

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.,

Abogada
DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D' ALEMAN
clarkemodet@clarkemodet.com.co

ASUNTO	Radicación	07 050 824A
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	519
	Oficio	15023
	Folios	016

Patente de Invención	☒	Patente de Modelo de Utilidad	☐
Via Nacional	☐		
Via PCT (Fase Nacional)	☒	Capítulo I	☐
		Capítulo II	☒
No. Solicitud Internacional	PCT/CA2005/001612		
Fecha de Presentación Internacional	20/Octubre/2005		

Como resultado del examen de fondo realizado, con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción:	Folios 4 a 91	22/Mayo/2007
Reivindicaciones:	Folios 92	5/Julio/2012
Prioridad:	US 60 620 452	20/Octubre/2004

1. Análisis de la prioridad

Se acepta la reivindicación de prioridad para las composiciones orales (reivindicaciones 14-17), percutáneas (reivindicación 13) e intravaginales en crema (1 y 2, 4-8) porque los óvulos o supositorios y geles de aplicación intravaginal que contuvieran la combinación de por lo menos un precursor de esteroides sexuales y por lo menos un modulador de receptores de estrógeno no estaban incluidos dentro de la solicitud sobre la cual se reivindica prioridad.

Expediente 07 050 824 1er Art 45

Se acepta para examen la solicitud fraccionaria presentada e identificada como 07-050824A, porque no implica ampliación de la materia contenida en la solicitud inicial.

3. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un precursor sexual en combinación con al menos un modulador receptor de estrógeno selectivo".

El problema planteado en esta solicitud consiste en la necesidad de proporcionar un método para tratar o reducir la probabilidad de adquirir problemas que afectan la lámina propia o capa muscular de la vagina.

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona composiciones farmacéuticas para administración vaginal, percutánea, y oral que comprende que comprenden: a) un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable; b) una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un precursor esteroide sexual seleccionado del grupo que consiste de dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona, y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol; y c) una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un modulador selectivo del receptor de estrógeno para la protección de la glándula uterina y mamaria contra el cáncer, en donde el modulador selectivo del receptor de estrógeno es seleccionado del grupo que consiste de raloxifeno, arzoxifeno (LY 353381), LY 335563, tamoxifeno, OH-tamoxifeno, droloxifeno, toremifeno, idoxifeno, ospemifeno, GW 5638, SERM 3339, TSE-424, ERA-923, lasoxifeno (CP 336156), levormeloxifeno, acolbifeno (EM-1538), EM-652 y EM-800.

El objeto de la presente solicitud se relaciona con la clasificación internacional de patentes (CIP): A61K 31/5685; A61K 31/566; A61K 31/453; A61K 31/519; A61P 15/05.

4. De la Solicitud de Patente

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

Las reivindicaciones 1, 13 y 14 no son concisas porque reclaman composiciones farmacéuticas, sin establecer claramente las cantidades de los componentes. Se recuerda al solicitante que una composición debe estar caracterizada por sus componentes y las cantidades de estos dentro de la composición.

Las reivindicaciones 1, 13 y 14 no son claras, porque hacen referencia a los códigos LY335563, GW5638, SERM 3339, TSE-424, ERA-9223, EM-652 y EM-800, los cuales son códigos de laboratorio que no definen el producto, porque su composición puede cambiar con el paso del tiempo aunque conserve el mismo código. Se sugiere especificar los nombres químicos o comunes de los compuestos.

La reivindicación 6 no es concisa porque establece que la composición de la reivindicación 1 comprende hasta 2% en peso con relación al peso total de la composición. Dicho porcentaje no es conciso porque no se establece un intervalo de concentración en el cual la composición reclamada presente los efectos establecidos, por tanto se sugiere establecer un intervalo de concentraciones dentro lo soportado en la descripción. Se sugiere incluir el contenido de la reivindicación 7 dentro de la reivindicación 1.

Las composiciones reclamadas que contienen un SERM diferente a acolbifeno no se encuentran soportadas en la descripción, ya que dentro de esta solamente se prueban y presentan composiciones que contienen acolbifeno y DHEA. Se sugiere restringirse a las composiciones efectivamente probadas y soportadas en la descripción.

Las composiciones de las reivindicaciones 2, 3 y 13 no se encuentran soportadas en la descripción, pues no se encuentra en la descripción ningún ejemplo que comprende la combinación establecida en dichas formas farmacéuticas. Se sugiere eliminarlas del pliego reivindicatorio.

5. Unidad de invención (Art 25 D 486)

La solicitud no cumple con el requisito de unidad de invención porque se refiere a 9 grupos inventivos.

Los grupos inventivos están definidos por las siguientes características **esenciales**:

1° Composición farmacéutica para aplicación vaginal que comprende un precursor esteroide sexual seleccionado del grupo que consiste de dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol y un modulador selectivo del receptor de estrógeno seleccionado del grupo que consiste de: Raloxifeno, Arzoxifeno, LY 335563, TSE 424 y Pipedoxifeno (ERA-923).

2° Composición farmacéutica para aplicación vaginal que comprende un precursor esteroide sexual seleccionado del grupo que consiste de dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol y un modulador selectivo del receptor de estrógeno seleccionado del grupo que consiste de: Tamoxifeno, OH-tamoxifeno, Droloxifeno, Toremifeno, Idoxifeno, Ospemifeno, GW5638.

3° Composición farmacéutica para aplicación vaginal que comprende un precursor esteroide sexual seleccionado del grupo que consiste de dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol y un modulador selectivo del receptor de estrógeno seleccionado del grupo que consiste de: Lasoxifeno, Levormeloxifeno, Acolbifeno, EM-652, EM-800.

4° Composición farmacéutica para aplicación percutánea que comprende un precursor esteroide sexual seleccionado del grupo que consiste de dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol y un modulador selectivo del receptor de estrógeno seleccionado del grupo que consiste de: Raloxifeno, Arzoxifeno, LY 335563, TSE 424 y Pipedoxifeno (ERA-923).

5° Composición farmacéutica para aplicación percutánea que comprende un precursor esteroide sexual seleccionado del grupo que consiste de dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol y un modulador selectivo del receptor de estrógeno seleccionado del grupo que consiste de: Tamoxifeno, OH-tamoxifeno, Droloxifeno, Toremifeno, Idoxifeno, Ospemifeno, GW5638.

6° Composición farmacéutica para aplicación vaginal que comprende un precursor esteroide sexual seleccionado del grupo que consiste de dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol y un modulador selectivo del receptor de estrógeno seleccionado del grupo que consiste de: Lasoxifeno, Levormeloxifeno, Acolbifeno, EM-652, EM-800.

7° Composición farmacéutica para administración oral que comprende un precursor esteroide sexual seleccionado del grupo que consiste de dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol y un modulador selectivo del receptor de estrógeno seleccionado del grupo que consiste de: Raloxifeno, Arzoxifeno, LY 335563, TSE 424 y Pipedoxifeno (ERA-923).

8° Composición farmacéutica para administración oral que comprende un precursor esteroide sexual seleccionado del grupo que consiste de dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol y un modulador selectivo del receptor de estrógeno seleccionado del grupo que consiste de: Tamoxifeno, OH-tamoxifeno, Droloxifeno, Toremifeno, Idoxifeno, Ospemifeno, GW5638.

9° Composición farmacéutica para administración oral que comprende un precursor esteroide sexual seleccionado del grupo que consiste de dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol y un modulador selectivo del receptor de estrógeno seleccionado del grupo que consiste de: Lasoxifeno, Levormeloxifeno, Acolbifeno, EM-652, EM-800.

Se sugiere presentar las solicitudes divisionales que considere necesarias, ó limitar la solicitud inicial a una sola invención, eliminando de ella las otras invenciones.

6. Determinación del estado de la técnica

El estado de la técnica se determinó con base en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad: Octubre 20 de 2004 para las composiciones para aplicación percutánea, las composiciones orales y las cremas vaginales, ó fecha de presentación internacional: Octubre 20 de 2005 para las composiciones farmacéuticas para aplicación vaginal en supositorio o gel, y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación*
D1	MXPA00012306	Usos médicos de un modulador de receptor de estrógeno selectivo en combinación con precursores esteroides sexuales	28/Julio/2003
D2	The Journal of Steroid Biochemistry	Effect of dehydroepiandrosterone on vaginal and uterine	03/Agosto/1998

	and Molecular Biology. Volume 66, Issue 3, August 1998, Pages 137-149	histomorphology in the rat.	
D3	Remington Farmacia 19ª Edición. Editorial Panamericana. Tomo 2.	Capítulo 90. Aplicaciones Medicinales. Supositorios páginas 2436-2443.	1998
D4	WO9416709	Therapeutic uses and delivery systems of dehydroepiandrosterone.	04 de agosto de 1994

D1

http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=worldwide.espacenet.com&II=0&ND=3&adjacent=true&locale=en_EP&FT=D&date=20030728&CC=MX&NR=PA00012306A&KC=A Divulga un método para el tratamiento y/o inhibición del desarrollo de cáncer de mama el cual envuelve la administración de un modulador de receptor de estrógeno de la fórmula (I) y una cantidad de un precursor de esteroide sexual seleccionado del grupo que consiste de dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol (resumen, Pág. 12 líneas 20-25 y Pág. 13 líneas 1-5). Establece que la aplicación de DHEA retrasa y previene la aparición de tumores de mama (Pág. 7 líneas 4-11) y que existe una sinergia en la combinación de un precursor de esteroide sexual y un modulador de receptor de estrógeno, contra el cáncer de mama, ya que el SERM proporciona un efecto antiestrogénico deseable y el precursor proporciona efecto androgénico y establece que los efectos indeseables también son mitigados en una forma sinérgica (Pág. 20 líneas 16-23). Establece que la combinación de un SERM (EM-800) y un precursor de esteroide sexual (DHEA) ejerce efectos inhibidores más potentes que cada compuesto utilizado solo sobre el desarrollo del carcinoma mamario (Pág. 34 líneas 2-10). Establece que los ingredientes activos para la administración transdérmica o transmucosa están preferiblemente del 0.5 al 20% en relación al peso total de la composición farmacéutica (Pág. 45 líneas 17-25), adicionalmente establece la forma como se pueden formular ungüentos, geles, lociones o cremas de (Pág. 46 y Pág. 47 líneas 1-5) combinación y establece la forma preferida para formular el precursor esteroide en gel (Pág. 47 línea 14-Pág. 48 líneas 1-3). Enseña que el principio activo puede ser formulado en tabletas, grageas, núcleos y cápsulas (Pág. 50-Pág 51 líneas 1-8, Pág. 99 ejemplos A y B).

D2 Enseña que la aplicación local en la mucosa vaginal es aproximadamente 10 veces más eficiente que la aplicación en un sitio distante en la piel y que la inversión de la atrofia vaginal se observó después de la administración intravaginal de la DHEA en ratas ovariectomizadas a la dosis de 0,3 mg, mientras que una dosis diez veces mayor de la DHEA se requiere para producir el mismo efecto cuando se les administró la DHEA percutáneamente en la piel dorsal (resumen Pág. 137, Pág. 141, Pág. 143 primer párrafo, columna de la izquierda último párrafo y columna de la derecha primer párrafo y Pág. 147 columna de la izquierda penúltimo párrafo).

D3 Enseña el uso de supositorios vaginales y que las medicaciones vaginales están disponibles en una variedad de formas físicas como cremas, geles o líquidos. Adicionalmente enseña que existen diferentes bases para supositorios y entre ellas nombra manteca de cacao, aceites vegetales hidrogenados y bases hidrosolubles o dispersables las cuales están formadas por polietilenglicoles o por una combinación de glicol-surfactante y también la forma de prepararlos (Pág. 2436-2442).

D4 Divulga el uso de precursores esteroides sexuales como la dehidroepiandrosterona (DHEA) en la prevención y tratamiento de atrofia vaginal y otros síntomas de la menopausia. También revela que estos precursores de esteroides sexuales pueden ser formulados para administración percutánea o transmucosal, y que se pueden presentar como geles, soluciones, lociones, cremas, ungüentos y parches transdérmicos. (Resumen, Pág. 32 líneas 4-11 y 20-34, Pág. 33 líneas 12-30, Pág. 37 líneas 10-36, Pág. 38 líneas 1-3, reivindicación 12).

7. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Novedad (Art 16 D486)

La reivindicación 14 consiste en una composición farmacéutica para administración oral que comprende:

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del estado de la técnica:

Características esenciales	D1
Composición farmacéutica para administración oral.	Composición farmacéutica para administración oral.
a) Un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.	Gelatina, lactosa almidón (Tableta Pág. 99, ejemplo A) ó Lactosa anhidra, almidón, celulosa microcristalina, estearato de magnesio (Págs. 99 y 100 ejemplo B).
b) Una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un precursor esteroide sexual seleccionado del grupo que consiste de dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol.	Dehidroepiandrosterona 15% (Págs. 99 y 100 ejemplos A y B).
c) Una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un modulador selectivo del receptor de estrógeno para la protección de la glándula uterina y mamaria contra el cáncer, en donde el modulador selectivo del receptor de estrógeno es seleccionado del grupo que consiste de Raloxifeno, Arzoxifeno (LY 353381), LY 335563, Tamoxifeno, OH-tamoxifeno, Droloxifeno, Toremifeno, Idoxifeno, Ospemifeno, GW 5638, SERM	EM-800 5% (Págs. 99 y 100 ejemplos A y B).

