

Згідно з винаходом запропоновано фармацевтичну комбінацію агоністів/антагоністів естрогену та засобів, що стимулюють утворення кісток та зростання кісткової маси, комплекти, що містять такі комбінації, та використання таких комбінацій для лікування станів ссавців, включаючи людину, для яких характерна слабка кісткова маса.

Остеопороз - системне кісткове захворювання, для якого характерна слабка кісткова маса та деградація кісткової тканини, що призводить до зростання ламкості кісток та схильності до переломів. В США хвороба вражає більше 25 мільйонів людей, викликаючи більше 1,3 мільйонів переломів кожного року, у т.ч. - 500000 переломів спини, 250000 - стегна та 240000 - зап'ястків. Переломи стегна найсерйозніші, з 5-20% смертності пацієнтів протягом року, а біля 50% виживших залишаються інвалідами.

Остеопороз має більший ступінь ризику для літніх людей і тому передбачають проблему значного його зростання з постарінням популяції. Передбачають, що в усьому світі число переломів зросте утричі протягом наступних 60 років, і що в 2050 році в усьому світі число переломів стегна буде 4,5 мільйона щорічно.

Ризик для жінок більший, ніж для чоловіків. Жінки виявляють різке прискорення втрат кісткової тканини безпосередньо після менопаузи. Інші фактори, що сприяють остеопорозу - паління, алкогольна залежність, малорухомий спосіб життя та низьке надходження кальцію.

Естроген є засобом попередження остеопорозу або втрат кісткової тканини після менопаузи у жінок. Крім того Black et al. у EP 0605193A1 показали, що естроген, особливо при оральному вживанні, знижує рівень у плазмі ліпопротеїнів низької густини та підвищує вміст цілющих ліпопротеїнів високої густини. Довготриваюча естрогенна терапія, однак, призводить до різних розладів, включаючи зростання ризику раку матки, внутрішньоматочного раку та можливості раку молочних залоз, тому багато жінок уникають такого лікування або приймають ліки тільки короткий відрізок часу. Хоча відомо, що ризик внутрішньоматочного раку зменшують конкурентним використанням прогестерону та естрогену, але вони викликають у пацієнта неприйнятну кровотечу. Крім того, комбінування прогестерону та естрогену, здається, притупляє зниження естрогеном сироваточного холестерину. Значні небажані побічні ефекти, що асоціюються з терапією естрогеном, викликають необхідність розвивати альтернативну терапію остеопорозу, що має бажаний цілющий вплив на сироваточні ліпопротеїни низької густини, але не викликає небажаних побічних ефектів.

Нещодавно було запропоновано кілька агоністів/антагоністів естрогену для лікування остеопорозу. Було проінформовано (Osteoporosis Conference Scrip No. 1812/13 April 16/20, 1993, р. 29), що ралоксифен, 6-гідрокси-2-(4-гідроксифеніл)-3-[4-(2-піперидинетокси)бензоіл]бензо[*b*]тіофен імітує сприятливу дію естрогену на кістки та ліпіди, але на відміну від естрогену має мінімальний стимулюючий вплив на матку. [Black L.J. et al., Raloxifene (LY139481 Hcl) Prevents Bone Loss and Reduces Serum Cholesterol Without Causing Uterine Hypertrophy in Ovariectomized Rats, J. Clin. Invest., 1994, 93:63-69].

Антиестрогеном є також тамоксифен, 1-(4-β-диметиламіноетоксифеніл)-1,2-дифеніл-бут-1-ен, який пропонують як остеопорозний засіб, який виявляє паліативну дію на рак молочних залоз, але були повідомлення, що він має деякий естрогенний вплив на матку. Gill-Shama et al., J. Reproduction and Fertility (1993) 99 395 показали, що тамоксифен у дозі 200 та 400мг/кг на добу зменшує масу та вторинні статеві органи у самців пацюків.

На додаток, патент США 5254594 (наданий як посилання) розкриває використання дролоксифену для лікування хвороб кісток, включаючи остеопороз.

Такі засоби, як дролоксифен попереджають втрату кісткової тканини і тому зменшують ризик переломів без побічної дії естрогену. Однак, від естрогену та його агоністів поодинокі можна тільки чекати зменшення ризику переломів приблизно на 50%, залишаючи приблизно 50% жінок з остеопенією під загрозою переломів.

Такі неестрогенні агоністи/антагоністи, як бісфосфонати, також запропоновано для лікування остеопорозу. Наприклад, фозамакс - бісфосфонат, який широко вживається при лікуванні остеопорозу. Інші бісфосфонати, про які регулярно повідомляють, включають ризедронат, тилудронат та ібандронат.

Frost et al., "Treatment of Osteoporosis by Manipulation of Coherent Bone Cell Populations", Clinical Orthopedics and Related Research, 143, 227 (1979) розкрили теоретичну модель, яка підтверджує можливість синхронізації активності та метаболізму кісткових клітин при застосуванні сперше активатору кісткових клітин, а потім інгібуючим кісткову ресорбцію засобом, що далі призводить до нормального формування кісток.

Tang et al., Restoring and Maintaining Bone in Osteogenic Female Rat Skeleton; I/ Changes in Bone Mass and Structure, J. Bone Mineral Research 7 (9) 1093-1104, 1992, розкрили загальні уявлення про втрату, перетворення та утворення (ВПУ), практичний підхід до позбуття існуючого остеопорозу. Концепція ВПУ використовує анаболіки для відновлення кісткової маси та структури (+фаза) а потім переходу до засобу з стійкою здатністю до утворення кісткової маси для збереження нової кістки (+/- фаза). При дослідженні пацюків використовували PGE₂ та ризедронат, бісфосфонат, побачивши, що більшість нових сітчастих та мозкових кісток, які індуковані PGE₂, можуть сформуватися щонайменше через 60 діб після припинення PGE₂ з застосуванням ризедронату.

Комбінації бісфосфонатів та простагландинів для лікування розкрито у патентній заявці EP 0381296, де після періоду активації кісток або лікувального режиму використовували режим інгібування кісткової ресорбції. Приклади кісткових активаторів, наведених у цьому посиланні, включають паратиреоїдний гормон (ПТГ), неорганічні фосфати, гормон росту, фторид, тиреоїдний гормон (наприклад, тиреоксин) деякі метаболіти вітаміну D та простагландини (PGE₂ у дозі 10мг/кг на добу). Поліфосфонати розкриті як інгібітори кісткової ресорбції.

PCT/US93/08529 розкриває одночасне постачання такого кісткового активатора, як простагландин, який хімічно сполучено з інгібітором кісткової ресорбції, який селективно постачає кістковий активатор у потрібне місце. При частковому гідролізі нової сполуки, продукти гідролізу здатні забезпечити інгібуючу активність по відношенню до кісткової ресорбції (через бісфосфонати) та ріст кісток або стимулювання активності (через PGE₂).

Дію комбінації простанландину E₂ та ризедронату (бісфосфонату) вивчали Lin et al., Effects of

Prostaglandin E₂ and Risedronate Administration on Cancellous Bone in Older Female Rats, Bone 15(5), 489-496 1994.

Gui et al., Experimental Study on Antiatherosclerotic Treatment by PGE₂ Combined With Vitamine E and Estradiol, Chinese Medical Journal, 108(1) 33-36 1995, показали, що одинична доза PGE₂ у комбінації з вітаміном Е та естрадіолом виявляє більш спрямоване інгібування атеросклеротичних пошкоджень аорти та серця, а також на агрегацію тромбоцитів, розмноження клітин гладких м'язів, пероксидацію ліпідів, ніж одинична доза PGE₂.

Реферат у "Nonhormonal Alternatives for the Management of Early Menopause in Younger Women with Breast Cancer Monogr. Natl. Cancer Inst. (16) 161-167, 1994, статті The use of several nonestrogen approach for the prevention and treatment of osteoporosis" є багатообіцяючим і дають такі традиційні рекомендації до підтримання скелетної цілісності, як вправи для зниження ваги, збагачена кальцієм дієта з обмеженням кофеїну, алкоголю та білків; відмова від паління; а заходи для мінімізації поширюються на використання або дослідження лікувальних засобів (поодинокі чи у комбінації). Ці засоби включають прогестини, метаболіти вітаміну D, інтраназальний чи для ін'єкцій синтетичний лососевий кальцитонін, бісфосфонати, флуорид натрію, паратиреоїдний гормон, фактори росту, тамоксифен тощо.

Отже, незважаючи на існуючу різноманітність способів лікування остеопорозу, існує постійна потреба та пошук альтернативної терапії, оскільки існуючі способи мають тільки обмежений успіх у зменшенні остеопорозних переломів.

Винахід спрямовано на фармацевтичні композиції, що включають агоністи/антагоністи естрогену та анаболіки, та використання таких композицій для лікування станів, які обумовлені слабкою масою кісток, включаючи остеопороз у ссавців (наприклад людей, особливо жінок).

Комбінації включають терапевтично діючу кількість першої сполуки, яка є агоністом/антагоністом естрогену; та терапевтично діючу кількість другої сполуки, яка є простагландином чи агоністом/антагоністом простагландину.

Кращі агоністи/антагоністи естрогену включають дролоксифен, ралоксифен, тамоксифен, 4-гідрокситамоксифен,

Цис-6-(4-флуорфеніл)-5-[4-(2-піперидин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;
(-)-Цис-6-феніл-5-[4-(2-піролідін-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;
Цис-6-феніл-5-[4-(2-піролідін-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;
Цис-[6'-піролідинетокси-3'-піридил]-2-феніл-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідронафталін;
1-(4'-піролідинетоксифеніл)-2-(4'-флуорфеніл)-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідрокінолін;
Цис-6-(4-гідроксифеніл)-5-[4-(2-піперидин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол; та
1-(4'-піролідинетоксифеніл)-2-феніл-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідрокінолін.

Кращі анаболіки включають PGD₁, PGD₂, PGE₁, PGE₂, PGF₂, PGF_{2α} та 3S-(3-гідрокси-4-фенілбутил)-2R[6-(1H-тетразол-5-іл)-гексил]-циклопентанон.

Другий аспект винаходу полягає у способі лікування станів ссавців, які обумовлені слабкою масою кісток,

- а) терапевтично діючою кількістю першої сполуки, яка є агоністом/антагоністом естрогену; та
- б) терапевтично діючою кількістю другої сполуки, яка є простагландином чи агоністом/антагоністом простагландину.

Кращі агоністи/антагоністи естрогену у цьому способі включають дролоксифен, ралоксифен, тамоксифен, 4-гідрокситамоксифен,

Цис-6-(4-флуорфеніл)-5-[4-(2-піперидин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;
(-)-Цис-6-феніл-5-[4-(2-піролідін-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;
Цис-6-феніл-5-[4-(2-піролідін-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;
Цис-1-[6'-піролідинетокси-3'-піридил]-2-феніл-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідронафталін;
1-(4'-піролідинетоксифеніл)-2-(4'-флуорфеніл)-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідрокінолін;
Цис-6-(4-гідроксифеніл)-5-[4-(2-піперидин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол; та
1-(4'-піролідинетоксифеніл)-2-фент-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідрокінолін.

Кращі анаболіки у цьому способі включають PGD₁, PGD₂, PGE₁, PGE₂, PGF₂, PGF_{2α} та 3S-(3-гідрокси-4-фенілбутил)-2R[6-(1H-тетразол-5-іл)-гексил]-циклопентанон.

Кращий аспект цього способу передбачає, що стан, який обумовлений слабкою масою кісток, представлено остеопорозом.

Другий кращий аспект полягає у тому, що першу та другу сполуки вживають одночасно.

Інший кращий аспект полягає у тому, що другу сполуку вживають протягом від трьох місяців до трьох років.

Як варіант, застосування другої сполуки супроводжується вживанням першої сполуки протягом від трьох місяців до трьох років без вживання другої сполуки протягом від трьох місяців до трьох років.

Альтернативно, застосування другої сполуки супроводжується вживанням першої сполуки строком більшим, ніж від трьох місяців до трьох років, без вживання другої сполуки строком більшим, ніж від трьох місяців до трьох років.

Інший аспект винаходу представлено синергетичною фармацевтичною композицією, що включає

- а) кількість першої сполуки, яка є агоністом/антагоністом естрогену; та
- б) кількість другої сполуки, яка є простагландином чи агоністом/антагоністом простагландину,

де кількість першої сполуки поодинокі та кількість другої сполуки поодинокі недостатні для досягнення терапевтичного впливу на посилення утворення кісток та зменшення резорбції кісток при їх одночасному використанні, а спільна дія першої та другої сполук більша за суму терапевтичної дії при окремому застосуванні першої та другої сполук та фармацевтично прийняттого розріджувача чи носія.

Подальший аспект винаходу представлено синергетичним способом лікування ссавців від станів, які обумовлені слабкою масою кісток, вживанням ссавцям зі станом, який обумовлено слабкою масою кісток,

- а) кількості першої сполуки, яка є агоністом/антагоністом естрогену; та
- б) кількості другої сполуки, яка є простагландином чи агоністом/антагоністом простагландину,

де кількість першої сполуки поодиноці та кількість другої сполуки поодиноці недостатні для досягнення терапевтичного впливу на посилення утворення кісток та зменшення резорбції кісток при їх одночасному використанні, а спільна дія першої та другої сполук більша за суму терапевтичної дії при окремому застосуванні першої та другої сполук та фармацевтично прийнятного розріджувача чи носія.

Подальший аспект винаходу представлено набором для лікування ссавців від станів, які обумовлені слабкою масою кісток, який включає

а) терапевтично діючу кількість першої сполуки, яка є агоністом/антагоністом естрогену та фармацевтично прийнятного носія у першій одиничній дозованій формі;

б) терапевтично діючу кількість другої сполуки, яка є простагландином чи агоністом/антагоністом простагландину та фармацевтично прийнятного носія у другій одиничній дозованій формі;

в) упаковку для вказаних першої та другої одиничних дозованих форм. Подальший аспект винаходу представлено фармацевтичною композицією, яка включає

а) терапевтично діючу кількість першої сполуки, якою є дролоксифен, ралоксифен, тамоксифен або ідоксифен;

б) терапевтично діючу кількість другої сполуки, якою є флуорид натрію або N-[1(R)-[1,2-дигідро-1-метансульфонілспіро[3Н-індол-3,4'-піперидин]-1'-іл]карбоніл]-2-(фенілметилокси)етил]-2-аміно-2-метилпропанамід:MK-677.

Кращим аспектом композиції є дролоксифен в якості першої сполуки.

Подальший аспект винаходу представлено способом лікування ссавців від станів, які обумовлені слабкою масою кісток, вживанням ссавцям зі станом, який обумовлено слабкою масою кісток,

а) терапевтично діючої кількості першої сполуки, якою є дролоксифен, ралоксифен, тамоксифен або ідоксифен;

б) терапевтично діючої кількості другої сполуки, якою є флуорид натрію або N-[1(R)-[1,2-дигідро-1-метансульфонілспіро[3Н-індол-3,4'-піперидин]-1'-іл]карбоніл]-2-(фенілметилокси)етил]-2-аміно-2-метилпропанамід:MK-677.

