



УКРАЇНА

ДЕРЖАВНЕ  
ПАТЕНТНЕ  
ВІДОМСТВО(19) **UA** (11) **26580** (13) **C1**(51) **A 61 K 38/29, A 61 K 31/38, A 61 K 31/44,  
A 61 K 31/505, A 61 K 31/495****ОПИС ДО ПАТЕНТУ  
НА ВІНАХІД****(54) СПОСІБ ЗБІЛЬШЕННЯ КІСТКОВОЇ МАСИ У ЛЮДИНИ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ СКЛАД**

1

- (21) 94075641  
(22) 19.07.94  
(24) 11.10.99  
(31) 08/096.480  
(32) 22.07.93  
(33) US  
(46) 11.10.99. Бюл. № 6  
(56) 1. Draper et al., Effects of raloxifene (ZY 139481 HCl) on biochemical markers of bone and lipid metabolism in healthy postmenopausal women, HonKong, Fourth Int'l, Symposium on Osteoporosis, Mar. 29, 1993.  
2. US 5118667, 1992.  
(72) Хок Жанет Марі (US)  
(73) ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ (US)  
(57) 1. Способ увеличения костной массы у человека или лечения заболеваний кости путем введения фактора роста кости в комбинации с ингибитором резорбции кост-

2

ти, отличающийся тем, что вводят эффективное количество парашитовидного гормона и ралоксифена.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что парашитовидный гормон и ралоксифен вводят одновременно.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что парашитовидный гормон и ралоксифен вводят последовательно.

4. Фармацевтический состав для увеличения костной массы у человека или лечения заболеваний кости, представляющий собой комбинацию фактора роста кости и ингибитора резорбции кости, отличающийся тем, что он содержит парашитовидный гормон и ралоксифен, и их молярное соотношение составляет от 10:1 до 1:10.

Настоящее изобретение относится к применению парашитовидного гормона (PTH) для увеличения массы кости, когда его используют с ралоксифеном. Результатом такого терапевтического комбинированного лечения является достижение повышенной скорости образования кости и увеличение массы кости.

Известен патент США № 5118667 (Адамс и другие), в котором раскрыто применение фактора роста кости в комбинации с ингибиторами резорбции кости, причем их используют одновременно в

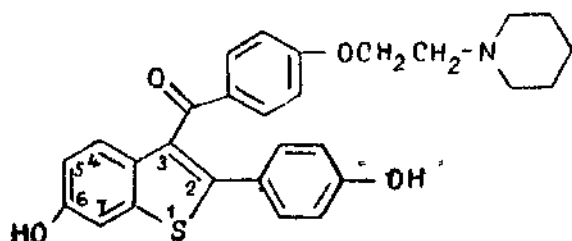
одном составе либо последовательно, для стимулирования образования кости.

Словик и другие (в журнале "Боун энд Мин. Рез.", 1:377-381, 1986) сообщают о том, что стимулирование роста кости достигается за счет применения парашитовидного гормона (PTH).

Ралоксифен описан в патенте США № 4418068. В заявке США № 07/920933, поданной 28 июля 1992 года (X-7947), которая указана здесь для справки, описано, что ралоксифен можно применять для предупреждения или исключения по-

(19) **UA** (11) **26580** (13) **C1**

терь в кости. Ралоксифен имеет следующую структурную формулу:



Настоящее изобретение относится к *in vivo* комбинированной терапии для увеличения костной массы за счет введения ралоксифена и парацитовидного гормона. Эта комбинация обеспечивает более эффективную терапию для исключения потерь костной ткани и замены кости, чем когда эти компоненты применяют в отдельности.

Настоящее изобретение касается способа увеличения костной массы у субъекта путем ввода ему парацитовидного гормона и ралоксифена.

Предметом изобретения является также способ лечения заболевания кости у субъекта путем введения парацитовидного гормона и ралоксифена.

Также, изобретение касается состава парацитовидного гормона ралоксифена для увеличения костной массы у субъекта.

Еще одним предметом изобретения является состав из парацитовидного гормона и ралоксифена для лечения повреждения кости у субъекта.

Что касается ралоксифена, то понятно, что он включает в себя соли и сольваты. Когда упоминают парацитовидный гормон, то подразумевают, что он включает в себя не только весь человеческий гормон, но также те его части, которые содержат долю гормона, ответственную за стимулирование роста кости, например, РТН 1-34 и его аналоги, в которых порядок чередования аминокислот слегка изменен, однако свойства стимулирования роста кости все же сохраняются, например, РТН-РР.

