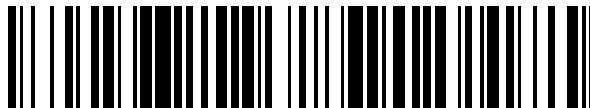


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 091**

51 Int. Cl.:
A61K 31/473 (2006.01)
A61K 31/48 (2006.01)
A61P 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08751001 .2**
96 Fecha de presentación: **01.02.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2109449**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.10.2009**

54

Título: **MEDICAMENTO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENDOMETRIOSIS.**

30

Prioridad:
01.02.2007 EP 07250429
29.06.2007 GB 0712626
29.06.2007 US 947165 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.12.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.12.2011

73

Titular/es:
Ferring B.V.
Polaris Avenue 144
2132 JX Hoofddorp, NL

72

Inventor/es:
PELLICER-MARTINEZ, Antonio;
SIMON-VALLES, Carlos y
NOVELLA-MAESTRE, Edurne

74

Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 370 091 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Medicamento para el tratamiento de la endometriosis

5 La presente invención se refiere a medicamentos para el tratamiento de la endometriosis.

La endometriosis es una enfermedad ginecológica crónica benigna. Puede definirse como la presencia de tejido endométrico, que comprende tanto epitelio glandular como estroma, fuera de la cavidad uterina. Es un trastorno ginecológico benigno que, en una subpoblación de pacientes femeninas, puede desembocar en una enfermedad agresiva. La endometriosis está asociada a diversos síntomas molestos incluyendo dismenorrea, dispaurenia, dolor pélvico y fertilidad reducida.

Es conocido que la angiogénesis (el proceso mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes) puede ser importante en el desarrollo de la endometriosis, y que el factor de permeabilidad vascular/factor de crecimiento endotelial vascular (VP/VEGF) tiene un papel en la génesis vascular y tanto en la angiogénesis fisiológica como patológica. Se ha estimado la eficacia potencial de la terapia antiangiogénica para tratar la endometriosis usando un estudio que usa tejidos endométricos humanos transplantados a ratones sin pelo inmunocomprometidos. Se administraron cuatro agentes antiangiogénicos diferentes tres semanas después de transplantar los explantes endométricos (Nap y col., 2004). Los cuatro inhibidores fueron capaces de reducir el tamaño de los explantes establecidos y se detuvo la formación de nuevos vasos sanguíneos. Sin embargo, los agentes antiangiogénicos conocidos son altamente tóxicos y bastante difíciles de introducir en un contexto clínico en seres humanos.

Se ha encontrado inesperadamente ahora que pueden usarse composiciones que incluyen un agonista de dopamina para tratar la endometriosis.

Por lo tanto, la presente invención proporciona el uso de un agonista de dopamina en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la endometriosis en el que el agonista de dopamina interacciona con un receptor de dopamina imitando una acción dopamínica. La presente invención proporciona también un agonista de dopamina para uso en el tratamiento y/o la prevención de la endometriosis en el que el agonista de dopamina interacciona con un receptor de dopamina imitando una acción dopamínica. En la presente memoria, el término "tratamiento de la endometriosis" incluye el tratamiento para reducir (o eliminar) la cantidad de tejido endométrico que está presente fuera de la cavidad uterina (por ejemplo, reducción o eliminación de lesiones endometriósicas) y/o el tratamiento para reducir y/o mejorar uno o más síntomas asociados a la endometriosis (por ejemplo, tratamiento para mejorar y/o reducir los síntomas de dismenorrea; tratamiento para mejorar y/o reducir los síntomas de dispaurenia y/o tratamiento para mejorar y/o reducir el dolor pélvico). El término "tratamiento de la endometriosis" incluye el tratamiento para reducir el número de casos, y/o reducir el tamaño de casos, de tejido endométrico que está presente fuera de la cavidad uterina (por ejemplo, reducción del número y/o tamaño de las lesiones endometriósicas). El término "tratamiento de la endometriosis" incluye el tratamiento para reducir el número de glándulas endométricas. El término "tratamiento de la endometriosis" incluye el tratamiento que da como resultado uno o más de: una rebaja significativa del porcentaje de lesiones endometriósicas activas, una pérdida significativa de la celularidad y la organización que se manifiestan características de tejido atrófico o degenerativo en lesiones endometriósicas y una rebaja significativa del número de nuevos vasos sanguíneos en las lesiones endometriósicas. El término "tratamiento de la endometriosis" incluye el tratamiento para reducir el número y/o tamaño de las lesiones endometriósicas en uno o más de ovario, fondo de saco vesicouterino, ligamentos uterosacros, superficies posteriores del útero, ligamento ancho, peritoneo pélvico restante, intestino, tracto urinario (incluyendo, por ejemplo, vejiga y/o uréteres).

El término endometriosis incluye, por ejemplo, endometriosis peritoneal, endometriosis ovárica y endometriosis profunda.

En la presente memoria, el término agonista de dopamina significa un compuesto que actúa como la dopamina, por ejemplo, un fármaco que interacciona (por ejemplo, se une específicamente) con un receptor de dopamina imitando una acción dopamínica. No incluye compuestos que son exclusivamente "sustancias dopaminérgicas", concretamente, exclusivamente compuestos que, mediante diferentes mecanismos de acción, aumentan los niveles de dopamina. El término agonista de dopamina no incluye los indenopirrolcarbazoles con puente dados a conocer en el documento US 6359130.

Se ha encontrado anteriormente que los agonistas de dopamina son útiles en el tratamiento o la prevención del síndrome de hiperestimulación ovárica (SHEO) (documento WO 2006117608). Esta es una afección en que los capilares aumentan significativamente su permeabilidad vascular. Se encontró que los agonistas de dopamina son capaces de revertir este efecto. Sin embargo, la afección endometriosis y la eficacia potencial de la terapia antiangiogénica para tratar la endometriosis no se dan a conocer aquí. El documento RU2273481 da a conocer el tratamiento de la infertilidad.

Los agonistas de dopamina que interaccionan con un receptor de dopamina imitando una acción dopamínica dentro

de los términos de la invención incluyen, pero sin limitación, amantadina, bromocriptina, cabergolina, quinagolida, lisurida, pergolida, ropinirol y pramipexol. Es un agonista de dopamina preferido para uso en la presente invención la cabergolina. Es un agonista de dopamina preferido para uso en la presente invención la quinagolida. Los denominados “agonistas de dopamina parciales” (por ejemplo, tergurida) pueden usarse también según la invención. Sin embargo, se prefiere el uso de agonistas de dopamina.

Preferiblemente, se usa un solo agonista de dopamina.

El agonista de dopamina puede administrarse a una dosis (por ejemplo, una dosis oral a un paciente humano) de entre 25 µg/día a 80 mg/día, preferiblemente entre 50 µg/día y 5 mg/día, más preferiblemente entre 300 µg/día y 1 mg/día; las dosis adecuadas dentro de este intervalo dependen del agonista de dopamina que se use, como resulta evidente para los especialistas en la materia.

