

#### 四、聲明事項：

☐ 主張專利法第22條第2項 $\square$ 第1款或 $\square$ 第2款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☐ 有主張專利法第27條第1項國際優先權：

☒ 無主張專利法第27條第1項國際優先權：

美 國 1999/07/06 60/142,407

☐ 主張專利法第29條第1項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第30條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

## 九、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

#### 發明領域

本申請案請求主張於1999年7月6日提出專利申請之美國臨時專利申請案第60/142,407號之優先權。

本發明係有關於一種用於對易罹患之溫血動物(包括人類)來治療及/或制止肥胖(尤其是腹部肥胖)以及治療或抑制不正常胰島素抗性之發生之新穎方法。該等方法涉及投藥以具有下列通式I之化合物或其等之藥學組成物。於其他之具體例中，本案方法涉及投藥以一種選擇性雌激素受體調節劑(“SERM”)與一種性類固醇前驅物之組合。

### 【先前技術】

#### 發明背景

肥胖，亦即一種以過多之體脂肪為特徵之病狀，對於許多疾病(例如心血管疾病、高血壓、糖尿病和乳癌)而言係為一熟知之危險因子。更甚者，個人之外貌在大多數人的整體幸福上扮演一個重要之部份。

肥胖之常見治療[例如各種減肥餐(包含食物限定飲食)、體重減輕程序和運動]對於許多人提供了各種不同程度之減肥成功。然而，對那些利用習知技術而經驗到不足夠結果之人而言，對於其他技術或是將之用作為習知技術之補助，仍存在有一需求。

近來，一些雌激素同效劑/拮抗劑被揭露供用於治療或制止肥胖：歐洲專利申請案編號EP 0 659 423 A1中之雷洛

賽芬(Raloxifene)和相關之化合物；歐洲專利申請案編號EP 0 659 423 A2中之具有一苯並噻吩核心的雌激素同效劑；國際專利申請案編號PCT/DK96/0011中之3,4-二苯基苯並二氫吡喃；國際專利申請案編號PCT/IB95/00286中之萘基雌激素同效劑/拮抗劑。

亦曾有報導指出，檀莫賽芬(Tamoxifen)，亦即另一個雌激素同效劑/拮抗劑，會制止雌性大鼠體內之止嘔靈(sulpiride)-誘發的體重增加(Baptista et al., Pharmacol., Biochem. Behav. (1997), 57(1/2), 215-222)。亦曾有報導指出，檀莫賽芬會模擬雌二醇(estradiol)對大鼠的食物攝取、體重和身體組成之作用(Wade et al., American Journal of Physiology 1993, 3(6), R1219-1223)。

脫氫異雄固酮(DHEA)於治療及/或制止肥胖上也具有有利之效用。於老化之司培瑞格-多利(Sprague-Dawley)大鼠身上，史瓦茲(Schwartz)(於Kent, Geriatrics 37:157-160, 1982)觀察到藉由DHEA而使體重由600公克減低至500公克且不影響食物的攝取。史瓦茲(Cancer 39:1129-1132, 1979)觀察到被給予DHEA (450毫克/公斤，一週3次)之C3H小鼠相較於對照組動物得到顯著較輕之體重且活得更久、具有較少的體脂肪和更好的活動力。體重之減少被達成而沒有失去胃口或是食物限制。更甚者，DHEA能夠制止被培育成在成年期會變成肥胖之動物的體重增加(於Kent, Geriatrics 37:157-160, 1982)。

DHEA投藥對於苗條之盧丘(Zucher)大鼠雖有增加食物

攝取但是減少了體重增加。接受處理之之動物具有較小之脂肪塊而因此，整體而言，暗示了DHEA會增加食物代謝，而造成較低之體重增加和脂肪積聚(Svec et al., 2<sup>nd</sup> Int. Conf. Cortisol and Anti-Cortisols, Las Vegas, Nevada, USA, p56, abst, 1997)。

肥胖被發現於A<sup>vy</sup>突變株小鼠(Yen et al., Lipids 12:409-413, 1977)和盧克(Zucker)大鼠(Cleary and Zisk, Fed. Proc. 42: 536, 1983)身上有被改善。DHEA治療之C3H小鼠相較於對照組具有一較年輕之外貌(Schwartz, Cancer Res. 39: 1129-1132, 1979)。

腹部脂肪與有關於心血管胸部疾病之代謝性危險性因子相關聯(Imbault et al., Metabolism 1999, 48 (3), 355-62; Ledoux et al. (CMAJ 1997, 157 Suppl.1, 46-53)。

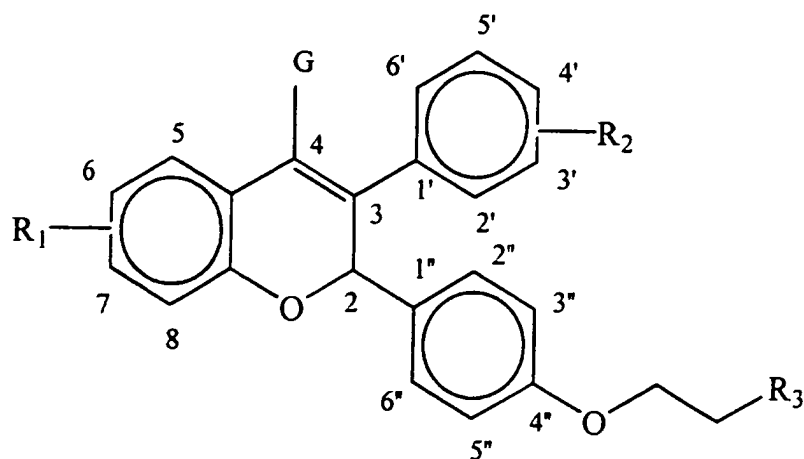
## 【發明內容】

### 15 發明概要

於是，本發明之一個目的是減少脂肪組織，尤其是腹部脂肪。

本發明之另一個目的是降低心血管疾病以及肥胖或過多脂肪組織對之係為危險因子的其他疾病或病狀之風險。

20 於一個具體例中，本發明係要提供一種用於治療或抑制易罹患之溫血動物(包括人類)之體重增加的新穎方法，該方法包含對一需要該治療或抑制之個體投藥以，含有或不含有一藥學稀釋賦形劑或載劑，一治療有效量之至少一個具有通式I之化合物：



化學式1

其中 $R_1$ 和 $R_2$ 是各自選自於下列群組：氫、羥基、-OM (M係選自於由直鏈或支鏈 $C_1$ - $C_4$ 烷基、直鏈或支鏈 $C_3$ - $C_4$ 烯基、直鏈或支鏈 $C_3$ - $C_4$ 炔基所構成之群組中)和一個可於活體內轉化為羥基之部分；

其中G是-H或- $CH_3$ ；以及

其中 $R_3$ 是一個選自於下列群組中之物種：吡咯啉基、哌啶並基、嗎啉並基和NRaRb (Ra和Rb分別是氫、直鏈或支鏈 $C_1$ - $C_6$ 烷基、直鏈或支鏈 $C_3$ - $C_6$ 烯基、直鏈或支鏈 $C_3$ - $C_6$ 炔基)。

於另一個具體例中，選擇性雌激素受體調節劑或其藥學上可接受鹽被投藥以供減低腹部脂肪或減低腹部脂肪之積聚。

於另一個具體例中，除了一個選擇性雌激素受體調節劑(SERM)之外，性類固醇前驅物(例如脫氫異雄固酮、脫氫異雄固酮硫酸鹽、雄-5-烯-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -二醇)被投藥以供治療肥胖或抑制體重增加。處於50歲或超過50歲的年齡之人類被相信為對該組合治療有良好反應，有可能是因為前驅物的

