

01 2038

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombre y Apellidos o Razón Social

1. STERIX LIMITED

2. SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT

No. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

1. REINO UNIDO

2. ALEMANIA

Departamento o Estado

Ciudad

1. OXFORD OX4 4GA - 2. D-13342 BERLIN

Dirección

1. Magdalen Centre, Robert Robinson Avenue, The Oxford Science Park
2. Muellerstrasse 178

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

DRA.: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

Dirección

CRA 9 No. 93-09, BOGOTA-COLOMBIA

DATOS DEL INVENTOR O DISEÑADOR

(72) Nombre del Inventor (es)

(VER ANEXO No.1) (FOLIO 3)

Dirección y Domicilio

Identificación

DATOS DEL DISEÑO INDUSTRIAL

(54) Título de la Invención

"COMPOSICIÓN Farmacéutica que comprende
un anillo de hidrocarbilo y un grupo
sulfonato"

PRIORIDAD REIVINDICADA

SI

☒

NO

☐

(33) País

GB

(32) Fecha

14/01/00

(31) No. Solicitud

0000792.2

GB

28/01/00

0002115.4

US

17/07/00

60/218730

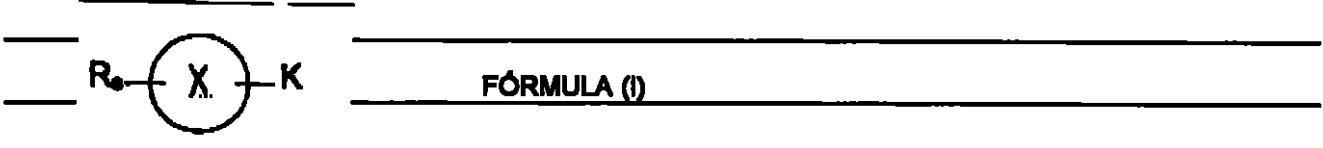
SE REIVINDICA EXPRESAMENTE LA PRIORIDAD DERIVADA DE ESTA SOLICITUD, DE CONFORMIDAD CON EL ART. 4°
DEL CONVENIO DE PARÍS, VIGENTE EN LA LEY 178 DEL 28 DE DICIEMBRE DE 1994.

(51) CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A 61K 31/56

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

En la siguiente invención se presenta una composición farmacéutica que comprende (i) un compuesto de la fórmula (I)



en la cual: X es un anillo de hidrocarbilo con por lo menos 4 átomos en el anillo; K es un grupo hidrocarbilo; Rs es un grupo sulfamato; (ii) optativamente mezclado con un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable, donde el compuesto está presente en una cantidad que produce una dosis de no más de 200 µg/día.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica	☐
Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la S.I.C.	☐
Recibo de la tasa respectiva	☒
Si reivindica prioridad, el certificado respectivo (copia legalizada)	☐
Traducción oficial	☐
Capítulo descriptivo	☒
Dibujos, planos necesarios	☒
Capítulo reivindicatorio	☒
Tarjeta archivo propietarios según formato	☒
Tarjeta archivo temático según formato	☒
Extracto para resumen o para publicación según formato	☒
Arte final 12 x 12 cms	☐

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

Nanaamca Cerillera
FIRMA DEL APODERADO

CC.39 '779.654 Usaquen

T.P.A No. 70819 del Consejo Superior de la Judicatura

12 ENE. 2006

ANEXO No.1**INVENTORES****1. Barry Victor Lloyd POTTER****Magdalen Centre,
Robert Robinson Avenue,
The Oxford Science Park,
Oxford OX4 4GA,
GRAN BRETAÑA.****2. Michael John REED****Magdalen Centre,
Robert Robinson Avenue,
The Oxford Science Park,
Oxford OX4 4GA,
GRAN BRETAÑA.****3. Walter ELGER****Schorlemcralle 12 b,
14195 BERLIN,
ALEMANIA.****4. Gudrun RODDERSEN****Friedrich-Engels-Str 10,
07749 Jena,
ALEMANIA.****5. Heinrich-Thomas PROSKE****Hektorstr. 17,
10711 BERLIN,
ALEMANIA.**



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176489-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 01002039 00000000

Folios: 103

Fecha (AMB): 2001-01-12 15:34:42

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 1,207
FECHA : ENERO 11 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No. PAGO	Vr. PAGO
ALEJANDRO MESA GONZALEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050 00110-6	3033400	3,140,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. CONTABILISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608,000.00
	TOTAL :	\$ 608,000.00

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
e-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

MEMORIA DESCRIPTIVA DE LA PATENTE DE INVENCION

SOBRE

"COMPOSICIÓN"

SOLICITADA POR : 1. STERIX LIMITED

2. SCHERING

AKTIENGESELLSCHAFT

DOMICILIO

: 1. MAGDALEN CENTRE,

ROBERT ROBINSON AVENUE,

THE OXFORD SCIENCE PARK,

OXFORD OX4 4GA,

REINO UNIDO.

2. MUELLERSTRASSE 178,

D-13342 BERLIN,

ALEMANIA

APODERADA: DRA.: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

BOGOTÁ - COLOMBIA

COMPOSICIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con una composición.

Específicamente, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un compuesto en una cantidad que produzca una dosis de no más de 200 µg diarios. El compuesto es un compuesto cíclico que comprende un sistema de anillos y un grupo sulfamato. La presente invención se relaciona asimismo con el uso de la composición en aplicaciones terapéuticas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los estrógenos desempeñan una función trascendental en la anticoncepción hormonal, en la terapia de reemplazo hormonal en la menopausia (TRH) y en el tratamiento de enfermedades ginecológicas (por ejemplo, carcinoma mamario) y enfermedades andrológicas (por ejemplo, carcinoma de próstata). Para la TRH y la anticoncepción, los estrógenos se utilizan principalmente junto con un gestágeno, por ejemplo levonorgestrel, desogestrel, norelisterona, ciproterona acetato, clormadinona acetato, dienogest.

Cuando se los utiliza para la anticoncepción, los estrógenos son necesarios para suprimir de manera segura la maduración del folículo y la ovulación, aunque también reemplazan la secreción ovárica endógena de estradiol, al que se suprime en mayor medida. Este reemplazo es importante para mantener un ciclo menstrual artificial y otras funciones genitales, lo que no se podría lograr en grado satisfactorio utilizando solamente un gestágeno.

Más aun, los estrógenos endógenos y exógenos cumplen funciones metabólicas y del sistema nervioso central de importancia en el organismo de la mujer: los niveles normales de estrógenos realizan una contribución decisiva para el bienestar de la mujer. Su presencia en el organismo contrarresta el desarrollo de enfermedades cardiovasculares por medio de diversos mecanismos: la

generación de patrones lipoproteicos "favorables" en la sangre, la inhibición de los depósitos de lípidos en las paredes de los vasos sanguíneos, la reducción de la presión sanguínea por medio de la influencia favorable sobre el tono vascular, la disminución de la resistencia a la perfusión en sectores vasculares esenciales, la atenuación de los estímulos contráctiles del músculo vascular. Las tónicas íntimas, al ser influenciadas por los estrógenos, liberan factores que contrarrestan la formación de trombos. Los estrógenos también son indispensables para preservar la estructura ósea de la mujer. Su ausencia puede dar como resultado la destrucción del hueso (osteoporosis). Estos últimos efectos "nerviosos centrales" y "metabólicos" de los estrógenos constituyen un aspecto fundamental de la TRH. Se puede considerar que los estrógenos tienen funciones análogas en el organismo masculino y que su retiro trae como consecuencia trastornos similares a los de la mujer. Una diferencia entre los dos sexos es que la producción hormonal en los hombres cesa con menos regularidad y a una edad más avanzada que en la mujer.

Sin embargo, pese a todos los aspectos positivos de la terapia estrogénica, también existen problemas aún no resueltos que restringen el uso terapéutico de los estrógenos o conllevan efectos perjudiciales.

Los estrógenos conocidos exhiben déficits farmacocinéticos. Los estrógenos naturales (el estradiol, la estrona, estrona sulfato, ésteres de estradiol, estriol) sólo pueden ser biodisponibles en un pequeñísimo grado si se los toma por vía oral. Este grado puede variar tanto de persona a persona que no se pueden dar recomendaciones generales en cuanto a la dosis. La rápida eliminación de las sustancias de la sangre constituye otro problema. El reemplazo de estrógenos en la TRH frecuentemente debe ser adaptado al individuo.

Lo mismo ocurre con los estrógenos sintéticos. El esteroide estrogénico sintéticamente modificado de mayor importancia es el etinil estradiol (EE). Este

estrógeno es dominante en la anticoncepción hormonal oral. Aparte del EE, en unos pocos casos se utiliza el mestranol; este es un "profármaco" que es metabolizado a EE en el organismo. Cuando se lo aplica a seres humanos por vía oral, el EE tiene una biodisponibilidad mucho mejor que los estrógenos naturales antes mencionados, aunque su biodisponibilidad oral varía considerablemente de individuo a individuo. Varios autores han señalado este hecho, así como el hecho de que las concentraciones en la sangre demostraron ser sumamente irregulares tras la aplicación oral de esta sustancia (Goldzieher, J. W. 1989, Goldzieher, J. W. 1990, Humpel, M. 1987, Kuhn, 1993).

Por añadidura, los estrógenos conocidos exhiben déficits farmacodinámicos. Tras la resorción de la luz intestinal, los ingredientes activos aplicados por vía oral penetran en el organismo por el hígado. Este hecho es de importancia específica para los agentes estrogénicos, ya que el hígado es un órgano "target" para los estrógenos; la ingesta oral de estrógenos produce fuertes efectos estrogénicos en el hígado. La actividad secretoria, que está controlada por los estrógenos en el hígado humano incluye la síntesis de las proteínas de transferencia CBG, SVG, TBG, antitensinógeno, varios factores que son importantes para la fisiología de la coagulación sanguínea y las lipoproteínas. Si se introducen estrógenos naturales en el organismo femenino evitando al mismo tiempo el paso por el hígado (por ejemplo, mediante aplicación transdérmica), las funciones hepáticas se mantienen virtualmente inalteradas. Las dosis terapéuticamente equivalentes de estrógenos naturales (ver la definición anterior), aplicadas por vía oral, traen como consecuencia claras respuestas de los parámetros hepáticos: aumento de SVG, CBG, antitensinógeno, HDL (lipoproteína de alta densidad). Estos efectos hepáticos del estrógeno son claramente más fuertes cuando, en lugar de estrógenos naturales, se utilizan formulaciones de

estrógenos equinos (mal llamados estrógenos conjugados) (Campbell, S. y otros, 1981). El etinil estradiol y el DES tienen una estrogenicidad hepática aun mayor.

En lo que se refiere a las propiedades antigonadotrópicas, el EE es aproximadamente 4 a 18 veces más estrogénico en el hígado que los estrógenos naturales aplicados por vía oral (Campbell S., y otros, 1981). Esta configura una disociación de propiedades muy desfavorable.

Estos déficits son de importancia clínica considerable en los casos en que se deben aplicar estrógenos naturales y sintéticos conocidos.

Una complicación conocida que se puede producir tras la aplicación de altas dosis de estrógeno a hombres que padecan carcinoma prostático es la tromboembolia fatal. El potencial del EE para producir efectos secundarios en el hígado determina, aunque en forma algo atenuada, la estrategia de la anticoncepción hormonal oral. Con vistas a los efectos anticonceptivos deseados y al mantenimiento del proceso menstrual por un lado, y a la necesidad de tomar en cuenta el considerable potencial de efectos secundarios por el otro, se puede comparar al control de los niveles de EE en sangre con una caminata sobre una cuerda floja. Es bastante posible que un gran porcentaje de mujeres no puedan aplicarse anticonceptivos orales ya sea porque las anomalías del sangrado menstrual, o bien los efectos colaterales relacionados con los estrógenos exceden el umbral de tolerancia.

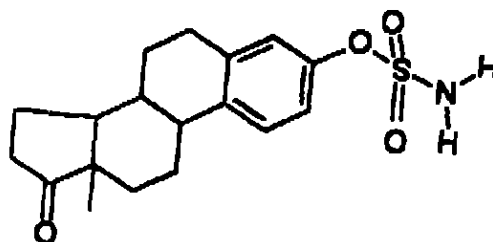
La evidencia sugiere que los estrógenos son los principales mitógenos implicados en la promoción del desarrollo de tumores en tejidos endocrinos tales como la mama y el endometrio. Si bien las concentraciones plasmáticas de estrógenos son similares en mujeres con o sin cáncer mamario, los niveles de estrona y estradiol en tumores mamaros son significativamente superiores a los del tejido mamario normal o la sangre. Se cree que la síntesis *in situ* de estrógeno realiza una importante contribución a los altos niveles de estrógenos en

tumores, y por lo tanto los inhibidores, en especial los inhibidores específicos, de la biosíntesis de estrógenos son de valor potencial para el tratamiento de los tumores endocrinológicos.

En las últimas dos décadas, se ha suscitado un interés considerable por el desarrollo de inhibidores de la ruta de la aromatasa – que convierte al precursor andrógeno androstenediona a estrona. Sin embargo, ahora hay evidencias de que la ruta de la estrona sulfatasa (E1-STS), es decir la hidrólisis de la estrona sulfato a estrona (E1S a E1), a diferencia de la ruta de la aromatasa, es la principal fuente de estrógenos en tumores mamarios. Esta teoría se ve respaldada por una modesta reducción de la concentración plasmática de estrógenos en mujeres con posterioridad a la menopausia con cáncer mamario tratados con inhibidores de la aromatasa tales como aminoglutetimida y 4-hidroxiandrostenediona, y también por el hecho de que la concentración de E1S en plasma en estos pacientes tratados con inhibidores de la aromatasa se mantenga relativamente elevada. La prolongada vida media del E1S en sangre (10 – 12 h) en comparación con los estrógenos no conjugados (20 minutos) y los altos niveles de actividad de esteroide sulfatasa en el hígado, y en los tejidos mamarios normales y malignos también sirven de sustento a esta teoría.

La PCT/ GB92/01587 describe novedosos inhibidores de la esteroide sulfatasa y composiciones farmacéuticas que los contienen para usar en el tratamiento de tumores dependientes de la estrona, especialmente el cáncer de mama. Estos inhibidores de esteroide sulfatasa son ésteres de sulfamato tales como N,N-dimetil estrona-3-sulfamato y, preferentemente, estrona-3-sulfamato (también conocido como "EMATE"). En WO 96/05216 y WO 96/05217 se describen otros ésteres de sulfamato. Estos ésteres de sulfamato incluyen el estradiol-3-sulfamato (al que en la presente se hace referencia como J995).

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



Se sabe que el EMATE es un potente inhibidor de E1-STS, ya que exhibe una inhibición superior al 99 % de la actividad de E1-STS en células MCF-7 intactas a razón de 0,1 mM. El EMATE también inhibe la enzima E1-STS en forma dependiente del tiempo y la concentración, lo que indica que actúa como activo inactivador de sitio específico. Si bien originariamente el EMATE estaba destinado a la inhibición de E1-STS, también inhibe la deshidroepiandrosterona sulfatasa (DHA-STS), que se cree es una enzima que cumple un papel crucial en la regulación de la biosíntesis del esteroide estrogénico androstenediol. Además, ahora se cuenta con evidencias que sugieren que el androstenediol puede ser de importancia aun mayor como promotor del desarrollo de tumores mamarlos. El EMATE también es activo in vivo como inhibidor casi total de las actividades de E1-STS (99 %) y DHA-STS (99 %) en el hígado de la rata, si se lo administra por vía oral o subcutánea. Más aun, se ha demostrado que el EMATE tiene efecto intensificador de la memoria en ratas. Los estudios en ratones han sugerido una asociación entre la actividad de DHA-STS y la regulación de parte de la respuesta inmune. Se piensa que esto puede ocurrir también en humanos. El átomo O que actúa como puente en la porción sulfamato del EMATE es importante para la actividad inhibitoria. Por consiguiente, cuando se reemplaza el átomo 3-O con otros heteroátomos como en el caso de la estrona-3-N-sulfamato y estrona-3-S-sulfamato, estos análogos son inactivadores más débiles y no dependen del tiempo.

Si bien se puede haber obtenido una potencia óptima para la inhibición de E1-STS en EMATE, es posible que se pueda liberar estrona durante la inhibición de la sulfatasa y que EMATE y su congénere estradiol puedan poseer actividad estrogénica.

Ahmed y otros (Biochem Biophys Res Commun 1999 enero 27; 254(3): 811 – 5) dan a conocer un estudio sobre la relación estructura – actividad de los inhibidores esteroides y no esteroides de STS.

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención presentar composiciones novedosas adecuadas para la anticoncepción oral, la terapia de reemplazo hormonal, la inhibición de E1-STS, así como para otras aplicaciones terapéuticas.

ASPECTOS RESUMIDOS DE LA PRESENTE INVENCION

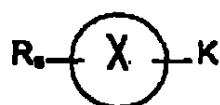
La presente invención se basa en el asombroso hallazgo de que ciertas composiciones que presentan un compuesto cíclico, compuesto cíclico que comprende un sistema de anillos y un grupo sulfamato ("un compuesto de sulfamato") en una cantidad que da origen a una dosis de no más de 200 µg/ día pueden producir la anticoncepción oral, la terapia de reemplazo hormonal y/o la inhibición de E1-STS. En las dosis provistas por la composición de la presente invención, los compuestos administrados exhiben una relación más favorable entre los efectos buscados y los terapéuticamente perjudiciales.

Los compuestos de sulfamato comprenden por lo menos un componente anular. Ese componente anular comprende por lo menos 4 átomos en el anillo. Típicamente, esos 4 átomos son átomos de carbono. Por consiguiente, típicamente ese componente anular conforma un grupo hidrocarbilo. El compuesto cíclico incluye asimismo un grupo sulfamato como sustituyente(s) adicional en el sistema de anillos. El grupo sulfamato es un sustituyente del componente anillo.

ASPECTOS PORMENORIZADOS DE LA PRESENTE INVENCION

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se presenta una composición farmacéutica que comprende

(i) un compuesto de la fórmula (I)



Fórmula I

en la cual: X es un anillo de hidrocarbilo con por lo menos 4 átomos en el anillo; K es un grupo hidrocarbilo; Rs es un grupo sulfamato;

(ii) optativamente mezclado con un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable,

donde el compuesto está presente en una cantidad que produzca una dosis de no más de 200 µg/ día.

En un aspecto alternativo, la presente invención presenta una composición farmacéutica que comprende un compuesto, donde el compuesto está presente en una cantidad tal que se depare al plasma sanguíneo del sujeto a tratar el compuesto antes descrito o un metabolito del mismo en una cantidad que no exceda los 200 µg/ día.

La dosis máxima mencionada, así como todas las dosis a las que se hace referencia en la presente memoria descriptiva se relaciona con una dosis para un sujeto de 70 kg, a menos que se indique lo contrario. Una persona capacitada en la material podría modificar fácilmente las dosis mencionadas para un sujeto que tenga una masa que no sea de 70 kg.

La dosis diaria se calcula dividiendo la dosis a administrar al sujeto por el período de dosificación estimado, en días. El período de dosificación estimado es típicamente el período hasta la siguiente administración, el período durante el cual

la dosis ha de producir su efecto o el período durante el cual es necesario que la dosis tenga efecto.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se presenta una composición de acuerdo con la presente invención para usar en medicina.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se presenta el uso de una composición de acuerdo con la presente invención en la elaboración de un medicamento para usar en anticoncepción oral.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se presenta el uso de una composición de acuerdo con la presente invención en la elaboración de un medicamento para usar en terapia de reemplazo.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se presenta el uso de una composición de acuerdo con la presente invención en la elaboración de un medicamento para usar en el tratamiento de un trastorno o enfermedad asociada con STS.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se presenta el uso de un compuesto de acuerdo con la presente invención en la elaboración de un medicamento para usar en el tratamiento de un trastorno o enfermedad asociada con niveles adversos de STS.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se presenta un método para tratar a un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto un compuesto de acuerdo con la presente invención en una cantidad que no exceda los 200 µg/ día.