Термин "ингибирование резорбции кости" означает предотвращение потерь костной ткани, особенно ингибирование удаления имеющейся кости или из минеральной фазы и/или из органической матричной фазы через прямое или косвен-

ное изменение образования остеокласта или метаболизма. Итак, термин "ингибитор резорбции кости", как его применяют здесь, означает вещества, которые препятствуют потерям костной ткани за счет прямого или косвенного изменения образования остеокласта или метаболизма.

Термин "остеогенноэффективное количество" означает то количество, которое влияет на образование и дифференциацию костной ткани.

Термин "доза, эффективная для образования костной ткани" также означает "фармацевтически эффективную дозу".

Термин "субъект", как он применяется здесь, означает позвоночное животное, например, млекопитающее или птицу, которое нуждается в лечении или замене кости. Такая необходимость возникает локально в случае повреждения, несращения, дефекта кости, вживления протеза и т.п. Такая необходимость также возникает в случае систематической боли в костях как, например, при рыхлости и пористости костей, остеоартритах, болезни Пагета, размягчения костей, при уменьшении содержания солей в костях, опухлях по типу клеток костного мозга и других формах рака, а также в случае потери костной массы, связанной с возрастом.

Термин "лечение" как он применяется здесь, означает (1) обеспечение субъекта некоторым количеством лекарства, которое достаточно, чтобы действовать профилактически для устранения развития ослабленного и/или нездорового состояния; или (2) обеспечения субъекта достаточным количеством лекарства, чтобы уменьшить или устранить болезненное состояние и/или симптомы болезненного, ослабленного и/или нездорового состояния.

Ралоксифен можно получить известными способами, например, теми, которые подробно описаны в патенте США № 4418068. Парацитовидный гормон можно получить известными способами синтетическим путем или путем рекомбинации. Парацитовидный гормон, РТН-1-34 можно купить у фирмы Bachem of Torrey, Калифорния.

Лекарства, которые препятствуют заболеванию кости, восстанавливают костную ткань и/или увеличивают массу костной ткани, можно испытать на крысах с удаленными яичниками. Эта модель испытания на животном хорошо известна (например, статью Вронского и другие

1985 г. в "Calcif Tissue Int. 37:324-328; статью Киммела и другие 1990 г. "Calcif Tissue Int.", 46: 101-110; и статью Дурбиджа и другие 1990 г. "Calcif Tissue Int.", 47: 383-387; которые указаны для справки. Вронский и другие описывают "Calcif Tissue Int.", 1985, 43, с. 179-183) ассоциацию потерь костной ткани у крыс с удаленными яичниками. Как и другие описывают использование молодых крыс для исследования ("Эндокринология", 1988, т. 122, с. 2899-2904).

Паращитовидный гормон и ралоксифен можно применять последовательно, совместно или одновременно в одном составе. Если его назначают для последовательного применения, то период между вводом паращитовидного гормона и ралоксифена будет обычно составлять от одной недели до одного года, а оптимально от одной недели до шести месяцев. В предпочтительном варианте ралоксифен будут вводить пациенту, после приема паращитовидного гормона с ралоксифеном или без него, после прекращения приема паращитовидного гормона.

Фармацевтические составы в соответствии с изобретением, которые включают в себя паращитовидный гормон и/или ралоксифен, будут обычно включать в себя эффективное количество для образования кости фактора роста или стимулирования роста костной ткани дополнительно к фармацевтически приемлемому инертному наполнителю. Соответствующие инертные наполнители включают в себя большинство носителей для приема лекарства, одобренных для парентерального применения, включая воду, соленый раствор, раствор Рингера, раствор Хэнка и растворы глюкозы, лактозы, декстрозы, этанола, глицерола, альбумина и т.п. Эти составы могут включать в себя стабилизаторы, антиоксиданты, противомикробные вещества, противосвертывающие средства, буферные агенты, поверхностно-активные вещества и другие вспомогательные добавки. Паращитовидный гормон и/или ралоксифен можно также вводить в нонтофорезном пластыре. Детальное обсуждение соответствующих носителей для парентерального применения лекарства можно найти у Е.У. Мартина в "Ремингтон'з Фармацевтикэл Сайнсез" (Мак Паб. Ко., разделы в последнем издании, относящиеся к носителям восприимчивого средства и к составам, указаны здесь для справки). Такие составы в общем известны специалистам в данной области меди-

цины и их вводят постоянно для систематического лечения.

