



MD 2335 F2 2003.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) **2335** (13) **F2**
(51) Int. Cl.⁷: C 07 D 333/64;
A 61 K 31/4535;
A 61 P 5/32, 35/00

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2000 0161 (22) Data depozit: 2000.07.28 (31) Nr.: 60/146184; 60/147642; 60/149820 (32) Data: 1999.07.29; 1999.08.06; 1999.08.19 (33) Țara: US (41) Data publicării cererii: 2001.04.30, BOPI nr. 4/2001	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2003.12.31, BOPI nr. 12/2003
(71) Solicitant: ELI LILLY AND COMPANY, US (72) Inventatori: BUSH Julie Kay, US; CONRAD Preston Charles, US; FLOM Merlyn Gerard, US (73) Titular: ELI LILLY AND COMPANY, US (74) Reprezentant: GLAZUNOV Nicolai, MD	

(54) **Hidrat cristalin de hidroclorură de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen, procedeu de obținere, compoziție farmaceutică care îl conține și utilizarea pentru inhibarea stărilor patologice și activarea colinacetyltransferazei**

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la tehnologiile farmaceutice, în special la o formă cristalină nouă de hidroclorură de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen, la un procedeu de obținere și la o compoziție care o conține.

Hidratul cristalin de hidroclorură de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen (arzofen), F-III, reprezintă un compus cu un grad înalt de cristalizare. Compoziția farmaceutică pe baza lui conține unul sau mai mulți purtători, diluanți sau excipienți, estrogen, progestină, un inhibitor al aromatazei, un analog al hormonului, care eliberează hormonul luteinizant (LHRH) și un inhibitor al acetilcolinesterazei. Procedeu de obținere a compusului menționat

2
5 prevede cristalizarea hidroclorurii de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen din amestecul de izopropanol și apă, luate în raportul de (1...9):1, optimal fiind de (3...5,6) : 1.

10 Compusul declarat se poate utiliza pentru inhibarea stărilor patologice asociate cu deficiență de estrogen, cum ar fi fibroza uterină, endometrioza, restenoza, cancerul estrogen-dependent (inclusiv cancerul mamar și cancerul uterin), cancerul de prostată, hiperplazia benignă a prostatei, osteoporoza, afecțiunile cardiovasculare, hiperlipidemia, tulburări ale SNC și boala Alzheimer, prevenirea cancerului mamar și activarea colinacetyltransferazei.

15
Revendicări: 19

MD 2335 F2 2003.12.31

MD 2335 F2 2003.12.31

3

Descriere:

Prezenta invenție se referă la tehnologiile farmaceutice, în special la o formă cristalină nouă de hidrat de hidroclorură de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen, la un procedeu de obținere a lui și la compozițiile care îl conțin.

5 Se cunoaște hidroclorura de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen (arxoxifen) în forma cea mai generală [1], detaliat examinată ulterior [2, 3]. Arxoxifenul reprezintă un antagonist/agonist mixt nesteroid al estrogenului, utilizat, printre altele, pentru reducerea colesterolului în sange, inhibarea hiperlipidemiei, osteoporozei, formelor de cancer estrogen-dependent, inclusiv a cancerului mamar și uterin, endometriozei, tulburărilor SNC, 10 incluzând boala Alzheimer, proliferării celulelor musculare netede aortale și restenozei.

Mai precis, arxoxifenul este util și în prezent se aplică în clinici în tratamentul cancerului mamar generalizat receptor-pozitiv, în tratamentul asociat al pacienților receptor-pozitivi după un tratament respectiv sistemic și local; pentru reducerea generalizării cancerului mamar invaziv și neinvaziv și 15 carcinomului ductal *in situ* (DCIS). Arxoxifenul se utilizează de asemenea în asociere cu radioterapia, inhibitorii aromatazei, analogii LHRH (*hormonului care eliberează hormonul luteinizant*) și inhibitorii acetilcolinesterazei (AChE).

Investigațiile cu utilizarea metodelor difracției pulverulente cu raze roentgen (XRD), analizei termogravimetrice (TGA), metodei cu rezonanță nucleară magnetică cu protoni (^1H NRM) și metodei 20 lui Karl Fischer (KF) a masei generale de arxoxifen, izolate printr-o metodă cunoscută [2], relevă că materialul menționat este un hidratat, care se cristalizează slab și conține în rețeaua sa cristalină diferite cantități de component organic volatil (acetat de etil).

De obicei, substanțele care se cristalizează slab sunt mai puțin dezirabile pentru prepararea medicamentelor, comparativ cu substanțele care au un grad înalt de cristalizare. În plus, în general, este indezirabilă prepararea formulărilor farmaceutice cu conținut înalt de solvent organic (de 25 exemplu, acetat de etil) din cauza toxicității posibile a solventului pentru recipient și modificării eficienței remediei sub influența acestuia. Arxoxifenul, obținut printr-un procedeu cunoscut, poate fi utilizat ca preparat farmaceutic.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este obținerea unei forme noi cristaline de arxoxifen, 30 care nu ar conține solvent organic în rețeaua cristalină și care ar putea fi reprodusă și obținută eficient la scară comercială.

Prezenta invenție se referă la o formă nouă nestoichiometrică de hidrat cristalin de hidroclorură de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen (F-III) cu următoarele 35 vârfuri pe difractograma radiologică: $4,6 \pm 0,2$; $7,8 \pm 0,2$; $9,3 \pm 0,2$; $14,0 \pm 0,2$; $17,6 \pm 0,2$; $20,8 \pm 0,2$ și $24,3 \pm 0,2^\circ$ la 2θ , obținute la $25 \pm 2^\circ\text{C}$ și la o umiditate relativă (UR) de $35 \pm 10\%$ dintr-o sursă de iradiere de cupru.

În plus, prezenta invenție se referă la o compoziție farmaceutică cu conținut de F-III; unul sau mai mulți purtători farmaceutici, diluanți sau excipienți și opțional estrogen, opțional progesteron, opțional un inhibitor al aromatazei, opțional un analog al LHRH și opțional un inhibitor al acetilcolinesterazei (AChE). 40

Estrogenul din compoziția menționată reprezintă Premarin®. Compoziția, conform prezentei invenții, mai conține progesteron, care se selectează din grupa ce include noretinodrel și noretindron.

Inhibitorul AChE din compoziția menționată se selectează din grupa constituită din salicilat de fizostigmină, hidroclorură de tacrin și hidroclorură de donepezil.

Într-un alt aspect, prezenta invenție, adțional la unul sau mai mulți purtători, conține diluanți sau 45 excipienți farmaceutici, estrogen și progesteron.

Prezenta invenție se referă de asemenea la un procedeu de obținere a compusului menționat, care include cristalizarea hidroclorurii de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen din amestec de izopropanol și apă, raportul apei la izopropanol (volum/volum) 50 constituind 1 și 9 la 1, mai potrivit fiind raportul de 2,5 și 5,6 la 1, cel mai potrivit fiind 3 și 5,6 la 1.

În plus, prezenta invenție asigură utilizarea lui F-III pentru inhibarea stărilor patologice, cum sunt fibroza uterină, endometrioza, proliferarea celulelor musculare netede aortale, restenoza, cancerul mamar, cancerul uterin, cancerul de prostată, hiperplazia benignă a prostatei, osteoporoza, afecțiunile cardio-vasculare, hiperlipidemia, tulburările SNC și boala Alzheimer, precum și utilizarea F-III în 55 producerea medicamentelor pentru inhibarea unor astfel de afecțiuni.

Prezenta invenție se referă de asemenea la metode de utilizare a F-III pentru activarea colin-acetiltransferazei (ChAT).

MD 2335 F2 2003.12.31

4

Intr-un alt aspect al prezentei invenții, acțiunea de inhibare este profilaxia.

Invenția se explică prin desenele din fig. 1-5, care reprezintă:

- fig. 1, imaginea tipică a colorimetriei diferențiale cu scanare (DSC)/TGA pentru S-II;
- fig. 2, imaginea tipică (DSC)/TGA pentru F-I;
- 5 - fig. 3, imaginea tipică (DSC)/TGA pentru F-III;
- fig. 4, izotermele sorbtiei umidității pentru F-I și F-III;
- fig. 5, desolvatarea lui S-II ca funcție temporală și a temperaturii de uscare.

Masa de arzoxifen, obținută prin metoda cunoscută (exemplul 41, cristalizarea din amestec de etanol și acetat de etil, filtrarea și uscarea checului de filtrat în vid până la o greutate constantă la 10 temperatura camerei), a fost caracterizată prin metoda XRD, determinandu-se că este o substanță care se cristalizează slab. Prin metoda ^1H RNM s-a confirmat că masa de material conține 6% de acetil acetat.

Procedeul de cristalizare cunoscut a fost ulterior modificat, astfel că etanolul se adaugă într-o suspensie de arzoxifen brut în acetat de etil fierbând. După răcire și filtrare în vid, substanța solidă, 15 obținută prin acest procedeu modificat, reprezintă un solvat cu un grad înalt de cristalizare de arzoxifen în amestec acetat de etil/apă (numit în continuare S-II), care ulterior s-a identificat că fiind material de start pentru F-I (unei alte forme cristaline hidratate nestoichiometrice de arzoxifen).

F-I se poate obține prin eliminarea acetatului de etil din rețeaua cristalină prin uscarea /recoacerea în vid a S-II la temperaturi înalte. Timpul și temperatura, necesare pentru recoacerea lui S-II, pentru a 20 obține F-I, variază de la lot la lot, însă de obicei constituie circa 5 zile la o temperatură de circa 100°C. Temperaturile înalte sunt necesare pentru conversia S-II în F-I, deoarece la suspensionarea lui S-II în apă la temperatura ambiantă sau depozitarea eșantionului la 98% UR pentru 3 săptămâni nu se produce conversia în F-I. În plus, uscarea lui S-II în cuptorul de convecție la temperaturi înalte nu desolvatează nici un material, ceea ce sugerează că vidul este necesar de asemenea pentru a scoate 25 acetatul de etil din rețeaua lui S-II. Mai potrivită este obținerea rapidă a F-I prin cristalizarea arzoxifenului (sau a oricărei modificări polimorfe a lui/solvat) din tetrahidrofuran și izolarea lui la temperatura ambiantă.

Conform prezentei invenții, o formă deosebit de potrivită de arzoxifen este F-III. F-III se obține și se separă ușor la temperatura ambiantă. La obținerea lui F-III, pentru eliminarea nivelelor joase reziduale de solvent de cristalizare sunt necesare doar condițiile de uscare moderate. Aceste condiții 30 de uscare moderate, respectiv, conduc la obținerea unei substanțe solide cu o puritate înaltă (adică liberă de solvent organic) și un grad de cristalizare înalt, astfel utilizarea F-III elimină toxicitatea, cauzată de reziduurile de solvent organic, și prezența solventului organic în rețeaua cristalină. În plus, obținerea lui F-III s-a dovedit a fi simplă și eficientă, adică potrivită pentru producerea lui în masă.

F-III se obține și se separă ușor prin cristalizarea arzoxifenului (sau oricărei modificări polimorfe a acestuia/solvat) din amestec de alcool izopropilic (AIP) și apă la temperatura ambiantă. De obicei, arzoxifenul poate fi suspensionat în amestec de AIP și apă și încălzit pentru dizolvarea materialului 35 inițial de arzoxifen. După dizolvarea acestuia, soluția se lasă să se răcească la temperatura camerei, apoi până la o temperatură între 0 și 5°C (cu o baie de gheață sau prin congelare). După expirarea unei perioade de timp suficiente pentru cristalizare, cristalele se colectează prin filtrare și uscare în vid până la o greutate constantă, pentru a obține F-III cu un randament ce depășește 80%.

