



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2109449 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

A61K 31/473 (2006.01)
A61K 31/48 (2006.01)
A61P 15/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2011.12.05
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet:	2011.07.20
(86)	Europeisk søknadsnr:	08751001.2
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.02.01
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2009.10.21
(30)	Prioritet	2007.02.01 EP 07250429 2007.06.29 GB 0712626 2007.06.29 US 947165 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	Ferring B.V., Polaris Avenue 1442132 JX Hoofddorp, Nederland
(72)	Oppfinner	PELLICER-MARTINEZ, Antonio, Jorge Juan, 8ES-46004 Valencia, Spania SIMON-VALLES, Carlos, Avda.Sauces, 7ES-46110 Valencia, Spania NOVELLA-MAESTRE, Edurne, IVI I+D, Plaza de la Policía Local 3ES-46015 Valencia, Spania
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua , 0306 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Medikament for behandling av endometriose
(56)	Anførte publikasjoner	US-B1- 6 359 130 B1, WO-A-2006/117608 B1, WO-A-93/03752 B1, CARPENTER ET AL: "A systematic review to determine the effectiveness of medical therapies at causing disease regression in endometriosis" REVIEWS IN GYNAECOLOGICAL AND PERINATAL PRACTICE, ELSEVIER, KIDLINGTON, GB, vol. 6, no. 3-4, September 2006 (2006-09), pages 161-167, XP005625236 ISSN: 1871-2320, TSAKOK F H ET AL: "The use of bromocriptine in hyperprolactinemia and galactorrhea in Singapore." INTERNATIONAL JOURNAL OF GYNAECOLOGY AND OBSTETRICS: THE OFFICIAL ORGAN OF THE INTERNATIONAL FEDERATION OF GYNAECOLOGY AND OBSTETRICS APR 1985, vol. 23, no. 2, April 1985 (1985-04), pages 109-113, XP002443515 ISSN: 0020-7292, M.H. BEERS ET AL.: "The Merck index" 1999, MERCK , XP002497582 See pages 1956-1959: "Endometriosis", NOVELLA-MAESTRE E ET AL: "Antiangiogenic action of dopamine agonists in experimentally-induced endometriotic lesions" HUMAN REPRODUCTION (OXFORD), vol. 22, no. Suppl. 1, July 2007 (2007-07), page 147, XP002497581 & 23RD ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN-SOCIETY-OF-HUMAN-REPRODUCTION-AND EMBRYOLOGY; LYON, FRANCE; JULY 01 -04, 2007 ISSN: 0268-1161, SCHMIDT C L: "Endometriosis: a reappraisal of pathogenesis and treatment." FERTILITY AND STERILITY AUG 1985, vol. 44, no. 2, August 1985 (1985-08), pages 157-173, XP009086932 ISSN: 0015-0282, DATABASE CA [Online] CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; CHERNOV, YU. N. ET AL: "Method for enhancing effectiveness of infertility treatment caused by small-scale external genital endometriosis" XP002443562 retrieved from STN Database accession no. 2006:332641 & RU 2 273 481 C2 (RUSSIA) 10 April 2006 (2006-04-10)

MEDIKAMENT FOR BEHANDLINGEN AV ENDOMETRIOSE

Den foreliggende oppfinnelsen angår medikamenter for behandlingen av endometriose

Endometriose er en godartet, kronisk, gynekologisk sykdom som kan defineres som en tilstedeværelse av endometrielt vev, omfattende både kjertelstrukturer, epitelium og stroma, på utsiden av livmorhulen. Det er en godartet gynekologisk forstyrrelse, som i en undergruppe av kvinnelige pasienter kan utvikle seg til en aggressiv sykdom. Endometriose er forbundet med forskjellige plagsomme symptomer inkludert dysmenoré, dyspareuni, bekken smerter og redusert fertilitet

Det er kjent at angiogenese (måten hvorved nye blodårer blir dannet fra eksisterende årer) kan være viktig i utviklingen av endometriose, og at vaskulær permeabilitetsfaktor/vaskulær endotel vekstfaktor (VP/VEGF) har en rolle i vaskulær genese, og i både fysiologisk og patologisk angiogenese. Den potensielle effektiviteten av anti-angiogen terapi for å behandle endometriose har blitt vurdert ved å bruke et studie hvor humant endometrielt vev ble transplantert til immunsvekkede nakne mus. Fire forskjellige anti-angiogene midler ble administrert tre uker etter at de endometrielle eksplantater hadde blitt transplantert (Nap et al, 2004). Alle fire inhibitorer var i stand til å redusere størrelsen på etablerte eksplantater, og ny blodåredannelse ble stoppet. Imidlertid har de kjente anti-angiogene midlene høy toksisitet, og relativt vanskelige å introdusere i klinisk bruk for mennesker.

Det har nå overraskende blitt funnet at sammensetninger som inkluderer en dopaminagonist kan bli anvendt for å behandle endometriose.

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer derfor anvendelsen av en dopaminagonist i fremstillingen av et medikament for behandlingen og/eller forhindringen av endometriose. Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer også anvendelsen av en dopaminagonist i behandlingen, og/eller forhindringen, av endometriose. Heri inkluderer uttrykket "behandling av endometriose" behandling for å redusere (eller fjerne) mengden av endometrielt vev som er til stede utenfor livmorhulen (for eksempel reduksjon eller fjerning av endometriotiske lesjoner) og/eller behandling for å redusere og/eller forbedre en eller flere symptomer forbundet med endometriose (for eksempel behandling for å forbedre og/eller redusere symptomene til dysmenoré, behandling for å forbedre og/eller redusere symptomene til dyspareuni, og/eller behandling for å forbedre og/eller redusere bekken smerter). Uttrykket "behandling av endometriose" inkluderer behandling for å redusere antallet av tilfeller, og/eller redusere størrelsen på tilfeller, av endometrielt vev som er tilstede utenfor livmorhulen (for eksempel reduksjon av antall og/eller størrelse på endometriotiske lesjoner). Uttrykket "behandling av endometriose" inkluderer behandling for å redusere antallet av endometrielle kjertler. Uttrykket "behandling av endometriose" inkluderer behandling som resulterer i en eller flere av følgende; en betydelig reduksjon i prosentandelen aktive endometriotiske lesjoner, et betydelig tap av cellulæriteten og organiseringen som fremviser kjennetegnene til atrofisk eller degenerativt vev i endometriotiske lesjoner, og en betydelig reduksjon i antallet nye blodårer i endometriotiske lesjoner. Uttrykket "behandling av endometriose" inkluderer behandling for å redusere antallet og/eller størrelsen av endometriotiske lesjoner på en eller flere av eggstokkene, livmorhulen, de uterosakrale ligamenter, de bakre overflater av livmoren, det brede ligamentet, den gjenværende bekkenbukhinnen, baugenel, urinveien (inkludert for eksempel blæren og/eller urinlederne).

Uttrykket endometriose inkluderer, for eksempel, peritoneal endometriose, ovarial endometriose og dyp endometriose.

Heri betyr uttrykket dopaminagonist en forbindelse som virker som dopamin, for eksempel, et legemiddel som interagerer (for eksempel binder spesifikt) med en dopaminreseptor for å etterape en dopaminvirkning. Det inkluderer ikke forbindelser som kun er "dopaminergiske forbindelser", dvs. kun forbindelser som, gjennom forskjellig virkningsmekanismer øker nivåene av dopamin. Uttrykket dopaminagonist inkluderer ikke de brosammenknyttede indenopyrrolokarbazolene beskrevet i US 6359130.