含量傾向於會非所欲地隨年齡而減低。

因此，在那方面，本發明提供一種用於治療肥胖或抑制體重增加之方法，其包含對一需要該治療或抑制之個體投藥以，含有或不含有一藥學稀釋賦形物或載劑，一治療有效量之至少一個SERM和一有效量之至少一個選自於下列群組中之性類固醇前驅物：脫氫異雄固酮、脫氫異雄固酮硫酸鹽、雄-5-烯-3b,17b-二醇，以及可於活體內被轉化成前述前驅物之任一者的化合物。

於另一方面，本發明提供一種用於治療或減低發展出胰島素抗性之危險的方法，其包含一需要該治療或減低之個體投藥以一治療有效量之至少一個SERM。於某些具體例中，一有效量之至少一種選自於由脫氫異雄固酮、脫氫異雄固酮硫酸鹽、雄-5-烯-3b,17b-二醇以及可於活體內被轉化成此等之任一者之化合物的性類固醇前驅物亦被投藥以作為一個組合治療之部分。

於另一方面，本發明提供一種用於治療肥胖之套組，其具有一個第一容器包含至少一種SERM，以及一個第二個容器包含至少一種性類固醇前驅物，該前驅物係選自於下列群組：脫氫異雄固酮、脫氫異雄固酮硫酸鹽、雄-5-烯-3b,17b-二醇，以及可於活體內被轉化成此等之任一者的化合物。

一個藥學賦形劑載劑或稀釋劑也可被提供於一或多個容器內，且可包含本技藝中已知之防腐劑和其他添加劑。前述也能夠與此處所描述之各種不同發明之任一具體例內

所用的任一活性成份被包含之。

如此處所使用的，一個選擇性類固醇受體調節劑 (SERM) 是為一個化合物，其直接地或是經由其活性代謝物功能來當做乳房組織內之一個雌激素受體拮抗劑(“抗雌激素”)，但對體脂肪、骨骼組織和血清膽固醇含量仍提供類似雌激素之作用(亦即，藉由減低血清膽固醇)。於活體外或是於人類或大鼠乳房組織內會產生有如雌激素受體拮抗劑之功能之非類固醇化合物(尤其是若該化合物對於人類乳房癌細胞發揮有如一抗雌激素化合物之作用)有可能產生有如一SERM之功能。我們曾測試過並發現可產生有如SERMs功能之非類固醇雌激素包含EM-800、EM-652、EM-652.HCl (EM-01538)、雷洛賽芬(Raloxifene)、檀莫賽芬(Tamoxifene)、伊多賽芬(Idoxifene)、托里美芬(Torimefene)、LY 353381、LY 335563、GW 5638和爵洛賽芬(Droloxifene)(將於後文中作更詳盡之描述)。依照本發明之任一具體例，當這些化合物被用作為抗雌激素時，SERMs較佳地係以相同於本技藝中所知之予以投藥。

不欲為理論所限制，據信SERMs[有許多較佳地係具有兩個藉由1至2個碳原子來連接之芳族環]被預期係經由最容易被雌激素受體所辨識之上述分子部份來與雌激素受體交互作用。該等SERMs也具有支鏈，該支鏈可選擇性地造成在乳房和子宮內膜組織內之拮抗特性但於其他組織(尤其是骨骼)內不具有拮抗特性。因此，SERMs能夠如所欲的於乳房和子宮內膜組織內產生有如抗雌激素之功能，同時

令人訝異地且如所欲地對體脂肪具有類似雌激素之活性。

本發明同時包含如所欲地抑制額外的體重增加或如所欲地提供體重減輕，即令正常體重沒有被達到。

如此處所使用的，肥胖此辭隱含一會導致一體重增加之過多脂肪組織。本發明之制止和治療方法包含抑制體重增加和誘發體重減少。本發明包含人體肥胖治療，其係藉由減低該人體之體重至(和維持體重於)正常體重。本發明也同時包含制止那些容易引發肥胖此種疾病之個體去產生肥胖。需要此處所示之本發明的病患包含那些體重過重者(相較於醫學上所認知之正常體重)或是那些有變成體重過重之危機者。

依照本發明SERMs也可以被用來降低血液甘油三酸酯含量。舉例而言，EM-800(描述於本案中)被認為對此目的而言是有效的。

於另一個具體例中，用於實施本發明之新穎的化合物和藥學組成物被提供之。

一需要該治療或降低一給定疾病或病狀之開始的風險之病患係為已被診斷為帶有此疾病者或是易於得到此疾病者。本發明特別適用於，基於遺傳、環境因素或其他被確認之危險因子，在得到本發明有關之病狀上要比一般群眾處於更高危險度之個體。

除非於他處另有敘明，本發明之活性化合物的較佳劑量就治療和預防目的而言是一樣的。於本案中所討論之每一個活性成份的劑量是一樣的，不論要被治療(或制止)的疾



病為何。

當兩個或多個不相同之活性試劑於本案中被討論以當  
做一組合治療之部份(例如一酵素抑制劑和一抗雄激素)，數  
個不同之化合物而非一個具有多重活性之單一化合物被投  
5 藥之。

除非於他處另有敘明，“化合物”此詞和任何相關之分  
子結構可包含其任何可能之相關立體異構物，呈一消旋混  
合物或光學活性之形式。

除非於他處另有註明或從前後文可明顯知悉的，本案  
10 之劑量係指不受藥學賦形劑、稀釋劑、載劑或其他成份所  
影響的活性化合物之重量，雖然該等額外的成份如所欲地  
被包含之，此如本案之實施例中所顯示的。一般被用於製  
藥工業之任何劑量型態(膠囊、藥錠、注射物或類似物)是適  
合於供本案之使用，而且該等術語“賦形劑”、“稀釋劑”或“  
15 載劑”包含那些典型地在工業上與活性成份一起被包含在  
該等劑量形式內之非活性成份。舉例而言，典型之膠囊、  
藥丸、腸溶衣、固體或液體稀釋物或賦形劑、調味劑、防  
腐劑或類似物被包含之。

於某些具體例中，於本案中所討論之活性成份的前驅  
20 藥(亦即會於活體內轉化成活性成份之化合物)被使用之。在  
製藥工業上已知許多官能基於活體內會轉化成本案中所討  
論的活性化合物之官能基。參閱，例如 Chaptet 5, “Design  
and Application of Prodrugs,” A Textbook of Drug Design &  
Development, Bundgaard & Larsen, Ed., Harwood Academic

Publishers GmbH (Chur, Switzerland, 1991)。前驅藥通常能夠提供較佳之生物可利用性、儲存安定性及/或製造之容易度、對應之活性化合物。

被使用於此處所討論之任一種治療之所有活性成份可  
5 被配方成亦包含有一或多個其他活性成份之藥學組成物。  
任擇地，其等可被各自分開地投藥但在時間上要能充分地  
同時，藉此，一病患最終具有升高之血液位準或者是同時  
地享受到每個活性成份(或策略)之效益。舉例而言，於本發  
明之某些較佳具體例中，一或多個活性成份係要被配方於  
10 一個單一藥學組成物內。於本發明之其他具體例中，提供  
一個包含至少兩個分開之容器的套組，其中至少一個容器  
之內含物，就當中所含有之活性成份而言，全部或部分地  
相異於至少一個另外的容器的內含物。二個或多個不同之  
容器被使用於本發明之組合治療中。於本案中所討論之組  
15 合治療也包含使用該組合中之一個活性成份以製造一用於  
治療(或制止)討論中的疾病之藥劑，其中該治療或制止進一  
步包含該組合之另一活性成份或策略。

腹部脂肪被認為不同於整個身體肥胖，且可於沒有整  
個身體肥胖時發生之。其亦被認為在心臟疾病上是一個更  
20 加危險之因子。腹部脂肪對於本發明能有利地產生反應。

本發明之較佳的SERMs，例如上述化學式1中的那些，  
對於子宮內膜不會有非所欲之雌激素作用，對於某些習知  
方法中所應用之SERM療法是一個非常重要之改善。

