

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **203439**

(21) Numer zgłoszenia: **380788**

(13) **B1**

(22) Data zgłoszenia: **10.06.1999**

(51) Int.Cl.

(62) Numer zgłoszenia, z którego nastąpiło wydzielenie:
345887

A61K 31/5685 (2006.01)

A61K 31/404 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

(86) Data i numer zgłoszenia międzynarodowego:

10.06.1999, PCT/CA99/00538

(87) Data i numer publikacji zgłoszenia międzynarodowego:

16.12.1999, WO99/63974

PCT Gazette nr 50/99

(54) **Kompozycja farmaceutyczna zawierająca dehydroepiandrosteron,
pochodną indolu i farmaceutycznie dopuszczalną zaróbkę,
zestaw i zastosowanie dehydroepiandrosteronu**

(30) Pierwszeństwo:

11.06.1998,US,09/096,284

(73) Uprawniony z patentu:

ENDORECHERCHE INC.,Ste-Foy,CA

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

14.01.2002 BUP 02/02

(72) Twórca(y) wynalazku:

Fernand Labrie,Ste-Foy,CA

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

30.10.2009 WUP 10/09

(74) Pełnomocnik:

**Wojasińska Ewa, Rzecznik Patentowy,
POLSERVICE, Kancelaria Rzeczników
Patentowych Sp. z o. o.**

PL 203439 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna zawierająca dehydroepiandrosteron, pochodną indolu i farmaceutycznie dopuszczalną zaróbkę, zestaw i zastosowanie dehydroepiandrosteronu.

Człowiek ma cechę unikalną, wraz z pewnymi innymi naczelnymi, posiadania nadnerczy, które wydzielają wielkie ilości prekursorowych sterydów, siarczanu dehydroepiandrosteronu (DHEA-S) i dehydroepiandrosteronu (DHEA), które przekształcają się w androstenodion (4-dion), a następnie w czynne androgeny i/lub estrogeny w tkankach obwodowych (Labrie i in., w: *Important Advances In Oncology*. Red. V. T. de Vita, S. Hellman, S. A. Rosenberg. J. B. Uppincott, Philadelphia, 193-217, 1985; Labrie, *Mol. Cell. Endocrinol.* 78: C113-C118, 1991; Labrie, i in., w *Signal Transduction in Testicular Cells*. Ernst Schering Research Foundation Workshbp. Red. V. Hansson, F. O. Levy, K. Tasken. Springer-Verlag, Berlin-New York (Supl. 2), str. 185-218, 1996; Labrie i in., *Steroids*, 62: 148-158, 1997). W ostatnich badaniach (Labrie, i in., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82: 2403-2409, 1997), opisaliśmy ostry spadek krążących ilości dehydroepiandrosteronu (DHEA), siarczanu DHEA (DHEA-S), androst-5-eno-3 β ,17 β -diolu (5-diolu), 5-diol-S, estrów kwasów tłuszczowych 5-diolu i androstenodionu u mężczyzn i kobiet w wieku pomiędzy 20 i 80 lat.

Pomimo znaczącego spadku ilości endogennych androgenów u kobiet podczas starzenia, zastosowanie androgenów u kobiet po menopauzie ograniczono głównie z powodu obawy o zwiększone ryzyko choroby sercowo-naczyniowej, w oparciu o dawniejsze badania pokazujące niekorzystny profil lipidów przy androgenach. Ostatnie badania nie wykazały jednak znaczącego wpływu kombinowanej terapii estrogenowej i androgenowej na poziomy w osoczu cholesterolu, triglicerydów, HDL, LDL i stosunek HDL/LDL w porównaniu z samym estrogenem (Sherwin i in., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 156: 414-419, 1987). Zgodnie z tymi obserwacjami pokazaliśmy, że DHEA, związek mający głównie androgeny wpływ, nie wykazuje wyraźnie szkodliwego wpływu na profil lipidów w osoczu (Diamond i in., *J. Endocrinol.*, 150: S43-S50, 1996). Podobnie, nie stwierdzono zmian w stężeniach cholesterolu, jego podfrakcji lub triglicerydów, w czasie terapii samym estradiolem po 6 miesiącach terapii implantami estradiol + testosteron (Burger i in., *Br. Med. J. Clin. Res. Ed.*, 294: 936-937, 1987). Należy wspomnieć, że badanie u mężczyzn wykazało odwrotną korelację pomiędzy DHEA-5 w osoczu i lipoproteinami o niskiej gęstości (Parker i in., *Science*, 208: 512-514, 1980). Niedawno znaleziono korelację pomiędzy niskim poziomem w osoczu testosteronu i DHEA a zwiększonym otłuszczeniem trzewi, parametrem wyższego zagrożenia sercowo-naczyniowego (Tchernof i in., *Metabolism*, 44: 513-519, 1995).

5-diol jest związkiem biosyntetyzowanym z DHEA pod działaniem redukcyjnej dehydrogenazy 17 β -hydroksysterydowej (17 β -HSD) i jest słabym estrogenem. Wykazuje 85-krotnie niższe powinowactwo niż 17 β -estradiol (E2) do receptora estrogenu w cytosolu przedniego płata przysadki szczura (Simard i Labrie, *J. Steroid Biochem.*, 26: 539-546, 1987), potwierdzając dodatkowo dane otrzymane dla tego samego parametru w ludzkiej tkance raka macicy i piersi (Kreitmann i Bayard, *J. Steroid Biochem.*, 11: 1589-1595, 1979; Adams i in., *Cancer Res.*, 41: 4720-4926, 1981; Poulin i Labrie, *Cancer Res.*, 46: 4933-4937, 1986). Jednakże przy stężeniach w zakresie poziomów w osoczu u dorosłych kobiet, 5-diol wspomaga namnażanie komórek i zwiększa poziomy receptora progesteronu w komórkach ludzkiego raka piersi ZR-75-1 (Poulin i Labrie, *Cancer Res.*, 46: 4933-4937, 1986) i zwiększa zależną od estrogenu syntezę glikoproteiny 52 kDa w komórkach MCF-7 (Adams i in., *Cancer Res.*, 41: 4720-4926, 1981).

Jak wspomniano powyżej, wiadomo, że poziomy w osoczu DHEA, DHEA-S i 5-diolu spadają z wiekiem i odpowiednio, że występuje silna zależna od wieku redukcja wytwarzania androgenów i estrogenów w obwodowych docelowych tkankach. Takie zmiany w sekrecji DHEA-S i DHEA powodują znaczący spadek biochemicznych i komórkowych funkcji stymulowanych sterydami płciowymi. W wyniku tego, DHEA i DHEA-S stosowano ostatnio w leczeniu wielu stanów, które są związane ze spadkiem i/lub nierównowagą w poziomach sterydów płciowych.

Osteoporoza, stan powstający u mężczyzn i kobiet, jest związana ze spadkiem ilości androgenów i estrogenów. Estrogeny okazały się zmniejszać szybkość degradacji kości, podczas gdy androgeny okazały się budować masę kości. Jednakże terapia podawania estrogenu zwykle stosowana wobec osteoporozy wymaga dodania progestyn dla przeciwdziałania przerostom macicy i ryzyku raka macicy indukowanego przez estrogeny. Ponadto, ponieważ estrogeny i progestyny zwiększają prawdopodobnie ryzyko raka piersi (Bardon i in., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 60: 692-697, 1985; Colditz

i in., *N. Engl. J. Med.*, 332: 1589-1593, 1995), stosowanie terapii substytucyjnej estrogen-progestin jest akceptowane przez niewiele kobiet i zwykle przez zbyt krótkie okresy.

Pewne badania sugerują, że osteoporoza jest kliniczną manifestacją niedoboru androgenów u mężczyzn (Baran i in., *Calcif. Tissue Res.* 26: 103-106, 1978; Odell i Swerdloff, *West J. Med.* 124: 446-475, 1976; Smith i Walker, *Calcif. Tissue Res.* 22 (Suppl.): 225-228, 1976). Terapia androgenowa, jak zauważono dla dekanianu nandrolonu, okazała się zwiększać gęstość minerałów kości kręgow kobiet po menopauzie (Need i in., *Arch. Intern. Med.*, 149: 57-60, 1989). Terapia kobiet po menopauzie nandrolonem zwiększała zawartość minerałów w korze kości (Need i in., *Clin. Orthop.* 225: 273-278, 1987). Androgenne skutki uboczne zarejestrowano jednak u 50% pacjentów. Takie dane są interesujące, ponieważ chociaż prawie wszystkie obecne terapie są ograniczone do redukcji utraty kości, wzrost masy kości stwierdzono przy stosowaniu anabolicznego sterydu nandrolonu. Podobną stymulację tworzenia kości przez androgeny proponowano u mężczyzn z niedoczynnością gonad (Baran i in., *Calcif. Tissue Res.* 26: 103, 1978). Stymulację tworzenia kości u kobiet po menopauzie po traktowanych DHEA przez 12 miesięcy opisuje Labrie i in. (*J. Clin. Endocrinol.* 82: 3498-3505, 1997).

DHEA (450 mg/kg, b. w., 3 razy tygodniowo) znacząco opóźniał pojawianie się guzów piersi u myszy C3H, które genetycznie wyhodowano z rozwojem raka piersi (Schwartz, *Cancer Res.* 39: 1129-1132, 1979). Ponadto, ryzyko powstania raka pęcherza wzrastało u mężczyzn mających niższe poziomy w osoczu DHEA (Gordon i in., *Cancer Res.* 51: 1366-1369, 1991).

Zgłoszenie patentowe Stanów Zjednoczonych Ameryki nr US 5 550 107 odnosi się do sposobu leczenia raka piersi i macicy u podatnych ciepłokrwistych zwierząt, który to sposób może obejmować inhibicję hormonalnej sekrecji jajników metodą chirurgiczną (wycięcie jajników) lub chemiczną (zastosowanie agonisty LHRH, np. [D-Trp⁶,des-Gly-NH₂¹⁰]LHRH-etyloamidu lub antagonisty) jako część terapii kombinacyjnej. Omówiono antyestrogeny, androgeny, progestyny, inhibitory tworzenia sterydów płciowych (szczególnie i katalizowanego 17 β -hydroksysterydową dehydrogenazą lub aromatazą wytwarzania sterydów płciowych), inhibitory sekrecji prolaktyny i sekrecji hormonu wzrostu oraz sekrecji ACTH. Odpowiednik opublikowano pod numerem publikacji międzynarodowej WO 90/10462.

Ponadto choroby sercowo-naczyniowe wiąże się ze spadkiem poziomów w osoczu DHEA i -DHEA-5 i zaproponowano, że DHEA oraz DHEA-5 zapobiegają lub leczą te stany (Barrett-Connor i in., *N. Engl. J. Med.* 315: 1519-1524, 1986).

U dorosłych szczurów Sprague-Pawley, Schwartz (w Kent, *Geriatrics* 37: 157-160, 1982) zauważył, że masa ciała spadła z 600 do 550 g przy pomocy DHEA nie naruszając poboru pożywienia. Schwartz (*Cancer* 39: 1129-1132, 1979) zauważył, że myszy C3H otrzymujące DHEA (450 mg/kg, 3 razy tygodniowo) uzyskały znacząco mniejszą masę i wyższy wiek niż kontrolne zwierzęta, miały mniej tłuszczu w ciele i były bardziej aktywne. Redukcję masy ciała uzyskano bez utraty apetytu lub ograniczania pokarmu. Ponadto DHEA może zapobiegać zwiększaniu masy u zwierząt hodowanych do uzyskania otyłości w stanie dorosłym (Kent, *Geriatrics* 37: 157-160, 1982).

Podawanie DHEA chudym szczurom Zucker zmniejszyło przyrost masy ciała pomimo większego poboru pokarmu. Potraktowane zwierzęta miały mniejsze poduszki tłuszczu, co ogólnie sugeruje, że DHEA zwiększa przemianę pokarmu, zmniejszając przyrost masy i akumulację tłuszczu (Svec i in., *Proc. 2nd int Conf. Cortisol and Anti-Cortisols*, Las Vegas, Nevada, USA, str. 56 abst., 1997).

Otyłość zwiększyła się u zmutowanych myszy AVY (Yen i in., *Lipids* 12: 409-413, 1977) i szczurze Zucker (Cleary i Zisk, *Fed. Proc.* 42: 536, 1983). Potraktowane DHEA myszy C3H miały młodszy wygląd niż kontrolne (Schwartz, *Cancer Res.* 39: 1129-1132, 1979).

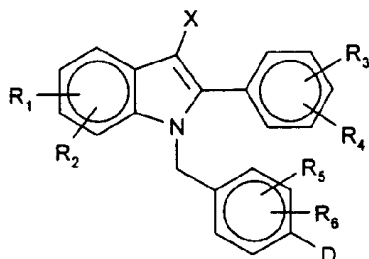
DHEA ogranicza występowanie miażdżycy tętnic u karmionych cholesterolem królików (Gordon i in., *J. Clin. Invest* 82: 712-720, 1988; Arad i in., *Arteriosclerosis* 9: 159-166, 1989). Ponadto, wysokie stężenia w osoczu DHEA-S opisano jako chroniące przed śmiercią od chorób sercowo-naczyniowych u mężczyzn (Barrett-Connor i in., *N. Engl. J. Med.* 315: 1519-1524, 1986). Poziomy w krążeniu DHEA i DHEA-S okazały się więc być odwrotnie skorelowane ze śmiertelnością z powodu chorób sercowo-naczyniowych (Barrett-Connor i in., *N. Engl. J. Med.* 315: 1519-1524, 1986) i zmniejszają się równolegle ze zmniejszaniem immunokompetencji (Thoman i Weigle, *Adv. Immunol.* 46: 221-222, 1989). Badanie u człowieka wykazało odwrotną korelację pomiędzy DHEA-S w surowicy płodowej i niskimi gęstościami lipoprotein (LDL) (Parker i in., *Science* 208: 512, 1980).

Zastosowania DHEA, jak też korzyści z terapii androgenowej i estrogenowej omówiono w międzynarodowej publikacji patentowej WO 94/16709.

Nie sądzi się, że korelacje zauważone w dziedzinie sugerują skuteczne sposoby leczenia lub profilaktyki, lub są wolne od niepożądanych skutków ubocznych, jak terapie kombinacyjne.

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna zawierająca dehydroepiandrosteron, selektywny modulator receptora estrogenu i farmaceutycznie dopuszczalną zaróbkę, która zawiera:

- farmaceutycznie dopuszczalną zaróbkę, rozcieńczalnik lub nośnik;
- lecniczo skuteczną ilość dehydroepiandrosteronu,
- lecniczo skuteczną ilość pochodnej indolu o wzorze ogólnym

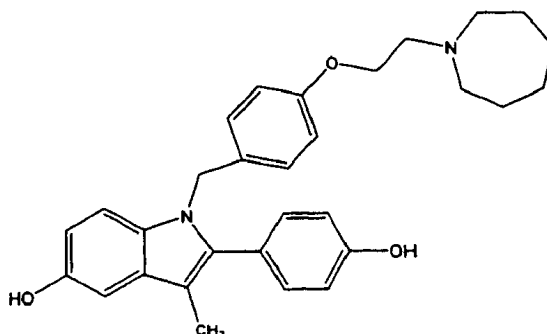


w którym D wybiera się z grupy obejmującej $-OCH_2CH_2N(R_7)R_8$, $-CH=CH-CON(R_7)R_8$, $-CC-(CH_2)_n-(R_7)R_8$, R_7 i R_8 niezależnie wybrane z grupy obejmującej C_1-C_6 alkil lub R_7 , R_8 i atom azotu, z którym są związane, razem tworzą strukturę pierścieniową wybraną z grupy obejmującej piperolidyno, dimetylo-1-piperolidyno, metylo-1-piperolidynyl, piperidyno, heksametylenoimino i morfolino;

w którym X wybiera się z grupy obejmującej: atom wodoru i C_1-C_6 alkil;

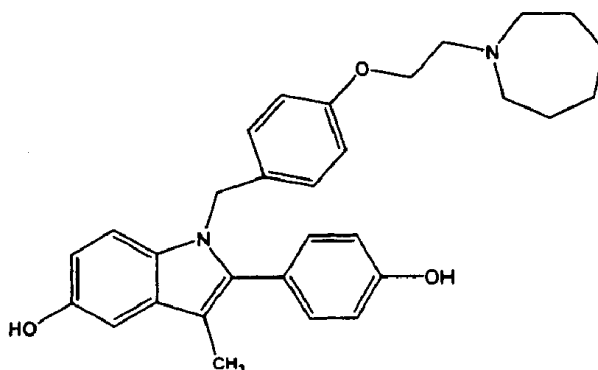
w którym R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 i R_6 wybiera się niezależnie z grupy obejmującej: atom wodoru, hydroksyl, C_1-C_6 alkil i ugrupowanie przekształcane *in vivo* w hydroksyl.

Korzystnie jako pochodną indolową zawiera związek o następującym wzorze:



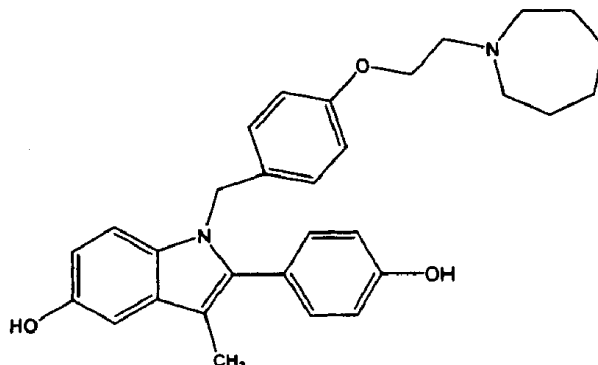
Przedmiotem wynalazku jest zestaw, w którym pierwszy pojemnik zawiera lecniczo skuteczną ilość dehydroepiandrosteronu i obejmujący drugi pojemnik zawierający lecniczo skuteczną ilość pochodnej indolowej.

Korzystnie zestaw według wynalazku jako pochodną indolową zawiera związek o następującym wzorze:



Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie dehydroepiandrosteronu do wytwarzania leku do leczenia lub zmniejszania ryzyka nabycia osteoporozy, w połączeniu z leczniczo skuteczną ilością pochodnej indolowej.

Korzystnie jako pochodną indolową stosuje się związek o następującym wzorze



Na figurach 1 i 2 pokazano podawanie samego SERM z wytworzeniem znaczącego działania profilaktycznego, nawet w nieobecności podawanych prekursorów.

W niniejszym opisie selektywny modulator receptora estrogenu (SERM) jest związkiem, który bezpośrednio lub przez aktywny metabolit działa jako antagonist receptor estrogenu („antyestrogen”) w tkance piersi, wytwarzając estrogenne lub estrogenopodobne działanie na tkankę kości i poziomy cholesterolu we krwi (to jest przez obniżenie cholesterolu w osoczu). Nie sterydowe związki działające jako antagoniści receptora estrogenu *in vitro* lub w ludzkiej lub szczurzej tkance piersi (szczególnie jeśli związek działa jak antyestrogen na ludzkie komórki raka piersi) mogą działać jako SERM. Odwrotnie, sterydowe antyestrogeny mogą działać jako SERM, ponieważ nie wykazują żadnego korzystnego działania na cholesterol w osoczu. Nie sterydowe antyestrogeny, które zbadaliśmy i stwierdziliśmy, że działają jako SERM, obejmują EM-800, EM-01538, Raloxifene, Tamoxifene i Droloxifene. Zbadaliśmy sterydowy antyestrogen ICI 182780 i stwierdziliśmy, że nie działa jako SERM. SERM można podawać w takich samych dawkach jak znane w dziedzinie, gdy te związki stosuje się jako antyestrogeny.

Zauważyliśmy też korelację pomiędzy korzystnym wpływem SERM na cholesterol w osoczu i korzystnym wpływem estrogennym lub estrogenopodobnym na kości i lipidy w osoczu. SERM, które w naszych badaniach działały korzystnie na wszystkie te parametry, obejmują masę kości, poziomy cholesterolu i triglicerydów. Bez wiązania się z teorią, można sądzić, że SERM, z których wiele korzystnie ma dwa pierścienie aromatyczne związane przez jeden do dwu atomów węgla, mogą oddziaływać z receptorem estrogenu dzięki powyższej części cząsteczki, która jest najlepiej rozpoznawana przez receptor. Korzystne SERM mają łańcuchy boczne, które mogą selektywnie wykazywać antagonistyczne właściwości w tkance piersi bez wykazywania znaczących antagonistycznych właściwości w innych tkankach. Tak więc SERM mogą działać w sposób pożądaný jako antyestrogeny w piersi, podczas gdy niespodziewanie i w sposób pożądaný działają jako estrogeny (lub wykazują estrogenopodobną aktywność) w kościach i we krwi (gdzie korzystnie wpływają na stężenia lipidu i cholesterolu). Korzystny wpływ na cholesterol i lipid przekłada się na korzystny wpływ na miażdżycę tętnic, na którą niekorzystnie wpływają niewłaściwe poziomy cholesterolu i lipidu.

Wszystkie te choroby leczone jak omówiono w opisie reagują korzystnie na androgeny. Zamiast stosować androgeny jako takie, zgłaszający stosują prekursory sterydów płciowych, takie jak DHEA, DHEA-S, 5-diol lub przedleki przekształcane w dowolne takie prekursory sterydów płciowych. *In vivo*, DHEA-S przekształca się w DHEA, który z kolei przekształca się w 5-diol. Można sądzić, że dowolna tkanka reagująca korzystnie na jeden z nich może odpowiadać prawdopodobnie korzystnie na inne. Postaci przedleków aktywnych metabolitów są dobrze znane w dziedzinie. Patrz np. H. Bundgaard „Design and Application of Prodrugs” (w: A Textbook of Drug Design and Development. Red. H. Bundgaard i P. Krogggaard-Larsen; Harwook Academic Publishers GmfH, Chur: Szwajcaria, 1991), dołączane niniejszym jako odnośniki. W szczególności, patrz str. 154-155 opisujące różne grupy funkcyjne aktywnych metabolitów i odpowiednie grupy przedleków, które przekształcają się *in vivo* w każdą grupę funkcyjną. Gdy poziomy prekursorów sterydów płciowych u pacjentów są podniesione, można zwy-

kle tego dokonać przez podawanie takiego prekursora lub podawanie prekursora takiego prekursora. Stosując prekursory zamiast androgenów zmniejsza się niepożądaną androgeną aktywność w tkankach innych niż docelowe. Tkanki przekształcają prekursory, takie jak DHEA, w androgeny tylko w naturalnym i bardziej regulowanym procesie. Znaczny procent androgenów powstaje lokalnie w obwodowych tkankach i w różnym stopniu w różnych tkankach.

Raki reagują niekorzystnie na estrogenną aktywność. Z drugiej strony osteoporoza, hipercholesterolemia, hiperlipidemia i miażdżyca tętnic reagują korzystnie na estrogenną lub estrogenopodobną aktywność. Stosując SERM uzyskuje się pożądane efekty w docelowych tkankach bez niepożądanego wpływu w pewnych innych tkankach. Np., SERM może mieć korzystne działanie estrogenne w kości (lub na lipid lub cholesterol) unikając niekorzystnego działania estrogenego na piersi.