Para facilidad de referencia, se describen estos y otros aspectos de la presente invención bajo los encabezamientos de sección correspondientes. Sin embargo, las descripciones presentadas en cada sección no están necesariamente limitadas a cada sección específica.

ASPECTOS PREFERIBLES

De preferencia, el compuesto está presente en la composición en una cantidad que dé lugar a una dosis de 10 a 200 μg diarios.

De preferencia, el compuesto está presente en la composición en una cantidad que dé lugar a una dosis de 50 a 200 μg diarios.

De preferencia, el compuesto está presente en la composición en una cantidad que dé lugar a una dosis de 20 a 50 μg diarios.

En otro aspecto, el compuesto está presente en la composición en una cantidad que dé lugar a una dosis que no exceda o sea inferior a 100 μg / día.

La composición puede ser formulada de tal manera que la administración diaria, semanal o mensual dé origen a la dosis diaria buscada. Por ejemplo, la presente invención puede proporcionar una composición que comprenda el compuesto de sulfamato en una cantidad de no más de 200 μg / dosis (para una dosis diaria), no más de 1,4 mg/ dosis (dosis semanal) o no mayor que 5 mg/ dosis (dosis mensual). Se apreciará que la composición también puede ser formulada para la administración con una frecuencia mayor o menor que diaria, semanal o mensual.

De preferencia, X en combinación con K limita una estructura esteroide.

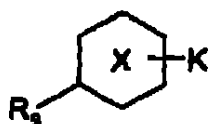
De preferencia, K es un grupo cíclico.

De preferencia, X es un anillo de seis miembros.

De preferencia, el anillo X tiene seis átomos de carbono en el anillo.

Es preferible que el compuesto de la fórmula I tenga la fórmula presentada como Fórmula II, en la cual cada uno de Rs, X y K tiene el significado antes expuesto.

Fórmula II



Es preferible que el grupo K y el anillo X, juntos, contengan, incluyendo todos los sustituyentes, un máximo de aproximadamente 50 átomos de carbono, más generalmente no más de aproximadamente 30 a 40 átomos de carbono.

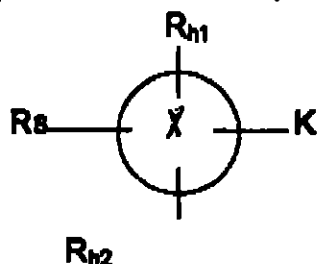
Es preferible que X, en combinación con K, sea una estructura de anillo esteroidal.

De preferencia, el grupo Rs está en la posición 3 del anillo X.

De preferencia, Rs es un grupo sulfamato.

De preferencia, el compuesto es de la fórmula III

Fórmula III



en la cual X, K y Rs son como se los definiera anteriormente, y donde Rh1 es un grupo halo optativo; Rh2 es un grupo halo optativo; por lo menos uno de Rh1 y Rh2 está presente.

De preferencia, el Rh1 está en la posición 2 del anillo X.

De preferencia, el Rh2 está en la posición 4 del anillo X.

Para algunas aplicaciones, es preferible que los compuestos no tengan efecto estrogénico, o lo tengan en infimo grado.

En una realización, la composición de la presente invención sirve para el tratamiento del cáncer mamario.

ALGUNAS VENTAJAS

Las ventajas clave de la presente invención incluyen la farmacocinética y farmacodinámica mejoradas de la composición de acuerdo con la presente invención.

Una ventaja clave de la presente invención es que, en la dosis administrada, los compuestos de sulfamato tienen un bajo metabolismo hepático.

Se cree que los compuestos de la presente invención, tales como EMATÉ y J995, tienen una elevada afinidad por los eritrocitos, por lo que se fija hasta 99 % del compuesto en la sangre. El paso del compuesto por el hígado en este compartimiento evita la extracción, el metabolismo y la acción de primer paso hepático. Por consiguiente, los compuestos de sulfamato administrados tienen elevada biodisponibilidad.

Otra de las ventajas clave de la presente invención es que los compuestos de sulfamato exhiben poca variación en la concentración plasmática de un individuo a otro. La reducción de la variación entre individuos de los niveles de estrógeno en la sangre permite específicamente la producción de un monoproducto tanto para sujetos histerectomizados como no histerectomizados, sin necesidad de desarrollar productos separados.

Otra de las ventajas clave de la presente invención es que los compuestos de sulfamato exhiben una lenta eliminación por el sujeto. La composición de la presente invención produce niveles plasmáticos constantes de estrona (E1) y estradiol (E2).

Una ventaja clave de la presente invención es que, en la dosis administrada, los compuestos de sulfamato tienen poca acción hormonal. Por lo tanto, se reducen los riesgos de trombosis venosa profunda.

Una ventaja clave de la presente invención es que, en la dosis administrada, se confiere protección a los huesos, y al mismo tiempo la dosis es inferior al umbral de proliferación/ estimulación del endometrio. Como se indicara anteriormente, los estrógenos son indispensables para preservar la estructura ósea en las mujeres. Su ausencia puede traer como consecuencia la destrucción del hueso (osteoporosis). Sin embargo, en una TRH típica, se administra una estrona en una dosis tal que prolifera el endometrio, así como los efectos

benéficos. La composición de la presente invención da lugar a una terapia de reemplazo hormonal para la protección ósea sin estimulación del endometrio.

Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención presenta el uso de un compuesto de acuerdo con lo definido en la presente, preferentemente una composición de acuerdo con lo definido en la presente, en la elaboración de un medicamento para la terapia de reemplazo hormonal con protección ósea sin estimulación del endometrio.

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

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

Otra ventaja es que algunos de los compuestos pueden no tener capacidad para ser metabolizados a compuestos que manifiestan o inducen actividad hormonal.

Algunos de los compuestos de la presente invención son ventajosos asimismo por el hecho de que pueden ser oralmente activos.

Algunos de los compuestos de la presente invención pueden ser útiles para el tratamiento del cáncer, como el cáncer mamario, así como para trastornos no malignos (como alternativa), tales como la prevención de enfermedades autoinmunes, sobre todo cuando los productos deben ser administrados desde una edad precoz.

Por consiguiente, se cree que algunos de los compuestos de la presente invención tienen usos terapéuticos aparte del tratamiento de los cánceres endocrinológicos tales como ser en el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

TERAPIA DE REEMPLAZO HORMONAL

La composición de la presente invención puede ser formulada para producir una terapia de reemplazo hormonal. La composición se formula de

manera que contenga el compuesto de sulfamato en una cantidad tal que, según la frecuencia de administración-prescripta, se aporte la dosis diaria necesaria del compuesto de sulfamato.

En un aspecto, se ha de formular la composición de manera que dé lugar a la administración diaria. Esta composición puede ser formulada en combinación con progestinas.

En todos los aspectos de la presente invención, incluso en la administración oral diaria, se obtiene la terapia de reemplazo hormonal de manera más conveniente que la aplicación de un parche transdérmico, que es una ruta de administración típica para la TRH.

DIARIA

Cuando se crea un régimen diario de administración de, por ejemplo, 100 μg / día, se observan principalmente las siguientes ventajas clave.

- reducción de la variación de los niveles de estrógeno en la sangre del sujeto de un individuo a otro
- niveles plasmáticos estables de E1 y E2

Cuando se crea un régimen diario de administración de 20 a 50 μg / día, se observan principalmente las siguientes ventajas clave.

- no se observa sangrado uterino
- no hay impacto sobre la glándula mamaria.

SEMANAL

En un aspecto, se ha de formular la composición de manera que se dé lugar a la administración semanal. Se puede proporcionar una dosis de 0,5 a 2 mg/ semana, por ejemplo de 1 mg/ semana.

La dosis semanal es ventajosa por motivos de conveniencia con respecto tanto a los parches como a la administración diaria de la composición de la presente invención.

MENSUAL

También se contempla una composición para TRH mensual en la cual se provee una dosis mensual de 2 a 4 mg, o de hasta 5 mg/ dosis del compuesto.

Más aun, las composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden ser utilizadas para el tratamiento de las endometriosis y para la terapia de tumores asociados con los estrógenos. En este aspecto, una de las ventajas clave de la presente invención es que los compuestos de sulfamato de la presente invención pueden actuar como inhibidores de la esteroide sulfatasa.

ESTEROIDE SULFATASA

La esteroide sulfatasa – a la que en ocasiones se hace referencia como esteroide sulfatasa o esteril sulfatasa o, abreviado "STS" – hidroliza a varios esteroides sulfatados tales como la estrona sulfato, dihidroespiandrosterona sulfato y colesterol sulfato. Se ha adjudicado a la STS el número de enzima EC 3.1.6.2.

La STS ha sido clonada y expresada. Ver, por ejemplo, Stein y otros (J. Biol. Chem. 264: 13865 – 13872 (1989) y Yen y otros (Cell 49: 443 – 454 (1987)).

La STS es una enzima que ha estado implicada en un número de trastornos patológicos.

A manera de ejemplo, los trabajadores han encontrado que una deficiencia total de STS produce ictiosis. De acuerdo con algunos trabajadores, la deficiencia de STS es bastante predominante en Japón. Los mismos trabajadores (Sakura y otros, J Inherit Metab Dis 1997 Nov; 20(6): 807 – 10) han dado a conocer también que las enfermedades alérgicas – tales como el asma bronquial, la rinitis alérgica o la dermatitis atópica – pueden estar asociadas con una deficiencia de esteroide sulfatasa.

Además de provocar estados patológicos por medio de una falta total de actividad de STS, un mayor nivel de actividad de STS también puede causar trastornos patológicos. A manera de ejemplo y de acuerdo con lo indicado anteriormente, existen fuertes evidencias que confirman la función de la STS en el desarrollo de cáncer mamario y metástasis.

La STS también ha estado implicada en otros estados de enfermedad. A manera de ejemplo, Le Roy y otros (Beba Genet 1999 Mar, 29(2): 131 – 6) han determinado que puede haber una correlación genética entre la concentración de esteroide sulfatasa y la iniciación del comportamiento de ataque en ratones. Los autores llegan a la conclusión de que la sulfatación de esteroides puede ser el principal iniciador de una compleja red, que incluye los genes que han demostrado estar implicados en la agresión por medio de mutagénesis.

INHIBICIÓN DE STS

Se cree que algunos trastornos asociados con la actividad de STS se deben a la conversión de una estrona sulfatada no activa a una estrona activa no sulfatada. En los desórdenes patológicos asociados con la actividad de STS, sería conveniente inhibir la actividad de STS.

En este caso, el término "inhibir" incluye reducir y/o eliminar y/o ocultar y/o prevenir la acción deletérea de STS.

INHIBIDOR DE STS

De acuerdo con la presente invención, el compuesto de la presente invención tiene capacidad para actuar como inhibidor de STS.

En este caso, el término "inhibidor" utilizado en la presente con respecto al compuesto de la presente invención representa un compuesto q que puede inhibir la actividad de STS – como por ejemplo reducir y/o eliminar y/o ocultar y/o prevenir la acción deletérea de STS. El inhibidor de STS puede actuar como antagonista.

La aptitud de los compuestos para inhibir la actividad de estrona sulfatasa puede ser evaluada empleando células intactas de cáncer mamario MCF-7 o microsomas placentarios. Además, se puede utilizar un modelo animal. Los detalles acerca de Protocolos de Ensayo adecuados aparecen en las siguientes secciones. Se debe apreciar que se podrían emplear otros ensayos para determinar la actividad de STS y, de esa manera, la inhibición de STS. Por ejemplo, también se puede hacer referencia al texto de WO-A-99/50453.

De preferencia, para algunas aplicaciones, el compuesto se caracteriza además por la característica de que, en caso de sustituir el grupo sulfamato con un grupo sulfato para formar un derivado de sulfato, luego el derivado sulfato sería hidrolizable por una enzima con actividad de esteroide sulfatasa (E.C. 3.1.6.2) – es decir, al ser incubada con esteroide sulfatasa EC 3.1.6.2 a pH 7,4 y a 37°C.

En una realización preferida, si se debiera reemplazar el grupo sulfamato con un grupo sulfato para formar un compuesto de sulfato, luego ese compuesto de sulfato podría ser hidrolizado por una enzima con actividad de esteroide sulfatasa (E.C. 3.1.6.2) y produciría un valor Km inferior a 200 mmolar, preferentemente inferior a 150 mmolar, preferentemente inferior a 100 mmolar, preferentemente inferior a 75 mmolar, preferentemente inferior a 50 mmolar al ser incubado con esteroide sulfatasa EC 3.1.6.2 a pH 7,4 y a 37°C.

En una realización preferida, el compuesto de la presente invención no es hidrolizable por una enzima con actividad de esteroide sulfatasa (E.C. 3.1.6.2).

Para algunas aplicaciones, es preferible que el compuesto de la presente invención tenga por lo menos una selectividad de 100 veces por un target propuesto (por ejemplo, STS), preferentemente una selectividad de por lo menos 150 veces con respecto al target deseado, preferentemente de por lo menos 200 veces con respecto al target deseado, preferentemente de por lo menos 250

veces con respecto al target deseado, preferentemente de por lo menos 300 veces con respecto al target deseado, preferentemente de por lo menos 350 veces con respecto al target deseado.

Se debe notar asimismo que el compuesto de la presente invención puede tener otras propiedades benéficas además o en lugar de su capacidad para inhibir la actividad de STS.

GRUPO K

No es necesario que el grupo K sea una estructura cíclica. En este aspecto, el grupo K puede ser una estructura lineal que puede tener la capacidad de conformarse a una estructura anular al encontrarse *in vivo*.

En un aspecto preferido, el grupo K es cíclico – como para formar el grupo cíclico K.

No es necesario que el grupo cíclico K esté fusionado al anillo X. En este aspecto, los mismos pueden estar separados por un grupo espaciador adecuado – que puede consistir en un grupo hidrocarbilo.

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

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

Por consiguiente, en un aspecto preferido, el grupo K y el anillo X conforman un compuesto policíclico. De acuerdo con lo señalado, en este caso el término "policíclico" incluye estructuras anulares fusionadas y no fusionadas, incluso combinaciones de las mismas.

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

Por lo menos uno de los grupos cíclicos K y X puede ser una estructura de anillo saturado o una estructura de anillo no saturado (tal como un grupo ariilo).

Es preferible que por lo menos uno de los grupos cíclicos sea un anillo de anilo.

Si el grupo cíclico es policíclico, algunos o todos los componentes del anillo del compuesto pueden estar fusionados entre sí o unidos por medio de uno o más grupos espaciadores adecuados.

El compuesto policíclico puede comprender un número de anillos fusionados. En este aspecto, los anillos fusionados pueden comprender cualquier combinación de anillos de diferentes tamaños, como por ejemplo 3 anillos de seis miembros (6, 6, 6), un anillo de seis miembros, un anillo de siete miembros y un anillo de seis miembros (6, 7, 6), un anillo de seis miembros y dos anillos de ocho miembros (6, 8, 8) etc.

En un aspecto, la presente invención se relaciona con compuestos en los cuales los compuestos policíclicos no son anillos (6, 6, 7). En otro aspecto, la presente invención se relaciona con compuestos en los cuales los compuestos policíclicos sólo contienen anillos que no tienen 7 miembros.

De preferencia, el compuesto policíclico ha de contener, incluyendo todos los sustituyentes, no más de aproximadamente 50 átomos de carbono, más habitualmente no más de aproximadamente 30 a 40 átomos de carbono.

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

Es preferible que el compuesto policíclico comprenda cuatro componentes de anillo.

Los compuestos policíclicos preferidos tienen un componente de anillo esteroide o bio-ésteres del mismo.

HIDROCARBILO

El término "grupo hidrocarbilo" empleado en el presente contexto significa un grupo que comprende por lo menos C y H y puede contener optativamente uno o más sustituyentes adecuados adicionales. Entre los ejemplos de tales sustituyentes pueden incluir halo, alcoxi, nitro, un grupo alquilo, un grupo cíclico, etc. Además de la posibilidad de que los sustituyentes sean un grupo cíclico, una combinación de sustituyentes puede formar un grupo cíclico. Si el grupo hidrocarbilo comprende no más de un C, luego no es necesario que esos carbonos estén ligados entre sí. Por ejemplo, por lo menos dos de los carbonos pueden estar ligados por medio de un elemento o grupo adecuado. Es así como el grupo hidrocarbilo puede contener heteroátomos. Los heteroátomos adecuados resultarán obvios para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, azufre, nitrógeno y oxígeno. Un ejemplo no limitante de grupo hidrocarbilo es un grupo acilo.

Un grupo hidrocarbilo típico es un grupo hidrocarburo. En este contexto, el término "hidrocarburo" significa cualquiera de un grupo alquilo, un grupo alquénilo, un grupo alquínilo, grupos éstos que pueden ser lineales, ramificados o cíclicos, o bien un grupo arilo. El término hidrocarburo también incluye esos grupos, pero cuando han sido optativamente sustituidos. Si el hidrocarburo es una estructura ramificada que tiene sustituyente(s) en el mismo, luego la sustitución puede estar en la cadena principal del hidrocarburo o en la ramificación; por otro lado, las sustituciones pueden estar en la cadena principal del hidrocarburo y en la ramificación.

GRUPO SULFAMATO

En una realización, el anillo X tiene un grupo sulfamato como sustituyente. El término "sulfamato" empleado en la presente incluye un éster de ácido

sulfámico o un éster de un derivado N-sustituido de ácido sulfámico, o bien una sal del mismo.

Si Rs es un grupo sulfamato, en ese caso se hace referencia al compuesto de la presente invención como compuesto de sulfamato.

Típicamente, el grupo sulfamato tiene la fórmula:



en la cual preferentemente R1 y R2 son independientemente seleccionados entre H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo y arilo o combinaciones de los mismos, o juntos representan alquileno, donde el o cada grupo alquilo o cicloalquilo o alquenilo contiene optativamente uno o más heteroátomos o grupos.

Cuando están sustituidos, los compuestos N-sustituidos de la presente invención pueden contener uno o dos sustituyentes N-alquilo, N-alquenilo, N-cicloalquilo o N-arilo, que preferentemente contienen o cada uno de los cuales contiene un máximo de 10 átomos de carbono. Cuando R1 y/o R2 es alquilo, los valores preferidos son aquellos en los cuales, cuando cada uno de R1 y R2 es independientemente seleccionado entre grupos alquilo inferior que contienen de 1 a 6 átomos de carbono, es decir metilo, etilo, propilo, etc., tanto R1 como R2 pueden ser metilo. Cuando R1 y/o R2 es arilo, los valores típicos son fenilo y toliilo (pHCH3; o). Cuando R1 y R2 representan cicloalquilo, los valores típicos son ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, etc. Cuando están unidos entre sí, R1 y R2 representan típicamente un grupo alquileno que presenta una cadena de 4 a 6 átomos de carbono, optativamente interrumpida por uno o más heteroátomos o grupos, por ejemplo para producir un heterociclo de 5 miembros, por ejemplo morfolino, pirrolidino o piperidino.

Dentro de los valores se incluyen grupos alquilo, cicloalquilo, alquenilo y arilo sustituidos que contienen, como sustituyentes, uno o más grupos que no interfieren con la actividad inhibitoria de sulfatasa del compuesto en cuestión.

Entre los ejemplos de sustituyentes que no interfieren se cuentan hidroxí, amino, halo, alcoxi, alquilo y arilo.

En algunas realizaciones, el grupo sulfamato puede formar una estructura anular al estar fusionado (o asociado con) uno o más átomos del grupo o presentes en el grupo X.

