

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 167**

51 Int. Cl.:
A61K 31/198 (2006.01)
A61P 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09171394 .1**
96 Fecha de presentación: **25.09.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2305238**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.04.2011**

54 Título: **N-acetil-L-cisteína para el tratamiento de endometriosis**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.06.2012

73 Titular/es:
**lasomai aktiebolag
Torsvikssvängen 20
181 34 Lidingö, SE**

72 Inventor/es:
**Parasassi, Tiziana y
Porpora, Maria Grazia**

74 Agente/Representante:
García-Cabrerizo y del Santo, Pedro

ES 2 382 167 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

N-acetil-L-cisteína para el tratamiento de endometriosis.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende N-acetil-L-cisteína útil para el tratamiento de endometriosis e indicaciones asociadas con endometriosis.

ANTECEDENTES

10 La endometriosis es la tercera causa principal de hospitalización ginecológica en los Estados Unidos, y se estima que afecta a 14 millones de mujeres en Europa. Números ampliamente usados para la incidencia de endometriosis incluyen el 5-10% de todas las mujeres en edad reproductiva y el 30-40% de todas las mujeres con un problema de esterilidad. Es una enfermedad caracterizada por la presencia fuera de la cavidad uterina de tejido que es histológicamente idéntico al endometrio, es decir la membrana que recubre el interior del útero de los mamíferos. Este tejido situado erróneamente se desarrolla en crecimientos o lesiones (también llamados implantes o nódulos) que responden al ciclo menstrual de la misma manera que lo hace el tejido endometrial del útero: cada mes el tejido se acumula, se rompe, y se derrama. Aunque la sangre menstrual fluye fuera del útero, en su lugar la sangre y el

15 tejido derramados a partir de crecimientos endometriales no tiene ninguna manera de fluir hacia fuera. Esto da como resultado hemorragia interna, rotura de vasos sanguíneos y tejido de las lesiones, y una consiguiente inflamación crónica.

20 Los dos síntomas más comunes de endometriosis son dolor y esterilidad. Los síntomas pueden incluir: dismenorrea, es decir dolor antes o después de los periodos menstruales, así como dolor durante o después de la práctica del sexo; dolor pélvico crónico o dolor en la zona lumbar o intestinal; periodos menstruales pesados, o manchado y hemorragias entre periodos; movimientos intestinales dolorosos o dolor al orinar durante los periodos menstruales; esterilidad.

25 La causa de la endometriosis no se conoce actualmente y se han propuesto varias teorías para dar una razón a la migración ectópica y el implante de células endometriales. Recientes evidencias relacionan la aparición de endometriosis con un estado alterado del propio tejido de origen: el endometrio eutópico. Existe un acuerdo cada vez mayor en la técnica sobre que la migración incontrolada, el implante y el crecimiento de endometriomas se originan a partir de trastornos en las células endometriales eutópicas.

30 Actualmente no existe ninguna cura para la endometriosis. Existen diversas opciones de tratamiento, y hay maneras de minimizar los síntomas causados por la afección. Además del uso de analgésicos para tratar el dolor, el tratamiento de la endometriosis se relaciona principalmente con la supresión de la función ovárica en la secreción de estrógenos, por lo tanto tratamientos hormonales de diversas entidades, hasta la inducción de la menopausia en los casos más graves. La cirugía se usa para extirpar endometriomas, adhesiones, implantes peritoneales y lesiones profundas situadas en el septo rectovaginal o en otros sitios (es decir, vejiga, intestino grueso), y para aliviar el dolor. Sin embargo, se producen recidivas después de tratamientos tanto médicos como quirúrgicos. Las mujeres jóvenes que padecen endometriosis a menudo se enfrentan a decisiones difíciles respecto a su futura reproducción. El

35 tratamiento hormonal, al estar dirigido a la supresión de la función ovárica, no es compatible con el embarazo.

40 La N-acetil-L-cisteína (en lo sucesivo en este documento denominada como NAC) es un fármaco bien conocido, que se ha usando principalmente como agente mucolítico y en el tratamiento de envenenamiento por paracetamol. En los últimos años, también se ha reconocido que tiene otras propiedades beneficiosas, tales como ser anti-inflamatorio y anti-proliferativo, y ha sido sugerido para el tratamiento de diversos trastornos y síntomas diferentes tales como esquizofrenia, diabetes y cáncer.

45 En estudios previos que investigaban los mecanismos moleculares subyacentes y relacionados con la endometriosis, se ha propuesto que las tasas de proliferación celular aumentadas en endometriosis pueden ser inducidas por estrés oxidativo en el tejido endometriósico, causado por radicales libres o ERO (especies reactivas de oxígeno). Se ha propuesto, por lo tanto, que nuevas estrategias terapéuticas para endometriosis pueden basarse en antioxidantes y eliminadores de ERO tales como NAC.

TÉCNICA ANTERIOR

50 Charlotte Ngô et. al., propusieron (The American Journal of Pathology (2009), Vol. 175, N° 1, páginas 225-234) que el estrés oxidativo podría inducir o potenciar la proliferación de las células endometriósicas en endometriosis. Por lo tanto, se sugirieron antioxidantes tales como NAC para el tratamiento de endometriosis. Estudios en líneas celulares primarias de pacientes con endometriosis, así como en un modelo de ratón implantado con tejido endometriósico de origen humano mostraron que la NAC suprimía los signos de estrés oxidativo así como aumentaba la proliferación en los respectivos modelos. Se sugirió que los antioxidantes, tales como NAC, podían usarse como un tratamiento seguro y eficaz de la endometriosis.

Nastaran Foyouzi et. al., también propusieron (*Fertility and Sterility* (2004), Vol. 82, Supl. 3, páginas 1019-1022) que los antioxidantes, tales como NAC, podían usarse para el tratamiento de endometriosis. El artículo describe un estudio in vitro en el que células aisladas de sujetos sanos así como pacientes con endometriosis fueron tratadas con diferentes antioxidantes, por ejemplo NAC. Todos los antioxidantes inhibían la proliferación de células estromales endometriales.

En estudios de Yan Wo y Sun-Wei Guo (*Gynecologic and Obstetric Investigation* (2006), Vol. 62, No. 4, páginas 193-205; *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, (2008), Vol. 137, páginas 198-203); documento de patente US 2007/0287676 A1) el efecto de NAC sobre la proliferación y la detención del ciclo celular en células estromales endometriales humanas inmortalizadas se investigó y se comparó con otros agentes propuestos para el tratamiento de endometriosis. La NAC demostró tener un efecto tanto sobre la proliferación como sobre la detención del ciclo celular, aunque no tan pronunciado en comparación con los inhibidores de histona desacetilasa.

En un estudio de S. Estany et. al., (*Journal of reproductive Immunology* (2007), Vol. 75, páginas 1-10) se demostró que la actividad antioxidante de NAC y otros agentes antioxidantes sobre células endometriales en cultivo mejoraba la viabilidad de células oxidadas, impidiendo la citotoxicidad células inducida por H₂O₂.

Otra técnica relacionada incluye los documentos US2003/0190381 A1, WO2004/096206 A2, US6239137 B1, US2003/0119875 A1, US2004/0014672 A1 y WO2005/048822 A2.

Otra técnica antecedente, que describe el efecto molecular de NAC en el tratamiento del cáncer, incluye T. Parasassi, et. al., (*Cell Death and Differentiation* (2005), Vol. 12, No. 10, páginas 1285-1296); E. K. Krasnowska et. al., (*Free Radicals Biology and Medicine* 2008, 45(11): 1566-72) y A. C. Gustafsson et. al., (*BMC Cancer* (2005), 5: 75).

OBJETOS DE LA INVENCION

El resultado clínico del tratamiento con NAC en endometriosis no se ha determinado, hasta donde saben los inventores, en la técnica anterior, ni se ha propuesto un régimen de dosificación eficaz para el tratamiento de endometriosis o el uso de NAC para el tratamiento de indicaciones asociadas con endometriosis.

Por lo tanto, es un objeto general de la presente invención proporcionar una solución al problema de proporcionar una composición farmacéutica de N-acetil-L-cisteína (NAC) para el tratamiento de endometriosis e indicaciones asociadas con endometriosis. Un aspecto del objeto es proporcionar una composición farmacéutica de N-acetil-L-cisteína (NAC) con un régimen de dosificación eficaz para el tratamiento de endometriosis y de síntomas relacionados con endometriosis.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se ha propuesto anteriormente que la NAC podía usarse en nuevas estrategias terapéuticas para endometriosis, en base a su uso como antioxidante y eliminador de ERO. Los inventores de la presente descripción muestran que la NAC induce cambios moleculares y celulares que no solamente inhiben la proliferación sino que también inducen diferenciación del tejido afectado a tejido normal.

Estos descubrimientos han conducido a los inventores de la presente invención a proponer una nueva prescripción de NAC en el tratamiento de endometriosis y de indicaciones asociadas con endometriosis, en un paciente ser humano o animal mamífero. Además, se propone un intervalo de dosis eficaz de NAC en el tratamiento de endometriosis. En una realización de la presente invención, el régimen de tratamiento prescrito puede usarse, por ejemplo, para controlar la frecuencia y la intensidad de síntomas dolorosos (dismenorrea, dispareunia y dolor pélvico crónico acíclico), para reducir el tamaño de lesiones endometrióticas eventualmente hasta su desaparición, para reducir las recidivas después de cirugía y/o para mejorar la fertilidad. Los efectos secundarios de este tratamiento son virtualmente ausentes y, en particular, este tratamiento no dificulta el embarazo.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de endometriosis que comprende N-acetil-L-cisteína.