Tak więc, prekursor i SERM wywierają korzystny wpływ na docelowe tkanki, minimalizując niekorzystny wpływ na pewne inne tkanki. Ponadto istnieją istotne synergie przy stosowaniu obu razem. Np., estrogeny i androgeny wywierają korzystne działanie na osteoporozę różnymi mechanizmami (estrogen redukując resorpcję kości, androgen pomagając w tworzeniu kości).

Kombinacja wynalazku zapewnia kościom korzystne działanie estrogenu lub estrogenopodobne przez aktywność SERM, a także zapewnia korzystny androgen przez lokalną konwersję prekursora do androgenu w kości. Sądzi się, że prekursor także dostarcza estrogen. Podobnie dzieje się w związku z kontrolowaniem lipidów lub cholesterolu (przydatne do leczenia lub zapobiegania miażdżycy tętnic). Podobna synergia występuje wobec raków piersi, trzonu macicy, jajników lub macicy, gdzie SERM zapewnia pożądane działanie antyestrogenne i prekursor zapewnia pożądane działanie androgenne (przy dowolnej przypadkowej konwersji prekursora do estrogenu łagodzonej przez antyestrogen). Niepożądane wpływy są także łagodzone w synergistyczny sposób przez kombinację.

Dla innych chorób wszelkie inne działania na tkanki piersi, które mogłyby wynikać z estrogenów wytwarzanych przez prekursor (gdy prekursor stosuje się do promocji androgennych efektów) są także łagodzone przez antyestrogenne działanie SERM w tkance piersi.

W pewnych przypadkach dodaje się progestyny uzyskując dalsze działanie androgenne. Progestyny można stosować w niskich dawkach znanych w dziedzinie bez niekorzystnego wpływania na receptory inne niż receptory androgenu (np. receptory glukokortykoidu). Są one także względnie wolne od niechcianych androgennych skutków ubocznych (takich jak włosy na twarzy żeńskich pacjentów).

Korzystne SERM odnoszą się: (1) do wszystkich stanów chorobowych; (2) do zastosowań leczniczych i profilaktycznych; i (3) do korzystnych kompozycji farmaceutycznych i zestawów.

Korzystnym prekursorem jest DHEA.

Pacjent potrzebujący leczenia lub zmniejszenia ryzyka ataku danej choroby jest tym, u którego zdiagnozowano taką chorobę lub który jest podatny na atak takiej choroby.

Jeśli nie powiedziano inaczej, korzystna dawka czynnych związków (stężeń i trybów podawania) jest identyczna dla leczniczych i profilaktycznych celów. Dawkowanie dla każdego składnika czynnego przedyskutowanego tutaj jest taka sama niezależnie od choroby leczonej (lub choroby, której możliwość ataku zmniejszono).

Jeśli nie powiedziano inaczej lub gdzie tak wynika z kontekstu, dawki odnoszą się do masy związków czynnych bez farmaceutycznych zaróbk, rozcieńczalników, nośników lub innych składników, chociaż takie dodatkowe składniki dołącza się użytecznie, jak pokazano w przykładach. Dowolna postać dawki (kapsułka, tabletki, zastrzyk lub tym podobne) zwykle stosowana w przemyśle farmaceutycznym nadaje się do stosowania tutaj i terminy „zaróbka”, „rozcieńczalnik” lub „nośnik” obejmują takie nieaktywne składniki jakie dołącza się typowo, wraz z czynnymi składnikami w takich postaciach dawek w przemyśle. Np., można stosować typowe kapsułki, pigułki, powłoki jelitowe, stałe lub ciekłe rozcieńczalniki lub zaróbki, środki smakowe, konserwanty lub tym podobne.

Wszystkie czynne składniki użyte w dowolnej z terapii omówionej tutaj można komponować w kompozycje farmaceutyczne, które obejmują także jeden lub więcej innych składników czynnych. Alternatywnie, można każdą podawać odrębnie, lecz na tyle jednocześnie w czasie, aby pacjent wykazywał na koniec podwyższone poziomy we krwi lub inaczej odbierał korzyści z każdego ze składników czynnych (lub strategii) jednocześnie. Korzystnie jeden lub wiele składników czynnych komponuje się w pojedynczej kompozycji farmaceutycznej. Korzystnie dostarcza się zestaw obejmujący co najmniej dwa odrębne pojemniki, gdzie zawartość co najmniej jednego pojemnika różni się, w całości lub w części, od zawartości co najmniej jednego innego pojemnika w odniesieniu do składników czynnych tam zawartych.

Terapie kombinacyjne omówione tutaj obejmują także zastosowanie składnika czynnego (kombinacji) do wytwarzania leku do leczenia (lub zmniejszania ryzyka) danej choroby, gdzie leczenie lub zapobieganie obejmuje ponadto inny składnik czynny kombinacji.

Figura 1 pokazuje wpływ leczenia DHEA (10 mg, przezskórnie, raz dziennie) lub EM-800 (75 µg, doustnie, raz dziennie) samym lub w kombinacji przez 9 miesięcy od wystąpienia indukowanego DM-BA raka sutka u szczura przez okres obserwacji 279 dni. Dane wyrażono jako procent łącznej liczby zwierząt w każdej grupie.

Figura 2 pokazuje wpływ leczenia DHEA (10 mg, przezskórnie, raz dziennie) lub EM-800 (75 µg, doustnie, raz dziennie) samym lub w kombinacji przez 9 miesięcy przy przeciętnej liczbie guzów na mające guzy zwierzę (A) i przy przeciętnych rozmiarach guza na mającego guzy szczura (B) przez okres obserwacji 279 dni. Dane wyrażono jako średnie ± SEM.

Figura 3 pokazuje wpływ leczenia DHEA (10 mg, przezskórnie, raz dziennie) lub EM-800 (75 µg, doustnie, raz dziennie) samym lub w kombinacji przez 9 miesięcy na poziomy w osoczu triglicerydu (A) i cholesterolu (B) u szczura. Dane wyrażono jako średnie ± SEM. **: $P < 0,01$ doświadczalne wobec odpowiednich kontrolnych.

Figura 4 pokazuje: A) Wpływ zwiększania dawek DHEA (0,3 mg, 1,0 mg lub 3,0 mg) podawanych przezskórnie dwa razy dziennie przy przeciętnych rozmiarach guzów ZR-75-1 u nagich myszy z wyciętymi jajnikami (OVX) uzupełnianych estronem. Kontrolne myszy OVX otrzymujące sam nośnik stosuje się jako dodatkowe kontrole. Początkowy rozmiar guza przyjęto jako 100%. DHEA podawano przezskórnie (p. c.) w 0,02 ml 50% roztworu etanolu - 50% glikolu propylenowego na skórze grzbietu. B) Wpływ leczenia rosnącymi dawkami DHEA lub EM-800 samym lub w kombinacji przez 9,5 miesięcy na guzy ZR-75-1 u nagich myszy OVX uzupełnianych estronem. **, $p < 0,01$, potraktowane względem kontrolnych myszy OVX uzupełnianych estronem.

Figura 5 pokazuje wpływ rosnących dawek doustnych antyestrogenu EM-800 (15 µg, 50 µg lub 100 µg) (A) lub przezskórnego podawania rosnących dawek DHEA (0,3, 1,0 lub 3,0 mg) kombinowanych z EM-800 (15 µg) lub samego EM-800 (B) przez 9,5 miesiąca przy przeciętnych rozmiarach guzów ZR-75-1 u nagich myszy z wyciętymi jajnikami (OVX) uzupełnianych estronem. Początkowy rozmiar guza przyjęto jako 100%. Kontrolne myszy OVX otrzymujące sam nośnik użyto jako dodatkowe zwierzęta kontrolne. Estron podawano podskórnym w dawce 0,5 µg raz dziennie, podczas gdy DHEA rozpuszczano w 50% etanolu - 50% glikolu propylenowym i nakładano na powierzchnię skóry grzbietu dwa razy dziennie w objętości 0,02 ml. Dokonuje się też porównania ze zwierzętami OVX otrzymującymi sam nośnik.

Figura 6 pokazuje wpływ 12-miesięcznego traktowania dehydroepiandrosteronem (DHEA) samym lub w kombinacji z Flutamidem lub EM-800 na objętość kości beleczkowatej u szczurów z wyciętymi jajnikami. Nietknięte zwierzęta dodaje się jako dodatkowe zwierzęta kontrolne. Dane przedstawiono jako średnią ± SEM ** $p < 0,01$ względem kontrolnej OVX.

Figura 7 pokazuje wpływ 12-miesięcznego leczenia dehydroepiandrosteronem (DHEA) samym lub w kombinacji z Flutamidem lub EM-800 na liczbę beleczek u szczurów z wyciętymi jajnikami. Nietknięte zwierzęta dodaje się jako dodatkowe zwierzęta kontrolne. Dane przedstawiono jako średnią ± SEM ** $p < 0,01$ względem kontrolnej OVX.

Figura 8 pokazuje bliższe przynasady puszczeli z nietkniętych szczurów kontrolnych (A), kontrolnych z wyciętymi jajnikami (B) i z wyciętymi jajnikami potraktowanych samym DHEA (C) lub w kombinacji z Flutamidem (D) lub EM-800 (E). Należy zauważyć zmniejszoną ilość kości beleczkowatej (T) u kontrolnych zwierząt z wyciętymi jajnikami (B) i znaczący wzrost objętości kości beleczkowatej (T) indukowany po podawaniu DHEA podawanie (C). Dodanie Flutamidu do DHEA częściowo zablokowało wpływ DHEA na objętość kości beleczkowatej (D), podczas gdy kombinacja DHEA i EM-800 dała pełną ochronę wobec związanej z wycięciem jajników utraty kości. Zmodyfikowany trójbarwny Masson-Goldner, powiększenie x 80. T: Beleczi, GP: Płytki wzrostowe.

Figura 9 pokazuje wpływ rosnących dawek (0,01, 0,03, 0,1, 0,3 i 1 mg/kg) EM-800, EM-1538 i Raloxifene (EM-1105) podawanych doustnie dziennie przez 4 dni na poziom cholesterolu u szczura z wyciętymi jajnikami.

Figura 10 pokazuje wpływ 34-tygodniowego leczenia dehydroepiandrosteronem (DHEA) samym lub w kombinacji z EM-1538 (EM-652 · HCl) na gęstość minerałów w kręgach lędźwiowych u szczurów z wyciętymi jajnikami. Nietknięte zwierzęta dodaje się jako dodatkowe zwierzęta kontrolne. Dane przedstawiono jako średnią ± SEM ** $p < 0,01$ względem kontrolnej OVX.

Figura 11 pokazuje połączone efekty SERM (EM-652) i DHEA na parametry menopauzy. Nie oczekiwano negatywnego wpływu.

Figura 12 pokazuje stężenia w osoczu DHEA (ng/ml) (oś Y) w funkcji czasu (oś X) po pojedynczej doustnej absorpcji korzystnych prekursorów sterydów płciowych (150 μ mol/szczura) u samców szczurów. W ramce podano AUC 24 godziny DHEA indukowanego przez te związki.

EM-760	dehydroepiandrosteron
EM-900	androst-5-eno-3 β ,17 β -diol
EM-1304	3-octan androst-5-eno-3 β ,17 β -diolu
EM-1305-CS	dioctan androst-5-eno-3 β ,17 β -diolu
EM-1397	3-octan, 17-benzoesan androst-5-eno-3 β ,17 β -diol
EM-1400	dibenzoesan androst-5-eno-3 β ,17 β -diolu
EM-1410	dipropionian androst-5-eno-3 β ,17 β -diolu
EM-1474-D	dihemisukcynian androst-5-eno-3 β ,17 β -diolu

Figura 13 pokazuje stężenie w osoczu androst-5-eno-3 β ,17 β -diolu (ng/ml) (oś Y) w funkcji czasu (oś X) po doustnej absorpcji prekursora sterydu płciowego (150 μ mol/szczura) u samców szczurów. W ramce podano AUC 24 godziny androst-5-eno-3 β ,17 β -diolu indukowane przez te związki.

EM-760	dehydroepiandrosteron
EM-900	androst-5-eno-3 β ,17 β -diol
EM-1304	3-octan androst-5-eno-3 β ,17 β -diolu
EM-1305-CS	dioctan androst-5-eno-3 β ,17 β -diolu
EM-1397	3-octan, 17-benzoesan androst-5-eno-3 β ,17 β -diol
EM-1400	dibenzoesan androst-5-eno-3 β ,17 β -diolu
EM-1410	dipropionian androst-5-eno-3 β ,17 β -diolu
EM-1474-D	dihemisukcynian androst-5-eno-3 β ,17 β -diolu

Estrogeny są dobrze znane ze stymulacji namnażania komórek nabłonka piersi, a samo namnażanie komórek uważa się za zwiększające ryzyko raka przez akumulację przypadkowych błędów genetycznych, które mogą spowodować nowotworzenie (Preston Martin i in., *Cancer. Res.* 50: 7415-21,1990). W oparciu o tę koncepcję wprowadzono antyestrogeny dla zapobiegania rakowi piersi w celu zmniejszenia szybkości podziału komórek stymulowanego przez estrogeny.

Utracie cykliczności jajczkowania stwierdzanej u samic szczurów Sprague-Dawley po 10 miesiącach życia towarzyszy zwiększony poziom estrogenu i proiaktyny w osoczu i spadek stężeń w osoczu androgeny i progesteronu (Lu i in., 61st Annual Meeting of the Endocrine Society 106 (abst. #134), 1979; Tang i in., *Biol. Reprod.* 31: 399-413,1984; Russo i in., *Monographs on Pathology of Laboratory Animals: Integument and Mammary Glands* 252-266, 1989; Sortino i Wise, *Endocrinology* 124: 90-96, 1989; Cardy, *Vet. Pathol.* 28: 139-145, 1991). Te zmiany hormonalne, które spontanicznie zachodzą u starzejących się samic szczurów, są związane z wieloogniskowym rozrostem i zwiększoną aktywnością wydzielniczą tkanki gronowej/pęcherzykowej, jak też rozszerzeniem kanału gruczołu sutkowego i tworzeniem cyst (Boorman i in., 433, 1990; Cardy, *Vet. Pathol.* 28: 139-145, 1991). Należy wspomnieć, że zmianom rozrostowym i nowotworowym gruczołu sutkowego szczura często towarzyszą zwiększone poziomy estrogenu i prolaktyny (Meites, *J. Neural. Transm.* 48: 25-42, 1980). Leczenie EM-800, SERM indukuje zanik gruczołu sutkowego, co charakteryzuje się spadkiem rozmiarów i liczby struktur zrazikowych i brakiem dowodów aktywności wydzielniczej, co wskazuje na silną antyestrogenową aktywność EM-800 w gruczole sutkowym (Luo i in., *Endocrinology* 138: 4435-4444, 1997).

Leczenie DHEA, prekursorem sterydu płciowego prowadzi do podwyższenia DHEA i 5-diolu w osoczu, podczas gdy poziomy w osoczu 4-dionu, testosteronu, dihydrotestosteronu i estradiolu wzrastają tylko umiarkowanie lub częściej pozostają niezmiennymi, ograniczając wewnątrzkomórkową biotransformację tego prekursora sterydu do tkanek obwodowych (Labrie i in., *Mol. Cell. Endocrinol.* 78: C113-C118, 1991). Jednakże wpływ stymulujący doustnie podawanego DHEA na poziomy w osoczu androgenów, takich jak testosteron i dihydrotestosteron, ma większą amplitudę niż efekt na poziomy w osoczu estrogenów, sugerując, że DHEA jest głównie transformowany do androgenów w tych zwierzętach. Ta obserwacja zgadza się z danymi otrzymanymi u kobiet, gdzie tworzenie androgenów z DHEA było ważniejszym szlakiem niż konwersja DHEA w estrogeny (Morales i in., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78: 1360-1367, 1994; Labrie i in., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 774:16-28, 1995; Labrie i in., *Steroids* 62: 148-158, 1997).

Wiedząc o powyżej opisanej silnej antyestrogennej aktywności powstałej z atrofii gruczołu, sutkowego i dominującego androgenowego wpływu DHEA na gruczoł sutkowy, histomorfologiczne zmiany

widziane u zwierząt potraktowanych kombinacją SERM i prekursora sterydu płciowego wyjaśnia się najlepiej bezkonkurencyjnym działaniem androgennym DHEA w gruczole sutkowym szczura.

Co ważniejsze, zauważono, że androgeny wywierają bezpośrednią przeciwozrostową aktywność na wzrost ludzkich komórek ZR-75-1 raka piersi *in vitro* i że takie działanie hamujące androgenów dodaje się do działania antiestrogenów (Poulin i Labrie, *Cancer Res.* 46: 4933-4937, 1986; Poulin i in., *Breast Cancer Res. Treat.* 12: 213-225, 1988). Podobne działanie hamujące zaobserwowano *in vivo* na heteroprzeszczepach ZR-75-1 u nagich myszy (Dauvois i in., *Cancer Res.* 51: 3131-3135, 1991). Androgeny okazały się także hamować wzrost indukowanego DMBA raka sutka u szczura i tę inhibicję odwracało równoczesne podawanie czystego antyandrogeny Flutamidu (Dauvois i in., *Breast Cancer Res. Treat.* 14: 299-306, 1989). Łącznie, niniejsze dane wskazują na zaangażowanie receptora androgeny w działanie hamujące DHEA na raka piersi.

Ponieważ antiestrogeny i prekursor sterydów płciowych wywierają działanie hamujące na raka piersi różnymi mechanizmami, to kombinacja SERM (EM-800) i prekursora sterydu płciowego (DHEA) wywiera silniejsze działanie hamujące niż każdy związek użyty samodzielnie na rozwój indukowanego DMBA raka sutka szczura, jak pokazano na fig. 1 i 2. Istotnie, nie znaleziono indukowanego DMBA guza na koniec eksperymentu u zwierząt otrzymujących DHEA i EM-800.

Kombinacja prekursora sterydu płciowego (DHEA) i SERM (EM-800) zachowuje wpływ stymulujący DHEA na tworzenie kości i wzmacnia działanie hamujące samego SERM (EM-800) na obrót metaboliczny i resorpcję kości, jak pokazał dalszy spadek wydalania w moczu hydroksyproliny i wapnia przy połączeniu obu związków.

Pokazaliśmy, że DHEA wykazuje korzystne działanie na kości u samic szczurów (Luo i in., *Endocrinology* 138: 4435-4444, 1997) i kobiet po menopauzie (Labrie i in., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 3498-3505, 1997). Tak więc, u nie tkniętych samic szczurów, terapia DHEA z większą gęstością mineralną kości (BMD) całego kośćca, kręgow łędźwiowych i kości udowej (Luo i in., *Endocrinology* 138: 4435-4444, 1997).

Z drugiej strony, terapia EM-800 nie miała znaczącego wpływu na BMD u nietkniętych zwierząt, chociaż zaobserwowano silne wpływy stymulujące u szczurów z wyciętymi jajnikami (Martel i in., niepublikowane dane). Ponieważ EM-800 wywiera takie wpływy stymulujące na BMD całego kośćca, kręgi łędźwiowe i kości udowe u szczurów z wyciętymi jajnikami, brak znaczącego wpływu stymulującego EM-800 u nietkniętych zwierząt może być spowodowany tym, że sterydy płciowe obecne u nietkniętych samic szczurów wywierają, maksymalny wpływ na BMD (Luo i in., *Endocrinology* 138: 4435-4444, 1997). Podobnie, brak znaczącego wpływu EM-800 u szczurów z wyciętymi jajnikami już pobierających DHEA jest prawdopodobnie spowodowany maksymalnymi wpływami stymulującymi wywieranym przez androgeny (i zapewne estrogeny) zsyntetyzowane w komórkach kości z egzogenego DHEA.

Wiadomo, że estrogeny obniżają poziomy w osoczu cholesterolu, lecz zwiększają lub nie mają wpływu na poziomy w osoczu triglicerydów (Love i in., *Ann. Intern. Med.* 115: 860-864, 1991; Walsh i in., *New Engl. J. Med.* 325: 1196-1204, 1991; Barrett-Connor, *Am. J. Med.* 95 (Suppl. 5A) : 40S-43S, 1993; Russell i in., *Atherosclerosis* 100: 113-122, 1993; Black i in., *J. Clin. Invest.* 93: 63-69, 1994; Dipippo i in., *Endocrinology* 136: 1020-1033, 1995; Ke i in., *Endocrinology* 136: 2435-2441, 1995).

Figura 3 pokazuje, że EM-800 wykazuje działanie hipocholesterolemiczne i hipotriglicerydemiczne u szczura, przedstawiając w ten sposób swoje unikalne działanie na profil lipidów w osoczu, które jest zupełnie różne od działania innych SERM, takich jak tamoxifene (Bruning i in., *Br. J. Cancer* 58: 497-499, 1988; Love i in., *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1327-1332, 1990; Dipippo i in., *Endocrinology* 136: 1020-1033, 1995; Ke i in., *Endocrinology* 136: 2435-2441, 1995), droloxifene (Ke i in., *Endocrinology* 136: 2435-2441, 1995) i raloxifene (Black i in., *J. Clin. Invest.* 93: 63-69, 1994). Kombinacja DHEA i EM-800 zachowała działanie hipocholesterolemiczne i hypotriglicerydemiczne EM-800, co sugeruje, że taka kombinacja może wywierać korzystne działanie na lipidy w osoczu.

Należy zauważyć, że profil lipidów w osoczu jest znacząco różny u szczurów i ludzi. Jednakże, ponieważ mechanizm mediacji przez receptor estrogeny jest zaangażowany w efekt hipocholesterolemiczny estrogenów, jak też antiestrogenów (Lundeen i in., *Endocrinology* 138: 1552-1558, 1997), szczur pozostaje przydatnym modelem do badania działania obniżającego poziom cholesterolu estrogenów i „antiestrogenów” u ludzi.

W skrócie, powyżej opisane dane wskazują wyraźnie wpływy kombinacji SERM (EM-800) i prekursora sterydu płciowego (DHEA) na rozwój raka sutka indukowanego przez DMBA, jak też działanie zabezpieczające takiej kombinacji na masę kości i lipidy w osoczu. Dane te sugerują do-

datkowe korzystne działanie takiej kombinacji w leczeniu i zapobieganiu osteoporozie przy polepszeniu profilu lipidów.

Zbadaliśmy także potencjalne interakcje efektu hamującego nowego antyestrogenu (EM-800) z działaniem prekursora sterydu płciowego (DHEA) na wzrost ludzkiego raka piersi ZR-75-1 w heteroprzesczczepach u nagich myszy przez kombinowane podawanie dwu leków. Fig. 4 i 5 pokazują, że sam DHEA, w użytych dawkach, powoduje 50 do 80% inhibicji wzrostu guza, podczas gdy prawie całkowita inhibicja wzrostu guza uzyskiwana przy niskiej dawce antyestrogenu nie była zakłócana przez DHEA.

Ograniczenia pomiarów gęstości mineralnej kości (BMD) są dobrze znane. Przykładowo, pomiary BMD nie wykazały zmian u szczurów potraktowanych sterydowym antyestrogenem ICI 182780 (Wakeling, Breast Cancer Res. Treat. 25: 1-9, 1993), podczas gdy widoczne były histomorfometryczne zmiany inhibicyjne (Gallagher i in., Endocrinology 133: 2787-2791, 1993). Podobne różnice opisywano dla Tamoxifene (Jordan i in., Breast Cancer Res. Treat. 10: 31-35, 1987; Sibonga i in., Breast Cancer Res. Treatm. 41: 71-79, 1996).