En algunas realizaciones, puede haber más de un grupo sulfamato. A manera de ejemplo, puede haber dos sulfamatos (es decir, compuestos de bis-sulfamato). Si estos compuestos están basados en un núcleo esteroide, preferentemente el segundo grupo sulfamato (o por lo menos uno de los adicionales) está situado en la posición 17 del núcleo esteroidal. No es necesario que estos grupos sean iguales.

En algunas realizaciones preferidas, por lo menos uno de R1 y R2 es H.

En otras de las realizaciones preferidas, cada uno de R1 y R2 es H.

IMITACIÓN

En un aspecto, X y K pueden ser una imitación de una estructura de anillo esteroidal.

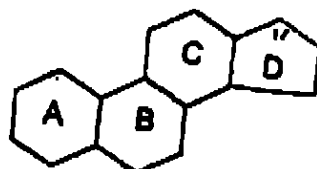
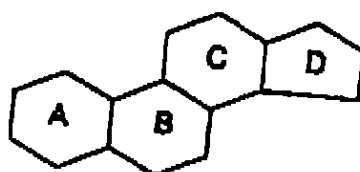
El término "imitación" empleado en la presente significa que tiene una estructura similar o diferente pero que tiene un efecto funcional similar. En otras palabras, el grupo K y el anillo X juntos, pueden representar una bioisostereo de los anillos de un esteroide o una parte activa de los mismos.

En un aspecto preferido, el grupo K y el anillo X juntos pueden ser un bioisostereo de los anillos de estrona o parte de los mismos.

ESTRUCTURA DE ANILLO ESTEROIDAL

En un aspecto preferido, X y K conforman una estructura de anillo esteroidal – es decir, un esqueleto de ciclopentanofenantreno o bioisostéreos del mismo.

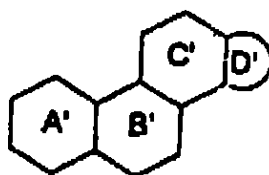
Como es de conocimiento de los técnicos en la materia, una estructura clásica de anillo esteroidal tiene la siguiente fórmula genérica:



En la fórmula que antecede, los anillos han sido rotulados de manera convencional.

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

En este aspecto, la estructura de una estructura policíclica preferida puede ser representada de la siguiente manera:



donde cada anillo A', B', C' y D' representa independientemente un anillo heterocíclico o un anillo no heterocíclico, anillos que pueden estar independientemente sustituidos o no sustituidos, saturados o insaturados.

A manera de ejemplo, uno o más cualesquiera de los anillos A', B', C' y D' puede estar sustituido con grupos adecuados – como ser un grupo alquilo, un grupo arilo, un grupo hidroxil, un grupo halo, un grupo hidrocarbilo, un grupo oxihidrocarbilo, etc.

Un ejemplo de D' es un anillo no heterocíclico de cinco o seis miembros con por lo menos un sustituyente.

En una realización preferida, el anillo D' está sustituido con un grupo etinilo.

Si alguno de los anillos A', B', C' y D' es un anillo heterocíclico, luego ese anillo heterocíclico preferentemente comprende una combinación de átomos de C y por lo menos un átomo de N y/o por lo menos un átomo de O. Puede haber otros átomos heterocíclicos en el anillo.

Entre los ejemplos de anillos de núcleos esteroidales preferidos A' – D' de los compuestos de la presente invención se cuentan los anillos A-D de deshidroepiandrosterona y estrógenos, incluyendo estrona. Los estrógenos preferidos incluyen estrógenos naturales tales como estrona, estradiol, estratriol, epiestriol y estrógenos conjugados (derivados de equilenina).

En un aspecto de la presente invención, es preferible que el compuesto de la presente invención sea un profármaco de un estrógeno natural, preferentemente un estrógeno natural seleccionado entre estrona, estradiol, estratriol y epiestriol.

Los anillos de núcleos esteroidales preferidos A'-D' de los compuestos de la presente invención incluyen los anillos A-D de:

estronas y estronas sustituidas, a saber,

estrona

4-OH-estrona

6 α -OH-estrona

7 α -OH-estrona

16 α -OH-estrona

18 α -OH-estrona

17-desoxiestrona

estrona

estradiolos y estradiolos sustituidos, a saber:

4-OH-17 β -estradiol

6 α -OH-17 β -estradiol

7 α -OH-17 β -estradiol

6 α -OH-17 α -estradiol

16 α -OH-17 α -estradiol

16 α -OH-17 β -estradiol

16 β -OH-17 α -estradiol

16 β -OH-17 β -estradiol

17 α -estradiol

17 β -estradiol

17 α -etinil-17 β -estradiol

17 β -etinil-17 α -estradiol

17-desoxiestradiol

estriolos y estriolos sustituidos, a saber:

estriol

4-OH-estriol

6 α -OH-estriol

7 α -OH-estriol

17-desoxiestriol

deshidroepiandrosteronas y deshidroepiandrosteronas sustituidas, a saber:

deshidroepiandrosteronas

6 α -OH-deshidroepiandrosterona

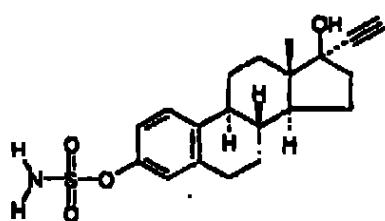
7 α -OH-deshidroepiandrosterona

16 α -OH-deshidroepiandrosterona

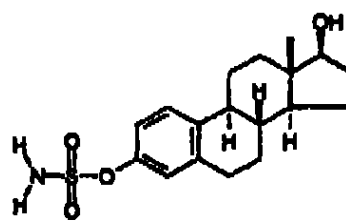
16 β -OH-deshidroepiandrosterona

En términos generales, el sistema de anillos A'B'C'D' puede contener una variedad de sustituyentes no interferentes. En especial, el sistema de anillos A'B'C'D' puede contener uno o más de hidroxilo, alquilo, especialmente alquilo inferior (C₁-C₆), por ejemplo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo y otros isómeros de pentilo y n-hexilo y otros isómeros de hexilo, alcoxi, especialmente alcoxi inferior (C₁-C₆), por ejemplo metoxi, etoxi, propoxi, alquilnilo, por ejemplo etinilo o halógeno, por ejemplo sustituyentes fluoro.

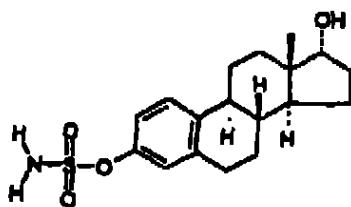
En un aspecto sumamente preferido, se combina una estructura de anillo esteroidal con sustituyentes preferidos de acuerdo con la presente invención de tal manera que el compuesto de la presente invención sea seleccionado entre los compuestos de las fórmulas:



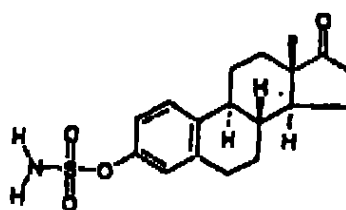
17 α etinil 17 β estradiol-3-sulfamato



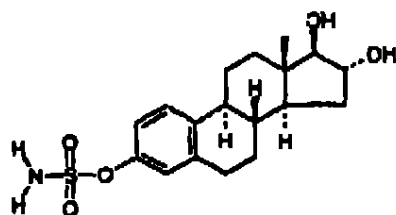
17 β estradiol-3-sulfamato



17 α estradiol-3-sulfamato



estrone-3-sulfamato (EMATE)



estriol-3-sulfamato

ESTRUCTURAS NO ESTEROIDES

En una realización alternativa, el compuesto de la presente invención puede no contener o estar basado en un núcleo esteroide. En este aspecto, el compuesto policíclico puede contener o basarse en un sistema de anillos no esteroideal – tal como dietilestilbestrol, estilbestrol, cumarinas, flavonoides, combrestatina y otros sistemas anulares. En US-A-5567831 se pueden encontrar otros compuestos no esteroides adecuados par usar en o como composición de la presente invención.

OTROS SUSTITUYENTES

El compuesto de la presente invención puede tener sustituyentes diferentes de Rh1, Rh2 y Rs. A manera de ejemplo, estos otros sustituyentes pueden ser uno o más de: uno o más grupos sulfamato, uno o más grupos fosfonato, uno o más grupos tiofosfonato, uno o más grupos sulfonato, uno o más grupos sulfonamida, uno o más grupos halo, uno o más grupos O, uno o más grupos hidroxí, uno o más grupos amino, uno o más grupos con contenido de azufre, uno o más grupos hidrocarbilo – como ser un grupo oxihidrocarbilo.

OXIHIDROCARBILQ

El término grupo "oxihidrocarbilo" utilizado en la presente se refiere a un grupo que comprende por lo menos C, H y O y que optativamente puede comprender uno o más sustituyentes adecuados adicionales. Entre los ejemplos de dichos sustituyentes se puede incluir halo-, alcoxi-, nitro-, un grupo alquilo, un grupo ciclico, etc. Además de la posibilidad de que los sustituyentes sean un

grupo cíclico, una combinación de sustituyentes puede formar un grupo cíclico. Si el grupo oxihidrocarbilo comprende más de un C, luego no es necesario que esos carbonos estén ligados entre sí. Por ejemplo, por lo menos dos de los carbonos pueden estar ligados por medio de un elemento o grupo adecuado. Por consiguiente, el grupo oxihidrocarbilo puede contener heteroátomos. Los heteroátomos adecuados son evidentes para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, azufre y nitrógeno.

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

En este contexto, el término "oxihidrocarburo" se refiere a cualquiera entre un grupo alcoxi, un grupo oxialquénilo, un grupo oxialquinilo, grupos éstos que pueden ser lineales, ramificados o cíclicos, o bien un grupo oxiarilo. El término oxihidrocarburo incluye asimismo a aquellos grupos que han sido optativamente sustituidos. Si el oxihidrocarburo es una estructura ramificada con sustituyente(s) en la misma, luego la sustitución puede estar en la columna principal del hidrocarburo o en la ramificación; por otro lado, las sustituciones pueden estar en la columna principal del hidrocarburo y en la ramificación.

Típicamente, el grupo oxihidrocarbilo es de la fórmula $C_{1-8}O$ (tal como $C_{1-3}O$).

ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE STS UTILIZANDO CÉLULAS CANCEROSAS (PROTOCOLO 1)

Inhibición de la Actividad de Esterolde Sulfatasa en células MCF-7

La actividad de esteroide sulfatasa se mide in vitro empleando células MCF-7 de cáncer mamario humanas intactas. Esta línea celular hormona-dependiente es de uso generalizado para el estudio del control del desarrollo de células de cáncer mamario en humanos. Posee considerable actividad de

esteroide sulfatasa (MacIndoe y otros, *Endocrinology*, 123, 1281 – 1287 (1988); Purohit & Reed, *Int. J. cáncer.*, 50, 901 – 905 (1992) y se la puede obtener en los Estados Unidos en la American Type Culture Collection (ATCC) y en el Reino Unido (por ejemplo en The Imperial cáncer Research Fund).

Se mantiene a las células en Medio Mínimo Esencial (MEM) (Flow Laboratories, Irvine, Escocia) con un contenido de 20 mM de HEPES, 5 % de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, aminoácidos no esenciales y 0,075 % de bicarbonato de sodio. Se siembran hasta 30 frascos iguales de cultivo tisular con capacidad para 25 cm² con aproximadamente 1×10^5 células/ frasco utilizando el medio mencionado. Se cultiva a las células hasta una confluencia de 80 % y se cambia el medio cada tres días.

Se lavan monocapas intactas de células MCF-7 en frascos iguales de cultivo tisular de 25 cm² con Solución Salina Equilibrada de Earle (ESS de ICN Flow, High Wycombe, R. U.) y se las incuban durante 3 – 4 horas a 37°C con 5 pmoles (7×10^6 dpm) de [6,7-³H]estrón-3-sulfato (actividad específica de 60 Ci/mmol de New England Nuclear, Boston, Mass., Estados Unidos) en MEM libre de suero (2,5 ml) junto con estrón-3-sulfato (11 concentraciones: 0; 1 fM, 0,01 pM, 0,1 pM, 1 pM, 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM). Después de la incubación, cada uno de los frascos es enfriado y se introduce el medio (1 ml), por medio de una pipeta, en tubos separados que contienen [14C]estrón (7×10^3 dpm) (actividad específica de 97 Ci/mmol de Amersham International Radiochemical Centre, Amersham, R.U.). La mezcla es agitada a fondo durante 30 segundos con tolueno (5 ml). Los experimentos han demostrado que, mediante este tratamiento, se separa >90 % de [14C]estrón y < 0,1 % de [3H]estrón-3-sulfato de la fase acuosa. Se retira una porción (2 ml) de la fase orgánica, se la evapora y se determina el contenido de 3H y 14C del residuo por espectrometría de centelleo. Se calcula la masa de estrón-3-sulfato hidrolizada a partir de los

28
35

conteos de ^3H obtenidos (ajustados a los volúmenes del medio y de la fase orgánica empleados, así como para la recuperación de ^{14}C estrona agregada) y la actividad específica del sustrato. Cada lote de experimentos incluye incubaciones de microsomas preparados de una placenta humana sulfatasa positiva (control positivo) y frascos sin células (para evaluar la hidrólisis no enzimática aparente del sustrato). Se determina el número de núcleos celulares por frasco utilizando un Contador Coulter después de tratar a las monocapas celulares con Saponina. Se utiliza un frasco de cada lote para evaluar el estado de las membranas celulares y la viabilidad utilizando el método de exclusión Trypan Blue (Phillips, J.H. (1973) en: Tissue culture and applications, [edit., Kruse, D.F. & Patterson, M.K]; pág. 406 – 408; Academic Press, Nueva York).

Los resultados de actividad de esteroide sulfatasa se expresan en términos de media $\pm$ 1 DS del producto total (estrona + estradiol) formado durante el período de incubación (20 horas) calculado para 10⁶ células y, para valores que exhiban importancia estadística, en términos de porcentaje de reducción (inhibición) con respecto a las incubaciones que no contienen estrona-3-sulfamato. Se utilizó el test de Student sin aparear para evaluar la trascendencia estadística de los resultados.

ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE STS UTILIZANDO MICROSOMAS PLACENTARIOS

(PROTOCOLO 2)

Inhibición de la Actividad de Esterolde Sulfatasa en Microsomas

Placentarios

Se tritura por completo placenta humana sulfatasa positiva de embarazos a término con tijeras y se la lava una vez con buffer de fosfato frío (pH 7,4, 50 mM); luego se la resuspende en buffer de fosfato frío (5 ml/g de tejido). Se obtiene la homogeneización con un homogenizador Ultra-Turrax, empleando tres

explosiones de 10 segundos separados por períodos de 2 minutos de enfriamiento en hielo. Se retiran los núcleos y los desechos celulares por centrifugación (4°C) a 2000 g por espacio de 30 minutos y se almacenan porciones (2 ml) del sobrenadante a 20°C. Se determina la concentración proteica de los sobrenadantes por el método de Bradford (Anal. Biochem. 72, 248 – 254 (1976)).

Se llevan a cabo incubaciones (1 ml) utilizando una concentración proteica de 100 mg/ml, concentración de sustrato de 20 mM de [6,7-3H]estrón-3-sulfato (actividad específica 60 Ci/mmol de New England Nuclear, Boston, Mass., Estados Unidos) y un tiempo de incubación de 20 minutos a 37°C. Si es necesario, se emplean ocho concentraciones de los compuestos: 0 (es decir, un control), 0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM, 0,8 mM, 1,0 mM. Tras la incubación, cada muestra es enfriada y el medio (1 ml) es transferido por medio de una pipeta a tubos separados que contienen [14C]estrón (7 x 10³ dpm) (actividad específica de 97 Ci/mmol de Amersham International Radiochemical Centre, Amersham, R.U.). La mezcla es agitada a fondo durante 30 segundos con tolueno (5 ml). Los experimentos han demostrado que, mediante este tratamiento, se separa >90 % de [14C]estrón y < 0,1 % de [3H]estrón-3-sulfato de la fase acuosa. Se retira una porción (2 ml) de la fase orgánica, se la evapora y se determina el contenido de 3H y 14C del residuo por espectrometría de centelleo. Se calcula la masa de estrón-3-sulfato hidrolizada a partir de los conteos de 3H obtenidos (ajustados a los volúmenes del medio y de la fase orgánica empleados, así como para la recuperación de [14C]estrón agregada) y la actividad específica del sustrato.

MODELO DE ENSAYO EN ANIMALES PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE

STS

(PROTOCOLO 3)

Inhibición de la actividad de estrona sulfatasa *in vivo*

Los compuestos de la presente invención pueden ser analizados utilizando un modelo animal, en especial en ratas sometidas a ovariectomía. En este modelo, los compuestos estrogénicos estimulan el desarrollo uterino.

Se administra el compuesto (0,1 mg/ kg/ día por espacio de cinco días) por vía oral a ratas, en tanto que otro grupo de animales recibe sólo vehículo (propilenglicol). Al finalizar el estudio, se obtienen muestras de tejido hepático y se analiza la actividad de estrona sulfatasa utilizando 3H estrona sulfato como sustrato de acuerdo con lo descrito anteriormente (ver PCT/GB95/02638).

MODELO DE ENSAYO EN ANIMALES PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ESTROGÉNICA (PROTOCOLO 4)

Falta de estrogénicidad *in vivo*

Los compuestos de la presente invención pueden ser analizados utilizando un modelo animal, en especial en ratas sometidas a ovariectomía. En este modelo, los compuestos estrogénicos estimulan el desarrollo uterino.

Se administra el compuesto (0,1 mg/ kg/ día por espacio de cinco días) por vía oral a ratas, en tanto que otro grupo de animales recibe sólo vehículo (propilenglicol). Al finalizar el estudio, se obtienen los úteros y se los pesa, expresándose los resultados en términos de peso uterino/ peso corporal entero x 100.

Los compuestos que carecen de efecto considerable sobre el desarrollo uterino no son estrogénicos.

ENSAYOS BIOTECNOLÓGICOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE STS (PROTOCOLO 5)

También se puede evaluar la capacidad de los compuestos para inhibir la actividad de estrona sulfatasa utilizando secuencias de aminoácidos o secuencias

de nucleótidos que codifican STS, o fragmentos activos, derivados, homólogos o variantes de las mismas, por ejemplo, en selecciones de alta resolución.

Se puede utilizar uno o más cualesquiera de los targets apropiados – como ser una secuencia de aminoácidos y/o una secuencia nucleotídica – para identificar un agente con capacidad para modular la STS en cualquiera de una variedad de técnicas de detección de fármacos. El target empleado en ese tipo de ensayo puede estar libre en solución, fijado a un soporte sólido, acarreado en la superficie de una célula o situado intracelularmente. Se puede medir la supresión de la actividad del target o la formación de complejos de enlace entre el target y el agente analizado.

El ensayo de la presente invención puede ser un análisis de selección, por lo cual se analiza un número de agentes. En un aspecto, el método de ensayo de la presente invención es un screening de alta resolución.

Las técnicas para screening de fármacos se pueden basar en el método descrito por Geysen, Solicitud de patente europea 84/03564, publicada el 13 de septiembre de 1984. En síntesis, se sintetizan grandes números de diferentes compuestos de ensayo de pequeños péptidos en un sustrato sólido tal como broches plásticos o alguna otra superficie. Se hace reaccionar a los compuestos peptídicos de ensayo con un target adecuado o fragmento del mismo y se los lava. Luego se detectan las entidades unidas – por ejemplo mediante métodos de adaptación correctos muy conocidos en la técnica. También se puede aplicar directamente un target purificado a placas para usar en una técnica de screening farmacológico. Por otro lado, se pueden utilizar anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo en un soporte sólido.

La invención contempla asimismo el uso de ensayos de screening competitivo de fármacos en los cuales los anticuerpos capaces de fijar

específicamente un target compiten con un compuesto de ensayo por fijarse a un target.