En una realización preferida, el agonista de dopamina es la cabergolina. Preferiblemente, la cabergolina se administra a una dosis (por ejemplo, una dosis oral a un paciente humano) de entre 0,01 y 12,5 mg/semana, preferiblemente entre 0,1 y 10 mg/semana, más preferiblemente entre 0,5 mg y 5 mg/semana, más preferiblemente a una dosis de entre 3,5 mg/semana y 4 mg/semana. El agonista de dopamina puede administrarse, por ejemplo, como una dosis diaria única (de, por ejemplo, entre 0,1 mg/día y 5 mg/día, de 0,2 mg/día a 1 mg/día, por ejemplo, 0,5 mg/día); o la dosis diaria puede dividirse en dos o más subdosis para tomar en momentos diferentes durante un periodo de 24 horas. El agonista de dopamina (cabergolina) puede administrarse como una dosis diaria a los niveles anteriores, o como dosis equivalentes, por ejemplo, una vez por semana, dos veces por semana o cada dos días. En un régimen, se administra el agonista de dopamina (por ejemplo cabergolina) a una dosis total de entre 3,5 y 12,5 mg/semana (por ejemplo, 4 mg/semana, 7 mg/semana, 10 mg/semana).

En otra realización, el agonista de dopamina es la quinagolida. Preferiblemente, la quinagolida se administra a una dosis (por ejemplo, una dosis oral a un paciente humano) de entre 25 y 1000 µg/día, preferiblemente entre 25 y 500 µg/día, más preferiblemente entre 25 y 300 µg/día. El agonista de dopamina puede administrarse como, por ejemplo, una dosis diaria única; o la dosis diaria puede dividirse en dos o más subdosis para tomar en momentos diferentes durante un periodo de 24 horas. El agonista de dopamina (quinagolida) puede administrarse como una dosis diaria a los niveles anteriores, o como dosis equivalentes, por ejemplo, una vez por semana, dos veces por semana o cada dos días.

En otra realización, el agonista de dopamina es la bromocriptina. Preferiblemente, la bromocriptina se administra a una dosis (por ejemplo, una dosis oral a un paciente humano) de entre 10 y 80 µg/día, preferiblemente de 10 a 40 µg/día.

En una realización, el agonista de dopamina se usa como el único tratamiento médico para la endometriosis. En otras palabras, el agonista de dopamina puede usarse en ausencia de otros tratamientos médicos o quirúrgicos (por ejemplo, en ausencia de danazol).

En una realización adicional, la administración de un agonista de dopamina puede combinarse con otros tratamientos médicos o quirúrgicos para la endometriosis (por ejemplo, AINE y/o tratamientos hormonales (danazol, AO, acetato de medroxiprogesterona, otras progestinas, agonistas y antagonistas de GnRH e inhibidores de aromatasa). En una realización adicional, puede usarse un tratamiento quirúrgico o tratamiento médico antes, durante o después del tratamiento con agonista de dopamina. Estas realizaciones se debaten con más detalle en los ejemplos siguientes.

Se ha encontrado también que la administración de un agonista de dopamina a un paciente necesitado de ello puede proporcionar beneficios clínicos sustanciales tales como, por ejemplo: una rebaja significativa del porcentaje de lesiones endometriósicas activas, una pérdida significativa de celularidad y la organización que se manifiestan características de tejido atrófico o degenerativo en lesiones endometriósicas y una rebaja significativa del número de nuevos vasos sanguíneos en lesiones endometriósicas.

Los medicamentos basados en agonistas de dopamina tienen también la ventaja de una alta tolerancia de dosis, con registros de uso clínico seguro y bien documentado.

Adicionalmente, se ha encontrado que el agonista de dopamina (por ejemplo cabergolina) puede administrarse durante largos periodos de tiempo (por ejemplo, de 1 a 3 semanas (por ejemplo de 1 a 21 días, por ejemplo de 1 a 14 días), de 1 a 3 meses, de 1 día a 6 meses, de 1 día a 12 meses o de 1 día a 2 años o más) con efecto terapéuticamente beneficioso y un bajo riesgo de efectos secundarios. La administración puede ser continua, por ejemplo con una dosis diaria o semanal, o puede interrumpirse con una o más interrupciones de, por ejemplo, una serie (por ejemplo de 1 a 3) de semanas o una serie (por ejemplo de 1 a 3) de meses. El agonista de dopamina puede administrarse mientras que el dolor (u otro síntoma) continúe.

El agonista de dopamina (por ejemplo cabergolina o quinagolida) puede administrarse a un sujeto embarazado.

El tratamiento o prevención de la endometriosis puede asociarse a la rebaja de la cantidad de glándulas endométricas.

En un ejemplo de la invención, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) puede ser la diana del agonista de dopamina como factor en el desarrollo de la endometriosis. Las isoformas VEGF₁₂₁ y VEGF₁₆₅ parecen ser las implicadas principalmente en el proceso de angiogénesis (Watkins, R.H. y col., *Am. J. Physiol.* 1999, vol. 276, pág. 858-867). Se han identificado dos receptores de membrana celular endotelial específicos de VEGF, el receptor 1 de VEGF (VEGFR-1; Flt-1) y el VEGFR-2 (Flk-1/KDR). El VEGFR-2 parece estar implicado principalmente en la regulación de angiogénesis y vasculogénesis.

El VEGFR-2 (KDR) puede ser por tanto la diana del agonista de dopamina como factor en el desarrollo de la endometriosis. El Notch-4 puede ser la diana del agonista de dopamina como factor en el desarrollo de la endometriosis. VEGF, VEGFR-2 y Notch-4 pueden ser las dianas del agonista de dopamina como factores en el desarrollo de la endometriosis. Otros mecanismos de acción del agonista de dopamina están dentro del alcance de la invención.

Se administra el agonista de dopamina como una preparación farmacéuticamente aceptable. Las preparaciones pueden administrarse según la invención en composiciones farmacéuticamente aceptables que pueden comprender opcionalmente sales, agentes de tamponación, conservantes y excipientes farmacéuticamente aceptables. Las preparaciones farmacéuticas que incluyen un agonista o agonistas de dopamina son bien conocidas en la técnica y están comercialmente disponibles. Por ejemplo, la cibergolina está disponible con las marcas comerciales registradas Cabaser y Sogilen/Dostinex. El uso de dichas preparaciones de agonista de dopamina comercialmente disponibles en el tratamiento de la endometriosis es según la invención.

El modo de administración seleccionado dependerá de la urgencia y gravedad de la afección que se esté tratando y de la dosificación requerida. Cualquier modo de administración que produzca el efecto terapéutico deseado sin efectos adversos inaceptables es relevante en la práctica de la invención. Dichos modos de administración pueden incluir oral, rectal, tópico, transdérmico, sublingual, intramuscular, parenteral, intravenoso, intracavitario, vaginal y por matriz adhesiva para usar durante la cirugía. Se describen diversos enfoques para formular composiciones para uso según la invención en el "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3ª edición, American Pharmaceutical Association, USA y Pharmaceutical Press UK (2000), y "Pharmaceutics - The Science of Dosage Form Design", Churchill Livingston (1988).

