



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1446128 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 31/565 (2006.01) **A61K 31/57** (2006.01)
A61P 5/30 (2006.01)

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

(22) Data de pedido: 2002.05.23	(73) Titular(es): PANTARHEI BIOSCIENCE B.V. P.O. BOX 464 3700 AL ZEIST NL
(30) Prioridade(s): 2001.11.15 EP 0120437 2002.02.21 EP 0207569	(72) Inventor(es): CHRISTIAN FRANZ HOLINKA US HERMAN, JAN, TIJMEN COELINGH BENNINK NL EVERT JOHANNES BUNSCHOTEN NL
(43) Data de publicação do pedido: 2004.08.18	(74) Mandatário: MARIA DO ROSÁRIO MAY PEREIRA DA CRUZ ALVES GARCIA Av. Conselheiro Fernando de Sousa 11, 15º 1070-072 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2006.12.06 003/2007	

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS ESTROGÉNICOS COMBINADOS COM COMPOSTOS PROGESTAGÉNICOS NA TERAPIA HORMONAL DE SUBSTITUIÇÃO**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS ESTROGÉNICOS COMBINADOS COM COMPOSTOS PROGESTAGÉNICOS NA TERAPIA HORMONAL DE SUBSTITUIÇÃO

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à utilização de um composto estrogénico para a fabricação de uma composição farmacêutica para ser utilizado numa terapia hormonal de substituição nos mamíferos. Mais particularmente a invenção refere-se a uma terapia de substituição hormonal que compreende a administração oral a um mamífero de uma combinação de um composto estrogénico e de um composto progestagénico numa quantidade eficaz para prevenir ou tratar os sintomas do hipoestrogenismo.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Numa terapia de substituição hormonal (HRT), às vezes também definida como terapia de substituição de estrogénios, os estrogénios são administrados para prevenir ou tratar os sintomas provocados por uma deficiência estrogénica ou hipoestrogenismo. O hipoestrogenismo pode-se produzir nas fêmeas assim como nos machos, e podem provocar doenças e perturbações como a osteoporose (perda de massa óssea), arteriosclerose, sintomas climatéricos como calores, suores, atrofia urogenital, mudanças do humor, insónia, palpitações. A deficiência estrogénica tem sido também associada com doenças cognitivas e com a doença de Alzheimer.

O hipoestrogenismo, e em particular o hipoestrogenismo crónico, é muitas vezes observado nas mulheres perimenopáusicas e pós-menopáusicas. No entanto este pode ser devido ainda ao hipogonadismo ou a uma castração, assim como a uma insuficiência ovariana primária, a um tratamento contra o cancro de mama por exemplo com um inibidor de aromatase e um tratamento hormonal análogo de libertação da gonadotropina para doenças ginecológicas benignas como a endometriose, adenomiose, fibróides uterinos (leiomiomas), dismenorréia, menorragia e metrorragia.

A HRT emprega a administração contínua de um estrogénio em quantidades eficazes durante períodos de tempo prolongados. No entanto, a administração de estrogénios tem sido associado, a uma proliferação endometrial nas mulheres e actualmente é de forma geral aceite o facto de que um tratamento "não oposto" com estrogénios aumenta substancialmente o risco de sofrer cancro endometrial (Cushing et al., 1998. *Obstet. Gynecol.* 91, 35-39; Tavani et al., 1999. *Drugs Aging*, 14, 347-357). Há ainda a evidência de um aumento significativo do cancro de mama com a utilização a longo prazo (10 a 15 anos) de um tratamento estrogénico (Tavani et al., 1999. *Drugs Aging*, 14, 347-357; Pike et al., 2000. *Steroids*, 65, 659-664).

Na actualidade, para contrariar os efeitos negativos de uma terapia estrogénica não oposta, habitualmente, é aplicado um tratamento progestagénico adjunto. O tratamento de hipoestrogenismo por administração de uma combinação de agentes estrogénicos e progestagénicos está descrito nos Pedidos de Patentes US 5,827,843 e EP-A-0 136 011. Acreditamos que a administração regular dos progestagénios inibe a estimulação estrogénica contínua do endométrio além de um efeito anti-proliferativo e produz a redução da incidência do carcinoma endometrial nas mulheres pós-menopáusicas que recebem uma terapia de substituição estrogénica

(Beral et al., 1999. J. Epidemiol. Bioestat., 4, 191-210). Este tratamento adjunto, em que geralmente são utilizados os progestagénios sintéticos, tanto é dado em regimes contínuos combinados com o estrogénio, ou adicionado de forma sequencial, normalmente durante aproximadamente 14 dias por mês, a um tratamento estrogénico contínuo.

Os estrogénios andógenos e exógenos cumprem funções nervosas centrais e metabólicas importantes no organismo feminino: Os níveis estrogénicos normais contribuem de forma decisiva para o bem-estar da mulher. Apesar da difusão da utilização dos estrogénios nos métodos da HRT, continua a haver problemas que ainda não foram resolvidos. Os estrogénios conhecidos, em particular os estrogénios biogénicos (isto é os estrogénios presentes de forma natural no corpo humano), mostram sérias deficiências farmacocinéticas. Os estrogénios biogénicos como o estradiol, a estrona, o sulfato de estrona, os ésteres de estradiol e do estriol quando tomados oralmente tornam-se bio-disponíveis apenas num grau muito baixo. Este grau pode variar muito de pessoa para pessoa pelo que não pode ser recomendada nenhuma dose generalizada. Outro problema relacionado é a eliminação rápida destes estrogénios do sangue. Por exemplo, a meia-vida do principal estrogénio biogénico humano 17β -estradiol é de aproximadamente 1 hora. O resultado é que, entre períodos de administração separados (diários), os níveis do soro sanguíneo destes estrogénios biogénicos tendem a variar consideravelmente. Assim, logo após a administração, a concentração do soro é habitualmente várias vezes superior à concentração óptima. Adicionalmente, se o período da seguinte administração é atrasado, as concentrações de soro diminuirão rapidamente até um nível em que o estrogénio já não estará fisiologicamente activo.

O esteroide estrogénico sinteticamente alterado mais importante é o 17 α -etinil estradiol (EE). Este estrogénio é poucas vezes utilizado nos métodos da HRT dado que a administração prolongada do EE tem sido associado a um aumento do risco de tromboembolia, que se considera particularmente prejudicial nas mulheres menopáusicas e pós-menopáusicas. Além do EE, nalguns casos tem sido utilizado o mestranol; o mestranol é um "profármaco" que é metabolizado no organismo em EE. Quando é aplicado oralmente nos seres humanos, o EE tem uma biodisponibilidade muito melhor que os estrogénios biogénicos anteriormente mencionados, mas a sua biodisponibilidade oral varia muito de indivíduo para indivíduo. Vários autores têm assinalado este facto assim como o de que as concentrações no sangue resultavam ser altamente variáveis após a administração oral desta substância.

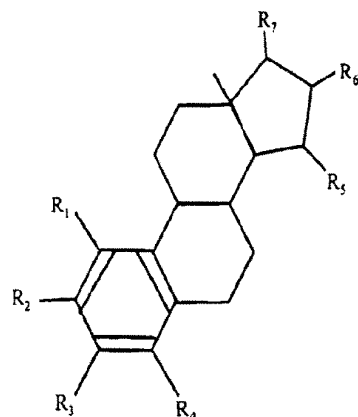
Além dos problemas farmacocinéticos, os estrogénios conhecidos mostram também deficiências farmacodinâmicas. Após a reabsorção no lúmen intestinal, os ingredientes activos administrados oralmente entram no organismo via fígado. Este facto tem uma importância específica para os agentes estrogénicos em virtude de que o fígado é o órgão-alvo para os estrogénios; uma toma oral de estrogénios resulta em fortes efeitos estrogénicos no fígado. A actividade da secreção que é controlada pelos estrogénios no fígado humano inclui o aumento da síntese das proteínas de transporte CBG, SHBG, TBG, vários factores que são importantes para a fisiologia da coagulação do sangue, e das lipoproteínas. Se os estrogénios biogénicos são introduzidos no organismo feminino ao mesmo que se impede a sua passagem através do fígado (por exemplo com a aplicação transdérmica), as funções do fígado mencionadas mantêm-se largamente não metabolizadas. As doses terapêuticamente equivalentes dos estrogénios biogénicos, quando são oralmente administradas, resultam em respostas evidentes de parâmetros hepáticos, como o aumento da SHBG, CBG, angiotensinogénio e HDL

(alta densidade lipoproteica). Estes efeitos hepáticos dos estrogénios são também observados aquando da utilização de formulações de estrogénios equinos (denominados também estrogénios conjugados). O etinilestradiol e o dietilestilbestrol (DES) têm ainda uma estrogénica hepática maior. Elger et al., J. Steroid Biochem. Molec. Biol. (1995), 55(3/4), 395-403, descreveram que o EE ou DES têm uma estrogénica hepatocelular muito mais elevada que a estrogénica sistémica: Em relação com uma actividade inibitória de secreção da FSH estes estrogénios são 4 a 18 vezes mais activos no fígado do que o sulfato de estrona.

Os deficits anteriormente mencionados têm uma considerável importância clínica quando os habitualmente conhecidos estrogénios biogénicos e sintéticos são aplicados. Consequentemente continua a existir a necessidade de produzir estrogénios que não mostrem estes deficits e que possam ser oralmente administrados de forma adequada nos métodos da HRT para substituir eficazmente a secreção ovariana endógena do estradiol, isto é para tratar ou prevenir os sintomas do hipoestrogenismo.

RESUMO DA INVENÇÃO

Os inventores surpreendentemente descobriram que estes objectivos são obtidos com umas substâncias estrogénicas que estão representadas pela seguinte fórmula:



em que R₁, R₂, R₃, R₄ independentemente são um átomo de hidrogénio, um grupo hidróxilo ou um grupo alcóxi com 1 a 5 átomos de carbono; cada um de R₅, R₆, R₇ é um grupo hidróxilo; e em que até 3 de R₁, R₂, R₃, R₄ são átomos de hidrogénio.

Um grupo conhecido e representativo destas substâncias estrogénicas é 1,3,5(10)-estratrieno-3,15 α ,16 α ,17 β -tetrol, também conhecidos pelos nomes de estetrol, oestetrol e 15 α -hidroxiestriol. O estetrol é um estrogénio que é produzido pelo fígado fetal humano durante uma gestação humana. Os níveis de estetrol não conjugado no plasma materno no fim da gestação são cerca de 1.2 ng/ml e são aproximadamente 12 vezes maiores no plasma fetal que no plasma materno (Tulchinsky et al., 1975. J. Clin. Endocrinol. Metab., 40, 560-567).

Em 1970, Fishman et al., "Fate of 15 α -hydroxyestriol -³H in Adult Man", J Clin Endocrinol Metab (1970) 31, 436-438, descreveram os resultados de um estudo onde tinha sido administrado trítio marcado 15 α -hidroxiestriol (estetrol) por via intravenosa a duas mulheres adultas. Foi descoberto que o estetrol era rápido e completamente excretado na urina como o glucosiduronato e que praticamente não

era produzido nenhum metabolismo excepto a conjugação.

Entre 1975 e 1985, vários investigadores estudaram as propriedades do estetrol e descreveram a sua potência estrogénica e a sua actividade uterotrónica. As publicações mais relevantes que apareceram durante este período são mencionadas à continuação:

- Levine et al., 1984. Efeitos vasculares uterinos do estetrol em ovelhas não gestantes. Am. J. Obstet. Gynecol., 148:73, 735-738: "Quando é administrado intravenosamente em ovelhas não gestantes, o estetrol é 15 a 30 vezes menos potente que o estriol e o 17 β -estradiol numa vasodilação uterina".

- Jozan et al., 1981. Os diferentes efeitos do estradiol, estriol, estetrol e estrona nas células do cancro da mama humano (MCF-7) num cultivo de tecido a longo prazo. Acta Endocrinologica, 98, 73-80: "A potência agonística do estetrol é de 2% da magnitude observada durante a proliferação de uma célula *in vitro* de 17 β -estradiol".