3339, TSE-424, ERA-923, Lasoxifeno (CP 336156), Levormeloxifeno, Acolbifeno (EM-1538), EM-652 y EM-800.	
---	--

Las características **esenciales** de la composición de la reivindicación 14 habían sido divulgadas previamente en D1, el cual enseña una composición en tableta y una composición en cápsula de gelatina, que comprende DHEA, EM-800 y excipientes farmacéuticamente aceptables (Ejemplos A y B Págs. 99 y 100).

En consecuencia, la reivindicación 14 no es nueva, según lo divulgado en el documento D1.

Las reivindicaciones dependientes 15 – 17 no mencionan alguna característica que haga nueva a la composición de la reivindicación 14, por lo cual se considera que no son nuevas.

Nivel Inventivo (Art18 D486)

La reivindicación 1 consiste en una composición farmacéutica para aplicación vaginal que comprende:

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del estado de la técnica:

Características esenciales	D1	D2
Una composición farmacéutica para aplicación vaginal	Composiciones en ungüento, gel, crema o similar (Pág. 46 líneas 3 y 4).	Composición para aplicación local en la vagina (Pág. 138, columna de la derecha, primer párrafo).
a) Un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.	El compuesto activo es mezclado con un portador adecuado el cual es compatible con la piel y mucosa humana y que mejora la penetración transdérmica del compuesto a través de la piel y mucosa. Algunos de los portadores mencionados son: hidroxipropil celulosa (Klucel HF y base Glaxal) (Pág. 46). Una mezcla de solventes orgánicos e inorgánicos puede ayudar a la solubilidad hidrofílica y lipofílica por ejemplo agua y etanol (Pág. 47 líneas 1-4). Se prefiere que los precursores de esteroide sexual se	Un excipiente como etanol y propilenglicol (Pág. 138, columna de la derecha, primer párrafo).

	formulen como un gel alcohólico que contenga triglicérido caprílico-cáprico, hexilenglicol, dietilenglicol monometiléter, cicloteticona, alcohol bencílico e hidroxipropilcelulosa (Pág. 47 líneas 14-17 y Pág. 48 líneas 1-3).	
b) Una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un precursor esteroide sexual seleccionado del grupo que consiste de dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol.	Una cantidad terapéuticamente efectiva de un precursor esteroide sexual seleccionado del grupo: Dehidroepiandrosterona, sus profármacos y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol (Pág. 47 líneas 5-11).	Una cantidad terapéuticamente efectiva de DHEA (Pág. 138, columna de la derecha, primer párrafo).
c) Una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un modulador selectivo del receptor de estrógeno para la protección de la glándula uterina y mamaria contra el cáncer, en donde el modulador selectivo del receptor de estrógeno es seleccionado del grupo que consiste de Raloxifeno, Arzoxifeno (LY 353381), LY 335563, Tamoxifeno, OH-tamoxifeno, Droloxifeno, Toremifeno, Idoxifeno, Ospemifeno, GW 5638, SERM 3339, TSE-424, ERA-923, Lasoxifeno (CP 336156), Levormeloxifeno, Acolbifeno (EM-1538), EM-652 y EM-800.	Una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un modulador selectivo del receptor de estrógeno para la protección de la glándula uterina y mamaria contra el cáncer, en donde el modulador selectivo del receptor de estrógeno es seleccionado del grupo que consiste de: Raloxifeno, Arzoxifeno, LY 335563, Tamoxifeno, Droloxifeno, Toremifeno, Idoxifeno, GW 5638, TSE-424, Lasoxifeno, Levormeloxifeno, Acolbifeno, EM-652 y EM-800.	No lo menciona.

El documento D1 se considera el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque divulga un método para el tratamiento y/o inhibición del desarrollo de cáncer de mama el cual envuelve la administración de un modulador de receptor de estrógeno de la fórmula (I) y una cantidad de un precursor de esteroide sexual seleccionado del grupo que consiste de dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol (resumen, Pág. 12 líneas 20-25 y Pág. 13 líneas 1-5). Establece que la aplicación de DHEA retrasa y previene la aparición de tumores de mama (Pág. 7 líneas 4-11) y que existe una sinergia en la combinación de un precursor de esteroide sexual y un modulador de receptor de estrógeno, contra el cáncer de mama, ya que el SERM proporciona un efecto antiestrogénico deseable y el precursor proporciona efecto androgénico y

establece que los efectos indeseables también son mitigados en una forma sinérgica (Pág. 20 líneas 16-23). Establece que la combinación de un SERM (EM-800) y un precursor de esteroide sexual (DHEA) ejerce efectos inhibidores más potentes que cada compuesto utilizado solo sobre el desarrollo del carcinoma mamario (Pág. 34 líneas 2-10). Establece que los ingredientes activos para la administración transdérmica o transmucosa están preferiblemente del 0.5 al 20% en relación al peso total de la composición farmacéutica (Pág. 45 líneas 17-25), adicionalmente establece la forma como se pueden formular ungüentos, geles, lociones o cremas de (Pág. 46 y Pág. 47 líneas 1-5) combinación y establece la forma preferida para formular el precursor esteroide en gel (Pág. 47 línea 14-Pág. 48 líneas 1-3).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y la composición de la reivindicación 1 consiste en que la anterioridad no divulga específicamente una composición para aplicación vagina que comprenda la combinación de un precursor de esteroide sexual y un modulador selectivo de receptor de estrógeno.

No se evidencia el efecto que logra el incluir esta característica porque las composiciones reveladas en el documento D1 también son útiles para prevenir el cáncer de mama.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: "cómo modificar las composiciones reveladas en el documento D1 para obtener una composición alternativa de aplicación vaginal para prevenir el cáncer de mama y tratar o reducir la probabilidad de adquirir problemas que afectan la lámina propia o capa muscular de la vagina".

Sin embargo, el documento D2 revela que la aplicación local de DHEA en la mucosa vaginal es 10 veces más eficiente que la aplicación en un sitio distante en la piel (Pág. 147 columna de la izquierda).

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, se vería motivada por lo revelado en D2 a formular la combinación revelada en D1 en una forma farmacéutica para aplicación local en la vagina, con la expectativa razonable de obtener una composición para prevenir el cáncer de mama y tratar o reducir la probabilidad de adquirir problemas que afectan la lámina propia o capa muscular de la vagina, porque ya era conocido el efecto sinérgico de la combinación de un precursor esteroide sexual como DHEA y un modulador selectivo del receptor de estrógeno en la prevención del cáncer de mama y el documento D2 revela que la administración de DHEA resulta en cambios histológicos en los tejidos vaginal y uterino afectando los diferentes tipos de células (Pág. 144 último párrafo y Pág. 145 primer párrafo).

Adicionalmente la presente solicitud no revela que exista algún efecto sinérgico de la combinación de DHEA y acolbifeno sobre el tejido vaginal (ni en el epitelio, ni en la lámina propia, ni en la capa muscularis) (ver folios 162, 164, 165, 166 y 167) y el efecto sinérgico en la prevención del cáncer de mama ya había sido revelado previamente en el documento D1. Por tanto se considera que el objeto de la

reivindicación 1 se deriva de lo divulgado en el estado de la técnica y carece de un efecto sorprendente.

Conclusión:
La reivindicación 1 cumple el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumple con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

Puesto que la reivindicación dependiente 2 no menciona características inventivas adicionales tampoco se puede considerar inventiva.

La reivindicación 3 consiste en una composición farmacéutica para aplicación vaginal de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la composición farmacéutica es un supositorio o un óvulo:

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del estado de la técnica:

Características esenciales	D1	D3
Una composición farmacéutica para aplicación vaginal que es un supositorio	Composiciones en ungüento, gel, crema o similar (Pág. 46 líneas 3 y 4).	Supositorios vaginales (páginas 2437-2442)
a) Un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.	El compuesto activo es mezclado con un portador adecuado el cual es compatible con la piel y mucosa humana y que mejora la penetración transdérmica del compuesto a través de la piel y mucosa. Algunos de los portadores mencionados son: hidroxipropil celulosa (Klucel HF y base Glaxal) (Pág. 46). Una mezcla de solventes orgánicos e inorgánicos puede ayudar a la solubilidad hidrofílica y lipofílica por ejemplo agua y etanol (Pág. 47 líneas 1-4). Se prefiere que los precursores de esteroide sexual se formulen como un gel alcohólico que contenga triglicérido caprílico-cáprico, hexilenglicol, dietilenglicol monometiléter, ciclometicona, alcohol bencílico e hidroxipropilcelulosa (Pág. 47 líneas 14-17 y Pág. 48 líneas 1-3).	Las bases para supositorios pueden ser grasas (manteca de cacao o aceites vegetales modificados por esterificación, hidrogenación) o hidromiscibles (página 2437 segunda columna y 2439)
b) Una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un precursor	Una cantidad terapéuticamente efectiva de un precursor esteroide sexual seleccionado	El porcentaje en peso de la sustancia activa en la formulación se

esteroide sexual seleccionado del grupo que consiste de dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona y androst-5-ene-3 β ,17 β - diol.	del grupo: Dehidroepiandrosterona, sus profármacos y androst-5-ene- 3 β ,17 β -diol (Pág. 47 líneas 5-11).	calcula en función de su densidad y de la cantidad de ingrediente activo a formular (página 2442)
c) Una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un modulador selectivo del receptor de estrógeno para la protección de la glándula uterina y mamaria contra el cáncer, en donde el modulador selectivo del receptor de estrógeno es seleccionado del grupo que consiste de Raloxifeno, Arzoxifeno (LY 353381), LY 335563, Tamoxifeno, OH- tamoxifeno, Droloxifeno, Toremifeno, Idoxifeno, Ospemifeno, GW 5638, SERM 3339, TSE-424, FRA-923, Lasoxifeno (CP 336156), Levormeloxifeno, Acolbifeno (EM-1538), EM-652 y EM-800.	Una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un modulador selectivo del receptor de estrógeno para la protección de la glándula uterina y mamaria contra el cáncer, en donde el modulador selectivo del receptor de estrógeno es seleccionado del grupo que consiste de: Raloxifeno, Arzoxifeno, LY 335563, Tamoxifeno, Droloxifeno, Toremifeno, Idoxifeno, GW 5638, TSE-424, Lasoxifeno, Levormeloxifeno, Acolbifeno, EM-652 y EM-800.	El porcentaje en peso de la sustancia activa en la formulación se calcula en función de su densidad y de la cantidad de ingrediente activo a formular (página 2442)

El documento D1 se considera el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque divulga un método para el tratamiento y/o inhibición del desarrollo de cáncer de mama el cual envuelve la administración de un modulador de receptor de estrógeno de la fórmula (I) y una cantidad de un precursor de esteroide sexual seleccionado del grupo que consiste de dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol (resumen, Pág. 12 líneas 20-25 y Pág. 13 líneas 1-5). Establece que la aplicación de DHEA retrasa y previene la aparición de tumores de mama (Pág. 7 líneas 4-11) y que existe una sinergia en la combinación de un precursor de esteroide sexual y un modulador de receptor de estrógeno, contra el cáncer de mama, ya que el SERM proporciona un efecto antiestrogénico deseable y el precursor proporciona efecto androgénico y establece que los efectos indeseables también son mitigados en una forma sinérgica (Pág. 20 líneas 16-23). Establece que la combinación de un SERM (EM-800) y un precursor de esteroide sexual (DHEA) ejerce efectos inhibidores más potentes que cada compuesto utilizado solo sobre el desarrollo del carcinoma mamario (Pág. 34 líneas 2-10). Establece que los ingredientes activos para la administración transdérmica o transmucosa están preferiblemente del 0.5 al 20% en relación al peso total de la composición farmacéutica (Pág. 45 líneas 17-25), adicionalmente establece la forma como se pueden formular ungüentos, geles, lociones o cremas de

Expediente 07 050 824 1er Art 45

(Pág. 46 y Pág. 47 líneas 1-5) combinación y establece la forma preferida para formular el precursor esteroide en gel (Pág. 47 línea 14-Pág. 48 líneas 1-3).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 3 y la composición de la reivindicación 1 consiste en que la anterioridad no divulga específicamente un supositorio que comprenda la combinación de un precursor de esteroide sexual y un modulador selectivo de receptor de estrógeno.

