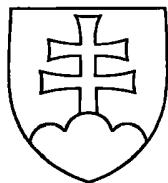


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU**

(21) Číslo dokumentu:

962-96

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶:

A 61K 38/00

(22) Dátum podania: 02.02.95

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 08/191 631

(32) Dátum priority: 04.02.94

(33) Krajina priority: US

(40) Dátum zverejnenia: 09.07.97

(86) Číslo PCT: PCT/US95/01479, 02.02.95

(71) Prihlasovateľ: THE MEDICAL COLLEGE OF HAMPTON ROADS, Norfolk, VA, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Hodgen Gary D., Norfolk, VA, US;
Williams Robert F., Norfolk, VA, US;
Grow Daniel, Long-meadow, MA, US;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Použitie kombinácie analógu hormónu uvoľňujúceho gonadotropín s antiprogestínom na prípravu liečiva**

(57) Anotácia:
Kombinácia analógu hormónu uvoľňujúceho gonadotropín s antiprogestínom sa používa na prípravu liečiva na zmiernenie symptómov stavov závislých od ovariálnych estrogénov.

Použitie kombinácie analógu hormónu uvoľňujúceho gonadotropín a antiprogestínom na prípravu liečiva

Oblasť techniky

Vynález sa týka spôsobu liečenia stavov závislých na ovariálnych estrogénoch.

Doterajší stav techniky

Endometrióza je ektopický výskyt žliaz a tkanív endometriálneho typu mimo maternicu, čo vedie často k tvorbe cýst obsahujúcich zmenu krvi. Pre milióny žien na celom svete tento stav ústi do ochromujúcej bolesti, ktorá nastáva hlavne v spojení s mesačnou proliferáciou endometriálneho tkaniva. Endometrióza je často celoživotný stav.

Endometrióza môže byť liečená rôznymi liečebnými postupmi, ale žiadny z nich nie je dostatočne účinný pre dlhodobé liečenie v trvaní šesť a viac mesiacov. Snáď najstarší liečebný postup s preukázateľným účinkom je podávanie progestínu buď injekčne, perorálne alebo v kombinácii s perorálnymi kontraktívami. Avšak dlhodobé podávanie progestínov, hlavne androgénnych, je spojené s nežiadúcimi vedľajšími účinkami v Spojených štátoch amerických nebolo povolené.

Syntetický steroid odvodený od etisteronu, 17 - α - pregna - 2, 4 - dien-20 - yno [2,3 - d] - izoxazol - 17 - ol, tiež známy pod názvom danazol a predávaný pod obchodnou značkou Danocrine, je účinným medikamentom na liečenie endometriózy, produkujúci hypoestrogénne prostredie. Bohužiaľ tento liek má tiež mnoho androgénnych vedľajších účinkov. Okrem väzomotorického sčervenania sprevádzajúceho nedostatok estrogénov, spôsobuje prírastok na váhe, kŕče dlhých svalov, atrofiu prsníkov, návaly tepla, striedanie nálad, olejovitú pokožku, depresiu, opuchy, akné, únavu, hirsutizmus, zmeny libida, bolesti hlavy, vyrážky a zhrubnutie hlasu.

Jedným z najúčinnějších postupov na liečenie endometriózy je podávanie agonistov hormónu uvoľňujúceho gonadotropíny, ktorý potláča sekréciu pituitárneho gonadotropínu a teda navodzuje stav reverzibilnej pseudomenopauzy. Avšak individuálna odozva kolíše, v priebehu troch mesiacov od začiatku liečby, endometrióza obvykle rýchle ustúpi. Po skončení liečby sa bolesť často vracia a niekoľko mesiacov po návrate normálnych menštruačných cyklov sa endometrióza znovu objaví. Liek môže byť tiež použitý pri liečbe maternicových fibroidných nádorov (leiomyómov). Hlavná nevýhoda tejto liečby je rad vedľajších účinkov prameniacych z protrahovaného vážneho hypoestrogenizmu alebo pseudomenopuzálneho stavu navodeného vážnym nedostatkom estrogénov a to návaly tepla, úbytok kostného tkaniva a strata kardiovaskulárnej ochrany poskytovanej estrogénmi. Cieľom hormonálnej substitučnej liečby je poskytnúť estrogén a/alebo progestín a tým predchádzať úbytku kostného tkaniva. Zatiaľčo individuálna odozva opäť kolíše, úbytok kostného tkaniva zvyčajne začína byť merateľný po troch mesiacoch liečby a u najviac citlivých pacientov sa stáva vysoko významný po šiestich mesiacoch liečby. Ak zvažíme možný prospech a riziko vedľajšieho účinku, ukazuje sa neprijateľnosť rizika vedľajšieho účinku vyplývajúci z faktu, že index úmrtnosti je 3,2 roka po tom, čo žena v menopauze zažije zlomeninu bedrového kĺbu dôsledkom osteoporózy. Kvôli tomuto vedľajšiemu účinku United States Food and Drug Administration (FDA) zakazuje akékoľvek podávanie analogu hormónu uvoľňujúceho gonadotropíny dlhšie než šesť mesiacov celkového podávania. Inými slovami, podľa klasifikačnej požiadavky FDA, liek nemôže byť znovu podávaný po období vysadenia.