- Holinka et al., 1980. Comparou os efeitos do estetrol e do tamoxifeno com os do estriol e do estradiol no útero de rato imatura. Biol. Reprod. 22, 913-926: "O estetrol administrado subcutaneamente tem uma actividade uterotrónica muito fraca e é considerada menos potente que o 17 β -estradiol e o estriol".

- Holinka et al., 1979. Efeitos *in vivo* do estetrol no útero de ratazana imatura. Biol. Reprod. 20, 242-246: "O estetrol administrado subcutaneamente tem uma actividade uterotrónica muito fraca e é considerado menos potente que o 17 β -estradiol e o estriol".

- Tseng et al., 1978. Heterogeneidade de sítios de ligação dos estradióis saturáveis nos núcleos do endométrio humano. Estetrol

studies. J. Steroid Biochem. 9, 1145-1148: "A ligação relativa dos receptores de estetrol com os receptores de estrogénio no endométrio humano é de 1.5 % de 17β -estradiol".

- Martucci et al., 1977. Direcção do metabolismo do estradiol como controlo da sua actividade hormonal de acção uterotrófica de metabolitos do estradiol. Endocrin. 101, 1709-1715: "A administração contínua do estetrol desde um depósito subcutâneo mostra uma actividade uterotrófica muito fraca e é consideravelmente menos potente do que o 17β -estradiol e o estriol".

- Tseng et al., 1976. Competição do estetrol e do etinilestradiol com o estradiol para uma ligação nuclear no endométrio humano. J. Steroid Biochem. 7, 817-822: "A constante ligação relativa do estetrol com o receptor do estrogénio no endométrio humano é de 6.25% comparado com o 17β -estradiol (100%)".

- Martucci et al., 1976. Ligação dos receptores dos estrogénios uterinos dos catecolestrogénios e do estetrol (1,3,5(10)-estratrieno-3, 15alfa,16alfa,17beta-tetrol). Steroids, 27, 325-333: "A afinidade de ligação relativa do estetrol com um receptor de estrogénio citosol uterino da ratazana é de 0.,5% de 17β -estradiol (100%). Além de que, a afinidade da ligação relativa de estetrol num receptor estrógeno nuclear uterino de ratazana é de 0.3% de 17β --estradiol (100%)".

Todas as publicações citadas têm em comum o facto de que os autores investigaram a potência estrogénica do estetrol. Todos sem excepção concluíram que o estetrol é um estrogénio fraco. Nalguns dos artigos citados foi descoberto que a potência estrogénica do estetrol era inferior à de outro estrogénio biogénico, isto é, o

17 β --estradiol, que é considerado um estrogénio relativamente fraco (quando por exemplo comparado com o etinilestradiol). Considerando estas descobertas, não é surpreendente que o interesse pelo estetrol tenha diminuído desde os anos oitenta e que desde então não tenha sido publicada nenhum estudo sobre as propriedades do estetrol.

O Pedido de Patente U.S. 5,468,736 (Hodgen) descreve um método de tratamento de substituição hormonal que implica a administração de um estrogénio juntamente com uma quantidade de antiprogestina (antiprogestagénio), que nas mulheres inibe a proliferação endometrial induzida pelo estrogénio. No exemplo 3 é mencionado a utilização combinada do estetrol e da lilepristona. Nos exemplos não foi dado nenhuma indicação relativa à forma e à frequência da administração ou em relação à quantidade de dose empregue. Uma desvantagem associada à utilização dos anti-progestagénios, como a lilepristona, é o risco de que esta possa induzir a uma morfologia endometrial anormal, isto é a hiperplasia cística, como a que foi observada nas mulheres que estavam a receber um tratamento anti-progestagénico para tratar a endometriose (Murphy et al., 1995. Fertil. Steril., 95, 761-766).

O Pedido de Parte estado-unidense US 5,340,586 (Pike et al.) refere composições e métodos que são eficazes para tratar mulheres ooforectomizadas, em que durante algum tempo foi administrada uma quantidade eficaz de uma composição estrogénica e de uma composição androgénica. Neste Pedido de Patente estado-unidense foi exposto que as composições estrogénicas naturais e sintéticas que podem ser utilizadas incluem hormonas e congéneres estrogénicos naturais, incluído mas não limitados ao estradiol, benzoato de estradiol, cipionato de estradiol, ao valerato de estradiol, estrona, dietilestilbestrol, sulfato de estrona de piperazina, etinilestradiol, mestranol, fosfato de poliestradiol, estriol,

hemisuccinato de estriol, quinestrol, estropipato, pinestrol e sulfato de potássio de estrona, além de que podem também ser empregues os estrogénios equinos, como por exemplo a equilenina, sulfato de equilenina e estetrol. Exceptuando o inventário exaustivo dos estrogénios conhecidos, neste Pedido de Patente estado-unidense não é feita nenhuma outra referência ao estetrol (que é erradamente indicado como um estrogénio equino).

A mesma lista exaustiva de estrogénios está indicada nos seguintes Pedidos de Patentes:

- O Pedido de Patente estado-unidense 4,762,717 (Crowley): Método contraceptivo compreendendo a administração sequencial de:

- (1) uma combinação de libertação hormonal de lutropina (LHRH) e estrogénio e

- (2) uma combinação de LHRH, estrogénio e de progestagénio.

- O Pedido de Patente estado-unidense 5,130,137 (Crowley): Método de tratamento da disfunção secretória ovariana benigna compreendendo a administração sequencial de:

- (1) uma combinação da libertação hormonal de lutropina (LHRH) e estrogénio e

- (2) uma combinação da LHRH e de estrogénio e progestogénio.

- O Pedido de Patente estado-unidense 5,211,952 (Spicer et al.): Método contraceptivo compreendendo a administração de uma composição hormonal de libertação de gonadotropina (GnRH) numa quantidade eficaz para inibir a ovulação, e a administração de estrogénio e progestagénio para manter os níveis do soro superiores

a um nível mínimo definido.

- O Pedido de Patente estado-unidense 5,340,584 (Spicer et al.): Método para prevenir a concepção ou tratar doenças ginecológicas benignas compreendendo a administração de uma composição de GnRH durante um primeiro período de tempo numa quantidade eficaz para suprimir a produção ovariana de estrogénio e de progesterona, administrando ao mesmo tempo uma composição estrogénica numa quantidade eficaz para prevenir sintomas de deficiência estrogénica e simultaneamente a administração de um progestagénio numa quantidade eficaz para manter o nível de soro do dito progestagénio num nível eficaz para reduzir a proliferação celular endometrial.

- O Pedido de Patente estado-unidense 5,340,585 (Pike et al.): Método para o tratamento das doenças ginecológicas benignas numa doente em que o risco da estimulação endometrial com composições estrogénicas é minimizada ou inexistente, compreendendo a administração de uma composição de GnRH numa quantidade eficaz para suprimir a produção ovariana de estrogénio e progesterona e a administração de uma composição estrogénica numa quantidade eficaz para prevenir sintomas de deficiência estrogénica.

- O Pedido de Patente WO 00/73416 (Yifang et al.): Método para regular a fertilidade de um hospedeiro, compreendendo o contacto das células ovarianas do hospedeiro com uma quantidade segura e eficaz de uma composição farmacêutica que compreende um oligonucleótido anti-sentido que é complementar à sequência nucleótida do receptor hormonal da estimulação folicular (FSH). Neste Pedido de Patente é mencionada a possibilidade da administração combinada deste oligonucleótido anti-sentido com um esteróide estrogénico.

As vantagens da presente invenção podem ser obtidas sem a co-administração de anti-progestogénios, composições de LHRH, composições de GnRH e/ou oligonucleótidos anti-sentido que são complementares à sequência dos nucleótidos do receptor hormonal de estimulação folicular (FSH) como o que tinha sido proposto nos Pedidos de Patentes anteriormente mencionadas. A presente invenção pode ainda ser aplicada de forma apropriada a indivíduos que não foram ooforectomizados, ou nos que o risco da estimulação endométrica por composições estrogénicas não tenha sido minimizado ou seja inexistente, outra que a co-administração de um progestagénio. Além de que, o presente método não requer a utilização de uma formulação de libertação lenta como a que é especificada na maioria das publicações anteriormente mencionadas.

Pode ser observado que em nenhuma das publicações anteriores é descrita a administração oral do estetrol. As únicas vias de administração nelas descritas são a administração intravenosa e a subcutânea (depósito). Para cada uma destas vias de administração pode ser concluído que o rendimento do estetrol é muito inferior a por exemplo o do 17β -estradiol. Dado que não havia nenhuma razão para assumir o facto de que possa ser obtido um resultado diferente no caso de uma administração oral, não é surpreendente que uma administração oral de estetrol não tenha sido levado a cabo e que na técnica anterior não possa ser encontrada nenhuma informação sobre este efeito.

Devido à baixa potência estrogénica das substâncias em forma de estetrol empregues segundo a invenção, é surpreendente que estas substâncias possam ser eficazmente utilizadas em métodos da HRT, particularmente em métodos da HRT utilizando a administração oral destas substâncias. Apesar de que os inventores não desejem estar condicionados por uma teoria, acreditamos que a inesperada eficácia das substâncias do tipo estetrol oralmente administradas provêm da

combinação imprevista das propriedades favoráveis farmacocinéticas (ADME) e farmacodinâmicas destas substâncias.

No que se refere às propriedades farmacocinéticas das presentes substâncias estrogénicas, os inventores descobriram que a sua biodisponibilidade oral é surpreendentemente alta e que sua meia-vida *in vivo* é consideravelmente maior do que a de outros estrogénios biogénicos. Assim, ainda que o estetrol e as substâncias do tipo estetrol tenham uma potência estrogénica relativamente baixa, estas podem ser eficazmente empregues num método oral para HRT já que a sua baixa potência é compensada por uma biodisponibilidade oral relativamente alta combinada com uma estabilidade metabólica alta, como o demonstrado pela sua longa meia-vida.

Uma vantagem importante da administração oral do estetrol e das substâncias do tipo estetrol consiste em que é considerado que os efeitos hepáticos das substâncias do tipo estetrol são mínimos dado que estas raramente são metabolizadas durante a denominada "primeira fase". O efeito da primeira fase dos medicamentos oralmente administrados, refere-se ao processo de degradação do medicamento pelo fígado durante a transição do medicamento desde a sua ingestão inicial até à sua circulação no fluxo sanguíneo.

Outra propriedade vantajosa das substâncias estrogénicas da presente invenção consiste no facto de que a globulina de ligação hormonal sexual (SHBG) raramente liga estas substâncias estrogénicas, o que significa que contrariamente à maioria dos estrogénios conhecidos, os níveis de soro são representativos dos níveis da bioactividade e dos níveis da SHBG independente.

Também outra vantagem importante das substâncias estrogénicas da presente invenção é devido à sua relativa insensibilidade às interacções com outros medicamentos (interacções entre medicamento e medicamento). É bem conhecido o facto de que certos medicamentos podem reduzir a eficácia dos estrogénios, como o etinilestradiol, e que outros medicamentos podem aumentar a sua actividade, produzindo um possível aumento de efeitos secundários. Identicamente os estrogénios podem interferir no metabolismo de outros medicamentos. Geralmente, o efeito de outros medicamentos sobre os estrogénios é devido a uma interferência com a absorção, o metabolismo ou a excreção destes estrogénios, enquanto que o efeito dos estrogénios sobre outros medicamentos é devido a uma competição das vias metabólicas.

O grupo clinicamente mais significativo das interacções de medicamentos à base de estrogénios dá-se com medicamentos que podem induzir enzimas microssómicas hepáticas, as quais podem reduzir os níveis em plasma dos estrogénios abaixo de um nível terapêutico (por exemplo, agentes anticonvulsivos; fenitoína, primidona, barbitúricos, carbamazepina, etosuximida, e metosuximida; medicamentos antituberculose como a rifampicina; medicamentos antifúngicos como a griseofulvina). As substâncias estrogénicas da presente invenção são menos dependentes da regulação por aumento ou regulação por diminuição do número de enzimas microssómicas hepáticas (por exemplo P450's) e também menos sensíveis à competição com outros substratos P450. De forma similar, estes não interferem significativamente no metabolismo de outros medicamentos.

