

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 291 709

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1996 - 2103  
(22) Přihlášeno: 02.02.1995  
(30) Právo přednosti:  
04.02.1994 US 1994/191631  
(40) Zveřejněno: 14.05.1997  
(Věstník č. 5/1997)  
(47) Uděleno: 12.03.2003  
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 14.05.2003  
(Věstník č. 5/2003)  
(86) PCT číslo: PCT/US95/01479  
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 95/020972

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.<sup>7</sup> :  
A 61 K 38/00  
A 61 P 15/00

(73) Majitel patentu:

The Medical College of Hampton Roads A Corporation  
of Virginia, Norfolk, VA, US;

(72) Původce vynálezu:

Hodgen Gary D., Norfolk, VA, US;  
Williams Robert F., Norfolk, VA, US;  
Grow Daniel, Longmeadow, MA, US;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273, Praha 4,  
14021;

(54) Název vynálezu:

**Léčivo pro léčení stavů závislých na ovariálních  
estrogenech**

(57) Anotace:

Použití analogu hormonu uvolňujícího gonadotropiny v kombinaci s antiprogestinem pro přípravu léčiva pro léčení stavů závislých na ovariálních estrogenech jako je endometrióza, leiomyomy uteru, premenstruální syndrom nebo dysfunkční děložní krvácení a snížení úbytku kostní tkáně, přičemž analog hormonu uvolňující ganadotropiny se podává ženám po dobu nejméně 30 dnů, což je doba postačující ke snížení hladiny sérového estrogeneru v krvi na 20 pg/ml nebo méně, a poté se podá antiproliferační a kost zachovávající množství antiprogestinu.

CZ 291709 B6

## Léčivo pro léčení stavů závislých na ovariálních estrogenech

### Oblast techniky

5

Vynález se týká použití analogu hormonu, uvolňujícího gonadotropiny v kombinaci s anti-progestinem pro přípravu léčiva pro léčení stavů závislých na ovariálních estrogenech.

### 10 Dosavadní stav techniky

Endometrióza je ektopický výskyt žláz a tkání endometriálního typu mimo dělohu, což vede často ke tvorbě cyst obsahujících pozměněnou krev. Pro miliony žen na celém světě tento stav ústí v ochromující bolest, která nastává zejména ve spojení s měsíční proliferací endometriální tkáně. Endometrióza je často celoživotní stav.

Endometrióza může být léčena různými léčebnými postupy, ale žádný z nich není dostatečně účinný pro dlouhodobé léčení dlouhé šest měsíců a více. Snad nejstarší léčebný postup s prokazatelným účinkem je podávání progestinu buď injekčně, perorálně nebo v kombinaci s perorálními kontraceptivy. Avšak dlouhodobé podávání progestinů, obzvláště androgenních, je spojeno s nežádoucími vedlejšími účinky a ve Spojených státech nebylo povoleno.

Syntetický steroid odvozený od ethisteronu, jmenovitě 17- $\alpha$ -pregna-2,4-dien-20-ynol[2,3-d]-izoxazol-17-ol, také známý pod jménem danazol a prodáváný pod obchodní značkou Danocrine, je účinnou medikací pro léčení endometriózy produkující hypoestrogenní prostředí. Bohužel tento lék má také mnoho androgenních vedlejších účinků. Kromě vazomotorického zrudnutí doprovázejícího nedostatek estrogenů způsobuje přírůstek na váze, křeče dlouhých svalů, atrofii prsů, návaly horka, střídání nálad, olejovitou kůži, depresi, otoky, akné, únavu, hirsutismus, změny libida, bolesti hlavy, vyrážku a prohloubení hlasu.

30

Jedním z neúčinnějších postupů pro léčbu endometriózy je podávání agonisty hormonu uvolňujícího gonadotropiny, který potlačuje sekreci pituitárního gonadotropinu, a tudíž navozuje stav reverzibilní pseudomenopauzy. Ačkoliv individuální odezva kolísá, v průběhu pouhých tří měsíců od začátku léčby endometrióza obvykle rychle ustoupí. Po ukončení léčby se bolest často vrací a několik měsíců po návratu normálních menstruačních cyklů se endometrióza znovu objeví. Hlavní nevýhoda této léčby je řada vedlejších účinků pramenících z protražovaného vážného hypoestrogenismu nebo pseudomenopauzálního stavu navozeného vážným nedostatkem estrogenů, a to návaly horka, úbytek kostní tkáně a ztráta kardiovaskulární ochrany poskytované estrogeny. Cíl hormonální substituční léčby je poskytnout estrogen a/nebo progestin, a tím předcházet úbytku kostní tkáně. Zatímco individuální odezva opět kolísá, úbytek kostní tkáně obvykle začíná být měřitelný po třech měsících léčby a u nejvíce citlivých pacientů se stává vysoce významný po šesti měsících léčby. Zvážíme-li možný prospěch a riziko vedlejšího účinku, ukazuje se nepřijatelnost rizika vedlejšího účinku vyplývající z faktu, že index úmrtnosti je 3,2 let poté, co žena v menopauze zažije zlomeninu kyčelního kloubu důsledkem osteoporózy. Kvůli tomuto vedlejšímu účinku United States Food & Drug Administration (FDA) zakazuje jakékoliv podávání analogu hormonu uvolňujícího gonadotropiny delší než šest měsíců celkového podávání. Jinými slovy, podle klasifikačního požadavku FDA lék nemůže být znovu podáván po období vysazení.

45

Společným rysem leiomyomů a endometriózy je závislost na ovariálních estrogenech. Lék, který je účinný v léčbě endometriózy a děložních leiomyomů je antiprogestin (někdy nazýván „antagonista progesteronu“ nebo „anti-gestagen“). Viz, např. Chwalisz a kol., *Endocrinology*, 129 (1):312, 1991; Kettel a kol., *Fertil Steril*, 56(3):402, 1991; Murphy a kol., *J. Clin.*

*Endocrinol. Metab.*, 76(2): 513, 1993, Viz tak Gravanis a kol., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 60:156, 1986 a Wolf a kol., *Fertil Steril*, 52:1055, 1989.

