



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată  
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: <b>96-01583</b>	(61) Perfecționare la brevet: Nr.
(22) Data de depozit: <b>02.02.1995</b>	(62) Divizată din cererea: Nr.
(30) Prioritate: <b>04.02.1994 US 08/191,631;</b>	(86) Cerere internațională PCT: Nr. <b>US 95 / 01479 02.02.1995</b>
(41) Data publicării cererii: <b>30.04.1997</b> BOPI nr. <b>4/1997</b>	(87) Publicare internațională: Nr. <b>WO 95/20972 10.08.1995</b>
(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: <b>29.03.2002</b> BOPI nr. <b>3/2002</b>	(56) Documente din stadiul tehnicii: <i>Journal. of Clinical Endocrinology and Metabolism</i> , V.66; No.3, issued 1992, V.G. Garzo et al, <i>Effects of and Antiprogesterone (RU 486) on the Hypothalamic-Hypophysel-Ovarian-Endometrial Axis During Luteal Phase of the Menstrual Cycle</i> , pag. 508...517; Case et al., <i>J. Clin. Endocrinol. Metab.</i> , 76:1217, 1993
(45) Data eliberării și publicării brevetului: BOPI nr.	

(71) Solicitant:	THE MEDICAL COLLEGE OF HAMPTON ROADS, NORFOLK, VIRGINIA, US;
(73) Titular:	THE MEDICAL COLLEGE OF HAMPTON ROADS, NORFOLK, VIRGINIA, US;
(72) Inventatori:	HODGEN GARY D., NORFOLK, VIRGINIA, US; WILLIAMS ROBERT F., NORFOLK, VIRGINIA, US; GROW DANIEL, LONGMEADOW, MASSACHUSETTS, US;
(74) Mandatar:	CABINET ENPORA S.R.L., BUCUREȘTI;

(54) **METODĂ DE TRATAMENT A UNOR STĂRI DEPENDENTE DE ESTROGENUL OVARIAN**

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la o metodă de tratament a unor stări dependente de estrogenul ovarian, ce constă în administrarea la o femeie a analogului de hormon eliberator de gonadotropină, timp de cel puțin 30 de zile, în cantitate suficientă pentru a scădea nivelul estrogenului circulant din sânge la 20 pg/ml sau mai puțin,

urmată de administrarea unui antiprogestiv într-o cantitate antiproliferativă și conservatoare a osului, în stări ovariene precum: amenoree, endometrioză, leiomiomatoză uterină, sindroame premenstruale și sângerări uterine disfuncționale.

Revendicări: 16  
Figuri: 3

RO 117420 B



Invenția se referă la o metodă de tratament a unor stări dependente de estrogenul ovarian.

Endometrioza este definită ca prezența ectopică a glandelor și stromei de tip endometrial în locuri situate în afara uterului. Este caracteristică apariția ectopică a țesutului endometrial ce duce la formarea de chisturi care conțin sânge alterat. Această stare determină durere importantă la milioane de femei din întreaga lume, apărând mai ales asociată cu proliferarea lunară a țesutului endometrial. În mod frecvent, endometrioza este o stare ce persistă toată viața.

Endometrioza poate fi tratată printr-o varietate de tratamente medicale, însă nici unul dintre acestea nu este suficient de eficient pe termen mai lung, adică peste șase luni. Cel mai vechi tratament, cu efect demonstrabil, este probabil, administrarea unui progestativ injectabil, oral sau în combinație cu contraceptive orale.

Totuși, administrarea progestativelor pe termen lung, mai ales a celor androgenice, a fost asociată cu un mare număr de reacții adverse nedorite și nu a primit aviz legal în Statele Unite ale Americii.

Un steroid sintetic, derivat din etisteronă, numit 17 -  $\alpha$  - pregna - 2,4 - dien - 20 - yno [2,3 - d] - isoxazol - 17 - ol, cunoscut și sub numele de danazol și comercializat sub marca Danocrine, s-a dovedit a fi un tratament eficient al endometriozei, inducând o stare hipoestrogenică. Din nefericire, și acest medicament are multe reacții adverse androgenice. Pe lângă eliminarea estrogenului prin mecanism vasomotor, se produce creșterea în greutate, crampe la nivelul mușchilor lungi, atrofia sânilor, bufeuri, oscilații ale stării de bună dispoziție, tegumente grase, depresie, edeme, acnee, oboseală, hirsutism, alterări ale libidoului, cefalee, urticarie și îngroșarea vocii.

Unul dintre cele mai eficiente tratamente ale endometriozei este administrarea unui agonist de hormon eliberator de gonadotropină ( GnRH ), care suprimă secreția hipofizară de gonadotropină, inducând prin aceasta o stare de pseudo-menopauză reversibilă. Deși, răspunsul individual variază, endometrioza regresează de regulă foarte rapid, în doar trei luni de la începerea tratamentului. La oprirea tratamentului, frecvent durerea revine, iar endometrioza reapare la câteva luni după restabilirea unui ciclu normal. Medicamentul mai poate fi folosit și în tratamentul tumorilor uterine fibroase (leiomiome). Principalul dezavantaj al acestui tratament este o serie de reacții adverse, rezultate din hipoestrogenismul sever sau din starea de premenopauză indusă de lipsa severă de estrogen, ce constă în bufeuri, osteoporoză și pierderea protecției cardiovasculare dată de estrogen. Într-adevăr, scopul tratamentului de substituție hormonală este prezența de estrogen și/sau progestativ care astfel previne osteoporoza. Deși, răspunsul individual variază de această dată, de regulă osteoporoza devine măsurabilă după aproximativ trei luni de la tratament, iar după aproximativ șase luni de tratament, la cele mai vulnerabile paciente se constată o osteoporoză importantă. Lipsa totală de acceptare a acestei reacții adverse, din punct de vedere al raportului beneficiu-risc, reiese și din faptul că indicele de mortalitate este de aproximativ 3,2 ani, după ce o femeie aflată în post-menopauză a avut o fractură de șold datorată osteoporozei. Datorită acestei reacții adverse Administrația Statelor Unite pentru Alimente și Medicamente (USFDA) interzice orice administrare a unui analog de hormon eliberator de gonadotropină, peste un total de șase luni de administrare. Cu alte cuvinte, medicamentul nu poate fi readministrat după o perioadă de pauză, în conformitate cu dispoziția expresă a FDA.