Кращим аспектом цього способу є дролоксифен в якості першої сполуки.

Другий кращий аспект цього способу полягає у тому, що станом, який обумовлено слабкою масою кісток, є остеопороз.

Інший кращий аспект полягає у тому, що першу та другу сполуки вживають практично одночасно.

Інший кращий аспект полягає у тому, що другу сполуки вживають протягом від трьох місяців до трьох років.

Як варіант, застосування другої сполуки супроводжується вживанням першої сполуки протягом від трьох місяців до трьох років без вживання другої сполуки протягом від трьох місяців до трьох років.

Альтернативно, застосування другої сполуки супроводжується вживанням першої сполуки строком більшим, ніж від трьох місяців до трьох років, без вживання другої сполуки строком більшим, ніж від трьох місяців до трьох років.

Інший аспект винаходу представлено синергетичною фармацевтичною композицією, що включає

а) кількість першої сполуки, якою є дролоксифен, ралоксифен, тамоксифен або ідоксифен;

б) кількість другої сполуки, якою є флуорид натрію або N-[1(R)-[1,2-дигідро-1-метансульфонілспіро[3Н-індол-3,4'-піперидин]-1'-іл]карбоніл]-2-(фенілметилокси)етил]-2-аміно-2-метилпропанамід:MK-677,

де кількість першої сполуки поодиноці та кількість другої сполуки поодиноці недостатні для досягнення терапевтичного впливу на посилення утворення кісток та зменшення резорбції кісток при їх одночасному використанні, а спільна дія першої та другої сполук більша за суму терапевтичної дії при окремому застосуванні першої та другої сполук та фармацевтично прийнятного розріджувача чи носія.

Кращим аспектом цієї синергетичної композиції є дролоксифен в якості першої сполуки.

Подальший аспект винаходу представлено синергетичним способом лікування ссавців від станів, які обумовлені слабкою масою кісток, вживанням ссавцям зі станом, який обумовлено слабкою масою кісток,

а) кількості першої сполуки, якою є дролоксифен, ралоксифен, тамоксифен або ідоксифен;

б) кількості другої сполуки, якою є флуорид натрію або N-[1(R)-[1,2-дигідро-1-метансульфонілспіро[3Н-індол-3,4'-піперидин]-1'-іл]карбоніл]-2-(фенілметилокси)етил]-2-аміно-2-метилпропанамід:MK-677,

де кількість першої сполуки поодиноці та кількість другої сполуки поодиноці недостатні для досягнення терапевтичного впливу на посилення утворення кісток та зменшення резорбції кісток при їх одночасному використанні, а спільна дія першої та другої сполук більша за суму терапевтичної дії при окремому застосуванні першої та другої сполук та фармацевтично прийнятного розріджувача чи носія.

Кращим аспектом цього синергетичного способу є дролоксифен в якості першої сполуки.

Подальший аспект винаходу представлено набором для лікування ссавців від станів, які обумовлені слабкою масою кісток, який включає

а) терапевтично діючу кількість першої сполуки, якою є дролоксифен, ралоксифен, тамоксифен або ідоксифен, та фармацевтично прийнятного носія у першій одиничній дозованій формі;

б) терапевтично діючу кількість другої сполуки, якою є флуорид натрію або N-[1(R)-[1,2-дигідро-1-метансульфонілспіро[3Н-індол-3,4'-піперидин]-1'-іл]карбоніл]-2-(фенілметилокси)етил]-2-аміно-2-метилпропанамід:MK-677, та фармацевтично прийнятного носія у другій одиничній дозованій формі;

в) упаковку для вказаних першої та другої одиничних дозованих форм.

Кращим аспектом цього набору є дролоксифен в якості першої сполуки.

Ще один аспект винаходу представлено фармацевтичною композицією, яка включає

а) терапевтично діючу кількість першої сполуки, якою є

Цис-6-(4-флуорфеніл)-5-[4-(2-піперидин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;

(-)-Цис-6-феніл-5-[4-(2-піролідін-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;

Цис-6-феніл-5-[4-(2-піролідін-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;

Цис-1-[6'-піролідінетокси-3'-піридил]-феніл-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідронафталін;

1-(4'-піролідінетоксифеніл)-2-(4'-флуорфеніл)-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідроксинолін;

Цис-6-(4-гідроксифеніл)-5-[4-(2-піперидин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол; або

1-(4'-піролідінетоксифеніл)-2-феніл-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідроксинолін; та

б) терапевтично діючу кількість другої сполуки, якою є флуорид натрію, паратиреоїдний гормон, гормон росту або посилюючий секрецію гормону росту засіб.

Ще один аспект винаходу представлено способом лікування ссавців від станів, які обумовлені слабкою масою кісток, вживанням ссавцям зі станом, який обумовлено слабкою масою кісток,

а) терапевтично діючої кількості першої сполуки, якою є

Цис-6-(4-флуорфеніл)-5-[4-(2-піперидин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;

(-)-Цис-6-феніл-5-[4-(2-піролідин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;

Цис-6-феніл-5-[4-(2-піролідин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;

Цис-1-[6'-піролідинетокси-3'-піридил]-2-феніл-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідронафталін;

1-(4'-піролідинетоксифеніл)-2-(4'-флуорфеніл)-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідрокінолін;

Цис-6-(4-гідроксифеніл)-5-[4-(2-піперидин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол; або

1-(4'-піролідинетоксифеніл)-2-феніл-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідрокінолін; та

б) терапевтично діючої кількості другої сполуки, якою є флуорид натрію, паратиреоїдний гормон, гормон росту або посилюючий секрецію гормону росту засіб.

Кращим аспектом цього способу є дролоксифен в якості першої сполуки.

Другий кращий аспект цього способу полягає у тому, що станом, який обумовлено слабкою масою кісток, є остеопороз.

Інший кращий аспект полягає у тому, що першу та другу сполуки вживають практично одночасно.

Інший кращий аспект полягає у тому, що другу сполуки вживають протягом від трьох місяців до трьох років.

Як варіант, застосування другої сполуки супроводжується вживанням першої сполуки протягом від трьох місяців до трьох років без вживання другої сполуки протягом від трьох місяців до трьох років.

Альтернативно, застосування другої сполуки супроводжується вживанням першої сполуки строком більшим, ніж від трьох місяців до трьох років, без вживання другої сполуки строком більшим, ніж від трьох місяців до трьох років.

Ще один аспект винаходу представлено синергетичною фармацевтичною композицією, яка включає

а) кількість першої сполуки, якою є

Цис-6-(4-флуорфеніл)-5-[4-(2-піперидин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;

(-)-Цис-6-феніл-5-[4-(2-піролідин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;

Цис-6-феніл-5-[4-(2-піролідин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;

Цис-1-[6'-піролідинетокси-3'-піридил]-2-феніл-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідронафталін;

1-(4'-піролідинетоксифеніл)-2-(4'-флуорфеніл)-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідрокінолін;

Цис-6-(4-гідроксифеніл)-5-[4-(2-піперидин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол; або

1-(4'-піролідинетоксифеніл)-2-феніл-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідрокінолін; та

б) кількість другої сполуки, якою є флуорид натрію, паратиреоїдний гормон, гормон росту або посилюючий секрецію гормону росту засіб,

де кількість першої сполуки поодиноці та кількість другої сполуки поодиноці недостатні для досягнення терапевтичного впливу на посилення утворення кісток та зменшення резорбції кісток при їх одночасному використанні, а спільна дія першої та другої сполук більша за суму терапевтичної дії при окремому застосуванні першої та другої сполук та фармацевтично прийняттого розріджувача чи носія.

Ще один аспект винаходу представлено синергетичним способом лікування ссавців від станів, які обумовлені слабкою масою кісток, вживанням ссавцям зі станом, який обумовлено слабкою масою кісток,

а) кількістю першої сполуки, якою є

Цис-6-(4-флуорфеніл)-5-[4-(2-піперидин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;

(-)-Цис-6-феніл-5-[4-(2-піролідин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;

Цис-6-феніл-5-[4-(2-піролідин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;

Цис-1-[6'-піролідинетокси-3'-піридил]-2-феніл-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідронафталін;

1-(4'-піролідинетоксифеніл)-2-(4'-флуорфеніл)-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідрокінолін;

Цис-6-(4-гідроксифеніл)-5-[4-(2-піперидин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол; або

1-(4'-піролідинетоксифеніл)-2-феніл-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідрокінолін; та

б) кількістю другої сполуки, якою є флуорид натрію, паратиреоїдний гормон, гормон росту або посилюючий секрецію гормону росту засіб,

де кількість першої сполуки поодиноці та кількість другої сполуки поодиноці недостатні для досягнення терапевтичного впливу на посилення утворення кісток та зменшення резорбції кісток при їх одночасному використанні, а спільна дія першої та другої сполук більша за суму терапевтичної дії при окремому застосуванні першої та другої сполук та фармацевтично прийняттого розріджувача чи носія.

Подальший аспект винаходу представлено набором для лікування ссавців від станів, які обумовлені слабкою масою кісток, який включає

а) терапевтично діючу кількість першої сполуки, якою є

Цис-6-(4-флуорфеніл)-5-[4-(2-піперидин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;

(-)-Цис-6-феніл-5-[4-(2-піролідин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;

Цис-6-феніл-5-[4-(2-піролідин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;

Цис-1-[6'-піролідинетокси-3'-піридил]-2-феніл-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідронафталін;

1-(4'-піролідинетоксифеніл)-2-(4'-флуорфеніл)-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідрокінолін;

Цис-6-(4-гідроксифеніл)-5-[4-(2-піперидин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол; або

1-(4'-піролідинетоксифеніл)-2-феніл-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідрокінолін;

б) терапевтично діючу кількість другої сполуки, якою є флуорид натрію, паратиреоїдний гормон, гормон росту або посилюючий секрецію гормону росту засіб; та

в) упаковку для вказаних першої та другої одиничних дозованих форм.

Інший аспект винаходу представлено фармацевтичною композицією, що включає

а) терапевтично діючу кількість першої сполуки, якою є ралоксифен, тамоксифен або ідоксифен;

б) терапевтично діючу кількість другої сполуки, якою є паратиреоїдний гормон, гормон росту або посилюючий секрецію гормону росту засіб.

Ще один аспект винаходу представлено способами лікування фармацевтичним композиціями та наборами найближчої вищенаведеної композиції.

Спеціалістам ясно, що інші антирезорбтивні засоби (бісфосфонати, естроген, естрадіол, премарин, естрон, естріол або 17α - чи 17β -етинілестрадіол), а також інші кісткові анаболічні засоби (андроген, агоніст/антагоніст андрогену) можна використовувати аналогічним чином разом або з будь-яким з вищеописаних засобів згідно з винаходом.

Наприклад, антирезорбтивний засіб дролоксифен можна комбінувати з таким окремим кістковим анаболічним засобом, як паратиреоїдний гормон, гормон росту або посилюючий секрецію гормону росту засіб.

Фраза "станни, які обумовлені слабкою масою кісток" відноситься до станів, при яких рівень кісткової маси нижчий за нормальний для цього віку, як це визначено рекомендаціями ВОЗ "Оцінка ризику переломів та її застосування до виявлення остеопорозу після менопаузи (1994), Доповіді пошукової групи ВОЗ. Технічна серія ВОЗ 843". Також включено первинний остеопороз та дитячий остеопороз невідомого походження. Включеними до лікування остеопорозу є попередження або пом'якшення таких довготривалих ускладнень, як викривлення хребта, втрата росту, хірургія простати та попередження порушень простати. Включено також прискорення лікування переломів кісток та посилення успішно пересаджених кісток. Включено також періодонтальні захворювання та альвеолярну кісткову втрату.

Фраза "станни, які обумовлені слабкою масою кісток" відноситься також до ссавців, що мають значно більший за середній шанс розвитку таких захворювань з вищеописаних, як остеопороз (наприклад, після менопаузи у жінок, у чоловіків, старших за 60 років, та осіб яких лікували засобами, відомими як такі, що в якості побічної дії викликають остеопороз (такі, як глюкокортикоїди)).

Спеціалістам ясно, що термін кісткова маса фактично означає кісткову масу в одиничній області, який іноді (хоча не завжди) означає мінеральну густину кісток.

Термін лікування включає попередження (наприклад, профілактику) та полегшуюче лікування.

Під галогеном мають на увазі хлор, бром, йод чи флуор.

Під алкілом мають на увазі насичений вуглеводень з лінійним чи розгалуженим ланцюгом. Прикладами таких алкілів (що при визначеній довжині включають окремі приклади) є метил, етил, пропіл, ізопропіл, бутіл, втор-бутіл, трет-бутіл, пентил, ізо-пентил, гексил та ізогексил.

Під алкоксилем мають на увазі насичений вуглеводень, приєднаний через кисень, з лінійним чи розгалуженим ланцюгом. Прикладами таких алкоксилів (що при визначеній довжині включають окремі приклади) є метоксил, етоксил, пропоксил, ізопропоксил, бутоксил, втор-бутоксил, трет-бутоксил, пентоксил, ізопентоксил, гексоксил та ізогексоксил.

Вираз "фармацевтично прийнятна катіонна сіль" означає таку нетоксичну катіонну сіль, як (але без обмеження) натрію, калію, кальцію, магнію, амонію чи протонизованого бензатину (N,N-дибензилетилендіаміну), холіну, етаноламіну, діетаноламіну, етилендіаміну, мелламіну (N-метилглукаміну), бентаміну (N-бензилфенетиламіну), піперазіну або трометаміну (2-аміно-2-гідроксиметил-1,3-пропандіолу).

Плюс та мінус у дужках у назвах означають напрям поляризації світла окремим стереоізомером.

Використаний вираз "інертний розчинник" означає розчинник, що не реагує з вихідними матеріалами, реагентами, інтермедіатами або продуктами способом, що суттєво впливає на вихід потрібного продукту.

Спеціалісти-хіміки розпізнають деякі сполуки згідно з винаходом, що містять один чи більше атомів, які можуть бути в окремих стереохімічних чи геометричних положеннях, утворюючи стереоізомери та конфігураційні ізомери. Усі такі ізомери та їх суміші, а також їх гідрати включено до рамок винаходу.

Спеціалісти-хіміки розпізнають деякі комбінації замісників, що містять гетероатоми, наведені у винаході, які менш стабільні у фізіологічних умовах (наприклад, ті, що містять ацетальні чи амінальні зв'язки). Відповідно, такі сполуки менш придатні.