5 Premenstruální syndrom (PMS) a dysfunkční děložní krvácení (DUB) jsou také stavy, jež mají společně to, že závisí na estrogenních hormonech cyklicky produkováných ovarii.

10 Zkoumalo se použití kombinace agonisty hormonu uvolňujícího gonadotropiny (leuprolid) a progestinu (medoxyprogesteron acetát) v léčbě děložních leiomyomů. Při průvodní léčbě progestin zvrátil působení hypoestrogenismu, vyvolaného agonistou, na snížení objemu nemyomové tkáně, což znamená, že léčení progestinem zabránilo blahodárným účinkům léčby agonistou. Když byl použit střídavý režim, progestin snížil výskyt návalů horka a ztráty vápníku močí, ale současně zvýšil celkový objem dělohy, i když ne zpátky k výchozím hodnotám. Viz. Case a kol., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 76:1217, 1993.

15

### Podstata vynálezu

20 Nyní bylo zjištěno, že léčebné schéma podávání analogu hormonu uvolňujícího gonadotropiny ve spojení s antiprogestinem způsobuje zmírnění symptomů stavů závislých na ovariálních estrogenech jako je endometrióza, děložní leiomyomy, PNS a DUB, a navíc zpomaluje úbytek kostní tkáně způsobený nedostatkem estrogenů, který je vyvolán podáním analogu GnRH. Cílem je poskytnout takové léčebné schéma. Tento a další cíle se ozřejmí osobám znalým daného oboru z následujícího podrobného popisu.

25 Vynález se týká použití analogu hormonu uvolňujícího gonadotropiny v kombinaci s antiprogestinem pro přípravu léčiva pro léčení stavů závislých na ovariálních estrogenech jako je např. endometrióza, leiomyomy uteru, premenstruální syndrom nebo dysfunkční děložní krvácení a pro dlouhodobou léčbu těchto nemocí bez rychlého úbytku kostní tkáně, přičemž stav závislý na ovariálních estrogenech se léčí podáváním analogu hormonu uvolňujícího gonadotropiny po dobu  
30 nejméně 30 dnů, která je postačující ke snížení hladiny sérového estrogenu na 20 pg/ml nebo méně a potom podáváním antiprogestinu v dávce působící antiproliferačně na endometrium a zachovávající kostní tkáň.

35 Žena trpící staven závislým na ovariálních estrogenech jako je endometrióza, děložní leiomyomy, PMS a/nebo DUB je léčena, v souhlase s předkládaným vynálezem, oběma léky, tj. analogem hormonu uvolňujícího gonadotropiny a antiprogestinem. Překvapivě nejsou zmírněny pouze symptomy endometriózy, PMS, DUB nebo myomů, ale je zmírněn také úbytek kostní tkáně spojený s nedostatkem estrogenů a v některých případech je skutečně zastaven. Výsledkem je, že tolerance k léčebnému schématu je zvýšena a délka léčby může být prodloužena a je ukázána  
40 prospěšnost podávání antiprogestinu déle než šest měsíců. Ačkoliv bazální hladina sérového estrogenu je vyšší během podávání antiprogestinu než během léčby agonistou GnRH, nebyl zaznamenán žádný zjevný relaps, a současně je hustota kostního minerálu zachována nebo zvýšena. Má se za to, že prahy estrogenního účinku jsou odlišné, takže po počátečním snížení estrogenu je okno vyšší koncentrace, ve kterém redukováná hladina sérového estrogenu navodí  
45 terapeutický účinek a zmírní obtíže, přičemž stejná koncentrace nevyvolává rychlý úbytek kostní tkáně, tudíž kostní masa je zachována nebo zvýšena.

50 Hormon uvolňující gonadotropiny je malý polypeptid produkováný v hypothalamu a někdy je nazýván gonadotropický uvolňující hormon, hormon uvolňující luteinizační hormon, GnRH nebo LHRH. V předkládaném vynálezu může být použit jakýkoliv analog, buď antagonist a nebo agonista, tohoto polypeptidu.

55 Příklady antagonisty hormonu uvolňujícího gonadotropiny mohou být nalezeny, kromě jiného, v patentech US 4 409 208, 4 547 370, 4 565 804, 4 569 927 a 4 619 914, 5 198 533 a WO 89/01944, na jejichž významenky zde odkazujeme. Příklady takových antagonistů jsou Antide

(dekapeptid znázorněný vzorcem  $D\text{-Ac-D-2-Nal}^1\text{-DpClPhe}^2\text{-D-3-Pal}^3\text{-Ser}^4\text{-NiLys}^5\text{-D-NicLys}^6\text{-Leu}^7\text{-iLys}^8\text{-Pro}^9\text{-D-Ala}^{10}$ ),  $[\text{Ac/D4CIDPhe}^1, \text{D4CIDPhe}^2, \text{DTrp}^3, \text{DArg}^6, \text{DAla}^{10}]$  GnRH,  $[\text{Ac/4CIDPhe}^2, \text{D}_3\text{Pal}^3, \text{Arg}^5, \text{D}_2\text{Nal}^1, \text{DAla}^{10}]$  GnRH,  $[\text{Ac-D}_2\text{Nal}^1, \text{4CIDPhe}^2, \text{DTrp}^3, \text{DArg}^6, \text{DAla}^{10}]$  GnRH,  $[\text{Ac-D}_2\text{Nal}^1, \text{4FDPhe}^2, \text{DTrp}^3, \text{DArg}^6]$  GnRH,  $[\text{Ac-D}_2\text{Nal}^1, \text{4CIDPhe}^2, \text{DTrp}^3, \text{DhArg}(\text{Et}_2)^6, \text{DAla}^{10}]$  GnRH, a  $[\text{Ac-Nal}^1, \text{DME4ClPhe}^2, \text{DPal}^3, \text{Ser}^4, \text{Tyr}^5, \text{DArg}^6, \text{Leu}^7, \text{iLys}^8, \text{Pro}^9, \text{DAla}^{10}]$  GnRH.

