

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 951702 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 951702

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
A61K 31/12
A61K 31/015
A61K 31/01 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 10.04.1995

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 10.04.1995

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 13.10.1995

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

12.04.1994 JP 6-73230

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Hoechst Japan Limited, 10-16, 8-chome, Akasaka, Minato-ku, Tokyo, JAPANI, (JP)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Tobe, Hiroyasu, Japan, JAPANI, (JP)

2 • Kitamura, Kazuyuki, Japan, JAPANI, (JP)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Farmaseuttinen menetelmä osteoporoosin hoitamiseksi

Farmaceutisk komposition för behandling av osteoporos

Farmaseuttinen koostumus osteoporoosin hoitamiseksi

Tämä keksintö koskee farmaseuttista koostumusta osteoporoosin hoitamiseksi.

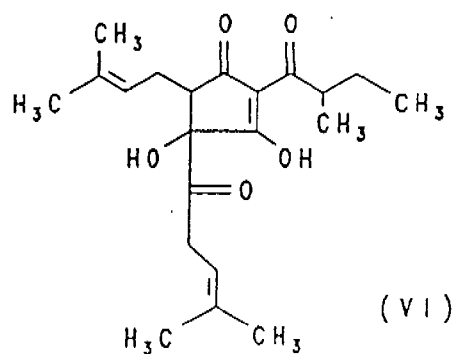
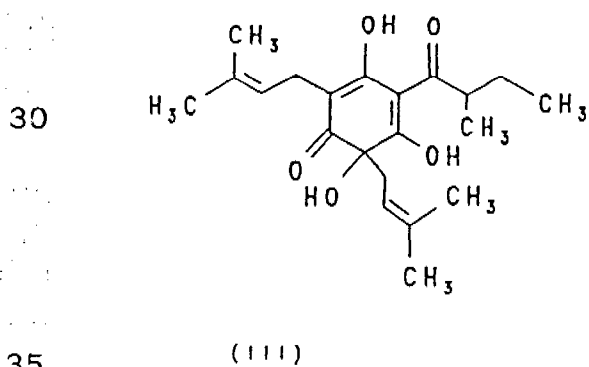
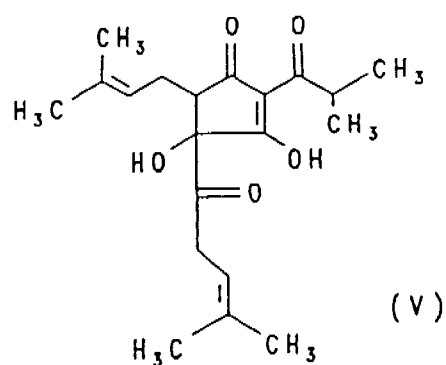
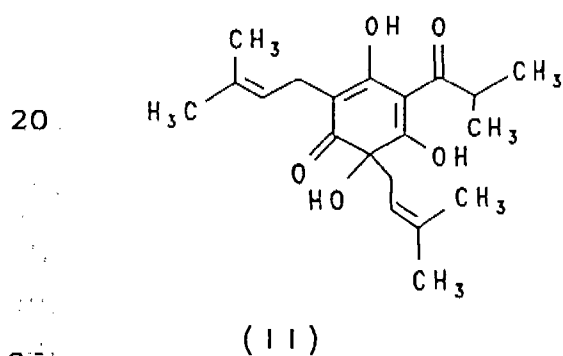
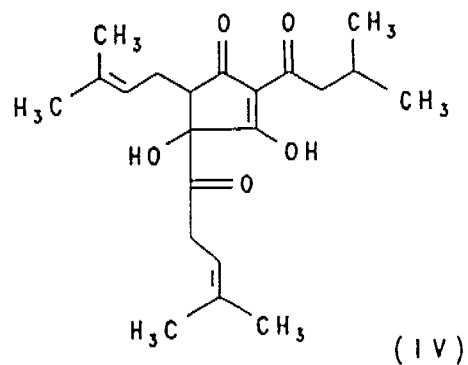
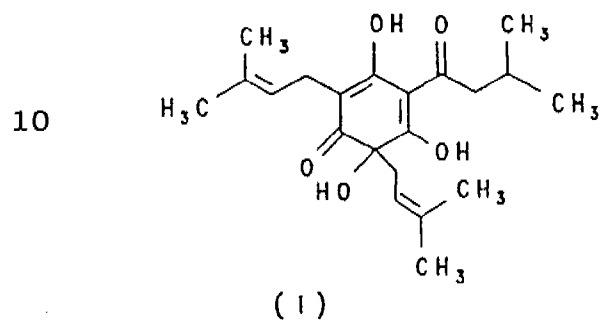
5 Japani on nykyisin ryntäämässä kehittyneen ajan yhteiskunnaksi, jollaista ei ole milloinkaan koettu menneisyydessä ja samanaikaisesti sellaisten potilaiden, joilla on osteoporoosi, määrän kasvu muodostuu nyt vakavaksi ongelmaksi. Sellaisten vanhusten, jotka ovat vuoteenomina
10 johtuen luunmurtumasta, lisääntynyt määrä, pakottaa valta-vaan sairauskulujen lisääntymiseen.