En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de indicaciones asociadas con endometriosis, que comprende N-acetil-L-cisteína. En un aspecto de esta realización, el tratamiento es para aliviar el dolor asociado con endometriosis. En otro aspecto de esta realización, el tratamiento es para favorecer el embarazo en un ser humano o mamífero que tiene endometriosis. En otro aspecto más de esta realización, el tratamiento es un pre-tratamiento antes de laparoscopia o cirugía en casos de endometriosis. En otro aspecto de esta realización, el tratamiento es un tratamiento después de laparoscopia o cirugía para prevenir recidivas. En un aspecto adicional de esta realización, el tratamiento es un tratamiento preventivo en caso de factores de riesgo evaluados y validados, de padecer endometriosis, incluyendo casos de incidencias familiares de endometriosis.

En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende NAC en una dosis de 150 mg a 2,7 g.

En otra realización más, la invención proporciona una composición farmacéutica una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente, para administración a una dosis diaria de entre 1,2 y 5,4 g/día.

5 En otra realización la invención proporciona una composición farmacéutica una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente, para administración a una dosis de entre 20 y 90 mg/kg/día.

En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente, para administración durante un periodo de tiempo de dos meses o más.

10 En otra realización más, la invención proporciona una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente, para administración durante 3-5 días consecutivos cada semana, con 2-4 días de interrupción.

En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de endometriosis o indicaciones asociadas con endometriosis que comprende N-acetil-L-cisteína para administración a una dosis de entre 20 y 90 mg/kg/día durante un periodo de tiempo de dos meses o más.

15 En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente, para administración durante 3-5 días consecutivos cada semana, con 2-4 días de interrupción.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La invención se explicará con más detalle en la siguiente descripción, en referencia a las figuras adjuntas, en las que:

20 La figura 1 muestra el efecto inhibitor de NAC sobre el crecimiento de las lesiones endometriósicas en ratones, como se demuestra mediante el ejemplo 1. El peso total promedio por animales de control (n=10) y tratados con NAC (n=10), después de 21 días desde el implante, con el error estándar. Significación $p < 0,05$. En las inserciones por encima de los histogramas, se reproducen fotografías representativas de endometriomas para un caso de control (A) y uno tratado con NAC (B). Barra: 1 cm.

25 La figura 2A muestra geles representativos de RT-PCR semi-cuantitativa, como se demuestra mediante el ejemplo 1. La figura 2B muestra la expresión reducida de COX-2 y MMP-9 en quistes de ratones tratados con NAC, como se demuestra mediante el ejemplo 1. Valores de RT-PCR semi-cuantitativa, promediados sobre 5 ratones de control y 5 tratados con NAC, con error estándar.

30 La figura 3 muestra la reubicación de E-cadherina en quistes de ratones tratados con NAC, como se demuestra mediante el ejemplo 1. Imágenes representativas de inmunotinción con E-cadherina en endometriomas de ratones de control (A y B) y tratados con NAC (C y D). En las muestras de control, puede observarse una tinción pardusca difusa en todo el citoplasma de células epiteliales, mientras que en muestras tratadas con NAC, esta tinción está bien confinada a nivel de los contactos célula-célula. Aumento original 40x.

35 La figura 4 muestra una tinción de Cox-2 reducida en quistes de animales tratados con NAC, como se demuestra mediante el ejemplo 1. Imágenes representativas de tinción inmunohistoquímica de quistes de ratones de control (A-C) y de ratones tratados con NAC (D-F). En las muestras de control, se detecta una presencia conspicua de tinción pardusca en varias zonas, mientras que ésta apenas es detectable en muestras tratadas con NAC. Aumento original 40x.

40 La figura 5 muestra tinción de Ki-67 reducida en quistes de animales tratados con NAC, como se demuestra mediante el ejemplo 1. Imágenes representativas de tinción inmunohistoquímica de quistes de ratones de control (A-C) y de ratones tratados con NAC (D-F). Las flechas señalan a células proliferantes teñidas.

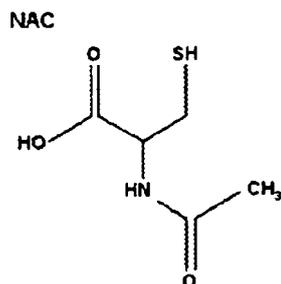
Aumento original 40x.

45 La figura 6 es una representación esquemática de la técnica anterior, que muestra varios mecanismos que operan cuando células proliferantes, como se ejemplifica mediante células cancerosas, son tratadas mediante NAC. Estos mecanismos convergen en la diferenciación celular terminal. Los ejemplos de la presente descripción también muestran que al menos algunos de estos efectos también se producen cuando NAC, de acuerdo con la presente invención, se usa para tratar endometriosis.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

NAC en general

50 La N-acetil-L-cisteína (NAC) es un fármaco farmacéutico de bajo peso molecular bien conocido, con la fórmula química



Las características de NAC están relacionadas principalmente con su grupo tiol, que le hace eficaz en la mayoría de las rutas bioquímicas donde el tripéptido glutatión (GSH), presente en todos los tejidos humanos a concentraciones relativamente altas, incluso por encima de 10 mM, actúa. La cisteína está, de hecho, entre los tres aminoácidos que componen GSH, así que la NAC está considerada como un precursor de GSH con su cisteína desacetilada. La NAC se ha usado y aún se sigue usando ampliamente como agente mucolítico, donde el modo de acción es atribuido generalmente a la rotura por oxidorreducción de los puentes disulfuro de cisteína sensible en las proteínas del moco. De hecho, la NAC participa en la compleja ciclación por oxidorreducción de grupos tiol, donde actúan varias enzimas. De hecho, el ciclo de formación y rotura del disulfuro es de extrema importancia fisiológica, un mecanismo común mediante el cual se regulan la actividad de proteínas y la señalización celular. Enzimas tales como protein tirosina fosfatasas y tirosina quinatas, por ejemplo, desempeñan papeles fundamentales en el control del ciclo celular, la proliferación y la diferenciación celulares, y muchas de ellas están reguladas por el estado oxidorreducción de sus cisteínas.

En conjunto, aunque los mecanismos de acción detallados no se han dilucidado finalmente, la NAC parece actuar en todas las rutas bioquímicas en las que lo hace el GSH. Las enzimas y proteínas cuya actividad es modulada por GSH operan en varios procesos directamente o mediante una red de rutas de transducción de señales. En este panorama, la NAC puede tener una acción paralela a la de GSH, o puede ser aún más eficaz que GSH.

El GSH, por ejemplo, se conjuga normalmente con metabolitos reactivos formados por paracetamol y ayuda a desintoxicarlos. Cuando se produce una sobredosis de paracetamol el GSH, sin embargo, se agota y los metabolitos de paracetamol comienzan a reaccionar con proteínas celulares, eventualmente conduciendo a la muerte celular. En el tratamiento de insuficiencia hepática fulminante después de envenenamiento por paracetamol, la NAC actúa en lugar de GSH en la desintoxicación de metabolitos de paracetamol. Se cree que la NAC carece virtualmente de efectos secundarios no deseados, lo que también es indicado por las elevadas dosis de NAC que se usan en el tratamiento de envenenamiento por paracetamol, estimadas, para un individuo de 70 kg, en aproximadamente 40 g/día.

Al contrario que el tripéptido GSH, que ya puede degradarse en el estómago, la sencilla molécula de NAC se difunde libremente en casi todos los tejidos y células. Los estudios farmacocinéticos de NAC determinaron una concentración máxima en plasma alcanzada en aproximadamente una hora, con una semi-vida de aproximadamente tres horas. La eliminación total se produce entre seis y doce horas.

30 *NAC como agente antiproliferativo, diferenciador*

Los inventores han descubierto recientemente que la N-acetil-L-cisteína (NAC) posee un marcado efecto antiproliferativo sobre células cancerosas de origen epitelial - el mismo origen que el de las células endometriales (Cell Death and Differentiation 2005, 12(10): 1285-1296). Aunque el cáncer y la endometriosis son principalmente enfermedades no relacionadas, comparten algunas propiedades comunes que condujeron eventualmente a los inventores a la idea de que la NAC también podría ser útil en el tratamiento de endometriosis. En particular, la endometriosis, al igual que el cáncer, es una enfermedad proliferativa aunque con otro mecanismo molecular y etiología subyacentes desconocidos. Las observaciones realizadas en cáncer se presentarán en este documento como un antecedente a los efectos de NAC y como un probable modo de acción también en endometriosis.

La NAC se usó para detener la proliferación e inducir la diferenciación en dos líneas celulares de adenocarcinoma y en queratinocitos normales primarios, todas de origen epitelial. En estos sistemas, la diferenciación se caracterizó morfológicamente, bioquímicamente y mediante el análisis de la expresión génica (el análisis de la expresión génica descrito ampliamente en el documento BMC Cancer 2005, 5: 75).

El efecto antiproliferativo de NAC, en el estudio del cáncer, no estaba relacionado con muerte celular o toxicidad sino que, en su lugar, se debía a la activación de una ruta de diferenciación fisiológica, que puede considerarse como una normalización de las funciones celulares hacia el tejido de origen.

Además de la proliferación reducida, la morfología de células cancerosas tratadas con NAC también resultó alterada. In vitro, las células epiteliales en proliferación activa muestran una morfología irregular - una morfología

mesenquimática - y a menudo forman varias capas celulares múltiples. Por el contrario, cuando las células experimentan un proceso de diferenciación, hacia la estructura y la función de su tejido diana final, detienen la proliferación, su morfología se vuelve regularmente poligonal, cada célula varias veces más gruesa y forman una única capa de células adyacentes. Este proceso viene acompañado por más uniones célula-célula y célula-sustrato, consecuente con un desplazamiento desde un mesénquima proliferante a un fenotipo adhesivo, menos mótil y diferenciado.