被用於本發明之SERMs被認為有利地減低血液甘油三

酸酯還有胰島素抗性。

於本案中所討論之較佳具體例中，SERM之作用被DHEA或類似之性類固醇前驅物所增強。

不欲為理論所限制，由組合SERMs和前驅物所得到之  
 5 協同作用的一個解釋可能為其等的作用機制上之至少部分  
 差異。舉例而言，DHEA顯現會增加食物代謝而不抑制胃  
 口。EM-652.HCl，一個SERM，顯現會抑制食物攝取。

圖式簡單說明

第1圖係顯示，以增高的劑量(0.01、 0.03、 0.1、 0.3  
 10 、 1 mg/kg，口服，每天一次)之SERMs EM-800、雷洛賽  
 芬、檀莫賽芬和一個無活性之鏡像異構物 EM-776 (EM-800  
 之鏡像異構物)對於卵巢切除的大鼠來處理35週之整體體  
 脂肪之作用。數據係以平均值±平均值之標準誤差(SEM)來  
 表示。\*\*:  $P < 0.01$ 實驗組相對於個別之對照組。

第2圖係顯示，卵巢完整之大鼠、卵巢切除的大鼠以及  
 15 以SERM EM-652.HCl或雌二醇來處理之卵巢切除的大鼠，  
 在一個20天之處理期下，對於體重增加(A)、蛋白質增加(B)  
 以及脂肪增加(C)之作用。數據係以公克計之平均值±SEM  
 來表示。\*  $P < 0.05$ 相對於卵巢完整組；+  $P < 0.05$ 相對於卵巢  
 20 切除的(OVX)+雌二醇組(僅有關於EM-652.HCl組)。

第3圖係顯示，卵巢完整之大鼠、卵巢切除的大鼠以及  
 以SERM EM-652.HCl或雌二醇來處理之卵巢切除的大鼠，  
 在一個20天之處理期下，對於累積食物攝取量上之作用。  
 數據係以公克來表示。

其中G是 -H或 -CH<sub>3</sub>；以及

其中R<sub>3</sub>是一個選自於下列群組中之物種：吡咯啉基、  
 哌啶並基、嗎啉並基和NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>(R<sub>a</sub>和R<sub>b</sub>分別是氫、直鏈或支  
 鏈C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、直鏈或支鏈C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>烯基、直鏈或支鏈C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>炔  
 5 基)，以及

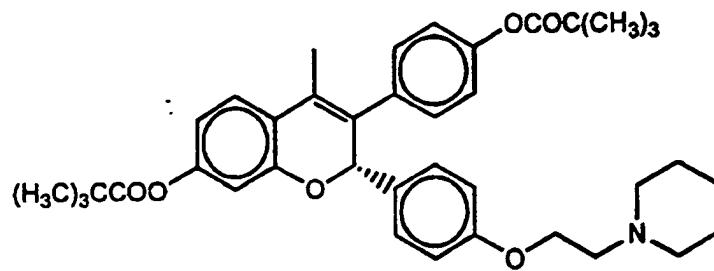
一個選自於下列群組中之性類固醇前驅物：脫氫異雄  
 固酮、脫氫異雄固酮硫酸鹽、雄-5-烯-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -二醇，以及可  
 於活體內被轉化成此等之任一者的化合物。

不同於習知技藝中已知之SERMs，一個依據上述化學  
 10 式I之SERM對於子宮內膜提供具有很少或無雌激素作用之  
 意想不到之優點。

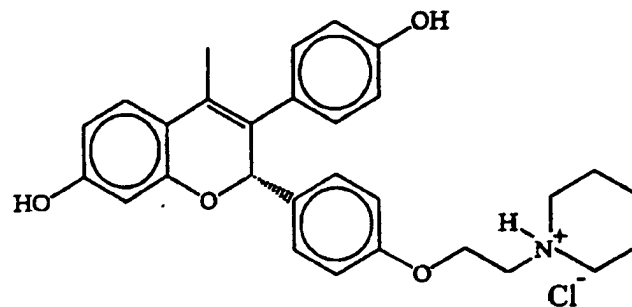
較佳的是本發明的SERM係為具有光學活性的且有大  
 於50%係為一個於2號碳原子上具有一絕對組態S之立體異  
 構物化合物。

15 對於安定性和水溶解性(生物可利用性)亦較佳的是，本  
 發明之SERM是為一個具有化學式I之化合物和一個選自於  
 下列群組中之酸所構成之鹽類：醋酸、己二酸、苯磺酸、  
 苯甲酸、d-樟腦磺酸、檸檬酸、延胡索酸、氫碘酸、氫溴  
 酸、氫氯酸、氫氯苯噻酸(hydrchlorothiazide acid)、羥基-  
 20 萘甲酸、乳酸、馬來酸、甲磺酸、甲基硫酸、1,5-萘二磺酸、  
 硝酸、棕櫚酸、三甲基乙酸、磷酸、丙酸、琥珀酸、硫酸、  
 酒石酸、對-酞酸、對-甲苯磺酸和戊酸。

本發明之一個較佳的化合物是PCT/CA96/00097 (WO  
 96/26201)中所報導之EM-800。EM-800的分子結構是：



本發明之另一個更佳的化合物是EM-652.HCl (也稱為EM-01538)：



5 EM-652.HCl對於其他SERMs(例如EM-800)提供額外之優點，因為其不含會增高血清中肉鹼(carnitine)含量之降低的危險性之三甲基乙醯基。

本發明之其他較佳的SERMs包含譚莫賽芬(Tamoxifen)((z)-2-[4-(1,2-二苯基-1-丁烯基)]-N,N-二甲基乙  
 10 烷胺)(可得自於Zeneca, UK)、多里米芬(Toremifene)(Orion-Farmos Pharmaceuticla, Finland或Schering-Plough)、爵洛賽芬(Droloxifene)和CP-336,156(順式-1R-[4'-吡咯啶並-乙氧苯基]-2S-苯基-6-羥基-1,2,3,4,-四氫萘D-(-)-酒石酸鹽)(Pfizer Inc., USA, 描述於US 5,889,042中)[另名為拉梭  
 15 福賽芬(Lasofoxifene)]、雷洛賽芬(Raloxifene)(Eli Lilly and Co., USA), LY 335563和LY353381(Eli Lilly and Co., USA 描述於WO 98/45287、WO 98/45288和WO 98/452864中)、

伊多賽芬(Idoxifene)( SmithKline Beecham, USA)、黎佛美洛賽芬 (Levormelxifene)(3,4- 反式 -2,2- 二 甲 基 -3- 苯 基 -4-[4-(2-(2-吡咯啉-1-基)乙氧基)苯基]-7-甲氧基苯並二氫哌喃)(Novo Nordisk, A/S, Denmark, 該化合物被揭露於Shalmi  
5 等人之WO 97/25034、WO 97/25037、WO 97/25038中；以及Korsgaard等人之WO 97/25036]、GW5638 (描述於Willson et al., Endocrinology, 138 (9), 3901-3911, 1997)和吲哚衍生物(被揭露於Miller等人之EP 0802183A1), 和TSE 424, 以及ERA 923(由 Wyrth Ayerst (USA)所研發且被揭露於  
10 JP10036347 (Ameican home products corporation), 及描述於WO 97/32837之非類固醇雌激素衍生物。本發明之其他SERMs被揭露於：WO 99/07377； WO 98/48806； EP 0823437A2； EP 0838464A1； EP 0834567A1； EP 0835868A1； EP 0792641A1； EP 0873992A1； 和EP 0895989A1。

15 可以採用任何為達所需要之有效性而被使用之SERM(如製造商所建議的來供治療及/或制止骨質疏鬆症或乳癌)。  
適當之劑量係為本技藝中已知的。任何其他商業上可購得之非類固醇性抗雌激素能夠依照本發明而被使用之。任何具有類似於SERMs之活性的化合物(例如：雷洛賽芬)可以  
20 被使用。