Leiomiomele și endometrioza sunt deopotrivă dependente de estrogenul ovarian. Un medicament care s-a observat că are eficiență în tratamentul endometriozei și leiomiomelor uterine este un antiprogestiv (numit uneori "antagonist de progesteron" sau "antigestagen"). A se vedea, de exemplu, Chwalisz et al., *Endocrinology*, 129 (1): 312, 1991; Kettel et al., *Fertil Steril*, 56 (3): 402, 1991; Murphy et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 76 (2): 513, 1991. A se vedea, de asemenea, Gravanis et. Al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 60:156, 1986 și Wolf et al., *Fertil Steril*, 52: 1055, 1989.

Sindromul premenstrual (SPM) și sângerarea uterină disfuncțională (SUD) sunt, de asemenea, stări dependente de un ciclu hormonal derivat din producția de estrogen a ovarelor.

S-au efectuat studii privind folosirea unei combinații de agonist de hormon eliberator de gonadotropină (leuprolid) cu progestativ (medroxiprogesteron acetat), pentru tratamentul leiomiomatozei uterine. În administrarea concomitentă, s-a observat că progestativul anulează eficiența hipoestrogenismului, indus de agonist asupra scăderii volumului nemiomatos, ceea ce înseamnă că tratamentul a împiedicat efectele pozitive ale tratamentului cu agonist. Atunci când este folosit în regim de administrare succesivă, progestativul reduce bufeurile și pierderea urinară de calciu, dar s-a înregistrat și o creștere ușoară a volumului uterin total, deși acesta nu a mai revenit la valorile de bază. A se vedea, Case et al., *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 76: 1217, 1993. 55 60

S-a descoperit, iar în prezent se cunoaște faptul că un regim de administrare al unui analog de hormon eliberator de gonadotropină combinat cu un antiprogestativ va acționa în sensul ameliorării simptomelor, date de stările dependente de estrogenul ovarian precum: endometrioza, leiomatoza uterină, sindromul premenstrual și sângerarea și în plus va ameliora efectele de osteoporoză datorate pierderii estrogenului, prin administrarea analogului de GnRH. 65

Metoda, conform invenției, constă în administrarea la o femeie a analogului de hormon eliberator de gonadotropină, timp de cel puțin 30 de zile, în cantitate suficientă pentru a scădea nivelul estrogenului circulant din sânge la 20 pg/ml sau mai puțin, urmată de administrarea unui antiprogestativ într-o cantitate antiproliferativă și conservatoare a osului. 70

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- siguranță îmbunătățită a metodei de tratament; 75
- lipsa de efecte adverse sau acțiuni nedorite pentru compuși, aceștia fiind selectați în mod special;
- timpul afectat aplicării metodei este suficient pentru a scădea nivelul estrogenului circulant și pentru a preveni osteoporoza, prin conservarea osului.

Invenția va deveni evidentă specialiștilor în domeniu, din descrierea detaliată care urmează. 80

- fig. 1, diagramă a mediei zilnice a estradiolului seric.

- fig. 2, diagramă a endometriozei peritoneale rezultată în urma unor diferite regimuri de tratament.

- fig. 3, diagramă a densității minerale a osului rezultată în urma unor diferite regimuri de tratament. 85

Invenția se referă, în general, la tratamentul stărilor dependente de estrogenul ovarian, precum: endometrioza, tumori miomatoase (de exemplu, leiomiomatoza uterină), sindrom premenstrual și/sau sângerare uterină disfuncțională.

Conform invenției de față, o femeie prezentând o stare dependentă de estrogenul ovarian, cum ar fi, endometrioza, leiomiomatoza uterină, sindromul premenstrual și/sau o sângerare uterină disfuncțională, este tratată, atât cu un analog de hormon eliberator de gonadotropină, cât și cu un antiprogestativ. 90

În mod surprinzător, nu numai că simptomele endometriozei, sindroamele premenstruale, sângerările uterine disfuncționale și tumorile miomatoase sunt ameliorate, dar și diminuarea densității osoase asociată scăderii estrogenului este combătută, iar în unele cazuri este chiar anulată. 95

Ca rezultat, poate fi crescută toleranța la regimul de tratament și durata acestuia, fiind prezentată utilizarea administrării antiprogestativului pe o durată mai mare de șase luni.

## RO 117420 B

100 Deși, nivelul bazal al estrogenului circulant este mai ridicat în cursul administrării antipro-  
gestativului, decât în cursul tratamentului anti-GnRH, nu s-a înregistrat o vindecare aparentă  
a stării de boală, cu toate că în același timp, densitatea osoasă se menține sau crește. Cu  
toate că explicația nu se limitează la sfera teoretică, se crede că există praguri diferențiate  
105 ale efectului estrogenic, în așa fel, încât, după reducerea inițială a estrogenului, se înre-  
gistrează o fereastră de concentrații mai mari, în care nivelul redus al estrogenului circulant  
stabilește beneficiul terapeutic și ameliorează starea de boală, dar aceeași concentrație nu  
induce o osteoporoză rapidă, masa osoasă fiind păstrată sau chiar crescută.

Hormonul eliberator de gonadotropină este un polipeptid mic, produs în hipotalamus  
și este uneori numit hormon eliberator gonadotropic, hormon eliberator de hormon luteini-  
110 zant, GnRH sau LHRH.

În invenția de față, poate fi folosit orice analog al acestui polipeptid, fie el antagonist  
ori agonist.

Exemple de antagoniști de hormon eliberator de gonadotropină, pot fi găsite, printre  
115 altele: **US 4409208, 4547370, 4565804, 4569927, 4619914, 5198 533** și în **WO 89/01944**,  
ale căror descrieri sunt încorporate în invenția de față prin referință.