Należy wskazać, że zmniejszona gęstość mineralna kości nie jest jedyną nienormalnością związaną ze zmniejszoną wytrzymałością kości. (Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis. Division of Metabolism and Endocrine Drug Products, FDA, May 1994). Jest zatem ważne zanalizowanie zmian w biochemicznych parametrach metabolizmu kości indukowanych przez różne związki i terapie w celu uzyskania lepszej wiedzy o ich działaniu.

Szczególnie ważne jest wskazanie, że kombinacje DHEA i EM-800 wywierały niespodziewane korzystne działanie na ważne biochemiczne parametry metabolizmu kości. W istocie, sam DHEA nie wpływał na stosunek hydroksyprolina/kreatynina w moczu, znacznik resorpcji kości. Ponadto, brak wpływu DHEA można wykryć w dziennym wydalaniu z moczem in., Endocrinology 138: 4435-4444, 1997). EM-800, z drugiej strony, obniżał w moczu stosunek hydroksyprolina/kreatynina o 48%, podczas gdy, podobnie jak u DHEA, nie było widać wpływu EM-800 na wydalanie w moczu wapnia lub fosforu. Ponadto EM-800 nie miał wpływu na poziomy w osoczu aktywności zasadowej fosfatazy, znacznika tworzenia kości, podczas gdy DHEA zwiększał wartość parametru o około 75% (Luo i in., Endocrinology 138: 4435-4444, 1997).

Jeden z niespodziewanych efektów kombinacji DHEA i EM-800 odnosi się do stosunku w moczu hydroksyprolina/kreatynina, znacznika resorpcji kości, który zmniejszył się o 69%, gdy połączyło się DHEA i EM-800 i ta wartość była statystycznie różna ($p < 0,01$) od 48% inhibicji uzyskanej przez sam EM-800, podczas gdy sam DHEA nie wykazał żadnego działania. Tak więc, dodanie DHEA do EM-800 zwiększa o 50% efekt hamujący EM-800 na reabsorpcję kości. Co ważne, innym niespodziewanym efektem dodania DHEA do EM-800 był około 84% spadek ilości wapnia w moczu (od $23,17 \pm 1,55$ do $3,71 \pm 0,75$ $\mu\text{mol}/24$ godziny/100 g ($p < 0,01$) i 55% spadek ilości fosforu w moczu (od $132,72 \pm 6,08$ do $59,06 \pm 4,76$ $\mu\text{mol}/24$ godziny/100 g ($p < 0,01$), odpowiednio (Luo i in., Endocrinology 138: 4435-4444, 1997).

Tablica 1

Grupa	Mocz			Osocze
	Wapń ($\mu\text{mol}/24$ godz./100 g)	Fosfor ($\mu\text{mol}/24$ godz./100 g)	HP/Cr ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)	tALP (IU/l)
Kontrolna	$23,17 \pm 1,55$	$132,72 \pm 6,08$	$13,04 \pm 2,19$	$114,25 \pm 14,04$
DHEA (10 mg)	$25,87 \pm 3,54$	$151,41 \pm 14,57$	$14,02 \pm 1,59$	$198,38 \pm 30,76^*$
EM-800 (75 μg)	$17,44 \pm 4,5$	$102,03 \pm 25,13$	$6,81 \pm 0,84^{**}$	$114,11 \pm 11,26$
HEA + EM-800	$3,71 \pm 0,75^{**}$	$59,06 \pm 4,76^{**}$	$4,06 \pm 0,28^{**}$	$204,38 \pm 14,20^{**}$

Ciekawie jest także zauważyć, że silnemu działaniu hamującemu EM-800 na cholesterol w osoczu nie zapobiega równoczesna terapia DHEA (Luo i in., Endocrinology 138: 4435-4444, 1997).

Podczas gdy Raloxifene i podobne związki zapobiegają utracie kości i spadkowi ilości cholesterolu w osoczu (jak estrogeny), należy zauważyć, że gdy Raloxifene porównywano z Premarinem pod względem BMD, wpływ Raloxifene na BMD był słabszy niż wpływ Premarinu (Minutes of the Endocrinology and Metabolism Drugs Advisory Committee, PDA Thursday, Meeting #68, November 20th

1997). Ze względu na jego dobrze znane niekorzystne wpływy na raka piersi i macicy, dodanie estrogeneru do Raloxifene, EM-800 lub innych podobnych związków nie jest dopuszczalnym rozwiązaniem.

Niniejsze wyniki otrzymane dla szczura wyraźnie pokazują, że DHEA może dać korzystne wyniki, których nie osiąga się użyciem samego selektywnego modulatora receptora estrogeneru (SERM), takiego jak EM-800, Raloxifene, itp. Podczas gdy SERM ogranicza swoje działanie do inhibicji resorpcji kości, dodanie DHEA, 5-diolu, DHEA-S prawdopodobnie stymuluje tworzenie kości (efekt nie stwierdzony dla SERM lub estrogeneru) i dalsze zmniejszenie resorpcji kości ponad, efekt uzyskany przez EM-800.

Co ważne, kombinacja EM-800 i DHEA u szczurów z wyciętymi jajnikami leczonymi dla 12 miesięcy wykazuje korzystny wpływ na morfometrię kości. Objętość kości beleczkowatej jest szczególnie ważna dla wytrzymałości kości i dla zapobiegania pęknięciom kości. Tak więc, w powyżej wspomnianym studium, objętość kości beleczkowatej piszczeli wzrosła od $4,1 \pm 0,7\%$ u szczurów z wyciętymi jajnikami do $11,9 \pm 0,6\%$ ($p < 0,01$) dla samego DHEA, podczas gdy dodanie EM-800 do DHEA dodatkowo zwiększyło objętość kości beleczkowatej o $14,7 \pm 1,4\%$, wartość podobna do znalezionej u nietkniętych zwierząt kontrolnych (fig. 6).

Od wartości $0,57 \pm 0,08$ na mm u szczurów z wyciętymi jajnikami, terapia DHEA dała 137% wzrost liczby kości beleczkowych w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi z wyciętymi jajnikami. Wpływ stymulujący DHEA osiągnął więc $1,27 \pm 0,1$ na mm, podczas gdy równoczesna terapia EM-800 i DHEA dała dodatkowy 28% wzrost liczby kości beleczkowych ($p < 0,01$) w porównaniu z uzyskanym przez sam DHEA (fig. 7). Podobnie, dodanie EM-800 do terapii DHEA dało dodatkowy 15% ($p < 0,05$) spadek oddzielania kości beleczkowych, w porównaniu z uzyskiwanym z samym DHEA, prowadząc do wartości nie różniących się od obserwowanych u nietkniętych zwierząt kontrolnych.

W uzupełnieniu do danych numerycznych przedstawionych na fig. 6 i 7, fig. 8 ilustruje wzrost objętości kości beleczkowatej w bliskiej przynasadzie piszczeli indukowany przez DHEA u potraktowanych zwierząt z wyciętymi jajnikami (C) w porównaniu z kontrolnymi z wyciętymi jajnikami (B), jak też częściową inhibicję wpływu stymulującego DHEA po dodaniu Flutamidu do terapii DHEA (D). Z drugiej strony, podawanie DHEA w kombinacji z EM-800 spowodowało całkowite zapobiegnięcie indukowanej wycięciem jajników osteopenii (E), przy czym objętość kości beleczkowatej jest porównywalna z obserwowaną u nietkniętych zwierząt kontrolnych (A).

Utrata kości obserwowana przy menopauzie u kobiet jest prawdopodobnie spokrewniona ze wzrostem szybkości resorpcji kości, która nie jest w pełni skompensowana przez wtórne zwiększenie tworzenia kości. Istotnie, parametry tworzenia kości i resorpcji kości rosną w osteoporozie i resorpcja kości i jej tworzenie są hamowane estrogenową terapią substytucyjną. Działanie hamujące substytucji estrogenowej na tworzenie kości prawdopodobnie wynika ze sprzężonego mechanizmu pomiędzy resorpcją kości i tworzeniem kości, takiego, że pierwotna indukowana estrogenem redukcja resorpcji kości pociąga za sobą redukcję tworzenia kości (Parfitt, *Calcined Tissue International* 36 Suppl. 1: S37-S45, 1984).

Wytrzymałość kości gąbczastej i dalsza odporność na pęknięcie zależy nie tylko od całkowitej ilości kości gąbczastej, lecz także od beleczkowatej mikrostruktury, określanej liczbą, rozmiarem i dystrybucją beleczek. Utracie funkcji jajczkowania u kobiet po menopauzie towarzyszy znaczący spadek łącznej objętości kości beleczkowatej (Melsen i in., *Acta Pathologica & Microbiologica Scandinavia* 86: 70-81, 1978; Vakamatsou i in., *Calcified Tissue International* 37: 594-597, 1985), głównie związany ze spadkiem liczby i w mniejszym stopniu szerokości beleczek (Weinstein i Hutson, *Bone* 8: 137-142, 1987).

W niniejszym badaniu androgenny wpływ stymulujący DHEA obserwowano na prawie wszystkich badanych parametrach histomorfometrycznych kości. DHEA spowodował więc znaczący wzrost objętości kości beleczkowatej, jak też liczby beleczek, podczas gdy zmniejszył powierzchnię międzybeleczkowatą.

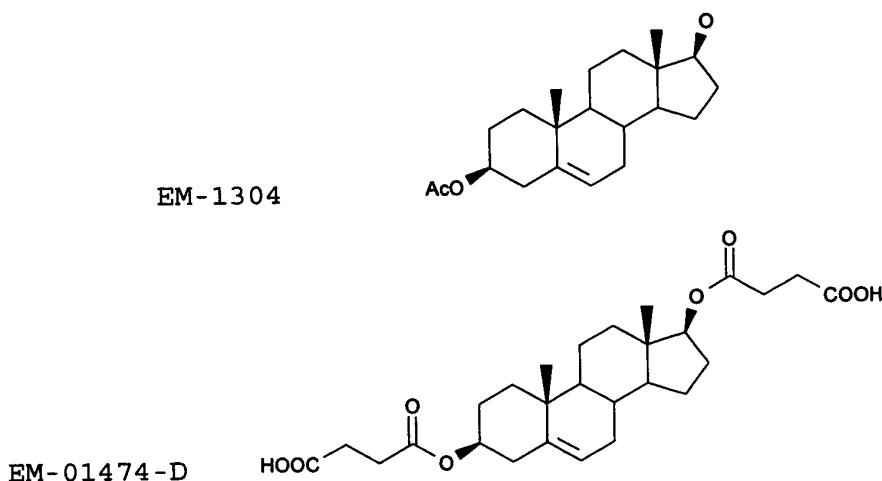
Kompozycja według wynalazku może być odpowiednia do podawania w dowolny tradycyjny sposób, w tym między innymi doustnego podawania, podskórnej iniekcji, domięśniowej iniekcji lub przezskórno podawania. Zestaw może obejmować odpowiednie substancje do doustnego podawania, np. tabletki, kapsułki, syropy i tym podobne oraz do przezskórno podawania, np. maści, mleczka, żele, kremy, plastry przedłużonego uwalniania i tym podobne.

Zgłaszający sądzą, że podawanie SERM i prekursorów sterydów płciowych można wykorzystać w leczeniu i/lub zapobieganiu rozwojowi osteoporozy, raka piersi, hipercholesterolemii, hiperlipidemii lub miażdżycy tętnic. Składnik czynny do podawania przezskórno lub przezśluzówkowego jest korzyst-

nie obecny w ilości od 0,5% do 20% wagowych łącznej masy kompozycji farmaceutycznej, korzystniej pomiędzy 2 i 10%. DHEA lub 5-diol powinien występować w stężeniu co najmniej 7% dla przezskórnego podawania. Alternatywnie, składnik czynny można umieścić w transdermalnym plastrze mającym strukturę znane w dziedzinie, np. struktury, takie jak przedstawione w europejskim opisie patentowym nr 0 279 982.

Przy komponowaniu jako maść, mleczko, żel lub krem lub tym podobne, związek czynny miesza się z odpowiednim nośnikiem, który jest kompatybilny z ludzką skórą lub śluzówką i który polepsza przezskórną penetrację związku przez skórę lub śluzówkę. Odpowiednie nośniki są znane w dziedzinie i obejmują między innymi Klucel HP i podstawę Glaxal. Pewne są dostępne w handlu, np. podstawa Glaxal dostępna z Glaxal Canada Limited Company. Inne odpowiednie nośniki można znaleźć u Kollera i Buri, S.T.P. Pharma 3(2), 115-124, 1987. Nośnik jest korzystnie takim, w którym składnik(i) czynny(e) jest(są) rozpuszczalny(e) w temperaturze otoczenia przy stosowanym stężeniu składnika czynnego. Nośnik powinien mieć dostateczną lepkość dla utrzymania inhibitora na zlokalizowanej powierzchni skóry lub śluzówki, na którą nałożono kompozycję, bez spływania lub parowania przez okres dostateczny do zapewnienia dostatecznej penetracji prekursora przez zlokalizowaną powierzchnię skóry lub śluzówki i do strumienia krwi, gdzie spowoduje pożądany efekt kliniczny. Nośnik jest typowo mieszaniną kilku składników, np. farmaceutycznie dopuszczalnych rozpuszczalników i środka zagęszczającego. Mieszanina organicznych i nieorganicznych rozpuszczalników może polepszyć hydrofilową i lipofilową rozpuszczalność, np. woda i alkohol, taki jak etanol.

Korzystnymi prekursorami sterydów płciowych są dehydroepiandrosteron (DHEA) (dostępny z Diosynth Inc., Chicago, Illinois, USA), jego przedleki (dostępne z Steraloids, Wilton, New Hampshire, USA), 5-androsten-3 β ,17 β -diol i jego przedleki EM-1304 i EM-01474-D (dostępne z Steraloids, Wilton, New Hampshire USA).



Korzystnie prekursor sterydu płciowego komponuje się jako żel alkoholowy zawierający 2,0 do 10% triglicerydu kaprylowego-kaprynowego (Neobee M-5); 10 do 20% glikolu heksylenowego; 2,0 do 10% eteru monometyloego glikolu dietylenowego (Transutol); 2,0 do 10% Cyklomethicone (Dow Corning 345); 1,0 do 2% alkoholu benzyłowego i 1,0 do 5,0% hydroksypropylocelulozy (Klucel HF).

Nośnik może także obejmować różne dodatki zwykle stosowane w maściach i mleczkach i dobrze znane w sztuce kosmetycznej i medycznej. Np. można stosować środki zapachowe, przeciwutleniające, perfumy, środki żelujące, środki zagęszczające takie jak karboksymetyloceluloza, surfaktanty, stabilizatory, zmiękczacze, środki barwiące i inne podobne środki. Przy zastosowaniu do leczenia chorób układowych, miejsce nakładania na skórę powinno się zmieniać w celu uniknięcia nadmiernego miejscowego stężenia składnika czynnego i możliwej nadmiernej stymulacji skóry i gruczołów łojowych przez androgenne metabolity prekursora sterydu płciowego.

W kompozycji farmaceutycznej do doustnego podawania, DHEA lub inny prekursor jest korzystnie obecny w stężeniu pomiędzy 5 i 98% wagowych całkowitej masy kompozycji, korzystniej pomiędzy 50 i 98%, szczególnie pomiędzy 80 i 98%. Pojedynczy prekursor, taki jak DHEA, może być jedynym składnikiem czynnym, lub alternatywnie, można stosować wiele prekursorów i/lub ich analogów (np., kombinacji DHEA, DHEA-S, 5-diolu, lub kombinacji dwu lub wielu związków przekształca-

nych *in vivo* w DHEA, DHEA-S lub 5-diol lub kombinacji DHEA lub 5-diolu i jednego lub wielu ich analogów, które przekształcają się w DHEA lub 5-diol *in vivo*, itp. Poziom DHEA w krwi jest końcowym kryterium adekwatnego dawkowania, który uwzględnia indywidualne różnice w absorpcji i metabolizmie.

Korzystnie, lekarz leczący, szczególnie na początku leczenia, obserwuje całkowitą reakcję indywidualnego pacjenta i poziomy DHEA w osoczu (w porównaniu z korzystnymi stężeniami w osoczu omówionymi powyżej) i obserwuje całkowitą reakcję pacjenta na leczenie, regulując dawki w miarę potrzeby, gdy metabolizm lub reakcja pacjentów na leczenie jest nietypowa.

Terapia ta nadaje się do nieokreślonej kontynuacji. Należy oczekiwać, że terapia DHEA i/lub 5-diolem będzie po prostu utrzymywała poziomy DHEA w zakresie podobnym do występującego naturalnie u kobiet przed menopauzą (stężenie w osoczu pomiędzy 4 i 10 µg na litr) lub naturalnie u młodych dorosłych mężczyzn (stężenie w osoczu pomiędzy 4 i 10 µg na litr).

Związek SERM lub bisfosfonian i/lub prekursor sterydu płciowego można także podawać drogą doustną i można komponować z konwencjonalnymi farmaceutycznymi zaróbkami, np. rozpryskowo suszoną laktozą, mikrokrystaliczną celulozą i stearynianem magnezu w tabletki lub kapsułki do doustnego podawania.

Czynną substancję można przetworzyć w tabletki lub rdzenie drażetek mieszając ze stałym, proszkowym nośnikiem, takim jak cytrynian sodu, węglan wapnia lub fosforan diwapnia oraz środkami wiążącymi, takimi jak poliwinylpirolidon, żelatyna lub pochodna celulozy, możliwie dodając także środki smarujące, takie jak stearynian magnezu, lurylosiarczan sodu, „Carbowax” lub poli(glikol etylenowy). Oczywiście można dodawać poprawiające smak substancje w przypadku postaci do doustnego podawania.

Jako dalsze postaci można stosować zamykane kapsułki, np. z twardej żelatyny, jak też dawkujące miękkie żelatynowe kapsułki obejmujące zmiękczacze lub plastyfikator, np. glicerynę. Zamykane kapsułki zawierają czynną substancję, korzystnie w postaci granulatu, np. w mieszaninie z wypełniaczami, takimi jak laktoza, sacharoza, mannitol, skrobie, takie jak skrobia kukurydziana lub amylopektyna, pochodne celulozy lub dobrze zdyspergowane kwasy krzemowe W miękkich żelatynowych kapsułkach, czynna substancja jest korzystnie rozpuszczona lub zawieszona w odpowiednich cieczach, takich jak oleje roślinne lub ciekłe poli(glikole etylenowe).

Mleczko, maść, żel lub krem powinien być starannie warty w skórę, aby nie było widać żadnego nadmiaru, a skóra nie powinna być przemywana w tym regionie aż do zajścia większości przezskórnej penetracji, korzystnie co najmniej 4 godziny i korzystnie co najmniej 6 godzin.

Przeškórny plaster można stosować do dostarczania prekursora znanymi technikami. Typowo nakłada się go na znacznie dłuższy czas, np. 1 do 4 dni, lecz typowo styka składnik czynny na mniejszej powierzchni, pozwalając na powolne i ciągle dostarczanie składnika czynnego.

Kilka systemów dostarczania przezskórnego leków, opracowanych i zastosowanych, jest odpowiednich do dostarczania składnika czynnego. Szybkość uwalniania jest typowo kontrolowana przez dyfuzję z matrycy lub przez przechodzenie składnika czynnego przez kontrolującą błonę.

Mechaniczne aspekty urządzeń przezskórnych są dobrze znane u szczurów i wyjaśniają je, np. opisy patentowe Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 5 162 037, 5 154 922, 5 135 480, 4 666 441, 4 624 665, 3 742 951, 3 797 444, 4 568 343, 5 064 654, 5 071 644, 5 071 657. Dodatkowe wyjaśnienia daje europejski opis patentowy nr 0 279 982 i brytyjskie zgłoszenie patentowe nr 2 185 187.

Urządzenie może być dowolnego ogólnego typu znanego w dziedzinie, w tym urządzeniem przezskórnego podawania z przylepną matrycą i zbiorniczkiem. Urządzenie może obejmować zawierające lek matryce zawierające włókna, które absorbują składnik czynny i/lub nośnik. W urządzeniu typu zbiorniczka, zbiorniczek można zdefiniować polimeryczną błoną nieprzepuszczalną dla nośnika i składnika czynnego.

W urządzeniu przezskórnym, samo urządzenie utrzymuje składnik czynny w kontakcie z żądaną zlokalizowaną powierzchnią skóry. W takim urządzeniu, lepkość nośnika dla składnika czynnego jest mniej ważna niż w kremie lub żelu. System rozpuszczalników do przezskórnego urządzenia może obejmować, np. kwas oleinowy, mleczan liniowego alkoholu i glikol dipropylenowy lub inny układ rozpuszczalników znany w dziedzinie. Składnik czynny można rozpuścić lub zawiesić w nośniku.

W celu przyklepienia do skóry, przezškórny plaster można umieścić na chirurgicznej taśmie przylepnej mającej otwór przekłuty na środku. Lepiszczce jest korzystnie pokryte odlepianą nakładką do jego ochrony przed użyciem. Typowa substancja odpowiednia dla odlepiania obejmuje polietylen i powlekany polietylenem papier, korzystnie powlekany silikonem dla łatwiejszego usuwania. Dla zastosowania urządzenia, odlepianą nakładkę po prostu zdiera się i lepiszcze przyczepia do skóry pa-

cjenta. W opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 5 135 480 Bannon i in. opisują alternatywne urządzenie mające nieprzylepne środki do mocowania] urządzenia na skórze.

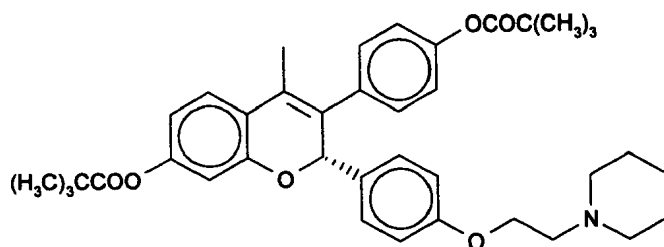
Przezskórne lub przezsłuzówkowe układy dostarczające można także stosować jako nowe i poprawione układy dostarczające dla zapobiegania i/lub leczenia osteoporozy lub innych chorób, które reagują korzystnie na terapię androgenami i/lub estrogenami.

Selektywny modulator receptora estrogenu ma wzór cząsteczkowy z następującymi cechami:

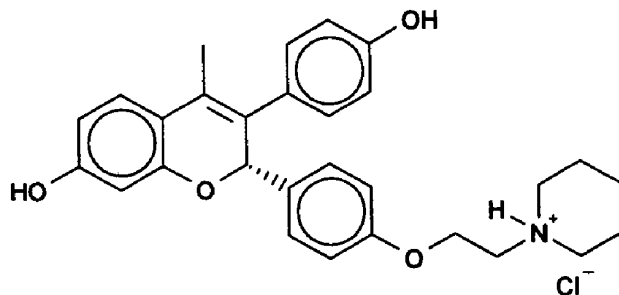
a) dwa pierścienie aromatyczne oddzielone 1 do 2 atomami węgla, oba pierścienie aromatyczne nie podstawione lub podstawione grupą hydroksylową lub grupą przekształcaną *in vivo* w hydroksyl; oraz

b) łańcuch boczny zawierający pierścień aromatyczny i grupę funkcyjną trzeciorzędowej aminy lub jej sól.