Japanissa on käytetty vitamiini D -valmisteita, kalsitoniinivalmisteita, ipriflavonivalmisteita ja muita samanlaisia terapeuttisena aineena osteoporoosiin. Ei kuitenkaan ole vakiintunut menetelmää osteoporoosin radikaaliksi hoitamiseksi, vaan tässä vaiheessa käytetään yksinkertaisesti oireidenhoitoa. Osteoporoosi kehittyy, kun luun muodostuksen ja luun resorption välinen tasapaino häviää ja tämän mukaisesti katsotaan olevan mahdollista
15 ehkäistä osteoporoosi edistämällä luun muodostusta tai ehkäisemällä luun resorptiota.

Tästä johtuen tämän keksinnön päämääränä on tarjota uusi farmaseuttinen koostumus osteoporoosin hoitamiseksi. Keksijät ovat havainneet erilaisten tutkimusten tuloksena
25 tosiasian, että humalauutteen sisältämillä α -hapoilla ja iso- α -happojohdannaisilla on voimakas inhiboiva aktiivisuus luun resorptiota vastaan ja tämä keksintö on nyt tehty valmiiksi.

Humala (*Humulus lupulus* L.) on alunperin tunnettu
30 lääkekasvina ja sitä on kauan käytetty oluen panossa. Iso- α -happojohdannaiset ovat yhdisteitä, joita muodostuu α -hapoista isomerisoinnin kautta oluen panon aikana (humaalan kiehumisvaiheen aikana) ja olut sisältää niitä kitkerän komponentin aktiivisena aineena. Edellä esitetyn perusteella α -happojen ja iso- α -happojohdannaisten toksisuuden
35

voidaan sanoa olevan riittävän alhaisen. Tiedetään, että α -hapot saattavat sisältää pääasissa humulonia (kaava I), kohumulonia (kaava II) ja adhumulonia (kaava III), kun taas iso- α -happojohdannaiset sisältävät pääasiassa isohumulonia (kaava IV), isokohumulonia (kaava V) ja isoadhumulonia (kaava VI).



Tämän takia tämä keksintö käsittää farmaseuttisen koostumuksen osteoporoosin hoitamiseksi, joka koostumus käsittää aktiivisena aineosana yhden tai useamman yhdisteistä, jotka on valittu ryhmästä, joka muodostuu humulosta, kohumulonista, adhumulonista, isohumulonista, isokohumulonista ja isoadhumulonista.

Keksijät ovat yrittäneet kehittää terapeuttisen aineen osteoporoosia varten ja he suorittivat seulontakokeet aineille luun resorption ehkäisemiseksi.

Toisaalta, eräänä luun resorptiota edistävästä tekijöistä on raportoitu prostaglandiini E_2 [IGAKU NO AYUMI (Journal of Clinical and Experimental Medicine), (1993), vol. 165, s. 568]. Uskotaan, että prostaglandiinia E_2 muodostuu osteoblasteissa, joilla on tärkeä rooli luunmuodotuksessa ja se voi vaikuttaa luun resorptiosoluihin luun resorption edistämiseksi. Jos löydetään jokin aine, joka kykenee inhiboimaan tai antagonisoimaan prostaglandiini E_2 :n toiminnan, mainittu aine olisi aine osteoporoosin hoitamiseksi. Tästä syystä erilaisten tutkimusten tuloksena, keksijät ovat kohdistaneet huomionsa siihen tosiasiaan, että α -hapoilla ja iso- α -happojohdannaisilla, joita humalauutteet sisältävät, on samanlainen rakenne kuin prostaglandiini E_2 :lla, niissä on nimittäin 6-jäseninen tai 5-jäseninen rengas, jossa on tyydyttymätön karbonyyliryhmä ja puhdistetuja α -happoja ja iso- α -happojohdannaisia, ja he tutkivat ne niiden luun resorptiota inhiboivan aktiivisuuden suhteen kuopanmuodostumiskokeella. Tuloksena havaittiin, että α -hapot ja iso- α -happojohdannaiset inhiboivat luun resorptiota konsentraatiolla, joka on niin matala kuin 1×10^{-9} M. Sitä tosiasiaa, että α -hapoilla ja iso- α -happojohdannaisilla on kuopanmuodostumista inhiboiva aktiivisuus, ei oltu raportoitu siihen mennessä, vaan se selvitettiin ensimmäistä kertaa tässä keksinnössä.