En una realización preferida, la administración es oral. Las composiciones adecuadas para administración oral incluyen cápsulas, sellos, comprimidos, jarabes, elixires o pastillas masticables.

La presente invención se ilustrará ahora con referencia a los ejemplos y dibujos adjuntos en los que:

la FIGURA 1 muestra el porcentaje de lesiones activas después del estudio animal debatido a continuación para el grupo de control y los grupos tratados con una dosis baja (0,05 mg/kg/día) y una dosis alta (0,1 mg/kg/día) de cabergolina; la FIGURA 1a muestra la relación de glándulas/estroma en los tres grupos establecidos (tanto la dosis baja como alta de cabergolina ("Cb2") tenían más estroma y menos glándulas que los controles (*p<0,05)).

la FIGURA 2 muestra los vasos sanguíneos (mm³) para los grupos de control, de dosis baja y alta;

la FIGURA 3 muestra el porcentaje de vasos sanguíneos "maduros" y "recién formados" en los animales de los grupos de control, de dosis baja y alta;

la FIGURA 4 muestra el índice de proliferación para los grupos de control y de dosis baja y alta;

la FIGURA 5 muestra la expresión relativa de VEGF, VEGFR-2 (KDR), Notch-4, Ang 1 y Wnt-1 para los grupos de control, de dosis baja y alta;

la FIGURA 6a muestra la presencia del receptor de dopamina 2 (Dp-r2) y VEGF en implantes endométricos de animales en los tres grupos establecidos (grupos de control, de dosis baja y alta); y

la FIGURA 6b muestra la expresión relativa de VEGF, VEGFR-2 (KDR) y D2R en lesiones endométricas (columna de la izquierda) y en el endometrio (columna de la derecha).

Ejemplo 1

Se desarrolló un modelo animal experimental de endometriosis en ratones sin pelo insertando fragmentos de endometrio humano. Se albergaron individualmente ratones hembra (Hsd: Athimic Nude-nu, Harlan Ibérica S.L, Barcelona, España) en jaulas y lechos sometidos a autoclave en campanas con filtro de flujo laminar. Se mantuvo la zona de animales a 26°C con un ciclo de 12 h de luz-12 h de oscuridad y se alimentaron los ratones a voluntad con pienso para roedores de laboratorio sometido a autoclave y agua acidificada. Se efectuó todo el manejo en

campanas con filtro de flujo laminar. Se usó una mezcla de ketamina/medetomidina (ketamina 75 µg/g y medetomidina 1 µg/g) (Ketolar®, Parke-Davis, España; Domtor®, Pfizer, España), inyectada por vía i.p., para anestesiar los ratones antes de los procedimientos invasivos y atipamezol (Antisedan®, SmithKline Beecham, España) 1 µg/g por vía i.p para revertir los efectos de la anestesia después de los procedimientos invasivos, usando instrumentos estériles.

A la edad de 5 semanas, se dispusieron cápsulas de liberación estériles de 60 días que contenían 18 mg de 17β-estradiol (Innovative Research of America, Sarasota, FL) por vía s.c. en el cuello de cada animal. Según la información del fabricante, las cápsulas proporcionan una liberación continua de hormona a concentraciones séricas de 150-250 pmol/l, en el intervalo de los niveles fisiológicos en ratones durante el ciclo estral. Este nivel fisiológico estable de estrógeno promueve el crecimiento de endometrio humano transplantado y evita las diferencias entre ratones relacionadas con diversas etapas del ciclo estral.

Cuatro días después de la inserción del aglomerado de estrógeno, se realizó una incisión en la cavidad peritoneal por la línea media del abdomen inferior para insertar endometrio humano reciente de donantes de óvulos por punción folicular. Se pegaron estos fragmentos con pegamento (Vetabond®, 3M Animal Care products, EE.UU.) con el peritoneo. Este protocolo permitía imitar la situación patológica de menstruación retrógrada que ocurre en las mujeres con endometriosis.

Tres semanas después del implante, se dividieron los animales en tres grupos. El primero era el grupo de control, el segundo era el grupo de dosis baja tratado con 0,05 mg/kg/día de cabergolina por vía oral y un grupo de dosis alta tratado con una dosis oral de 0,1 mg/kg/día de cabergolina. 2 semanas después del tratamiento, se sacrificaron los animales y se muestrearon y analizaron las lesiones endometriósicas como se indica a continuación. Se muestran los resultados en las Fig. 1, 1a y 2 a 6b.

Se estimaron los efectos antiangiogénicos de los agonistas de dopamina mediante inmunofluorescencia, generando los anticuerpos usados en microscopía confocal contra el factor de Von Willebrand (IgG1 monoclonal de vWF, DAKO Corp., Dinamarca) presente en células epiteliales y células de músculo liso vasculares (IgG2 monoclonal α-SMA-conjugada con FITC de Sigma, St. Louis, EE.UU.). Los vasos sanguíneos que no son de nueva formación, están rodeados por una capa de músculo liso que les confiere madurez. Se realizó la identificación de las células endoteliales empleando vWF, mientras que los vasos maduros se identificaron mediante una tinción positiva de SMA. Por tanto, los vasos sanguíneos vWF+αSMA - se consideraron nuevos o inmaduros, mientras que los vasos vWF+αSMA+ se clasificaron como vasos sanguíneos viejos o maduros.

Se efectuó el estudio morfométrico para medir el área de implante y la densidad celular. Se efectuó la inmunocitoquímica con Ki-67 (IgG1 monoclonal de DAKO Corp., Dinamarca) para evaluar la actividad proliferativa de los implantes. Se detectaron los cambios histopatológicos y subcelulares ultraestructurales usando un microscopio óptico (MO), un microscopio de transmisión electrónica (MTA) y tinción histoquímica. Se efectuaron la microscopía óptica (MO), microscopía de transmisión de electrones (MTE) y morfometría para valorar la presencia de glándulas y estroma endométricos y estudiar los cambios subcelulares ultraestructurales, el área de los implantes y la densidad celular.

Se usaron procedimientos de PCR instantánea TaqMan y $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para analizar los perfiles de expresión génica de tres marcadores diferentes que promueven la angiogénesis (VEGF, VEGFR-2, Notch-4); angiopoyetina 1 (Ang-1), un marcador de la antiangiogénesis que promueve el crecimiento de los vasos existentes y la resistencia a las fugas y Wnt-1. Se realizó la demostración de la presencia de expresión de VEGF y receptor de tipo 2 de dopamina (Dp-r2) en implantes experimentales, lesiones endometriósicas peritoneales humanas y endometrio usando PCR instantánea TaqMan y el procedimiento $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Fig. 6a, 6b). De forma similar, se usó este procedimiento para demostrar la presencia de expresión de VEGFR-2 en lesiones endometriósicas peritoneales humanas y endometrio (Fig. 6b).