Příklady agonisty hormonu uvolňujícího gonadotropiny jsou leuprolid, nafarelin, busarelin,  $[\text{DAla}^6, \text{des-Gly-NH}_2^{10}]$  GnRH,  $[\text{DLys}^6]$  GnRH,  $[\text{DAla}^6]$  GnRH,  $[\text{2-Me-Ala}^6]$  GnRH,  $[\text{D-}\alpha\text{-aminobutyryl}^6, \text{des-GlyNH}_2^{10}]$  GnRH triptorelin, lutrelin, goserelin, histrelin a pod.

Analogy hormonu uvolňujícího gonadotropiny použité v předpokládaném vynálezu mohou být podávány ve formě farmaceuticky přijatelných netoxických solí nebo komplexů. Soli zahrnují kyselé soli jako jsou například hydrochlorid, hydrobromid, sulfát, fosfát, nitrát, oxalát, fumarát, glukonát, tanát, maleát, acetát, benzoát, sukcinát, alginát, malát, askorbát, tartrát apod. Komplexy mohou být s kovy jako například zinek, baryum, kalcium, magnezium, aluminium a pod.

Z hlediska použití analogu hormonu uvolňujícího gonadotropiny je předkládaný vynález podobný předcházejícímu použití takovýchto analogů pro léčbu endometriózy a/nebo děložních leiomyomů. Tak nejenom může být použit jakýkoliv známý analog GnRH, ale v praxi předkládaného vynálezu může být využito také až dosud používané dávkování a způsob podání. Způsob podání může být jakýkoliv konvenční způsob, kde je analog aktivní, například perorálně, intravenózně, subkutánně, intramuskulárně, sublingválně, perkutánně, rektálně, intranazálně nebo intravaginálně. Podobně forma podání může být tableta, dražé, kapsle, pilulka, nosní aerosol, aerosol, pelet, implantát (nebo jiná depotní forma) a pod.

Podané množství analogu hormonu uvolňujícího gonadotropiny je takové, že stačí ke snížení sérového estrogenu na 20 pg/ml nebo méně na konci časového období od 1 do 6 měsíců a je podobné tomu, co se až dosud používá. Obecně množství může být v rozmezí od 0,05 do 50 mg, výhodně od 0,5 do 10 mg denně. Určení účinné dávky je rutinním farmaceutickým úkonem a bere do úvahy různé fyzické parametry jako je váha, věk a pod. a nejlépe je určí ošetřující lékař. Podávání léku může být periodické, to znamená na měsíční bázi, nebo kontinuální, na denní bázi. Denní aplikace se preferuje, protože je pravděpodobnější, že pacienti se řídí léčebným schématem a nezapomínají či nepřehlížejí periodický rozpis dávkování. Může být výhodné použití depotního dávkování, například užití leuprolidu acetátu komerčně dostupného pod obchodní značkou Lupron Depot.

Antiprogestin vhodný pro kombinování s agonistou nebo antagonistou GnRH může být antagonistou progesteronového receptoru nebo farmaceuticky vhodná látka, která působí proti normální biologické funkci progesteronu. Preferovaný antiprogestin je antagonistou progesteronového receptoru, buď steroidní nebo nesteroidní, který projevuje určitou schopnost snížit estrogenní sekreci, ale což je důležitější, blokuje estrogenní stimulaci trojných tkání jako je endometrióza, ektopická nebo děložní, nebo tkáň leiomyomů. Například obzvláště vhodný pro provádění tohoto vynálezu je RU 486.

Příklady antiprogestinů, které mohou být využity v tomto vynálezu jsou RU 486 („mifepriston“, Roussel Uclaf, Paris; US patent 4 386 085); a „onapriston“ (Schering AG, Berlin; US patent 4 780 461) a steroidy popsané v následujících patentech: US patent 4 609 651, obzvláště sloučenina lilopriston ( $11\beta\text{-(4-dimethylaminophenyl)-17}\beta\text{-hydroxy-17}\alpha\text{-(3-hydroxy-prop-1-(Z)-benzyl-4,9(10) estradien-3-on)}$ ); US patent č. 5 681 817, zejména sloučeniny  $11\beta\text{-(4-acetylphenyl)-17}\beta\text{-hydroxy-17}\alpha\text{-(1-propionyl)-4,9-estradien-3-on}$  a  $11\beta\text{-(4-acetylphenyl)-17}\beta\text{-hydroxy-17}\alpha\text{-(3-hydroxy-1(2)-propenyl)-4,9-estradien-3-on}$ ; US patenty č. 5 516 769 a č. 5 468 736 publikovaná Evropská patentová žádost EP-A 04 042 831; publikovaná PCT žádost WO 91/14 704; a další antiprogestiny, např. US patent 4 891 368.

Antiprogestin může být podáván jakýmkoliv způsobem a prostředky uznávanými farmaceutickou vědou. Například, vhodný antiprogestin může být navržen tak, že může být podáván perorálně, subkutánně, intramuskulárně, bukálně, kožní náplastí pro transdermální absorpci, obsažený v inertním nosiči, který je implantován v těle a v depotním stavu, nebo intravaginálně v nosiči, který pomalu uvolňuje antiprogestin (implantát ve smyslu patentů: US patent 4 957 119 a 5 088 505 apod.).

Farmaceutické složení látky obsahující antiprogestin a vhodný nosič mohou být pevné lékové (dávkovací) formy, které zahrnují tablety, kapsle, oplatky, pelety, pilulky, prášek nebo granule; místní lékové formy, které zahrnují roztoky, pudry, tekuté emulze, tekuté suspenze, polopevné látky, mazání, pasty, krémy, gely nebo želé a pěny; a parenterální lékové formy, které zahrnují roztoky, suspenze, emulze nebo suchý prášek obsahující účinné množství antiprogestinu, jak je uváděno v tomto vynálezu. V oboru je známo, že aktivní složka, antiprogestin, může být obsažen v takových směsích látek navíc k farmaceuticky přijatelným ředidlům, plnidlům, dezintegrátům, pojidlům, lubrikantům, surfaktantům, hydrofobním nosičům, ve vodě rozpustným nosičům, emulgátorům, pufrům, zvlhčovačům, zmlžovačům, rozpouštědlům, konzervačním prostředkům a dalším prostředkům zvyšujícím léčivou podstatu. Prostředky a metody podávání jsou v oboru známy a odborník si může vyhledat další údaje ve farmakologické literatuře, například „Modern Pharmaceutics“, Banker & Rhodes, Marcel Dekker, Inc. 1979; „Goodman & Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics“, 6. vydání, MacMillan Publishing Co., New York 1980.