Фармацевтичні композиції згідно з винаходом призводять до швидшого та інтенсивнішого зростання кісткової маси, ніж при застосуванні тих же доз вищеописаних агоністів/антагоністів естрогену поодиноці або вищеописаного засобу, що стимулює зростання мінеральної кісткової густини поодиноці. Отже, ці комбінації виявляють синергетичну дію на зростання кісткової маси та зменшення можливості переломів у порівнянні з дією кожного засобу поодиноці.

Винахід вносить значний вклад у практику, пропонуючи композиції та способи, що збільшують та підтримують кісткову масу, результатом чого є попередження, гальмування та/або послаблення остеопорозу та відповідних кісткових розладів.

Інші особливості та переваги стануть ясними з опису та формули винаходу.

Першою сполукою згідно з винаходом є агоніст/антагоніст естрогену ссавців. Як першу сполуку згідно з винаходом можна використовувати будь-який агоніст/антагоніст естрогену. Термін агоніст/антагоніст естрогену означає сполуку, яка приєднується до рецептору естрогену, інгібує кістковий обмін та попереджає кісткову втрату. Таку активність легко визначити спеціалісту стандартними аналізами, включаючи аналізи на визначення зв'язування рецепторів естрогену (див. наведений нижче дослід визначення зв'язування *in vitro* рецепторів естрогену), стандартні способи кісткової гістоморфометрії та денситометрії (див. наведені нижче інструкції відносно агоністів/антагоністів естрогену та Eriksen E.F. et al., Bone Histomorphometry, Raven Press, New York, 1994, 1-74; Grier S.J. et al., The Use of Dual-Energy X-Ray Absorptiometry in Animals, Inv. Radiol., 1996, 31(1):50-62; Wahner H.W. and Fogelman I., The Evaluation of Osteoporosis: Dual Energy X-Ray Absorptiometry in Clinical Practice, Martin Dunitz Ltd., London 1994:1-296). Нижче описано та згадано деякі з цих сполук, спеціалістам відомі і інші агоністи/антагоністи естрогену.

Кращим агоністом/антагоністом естрогену є дролоксифен: (феніл, 3-[1-[4(2-(диметиламіно)етокси)феніл]-2-феніл-1-бутеніл]-, (E)-) та асоційовані сполуки, які розкрито у патенті США 5047431, наданому як посилання.

Іншим кращим агоністом/антагоністом естрогену є тамоксифен: (етанамін, 2-[4-(1,2-дифеніл-1-бутеніл)феноксид]-N,N-диметил-, (Z)-2-, 2-гідрокси-1,2,3-пропантрикарбоксилат (1:1)) та асоційовані сполуки, які розкрито у патенті США 4536516, наданому як посилання. Іншою сполукою є 4-гідрокситамоксифен, який розкрито у патенті США 46236606, наданому як посилання.

Іншим кращим агоністом/антагоністом естрогену є ралоксифен: (метанон, [6-гідрокси-2-(4-

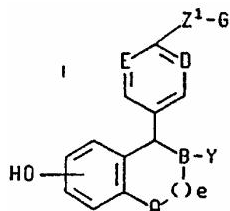
гідроксифеніл)бензо[b]тієн-3-іл][4-[2-(1-піперидиніл)етокси]феніл]-гідрохлорид та асоційовані сполуки, які розкрито у патенті США 4418-68, наданому як посилання.

Іншим кращим агоністом/антагоністом естрогену є тореміфен: (етанамін, 2-[4-(хлор-1,2-дифеніл-1-бутеніл)феноксид]-N,N-диметил, (Z)-, 2-гідрокси-1,2,3-пропантрикарбоксилат(1:1)) та асоційовані сполуки, які розкрито у патенті США 4996225, наданому як посилання.

Іншим кращим агоністом/антагоністом естрогену є центхроман: 1-[2-[[4-(метокси-2,2, диметил-3-фенілхроман-4-іл)-феноксид]-етил]-піролідин, та асоційовані сполуки, які розкрито у патенті США 3822287, наданому як посилання.

Іншим кращим агоністом/антагоністом естрогену є ідоксифен: піролідин, 1-[1-[4-[(4-іодфеніл)-2-феніл-1-бутеніл]феноксид]етил] та асоційовані сполуки, які розкрито у патенті США 4839155, наданому як посилання.

Інші кращі агоністи/антагоністи-естрогену включають сполуки формули



в якій:

A вибирають з CH₂ та NR;

B, D та E незалежно вибирають з CH та N;

Y - а) феніл, як варіант заміщений 1-3 замісниками, незалежно вибраними з R⁴;

б) нафтил, як варіант заміщений 1-3 замісниками, незалежно вибраними з R⁴;

в) C₃-C₈-циклоалкіл, як варіант заміщений 1-2 замісниками, незалежно вибраними з R⁴;

г) C₃-C₈-циклоалкеніл, як варіант заміщений 1-2 замісниками, незалежно вибраними з R⁴;

д) 5-членний гетероцикл, що включає до двох гетероатомів, вибраних з групи, що включає -O-, -NR²- та -S(O)_n-, як варіант заміщений 1-3 замісниками, незалежно вибраними з R⁴;

е) 6-членний гетероцикл, що містить до двох гетероатомів, вибраних з групи, що включає -O-, -NR²- та -S(O)_n-, як варіант заміщений 1-3 замісниками, незалежно вибраними з R⁴;

є) біциклічна система, що включає 5- чи 6-членний гетероцикл, який злитий з бензольним кільцем, який містить до двох гетероатомів, вибраних з групи, що включає -O-, -NR²- та -S(O)_n-, як варіант заміщений 1-3 замісниками, незалежно вибраними з R⁴;

Z¹ - а) -(CH₂)_pW(CH₂)_q;

б) -O(CH₂)_pCR⁵R⁶;

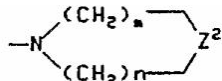
в) -O(CH₂)_pW(CH₂)_q;

г) -OCHR²CHR³;

г) -SCHR²CHR³;

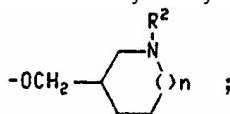
G - а) -NR⁷R⁸;

б -



де n - 0, 1 чи 2; m - 1, 2 чи 3; Z² - -NH-, -O-, -S- чи -CH₂-; як варіант, злиті сусідніми атомами карбону з одним чи двома фенільними кільцями, та як варіант, заміщені по атому карбону 1-3 замісниками, а також, як варіант, заміщені по атому нітрогену хімічно придатним замісником, вибраним з R⁴; або

Z¹ та G у сполученні можуть бути



W - а) -CH₂-;

б) -CH=CH-;

в) -O-;

г) -NR²-; г) -S(O)_n;

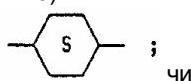
д) -C(=O)-;

е) -CR²(OH)-;

є) -CONR²-;

ж) -NR²CO-;

з) -



і) -C=CH-;

R - гідроген чи C₁-C₆-алкіл;

R² та R³, незалежно -

а) гідроген; чи

б) C₁-C₄-алкіл;

R⁴-

а) гідроген;

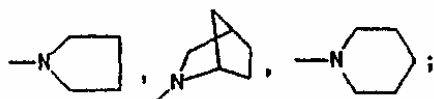
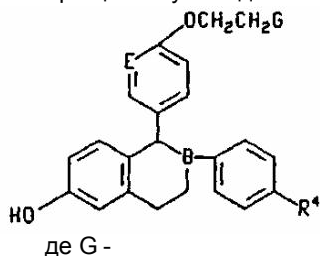
- б) галоген;
- в) C₁-C₆-алкіл;
- г) C₁-C₄-алкоксил;
- д) C₁-C₄-ацилоксил;
- е) C₁-C₄-алкілтіо;
- є) C₁-C₄-алкілсульфініл;
- ж) C₁-C₄-алкілсульфоніл;
- з) гідроксі-C₁-C₄-алкіл;
- і) арил-C₁-C₄-алкіл;
- и) -CO₂H;
- к) -CN;
- л) -CONHOR;
- м) -SO₂NHOR;
- н) NH₂;
- о) C₁-C₄-алкіламіно;
- п) C₁-C₄-діалкіламіно;
- р) -NHSO₂R;
- с) -арил; або
- т) -OH;
- R⁵ та R⁶, незалежно - C₁-C₆-алкіл або разом утворюють C₃-C₁₀-карбоцикл;
- R⁷ та R⁸, незалежно -
- а) феніл;
- б) C₃-C₁₀-карбоцикл, насичений чи ні;
- в) C₃-C₁₀-гетероцикл, що містить до 2 гетероатомів вибраних з -O-, -N- та -S-;
- г) H;
- д) C₁-C₆-алкіл; або
- е) разом з R⁵ чи R⁶ утворюють 3-8 членний гетероцикл з нітрогеном;

R⁷ та R⁸ у лінійній чи кільцевій формі можуть, як варіант, бути заміщеними замісниками кількістю до трьох, незалежно вибраними з C₁-C₆-алкіла, галогена алкоксила, гідроксила, та карбоксила; кідьце, що утворене R⁷ та R⁸ може, як варіант, бути злитим з фенільним кільцем;

- е - 0, 1 чи 2;
- т - 1, 2 чи 3;
- п - 0, 1 чи 2;
- р - 0, 1, 2 чи 3;
- q - 0, 1, 2 чи 3;

а також їх оптичні та геометричні ізомери; нетоксичні фармакологічно придатні солі приєднання кислот, N-оксиди, естери та четвертинні солі амонія.

Кращі сполуки згідно з винаходом мають формулу:



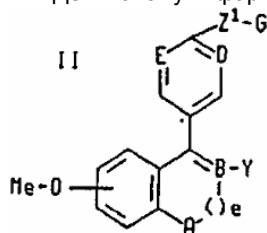
а R⁴ - H, OH, F чи Cl; B та E, незалежно вибирають з CH та N.

Найкращими сполуками є

- Цис-6-(4-флуорфеніл)-5-[4-(2-піперидин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;
- (-)-Цис-6-феніл-5-[4-(2-піролідін-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;
- Цис-6-феніл-5-[4-(2-піролідін-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;
- Цис-1-[6'-піролідінетокси-3'-піридил]-2-феніл-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідронафталін;
- 1-(4'-піролідінетоксифеніл)-2-(4'-флуорфеніл)-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідрокінолін;
- Цис-6-(4-гідроксифеніл)-5-[4-(2-піперидин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол; та
- 1-(4'-піролідінетоксифеніл)-2-феніл-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідрокінолін.

Вищезгадані сполуки згідно з винаходом легко виготовити ілюстрованими нижченаведеною схемою реакціями.

Деякі сполуки формули I зручно виготовляти з ненасиченого інтермедіату



гідруванням з каталізаторами з благородних металів у інертному розчиннику. Тиск та температура не є

критичними і гідрування звичайно завершують через кілька годин при кімнатній температурі при тиску водню 20-80psi (138-552кПа).

Гідрогенований продукт виділяють, за бажанням очищають і відщеплюють етерну групу кислотним каталізом у інертному розчиннику при температурі 0-100°C в залежності від природи кислотного каталізатора. Було виявлено, що активними у цій реакції є гідрогенбромід при підвищеній температурі, трибромід бора та хлорид алюмінію при температурі від 0°C до навколишньої.

Продукт формули I виділяють і очищають стандартними способами.

Інтермедіати формули II, де A - CH₂, а B, D та E - CH, описано у патенті США 3274213; J. Med. Chem. 10 78 (1967); J. Med. Chem. 10 138 (1967); та J. Med. Chem. 12 881 (1969), що надані як посилання. Їх можна також виготовити нижчеописаним способом.

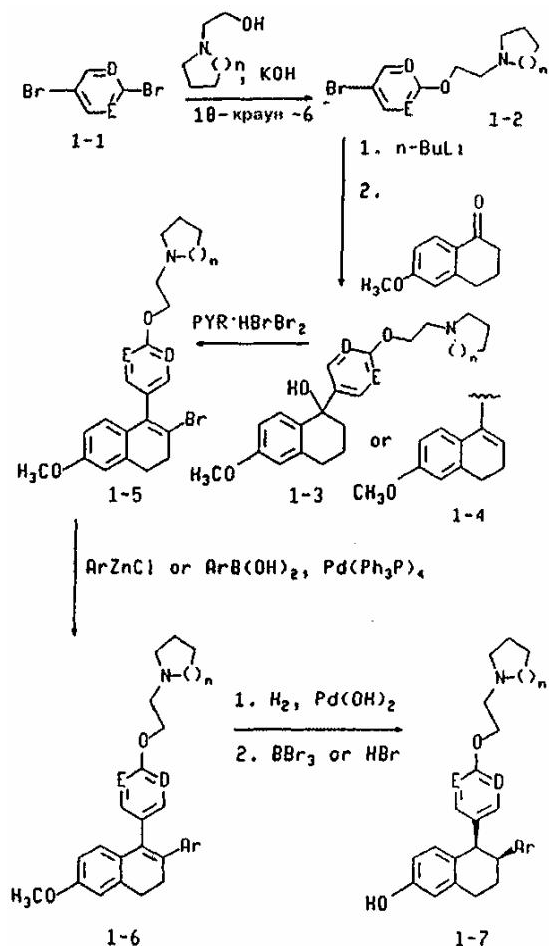
Виготовлення сполуки формули I, де e=1, A - CH₂, Z¹ - OCH₂CH₂, G - циклоалкіламін, B - CH, показано на схемі 1. Сполуки 1-2, в яких D та E - CH, отримано алкілюванням 4-бромфенолу відповідним N-хлоретиламіном з карбонатом калію в якості основи у полярному апротонному розчиннику типу диметилформаміду при підвищеній температурі, краще 100°C. Сполуки 1-2, в яких D чи E, або обидва - N, синтезують з використанням нуклеофільного заміщення з дибромідом (1-1), використовуючи гідроксietилциклоалкіламіни в умовах міжфазного переносу, з утворенням бромамінів 1-2. Synthesis, 77 573 (1980). Наступним обміном галогену на метал з використанням n-бутиллітію або металевого магнію бромаміни (1-2) перетворюються у відповідні літєві чи магнієві реагенти, які дозволяють реакцію при низькій температурі, краще у присутності хлориду цезію (у його відсутність реакція відбувається теж), з 6-метокси-1-тетраліном, отримують або карбіноли (1-3), або стиролі (1-4) після кислотної обробки. Обробкою або карбінолів (1-3), або стиролів (1-4) такими бромуючими засобами, як пербромід броміду піридину, отримують бромстиролі (1-5). Арил- чи гетероарил-цинк-хлориди або арил- чи гетероарил-боронові кислоти реагують з бромідами (1-5) у присутності паладієвого каталізатора типу тетракіс(трифенілфосфін)паладію(0) з утворенням діарилстиролів (1-6). [Pure & Applied Chem. 63 419 (1991) та Bull. Chem. Soc. Jpn. 61 3008-3010 (1988)]. Для виготовлення кращих сполук у цих реакціях використовують заміщені феніл-цинк-хлориди або заміщені феніл-боронові кислоти. Арил-цинк-хлориди виготовляють руйнуванням відповідних літєвих реагентів безводним хлоридом цинку. Арил-боронові кислоти, яких нема у продажу, готують руйнуванням відповідних арил-літійових реагентів тріалкіл боратом, переважно триметил- чи тріізопропілборатом, з наступною обробкою водною кислотою. Acta Chemical Scan. 47 221-230 (1993). Літєві реагенти, яких нема у продажу, готують обміном галогену на метал у відповідних бромідах чи галідах з використанням n-бутиллітію або t-бутиллітію. Інакше літєві реагенти виготовляють гетероатомним полегшеним літіюванням, як описано у Organic Reactions, V. 27, Chapter 1. Каталітичним гідруванням 1-6 у присутності гідроксиду паладію на активованому вугіллі, наприклад, отримано відповідні дигідрометокси-інтермедіати, які потім деметилують з використанням триброміду бора при 0°C у метиленхлориді або 48% гідрогенброміду в оцтовій кислоті при 80-100°C, отримуючи потрібні структури (1-7), що є рацемічними і можуть бути розділеними на енантіомери високоефективною рідинною хроматографією на колонці з хіральною стаціонарною фазою типу колонок Chiralcel OD. Інакше оптичне розділення можна провести перекристалізацією діастереомерних солей оптично чистих кислот типу 1,1'-бінафтил-2,2'-дііл(гідрогенфосфата). Цис-сполуки (1-7) можна ізомеризувати у транс-сполуки обробкою основами.