Exemplele unor astfel de antagoniști includ Antide ( un decapeptid reprezentat de  
formula D - Ac - D - 2 - Nal<sup>1</sup> - DpClPhe<sup>2</sup> - D - 3 - Pal<sup>3</sup> - Ser<sup>4</sup> - NiLys<sup>5</sup> - D - NicLys<sup>6</sup> - Leu<sup>7</sup> - Ilys<sup>8</sup>  
- D - Ala<sup>10</sup>), [Ac - D4CIDPhe<sup>1</sup>, D4CIDPhe<sup>2</sup>, Dtrp<sup>3</sup>, Darg<sup>6</sup>, Dala<sup>10</sup> ] GnRH, [Ac - 4 CIDPhe<sup>2</sup>,  
120 D<sub>3</sub>Pal<sup>3</sup>, Arg<sup>5</sup>, D<sub>2</sub>Nal<sup>6</sup>, Dala<sup>10</sup> ] GnRH, [Ac - 4CIDPhe<sup>2</sup>, Trp<sup>3</sup>, DArg<sup>6</sup>, DALa<sup>10</sup> ] GnRH, [AcD<sub>2</sub> Nal<sup>1</sup>,  
4FDPhe<sup>2</sup>, DTrp<sup>3</sup>, DArg<sup>6</sup> ] GnRH, [Ac - D2Nal<sup>1</sup>, 4CIDPhe<sup>2</sup>, DTrp<sup>3</sup>, DhArg(Et<sub>2</sub>)<sup>6</sup>, DALa<sup>10</sup> ] GnRH  
și [Ac - Nal<sup>1</sup>, DMEClPhe<sup>2</sup>, DPal<sup>3</sup>, Ser<sup>4</sup>, Tyr<sup>5</sup>, DArg<sup>6</sup>, Leu<sup>7</sup>, Ilys<sup>8</sup>, Pro<sup>9</sup>, DALa<sup>10</sup> ] GnRH.

Exemplele de agoniști de hormon eliberator de gonadotropină includ leuprolid,  
nafarelin, buserelin, [DALa<sup>6</sup> - des Gly - NH<sub>2</sub><sup>10</sup> ] GnRH, [DLys<sup>6</sup> ] GnRH, [Dlys<sup>6</sup> ] GnRH, [Dala<sup>6</sup>]  
125 GnRH, [2 - Me - Ala<sup>6</sup> ] GnRH, [D - α - aminobutiroil<sup>6</sup>, des - GlyNH<sub>2</sub><sup>10</sup> ] GnRH, triporelin,  
lutrelin, goserelin, histerelin, etc.

Analogii de hormon eliberator de gonadotropină folosiți în invenția de față pot fi admi-  
nistrați sub formă de săruri sau complexe netoxice, acceptabile din punct de vedere  
farmaceutic.

Sărurile includ săruri de adiție de acizi, cum ar fi, de exemplu, clorhidrat, bromhidrat,  
130 sulfat, fosfat, nitrat, oxalat, fumarat, gluconat, tanat, maleat, acetat, benzoat, succinat,  
alginat, malat, ascorbat, tartrat, etc. Complexele pot fi formate cu metalele, ca de exemplu:  
zinc, bariu, calciu, magneziu, aluminiu, etc.

Aspectele legate de analogul hormonului eliberator de gonadotropină din invenția de  
față sunt similare cu folosirea anterioară a unor astfel de analogi în tratamentul endo-  
135 metriozei și/sau leiomatozei uterine. Deci, nu numai că poate fi utilizat orice analog de GnRH  
cunoscut, dar și cantitatea pe doză și modul de administrare, aplicate până în prezent pot  
fi folosite în practica invenției de față. Ca urmare, calea de administrare poate fi oricare cale  
convențională, prin care analogul este activ, spre exemplu: calea orală, intravenoasă, sub-  
cutanată, intramusculară, sublinguală, percutanată, rectală, intranasală sau intravaginală.

140 În mod corespunzător, forma de administrare poate fi: tabletă, drajeu, capsulă,  
comprimat, aerosol nazal, aerosol, granule, implant ( alt depozit), etc.

Cantitatea de analog de hormon eliberator de gonadotropină administrată, este  
aleasă în așa fel, încât să reducă estrogenul circulant la aproximativ 20 pg/ml sau mai puțin,  
la sfârșitul unei perioade de timp de aproximativ una până la șase luni, similar cu ceea ce se  
145 practică în prezent. În general, cantitatea de produs poate varia, între, aproximativ 0,05 mg  
până la 50 mg, de preferință, aproximativ 0,5 mg până la 10,0 mg pe zi. Determinarea unei  
doze eficiente este un exercițiu de rutină în practica farmaceutică, luând în considerare  
diferiți parametri fizici cum ar fi: greutatea, vârsta și altele, fiind determinată cel mai bine de  
către medicul curant.

Administrarea poate fi periodică, de exemplu, lunară sau poate fi continuă. Administrarea zilnică este preferată, deoarece pacienții urmează mult mai atent regimul de tratament și nu uită sau nu scapă nici o doză, cum se mai întâmplă la schema de administrare periodică. Folosirea unei administrări în depozit, cum ar fi, leuprolid acetat, comercializat sub marca Lupron Depot, poate fi, de asemenea, convenabilă. 150

Antiprogestativul poate fi combinat cu un agonist de GnRH sau antagonistul de GnRH, poate fi un antagonist al receptorilor de progesteron ori un alt agent farmaceutic, adecvat contracarării activității biologice normale a progesteronului. 155

Un antiprogestativ preferat este un antagonist al receptorilor de progesteron, fie steroidian, fie nesteroidian, care prezintă o oarecare capacitate de a diminua secreția de estrogen, dar mai important este faptul că blochează stimularea estrogenică asupra țesuturilor pentru care estrogenul are tropism, cum ar fi, endometrioza ectopică sau intrauterină ori țesutul leiomatos. De exemplu, RU 486 este în mod special adecvat aplicării invenției de față. 160

