(19) Országkód

HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

222 501 B1

(21) A bejelentés ügyszáma: P 93 03716
(22) A bejelentés napja: 1992. 06. 26.
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/CA 92/00275
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 93/00070

(51) Int. Cl.[7]

A 61 K 31/57
A 61 P 35/00
A 61 P 19/10

(40) A közzététel napja: 1995. 01. 30.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 2003. 07. 28.

(72) Feltalálók:
Labrie, Fernand, Ste-Foy, Québec (CA)
Lepage, Martin, Same, Québec (CA)

(73) Szabadalmas:
Endorecherche Inc., Ste-Foy, Québec (CA)

(74) Képviselő:
dr. Török Ferenc, DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) MPA-t vagy MGA-t tartalmazó nyújtott hatóanyag-felszabadulású gyógyászati készítmény és eljárás előállítására

KIVONAT

A találmány tárgya hatóanyagként MPA-t vagy MGA-t tartalmazó, emlőkarcinóma, osteoporosis, endometriumkarcinóma vagy endometriosis kezelésére vagy megelőzésére alkalmas elnyújtott felszabadulású gyógyászati készítmény, azzal jellemezve, hogy a készítmény grammonként 200–700 mg MPA- vagy MGA-hatóanyagot tartalmaz, és a készítmény grammonként és naponta 4–25 mg hatóanyagot ad le.

A találmány tárgyát képezi továbbá a fenti készítmény előállítására szolgáló eljárás is.

HU 222 501 B1

Jelen találmány tárgya hatóanyagként MPA-t vagy MGA-t tartalmazó, emlőkarcinóma, osteoporosis, endometriumkarcinóma vagy endometriosis kezelésére vagy megelőzésére alkalmas gyógyászati készítmény és eljárás előállítására.

Új, elhúzódó felszabadulású készítményeket és ezek előállítására szolgáló eljárásokat ismertetünk az alábbiakban. A medroxi-progeszteron-acetát (MPA) és megestrol-acetát (MGA) injektálható új kiszerelési formáinak előnyös képviselői azok, amelyek az aktív résztvevő előre meghatározott keringési szintjét biztosítják elhúzódó ideig. Biológiai úton lebontható mikrorészecskéket alkalmazunk, amelyek medroxi-progeszteron-acetátot és megestrol-acetátot szabadítanak fel egy közel állandó alacsony arányban, ha meleg vérű állatba vagy emberbe injektáljuk őket. A megbetegedések megelőzésére és kezelésére csakúgy alkalmas, mint a fogamzóképesség szabályozására.

Számos kutató tanulmányozza a hormonterápiát emlő- és endometriumkarcinóma kezelésére csakúgy, mint csontritkulás megelőzésére és kezelésére és endometriosis kezelésére. A már kifejlődött emlőrák esetén a kezelés fő megközelítési módjai az ösztrogénhatás gátlásával és/vagy képzésének gátlásával állnak összefüggésben. Az ösztrogének szerepe az ösztrogénérzékeny emlőrák növekedésének előmozdításában jól ismert [Lippman, Semin. Oncol. 10 (suppl. 4): 11–19, 1983; Sledge and McGuire, Cancer Res. 38: 61–75, 1984; Wittliff, Cancer 53: 630–643, 1984; Poulin and Labrie, Cancer Res. 46: 4933–4937, 1986].

Az ösztrogénekről ismert az is, hogy elősegítik a normál endometrium (méhnyálkahártya) proliferációját. A krónikus ösztrogénexpozíció, amellyel nem áll szemben progeszteronhatás, endometrium hyperplasiához vezethet, ami az endometriumkarcinóma predisponáló tényezője (Lucas, Obstet. Gynecol. Surv. 29: 507–528, 1974). Az endometriumkarcinóma incidenciája megnő menopausa után, különösen olyan nőknél, akik ösztrogénterápiában részesültek szimultán progeszteronkezelés nélkül (Smith és munkatársai, N. Engl. J. Med. 293: 1164–1167, 1975; Mack és munkatársai, N. Engl. J. Med. 294: 1262–1267, 1976).

Különböző kutatók vizsgálták a hormondependens emlő- és endometriumkarcinómát. Az endokrin terápia ismert formája menopausa előtti nőknél a kasztrálás, ami legáltalánosabban sebészi úton vagy besugárzással történik, ami két irreverzíbilis kasztrálást jelentő eljárás. Újabban a kasztrálás reverzíbilis módja vált elérhetővé luteinizáló hormon felszabadító hormon agonisták (LHRH-agonisták) felhasználásával, amelyek – miután gátolják a bioaktív luteinizáló hormonok (LH) szekrécióját a hipofízisben – lecsökkentik a szérumösztrogéneket a kasztrálásnak megfelelő szintre (Nicholson és munkatársai, Brit. J. Cancer 39: 268–273, 1979).

Néhány tanulmányban bemutatták, hogy a menopausa előtt álló mellrákos betegek LHRH-agonistákkal való kezelése a kasztrálás más módjaival kezeltekénél elért eredményekhez hasonlítható válaszokat indukált (Klijn és munkatársai, J. Steroid Biochem. 20: 1381, 1984; Manni és munkatársai, Endocr. Rev. 7, 89–94, 1986). Az LHRH-agonistákkal történő kezelés jó hatását megfigyelték menopausa után álló nőknél is (Nicholson és munkatársai, J. Steroid Biochem. 23; 843–848, 1985).

A 4 071 622 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás tárgya bizonyos LHRH-agonisták felhasználása DMBA indukálta emlőkarcinóma ellen patkányban.

A 4 775 660 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás tárgya a női emlőkarcinóma kezelése egy olyan kombinált terápiával, ami egy antiandrogén és egy antiösztrogén adagolását alkalmazza nőknél, miután a petefészek hormontermelését kémiai vagy sebészi úton leállították.

A 4 775 661 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás tárgya a női emlőkarcinóma kezelése egy olyan terápia alkalmazásával, melynek során, miután a petefészkek hormontermelését kémiai vagy sebészi úton leállították, egy antiandrogént és nem kötelezően egyes szexszteroid bioszintézisgátlókat alkalmaztak.

A 4 760 053 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás bizonyos szexszteroid-dependens rákok kezelését írja le, amelybe az LHRH-agonisták, antiandrogének, antiösztrogének és egyes szexszteroid bioszintézisgátlók közül kiválasztott vegyületek különböző speciális kombinációinak alkalmazása tartozott.

A 4 472 382 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás tárgya a prosztata-adenokarcinóma, a benignus prosztata hypertrophia és a hormonfüggő emlőtumorok kezelése speciális gyógyszerekkel, illetve azok kombinációival. Különböző LHRH-agonistákat és antiandrogéneket említenek.

A WO 92 105763 számon publikált nemzetközi bejelentés egyes 16,16-kétszeresen szubsztituált androsztén szteroidvegyületeket említ hajnövesztőnek és bőrelváltozásokra. A PCT/WO86/01105 számú nemzetközi bejelentés a meleg vérű állatok egy szexszteroidfüggő rákjainak kezelésére egy olyan eljárást ismertet, amely speciális gyógyszerek és kombinációik adagolását tartalmazza. Antiandrogéneket, antiösztrogéneket, a szexszteroid bioszintézis egyes gátlóit és a hormontermelés leállítását említik.

A feltalálók ezzel összefüggő 1989. március 10-én benyújtott 07/321926 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésének tárgya eljárás emlő- és endometriumkarcinóma kezelésére az arra hajlamos meleg vérű állatokban, amely tartalmazhatja, mint egy kombinált terápia részét, a petefészkek hormontermelésének gátlását sebészi (ovariectomia) vagy kémiai (LHRH-agonista felhasználása, például [D-Trp^6, des-Gly-NH$_2$^{10}]LHRH-etil-amid, vagy agonistái) úton; továbbá antiösztrogéneket, androgéneket, progesztineket, szexszteroidképzés-gátlókat (különösen a szexszteroidok 17β-hidroxi-szteroid-dehidrogenáz vagy aromatáz katalizálta termelését gátlókat), a prolaktinszekréció, a növekedésihormon-szekréció és ACTH-szekréció gátlókat ismertetünk.

Androgénreceptorok jelenlétét mutatták ki normál [Witliff, In: Bush, H. (Ed), Methods in Cancer Res.,

Vol. 11, Acad. Press, New York, 1975, 298–304; Allegra és munkatársai, Cancer Res. 39: 1447–1454, 1979] és daganatos (Allegra és munkatársai, Cancer Res. 39: 1147–1454, 1979, Engelsman és munkatársai, Brit. J. Cancer 30: 177–181, 1975, Mossa és munkatársai, J. Ster. Biochem. 6: 743–749, 1975: Miller és munkatársai, Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 2: 539–542, 1985; Lippman és munkatársai, Cancer 38: 868–874, 1976; Allegra és munkatársai, Cancer Res. 39: 1447–1454, 1979; Miller és munkatársai, Eur. J. Clin. Oncol. 21: 539–542, 1985, Lea és munkatársai, Cancer Res. 49: 7162–7167, 1989), valamint néhány mesterségesen fenntartott emlőrák sejtvonalában (Lippman és munkatársai, Cancer Res. 36: 4610–4618, 1976; Horwitz és munkatársai, Cancer Res. 38: 2434–2439, 1978; Poulin és munkatársai, Breast Cancer Res. Treatm. 12: 213–225, 1988). Androgénreceptorok vannak jelen a dimetil-benzantracén (DMBA) indukálta emlőtumorokban is patkányban (Asselin és munkatársai, Cancer Res. 40: 1612–1622, 1980).

Androgénreceptorokat írtak le humán endometriumban is (MacLaughlin és Richardson, J. Steroid Biochem. 10: 371–377, 1979; Muechler és Kohler, Gynecol. Invest. 8: 104, 1988). Leírták az androgén metil-triénolon (R 1881) endometriumkarcinóma-növekedést gátló hatásait in vitro (Centola, Cancer Res. 45: 6264–6267, 1985).

Újabb beszámolók szerint androgénreceptorok hozzájárulhatnak az ösztrogénreceptorok szelektivitásához, vagy éppen háttérbe szoríthatják az ösztrogénreceptorokat; ez fordul elő a leggyakrabban az endokrin terápiában (Teulings és munkatársai, Cancer Res. 40: 2557–2561, 1980, Bryan és munkatársai, Cancer Res. 54: 2436–2440, 1984).

Az első sikeresen alkalmazott androgén előrehaladott emlőkarcinóma kezelésére a tesztoszteron-propionát (Nathanson, Rec. Prog. Horm. Res. 1: 261–291, 1947). Ezután sok vizsgálat megerősítette az androgének pozitív hatását az emlőkarcinómára (Alan és Herrman, Ann. Surg. 123: 1023–1035; Adair, Surg. Gynecol. Obstet. 84: 719–722, 1947; Adair és munkatársai, JAMA 140: 1193–2000, 1949). Ezek a kezdeti eredmények kooperatív vizsgálatok elvégzésére késztettek a tesztoszteron-propionát és a DES hatásaira vonatkozóan, melyek közül mindkettőt hatékonynak találták objektív javulások elérésében [az USA Orvosi Szövetsége (Am. Med. Association) Kémiai és Gyógyszerészeti Tanácsának Kutatási Bizottságának a szteroidokkal és rákkal foglalkozó alcsoportja és az NCI Rák Kemoterápia Nemzeti Szolgáltató Központjának kooperatív mellrákkal foglalkozó csoportjának kutatásai alapján azt találták, hogy a tesztoszteron-propionát jobb javulási arányt és időtartamot, életvitelt és túlélést biztosít (Cooperative Breast Cancer Group, JAMA 188, 1069–1072, 1964)].

A reagálási arányt 48%-nak találták (27 betegből 13) menopausa után levő nőkben, akik hosszú hatású androgént, a metanolon-enantátot kapták (Kennedy és munkatársai, Cancer 21: 197–201, 1967). A túlélési idő középértéke négyszer hosszabb volt a reagálók esetében a nem reagáló csoporthoz hasonlítva (27, illetve 7, 5 hónap). Nagyszámú vizsgálat igazolta, hogy az androgének a metasztázisos mellrákos nők 30–40%-ában javulást indukáltak (Kennedy, Hormone Therapy in Cancer, Geriatrics 25: 106–112, 1970; Goldenberg és munkatársai, JAMA 223: 1267–1268, 1973).

Újabban 39%-os reagálási arányt figyeltek meg 11 hónapos átlagos időtartammal 33 menopausa utáni nőből álló csoportban Fenoximeszteron- (Halostatin, 10 mg, kétszer naponta) kezelésre, akik korábban nem jól vagy egyáltalán nem reagáltak Tamoxifenre (Manni és munkatársai, Cancer 48: 2507–2509, 1981).

Ezen nők közül 17 hypophysectomián is átesett. Nem volt eltérés a Fluoximeszteronra való reagálási arányban azon páciensek között, akik korábban reagáltak Tamoxifenre, és azok között, akik nem. A 17 beteg közül, akik sem a Tamoxifenre, sem a hypophysectomiára nem reagáltak, 7 reagált a Fluoximeszteronra 10 hónap átlagos időtartamig. Ezek közül kettő nem reagált vagy a Tamoxifenre, vagy a hypophysectomára.

A Fluoximeszteron és Tamoxifen kombinációja hatékonyabbnak bizonyult, mint a Tamoxifen egyedül. Valójában teljes reakciót (CR) csak a kombinált alkalmazásnál láttunk, míg 32% mutatott részleges reakciót (PR) kombinált kezelés esetén a mindössze 15%-kal szemben a monoterápia esetén. Továbbá kombinált terápia esetén a nem reagálók aránya csak 25% volt, míg ez 50% a csak TAM-mal kezelt betegek esetén. (Tormey és munkatársai, Ann. Int. Med. 98: 139–144, 1983). Továbbmenve, a terápia kezdetétől a kezelés elégtelenségéig eltelt középidő hosszabb volt Fluoximeszteron+Tamoxifen adásakor (180 nap), mint csak Tamoxifen alkalmazása esetén (64 nap). A túlélési növekedési tendenciája volt megfigyelhető kombinált terápiára (380 nap 330 nappal szemben).

Egy antiösztrogénnel kombinált androgén független pozitív hatására utal az a beszámoló, amely szerint azok a betegek, akik nem reagálnak Tamoxifenre, reagálhatnak Fenoximeszteronra, és fordítva. Továbbmenve, a Tamoxifennel kezelt betegek, akiknél később Fluoximeszteronra váltottak, hosszabb túlélésűek voltak, mint akiket fordított sorrendben kezeltek (Tormey és munkatársai, Ann. Int. Med. 98: 139–144, 1983).

Minthogy a tesztoszteron-propionát pozitív hatású mind menopausa előtt, mind menopausa után levő nőknél (Adair és munkatársai, J. Am. Med. Ass. 15: 1193–1200, 1949), ez arra utal, hogy az androgén a gonadotropinszekréció-gátláson túl androgén direkt gátló hatást fejt ki a tumornövekedésre.

Új in vitro vizsgálatok leírják egy androgén relatív antiproliferatív hatását a ZR–75–1 ösztrogénérzékeny humán emlőkarcinóma-sejtvonal növekedésére (Poulin és munkatársai, „Androgens inhibit basal and estrogen-induced cell proliferation in the ZR–75–1 human breast cancer cell line", Breast Cancer Res. Treatm. 12: 213–225, 1989). Amint a fentiekben megjegyeztük, Poulin és munkatársai (Breast Cancer Res. Treatm. 12: 213–225, 1989) találták azt, hogy a ZR–75–1 humán emlőkarcinóma-sejtek növekedését gátolják az androgének, az androgének gátló hatása hozzáadódik

az antiösztrogénekéhez. Az androgének gátló hatását a ZR–75–1 humán emlőkarcinóma-sejtek növekedésére in vivo is megfigyelték csupasz egereken (Dauvois és Labrie, Cancer Res. 51: 3131–3151, 1991).

Az androgén emlőkarcinómára kifejtett hatásának egy lehetséges mechanizmusaként ismertették azt nemrégiben, hogy az androgének erősen lecsökkentik az ösztrogén- (ER) és progeszteron- (PgR) receptorok mennyiségét a ZR–75–1 humán emlőkarcinóma-sejtekben, amint ez radioligand kötés és anti-ER monoklonális antitestek mérésével megállapítható. Hasonló gátló hatásokat figyeltek meg az ER mRNS-szintjeire, amit ribonukleázvédési vizsgálattal mértek. Az androgén hatást a nem aromatizálható androgén, az 5α-dihidrotesztoszteron nanomol/l alatti koncentrációinál mérték függetlenül az ösztrogének jelenlététől, és kompetitíve visszafordították az antiandrogén hidroxi-flutamiddal (Poulin és munkatársai, Endocrinology 125: 392–399, 1989). Ezek az ösztrogénreceptor-kifejeződésre vonatkozó adatok legalább részben egy értelmezést nyújtanak az androgének emlőráksejtek növekedésére kifejtett antiösztrogén hatásaira, és arra mutatnak továbbá, hogy az androgén terápia specifikus gátló hatásai hozzájárulhatnak az ösztrogéneknek antiösztrogénekkel való blokkolására korlátozódó standard kezeléshez.

Dauvois és munkatársai (Breast Cancer Res. Treatm. 14: 299–306, 1989) kimutatták, hogy az 5α-dihidrotesztoszteron (DHT) androgén állandó felszabadulása ovariectomizált patkányokban, akik DMBA indukálta emlőkarcinómában szenvedtek, a 17β-ösztradiol (E_2) indukálta tumornövekedés jelentős gátlását eredményezte. Azt, hogy a DTH az androgénreceptorral való interakció révén hat, alátámasztja az a megfigyelés, hogy szimultán kezelés az antiandrogén Flutamiddal teljesen kiküszöbölte a DTH hatását. Különösen illusztratív az androgén DTH tumornövekedésre kifejtett effektív gátló hatására az, hogy a DTH által az E_2-vel kezelt állatoknál a progresszív tumorok száma 69,2%-ról 29,2%-ra csökkent, és az androgén révén a komplett reakciók száma (tapintható tumorok eltűnése) 11,5%-ról 33,3%-ra nőtt az állatok ugyanazon csoportjánál. Az újonnan megjelenő tumorok száma a 28 napos megfigyelési idő alatt 1,5±0,3-ról 0,7±0,2-re csökkent patkányonként az E_2-vel kezelt állatoknál az androgén DTH adagolása alatt, ami olyan hatás, amit az antiandrogén Flutamid ugyancsak visszafordít. Ezek az adatok először demonstrálják, hogy az androgének hatékony gátlói a DMBA indukálta emlőkarcinóma-növekedésnek olyan hatásmechanizmus révén, amely független a gonadotropinszekréció-gátlástól, és olyan hatásra utal, ami közvetlenül a tumor szintjén valósul meg, így alátámasztja továbbá a humán ZR–75–1 emlőkarcinóma-sejtekkel in vitro nyert adatokat (Poulin és munkatársai, Breast Cancer Res. Treatm. 12: 213–225, 1988).

A tesztoszteron (TESTO) és dihidrotesztoszteron (DHT) természetes androgének az androsztén-dionnak 17b-hidroxi-szteroid-dehidrogenáz segítségével TESTO-vá, majd a TESTO-nak 5α-reduktáz enzim segítségével DHT-vá alakulásával képződnek. A mellékvesében levő prekurzor, az 5-androszt-5-én-3β,16β-diolból is keletkezhet TESTO a 3β-hidroxi-szteroid dehidrogenáz/$\Delta^5\Delta^4$ izomeráz (3β-HSD) enzim hatására.

Minthogy a TESTO és DHT természetes androgének erősen maszkulinizáló hatásúak, a TESTO-nak csakúgy, mint a progeszteronnak számos származékát szintetizálták, hogy olyan használható vegyületeket nyerjenek, amelyek kevesebb nemkívánatos maszkulinizáló mellékhatást okoznak (testszőrzet növekedése, hajhullás, akne, seborrhoea és mély hang).

A medroxi-progeszteron-acetát egyike a legszélesebb körben alkalmazott vegyületeknek az előrehaladott emlőrák endokrin kezelésére nőkben (Mattsson, Breast Cancer Res. Treatm. 3: 231–235, 1983; Blumenschein, Semin. Oncol. 10: 7–10, 1983; Hortobagyi és munkatársai, Breast Cancer Res. Treatm. 5: 321–326, 1985; Haller és Glick, Semin. Oncol. 13: 2–8, 1986; Horwitz, J. Steroid Biochem. 27: 447–457, 1987). Általában a klinikai reakció aránya ezen szintetikus progesztin nagy dózisainál átlagosan 40% válogatatlan emlőrákos betegeknél (Horwitz, J. Steroid Biochem. 27: 447–457, 1987), ami a nem szteroid antiösztrogén tamoxifen hatásához hasonlítható [Lippman, Semin. Oncol. 10 (Suppl.): 11–19, 1983]. Általánosabb felhasználása azonban az emlőrák relapsusát célozza más endokrin terápiás módszert követően. A medroxi-progeszteron-acetát (MPA) maximális gátló hatását a humán emlőkarcinóma-sejtek növekedésére in vitro 1 nmol/l-es, igen alacsony koncentrációval érhetjük el, míg gyakran kb. 1000-szer magasabb dózis szükséges a glukokortikoid-hatás eléréséhez (Poulin és munkatársai, Breast Cancer Res. Treatm. 13: 161–172, 1989).

Mostanáig az MPA tumorellenes hatása alapját képező mechanizmusok kevéssé voltak világosak, és azokat a progeszteronreceptorokkal való interakciónak tulajdonították. Ez a szteroid azonban nagy affinitást mutat a progeszteron- (PgR), valamint az androgén- (AR) és glukokortikoid-receptorokhoz (GR) is különböző állati szövetekben (Perez-Palacios és munkatársai, J. Steroid Biochem. 19: 1729–1735, 1983; Janne és Bardin, Pharmacol. Rev. 36: 35S–42S, 1984; Pridjian és munkatársai, J. Steroid Biochem. 26:313–319, 1987; Ojasso és munkatársai, J. Steroid Biochem. 27: 255–269, 1987), valamint humán emlőtumorokban (Young és munkatársai, Am. J. Obstet, Gynecol. 137: 284–292, 1980), és ez a tulajdonság jellemző más szintetikus progeszteron-származékokra is (Bullock és munkatársai, Endocrinology 103: 1768–1782, 1978; Janne és Bardin, Pharmacol. Rev. 36: 35S–42S, 1984; Ojasso és munkatársai, J. Steroid Biochem. 27: 255–269, 1987). Ismert, hogy a progeszteronreceptorokon (PgR) túlmenően a legtöbb szintetikus progesztagén szer szignifikáns affinitással kötődik az androgénreceptorokhoz (AR) és a glukokortikoid-receptorokhoz (GR), és olyan biológiai hatásokat váltanak ki, amelyeket ezek az individuális receptorrendszerek specifikusan meghatároznak [Labrie és munkatársai, Fertil. Steril 28; 1104–1112, 1977; Engel és munkatársai, Cancer Res. 38: 3352–3364, 1978; Raynaud és munkatársai, In Mechanism of Steroid Action (G. P. Lewis, M. Grisburg szerkesztők), MacMiland Press, London, 145–158., 1981; Rochefort and Chal-

bos, Mol. Cell. Endocrinol. 36: 3–10, 1984; Jänne es Bardin, Pharmacol. Rev. 36: 35S–42S, 1984; Poyet és Labrie, Mol. Cell. Endocrinol 42: 283–288, 1985; Poulin és munkatársai, Breast Cancer Res. Treatm. 13: 161–172, 1989]. Ennek megfelelően a progeszteronétól különböző néhány mellékhatást észleltek az MPA-val kezelt betegeknél.

Az MPA a gonadotropinszekrécióra érthetően gátló hatást gyakorol a patkány és az emberi hipofízis AR-aival való közvetlen interakció révén (Labrie és munkatársai, Fertil. Steril. 28: 1104–1112, 1977; Perez-Palacios és munkatársai, J. Steroid Biochem. 19: 1729–1735, 1983, Perez-Palacios és munkatársai, J. Steroid Biochem. 15: 125–130, 1981). Továbbá az MPA gátolja az androgénaktivitást egérvesében (Jänne és Bardin, Pharmacol. Rev. 36: 35S–42S, 1984) és patkány neutrális prosztatájában (Labrie C. és munkatársai, J. Steroid Biochem. 28: 379–384, 1984; Labrie C. és munkatársai, Mol. Cell. Endocrinol. 68: 169–179, 1990). Az AR-hoz való nagy affinitása ellenére az MPA ritkán okoz szignifikáns virilizációs tüneteket (akne, hirsutismus stb., Haller és Glick, Semin. Oncol. 13, 2–8, 1986).