No se evidencia el efecto que logra el incluir esta característica porque las composiciones reveladas en el documento D1 también son útiles para prevenir el cáncer de mama y los problemas que afectan la lámina propia o capa muscular de la vagina.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: "cómo modificar las composiciones reveladas en el documento D1 para obtener una composición alternativa de aplicación vaginal para prevenir el cáncer de mama y tratar o reducir la probabilidad de adquirir problemas que afectan la lámina propia o capa muscular de la vagina".

Sin embargo, el documento D3 ya revelaba que una forma de aplicación intravaginal son los supositorios (página 2437 primera columna). D3 revela diferentes vehículos o bases para supositorios, entre los que se encuentran la manteca de cacao o aceite de teobroma y aceites vegetales modificados por esterificación, hidrogenación y/o fraccionamiento (página 2439).

Por lo tanto, una persona normalmente versada en la materia que conoce que la aplicación local de DHEA en la mucosa vaginal es 10 veces más eficiente que la aplicación en un sitio distante en la piel y que dosis de 0.3mg revierten la atrofia vaginal en ratas ovariectomizadas¹, se vería motivada a formular un supositorio como es descrito en el documento D3 (Págs. 2439-2442), pues sabe que esta es una forma farmacéutica que permite la aplicación local en la vagina, y tal como establece el documento D3 el porcentaje o cantidad de principio activo se calcula en función de la densidad de este y de la cantidad del mismo a formular, lo cual está dentro de las capacidades de una persona de nivel medio versada en la materia.

Adicionalmente la presente solicitud no revela que exista algún efecto sinérgico de la combinación de DHEA y acolbifeno sobre el tejido vaginal (ni en el epitelio, ni en la lámina propia, ni en la capa muscularis) (ver folios 162, 164, 165, 166 y 167) y el efecto sinérgico en la prevención del cáncer de mama ya había sido revelado previamente en el documento D1. Por tanto se considera que el objeto de la reivindicación 3 se deriva de lo divulgado en el estado de la técnica y carece de un efecto sorprendente.

En conclusión, ante la falta de evidencia de un efecto inesperado de la composición

¹ The journal of steroid biochemistry and molecular biology. Volume 66, Issue 3, August 1998, Pags. 137-149.

reclamada frente a las composiciones previamente reveladas en el estado de la técnica, se considera que el objeto de la reivindicación 3 no presenta nivel inventivo.

Puesto que las reivindicaciones dependientes 4-12 no mencionan características inventivas adicionales tampoco se pueden considerar inventivas.

La reivindicación 13 consiste en una composición farmacéutica para aplicación percutánea que comprende:

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del estado de la técnica:

Características esenciales	D1	D4
Una composición farmacéutica para aplicación percutánea	Composiciones en ungüento, gel, crema o similar (Pág. 46 líneas 3 y 4).	Una composición farmacéutica para aplicación percutánea
a) Un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.	El compuesto activo es mezclado con un portador adecuado el cual es compatible con la piel y mucosa humana y que mejora la penetración transdérmica del compuesto a través de la piel y mucosa. Algunos de los portadores mencionados son: hidroxipropil celulosa (Klucel HF y base Glaxal) (Pág. 46). Una mezcla de solventes orgánicos e inorgánicos puede ayudar a la solubilidad hidrofílica y lipofílica por ejemplo agua y etanol (Pág. 47 líneas 1-4). Se prefiere que los precursores de esteroide sexual se formulen como un gel alcohólico que contenga triglicérido caprílico-cáprico, hexilenglicol, dietilenglicol monometiléter, cicloteticona, alcohol bencilico e hidroxipropilcelulosa (Pág. 47 líneas 14-17 y Pág. 48 líneas 1-3).	Vehículo (Pág. 14 líneas 31-36) como etanol y propilenglicol (Pág. 20 líneas 30-36) o base glaxal (Pág. 22 líneas 1-8, Pág. 33 líneas 11-36 y Pág. 34 líneas 1-11). Propilparabeno, aceite de lanolina, aceite de sésamo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerilo, trietanolamina, propileno glicol, carbomero 940 y agua (Pág. 48, ejemplo 17)
b) Una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un precursor esteroide sexual seleccionado del grupo que consiste de dehidroepiandrosterona,	Una cantidad terapéuticamente efectiva de un precursor esteroide sexual seleccionado del grupo: Dehidroepiandrosterona, sus profármacos y androst-5-ene-3 β ,17 β -diol (Pág. 47 líneas 5-	Al menos 7% de Dehidroepiandrosterona o sulfato de dehidroepiandrosterona (Pág. 15 líneas 1-7)

sulfato de dehidroepiandrosterona y androst-5-ene-3β,17β-diol.	11).	
c) Una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un modulador selectivo del receptor de estrógeno para la protección de la glándula uterina y mamaria contra el cáncer, en donde el modulador selectivo del receptor de estrógeno es seleccionado del grupo que consiste de Raloxifeno, Arzoxifeno (LY 353381), LY 335563, Tamoxifeno, OH-tamoxifeno, Droloxifeno, Toremifeno, Idoxifeno, Ospemifeno, GW 5638, SERM 3339, TSE-424, ERA-923, Lasoxifeno (CP 336156), Levormeloxifeno, Acolbifeno (EM-1538), EM-652 y EM-800.	Una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un modulador selectivo del receptor de estrógeno para la protección de la glándula uterina y mamaria contra el cáncer, en donde el modulador selectivo del receptor de estrógeno es seleccionado del grupo que consiste de: Raloxifeno, Arzoxifeno, LY 335563, Tamoxifeno, Droloxifeno, Toremifeno, Idoxifeno, GW 5638, TSE-424, Lasoxifeno, Levormeloxifeno, Acolbifeno, EM-652 y EM-800.	No lo menciona

El documento D1 se considera el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 13 porque divulga un método para el tratamiento y/o inhibición del desarrollo de cáncer de mama el cual envuelve la administración de un modulador de receptor de estrógeno de la fórmula (I) y una cantidad de un precursor de esteroide sexual seleccionado del grupo que consiste de dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona y androst-5-ene-3β,17β-diol (resumen, Pág. 12 líneas 20-25 y Pág. 13 líneas 1-5). Establece que la aplicación de DHEA retrasa y previene la aparición de tumores de mama (Pág. 7 líneas 4-11) y que existe una sinergia en la combinación de un precursor de esteroide sexual y un modulador de receptor de estrógeno, contra el cáncer de mama, ya que el SERM proporciona un efecto antiestrogénico deseable y el precursor proporciona efecto androgénico y establece que los efectos indeseables también son mitigados en una forma sinérgica (Pág. 20 líneas 16-23). Establece que la combinación de un SERM (EM-800) y un precursor de esteroide sexual (DHEA) ejerce efectos inhibidores más potentes que cada compuesto utilizado solo sobre el desarrollo del carcinoma mamario (Pág. 34 líneas 2-10). Establece que los ingredientes activos para la administración transdérmica o transmucosa están preferiblemente del 0.5 al 20% en relación al peso total de la composición farmacéutica (Pág. 45 líneas 17-25), adicionalmente establece la forma como se pueden formular ungüentos, geles, lociones o cremas de (Pág. 46 y Pág. 47 líneas 1-5) combinación y establece la forma preferida para formular el precursor esteroide en gel (Pág. 47 línea 14-Pág. 48 líneas 1-3).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y la composición de la reivindicación 13 consiste en que la anterioridad no divulga específicamente una composición para aplicación percutánea que comprenda la combinación de un precursor de esteroide sexual y un modulador selectivo de receptor de estrógeno.

No se evidencia el efecto que logra el incluir esta característica porque las composiciones reveladas en el documento D1 también son útiles para prevenir el cáncer de mama y para tratar o reducir la probabilidad de adquirir problemas que afectan la lámina propia o capa muscular de la vagina.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: "cómo modificar las composiciones reveladas en el documento D1 para obtener una composición alternativa de aplicación vaginal para prevenir el cáncer de mama y tratar o reducir la probabilidad de adquirir problemas que afectan la lámina propia o capa muscular de la vagina".

Sin embargo, el documento D4 enseña el uso de precursores esteroides sexuales como la dehidroepiandrosterona (DHEA) en la prevención y tratamiento de atrofia vaginal y otros síntomas de la menopausia. También revela que estos precursores de esteroides sexuales pueden ser formulados para administración percutánea o transmucosal, y que se pueden presentar como geles, soluciones, lociones, cremas, ungüentos y parches transdérmicos. (Resumen, Pág. 32 líneas 4-11 y 20-34, Pág. 33 líneas 12-30, Pág. 37 líneas 10-36, Pág. 38 líneas 1-3, reivindicación 12). Adicionalmente, el documento presenta diferentes formulaciones de DHEA para aplicación percutánea (Pág. 48).

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, se vería motivada por lo revelado en D4 a formular la combinación revelada en D1 en una forma farmacéutica para aplicación percutánea, con la expectativa razonable de obtener una composición para prevenir el cáncer de mama y tratar o reducir la probabilidad de adquirir problemas que afectan la lámina propia o capa muscular de la vagina, porque ya era conocido el efecto sinérgico de la combinación de un precursor esteroide sexual como DHEA y un modulador selectivo del receptor de estrógeno en la prevención del cáncer de mama y el efecto de la DHEA sobre el tejido vaginal.

Adicionalmente la presente solicitud no revela que exista algún efecto sinérgico de la combinación de DHEA y acolbifeno sobre el tejido vaginal (ni en el epitelio, ni en la lámina propia, ni en la capa muscularis) (ver folios 162, 164, 165, 166 y 167) y el efecto sinérgico en la prevención del cáncer de mama ya había sido revelado previamente en el documento D1. Por tanto se considera que el objeto de la reivindicación 13 se deriva de lo divulgado en el estado de la técnica y carece de un efecto sorprendente.

Conclusión:

La reivindicación 13 cumple el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumple con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

8. Conclusión

Los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud están afectados así:

Item	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	MXPA00012306	14	Novedad
D1	MXPA00012306	1 – 13	Nivel Inventivo
D2	The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. Volume 66, Issue 3, August 1998, Pages 137–149	1 – 12	Nivel Inventivo
D3	Remington Farmacia 19ª Edición. Editorial Panamericana. Tomo 2.	3-12	Nivel Inventivo
D4	WO9416709	13	Nivel Inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante para dar respuesta y presentarla por escrito.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.


JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 28 AGO. 2012

Realizado por: Juanita Catalina Rico. 
Revisado por: Consuelo Leguizamón L. 



Effect of Dehydroepiandrosterone on Vaginal and Uterine Histomorphology in the Rat

Antigone Sourla, Michel Flamand, Alain Bélanger and
Fernand Labrie*

Laboratory of Molecular Endocrinology, CHUQ Research Center and Laval University, Québec, Canada G1V 4G2

Dehydroepiandrosterone (DHEA) applied on the dorsal skin of ovariectomized animals, at the twice daily dose of 30 mg, resulted in a complete reversal of the vaginal atrophy seen 1, 3 and 6 months after ovariectomy, and induced proliferation and mucification of the vaginal epithelium. A similar mucification of the vaginal epithelium related to androgenic action was observed in intact rats treated with DHEA. While treatment of intact rats with DHEA resulted in a significant increase in uterine weight at 1 month, the value of the same parameter decreased by approximately 30% after 3 and 6 months of DHEA administration. In ovariectomized DHEA-treated animals, uterine weight was increased at all time intervals. At histopathological examination, following DHEA administration to intact animals, stimulation was seen in the myometrial layers of the uterus whereas atrophy, involving especially the endometrium, became apparent after 3 and 6 months of treatment. In ovariectomized animals, the endometrium remained atrophic at all time intervals during DHEA treatment and the uterine epithelium thus remained atrophic under DHEA treatment. Examination of the effect of DHEA on the vaginal epithelium indicates that local application of DHEA on the vaginal mucosa is approximately 10-fold more efficient than application at a distant site on the skin. Reversal of the ovariectomy-induced increase in serum LH levels was also observed after DHEA treatment. The present data suggest that DHEA possesses a tissue-specific action, through its local transformation into active estrogens in the vaginal epithelium while the uterine epithelium remains atrophic. In addition, the site of administration of DHEA appears to be a significant factor, at least for its stimulatory effect on the vaginal mucosa. © 1998 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

J. Steroid Biochem. Molec. Biol., Vol. 66, No. 3, pp. 137–149, 1998

INTRODUCTION

Man is unique in having adrenals that secrete large amounts of dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfate (DHEA-S). In fact, plasma DHEA-S levels in adult men and women are 100–500 times higher than those of testosterone, and 1000–10 000 times higher than those of estradiol, thus providing a large reservoir of substrate for conversion into androgens and/or estrogens in peripheral intracrine tissues [1]. Depending upon the activity of the different steroidogenic enzymes expressed in each cell type, DHEA-S and DHEA are thus converted into potent androgens and/or estrogens, according to specific tissue requirements. This local synthesis of active sex steroids in

peripheral target tissues has been called intracrinology [2, 3].