Spoločným rysom leiomyómov a endometriózy je závislosť na ováriálnych estrogénoch. Liek, ktorý je účinný v liečbe endometrizy a maternicových leiomyómov je antiprogestín (niekedy nazývaný "antagonista progesteronu" alebo "anti-gestagén"). Vid' napr. Chwalisz a kol., *Endocrinology*, 129 (1):312,1991; Kettel a kol., *Fertil Steril*, 56 (3):402,1991; Murphy a kol., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 76 (2):513, 1993. Vid' tiež Gravanis a kol., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 60:156,1986 a Wolf a kol., *Fertil*

Steril, 502:1055, 1989.

Premenštruačný syndróm (PMS) a dysfunkčné maternicové krvácanie (DUB) sú tiež stavy, ktoré majú spoločné to, že závisia na estrogénnych hormónoch cyklicky produkovaných ováriami.

Skúmalo sa použitie kombinácie agonistu hormónu uvoľňujúceho gonadotropíny (leuprolid) a progestínu (medoxyprogesterón acetát) v liečbe maternicových leiomyómov. Pri sprievodnej liečbe progestin zvrátil pôsobenie hypoestrogenizmu. vyvolaného agonistom, na zníženie objemu nemyomového tkaniva, čo znamená, že liečenie progestínom zabránilo blahodárnym účinkom liečby agonistom. Keď sa použil striedavý režim, progestin znížil výskyt návalov tepla a straty vápniku v moči, ale súčasne zvýšil celkový objem maternice, i keď nie späť k východiskovým hodnotám. Vid' Case a kol., J. Clin. Endocrinol. Metab., 76:1217, 1993.

Zistilo sa, že liečebná schéma podávania analógu hormónu uvoľňujúceho gonadotropíny v spojení s antiprogestínom spôsobuje zmiernenie symptómov stavov závislých na ovariálnych estrogénoch ako je endometriózy, maternicové leiomyomy, PMS a DUB a navyac spomaľuje úbytok kostného tkaniva spôsobený nedostatkom estrogénov, ktorý je vyvolaný podaním analógu GnRH. Predmetom tohto vynálezu je poskytnúť takú liečebnú schému. Tento a ďalší cieľ vynálezu sa ozrejní osobám znalým danú problematiku z nasledujúceho podrobného popisu.

Podstata vynálezu

Tento vynález sa týka liečenia celého spektra stavov závislých na ovariálnych estrogénoch ako sú endometrióza, myomy (napr. maternicové leiomyomy), PMS a/alebo DUB. Týka sa hlavne spôsobu liečenia stavu závislého na ovariálnych estrogénoch podávaním analógu hormónu uvoľňujúceho gonadotropíny po dobu najmenej 30 dní, ktorá je postačujúca na zníženie hladiny sérového estragénu na 20 pg/ml alebo menej a potom podávanie

antiprogestínu v dávke pôsobiacej antiproliferačne na endometrium a zachovávajúci kostné tkanivo.

Žena trpiaca stavom závislým na ovariálnych estrogénoch ako je endometrióza, maternicové leiomyomy, PMS a/alebo DUB, je liečená v súlade s predkladaným vynálezom, oboma liekmi, t.j. analogom hormónu uvoľňujúceho gonadotropíny a antiprogestínom. Prekvapivo nie sú zmiernené len symptómy endometriózy, PMS, DUB alebo myomov, ale je zmiernený tiež úbytok kostného tkaniva spojený s nedostatkom estrogénu a v niektorých prípadoch je skutočne zastavený. Výsledkom je, že tolerancia k liečebnej schéme je zvýšená a dĺžka liečby môže byť predĺžená a je ukázaná prospešnosť podávania antiprogestínu ďalej než šesť mesiacov. Aj keď je bazálna hladina sérového estrogénu vyššia v priebehu podávania antiprogestínu než v priebehu liečby agonistom GnRH, nebol zaznamenaný žiadny zjavný relaps a súčasne je hustota kostného minerálu zachovaná alebo zvýšená. Má sa za to, že prahy estrogénneho účinku sú odlišné, takže po počiatočnom znížení estrogénu je okno vyššej koncentrácie, v ktorom redukovaná hladina sérového estrogénu navodí terapeutický účinok a zmierni obtiaže, pričom rovnaká koncentrácia nevyvolá rýchly úbytok kostného tkaniva, teda kostná masa je zachovaná alebo zvýšená.

