SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

# PATENTOVÝ SPIS

(21) Číslo prihlášky: **1478-93**

(22) Dátum podania: **26.06.1992**

(31) Číslo prioritnej prihlášky: **724 532, 900 817**

(32) Dátum priority: **28.06.1991, 24.06.1992**

(33) Krajina priority: **US, US**

(40) Dátum zverejnenia: **07.09.1994**

(45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: **12.06.2000**

(86) Číslo PCT: **PCT/CA92/00275, 26.06.1992**

(11) Číslo dokumentu:

**280 697**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl[7]:

**A 61K 9/16**
A 61K 31/57

(73) Majiteľ patentu: Endorecherche, Inc., Quebec, CA;

(72) Pôvodca vynálezu: Labrie Fernand, Quebec, CA;
Lepage Martin, Quebec, CA;

(74) Zástupca: Labudík Miroslav, Ing., Kysucké Nové Mesto, SK;

(54) Názov vynálezu: **Farmaceutický prípravok na liečenie alebo prevenciu osteoporózy, rakoviny maternicovej sliznice, rakoviny prsníka, endometriózy alebo na antikoncepciu a spôsob jeho výroby**

(57) Anotácia:
Farmaceutický prípravok je s oneskoreným alebo diferencovaným uvoľňovaním androgénneho steroidu. Obsahuje pozvoľne uvoľňujúce častice s androgénnym steroidom zvoleným zo súboru zahŕňajúcim medroxyprogesterón acetát a/alebo megestról acetát s konštantou inhibície $K_i$ nižšou ako 2 x $10^{-8}$ M pre androgénny receptor a hodnotou $ED_{50}$ menšou ako 3,0 nM pre bunky rakoviny prsníka ZR-75-1, ktorý je rozptýlený v pomalo uvoľňujúcom spojive biologicky kompatibilnom s ľudským tkanivom a v tele rozložiteľnom na biologicky znášateľné metabilické produkty. Spojivo obsahuje polymetrickú matricu odvodenú z kopolymetrických a homopolymetrických polyesterov s hydrolyzovateľnými esterovými väzbami a je schopné pri svojom biologickom rozklade uvoľňovať androgénny steroid rýchlosťou udržujúcou koncentráciu androgénneho steroidu v sére medzi 1,0 a 50,0 nM počas trvania od 48 hodín do 28 dní po podaní. Je opísaný aj spôsob farmaceutického prípravku.

## Oblasť techniky

Vynález sa týka farmaceutického prípravku na liečenie alebo prevenciu osteoporózy, rakoviny maternicovej sliznice, rakoviny prsníka, endometriózy alebo na antikoncepciu, s oneskoreným alebo diferencovaným uvoľňovaním androgénneho steroidu, obsahujúceho pozvoľne uvoľňujúce častice s androgénnym steroidom. Zároveň sa vynález týka spôsobu výroby takéhoto farmaceutického prípravku.

## Doterajší stav techniky

Rôzni bádatelia študovali hormonálnu terapiu na rakovinu maternicovej sliznice a prsníka, ako i prevenciu a liečbu úbytku kostnej hmoty a liečenie endometriózy. Hlavné smery liečenia už rozvinutej rakoviny prsníka sa týkajú zamedzenia pôsobenia a/alebo tvorby estrogénu. Úloha estrogénu pri podpore rastu rakoviny prsníka citlivej na estrogén je dobre známa (Lippman, Semin. Oncol. 10 (príloha 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).

Známe je taktiež, že estrogény podporujú rast normálnej maternicovej sliznice. Chronické vystavenie estrogénom bez protiváhy progesterónu môže viesť k vzniku hyperplazie maternicovej sliznice, ktorá je predstupňom rakoviny maternicovej sliznice (Lucas, Obstet. Gynekol. Surv. 29 : 507 - 528, 1974). Výskyt rakoviny maternicovej sliznice sa zvyšuje po prechode, najmä u žien prijímajúcich estrogénnu terapiu bez súčasnej liečby progestíny (Smith et al., N. Engl. J. Med. 293: 1164-1167, 1975; Mack et al., N. Engl. J. Med. 294: 1262-1267, 1976).

Rôzni bádatelia skúmali od hormónov závislú rakovinu prsníka a maternicovej sliznice. Jeden známy spôsob endokrinnej terapie u žien pred prechodom je kastrácia, najčastejšie vykonávaná chirurgicky alebo ožiarením, pričom obidva tieto postupy vytvárajú nevratnú neplodnosť. Nedávno bolo dosiahnuté vratnej formy kastrácie použitím Luteinizačného hormónu - uvoľňujúceho hormón agonista (LHRH agonisty), ktorý po potlačení sekrécie bioaktívneho Luteinizačného hormónu (LH) hypofýzou zredukuje sérové estrogény na kastrované hladiny (Nicholson et al., Brit. J. Cancer 39: 268 - 273, 1979).

Rôzne štúdie ukazujú, že liečenie rakoviny prsníka u pacientok pred prechodom pomocou LHRH agonistov vyvoláva reakcie porovnateľné s tými, ktoré je možné dosiahnuť inými formami kastrácie (Klijn et al., J. Stereoid Biochem. 20: 1381, 1984; Manni et. al., Endokr. Rev. 7: 89 - - 94, 1986). Kladné účinky liečby pomocou LHRH agonistov boli pozorované taktiež u žien po prechode (Nicholson et al., Stereoid Biochem, 23: 843 - 848, 1985).

Patent US 4,071,0622 sa týka použitia niektorých LHRH agonistov proti nádorom krýs vyvolaným DMBA.

Patent US 4,775,660 sa týka liečenia rakoviny ženského prsníka použitím kombinovanej terapie obsahujúcej podávanie antiandrogénu a antiestrogénu žene potom, čo bol výstup z jej vaječníkov zablokovaný chemickými alebo chirurgickými prostriedkami.

Patent US 4,775,661 sa týka liečby rakoviny ženského prsníka použitím terapie pri ktorej sa žene, potom čo výstup hormónov z jej vaječníkov bol zablokovaný chemickými alebo chirurgickými prostriedkami, podáva antiandrogén a voliteľne niektoré inhibítory biosyntézy pohlavného steroidu.

Patent US 4,760,053 opisuje liečbu vybraných, od pohlavného steroidu závislých druhov rakoviny, ktorá obsahuje rôzne špecifikované kombinácie zlúčenín zvolenej z LHRH agonistov, antiandrogénov a antiestrogénov a niektorých inhibítorov biosyntézy pohlavného steroidu.

Patent US 4,472,382 sa týka liečby adenokarcinómu prostaty, benignej (nezhubnej) hypertrofie prostaty a od hormónu závislých prsných nádorov určenými liekmi alebo kombináciami. Hovorí o rôznych LHRH agonistoch a antiandrogénoch.

Medzinárodne zverejnená prihláška WO 921 05763 hovorí o istých 16,16 disubstituovaných zlúčeninách steroidu androsténu na vzrast vlasov a choroby kože. Medzinárodná patentová prihláška PCT/WO 86/01105 opisuje spôsob liečenia od pohlavného steroidu závislých rakovín pri teplokrvných živočíchoch, ktorý obsahuje podávanie konkrétnych liekov a kombinácií. Hovorí o antiandrogénoch, antiestrogénoch, niektorých inhibítoroch biosyntézy pohlavného steroidu a blokovania hormonálneho výstupu.

Paralelná prihláška prihlasovateľa čís. US 07 321 926, podaná 10. marca 1989 sa týka spôsobu liečenia rakoviny prsníka a maternicovej sliznice teplokrvných živočíchov, ktorý môže obsahovať zabránenie hormonálnej sekrécie z vaječníkov chirurgickými prostriedkami (ovariectomiu) alebo chemickými prostriedkami (použitie LHRH agonistov, napr. /D-Trp$^6$, des-Gly-$NH_2$$^{10}$/ LHRH ctylamidu alebo antagonistov), ako súčasť kombinovanej terapie. Hovorí o antiestrogénoch, androgénoch, progestínoch, inhibítoroch vytvárania pohlavného steroidu (najmä vytvárania pohlavných steroidov, ktoré sú katalyzované 17 ß-hydroxysteroidom dehydrogenázou alebo aromatázou), inhibítoroch sekrécie prolaktínov, sekrécie hormónov rastu a sekrécie ACTH.

Bolo poukázané na to, že receptory androgénu sú prítomné v normálnych (Witliff, In: Bush, H. (Ed.), Methods in Cancer Res., Vol. 11, Acad. Press, New York, 1975, pp. 298 - 304; Allegra et al., Cancer Res. 39: 1447-1454, 1979) i neoplastických (Allegra et al., Cancer Res. 39: 1447-1454, 1979; Engelsman et al., Brit. J. Cancer 30: 177-181, 1975; Moss et al., J. Ster. Biochem. 6 : 743-749, 1975; Miller et al., Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 2: 539-542, 1985; Lippman et al., Cancer 38: 868-874, 1976; Allegra et.al., Cancer Res. 39: 1447-1454, 1979; Miller et al., Eur. J. Clin. Oncol. 21: 539-542, 1985; Lea et al., Cancer Res. 49: 7162-7167, 1989), ako i v rôznych vytvorených radoch buniek rakoviny prsníka (Lippman et al., Cancer Res. 36: 4610 - 4618, 1976; Horwitz et al., Cancer Res 38 : 2434-2439, 1978; Poulin et al., Breast Cancer Res. Treatm. 12: 213-225, 1988).

Receptory androgénu sú prítomné taktiež v prsných nádoroch krýs vyvolaných antracénom dimetylbenzénu (DMBA) (Asselin et al., Cancer Res. 40 : 1612-1622, 1980).

Receptory androgénu boli opísané taktiež v ľudskej maternicovej sliznici (MacLaughlin and Richardson, J. Steroid Biochem. 10 : 371-377, 1979; Muechler and Kohler, Gynekol. Invest. 8 : 104, 1988). Účinky na potlačenie rastu pomocou metyltrienolón androgénu (R 1881), na rakovinu maternicovej sliznice in vitro boli taktiež už opísané (Centola, Cancer Res. 45: 6264-6267, 1985).

Posledné správy uvádzajú, že receptory androgénu môžu zvýšiť selektívnu schopnosť receptorov estrogénu alebo dokonca nahradiť receptory estrogénu ako najlepšiu reakciu na endokrinnú terapiu (Teulings et al., Cancer Res. 40: 2557-2561, Bryan et al., Cancer 54: 2436-2440, 1984).

Prvý androgén úspešne použitý pri liečbe rozvinutého nádoru prsníka je testosterón propionát (Narthanso, Rec, Prog. Horm. Res. 1 : 261-291, 1947). Mnoho štúdií následne potvrdilo kladný účinok androgénov na rakovinu prsníka

(Alan and Herrman, Ann. Surg. 123: 1023-1035; Adair, Surg. Gynekol. Obstet. 84: 719-722, 1947; Adair et al., JAMA 140: 1193-2000, 1949). Tieto počiatočné výsledky podnietili kolektívne štúdie o účinku testosterón propionátu a DES, ktoré oba boli zistené ako účinné na vytváranie objektívnych remisií. (Podvýbor pre steroidy a rakovinu výboru pre výskum rady pre farmáciu a chémiu Americkej lekárskej spoločnosti, následovaný Cooperative Breast Cancer Group v stredisku Cancer Chemoterapy National Service Center NCI, ktorý zistil, že testosterón propionát zlepšil početnosť i trvanie remisie, kvalitu života a prežitia (Cooperative Breast Cancer Group, JAMA 188 : 1069-1072, 1964)).

Percento reakcie 48 % (13 z 27 pacientok) bolo zaznamenané u žien po prechode, ktoré užívali dlhodobe pôsobiaci androgén metonolón enantát (Kennedy et al., Cancer 21 : 197-201, 1967). Priemerná doba prežitia bola štyrikrát dlhšia u respondentov v porovnaní so skupinou nerespondentov (27 oproti 7,5 mesiacov). Veľký počet štúdií preukázal, že androgény iniciujú remisiu u 20 až 40 % žien s metastatickou rakovinou prsníka (Kennedy, Hormone Therapy in Cancer. Geriatrics 25: 106-112, 1970; Goldenberg et al., JAMA 223: 1267-1268, 1973).

Reakcie v rozsahu 39 % s priemerným trvaním 11 mesiacov boli nedávno pozorované u skupiny 33 žien po prechode, ktoré predtým nereagovali na Tamoxifén (Manni et al., Cancer 48: 2507-2509, 1981) po liečení Fluoxymesterónom (Halostatin) (10mg, b.i.d.). Z týchto sa 17 taktiež podrobilo hypofysektómii. Nebol žiadny rozdiel v percente reakcie na Fluoxymesterón u pacientok, ktoré predtým reagovali na Tamoxifén a u tých, ktoré nereagovali. Z tých 17-tich pacientok, u ktorých zlyhal tak Tamoxifén ako i hypofysektómia, reagovalo 7 na Fluoxymesterón v priemere na dobu 10 mesiacov. Medzi nimi dve nereagovali na Tamoxifén ani na hypofysektómiu.

Ukázalo sa, že kombinácia Fluoxymesterónu a Tamoxifénu je lepšia, ako len samotný Tamoxifén. V skutočnosti boli kompletné reakcie (KR) zaznamenané len v skupine kombinovanej liečby, pričom 32 % zaznamenalo čiastočnú reakciu (ČR) v skupine kombinovanej liečky oproti iba 15 % monoterapeutickej skupiny. V skupine kombinovanej liečby bolo iba 25 % nereagujúcich pacientok oproti 50 % pacientok, ktoré dostávali iba TAM (Torney et al., Int. Med. 98: 139-144, 1983). Okrem toho priemerná doba medzi nasadením terapie a jej zlyhaním bola dlhšia u Fluoxymesterónu + Tamoxifénu (180 dní), oproti skupine liečenej len Tamoxifénom (64 dní). V skupine kombinovanej liečby bola tendencia k zlepšenému prežitiu (380 oproti 330 dňom).

Nezávislý kladný účinok androgénu kombinovaného s antiestrogénom naznačuje údaj, že pacientky ktoré nereagovali na Tamoxifén, dokázali reagovať na Fluoxymesterón a naopak. Okrem toho pacientky liečené Tamoxifénom a prechádzajúce na Fluoxymesterón prežili dlhšie, ako tie ktoré boli liečené opačným režimom (Torney et al., Ann. Int. Med. 98 : 139-144, 1983).

Pretože testosterón propionát mal kladné účinky u žien pred prechodom i po ňom (Adair et al., J. Am. Med. Ass. 15 : 1193-1200, 1949), nasvedčuje to tomu, že androgén nielen inhibuje sekréciu gonadotropínu, ale má i priamy inhibičný vplyv na rast rakoviny.

Posledné štúdie in vitro opisujú relatívne protirastové účinky androgénu na rast nádora prsníka citlivého na estrogén, resp. buniek radu ZR-75-1 (Poulin et al. „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). Ako už bolo skôr uvedené, Poulin et al. (Breast Cancer Res. Treatm. 12: 213-225, 1989) zistili, že bujnenie buniek ZR-75-1 nádora prsníka je inhibované androgénmi, pričom inhibičný účinok androgénov sa spočíta s inhibičným účinkom antiestrogénu. Inhibičný účinok androgénov na rast nádorových buniek prsníka ZR-75-1 bol taktiež pozorovaný in vivo na myšiach (Dauvois a Labrie, Cancer Res. 51 : 3131-3151, 1991).

Ako možný mechanizmus pôsobenia androgénu na rakovinu prsníka bolo nedávno preukázané, že androgény silno potláčajú obsah receptora estrogénu (ER) a progesterónu (PgR) v rakovinových bunkách ZR-75-1 meraný podľa rádioligandnej väzby a monoklonárnymi protilátkami proti ER. Podobné inhibičné účinky boli pozorované na úrovniach ER a RNA meraných skúškou ribonukleázovej ochrany. Androgénny účinok je meraný ako subnanomolárna koncentrácia nearomatizovateľného androgénu 5α-dihydrotestosterón, bez ohľadu na prítomnosť estrogénov a je kompetitívne vyvrátený antiandrogénom hydroxyflutamidom (Poulin et al., Endocrinology 125 : 392-399, 1989). Takéto údaje o vytlačení receptora estrogénu poskytujú vysvetlenie pre aspoň časť antiestrogénových účinkoch androgénov na rast rakovinových buniek prsníka a naznačujú, že špecifické inhibičné účinky androgénnej liečby by sa mohli pripojiť k štandardnej liečbe obmedzenej na blokovanie estrogénov antiestrogénmi.

Dauvois et al., (Breast Cancer Res. Treatm. 14 : 299-306, 1989) ukázali, že neustále uvoľňovanie androgénu 5α-dihydrotestosterónu (DHT) v ovariektomizovaných krysách majúcich nádor prsníka spôsobený DMBA malo za následok výrazné blokovanie rastu nádora vyvolaného 17ß-estradiolom ($E_2$). To, že DHT pôsobí interakciou s receptorom androgénu, je podporované zistením, že súčasná liečba antiandrogénom Flutamidom úplne zabránila pôsobeniu DHT. Mohutný inhibičný účinok androgénu DHT na rast nádora ilustruje najmä skutočnosť, že počet pokračujúcich nádorov poklesol pôsobením DHT zo 69,2 % na 29,2 % pri zvieratách liečených pomocou $E_2$ a zvýšenie počtu kompletných reakcií (zmiznutie hmatných nádorov) pôsobením androgénu zo 11,5 % na 33,3 % v tej istej skupine zvierat. Počet nových nádorov, ktoré sa objavili v priebehu 28 dní pozorovania pri zvieratách liečených pomocou $E_2$, sa zmenšil z 1,5 ± 0,3 na 0,7 ± 0,2 na krysu počas liečby androgénom DHT. Takýto účinok bol taktiež dosiahnutý antiandrogénom Flutamidom. Takéto údaje demonštrujú predovšetkým to, že androgény sú silné inhibítory rastu nádora prsníka vyvolaného pôsobením DMBA nezávislým od inhibície sekrécie gonadotropínu a nasvedčujú o činnosti prebiehajúcej priamo na úrovni nádora, čím ďalej potvrdzujú údaje in vitro, získané s rakovinovými bunkami ZR-75-1 nádora ľudského prsníka (Poulin et al., Breast Cancer Res. Treatm. 12 : 213-225, 1988).

Prírodné androgény testosterón (TESTO) a dihydrotestosterón (DHT) sa tvoria konverziou androstenediónu na TESTO pomocou dehydrogenázy 17 ß-hydroxysteroidu a potom TESTO na DHT pôsobením enzýmu 5α-reduktázy. Predchodca adrenalínu 5-androst-5ene-3ß, 17 ß-diol sa môže tiež premeniť na TESTO pôsobením enzýmu 3ß-hydroxysteroid dehydrogenáza $\Delta^5$ $\Delta^4$, izomerázy (3ß-HSD).

Pretože prírodné androgény TESTO a DHT majú silné maskulinizujúce účinky, boli synteticky vyrobené viaceré deriváty TESTO, ako i progesterón, aby sa získali užitočné zlúčeniny majúce menej nežiaducich maskulinizujúcich vedľajších účinkov (rast chlpov na tele, strata vlasov na temene hlavy, akné, seborea a silný hlas).

Medroxyprogesterón acetát (MPA) je jeden z najrozšírenejších zlúčenín v endokrinnej liečbe rozvinutej rakoviny prsníka u žien (Mattsson, Breast Cancer Res. Treatm. 3:

231-235, 1983; Blumenschein, Semin. Onkol. 10: 7-10, 1983; Hortobagyi et al. Breast Cancer Res. Treatm. 5: 321-326, 1985; Haller and Glick, Semin Oncol. 13: 2-8, 1986; Horwitz, J. Steroid Biochem. 27 : 447-457, 1987). Celková klinická reakcia na vysoké dávky tohto syntetického progestínu je v priemere 40 % u nevýberove vybratých pacientok (Horwitz, J. Steroid. Biochm. 27 : 447-457, 1987), čo je účinnosť porovnateľná s nesteroidným antiestrogénom Tamoxifénom (Lippman, Semin. Oncol. 10 (Suppl.): 11-19, 1983). Všeobecnejšie sa však používa na recidívu rakoviny prsníka po ostatných endokrinných terapeutických opatreniach. Maximálne inhibičné pôsobenie medroxyprogesterón acetátu (MPA) na rast rakovinových buniek ľudského prsníka in vitro je možné dosiahnuť pri koncentrácii iba 1 nM, kým dávka približne tisíckrát silnejšia sa často vyžaduje na účinok glukokortikoidu (Poulin et al., Breast Cancer Res. Treamt. 13: 161-172, 1989).

Až donedávna boli len málo chápané mechanizmy, na ktorých je založené protirakovinové pôsobenie MPA a boli prisudzované interakcii s receptorom progesterónu. Tento steroid však má vysokú afinitu k receptorom progesterónu (PgR), ako i adrogénu (AR) a glukokortikoidu (GR) v rôznych živočíšnych tkanivách (Perez-Palacios et al., J. Steroid Biochem. 19: 1729-1735, 1983; Janne and Bardin, Pharmacol. Rev. 36: 35S-42S, 1984; Pridjian et al., J. Steroid Biochem. 26: 313-319, 1987; Ojasso ot al., J. Steroid Biochem. 27: 255-269, 1987) rovnako ako v nádoroch ľudského prsníka (Young et al., Am. J. Obstet. Gynecol. 137: 284 - 292, 1980), čo je vlastnosť, ktorú má s ostatnými syntetickými derivátmi progesterónu (Bulloc et al., Endocrinology 103: 1768-1782, 1978; Janne and Bardin, Pharmacol. Rev. 36: 35S-42S, 1984; Ojasso et al., J. Steroid Biochem. 27: 255-269, 1987). Je známe, že väčšina syntetických progestacionálnych činidiel dosahuje významnú afinitu nielen k receptorom progesterónu (PgR), ale i androgénu (AR), ako i glukokortikoidu a vyvoláva biologické pôsobenie špecificky určované týmito individuálnymi receptorovými systémami (Labrie et al., Fertil. Steril. 28: 1104-1222, 1977; Engel et al., Cancer Res. 38 : 3352-3364, 1978; Raynaud et al., In: Mechanismus of Steroid Action /G. P. Lewis, M. Grisburg, eds/; MacMiland Press, London, pp. 145-158, 1981; Rochefort and Chalbos, Mol. Cell. Endocrinol. 36: 3-10, 1984; Janne and Bardin, Pharmacol. Rev. 36: 35S-42S 1984; Poyet and Labrie, Mol. Cell. Endocrinol. 42: 283-288, 1985; Poulin at al., Breast Cancer Res. Treatm. 13: 161-172, 1989). Preto tiež boli u pacientok liečených MPA pozorované rôzne vedľajšie účinky odlišné od progestacionálnych.

Inhibičný účinok MPA na sekréciu gonadotropínu sa zrejme uskutočňuje jeho priamou interakciou s hypofýzou AR pri kryse i u človeka (Perez-Palacion et al., J. Steroid Biochem. 15: 125-130, 1981). Okrem toho MPA vyvodzuje androgénnu činnosť v ľadvine myši (Janne a Bardin, Pharmacol. Rev. 36: 35S-42S, 1980) a vo vertikálnej prostate krysy (Labrie, C. et al., J. Steroid Biochem. 28: 379-384, 1987; Labrie, C. et al., Mol. Cell. Endocrinol. 68: 169-179, 1990). Napriek svojej vysokej afinite proti AR, MPA len zriedka vyvoláva významné virilizačné symptómy (akné, chlpatosť atď.) (Haller a Glick, Semin. Oncol. 13, 2-8, 1986).