Considering the fact that the peripheral conversion of DHEA and DHEA-S accounts for approximately 50% of androgens in adult men and for 75% to 100% of estrogens in women before and after menopause, respectively [1, 2, 4–6], the physiological importance and the biological functions of DHEA and DHEA-S have so far received little attention. After reaching their peak values at the age of 20–30 years, the circulating levels of DHEA and DHEA-S decrease progressively with age in both men and women, thus causing an important reduction in the peripheral formation of estrogens and androgens [7–10]. In fact, low DHEA levels have been associated with the development of a number of problems of aging [11, 12], including the functional and anatomical involution of sex steroid-sensitive tissues.

*Correspondence to: F. Labrie. Tel. 654 2704; Fax: 654 2735; e-mail: fernand.labrie@crchul.ulaval.ca

Received 13 Oct. 1997; accepted 16 Feb. 1998.

In order to obtain additional knowledge on the activity of DHEA, we have used the rat as a model to study the effects of DHEA administration on the histomorphology and anatomical integrity of sex-steroid target tissues such as the uterus and vaginal epithelium. In the past, the analysis of the effect of DHEA on the uterus and vagina has been limited to the effect on total organ weight [13,14] while cell-specific effects have not been investigated. Since the rat adrenals do not secrete DHEA or DHEA-S [2,15,16], DHEA administered percutaneously or intravaginally represented the only source of this steroid in the model used. We thus studied the possible time-dependent differential effects of 1, 3, and 6 months of percutaneous DHEA treatment and we also compared the relative potency of the percutaneous and intravaginal routes of DHEA administration on the vaginal and uterine histomorphology.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Female Sprague-Dawley rats at approximately 60 days of age and weighting 180–200 g were obtained from Charles River (St. Constant, Quebec, Canada) and housed 2 per cage in a temperature

($23 \pm 1^\circ\text{C}$) and light (12 h light/day, lights on at 07h15)-controlled environment. The animals were fed rat chow and tap water *ad libitum*.

Animals were randomly divided into 4 groups each containing 8 rats as follows: (a) intact; (b) intact DHEA-treated; (c) ovariectomized control; and (d) ovariectomized DHEA-treated. DHEA was administered percutaneously by application on an area of $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ of shaved dorsal skin at the dose of 30 mg, twice daily, in 50% ethanol-50% propylene glycol for 1, 3, or 6 months. In a parallel experiment, DHEA was administered to ovariectomized animals at the increasing twice daily doses of 0.1, 0.3, 1.0 or 3.0 mg and 1.0, 3.0, 10 or 30 mg topically on the vaginal mucosa or percutaneously on the dorsal skin, respectively. The duration of treatment was 3 weeks. Sacrifice of the animals was performed between 08h00 and 10h00.

Histological examination

At the end of treatment, the animals were sacrificed by decapitation and the vagina as well as the uterus of each animal were collected and immediately fixed in 10% buffered formalin for 48 h. Tissues were then routinely processed in a tissue processor and $5\text{ }\mu\text{m}$ thick sections were prepared and stained with hematoxylin-eosin, as previously described [17].

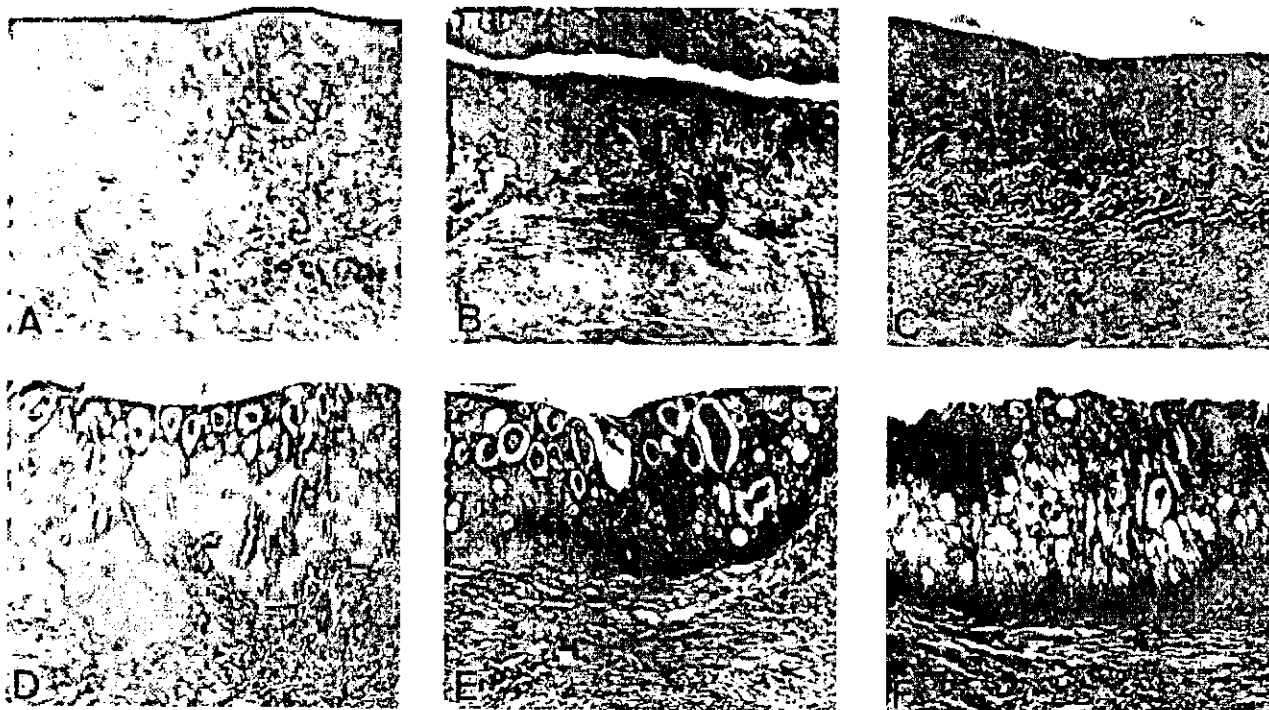


Fig. 1. Effect of 1, 3, or 6 months of treatment with DHEA applied at the dose of 30 mg twice daily in 50% ethanol-50% propylene glycol on an area of $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ of the dorsal skin on vaginal histology in the ovariectomized rat. The marked vaginal atrophy that follows ovariectomy was completely prevented by DHEA treatment at all time intervals. Histopathologic examination showed significant proliferation and mucification of the vaginal epithelium and complete prevention by DHEA of the histological signs of vaginal atrophy induced by ovariectomy. Atrophic vaginal epithelium 1 (A), 3 (B), and 6 (C) months after castration. Complete and similar prevention of vaginal atrophy in animals treated with DHEA for 1 (D), 3 (E), or 6 (F) months. Hematoxylin-eosin, magnification $\times 200$

Histopathologic examination was performed by light microscopy. Blood was collected, at sacrifice, between 08h00 and 10h00, from each animal for LH, FSH, and steroid measurements.

Serum steroid measurements

Serum steroid concentrations were measured by radioimmunoassays following methanol and diethyl ether extraction and chromatography on LH-20 columns as described [18]. All the samples were chromatographed and radioimmunoassayed simultaneously.

Serum LH and FSH measurements

Serum luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) were measured by double-antibody RIA using rat hormones (LH-I-6 and FSH-I-6 for iodination, LH-RP-2 and FSH-RP-2 as standards) and the rabbit antisera anti-rLH-S-9 and rFSH-S-9, generously supplied by the National Pituitary Program, Baltimore, MD, U.S.A.

Statistical analyses

Data are presented as means $\pm$ SEM of 6–8 individual determinations. Statistical significance was determined according to the multiple-range test of Duncan-Kramer [19].

RESULTS

After 1, 3, and 6 months of twice daily application of DHEA (30 mg) on the dorsal skin area of ovariectomized rats, the marked vaginal atrophy that follows ovariectomy was completely prevented (Fig. 1). Histopathologic examination shows proliferation and mucification of the vaginal epithelium and complete reversal of the histological signs of atrophy. In DHEA-treated animals, the vaginal epithelium was composed of 5–12 layers of columnar epithelial cells filled with eosinophilic vacuoles. In the superficial layers, epithelial cells were hypertrophic and often distended by only one large secretory vacuole (Fig. 1). DHEA treatment of intact animals led to a complete mucification of the vaginal epithelium, analogous to that seen in ovariectomized DHEA-treated animals (Fig. 2).

The corresponding DHEA-induced changes in vaginal weight after 6 months of DHEA administration in intact and ovariectomized rats are illustrated in Fig. 3. While DHEA had no significant effect on vaginal weight in the intact rat (296 ± 18 mg versus 301 ± 17 mg, N.S.), the same treatment resulted in an increase in vaginal weight in ovariectomized animals from 127 ± 10 mg to 284 ± 17 mg ($p < 0.01$), a value not significantly different from that measured in intact animals.

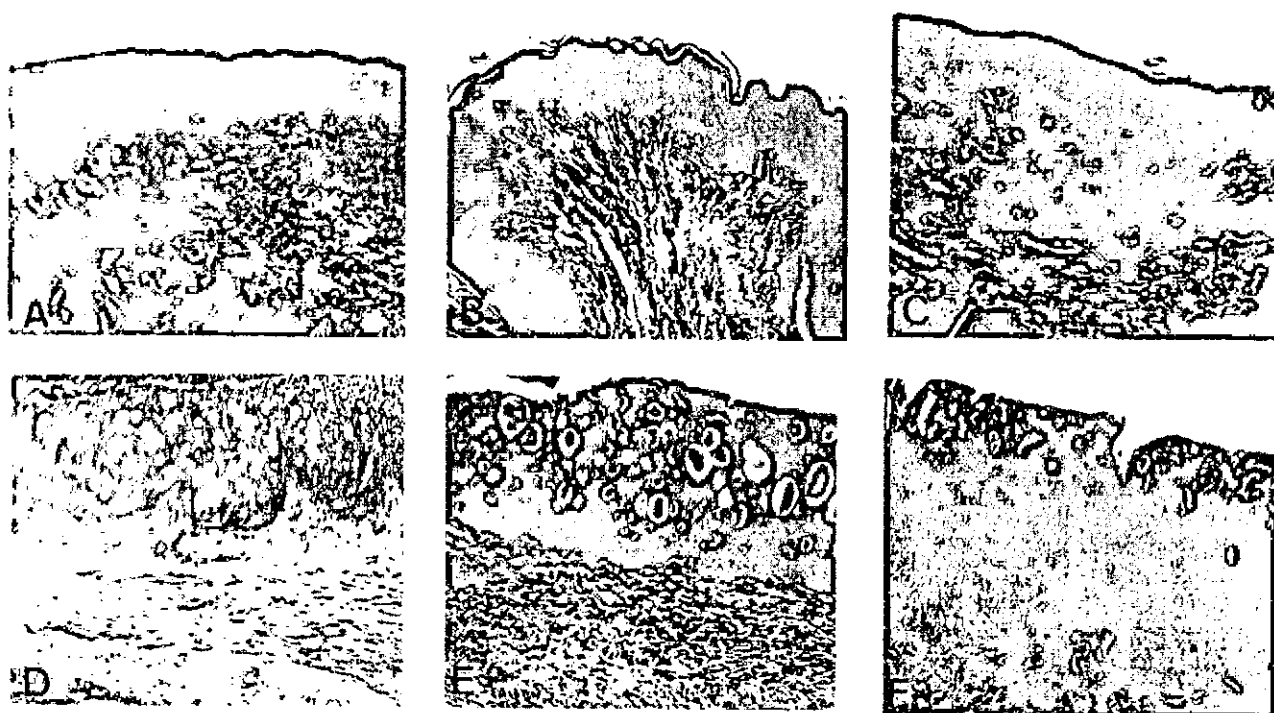


Fig. 2. Effect of 1, 3, or 6 months of treatment with DHEA applied at the dose of 30 mg twice daily in 50% ethanol–50% propylene glycol on an area of 2 cm $\times$ 2 cm of the dorsal skin in the intact rat. Similar mucification of the vaginal epithelium is seen after 1 (D), 3 (E), or 6 (F) months of DHEA treatment. Compare with the intact controls at the same time intervals of 1 (A), 3 (B), or 6 (C) months. Hematoxylin-eosin, magnification $\times 200$

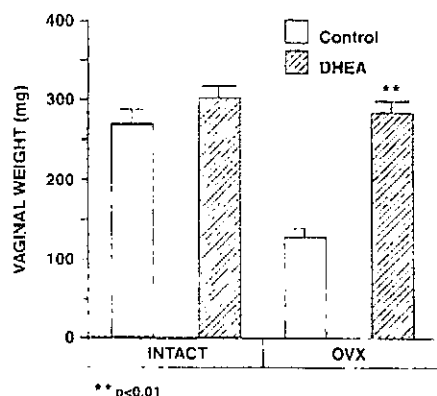


Fig. 3. Effect of percutaneous treatment with 30 mg DHEA, twice daily, for 6 months on vaginal weight in the intact and ovariectomized rat

As illustrated in Fig. 4, percutaneous administration of DHEA for 1 month caused a significant increase in uterine weight in intact animals from 431 ± 36.6 mg to 709 ± 41.7 mg ($p < 0.01$) while after 3 and 6 months of DHEA administration, a significant decrease in uterine weight was observed (489 ± 25.3 mg versus 353 ± 13.5 mg ($p < 0.01$) and 568 ± 59.6 mg versus 384 ± 34.0 mg, $p < 0.01$, respectively). Similarly, the effect of DHEA percutaneous administration on uterine histology in intact female rats, depended upon the duration of treatment. After 1 month of DHEA administration, an increased thickness of the myometrium was observed compared to intact controls, thus resulting in a decreased endometrial to myometrial ratio. An increased height of both the luminal and glandular epithelium was also observed after the administration of DHEA for 1 month to intact animals, although no hyperplastic changes of endometrial glands or epithelial cellular atypia was seen (Fig. 5(B)). After 1 month of DHEA treatment of intact animals, the absence of histological signs of normal cycling of the endometrium was noted.