Hormón uvoľňujúci gonadotropíny je malý polypeptid produkovaný v hypotalame a niekedy je nazývaný gonadotropický uvoľňujúci hormón, hormón uvoľňujúci luteinizačný hormón GnRH alebo LHRH. V predpokladanom vynáleze môže byť použitý akýkoľvek analóg, buď antagonistu alebo agonistu, tohto polypeptidu.

Príklady antagonistu hormónu uvoľňujúceho gonadotropíny môžu byť nájdené, okrem iného, v patentoch Spojených štátov amerických č. 4 409 208, 4 547 370, 4 565 804, 4 569 927 a 4 619 914, 5 198 533 a WO 89/01944, na významenky ktorých tu odkazujeme. Príklady takých antagonistov sú Antide (dekapeptid znázornený vzorcom D-Ac-D-2-Nal¹-DpClPhe²-D-3-Pal³-Ser⁴-NiLys⁵-D-NicLys⁶-Leu⁷-ILys⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰), [Ac/D₄ClDPhe¹, D₄ClDPhe², DTrp³, DArg⁶, DAla¹⁰] GnRH, [Ac/4ClDPhe², D₃Pal³, Arg⁵, D₄Nal⁶, DAla¹⁰] GnRH, [Ac-D₂-Nal¹, 4ClDPhe², DTrp³, DArg⁶, DAla¹⁰]GnRH, [Ac-D₂Nal¹, 4FDPhe², DTrp³, DArg⁶] GnRH, [Ac-D₂Nal¹, 4ClDPhe², Dtrp³,

DhArg(Et₂)⁶, DALa⁶] GnRH a [Ac-Nal¹, DME4ClPhe⁴, DPal³, Ser⁴, Tyr⁵, DArg⁶, Leu⁷, ILys⁸, Pro⁹, DALA¹⁰] GnRH.

Príklady antagonistu hormónu uvoľňujúceho gonadotropín sú leuprolid, nafarelin, buserelin, [DALa⁶, des-Gly-NH₂]GnRH, [DLys⁶]GnRH, [DALa⁶] GnRH, [2-Me-Ala⁶]GnRH, [D-α-aminobutyroyl⁶, des-GlyNH₂¹⁰]GnRH triporelin, lutrelin, goserelin, histrelin a pod.

Analógy hormónu uvoľňujúceho gonadotropíny použité v predpokladanom vynáleze môžu byť podávané vo forme farmaceuticky prijateľných netoxických solí alebo komplexov. Soli zahŕňajú kyslé soli, ako sú napr. hydrochlorid, hydrobromid, sulfát, fosfát, nitrát, oxalát, fumarát, glukonát, tanát, maleát, acetát, benzonát, sukcinát, alginát, malát, askorbát, tartarát a pod. Komplexy môžu byť s kovmi napr. zinok, baryum, kalcium, magnézium, aluminium a pod.

Z hľadiska použitia analógu hormónu uvoľňujúceho gonadotropíny je predpokladaný vynález podobný predchádzajúcemu použitiu takýchto analógov na liečbu endometriozy a/alebo maternicových leiomyomov. Tak nielenže môže byť použitý akýkoľvek známy analóg GnRH, ale v praxi predpokladaného vynálezu môže byť využité tiež až dosiaľ používané dávkovanie a spôsob podávania. Spôsob podávania môže byť akýkoľvek konvenčný spôsob, kde je analóg aktívny, napr. perorálne, intravenózne, subkutánne, intramuskulárne, sublingválne, perkutánne, rektálne, intranazálne alebo intravaginálne. Podobne forma podávania môže byť tableta, dražé, kapsula, pilulka, nosný aerosol, aerosol, pelet, implantát (alebo iná depotná forma) a pod.