Materialul inițial de arzoxifen, potrivit pentru cristalizarea sus-menționată, include, nefiind exhaustiv, S-II, F-I, arzoxifenul obținut prin procedeul cunoscut [2] și oricare amestec al acestuia. Nu este important ce formă inițială de arzoxifen se utilizează, deoarece cristalizarea din AIP și apă, 45 conform procedurii descris în document, rezultă cu cristale de F-III. Rapoartele apei și AIP (volum : volum) de obicei sunt de 1:1...9:1. Mai potrivit este raportul de 2,5 și 5,6:1, cel mai potrivit fiind de 3 și 5,6:1. După colectarea cristalelor prin filtrare în vid, înainte de uscare în vid checul umed de F-III poate fi spălat cu apă deionizată rece. În plus, este potrivită o ușoară ridicare a temperaturii de uscare (circa 50°C pentru 12...24 ore). Pentru sinteza F-III la scară comercială poate fi utilă folosirea unui 50 agent de cristalizare a F-III.

În unul din procedeele potrivite, F-III se obține, se separă și se purifică concomitent cu eliminarea chimică a grupei de protecție 6-izopropilhidroxi din hidroclorură de 6-izopropoxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen (precursorul A). Reacția de deprotecție se controlează până la eliminarea completă a grupei de protecție izopropil, și în cazul în care se constată 55 finalizarea în esență a eliminării, continuarea reacției, de preferință, va include cristalizarea în condițiile care asigură formarea de F-III, examinat anterior și în continuare.

Procedeele de obținere a precursorului A și de eliminare a grupei izopropil sunt descrise în Brevetul US 5723474, referințele la care se fac în descriere.

MD 2335 F2 2003.12.31

5

Intr-un alt procedeu F-III se obține, se separă și se purifică concomitent cu reducerea chimică a S-oxidului și eliminarea chimică a grupei benzil de protecție din 6-hidroxil în 6-benziloxi-3-4- [2-(piperidin-1-il)etoxi]-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen-(S-oxid) (precursorul B). Reacțiile de reducere și deprotecție se controlează până la reducerea completă a sulfoxidului în sulfid și eliminarea completă a grupei benzilhidroxi. Imediat ce se constată finalizarea reducerii/eliminării, continuarea reacției, de preferință, va include cristalizarea în condițiile care asigură formarea de F-III, conform invenției. Procedeele de obținere a precursorului B, de eliminare a grupei benzil și reducere a 1-sulfoxidului până la sulfida respectivă de asemenea sunt cunoscute.

Indiferent de tehnologiile chimice, utilizate în stadiile de deprotecție și reducere, cristalizarea arzoxifenului din soluție de AIP/apă ulterior dă cristale de F-III cu un grad înalt de puritate.

Caracteristica și diferențierea S-II, F-I și F-III

Pentru caracteristica S-II, F-I și F-III se folosesc procedeele DSC/TGA și XRD. TGA deseori se utilizează pentru detectarea diferențelor între diferite forme de substanță solidă, deoarece temperatura (temperaturile) la care se produc modificările fizice în substanță, de obicei, reprezintă caracteristica polimorfului sau solvatului. DSC este un procedeu care se utilizează frecvent în screeningul compușilor pentru formarea modificării polimorfe și solvatului. XRD este o tehnică care detectează ordinea îndepărtată în substanța cristalină.

Arzoxifenul, obținut prin procedeele cunoscute, are o radiogramă cu un raport mic al semnalului către fon și linia de bază ascendentă, ceea ce indică o substanță ce se cristalizează slab. De aceea se compară F-I și F-II cu substanța (S-II), obținută prin procedeul modificat, examinat anterior, de cristalizare a arzoxifenului (adiția etanolului în suspensie de arzoxifen în acetat de etil fierbând).

Imaginile reprezentative ale DSC/TGA pentru S-II, F-I și F-III sunt prezentate în fig. 1, 2 și 3, respectiv. Imaginea DSC pentru S-II atestă o reacție endotermă intensă, inițiată la circa 62°C, care corespunde pierderii acetatului de etil și apei din rețea. Endotermia, inițiată la circa 152°C, reprezintă o topitură. Pierdere în TGA a masei de circa 2,5% se produce concomitent cu prima transformare, în timp ce 0,5% de pierdere a masei restante se produce nemijlocit până la începutul topirii, ceea ce sugerează că o oarecare cantitate de molecule de solvent se mențin în rețea mai rigid.

Imaginea DSC pentru F-I atestă o reacție endotermă intensă, inițiată la circa 75°C, urmată de a doua reacție endotermă, inițiată la 155°C, corespunzătoare topiturii. Imaginea în TGA pentru F-I indică o pierdere permanentă de 0,3% din masă cu o pierdere semnificativă ulterioară de 1,5%, ceea ce împreună reprezintă deshidratarea rețelei. Debutul primei DSC transformări și pierderea în TGA a masei respective, deviază nesemnificativ în urma diferențelor de viteze de încălzire. Pierdere inițială a masei reprezintă o hidratare cu reținerea redusă a apei, în timp ce pierdere secundă a masei corespunde la circa 0,5 mol de apă, prezente în rețea la o umiditate relativă foarte joasă (sub 5% - vezi datele sorbției umidității).

Imaginea DSC pentru F-III reprezintă o curbă a reacției endoterme intense la o temperatură joasă - la circa 30°C, cu o reacție endotermă secundă completă relativ slabă, inițiată la 70°C, și transformarea finală, inițiată la circa 146°C, corespunzătoare topiturii. Pierdere semnificativă a masei de 1,5% (circa 0,5 mol) în TGA, care coincide cu prima reacție endotermă, corespunde pierderii moleculelor de apă slab reținute, în timp ce pierdere suplimentară de circa 1,6% de masă la o temperatură ce depășește 60°C reprezintă o pierdere a moleculelor reținute mai rigid, adică moleculele prezente la o umiditate relativă foarte joasă. Pierdere masei, observată la temperaturi ce depășesc 170°C, corespunde descompunerii lui F-III.

Schemele XRD pentru F-I și F-III reprezintă vârfurile ascuțite și linia de bază plată, care indică substanțele cu grad de cristalizare înalt. Pozițiile unghiulare ale vârfurilor la 2θ și datele I/I₀ respective pentru eșantioanele de F-I, F-III și S-II sunt prezentate în tabelul 1. Cu toate că numeroase reflectări ale intensității, de obicei, se află în asemenea unghiuri ale difracției, fiecare din forme prezintă o radiogramă pulverulentă deosebită, indicând deosebiri distincte între S-II, F-I și F-III.

În domeniul cristalografiei este bine cunoscut, că pentru orice modificare polimorfă intensitățile relative ale vârfurilor de difracție se pot modifica în funcție de orientarea potrivită, determinată de un așa factor, cum este morfologia cristalelor. În cazul în care există o influență a orientării potrivite, intensitatea vârfurilor se modifică, însă pozițiile caracteristice ale vârfurilor modificării polimorfe nu se modifică (The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18, pages 1843-1844, 1995). Astfel, în baza intensității vârfurilor, precum și a poziției lor, F-III poate fi identificat după prezența

vârfurilor la 4,6±0,2; 7,8±0,2; 9,3±0,2; 14,0±0,2; 17,6±0,2; 20,8±0,2; și 24,3±0,2° la 2θ, când imaginile au fost obținute la 25±2°C și la o umiditate relativă de 35±10% dintr-o sursă de iradiere de cupru.

MD 2335 F2 2003.12.31

6

Tabelul 1

S-II		F-I		F-III	
$2\theta (^{\circ})$	$I/I_0 (\%)$	$2\theta (^{\circ})$	$I/I_0 (\%)$	$2\theta (^{\circ})$	$I/I_0 (\%)$
4,67	1,3	4,92	2,6	4,63	20,8
5,03	6	7,69	34,6	7,82	100
6,83	5,8	7,91	100	9,29	16,9
7,17	16,1	9,89	2,5	10,16	22,7
7,73	100	10,22	2	10,35	5,4
9,03	1,3	10,74	7,4	13,77	10,7
9,31	1,7	14,86	9,1	13,97	15,2
9,66	2,4	15,45	2,3	15,06	6,9
10,27	1,6	15,92	15,9	15,71	22,3
10,47	2,2	16,67	1,7	15,87	7,4
10,91	6,3	16,98	3,1	16,35	34,5
13,63	2,1	18,28	17,8	16,77	12,3
14,09	4,6	18,56	7	17,28	10
15,10	4,1	20,58	13,1	17,62	47,9
15,52	10,5	20,85	8,8	18,09	43,9
16,45	9,1	21,64	3,9	20,43	42
16,67	7,6	22,19	4,8	20,80	33,6
17,21	4,9	22,65	2,9	21,31	42,7
17,53	2,4	23,28	3,4	21,71	13
18,33	28,2	23,97	11,8	21,85	14,5
18,69	11,1	24,31	6,3	22,13	12,8
19,37	3,5	25,52	3,9	22,26	16,3
20,29	8,6	26,20	3,4	23,51	13,2
20,64	17,2	26,47	3,1	23,69	15,9
21,02	12,7	28,84	6,4	23,91	25,6
21,68	5,1	30,13	3,5	24,31	38,7
22,01	8,3	31,12	2,9	25,22	8
22,29	8			25,67	8,9
23,17	7,8			27,05	18,9
23,39	9,1			27,89	13,3
24,30	13,6			28,24	8,6
25,76	3,4			28,71	21,3
26,05	4			29,89	8,9
26,63	5,5			30,24	18,7
27,01	3,1			30,88	5,8
27,49	2,8			31,44	7,6
28,10	1,8			33,06	4,5
28,73	10,9			34,36	6
29,42	3,2				
30,00	3,7				
30,89	2,1				
31,34	2,4				
31,70	1,1				
32,81	1				
32,91	0,8				
33,48	2				

Caracteristica ulterioară a F-I și F-III

- 5 S-a studiat higroscopicitatea lui F-I și F-III. În fig. 4 sunt prezentate izotermele sorbției umidității pentru F-I și F-III. După expoziția inițială a eșantioanelor la o umiditate relativă de până la circa 5% UR se produce o creștere imediată a masei umede cu 1,5% și 1,7% pentru F-I și F-III, respectiv, echivalentă cu circa 0,5 mol de apă. Ambele forme manifestă o sorbție continuă a umidității în întreaga zonă a umidității, ceea ce este rezultatul încorporării moleculelor de apă în rețea.

MD 2335 F2 2003.12.31

7

Diferențele înregistrate în absorbția umidității de către aceste două forme, probabil, reflectă cantitatea de apă, care poate fi încorporată în două rețele (adică valoarea spațiului accesibil al rețelei, care poate încorpora moleculele de apă). Absența histerezisului în izotermele sorbție-desorbție pentru F-I și F-III indică faptul că formele cristaline se echilibrează rapid la orice umiditate.

5 Profilurile sorbției umidității pentru F-I și F-III atestă că aceste forme, în esență, reprezintă hidrați nestoichiometrici. La umiditatea relativă a mediului ambiant (de circa 50% UR) F-I conține circa 1,7% de apă sau 0,5% mol de apă, respectiv, în timp ce F-III absoarbe circa 0,3% de apă, ceea ce corespunde la circa 0,85 mol de apă. Masa principală de forme F-I și F-III se echilibrează rapid cu atmosfera, astfel că conținutul de apă, determinat prin metode analitice, este o reflectare a umidității
10 relative în timpul colectării datelor. Conform datelor DSC, deosebirile depistate de la un lot la altul, probabil, sunt determinate de eșantioanele hidratate în grade diferite, din cauza păstrării lor în diferite condiții ale mediului ambiant.

Au fost obținute radiogramele eșantioanelor de F-I și F-III, care s-au păstrat la umiditate relativă diferită (0, 22, 50 și 80%). În cazul în care crește umiditatea relativă, se produce o deviere treptată a
15 vârfulor inițiale (0% UR) pentru F-III la circa 13,8; 17,6; 18,0; 20,5 și 24,0° cu 2θ , precum și o deviere nesemnificativă a vârfulor mai puțin intense. Aceste modificări înregistrate în radiogramele pentru F-III atestă că în cazul în care crește umiditatea relativă se modifică dimensiunile celulei elementare, probabil, pentru a încorpora moleculele de apă care se rețin slab. Devierea permanentă a vârfulor în funcție de umiditate corelează cu datele sorbției umidității, despre ce atestă majorarea
20 lentă a masei în limitele acestei zone a UR, demonstrând variabilitatea formării hidratului.

