(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 305 443**

(51) Int. Cl.:
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 36/53 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 5/30 (2006.01)
A61P 5/34 (2006.01)
A61P 15/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **03706473 .0**
(86) Fecha de presentación : **10.02.2003**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1474119**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **10.11.2004**

(54) Título: **Uso de extractos que contienen fitoestrógenos que modulan de manera selectiva el receptor de estrógenos beta.**

(30) Prioridad: **15.02.2002 DE 102 06 390**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

(73) Titular/es: **Bionorica AG.**
Kerschensteiner Strasse 11-15
92318 Neumarkt, DE

(72) Inventor/es: **Wuttke, Wolfgang;**
Jarry, Hubertus;
Christoffel, Volker;
Spengler, Barbara y
Popp, Michael

(74) Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Uso de extractos que contienen fitoestrógenos que modulan de manera selectiva el receptor de estrógenos beta.

La presente invención se refiere al uso de extractos que contienen fitoestrógenos, que modulan de manera selectiva el receptor de estrógenos beta [ER-beta] sin presentar un efecto uterotrópico según el preámbulo de la reivindicación 1.

Se han empleado extractos de *Vitex agnus castus* (agnocasto, sauzgatillo) desde hace mucho tiempo para el tratamiento de anomalías temporales del ciclo menstrual, mastodinia, síndrome premenstrual, alteraciones de la menstruación (a consecuencia de insuficiencia primaria y secundaria de cuerpo lúteo), pero no se han utilizado extractos de este tipo para el tratamiento sustitutivo de estrógenos.

En la menopausia se produce una reducción del nivel de estradiol como consecuencia de la desaparición de la función ovárica. Esto da como resultado una debilitación de los procesos proliferativos y conduce en el hipotálamo a un refuerzo de la actividad del generador de pulsos de GnRH. (El generador de pulsos de la hormona liberadora de gonadotropina es una especie de temporizador en el hipotálamo y temporiza la distribución pulsátil de LH, influyendo los esteroides en la amplitud y la frecuencia). La distribución de LH estimulada resultante conduce en el caso de la mujer climatérica a oleadas de calor crecientes que se perciben como molestas, los denominados “sofocos”.

En ausencia de un nivel de estradiol suficientemente elevado en la sangre, predomina en el tejido óseo la actividad de los osteoclastos y con ello la degradación de la masa ósea, que va acompañada de un aumento en el peligro de fractura del esqueleto. Al mismo tiempo existe a largo plazo el peligro de la formación de placas en el sistema vascular y con ello el aumento en el riesgo de infartos.

Serían desventajosos los efectos de tipo estrogénico sobre el útero, la vagina, el tejido mamario y el hígado. Sin embargo es indeseable a este respecto que hasta el momento no haya estado disponible ningún fitofármaco en el estado de la técnica, que pueda usarse para una profilaxis o un tratamiento selectivo para un órgano en el caso de carencia de estrógenos.

El documento WO 01/74345 A2 describe una serie de leguminosas como fuente de fitoestrógenos para el tratamiento de la obesidad.

Partiendo de este estado de la técnica, es por tanto objetivo de la presente invención poner a disposición fármacos vegetales con efecto de tipo estrogénico.

La solución de este objetivo tiene lugar mediante un uso según la reivindicación 1.

Con los extractos que contienen fitoestrógenos, especialmente de *Vitex agnus castus*, preferiblemente frutos, de la presente invención es posible por primera vez conseguir un efecto de ER-beta selectivo (sin efecto uterotrópico). Mediante los extractos de *Vitex agnus castus* usados es posible tratar mediante la modulación del ER-beta los siguientes cuadros clínicos y estados fisiopatológicos:

- obesidad y mediante esto la posible influencia del síndrome metabólico, especialmente hipertensión, arteriosclerosis, infarto de miocardio, hiperandrogenismo.

Los extractos para el uso según la invención pueden usarse en la forma farmacéuticamente habitual, por ejemplo en forma de gotas, comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas, productos granulados, grageas, supositorios, pomadas, cremas o similares.

Los extractos de *Vitex agnus castus*, especialmente de sus frutos y/u hojas pueden obtenerse según la invención mediante extracción etanólica de la planta o de las partes de la planta.

Para demostrar la presencia de fitoestrógenos en extractos de *Vitex agnus castus* (VAC), los inventores han usado un ensayo de receptor de estrógenos competitivo en el que el estradiol marcado radiactivamente se ve desplazado de los receptores por ligandos, que igualmente se unen al receptor, denominados en lo sucesivo moduladores del receptor. Como moduladores del receptor se utilizaron por un lado estradiol no radiactivo y por otro lado el extracto que había que estudiar. La preparación de receptor consistía en una fracción citosólica de úteros de cerdo hembra, que contiene ambos subtipos del receptor de estrógenos, concretamente ER-alfa y ER-beta. Los resultados de un experimento típico se muestran en la figura 1.