En conjunto, se detectaron una compleja serie de cambios metabólicos después de la suplementación de NAC a células cancerosas, que convergían todos en la detención de la proliferación incontrolada y en la inducción de su diferenciación terminal, como se representa en el esquema mostrado en la figura 6.

Notablemente, el tratamiento con NAC indujo un aumento considerable de los complejos de adhesión célula-célula y célula-sustrato. La proliferación incontrolada puede considerarse una afección en la que las células han perdido la inhibición por contacto y su capacidad para responder a señales de diferenciación. Las células que entran en la ruta de diferenciación muestran un perceptible aumento de los complejos de unión célula-célula, y el proceso también se indica generalmente como inhibición por contacto. Varias evidencias indican que las señales para que las células entren en la fase final de la diferenciación se originan a partir de los componentes de los propios complejos célula-célula. Estas uniones son también una vía para la difusión de señales entre células.

Las células migratorias tales como células endometriales en endometriosis, además de una cantidad reducida de complejos de adhesión, deben poseer y secretar suficientes metaloproteinasas de la matriz activas, enzimas dedicadas a la degradación de la matriz extracelular, para permitir la migración a través de la matriz extracelular. De forma interesante, en este modelo de cánceres epiteliales, también se descubrió que la NAC regula negativamente esta enzima, lo que sugiere que la migración celular resultó obstaculizada. Además, el ejemplo 1 de la presente descripción muestra, de hecho, que la NAC, cuando se usa de acuerdo con la presente invención para el tratamiento de endometriosis, regula negativamente la expresión de la metaloproteinasa de la matriz 9 (MMP-9). Esto sugiere que la NAC podría dificultar la migración celular tanto desde endometrio eutópico a nuevos implantes (prevención de recidivas) como en tejido endometriósico (prevención de lesiones adicionales).

Un efecto conocido de la NAC también está relacionado con su efecto antiinflamatorio, una razón para la adición a la familia de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). El perfil de expresión génica de células tratadas con NAC mostraba, de hecho, una regulación negativa de ciclooxigenasa-2 (COX-2), un gen cuya inducción está asociada a reacciones inflamatorias. Además, este efecto de la NAC se confirmó en tejido endometriósico en el ejemplo 1 de la presente descripción, lo que sugería que la NAC también puede aliviar los síntomas relacionados con la inflamación en endometriosis.

Como ejemplo de la capacidad de la NAC para modular la transducción de señales en células mediante el estado de oxidorreducción de cisteínas sensibles, se estudió la enzima no receptora tirosina quinasa c-Src en un modelo in vitro de células de carcinoma de colon (CaCo-2) y células de carcinoma de ovario (OVCAR-3) (Free Radicals Biology and Medicine 2008, 45(11): 1566-72). La c-Src está implicada en el cambio proliferación/diferenciación, y es activa en el ensamblaje/desensamblaje de complejos de unión y de la organización del citoesqueleto. Esta quinasa es activada y sobre-expresada en una serie de cánceres humanos, particularmente en carcinoma de colon y ovario. Los evidentes esfuerzos internacionales en el diseño de fármacos están centrados, de hecho, en la búsqueda de inhibidores de c-Src específicos. En su lugar, se descubrió que un simple tratamiento de células de adenocarcinoma con NAC puede conseguir el objetivo de la inhibición de c-Src, con un mecanismo relacionado con las transiciones de oxidorreducción en restos de cisteína sensibles en c-Src, capaces de desactivar esta quinasa y de suministrarla a endo-lisomas, donde se almacena o se degrada. Por lo tanto, la diferenciación terminal en células de adenocarcinoma inducida por NAC estaba relacionada con la inhibición de c-Src. Cabe mencionar que, la actividad de esta quinasa parece de relevancia durante la fase decidual del ciclo de células endometriales, sugiriendo esto la implicación de su desregulación en endometriosis (Endocrine Journal, 2008, 55(5): 795-810).

NAC y endometriosis

Como se ha explicado en la sección de antecedentes, se había propuesto anteriormente que la NAC podía usarse en nuevas estrategias terapéuticas para endometriosis, en base a su uso como antioxidante y eliminador de ERO. A partir de los estudios sobre cáncer epitelial descritos anteriormente, los inventores de la presente invención observaron que la NAC tenía algunos efectos ventajosos, diferentes de aquellos como antioxidante y eliminador de ERO, sobre células de cáncer epitelial y que esos efectos también podían ser útiles en el tratamiento de células endometriósicas, si las células endometriósicas deben responder de forma similar. En particular, se esperaba que los efectos anti-proliferativo y diferenciador de la NAC observados en cáncer también podrían producirse cuando se usaba NAC en el tratamiento de endometriosis.

Se creía que si NAC tenía los siguientes efectos moleculares, que habían sido observados en cáncer, también en tejido endometriósico serían beneficiosos para el tratamiento de endometriosis;

- i) un aumento de las uniones célula-célula y célula-sustrato, consecuente con un desplazamiento desde un fenotipo proliferante a uno diferenciado;

ii) una disminución de la expresión de metaloproteinasas de la matriz, asociada a una disminución de la migración celular;

iii) una disminución de la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2), asociada a una reacción de inflamación reducida;

5 iv) una modulación de la actividad de c-Src para regular el ciclo de proliferación/decidualización endometrial y para permitir el embarazo.

Por lo tanto, se formuló la hipótesis de que NAC podría tener los siguientes efectos fisiológicos sobre endometriosis:

i) una disminución de la proliferación de células endometriales;

ii) una reducción de la inflamación local crónica y, por lo tanto, un alivio del dolor relacionado;

10 iii) una normalización del tejido de origen, el endometrio eutópico, a través del establecimiento de ciclos de proliferación-diferenciación más regulares;

iv) un número reducido de células endometriales ectópicas relacionado con una motilidad celular reducida debido tanto a la reducción de las metaloproteinasas del tejido como al incremento de uniones célula-célula y célula-sustrato;

15 v) una reorganización de la conformación de receptores de estrógenos a través de un ensamblaje de nuevo de puentes disulfuro en residuos de cisteína relevantes.

En conjunto, los resultados planteados hipotéticamente fueron verificados todos directa o indirectamente mediante la respuesta del paciente en el estudio clínico y mediante el análisis histológico de sus biopsias o, en un modelo animal, a nivel de la morfología, histología, bioquímica y biología molecular.

20 En particular, los inventores han descubierto que la NAC reduce, de hecho, la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y metaloproteinasa de la matriz 9 (MMP-9) en tejido endometriósico. También muestran que la NAC induce la reubicación de E-cadherina desde el citoplasma a tejido endometriósico, a uniones célula-célula en tejido tratado con NAC. Esto indica un aumento de las uniones célula-célula, que es consecuente con una reducción de la proliferación celular. De hecho, otros efectos, tales como la expresión aumentada de p21 y la expresión reducida de Ki-67, también indican que el tratamiento con NAC en endometriosis conduce a una proliferación celular reducida. Los inventores también muestran que estos efectos moleculares del tratamiento con NAC de endometriosis conducen a una reducción del tamaño de las lesiones endometriósicas, al alivio del dolor y al deseado embarazo. Una ventaja con el uso de NAC para tratar endometriosis o indicaciones relacionadas con endometriosis es que no es necesario usar los tratamientos hormonales usados normalmente para endometriosis, que suprimen la función ovárica. El uso de NAC por lo tanto, en comparación, aumenta las probabilidades de que estas pacientes se queden embarazadas. El tratamiento con NAC antes de la cirugía también dio como resultado endometriomas más regulares y compactos que se extirparon más fácilmente y condujo a una hemorragia extremadamente baja durante laparoscopia.

Régimen de dosificación

35 A partir del estudio del tratamiento con NAC en líneas celulares de adenocarcinoma y queratinocitos normales primarios (Cell Death and Differentiation 2005, 12(10): 1285-1296), se concluyó que la dosis eficaz de NAC para la inducción del efecto antiproliferativo-diferenciador variaba y dependía del tipo celular. El tejido de origen dicta, por lo tanto, la concentración de NAC eficaz requerida para observar un bloqueo completo de la proliferación, y debe determinarse para cada tejido. Además, la dosis de NAC también estaba relacionada con el grado de neoplasia de las células. En detalle, mientras que las células normales requerían una dosis baja para detener la proliferación e iniciar la diferenciación, las células de carcinoma con un peor pronóstico característico requerían una mayor concentración de NAC.

Para los fines de la presente invención, se desarrolló un régimen de dosificación de NAC para el tratamiento de endometriosis en base a los siguientes criterios:

45 1) una dosificación de NAC al día que está de acuerdo con otros tratamientos clínicos actuales y se considera sin efectos secundarios indeseables;

2) una dosis que se considera lo suficientemente alta para cumplir los requisitos de células que proliferan anormalmente, para cambiarlas a la ruta de diferenciación;

50 3) dada una disminución descrita del nivel de NAC en plasma después de tratamientos prolongados (Pendyala L, Creaven PJ. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1995; 4: 245-51), se consideró la suspensión del tratamiento durante aproximadamente la mitad de cada semana para una respuesta biológica óptima en un tratamiento de dos meses o más largo.