Un experiment similar s-a realizat cu F-I, pentru a stabili influența modificării umidității relative (0; 25; 52; 73 și 95% UR) asupra rețelei lui. În cazul în care crește umiditatea relativă se înregistrează doar o deviere nesemnificativă a vârfulor UR de 0% cu circa 7,7; 18,3; 18,5; 20,5; 20,8° la 2θ . De asemenea s-a constatat că la o umiditate relativă mai înaltă, în special la UR de 73 și 95%, vârfulurile la
25 circa 7,7; 20,8 și 24,1 devin ceva mai late și mai puțin diferențiate, indicând că apa se dovedește a fi absorbită în componentele amorfe (sau plastifică substanța solidă). Devierile vârfulor pe radiogramele pentru F-I sunt mai puțin dramatice, comparativ cu devierea vârfulor în cazul expunerii F-III la umidități relative diferite. Aceasta sugerează că rețeaua F-I nu se supune expansiunii și/sau contracției, ca rețeaua F-III.

30 S-a constatat că în pofida abilității F-III de a absorbi de două ori mai multă apă, F-I și F-III sunt stabile în limitele întregii zone de umiditate relativă. S-a stabilit că ambele forme au dimensiuni ale cristalelor, morfologie, solubilitate în apă și viteze de dizolvare comparabile.

Pentru a urmări desolvatarea pentru S-II, ca funcție temporală și a temperaturii de uscare, s-a realizat un studiu cu uscare (fig. 5). În cadrul experimentului cu desolvatare s-au obținut radiogramele
35 pentru diferite puncte temporale. Majoritatea vârfulor difracției, obținute în studiul desolvării S-II, s-au dovedit a fi cu unghiuri similare celor pentru F-I, confirmând că rețelele S-II și F-I sunt foarte asemănătoare. Dispariția vârfulor difracției la circa 6,8; 7,2 și 14,0° la 2θ numai după o uscare minimă sugerează că aceste reflectări se pot referi la secțiunile cristalografice care conțin densitatea parțială a electronilor moleculelor de acetat de etil.

40 Răscoacerea îndelungată în vid a substanței solvate la temperaturi înalte rezultă cu F-I. Ultimul, obținut în așa mod, manifestă pe radiograme un grad înalt de cristalizare. De aceea substanța, obținută prin cristalizare din soluție de etanol și acetat de etil cu uscare ulterioară în vid timp de câteva ore, conform procedurii cunoscut [2], manifestă o cristalizare foarte redusă, deoarece într-un astfel de
45 procedeu se obține S-II parțial desolvatat.

F-I și F-III au unele avantaje, comparativ cu forma de arzoxifen examinată anterior din stadiul anterior. Comparativ cu arzoxifenul, obținut prin procedeele cunoscute [2], F-I și F-III sunt mai stabile la temperatura mediului ambiant și de aceea sunt mai ușor manevrate în cadrul tratării
50 farmaceutice, adică la crearea unor compoziții dozate. În plus, F-I și F-III sunt cu mult mai cristaline, comparativ cu forma obținută în procedeul cunoscut [2]. Substanțele cristaline, de obicei, sunt mai puțin higroscopice și mai stabile (adică sunt abile pentru o descompunere chimică, își mențin consistența), comparativ cu substanțele amorfe și de aceea sunt mai dezirabile pentru formularea compozițiilor. În plus, spre deosebire de forma arzoxifenului, obținut prin procedeele cunoscute [2], care conține în rețeaua sa acetat de etil și apă, F-I și F-III conțin numai apă.

Metode de investigație

55 Măsurările DSC s-au efectuat cu dispozitivele 2920 TA, modulate de DSC, atașate la analizatorul termic 3100 și asigurate cu un sistem de răcire. Eșantioanele (3-5 mg) se încălzeau în rezervoare de aluminiu contorte de la 10 la 240°C, viteza de încălzire de 2°C/min.

MD 2335 F2 2003.12.31

8

Analizele TGA s-au realizat cu dispozitivul TA 2050, cu un analizator termogravimetric, atașat la analizatorul termic 3100. Eșantioanele (5-10 mg) se încălzeau în rezervoare deschise de la 25°C la 250°C, viteza de încălzire de 5°C/min.

Radiogramele s-au obținut cu difractometrul pulverulent radiologic Siemens D5000, asigurat cu sursa CuK α ($\lambda=1,54056$ Å) și detectorul Kervex al stării solide, care funcționează la 50 kV și 40 mA. Fiecare eșantion se scana între 4° și 35° în 2 θ . Eșantioanele se lasau pentru echilibrare cel puțin pentru 30 minute la temperatura și/sau umiditatea relativă necesară până la colectarea datelor.

Pentru F-I și F-III măsurările higroscopicității s-au realizat prin metoda VTI în modul ce urmează. Fiecare eșantion s-a uscat în vid la 60°C până nu s-a mai înregistrat pierderea ulterioară a masei, timp în care în camera de experiențe s-a instalat umiditatea relativă de 0%. Izotermele sorbtiei umidității s-au înregistrat la 25°C utilizând balanța cu pârghie cu vid VTI cu scară gradată în procente de umiditate, în următoarele condiții: mărimea eșantionului 10-15 mg; diapazonul adsorbției/desorbției 0-95% umiditate relativă; pasul intervalului – 5%; intervalul de timp între colectarea eșantioanelor 10 minute.

Exemplele ce urmează ilustrează procedeele de obținere a hidratului, conform prezentei invenții. Aceste exemple nu restrâng volumul protecției acestor procedee și nu trebuie astfel interpretate.

EXEMPLE

Exemplul 1

F-III din hidroclorură de 6-izopropoxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen

La soluția de hidroclorură de 6-izopropoxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen (10 g; 18 mmol) în clorură de metilen (100 ml) într-o atmosferă de azot de la -10°C la -20°C se adaugă BCl₃ (g) (4,23 g; 34 mmol) cu o viteză care menține temperatura reacției sub -10°C. După terminarea adității amestecul de reacție se lasă încă 2 ore pentru fuzionare. La amestecul de reacție se adaugă lent alcoolul izopropilic (AIP, 12,35 ml; 167 mmol) la o temperatură sub -10°C, agitarea se continuă 30 minute. Un balon aparte se umple cu 100 ml de apă și se răcește pe o baie cu gheață până la circa 0°C. Soluția de produs se transferă în apă cu o canulă, agitand-o energic. Șlamul alb obținut se lasă pentru agitare la 0°C pentru 1 oră. Produsul se separă prin filtrare și se spală cu 25 ml de 40% CH₂Cl₂/apă, apoi cu 25 ml de apă rece. Produsul se suspensionează în 60 ml de AIP și 60 ml apă și se încălzește până la 60°C. Soluția se obține la 48°C. Adicional se mai adaugă apă (120 ml). Soluția se lasă pentru răcire până la 35°C și apoi suspensia se răcește lent până la 0...5°C și se agită câteva ore. Produsul se separă prin filtrare și se spală cu apă deionizată rece (25 ml). Checul umed de F-III se usucă până la o masă constantă în vid la 50°C timp de 12...24 ore, pentru a obține F-III.

Exemplul 2

F-III din 6-benziloxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen-(S-oxid)

Intr-un balon Parra de 250 ml se toarnă apă deionizată (5,25 ml), 1M HCl (7,74 ml; 7,75 mmol), 10% Pd/C (tip A32110, 1,37 g; 1,29 mmol Pd, 6-benziloxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen-(S-oxid) (3 g; 5,16 mmol) și alcool izopropilic (32 ml) la temperatura ambiantă. Balonul se conectează cu vibratorul Parra, de două ori consecutiv se evacuează gazul și se umple cu azot și apoi iarăși se evacuează gazul și se umple cu hidrogen gazos până la o presiune de 30 psi pe țol pătrat (1 țol=6,89476 kPa). Se startează vibratorul și amestecul de reacție se încălzește până la 60°C. Finalizarea reacției se determină prin analiza CLRÎ peste circa 4 ore. Amestecul se filtrează printr-o garnitură fină de diatomit și garnitura se spală cu 0,1 M HCl (2x10 ml). Solventul se elimină în vid la circa 50°C. Reziduul obținut se dizolvă în amestec de 50% alcool izopropilic/apă deionizată (30 ml) și se încălzește precaut pe o baie cu vapori până la obținerea unei soluții. La soluție se adaugă apă deionizată (22 ml) și soluția se lasă să se răcească la temperatura ambiantă. Suspensia de produs se răcește în continuare până la 0°C. Produsul se izolează prin filtrare, se spală cu apă deionizată (2x15 ml) și se usucă în vid la 50°C până la o masă constantă, pentru a obține F-III.

Exemplul 3

F-III din 6-izopropoxi-3-[4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi]-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen-(S-oxid)

Clorura de metilen (105 l) și 6-izopropoxi-3-[4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi]-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen-(S-oxid) (10,5 kg) se fuzionează și se răcește de la -15°C la -20°C. Triclorura de bor (4,6 kg) se adaugă pentru menținerea temperaturii reacției între -10°C și -20°C.

MD 2335 F2 2003.12.31

9

Agitarea se continuă până când suprafața vârfului materialului inițial în CLRÎ nu constituie mai puțin de 1%. Sistemul CLRÎ (4,6 mm diametrul intern x 25 cm coloana Zorbax SB-Phenil, 30°C, 70:30 metanol:0,01 N acid sulfuric, viteza fluxului 1,5 ml/min; detectorul 300 nm). Pentru menținerea temperaturii reacției între -10°C și -20°C se adaugă izopropanol (10,28 kg). Amestecul de reacție se agită timp de 30-45 minute. Produsul crud al reacției se separă din reacție prin adăugarea a 105 l adiționali de apă, răcită în prealabil de la 2 la 7°C pentru menținerea temperaturii reacției de la 2 la 7°C. După adăugarea urmează spălarea cu clorură de metilen (20 l), răcită în prealabil de la 7 la 2°C. Șlamul cristalin se agită pentru 2...3 ore, se filtrează și se spală succesiv cu clorură de metilen (26 kg) și apă (53 l), răcite în prealabil de la 7 la 2°C. Checul de filtrat umed brut se amestecă cu apă (42 l) și izopropanol (40 l), se încălzește de la 65°C la 70°C pentru dizolvare. Soluția fierbinte se filtrează. Filtrarea se realizează cu spălare cu un amestec de izopropanol (20 l) și apă (21 l), încălzite până la 65-70°C și spălare cu apă (126 l), încălzită în prealabil până la 65-70°C. Soluția se răcește până la 40-45°C, se introduce un agent de cristalizare și se agită la această temperatură 2-3 ore pentru formarea cristalelor. Șlamul se răcește până la 0-5°C, se agită 3-4 ore și se filtrează. Checul de filtrat se spală cu apă (122,6 l), răcită în prealabil până la 2-7°C. Produsul se usucă în vid la o temperatură maximă de 50°C până când modificarea masei checului nu constituie mai puțin de 0,05 kg timp de 2-4 ore. Randamentul: 8,468 kg (87,3%). Eficiența CLRÎ: 98,5%. Apa conform metodei lui Carl Fischer: 3,0%. Total de substanțe în CLRÎ: 1,79%.

Exemplul 4

20 F-III din 6-benziloxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen-(S-oxid)

Tetrahidrofuranul (261 ml), apa (45 ml), acidul sulfuric concentrat (6,14 g) și 6-benziloxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen-(S-oxid) (eficiența CLRÎ 99%, nivelul total de substanțe în CLRÎ 0,35%) se combină și se agită până la omogenitate. Se adaugă 10% Pd/C (5,6 g se suspensează în 22 ml de apă) cu 5 ml de apă pentru spălături. Suspensia obținută se evacuează și se lasă sub hidrogen la 60 psi. Temperatura reacției se menține la 30°C. Peste 2 ore se adaugă 10% Pd/C (5,6 g) cu apă (30 ml). Hidrogenizarea la 60 psi și la 30°C se continuă 22 ore adiționale. Se mai adaugă 4,40 g de 10% Pd/C în 30 ml de apă, iar hidrogenizarea se continuă la 60 psi și la 30°C timp de 2,5 ore adiționale. Catalizatorul se elimină prin filtrare și pH-ul filtratului se menține la 7,24 cu 50% hidroxid de sodiu. Se adaugă clorura de sodiu (8,66 g), dizolvată în apă (18 ml), și soluția bifazică se agită 30 minute, fazele se separă și faza apoasă se extrage din nou cu 50 ml de tetrahidrofuran. Fazele organice se combină și se concentrează până la volumul de 50 ml prin distilare la presiune atmosferică. La concentrat la 24°C se adaugă 180 ml de metanol timp de 1 oră. Șlamul cristalin obținut se agită 30 minute la 24°C, se răcește până la 0°C și se agită 1 oră. Substanțele solide se separă prin filtrare și se spală succesiv cu 39 ml de apă și 39 ml de metanol cu uscare ulterioară în vid peste noapte la 50°C. Randamentul: 15,52 g (67,8%).