Najľahšie vysvetliteľné nepriaznivé vedľajšie účinky MPA sa vzťahujú na jeho pôsobenie glukokortikoidného typu s Cushingoidným syndrómom, eufóriou a subjektívnou úľavou bolesti (Mattsson, Breast Cancer Res. Treatm. 3: 231-235, 1983; Blossey et al., Cancer 54: 1208-1215, 1984; Hortobagyi et al., Breast Cancer Res. Treatm. 5: 321-326, 1985; Van Veelen et al., Cancer Chemother. Pharmacol. 15: 167-170, 1985). Usudzuje sa, že potlačenie adrenálnej funkcie pôsobením MPA je spôsobené tak inhibičným pôsobením na ACTH sekréciou na úrovni hypofýzy, ako i priamou inhibíciou tvorby steroidu na adrenálnej úrovni (Blossey et al., Cancer 54: 1208-1215, 1984; Van Veelen et al., Cancer Treatm. Rep. 69 : 977-983, 1985).

Napriek svojej vysokej afinite k AR, spôsobuje MPA len zriedka virilizačné symptómy (akné, chlpatosť a pod.). Okrem toho je jeho inhibičný účinok na sekréciu gonadotropínu spôsobený zrejme jeho priamou interakciou a hypofýzou AR pri kryse (Labrie et al., Fertil. Steril. 28: 1104-1112, 1977; Perez-Palacios et al., J. Steroid Biochem. 19: 1729-1735, 1983) i u človeka (Perez-Palacios et al., J. Steroid Biochem. 15: 125-130, 1981). Okrem toho MPA vyvíja androgénnu činnosť v ľadvine myši (Janne and Bardin, Pharmacol. Rev. 36 : 35S-42S, 1980) a vo vertikálnej prostate krýs (Labrie, C. et al., Steroid Biochem. 28: 379-384, 1987; Labrie, C. et al., Mol Cell. Endocrinol. 68: 169-179, 1990).

Poulin et al. „Androgenný a glukokortikoidný receptor sprostredkujúci bunkové proliferacie medroxyprogesterón acetátu v ľudských rakovinových bunkách prsníka ZR-75-1", (Breast Cancer Res. Treamt. 13: 161-172, 1989) nedávno zistili, že inhibičný účinok medroxyprogesterón acetátu (MPA) na rast rakovinových buniek ZR-75-1 ľudského prsníka je spôsobený najmä androgénnymi vlastnosťami zlúčeniny. Androgenálne vlastnosti MPA boli demonštrované v iných systémoch (Labrie, C. et al., J. Steroid Biochem. 28: 379-384, 1987; Luthy et al., J. Steroid Biochem. 31: 845-852, 1988; Plante at al., J. Steroid Biochem. 31: 61-64, 1988; Labrie, C. et al., Mol. Cell. Endocrinol. 58: 169-179, 1990). Taktiež pri iných syntetických progestínoch bolo zistené, že vedľa svojho účinku progesterónového typu majú i rôzne stupne androgénneho účinku (Labrie et al., Fertil Steril. 31: 29-34, 1979; Poyet and Labrie, The Prostate 9: 237-246, 1986; Labrie C. et al., J. Steroid Biochem. 28: 379-384, 1987; Luthy et al., J. Steroid Biochem. 31: 845-852, 1988; Plante et al., J. Steroid Biochem. 31: 61-64, 1989).

Vysokodávkované progestíny, najmä medroxyprogesterón acetát a megestról acetát, boli rovnako s úspechom použité na liečbu rakoviny maternicovej sliznice (Tatman et al., Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 25: 1619-1621, 1989; Podratz et al., J. Obstet. Gynecol. 66: 106-110, 1985; Ehrlich et al., Am. J. Obstet. Gynecol. 158: 797-807, 1988). Bolo dokázané, že metyltestosterón zmierňuje symptómy endometriózy. (Hamblen South Med. J. 50: 743, 1987; Preston, J. Obstet. Gynecol. 2 : 152, 1965). Androgenálne a maskulinizujúce vedľajšie účinky (niekedy nevratné) sú však významné pri silných androgénnych zlúčeninách, ako je testosterón a jeho deriváty.

Vysokodávkovaný MPA ako prvé liečenie rakoviny prsníka prejavil podobné účinky ako Tamoxifén (Van Vellen et al. Cancer 58: 7-13, 1986). Vysokodávkované progestíny, najmä medroxyprogesterón acetát a megestról acetát boli taktiež s úspechom použité na liečenie rakoviny maternicovej sliznice. (Tatman et al., Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 25: 1619-1621, 1989; Podratz el al., Obstet. Gynecol. 66: 106-110, 1985; Ehrlich et al., Am. J. Obstet. Gynecol. 158: 797-807, 1988). Vysokodávkovaný MPA sa používa s úspechom podobným ako Tamoxifén na liečenie nádora maternicovej sliznice (Rendina et al., Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 17: 285-291, 1984).

Pri nevýberovom klinickom teste sa ukázalo, že vysokodávkovaný MPA podávaný počas 6 mesiacov spôsobuje zastavenie choroby u 50 % pacientov a čiastočné zastavenie u 13 % subjektov oproti 12 %, resp. 6 % pacientov, ktorí

dostávali platené (Telimaa et al., Gynecol. Endocrinol. 1: 13, 1987).

Ukázalo sa, že androgén metyltesterón zmierňuje symptómy endometriózy (Hamblen, South Med. J. 50: 743, 1987; Preston, Obstet. Gynecol. 2: 152, 1965). Androgenálne maskulinizujúce vedľajšie účinky (niekedy nevratné) sú však dôležité pri silných androgénnych zlúčeninách, ako je testosterón.

Analogicky sa znížením receptorov estrogénu pri rakovinových bunkách ľudského prsníka ZR-75-1 vyvolávaným androgénom (Poulin et al., Endocrinology 125: 392-399, 1989) spôsobilo orálne podávanie MPA ženám počas folikulárnej fázy zníženie hladiny estrogénu viazaného v maternicovej sliznici (Tseng a Gurpied, J. Clin. Endocrinol. Metab. 41: 402-404, 1975).

Pokusy na zvieratách ukázali, že nedostatok androgénu vedie k osteopénii (úbytok kostného tkaniva), kým podávanie testosterónu zvyšuje celkové množstvo kostného tkaniva (Silberberg and Silberberg, 1971, pozri Finkelstein et al., Ann. Int. Med. 106: 354-361, 1987). Orchiectomia pri krysách môže spôsobiť osteoporózu zistiteľnú počas dvoch mesiacov (Winks and Felts, Calcif. Tissue Res. 32: 77-82, 1980; Verhas et al., Calif. Tissue Res. 39: 74-77, 1986).

Zatiaľ čo by sa dalo očakávať, že zmenšené kostné tkanivo budú mať ženy oligomenoreické a amenoreické s nízkymi hladinami cirkulácie $E_2$, tieto ženy s vysokými hladinami androgénu (ale nízkymi hladinami estrogénu) majú zmenšené riziko vzniku osteroporózy (Dixon et al., Clinical Endocrinology 30: 271-277, 1989).

Bolo zistené, že hladiny adrenálneho androgénu sa znižujú pri osteroporóze (Nordin et al., J. Clin. Endocr. Metab. 60: 651, 1985). Okrem toho bolo zistené, že vysoké hladiny androgénu u žien po prechode chránia proti zrýchlenému úbytku kostného tkaniva. (Deutsch et al., INT. J. Gynecol. Obstet. 25: 217-222, 1987; Aloia et al., Arch. Int. Med. 143: 1700-1704, 1983). V súlade s touto úlohou androgénov sú hladiny metabolitov androgénu v moči nižšie pri postmenopauzálnej symptomatickej menopauzy ako pri kontrolovanej skupine a významné zmenšenie konjugovaného dehydroepiandrosténu (DHEA) bolo zistené v plazme osteoporotických pacientok (Hollo and Feher, Acta Med. Hung. 20: 133, 1964; Urist and Vincent, J. Clin. Orthop. 18: 199, 1961; Hollo et al., Acta Med. Hung. 27: 155, 1970). Dokonca bola vyslovená domienka, že postmenopauzálna osteoporóza vzniká z hypoestrogenizmu i z hypoandrogenizmu (Hollo et al., Lancet: 1357, 1976).

Mechanizmom skôr uvedenej úlohy oboch estrogénov a androgénov v osteoporóze, prítomnosť esterogénnych (Komm. et al., Science 241 : 81-84, 1988; Eriksen et al., Science 241 : 84-86, 1988) i androgénnych (Colvard et al., Proc. Natl. a Cat. Sci. 86: 854-857, 1989) receptorov v osteoblastiach by mohla vysvetliť zvýšenú kostnú resorbciu pozorovanú pri nedostatku estrogénov a androgénov.

U chlapcov počas puberty zvýšenie sérovej hladiny testosterónov spôsobuje zvýšenie alkalickej fosfátovej aktivity (znak osteoblastickej aktivity), ktorá sama spôsobuje zväčšenie kostnej hustoty (Krabe et al., Arch. Dis. Child. 54: 959-953, 1979; Krabbe et al., Arch. Pediat. Scand. 73: 750-755, 1984; Riis et al., Calif. Tissue Res. 37: 213-217, 1985).

Zatiaľ čo u žien je rýchla kostná resorbcia odštartovaná v menopauze, u mužov môže byť strata kostného materiálu rozpoznaná až okolo 65. roku (Riggs et al., J. Clin. Invest. 67: 328-335, 1987). Podstatná kostná resorbcia sa prejavuje viditeľne u mužov okolo 80. roku veku a je spojená s výskytom zlomenín bedra, chrbtice a zápästia. Niektoré štúdie naznačujú, že steoporóza je klinickým prejavom nedostatku androgénu u mužov (Baran et al., Calcif. Tissue Res. 26: 103-106, 1978; Odell a Swerdloff, West. J. Med. 124: 446-475, 1976; Smith and Walker, Calif. Tissue Res. 22 (Suppl.): 225-228, 1976).

I keď menej frekventovaná ako u žien, môže byť osteoporóza u mužov významnou príčinou morbidity. (Seeman et al., Am. J. Med. 75: 977-983, 1983). Skutočný nedostatok androgénov je hlavným rizikom chrbtových kompresií u mužov (Seeman et. al., Am. J. Med. 75: 977-983,1983). Zhoršená radiálna a chrbticová kostná hustota sprevádza hypogonadizmus spojený s hyperprolaktinémiou (Greespan et al., Ann. Ind. Med. 104: 777-782, 1986) alebo anorexiu nervosa (Rigotti et al. JAMA 256: 358-388, 1986). V týchto prípadoch je však úloha hyperprolaktinémie a strata telesnej hmotnosti neistá.

Hypogonadizmus u mužov bol rozpoznaný, nakoľko bol príčinou osteoporotických zlomenín (Albright and Reifenstein, 1948; Saville, Clin. End. Metab. 2: 177-185, 1973). Hustota kosti je fakticky zoslabená tak pri primárnom, ako i pri sekundárnom hypogonadizme (Velentzas and Karras. Nouv. Presse. Médicale 10: 2520, 1981).

Ťažká osteopénia bola opísaná u 23 mužov s hypogonadizmom odhalením zníženia kortikálnej a trabekulárnej kostnej hustoty (Finkelstein et al, Ann. Int. Med. 106: 354-361, 1987; Foresta et al., Horm. Metab. Res. 15: 56-57, 1983). Osteopénia bola tiež opísaná u mužov s Klinefelterovým syndrómom (Foresta et al., Hor. Metab. Res. 15: 204-207, 1983; Foresta et al., Horm. Metab. Res. 15: 56-57, 1983; Smith and Walker. Calif. Tissue Res. 22: 225-228, 1977).

Vratne znížená androgénna citlivosť na kalcitonín bola opísaná pri krysách po kastrácii (Ogata et al., Endocrinology 87: 421, 1970; Hollo et al., Lancet 1: 1205, 1971; Hollo et. al. Lancet 1: 1357, 1976). Okrem toho zníženie sérového kalcitonínu bolo nájdené u mužov s hypogonadizmom (Foresta et al., Horm. Metab. Res. 15: 206-207, 1983) a testosterónová terapia pri vykastrovaných krysách zvyšuje hypokalcemický efekt kalcitonínu (Mc Dermatt and Kidd, And. Rev. 8: 377-390, 1987).

Albright a Rufestein (1948) pôvodne predpokladali, že androgény zvyšujú syntézu kostnej matrice. Androgény tiež preukázali, že zvyšujú kostnú syntézu a mineralizáciu pri kurčatách (Puche and Rosmano, Calif. Tissue Res. 4: 39-47, 1969). Androgénna terapia u mužov s hypogonadizmom zvyšuje rast skeletu a dospievanie (Webster and Hogkins, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 45: 72-75, 1940). Navyše sa ukázalo, že terapia testosterónom spôsobuje pozitívnu dusíkovú, kalciovú a fosfátovú bilanciu (Albriht, F., Reifeinstein, E. C. In.: Prištítne žľazy a metabolické kostné choroby, Williams and Williams Co.: Baltimore pp. 145-204, 1948). Štúdiom kostnej hystomorfometrie sa zistilo, že terapia testosterónom u mužov s hypogonadizmom mala za následok relatívne zväčšenie kostného objemu, celkového kostného povrchu, lineárne rozšírenie kostnej formácie a kostnú mineralizáciu (Barau et al., Calcif. Tissue Res. 26: 103-106, 1978).

Liečba testosterónom, ako sa ukázalo, zväčšuje kostné povrchy a šírku trámčiny bez zmenených alebo znížených opačných procesov a je takto vhodnou liečbou a zväčšuje celkový kostný mineralizačný proces (Peacock at al., Bone 7: 261-268, 1986). Bolo tu tiež zníženie hladiny plazmatického fosfátu pravdepodobne spôsobené efektom na renálnu tubulárnu resorbciu fosfátu (Selby et a., Clin. Sci. 69: 265-271, 1985).

Kortikálna hustota kostí sa zväčšuje u mužov s hyperprolaktinémiou a hypogonadizmom, len čo je testikulárna funkcia normalizovaná (Geenspan et al., Ann. Int. Med.

104: 777-782, 1986; Geenspan et al., Ann. Int. Med. 110: 526- 531, 1989). Testosterónová terapia zväčšuje vytváranie kostí u mužov s primárnym hopogonadizmom (Baron et al., Calcif. Tissue Res. 26: 103-106, 1978; Francis et al., Bone 7: 261-268, 1986).

U 21 mužov s hypogonadizmom a s izolovaným nedostatkom GnRH normalizácia sérového testosterónu na viac ako 12 mesiacov zväčšila kostnú hustotu (Kinkelstein et al., J. Clin. Endocr. Metab. 69: 776-783, 1989). U mužov s už rozpustenou epifýzou, i keď tu bolo signifikantné zväčšenie kortikálnej hustoty kostí, neboli zatiaľ pozorované žiadne podstatné zmeny v hustote kostnej trámčiny. Týmto je podporovaný predchádzajúci návrh premennej citlivosti kortikálnej a trabekulárnej časti kosti na steroidnej terapii.

Predchádzajúce štúdie s anabolickými steroidmi na malom počte pacientov predpokladali pasívny efekt na kosť (Lafferty et al., Ann. J. Med. 36: 514-528, 1964; Riggs et al., J. Clin. Invest. 51: 2659-2663, 1972; Harrison et al., Metab. 20: 1107-1118, 1971). Omnoho neskôr s použitím merania celkového telesného kalcia neutrónovou aktiváciou ako parametra, bol preukázaný pozitívny a relatívne dlhodobý efekt anabolického steroidu metandrostenolónu v opakovanej štúdii naslepo pri postmenopauzálnej osteoporóze (Chessnut et al., Metab. 26: 267-277, 1977; Aloia et al., Metab. 30: 1076-1079, 1981).

Anabolický steroid nandrolón dekanoat znižoval kostný úbytok u žien s osteoporózou (Dequeker and Geusens, Acta Endocrinol. 271 (suppl.): 45-52, 1985) súhlasne s výsledkami získanými počas estrogénnej terapie (Dequeker and Ferin, 1976, pozri Dequeker and Geusens). Tieto podklady potvrdzujú experimentálne údaje u králikov a psov, keď nandrolón dekanoat znížil kostný úbytok (Ohem et al., Curr. Med. Res. Opin. 6: 606-613, 1980). Navyše anabolické steroidy u žien s osteoporózou neznižujú len kostnú stratu, ale tiež zväčšujú kostnú hmotu. Na druhej strane liečba vitamínom D len znižuje kostný úbytok.

Terapia nandrolónom u žien v postmenopauze zvyšuje obsah kostných minerálov (Clin. Orthop. 224: 273-277). Vedľajšie androgénne účinky boli zaznamenané u 50 % pacientov. Tieto podklady sa stali zaujímavé, keď bolo zistené zvýšenie kostnej hmoty použitím anabolika nandrolónu, pretože väčšina terapii bola obmedzovaná kostnou stratou. Podrobná stimulácia kostnej tvorby androgénmi bola predpokladaná u mužov s hypogonadizmom (Baran et al., Calcif. Tissue Res. 26: 103, 1978). Problém s diétou s kalciom, kalcitriolom alebo hormónmi, ktorý inhibuje kostný úbytok je ten, že temer iste vedie k potlačeniu kostnej tvorby (Need et al., Mineral. Electrolyte Metab. 11 : 35, 1985). I keď Albright a Reiferstein (1948) (pozri Need Clin. Orthop. 225: 273, 1987) predpokladali, že osteoporóza sa týka zníženia kostnej tvorby a bude reagovať na terapiu testosterónom, virilizujúce účinky androgénov urobili túto terapiu nevhodnú na liečbu žien v postnemopauze. Anabolické steroidy, zlúčeniny majúce menšie virilizujúce účinky, boli postupne vyvíjané. I keď im niektorí autori pripísali minimálne účinky (Wilson and Griffin, Metab. 28: 1278, 1980), iní im prisvojili viacej pozitívnych výsledkov (Chessnut et al., Metab. 32: 571-580, 1983; Chessnut et al., Metab. 26: 267, 198; Dequeker and Geusens Acta Endocrinol. (Suppl. 110) 271 : 452, 1985). Náhodne vyhotovená štúdia u žien v menopauze ukázala zväčšenie celkovej kostnej hmoty počas liečby anabolickým steroidom stanazólom, hoci boli zaznamenané vedľajšie účinky u väčšiny pacientok (Chessnut et al., Metabolism 32: 571-580, 1983).

Ako bolo už uvedené, dávky progestínov (napr. medroxyprogesterónu acetátu) použité pre bežnú terapiu rakoviny prsníka sú spojené s dôležitými nežiaducimi účinkami (tieto sú zvlášť spôsobené interakciou steroidu a glukokortikoidným receptorom, najmä s Cushingovým syndrómom, eufóriou) (Mattson, Breast Cancer Res.-Treat. 3: 231-235, 1983; Blossey et al. Cancer 54: 1208-1215; Von Veelen et al., Cancer Chemotherm. Pharmacol. 15: 167-170, 1985).

Výraz „progestíny" odkazuje na deriváty progesterónu a testosterónu. Tieto progestíny boli syntetizované s cieľom vyvinúť zlúčeniny pôsobiace ako analógy progesterónu na progesterónové receptory na riadenie plodnosti.

S dostupnosťou nových a presných testov sa stáva evidentným, že tieto zlúčeniny pôvodne vytvorené pre interakciu výlučne na pregesterónovom receptore, tiež často obsadzujú svojou vysokou afinitou androgénny receptor. (Labrie et al., Fertil Steril. 28: 1104-1112, 1977; Labrie et al., Fertil. Steril. 31: 29-34, 1979; Labrie, C. et al., Steroid Biochem. 28: 379-384, 1987; Labrie, C. et al., Mol. Cell. Endocrinol. 68: 169-179, 1990). V nízkych koncentráciách sa androgénna aktivita týchto zlúčenín stáva dôležitejšia ako pravá aktivita progestínu. Je to napríklad pri medroxyprogestrón acetáte (Poulin et al., Breast Cancer Res. Treatm. 13: 161-172, 1989).

Problémom skoršej liečby rakoviny prsníka a maternicovej sliznice syntetickými progestínmi sú vedľajšie účinky pri terapii. Blokáda estrogénov pri bežnej terapii rakoviny prsníka by mala nežiaduce škodlivé účinky na kostnú hmotu u žien. Podobne blokáda estrogénov pri bežnej terapii endometriózy má podobné nežiaduce škodlivé účinky na kostnú hmotu u žien.

Antikoncepčné preparáty, ktoré dovoľujú ochranu po dlhší čas boli vyvinuté v posledných 25 rokoch. Obsahujú steroidy s dlhodobým vnútorným pôsobením po injekcii (napr. Depoprovera alebo neskôr priame použitie vonkajších systémov-implanátov, mikroguľôčok, vaginálnych krúžkov, I.U.Ds. (DANA) atď.).Teraz MPA a noretisterón (NET)-enantát sú používané v programoch plánovaného rodičovstva. V roku 1985 bolo odhadované, že 4 milióny žien používalo MPA a temer milión NET-enantát (Hall, P.E.,Long-Acting injectable preparations. Fertility Regulation, Today and Tomorrow (Diczfalusy, E. Bydeman, M., eds) Raven Press: New York, pp. 119-141, 1987). Ďalej je odhadované, že pol milióna žien v Latinskej Amerike a 1 mil. žien v Číne používajú rôzne jednomesačné injekčné preparáty obsahujúce progesterón a estrogén (Hall, 1987, rovnaká citácia ako skôr).

Antikoncepčné preparáty, ktoré dovoľujú ochranu na dlhší čas boli vyvinuté za posledných 25 rokov.

Prehľad dvoch dlhodobe pôsobiacich steroidov je uvedený v Contraception, máj 1977, zväzok 15, čís. 5, pp. 513--533.

Depoprovera (25 mg) v kombinácii s 5 mg estradiól cypionátu boli podané na riadenie plodnosti jedenkrát mesačne (VHO, Sait et al., Contraception 37: 1-20, 1988). Malé rozdiely v účinnosti a vedľajšie účinky boli pozorované v porovnaní s jednomesačnou injekciou 50 mg NET--enantátu a 5 mg estradiol valerátu. Viac ako 10 tis. žien mesačne bolo sledované v každej skupine. Kombinácia MPA - $E_2$ cypionátu bola vysoko účinná ako antikoncepcia, lebo žiadne otehotnenie nebolo zaznamenané u 10 969 žien v priebehu jedného mesiaca. Prerušenie cyklu u žien používajúcich injekciu 1x mesačne bolo pomerne vysoké 35 % v roku (WHO, Said et al. Contaception, 37: 11-20, 1988), zatiaľ čo nepravidelnosti v krvácaní boli zaznamenané len v 6,1 % a amenorea u 2,1 % žien.

Neskorý príchod pre injekciu, osobné dôvody a strata pochopenia predstavovali 18,6 % prerušení. Tieto informá-

cie ukazujú potrebu jednoduchšieho a prijateľnejšieho spôsobu podávania.

DepoMPA (t. j. Depoprovera) používaný osamotene (150 mg, i.m. každé 3 mesiace) u 20 498 žien dosiahol počet otehotnení 0,1 ± 0,1 % a 15,0 ± 1 % nepravidelnosti v krvácaní a 11,9 ± 1 % incidencií amenorey (WHO, Said et al., Contraception 37: 1-20, 1988). V menšej štúdii (5434 žien DepoMPA v rovnakej dávke) viedlo k zastaveniu cyklu u 40,7 ± 2 %, zatiaľ čo nepravidelné krvácania a e-menorea sa objavili u 14,7 ± 1,5 %.

Predchádzajúce použitie MPA bolo aplikované perorálne alebo intramuskulárne. Orálne podávanie je limitované problémom udržovania a kolísania krvných hladín, zatiaľ čo uvoľnenie MPA z Depoprovera injekcie je spočiatku rýchle, potom v neskorších časových intervaloch klesá veľmi premenlivo. Je preto potreba riadeného uvoľňovania MPA, ktoré dodáva konštantné množstvo steroidu na definovanie dĺžky časov, ktoré zaistia pacientovu spoluprácu a zvýšenie účinnosti dodávaním konštantných krvných hladín lieku do tkanív, tak ako je potrebné na liečbu. Podobné argumenty sa týkajú MGA.