Jednym z korzystnych SERM jest EM-800 omawiany w PCT/CA96/00097 (WO 96/26201). Budowa cząsteczkowa EM-800 jest następująca:



Innym korzystnym SERM jest EM-01538:



EM-1538 (także nazywany EM-652 · HCl) jest chlorowodorkiem silnego antyestrogenu EM-652, w porównaniu z EM-800, EM-1538 jest prostszą i łatwiejszą w syntezie solą. Jest także łatwy do wydzielenia, oczyszczenia, krystalizuje i wykazuje dobrą trwałość w stanie stałym. Przy podawaniu EM-800 lub EM-1538 uważa się, że dają one ten sam czynny związek *in vivo*.

Inne korzystne SERM obejmują Tamoxifene ((Z)-2-[4-(1,2-difenylo-1-butenylo)]-N,N-dimetyloetanoamina) (dostępny z Zeneca, UK), Toremifene (dostępny z Orion-Farmos Pharmaceutica, Finland, lub Schering-Plough), Droloxifene i CP-336156 (cis-1R-[4'-pirolidyno-etoksyfenylo]-2S-fenylo-6-hydroksy-1,2,3,4,-tetrahydronaftalen, D-(-)-winian) (Pfizer Inc., USA), Raloxifene (Eli Lilly i CO., USA), LY 335563 i LY 353381 (Eli Lilly i Co., USA), Iodoxifene (SmithKline Beecham, USA), Levormeloxifene (3,4-trans-2,2-dimetylo-3-fenylo-4-[4-(2-(2-(pirolidyn-1-ylo)etoksy)fenylo]-7-metoksyochroman) (Novo Nordisk, A/S/ Dania), który ujawniają Shalmi i in., WO 97/25034, WO 97/25035, WO 97/25037, WO 97/25038; i Korsgaard i in. WO 97/25036), GW5638 (opisany przez Willsona i in., Endocrinology, 138(9), 3901-3911, 1997) i pochodne indolowe (ujawnione przez Millera i in., EP 0802183A1) i TSE 424 opracowane przez Wyeth Ayers (USA) i ujawnione w JP 10036347 (American Home Products Corporation) oraz pochodne nie sterydowych estrogenów opisane w WO 97/32837.

Można stosować dowolny SERM użyty zgodnie z wymaganiami skuteczności, jak zaleca producent. Odpowiednie dawki są znane w dziedzinie. Można stosować dowolny inny nie sterydowy antyestrogen dostępny w handlu. Można stosować dowolny związek mający aktywność podobną do SERM (przykład: Raloxifene).

SERM korzystnie podaje się w zakresie dawek 0,01 do 10 mg/kg masy ciała dziennie (korzystnie 0,05 do 1,0 mg/kg), korzystnie 5 mg dziennie, szczególnie 10 mg dziennie, w dwu równo podzielonych dawkach dla osoby o przeciętnej masie ciała przy doustnym podawaniu lub w zakresie dawek 0,003 do 3,0 mg/kg masy ciała dziennie (korzystnie 0,015 do 0,3 mg/ml), korzystnie 1,5 mg dziennie, szczególnie 3,0 mg dziennie, w dwu równo podzielonych dawkach dla osoby o przeciętnej masie ciała przy pozajelitowym podawaniu (to jest domięśniowym, podskórnym lub przezskórnym). Korzystnie SERM podaje się wraz z farmaceutycznie dopuszczalnym rozcieńczalnikiem lub nośnikiem, jak opisano poniżej.

Korzystne bisfosfoniany obejmują Alendronate [kwas (4-amino-1-hydroksybutylideno)bisfosfonowy, sól disodowa, hydrat] dostępny z Merck Shape and Dohme pod nazwą handlową Fosamax, Etidronate [kwas (1-hydroksyetylideno)bisfosfonowy, 2,2'-iminobisetanol] dostępny z Procter and Gamble pod nazwami handlowymi Didrocal i Didronel, Clodronate [kwas (dichlorometyleno)bisfosfonowy, sól disodowa] dostępny z Rhône-Poulenc Rorer pod nazwą handlową Bonafos lub dostępny z Boehringer Mannheim pod nazwą handlową Ostac oraz Pamidronate kwas (3-amino-1-hydroksypropylideno)bisfosfonowy, sól disodowa) dostępny z Geigy pod nazwą handlową Aredia. Risedronate (kwas 1-hydroksy-2-(3-pirydynylo)etylideno)bisfosfonowy, sól monosodowa) jest w badaniach klinicznych. Wszelkie inne bisfosfoniany dostępne w handlu można stosować w dawkach zalecanych przez producenta. Podobnie można stosować prekursorów sterydów płciowych w dawkach zalecanych w dziedzinie, korzystnie w dawkach odtwarzających poziomy w krążeniu do poziomów zdrowych mężczyzn w wieku 20-30 lat lub przedmenopauzalnych dorosłych kobiet.

W odniesieniu do wszystkich dawek zalecanych w wynalazku, leczący lekarz powinien monitorować reakcję indywidualnego pacjenta i odpowiednio ustawiać dawkowanie.

Przykład 1

Substancje i metodyka

Zwierzęta

Samice szczurów Sprague-Dawley [CrI:CD(SD)Br] otrzymano w wieku 44-46 dni z Charles River Canada Inc. (St. Constant, Quebec) i trzymano po 2 na klatkę w świetle (12 godzin światła/dziennie; włączanie o 07:15) i środowisku o kontrolowanej temperaturze ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Zwierzęta otrzymywały karmę Purina dla gryzoni i wodę z kranu w dowolnej ilości. Badania na zwierzętach prowadzono w pomieszczeniach dopuszczonych przez Canadian Council on Animal Care (CCAQ) zgodnie z CCAC Guide for Care and Use of Experimental Animals.

Indukcja guzów sutka przez DMBA

Raki sutka indukowano przez jednorazowe podawanie do przewodu pokarmowego 20 mg DMBA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) w 1 ml oleju kukurydzianego w wieku 50-52 dni. Dwa miesiące później pomiary guza prowadzono co dwa tygodnie. Rejestrowano dwie największe prostopadłe średnice każdego guza cyrklami dla oceny rozmiarów guzów, jak opisano (Asselin i in., Endocrinology 101: 666-671, 1977). Miejsce, rozmiar i liczbę guzów zarejestrowano.

Terapia

Zwierzęta podzielono przypadkowo na grupy, każda zawierająca 20 szczurów, za wyjątkiem 40 zwierząt w grupie kontrolnej. Zwierzęta leczono przez 282 dni następującymi: (1) nośnikami kontrolnymi, dla DHEA i EM-800; (2) EM-800 ((+)-7-piwaloiloksy-3-(4'-piwaloiloksyfenylo)-4-metylo-2-(4''-(2'''-piperydynoetoksy)fenylo)-2H-benzopitran) (75 μg , doustnie, raz dziennie) w 0,5 ml 4% etanolu, 4% poli(glikolu etylenowego)-600, 1% żelatyny, 0,9% zawiesiny NaCl; (3) DHEA (10 mg, przezskórnie, raz dziennie) w 0,5 ml i 50% etanolu, 50% glikolu propylenowego; i (4) EM-800 i DHEA. Terapię rozpoczęto na 3 dni przed doustnym podawaniem DMBA. EM-800 zsyntetyzowano w Dziale Chemii Medycznej naszego laboratorium, z DHEA zakupiono w Steraloids Inc., Wilton, NH.

Wiele zwierząt kontrolnych i pewne leczone EM-800 lub DHEA zwierzęta zabito przez przemieszczenie kręgu szyjnego pod znieczuleniem izofluranem 6 miesięcy po podaniu DMBA ze względu na zbyt wielkie rozmiary guzów. Wartości rozmiarów guzów i liczba tych zabitych szczurów, wraz ze zmierzonymi w późniejszych okresach u żyjących zwierząt, zastosowano do późniejszej analizy występowania guzów, średniej liczby guzów na mającego guzy szczura i średnich rozmiarów guzów na mającym guzy zwierzęciu. Pozostałe zwierzęta (9 szczurów kontrolnych i 13-19 szczurów z każdej innej grupy) nadal podlegało terapii przez dalsze 3 miesiące w celu zaobserwowania długoterminowej siły zapobiegawczej DHEA i EM-800 samych lub w kombinacji. Szczury zabito 279 dni po podaniu DMBA. Macice, pochwy i jajniki natychmiast usunięto, uwolniono od tkanki łącznej i tłuszczowej i zważono.

Zbieranie i przetwarzanie próbek

Próbki moczu z 24 godzin zebrano na koniec eksperymentu od pierwszych 9 szczurów z każdej grupy po przeniesieniu do klatek metabolicznych (Allentown Caging Equipment Co., Allentown, NJ). Po dwie próbki moczu zebrano i zanalizowano w różnych dniach dla każdego zwierzęcia w celu zminimalizowania wpływu dziennych wahań. Tak więc, każda wartość pokazana oznacza średnią z dwu pomiarów przeprowadzonych w dwu różnych dniach. 0,5 ml toluenu dodano do probówek na mocz dla zapobiegania odparowaniu moczu i wzrost bakterii i objętość moczu zarejestrowano. Krew z tułowia zebrano po zabiciu i pozostawiono do skrzepnięcia w temperaturze 4°C przez noc przed odwirowaniem przy 3000 obrotach na minutę przez 30 minut.

Analiza moczu i biochemicznych parametrów osocza

Świeżych próbek użyto do zbadania poziomu kreatyniny, wapnia i fosforu w moczu, jak też poziomów w osoczu całkowitej aktywności zasadowej fosfatazy (tALP), cholesterolu i triglicerydów. Te biochemiczne parametry zmierzono automatycznie w Monarch 2000 Chemistry System (Instrumentation Laboratory Co. Lexington, MA) w warunkach Good Laboratory Practice. Zmierzono hydroksyprolinę w moczu, jak opisano (Podenphant i in., Clinica Chimica Acta 142: 145-148, 1984).

Pomiary masy kości

Szczury znieczulono dootrzewnowym zastrzykiem chlorowodoru ketaminy i diazepamem w dawkach 50 i 4 mg/kg masy ciała, odpowiednio. Cały kościec i prawą kość udową skanowano stosując absorpcjometrię rentgenowską o podwójnej energii (DEXA; QDR 2000-7.10C, Hologic, Waltham, MA) na urządzeniu wyposażonym w oprogramowanie Regional High Resolution. Pola skanowane miały wymiary 28,110 x 17,805 cm i 5,0 x 1,902 cm, rozdzielczości wynosiły 0,1511 x 0,0761 cm i 0,0254 x 0,0127 cm, szybkości skanowania odpowiednio 0,3608 i 0,0956 mm/s dla całego kośćca i kości udowej. Zmierzono zawartość minerałów w kości (BMC) i gęstość mineralną kości (BMD) całego kośćca, kręgów lędźwiowych i kości udowej na zeskanowanych obrazach całego kośćca i kości udowej.

Analizy statystyczne

Istotność statystyczną zmierzono według testu wielozakresowego Duncana-Kramera (Biometrics 12: 307-310, 1956). Analizy częstości rozwoju guzów sutka przeprowadzono stosując dokładny test Fishera (Conover, Practical nonparametric statistics, wyd. 2, 153-170, 1980). Dane przedstawiono jako średnie \pm S.E.M.

Wyniki

Wpływ rozwój indukowanego DMBA raka sutka

Jak zilustrowano na fig. 1, 95% zwierząt kontrolnych uzyskało wyczuwalne guzy sutka w 29 dni po podawaniu DMBA. Terapia DHEA lub EM-800 częściowo zapobiegła rozwojowi indukowanego DMBA raka sutka i zapadalność zmalała w ten sposób odpowiednio do 57% ($p < 0,01$) i 38% ($p < 0,01$). Co ciekawe, kombinacja obu związków dała znacząco wyższe działanie hamujące niż działanie uzyskiwane przez każdy związek samodzielnie ($p < 0,01$ względem samego DHEA lub EM-800). W istocie, jedyne dwa guzy, które pojawiły się w grupie zwierząt potraktowanych obu związkami, zniknęły przed końcem eksperymentu.

Terapia DHEA lub EM-800 zmniejszyła średnią liczbę guzów na mających guzy zwierzęciu od $4,7 \pm 0,5$ guzów u kontrolnych zwierząt do odpowiednio $3,4 \pm 0,7$ (N. S.) i $1,4 \pm 0,3$ ($p < 0,01$) guzów/zwierzę, podczas gdy nie znaleziono guza na koniec eksperymentu u zwierząt, które otrzymywały oba leki ($p < 0,01$ względem trzech innych grup) (fig. 2A).

Jeden z dwu guzów, które zniknęły później, był obecny od dnia 79 do dnia 201 po podaniu DMBA, a drugi guz był dotykalny od dnia 176 do dnia 257. Widać z fig. 2B, że sam DHEA lub EM-800 zmniejszył średnie pole guza na mającym guzy zwierzęciu od $12,8 \pm 1,3$ cm² na koniec eksperymentu do odpowiednio $10,2 \pm 2,1$ cm² (N. S.) i $7,7 \pm 1,8$ cm² (N. S.), podczas gdy terapia kombinacyjna dała wartość zero ($p < 0,01$ względem trzech innych grup). Dwa guzy powstałe w grupie zwierząt potraktowanych DHEA i EM-800 nie urosły większe niż 1 cm².

Należy zauważyć, że rzeczywiste wartości średniego pola guza, jak też średnia liczba guzów na mającym guzy zwierzęciu w grupie kontrolnej powinna być wyższa niż wartości przedstawione na fig. 2, ponieważ wiele szczurów trzeba było zabić przed końcem eksperymentu ze względu na nadmierne rozmiary guzów.

Wartości zmierzone w czasie zabicia dołączono więc jako takie do obliczeń dokonywanych później w celu zminimalizowania tendencji w grupie kontrolnej, która, w każdym przypadku, pozostawała znacząco powyżej innych grup.

Wpływ na kości

Długoterminowe przezskórne podawanie DHEA samicom szczurów indukowało odpowiednio 6,9% ($p < 0,01$), 10,6% ($p < 0,05$), i 8,2% ($p < 0,01$) wzrosty gęstości mineralnej kości (BMD) całego kośćca, kręgow łędźwiowych i kości udowej (tablica 2). Z drugiej strony, nie znaleziono znaczących zmian u zwierząt potraktowanych EM-800. Ponadto, gdy oba związki podawano jednocześnie, otrzymane wartości były porównywalne z uzyskiwanymi z samym DHEA.

Terapia DHEA zwiększyła poziomy w osoczu aktywności łącznej zasadowej fosfatazy (tALP) o 74% ($p < 0,05$), lecz nie miała wpływu na codzienne wydalanie w moczu wapnia i fosforu i stosunek w moczu hydroksyproliny do kreatyniny (tablica 3).

Z drugiej strony, terapia EM-800 zmniejszyła stosunek hydroksyproliny do kreatyniny w moczu o 48% ($p < 0,01$), lecz nie miała statystycznie znaczącego wpływu na codzienne wydalanie w moczu wapnia lub fosforu i poziomy aktywności tALP w osoczu.

Kombinacja DHEA i EM-800 doprowadziła do wzrostu poziomów aktywności w osoczu tALP ($p < 0,01$) |podobnie do uzyskanych z samym DHEA i zmniejszonego stosunku hydroksyproliny do kreatyniny w moczu o 69%, wartości znacząco ($p < 0,01$) niższej niż uzyskana z samym EM-800. Ponadto kombinacja obu leków znacząco zmniejszyła codzienne wydalanie w moczu wapnia i fosforu o odpowiednio 84% ($p < 0,01$) i 56% ($p < 0,01$), podczas gdy nie zauważono znaczącej zmiany dla każdego leku samego (tablica 3).

Wpływ na poziomy w osoczu lipidów

Długoterminowa terapia EM-800 obniżała poziomy w osoczu triglicerydów i cholesterolu odpowiednio o 72% ($p < 0,01$) i 45% ($p < 0,01$), podczas gdy długoterminowe podawanie DHEA zmniejszyło poziomy w osoczu triglicerydów o 60% ($p < 0,01$), a poziomy cholesterolu we krwi nie zmieniły się. Ponadto, 42% ($p < 0,01$) i 52% ($p < 0,01$) spadki stężeń w osoczu triglicerydów i cholesterolu zmierzono u zwierząt potraktowanych EM-800 i DHEA (fig. 3).

Tablica 2

Wpływ leczenia DHEA (10 mg, przezskórnie, raz dziennie) lub EM-800 (75 µg, doustnie, raz dziennie) samymi lub w kombinacji przez 9 miesięcy na gęstość mineralną kości (BMD) kości udowej, kręgow łędźwiowych i całego kośćca u samic szczura. Pomiary przeprowadzono dla 9 szczurów na grupę

Grupa	Gęstość mineralna kości (g/cm ²)		
	Cały kościec	Kręgi łędźwiowe	Kości udowe
Kontrolna	0,1371 ± 0,0025	0,195 ± 0,0067	0,3151 ± 0,0063
DHEA (10 mg)	0,1465 ± 0,0010**	0,2161 ± 0,0049*	0,3408 ± 0,0038**
EM-800 (75 µg)	0,1356 ± 0,0017	0,1885 ± 0,0045	0,3097 ± 0,0047
DHEA + EM-800	0,1498 ± 0,0019**	0,210 ± 0,0061	0,3412 ± 0,0056**

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$, eksperyment względem kontroli

Tablica 3

Wpływ leczenia DHEA (10 mg, przezskórnie, raz dziennie) lub EM-800 (75 µg, doustnie, raz dziennie) samym lub w kombinacji przez 9 miesięcy na parametry metabolizmu kości u szczura: codzienne wydalanie w moczu wapnia i fosforu, stosunek w moczu hydroksyproliny do kreatyniny (HP/Cr) oraz poziomy aktywności łącznej zasadowej fosfatazy w osoczu (tALP). Próbkę otrzymano dla 9 zwierząt w grupie

Grupa	Mocz			Osocze
	Wapń (µmol/24 h/100 g)	Fosfor (µmol/24 h/100 g)	HP/Cr (µmol/mmol)	tALP(IU/l)
Kontrolna	23,17 ± 1,55	132,72 ± 6,08	13,04 ± 2,19	114,25 ± 14,04
DHEA (10 mg)	25,87 ± 3,54	151,41 ± 14,57	14,02 ± 1,59	198,38 ± 30,76*
EM-800(75 fig)	17,44 ± 4,5	102,03 ± 25,13	6,81 ± 0,84**	114,11 ± 11,26
DHEA + EM-800	3,71 ± 0,75**	59,06 ± 4,76**	4,06 ± 0,28**	204,38 ± 14,20**

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ eksperyment względem kontroli

Przykład 2

Streszczenie

W gruczole sutkowym androgeny powstają z prekursora sterydu dehydroepiandrosteronu (DHEA). Kliniczne dowody wskazują, że androgeny mają działanie hamujące na raka piersi. Estrogeny, z drugiej strony, stymulują rozwój i wzrost raka piersi. Zbadaliśmy wpływ DHEA samego lub w kombinacji z nowo opisanym czystym antyestrogenem, EM-800, na wzrost heteroprzeszczepów guzów tworzonych przez linię komórek ludzkiego raka piersi ZR-75-1 u nagich myszy z wyciętymi jajnikami.

Myszy otrzymały dzienną podskórną iniekcję 0,5 µg estronu (hormonu estrogennego) zaraz po wycięciu jajników. EM-800 (15, 50 lub 100 µg) podawano doustnie raz dziennie. DHEA podawano dwa razy dziennie (łączna dawka 0,3, 1,0 lub 3,0 mg) na skórę grzbietu sam lub w kombinacji z 15 µg dziennie doustnej dawki EM-800. Zmiany w rozmiarach guzów w odpowiedzi na terapię oceniano periodycznie w odniesieniu do pomiarów z pierwszego dnia. Na koniec eksperymentów guzy wycięto i zważono.

9,4-krotny wzrost rozmiarów guzów w czasie 9,5 miesiąca zaobserwowano u myszy z wyciętymi jajnikami otrzymujących sam estron w porównaniu z myszami nie otrzymującymi estronu. Podawanie 15, 50 lub 100 µg EM-800 u otrzymujących estron u myszy z wyciętymi jajnikami doprowadziło do zahamowania odpowiednio 88%, 93% i 94% rozmiarów guzów. DHEA, z drugiej strony, w dawkach 0,3, 1,0 lub 3,0 mg hamowała końcową masę guza odpowiednio o 67%, 82% i 85%. Porównywalną inhibicję rozmiarowych guzów otrzymano przy dziennej 15 µg doustnej dawce EM-800 w obecności lub bez różnych dawek przezskórnych DHEA.

DHEA i EM-800 niezależnie tłumili wzrost stymulowanych estronem mysich heteroprzeszczepów guzów ZR-75-1 u nagich myszy. Podawanie DHEA w zdefiniowanych dawkach nie zmienia działania hamującego EM-800.

Materiały i metodyka

Komórki ZR-75-1

Komórki ludzkiego raka piersi ZR-75-1 otrzymano z American Type Culture Collection (Rockville, MD) i rutynowo hodowano jako monowarstwy w pożywce RPMI 1640 uzupełnionej 2 mM L-glutaminy, 1 mM pirogronianu sodu, 100 IU penicyliny/ml, 100 µg streptomycyny/ml oraz 10% płodowej surowicy bydłowej, w wilgotnej atmosferze 95% powietrza/5% CO₂ w temperaturze 37°C, jak opisano (Poulin i Labri, *Cancer Res.* 46: 4933-4937, 1986; Poulin i in., *Breast Cancer Res. Treat.*, 12: 213-225, 1988). Komórki poddawano pasażowaniu co tydzień po potraktowaniu 0,05% trypsyną; 0,02% EDTA (wagowo). Kultury bakterii użyte w eksperymentach opisane w tym raporcie uzyskano z pasażu 93 linii komórkowej ZR-75-1.

Samice homozygotycznych Harian Sprague-Dawley (nu/nu) bezgrasiczych myszy (wiek 28 do 42 dni) otrzymano z HSD (Indianapolis, Indiana, USA). Myszy trzymano w winylowych klatkach z filtrem powietrza w dachu w kapturach z laminarnym przepływem powietrza i w warunkach ograniczonej liczby patogenów. Klatki, podściółkę i pokarm autoklawowano przed użyciem. Wodę autoklawowano, zakwaszono do pH 2,8 i podawano w dowolnej ilości.

Szczepienie komórek

Myszom wycięto oba jajniki (OVX) na tydzień przed zaszczepieniem komórek guza pod znieczuleniem dootrzewnową iniekcją 0,25 ml/zwierzę Avertin (alkohol amylový: 0,8 g/100 ml 0,9% NaCl oraz tribromoetanól: 2 g/100 ml 0,9% NaCl). 1,5 x 10 komórek ZR-75-1 w logarytmicznej fazie wzrostu zebrano po potraktowaniu monowarstwy 0,05% trypsyny/0,02% EDTA (wagowo), zawieszono w 0,1 ml pożywki kultury zawierającej 25% Matrigel i zaszczepiono podskórną z obu boków zwierzętom stosując strzykawkę nr 20 i jednocalową igłę, jak opisano wcześniej (Dauvois i in., *Cancer Res.* 51: 3131-3135, 1991).