Dopaminagonister har tidligere blitt funnet å være nyttige i behandlingen, eller forhindringen, av ovarisk hyperstimuleringssyndrom (OHSS) (WO 2006117608). Dette er en tilstand hvor kapillærene øker sin vaskulære permeabilitet betydelig. Dopaminagonister ble funnet å være i stand til å reversere denne effekten. Imidlertid er tilstanden med endometriose og den potensielle effektiviteten av anti-angiogen terapi for å behandle endometriose ikke beskrevet her. RU2273481 beskriver behandling for infertilitet.

Dopaminagonister som interagerer med en dopaminreseptor for å etterape en dopaminvirkning omfattet av uttrykkene ifølge oppfinnelsen inkluderer, men er ikke begrenset til, amantadin, bromcryptin, cabergolin, quinagolid, lisund, pergolid, ropinirol og pramipexol A. Foretrukket dopaminagonist for anvendelse i den foreliggende oppfinnelsen er cabergolin. En foretrukket dopaminagonist for anvendelse i den foreliggende oppfinnelsen er quinagolid. De såkalte "delvise dopaminagonister" (for eksempel tergund) kan også bli anvendt i henhold til oppfinnelsen. Imidlertid er anvendelsen av dopaminagonister foretrukket.

Fortrinnsvis blir en enkelt dopaminagonist anvendt.

Dopaminagonisten kan bli administrert ved en dose (for eksempel en oral dose til en menneskelig pasient) på mellom 25 mikrogram per dag og 80 mg/dag, fortrinnsvis mellom 50 mikrogram per dag og 5 mg/dag, mer fortrinnsvis mellom 300 mikrogram per dag og 1 mg/dag, egnede doser innen dette intervallet avhenger av dopaminagonisten som skal anvendes, noe som er åpenbart for fagmannen

I en foretrukket utførelsesform er dopaminagonisten cabergolin. Fortrinnsvis blir cabergolin administrert ved en dose (for eksempel en oral dose til en menneskelig pasient) på mellom 0.01 og 12.5 mg/uke, fortrinnsvis mellom 0.1 og 10 mg/uke, mer fortrinnsvis mellom 0.5 mg og 5 mg/uke, mer fortrinnsvis ved en dose på mellom 3.5 mg/uke og 4 mg/uke. Dopaminagonisten kan bli administrert som, for eksempel, en enkelt daglig dose (på for eksempel, mellom 0.1 mg/dag og 5 mg/dag, fra 0.2 mg/dag til 1 mg/dag, for eksempel 0.5 mg/dag), eller den daglige dosen kan bli delt opp i to eller flere underdoser som skal tas ved forskjellige tider over en 24-timers periode. Dopaminagonisten (cabergolin) kan bli administrert som en daglig dose ved nivåene over, eller som ekvivalente doser for eksempel per uke, to ganger per uke, eller hver annen dag. I et regime blir dopaminagonisten (for eksempel, cabergolin) administrert ved en total dose på mellom 3.5 og 12.5 mg per uke (for eksempel 4 mg per uke, 7 mg per uke, 10 mg/uke)

I en annen utførelsesform er dopaminagonisten quinagolid. Fortrinnsvis blir quinagolid administrert ved en dose (for eksempel en oral dose til en menneskelig pasient)

på mellom 25 og 1000 mikrogram/dag, fortrinnsvis mellom 25 og 500 mikrogram/dag, mer fortrinnsvis mellom 25 og 300 mikrogram/dag. Dopaminagonisten kan bli administrert som, for eksempel, en enkelt daglig dose, eller den daglige dosen kan bli delt opp i to eller flere underdoser som skal tas ved forskjellige tider over en 24-timers periode. Dopaminagonisten (quinagolid) kan bli administrert som en daglig dose ved nivåene over, eller som ekvivalente doser for eksempel en per uke, to ganger per uke, eller hver annen dag.

I en annen utførelsesform er dopaminagonisten bromcryptin. Fortrinnsvis blir bromcryptin administrert ved en dose (for eksempel en oral dose til en menneskelig pasient) på mellom 10 til 80 mikrogram/dag, fortrinnsvis 10 til 40 mg/dag.

I en utførelsesform blir dopaminagonisten anvendt som den eneste medisinske behandlingen for endometriose. Med andre ord, dopaminagonisten kan bli anvendt i fraværet av andre medisinske eller kirurgiske behandlinger [for eksempel, i fraværet av danazol]

I en ytterligere utførelsesform kan administrasjonen av en dopaminagonist bli kombinert med andre medisinske eller kirurgiske behandlinger for endometriose [for eksempel, NSAIDer og/eller hormonelle behandlinger (danazol, OCer, medroksyprogesteron acetat, andre progestiner, GnRH agonister og antagonister, aromatase inhibitorer)]. I en ytterligere utførelsesform kan kirurgisk behandling eller medisinsk behandling bli anvendt før, i løpet av eller etter behandling med dopaminagonist. Disse utførelsesformene er diskutert i litt mer detalj i eksemplene, under.

Det har også blitt funnet at administrasjonen av dopaminagonist til en pasient med behov derav kan tilveiebringe betydelige kliniske fordeler sånn som, for eksempel betydelig reduksjon av prosentandelen med aktive endometriotiske lesjoner, betydelig tap av cellulæriteten og organiseringen som fremviser kjennetegnene på atrofisk eller degenerativt vev i endometriotiske lesjoner, og betydelig reduksjon i antallet nye blodårer i endometriotiske lesjoner

Medikamenter basert på dopaminagonister har også fordelen av høy dose toleranse, med sikre og godt dokumenterte registreringer av klinisk anvendelse.

Videre har det blitt funnet at dopaminagonisten (for eksempel, cabergolin) kan bli administrert i lange tidsperioder (for eksempel 1 til 3 uker (for eksempel 1 til 21 dager, for eksempel 1 til 14 dager), fra 1 dag til 3 måneder, 1 dag til seks måneder, 1 dag til 12 måneder, eller 1 dag til 2 år, eller lenger) med terapeutisk nyttig effekt, og lav risiko for bivirkninger. Administrasjonen kan være kontinuerlig ved for eksempel daglig eller ukentlig dose, eller kan bli avbrudt av en eller flere opphold på, for eksempel, et antall (for eksempel 1 til 3) uker eller et antall (for eksempel 1 til 3) måneder. Dopaminagonisten kan bli administrert så lenge smerte (eller andre symptomer) fortsetter.

Dopaminagonisten (for eksempel, cabergolin, quinagolid) kan bli administrert til en gravid pasient.

Behandlingen, eller forhindringen, av endometriose kan være forbundet med en reduksjon i mengden av endometrielle kjertler.

I et eksempel på oppfinnelsen kan vaskulær endotel vekstfaktor (VEGF) bli målrettet av dopaminagonisten, som en faktor i utviklingen av endometriose. Isoformene VEGF₁₂₁ og VEGF₁₆₅ synes å være hovedsaklig involvert i angiogenese

(Watkins, R t , et al , Am J Physiol 1999, vol 276, pp 858-67). To spesifikke endotel cellemembran-reseptorer for VEGF har blitt identifisert, VEGF reseptor-1 (VEGFR-1 , Flt-1) og VEGFR-2 (Flk- 1/KDR). VEGFR-2 synes å være hovedsaklig involvert i å regulere angiogenese og vaskulogenese.