Se combină izopropanolul (33 ml), apa (66 ml) și 10 g de substanță solidă izolată anterior. La amestecul agitat la 25°C se adaugă 1,8 M HCl (21 ml). Substanțele se dizolvă rapid cu reprecipitarea ulterioară a sării de hidroclorură. După agitare timp de 30 minute, șlamul se încălzește la 70°C pentru dizolvarea substanțelor solide. Soluția se răcește până la 60°C și se adaugă 33 ml de apă. Soluția obținută se răcește până la 25°C timp de 3 ore, perioadă în care se precipită sarea de hidroclorură. Șlamul se agită circa 3 ore la 25°C, se spală cu apă (30 ml) și se usucă în vid peste noapte la 50°C, randamentul pentru F-III constituie 8,9 g (82,7%). Eficiența CLRÎ: 96,5%. Apa conform metodei lui Karl Fischer: 2,44%. Substanțe în CLRÎ: 1,09%.

45 Terminologia utilizată

Termenul utilizat "cantitate eficientă" definește o cantitate de F-III, care este capabilă să inhibe afecțiunea sau efectele ei nocive, descrise în prezenta invenție. În cazul în care F-III se administrează asociat cu estrogen, progestină, inhibitorii aromatazei, analogul LHRH sau inhibitorul AChE, termenul "cantitate eficientă" de asemenea definește o cantitate de acest agent capabilă să realizeze efectul dezirabil.

Termenii "inhibitor" sau "inhibă" definesc semnificațiile lor uzuale, adică care previne, împiedică, restrânge, jugulează, ameliorează, diminuează intensitatea de manifestare a simptomelor, stopează sau face reversibilă progresarea sau severitatea stării patologice sau a complicațiilor ei, descrise în prezenta invenție.

Termenii utilizați "care previne", "prevenție", "profilaxie", "profilactic" și "a preveni" sunt interschimbabili și presupun reducerea probabilității, că la recipientul lui F-III vor persista incurabile sau se vor manifesta oricare stări patologice sau complicațiile lor, descrise în prezenta invenție.

Termenii "estrogen-deficitar" și "deficiență de estrogen" se referă la starea fie naturală, fie indusă clinic, în cazul în care femeia nu poate produce o cantitate suficientă de hormoni estrogeni endogeni pentru menținerea funcțiilor estrogen-dependente, de exemplu, menses, homeostazia masei osoase,

MD 2335 F2 2003.12.31

10

funcției neuronale, stării sistemului cardio-vascular etc. Astfel de stări estrogen-deficitare se instalează în menopauză și în urma ovariectomiei chirurgicale și chimice, incluzând echivalentul ei funcțional, de exemplu, în urma tratamentului medicamentos cu inhibitorul aromatazei, agoniștii sau antagoniștii GnRH, ICI 182780 etc. Afecțiunile, asociate cu depleția estrogenului, includ, nefiind

5 exhaustive, osteoporoza, afecțiunea cardiovasculară și hiperlipidemia.
Termenul utilizat “estrogen” include compușii steroizi, caracterizați prin activitate estrogenică, cum ar fi 17β -estradiol, estron, estrogen conjugat (Premarin[®]), estrogen de cal, 17β -etinil estradiol etc. Compuși potriviți în bază de estrogen sunt Premarin[®] și noretinodrel.

10 Termenul utilizat “progestină” include compușii cu activitate similară progestinei, cum ar fi progesteron, noretinodrel, nongestrel, megestrol acetat, noretindron, etc. Agentul potrivit în bază de progesteron este noretindron.

Termenul utilizat “inhibitorul aromatazei” include compușii care sunt abili să inhibe aromataza, de exemplu, așa inhibitori comercial accesibili, cum ar fi aminoglutemida (CYTANDREN[®]), anastrozol (ARIMIDEX[®]), letrozol (FEMARA[®]), formestan (LENATRON[®]), exemestan

15 (AROMASIN[®]), etc.
Termenul utilizat în descrierea prezentei invenții “analogi ai LHRH” se referă la analogii hormonului care eliberează hormonul luteinizant, care inhibă producerea estrogenelor la femeile aflate în premenopauză și includ, de exemplu, goserlin (ZOLADEX[®]), leuprolid (LUPRON[®]) etc.

20 Termenul utilizat “inhibitorul AChE” include compușii care inhibă acetilcolinesteraza, de exemplu, salicilat de fizostigmină, hidroclorură de tacrin, hidroclorură de donepezil, etc.

Termenul “activează ChAT” definește amplificarea activității enzimice a ChAT, adică accelerarea conversiei colinei până la acetilcolină. Această activare trebuie să includă amplificarea eficienței și/sau vitezei reacției ChAT și colinei și/sau creșterea cantității de ChAT, prezente în zona de acțiune. Această majorare a cantității de enzimă prezentă poate fi determinată de reglarea genică sau de un alt stadiu al sintezei în formarea enzimei și/sau reducerea inactivării și metabolismului enzimei.

Metodele selectate de testare

Metoda generală de pregătire a șobolanilor: Femelele de șobolani Sprague Dawley (masa corporală 200...255 g) în vârstă de șaptezece și cinci de zile (în cazul în care nu sunt alte specificații) au fost furnizate de laboratorul Charles River (Portage, MI). Animalele au fost supuse ovariectomiei bilaterale (OVX) ori s-au efectuat intervenții chirurgicale după Sham în laboratorul Charles River, fiind transportate peste o săptămână. La sosire ele erau amplasate în cuști metalice transportabile în grupuri de câte 3 sau 4 animale într-o cușcă, având acces *ad libitum* la mâncare (conținutul de calciu de circa 0,5%) și la apă timp de o săptămână. Temperatura încăperii s-a menținut la nivelul de $22,2 \pm 1,7^\circ\text{C}$, umiditatea relativă minimă de 40%. Regimul de lumină în încăpere constituia 12 ore lumină și

35 12 ore întuneric.

Regimul de dozare și colectare a țesutului: După o săptămână de aclimatizare (adică două săptămâni după OVX) s-a inițiat administrarea F-III. 17α -etinil estradiol sau F-III se administrează *per os* (în cazul în care nu sunt alte specificații), în formă de suspensie în 1% carboximetilceluloză sau dizolvate în 20% ciclodextrină. Animalele primeau dozele de preparat zilnic timp de 4 zile. După seria de administrare a medicamentului, animalele erau cântărite și se aplica anestezia cu amestec de ketamină:xilazin (2:1, volum/volum) și eșantioanele de sânge se colectau prin punctura cardiacă. Apoi animalele se sacrificau prin asfixie cu CO_2 , uterul se extirpa prin incizia mediană, se determina masa umedă a lui. 17α -etinil estradiolul a fost furnizat de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

Afecțiunea cardiovasculară/hiperlipidemia

45 Eșantioanele de sânge, colectate de la animalele menționate anterior, se lăsau pentru coagulare la temperatura camerei pentru 2 ore și se obțineau serul prin centrifugare cu 3000 rotații pe minut timp de 10 minute. Colesterolul serului s-a determinat prin testul cu eficiență înaltă Boehringer Mannheim Diagnostics. Succint, colesterolul s-a oxidat până la colest-4-en-3-onă și peroxid de hidrogen. Apoi, peroxidul de hidrogen s-a interacționat cu fenol și 4-aminofenazon în prezența peroxidazei cu formare de colorant p-chinonă, care s-a determinat spectrofotometric la 500 nm. Concentrația de colesterol s-a calculat conform curbei standard. Toate investigațiile au fost automatizate, s-au realizat cu Biomek Automated Workstation.

Studiul peroxidazei eozinofilelor uterine

55 Uterele de la animalele menționate anterior s-au depozitat la 4°C până în momentul studierii enzimei. Uterele s-au omogenizat în 50 mM de tris-tampon (pH 8,0) cu conținut de 0,005% triton X-100. După adăugarea în tris-tampon a 0,01% peroxid de hidrogen și 10 mM de O-fenilendiamină (concentrațiile finale), timp de 1 minut s-a urmărit creșterea absorbției la 450 nm. Prezența

MD 2335 F2 2003.12.31

11

eozinofilelor în uter este un indicator al activității estrogenice a compusului. S-a determinat viteza maximă în intervale de 15 secunde în limitele segmentului inițial liniar al curbei reacției.

Metoda de testare a inhibării osteoporozei

5 După realizarea pregătirii generale, descrise mai sus, șobolanii erau tratați zilnic timp de treizeci și cinci de zile (6 șobolani în grupul de tratare), în ziua a 36 fiind sacrificați prin asfixie cu bioxid de carbon. Perioada de treizeci și cinci de zile era suficientă pentru obținerea unui grad maxim de osteoporoză, care se determină conform prezentei invenții. În timpul sacrificării s-a extirpat uterul, s-au disecat țesuturile din exterior și conținutul lichid se elimina înainte de a determina masa umedă, pentru confirmarea deficienței de estrogenice, asociate cu ovariectomia completă. De obicei, ca răspuns la ovariectomie masa uterului se reducea cu circa 75%. Apoi, pentru examenul histologic ulterior, uterul s-a plasat în 10% formalină tampon neutru.

10 S-a efectuat excizia oaselor femurale drepte și s-a obținut radiograma numerică a metafizei periferice, care s-a analizat cu un program de analiză a imaginii (NIH). Părțile proximale ale oaselor tibiei ale acestor animale de asemenea au fost scanate prin tomografia computerizată cantitativă. Conform metodelor examinate mai sus, animalele administrău *per os* F-III sau etinilestradiol (EE_2) în 20% hidroxipropil β -ciclodextrină. F-III s-a utilizat de asemenea în asociere cu estrogen sau progestină.

Studierea proliferării MCF-7

20 Celulele MCF-7 de adenocarcinom mamar (ATCCHTB 22) s-au întreținut în mediul MEM (mediu esențial minimal, fără roșu de fenol, Sigma, St. Louis, MO) suplimentat cu 10% ser bovin fetal (FBS) (volum/volum), L-glutamină (2 mM), piruvat de sodiu (1 mM), HEPES {(N-[2-hidroxietyl]piperazin-N'-[2-acid etansulfonic] 10 mM}, aminoacizi neesențiali și insulină de bovină (1 μ g/ml) (mediu de întreținere). Cu zece zile până la testare, celulele MCF-7 s-au transferat în mediul de întreținere, suplimentat cu 10% cărbune de lemn acoperit cu dextrină, care cuprindea ser fetal de bovină ((DCC-FBS) mediul de testare) care a substituit 10% FBS, pentru a epuiza acumulările interne de steroizi. Celulele MCF-7 s-au izolat din cutiile cu mediu de întreținere, utilizând mediul celular de disociere (Ca^{++}/Mg^{++} fără HBSS (fără roșu de fenol) suplimentat cu 10 mM HEPES și 2 mM EDTA). Celulele s-au spălat repetat cu mediu analitic și numărul lor s-a adus până la 80000 celule/ml. Circa 100 ml (8000 celule) s-au introdus în alveolele cu fundul plat pentru microcultură (Costar 3596) și s-au incubat la 37°C în 5% CO_2 într-un incubator umidificat pentru 48 ore, pentru a asigura aderența și echilibrul celulelor după transfer. Seriele de diluții ale medicamentelor și DMSO, în calitate de control, s-au preparat în mediu analitic și 50 ml s-au transferat în microculturile triplicate, cu adăția ulterioară a 50 ml de mediu de testare până la un volum final de 200 ml. După 48 ore adăionale la 37°C în 5% CO_2 -incubator, microculturile s-au marcat cu impulsuri de timidină tratată cu tritiu (1 μ Ki/alveolă) timp de 4 ore. Cultivarea s-a finalizat cu congelare la -70°C pentru 24 ore cu dezghețare ulterioară și colectarea microculturilor, utilizând colectorul de celule semiautomat Skatron. Cuantificarea eșantioanelor s-a efectuat cu scintilatorul cu lichid, utilizând contorul β Wallac BetaPlace.

