

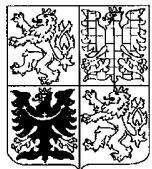
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1999 -3150

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **03.03.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **05.03.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/97200646**

(33) Země priority: **EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.03.2000**
(Věstník č. 3/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/EP98/01293**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/39012**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 31/565

A 61 P 9/10

(71) Přihlašovatel:

AKZO NOBEL N. V., Arnhem, NL;

(72) Původce:

Meuleman Dirk Gerrit, Oss, NL;
Zandberg Pieter, Oss, NL;

(74) Zástupce:

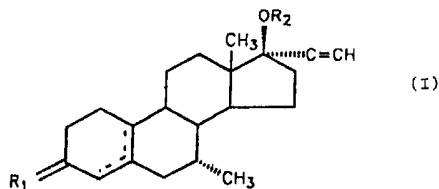
Korejzová Zdenka JUDr., Spálená 29, Praha 1,
110 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Farmaceutický prostředek

(57) Anotace:

Řešení se týká použití alfa-methyl-17alfa-ethinylestranových derivátů obecného vzorce I, v němž jednotlivé symboly mají význam, uvedený v hlavním nároku, pro výrobu farmaceutického prostředku pro profylaxi nebo léčení atherosklerozy.



Farmaceutický prostředek

Oblast techniky

Vynález se týká použití 7alfa-methyl-17alfa-ethinyl-
estranového derivátu pro výrobu farmaceutického prostředku
pro léčení atherosklerozy.

Dosavadní stav techniky

Vývoj atherosklerozy začíná současně s hromaděním
cholesterolu v lipoproteinech cévních stěn s následným vývo-
jem míst s uloženými tuky, které jsou pravděpodobně nejčas-
nějšími makroskopickými poškozeními a nacházejí se v intimě
stěn tepen jako místní nahromadění makrofágů, vyplněných tu-
kovitými látkami, jde o tzv. "pěnové buňky". Tento postup se
může rozvíjet až do nekrozy pěnových buněk a poškození endot-
helu může vést až k migraci buněk hladkých svalů a prolifera-
ci a ke tvorbě extracelulární matrice. Atheroskleróza je tedy
výsledkem interakce řady buněčných typů v cévní stěně, při-
čemž vyvolávající příčinou může být zvýšená koncentrace cho-
lesterolu v krevní plazmě podle publikace Davies, M.J. a Wo-
olf N. "Atherosclerosis: what is it and why does it occur",
Brit. Heart J., 1993, 69 (supl.) str. 3-11.

Onemocnění koronárních srdečních cév CHD je důsledkem
atherosklerotických pochodů ve stěně tepen. Je dobře známo,
že výskyt CHD u žen v reprodukčním věku je daleko nižší než
u mužů v obdobném věku, riziko se však prudce zvyšuje po
menopauze.

Menopauza je spojena s velkým množstvím vasomotoric-
kých, psychologických a gynekologických příznaků, z nichž
část je charakteristická pro perimenopauzální období přecho-
du. Bylo prokázáno, že menopauza znamená rizikový faktor pro
některá chronická onemocnění, jako jsou osteoporóza nebo

atheroskleróza. Předpokládá se, že tyto příznaky jsou vyvolá-
vány v podstatě prudkým poklesem koncentrací estrogenů,
zvláště estradiolu, estra-1,3,5 (10)-trien-3,17-diolu a také
estronu, 3-hydroxyestra-1,3,5 (10)-trien-17-onu. Z tohoto
5 důvodu se léčba estrogeny, nahrazující nedostatek tohoto hor-
monu v poslední době stále více užívá k zábraně osteoporózy a
dalších nežádoucích příznaků v přechodu a po něm. Mimo to se
uvádí, že také exogenní estrogen má příznivý vliv na snížení
cholesterolu a lipoproteinů s nízkou hustotou v krevní plazmě
10 a také na zvýšení komplexů lipoproteinů s vysokou hustotou a
cholesterolu v plazmě. Z těchto důvodů se u estrogenů předpo-
kládá celkový ochranný účinek proti tvorbě atherosklerotické-
ho poškození.

Podávání estrogenů po menopauze však zvyšuje riziko
15 hyperplazie endometria a endometriálního karcinomu. Z tohoto
důvodu se v poslední době užívá kombinovaného podávání estro-
genu a progestagenu, který by měl toto riziko snížit. Avšak
také progestagen může mít nežádoucí účinky, zejména na kon-
centrace lipoproteinů v krevní plazmě, takže antagonizuje
20 příznivé účinky estrogenů na cévní stěny.

Syntetický steroid, 7alfa-methyl-17alfa-ethinyl-
17beta-hydroxyestra-5(10)-en-3-on (Org OD-14, tibolon), vyrá-
běný firmou Organon, Nizozemí má současně slabě estrogenní,
progestogenní a androgenní vlastnosti a bylo prokázáno, že
25 při zlepšování příznaků přechodu je stejně účinný jako estra-
diolvalerát nebo konjugované koňské estrogeny. Mimo to bylo
prokázáno, že Tibolon při dlouhodobém podávání zabrání vzniku
osteoporózy u žen v menopauze podle publikace Hannover, N. a
další, J.Clin. Endocrinology and Metabolism 1996, 81,
30 2419-2422.