La composición de la presente invención, que comprende NAC para el tratamiento de endometriosis o indicaciones asociadas con endometriosis es de acuerdo con una realización para administrarla a una dosis entre aproximadamente 20 y 90 mg/kg/día. El límite inferior se basa en dos veces la dosis usada para la acción mucolítica, es decir se sabe *per se* que tiene un efecto fisiológico. El límite superior se basa en la consideración de que se ha descubierto que dosis más altas causan problemas gástricos en muchos pacientes. En otra realización de la presente invención, la composición comprende NAC que se administrará a una dosis de aproximadamente 30-60 mg/kg/día. El límite inferior ha demostrado ser eficaz en endometriosis y se sabe que el límite superior no tiene virtualmente efectos secundarios. En otra realización más de la presente invención, la composición comprende NAC que se administrará a una dosis de aproximadamente 30-45 mg/kg/día. Esta baja dosificación ha demostrado sorprendentemente ser eficaz en endometriosis. En una realización, la composición se administrará durante un periodo de tiempo que es de dos meses o más, o preferentemente tres meses o más. Para contrarrestar una disminución del nivel de NAC en plasma después de un tratamiento prolongado, puede administrarse NAC a la dosificación prescrita durante 3-5 días a la semana, por ejemplo durante 3-5 días consecutivos cada semana, con 2-4 días de interrupción o durante 3-4 días consecutivos cada semana, con 2-4 días de interrupción.

En una realización, en referencia a un peso corporal de aproximadamente 60 kg, la dosis de NAC está en el intervalo entre 1,2 y 5,4 g/día, preferentemente entre 1,8 y 3,6 g/día. La dosis puede dividirse en dos o más, preferentemente tres o cuatro, administraciones diarias de una o dos dosis (por ejemplo píldoras) cada una, donde cada dosis puede comprender por ejemplo 0,15-2,7 g de NAC o preferentemente 0,6-1,2 g de NAC. El tratamiento incluye la administración de las dosis mencionadas anteriormente durante de tres a cuatro días consecutivos cada semana, con una suspensión de cuatro a tres días, respectivamente. La duración total mínima del tratamiento es de dos meses, sin duración máxima. Para pacientes con otros pesos, por ejemplo personas con un peso superior o uno inferior, es necesario ajustar la dosis diaria de forma consecuente.

En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica para el tratamiento de endometriosis o síntomas relacionados con endometriosis comprende NAC en una dosis de 150-5400 mg que se administrará en dos o más administraciones al día, durante un periodo de al menos 2 meses, tal como al menos 3 meses. En una realización preferida de la presente invención, la composición farmacéutica comprende NAC en una dosis de 230-3600 mg que se administrará en dos o más administraciones al día, durante un periodo de al menos 2 meses, tal como al menos 3 meses. En otra realización de la presente invención, la composición farmacéutica para el tratamiento de endometriosis o síntomas relacionados con endometriosis comprende NAC que se administrará en una única o más administraciones al día, 3-5 días a la semana, durante un periodo de al menos 2 meses, tal como al menos 3 meses.

Formulaciones farmacéuticas

Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede prepararse de una manera conocida *per se* por una especialista en la técnica farmacéutica. La composición puede comprender una cantidad eficaz de NAC, de acuerdo con la invención, así como un vehículo o excipiente adecuado que sirve como vehículo o medio para el ingrediente activo. Dichos vehículos o excipientes se conocen en la técnica e incluyen materiales sólidos tales como ácido cítrico, citrato de natrio, carbonato de natrio (ácido) más aromatizantes. La composición farmacéutica está preferentemente adaptada para administración oral. Dichas composiciones podrían administrarse en diferentes formas, actualmente preferentemente como comprimidos. Otras formas, tales como cápsulas, supositorios, soluciones, suspensiones, jarabes o similares también son concebibles.

La invención requiere una estricta evaluación de la calidad farmacéutica de la preparación de NAC para obtener la dosis eficaz. Por lo tanto, deben usarse preparaciones de marca o genéricas certificadas. La NAC no es una molécula estable, su residuo tiol activo puede ser oxidado fácilmente por oxígeno, luz y otras radiaciones, de modo que la dosis eficaz no se alcanzaría. La preparación está, por lo tanto, preferentemente protegida de la luz, en comprimidos solubles, con hidrogenocarbonato sódico, que ayuda en la retirada parcial de oxígeno de agua durante la disolución.

Usolindicaciones médicas de la presente invención

La presente invención ha demostrado tener propiedades beneficiosas en muchos aspectos relacionados con endometriosis y puede usarse tanto para el tratamiento de endometriosis como para el tratamiento de diversas indicaciones asociadas con endometriosis. Por tratamiento de diversas indicaciones asociadas con endometriosis se entiende, por ejemplo, tratamiento para aliviar los síntomas de la enfermedad tales como dolor e inflamación; tratamiento para aumentar las posibilidades de quedarse embarazada; pre-tratamiento antes de la cirugía para facilitar la extirpación de lesiones endometriósicas y para mejorar el resultado de la cirugía; tratamiento después de cirugía para prevenir la recidiva de lesiones; y tratamiento preventivo en el caso de factores de riesgo evaluados, validados o presencia de endometriosis familiar.

La NAC, de acuerdo con la presente invención, ha demostrado reducir el tamaño de la lesión y revertir el tejido proliferativo a tejido normal más diferenciado. Por lo tanto, en una realización de la presente invención, la composición farmacéutica comprende NAC para el tratamiento de endometriosis para reducir - eventualmente hasta

su desaparición - endometriomas, adhesiones, implantes peritoneales y lesiones profundas ubicadas en el septo rectovaginal o en otros sitios.

La NAC, de acuerdo con la presente invención, también ha demostrado aliviar los síntomas de dolor causados por endometriosis. Por lo tanto, en otra realización de la presente invención, la composición farmacéutica comprende NAC para aliviar el dolor asociado a endometriosis.

En otra realización de la presente invención, la composición farmacéutica comprende NAC para el favorecimiento de un embarazo deseado en una persona con endometriosis.

En otra realización más de la presente invención, la composición farmacéutica comprende NAC para el pretratamiento de laparoscopia o cirugía en casos de endometriosis, para facilitar la extirpación de masas, reducir la hemorragia, hacer a los tejidos más compactos/menos frágiles.

En otra realización de la presente invención, la composición farmacéutica comprende NAC para la prevención de recidivas después de laparoscopia o cirugía.

En otra realización más de la presente invención, la composición farmacéutica comprende NAC para su uso en casos de factores de riesgo evaluados, validados, para la prevención de endometriosis debida a incidencia familiar.

EJEMPLOS

La invención se describirá e ilustrará adicionalmente a continuación en referencia a los siguientes ejemplos. Debe observarse, sin embargo, que no debe considerarse que estos ejemplos limitan la invención de ninguna manera.

Ejemplo 1. Efecto de NAC en un modelo murino de endometriosis.

Materiales y métodos

Materiales. A no ser que se especifique, todos los productos químicos eran de Sigma-Aldrich, Milán, Italia.

Animales. 36 ratones BALB/C hembra, de 6 a 8 semanas de edad se adquirieron de Charles River Italia (Calco, Italia). Se les proporcionaron alimento granulado (dieta convencional enriquecida; Mucedola, Milán, Italia) y agua *ad libitum*. Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 16/8 horas en condiciones controladas. Antes de cualquier procedimiento invasivo, los ratones fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de 0,4 ml de una solución fisiológica que contenía el 2,5% de AVERTIN.

Inducción de endometriosis. La inducción de endometriosis se realizó siguiendo el método descrito en Somigliana et al., Hum Reprod, diciembre de 1999; 14(12): 2944-50. Las intervenciones quirúrgicas se realizaron en condiciones de asepsia. En resumen, los cuernos uterinos de ratones sinérgicos se extirparon a través de una pequeña incisión en la línea media en el espacio peritoneal, justo por debajo del ombligo, y se colocaron en una placa de Petri que contenía solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se obtuvieron fragmentos endometriales cortando finamente los cuernos uterinos usando una cuchilla de afeitar. Los fragmentos se suspendieron en 0,6 ml de PBS y rápidamente se inocularon en la cavidad peritoneal de ratones receptores con una proporción de un donante cada dos receptores. Los ratones con endometriosis inducida se dividieron aleatoriamente en dos grupos de 12 ratones cada uno: control y tratamiento con NAC.

Tratamiento con NAC. El día siguiente al implante endometrial, los ratones del grupo de tratamiento se sometieron a alimentación por sonda con 100 μ l de la solución madre a 10 mg/ml de NAC en agua. El grupo de control solamente recibió agua. La administración de NAC continuó diariamente durante 21 días. Dado el peso corporal promedio de los ratones de $22,5 \pm 0,7$, la dosis de NAC de 1 mg/ratón corresponde a 44 mg/kg/día. No se observó ninguna evidencia de toxicidad a la dosis administrada en base al peso corporal - que no cambió al final del tratamiento - el consumo de alimento, el comportamiento de acicalamiento, o niveles de actividad en comparación con los controles. Al final del tratamiento, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical.

Recogida de endometriomas. Al final del tratamiento, los animales fueron sacrificados y las lesiones endometriósicas se extirparon cuidadosamente del tejido circundante, su peso y número totales se evaluaron. Los quistes se fijaron inmediatamente en formalina al 10% o se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

Histología e inmunohistoquímica. Las muestras fijadas en formalina se incluyeron en parafina y las secciones tisulares (5 μ m de grosor) se tiñeron usando hematoxilina-eosina. Todos los portaobjetos fueron evaluados por un patólogo experimentado que desconocía la procedencia de las muestras del estudio y el diagnóstico histológico de endometriosis se basó en la identificación morfológica de tejido glandular y estroma endometrial.