- 5 VEGFR-2 (KDR) kan således bli målrettet av dopaminagonisten, som en faktor i utviklingen av endometriose. Notch-4 kan bli målrettet av dopaminagonisten, som en faktor i utviklingen av endometriose. VEGF, VEGFR-2 og Notch-4 kan bli målrettet av dopaminagonisten, som en faktor i utviklingen av endometriose. Andre virkningsmekanismer til dopaminagonisten er innen omfanget av oppfinnelsen
- 10 Dopaminagonisten blir administrert som et farmasøytisk akseptabelt preparat. Preparater kan bli administrert i henhold til oppfinnelsen i farmasøytisk akseptable sammensetninger som valgfritt kan omfatte farmasøytisk akseptable salter, buffere, konserveringsmidler og eksipienser. Farmasøytiske preparater som inkluderer dopaminagonist(er) som aktive midler er velkjent i teknikken og er
- 15 kommersielt tilgjengelige. For eksempel er cabergolin tilgjengelig under de registrerte varemerkene Cabaser og Sogilen/Dostinex. Anvendelsen av slike kommersielt tilgjengelige dopaminagonist-preparater i behandlingen av endometriose er i samsvar med oppfinnelsen.

- 20 Den valgte administrasjonsformen vil avhenge av viktigheten og alvorlighetsgraden til tilstanden som blir behandlet, og den nødvendige dosen. Enhver administrasjonsform som produserer ønsket terapeutisk effekt uten uakseptable ugunstige virkninger er relevant i utføringen av oppfinnelsen Slike administrasjonsformer kan inkludere oral, rektal, topisk, transdermal, sublingual, intramuskulær, parenteral, intravenøs, intrakavital, vaginal, og adhesiv matriks for
- 25 anvendelse i løpet av kirurgi. Forskjellige tilnærminger for å formulere sammensetninger for anvendelse i henhold til oppfinnelsen er beskrevet i "the Handbook of Pharmaceutical Exipients, Third Edition, American Pharmaceutical Association, USA og Pharmaceutical Press UK (2000), og Pharmaceutics - The Science of Dose Form Design, Churchill Livingstone (1988).

- 30 I en foretrukket utførelsesform er administrasjonen oral. Sammensetninger egnet for oral administrasjon inkluderer kapsler, cachets, tabletter, siruper, eliksirer eller sugepastiller.

Den foreliggende oppfinnelsen vil nå bli illustrert med referanse til eksemplene og vedlagte tegninger, hvori:

- 35 FIGUR 1 viser prosentandelen av aktive lesjoner etter dyreforsøket diskutert under, for kontrollgruppen, og gruppene behandlet med lav dose (0.05 mg/kg/dag) og høy dose (0.1 mg/kg/dag) med cabergolin, FIGUR 1 a viser forholdet mellom kjertler/stroma i de tre etablerte gruppene [både lav og høy cabergolin ("Cb2") doser had mer stroma og mindre kjertler enn kontrollene (*P<0.05)];

- 40 FIGUR 2 viser blodårene (mm³) for kontroll, lav- og høydose gruppene;

FIGUR 3 viser prosentandelen med "modne" og "nylig dannede" blodårer i dyrene til kontroll, lav- og høy-dose gruppene;

FIGUR 4 viser Proliferasjonsindeksen for kontrollen, og lav og høy-dose gruppene;

FIGUR 5 viser den relative uttrykkningen av VEGF, VEGFR-2 (KDR), Notch-4, Ang 1 og Wnt-1 for kontrollen, og lav og høy-dose gruppene;

FIGUR 6a viser tilstedeværelsen av dopaminreseptor 2 (Dp-r2) og VEGF i endometrielle implantater hos dyrene i de tre etablerte gruppene (kontroll, lav- og høy-dose gruppene); og

FIGUR 6b viser den relative uttrykkningen av VEGF, VEGFR-2 (KDR) og D2R i endometriotiske lesjoner (venstre kolonne) og i endometrium (høyre kolonne);

Eksempel 1

En eksperimentell dyremodell for endometriose ble utviklet i naken mus ved å
 10 insette menneskelige endometrium-fragmenter. Hunkjønn-mus (Hsd Atimic Nude-
 nu, Harlan Iberica S L, Barcelona, Spain) ble individuelt oppbevart i autoklavede bur
 og sengetøy, i laminær luftstrøm filtrerte avtrekk. Dyrerommet ble opprettholdt ved
 26 °C med et 12-t lys, 12-t mørkt syklus, og mus ble foret ad libitum med
 autoklavet laboratoriegnagermat og surgjort vann All håndtering ble utført i
 15 laminær luftstrøm filtrerte avtrekk. En blanding av ketamin/medetomidin (75 µg/g
 ketamin og 1 µg/g medetomidin) (Ketolar®, Parke-Davis, España, Domtor®, Pfizer,
 Spain) ip-injisert, ble anvendt for å bedøve mus før invasive prosedyrer og
 atipamezol (Antisedan®, SmithKline Beecham, Spania) 1 µg/g ip-injisert, for å
 reversere bedøvelsesvirkninger, ble anvendt etter invasive prosedyrer, ved å bruke
 20 sterile instrumenter.

Ved en alder på 5 uker, ble sterile 60-d frigjørelseskapsler inneholdende 18 mg
 17β-estradiol (Innovative Research of America, Sarasota, FL) plassert subkutant i
 nakken til hvert dyr. Ifølge produsentens informasjon tilveiebringer kapslene
 kontinuerlig frigjørelse av hormon ved serumkonsentrasjoner på 150-250
 25 pmol/liter, i området til fysiologiske nivåer i mus i løpet av menstruasjonssyklusen.
 Dette stabile fysiologiske nivået av østrogen promoterer veksten av transplantert
 humant endometrium og unngår intermus-forskjeller som er relatert til forskjellige
 trinn av menstruasjonssyklusen.

Fire dager etter innsetting av østrogenkapslen, ble det lagd en inngang til bukhulen
 30 i midtlinjen av lavere abdomen for å sette inn nylagd humant endometrium fra
 ovum "pick-up"-donorer. Disse fragmentene ble festet med lim (Vetabond®, 3M
 Animal Care products, USA) til peritoneum. Denne protokollen tillot å etterape den
 patologiske situasjonen av retrograd menstruasjon som oppstår i kvinner med
 endometriose.

Tre uker etter implantering ble dyrene delt inn i tre grupper. Den første var en
 kontrollgruppe, den andre var lav-dose gruppen, behandlet med 0.05 mg/kg/dag
 oral cabergolin, og en høy-dose gruppe, behandlet med en oral dose av 0.1
 mg/kg/dag cabergolin. To uker etter behandling ble dyrene avlivet og de
 endometriotiske lesjonene tatt prøver av og analysert som beskrevet under.
 40 Resultatene blir vist i Figurer 1, 1a og 2 til 6b

De anti-angiogene virkningene av dopaminagonistene ble vurdert ved
 immunofluorescens, antistoffene anvendt i konfokal mikroskopi oppdratt mot Von
 Willebrand faktor (vWF monoklonal IgG1, DAKO Corp , Danmark) til stede i endotel
 celler og vaskulære glatte muskelceller (monoklonal IgG2 α-SMA-FITC konjugert de
 45 Sigma, St Louis, USA). Blodårer som ikke er nye, er avrundet av et lag av glatt
 muskel som gir dem modenhet. Identifisering av endotelceller ble gjort ved å
 anvende vWF, mens modne årer ble identifisert ved α-SMA positiv farging. Således

ble vWF+ / α SMA- blodårer ansett nye eller umodne, mens vWF+ / α SMA+ årer ble klassifisert som gamle eller modne blodårer.