Коли D та/або E - нітроген, інтермедіати формули II та сполуки формули I можна виготовити з відповідних дигалогенпіридинів або піримідинів як показано на схемі 1.

Метилловий етер сполуки формули I, де e=1, A - CH₂, Z¹ - OCH₂CH₂, G - піролідін, B, D та E - CH, Y - феніл, можна також зручно приготувати на першій стадії гідруванням нафоксидину (Upjohn & Co., 700 Portage Road, Kalamazoo, MI 49001) у інертному розчиннику з каталізом благородними металами. Тиск та температура не є критичними і гідрування в етанолі звичайно завершують через приблизно 20 годин при кімнатній температурі при 50psi (345кПа).

На другій стадії відщеплюють метоксил, що зручно проводити при кімнатній температурі з каталізом такими кислотами, як трибромід бора в інертному розчиннику або 48% гідрогенбромід в оцтовій кислоті при 80-100°C. Продукт далі виділяють звичайними способами і за бажанням перетворюють у сіль кислоти.

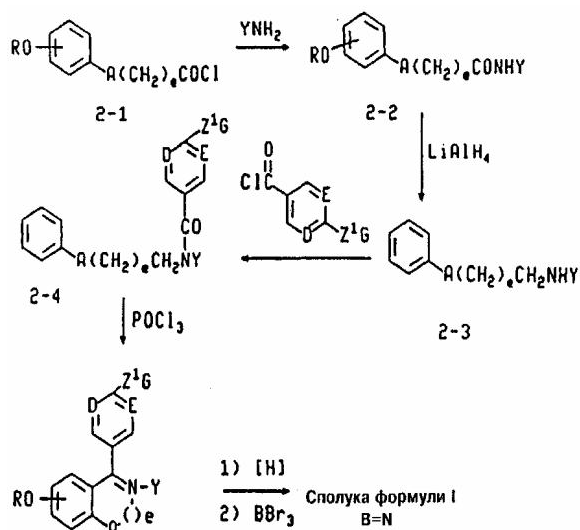
Схема 1



Сполуки формули I, де В - N, готують способами, наведеними у схемах 2 та 3.

Синтези сполук формули I, де В - N, наведені у схемі 2. Хлорангідриди арилових кислот (2-1) обробляють первинними амінами, одержуючи вторинні арилові аміді (2-2), які відновлюють алюмогідридом літію у етерному розчиннику, одержуючи вторинні аміни (2-3). Наступне ацилювання (2-3) хлорангідридами арилових кислот дає третинні аміді (2-4), які циклізують у гарячому оксихлориді фосфору з утворенням солей диідроксихіноліну (2-5). Відновлення борогідридом натрію до алкокситетрагідроксихіноліну; наступне деметилювання трибромідом бора у метиленхлориді дають потрібну структуру.

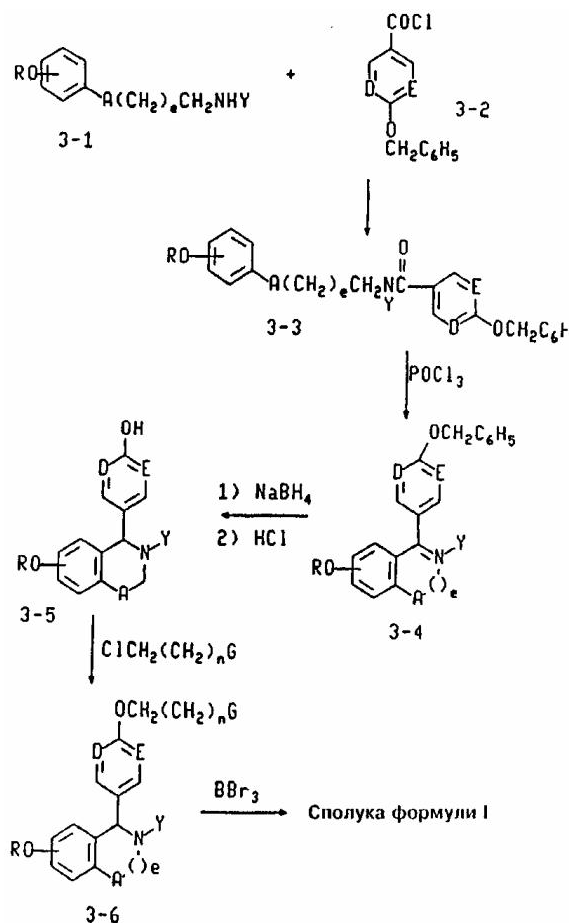
Схема 2



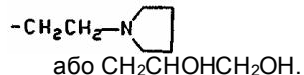
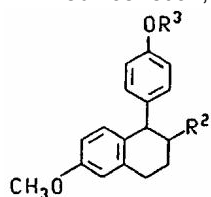
2-5

Синтези сполук формули I, де В - N, також наведені нижче на схемі 3. Вторинні аміни (3-1) ацилюванням бензилхлоридом (3-2), одержуючи третинні аміді (3-3), які циклізацією гарячим оксихлоридом фосфору з перетворюють у солі диідроксихіноліну (3-4), які далі відновлюють борогідридом натрію з наступним дебензилюванням соляною кислотою до ізохінолінів (3-5), які алкілюють прийнятно функціоналізованими хлоридами та деметилюють трибромідом бора, одержуючи потрібну структуру.

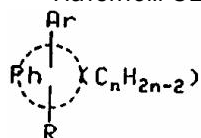
Схема 3



Інші агоністи/антагоністи естрогену описано патентом США 4138814, що наданий як посилання і в якому розкрито похідні 2-феніл-3'-ароїл-бензотіофену та 2-феніл-3-ароїлбензотіофен-1-оксиду. Lednicher et al., J. Med. Chem. 12 881 (1969), описали антагоністи естрогену структури

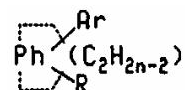


Патентом США 3234090, що наданий як посилання, описано агоністи/антагоністи естрогену формули



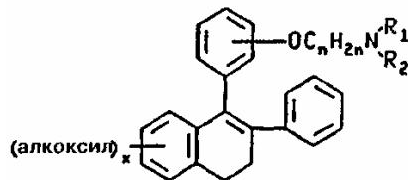
в якій Ph - 1,2-феніленовий радикал, Ar - моноциклічний арил, заміщений третинним амін-нижчий алкілоксид, причому третинний амін відділено від окси щонайменше двома атомами карбону, R - гідроген, аліфатичний радикал, арил, арилаліфатичний радикал, гетероарил або гетероарилаліфатичний радикал, $-(\text{C}_n\text{H}_{2n-2})-$ - нерозгалужений алкіленовий радикал з 3-5 атомами карбону, який несе на собі Ar та R, їх солі, N-оксиди, солі N-оксидів, або четвертинні амонієві сполуки, а також способи одержання таких сполук.

Патентом США 3277106, що наданий як посилання, описано основні етери, що виявляють властивості агоністів/антагоністів естрогену, формули



в якій Ph - 1,2-феніленовий радикал, Ar - моноциклічний арил, заміщений щонайменше одною амін-нижчий алкілоксигрупою, в якій атом нітрогена відділено від оксигена щонайменше двома атомами карбону, R - арил, а $-(\text{C}_n\text{H}_{2n-2})-$ - нижчий алкілен, що утворює з Ph 6-7-членний цикл, в якому два атоми карбону несуть на собі Ar та R, їх солі, N-оксиди, солі N-оксидів та четвертинні амонієві сполуки.

Патентом США 3274213, що наданий як посилання, описано агоністи/антагоністи естрогену формули



в якій R^1 та R^2 вибрано з нижчого алкілу та нижчого алкілу, поєднаних разом з утворенням 5-7-членного насиченого гетероцикла.

Другою сполукою згідно з винаходом може бути будь-яка з нижчеописаних, що посилює кісткову масу до рівня, який є критичним для переломів згідно з рекомендаціями ВОЗ "Оцінка ризику переломів та її застосування до виявлення остеопорозу після менопаузи (1994), Доповіді пошукової групи ВОЗ. Технічна серія ВОЗ 843".

В якості другої сполуки згідно з винаходом можна використовувати будь-який простагландин чи агоніст/антагоніст простагландину. Спеціалістам відомо, що можна також використовувати флуорид натрію, паратиреоїдний гормон (ПТГ), активні фрагменти паратиреоїдного гормону, гормон росту або посилюючий секрецію гормону росту засіб. Наступні розділи детальніше описують приклади другої сполуки згідно з винаходом.

В якості другої сполуки згідно з винаходом можна використовувати будь-який простагландин. Термін простагландин означає сполуки, що є аналогами природних простагландинів PGD_1 , PGD_2 , PGE_1 , PGE_2 та $PGF_{2\alpha}$, які корисні при лікуванні остеопорозу. Ці сполуки приєднуються до рецепторів простагландину. Таке приєднання спеціалістам легко визначити стандартним аналізом (наприклад, An S. et al., Cljying and Expression of the EP_2 Subtype of Human Receptors for Prostaglandin E_2 , Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993, 197(1):263-270).

Простагландини - аліциклічні сполуки, що відносяться до основних простанових кислот. Атоми карбону основного простагландину нумерують послідовно від карбоксильного атома через цикlopентильне кільце до кінцевого атома карбону приєданого бічного ланцюга. Звичайно приєднані бічні ланцюги знаходяться у транс-положенні. Присутність оксогрупи на C-9 цикlopентила вказує на простагландин E-класу, при цьому PGE_2 містить транс-подвійний зв'язок між C_{13} - C_{14} та цис-подвійний зв'язок між C_5 - C_6 .

Нижче описано деякі з простагландинів, однак, спеціалістам відомі і інші простагландини. Приклади простагландинів розкрито у патентах США 4171331 та 3927197, що надані як посилання.

Norrdin et al., the Role of Prostaglandins in Bone in Vivo, Prostaglandins Leukotrien Essential Fatty Acids 41, 139-150, 1990, наводить огляд кісткової активності простагландинів.

Будь-який з агоністів/антагоністів простагландину можна використовувати в якості другої сполуки згідно з винаходом. Термін агоніст/антагоніст простагландину означає сполуки, що приєднуються до рецепторів простагландину (наприклад, An S. et al., Cljying and Expression of the EP_2 Subtype of Human Receptors for Prostaglandin E_2 , Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993, 197(1):263-270) та імітують дію простагландину in vivo (наприклад, стимулюють утворення кісток та зростання кісткової маси). Таку дію легко визначити спеціалістам стандартним аналізом (див., наприклад, Anabolic Agent Protocol, описаний нижче, та Eriksen E.F. et al., Bone Histomorphometry, Raven Press, New York, 1994, 1-74; Grier S.J. et al., The Use of Dual-Energy X-Ray Absorptiometry in Animals, Inv. Radiol., 1996, 31(1):50-62; Wahner H.W. and Fogelman I., The Evaluation of Osteoporosis: Dual Energy X-Ray Absorptiometry in Clinical Practice, Martin Dunitz Ltd., "London 1994:1-296). Нижче описано та згадано деякі з цих сполук, спеціалістам відомі і інші агоністи/антагоністи простагландину. Приклади агоністів/антагоністів простагландину надано у нижченаведених посиланнях.

Патентом США 3932389, що наданий як посилання, описано 2-дезкарбокси-2-(тетразол-5-іл)-11-дезоксид-15-заміщені-омега-пентанорпростагландини, що корисні як активні при утворенні кісток.

Патентом США 4018892, що наданий як посилання, описано п-біфенілові естери 16-арил-13,14-дигідро PGE_2 , що корисні як активні при утворенні кісток.

Патентом США 4219483, що наданий як посилання, описано 2,3,6-заміщені-4-пірони, що корисні як активні при утворенні кісток.

Патентом США 4132847, що наданий як посилання, описано 2,3,6-заміщені-4-пірони, що корисні як активні при утворенні кісток.

Патентом США 4000309, що наданий як посилання, описано п-біфенілові естери 16-арил-13,14-дигідро PGE_2 , що корисні як активні при утворенні кісток.

Патентом США 3982016, що наданий як посилання, описано п-біфенілові естери 16-арил-13,14-дигідро PGE_2 , що корисні як активні при утворенні кісток.

Патентом США 4621100, що наданий як посилання, описано заміщені цикlopентани, що корисні як активні при утворенні кісток.

Патентом США 5216183, що наданий як посилання, описано цикlopентанони, що корисні як активні при утворенні кісток.

В якості другої сполуки згідно з винаходом можна використовувати флуорид натрію. Термін флуорид натрію означає флуорид натрію в усіх його формах (наприклад, флуорид натрію, що повільно вивільняється, флуорид натрію, що постійно вивільняється). Флуорид натрію, що постійно вивільняється, розкрито у патенті США 4904478, який наданий як посилання. Активність флуориду натрію спеціалістам легко визначити згідно з біологічними інструкціями (див., наприклад, Anabolic Agent Protocol, описаний нижче, та Eriksen E.F. et al., Bone Histomorphometry, Raven Press, New York, 1994, 1-74; Grier S.J. et al., The Use of Dual-Energy X-Ray Absorptiometry in Animals, Inv. Radiol., 1996, 31(1):50-62; Wahner H.W. and Fogelman I., The Evaluation of Osteoporosis: Dual Energy X-Ray Absorptiometry in Clinical Practice, Martin Dunitz Ltd., London 1994:1-296).