Para inmunohistoquímica, las secciones se desparafinaron y se rehidrataron en etanol graduado. Para la recuperación del antígeno, las secciones se sometieron a microondas durante 6 minutos en tampón citrato 0,1 M (pH 6,0) y la actividad peroxidasa endógena se bloqueó mediante una incubación de 20 minutos en H₂O₂/metanol al 3%.

Las secciones se aclararon en PBS/TritonX-100, se sumergieron durante 15 minutos en PBS-albúmina de suero bovino (BSA) al 1% para bloquear sitios de unión no específicos, y a continuación se incubaron con el anticuerpo primario seleccionado diluido en PBS-BSA al 1%. Para la inmunodetección de ciclooxigenasa (COX)-2 (anticuerpo policlonal de conejo anti-ratón, Cayman Chemical, Milán, Italia), Ki-67 (anticuerpo policlonal de conejo anti-ser humano, Monosan Xtra, DBA Italia, Segrate, Italia), y E-cadherina (BD Biosciences, Milán, Italia), la incubación se realizó durante una noche a 4°C y las diluciones fueron de 1:100, 1:600, 1:200, respectivamente. La tinción inmunohistoquímica continuó usando el sistema DAKO Cytomation LSAB2 System-HRP (Dako Italia, Milán, Italia) y los sitios de unión a anticuerpo se visualizaron mediante estreptavidina de anticuerpo policlonal de conejo anti-ser humano, solución de complejo de avidina-biotina peroxidasa usando diaminobencidina como cromógeno. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron, se montaron en bálsamo de Canadá y a continuación se observaron con un microscopio Leica. La cuantificación de la expresión de Ki-67 fue realizada de manera ciega por dos observadores independientes; cada observador contó al menos 200 células en más de 10 campos seleccionados aleatoriamente para cada muestra y el índice de marcado de Ki-67 se expresó en porcentaje.

Extracción del ARN, RT-PCR semi-cuantitativa y qRT-PCR. El ARN total se aisló lisando los quistes endometriales congelados con TissueLyser (QIAGEN, Milán, Italia) usando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Milán, Italia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un microgramo de ARN total de cada muestra se trató con 1 U de ADNasa I (Invitrogen) y se transcribió de forma inversa con 200 U de SuperScript III Transcriptasa Inversa (Invitrogen), usando 250 ng de cebadores aleatorios en 20 µl de volumen final. El mismo producto de ADNc obtenido de cada muestra se usó para posterior amplificación por PCR con los conjuntos de cebadores preparados para los genes diana. El gen constitutivo de ARN 18S se usó como control interno. Las muestras de control negativo estaban constituidas por mezcla de reacción y cebadores sin plantilla de ADNc. Las secuencias de cebador (Tabla I) se diseñaron usando el software Primer-BLAST disponible en línea de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

En primer lugar, la proporción entre la muestra y el gen constitutivo se calculó mediante amplificación simultánea de ARNm específico de gen y ARN 18S en un único tubo de reacción. Dado que este procedimiento no tenía éxito para todas las muestras - probablemente debido al número relativamente pequeño de transcritos específicos por lo tanto de una amplificación preferencial de ARNm 18S - para prevenir inexactitudes cuantitativas derivadas de efectos competitivos, los genes diana y ADNc 18S generados en la misma reacción RT se amplificaron en tubos diferentes. Para documentar la amplificación en el intervalo exponencial, se generó un diagrama de amplificación para ARN 18S y se seleccionó el número apropiado de ciclos. Se realizó PCR semi-cuantitativa en un volumen de reacción de 25 µl, con 1 µl de ADNc, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,2 mM, 0,5 µM de cada cebador y 1,25 U de Hotstart Taq Polimerasa (QIAGEN). La amplificación por PCR se realizó mediante iCycler (Bio-Rad, Milán, Italia). Los productos de PCR se resolvieron a continuación electroforéticamente en gel de agarosa al 1,5% y se tiñeron con bromuro de etidio. Los niveles de ARNm diana se estimaron mediante barrido densitométrico y se normalizaron contra controles de carga 18S. Los análisis densitométricos de los productos de PCR se realizaron usando un software de imágenes Quantity One (VersaDOC, Bio-Rad).

Tabla I. Secuencias de cebadores usadas para PCR semi cuantitativa y qRT-PCR

ARNm diana	cebadores	SEC ID N°	Secuencia	Hibridación (por 30 segundos)	N° de ciclos	Producto de PCR (pb)
ARN 18 S NR_ 003278.1	directo	1	CGCGGTTCTATTTTGTGGT	60°C	18-24	219
	inverso	2	AGTCGGCATCGTTTATGGTC			
COX-2 NM_ 011198.3	directo	3	CCCCACAGTCAAAGACACT	60°C	35	196
	inverso	4	AGTTGCTCATCACCCTACTC			
MMP-9 NM_ 013599.2	directo	5	TGAATCAGCTGGCTTTTGTG	60°C	35	242
	inverso	6	GTGGATAGCTCGGTGGTGT			
P21 (cdkn1a)	directo	7	TCCACAGCGATATCCAGACA	60°C	35	196

NM_ 007669.4	inverso	8	ACGAAGTCAAAGTTCCACCG			
-----------------	---------	---	----------------------	--	--	--

Resultados

Efecto del tratamiento con NAC sobre el crecimiento de lesiones endometriósicas. Veintiún días después de la inducción de endometriosis, todos los ratones experimentales fueron sacrificados y sus endometriomas se extirparon y se recogieron. De los 12 ratones de control, uno murió y uno no desarrolló endometriomas. De los 12 ratones tratados con NAC, dos no desarrollaron endometriomas. Morfológicamente, las lesiones ectópicas eran grandes, quísticas y vascularizadas: estaban constituidas por quistes llenos de fluido, que eran de color blanco, rojo u ocasionalmente marrón, y preferentemente localizados en el peritoneo de la cavidad abdominopélvica. En las inserciones de la figura 1.1, se presentan fotos representativas de quistes de animales de control (A) y tratados con NAC (B). Como promedio, se observó una reducción de peso significativa en el grupo tratado (n = 10) en comparación con los controles (n = 10) (figura 1).

La NAC reduce la expresión de COX-2 y MMP-9, y desactiva la proliferación. El análisis de RT-PCR reveló que, con respecto a quistes de ratones de control (n=5), el tratamiento con NAC (n=5) inducía una reducción significativa de los niveles de ARNm de COX-2 (-32%) y de MMP-9 (-34%), con una significación $p < 0,01$, según lo normalizado para la expresión de 18S (figura 2A y B). El gen P21, típicamente expresado solamente cuando el ciclo de proliferación está bloqueado, nunca se expresaba en los 5 controles, mientras que se expresaba en 3 de las 5 muestras tratadas con NAC examinadas (ejemplo representativo en la figura 2A).

La NAC impulsa la relocalización de E-cadherina. La detección inmunohistoquímica de E-cadherina era positiva en el 100% de los casos examinados. El marcado estaba restringido a células epiteliales glandulares, mientras que ninguna de la muestra presentaba tinción estromal. A un nivel celular, en quistes de ratones de control se descubrió que la tinción de E-cadherina se difundía en todo el citoplasma celular, mientras que en quistes de ratones tratados con NAC, la E-cadherina se detectó principalmente a lo largo de las uniones célula-célula (Figura 3). La E-cadherina es parte del complejo de adhesión multiproteínas, por lo tanto, su presencia incrementada en los límites de las células indica un aumento de las adhesiones célula-célula. Además, y de acuerdo con la expresión de P21, descrita anteriormente, esta reubicación es consecuente con la pérdida de comportamiento proliferativo de las células desplazado hacia la diferenciación terminal (Conacci-Sorrell et al., J. Clin. Invest. 2002, 109: 987-991; Parasassi et al., Cell Death Differ. 2005, 12: 1285-1296).

El tratamiento con NAC reduce la cantidad de Cox-2 en endometriomas. La detección inmunohistoquímica de la proteína Cox-2 relacionada con la inflamación reveló que, con respecto a quistes de ratones de control, las muestras recogidas de ratones tratados con NAC mostraban una tinción bastante reducida que, en algunos casos, estaba completamente ausente (Figura 4).

La NAC reduce el número de células proliferantes. El antígeno Ki-67 (Ki-67) es un marcador clásico de proliferación celular, con células en reposo, no en ciclo que carecen completamente de expresión de Ki-67. Cuando se usa para teñir quistes de ratones de control, varias células marcadas podían detectarse (flechas en los paneles A-C de la figura 5). En su lugar, se detectaron muy pocas células marcadas en quistes de ratones tratados con NAC (flechas en D-F de la figura 5). Una evaluación estadística realizada en 8 animales para cada grupo (10 imágenes/200 células de ratón) dio una reducción de las células proliferantes del 54% (Tabla II).

Tabla II. Índice de marcado para Ki-67 con error estándar. Significación: $p < 0,01$

Control (n = 8 x 5)	Tratados con NAC (n = 8 x 5)
1,88 ± 0,28	0,87 ± 0,11

Discusión

El modelo animal de endometriosis era eficaz en la inducción de implantes endometriales ectópicos. Solamente un animal en el grupo de control y dos en el tratado con NAC no mostraron endometriomas.

De forma consecuente con las expectativas, el peso - proporcional con el tamaño - de los quistes era menor en ratones tratados con NAC. Esto puede atribuirse a un efecto antiproliferativo de NAC (Parasassi et al., Cell Death Differ. 2005, 12: 1285-1296), como se ilustra de forma exhaustiva en este documento mediante el análisis de la expresión génica y mediante inmunohistoquímica. De hecho, P21, un gen expresado solamente en células en diferenciación, no proliferantes, se observó en el 60% de los animales tratados con NAC mientras que no se

expresaba en controles. A la inversa, la proteína Ki-67, que solamente se expresa en células proliferantes, mostraba una disminución del 54% en ratones tratados con NAC con respecto a los de control.