Mimo to byl sledován také vliv uvedené látky na koncentraci lipoproteinů v plazmě. V první řadě pokusů byl Tibolon podáván 6 měsíců za současného sledování koncentrace cholesterolu, celkového množství glyceridů nebo LDL- a HDL cholesterolu a podle prvních výsledků nebyly účinky významné, avšak nebyly také pozorovány žádné negativní vedlejší účinky, zejména pokud jde o rozvoj CHD. Sloučenina byla proto považována za použitelnou alternativu při hormonálním léčení žen po přechodu podle Maturitas, sv.8, č.4,1986, str.327-334. Pokusy s dlouhodobým vlivem Tibolonu na metabolismus lipidů potvrdily tyto výsledky podle Maturitas, sv.12, č.1,1990, str.37-42. Další studie kladou důraz na negativní účinek Tibolonu na koncentraci HDL, tento pokles je spojen se zvýšeným rizikem CHD, avšak popisují také příznivý účinek na pokles lipoproteinů Lp(a), který podle autorů může vyrovnat riziko, spojené s použitím Tibolonu podle Acta Endocrinologica, sv.128,1993, str.259-262 a Eur.J.Clin. Chem. Clin.Biochem., sv.31,1993, str.645-650.

Lp(a) je lipoprotein, bohatý na cholesterol a podobný LDL, který však je u většiny jednotlivců přítomen pouze ve stopovém množství. Osoby, které mají zvýšenou koncentraci těchto látek nad 300 mg/l mají také vysoké riziko CHD, takže uvedená látka je nezávislým rizikovým faktorem pro CHD.

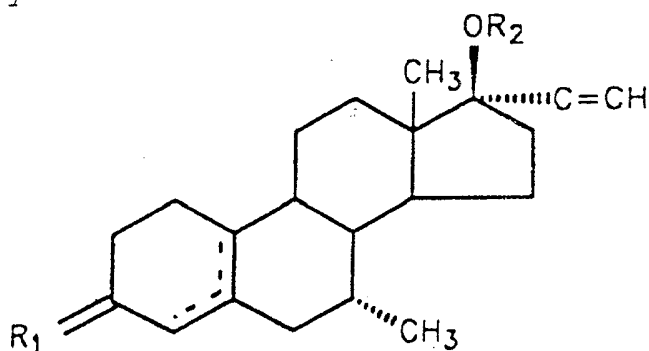
Dlouhodobé léčení Tibolonem a jeho vliv na HDL je však možno považovat na méně příznivý vzhledem k onemocnění srdce a cév než léčení estrogeny podle Riggs, B.L., J.Clin. Endocrinology and Metabolism, 1996, 81, 2417-2418.

Nyní bylo zcela neočekávaně zjištěno, že prekursor Tibolonu a některé jeho metabolity mají význačné

protisklerotické vlastnosti. Tyto vlastnosti jsou přitom daleko více vyjádřeny než vlastnosti 17beta-estradiolu v tomto smyslu.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří použití 7alfa-methyl-17alfa-ethinylesternových derivátů obecného vzorce I



kde

R_1 znamená $H(OR_3)$ nebo atom kyslíku,

R_2 znamená atom vodíku nebo acyl o 1 až 18 atomech uhlíku a

R_3 znamená atom vodíku nebo acyl o 1 až 18 atomech uhlíku,

přerušovaná čára znamená dvojnou vazbu v poloze 4,5-nebo v poloze 5,10-,

pro výrobu farmaceutického prostředku pro prevenci nebo léčení aterosklerózy.

Sloučeniny obecného vzorce I a zvláště ty látky, v nichž R_1 znamená atom vodíku, hydroxyskupinu nebo atom kyslíku a zejména ty sloučeniny, v nichž R_2 znamená atom vodíku a dvojná vazba se nachází v poloze 5,10-, s výhodou ty látky, v nichž R_1 znamená atom kyslíku, R_2 znamená atom vodíku a dvojná vazba se nachází v poloze 5,10- (Tibolon, Org OD-14) mají velmi vyjádřenou atheroprotektivní účinnost.

Vhodnými deriváty uvedeného typu obecného vzorce I, které je možno podle vynálezu použít jsou například 7alfa-methyl-17alfa-ethinyl-17beta-hydroxyestra-5(10)-en-3-on (Org OD-14, tibolon), 7alfa-methyl-17alfa-ethinylestra-5(10)-en-3alfa, 17beta-diol, 7alfa-methyl-17alfa-ethinylestra-5(10)-en-3beta, 17beta-diol, 7alfa-methyl-17alfa-ethinyl-17beta-hydroxyestra-4-en-3-on a estery těchto látek. Výhodnými deriváty jsou Tibolon a 7alfa-methyl-17alfa-ethinylestra-5(10)-en-3alfa, 17beta-diol, zvláště výhodným derivátem je Tibolon.