Mikroenkapsulačné liekové systémy boli v širokom rozsahu vyvíjané počas posledných tridsať rokov na riadenie uvoľňovania liečivých činidiel, zvlášť inkorporáciu aktívneho činidla do biodegradačných polyesterov a to takých ako poly (ε-caprolaktón), poly (ε-caprolactón-CO-DL-kyselina mliečna), poly (DL-kyselina mliečna), poly (DL-kyselina mliečna-CO-kyselina glykolová) a poly (ε-caprolaktón-CO-kyselina glykolová). Pozri napríklad R. W. Baker, ( R. W. Baker, Controled Relcase of biologically active agents; John Wiley and Sons Ed., N. Y., 1987), F. Lim (F. Lim, Biomedical Aplication of Microencapsulation, Franklin Lim. Ed. CRC Press, Boca Raton, 1984).

V US patente 3.773.919 G. A. Boswell a R. M. Scribner uverejňujú použitie polymliečnych liečebných zmesí, najmä so stereoidmi ako MPA na pozvoľné uvoľňovanie liekov.

V DE 3 503 679 Carli uverejňuje formuláciu o MPA, ktorý v kombinácii s vodou vytvára vo vode nerozpustný polymér.

Vo WO 8.807.816 R. J. Leonard uverejňuje rozpúšťanie rekryštalizovanej steroidnej pilulky užitočnej na pozvoľné uvoľňovanie.

V US patente 4.818.542 De Luca a spol. uverejňujú vytvorenie a použitie poróznych mikroguľôčok na liečebné podávanie.

V DE 2 010 115 Farbenfabriken Bayer A. G. uverejňuje prípravu pevných mikrogranúl v spreji na pozvoľné uvoľňovanie.

V US patente 4.166.800 F. W. Fong uverejňuje výrobu mikroguľôčok pridaním separovaného činidla pri nízkej teplote.

V US patente 4.897.268 Tice a spol. uverejňujú systém dodávky liekov obsahujúcich poly /DL-lactid-CO-glycolid/ na enkapsuláciu.

V US patente 4.107.071 R. G. Bayless uverejňuje prípravu mikrokapsúl čiastočne hydrolyzovaného kopolyméru etylénu a vinylacetátu.

V DE 2 051 580 Dupont a spol., uverejňujú prípravu piluliek a riadenie uvoľňovania na parenterálne použitie.

V US patente 4.622.244 Lapka a spol., uverejňujú enkapsuláciu častíc alebo materiálu s fázou oddeľovania a odlučovania mikrokapsúl pri nízkej teplote.

V US patente 4.987.268 E. S. Nuwayser a W. A. Nucefora uverejňujú prípravu zmiešaného jadra mikročastíc.

Wise a spol. (D.L. Wise Lactic/Glycol Acid Polymers, Biology and Medicine, G. Gregotiadis Ed, New York Academia Press, pp. 237-270, 1979) opisujú aplikáciu (ko)polyméru kyseliny mliečnej a glykolovej v medicíne. Pozri tiež Lewis, „Controlled Release of Bioactive Agents from Lactide/Glycolide Polymers", Drug and Farmaceutical Sciences zväzok 45, pp. 1-41, 1990.

Nemecký patent DE 4036425 zverejňuje niektoré antiestrogény alebo antiprogestomimetické steroidy.

Injekčne udržované uvoľňovanie preparátu obsahujúceho NET ako steroidná antikoncepcia pri krysách preukázalo stále uvoľňovanie počas dvoch mesiacov (Anderson a spol., Contraception 13: 375-374, 1976). Kryogénne základné častice s veľkosťou 90-180 um obsahovali 20 % NET zabudovaného do biodegradačnej polymérovej matrice, syntetizovanej z L(+) mliečnej kyseliny s molekulovou hmotnosťou 200 000. Preparát (prášok s veľkosťou častíc 90-180 um) obsahujúci 20 % NET v polymére tvorenom zlúčenín 90 % L-Laktidu z podielu hmotnosti a 10 % glykolidu na molekulovú hmotnosť 200 000, uvoľňoval zlúčeniny pri paviánoch približne dva mesiace (Gresser a spol., Contraception 17: 253-266, 1978). Predsa len nulová rýchlosť uvoľňovania nájdená pri krysách nebola overená v štúdii vykonanej na primátoch (Beck and Tice, In Long acting steroid contaception (D. R. Mishell, ed) Raven Press: New York, pp. 175-199, 1983). Injekčný DL-PLA NET mikrokapsulárny systém je jedinou formou, ktorá bola detailne sledovaná v podmienkach in vivo (Review by Beck and Tice. In Long acting steroid contraception (D.R. Mishell ed) Raven Press: New York, pp. 175-199, 1983).

Väčšina techník používaných na prípravu mikročastíc vyžaduje použitie organických rozpúšťadiel, ktoré zostávajú prítomné v nezanedbateľnom percente a môžu spôsobiť lokálne alebo systémové nežiaduce toxické reakcie. Iné doterajšie techniky musia použiť vysokých teplôt s možným nežiaducim tepelným rozložením steroidu a/alebo polyméru.

Problém s doterajšou liečbou rakoviny prsníka a maternicovej sliznice pomocou MPA a megestról acetátu je vo vedľajších účinkoch pozorovaných pri tejto terapii. Problémom pri použití derivátov 19-nortesterónu, ako je norgestról, noretysterón a noretindrón je, že tieto zlúčeniny majú estrogénnu aktivitu (Vilchis a spol., J. Ster. Biochem. 24: 525-531, 1986; Larrea a spol., J. Ster. Biochem. 27: 657-663, 1987; Poulin a spol., Breast Cancer Res. Treatm. 17: 197-210, 1990). Táto estrogenná aktivita by sa mohla negatívne prejaviť pri dlhodobom používaní týchto liekov pri rakovine prsníka.

Je teda potrebné stratégiu liečby a prevencie pri onemocneniach závislých od estrogénov (ako je osteoporóza a antikoncepcia) použiť injekčných dlhodobo pôsobiacich systémov medroxyprogesterón acetátu a megestról acetátu, ktoré by mohli udržovať koncentráciu týchto cirkulujúcich steroidov na nízkej úrovni po dlhý čas (mesiac a dlhšie) a ktoré obsahujú zanedbateľné množstvo zvyškových toxických organických rozpúšťadiel a/alebo tepelných rozpadových nečistôt vzniknutých vystavením terapeutika nadmernému pôsobeniu tepla.

Zvlášť dlhodobo pôsobiace uvoľňovacie systémy MPA, MGA alebo iné androgénne zlúčeniny so zanedbateľnou maskulinizačnou aktivitou na účel antikoncepcie a prevencie, by mali mať pozitívny vplyv na cenu systému zdravotného zabezpečenia.

**Podstata vynálezu**

Jedným z cieľov tohto vynálezu je vytvoriť farmaceutický prípravok na liečenie alebo prevenciu osteoporózy,

rakoviny maternicovej sliznice, rakoviny prsníka, endometriózy alebo na antikoncepciu s oneskoreným alebo diferencovaným uvoľňovaním androgénneho steroidu, obsahujúci pozvoľne uvoľňujúce častice s androgénnym steroidom, pričom podstata vynálezu je v tom, že androgénny steroid je zvolený zo súboru, ktorý zahŕňa medroxyprogesterón acetát a/alebo megestról acetát s konštantou inhibície $K_i$ nižšou ako $2x10^{-8}$ M pre androgénny receptor a hodnotou $ED_{50}$ menšou ako 3,0 nM pre bunky rakoviny prsníka ZR-75-1 a je rozptýlený v pomaly uvoľňujúcom spojive, ktoré je biologicky kompatibilné s ľudským tkanivom a v tele je rozložiteľné na biologicky znášateľné metabolické produkty, pričom pomaly uvoľňujúce spojivo obsahuje polymetrickú matricu odvodenú z kopolymetrických a homopolymetrických polyesterov s hydrolyzovateľnými esterovými väzbami a je schopné pri svojom biologickom rozklade uvoľňovať androgénny steroid rýchlosťou udržujúcou koncentráciu androgénneho steroidu v sére medzi 1,0 a 50,0 nM počas trvania od 48 hodín do 28 dní po podaní.

Uvedený farmaceutický prípravok je zvlášť užitočný na liečenie rakoviny prsníka alebo maternicovej sliznice, osteoporózy alebo endometriózy.

Je výhodné, ak pozvoľne uvoľňujúce častice sú mikroguľôčky s priemerným rozmerom medzi 5 um a 40 um, pričom tieto mikroguľôčky obsahujú maximálne 0,1% hmotn. organického rozpúšťadla.

Ďalej je výhodné, ak tvoria mikroguľôčky 10 až 70 % hmotn. celkového farmaceutického prípravku, pričom hmotnostný pomer uvedeného androgénneho steroidu k uvedenému pozvoľne uvoľňujúcemu spojivu je v intervale medzi 3 : 2 a 3 : 7.

Pozvoľne uvoľňujúce častice sú schopné pri svojom biologickom odbúravaní počas až 12 týždňov udržovať koncentráciu androgénneho steroidu v sére medzi 1,0 až 5,0 nM.

„Štandartné podmienky" na meranie rýchlosti uvoľňovania sú opísané v ďalšej časti s názvom „Podrobný opis". Rýchlosť uvoľňovania je inherentnou vlastnosťou pozvoľne uvoľňujúceho spojiva za definovaných podmienok a nie je to obmedzenie čo do spôsobu, ktorým je možné takéto spojivo použiť. Tak napr. sa rýchlosť uvoľňovania definuje pri určitom dávkovaní. Farmaceutický prípravok takto definovaný však môže byť použitý vo veľkom počte rôznych dávkovaní, ako je podrobne ďalej uvedené a ako to pokladá za vhodné ošetrujúci klinický lekár. Iné parametre, ako napr. spôsob podávania prípravku, trvanie pozvoľného uvoľňovania a podobne, sa taktiež môžu meniť v širokom rozsahu tak, ako je to ďalej rozobraté.

Farmaceutický prípravok obsahuje organické rozpúšťadlá a/alebo nosiče v množstve menšom ako 0,1 % hmotn.

Podstata spôsobu výroby farmaceutického prípravku je v tom, že androgénny steroid zvolený zo súboru, ktorý zahŕňa medroxyprogesterón acetát a/alebo megestról acetát, sa rozpustí v organickom rozpúšťadle spolu s pozvoľne uvoľňujúcim spojivom, ktoré obsahuje polymetrickú matricu odvodenú z kopolymetrických a homopolymetrických polyesterov a hydrolyzovateľnými esterovými väzbami a potom sa uvedená zmes pridá do vody, ktorá sa mieša rýchlosťou postačujúcou na vytvorenie mikroguľôčky s priemerom 5 um až 40 um, následne sa mikroguľôčky vystavia tlaku menšiemu ako 133 Pa a teplote o 7 až 20 °C nižšej ako je teplota sklovitého prechodu mikrogulôčok v čase až sa dosiahne zníženie koncentrácie zostatkového organického rozpúšťadla na hodnotu menšiu ako 0,1 % hmotn.

Tento spôsob je zdokonalený tým, že pred vystavením tlaku menšiemu ako 133 Pa sa mikroguľôčky vystavia vákuu aspoň 6650 Pa pri teplote maximálne 30 °C na čas aspoň 24 hodín, pričom následné vystavenie tlaku menšiemu ako 133 Pa sa uskutočňuje pri teplote 7 až 12 °C nižšej ako je teplota sklovitého prechodu mikroguľôčok a v čase postačujúcom na zníženie zostatkového organického rozpúšťadla v mikroguľôčkach na menej ako 0,02 % hmotn.

Použité androgény majú špeciálnu vlastnosť, že majú mohutný androgénny účinok pri nízkej koncentrácii v krvi /t. j. menšej ako 50 nM/, pričom pri týchto koncentráciach prejavujú veľmi malú aktivitu receptora glukokortikoidu. Sú taktiež charakterizované neprítomnosťou fyzického maskulinizujúceho pôsobenia na ženy pri rozmedzí koncentrácie, v ktorej sú používané. Toto je potrebné odlišovať od prírodných androgénov vytváraných v gonádových alebo periférnych tkanivách, ako je testosterón alebo dihydrotestosterón, ktoré majú značný maskulinizujúci účinok i pri nízkych koncentráciách v krvi. Syntetické progestíny, napr. deriváty progesterónu, sú užitočné pre tento vynález, rovnako ako i niektoré anabolické steroidy.

Androgény podľa vynálezu v priemere nespôsobujú fyzicky zistiteľné zväčšenie maskulinizujúcich účinkov, ako je zvýšený rast vlasov u žien, akné, seborea alebo vypadávanie vlasov. Tieto maskulinizujúce účinky boli kvantifikované v literatúre - pozri napríklad ( Ferriman and Gallwey, J. P. Clin. Endocrinol. Metab. 21: 1440-1447, 1961 (týkajúce sa rastu vlasov); Cremoncini et al., Acta. Eur. Fertil. 7: 248-314, 1976 (akné, seborea a vypadávanie vlasov). Pozri tiež Cusan et al., J. Am. Acad. Dermatol. 23: 462-469, 1990).

Tabuľky 1 a 2 udávajú kvantifikáciu.

Tabuľka 1

Definícia odstupňovania vlasov na každom z 11 miest (stupeň 0 na všetkých miestach vyznačuje neprítomnosť zakončenia vlasov)

| Miesto | Stupeň | Definícia |
|---|---|---|
| 1. Horná pera | 1 | Niekoľko fúzov na vonkajšom okraji |
| | 2 | Malý fúzik na vonkajšom okraji |
| | 3 | Fúzik do polovice z vonkaj. okraja |
| | 4 | Fúzik vedúci až k stredovej línii |
| 2. Brada | 1 | Niekoľko roztrúsených fúzov |
| | 2 | Roztrúsené fúzy s malými koncentráciami |
| | 3+4 | Kompletné krytie, ľahké a ťažké |
| 3. Praia | 1 | Cirkumareolárne chlpy |
| | 2 | Navyše s chlpmi v stredovej línii |
| | 3 | Spojenie týchto oblastí, s pokrytím z 3/4 |
| | 4 | kompletné pokrytie |
| 4. Horný chrbát | 1 | Niekoľko roztrúsených chlpov |
| | 2 | Väčšie množstvo, ale stále ešte roztrúsené |
| | 3+4 | Kompletné pokrytie, ľahké i ťažké |
| 5. Spodný chrbát | 1 | Sakrálny chumáč chlpov |
| | 2 | S určitým rozšírením do strán |
| | 3 | Pokrytie z 3/4 |
| | 4 | Kompletné pokrytie |
| 6. Horné brucho | 1 | Niekoľko chlpov v strednej línii |
| | 2 | Väčšie množstvo, stále však v strednej línii |
| | 3+4 | Polovičné a úplné pokrytie |
| 7. Spodné brucho | 1 | Niekoľko chlpov v strednej línii |
| | 2 | Prúžok chlpov v strednej línii |
| | 3 | Pás chlpov v strednej línii |
| | 4 | Porast v tvare obráteného V |
| 8. Paža | 1 | Riedky porast najviac 1/4 údu |
| | 2 | Väčší ako (1), ale stále ešte neúplné pokrytie |
| | 3+4 | Úplné pokrytie ľahké i ťažké |
| 9. Predlaktie | 1-4 | Úplné pokrytie dorzálneho povrchu, dva stupne ľahkého a dva silného vzrastu |
| 10. Stehno | 1-4 | Ako pri paži |
| 11. Noha | 1-4 | Ako pri paži |

Tabuľka 2
Odstupňovanie akné, seborea a straty vlasov

Akné

1. Izolované pustuly, najviac 10
2. Viac ako 10 izolovaných pustúl
3. Zhluky pustúl
4. Splývajúce pustuly

Seborea

1. Mierna
2. Stredná
3. Silná

Úbytok vlasov

1. Mierny
2. Zrejmé rednutie
3. Veľmi zrejmé rednutie
4. Plešina

Podrobný opis výhodných uskutočnení

Výhodné zlúčeniny na použitie v tomto vynáleze obsahujú syntetické progestíny, anabolické steroidy a iné steroidné zlúčeniny, ktoré majú hodnotu Ki menšiu ako 2 x $10^{-8}$M pre receptor androgénu, pričom receptorom androgénu sprostredkovaný inhibičný účinok na rast rakovinových buniek ZR-75-1 ľudského prsníka dosahuje polovicu maximálnej hodnoty pri koncentrácii nižšej ako 3 nanomola na jeden liter a nemá skôr uvádzaný maskulinizujúci účinok. Výhodné androgény by podľa vynálezu nespôsobovali žiadne významné zvýšenie priemerného maskulinizujúceho účinku (t. j. podstatné zvýšenie ktoréhokoľvek z číselných stupňov skôr uvedených v tabuľke 1 alebo 2) pozorovaného u žien po trojmesačnej liečbe pri koncentrácii androgénu v krvi udržovanej na hornej hranici nárokovaného rozsahu koncentrácie (napr. 50 nanomolov na jeden liter). Väčšine pacientok, u ktorých pred liečbou neboli badateľné žiadne maskulinizujúce účinky, kde teda celkový súčet bodov všetkých 11 položiek uvedených v tabuľke 1 predstavoval pred liečbou 10 alebo menej, by bol takýto súčet normálne zachovaný pri liečbe podľa tohto vynálezu. To znamená, že po trojmesačnej liečbe by u nich nemali byť badateľné žiadne maskulinizujúce účinky. Pacientkám, u ktorých sa už pred liečbou prejavovali maskulinizujúce účinky, by sa liečbou podľa vynálezu tieto účinky nemali zvýšiť.

Pre zistenie, či hodnoty Ki sú nižšie ako 2 x $10^{-8}$ M, je možné hodnoty Ki zisťovať nasledujúcou metódou merania afinity rôznych zlúčenín k receptoru androgénu.

Príprava prostatického tkaniva : Ventrálne prostaty sú z krýs Sprague-Dawley (Crl: CD(SD)Br) (získaných od Charles River, St.- Constanc, Quebec) vážiacich 200-250 g a kastrovaných 24 hodín pred usmrtením. Ihneď po vyňatí sa prostaty uložia k ľadu a použijú sa vzorky spojiva androgénu.

Príprava cytozolu : Tkanivá prostaty sa na jemno rozstrihajú nožnicami (čerstvé tkanivo) alebo pulverizujúcim systémom Thermovac (zmrazené tkanivo) pred homogenizáciou v tlmiacom roztoku A (Tris, 0,025 M; monotioglycerol, 20 mM; glycerol, 10 % (v/v); EDTA 1,5 mM a molybden sodný, 10 mM, pH, 7,4) v pomere 1 : 5 (w/v) (hmotnosť/objem) s použitím Polytrónu PT-10 ako homogenizátora. Tieto a všetky ďalšie úkony sa uskutočňujú pri 0 - 4 °C. Homogenát sa spracuje v centrifúge pri 105 000 x g počas jednej hodiny, aby sa získala cytozolická frakcia v kvapaline nad usadeninou.

Vzorok cytozolického receptora androgénu : Násobky 100 ul sa inkubujú pri 0 - 4 °C 18 hodín so 100 ul 3 nM ($^3$H) R 1881 v prítomnosti alebo neprítomnosti zvyšujúcich sa koncentrácii neoznačenej androgénnej zlúčeniny, ktorá má byť testovaná. Na konci inkubácie sa voľný a viazaný T z R 1881 separuje pridaním 200 ul dextranom potiahnutého dreveného uhlia (1 % dreveného uhlia, 0,1 % dextranu T-70, 0,1 % želatíny, 1,5 mM EDTA a 50 mM Tris (pH 7,4)) na 15 minút pred centrifugovaním pri 2300 x g po ďalších 15 minút pri 0 - 4 °C. Násobky (350 ul) kvapaliny nad usadeninou sa prevedú do scintilačných nádob so 10 ml vodného vypočítaného roztoku (Formula 963, New England Nuclear) pred vypočítaním v počítadle Beckman LS 330 (30 % - ná účinnosť pre trítium).

Výpočet Ki: Skutočné hodnoty inhibičnej konštanty sa vypočítajú podľa rovnice Ki = $IC_{50}$ /( 1 + S/K) (Cheng a Prusoff, Biochem. Pharmacol. 22: 3099 - 3108, 1973). V tejto rovnici znamená S koncentráciu ($^3$H) T alebo ($^3$H) R 1881, K je disociačná konštanta ($K_D$) z T alebo R 1881 a $IC_{50}$ je koncentrácia neoznačených zlúčenín dávajúcich 50 % inhibíciu spojiva T alebo R 1881. Pre viaceré zlúčeniny sú hodnoty Ki uvedené v literatúre. Pozri napr.(Ojsso et al., J. Ster. Biochem. 57 : 255-269, 1987; Asselin et al., Cancer Res. 40: 1612-1622, 1980; Toth and Zakar, J. Steroid Biochem. 17 : 653-660, 1982). Metóda dávajúca podobné výsledky je opísaná v (Poulin et al., Breast Cancer Res. Treamt. 12 : 213-225, 1988). Na určenie koncentrácie, pri ktorej tá ktorá zlúčenina dosahuje polovicu maximálneho, receptorom androgénu sprostredkovaného inhibičného účinku na rakovinové bunky ZR-75-1 ženského prsníka sa používa nasledujúca technika, ktorá je podrobne opísaná v (Poulin et al., Breast Cancer Res. Treamt. 12 : 213-225, 1988).

Udržovanie kmeňových kultúr : Rakovinové bunky ZR-75-1 ženského prsníka možno získať z American Type Culture Collection (Rockville, MD). Bunky sa rutinne pestujú vo fenolovom červenom prostom médiu RPMI 1640 doplnenom o 10 $nME_2$, 15 mM Hepes, 2 mM L-glukatinu, 1 mM pyrohroznanu sodíka, 100 IU penicilínu na ml, 100 ug sulfátu streptomycínu na ml, 10 % (objemových) zárodočného hovädzieho séra (FBS) vo vodou nasytenej atmosfére 95 % vzduch : 5 % $CO_2$ pri 37 °C.

Kmeňové kultúry sú vo fáze logaritmického rastu vyživované 0,05 % trypsínom (0,02 % EDTA (hmotnosť/objem) v Hankovom vyváženom roztoku solí a resuzpendované v médiu $E_2$ a červenom prostom fenole RPMI 1640 obsahujúcom 5 % (objemových) dexstranom potiahnutého živočíšneho uhlia (DCC), resp. im upraveného FBS a 500 ng hovädzieho inzulínu na ml, ale inak doplneného tak, ako je skôr uvedené na pestovanie kmeňových kultúr. Bunky boli umiestnené do 24 jamkových doštičiek Linbro pre kultúry (Flow Laboratories) s výslednou hustotou 0,5 - 4,0 x $10^4$ buniek na jamku. Štyridsať osem hodín po umiestnení na dosky sa k nim pridá čerstvé médium SD obsahujúce potrebnú koncentráciu steroidov. Výsledná koncentrácia etanolu použitého na pridanie testovacích substancií neprekračuje 0,12 objemových percent a nemá žiadny významný účinok na rast, morfológiu buniek. Inkubačné média sa vymieňajú vždy každý druhý deň a bunky sú vyživované trypsinizáciou po 12 dňoch liečby, ak nie je inak uvedené. Počet buniek je možné určiť Coulterovým počítačom.

Výpočty a štatistické analýzy : Skutočné hodnoty $IC_{50}$ sa vypočítajú použitím interatívnej regresie najmenších štvorcov (Rodbart, Endocrinology 94 : 427-437, 1974), ale skutočné konštanty inhibície (hodnoty Ki) sa vypočítajú

podľa Chenga a Prusoffa (Biochem. Pharmacol. 22: 3099--3108, 1973).