Podané množstvo analógu hormónu uvoľňujúceho gonadotropíny je také, že stačí na zníženie sérového estrogénu na 20 pg/ml alebo menej na konci časového obdobia od 1 do 6 mesiacov a je podobné tomu, čo sa až dosiaľ používa. Všeobecne množstvo môže byť v rozmedzí od 0,05 do 50 mg, výhodne od 0,5 do 10 mg denne. Určenie účinnej dávky je rutinnou farmaceutickou úlohou a berie do úvahy rôzne fyzické parametre ako je váha, vek a pod. a najlepšie ich určí ošetrojúci lekár. Podávanie lieku môže byť periodické, to znamená na mesačnej báze, alebo kontinuálne, na den

nej báze. Denná aplikácia sa preferuje, pretože je pravdepodobnejšie, že pacienti sa riadia liečebnou schémou a nezabúdajú či neprehliadajú periodický rozpis dávkovania. Môže byť výhodné použitie depotného dávkovania, napr. užitie leuprolidu acetátu komerčne dostupného pod obchodnou značkou Lupron Depot.

Antiprogestin vhodný pre kombinovanie s agonistom alebo antagonistom GnRH môže byť antagonist progesteronového receptora alebo farmaceuticky vhodná látka, ktorá pôsobí proti normálnej biologickej funkcii progesteronu. Preferovaný antiprogestin je antagonist progesteronového receptora, buď steroidný alebo nesteroidný, ktorý prejavuje určitú schopnosť znížiť estrogénnu sekréciu, ale čo je dôležitejšie, blokuje estrogénnu stimuláciu tropných tkanív ako je endometrióza, ektopická alebo maternicová, alebo tkanivoleiomomov. Napr. zvlášť vhodný pre uskutočňovanie tohto vynálezu je RU 486.

Príklady antiprogestínov, ktoré môžu byť využité v tomto vynáleze sú RU 486 ("mifepriston", Roussel Uclaf, Paris; U.S. patent 4 386 085); a "onapriston" (Schering AG, Berlin; U.S. patent 4 780 461) a steroidy popísané v nasledujúcich patentoch a patentových žiadostiach: U.S. Patent 4 609 651, obzvlášť zlúčenina lilo-priston (11β - (4-dimetylaminofenyl) - 17β - hydroxy - 17α - (3-hydroxy-prop-1-(Z)-enyl-4,9(10) estradien-3-on); U.S. žiadosť por.č.06/827 050, hlavne zlúčeniny 11β - (4-acetylphenyl) - 17β - hydroxy - 17α - (1-propionyl) - 4,9-estradien-3-on a 11β - (4-acetylphenyl) - 17β - hydroxy - 17α - (3-hydroxy-1(2)-propenyl) - 4,9-estradien-3-on; U.S. žiadosť por.č. 07/283 632: publikovaná Európska patentová žiadosť EP-A 04042831; publikovaná PCT žiadosť WO 91/14704; a ďalšie antiprogestíny, napr. U.S. Patent 4 891 368.

Antiprogestin môže byť podávaný akýmkoľvek spôsobom a prostriedkami uznávanými farmaceutickou vedou. Napríklad, vhodný antiprogestín môže byť navrhnutý tak, že môže byť podávaný perorálne, subkutánne, intramuskulárne, bukálne, kožnou náplastou na transdermálnu absorbciu, obsiahnutý v inertnom nosiči, ktorý

je implantovaný v tele a v depotnom stave alebo intravaginálne v nosiči, ktorý pomaly uvoľňuje antiprogestin (implantát v zmysle patentov: U.S. Patent 4 957 119 a 5 088 505 a pod.).

Farmaceutické zloženie látky obsahujúcej antiprogestin a vhodný nosič, môžu byť pevné liekové (dávkovacie) formy, ktoré zahŕňajú tablety, kapsule, obľátky, pelety, pilulky, prášok alebo granule; miestne liekové formy, ktoré zahŕňajú roztoky, púdre, tekuté emulzie, tekuté suspenzie, polopevné látky, mazanie, pasty, krémy, gély alebo želé a peny; a parenterálne liekové formy, ktoré zahŕňajú roztoky, suspenzie, emulzie alebo suchý prášok obsahujúci účinné množstvo antiprogestínu ako je uvedené v tomto vynáleze. V odbore je známe, že aktívna zložka, antiprogestín, môže byť obsiahnutá v takých zmesiach látok, navyše farmaceuticky prijateľným riedidlám, plnidlám, dezintegrátorom, spojivám, lubrikantom, surfatantom, hydrofóbnym nosičom, vo vode rozpustným nosičom, emulgátorom, tlmivým roztokom, zvlhčovačom, rosičom, rozpúšťadlám, konzervačným prostriedkom a ďalším prostriedkom zvyšujúcim liečivú pđstatu. Prostriedky a metódy podávania sú v odbore známe a odborník si môže vyhládať ďalšie údaje vo farmakologickej literatúre, napr. "Modern Pharmaceutics", Banker and Rhodes, Marcel Dekker, Inc. 1979: "Goodman and Gilman s The Pharmaceutical Basis of Therapeutics", 6 vydanie, MacMillan Publishing Co., New York 1980.