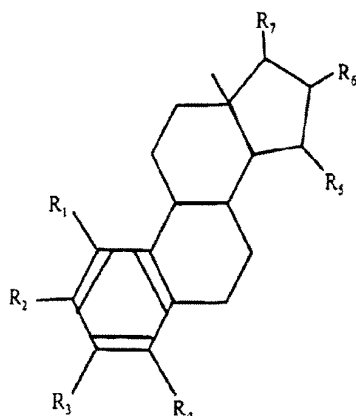
Os conjugados da maioria dos estrogénios, por exemplo formados no fígado, são excretados na bÍlis e podem ser destruídos pelas bactérias intestinais no cólon para libertar a hormona activa que pode seguidamente ser reabsorbida (recirculação enterohepática).

Existem informações clínicas que sustentam a ideia de que uma recirculação enterohepática de estrogénios é reduzida nas mulheres que tomam antibióticos como a ampicilina, tetraciclina, etc. As formas conjugadas das substâncias estrogénicas da presente invenção dificilmente são excretadas na bÍlis, o que significa que estas são substancialmente insensÍveis aos medicamentos que influem na recirculação enterohepática de outros estrogénios.

As observações anteriores servem para explicar porque as substâncias estrogénicas da invenção apenas sofrem as interacções entre medicamento e medicamento e conseqüentemente produzem um impacto muito consistente, isto é previsÍvel. Assim, a eficácia das substâncias estrogénicas da invenção são extremamente fiáveis.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Conseqüentemente, um aspecto da presente invenção refere-se à utilização de um composto estrogénico na produção de uma composição farmacêutica para ser utilizada num método hormonal de substituição em mamíferos, este método compreende a administração oral a um mamífero de um composto estrogénico e de um composto progestagénico numa quantidade eficaz para prevenir ou tratar os sintomas de hipostrogenismo, onde o composto estrogénico é seleccionado do grupo composto por substâncias representadas pela seguinte fórmula:



em que R₁, R₂, R₃, R₄ independentemente são um átomo de hidrogénio, um grupo hidróxilo ou um grupo alcóxi com 1 a 5 átomos de carbono; cada um de R₅, R₆, R₇ é um grupo hidróxilo; e até 3 de R₁, R₂, R₃, R₄ são átomos de hidrogénio; precursores capazes de libertar uma substância segundo a fórmula anteriormente mencionada quando é utilizada no presente método, cujos precursores são derivados das substâncias representadas pela fórmula, onde o átomo de hidrogénio de pelo menos um dos grupos hidróxilo na dita fórmula tem sido substituída por um radical acilo de um ácido carboxílico, sulfónico ou sulfâmico hidrocarbonado com 1 a 25 átomos de carbono: tetrahidrofurânico; tetrahidropiranol: ou um resíduo de glicose de cadeia linear ou ramificada contendo 1 a 20 unidades de glicose por resíduo; e misturas de uma ou mais das substâncias e/ou precursores anteriormente mencionadas. A designação "administração oral" como é utilizada neste documento inclui também a administração oral por sonda esofágica.

O método da HRT de acordo com a invenção pode ser vantajosamente utilizada para tratar todas as formas conhecidas de hipoestrogenismo, por exemplo o hipoestrogenismo associado a mulheres perimenopáusicas e pós-menopáusicas, hipoestrogenismo derivado do hipogonadismo ou castração, assim como o hipoestrogenismo resultante de uma insuficiência ovariana primária,

tratamento de por exemplo cancro da mama com inibidor da aromatase e tratamento análogo hormonal de libertação da gonadotropina para por exemplo doenças ginecológicas benignas. Exemplos das manifestações de hipoestrogenismo que podem ser eficazmente tratadas ou evitadas com o presente método tanto em mulheres como em homens, incluem a osteoporose, arteriosclerose, doenças cognitivas e doença de Alzheimer. O método pode também ser vantajosamente utilizado no tratamento (profilático) de sintomas climatéricos como os calores, suores, atrofia urogenital, mudanças de humor, insónia e palpitações. O presente método é particularmente adequado para tratar ou prevenir a osteoporose e os sintomas climatéricos.

A designação "composto estrogénico" como é utilizado ao longo deste documento inclui substâncias que são capazes de desencadear uma resposta estrogénica *in vivo*, assim como precursores que são capazes de libertar este composto estrogénico *in vivo* quando são utilizados de acordo com a presente invenção. Para que os compostos estrogénicos possam desencadear esta resposta, estes normalmente têm que estar ligados a um receptor de estrogénios, os quais se encontram em vários tecidos no interior do corpo de um mamífero. A designação "composto progestagénico" é definida como uma substância que é capaz de desencadear uma resposta progestogénica *in vivo* ou um precursor que é capaz de libertar esta substância *in vivo*. Habitualmente, os compostos progestagénicos são capazes de se ligarem a um receptor de progestogénios.

Deve ser salientado que a presente invenção não só abrange a utilização dos compostos estrogénicos e progestagénicos especificamente mencionados neste Pedido de Patente, mas inclui também os metabolitos destas hormonas que exibem uma funcionalidade *in vivo* comparável. Neste contexto tem sido por exemplo, observado que o levonorgestrel é um metabolito de norgestimato e que o

estriol é um metabolito de 17beta-estradiol. Os progestagénios e os estrogénios podem ser aplicados nas formulações de contraceptivos e/ou num tratamento hormonal de substituição. A designação "substâncias estrogénicas" como é utilizado neste documento não abrange as substâncias estrogénicas marcadas com trítio (^3H) como por exemplo o estetrol marcado com trítio.

As substâncias estrogénicas da presente invenção distinguem-se dos estrogénios biogénicos e sintéticos que habitualmente são aplicados nas formulações farmacêuticas em que estas contêm pelo menos 4 grupos hidróxilo. As substâncias da presente invenção são especiais porque 5 membros no esqueleto esteróide compreendem mais de 3 substituintes de hidróxilo em vez de 0 a 2. Os estrogénios conhecidos contêm pelo menos 4 grupos hidroxilo e derivados destes são:

1,3, 5(10)-estratrieno-2, 3, 15 α , 16 α , 17 β --pentol 2-metil éter

1,3, 5(10)-estratrieno-2, 3, 15 β , 16 α , 17 β -pentol 2-metil éter

1,3, 5(10)-estratrieno-2, 3, 16 α , 17 β - tetrol

1,3, 5(10)-estratrieno-3, 4, 16 α , 17 β - tetrol 4-metil éter

1,3, 5(10)-estratrieno-3, 15 α , 16 α , 17 β -tetrol

1,3, 5(10)-estratrieno-3, 15 α , 16 α , 17 β -tetrol tetra acetato

1,3, 5(10)-estratrieno-3, 15 β , 16 β , 17 β -tetrol tetra acetato

Preferencialmente, a substância estrogénica aplicada como o composto activo na presente composição é um estrogénio natural,

isto é um estrogénio que está presente na natureza e especialmente nos mamíferos. Ainda mais preferencialmente, a substância estrogénica é um estrogénio também denominado biogénico, isto é um estrogénio que se produz naturalmente no corpo humano, um precursor de um estrogénio biogénico ou misturas deles. Porque os estrogénios biogénicos estão presentes naturalmente no corpo fetal e no corpo feminino, não é esperado que se dê algum efeito secundário, particularmente quando os níveis produzidos no soro pela administração exógena destes estrogénios substancialmente não excedam as concentrações de origem natural. Desde que os níveis de soro de estetrol no feto sejam várias vezes superiores aos que são encontrados nas fêmeas em gestação e sabendo que o feto é particularmente vulnerável, é considerado que o estetrol é um estrogénio biogénico particularmente seguro. Não é esperado que se dê algum efeito secundário, particularmente quando os níveis no soro obtidos pela administração exógena destes estrogénios não excedam substancialmente as concentrações (fetais) produzidas naturalmente. Com os estrogénios sintéticos como por exemplo o etinilestradiol, há um risco (dependendo da dose) de efeitos secundários indesejáveis, como por exemplo uma tromboembolia, retenção de líquidos, náuseas, inchaço, colelitíase, dor de cabeça e dor de peito.

Numa forma preferida de realizar a presente invenção a substância estrogénica contém 4 grupos hidróxilo. Também, na fórmula anteriormente mencionada, R_1 preferencialmente representa um átomo de hidrogénio. Na dita fórmula preferencialmente pelo menos 2, mais preferencialmente pelo menos 3 dos grupos R_1 , R_2 , R_3 e R_4 representam um átomo de hidrogénio.

As substâncias estrogénicas segundo a fórmula abrangem vários enantiómeros desde que os átomos de carbono que transportam os substituintes de hidróxilo R_5 , R_6 e R_7 sejam quiralmente activos.

Numa forma preferida de realizar a invenção, a presente substância estrogénica é 15 α -hidroxi substituído. Noutra forma preferida de realizar a presente invenção a substância é 16 α -hidroxi substituído. Ainda noutra forma preferida de realizar a invenção, a substância é 17 β -hidroxi substituído. Mais preferencialmente as substâncias estrogénicas são 15 α , 16 α , 17 β -trihidroxi substituídos.

Noutra forma preferida de realizar a presente invenção R₃ representa um grupo hidróxilo ou um grupo alcóxi. Noutra forma preferida de realizar a invenção os grupos R₁, R₂ e R₄ representam átomos de hidrogénio, e no caso de que R₃, R₅, R₆ e R₇ sejam grupos hidróxilo, a substância é 1,3,5(10)-estratrieno-3, 15, 16, 17-tetrol. Um isómero preferido desta última substância é o 1,3,5(10)-estratrieno-3, 15 α ,16 α ,17 β -tetrol (estetrol).

A invenção abrange também a utilização de precursores das substâncias estrogénicas que constituem o composto activo do presente método. Estes precursores são capazes de libertar as substâncias estrogénicas anteriormente mencionadas quando são utilizadas no presente método, por exemplo como resultado de uma conversão metabólica.

Alguns exemplos típicos dos precursores que podem ser adequadamente utilizados de acordo com a invenção são ésteres que podem ser obtidos com uma reacção dos grupos hidróxilo das substâncias estrogénicas com substâncias que contêm um ou mais grupos carbóxi (M⁺ ⁻OOC-), onde M⁺ representa um hidrogénio ou catião metálico (alcalino). Portanto, numa forma particularmente preferida de realizar a invenção, os precursores são derivados das substâncias estrogénicas, onde o átomo de hidrogénio de pelo menos um dos grupos hidróxilo na dita fórmula tem sido substituído por -CO-R, onde R é um radical de hidrocarbonetos composto por 1 a 25 átomos

de carbono. Preferencialmente R é hidrogénio, ou um radical alquilo, alquenilo ou arilo composto por 1 a 20 átomos de carbono.

O método da presente invenção habitualmente emprega uma administração oral ininterrupta do composto estrogénico durante um período de pelo menos 10 dias, preferencialmente de pelo menos 20 dias. A designação "ininterrupta" como é utilizada neste documento, significa que o composto estrogénico é administrado em intervalos relativamente regulares, sem interrupções (terapeuticamente) significativas. Naturalmente, pode haver interrupções pouco importantes sem que estas afectem a eficácia global do presente método, e de facto estas aberrações estão abrangidas pela presente invenção. Numa forma preferida de realizar a invenção, e de forma mais aritmética, o regime de administração é considerado contínuo quando o intervalo maior entre 2 administrações consecutivas não é superior a mais de 3.5 vezes a média do intervalo. Ainda mais preferencialmente, o dito intervalo maior não é superior a 2.5 vezes, mais preferencialmente a 1.5 vezes o intervalo médio.

As vantagens da presente invenção são mais pronunciadas quando o composto de estrogénio é utilizado numa terapia de substituição hormonal durante um período de tempo maior para minimizar os efeitos negativos de um hipoestrogenismo crónico. Consequentemente, o método de terapia de substituição hormonal, preferencialmente, compreende a administração do composto estrogénico durante um período de pelo menos 1 mês, mais preferencialmente de pelo menos 3 meses.