Otra técnica de screening da lugar al screening de alta resolución (HTS) de agentes con afinidad de unión adecuada por las sustancias y se basa en el método descrito en WO 94/03564 en forma detallada.

Se estima que los métodos de ensayo de la presente invención son adecuados tanto para el screening en pequeña como a gran escala de los compuestos de ensayo, así como para ensayos cuantitativos.

En un aspecto preferido, la presente invención se relaciona con un método par identificar agentes que modulan la STS en forma selectiva, compuestos que tienen la fórmula (Ia).

INDICADORES

Se puede utilizar una amplia variedad de indicadores en los métodos de ensayo (así como en los screening (detecciones) (por ejemplo, por espectroscopia). A manera de ejemplo, un gen indicador puede codificar una enzima que cataliza una reacción que altera las propiedades de absorción de la luz.

Otros protocolos incluyen el ensayo enzimático de Inmunoabsorbencia (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA) y la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Incluso se puede emplear un Inmunoensayo monoclonal de dos secuencias que utiliza anticuerpos monoclonales que reaccionan ante dos epítopos no interferentes. Estos y otros ensayos han sido descritos, entre otros lugares, en Serological Methods, A Laboratory Manual, de Hampton R y otros (1990), APS Press, St Paul MN) y en J. Exp. Med 15 8: 121 1) de Maddox DE y otros.

Entre los ejemplos de moléculas indicadores se cuentan, aunque sin limitarse a (β -galactosidasa, invertasa, proteína verde fluorescente, luciferasa,

cloranfenicol, acetiltransferasa (-glucuronidasa, exo-glucanasa y glucoamilasa. Por otro lado, se pueden incorporar nucleótidos nucleótidos radiomarcados o fluorescentes marcados con rótulos que se pueden incorporar a transcritos nacientes y luego ser identificados al unirse a las sondas oligonucleotídicas.

A manera de ejemplos adicionales, un número de compañías tales como Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI) y US Biochemical Corp (Cleveland, OH) proveen kits comerciales y protocolos para los procedimientos de análisis. Entre las moléculas indicadoras o marcadores adecuados se cuentan los radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y demás. Las patentes que describen el uso de tales marcadores incluyen US-A-3817837; US-A-3850752, US-A-3939350; US-A-3896345; US-A-4275149 y US-A-4366241.

CÉLULAS HUÉSPED

El término "célula huésped" – en conexión con la presente invención, incluye cualquier célula que pueda comprender el target para el agente de la presente invención.

Por consiguiente, otra realización de la presente invención presenta células huésped transformadas o transfectadas con un polinucleótido que es o expresa el target de la presente invención. De preferencia, dicho polinucleótido es acarreado por un vector para la replicación y expresión de polinucleótidos que han de constituir el target o que deben expresar el target. Las células deben ser elegidas de manera que sean compatibles con dicho vector y pueden ser, por ejemplo, procarionóticas (por ejemplo bacterianas), fúngicas, de levadura o vegetales.

La bacteria gram negativa *E. coli* es ampliamente utilizada como huésped para la expresión génica heteróloga. Sin embargo, tienden a acumularse grandes cantidades de proteína heteróloga en el interior de la célula. En ocasiones se

puede dificultar la purificación posterior de la proteína deseada del grueso de proteínas intracelulares de *E. coli*.

A diferencia de *E. coli*, las bacterias del género *Bacillus* son muy adecuadas como huéspedes heterólogos debido a su capacidad de secretar proteínas en el medio de cultivo. Otras bacterias adecuadas como huéspedes son las de los géneros *Streptomyces* y *Pseudomonas*.

Dependiendo del carácter del polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención y/o de la conveniencia de un procesamiento adicional de la proteína expresada, pueden ser preferibles los huéspedes eucarióticos tales como levaduras y otros hongos. En general, las células de levadura son preferidas con respecto a las células fúngicas porque son más fáciles de manipular. No obstante, algunas proteínas son secretadas en bajos niveles de la célula de levadura o, en algunos casos, no son procesadas correctamente (por ejemplo, la hiperglicosilación en la levadura). En estos casos, se debe optar por un organismo huésped fúngico diferente.

Entre los ejemplos de huéspedes de expresión adecuados dentro del alcance de la presente invención se cuentan los hongos tales como los de la especie *Aspergillus* (tales como los descritos en EP-A-0184438 y EP-A-0284603) y la especie *Trichoderma*; bacterias tales como las de la especie *Bacillus* (tales como las descritas en EP-A-0134048 y EP-A-0253455), los de la especie *Streptomyces* y la especie *Pseudomonas*, así como levaduras tales como las de la especie *Kluyveromyces* (como las descritas en EP-A-0096430 y EP-A-0301670) y la especie *Saccharomyces*. A manera de ejemplo, los huéspedes de expresión típicos pueden ser seleccionados entre *Aspergillus niger*, *Aspergillus Niger* var. *tubigenis*, *Aspergillus Niger* var. *awamori*, *Aspergillus aculeatis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*,

Bacillus licheniformis, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kluyveromyces lactis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

El uso de células huésped adecuadas – tales como células huésped de levadura, fúngicas y vegetales – puede dar lugar a las modificaciones post-traducción (por ejemplo, miristoilación, glucosilación, truncamiento, lapidación y fosforilación con tirosina, serina o treonina) que resulten necesarias para conferir actividad biológica óptima a los productos de expresión recombinante de la presente invención.

ORGANISMO

El término "organismo" con relación a La presente invención se relaciona asimismo incluye cualquier organismo que pueda comprender el target de acuerdo con la presente invención y/o productos obtenidos del mismo. Entre los ejemplos de organismos se pueden contar los hongos, las levaduras o las plantas.

El término "organismo transgénico" con relación a la presente invención incluye cualquier organismo que comprenda el target de acuerdo con la presente invención y/o los productos obtenidos.

TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS HUÉSPED/ ORGANISMOS HUÉSPEDES

Como se indicara anteriormente, el organismo huésped puede ser un organismo procariótico o eucariótico. Entre los ejemplos de huéspedes procarióticos adecuados se incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*. La descripción de la transformación de huéspedes procarióticos está muy documentada en la técnica; ver, por ejemplo, Sambrook y otros (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a. edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) y Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons, Inc.

Si se utiliza un huésped procariótico, en ese caso es posible que la secuencia nucleotídica deba ser modificada adecuadamente antes de la transformaciones – como por ejemplo mediante la eliminación de Intrones.

En otra realización, el organismo transgénico puede ser una levadura. En este aspecto, también se ha utilizado ampliamente a la levadura como vehículo para la expresión génica heteróloga. La especie *Saccharomyces cerevisiae* tiene un largo historial de uso industrial, incluyendo su uso para la expresión de genes heterólogos. La expresión de genes heterólogos en *Saccharomyces cerevisiae* ha sido reseñada por Goodey y otros (1987, *Yeast Biotechnology*, D R. Berry y otros, edit., pag. 401 – 429, Allen y Unwin, Londres) y por King y otros (1989, *Molecular and Cell Biology of Yeasts*, E F Walton y G T Yarronton, edit., pag. 107 – 133, Blackie, Glasgow).

Por varias razones, *Saccharomyces cerevisiae* es muy adecuado para la expresión de genes heterólogos. En primer lugar, no es patógeno para los humanos y no tiene capacidad para producir ciertas endotoxinas. En segundo lugar, tiene una larga historia de uso inocuo después de siglos de explotación comercial para diversos fines. Esto ha llevado a una amplia aceptación del público. En tercer lugar, el extenso uso comercial e investigación dedicados al organismo ha dado como resultado una riqueza de conocimientos acerca de la genética y fisiología, así como las características de la fermentación a gran escala del *Saccharomyces cerevisiae*.

En la obra de E Hinchcliffe E Kenny (1993, "Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", *Yeasts*, Vol. 5, Anthony H Rose y J Stuart Harrison, edit., 2a. edición, Academic Press Ltd) se presenta una reseña de los principios de la expresión génica heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae*.

Se dispone de varios tipos de vectores de levadura, incluyendo vectores integrativos, que requieren recombinación con el genoma del huésped para su mantenimiento y vectores plásmidos de replicación autónoma.

A fin de preparar el *Saccharomyces* transgénico, se preparan construcciones de expresión insertando la secuencia nucleotídica en una construcción diseñada para la expresión en levadura. Se han desarrollado varios tipos de construcciones empleadas para la expresión heteróloga. Las construcciones contienen un promotor activo en levadura fusionado a la secuencia nucleotídica; habitualmente se utiliza un promotor de levadura, como ser el promotor GAL1. Habitualmente se utiliza una secuencia señal de levadura, tal como la secuencia que codifica al péptido señal SUC2. Un terminador activo en levadura da por finalizado el sistema de expresión.

Para la transformación de levaduras se han desarrollado varios protocolos de transformación. Por ejemplo, se puede preparar un *Saccharomyces* transgénico de acuerdo con la presente invención siguiendo las Indicaciones de INEN y otros (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75, 1929); Beggs J D (1978, Nature, Londres 275, 104) y Ito, H y otros (1983, J Bacteriology 153, 163 - 168).

Las células de levadura transformadas son seleccionadas utilizando diversos marcadores selectivos. Entre los marcadores empleados para la transformación se cuenta un número de marcadores auxotrópicos tales como LEU2, HIS4 y TRP1, así como marcadores dominantes de resistencia a los antibióticos tales como marcadores antibióticos de aminoglucósido, por ejemplo G418.

Otro organismo huésped es una planta. El principio básico de la construcción de plantas genéticamente modificadas consiste en insertar información genética en el genoma de la planta a fin de obtener un mantenimiento

estable del material genético insertado. Existen varias técnicas para insertar información genética, siendo las dos principales la introducción directa de la información genética y la introducción de la información genética mediante el uso de un sistema vector. Se puede encontrar una reseña de las técnicas generales en artículos de Potrykus (Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. [1991] 42: 205 – 225) y Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech Marzo/ abril 1994 (17 – 27). Se pueden encontrar otras indicaciones sobre transformación de plantas en EP-A-0449375.

Por consiguiente, la presente invención presenta asimismo un método para la transformación de una célula huésped con una secuencia nucleotídica que ha de constituir el target o que ha de expresar el target. Las células huésped transformadas con la secuencia nucleotídica pueden ser cultivadas en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína codificada. La proteína producida por una célula recombinante puede ser desplegada sobre la superficie de la célula. Si es conveniente, como sabrán apreciar los expertos en la técnica, se pueden diseñar vectores de expresión que contengan secuencias codificadoras con secuencias señal que dirigen la secreción de las secuencias codificadoras a través de la membrana de una célula procariótica o eucariótica específica. Otras construcciones recombinantes se pueden unir la secuencia codificadora a la secuencia nucleotídica que codifica un dominio polipeptídico que facilite la purificación de proteínas solubles (Kroll DJ y otros (1993) DNA Cell Biol. 12: 441 – 53).

VARIANTES/ HOMÓLOGOS/ DERIVADOS

Además de las secuencias de aminoácidos y las secuencias nucleotídicas específicas antes mencionadas, la presente invención también abarca el uso de variantes, homólogos y derivados de las mismas. En este contexto, el término "homología" se puede equiparar a "identidad".

En el presente contexto, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos que puede ser por lo menos 75, 85 o 90 % idéntica, preferentemente por lo menos 95 o 98 % idéntica. Si bien también se puede considerar la homología en función de la similitud (es decir, residuos aminoácidos con propiedades químicas/ funciones similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Las comparaciones de homología se pueden efectuar a ojo, o más habitualmente con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas de computación pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

El % de homología se puede calcular en secuencias contiguas, es decir, se alinea una secuencia con la otra secuencia y se compara cada uno de los aminoácidos de una secuencia directamente con el correspondiente aminoácido de la otra secuencia, tomando un residuo por vez. Esto se denomina alineación "sin brechas". Típicamente, esas alineaciones sin brechas se efectúan sólo en un número relativamente exiguo de residuos.

Si bien éste es un método muy sencillo y estable, no toma en cuenta que, por ejemplo, en un par de secuencias de otro modo idénticas, una inserción o delección hace que los siguientes residuos aminoácidos caigan fuera de alineación, produciendo así, potencialmente, una gran reducción del % de homología cuando se realiza una alineación global. En consecuencia, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineaciones óptimas que tomen en cuenta las posibles inserciones y delecciones sin penalizar indebidamente el puntaje de homología total. Esto se obtiene insertando "brechas" en la alineación de secuencias para tratar de elevar al máximo la homología local.

Sin embargo, estos métodos más complejos asignan "penalidades por brecha" a cada brecha que se produce en la alineación de manera que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una alineación de secuencias con el menor número de brechas posible – que refleja una mayor correlatividad entre las dos secuencias comparadas – obtendrá un puntaje más elevado que una que tenga muchas brechas. Típicamente se utilizan "costos de brecha de valores definitivos" que imponen un costo relativamente elevado por la existencia de una brecha y una penalidad menor para cada residuo subsiguiente de la brecha. Este es el sistema de puntuación de brechas utilizado con más frecuencia. Las penalidades por brecha más elevadas producen, por supuesto, alineaciones optimizadas con menor cantidad de brechas. La mayoría de los programas de alineación permiten la modificación de las penalidades por brecha. Sin embargo, es preferible utilizar los valores por omisión cuando se utiliza ese software para comparación de secuencias. Por ejemplo, cuando se hace uso del paquete GCG Wisconsin Bestfit (ver más adelante), la penalidad por brecha por omisión para las secuencias de aminoácidos es -12 para una brecha y -4 para cada extensión.

Por lo tanto, el cálculo del % máximo de homología requiere en primer lugar la producción de una alineación óptima, que tome en cuenta las penalidades por brechas. Un programa de computación adecuado para llevar a cabo ese tipo de alineación es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Universidad de Wisconsin, U.S.A; Devereux y otros, 1984, *Nucleic Acids Research* 12: 387). Entre los ejemplos de otros softwares que pueden realizar comparaciones de secuencias se cuentan, aunque sin limitarse a estos, el paquete BLAST (ver Ausubel y otros, 1999 ibld – Capítulo 18), FASTA (Atschul y otros, 1990, *J. Mol. Biol.*, 403 – 410) y el juego de herramientas de comparación GENWORKS. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para la búsqueda sin conexión y con conexión (ver

Ausubel y otros, 1999 *ibid*, páginas 7-58 a 7-60). No obstante, se prefiere utilizar el programa GCG Bestfit.

Otra referencia útil es la que se puede encontrar en FEMS Microbiol Lett 1999 mayo 15; 174(2): 247 – 50 (y se publicó una errata en FEMS Microbiol Lett 1999 agosto 1; 177(1): 187 – 8).

Si bien se puede medir el % de homología final en términos de identidad, el proceso de alineación en sí no se basa típicamente en una comparación de pares a todo o nada. Por el contrario, generalmente se utiliza una matriz de puntuación de similitud a escala que asigna puntajes a cada comparación por pares basándose en la similitud química o la distancia evolutiva. Un ejemplo de una matriz de ese tipo utilizada comúnmente es la matriz BLOSUM62 – la matriz por omisión de la serie de programas BLAST. Los programas GCG Wisconsin utilizan generalmente los valores por omisión públicos o una tabla de comparación de símbolos especial, si está disponible (ver el manual del usuario para recabar más detalles). Es preferible utilizar los valores por omisión públicos para el paquete GCG o, en el caso de otro software, la matriz por omisión, como ser BLOSUM62.

Una vez que el software ha producido una alineación óptima, es posible calcular el % de homología, preferentemente el % de identidad de secuencia. El software típicamente lo hace como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

Las secuencias también pueden tener delecciones, inserciones o sustituciones de residuos aminoácidos que producen un cambio imperceptible y dan lugar a una sustancia funcionalmente equivalente. Se pueden efectuar sustituciones de aminoácidos deliberados sobre la base de la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos, siempre que se mantenga la actividad de enlace secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa

incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos con carga positiva incluyen lisina y arginina y los aminoácidos con grupos polares de cabeza sin carga con valores de hidrofiliidad similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

Se pueden realizar sustituciones conservadoras, por ejemplo de acuerdo con la siguiente Tabla. Los aminoácidos del mismo bloque de la segunda columna y preferentemente de la misma fila de la tercera columna pueden ser sustituidos entre sí.

ALIFÁTICO	No polares	G A P
		I L V
	Polares – sin carga	C S T M
		N Q
	Polares – con carga	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

VECTORES DE EXPRESIÓN

La secuencia nucleotídica para usar como target o para expresar el target puede ser incorporada a un vector replicable recombinante. Se puede emplear el vector para replicar y expresar la secuencia nucleotídica en y/o desde una célula huésped compatible. La expresión se puede controlar utilizando secuencias control que incluyen promotores/ intensificadores y otras señales de regulación de la expresión. Se pueden utilizar promotores procarlóticos y promotores funcionales en células eucarióticas. Se pueden utilizar promotores específicos para cada tejido o específicos para cada estímulo. También se pueden emplear promotores quiméricos que comprenden elementos de secuencia de dos o más promotores diferentes antes descritos.

La proteína producida por una célula huésped recombinante mediante la expresión de la secuencia nucleotídica puede ser secretada o puede estar contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o del vector empleado. Las secuencias codificadoras pueden ser diseñadas con secuencias señal que dirigen la secreción de las secuencias codificadoras de sustancias a través de la membrana de una determinada célula procariótica o eucariótica.

PROTEÍNAS DE FUSIÓN

La secuencia de aminoácidos diana puede ser producida en forma de proteína de fusión, por ejemplo para asistir en la extracción y purificación. Entre los ejemplos de pares de proteínas de fusión se cuentan la glutatión-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de unión de ADN y/o de activación de transcripción) y (-galactosidasa. También puede ser conveniente incluir un sitio de escisión proteolítica entre la proteína de fusión asociada y la secuencia proteica de interés para permitir la eliminación de las secuencias de proteínas de fusión. De preferencia, la proteína de fusión no ha de obstaculizar la actividad del target.

La proteína de fusión puede comprender un antígeno o un determinante antigénico fusionado a la sustancia de la presente invención. En esta realización, la proteína de fusión puede ser una proteína de fusión de origen no natural que comprende una sustancia que puede actuar como adyuvante en el sentido de producir una estimulación generalizada del sistema inmune. El antígeno o determinante antigénico puede estar unido al término amino o carboxi de la sustancia.

En otra realización de la presente invención, la secuencia de aminoácidos puede estar ligada a una secuencia heteróloga para codificar una proteína de fusión. Por ejemplo, para la selección de genotecas peptídicas para agentes con capacidad para afectar la actividad de la sustancia, puede ser conveniente

codificar una sustancia quimérica que expresa un epítopo heterólogo reconocido por un anticuerpo comercialmente disponible.

TERAPIA

Los compuestos de la presente invención se pueden emplear como agentes terapéuticos – es decir, en aplicaciones terapéuticas.

El término "terapia" incluye efectos curativos, efectos paliativos y efectos profilácticos.

La terapia se puede realizar en humanos o animales, preferentemente de sexo femenino, más preferentemente humanos de sexo femenino.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

La presente invención presenta una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de acuerdo con la presente invención y optativamente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable (incluyendo combinaciones de los mismos).

Las composiciones farmacéuticas pueden ser para uso humano o animal en medicina humana y veterinaria y típicamente comprenden uno o más cualesquiera entre un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son muy conocidos en la técnica farmacéutica y han sido descritos, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). La elección de vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico puede efectuarse con respecto a la ruta de administración pretendida y a la práctica farmacéutica standard. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, como vehículo, el vehículo, excipiente o diluyente, o además del mismo, cualquier aglutinante(s) adecuado, lubricante(s), agente(s) suspensor(es), agente(s) de revestimiento, agentes solubilizante(s).