V niektorých situáciách sa podávanie analógu hormónu uvoľňujúceho gonadotropíny a antiprogestin môže prekrývať. V tomto prípade môžu byť obe zložky podávané súčasne s použitím rovnakých alebo rôznych liekových foriem alebo prostriedkov, napr. v jednej tablete. Aplikácia zložiek, prostriedkov a metód tohto vynálezu pre lekárske a/alebo farmaceutické použitie, popísaná v tomto texte, môže byť doplnená akýmkoľvek klinickými, liečebnými alebo farmaceutickými metódami či technikami tak, ako sú v súčasnosti alebo výhľadovo známe odborníkom.

Analóg hormónu uvoľňujúceho gonadotropíny je podávaný po časovom období najmenej 30 dní, ktoré je dostatočné k zníženiu

hladiny sérového estrogénu v krvi na 20 pg/ml alebo menej a výhodne k zníženiu hladiny sérového estrogénu na 10pg/ml alebo menej a tým simuluje postmenopauzálnu hladinu estrogénov. V súčasnej dobe podávanie analógu trvá najviac 6 mesiacov, hoci by ho bolo možno predĺžiť, ak sa včas začalo podávanie antiprogestínu v množstve zachovávajúcom kostné tkanivo. V súčasnosti sa dáva prednosť podávaniu agonistu GnRH v trvaní troch mesiacov.

Antiprogestín sa začne podávať, keď hladina sérového estrogénu poklesla na 20pg/ml alebo menej, výhodne na 10 pg/ml alebo menej. Obdobie podávania antiprogestínu môže prekrývať obdobie podávania analógu hormónu uvoľňujúceho gonadotropíny alebo môže začať pri ukončení podávania analógu GnRH alebo medzi aplikačnými intervalmi môže byť medzera, pokiaľ sa nezvýši hladina sérového estrogénu nad 20 pg/ml. Množstvo antiprogestínu je také, že inhibuje estrogénnu endometriálnu proliferáciu, t.j. antiproliferačne účinné množstvo a súčasne je množstvom zachovávajúcim kostné tkanivo. V tejto súvislosti výraz "zachovávajúci kostné tkanivo" znamená, že kostná masa (hustota kostného minerálu) je buď nezmenená alebo zvýšená. V prípade antiprogestínu RU 486, podávané množstvo je obyčajne 0,05 až 10,0 mg/kg a výhodne 0,5 až 5,0 mg/kg denne. V prípade odlišných antiprogestínov však môžu byť vhodné iné miligramové dávky. Liečebné schémy, v ktorých dávkovanie antiprogestínu (a analógu GnRH) periodicky kolíše, sú tiež zahrnuté v predkladanom vynáleze. Pri podávaní antiproliferačne účinného množstva antiprogestínu môže nastať slabšie periodické krvácanie alebo špinenie v mesačných či ročných intervaloch. Inými slovami stav amenorey (neprítomnosť menštruačného krvácania) navodený podľa tohto vynálezu je až na výnimky úplný. Použité množstvo antiprogestínu môže byť rovnako ako množstvo analógu hormónu uvoľňujúceho gonadotropíny, stanovené použitím v odbore uznávaných metód ako napríklad stanovením kriviek dávka-odpoveď vo vhodných modeloch primátov majúcich vlastný ovariálny menštruačný cyklus podobný tomu ženskému a extrapolácií na človeka, extrapolácií z vhodných systémov in vitro alebo testovaním účinnosti v klinických pokusoch. Pre stanovenie vhodné

dávky vezme ošetrojúci lekár do úvahy hmotnosť, vek a ďalšie fyzické a lekárske parametre.

Nižšie uvedené špecifické príklady ďalej osvetľujúce predkladaný vynález. Tieto príklady sú len ilustratívne a v žiadnom prípade nie sú jedinými aplikáciami tohto vynálezu.

Prehľad obrázkov

Obrázok 1 je graf priemerných denných hodnôt sérového estradiolu.

Obrázok 2 je graf peritoneálnej endometriózy zahŕňajúci rôzne liečebné schémy.

Obrázok 3 je graf hustoty kostného minerálu ako výsledok rôznych liečebných schém.