Pod pojmem acyl se rozumí acylová skupina, odvozená od organické karboxylové kyseliny, obsahující 1 až 18 atomů uhlíku. Jako příklady těchto karboxylových kyselin je možno uvést kyselinu mravenčí, octovou, propionovou, máselnou, isomáselnou, trimethyloctovou, valerovou, kapronovou, kaprinovou, undecylenovou, laurovou, palmitovou, olejovou, fenylacetovou, fenylpropionovou, benzoovou, fumarovou, maleinovou, jantarovou, citronovou. Výhodnými acylovými skupinami jsou ty, které obsahují 1 až 6 atomů uhlíku, nejvýhodnější je acetyl.

Deriváty obecného vzorce I jsou známé sloučeniny. Tyto látky je možno připravit například způsobem popsáním v US 3340279 a US 4701450 pro Tibolon.

Použití sloučenin uvedeného typu nevede pouze k vyloučení negativních kardiovaskulárních vedlejších účinků při náhradě hormonů, jak by bylo možno se domnívat z literárních údajů, tyto látky mají zcela neočekávaný, významný a příznivý ochranný účinek proti ateroskleroze. Popsané 7alfa-methyl-17alfa-ethinylestranové deriváty a farmaceutické prostředky s jejich obsahem tedy mají příznivý vliv na

hromadění cholesterolu v cévní stěně i na pokročilejší poškození cév.

Tyto přímé účinky na cévní stěnu bylo možno prokázat na obecně uznávaném modelu atherosklerozy u králíků. Na tomto modelu byl oproti očekávání vzhledem ke slabé estrogení účinnosti těchto látek prokázán značný a nepředpověditelný silný atheroprotektivní účinek i ve velmi malých dávkách, přičemž tento účinek byl daleko silnější než obdobný účinek 17beta-estradiolu.

Přestože uvedené látky mohou narozdíl od estradiolu snižovat v krevní plasmě koncentraci lipoproteinů typu Lp(a), nemůže to být vysvětlením pro tak vyjádřený atheroprotektivní účinek. Na rozdíl od člověka není u králíka v plasmě vůbec přítomen lipoprotein typu Lp(a), protože u králíka nedochází k jeho tvorbě podle Science, sv.246,1989, str.904-910. Silný ochranný účinek těchto látek proti atheroskleroze musí být tedy u králíka nezávislý na účinnosti na koncentraci Lp(a). Z toho je zřejmé, v případě, že u člověka navíc dochází ke snížení koncentrace lipidu Lp(a), který hraje přídatnou roli při vzniku atherosklerozy, měl by být u člověka účinek ještě silnější než pozorovaný účinek u králíků.

17alfa-methyl-17alfa-ethinylestranové deriváty obecného vzorce I tedy mají silný ochranný účinek proti atheroskleroze a jde tedy nejen o použitelnou látku při náhradě hormonů v průběhu přechodu a po něm, nýbrž také o látku, vhodnou k léčení atherosklerozy u savců, zvláště člověka, a to u mužů i žen jakéhokoliv stáří. Mimo to je možno uvedené látky použít i preventivně k zábraně vzniku atherosklerozy.

Uvedené látky je možno použít samostatně nebo v kombinaci s jednou nebo větším počtem látek s podobným účinkem

za předpokladu, že nedochází ke vzájemnému nepříznivému ovlivnění těchto látek. Kombinaci látek vždy musí určit ošetřující lékař.

Deriváty obecného vzorce I je možno podávat enterálně nebo parenterálně, u člověka se bude denní dávka pohybovat v rozmezí 0,05 až 10 mg, s výhodou 0,1 až 2,5 mg.

Denní dávku je možno podat najednou nebo rozděleně například perorálně, rektálně, pod jazyk, nosní sliznicí nebo pokožkou, například ve formě náplastí s transdermálním účinkem nebo ve formě krému. S výhodou se celá denní dávka podává najednou perorálně. Je také možno připravit prostředky s dlouhodobým řízeným uvolněním účinné látky. Tyto prostředky se s výhodou podávají ve formě podkožního implantátu.

Farmaceutický prostředek pro použití podle vynálezu je možno připravit běžnými postupy, popsány například ve standardních publikacích Gennaro a další, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.vydání, Mack Publishing Company, 1990, např. část 8: Pharmaceutical Preparations And Their Manufacture. Při výrobě farmaceutických prostředků tohoto typu se deriváty obecného vzorce I nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli mísí s farmaceutickým nosičem nebo se v něm rozpuštějí. Jako příklady vhodných lékových forem je možno uvést tablety, pilulky, čípky, kapsle, mikrokapsle, prášky, emulze, krémy, mazání, suspenze, roztoky, implantáty nebo spreje.

Příkladem farmaceuticky přijatelných nosičů mohou být škroby, jako bramborový nebo kukuřičný škrob, cukry, například laktoza, kluzné látky, například stearan hořečnatý, pojiva, jako amylopektin nebo polyvinylpyrrolidon, dále voda, alkohol, glycerol a jeho deriváty, rostlinné, živočišné a

minerální oleje a tuky, alifatické alkoholy, silikony, polyalkylenglykoly, deriváty celulozy, oxid křemičitý, dispergační činidla, emulgátory, smáčedla, antioxidační činidla, barviva a konzervační prostředky. Zásadně je možno použít jakýkoliv běžný farmaceutický nosič, který neovlivní nepříznivě účinnou látku.