Se efectuó el análisis estadístico usando GraphPad InStat V3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.). Se diseñó el estudio para detectar las diferencias en los diferentes marcadores analizados entre los grupos de tratamiento y de control. Se expresaron los datos categóricos como número y porcentaje, y los datos numéricos como media ± error estándar de la media (EEM) excepto cuando se especifica. Se definió la significancia como $P < 0,05$. Se usó análisis de la varianza de un factor para el análisis estadístico.

Toxicidad

Ningún ratón del estudio murió después de la administración de cabergolina. La cabergolina no parecía cambiar la salud global de los ratones, porque el peso de los ratones en los diferentes grupos de tratamiento no era significativamente diferente (resultados no mostrados).

Resultados

La Figura 1 muestra el porcentaje de lesiones activas después del estudio animal debatido anteriormente para el

grupo de control y los grupos tratados con cabergolina de dosis baja (0,05 mg/kg/día) y de dosis alta (0,1 mg/kg/día). Los animales tratados con dosis baja (58,6±9,7%) y alta (60,4±8,4%) tenían una rebaja significativa ($p= 0,0169$) de las lesiones activas en comparación con los controles (89,6±5,7%). Los animales tratados con cabergolina (ambos grupos de dosis baja y alta) tienen significativamente menos lesiones activas en comparación con el grupo de control. En otras palabras, el tratamiento con cabergolina parece reducir el número de lesiones endometriósicas activas en este modelo. Los estudios de MO y MTE mostraron que en el grupo de control las lesiones endometriósicas presentaban un alto estroma celular y un aspecto histológico de reorganización completa y una estructura como puede verse en una lesión endometriósica humana típica. Sin embargo, en lesiones tratadas (dosis alta y baja de cabergolina), se observa un estroma laxo con celularidad y organización perdidas; esto es característico de tejido atrófico o degenerativo. El estroma endométrico humano que rodea las zonas glandulares se diferenciaba fácilmente del tejido conjuntivo muscular de murino.

Estos resultados histológicos se confirmaron mediante análisis morfométrico (Fig. 1a). Aunque no había diferencias estadísticas entre los grupos en densidad celular, había una diferencia significativa ($p= 0,0093$) entre grupos en la relación de glándulas/estroma, como se observa en la Figura 1a; tanto las dosis baja como alta de cabergolina tenían más estroma y menos glándulas que los controles ($*p< 0,05$). Esto indica que el tratamiento con cabergolina puede asociarse a una rebaja o reducción de la cantidad de glándulas endométricas.

La Figura 2 muestra los vasos sanguíneos (mm^3) para los grupos de control, de dosificación baja y alta, divididos entre vasos sanguíneos "maduros" y vasos sanguíneos "recién formados". El grupo de control tiene una mayor proporción de vasos sanguíneos recién formados (indicativo de una angiogénesis significativa), mientras que los grupos de dosis baja y alta tienen una proporción significativamente mayor de vasos sanguíneos maduros, lo que sugiere una angiogénesis significativamente reducida. Esto se demostró también mediante la histología (resultados no mostrados). Estos resultados indican que la cabergolina reducía significativamente la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) en este modelo.

La Figura 3 muestra el porcentaje de vasos sanguíneos en los grupos de control y dosificación baja y alta. El grupo de control tiene aproximadamente un 74% de los vasos sanguíneos totales como vasos sanguíneos recién formados, lo que indica una angiogénesis significativa. Los grupos de dosificación baja y alta, por otro lado, tienen de aproximadamente un 85 a un 89% del total como vasos sanguíneos maduros, lo que indica que la angiogénesis no es significativa. Estos resultados indican que la cabergolina reducía significativamente la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) en este modelo.

La Figura 4 muestra los resultados de un estudio de proliferación. Se usó un estudio de inmunocitoquímica usando el anticuerpo Ki-67 (concretamente, analizando el grado de proliferación celular empleando anticuerpos contra Ki-67) para evaluar la actividad proliferativa de los implantes usando procedimientos conocidos en la técnica. Se usó el software de recuento de imágenes para contar las células positivas de Ki-67 y calcular así el índice de proliferación de cada grupo. Se observó una rebaja significativa ($P<0,001$) de la proliferación en lesiones de animales tratados con cabergolina (tanto el grupo de dosis baja como alta) en comparación con el grupo de control.

Se analizó inicialmente el estado angiogénico de las lesiones usando inmunofluorescencia empleando anticuerpos para identificar los vasos sanguíneos nuevos ($\text{vWF}+\alpha\text{SMA}^-$) y viejos ($\text{vWF}+\alpha\text{SMA}^+$) y microscopía confocal (Leica Confocal Software). Puede usarse inmunofluorescencia que emplea anticuerpos generados contra el factor de Von Willebrand (vWF) presente en células endoteliales y células de músculo liso vascular ($-\text{SMA}$) para ensayar la acción antiangiogénica de Cb2. Los vasos sanguíneos que no son de nueva formación están rodeados por una capa de músculo liso que les confiere madurez. Se realizó la identificación de las células endoteliales empleando vWF , mientras que los vasos maduros se identificaron mediante tinción positiva de $-\text{SMA}$. Por tanto, los vasos sanguíneos $\text{vWF}+\alpha\text{SMA}^-$ se consideraron nuevos o inmaduros, mientras que los vasos $\text{vWF}+\alpha\text{SMA}^+$ se clasificaron como vasos sanguíneos viejos o maduros.

Los implantes presentaban un mayor estroma celular y el aspecto histológico de reorganización completa y estructura observadas típicamente en una lesión endometriósica en el grupo de control, mientras que los implantes en ratones incluidos en los grupos de dosificación baja y alta mostraron un estroma laxo con celularidad y organización disminuidas, que son características de tejido atrófico/degenerativo. La morfometría no mostró diferencias en la densidad celular y el área de estroma/glándulas entre grupos.

Se usaron los procedimientos de PCR instantánea TaqMan y $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ para analizar los perfiles de expresión génica de tres marcadores diferentes que promueven la angiogénesis (VEGF, VEGFR-2, Notch-4); angiopoyetina 1 (Ang-1), un marcador de la antiangiogénesis que promueve el crecimiento de los vasos existentes y la resistencia a fugas y Wnt-1. Se usó ARNr de 18S propio para normalizar los valores de Ct del gen diana. El valor de Ct en cada grupo se expresó respecto a los valores de Ct del grupo de control (calibrador) para calcular la expresión relativa por el procedimiento $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Se usó ADNc obtenido a partir de células tumorales de sarcoma 180 (S-180) y células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) como control negativo y positivo, respectivamente, para la expresión del gen de VEGF y VEGFR-2. Se usó el bazo como control positivo para Ang-1 y Wnt-1, y se empleó el pulmón como control positivo de Notch-4.

5 La Tabla 1 muestra que los perfiles de expresión génica de los marcadores proangiogénicos (VEGF, VEGFR-2 y Notch-4) estaban regulados por disminución en los implantes tratados con cabergolina a dosis baja y alta (“Cb2”) en comparación con los controles. Ang-1 y Wnt-1 se considera que son marcadores antiangiogénicos; sus perfiles de expresión estaban regulados por aumento en los implantes de ratones tratados con dosis bajas y altas de Cb2 en comparación con los controles, mostrando que el tratamiento con cabergolina está asociado a la inhibición de la angiogénesis. Los datos de expresión relativa de la tabla se muestran gráficamente en la Figura 5.