V některých situacích se podávání analogu hormonu uvolňujícího gonadotropiny a antiprogestinu může překrývat. V tomto případě mohou být obě složky podávány současně za použití stejných nebo různých lékových forem nebo prostředků, například v jedné tabletě. Aplikace složek, prostředků, například v jedné tabletě. Aplikace složek, prostředků a metod tohoto vynálezu pro lékařské a/nebo farmaceutické použití, popsána v tomto textu, může být doplněna jakýmkoliv klinickými léčebnými nebo farmaceutickými metodami či technikami tak, jak jsou v současnosti nebo výhledově známy odborníkům.

Analogu hormonu uvolňujícího gonadotropiny je podáván po časové období nejméně 30 dnů, které je dostatečné ke snížení hladiny sérového estrogenu v krvi na 20 pg/ml nebo méně a výhodně ke snížení hladiny sérového estrogenu na 10 pg/ml nebo méně, a tím simuluje postmenopauzální hladinu estrogenu. V současné době podávání analogu trvá nejvýše 6 měsíců, ačkoliv by bylo možné ho prodloužit, jestliže včas začalo podávání antiprogestinu v množství zachovávajícím kostní tkáň. V současnosti se dává přednost podávání agonisty GnRH po dobu dlouhou tři měsíce.

Antiprogestin se začne podávat, když hladina sérového estrogenu poklesla na 20 pg/ml nebo méně, výhodně na 10 pg/ml nebo méně. Období podávání antiprogestinu může překrývat období podávání analogu hormonu uvolňujícího gonadotropiny nebo může začít při ukončení podávání analogu GnRH nebo mezi aplikačními intervaly může být mezera, pokud se nezvýší hladina sérového estrogenu nad 20 pg/ml. Množství antiprogestinu je takové, že inhibuje estrogeni endometriální proliferaci, tj. antiproliferačně účinné množství, a současně je množstvím zachovávajícím kostní tkáň. V této souvislosti výraz „zachovávající kostní tkáň“ znamená, že kostní masa (hustota kostního minerálu) je buď nezměněna nebo zvýšena. V případě antiprogestinu RU 486, podávané množství je obvykle 0,05 až 10,0 mg/kg a výhodně 0,5 až 5,0 mg/kg denně. V případě odlišných antiprogestinů však mohou být vhodné jiné miligramové dávky. Léčebná schémata, ve kterých dávkování antiprogestinu (a analogu GnRH) periodicky kolísá, jsou také zahrnuta v předkládaném vynálezu. Při podávání antiproliferačně účinného množství antiprogestinu může nastat slabší periodické krvácení nebo špinění v měsíčních či ročních intervalech. Jinými slovy stav amenorey (nepřítomnost menstruačního krvácení) navozený dle tohoto vynálezu je až na výjimky úplný. Použité množství antiprogestinu může být, stejně jako množství analogu hormonu uvolňujícího gonadotropiny, stanoveno použitím v oboru uznávaných metod jako například stanovením křivek dávka-odpověď ve vhodných modelech primátů majících vlastní ovariální menstruační cyklus podobný témuž u žen a extropolací na

člověka, extrapolací z vhodných systémů in vitro nebo testováním účinnosti v klinických pokusech. Pro stanovení vhodné dávky vezme ošetřující lékař do úvahy váhu, věk a další fyzické a lékařské parametry.

- 5 Níže uvedené specifické příklady dále osvětlují předkládaný vynález. Tyto příklady jsou pouze ilustrativní a v žádném případě nejsou jedinými aplikacemi tohoto vynálezu.

#### Přehled obrázků

10

Obrázek 1 je graf průměrných denních hodnot sérového estradiolu.

Obrázek 2 je graf peritoneální endometriózy zahrnující různá léčebná schémata.

15

Obrázek 3 je graf hustoty kostního minerálu jako výsledek různých léčebných schémat.

- Sloupce ukazující průměrný denní estradiol na obrázku 1 představují, zleva doprava, Lupron, RU 486 a kontrolní skupinu. V datech týkajících se peritoneální endometriózy na obrázku 2 sloupce 1, 5, 7 a 10 jsou endometriální léze před léčbou, sloupce 2 a 8 ukazují léze po podávání Lupronu, sloupec 6 léze po podávání RU 486 a sloupec 11 je kontrolní skupina. Sloupce na obrázku 3, zleva doprava, představují stav před léčbou, stav po léčbě analogem a stav po léčbě antagonistou.

25

#### Příklady provedení vynálezu

##### Příklad 1

- 30 Pro účely této studie byl jako agonista hormonu uvolňujícího gonadotropiny vybrán leuprolid acetát a jako antiprogestin RU 486, které byly podávány samicím cynomolgických opic, jež se považují za vysoce žádoucí model pro lidský výzkum.

- 35 Třicet šest dospělých samic opic rodu makak (*Macaca fascicularis*), které měly pravidelné menstruační cykly, bylo umístěno do samostatných klecí, kde měly potravu a vodu dostupnou dle libosti.

- 40 Při použití anestézie (ketamin 20 mg/kg i.m., xylazin, 1 mg/kg) se 3. den menstruačního cyklu prováděla diagnostická laparoskopie k vyloučení pánevních adhezí nebo již existující endometriózy. Opice s pozorovatelnými pánevními adhezemi byly vyloučeny ze studie. Krev byla odebírána ze žíly během 8. až 14. dne menstruačního cyklu (ketamin 10 mg/kg i.m.) a sérum vyšetřeno pomocí RIA na estradiol-17 $\beta$ . 3 až 5 dnů po jasně definovaném preovulačním vrcholu estradiolu byla prováděna laparotomie (ketamin 20 mg/kg, xylazin 1 mg/kg). Provedla se hysterotomie fundu dělohy v rozsahu 2 cm a kyretáží se odstranilo přibližně 100 mg endometriální tkáň, která byla rozkrájena ve sterilním fyziologickém roztoku (0,9%). Děložní řez se sešil vicrylovým vláknem 4 až 0. Kousky endometriální tkáň se subperitoneálně injikovaly na pět míst, do levého a pravého záhybu vezikouterinního vazů, do pravého a levého širokého vazů děložního a do Douglasova prostoru.