Farmaceutické prostředky s obsahem výhodného derivátu obecného vzorce I, to znamená 17alfa-methyl-17alfa-ethinyl-17beta-hydroxyestra-5(10)-en-3-onu (Org OD-14, Tibolon) se s výhodou připravují při použití čisté monoklinické krystalické formy (P2₁) této látky vzhledem k lepší stálosti, biologické dostupnosti a skladovatelnosti této formy. Příprava a zpracování tohoto monoklinického derivátu na farmaceutický prostředek byla popsána v EP 389035.

Praktické provedení vynálezu bude osvětleno následujícími příklady, které však nemají sloužit k omezení rozsahu vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Atheroprotektivní vlastnosti 17alfa-methyl-17alfa-ethinylestranových derivátů vzorce I byly prokázány na králičím modelu, při němž se králíkům podává cholesterol a stanoví se účinnost sledovaných látek na vznik aterosklerozy u králíků samic po vynětí vaječníků. Tento model odpovídá vzniku choroby u člověka vzhledem k tomu, že buněčné změny, které vznikají u králíka v průběhu tohoto pokusu jsou obdobné změnám, které je možno pozorovat v různém stupni aterosklerozy srdečních cév. Jediný rozdíl spočívá v tom, že u králíka nedochází ke tvorbě lipoproteinu Lp(a) a proto se tato látka u králíka v plasmě nevyskytuje.

Příklad 1

Tablety se připravují ze základního granulátu, obsahujícího 100 mg laktozy na tabletu a 10 mg sušeného bramborového škrobu na tabletu. Základní granulát se připraví smísením laktozy s částí škrobu. Zbytek škrobu se zpracuje na suspenzi s vodou a přidá se ke směsi. Výsledná směs se granuluje a suší. Tento základní granulát se smísí s 0,2 mg askorbylpalmitátu na tabletu a buď s 2 nebo 6 mg Tibolonu na tabletu nebo se 4 mg 17beta-estradiolu na tabletu, směs se protlačí sítem, přidá se 0,5 mg stearanu hořečnatého na tabletu a směs se zpracuje na tabletu.

Příklad 2

Pokus byl proveden na 7 skupinách sexuálně zralých dosud nebřezích samic bílých králíků New Zealand White (Harlan, Zeist, Nizozemsko) ve stáří 7 až 9 měsíců s hmotností přibližně 3 kg, počet králíků ve skupině byl 13 až 14. V průběhu aklimatizace bylo králíkům podáváno běžně dodávané krmivo LKK20 (Hope Farms, Woerden, Nizozemí). 3 týdny před zahájením pokusu byla zvířata anestetizována a byly vyňaty oba vaječníky (OVX) nebo byla provedena simulovaná operace. Po 3 týdnech na začátku pokusu byly králičí samice náhodně rozděleny do skupin. U všech zvířat byla provedena deendothelializace segmentu levé krkavice při použití sušení vzduchem způsobem podle publikace Fishman, J.A. a další, Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening, Lab. Invest, 1975, 32, 339-351 a Lafont, A. a další, Restenosis and experimental angioplasty: Intimal, medial and adventitial changes associated with constructive remodeling, Circulation Research, 1995, 76, 996-1002.

Zvířata byla náhodně rozdělena do 7 pokusných skupin. Skupinám bylo podáváno atherogenní krmivo, a to běžně dodávané krmivo pro králíky LKK20, obohacené 0,4 g cholesterolu, 3,75 g kokosového oleje a 3,75 g arašidového oleje na 100 g. Jedné ze skupin bylo podáváno neobohacené krmivo LKK20. Příjem krmiva byl omezen na 80 g denně. Účinné látky byly podávány denně perorálně ve formě tablet, připravených podle příkladu 1, jak je uvedeno v tabulce I. Skupinám 1, 2 a 3 bylo denně podáváno placebo. Skupinám 4 a 5 byl podáván 7alfa-methyl-17alfa-ethinyl-17beta-hydroxyestra-5(10)-en-3-on v dávce 6 nebo 2 mg denně, skupině 6 byl podáván 17beta-estradiol v dávce 4 mg denně a skupině 7 byl podáván 17beta-estradioldekanoát v dávce 150 mg v 1 ml arašidového oleje podkožně 1x týdně.

V průběhu pokusu byly odebírány krevní vzorky z centrální ušní tepny po podání uklidňujícího prostředku Hypnorm v dávce 0,1 ml i.m. (Janssen Pharmaceutics, Beerse, Belgie) před podáním účinné látky v týdnech 4, 8, 12, 16 a 20 ke sledování koncentrace cholesterolu v krevní plasmě a v týdnu 17 ke sledování koncentrace estradiolu nebo Tibolonu v krevní plasmě.