В якості другої сполуки згідно з винаходом можна використовувати будь-який паратиреоїдний гормон (ПТГ). Термін паратиреоїдний гормон означає паратиреоїдний гормон, його фрагменти чи метаболіти, а також структурні аналоги, які можуть стимулювати утворення кісток та зростання кісткової маси. Таку

функціональну активність спеціалістам легко визначити згідно з біологічними інструкціями (див., наприклад, Anabolic Agent Protocol, описаний нижче, та Eriksen E.F. et al., Bone Histomorphometry, Raven Press, New York, 1994, 1-74; Grier S.J. et al., The Use of Dual-Energy X-Ray Absorptiometry in Animals, Inv. Radiol., 1996, 31(1):50-62; Wahner H.W. and Fogelman I., The Evaluation of Osteoporosis: Dual Energy X-Ray Absorptiometry in Clinical Practice, Martin Dunitz Ltd., London 1994:1-296). Нижче описано та згадано деякі з цих сполук, спеціалістам відомі і інші агоністи/антагоністи простагландину. Приклади агоністів/антагоністів простагландину надано у нижченаведених посиланнях.

"Human Parathyroid Peptide Treatment of Vertebral Osteoporosis", Osteoporosis Int., 3, (Supp 1): 199-203.

"PTH 1-34 Treatment of Osteoporosis with Added Hormone Replacement Therapy: Biochemical, Kinetic and Histological Responses" Osteoporosis Int., 1:162-170.

В якості другої сполуки згідно з винаходом можна використовувати будь-який гормон росту або посилюючий секрецію гормону росту засіб. Термін - посилюючий секрецію гормону росту засіб означає сполуки, що стимулюють вивільнення гормону росту, або імітують дію гормону росту (наприклад, посилення утворення кісток, що призводить до зростання кісткової маси). Таку функціональну активність спеціалістам легко визначити згідно зі стандартними аналізами (як наприклад, вищеописаними). Деякі з цих сполук включено у нижченаведені опубліковані патентні заявки PCT WO 95/14666, WO 95/13069, WO 94/19367, WO 94/13696 та WO 95/34311. Однак, спеціалістам відомі і інші гормони росту або посилюючі секрецію гормону росту засоби.

Зокрема, кращий посилюючий секрецію гормону росту засіб представлено N-[1(P)-[1,2-дигідро-1-метансульфонілспіро[3H-індол-3,4'-піперидин]-1'-іл]жарбоніл]-2-(фенілметилокси)етил]-2-аміно-2-метилпропанамідом:MK-677.

Інші кращі посилюючі секрецію гормону росту засоби включають 2-аміно-N-[2-(3a-(R)-бензил-2-метил-3-оксо-2,3,3a,4,6,7-гексагідро-піразол[4,3-с]піридин-5-іл)-1-(R)-бензилоксиметил-2-оксоетил]-ізобутирамід або його тартрат;

2-аміно-N-(1-(R)-бензилоксиметил-2-[3a-(R)-(4-флуорбензил)-2-метил-3-оксо-2,3,3a,4,6,7-гексагідро-піразол[4,3-с]піридин-5-іл)-2-оксоетил-ізобутирамід; та

2-аміно-N-[2-(3a-(R)-бензил-3-оксо-2,3,3a,4,6,7-гексагідро-піразол[4,3-с]піридин-5-іл)-1-(R)-бензилоксиметил-2-оксо-етил]-ізобутирамід.

Взагалі, сполуки згідно з винаходом можна виготовити способами, включаючи відомі у хімії, особливо у світлі описаних тут способів.

Деякі зі способів приготування, корисні для отримання сполук згідно з винаходом, можуть потребувати захисту віддалених функціональних груп, наприклад, первинних та вторинних амінів, карбоксильних. Необхідність у такому захисті залежить від природи віддаленої функціональної групи та умов виготовлення і легко визначається спеціалістами. Використання таких способів протектування/депротектування добре знайоме спеціалістам. Загальний опис протектуючих груп та їх використання див. у T.W. Green, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991. Вихідні матеріали та реагенти для сполук згідно з винаходом також легко доступні або можуть бути легко синтезовані спеціалістами з використанням звичайних способів органічного синтезу. Наприклад, багато використаних тут сполук відносяться до природних сполук, що дуже цікаві у науковому плані і в яких є комерційна потреба, або є похідними від них. Відповідно, багато таких сполук є у продажу, описано у літературі або їх легко приготувати зі звичайних доступних речовин описаними у літературі способами. Такі сполуки, наприклад, включають простагландини.

Деякі зі сполук згідно з винаходом мають асиметричні атоми карбону і тому є енантіомерами чи діастереомерами. Діастереомерну суміш можна розділити на окремі діастереомери на базі їх фізико-хімічних відмінностей відомими способами, наприклад, хроматографією або фракційною кристалізацією. Енантіомери можна розділити перетворенням енантіомерної суміші реакцією з прийнятною оптично активною сполукою (наприклад, спиртом), розділенням діастереомерів та перетворенням (наприклад, гідролізом) окремих діастереомерів у відповідні чисті енантіомери. Всі такі ізомери, включаючи діастереомери та енантіомери, а також їх суміші включено у рамки винаходу.

Хоча багато сполук згідно з винаходом не здатні іонізуватися у фізіологічних умовах, деякі сполуки згідно з винаходом можуть у фізіологічних умовах іонізуватися. Отже, наприклад, деякі сполуки згідно з винаходом є кислотними і утворюють солі з фармацевтично прийнятними катіонами. Всі такі солі включено у рамки винаходу, виготовити їх можна звичайними способами. Наприклад, це можна зробити просто сполученням кислих та основних реагентів звичайно, у стехіометричних співвідношеннях, у водних, неводних та змішаних придатних розчинниках. Солі відокремлюють фільтруванням, осадженням у нерозчиняючому їх середовищі з наступним фільтруванням, випарюванням розчинника, або у випадку водних розчинів - ліофілізацією, як зручно.

Крім того, деякі сполуки згідно з винаходом є основними і утворюють солі з фармацевтично прийнятними аніонами. Всі такі солі включено у рамки винаходу, виготовити їх можна звичайними способами. Наприклад, це можна зробити просто сполученням кислих та основних реагентів звичайно, у стехіометричних співвідношеннях, у водних, неводних та змішаних придатних розчинниках. Солі відокремлюють фільтруванням, осадженням у нерозчиняючому їх середовищі з наступним фільтруванням, випарюванням розчинника, або у випадку водних розчинів - ліофілізацією, як зручно.

Крім того, деякі сполуки згідно з винаходом утворюють гідрати чи сольвати, які теж включено у рамки винаходу.

Фармацевтичні композиції та способи згідно з винаходом адаптовано для терапевтичного використання як засобів, які активують перетворення кісток, попереджають кісткову резорбцію або посилюють утворення кісток у ссавців, зокрема, людини. Оскільки ці функції тісно пов'язані з розвитком остеопорозу та кісткових розладів, ці комбінації завдяки їх дії на кістки попереджують, зупиняють, зменшують та відвертають остеопороз.

Корисність сполук згідно з винаходом як засобів для лікування станів, обумовлених слабкою кістковою масою (наприклад, остеопороз), тварин (наприклад, людини, особливо жінок), продемонстровано їх активністю у звичайних дослідях *in vitro* та *in vivo*, які описано нижче. Такі дослідження також забезпечують

можливість порівняння активності сполук згідно з винаходом між собою та з активністю інших відомих сполук. Результати таких порівнянь корисні для визначення дозування для тварин, включаючи людину, при лікуванні таких захворювань.

Способи комбінованого та послідовного лікування Звичайно, нижченаведене може варіюватися спеціалістами. Наприклад, можна використовувати незайманих самців чи самиць пацюків, самців з гормональною недостатністю (видаленими яєчками) або самиць (з видаленим яєчником). Крім того, можна використовувати самців чи самиць пацюків різного віку (такого, як 12 місяців). Пацюки можуть бути незайманими чи кастрованими (з видаленими яєчками чи яєчником) з застосуванням до них таких анаболіків, як простагландин E₂ (PGE₂) у різних дозах (1, 3 чи 6мг/кг на добу) протягом деякого періоду (від 2 тижнів до 2 місяців) з наступним прийомом таких антирезорбтивних засобів, як дролоксифен у різних дозах (1, 5, 10мг/кг на добу) протягом деякого періоду (від 2 тижнів до 2 місяців), або комбінованого лікування анаболіками та антирезорбтивними засобами у різних дозах протягом деякого періоду (від 2 тижнів до 2 місяців). Лікування кастрованих пацюків можна починати у наступну добу після операції (щоб попередити кісткові втрати), або коли кісткові втрати вже відбулися (щоб відновити кісткову масу).

Нижче описано використання PGE₂ в якості анаболічного засобу та дролоксифену як антирезорбтивного засобу, але згідно з інструкціями можна використовувати і інші анаболічні та антирезорбтивні засоби.

У 104 самиць пацюків Sprague Dawley (Charles River, Wilmington, MA) віком 12 місяців видаляли яєчники (ВЯ) або симулювали це у місяць 0. Через 3 місяці пацюки (ВЯ) отримували або відомий кістковий анаболік простагландин E₂ (PGE₂) у дозі 3мг/кг на добу (підшкірною ін'єкцією), або PGE₂ у дозі 3мг/кг на добу (підшкірною ін'єкцією) у комбінації з дролоксифеном (ДОФ) у дозі 10мг/кг на добу (орально) протягом 2 місяців. Після цього лікування PGE₂ припиняли і пацюкам давали або середовище (10% спирт у фізіологічному розчині), або (ДОФ) у дозі 10мг/кг на добу (орально) протягом наступних 1,5 місяців, як нижчеописано.

Гр. I: 8 пацюків розтинали у місяць 0 для базового контролю.

Гр. II: 8 імітовано оперованих пацюків розтинали у місяць 3 для контролю лікування.

Гр. III: 8 імітовано оперованим пацюкам орально давали середовище (10% спирт у фізіологічному розчині) у місяці від 3 до 5 і розтинали у місяць 5.

Гр. IV: 8 імітовано оперованим пацюкам орально давали середовище (10% спирт у фізіологічному розчині) у місяці від 3 до 6,5 і розтинали у місяць 6,5.

Гр. V: 8 пацюків ОЯ розтинали у місяць 3 як контроль до лікування.

Гр. VI: 8 пацюкам ОЯ орально давали середовище (10% спирт у фізіологічному розчині) у місяці від 3 до 5 і розтинали у місяць 5.

Гр. VII: 8 пацюкам ОЯ орально давали середовище (10% спирт у фізіологічному розчині) у місяці від 3 до 6,5 і розтинали у місяць 6,5.

Гр. VIII: 8 пацюкам ОЯ підшкірно вводили PGE₂ у дозі 3мг/кг на добу у місяці від 3 до 5 і розтинали у місяць 5.

Гр. IX: 8 пацюкам ОЯ підшкірно вводили PGE₂ у дозі 3мг/кг на добу у місяці від 3 до 5 та середовище у місяці від 5 до 6,5 і розтинали у місяць 6,5.

Гр. X: 8 пацюкам ОЯ підшкірно вводили PGE₂ у дозі 3мг/кг на добу у місяці від 3 до 5 та ДОФ перорально у дозі 10мг/кг на добу у місяці від 5 до 6,5 і розтинали у місяць 6,5.

Гр. XI: 8 пацюкам ОЯ підшкірно вводили PGE₂ у дозі 3мг/кг на добу та ДОФ перорально у дозі 10мг/кг на добу у місяці від 3 до 5 і розтинали у місяць 5.

Гр. XII: 8 пацюкам ОЯ підшкірно вводили PGE₂ у дозі 3мг/кг на добу та ДОФ перорально у дозі 10мг/кг на добу у місяці від 3 до 5 та середовище у місяці від 5 до 6,5 і розтинали у місяць 6,5.

Гр. XIII: 8 пацюкам ОЯ підшкірно вводили PGE₂ у дозі 3мг/кг на добу та ДОФ перорально у дозі 10мг/кг на добу у місяці від 3 до 5 та ДОФ перорально у дозі 10мг/кг на добу у місяці від 5 до 6,5 і розтинали у місяць 6,5.

PGE₂ (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI) та дролоксифен (Pfizer Inc. Groton, CT) у порошку спочатку розчиняли у 100% етанолі і розбавляли фізіологічним розчином до потрібної концентрації (кінцева концентрація етанолу 10%). 1мл/кг розчину PGE₂ кожної доби підшкірно вводили у спину. 1мл/пацюка розчину ДОФ кожної доби давали перорально. Усім пацюкам підшкірно вводили 10мг/кг кальцеїну (флуорохромний кістковий маркер, Sigma Chemical Co. St. Louis MO) за 12 та 2 доби до розтину для визначення динаміки змін у кістковій тканині.

Тварин умертвляли під анестезією кетаміном. Було визначено такі показники:

Виміри кісткової мінералізації на стегні: Праве стегно кожного пацюка видаляли при розтинанні та сканували, використовуючи подвійний абсорбціометр енергії рентгенівських променів (DXA, QDR 1000/W, Hologic Inc., Waltham, MA), опоряджений програмним забезпеченням "Regional high Resolution Scan" (Hologic Inc., Waltham, MA). Розмір поля сканування 5,08x1,902см, розділення 0,0254x0,0127см та швидкість сканування 7,25мм/с. Зображення стегна аналізували і визначали розмір кістки, кістковий мінеральний вміст (МВ), кісткову мінеральну густину (МГ) для усього стегна (УС), периферійного метафізу стегна (ПМС), тіла стегна (ТС) та середини стегна (СС).

Виміри кісткової мінералізації на поперековому хребці: Розмір кістки, кістковий мінеральний вміст (МВ), кісткову мінеральну густину (МГ) усього поперекового хребта та кожного з шести поперекових хребців (ПХ1-6) визначали за допомогою подвійного абсорбціометра енергії рентгенівських променів (DXA, QDR 1000/W, Hologic Inc., Waltham, MA), опорядженого програмним забезпеченням "Regional high Resolution Scan" (Hologic Inc., Waltham, MA). Розмір поля сканування 6x1,9см, розділення 0,0254x0,0127см та швидкість сканування 7,25мм/с. Зображення усього поперекового хребта отримували і аналізували. Визначали розмір кістки (РК) та кістковий мінеральний вміст (МВ), а кісткову мінеральну густину розраховували (МВ/РК) для усього поперекового хребта та кожного з шести поперекових хребців (ПХ1-6).