Tabla 1: Perfiles de expresión de genes angiogénicos

Marcador de la angiogénesis	Gen	Control ±	Vehículo	Dosis baja (0,05 mg/kg/día)	Dosis alta (0,1 mg/kg/día)	Valor de p	Expresión
+	VEGF	HUVEC	1,2 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1	< 0,05	Regulada por disminución en grupos tratados con Cb2
+	VEGFR-2 (KDR)	HUVEC	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	< 0,05	Regulada por disminución en grupos tratados con Cb2
+	Notch-4	Pulmón	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	< 0,05	Regulada por disminución en grupos tratados con Cb2
-	Ang-1	Bazo	1,1 ± 0,2	3,2 ± 0,6	3,7 ± 0,6	< 0,05	Regulada por aumento en grupos tratados con Cb2
-	Wnt-1	Bazo	1,0 ± 0,1	3,4 ± 0,2	3,3 ± 0,6	= 0,07	Regulada por aumento en grupos tratados con Cb2
Datos expresados como media ± DE							

10 Se investigó la presencia de receptores de tipo 2 de dopamina en tejido endométrico humano e implantes endometriósicos en mujeres que experimentaron cirugía (laparoscopia). Se usaron los procedimientos de PCR instantáneo TaqMan y $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para estimar la presencia del receptor 2 de dopamina (“Dp-r2”, “D2R”) y VEGF en tejido

15 endométrico humano, no solo en implantes (Fig. 6a), pero también en lesiones endometriósicas peritoneales obtenidas a partir de 10 mujeres en la laparoscopia (Fig. 6b – que incluye también datos de VEGFR-2). Los controles positivos y negativos de Dp-r2 fueron ADNc de células HUVEC y S-180, respectivamente. En ratones, se usaron los valores de Ct de control como calibrador, y en lesiones peritoneales humanas, se emplearon los valores de Ct de HUVEC como calibración para calcular la expresión relativa mediante el procedimiento $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

20 La Figura 6a muestra la presencia de VEGF y Dp-r2 en implantes endométricos de animales en los tres grupos establecidos. Existía una tendencia hacia una expresión aumentada de Dp-r2 a medida que los animales se trataban con dosis crecientes de cabergolina. Existe una tendencia hacia una expresión reducida de VEGF a medida que los animales se trataban con dosis crecientes de cabergolina.

25 La Figura 6b muestra (columna de la izquierda) la expresión relativa de VEGF, VEGFR-2 (KDR) y D2R (“Dp-r2”) en diferentes tipos de lesiones endometriósicas: rojo, blanco y negro. Existe una clara diferencia en la expresión de VEGF, VEGFR-2 y Dp-r2 según el tipo de lesión.

30 La Figura 6b muestra también (columna de la derecha) la expresión relativa de VEGF, VEGFR-2 (KDR) y D2R (“Dp-r2”) en el endometrio. La expresión relativa de VEGF y VEGFR-2 en el endometrio de sujetos con endometriosis es mayor que en aquellos sin endometriosis; la expresión relativa de Dp-r2 en el endometrio de sujetos con endometriosis es menor que en aquellos sin ella.

35 Se muestran estos resultados en la Tabla 2 siguiente.

Gen	Endometrio				Lesiones endometriósicas			
	Sin endometriosis	Moderada	Grave	Valor de P	Rojo	Blanco	Negro	Valor de P
VEGF	1,0 ± 0,1	2,2 ± 0,7	2,1 ± 0,4	NS	17,8 ± 5,8	10,1 ± 4,8	11,1 ± 3,9	NS
KDR	1,0 ± 0,1	2,1 ± 0,6	1,9 ± 0,3	NS	47,4 ± 15,0	26,9 ± 12,2	23,6 ± 7,2	NS
D2R	1,0 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	=0,07	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,6 ± 0,3	NS

Los resultados indican que el agonista de dopamina cabergolina, administrado a una dosis de 0,05 y 0,1 mg/kg/día, era capaz de:

- 5 (a) rebajar significativamente el número de lesiones endometriósicas activas;
- (b) causar la pérdida de celularidad y organización que se presentan característicamente en tejido atrófico o degenerativo en los implantes endometriósicos;
- 10 (c) rebajar significativamente el número de nuevos vasos sanguíneos en los implantes endometriósicos;
- (d) rebajar significativamente la expresión de marcadores de la angiogénesis y la proliferación celular y
- 15 (e) aumentar la degeneración de tejido y reducir los implantes endometriósicos.

Existe una alta homología entre los sistemas de VEGF humano y de roedor que ofrece una indicación de que la actividad mostrada en el modelo de roedor anterior es aplicable a modelos humanos. Los resultados indican que la administración de agonistas de dopamina tiene un efecto significativo sobre la endometriosis, ligado posiblemente a la acción sobre la angiogénesis. Los resultados pueden estar relacionados con la presencia de receptores de dopamina en tejido endométrico eutópico y ectópico.

Ejemplo 2

25 Una formulación de comprimido para uso oral es 0,5 mg de cabergolina (comercialmente disponible como Dostinex®, Pfizer, España).

Ejemplos adicionales

30 Ejemplo A: Una paciente experimenta laparoscopia de diagnóstico después de padecer dolor pélvico crónico y se diagnostica con endometriosis de tipo III. En la misma laparoscopia, la paciente experimenta cirugía tal como una resección de las lesiones disponibles y se inicia la administración de cabergolina.

35 Ejemplo B: Paciente diagnosticada anteriormente con endometriosis, que presenta síntomas de dolor pélvico y dismenorrea. La administración de cabergolina se inicia sin cirugía.

40 Ejemplo C: Paciente diagnosticada con endometriosis que experimenta tratamiento con agonistas de GnRH (o danazol o inhibidores de aromatasas) y se inicia la administración de cabergolina (con uso continuo de agonista de GnRH) durante un periodo de tiempo. Después de 3 a 6 meses adicionales sin terapia, la paciente vuelve a recibir cabergolina durante un periodo de tiempo adicional.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un agonista de dopamina en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la endometriosis, en el que el agonista de dopamina interacciona con un receptor de dopamina para imitar una acción dopamínica.
- 10 2. Un agonista de dopamina para uso en el tratamiento o la prevención de la endometriosis en el que el agonista de dopamina interacciona con un receptor de dopamina para imitar una acción dopamínica.
- 15 3. El uso según la reivindicación 1 o el agonista para el uso según la reivindicación 2, en el que dicho agonista de dopamina es uno de amantadina, bromocriptina, cabergolina, quinagolida, lisurida, pergolida, ropinirol y pramipexol.
- 20 4. El uso o el agonista para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agonista de dopamina es cabergolina administrada a una dosis de entre 0,01 y 12,5 mg/semana.
- 25 5. El uso o el agonista para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agonista de dopamina es quinagolida administrada a una dosis de entre 25 y 1000 microgramos/día.
- 30 6. El uso o el agonista para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agonista de dopamina es bromocriptina administrada a una dosis de entre 10 y 80 mg/día.
- 35 7. El uso o el agonista para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agonista de dopamina se administra durante un periodo de entre 1 día y 2 años.
8. El uso o el agonista para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agonista de dopamina se administra en combinación con otros tratamientos quirúrgicos o médicos para la endometriosis.
9. El uso o el agonista para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el(los) agonista(s) de dopamina se usa(n) para el tratamiento o la prevención de la endometriosis en un sujeto embarazado.
10. El uso o el agonista para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que es diana el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).
11. El uso o el agonista para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la administración es oral y en forma de composiciones como cápsulas, sellos, comprimidos, jarabes, elixires o pastillas masticables.