- 50 Během následujícího menstruačního cyklu se laparotomie provedla 3 až 5 dní po estradiolovém vrcholu uprostřed cyklu. Pozoroval se výskyt ektopické endometriální tkáň a rozsah adhezí za současného pečlivého měření peritoneálních implantátů. Všechny léze se fotografovaly a byly náhodně očíslovány kvůli pozdějšímu histologickému určování stadií endometriózy nezaujatým pozorovatelem. Z reprezentativních lézí se odebíraly biopsie a tkáň byla fixována v 10% formalinu pro histologické vyšetření po obarvení hematoxylinem-eosinem.

55

Primáti byli rovnoměrně rozděleni do čtyřech léčených skupin (n=8). Skupině 1 se měsíčně podávaly injekce agonisty hormonu uvolňujícího gonadotropiny v dávce 80 µg/kg i.m. 21. den menstruačního cyklu ve druhém laparotomickém cyklu. Pokračovalo se ve 28-denních intervalech do celkového počtu 3 injekcí a v tuto dobu se začalo s týdenními injekcemi antiprogestinu RU 486 (zpočátku 5 mg/kg i.m. v oleji, poté 2 mg/kg/týden). Aplikace RU 486 pokračovala po období 24 týdnů.

Skupině 2 se týdně podávaly intramuskulární injekce samotného RU 486 (zpočátku 5 mg/kg, poté 2 mg/kg/týden) od 1. dne menstruačního cyklu, který nastal poté, co byla potvrzena endometrióza. Pokračovalo se po léčebné období 36 týdnů. Skupině 3 se 36 týdnů podávaly dávky samotného analogu GnRH. Skupina 4 byla kontrolní a dostávala týdně po 36 týdnů samotný nosič, 0,5 ml normálního fyziologického roztoku i.m.

Poté, co začaly denní injekce, se každých 12 týdnů prováděla laparotomie k určování stadií endometriózy až do konce léčby k posouzení progresu nebo regrese nemoci.

Při použití anestézie ketaminem se každý druhý den všem skupinám odebírala krev po 28 dnů od počátku léčení, poté co se potvrdila aktivní endometrióza. Sérum bylo zmrazeno pro pozdější analýzu. Dále se krev odebírala v týdenních intervalech. Krevní odběry pokračovaly buď do znovuobjevení spontánní menstruace anebo po dobu dvou měsíců od ukončení injekcí. Sérum bylo zmrazeno, označeno a uschováno pro následné vyšetření pomocí radioimunoanalýzy. Estradiol a progesteron byly vyšetřeny pomocí RIA (ICN Biomedical, Los Angeles, CA).

Během každé operace se odebíral také vaginální epitel pomocí Kevorkianových bioptických kleští z laterální stěny vaginy v jejích horních dvou třetinách.

Opice byly denně vyšetřovány při ranních vizitách. Zaznamenávaly se změny chování. Kůže se vyšetřovala na známky vyrážky nebo zánětlivé změny v místě injekcí. Hráz se vyšetřovala pro známky menstruace. Tělesná váha se určovala měsíčně a zaznamenávaly se změny chuti k jídlu.

V době krevních odběrů se sbírala moč. První vzorek se odebral v době první laparotomie a druhý vzorek se odebíral v době první injekce s dalšími vzorky odebíranými každé čtyři týdny od doby odběru druhého vzorku moče. K měření hustoty kostního minerálu v oblasti bederní páteře se používala dvojitá rentgenová absorpční fotometrie (DXA, Norland). Primáti byli anestetizováni ketaminem a přidržováni, aby se zmenšily artefakty vzniklé pohybem. Fotometrie (DXA) se prováděla před začátkem injekcí a dále pak ve tříměsíčních intervalech až do dokončení studie.

V době každé laparotomie se opakovaně prováděla malá hysterotomie za účelem sběru vzorků endometria pro histologické vyšetření.

Zjistilo se, že obě léčby samotným antiprogestinem či analogem GnRH vedly k potlačení ovulace. V každé z léčených skupin 1 až 3 došlo pouze k jedné ovulaci během 24 měsíců (progesteron > 3 ng/ml), zatímco v kontrolní skupině 4 (pouze nosič) nastalo 18 ovulací během 24 měsíců. Průměrné sérové hladiny estradiolu mezi skupinami kolísaly, jak ukazuje obr. 1. Hladina estradiolu ve skupině léčené analogem GnRH byla jednotně snížena ( $24,2 \pm 17$  pg/ml), kdežto v kontrolní skupině hladiny estrogenu kolísaly ve značně širokém rozsahu ( $40,6 \pm 43$  pg/ml), což se čekalo. Zajímavé je, že skupina léčená RU 486 měla vyšší průměrnou hladinu sérového estrogenu než jakákoliv další skupina ( $57,8 \pm 34,6$ , Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ).

Plocha ektopického endometria kontrolovaná zrakem na peritoneu je ukázána na obr. 2. Před léčbou měly plochy ve všech skupinách obdobnou velikost (ANOVA,  $p > 0,1$ ). Plocha po léčbě byla významně odlišná od ploch před léčbou pro skupiny 1, 2 a 3, a od ploch po léčbě u kontrolní skupiny 4 (Wilcoxon,  $p < 0,05$ ). Toto pozorování ukazuje, že oba, analog GnRH a antiprogestin, měly nestejný účinek na velikost endometriálních implantátů. Ve skupině 1, kde byli primáti po

ukončení léčby analogem GnRH převedeni na tříměsíční léčbu RU 486, zůstávala průměrná velikost peritoneální léze nezměněna.