**Prehľad obrázkov na výkresoch**

Obr. 1 je porovnávací graf s počtom nádorov pozorovaných pri skupine krýs chránených spôsobom podľa tohto vynálezu, t. j. podaním 30 mg DepoProvera 1 týždeň predtým, ako boli nádory indukované podaním dimetylbenzantracénu (DMBA) v porovnaní s nechránenou kontrolnou skupinou.

Obr. 2 je porovnávací graf časového priebehu nádorov ovariektomovaných krýs (o-o) v porovnaní s neliečenou kontrolnou skupinou (o-o). Nádory boli indukované použitím dimetylbenzantracénu. Na stimuláciu rastu nádorov tak liečenej, ako i kontrolnej skupiny krýs bol použitý estradiól. Každé zviera z liečenej skupiny dostalo jedinú subkutánnu dávku 30 mg DepoProvera. Výsledky sú vyjadrené ako percento zmien v celej nádorovej oblasti v každej skupine.

Obr. 3 je spektrum $^1H$ mikročastíc podľa vynálezu rozpustených v $CDCl_3$ pri magnetickej rezonancii zaznamenanej na spektrometre Brucker AC-F.300 FT NMR. Oblasti pod vrcholmi pri $\delta = 0,65$ ppm pre MPA a pri $\delta = 5,20$ ppm pre laktid sú použité na určenie náplne jadra podľa vzorca:
% MPA (náplne jadra)=0,28391+0,98720x /% oblasť ($\delta$ = = 0,65 ppm)/,
kde % oblasť ($\delta = 0,65$ ppm) je definovaná ako:
% oblasť ($\delta = 0,65$ ppm) =
oblasť ($\delta$=0,65 ppm)//oblasť ($\delta$=5,20 ppm) + oblasť ($\delta$ = = 0,65 ppm)/.

Obr. 4 je štandardná krivka na určenie zaťaženia jadra odvodená od údaja NMR podobne ako pri obr. 3 pre známe zmesi polyméru a MPA.

Obr. 5 je chromatogram pozvoľne uvoľňovaných mikroguľôčok MPA oddelených sférickou vylučovacou chromatografiou (SEC) pre určenie náplne jadra. Vrchol pri retenčnej dobe 12 minút korešponduje s polymérovým stálym spojivom, kým vrchol pri retenčnom čase 15,6 minút je MPA. Vsuvka na obr. 5 je kalibračná krivka vytvorená zo štandardných zmesí LPG/MPA. Oblasť vrchola je vyjadrená ako logaritmus percenta MPA v známej zmesi s 50:50 poly (DL-laktid-co-glykoid).

Obr. 6 je fotografia mikroguľôčok MPA vykonaná snímacím elektrónovým mikroskopom (SEM) pri (A) zväčšení 350x a (B) zväčšení 2000x.

Obr. 7 je snímacím elektrónovým mikroskopom (SEM) vykonaná fotografia priečneho rezu mikroguľôčkami podľa vynálezu pri (A) zväčšení 1500x a (B) zväčšení 5000x.

Obr. 8 ukazuje rozmerové rozloženie mikroguľôčok MPA zistené snímacím elektrónovým mikroskopom. Percento mikroguľôčok v každej rozmerovej skupine je vyjadrené vo vzťahu k rozmerovej skupine (um).

Obr. 9 je krivka diferenciálnej snímacej kalorimetrie (DSC), kde je vyjadrený tepelný tok (rozdiel energie medzi vzorkou a referenčnou vzorkou pri definovanej teplote, pričom tepelný tok je priamo úmerný kalorickej kapacite vzorky). Táto krivka ukazuje teplotu (Tg) prechodu dávky MPA enkapsulovanej do 65:35 poly (DL-laktid-co-glykolid), mikroguľôčky podľa vynálezu s 33 % zaťažením MPA.

Obr. 10 znázorňuje v (A) variáciu rôznych parametrických charakteristík (M(n-1), Mn, Mw, Mz, M(z+1)) molekulárnej hmoty 50:50 poly (DL-laktid-co-glykolid) po vystavení vyznačeným hladinám žiarenia gama (Mrad) a v (B) variáciu polydenzity (Mw/Mn) vo vzťahu k ožiareniu gama (Mrad).

Obr. 11 znázorňuje hladiny séra MPA v priebehu času pri novozélandskom bielom králikovi po jedinej subkutánnej injekcii 50 mg MPA enkapsulovaného do mikroguľôčok poly (DL-laktid-co-glykolid).

Obr. 12 znázorňuje hladiny séra MPA v priebehu času pri ovariektomovaných krysách ženského pohlavia Sprague-Dawley po jedenej subkutánnej injekcii vyznačeného množstva MPA enkapsulovaného do 50:50 poly(DL-laktid--co-glykolid) mikroguľôčok (1 nM = 0,386 mg/ml).

Obr. 13 je graf znázorňujúci percento krýs majúcich dimetylbenzatracenóm indukované nádory prsníka v časovom priebehu nasledujúcom po jedinej injekcii mikročastíc MPA (30 a 100 mg MPA alebo spojivo (riadené)) pred podaním DMBA pri kryse (1 nM = 0,386 ng/ml).

**Príklady uskutočnenia vynálezu**

Lepšie porozumenie mnohopočetnej endokrinnej aktivity syntetického progestínu je požadované nielen pre jeho racionálnejšie využitie pri prevencii a terapii rakoviny prsníka a maternicovej sliznice, ale i pri andometrióze a strate kostnej hmoty a tiež na odstránenie vedľajších účinkov spôsobených interakciou steroidných receptorov nevyhnutných pre požadovaný kladný účinok.

Presná analýza biologických pôsobení syntetických „progestínov" majúcich afinitu k mnohým steroidným receptorom by v ideálnom prípade vyžadovala selekciu modelov in vitro, majúcich funkčné receptory pre všetky hlavné triedy steroidov. Na tento účel boli zvolené rakovinové bunky ženského prsníka radu ZR-75-1 majúce funkčné receptory pre estrogény, androgény, progesterón a glukokortikoidy (Vignon et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 56: 1124-1130, 1983), aby sme porovnávali relatívny prínos rôznych systémov receptorov steroidov pri ovplyvňovaní množenia buniek syntetickými progestínmi. Zatiaľ čo estrogény sú v bunkách ZR-75-1 silno mitogenické (Poulin and Labrie, Cancer Res. 46: 4933-4937, 1986) a špecificky regulujú vyjadrenie a/alebo sekréciu rôznych proteínov (Dickson and Sippman, Endocr. Rev. 8: 29-43, 1987), androgény (Poulin et al., Breast Cancer Res. Treamt. 12: 213--225, 1988), glukokortikoidy (Hatton, A. C., Labrie, F., nepublikované výsledky) ako i progestíny potlačujú ich množenie špecifickými interakciami s ich príslušnými receptormi.

Pri liečbe rakoviny prsníka bolo použité mnoho progestínov, vrátane MPA (Blossey et al., Cancer 54: 1208--1215 1984; Hortobagyi et al., Breast Cancer Res. Treamt. 5: 321-326, 1985), MGA (Jonson et al., Semir. Oncol. 13 (Suppl.) : 15-19, 1986; Tchekmedyan et al., Semin. Oncol. 13 (Suppl.) : 20-25, 1986) a noretindrónu (Clavel et al., Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 18 : 821-826, 1982; Earl et al., Clin. Oncol.10: 103-109, 1984). Použitím systému in vitro na rakovinové bunky ZR-75-1 ženského prsníka bolo teraz zistené, že syntetické progestíny alebo anabolické steroidy, Nor-testosterón, R 1881, dromostanolón, fluoxymesterón, etisterón, metandrostanolón, oxandrolón, danazól, stanozól, calusterón, oxymetolón, cyproterón acetát, chlórmadinonón acetát a norgestról majú androgénny účinok pri nízkych koncentráciách. V nadväznosti na potlačovanie rastu buniek, najmä cystickej choroby, sekrécia dvoch glykoproteínov, tekutého proteínu - 15(GCDFP-15) a GCDFP-24, je výrazne stimulovaná androgénmi (Simard et al., Mol. Endocrinol. 3 : 694-702, 1989; Simard et al., Endocrinology 126: 3223-3231, 1990). Meranie sekrécie GCDFP-15 alebo sekrécie GCDFP-24 je možné takto použiť ako citlivý parameter alebo indikátor pôsobenia androgénu v týchto bun-

kách. Zmeny GCDFP-15 a GCDFP-24 sú v skutočnosti opačné ako zmeny v raste buniek pri všetkých skúšaných experimentálnych podmienkach. Všetky syntetické progestíny alebo anabolické steroidy študované v súvislosti s týmto vynálezom prejavujú androgénny účinok na rast rakoviny prsníka ZR-75-1 a sekréciu GCDFP-15 a GCDFP-24.

Identifikácia receptorov (estrogén, androgén, progesterón a glukokortikoid) zodpovedných za tento účinok zlúčenín je podstatná pre určenie ich potenciálnych účinkov (vrátane nepriaznivých). Je teda zvlášť dôležité určiť špecifickú interakciu pri nízkych koncentráciách s receptorom androgénu, lebo takéto nízke koncentrácie nevyvíjajú interakciu s receptorom glukokortikoidu, čím vylučujú alebo minimalizujú sekundárne vedľajšie účinky.

Jedným zo spôsobov potlačenia rastu buniek prsníka a maternicovej sliznice je aktivizácia receptora androgénu účinnou zlúčeninou, majúcou proti miestu receptora takú afinitu, že sa viaže na receptor androgénu pri nízkych koncentráciách a pritom inak významne neaktivizuje iné triedy receptorov steroidov majúcich vzťah k vedľajším možným účinkom. Je dôležité zvoliť zlúčeniny majúce maximálnu afinitu k receptoru androgénu a ktoré však majú minimálne alebo žiadne virilizujúce účinky na ženy. Pre minimalizáciu interakcie takýchto zlúčenín s receptormi glukokortikoidu a estrogénu je dôležité používať nízkej dávky týchto zlúčenín. Je taktiež dôležité zvoliť steroidy majúce androgénny účinok pri nízkych koncentráciách, ktoré sa metabolizujú do estrogénov za podmienok in vivo a ktoré pri použitých nízkych koncentráciách nebudú vplývať na významnejšiu aktivizáciu iných receptorov ako receptorov androgénu.

Zlúčeniny pri tomto vynáleze, najmä anabolické steroidy a syntetické progestíny, majú pri rôznych koncentráciách pozoruhodné rozdiely vo svojej schopnosti aktivizovať rôzne triedy receptorov steroidov. Starostlivým strážením koncentrácie podľa tohto vynálezu je možné selektívne aktivizovať požadované receptory bez vyvolania podstatnejšej aktivizácie tých receptorov, ktorých aktivizácia je nežiaduca. Tak napr. pri tu uvedených nízkych koncentráciách je možné MPA použiť na žiaducu aktivizáciu receptora androgénu a pritom sa v podstate uchrániť vedľajších účinkov spojených s aktivizáciou glukokortikoidu, ktoré nežiaduco doprevádzali liečbu podľa doterajšieho stavu techniky.

Vynález teda vytvára nový spôsob liečby s prevencie rakoviny prsníka a maternicovej sliznice, ako i iných chorôb reagujúcich na aktivizáciu receptora androgénu, napr. úbytok kostnej hmoty s endometriózu. Pri tomto vynáleze je množstvo podávaných androgénnych zlúčenín omnoho nižšie, ako sa podľa doterajšieho stavu techniky používalo na liečenie rakoviny prsníka a maternicovej sliznice.

Zisťovanie koncentrácie androgénov v krvi podľa vynálezu:

Pomocne pre určenie potenciálnych účinkov liečby je možné merať koncentráciu zlúčeniny v krvi. Tak napr. meranie hladín plazmy medroxyprogesterón acetátu (MPA) možno uskutočniť testom rádioimunity po extrakcii takto:

Príprava protilátky:

Protilátka 144A bola vypestovaná v králikoch proti 17-hydroxyprogesterón-3-0-carboxymethyloxim-BSA. Označený steroid použitý v teste rádioimunity (RIA) bol metyl-17α-hydroxyprogesterón acetát, 6α-/1,2-$^3$H(N)/ -získaný z NEN (CAT NO: NET 480), kým referenčným preparátom bol medroxyprogesterón acetát (MPA) získaný zo steraloidov. Ako tlmiaci roztok bol použitý 0,1 % želatíny v 0,1 M fosforečňane sodnom, 0,15 M chloridu sodného, 0,1% azidu sodného, pH 7,2. Rozpúšťacou zmesou extraktu bol etyl éter-acetón (9:1 objemove) (EEA), kým rozpúšťacou zmesou chromatografie LH-20 bol izookan : toluén : metanol (90:5:5 objemove) (IOTH).

Postup pri extrakcii :

Jeden ml plazmy bol extrahovaný dvakrát s 5 ml EEA. Extrakty boli vyparením vysušené dusíkom a zvyšok bol rozpustený v jednom ml IOTH. Potom boli extrakty podrobené chromatografii LH-20 v stĺpcoch 10 x 30 cm (Cornig CAT NO: 05722A) naplnených 2 g LH-20 (Pharmacia). Gél bol umytý 30 ml IOTH pred pridaním jedného ml vzorky a vyluhovaní IOTHom. Prvých 6 ml bolo odložené. Nasledujúcich 10, 16,5 a 27,5 ml eluentu predstavovali frakciu I (progesterón), II (MPA) a III (17-LH-progesterón) v tomto poradí. Frakcia II bola odparením vysušená a rekonštituovaná v 1,5 ml testovacieho tlmiaceho roztoku.

Test rádioimunity:

Do každej skúmavky z borokremičitého skla s rozmermi 12 x 75 mm bolo vložené: 0,2 ml obsahujúceho 25 000 DPM tritiovaného steroidu, 0,5 ml referenčného preparátu v rozpätí od 5 do 5000 pg na jednu skúmavku alebo 0,5 ml frakcie II extrahovanej vzorky, 0,2 ml antiséra 144A zriedeného 1/5000 alebo 0,2 ml testovacieho tlmiaceho roztoku zastupujúceho nešpecifikované spojivo. Skúmavky potom boli cez noc inkubované pri 4 °C. Potom bolo pridané 0,2 ml živočíšneho uhlia Norit-A, 0,2 % prípravku Dextran T-70 rozpusteného vo vode. Potom boli skúmavky mierne pretrepané a po 10 minútach boli odstreďované pri 2 000 x g počas 10 minút. Na povrchu plávajúca látka bola zmiešaná s 8 ml Formula-989 (NEN: NEF-989) a rádioaktivita bola meraná v ß-počítači.

Dolná a horná hranica zistenia MPA je 10 a 1000 pg/ml, kým strmosť (LOGIT-LOG) je -2,2 a hodnota $ED_{50}$ je 315 pg/ml. Nešpecifické a čisté spojivo je vo vymenovanom poradí 1,5 a 45 %. Protilátka 144A je vysoko špecifická na MPA, pretože vzájomná reaktivita tejto látky s progesterónom, 20α-OH-Prog, pregnenólom, 17-OG-pregnenólom, DHT, androstenediónom, testosterónom, 3α-diólom, estradiólom a kortizólom je menšia ako 0,1 %.

Kalkulácia a štatistika:

Údaje RIA boli analyzované s použitím programu založeného na modele II Roadbarda a Lewalda (V: 2nd Karolinska Symposium, Geneva, 1970, str. 79-103). Hodnoty plazmy MPA sú obvykle uvádzané ako priemer ± SEM (stredná odchýlka priemeru) zdvojeného merania jednotlivých vzoriek. Štatistický význam sa meria podľa viacpásmového testu Duncan-Kramer (Kramer, C.Y. Biometrics 12: 307-310, 1956).

Relatívny účinok testovacej zlúčeniny na rôzne receptory:

Na zistenie aktivity potenciálnych zlúčenín pre rôzne receptory steroidu, androgénu, glukokortikoidu, progesterónu a estrogénu, sprostredkované pôsobenie syntetických progestínov a anabolických steroidov je možné merať pri rakovinových bunkách ZR-75-1 ľudského prsníka použitie rastu buniek, tiež i uvoľňovanie CGDFP-15 a CGDFP-24, ako parametrov reakcie (Poulin and Labrie, Cancer Res. 46:4933-4937,1986; Poulin et al., Breast Cancer Res. Treatm. 12: 213-225, 1988; Poulin et al., Breast Cancer Res. Treatm. 13: 161-172, 1989; Poulin et al., Breast Cancer Res. Treatm. 13:265-276, 1989; Simard et al., Mol Endocrinol. 3: 694-702, 1989; Simard et al., Endocrinology 126: 3223-3231, 1990).

Nasledujúce vlastnosti umožňujú meranie pôsobenia receptora progesterónu (PgR) : 1. Pridaním inzulínu sa celkom zruší potlačenie spôsobené interakciou progestínu R5020 a PgR v bunkách ZR-75-1; a 2. antiproliferačný účinok R5020 je pozorovaný len za podmienok stimulovaných $E_1$. Tieto dve charakteristiky rastu buniek ZR-75-1 umožňujú študovať rozsah, v ktorom účinky testovanej zlúčeniny na bunky ZR-75-1 sú prisudzované jej interakcii s PgR vyhodnotením účinku pridania inzulínu a/alebo estrogénu na reakciu rastu meranú na konci 15-dennej inkubácie buniek ZR-75-1 s testovanými zlúčeninami.

Vplyv receptora estrogénu (ER) možno naproti tomu merať priamo inkubáciou buniek ZR-75-1 tak za prítomnosti, ako i za neprítomnosti estrogénu v médiu.

Na analýzu interakcií syntetických progestínov alebo anabolických steroidov s receptorom androgénu (AR) a receptorom glukokortikoidu (GR) v ich potlačovacom účinku na rast buniek, je možné výhodne použiť aditivitu antiproliferačných účinkov androgénov a glukokortikoidov v tejto vetve buniek (Poulin et al., Breast Cancer Res. Treamt. 12: 213-225, 1988; Hatton and Labrie, F., neuverejnené údaje). Možno takto saturovať AR 5α-dihydrotestosterónom (DHT) a potom merať účinok na množenie buniek, vyplývajúci z pridania glukokortikoidu. Na druhej strane je možné účinok androgénu merať podobne podľa saturácie GR dexametazónom (DEX). Špecifickosť takto pozorovaním zisteného potlačovania rastu testovanou zlúčeninou je možné taktiež ďalej určiť jej reverzibilitou s použitím vhodnej protilátky (napr. antiglukokortikoidu alebo antiandrogénu). Takto v prítomnosti nadbytku androgénu (1 um DHT) za prítomnosti $E_2$ a inzulínu možno účinky glukokortikoidu zisťovať presne a bez interferencie s inými receptormi. To isté platí pre štúdium úlohy AR, keď sú bunky inkubované v prítomnosti nadbytku glukokortikoidu (3u MDEX), $E_2$ a inzulínu. Ako ukazujú podrobné kinetické štúdie, 1 uM DHT a 3 uM DEX majú maximálny účinok na AR a GR vo vymenovanom poradí.

Možné antagonické účinky „progestínov" sprostredkované cez AR a GR je možné zistiť saturovaním oboch receptorových systémov DHT a DEX, pričom jeden činiteľ je zastúpený omnoho viac, ako druhý, aby bolo možné uskutočniť obrátenie jediným zvoleným receptorom súčasne. Všetky experimenty sa vykonávajú s bunkami ZR-75-1 vypestovanými v médiu doplnenom o $E_2$, aby sa zabránilo PgR-om sprostredkovanému účinku „progestínov" na rast buniek.

S použitím skôr uvedených techník bolo zistené, že početné androgénne zlúčeniny, ktoré aktivizujú i iné receptory (napr. receptory glukokortikoidu alebo progesterónu) menia svoje relatívne účinky na rôzne receptory v závislosti od koncentrácie. Ak zostanú v tu definovanom rozpätí koncentrácie, môžu zlúčeniny podľa vynálezu kladne pôsobiť na receptory androgénu bez podstatných nežiaducich účinkov na iné receptory.

Výber pacientov, ktorí môžu s úspechom využiť tu opísanú metódu:

Výskyt rakoviny prsníka sa obvykle zistí priamo pacientom a/alebo mammografiou. Rakovina maternicovej sliznice je zasa diagnostikovaná endometricku biopsiou. Obe rakoviny možno diagnostikovať a vyhodnocovať štandardnými fyzikálnymi metódami, ktoré sú odborníkom známe, napríklad zobrazením kosti, röntgenom hrudníka, kontrolou skeletu, ultrasonografiou pečene a jej zobrazením (ak je potrebné), zobrazením CAT, MRI a telesnou prehliadkou. Endometriózu možno diagnostikovať podľa bolesti alebo príznakov spojených s menštuáciami žien, kým definitívnu diagnózu je možné získať laparoskopiou a v niektorých prípadoch biopsiou.

Na druhej strane možno hustotu kostí merať štandardnými metódami dobre známymi pre odborníkov, ako napr. QDR (kvantitatívnou digitálnou rádiografiou, duálnou fotónovou absorbciometriou a počítačovou tomografiou). Plazmu a vápnik v moči i hladinu fosfátu, alkalickú fosfatázu, koncentráciu kalcitonínu a paratormónu, ako i močový hydroxyprolín a pomery kalcium/kreatinín.

Rakovinu prsníka alebo maternicovej sliznice, osteoporózu alebo inak nedostatočnú kostnú hmotu i iné choroby liečiteľné aktivizáciou receptora androgénu možno podľa vynálezu liečiť alebo im profylakticky predchádzať.

Metodológiu vhodnú na zistenie antikoncepčnej účinnosti i sprievodné vedľajšie účinky je možné nájsť v : Said et al., Contraception 37: 11-20, 1988.

Typicky vhodné androgénne zlúčeniny obsahujú 6-α--metyl, 17-α-acetoxy progesterón alebo medroxyprogesterón, ktorý je možné získať napr. vo firme Upjohn and Farmitalia Carlo Erba, S.p.A. pod obchodnými názvami Provera, DepoProvera alebo Farlutal a pod skratkou MPA.

Ďalšie vhodné androgénne zlúčeniny obsahujú tie, ktoré sú opísané v Labrie et al., (Fertil. Steril. 31: 29-34, 1979), ako i anabolické steroidy alebo progestíny (Raynaud and Ojasso, In: Innovatine Approches in Drug Research, Elsevier Sci. Publishers, Amsterdam, pp. 47-72, 1986; Sanberg and Kirdoni, Pharmac. Ther. 36: 263-307, 1988; and Vincens, Simard and De Lingnieres, Les Androgenes. In: Pharmacologie Clinique, Base de Therapeutique, 2ieme Edition, Expansion Scientifique (Paris), pp. 2139-2158, ako i Calusterone (7ß, 17α-dimetyltestosterón), anabolické steroidy (Lam, Am. J. Sports Medicine 12: 31-38, 1984; Hilf, R., Anabolic-androgenic steroid and exsperimental tumors. In: (Kochachian, C.D, eds.)), Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 43, Anabolic-Androgenic Steroid, Springer-Verlag, Berlin, 725 pp.1976), fluoxymesterón (9α-fluoro-11ß-hydroxy-17α-metyltesterón), testosterón, 17ß-cypionát, 17α-metyltestosterón, Pantestone (testosterón undekanoát), $D^1$-testololakton a Andractim.