Если комбинацию вводят в виде одного состава, то молярное отношение паращитовидного гормона к ралоксифену будет составлять примерно от 10:1 до 1:10, предпочтительно от 5:1 до 1:5, а оптимально 1:1. Также, если ее вводят в виде одного состава, то она может состоять из отдельных компонентов состава, либо компоненты могут быть сопряжены друг с другом.

Необходимая точная дозировка будет зависеть от возраста, размера тела, состояния субъекта, характера и сложности заболевания, требующего лечения и т.п., таким образом нельзя заранее определить точное эффективное количество, которое будет устанавливаться теми, что будут оказывать медицинскую помощь. Однако соответствующее количество можно определить экспериментальным путем на моделях животных. В общих чертах, эффективная доза паращитовидного гормона для систематического лечения будет составлять от примерно 0,001 миллиграмм на кг до примерно 10 мг/кг массы тела в день. Эффективная доза ралоксифена примерно от 0,001 мг/кг до 10 мг/кг массы тела в день.

Способы и составы в соответствии с изобретением можно использовать для лечения переломов костей, дефектов и таких расстройств, которые обычно возникают в ослабленных костях, например, при рыхлости или пористости костей, остеоартритах, болезни Пагета, уменьшении количества солей в костях, остеомалацию, потерях костной ткани в результате образования опухоли по типу клеток костного мозга и других формах рака, при заболевании кости в результате побочных эффектов другого лечения (например, стероиды) и потерь костной массы, связанных с возрастом пациента.

В соответствии с одним способом применения паращитовидный гормон и ралоксифен можно вводить систематически внутрь и/или парентерально, включая подкожные или внутривенные инъекции и/или через нос.

В соответствии с другим способом применения паращитовидный гормон можно вводить локально в определенном месте, где требуется рост или исправление кости, с одновременным вводом ралоксифена в этом месте или вводом ралоксифена в отдельном носителе, причем его можно вводить локально с применением паращитовидного гормона в отдельном но-

сителе. Таким образом парашитовидный гормон и/или ралоксифен можно вводить непосредственно на участке, требующем лечения, например, путем инъекции или хирургической имплантации. Соответствующие носители включают в себя гидрогели, управляемые или ручные устройства для инъекции (например, шприцы Alzef®), полимолочная кислота и коллагеновые матрицы. В настоящее время предпочтительными носителями являются те, которые состоят из порошкообразных минеральных компонентов фосфата кальция, содержащих ателопептидный коллаген, например, комбинации гомологического или ксенографического фибриллярного ателопептидного коллагена (например, имплантат из коллагена Lyderm®, поставляемый фирмой Коллаген Корпорейшн, Пало Алто, Калифорния) с оксипатиттрикальцийфосфатом (HA-TCP, поставляется фирмой Zimmer, Inc., Варшава).

Зубные и ортопедические протезы можно покрыть парашитовидным гормоном в комбинации с ралоксифеном для повышения прочности крепления протеза к кости. Либо парашитовидный гормон можно использовать для покрытия имплантата, при этом ралоксифен можно вводить одновременно или последовательно в отдельном носителе и наоборот.

В общих чертах, имплантируемые устройства можно покрыть парашитовидным гормоном и/или ралоксифеном следующим образом.

Парашитовидный гормон (и ралоксифен, если это потребуется) растворяют при концентрации в пределах от 0,01 мг/мл до 200 мг/мл в фосфатном буферном солевом растворе (PBS), содержащем 2 мг/мл сывороточного альбумина. Пористый конец имплантата окунают в раствор и сушат на воздухе (или лиофилизируют) или сразу вживляют на месте кости. Если это требуется, то вязкость покровного раствора можно увеличить путем добавки гиалуроната при окончательной концентрации 0,1 мг/мл – 100 мг/мл или добавки других фармацевтически приемлемых восприимчивых средств. Либо раствор, содержащий парашитовидный гормон (и ралоксифен, если это требуется) смешивают с коллагеновым гелем или человеческим коллагеном (например, коллагеновый имплантат Lyderim® фирмы Коллаген Корп., Пало Алто, Калифорния) до конечной концентрации коллагена 2 мг/мл – 100 мг/мл для образования пасты или геля, который затем исполь-

зуют для покрытия пористого конца имплантируемого устройства. Имплантируемое устройство с покрытием помещают на месте кости сразу, или его сначала сушат на воздухе и повторно гидратируют фосфатным буферным солевым раствором до его имплантирования для максимизации образования новой кости в имплантате, при этом уменьшая врос-  
5 тание мягкой ткани в имплантат.