Fig 1

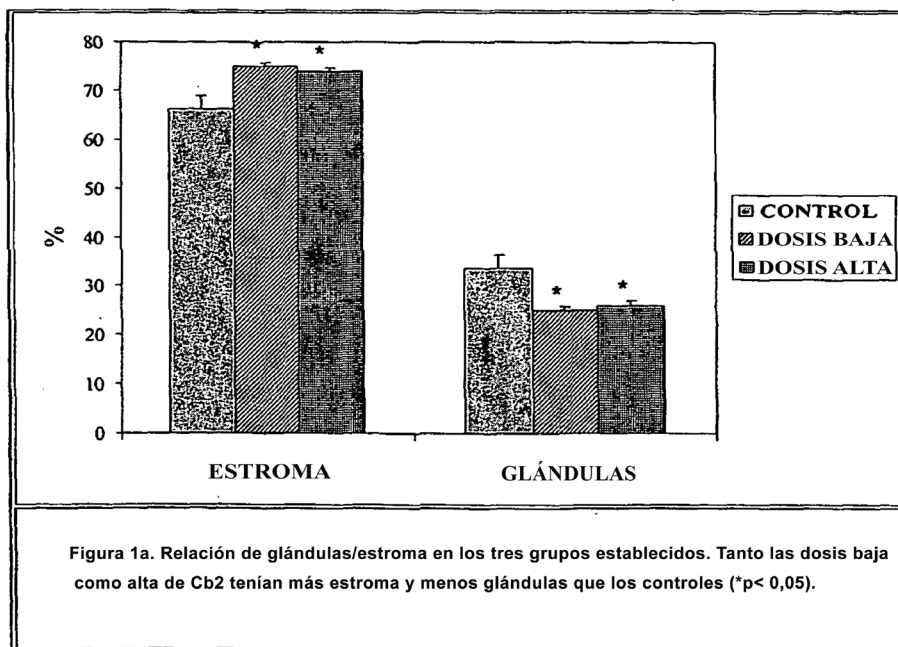
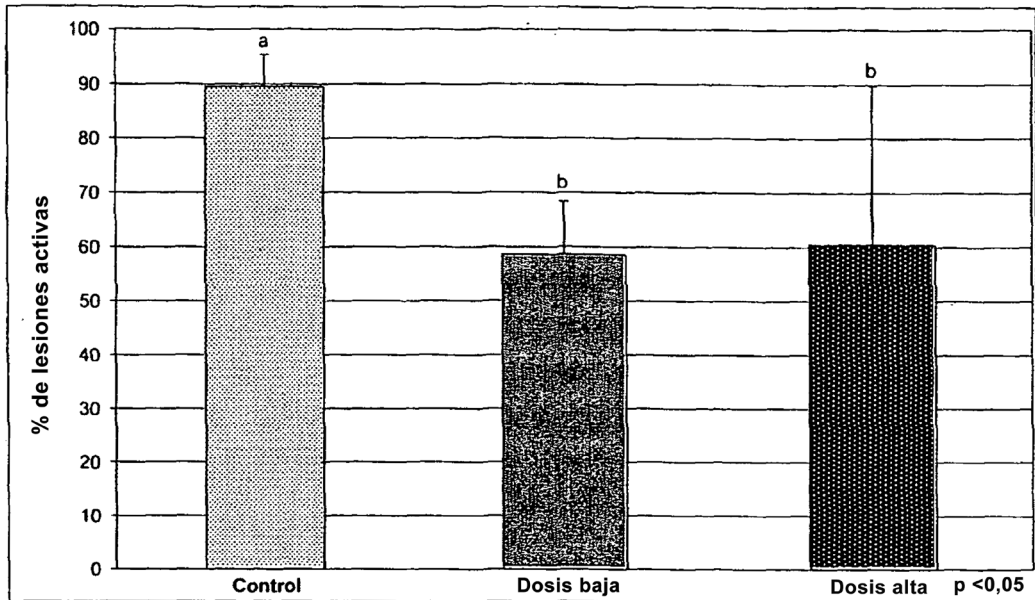


Fig. 2 (Estudio angiogénico)

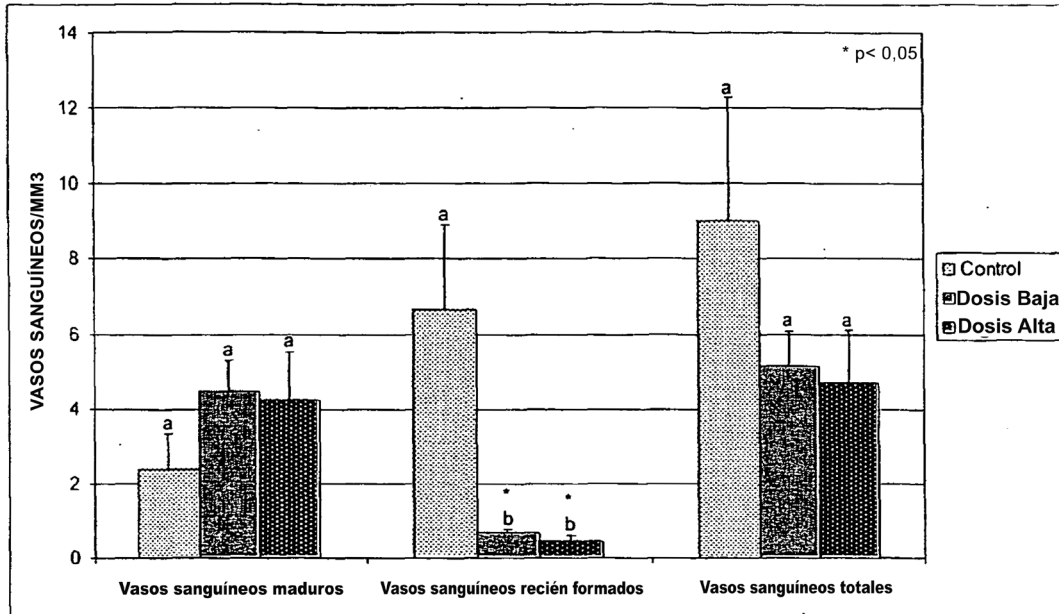


Fig. 3 (Porcentaje)