Exemple de antiprogestive ce pot fi folosite în invenția de față sunt RU 486 ("mifepristonă", Roussel Uclaf, Paris, **SU 4386085**); "onapristonă" (Schering Ag, Berlin; **US 4780461**) și steroizii descriși în **US 4609651**, mai ales compusul "lilopristonă" ( $11\beta$  - (4 - dimetilaminofenil) -  $17\beta$  - hidroxi -  $17\alpha$  - (hidroxi - (3 - hidroxi - prop - 1 - (Z) - enzil - 4,9 (10) estradien - 3 - onă); cererea **SUA nr. 06/827 050**, în special, compusul  $11\beta$  - (4 - acetilfenil) -  $17\beta$  - hidroxi -  $17\alpha$  - (1 - propinil) - 4,9 - estradien - 3 - onă și compusul  $11\beta$  - (4 - acetilfenil) -  $17\beta$  - hidroxi -  $17\alpha$  - (3 - hidroxi - 1(2) - propenil) - 4,9 - estradien - 3 - onă; **EP 04042831**; **WO 91/ 14047**; și alte antiprogestative, de exemplu, din **SU 4891368**. 165

Antiprogestativul poate fi administrat prin orice mijloc cunoscut până în prezent în domeniu, conform practicilor farmaceutice. De exemplu, antiprogestativul poate fi realizat într-o astfel de formă încât să poată fi administrat oral, subcutanat, intramuscular, bucal, printr-un plasture cutanat pentru absorbție transdermică, conținut într-o matrice inertă care este implantată în corp și este sub formă de depozit ori intravaginal într-o matrice care eliberează treptat antiprogestativul (un astfel de implant este prevăzut în **US 4957119** și **5088505**). 175

Formulele farmaceutice care conțin antiprogestativul și un excipient adecvat pot fi forme dozabile de natură solidă, care includ: tablete, capsule, cașete, granule peletizate, comprimate, pulberi sau granule; Formele dozabile topice sunt cele care includ: soluții, pulberi, emulsii fluide, suspensii fluide, semi-solide, unguente, paste, creme, geluri, jeleuri și spume; Formele dozabile parenterale includ: soluții, suspensii, emulsii sau pulberi uscate, conținând o cantitate eficientă de antiprogestativ, așa cum este prevăzut în invenția de față. 180

Este deja cunoscut faptul că ingredientul activ, antiprogestativul, poate fi conținut în aceste formule împreună cu diluanți, agenți de umplutură, agenți de descompunere, lianți, lubrifianți, surfactanți, vehicule hidrofobe, vehicule hidrosolubile, emulsifianți, soluții-tampon, agenți de umezire, agenți de umectare, agenți de solubilizare, conservanți sau alte mijloace care pot spori entitatea medicamentului, toate acceptabile din punct de vedere farmaceutic. 185

Mijloacele și procedeele de administrare sunt cunoscute în domeniu, iar un specialist poate face apel la diferite referințe farmacologice pentru orientare. De exemplu, pot fi consultate "Farmacologia modernă", Banker & Rhodes, Dekker, Inc. 1979; "Bazele farmacologice ale tratamentului", Goodman & Gilman's, 6<sup>th</sup> Edition, MacMillan Publishing Co., New York 1980. 190

În unele cazuri, administrarea analogului de hormon eliberator de gonadotropină și a antiprogestativului poate fi făcută concomitent. În această situație, cele două componente pot fi administrate împreună, folosind forme dozabile și mijloace similare sau diferite, de exemplu, într-o singură tabletă. 195

## RO 117420 B

200 Aplicarea în practică, în cadrul utilizării medicale și/sau farmaceutice, a componen-  
telor, compozițiilor și procedeelelor din invenția de față, care sunt descrise în acest text, se  
poate face prin orice procedeu sau tehnică medicală, clinică ori farmaceutică, conform celor  
cunoscute în prezent de către specialiști sau celor ce se vor pune la punct în viitor.

205 Analogul de hormon eliberator de gonadotropină este administrat pe o perioadă de  
timp, de cel puțin 30 de zile, timp suficient pentru a reduce nivelul estrogenului circulant în  
sânge, până la aproximativ 20 pg/ml sau mai puțin, de preferință, pentru a reduce nivelul  
estrogenului circulant până la cel puțin 10 pg/ml aproximativ, sau mai puțin, stimulând prin  
aceasta niveluri de estrogen de tip post-menopauză.

210 În prezent, administrarea analogului este oprită după circa 6 luni, deși este posibil să  
fie prelungită, dacă administrarea unei cantități cu efect conservator al osului din antipro-  
gestativ este începută într-o formă potrivită. Perioada administrării de antagonist de GnRH  
preferată în prezent este de aproximativ trei luni.

215 Administrarea antiprogestativului este începută atunci când nivelul estrogenului  
circulant a scăzut la 20 pg/ml sau mai puțin, preferabil aproximativ 10 pg/ml sau mai puțin.  
Perioada de administrare a antiprogestativului se poate suprapune peste perioada de admi-  
nistrare a analogului de hormon eliberator de gonadotropină, poate începe la oprirea admi-  
nistrării de analog de GnRH sau poate exista o fereastră, între intervalele de administrare,  
atâta timp, cât nivelul estrogenului circulant nu depășește 20 pg/ml, aproximativ.

220 Cantitatea de antiprogestativ este aceea care inhibă proliferarea endometrială estro-  
genică, adică o cantitate antiproliferativă eficientă, în același timp fiind eficientă în conserva-  
rea osului. În legătură cu aceasta, conservarea osului înseamnă că masa osoasă  
(densitatea) este fie menținută, fie crescută.

În cazul antiprogestativului RU 486, cantitatea administrată este, în general, de 0,05 -  
10,0 mg/kg aproximativ, de preferință, aproximativ 0,5 - 5,0 mg/kg/zi. Celelalte cantități în  
miligrame pot fi adecvate în cazul diverselor antiprogestative.