Kuten edellä on kuvattu, iso- α -happojohdannaisia valmistetaan isomerisoimalla α -happoja ja tästä johtuen

isomerisointi α -hapoista iso- α -happojohdannaisiksi etenee jatkuvasti eristämisen ja puhdistamisen aikana. Toisaalta fosfomolybdeenihapon (ostettavissa Merck AG:ltä) havaittiin olevan tehokas värireagenssina, joka kehittää keltävän vihreän värin sekä α -hapoille että iso- α -happojohdannaisille, ja mainittua värireagenssia käytettiin identifioimisreagenssina α -hapoille ja iso- α -happojohdannaisille.

Alfahappoja ja iso- α -happojohdannaisia voidaan valmistaa puhdistamalla luonnon humalasta sekä myös tunnetun kemiallisen rakenteen organosynteesillä traditionaalisen menetelmän mukaisesti.

α -happojen tai iso- α -happojohdannaisten annos kliinisessä käytössä, vaikka se vaihtelee riippuen antamismenetelmistä, on tavallisesti välillä 0,1 g - 2 g aikuiselle päivässä (noin 1,5 mg - 30 mg/kg/päivä). Sitä voidaan antaa intravenoosisesti, intramuskulaarisesti, oraalisesti ja intrarektaalisesti. Intravenoosin antamisen tapauksessa voidaan käyttää intravenoosia tippaa tavallisten intravenoosisten injektoiden lisäksi.

α -happoja ja iso- α -happojohdannaisia sisältävät valmisteet valmistetaan tavanomaisella menetelmällä käyttämällä tavanomaisia täyteaineita ja lisäaineita.

Injektoitavia valmisteita voidaan formuloida esimerkiksi injektoitavien jauheiden muotoon. Sellaisessa tapauksessa jauheet voidaan valmistaa lisäämällä yhtä tai useampaa sopivaa vesiliukoista täyteainetta, sellaista kuten mannitoli, sakkaroosi, laktoosi, maltoosi, glukoosi, fruktoosi ja samanlaiset, aktiiviseen aineosaan, liuottamalla seos veteen, jakamalla se putkiin tai ampulleihin, jota seuraa lyofilisointi ja sulkeminen.

Oraalisena valmisteena se voidaan formuloida tavallisten tablettien, kapselien, rakeiden, hienojen rakeiden tai jauheiden muotoon sekä enteerisiksi valmisteiksi.

Enteeriset valmisteet voidaan valmistaa lisäämällä aktiiviseen aineosaan täyteaineita, sellaisia kuten mannitolia, sakkaroosi, laktoosi, maltoosi, tärkkelys, piidioksidi, kalsiumfosfaatti ja samanlaiset, voiteluaineita, 5 sellaisia kuten talkki, magnesiumstearaatti ja samanlaiset, sitovia aineita, sellaisia kuten karboksimeetyyliseluloosa, metyyliiselluloosa, gelatiini, arabikumi ja samanlaiset ja disintegroivia aineita, sellaisia kuten kalsiumkarboksimeetyyliseluloosa ja samanlaiset, jos se on tarpeen, tablettien, rakeiden, hienojen rakeiden ja samanlaisten valmistamiseksi, joihin edelleen lisätään yksi tai useampia enterisiä emäksiä, sellaisia kuten selluloosaasetaatiftalaatti, hydroksipropyylimetyyliiselluloosaftalaatti, hydroksipropyylimetyyliiselluloosa-asetyyliisukki- 15 naatti, polyvinyylialkoholiftalaatti, styreeni-maleiinihapon anhydridi-kopolymeeri, styreeni-maleiinihappo-kopolymeeri, metyyliimetakrylaatti-metakryylihappo-kopolymeeri, metyyliakrylaatti-metakryylihappo-kopolymeeri, ja jos se on tarpeen, väriä muodostavaa ainetta, sellaista kuten titaanioksidi, päällystettyjen valmisteiden valmistamiseksi. Edellä valmistetut enteriset rakeet tai hienot rakeet voidaan kapseloida kapselien muodostamiseksi.