Morfometrisk studie ble utført for å måle implantatareal og cellulær tetthet. Immunocyto kjemi med Ki-67 (monoklonal IgG1 DAKO Corp, Danmark) antistoff ble utført for å evaluere den proliferative aktiviteten til implantatene. De histopatologiske og subcellulære ultrastrukturelle forandringene ble detektert ved å bruke et optisk mikroskop (OM), elektronisk transmisjonsmikroskop (TEM) og histokjemisk farging. Optisk mikroskopi (OM), elektronisk transmisjonsmikroskopi (TEM) og morfometri ble utført for å fastslå tilstedeværelsen av endometrielle kjertler og stroma og studere subcellulære ultrastrukturelle forandringer, areal til implantatene og cellulær tetthet.

TaqMan Real-time PCR og $2^{-\Delta\Delta C_t}$ fremgangsmåter ble anvendt for å analysere genuttrykkingsprofilene til tre forskjellige markører som promoterer angiogenese (VEGF, VEGFR-2, Notch-4), Angiopoietin-1 (Ang-1), en antiangiogenese markør som promoterer forstørrelsen av eksisterende årer og resistans ovenfor lekkasje, og Wnt-1. Demonstrasjon av tilstedeværelsen av VEGF og dopamin type-2 reseptor (Dp-r2) uttrykking i eksperimentelle implantater, humane peritoneale endometriotiske lesjoner, og endometrium, ble utført ved å bruke TaqMan Realtime PCR og $2^{-\Delta\Delta C_t}$ fremgangsmåte (Fig 6a, 6b). Tilsvarende ble denne fremgangsmåten anvendt for å fremvise tilstedeværelsen av VEGFR-2 uttrykking i humane peritoneale endometriotiske lesjoner, og endometrium (Fig 6b).

Statistisk analyse ble utført ved å bruke GraphPad InStat V3 0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Studien ble designet for å detektere forskjeller i de forskjellige markører som ble analysert blant behandlings- og kontrollgrupper. Kategoriske data ble uttrykt som antall og prosentandel, og numeriske data som gjennomsnitt $\pm$ standard avvik (SEM) bortsett ifra når spesifisert. Signifikans ble definert som $P < 0.05$. Enveis-analyse av variansen ble anvendt for statistisk analyse.

Toksisitet

Ingen mus i studien døde etter administrasjonen av cabergolin. Cabergolin syntes ikke å forandre den totale helsen til musene, fordi kroppsvekten til musene i de forskjellige behandlingsgrupper ikke var betydelig forskjellig (resultater ikke vist)

Resultater

Figur 1 viser prosentandelen av aktive lesjoner etter dyreforsøket diskutert over, for kontrollgruppen, og gruppene behandlet med lav dose (0.05 mg/kg/dag) og høy dose (0.1 mg/kg/dag) med cabergolin. Dyr behandlet med lave ($58.6 \pm 9.7\%$) og høy ($60.4 \pm 8.4\%$) doser, hadde en betydelig reduksjon ($p = 0.0169$) i aktive lesjoner, sammenlignet med kontroller ($89.6 \pm 5.7\%$). Dyrene behandlet med cabergolin (både lav- og høy-dose grupper) har betydelig færre aktive lesjoner når sammenlignet med kontrollgruppen. Med andre ord, behandling med cabergolin synes å redusere antallet av aktive endometriotiske lesjoner i denne modellen. OM- og TEM-studiene viste at i kontrollgruppen presenterte de endometriotiske lesjonene en høy cellulær stroma og et histologisk aspekt av komplett reorganisering og struktur, som kan sees i en typisk human endometriotisk lesjon. Imidlertid, i behandlede lesjoner (høy og lav dose med cabergolin) en avslappet stroma, med tapt cellulær tetthet og organisering, er observert, dette er karakteristisk for atrofisk eller degenerativt vev. Den humane endometriae stroma som ligger

rundt kjertelområder var lett å differensiere fra det muskulære-konjunktive murine vev

Disse histologiske resultater ble bekreftet ved morfometrisk analyse (Fig.1a) Selvom det ikke var noen statistisk forskjell blant grupper i cellulær tetthet, var det en betydelig ($p=0.0093$) forskjell blant grupper i forholdet kjertler/stroma, som sett i Figur 1 a, både lave og høye cabergolin doser hadde mer stroma og mindre kjertler enn kontrollene ($*p<0.05$). Dette indikerer at cabergolin-behandling kan være forbundet med en reduksjon av, eller reduksjon i mengden av, endometrielle kjertler.

Figur 2 viser blodårene (mm^3) for kontrollen, og lav og høy-dose gruppene, delt mellom "modne" blodårer og "nylig dannede" blodårer. Kontrollgruppen har en større andel nylig dannede blodårer (indikerende for betydelig angiogenese), mens lav- og høy-dose gruppene har en betydelig større andel av modne blodårer, noe som tyder på betydelig redusert angiogenese. Dette ble også demonstrert ved histologi (resultater ikke vist). Disse resultatene indikerer at cabergolin betydelig reduserer dannelsen av nye blodårer (angiogenese), i denne modellen.

Figur 3 viser prosentandelen av blodårer i kontrollen, og lav og høy-dose gruppene. Kontrollgruppen har omtrent 74 % av det totale antall blodårer som nylig dannede blodårer, noe som indikerer betydelig angiogenese. På den andre siden har lav- og høy-dose gruppene omtrent 85 til 89 % av totalen som modne blodårer, noe som tyder på at angiogenese er ikke betydelig. Disse resultater indikerer at cabergolin har betydelig redusert dannelsen av nye blodårer (angiogenese), i denne modellen.

Figur 4 viser resultatene av et proliferasjonsstudie. Et immunocyto kjemi-studie ved å bruke Ki-67 antistoffet (dvs. analysere graden av cellulær proliferasjon ved å bruke antistoffer mot Ki-67) ble anvendt for å evaluere den proliferative aktiviteten til implantatene ved å bruke fremgangsmåter kjent i teknikken. Bildetelling software ble anvendt for å telle de Ki-67-positive cellene og følgelig beregne proliferasjonsindeksen i hver gruppe. En betydelig ($P<0.001$) reduksjon i proliferasjon ble observert i lesjoner i dyr behandlet med cabergolin (både lav- og høy-dose grupper) sammenlignet med kontrollgruppen

Den angiogene statusen til lesjonene ble til å begynne med analysert ved å bruke immunofluorescens ved å bruke antistoffer for å identifisere nye (vWF+/ α SMA-) og gamle årer (vWF+/ α SMA+) og konfokal mikroskopi (Leica Confocal Software). Immunofluorescens ved bruk av antistoffer rettet mot the Von Willebrand faktor (vWF) til stede i endotel-celler og vaskulære glatte muskelceller (α -SMA) kan bli anvendt for å teste den antiangiogene virkningen Cb2. Blodårer som ikke er nydannede, er avrundet ved et lag av glatte muskler som gir dem modenhet. Identifisering av endotelceller ble gjort ved å benytte vWF, mens modne årer ble identifisert ved α -SMA positiv farging. Således ble vWF+ / α SMA- blodårer ansett nye eller umodne, mens vWF+ / α SMA+ årer ble klassifiser som gamle eller modne blodårer.