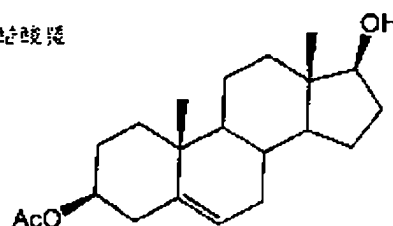
依照本發明被投藥之SERMs較佳地係以一劑量範圍為0.01至10 mg/kg體重/天(較佳是0.05至1.0 mg/kg), 每天為60毫克(尤其是每天20毫克)來投藥, 這對於一具平均體重且以口服來投藥之個體而言係較為理想的, 或以一劑量範圍在

0.03至3.0 mg/kg體重/天(較佳是0.015至0.3 mg/kg體重)，每天為20毫克(尤其是每天10毫克)，最為理想係對於一具平均體重且以非經腸道方式(例如肌肉內、皮下或經皮投藥)來投藥之個體而言係較為理想的。較佳地，SERMs是如下所述

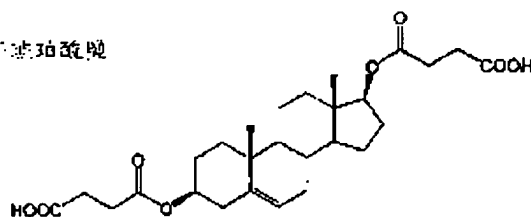
5 與一藥學上可接受之稀釋劑或載劑一起被投藥。

理想之性類固醇前驅物是脫氫異雄固酮(DHEA)(可得自於Diosynth Inc., Chicago, Illinois, USA)和其前驅藥(可得自於Steraloids, Wilton, New Hampshire, USA)、5-雄-3b,17b-二醇和其前驅藥雄-5-烯-3b,17b-二醇3-二醋酸鹽和雄-5-烯-10 -3b,17b-二醇二半琥珀酸鹽(可得自於Steraloids, Wilton, New Hampshire, USA)。

雄-5-烯-3b,17b-二醇3-二醋酸鹽



雄-5-烯-3b,17b-二醇二半琥珀酸鹽



性類固醇前驅物可以被配方為一種醇性凝膠，該凝膠含有2.0-10%之辛基-癸基甘油三酸酯(Neobee M-5); 10-20%  
15 之己二醇；2.0-10%之二甘醇單乙醚(Transutol)；2.0-10%之賽克洛美西康(cyclomethicone)(Dow Corning 345)；1.0-2%之羥基丙基纖維素(Klucel HF)。

載劑(供SERM或前驅物之用)也同時可以包含一般被

使用於製藥工業之各種不同的添加物。舉例而言，香料、抗氧化劑、香水、膠凝劑、稠化劑(例如羧基甲基纖維素)、表面活性劑、安定劑、保濕劑、調色試劑和其他類似之試劑可以存在。當活性成份被經皮投藥時，皮膚上之投藥位置應做變換以避免活性成份之過高的局部濃度及可能之由性類固醇前驅物之雄激素代謝物所致之皮膚和皮脂腺過度刺激。

於一供口服投藥之藥學組成物中，較佳地DHEA或其他前驅物之存在量係為，相對於組成物之總重量，一濃度介於5和98%重量百分比，更理想是介於50和98百分比，尤其是介於80和98百分比。一個單一之前驅物(如DHEA)可以為唯一之活性成份，或任擇地，數種前驅物及/或此等之類似物能夠被使用(例如：DHEA、DHEA-S、5-二醇之一組合，或是一個兩個或多個化合物可於活體內被轉化為DHEA、DHEA-S或5-二醇之化合物所構成之組合，或是一個由DHEA、5-二醇以及一個或多個此等之可於活體內被轉化為DHEA或5-二醇的類似物所構成之組合等等。DHEA之血液含量是為足夠劑量之終極指標，該指標考量了吸收和代謝上之個體差異。

理想地，治療醫師會(尤其於治療開始時)監測一病患個體之整體反應和DHEA之血清含量(相較於上述所討論之較佳的血清含量)，和監測病患對治療之整體反應，且當一病患之代謝或治療之反應是非正常時依需要來調整劑量。

依照本發明之治療是適合供無限定之持續治療。預期



的是，DHEA及/或5-二醇或其他前驅物之治療將單純維持DHEA含量於一範圍，該範圍近似於婦女停經前自然之狀態(血清濃度介於4和10毫克/每公升)，或自然之年輕成年男性(血清濃度介於4和10毫克/每公升)。

5           SERM化合物及/或性類固醇前驅物也能夠經由口服途徑被投藥，且可以配方以傳統的藥學賦形劑(例如噴灑乾燥的乳糖、微晶粒纖維素和硬脂酸鎂)而形成藥錠或膠囊來供口服投藥。

10           活性物質可被製造成藥錠或糖衣藥丸之核心，此係經由將之混合以固體、粉狀載劑物質(例如檸檬酸鈉、碳酸鈣或磷酸氫鈣)，及結合劑(例如聚乙基吡咯啶、明膠或纖維素衍生物)，亦可能同時添加潤滑劑(例如硬脂酸鎂、十二烷基硫酸鈉、“Carbowax”或聚乙二醇)。當然，就口服投藥之型態而言，改善味道之物質可被添加之。

15           作為進一步之形式，可以使用塞劑膠囊，例如硬明膠，和密合式軟明膠膠囊(含有一軟化劑或塑化劑，例如甘油)。

20           塞劑膠囊含有之活性物質理想是呈顆粒型態，例如佳有填充物之混合物，該填充物係如乳糖、蔗糖、甘露醇、澱粉(例如馬鈴薯澱粉或支鏈澱粉)、纖維素衍生物或高分散度之矽酸。於軟明膠膠囊中，活性物質理想是被溶解或懸浮於適當之液體(例如蔬菜油或液態聚乙二醇)內。

乳液、油膏、凝膠或乳霜形式是可能的且應被徹底按摩入皮膚內至沒有多餘留存可清晰看見者，且皮膚上該區域不應被沖洗直至絕大部份之經皮膚滲透已被達成，理想

地是至少4小時，且更理想是至少6小時。

一經皮膚貼劑可以依照已知之技術被使用來傳遞前驅物或SERM。其一般被施用歷時一更長之時間，例如1至4天，但通常是使活性成份接觸一較小表面區域，而允許一  
5 慢而恆定之活性物質傳遞。

許多已被研發且被使用之經皮藥物傳遞系統是適合供傳遞本發明之活性物質。釋放速率典型地是由一基質擴散來控制，或是藉由使活性成份通經一控制膜。

經皮裝置之機械方面是本技藝所熟知的且被闡釋於，  
10 例如，美國專利案5,162,037、5,154,922、5,135,480、4,666,441、4,624,665、3,742,951、3,797,444、4,568,343、5,064,654、5,071,644、5,071,657，此等之揭露內容於此併入本案以為參考文獻。額外之背景技藝是由歐洲專利案0279982和英國專利申請案2185187所提供。

15 該裝置可為本技藝中已知之任何一般型態，這包含黏著性基質和蓄積槽-型經皮傳遞裝置。該裝置可以包含含有藥物之基質，該基質結合有會吸收活性成份及/或載劑之纖維。於一蓄積槽型之裝置中，該蓄積槽可被定義為一個無法為載劑和活性成份所滲透之聚合物膜片。

20 於一經皮裝置中，該裝置本身維持活性成份與所欲之局部化皮膚表面相接觸。於如此之一裝置中，相較於一乳霜或膠體，供活性成份用之載劑之黏度係是較不需考慮的。一供一經皮裝置用之溶劑系統可以包含，舉例而言，油酸、直鏈醇乳酸酯和二丙二醇，或於本技藝中已知之其他