Stĺpce ukazujúce priemerný denný estradiol na obrázku 1 predstavujú zľava do prava, Lupron, RU 486 a kontrolnú skupinu. V dátach týkajúcich sa peritoneálnej endometriózy na obrázku 2, stĺpce 1, 5, 7 a 10 sú endometriálne poruchy pred liečbou, stĺpce 2 a 8 ukazujú poruchy po podávaní Lupronu, stĺpec 6 poruchy po podávaní RU 486 a stĺpec 11 je kontrolná skupina. Stĺpce na obrázku 3, zľava do prava, predstavujú stav pred liečbou, stav po liečbe analógom a stavom po liečbe antagonistom.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Pre účely tejto štúdie bol ako agonista hormónu uvoľňujúceho gonadotropíny vybraný leuproliď acetát a ako antiprogesterín RU 486, ktoré boli podávané samiciam cynomolgových opíc, ktoré sú

považované za vysoko žiadaný model pre ľudský výskum. Tridsaťšesť dospelých samíc opíc rodu makak (*Macaca fascicularis*), ktoré mali pravidelné menštruačné cykly, boli umiestnené do samostatných kliebok, kde mali potravu a vodu dostupnú podľa ľubovôle.

Pri použití anestézy (ketamín 20 mg/kg i.m., xylazín 1 mg/kg) sa na tretí deň menštruačného cyklu robila diagnostická laparoscopia na vylúčenie panvových adhézií alebo už existujúce endometriózy. Opice s pozorovateľnými panvovými adhéziami boli vylúčené zo štúdie. Krv bola odoberaná zo žily behom 8 až 14 dňa menštruačného cyklu (ketamín 10 mg/kg i.m.) a sérum vyšetrené pomocou RIA na estradiol-17 β . 3 až 5 dní jasne definovanom preovulačnom vrchole estradiolu bola urobená laparotómia (ketamín 20 mg/kg, xylazín 1 mg/kg). Urobila sa hysterotómia fondu maternice v rozsahu 2 cm a kyretážou sa odstránilo približne 100 mg endometriálneho tkaniva, ktoré bolo rozkrájané v sterilnom fyziologickom roztoku (0,9%). Maternicový rez sa zošil vycrylovým vláknom 4-0. Kúsky endometriálneho tkaniva sa subperitoneálne injikovali na päť miest, do ľavého a pravého záhybu vezikouterinného väzu, do pravého a ľavého širokého väzu maternicového a do Douglasovho priestoru.

Počas nasledujúceho menštruačného cyklu sa laparotomia urobila na 3 až 5 deň po estradiolovom vrchole uprostred cyklu. Pozoroval sa výskyt ektopického endometriálneho tkaniva a rozsah adhézií za súčasného starostlivého merania peritoneálnych implantátov. Všetky poruchy sa fotografovali a boli náhodne očíslované kvôli neskoršiemu histologickému určovaniu štádií endometriózy nezaujatým pozorovateľom. Z reprezentatívnych porúch sa odoberali biopsie a tkanivá boli fixované v 10% formalíne pre histologické vyšetrenia po farbení hematoxylinom-eosinom.

Primáti boli rovnomerne rozdelení do štyroch liečených skupín (n=8). Skupine 1 sa mesačne podávali injekcie agonistov hormón uvoľňujúceho gonadotropíny v dávke 80 μ g/kg i.m. 21. deň menštruačného cyklu v druhom laparotomickom cykle. Pokračovalo sa v 28-denných intervaloch do celkového počtu 3 injekcií a v tejto dobe sa začalo s týždennými injekciami antiprogestínu RU

486 (spočiatku 5 mg/kg i.m. v oleji, potom 2 mg/kg/týždeň). Aplikácia RU 486 pokračovala po období 24 týždňov.

Skupine 2 sa týždenne podávali intramuskulárne injekcie samotného RU 486 (spočiatku 5 mg/kg, potom 2 mg/kg/týždeň) od 1. dňa menštruačného cyklu, ktorý nastal potom, čo bola potvrdená endometrióza. Pokračovalo sa po liečebné obdobie 36 týždňov. Skupine 3 sa po dobu 36 týždňov podávali dávky samotného analógu GnRH. Skupina 4 bola kontrolná a dostávala týždenne po dobu 36 týždňov samotný nosič, 0,5 ml normálneho fyziologického roztoku i.m.

Potom, čo začali denné injekcie, sa každých 12 týždňov robila laparotomia na určovanie štádií endometriózy až do konca liečby na posúdenie progresu alebo regresu choroby.