Iné typicky vhodné androgénne zlúčeniny sú cyproteróne acetát (Androcur), ktorý dodáva Schering AG, 6-α--metyl, 17-α-acetoxy progesterón alebo medroxyprogesterón acetát (MPA), ktoré dodáva m. Upjohn and Farmitalia, Calbo ERba, Gestodene, ktorý dodáva Shering, megestról acetát (17α-acetoxy-6-metyl-pregna-4, 6-diene-3, 20-dione) dodávaný firmou Mead Johnson and Co. Evansville, Ind., pod obchodným názvom Megace. K ďalším syntetickým progestínom patrí Levonorgestról, Norgestimate, Dezogestról, 3-ketodezogestról, noretindrón, noretisterón, 13α-etyl-17-hydroxy-18, 19-dinor-17-ß-pregna-4,9, 11--triene-20-yn-3-one (R2323), gestrinón, demegestón, norgestrienón, gastrinón a ďalšie opísané v (Raynaud and Ojasso, J. Steroid Biochem. 25: 811-833, 1986; Raynaud et al., J. Steroid Biochem. 12: 143-157, 1980; Raynaud, Ojasso and Labrie, Steroid Hormones Agonists and Antagonists, In: Mechanismus of Steroid Action (G. P. Lewis and M. Ginsburg, eds.); McMillan Press, London pp. 145-158 (1981)). Ktorýkoľvek iný derivát progestínu majúci skôr uvedené charakteristiky by mohol byť taktiež užitočný pre tento vynález.

Androgénna zlúčenina sa podáva výhodne ako farmaceutická látka topicky, parenterálne alebo orálne. Zlúčeninu je možné podávať parenterálne, t. j. intramuskulárne alebo subkutánne injekciou alebo nosnými kvapkami, čapíkmi alebo tam, kde je to možné intravaginálne alebo transdermálne s použitím gélu, náplasti alebo iného vhodného prostriedku. Androgénna zlúčenina môže byť vložená do

mikropuzdier alebo pripojená k biologicky kompatibilnému a biologicky rozložiteľnému polyméru, napr. poly(d,l--lactid-co-glycolid) a subkutánne alebo intramuskulárne injekčnou technikou nazývanou subkutánny alebo intramuskulárny depot pre poskytovanie kontinuálneho, pomalého uvoľňovania počas 30 dní alebo dlhšie. Vedľa orálneho podávania je výhodným spôsobom podávania zlúčeniny subkutánny depot (injekcia). DepoProvera sa môže uvoľňovať relatívne konštantnou rýchlosťou počas približne troch mesiacov po intramuskulárnom podávaní vodnej disperzie.

Množstvo každej podávanej zlúčeniny určuje ošetrujúci lekár s prihliadnutím na stav a vek pacientky, účinnosti každej zložky a iným faktorom. Pri prevencii rakoviny prsníka a maternicovej sliznice i úbytku kostnej hmoty podľa vynálezu sú vhodné ďalej uvedené rozmedzia dávkovania.

Androgénna látka sa podáva najlepšie denným dávkovaním, ktoré dodáva menej ako 25 mg aktívneho androgénneho steroidu na 50 kg telesnej hmotnosti.

Výhodné je dávkovanie 1-10 mg na 50 kg telesnej hmotnosti, najmä 3-7 mg (napr. 5 mg). Zvolené dávkovanie výhodne udržuje koncentráciu séra pod 50 nanomola na liter, výhodne medzi 1,0 nanomolom na liter a 10, 15 alebo 25 nanomolmi na liter podľa reakcie pacientky. Dávkovanie potrebné na udržovanie týchto hladín môže pritom od pacientky k pacientke kolísať. Možno doporučiť, aby ošetrujúci klinický lekár monitoroval hladiny technikami tu opísanými a podľa toho optimalizoval dávkovanie. Na účely profylaxie sa podávanie androgénu výhodne začne v perimenopauzálnom období pre prevenciu rakoviny prsníka i maternicovej sliznice a úbytku kostnej hmoty u normálnych žien. Androgén je možné spojiť s prijímanou dávkou estrogénu používaného na prevenciu iných príznakov menopauzy. U týchto žien, kde tvorba a/alebo pôsobenie estrogénu bolo blokované na liečenie endometriózy, leiomyomatózy, rakoviny prsníka, rakoviny maternicovej sliznice, rakoviny vaječníkov alebo inej na estrogén citlivej choroby, možno podávanie androgénu začať kedykoľvek, výhodne však súčasne s blokádou estrogénov.

Androgén na intramuskulárny alebo subkutánny depot injekciou môže byť uložený v biologicky kompatibilnom, biologicky rozložiteľnom polymére, napr. poly (d,l-lactid--co-glycolid) a to vedľa iných techník, procesom separácie fáz alebo vytvarovaním do tabletiek či tyčinick. Mikroguľôčky môžu byť suspendované v nosiči pre vytvorenie injektovateľného prípravku alebo je možné depot injikovať vo forme tabletky alebo tyčinky. Pozri taktiež Európsku patentovú prihlášku EPA čís. 58 481 uverejnenú 25. 8. 1982 a týkajúcu sa pevných látok pre subdermálnu injekciu alebo implatáciu alebo kvapalnej látky na intramuskulárne alebo subkutánne injekcie obsahujúce biologicky kompatibilné, biologicky rozložiteľné polyméry, ako napr. kopolymér laktid-glykolid a aktívne zlúčeniny. Tieto látky umožňujú riadené uvoľňovanie zlúčeniny.

Androgény užitočné v tomto vynáleze môžu byť typicky vytvorené so štandardnými farmaceutickými excipientmi, napr. rozprášením vysušenej laktózy a stearanu horečnatého, v tabletkách alebo kapsulách na orálne podávanie.

Aktívnu substanciu je možné spracovať na tablety alebo dražé zmiešaním s pevnými práškovými nosnými látkami, ako citran sodný, uhličitan vápenatý alebo dikalciumfosfát a so spojivami ako je polyvinyl pyrolidin, želatína alebo deriváty celulózy, príp. tiež s pridaním lubrikantov, ako je stearan horečnatý, lauryl síranu horečnatého, „Carbowax“ alebo polyetylénglykol. Samozrejme je možné pre prípad orálneho podávania pridať tiež látky zlepšujúce chuť.

Ako ďalšie formy je možné používať kapsuly, napr. tvrdú želatínu, ako i uzatvorené puzdra z mäkkej želatíny obsahujúce zmäkčovač alebo zvláčňovač, napr. glycerín. Kapsly obsahujú aktívnu substanciu výhodne vo forme granulátu. t. j. v zmesi s výplňami ako je laktóza, sacharóza, manit, škroby, ako napr. zemiakový škrob alebo amylopektín, deriváty celulózy alebo dobre rozptýlenú kyselinu kremičitú. Pri kapsulách z mäkkej želatíny je aktívna substancia výhodne rozpustená alebo suspendována vo vhodných kvapalinách, ako sú rastlinné oleje alebo tekuté polyetylénglykoly.

Namiesto orálneho podávania možno aktívnu zlúčeninu podávať parenterálne. V takomto prípade je možné použiť roztok aktívnej substancie, napr. v sézamovom alebo olivovom oleji. Aktívna substancia môže byť obsiahnutá alebo pripojená k biokompatibilnému, biologicky rozložiteľnému polyméru, napríklad poly(d-l-laktid-co-glykolid) a subkutánne alebo intramuskulárne injikovaná technikou nazývanou subkutánny alebo intramuskulárny depot pre vytvorenie kontinuálneho pomalého uvoľňovania počas dvoch týždňov i dlhšie.

Vynález taktiež zahŕňa súpravy alebo jednotlivé balenia obsahujúce farmaceutickú látku, aktívnu ingredienciu alebo prostriedky pre ich podávanie na použitie a liečenie rakoviny prsníka a maternicovej sliznice, ako i úbytkov kostnej hmoty a liečenia endometriózy, ako už bolo uvedené. Súpravy alebo balenia môžu taktiež obsahovať návod na používanie farmaceutických látok podľa tohto vynálezu.

Pri použití skôr uvedenej terapie opísaným spôsobom je možné zmierniť rast nádora prsníka a maternicovej sliznice, ako i úbytok kostnej hmoty i endometriózy a pritom minimalizovať nepriaznivé vedľajšie účinky. Použitie opísaného spôsobu môže taktiež zabrániť vznik týchto chorôb.

Keď sú požadované zloženia látky zaručujúce riadené uvoľňovanie riadeného uvoľňovacieho spojiva vhodného na použitie podľa vynálezu, tieto zahŕňa všetok biologicky kompatibilný materiál s riadeným uvoľňovaním, ktorý je inertný k aktívnej zložke a je schopný aktívnu zložku do seba pojať. Odborníkom je známe mnoho takýchto materiálov. Výhodnými spojivami s riadeným uvoľňovaním sú také materiály, ktoré sa za fyziologických podmienok pomaly metabolizujú po svojej subkutánnej alebo intramuskulárnej injekcii pri savcoch (t. j. v prítomnosti telesných tekutín, ktoré tam existujú). Spojivo má byť také, aby jeho rýchlosť biologického rozkladu bola dostatočne pomalá a samotné mikroguľôčky spojiva (t. j. bez steroidu či inej aktívnej zložky) majúce priemerný priemer nad 20 mikrónov neboli biologicky celkom rozložené aspoň jeden mesiac po subkutánnej alebo intramuskulárnej injekcii. Vhodnými spojivami sú o. i. biologicky kompatibilné polyméry a kopolyméry dosiaľ používané pri látkach na pozvoľné uvoľňovanie. Takéto biologicky kompatibilné zlúčeniny sú netoxické a inertné na okolité tkanivá po subkutánnej alebo intramuskulárnej injekcii a nevyvolávajú významnejšie nepriaznivé účinky, ako imunitné reakcie, zápal alebo pod., metabolizujúce sa do metabolických produktov, ktoré sú taktiež biologicky kompatibilné a ľahko sa vylučujú z tela.

Tak napr. je možné použiť polymerickú matricu odvodenú od kopolymerických a homopolymerických polyesterov majúcich hydrolyzovateľné estérové väzby. O mnohých z nich je odborníkom známe, že sú biologicky rozložiteľné a vytvárajú tak produkty buď netoxické alebo len mierne toxické. Takými polymérmi sú typicky polyglykolové kyseliny (PGA) a polymliečne kyseliny (PLA), poly(DL--kyselina mliečna-co-kyselina glykolová) (DL PLGA), po-

ly(D-kyselina mliečna-co-kyselina glykolová) (D PLGA) a poly(L-kyselina mliečna-co-kyselina glykolová) (L PLGA). Výhodný pomer medzi polymérmi kyseliny mliečnej a kyseliny glykolovej v poly(kyselina mliečna-co-kyselina glykolová) je v rozmedzí od 100 : 0 /t. j. čistý polyaktid/ do 50 : 50. Ďalšími užitočnými biologicky rozložiteľnými alebo biologicky rozrušiteľnými polymérmi sú poly(ε-kaprolactón), poly(ε-kaprolaktón-CO-kyselina mliečna), poly-(ε-kaprolactón-CO-kyselina glykolová), poly (ß-hydroxy kyselina maslová), poly(alkyl-2 kyanoakrylát), hydrogély, ako poly(hydroxyetyl metakrylát), polyamidy, poly (amino kyseliny) (i.e. L-leucin, kyselina glutamová, L-kyselina asparagová) a pod.), poly(ester močoviny), poly (2-hydroxyetyl DL-aspartamid),(polyméry polyacetátu, polyortoestéry, polykarbonáty, polymaleamidy, polysacharidy) a ich kopolyméry. Početné vhodné materiály sú dostupné v predaji, ako napr. polykyselina mliečna-co-glycolid (dodáva Birmingham Polymer Inc., Birmingham Al. alebo Dupont Company, Washington DC).

Pozvoľne uvoľňované častice podľa tohto vynálezu majú rýchlosť uvoľňovania aktívnej zložky vypočítanú tak, aby zaisťovali v podstate konštantnú koncentráciu séra. Keď je podaný nízkodávkovaný androgén podľa tohto vynálezu, je androgén uvoľňovaný spojivom rýchlosťou udržujúcou hladiny séra tohto androgénu medzi 1 a 50 nanomolmi na liter, typicky medzi 1 a 25, výhodne medzi 1 a 15 a najlepšie medzi 1 a 10 nanomolmi na liter, keď je podávaný za štandardných podmienok ďalej uvádzaných. Štandardné podmienky sú definované (len pre obmedzený účel merania tu uvádzanej vlastnosti rýchlosti uvoľňovania pozvoľne uvoľňovaných častíc) ako perkutánna injekcia 10 mg častíc (vo forme 20 mg farmaceutickej látky s pomerom 1 : 1 (váhove) častíc proti 2 % vodného nosiča karboxymetyl celulózy (váhove) do zadnej časti mladých krýs Spraque-Dawley ženského pohlavia. Potom sa meria koncentrácia androgénu tým, že sa od krýs periodicky odoberajú vzorky séra začínajúc 48 hodín po podaní a končiac 28 dní po podaní tak, aby bolo zaručené, že hladiny séra sú po celé toto obdobie udržované v požadovanom rozpätí.

Rýchlosť uvoľňovania pozvoľne uvoľňovaných častíc možno meniť zmenou ktoréhokoľvek z viacerých parametrov (alebo kombináciou parametrov), o ktorých je odborníkom známe, že menia rýchlosť uvoľňovania. K týmto parametrom patrí o. i. zloženie spojiva pozvoľne uvoľnovaných častíc, veľkosť častíc a náplň jadra. Tak napr. je známe, že polyaktidové spojivo sa hydrolyzuje pomalšie a preto za inak rovnakých pomerov uvoľňuje aktívnu zložku pomalšie než kopolyméry kyseliny mliečnej a kyseliny glykolovej. Pri týchto kopolyméroch rýchlosť uvoľňovania narastá s narastajúcim percentom glykolidu v móloch. Pri rovnakých hmotnostiach častíc narastá rýchlosť uvoľňovania s klesajúcim rozmerom, pretože väčšia celková plocha povrchu (súčet všetkých častíc) je predstavovaná menšími časticami. Rovnako i pri zvyšovaní náplne jadra sa zvyšuje rýchlosť uvoľňovania. Tieto parametre je možné taktiež známymi spôsobmi meniť na riadenie doby trvania uvoľňovania. Podrobné vysvetlenie prípravy lieku s pozvoľným uvoľňovaním podal F. Lim (F. Lim Biomedical Application of Microencapsulation, Franclin Lim, ed., CRC, Press, Boca Raton, 1984), ktorého celý obsah sa tu začleňuje odkazom namiesto úplnej citácie.

Štandardné podmienky a merania skôr uvedené sa týkajú len inherentnej vlastnosti rýchlosti uvoľňovania častíc a sú len definičné. Častice majúce vhodnú rýchlosť uvoľňovania je možné tak, ako je tu podrobne rozoberané pripravovať a podávať mnohými rôznymi spôsobmi. Používajú sa na rôzne účely a podávajú sa v širokom rozpätí dávkovania (pozri ďalej). Tieto častice môžu poskytovať pozvoľné uvoľňovanie aktívnej zložky buď len 28 dní alebo po podstatne dlhšie obdobie, t. j. napr. 2 mesiace, 3 mesiace, 6 mesiacov i dlhšie. Inak povedané, zatiaľ čo častice musia udržovať správne hladiny v krvi po 28 dní, sú žiaducim spôsobom vytvorené v takom zložení, aby tieto hladiny v krvi udržovali po podstatne dlhší čas.

Ošetrujúci klinický lekár môže dávkovanie meniť tak, aby udržoval hladiny séra na požadovanej úrovni, napr. medzi 1 a 50 nanomolmi androgénu na liter. Dávkovanie u ľudí potrebné na dosiahnutie hladín séra na úrovni podobnej ako pri kryse za štandardných podmienok, má tendenciu byť asi 30-krát väčšie ako dávky pre krysu, i keď bude kolísať podľa metabolizmu jednotlivých pacientok. Tak napr. by bolo možné očakávať, že pozvoľne uvoľňované častice MPA, ktoré udržujú koncentráciu séra na 30 nanomoloch po injekciách 10 mg pri kryse, by u človeka vytvorili koncentráciu 30 nanomolov injekciou 300 mg, 20 nanomolov injekciou 200 mg, 15 nanomolov injekciou 150 mg atď. Takéto dávkovanie je podľa hmotnosti pozvoľne uvoľňovaných častíc a neobsahuje vplyv nosiča. Dávkovanie finálnej farmaceutickej látky musí byť upravené tak, aby sa bral do úvahy i nosič. Ak je napr. požadovaná dávka 100 mg častíc, potom pri látke, ktorej pomer častíc k nosiču je 1 : 1, musí byť podaná dávka 200 mg. Dávkovanie by malo byť taktiež upravené podľa rýchlosti uvoľňovania pozvoľne uvoľňovaných častíc za štandardných podmienok. Tak napríklad na dosiahnutie rovnakej koncentácie séra je nutné pri časticiach, ktorých rýchlosť uvoľňovania je 5 nanomolov (za štandardných podmienok), podávať v dávkach približne dvakrát väčších, ako pri dávkovaní častíc s rýchlosťou uvoľňovania 10 nanomolov (za štandardných podmienok).

V typickom prípade ošetrujúci klinický lekár začne dávkou vypočítanou na udržovanie hladín séra aktívnej zložky medzi 1 a 10 nanomolmi, napr. medzi 3 a 7 nanomolmi. V závislosti od reakcie pacientky je možné potom dávkovanie zvyšovať alebo znižovať. Je výhodné používať krátkodobe (napr. 28 dní) pôsobiace častice, pokiaľ sa nezistí optimálne dávkovanie. Potom možno podávať dlhodobejšie pôsobiace častice v dávkach udržujúcich optimálne hladiny v krvi. Dávkovanie sa ale prispôsobí tak, ako bolo skôr uvedené, pre akýkoľvek rozdiel v štandardných rýchlostiach uvoľňovania medzi krátkodobejšie a dlhodobejšie pôsobiacimi časticami.

Výhodné aktívne zlúčeniny obsahujú všetky tu uvádzané androgénne zlúčeniny, napr. medroxyprogesterón acetát (6-α-metyl, 17-α-acetoxy-progesterón) alebo „MPA“, ktorý je možné získať o. i. od firmy Upjohn and Farmittalia Carlo Erba, S.p.A., pod obchodným názvom Provera, Depoprovera alebo Farlutal; a megestról acetát (17α-acetoxy-6-metyl-pregna-4, 6-diene-3,20-dione) čiže „MGA“, ktorý možno získať o. i. od firmy Mead Johnson and Co. pod obchodným názvom Megace.

Je výhodné, ak pozvoľne uvoľňované častice sú v podstate sférické /guľové/. Toho je možné dosiahnuť, napr. rozpustením aktívnej zložky a pozvoľne uvoľňovaného spojiva v organickom rozpúšťadle a potom vlievaním rozpúšťadla do vody za súčasného miešania. Malé guľôčky mikrospojiva majúceho v sebe disperzovanú aktívnu zložku sú takto vytvárané v dôsledku nedostatku rozpustnosti mikroguľôčok vo vode pridaním nadbytku vody. Mikroguľôčky sa zbavujú značného množstva organického rozpúšťadla, dokiaľ je organické rozpúšťadlo miesiteľné vo vode. Je možné pridať povrchovo aktívnu látku, aby sa napomohlo separácii mikroguľôčok z rozpúšťadla počas tvorenia guľôčok vo vode. Priemernú veľkosť mikroguľôčky je možné

zväčšiť menej intenzívnym miešaním alebo zmenšiť intenzívnejším miešaním. Na účely ľahkej aplikácie pri podávaní pacientom a tiež na uľahčenie nasledujúceho odstraňovania nežiaduceho zostatkového organického rozpúšťadla sú výhodnejšie menšie mikroguľôčky. Typicky je priemerná veľkosť guľôčok medzi 5 a 40 um a výhodne medzi 9 a 28 um.

Dáva sa prednosť postupu, keď sa uskutoční uzatvorenie MPA vytvorením vodnej suspenzie mikrokvapôčok obsahujúcich zmes MPA a polyméru v metylénchloride. Polymérom môže byť napr. kopolymér 50 : 50 kyseliny mliečnej a glykolovej. Tvorenie mikroguľôčok je riadené detergentom, napr. polyvinylalkoholom. Kvapky sa nechajú stvrdnúť odstránením metylénchloridu extrahovaného s veľkým množstvom vody, čo je technika, ktorá dáva kvapkám lepší tvar ako obvyklé odparovanie vo vákuu. Veľkosť mikroguľôčky je riadená množstvom detergentu a rýchlosťou miešania zmesi suspenzie.

Celkové rozdelenie rozmerov častíc môže kolísať, ale doporučuje sa úzke a jednotnejšie rozmedzie. Výhodne je, ak je najmenej 90 % častíc medzi 1 a 40 um, ešte lepšie ak je najmenej 90 % častíc medzi 9 a 28 um. Rozmerom mikroguľôčok sa tu rozumie priemer jednotlivých guľôčok i keď (čo je nežiaduce) sú v zhluku s inými guľôčkami. Rozmerom nepravideľných častíc sa rozumie najdlhšia priamka medzi ktorýmikoľvek dvoma časťami častice. Rozmer pritom možno merať prehliadnutím reprezentatívnej vzorky častíc elektrónovým mikroskopom.

K reprezentatívnym organickým rozpúšťadlám na použitie na prípravu mikroguľôčok podľa vynálezu patrí o. i. metylénchlorid, etylacetát, acetón, dietyléter, tetrahydrofurán, hexafluoracetón, hexafluóroizopropanól, acetonitril a zmesi týchto rozpúšťadiel. Reprezentatívnymi detergentmi použitými v prvej časti výroby mikroguľôčok spôsobom extrakcie rozpúšťadla mikroenkapsuláciou tak, ako je uvedené v príklade 3, sú o. i. polyvinylalkohol, polyvinyl pyrolidín, karboxymetylcelulóza, želatína, škrob, mastek (steatit), síran horečnatý, uhličitan vápenatý a ionické činidlá. Detergent sa pridáva výhodne v množstve medzi 1 a 10 % vody (objemovo).

Pomer vody k rozpúšťadlu (vrátane rozpusteného spojiva) sa môže meniť, ale doporučuje sa veľký prebytok vody, napr. pomer vody k rozpúšťadlu 5 a 20 (objemovo) alebo i viac.

Spojivo sa výhodne pridáva k organickému rozpúšťadlu s koncentráciou medzi približne 1 % a 20 % (objemovo) v závislosti od rozpustnosti. Množstvo rozpúšťadla je výhodne blízko minima potrebného na úplné rozpustenie spojiva a aktívnej zložky. Ak je rozpustenie neúplné, je možné pridať ďalšie rozpúšťadlo. Pomer aktívnej zložky k spojivu je určený požadovanou náplňou jadra, ktorý sa pohybuje výhodne medzi 1 : 4 a 7 : 3 (hmotnostne) a ešte lepšie medzi 3 : 7 a 3 : 2. Stupeň náplne jadra je možné zvoliť na ovplyvňovanie rýchlosti uvoľňovania pozvoľne uvoľňovaných častíc alebo doby trvania uvoľňovania alebo iných odborníkom známych parametrov.

Pri výrobe mikroguľôčok s použitím procesu mikroenkapsulácie extrakciou rozpúšťadla, ako je uvedené v príklade 3, je výhodným rozpúšťadlom na rozpúšťanie medroxyprogeterón acetátu a polyméru alebo kopolyméru metylénchlorid, ale i iné rozpúšťadlá čiastočne miesiteľné s vodou a majúce nízky stupeň toxicity pre človeka sú taktiež vhodné (napr. etylacetát, acetón, dietyléter, tetrahydrofurán, hexafluóracetón, acetonitril a zmesi týchto rozpúšťadiel). Okrem toho toxicita rozpúšťadla nie je významným faktorom, keď je rozpúšťadlo v podstate odstránené použitím tu opísaných techník odstraňovania rozpúšťadla. Výhodným detergentom je poly(vinylalkohol), ale i iné detergenty sú taktiež vhodné : napr. polymerické disperzné činidlá (t. j. poly (vinylpyrolidín), karboxymetylcelulóza, želatína, škrob), mastek, síran horečnatý, uhličitan vápenatý a ionové činidlá.

