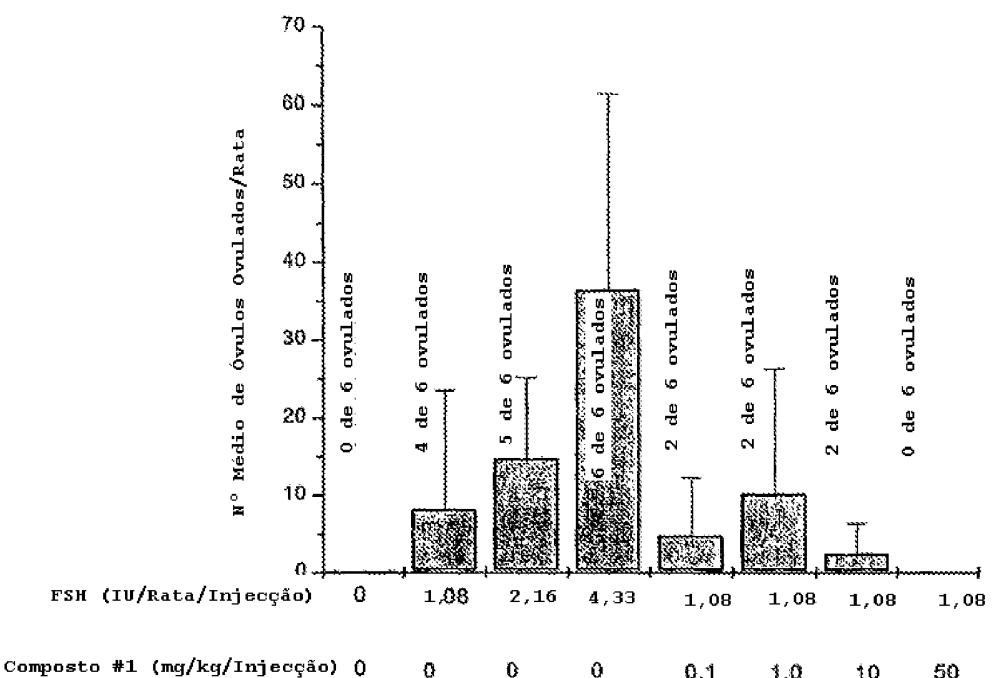
12. Utilização do inibidor de fosfodiesterase ácido cis-4-ciano-4-(3-(cilopentiloxi)-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico para o fabrico de um medicamento, em que o medicamento é para administração num método de recolha de oócitos para fertilização *in vitro*.