225 Un alt obiect al invenției de față îl constituie regimurile în care dozarea antiprogestati-  
vului (și analogului de GnRH) este schimbată periodic. Astfel, în timpul administrării unei  
cantități antiproliferative eficiente de antiprogestativ, se poate produce periodic, lunar sau  
anual, o sângerare minoră sau neînsemnată cantitativ. Cu alte cuvinte, starea de amenoree  
(absența sângerării de tip menstrual) obținută în urma aplicării invenției de față este substan-  
țială, dar nu neapărat totală, completă. Cantitatea de antiprogestativ folosită poate fi determi-  
230 nată, la fel ca în cazul analogului de hormon eliberator de gonadotropină, utilizând procedee  
cunoscute în domeniu cum ar fi, de exemplu, stabilirea curbelor doză - răspuns, pe modele  
de primat ( maimuțe ) adecvate acestui scop, adică având un ciclu ovarian înăscut, similar  
celui al femeilor și extrapolarea rezultatelor la om, o dată cu extrapolarea rezultatelor de la  
sistemele " *in vitro* " și determinarea eficienței prin studii clinice. Medicul curant va lua în  
235 considerare greutatea, vârsta și alți parametri fizici și medicali atunci când stabilește  
cantitatea potrivită pe doză.

În scopul unei și mai bune ilustrări a invenției de față, în cele ce urmează sunt pre-  
zentate exemple specifice.

240 **Exemplul 1.** Pentru nevoile acestui studiu, agonistul de hormon eliberator de gona-  
dotropină ales a fost leuprolid acetat, iar antiprogestativul ales a fost RU 486, și amândouă  
au fost administrate femelelor de maimuță cynomolgus, care sunt recunoscute a fi un model  
extrem de potrivit pentru cercetările clinice pe om.

Trezecișisase de femele adulte de maimuță cynomolgus (*Maccaca facularis*) având  
cicluri menstruale regulate au fost plasate în cuști individuale, cu alimente și apă la discreție.

245 În a treia zi a ciclului menstrual, după anestezie (ketamină 20 mg/kg intra- muscular,  
xylazină 1 mg/kg), s-a efectuat laparoscopie, diagnosticată pentru a elimina cazurile de  
boală aderențială pelviană sau de endometrioză existentă. Au fost excluse maimuțele care  
prezentau aderențe pelviene observabile.

În zilele ciclului menstrual 8 - 14 a fost recoltat sânge prin puncție venoasă (sub anestezie de ketamină 10 mg/kg intra-muscular), serul fiind testat RIA pentru a determina estradiol -  $17\beta$ . La 3 - 5 zile după producerea pic - ului preovulator clar definit, de estradiol, s-a efectuat laparotomie (sub anestezie de ketamină 20 mg/kg, xylazină 1 mg/kg ). Apoi, s-a practicat o histerectomie fundică de 2 cm și s-a extras prin chiuretaj, aproximativ 100 g de țesut endometrial, care a fost mărunțit și introdus într-o soluție salină 0,9% sterilă. 250

Incizia uterină a fost închisă prin sutură cu vicryl 4-0. Țesutul endometrial mărunțit a fost injectat sub-peritoneal în cinci locuri, respectiv, în fundurile de sac vezico-uterine stâng și drept, în ligamentele largi drept și stâng și în fundul de sac uterin. 255

În timpul ciclului menstrual care a urmat, s-a efectuat laparotomia, la 3 - 5 zile după creșterea estradiolului, de la mijlocul ciclului. S-au notat prezența de țesut endometrial ectopic și extinderea aderențelor, implanturile peritoneale fiind măsurate cu atenție. Totodată s-au fotografiat toate leziunile și s-a ales la întâmplare un număr de leziuni, pentru ulterioara stadializare histologică a endometriozei, de către un observator independent. Din leziunile reprezentative s-au efectuat biopsii, țesutul prelevat fiind fixat în formaldehidă 10% pentru a fi examinat histologic după colorarea cu hematoxilină și eozină. 260

Primatele au fost egal împărțite în patru grupuri de tratament ( N=8 ). 265

Grupului nr. 1 i s-au administrat lunar injecții cu agonist de hormon eliberator de gonadotropină, în doză, de 80  $\mu$ g/kg intra-muscular în ziua a 21-a a ciclului celei de-a doua laparotomii. Acestea s-au repetat la un interval de 28 de zile, în total trei injecții, după care s-au început injecțiile săptămânale cu antiprogestativul RU 486 (inițial 5 mg/kg intra-muscular în soluție uleioasă, ulterior 2 mg/kg/săptămână). RU 486 a fost continuat, timp, de 24 de săptămâni. 270

Grupului nr. 2 i s-au administrat intra-muscular, săptămânal, doar injecții RU 486 (inițial 5 mg/kg, ulterior 2 mg/kg/săptămână), începând din prima zi a ciclului menstrual de după confirmarea endometriozei. Administrarea a continuat, timp de 36 de săptămâni.

Grupului nr. 3 i s-au administrat doar doze de analog de GnRH, timp de 36 săptămâni. 275

Grupul nr. 4 a fost grup de control și a primit un vehicul neutru, respectiv 0,5 ml soluție salină normală, pe cale intra-musculară, săptămânal, timp de 36 de săptămâni. După începerea injecțiilor zilnice s-a efectuat laparotomie stadializată, la fiecare 12 săptămâni, până la sfârșitul tratamentului, pentru a se putea observa cu acuratețe progresivitatea sau regresivitatea bolii. 280

Sub anestezie cu ketamină s-a recoltat sânge, de la toate grupele, în zile alternative, timp de 28 de zile de la tratamentele inițiale care au urmat confirmării endometriozei active. Serul a fost păstrat la rece pentru analize ulterioare. După aceea, sângele a fost recoltat săptămânal. Acest lucru a continuat până când menstruațiile spontane au reapărut lunar sau la timp de două luni de la încetarea injecțiilor, indiferent care din aceste momente a survenit primul. Serul a fost pus la rece, înregistrat și păstrat pentru radioimunizare ulterioară. Estradiolul și progesteronul au fost testate prin RIA ( ICN Biomedical, Los Angeles, CA ). 285

Prelevări din epiteliul vaginal s-au recoltat concomitent cu fiecare intervenție chirurgicală ( folosind pensa de biopsie Kevorkian), din peretele vaginal lateral al celor două treimi superioare ale vaginului. 290

Maimuțele au fost examinate zilnic la vizita de dimineață. S-au notat modificările de comportament. S-au examinat tegumentele pentru depistarea semnelor de urticarie sau a modificărilor inflamatorii la locurile de injectare. Perineul a fost examinat pentru a observa semne de menstruații. Greutatea corporală a fost detrimată lunar, iar modificările apetitului au fost notate. 295

## RO 117420 B

300 Urina s-a recoltat în același timp cu recoltarea probelor de sânge. Prima probă de urină a fost recoltată în momentul primei laparatomii, cea de-a doua probă în momentul primei injectări, iar probele ulterioare au fost recoltate la fiecare patru săptămâni din momentul recoltării celei de-a doua probe. S-a folosit absorbtimetria dublă cu raze X ( DXA, Norland ) pentru măsurarea densității minerale a osului la nivelul coloanei lombare. Primatele au fost anesteziate cu ketamină și imobilizate pentru a reduce artefactele determinate de mișcarea lor. DXA a fost efectuată înainte de începerea injecțiilor și la trei luni interval, până la finalizarea studiului.