Implantatene presenterte en høyere cellulær stroma og det histologiske aspekt av komplett reorganisering og struktur typisk sett i en endometriotisk lesjon i kontrollgruppen, mens implantatene i mus inkludert i lav- og høy-dose gruppene viste en avslappet stroma med løs cellulæritet og organisering, som er karakteristisk for atrofisk/degenerativt vev. Morfometri viste ingen forskjell i cellulær tetthet og stroma/kjertler kjertelareal blant gruppene.

TaqMan Real-time PCR og $2^{-\Delta\Delta Ct}$ fremgangsmåter ble anvendt for å analysere genuttrykingsprofilene for tre forskjellige markører som promoterer angiogenese (VEGF, VEGFR-2, Notch-4), Angiopoietin-1 (Ang-1), en antiangiogenese markør som promoterer forstørrelsen av eksisterende årer og resistanse ovenfor lekkasje og Wnt-1. Husholder 18S rRNA'et ble anvendt for å normalisere målgenets Ct-verdier. Ct-verdien i hver gruppe ble uttrykt relativt til kontrollgruppe Ct-verdiene (kalibrator), for å beregne den relative uttrykkingen ved $2^{-\Delta\Delta Ct}$ fremgangsmåten. cDNA oppnådd fra sarkoma 180 tumorceller (S-180) og humane endotelceller fra navlestrengårer (HUVEC) ble anvendt som henholdsvis negativ og positiv kontroll, for VEGF og VEGFR-2 genuttrykkingen. Milt ble anvendt som positiv kontroll for Ang-1 og Wnt-1, og lunge ble anvendt som en Notch-4 positiv kontroll.

Tabell 1 viser at genuttrykingsprofilene til pro-angiogene markører (VEGF, VEGFR-2 og Notch-4) ble nedregulert i implantatene behandlet med lave og høye cabergolin ("Cb2") doser sammenlignet med kontroller. Ang-1 og Wnt-1 er ansett å være anti-angiogene markører, deres uttrykingsprofiler ble oppregulert i implantatene til mus behandlet med lave og høye Cb2-doser sammenlignet med kontroller, noe som viser at cabergolin-behandling er forbundet med angiogenese-inhibering. Data for relativ uttrykking fra tabellen blir vist grafisk i Figur 5.

Tabell 1: Angiogene genuttrykingsprofiler

Angiogene markør	Gen	Kontroll ±	Vehikel	LAV DOSE (0.05 mg/kg/dag)	HØY DOSE (0.1 mg/kg/dag)	p verdi	Uttrykking
+	VEGF	HUVEC	1.2±0.3	0.5±0.2	0.4±0.1	<0.05	Nedregulert i Cb2-behandlede grupper
+	VEGFR -2 (KDR)	HUVEC	1.0±0.1	0.4±0.1	0.3±0.1	<0.05	Nedregulert i Cb2-behandlede grupper
+	Notch-4	LUNGE	1.0±0.1	0.5±0.1	0.4±0.1	<0.05	Nedregulert i Cb2-behandlede grupper
-	Ang-1	MILT	1.1±0.2	3.2±0.6	3.7±0.6	<0.05	Oppregulert i Cb2-behandlede grupper
-	Wnt-1	MILT	1.0±0.1	3.4±0.2	3.3±0.6	=0.07	Oppregulert i Cb2-behandlede grupper

Data uttrykt som Gjennomsnitt ± SD

Tilstedeværelsen av dopamin type-2 reseptorer i humant endometrielt vev og endometriotiske implantater i kvinner som undergår kirurgi (laparoskopi) ble undersøkt. TaqMan Real-time PCR og $2^{-\Delta\Delta Ct}$ fremgangsmåter ble anvendt for å bekrefte tilstedeværelsen av dopaminreseptor 2 ("Dp-r2", "D2R") og VEGF i humant

endometrielt vev, ikke bare i implantater (Fig 6a), men også i peritoneale endometriotiske lesjoner oppnådd fra 10 kvinner ved laparoskopi (Fig 6b - som også inkluderer data for VEGFR-2). Positive og negative kontroller for Dp-r2 var henholdsvis HUVEC og S-180 cDNA celler. I mus ble kontroll Ct-verdiene anvendt
 5 som en kalibrator, og i humane peritoneale lesjoner ble HUVEC Ct-verdiene anvendt som kalibrator for å beregne den relative uttrykking ved $2^{-\Delta\Delta Ct}$ fremgangsmåte.

Figur 6a viser tilstedeværelsen av VEGF og Dp-r2 i endometrielle implantater til dyrene i de tre etablerte gruppene. Det var en trend mot økt Dp-r2 uttrykking når dyrene ble behandlet med økende doser av cabergolin. Det er en trend mot senket
 10 VEGF-uttrykking når dyrene ble behandlet med økende doser av cabergolin.

Figur 6b viser (venstre kolonne) den relative uttrykkingen av VEGF, VEGFR-2 (KDR) og D2R ("Dp-r2") i forskjellige typer av endometrielle lesjoner, rød, hvit og svart. Det er en klar forskjell i VEGF, VEGFR-2 og Dp-r2 uttrykking ifølge typen av lesjon.

Figur 6b viser også (høyre kolonne) den relative uttrykkingen av VEGF, VEGFR-2 (KDR) og D2R ("Dp-r2") i endometrium. Den relative uttrykkingen av VEGF og VEGFR-2 i endometrium hos subjekter med endometriose er høyere enn hos de uten endometriose, den relative uttrykkingen av Dp-r2 i endometrium hos
 15 subjekter med endometriose er lavere enn de uten.

20 **Disse resultater blir vist i Tabell 2, under.**

Gen	ENDOMETRIUM				ENDOMETRISKE LESJONER			
	UTEN ENDOMETRIOSE	MODE RAT	ALVOR LIG	P verdi	RØD	HVIT	SVART	P verdi
VEGF	1.0±0.1	2.2±0.7	2.1± 0.4	NS	17.8±5.8	10.1±4 .8	11.1±3.9	NS
KDR	1.0±0.1	2.1±0.6	1.9± 0.3	NS	47.4±15.0	26.9±1 2.2	23.6±7.2	NS
D2R	1.0±0.1	0.3±0.1	0.2± 0.1	=0.07	0.2±0.1	0.3±0. 2	0.6±0.3	NS

Resultatene indikerer at dopaminagonisten cabergolin, administrert ved en dose på
 25 0.05 og 0.1 mg/kg/dag, var i stand til å

(a) betydelig redusere antallet av aktive endometriotiske lesjoner,

(b) forårsake tap av cellulæritet- og organiseringskarakteristikker som er tilstede i atrofisk eller degenerativt vev i de endometriotiske implantater,

(c) betydelig redusere antallet av nye blodårer i de endometrielle implantater,

30 (d) betydelig redusere uttrykking av markører for angiogenese, og cellulær proliferasjon, og

(e) øke vevdegenerering og redusere de endometriotiske implantater.

Det er en høy grad av homologi mellom det humane og gnager VEGF-systemer som gir en indikasjon på at aktiviteten vist i gnagermodellen over er anvendbar for humane modeller. Resultatene indikerer at administrasjonen av dopaminagonister har en betydelig effekt på endometriose, muligens bundet til virkning på angiogenese. Resultatene kan være relatert til tilstedeværelsen av dopaminreseptorer i eutopisk og ektopisk endometrielt vev.

Eksempel 2

En formulering som en tablett for oral anvendelse er 0.5 mg med cabergolin (kommersielt tilgjengelig som Dostinex®, Pfizer, Spania).