Figura 1
Protocolo Convencional

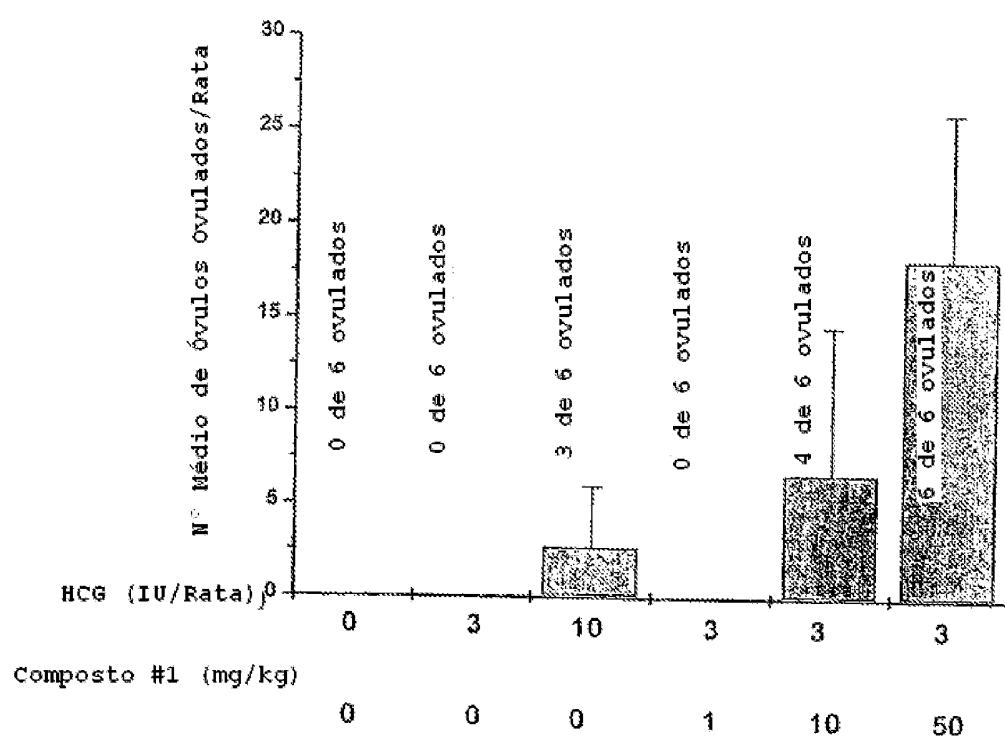




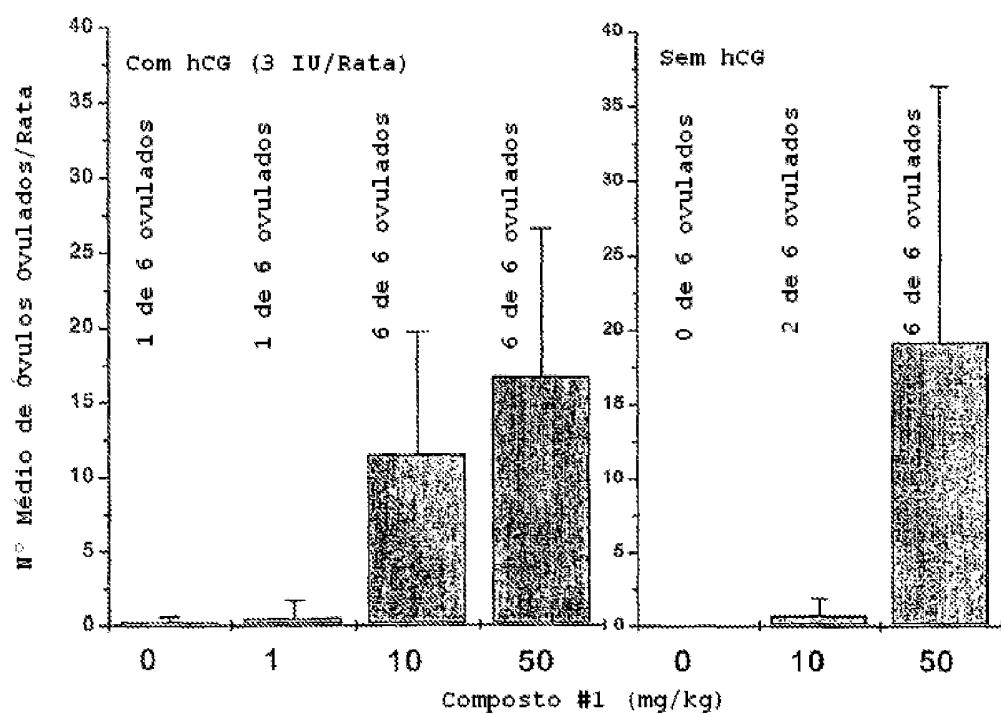