W celu ułatwienia wzrostu guzów, każde zwierzę otrzymało dzienną podskórną iniekcję 10 µg estradiolu (E₂) w nośniku złożonym z 0,9% NaCl, 5% etanolu, 1% żelatyny przez 5 tygodni. Po pojawieniu się dotykalnych guzów ZR-75-1, średnicę guza zmierzono cyrklami i myszy mające średnicę guza pomiędzy 0,2 i 0,7 cm wybrano do tego badania.

Terapia hormonalna

Wszystkie zwierzęta, poza tymi z grupy kontrolnej OVX otrzymały codzienne podskórne iniekcje 0,5 µg estronu (E₁) w 0,2 ml 0,9% NaCl, 5% etanolu, 1% żelatyny. We wskazanych grupach, DHEA podawano przezskórną dwa razy dziennie przy dawkach 0,3, 1,0 lub 3,0 mg/zwierzę podawanych

w objętości 0,02 ml na skórze grzbietu poza powierzchnią wzrostu guza. DHEA rozpuszczono w 50% etanolu, 50% glikolu propylenowego. EM-800, ((+)-7-piwaloiloksy-3-(4'-piwaloiloksyfenylo)-4-metylo-2-(4''-(2'''-piperydinoetoksy)fenylo)-2H-benzopiran), zsyntetyzowano jak opisano wcześniej (Gauthier i in., J. Med. Chem. 40: 2117-2122, 1997) w dziale chemii medycznej Laboratory of Molecular Endocrinology CHUL Research Center. EM-800 rozpuszczono w 4% (objętościowo) etanolu, 4% (objętościowo) poli(glikolu etylenowego) (PEG) 600, 1% (wagowo) żelatyny, 0,9% (wagowo) NaCl. Zwierzęta wskazanych grup otrzymały codzienne doustne dawki 15 µg, 50 µg lub 100 µg EM-800 samego lub w kombinacji z DHEA, podczas gdy zwierzęta z grupy OVX otrzymały sam nośnik (0,2 ml 4% etanol, 4% PEG 600, 1% żelatyny, 0,9% NaCl). Guzy mierzone raz na tydzień cyrklem Verniera. Rejestrowano prostopadłe średnice w cm (L i W) i pole guza (cm²) obliczano stosując wzór: $L/2 \times W/2 \times \pi$ (Dauvois i in., Cancer Res. 51: 3131-3135, 1991). Pole zmierzone pierwszego dnia leczenia przyjęto jako 100% i zmiany w rozmiarach guzów wyrażano jako procent początkowego pola guza. W przypadku podskórnych guzów ogólnie nie jest (możliwy dokładny dostęp w trzech wymiarach do guza, tak więc zmierzono tylko pola guzów. Po 291 dniach (lub 9,5 miesiącach) leczenia, zwierzęta zabito.

Kategorie odpowiedzi oceniono jak opisano (Dauvois i in., Breast Cancer Res. Treat. 14: 299-306, 1989; Dauvois i in., Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 25: 891-897, 1989; Labrie i in., Breast Cancer Res. Treat. 33: 237-244, 1995). W skrócie, częściowa regresja odpowiada guzom, które zmniejszyły się o 50% lub więcej niż 50% początkowych rozmiarów; trwała odpowiedź odnosi się do guzów, które zmniejszyły się o mniej niż 50% początkowych rozmiarów lub powiększyły o mniej niż 50% początkowych rozmiarów, podczas gdy kompletna regresja odnosi się do guzów, które były niewykrywalne na koniec leczenia.

Progresja odnosi się do guzów, które powiększyły się o więcej niż 50% w porównaniu z ich początkowymi rozmiarami. Na koniec eksperymentu wszystkie zwierzęta zabito przez odcięcie głów. Guzy, macicę i pochwę natychmiast usunięto, uwolniono od tkanki łącznej i tłuszczowej i zważano.

Analiza statystyczna

Istotność statystyczną wpływu leczenia na rozmiary guzów oceniono stosując analizę wariancji (ANOVA) oceniającą wpływ związany z DHEA, EM-800 i czasem i ponowne pomiary u tych samych zwierząt przeprowadzono na początku i na końcu terapii (osobnicy w grupie czynnikowej). Powtórzone pomiary w czasie 0 i po 9,5 miesiąca leczenia stanowią stochastyczny blok zwierząt. Czas zanalizowano więc jako efekt wewnątrzblokowy, podczas gdy obie terapie oceniono jako efekty międzyblokowe. Wszystkie interakcje pomiędzy głównymi efektami dołączono do modelu. Znaczenie czynników terapii i ich interakcji zanalizowano stosując osobników w grupie jako czynnik błędny. Dane przekształcono logarytmicznie. Hipotezy będące podstawą ANOVA zakładały normalność reszt i jednorodność wariancji.

Porównania parami *a posteriori* przeprowadzono stosując test Fishera dla najmniej znaczącej różnicy. Główne wpływy i interakcje terapii na masę ciała i masę narządów zanalizowano stosując standardową dwukierunkową ANOVA z interakcjami. Wszystkie analizy ANOVA przeprowadzono stosując program SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA). Istotność różnic deklarowano stosując dwustronny test z łącznym poziomem 5%.

Dane w kategoriach zanalizowano testem Kruskala-Wallisa dla zorganizowanych kategorijskich zmiennych odpowiedzi (pełna odpowiedź, częściowa odpowiedź, trwała odpowiedź i progresja guza). Po ogólnej ocenie wyników terapii podgrupę wyników zaprezentowaną w tablicy 4 zanalizowano ustawiając krytyczną wartość p dla wielokrotnych porównań. Dokładne wartości p obliczono stosując program StatXactp (Cytel, Cambridge, MA, USA). Dane wyrażono jako średnie ± błąd standardowy średniej (SEM) 12 do 15 myszy w każdej grupie.

Wyniki

Jak zilustrowano na fig. 4A, ludzkie guzy ZR-75-1 zwiększyły się 9,4-krotnie w czasie 291 dni (9,5 miesiąca) u nagich myszy z wyciętymi jajnikami potraktowanych dzienną 0,5 µg podskórnie podawaną dawką estronu, podczas gdy u kontrolnych myszy OVX, które otrzymywały sam nośnik, rozmiary guzów zmniejszyły się do 36,9% początkowej wartości podczas trwania badania.

Terapia rosnącymi dawkami przezskórnymi DHEA spowodowała postępującą inhibicję stymulowanego E₁ wzrostu guza ZR-75-1. Inhibicje 50,4%, 76,8% i 80,0% osiągnięto przez 9,5 miesiąca leczenia przy odpowiednio 0,3 mg, 1,0 mg i 3,0 mg dziennych dawek DHEA na zwierzę (fig. 4A). Zgodnie ze spadkiem całkowitej ilości nowotworu, terapia DHEA doprowadziła do znaczącego spadku średniej masy guzów pozostałych na koniec eksperymentu.

W istocie, średnia masa guza zmniejszyła się od $1,12 \pm 0,26$ g u kontrolnych traktowanych E_1 nagich myszy z wyciętymi jajnikami do odpowiednio $0,37 \pm 0,12$ g ($P = 0,005$), $0,20 \pm 0,06$ g ($P = 0,001$) i $0,17 \pm 0,06$ g ($P = 0,0009$) w grupie zwierząt otrzymującej dziennie 0,3, 1,0 i 3,0 mg dawki DHEA (fig. 4B).

Przy dziennych dawkach 15 μ g, 50 μ g i 100 μ g, antiestrogen EM-800 hamował stymulowane estrogenem rozmiary guzów o odpowiednio 87,5% ($P < 0,0001$), 9,5% ($P < 0,0001$) i 94,0% ($P = 0,0003$) (fig. 5A) w porównaniu z rozmiarami guzów u kontrolnych zwierząt po 9,5 miesiąca.

Redukcje rozmiarów guzów uzyskane z trzema dawkami EM-800 nie różnią się znacząco pomiędzy sobą. Jak zilustrowano na fig. 4B, masa guza na koniec 9,5-miesięcznego badania zmniejszyła się od $1,12 \pm 0,26$ g u kontrolnych traktowanych E_1 myszach OVX do $0,08 \pm 0,03$ g, $0,03 \pm 0,01$ g i $0,04 \pm 0,03$ g u zwierząt potraktowanych dziennie 15 μ g, 50 μ g i 100 μ g dawkami EM-800, odpowiednio ($P < 0,0001$ przy wszystkich dawkach EM-800 względem traktowanych E_1 OVX).

Jak wspomniano powyżej, antiestrogen EM-800, przy dziennej doustnej dawce 15 μ g, spowodował 87,5% inhibicji stymulowanego estronem wzrostu guza mierzonego po 9,5 miesiąca. Dodanie DHEA przy trzech użytych dawkach nie miało znaczącego wpływu na już znaczącą inhibicję rozmiarów guzów uzyskiwane przy 15 μ g dziennej dawce antiestrogenem EM-800 (fig. 5B). Tak więc, średnia masa guza została silnie zmniejszona od $1,12 \pm 0,26$ g u kontrolnych traktowanych estronem myszy do $0,08 \pm 0,03$ g ($P < 0,0001$), $0,11 \pm 0,04$ g ($P = 0,0002$), $0,13 \pm 0,07$ g ($P = 0,0004$) i $0,08 \pm 0,05$ g ($P < 0,0001$) u zwierząt, które otrzymywały dzienną dawkę 15 μ g antiestrogenem samego lub w kombinacji z odpowiednio 0,3, 1,0, i 3,0 mg dawkami DHEA (nie zauważono znaczącej różnicy pomiędzy 4 grupami) (fig. 4B).

Ciekawie też było zbadać kategorie odpowiedzi uzyskane przy powyżej wskazanych terapiach. Tak więc, terapia rosnącymi dawkami DHEA zmniejszyła, chociaż nie do poziomu istotności statystycznej ($P = 0,088$), liczbę rosnących guzów, od 87,5% u kontrolnych zwierząt OVX traktowanych estronem do wartości 50,0%, 53,3% i 66,7% u zwierząt potraktowanych dziennymi dawkami 0,3, 1,0 lub 3,0 mg DHEA (tablica 4). Pełne odpowiedzi, z drugiej strony, wzrastały od 0% u traktowanych estronem myszy do 28,6%, 26,7% i 20,0% u zwierząt utrzymujących 0,3, 1,0 i 3,0 mg dziennej dawki przezskórnej DHEA.

Trwałe odpowiedzi, z drugiej strony, zmierzono uzyskując 12,5%, 21,4%, 20,0% i 13,3% u kontrolnych traktowanych myszy i w trzech grupach zwierząt, które otrzymywały odpowiednio powyżej wskazane dawki DHEA. U kontrolnych myszy z wyciętymi jajnikami wielkości kompletnych, częściowych i trwałych odpowiedzi zmierzono uzyskując odpowiednio 68,8%, 6,2% i 18,8%, podczas gdy progresję widziano tylko dla 6,2% guzów (tablica 4).

Pełne odpowiedzi lub zniknięcie guzów uzyskano dla 29,4%, 33,3%, 26,7% i 35,3% guzów u zwierząt, które otrzymywały sam andestrogen EM-800 ($P = 0,0006$) (15 μ g) lub w kombinacji odpowiednio z 0,3 mg, 1,0 mg lub 3,0 mg DHEA (tablica 4).

Progresję, z drugiej strony, zauważono dla odpowiednio 35,3%, 44,4%, 53,3% i 17,6% guzów w tej samej grupie zwierząt. Nie ma znaczącej różnicy pomiędzy grupami potraktowanymi EM-800, samym lub w kombinacji z DHEA.

Nie zauważono żadnego znaczącego wpływu terapii DHEA lub EM-800 na masę ciała z uwzględnieniem masy guza. Terapia myszy OVX estronem zwiększała masę macicy od 28 ± 5 mg u kontrolnych myszy OVX do 132 ± 8 mg ($P < 0,01$), podczas gdy zwiększanie dawek DHEA spowodowało progresywną, lecz względnie małą inhibicję wpływu stymulującego estronu, który osiągnął 26% ($P = 0,0008$) przy najwyższej użytej dawce DHEA.

Widać z tej samej figury, że masa macicy stymulowanej estronem zmniejszyła się ze 132 ± 8 mg u kontrolnych traktowanych estronem myszy do 49 ± 3 mg, 36 ± 2 mg i 32 ± 1 mg ($P < 0,0001$ przy wszystkich dawkach względem kontrolnych) z dziennymi doustnymi dawkami odpowiednio 15 μ g, 50 μ g lub 100 μ g EM-800 (łącznie $P < 0,0001$). 15 μ g EM-800 w kombinacji z 0,3 mg, 1,0 mg lub 3,0 mg dziennej dawki DHEA dało zmierzoną masę macicy odpowiednio 46 ± 3 mg, 59 ± 5 mg i 69 ± 3 mg.

Z drugiej strony, terapia estronem zwiększa masę pochwy od 14 ± 2 mg u zwierząt OVX do 31 ± 2 mg ($P < 0,01$), podczas gdy dodanie DHEA nie miało znaczącego wpływu. Masa pochwy zmniejszyła się następnie do 23 ± 1 mg, 15 ± 1 mg i 11 ± 1 mg po terapii dziennymi odpowiednio 15 μ g, 50 μ g lub 100 μ g dawkami EM-800 (całkowite p i $P < 0,0001$ dla par przy wszystkich dawkach względem kontrolnych).

W kombinacji z 0,3 mg, 1,0 mg lub 3,0 mg dawkami DHEA i EM-800, masę pochwy zmierzono otrzymując odpowiednio 22 ± 1 mg, 25 ± 2 mg i 23 ± 1 mg (N. S. dla wszystkich grup względem 15 μ g EM-800). Należy zauważyć, że przy najwyższej użytej dawce, 100 μ g dziennie, EM-800 zmniejszył masę macicy w traktowanych estronem zwierzętach OVX do wartości nie różnej od wartości dla kontrolnych OVX, podczas gdy masa pochwy zmniejszyła się do wartości poniżej zmierzonej dla kontrolnych zwierząt OVX ($P < 0,05$). DHEA, zapewne wskutek jego androgennego wpływu, częściowo zwałczał wpływ EM-800 na masę macicy i pochwy.

T a b l i c a 4

Wpływ przezskórnego podawania DHEA lub doustnego podawania EM-800 samych lub w kombinacji przez 9,5 miesiąca na odpowiedzi (pełną, częściową, trwałą i progresję) hetero-przeszczepów ludzkich guzów piersi ZR-75-1 u nągich myszy

Grupa	Łączna liczba zwierząt	Kategoria odpowiedzi			
		Pełna	Częściowa	Trwała	Progresja
		Liczba i %			
OVX	16	11 (68,8)	1 (6,2)	3 (18,8)	1 (6,2)
OVX + E ₁ (0,5 μ g)	16	0 (0)	0 (0)	2 (12,5)	14 (87,5)
OVX + E ₁ (0,5 μ g) + DHEA	0,3 mg	4 (28,6)	0 (0)	3 (21,4)	7 (50,0)
	1,0 mg	4 (26,7)	0 (0)	3 (20,0)	8 (53,3)
	3,0 mg	3 (20,0)	0 (0)	2 (13,3)	10 (66,7)
OVX + E ₁ (0,5 μ g) + EM-800	15 mg	5 (29,4)	1 (5,9)	5 (29,4)	6 (35,3)
	50 mg	4 (25,0)	3 (18,8)	5 (31,2)	4 (25,0)
	100 mg	8 (50,0)	0 (0)	3 (18,8)	5 (31,2)
OVX + E ₁ (0,5 μ g) + EM-800 + DHEA	0,3 mg	6 (33,3)	0 (0)	4 (22,2)	8 (44,4)
	1,0 mg	4 (26,7)	0 (0)	3 (20,0)	8 (53,3)
	3,0 mg	6 (35,3)	0 (0)	8 (47,1)	3 (17,6)

E₁ = estron; DHEA = dehydroepiandrosteron; OVX = z wyciętymi jajnikami

Przykład 3 Zwierzęta i terapia

Użyto samic szczurów Sprague-Dawley w wieku 50 do 60 dni (CrI:CD(SD)Br) (Charles River Laboratory, St-Constant, Canada) ważących około 190 g w okresie wycięcia jajników. Zwierzęta przyzwyczajono do warunków środowiska (temperatura: $22 \pm 3^\circ\text{C}$; wilgotność: $50 \pm 20\%$; cykle 12 godzin światła - 12 godzin nocy, włączanie światła o 07:15) przez 1 tydzień przed zabiegiem. Zwierzęta trzymano po trzy na klatkę i miały one swobodny dostęp do wody z kranu i granulowanej certyfikowanej karmy dla gryzoni (Lab Diet 5002, Ralston Purina, St-Louis, MO). Eksperyment prowadzono w pomieszczeniu dopuszczonym przez Canadian Council on Animal Care zgodnie z CCAC Guide for Care and Use of Experimental Animals.

Wycięto jajniki 136 samicom szczurów pod znieczuleniem izofluranem w dniu 0 badania i podzielono je przypadkowo na 17 grup zwierząt dla przeprowadzenia badań wyjaśnionych poniżej:

- Grupa 1: OVX Kontrolne
- Grupa 2: OVX + EM-800 (0,01 mg/kg, doustnie, ID)
- Grupa 3: OVX + EM-800 (0,03 mg/kg, doustnie, ID)
- Grupa 4: OVX + EM-800 (0,1 mg/kg, doustnie, ID)
- Grupa 5: OVX + EM-800 (0,3 mg/kg, doustnie, ID)
- Grupa 6: OVX + EM-800 (1 mg/kg, doustnie, ID)
- Grupa 7: OVX + EM-01538 (0,01 mg/kg, doustnie, ID)
- Grupa 8: OVX + EM-01538 (0,03 mg/kg, doustnie, ID)

- Grupa 9: OVX + EM-01538 (0,1 mg/kg, doustnie, ID)
Grupa 10: OVX + EM-01538 (0,3 mg/kg, doustnie, ID)
Grupa 11: OVX + EM-01538 (1 mg/kg, doustnie, ID)
Grupa 12: OVX + Raloxifene EM-1105 (0,01 mg/kg, doustnie, ID)
Grupa 13: OVX + Raloxifene EM-1105 (0,03 mg/kg, doustnie, ID)
Grupa 14: OVX + Raloxifene EM-1105 (0,1 mg/kg, doustnie, ID)
Grupa 15: OVX + Raloxifene EM-1105 (0,3 mg/kg, doustnie, ID)
Grupa 16: OVX + Raloxifene EM-1105 (1 mg/kg, doustnie, ID)
Grupa 17: INT Kontrolne

Podawanie leków rozpoczęto w dniu 10 badania i podawano doustnie zgłębnikiem raz dziennie do dnia 13 badania.

Dawkowane zawiesiny wytworzono w 0,4% mtylocelulozie i stężenie ustawiono odpowiednio do średniej masy ciała grupy zanotowanej w dniu 10 badania w celu wytworzenia 0,5 ml dawkowanej zawiesiny na szczura.

Około 24 godziny po ostatnim dawkowaniu, wyposzczone przez noc zwierzęta zabito przez wykrwawienie z tętnicy brzusznej pod znieczuleniem izofluranem i próbki krwi przetworzono dla wytworzenia osocza. Macice usunięto, oczyszczono z pozostałego tłuszczu i zważono.

Test cholesterolu i triglicerydów w osoczu

Łączne poziomy cholesterolu i triglicerydów w osoczu określono stosując Boehringer Mannheim Diagnostic Laboratory Systems.

P r z y k ł a d 4

Androsteno-3 β ,17 β -diol (5-diol) wykazuje wewnętrzną aktywność estrogeną. Ponadto, jako prekursor sterydów płciowych, może być przekształcony w aktywne androgeny i/lub inne estrogeny w obwodowych wydzielniczych tkankach.

W celu przetestowania względnej ważności androgennych i estrogennych składników działania 5-diolu na masę kości, 21-tygodniowym szczurom wycięto jajniki i traktowano przezskórnie raz dziennie 2, 5 lub 12,5 mg 5-diolu samego lub w kombinacji z anty-androgenem Flutamid (FLU, 10 mg podskórnie, raz dziennie) i/lub antyestrogenem EM-800 (100 μ g, podskórnie, raz dziennie) przez 12 miesięcy.

Gęstość mineralną kości (BMD) zmierzono po 11 miesiącach terapii. Wypięcie jajników (OVX) doprowadziło do 12,8% spadku w udowym BMD ($p < 0,01$), podczas gdy terapia najwyższą dawką 5-diolu odtworzyła 34,3% udowego BMD utraconego podczas 11 miesięcy po OVX ($p < 0,01$).

Jednoczesne podawanie FLU całkowicie zapobiegło wpływowi stymulującemu 5-diolu na udowe BMD, podczas gdy dodanie EM-800 spowodowało dodatkową 28,4% stymulację w porównaniu z wpływem samego 5-diolu. Równoczesne podawanie 5-diolu, FLU i EM-800 tylko wykazało wpływ EM-800 (27%), ponieważ wpływ 5-diolu został całkowicie zablokowany przez FLU.

Porównywalne wyniki otrzymano dla BMD kręgów lędźwiowych, chociaż BMD kręgów lędźwiowych u szczurów OVX otrzymujących 12,5 mg samego 5-diolu, 12,5 mg 5-diolu + EM-800 lub 5-diol + FLU + EM-800 powróciła do wartości nie różniących się znacząco od tych dla nietkniętych zwierząt. Histomorfometryczna analiza pokazuje, że wpływy stymulujące 5-diolu na objętość kości, liczbę beleczek i działanie hamujące na oddzielanie beleczek we wtórnej gąbczastości obszaru bliskiej przynasady piszczeli są hamowane przez FLU, lecz z kolei wzmagane przez EM-800.

Znacząca stymulacja poziomu aktywności w osoczu zasadowej fosfatazy uzyskana po terapii 5-diolem wynosi 57% ($p < 0,01$ wobec 12,5 mg samego 5-diolu) i jest odwracana równoczesnym podawaniem FLU. Terapia 5-diolem nie miała statystycznie znaczącego działania hamującego na stosunek wapnia do kreatyniny w moczu. Najwyższa dawka 5-diolu powodowała znaczące 23% ($p < 0,01$) zmniejszenie ilości cholesterolu w osoczu, podczas gdy dodanie EM-800 zmniejszyło ilość cholesterolu w osoczu o 62% ($p < 0,01$). Niniejsze dane wyraźnie pokazują wpływ stymulujący 5-diolu na tworzenie kości i sugerują, że chociaż 5-diol jest słabym estrogenem, jego wpływ stymulujący na tworzenie kości jest głównie mediowany efektem androgennym. Ponadto, dodatkowe wpływy stymulujące EM-800 i 5-diolu na masę kości pokazują oszczędzający kości wpływ antyestrogenu EM-800 u szczura. Aktywność obniżania poziomu cholesterolu 5-diolu i EM-800 może mieć interesujące zastosowanie przy zapobieganiu chorobom sercowo-naczyniowym.

Przykład 5

Grupa	Zasadowa fosfataza w osoczu	OH-prolina /kreatynina w moczu	LH	Poziomy mRNA GnRH	Cholesterol	Triglicerydy
	IU/l	μmol/mmol	ng/ml	ziarn srebra na komórkę	mmol/l	mmol/l
Nietknięta kontrola	30 ± 3**	15,4 ± 1,3	0,09 ± 0,03**	33,7 ± 0,7**	2,28 ± 0,12	1,4 ± 0,2
Kontrola OVX	51 ± 4	11,7 ± 1,2	3,55 ± 0,50	44,0 ± 0,9	2,29 ± 0,16	1,1 ± 0,1
OVX + MPA	57 ± 4	11,7 ± 1,2	2,51 ± 0,20*	35,5 ± 0,7**	2,55 ± 0,14	1,3 ± 0,1
OVX + E ₂	41 ± 5	9,2 ± 0,9	2,37 ± 0,45*	40,4 ± 0,8**	2,02 ± 0,15	0,8 ± 0,1
OVX + DHT	56 ± 5	7,8 ± 0,7*	1,55 ± 0,27**	38,8 ± 0,7**	2,44 ± 0,16	0,9 ± 0,1
OVX + DHEA	201 ± 25**	7,3 ± 1,0*	0,02 ± 0,01**	34,5 ± 0,7**	1,78 ± 0,16*	0,8 ± 0,1
OVX + DHEA + FLU	103 ± 10**	14,5 ± 1,2	1,13 ± 0,24**	41,5 ± 0,7*	2,27 ± 0,15	0,8 ± 0,1
OVX + DHEA + EM-800	202 ± 17**	6,4 ± 1,0**	LD**	39,2 ± 0,7**	0,63 ± 0,09**	1,0 ± 0,2

LD: Granice wykrywalności: 0,01 ng/ml

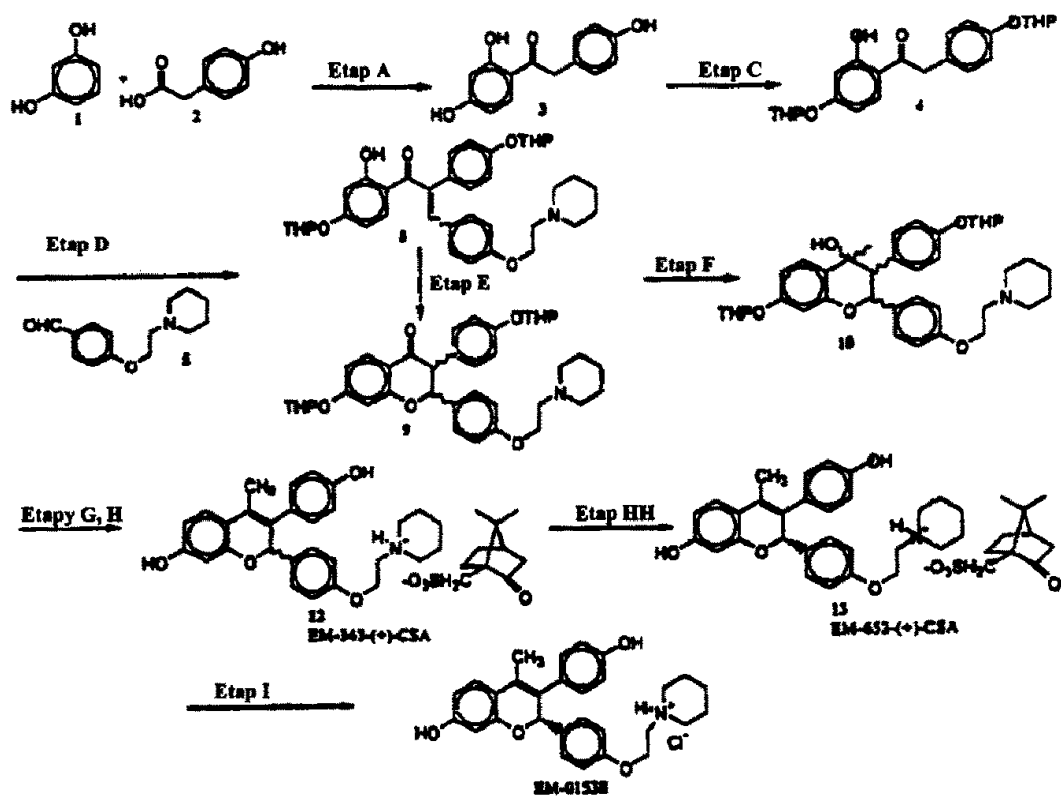
* p < 0,05; ** p < 0,01 względem kontroli OVX

Przykład 6

Przykład syntezy korzystnego związku według wynalazku

Synteza chlorowodorku (S)-(+)-7-hydroksy-3-(4'-hydroksyfenylo)-4-metylo-2-(4''-(2'''-piperydino-etoksyfenylo)-2H-1-benzopirano, EM-01538 (EM-652, HCl)

Schemat 1



Etap A: $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, toluen; 100°C ; 1 godzina.

Etap C: 3,4-dihydropiran, monohydrat kwasu p-toluenosulfonowego, octan etylu; 25°C pod azotem, 16 godzin, a następnie krystalizacja w izopropanolu.

Etapy D, E i F:

(1) piperydyna, toluen, aparat Deana i Starka, refluks pod azotem;

(2) 1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en, DMF, refluks 3 godziny;

(3) CH_3MgCl , THF, -20 do 0°C i następnie temperatura pokojowa przez 24 godziny;

Etapy G, H: Kwas (1S)-(+)-10-kamforosulfonowy, aceton, woda, toluen, temperatura pokojowa, 48 godzin.

Etap HH: 95% etanol, 70°C , następnie temperatura pokojowa 3 dni.

Etap HHR: Zawracanie cieczy macierzystej i przemywanie z etapu HH.

Kwas (1S)-10-kamforosulfonowy, refluks; 36 godzin, następnie temperatura pokojowa przez 16 godzin.

Etap I:

(1) Wodny roztwór DMF, Na_2CO_3 , octan etylu;

(2) etanol, rozcieńczony HCl;

(3) woda.

Synteza 2-tetrahydropiranyloksyhydroksy-2'-(4"-tetrahydropiranyloksyfenylo)acetofenonu (4)

Zawiesinę 2,4-dihydroksy-2'-(4"-hydroksyfenylo)acetofenonu 3 (97,6 g, 0,4 mol) (dostępny z Chemsyn Science Laboratories, Lenexa, Kansas) w 3,4-dihydropiranie (218 ml, 3,39 mol) i octanu etylu (520 ml) potraktowano monohydratem kwasu p-toluenosulfonowego (0,03 g, 0,158 mmol) w temperaturze około 25°C . Mieszaninę reakcyjną mieszano pod azotem bez zewnętrznego ogrzewania przez około 16 godzin. Mieszaninę przemyto następnie roztworem wodorowęglanu sodu (1 g) i chlorku sodu (5 g) w wodzie (100 ml). Fazy oddzielono i fazę organiczną przemyto solanką (20 ml). Każde połączenie ekstrahowano ponownie 50 ml octanu etylu. Wszystkie fazy organiczne połączono i przesączono przez siarczan sodu.

Rozpuszczalnik (około 600 ml) usunięto przez destylację pod ciśnieniem atmosferycznym i dodano izopropanol (250 ml). Dodatkowy rozpuszczalnik (około 300 ml) destylowano pod ciśnieniem atmosferycznym i dodano izopropanol (250 ml). Dodatkowy rozpuszczalnik (około 275 ml) destylowano pod ciśnieniem atmosferycznym i dodano izopropanol (250 ml). Roztwór ochłodzono w temperaturze około 25°C z mieszaniem i po około 12 godzinach krystaliczne ciało stałe przesączono, przemyto izopropanolem i osuszono (116,5 g, 70%).

Synteza 4-hydroksy-4-metylo-2-(4'-[2"-piperydino]etoksy)fenylo-3-(4'''-tetrahydropiranyloksy)fenylo-7-tetrahydropiranyloksychromanu (10)

Roztwór 2-tetrahydropiranyloksy-4-hydroksy-2'-(4"-tetrahydropiranyloksyfenylo)acetofenonu 4 (1 kg, 2,42 mol), 4-[2-(1-piperydino)etoksy]benzaldehydu 5 (594 g, 2,55 mol) (dostępny z Chemsyn Science Laboratories, Lenexa, Kansas) i piperydynę (82,4 g, 0,97 mol) (dostępny z Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, Wis.) w toluenie (8 l) poddawano refluksowi pod azotem z aparatem Deana i Starka do zebrania jednego równoważnika wody (44 ml).

Toluen (6,5 l) usunięto z roztworu przez destylację pod ciśnieniem atmosferycznym. Dodano dimetyloformamid (6,5 l) i 1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en (110,5 g, 0,726 mol). Roztwór mieszano przez około 8 godzin w temperaturze pokojowej do izomeryzacji chalkonu 8 do chromanonu 9 i następnie dodano do mieszaniny wody z lodem (8 l) i tolueniem (4 l). Fazy oddzielono i warstwę toluenową przemyto wodą (5 l). Połączone wodne połączenia ekstrahowano tolueniem (3 x 4 l). Połączone ekstrakty toluenowe przemyto na koniec solanką (3 x 4 l), zatężono pod ciśnieniem atmosferycznym do 5,5 l i następnie ochłodzono do -10°C .

Przy ciągłym zewnętrznym chłodzeniu i mieszaniu pod azotem dodano 3M roztwór chlorku metylomagnezu w THF (2,5 l, 7,5 mol) (dostępny z Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, Wis.), utrzymując temperaturę poniżej 0°C . Po dodaniu całości reagentu Grignarda zewnętrzne chłodzenie usunięto i mieszaninę pozostawiono do ogrzania do temperatury pokojowej. Mieszaninę mieszano w tej temperaturze przez około 24 godziny.

Mieszaninę ponownie ochłodzono do około -20°C i przy ciągłym zewnętrznym chłodzeniu i mieszaniu dodano powoli nasycony roztwór chlorku amonu (200 ml), utrzymując temperaturę poniżej 20°C . Mieszaninę mieszano przez 2 godziny i następnie dodano nasycony roztwór chlorku amonu (2 l) i toluen (4 l) i mieszano przez 5 minut. Fazy oddzielono i warstwę wodną ekstrahowano tolueniem (2 x 4 l). Połączone toluenowe ekstrakty przemyto rozcieńczonym kwasem chlorowodorowym, aż roztwór

stał się jednorodny i następnie solanką (3 x 4 l). Roztwór toluenowy zatężono na koniec pod ciśnieniem atmosferycznym do 2 l. Ten roztwór użyto bezpośrednio w następnym etapie.

Synteza soli kwasu (1S)-10-kamforosulfonowego (2R,S)-7-hydroksy-3-(4'-hydroksyfenylo)-4-metylo-2-(4"-[2"-piperydino]etoksy)fenylo)-2H-1-benzopirany (± 12)

Do roztworu toluenowego 4-hydroksy-4-metylo-2-(4'-[2"-piperydino]etoksy)fenylo-3-(4"-tetrahydropiranyloksy)fenylo-7-tetrahydropiranyloksychromanu (10) dodano aceton (6 l), wodę (0,3 l) i kwas (S)-10-kamforosulfonowy (561 g, 2,42 mol) (dostępny z Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, Wis.). Mieszaninę mieszano pod azotem przez 48 godzin, po czym stałą sól kwasu (1S)-10-kamforosulfonowego (2R,S)-7-hydroksy-3-(4'-hydroksyfenylo)-4-metylo-2-(4"-[2"-piperydino]etoksy)fenylo)-2H-1-benzopirany (12) przesączono, przemyto acetonem i osuszono (883 g). Tej substancji użyto w następnym (HH) etapie bez dalszego oczyszczania.

Synteza soli kwasu (1S)-10-kamforosulfonowego (2S)-7-hydroksy-3-(4'-hydroksyfenylo)-4-metylo-2-(4"-[2"-piperydino]etoksy)fenylo)-2H-1-benzopirany (13, sól (+)-EM-652(1S)-CSA)

Zawiesinę soli kwasu (1S)-10-kamforosulfonowego (2R,S)-7-hydroksy-3-(4'-hydroksyfenylo)-4-metylo-2-(4"-[2"-piperydino]etoksy)fenylo)-2H-benzopirany 12 (759 g) w 95% etanolu ogrzewano z mieszaniem do około 70°C, aż ciało stałe rozpuściło się. Roztwór pozostawiono do ochłodzenia do temperatury pokojowej z mieszaniem, następnie zaszczerpiono kilkoma kryształami soli kwasu (1S)-10-kamforosulfonowego (2S)-7-hydroksy-3-(4'-hydroksyfenylo)-4-metylo-2-(4"-fenylo)-2H-1-benzopirany 13. Roztwór mieszano w temperaturze pokojowej przez około trzy dni łącznie. Kryształy przesączono, przemyto 95% etanolem i osuszono (291 g, 76%). Wydajność produktu wynosiła 94,2% i czystość 98,8%.

Synteza chlorowodoru (S)-(+)-7-hydroksy-3-(4'-hydroksyfenylo)-4-metylo-2-(4"-[2"-piperydino]etoksy)fenylo)-2H-1-benzopirany, EM-01538 (EM-652, HCl)

Zawiesinę związku 13 (sól EM-652-(+)-CSA, 500 mg, 0,726 mmol) w dimetyloformamidzie (11 μ l, 0,15 mmol) potraktowano 0,5 M wodnym roztworem węgla sodu (7,0 ml, 3,6 mmol) i mieszano przez 15 minut. Zawiesinę potraktowano octanem etylu (7,0 ml) i mieszano przez 4 godziny. Fazę organiczną przemyto wodnym nasyconym roztworem węgla sodu (2 x 5 ml) i solanką (1 x 5 ml), osuszono nad siarczanem magnezu i zatężono. Roztwór powstałej różowej piany (EM-652) w etanolu (2 ml) potraktowano 2N kwasem chlorowodorowym (400 μ l, 0,80 mmol), mieszano przez 1 godzinę, potraktowano destylowaną wodą (5 ml) i mieszano przez 30 minut. Powstałą zawiesinę przesączono, przemyto wodą destylowaną (5 ml), osuszono na powietrzu i pod silnie zmniejszonym ciśnieniem (65°C) z wytworzeniem 77%); drobny białawy proszek; kalorymetria skaningowa: początek pikowania w temperaturze 219°C, $\Delta H = 83$ J/g; $[\alpha]_D^{24} = 154^\circ$ w metanolu 10 mg/ml.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 1,6 (szerokie, 2H, H-4"), 1,85 (szerokie, 4H, H-3" i 5"), 2,03 (s, 3H, CH_3), 3,0 i 3,45 (szerokie, 4H, H-2" i 6"), 3,47 (t, $J = 4,9$ Hz, 2H, H-3"), 4,26 (t, $J = 4,9$ Hz, 2H, H-2"), 5,82 (s, 1H, H-2), 6,10 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, H-8), 6,35 (dd, $J = 8,4, 2,43$ Hz, 1H, H-6), 6,70 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, H-3' i H-5'), 6,83 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H-3" i H-5"), 7,01 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-2' i H-6'), 7,12 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, H-5), 7,24 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, H-2" i H-6");

$^{13}\text{C RMN}$ (CD_3OD , 75 MHz) δ ppm 14,84, 22,50, 23,99, 54,78, 57,02 109,11, 115,35, 116,01, 118,68, 130,72, 131,29, 131,59, 134,26, 154,42, 157,56, 158,96, 159,33.

Skład elementarny: C, H, N, Cl: teoretycznie; 70,51, 6,53, 2,84, 7,18%, znalezione: 70,31, 6,75, 2,65, 6,89%.

P r z y k ł a d 7

Testy *in vivo* biodostępności przedleków androst-5-eno-3 β ,17 β -diolu

1) Zasada

Testy biodostępności przedleków płciowych przeprowadzono na samcach mierząc stężenia w osoczu związków podawaniu związków.

a) Zwierzęta i terapia

Samce szczurów Sprague-Dawley [CrI:CD(SD)Br] ważące 275-350 g otrzymano z Charles-River Canada Inc. i trzymano po 2 na klatkę podczas okresu przyzwyczajania i indywidualnie podczas okresu badań. Zwierzęta trzymano w reżimie 12 godzin oświetlenia: 12 godzin ciemności (zapalenie światła o 08:00). Zwierzęta otrzymywały certyfikowany pokarm dla gryzoni (Lab Diet # 5002, granulki) i wodę z kranu w dowolnej ilości. Szczury wyposzczono (dostęp tylko do wody) rozpoczynając od wieczora przed dawkowaniem.

Każdy związek testowany podawano trzem zwierzętom jako zawiesinę w 0,4% metylocelulozie z gębnikiem doustnym przy dawce 150 µg/szczura. Jedną próbkę krwi ~0,7 ml pobrano z żyły szyjnej szczurów pod znieczuleniem indukowanym Izofluranem w 1, 2, 3, 4 i 7 godzin po stosowaniu gębnika. próbki krwi natychmiast przeniesiono do ochłodzonego pojemnika 0,75 ml Microtainer zawierającego EDTA i trzymano w łaźni z wodą z lodem do odwirowania przy 3000 obrotach na minutę przez 10 minut.

Oddzielanie osocza przeprowadzono szybko (mniej niż 50 minut) po zebraniu krwi. Jedną próbkę 0,25 ml osocza przeniesiono następnie do borokrzemianowej probówki (13 x 100) i szybko zamrożono na suchym lodzie.

Próbki osocza trzymano w temperaturze -80°C aż do pomiaru stężenia w osoczu sterydów płciowych lub prekursorów sterydów płciowych metodą GC-MS.

Wyniki

Doustną absorpcję i AUC pokazano na fig. 12 i 13.

Przykłady kompozycji farmaceutycznej

Poniżej, przykładowo przedstawiono kilka kompozycji farmaceutycznych wykorzystujących korzystny czynny SERM EM-800 lub EM-1538 i korzystny czynny prekursor sterydu płciowego DHEA, EM-1304 lub EM-01474-D. Inne związki lub ich kombinacje można stosować w miejsce (lub poza) EM-800 lub EM-1538, DHEA, EM-1304 lub EM-01474-D. Stężenie składnika czynnego można zmieniać w szerokim zakresie, jak przedstawiono tutaj. Ilości i typy innych składników, które można dołączać, są dobrze znane w dziedzinie.

Przykład A

Tabletka

Składnik	% wagowych (względem masy całej kompozycji)
EM-800	5,0
DHEA	15,0
Żelatyny	5,0
Laktoza	58,5
Skrobia	16,5

Przykład B

Kapsułka żelatynowa

Składnik	% wagowych (względem masy całej kompozycji)
EM-800	5,0
DHEA	15,0
Uwodniona laktoza	65,0
Skrobia	4,8
Celuloza mikrokrystaliczna	9,8
Stearynian magnezu	0,4

Przykłady zestawów

Poniżej, przykładowo przedstawiono kilka zestawów wykorzystujących korzystny czynny SERM EM-800 lub EM-1538 i korzystny czynny prekursor sterydu płciowego DHEA, EM-1304 lub EM-01474-D. Inne związki lub ich kombinacje można stosować w miejsce (lub poza) EM-800 lub EM-1538, DHEA, EM-1304 lub EM-01474-D. Stężenie składnika czynnego można zmieniać w szerokim zakresie, jak przedstawiono tutaj. Ilości i typy innych składników, które można dołączać, są dobrze znane w dziedzinie.

Przykład A

SERM jest podawany doustnie, a prekursor sterydu płciowego jest podawany przezskórnie.

Kompozycja SERM do doustnego podawania (kapsułki)

Składnik	% wagowych (względem masy całej kompozycji)
EM-800	5,0
Uwodniona laktoza	80,0
Skrobia	4,8
Celuloza mikrokrystaliczna	9,8
Stearynian magnezu	0,4

Kompozycja prekursora steroidu płciowego do miejscowego podawania (żel)

Składnik	% wagowych (względem masy całej kompozycji)
DHEA	10,0
Kaprylowy-kaprynowy trigliceryd (Neobee M-5)	5,0
Glikol heksylenowy	15,0
Transcutol (eter monometylowy glikolu dietylenowego)	5,0
Alkohol benzylowy	2,0
Cyklometrykon (Dow Corning 345)	5,0
Etanol (absolutny)	56,0
Hydroksypropyloceluloza (1500 cps) (KLUCEL)	2,0

Przykład B
SERM i prekursor steroidu płciowego są podawane doustnie.

Niesterydowa antyestrogenowa kompozycja do doustnego podawania (kapsułki)

Składnik	% wagowych (względem masy całej kompozycji)
EM-800	5,0
Uwodniona laktoza	80,0
Skrobia	4,8
Celuloza mikrokrystaliczna	9,8
Stearynian magnezu	0,4

Kompozycja prekursora steroidu płciowego do doustnego podawania (kapsułka żelatynowa)

Składnik	% wagowych (względem masy całej kompozycji)
1	2
DHEA	15,0
Uwodniona laktoza	70,0

cd. tabeli

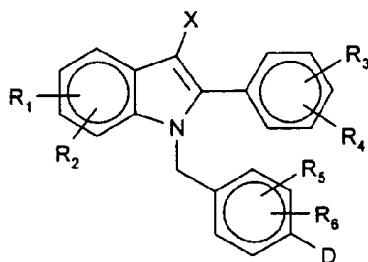
1	2
Skrobia	4,8
Celuloza mikrokrystaliczna	9,8
Stearynian magnezu	0,4

Inne SERM można podstawić za EM-800 lub EM-01538 w powyższych kompozycjach, jak też inne inhibitory sterydów płciowych można podstawić za DHEA, EM-1304 lub EM-01474-D. Można dołączać więcej niż jeden SERM lub więcej niż jeden prekursor, w którym to przypadku połączony procent wagowy jest korzystnie procentem wagowym dla pojedynczego prekursora lub pojedynczego SERM podanego w przykładach powyżej.

Zastrzeżenia patentowe

1. Kompozycja farmaceutyczna zawierająca dehydroepiandrosteron, selektywny modulator receptora estrogenu i farmaceutycznie dopuszczalną zaróbkę, **znamienna tym**, że zawiera

- farmaceutycznie dopuszczalną zaróbkę, rozcieńczalnik lub nośnik;
- lecniczo skuteczną ilość dehydroepiandrosteronu,
- lecniczo skuteczną ilość pochodnej indolu o wzorze ogólnym

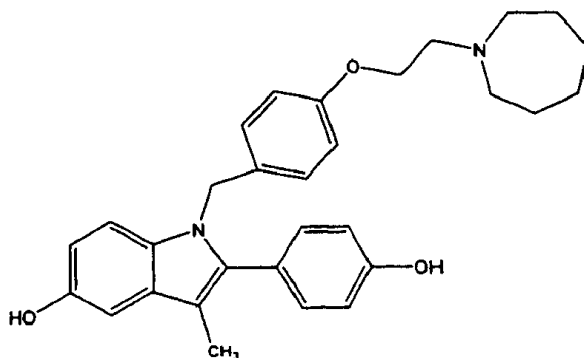


w którym D wybiera się z grupy obejmującej $-OCH_2CH_2N(R_7)R_8$, $-CH=CH-CON(R_7)R_8$, $-CC-(CH_2)_n-(R_7)R_8$, R_7 i R_8 niezależnie wybrane z grupy obejmującej C_1-C_6 alkil lub R_7 , R_8 i atom azotu, z którym są związane, razem tworzą strukturę pierścieniową wybraną z grupy obejmującej piperidyno, dimetylo-1-piperidyno, metylo-1-piperidynyl, piperidyno, heksametylenoimino i morfolino;

w którym X wybiera się z grupy obejmującej: atom wodoru i C_1-C_6 alkil;

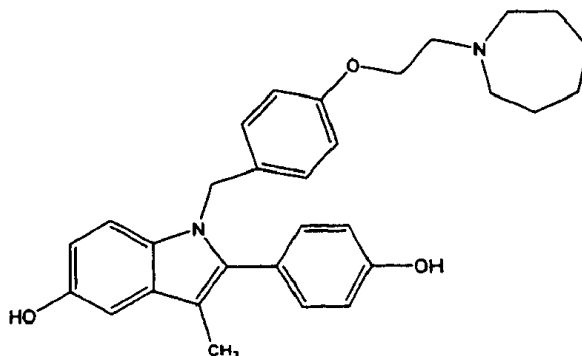
w którym R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 i R_6 wybiera się niezależnie z grupy obejmującej: atom wodoru, hydroksyl, C_1-C_6 alkil i ugrupowanie przekształcane *in vivo* w hydroksyl.

2. Kompozycja farmaceutyczna według zastrz. 1, **znamienna tym**, że jako pochodną indolową zawiera związek o następującym wzorze:



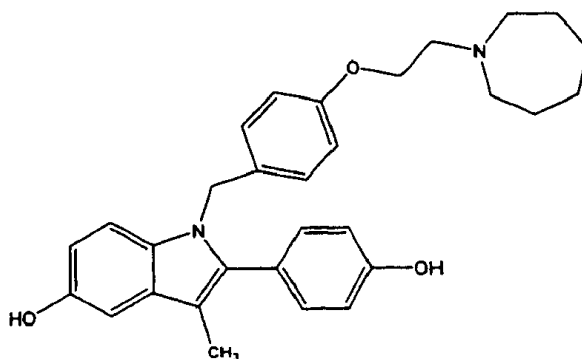
3. Zestaw, **znamienny tym**, że pierwszy pojemnik zawiera leczniczo skuteczną ilość dehydroepiandrosteronu i obejmujący drugi pojemnik zawierający leczniczo skuteczną ilość pochodnej indolowej, jak określono w zastrz. 1.

4. Zestaw według zastrz. 3, **znamienny tym**, że jako pochodną indolową zawiera związek o następującym wzorze:



5. Zastosowanie dehydroepiandrosteronu do wytwarzania leku do leczenia lub zmniejszania ryzyka nabycia osteoporozy, w połączeniu z leczniczo skuteczną ilością pochodnej indolowej, jak określono w zastrz. 1

6. Zastosowanie według zastrz. 5, **znamiennie tym**, że jako pochodną indolową stosuje się związek o następującym wzorze:



Rysunki

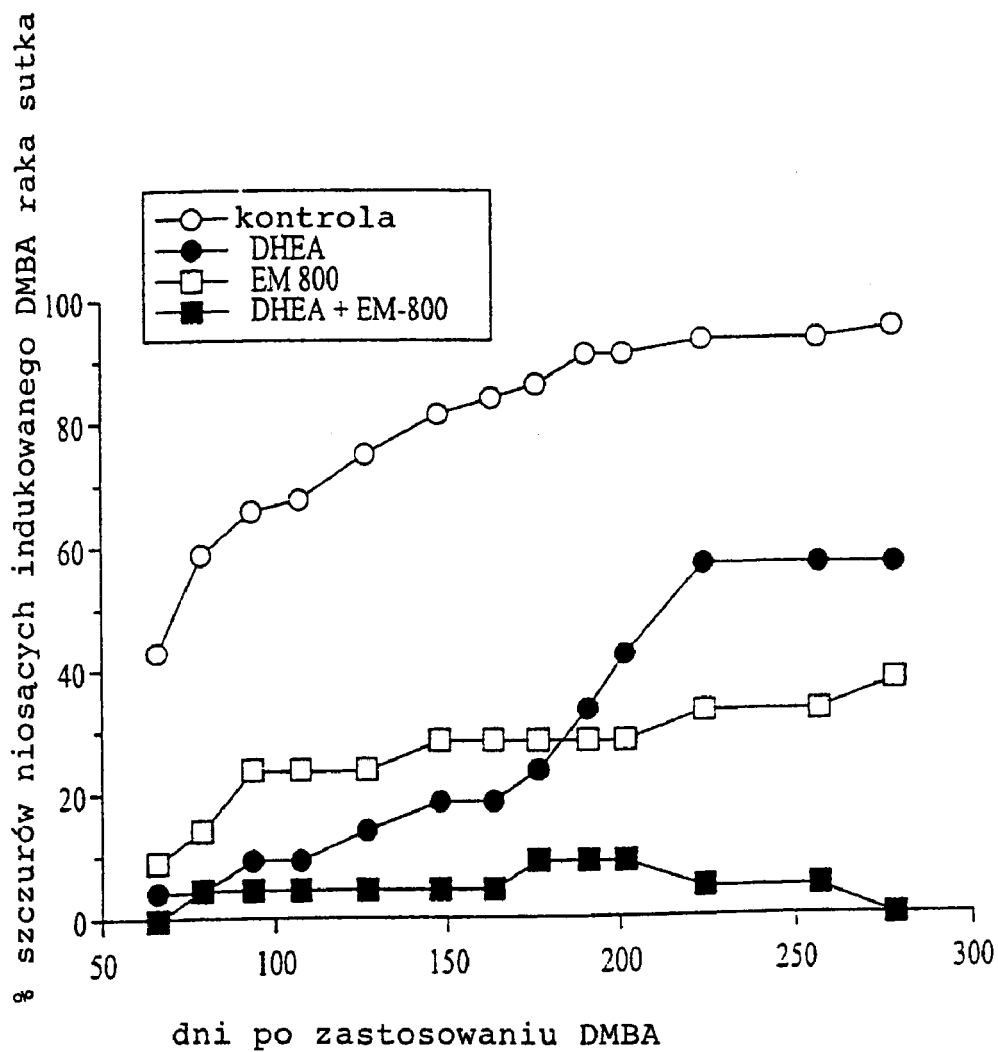


FIG. 1

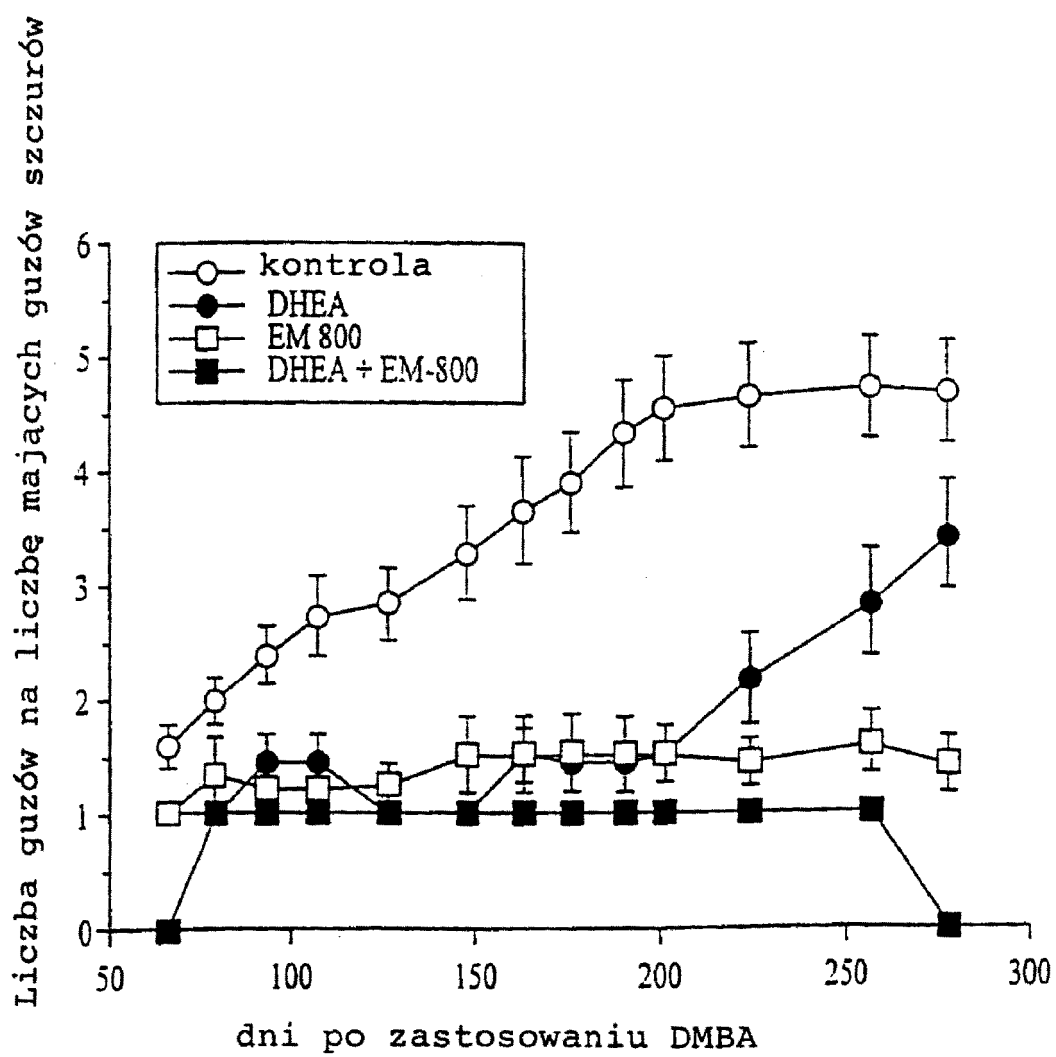


FIG. 2A

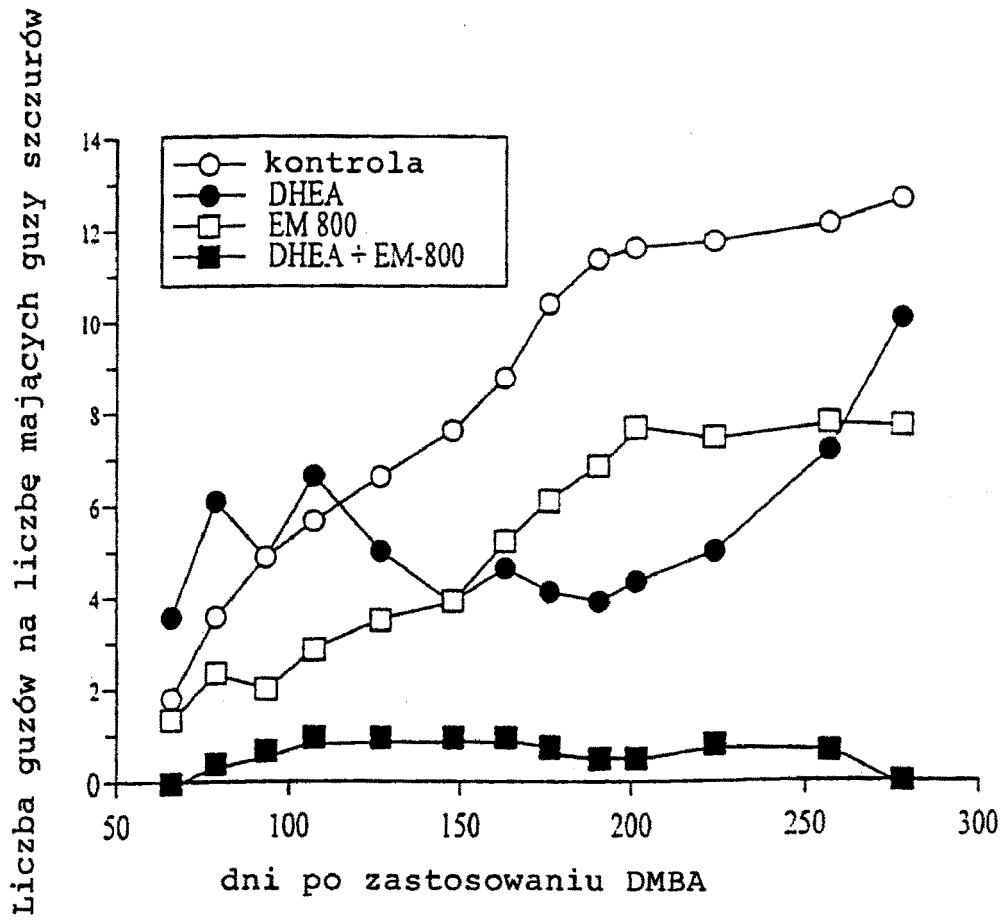


FIG. 2B

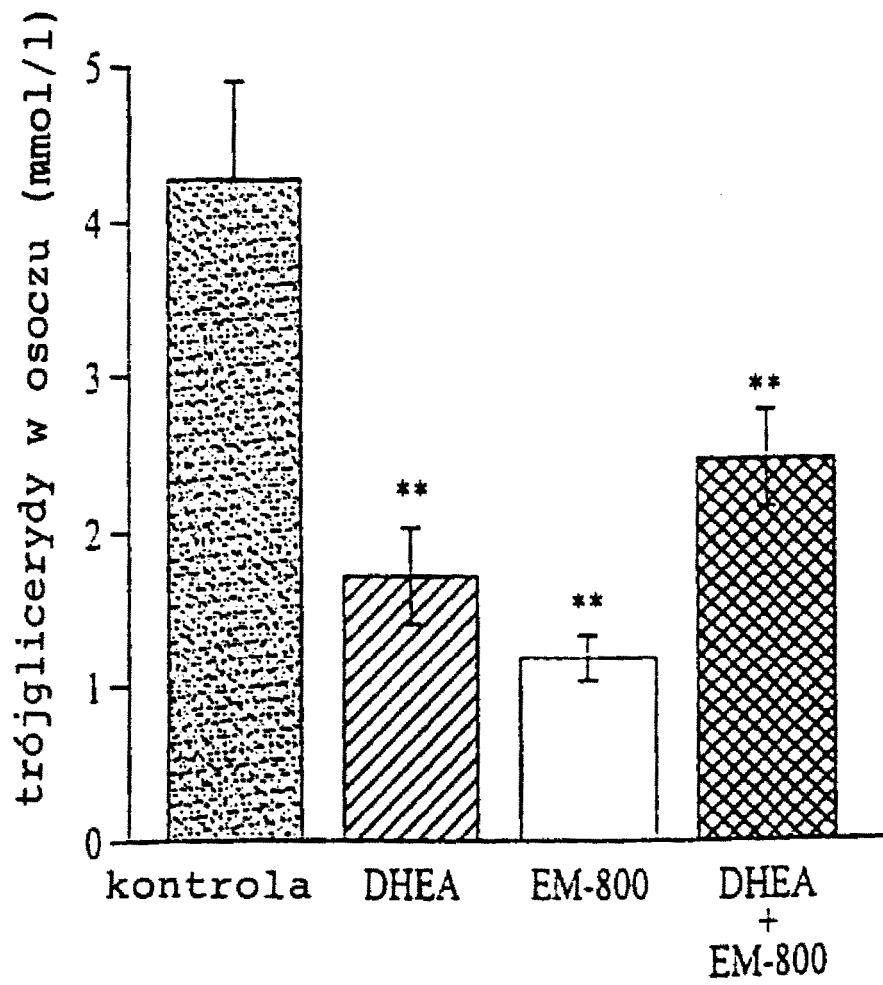


FIG. 3A

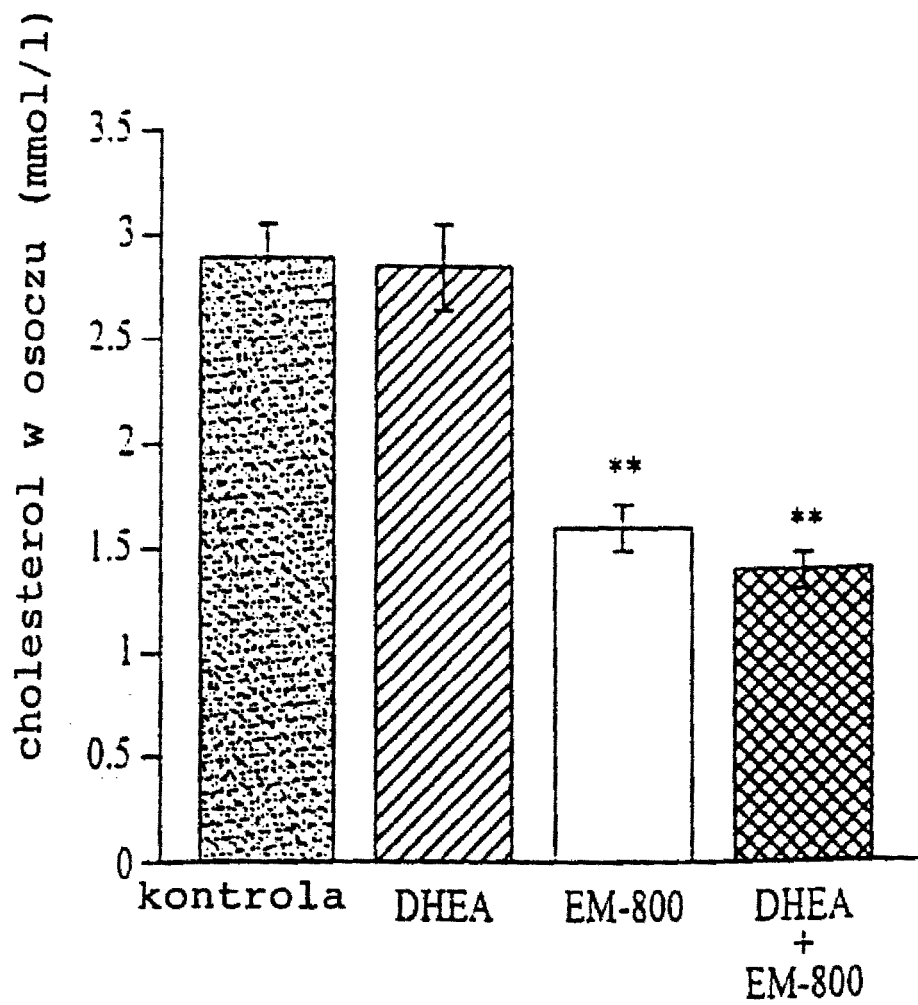


FIG. 3B

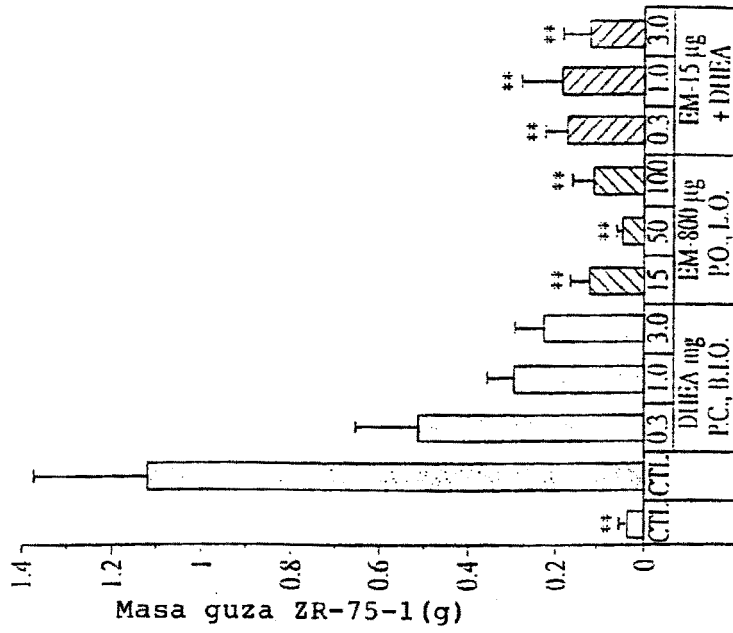


FIG. 4B

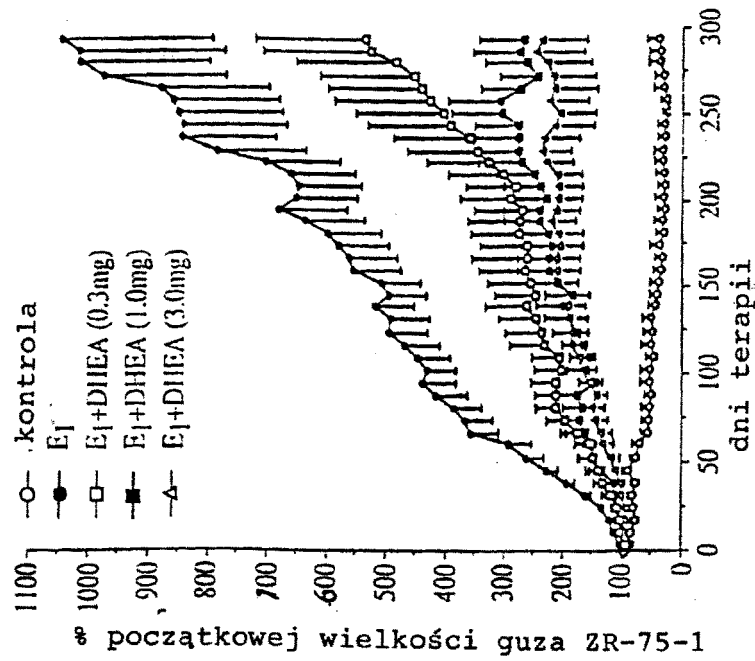


FIG. 4A

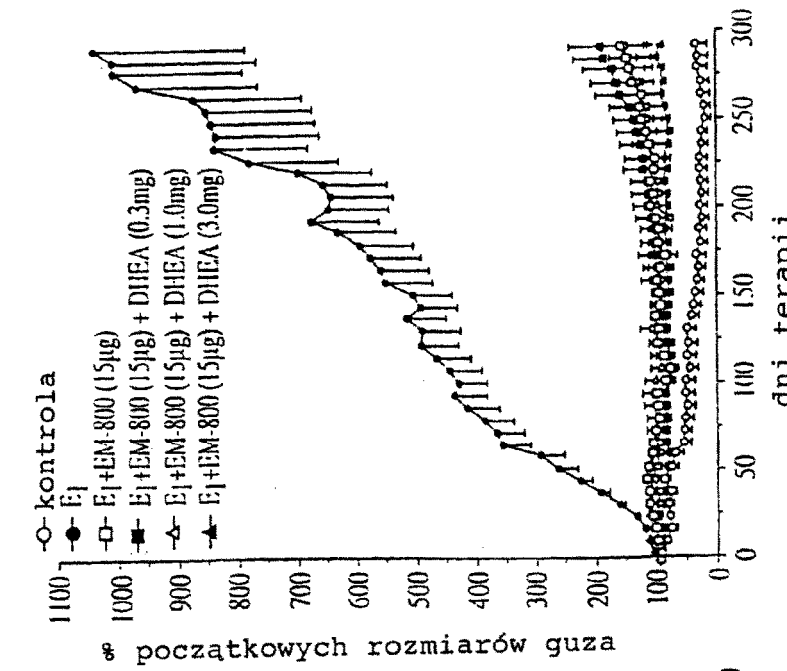


FIG. 5B

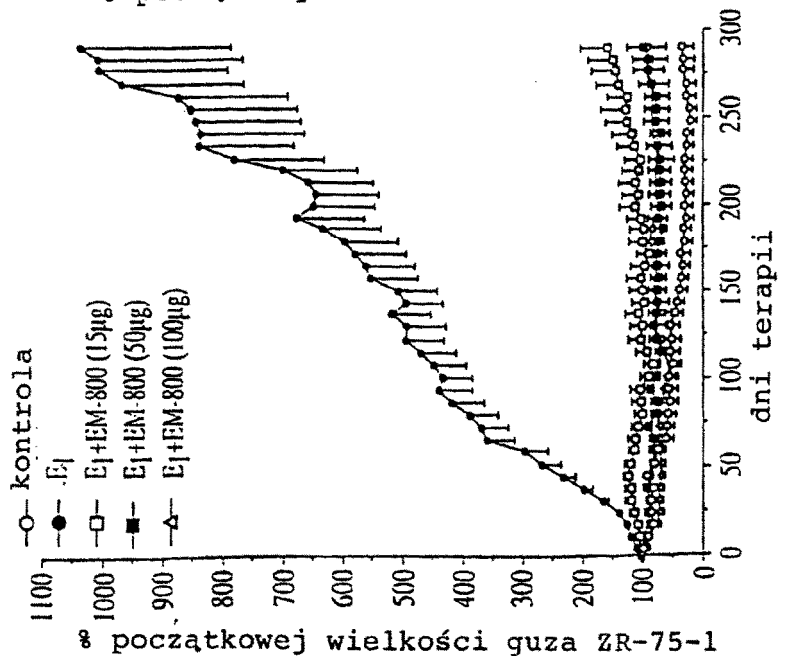


FIG. 5A

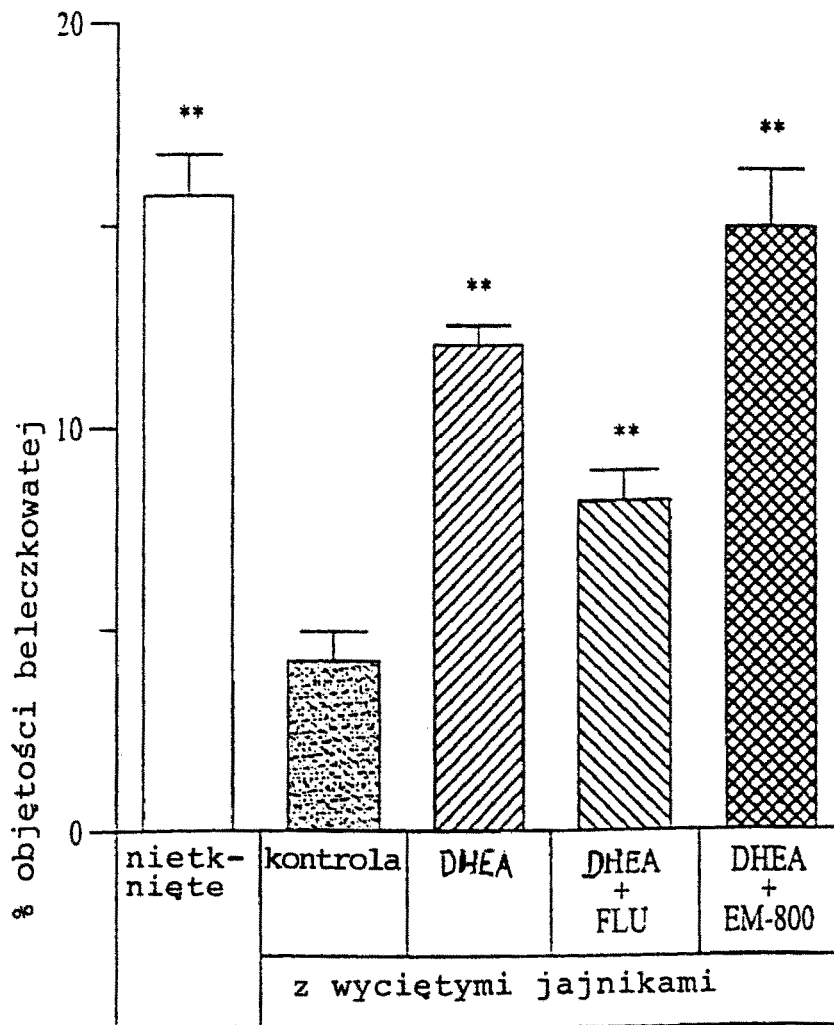


FIG. 6

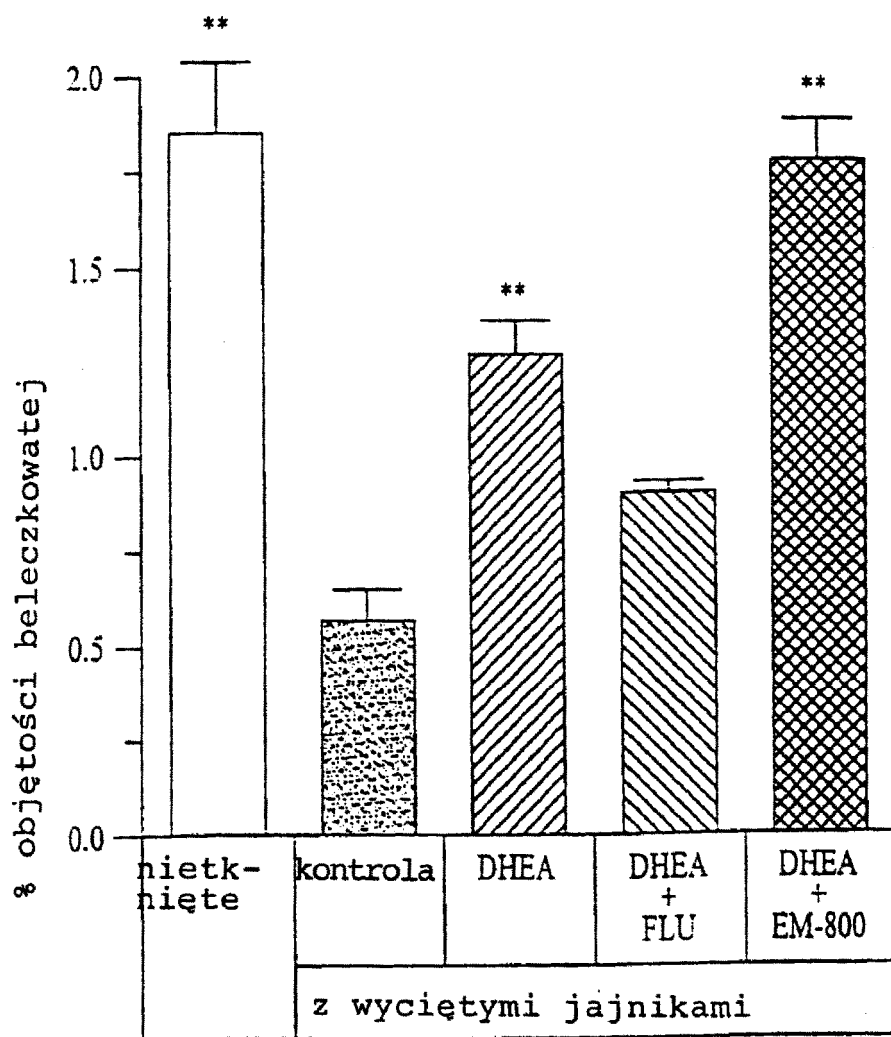


FIG. 7



FIG. 8B



FIG. 8A



FIG. 8D



FIG. 8C

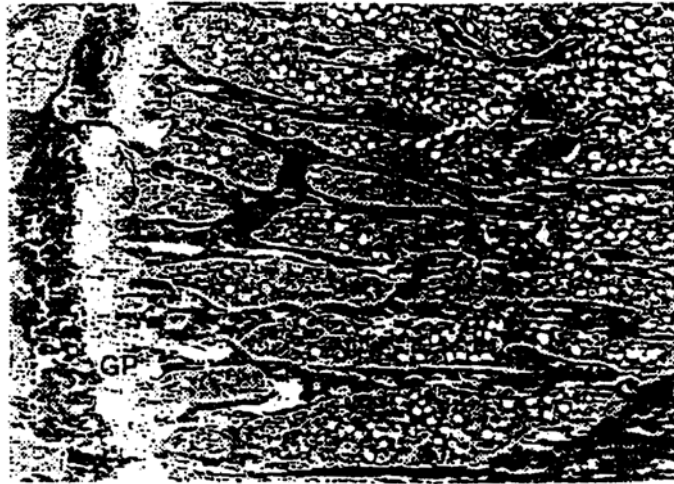


FIG. 8E

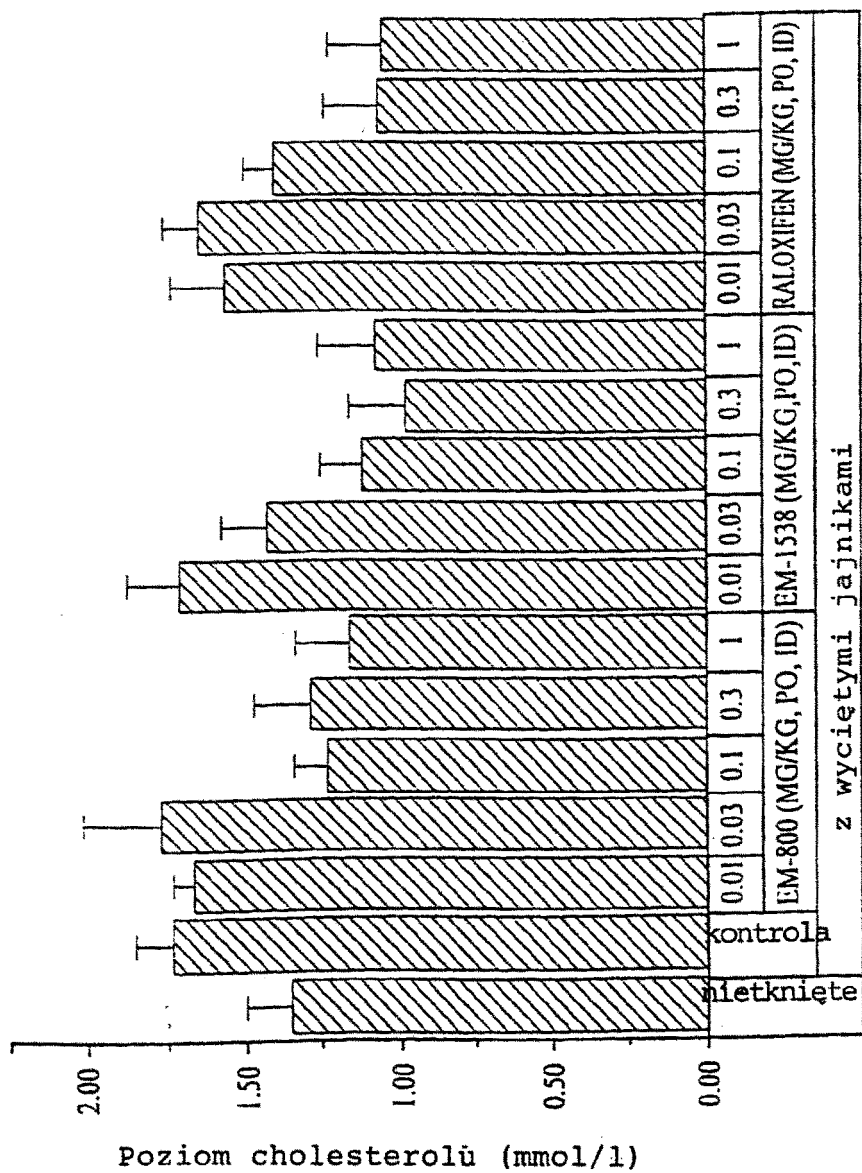


FIG. 9

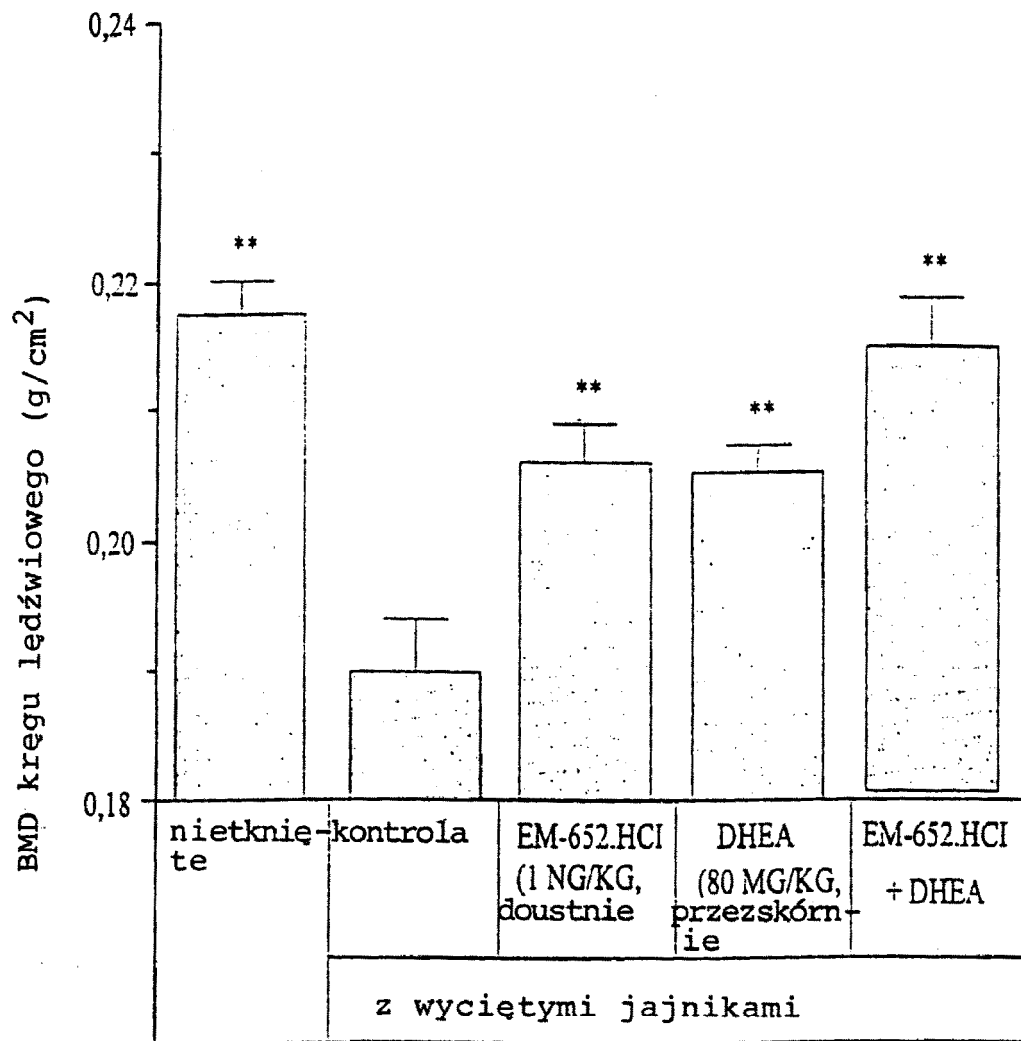


FIG. 10

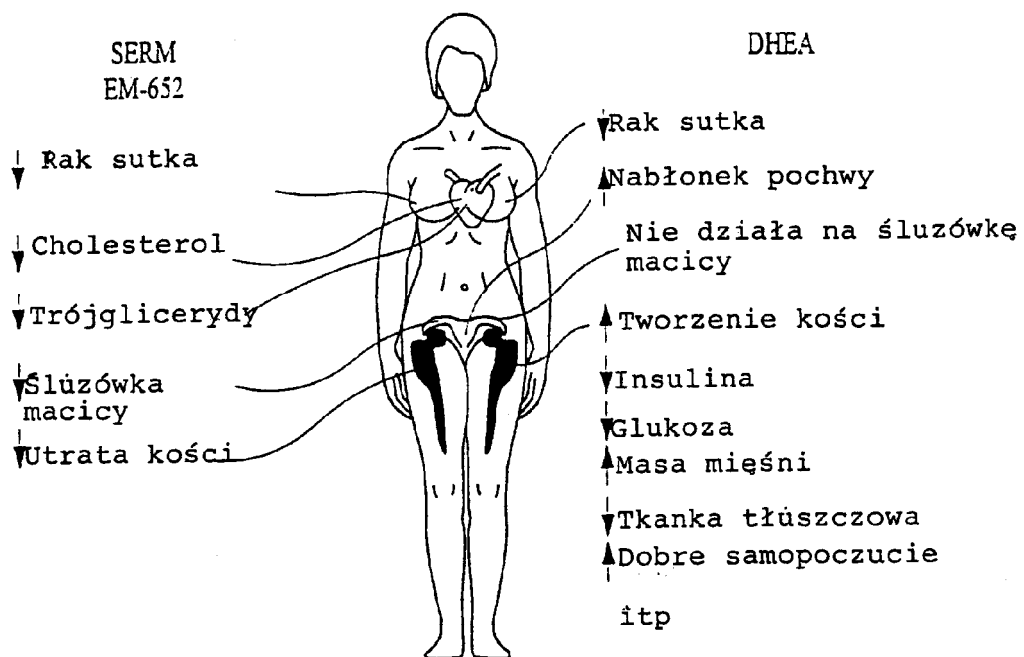


FIG. 11

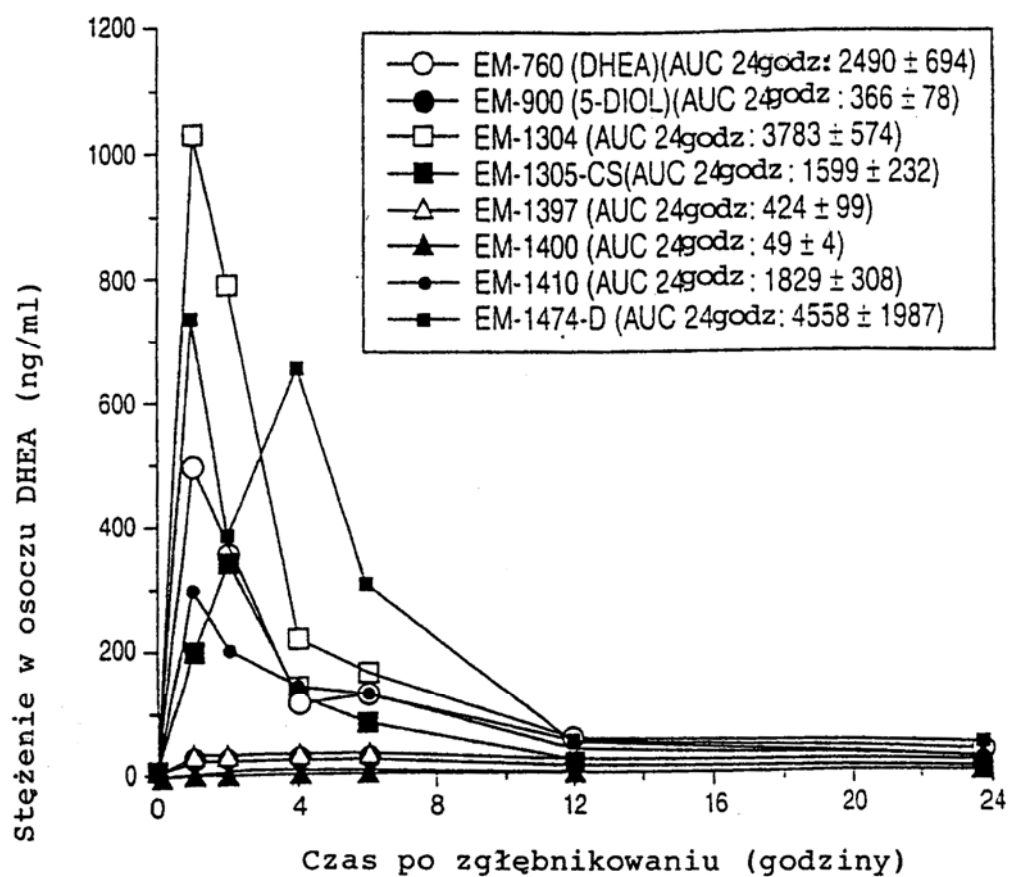


FIG. 12

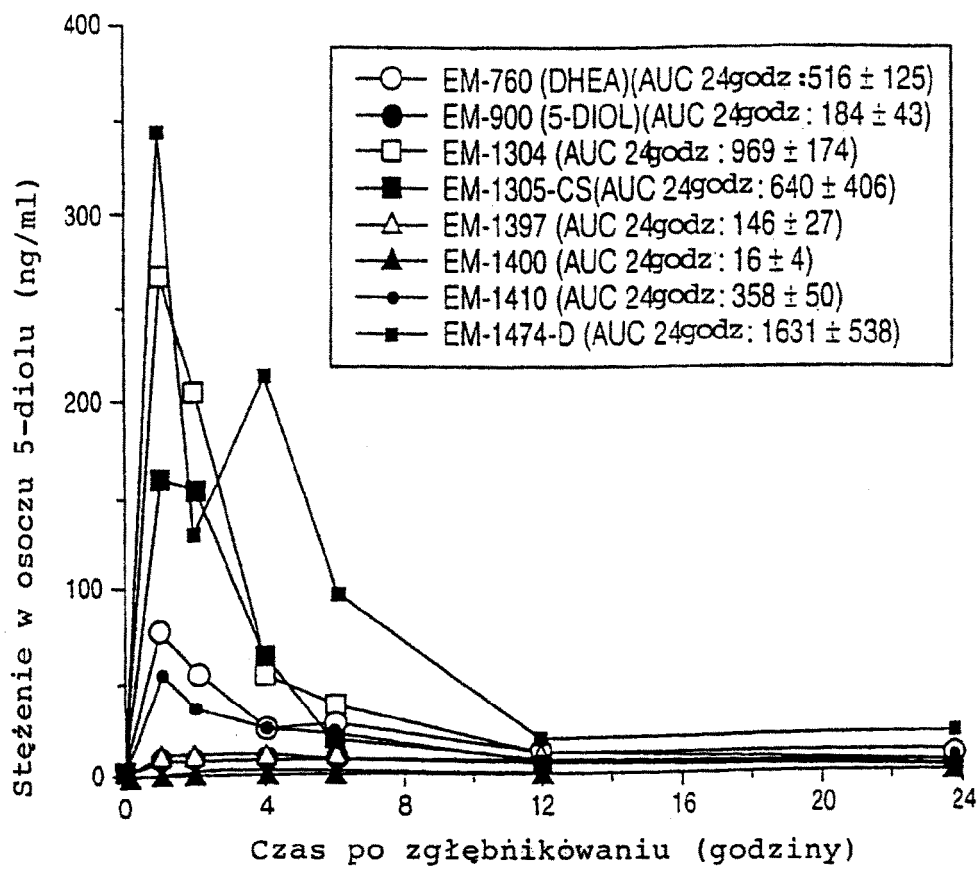


FIG. 13