溶劑系統。該活性成份能夠被溶解或懸浮於該載劑中。

對於貼附至皮膚，一經皮貼劑可以固定至一於中央處被穿打有一洞之外科黏貼膠帶上。該黏貼物較佳地被覆蓋有一可撕性護膜以保護該黏貼物至使用前。適用於該可撕性護膜之典型材料包含聚乙烯和聚乙烯塗覆之紙，且較佳為矽酮-塗覆的以供容易移除。於使用該裝置上，僅是將該可撕性護膜撕除，然後將之黏貼至病患之皮膚上。於美國專利案5,135,480（該案之揭露內容於此併入本案做為參考文獻）中，Bannon等人描述一任擇性裝置，該裝置具有一用以固定該裝置至皮膚之非黏貼構件。

本發明之經皮或經由黏膜的傳遞系統也能夠被使用為一全新或改良之傳遞系統以供用於制止及/或治療肥胖。

#### 本發明方法之有效性的實施例

##### 實施例1

15 使用本發明化合物之35週之處理對於切除卵巢的大鼠之體脂肪和體重之作用

##### 材料與方法

##### 動物及治療

10至12週大之雌性司培瑞格-多利(Sprague-Dawley)大鼠 (Crl:CD(SD)Br)(Charles River Laboratory, St-Constant, Canada)體重約225-250公克，於開始處理時使用。動物適應周圍環境(溫度：22 ± 3 °C；濕度：50 ± 20%；12小時-光亮-12小時-黑暗之循環，光量於上午07:15)一週於試驗開始前。動物每3隻一籠，且允許其等自由飲水和一丸狀檢驗合格

之齧齒動物飼料(製造商：Lab Diet 5002, Ralston Purina, St-Louis, MO)。試驗之進行是以加拿大動物管理委員會(CCAC)核准之設備，並依照CCAC之實驗動物照料與使用指導。

5           276隻大鼠被隨機地分組，至每組12隻動物的23組如下  
：1)卵巢完整鼠對照組；2)OVX對照組； 3-7)OVX + EM-800  
(0.01、0.03、0.1、0.3或1 mg/kg)；8-12) OVX + 雷洛賽芬(0.01  
、0.03、0.1、0.3或1 mg/kg)；13-17) OVX + 檀莫賽芬(0.01  
、0.03、0.1、0.3或1 mg/kg)；18-22)OVX + EM-776 (0.01  
10   、0.03、0.1、0.3或1 mg/kg)；23) OVX + 雌二醇( $E_2$ ，植入  
物)。試驗之第1天，條件項目符合之群組的動物於愛舒活  
能(Isoflurane)麻醉下來進行兩側卵巢切除(OVX)。一個含雌  
二醇( $E_2$ )之矽橡膠植入物是經由皮下至第13組之每隻動物的  
背部區域。植入物內之 $E_2$ 濃度和大小如下： $E_2$  ( $E_2$ ：膽固  
15   醇(1:100, 重量:重量))，0.5公分(長度)，0.125英吋(外圍直  
徑)和0.062英吋(內圍直徑)。於試驗過程，植入物內之 $E_2$ 於  
每個月更換。使用EM-800、雷洛賽芬、檀莫賽芬、和EM-766  
或載劑(4%乙醇、4%聚乙二醇-600、1%明膠或0.09%氯化鈉  
)之處理於試驗之第2天開始。適當之化合物或載劑每日予  
20   以給藥一次，此係藉由口服硬性餵食每隻大鼠0.5毫升持續  
37週。最後一次給藥後大約24小時，被過夜絕食之動物是  
藉由於愛舒福能麻醉下從腹部主動脈處予以放血而將之殺  
死。

#### 脂肪體組成物

處理35週後，每隻大鼠於愛舒福能麻醉下做其全身之骨骼(包括其右股骨)之掃描，該掃描是使用雙倍數能量x射線吸光分析儀(DEXA; QDR 4500A, Hologic, Waltham, MA)和一局部高解析度掃描軟體。使用於全身之掃描區域大小是30.492 x 17.912公分，解析度是0.1512 x 0.064公分且掃描速度是每秒2.499毫米。全身之體脂肪組成被測定之。

### 統計分析

數據表示是以平均 ± 標準差(SEM)。統計顯著性之決定是依據杜肯-克拉瑪氏(Duncan-Kramer)(1956)之多重範圍測試。

### 結果

當以DEXA分析儀於活體內來作測量，增加EM-800、雷洛賽芬、檀莫賽芬和EM-776之每日口服劑量對於體脂肪的作用係圖解於第1圖中。能夠看出EM-800於最低劑量0.01 mg/kg下會降低78%之OVX誘導的體脂肪刺激，雷洛賽芬要比EM-800之活性為低，而EM-776(其為EM-800的鏡像立體異構物)不具顯著差異之作用。於表1中所報導的是，EM-800或雷洛賽芬對於卵巢切除的大鼠之體重之作用。比較是以卵巢完整的大鼠和卵巢切除的對照組大鼠來進行。能夠看出小劑量之EM-800達到之重量控制係類似於明顯較高數量之雷洛賽芬(亦即0.03 mg/kg之EM-800達到類似於0.3 mg/kg之雷洛賽芬所得的結果)。此二者於較高之劑量下實質地逆轉卵巢切除所誘導之體重增加。

表 1

| 組別                       | 在Necropsy下之體重 |
|--------------------------|---------------|
|                          | 公克            |
| 卵巢完整的大鼠對照組               | 356 ± 16**    |
| OVX對照組                   | 491 ± 16      |
| OVX + EM-800 (0.01毫克/公斤) | 385 ± 17**    |
| "    (0.03毫克/公斤)         | 364 ± 10**    |
| "    (0.1毫克/公斤)          | 369 ± 17**    |
| "    (0.3毫克/公斤)          | 359 ± 7**     |
| "    (1毫克/公斤)            | 368 ± 6**     |
| OVX + 雷洛賽芬(0.01毫克/公斤)    | 439 ± 13**    |
| OVX + 雷洛賽芬(0.03毫克/公斤)    | 451 ± 14**    |
| OVX + 雷洛賽芬(0.1毫克/公斤)     | 389 ± 14**    |
| OVX + 雷洛賽芬(0.3毫克/公斤)     | 367 ± 9**     |
| OVX + 雷洛賽芬(1毫克/公斤)       | 342 ± 12**    |

## 實施例 2

11個月之組合處理使用本發明之化合物

### 1. 測試材料

#### 5 1.1 測試化合物：

DHEA：可購自於Steraloids Inc. Wilton, NH. Lot:

H137：

EM-800：是合成於UCPO部門，Lab. Of Mol. Endo.,  
CHUL.

#### 10 1.2 載劑

a) 明膠：Lab-Grade, ACP Chemicals Inc., Montreal,  
Qc.

Lot # F0195

b) 乙醇：Commercial Alcohols Inc., Brampton,  
Ontario.

批號編號11296

c) 聚乙二醇-600 (PEG-600) : Omega Chemical  
Company Inc., Levis, Quebec. 批號編號  
00-0117-EZ

d) 生理鹽水 : 0.9 %氯化鈉

5 灌注 USP

Abbot Laboratories Limited, St-Laurent, Qc..

e) 丙二醇(1,2-丙烷二醇, PPG) :

Sigma Chemical Co., St-Louis, MO.

f) 載劑1 : 供皮下注射之4%乙醇-4% PEG-600-1%明  
10 膠-0.9%氯化鈉-水。

g) 載劑2 : 供局部使用之50%乙醇-50%PPG。

## 2. 測試動物之特徵 :

2.1 品種 : *Rattus norvegicus*

2.2 品系 : 司培瑞格-多利大鼠 (CrI : CD® (SD) BR  
15 VAF/Plus™)

2.3 性別 : 雌性

2.4 供應源 : Charles River Canada Inc.