En la composición farmacéutica se pueden presentar conservantes, estabilizantes, tinturas e incluso agentes saborizantes. Entre los ejemplos de conservantes se cuentan el benzoato de sodio, el ácido sórbico y los ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También se pueden utilizar agentes antioxidantes y suspensores.

Puede haber diferentes requerimientos de composición/ formulación dependiendo de los diferentes sistemas de administración. A manera de ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser formulada para ser administrada utilizando una minibomba o por una ruta mucosa, por ejemplo como spray nasal o aerosol para inhalación o solución para ingerir, o por vía parenteral para la cual la composición se formula en forma inyectable para la administración, por ejemplo, por una ruta intravenosa, intramuscular o subcutánea. Por otro lado, la formulación puede estar diseñada para ser administrada por ambas vías.

En caso de administrarse el agente por la vía mucosa a través de la mucosa gastrointestinal, éste debe poder mantenerse estable durante el tránsito por el tracto gastrointestinal; por ejemplo, debe ser resistente a la degradación proteolítica, estable a pH ácido y resistente a los efectos detergentes de la bilis.

En caso de ser apropiado, las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas por inhalación, en forma de supositorio o pesario, como sistema intrauterino, por vía tópica en forma de loción, solución, crema, ungüento o polvo para espolvorear, mediante el uso de un parche cutáneo, por vía oral en forma de comprimidos que contienen excipientes tales como almidón o lactosa o en cápsulas u óvulos ya sea solos o mezclados con excipientes, o bien en forma de elixires, soluciones o suspensiones que contengan agentes saborizantes y colorantes, o se los puede inyectar por vía parenteral, por ejemplo por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para la administración parenteral, las

composiciones pueden utilizarse óptimamente en forma de solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo suficientes sales o monosacáridos para que la solución sea isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual, las composiciones pueden ser administradas en forma de comprimidos o pastillas que pueden ser formuladas de modo convencional.

PRODUCTO FARMACÉUTICO COMBINADO

El compuesto de la presente invención puede ser utilizado en combinación con uno o más agentes activos, como ser uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales.

A manera de ejemplo, los compuestos de la presente invención pueden ser utilizados en combinación con otros inhibidores de STS y/u otros inhibidores tales como un inhibidor de la aromatasa (tal como, por ejemplo, 4hidroxiandrostenediona (4-OHA) y/o esteroides – tales como los esterneurosteroides sulfato de deshidroepiandrosterona (DHEAS) y sulfato de pregnenolona (PS) y/o otros compuestos orgánicos estructuralmente similares.

Los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar solos o en combinación con una progestina. De preferencia, los compuestos de acuerdo con la presente invención se utilizan en ausencia de progestina. Por consiguiente, en un aspecto preferido, la composición de la presente invención es sustancialmente libre de progestinas.

Por añadidura, como alternativa, el compuesto de la presente invención puede ser utilizado en combinación con un modificador de la respuesta biológica.

El término modificador de la respuesta biológica ("MRB") incluye a las citocinas, moduladores inmunes, factores de crecimiento, factores reguladores de la hematopoyesis, factores estimulantes de colonias, factores quimiotácticos, hemolíticos y trombolíticos, receptores de la superficie celular, ligandos,

moléculas para la adhesión de leucocitos, anticuerpos monoclonales, vacunas preventivas y terapéuticas, hormonas, componentes de matriz extracelular, fibronectina, etc. Es preferible que, para algunas aplicaciones, el modificador de la respuesta biológica sea una citosina. Entre los ejemplos de citocinas se cuentan: las interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-19; Factor de Necrosis Tumoral (TNF) – tal como TNF- α ; interferón alfa, beta y gama, TGF- β . Para algunas aplicaciones, es preferible que la citosina sea un factor de necrosis tumoral (TNF). Para algunas aplicaciones, el TNF puede ser cualquier tipo de TNF – como ser TNF- α , TNF- β , incluso derivados o mezclas de los mismos. Más preferentemente, la citosina es TNF- α . Se pueden encontrar reseñas sobre TNF en la técnica - por ejemplo, en WO-A-98/08870 y WO-A-98/13348.

ADMINISTRACIÓN

Typicamente, un médico determina la dosis real más adecuada para cada sujeto individual y ésta varía con la edad, el peso y la respuesta del paciente específico. Las dosis expuestas son representativas del caso promedio. Naturalmente, puede haber casos individuales en los que se requieran dosis más elevadas o menores.

Las composiciones de la presente invención pueden ser administradas por inyección directa. La composición puede ser formulada para la administración parenteral, a las mucosas, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular o transdérmica.

La concentración específica de la dosis y la frecuencia de administración para un paciente determinado puede variar y depende de una diversidad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de dicho compuesto, la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo, la dieta y el período de

administración, la velocidad de excreción, la combinación de drogas, la gravedad del trastorno específico y el huésped sometido a terapia.

Aparte de los modos de administración típicos – antes indicados – el término "administrar" también incluye la administración por técnicas tales como transfección mediada por lípidos, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, anfifilos faciales catiónicos (CFAs) y combinaciones de los mismos. Las rutas para dichos mecanismos de administración incluyen, aunque no se limitan a, las rutas mucosa, nasal, oral, parenteral, gastrointestinal, tópica o sublingual.

El término "administrado" incluyen, aunque no se limita a la administración por la ruta de las mucosas, por ejemplo en forma de spray nasal o aerosol para la inhalación o en forma de solución bebible; una ruta parenteral en la que la administración se efectúa en forma inyectable como por ejemplo por la ruta intravenosa, intramuscular o subcutánea.

Por consiguiente, para la administración farmacéutica, los inhibidores de STS de la presente invención pueden ser formulados de cualquier manera adecuada utilizando técnicas de formulación farmacéutica convencionales y vehículos, adyuvantes, excipientes, diluyentes farmacéuticos, etc. y habitualmente para la administración parenteral... Las dosis pueden ser administradas en regímenes de dosificación diaria, regímenes de dosis divididas y/o en regímenes de múltiples dosis con una duración de varios días. Para la administración oral, pueden ser formulados en comprimidos, cápsulas, en solución o suspensión. Por otro lado, los compuestos se forman para la administración parenteral en un vehículo adecuado para la administración por vía parenteral y para dar lugar a frecuencias de dosis diarias únicas. No obstante, las dosis diarias efectivas varían dependiendo de la actividad inherente del ingrediente activo y del peso corporal del paciente, variaciones que están de acuerdo con el criterio y los conocimientos del médico.

CICLACIÓN CELULAR

Los compuestos de la presente invención pueden ser útiles en el método de tratamiento de un trastorno de ciclación celular.

Como se describe en "Molecular Cell Biology", 3a. edic. Lodish y otros, páginas 177 – 181, diferentes células eucarióticas pueden crecer y dividirse a velocidades bastante diferentes. Las células de levadura, por ejemplo, pueden dividirse cada 120 min, y las primeras divisiones de huevos fertilizados en las células embrionarias de erizos de mar e insectos llevan sólo 1530 min. debido a que se subdivide una gran célula preexistente. Sin embargo, la mayoría de las células vegetales y animales en cultivo requiere 10 – 20 horas para duplicarse en número, y algunas se duplican a una velocidad mucho menor. Muchas células de los adultos, como las células nerviosas y las células de músculos estriados, no se dividen en absoluto; otras, como los fibroblastos que ayudan a la curación de las heridas, se desarrollan según la demanda pero, de lo contrario, son inactivas.

Pese a esto, toda célula eucariótica que se divide debe ser capaz de donar igual material genético a dos células hijas. La síntesis de ADN en eucariotas no se produce en todo el ciclo de división celular sino que se limita a parte del mismo antes de la división celular.

La relación entre la síntesis de ADN eucariótico y la división celular ha sido analizada a fondo en cultivos de células de mamíferos, todas las cuales tuvieron capacidad para crecer y dividirse. A diferencia de las bacterias, se encontró que las células eucarióticas sólo emplean parte de su tiempo en la síntesis de ADN y ésta se completa horas antes de la división celular (mitosis). Por consiguiente, se produce una pausa de tiempo tras la síntesis del ADN y antes de la división celular; se encontró que se producía otra pausa temporal tras la división y antes de la siguiente tanda de síntesis de ADN. Este análisis llevó a la conclusión de que el ciclo de las células eucarióticas consiste en una fase M (mitótica), una fase

G_1 (la primera pausa), la fase S (síntesis de ADN), una fase G_2 (la segunda pausa) y M una vez más. Las fases entre mitosis (G_1 , S y G_2) se conocen colectivamente como interfases.

Muchas células no divisibles de los tejidos (por ejemplo, todos los fibroblastos inactivos) suspenden el ciclo tras la mitosis e inmediatamente antes de la síntesis de ADN; se dice que esas células en "reposo" han salido del ciclo celular y están en el estado G_0 .

Es posible identificar las células cuando están en una de las tres etapas interfases del ciclo celular, utilizando un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS) para medir su contenido relativo de ADN: una célula que se encuentra en G_1 (antes de la síntesis de ADN) tiene una cantidad determinada x de ADN; durante S (replicación de ADN) tiene entre x y $2x$ y cuando está en G_2 (o M) tiene $2x$ de ADN.

Las etapas de mitosis y citocinesis en una célula animal son las siguientes:

(a) Interfase: La etapa G_2 de interfase precede inmediatamente al comienzo de la mitosis. El ADN cromosómico se ha replicado y unido a la proteína durante la fase S, si bien aún no se ven los cromosomas como estructuras diferenciadas. Los nucleolos son la única estructura nuclear visible bajo el microscopio óptico. En una célula diploide antes de la replicación de ADN hay dos cromosomas morfológicos de cada tipo y se dice que la célula es $2n$. En G_2 , con posterioridad a la replicación de ADN, la célula es $4n$. Hay cuatro copias de cada ADN cromosómico. Dado que los cromosomas hermanos aún no se han separado, se los denomina cromátides hermanas.

b) Profase temprana. Los centriolos, cada uno de los cuales tiene un centriolo hijo recientemente formado, comienzan a moverse hacia polos opuestos de la célula; se puede ver a los cromosomas como largos filamentos. La membrana nuclear comienza a disgregarse en pequeñas vesículas.

(c) Profase Intermedia y Tardía – Se completa la condensación de los cromosomas; cada estructura cromosómica visible se compone de dos cromátides unidas entre sí en sus centrómeros. Cada cromátide contiene una de las dos moléculas hijas de ADN recién replicadas. El huso microtubular comienza a radiarse desde las regiones apenas adyacentes a los centriolos, que se están desplazando hacia sus polos. Algunas del huso llegan de polo a polo; la mayoría llega hasta las cromátides y se unen cinetocoros.

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

(e) Anafase. Las dos cromátides hermanas se dividen en cromosomas independientes. Cada uno contiene un centrómero que está ligado por una fibra del huso a un polo, hacia el cual se desplaza. Por consiguiente, se aporta una copia de cada cromosoma a cada célula hija. Simultáneamente, la célula se alarga, al igual que los husos de polo a polo. La citocinesis se inicia al comenzar a formarse el surco de escisión.

(f) Telofase. Se forman nuevas membranas alrededor de los núcleos hijos; los cromosomas se desenrollan y se toman menos diferenciados, el nucléolo se toma visible una vez más y se forma la membrana nuclear alrededor de cada núcleo descendiente. La citocinesis está casi completa y el huso desaparece al despolimerizarse los microtúbulos y demás fibras. Durante toda la mitosis el centriolo "hijo" de cada polo crece hasta alcanzar su longitud total. En la telofase la duplicación de cada uno de los centriolos originales se completa y se generan nuevos centriolos hijos durante la siguiente interfase.

(g) Interfase. Una vez completada la citocinesis, la célula entra en la fase G₁ del ciclo celular y atraviesa el ciclo una vez más.

Se apreciará que la ciclación celular es un proceso celular sumamente importante. Las desviaciones de la ciclación celular normal dan como resultado un número de trastornos médicos. La ciclación celular incrementada y/o descontrolada puede producir cáncer. La ciclación celular reducida puede dar origen a trastornos degenerativos. El uso del compuesto de la presente invención puede brindar un medio para tratar dichos trastornos y afecciones.

Por consiguiente, el compuesto de la presente invención puede ser adecuado para usar en el tratamiento de trastornos de la ciclación celular tales como cánceres, incluyendo los cánceres dependientes e independientes de las hormonas.

Por añadidura, el compuesto de la presente invención puede ser adecuado para el tratamiento de cánceres tales como el cáncer de mamas, el cáncer ovárico, el cáncer de endometrio, sarcomas, melanomas, cáncer de próstata, cáncer pancreático, etc. y demás tumores sólidos.

Para algunas aplicaciones, se inhibe y/o impide y/o se detiene el ciclo celular preferentemente donde se impide y/o detiene la ciclación celular. En un aspecto, la ciclación celular puede ser inhibida y/o prevenida y/o detenida en la fase G₂/M. En un aspecto, la ciclación celular puede ser irreversiblemente impedida y/o inhibida y/o detenida, preferentemente donde la ciclación celular es irreversiblemente impedida y/o detenida.

La expresión "irreversiblemente impedida y/o inhibida y/o detenida" indica que, tras la aplicación de un compuesto de la presente invención, al aclararse el compuesto, aún se observan los efectos del compuesto, es decir la prevención y/o inhibición y/o detención de la ciclación celular. Más específicamente, el término "irreversiblemente impedida y/o inhibida y/o detenida" pretende indicar que al analizarlas de acuerdo con el protocolo de análisis de ciclación celular presentado en esta solicitud, las células tratadas con un compuesto de interés exhiben menor

desarrollo después de la Etapa 2 del protocolo I que las células control. A continuación se presentan los detalles de este protocolo.

En consecuencia, la presente invención presenta compuestos que: causan la inhibición del desarrollo de células de cáncer mamario receptoras de estrógenos positivas (ER+) y ER negativas (ER-) in vitro impidiendo y/o inhibiendo y/o deteniendo la ciclación celular, y/o causan la regresión de los tumores inducidos por nitrosometilurea (NMU) en animales intactos (es decir, no sometidos a ovariectomía) y/o impiden y/o Inhiben y/o detienen la ciclación celular en células cancerosas; y/o actúan in vivo impidiendo y/o inhibiendo y/o deteniendo la ciclación celular y/o actúan como agonistas de la ciclación celular.

Análisis de Ciclación Celular (Protocolo 6).

Procedimiento

Etapas 1

Se siembran células de cáncer mamario MCF-7 en placas de cultivo de múltiples pocillos a una densidad de 105 células/ pocillo. Se deja que las células se adhieran y se desarrollen hasta una confluencia de 30 %, cuando se las trata de la siguiente manera:

Control – sin tratamiento

Compuesto de interés (CDI) 20 μ M.

Se cultiva a las células por espacio de 6 días en medio de cultivo que contiene el CDI con cambios de medio/ CDI cada 3 días. Al final de este período se cuentan los números de células utilizando un contador celular Coulter.

Etapas 2

Después de tratar a las células durante un período de 6 días con el CDI, se vuelven a sembrar las células a una densidad de 10^4 células/ pocillo. No se agregan más tratamientos. Se deja que las células continúen desarrollándose

durante 6 días más en presencia de un medio de cultivo. Al final de este período se cuentan una vez más los números de células.

CÁNCER

De acuerdo con lo expuesto, los compuestos de la presente invención pueden ser de utilidad en el tratamiento de un trastorno de la ciclación celular. Un trastorno específico de la ciclación celular es el cáncer.

El cáncer sigue siendo una causa importantísima de mortalidad en la mayoría de los países occidentales. Las terapias contra el cáncer desarrolladas hasta el presente han incluido el bloqueo de la acción o de la síntesis de hormonas para inhibir el desarrollo de tumores dependientes de las hormonas. No obstante, actualmente se emplea una quimioterapia más agresiva para el tratamiento de tumores independientes de las hormonas.

Por ende, el desarrollo de un tratamiento farmacéutico anticanceroso de tumores dependientes de las hormonas y/o independientes de las hormonas, que a la vez carezcan de algunos o todos los efectos colaterales asociados con la quimioterapia representaría un avance terapéutico trascendental.

Se sabe que los estrógenos sufren un número de reacciones de hidroxilación y conjugación con posterioridad a su síntesis. Hasta tiempos muy recientes se pensaba que esas reacciones eran parte de un proceso metabólico que, en última instancia, hacía que los estrógenos fueran hidrosolubles y aumentaba su eliminación del cuerpo. Ahora es evidente que algunos metabolitos de hidroxilación (por ejemplo, 2-hidroxil y 16alfa-hidroxil) y conjugados (por ejemplo, sulfato de estrona, E1S) son importantes para la determinación de algunas de las complejas acciones que los estrógenos desarrollan en el cuerpo.

Los técnicos han investigado la formación de estrógenos 2- y 16-hidroxilados en relación con los trastornos que alteran el riesgo de cáncer mamario. Ahora existen evidencias de que los factores que aumentan la actividad

de 2-hidroxilasa están asociados con un riesgo de cáncer reducido, en tanto que los que aumentan la 16-alfa-hidroxilación pueden incrementar el riesgo de cáncer mamario. Se ha estimulado un mayor interés en el rol biológico de los metabolitos de estrógenos por el creciente número de evidencias de que el 2-metoxiestradiol es un metabolito endógeno con propiedades antimitóticas, que el 2-metoxiestrona-3-O-sulfamato (2-MeOE2) se forma a partir del 2-hidroxiestradiol (2-OHE2) por la catecol estrógeno metiltransferasa, una enzima que está ampliamente distribuida por todo el cuerpo.

Los investigadores han demostrado que el 2-MeOE2 inhibe in vivo el desarrollo de tumores producidos como resultado de la inyección subcutánea de células de sarcoma Meth A, B16 de melanoma o MDA-MB-435 de cáncer mamario receptor de estrógeno negativas (ER-). También inhibe la proliferación celular endotelial y la migración, así como la angiogénesis in vitro. Se ha sugerido que la capacidad de 2-MeOE2 para inhibir el desarrollo de tumores in vivo puede deberse a su capacidad para inhibir la angiogénesis inducida por tumores en lugar de dirigir la inhibición de la proliferación de células tumorales.

El mecanismo por el cual el 2-MeOE2 ejerce sus potentes efectos antimitogénicos y antilangiogénicos está aún por ser dilucidado. Existe evidencia de que, en concentraciones elevadas, pueda inhibir la polimerización de los microtúbulos y actuar como débil inhibidor de la unión de colchicina a tubulina. Sin embargo, recientemente, no se encontró que, en concentraciones que bloquean la mitosis, los filamentos de tubulina se despolimerizaran sino que tenían morfología idéntica a la observada después del tratamiento con taxol. Es posible, por lo tanto, que al igual que el taxol, una droga utilizada para la terapia contra el cáncer mamario y ovárico, el 2-MeOE2, actúe estabilizando la dinámica de los microtúbulos.

Si bien la identificación de 2-MeOE2 como nueva terapia contra el cáncer representa un importante avance, la biodisponibilidad de los estrógenos administrados por vía oral es baja. Más aun, pueden sufrir un extenso metabolismo durante su primer paso a través del hígado. Como parte de un programa de investigaciones para desarrollar un inhibidor de la esteroide sulfatasa para la terapia contra el cáncer mamario, se ha identificado a la estrona-3-O-sulfato (EMATE) como potente inhibidor de sitios activos. Asombrosamente, EMATE demostró poseer poderosas propiedades estrogénicas, siendo su actividad uterotrópica oral en ratas 100 veces superior a la del estradiol. Se supone que su mayor estrogenicidad es el resultado de su absorción por los glóbulos rojos sanguíneos (rbc), que los protege de su inactivación durante su pasaje por el hígado y que actúa como reservorio para su liberación lenta durante un período de tiempo prolongado. Se ha sintetizado y analizado un número de análogos con anillo A modificado incluyendo al 2-metoxiestrona-3-O-sulfamato. Si bien este compuesto fue equipotente con el EMATE como inhibidor de la esteroide sulfatasa, carecía de estrogenicidad.