20 týdnů po začátku pokusu byla zvířata anestetizována prostředkem Hypnorm v dávce 0,5 ml/kg i.m. Po odebrání krve byli králíci vykrváčeni a byl odebrán oblouk aorty, děloha a krkavice pro další analýzu.

Tabulka I provedení pokusu

	Skupina n	Ošetření ^x	Dávka	Krmivo	OVX
30	1	14 Placebo		cholesterol	ano

	2	13	Placebo		cholesterol	ne
	3	13	Placebo		normální	ano
	4	14	Org OD14	6 mg	cholesterol	ano
	5	13	Org OD14	2 mg	cholesterol	ano
5	6 E2	14	Estradiol	4 mg	cholesterol	ano
	7 E2D	14	Estradiol-	150,ug	cholesterol	ano
			dekanoát			

x znamená, že dávky byly podány perorálně až na skupinu 7, již byla dávka podána podkožně 1x týdně.

10

Příklad 3

Kromě pokusů v příkladu 2 byly provedeny ještě 2 další pokusy s dvěma nižšími dávkami Org OD14 a s vyšší dávkou estradioldekanoátu. Tyto skupiny byly spolu se skupinou, již bylo podáváno placebo a s kontrolní skupinou zařazeny do pokusu s úhrnem 5 skupinami, jak je shrnuto v tabulce II. Jinak byl postup totožný s postupem v příkladu 2.

15

3 týdny před začátkem pokusu byly zvířatům odstraněny vaječníky. Na začátku pokusu byla krkavice zbavena endothelu sušením vzdudech. Místo běžného krmiva bylo podáváno atherogenní krmivo s výjimkou kontrolní skupiny, které bylo podáváno normální krmivo.

20

Účinné látky byly podávány skupinám 1,2,3 a 4 denně perorálně ve formě tablety, připravené podle příkladu 1. Dávky Org OD14 na tabletu však byly 0,6 mg a 0,15 mg. Skupině 5 bylo podáno 300 mikrogramů 17beta-estradioldekanoátu v 1 ml arašidového oleje podkožně 1x týdně.

25

20 týdnů po začátku pokusu byl pokus ukončen stejným způsobem jako v příkladu 2.

30

Tabulka 2: provedení pokusu

	Skupina n	Ošetření*	Dávka	Krmivo	OVX
	1	22 Placebo		cholesterol	ano
	2	13 Placebo		normální	ano
5	3	13 Org OD14	0,6 mg	cholesterol	ano
	4	11 Org OD14	0,15 mg	cholesterol	ano
	5 E2D	14 Estradiol- dekanoát	300,ug	cholesterol	ano

10 x znamená, že účinné látky byly podány perorálně s
vyjímkou skupiny 5, již byla účinná látka podávána podkožně
1x týdně.

Vyhodnocení atherosklerozy

A Proužky tuku

15 Oblouk aorty byl vyjmut, podélně rozříznut a fixován
ve 2% paraformaldehydu. Pak byly tkáně barveny na lipidy při
použití 0,3% sudanové červení. Pro všechny úseky byly prove-
deny barevné fotografie. Pak bylo analýzou získaných obrázků
20 vyhodnoceno překrytí oblouku aorty tukovými proužky v %
(Context Vision Systems AB, Linköping, Švédsko).

B: stanovení cholesterolu v cévní stěně

25 Po provedeném měření tukových proužků byl oblouk aor-
ty homogenizován pomocí zařízení Mikro-Dismembrátor, (B.Braun,
Melsungen, SRN) a pak byly extrahovány lipidy způsobem podle
publikace Bligh a Dyer, Can.J.Biochem. Biophys, 1959,
37, 1911-1917. Celkové množství cholesterolu, extrahované smě-
sí chloroformu a methanolu bylo po odpaření této směsi pod
30 dusíkem a rozpuštění v methanolu stanoveno enzymaticky při
použití postupu CHOD-PAP (číslo katalogu 1442341, Boehringer
Mannheim, SRN) a vyhodnoceno spektrofotometricky při vlnové

délce 500 nm. Množství bílkoviny ve tkáni bylo stanoveno způsobem podle Lowryho.

C: Ztluštění intimy po odstranění endothelu

Levá krkavice, vysušená pomocí vzduchu byla odstraněna a fixována ve 2% paraformaldehydu s obsahem 6,8 % glukózy. Pravá krkavice sloužila jako srovnání. Po fixaci byly tkáně rozděleny na bloky s délkou 2 mm a zality do parafinu Paraplast plus, (Sherwood Medical Co, St. Louis, USA) při použití automatického zařízení pro zpracování tkání (Hypercenter XP, Shandon).

Aby bylo možno měřit ztluštění intimy analýzou fotografií, bylo vyvinuto specifické barvení a v souvislosti s ním i specifická analýza obrázků. Měření bylo prováděno na příčných řezech s tloušťkou 2 mikrometry po působení elastázy (Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, SRN) před barvením elastinu Lawsonovým roztokem (Boom, Meppel, Nizozemí) a světlou zelení (Sigma). Po sobě následující řezy byly usušeny na vzduchu a upevněny do Pertexu (Leica GmbH, Nussloch, SRN).