Mikročastice je možné taktiež vytvárať odlievaním, pri ktorom sa odlieva roztok MPA a polymér alebo kopolymér vo vhodnom rozpúšťadle (napr. v niektorom z uvedených rozpúšťadiel). Rozpúšťadlo sa potom odparí pri atmosférickom tlaku. Takto získaný film sa zahreje a extruduje cez drôtennú sieť. Vzniknuté tyčinky alebo úlomky sa rozomelú na mikročastice. Vhodným molekulárnym sitom je možné mikročastice rozdeliť do veľkostných skupín. Priemerný rozmer je od 1 do 250 um, výhodne 5-100 um a ešte lepšie 9-28 um. Tak odstraňovanie rozpúšťadla, ako i ľahkosť injikovania sú uľahčené použitím menších častíc, výhodne s priemernou veľkosťou (90 % častíc) menšou ako 40 um.

Podľa vynálezu má výhodná farmaceutická látka náplň jadra v rozpätí od 20 do 70 % MPA alebo MGA, najmä od 30 do 60 %. Pomer aktívnej zložky k spojivu je výhodne 1 : : 4 až 7 : 3, napr. 3 : 7 - 3 : 2.

Informácie o metódach všeobecného použitia na prípravu látok s riadeným uvoľňovaním iných zlúčenín je možné nájsť v (Kitchell and Wise, In Methods in Enzymology, Academic Press vol. 112, pp. 436-448; Beck and Tice, In Long Acting Steroid Contraception (D. R. Mishell Jr., ed), Raven Press: New York, pp. 175-199, 1983 and Wise et al., In Biology and Medicine (G. Gregotiadis, ed), Academic Press: New York, pp. 237-270, 1979), ktorých celý obsah sa týmto zahŕňa do opisu vynálezu odkazovo, miesto citácie úplných textov.

Steroid sa podáva výhodne denným dávkovaním, ktorým sa podáva menej ako 25 mg aktívneho MPA alebo MGA na 50 kg telesnej hmotnosti, výhodne 1 - 10 mg a ešte lepšie 3 - 7 mg (napr. 5 mg). Takto zvolené dávkovanie výhodne udržuje koncentráciu séra pod 50 nanomolmi na liter, výhodne medzi 1,0 nanomolom na liter a 10, 15 alebo 25 nanomolmi na liter, podľa reakcie pacientky.

Podľa tohto vynálezu obsahuje jedna parenterálna injekcia výhodne menej ako 2,0 gramu aktívnej zložky (napr. medroxyprogesterón acetátu alebo megestról acetátu), ešte lepšie 0,15 až 1,0 gramu.

Je veľmi žiaduce odstrániť z pozvoľne uvoľňovaných častíc čo najviac zostatkového organického rozpúšťadla. V skutočnosti sú niektoré organické rozpúšťadlá tak toxické, že ich nemožno použiť na tvorbu pozvoľne uvoľňovaných častíc, ak neexistuje prostriedok na ich účinné odstránenie. Nezačlenené organické rozpúšťadlo, ktoré nie je zachytené do fyzikálnej štruktúry častice, t. j. je len v styku s povrchom častice, je možné ľahko odstrániť tradičnými technikami (napr. opakovaným oplachovaním vodou, prúdom vzduchu a pod.). Organické rozpúšťadlo zachytené do fyzikálnej štruktúry častice je problematickejšie a v ďalšom texte sa hovorí o novom spôsobe odstraňovania takéhoto rozpúšťadla.

Odstraňovanie rozpúšťadla je uľahčené prípravou častíc s malým rozmerom častice. Častice majú výhodne priemerný rozmer menší ako 40 um, napr. medzi 5 a 40 um a ešte lepšie medzi 9 a 28 um. Najvýhodnejšie je také ich rozdelenie do rozmerových skupín, pri ktorom 90 % častíc je vnútri skôr uvedených rozpätí.

Pri výhodných uskutočneniach sa po vytvorení častíc odstráni nezačlenené rozpúšťadlo tradičnými technikami, ako napr. opakovaným oplachom vodou a/alebo sušením.

Odstraňovanie rozpúšťadla potom výhodne postupuje tak, že sa častice vystavia miernemu vákuu, v ktorom je

tlak najmenej 6650 Pa (50 torr) a teplota nie je vyššia ako menšia z (A) 30 °C a (B) 7 °C pod teplotou sklovitého prechodu častíc.

Častice sa v podstate zbavia zostatkového rozpúšťadla vrátane rozpúšťadla fyzikálne začleneného do častice tak, že sa častice vystavia silnému vákuu (menšiemu ako 133 Pa (1,0 torr), výhodne menšiemu ako 66 Pa (0,5 torr) pri teplote o 7 až 20 °C nižšej ako je teplota (Tg°) -sklovitého prechodu častíc, výhodne o 7 až 15 °C pod Tg a ešte lepšie o 7 až 12 °C pod Tg. Táto fáza silného vákua pokračuje v čase postačujúcom na zmenšenie reziduálneho rozpúšťadla v časticiach na koncentráciu menšiu ako 0,1 % (hmotnostne proti celkovej hmotnosti týchto častíc). Zvyškové rozpúšťadlo sa zredukuje výhodne na menej ako 0,05 % a ešte lepšie na menej ako 0,02 %.

Teplotu sklovitého prechodu je možné merať alebo vypočítať mnohými odborníkom známymi spôsobmi, o. i. meraním a grafickým znázornením tepelného toku proti teplote pri štandardných podmienkach (ako je znázornené na obr. 9). Maximálna teplota ohrevu má byť výhodne nastavená nie viac, ako je koniec lineárneho úseku krivky pod prechodovou teplotou (ako je znázornené na obr. 9). Vyššie teploty môžu nežiaducim spôsobom zapríčiňovať aglomeráciu častíc alebo vytváranie produktov podliehajúcich tepelnému rozkladu. Udržovaním teploty v rozpätí tohto vynálezu sa dosiahne, že v podstate častice voľne plávajú a sú bez produktov podliehajúcich tepelnému rozkladu. Použitie mierneho tepla podľa vynálezu však napomáha značnému odstráneniu organického rozpúšťadla.

Pri výhodných uskutočneniach predchádza pred fázou silného vákua fáza mierneho vákua alebo iný spôsob obmedzenia zvyškového rozpúšťadla na menej ako 5 % a výhodne na menej ako 2 % (hmotnostne proti celkovej hmotnosti častíc). Vyššie hladiny rozpúšťadla môžu nežiaducim spôsobom zapríčiniť rozbíjanie častíc pri následnej fáze silného vákua. Takéto rozbitie môže mať nežiaduce účinky na charakteristiku rýchlosti uvoľňovaných častíc.

Keď sa použije fáza predchádzajúceho mierneho vákua, sú typické časové intervaly 1 až 10 dní, výhodne 2 až 4 dni. Typické intervaly pre fázu silného vákua sú 1 až 20 dní, výhodne 2 až 15 dní a ešte lepšie 3 až 10 dní. Trvanie fázy silného vákua však má pokračovať dokiaľ zvyškové organické rozpúšťadlo nie je zredukované pod požadovanú hladinu. Hladinu zvyškového rozpúšťadla je možné určiť známymi spôsobmi, ako je uvedené v príklade 6 a ďalej. Spôsob podľa vynálezu bol úspešne využitý na redukciu rozpúšťadla na menej ako 0,2 % (váhove), pričom najnižšie množstvo zistiteľné analýzou GC je uvedené v príklade 6.

Pozvoľne uvoľňované častice pripravené podľa vynálezu môžu byť pripravené pre konečné použitie mnohými známymi spôsobmi. Výhodne sa sterilizujú známymi technikami (napr. ako je opísané v príklade 10). Potom je ich možné kombinovať s farmaceuticky prijateľnými rozpúšťadlami alebo nosičmi. Taktiež je k nim možné pridať známe konzervačné prísady. Koncentrácia pozvoľne uvoľňovaných častíc (hmotnostne k celkovej hmotnosti látky) je približne medzi 10 a 70 %. Nosič je výhodne taký, pri ktorom je spojivo častíc v podstate nerozpustné, napríklad karboxymetylcelulóza vo vode, destilovanej vode alebo vo fyziologickom roztoku.

Podľa vynálezu sa výhodné mikroguľôčky vyznačujú neprítomnosťou nečistôt podliehajúcich tepelnému rozkladu. Toho sa dosiahne použitím nízkej teploty a vysokého vákua na sušenie mikroguľôčok.

Výhodný nosič pre parenterálnu injekciu mikročastíc podľa vynálezu je zvolený zo skupiny pozostávajúcej z fyziologického roztoku karboxymetylcelulózy, vodného zriedeného roztoku glycerínu, vodného zriedeného roztoku glykolu, vodného zriedeného etanolu. Konkrétnym výhodným nosičom je 2 až 5 %-ný vodný roztok karboxymetylcelulózy.

Výhodné spôsoby podávania pozvoľne uvoľňovaných látok zahŕňajú o. i. subkutánnu alebo intramuskulárnu injekciu a orálne podávanie.

Vzhľadom na nízke dávky používané podľa vynálezu, sú vedľajšie účinky dostatočne obmedzené, takže preventívne používanie metód podľa vynálezu je lepšie praktikovateľné a má väčšiu pravdepodobnosť rozšíreného prijatia, ako metódy používajúce vysoké dávky. Pretože liečebné dávky sú nízke, nie je potrebné účinok „preventívnej liečby" ohrozovať použitím zníženého dávkovania.

Príklad 1

Prevencia karcinómu prsníka vyvolaného na krysách dimetylbenz (a) -antracénom (DMBA) nízkou dávkou medroxyprogesterón acetátu („MPA"):

Na preukázanie účinnosti vynálezu pre obmedzenie výskytu nádora prsníka vyjadruje obr. 1 účinok jedinej subkutánnej injekcie Depo-Provera (medroxyprogesterón acetát (MPA) (30 mg)) jeden týždeň pred vyvolaním nádora dimetylbenz(a)antracénom. Obr. 1 znázorňuje obdobie 30 až 85 dní po podaní DMBA. Jedna krivka na obr. 1 vyznačuje priemerný počet nádorov na jedno zviera v skupine chránenej preparátom Depo-Provera, kým druhá krivka vyznačuje priemerný počet nádorov na jedno zviera v nechránenej skupine. 30 mg injekcie Depo-Provera uvoľní približne 0,17 mg aktívneho medroxyprogesterón acetátu za jeden deň počas 6 mesiacov. Ako vidno z porovnania oboch grafov na obr. 1, skupina ošetrená preparátom Depo-Provera prejavila omnoho väčšiu odolnosť na prepuknutie nádora, ako nechránená skupina. Po 85 dňoch bol pozorovaný výskyt priemerne 1,89 nádorov na krysu v nechránenej skupine a len 0,30 nádorov na krysu v skupine ošetrenej prípravkom Depo-Provera. Počet a veľkosť nádorov meraný hmatadlom bol zisťovaný týždenne.

Príklad 2

Liečba nádora prsníka vyvolaného na krysách dimethylbenz(a) -antracénom (DMBA) nízkou dávkou medroxyprogesterón acetátu (MPA):

Obr. 2 znázorňuje potlačenie rastu nádora prsníka, čo je možné dosiahnuť spôsobmi podľa vynálezu. Nádory boli indukované v ovariektomizovaných krysách použitím dimetylbenz (a) -antracénu. Extradiól bol použitý na stimuláciu rastu tak ošetrenej, ako i u kontrolnej skupiny krýs. Každé zviera v ošetrovanej skupine dostalo jedinú subkutánnu dávku 30 mg Depo-Provera, (ktorá uvoľňuje odhadom približne 0,17 mg denne aktívneho medroxyprogesterón acetátu po obdobie asi 6 mesiacov). Vyobrazenie znázorňuje priemernú estradiólom stimulovanú zmenu celkovej oblasti nádora v každej z oboch skupín po liečení. Z obr. 2 plynie, že v skupine ošetrenej preparátom Depo-Provera sa prejavil podstatne menší rast nádora, ako v neošetrenej skupine.

Príklad 3

Príprava mikroguľôčok obsahujúcich medroxyprogesterón acetát procesom extrakcie rozpúšťadla:

Úplného rozpustenia polyméreho materiálu 50/50 poly(DL-laktid-co-glycolid) (dodáva firma Birmingham Polymer Inc., Birmingham, Al.) sa dosiahne „cez noc" pretrepávaním s rozpúšťadlom v šejkre KS-10 (od firmy BEA Enprotech Corp.) nastavenom na rýchlosť 150 - 200 ot/min. Použitým rozpúšťadlom je metylénchlorid ($CH_2Cl_2$) získa-

ný z BDH a destilovaný jedenkrát tesne pred použitím. Polymér (1,50 g) sa pridáva do sklenej fľašky obsahujúcej už $CH_2Cl_2$ (15g) za nepretržitého pretrepávania. Potom sa za nepretržitého pretrepávania pridá medroxyprogesterón acetát na vytvorenie roztoku PLG-MPA-$CH_2Cl_2$.

Samostatne sa v živičnom tégliku na 250 ml od firmy (Kontes) zmieša 94 ml vody a 6 ml detergentu /poly-(vinylalcohol) (PVA) (Airvol $TM_{205}$, ktorý dodáva Air Products and Chemicals)/ a zmes sa udržuje za neustáleho miešania teflónovým, turbínu pripomínajúcim obežným kolesom, nasadeným na ťažký laboratórny miešač. Potom sa pridá k roztoku detergentu 1,16 ml metylénchloridu na saturáciu vodného roztoku a zabránenie extrakcie metylénchloridu v tejto fázy, použitím 2,0 ml sklenej pipety vsunutej jedným zo štyroch priechodov v hornej časti živičného téglika. Následne sa pokračuje v miešaní počas 5 minút rýchlosťou 850 ot/min. Mikroguľôčky sa potom pripravia pridaním už predtým pripraveného roztoku PLG-MPA--$CH_2Cl_2$ do miešaného $CH_2Cl_2$ saturovaného roztoku PVA použitím celopolypropylénovej striekačky so 6 palcov dlhou ihlou čís. 16. Po pridaní roztoku MPA sa v miešaní pokračuje ďalších 5 minút.

Vytvrdenie mikroguľôčok:
Postup pri vytvrdení je tento:

1. Obsah živičného téglika sa rýchlo naleje do vytvrdzovacieho kúpeľa, živicový téglik sa vypláchne destilovanou vodou a obsah sa znovu vleje do vytvrdzovacieho kúpeľa. Vytvrdzovací kúpeľ tvorí veľká, z nehrdzavejúcej ocele vyrobená kadička (7 l) obsahujúca 5 l destilovanej vody. Miešanie je udržované veľkou rýchlosťou (850 ot/min.) po 20 minút ťažkým laboratórnym miešačom opatreným 2,5 palcovým obežným kolesom SS.

2. Mikroguľôčky sú potom separované od omývacieho média použitím filtračného systému Millipore 142. Po vytvrdení sa obsah kúpeľa prenesie do výdajovej tlakovej nádoby 20 l Millipore. V tomto čase je nutné dbať o to, aby dôkladným vymytím vytvrdzovacej kadičky boli účinne zachytené mikroguľôčky, ktoré sa usadzujú ako sa preruší miešanie. Mikroguľôčky sa potom zhromaždia na membráne 142 mm (veľkosť, póru 8 um) tým, že sa obsah výdajovej tlakovej nádoby pretlačí membránovou jednotkou pomocou stlačeného vzduchu 6900 Pa (10 psi)).

3. Membrána sa potom premyje destilovanou vodou a mikroguľôčky sa pritom zmyjú z membrány do druhého vytvrdzovacieho kúpeľa, zhodného s prvým. Potom sa zber mikroguľôčok uskutoční druhýkrát tak, ako je skôr opísané.

4. Konečné premytie a osušenie mikroguľôčok sa uskutočňuje vo filtračnom systéme Millipore 142. Prvý sušiaci úkon sa uskutoční prúdom vzduchu udržovaným jednu hodinu na 6900 Pa ( 10 psi). Mikroguľôčky sa potom premiestnia z membrány do sušičky obsahujúcej približne 1 palec prípravku Drierite a vložia sa do mierneho vákua (9300 Pa (70 torr)) počas 2-3 dní. Konečné usušenie sa uskutočňuje vo vákuovej peci pri 35 - 40 °C a tlaku 54 Pa (0,4 torr)), až sa rozpúšťadlo stane nezistiteľné plynovou chromatografiou, ktorej hranica citlivosti na zistenie $CH_2Cl_2$ je 0,02 % (váhove proti celkovej hmotnosti mikročastíc). Touto technikou bolo teda odstránené v podstate celé organické rozpúšťadlo pod hodnotu menej ako 0,02 %.

Príklad 4
Príprava 60 % medroxyprogesterón acetátu (MPA) /40 % MedisorbTM 85:15 DL poly(kyselina mliečna-co-kyselina glykolová) (PLGA) mikročastíc metódou liatia

Medroxyprogesterón acetát (MPA) bol použitý tak, ako bol získaný zo steraloidov. Pred použitím bola táto zložka preskúmaná UV spektroskopiou a na svoj bod tavenia. Medisorb™ 85:15 DL kyselina bola od firmy DuPont a tiež bola použitá tak, ako bola získaná. Metylénchlorid (najvyšší dostupný stupeň) bol získaný od firmy Fischer Scientific. Polymér (6,0022 g) bol rozpustený v 24 ml metylénchloridu ako 25 %-ný roztok ( 0,25 g PLGA/ml metylénchloridu). K polymérnemu roztoku bol pridaný medroxyprogesterón acetát (9,0022g) a v miešaní bolo pokračované, aby sa zabezpečilo úplné premiešanie roztoku. Roztok bol potom naliaty na čistú rovnú dosku zo skla s použitím zoraditeľnej doštičky Boston-Bradley na jeho rozotrenie do rovnomernej hrúbky. Takto naliaty film bol ponechaný na sušenie v klobúku na odvádzanie výparov niekoľko hodín. Po odparení väčšiny rozpúšťadla bol výsledný film zoškrabaný zo sklenenej dosky a štyri dni sušený vo vákuu pri izbovej teplote.

Film vytvorený v operácii liatia mal veľmi nízku hustotu, pretože operácia odstraňovania rozpúšťadla zanechala veľmi veľký objem. Tento prázdny objem bol zmenšený, aby sa znížilo prestupovanie kvapalín do mikročastíc, operáciou kompresie s použitím tepla a hydraulického tlaku. Film bol extrudovaný do tyčiniek lisom firmy Pasadena Hydraulics Inc., pri približne 125 °C.

Extrudované tyčinky boli rozomleté na malé častice bežne dostupnou brúskou s chladenou brúsnou komorou. Po rozbrúsení bol prášok preosiaty sitami zodpovedajúcimi normám USA na zhromaždenie mikročastíc v rozmerových skupinách od 38 do 125 um, 125 do 180 um a 180 do 250 um. Sitami osiate mikročastice boli zhromaždené.

Príklad 5
Odparenie zvyškového rozpúšťadla:
a/ Na sušenie bol použitý sklenený prístroj Abderhalden (dodaný firmou Aldrich Chemicals Co.). Jeho najdôležitejším znakom je to, že umožňuje súčasné použitie vysokého vákua a ohrevu v kombinácii s možnosťou uloženia vzorky na sušenie za prítomnosti sušiaceho činidla (molekulárneho sita 3A). Vysoké vákuum bolo dosiahnuté vývevou Edwards E2M5. Zahriatie vzorky na sušenie sa dosiahne refluxom zmesi rozpúšťadla $CH_2Cl_2$ + acetón v prípade šarže MPA-UB-V na získanie teploty 45 °C.
b/ Šarže MPA-MB-VII až MPA-MB-XI, MPA-MFI-73, MPA-MLV-31, MPA-MLV-32, MPA-MLV-34, MPA--MLV-35, MPA-MLV-39 a MPA-MLV-40 boli usušené takto : pri všetkých týchto šaržiach bola použitá vákuová pec na dosiahnutie ďalšieho sušenia mikroguľôčok. Vákua 54 Pa (0,4 torr) bolo dosiahnuté vývevou Edvards E2M5. Teplota bola dobre riadená (v rozsahu 44 až 46 °C) a všetky tieto dávky boli v systéme sušené súčasne.

Príklad 6
Určovanie zvyškového metylénchloridu

Koncentrácia zvyškového metylénchloridu v mikroguľôčkach sa určí analýzou GC (plynovej chromatografie) plynovým chromatografom Variant 3700 s kapilárnym stĺpcom a detektorom FID. Teplotný program je : 7 minút pri 40 °C pred zahriatím rýchlosťou 10 °C/min. až do dosiahnutia 200 °C (1 min.). Objemy injekcie sú 1,0 ul. Na účely analýzy GC sa mikroguľôčky (približne 25 mg) rozpustia v $CHCl_3$ (stupeň - HPLC), 1 ml a potom sa rozriedia 5 ml izooktánu. Presná koncentrácia metylénchloridu sa určí pomocou kalibračnej krivky vytvorenej z piatich štandardov. Tieto štandardy sa pripravujú z čistého metylénchloridu ($CH_2Cl_2$) a chlóroformu ($CHCl_3$) v koncentráciach od 0,1 do 1,0 % (hmotnostne).

Nasledujúca tabuľka uvádza výsledky získané analýzou metylénchloridu:

| Systém MPA | % $CH_2Cl_2$ (hmotnostne) |
|---|---|
| Liaci proces: šarža pripravená ako v príklade 4 | 0,3 |
| mikroguľôčka 50:50 DL-PLG | menšia ako 0,02 |

Príklad 7

Určenie náplne jadra MPA :

a/ Nukleárna magnetická rezonancia: Toto určenie bolo uskutočnené spektroskopiou NMR a to analýzou oblasti pod vrcholom skupiny 19-metyl MPA pri δ=0,65 ppm a pri vrchole atómov vodíka polyméru (multiplet pri δ=5,20 a pri δ=4,8). Bol použitý spektrometer Bruker AC-F 300 FT NMR - pozri obr.3, kde je uvedený príklad spektra NMR a obr. 4 ako príklad kriviek štandardov pre toto určenie, ktoré sú odvodené od spektier NMR známych zmesí MPA a polyméru.

b/ Chromatografia priestorového vylúčenia: Meranie náplne jadra priestorovou vylučovacou chromatografiou (chromatografiou sférickej exklúzie) (SEC) bolo uskutočnené použitím systému SEC Perkin-Elmer 250 ISO/LC-30 so stĺpcom PLgel 50 A 5 um a so zmiešaným stĺpcom PLgel s použitím chloroformu stupňa HPLC, ako zrieďovacej látky. Tak napr. na obr. 5 boli merania mikroguľôčok 50:50 PLG uskutočnené pri 40 °C a MPA i DL-PLG boli za týchto podmienok dobre separované. Náplň jadra vzorky bola určená meraním oblasti pod vrcholom MPA so vzťahom ku kalibračnej krivke vytvorenej podľa štandardných koncentrácií zmesí PLG/MPA (insert).

Príklad 8

Fyzikálne charakteristiky mikroguľôčok zistené elektrónovou rozkladovou mikroskopiou (SEM)

Pre analýzu morfológie svojho povrchu boli mikroguľôčky skúmané elektrónovou rozkladovou mikroskopiou (SEM), s použitím prístroja JEOL JSM T33OA. Vzorky boli pripravené položením guľôčok na dvojstranný pásik papierového chromatogramu pred nanesením vrstvy zlata s hrúbkou 500-600A. Takéto analýzy boli použité taktiež na zisťovanie stredného priemeru (∅) mikroguľôčok. Tieto zistenia sa vykonávajú ručným počítaním a meraním všetkých mikroguľôčok, ktoré sú vidieť na vyobrazení uskutočnenom s miernym zväčšením 350x (obr. 6a). Väčšie zväčšenie až 2000x dovoľuje podrobnejšiu analýzu povrchu mikroguľôčok (obr. 6b).