Creemos que el compuesto de la presente invención proporciona un medio para el tratamiento de los cánceres y, en especial, del cáncer mamario.

Además o como alternativa, el compuesto de la presente invención puede servir para el bloqueo del desarrollo de cánceres que incluyen leucemias y tumores sólidos tales como tumores mamarios, del endometrio, próstata, ovarios y pancreáticos.

TERAPIA VINCULADA CON LOS ESTRÓGENOS

Creemos que algunos de los compuestos de la presente invención pueden ser de utilidad en el control de los niveles de estrógenos en el cuerpo – en especial en las mujeres. Por consiguiente, algunos de los compuestos pueden ser útiles para aportar un medio para el control de la fertilidad – como ser un

comprimido, píldora, solución o pastilla anticonceptiva oral. Por otro lado, el compuesto podría presentarse en forma de implante o de parche.

En consecuencia, los compuestos de la presente invención pueden ser de utilidad en el tratamiento de desórdenes hormonales asociados con el estrógeno, en especial el tratamiento de trastornos hormonales asociados con la deficiencia de estrógeno.

Además o como alternativa, el compuesto de la presente invención puede servir para el tratamiento de trastornos hormonales además de los asociados con el estrógeno. Por lo tanto, el compuesto de la presente invención también puede tener capacidad para afectar la actividad hormonal y también puede ser capaz de afectar una respuesta inmune.

ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Creemos que algunos de los compuestos de la presente invención pueden ser de utilidad en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y afecciones similares.

A manera de ejemplo, se cree que los inhibidores de STS pueden ser de utilidad para incrementar la función mnemónica de pacientes que sufren enfermedades tales como amnesia, lesiones en la cabeza, enfermedad de Alzheimer, demencia epiléptica, demencia presenil, demencia postraumática, demencia senil, demencia vascular y demencia pos-apoplejía o de individuos que por otras razones buscan la intensificación de su memoria.

TH1

Creemos que algunos de los compuestos de la presente invención pueden ser de utilidad en casos de TH1.

A manera de ejemplo, se cree que la presencia de inhibidores de STS dentro del macrófago u otras células que presentan antígenos puede llevar a la reducción de la capacidad de las células T sensibilizadas para montar una

respuesta TH1 (alta IL-2, IFN γ baja IL-4). Predominaría por lo tanto la influencia reguladora normal de otros esteroides tales como los glucocorticoides.

TRASTORNOS INFLAMATORIOS

Creemos que algunos de los compuestos de la presente invención pueden ser de utilidad en el tratamiento de trastornos inflamatorios – tales como afecciones asociadas con uno o más cualesquiera de: autoinmunidad, incluyendo, por ejemplo, la artritis reumatoidea, diabetes de tipo I y II, lupus eritematoso generalizado, esclerosis múltiple, miastenia gravis, tiroiditis, vasculitis, colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn, afecciones cutáneas, por ejemplo la soriasis y la dermatitis de contacto; la enfermedad de injerto contra huésped; eczema, asma y rechazo de órganos con posterioridad al trasplante.

A manera de ejemplo, se cree que los inhibidores de STS pueden impedir el efecto fisiológico normal de DEA o esteroides relacionados sobre las respuestas inmunes y/o inflamatorias.

Los compuestos de la presente invención pueden ser de utilidad en la elaboración de un medicamento para revelar un efecto endógeno de tipo glucocorticoide.

OTRAS TERAPIAS

También se debe tener en cuenta que el compuesto/ composición de la presente invención puede tener otras aplicaciones médicas de importancia.

Por ejemplo, el compuesto o composición de la presente invención puede ser útil en el tratamiento de los trastornos enumerados en WO-A-99/52890 – a saber:

Además o como alternativa, el compuesto de la presente invención puede ser útil en el tratamiento de los trastornos enumerados en WO-A-98/ 05435. Para facilidad de referencia, se presenta a continuación parte de esa lista: cáncer, inflamación o enfermedad inflamatoria, trastornos dermatológicos, fiebre, efectos

cardiovasculares, hemorragia, coagulación y respuesta a la fase aguda, caquexia, anorexia, infección aguda, infección por HIV, estados de shock, reacciones de injerto contra huésped, enfermedad autoinmune, lesión por reperfusión, meningitis, migraña y antitrombosis dependiente de la aspirina; desarrollo, propagación e invasión de tumores, angiogénesis, metástasis, malignidades, ascitis y efusión pleural maligna. isquemia cerebral, enfermedad isquémica cardíaca, osteoartritis, artritis reumatoidea, osteoporosis, asma, esclerosis múltiple, neurodegeneración, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, apoplejía, vasculitis, enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, periodontitis, gingivitis, soriasis, dermatitis atópica, úlceras crónicas, epidermólisis bullosa; ulceración corneal, retinopatía y cicatrización de heridas quirúrgicas, rinitis, conjuntivitis alérgica, eczema, anafilaxis, restenosis, insuficiencia cardíaca congestiva, endometriosis, aterosclerosis o endosclerosis.

Además o como alternativa, el compuesto de la presente invención puede ser útil en el tratamiento de los trastornos enumerados en WO-A- 98/07859. Para facilitar la referencia, se presenta ahora parte de esa lista: actividad de citocinas y proliferación/ diferenciación celular, actividad Inmunosupresora o inmunoestimulante (por ejemplo para el tratamiento de deficiencia inmunológica, incluyendo la infección con el virus de inmunodeficiencia humana; regulación del desarrollo de linfocitos, tratamiento del cáncer y numerosas enfermedades autoinmunes y en la prevención del rechazo de trasplantes o para inducir inmunidad contra tumores), regulación de la hematopoyesis, por ejemplo en el tratamiento de enfermedades mieloides o linfoides, promoción del desarrollo del hueso, el cartílago, en tendón, el ligamento y el tejido nervioso, por ejemplo para la cicatrización de heridas, el tratamiento de quemaduras, úlceras y enfermedades periodontales y neurodegeneración; inhibición o activación de la hormona foliculoestimulante (modulación de la fertilidad); actividad quimiotáctica/

quimiocinética (por ejemplo para la movilización de tipos de células específicas a centros de lesión o infección); actividad hemostática y trombolítica (por ejemplo para el tratamiento de la hemofilia y la apoplejía); actividad antiinflamatoria (para el tratamiento, por ejemplo, del choque séptico o la enfermedad de Crohn); como antimicrobianos, moduladores, por ejemplo, del metabolismo o el comportamiento; como analgésicos, para el tratamiento de trastornos de deficiencias específicas; en el tratamiento, por ejemplo de la soriasis, en medicina humana y veterinaria.

Además o como alternativa, el compuesto de la presente invención puede ser útil en el tratamiento de los trastornos enumerados en WO-A- 98/09985. Para facilitar la referencia, se presenta ahora parte de esa lista: actividad inhibitoria de macrófagos y/o de células T y, por consiguiente, actividad antiinflamatoria; actividad autoinmune, es decir, efectos inhibitorios contra una respuesta inmune celular y/o humoral, incluyendo una respuesta no asociada con inflamación; inhiben la capacidad de los macrófagos y células T para adherirse a los componentes de la matriz extracelular y la fibronectina, así como la expresión del receptor fas en aumento en células T; inhiben la reacción inmune perjudicial y la inflamación, incluyendo la artritis, incluso la artritis reumatoidea, inflamación asociada con hipersensibilidad, reacciones alérgicas, asma, lupus eritematoso generalizado, enfermedades del colágeno y otras enfermedades autoinmunes, inflamación asociada con aterosclerosis, arteriosclerosis, enfermedad cardíaca aterosclerótica, lesión por reperfusión, paro cardíaco, infarto de miocardio, desórdenes inflamatorios vasculares, síndrome de insuficiencia respiratoria u otras enfermedades cardiopulmonares, inflamación asociada con úlcera péptica, colitis ulcerativa y demás enfermedades del tracto gastrointestinal, fibrosis hepática, cirrosis hepática u otras enfermedades hepáticas, tiroiditis u otras enfermedades glandulares, glomerulonefritis u otras enfermedades renales y urológicas, otitis u otras enfermedades otorrinolaringológicas, dermatitis u otras

enfermedades cutáneas, enfermedades periodontales u otras enfermedades dentales, orquitis o epidídimo-orquitis, infertilidad, trauma testicular u otras enfermedades testiculares relacionadas con el sistema inmune, disfunción placentaria, insuficiencia placentaria, abortos reiterados, eclampsia, preeclampsia y otras enfermedades ginecológicas relacionadas con inflamación, uveítis posterior, uveítis intermedia, uveítis anterior, conjuntivitis, corioetinitis, uveorretinitis, neuritis óptica, inflamación intraocular, por ejemplo retinitis o edema macular cistoide, oftalmia simpática, escleritis, retinitis pigmentosa, componentes inmunes e inflamatorios de enfermedad de causa degenerativa, componentes inflamatorios de trauma ocular, inflamación ocular causada por infección, vitreorretinopatías proliferativas, neuropatía óptica isquémica aguda, tejido cicatrizal excesivo, por ejemplo tejido cicatrizal excesivo, con posterioridad a una operación de filtración de glaucoma, reacción inmune y/o inflamación contra implantes oculares y otras enfermedades oftálmicas inmunes y relacionadas con inflamación, inflamación asociada con enfermedades autoinmunes o trastornos o afecciones en los que tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en cualquier otro órgano, sería ventajosa la supresión inmune y/o de la inflamación, la enfermedad de Parkinson, complicación y/o efectos colaterales del tratamiento de la enfermedad de Parkinson, complejo de demencia relacionada con el SIDA – encefalopatía relacionada con el HIV, enfermedad de Devic, corea de Sydenham, enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades, trastornos o desórdenes degenerativos del SNC, componentes inflamatorios de stokes, síndrome pos-polio, componentes inmunes e inflamatorios de trastornos psiquiátricos, mielitis, encefalitis, panencefalitis esclerosante subaguda, encefalomielitis, neuropatía aguda, neuropatía subaguda, neuropatía crónica, síndrome de William-Barre, corea de Sydenham, miastenia grave, pseudo-tumor cerebral, Síndrome de Down, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, componentes

inflamatorios de compresión del SNC o trauma del SNC o infecciones del SNC, componentes inflamatorios de atrofas y distrofias musculares y enfermedades, trastornos y desórdenes inmunes e inflamatorios de los sistemas nerviosos central y periférico, inflamación postraumática, choque séptico, enfermedades infecciosas, complicaciones inflamatorias o efectos secundarios de la cirugía, trasplante de médula ósea u otras complicaciones y/o efectos secundarios del trasplante, complicaciones inflamatorias y/o inmunes y efectos secundarios de la terapia génica, por ejemplo debido a la infección con un vehículo viral o inflamación asociada con el SIDA, para suprimir o inhibir la respuesta inmune humoral y/o celular, para tratar o mitigar las enfermedades proliferativas de monocitos o leucocitos, por ejemplo la leucemia, reduciendo la cantidad de monocitos o linfocitos, para la prevención y/o tratamiento del rechazo de injertos en casos de trasplante de células, tejidos y órganos naturales o artificiales tales como la córnea, médula ósea, órganos, lentes, marcapasos, tejido cutáneo natural o artificial.

PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS

Los compuestos de la presente invención se pueden preparar haciendo reaccionar un alcohol apropiado con un cloruro adecuado. A manera de ejemplo, los compuestos de sulfamato de la presente invención se pueden preparar mediante la reacción de un alcohol apropiado con un cloruro de sulfamoilo adecuado de la fórmula $R_1R_2NSO_2Cl$.

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

Se agrega hidruro de sodio y un cloruro de sulfamoilo a una solución agitada del alcohol en dimetilformamida anhidra a 0°C. Seguidamente se deja que la reacción entibie a temperatura ambiente, tras lo cual se continúa agitando durante 24 horas más. Se vierte la mezcla de reacción sobre una solución fría saturada de bicarbonato de sodio y se extrae la fase acuosa resultante con

diclorometano. Se secan los extractos orgánicos combinados sobre MgSO_4 anhidro. La filtración seguida por evaporación del solvente al vacío y la coevaporación con tolueno da un residuo crudo que es adicionalmente purificado por cromatografía instantánea.

De preferencia, se procesa el alcohol, según lo apropiado, antes de la reacción con el cloruro de sulfamilo. En caso de ser necesario, se pueden proteger los grupos funcionales del alcohol de manera conocida y eliminar el o los grupos protectores al final de la reacción.

De preferencia, los compuestos de sulfamato se preparan de acuerdo con los principios expuestos por Page y otros (1990 Tetrahedron 46: 2059 – 2068). Por otro lado, los compuestos de sulfamato se pueden preparar de acuerdo con WO 96/05216 o WO 96/05217.

SÍNTESIS

En suma, la presente invención presenta novedosas composiciones adecuadas para la anticoncepción oral, la terapia de reemplazo hormonal, la inhibición de E1-STS, así como otras aplicaciones terapéuticas.

EJEMPLOS

A continuación se describe la invención, sólo a manera de ejemplo, con referencia a los dibujos que la acompañan, en los cuales:

La Figura presenta un diagrama de flujo;

La Figura 2 presenta un gráfico;

La Figura 3 presenta un gráfico;

La Figura 4 presenta un gráfico;

La Figura 5 presenta un gráfico;

La Figura 6 presenta un gráfico;

La Figura 7 presenta un gráfico;

La Figura 8 presenta un gráfico;

La Figura 9 presenta un gráfico;

La Figura 10 presenta un gráfico;

La Figura 11 presenta gráficos;

Se prepararon los siguientes compuestos de acuerdo con la presente invención

Preparación de estrona-3-sulfamato

Se agregó hidruro de sodio (dispersión al 60 %; 2 eq.) y cloruro de sulfamoilo (2 eq.) a una solución agitada de estrona (1 eq.) en dimetilformamida anhidra a 0°C. Seguidamente se dejó que la reacción entibiara a temperatura ambiente, tras lo cual se continuó agitando durante 24 horas más.

Se vertió la mezcla de reacción sobre una solución fría saturada de bicarbonato de sodio y se extrajo la fase acuosa resultante con diclorometano. Se secaron los extractos orgánicos combinados sobre MgSO_4 anhidro. La filtración seguida por evaporación del solvente al vacío y la coevaporación con tolueno dio un residuo crudo que fue adicionalmente purificado por cromatografía instantánea.

El análisis arrojó los siguientes datos:

δ ^1H (270 MHz; CD_3OD): 0,91 (s, 3H, $\text{C}_{18}\text{-Me}$), 1,40 – 2,55 (serie de m, 13H), 2,90 – 2,92 (m, 2H), 7,04 (d amp, 2H, $J = 10,44$ Hz), 7,33 (d amp, 1H, $J = 8,42$ Hz).

δ ^{13}C (67,8 MHz; CD_3OD): 14,53 (q, $\text{C}_{18}\text{-Me}$), 22,80 (t), 27,24 (t), 27,73 (t), 30,68 (t), 33,05 (t), 37,01 (t), 29,76 (d), 45,73 (s, C_{18}), 51,86 (d), 120,76 (d), 123,54 (d), 127,89 (d), 139,83 (s), 150,27 (s), 223,87 (s, C=O).

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

Microanálisis:

	C	H	N
Estimado:	61,87 %	6,63 %	4,01 %

Encontrado: 61,90 % 6,58 % 3,95 %

Estudios con Estradiol Sulfamato (J995)

Tecnología

El estradiol sulfamato (J 995) fue investigado con respecto a sus propiedades hormonales in vitro e in vivo. Los estudios in vitro incluyeron la evaluación de su unión específica a los receptores de estrógeno utilizando preparaciones citosólicas de tejido uterino de ratas y ratones y células tumorales MCF-7. Los estudios in vivo se realizaron en varias especies animales incluyendo ratas intactas y sometidas a ovariectomía y monos cinomolgus. Estas especies sirvieron para los estudios farmacodinámicos y farmacocinéticos pormenorizados ante la administración parenteral y oral del compuesto.

Los estudios en seres humanos se realizaron con la administración oral del compuesto en mujeres en edad posmenopáusica. Se evaluaron varias dosis y la administración única y múltiple. Los estudios in vitro se llevaron a cabo con soluciones en vehículos oleosos para la administración parenteral. El tratamiento oral se llevó a cabo con suspensiones de J995 cristalino en vehículos acuosos. Los estudios clínicos se realizaron con sustancia farmacológica amorfa formulada en forma galénica con una mezcla de ingredientes convencionales en forma de cápsulas o comprimidos.

Los estudios in vitro revelaron que el J995 en sí no tiene afinidad con el receptor de estrógeno. No hubo unión específica del J995 radiactivamente marcado al receptor de estrógeno de ratones, ratas y en el ser humano. Un enorme exceso de J995 no pudo desplazar al Estradiol específicamente unido radiactivamente marcado. Ambos hallazgos constituyen una fuerte evidencia de que el J995 ejerce efectos estrogénicos tras la transformación de una molécula hormonalmente inactiva a una molécula hormonalmente activa. El profármaco J995, o su principal metabolito Estrona Sulfamato (EMATE), se hidroliza a ácido

sulfámico y las hormonas estrogénicas naturales Estradiol y Estrona, respectivamente (fig. 1).

Debido al transporte preferencial en eritrocitos, el profármaco y J995 tienen propiedades farmacocinéticas singulares: J995 no circula en la fracción plasmática de la sangre como lo hacen los estrógenos convencionales, sino que una cantidad del 98 – 99 % de J995 circula en el compartimiento de los eritrocitos. Este transporte de eritrocitos lleva a una acción y extracción hormonal hepática muy reducida en el primer paso por el hígado y a la liberación prolongada del J995 de los eritrocitos, que funcionan como reservorio.

Ventajas de J995 con respecto a la terapia oral con estrógenos:

- Reducción de la variación de los niveles sanguíneos entre individuos (Fig. 2 y 3):

El patrón de oro de la terapia con estrógenos es el etinil estradiol. Este compuesto no lleva a niveles sanguíneos bien definidos (fig. 4). La desventaja de esta variación individual es la necesidad de administrar dosis más elevadas que las necesarias en la mayoría de los individuos para obtener una tasa aceptable de tratamientos exitosos.

- Reducción de la dosis de estrógeno y carga de metabolitos activos, los que se supone promueven el desarrollo de algunos tumores dependientes de las hormonas:

La terapia de reemplazo de estrógenos oral convencional con los estrógenos llamados conjugados, estradiol, estradiol valerato o estrona sulfato lleva a una gran acumulación de estrona sulfato en la circulación. La hidrólisis de parte de este metabolito tiene como resultado niveles sanguíneos terapéuticamente relevantes de estrona y estradiol. Sin embargo, el estrona sulfato tiene la desventaja de que es hidrolizado por la sulfatasa del tejido tumoral mamario de manera especialmente activa, lo que puede generar potencialmente

estrógenos promotores del crecimiento. J995, en relación a su dosis, lleva a niveles de estradiol más elevados y de acción mucho más duradera que el Estradiol Valerato en la misma dosis (Fig. 6, 7). El metabolito sulfato de estrona que surge posteriormente se mantiene más bajo por lo menos en un factor de 10 que bajo el tratamiento con Estradiol Valerato (Fig. 5).