Pro morfologické sledování byly příčné řezy s tloušťkou 2 mikrometrů barveny jak směsí methylenové modři a azuru II, tak směsí hematoxylinu a eosinu. Buňky hladkých svalů a makrofágy byly prokazovány příslušnými alfa-actinovými protilátkami (Sigma) a protilátkami proti makrofágům (RAM 11, DAKO, Glostrup, Dánsko). Pro detekci vázaných protilátek byly použity konjugované sekundární kozí protilátky pro myším tkáním (Aurion, Wageningen, Nizozemí) a imunitní zkoušky s protilátkami vázanými na směs zlata a stříbra (SilvEnhance-LM Kit, Zymed).

Obrazy jednotlivých řezů byly získány při použití černobílé videokamery (MX-5, Adimec Image Systems BV,

Eindhoven), upevněné na světelný mikroskop (Axioplan, Zeiss, Jena, SRN). Obraz videokamery byl digitalizován a ztlustění intimy bylo měřeno pomocí poloautomatického analyzátoru obrazu (Context Vision Systems AB, Linköping, Švédsko).

5 Ke statistickému vyhodnocení byly údaje vyjádřeny jako průměr spolu se směrodatnou odchylkou, pokud není uvedeno jinak. Bylo užito analýzy variance (ANOVA). Údaje byly transformovány logaritmicky k normalizaci variací. Za statisticky významnou je považována hodnota P menší než 0,05.

10

Výsledky (příklad 2, tabulka III)

15 Po 20 týdnech podávání obohaceného krmiva při denním podávání účinných látek byla provedena nekropsie ke stanovení nahromadění cholesterolu a tukových proužků v oblouku aorty a změn v krkavici. Mimo to byla sledována hmotnost dělohy. Vý-

20 sledky jsou uvedeny v tabulce III. Nebylo možno pozorovat žádné statisticky významné rozdíly u zvířat s odstraněnými vaječníky ve skupině 1 a u zvířat již byly vaječníky ponechány ve skupině 2. To po-

25 tvrzuje, že i u samic králíků s přítomnými vaječníky je endogenní koncentrace estradiolu v plasmě nízká. Po perorálním podání 4 mg 17beta-estradiolu denně ve skupině 6, E2 bylo dosaženo 1 hodinu po podání nejvyšší koncentrace estradiolu v plasmě 238 pg/ml, tato koncentrace klesla po 24 hodinách na 18 pg/ml. Podkožně podávaný estradiol-

30

dekanoát v dávce 150 mikrogramů týdně ve skupině 7, E2D zajistil stálou koncentraci estrogenu přibližně 60 až 70 pg/ml v průběhu dne. Tyto koncentrace prokazují, že při obou způsobech podávání estradiolu je možno zajistit jeho účinnou koncentraci v krevní plasmě.

Při přepočtu na energetický příjem je možno očekávat, že u králíka je perorální dávka 4 mg estradiolu přibližně odpovídající dávce 6 mg Org OD14. Měření koncentrace v plasmě králíků prokázalo, že Org OD14 v dávce 6 mg denně zajistí koncentraci této látky v plasmě, která je srovnatelná s koncentrací, kterou je možno dosáhnout u člověka při klinické dávce 2,5 mg této látky.

Při podávání 2 a 6 mg Org OD14 denně bylo možno pozorovat v důsledku estrogenního účinku zvýšení hmotnosti dělohy obdobně jako při podávání estradiolu E2 nebo E2D, což potvrzuje, že dávky jsou ekvivalentní.

Přes tuto srovnatelnost účinnosti estrogenu a Org OD14 na dělohu jsou účinky na hromadění cholesterolu v aortě a na poškození aorty u obou typů látek rozdílné. Podávání 17beta-estradiolu E2 nevedlo ke sníženému hromadění cholesterolu, po podávání 17beta-estradioldekanoátu ED2 došlo ke snížení nahromadění cholesterolu v oblouku aorty o 46 %, kdežto podávání Org OD14 zcela zabránilo ukládání cholesterolu do oblouku aorty v obou koncentracích.

17beta-estradiol E2 a 17beta-estradioldekanoát E2D neovlivnily koncentraci cholesterolu v plasmě, kdežto Org OD14 tuto koncentraci účinně snižuje.

Tvorba tukových proužků v oblouku aorty byla po podávání estrogenů jen mírně snížena, kdežto po podávání Org OD14 došlo k téměř úplné prevenci tvorby tukových proužků v této oblasti.

17beta-estradiol E2 neměl žádný vliv na tvorbu závažnějších poškození cév po mechanickém odstranění endotelu, kdežto 17beta-estradioldekanoát E2D tvorbu těchto poškození snižoval. Histologické sledování prokázalo, že po podávání

placeba pokusným zvířatům s cholesterolem v krmivu se poškození projevovало přítomností buněk hladkých svalů a pěnových buněk, kdežto u zvířat, jimž bylo podáváno běžné krmivo byly v poškozených oblastech pozorovány pouze buňky hladkých svalů. Při histologickém sledování zvířat, léčených E2D bylo prokázáno, že poškozená místa rovněž obsahují buňky hladkých svalů a pěnové buňky. Po podání Org OD14 však došlo k účinné inhibici tvorby takového poškození. Rozsah poškození byl dokonce nižší než u zvířat kontrolních, jimž bylo podáváno běžné krmivo a mimo to bylo možno v poškozených oblastech nalézt pouze buňky hladkých svalů.