La figura 1 muestra las curvas de desplazamiento del estradiol (E_2, símbolos huecos) y de extractos de VAC (símbolos opacos). El eje de ordenadas indica la proporción porcentual de la unión (aún restante) de estradiol marcado radiactivamente al receptor de estrógenos. El eje de abscisas superior designa la concentración de E_2, mientras que el eje de abscisas inferior reproduce la concentración de VAC. Aquel desplazamiento que se obtuvo con la menor concentración de las sustancias de prueba se define como el 100%. Los valores medios ± EEM se obtuvieron a partir de una determinación por triplicado. La CE_{50} de VAC asciende a 7,8 μg/ml.

Tal como resulta evidente a partir de la figura 1, los compuestos en los extractos de VAC compiten en función de la dosis con el estradiol marcado radiactivamente por los sitios de unión de los receptores de estrógenos. Los datos obtenidos demuestran de manera impresionante que los extractos estudiados contienen fitoestrógenos.

Para fundamentar este hallazgo aún más, se realizó el mismo ensayo con una preparación de receptor de endometrio humano. De nuevo están presentes ambos subtipos de ER en la disolución. Los resultados de estos estudios se muestran en la figura 2.

La figura 2 muestra las curvas de desplazamiento del estradiol marcado radiactivamente de ER de endometrio humano por estradiol (E_2, símbolos huecos) y extractos de VAC (símbolos opacos). El eje de ordenadas indica la proporción porcentual de la unión (aún restante) de estradiol marcado radiactivamente al receptor de estrógenos. El eje de abscisas superior designa la concentración de E_2, mientras que el eje de abscisas inferior reproduce la concentración de VAC. Aquel desplazamiento que se obtuvo con la menor concentración de las sustancias de prueba se define como el 100%. Los valores medios ± EEM se obtuvieron a partir de una determinación por triplicado. La CE_{50} de VAC asciende a 12,7 μg/ml.

Los resultados muestran claramente que los fitoestrógenos de extractos de VAC se unen a los receptores de estrógenos humanos, lo que es el resultado molecular inicial en el caso de un efecto de tipo estrogénico de compuestos de VAC en el ser humano.

Debido a la disponibilidad de proteínas receptoras recombinantes pueden realizarse ensayos de ER específicos del subtipo (ER-alfa o ER-beta). El resultado en forma de una curva de desplazamiento de ER-alfa típica se muestra en la figura 3.

La figura 3 muestra curvas de dosis/efecto de estradiol (E_2, símbolos huecos) y de los extractos de VAC de la solicitante (símbolos opacos) en un ensayo con ER-alfa humano recombinante. El eje de abscisas superior indica la concentración de E_2, mientras que el inferior indica la concentración de VAC. Aquella unión, que se obtuvo con la menor concentración de las sustancias de prueba, se definió con el 100%. Los valores medios ± EEM se obtuvieron a partir de determinaciones por triplicado por valor de concentración.

Mientras que E_2 muestra una competencia en función de la dosis con respecto al ligando receptor radiactivo, los fitoestrógenos del extracto de VAC no se unen al ER-alfa. Por consiguiente no pudo calcularse la CE_{50}.

Con los mismos compuestos de prueba que en el ensayo de ER-alfa, se realizaron ahora los ensayos de ER-beta. Los datos y el gráfico de un experimento representativo se muestran en la figura 4.

La figura 4 muestra curvas de dosis/efecto de estradiol (E_2, símbolos huecos) y de los extractos de VAC de la solicitante (símbolos opacos) en un ensayo con ER-beta humano recombinante. El eje de abscisas superior indica la concentración de E2, mientras que el inferior indica la concentración de VAC. Aquel desplazamiento, que se obtuvo con la menor concentración de los compuestos de prueba, se definió como el 100%. Los valores medios ± EEM se obtuvieron a partir de determinaciones por triplicado por valor de concentración. La CE_{50} de VAC asciende a 9,9 μg/ml.

A diferencia del ensayo de ER-alfa, los fitoestrógenos de los extractos de VAC de la solicitante se unen en función de la dosis al ER-beta. Estos datos confirman sin ninguna duda la selectividad de ER-beta de los extractos de *Vitex agnus castus* de la solicitante.

Para la comprobación del efecto uterotrópico se realizó el siguiente experimento, cuyos datos se muestran gráficamente en la figura 5.