- **Reducción de los efectos estrogénicos hepáticos:**

Una dosis elevada de estrógeno es esencial para la terapia oral convencional con estrógenos para hacer frente a la sustancial pérdida hepática de la hormona. El inconveniente de esta dosis elevada es un efecto desfavorable sobre las funciones hepáticas reguladas por el estrógeno. Estas incluyen el efecto sobre los factores del sistema hepatopoyético y los trastornos tromboembólicos relacionados, elevación del angiotensinógeno en la circulación y consiguientes efectos sobre las funciones adrenales, renales y vasculares, cambios de la secreción biliar y del metabolismo de los lípidos. El mecanismo de circunvalación del hígado de la acción de J995 y la estrategia de dosis ultra baja de acuerdo con la presente invención evita los correspondientes efectos adversos del tratamiento con estrógenos en el climaterio. El J995 administrado por vía oral lleva la acumulación de eritrocitos a casi 100 %. Mucho más de 50 % de este profármaco aparece como estrona y estradiol en la circulación (Fig. 11). Esto permite una dosis muy reducida en comparación con la terapia estrogénica oral por unidad de tiempo.

- **Obtención de niveles sanguíneos constantes:**

Los niveles sanguíneos de estrógenos fluctúa día a día bajo tratamiento convencional diario con estrógenos orales (Fig. 5, 6, 7) en tanto que J995 lleva a niveles sanguíneos muy constantes y duraderos (Fig. 5, 6, 7, 8, 9, 10). La Figura 9 ilustra los niveles de estrona sulfato casi constantes, que reflejan la generación "upstream" de estradiol y estrona al cabo de 14 días de tratamiento con J995 a

una dosis muy baja de 100 µg por día en una fase de aclarado en el curso de 144 horas.

- **Efectos del Estradiol Sulfamato en huesos con deficiencia de estrógeno:**

No se pueden obtener niveles constantes y bien definidos en sangre de acuerdo con lo descrito en la presente con la terapia oral establecida con estrógenos. J9995 permite un tratamiento osteoprotector preciso apenas por debajo del umbral, lo que lleva al crecimiento del endometrio. La ausencia de efectos en el endometrio permite, en un aspecto preferido, el uso de JJ5 sin la administración simultánea de progestinas.

Mejoras que se pueden obtener con una preparación de estrógenos solamente para la terapia de reemplazo de estrógenos basada en J995.

- **Terapia libre de sangrado:**

El fundamento de un tratamiento combinado con estrógeno/ progestina es el control de la proliferación del endometrio, que representa un riesgo de desarrollo de cáncer de endometrio. El precio de este efecto protector esencial es bastante considerable. Tanto el tratamiento combinado cíclico como el continuo llevan a sangrados uterinos que probablemente constituyen la razón más importante para interrumpir la terapia de reemplazo de estrógenos.

- **Efectos sobre el bienestar:**

Otro aspecto negativo concreto de este tratamiento es un deterioro de los efectos positivos que los estrógenos ejercen sobre el bienestar de la mujer en el climaterio.

- **Mama:**

Los efectos proliferativos de las progestinas en la mama suscitan cuestionamientos, al igual que los efectos de la progesterona en la gestación. La

preocupación acerca de estos efectos se relaciona con su rol potencial en el desarrollo del cáncer mamario.

• **Efectos colaterales metabólicos:**

Las progestinas, al igual que la progesterona en sí, tienen efectos importantes sobre un amplio espectro de funciones metabólicas. Estas incluyen la secreción de insulina y la resistencia a la insulina, que se reduce, así como efectos sobre el metabolismo de los lípidos. Los efectos correspondientes representan efectos adversos en el contexto de la terapia de reemplazo de estrógeno.

Importancia de la terapia de reemplazo de estrógeno

Las mujeres tienen una constante pérdida de masa ósea una vez cesada su secreción de estrógeno ovárica tras la menopausia. Debido al hecho de que la expectativa de vida de la mujer es muy elevada y aún en aumento, es imprescindible prevenir la pérdida ósea y la consiguiente fragilidad del esqueleto. Este es, en mucho, el factor de riesgo más importante para la discapacidad y también para la morbilidad y mortalidad a edad avanzada.

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en la memoria descriptiva que antecede se incorporan a la presente como referencia.

Las diversas modificaciones y variaciones de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance y espíritu de la invención. Si bien la invención ha sido descrita en conexión con realizaciones preferidas específicas, se debe entender que la invención reivindicada no debe limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas. Por cierto, se pretende que las diversas modificaciones de las modalidades descritas para llevar a la práctica la invención, que son obvias para los expertos en química, biología o campos relacionados, estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende
(i) un compuesto de la fórmula (I)



Fórmula I

en la cual: X es un anillo de hidrocarbilo con por lo menos 4 átomos en el anillo; K es un grupo hidrocarbilo; R_s es un grupo sulfamato;

(ii) optativamente mezclado con un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable,

donde el compuesto está presente en una cantidad que produce una dosis de no más de 200 µg/ día.

2. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 en la cual el compuesto está presente en una cantidad que produce una dosis de 10 a 200 µg/ día.

3. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 en la cual el compuesto está presente en una cantidad que produce una dosis de 50 a 200 µg/ día.

4. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 en la cual el compuesto está presente en una cantidad que produce una dosis de 20 a 50 µg/ día.

5. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 en la cual el compuesto está presente en una cantidad que produce una dosis de no más de 200 µg/ día.

6. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 en la cual el compuesto está presente en una cantidad que produce una dosis de no más de 1 mg/ dosis.

7. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 en la cual el compuesto está presente en una cantidad que produce una dosis de no más de 4 mg/ dosis.

8. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual X en combinación con K imita una estructura esteroide.

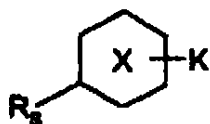
9. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual K es un grupo cíclico.

10. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual X es un anillo de seis miembros.

11. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual el anillo X tiene seis átomos de carbono en el anillo.

12. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual el compuesto es de la Fórmula II

Fórmula II



en la cual cada uno de R_s , X y K son como se los definiera en la reivindicación 1.

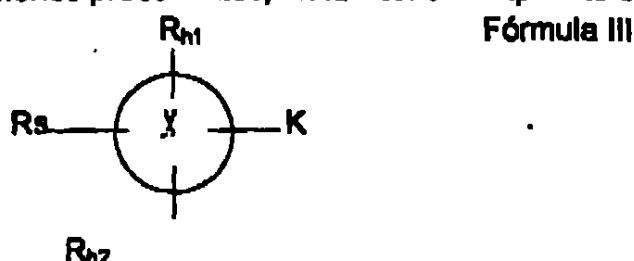
13. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual X en combinación con K es una estructura de anillo esteroide.

14. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual el grupo K y el anillo X constituyen una estructura de anillo esteroide o un derivado sustituido de la misma.

15. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14 en la cual el grupo Rs está en la posición 3 del anillo X.

16. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual Rs es un grupo sulfamato.

17. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual el compuesto es de la fórmula III

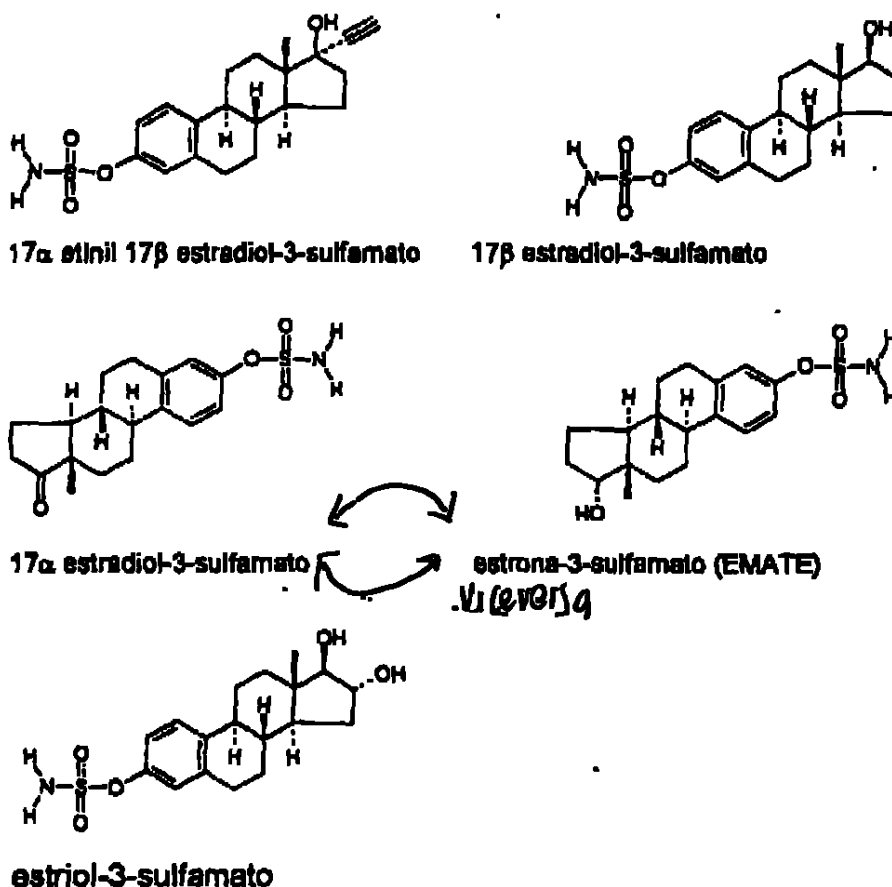


en la cual X, K y Rs son como se los definiera en la reivindicación 1, y donde Rh1 es un grupo halo optativo; Rh2 es un grupo halo optativo; por lo menos uno de Rh1 y Rh2 está presente.

18. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17, en la cual Rh1 está en la posición 2 del anillo X.

19. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17 ó 18 en la cual Rh2 está en la posición 4 del anillo X.

20. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la cual el compuesto de la fórmula I es seleccionado entre los siguientes compuestos



21. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para usar en medicina.

22. El uso de una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 en la elaboración de un medicamento para usar en la anticoncepción oral.

23. El uso de una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 en la elaboración de un medicamento para usar en terapia de reemplazo hormonal.

24. El uso de una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 en la elaboración de un medicamento para la terapia de reemplazo hormonal para la protección ósea sin estimulación del endometrio.

25. El uso de una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 en la elaboración de un medicamento para usar en la terapia de un trastorno o enfermedad asociada con STS.

26. El uso de una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 en la elaboración de un medicamento para usar en la terapia de un trastorno o enfermedad asociada con niveles adversos de STS.

RESUMEN**COMPOSICIÓN**

Se presenta una composición farmacéutica que comprende (i) un compuesto de la fórmula (I)

**Fórmula I**

en la cual: X es un anillo de hidrocarbilo con por lo menos 4 átomos en el anillo; K es un grupo hidrocarbilo; Rs es un grupo sulfamato; (ii) optativamente mezclado con un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable, donde el compuesto está presente en una cantidad que produce una dosis de no más de 200 µg/ día.

Principales rutas de biotransformación de estradiol valerato vs. estradiol sulfamato (J995).

Main routes of biotransformation of estradiol valerate vs estradiol sulfamate (J995)

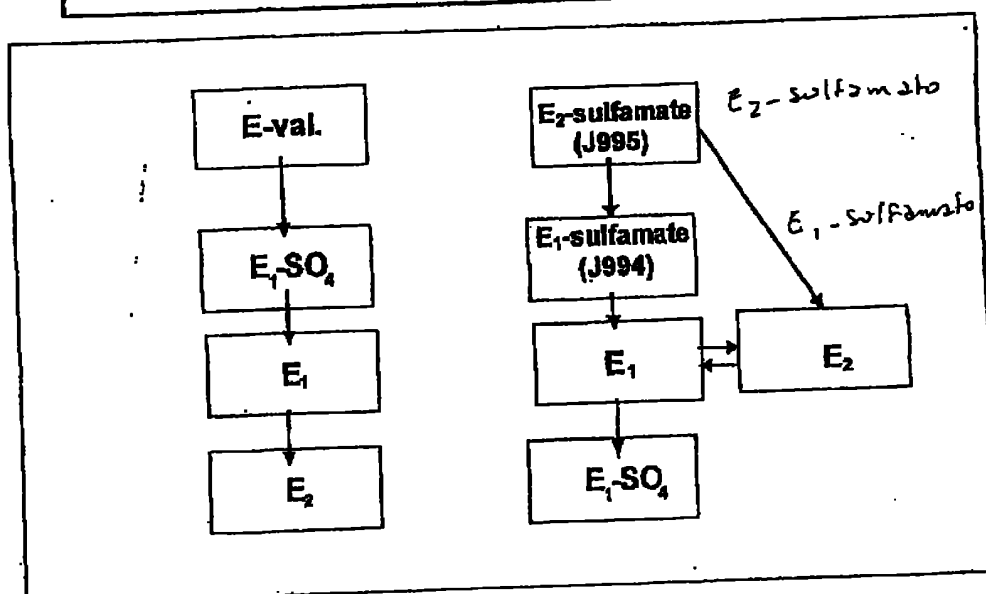
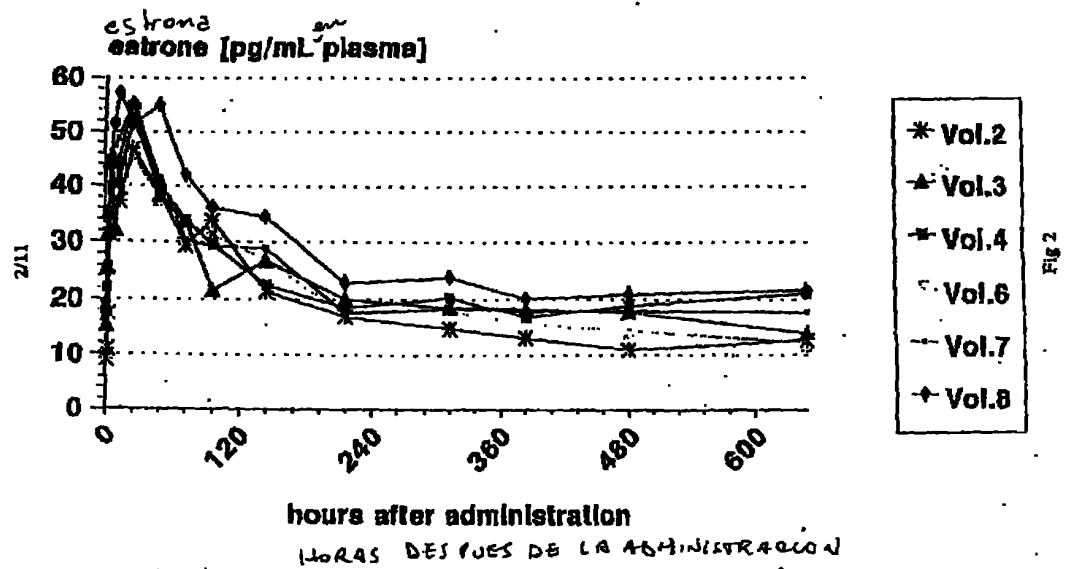


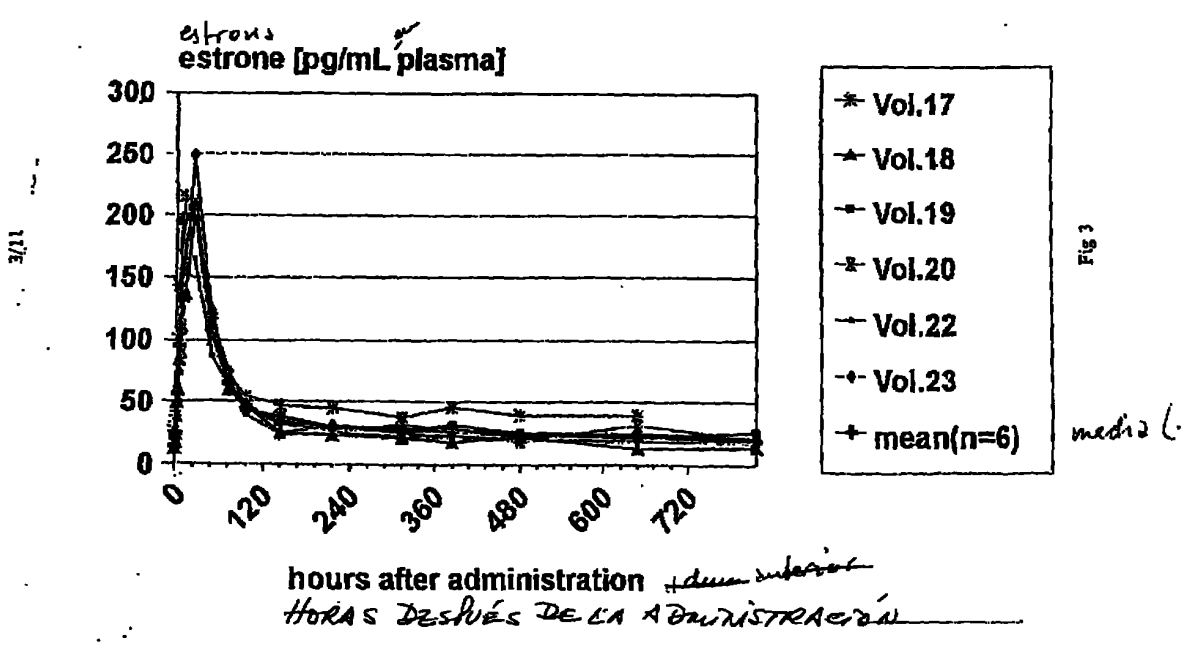
Fig 1

Curso de la estrona plasmática en mujeres menopausiadas (n=6) después de una única dosis oral de 1mg. de Estradiol Sulfamato (J995) ⁸⁴

**Course of plasma estrone in menopausal women (n=6)
after a single oral dose of
1mg of Estradiol Sulfamate (J995)**

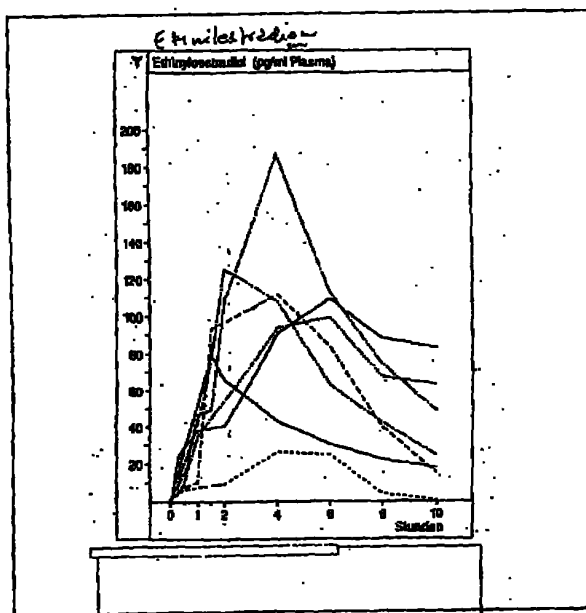


Course of plasma estrone in menopausal women (n=6)
after a single oral dose of
4mg of Estradiol Sulfamate (J995)



VARIACION ENTRE INDIVIDUOS DE LOS NIVELES PLASMATICOS RESULTANTES DE UNA DOSIS ORAL UNICA (50µg) de etinilestradiol aplicada en condiciones RIGOROSAMENTE NORMALIZADAS.