Pri použití anestézy ketaminom sa každý druhý deň všetkým skupinám odoberala krv po 28 dni od počiatku liečenia, potom čo sa potvrdila aktívna endometrióza. Sérum bolo zamrazené pre neskoršiu analýzu. Ďalej sa krv odoberala v týždenných intervaloch. Krvné odbery pokračovali buď do znovuobjavenia spontánnej menštruácie alebo po dobu dvoch mesiacoch od ukončenia injekcií. Sérum bolo zmrazené, označené a uschované pre následne vyšetrenie pomocou rádioimunoanalýzy. Estradiol a progesteron boli vyšetrené pomocou RIA (ICN Biomedical, Los Angeles, CA).

Počas každej operácie sa odoberal tiež vaginálny epitel pomocou Kevorkianových bioptických kliešťov z laterálnej steny vagíny v jej horných dvoch tretinách.

Opice boli denne vyšetrované pri ranných vizitách. Zaznamenávali sa zmeny správania. Koža sa vyšetrovala na známky vyrážky alebo zápalové zmeny v mieste vpichu injekcie. Hrádza sa vyšetrovala na známky menštruácie. Telesná hmotnosť sa určovala mesačne a zaznamenávali sa chute do jedla.

Počas krvných odberov sa zbieral moč. Prvá vzorka sa odoberala v dobe prvej laparotomie a druhá vzorka sa odoberala v dobe prvej injekcie s ďalšími vzorkami odoberanými každé štyri týždne od doby odberu druhej vzorky moču. Na meranie hustoty kostného minerálu v oblasti bedrovej chrbtice sa používala dvojitá rontgenová absorpčná fotometria (DXA, Norland). Primáti

boli anestetizovaní ketamínom a pridržiavaní, aby sa zmenšili artefakty vzniknuté pohybom. Fotometria (DXA) sa robila pred začiatkom injekcií a ďalej potom v trojmesačných intervaloch až do dokončenia štúdie.

V dobe každej laparotomie sa opakovane robila malá hysterotómia s účelom odberu vzoriek endometrie pre histologické vyšetrenie.

Zistilo sa, že obe liečby samotným antiprogestínom či analógom GnRH viedli k potlačeniu ovulácie. V každej z liečených skupín 1 až 3 došlo len k jednej ovulácii behom 24 mesiacov (progesteron >3 ng/ml), zatiaľčo v kontrolnej skupine 4 (len nosič) nastalo 18 ovulácií behom 24 mesiacov. Priemerné sérové hladiny estradiolu medzi skupinami kolísali, ako ukazuje obr. 1. Hladina estradiolu v skupine liečenej analógom GnRH bola jednotne znížená ($24,2 \pm 17$ pg/ml), zatiaľ čo v kontrolnej skupine hladiny estrogénu kolísali v značne širokom rozsahu ($40,6 \pm 43$ pg/ml), čo sa čakalo. Zaujímavé je, že skupina liečená RU 486 mala vyššiu priemernú hladinu sérového estrogénu než akákoľvek ďalšia skupina ($57,8 \pm 34,6$, Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

Plocha ektopického endometria kontrolovaná zrakom na peritoneu je ukázaná na obr. 2. Pred liečbou mali plochy vo všetkých skupinách podobnú veľkosť (ANOVA, $p > 0,1$). Plocha po liečbe bola významne odlišná od plôch pred liečbou pre skupiny 1, 2 a 3 a od plôch po liečbu v kontrolnej skupine 4 (Wilcoxon, $p < 0,05$). Toto pozorovanie ukazuje, že analog GnRH a antiprogestín, mali nerovnaký účinok na veľkosť endometriálnych implantátov. V skupine 1, kde boli primáti po ukončení liečby analógom GnRH, presunutí na trojmesačnú liečbu RU 486, zostávala priemerná veľkosť peritoneálnej poruchy nezmenená.

Hodnoty hustoty kostného minerálu z dvojitej rontgenovej absorpčnej fotometrie boli:

SKUPINA	Pred liečbou	Po 3 mesiacoch	Po 6 mesiacoch
Analog/ Antiprogestin	0,48 0,46	0,481 0,056	0,049 0,046
Antiprogestin	0,501 0,029	0,541 0,033	neanalyzované
Kontrola	0,441 0,028	0,446 0,047	neanalyzované

x párový t-test, $p=0,08$ v porovnaní s hustotou pred liečením

Po troch mesiacoch liečby len samotným GnRH alebo v kontrolnej skupine nebola nájdená žiadna zmena hustoty kostného minerálu. To sa dalo očakávať, pretože preukázateľný úbytok kostného tkaniva v populácii nastáva až po 3 až 6 mesiacoch. trom zvieratám v skupine 1 sa znížila hustota kostného minerálu po trojmesačnej liečbe analógom GnRH, zatiaľčo u ostatných zostala hustota nezmenená alebo sa zvýšila. Príklad rýchleho úbytku kostného tkaniva u opice číslo 2190 a príslušné dáta sú uvedené na obr. 3. Po troch mesiacoch liečby analógom GnRH došlo k významnému úbytku kostného tkaniva. Liečba antiprogetínom pôsobila proti tomuto úbytku a po 3 mesiacoch liečby antiprogestínom došlo k zvýšeniu hustoty kostného minerálu, ktoré bolo na hranici statickej významnosti (párový t-test, $p=0,08$).