Гістоморфометричний аналіз серединної метафізальної губчастої великої гомілкової кістки: Праву гомілку видаляли при розтинанні, звільняли від м'язів і розрізали на три частини. Середину гомілки фіксували у 70% етанолі, дегідрували при зростаючій концентрації етанолу, обезжирювали ацетоном, потім

умувували у метилметакрилат (Eastman Organic Chemicals, Rochester, NY). Фронтальні зрізи серединних метафізів гомілки одержували на мікротомі Reichert-Jung Polycut S. Для гістоморфометрії губчастої кістки використовували по одному зрізу товщиною 4 та 10 μm від кожного пацюка. Зрізи товщиною 4 μm фарбували модифікованим барвником Masson's Trichrome, а зрізи товщиною 10 μm залишали непофарбованими.

Для статичних та динамічних гістоморфометричних вимірів вторинного спонгіозу серединних метафізів гомілки між 1,2 та 3,6 мм до епіфізальної платівки зони росту використовували гістоморфометричну систему Bioquant OS/2 (R&M biometrics, Inc., Nashville, TN). Першими 1,2 мм зони метафізу гомілки потрібно нехтувати, щоб обмежити виміри вторинним спонгіозом. Зрізи товщиною 4 μm використовували для визначення ознак, що відносяться до об'єму кісток, а зрізи товщиною 10 μm використовували для визначення ознак, що відносяться до утворення та перетворення кісток.

I. Виміри та розрахунки стосовно об'ємів та структур трабекулярних кісток:

1. Загальна площа метафізу (ЗП, mm^2): площа метафізу між 1,2 та 3,6 мм до епіфізальної платівки зони росту.

2. Площа трабекул кістки (ТП, mm^2): загальна площа трабекул у ЗП.

3. Периметр трабекул кістки (ПТК, мм): довжина загального околу трабекул.

4. Частка трабекул кістки (ТП/ЗП, %, мм): $\text{ТП/ЗП} \times 100$.

5. Число трабекул кістки (ЧТ, N/мм): $1,199/2 \times \text{ПТК/ЗП}$.

6. Товщина трабекул кістки (ТКТ, μm): $2000/1,199 \times \text{ТП/ПТК}$.

7. Відокремлення трабекул кістки (ВТК, μm): $2000 \times 1,199 \times \text{ЗП/ТП}$.

II. Виміри та розрахунки стосовно кісткової резорбції:

1. Число остеокластів (ЧОК, N): загальне число остеокластів в усій площі метафізу.

2. Периметр остеокластів (ПОК, мм): довжина загального периметру остеокластів.

3. Густина остеокластів (ГОК, N/мм): ЧОК/ПТК .

4. Процент периметру остеокластів (ППО, %): ПОК/ПТК .

III. Виміри та розрахунки стосовно кісткового утворення та перетворення:

1. Одинично маркований кальцієм периметр (ОМП, мм): загальна довжини периметру трабекул, позначена одним маркером кальцеїну.

2. Подвійно маркований кальцеїном периметр (ПМП, мм): загальна довжини периметру трабекул, позначена двома маркерами кальцеїну.

3. Внутрішньомаркерна ширина (ВМШ, μm): середня відстає між двома кальцеїновими маркерами.

4. Процент мінералізованого периметру (ПМ, %): $(\text{ОМП}/2 + \text{ПМП})/\text{ПТК} \times 100$.

5. Швидкість мінерального нанесення (ШМ, $\mu\text{m}/\text{добу}$): $\text{ВМШ}/\text{маркерний інтервал}$.

6. Швидкість утворення кісток (ШУК/ПТК, $\mu\text{m}^2/\text{d}/\mu\text{m}$): $(\text{ОМП}/2 + \text{ПМП}) \times \text{ШМ}/10/\text{ПТК}$.

7. Швидкість перетворення кісток (ШПК, %/y): $(\text{ОМП}/2 + \text{ПМП}) \times \text{ШМ}/\text{ТП} \times 100$.

Статистичні дані можна розрахувати, використовуючи StatView 4.0 packages (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA). Для визначення різниці між групами можна використати аналіз відмінностей за Fisher's PLSD.

Визначення для агоністів/антагоністів естрогену Агоністи/антагоністи естрогену належать до класу сполук, що інгібують кісткове перетворення та попереджають викликані дефіцитом естрогену кісткові втрати. В якості моделі кісткових втрат після менопаузи широко використовують кісткові втрати пацюків з видаленими яєчниками. Використовуючи цю модель можна визначати ефективність сполук агоністів/антагоністів естрогену у попередженні кісткових втрат та інгібування кісткової резорбції.

В цьому досліді використовували самиць пацюків Sprague Dawley (Charles River, Wilmington, MA) різного віку (такого, як 5 місяців). Пацюків поодиночі тримали у клітинах 20 см x 32 см x 20 см протягом періоду експерименту. Усі тварини досхочу отримували воду та покупний корм (Agway ProLab 3000, Agway County Food, Inc., Syracuse, NY), що містив 0,97% кальцію, 0,85% фосфору та 1,05 одиниць/р вітаміну D₃.

Групи з 8-10 пацюків імітували операцію і вони перорально отримували середовище (10% спирту та 90% фізіологічного розчину, по 1 мл/добу), а іншим пацюкам з двох боків видаляли яєчники (ВЯ) і давали або середовище (перорально), 17 β -естрадіол (Sigma, E-8876, E₂, 30 $\mu\text{g}/\text{кг}$ на добу, підшкірно) або агоніст/антагоніст естрогену (такий, як долоксифен, перорально, 5, 10 чи 20 $\text{mg}/\text{кг}$ на добу) протягом деякого періоду (такого, як 4 доби). Усі пацюки отримували підшкірно кальцеїн (флуорохромний кістковий маркер) по 10 $\text{mg}/\text{кг}$ за 12 та 2 доби перед умертвлюванням, щоб визначити динаміку змін у тканині кісток. Через 4 доби досліді пацюків розтинали. Визначали показники:

Приріст маси тіла: різниця маси тіла при розтині та маси тіла при видаленні.

Гістологія та маса матки: матку кожного пацюка видаляли при розтині та негайно зважували. Потім матку піддавали таким гістологічним вимірам, як поперечне площина тканини матки, товщина основи та товщина порожнинного епітелію.

Загальний сироваточний холестерин: Кров отримували серцевою пункцією та давали їй спектися при 4°C, а потім центрифугували 20 хвилин при 2000g. Зразки сироватки аналізували на загальний сироваточний холестерин з використанням калориметричного високопродуктивного аналізу на холестерин (Boehringer Mannheim Biochemical, Indianapolis, IN).

Виміри кісткової мінералізації стегна: Праве стегно кожного пацюка видаляли при розтинанні та сканували, використовуючи подвійний абсорбціометр енергії рентгенівських променів (DXA, QDR 1000/W, Hologic Inc., Waltham, MA), опоряджений програмним забезпеченням "Regional High Resolution Scan" (Hologic Inc., Waltham, MA). Розмір поля сканування 5,08x1,902 см, розділення 0,0254x0,0127 см та швидкість сканування 7,25 мм/с. Зображення стегна аналізували і визначали розмір кістки, кістковий мінеральний вміст (МВ), кісткову мінеральну густину (МГ) для усього стегна (УС), периферійного метафізу стегна (ПМС), тіла стегна (ТС) та середини стегна (СС).

Гістоморфометричний аналіз серединної метафізуальної губчастої великої гомілкової кістки: Праву гомілку видаляли при розтинанні, звільняли від м'язів і розрізали на три частини. Середину гомілки фіксували у 70% етанолі, дегідрували при зростаючій концентрації етанолу, обезжирювали ацетоном, потім умовували у метилметакрилат (Eastman Organic Chemicals, Rochester, NY). Фронтальні зрізи серединних метафізів гомілки одержували на мікротомі Reichert-Jung Polycut S. Для гістоморфометрії губчастої кістки

використовували по одному зрізу товщиною 4 та 10µм від кожного пацюка. Зрізи товщиною 4µм фарбували модифікованим барвником Masson's Trichrome, а зрізи товщиною 10µм залишали непофарбованими.

Для статичних та динамічних гістоморфометричних вимірів вторинного спонгіозу серединних метафізів гомілки між 1,2 та 3,6мм до епіфізальної платівки зони росту використовували гістоморфометричну систему Bioquant OS/2 (R&M biometrics, Inc., Nashville, TN). Першими 1,2мм зони метафізу гомілки потрібно нехтувати, щоб обмежити виміри вторинним спонгіозом. Зрізи товщиною 4µм використовували для визначення ознак, що відносяться до об'єму кісток, а зрізи товщиною 10µм використовували для визначення ознак, що відносяться до утворення та перетворення кісток.

I. Виміри та розрахунки стосовно об'ємів та структур трабекулярних кісток:

1. Загальна площа метафізу (ЗП, мм²): площа метафізу між 1,2 та 3,6мм до епіфізальної платівки зони росту.

2. Площа трабекул кістки (ТП, мм²): загальна площа трабекул у ЗП.

3. Периметр трабекул кістки (ПТК, мм): довжина загального околу трабекул.

4. Частка трабекул кістки (ТП/ЗП%, мм): $ТП/ЗП \times 100$.

5. Число трабекул кістки (ЧТ, N/мм): $1,199/2 \times ПТК/ЗП$.

6. Товщина трабекул кістки (ТКТ, µм): $2000/1,199 \times ТП/ПТК$.

7. Відокремлення трабекул кістки (ВТК, µм): $2000 \times 1,199 \times ЗП/ТП$.

II. Виміри та розрахунки стосовно кісткової резорбції:

1. Число остеокластів (ЧОК, N): загальне число остеокластів в усій площі мета-фізу.

2. Периметр остеокластів (ПОК, мм): довжина загального периметру остеокластів.

3. Густина остеокластів (ГОК, N/мм): $ЧОК/ПТК$.

4. Процент периметру остеокластів (ППО,%): $ПОК/ПТК$.

III. Виміри та розрахунки стосовно кісткового утворення та перетворення:

1. Одинично маркований кальцеїном периметр (ОМП, мм): загальна довжини периметру трабекул, позначена одним маркером кальцеїну.

2. Подвійно маркований кальцеїном периметр (ПМП, мм): загальна довжини периметру трабекул, позначена двома маркерами кальцеїну.

3. Внутрішньомаркерна ширина (ВМШ, µм): середня відстань між двома кальцеїновими маркерами.

4. Процент мінералізованого периметру (ПМ, %): $(ОМП/2+ПМП)/ПТК \times 100$.

5. Швидкість мінерального нанесення (ШМ, µм/добу): $ВМШ/маркерний\ інтервал$.

6. Швидкість утворення кісток (ШУК/ПТК, µм²/d/µм): $(ОМП/2+ПМП) \times ШМ/10/ПТК$.

7. Швидкість перетворення кісток (ШПК, %/у): $(ОМП/2+ПМП) \times ШМ/ТП \times 100$.

Статистичні дані можна розрахувати, використовуючи StatView 4,0 packages (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA). Для визначення різниці між групами можна використати аналіз відмінностей за Fisher's PLSD.

Визначення для анаболічних засобів. Активність анаболічних засобів стосовно стимулювання утворення кісток та зростання кісткової маси можна визначати на незайманих самцях та самицях пацюків, самцях з гормональною недостатністю (видаленими яєчками) або самицях (з видаленим яєчником). Крім того, використовували самців чи самиць пацюків різного віку (такого, як 3 місяці). Пацюки можуть бути незайманими чи кастрованими (з видаленими яєчками чи яєчником) з застосуванням до них перорально чи підшкірно таких анаболіків, як простагландин E₂ (PGE₂) у різних дозах (1, 3 чи 6мг/кг на добу) протягом деякого періоду (від 2 тижнів до 2 місяців). Лікування кастрованих пацюків починали у наступну добу після операції (щоб попередити кісткові втрати), або коли кісткові втрати вже відбулися (щоб відновити кісткову масу). Усі тварини досхочу отримували воду та покупний корм (Teklad Rodent Diet #8064, Harian Teklad, Madison, WI), що містив 1,46% кальцію, 0,99% фосфору та 4,96 одиниць/г вітаміну D₃. Усі пацюки отримували підшкірно кальцеїн по 10мг/кг за 12 та 2 доби перед умертвлюванням. Визначали показники:

Виміри кісткової мінералізації стегна: Праве стегно кожного пацюка видаляли при розтинанні та сканували, використовуючи подвійний абсорбціометр енергії рентгенівських променів (DXA, QDR 1000/W, Hologic Inc., Waltham, MA), опоряджений програмним забезпеченням "Regional High Resolution Scan" (Hologic Inc., Waltham, MA). Розмір поля сканування 5,08x1,902см, розділення 0,0254x0,0127см та швидкість сканування 7,25мм/с. Зображення стегна аналізували і визначали розмір кістки, кістковий мінеральний вміст (МВ), кісткову мінеральну густину (МГ) для усього стегна (УС), периферійного метафізу стегна (ПМС), тіла стегна (ТС) та середини стегна (СС).

Гістоморфометричний аналіз серединної метафізальної губчастої великої гомілкової кістки: Праву гомілку видаляли при розтинанні, звільняли від м'язів і розрізали на три частини. Середину гомілки фіксували у 70% етанолі, дегідрували при зростаючій концентрації етанолу, обезжирювали ацетоном, потім умуrowували у метилметакрилат (Eastman Organic Chemicals, Rochester, NY). Фронтальні зрізи серединних метафізів гомілки одержували на мікротомі Reichert-Jung Polycut S. Для гістоморфометрії губчастої кістки використовували по одному зрізу товщиною 4 та 10µм від кожного пацюка. Зрізи товщиною 4µм фарбували модифікованим барвником Masson's Trichrome, а зрізи товщиною 10µм залишали непофарбованими.

Для статичних та динамічних гістоморфометричних вимірів вторинного спонгіозу серединних метафізів гомілки між 1,2 та 3,6мм до епіфізальної платівки зони росту використовували гістоморфометричну систему Bioquant OS/2 (R&M biometrics, Inc., Nashville, TN). Першими 1,2мм зони метафізу гомілки потрібно нехтувати, щоб обмежити виміри вторинним спонгіозом. Зрізи товщиною 4µм використовували для визначення ознак, що відносяться до об'єму кісток, а зрізи товщиною 10µм використовували для визначення ознак, що відносяться до утворення та перетворення кісток. I. Виміри та розрахунки стосовно об'ємів та структур трабекулярних кісток:

1. Загальна площа метафізу (ЗП, мм²): площа метафізу між 1,2 та 3,6мм до епіфізальної платівки зони росту.

2. Площа трабекул кістки (ТП, мм²): загальна площа трабекул у ЗП.

3. Периметр трабекул кістки (ПТК, мм): довжина загального околу трабекул.

4. Частка трабекул кістки (ТП/ЗП%, мм): $ТП/ЗП \times 100$.

5. Число трабекул кістки (ЧТ, N/мм): $1,199/2 \times ПТК/ЗП$.

6. Товщина трабекул кістки (ТКТ, μm): $2000/1,199 \times \text{ТП/ПТК}$.
7. Відокремлення трабекул кістки (ВТК, ц.м): $2000 \times 1,199 \times \text{ЗП/ТП}$.