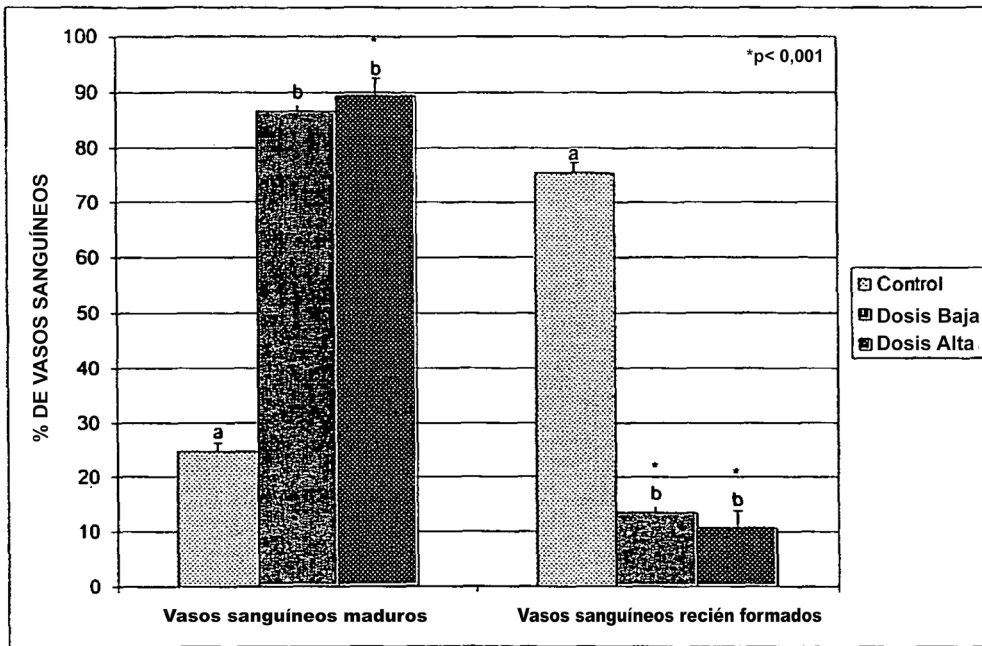
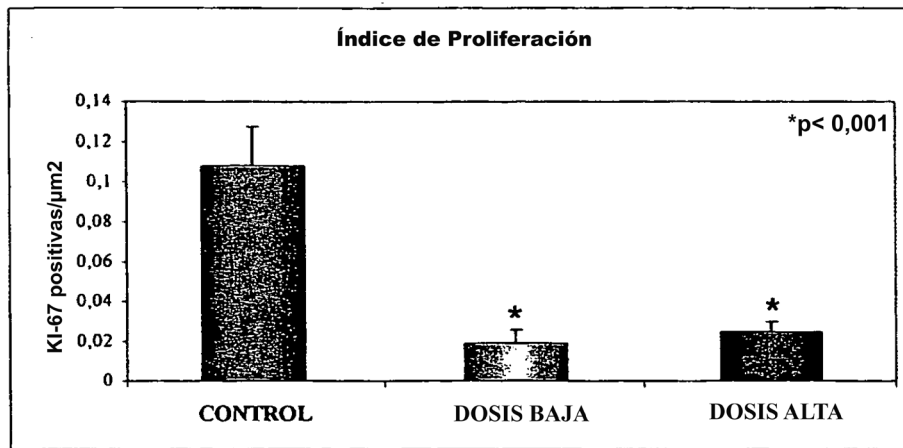