Lisäksi, kapselit, jotka on valmistettu tavanomaisella menetelmällä, voidaan päällystää edellä mainituilla 25 enterisillä emäksillä enteristen kapselien valmistamiseksi. Vaihtoehtoisesti enteriset kapselit voidaan valmistaa käyttämällä kapselia, joka on valmistettu edellä esitetyistä enterisistä emäksistä yksinään tai seoksena gelatiinin kanssa.

30 Lääkepuikkoja voidaan valmistaa lisäämällä aktiiviseen aineosaan lyofiilistä emästä, sellaista kuten puolisynteettistä emästä, jossa kaakaovoita tai rasvahapon triglyseridiä on sekoitettu rasvahapon monoglyseridin tai rasvahapon diglyseridin kanssa erilaisissa suhteissa, tai 35 hydrofiilisiä emäksiä, sellaisia kuten polyetyleeniglykoli

ja glyserogelatiini ja samanlaiset, liuottamalla kuumentamalla, jolloin saadaan homogeeninen seos ja sen jälkeen kaatamalla seos muottiin lääkepuikon valmistamiseksi.

5 Tätä keksintöä kuvataan havainnollisemmin seuraavien esimerkkien avulla.

Esimerkit

Esimerkki 1

(1) α -happojen puhdistaminen humalasta

250 g:aan kaupallisesti saatavaa humalaa (ostettiin
10 Rupofresh Co., Inc:lta) lisättiin 500 ml asetonia, ja perkolaatio- ja uuttomenetelmät yhden tunnin ajan toistettiin yhteensä kolme kertaa. Saatu asetoniuute konsentroitiin alennetussa paineessa, jolloin saatiin 50 g mustaa siirappimaista ainetta. Osa saadusta siirapista (17,5 g) liuotettiin 500 ml:aan 0,5 % etikkahappo/80-%:ista metanolia
15 ja kehitettiin anioninvaihtohartsilla Dowex-1 (ristisitoutumisaste X4, partikkelikoko 200 - 400 meshiä, etikkahappopotyyppi, The Dow Chemical Co.) käyttämällä pylvästä (5 cm halkaisija x 27,5 cm pituus) virtausnopeudella 3 ml/minuutti.
20

Adsorboituneet humalauutteet eluoitiin etikkahapon ja metanolin seoksen gradientilla kirjallisuuden mukaisesti (Agric. Biol. Chem., (1985), vol. 49, s. 399 - 403) ja eluaatti fraktioitiin 10 g:n osiin nestepainosta fraktion-
25 kerääjällä. Ensin käytettiin 1 l 0,5-%:inen etikkahappo/80-%:ista metanolia ja sen jälkeen 2 l 5-%:inen etikkahappo/80-%:ista metanolia eluution suorittamiseksi.

Jokaisen 10 μ l:n näytteen otto suoritettiin fraktioista nrot 1 - 300 sellaisista fraktioista, jotka kukin
30 oli fraktioitu 10 g:ksi ja näytteet spotattiin silikageeliohutkerrokselle (Silica gel plate No. 5715, saatavana Merck AG:ltä), joka kehitettiin sitten orgaanisten liuottimien seoksella (etyyliasetatti : metanoli = 30:1). Silikageelilevyn päälle ruiskutettiin 4-%:ista metanolipitoista fosfomolybdeenihappoliuosta (ostettiin Merck
35

AG:ltä) värireaktionesteinä fenoliselle hydroksiryhmälle, jonka jälkeen se saatettiin kosketukseen kaasumaisen ammoniakin kanssa värinmuodostuksen aikaansaamiseksi. α -happofraktio värjäytyi kellertävän vihreäksi ja tätä värjäytymisreaktiota käytettiin seuraavaan α -happofraktion identifiointiin.

Fraktiot (fraktiot nrot 232 - 240), jotka sisälsivät α -happofraktiot, jotka oli eluoitu Dowex-1-pylväskromatografilla, puhdistettiin edelleen käyttämällä geelisuodatuskromatografiaa: Sephadex LH-20 (5 cm halkaisija x 39 cm pituus, saatavana Pharmacia AB:ltä). Jokainen 5 g:n osa fraktioitiin käyttämällä metanolia eluenttina fraktionkerääjää käyttämällä. Tuloksena α -hapot eluoituivat fraktioista, joiden fraktionumerot olivat 39 - 60, konsentroitiin alennetussa paineessa ja kuivattiin, jolloin saatiin 150 mg öljymäistä ainetta. Tämän mukaisesti 100 g humalaa kohti laskettiin saatavan 170 mg α -happoja.