Las proteínas de relevancia en la endometriosis, tales como MMP-9 (Collette et al., Hum Reprod 2006; 21: 3059-3067) y Cox-2 (Carli et al., Endocrinology 2009; 150: 3128-3137), mostraban una disminución después del tratamiento con NAC. La MMP-9 se considera fundamental para el movimiento celular y el comportamiento invasivo, mientras que Cox-2 es una enzima paradigmática asociada a la inflamación. Ambos genes relativos mostraban una disminución de aproximadamente el 30% después del tratamiento con NAC. Además, la cantidad de Cox-2 también se examinó mediante tinción histoquímica en quistes y el resultado mostraba una disminución relevante de la tinción.

En base a la noción ampliamente aceptada que considera a la E-cadherina citoplasmática como un marcador de comportamiento celular proliferativo, mientras que, por el contrario, su ubicación en el complejo de adhesión célula-célula se considera tanto un marcador como un inductor de diferenciación, también se examinó la ubicación de E-cadherina en quistes de ratones de control y tratados con NAC. Los resultados están perfectamente de acuerdo con los anteriores descubrimientos de los inventores en células de adenocarcinoma (Parasassi et al., Cell Death Differ. 2005, 12: 1285-1296), que muestran una reubicación de E-cadherina del citoplasma celular a los límites de las células después del tratamiento con NAC. Esta asociación de E-cadherina al complejo de adhesión también está de acuerdo con un comportamiento celular menos mótil, menos invasivo.

En conclusión, desde todos los puntos de vista examinados, la NAC puede constituir un tratamiento óptimo en endometriosis. Cuando se traslada al tratamiento de mujeres, este fármaco tiene la relevante ventaja de estar virtualmente libre de efectos secundarios, en comparación con la magnitud de efectos secundarios debida al tratamiento hormonal. La NAC puede usarse, por lo tanto, para reducir el tamaño de los quistes, para reducir la inflamación local y el dolor crónico asociado, y para reducir la recidiva después de la cirugía. Este último punto está motivado por una proliferación reducida y una motilidad celular reducida.

Ejemplo 2. Estudio clínico piloto sobre el efecto de NAC para tratar endometriosis.

Objetivo del estudio. Este estudio clínico piloto se diseñó para tratar a mujeres con endometriosis usando NAC en lugar de otros tratamientos. El único tratamiento aditivo posible era con analgésicos para el alivio del dolor, cuando fuera necesario.

Criterios para la inclusión de pacientes. Mujeres con un primer diagnóstico de endometriosis, en base al dolor y a pruebas por ultrasonido ovárico de la enfermedad, y pacientes con una recidiva del dolor y/o endometrioma ovárico después del tratamiento laparoscópico se incluyeron en el estudio.

Antes del tratamiento, la intensidad de los síntomas del dolor se midió por medio de una escala analógica visual (EAV) de 10 puntos y las características de los endometriomas ováricos mediante ultrasonidos transvaginales. Durante el tratamiento con NAC, se excluyen otros tratamientos con la excepción de analgésicos para tratar el dolor, cuando fuera necesario.

Tratamiento. La dosis de NAC prescrita era cercana a la usada en el estudio animal, de 30 mg/kg/día. En la práctica, para un peso corporal promedio de 60 kg, la prescripción para todos los pacientes incluidos era de tres dosis orales de 600 mg de NAC, tres veces al día, durante tres días consecutivos cada semana, con cuatro días de interrupción. Esto daba como resultado 1,8 g de NAC al día, 5,4 g a la semana, 21,6 g al mes. Estas precisas modalidades de tratamiento se basaban en las siguientes consideraciones: 1) la dosis de 1,8 g de NAC al día está de acuerdo con otros actuales tratamientos clínicos y se considera que no tiene efectos secundarios indeseables; 2) dada la farmacocinética de NAC, las tres dosis diarias de 0,6 mg se aproximan a un nivel en plasma casi constante, sin incomodidad de los pacientes para un tratamiento complejo; 3) dada una disminución descrita del nivel en plasma de NAC después de tratamientos prolongados (Pendyala L, Creaven PJ. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1995; 4: 245-51), la suspensión del tratamiento durante aproximadamente la mitad de cada semana garantiza una respuesta biológica óptima en un tratamiento duradero, por ejemplo de dos a seis meses o más largo.

Seguimiento. La intensidad de los síntomas de dolor (escala EAV del dolor) y el tamaño de los endometriomas ováricos (exámenes clínico y US [ultrasónico]) se evaluaron después de los tres primeros meses de tratamiento, con una evaluación de seguimiento planificada al final del estudio después de seis meses. En caso necesario, se realizó tratamiento laparoscópico después de 3 meses. En estos casos, la terapia con NAC continuó para evaluar el efecto del fármaco en la prevención de la recidiva.

Resultados

A continuación se presentan los datos después del periodo de seguimiento de los tres primeros meses. La edad media de las mujeres era de 33,3, en el intervalo entre 21 y 47 años.

La modificación del tamaño y el número de los endometriomas después de tres meses de tratamiento con NAC, según lo medido mediante ultrasonidos como el diámetro máximo, se describe en la Tabla III. En esta fase, se observó una reducción del tamaño o la desaparición en aproximadamente 2/3 de los endometriomas, mientras que

el 20% permanecía sin cambios y el 13,3% mostraba un aumento. Debido a la reducción de los endometriomas, en dos casos la laparoscopia programada no se realizó.

Tabla III. Cambio del tamaño de endometriomas y número después de tres meses de tratamiento con NAC.

	Número de quistes	% de casos
Sin cambios	3 (4 mujeres)	20
No más detectables en US	2*	13,3
Reducción (> 1 cm)	8 (7 mujeres)	53,3
Aumento	2	13,3
* < 2 cm en el primer ultrasonido.		

5 La percepción del dolor también se modificaba después del tratamiento con NAC. La dismenorrea, dispareunia profunda, y dolor pélvico crónico (CPP) - definido como dolor pélvico no cíclico, se evaluaron, antes y después del tratamiento de tres meses, mediante una escala analógica visual (EAV) de 10 puntos con cero representando sin dolor y 10 representando el peor dolor imaginable. La intensidad de los síntomas se clasificó como ninguno (0), leve (1-4), moderado (5-7), o grave (8-10). Los resultados obtenidos de 19 mujeres se muestran en la Tabla IV y muestran un nivel de dolor definitivamente reducido después de tres meses de tratamiento con NAC.

10 Tabla IV. Dolor después de tres meses de tratamiento con NAC en 19 mujeres.

	ninguno	leve	moderado	grave
Dispareunia				
Antes de NAC	10	3	4	2
Después de NAC	17	1	1	0
Dismenorrea				
Antes de NAC	7	0	5	7
Después de NAC	17	1	1	0
Dolor pélvico crónico				
Antes de NAC	13	0	3	3
Después de NAC	18	0	1	0

15 No se describieron efectos secundarios adversos. También se describió un caso anecdótico de embarazo. También fue anecdótica la observación descrita por el cirujano, que tenía amplia experiencia previa, de que después del tratamiento con NAC en laparoscopia, el endometrioma era más regular y compacto, y fácil de extirpar. La hemorragia durante laparoscopia era extremadamente baja.

En dos casos adicionales de nódulos del septo rectovaginal, aunque el tratamiento con NAC no modificó el tamaño de los nódulos, ambos casos resultaron menos sintomáticos.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> lasomai Aktiebolag
- 20 <120> N-acetil-cisteína para el tratamiento de endometriosis
- <130> IPQ1406
- <140> EP 09171394.1
- <141> 25-09-2009
- 25 <160> 8

<170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Mus musculus
 <400> 120
 cgcggttcta tttgttgg 20
 <210> 2
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> MUS musculus
 <400> 2
 agtcggcatc gtttatggc 20
 <210> 3
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> MUS musculus
 <400> 3
 cccccacagt caaagacact 20
 20 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> MUS musculus
 <400> 4
 25 agttgctcat cacccactc 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> MUS musculus
 30 <400> 5
 tgaatcagct ggcttttg 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> MUS musculus
 <400> 6

ES 2 382 167 T3

gtggatagct cggtggtgtt 20
<210> 7
<211> 20
<212> ADN
5 <213> Mus musculus
<400> 7
tccacagcga tatccagaca 20
<210> 8
<211> 20
10 <212> ADN
<213> MUS musculus
<400> 8
acgaagtcaa agttccaccg 20

15

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende N-acetil-L-cisteína para su uso en el tratamiento de un ser humano o mamífero que tiene endometriosis, **caracterizada porque** la composición es para administración oral durante un periodo de tiempo de dos meses o más;
- 5 durante 3-5 días consecutivos cada semana, con 2-4 días de interrupción; y a una dosis de N-acetil-L-cisteína que está entre 20 y 90 mg/kg/día, los días de administración.
2. Una composición farmacéutica que comprende N-acetil-L-cisteína para su uso de acuerdo con la reivindicación anterior, **caracterizada por** la administración a una dosis de N-acetil-L-cisteína de entre 30 y 60 mg/kg/día, los días de administración.
- 10 3. Una composición farmacéutica que comprende N-acetil-L-cisteína para su uso de acuerdo con la reivindicación anterior, **caracterizada por** la administración a una dosis de N-acetil-L-cisteína de entre 30 y 45 mg/kg/día, los días de administración.
4. Una composición farmacéutica que comprende N-acetil-L-cisteína para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** está protegida de la luz.
- 15 5. Una composición farmacéutica que comprende N-acetil-L-cisteína para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** es un comprimido soluble en agua.
6. Una composición farmacéutica que comprende N-acetil-L-cisteína para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** contiene hidrogenocarbonato sódico.
- 20 7. Una composición farmacéutica que comprende N-acetil-L-cisteína para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el tratamiento del dolor causado por endometriosis.
8. Una composición farmacéutica que comprende N-acetil-L-cisteína para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para favorecer el embarazo.
9. Una composición farmacéutica que comprende N-acetil-L-cisteína para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en el pre-tratamiento de mamíferos que tienen endometriosis antes de laparoscopia o cirugía.
- 25 10. Una composición farmacéutica que comprende N-acetil-L-cisteína para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en el tratamiento, después de laparoscopia o cirugía, para prevenir recidivas de lesiones endometriósicas.