188 Lasalle Road

St. Constant, Quebec

20 1-800-561-4975

2.5 劑量起始時之年齡 : 第18-29組之大鼠是16週大。

2.6 動物房和飼養

a) 動物房 : 大鼠每2-3隻關1籠之鞋盒。所有之鼠籠清  
楚標記有一箱籠標記註明實驗編號、組別號碼和

動物編號。

b)於試驗中，動物房之環境狀態將予以調控(目標狀態：溫度20至25℃；濕度：50 ± 20 %)。光週期為12小時亮：12小時暗。

5 c)食物和飲水：啮齒動物飼料(丸粒)，和自來水的提供是採不限制之供給。

2.7 適應時間：至少兩週。

2.8 隨機分散：於抵達時大鼠被隨機地指定至每一組。

2.9 安樂死之方法：愛舒福能誘導的全身麻醉。

### 10 3. 方法和實驗設計

|              |                        |
|--------------|------------------------|
| 1 卵巢完整之大鼠    | 11隻大鼠/每組               |
| 2 OVX 對照組    | 共44隻大鼠                 |
| 3 OVX + DHEA | 12.5毫克                 |
| 4 OVX + DHEA | 12.5毫克+EM-800 (100 µg) |

#### 15 3.1 載劑和測試物件之製備

a)EM-800之配製：

EM-800 或與 EM-776 此二者將被溶解於 EtOH:PEG-600 (1:1)內，並於 Fisher Scientific Stirring Hot Plate上加以搖晃，然後，1% GNS將被  
20 添加至所需體積。

b)DHEA之配製：

DHEA經由搖晃處理被溶解於50%乙醇、50% PPG  
。

#### 3.2 動物之製備和處理：



動物將如項目6.1所示每日被處理一次。

配製於50%乙醇、50% PPG內之DHEA將呈每日一次(I.D.)且體積為0.5毫升而藉由經皮施用(P.C.)至對應之動物。

5 EM-800將被配製於4 %乙醇、4 %PEG-600、1 %明膠、0.9 %氯化鈉內，然後呈每日一次(S.C.，I.D.)且體積為0.5毫升而經皮下注射被投藥至對應之組別的動物體內。

10 大鼠當其未被皮下注射以任何之測試化合物時，係被皮下注射以一體積為0.5毫升的載劑1，且當大鼠無5-DIOL或DHEA之處理時被局部給予0.5毫升之載劑2。

### 3.3 觀察和量測

#### a)臨床觀察：

15 每隻大鼠將被觀察至少每日一次以供一般性之表示。

#### b)體重：

大鼠將於試驗開始和結束時，以及於處理期間中每隔三個月被稱重之。

### 20 4.結果：

如顯示於表2，在每日劑量為12.5毫克之DHEA處理的作用是降低87%之OVX刺激產生之體重。以每日劑量100  $\mu$ g之EM-800投藥產生協同性作用，且對於OVX刺激產生之體重得到一為140 %的抑制作用。

25

表2

| 處理                                               | 總體重(公克)      |
|--------------------------------------------------|--------------|
| 卵巢完整之大鼠                                          | 479.5 ± 20.4 |
| OVX                                              | 567.4 ± 25.7 |
| OVX + DHEA (12.5 mg/日/大鼠)                        | 490.8 ± 24.1 |
| OVX + DHEA (12.5 mg/日/大鼠) + EM-800 (100 µg/日/大鼠) | 444.5 ± 20.5 |

### 實施例 3

使用EM-652.HCl之20天處理對於切除卵巢的大鼠之體脂肪和體重參數之作用

#### 5 材料與方法

##### 動物及處理

於處理開始時係使用8至10週大之雌性司培瑞格-多利 (Sprague-Dawley) 大鼠 (Crl:CD(SD)Br)(Charles River Laboratory, St-Constant, Canada)體重約200-225公克。於試驗開始前，令動物適應周圍環境(溫度：22 ± 3 °C；10小時-光亮-14小時-黑暗之循環，燈量於06:00h)歷時一週。動物個別飼養於一般設計之不鏽鋼籠，且允許其等自由飲水和一高碳水化合物之混合飼料，該飼料含有（公克/每100公克）：玉米澱粉，31.2；葡萄糖，31.2；酪蛋白，20.0；玉米油，6.4；dl-甲硫胺酸，0.3；混合維生素，1.0；AIN-76混合礦物質，4.9；和纖維素，5.0。試驗之進行是以加拿大動物管理委員會(CCAC)核准之設備，並依照CCAC之實驗動物照料與使用指導。

40隻大鼠被隨機地分組至每組10隻動物的4組如下：1) 卵巢完整鼠對照組；2)OVX對照組； 3)OVX + EM-652.HCl

(0.5毫克/每隻大鼠，~2.5毫克/每公斤)； 4) OVX +雌二醇(E<sub>2</sub>，植入物)。試驗之第1天，條件項目符合之群組的動物於愛舒活能麻醉下被進行兩側卵巢切除(OVX)。一個雌二醇(E<sub>2</sub>)之矽橡膠植入物經由皮下被插入至第4組之每隻動物的背部區域。植入物(於初步試驗被選定以提供E<sub>2</sub>之生理含量)具有下列膽固醇濃度和大小：E<sub>2</sub>：膽固醇(1:50，重量：重量))，0.5公分(位於矽橡膠管內之稀釋之類固醇的長度)，0.125英吋(矽橡膠管之外圍直徑)和0.062英吋(矽橡膠管之內圍直徑)。在皮下插入至動物體內之前，雌二醇植入物於37°C下被浸泡於0.9 %氯化鈉溶液內過夜後被使用之。僅含有EM-652.HCl或載劑(0.4 %甲基纖維素溶於水中)本身之處理係開始於試驗起始之第2天。本案化合物或載劑係以每日一次藉由口服硬性餵食0.5 ml/大鼠歷時共20天。體重和食物攝取量是每2天記錄一次。

於最後一次給藥之後大約24小時，經隔夜絕食之動物在利用易他明-來拉辛(ketamine-xylazine)之麻醉下以心臟穿刺將血液抽出。血液還有白色和棕色脂肪組織被收集之。

#### 能量、脂肪和蛋白質量測中之體重、食物攝取和身體增加

體重、食物攝取身體增加之能量、脂肪和蛋白質之定量是依照 Deshaies et al., Am. J. Physiol., 1997; 273, E355-E362 (1997)。

#### 組織之測定

脂蛋白脂肪酶活性之測定是依照 Deshaies et al., Am. J.

Physiol., 1997; 273, E355-E362 (1997)。

## 結果

可以由第2A和C圖看出20天之EM-652.HCl處理係完全逆轉4倍之體重增加和3倍之脂肪增加，該作用是分別的，  
5 觀察係於卵巢切除之後，而此作用是較不顯著於蛋白質的增加(第2B圖)。雌二醇具有較小之作用。累積性食物攝取是顯示於第3圖。處理作用反應於體重之增加。雌二醇部份地制止食物攝取之增加係由於卵巢切除，而EM-652.HCl之作用較雌二醇更有效，其降低食物攝取至一數量是較卵巢  
10 無切除之動物更低。

主要之能量平衡變異是摘要說明於表3。卵巢切除(Ovx)增加之消化性能量攝取為44 %。雌二醇減低Ovx動物之能量攝取，但總能量攝取維持17 %係高於卵巢無切除動物之總能量攝取，而EM-652.HC則完全制止Ovx誘導所增加之能  
15 量攝取。能量增加與食物攝取成正比。再度的是，雌二醇減低能量增加(其達到之程度係非顯著不同於卵巢無切除動物之能量增加)，但EM-652.HCl則較為有效(其顯著不同於雌二醇)。