Az MPA legkönnyebben magyarázható káros mellékhatásai a glukokortikoidszerű hatáshoz kötődnek, így a Cushingoid-szindróma, eufória és szubjektív fájdalomcsökkenés (Mattsson, Breast Cancer Res. Treatm. 3: 231–235, 1983; Blossey és munkatársai, Cancer 54: 1208–1215, 1984; Hortobágyi és munkatársai, Breat Cancer Res. Treatm. 5: 321–326, 1985; Van Veelen és munkatársai, Cancer Chemother. Pharmacol. 15: 167–170, 1985). A PMA mellékvese-működést gátló hatását mind az ACTH-szekrécióra kifejtett gátló hatásával hipofizisszinten, mind a szteroidképzés direkt gátlásával mellékveseszinten magyarázzuk (Blossey és munkatársai, Cancer 54: 1208–1215, 1984; Van Veelen és munkatársai, Cancer Chemother. Pharmacol. 15: 167–170, 1985; Van Veelen és munkatársai, Cancer Treat. Rep. 69: 977–983, 1985).

Az AR-hoz való nagy affinitása ellenére az MPA ritkán okoz szignifikáns virilációs tüneteket (akne, hirsutismus stb., Haller és Glick, Semin. Oncol. 13: 2–8, 1986). Ezenfelül az MPA a gonadotropinkiválasztásra kifejtett gátló hatását egyértelműen visszavezették a hipofízis AR-ral való kölcsönhatására patkányban (Labrie és munkatársai, Fertil. Steril. 28: 1104–1112, 1977; Perez-Palacios és munkatársai, J. Steroid Biochem. 19: 1729–1735, 1983) és emberben (Perez-Palacios és munkatársai, J. Steroid Biochem. 15: 125–130, 1981). Továbbá az MPA gátolja az androgénaktivitást egérvesében (Jänne és Bardin, Pharmacol. Rev. 36: 35S–42S, 1984) és patkány ventrális prosztatájában (Labrie, C. és munkatársai, J. Steroid Biochem. 28: 379–384, 1987; Labrie C. és munkatársai, Mol. Cell. Endocrinol. 68: 169–179, 1990).

Poulin és munkatársai „A sejtproliferáció androgén- és glukokortikoid-receptor közvetítette gátlása medroxi-progeszteron-acetáttal ZR–75–1 humán emlőkarcinóma-sejtekben" (Breast Cancer Res. Treatm. 13: 161–172, 1989) című munkájukban újabban azt találták, hogy a medroxi-progeszteron-acetát (MPA) gátló hatása a ZR–75–1 humán emlőkarcinóma-sejtekre főképpen a vegyület androgén tulajdonságainak tulajdonítható. Az MPA androgén tulajdonságait más rendszerekben már bemutatták (Labrie C. és munkatársai, J. Steroid Biochem. 28: 379–384, 1987; Luthy és munkatársai, J. Steroid Biochem 31: 845–852, 1988, Plante és munkatársai, J. Steroid Biochem. 31: 61–64, 1988, Labrie C. és munkatársai, Mol. Cell. Endocrinol. 58: 169–179, 1990). Egyéb szintetikus progesztinekről is megmutatkozott, hogy a progeszteronszerű hatásukon túl különböző mértékben androgén hatással is rendelkeznek (Labrie és munkatársai, Fertil. Steril. 31: 29–34, 1979, Poyet és Labrie, The Prostate 9: 237–246, 1986; Labrie C. és munkatársai, J. Steroid Biochem. 28: 379–384, 1987; Luthy és munkatársai, J. Steroid Biochem. 31: 845–852, 1988; Plante és munkatársai, J. Steroid Biochem. 31: 61–64, 1989).

Nagy dózisú progesztineket, különösen medroxi-progeszteron-acetátot és megestro-acetátot sikeresen alkalmaztak endometriumkarcinóma kezelésére is (Tatman és munkatársai, Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 25: 1619–1621, 1989; Podratz és munkatársai, Obstet. Gynecol. 66: 106–110, 1985; Ehrlich és munkatársai, Am. J. Obstet, Gynecol. 158: 797–807, 1988). Az androgén metil-tesztoszteron enyhíti az endometriosis tüneteit (Hamblen, South Med. J. 50: 743, 1987; Preston, Obstet. Gynecol 2: 152, 1965). Az androgén és maszkulinizáló mellékhatások (amelyek időnként irreverzíbilisek) azonban lényegesek az olyan hatékony androgénvegyületeknél, mint a tesztoszteron és származékai.

A nagy dózisú MPA – az emlőkarcinóma első kezelésére alkalmazva – a Tamoxifenhez hasonló hatást fejtett ki (Van Veelen és munkatársai, Cancer 58: 7–13, 1986). A nagy dózisú progesztineket, különösen a medroxi-progeszteron-acetátot és megestrol-acetátot sikeresen alkalmazzák endometriumkarcinóma kezelésére is (Tatman és munkatársai, Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 25: 1619–1621, 1989; Podratz és munkatársai, Obstet, Gynecol. 66: 106–110, 1985: Ehrlich és munkatársai, Am J. Obstet. Gynecol. 158: 797–807, 1988). Nagy dózisú MPA-t a Tamoxifenéhez hasonló sikerrel alkalmaztak endometriumkarcinóma kezelésére (Rendina és munkatársai, Europ. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 17: 285–291, 1984).

Egy randomizált klinikai kipróbálásnál a 6 hónapig alkalmazott nagy dózisú MPA a betegség visszafejlődését indukálta a betegek 50%-ánál és részleges visszafejlődését váltotta ki 13%-nál, míg azoknál a betegeknél, akik placebót kaptak, ezek az értékek 12%, illetve 6% voltak (Telimaa és munkatársai, Gynecol. Endocrinol. 1: 13, 1987).

Az androgén metil-tesztoszteron az endometriosis tüneteit szüntette meg (Hambleen, South Med. J. 50: 743, 1987; Preston, Obstet, Gynecol. 2: 152, 1965). Az androgén és maszkulinizáló mellékhatások (időnként irreverzíbilisek) azonban lényegesek az olyan hatékony androgénvegyületeknél, mint a tesztoszteron.

Az ösztrogénreceptorok androgén indukálta csökkenéséhez hasonlóan a ZR–75–1 humán emlőráksejtekben (Poulin és munkatársai, Endocrinology 125: 392–399,

1989) az MPA orális adagolása nőknél a follikuláris fázisban az ösztrogénkötés szintjének csökkenését okozta az endometriumban (Tseng és Gurpide, J. Clin. Endocrinol. Metab. 41, 402–404, 1975).

Állatokon végzett vizsgálatok kimutatták, hogy az androgénhiány osteopeniához vezet, míg a tesztoszteronadás növeli a csontok átlagos mennyiségét (Silberberg és Silberberg, 1971; lásd Finkelstein és munkatársai, Ann. Int. Med. 106: 354–361, 1987). Orchiectomia (hereeltávolítás) patkányokon észlelhető osteoporosist okozhat 2 hónapon belül (Winks and Felts, Calcif. Tissue Res. 32: 77–82, 1980; Verhas és munkatársai, Calif. Tissue Res. 39: 74–77, 1986).

Bár a hirsutismusos oligomenorrhoeás és amenorrhoeás nők keringő E_2-szintje alacsony, és azt várnánk, hogy a csonttömegük csökkent, ezek a nők magas androgén- (de alacsony ösztrogén-) szinttel kevésbé hajlamosak osteoporosisra (Dixon és munkatársai, Clinical Endocrinology 30: 271–277, 1989).

A mellékvese androgénszintjeit csökkentnek találták osteoporosisban (Nordin és munkatársai, J. Clin. Endocr. Metab. 60: 651, 1985). Továbbá a megnövekedett androgénszint menopausa után levő nőkben védőhatásúnak bizonyult a gyors csontállományvesztéssel szemben (Deutsch és munkatársai, Int. J. Gynecol. Obstet. 25: 217–222, 1987; Aloia és munkatársai, Arch. Int. Med. 143: 1700–1704, 1983). Az androgének ilyen szerepének megfelelően az androgén metabolitok szintje a vizeletben alacsonyabb postmenopausalis symptomás menopausában, mint a megfelelő kontrollokban és a konjugált dehidroepiandroszteron (DHEA) szignifikáns csökkenését találták osteoporosisos betegek plazmájában (Holló és Fehér, Acta Med. Hung. 20: 133, 1964; Urist és Vincent, J. Clin Orthop. 18: 199, 1961; Holló és munkatársai, Acta Med. Hung. 27: 155, 1970). Ez arra utal, hogy a postmenopausalis osteoporosist a hypoösztrogenizmus és hypoandrogenizmus együtt okozza (Holló és munkatársai, Lancet: 1357, 1976).

Az ösztrogének és androgének fentiekben feltételezett osteoporosisban játszott szerepének mechanizmusa alapulhat ösztrogén- (Komort és munkatársai, Science 241: 81–84, 1988; Eriksen és munkatársai, Science 241: 84–86, 1988) és androgén- (Colyard és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci 86: 854–857) receptorok osteoblastokban való jelenlétén, ami megmagyarázná az ösztrogén- és androgéncsökkenés után megfigyelt megnövekedett csontfelszívódást.

Fiúkban normál pubertás alatt a szérumtesztoszteron-szint növekedése az alkalikusfoszfát-aktivitás (az osteoblast-aktivitás jelzője) növekedését idézi elő, ami viszont a csont sűrűségének növekedését okozza (Krabbe és munkatársai, Arch. Dis. Child. 54: 950–953, 1979; Krabbe és munkatársai, Arch. Pediat. Scand. 73: 750–755, 1984; Riis és munkatársai, Calif. Tissue Res. 37: 213–217, 1985).

Míg nőknél gyors csontfogyatkozás kezdődik a menopausával, férfiaknál a csontállomány-veszteség kb. 65 éves korban észlelhető (Riggs és munkatársai, J. Clin. Invest. 67: 328–335, 1987). Szignifikáns csontritkulást kb. 80 éves korban látunk a férfiaknál a csípő-, gerinc- és csuklótörések következményes előfordulásával. Számos vizsgálat kimutatta, hogy az osteoporosis az androgénhiány klinikai megnyilvánulása férfiakban [Baran és munkatársai, Calif. Tissue Res. 26: 103–106, 1978; Odell és Swerdloff, West. J. Med. 124: 446–475, 1976; Smith és Walker, Calif. Tissue Res. 22 (Suppl.): 225–228, 1976]. Ha kevesebbszer is, mint nőknél, az osteoporosis szignifikáns megbetegedést okozhat férfiaknál is (Seeman és munkatársai, Am. J. Med. 75: 977–983, 1983). Valójában az androgénhiány nagy kockázatot jelent csigolya-összeroppanás szempontjából férfiakban (Seeman és munkatársai, Am. J. Med. 75: 977–983, 1983). Az orsócsont és a csigolyacsontok keménységének csökkenése a hyperprolaktinaemiával (Greespan és munkatársai, Ann. Int. Med. 104: 777–782, 1986) vagy anorexia nervosával (Rigotti és munkatársai, JAMA 256: 385–288, 1986) összefüggésben álló hypogonadizmus következménye. Ezekben az esetekben azonban a hyperprolaktinaemia és a súlyvesztés szerepe vitatható.

A hypogonadizmus férfiaknál jól ismert oka a csontritkulásos töréseknek (Albright és Reinfenst, 1948; Saville, Clin. End. Metab. 2: 177–185, 1973). A csontok sűrűsége valójában mind elsődleges, mind másodlagos hypogonadizmus esetén csökken (Velentzas és Karras. Nouv. Presse Médicale 10: 2520, 1981).

Súlyos osteopeniát írtak le 23 csökkent gonadotrop hormonú hypogonadizmusban szenvedő férfinél, ahol a csont kortikális és trabekuláris állományának sűrűsége is csökkent (Finkelstein és munkatársai, Ann. Int. Med. 106: 354–361, 1987; Foresta és munkatársai, Horm. Metab. Res. 15: 56–57, 1983). Osteopeniát írtak le Klinefelter-syndromás férfiaknál is (Foresta és munkatársai, Horm. Metab. Res. 15: 206–207, 1983; Foresta és munkatársai, Horm. Metab. Res. 15: 56–57, 1983; Smith és Walker, Calif. Tissue Res. 22: 225–228, 1977).

Patkányokban kasztrációt követően androgénre reverzíbilisen csökkent érzékenységet írtak le kalcitoninra (Ogata és munkatársai, Endocrinology 87: 421, 1970: Holló és munkatársai, Lancet 1: 1205, 1971; Holló és munkatársai, Lancet 1: 1357, 1976). Továbbá szérumkalcitoninszint-csökkenést írtak le hypogonadizmusban szenvedő férfiaknál (Foresta és munkatársai, Horm. Metab. Res. 15: 206–207, 1983), és kasztrált patkányok tesztoszteronkezelése megnövelte a kalcitonin hypocalcaemiás hatását (McDermatt és Kidd, End. Rev. 8: 377–390, 1987).

Albright és Ruferstein (1948) feltételezték először, hogy az androgének növelik a csontállomány építését. Az androgénekről azt is kimutatták, hogy növelik az osteoid szintézist és mineralizációt csirkében (Puche és Rosmano, Calif. Tissue Res. 4: 39–47, 1969). Az androgénkezelés a hypogonadizmusban szenvedő férfiaknál előmozdítja a csontok növekedését és fejlődését (Webster és Hogkins, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 45: 72–75, 1940). Továbbá a tesztoszteronkezelés férfiaknál pozitív nitrogén-, kalcium- és foszfátegyensúlyhoz vezet (Albright F., Reifenstein, E. G. In: The parathyroid glands and metabolic bone disease, Williams and Williams Co.: Baltimore, 145–204. oldalak,

1948). Csonthystomorphometriával vizsgálva a tesztoszteronkezelés hypogonadizmusban szenvedő férfiaknál a relatív osteoid térfogat, a teljes osteoid felszín, a csontok hosszanti képződése és a csontmineralizáció növekedését eredményezte (Barau és munkatársai, Calcif. Tissue Res. 26: 103–106, 1978).

A tesztoszteronnal való kezelés növelte az osteoid felszíneket és a csontgerendák szélességét változatlan vagy csökkentett rárakódási arány mellett, és ez a teljes csontmineralizáció arányának növekedését jelzi (Peackock és munkatársai, Bone 7: 261–268, 1986). A plazmafoszfátszint is csökkent volt, ami valószínűleg a foszfátok renális tubuláris visszaszívódására kifejtett hatásnak köszönhető (Selby és munkatársai, Clin. Sci. 69: 265–271, 1985).

A kortikális csont sűrűsége nő hyperprolactinaemás hypogonadizmusos férfiaknál, ha a here működése normalizálódik (Greenspan és munkatársai, Ann. Int. Med. 104: 777–782; Greenspan és munkatársai, Ann. Int. Med. 110: 526–531, 1989). A tesztoszteronkezelés növeli a csontképzést primer hypogonadizmusban szenvedő férfiaknál (Baron és munkatársai, Calcif. Tissue Res. 26: 103–106, 1978; Francis és munkatársai, Bone 7: 261–268, 1986).

21 GnRH hiányos hypogonadizmusos férfinál a szérumtesztoszteron több mint 12 hónapos normalizálása megnövelte a csontok sűrűségét (Kinkelstein és munkatársai, J. Clin. Endocr. Metab. 69: 776–783, 1989). A már csontfejlődésüket befejezett férfiaknál (azt epiphysisek záródása után) azonban a kortikális csontsűrűség szignifikásan növekedett, míg a csontgerendák sűrűségében nem volt szignifikáns változás tapasztalható, így ez alátámasztja a kortikális és trabekuláris csontállomány előzőekben feltételezett eltérő érzékenységét a szteroid terápiára.

Anabolikus szteroidokkal kisszámú betegen végzett előzetes vizsgálatok pozitív hatásokat mutattak a csontra (Lafferty és munkatársai, Ann. J. Med. 36: 514–528, 1964; Riggs és munkatársai, J. Clin. Invest. 51: 2659–2663, 1972; Harrison és munkatársai, Metabolism 20: 1107–1118, 1971). Újabban teljes testkalcium, mint paraméter, neutronaktiválásos mérésének segítségével a metandrosztenolon anabolikus szteroid pozitív és relatív hosszú ideig tartó (24–26 hónap) hatását mutatták ki egy kettős vakvizsgálatban postmenopausalis osteoporosis esetében (Chessnut munkatársai, Metabolism 26: 267–277, 1977; Aloia és munkatársai, Metabolism 30: 1076–1079, 1981).

A nandrolon-dekanoát anabolikus szteroid csökkentette a csontfelszívódást osteoporosisos nőkben [Dequeker és Geusens, Acta Endocrinol. 271 (Suppl.): 45–52, 1985] hasonlóan az ösztrogénterápia során megfigyelt eredményekhez (Dequeker és Ferin, 1976, lásd Dequeker és Geusens). Ezek az adatok megerősítik a kutyákkal és nyulakkal végzett kísérletek eredményeit, ahol a nandrolon-dekanoát csökkentette a csontfelszívódást (Ohem és munkatársai, Curr. Med. Res. Opin. 6: 606–613, 1980). Továbbmenve, osteoporosisos nőkben [Dequeker és Geusens, Acta Endocrinol. (Suppl.) 271: 45–52, 1985] az anabolikus szteroid nemcsak csökkentette a csontveszteséget, hanem növelte is a csonttömeget. Másrészt a D-vitamin-kezelés csak a csontfelszívódást csökkentette.

Postmenopausalis nők nandrolonkezelése növelte a kortikális csont ásványianyag-tartalmát (Clin. Orthop. 225: 273–277). Az androgén mellékhatásokat azonban a betegek 50%-ánál észlelték. Ezek az adatok azért érdekesek, mert a legtöbb kezelés a csontvesztés megállítására korlátozódik, a csonttömeg növekedése a nandrolon anabolikus szteroid alkalmazása esetén figyelhető meg. Az androgének csontképzésre való hasonló stimuláló hatását vetették fel egy hypogonadizmusban szenvedő férfi esetén (Baran és munkatársai, Calcif. Tissue Res. 26: 103, 1978). Azokkal a diétákkal, amelyeknél a csontfelszívódást kalciummal, calcitriollal vagy hormonokkal akadályozzuk meg, az a probléma, hogy majdnem biztosan a csontképzés csökkenéséhez vezetnek (Need és munkatársai, Mineral. Electrolyte Metabolism 11: 35, 1985). Noha Albright és Reiferstein (1948) (lásd Need, Clin. Orthop. 225: 273, 1987) felvetik, hogy az osteoporosis a csontképzés csökkenésével áll összefüggésben, és reagálnia kell a tesztoszteronkezelésre, az androgének virilizáló hatása alkalmatlanná teszi őket menopausa után álló nők kezelésére. Azután kifejlesztették az anabolikus szteroidokat, melyek olyan vegyületek, amelyek kevésbé virilizáló hatásúak. Noha egyesek minimális hatásról számolnak be (Wilson és Griffin, Metabolism 28: 1278, 1980), többen írnak le pozitív eredményeket [Chessnut és munkatársai, Metabolism 32: 571–580, 1983, Chessnut és munkatársai, Metabolism 26: 267, 1988; Dequeker és Geusens, Acta Endocrinol. (Suppl. 110) 271: 452, 1985]. Egy menopausa után álló nőknél végzett randomizált vizsgálat szerint a teljes csonttömeg növekedett a stanazolol anabolikus szteroid terápia alatt, noha mellékhatásokat észleltek a betegek többségénél.

A fentiekben említettek szerint az emlőkarcinóma standard terápiájában használatos progesztindózisok (például medroxi-progeszteron-acetát) következtében nemkívánatos lényeges mellékhatások lépnek fel, különösen azok, amelyek a szteroidnak a glukokortikoid-receptorral való interakciójával állnak összefüggésben, például Cushing-szindróma, eufória (Mattsson, Breast Cancer Res. Treatm. 3: 231–235, 1983; Blossey és munkatársai, Cancer 54: 1208–1215, 1984; Hortobágyi és munkatársai, Breast Cancer Res. Treatm. 5: 321–326, 1985; Von Veelen és munkatársai, Cancer Chemother. Pharmacol. 15: 167–170, 1985).

A progesztin kifejezés a progeszteron és tesztoszteron származékainak megjelölésére szolgál. Ilyen progesztineket egy időben azért szintetizáltak, hogy a progeszteronreceptorokra progeszteronanalógként ható vegyületeket fejlesszenek ki különösen fogamzásgátlás céljára. Az új és precízebb vizsgálatok révén azonban nyilvánvalóvá vált, hogy ezek a vegyületek, amelyeket kizárólag a progeszteronreceptorokkal kölcsönhatásba lépőnek szántak, interakcióba lépnek, gyakran nagy affinitással az androgénreceptorokkal (Labrie és munkatársai, Fertil. Steril. 28: 1104–1112, 1977; Labrie és munkatársai, Fertil. Steril. 31: 29–34, 1979; Labrie, C. és

munkatársai, J. Steroid Biochem. 28: 379–384, 1987; Labrie C. és munkatársai, Mol. Cell. Endocrinol. 68: 169–179, 1990). Időnként ezen vegyületek androgén hatása, különösen alacsony koncentrációknál, lényegesebbé válik, mint maga a progesztinaktivitás. Ez az eset fordul elő például medroxi-progeszteron-acetátnál (Poulin és munkatársai, Breast Cancer Res. Treatm. 13: 161–172, 1989).

Az emlő- és endometriumkarcinóma szintetikus progesztinekkel történő elsődleges kezelésénél az ezen terápiánál megfigyelt mellékhatások okoznak problémát. Az ösztrogének blokádja, egy másik szokásos módja az emlőkarcinóma kezelésének, nemkívánatos káros mellékhatást fejt ki a csontállományra nőkben. Hasonló módon, az ösztrogének blokádja, ami endometriosisban szokásos kezelés, hasonló nemkívánatos káros hatásokat gyakorol a csontállományra nőkben.

Az olyan fogamzásgátló készítményeket, amelyek huzamosabb időtartamra nyújtanak védelmet, az utóbbi 25 év során fejlesztették ki. Ide hosszú hatású injekciós szteroidkészítmények tartoznak (például Depoprovera vagy gyakrabban külső fogamzásgátló szisztémák használatán keresztül, például beültetés, mikrogyöngyök, vaginális gyűrűk, I. U. D. stb). Manapság az MPA és novetiszteron (NET)-enantát használatosak a családtervező programokban. 1985-ös becslések szerint 4 millió nő szedett MPA-t és csaknem 1 millió NET-enantátot (Hall, P. E., Long-acting injectable preparations. Fertility Regulation, Today and Tomorrow, Diczfalusy, E., Bydeman, M. szerkesztők, Raven Press: New York, 119–141. oldalak, 1987). Megbecsülték továbbá, hogy Latin-Amerikában 0,5 millió és Kínában 1 millió nő védekezik egy progesztogén- és egy ösztrogéntartalmú különböző havi injektálást igénylő készítménnyel (Hall, 1987, ugyanaz a referencia, mint fent). A hosszú hatású kontraceptív készítményeket az utóbbi 25 évben fejlesztették ki.

Két hosszú hatású kontraceptív szteroid áttekintését tartalmazza a Contraception (1977. május, 15. kötet, 5. szám. 513–533. oldalak).

A Depoproverát (25 mg) 5 mg ösztradiol-cipionáttal kombinálva adták havonta egyszer injekcióban fogamzásgátlásra (WHO, Said és munkatársai, Contraception, 37: 1–20, 1988). Az 50 mg noretiszteron-enantátot és 5 mg ösztradiol-valerátot tartalmaz havi egyszeri injekcióval összehasonlítva kis eltérést találtak hatékonyságban és a mellékhatásokban. Több mint 10 000 női hónapot (ciklust) vizsgáltak minden csoportban. Az MPA-E_2-cipionát igen hatékony kontraceptívumnak bizonyult, minthogy nem észleltek terhességet 10 969 ciklus alatt. Az abbahagyás aránya a havi egyszeri injekciót alkalmazó nőknél relatíve magas volt, 35% egy év alatt (WHO, Said és munkatársai, Contraception, 37: 11–20, 1988), míg a vérzési rendellenességei csak kb. 6,1%-ban és amenorrhoea 2,1%-ban fordult elő a nőknél. Az injekcióról való lekésés, személyes okok és a követés megszakadása eredményezte a kezelésmegszakítások 18,6%-át. Ezek az adatok arra utalnak, hogy könnyebben akceptálható alkalmazási módra van szükség.

A DepoMPA (azaz Depoprovera) egyedül alkalmazva (150 mg, im. 3 havonta) 20 498 ciklusban vizsgálva 0,1±0,1% teherbeesési arányt, 15,0±1,0% vérzési rendellenességet, és 11,9±1,0% incidenciájú amenorrhoeát idézett elő (WHO, Said és munkatársai, Contraception, 37: 1–20, 1988). Egy kisebb vizsgálatban (5434 ciklus) a DepoMPA ugyanezen dózisa esetén a kezelésmegszakítás aránya 40,7±2,0% volt, míg vérzési rendellenesség és amenorrhoea a betegek 14,7±1,5%-ánál fordult elő.