Fig. 4. Estudio de la proliferación



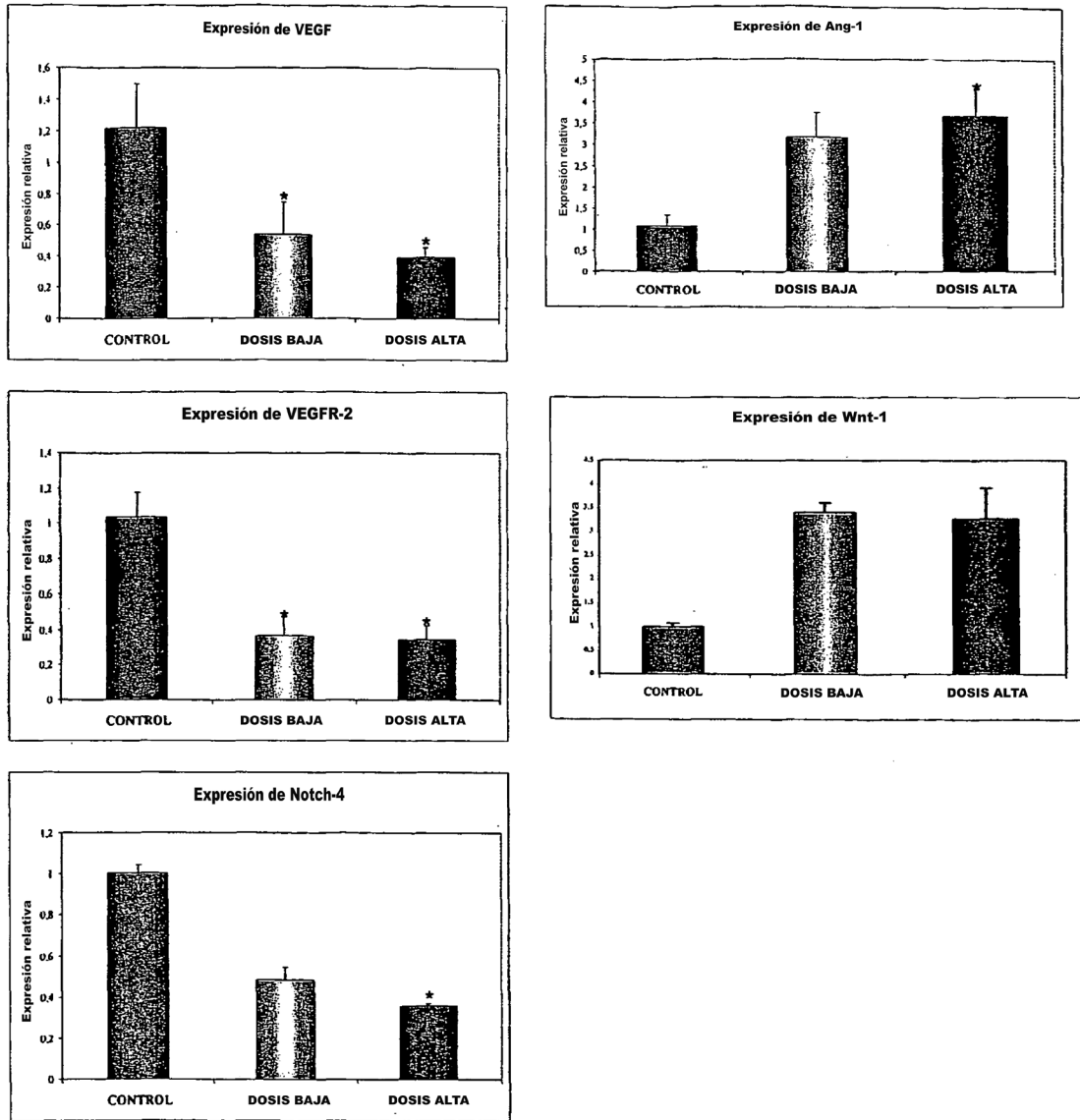
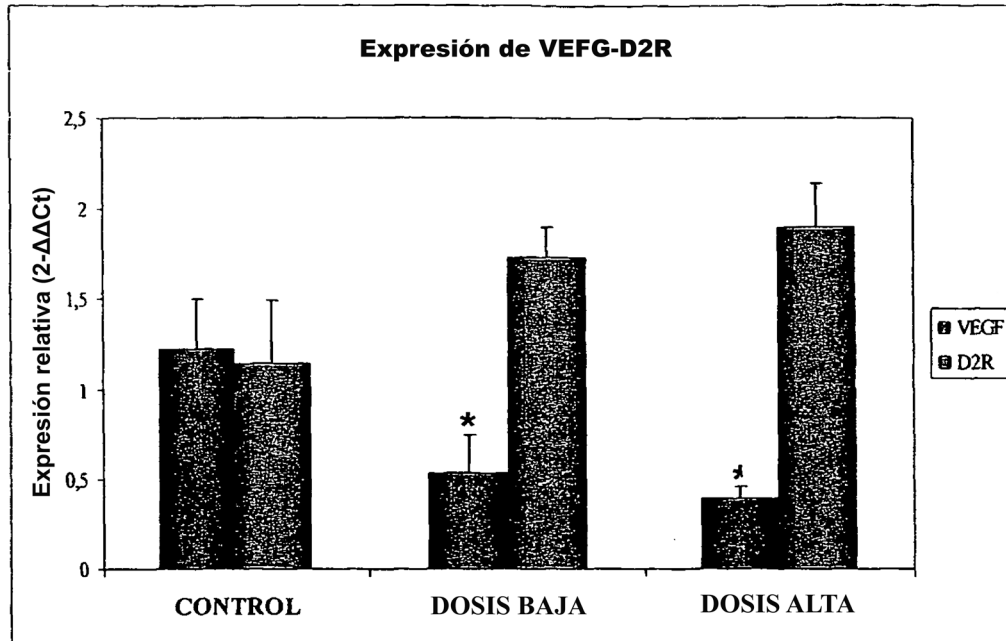
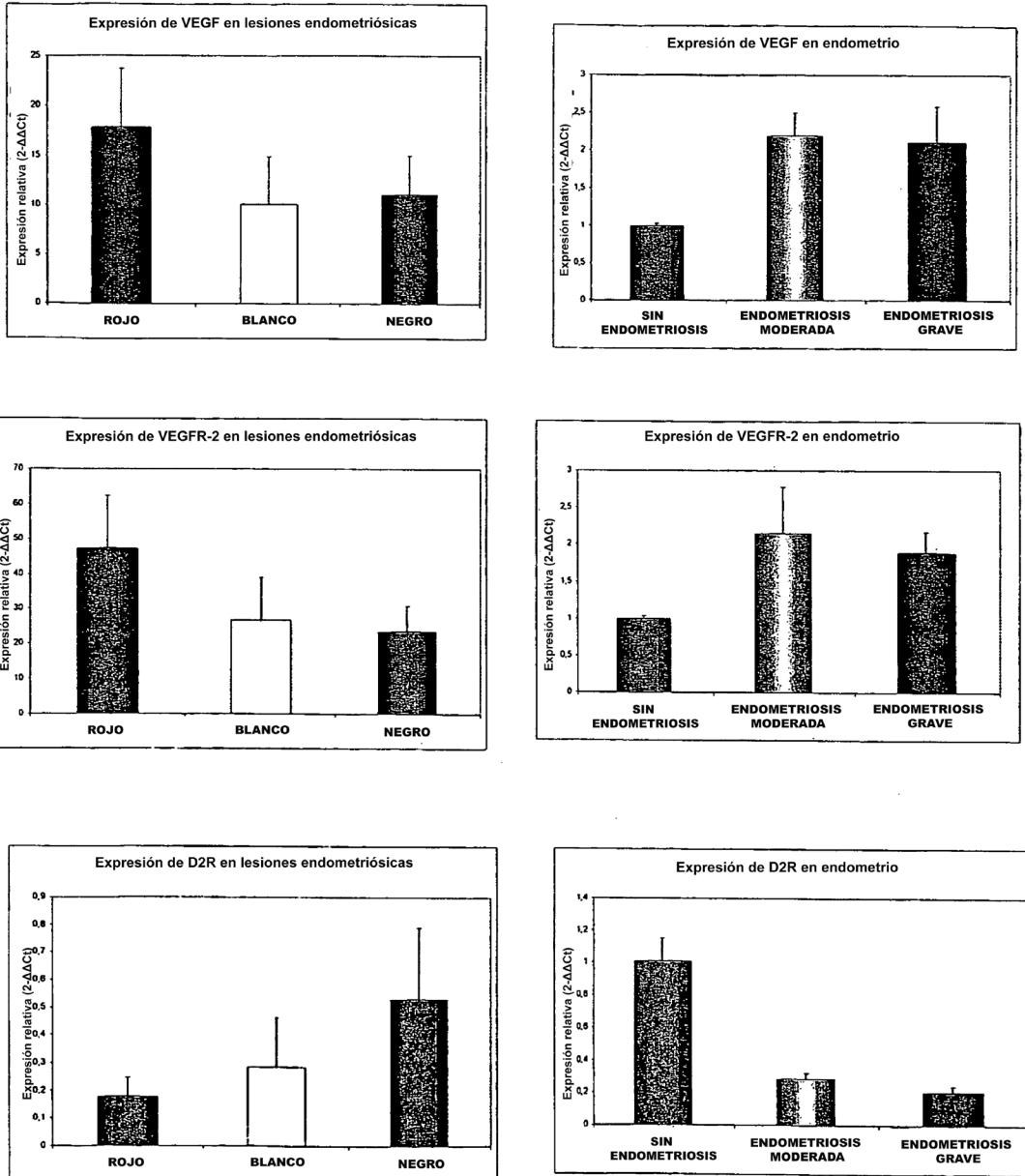


Fig 5



LA FIGURA 6A muestra el perfil de expresión del receptor 2 de dopamina (Dp-r2, "D2R") y VEGF en implantes endométricos de los animales en los tres grupos establecidos (grupos de control, dosis alta y baja)

Fig 6b



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 *Esta lista de referencias citadas por el solicitante es solo por conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido un gran cuidado en la recopilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad a este respecto.*

Documentos de patente citados en la descripción

10 US 6359130 B
WO 2006117608 A
RU 2273481

Bibliografía no de patentes citada en la descripción

15 Watkins, R.H. y col., *Am. J. Physiol.*, 1999, vol. 276, 858-867.
"Handbook of Pharmaceutical Excipients". American Pharmaceutical Association, USA y Pharmaceutical Press UK, 2000.
"Pharmaceutics. The Science of Dosage Form Design", 1988.