Tak napríklad presné určenie rozloženia veľkosti mikroguľôčok šarže MPA-MB-V bolo uskutočnené priamym meraním priemeru mikroguľôčok podľa fotografií SEM. Z obr. 8 vyplýva, že viac ako 95 % zo 680 mikroguľôčok takto spočítaných má veľkosť menšiu ako 40 um pri strednom priemere 18,6 ± 9,7 (S.D) um. Takto malý rozmer mikroguľôčok uľahčuje injekciu látky a skracuje čas uvoľňovania.

Priečny rez mikroguľôčkami na obr. 7 ukazuje, že MPA je sústredená v ostrovčekoch rozptýlených v polymére.

Príklad 9

Charakteristika mikroguľôčok diferenciálnou rozkladovou kalorimetriou

Teplotná analýza vzorkov bola uskutočnená prístrojom Perkin-Elmer DSC-7. Prístroj bol kalibrovaný indiom a pracoval s rýchlosťou rozkladu 10 °C/min.

Na obr. 9 ukazuje krivka DSC mikroguľôčok, že maximálnu teplotu sušenia je možné ľahko zistiť.

Príklad 10

Sterilizácia mikroguľôčok

Pred injekciou boli mikroguľôčky sterilizované vystavením 2,2 megaradom žiarenia gama generovaného zdrojom Cobalt-60 (Gammacell 200). Stabilita MPA bola kontrolovaná priestorovou vylučovacou chromatografiou (SEC), kým stabilita polyméru bola analyzovaná SEC s použitím polystyrénových štandardov pre kalibrovanie a modifikáciu relatívnej viskozity s použitím kapilárneho viskozimetra Ubbelohde.

Vystavením žiareniu gama (2,2 megaradov) sa MPA nepoškodzuje, ale špecifická viskozita mikroguľôčok v roztoku $CH_2Cl_2$ je znížená z 0,301 ± 0,008 na 0,262 ± ± 0,003 dL/g čo signalizuje, že niektoré reťazce polyméru boli prerušené.

Vzorky dávky MPA-MB-V boli vystavené rôznym množstvám žiarenia gama (0, 1,1, 2,2 megaradov) a boli merané parametre rozloženia hmoty /M(n-1), Mn, Mw, Mz, M(z+1)/ (pozri obr. 10A), rovnako ako ich polydisperzita (Mw/Mn) (pozri obr. 10B).

Tieto údaje ukazujú, že dominantným procesom je náhodné štiepenie polymerických reťazcov. Ožiarené mikroguľôčky teda budú biologicky rozkladané rýchlejšie, ako neožiarené a preto účinky ožiarenia je treba vziať do úvahy, keď sú mikroguľôčky pripravované, t. j. pri nastavení predradiačnej rýchlosti uvoľňovania a to nepatrne nižšie, ako je požadované pre finálny výrobok.

Príklad 11

Hladiny séra MPA s mikroguľôčkami obsahujúce MPA pri subkutánnej injekcii králikom

Novozélandské biele králiky (asi 2,7 kg) boli umiestnené po jednom v klietkach pri režime 10 hodín svetla a 14 hodín tmy (svetla sa rozsvietili o 7.00 hodine) a dostávali 16 % „Tabletky pre králiky" získané od Moulées Kiloplus (Quebec, Kanada) a vodu z vodovodu neobmedzene.

50 mg mikroguľôčok obsahujúcich MPA (šarža MPA--MB-V) v suspenzii roztoku 2 % karboxylmetylcelulózy a 1 % Tween 80 boli injikované subkutánne skupine 10 králikov. V rôznych časových intervaloch boli odoberané vzorky krvi a pomocou RIA boli merané koncentrácie MPA. Hladiny séra MPA sú uvedené na obr. 11.

Príklad 12

Hladiny séra MPA pri krysách, ktorým boli subkutánne injikované mikroguľôčky podľa vynálezu obsahujúce MPA

Mladé krysy ženského pohlavia Spraque - Dawley /Crl:CD(SD)Br/ boli získané od firmy Charles River Canada Inc. (St. Constanc, Quebec) a umiestnené po dvojiciach v klietkach pri režime 14 hodín svetla a 10 hodín tmy (svetlo sa vždy rozsvietilo o 5.00 hod.). Zvieratá dostávali potravu pre krysy a vodu z vodovodu neobmedzene.

Zvyšujúce sa dávky (5, 10 a 20 mg) mikroguľôčok s MPA v suspenzii v roztoku 2 % karboxymetylcelulózy a 1 % Tween-80 boli injikované subkutánne skupine 10 krýs (Spraque-Dawley) ženského pohlavia. V rôznych časových intervaloch boli potom odoberané ich vzorky krvi a pomocou RIA boli merané koncentrácie MPA. Výsledky sú znázornené na obr. 12.

Príklad 13

Prevencia rakovinového nádoru prsníka indukovaného dimetylbenz(a)antracénom (DMBA) pri krysiach s nízkou dávkou MPA (mikroguľôčok)

Materiál a metódy:
Zvieratá a indukcia karcinómu prsníka:

Karcinóm prsníka bol indukovaný krysám Spraque-Dawley ženského pohlavia (Crl:CD(SD)Br) (získaných od Charles River, Canada Inc., St. Constant, Quebec) vo veku 50 až 52 dní jediným intragastrickým podaním 20 mg dimetylbenz(a)antracénu (DMBA) (Sigma Checals co., St. Louis, Mo) v 1 ml kukuričného oleja.

Liečba:

Jeden týždeň pred podaním DMBA boli zvieratá rozdelené do troch skupín (intaktné, intaktné + 30 mg MPA a intaktné + 100 mg MPA) a dostali jednu subkutánnu dávku mikroguľôčok obsahujúcu 30 mg, resp. 100 mg MPA.

Výsledky:

Ako je znázornené na obr. 13, 85 dní po podaní DMBA z intaktných (neošetrených) zvierat malo 63 % zistiteľné nádory prsníka, kým pri zvieratách ošetrených 30 mg MPA (mikroguľôčkami) len 7,4 %, resp. 6,3 % zvierat malo zistiteľné nádory prsníka. Tieto údaje ukazujú, že preventívna liečba mikroguľôčkami MPA potláča vývoj nádora prsníka indukovaného DMBA pri krysách a takto preukazuje možné použitie mikrokapsuly MPA na prevenciu rakoviny prsníka i u žien.

Podmienky a opisy tu použité predstavujú výhodné uskutočnenia uvedené len na ilustráciu a nie sú mienené ako obmedzenia mnohých obmien, ktoré odborníci tohto odboru uznajú za možné pri uskutočňovaní tohto vynálezu tak, ako sú definované patentovými nárokmi.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Farmaceutický prípravok na liečenie alebo prevenciu osteoporózy, rakoviny maternicovej sliznice, rakoviny prsníka, endometriózy alebo na antikoncepciu s oneskoreným alebo diferencovaným uvoľňovaním androgénneho steroidu, obsahujúci pozvoľne uvoľňujúce častice s androgénnym steroidom, **vyznačujúci sa tým**, že androgénny steroid je zvolený zo súboru, ktorý zahŕňa medroxyprogesterón acetát a/alebo megestról acetát s konštantou inhibície $K_i$ nižšou ako $2x10^{-8}$ M pre androgénny receptor a hodnotou $ED_{50}$ menšou ako 3,0 nM prc bunky rakoviny prsníka ZR-75-1 a je rozptýlený v pomalo uvoľňujúcom spojive, ktoré je biologicky kompatibilné s ľudským tkanivom a v tele rozložiteľné na biologicky znášateľné metabolické produkty, pričom pomaly uvoľňujúce spojivo obsahuje polymetrickú matricu odvodenú z kopolymetrických a homopolymetrických polyesterov s hydrolyzovateľnými esterovými väzbami a je schopné pri svojom biologickom rozklade uvoľňovať androgénny steroid rýchlosťou udržujúcou koncentráciu androgénneho steroidu v sére medzi 1,0 a 50,0 nM počas trvania od 48 hodín do 28 dní po podaní.

2. Farmaceutický prípravok podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že pozvoľne uvoľňujúce častice sú mikroguľôčky s priemerným rozmerom medzi 5 um a 40 um, pričom tieto mikroguľôčky obsahujú maximálne 0,1 % hmotn. organického rozpúšťadla.

3. Farmaceutický prípravok podľa nároku 2, **vyznačujúci sa tým**, že mikroguľôčky tvoria 10 až 70 % hmotn. celkového farmaceutického prípravku, pričom hmotnostný pomer uvedeného androgénneho steroidu k uvedenému pozvoľne uvoľňujúcemu spojivu je v intervale medzi 3 : 2 a 3 : 7.

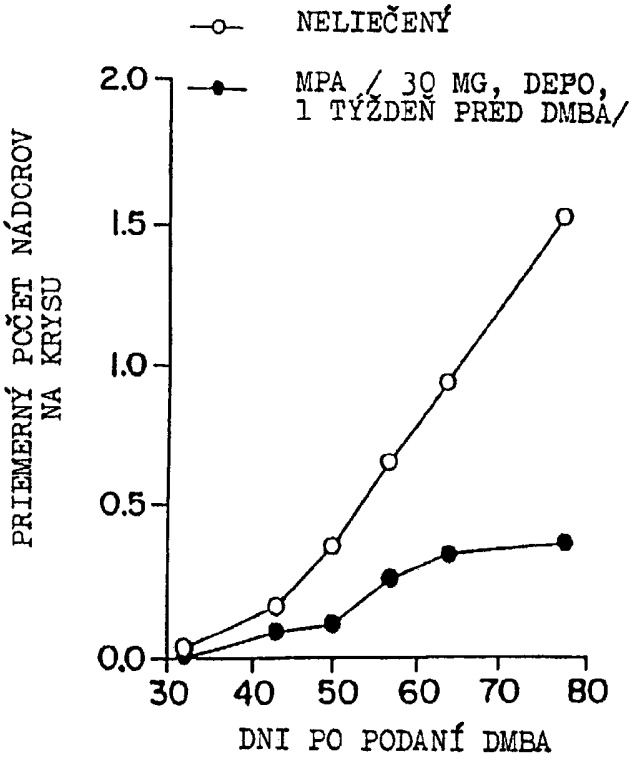
4. Farmaceutický prípravok podľa nároku 1 až 3, **vyznačujúci sa tým**, že pozvoľne uvoľňujúce častice sú schopné pri svojom biologickom odbúravaní počas až 12 týždňov udržovať koncentráciu androgénneho steroidu v sére medzi 1,0 až 5,0 nM.

5. Farmaceutický prípravok podľa nároku 1 až 4, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje organické rozpúšťadlá a/alebo nosiče v množstve menšom ako 0,1 % hmotn.

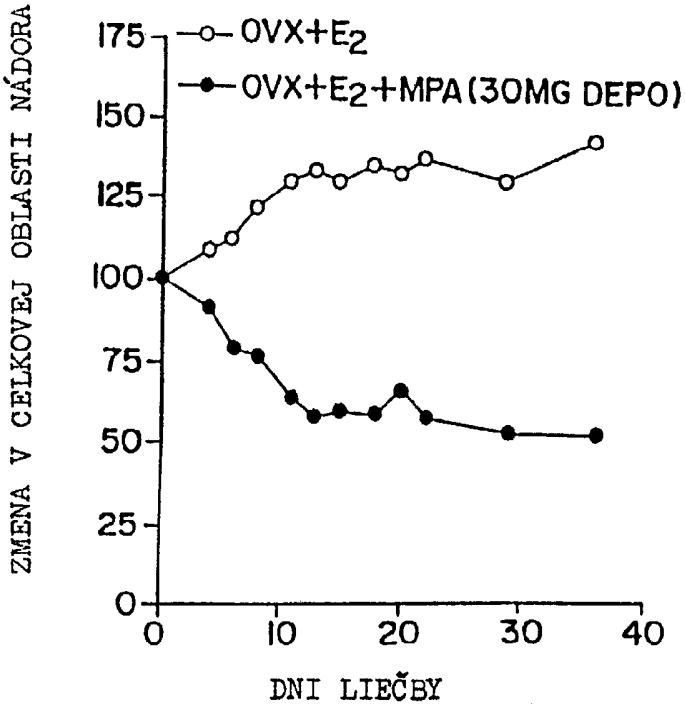
6. Spôsob výroby farmaceutického prípravku podľa nárokov 1 až 5, **vyznačujúci sa tým**, že androgénny steroid zvolený zo súboru, ktorý zahŕňa medroxyprogesterón acetát a/alebo megestról acetát, sa rozpustí v organickom rozpúšťadle spolu s pozvoľne uvoľňujúcim spojivom, ktoré obsahuje polymetrickú matricu odvodenú z kopolymetrických a homopolymetrických polyesterov a hydrolyzovateľnými esterovými väzbami a potom sa uvedená zmes pridá do vody, ktorá sa mieša rýchlosťou postačujúcou na vytvorenie mikroguľôčok s priemerom 5 um až 40 um, následne sa mikroguľôčky vystavia tlaku menšiemu ako 133 Pa a teplote o 7 až 20 °C nižšej ako je teplota sklovitého prechodu mikroguľôčok v čase až sa dosiahne zníženie koncentrácie zostatkového organického rozpúšťadla na hodnotu menšiu ako 0,1 % hmotn.

7. Spôsob výroby farmaceutického prípravku podľa nároku 6, **vyznačujúci sa tým**, že pred vystavením tlaku menšiemu ako 133 Pa sa mikroguľôčky vystavia vákuu aspoň 6650 Pa pri teplote maximálne 30 °C na čas aspoň 24 hodín, pričom následné vystavenie tlaku menšiemu ako 133 Pa sa uskutočňuje pri teplote 7 až 12 °C nižšej ako je teplota sklovitého prechodu mikroguľôčok a v čase postačujúcom na zníženie zostatkového organického rozpúšťadla v mikroguľôčkách na menej ako 0,02 % hmotn.

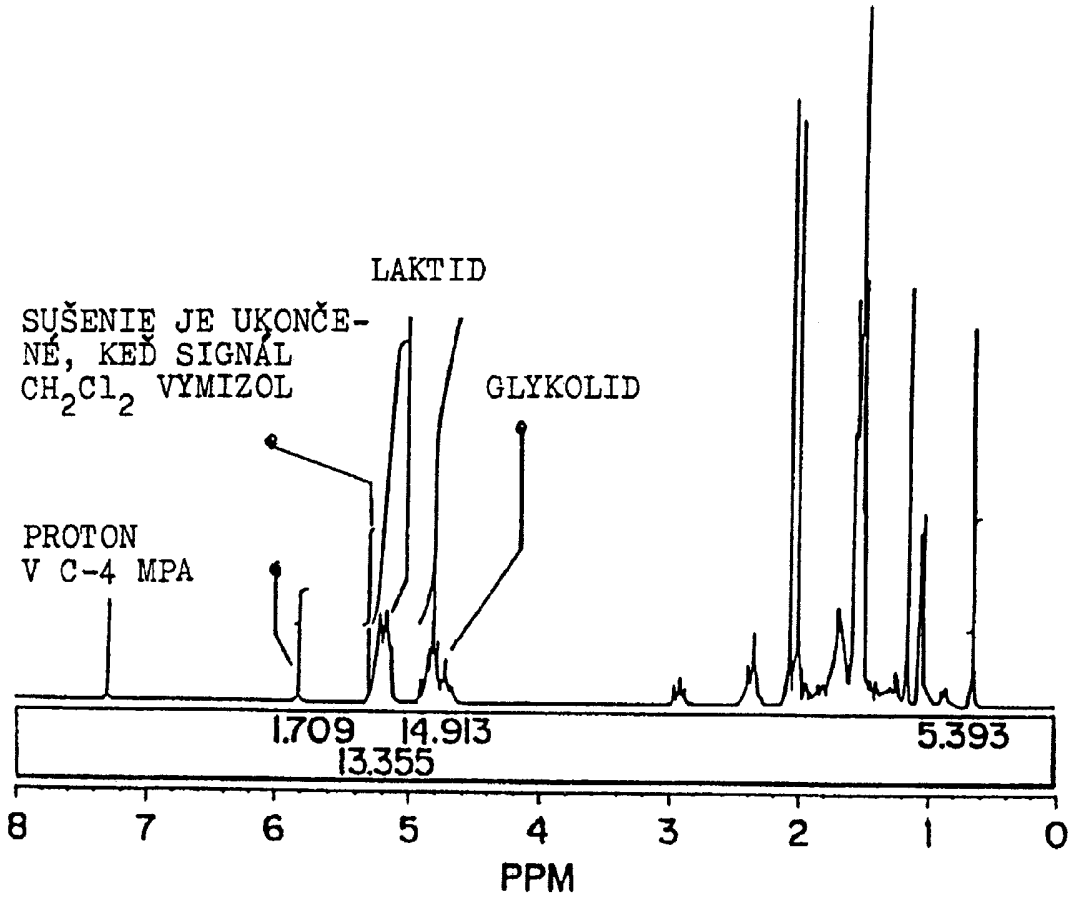
**9 výkresov**


NELIEČENÝ
MPA / 30 MG, DEPO,
1 TÝŽDEŇ PRED DMBA/
PRIEMERNÝ POČET NÁDOROV NA KRYSU
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
30
40
50
60
70
80
DNI PO PODANÍ DMBA

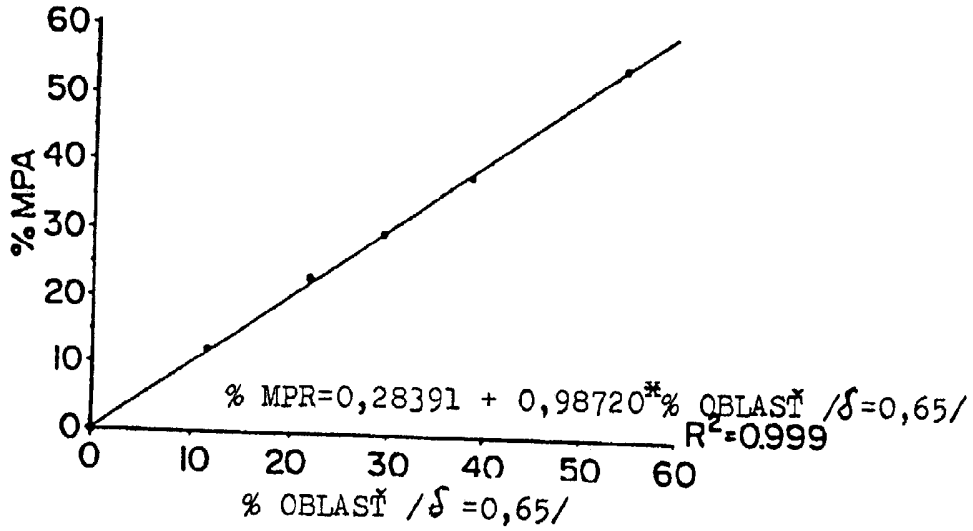
Obr. 1


OVX+E2
OVX+E2+MPA(30MG DEPO)
ZMENA V CELKOVEJ OBLASTI NÁDORA
175
150
125
100
75
50
25
0
0
10
20
30
40
DNI LIEČBY

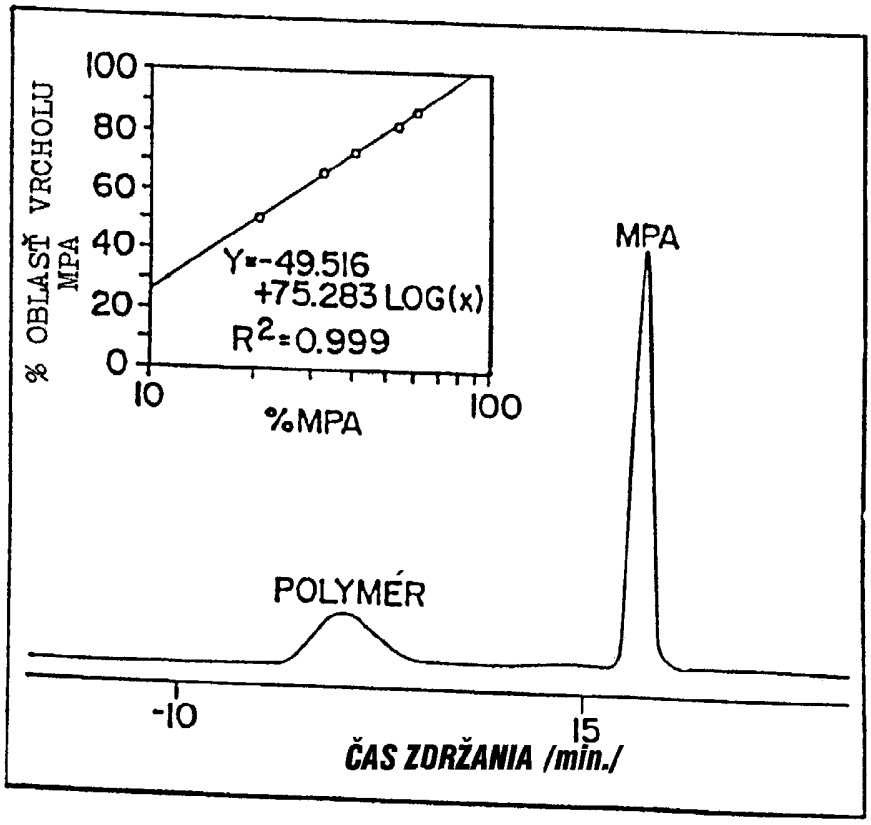
Obr. 2


LAKTID
SUŠENIE JE UKONČE-
NÉ, KEĎ SIGNÁL
$CH_2Cl_2$ VYMIZOL
GLYKOLID
PROTON
V C-4 MPA
1.709
14.913
13.355
5.393
8
7
6
5
4
3
2
1
0
PPM