Výsledky (příklad 3, tabulka IV)

V příkladu 2 bylo prokázáno, že dávka 2 a 6 mg Org OD14 u králíků účinně zabrání tvorbě atherosklerotického poškození. Tento účinek byl zcela neočekávaně daleko vyšší než účinek estradiolu nebo estradioldekanoátu, i když estrogení účinek na dělohu byl přibližně stejný. V příkladu 3 byl podáván Org OD14 ve dvou nižších dávkách 0,6 a 0,15 mg perorálně 1x denně, estradioldekanoát byl podáván ve vyšší dávce 300 mikrogramů podkožně 1x týdně. Účelem bylo nalézt dávku Org OD14 s přibližně stejným antiatherosklerotickým účinkem, jaký je možno prokázat pro estradioldekanoát.

Výsledky prokazují, že Org OD14 v dávce 0,6 mg stále ještě téměř úplně brání vzniku atherosklerotického poškození. Dvakrát vyšší dávka estradioldekanoátu (ve srovnání s tabulkou III) stále ještě pouze částečně zabrání tvorbě takového poškození.

Dávka v rozmezí 0,60 až 0,15 mg Org OD14 bude mít přibližně stejný účinek jako 300 mikrogramů

estradioldekanoátu. Účinek na dělohu je však zcela odlišný. Hmotnost dělohy se zvýšila z 0,054 na 0,132 g, tzn. na 144 % v případě Org OD14, kdežto v případě estradioldekanoátu se hmotnost dělohy zvýšila na 0,505 g, to znamená vzestup 835 %.

5

Závěry:

Výsledky z příkladu 2 prokazují, že 17beta-estradiol, 17beta-estradioldekanoát a Org OD14 jsou v klinicky ekvivalentních dávkách přibližně stejně účinné na růst dělohy u králíků, avšak účinnost OD 14 na cholesterol v plasmě a na jeho hromadění v aortě je daleko vyjadřenější.

10

15

Jak je zřejmé z příkladu 3, dávka 0,60 až 0,15 mg Org OD14 má přibližně stejnou antisklerotickou účinnost jako 300 mikrogramů estradioldekanoátu, to znamená účinek 10x až 40x vyšší, kdežto estrogení účinek je daleko vyjadřenější u estradioldekanoátu. Je tedy zřejmé, že Org OD14 je klinicky účinný pro prevenci i léčení atherosklerozy.

20

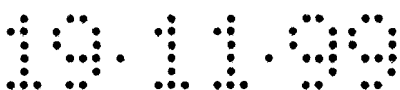
25

30

Tabulka III: Vliv různých látek na atherosklerotické změny, vyvolané atherogenní stravou v aortálním oblouku a na krevnici a vliv na další metabolické hodnoty 20 týdnů od začátku pokusu

	Kontrola skupina 3	Placebo Skupina 1	Org OD14 Skupina 4	Org OD14 Skupina 5	Estradiol Skupina 6	Estradiol dekanóat Skupina 7
Počet králíků	13	9	13	12	13	11
Hmotnost v g	2831 ± 50	2683 ± 95	2758 ± 41	2815 ± 50	2831 ± 58	2973 ± 52
Hmotnost dělohy na 100 g hmotnosti	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.24 ± 0.06 *	0.29 ± 0.03 *	0.31 ± 0.02 *	0.37 ± 0.04 *
Průměr konc.cholesterolu mmol/l/den	1.0 ± 0.1 *	26.9 ± 3.3	11.2 ± 1.5 *	9.0 ± 1.3 *	27.7 ± 2.8	30.0 ± 3.7
Cholesterol v oblouku aorty nmol/mg bílk.	45 ± 5 *	590 ± 126	52 ± 9 *	61 ± 11 *	521 ± 99	318 ± 58 *
Plocha tukových pruhů v oblouku aorty %	0.3 ± 0.2 *	34.5 ± 6.8	1.3 ± 0.8 *	1.4 ± 0.7 *	25.5 ± 5.2	28.1 ± 4.1
Větší poškození krevnice mm ² intimy	0.22 ± 0.03 *	0.44 ± 0.10	0.13 ± 0.03 *	0.14 ± 0.02 *	0.30 ± 0.06	0.23 ± 0.06 *

* p je nižší než 0,05 ve srovnání s placebem (skupina 1)





Tabulka IV: Účinek 0,6 a 0,15 mg Org OD 14 perorálně jednou denně u králíků ve srovnání s dvojnásobnou dávkou estradioldekanóatu 300 μ g podkožně jednou týdně na změny, vyvolané atherogenní stravou u králíků na obilouku aorty, krevnici a na metabolické hodnoty 20 týdnů od začátku pokusu