No método da presente invenção, o composto estrogénico e o composto progestagénico podem ser administradas em unidades de doses orais separadas. No entanto, é também possível e de facto muito conveniente combinar estes dois compostos numa unidade de dose oral única.

Na prática a invenção pode ser adequadamente reduzida a uma variedade de métodos da HRT que são conhecidos pelos técnicos especializados. Entre estes métodos existem também os denominados métodos "combinados". Os métodos combinados utilizam preparações que contêm uma combinação de um estrogénio e de um progestagénio. Os métodos combinados têm em comum o facto de estarem baseados num regime que envolve a administração da preparação combinada anteriormente mencionada, seguida de um intervalo sem administração de aproximadamente 7 dias durante o qual uma hemorragia por supressão é produzida, simulando as menstruações naturais. Desta maneira, os intervalos de 21 dias de administração hormonal alternam com 7 dias durante os quais nenhuma hormona é administrada.

Como alternativa aos métodos combinados anteriormente mencionados, foi proposto o método denominado "sequencial". O método sequencial habitualmente compreende duas fases consecutivas, isto é uma fase na que não é administrado estrogénio nem progestagénio e outra fase na que é administrado uma combinação de estrogénio e de progestagénio. Como nos métodos combinados anteriormente mencionados os primeiros métodos sequenciais, tinham também um intervalo sem administração de aproximadamente 7 dias. Mais recentemente, têm sido propostos métodos sequenciais que não incluem um período sem administração (ou placebo), o que significa que o estrogénio é administrado durante o ciclo inteiro e que o progestagénio é somente co-administrado durante uma parte desse ciclo. O Pedido de Patente WO 95/17895 (Ehrlich et al.), descreve este método sequencial ininterrupto.

Também outro exemplo de um método da HRT abrangida pela presente invenção é o método denominado "combinado contínuo", que é uma versão particular do método combinado que utiliza uma administração combinada ininterrupta de um composto progestagénico e de um

composto estrogénico durante um longo período de tempo, por exemplo de mais de 50 dias. Inversamente aos métodos combinados ordinários e sequenciais, não se dão menstruações regulares no método combinado contínuo desde que a administração contínua do progestagénio nas quantidades indicadas induza à amenorreia.

Numa forma de realizar a invenção, que se refere ao método contínuo combinado, o presente método compreende a administração oral ininterrupta da combinação do composto estrogénico e do composto progestagénico durante um período de pelo menos 28, preferencialmente de pelo menos 60 dias.

Noutra forma de realizar a invenção, que se refere a métodos sequenciais e combinados nos que se emprega um intervalo significativo sem administração, o método da invenção compreende um intervalo de pelo menos 2 dias, preferencialmente de 3 a 9 dias, mais preferencialmente de 5 a 8 dias, durante o qual nenhum composto progestagénico nem composto estrogénico é administrado e onde a diminuição resultante na concentração do soro do composto progestagénico e do composto estrogénico induz às menstruações.

Ainda outra forma de realizar a invenção, que se refere a um método sequencial sem uma pausa significativa, é caracterizada por compreender a administração oral ininterrupta do composto estrogénico durante um período de pelo menos 28 dias, preferencialmente de pelo menos 60 dias, e em que, seguindo a administração combinada do composto estrogénico e do composto progestagénico, o composto estrogénico e nenhum composto progestagénico é administrado durante 3 a 18 dias consecutivos, preferencialmente durante 5 a 16 dias consecutivos e a diminuição resultante na concentração do soro do composto progestagénico normalmente deveria ser o bastante para induzir as menstruações.

Nos métodos ininterruptos da presente invenção a administração do composto estrogénico pode normalmente dar-se em intervalos compreendidos entre 6 horas e 7 dias, preferencialmente entre 12 horas e 3 dias. A meia-vida *in vivo* relativamente elevada dos compostos estrogénicos presentes em comparação com os estrogénios mais conhecidos torna mais fiável o facto de empregar intervalos de administração oral que são significativamente maiores que 1 dia. Por questões práticas, e particularmente dirigido ao utilizador, é preferível administrar oralmente o composto estrogénico assim como o composto progestagénico pelo menos uma vez ao dia, mais preferencialmente uma vez ao dia.

Em todos os métodos anteriormente mencionados é preferível administrar oralmente o composto estrogénico e o composto progestagénico pelo menos uma vez ao dia durante um período de pelo menos 10 dias, preferencialmente de pelo menos 20 dias. No caso do método sequencial sem pausa ou do método combinado contínuo, é preferível administrar oralmente o composto estrogénico e/ou o composto progestagénico pelo menos uma vez ao dia durante um período de pelo menos 30 dias, mais preferencialmente de pelo menos 60 dias, mais preferencialmente de pelo menos 150 dias. Os métodos sequenciais ininterruptos nos quais é empregue a administração contínua de estrogénio são caracterizados por um controlo cíclico excelente.

As preocupações gerais sobre a denominada administração não oposta do estrogénio, isto é uma administração de estrogénio sem progestagénio co-administrado que pode causar uma hiperplasia endometrial, são menos aplicáveis aos compostos estrogénicos da presente invenção. Consequentemente, numa forma particularmente preferida de realização, o presente método da HRT é realizado de acordo com um método sequencial sem pausa.

Com o presente método podem ser obtidos bons resultados se o composto estrogénico for administrado oralmente numa quantidade inferior a 1 mg ao dia por kg de peso corporal, preferencialmente inferior a 400 µg ao dia por kg de peso corporal, mais preferencialmente inferior a 200 µg ao dia por kg de peso corporal. Para obter um impacto significativo com a administração do presente composto estrogénico, é aconselhável administrá-lo oralmente numa quantidade de pelo menos 1 µg ao dia por kg de peso corporal. Preferencialmente, a quantidade administrada oralmente é de pelo menos 2 µg ao dia por kg de peso corporal. Mais preferencialmente, a quantidade administrada oralmente é de pelo menos 5 µg ao dia por kg de peso corporal.

No presente método, particularmente quando é aplicado aos seres humanos, o composto estrogénico é normalmente administrado numa dose média de pelo menos 0.05 mg ao dia, preferencialmente de pelo menos 0.1 mg ao dia. A dosagem máxima é normalmente mantida abaixo de 40 mg por dia, preferencialmente abaixo de 20 mg por dia. A dosagem do composto progestagénico normalmente empregue é equivalente a uma dosagem oral média de 30 a 750 µg de levonorgestrel ao dia, preferencialmente uma dosagem oral média de 50 a 400 µg de levonorgestrel ao dia.

No presente método, o composto estrogénico é preferencialmente administrado numa quantidade eficaz para conseguir uma concentração no soro sanguíneo de pelo menos 1 nanograma por litro, mais preferencialmente de pelo menos 10 nanogramas por litro, mais preferencialmente de pelo menos 100 nanogramas por litro. Geralmente a concentração no soro sanguíneo resultante do composto estrogénico não excederá 100 µg por litro, preferencialmente não excederá 50 µg por litro, mais preferencialmente não excederá 25 µg por litro.

De acordo com a presente invenção, o composto progestagénico é vantajosamente administrado numa quantidade que é equivalente a uma dosagem oral diária de 0.3 a 20 µg de levonorgestrel por kg de peso corporal, preferencialmente de 0.5 a 5 µg de levonorgestrel por kg de peso corporal.

Alguns exemplos de progestogénios que podem ser utilizados de maneira adequada conforme a presente invenção incluem: A Progesterona, o levonorgestrel, o norgestimato, a noretisterona, o didrogesterona, a drospirenona, o 3-beta-hidroxidesogestrel, o 3-ceto-desogestrel (=etonogestrel), o 17-deacetil norgestimato, a 19-norprogesterona, o acetoxipregnenolona, o alilestrenol, a anagestona, a clormadinona, a ciproterona, a demegestona, o desogestrel, o dienogest, a didrogesterona, a dimetisterona, a etisterona, o diacetato de etinodiol, o acetato de fluorogestona, o gastrinon, o gestodeno, a gestrinona, a hidroximetilprogesterona, a hidroxiprogesterona, o linestrenol (=linoestrenol), a medrogestona, a medroxiprogesterona, o megestrol, o melengestrol, o nomegestrol, a noretindrona (=noretisterona), o noretinodrel, o norgestrel (inclui d-norgestrel e dl-norgestrel), a norgestrienona, a normethisterone, a progesterona, o quingestanol, o (17alfa)-17-hidroxi-11-metileno-19-norpregna-4,15-dieno-20-yn-3-ona, a tibolona, a trimegestona, a algestona acetofenida, o nestorone, a promegestona, os ésteres de 17-hidroxiprogesterona, 19-nor-17-hidroxiprogesterona, 17alfa-etinil-testosterona, 17-alfa-etinil-19-nor-testosterona, d-17beta-acetoxi-13beta-etil-17alfa-etinil-gon-4-en-3-ona oxima e precursores destes compostos que quando são utilizados no presente método são capazes de libertar estes progestagénios in vivo. Preferencialmente o progestagénio utilizado no presente método é seleccionado do grupo composto por: progesterona, desogestrel, etonogestrel, gestodeno, dienogest, levonorgestrel, norgestimato, noretisterona, drospirenona, trimegestona, didrogesterona, precursores destes progestagénios e

misturas deles.

O presente método abrange também a co-administração de princípios activos adicionados aos compostos progestagénicos e estrogénicos. Por exemplo, os andrógenos podem ser vantajosamente co-administrados para prevenir os sintomas da hipoandrogenicidade. Assim, uma forma preferida de realizar a invenção compreende a co-administração de um composto androgénico. O composto androgénico é co-administrado de forma adequada numa quantidade eficaz para suprimir os sintomas da hipoandrogenicidade. A hipoandrogenicidade tem sido associada com as mudanças de humor, mudanças desfavoráveis nos parâmetros hemostáticos e perda de massa óssea.

A designação "composto androgénico" é definida como uma substância que é capaz de activar *in vivo* a resposta androgénica ou um precursor que é capaz de libertar a dita substância μ . Habitualmente, os compostos androgénicos são capazes de se ligarem a um receptor andrógeno.

Os compostos androgénicos que podem ser empregues de maneira adequada no presente método podem ser seleccionados do grupo composto por desidroepiandrosterona (DHEA), danazol, gestrinona, ésteres de testosterona, precursores capazes de libertar estes andrógenos quando são utilizados no presente método e misturas destes. Preferencialmente os ésteres de testosterona utilizados compreendem um grupo acilo que compreende pelo menos 6, mais preferencialmente de 8 a 20 e preferencialmente de 9 a 13 átomos de carbono. Os andrógenos que podem ser utilizados mais vantajosamente no presente método são DHEA e/ou undecanoato de testosterona.

Foi por exemplo notado que a DHEA e o undecanoato de testosterona são precursores da testosterona, e que os ditos precursores *per se*

praticamente não exibem nenhuma afinidade com os receptores andrógenos no corpo feminino. A eficácia dos andrógenos no método da invenção é determinada pela sua forma funcionalmente activa, que pode ser bastante diferente da forma em que estes são administrados.

Numa forma preferida de realizar a invenção, o andrógeno é provido numa quantidade equivalente a uma dose oral diária de 5 a 250 mg de DHEA, que é equivalente a uma dose oral diária de 1 a 50 mg de undecanoato de testosterona. Mais preferencialmente o andrógeno é provido numa quantidade que é equivalente a uma dose oral diária de 10 a 120 mg de DHEA. Mais preferencialmente o andrógeno é administrado numa quantidade que é equivalente a uma dose oral diária de 20 a 60 mg de DHEA.

Para obter o impacto desejado com o presente método é aconselhável administrar as unidades de dose numa quantidade que suponha um aumento do nível de andrógenos no soro sanguíneo não superior a 5 nmol de testosterona equivalente por litro, preferencialmente menos de que 3 nmol de testosterona equivalente por litro e mais preferencialmente menos de que 1.5 nmol de testosterona equivalente por litro.