II. Виміри та розрахунки стосовно кісткової резорбції:

1. Число остеокластів (ЧОК, N): загальне число остеокластів в усій площі метафізу.
2. Периметр остеокластів (ПОК, мм): довжина загального периметру остеокластів.
3. Густина остеокластів (ГОК, N/мм): ЧОК/ПТК .
4. Процент периметру остеокластів (ППО, %): ПОК/ПТК .

III. Виміри та розрахунки стосовно кісткового утворення та перетворення:

1. Одинично маркірований кальцеїном периметр (ОМП, мм): загальна довжини периметру трабекул, позначена одним маркером кальцеїну.
2. Подвійно маркірований кальцеїном периметр (ПМП, мм): загальна довжини периметру трабекул, позначена двома маркерами кальцеїну.
3. Внутрішньомаркерна ширина (ВМШ, μm): середня відстань між двома кальцеїновими маркерами.
4. Процент мінералізованого периметру (ПМ, %): $(\text{ОМП}/2 + \text{ПМП})/\text{ПТК} \times 100$.
5. Швидкість мінерального нанесення (ШМ, $\mu\text{m}/\text{добу}$): $\text{ВМШ}/\text{маркерний інтервал}$.
6. Швидкість утворення кісток (ШУК/ПТК, $\mu\text{m}^2/\text{д}/\mu\text{m}$): $(\text{ОМП}/2 + \text{ПМП}) \times \text{ШМ}/10/\text{ПТК}$.
7. Швидкість перетворення кісток (ШПК, $\%/y$): $(\text{ОМП}/2 + \text{ПМП}) \times \text{ШМ}/\text{ТП} \times 100$.

Статистичні дані можна розраховувати, використовуючи StatView 4.0 packages (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA). Для визначення різниці між групами можна використати аналіз відмінностей за Fisher's PLSD.

Визначення зв'язування рецепторів естрогену *in vitro*: Аналізом зв'язування рецепторів естрогену *in vitro* визначали здатність агоністів/антагоністів естрогену згідно з винаходом заміщувати $[3\text{H}]$ -естрадіол на рецепторах естрогену людини, отриманих рекомбінантними способами з дріжджів. Використовували такі матеріали: (1) буфер TD-0,3 (вміст ТРИС 10mM , $\text{pH } 7,6$, $0,3\text{M}$ хлорид калія та 5mM дитіотреїтол (ДТТ) (Sigma Co.), $\text{pH } 7,6$); (2) радіолігандом є $[3\text{H}]$ -естрадіол, отриманий від New England Nuclear; холодним лігандом - естрадіол, отриманий від Sigma, (4) рекомбінантний рецептор естрогену людини (РЕЛ).

Розчин тестуємої сполуки готували у TD-0,3 з 4% ДМСО та 16% етанолу. Тритійований естрадіол розчиняли у TD-0,3 так, щоб кінцева концентрація у зразку була 5nM . РЕЛ також розбавляли TD-0,3 так, щоб у кожній дослідній комірці було $4\text{--}10\mu\text{g}$ загального білку. При використанні плат для мікротитрування кожний інкубат містив $50\mu\text{l}$ холодного естрадіолу (неспецифічне зв'язування) або розчин сполуки, $20\mu\text{l}$ тритійованого естрадіолу та $30\mu\text{l}$ розчину РЕЛ. Кожна пелета включала потрібне загальне зв'язування та різні концентрації сполуки, лати протягом ночі інкубували при 4°C . Реакцію зв'язування далі зупиняли додаванням при перемішуванні 100ml гідроксипатиту у 10mM ТРИС, $\text{pH } 7,6$ та інкубацією протягом 15 хвилин при 4°C . Суміш центрифугували і промивали пелету 4 рази 1% Triton x 100 у 10mM ТРИС, $\text{pH } 7,6$. Пелету гідроксипатиту суспендували в Ecoscint A та визначали радіоактивність бета-сцинтиграфією. Визначали результат потрібних вимірювань (число/хвилину, Ч/Х). Специфічне зв'язування розраховували як різницю між Ч/Х при загальному зв'язуванні (визначеному підрахунками після розділення реакційної суміші з вмістом тільки рекомбінантного рецептора, радіоліганду) та Ч/Х при неспецифічному зв'язуванні (визначеному підрахунками після розділення реакційної суміші з вмістом рекомбінантного рецептора, радіоліганду, та надлишку немаркірованого ліганду). Потужність сполуки визначали за величинами IK_{50} (концентрація сполуки, що необхідна для 50% інгібування загального специфічного зв'язування тритійованого естрадіолу). Специфічне зв'язування при різних концентраціях сполуки визначали та розраховували як процент специфічного зв'язування від загального специфічного зв'язування радіоліганда. Результати представлено як процент інгібування сполуки (лінійна шкала) в залежності від концентрації сполуки (логарифмічна шкала).

Визначення для гормону росту/посилюючого секрецію гормону росту засобу: Сполуки, що здатні стимулювати секрецію ГР, з культивованих клітин гіпофізу пацюків ідентифікували як описано нижче. Це визначення корисно також у порівнянні зі стандартами стосовно визначення рівнів дозування. Клітини виділяли з гіпофізів 6-тижневих самців пацюків Wistar. Після обезголовлювання передні частки гіпофіза видаляли у холодний стерильний збалансований сольовий розчин Ханка без кальцію та магнію (3CPX). Тканини було дрібно покрито і піддано двом циклам ферментативного диспергування з механічною допомогою і використанням 10 одиниць/мл бактеріальної протеази (EC 3.4.24.4, Sigma P-6141) у 3CPX. Суміш тканини та ферменту перемішували у колбі з втулкою при 30об/хв. у атмосфері з 5% CO_2 при 37°C приблизно 30 хвилин, ручним розтиранням через приблизно 15 хвилин та протягом приблизно 30 хвилин, використовуючи 10-мл піпетку. Суміш центрифугували при 200g приблизно 5 хвилин. До супернатанту додавали кінську сироватку для нейтралізації надлишку протеази. Пелету ресуспендували у свіжій протеазі, перемішували приблизно на 30 хвилин більше за попередні умови та розтирали вручну, а інакше голкою 23 розміру. Знов додавали кінську сироватку, потім клітини після обох обробок комбінували, пелету (200g , приблизно 15 хвилин) промивали, ресуспендували у середовищі для культури та підраховували. Клітини у кількості $6\text{--}6,5 \times 10^4$ клітин/ cm^2 розміщали на 48-коміркових пластинах Costar та культивували $3\text{--}4$ доби у середовищі Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), з добавкою $4,5\text{г/л}$ глюкози, 10% кінської сироватки, $2,5\%$ сироватки зародку теляти, 1% замінних амінокислот, 100од./мл ністатину та 50мг/мл гентаміцину сульфату перед випробуванням стосовно секреції ГР. Безпосередньо перед випробуванням культуру клітин двічі промивали, урівноважували протягом приблизно 30 хвилин у секретуючому субстраті (DMEM, буферований 25mM ГЕПЕС, $\text{pH } 7,4$, що містив $0,5\%$ альбуміну бичачої сироватки при 37°C). Тестуємі сполуки розчиняли у ДМСО і розбавляли попередньо нагрітим секретуючим субстратом. Аналіз здійснювали чотири рази. Визначення починали додаванням $0,5\text{мл}$ секретуючого субстрату (з середовищем чи тестуємою сполукою) до кожної культури клітин. Інкубацію проводили при 37°C приблизно 30 хвилин, потім зупиняли видаленням середовища культури центрифугуванням при 2000g приблизно 15 хвилин для відокремлення клітинного матеріалу. Концентрацію гормону росту пацюків у супернатанті визначали стандартним радіоімунним аналізом, використовуючи препарат порівняння гормону росту пацюків (NIDDK-rGH-RP-2) та антисироватку гормону росту пацюків, вироблену з мавп (NIDDK-anti-rGH-S-5), отриману від Др. А. Парлоу (Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, CA). Додатковий гормон росту пацюків ($1,5\text{од./мг}$,

#G2414, Scripps Lab., San Diego, CA) іодували до специфічної активності приблизно 30μKi/μг способом з хлораміном T для використання як міченої сполуки. Імунні комплекси отримували додаванням козиної антисироватки до мавпячого IgG (Organon Teknika, Durham, NC) з поліетиленгліколем молекулярної маси 10000-20000 до кінцевої концентрації 4,3%; відокремлення досягали центрифугуванням. Робочі межі цього аналізу на 0,08-2,5μг гормону росту пацюків перевищували базовий рівень. Активні сполуки звичайно стимулювали секрецію гормону росту більше, ніж в 1,4 рази. (Посилання: Cheng K., Chan W.S., Barreto Jr., A., Convey, E. V, Smith R.G. 1989).

Визначення екзогенно стимульованої секреції гормону росту у пацюків після внутрішньовенного введення тестуємих сполук. Самиць пацюків Sprague Dawley (Charles River Laboratory, Wilmington, MA) віком 21 доба акліматизували в умовах віварію (24°C, 12 годин на світлі, 12 годин у темряві) приблизно один тиждень перед тестуванням сполук. Усі тварини досхоchu отримували воду та покупний корм (Agway County Food, Syracuse, NY).

У день дослідження тестуємі сполуки розчиняли у середовищі з 1% етанолу, 1мМ оцтовою кислотою та 0,1% бічним сироваточним альбуміном у фізіологічному розчині. Кожну сполуку тестували з n=3. Пацюків зважували та анестезували інтраперитональною ін'єкцією фенобарбіталу натрію (нембутал 50мг/кг маси тіла). Через 14 хвилин після анестезії відбирали зразки крові обрізанням кінчика хвоста, дозволяючи крові стікати у тубу для мікроцентрифугування (базовий зразок крові, приблизно 100μг). Через 15 хвилин після анестезії у хвостову вену ін'єкцією вводять тестуєму сполуку при об'ємі ін'єкції 1мл/кг маси тіла. Додаткові зразки крові беруть з хвоста через 5, 10 та 15 хвилин після введення сполуки. Зразки крові витримують на льоді до відділення сироватки центрифугуванням (1430g, 15 хвилин, 10°C). Сироватку зберігають при -80°C до визначення радіоімунним аналізом, описаним вище та нижче, гормону росту.

Оцінка екзогенно стимульованої секреції гормону росту у собак після орального введення тестуємих сполук. У день дослідження тестуємі сполуки дозували та розчиняли у воді. Дозування проводили з розрахунку 0,5мл/кг для 4-х собак у кожному режимі дозування. Зразки крові по 2мл відбирали з яремної вени прямою венозною пункцією перед дозою та через 0,08, 0,17, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2,4,6 та 8 годин після прийому дози, використовуючи 2-мл вакуумовані контейнери з літєвим гепарином. Одержану плазму зберігали при -20°C до проведення аналізу.

Визначення гормону росту собак Концентрацію гормону росту собак визначали стандартним радіоімунним аналізом, використовуючи гормон росту собак (антиген іодованого та препарату порівняння AFP-1983B) та антисироватку гормону росту собак (AFP-21452578), отримані від Др. А. Парлоу (Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, CA). Мічену сполуку отримували іодуванням до специфічної активності приблизно 20-40μKi/μг з хлораміном T. Імунні комплекси отримували додаванням козиної антисироватки до мавпячого IgG (Organon Teknika, Durham, NC) з поліетиленгліколем молекулярної маси 10000-20000 до кінцевої концентрації 4,3%; відокремлення досягали центрифугуванням. Робочі межі цього аналізу складали 0,08-2,5μг гормону росту собак/тубу.

Застосування сполук згідно з винаходом можна здійснювати будь-яким шляхом розподілу сполуки згідно з винаходом системно та/або локально, включаючи оральні, парентеральні, інтрадуоденальні тощо. Взагалі, сполуки згідно з винаходом застосовують орально, але може використовуватися парентеральне застосування (наприклад, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, підшкірно або інтрамедулярно), наприклад, коли оральне вживання непридатне для швидкої дії або коли пацієнт нездатний прийняти ліки. Дві різні сполуки згідно з винаходом можна вживати разом одночасно чи послідовно у будь-якому порядку, або як одиничну фармацевтичну композицію, що містить першу описану вище сполуку та другу описану вище сполуку, у фармацевтично прийнятному носії.

Наприклад, кістковий анаболічний засіб можна використовувати поодиночі або у сполученні з антирезорбтивним засобом від 3-х місяців до 3-х років, з наступним використанням антирезорбтивного засобу від 3-х місяців до 3-х років з довільним повторенням повного лікувального циклу. З іншого боку, наприклад, кістковий анаболічний засіб можна використовувати поодиночі або у сполученні з антирезорбтивним засобом від 3-х місяців до 3-х років, з наступним використанням антирезорбтивного засобу протягом подальшого життя пацієнта. Наприклад, в одному з кращих способів вживання другої описаної вище сполуки (наприклад, PGE₂) її застосовують один раз на добу, а першу описану вище сполуку (наприклад, агоніст/антагоніст естрогену) - один чи кілька разів. Альтернативно, наприклад, у другому з кращих способів вживання обидві сполуки приймають послідовно, причому другу описану вище сполуку (наприклад, PGE₂) застосовують один раз на добу протягом періоду, достатнього для збагачення кісткової маси до рівня, що вище за критичний для переломів кісток (рекомендації ВОЗ "Оцінка ризику переломів та її застосування до виявлення остеопорозу після менопаузи (1994), Доповіді пошукової групи ВОЗ. Технічна серія ВОЗ 843"), а першу описану вище сполуку (наприклад, агоніст/антагоніст естрогену) - один чи кілька разів на добу. Бажано другу описану вище сполуку (наприклад, PGE₂) застосовувати один раз на добу з таким швидким розподілом, як оральний (наприклад кращою є форма для постійного вивільнення).

У будь-якому випадку кількість та строк вживання сполук залежить, безумовно, від лікуємої особи, суворості положення, способу вживання, а також досвіду лікаря. Отже, внаслідок відмін між пацієнтами нижченаведені дози є директивними, а лікар може підбирати дози для забезпечення активності (наприклад, збагачення кісткової маси), яку він вважає прийнятною для конкретного пацієнта. Підбираючи бажаний ступінь активності лікар повинен зважати на такі різні фактори, як початковий рівень кісткової маси, вік пацієнта, наявність попередніх, а також інших захворювань (наприклад, серцевосудинних). Наприклад, застосування агоністів/антагоністів естрогену може призвести до серцевосудинного поліпшення, особливо у жінок після менопаузи. У наступних розділах запропоновано кращі межі дозування для різних сполук згідно з винаходом.

Кількість використовуваного антирезорбтивного засобу визначають за його активністю відносно інгібування кісткових втрат. Цю активність визначають фармако-кінетичними засобами, мінімальні та максимальні дози при інгібуванні кісткових втрат визначають як вище описано (Інструкції стосовно агоністів/антагоністів естрогену).