A lo largo de tres meses se mezclaron dos concentraciones diferentes de extractos de VAC (100 mg/kg = VAC100 y 400 mg/kg de peso corporal = VAC400) con el alimento de ratas hembra sometidas a ovariectomía y machos sometidos a orquiectomía. El VAC, a diferencia del estradiol, no tuvo ninguna influencia uterotrópica y tampoco se vio influido el epitelio vaginal. Ambos efectos proliferativos del estradiol son indeseados en el marco del tratamiento sustitutivo de estrógenos peri y posclimatérico o de un tratamiento hormonal sustitutivo en el caso de mujeres tras una ovariectomía, dado que en el caso de una administración continua de estrógenos y una contrarregulación mediante gestágenos no puede excluirse una hiperplasia del endometrio por el efecto proliferativo persistente del estradiol.

En la figura 5 se indican en el eje de ordenadas los pesos uterinos de las ratas. Las barras individuales se refieren al grupo control (sometido sólo a ovariectomía), un control positivo de estradiol, así como a los efectos con dos concentraciones de extracto de VAC diferentes.

No pudo detectarse un efecto uterotrópico tal como en el caso del estradiol según la figura 5 en el caso de los animales tratados con VAC, lo que significa que el VAC no tiene un efecto proliferativo sobre el tejido uterino.

Sin embargo se encontró sorprendentemente en otros estudios, que el VAC puede tener efectos estrogénicos sobre otros sistemas de órganos.

Con tomografía computerizada se determinó el tejido adiposo abdominal y paratibial en ratas macho y hembra. Con E_2 y la dosis alta de *Vitex agnus castus* se observó una reducción de ambas proporciones de tejido. Al mismo tiempo disminuyen los niveles de leptina sérica de los animales tratados con VAC. Los resultados de este estudio se muestran en las figuras 6 y 7.

La figura 6 muestra el efecto del estradiol y dos concentraciones de VAC diferentes sobre el tejido adiposo paratibial, representado como la proporción en área porcentual del tejido adiposo de una imagen de TC en la zona de la tibia frente a un control.

La figura 7 muestra el efecto del estradiol y dos concentraciones de VAC diferentes sobre el contenido en leptina sérica, indicado en el eje de ordenadas en ng/ml.

Tal como resulta evidente a partir de las figuras 6 y 7, se muestra una disminución del contenido en grasa paratibial y una disminución de la concentración de leptina sérica con la administración de VAC.

Igualmente con tomografía computerizada se observó la modificación de la densidad ósea (menor desarrollo de osteoporosis) en la metáfisis de la tibia en el caso de ratas macho y hembra. Se demostró que con VAC se reducía claramente menos la densidad ósea que en el caso de los animales control no tratados.

La instilación de 1 ml de solución fisiológica de cloruro de sodio con un catéter en la vejiga de ratas hembra sometidas a ovariectomía en el transcurso de 1 min. conduce a un aumento de la presión interna de la vejiga. En el caso de animales a los que se les había sustituido durante tres meses con E_2, el aumento de presión es aproximadamente tres veces mayor que en el caso de los animales control tratados de manera ficticia y es un poco más débil pero de manera significativa que en el caso de los animales tratados con estradiol, cuando se trataron los animales con VAC. Los resultados de este estudio se muestran en las figuras 8 y 9.

En la figura 8 se indica en el eje de ordenadas la máxima presión interna de la vejiga en mm de Hg que se midió para un control, el estradiol como control positivo y dos concentraciones de VAC diferentes.

La figura 9 muestra por el contrario en el eje de ordenadas el área bajo la curva de medición de la presión [AUC] en mm de Hg x s para un control, el estradiol como control positivo y dos concentraciones de VAC diferentes.

Después de todo es por tanto posible utilizar extractos de VAC para la producción de fármacos para el tratamiento de:

- obesidad y mediante esto la posible influencia del síndrome metabólico, especialmente hipertensión, arteriosclerosis, infarto de miocardio, hiperandrogenismo, sin efecto uterotrópico.

Bibliografía

1.) **Hrabovszky** E, **Shughrue** PJ, **Merchenthaler** I, **Hajszan** T, **Carpenter** CD, **Liposits** Z, **Petersen** SL Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125l-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology* septiembre de 2000; 141 (9): 3506-9.

2.) **Hosokawa** K, **Ottander** U, **Wahlberg** P, **Ny** T, **Cajander** S, **Olofsson** IJ. Dominant expression and distribution of oestrogen receptor beta over oestrogen receptor alpha in the human corpus luteum. *Mol Hum Reprod* febrero de 2001; 7(2): 137-45.

3.) **Taylor** AH, **Al-Azzawi** F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol* febrero de 2000; 24(1): 145-55.