Korábban az MPA felhasználása orális adagolás vagy intramusculáris injekció (Depoprovera) formájában történt. Az orális alkalmazást korlátozzák az együttműködéssel kapcsolatos problémák és a fluktuáló vérszint, míg az MPA felszabadulása a Depoprovera-injekcióból eleinte gyors, majd igen változó mértékben csökken a későbbi időintervallumokban. Így szükség van olyan szabályozott felszabadulású készítményre, amely a szteroid konstans mennyiségét szolgáltatja előre meghatározott időtartamra, ami így biztosított a beteg gyakori együttműködése nélkül is, és megnövekedett hatékonyságot biztosít azáltal, hogy a szer konstans vérszintjét biztosítja a kezelendő szövet(ek)ben. Hasonló szempontok vonatkoznak az MGA-ra. A mikrokapszulákból felszabaduló gyógyszerrendszereket az utóbbi harminc évben fejlesztették ki széles körben a terápiás szerek szabályozott felszabadulása érdekében, különösen gyakori az aktív szerek biológiailag lebontódó olyan poliészterekbe való töltése, mint például a poli(kaprolakton), poli (ε-kaprolakton-CO-DL-tejsav), poli(DL-tejsav), poli(DL-tejsav-CO-glikolsav) és poli(ε-kaprolakton-CO-glikolsav). Lásd példák és referenciák R. W. Bakernél (R. W. Baker, Controlled release of biologically active agents, John Wiley and Sons Ed., N. Y., 1987), F. Limnél (F. Lim. Biomedical Application of Microencapsulation, Franklin Lim. Ed. CRC Press, BocaRaton, 1984).

A 3 773 919 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban G. A. Boswell és R. M. Schribner egy polilaktid-gyógyszerkeverék használatát írják le különösen olyan szteroidokkal, mint a medroxi-progeszteron-acetát, a szerek lassú és hosszan tartó felszabadulása céljából.

A DE 3 503 679 számú szabadalmi leírásban Carli medroxi-progeszteron-acetát-készítményeknek vízben nem oldódó, de vízben megduzzadó polimerrel való kombinálását ismerteti.

A WO 8807816 számú nemzetközi bejelentésben R. J. Leonard fuzionált átkristályosított szteroidhatóanyag-pelleteket ismertet, ami hosszan tartó felszabadulást biztosító implantátumként használható.

A 4 818 542 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban DeLuca és munkatársai porózus mikrogyöngyök készítését és használatát írják le gyógyszerhatóanyag-hordozóként.

A DE 2 010 115 számú szabadalmi leírásban a Farbenfabriken Bayer AG egy szilárd permetezhető mikrogranulátumkészítményt ismertet gyógyszerek retardált felszabadulására.

A 4 166 800 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban F. W. Fong mikrogyöngyök előál-

lítását írja le alacsony hőmérsékleten fázisszeparáló szer hozzáadásával.

A 4 897 268 számú amerikai egyesült államokbeli bejelentésben Tice és munkatársai egy kapszulázásra használatos poli(DL-laktid-CO-glikolid)-ot tartalmazó gyógyszerhatóanyag-hordozó rendszert írnak le.

A 4 107 071 számú amerikai egyesült államokbeli bejelentésben R. G. Bayless etilén- és vinil-acetát részben hidrolizált kopolimerjéből álló mikrokapszulák előállítását ismerteti.

A DE 2 051 580 számú szabadalmi leírásban a DuPont cég szabályozott felszabadulást biztosító parenterális golyócskák előállítását ismerteti.

A 4 622 244 számú amerikai egyesült államokbeli bejelentésben Lapka és munkatársai a részecskék vagy anyagok fázisreparációval és a mikrokapszulák alacsony hőmérsékleten történő elválasztásával végzett kapszulázását, és a mikrokapszulák alacsony hőmérsékleten végzett izolálását írják le.

A 4 987 268 számú amerikai egyesült államokbeli bejelentésben E. S. Nuwayser és W. A. Nucefora kompozit magvas mikrorészecskék előállítását ismerteti.

Wise és munkatársai (D. L. Wise Lactic/Glycolic Acid Polymers, Biology & Medicine, G. Gregotiadis szerkesztő, New York Academic Press, 237–270. oldalak, 1979) a tej/glikolsav (ko)polimerek alkalmazását ismertetik a gyógyászatban. Lásd Lewis „Controlled Release of Bioactive Agents from Lactide/Glycolide Polymers" (lásd Lewis, „Controlled Release of Bioactive Agents from Lactide/Glycolide Polymers", Drug and Pharmaceutical Sciences, 45. kötet, 1–41. oldalak, 1990).

Egy noretiszteront mint kontraceptív szteroidot tartalmazó injektálható tartós felszabadulást biztosító készítménynél egyenletes felszabadulás mutatkozott 2 hónapig patkányban (Anderson és munkatársai, Contraception 13: 375–384, 1976). A hűtéssel darabolt 90–180 μm-es részecskék 20% noretiszteront tartalmaztak egy olyan biológiai úton lebomló polimer mátrixban, amit L(+)-tejsavból szintetizáltak 200 000 molekulatömegig. A készítmény (90–180 μm részecskenagyságú por) 20% noretiszteront tartalmazott egy polimerben, ami tömeg szerint 90 rész L-laktidból és 10 rész maximálisan 200 000 molekulatömegű glikolidból állt; a vegyület kb. 2 hónapig szabadult fel páviánban (Gresser és munkatársai, Contraception 17: 253–266, 1978). Azonban a patkányoknál talált 0-d fokú felszabadulást a főemlősökön végzett ezen vizsgálat nem erősítette meg (Beck és Tice, Long acting steroid contraception, D. R. Mishell szerkesztő, Raven Press: New York, 175–199, 1983). Az injektálható DL-PLA NET mikrokapszularendszer az egyetlen olyan forma, amit részletesen vizsgáltak in vivo körülmények között (Review by Beck and Tice, Long acting steroid contraception, D. R. Mishell szerkesztő, Raven Press: New York, 175–199, 1983).

A legtöbb mikrorészecskék előállítására szolgáló technikához szükséges olyan szerves oldószerek használata, amelyek jelentékeny mértékben visszamaradnak, és helyi vagy szisztémás nemkívánatos toxikus hatásokat okozhatnak. Más korábbi technikákhoz magas hőmérséklet alkalmazása volt szükséges, ami a szteroid és/vagy polimer potenciális nemkívánatos hőbomlásával járt együtt.

Az emlő- és endometriumkarcinóma korábbi MPA és megestrol-acetát kezelésével kapcsolatos problémát az ezen kezelések alatt fellépő mellékhatások jelentik. A 19-nortesztoszteronok (mint a norgesztrel, noretiszteron és noretindron) használatával az a probléma, hogy ezek a vegyületek ösztrogénhatást fejtenek ki (Vilchis és munkatársai, J. Ster Biochem. 24: 525–531, 1986; Larrea és munkatársai, J. Ster. Biochem, 27: 657–663, 1987; Poulin és munkatársai, Breast Cancer Res. Treatm, 17: 197–210, 1990). Az ilyen ösztrogénaktivitás negatív hatású az emlőkarcinóma incidenciájára hosszú távú alkalmazás esetén.

Ezek szerint szükség van az ösztrogénfüggő megbetegedések (csakúgy, mint a csontritkulás és a fogamzásgátlás területén) egy injektálható, a medroxi-progeszteron-acetát és a megestrol-acetát tartós felszabadulását biztosító rendszerre, amely képes ezen szteroidok keringő koncentrációját hosszú időn át alacsony szinten tartani (például 1 hónapra vagy tovább), és amely a toxikus maradék oldószer és/vagy termikus bomlástermékek, (amelyek a terápiás készítmény magas hőkezelése során képződtek) jelentéktelen mennyiségét tartalmazza.

Különösen a preventív célú készítmények esetén az elhanyagolható maszkulinizáló hatású, MPA-t, MGA-t vagy más androgén vegyületeket tartalmazó tartós felszabadulást biztosító rendszerek bizonyára pozitív hatást gyakorolnak az egészségügyi ellátás költségeire.

Itt jegyezzük meg, hogy az EP 58481 és a DE 4 036 425 számú szabadalmi iratokban olyan, az MPA-tól és az MGA-tól eltérő szerkezetű vegyületeket ismertetnek, melyek ösztrogén- és progesztinreceptorokra hatnak, illetve leírják a vegyületeket tartalmazó elnyújtott felszabadulású készítményeket. Azonban semmiféle kitanítás nem található ezen leírásokban arra nézve, hogy egyéb szteroidok (előnyösen az MPA és az MGA) alacsony koncentrációban szelektíven hatnának androgénreceptorokra.

A találmány tárgya tehát hatóanyagként MPA-t vagy MGA-t tartalmazó, emlőkarcinóma, osteoporosis, endometriumkarcinóma vagy endometriosis kezelésére vagy megelőzésére alkalmas elnyújtott felszabadulású gyógyászati készítmény, melyre jellemző, hogy a készítmény grammonként 200–700 mg MPA- vagy MGA-hatóanyagot tartalmaz, és a készítmény grammonként és naponta 4–25 mg hatóanyagot ad le.

Így a gyógyszerkészítményt olyan formában szolgáltatjuk, mely a hatóanyag keringési szérumszintjét 1,0 és 50,0 nmol/l között tartja fent az alkalmazást követően 48 órával kezdődő és az alkalmazást követő legalább 28 napig terjedő periódusban.

A találmány szerinti készítmény előnyösen mikrogyöngyök vagy mikrorészecskék formájában van kiszerelve, melyekben a hordozó előnyösen tejsav/glikolsav alapú kopolimer, amely meleg vérű állatokban és emberben a hatóanyag szérumkoncentrációját a fenti alacsony szinten tartja fent hosszabb időtartamra.

A készítmény előnyösen szubkután vagy intramuszkuláris adagolásra alkalmas módon van kiszerelve.

További előnyös megvalósítás során a készítmény grammonként 300–600 mg MPA- vagy MGA-hatóanyagot tartalmaz és grammonként és naponta 6–22 mg hatóanyagot ad le.

A találmány tárgya továbbá eljárás hatóanyagként MPA-t vagy MGA-t tartalmazó, emlőkarcinóma, osteoporosis, endometriumkarcinóma vagy endometriosis kezelésére vagy megelőzésére alkalmas elnyújtott felszabadulású gyógyászati készítmény előállítására, oly módon, hogy az MPA- vagy MGA-hatóanyagot a készítmény grammjaira számolva 200–700 mg mennyiségben alkalmazzuk, és így olyan készítményt alakítunk ki, amely grammonként és naponta 4–25 mg hatóanyagot ad le.

A találmány fent említett és egyéb tárgyait az itt ismertetett eljárások gyakorlati alkalmazásával és/vagy az itt ismertetett gyógyászati vegyületek, készítmények és kiszerelések felhasználásával valósítjuk meg.

Az egyik alkalmazási lehetőség szerint a készítmény androgénreceptorok aktiválását biztosítja meleg vérű állatokban vagy emberben azáltal, hogy az állatnak legalább egy androgén szteroidot adagolunk, amelynek Ki-értéke kisebb, mint 2×10^{-8} mol/l az androgénreceptorra, és amely androgénreceptor közvetítette gátló hatást gyakorol a ZR–75–1 humán emlőkarcinóma-sejtek növekedésére, ami maximális értékének felét 3,0 nmol/l koncentráció alatt éri el, és nincs látható maszkulinizáló hatása 50 nmol/l vérszérum-koncentráció alatt. Vagyis tehát a készítmény alkalmazásával az androgén szteroidot elég alacsony dózisban adagoljuk ahhoz, hogy a kumulatív (összegződő) szérumkoncentrációt 50 nmol/l alatt tartsuk.

Az itt ismertetett készítmények különösen alkalmasak emberi emlőkarcinóma, endometriumkarcinóma, osteoporosis és endometriosis kezelésére. A készítményeket alkalmasnak tartjuk olyan egyéb célokra is, amelyek androgének adagolásával vagy az androgénreceptorok egyéb módon történő aktiválásával érhetők el. A találmány szerinti készítményeket alkalmasnak tartjuk mind megelőzés, mind kezelés céljára.

A találmány szerint tartós (retard) felszabadulást biztosító részecskéket nyújtunk, amelyek egy, a találmány szerinti androgén szteroidot tartalmaznak, ahol az androgén szteroid egy olyan tartós felszabadulást biztosító kötőanyagban van diszpergálva, amely biokompatibilis a humán szövetekkel, és amely biológiai úton biokompatibilis metabolikus termékekké bomlik le a szervezetben, oly módon, hogy az említett részecskék standard körülmények között képesek az androgén szteroid felszabadítására a fenti kötőanyag biológiai úton történő lebomlása során és következtében olyan arányban és időtartamra, amely az androgén szteroid keringő szérumszintjét 1,0 és 50,0 nmol/l között határozza meg olyan időtartamban, ami beadás után 48 órával kezdődik, és az alkalmazást követően legalább 28 napig tart.

A standard körülményeket a felszabadulási arány mérésére az alább következő részletes leírásban ismertetjük. A felszabadulási arány a tartós felszabadulást biztosító részecskék jellemző tulajdonsága meghatározott körülmények között, és nem korlátozza az ilyen részecskék alkalmazási módjait. Például, a részecskék felszabadulási arányát egy bizonyos dózisnál meghatározzuk. Az így jellemzett részecskéket azonban tág határok közötti dozírozással alkalmazhatjuk, amint azt részletesen ismertetjük a továbbiakban, és amelyet az ellátó orvos megfelelőnek ítél. Az egyéb változók, mint a részecskék adagolási módja, a tartós felszabadulás időtartama és hasonlók ugyancsak széles körben változhatnak, amint azt alább ismertetjük. Gyógyászatilag alkalmas oldószert vagy vivőanyagot is alkalmazhatunk.

A találmány szerinti készítményeket előnyösen előállíthatjuk a következő módon:

(A) tartós felszabadulást biztosító részecskéket állítunk elő, amelyek átlagos mérete 5 μm és 40 μm közötti, ahol a részecskék az aktív vegyületet egy tartós felszabadulást biztosító kötőanyagban diszpergálva tartalmazzák, és nemkívánatos maradék szerves oldószert is tartalmaznak;

(B) a fenti részecskéket erős vákuumhatásnak tesszük ki, ahol a nyomás kisebb, mint 140 Pa és a hőmérséklet 7 és 15 °C közötti, ami kevesebb, mint a fenti kötőanyag üvegesedési hőmérséklete, olyan időtartamra, ami elegendő ahhoz, hogy a mikrogyöngyökben a maradék szerves oldószer 0,1% koncentráció alá kerüljön (tömeg%, a részecskék teljes tömegére viszonyítva).

A találmánnyal például egy olyan gyógyászati készítményt nyújtunk, amely egy szabadon választható gyógyászatilag alkalmas oldószert vagy vivőanyagot tartalmaz, és amelyben több tartós felszabadulást biztosító mikrogyöngy van, melyek átlagos mérete 5 μm és 40 μm közötti, és amelyekben az aktív szer egy olyan tartós felszabadulást biztosító kötőanyagban van diszpergálva, amely biokompatibilis a humán szövetekkel, és amely biológiai úton bontódik le a szervezetben biokompatibilis metabolikus termékekké. A fenti mikrogyöngyök standard körülmények között képesek az aktív szer felszabadítására az említett kötőanyag biológiai úton történő lebontása közben és következtében egy legalább 28 napig tartó periódusban, miközben a mikrogyöngyök nem tartalmaznak 0,1%-nál (tömeg%; a mikrogyöngyök teljes tömegére viszonyítva) több szerves oldószert.

A felhasznált androgének speciális tulajdonsága az, hogy hatékony androgénaktivitást fejtenek ki alacsony vérkoncentrációnál (például kevesebb mint 50 nmol/l), míg igen kis glukokortikoidreceptor-aktivitást mutatnak ezeknél a koncentrációknál. Ugyancsak jellemző rájuk a nőknél jelentkező fizikális maszkulinizáló hatás hiánya a használt koncentrációintervallumban. Ez megkülönbözteti őket az ivarmirigyekben vagy perifériás szövetekben termelődő természetes androgénektől, mint a tesztoszteron vagy dihidrotesztoszteron, amelyek tekintélyes maszkulinizáló hatásúak még alacsony vérkoncentráció esetén is. A szintetikus progesztinek, például a progeszteronszármazékok használatosak ebben a találmányban.

A találmány szerinti készítményben alkalmazott androgének általában nem okozzák a maszkulinizáló hatások fizikálisan észlelhető növekedését, mint például a nőknél fokozott szőrnövekedést, aknét, seborrhoeát vagy

hajhullást. Ezeket a maszkulinizáló hatásokat már értékelték a irodalomban. Lásd például Ferriman és Gallwey, J. P. Clin. Endocrinol. Metab. 21: 1440–1447, 1961 (hajnövekedésre vonatkozóan); Cremoncini és munkatársai, Acta. Eur. Fertil. 7: 248–314, 1976 (akne, seborrhoea és hajhullás). Lásd még Cusan és munkatársai, J. Am. Acad. Dermatol 23: 462–469, 1990.

Az 1. és 2. táblázatokban a későbbiekben említett kvantitatív eredmények értékelési szempontjait ismertetjük.

1. táblázat

A szőrnövekedés meghatározása 11 helyen vizsgálva (A ∅ érték mindenütt a szőr hiányát jelzi)

Hely	Fokozat	Meghatározás
1. Felső ajak	1	Néhány szőr a külső szélen
	2	Kis bajusz a külső szélen
	3	A külső széltől félútig terjedő bajusz
	4	A középvonalig terjedő bajusz
2. Áll	1	Elszórtan néhány szőrszál
	2	Kis sűrűségű elszórt szőrszálak
	3–4	Teljesen fedett, gyenge, illetve erős szőrrel
3. Mellkas	1	A bimbóudvar körüli szőrszálak
	2	A fenti és középvonali szőrszálak
	3	Ezen területeken összefüggően 3/4 részben fedett
	4	Teljesen fedett
4. Hát	1	Néhány elszórt szőrszál
	2	Jóval több, de még elszórt
	3–4	Teljesen fedett, gyenge, illetve erős szőrzet
5. Ágyék	1	Szakrális szőrös terület
	2	Oldalirányú kiterjedéssel
	3	3/4 részben fedett
	4	Teljesen fedett
6. Has felső része	1	Néhány középvonali szőrszál
	2	Jóval több, de még középvonali
	3–4	Félig, illetve teljesen fedett
7. Alhas	1	Néhány középvonali szőrszál
	2	Középvonali szőrcsík
	3	Középvonali szőrsáv
	4	Fordított V alakú szőrnövekedés
8. Kar	1	Elszórt szőrnövés, a végtag felszínének negyedénél többet nem érint
	2	Az előzőnél kiterjedtebb, de nem fedi teljesen
	3–4	Teljesen fedi, gyenge és erős
9. Alkar	1, 2, 3, 4	A dorzális felszín teljesen fedett; 2 fokozat szolgál a gyenge, és 2 az erős szőrnövekedés jelzésére
10. Comb	1, 2, 3, 4	Lásd a karnál
11. Lábszár	1, 2, 3, 4	Lásd a karnál

2. táblázat

Az akne, seborrhoea és hajhullás értékelésére

Akne

1. Izolált pattanások, maximum 10 db
2. Több mint 10 izolált pattanás
3. Csoportos pattanások
4. Összefolyó pattanások

Seborrhoea

1. Mérsékelt
2. Közepes
3. Súlyos

Hajhullás

1. Mérsékelt
2. Szembeszökő megvékonyodás
3. Igen feltűnő megvékonyodás
4. Kopaszság

A találmányban felhasznált előnyös vegyületek közé tartoznak olyan szteroidvegyületek, amelyek androgénreceptorra vonatkozó Ki-értéke kisebb 2×10^{-8} mol/l-nél, és androgénreceptor által közvetített gátló hatást fejtenek ki a ZR–75–1 humán emlőkarcinóma-sejtek növekedésére úgy, hogy a maximális érték felét 3,0 nanomol/l koncentráció alatt érik el, és nem rendelkeznek a fentiekben ismertetett maszkulinizáló hatással. Előnyösen a találmány szerinti androgének nem okozzák az átlagos maszkulinizáló hatás szignifikáns növekedését (például a fenti 1. vagy 2. táblázatban feltüntetett számértékek egyike sem mutat szignifikáns növekedést) nőpáciensekben vizsgálva a három hónapos kezelést követően, ahol az androgén vérkoncentrációit az igényelt koncentrációsáv (v. határok) maximumán tartottuk (például 50 nmol/l). A legtöbb nőpáciensnél, akiknél a kezelés előtt vagy nem volt maszkulinizáló hatás észlelhető vagy az összpontértékük 10 vagy annál kevesebb volt az 1. táblázatban feltüntetett mind a 11 helyet figyelembe véve, a jelen találmány szerinti kezelés alatt általában nem változott ugyanazon pontértékük. Eszerint a három hónapos kezelés után nem lenne észlelhető maszkulinizáló hatás. Azoknál a nőpácienseknél, akiknél már a kezelés előtt mutatkozik maszkulinizáló hatás, várható, hogy ezek a hatások ne erősödjenek a kezelés által.

Annak vizsgálatára, hogy a Ki-értékek 2×10^{-8} mol alatt vannak-e, a Ki-értékeket a következő módon határozhatjuk meg, miközben a különböző vegyületeknek androgénreceptorhoz való affinitását mérjük.

Prosztataszövet preparációja:

200–260 g-os Sprague–Dawley-patkányokból (Crl: CD(SD)Br) (Charles River, St-Constant, Quebec) származó rentális prosztatákat használtunk fel. Az állatokat leölésük előtt 24 órával kasztráltuk. A prosztatákat eltávolításuk után azonnal jégen tároltuk, és az androgénkötő vizsgálathoz használtuk fel.

A citoszol előállítása:

A prosztataszöveteket ollóval finomra vagdaltuk (friss szövet esetén) vagy egy Thermovac rendszerrel porítottuk (fagyasztott szövet esetén), mielőtt A pufferban (Tris, 0,025 mol/l; monotioglicerol, 2 mmol/l; glicerol 10 térf%.; EDTA, 1,5 mmol/l és nátrium-molibdát, 10 mmol/l, pH=7,4) 1:5 tömeg/térfogat arányban homogenizáltuk egy PT-szulfonát-10 homogenizátor segítségével. Ezeket és az összes ezután következő eljárásokat 0–4 °C-on hajtjuk végre. A homogenizátumot 105 000 g-vel 1 órán keresztül centrifugáljuk, hogy a felülúszóban a citoszolfrakciót létrehozzuk.

Citoszol androgénreceptor-vizsgálat:

100 µl-es mennyiségeket inkubáltunk 0–4 °C-on 18 órán keresztül 100 µl 3 mmol/l-es [^{3}H]T-vel vagy [^{3}H]R1881-gyel a vizsgálandó, jelöletlen androgénvegyület növekedő koncentrációinak jelenlétében, vagy annak hiányában. Az inkubálás végén a szabad és kötött T-t vagy R1881-et 200 µl dextránnal bevont csontszénnel (1% csontszén, 0,1% dextrán T–70; 0,1% zselatin; 1,5 mmol/l EDTA és 50 mmol Tris (pH=7,4) választottuk szét 15 percig, a 2300 g-vel végzett további 15 perces 0–4 °C-on történő centrifugálás előtt. A felülúszó egyenlő mennyiségeit (350 µl) áttettük szcintillációs üvegekbe 10 ml vizes számlálófolyadékkal (Formula 963, New England Nuclear), mielőtt Beckman LS 330 számlálóval (30%-os hatékonyság tríciumra) megszámláltuk.

A Ki-érték kiszámolása:

A látható gátlási konstans (apparent inhibition constant) „Ki"-értékeket a $Ki=IC_{50}/(1+S/K)$ egyenlet szerint számoljuk ki (Cheng és Prusoff, Biochem. Pharmacol. 22: 3099–3108, 1973). Ebben az egyenletben az S a [^{3}H]T vagy [^{3}H]R1881 koncentrációját jelenti, a K a T vagy R1881 disszociációs állandója (K_D), és az IC_{50} a jelöletlen vegyület azon koncentrációja, amely a T- vagy R1881-kötés 50%-os gátlását okozza. Számos vegyületre vonatkozó Ki-érték ismertetett az irodalomban. Lásd például Ojasso és munkatársai, J. Ster. Biochem. 27: 255–269, 1987; Asselin és munkatársai, Cancer Res. 40: 1612–1622, 1980; Tóth és Zakar J. Steroid Biochem. 17: 653–668, 1982. Hasonló eredményt adott a következőkben leírt eljárás: Poulin és munkatársai, Breast Cancer. Res. Treatm. 12: 213–225, 1988.