Videre Eksempler

Eksempel A: En pasient undergår diagnostisk laparoskopi etter å ha lidd fra kroniske bekkensmerter og er diagnostert med endometriose type III. Ved den samme laparoskopi, undergår pasienten kirurgi, sånn som reseksjon av tilgjengelige lesjoner, og administrasjonen av cabergolin blir startet.

Eksempel B: Pasient diagnostert tidligere for endometriose, fremstilles med symptomer på bekkensmerter og dysmenorre. Administrasjonen av cabergolin blir startet uten kirurgi.

Eksempel C: Pasient diagnostert med endometriose undergår behandling med GnRH-agonister (eller danazol eller aromatase-inhibitorer) og administrasjonen av cabergolin blir startet (med fortsatt anvendelse av GnRH-agonist) for en periode. Etter en videre 3 eller 6 måneder uten terapi, starter pasienten igjen med cabergolin for en ytterligere periode.

KRAV

1. Anvendelse av en dopaminagonist i fremstillingen av et medikament for
5 behandlingen eller forhindringen av endometriose, hvori dopaminagonisten
interagerer med en dopaminreseptor for å etterape en dopaminvirkning.
2. En dopaminagonist for anvendelse i behandlingen eller forhindringen av
endometriose, hvori dopaminagonisten interagerer med en dopaminreseptor
for å etterape en dopaminvirkning.
3. Anvendelsen ifølge krav 1 eller agonisten for anvendelse ifølge krav 2, hvori
10 nevnte dopaminagonist er en av amantadin, bromcryptin, cabergolin,
quinagolid, lisunde, pergohde, ropinirol og pramipexol.
4. Anvendelsen, eller agonisten for anvendelsen, ifølge ethvert av de
forutgående krav, hvori dopaminagonisten er cabergolin administrert ved en
dose på mellom 0.01 og 12.5 mg/uke.
- 15 5. Anvendelsen, eller agonisten for anvendelsen, ifølge ethvert av de
forutgående krav, hvori dopaminagonisten er quinagolid administrert ved en
dose på mellom 25 og 1000 mikrogram/dag.
6. Anvendelsen, eller agonisten for anvendelsen, ifølge ethvert av de
forutgående krav, hvori dopaminagonisten er bromcryptin administrert ved
20 en dose på mellom 10 og 80 mg/dag.
7. Anvendelsen, eller agonisten for anvendelsen, ifølge ethvert av de
forutgående krav, hvori dopaminagonisten blir administrert for en periode på
mellom 1 dag og 2 år.
8. Anvendelsen, eller agonisten for anvendelsen, ifølge ethvert av de
25 forutgående krav, hvori dopaminagonisten blir administrert i kombinasjon
med annen kirurgisk eller medisinal behandling for endometriose.
9. Anvendelsen, eller agonisten for anvendelsen, ifølge ethvert av de
forutgående krav, hvori dopaminagonisten(e) blir anvendt for behandlingen
eller forhindringen av endometriose i et gravid subjekt.
- 30 10. Anvendelsen, eller agonisten for anvendelsen, ifølge ethvert av de
forutgående krav, hvori vaskulær endotel vekst faktor (VEGF) er målrettet
11. Anvendelsen, eller agonisten for anvendelsen, ifølge ethvert av de
forutgående krav hvori administrasjonen er oral, og i form av
sammensetninger som kapsler, cachets, tabletter, siruper, eliksirer eller
35 sugepastiller.

Fig 1

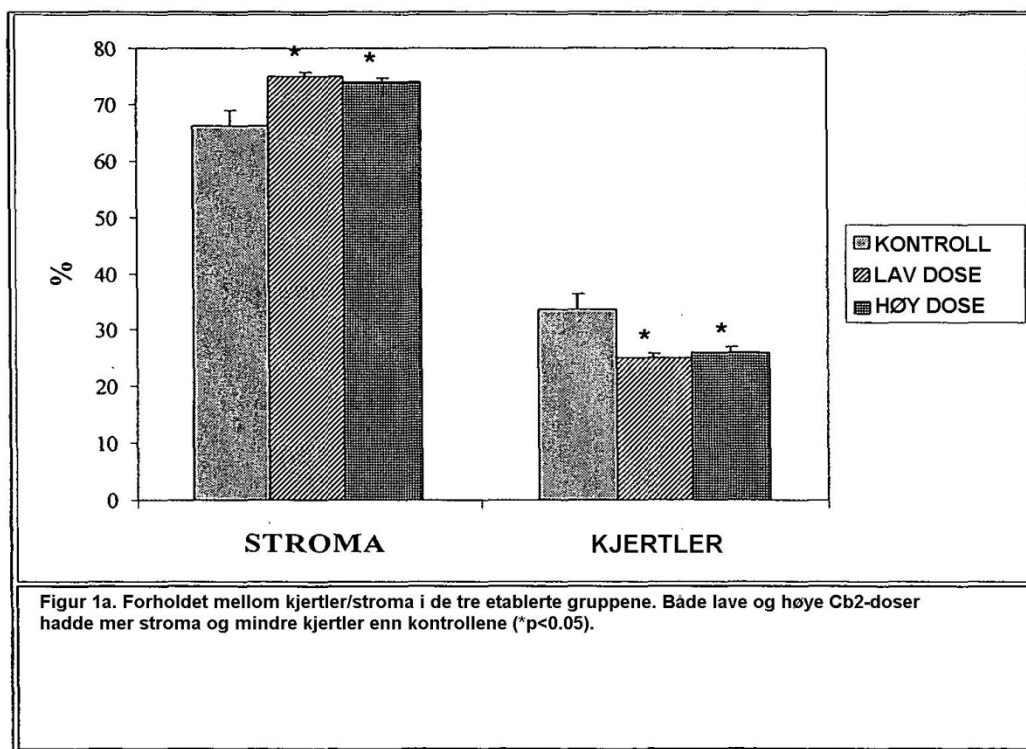
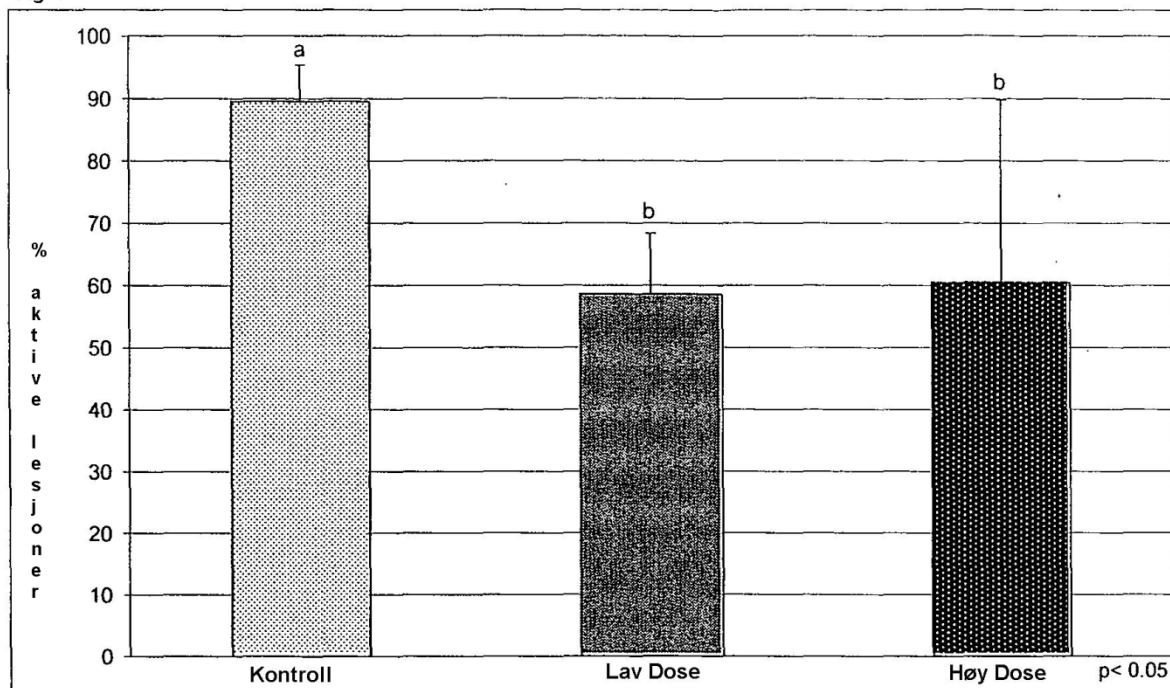