Hodnoty hustoty kostního minerálu z dvojité rentgenové absorpční fotometrie byly:

5

Skupina	Před léčbou (MEAN ± SD)	Po 3 měsících	Po 6 měsících
Analog/antiprogestin	0,481 ± 0,046	0,481 ± 0,056	0,049 ± 0,046
Antiprogestin	0,501 ± 0,029	0,541 ± 0,033*	Neanalyzováno
Kontrola	0,441 ± 0,028	0,446 ± 0,047	Neanalyzováno

\* párový t-test, p=0,08 ve srovnání s hustotou před léčením

10 Po třech měsících léčby pouze samotným GnRH nebo u kontrolní skupiny nebyla nalezena žádná změna hustoty kostního minerálu. To se dalo očekávat, neboť prokazatelný úbytek kostní tkáně v populaci nastává až po 3 až 6 měsících. Třem zvířatům ve skupině 1 se snížila hustota kostního minerálu po tříměsíční léčbě analogem GnRH, zatímco u ostatních zůstala hustota nezměněna nebo se zvýšila. Příklad rychlého úbytku kostní tkáně u opice číslo 2190 a příslušná data jsou uvedena na obr. 3. Po třech měsících léčby analogem GnRH došlo k významnému úbytku kostní tkáně. Léčba antiprogestinem působila proti tomuto úbytku a po 3 měsících léčby anti-  
15 progestinem došlo ke zvýšení hustoty kostního minerálu, které bylo na hranici statistické významnosti (párový t-test, p=0,08).

20 Denní hodnocení zdravotního stavu neodhalilo podstatné změny chování, zánětlivé kožní změny či změny stravovacích návyků. Tělesná váha kontrolovaná v měsíčních intervalech se významně neměnila v žádné skupině.

25 Histologická hodnocení endometriálního a vaginálního epitelu barveného hematoxylinem-eosinem jsou shrnuta v následující tabulce:

25

Skupina	Endometrium		Vaginální epitel a Keratin
	Fáze menstruačního cyklu	Tloušťka sliznice	
Pouze analog	Inaktivní, časně proliferativní	tenká	tenký
Analog/antiprogestin	Intervalová fáze, statická	mírně tenká	mírně tenký
Kontroly	Cyklická	mírně silná, proměnná	cyklický

30 Endometrium vystavené vlivu analogu GnRH bylo jednotně tenké a proliferační v týdenních intervalech. Endometrium vystavené účinku antiprogestinu bylo tenčí než u kontrolních opic, ale bylo shodně v intervalové fázi, jako je 17. den typického normálního menstruačního cyklu. Primáti kontrolní skupiny měli cyklické endometrium, které bylo ve všech bioptických dnech silnější než endometrium u jakékoliv další z ostatních skupin. Vaginální epitel a keratinová vrstva byly silnější v antiprogestinové skupině než ve skupinách analogu GnRH. Nálezy v kontrolní skupině byly proměnlivé, ale keratinová vrstva byla silnější než po léčbě analogem GnRH.

35 Ektopické endometriální léze, jako endometrium in situ, prodělávaly postupnou regresi během tří měsíců léčby, přičemž změny endometria nastávaly rychleji během léčby analogem hormonu uvolňujícího gonadotropiny než při léčbě samotným antiprogestinem. Výše uvedené výsledky ukazují, že antiprogestin byl schopen uchovat velikost peritoneální endometriózy i po přerušení léčby analogem. U kontrolních primátů se endometrióza spontánně nezlepšovala a dokonce se  
40 endometriální léze za tři měsíce zhoršily.

Tři z primátů použitých ve studii byli identifikováni jako ti, co rychle ztrácejí kostní minerál po léčbě navozeném hypoestrogenismu při léčbě analogem GnRH. Bylo dokázáno, že se hustota kostního minerálu vrátila na výchozí hodnoty po třech měsících podávání antiprogestinu. U primátů léčených antiprogestinem došlo k vzestupu, i když jen na hranici statistické významnosti, hustoty kostního minerálu ve srovnání s výchozím stavem. Vaginální atrofie, obvyklý problém u léčby analogy hormonu uvolňujícího gonadotropiny, nebyla zaznamenána. Tloušťka vaginálního epitelu a keratinové vrstvy byla silnější ve skupině léčené antiprogestinem, což je stav, který je obvykle spojován se snazším pohlavím stykem, zmenšením močové inkontinence a snížením dysurie. Kromě výhod pro kostní tkáň a vaginální epitel, endometrium zůstalo středně tenké ve srovnání s endometriem neléčených cyklických opic, což je připisováno antiproliferačnímu působení antiprogestinu.

Příklady 2 až 10

Léčebné schéma popsané v příkladu 1 se opakuje s následujícími kombinacemi chemických prostředků:

Příklad	Analog	Antiprogestin
2	nafarelin	onapriston
3	buserelin	lilopriston
4	antid	11 $\beta$ -(4-acetylphenyl)-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -(1-propionyl)-4,9-estradien-3-on
5	goserelin	11 $\beta$ -(4-acetylphenyl)-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -(3-hydroxy-1(2)-propenyl)-4,9-estradien-3-on
6	histrelin	mifepriston
7	lutrelin	onapriston
8	tristorelin	lilopriston
9	Nal-Glu	mifepriston
10	Azalin B	mifepriston

Přítomný vynález je možno modifikovat při zachování základní myšlenky a předmětu tohoto vynálezu. Různá ztělesnění vynálezu zde popsaná a ilustrovaná jsou pouze příklady a v žádném případě nejsou jedinými ztělesněními vynálezu.

#### 25 Průmyslová využitelnost

Léčebné schéma navržené ve vynálezu, spočívající v podávání analogu hormonu uvolňujícího gonadotropiny ve spojení s antiprogestinem, způsobuje zmírnění symptomů stavů závislých na ovariálních estrogenech, jako je endometrióza, děložní leimyomy, PMS a DUB a navíc snižuje úbytek kostní tkáně způsobený nedostatkem estrogenů vyvolaným podáním analogů GnRH.