Крысам возрастом 4 недели, у которых удалили яичники (OVX), вводили специальное воспринимающее средство (V) или человеческий парашитовидный гормон, hPTH 1-34(P) в количестве 8 мг/100 г в день отдельно или в комбинации с ралоксифеном (R) в количестве 0,3 мг/100 г в день следующим образом: воспринимающее средство (V) вводили в течение 24 дней; ралоксифен (R) – 24 дня; парашитовидный гормон (P) – 24 дня; парашитовидный гормон и ралоксифен (P и R) – 24 дня; парашитовидный гормон (P) – в течение 12 дней, затем вводили воспринимающее средство (V) в течение 12 дней; парашитовидный гормон – 12 дней; ралоксифен – 12 дней; воспринимающее средство – 12 дней; ралоксифен – 12 дней. На 24-ый день крыс умертвили, а кровь, бедренные кости, поясничные поз-  
20 вонки и почки собрали. Массу кости измерили в значении содержания кальция (Ca) и сухого веса (DW) дистальных отделов бедренных костей; позвонки обра-  
25 ботали для гистоморфометрии.

Когда окончательная масса тела крыс с удаленными яичниками, которым вводили ралоксифен, была меньше массы тела крыс с удаленными яичниками (OVX) или у нетронутых крыс, данные откорректировали на 100 г массы тела. Содержание кальция и сухой вес в дистальных отделах бедренных костей уменьшились на 15% у крыс OVX в сравнении с "контрольными" крысами (Sham). Масса кости увеличивалась примерно на 25% при введении ралоксифена в течение 24 дней и примерно на 42% при введении парашитовидного гормона в течение 24 дней. Анаболический эффект парашитовидного гормона исчез после его удаления (ведение парашитовидного гормона (P) в течение 12 дней и воспринимающего средства (среда для ле-  
30 карства (V) в течение 12 дней). Ралоксифен имел дополнительный эффект, когда его вводили одновременно с парашитовидным гормоном (увеличение на 65% в сравнении с контрольной группой OVX). Длина бедренной кости, содержа-

ние кальция в сыворотке и почках были одинаковыми между всеми группами (табл. 1).

Данные были выражены, как среднее значение  $\pm$  sem для групп из 8 крыс. Было отмечено значительное различие,  $P < 0,05$ , а в сравнении с группой крыс Sham, которым вводили среду для лекарства (носитель),  $b$  – в сравнении с группой крыс, которым вводили паращитовидный гормон и ралоксифен,  $c$  в сравнении с группой крыс OVX, которым вводили ралоксифен (12+12 дней).

У крыс возрастом 4 недели, у которых были удалены яичники и которых умертвили примерно после 10 недель, прирост в весе был больше, чем у крыс одного возраста без удаления яичников. Паращитовидный гормон не изменяет этот прирост в весе. Ралоксифен препятствует увеличению массы тела, связанного с удалением яичников, в присутствии или отсутст-

вии паращитовидного гормона. Крысы, которым вводили ралоксифен в течение 12 дней и затем среду для лекарства еще в течение 12 дней, показали меньше прирост в весе, чем контрольные крысы группы OVX, однако прирост в весе был больше, чем у крыс, которым продолжали вводить ралоксифен. Отсутствие эффекта на длину бедренной кости (табл. 2), которая является мерилем увеличения длины кости, означает, что изменения в массе тела не показывают изменения в росте ног (крысы становятся более тощими).

Общая масса кости равна сумме компактного и губчатого вещества кости (табл. 3).

Таким образом, лечение крыс, у которых удалили яичники, паращитовидным гормоном, приводит к повышенному образованию кости. Однако образование кости значительно ускорилось за счет однократного ввода ралоксифена.