Inhibarea tumorii mamare DMBA-induse

40 Tumorile mamare estrogen-dependente s-au produs la femelele de șobolani Sprague-Dawley, comercializate de Harlan Industries, Indianapolis, Indiana. Șobolanilor în vârstă de circa 55 zile s-a administrat în asociere cu o singură hrănire oral 20 mg de 7,12-dimetilbenzo[α]antracenă (DMBA). Aproximativ peste 6 săptămâni după administrarea DMBA s-a inițiat palparea glandelor mamare la intervale de o săptămână în scopul depistării tumorilor. Din moment ce apărea una sau mai multe tumori, metric cu un șubler s-a măsurat diametrul maxim și minim al fiecărei tumori, măsurările s-au înregistrat și așa animale erau selectate pentru experimente. S-a încercat de a repartiza uniform tumorile de diferite dimensiuni între grupurile tratate și cele de control astfel, ca tumorile de dimensiuni medii să fie repartizate între grupurile de studiu. Grupurile de control și experimentale pentru fiecare experiment conțineau de la 5 la 9 animale.

50 F-III s-a administrat sau în injecții intraperitoneale în 2% de gumă arabică, sau oral. Compușii administrați oral sau se dizolvau, sau erau suspensionați în 0,2 ml de ulei de porumb. Fiecare administrare, inclusiv cele de control de gumă arabică și ulei de porumb, s-a realizat o dată zilnic fiecărui animal experimental. După măsurarea inițială a tumorii și selectarea animalelor experimentale, tumoarea s-a măsurat săptămânal prin metoda menționată anterior. Tratarea și măsurările au continuat în decurs de 3...5 săptămâni, timp în care se determinau dimensiunile finale ale tumorii. Pentru fiecare tratament, cu compuși și de control, s-au înregistrat modificările dimensiunii medii a tumorii.

MD 2335 F2 2003.12.31

12

Metode de testare a fibrozei uterine

Testul 1: La femeile, în număr de 3...20, cu fibroză uterină s-a administrat F-III. Cantitatea de compus a constituit de la 0,1 la 1000 mg/zi, iar perioada de administrare - 3 luni. Pentru elucidarea
5 efectului compusului în fibroza uterină, femeile s-au aflat sub observație în perioada administrării compusului și până la 3 luni după sistarea tratamentului.

Testul 2: S-a utilizat metoda din testul 1, cu excepția că perioada de administrare a compusului a constituit 6 luni.

Testul 3: S-a utilizat metoda din testul 1, cu excepția că perioada de administrare a compusului a
10 constituit 1 an.

Testul 4: Pentru inducerea leiomiomului la femelele sexual mature de cobai s-a folosit stimularea
prolongată cu estrogeni. Estradiolul s-a administrat la animale în injecții de 3-5 ori pe săptămână timp
de 2-4 luni sau până au apărut tumorile. Tratamentul, constând din F-III sau purtător, s-a administrat
zilnic timp de 3-16 săptămâni, iar apoi animalele erau sacrificate, se preleva uterul și se studia
15 regresivitatea tumorii.

Testul 5: Țesutul de leiomiom uman s-a implantat în cavitatea peritoneală și/sau în miometrul
uterin al femelei sexual mature castrate de șoareci fără timus. Estrogenul exogen s-a administrat
pentru a induce creșterea țesutului explantului. În unele cazuri celulele tumorale colectate s-au
cultivat *in vitro* până la implantare. Tratamentul, constând din F-III sau purtător, s-a furnizat prin
20 spălături gastrice zilnic timp de 3-16 săptămâni, apoi implanturile s-au eliminat și s-a apreciat
creșterea sau regresivitatea. În timpul sacrificării uterul s-a prelevat pentru a evalua starea organului.

Testul 6: S-a prelevat țesut din tumorile fibroase uterine umane, care s-a menținut *in vitro* în
calitate de culturi primare netransformate. Preparatele chirurgicale s-au trecut printr-o celulă sau un
ciur steril sau, în mod alternativ, cu un ac s-a prelevat țesut din regiunile adiacente, pentru a obține o
25 suspensie celulară omogenă. Celulele s-au menținut în mediu cu conținut de 10% ser și antibiotic. S-a
determinat viteza creșterii în prezența estrogenului și fără el. S-a studiat abilitatea celulelor de a
produce componentul C-3 al complementului și răspunsul lor la factorii de creștere și hormoni de
creștere. *In vitro* s-a estimat răspunsul proliferativ al culturilor la tratamentul cu progestine, GnRH, F-
III și purtători. Săptămânal s-au determinat nivelele receptorilor hormonilor steroizi, pentru a
30 determina dacă se mențin *in vitro* caracteristicile importante ale celulelor. S-a utilizat țesutul de la 5-
25 pacienți.

Testul 7: S-a determinat abilitatea F-III de a inhiba proliferarea, stimulată de estrogen, a liniei
celulare ELT, obținută din leiomiom printr-o metodă descrisă de Fuchs-Young ș. a. "Inhibition of
Estrogen-Stimulated Growth of Uterine Leiomyomas by Selective Estrogen Receptor Modulators"
35 Mol. Car., 17(3):151-159 (1996) [5], recomandările cărui sunt încorporate în descriere prin referințe.

Metoda de testare a endometriozei

Testul 1: În calitate de animale experimentale s-au folosit 12...30 femele mature de șobolani, linia
CD. Șobolanii au fost repartizați în trei grupuri egale. La toate animalele se afla sub control ciclul
estral. În ziua proestrului femelele erau operate. La femelele din fiecare grup s-a extirpat cornul uterin
40 stâng, cornul s-a secționat în bucăți pătrate nu prea mari, aceste pătrate fiind aleatoriu suturate în
diferite sectoare adiacente fluxului sangvin mezenteric. În plus, la femelele din grupul 2 s-au extirpat
ovarele. Din ziua următoare după operație femelele din grupul 1 și 2 s-a administrat intraperitoneal
apă timp de 14 zile, animalelor din lotul 3 – intraperitoneal 1,0 mg de F-III la kg de masă corporală
aceeași perioadă de timp. Peste 14 zile de tratament fiecare femelă a fost sacrificată, s-au extirpat
45 explanturile endometriale, suprarenalele, partea restantă a uterului și ovarelor, cea ce era posibil, s-au
pregătit pentru examenul histologic, ovarele și suprarenalele s-au cântărit.

Testul 2: În calitate de animale experimentale s-au folosit 12...30 femele mature de șobolani linia
CD. Șobolanii au fost repartizați în două grupuri identice. Ciclul estral la toate animalele era sub
control. În ziua proestrului fiecare femelă era operată. La femelele din fiecare grup s-a extirpat cornul
50 uterin stâng, care s-a secționat în bucăți pătrate nu prea mari, aceste pătrate fiind aleatoriu suturate în
diferite sectoare adiacente fluxului sangvin mezenteric. Peste circa 50 zile după operație animalelor
din grupul 1 s-a administrat intraperitoneal apă timp de 21 zile, animalelor din lotul 2 – intraperito-
neal 1,0 mg de F-III la kg de masă corporală aceeași perioadă de timp. Peste 21 zile de tratament
fiecare femelă a fost sacrificată, iar explanturile endometriale și suprarenalele s-au extirpat și cântărit.
55 Explanturile s-au apreciat ca indicator al creșterii. Ciclurile estrale erau sub control.

Testul 3: Pentru inducerea endometriozei la șobolani și/sau iepuri s-au folosit autogrefe de țesut
endometrial. Animalele - femele la maturitate reproductivă erau supuse ovariectomiei bilaterale, iar
estrogenul se compensa exogen, asigurând astfel un anumit și constant nivel de hormon. La 5-150
animale țesutul endometrial autolog s-a implantat în peritoneu și s-au asigurat cu estrogen, pentru a
60 induce creșterea țesutului explantat. Tratamentul cu compusul conform prezentei invenții s-a realizat
prin spălături gastrice zilnic timp de 3-16 săptămâni, implanturile s-au eliminat și s-a apreciat

MD 2335 F2 2003.12.31

13

creșterea sau regresia. În cadrul sacrificării s-a prelevat cornul uterin intact, pentru aprecierea stării endometrialului.

5 Testul 4: Țesutul din sectoarele patologice ale endometrialului uman s-au implantat în peritoneul femelelor sexual mature castrate de șoareci fără timus. Ele erau asigurate cu estrogen exogen, pentru a produce creșterea țesutului explant. În unele cazuri celulele endometrialului prelevate s-au cultivat. Tratamentul cu F-III s-a realizat prin spălături gastrice zilnic timp de 3-16 săptămâni, implanturile s-au eliminat și s-a apreciat creșterea sau regresia. În cadrul sacrificării s-a extirpat uterul, pentru aprecierea stării endometrialului intact.

10 Testul 5: Țesutul din sectoarele deteriorate ale endometrialului uman s-a colectat și s-a menținut *in vitro* în calitate de culturi netransformate. Preparatele chirurgicale s-au trecut printr-o celulă sau un ciur steril sau, în mod alternativ, cu un ac s-a prelevat țesut din regiunile adiacente, pentru a obține o suspensie din celule de același tip. Celulele s-au menținut în mediu cu conținut de 10% ser și antibiotic. S-a determinat viteza creșterii în prezența estrogenului și fără el. S-a studiat abilitatea celulelor de a produce componentul C-3 al complementului, precum și răspunsul celulelor la factorii de creștere și hormonii de creștere. *In vitro* după tratamentul cu progestine, GnRH, F-III și purtători s-a estimat răspunsul proliferativ al culturilor. Săptămânal s-au determinat nivelele receptorilor hormonilor steroizi, pentru a determina persistența *in vitro* a caracteristicilor importante ale celulelor. S-a utilizat țesutul de la 5-25 pacienți.

Tulburările SNC, inclusiv boala Alzheimer

20 Estrogenele, cum ar fi 17 β -estradiol, reglează transcrierea genică prin conjugarea cu receptorii estrogenici (RE), care se află în citoplasma unor anumite populații de celule. Activarea RE de către ligandă este premisă pentru transportul complexului în nucleu, în care conjugarea cu succesiunea corespunzătoare de 13 perechi de baze ale ADN palindromic (elementul răspunsului estrogenului sau ERE) generează procesul asamblării aparatului transcripțional, care atinge culminația la activarea genelor-țintă respective. Au fost identificate numeroase gene, care sunt reglate de estrogene. Ele includ proteinele citoscheletale, enzimele biosintezei neurotransmițătorilor, enzimele metabolismului și receptorii, precum și alți hormoni și neuropeptide. Elementele ERE s-au identificat în numeroase gene estrogen- pozitive, inclusiv vitelogenina, c-fos, prolactina și hormonul luteinizant.

30 Succesiunile ERE similare, cu semnificație majoră pentru sistemul nervos central, au fost identificate în p75^{NGF} și trkA, ambele servind ca molecule de semnalizare pentru neurotrofine: factorul de creștere a nervilor (NGF), factorul neurotrofic derivat din encefal (BDNGF) și neurotrofina-3.

35 S-a constatat că BDNF, la fel ca și NGF, amplifică vitalitatea neuronilor colinergici în cultură. Se presupune că interacțiunea între neurotrofine și estrogene este importantă pentru evoluția și vitalitatea neuronilor bazali ai prosencefalului (care degenerază în boala Alzheimer) în acele stări clinice, în care deficiența existentă de estrogen (după menopauză) poate contribui la pierderea acestor neuroni.