4.) **Kuiper** GG, **Carlsson** B, **Grandien** K, **Enmark** E, **Haggblad** J, **Nilsson** S, **Gustafsson** JA 1997 Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138: 863-870.

5.) **Saunders** PT, **Maguire** SM, **Gaughan** J, **Millar** MR, 1997 Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. *J Endocrinol* 154: R13-R16.

6.) **Mäkelä** S, **Strauss** L, **Kuiper** G, **Valve** E, **Salmi** S, **Santti** R, **Gustafsson** JA, 2000 Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in adult rat accessory sex glands and lower urinary tract. *Mol Cell Endocrinol* 164: 109-116.

REIVINDICACIONES

1. Uso de extractos que contienen fitoestrógenos exclusivamente de *Vitex agnus castus* para la producción de un medicamento para la modulación selectiva del receptor de estrógenos beta sin efecto uterotrópico, **caracterizado** porque la modulación selectiva del receptor de estrógenos beta se utiliza para el tratamiento de cuadros clínicos y estados fisiopatológicos de

- obesidad y mediante esto la posible influencia del síndrome metabólico, especialmente hipertensión, arteriosclerosis, infarto de miocardio, hiperandrogenismo,

pudiendo producirse los extractos mediante extracción etanólica.

2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el extracto se usa en la forma farmacéuticamente habitual.

3. Uso según la reivindicación 3, **caracterizado** porque como formulación farmacéutica se usan gotas, comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas, productos granulados, grageas, supositorios, pomadas, cremas.

4. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque los extractos de *Vitex agnus castus* pueden producirse a partir de sus frutos y/u hojas.