(2) α -happojen rakenteen määrittäminen

Näin fraktioitujen ja puhdistettujen α -happojen rakenteen tutkiminen suoritettiin käyttämällä värireaktiota, protoni- ja ^{13}C -ydinmagneettisen resonanssin spekttriä, massaspekttriä ja ultraviolettia absorptiospekttriä. Tuloksena havaittiin, että α -happofraktiot sisältävät pääasiassa humulonia, edelleen kohumulonia ja adhumulonia.

(3) α -happojen värireaktio käyttämällä rauta(3)kloridia (FeCl_3)

2-%:ista FeCl_3 -liuosta (ostettiin Wako Pure Chemicals Ltd:ltä) etanolissa ruiskutettiin α -happojen päälle silikageelilevyllä samanlaisen sinimusta sävyn kehittämiseksi kuin kirjallisuudessa on esitetty (Agric. Biol. Chem., loc. cit.). Tämän mukaisesti näiden α -happojen värjäytyminen oli yhdenmukaista kirjallisuudessa esitetyn kanssa.

(4) ^1H -NMR-spektri

Deuteriometanoliin liuotettiin 20 mg α -happoja ja mainittu ^1H -NMR-spektri määritettiin 400 MHz:ssä (JEOL Ltd., JNM-GSX400, saatavana JEOL Ltd:ltä). Tulokset esitetään alla. TMS:ää käytettiin sisäisenä standardina.

^1H -NMR δ (CD_3OD): 0,928 (3H, d, $J = 6,8$ Hz, CH_3), 0,950 (3H, d, $J = 6,8$ Hz, CH_3), 1,508 (3H, s, CH_3), 1,632 (3H, s, $\text{CH}_3 \times 2$), 1,704 (3H, s, CH_3), 2,048 (1H, m, $J = 6,8$ Hz, $-\text{CH}<$), 2,415 (3H, d, $J = 7,2$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 2,632 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, $-\text{CH}<$), 2,737 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, $-\text{CH}<$), 2,924 (1H, d, $J = 6,8$ Hz, $-\text{CH}<$), 2,991 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, $-\text{CH}<$), 5,095 (1H, t, $J = 6,8$ Hz, $-\text{CH}=$), 5,125 (1H, t, $J = 7,2$ Hz, $-\text{CH}=$).

Nämä arvot ovat yhdenmukaiset humulonille kirjallisuudessa esitettyjen arvojen kanssa (Wallestein Lab., tiedonanto, (1964), vol. 27, s. 19 - 28).

(5) ^{13}C -NMR-spektri

Deuteriometanoliin liuotettiin 20 mg α -happoja ja mainittu ^{13}C -NMR-spektri määritettiin 100 MHz:ssä (JEOL Ltd., JNM-GSX400, saatavana JEOL Ltd:ltä). Tulokset esitetään alla. TMS:ää käytettiin sisäisenä standardina.

^{13}C -NMR δ (CD_3OD): 18,063, 18,154, 22,283, 23,315, 23,437, 26,275, 27,702, 36,111, 44,384, 83,819, 104,189, 119,566, 125,971, 130,267, 135,397, 182,574, 193,230, 198,937, 199,544.

(6) Ultraviolettiaabsorptiospektri

α -happojen metanolipitoisesta liuoksesta (10 mg/ml) määritettiin ultraviolettiaabsorptiospektri. Sen maksimiabsorptio oli E (1 %, 1 cm) 236, 283, 323, jotka ovat yhdenmukaiset kirjallisuudessa esitettyjen arvojen kanssa (Bull. Soc. Chim. Belg., (1963), vol. 72, s. 60 - 68).

(7) Massaspektri

EIMS m/z : 362 (M^+), 344, 248, 234, 233, 215, 191, 149, 114, 69.

Erilaisten spektrien tulosten määrittämisellä edellä kohdissa 4 - 7 havaittiin, että α -happofraktio sisältää

pääasiassa humulonia, edelleen kohumulonia ja adhumulonia, joilla on samanlainen matriksi humulonin kanssa ja erilaiset alemmat alkyyliryhmät verrattuna humuloniin.