食物之利用效率是由Ovx所增加，其降低係發生於Ovx動物  
20 由E<sub>2</sub>所導致，和進一步之降低是由EM-652.HCl所導致。

身體能量經由蛋白質之30 %的增加於卵巢無切除手術之後同時還有身體能量經由脂肪之80 %的增加皆完全由EM-652.HCl處理所逆轉該等可見於第4A和B圖。如顯示於第5A圖，胰島素抗性之產生於Ovx動物體之確認是經由出

現fasting高血中胰島素症狀(其通常正比於胰島素抗性之程度)和fasting高血糖症狀(一回應係為損失之胰島素效能該效能使胰島素能維持正常之血糖濃度)。雌二醇和EM-652.HCl二者皆可制止Ovx誘導之胰島素抗性。

5           第6A和6C圖顯示OVX增加鼠蹊部和腹膜之後脂肪組織的質量(數量)該等代表觀察之總體脂肪的變化。此變化之完全破壞是由EM-652.HCl處理所致。而雌二醇，其作用則較不重要。相同之作用方式顯示於第6B和6D圖該處有脂蛋白脂肪酶之酵素活性的結果報告。此酵素調控血管內三酸  
10 甘油酯之水解及因此之所有脂肪酸進入至脂肪組織的儲存。

棕色脂肪組織是一主要之產熱作用組織於齧齒動物體。卵巢切除手術顯示一不同之型態於肩胛骨之間之棕色脂肪組織其不同係相較於白色脂肪組織。棕色脂肪組織的重  
15 量是兩倍增加(第7A圖)係相較所觀察於白色脂肪組織。然而，蛋白質含量(第7B圖)和脂蛋白活性(第7C圖)是分別減低33和30 %於卵巢切除之後。就此三個參數，EM-652.HCl處理是完全逆轉卵巢切除之作用。

比目魚肌(Soleus)之重量通常是一很好的指標係對生物體之蛋白質質量的狀態。如所預期，比目魚肌之重量，  
20 如顯示於第8圖，其增加係由於卵巢切除(食物攝取之增加產生增加的能量儲存在脂肪和蛋白質兩方面)。雌二醇和EM-652.HCl之處理二者皆制止肌肉重量的增加。於肌肉中之脂蛋白脂肪酶是通常正面相關於胰島素敏感性(敏感性

愈好，肌肉中之脂蛋白脂肪酶愈多)。卵巢切除減低比目魚肌之脂蛋白脂肪酶活性，其為產生胰島素抗性之一間接證據。雌二醇和EM-652.HCl之處理二者皆制止肌肉之脂蛋白脂肪酶的減少。

| 表3<br>能量平衡                                                                  |      |                   |                   |                   |
|-----------------------------------------------------------------------------|------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 卵巢之狀態<br>處理                                                                 | 卵巢完整 | 卵巢切除              |                   |                   |
|                                                                             |      | 無                 | E <sub>2</sub>    | EM-652            |
| 消化性能量之攝取(千焦耳)                                                               | 4708 | 7658 <sup>a</sup> | 5511 <sup>a</sup> | 4479 <sup>b</sup> |
| 能量之增加(千焦耳)                                                                  | 532  | 1677 <sup>a</sup> | 903               | 278 <sup>b</sup>  |
| 顯示之能量消耗(千焦耳)                                                                | 4176 | 5081 <sup>a</sup> | 4609 <sup>a</sup> | 4201 <sup>b</sup> |
| 食物之利用效率(%)                                                                  | 10.2 | 24.1 <sup>a</sup> | 15.9              | 5.9 <sup>b</sup>  |
| <sup>a</sup> 與卵巢完整之差異，p<0.05 <sup>b</sup> 與卵巢切除+E <sub>2</sub> 處理之差異，p<0.05 |      |                   |                   |                   |

5

消化性能量之攝取是所有攝入能量之總和於20天之處理期間內(一併計算的有不可消化物例如纖維)。

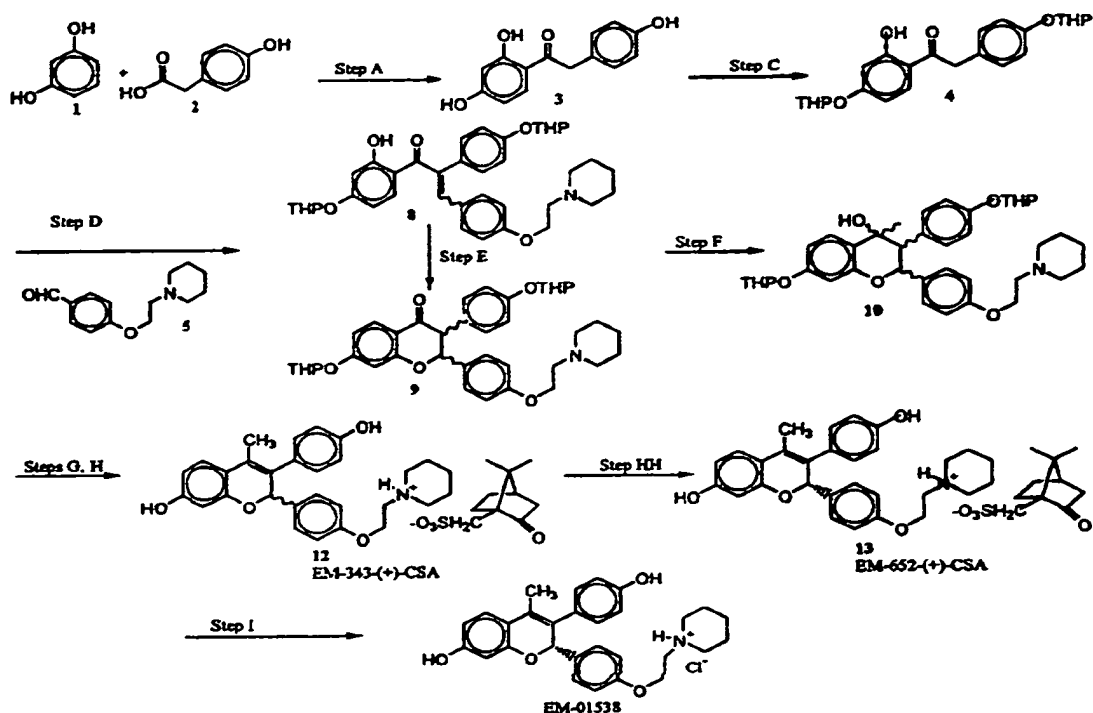
能量增加是以千焦耳之計量儲存為脂肪+蛋白質於20天之處理期間內。

- 10      顯示之能量消耗的計量係消耗於代謝所需和運動力(計算是由能量之攝取和能量之增加)。預期量會較高是當無脂肪的質量較高(例如卵巢切除之動物)。

實施例4

合成本發明理想化合物之實施例

- 15      合成(S)-(+)-7-羥基-3-(4'-羥基苯基)-4-甲基-2-(4''-(2'''-哌啶基乙氧基)苯基)-2H-1-1苯基吡喃氫氯酸鹽  
EM-01538 (EM-652, HCl)



步驟A： $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ，甲苯； $100^\circ\text{C}$ ；1小時。

步驟C：3,4-二氫基吡喃，對-甲苯磺酸 單一結晶水，醋酸乙酯； $25^\circ\text{C}$ 於氮氣之下，16小時，然後於異丙醇中結晶。

5 步驟D,E和F：

(1)六氫吡啶，甲苯，迪恩&司塔克裝置(dean & Stark apparatus)，迴流於氮氣之下，(2)1,8-二咪唑雙環[5, 4, 0]undec-7-ene，DMF(二甲基甲醯胺)，迴流3小時；