40 Experimentul următor s-a realizat pe șobolanii ovariectomizați (preparați prin metoda descrisă anterior) pentru a determina similitudinea și/sau deosebirea în influența F-III și estrogenului asupra expresiei genei în variate regiuni ale creierului. Șobolanilor în vârstă de șase săptămâni, zilnic s-a administrat în injecții subcutanate estradiol benzoat (0,03 mg/kg), F-III și un purtător (control). Peste cinci săptămâni de tratament, animalele erau sacrificate, s-a extirpat creierul și prin microdisecție s-a prelevat hipocampusul. Hipocampusul s-a congelat rapid în azot lichid și s-a păstrat la -70°C. ADN total s-a obținut din țesutul asociat al animalelor din grupurile cu tratament corespunzător și din grupul de control și s-a efectuat transcrierea inversă, utilizând primerul 3'-oligonucleotid, selectat pentru populațiile de ARN specifici (poli-A+). Reacțiile polimerazei în lanț (PCR) s-au condus în cocktailuri, constând din: 5'-oligonucleotide accidentale (cu lungimea de 10 perechi de baze; total - 150), tampon de reacție, Tagpolimerază și ³²PdTCP.

45 După 40 de cicluri de amplificare, produsele reacției s-au fracționat, în funcție de dimensiuni, în 6% gel TBE-uree, s-au uscat și s-au expus pe peliculă radiologică. Tablourile repartizării ARNm s-au comparat între grupuri.

Utilizarea F-III în asociere cu estrogen

50 Se cunoaște că femeile în perioada pre- și postmenopauză deseori recurg la tratament hormonal de substituție (THS), pentru a evita consecințele negative asociate cu reducerea nivelului de estrogen endogen circulator, de exemplu, pentru tratamentul acceselor de bufeuri de căldură. Însă, THS poate să se asocieze cu un risc înalt de apariție a anumitor forme de cancer, inclusiv cancer uterin și mamar. F-III poate fi administrat în asociere cu THS pentru inhibarea acestor procese.

Utilizarea F-III în asociere cu inhibitorul aromatazei

60 Conform definiției, la femeile în postmenopauză ovarele nu funcționează. Singura sursă de estrogene la ele este conversia androgenilor suprarenalelor până la estrogen cu enzima aromataza, care se detectează în țesuturile periferice (inclusiv în țesutul adipos, mușchi și în însăși tumoarea glandei mamare). Astfel, la femeile în postmenopauză medicamentele care inhibă aromataza

MD 2335 F2 2003.12.31

14

(inhibitorii aromatazei) epuizează estrogenul circulant. Depleția estrogenului prin inhibarea aromatazei este o posibilitate de semnificație majoră în tratamentul pacientelor cu cancer mamar metastatic. În cadrul tratamentului cu inhibitorii aromatazei absența estrogenului circulant poate avea efecte negative, de exemplu, la nivelul lipidelor serice. Pentru prevenirea acestor efecte negative se poate administra F-III.

Utilizarea F-III în asociere cu analogul LHRH

Acțiunea continuă a analogului LHRH (hormonului care eliberează hormonul luteinizant) inhibă producerea estrogenului la femeile în postmenopauză, desensibilizând hipofiza, care apoi nu mai stimulează ovarele pentru producerea estrogenului. Efectul clinic se manifestă ca "ovariectomie medicamentoasă", care este reversibilă la suspendarea analogului LHRH. În cadrul tratamentului cu analogul LHRH, absența estrogenului circulant poate fi cauza unor efecte negative, efecte secundare neprevăzute, de exemplu, influența asupra nivelurilor de lipide serice. F-III se poate folosi pentru inhibarea acestor efecte negative.

Creșterea nivelurilor de acetilcolină

Este cunoscut că la pacienții cu boala Alzheimer se înregistrează declinul semnificativ al nivelului de neuroni colinergici în hipocamp, comparativ cu semenii lor care nu suferă de această boală. S-a constatat că la acești pacienți reducerea progresivă a neuronilor colinergici reflectă pierderea memoriei și funcțiilor cognitive. Se presupune că o cauză a reducerii numărului de acești neuroni este pierderea sau diminuarea funcției acetilcolinei neurotransmițătorilor.

Nivelul de acetilcolină în neuron, în general, se determină în funcție de direcția în care se modifică echilibrul între biosinteză și biodegradare. Enzima colin-acetiltransferaza (ChAT), în general, este responsabilă de sinteza acetilcolinei, iar acetilcolinesteraza (AChE) – de degradarea ei.

Pentru studierea influenței F-III asupra nivelurilor de ChT s-a efectuat următorul experiment: după prepararea șobolanilor prin metoda descrisă mai sus, la 40 de șobolani zilnic s-au administrat în injecții subcutanate și *per os* printr-o sondă gastrică câte 3 mg/kg/zi de F-III într-un purtător cu conținut de 10% ciclodextrină, estradiol benzoat în cantitate de 0,03 sau 0,3 mg/kg/zi sau purtător control. Animalele au fost tratate timp de 3...10 zile. Au fost folosite douăsprezece animale pentru fiecare schemă de tratament. La intervale corespunzătoare de timp, animalele se sacrificau și se diseca creierul lor. Anumite porții de creier se omogenizau și se examinau. Omogenatele hipocampului și părții frontale a cortexului cerebral s-au tratat și în ele s-a determinat activitatea ChAT prin analiza radioactivității biosintezei acetilcolinei [6].

Cum s-a presupus, la animalele OVX nivelurile de ChAT sunt reduse cu >50% ($p < 0,001$), comparativ cu controalele operate fictiv.

Într-un alt aspect al prezentei invenții, F-III s-a administrat în asociere cu inhibitorul AChE. Utilizarea inhibitorului AChE, grație blocării degradării ei prin inhibarea AChE, conducea la creșterea nivelurilor de acetilcolină.

Hiperplazia benignă a prostatei (HBP)

Preistoricul problemei relației între acțiunea estrogenului și tratamentul HBP și carcinomului prostatei este cunoscut [7].

În experimentele descrise în continuare, pe câteva linii celulare de cancer de prostată uman s-a estimat abilitatea F-III de a conjuga receptorii estrogenului.

Lizatele liniilor celulare LNCaP, DU-45 și PC-3 de cancer de prostată uman s-au preparat în mediul TGE cu conținut de 50 nM tris-HCl; pH 7,4; 1,5 mM acid etilendiamintetraacetic (EDTA); 0,4 M KCl; 10% glicerină; 0,5 mM 2-ME și 10 mM molibdat de sodiu, conținând adițional inhibitorii proteazelor: pepstatina (1 mg/ml), leupeptina (2 mg/ml), aprotinina (5 mg/ml) și fluorura de fenilmetilsulfonil (PMSF, 0,1 mM) (TEGP).

Lizatele celulare s-au centrifugat, precipitatul s-a resuspendat în TEGP rece (1 ml TEGP/100 mg precipitat) și s-a sonificat timp de 30 secunde (sarcina ciclului 70%, potențialul 1,8) cu dispozitivul ultrasonor Branson, modelul 450. Lizatele s-au sedimentat prin centrifugare la 10000 x g pentru 15 minute la 4°C, apoi supernatantul s-a separat și s-a folosit imediat, ori s-a depozitat la -70°C.

Testul de conjugare competitiv: În calitate de tampon de conjugare s-a utilizat TEG, în care 0,4 M KCl s-au substituit cu 50 mM NaCl și în care s-a mai adăugat 1 mg/ml de ovalbumină (TEGO). F-III s-a diluat până la 20 nM în TEGO, din care s-au preparat diluții triple în serie. Testările s-au realizat pe microplășete de polipropilenă cu fundul plat în microalveole triplate. În fiecare alveolă s-au

introdus 35 ml de 17 β -estradiol marcat cu tritiu (0,5 nM, activitatea specifică 60,1 Ci/mmol, DuPont-New England Nuclear, Boston, MA) și 35 ml de compus testat răcit (0,1 nM – 5 mM) sau TEGO, după incubare pentru 5 minute la 4°C cu agitare s-au adăugat 70 ml de lizat de linie celulară MCF-7.

MD 2335 F2 2003.12.31

15

Planșetele s-au incubat pentru 24 ore la 4°C, apoi în fiecare alveolă s-au adăugat 70 ml de cărbune de lemn acoperit cu dextran (DCC) cu o agitare ulterioară energică timp de 8 minute la 4°C. Planșetele s-au centrifugat apoi la 1500xg timp de 10 minute la 4°C. Supernatantul s-a colectat din fiecare alveolă într-o microplanșetă de polistiren flexibilă pentru numărarea scintilațiilor cu contorul Wallac Micobeta Model 1450. Radioactivitatea s-a exprimat în dezintegrări/minut (DPM) după corecția în funcție de eficiența numărării (35-40%) și fon. Pentru determinarea limitei inferioare a numărării DCC extractibile, drept controale suplimentare au servit numărările totale și numărările totale + DCC. Rezultatele acestei conjugări competitive s-au exprimat ca procent mediu al conjugării (% conjugării) ± devierea standard, utilizând formula:

$$\% \text{ conjugării} = \frac{\text{DPM}_{\text{compusul testat}} - \text{DPM}_{\text{total}} + \text{DCC}}{\text{DPM}_{\text{fără compus testat}} - \text{DPM}_{\text{total}} + \text{DCC}} \times 100$$

Prevenirea cancerului mamar

Prezența invenției se referă de asemenea la administrarea F-III recipientului, care face parte din grupul de risc al apariției *de novo* a cancerului mamar. Termenul *de novo* definește, în primul rând, absența transformării sau metamorfozei celulelor normale ale glandei mamare în celule canceroase sau maligne. O astfel de transformare se poate produce în stadii în aceleași celule sau în celulele succesori prin proces evolutiv sau poate evolua ca un proces central aparte. Acest proces *de novo* diferă de metastazarea, colonizarea sau răspândirea celulelor de acum transformate sau malignizate din tumoarea primară în sectoare noi de localizare.

Persoana, care nu face parte din grupul cu un risc înalt de instituire a cancerului mamar, este aceea la care se poate dezvolta *de novo* cancer mamar, care nu prezintă nici un fel de simptome sau suspiciuni în ce privește probabilitatea afecțiunii în afara riscului obișnuit și la care niciodată nu s-a diagnosticat boala. Factorul major de risc, care contribuie la dezvoltarea carcinomului mamar, este istoricul vieții persoanei care suferă de această boală sau prezența în antecedente a manifestărilor care preced afecțiunea, chiar dacă în prezent se află în remisiune fără de oricare simptome de prezență a ei. Un alt factor de risc este prezența unei așa patologii în antecedentele ereditare familiale.

Inducția tumorii mamare la șobolani prin administrarea cancerigenului N-nitroso-N-metiluree este un model bine cunoscut pentru studierea cancerului mamar și se consideră potrivit pentru analiza efectelor agenților chimioprolactici.

În două studii diferite, femelelor de șobolani Sprague-Dawley în vârstă de 55 zile s-a administrat intravenos (Studiul 1) sau intraperitoneal (Studiul 2) N-nitroso-N-metiluree în doză de 50 mg la kilogram de masă corporală o săptămână până la accesul *ad libitum* la hrană, în care s-au adăugat variate cantități de F-III, bază de (Z)-2-[4-(1,2-difenil-1-butenil)fenoxi]-N,N-dimetiletanamină (bază de tamoxifen) sau control.

În studiul 1 dozele dietetice de 60 mg/kg și 20 mg/kg de hrană au fost transformate în doze brute comparabile de 3 și 1 mg/kg de masă corporală pentru fiecare animal.

În studiul 2 dozele dietetice de 20, 6, 2 și 0,6 mg/kg de hrană au fost transformate în doze brute comparabile de 1; 0,3; 0,1 și 0,03 mg/kg de masă corporală pentru animalele experimentale.

Șobolanii au fost observați în ceea ce privește manifestările toxicității și o dată în săptămână erau cântăriți și palpați pentru a determina formarea de tumori. Peste treisprezece (studiul 1) sau optsprezece săptămâni (studiul 2) animalele erau sacrificate, la autopsie se confirma prezența tumorilor și acestea se cântăreau.