Az adott vegyület azon koncentrációjának meghatározása céljából, amelynél a humán ZR–75–1 emlőkarcinóma-sejtek növekedésére az androgénreceptor közvetítette gátló hatás maximumának felét éri el, a következő eljárás használatos, amint azt Poulin és munkatársai részletesen ismertetik a Breat Cancer Res. Treatmentben (12: 213–225, 1988).

A sejtkultúrák fenntartása:

A ZR–75–1 humán emlőkarcinóma-sejtvonal az American Type Culture Collectionből (Rockville, MD) szerezhető be. A sejteket szokásos módon fenolvörösmentes RPMI–1640 közegben tenyésztjük, amelyet 10 nmol/l E_2, 15 mmol/l Hepes, 2 mmol/l L-glutamin, 1 mmol/l nátrium-piruvát, 100 NE (nemzetközi egység) penicillin/ml, 100 µg streptomicin-szulfát/ml és 10 térfogat% fötális marhaszérum (FBS) egészít ki egy vízgőzzel telített 95% levegő-, 5% CO_2-atmoszférában 37 °C-on.

A sejtkultúrákat a logaritmikus növekedési fázisukban gyűjtöttük össze 0,05% tripszin/0,02% EDTA-val (tömeg/térfogat%) Hanks-féle kiegyensúlyozott sóoldatban és olyan E_2-es fenolvörösmentes RPMI–1640 közegben reszuszpendáltuk, amely 5 térfogat% dextránnal

bevont csontszénnel kezelt FBS-t és 500 μg/ml marhainzulint tartalmazott, vagy másképpen kiegészített a fent leírtak szerint a sejtkultúra fenntartására. A sejteket 24 lyukú Linbro-kultúra-tányérokra (Flow Laboratories) tettük $0,5-4,0 \times 10^4$ sejt/lyuk végső sűrűségig.

Negyvennyolc órával a tányérokra juttatást követően a szteroidok megfelelő koncentrációit tartalmazó friss SD közeget adtunk hozzájuk. A tesztvegyületek hozzáadásához használatos etanol végső koncentrációja nem haladta meg a 0,12 térfogat%-ot, és nem volt szignifikáns hatása a sejtnövekedésre és -morfológiára. Az inkubációs közeget minden másnap felújítottuk, és a sejteket 12 napi kezelés után tripszinizációval gyűjtöttük össze, ha másképp nem jelöltük. A sejtszám Coulter-számlálóval határozható meg.

Számítások és statisztikai analízisek:

A meglévő ID_{50}-értékeket egy ismétlődő legkisebb négyzetek módszerén alapuló regresszió segítségével (Rodbard, Endocrinology 94: 1427–1437, 1974), míg a látható gátlási állandót (a Ki-értékeket) Cheng és Prusoff szerint (Biochem. Pharmacol. 22: 3099–3108, 1973) számítottuk ki.

Az ábrák rövid leírása

Az 1. ábra összehasonlító grafikon, olyan patkánycsoportban megfigyelt tumorok számát ábrázolja az idő függvényében, amely patkánycsoport tagjait egy, a találmány szerinti eljárással védtünk, azaz 30 mg Depoproverát adagoltunk 1 héttel a dimetil-benz[a]antracén- (DMBA) adagolással végzett tumorindukció előtt, és ezt hasonlítottuk össze egy védelemben nem részesített kontrollcsoporttal.

A 2. ábra összehasonlító grafikon, az ösztradiol stimulálta tumornövekedést mutatja az idő függvényében ovariectomizált patkányokban, összevetve a kezeletlen kontrollcsoporttal. A tumorokat dimetil-benz[a]antracén felhasználásával indukáltuk. Ösztradiolt alkalmaztunk a tumornövekedés serkentésére mind a kezelt, mind a kontroll patkánycsoportnál. A kezelt csoportban minden állat a Depoprovera egyszeri, 30 mg-os szubkután adagját kapta. Az eredményeket a teljes tumoros terület százalékos változása adja mindegyik csoportnál.

A 3. ábra a $CDCl_3$-ban oldott találmány szerinti mikrorészecskék ^1H–mágnesesmagrezonancia-spektruma egy Bruckner AC–F300 FT NMR-spektrométerrel mérve. A keretben a csúcsok alatti területet – $\delta=0,65$ ppm-nél az MPA esetén és $\delta=5,20$ ppm-nél a laktid esetén – a részecskén belüli koncentrációmeghatározásra használjuk az alábbi képlet segítségével:

% MPA (koncentráció)=
$0,28391+0,98720 \times$ [% terület ($\delta=0,65$ ppm)],

ahol a %-os terület meghatározása:

% terület ($\delta=0,65$ ppm)=
($\delta=0,65$ ppm) terület/[($\sigma=5,20$ ppm) terület+($\delta=0,65$ ppm) terület].

A 4. ábra egy standard görbe, a 3. ábrához hasonlóan az NMR adataiból származó koncentrációmeghatározásra a polimer és MPA ismert keverékeinél.

Az 5. ábra a szterikus kizáráson alapuló kromatográfiával (SEC) elkülönített tartós felszabadulást biztosító MPA-mikrogyöngyök kromatogramja koncentrációmeghatározásra.

A 12. percnél (retenciós idő) jelentkező csúcs a tartós felszabadulást biztosító kötőanyagra, míg a 15,6 percnél (retenciós idő) jelentkező csúcs az MPA-ra vonatkozik. Az 5. ábrában látható kisebb ábra egy kalibrációs görbe, melyet PLG/MPA keverék standard koncentrációinál vettünk fel. Az MPA-csúcs alatti területet ábrázoltuk az ismert elegyek és 50:50 arányú poli(DL-laktid-koglikolid) keverékében mért százalékos MPA-tartalom logaritmusának függvényében.

A 6. ábra egy scanning elektronmikroszkópos (SEM) felvétel az MPA-mikrogyöngyökről 350-szeres nagyításnál (6A. ábra), illetve 2000-szeres nagyítás mellett (6B. ábra).

A 7. ábra egy scanning elektronmikroszkópos (SEM) felvétel az MPA-mikrogyöngyök transzverz (átvezető) részéről 1500-szeres nagyításnál (7A. ábra), illetve 5000-szeres nagyítás mellett (7B. ábra).

A 8. ábra mutatja be az MPA-részecskék scanning elektronmikroszkópos módszerrel meghatározott méreteloszlását. A mikrorészecskék mérettartományokkénti százalékos értékét ábrázoltuk a mérethatárok függvényében.

A 9. ábra egy differenciál scanning kalorimetriás (DSC) görbét ábrázol, ahol a hőáram a hőmérséklet függvényében kerül ábrázolásra (a hőáram a minta és a referencia energiája közti különbség egy adott hőmérsékleten; a hőáram egyenesen arányos a minta kalorikus kapacitásával). A görbe megmutatja egy olyan termék üvegesedési hőmérsékletét (TG), amelyben az MPA 65:35 arányú poli(DL-laktid-koglikolid) mikrorészecskékbe van beépítve, úgy, hogy a részecskékben az MPA-koncentráció 33%.

A 10. ábra felső részén 50:50 arányú poli(DL-laktid-koglikolid) molekulatömegének különféle jellemző paramétereinek [M(n–1), Mn, Mw, Mz, M(z+1)] különböző mértékű gamma-sugárzás hatására bekövetkező változását mutatjuk be. Az

ábra alsó részén a polidenzitás (Mw/Mn) változását a gamma-sugárzás függvényében (Mrad) ábrázoljuk.

A 11. ábra az MPA szérumszintjét adja meg az idő függvényében 50:50 arányú poli(DL-laktid-koglikolid) mikrorészecskékbe beépített 50 mg MPA egyszeri szubkután injektálását követően.

A 12. ábra az MPA szérumszintjét adja meg petefészek-eltávolított nőstény Sprague–Dawley-patkányoknak megadott mennyiségű, 50:50 arányú poli(DL-laktid-koglikolid) mikrorészecskékbe beépített MPA (1 nmol/l=0,386 ng/ml) egyszeri szubkután injektálását követően.

A 13. ábra megadja a dimetil-benz[a]antracén (DMBA) indukált emlőkarcinómában szenvedő patkányok százalékos számát az idő függvényében, ahol a patkányokat a DMBA adagolását megelőzően MPA-tartalmú mikrorészecskékkel (30 és 100 mg MPA) vagy csak hordozóval kezeltük.

A szintetikus progesztinek sokrétű endokrin aktivitásának jobb megértése nemcsak azért kívánatos, hogy racionálisabban használhassuk fel az emlő- és endometriumkarcinóma, valamint az endometriosis és csontritkulás megelőzésére és kezelésére, hanem hogy elkerüljük azokat a mellékhatásokat, amelyeket a szteroidreceptorokkal való interakció okoz, és amelyek szükségtelenek a kívánt pozitív hatáshoz.

A többféle szteroidreceptorhoz affinitást mutató szintetikus progesztinek biológiai hatásainak precíz analízise ideális lenne olyan in vitro modellek kiválasztásával, amelyek rendelkeznek minden nagy szteroidcsoport funkcionális receptoraival. E célból mi a ZR–75–1 humán emlőkarcinóma-sejtvonalat választottuk, ami rendelkezik funkcionális ösztrogén-, androgén-, progeszteron- és glukokortikoid-receptorokkal (Vignon és munkatársai, Endocrinol. Metab. 56: 1124–1130) azért, hogy összehasonlítsuk a különböző szteroidreceptor-rendszerek relatív közreműködését a sejtproliferáció szintetikus progesztinek általi gátlásában. Míg az ösztrogének erősen mitogén hatásúak a ZR–75–1 sejtekre (Poulin and Labrie, Cancer Res. 46: 4933–4937, 1986), és specifikusan szabályozzák néhány fehérje expresszióját és/vagy szekrécióját (Dickson and Lippman, Endocr. Rev. 8: 29–43, 1987), az androgének (Poulin és munkatársai, Breast Cancer Res. Treatm. 12: 213–225, 1988), a glukokortikoidok (Hatton, A. C., Labrie, F., publikálatlan eredmények) csakúgy, mint a progesztinek (Poulin és munkatársai, Breast Cancer Res. Treatm. 13: 161–172, 1989) gátolják a proliferációjukat a megfelelő receptorokkal való specifikus interakciókon keresztül.

A receptorok azonosítása (ösztrogén, androgén, progeszteron és glukokortikoid), amelyek felelősek a vegyületek hatásáért, azért szükséges, hogy felbecsüljük ezen vegyületek lehetséges hatásait, beleértve az ellentétes hatásokat is. Így különösen fontos, hogy felbecsüljük a specifikus kölcsönhatásokat az androgénreceptorokkal alacsony koncentrációk mellett, mivel alacsony koncentrációknál nem lépnek interakcióba a glukokortikoid-receptorokkal, így elkerülhetők, illetve minimalizálhatók a másodlagos mellékhatások.

Az emlő- és endometriumsejtek növekedésének gátlására egy módszer az androgénreceptorok aktiválása egy olyan hatékony vegyülettel, amelynek olyan az affinitása a receptorhelyhez, hogy az androgénreceptorhoz alacsony koncentrációban kötődik, míg a lehetséges mellékhatásokkal összefüggésben lévő más csoportba tartozó szteroidreceptorokat nem aktiválja szignifikánsan. Olyan vegyületek kiválasztása szükséges, amelyek maximális affinitást mutatnak az androgénreceptorokhoz, és amelyek nem mutatnak, vagy csak minimális mértékben virilizáló hatást nőkben. Azért, hogy minimálisra csökkentsük ezen vegyületeknek a glukokortikoid- és ösztrogénreceptorokkal való kölcsönhatását, szükséges, hogy a vegyületeket alacsony dózisban alkalmazzuk. Ugyancsak lényeges, hogy olyan szteroidokat válasszunk, amelyek alacsony koncentrációban mutatnak androgén hatást, és nem metabolizálódnak ösztrogénekké in vivo körülmények között, és amelyek az alkalmazott alacsony koncentrációban nem vezetnek az androgénreceptortól eltérő receptorok szignifikáns aktiválásához.

A találmányban használatos vegyületek nagymértékben eltérően viselkednek különféle koncentrációiknál a különböző csoportba tartozó szteroidreceptor-aktiváló képességükre nézve. Gondosan ellenőrzött koncentrációval – a találmány szerint – lehetséges a kívánt receptorok szelektív aktiválása, míg azon receptoroknál, amelyek aktivizálása nem kívánatos, nem okozunk szignifikáns aktiválást. Például, az itt előírt alacsony koncentrációknál az MPA felhasználható az androgénreceptorok kívánt aktiválására, míg a glukokortikoid-aktiválással kapcsolatos mellékhatásokat elkerüljük, ami a korábbi típusú kezeléseknél észlelhető volt.

Ilyenformán a jelen találmány egy új készítményt nyújt az emlő- és endometriumkarcinóma, valamint egyéb, androgénreceptor-aktiválásra reagáló megbetegedések, például csontritkulás és endometriosis megelőzésére és kezelésére. A jelen találmányban az alkalmazott androgénvegyületek mennyisége jóval kisebb, mint a korábbiakban alkalmazott módszereknél az emlő- és endometriumkarcinóma kezelésére.

A találmány szerinti androgének vérkoncentrációjának mérését az alábbiakban ismertetjük.

Azért, hogy a kezelés lehetséges hatásainak meghatározását elősegítsük, mérhetjük a vegyület vérkoncentrációit. Például a plazma medroxi-progeszteron-acetát-(MPA) szintjeinek mérését radioimmunovizsgálattal végezhetjük az alábbiak szerint végzett exrakciót követően.

Antitest-előállítás

144A antitestet termeltettünk nyulakban a 17-hidroxi-progeszteron-3-O-karboxi-metil-oxim-BSA ellen. A radioimmunovizsgálathoz (RIA) használt jelölt szteroid a metil-17α-hidroxi-progeszteron-acetát, 6α[1,2-^{3}H(N)]

volt, amit a NEN-ből szereztünk be (CAT No. NET 480), míg a referenciakészítmény a medroxi-progeszteron-acetát (MPA) volt a Steraloidostól. A felhasznált vizsgálati puffer 0,1% zselatin volt 0,1 mol/l-es nátrium-foszfát, 0,15 mol/l-es nátrium-klorid és 0,1% nátrium-azid pH 7,2-es keverékében. Az extrakciós oldószerkeverék etil:éter-aceton (9:1 térfogatarány) [EEA] volt, míg az LH–20 kromatográfiás oldószerkeverék izooktán:toluol:metanol (90:5:5 térfogatarány) [IOTH] volt.

Az extrakció végrehajtása

Egy ml plazmát kétszer extraháltunk 5 ml EEA-val. Az extraktumokat nitrogénnel szárazra párologtattuk, és a maradékot 1 ml IOTH-ban oldottuk. Az extraktumokat ezután LH–20 kromatográfiának vetettük alá 2 g LH–20 (Pharmacia)-szal töltött 10×30 cm-es oszlopokon (Corning CAT No. 05 722A). A gélt 30 ml IOTH-val mostuk, mielőtt a minta 1 ml-ét hozzáadtuk és IOTH-val eluáltuk volna. Az első 6 ml-t eldobtuk. A következő 10, 16,5 és 27,5 ml-nyi frakciót a sorrendben az I (progeszteron), II (MPA) és III (17-LH-progeszteron) frakciót képezték. A II frakciót párologtatással leszárítottuk, és 1,5 ml vizsgálati pufferban újraoldottuk.

Radioimmunovizsgálat

Minden egyes 12×75 mm-es boroszilikátcsőhöz a következőket adtuk: 0,2 ml 25 000 DPM-et tartalmazó tríciummal jelzett szteroid, 0,5 ml 5–5000 pg referenciakészítmény csövenként vagy 0,5 ml extrahált II frakcióminta, 0,2 ml 1:5000 arányban hígított 144A antiszérum vagy 0,2 ml vizsgálati puffer a nemspecifikus kötődés mérésére. A csöveket ezután egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. Ezután 0,2 ml 2%-os csontszenes Norit-A-t és vízben oldott 2%-os Dextrán T–70-et adtunk hozzá. A csöveket óvatosan összeráztuk, és 10 perc elteltével 2000 g-vel 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót 8 ml Formula 989-cel (NEN:NEF-989) kevertük össze, és a radioaktivitást β-számlálóval számoltuk meg.

Az MPA detektálhatóságának alsó és felső határa 10, illetve 10 000 pg/ml, míg az esés (slope) (LOGIT-LOG) –2,2 és az ED_{50}-érték 315 pg/ml. A nemspecifikus és a nettó kötődés 1,5, illetve 45%. A 144A antitest erősen specifikus az MPA-ra, míg a keresztreakció kevesebb mint 0,1% progeszteron, 20α-OH-Prog, pregnenolon, 17-OH-pregnenolon, DHT, androszténdion, tesztoszteron, 3a-diol, ösztron, ösztradiol és kortizol esetén.

Számítások és statisztikai adatok

A RIA adatait a Roadbard és Lewald II modelljén alapuló program felhasználásával elemeztük (2. Karolinska Symposium Genf, 1970, 79–103. old). A plazma MPA-szintjeit általában az egyes minták kétszeri mérésének átlaga±SEM (az átlag standard hibája) értékeként mutatjuk be. A statisztikai szignifikanciát Duncan-Kramer (Kramer, C. Y., Biometrics 12: 307–310, 1956) többintervallumos tesztje szerint mérjük.

A tesztvegyület relatív hatása a különböző receptorokra

A lehetséges vegyületeknek a különböző szteroidreceptorokra kifejtett hatásának meghatározására a szintetikus progesztinek és anabolikus szteroidok androgén-, glukokortikoid-, progeszteron- és ösztrogénreceptor közvetítette hatását mérhetjük a ZR–75–1 humán emlőkarcinóma-sejteken a sejtnövekedést, illetve a GCDFP–15 és GCDFP–24 válaszokat használva a válasz paramétereiként (Poulin és Labrie, Cancer Res. 46: 4933–4937, 1986; Poulin és munkatársai, Breast Cancer Res. Treatm. 12: 213–225, 1988, Poulin és munkatársai, Breast Cancer Res. Treatm. 13: 161–172, 1989; Poulin és munkatársai, Breast Cancer Res. Treatm. 13: 265–276, 1989; Simard és munkatársai, Mol. Endocrinol. 3: 694–702, 1989; Simard és munkatársai, Endocrinology 126: 3223–3231, 1990).

A következő jellemzők teszik lehetővé a progeszteronreceptor- (PgR) aktivitás mérését:

1. Inzulin hozzáadása teljesen felfüggeszti a progesztin R 5020 és a PgR kölcsönhatásán alapuló gátlást a ZR–75–1 sejtekben.

2. Az R 5020 antiproliferatív hatása csak E_1-gyel stimulált körülmények között figyelhető meg.

A ZR–75–1 sejtek növekedésének ezen két tulajdonsága teszi lehetővé annak vizsgálatát, hogy meddig terjednek a vizsgált vegyület hatásai a ZR–75–1 sejtekre, ami a PgR-rel való kölcsönhatásainak tulajdonítható, azáltal, hogy felbecsüljük az inzulin- és/vagy ösztrogénhozzáadás hatását a növekedésre, amit a ZR–75–1 sejtek tesztvegyületekkel történő 15 napos inkubálásának végén mérünk.

Másrészt az ösztrogénreceptor (ER) részvételét direkt módon is mérhetjük úgy, hogy a ZR–75–1 sejteket megfelelő közegben ösztrogén jelenlétében vagy hiányában inkubáljuk.

Azért, hogy elemezzük a szintetikus progesztinek vagy az anabolikus szteroidok androgénreceptorral (AR) és glukokortikoid-receptorral (GR) való kölcsönhatásait a sejtnövekedést gátló hatásukra vonatkozóan, előnyt jelent az androgének és glukokortikoidok antiproliferatív hatásainak összeadódása ebben a sejtvonalban (Poulin és munkatársai, Breast Cancer Res. Treatm. 12: 213–225, 1988; Hatten és Labrfie, F., nem publikált adatok). Így az AR-t lehet például telíteni 5α-dihidrotesztoszteronnal (DHT), és ezután mérni egy vélt glukokortikoid-sejtproliferációra tett hatását.

Másrészt egy vélt androgén hatását hasonló módon mérhetjük a GR-ok dexamethasonnal (DEX) történt telítését követően. Az ily módon a tesztvegyülettel mért növekedést gátló aktivitás specificitása ugyancsak megbecsülhető a vegyület reverzibilitása révén a megfelelő antagonista (azaz antiglukokortikoid vagy antiandrogén) használatával.

Így az androgénfelesleg (1 μmol DHT), valamint E_2 és inzulin jelenlétében a glukokortikoid-hatásokat mérhetjük fel pontosan és más receptorokkal való interakció nélkül. Ugyanez vonatkozik az AR szerepének vizsgálatára, amikor is a sejteket glukokortikoid-felesleg (3 μmol/l DEX), valamint E_2 és inzulin jelenlétében inkubáljuk. Amint a részletes kinetikai vizsgálatok mutatják, 1 μmol/l DHT és 3 μmol/l DEX fejt ki maximális gátló hatást az AR-ra, illetve a GR-ra.

Továbbá a progesztinek lehetséges antagonista hatásait, melyeket az AR-on és GR-on keresztül fejtene ki,

meghatározhatjuk mindkét receptorrendszernek DTH-val és DEX-szel való telítésével úgy, hogy az egyik ligand jóval nagyobb feleslegben van, mint a másik.

Az összes kísérletet olyan ZR–75–1 sejtekkel végeztük, amelyek inzulint tartalmazó E_2-vel kiegészített közegben növekedtek, hogy megelőzzük a progesztinek PgR-en keresztül kifejtett hatását a sejtnövekedésre.

Az előzőekben ismertetett technikák felhasználásával azt találtuk, hogy számos androgénvegyület, amelyek más receptorokat is aktiválnak (például glukokortikoid- vagy progeszteronreceptorokat), a koncentrációtól függően változó relatív hatást fejtenek ki a különböző receptorokra. Az itt közölt koncentrációtartományban maradva a találmány szerinti vegyületek jó hatást fejthetnek ki az androgénreceptorokra anélkül, hogy lényeges nemkívánatos hatást okoznának más receptorokon keresztül.

Az itt ismertetett eljárásokkal gyógyítható betegek kiválasztása

Az emlőkarcinóma jelenlétét általában magának az emlőnek a vizsgálatával és/vagy mammográfiával állapítják meg. Másrészt az endometriumkarcinómát általában endometriumbiopsziával diagnosztizálják. Mindkét karcinóma diagnosztizálható és értékelhető a témában tájékozottak számára jól ismert standard fizikai eljárásokkal például csontscan, mellkasröntgen, a csontrendszer vizsgálata, máj-ultrahangvizsgálat, másfajta scan (ha szükséges, CAT scan, MRI) és fizikális vizsgálat. Az endometriosis diagnosztizálható a nőknél a menstruációval kapcsolatosan fellépő fájdalom vagy egyéb tünetek fellépésének követésével, míg végleges diagnózishoz laparoszkópiával és időnként biopsziával juthatunk.

Másrészt a csontsűrűség a szakmában járatosak számára jól ismert standard eljárásokkal mérhető, alkalmazható például QDR (Kvantitatív Digitális Radiográfia), kettős foton-abszorpciometria és komputertomográfia. Továbbá plazma és vizelet kalcium- és foszfátszint, plazma alkalikusfoszfatáz-, kalcitonin- és parathormon-koncentráció, valamint vizelet hidroxi-prolin és kalcium/kreatinin arány.

Emlő- vagy endometriumkarcinóma, osteoporosis vagy egyéb módon elégtelen csonttömeg és más, androgénreceptor-aktiválással kezelhető betegségek kezelhetők a jelen találmány szerinti készítményekkel, illetve azokkal profilaktikusan megelőzhetők az itt ismertetettek szerint.

A jellemzően megfelelő androgénvegyületek közé tartozik a 6α-metil,17α-acetoxi-progeszteron vagy medroxi-progeszteron-acetát, ami Upjohn és Farmitalia Carlo Erba S. p. A.-tól szerezhető be. Provera, Depoprovera vagy Fartutal gyári neveken MPA kezdőbetűkből alkotott néven.

Egyéb jellemzően alkalmas androgénvegyület a megestrol-acetát (17α-acetoxi-6-metil-pregna-4,6-dién-3,20-dion), ami Mead Johnson & Co., Evanswille, Ind.-től szerezhető be Megace gyári néven.

Az androgénvegyület előnyösen gyógyászati készítményként helyileg, parenterálisan vagy szájon keresztül alkalmazandó. A vegyületet alkalmazhatjuk parenterálisan, azaz intramuszkuláris vagy szubkután injekcióban, vagy bejuttathatjuk orrcsepp, kúp formájában, vagy ahol alkalmas, intravaginálisan vagy bőrön keresztül gél vagy tapasz alkalmazásával, vagy más megfelelő módon. Az androgénvegyület elhelyezhető mikrokapszulában vagy köthető egy biokompatibilis, biológiai úton lebontódó polimerhez, például poli(D,L-laktid-koglikolid), és szubkután vagy intramuszkulárisan injektálható egy úgynevezett szubkután vagy intramuszkuláris depótechnikával, hogy a vegyület állandó lassú felszabadulása biztosított legyen 30 napos vagy még hosszabb periódusra. Az orális úton túl előnyös módja a vegyület adagolásának a szubkután depóinjekció. A Depoprovera relatíve állandó arányban szabadulhat fel kb. három hónapig a vizes diszpergátum intramuszkuláris beadását követően.