3/10



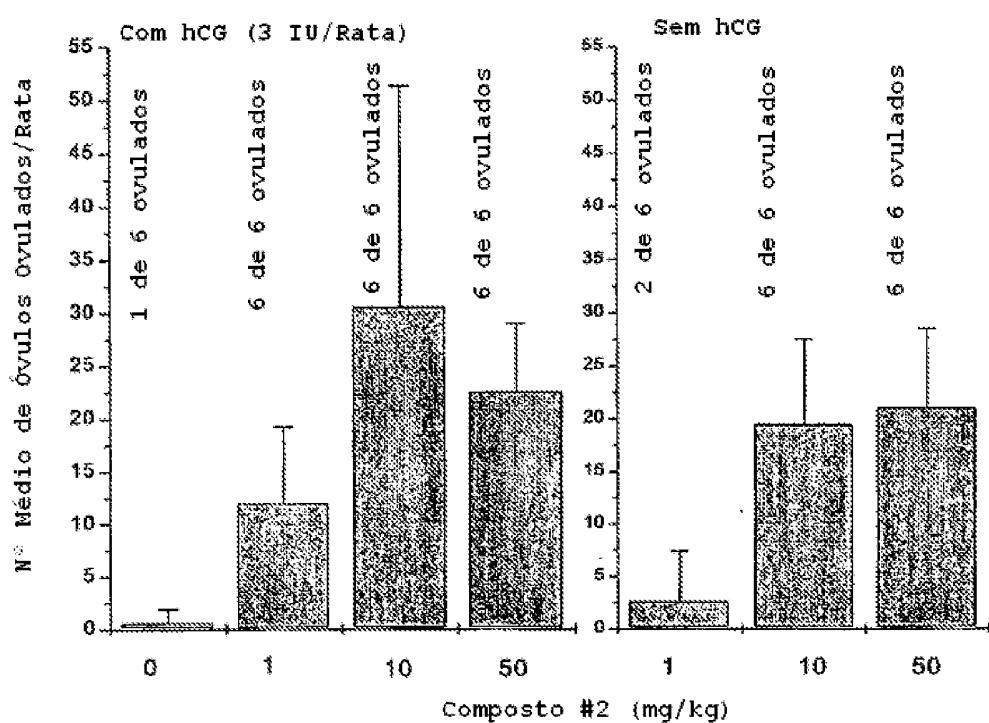
4/10



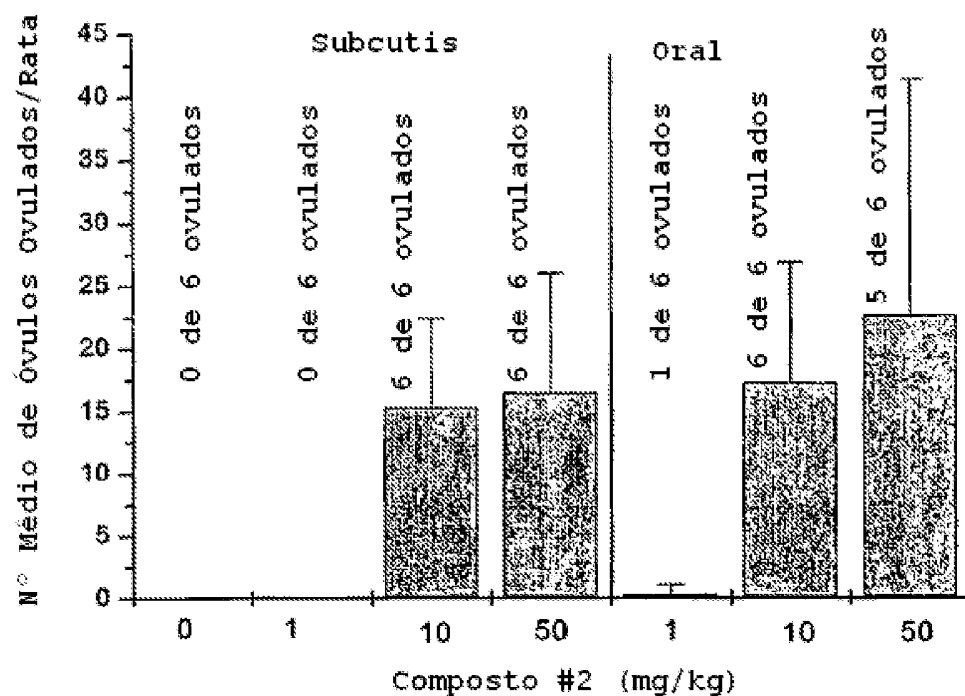
5/10