Esimerkki 2

5 α -happojen luun resorptiota inhiboivan aktiivisuuden määrittäminen

(1) Solun valmistus

10 - 11 päivää vanhoilta ICR-hiiriltä (ostettiin Charles River Inc.) poistettiin reisiluu ja sääriluu, jotka pilkottiin sen jälkeen käyttämällä saksia α -MEM-väliaineessa (ostettiin Flow Laboratories Inc.), joka sisälsi 5 % FBS:a (ostettiin Irving Scientific Inc:lta), 100 U/ml penisilliiniä ja 100 μ g/ml streptomysiiniä. Sen jälkeen saatu supernatantti otettiin talteen pipetoimalla, pestiin 15 väliaineella ja suspendoitiin sitten 5-%:iseen FBS:iin α -MEM-väliaineessa, jolloin muodostui luusoluja, jotka sisälsivät osteoklasteja. Näin valmistettua luusolususpensiota inkuboitiin väliaineessa, joka sisälsi rotan paratyroidihormonia, yhden viikon ajan. Kun inkubointi oli suoritettu loppuun, solut otettiin talteen käyttämällä 20 0,05-%:ista trypsiini-EDTA-PBS:a ja ne käytettiin kuopanmuodostuskokeeseen.

(2) Koe, jossa käytettiin kuopanmuodostuskoetta

25 Norsunluukappale leikattiin 150 μ m:n paksuuteen käyttämällä matalanopeuksista täsmäleikkuria (ostettiin Buehler GmbH:lta) ja sen jälkeen leikattiin pyöreitä kappaleita, joiden halkaisija oli 6 mm käyttämällä yksireikäistä lävistintä. Nämä norsunluukappaleet upotettiin 70-%:iseen etanoliin, altistettiin sonikoinnille kahdesti 30 kulloinkin 5 minuutiksi ja sen jälkeen ne pestiin kolme kertaa steriilillä PBS:lla ja kahdesti väliaineella. Nämä norsunluukappaleet laitettiin 96-kuoppaiselle viljelymaljalle (ostettiin Falcon Inc:ltä) ja 100 μ l väliainetta, joka sisälsi lääkkeitä eri konsentraatioissa, lisättiin. 35 Sen jälkeen jokaiseen kuoppaan lisättiin 100 μ l väliainet-

ta, joka sisälsi edellä valmistettuja luusoluja 1×10^5 . Inkubointi suoritettiin 37°C :ssa 10% :isessa CO_2 -inkubaattorissa 2 päivää. Inkuboinnin mentyä loppuun, solu norsunluukappaleen päältä poistettiin, absorptiokolot värjättiin
5 Coomassie Brilliant Blue'lla ja näin muodostuneiden absorptiokolojen lukumäärä laskettiin mikroskoopilla.

Tulokset esitetään taulukossa 1. Alfahapot inhiboivat luun resorptiota annoksesta riippuvalla tavalla, maksimaalisen inhiboivan annoksen puolikkaan (ID_{50}) ollessa
10 $1,2 \times 10^{-9}$ M.

Taulukko 1

Lääkekonsentraatio (M)	Absorptiokolojen lukumäärä (keskiarvo $\pm$ SD)	Inhiboitumisprosentti (%)
0	$224,0 \pm 17,4$	-
1×10^{-4}	0	100
1×10^{-5}	$12,3 \pm 7,3$	94,5
1×10^{-6}	$21,5 \pm 9,1$	90,4
1×10^{-7}	$32,0 \pm 9,3$	85,7
1×10^{-8}	$81,5 \pm 14,7$	63,6
1×10^{-9}	$107,0 \pm 29,1$	52,2
1×10^{-10}	$188,5 \pm 57,2$	15,8

Esimerkki 3

30 Koe, jossa käytetään kuopanmuodostuskoetta organosynteettisellä α -hapolla

Organosynteettinen humuloni valmistettiin Obara H. et al.:n, julkaisussa Bull. Chem. Soc. Jpn., vol. 62, s. 3034 - 3035 (1989) mukaisesti. Näin saadun organosynteettisen humulonin ja esimerkissä 1 saatujen α -happojen luun
35

resorptiota inhiboivat aktiivisuudet määritettiin esimerkiksi 2 kohdassa (2) kuvatulla kokeella.

Tuloksena määritettiin 50-%:inen inhiboiva arvo (ID_{50}), jolloin havaittiin, että organosynteettinen humu-
 5 loni ja esimerkin 1 mukaiset α -hapot inhiboivat luun re-
 sorptiota konsentraationa, joka oli niin alhainen kuin
 $1,3 \times 10^{-7}$ M ja $3,5 \times 10^{-7}$ M, mainitussa järjestyksessä.
 Toisaalta esimerkissä 2 valmistettujen ja 10 kuukautta
 säilytettyjen α -happojen ID_{50} -arvo oli $3,5 \times 10^{-7}$ M, noin
 10 300 kertaa alempi kuin esimerkissä 2 saatu arvo. Syy orga-
 nosynteettisen humulonin alempaan aktiivisuuteen voi liit-
 tyä alhaiseen stabiiliuteen.