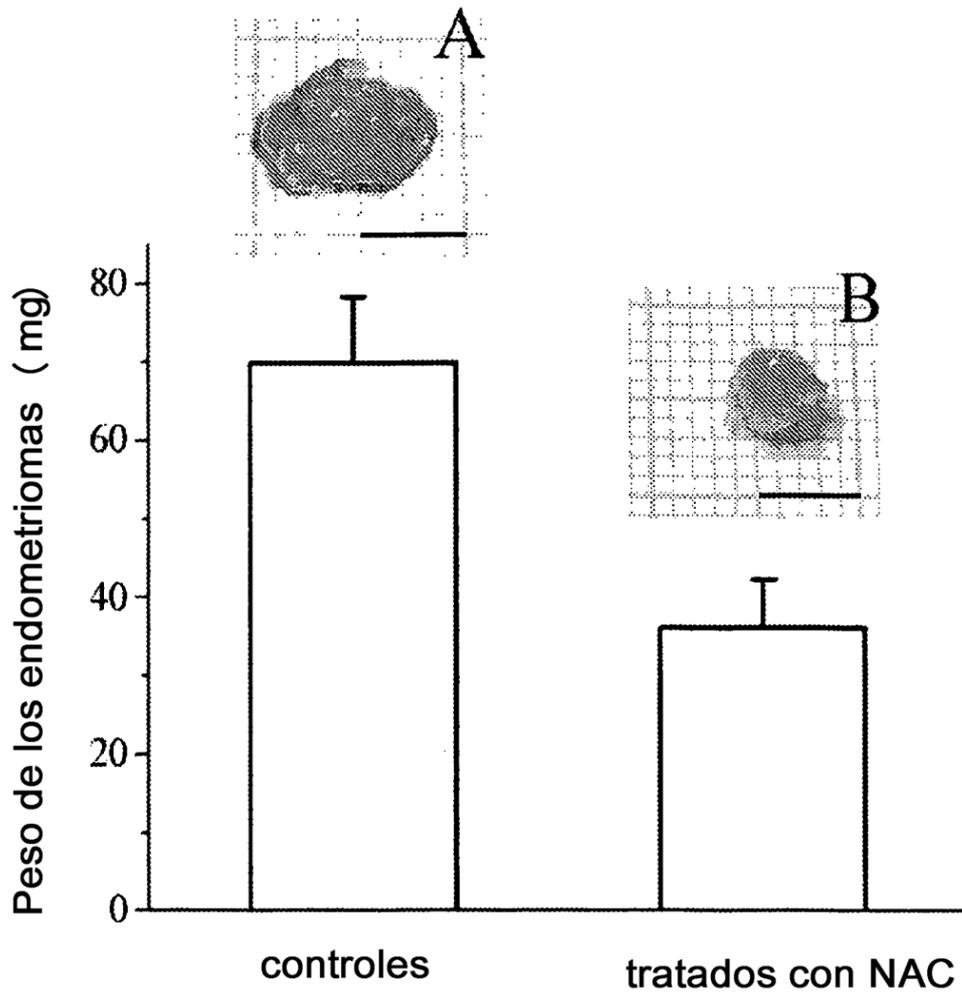


Fig. 1

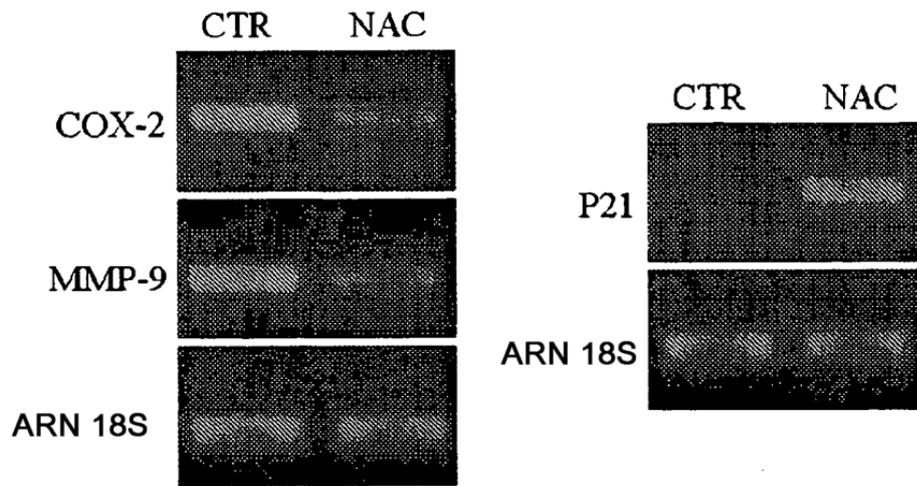


Fig. 2A

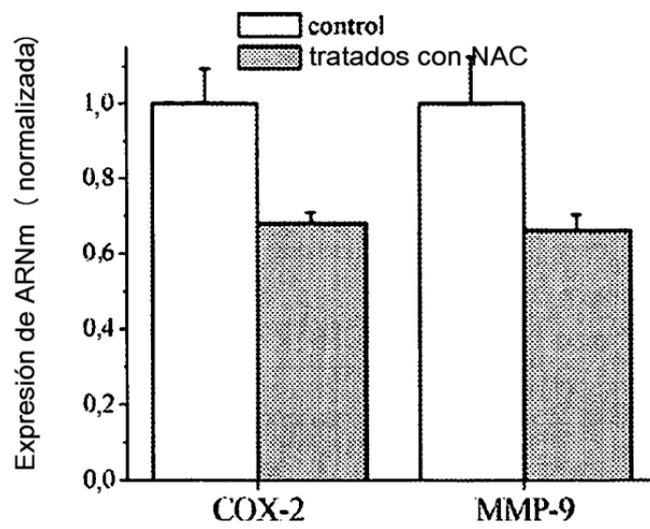


Fig. 2B

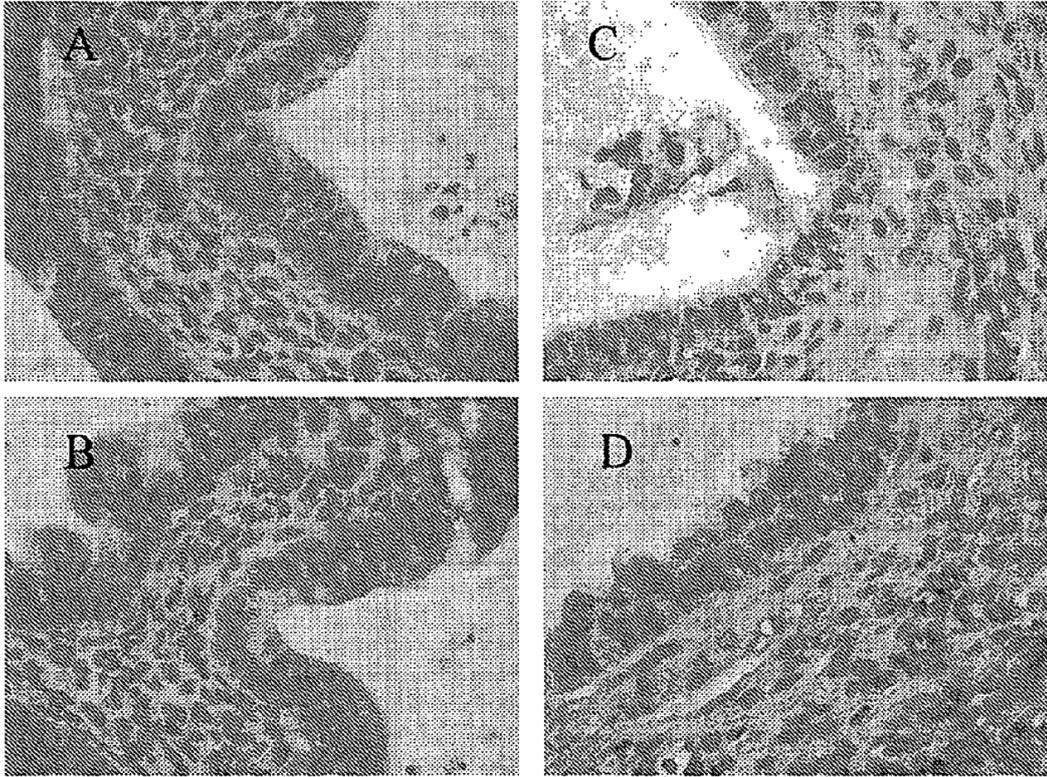


Fig. 3