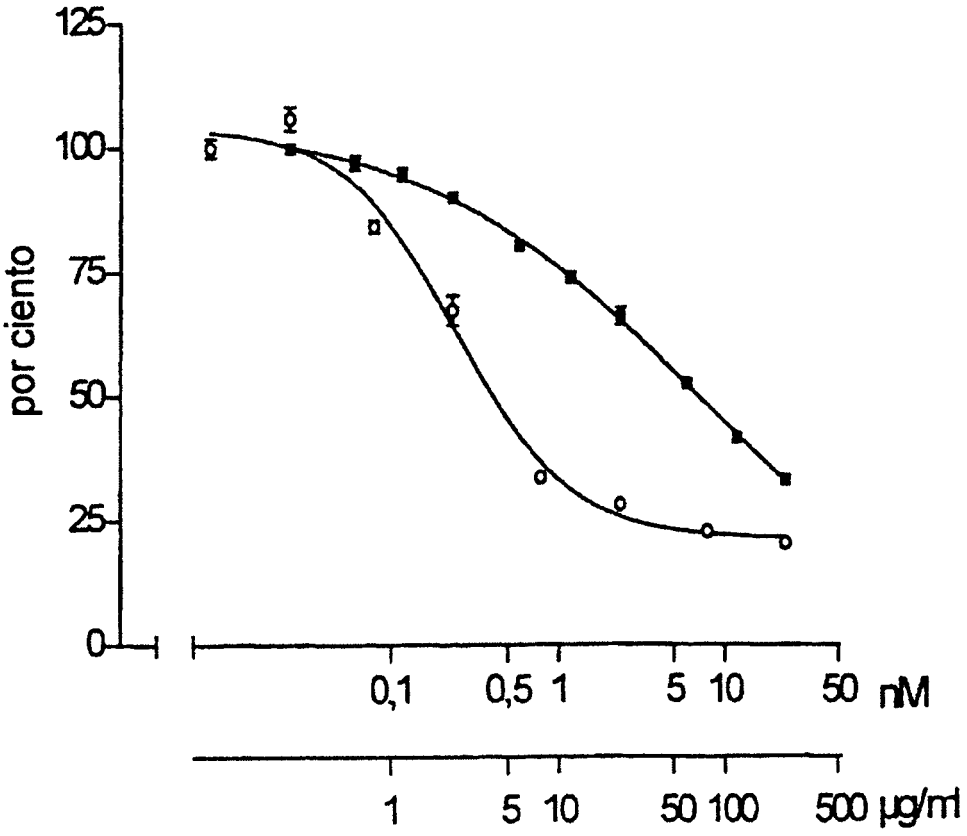

125
100
75
50
25
0
por ciento
0,1
0,5
1
5
10
50
nM
1
5
10
50
100
500
µg/ml

Fig. 1

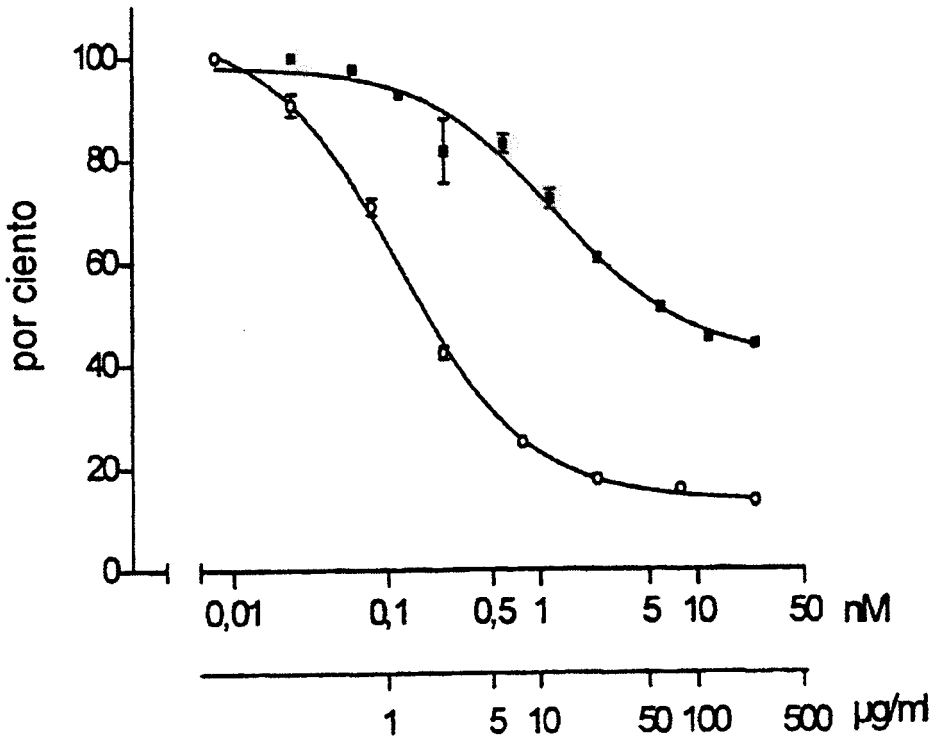

100
80
60
40
20
0
por ciento
0,01
0,1
0,5
1
5
10
50
nM
1
5
10
50
100
500
µg/ml

Fig. 2