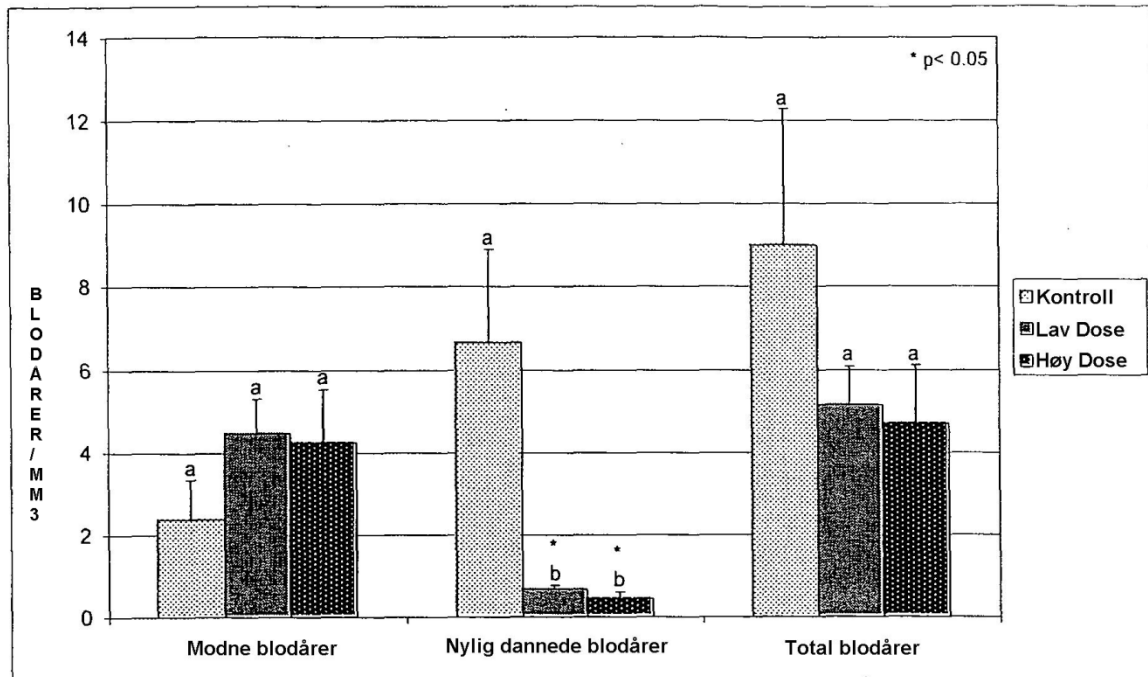
Fig 2 (Angiogenet Studie)

Fig 3 (Prosentandel)

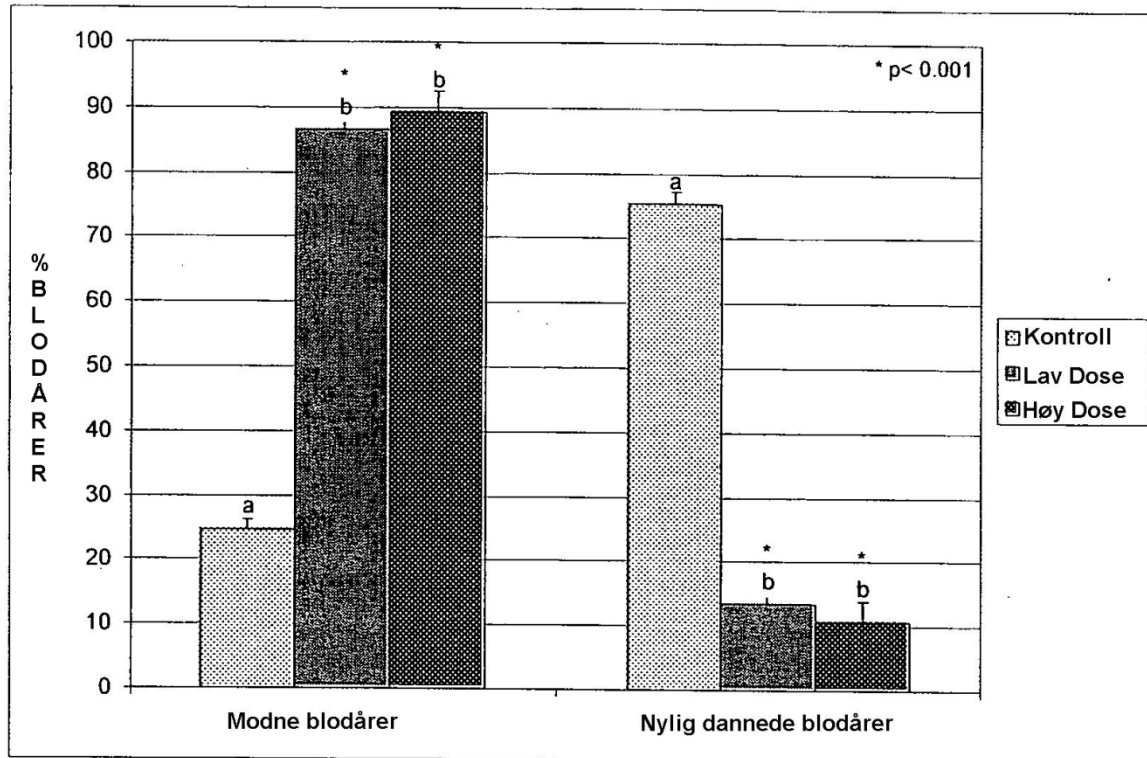
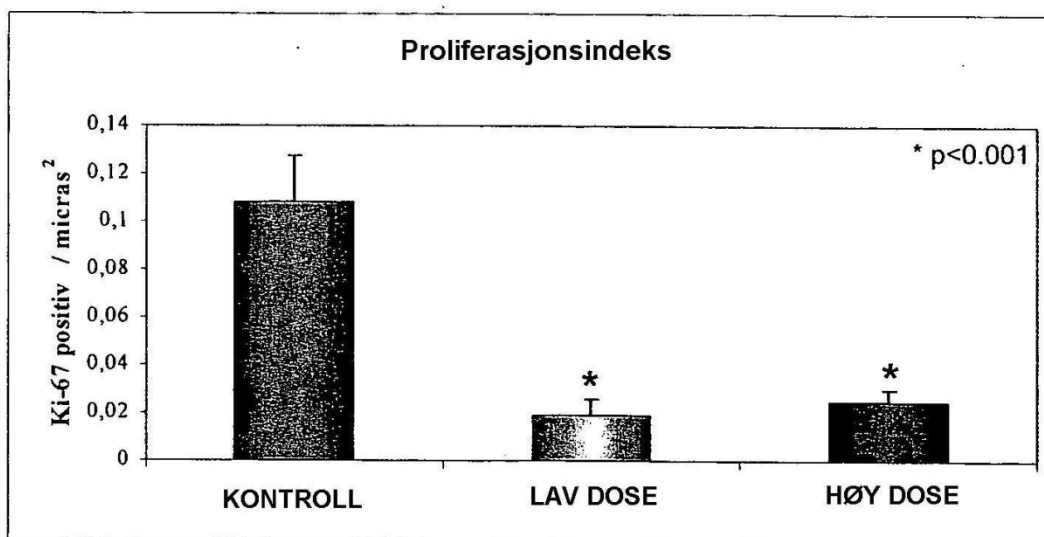