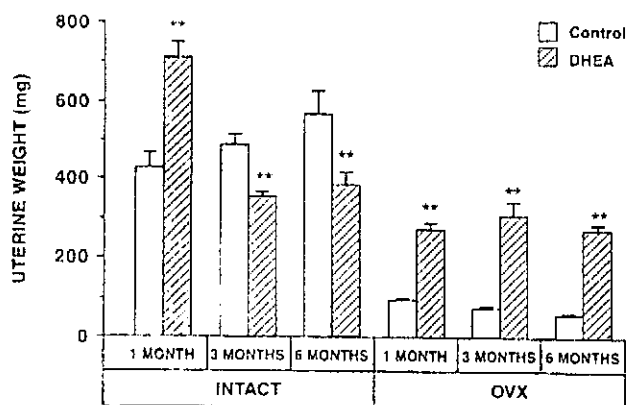


Fig. 4. Effect of percutaneous treatment with 30 mg DHEA, twice daily, for 1, 3, or 6 months on uterine weight in the intact and ovariectomized rat

After 3 or 6 months of DHEA administration to intact animals, decreased endometrial thickness and endometrial atrophy could be observed (Fig. 5(D), (F), respectively). This atrophy was characterized by the presence of fewer and smaller endometrial glands lined by a cuboidal atrophic epithelium. Moreover, an increase in the relative amount of collagen as well as a decreased cellularity of the endometrial stroma were seen compared to controls. The endometrial to myometrial ratio was lower than in intact controls, this change being mainly due to the relative decrease in the endometrial thickness. These effects were more apparent in animals who had received DHEA for 6 months (Fig. 5(F)).

When administered to ovariectomized animals, DHEA induced a significant increase in uterine weight after 1 (272 ± 14.5 mg versus 96.1 ± 3.4 mg, $p < 0.01$), 3 (306 ± 35.1 mg versus 74.5 ± 2.8 mg, $p < 0.01$) and 6 months (270.2 ± 20.1 mg versus 59.9 ± 3.68 mg, $p < 0.01$) respectively (Fig. 4). The values, however, remained significantly lower than those measured in intact untreated controls. Histologically, after 1, 3 and 6 months of treatment of ovariectomized animals with DHEA, a partial reversal of the uterine atrophy was observed. These effects were characterized by an increased thickness mainly of the myometrium and, to a lower extent, of the endometrial layer, thus resulting in a lower endometrial to myometrial ratio. The increased thickness of the endometrium was essentially related to an increase in the amount of collagen in the stroma, while the epithelium remained atrophic. In fact, the endometrium of ovariectomized animals treated with DHEA for 3 and 6 months remained atrophic, without any histological sign of endometrial hyperplasia or epithelial atypia. On the contrary, the endometrium was composed of a few small inactive endometrial glands, while the cytoplasmic to nuclear ratio of the luminal and glandular epithelium was smaller than one (Fig. 6).

At 6 months of DHEA treatment, an increase in the serum DHEA, DHEAS as well as androst-5-ene- 3β , 17β -diol (5-diol), androst-5-ene- 3β , 17β -diol-sulfate (5-diol-S), androst-4-ene- 3β , 17β -diol (4-diol), androst-4-ene- 3β , 17β -diol-sulfate (4-diol-S), androsterone (ADT), androstenediol-sulfate, testosterone, 3α -androstenediol, and 3β -androstenediol levels were observed in intact and ovariectomized treated animals, compared to intact and ovariectomized controls, respectively (Table 1). On the contrary, a significant decrease in serum progesterone levels was seen in intact animals treated with DHEA (3.7 ± 0.5 ng/ml) compared to intact controls (20.2 ± 2.6 ng/ml), $p < 0.01$ (Table 1).

It was then of interest to compare, using ovariectomized rats, the efficacy of DHEA administered percutaneously on the dorsal skin with the effect of the compound applied topically directly on the

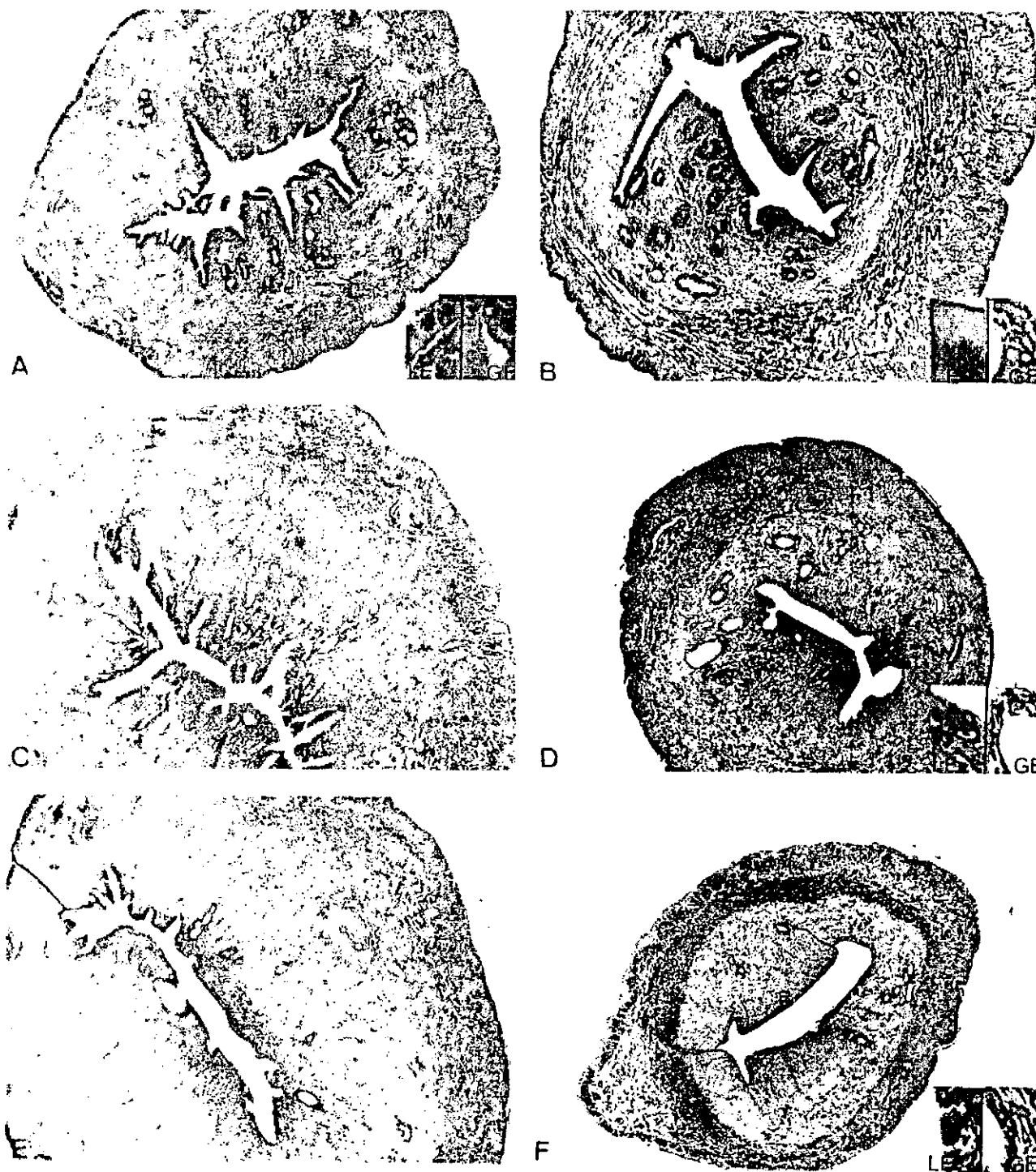


Fig. 5. Uterine histology after 1 (B), 3 (D) and 6 (F) months of percutaneous DHEA administration on the dorsal skin at the twice daily dose of 30 mg in the intact rat. See the slightly increased thickness of the myometrial layer (M) and the increased height of the luminal (LE) and glandular (GE) epithelium in the intact rat treated for 1 month with DHEA (B) as compared to the intact control (A). On the other hand, a decreased endometrial to myometrial ratio, and an inactive and atrophic endometrium with a decreased height of the luminal (LE insert) and glandular (GE insert) epithelium was observed in intact animals after 3 months (D) and 6 months (F) of DHEA treatment. Compare with intact controls (C) and (E), respectively, at the same time interval. Hematoxylin-eosin, magnification $\times 80$, inserts $\times 800$

vaginal mucosa. As illustrated in Fig. 7, the 0.1 and 0.3 mg doses of DHEA administered topically in the vagina for 21 days had no systemic effect as assessed by the absence of change in uterine weight. At the

doses of 1 and 3 mg, however, DHEA had similar 10% ($p < 0.01$) and 25% ($p < 0.01$) stimulatory effects on uterine weight when administered on the vaginal epithelium or on the dorsal skin. At the higher

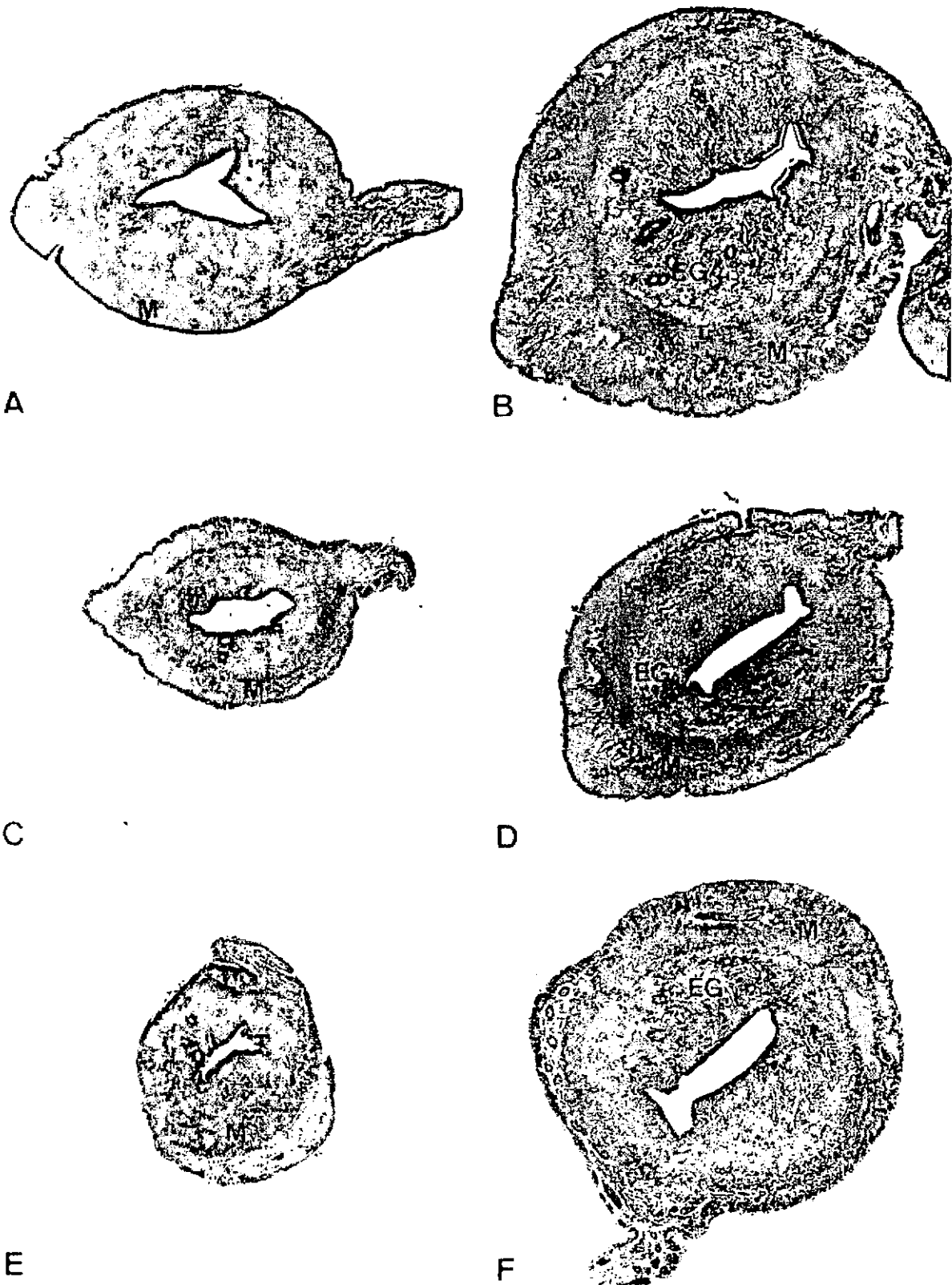


Fig. 6. Uterine histology after 1 (B), 3 (D) and 6 (F) months of DHEA treatment applied on the dorsal skin at the twice daily dose of 30 mg in the ovariectomized rat. DHEA partially reversed the uterine atrophy observed 1 (A), 3 (C) and 6 (E) months after castration. An increased thickness was observed mainly in the myometrial layer (M) while the endometrium remained atrophic with a few small endometrial glands (EG). Hematoxylin-eosin, magnification $\times 80$