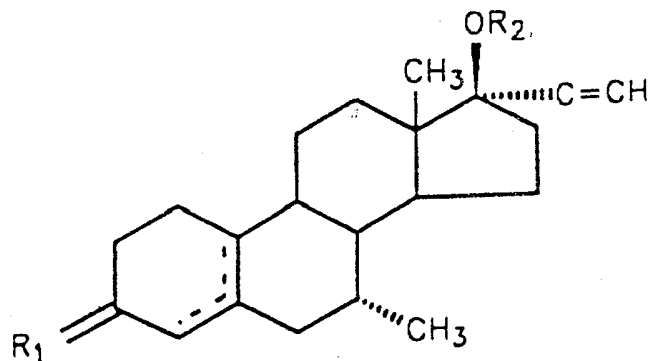
	Kontrola	Placebo	Org OD14 0.6 mg	Org OD14 0.15 mg	Estradiol dekanóat
Počet králíků	13	22	13	11	14
Hmotnost v g	2869 $\pm$ 38	2882 $\pm$ 73	3008 $\pm$ 58	2850 $\pm$ 42	3093 $\pm$ 60
Hmotnost dělohy na 100 g hmotnosti	0.051 $\pm$ 0.009	0.054 $\pm$ 0.007	0.224 $\pm$ 0.016 *	0.132 $\pm$ 0.013 *	0.505 $\pm$ 0.076 *
Průměr konc.cholesterolu mmol/l/den	1.3 $\pm$ 0.4 *	38.9 $\pm$ 2.5	12.8 $\pm$ 1.2 *	20.7 $\pm$ 1.5 *	23.0 $\pm$ 2.0 *
Cholesterol v obilouku aorty mmol/mg bílk.	51 $\pm$ 9 *	636 $\pm$ 53	97 $\pm$ 23 *	297 $\pm$ 67 *	225 $\pm$ 69 *
Plocha tukových pruhů v obilouku aorty %	1.0 $\pm$ 0.7 *	41.9 $\pm$ 2.8	5.9 $\pm$ 2.4 *	23.5 $\pm$ 5.3 *	14.2 $\pm$ 3.2 *
Větší poškození krevnice mm intimy	0.13 $\pm$ 0.02 *	0.31 $\pm$ 0.07	0.14 $\pm$ 0.01 *	0.24 $\pm$ 0.05	0.18 $\pm$ 0.02 *

* p je nižší než 0,01 ve srovnání s placebem (skupina 1)

5 10 15 20 25 30

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití 7alfa-methyl-17alfa-ethinylestranového derivátu
obecného vzorce I



kde

R_1 znamená $H(OR_3)$ nebo O ,

R_2 znamená vodík nebo acyl o 1 až 18 atomech uhlíku,

R_3 znamená vodík nebo acyl o 1 až 18 atomech uhlíku,

přerušovaná čára znamená dvojnou vazbu v poloze 4,5-nebo v
poloze 5,10-,

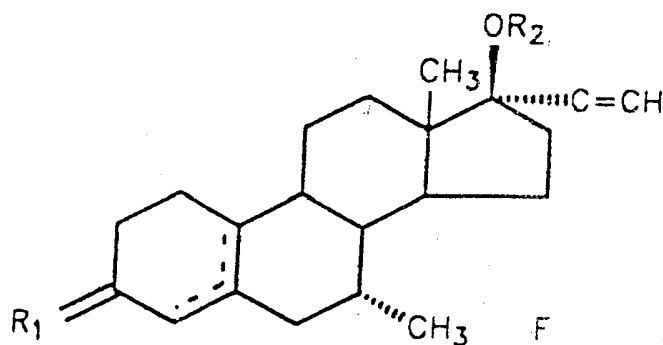
pro výrobu farmaceutického prostředku pro profylaxi nebo
léčení atherosklerozy.

2. Použití podle nároku 1, při němž R_1 znamená atom vodí-
ku, hydroxyskupinu nebo atom kyslíku.

3. Použití podle nároku 1 nebo 2, při němž R_2 znamená atom
vodíku a přerušovaná čára znamená dvojnou vazbu v poloze
5,10-.

4. Použití podle nároku 1, při němž se jako
7alfa-methyl-17alfa-ethinylestranový derivát vzorce I užije
7alfa-methyl-17alfa-ethinyl-17beta-hydroxyestra-5(10)-en-3-on.

5. Způsob inhibice tvorby atherosklerotického poškození,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že se savcům podává o-
chranné množství 17alfa-methyl-17alfa-ethinylestranového de-
rivátu obecného vzorce I



kde

R_1 znamená $H(OR_3)$ nebo O ,

R_2 znamená vodík nebo acyl o 1 až 18 atomech uhlíku,

R_3 znamená vodík nebo acyl o 1 až 18 atomech uhlíku,

přerušovaná čára znamená dvojnou vazbu v poloze 4,5-nebo v
poloze 5,10-.

6. Způsob podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e
t í m, že se účinná látka podává člověku.

Zastupuje :