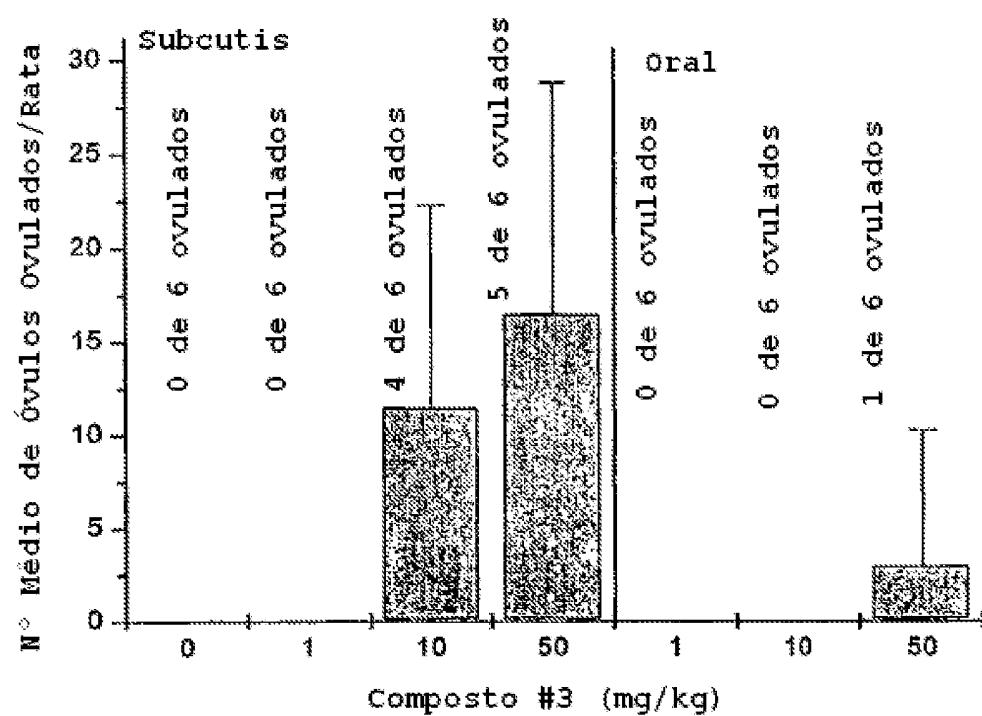
6/10



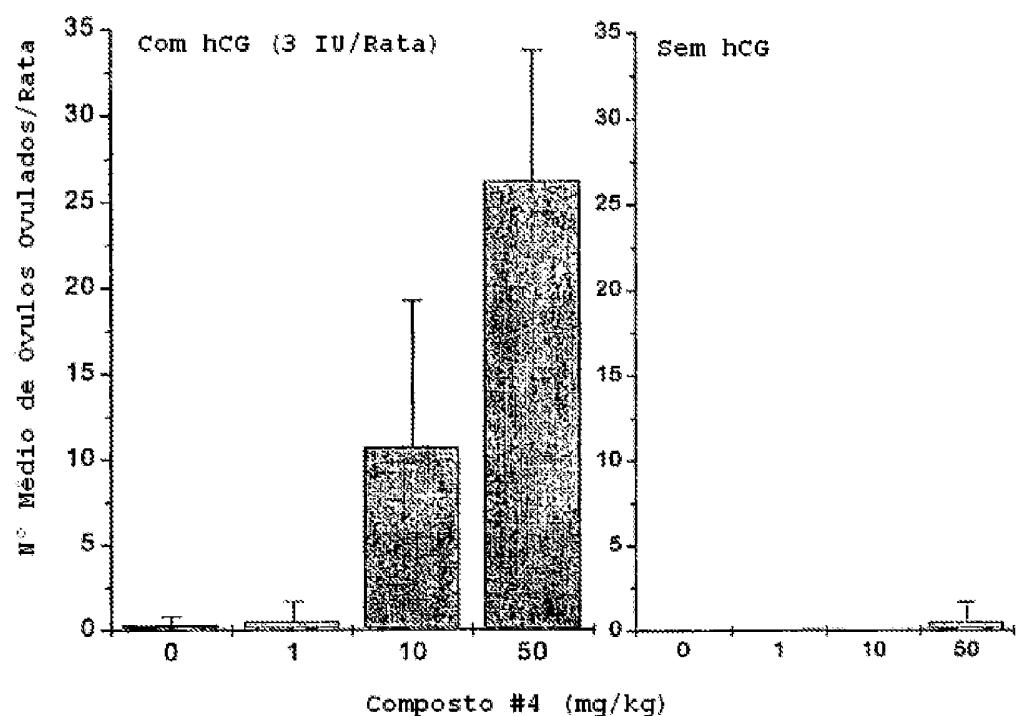
7/10



8/10



9/10



10/10