Compoziții

Termenul “farmaceutic”, utilizat ca adjectiv, în esență se definește ca nedăunător pentru recipientul mamifer. Termenul de “compoziție farmaceutică” prevede că purtătorul, diluantul, excipienții și ingredientul (ingredientele) activ (active) trebuie să fie compatibile cu alte ingrediente ale compoziției și să nu fie nocive pentru recipient. Mai potrivită este introducerea lui F-III în compoziție până la administrare. Selecția compoziției trebuie să o facă medicul curant în funcție de aceiași factori, care au fost incluși în definiția de cantitate eficientă.

Ingredientele active sumare într-o astfel de compoziție constituie de la 0,1 la 99,9% din greutatea compoziției. În compoziția menționată mai potrivită este includerea a nu mai mult de două ingrediente active. Astfel, este potrivită includerea în compoziție a F-III în asociere cu un alt ingredient activ, selectat din estrogen, progestină, un inhibitor al aromatazei, un analog al LHRH și un inhibitor al AChE. Mai potrivite sunt compozițiile în care F-III este singurul ingredient activ.

MD 2335 F2 2003.12.31

16

Compozițiile farmaceutice, conform prezentei invenții, se prepară prin procedee cunoscute în domeniu, utilizând ingrediente bine cunoscute și ușor disponibile. De exemplu, F-III, sau de unul singur sau în asociere cu estrogen, progestină, un inhibitor al aromatazei, un analog al LHRH și un inhibitor al AChE se formulează cu excipienți, diluanți sau purtători obișnuiți în formă de tablete, capsule, suspensii, soluții, compoziții injectabile, aerosoli, prafuri etc.

Compozițiile farmaceutice, conform prezentei invenții, pentru administrare parenterală conțin soluții, dispersii, suspensii sau emulsii apoase sau neapoase sterile, precum și prafuri sterile, care se reconstituie înainte de utilizare în soluții sau suspensii sterile. Exemplele de purtători, diluanți, solvenți sau excipienți sterili apoși sau neapoși includ: apă, soluție salină fiziologică, etanol, poliooli (cum ar fi glicerina, propilenglicol, poli(etilenglicol) etc.) și amestecurile lor potrivite; uleiuri vegetale (cum ar fi ulei de măsline) și esteri organici injectabili, cum ar fi oleat de etil. Fluiditatea necesară se menține, de exemplu, prin folosirea materialelor de acoperire, cum ar fi lecitina, prin crearea unor dimensiuni potrivite ale particulelor, în cazul dispersiilor și suspensiilor, și utilizarea substanțelor tensioactive.

Compozițiile parenterale de asemenea pot conține adjuvanți, cum ar fi conservanți, agenți de umectare, agenți de emulsionare și dispersanți. Prevenirea acțiunii microorganismelor se asigură prin includerea agenților antibacterieni și antifungici, de exemplu, paraben, clorbutanol, acidul fenolsorbic etc. Este dezirabilă de asemenea includerea agenților izotonici, cum ar fi zaharuri, clorură de sodiu etc. Prolongarea absorbției compozițiilor injectabile se realizează prin includerea agenților, care frânează absorbția, cum ar fi monostearat de aluminiu și gelatină.

În unele cazuri pentru prolongarea efectului substanței medicamentoase este dezirabilă diminuarea absorbției medicamentului după administrare subcutanat sau intramuscular. Aceasta se poate realiza prin utilizarea unei suspensii lichide de substanță cristalină cu o solubilitate joasă sau prin suspensionarea substanței medicamentoase într-un purtător uleios. În cazul injectării subcutanat sau intramuscular a unei suspensii cu conținut de substanță medicamentoasă cu o solubilitate joasă în apă, viteza absorbției medicamentului depinde de viteza lui de dizolvare. Compozițiile injectabile “depozitate” de F-III se obțin prin formarea matricelor microîncapsulate de medicament în polimeri biodegradabili, cum ar fi poli(acid lactic), poli(acid glicolic), copolimeri ai acidului lactic și glicolic, poli(ortoesterii) și poli(anhidridele) acestor substanțe, descrise în domeniu. În funcție de rapoartele de substanță medicamentoasă și polimer și proprietățile polimerului utilizat aparte, poate fi controlată eliberarea medicamentului.

Compozițiile injectabile se sterilizează, de exemplu, prin filtrare printr-un filtru antibacterian sau presterilizarea compoziției până la fuzionarea lor, sau în timpul producerii, sau nemijlocit înainte de administrare (în seringă-ambalaj cu două camere).

Formele dozate solide pentru administrare orală includ: capsule, tablete, pastile, prafuri și granule. În astfel de forme dozate solide, F-III se amestecă cel puțin cu un purtător farmaceutic inert, cum ar fi clorura de sodiu sau dicalciu fosfat și/sau a) cu diluanți uscați, cum ar fi amidon, zaharuri, inclusiv lactoză și glucoză, manitol și acid silicic; b) lianți, cum ar fi carboximetilceluloza și alți derivați ai celulozei, alginat, gelatină, poli(vinilpirolidină), zaharoză și gumă arabică; c) umectori, cum ar fi glicerina; d) dispersanți, cum ar fi agar-agar, carbonat de calciu, bicarbonat de sodiu, amidon de cartofi sau tapiocu, acid alginic, silicați și carbonat de sodiu; e) agent de umezire, cum ar fi glicerina; f) agenți care împiedică dizolvarea, cum ar fi parafina; g) agenți care accelerează absorbția, cum ar fi compuşii de amoniu cuaternar; h) emolienți, cum ar fi alcool cetilic și monostearat de glicerină; i) absorbant, cum ar fi caolina și bentonita și j) lubrifianți, cum ar fi talc, stearat de calciu, stearat de magneziu, poli(etilenglicol) solid, lauril sulfat de sodiu și amestecurile acestora.

Compozițiile solide de tip similar pot conține de asemenea umplutură pentru capsule de gelatină moi sau tari, utilizând așa excipienți, cum ar fi lactoză, precum și poli(etilenglicolii) macromoleculari etc.

Formele dozate solide, cum ar fi tabletele, drajeurile, capsulele, pastilele și granulele, de asemenea pot fi preparate cu învelișuri, cum ar fi învelișuri enterice sau alte învelișuri bine cunoscute în tehnologia preparării medicamentelor. Învelișurile pot conține agenți, care opacifiază substanțele, sau agenți care eliberează ingredientul (ingredientele) activ (e) într-un anumit segment al tractului digestiv, de exemplu, învelișurile solubile în acid pentru eliberarea ingredientului (ingredientelor) activ (e) în stomac sau învelișuri solubile în baze – pentru eliberarea ingredientului (ingredientelor) activ (e) în intestine.

Ingredientul (ingredientele) activ (e) poate fi de asemenea microîncapsulat în învelișuri cu eliberare lentă, microcapsulele fiind parte a tabletei sau capsulei.

Formele dozate lichide de F-III pentru administrare orală includ soluție, emulsii, suspensii, siropuri sau elixire. Adicional la compuşii activi, formulările lichide mai pot include diluanți inerti, folosiți de obicei în acest domeniu, cum ar fi apa sau alți solvenți farmaceutici, agenți de solubilizare și agenți de emulsifiere, cum ar fi etanol, izopropanol, etilcarbonat, acetat de etil, alcool benzilic,

MD 2335 F2 2003.12.31

17

benzilbenzoat, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamidă, uleiuri (în special, ulei de bumbac, de arahide, porumb, de semințe, de măsline, de ricin și sesam), glicerină, alcool tetrahidrofurfurilic, poli(etilenglicoli), esteri ai acizilor grași ai sorbitei și amestecurile lor.

5 Adițional la diluanții inerti, formele lichide de compoziții mai pot include adjuvanți, cum ar fi umectanți, agenți de emulsifiere și de suspensionare, agenți de îndulcire, gustativi și aromatizanți.

Suspensiile lichide, adițional la ingredientul (ingredientele) activ (e) mai pot conține agenți de suspensionare, cum ar fi alcooli etoxilați izostearili, polioxietilensorbit și esteri ai sorbitanului, celuloză microcristalină, metahidroxid de aluminiu, bentonită, agar-agar, tragacant și amestecurile lor.

10 Compozițiile pentru aplicare rectală sau intravaginal se obțin prin fuzionarea F-III cu excipienți potriviți, care nu irită, cum ar fi unt de cacao, polietilenglicol sau altă ceară pentru supozitoare, care se menține solidă la temperatura camerei, însă se lichefiază la temperatura corpului și, astfel, se topește în rect sau în cavitatea vaginului cu eliberarea compusului (compuşilor) activ (i). Compușii se dizolvă în ceară topită, se formulează în forma necesară și se lasă să se solidifice în compoziția finală pentru supozitoare.

15 F-III, de asemenea, poate fi administrat în formă de lipozomi. Este cunoscut în acest domeniu, că lipozomii de obicei se prepară din fosfolipide sau alte substanțe lipide. Compozițiile lipozomice se formează cu cristale lichide hidratate mono- sau pluristratificate, care dispersează într-un mediu apos. Se poate folosi orice lipidă farmaceutic netoxică și metabolizantă, capabilă să formeze lipozomi. Aceste compoziții în formă de lipozomi pot conține, adițional la F-III, stabilizatori, excipienți, conservanți etc. Lipidele potrivite sunt fosfolipidele și fosfatidilcolinele (lecitine) atât naturale, cât și sintetice.

20 Procedeele de formare a lipozomilor sunt cunoscute în domeniu și descrise, de exemplu, în Prescott, Ed., Methods in Cell Biology, Volume XIV, Academic Press, New York, 1976, p. 33 [8] și următoarele.

25 Exemplele ce urmează de compoziții doar ilustrează prezenta invenție și nu restrâng volumul revendicat de aceasta.

Compoziția 1: Capsule de gelatină

Capsule solide de gelatină preparate cu utilizarea următoarelor ingrediente	Cantitatea (mg/capsulă)
F-III	0,1...1000
Amidon, Farmacopea Națională a S.U.A.	0...650
Amidon, praf fluid	0...650
Silicon fluid 350 centistox	0...15

30 Compoziția menționată poate fi modificată în conformitate cu modificările rezonabile propuse.

Compoziția pentru tablete se prepară cu utilizarea ingredientelor prezentate în continuare:

Compoziția 2: Tablete

Ingrediente	Cantitatea (mg/tabletă)
F-III	2,5...1000
Celuloză, microcristalină	200...650
Dioxid de silicon, fumigant	10...650
Acid stearic	5...15

Componentele se fuzionează și se presează cu formarea tabletelor.

35 Compoziția 3: Tabletele cu conținut de circa 10 și 50 mg de F-III se pot prepara după cum urmează:

Ingrediente	Cantitatea (mg/tabletă)	Cantitatea (mg/tabletă)
F-III	11,3	56,5
Lactoză anhidră	176,8	128,2
Lactoză, uscată prin pulverizare	44,2	32,0
Povidon	11,0	13,0
Polisorbat 80	2,5	2,6
Crospovidon (interior)	6,25	6,24
Crospovidon (exterior)	6,25	6,5
Stearat de magneziu	1,5	1,7
Celuloză microcristalină (exterior)	0,0	13,0

Componentele se fuzionează și se presează cu formarea tabletelor.

MD 2335 F2 2003.12.31

18

În mod alternativ, tabletele, fiecare cu un conținut de 2,5...1000 mg de F-III se pot obține în modul ce urmează:

5

Compoziția 4: Tablete

Ingrediente	Cantitatea (mg/tabletă)
F-III	25...1000
Amidon	45
Celuloză, microcristalină	35
Polivinilpirolidon (în formă de 10% soluție în apă)	4
Sodiucaboximetilceluloză	4,5
Stearat de magneziu	0,5
Talc	1

10 F-III, amidonul și celuloza se cern printr-un ciur nr. 45 meș US și se agită energic. Soluția de polivinilpirolidonă se amestecă cu prafulurile obținute și apoi se cerne printr-un ciur nr. 14 meș US. Granulele astfel obținute se usucă la 50...60°C și se cern printr-un ciur nr. 18 meș US. Sodiucaboximetilamidonul, stearatul de magneziu și talcul, trecute în prealabil printr-un ciur nr.60 meș US, se adaugă apoi la granule, care după agitare se presează cu un dispozitiv de preparare a tabletelor pentru formarea tabletelor.