Esimerkki 4

Natiivin humulonin puhdistus α -hapoista

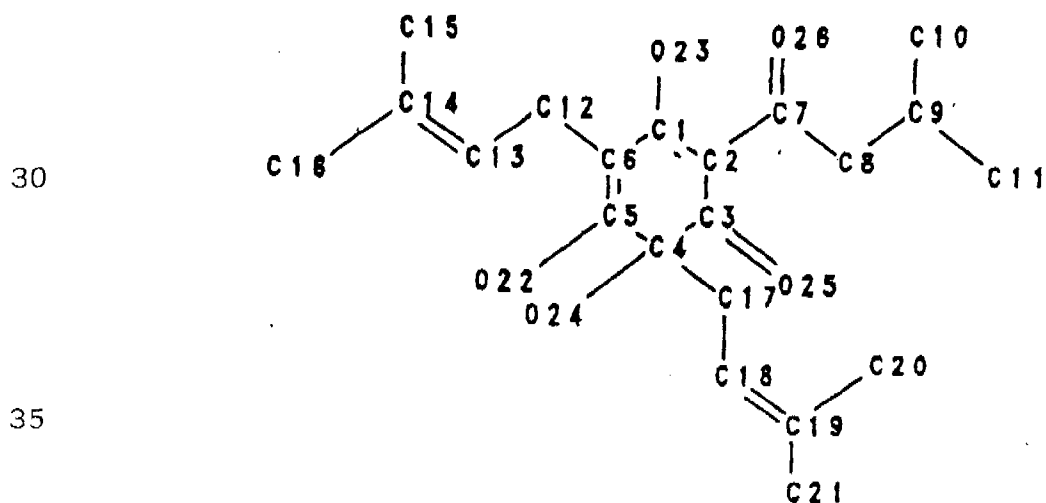
15 Natiivi humuloni puhdistettiin esimerkissä 1 saa-
 duista α -hapoista tavanomaisten menetelmien mukaisesti
 [Ber. Chem. vol. 49, s. 780 - 794 (1916) ja J. Chem. Soc.
 s. 1906 - 1914 (1952)]. Saadut humulonin kemialliset tu-
 lokset ovat seuraavat:

- | | | |
|----|---|---|
| 20 | 1) MP | 362 |
| | 2) sulamispiste | 63 °C |
| | 3) $[\alpha]_D$ | -206 °C (C = 0,38, MeOH) |
| | 4) IR | $\nu_{\max}$ cm^{-1} (KBR) 3370, 1670, 1630,
1530, 1470, 1350 |
| 25 | 5) UV | $\lambda_{\max}$ nm (EtOH) (ϵ) 228 (15900), 326
(12500), 362 (10400)
$\lambda_{\max}$ nm (happopitoinen EtOH) (ϵ) 234
(~11000), 286 (~7300), 324, 360 (sd) |
| | 6) ^1H -NMR ($\text{CCl}_4:\text{CDCl}_3 = 4:1$) | |
| 30 | δ : 0,99, 1,03 (kukin 3H, d, J = 7Hz, C9-(CH ₃) ₂), 1,54, 1,68,
1,70, 1,73 (kukin 3H, s, C14-(CH ₃) ₂ , C19-(CH ₃) ₂), 2,10 -
2,20 (1H, nonetti, C9-H), 2,43, 2,53, (kukin 1H, dd, J =
8, 14 Hz, C12- tai C17-H ₂), 2,70 - 2,80 (2H, oktetti,
C8-H ₂), 2,99, 3,07 (kukin 1H, dd, J=7, 14 Hz, C12- tai | |

C17-H₂), 5,00, 5,11 (kukin 1H, triplettimäinen, C13- ja C18-H)

7) ¹³C-NMR

	Atomin numero	α-happojen tulokset
5	1	191,0
	2	106,0
	3	194,8
	4	78,8
	5	167,4
10	6	109,6
	7	199,1
	8	46,4
	9	26,1
	10	22,9
15	11	23,1
	12	21,3
	13	121,6
	14	132,0
	15	18,0
20	16	26,3
	17	43,0
	18	116,5
	19	137,6
	20	18,1
25	21	26,5



Tulokset olivat yhdenmukaiset julkaisussa Organic Magnetic Resonance, vol. 7, s. 415 - 417, (1975) esitettyjen tulosten kanssa.

Esimerkki 5

5 Natiivin humulonin luun resorptiota inhiboivan aktiivisuuden määrittäminen

Esimerkissä 4 saadun natiivin humulonin ja esimerkiksi 3 saadun organosynteettisen humulonin luun resorptiota inhiboivat aktiivisuudet määritettiin käyttämällä
10 esimerkin 2 kohdassa (2) kuvattua koetta.