Denné hodnotenie zdravotného stavu neodhalilo podstatné zmeny správania, zápalové kožné zmeny či zmeny stravovacích návykov. Telesná váha kontrolovaná v mesačných intervaloch sa významne nemenila v žiadnej skupine.

Ektopické endometriálne poruchy, ako endometrium in situ, prekonávali postupnú regresiu behom troch mesiacov liečby, pričom zmeny endometrie nastávali rýchlejšie behom liečby anaalógom hormónu uvoľňujúceho gonadotropíny než pri liečbe samotným antiprogestínom. Vyššie uvedené výsledky ukazujú, že antiprogestin bol schopný uchovať veľkosť peritoneálnej endometriózy i po prerušení liečby analógom. Pri kontrolovaných primátov sa endometrióza spontánne nezlepšovala a dokonca sa endometriálne poruchy za tri mesiace zhoršili.

Traja z primátov použitých v štúdiu boli identifikovaní ako tí, čo rýchlo strácajú kostné minerály po liečebne navodenom hypoestrogenizme pri liečbe analógom GnRH. Bolo dokázané, že sa hustota kostného minerálu vrátila na východiskové hodnoty po troch mesiacoch podávania antiprogestínu. U primátov liečených antiprogestínom došlo k vzostupu, i keď len na hranici štatistickej významnosti, hustoty kostného minerálu v porovnaní s východiskovým stavom. Vaginálne atrofie, zvyčajný problém pri liečbe analógmi hormónu uvoľňujúceho gonadotropíny, nebola zaznamenaná. Hrúbka vaginálneho epitelu a keratínové vrstvy boli silnejšie v skupine liečenej antiprogestínom, čo je stav, ktorý je obyčajne spájaný s ľahším pohlavným stykom, zmenšením močovej inkontinencie a znížením dysurie. Okrem výhod pre kostné tkanivo a vaginálny epitel, endometrium zostalo stredne tenké v porovnaní s endometriom cyklicky neliečených opíc, čo je pripisované antiproliferanému pôsobeniu antiprogestínu.

Príklady 2 až 10

Liečebná schéma popísaná v príklade 1 sa opakuje s nasledujúcimi kombináciami chemických prostriedkov:

Príklad	Analóg	Antiprogestín
2	nafarelin	onapriston
3	buserelín	lilopriston
4	antid	11 β - (4-acetylfenyl) - 17 β - hydroxy - 17 α - (1-propionyl) - 4,9-estradien-3-on
5	goserelin	11 β - (4-acetylfenyl) - 17 β - hydroxy - 17 α - (3-hydroxy-1-propenyl) - 4,9-estradien-3-on
6	histrelin	nifepriston
7	lutrelin	onapriston
8	tristorelin	lilopriston
9	Nal-Glu	nifepriston
10	Azalin B	nifepriston

Prítomný vynález je možno modifikovať pri zachovaní základnej myšlienky a predmetu tohto vynálezu. Rôzne stelesnenia vynálezu tu popísané a ilustrované sú len príklady a v žiadnom prípade nie sú jediným stelesnením vynálezu.

Priemyselná využiteľnosť

Liečebná schéma navrhnutá vo vynáleze spočívajúca v podávaní analógu hormónu uvoľňujúceho gonadotropíny v spojení s antiprogestínom spôsobuje zmiernenie symptómov stavov závislých na ovariálnych estrogénoch, ako je endometrióza, maternicové leiomyomy, PMS a DUB a navyše znižuje úbytok kostného tkaniva spôsobený nedostatkom estrogénov vyvolaným podaním analógu GnRH.

P A T E N T O V E N Á R O K Y

Použitie kombinácie analógu hormónu uvoľňujúceho gonadotropín s antiprogestínom na prípravu liečiva na zmiernenie symptómov stavov závislých na ovariálnych estrogénoch, ako endometriózy, maternicovej leiomyómy, premenštruačného syndrómu, dysfunkčného maternicového krvácania a zníženia úbytku kostného tkaniva.