305 În momentul fiecărei laparatomii s-a repetat o mică histerectomie, pentru a lua probe de endometru în vederea examinării histologice.

310 S-a observat că, atât tratamentul doar cu antiprogestativ, cât și cel doar cu analog de GnRH duc la suprimarea ovulației. A existat o singură ovulație demonstrată de-a lungul a 24 de luni ( progesteron > 3 ng/ml ), în fiecare din grupurile 1-3 de tratament, față de 18 ovulații evidente în timpul a 24 de luni, la grupul 4 de control (care a primit doar vehiculul). Mediile nivelurilor serice de estradiol au variat de la o grupă la alta, așa cum este prezentat în fig. 1.

315 Grupul tratat cu analog de GnRH a prezentat o supresie mult mai uniformă (  $24,2 \pm 17$  pg/ml ), în timp ce în grupul de control nivelurile de estrogen au variat mai larg (  $40,6$  pg/ml), decât se aștepta. Interesant este faptul că grupul tratat cu RU 486 a avut un nivel mediu de estradiol în circulație mai mare decât oricare dintre celelalte grupuri (  $57,8 \pm 34,6$ , Kruskal - Wallis,  $p < 0,05$  ).

320 Suprafața de endometru ectopic vizualizată la nivelul peritoneului este prezentată în fig. 2. Suprafețele de dinainte de tratament au fost similare la toate grupurile (ANOVA,  $p > 0,1$ ). Suprafața de după tratament a fost semnificativ diferită de suprafețele de dinaintea tratamentului la toate grupurile nr. 1, 2 și 3 și de suprafața de după tratament existentă la grupul nr. 4 de control (Wilcoxon,  $p < 0,05$ ). Această observație arată că, atât analogul de GnRH, cât și antiprogestativul au un impact limitat fără echivoc, asupra mărimii implanturilor endometriale.

325 La grupul nr. 1, în care primatele au fost trecute pe RU 486 pentru trei luni de la încheierea tratamentului cu analog de GnRH, suprafața medie a bolii peritoneale a rămas neschimbată.

Determinările densității osoase prin absorbtimetrie dublă cu raze X au fost:

GRUPUL	PRE-TRATAMENT (MEDIE $\pm$ SD)	DUPĂ 3 LUNI	DUPĂ 6 LUNI
ANALOG / ANTIPROGESTATIV	$0,481 \pm 0,046$	$0,481 \pm 0,056$	$0,049 \pm 0,046$
ANTIPROGESTATIV	$0,501 \pm 0,029$	$0,541 \pm 0,033^*$	NA
CONTROL	$0,441 \pm 0,028$	$0,446 \pm 0,047$	NA

340 \*t - test pereche,  $p=0,08$  față de densitatea dinaintea tratamentului

345 Nu au existat modificări ale densității osoase după trei luni, la grupul doar cu GnRH sau la grupul de control. Acest lucru era de așteptat, întrucât din punct de vedere statistic, pierderea osoasă într-o populație nu devine evidentă decât după 3-6 luni. Trei animale din grupul nr. 1 au pierdut din densitatea osoasă după trei luni de tratament cu analog de GnRH,

În timp ce la celelalte densitatea osoasă a rămas neschimbată sau a crescut. Un exemplu de maimuță, 2190, cu pierdere osoasă rapidă și datele referitoare la acest studiu sunt prezentate în fig. 3. Este evident un grad semnificativ de pierdere osoasă după trei luni de tratament cu analog de GnRH. Tratamentul cu antiprogestativ a contracarat această pierdere și a existat o creștere semnificativă marginală a densității osoase (t - test pereche, p=0,08) după trei luni de tratament cu antiprogestativ.

350

Aprecierea zilnică a stării generale de confort a evidențiat mici modificări de comportament, modificări inflamatorii cutanate sau alterări ale obiceiurilor alimentare. Determinările greutății la interval de o lună nu au arătat modificări la nici unul din grupuri.

Evaluările histologice ale epiteliului endometrial și vaginal, folosind colorația cu hematoxină și eozină, sunt rezumate după cum urmează:

355

GRUPUL	ENDOMETRU		EPITELIUL ȘI KERATINA VAGINALĂ	
	FAZA MENSTRUALĂ	GROSIME		
DOAR ANALOG	PROLIFERATIV PRECOCE, INACTIV	SUBȚIRE	SUBȚIRE	
ANALOG / ANTIPROGESTATIV	INTERMEDIAR, STATIC	MODERAT SUBȚIRE	MODERAT GROS	365
CONTROL	CICLIC	MODERAT GROS, VARIABIL	CICLIC	370

Endometrul expus analogului de GnRH a fost uniform de subțire și cu proliferare slabă. Endometrul expus antiprogestativului a fost mai subțire decât la maimuțele din grupul de control, dar a fost în faza intermediară evidentă, la fel ca în ziua a 17 - a, a unui ciclu menstrual normal tipic.

375

Primatele din grupul de control au avut, în toate zilele la controlul biopsic, un endometru ciclic, mai gros decât la oricare din celelalte grupuri. Grosimea epiteliului vaginal, stratul de keratină și grosimea lui până la rețeaua de fixare au fost mai mari în grupul cu antiprogestativ decât în grupurile cu analog de GnRH. Datele obținute în grupul de control au fost variabile, dar stratul de keratină a fost mai gros decât după tratamentul cu analog de GnRH.