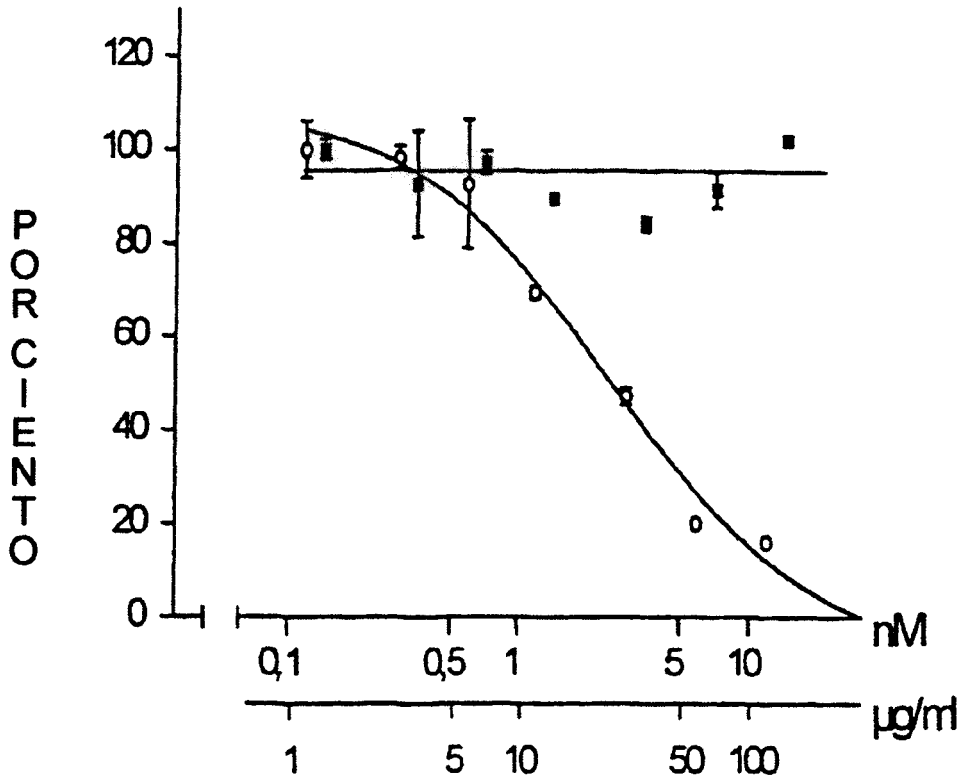


Fig. 3

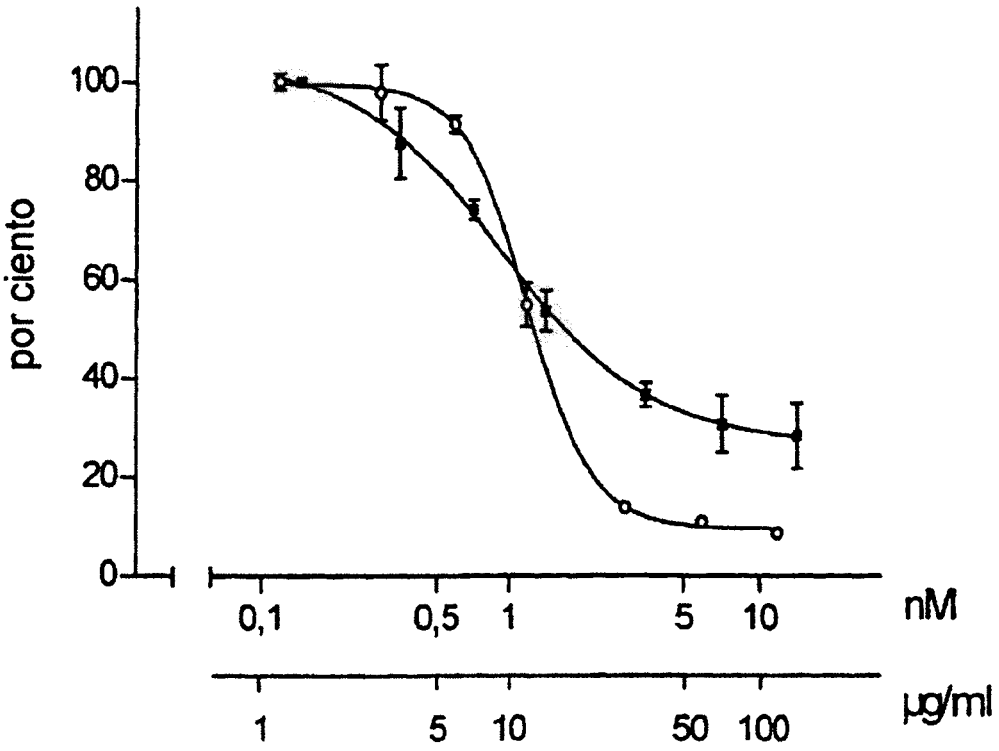


Fig. 4

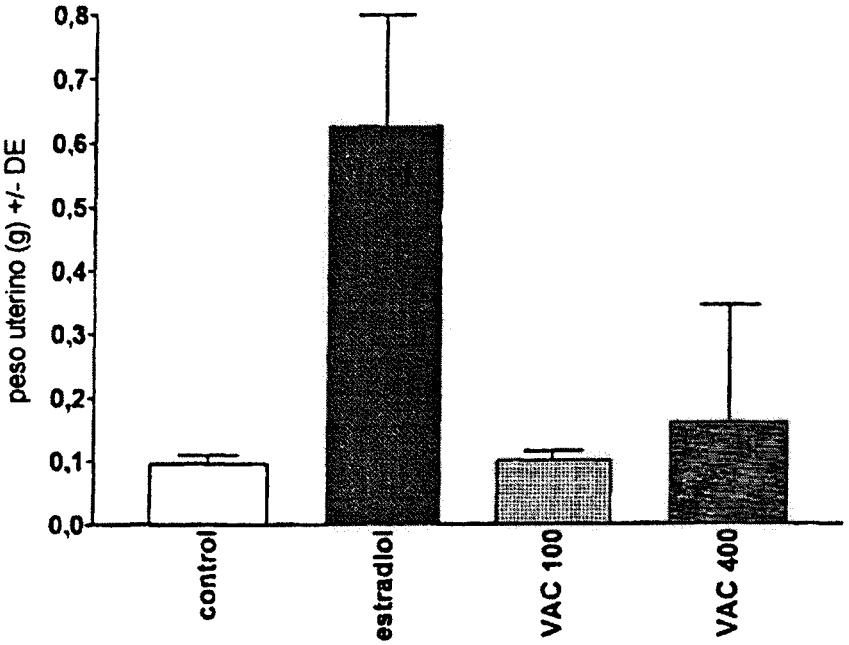

peso uterino (g) +/- DE
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
control
estradiol
VAC 100
VAC 400