Mindegyik alkalmazott vegyület mennyiségét a kezelőorvos határozza meg figyelembe véve a páciens állapotát és korát, továbbá mindegyik résztvevő hatását és egyéb tényezőket. Az emlő- és endometriumkarcinóma, valamint a csontritkulás megelőzésére jelen találmány szerint a következő dózisintervallumok alkalmazhatók.

Az androgénkészítmény előnyösen napi dózisban adagolandó, amiből kevesebb mint 25 mg aktív androgén szteroid szabadul fel 50 testsúlykilogrammonként. 1–10 mg/50 testsúly-kg adagolás kívánatos, különösen 3–7 mg (például 5 mg). A választott dózis előnyösen a szérumkoncentrációt 50 nanomol/l alatt tartja, előnyösen 1 nanomol/l és 10, 15 vagy 25 nanomol/l között a páciens reakciójától függően. Az ezen szintek fenntartásához szükséges dózisok páciensről páciensre változóak lehetnek. Ajánlatos, hogy a kezelőorvos ellenőrizze a szinteket az itt ismertetett eljárásokkal, és ennek megfelelően optimalizálja az adagolást. Profilaktikus célra az androgén adagolását előnyös a menopausa körüli időszakban kezdeni az emlő- és endometriumkarcinóma és a csontritkulás megelőzésére egészséges nőknél. Az androgén alkalmazható megfelelő mennyiségű ösztrogénnel együtt, ami a menopausa egyéb jeleinek és tüneteinek megelőzésére szolgál. Azon nőknél, akiknél az ösztrogénképzést és/vagy -hatást blokkoljuk endometriosis, leiomyoma, emlőkarcinóma, méhrák, petefészekrák vagy egyéb ösztrogénérzékeny megbetegedés kezelése céljából, az androgén adagolása bármely időpontban kezdődhet, előnyösen az ösztrogének blokkolásával egy időben.

Az androgéneket intramuszkuláris vagy szubkután depóinjekció céljára mikrokapszulában állíthatjuk elő egy biokompatibilis, biológiai úton lebomló polimerben, például: poli(D,L-laktid-koglikolid)-ban, egyebek között egy fázisszeparációs eljárással vagy pellet vagy rudacska formájában. A mikrogyöngyöket azután szuszpendálhatjuk egy vivőanyagban, hogy egy injektálható készítményt kapjunk, vagy a depó injektálható pellet vagy rudacska formájában. Lásd az EPA 58481 számú európai szabadalmi bejelentést is, amit 1982. augusztus 25-én publikáltak, és amelynek témája szilárd készítmények szubdermális injekció vagy beültetés céljára, illetve folyékony készítmények intramuszkuláris vagy szubkután injekciók céljára, amelyek biokompatibilis, biológiai úton lebomló polimereket tartalmaznak, mint pél-

dául laktid-glikolid-kopolimer és aktív vegyületek. Ezek a készítmények a vegyület szabályozott felszabadulását teszik lehetővé.

A jelen találmányban használatos androgéneket általában a konvencionális gyógyászati adalék anyagokkal állíthatjuk elő, mint például permetezve szárított laktóz- és magnézium-sztearát-tablettákhoz vagy -kapszulákhoz, orális adagolás céljára.

Az aktív vegyület feldolgozható tablettákká vagy drazsévá szilárd, porított vivőanyagokkal összekeverve, mint például nátrium-citrát, kalcium-karbonát vagy dikalcium-foszfát, és ragasztóanyagokkal, mint például poli(vinil-pirrolidon), zselatin vagy cellulózszármazékok, lehetőleg kenőanyagok hozzáadásával, mint például magnézium-sztearát, nátrium-lauril-szulfát, „Carbowax" vagy polietilénglikol. Természetesen ízjavító anyagok is hozzáadhatók az orális adagolású készítmények esetében.

További készítményként alkalmazhatók plug kapszulák, például keményzselatinból csakúgy, mint lágyzselatinból, ami egy lágyítót vagy plasztícitást biztosító anyagot, például glicerint tartalmaz. A plug kapszulák az aktív anyagot előnyösen granulátum formájában tartalmazzák például töltőanyagokkal, mint például laktóz, szacharóz, mannit, keményítőkkel, mint például burgonyakeményítő vagy amilopektin, cellulózszármazékokkal vagy erősen diszpergáló kovasavakkal keverve. A lágyzselatin-kapszulákban az aktív anyag előnyösen megfelelő folyadékban oldott vagy diszpergált, mint például növényi olajokban vagy folyékony polietilénglikolokban.

Orális adagolás helyett az aktív vegyületet alkalmazhatjuk parenterálisan. Ilyen esetben az aktív anyag oldatát használhatjuk például szezámolajban vagy olívaolajban. Az aktív anyagot előállíthatjuk mikrokapszulában vagy egy biokompatibilis, biológiai úton lebomló polimerhez kötve, ami lehet például poli(D,L-laktid-koglikolid) és szubkután vagy intramuszkulárisan injektálható egy szubkután vagy intramuszkuláris depónak nevezett technikával, ami a vegyület(ek) állandó, lassú felszabadulását biztosítja kéthetes vagy annál hosszabb időtartamra.

Tekintettel arra, hogy leggyakrabban olyan elnyújtott felszabadulású gyógyászati készítményt célszerű előállítani, amely 28 nap alatt adja le a hatóanyagot, egy ilyen előnyös készítmény grammonként 200–700 mg, előnyösebb 300–600 mg MPA- vagy MGA-hatóanyagot tartalmaz (és a készítmény grammonként és naponta kb. 4–25 mg, előnyösen 6–22 mg hatóanyagot ad le, ezzel biztosítva a kívánt szérumkoncentrációt).

A fenti terápiát követően az ismertetett utasításokat betartva az emlő- és endometriumkarcinóma növekedése csakúgy, mint a csontritkulás és az endometriosis megállítható, míg a nemkívánatos mellékhatások minimálisak maradnak. Az ismertetett utasítások alkalmazása ugyanezen megbetegedések kifejlődését is megelőzheti.

A találmánynak megfelelő felhasználásra alkalmas szabályozott felszabadulású kötőanyagok közé tartozik bármely biokompatibilis szabályozott felszabadulású anyag, amely közömbös az aktív résztvevőre, és amely képes beépíteni az aktív anyagot. A területen számos ilyen anyag ismert. Előnyös szabályozott felszabadulású kötőanyagok azok az anyagok, amelyek lassan metabolizálódnak fiziológiai körülmények között, miután emlősökbe szubkután vagy intramuszkulárisan injektáltuk őket (azaz az ott jelen lévő testfolyadékok jelenlétében). A kötőanyag lehet például olyan, amelynek a biológiai lebomlási ideje elég lassú ahhoz, hogy a kötőanyag tiszta mikrogyöngyei (azaz szteroid vagy más aktív résztvevő nélkül), amelyeknek átlagos átmérője 20 mikron fölött van, nem bomlanak le teljesen legalább egy hónapig a szubkután vagy intramuszkuláris injektálást követően. Az alkalmas kötőanyagok közé tartoznak (de nem korlátozódnak ezekre) az e területen korábbiakban elnyújtott felszabadulású készítményekben alkalmazott biokompatibilis polimerek és kopolimerek. Ezek a biokompatibilis vegyületek nem toxikusak, és közömbösek a környező szövetekre a szubkután vagy intramuszkuláris injekciót követően, és nem váltanak ki szignifikáns nemkívánatos hatásokat, mint immunválasz, gyulladás és hasonlók. Olyan metabolikus termékekké bomlanak le, amelyek ugyancsak biokompatibilisak és könnyen eliminálódnak a szervezetből.

Például hidrolizálható észterkapcsolást tartalmazó kopolimerből és homopolimerből származó polimer anyag használható. Számos ilyen anyag ismert a területen, amelyek biológiai úton bomlanak, és bomlástermékeik nem vagy kevéssé toxikusak. Általában ilyen előnyös polimerek a poliglikolsavak (PGA) és politejsavak (PLA), poli(DL-tejsav-koglikolsav), (DL PLGA), poli(D-tejsav-koglikolsav) (DPLGA) és poli(L-tejsav-koglikolsav) (LPLGA). A tejsav- és glikolsavpolimerek előnyös aránya a poli(tejsav-koglikolsav)-ban 100:0 (azaz tiszta polilaktid) és 50:50 szélső értékek között van. További használható biológiai lebomlású vagy biológiai úton károsodó polimerek közé tartoznak (de nem korlátozódnak ezekre) az alábbi polimerek: poli(ε-kaprolakton), poli (ε-kaprolakton-CO-tejsav), poli(ε-kaprolakton-CO-glikolsav), poli(β-hidroxi-vajsavsav), poli(alkil-2-ciano-akrilát), hidrogélek, mint poli(hidroxi-etil-metakrilát), poliamidok, poliaminosavak (azaz α-leucin, glutaminsav, α-aszparaginsav és hasonlók), poli(észter-karbamid), poli(2-hidroxi-etil-DL-aszpartamid), poliacetálpolimerek, poli(orto-észter)-ek, polikarbonát, polimaleamidok, poliszacharidok és ezek kopolimerjei. Számos alkalmas anyag kapható a kereskedelemben például poli(tejsav-koglikolid) (beszerezhető a Birmingham Polymer Inc.-től, Birmingham Al. vagy a Dupont Companytól, Washington DC.).

A találmány szerinti prolongált felszabadulású részecskék aktív résztvevőjének felszabadulásának mértéke úgy van megállapítva, hogy alapvetően állandó szérumkoncentrációt biztosítson. Ha a találmány szerinti alacsony dózisú androgént alkalmazzuk, az androgén a kötőanyag révén olyan mértékben szabadul fel, ami az említett androgén szérumszintjeit 1 és 50 nanomol/l között tartja fenn, általában 1 és 25 között, előnyösen 1 és 15 között, és legelőnyösebben 1 és 10 nanomol/l között, amennyiben az alábbiakban ismertetésre kerülő

standard körülmények között alkalmazzuk. A standard körülmények meghatározása (csak az itt ismertetett prolongált felszabadulású részecskék jellemző felszabadulási mértékének mérésére korlátozódó célból):

10 mg részecske (20 mg gyógyászati készítmény formájában, ahol a részecskék tömegének aránya a 2 tömeg%-os vizes karboxi-metil-cellulóz-vivőanyag tömegéhez 1:1) perkután injektálunk fiatal nőstény Sprague–Dawley-patkányok hátába. Ezután az androgén szérumkoncentrációját a patkányokból periodikusan vett szérumminták alapján mérjük; a mintavételt a beadás után 48 órával kezdjük, és a beadás után 28 nappal végezzük utoljára, hogy meggyőződjünk róla, hogy a szérumszintek ezen időtartam alatt a kívánt sávban maradnak fenn.

A prolongált felszabadulású részecskék felszabadulásának mértékét megváltoztathatjuk a szakterületen ismert számos paraméter egyikének (vagy a paraméterek kombinációjának) megváltoztatásával, hogy a felszabadulás mértékét módosítsuk. Ezen paraméterek közé tartoznak (de nem korlátozódnak ezekre) a prolongált felszabadulású kötőanyag összetétele, a részecske mérete és aktív vegyület tartama. Például ismert, hogy a polilaktid-kötőanyag lassabban hidrolizálódik, és ennélfogva (azonos paraméterek mellett) az aktív résztvevőt lassabban szabadítja fel, mint a tejsav és a glikolsav kopolimerjei. Az ilyen kopolimereknél a felszabadulás mértéke nő a glikolid mólarányának növelésével. Egyenlő tömegű részecske esetén a felszabadulás mértéke nő a részecske méretének csökkenésével, mert nagyobb összfelszínt (összeadódik az összes részecskéé) képeznek a kisebb részecskék. Hasonlóan, az aktív vegyület százalékos arányának növelése a részecskében megnöveli a felszabadulás mértékét. Ezeket a paramétereket ismert módokon meg is változtathatjuk, hogy ellenőrizzük a felszabadulás időtartamát. A prolongált felszabadulású gyógyászati készítmények előállításának részletes ismertetését nyújtja F. Lim (F. Lim, Biomedical Application of Microencapsulation, Franklin Lim, ed., CRC Press, Boca Raton, 1984); itt a teljes leírásra referenciaként hivatkozunk.

A fentiekben ismertetett standard körülmények és mérések csak a részecskékre jellemző felszabadulás mértékére vonatkoznak, és csak definíciószerűek. Az alkalmas felszabadulási mértékű részecskék, amint itt részletesen ismertettük, különféle formában állíthatók elő, és különböző módokon alkalmazhatjuk őket. Felhasználásuk különböző lehet, és széles dózissávban alkalmazhatók (lásd alább). A részecskék biztosíthatják az aktív résztvevő felszabadulását rövid időtartamra, mint például 28 nap vagy akár lényegesen hosszabb periódusra, például 2 hónap, 3 hónap, 6 hónap vagy még tovább. Más szóval, míg a részecskéknek fenn kell tartaniuk a vérszintet 28 napig, de előnyösen úgy alakítjuk, hogy ezeket a vérszinteket lényegesen hosszabb ideig biztosítsák.

A dozírozás változó lehet, amit a kezelőorvos állapít meg, hogy a szérumszinteket a kívánt szinten tartsuk, például az androgén esetében 1 és 50 nanomol/l közötti értéken. Szükséges, hogy a humán dózis hasonló keringő szérumszintet biztosítson, mint amilyet a patkányoknál biztosít standard körülmények között, így körülbelül a patkánydózis 30-szorosára van szükség, bár ez változó a páciensek egyéni metabolizmusa miatt. Így például azok a prolongált felszabadulású MPA-részecskék, amelyek 30 nanomólos szérumkoncentrációt tartanak fenn 10 mg injekciót követően patkányban standard körülmények között, várhatóan körülbelül 30 nanomól koncentrációt fognak biztosítani emberben 300 mg-os injekció után, 20 nanomólos koncentrációt 200 mg-os injekció után, 15 nanomólos koncentrációt 150 mg injekció után stb. Az előző dózisok a prolongált felszabadulású részecskék tömegét jelentik, és nem tartalmaznak vivőanyagot. A kész gyógyászati készítmény dózisait a vivőanyag figyelembevételével kell megállapítani. Például, ahol 100 mg dózis kell a részecskékből, egy olyan készítményt, ami 1:1 arányban tartalmazza a részecskéket és a vivőanyagot, 200 mg-os dózisban kell alkalmazni. Hasonló módon, a dózist módosítani kell a prolongált felszabadulású részecskék felszabadulási mértékétől függően standard körülmények között. Azért, hogy ugyanazt a szérumkoncentráció-szintet biztosítsuk, az 5 nanomól felszabadulási mértékű részecskéket (standard körülmények között) például körülbelül kétszeres mennyiségben kell alkalmazni, mint a 10 nanomól felszabadulási mértékű részecskéket (standard körülmények között).

Általában a kezelőorvos olyan dózissal kezdi a kezelést, ami várhatóan az aktív résztvevő szérumszintjét 1 és 10 nanomól, például 3–7 nanomól között tartja fenn. A páciens reakciójától függően a dózis ezután emelhető vagy csökkenthető. Előnyös, ha rövid hatástartalmú részecskéket (például kb. 28 nap) használunk, amíg az optimális dózist megállapítjuk. Ezután hosszabb hatástartalmú prolongált felszabadulású részecskéket adagolhatunk olyan dózisban, amely az optimális vérszintet tartja fenn. A dózis természetesen módosítandó a fentieknek megfelelően a standard felszabadulási mértékek különbsége szerint, ami a rövidebb, illetve hosszabb hatástartalmú részecskék között van.

Az androgének közül választott előnyös aktív vegyület a medroxi-progeszteron-acetát (6α-metil,17α-acetoxi-progeszteron) vagy „MPA", ami egyebek között Upjohn és Farmitalia Carlo Erbatol, S. p. A. szerezhető be Provera, Depoprovera vagy Farlutal gyári neveken; és a megestrol-acetát (17α-acetoxi-6-metil-pregna-4,6-dién-3,20-dion) vagy „MGA", ami többek között a Mead & Co.-tól szerezhető be Megace gyári néven.

Előnyös, ha a prolongált felszabadulású részecskék nagyjából gömb alakúak. Ezt úgy érhetjük el például, hogy az aktív résztvevőt és a prolongált felszabadulású kötőanyagot szerves oldószerben oldjuk, majd az oldatot rázás közben vízbe juttatjuk. A kötőanyag kis mikrogyöngyei, amelyek az aktív résztvevőt magukban diszpergálva tartalmazzák, azáltal képződnek – lévén a mikrogyöngyök vízben nem oldódnak –, ha vízfelesleget alkalmazunk. A mikrogyöngyök nem tartalmaznak szignifikáns mennyiséget a szerves oldószerből, mindaddig, amíg a szerves anyag vízzel keverhető. Felületaktív anyagot adhatunk hozzá, hogy elősegítsük a mikro-

gyöngyök elkülönülését az oldószertől a vízben való mikrogyöngyképződés ideje alatt. Az átlagos mikrogyöngyméret növelhető a rázás erősségének csökkentésével, és csökkenthető erősebb rázással.

A páciensnek való adagolásnál a könnyebb injektálhatóság kedvéért, valamint hogy azután a nemkívánatos fennmaradó szerves oldószer eltávolítását elősegítsük, kisebb mikrogyöngyök kívánatosak. Általában a mikrogyöngyök átlagos mérete 5 és 40 μm között van, előnyösen 9 és 28 μm között.

Egy előnyös megjelenési formában az MPA rögzítését úgy érjük el, hogy metilén-kloridba kevert MPA-t és polimert tartalmazó mikrocseppecskék vizes szuszpenzióját állítjuk elő. A polimer lehet például tejsav és glikolsav 50:50 arányú kopolimerje. A mikrogyöngyök képződését egy felületaktív anyag szabályozza, mint például a poli(vinil-alkohol). A cseppecskéket megszilárdítjuk a metilén-klorid eltávolításával, amit nagy mennyiségű vízzel extrahálunk; ez a cseppeknek jobb formát biztosít, mint az általában alkalmazott vákuumpárologtatásos módszer. A mikrogyöngyök méretét a felületaktív anyag mennyiségével szabályozzuk, és a szuszpenziókeverék rázási sebességével.

A részecskeméret szélsőérték-megoszlása változó lehet, de egy szűk és egységesebb sáv kívánatos. Előnyösen a részecskéknek legalább 90%-a 1 és 10 μm között van. Legelőnyösebb, ha legalább 90% 9 és 28 μm között van. Ez úgy értelmezendő, hogy a mikrogyöngyök mérete az egyes mikrogyöngyök átmérőjét jelenti, még ha nemkívánatos agglomerátum képződne is más mikrogyöngyökkel. Szabálytalan alakú részecskék mérete alatt a részecske (bármely) két pontja között húzható leghosszabb egyenes átmérőt értjük. A méret a részecskék egy reprezentatív mintájának elektronmikroszkópos vizsgálatával mérhető.

Megfelelő szerves oldószerek a mikrogyöngyök előállítására (de nem kizárólagosan) az alábbiak: metilén-klorid, etil-acetát, aceton, dietil-éter, tetrahidrofurán, hexafluor-aceton, hexafluor-izopropanol, acetonitril és az oldószerek keverékei. Megfelelő felületaktív anyagok, amelyeket a mikrogyöngyök előállításának első lépcsőjénél használunk az aktív anyagnak oldószerkivonással való mikrorészecskébe juttatásához összhangban a 3. példában leírtakkal, a következők (de nem kizárólagosan): poli(vinil-alkohol), poli(vinil-pirrolidon), karboxi-metil-cellulóz, zselatin, keményítő, talkum, magnézium-szulfát, kalcium-karbonát és ionos szerek. A felületaktív anyagot előnyösen 1 és 10 térfogat% körüli mennyiségben adagoljuk vízben.

Minthogy a víz:oldószer (beleértve az oldott kötőanyagot is) arány változó lehet, nagy mennyiségű víz (például a víz:oldószer arány 5–20 térfogat% vagy több) alkalmazása előnyös.

A kötőanyagot az oldószerhez előnyösen kb. 1–20 térfogat% koncentrációban adjuk hozzá az oldékonyságtól függően. Előnyösen az oldószer mennyisége a körül a minimum körül mozog, ami ahhoz szükséges, hogy a kötőanyag és az aktív résztvevő teljesen oldódjanak. Ha az oldódás nem teljes, adalék oldószert adhatunk hozzá. Az aktív résztvevő és a kötőanyag arányát a részecske által hordozott aktív résztvevő kívánt mennyiségi aránya határozza meg, ami előnyösen 1:4 és 7:3 (tömeg/tömeg) között változik, még előnyösebben 3:7 és 3:2 között. A hordozott aktív résztvevő mennyiségi arányát úgy választhatjuk meg, hogy befolyásoljuk a prolongált felszabadulású készítmény felszabadulási sebességét, vagy a felszabadulás tartamát vagy a területen ismert más paramétert.

A mikrogyöngyök előállításánál, amikor a 3. példában ismertetett oldószer-extrakciós mikrokapszulálást alkalmazzuk, az előnyös oldószer a medroxi-progeszteron-acetát és a polimer vagy kopolimer oldására a metilén-klorid, de más olyan oldószer, amely részben vízzel keverhető és kismértékű humán toxicitással rendelkezik, ugyancsak alkalmas (például etil-acetát, aceton, dietil-éter, tetrahidrofurán, hexafluor-aceton, hexafluor-izopropanol, acetonitril és ezen oldószerek keverékei). Továbbá az oldószer toxicitása nem szignifikáns faktor, ha az oldószert alaposan eltávolítjuk az itt ismertetett oldószer-eltávolító technikákkal. Az előnyös felületaktív anyag a poli(vinil-alkohol), de más felületaktív anyag is megfelelő: polimerizált diszpergálószerek [azaz poli(vinil-pirrolidon), karboxi-metil-cellulóz, zselatin, keményítő], talkum, magnézium-szulfát, kalcium-karbonát és ionos szerek.

A mikrorészecskéket előállíthatjuk öntéses eljárással is, ahol az MPA és polimer vagy kopolimer oldatát egy alkalmas oldószerbe (például a fent ismertetett oldószerek egyikébe) öntjük. Ezután az oldószert 10^5 Pa nyomáson elpárologtatjuk. Az így nyert filmet melegítjük, és egy dróthálón keresztülpréseljük. A kapott rudacskákat és részecskéket mikrorészecskékké őröljük. A mikrorészecskéket mérethatárok szerint szétválaszthatjuk egy megfelelő molekuláris szűrőn keresztül. Az átlagos méret általában 1 és 250 μm között van, előnyösen 5 és 100 μm között, és még előnyösebben 9 és 28 μm között. Az oldószer eltávolítását csakúgy, mint az injektálás egyszerűségét elősegíti a kisebb részecskék alkalmazása, előnyösen abban az esetben, ha az átlagos méret (és a részecskék 90%-a) kisebb, mint 40 μm.

A jelen találmánynak megfelelően az előnyös gyógyászati készítményben a mikrorészecske által hordozott aktív résztvevő aránya 20 és 70% MPA vagy MGA között van, még pontosabban 30 és 60% között. Az aktív résztvevő és a kötőanyag aránya előnyösen 1:4-től 7:3-ig terjed, például 3:7–3:2.

Más vegyületeket tartalmazó szabályozott felszabadulású készítmények előállításához használatos általános eljárásokról találhatók információk a következő művekben: Kitchell és Wise In Methods in Enzymology, Academic Press, 112. kötet, 436–448; Beck és Tice, In Long Acting Steroid Contraception (D. R. Mishell Jr., ed), Raven Press: New York, 175–199. oldalak, 1983 és Wise és társai, In Biology and Medicine (G. Gregotiadis, ed), Academic Press: New York, 237–270. oldalak, 1979; a fenti műveket azonban jelen leírásunkban is ismertetjük.

A szteroidot előnyösen olyan napi dózisban alkalmazzuk, ami nem éri el a 25 mg aktív MPA vagy MGA mennyiségét 50 kg-onként, előnyösen 1–10 mg, legelő-

nyösebben 3–7 mg-ot (például 5 mg) alkalmazunk. Az előnyösen választott dózis a szérumkoncentrációkat 50 nanomol/l alatt tartja, előnyösen 1,0 nanomol/l és 10, 15 vagy 20 nanomol/l között, a páciens válaszkészségétől függően.