380

Leziunile de endometrioză ectopică, precum și ale endometrului "in situ" au parcurs o regresie gradată în timpul celor trei luni de tratament, modificările endometriale apărând mai rapid în cursul tratamentului cu analog de hormon eliberator de gonadotropină decât cu antiprogestativul singur.

385

Rezultatele de mai sus, demonstrează că antiprogestativul a fost capabil să întrețină suprafața redusă a endometriozei peritoneale, după întreruperea perioadei de tratament cu analog.

La primatele din grupul de control, endometrioza nu s-a ameliorat spontan, ci dimpotrivă, leziunile de endometrioză s-au agravat progresiv de-a lungul a trei luni.

390

Au fost identificate în timpul studiului trei primate, care au pierdut substanță osoasă minerală rapid după inducerea medicamentoasă a hipoestrogenismului, prin tratament cu analog de GnRH. S-a demonstrat că densitatea osoasă a revenit la nivelul bazal după trei luni de administrare de antiprogestativ.

# RO 117420 B

395 Ca generalizare, primarele tratate cu antiprogestativ au avut o creștere semnificativă marginală a densității osoase față de măsurătorile lor bazale.

Nu a fost observată atrofia vaginală, problemă care este în legătură cu analogii de hormon eliberator de gonadotropină.

400 Grosimea epiteliului vaginal și a stratului de keratină a fost mai mare decât la grupul tratat cu antiprogestativ, situație care determină o desfășurare mai ușoară a contactului sexual, cât și diminuarea incontinenței urinare și scăderea disuriei. În plus față de aceste avantaje la nivelul osului și epiteliului vaginal, endometru s-a menținut moderat subțire, comparativ cu maimuțele cu endometru ciclic din grupul de control netratat, lucru atribuit acțiunii antiproliferative a antiprogestativilui.

405 **Exemplele 2 - 10.** Regimul descris în exemplul 1 este repetat cu următoarea combinație de agenți:

EXEMPLUL	ANALOG	ANTIPIROGESTATIV	
410	2	Nafarelin	Onapristonă
	3	Burserelin	Lilopristonă
415	4	Antide	11 $\beta$ -(4-acetilfenil)-17 $\beta$ -hidroxi-17 $\alpha$ -(1-propinil)-4,9-estradien-3-onă
420	5	Goserelin	11 $\beta$ -(4-acetilfenil)-17 $\beta$ -hidroxi.17 $\alpha$ -3hidroxi-1(2)-propenil-4,9-estradien-3-onă
	6	Histrelin	Mifepristonă
425	7	Lutrelin	Onapristonă
	8	Tristorelin	Lilopristonă
	9	Nal - Glu	Mifepristină
430	10	Azaline B	Mifepristonă

435 În invenția de față se pot face diferite schimbări și modificări, fără îndepărtarea de la spiritul și domeniul ei. Diversele alcătuiuri care au fost descrise și ilustrate aici au avut intenția de a fi reprezentative și nu limitative.

## Revendicări

440 1. Metodă de tratament a unor stări dependente de estrogenul ovarian, **caracterizată prin aceea că**, constă în administrarea la o femeie a analogului de hormon eliberator de gonadotropină, timp de cel puțin 30 de zile, în cantitate suficientă pentru a scădea nivelul estrogenului circulant din sânge, la 20 pg/ml sau mai puțin, urmată de administrarea unui antiprogestativ într-o cantitate antiproliferativă și conservatoare a osului.