Preferencialmente, no método presente não é empregue uma composição hormonal de libertação de gonadotropina como por exemplo foi descrito nos Pedidos de Patentes estado-unidenses anteriormente mencionadas US 5,211,952, US 5,340,584 e US 5,340,585. Identicamente, no método presente preferencialmente não é empregue uma composição hormonal de libertação da lutropina como a que foi descrita nos Pedidos de Patentes estado-unidenses US 4,762,717 e US 5,130,137. Além de que, o presente método preferencialmente não compreende a co-administração de um anti-progestagénio como a que foi descrita no Pedido de Patente estado-unidense US 5,468,736. O

método pode também ser aplicado adequadamente sem a co-administração de um oligonucleótido anti-sentido que é complementar à sequência de nucleótidos do receptor da hormona de estimulação folicular (FSH) (WO 00/73416).

Preferencialmente o presente método não se aplica a fêmeas ooforectomizadas ou fêmeas nas que uma estimulação endometrial por composições estrogénicas é minimizada ou inexistente, se não é mediante uma administração combinada de progestagénio e estrogénio, como por exemplo resultado de uma histerectomia.

Outro aspecto da invenção refere-se a um kit farmacêutico que compreende pelo menos 20 unidades de doses orais que contêm o composto estrogénico como foi anteriormente definido neste Pedido de Patente e/ou o composto progestagénico e/ou o composto androgénico como foi anteriormente descrito neste Pedido de Patente, onde pelo menos 10 unidades contêm entre 0.01 e 20 mg, preferencialmente entre 0.05 e 10 mg do composto estrogénico, pelo menos 10 unidades contêm o composto progestagénico numa quantidade equivalente a 30-750 µg de levonorgestrel e pelo menos 10 unidades de dose contêm o composto androgénico numa quantidade equivalente a 5 a 250 mg de deshidroepiandrosterona.

No kit da presente invenção, o composto estrogénico pode estar convenientemente combinado com o composto progestagénico e androgénico numa unidade de dose individual. Consequentemente, o kit preferencialmente compreende pelo menos 10 unidades de dose que contêm entre 0.01 e 20 mg do composto estrogénico, o composto progestagénico numa quantidade equivalente a 30-750 µg de levonorgestrel e o composto androgénico numa quantidade equivalente a 5-250 mg de dehidroepiandrosterona. Um kit farmacêutico que é particularmente adequado para ser utilizado com métodos combinados e sequenciais que habitualmente compreenderá 20 a 35 unidades de

doses orais, onde 10 a 35 unidades contêm uma combinação do composto estrogénico e do composto progestagénico nas quantidades indicadas, 0 a 25 unidades não contêm o composto progestagénico mas sim contêm o composto estrogénico nas quantidades indicadas, e 0 a 8 unidades não contêm o composto estrogénico nem o composto progestagénico.

Um kit farmacêutico que é particularmente apropriado para ser utilizado num regime combinado contínuo ou um regime combinado, este kit compreende pelo menos 20 unidades de doses orais que contêm a combinação do composto progestagénico e o composto estrogénico ou não contêm nenhum destes dois compostos (placebo) e de cujas unidades de dose, pelo menos 15, preferencialmente pelo menos 20 contêm a combinação do composto estrogénico e composto progestagénico e 0 a 8 não contêm composto estrogénico nem composto progestagénico. Se este tipo de kit vai ser utilizado num método combinado contínuo, vantajosamente o kit pode compreender pelo menos 28, preferencialmente pelo menos 60 unidades de dose, cujas unidades de dose contêm todas as combinações do composto estrogénico e do composto progestagénico nas quantidades anteriormente indicadas.

No caso de que se pense utilizar o presente kit num método de HRT que empregue um intervalo sem administração para induzir as menstruações (por exemplo um método combinado ou um método sequencial com pausa) o kit habitualmente compreenderá pelo menos 3 unidades, preferencialmente pelo menos 5 unidades sem composto estrogénico nem composto progestagénico.

Numa forma particularmente preferida de realizar a invenção o presente kit está desenhado para ser utilizado num método sequencial. Habitualmente este kit compreenderá 20 a 35 unidades de doses orais das quais 10 a 32 unidades contêm a combinação do

composto estrogénico e do composto progestagénico, e 3 a 18 unidades contêm o composto estrogénico e nenhum composto progestagénico. Particularmente preferido é um kit que está desenhado para ser utilizado num método sequencial sem pausa significativa. Este tipo de kit, que habitualmente compreenderá 20 a 35 unidades de doses orais, em que 10 a 20 unidades contêm uma combinação do composto estrogénico e do composto progestagénico, 10 a 18 unidades contêm o composto estrogénico e nenhum composto progestagénico e no máximo 1 unidade sem composto estrogénico nem composto progestagénico.

Os kits farmacêuticos de acordo com a presente invenção habitualmente só contêm uma ou mais dos seguintes tipos de unidades de doses orais:

unidades que contêm a combinação do composto estrogénico com o composto progestagénico;

unidades que contêm o composto estrogénico e nenhum composto progestagénico; e

unidades que funcionam eficazmente como placebo.

Preferencialmente o kit compreende pelo menos 20 unidades que contêm a combinação do composto estrogénico com o composto progestagénico ou o composto estrogénico sem nenhum composto progestagénico.

Se o presente kit vai ser utilizado num protocolo combinado ou sequencial, as unidades de doses orais preferencialmente serão dispostas no kit numa sequência fixa correspondente à ordem prevista de administração. A embalagem pode estar provida com as indicações. A embalagem pode ser um tubo ou uma caixa ou uma tira.

A caixa pode ser redonda, quadrada, ou formada de outro modo com os comprimidos dispostos separadamente no seu interior para facilitar a administração. As indicações da data podem aparecer adjacentes a cada pastilha correspondendo aos dias em que cada pastilha deve ser tomada. Preferencialmente a embalagem pode ter algumas indicações sobre a sequência em que os comprimidos devem ser tomados seja qual for a sua forma.

Em termos gerais, as unidades de doses orais no kit da presente invenção são preparados de acordo com os procedimentos farmacêuticos bem conhecidos. O(s) ingrediente(s) activo(s) é (são) combinado(s) com um excipiente aceite na Indústria Farmacêutica e convertidos numa forma aceite por esta Indústria para uma administração oral, por exemplo uma pastilha, cápsula, tablete, granulado, pilula, pó ou grânulos. O excipiente pode incluir veículos farmacêuticos apropriados como diluentes, aglutinantes e lubrificantes. Por exemplo gomas, amidos e açúcares são habitualmente utilizados como veículos farmacêuticos. Os comprimidos e outras unidades de doses orais podem conter de forma adequada materiais como por exemplo aglutinantes (por exemplo hidroxipropilmetilcelulose, polivinilpirrolidina, outros materiais celulósicos e amido), diluentes (por exemplo lactose e outros açúcares, amido, fosfato dicálcico e materiais celulósicos), agentes de desintegração (por exemplo polímeros de amido e materiais celulósicos) e agentes lubrificantes (por exemplo, estearatos e talco).

O(s) ingrediente(s) activo(s) pode(m) compreender desde aproximadamente 0.01 % em peso até aproximadamente 50% em peso da formulação na unidade de dose, sendo a parte restante um excipiente. O(s) ingrediente(s) activo(s) são compostos com o veículo escolhido e por exemplo no caso da pastilha, estes são dispostos num aparelho de moldagem de pastilhas para formar as

pastilhas. De forma alternativa, o material composto pode ser incorporado numa cápsula em forma de pó ou grânulos. O Farmacêutico especializado conhecerá muitas outras opções que podem adequadamente ser utilizadas de acordo com a presente invenção.

A presente invenção é ilustrada mais detalhadamente com os exemplos seguintes, os quais, no entanto, não devem ser considerados limitativos. As formas de realizar a presente invenção anteriormente descritas, nos exemplos seguintes e nas reivindicações anexas podem, separadamente assim como em qualquer combinação entre elas, serem materializadas para realizar a invenção nas suas distintas formas.

EXEMPLOS

Exemplo 1

A cornificação vaginal foi escolhida como o critério de valorização tecidual específico e sensível ao estrogénio para determinar a estrogenicidade do estetrol (E4), após uma administração oral, em ratazanas hipoestrogénicas. Nestes ensaios biológicos o 17 α -etinilestradiol (EE) e o veículo (10% etanol/óleo de sésamo) serviram de controlo. O aumento de peso uterino na ratazana é habitualmente mais utilizado como medida de estrogenicidade. No entanto, o peso uterino também responde à progesterona, testosterona, e a outros agentes que caracteristicamente não são definidos como estrogénios. No início do ano 1920, foi descoberto que o fluido folicular do ovário de porco continha um(uns) factor(es) que provocava uma cornificação/queratinização do epitélio vaginal na ratazana (Allen & Doisy, 1923, JAMA, 81, 819-821; Allen & Doisy, 1924, Am. J. Physiol., 69, 577-588). A resposta denominada cornificação vaginal nas ratazanas proporcionou subsequentemente um ensaio biológico para testar a estrogenicidade.

A cornificação/queratinização vaginal epitelial nas ratazanas ovariectomizadas somente pode ser produzida por compostos considerados como verdadeiros estrogénios (Jones et al, 1973, Fert. Steril. 24, 284-291). A cornificação/queratinização vaginal epitelial representa, portanto, um critério de valorização altamente selectivo para determinar a potência dos estrogénios (Reel et al., 1996, Fund. Appli. Toxicol. 34, 288-305).

As ratazanas CD fêmeas adultas intactas foram ovariectomizadas para induzir uma deficiência estrogénica. Durante sete dias foram feitas lavagens vaginais para garantir que as ratazanas demonstravam esfregaços vaginais de animais castrados (predomínio de leucócitos no esfregaço vaginal, e com um aspecto idêntico a um esfregaço vaginal do diestro). Os esfregaços vaginais dos animais castrados são indicativos de que uma ovariectomia completa foi obtida. O tratamento foi iniciado após finalizados os 7 dias de persistência (dia 0 = primeiro dia de dose). Os animais tomaram uma dose diária durante 7 dias consecutivos. As lavagens vaginais diárias foram feitas durante 7 dias após ter sido iniciada a dosagem para detectar uma cornificação vaginal, como uma indicação da resposta estrogénica. Uma gota do lavado vaginal foi colocada numa lâmina de vidro e examinada num microscópio óptico para detectar a presença ou ausência de células epiteliais cornificadas. Os lavados vaginais foram obtidos antes de uma dosagem durante os dias de 0 a 6 e antes de uma necropsia no 7º dia.

O ensaio biológico da cornificação vaginal foi executado para determinar o perfil estrogénico de E4 quando é oralmente (po) administrado a ratazanas adultas ovariectomizadas. O EE foi utilizado como um controlo positivo. O veículo (10% de etanol/óleo de sésamo) serviu de controlo negativo. Os esteróides foram dissolvidos em etanol absoluto e seguidamente introduzidos na concentração final com óleo de sésamo (10% de etanol em óleo de

sésamo). Ao 7º dia todas as ratazanas (8/8) que tomaram 50 mg/kg/dia de EE tinham desenvolvido uma resposta vaginal estrogénica (quadro 1). Identicamente, ao 7º dia foi observado uma cornificação epitelial vaginal em todas as ratazanas (8/8) tratadas po com qualquer de 0.1, 0.3, 1.0, ou 3.0 mg/kg/dia de E4 (quadro 1), enquanto que os animais tratados com o veículo não exibiram cornificação epitelial vaginal (0/8). Até nas ratazanas a que foram administradas doses relativamente baixas de E4 (por exemplo 0.1 e 0.3 mg/kg/dia), a aparição da cornificação vaginal (definida como a quantidade de animais que responderam ao estudo nos dias 1 a 3) foi tão rápida como a dos animais tratados com EE (quadro 1), demonstrando características da biodisponibilidade do estetrol insuperáveis após uma administração oral.

Quadro 1: Resposta vaginal estrogénica das ratazanas ovariectomizadas tratadas oralmente (po) com 17 α -etinilestradiol (EE) ou estetrol (E4). Os dados são expressos como o número de ratazanas que apresentaram uma cornificação vaginal em relação (rácio) ao número de ratazanas tratadas.