Table 1. Effect of percutaneous treatment with DHEA for 6 months on serum DHEA, androstenedione, androst-5-ene-3 β ,17 β -diol (5-diol) androstane-3 γ ,17 β -diol (3 γ -diol), androstane-3 β ,17 β -diol (3 β -diol), androsterone (ADT), testosterone, and progesterone levels. DHEA was administered percutaneously twice daily at the dose of 30 mg on the dorsal skin, to intact and ovariectomized female rats

Steroids (ng/ml)	Intact	Intact + DHEA	Ovariectomized	Ovariectomized + DHEA
DHEA	0.9 $\pm$ 0.7	33.6 $\pm$ 5.2 ^b	ND ^a	29.8 $\pm$ 5.6 ^b
Androstenedione	0.4 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.7 ^b	ND	2.6 $\pm$ 0.3 ^b
5-diol	0.4 $\pm$ 0.1	36.0 $\pm$ 4.0 ^b	ND	29.1 $\pm$ 4.7 ^b
3 γ -diol	1.1 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.2	ND	0.9 $\pm$ 0.1 ^b
3 β -diol	1.05 $\pm$ 0.24	7.0 $\pm$ 1.0 ^b	ND	5.6 $\pm$ 0.6 ^b
ADT	1.3 $\pm$ 0.2	8.0 $\pm$ 1.1 ^b	ND	7.2 $\pm$ 0.8 ^b
Testosterone	0.4 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 0.3 ^b	ND	3.0 $\pm$ 0.4 ^b
Progesterone	20.2 $\pm$ 2.6	3.7 $\pm$ 0.5 ^b	ND	ND

^aNot detectable (values below detection limit). Data are expressed as means $\pm$ SEM.
^b $p < 0.01$, experimental vs intact or ovariectomized control.

doses of 10 and 30 mg applied on the dorsal skin, DHEA caused 70% and 100% stimulations of uterine weight, respectively ($0.05 > p < 0.01$) (Fig. 7).

The stimulatory effect of DHEA on the uterus, when given intravaginally or percutaneously to ovariectomized animals, mainly involved the myometrial layer while the endometrium although increased in thickness, remained atrophic, and was composed of a few small, inactive, endometrial glands lined by a low cuboidal epithelium (Fig. 8). As mentioned above, the stimulatory effect on the endometrium was essentially related to an increased amount of collagen in the stroma. The above-indicated effects were mainly observed after the administration of DHEA at the doses of 3 and 10 mg, intravaginally or percutaneously, respectively.

DHEA administration caused a complete reversal of the vaginal atrophy observed 3 weeks after castration. This effect was accompanied by stratification as well as keratinization and mucification of the vaginal epithelium after intravaginal and percutaneous administration. The above-indicated stimulatory effect, however, was seen at an approximately 10-fold lower

dose after local vaginal application compared to peripheral application on the skin (Figs 9 and 10).

When administered on the vaginal mucosa or the dorsal skin, 3 mg was the lowest dose of DHEA giving a significant inhibitory effect on the serum LH concentration in ovariectomized rats, the inhibitory effect being approximately 25% ($p < 0.01$) (Table 2). At the 10 and 30 mg doses of DHEA applied on the dorsal skin, serum LH was inhibited by 80 to 95%, respectively ($p < 0.01$). Serum FSH, on the other hand, was somewhat more resistant to the inhibitory action of DHEA, the only significant effects being observed at the doses of 10 (55%, $p < 0.01$) and 30 mg (70%, $p < 0.01$) when DHEA was applied on the dorsal skin, while no significant effect on this parameter was observed when DHEA was applied on the vaginal mucosa (Table 2).

DISCUSSION

The present study compares the relative efficacy of DHEA in inducing androgenic or/and estrogenic responses, when given percutaneously on the dorsal skin and topically on the vaginal mucosa, in adult virgin female rats. The percutaneous route of administration was used to avoid first pass through the liver and thus excessive degradation of DHEA by the hepatic enzymes [20]. The present data show that treatment with DHEA completely reverses the atrophic changes in the vaginal epithelium seen 3 weeks as well as 1, 3, and 6 months after ovariectomy.

Since DHEA has no intrinsic androgenic or estrogenic activity, the histological changes observed after DHEA treatment, reflect its intracrine conversion into active sex steroids having estrogenic and/or androgenic action [1]. The tissue-specific conversion of DHEA in individual cells and tissues permits adjustments according to local anatomical and functional requirements, thus representing the new sector of endocrinology called intracrinology [1-3]. Previous studies have shown that DHEA administration in the

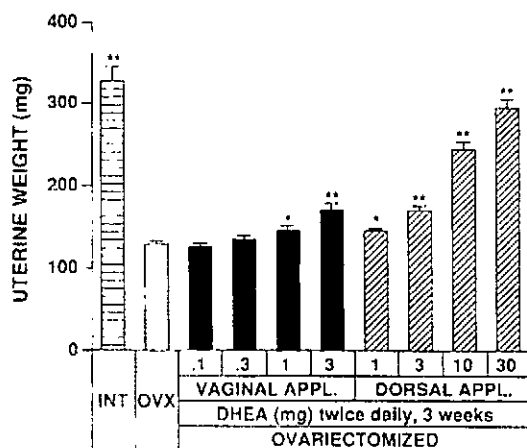


Fig. 7. Effect of 3-week administration of increasing doses of DHEA applied on the vaginal epithelium or on the dorsal skin on uterine weight in the ovariectomized rat. Intact animals are used as additional controls

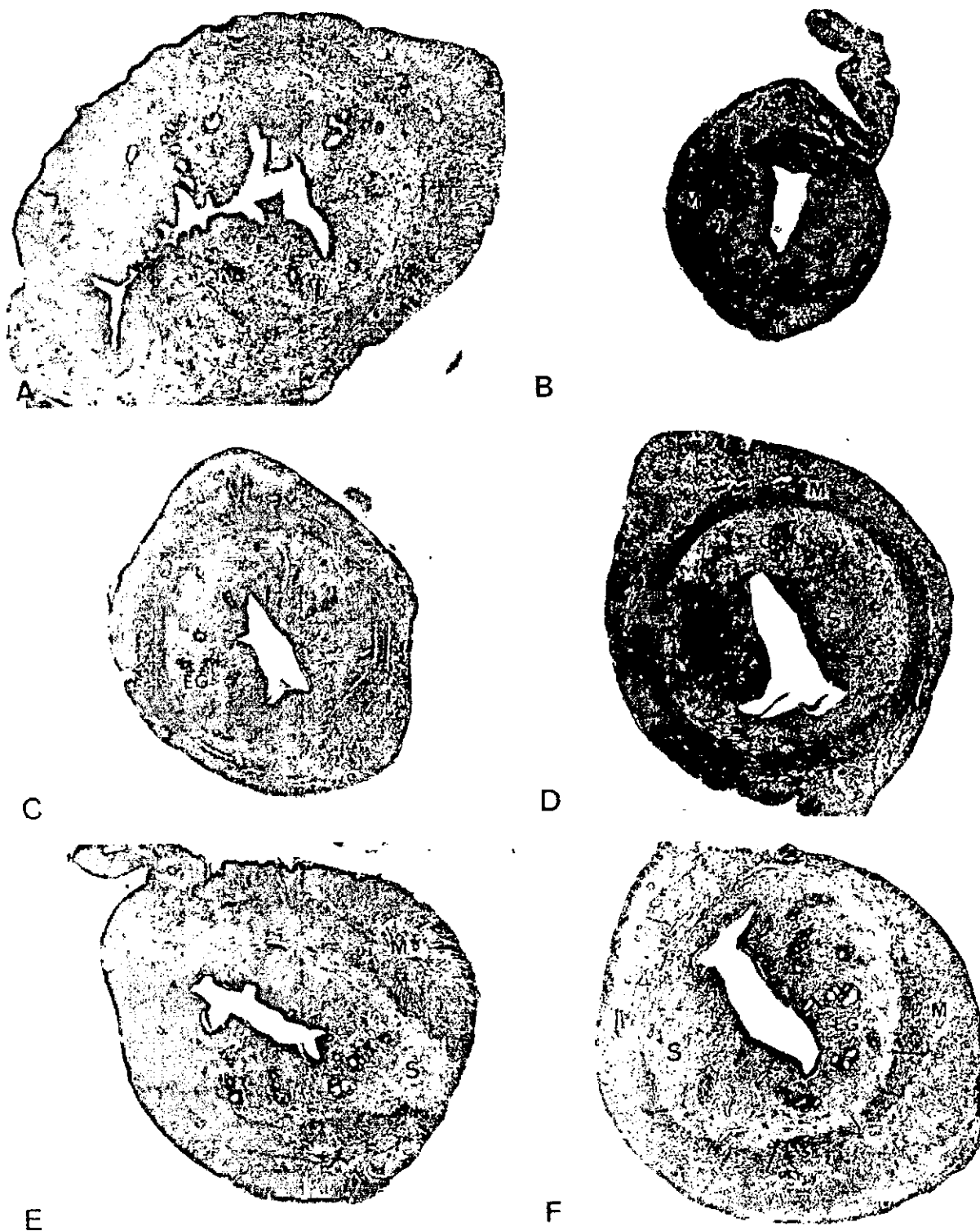


Fig. 8. Uterine histology after 3-week administration of 1.0 (C) and 3.0 (D) mg of DHEA on the vaginal epithelium as well as of 10 mg (E) and 30 mg (F) of DHEA on the dorsal skin. The above-indicated doses of DHEA resulted in a slight (C)–(D) to moderate (E)–(F) increase of mainly the myometrial (M) thickness. The endometrium remained atrophic, with a few, inactive glands (EG) and a more collagenous endometrial stroma (S). Compare with intact (A) and ovariectomized (B) controls. Hematoxylin-eosin, magnification $\times 80$

ovariectomized or orchietomized rat for 7 days had stimulatory androgenic and/or estrogenic effects, as assessed by changes in ventral prostate, dorsal prostate, seminal vesicle, and uterine weight [3, 13, 14, 20].