Fig. 5

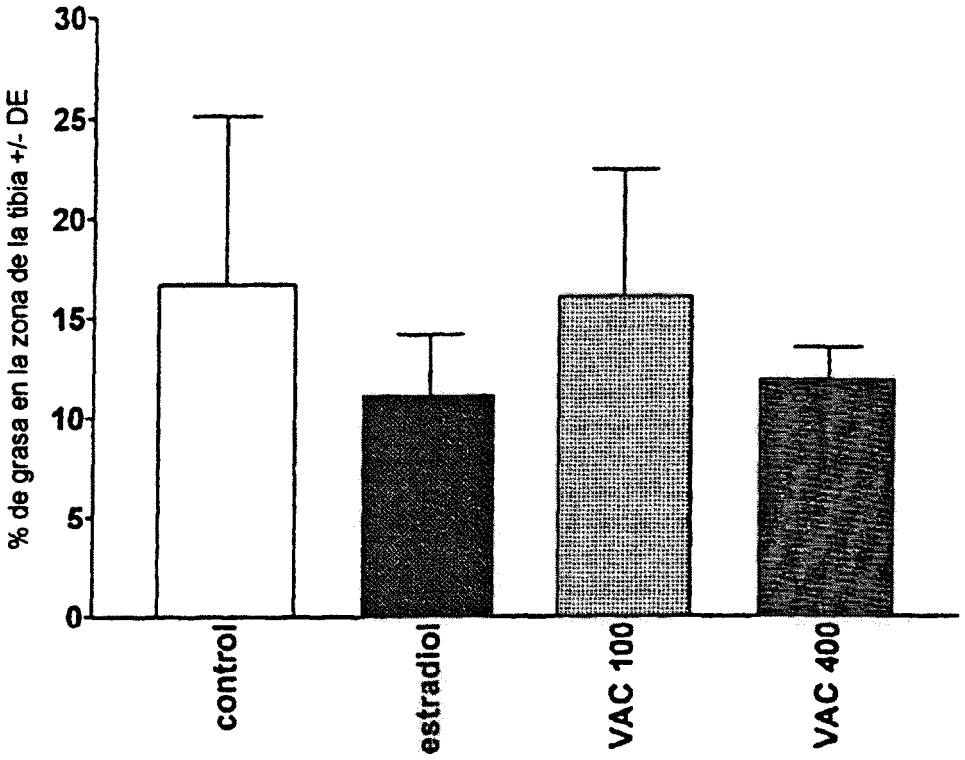

% de grasa en la zona de la tibia +/- DE
30
25
20
15
10
5
0
control
estradiol
VAC 100
VAC 400

Fig. 6

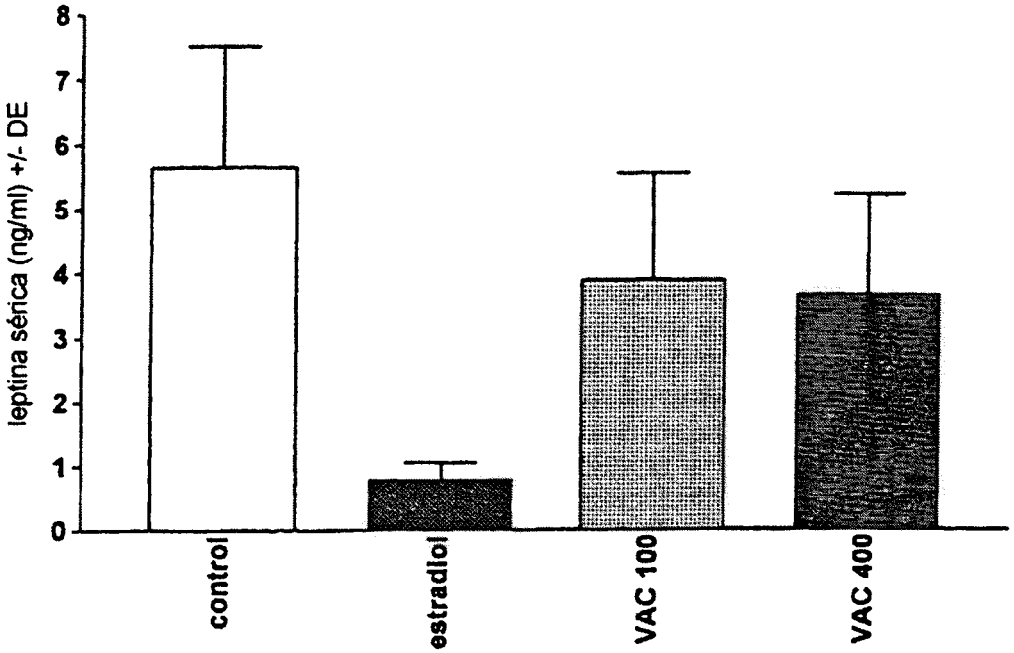

leptina sérica (ng/ml) +/- DE
8
7
6
5
4
3
2
1
0
control
estradiol
VAC 100
VAC 400