15 Suspensiile, fiecare dintre ele conținând 0,1...1000 mg de substanță medicamentoasă în 5 ml de formă dozată, se prepară în modul ce urmează:

Compoziția 5: Suspensii

Ingrediente	Cantitatea (mg/ml)
F-III	0,1...1000 mg
Sodiucaboximetilceluloză	50 mg
Sirop	1,25 mg
Soluție de acid benzoic	0,10 ml
Substanță gustativă	cantitate suficientă
Colorant	cantitate suficientă
Apă purificată până la	5 ml

20 Medicamentul se cerne prin ciurul nr. 45 meș US și se fuzionează cu sodiucaboximetilceluloza și siropul cu formarea unei paste omogene. Soluția de acid benzoic, substanța gustativă și colorantul se diluează cu o cantitate oarecare de apă și se adăunează cu agitare. Apoi se adaugă o cantitate suficientă de apă pentru a obține volumul necesar.

Soluțiile aerosol se prepară din următoarele ingrediente:

Compoziția 6: Aerosol

Ingrediente	Cantitatea (% masice)
F-III	0,25
Etanol	25,75
Propelent 22 (clordifluormetan)	70,0

25 F-III se amestecă cu etanolul și amestecul se adaugă la o porție de propelent 22, se răcește până la 30°C și se transferă în dispozitivul de umplere. Apoi, cantitatea necesară se introduce într-un container de oțel inoxidabil și se diluează cu propelentul restant. Dispozitivul valvular se assemblează la container.

Supozitoarele se prepară în modul ce urmează:

30

Compoziția 7: Supozitoare

Ingrediente	Cantitatea (mg/supozitor)
F-III	250
Gliceride ale acizilor grași saturați	2000

F-III se cerne printr-un ciur nr.60 meș US și se suspensionează în gliceride ale acizilor grași saturați, în prealabil topite, folosind o încălzire minimă necesară. Apoi amestecul se toarnă în forme pentru supozitoare cu capacitate nominală de 2 g și se lasă pentru răcire.

35

MD 2335 F2 2003.12.31

19

Compoziția pentru administrare intravenos se prepară în modul ce urmează:

Compoziția 8: Soluție pentru administrare intravenos

Ingrediente	Cantitatea
F-III	25 mg
Soluție salină izotonică	1000 ml

- 5 Soluția de ingredientele menționate se administrează pacientului intravenos cu o viteză de circa 1 ml pe minut.

Compoziția 9: Capsulă, combinația 1

Ingrediente	Cantitatea (mg/capsulă)
F-III	50
Premarin	1
Avicel pH 101	50
Amidon 1500	117,50
Ulei de silicon	2
Tvin 80	0,50
Cab-O-Sil	0,25

Compoziția 10: Capsulă, combinația 2

Ingrediente	Cantitatea (mg/capsulă)
F-III	50
Noretinodrel	5
Avicel pH 101	82,5
Amidon 1500	90
Ulei de silicon	2
Tvin 80	0,50

10

Compoziția 11: Tabletă complexă

Ingrediente	Cantitatea (mg/capsulă)
F-III	50
Premarin	1
Amidon de porumb, Farmacopea Națională a S.U.A.	50
Polidon, K29-32	6
Avicel pH 101	41,50
Avicel pH 102	136,50
Crospovidon XL10	2,50
Stearat de magneziu	0,50
Cab-O-Sil	0,50

Dozarea

- 15 O doză anumită de F-III, administrată conform prezentei invenții, se stabilește în funcție de circumstanțele deosebite, înregistrate în fiecare situație. Aceste circumstanțe includ: metoda de administrare, antecedentele bolii, starea patologică sau simptomele, care necesită aplicarea unui tratament, severitatea bolii/simptomului, care necesită un tratament, vârsta bolnavului și sexul recipientului.

- 20 De obicei, doza zilnică minimă eficientă pentru F-III constituie 1, 5, 10, 15 sau 20 mg. Doza maximă eficientă constituie 800, 100, 60, 50 sau 40 mg. Mai tipic, doza variază între 15 și 60 mg. Doza exactă poate fi stabilită în conformitate cu regula standard din practica medicală "titrarea dozei" recipientului, care constă în administrarea inițial a unei doze mici de compus și majorarea treptată a ei până la apariția efectului terapeutic dezirabil.

- 25 Cu toate că poate este necesară titrarea dozei recipientului în ce privește tratamentul asociat examinat anterior, dozele tipice pentru ingredientele active, cu excepția F-III, s-au dovedit a fi următoarele: etinilestrogen (0,01-0,03 mg/zi), mestranol (0,05-0,15 mg/zi), hormonii estrogeni conjugați (de exemplu, Premarin®, Wyeth-Ayerst; 0,3-2,5 mg/zi), medroxioprogesteron (2,5-10 mg/zi), noretinodrel (1,0-10,0 mg/zi), noretindron (0,5-2,0 mg/zi), aminoglutemida (250-1250 mg/zi, de preferință, 250 mg de patru ori pe zi), anastrozol (1-5 mg/zi, de preferință, 1 mg pe zi), letrozol (2,5-10 mg/zi, de preferință, 2,5 mg pe zi), formestan (250-1250 mg pe săptămână, de preferință, 250

MD 2335 F2 2003.12.31

20

mg de două ori pe săptămână), goserlin (3-15 mg/trei luni, de preferință 3,6-7,2 mg o dată în trei luni) și leuprolid (3-15 mg/lună, de preferință 3,75-7,5 mg o dată în fiecare lună).

Modul de administrare

5 F-III se poate administra prin diferite modalități, inclusiv oral, rectal, transdermal, subcutanat, intravenos, intramuscular și intranasal. Modul de administrare pentru fiecare agent cu conținut de estrogen și progestină corespunde oricărei modalități cunoscute în domeniu. F-III, singur sau în asociere cu estrogen, progestină sau un inhibitor al AChE, de obicei, se administrează într-o compoziție potrivită.

10 Compozițiile farmaceutice, conform prezentei invenții, pentru uz uman sau la mamifere (de exemplu, la canine, pisici, cai, porcine etc.) se pot administra oral, rectal, intranasal, parenteral, topic, transbucal sau sublingual, sau nazal. Termenul "administrare parenterală" se referă la modurile de administrare, care includ: intravenos, intraperitoneal, intrasternal sau intraarticular sau în infuzii.

Modul/durata administrării

15 Pentru majoritatea din procedeele, conform prezentei invenții, F-III se administrează permanent de la 1 la 3 ori pe zi sau atât de frecvent, cât este necesar, pentru a-i asigura recipientului o cantitate eficientă. Terapia ciclică poate fi benefică, în special, în tratamentul endometriozei sau poate fi de o eficiență înaltă în tratamentul acceselor de dureri în cadrul afecțiunii. În cazul restenozei tratamentul poate fi limitat doar la intervalele nu prea mari (1-6 luni) dintre procedurile curative, cum ar fi angioplastia.

20

25 (57) Revendicări:

1. Hidrat cristalin de hidrocilorură de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen (F-III), caracterizat de următoarele reflexii ale radiațiilor X: $4,6 \pm 0,2$; $7,8 \pm 0,2$; $9,3 \pm 0,2$; $14,0 \pm 0,2$; $17,6 \pm 0,2$; $20,8 \pm 0,2$; și $24,3 \pm 0,2^\circ$ la 2θ , obținute la $25 \pm 2^\circ\text{C}$ și la umiditatea relativă de $35 \pm 10\%$ cu o sursă de iradiere de cupru.

30 2. Compoziție farmaceutică care conține compusul cristalin, definit în revendicarea 1, unul sau mai mulți purtători, diluanți sau excipienți farmaceutici și opțional estrogen, opțional progestină, opțional un inhibitor al aromatazei, opțional un analog al hormonului care eliberează hormonul luteinizant (LHRH) și, opțional, un inhibitor al acetilcolinesterazei.

35 3. Compoziție, conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că** conține compusul cristalin, definit în revendicarea 1, unul sau mai mulți purtători, diluanți sau excipienți farmaceutici și estrogen.

4. Compoziție, conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că** estrogenul reprezintă Premarin[®].

40 5. Compoziție, conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că** conține compusul cristalin, definit în revendicarea 1, unul sau mai mulți purtători, diluanți sau excipienți farmaceutici și progestină.

6. Compoziție, conform revendicării 5, **caracterizată prin aceea că** progestina se selectează din grupa, ce constă din noretinodrel și noretindronă.

45 7. Compoziție, conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că** conține compusul cristalin, definit în revendicarea 1, unul sau mai mulți purtători, diluanți sau excipienți farmaceutici și un inhibitor al acetilcolinesterazei.

8. Compoziție, conform revendicării 7, **caracterizată prin aceea că** inhibitorul acetilcolinesterazei se selectează din grupa, ce constă din salicilat de fizostigmină, hidrocilorură de tacrin și hidrocilorură de donepezil.

50 9. Compoziție, conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că** conține compusul cristalin, definit în revendicarea 1, unul sau mai mulți purtători, diluanți sau excipienți farmaceutici estrogen și progestină.

10. Procedeu de obținere a compusului, definit în revendicarea 1, care include cristalizarea hidrocilorurii de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen din amestecul izopropanol - apă.

55 11. Procedeu, conform revendicării 10, **caracterizat prin aceea că** raportul apei la izopropanol constituie (1...9):1 respectiv.

12. Procedeu, conform revendicării 11, **caracterizat prin aceea că** raportul menționat constituie (2,5...5,6):1.

MD 2335 F2 2003.12.31

21

13. Procedeu, conform revendicării 11, **caracterizat prin aceea că** raportul menționat constituie (3...5,6):1.

5 14. Utilizarea compusului, definit în revendicarea 1, pentru inhibarea stărilor patologice selectate din grupa ce include fibroză uterină, endometrioză, proliferarea celulelor musculare netede aortale, restenoză, cancer mamar, cancer uterin, cancer de prostată, hiperplazie benignă a prostatei, osteoporoză, afecțiuni cardiovasculare, hiperlipidemie, tulburări ale sistemului nervos central și boala Alzheimer.

15. Utilizare, conform revendicării 14, pentru inhibarea cancerului mamar.

10 16. Utilizare, conform revendicării 15, modul de inhibare fiind profilaxia.

17. Utilizare, conform revendicării 14, pentru inhibarea cancerului ovarian.

18. Utilizare, conform revendicării 14, pentru inhibarea cancerului endometrial.

19. Utilizarea compusului, definit în revendicarea 1, pentru activarea colinacetiltransferazei la mamifere.

15

(56) Referințe bibliografice:

1. US 5510357 1996.04.23

2. US 5723474 1998.03.03

3. EP 0729956 1996.09.04

**Director Departament
Examinare Invenții:**

CRECETOV Veaceslav

Examinator:

EGOROVA Tamara

Redactor:

CANȚER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2000 0161		
(22) Data depozit: 2000.07.28		
Prioritatea invocată : (31) nr.: 60/146184; 60/147642; 60/149820 32) data : 1999.07.29; 1999.08.06; 1999.08.19 33) țara :US (51) ⁷ : C 07 D 333/64; A 61 K 31/4535; A 61 P 5/32, 35/00 Alți indici de clasificare: Titlul : Hidrat cristalin de hidrociorură de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen, procedeu de obținere, compoziție farmaceutică care îl conține și utilizarea pentru inhibarea stărilor patologice și activarea colinacetiltransferazei (71) Solicitantul : ELI LILLY AND COMPANY, US Termeni caracteristici : arzofen, hidrat cristalin de hidrociorură de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))		
Int. Cl. ⁷ C 07 D 333/64; A 61 K 31/4535; A 61 P 5/32, 35/00 MD baza de date 1994-2002 EA Buletine Oficial 1995-2002 SU Colecția de certificate de autor 1970-1991		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	US 5510357 1996.04.23	1, 2, 14
A	US 5723474 1998.03.03	1, 2, 14
A	EP 0729956 1996.09.04	1, 2, 14
☐ Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă cand documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării		2003.10.17
Examinatorul		EGOROVA Tamara