The various uterine cell types respond differently to sex steroids having estrogenic and androgenic activity. In fact, the present data show that DHEA administration results in histological changes of the vaginal

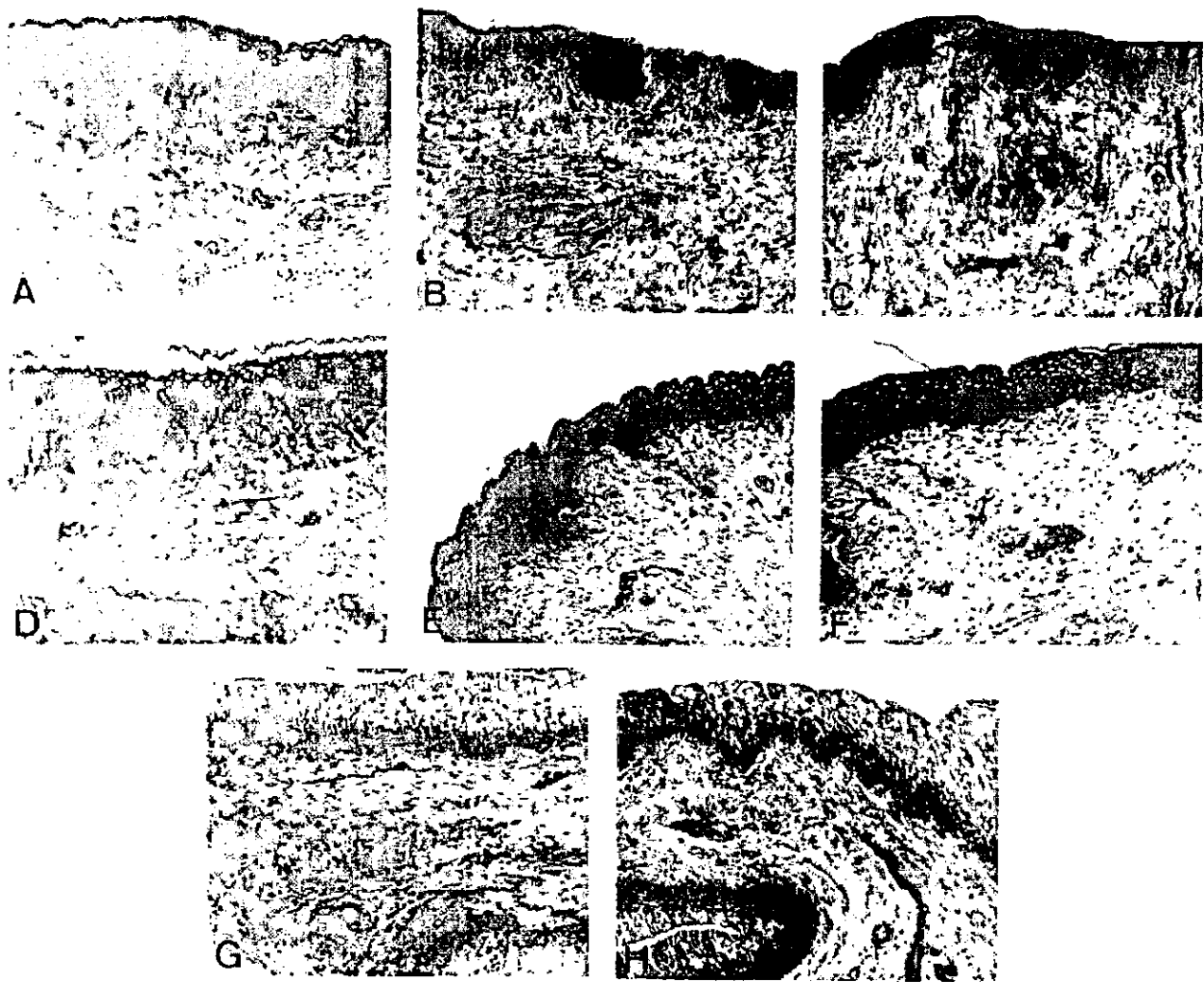


Fig. 9. Vaginal histology after 3-week treatment with DHEA applied on the vaginal epithelium of ovariectomized animals at the doses of 0.1 (C), 0.3 (D), 1.0 (E)–(G) and 3.0 mg (F)–(H). DHEA administration at the doses of 0.3 (D), 1.0 (E) and 3.0 mg (F) caused stratification and keratinisation of the vaginal epithelium with complete reversal of the vaginal atrophy (B) caused by castration. Areas of mucification were also seen at the doses of 1 (G) and 3 mg (H) of DHEA. Compare with the intact (A) and ovariectomized (B) controls. Hematoxylin-eosin, magnification $\times 200$

and uterine tissues, affecting differently, the various cell types. A stimulatory effect on the myometrial layer was present at all time intervals as opposed to the atrophic changes of the endometrium which persisted throughout the study. Although DHEA induced some increase in the height of both luminal and glandular epithelium of the endometrium when given to intact animals for 1 month, no hyperplastic changes of the endometrial glands or epithelial atypia was noted. In fact, endometrial atrophy, especially in the epithelial cells, became predominant after 3 and 6 months of DHEA administration. Since treatment with DHEA inhibits ovarian function, even after short term administration (Luo *et al.*, unpublished observations), we can speculate that the absence of histological signs of regular cycling of the endometrial mucosa, seen after 1 month treatment with DHEA in intact rats as well as the endometrial atrophy seen

after longer-term DHEA treatment for 3 and 6 months, results from gradually disrupted ovarian function and cyclicity. The stimulatory effect of DHEA on the uterus observed at 1 month could be due to the increased formation of sex steroids by the ovary at this early time interval.

DHEA administration to ovariectomized animals only partially reversed the uterine atrophy seen 1, 3, and 6 months after castration. In fact, this effect was mainly related to an increase in myometrial thickness. In the endometrium, a relative increase was observed in the amount of collagen while the endometrial glands were atrophic. Since, in rats, the gonads represent the exclusive source of sex steroids [4, 15, 21], we can speculate that the uterotrophic response seen in ovariectomized animals treated with DHEA, results from its peripheral transformation into active sex steroids having estrogenic and/or androgenic action.

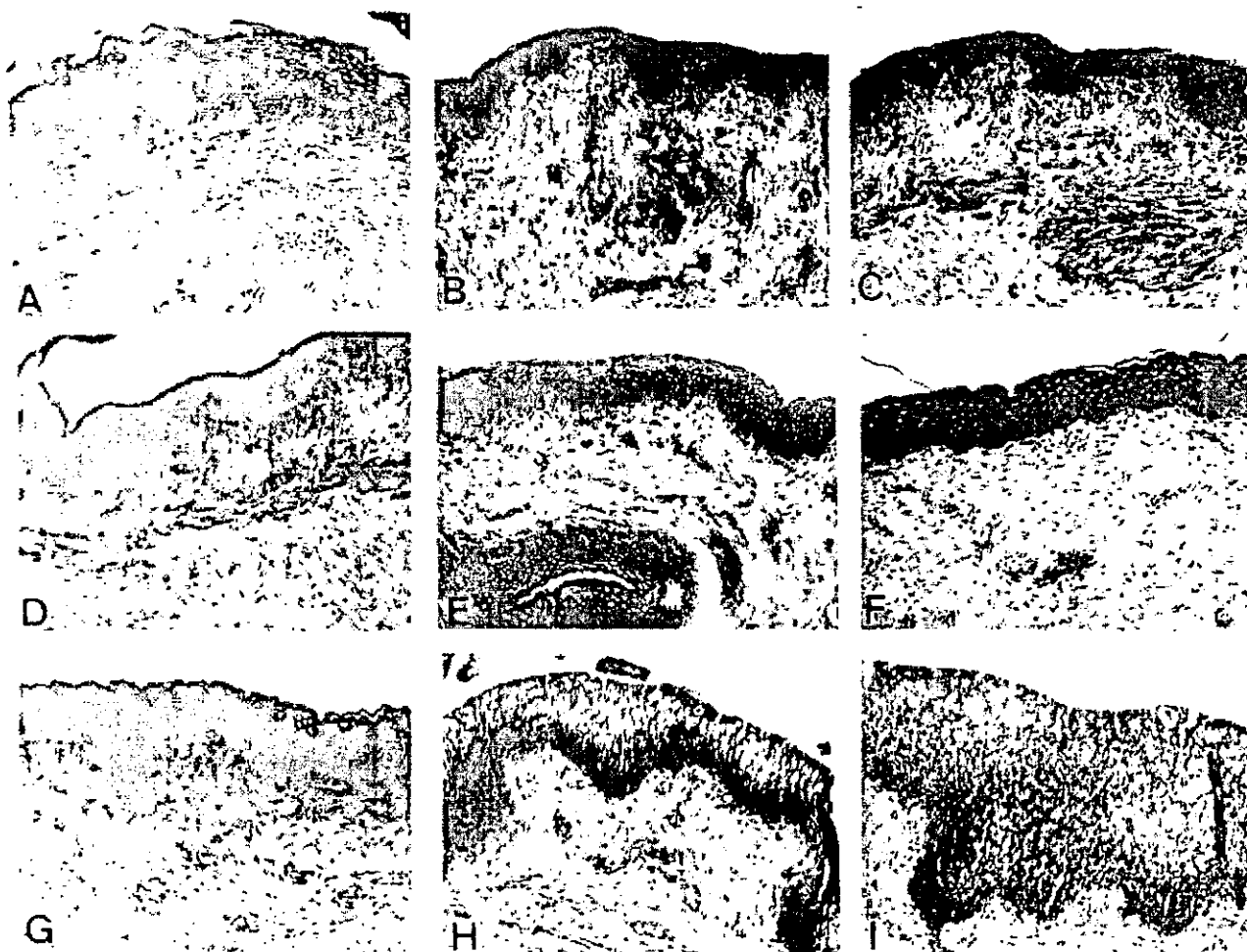


Fig. 10. Vaginal histology after 3-week administration of DHEA applied on the dorsal skin to ovariectomized animals at the doses of 0.3 (C), 1.0 (D), 3.0 (E), 10 (F)–(H) and 30 mg (G)–(I). Keratinization (E)–(F)–(G) of the vaginal epithelium was observed after DHEA treatment, beginning at the dose of 3.0 mg, with a complete reversal of the vaginal atrophy (B) caused by castration. Areas of mucification of the vaginal epithelium were also seen at the doses of 10 (H) and 30 mg (I) of DHEA. Hematoxylin-eosin, magnification $\times 200$

Interestingly, a stimulatory effect of DHEA and 5-diol, a DHEA derivative, on uterine weight as well as on progesterone receptor levels has been demonstrated by Spinola *et al.* [22]. In fact, 5-diol, a steroid possessing intrinsic estrogenic activity which can promote uterine growth in rodents, binds to the estrogen receptor [23–25].

Estrogens and androgens are known to differ in their uterotrophic responses, affecting predominantly the endometrial and myometrial layers, respectively [26]. While estradiol and testosterone stimulate both the endometrial and myometrial layers, and result in hypertrophy and stratification of the luminal epithelium [27], the administration of DHT was not found to have an effect on uterine histology when given to ovariectomized rats [28]. Knowing the preferential effect of androgens in the myometrium [26] as well as the differential effects of estrogens and androgens in various uterine cell types [27–30], a possible local transformation of DHEA in favor of estrogens or androgens, in individ-

ual uterine cell types, is likely to account for the different uterine responses observed in the present study after DHEA administration.

Ip *et al.* [31] have observed that androgens can also exert antiestrogenic effects, via binding to the androgen receptor, in the rat uterus and mammary tumors. On the other hand, Schmidt and Katzenellenbogen [32] have observed that testosterone can elicit estrogenic- or antiestrogenic-like responses in the rat uterus by binding to the estrogen (high doses) or androgen (low doses) receptor, respectively.

The significant increase in the serum levels of potent steroids, in both intact and ovariectomized animals treated with DHEA illustrates the peripheral metabolism of DHEA, into active androgens and/or estrogens. The peripheral biotransformation of DHEA has also been shown in human studies [33–35] where administration of DHEA in postmenopausal women, resulted in increases in serum androgens and estrogens or mainly androgens, respectively, depending upon the dose administered. These obser-

Table 2. Effect of intravaginal or percutaneous administration of DHEA for 3 weeks on serum LH and FSH levels. DHEA was administered to ovariectomized animals at the increasing twice daily doses of 0.1, 0.3, 1.0 or 3.0 mg and 1.0, 3.0, 10 or 30 mg topically on the vaginal mucosa or percutaneously on the dorsal skin, respectively

Groups	LH (ng/ml)	FSH (ng/ml)
Intact	0.8 ± 0.4	5.7 ± 0.5
Ovariectomized	4.7 ± 0.2	23.0 ± 1.0
Ovariectomized + DHEA		
0.1 mg (intravaginal)	3.8 ± 0.1	25.0 ± 1.0
0.3 mg (intravaginal)	4.6 ± 0.2	26.4 ± 1.0
1.0 mg (intravaginal)	4.6 ± 0.2	25.0 ± 1.3
3.0 mg (intravaginal)	3.3 ± 0.2 ^a	25.6 ± 1.4
1.0 mg (percutaneous)	4.5 ± 0.2	26.0 ± 1.1
3.0 mg (percutaneous)	3.4 ± 0.2 ^a	24.4 ± 0.8
10 mg (percutaneous)	0.20 ± 0.05 ^a	11.0 ± 0.9 ^a
30 mg (percutaneous)	0.06 ± 0.02 ^a	5.7 ± 0.3 ^a

Data are expressed as means ± SEM.

^a*p* < 0.01, experimental vs intact or ovariectomized control.

variations performed in the serum do not reflect the levels of active intracellular steroids and the estrogenic and/or androgenic biological activity in peripheral tissues, especially in postmenopausal women where most of sex steroids are formed locally from DHEA and DHEAS of adrenal origin [1, 2, 6].

In the present study, DHEA administration reversed the castration-induced increases in serum LH levels, while in intact DHEA-treated rats, the LH concentration was further decreased to values lower than that measured in intact controls. The above-described data and the decrease in the serum progesterone concentration as well as the inactive endometrium seen in intact DHEA-treated animals, are all suggestive of an arrest of ovulatory cycles by DHEA treatment, in the intact female rat.

DHEA administration to intact animals led to a complete mucification of the vaginal epithelium at all time intervals studied, while it completely reversed the vaginal atrophy seen 1, 3, and 6 months after castration. Mori *et al.* [36] have shown that treatment with testosterone results in vaginal mucification in both intact and ovariectomized mice while vaginal stratification and cornification is an estrogenic effect. It is likely that the effect of DHEA observed on the vaginal epithelium results from both an androgenic and an estrogenic action. It is of interest to mention that reversal of the vaginal atrophy was seen after the intravaginal administration of DHEA in ovariectomized rats at the dose of 0.3 mg, while a ten-fold higher dose of DHEA was required to produce the same effect when DHEA was given percutaneously on the dorsal skin. This observation illustrates the local biological transformation and action of DHEA on the vaginal epithelium.