Fig. 7

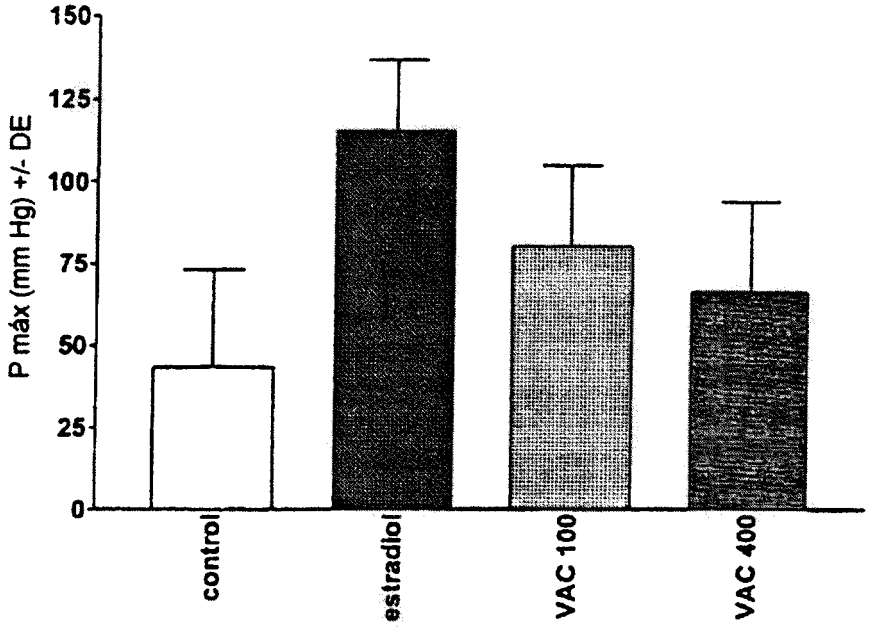

150
125
100
75
50
25
0
P máx (mm Hg) +/- DE
control
estradiol
VAC 100
VAC 400

Fig. 8

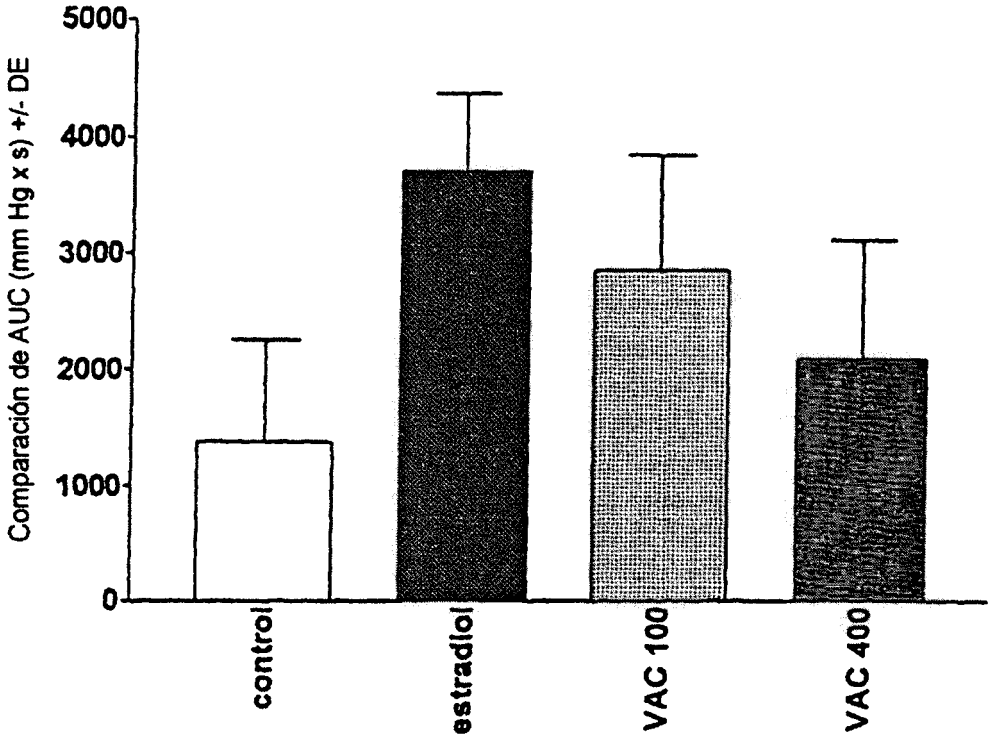

Comparación de AUC (mm Hg x s) +/- DE
5000
4000
3000
2000
1000
0
control
estradiol
VAC 100
VAC 400

Fig. 9