Fig 4: Proliferasjonsstudie



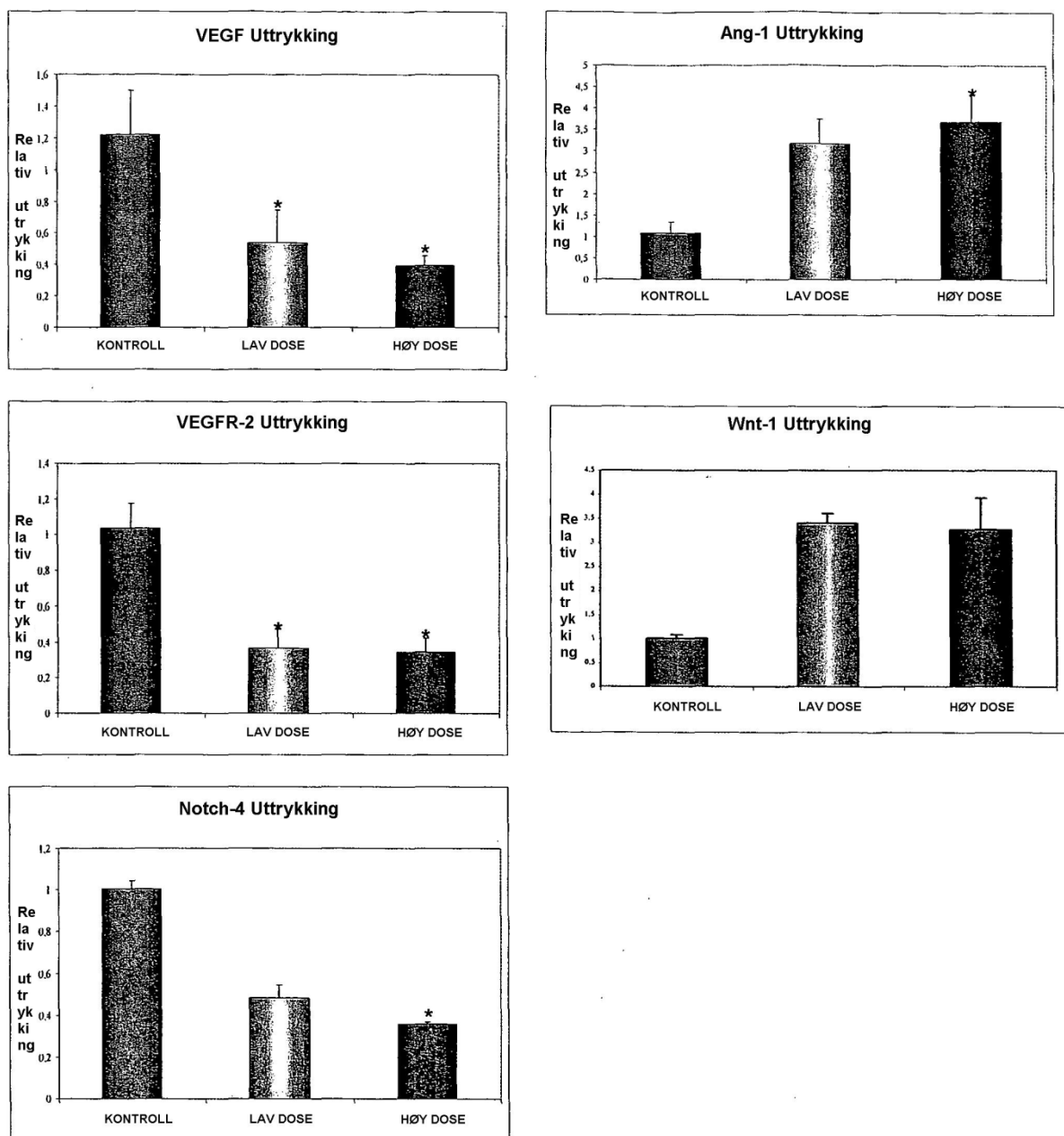
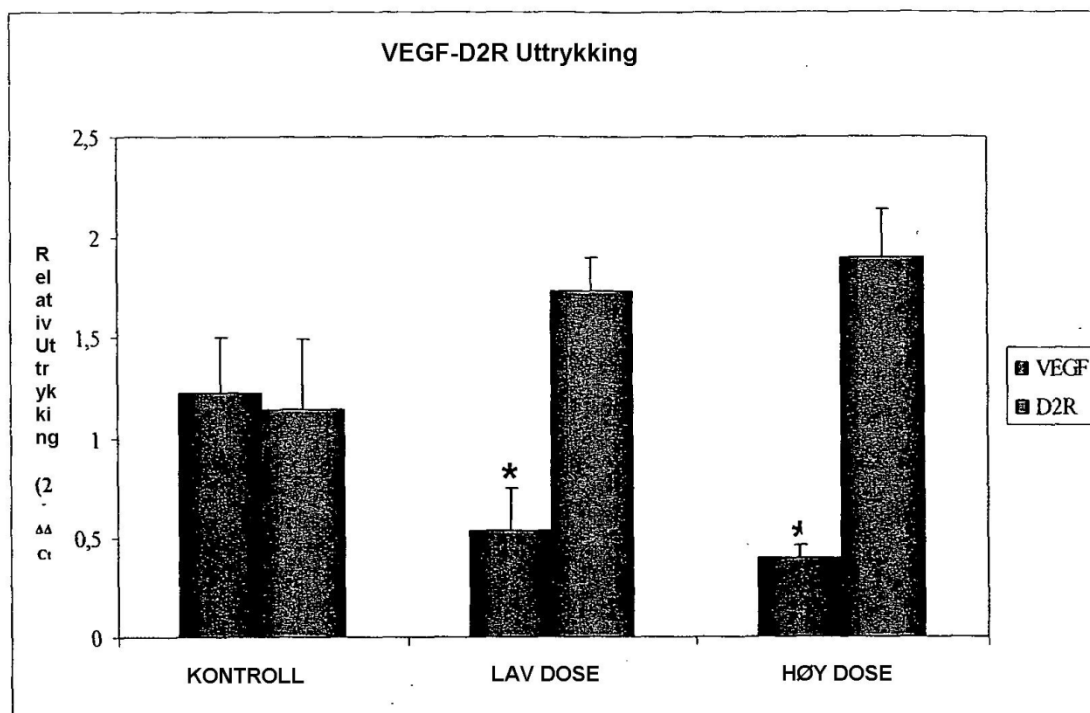


Fig 5



Figur 6a viser uttrykingsprofilen til dopaminreseptor 2 (Dp-r2, "D2R") og VEGF i endometrielle implantater i dyrene i de tre etablerte gruppene (kontroll-, lav- og høydose grupper)

Fig 6b