The dramatic decrease in serum DHEA and DHEAS levels observed during aging has been correlated with various human age-related diseases [11, 12]. Moreover, low circulating levels of DHEA-S and

DHEA have been found in patients with prostate and breast cancer [37, 38]. In addition, DHEA has been shown to have antioncogenic [39–43] activity in a series of animal models, while it has been reported to be an antiobesity and an anti-aging agent [40, 42, 44–46] with positive effects on bone mineral density in human [47]. Most interestingly, in a study performed in 60–70 year-old postmenopausal women, 12 month DHEA replacement therapy increased vaginal epithelial maturation without any stimulatory effect on the endometrium [47].

It is clear that DHEA represents a major source of sex steroids in both women and men where it is converted in peripheral tissues, through various tissue-specific steroidogenic pathways, into active androgens or/and estrogens, according to local cell requirements [2, 21, 48]. The rat is a valid model to study the effects of DHEA and its metabolites in target tissues, because exogenous administration of this steroid can mimic the human situation where DHEA of adrenal origin is a major source of sex steroids in peripheral tissues, especially, after menopause [2, 4]. Previous studies have already indicated that DHEA induces polycystic ovaries in the rat [13, 14].

In the present study, we have shown that DHEA exerts stimulatory effects in the vagina of the rat, thus preventing the ovariectomy-induced atrophic changes in the vaginal epithelium. It is most likely that this effect is achieved through the local conversion of DHEA into active estrogens and androgens. In addition, the biological action of DHEA is highly tissue-specific, the endometrial epithelium remaining atrophic in the presence of a moderate stimulation of the myometrium as well as of the stromal component of the endometrium. Up to date, most therapeutic approaches have focused on the control of steroids originating from classical steroidogenic tissues. The present data provide evidence supporting the importance of sex steroids made locally in target tissues

from DHEA and DHEA-S. Such data support the potential use of DHEA as replacement therapy in women, thus permitting a more specific and physiological stimulation of sex steroid target tissues, such as the vagina, while protecting the endometrium from the stimulatory effect of estrogens observed with standard hormone replacement therapy. Further studies are however needed to obtain a better knowledge of the changes in tissue-specific steroidogenic gene expression, local control of expression of these isoenzymes and regulation of steroid receptors in each peripheral tissue, since all these factors contribute to a variable extent to the overall tissue-specific response to DHEA.

REFERENCES

1. Labrie F., Bélanger A., Simard J., Luu-The V. and Labrie C., DHEA and peripheral androgen and estrogen formation: intracrinology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 774 (1995) 16-28.
2. Labrie F., Intracrinology. *Mol. Cell. Endocrinol.* 78 (1991) C113-C118.
3. Labrie C., Bélanger A. and Labrie F., Androgenic activity of dehydroepiandrosterone and androstenedione in the rat ventral prostate. *Endocrinology* 123 (1988) 1412-1417.
4. Bélanger B., Bélanger A., Labrie F., Dupont A., Cusan L. and Monfette G., Comparison of residual C-19 steroids in plasma and prostatic tissue of human, rat and guinea pig after castration: unique importance of extratesticular androgens in men. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 32 (1989) 695-698.
5. Labrie F., Bélanger A., Cusan L., Gomez J. L. and Candas B., Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 2396-2402.
6. Labrie F., Bélanger A., Cusan L. and Candas B., Physiological changes in DHEA are not reflected by the serum levels of active androgens and estrogens but of their metabolites: intracrinology. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 2403-2409.
7. Migeon C. J., Keller A. L., Lawrence B. and Shepart II T. H., Dehydroepiandrosterone and androsterone levels in human placenta. Effect of age and sex: day-to-day and diurnal variations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 17 (1957) 1051-1062.
8. Orentreich N., Brind J. L., Rizer R. L. and Vogelmann J. H., Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59 (1984) 551-555.
9. Vermeulen A., Deslypere J. P., Schelkhouw W., Verdonck L. and Rubens R., Adrenocortical function in old age: response to acute adrenocorticotropin stimulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54 (1982) 187-191.
10. Bélanger A., Candas B., Dupont A., Cusan L., Diamond P., Gomez J. L. and Labrie F., Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79 (1994) 1086-1090.
11. Coleman D. L., Leiter E. H. and Schwizer R. W., Therapeutic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in diabetic mice. *Diabetes* 31 (1982) 830-833.
12. Nestler J. E., Barlaschini C. O., Clore J. N. and Blackard W. G., Dehydroepiandrosterone reduces serum low density lipoprotein levels and body fat but does not alter insulin sensitivity in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66 (1988) 57-61.
13. Roy S., Mahesh V. B. and Greenblatt K. B., Effect of dehydroepiandrosterone and Δ^4 -androstenedione on the reproductive organs of female rats: production of cystic changes in the ovary. *Nature* 196 (1962) 42-43.
14. Ward R. C., Costoff A. and Mahesh V. B., The induction of polycystic ovaries in mature cycling rats by the administration of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Biol. Reprod.* 18 (1978) 614-623.
15. van Weerden W. M., Bierings H. G., van Steenbrugge G. J., de Jong F. H. and Schroder F. H., Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. *Life Sci.* 50 (1992) 857-861.
16. Bélanger A., Labrie F., Monfette G., Dupont A. and Caron S., Measurement of non-conjugated C-19 steroids as well as C-19 steroid glucuronides in plasma and tissue. In *First International Symposium on Steroid Formation, Degradation and Action in Peripheral, Normal and Neoplastic Tissues*. Taormina, Italy, 1989, p. 35 (Abstract).
17. Carson, F. L., *Histotechnology. A self-instructional text*. ASCP Press, Chicago, 1990, p. 308.
18. Bélanger A., Caron S., Labrie F., Naldoni C., Dogliotti L. and Angeli A., Levels of eighteen non-conjugated and conjugated steroids in human breast cyst fluid: relationship with cyst type. *Eur. J. Cancer* 26 (1990) 277-281.
19. Kramer C. Y., Extension of multiple range tests to group means with unique numbers of replications. *Biometrics* 12 (1956) 307-310.
20. Labrie C., Flamand M., Bélanger A. and Labrie F., High bioavailability of DHEA administered percutaneously in the rat. *J. Endocrinol.* 150 (1996) S107-S118.
21. Labrie F., Simard J., Luu-The V., Bélanger A. and Pelletier G., Structure, function and tissue-specific gene expression of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4-ene isomerase enzymes in classical and peripheral intracrine steroidogenic tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43 (1992) 805-826.
22. Spinola P. G., Marchetti B. and Labrie F., Adrenal steroids stimulate growth and progesterone receptor levels in rat uterus and DMBA-induced mammary tumors. *Breast Cancer Res. Treat.* 8 (1986) 241-248.
23. Seymour Munn K. and Adams J., Estrogenic effects of 5-androstene-3 β , 17 β -diol at physiological concentrations and its possible implication in the etiology of breast cancer. *Endocrinology* 112 (1983) 486-491.
24. Poortman J., Prenen J. A., Schwarz F. and Thijssen J. H., Interaction of delta-5-androstene-3 β , 17 β -diol with estradiol and dihydrotestosterone receptors in human myometrial and mammary cancer tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 40 (1975) 373-379.
25. Garcia M. and Rochefort H., Evidence and characterization of the binding of two ^3H -labeled androgens to the estrogen receptor. *Endocrinology* 104 (1979) 1797-1804.
26. Lerner L. J., Hormone antagonists. Inhibitors of specific activities of estrogen and androgen. *Rec. Prog. Horm. Res.* 20 (1964) 435-490.
27. Gonzalez Diddi M., Komisaruk B. and Beyer C., Differential effects of testosterone and dihydrotestosterone on the diverse uterine tissues of the ovariectomized rat. *Endocrinology* 91 (1972) 1129-1132.
28. Terada N., Yamamoto R., Takada T., Taniguchi H., Terakawa N., Li W., Kitamura Y. and Matsumoto K., Inhibitory effect of androgen on cell death of mouse uterine epithelium. *J. Steroid. Biochem.* 36 (1990) 305-310.
29. Tchernitchin, A. N., Mena, M. A., Rodriguez, A. and Maturana, M., Radioautographic localization of estrogen receptors in the rat uterus: a tool for the study of classical and nontraditional mechanism of hormone action. In *Localization of putative steroid receptors*, ed. L. P. Pertschuk and S. H. Lee. CRC Press, Boca Raton FL, 1985, pp. 5-37.
30. Arriaza C. A., Mena M. A. and Tchernitchin A. N., Prenatal androgenization selectively modifies some responses to oestrogen in the prepubertal rat uterus. *J. Endocrinol.* 120 (1989) 379-384.
31. Ip M. M., Milholland R. J., Kim U. and Rosen F., Androgen control of cytosol progesterone receptor levels in the M1-W9B transplantable mammary tumor in the rat. *J. Natl. Cancer Inst.* 69 (1982) 673-681.
32. Schmidt W. N. and Katzenellenbogen B. S., Androgen-uterine interactions: an assessment of androgen interaction with the testosterone- and estrogen-receptor systems and stimulation of uterine growth and progesterone-receptor synthesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 15 (1979) 91-108.
33. Mortola J. F. and Yen S. S., The effects of oral dehydroepiandrosterone on endocrine-metabolic parameters in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71 (1990) 1360-1367.
34. Morales A. J., Nolan J. J., Nelson J. C. and Yen S. S., Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and

- women of advancing age. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **78** (1994) 1360-1367.
35. Labrie F., Luu-The V., Lin S. X., Labrie C., Simard J., Breton R. and Bélanger A., The key role of 17 β -HSDs in sex steroid biology. *Steroids* **62** (1997) 148-158.
36. Mori T., Mills K. T. and Bern H. A., Sensitivity of the vagina and uterus of mice neonatally exposed to estrogen or androgen to postnatal treatment with estrogen or androgen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **199** (1992) 466-469.
37. Zumoff B., Levin J., Rosenfeld R. S., Markham M., Strain G. W. and Fukushima D. K., Abnormal 24 h mean plasma concentrations of dehydroepiandrosterone and dehydroisoandrosterone sulfate in women with primary operable breast cancer. *Cancer Res.* **41** (1981) 3360-3363.
38. Stahl F., Schnorr D., Pilz C. and Dörner G., Dehydroepiandrosterone (DHEA) levels in patients with prostatic cancer, heart diseases and under surgery stress. *Exp. Clin. Endocrinol.* **99** (1992) 68-70.
39. Schwartz A. G., Pashko L. and Whitcomb J. M., Inhibition of tumor development by dehydroepiandrosterone and related steroids. *Toxicol. Pathol.* **14** (1986) 357-362.
40. Schwartz A. G., Hard G. C., Pashko L. L., Abou Gharbia M. and Swern D., Dehydroepiandrosterone: an anti-obesity and anti-carcinogenic agent. *Nutr. Cancer* **3** (1981) 46-53.
41. Rao A. R., Inhibitory action of dehydroepiandrosterone on methylcholanthrene-induced carcinogenesis in the uterine cervix of mouse. *Cancer Lett.* **45** (1989) 1-5.
42. Schwartz A. G. and Pashko L. L., Mechanism of cancer preventive action of DHEA. Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Ann. NY Acad. Sci.* **774** (1995) 180-186.
43. Li S., Yan X., Bélanger A. and Labrie F., Prevention by dehydroepiandrosterone of the development of mammary carcinoma induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) in the rat. *Breast Cancer Res. Treatm.* **29** (1993) 203-217.
44. MacEwen E. G. and Kurzman I. D., Obesity in the dog: role of the adrenal steroid dehydroepiandrosterone (DHEA). *J. Nutr.* **121** (1991) S51-S55.
45. Kent S., DHEA: Miracle drug? *Geriatrics* **37** (1982) 157-161.
46. Diamond P., Cusan L., Gomez J. L., Bélanger A. and Labrie F., Metabolic effects of 12 month percutaneous DHEA replacement therapy in postmenopausal women. *J. Endocrinol.* **150** (1996) S43-S50.
47. Labrie F., Diamond P., Cusan L., Gomez J. L. and Bélanger A., Effect of 12 month DHEA replacement therapy on bone, vagina, and endometrium in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82** (1997) 3498-3505.
48. Labrie F., Simard J., Luu-The V., Pelletier G., Beighmi, K. and Bélanger, A., Structure, regulation and role of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase and aromatase enzymes in formation of sex steroids in classical and peripheral intracrine tissues. In *Hormone, enzymes and receptors*, ed. M. C. Sheppard and P. M. Stewart. Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism, Baillière Tindall, London, 1994, pp. 451-474.