A jelen találmánynak megfelelően egy parenterális injekció előnyösen kevesebb mint 2,0 g aktív résztvevőt (például medroxi-progeszteron-acetátot vagy megestrol-acetátot) tartalmaz, még előnyösebben 0,15 és 1,0 g közötti mennyiséget.

Erősen kívánatos, hogy a prolongált felszabadulású részecskékből annyi fennmaradó szerves oldószert távolítsunk el, amennyit csak lehetséges. Valójában néhány szerves oldószer annyira toxikus, hogy nem használhatók anélkül a prolongált felszabadulású részecskék előállításához, hogy ne találnánk módot hatékony eltávolításukra. A be nem épült szerves oldószer, amit nem tart fogva a részecske fizikai szerkezete, például csak a felszínével van kontaktusban, könnyen eltávolítható a konvencionális eljárásokkal (például többszöri átmosás vízzel, levegőátáramoltatás stb.). A fizikai szerkezetbe beépült szerves oldószer problematikusabb, és az alábbiakban egy új eljárást ismertetünk az oldószer eltávolítására.

Az oldószer eltávolítását elősegíti, ha kisméretű részecskéket állítunk elő. Előnyösen a részecskék átlagos mérete kisebb 40 μ-nál, például 5 és 40 μ közötti, még előnyösebben 9 és 28 μ között van. Legelőnyösebben a méretmegoszlás olyan, hogy a részecskék 90%-a a fent felállított mérethatárokon belül van.

Előnyös megjelenési formákban a részecskék képződését követően a be nem épült oldószert a szokványos eljárásokkal eltávolítjuk, mint például a többszöri vízzel való átmosással és/vagy levegővel szárítással.

Az oldószer eltávolítása ezután előnyösen a részecskék mérsékelt vákuumba helyezésével történik, ahol a nyomás nem kevesebb $6{,}6 \cdot 10^3$ Pa-nál, és a hőmérséklet nem több mint 30 °C-kal (A esetben), illetve 7 °C-kal (B esetben), a részecskék üvegesedési hőmérséklete alatti érték.

A részecskékből alaposan eltávolítjuk a maradék oldószert, beleértve a fizikailag a részecskékbe beépült oldószert is, azáltal, hogy a részecskéket erős vákuumhatásnak tesszük ki (kevesebb mint 133 Pa, és előnyösen kevesebb mint 66,5 Pa) olyan hőmérsékleten, ami 7 és 20 °C-kal a részecskék üvegesedési hőmérséklete (Tg) alatt van, előnyösen 7 és 15 °C-kal a Tg alatt, és még előnyösebben 7 és 12 °C-kal a Tg alatt. Ezt az erős vákuumhatást elegendő ideig tartjuk fenn ahhoz, hogy a részecskékben a maradék szerves oldószert 0,1% (tömeg% a részecske teljes tömegéhez képest) alatti koncentrációra csökkentsük. Előnyösen a maradék oldószer 0,05% alá csökken, még előnyösebben 0,02% alá.

Az üvegesedési hőmérséklet a szakmában ismert számos módszerrel mérhető vagy számolható, többek között (de nem kizárólag) a folyékonyságnak a hőmérséklet függvényében standard eljárással való mérésével és ábrázolásával, amint azt a 9. ábra mutatja. A maximális hevítési hőmérséklet előnyösen nem lehet magasabb, mint a görbe lineáris szakaszának vége az üvegesedési hőmérséklet alatt (ugyancsak a 9. ábrán szemléltetve). Magasabb hőmérsékletek a részecskék nemkívánatos agglomerációját okozhatják, vagy hődegradációs termékek keletkezését.

A jelen találmány szerinti határok között fenntartott hőmérséklet esetén a részecskék szabad folyással rendelkeznek, és nem keletkeznek hődegradációs termékek. A találmány szerinti mérsékelt hőmérséklet alkalmazása azonban lényegesen elősegíti a szerves oldószer eltávolítását.

Az előnyös megjelenési formákban egy mérsékelt vákuumkezelés vagy más eljárás vagy a maradék oldószer 5% alá csökkentése, előnyösen 2% (tömeg% a részecske teljes tömegére vonatkoztatva) alá csökkentése előzi meg az erős vákuumkezelést. Magasabb oldószerszintek nemkívánatos módon a részecskék repedéséhez vezethetnek az erős vákuumkezelés alatt. Az ilyen repedések nemkívánatos módon befolyásolhatják a részecskék felszabadulási mértékének jellemzőit.

Az előzőekben említett mérsékelt vákuumkezelés során a szokásos időtartam általában 1–10 nap, előnyösen 1–5 nap, még előnyösebben 2–4 nap. Az erős vákuumkezelés szokásos időtartama 1–20 nap, előnyösen 2–15 nap, még előnyösebben 3–10 nap. Az erős vákuumkezelés időtartamának azonban addig kell tartania, amíg a maradék szerves oldószer a kívánt szint alá csökken. A maradék oldószer szintjét ismert eljárásokkal határozhatjuk meg, például úgy, ahogyan azt az alább következő 6. példa szemlélteti. A találmány szerinti eljárást sikeresen alkalmazhatjuk az oldószer 0,02 tömeg% alá csökkentésére, ami a legkisebb mérhető mennyiség G analízis alkalmazásával, lásd a 6. példa.

A találmány szerint előállított prolongált felszabadulású részecskék végső felhasználási formáját különböző ismert módokon állíthatjuk elő. Előnyösen ismert eljárásokkal sterilizáljuk őket (például a 10. példában ismertetett módon). Kombinálhatók továbbá gyógyászatilag alkalmazható oldószerekkel vagy vivőanyagokkal. Ismert tartósítószereket is adhatunk hozzájuk. Előnyösen a prolongált felszabadulású részecskék koncentrációja (tömeg% a készítmény teljes tömegéhez képest) kb. 10 és 70% között van. A vivőanyag előnyösen olyan, amelyben a részecske kötőanyaga lényegében oldhatatlan, például karboxi-metil-cellulóz vízben, desztillált vízben vagy fiziológiás sóoldatban.

A jelen találmány szerint az előnyös mikrogyöngyökre jellemző a hőbomlásból származó szennyeződések hiánya. Ezt a mikrogyöngyök szárítása során alkalmazott alacsony hőmérséklettel és erős vákuummal érjük el.

A találmány szerinti előnyös vivőanyag a mikrorészecskék parenterális injektálására a következő csoportból választható: fiziológiás sóoldat, karboxi-metil-cellulóz vizes oldata, glikol vagy glicerin vizes oldata, víz vagy etanol vizes oldata. Pontosabban az előnyös vivőanyag a karboxi-metil-cellulóz 2–5%-os vizes oldata.

A találmány szerinti prolongált felszabadulású készítmények alkalmazására előnyös eljárások közé tar-

toznak (de nem kizárólag) a szubkután vagy intramuszkuláris injekció és az orális adagolás.

A találmány szerint alkalmazott alacsony dózisok miatt a mellékhatások kielégítően visszaszorulnak, így a találmány szerinti eljárások profilaktikus használata sokkal praktikusabb, és valószínűbb, hogy széles körben akceptálható, mint a nagyobb dózisokat alkalmazó eljárások. Minthogy a kezelési dózis is már alacsony, a preventív kezelés hatékonyságát nem kell kisebb adagok alkalmazásával veszélyeztetni.

1. példa

Dimetil-benz[a]antracénnal (DMBA) indukált emlőkarcinóma megelőzése patkányban alacsony dózisú medroxi-progeszteron-acetáttal (MPA)

A jelen találmány emlőkarcinóma incidenciájára kifejtett hatékonyságának ábrázolására az 1. ábra bemutatja egy egyszeri szubkután Depoprovera- [medroxi-progeszteron-acetát (MPA)=30 mg] injekció hatását egy héttel a dimetil-benz[a]antracénnal történő karcinómaindukció előtt alkalmazva. Az 1. ábra a DMBA beadását követő 30–85 nap időtartamot mutatja. Az egyik görbe az 1. ábrán a Depoproverával kezelt állatcsoportban a tumorok átlagos számát mutatja a csoport állatainak számára vonatkoztatva, a másik görbe pedig a nem előkezelt állatcsoportban mutatja az egy állatra eső tumorok átlagos számát. Becslések szerint a Depoprovera 30 mg-os injekciójából kb. 0,17 mg aktív medroxi-progeszteron-acetát szabadulna fel naponta hat hónapos időtartamig.

Amint az 1. ábrán a két görbe összehasonlításából látható, a Depoproverával kezelt csoport sokkal nagyobb ellenállást mutatott a tumorok kifejlődésével szemben, mint a nem kezelt csoport. 85 nap múlva átlagosan 1,89 tumort figyeltünk meg a nem kezelt csoportnál patkányonként, míg mindössze 0,30 tumort észleltünk patkányonként a Depoproverával kezelt csoportban. A tumorok számát és mérőkörzővel mért méretét hetente határoztuk meg.

2. példa

Dimetil-benz[a]antracénnel indukált emlőkarcinóma kezelése patkányban alacsony dózisú medroxi-progeszteron-acetáttal

A 2. ábra az emlőkarcinóma-növekedés gátlását mutatja be, ami a találmány szerinti eljárásokkal érhető el. A tumorokat ovariectomizált (petefészekirtott) patkányoknál dimetil-benz[a]antracén felhasználásával indukáltuk. Ösztradiolt használtunk a növekedés serkentésére a patkányoknál, mind a kezelt, mind a kontrollcsoportban. A kezelt csoportban minden patkány egy egyszeri szubkután injekcióban 30 mg Depoproverát kapott (amely becslések alapján kb. 0,17 mg aktív medroxi-progeszteron-acetát felszabadulását biztosítja kb. hat hónapos időtartamra). Ez az ábra bemutatja az átlagos ösztradiol stimulálta változást a teljes tumorterületen minden csoportban a kezelést követően. Amint a 2. ábrán látható, a Depoproverával kezelt csoport szignifikánsan kisebb tumornövekedést mutatott, mint a kezeletlen csoport.

3. példa

Medroxi-progeszteron-acetát-tartalmú mikrogyöngyök előállítása oldószer-extrakciós módszerrel

A polimer anyag 50:50 poli(DL-laktid-koglikolid) (PLG) (szállítja a Birmingham Polymer Inc., Birmingham, Al) teljes oldódását az oldószerben egy éjszakán át tartó rázással/keveréssel érjük el KS–10 keverőedényben (a BEA Enprotech Corp.-tól) 150–200 fordulat per perc sebességre beállítva. A használt oldószer a metilénklorid (CH_2Cl_2), amit BDH-tól szereztünk be, és közvetlenül használat előtt egyszer desztilláltunk. A polimert (1,50 g) egy üvegedénybe juttatjuk, ami már tartalmazza a CH_2Cl_2-t (15,00 g), állandó keverés mellett. Ezután hozzáadjuk a medroxi-progeszteron-acetátot (0,75 g) állandó keverés mellett, hogy egy PLG-MPA-CH_2Cl_2-oldatot kapjunk.

Elkülönítve egy 250 ml-es gyantaedényben (a Kontes cégtől beszerezve) összekeverünk 90 ml vizet és 6 ml felületaktív anyagot [poli(vinil-alkohol)] (PVA) (Airvol™ 205, beszerezve az Air Products Chemicalstől), és állandó keverés alatt tartjuk őket egy teflon turbinaszerű keverővel egy laboratóriumi nagy teljesítményű keverőben. Ezután 1,16 ml metilén-kloridot adunk a felületaktív anyag oldatához, hogy telítsük a vizes oldatot, és hogy elkerüljük a metilén-klorid extrahálódását ebben a stádiumban. Ehhez egy 2 ml-es üvegpipettát vezetünk be a gyantaedény felső részén található négy nyílás egyikén. A keverést 5 percen át 850 fordulat/percen végezzük. A mikrogyöngyöket ezután úgy állítjuk elő, hogy az előzőleg előállított PLG-MPA-CH_2Cl_2-oldatot a keverés alatt álló CH_2Cl_2-vel telített PVA-oldathoz adjuk egy 16-os méretű 15 cm hosszú tűvel ellátott polipropilénfecskendő segítségével. Az MPA-oldat hozzáadása után a keverést további ötperces időtartamig folytatjuk.

A mikrogyöngyök megszilárdítása

A megszilárdítás folyamatának lépései a következők:

1. A gyantaedény tartalmát gyorsan egy megszilárdításra alkalmas fürdőbe öntjük, és a gyantaedényt desztillált vízzel átmosva annak tartalmát szintén a fürdőbe öntjük. A megszilárdulást szolgáló fürdő egy nagy rozsdamentes acélkádból (7 l) áll, ami 5 l desztillált vizet tartalmaz. A keverést nagy sebességgel (850 fordulat/perc) 20 percig végezzük egy 6,25 cm-es SS keverőlapáttal felszerelt laboratóriumi nagy teljesítményű keverővel.

2. Ezután a mikrogyöngyöket elválasztjuk a mosóközegtől Millipore 142 mm-es szűrőrendszerrel. Megszilárdulás után a fürdő tartalmát a 20 l-es Millipore nyomással szeparálóedénybe juttatjuk. Ekkor ügyelni kell arra, hogy a megszilárdulást szolgáló SS kád alapos öblítését biztosítsuk, hogy hatékonyan visszanyerjük a keverés szünetelésekor leülepedett mikrogyöngyöket. Azután a mikrogyöngyöket egy 142 mm-es membránon (pórusméret: 8 μm) gyűjtjük össze úgy, hogy a szeparálóedény tartalmát kompresszált levegővel ($6,9 \cdot 10^4$ Pa) keresztülnyomjuk a membránon.

3. Ezután a membránt desztillált vízzel átmossuk, és ezzel egyidejűleg a mikrogyöngyöket lemossuk a

membránról egy második megszilárdulást szolgáló fürdőbe, ami megegyezik az elsővel. A mikrogyöngyök összegyűjtése a 142 mm-es membránon ezután másodízben a fent ismertetettek szerint zajlik.

4. A mikrogyöngyök végső átmosása és szárítása a Millipore 142 mm-es szűrőrendszeren történik. A szárítás első lépése $6,9 \cdot 10^4$ Pa nyomású levegő átáramoltatásával történik 1 órán keresztül. Ezután a mikrogyöngyöket a membránról egy deszikkátorba helyezzük át, ami kb. 2,5 cm Drierite-et tartalmaz, és 2-3 napos időtartamra mérsékelt vákuumot ($9,33 \cdot 10^2$ Pa) biztosítunk. A végső szárítást vákuumszárítóban végezzük 35–40 °C-on 53 Pa nyomáson, amíg az oldószer gázkromatográfiával kimutathatatlanná válik, aminek az érzékenysége CH_2Cl_2-re nézve 0,02% (tömeg% a mikrorészecskék teljes tömegére nézve). Így ezzel a technikával eltávolítjuk alapjában véve az összes maradék szerves oldószert, kevesebb mint 0,02% marad vissza.

4. példa

60% medroxi-progeszteron-acetátot (MPA), 40% Medisorb™ 85:15 DL-poli(laktid-koglikol)-savat (PLGA) tartalmazó mikrorészecskék előállítása öntéses módszerrel

A medroxi-progeszteron-acetátot a Steraloidstól beszerzett formában használtuk. Felhasználás előtt UV-spektroszkópiával vizsgáltuk, és meghatároztuk az olvadáspontját. A Medisorb™ 85:15 DL-poli(laktid-koglikol)-sav a DuPont-tól származott és ugyancsak azonos állapotban került felhasználásra. A metilén-kloridot (az elérhető legkoncentráltabbat) a Fisher Scientifictől szereztük be. A polimert (6,0022 g) 24 ml metilén-kloridban oldottuk, így 25%-os oldatot (0,25 g PLGA/ml metilén-klorid) kaptunk. Medroxi-progeszteron-acetátot (9,0022 g) adtunk a polimer oldathoz, és a keverést addig folytattuk, amíg a teljes keveredést elértük. Ezután az oldatot egy tiszta, sima üveglapra öntöttük egy Boston Bradley szabályozható lapát segítségével, hogy egyenletes vastagságot érjünk el. Az öntött filmet hagytuk száradni egy párologtatóedényben néhány órán keresztül. Az oldószer nagy részének elpárolgása után a fennmaradt filmet levakartuk az üveglapról és vákuummal szárítottuk szobahőmérsékleten négy napig.

Az öntéses folyamat alatt képződött film nagyon kis sűrűségű volt, minthogy az oldószer eltávolítása igen nagy üres térfogatot hagy vissza. Az üres térfogatot csökkentettük kompresszió alkalmazásával, hogy csökkentsük a folyadéknak mikrorészecskékbe való bejutását, ehhez hőt és hidraulikus nyomást használtunk fel. Ezután a filmet rudacskákká alakítottuk át Pasadena Hydraulics Inc. Press felhasználásával kb. 125 °C-on. Az extrudált pálcikákat kis részecskékké őröltük egy lehűtött őrlőtérrel rendelkező közönséges őrlővel. Az őrlést követően a port keresztülnyomtuk egy US Standard (szérián) szűrősorozaton, hogy a mikrorészecskéket 38–125 μm, 125–180 μm és 180–250 μm szélső értékek közötti sávok szerint gyűjtsük össze. A megszűrt mikrorészecskéket összegyűjtöttük.

5. példa

A fennmaradt oldószer elpárologtatása

a) A szárításhoz egy Abderhalden készüléket (Aldrich Chemicals Co.-tól beszerezve) használtunk fel. Ennek az üvegárunak a legfontosabb tulajdonsága, hogy megengedi erős vákuum és melegítés együttes alkalmazását azzal a lehetőséggel kombinálva, hogy tárolja is a szárítandó mintát egy szárítószer jelenlétében (3 angströmös molekuláris szűrő). A mi vizsgálatunk esetén az erős vákuumot (kb. 1,3 Pa) egy E2M5 Edwards vákuumpumpával állítottuk elő. Szárítás céljára a minta melegítését egy CH_2Cl_2+aceton keverék refluxáltatásával végeztük MPA–MBA minta esetén, hogy 45 °C-os hőmérsékletet tartsunk fenn.

b) MPA–MB–VII, MPA–MB–XI, MPA–MFI–73, MPA–MLV–31, MPA–MLV–32, MPA–MLV–34, MPA–MLV–35, MPA–MLV–39 és MPA–MLV–40 mintákat úgy szárítottuk, hogy mindegyik csoportnál vákuumszárítót használtunk, hogy a mikrogyöngyök további szárítását érjük el. A kezdeti gyengébb vákuum (7000 Pa) után az erős vákuumot (53 Pa) egy E2M5 Edwards vákuumpumpával biztosítottuk. A hőmérsékletet szabályoztuk (44–46 °C), és az összes mintát egyszerre szárítottuk a rendszerben.

6. példa

A fennmaradó metilén-klorid meghatározása

A mikrogyöngyökben a fennmaradó metilén-klorid-koncentrációt G analízissel határoztuk meg egy Varian 3700 gázkromatográf használatával, ami egy DB–1 kapilláris csővel és egy FID detektorral van felszerelve. A hőmérsékleti program: 7 percig 40 °C, mielőtt a 10 °C/perc melegítés beindulna 200 °C (1 percig) eléréséig. Az injektált mennyiségek 1,0 μl-ek. A G analízis céljára a mikrogyöngyöket (kb. 25 mg) 1 ml $CHCl_3$-ban oldjuk (HPLC minőség), majd 5 ml izooktánnal hígítjuk. A metilén-klorid pontos koncentrációját egy kalibrációs görbe felhasználásával határozzuk meg, ami öt standardtól származik. Ezeket a standardokat tiszta metilén-kloridból (CH_2Cl_2) és kloroformból ($CHCl_3$) állítjuk elő 0,1–1,0 tömeg% szélső koncentrációértékek között.

A következő táblázat mutatja a visszamaradt metilén-klorid-analízissel nyert eredményeket:

MPA-rendszer	% CH_2Cl_2 (tömeg/tömeg)
Öntéses módszer: minták a 4. példa szerint előállítva	0,3
Mikrogyöngy 50:50 DL-PLG	<0,02

7. példa

Az MPA-hatóanyag-tartalom meghatározása

a) Mágneses magrezonancia

Ezt a meghatározást NMR-spektroszkópiával végeztük az MPA 19-metilcsoportjának csúcsa alatti terület (δ=0,65 pm-nél) és a polimer hidrogénatomjainak csúcsa alatti terület (multiplet, δ=5,20-nál és δ=4,8-nál) elemzésével. Bruker AC–F 300 FT NMR-spektromé-

tert használtunk. Lásd a 3. ábrát példaként az NMR-spektrumra, és a 4. ábrát, ami ezen meghatározásokhoz a standard görbékre példa, ami az MPA és a polimer ismert keverékeinek NMR-spektrumaiból származik.

b) Szterikus kizárásos kromatográfia

Az MPA-tartalom szterikus exclusion kromatográfiás (SEC) mérése Perkin–Elmer 250 ISO/LC-30 SEC rendszerrel történt PL-gél 50 angströmös 5 μm-es oszloppal és egy PL-gél kevert oszloppal HPLC tisztaságú kloroform, mint eluens felhasználásával. Az 5. ábrán például 50:50 PLG-mikrogyöngy méréseit végeztük 40 °C-on, és ezen körülmények között az MPA és DL-PLG jól elkülönültek. Egy minta hatóanyag-tartalmát az MPA-csúcs alatti területnek a PLG/MPA keverékek standard koncentrációból készült kalibrációs görbéhez való viszonyításával állapítottuk meg (insert).

8. példa

A mikrogyöngyök scanning elektronmikroszkóppal (SEM) meghatározott jellemzői

Felszíni morfológiájuk elemzése céljából a mikrogyöngyöket elektron scanning mikroszkóppal (SEM) vizsgáltuk JEOL JSM T330A készülék alkalmazásával. A mintákat a mikrogyöngyöknek egy kétfelszínű szalagra juttatásával állítottuk elő, mielőtt egy $5-6\cdot10^{-8}$ m vastagságú aranyréteggel vontuk be őket. Ezeket a vizsgálatokat a mikrogyöngyök átlagos átmérőjének meghatározására is felhasználtuk. Ezek a meghatározások a gyenge mágneses térben (350X) rögzített képen látható összes mikrogyöngy kézi számlálásával és mérésével történtek (6A. ábra). Erősebb mágnesezés, 2000 x-ig, a mikrogyöngyök felszínének még részletesebb elemzését teszik lehetővé.

Például az MPA–MB–V minta MPA-mikrogyöngyei méretbeli megoszlásának precíz meghatározását a SEM fényképeken a mikrogyöngyök átmérőjének direkt mérésével végeztük. Amint a 8. ábrán látható, az így megszámlált 680 mikrogyöngy több mint 95%-a kisebb méretű 40 μm-nél, átlagos átmérőjük 18,6±9,7 (S. D.) μm. A mikrogyöngyök ilyen kis mérete elősegíti az anyag injektálását, és megrövidíti a felszabadulás időtartamát. A 7. ábrán a mikrogyöngyök keresztmetszetén látható, hogy az MPA szétszórt szigetekben koncentrálódik a polimerben.

9. példa

A mikrogyöngyök jellemzése differenciál scanning kalorimetriával (DSC)

A minták hőanalízisét Perkin–Elmer DSC–7-tel végeztük. A készüléket indiummal kalibráltuk, és 10 °C/min vizsgálati sebességgel működtettük.

A 9. ábrán az MPA-mikrogyöngyök DSC-görbéje szerint a maximális szárító hőmérséklet könnyen meghatározható.

10. példa

A mikrogyöngyök sterilizálása

Injektálás előtt a mikrogyöngyöket 2,2 megarad gamma-sugárzásnak tettük ki, ami egy kobalt-60 forrásból származott (Gammacell 200). Az MPA stabilitását szterikus kizárásos kromatográfiával (SEC) ellenőriztük, míg a polimer stabilitását SEC-kel a kalibráláshoz polisztirén standardok segítségével elemeztük, és a relatív viszkozitásváltozás mérésére Ubbelohde kapillárisviszkométert használtunk.

A gamma-sugárzás (2,2 megarad) nem károsítja az MPA-t, de a mikrogyöngyök csökkent specifikus viszkozitása CH_2Cl_2-folyadékban 0,301±0,008-ról 0,262±0,003 dL/g-ra esett, ezzel jelezve, hogy a polimer láncok egy része felszakadt.

Az MPA–MB–V csoport mintáit különböző erősségű gamma-sugárzásnak tettük ki (0, 1, 1; 2,2 megarad), és mértük a molekulatömeg-megoszlási értékeket [M(n–1), Mn, Mw, Mz, M(z+1)] (lásd 10A. ábra), valamint polidiszperzitásukat (Mw/Mn) (10B. ábra).

Ezek az adatok azt mutatják, hogy a domináns folyamat a polimer láncok random szétszakadása. Így a besugárzott mikrogyöngyök biológiai lebontása gyorsabb lesz, mint a nem besugárzott mikrogyöngyöké, és a besugárzás hatásait számításba kell venni a mikrogyöngyök előállításánál, például a besugárzás előtti felszabadulási mérték némileg alacsonyabbnak mondható a végterméktől megkívántnál.