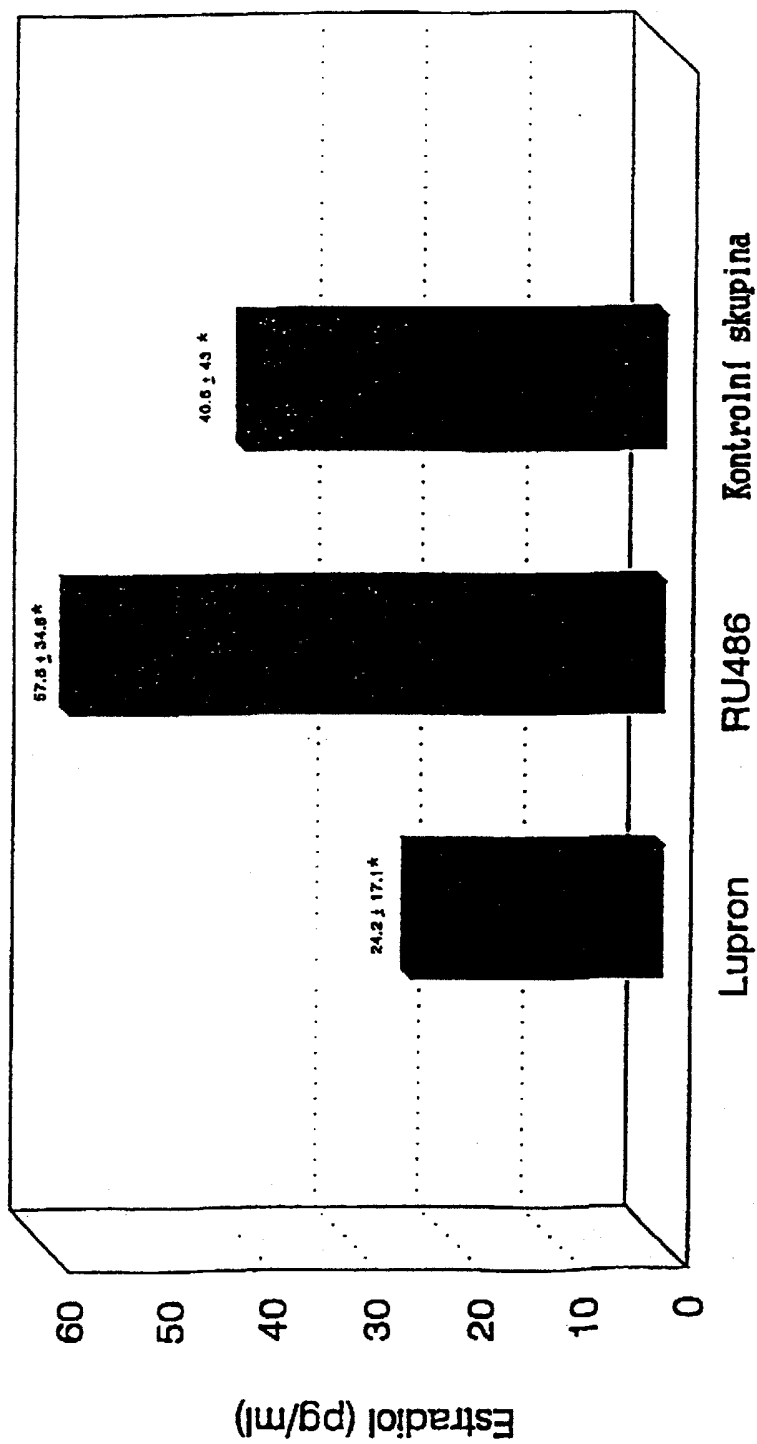
## PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Použití analogu hormonu uvolňujícího gonadotropiny v kombinaci s antiprogestinem pro přípravu léčiva pro léčení stavů závislých na ovariálních estrogenech jako je endometrióza, leiomyomy uteru, premenstruální syndrom nebo dysfunkční děložní krvácení a snížení úbytku kostní tkáně, přičemž analog hormonu uvolňující gonadotropiny se podává ženám po dobu  
10 nejméně 30 dnů, což je doba postačující ke snížení hladiny sérového estrogenu v krvi na 20 pg/ml nebo méně, a poté se podá antiproliferační a kost zachovávající množství anti-progestinu.