Individual variation in plasma levels after a single oral dose (50µg) of ethinylestradiol given under rigidly standardized conditions



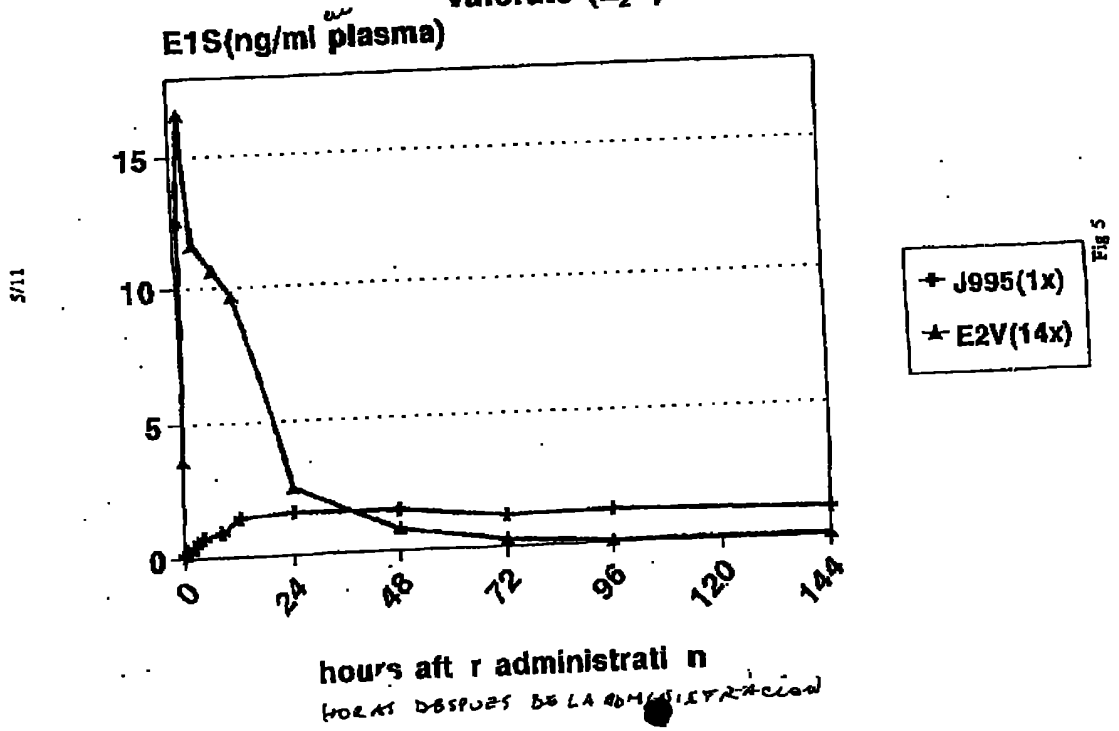
Goldzieher JW et al., Am Obst Gyn 160/5 (1989) 1260-1264

11/1999

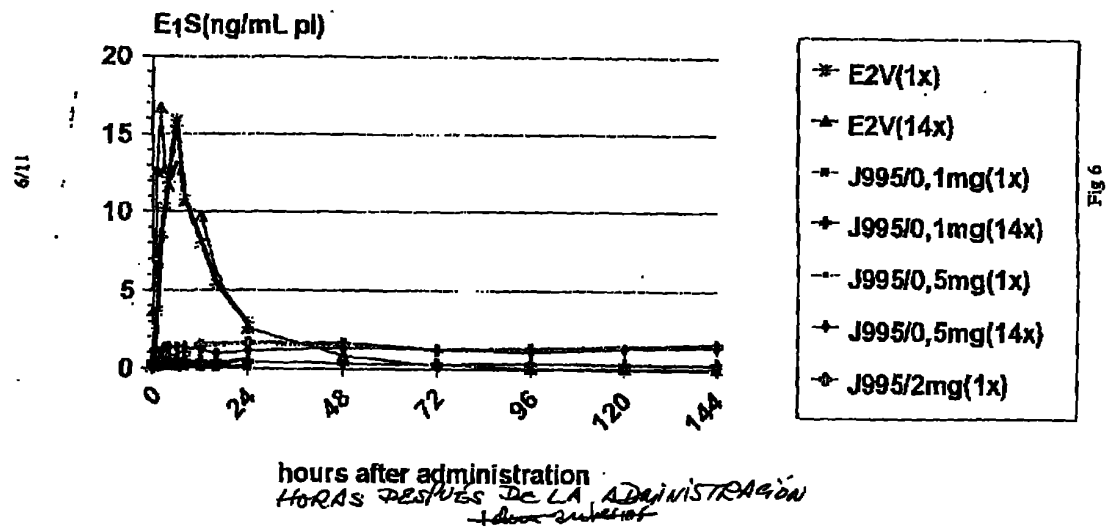
ESTRONE SULFATO EN PLASMA EN MUJERES MENOPÁUSICAS. COMPARACION ENTRE UNA ÚNICA DOSIS ORAL DE 2mg de ESTRADIOL SULFATO (J995) Y MÚLTIPLES DOSIS ORALES DE 2mg de ESTRADIOL VALERATO (E₂V)

87

Plasma estrone sulfate in menopausal women:
Comparison between a single oral dose of 2 mg Estradiol Sulfamate (J995) and multiple oral doses of 2 mg Estradiol Valerate (E₂V)



Course of plasma estrone sulfate in menopausal women (n=6)
after various oral doses of
Estradiol Sulfamate (J995) and 2mg Estradiol Valerate (E2V)



curso de estrona en plasma en mujeres menopausicas (n=6) tras una dosis oral única de 2mg de Estradiol Sulfamato (J995) y 2mg de Estradiol Valerato (E₂V).

89

Course of plasma estrone and estradiol in menopausal women (n=6) after a single oral dose of 2mg Estradiol sulfamate (J995) and 2mg Estradiol valerate (E₂V)

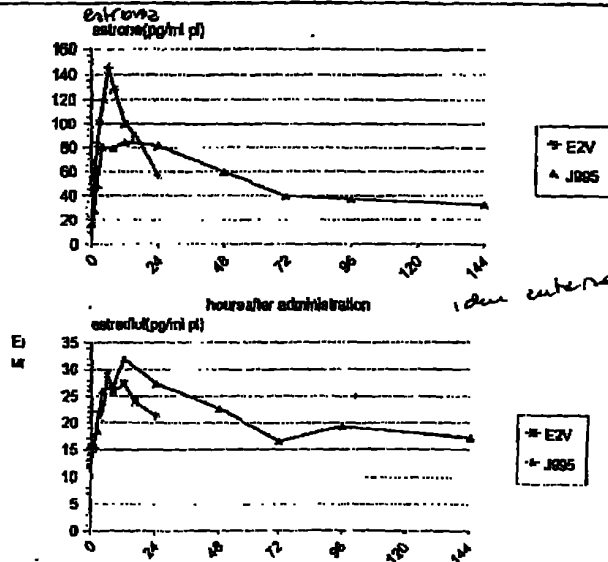


Fig 7

HOAS DE SIVS idem anterior
DE LA ADMINISTRACION

11/1999

Curso de estrone y estradiol en plasma en mujeres menopausi-
cas (n=6) tras una dosis oral única de placebo; 0,5mg, 1mg,
2mg, 4mg, 8mg de Estradiol Sulfamato (J995)

**Course of plasma estrone and estradiol in
menopausal women (n=6) after a single
oral dose of placebo, 0.5mg, 1mg, 2mg,
4mg, 8mg of Estradiol Sulfamate (J995)**

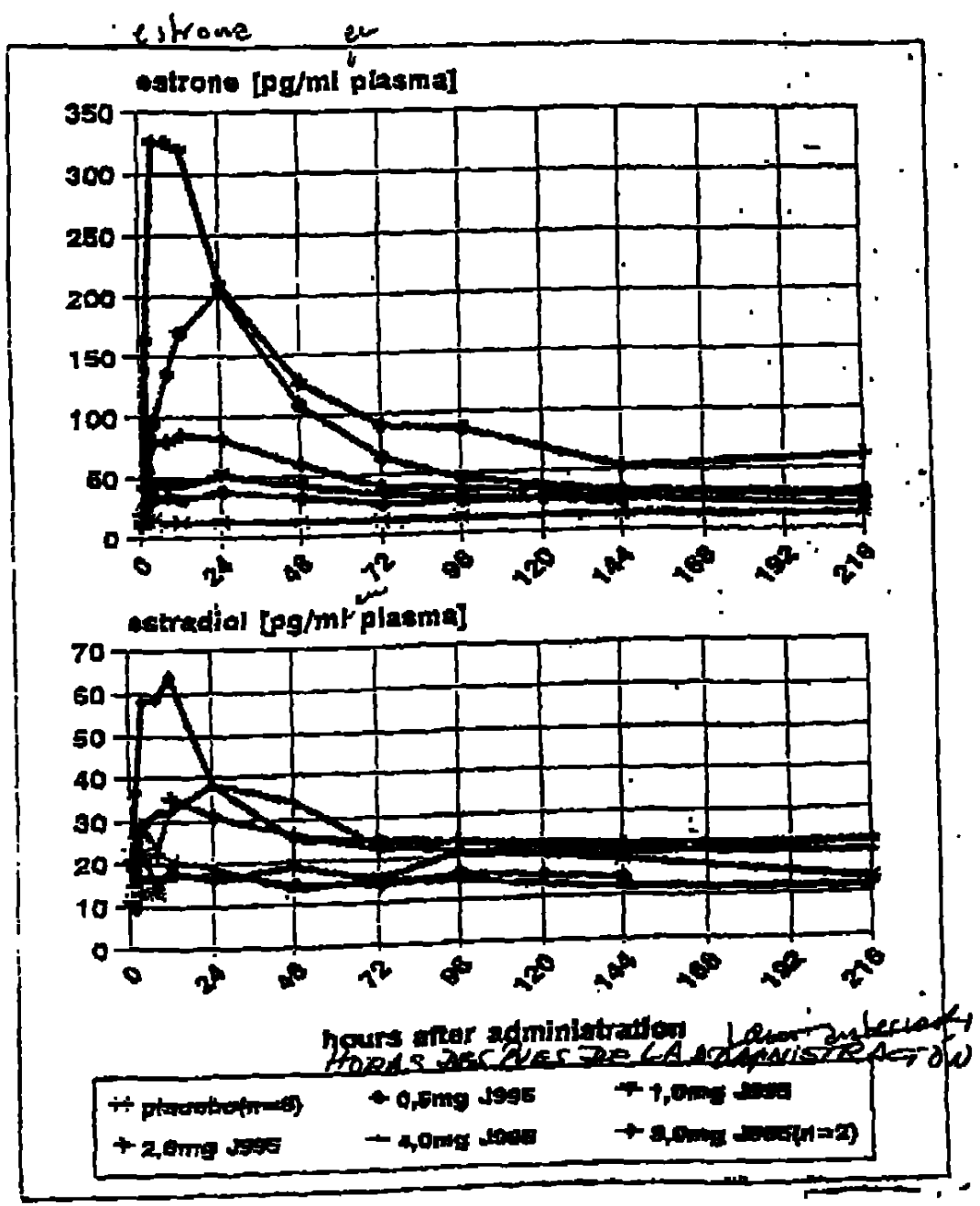
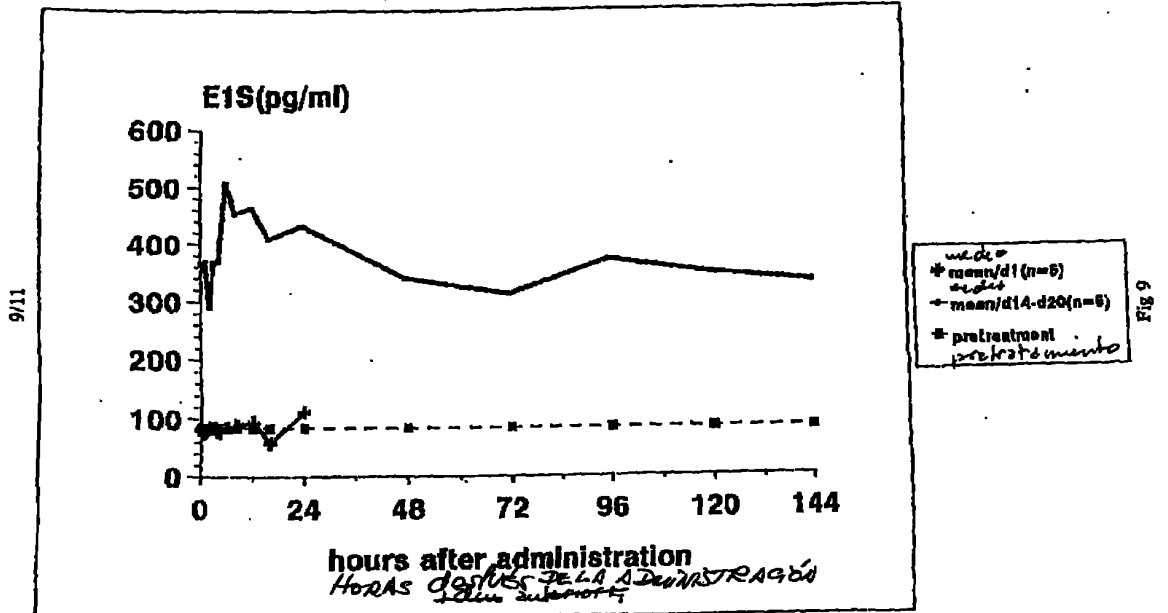


Fig 8

91
 Curso plasmático de estrona sulfato (E1S) en mujeres menopáusicas (n=6)
 tras múltiples dosis orales de 100 µg de Estradiol Sulfamato (J995)

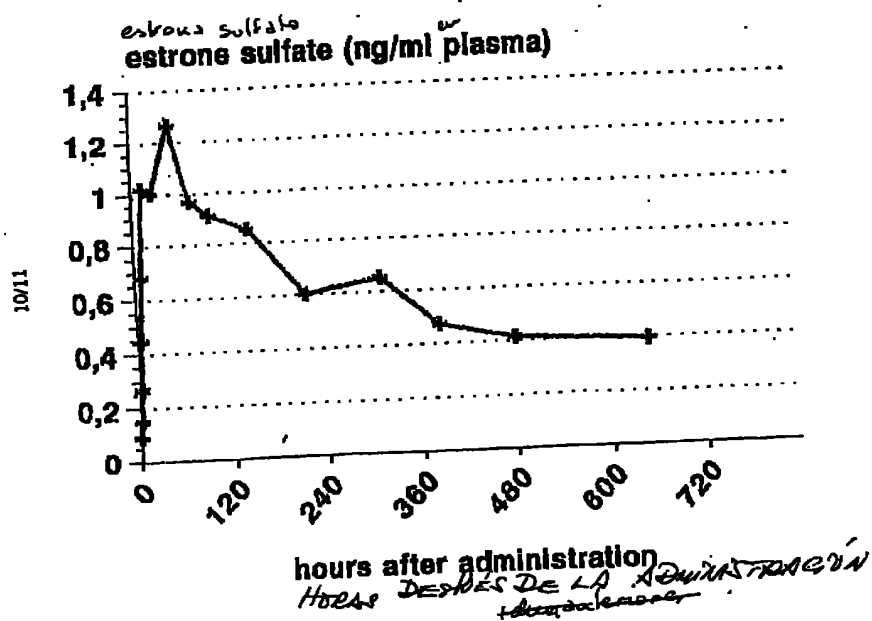
: Cours of plasma estron sulfat (E1S) in m nopausal wom n (n=6)
 after multiple oral doses f
 100µg-of Estradiol Sulfamate (J995)



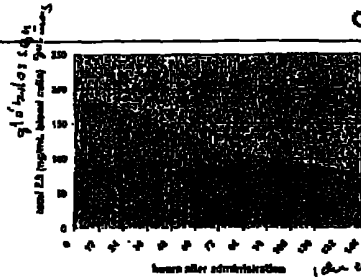
92

Curso de estrona sulfato en plasma en mujeres menopausiales (n=6)
tras dosis orales únicas de 2mg de Estradiol Sulfamato (J995)

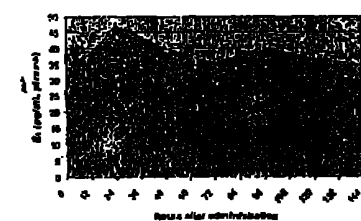
Course of plasma estrone sulfate in menopausal women (n=6)
after single oral doses of
2mg of Estradiol Sulfamate(J995)



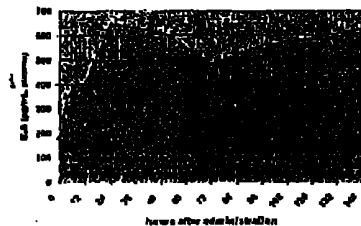
Estimation of oral bioavailability of estradiol sulfamate (J995) at a single oral dose of 0.5 mg



Conc. de eritrocitos, $\mu\text{g/g}$ eritrocitos $\mu\text{g/g}$
Erythrocyte conc.: Ca. 200 ng/mL erythrocytes/ca
100 $\mu\text{g/L}$ blood $\mu\text{g/g}$
 $\approx 500 \mu\text{g/5L}$ blood
Sangre



Actuado de E_1 : en un plazo de 5 días
Clearance of E_1 : 40 pg/ml over 5 days
*calculated 40 ng/l over 5 days
calculado 1870 l x 40 ng/l/day 1870 l x 40 ng/l/día
374 $\mu\text{g/5 days}$ en 5 días



Actuado de E_{1S} en un plazo de 5 días
Clearance of E_{1S} : 700 pg/ml over 5 days
*calculated 700 ng/l over 5 days
calculado 110 l x 700 ng/l/day 110 l x 700 ng/l/día
385 $\mu\text{g/5 days}$ en 5 días

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

11/1989

Folios 94 a 96 targeta prop.
Folios 97 a 100 targeta termómetro

GE

EXTRACTO

(21) No. SOLICITUD

(51) INT.CI.

(22) FECHA DE
PRESENTACIÓN

(71) SOLICITANTE 1. STERIX LIMITED
2. SCHERING
AKTIENGESELLSCHAFT

(30) PRIORIDAD

(VER ANEXO NO. 2)

(31) No. DE SOLICITUD

(72) INVENTORES (VER ANEXO No.1)

(32) FECHA DE PRESENTACIÓN

(33) PAÍS

(74) APODERADO DRA.: MARGARITA
CASTELLANOS ABONDANO

(34) TÍTULO

" COMPOSICIÓN "

(57) RESUMEN

Una composición farmacéutica que comprende

(i) un compuesto de la fórmula (I)



FÓRMULA I

en la cual: X es un anillo de hidrocarbilo con por lo menos 4 átomos en el anillo; K es un grupo hidrocarbilo; Rs es un grupo sulfamato;

(ii) optativamente mezclado con un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable,

donde el compuesto está presente en una cantidad que produce una dosis de no más de 200 µg/día.

ARTE FINAL

TAMAÑO 6 X 6

folios 102 y 103
anexos del extracto
de publicación
no 2050

REQUISITOS MINIMOS PARA AD

PATENTE DE INVENCION [X]

MODELO DE UTILIDAD []

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X]
- Descripción de la invención [X]
- Dibujos de ser estos pertinentes []
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas [X]

COMPLETA [X]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial. []
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. []
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño. []
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado. []
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. []
- Representación gráfica del esquema de trazado []
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha: _____

2020
Bogotá, D.C.

Doctora
MARGARITA CASTELLANOS

REFERENCIA:	Radicación No.	01-2039
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio No.	1035
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Debe modificar el título, ya que debe definir en forma breve y precisa el objeto de la invención y estar acorde con la descripción y las reivindicaciones.
- Debe allegar los poderes otorgados a la abogada que aparece en la solicitud como apoderada, con el lleno de los requisitos exigidos en el Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar los documentos que acreditan la existencia y representación legal de las sociedades solicitantes.
- Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante (art. 26-k, Dec 486/2000).
- Debe indicarse el lugar de constitución de la sociedad solicitante (Art. 27-c, D 486/00).

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución Reglamentaria No. 210 del 15 de enero del 2001.

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 05 ABR 2001.

Se recuerda al interesado que debe presentar, dentro de los dieciséis meses siguientes contados a partir de la fecha de presentación de las solicitudes cuya prioridad se invoca, copia de las mismas certificadas por la autoridad que las expidió y, en los casos en que haya lugar, la traducción simple del capítulo reivindicatorio. El incumplimiento de este plazo, acarreará la pérdida de la prioridad invocada.

202027/202022

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 382 2695
E-mail: info@sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia