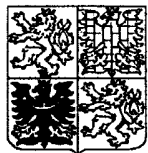


PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

287 603

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1995 2320**
(22) Přihlášeno: **13.01.1994**
(30) Právo přednosti:
11.03.1993 US 1993/029729
(40) Zveřejněno: **17.04.1996**
(Věstník č. 4/1996)
(47) Uděleno: **01.11.2000**
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **17.01.2001**
(Věstník č. 1/2001)
(86) PCT číslo: **PCT/US94/00633**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 94/20098**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷

A 61 K 31/40
A 61 K 31/353
A 61 P 19/08
A 61 P 19/10

(73) Majitel patentu:

ZYMOGENETICS, INC., Seattle, WA, US;

(72) Původce vynálezu:

Labroo Virender M., Mill Creek, WA, US;

Piggot James R., Bothell, WA, US;

Bain Steven D., Seattle, WA, US;

(74) Zástupce:

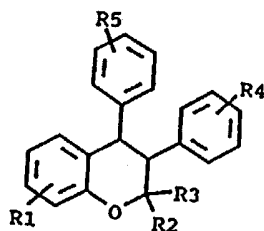
**PATENTSERVIS PRAHA, a.s., Jivenská 1/1273, Pra
4, 14021;**

(54) Název vynálezu:

**Farmaceutický přípravek k prevenci nebo
snížení úbytku kostní hmoty**

(57) Anotace:

Farmaceutický přípravek se zakládá na použití 3,4-diarylxchromanů obecného vzorce I, v němž R1, R4 a R5 značí jednotlivě vodík, hydroxyl, halogen, trifluormethyl, C₁₋₆ alkyl, C₁₋₆ alkoxy nebo terciární amino-C₁₋₆ alkoxy a R5 kromě toho značí ještě pyrrolidinoethoxyl a R2 a R3 značí jednotlivě vodík nebo C₁₋₆ alkyl, a jejich farmaceuticky přijatelných solí ve spojení s farmaceuticky přijatelnými nosiči pro výrobu farmaceutických přípravků k prevenci nebo snížení úbytku kostní hmoty.



(I)

CZ 287603 B6

Farmaceutický přípravek k prevenci nebo snížení úbytku kostní hmotyOblast techniky

5

Vynález se týká farmaceutického přípravku k prevenci nebo snížení úbytku kostní hmoty na základě použití nových diarylchromanů a jejich farmaceuticky přijatelných solí.

10

Dosavadní stav techniky

Přestavba kostí je dynamický proces, při kterém se skeletální hmota a architektura obnovují a udržují. Tato obnova a udržování je rovnováha mezi kostní resorpční a tvorbou kostí, kdy jsou osteoklasty a osteoblasty považovány za dva klíčové účastníky v procesu přestavby. Osteoklast

15 inicie cyklus přestavby resorbováním dutiny v kosti, která se následně znovu naplňuje, když osteoblast syntetizuje a ukládá novou kostní matici do exkavace. Aktivace osteoklastu a osteoblastu jsou regulovány komplexem interakcí mezi syntetickými hormony a lokální produkcí růstových faktorů a cytokinů v aktivních přestavovaných místech.

20 Nerovnováhy v přestavbě kostí jsou spojeny s takovými stavy jako je osteoporóza, Pagetova choroba a hyperparathyroidismus. Osteoporóza charakterizovaná úbytkem skeletální hmoty je jednou z nejběžnějších chorob u postmenopausálních žen a je často příčinou oslabení a bolestivých fraktur páteře, kyčlí a zápěstí.

25 Přibližně 25 % všech žen po menopauze je postiženo osteoporózou a obecně je přijímáno hledisko, že etiologie choroby zahrnuje redukci oběhových estrogenů (Komm a spol., Science 241:81–84, 1988). Komm a spol. dále uvádějí, že podíl bílých žen ve Spojených státech, u kterých je nebezpečí fraktury kyčlí je 15 %, nebo 247 000 kyčelních fraktur za rok u žen ve věku nad 45 let.

30 Náklady na osteoporózu, jak personální, tak finanční, jsou enormní. V roce 1984 bylo provedeno 145 000 repozic zlomenin u pacientek a 107 000 kyčelních arthroplastik a náhrad u amerických žen na 65 let. Z pacientek, které žily samotné před frakturou kyčle vyžaduje pak 15 až 20 % dlouhou dobu péči následkem fraktury a o rok později fraktura stále ještě neumožňovala, jejich nezávislost. Celkové finanční náklady na léčbu osteoporózy, zahrnující fraktury, byly ve Spojených státech v roce 1986 7 až 10 milionů dolarů (Peck a spol., Am. J. Med. 84:275–282, 1988).

35

Úbytek kostní hmoty spojený s osteoporózou byl zastaven podáváním exogenních estrogen. Aby byla účinná, musí estrogenová terapie začít několik let před menopausou a měly by pokračovat 10 až 15 let – podle Thomeycrofta (Am. J. Obstet. Gynecol. 160:1306–1310, 1989). I když

40 existují různé typy estrogenů, je 17- β -estrediol primárním estrogenem, nacházejícím se přirozeně u premenopausálních žen a je často sloučeninou volby pro terapeutické použití. Při doporučených dávkách však dochází k nežádoucím vedlejším účinkům, kde největším problémem je dobře známý vztah estrogenové terapie s rakovinou endometria a prsu. Výskyt rakoviny je závislý jak na dávce tak na době trvání.

45

Vyloučení rakovinového rizika bylo dosaženo současným použitím progestogenu s estrogenem. Tato kombinace nicméně působí návrat menses, který mnoho žen shledává nežádoucím. Další nevýhodou je, že dlouhodobé účinky progestogenu nebyl úplně stanoveny. Velká populace žen vyžaduje tedy náhradu k ormonovým náhradovým terapiím, která by bezpečně zabránila rychlé ztrátě kostní hmoty, která prochází menopauzou.

50

Centchroman je nesteroidní sloučenina, o které je známo, že má antiestrogenní aktivitu. Používá se v Indii jako orální antikoncepce (viz například Salman a spol., US patent č. 447622; Singh a spol., Acta Endocrin (Copenh) 126:444–450, 1992; Grubb, Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 3:491–495, 1991; Sankaran a spol., Contraception 9:279–289, 1974; indický patent č. 129187).

55

Centchroman může být také hodnocen jako protirakovinové činidlo pro léčbu pokročilé rakoviny prsu (Misra a spol., Int. J. Cancer 43:781, 1989), ale dosud nebyl považován za mající vliv na kostní resorpci.

- 5 Zůstává zde tedy v oboru potřeba přípravků a způsobů vhodných pro snížení úbytku kostní hmoty, zejména úbytku kostní hmoty spojené s osteoporózou. Existuje další potřeba takových přípravků, které nevykazují nežádoucí vedlejší účinky estrogenu. Předložený vynález poskytuje takové prostředky a způsoby a poskytuje i jiné s tím spojené nevýhody.

10

Popis obrázků na připojených výkresech

Obr. 1 ilustruje účinky centchromanu na úbytek kostní hmoty u ovariectomizované myši.

- 15 Obr. 2 ilustruje účinky centchromanu na spongiozní kostní objemy v proximální tibii ovariectomizovaných krys.

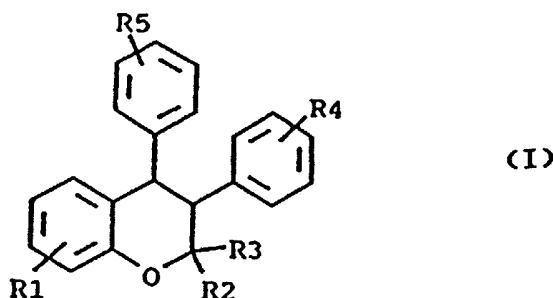
Obr. 3 ilustruje účinky centchromanu na kostní resorpci (vlevo) a hmotnosti dělohy (vpravo) u ovariectomizovaných krys.

20

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je použití 3,4-diarylchromanů obecného vzorce I

25



v němž

- 30 R1, R4 a R5 značí jednotlivě vodík, hydroxyl, halogen, trifluormethyl, C₁₋₆ alkyl, C₁₋₆ alkoxy nebo terciární amino-C₁₋₆ alkoxy R5 kromě toho značí ještě pyrrolidinoethoxy a

R2 a R3 značí jednotlivě vodík nebo C₁₋₆ alkyl,

- 35 a jejich farmaceuticky přijatelných solí ve spojení s farmaceuticky přijatelnými nosiči pro výrobu farmaceutických přípravků k prevenci nebo snížení úbytku kostní hmoty.

Použití podle vynálezu se týká pro výrobu farmaceutických prostředků ke snížení úbytku kostní hmoty vlivem zejména osteoporózy, Pagetovy choroby nebo hyperparathyroidismu.

40

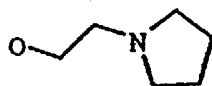
Jedno provedení vynálezu představuje použití uvedených 3,4-diarylchromanů obecného vzorce I, v němž R1 je C₁₋₆-alkoxy, R2 a R3 jsou C₁₋₆ alkyly, R4 je vodík a R5 je terciární amino-C₁₋₆ alkoxy.

- 45 Jiné provedení vynálezu se týká použití 3,4-diarylchromanů uvedeného obecného vzorce I, v němž R1 je methoxy a ostatní substituenty mají shora uvedené významy.

Dalším provedením tohoto vynálezu je použití 3,4-diarylchromanů uvedeného obecného vzorce I, v němž R2 a R3 jsou methyly a ostatní substituenty mají shora uvedené významy.

Jiným výhodným provedením vynálezu je použití 3,4-diarylchromanů uvedeného obecného vzorce I, v němž R4 je vodík a ostatní substituenty mají shora uvedené významy.

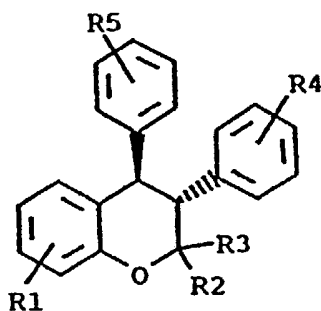
Dalším provedením vynálezu je použití 3,4-diarylchromanů uvedeného obecného vzorce I, v němž R5 je skupina vzorce



a ostatní substituenty mají shora uvedené významy.

Výhodné provedení vynálezu představuje použití 3,4-diarylchromanů ve formě izolovaných d- nebo l-enantiomerů, zejména ve formě izolovaných l-enantiomerů.

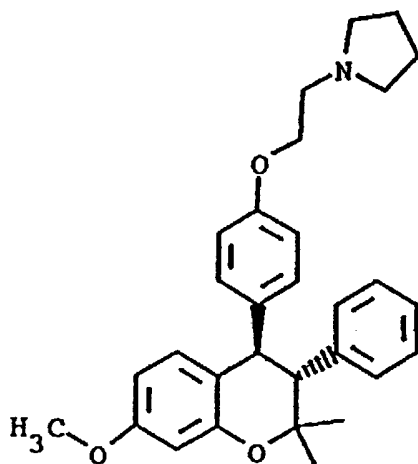
Jiným provedením vynálezu je použití 3,4-diarylchromanů, jež mají obecný vzorec Ia



(Ia)

v němž všechny substituenty mají shora uvedené významy.

Výhodným provedením vynálezu je použití 3,4-diarylchromanu, který má konkrétní vzorec Ib



(Ib)

a to ve formě jeho izolovaného d- nebo l-enantiomeru, zejména pak ve formě izolovaného l-enantiomeru.

Použití 3,4-diarylchromanů podle vynálezu je vhodné pro přípravu farmaceutických přípravků zejména pro postmenopauzální pacientky.

Výhodné jsou podle tohoto vynálezu farmaceutické přípravky ve formě pro orální podávání a s obsahem 0,1 až 5,0 mg účinné látky na kg tělesné hmotnosti pacienta v denní dávce.

- 5 Jiným provedením tohoto vynálezu jsou farmaceutické přípravky podavatelné v denních až týdenních intervalech.

Dalším provedením vynálezu je použití 3,4-diarylchromanů pro výrobu farmaceutických přípravků podavatelných ve formě podkožního implantátu.

10

Jiným provedením vynálezu je použití izolovaných d- nebo l-enantiomerů 3,4-diarylchromanů inhibujících úbytek kostní hmoty, shora uvedeného obecného vzorce I, v němž R1, R4 a R5 značí jednotlivě vodík, hydroxyl, halogen, trifluormethyl, C₁₋₆ alkyl, C₁₋₆ alkoxy nebo terciární amino-C₁₋₆ alkoxy a R5 kromě toho značí ještě pyrrolidinoethoxy a R2 a R3 jsou jednotlivě

15

vodík nebo C₁₋₆ alkyl, nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí, pro výrobu farmaceutických přípravků k léčení osteoporózy, obsahujících účinnou látku v množstvích inhibujících resorpci kostní hmoty.

Dalším výhodným provedením vynálezu je použití izolovaných d- nebo l-enantiomerů 3,4-diarylchromanů uvedeného obecného vzorce I, v němž R1 je C₁₋₆ alkoxy, R2 a R3 jsou C₁₋₆ alkyly, R4 je vodík a R5 je terciární amino-C₁₋₆ alkoxy.

20

Jiné provedení vynálezu se týká použití izolovaných d- nebo l-enantiomerů 3,4-diarylchromanů uvedeného obecného vzorce I, v němž R1 je methoxy a ostatní substituenty mají shora uvedené významy.

25

Ještě jiným provedením vynálezu je použití izolovaných d- nebo l-enantiomerů 3,4-diarylchromanů uvedeného obecného vzorce I, v němž R2 a R3 jsou methyly a ostatní substituenty mají shora uvedené významy.

30

Další použité podle tohoto vynálezu se týká izolovaných d- nebo l-enantiomerů 3,4-diarylchromanů uvedeného obecného vzorce I, v němž R4 je vodík a ostatní substituenty mají shora uvedené významy.

Jinou výhodnou možností je použití izolovaných d- nebo l-enantiomerů 3,4-diarylchromanů uvedeného obecného vzorce I, v němž R5 je skupina vzorce

35



a ostatní substituenty mají shora uvedené významy.

40

Další provedení vynálezu představuje použití izolovaných d- nebo l-enantiomerů 3,4-diarylchromanů uvedeného obecného vzorce Ia, v něm všechny substituenty mají shora uvedené významy.

45

Výhodné je použití izolovaných d- nebo l-enantiomerů 3,4-diarylchromanů uvedeného konkrétního vzorce Ib, zejména u postmenopauzálních pacientek.

ještě jiné výhodné provedení vynálezu představuje použití 3,4-diarylchromanů shora uvedeného obecného vzorce I, v němž R1, R4 a R5 značí jednotlivě vodík, hydroxyl, halogen, trifluormethyl, C₁₋₆ alkyl, C₁₋₆ alkoxy nebo terciární amino-C₁₋₆ alkoxy a R5 kromě toho značí ještě pyrrolidinoethoxy a R2 a R3 jsou jednotlivě vodík nebo C₁₋₆ alkyl, pro přípravu farmaceutických

50

přípravků k léčení úbytku kostní hmoty vlivem osteoporózy, Pagetovy nemoci nebo hyperparathyroidismu.

Termín „C₁₋₆ alkyl“ značí alkyl s přímým nebo rozvětveným řetězcem, jako je methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, terc.butyl, n-amyl, sek.amyl, n-hexyl, 2-ethylbutyl, 2,3-dimethylbutyl a podobně.

Termín „C₁₋₆ alkoxy“ značí alkoxy s přímým nebo rozvětveným řetězcem, jako je methoxy, ethoxy, n-propoxy, isopropoxy, terc.butoxy, n-amyloxy, sek.amyloxy, n-hexyloxy, 2-ethylbutoxy, 2,3-dimethylbutoxy a podobně.

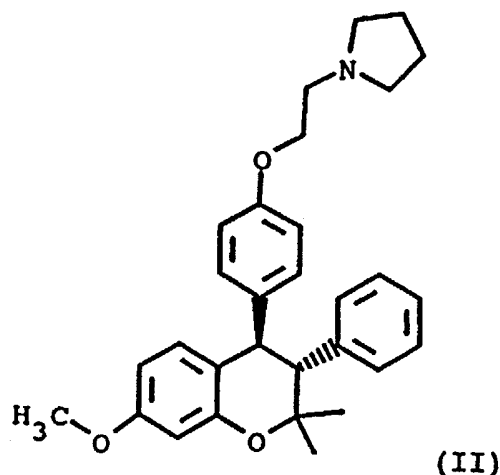
„Halogen“ zahrnuje chlor, fluor, brom a jod.

„Terciární amino-C₁₋₆ alkoxy“ značí dialkylamin, jako je dimethyl, diethyl, dipropyl, dibutyl nebo polymethylenimin, např. piperidin, pyrrolidin, N-methylpiperazin nebo morfolin.

Výhodné je použití sloučeniny obecného vzorce I v trans-konfiguraci. Tyto sloučeniny mohou být používány jako racemické směsi nebo izolované d- nebo l-enantiomery.

Předložený vynález je založen na objevu, že reprezentativní 3,4-diarylchroman, centchroman (3,4-trans-2,3-dimethyl-3-fenyl-4-[p-(beta-pyrrolidinoethoxy)fenyl]-7-methoxy-chroman), je účinným inhibítozem úbytku kostní hmoty u ovariectomizovaných myši a krys. Tyto zvířecí modely napodobují postmenopauzální stav a jsou obecně uznávanými modely osteoporózy. Tyto údaje tak indikují, že 3,4-diarylchromany jsou vhodnými terapeutickými činidly pro snížení úbytku kostní hmoty u savců, včetně primátů jako je člověk.

Zvláště výhodnou sloučeninou pro použití v předloženém vynálezu je centchroman vzorce II



30

I když je uveden jen enantiomer, je třeba chápat, že vzorec II je zde používán pro označení trans konfigurace 3- a 4-fenylových skupin a že zahrnuje jak d- a l-enantiomery jakož i racemické směsi.

3,4-Diarylchromany se připraví známými metodami jako jsou metody popsány v US patentu č. 3340276. Carney a spol., US patent č. 3822287, Bolger a Ray a spol., J. Med. Chem. 19:276-279, 1976, které jsou zde zahrnuty jako odkazy. Konverze cis izomeru na trans konfiguraci pomocí přeskymu katalyzovaného organokovovou bází je popsána v US patentu č. 3822287. Opticky aktivní d- a l- enantiomery mohou být připraveny jak popsal Salman a spol. v US patentu č. 4447622 (zahrnut zde jako odkaz) tvorbou soli opticky aktivní kyselinou, která se podrobí alkalické hydrolýze za vzniku požadovaného enantiomeru.

V předloženém vynálezu mohou být 3,4-diarylchromany připraveny ve formě farmaceuticky přijatelných solí, zejména adičních solí s kyselinami, zahrnující soli organických a anorganických kyselin. Příklady takových solí zahrnují soli organických kyselin jako je kyselina mravenčí, kyselina octová, kyselina propionová, kyselina glykolová, kyselina mléčná, kyselina hroznová, kyselina šťavelová, kyselina jantarová, kyselina jablečná, kyselina vinná, kyselina citronová, kyselina benzoová, kyselina salicylová a podobně. Vhodné soli s anorganickými kyselinami zahrnují soli kyseliny chlorovodíkové, bromovodíkové, sírové a fosforečné a podobně. Adiční soli s kyselinami mohou být získány jako přímé produkty syntézy sloučeniny. Alternativně může být volná báze rozpuštěna ve vhodném rozpouštědle, obsahujícím vhodnou kyselinu a sůl být izolována odpařením rozpouštědla nebo jiným způsobem oddělení soli a rozpouštědla.

3,4-Diarylchromany a jejich soli jsou použitelné v lidské a veterinární medicíně pro regulaci kostního metabolismu. Tyto sloučeniny mohou být použity například v léčbě pacientů postižených úbytkem kostní hmoty způsobeným osteoporózou (zahrnující postmenopauzální osteoporózu a s glukokortikoidy spojenou osteoporózou), Pagetovu chorobu, hyperparathyroidismus, hyperkalcemii maligních a jiných stavů charakterizovaných nadměrnou rychlostí kostní resorpce a/nebo sníženou rychlostí tvorby kostí.

Pro použití v předloženém vynálezu jsou 3,4-diarylchromany a jejich farmaceuticky přijatelné soli formulovány s farmaceuticky přijatelným nosičem pro poskytnutí léčiva pro parenterální, orální, nasální, rektální, subdermální nebo transdermální podání podle běžných metod. Formulace mohou dále obsahovat jedno nebo více ředidel, plniv, emulgátorů, ochranných látek, pufrů, přísad atd. a mohou být poskytnuty v takových formách jako jsou kapaliny, prášky, emulze, čípky, liposomy, transdermální náplasti, podkožní implantáty s řízeným uvolňováním, tablety atd. Odborník v oboru může formulovat sloučeniny vhodným způsobem a v souladu s přijatelnou praxí tak, jak je popsáno v Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990 (zahrnut jako reference v celém svém rozsahu).

Preferováno je orální podání. Účinná sloučenina se připraví ve formě vhodné pro orální podání jako je tableta nebo kapsle. Typicky se farmaceuticky přijatelná sůl sloučeniny kombinuje s nosičem a lisuje do tablet. Vhodné nosiče z tohoto hlediska zahrnují škrob, cukry, fosforečnan divápenatý, stearat vápenatý, stearat hořečnatý a podobně. Takové kompozice mohou dále obsahovat jednu nebo více pomocných substancí jako jsou smáčecí činidla, emulgátory, ochranné látky, stabilizátory, barviva atd.

Farmaceutické přípravky jsou podávány v denních až týdenních intervalech. „Účinné množství“ takového farmaceutického přípravku je množství, které poskytuje klinicky významnou inhibici úbytku kostní hmoty. Taková množství budou zejména záviset na konkrétních podmínkách, které mají být léčeny, věku, hmotnosti a celkovém zdraví pacienta a jiných faktorech, které jsou zřejmé odborníkům v oboru. Obecně je inhibice úbytku kostní hmoty vyjádřena jako statisticky významný rozdíl ve spongiozním kostním objemu mezi léčenou a kontrolní skupinou. Toto může být zřejmé například jako 5 až 10% nebo vyšší rozdíl ve hmotě spinální kosti nebo kostním obsahu minerálů za dva roky. Údaje z přijímaných zvířecích modelů, jako jsou ovariectomizované myši nebo krysí modely osteoporózy, jsou obecně základem pro řádovou předpověď velikosti dávek u lidí. Například terapeutické dávky pro léčbu osteoporózy budou obecně v rozmezí od 0,01 a 50 mg/kg/den, výhodně 0,05 až 10 mg/kg/den, nejvýhodněji 0,1 až 5,0 mg/kg/den. Použití cis-izomerů nebo racemických směsí může vyžadovat dávky bližší vyšší hodnotě uvedeného rozmezí.

Farmaceutické přípravky mohou být podávány v jednotkové dávkové formě denně až týdně. Alternativně mohou být poskytnuty jako přípravky s řízeným uvolňováním vhodné pro podkožní implantaci. Implanty jsou formulovány pro poskytnutí uvolnění účinné sloučeniny během požadované časové periody, která může činit až několik let. Přípravky s řízeným uvolňováním

jsou například popsány Sandersem a spol., J. Pharm. Sci. 73:1294–1297, 1984, US patent č. 4489056 a US patent č. 4210644, které jsou zde zahrnuty jako reference.

Následující příklady jsou míněny jako ilustrující a v žádném případě ne jako omezující.

5

Příklady provedení vynálezu

10 Příklad 1

Schopnost centchromanu chránit před osteopenií vyvolanou nedostatkem estrogenu byla hodnocena v modelu ovariektomizované myši. Dvacetčtyři samic myši Swiss–Webster (8 týdnů staré) bylo ošetřeno před pokusem ovariektomií nebo klamným chirurgickým zákrokem před počátkem 4týdenního léčebného protokolu. U ovariektomie byl proveden boční řez kůží, svalstvo a abdominální peritoneum byly odtaženy, vaječníky lokalizovány a odděleny od připojeného tuku a pojivové tkáně a vyříznuty. V klamavém postupu byly vaječníky exteriorizovány a znovu navraceny. U všech zvířat byly peritoneum a svalovina sešity a kožní řezy byly uzavřeny svorkami.

20

Centchroman byl rozpuštěn v minimálním množství dimethylsulfoxidu a zředěn olejovým vehikulem na koncentraci 50 µg/100 µl. Myši byly ošetřeny dvakrát za týden po 4 týdny subkutánní injekcí centchromanu nebo olejového vehikula podle následujícího režimu: simulovaný/olejový vehikulum (SV); OVX/olejové vehikulum; OVX/50 µg centchromanu dvakrát týdně. V každý skupině bylo 8 zvířat.

25

Na závěr 4–týdenního centchromanového léčení byly myši anestetizovány etherem a usmrčeny cervikální dislokací. Ihned po usmrčení byly odebrány femury a fixovány v 70% ethylalkoholu (EtOH) a dehydratovány postupně zvyšujícími se koncentracemi alkoholu: 95% EtOH po 24 hodin pak třikrát výměna 100% EtOH vždy po 24 hodinách. Po konečném 100% EtOH byly femury vyčištěny ve dvou výměnách xylenu a pak zpracovány tak, aby nedekalcinovaly a byly uloženy do methakrylátového plastu podle již popsaných metod (Bain a spol., Stain Technology 65: 159–163, 1990). Přední sekce distálních metafýz femuru silné 5 µm byly odříznuty na rotační mikrořezačce Reichert–Jung 2050 opatřené wolframo–karbidovým nožem. 5 µm sekce byly umístěny na sklíčka a vybarveny Goldnerovým trichromanovým barvivem.

35

Histomorfometrická měření distálních metafýz byla provedena použitím Bioquant Bone Morphometry Program (Biometrics, Inc. Nashville, TN) za snímání přes camera lucida světelným/epifluorescentním mikroskopem Olympus BH–2 (Scientific Instruments, Inc. Redmond, WA). Morfometrická měření spongiozního kostního objemu (BV/TV) byla provedena ve tkáňovém prostoru větším než 0,25 mm od růstového metafyzálního spojení pro vyloučení primární spongiozy.

40

Hodnoty uvedené na obr. 1 jsou vyjádřeny jako průměr ± SD pro každou skupinu. Porovnání spongiozního kostního objemu distálního femuru jsou založeny na analýze variance za použití Statview^R statistických programů (Abacus Concepts, Inc. Berkeley, CA). Léčebné rozdíly indikované u ANOVA byly porovnány za použití Dunnettovy násobného porovnávacího postupu. P hodnota menší než 0,05 byla považována za významnou.

45

U ovariektomizované myši léčené olejovým vehikulem bylo pozorováno 50% snížení spongiozního kostního objemu distálního femuru ve srovnání se simulovanými zvířaty ošetřenými vehikulem. U ovariektomizovaných zvířat ošetřených 50 µg centchromanu dvakrát za týden bylo zcela zabráněno úbytku kostní hmoty.

50

Příklad 2

Pro hodnocení centchromanových účinků na kostní úbytek a kostní hmotu byly kostry 54 samic krys Sprague–Dawley předem označovány po čtyři po sobě jdoucí týdny tritiovým tetracyklem ($^3\text{H-T}$; získaný od Dupont NEN Research Products, Boston, MA). Zvířata dostala 12 až 15 injekcí 15 μCi každá – celkem 200 μCi na zvíře. 15 dní po konečné $^3\text{H-T}$ injekci bylo osm zvířat usmrceno jako základní kontrola a zbývající zvířata byla náhodně ošetřena estrogenem (E2) nebo centchromanem (C) následovně: simulace/placebo; ovariectomie (ovx)/placebo; ovariectomie/E2 (0,05 mg/kg/den); ovariectomie/C (0,5 mg/kg/den); ovariectomie/C (0,5 mg/kg/den); a ovariectomie/C (5,0 mg/kg/den). Hormonová léčba byla poskytnuta podkožními peletovými implantáty, obsahujícími matici cholesterolu, laktózy, celulózy, fosfatás a stearatů (Innovative Research, Toledo, OH), vypočtenou pro doručení výše uvedených dávek. Navíc ke kvantifikaci kostní resorpce použitím $^3\text{H-T}$ zkoušky, byla také stanovena kostní hmota femuru a obratlů pro doložení změn ve fyzikálních vlastnostech kosti a kvantitativní histomorfometrie byla použita pro porovnání změn ve spongiozních kostních objemech proximální tibiae.

Šest dnů po započtení léčebných protokolů byla zvířata anestetizována etherem a usmrcena cervikální dislokací. Ihned po usmrcení byly odňaty dělohy a byly zaznamenány hmotnosti; oba fumery a tři hrudní obratle (T11–T13) byly vyňaty pro zkoušku kostní resorpce; jedna tibia a první lumbární obratel byly spojeny pro doložení fyzikálních vlastností kostí; a druhá tibia byla vyříznuta a zpracována pro kostní histomorfometrii. Všechny tkáně byly na počátku fixovány v 70 % obj. ethylalkoholu (EtOH) a dehydratovány postupně dále EtOH se stoupající koncentrací až do 100 % obj. Po konečné výměně 100 % obj. EtOH byly vzorky zpracovány podle zkušebních dále uvedených protokolů.

Zkoušky celé kostní resorpce byly založeny na hladinách $^3\text{H-T}$ zadržených v předem značených femurech a obratlích v postatě tak, jak popsal Klein a Jackman (Calcified Tissue Research 20: 275–290, 1976). Stručně, vzorky byly zbaveny tuku ve třech výměnách chloroformu vždy na 24 hodin každá, a sušeny při 100 °C po 24 hodin a byly zaznamenány hmotnosti. K extraktu $^3\text{H-T}$ byly femury a obratle demineralizovány v 15 ml 0,5N kyseliny chlorovodíkové (HCl) a supernatanty byly dekantovány a uloženy. Pro kvantifikaci hladin tritia byly 625 μl podíly odpipetovány do skleněných scintilačních lahvíček, obsahujících 10 ml OPTiflor scintilační kapaliny (Packard Instruments, Meriden, CT) a $^3\text{H-T}$ hladiny byly odečteny na kapalinovém scintilačním spektrometru (Beckman LS 1800).

Po EtOH dehydrataci byly vzorky pro měření kostní hmoty odtučněny ve třech výměnách chloroformu po 24 hodin každá a sušeny při 60 °C a sušárně přes noc. Kostní hmota byla vyjádřena jako mg suché hmotnosti na gram tělesné hmotnosti.

Po konečném zpracování se 100 % obj. EtOH byly tibiae vyčištěny ve dvou výměnách xylenu, zpracovány tak aby nebyly kalcifikovány a upevněny v methakrylátových plastech v postatě jak popsal Bain a spol. (Stain Technology 65: 159–163, 1990). Frontální sekce proximální tibiae 5 μm silné byly nařezány na Reichert–Jung 2050 rotačním zařízením pro mikrovzorky (Leica Instruments, Nusslock, Německo) opatřeném nožem z karbidu wolframu. 5 μm sekce byly vybarveny Goldnerovým trichromovým barvivem.

Histomorfometrická měření proximální tibiae byla stanovena za použití Bioquanz Bone Morphometry programu (Biometrics, Inc. Nashville, TN) spojeným přes camera lucida s Olympus BH–2 světelným/epifluorescenčním mikroskopem (Scientific Instruments, Inc. Redmond, WA). Morfometrická měření spongiozního kostního objemu (BV/TV) byla provedena ve 3,0 mm² tkáňovém prostoru 1,5 milimetru od spoje růstová plocha–metafýza pro vyloučení měření primární spongiósy. Minimálně byly od každého zvířete měřeny čtyři oddělené sekce.

Analýzy hmotností děloh, zkoušek kostního úbytku, fyzikální vlastnosti kostí a kostní histomorfometrie byly založeny na analýze proměnnosti (ANOVA) za použití Statview^R statistických programů (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA). Jestliže podle ANOVA byla zaznamenána významnost byly kontrolní a ošetřené průměry porovnány za použití Dunnettova násobného srovnávacího postupu. P hodnoty menší než 0,05 byly považovány za významné.

Ve srovnání se simulovanými-vehikulem ošetřenými zvířaty vedla ovariektomie k významnému snížení vlhké hmotnosti dělohy. Estrogenová náhrada obnovuje hmotnostní dělohy na simulované hmotnosti, ale ošetření centchromanem nemělo žádný statisticky významný vliv na hmotnosti dělohy, ani při nejvyšší dávce 5 mg na den. Udává se zvýšená kostní resorpce, ovariektomií snížená skeletální retence ³H-T ve femuru a obratlích (tabulka 1 a 2). Podle očekávání ošetření zvyšuje skeletální retenci ³H-T. Centchroman napodobuje vliv estrogenu na kostní resorpci vyvoláním dávkově závislého zvýšení ve skeletální retenci ³H-T na obou skeletálních místech (r^2 hodnoty rovné 0,96 a 0,92 pro femury a obratle).

Tabulka 1

Retence ³H-T ve femurech

Skupina	počet	cpm (tisíce)	
		průměr	std. odch.
simul./placebo	8	3832,25	928,975
ovx/placebo	8	3184,375	680,598
ovx/0,05 mg E2	10	4782	1501,813
ovx/0,05 mg C	9	3373,556	733,896
ovx/0,5 mg C	10	3405,1	1107,792
ovx/5,0 mg C	9	4192,222	1107,3

Tabulka 2

Retence ³H-T v obratlích

Skupina	počet	cpm (tisíce)	
		průměr	std. odch.
simul./placebo	8	1876,75	481,552
ovx/placebo	8	1531,625	416,205
ovx/0,05 mg E2	9	2467,556	733,064
ovx/0,05 mg C	9	1523,333	406,635
ovx/0,5 mg C	10	1616	509,954
ovx/5,0 mg C	10	2156,7	495,741

Schopnost centchromanu inhibovat kostní resorpci a bránit kostnímu úbytku byla potvrzena měřením spongiozního kostního objemu v tibiae a stanoveními kostní hmoty femuru a obratlů. Ve srovnání s ovariektomizovanými krysami ošetřenými vehikulem působí centchroman dávkově závislé zvýšení ve spongiozním kostním objemu proximální tibiae (obr. 2; $r^2 = 0,99$). Podobně má centchroman dávkově závislé účinky na kostní hmotu femuru a obratlů.

Souhrnně tyto údaje indikují, že schopnost centchroman bránit úbytku kostní hmoty u ovariektomizovaných krys je nezávislá na jakékoliv zjevné uterotrofní aktivitě. Toto je jasně demonstrováno na obr. 3 spojením údajů o hmotnosti dělohy s údaji o kostní resorpci z femuru pro představení nezávislých účinků centchromanu na tyto dvě tkáně.

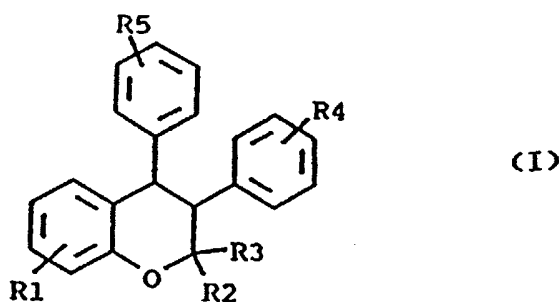
I když byl vynález popsán v některých detailech pro ilustraci a příklady pro lepší zřejmost a pochopení, bude zřejmé, že některé změny a modifikace mohou být provedeny v rozsahu připojených nároků.

5

PATENTOVÉ NÁROKY

10

1. Použití 3,4-diarylchromanů obecného vzorce I



15 v němž

R1, R4 a R5 značí jednotlivě vodík, hydroxyl, halogen, trifluormethyl, C₁₋₆ alkyl, C₁₋₆ alkoxy nebo terciární amino-C₁₋₆ alkoxy a R5 kromě toho značí ještě pyrrolidinoethoxy a

20 R2 a R3 značí jednotlivě vodík nebo C₁₋₆ alkyl,

a jejich farmaceuticky přijatelných solí ve spojení s farmaceuticky přijatelnými nosiči pro výrobu farmaceutických přípravků k prevenci nebo snížení úbytku kostní hmoty

25

2. Použití 3,4-diarylchromanů obecného vzorce I podle nároku 1 pro výrobu farmaceutického přípravku ke snížení úbytku kostní hmoty vlivem osteoporózy, Pagetovy choroby nebo hyperparathyroidismu.

30

3. Použití podle nároku 1 nebo 2 uvedených 3,4-diarylchromanů obecného vzorce I, v němž R1 je C₁₋₆ alkoxy, R2 a R3 jsou C₁₋₆ alkyly, R4 je vodík a R5 je terciární amino-C₁₋₆ alkoxy.

4. Použití podle některého z předchozích nároků 3,4-diarylchromanů uvedeného obecného vzorce I, v němž R1 je methoxy a ostatní substituenty mají shora uvedené významy.

35

5. Použití podle některého z předchozích nároků 3,4-diarylchromanů uvedeného obecného vzorce I, v němž R2 a R3 jsou methyly a ostatní substituenty mají shora uvedené významy.

40

6. Použití podle některého z předchozích nároků 3,4-diarylchromanů uvedeného obecného vzorce I, v němž R4 je vodík a ostatní substituenty mají shora uvedené významy.

7. Použití podle některého z předchozích nároků 3,4-diarylchromanů uvedeného obecného vzorce I, v němž R5 je skupina vzorce



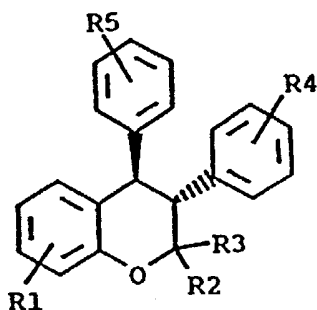
5

a ostatní substituenty mají shora uvedené významy.

8. Použití podle některého z předchozích nároků 3,4-diarylchromanů ve formě izolovaných d- nebo l-enantiomerů.

9. Použití podle nároku 9 uvedených 3,4-diarylchromanů ve formě izolovaných l-enantiomerů.

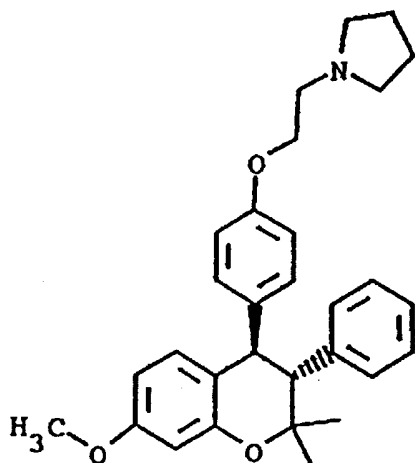
10. Použití podle některého z předchozích nároků 3,4-diarylchromanů, jež mají obecný vzorec Ia



(Ia)

20 v němž všechny substituenty mají shora uvedené významy.

11. Použití podle některého z předchozích nároků 3,4-diarylchromanu, vzorce Ib



(Ib)

25

12. Použití podle nároku 11 diarylchromanu ve formě izolovaného d- nebo l-enantiomeru.

13. Použití podle nároku 12 diarylchromanu ve formě izolovaného l-enantiomeru.

30

14. Použití podle některého z předchozích nároků 3,4-diarylchromanů pro výrobu farmaceutických přípravků pro postmenopausální pacientky.

5 15. Použití podle některého z předchozích nároků 3,4-diarylchromanů pro výrobu farmaceutických přípravků ve formě pro orální podávání.

10 16. Použití podle některého z předchozích nároků 3,4-diarylchromanů pro výrobu farmaceutických přípravků s obsahem 0,1 až 5,0 mg účinné látky na kg tělesné hmotnosti pacienta v denní dávce.

17. Použití podle některého z předchozích nároků 3,4-diarylchromanů pro výrobu farmaceutických přípravků podavatelných v denních až týdenních intervalech.

15 18. Použití podle některého z předchozích nároků 3,4-diarylchromanů pro výrobu farmaceutických přípravků podavatelných ve formě podkožního implantátu.

19. Použití izolovaných d- nebo l-enantiomerů 3,4-diarylchromanů inhibujících úbytek kostní hmoty, shora uvedeného obecného vzorce I, v němž R1, R4 a R5 značí jednotlivě vodík, hydroxyl, halogen, trifluormethyl, C₁₋₆ alkyl, C₁₋₆ alkoxyl nebo terciární amino-C₁₋₆ alkoxyl a R5 kromě toho značí ještě pyrrolidinoethoxyl a R2 a R3 jsou jednotlivě vodík nebo C₁₋₆ alkyl, nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí, pro výrobu farmaceutických přípravků k léčení osteoporózy, obsahujících účinnou látku v množstvích inhibujících resorpci kostní hmoty.

25 20. Použití podle nároku 19 izolovaných d- nebo l-enantiomerů 3,4-diarylchromanů uvedeného obecného vzorce I, v němž R1 je C₁₋₆ alkoxyl, R2 a R3 jsou C₁₋₆ alkyly, R4 je vodík a R5 je terciární amino-C₁₋₆ alkoxyl.

30 21. Použití podle nároku 19 izolovaných d- nebo l-enantiomerů 3,4-diarylchromanů uvedeného obecného vzorce I, v němž R1 je methoxyl a ostatní substituenty mají shora uvedené významy.

22. Použití podle nároku 19 izolovaných d- nebo l-enantiomerů 3,4-diarylchromanů uvedeného obecného vzorce I, v němž R2 a R3 jsou methyly a ostatní substituenty mají shora uvedené významy.

35 23. Použití podle nároku 19 izolovaných d- nebo l-enantiomerů 3,4-diarylchromanů uvedeného obecného vzorce I, v němž R4 je vodík a ostatní substituenty mají shora uvedené významy.

40 24. Použití podle nároku 19 izolovaných d- nebo l-enantiomerů 3,4-diarylchromanů uvedeného obecného vzorce I, v němž R5 je skupina vzorce



a ostatní substituenty mají shora uvedené významy.

45 25. Použití podle nároku 19 izolovaných d- nebo l-enantiomerů 3,4-diarylchromanů uvedeného obecného vzorce Ia, v němž všechny substituenty mají shora uvedené významy.

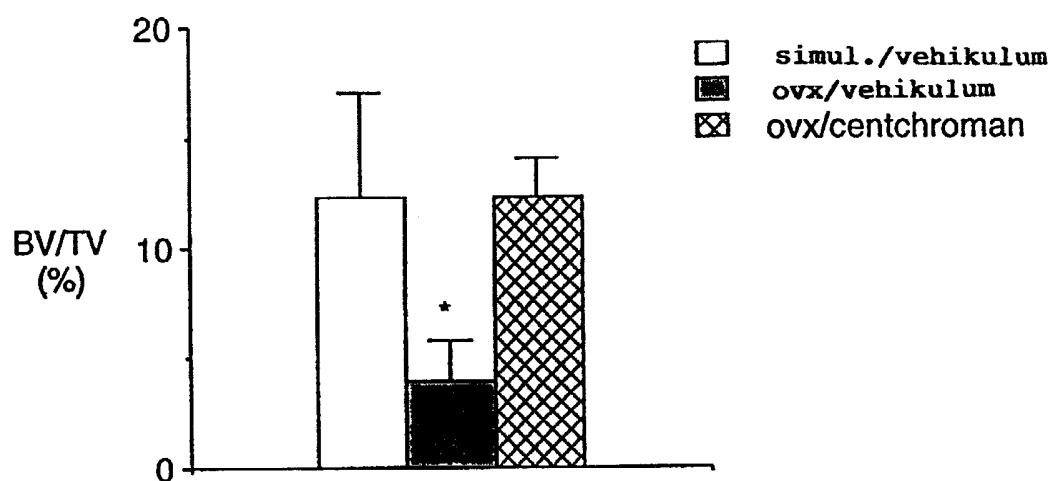
26. Použití podle nároku 19 izolovaných d- nebo l-enantiomerů 3,4-diarylchromanů vzorce Ib podle nároku 11.

50 27. Použití podle nároku 19 izolovaných d- nebo l-enantiomerů 3,4-diarylchromanů u postmenopausálních pacientek.

28. Použití 3,4-diarylchromanů shora uvedeného obecného vzorce I, v němž R1, R4 a R5 značí jednotlivě vodík, hydroxyl, halogen, trifluormethyl, C₁₋₆ alkyl, C₁₋₆ alkoxy nebo terciární amino-C₁₋₆ alkoxy a R5 kromě toho značí ještě pyrrolidinoethoxy a R2 a R3 jsou jednotlivě vodík nebo C₁₋₆ alkyl, pro výrobu farmaceutických přípravků k léčení úbytku kostní hmoty vlivem osteoporózy, Pagetovy nemoci nebo hyperparathyroidismu.

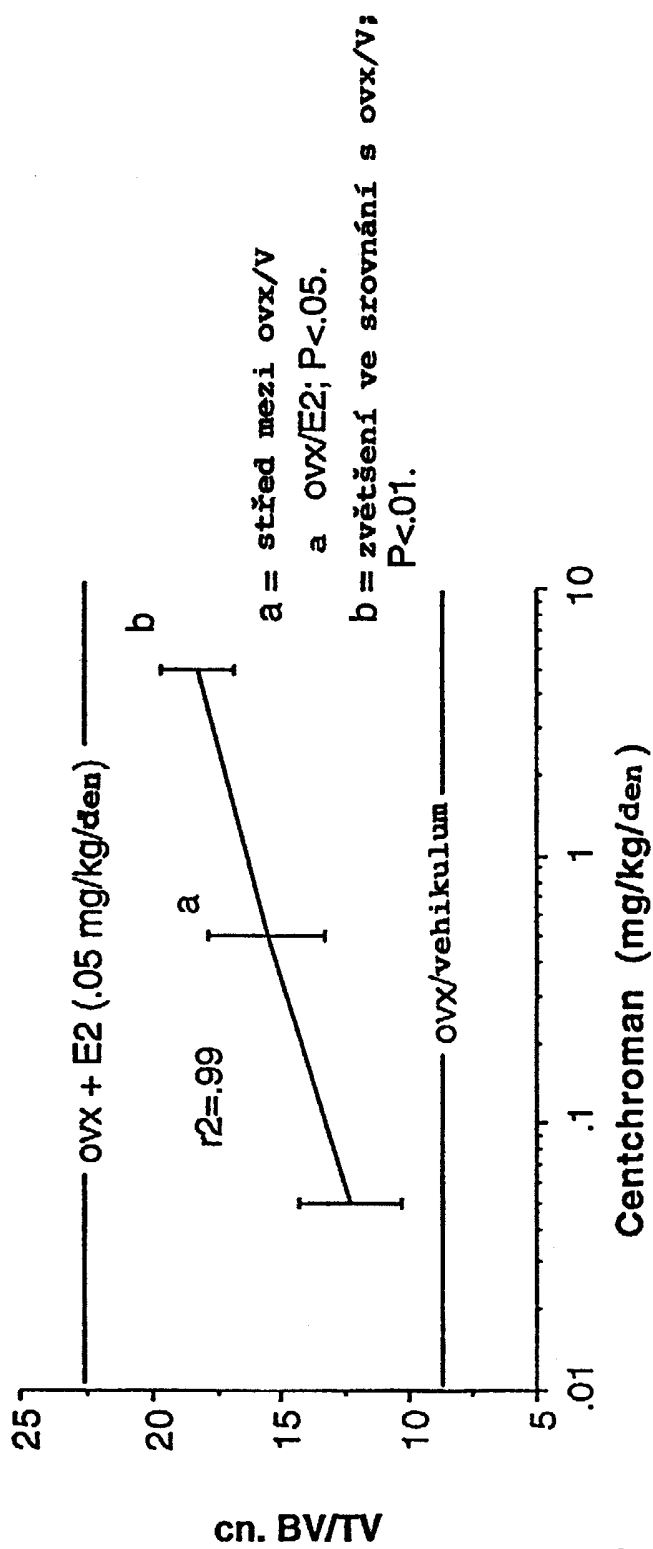
10

3 výkresy

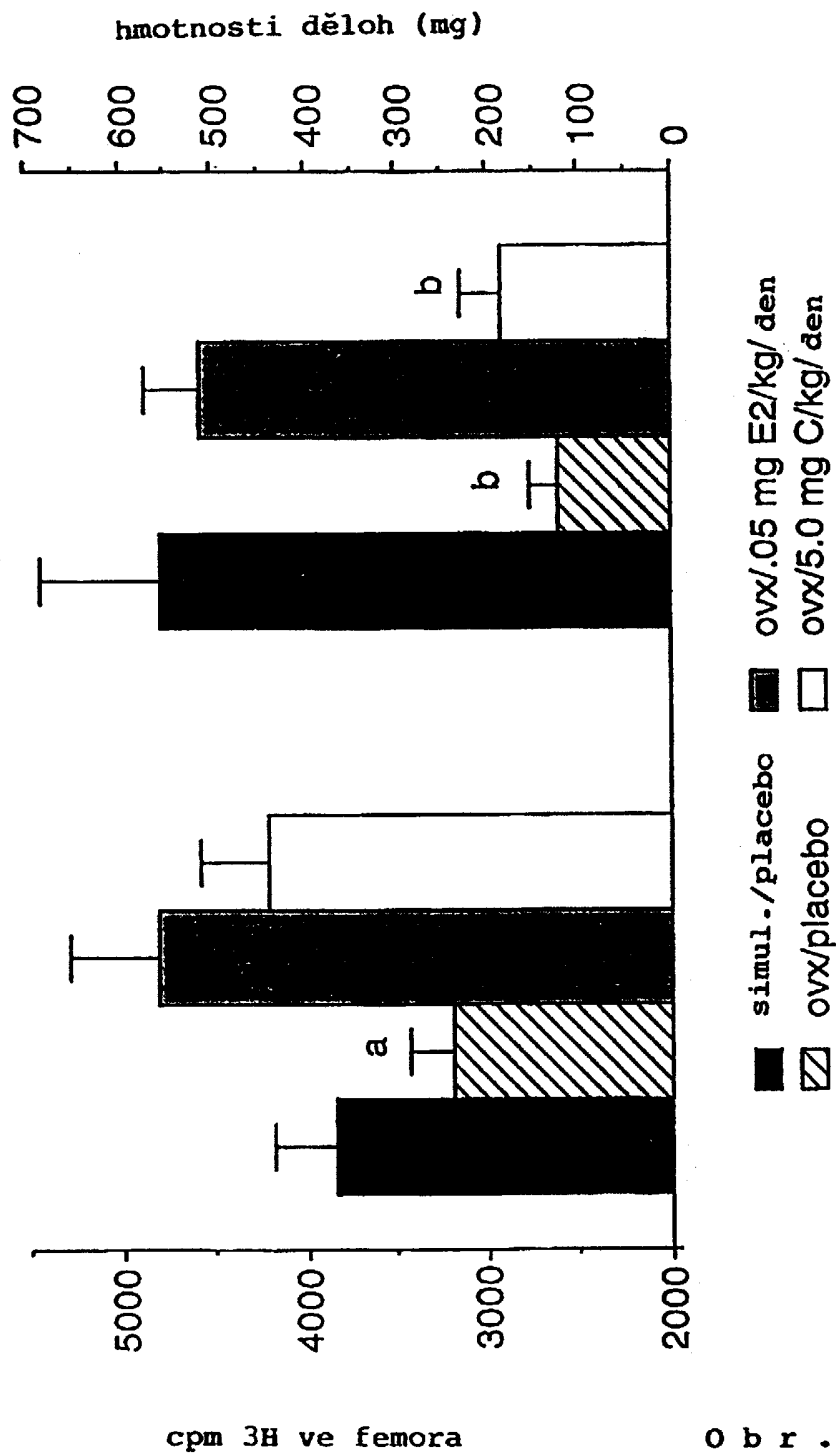


* $P < .05$ pokles ve srovnání se simul. zvířaty ošetřenými vehikulem a ovx myši ošetřené centchromanem; $n=8$ myší/skupina

O b r . 1



O b r . 2



a = významný pokles vs ovx/E2 a ovx/C skupin; $P < .05$
 b = významný pokles vs simul. a ovx/E2 skupin; $P < .01$

Konec dokumentu