11. példa

MPA-tartalmú mikrogyöngyök szubkután injekcióját követő szérum-MPA-szintek nyúlban

Új-zélandi fehér nyulakat (kb. 2,7 kg) tartottunk – ketrecenként egyet – 10 órás sötétség és 14 órás világosság váltakoztatásával (fénybekapcsolás 07,00-kor), elláttuk őket 16%-os nyulaknak való tablettával, amit Moulées Kilplustól (Quebec, Kanada) szereztünk be, és tetszés szerint csapvízzel.

2%-os karboxi-metil-cellulóz és 1% Tween 80 oldatában szuszpendált 50 mg MPA-tartalmú mikrogyöngyöt (MPA–MB–U minta) injektáltunk szubkután egy 10 nyúlból álló csoportba. A vérmintákat különböző időintervallumokban vettük, és az MPA-koncentrációkat RIA-val mértük. Az MPA szérumszintjeit a 11. ábra mutatja.

12. példa

Szérum-MPA-szintek patkányban a találmány szerinti MPA-tartalmú mikrogyöngyök szubkután injekciója után

Fiatal nőstény Sprague–Dawley-patkányokat [Crl: CD(SD)Br] szereztünk be a Charles River Canada Inc.-től (St-Constant, Quebec) és ketrecenként kettőt tartottunk 14 órás fény és 10 óra sötétség váltakoztatásával (fénybekapcsolás 05,00-kor). Az állatok patkányeledelt és tetszés szerinti mennyiségű csapvizet kaptak.

2% karboxi-metil-cellulóz és 1% Tween 80 oldatában szuszpendálva az MPA-tartalmú mikrogyöngyök növekvő adagjait (5, 10 és 20 mg) injektáltuk bőr alá egy 10 nőstény (Sprague–Dawley) patkányból álló csoportnak. A vérmintákat különböző intervallumokban vettük le, és az MPA-koncentrációkat RIA-val mértük. Az eredményeket a 12. ábra mutatja.

13. példa

Dimetil-benz[a]antracénnal (DMBA) indukált emlőkarcinóma prevenciója patkányban alacsony dózisú MPA-val (mikrogyöngyökkel)

Anyagok és módszerek

Állatok és az emlőkarcinóma kiváltása

Emlőkarcinómát idéztünk elő nőstény Sprague–Dawley (Crl: CD(SD)Br) 50–52 napos patkányokban (Charles River Canada Inc.-től beszerezve /St-Constant, Quebec/) 20 mg dimetil-benz[a]antracén (DMBA) (Sigma Chemicals, Co., St. Louis, Mo) egyszeri, gyomorba történő adásával 1 ml kukoricaolajban.

Kezelés

Egy héttel a DMBA alkalmazása előtt az állatokat három csoportba osztottuk (kezeletlen, kezeletlen+30 mg MPA és kezeletlen+100 mg MPA), és ennek megfelelően 30 mg, illetve 100 mg MPA-tartalmú mikrogyöngyöt kaptak egyszer, szubkután alkalmazva.

Eredmények

Amint a 13. ábrán látható, 85 nappal a DMBA alkalmazása után a kezeletlen állatok 63%-ában fordult elő észlelhető emlőtumor, míg a 30 mg MPA-val (mikrogyönggyel) előkezelt állatoknak csak 7,4%-ában, a 100 mg-mal kezeltek 6,3%-ában volt észlelhető emlődaganat. Ezek az adatok világosan mutatják, hogy az előkezelés MPA-mikrogyöngyökkel meggátolja a DMBA-val indukált emlőkarcinóma kifejlődését patkányban, így felvetődik az MPA-mikrokapszulák felhasználásának lehetősége humán emlőkarcinóma megelőzésére nőkben.

14. példa

Az MGA hatása patkányokban a csont-ásványianyagsűrűségre

Céline MARTEL, Fernand LABRIE

Anyagok és módszerek

Az állatok és a kezelés

Felnőtt nőstény Sprague–Dawley-patkányokat [Crl: CD(SD)Br, Charles River Laboratory, St-Constant, Kanada] alkalmaztunk a vizsgálatokban, melyek tömege 220–265 g volt az adagolás megkezdésekor, mikor is az állatok kb. 9–12 hetesek voltak. A patkányokat a kísérletek megkezdése előtt egy hétig szoktattuk a környezethez (hőmérséklet: 21±3 °C, 12 órás nappal és 12 órás éjjel ciklikusan váltakozva, megvilágítás 7 óra 15 perctől). Az állatokat hármas csoportokba különítettük el. Csapvizet tetszés szerint fogyaszthattak és Lab Diet rágcsálóeledellel etettük őket (# 5002 jelű tabletták). A kísérleteket a Canadian Council on Animal Care által jóváhagyott berendezésben, a kísérleti állatok kezelésére és felhasználására vonatkozó CCAC-előírásoknak megfelelően hajtottuk végre.

72 patkányt véletlenszerűen 6 db 12 állatot tartalmazó csoportra osztottuk, és a következőképpen kezeltük: 1. semmiféle kezelés, intakt kontrollcsoport; 2. eltávolított ováriumú állatok (OVX) kontrollcsoportja; OVX+MGA, 1 mg/kg; 4. OVX+MGA, 3 mg/kg; 5. OVX+MGA, 10 mg/kg; 6. OVX+MGA, 30 mg/kg. A kísérlet 0. napján az állatok megfelelő csoportjaiban az ováriumot teljes mértékben (bilaterálisan) eltávolítottuk (OVX) isoflurane-indukált altatás mellett. A megestrol-acetáttal (MGA) végzett kezelést a kísérlet 1. napján indítottuk. Az MGA-t naponta kétszer adagoltuk gyomorszonda segítségével 4% etanolt, 4% Polyethylene Glicol–600-at, 1% zselatint és 0,9% NaCl-oldatot tartalmazó elegyben. Az adagolás következtében a szérumszintek a találmány szerinti 1–50 nmol/l sávon mozogtak. A kontrollállatok a hordozót kapták.

A csont ásványianyag-tartalmának és -sűrűségének mérése

6 hetes kezelést követően csoportonként 10 patkányt izoflurránnal altattunk, majd az állatok jobb combcsontját (femur) kettős energiájú röntgen-abszorpciometriával szkenneltük (DEXA; QDR 2000–7.10C, Hologic, Waltham, MA); az eredményeket Regional High Resolution Scan szoftverrel értékeltük ki. A combcsont vizsgált részének mérete 5,080×1,902 cm, a felbontás 0,0254×0,0127 cm és a szkennelés sebessége 0,0956 mm/másodperc volt. Így meghatároztuk a combcsont ásványianyag-tartalmát és -sűrűségét.

Statisztikai analízis

A 10 állatból kapott eredményeket átlag+standard hiba adatokkal határoztuk meg. A statisztikai szignifikanciát Duncan-Kramer (1956)-féle többtartományos teszttel határoztuk meg.

Eredmények

Az ovárium eltávolítását követő 6 héttel combcsonti ásványianyag-tartalom és a combcsonti ásványianyag-sűrűség 7,7% (nem szignifikáns), illetve 7,9% ($p<0,01$) növekedett (lásd 14. és 15. ábra). Az 1, 3, 10 és 30 mg/kg MGA-val végzett kezelések után kapott combcsonti ásványianyag-tartalom és -sűrűség nem különbözött az intakt kontrollcsoport állataiban mért értékektől, vagyis nem jelentkezett az ováriumeltávolítás káros hatása.

A 14. és 15. ábrán alkalmazott jelölések jelentése a következő:

* $p<0,05$;

** $p<0,01$ az OVX kontrollcsoporttal szemben.

Az itt alkalmazott feltételek (viszonyok) és leírások előnyös alkalmazási módok, amelyek csak illusztrációként szolgálnak, és nem célozzák annak a számos variációnak a korlátozását, ami a témában járatosak számára felismerhetően lehetséges a jelen találmány gyakorlati alkalmazásában, amit a szabadalmi igénypontokban meghatározunk.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Hatóanyagként MPA-t vagy MGA-t tartalmazó, emlőkarcinóma, osteoporosis, endometriumkarcinóma vagy endometriosis kezelésére vagy megelőzésére alkalmas elnyújtott felszabadulású gyógyászati készítmény, *azzal jellemezve,* hogy a készítmény grammonként 200–700 mg MPA- vagy MGA-hatóanyagot tartalmaz, és a készítmény grammonként és naponta 4–25 mg hatóanyagot ad le.

2. Az 1. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy a készítmény tejsav/glikolsav kopolimer alapú hordozót tartalmaz.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy a készítmény mikrogyöngyök formájában van kiszerelve.

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy a készítmény szubkután vagy intramuszkuláris adagolásra alkalmas módon van kiszerelve.

5. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy a készítmény grammonként 300–600 mg MPA- vagy MGA-hatóanyagot tartalmaz, és grammonként és naponta 6–22 mg hatóanyagot ad le.

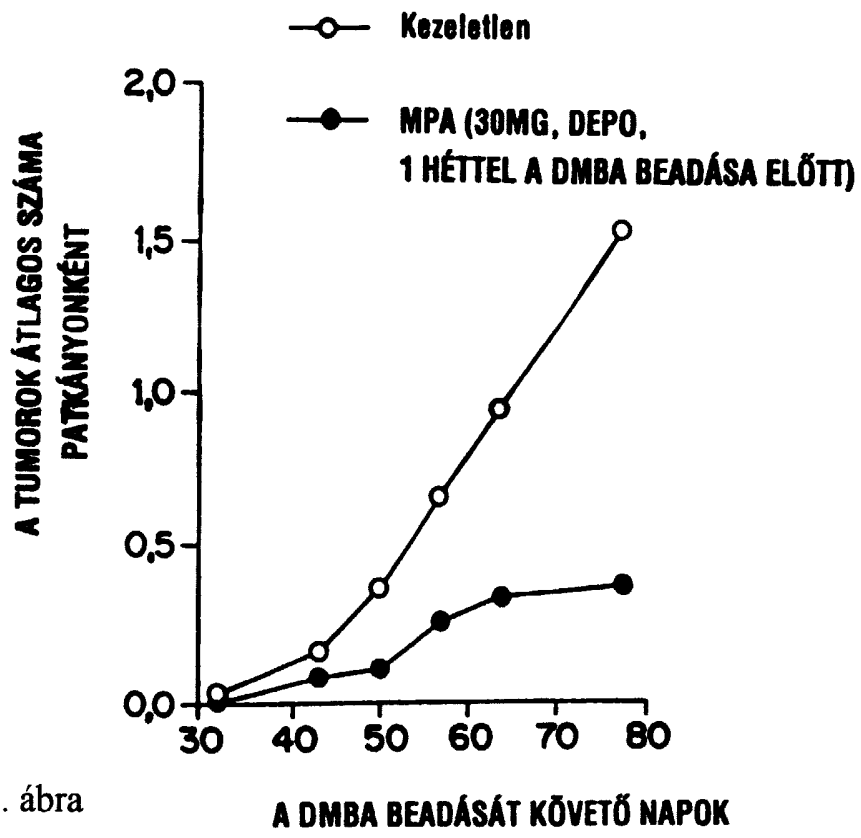
6. Eljárás hatóanyagként MPA-t vagy MGA-t tartalmazó, emlőkarcinóma, osteoporosis, endometriumkarcinóma vagy endometriosis kezelésére vagy megelőzésére alkalmas elnyújtott felszabadulású gyógyászati készítmény előállítására, *azzal jellemezve,* hogy az MPA- vagy MGA-hatóanyagot a készítmény grammjaira számolva 200–700 mg mennyiségben alkalmazzuk, és így olyan készítményt alakítunk ki, amely grammonként és naponta 4–25 mg hatóanyagot ad le.

7. A 6. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy a készítményben tejsav/glikolsav kopolimer alapú hordozót alkalmazunk.

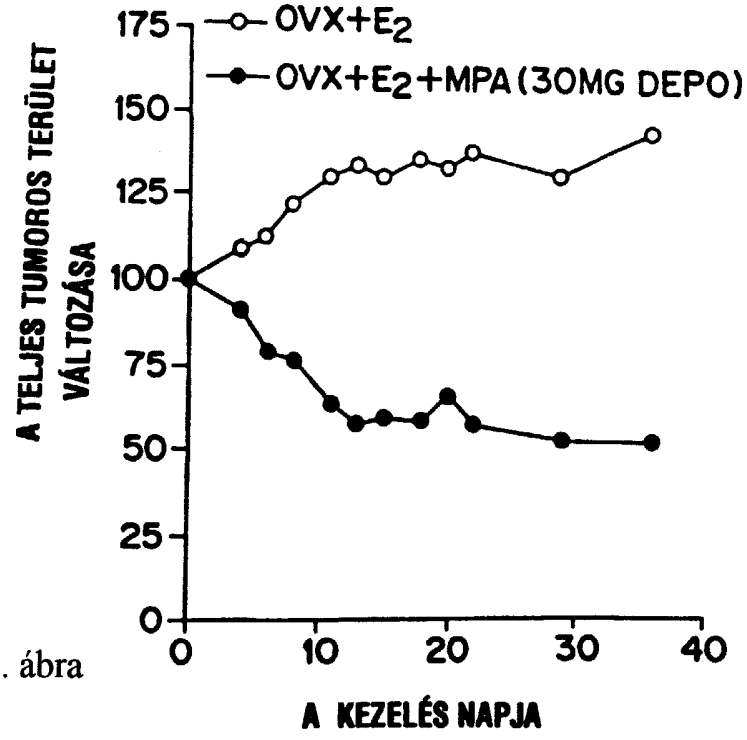
8. A 6. vagy 7. igénypont szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy a készítményt mikrogyöngyök formájában szereljük ki.

9. A 6–8. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy a készítményt szubkután vagy intramuszkuláris adagolásra alkalmas módon szereljük ki.

10. A 6–9. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, *azzal jellemezve,* hogy a készítményben grammonként 300–600 mg MPA- vagy MGA-hatóanyagot alkalmazunk, és így olyan készítményt alakítunk ki, amely grammonként és naponta 4–22 mg hatóanyagot ad le.

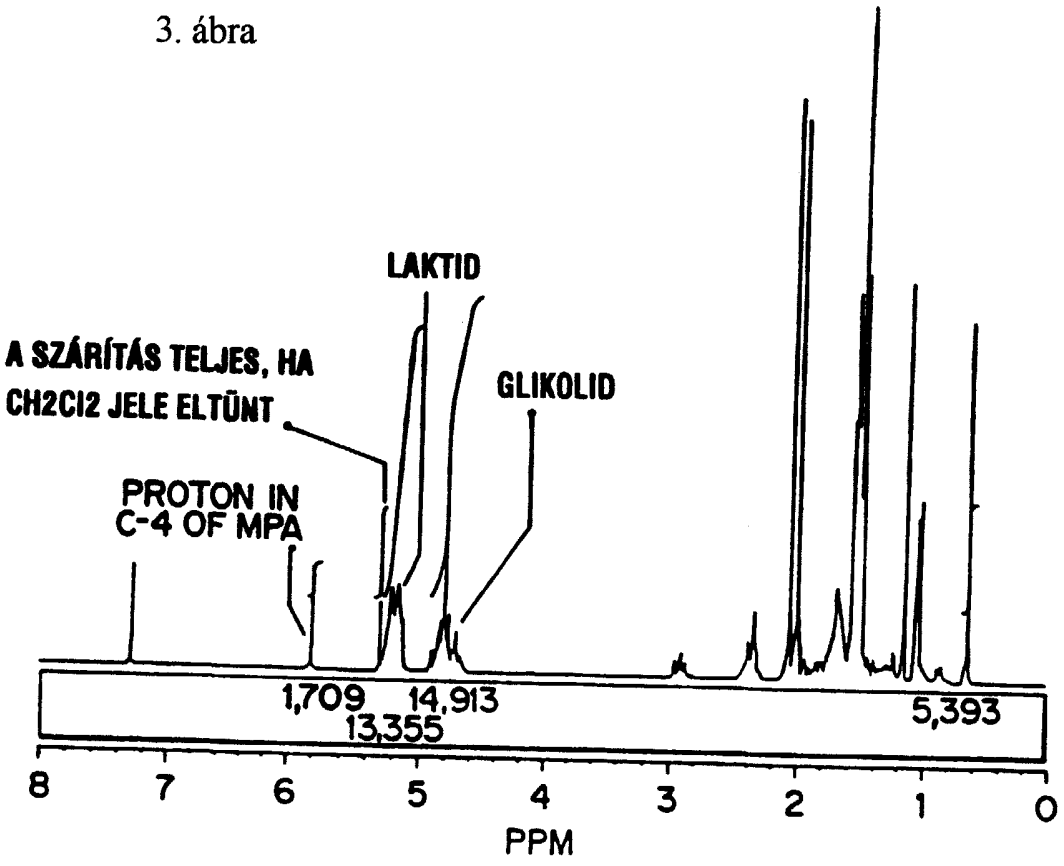

Kezeletlen
MPA (30MG, DEPO,
1 HÉTTEL A DMBA BEADÁSA ELŐTT)
A TUMOROK ÁTLAGOS SZÁMA
PATKÁNYONKÉNT
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
30
40
50
60
70
80
A DMBA BEADÁSÁT KÖVETŐ NAPOK

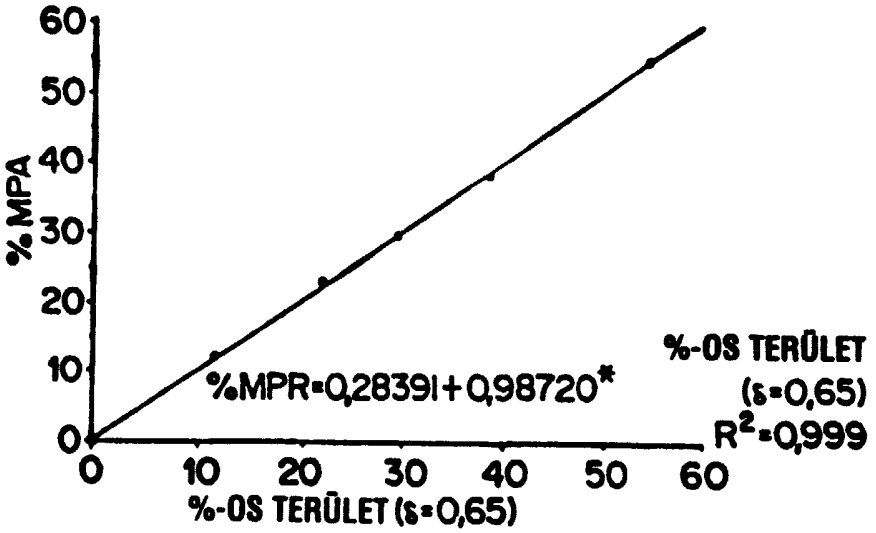
1. ábra


OVX+E2
OVX+E2+MPA (30MG DEPO)
A TELJES TUMOROS TERÜLET
VÁLTOZÁSA
175
150
125
100
75
50
25
0
0
10
20
30
40
A KEZELÉS NAPJA

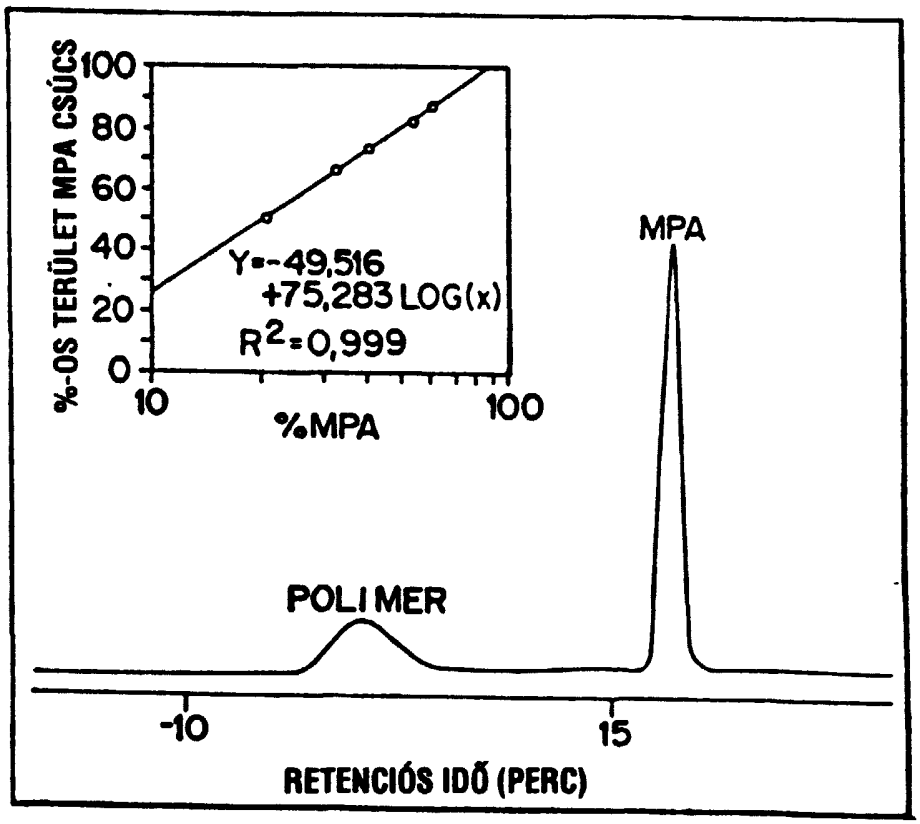
2. ábra

3. ábra

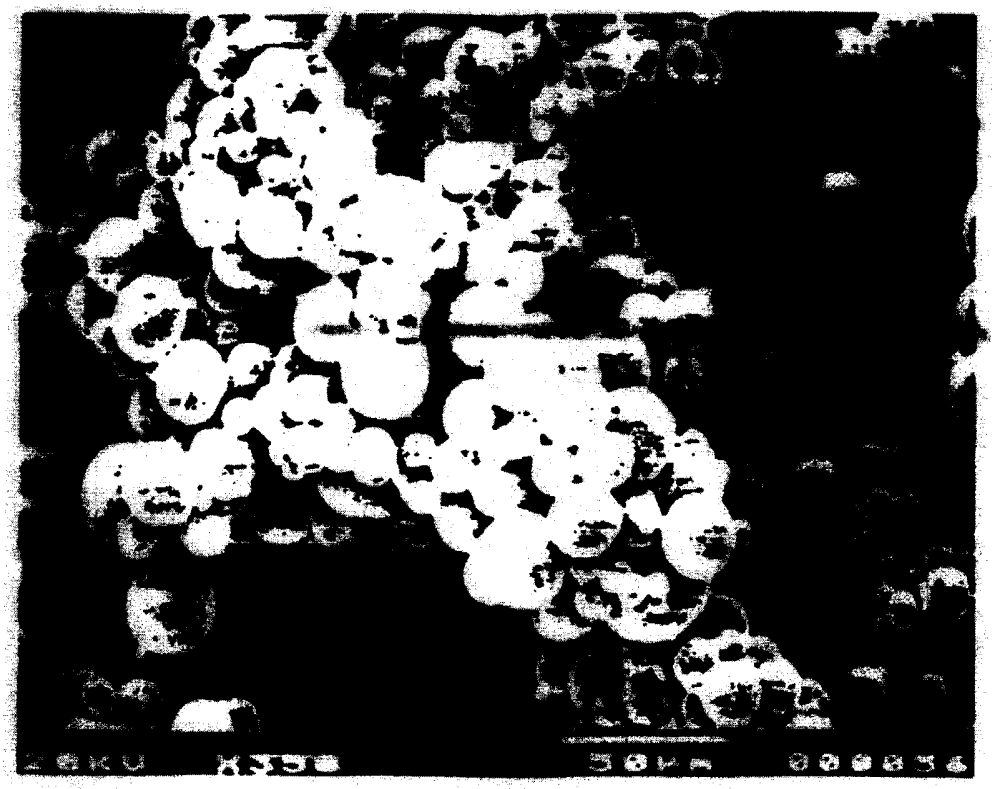

LAKTID
A SZÁRÍTÁS TELJES, HA
CH2CI2 JELE ELTŰNT
GLIKOLID
PROTON IN
C-4 OF MPA
1,709
14,913
13,355
5,393
8
7
6
5
4
3
2
1
0
PPM


60
50
40
30
20
10
0
% MPA
%MPR=0,28391+0,98720*
%-OS TERÜLET
(s=0,65)
R2=0,999
0
10
20
30
40
50
60
%-OS TERÜLET (s=0,65)