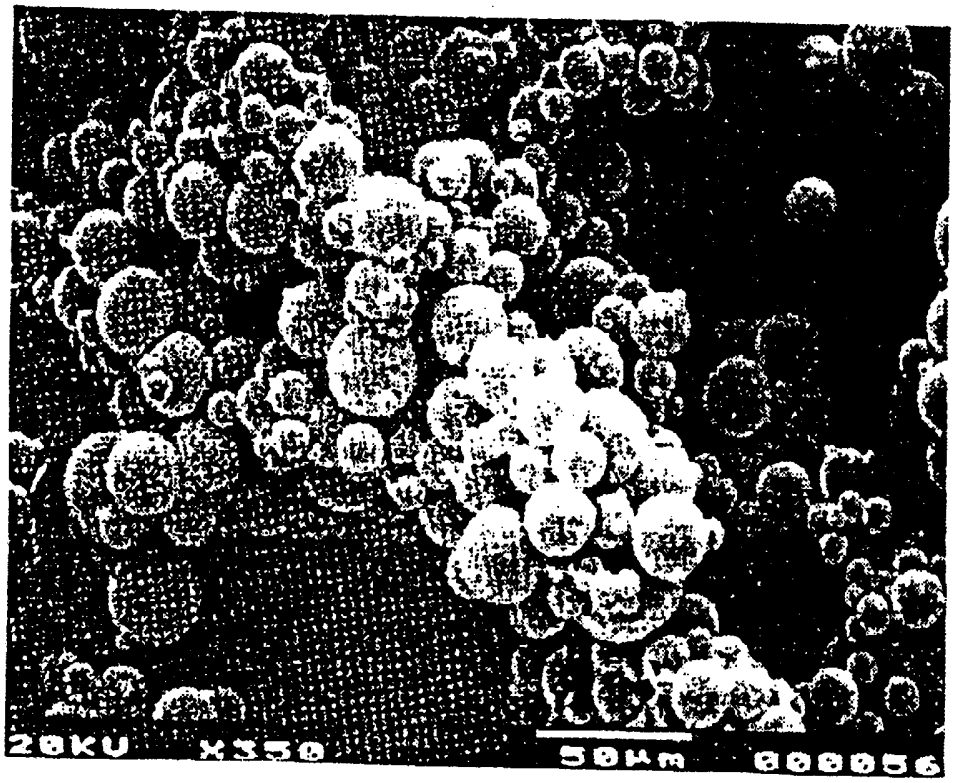
Obr. 3


60
50
40
30
20
10
0
% MPA
0
10
20
30
40
50
60
% OBLASŤ /δ =0,65/
% MPR=0,28391 + 0,98720*% OBLASŤ /δ=0,65/
R²=0.999

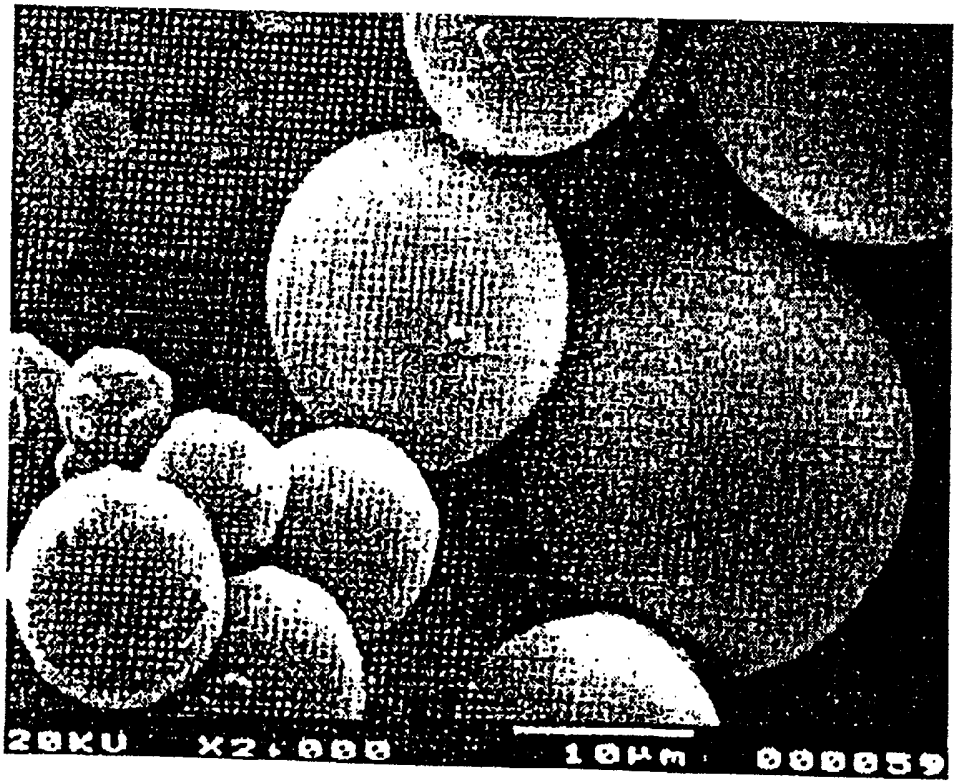
Obr. 4


% OBLASŤ VRCHOLU MPA
100
80
60
40
20
0
10
%MPA
100
Y=-49.516
+75.283 LOG(x)
R²=0.999
MPA
POLYMÉR
-10
15
ČAS ZDRŽANIA /min./

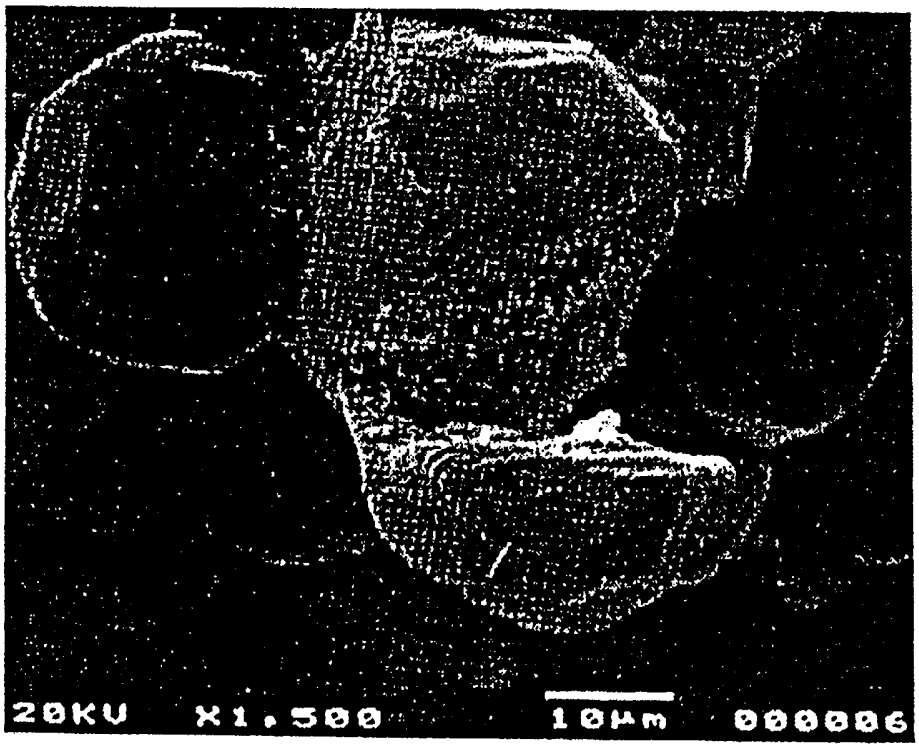
Obr. 5



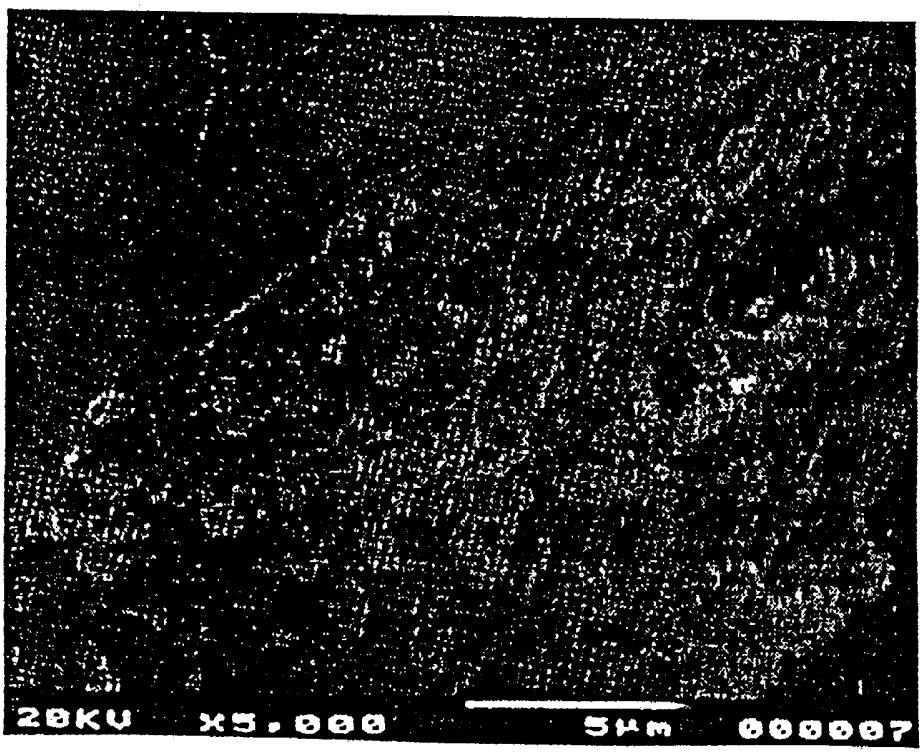

Obr. 6A



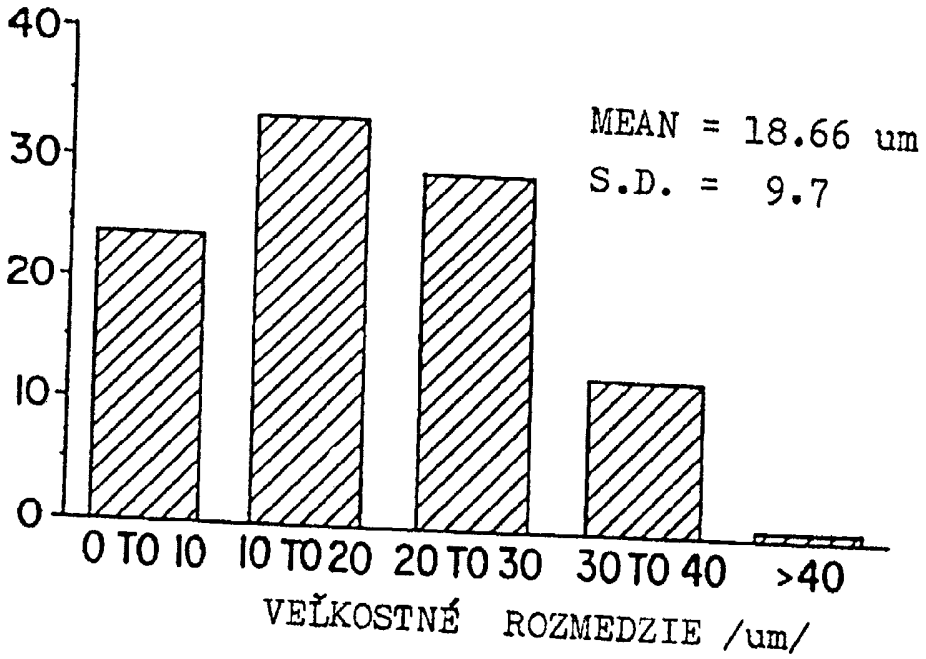

Obr. 6B



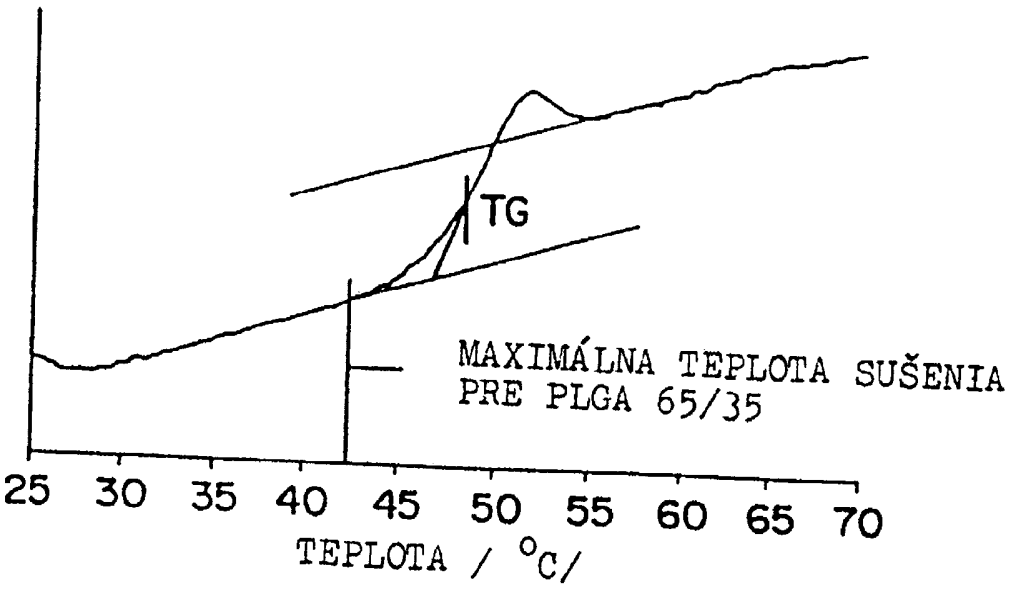

Obr. 7A



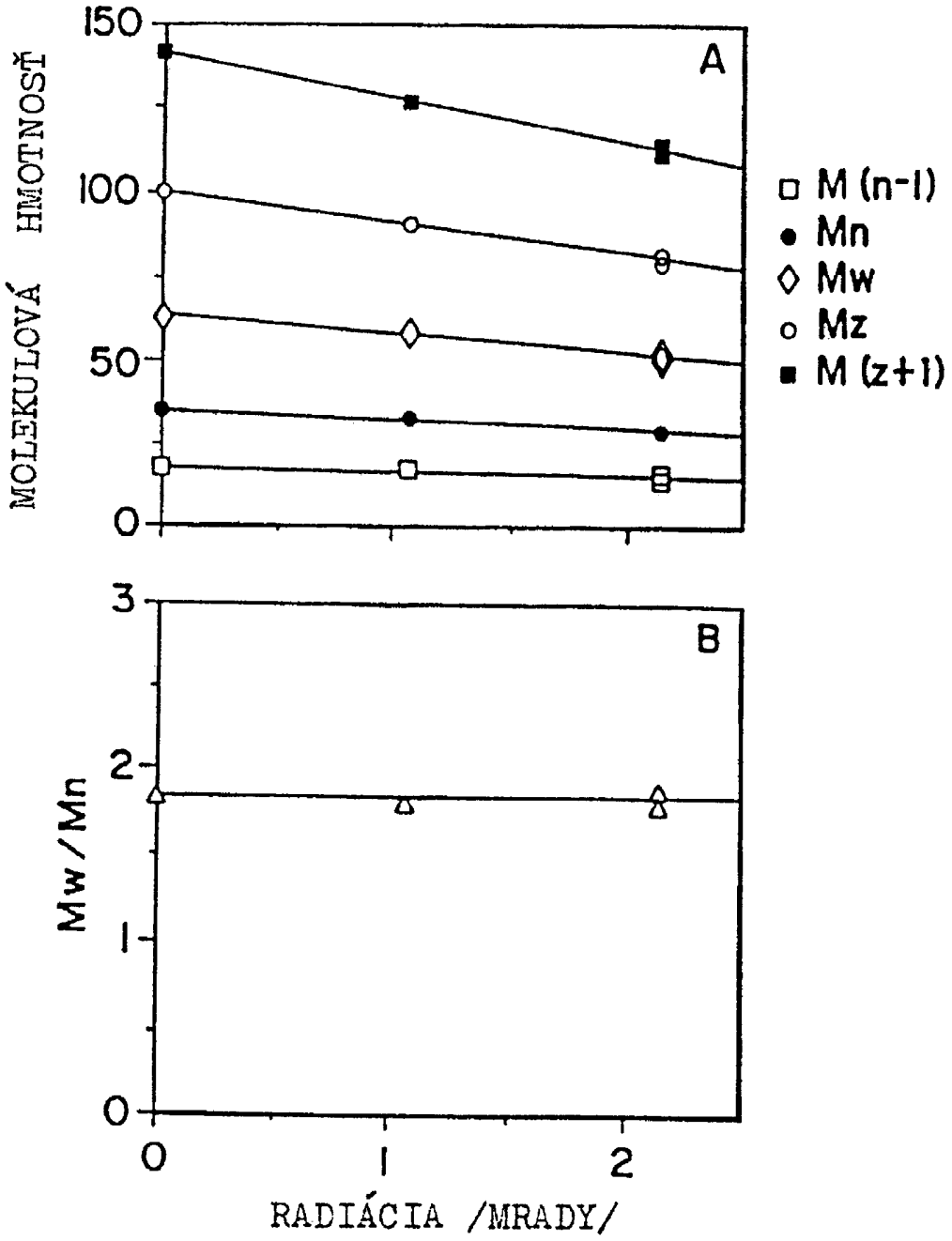

Obr. 7B


40
30
20
10
0
MEAN = 18.66 um
S.D. = 9.7
0 TO 10
10 TO 20
20 TO 30
30 TO 40
>40
VEĽKOSTNÉ ROZMEDZIE /um/

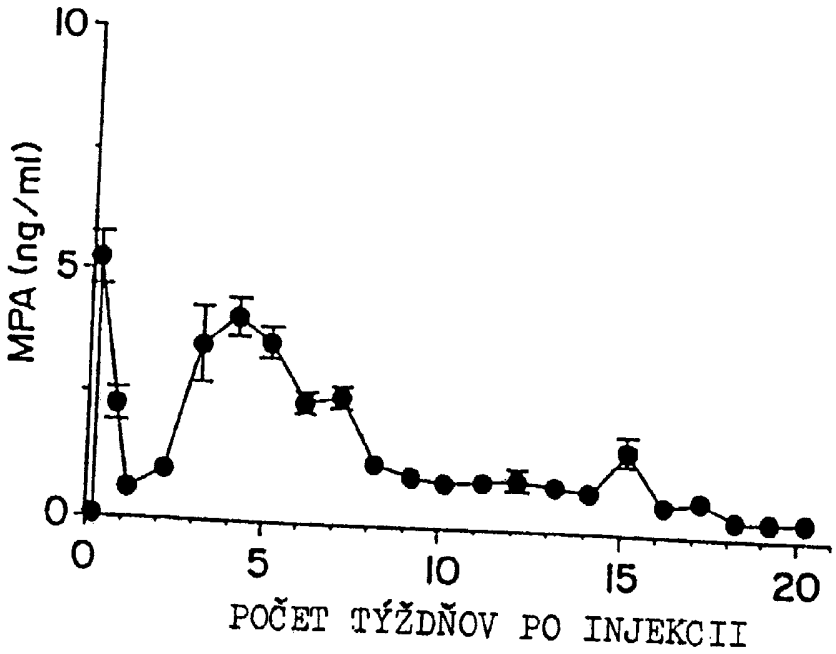
*Obr. 8*


TG
MAXIMÁLNA TEPLOTA SUŠENIA
PRE PLGA 65/35
25 30 35 40 45 50 55 60 65 70
TEPLOTA / °C/

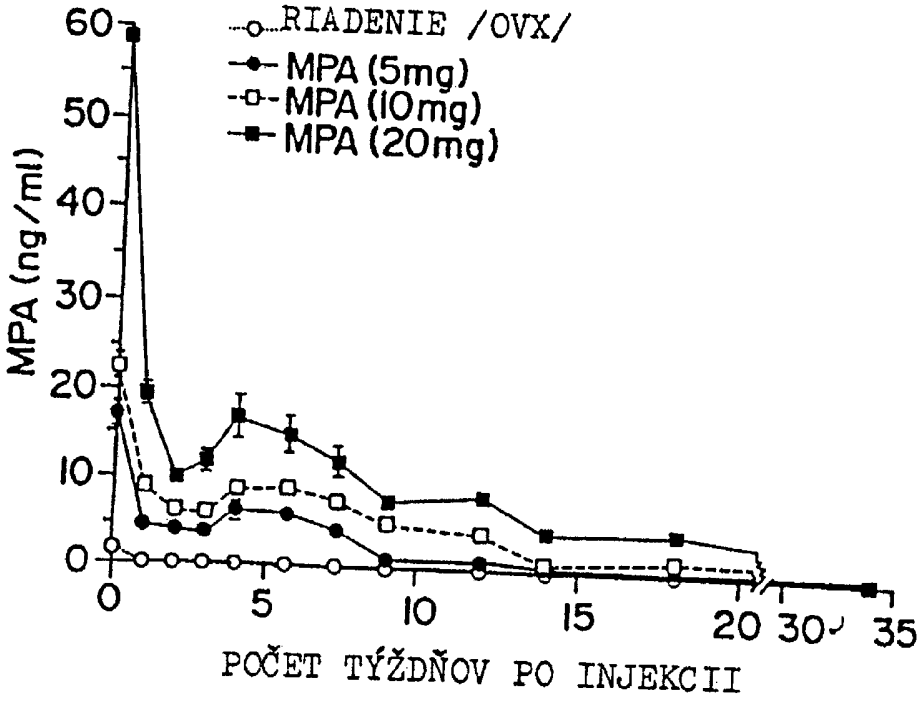
*Obr. 9*


150
100
50
0
A
MOLEKULOVÁ HMOTNOSŤ
M (n-1)
Mn
Mw
Mz
M (z+1)
3
2
1
0
B
Mw / Mn
0
1
2
RADIÁCIA /MRADY/

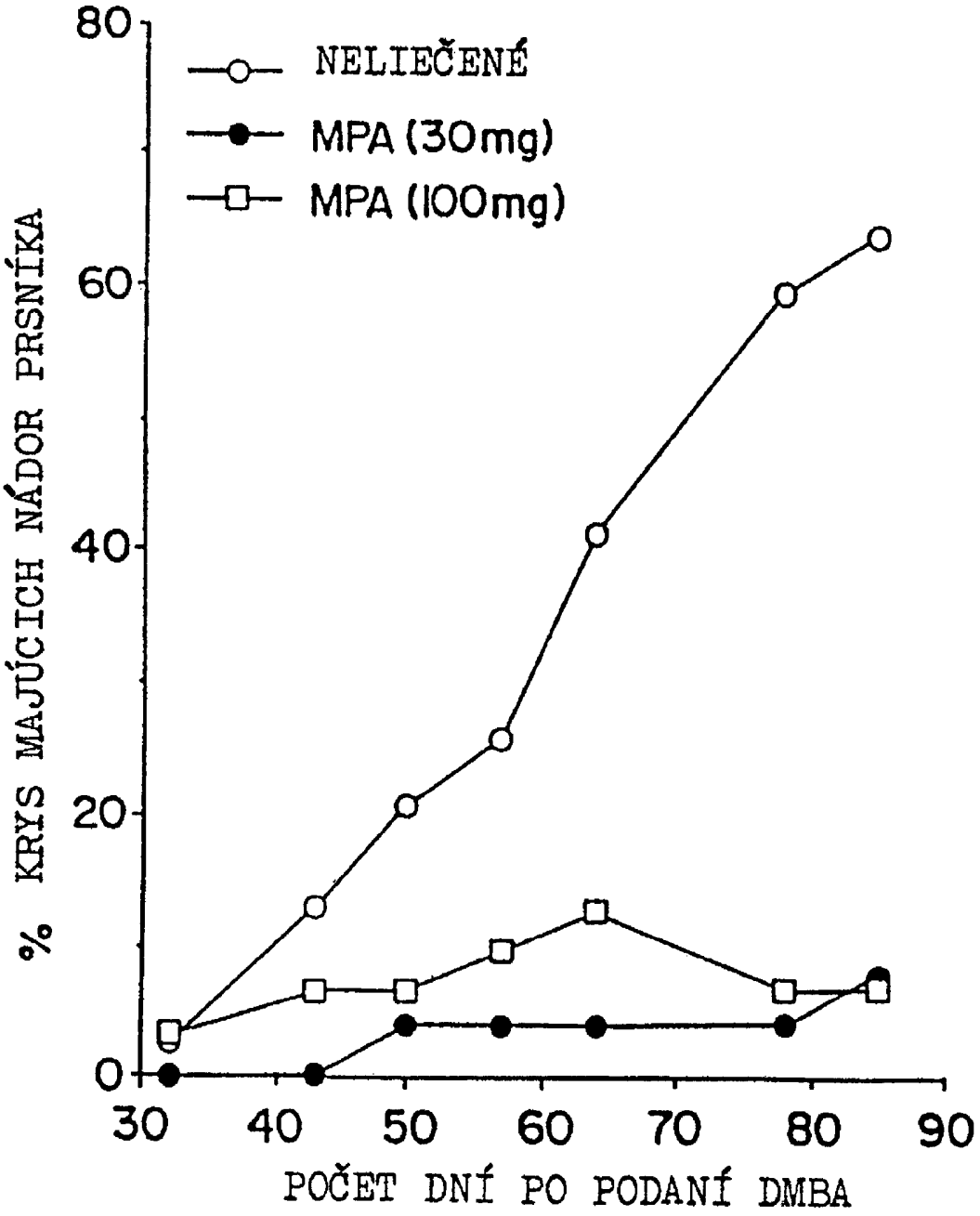
*Obr. 10*


10
5
0
MPA (ng/ml)
0
5
10
15
20
POČET TÝŽDŇOV PO INJEKCII

*Obr.* 11


RIADENIE /OVX/
MPA (5mg)
MPA (10mg)
MPA (20mg)
60
50
40
30
20
10
0
MPA (ng/ml)
0
5
10
15
20
30
35
POČET TÝŽDŇOV PO INJEKCII

*Obr.* 12




Obr. 13

Koniec dokumentu