Т а б л и ц а 1

Группа крыс	Вводимая среда, 12 дней	Вводимая среда, 12 дней	Окончательная масса тела	Длина бедренной кости
Группа крыс Sham (контрольные или здоровые)	Среда для лекарства (носитель)	Среда для лекарства	201 $\pm$ 4	28,6 $\pm$ 0,4
Группа крыс OVX (с удаленными яичниками)	Среда для лекарства	Среда для лекарства	241 $\pm$ 5a	28,8 $\pm$ 0,3
OVX	Паращитовидный гормон	Паращитовидный гормон	241 $\pm$ 4ac	29,8 $\pm$ 0,2
OVX	Ралоксифен	Ралоксифен	189 $\pm$ 5b	28,5 $\pm$ 0,2
OVX	Паращитовидный гормон и ралоксифен	Паращитовидный гормон и ралоксифен	190 $\pm$ 4b	28,8 $\pm$ 0,2
OVX	Паращитовидный гормон	Среда для лекарства	245 $\pm$ 4a	29,6 $\pm$ 0,3
OVX	Паращитовидный гормон	Ралоксифен	208 $\pm$ 2bc	30,0 $\pm$ 1,2
OVX	Ралоксифен	Среда для лекарства	208 $\pm$ 6bc	29,0 $\pm$ 0,3

Т а б л и ц а 2

Масса кости, выраженная в значении сухого веса дистальных отделов бедренных костей

Крысы	Вводимая среда	Вводимая среда	Общий сухой вес кости на 100 г массы тела
1. Sham (контрольные крысы)	1-12 Среда для лекарства (V)	13-24 Среда для лекарства (V)	18,5±0,5ab
2. OVX (с удаленными яичниками)	Среда для лекарства (V)	Среда для лекарства (V)	15,8±0,5abcd
3. OVX	Ралоксифен (R)	Ралоксифен (R)	19,7±0,5ab
4. OVX	Паращитовидный гормон (P)	Паращитовидный гормон (P)	22,4±0,4ab
5. OVX	Паращитовидный гормон и ралоксифен	Паращитовидный гормон и ралоксифен	26,1±0,9a
	1-12	13-24	
6. OVX	Паращитовидный гормон (P)	Среда для лекарства (V)	16,7±0,3abc
7. OVX	Паращитовидный гормон (P)	Ралоксифен (R)	17,8±0,4abcd
8. OVX	Среда для лекарства (V)	Ралоксифен (R)	16,8±0,4abc

П р и м е ч а н и е.  $P < 0,05$ , а – в сравнении с паращитовидным гормоном;  
 b – в сравнении с паращитовидным гормоном и ралоксифеном;  
 c – в сравнении с ралоксифеном;  
 d – в сравнении с OVX (с крысами, у которых удалены яичники).

Сухой вес Са равен общей массе костной ткани в дистальных отделах бедренных костей.

Процент увеличения между средствами:

1.	-3%	-3%
2.		
3.	3%	0%
4.	31%	41%
5.	25%	29%
6.	6%	7%
7.	7%	-3%
8.	-3%	-1%

Т а б л и ц а 3

Масса дистальных отделов бедренных костей

Вещество	Губчатое вещество		Компактное вещество сухой вес (DW)
	Ca	сухой вес (DW)	
Группа крыс Sham (контрольных)	5,2±0,2	9,7±0,3	27,4±0,6
Среда для лекарства (V)	4,7±0,3	8,5±0,5	29,9±1,0
Паращитовидный гормон (P)	9,3±0,5a	16,5±0,8	37,7±1,5
Ралоксифен (R)	5,6±0,4	9,7±0,5	27,5±0,9
Паращитовидный гормон и ралоксифен	7,6±0,6b	13,4±1,06	36,1±1,46
Паращитовидный гормон и среда для лекарства	5,6±0,1	10,8±0,4	30,2±1,2
Паращитовидный гормон и ралоксифен	5,2±0,3	9,1±0,6	28,0±0,7
Ралоксифен и среда для лекарства	4,3±1,0	8,6±0,5	26,3±1,1

П р и м е ч а н и е.  $P < 0,05$ ; a, b в сравнении со всеми другими группами. Показывает увеличение внутреннего диаметра как трубчатого вещества, так и компактного вещества.

Упорядник

Техред М. Келемеш

Коректор М. Самборська

Замовлення 517

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,  
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101