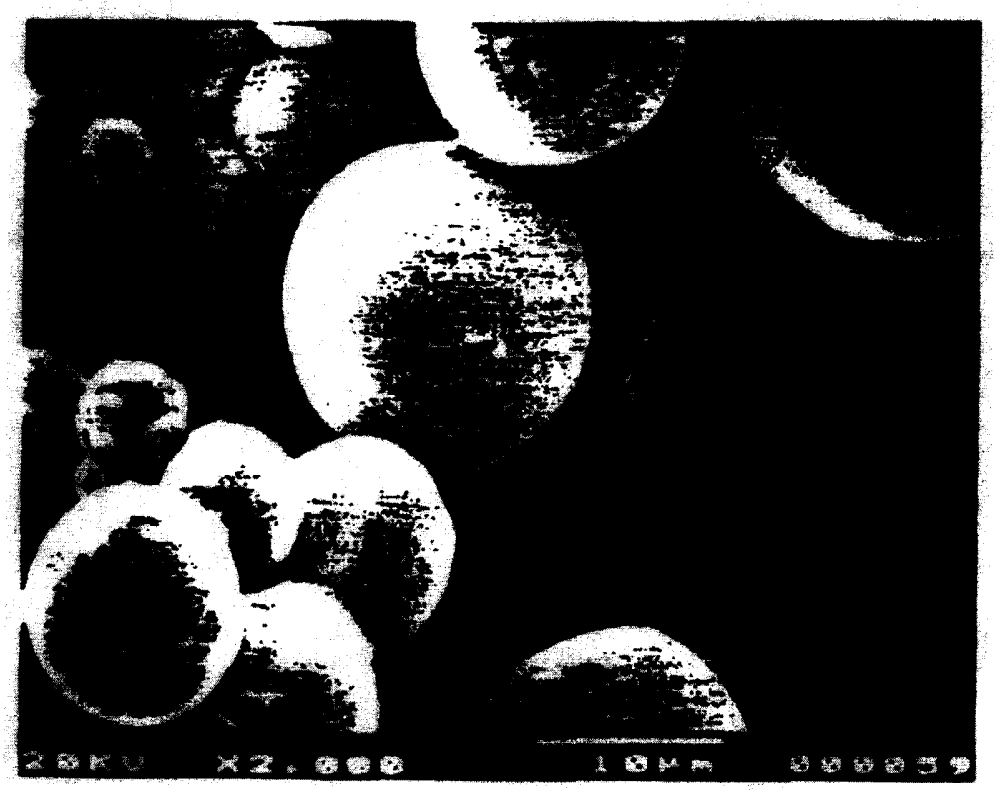
4. ábra


%-OS TERÜLET MPA CSÚCS
100
80
60
40
20
0
Y=-49,516
+75,283 LOG(x)
R2=0,999
10
100
%MPA
MPA
POLIMER
-10
15
RETENCIÓS IDŐ (PERC)

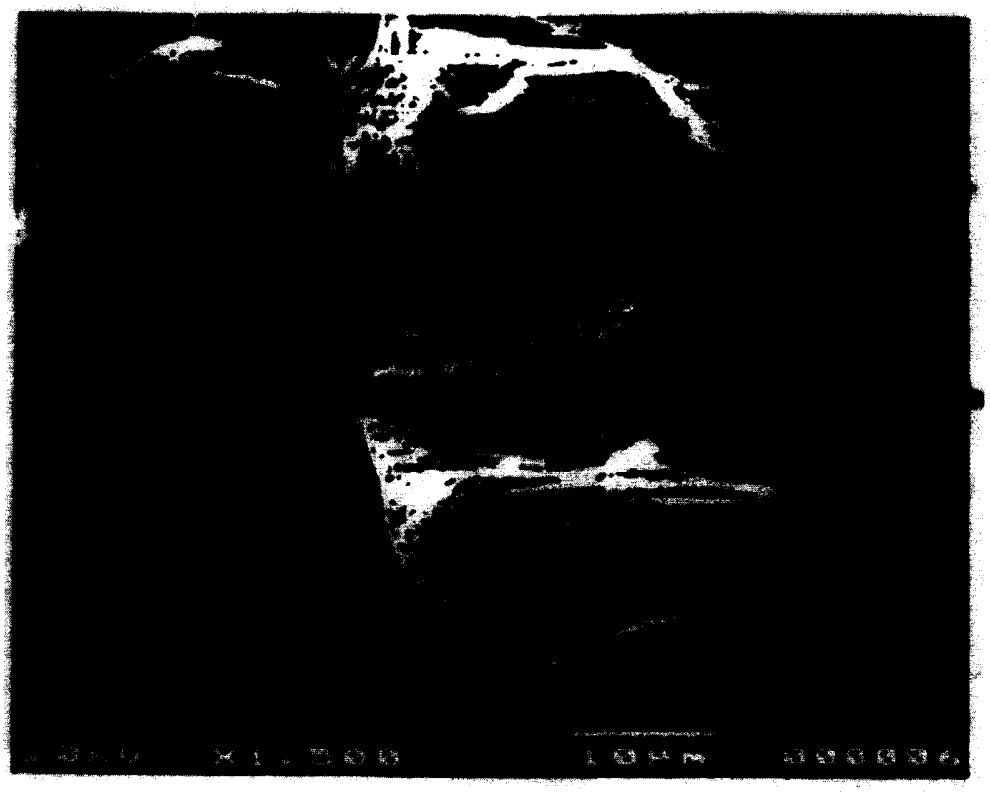
5. ábra



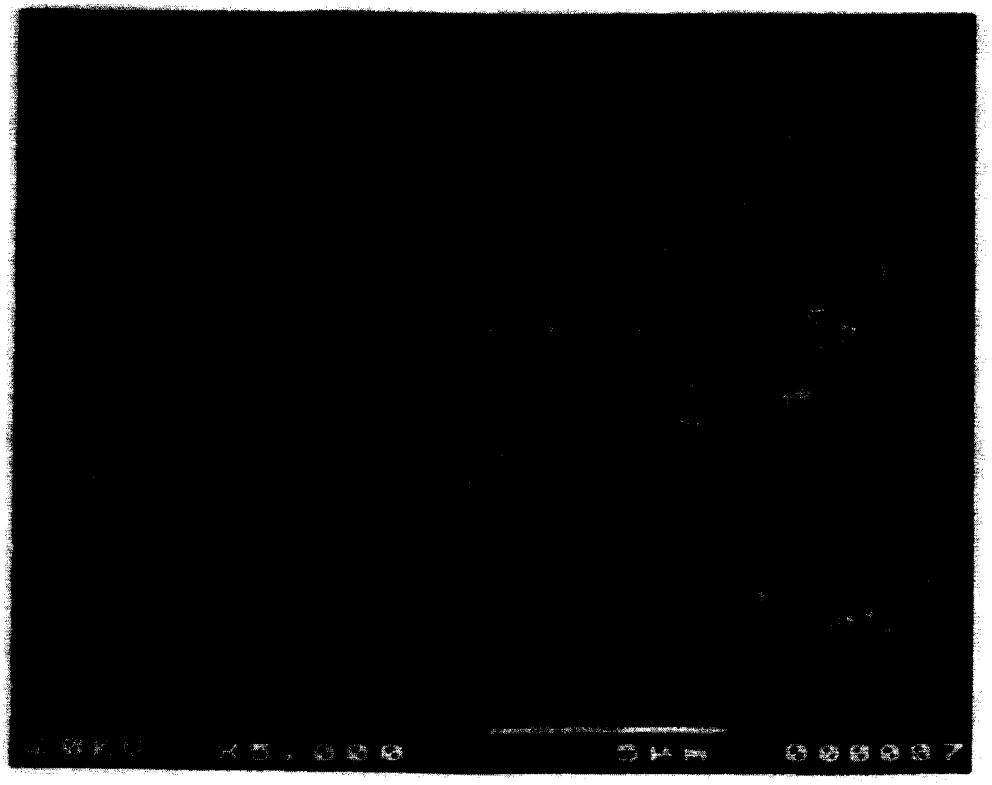
6A. ábra



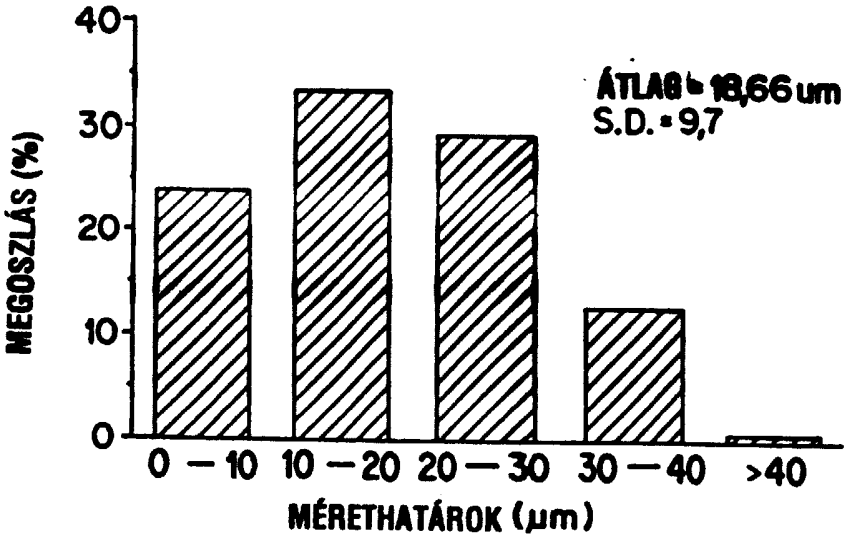
6B. ábra



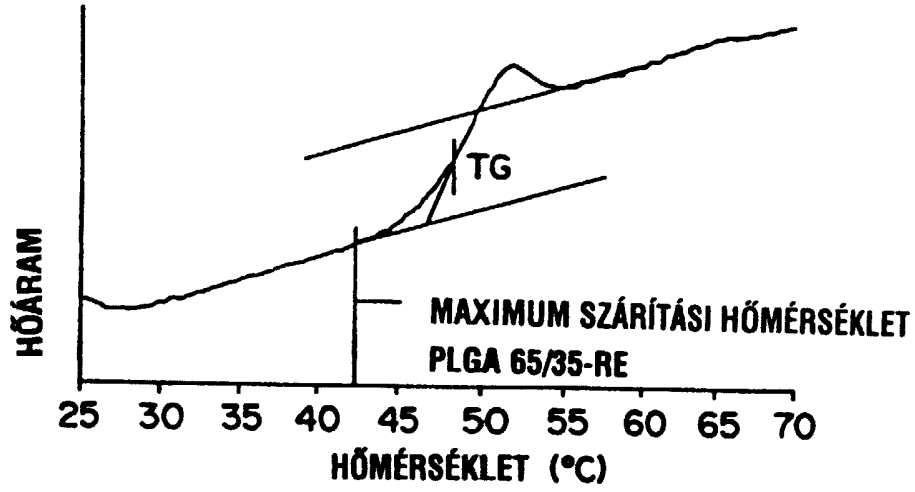
7A. ábra



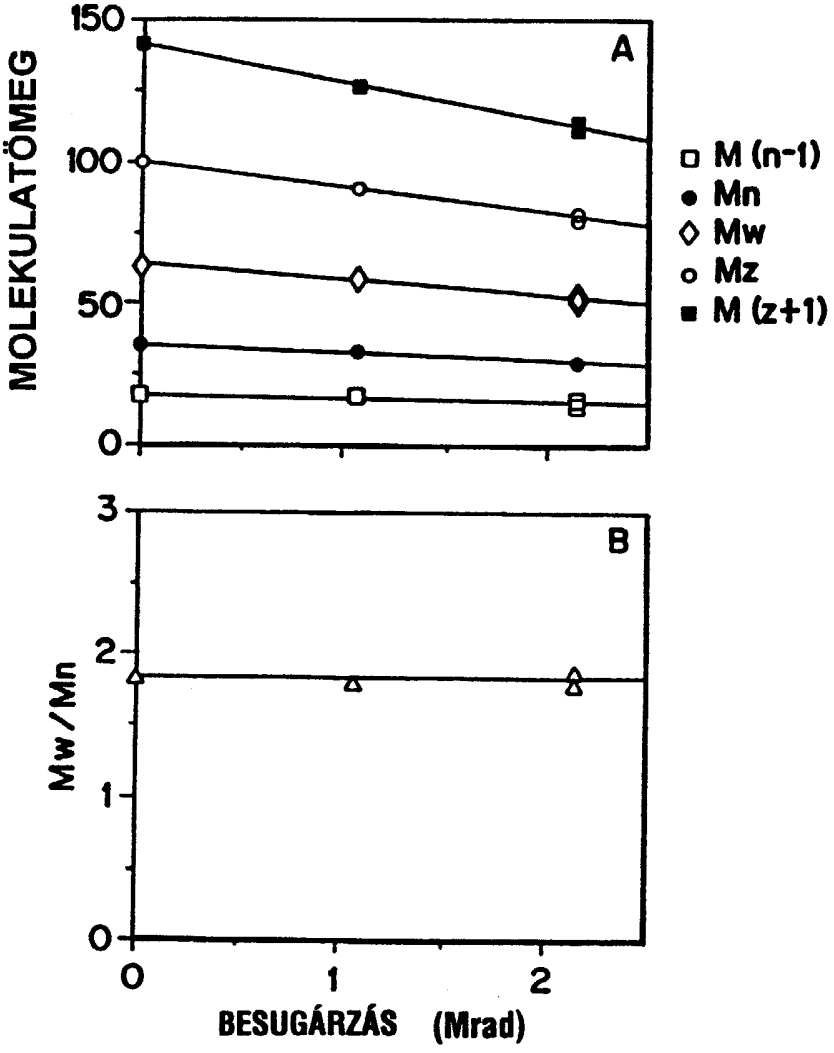
7B. ábra


40
30
20
10
0
MEGOSZLÁS (%)
ÁTLAG = 18,66 um
S.D. = 9,7
0 — 10
10 — 20
20 — 30
30 — 40
>40
MÉRETHATÁROK (µm)

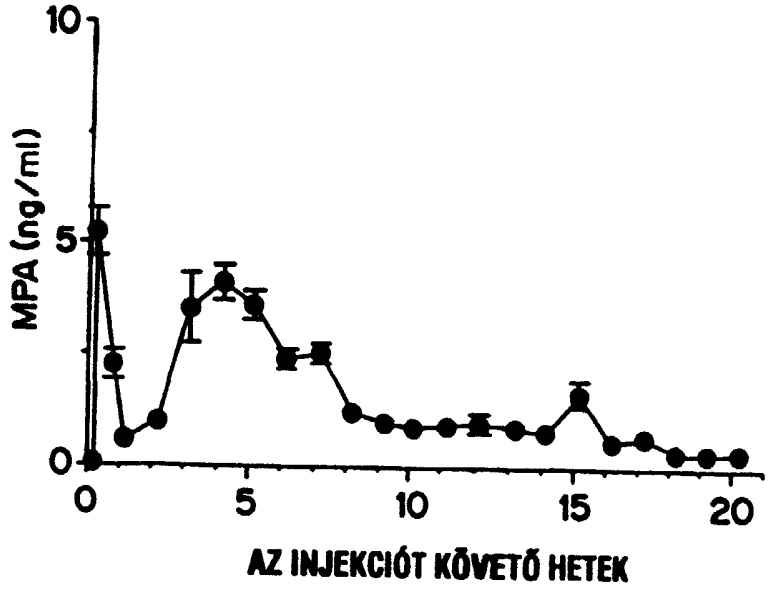
8. ábra


TG
HŐÁRAM
MAXIMUM SZÁRÍTÁSI HŐMÉRSÉKLET
PLGA 65/35-RE
25 30 35 40 45 50 55 60 65 70
HŐMÉRSÉKLET (°C)

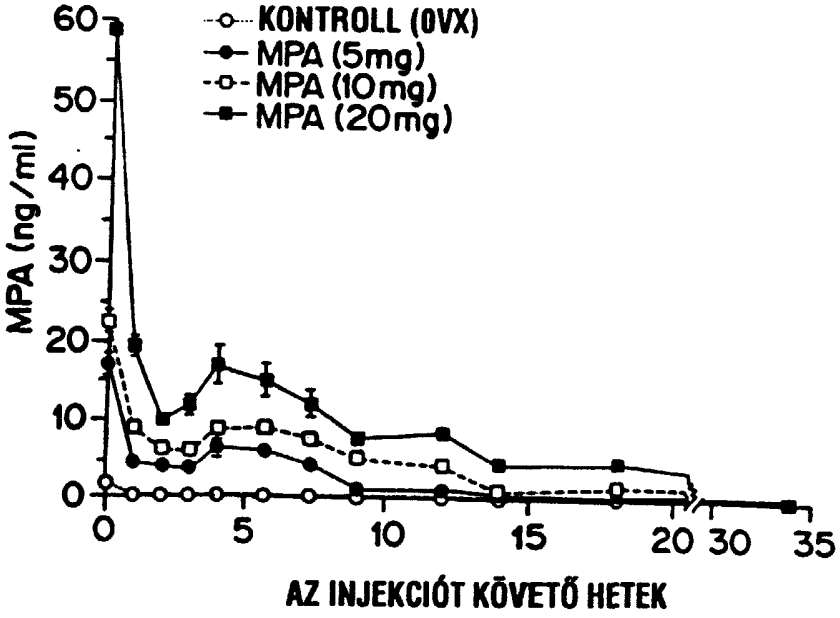
9. ábra


150
100
50
0
MOLEKULATÖMEG
A
M (n-1)
Mn
Mw
Mz
M (z+1)
3
2
1
0
Mw/Mn
B
0
1
2
BESUGÁRZÁS (Mrad)

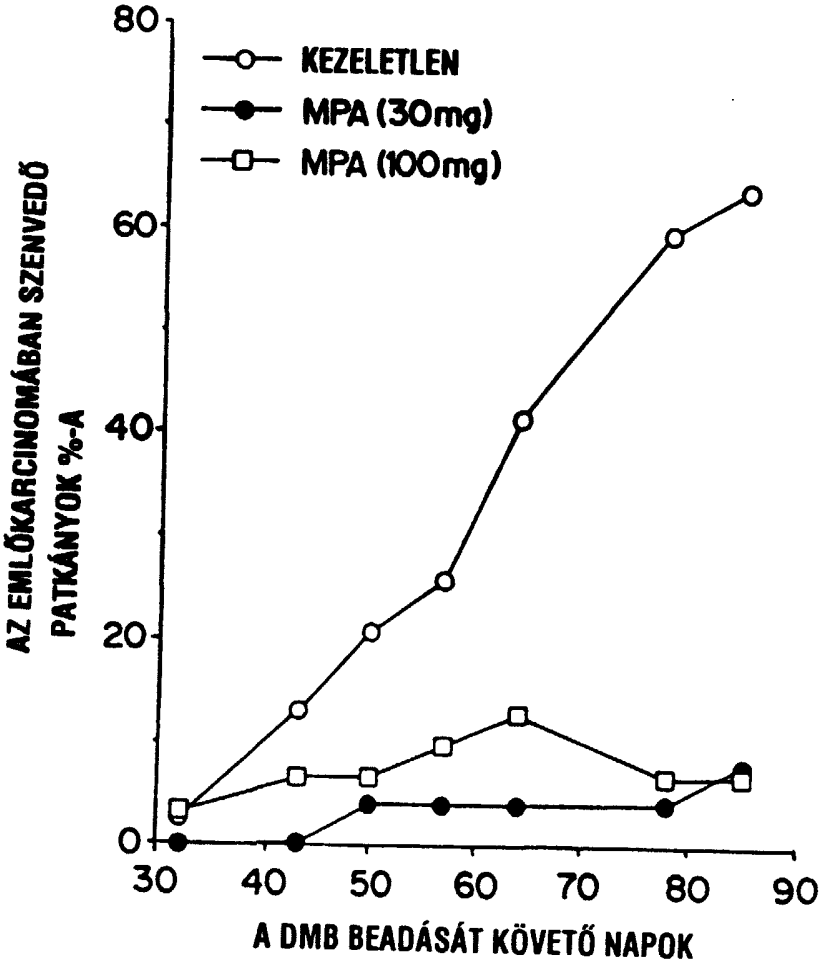
10. ábra



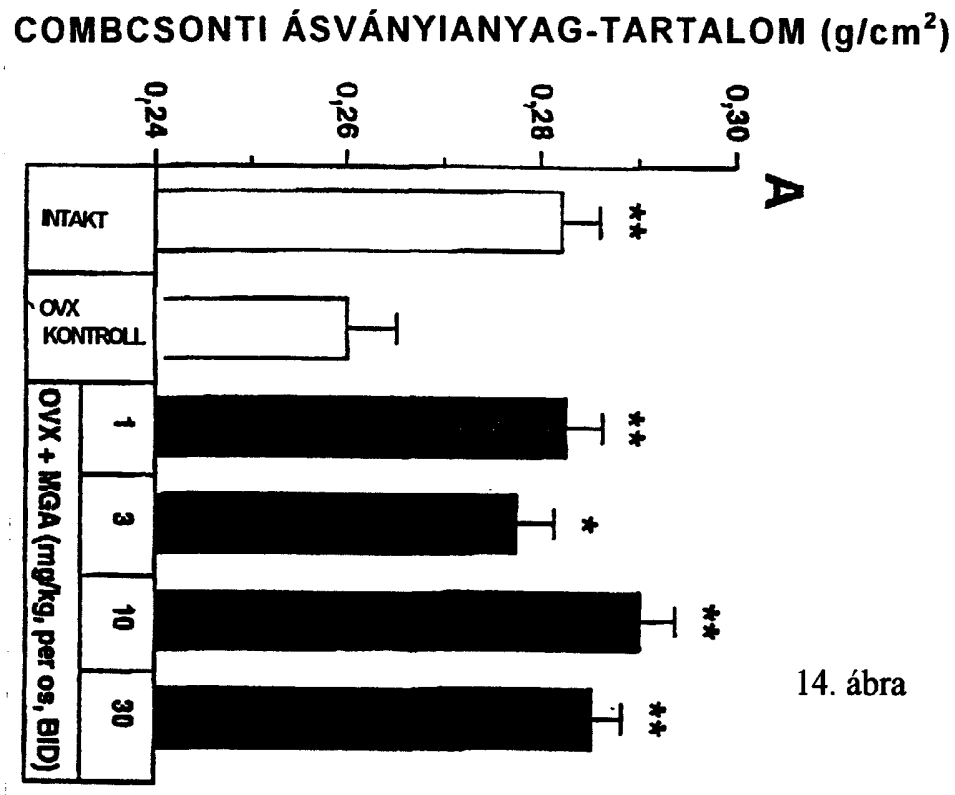
11. ábra



12. ábra

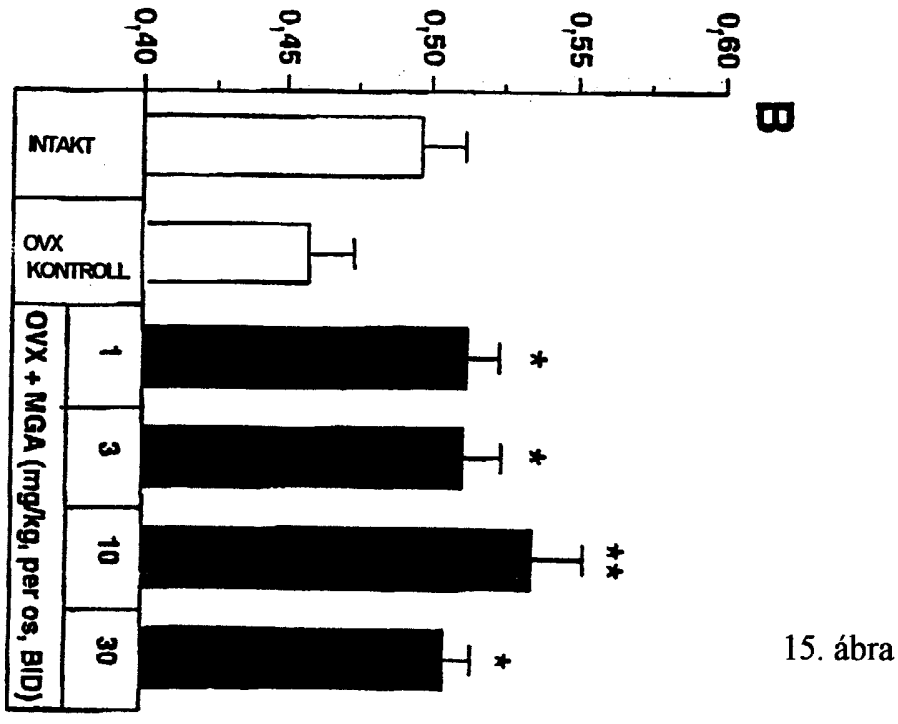

80
60
40
20
0
KEZELETLEN
MPA (30mg)
MPA (100mg)
AZ EMLŐKARCINOMÁBAN SZENVEDŐ PATKÁNYOK %-A
30
40
50
60
70
80
90
A DMB BEADÁSÁT KÖVETŐ NAPOK

13. ábra



14. ábra

* p<0,05
** p<0,01



15. ábra

* p<0,05
** p<0,01