Grupo de tratamento	Via de dosagem	Número de ratas que exibem uma resposta estrogénica / número de ratas tratadas							
		Dia do Estudo							
		Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
0.05 mg/kg/dia de EE	po	0/8	1/8	3/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
Controlo do veículo (2 ml/kg/dia)	po	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8

0.1 mg/kg/dia de E4	po	0/8	0/8	1/8	7/8	8/8	8/8	8/8	8/8
0.3 mg/kg/dia de E4	po	0/8	0/8	1/8	7/8	8/8	8/8	8/8	8/8
1.0 mg/kg/dia de E4	po	0/8	0/8	4/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
3.0 mg/kg/dia de E4	po	0/8	0/8	6/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8

Exemplo 2

A ratazana ovariectomizada envelhecida foi utilizada como modelo para a doença de osteoporose humana. Este é um modelo de animal estabelecido, recomendado pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América (FDA), para interpretar e avaliar os agentes potenciais para a prevenção e tratamento da osteoporose. A eficácia anti-reabsortivas do estetrol (E4) foi testada com uma medição da densidade total mineral óssea trabecular e a resistência óssea ex vivo após 4 semanas de tratamento com necropsopia. O 17 α --etinil-estradiol (EE) e o veículo (1 % etanol/óleo de amendoim) neste ensaio biológico serviram de controlos.

As ratazanas fêmeas Sprague-Dawley com três meses foram falso operadas (Sham) ou ovariectomizadas (OVX) um dia antes do estudo da dosagem. Os animais foram anestesiados utilizando uma mistura anestésica de quetamina/xilazina e foram submetidos a uma ovariectomia bilateral ou foram falso tratados. Uma secção de pelo

na superfície dorsal foi rapada e foi realizada uma incisão ao longo da região lombar da coluna vertebral. A pele foi separada da fáscia subjacente para poder efectuar uma segunda incisão através da musculatura abdominal próxima do caudal dos rins. Os ovários foram seguidamente extirpados e retirados e a musculatura foi fechada com uma sutura única. A incisão da pele foi fechada com a utilização de agrafes cirúrgicos.

Dez animais por cada grupo de tratamento tomaram uma dose oral uma vez ao dia durante quatro semanas consecutivas. A dosagem foi iniciada no 1º dia após terem sido extraídos cirurgicamente os ovários e foi administrada mediante uma alimentação oral por sonda utilizando uma seringa e uma agulha de aço inoxidável para sondas com doses de 0.1 mg/kg/dia de EE, ou qualquer de 2.5, 0.5 ou 0.1 mg/kg/dia de E4. O controlo do veículo foi administrado diariamente a um grupo de animais OVX e a ratazanas falso operadas. Depois do tratamento, as ratazanas anestesiadas foram submetidas a uma punção cardíaca e asfixiadas por inalação de CO₂. A tibia e o fémur foram removidas, os seus tecidos brandos foram limpos, fixados e guardados em 70% de etanol/solução salina a 4°C (tibia) ou solução salina a 4°C (fémur) para análises posteriores.

Uma tomografia computadorizada quantitativa periférica *ex vivo* (pQCT) foi realizada à tibia esquerda por excisão utilizando um Stratec XCT-RM e um software associado (Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim, Alemanha, software versão 5.40). As explorações foram realizadas em 12 % do comprimento máximo da extremidade proximal da tibia. As posições foram comprovadas utilizando a visão de reconhecimento e foi adquirido um corte perpendicular de 0.5 mm no eixo ao longo do eixo tibial de cada sítio. Os reconhecimentos foram analisados utilizando um limiar para o reconhecimento do limite externo. O conteúdo mineral ósseo total e trabecular, a área e a densidade em cada sítio foram determinadas. Os valores

principais são mostrados no quadro 2. Além de que, na figura 1 aparecem os dados de pQCT para indicar uma densidade mineral óssea total.

Quadro 2: Dados da densitometria pQCT da tíbia proximal das ratas Sham e OVX tratadas oralmente (po) com 17 α -etinilestradiol (EE), estetrol (E4) ou um veículo. Os dados são expressos como os valores principais obtidos para cada grupo (n=10).

Grupo de tratamento (n=10)	Via de dosagem	Mineral ósseo total principal			Mineral ósseo trabecular principal		
		Conteúdo (mg/mm)	Área (mm ²)	Densidade (mg/cm ³)	Conteúdo (mg/mm)	Área (mm ²)	Densidade (mg/cm ³)
SHAM + veículo	po	9.36	14.10	664.07	1.49	6.34	235.48
OVX + veículo	po	8.76	14.47	606.61	1.10	6.51	169.63
OVX+0.1 mg/kg/dia de EE	po	9.66	13.87	697.48	1.81	6,24	290.16
OVX + 0.1 mg/kg/dia de E4	po	8.46	14.41	588.62	0.96	6.48	145,46
OVX + 0.5 mg/kg/dia de E4	po	9.74	14.80	660.57	1.60	6.65	243.3
OVX + 2.5 mg/kg/dia de E4	po	9.61	13.59	707.11	1.89	6.12	309.58

A comparação dos dados da densitometria de pQCT da tíbia proximal das ratas falso operadas e OVX demonstrou uma perda consistente óssea total e trabecular no grupo OVX, como o esperado (quadro 2, figura 1). Além de que, houve um aumento consistente em função da dose para cada um dos parâmetros associados com um conteúdo mineral ósseo total e trabecular e densidade mineral óssea nos animais tratados oralmente com E4 (quadro 2, figura 1). Em comparação com as ratas OVX hipoestrogênicas que receberam o tratamento com

veículo sozinho, 0.5 e 2.5 mg/kg/dia de E4 evitaram a reabsorção óssea como o exemplificado para os níveis de densidade mineral óssea total equivalentes às ratazanas falso operadas (figura 1). Além de que, a actividade anti-reabsortivas obtida com a dose mais alta de E4 (2.5 mg/kg/dia) era equivalente ao efeito visto com o controlo positivo de EE.

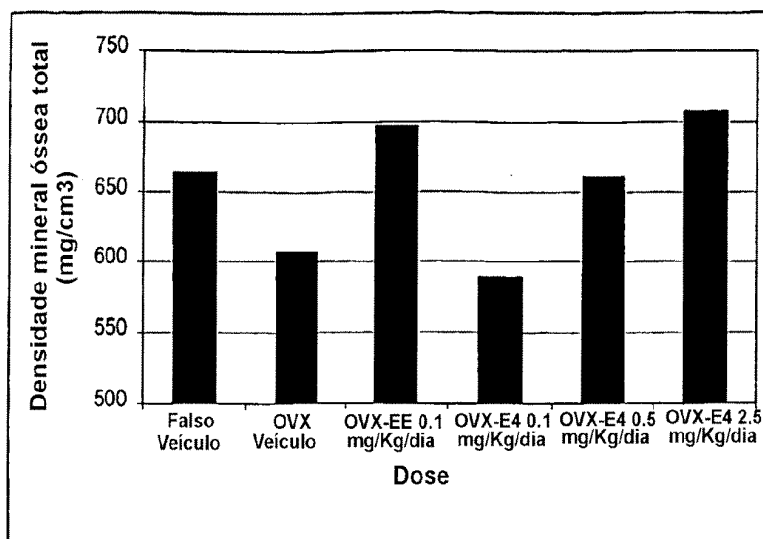


Figura 1: Densidade mineral óssea total da tíbia proximal das ratazanas Sham e OVX tratadas oralmente (po) durante 4 semanas consecutivas com 17 α -etinilestradiol (EE), estretol (E4) ou veículo. Os dados são expressos como os valores principais obtidos para cada grupo (n=10).

Uma interpretação *ex vivo* da resistência óssea biomecânica foi executada com um teste de indentação do fémur distal. Antes do teste mecânico o fémur foi enxaguado numa solução salina fria e cuidadosamente limpa para retirar qualquer resto de tecido brando ainda existente. Um segmento de 3 mm da metáfise femoral distal foi cortado directamente proximal ao côndilo femoral com uma serra Diamond de baixa velocidade com uma irrigação constante de solução salina. A carga foi aplicada com um indentador cilíndrico (com uma face de teste plana de 1.6 mm de diâmetro) no centro da cavidade medular na face distal do segmento. O indentador penetrou na cavidade a uma deslocação constante de 6 mm/min. a uma profundidade

de 2 mm antes de inverter a carga.

Quadro 3: Prova de indentação do fêmur distal das ratazanas Sham e OVX tratadas oralmente (po) com 17 α -etinilestradiol (EE), estetrol (E4) ou um veículo. Os dados são expressos como os valores principais obtidos para cada grupo (n=10).

Grupo de tratamento (n=10)	Via de dosagem	Carga máxima (N)	Rigidez (N/mm)	Energia (mJ)	Resistência definitiva (N/mm ²)
SHAM + veículo	po	8.61	131.96	0.48	4.57
OVX + veículo	po	2.77	42.08	0.21	1.47
OVX + 0.1 mg/kg/dia de EE	po	9.05	169.12	0.53	4.80
OVX + 0.1 mg/kg/dia de E4	po	1.50	28.00	0.09	0.80
OVX + 0.5 mg/kg/dia de E4	po	7.25	132.57	0.31	3.85
OVX + 2.5 mg/kg/dia de E4	po	13.07	173.12	0.68	6.94

A carga máxima, rigidez e energia absorvida foram determinadas com curvas de deslocação de carga. A resistência definitiva foi calculada dividindo a carga máxima pela área do indentador. Os valores principais de carga máxima, rigidez, energia e resistência definitiva são mostrados no quadro 3. Além de que, os principais valores de resistência definitiva são mostrados na figura 2. Em comparação com as ratazanas falso operadas, a força mecânica de um osso esponjoso resulta ser marcadamente reduzida nas ratazanas OVX

tratadas com um veículo sozinho (quadro 3, figura 2). As reduções de carga máxima, rigidez, energia e resistência definitiva foram de -68%, -68%, -27% e -68%, respectivamente, claramente acompanhadas com perda da densidade mineral óssea nas ratazanas com deficiência estrogénica. O tratamento oral das ratazanas OVX hipoestrogénicas com E4 impediu a declinação da carga máxima, rigidez, energia e resistência definitiva, em função da dose (quadro 3, figura 2). Adicionalmente, a eficácia obtida com a dose máxima de E4 (2.5 mg/kg/dia) resulta ser até superior à do controlo positivo de EE (quadro 3, figura 2).

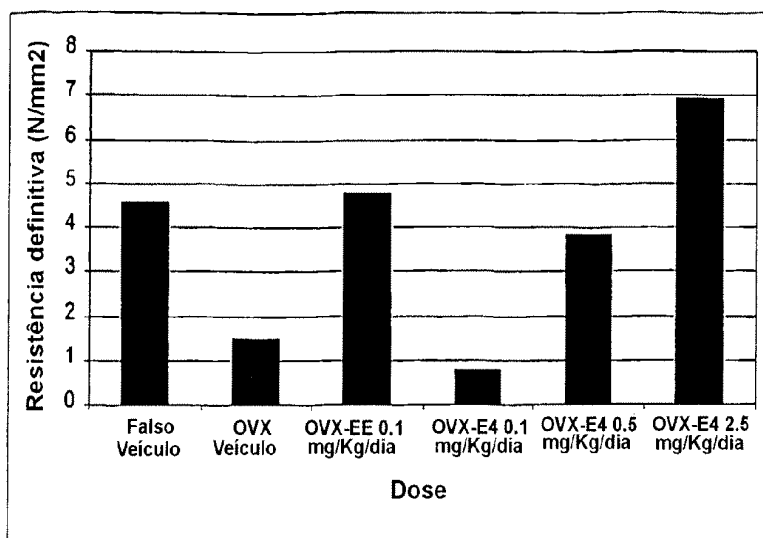


Figura 2: Resistência definitiva principal do fémur distal das ratazanas Sham e OVX tratadas oralmente (po) durante 4 semanas consecutivas com 17-etinilestradiol (EE), estretol (E4) ou veículos. Os dados são expressos como os valores principais obtidos para cada grupo (n=10)

Exemplo 3:

Foi utilizada a ratazana ovariectomizada (OVX) morfínica independente como modelo para os calores pós-menopáusicos. Foi comprovado o

poder do estetrol (E4) para prevenir os aumentos de temperatura corporal da cauda, habitualmente acompanhados por uma queda da temperatura corporal central, depois de ser testada a supressão opiácia induzida por naloxona. Neste ensaio biológico o 17 α -etinil-estradiol (EE) e um veículo (hidroxipropil-beta-ciclodextrina 20% em peso/volume) serviram de controlos.