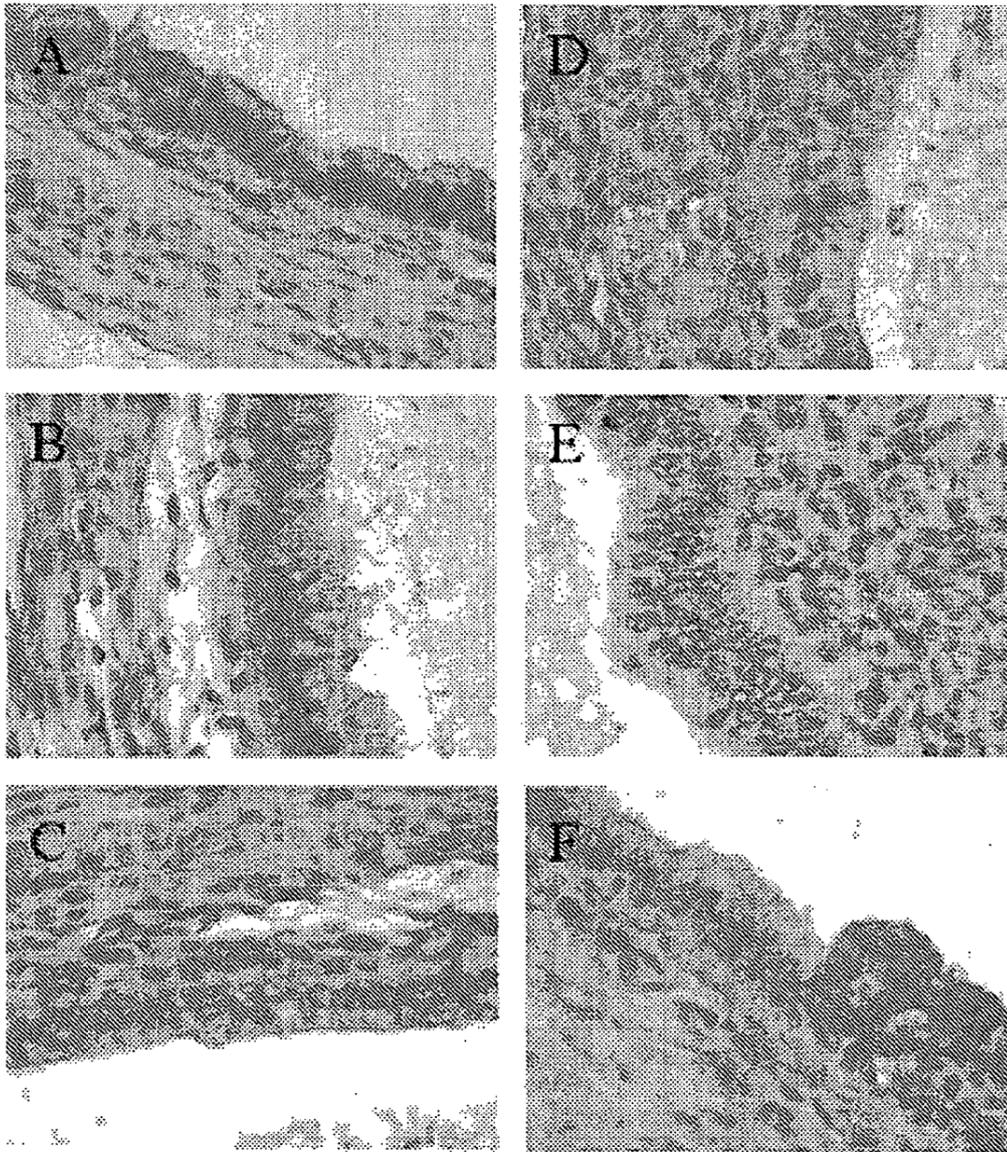


Fig. 4

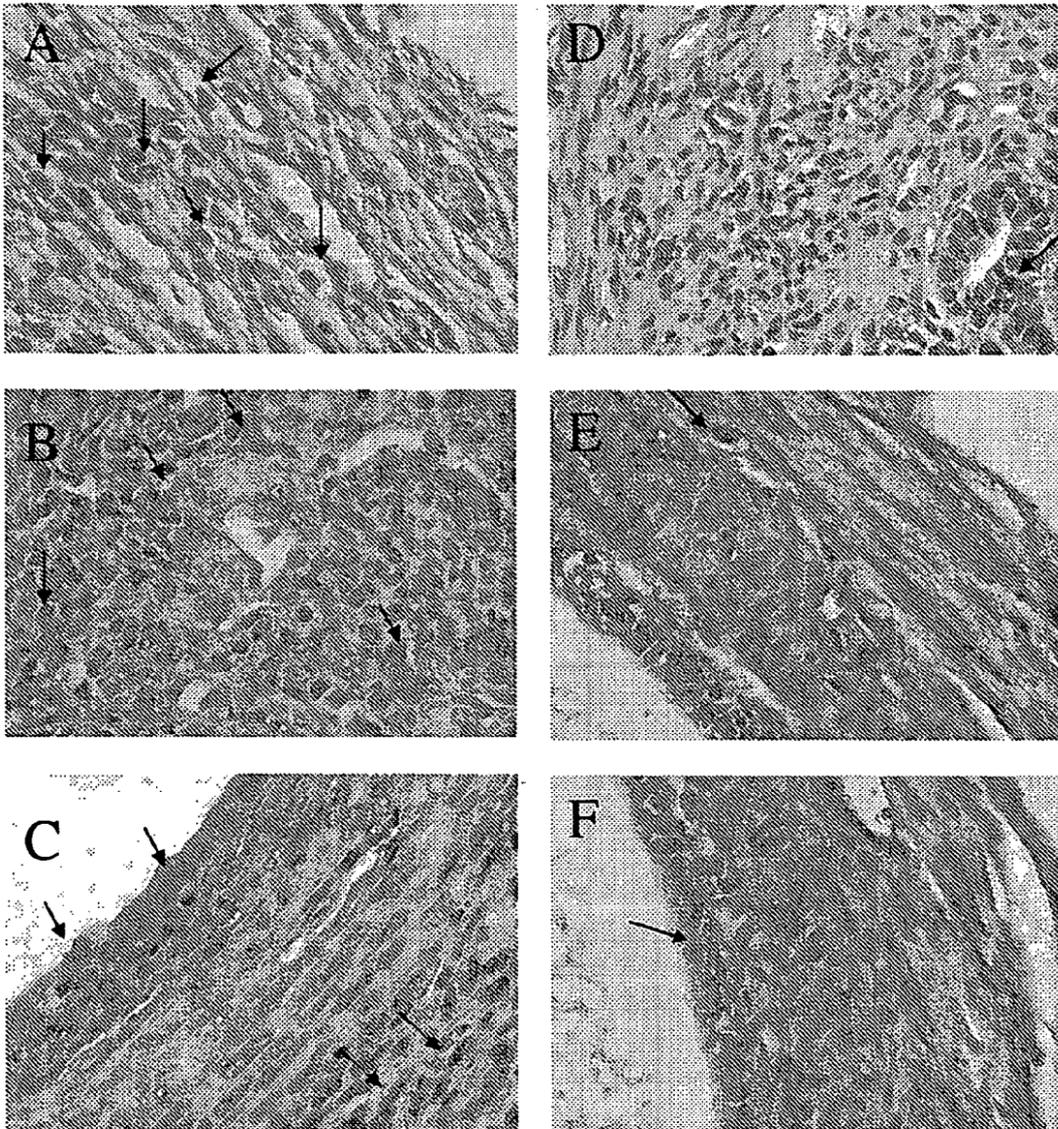


Fig. 5

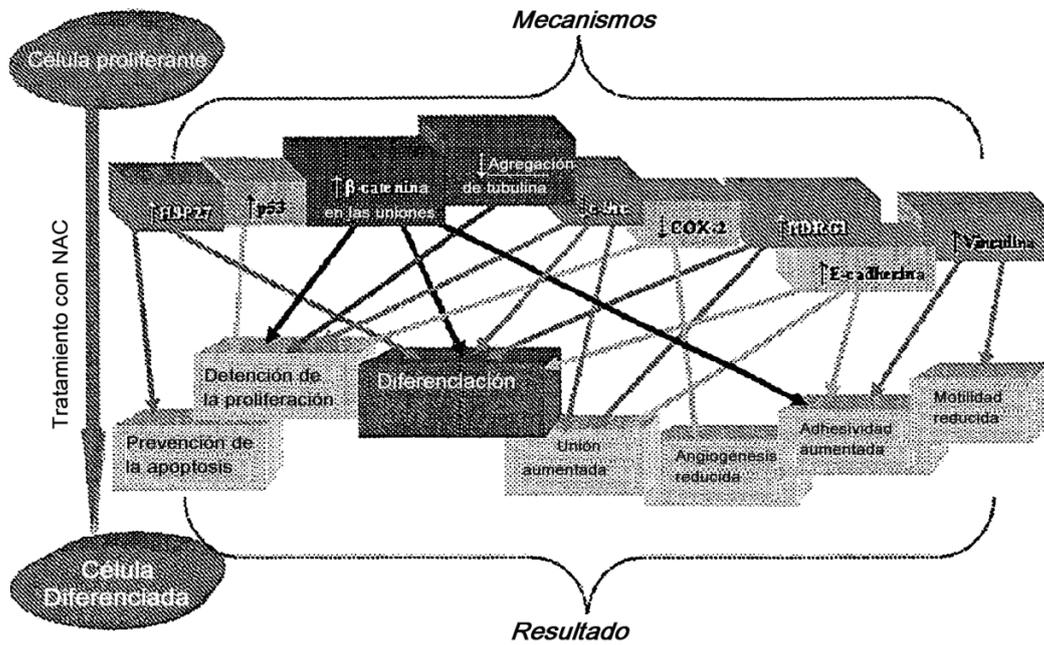


Fig. 6 (Técnica Anterior
 -efectos metabólicos en células cancerosas tratadas con NAC)