Tulokset esitettiin taulukossa 2. Tuloksena natiivin humulonin ja organosynteettisen humulonin 50 %:n inhiboivat arvot (ID_{50}) inhiboivat luun resorptiota konsentraationa, joka oli niin matala kuin $5,9 \times 10^{-9}$ M ja $2,6 \times$
15 10^{-8} M, mainitussa järjestyksessä.

Taulukko 2

Synteettisen humulonin ja natiivin humulonin vaikutus kuopan muodostumiseen

Annos (M)	Organosynteettinen humuloni		Natiivi humuloni	
	Kuoppien lukumäärä (keskiarvo $\pm$ SD)	Inhibointi (%)	Kuoppien lukumäärä (keskiarvo $\pm$ SD)	Inhibointi (%)
0	328,0 $\pm$ 51,0	—	328,0 $\pm$ 51,0	—
25 10^{-11}	281,3 $\pm$ 38,1	14,2	274,3 $\pm$ 91,6	16,4
10^{-10}	221,3 $\pm$ 54,1	32,5	274,3 $\pm$ 54,9	16,4
10^{-9}	221,8 $\pm$ 88,3	32,4	251,5 $\pm$ 135,4	23,3
30 10^{-8}	217,0 $\pm$ 89,1	33,8	128,5 $\pm$ 23,1	60,8
10^{-7}	70,7 $\pm$ 9,3	78,4	34,5 $\pm$ 7,4	89,5
10^{-6}	33,7 $\pm$ 20,2	89,7	6,5 $\pm$ 3,8	98,0
10^{-5}	6,8 $\pm$ 5,3	97,9	0,3 $\pm$ 0,5	99,9

Patenttivaatimukset

1. Farmaseuttisen koostumuksen käyttö lääkkeen valmistamiseksi osteoporoosin hoitamiseksi, joka koostumus käsittää aktiivisena aineosana vaikuttavan määrän yhtä tai useampaa yhdistettä, jotka on valittu ryhmästä, joka käsittää humulonin, kohumulonin, adhumulonin, isohumulonin, isokohumulonin ja isoadhumulonin, yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan tai täyteaineen kanssa.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen farmaseuttisen koostumuksen käyttö osteoporoosin hoitamiseksi, tunnetaan siitä, että koostumus käsittää humulonin aktiivisena aineosana.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen farmaseuttisen koostumuksen käyttö osteoporoosin hoitamiseksi, tunnetaan siitä, että koostumus käsittää kohumulonin aktiivisena aineosana.
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen farmaseuttisen koostumuksen käyttö osteoporoosin hoitamiseksi, tunnetaan siitä, että koostumus käsittää adhumulonin aktiivisena aineosana.
5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen farmaseuttisen koostumuksen käyttö osteoporoosin hoitamiseksi, tunnetaan siitä, että koostumus käsittää isohumulonin aktiivisena aineosana.
6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen farmaseuttisen koostumuksen käyttö osteoporoosin hoitamiseksi, tunnetaan siitä, että koostumus käsittää isokohumulonin aktiivisena aineosana.
7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen farmaseuttisen koostumuksen käyttö osteoporoosin hoitamiseksi, tunnetaan siitä, että koostumus käsittää isoadhumulonin aktiivisena aineosana.
8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen farmaseuttisen koostumuksen käyttö osteoporoosin hoitamiseksi, tun-

n e t t u siitä, että koostumus käsittää aktiivisena aineosana humulonin, kohumulonin, adhumulonin, isohumulonin, isokohumulonin ja isoadhumulonin seoksen.

5 9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen farmaseuttisen koostumuksen käyttö osteoporoosin hoitamiseksi, t u n n e t t u siitä, että koostumus käsittää aktiivisena aineosana humulonin, kohumulonin, adhumulonin, isohumulonin, isokohumulonin ja isoadhumulonin, jotka ovat saatavissa humalasta uuttamalla, seoksen.

10 10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen farmaseuttisen koostumuksen käyttö osteoporoosin hoitamiseksi, t u n n e t t u siitä, että koostumus käsittää aktiivisina aineosina humulonin, kohumulonin ja adhumulonin, jotka ovat saatavissa humalasta uuttamalla.

15 11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen farmaseuttisen koostumuksen käyttö osteoporoosin hoitamiseksi, t u n n e t t u siitä, että koostumus käsittää aktiivisina aineosina isohumulonin, isokohumulonin ja isoadhumulonin, jotka ovat saatavissa humalasta uuttamalla.