O sintoma mais característico e comum da menopausa humana é os calores, que são experimentados por mais de 70% das mulheres menopáusicas. Embora seja ainda desconhecido o exacto mecanismo subjacente a esta instabilidade vasomotora, as características essenciais dos calores são um reflexo da adaptação mediada centralmente de um declínio progressivo dos níveis de estrogénios. As mulheres que sofrem de calores, os sintomas são manifestadas por:

- 1) aumentos regionais rápidos da temperatura do corpo;
- 2) redução da temperatura corporal interna;
- 3) aumento do ritmo cardíaco sem que se altere a pressão arterial;
e
- 4) aumentos em intervalos de tempo curtos de libertação da hormona luteinizante (LH) e β -endorfina.

O modelo da ratazana ovariectomizada morfino-dependente (OVX) tem sido proposto como modelo animal para os calores por diferentes investigadores (Katovich et al, 1986, Maturitas, 67-76; Merchanthaler et al. 1998, Maturitas, 307-316). Durante a supressão opiácia com a naloxona antagonista da morfina, a temperatura corporal na cauda (TST) aumenta e este aumento é acompanhado por uma descida da temperatura corporal interna.

Adicionalmente, as mudanças da temperatura são acompanhadas por variações na LH e uma taquicardia transitória. Estes eventos são idênticos em magnitude e natureza temporal aos que são observados durante os calores menopáusicos.

As ratas OVX de 8 semanas foram previamente tratadas oralmente (po) durante sete dias consecutivos com estetrol (E4), 17 α -etinilestradiol (EE) ou um veículo de controle (20% em peso/volume de hidróxi-propil-beta-ciclodextrina) e na manhã seguinte de uma supressão opiácia induzida por naloxona em animais morfíno-dependentes. Três dias antes do início da dosagem, os animais foram anestesiados utilizando uma mistura de quetamina/xilazina anestésica e submetidos a uma ovariectomia bilateral. Foi rapada uma secção do pelo na superfície dorsal e foi realizada uma incisão ao longo da região lombar da coluna vertebral. A pele foi separada da fáscia subjacente para que pudesse ser feita uma segunda incisão através da musculatura abdominal próxima do caudal dos rins. Os ovários foram posteriormente exteriorizados e removidos e a musculatura foi fechada com uma sutura única. A incisão da pele foi fechada utilizando agrafes cirúrgicos. Seis ratas por grupo de tratamento tomavam uma dose diária durante oito dias consecutivos antes de e incluído o dia de supressão opiácia induzido por naloxona (a sessão de calores). A dosagem foi iniciada três dias depois de terem sido extirpados cirurgicamente os ovários e foi administrada por sonda utilizando uma seringa e uma agulha de aço inoxidável para sondas. A dependência à morfina foi induzida com uma implantação de umas pastilhas subcutâneas contendo 75 mg de morfina. A primeira pastilha foi implantada cinco dias antes dos calores com uma ligeira anestesia por inalação. Três dias antes da sessão dos calores, outras duas pastilhas de morfina foram implantadas nas mesmas condições.

Para as manipulações com calores, os animais foram colocados numa gaiola de ensaio. Seguindo um período de adaptação de 5 a 10 minutos, as ratazanas foram anestesiadas com quetamina HCl aproximadamente durante 10 minutos antes do período dos calores. Um eléctrodo sensível à temperatura foi fixado na superfície ventral da cauda com adesivo e o eléctrodo foi ligado a um registador multi-canais temperaturas. A temperatura corporal da cauda foi registada até à sua estabilização e os animais receberam uma injeção de naloxona HCl (1 mg/kg). Continuaram-se com os registos das temperaturas durante mais um período de 60 minutos e a temperatura era registada de 5 minutos em 5 minutos. No final da sessão dos calores, todos os animais foram mortos por asfixia com CO₂ seguida de uma deslocação cervical.

Como o esperado, o controlo do veículo não foi efectivo para a prevenção dos aumentos de TST induzida por naloxona nas ratazanas OVX adictas à morfina (figura 3). O 17 α -etinilestradiol (EE), na dose individual testada com 0.3 mg/kg/dia, impediu os aumentos de TST induzida por naloxona nas ratazanas OVX adictas à morfina (figura 3). O tratamento oral com estetrol (E4) mostrou um claro efeito em função da dose (figura 3). As três doses máximas de E4 (0.3, 1.0 e 3.0 mg/kg/dia) atenuaram todos os TST, com a dose mais elevada (3.0 mg/kg/dia) tiveram uma resposta supressora idêntica ao do estrogénio oral potente, 17 α -etinilestradiol (EE).

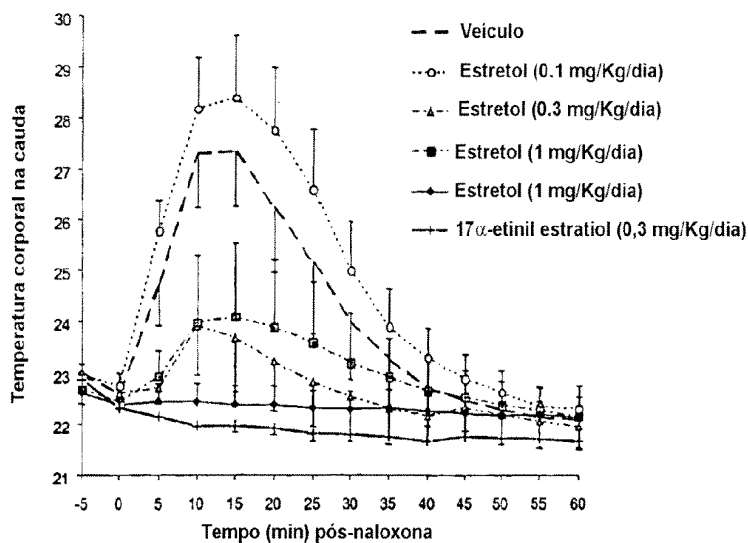


Figura 3: Efeitos do estretol (E4) e do 17 α -etinilestradiol (EE) na resposta de calor induzida por naloxona nas ratas fêmeas ovariectomizadas.

Exemplo 4

Para avaliar a biodisponibilidade oral do estretol (E4) e para determinar a meia-vida de eliminação, foram executados estudos de doses orais (po) e subcutâneas (sc) únicas em ratas fêmeas Sprague Dawley seguida de frequentes recolhas de amostras de sangue durante um intervalo de 24 horas.

Nas Ratas fêmeas Sprague Dawley foi colocado no coração um cateter permanente Silastic, como o que tinha sido descrito por Kuipers et al. (1985, Gastroenterology, 88, 403-411). Deixamos que as ratas durante 5 dias se recuperassem da cirurgia e foi-lhes administrado 0.05, 0.5, ou 5 mg/kg de E4 em 0.5 ml de óleo de amendoim. Para uma administração sc, o E4 foi injectado na zona do pescoço utilizando uma seringa de 1 ml e uma agulha de 20g. Para uma administração po de E4, as ratas foram ligeiramente

anestesiadas com halotano/N₂O/O₂ e o E4 foi aplicado directamente de forma intragástrica utilizando um entubador de plástico no estômago. As amostras de sangue foram subseqüentemente colhidas através do cateter no coração em tubos heparinizados em períodos de 0.5, 1, 2, 4, 8 e 24 horas. Os eritrócitos foram eliminados por centrifugação a 5000xg durante 10 minutos a 4°C e o plasma sanguíneo foi guardado a -20°C. Depois de descongelar as amostras de plasma, foi empregue uma extracção líquido-líquido (hexano e éter dietílico) para preparar as amostras com um conteúdo de E4 em plasma para uma análise de HPLC (Perkin Elmer 200) e uma espectroscopia de massa em série utilizando um espectrómetro de massa em série PE Sciex 3000 e uma interface APCI. Com cada lote de amostra, foi registada uma curva de calibração com 6 calibradores. A curva de calibração foi calculada utilizando uma regressão linear (coeficiente de correlação > 0.98), que permitiu a quantificação das concentrações em plasma. Os dados de cada plasma das ratazanas, foram colhidos a diferentes intervalos de tempo.

Os dados da concentração em plasma de E4 foram analisados com "WinNonLin, versão 3.1" e os parâmetros farmacocinéticos envolvidos para C_{max} , meia-vida e AUC_{0-24} . Especialmente, com a utilização de níveis de dose inferiores e intermédios a 0.05, 0.5 mg/kg, o E4 demonstrou uma biodisponibilidade oral idêntica à biodisponibilidade obtida com uma administração sc (80-100 %). No nível de dose máxima testada, 5.0 mg/kg de E4, as cinéticas de absorção deram origem a uma biodisponibilidade oral aproximada de 30 a 60% de E4 administrada sc. Interessantemente, o E4 teve uma meia-vida relativamente grande de 2 a 3 horas, permitindo a detecção dos níveis bioactivos de E4 não conjugado em todos os períodos de tempo durante um intervalo de 24 horas.

Exemplo 5

Foi utilizado um ensaio de fixação de esteróides competitivo estabelecido (Hammond e Lahteenmaki. 1983. Clin Chem Acta 132: 101-110) para determinar a afinidade da fixação relativa do estetrol (E4), 17 α -etinilestradiol (EE2), 17 β -estradiol (E2), testosterona (T) e 5 α -dihidrotestosterona (DHT) para a Globulina de Ligação às Hormonas sexuais humanas (SHBG).

A SHBG humana foi purificada a partir de soro de rato transgênico, como foi previamente descrito (Avvakumov GV et al., 2000. J Biol Chem 275: 25920-25925). A SHBG humana preparado desta maneira foi submetida a um ensaio para ser pura a >99% por electroforese em gel de poliacrilamida em condições de desnaturalização. As suas características de fixação dos esteróides não se distinguem da SHBG no soro humano (Avvakumov GV et al., 2000 J Biol Chem 275: 25920-25925). O ensaio *in vitro* inclui a utilização da SHBG humana purificada e [³H]DHT ou [³H]estradiol como ligandos marcados. A SHBG humana foi tratada durante 30 minutos à temperatura ambiente com uma suspensão de carvão revestido com dextrano (DCC) numa solução salina com tampão de fosfato (PBS) para eliminar qualquer ligando de esteróides. Após a centrifugação (2,000 x g durante 10 min.) para sedimentar o DCC, o sobrenadante contendo a SHBG humana foi diluído em PBS numa concentração de 1 nM baseada na sua capacidade de fixação dos esteróides.

Partes alíquotas duplicadas (100 μ l) desta solução da SHBG humana foram posteriormente incubadas com um volume igual de [³H]DHT ou de [³H]estradiol de 10 nM, juntamente com 100 μ l de PBS sozinho ou a mesma quantidade de PBS contendo concentrações maiores de ligandos de esteróides não marcados como competidores em tubos de ensaio de poliestireno. Após incubação durante 1 hora à temperatura ambiente, as misturas da reacção foram colocadas num

banho de gelo durante mais 15 minutos. As partes alíquotas (600 μ l) da suspensão gelada de DCC foram seguidamente adicionadas a cada tubo, e depois uma mistura breve de 2 segundos, cada tubo foi incubado num banho com gelo durante 10 ou 5 minutos dependendo dos ligandos marcados empregues, respectivamente [3 H]DHT ou [3 H]estradiol. Os ligandos não ligados adsorbidos em DCC foram posteriormente eliminados por centrifugação (2,000 x g durante 15 minutos a 4°C), e as quantidades dos ligandos marcados [3 H] ligados à SHBG foram calculadas numa mistura de cintilação ACS de 2 ml com a utilização de um espectrofotómetro de cintilação líquida. As quantidades médias dos ligandos marcados [3 H] ligados à SHBG em cada concentração do competidor (B) foram expressas como uma percentagem das quantidades médias dos ligandos marcados [3 H] ligados à SHBG na ausência do competidor (B_0), e foram marcadas em relação à concentração de competidor em cada tubo de ensaio.