Взагалі, ефективне дозування активності згідно з винаходом, наприклад, активності кісткової резорбції

першої сполуки згідно з винаходом характеризується межами 0,01-200мг/кг на добу, краще - 0,5-100мг/кг на добу.

Зокрема, ефективна доза дролоксифену - 0,1-40мг/кг на добу, краще - 0,1-5мг/кг на добу.

Зокрема, ефективна доза ралоксифену - 0,1-100мг/кг на добу, краще - 0,1-10мг/кг на добу.

Зокрема, ефективна доза тамоксифену - 0,1-100мг/кг на добу, краще - 0,1-5мг/кг на добу.

Зокрема, ефективні дози

Цис-6-(4-флуорфеніл)-5-[4-(2-піперидин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-олу;

(-)-Цис-6-феніл-5-[4-(2-піролідин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-олу;

Цис-6-феніл-5-[4-(2-піролідин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-ол;

Цис-[6'-піролідинетокси-3'-піридил]2-феніл-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідронафталіну;

1-(4'-піралідинетоксифеніл)-2-(4'-флуорфеніл)-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідрокіноліну;

Цис-6-(4-гідроксифеніл)-5-[4-(2-піперидин-1-іл-етокси)-феніл]-5,6,7,8-тетрагідронафталін-2-олу; або

1-(4'-піролідинетоксифеніл)-2-феніл-6-гідрокси-1,2,3,4-тетрагідрокіноліну 0,0001-100мг/кг на добу, краще - 0,001-10мг/кг на добу.

Зокрема, ефективна доза 4-гідрокситамоксифену - 0,0001-100мг/кг на добу, краще - 0,001-10мг/кг на добу.

Взагалі, кількість анаболічного засобу (наприклад, PGE₂) використовують, щоб досягти збагачення кісткової маси до рівня, що вище за критичний для переломів кісток (як деталізовано у вищеописаних рекомендаціях ВОЗ).

Взагалі, ефективна доза вищеописаного анаболічного засобу - 0,001-100мг/кг на добу, краще - 0,01-10мг/кг на добу.

Зокрема, ефективна доза PGE₂ - 0,001-10мг/кг на добу, краще - 0,01-1мг/кг на добу.

Зокрема, ефективна доза 3S-(3-гідрокси-4-фенілбутил)-2R[6-(1H-тетразол-5-іл)-гексил]-циклопентанону - 0,001-20мг/кг на добу, краще - 0,01-10мг/кг на добу.

Зокрема, ефективна доза флуориду натрію - 0,001-20мг/кг на добу, краще - 0,01-10мг/кг на добу.

Зокрема, ефективна доза паратиреоїдного гормону та його метаболітів та фрагментів - 0,00001-1мг/кг на добу, краще - 0,001-0,5мг/кг на добу.

Зокрема, ефективна доза гормону росту або посилюючих його секрецію сполук - 0,0001-100мг/кг на добу, краще - 0,01-5мг/кг на добу.

Сполуки згідно з винаходом взагалі застосовують у формі фармацевтичних композицій, що містять щонайменше одну зі сполук згідно з винаходом, разом з фармацевтично прийнятними середовищами чи розріджувачами. Отже, сполуки згідно з винаходом можна застосовувати разом або окремо у будь якій звичайній оральній, парентеральній або трансдермальній дозованій формі.

Для орального вживання фармацевтичні композиції можуть мати форму розчинів, суспензій, таблеток, пілюль, капсул, порошоків тощо. Таблетки містять такі допоміжні речовини, як цитрат натрію, карбонат чи фосфат кальцію, разом з такими дезінтегруючими засобами, як крохмаль, краще картопляний або для тапіоки, та деякі складні силікати, разом з такими зв'язуючими засобами, як полівінілпіролідон, цукор, желатин та гуміарабік. Крім того, часто корисні такі змащувачі, як стеарат магнію, лаурилсульфат натрію, тальк. Тверді композиції такого типу також застосовують як наповнювачі м'яких та твердих капсул; бажані у цих сполученнях матеріали включають також лактозу чи молочний цукор, а також поліетиленгліколі високої молекулярної маси. Коли для орального вживання бажані водні суспензії або елексири, сполуки згідно з винаходом можна сполучати з різними підсолоджуючими, смаковими, забарвлюючими, емульгуючими та/або суспендуючими засобами, а також з такими розріджувачами, як вода, етанол, пропіленгліколь, гліцерин та їх комбінації.

Для парентерального вживання можна застосовувати розчини у кунжутній чи арахісовій олії або у водному пропіленгліколі, а також стерильні розчини у воді відповідних водорозчинних солей. Такі водні розчини може бути необхідно буферувати, а рідкий розріджувач робити ізотонічним сіллю чи глюкозою. Ці водні розчини особливо придатні для внутрішньовенного, внутрішньом'язового, підшкірного або інтраперитонеального введення. У цих сполученнях стерильне водне середовище легко отримати способами, відомими спеціалістам.

Для трансдермального (наприклад, за місцем) використання готують подібні до парентеральних розбавлені стерильні водні чи частково водні розчини (звичайно концентрації 0,1-5%). Способи виготовлення різних фармацевтичних композицій з деякою кількістю активного інгредієнту відомі або стануть ясними з описаного спеціалістам. Див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easter, PA., 15th Edition (1975).

Фармацевтичні композиції згідно з винаходом можуть містити 0,1-95% сполук згідно з винаходом, краще 1-70%. В усіх випадках композиції чи рецептури для вживання повинні містити сполуки згідно з винаходом у кількості, достатній для лікування захворювань/станів лікуємої особи.

Таким чином, винахід відноситься до збагачення та підтримки кісткової маси лікуванням комбінацією активних інгредієнтів, які можна застосовувати окремо, а також до комбінацій окремих фармацевтичних композицій у складі наборів. Набір включає дві окремих фармацевтичних композиції: агоністів/антагоністів естрогену та анаболічних засобів. Набір включає таку упаковку для зберігання окремих фармацевтичних композицій, як окремі скляночки, або окремі пакети з фольги. Звичайно набір включає інструкцію по вживанню окремих компонентів. Набір має особливу перевагу, коли окремі компоненти краще застосовувати у різних дозованих формах, наприклад, оральній та парентеральній, при різних інтервалах між прийомом, або коли необхідний підбір окремих компонентів комбінації за рекомендаціями лікаря.

Прикладом такого набору є так звана блістерна упаковка, що добре відома у виробництві упаковок і яку широко використовують для упаковки фармацевтичних одиничних доз (таблетки, капсули тощо). Блістерні упаковки звичайно включають лист відносно жорсткого матеріалу, покритого фольгою з переважно прозорого пластичного матеріалу, в якому у процесі виготовлення утворюють порожнини, що мають розмір та форму таблеток чи капсул. Далі таблетки чи капсули розміщують у порожнинах і покривають включають листом відносно жорсткого матеріалу з протилежного напрямку порожнини боку. В результаті таблетки чи капсули залишаються у порожнинах між жорсткою та пластичною плівками. Краще, щоб міцність листа була

такою, щоб можна було видалити таблетки та капсули вручну, надавляючи на порожнини так, щоб отвори на листі утворилися над порожнинами. Таблетки та капсули видаляють через ці отвори.

Для запам'ятовування бажано забезпечити позначки на пластинах, наприклад, номерами таблеток чи капсул, які відповідають добі прийому таблетки чи капсули. Іншим прикладом є календарні позначки, наприклад, "перша доба, понеділок, вівторок і т.д., друга доба, понеділок, вівторок..." і т.д. Можливі і інші позначки для пам'яті. Добова доза може бути одною таблеткою чи капсулою, або кількома пілюлями чи капсулами для прийому у певну dobu. Крім того, добова доза кісткового анаболіка може бути одною таблеткою чи капсулою, у той час як добова доза антирезорбтивного засобу може бути кількома пілюлями чи капсулами, що треба відображувати у позначках для пам'яті.

Згідно з іншим окремим втіленням винаходу передбачено розподільник для роздачі добових доз поодиноці під час їх вживання. Краще, щоб розподільник було опоряджено позначальниками для пам'яті. Прикладом такого позначальника є механічний рахувальний пристрій, що показує номер добової дози, яку треба прийняти. Іншим прикладом такого позначальника є мікрочип пам'яті, сполучений з рідкокристалічним зображенням або джерело виразного сигналу, який наприклад, позначає дату, коли було прийнято останню дозу і треба прийняти наступну.

Приклади. У 104 самиць пацюків Sprague Dawley (Charles River, Wilmington, MA) віком 12 місяців видаляли яєчники (ВЯ) або симулювали це у місяць 0. Через 3 місяці пацюки (ВЯ) отримували або відомий кістковий анаболік простагландин E_2 (PGE_2) у дозі 3мг/кг на добу (підшкірною ін'єкцією), або PGE_2 у дозі 3мг/кг на добу (підшкірною ін'єкцією) у комбінації з дролоксифеном (ДОФ) у дозі 10мг/кг на добу (орально) протягом 2 місяців. Після цього лікування PGE_2 припиняли і пацюкам давали або середовище (10% спирт у фізіологічному розчині), або (ДОФ) у дозі 10мг/кг на добу (орально) протягом наступних 1,5 місяців, як нижчеописано.

Гр. I: 8 пацюків розтинали у місяць 0 для базового контролю.

Гр. II: 8 імітовано оперованих пацюків розтинали у місяць 3 для контролю лікування.

Гр. III: 8 імітовано оперованим пацюкам орально давали середовище (10% спирт у фізіологічному розчині) у місяці від 3 до 5 і розтинали у місяць 5.

Гр. IV: 8 імітовано оперованим пацюкам орально давали середовище (10% спирт у фізіологічному розчині) у місяці від 3 до 6,5 і розтинали у місяць 6,5.

Гр. V: 8 пацюків ОЯ розтинали у місяць 3 як контроль до лікування.

Гр. VI: 8 пацюкам ОЯ орально давали середовище (10% спирт у фізіологічному розчині) у місяці від 3 до 5 і розтинали у місяць 5.

Гр. VII: 8 пацюкам ОЯ орально давали середовище (10% спирт у фізіологічному розчині) у місяці від 3 до 6,5 і розтинали у місяць 6,5.

Гр. VIII: 8 пацюкам ОЯ підшкірно вводили PGE_2 у дозі 3мг/кг на добу у місяці від 3 до 5 і розтинали у місяць 5.

Гр. IX: 8 пацюкам ОЯ підшкірно вводили PGE_2 у дозі 3мг/кг на добу у місяці від 3 до 5 та середовище у місяці від 5 до 6,5 і розтинали у місяць 6,5.

Гр. X: 8 пацюкам ОЯ підшкірно вводили PGE_2 у дозі 3мг/кг на добу у місяці від 3 до 5 та ДОФ перорально у дозі 10мг/кг на добу у місяці від 5 до 6,5 і розтинали у місяць 6,5.

Гр. XI: 8 пацюкам ОЯ підшкірно вводили PGE_2 у дозі 3мг/кг на добу та ДОФ перорально у дозі 10мг/кг на добу у місяці від 3 до 5 і розтинали у місяць 5.

Гр. XII: 8 пацюкам ОЯ підшкірно вводили PGE_2 у дозі 3мг/кг на добу та ДОФ перорально у дозі 10мг/кг на добу у місяці від 3 до 5 та середовище у місяці від 5 до 6,5 і розтинали у місяць 6,5.

Гр. XIII: 8 пацюкам ОЯ підшкірно вводили PGE_2 у дозі 3мг/кг на добу та ДОФ перорально у дозі 10мг/кг на добу у місяці від 3 до 5 та ДОФ перорально у дозі 10мг/кг на добу у місяці від 5 до 6,5 і розтинали у місяць 6,5.

PGE_2 (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI) або дролоксифен (Pfizer Inc. Groton, CT) у порошку спочатку розчиняли у 100% етанолі і розбавляли фізіологічним розчином до потрібної концентрації (кінцева концентрація етанолу 10%). 1мл/кг розчину PGE_2 кожної доби підшкірно вводили у спину. 1мл/пацюка розчину ДОФ кожної доби давали перорально.

Виміри кісткової мінералізації на поперековому хребті: Розмір кістки, кістковий мінеральний вміст (МВ), кісткову мінеральну густину (МГ) усього поперекового хребта та кожного з шести поперекових хребців (ПХ1-6) анестезованих пацюків визначали з а допомогою подвійного абсорбціометра енергії рентгенівських променів (DXA, QDR 1000/W, Hologic Inc., Waltham, MA), опорядженого програмним забезпеченням "Regional high Resolution Scan" (Hologic Inc., Waltham, MA). Розмір поля сканування 6x1,9см, розділення 0,0254x0,0127см та швидкість сканування 7,25мм/с. Зображення усього поперекового хребта отримували і аналізували. Визначали розмір кістки (РК) та кістковий мінеральний вміст (МВ), а кісткову мінеральну густину розраховували (МВ/РК) для усього поперекового хребта та кожного з шести поперекових хребців (ПХ1-6).

Через 3, 5 або 6 місяців після операції МВ та МГ для усього поперекового хребта та кожного з шести поперекових хребців значно знизилися на 15-27% у ВЯ-пацюків порівняно з удавано оперованими. Пацюки, яких 3 місяці після ВЯ лікували одним PGE_2 , а 2 місяці у сполученні з ДОФ повністю зберегли МВ та МГ порівняно з удавано оперованими. Не було різниці у МВ та МГ ВЯ-пацюків, яких лікували одним PGE_2 , або PGE_2 у сполученні з ДОФ, що показало відсутність притуплення ДОФ анаболічної дії PGE_2 . Після припинення лікування PGE_2 спостерігали значне зменшення МГ ПХ1, ПХ2 та ПХ3 та МВ ПХ2. З іншого боку, коли цих ВЯ-пацюків лікували ДОФ після перерви PGE_2 , кісткове збереження за рахунок PGE_2 підтримувалося. Аналогічно, перерва PGE_2 та ДОФ на 1,5 місяці викликало значне зменшення МГ ПХ3. Однак, після відміни PGE_2 та продовження ДОФ протягом інших 1,5 місяці кісткових втрат на поперековому хребті цих ВЯ-пацюків не знайшли. Зроблено висновок, що антирезорбтивний засіб ДОФ не притупляє анаболічний вплив PGE_2 на остеогенних пацюків. Крім того, ДОФ виявився ефективним при підтриманні збережених PGE_2 кісток після його відміни. Це підтримує стратегію використання анаболіків для збереження кісткової маси остеопорозного скелету з наступним застосуванням антирезорбтивного засобу для підтримки збереженої кісткової маси.

Повинно бути зрозуміло, що винахід не лімітовано окремими описаними тут втіленнями, тобто різні зміни та модифікації можна зробити без виходу за рамки та суть цієї концепції, що позначена у наступній формулі винаходу.