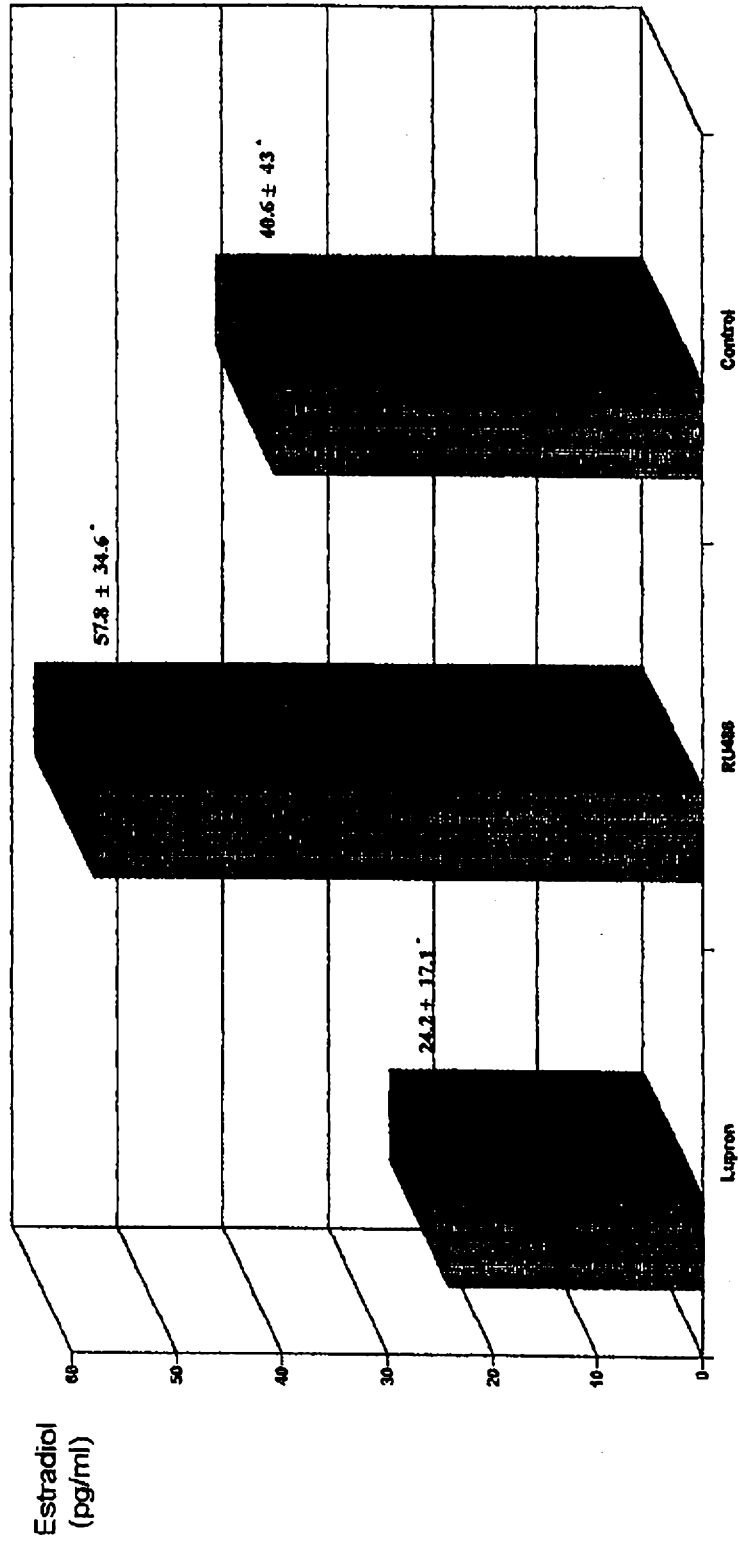
## RO 117420 B

2. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, administrarea analogului și a antiprogestativului este periodică. 445
3. Metodă, conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că**, administrarea este zilnică.
4. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, administrarea analogului și a antiprogestativului este suprapusă. 450
5. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, administrarea analogului și a antiprogestativului nu este suprapusă.
6. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, analogul este administrat timp de șase luni.
7. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, analogul este un agonist de hormon eliberator de gonadotropină. 455
8. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, analogul este un antagonist de hormon eliberator de gonadotropină.
9. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, analogul de GnRH este administrat pe o perioadă de timp suficientă pentru a scădea nivelul estrogenului circulant până, la 10 pg/ml, sau mai puțin. 460
10. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, antiprogestativul este un antagonist al receptorilor de progestativ.
11. Metodă, conform revendicării 10, **caracterizată prin aceea că**, antiprogestativul este mifepristonă. 465
12. Metodă, conform revendicării, **caracterizată prin aceea că**, cantitatea de anti-progestativ este suficientă pentru a realiza o stare de amenoree substanțială.
13. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, starea dependentă de estrogenul ovarian este endometrioza.
14. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, starea dependentă de estrogenul ovarian este leiomiomatoza uterină. 470
15. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, starea dependentă de estrogenul ovarian este sindromul premenstrual.
16. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, starea dependentă de estrogenul ovarian este sângerarea uterină disfuncțională. 475

Președintele comisiei de examinare: **biochim. Crețu Adina**

Examinator: **dr. med. vet. Moroianu Iuliana-Emilia**

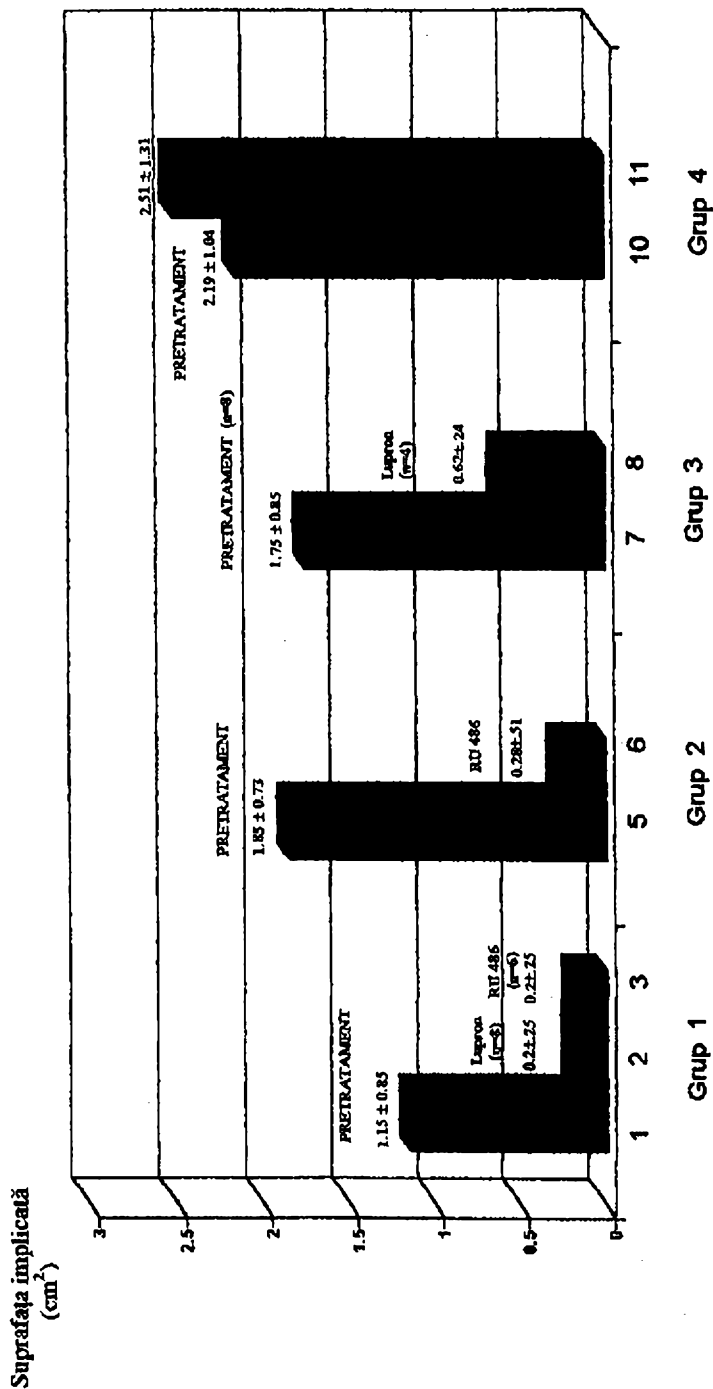
## MEDIA ZILNICĂ A ESTRADIOLULUI



\* Toate grupele sunt diferite, (p < 0.05)

Fig. 1

# ENDOMETRIOZA PERITONEALĂ



\*Diferență semnificativă față de suprafața dinaintea tratamentului ( $p < 0.05$ , Wilcoxon)  
 Suprafața dinaintea tratamentului este similară în toate grupurile (anov  $p > 0.1$ )

Fig. 2