Os resultados dos ensaios de ligação competitivos são mostrados na figura 4. Como é claramente evidente com estes ensaios de ligação competitivos, o estetrol não se liga totalmente à SHBG humana quando é testado com ligandos marcados [3 H]DHT ou [3 H]estradiol. Estes num contraste marcado com esteróides do etinilestradiol, 17 β -estradiol, testosterona e 5 α -dihidrotestosterona, os quais, nesta ordem, mostram uma afinidade de ligação relativa aumentada para a SHBG humana. Importantemente, a ligação do estetrol à SHBG foi insignificante quando comparado com os outros estrogénios testados do etinilestradiol e do 17 β -estradiol.

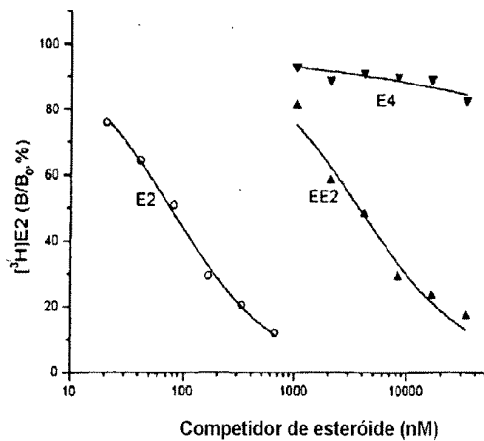
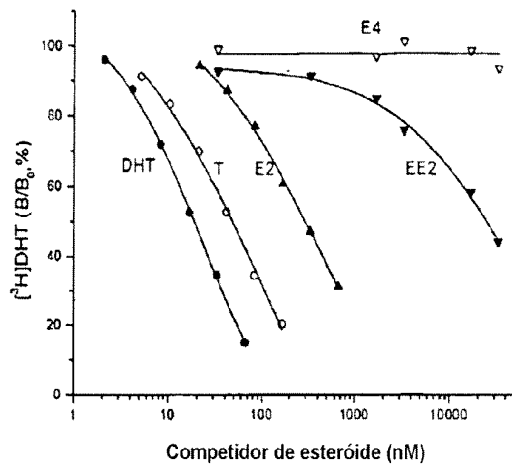


Figura 4: Deslocação competitiva do $[^3\text{H}]\text{DHT}$ (painel A) e $[^3\text{H}]\text{estradiol}$ (painel B) desde o sítio de fixação dos esteróides da Globulina de Ligação às Hormonas sexuais humanas. Os ligandos dos esteróides não marcados utilizados como competidores são os seguintes: estretol (E4), $17\alpha\text{-etinil-estradiol}$ (EE2), $17\beta\text{-estradiol}$ (E2), testosterona (T) e $5\alpha\text{-dihidrotestosterona}$ (DHT)

Exemplo 6

Os compostos estrogénicos da presente invenção podem ser processados de forma adequada, juntamente com aditivos, excipientes e/ou agentes aromatizantes habituais na farmácia

galénica, de acordo com os métodos habituais nas formas usuais de administração. Para uma administração oral, adequada existem, em particular, comprimidos, pílulas, cápsulas, pílulas, suspensões, ou soluções.

Comprimidos de estetrol: 1,000 comprimidos de 185 mg, compreendendo 1.5 mg de estetrol e 0.15 mg de levonorgestrel, são produzidos a partir da seguinte formulação:

Estetrol	1.500 g
Levonorgestrel	0.150 g
Polivinilpirrolidona (Kollidon 25 [®] ex BASF)	13.500 g
Lactose	135.645 g
Celulose microcristalina (Avicel pH 101 [®])	26.250 g
Glicerilpalmitoestearato (Precirol [®])	2.775 g
Sílica anidro coloidal (Aerosil 200 [®])	1.000 g
Crospovidona (poliplasdon XL [®])	4.000 g
Agente corante	0.180 g

Os comprimidos que adicionalmente contenham 50 mg de dehidroepiandrosterona podem ser obtidos a partir de uma formulação idêntica.

Lisboa, 6 de Março de 2007.

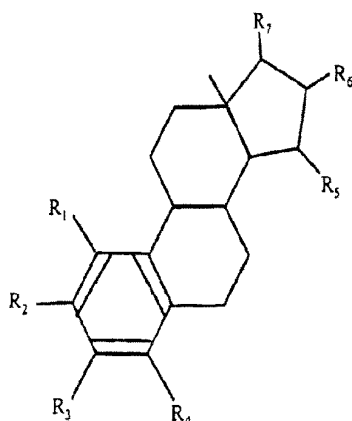
Pela Requerente
O Agente Oficial



ROSÁRIO CRUZ GARCIA
Agente Oficial da Propriedade Industrial
Av.º Conselheiro Fernando de Sousa, 11-15.º
1070-072 LISBOA

REIVINDICAÇÕES

1. A utilização de um composto estrogénico seleccionado do grupo composto pelas substâncias representadas pela seguinte fórmula:



em que R₁, R₂, R₃, R₄ independentemente são um átomo de hidrogénio, um grupo hidróxilo ou um grupo alcóxi com 1 a 5 átomos de carbono; até 3 de R₅, R₆, R₇ é um grupo hidróxi; e no máximo de 3 de R₁, R₂, R₃, R₄ são átomos de hidrogénio; precursores capazes de libertar uma substância de acordo com a fórmula anteriormente mencionada quando são utilizadas no método da presente invenção, sendo os ditos precursores derivados de substâncias representadas pela fórmula, na que o átomo de hidrogénio de pelo menos um dos grupos hidróxilo na dita fórmula foi substituído por um radical acilo de um ácido carboxílico, sulfónico ou sulfámico hidrocarbonado de 1 a 25 átomos de carbono, um grupo tetrahydrofurânico; tetrahydropirano; ou uma cadeia linear ou ramificada de um resíduo glicosídico contendo 1 a 20 unidades glicosídicas por resíduo; e misturas de uma ou várias

das substâncias e/ou dos precursores anteriormente citadas; na fabricação de uma composição farmacêutica utilizada numa terapia hormonal de substituição em mamíferos, **caracterizado por** o dito método compreender a administração oral do dito composto estrogénico e de um composto progestagénico a um mamífero numa quantidade eficaz para prevenir e tratar os sintomas de hipoestrogenismo.

2. A utilização de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** os sintomas do hipoestrogenismo serem seleccionados do grupo composto por: osteoporose, arterioesclerose, sintomas climatéricos, doenças cognitivas e doença de Alzheimer.

3. A utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada por** R_3 representar um grupo hidróxilo ou um grupo alcóxi.

4. A utilização de acordo com uma das reivindicações 1 a 3 **caracterizada por** menos 3 dos grupos R_1 , R_2 , R_3 e R_4 representarem átomos de hidrogénio.

5. A utilização de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizada por** o método compreender a administração oral ininterrupta durante um período de pelo menos 10 dias, preferencialmente de pelo menos 20 dias, do composto estrogénico.

6. A utilização de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada por** o método compreender a administração oral ininterrupta durante um período de pelo menos 10 dias de uma combinação do composto estrogénico e de um composto progestagénico.

7. A utilização de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada por** o método compreender a administração oral ininterrupta da composição do composto estrogénico e do composto progestagénico durante um período de pelo menos 28 dias, preferencialmente de pelo menos 60 dias.

8. A utilização de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada por** o método compreender um intervalo de pelo menos 2 dias, preferencialmente 3 a 9 dias durante o qual nenhum composto progestagénico e nenhum composto estrogénico é administrado e por a diminuição resultante na concentração no soro do composto progestagénico e do composto estrogénico induzir a menstruação.

9. A utilização de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada por** o método compreender a administração oral ininterrupta do composto estrogénico durante um período de pelo menos 28 dias, preferencialmente de pelo menos 60 dias, e **por** seguidamente ser administrado o combinado do composto estrogénico e do composto progestagénico, por o composto estrogénico sem nenhum composto progestagénico ser administrado durante 3 a 10 dias consecutivos e a resultante diminuição na concentração no soro do composto progestagénico induzir à menstruação.

10. A utilização de acordo com uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizada por** o método compreender a administração oral pelo menos uma vez ao dia do composto estrogénico e/ou do composto progestagénico durante um período de pelo menos 10 dias, preferencialmente de pelo menos 20 dias.

11. A utilização de acordo com uma das reivindicações de 1 a 10, **caracterizada por** o composto estrogénico ser oralmente administrado numa quantidade inferior a 1 mg ao dia por kg de peso corporal, preferencialmente inferior a 400 µg ao dia por kg de peso corporal, mais preferencialmente 200 µg de peso corporal ao dia.

12. A utilização de acordo com uma das reivindicações de 1 a 11, **caracterizada por** o composto estrogénico ser oralmente administrado numa quantidade inferior a 1 µg ao dia por kg de peso corporal, preferencialmente inferior a 2 µg ao dia por kg de peso corporal, e mais preferencialmente de pelo menos 5 µg ao dia por kg de peso corporal.

13. A utilização de acordo com uma das reivindicações de 1 a 12, **caracterizada por** o composto progestagénico ser administrado numa quantidade que é equivalente a uma dose diária oral diária de 0.3 a 20 µg de levonorgestrel por kg de peso corporal, preferencialmente de 0.5 a 5 µg de levonorgestrel por kg de peso corporal.

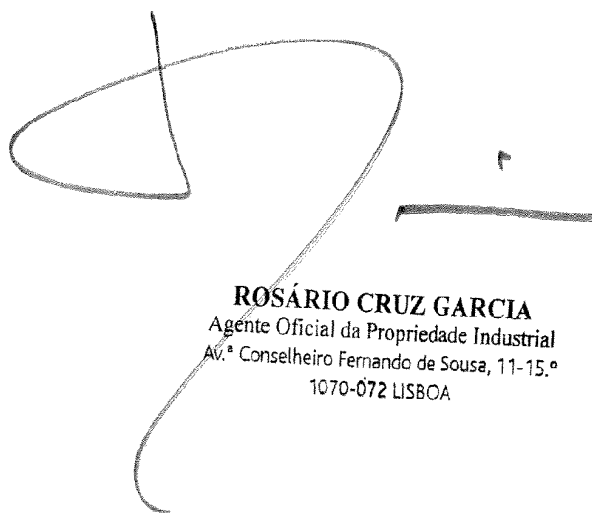
14. Um kit farmacêutico **caracterizado por** este compreender pelo menos 20 unidades de doses orais com o composto estrogénico como as definidas na reivindicação 1 e/ou um composto progestagénico e/ou um composto androgénico, **por** pelo menos 10 unidades conterem entre 0.01 e 20 mg do composto estrogénico, **por** pelo menos 10 unidades conterem o composto progestagénico numa quantidade equivalente a 30 a 750 µg de levonorgestrel e pelo menos 10 unidades de dose conterem a dose do composto androgénico numa quantidade equivalente a 5 a 250 mg de dehidroepiandrosterona.

15. Um kit farmacêutico de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado por** este compreender pelo menos 10 unidades de doses orais que contêm entre 0.01 e 20 mg do composto estrogénico, uma quantidade do composto progestagénico equivalente de 30 a 750 µg de levonorgestrel e uma quantidade do composto androgénico equivalente de 5 a 250 mg de dehidroepiandrosterona.

16. Um kit farmacêutico de acordo com a reivindicação 14 ou 15, **caracterizado por** o composto androgénico ser seleccionado do grupo composto por: dehidroepiandrosterona (DHEA), danazol, gestrinona, ésteres de testosterona, precursores capazes de libertar estes andrógenos quando são utilizados no método da presente invenção e misturas destes.

Lisboa, 6 de Março de 2007.

Pela Requerente
O Agente Oficial



ROSÁRIO CRUZ GARCIA
Agente Oficial da Propriedade Industrial
Av.º Conselheiro Fernando de Sousa, 11-15.º
1070-072 LISBOA