15 3 výkresy

15

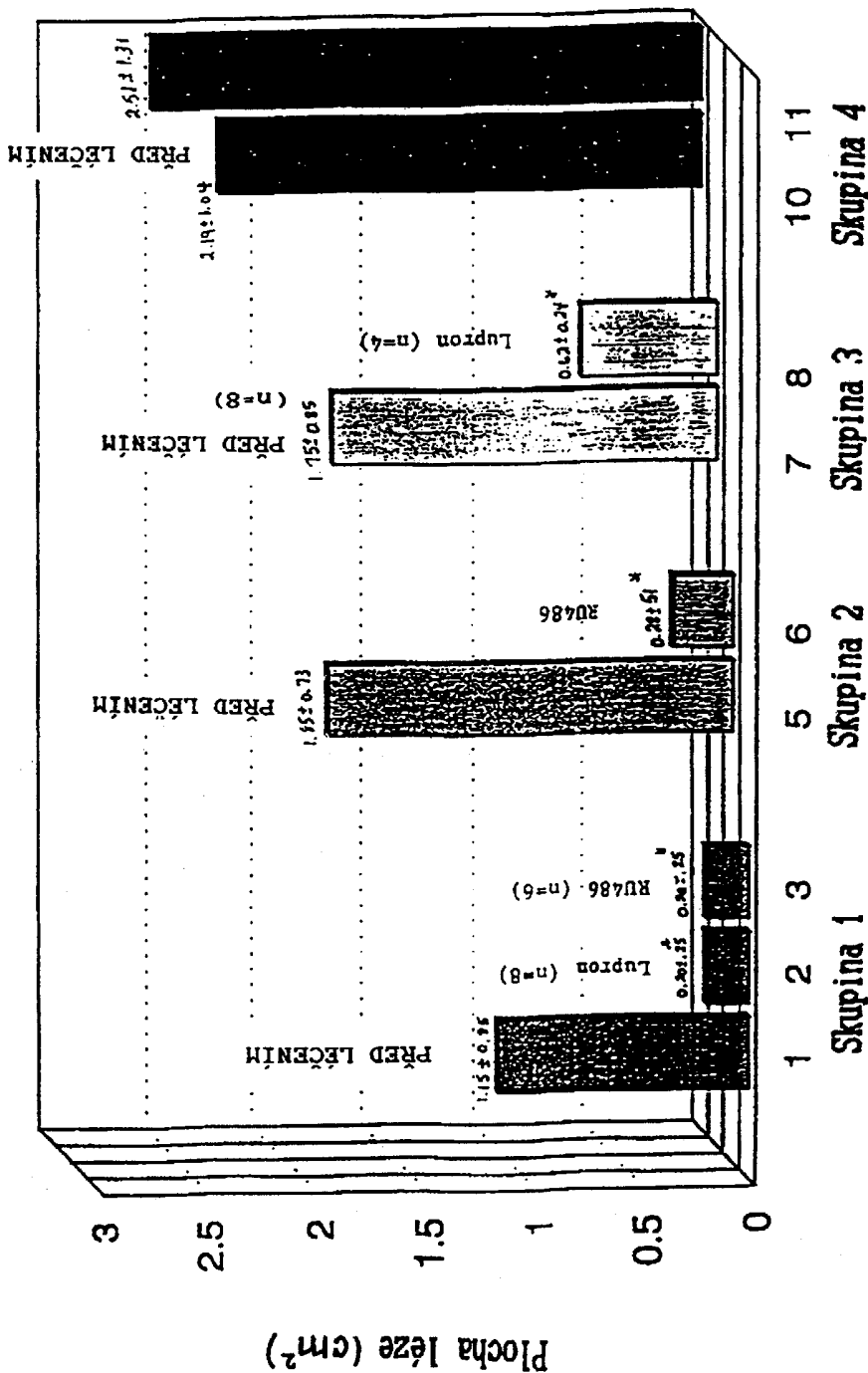
**Průměrný denní estradiol**



\* Rozdíly mezi všemi skupinami jsou statisticky významné (p < 0,05).

**OBR. 1**

# Peritoneální endometrióza



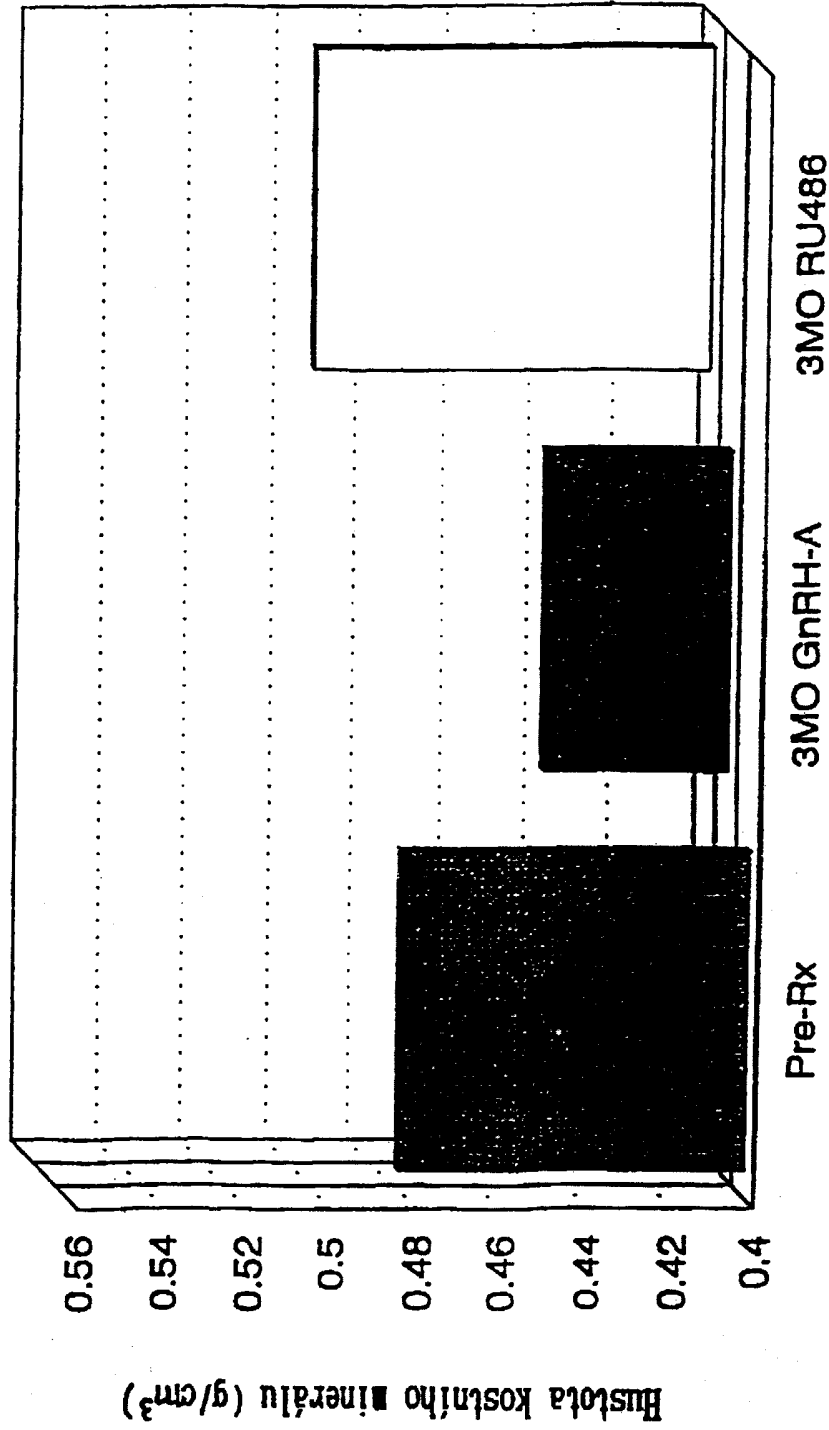
\*Statisticky významné od léze před léčním (p<0,01, Wilcoxon)

Léze před léčním je podobná ve všech skupinách (ANOVA p>0,01)

OBR. 2

# Hustota kosti měřená DXA

Skupina 1 - postupná léčba - opice 2190



OBR. 3

Konec dokumentu