(3) $\text{CH}_3\text{MgCl}$ ，THF (四氫呋喃)， $-20$  至 $0^\circ\text{C}$ 然後回溫至室溫

10 24小時；

步驟G和H：(1S)-(+)-10-樟腦磺酸，丙酮，水，甲苯，室溫，48小時。

步驟HH：95 %乙醇， $70^\circ\text{C}$ ，然後室溫下3天。

步驟HHR：母溶液再循環然後沖洗之步驟HH

15 (S)-10-樟腦磺酸，迴流；36小時，然後室溫下16小時。

步驟I：

(1) DMF(溶液)，碳酸鈉，醋酸乙酯；

(2) 乙醇，稀釋之氫氯酸；

(3) 水。

5 合成2-四氫吡喃基氧-4-羥基-2'-(4''-四氫吡喃基氧苯基)乙  
 醯苯 (4)。—2,4-二羥基-2'-(4''-羥基苯基)乙醯苯3 (97.6克  
 ，0.4莫耳)(可購自製造商：Chemsyn Science Laboratories,  
 Lenexa, Kansas)溶於3,4-二氫吡喃(218毫升，3.39莫耳)和醋  
 酸乙酯(520毫升)然後加入對-甲苯磺酸 單一結晶水(0.03克  
 10 ，0.158毫莫耳)於約25°C。反應混合物攪拌於氮氣下無另外  
 之加熱共16小時。然後混合物之沖洗係以一溶液其為碳酸  
 氫鈉(1克)和氯化鈉(5克)溶於水(100毫升)。分層區分後有機  
 層之沖洗係以高濃度食鹽水(20毫升)。每一次沖洗是以50  
 毫升之醋酸乙酯再萃取。所有之有機層合併然後過濾通過  
 15 硫酸鈉。

溶劑(約600毫升)之移除係以蒸餾法於大氣壓力下且有  
 異丙醇(250毫升)之添加。添加之溶劑(約300毫升)以蒸餾除  
 去於大氣壓力下且有異丙醇(250毫升)之添加。溶液冷卻於  
 大約25°C且加以攪拌然後於12小時之後，結晶之固體進行  
 20 過濾，異丙醇沖洗然後乾燥(116.5克，70%)。

合成4-羥基-4-甲基-2-(4'-[2''-六氫吡啶基-]乙氧基)苯基  
 -3-(4'''-四氫吡喃氧)苯基-7--四氫吡喃氧-苯并二氫吡喃  
 (10)一溶液含有2--四氫吡喃氧-4-羥基-2'-(4''-四氫吡喃氧  
 苯基)乙醯苯4(1公斤，2.42莫耳)，4-[2-(1-六氫吡啶基)乙氧



基]苯甲醛5 (594克, 2.55莫耳)(可購自製造商: Chemsyn Science Laboratories, Lenexa, Kansas)和六氫吡啶(82.4克, 0.97莫耳)(可購自製造商: Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, Wis.)溶於甲苯(8公升)迴流於氮氣之下係使用  
5 迪恩&司塔克裝置(dean & Stark apparatus)直至一相當量之水(44毫升)的收集完成。

甲苯(6.5公升)移除自溶液是以蒸餾於大氣壓下。添加DMF(二甲基甲醯胺)(6.5公升)和1,8-二咪唑雙環[5, 4, 0]undec-7-ene(110.5克, 0.726莫耳)。溶液進行搖晃約8小時  
10 於室溫下以進行異構化使Chalcone 8轉變成Chalcone 9然後加入至一混合物含有水和冰(8公升)及甲苯(4公升)。各分層分開且甲苯層之沖洗是以水(5公升)。合併之溶液沖洗液之萃取是以甲苯(3 x 4公升)。合併之甲苯萃取液最後以高濃度食鹽水(3 x 4公升), 濃縮於大氣壓力下至5.5公升然後冷卻  
15 至-10°C。

連續之外部冷卻和攪拌於氮氣下, 一3重量莫耳濃度(M)之溶液: 甲基鎂氯溶於THF(四氫呋喃)(2.5公升, 7.5莫耳)(可購自製造商: Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, Wis.)被加入, 維持溫度於0°C以下。於所有格里那試劑  
20 (Grinard reagent)添加後, 外部冷卻移除然後混合物回溫至室溫。混合物攪拌於此溫度下共約24小時。

混合物再次冷卻至約-20°C且持續以外部冷卻及攪拌, 飽和之氯化氮溶液(200毫升)以緩慢添加, 維持溫度於-20°C以下。混合物攪拌2小時然後添加飽和之氯化氮溶液(2公

升)和甲苯(4公升)然後搖晃5分鐘。各分層分開且溶液層之萃取是以甲苯(2 x 4公升)。合併之甲苯萃取液是以稀釋之氫氯酸直至溶液變成均一然後以高濃度食鹽水(3 x 4公升)。甲苯溶液最後濃縮於大氣壓力下至2公升。此溶液直接使用於

5 下一步驟。

合成(2R,S)-7-羥基-3-(4'-羥基苯基)-4-甲基-2-(4''-[2'''-六氫吡啶基]乙氧基)苯基)-2H-1-苯并二氫吡喃 (1S)-10-樟腦磺酸鹽(±12)。

於4-羥基-4-甲基-2-(4'-[2''-六氫吡啶基-]乙氧基)苯基

10 -3-(4'''-四氫吡喃氧)苯基-7--四氫吡喃氧-苯并二氫吡喃(10)之甲苯溶液中加入丙酮(6公升)，水(0.3公升)和(S)-10-樟腦磺酸(561克，2.42莫耳)(可購自製造商：Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, Wis.)。該混合物攪拌於氫氣之下48小時之後固體之(2R,S)-7-羥基-3-(4'-羥基苯基)

15 )-4-甲基-2-(4''-[2'''-六氫吡啶基]乙氧基)苯基)-2H-1-苯并二氫吡喃(1S)-10-樟腦磺酸鹽(12)進行過濾，沖洗是以丙酮然後乾燥(重量883公克)。此產物使用於下一個(HH)步驟無需進一步之純化。

合成(2S)-7-羥基-3-(4'-羥基苯基)-4-甲基-2-(4''-[2'''-六氫吡啶基]乙氧基)苯基)-2H-1-苯并二氫吡喃 (1S)-10-樟腦磺酸鹽(13), (+)-EM-652(1S)-CSA 鹽)。一(2R,S)-7-羥基-3-(4'-羥基苯基)-4-甲基-2-(4''-[2'''-六氫吡啶基]乙氧基)苯基)-2H-1-苯并二氫吡喃 (1S)-10-樟腦磺酸鹽(±12)(759克)溶於95%乙醇之懸浮液進行加熱並攪拌至約70°C且固體已

20

溶解。溶液可以冷卻至室溫並加以攪拌然後灑下一些  
 (2S)-7-羥基-3-(4'-羥基苯基)-4-甲基-2-(4''-[2'''-六氫吡啶  
 基]乙氧基)苯基)-2H-1-苯并二氫吡喃 (1S)-10-樟腦磺酸鹽  
 13的晶粒。該溶液攪拌於室溫下總計約三天。晶體過濾，  
 5 沖洗是以95 %乙醇然後乾燥(291克，76 %)。產物之產率是  
 94.2%其純度是98.9 %。

合成 (S)-(+)-7-羥基-3-(4'-羥基苯基)-4-甲基  
 -2-(4''-[2'''-六氫吡啶基]乙氧基)苯基)-2H-1-苯并二氫吡喃  
 氫氯酸 EM-01538 (EM-652，氫氯酸)化合物13之一懸浮液  
 10 (EM-652-(+)-CSA鹽，500毫克，0.726毫莫耳)溶於二甲基甲  
 醯胺(11  $\mu$ L，0.15毫莫耳)加入一0.5重量莫耳濃度(M)液態碳  
 酸鈉溶液(7.0毫升，3.6毫莫耳)然後進行攪拌15分鐘。懸浮  
 液加入醋酸乙酯(7.0毫升)然後進行攪拌4小時。有機層之  
 沖洗是以一液態飽和碳酸鈉溶液(2 x 5毫升)和高濃度食鹽  
 15 水(1 x 5毫升)再乾燥於硫酸鎂之上，而濃縮。於一溶液為產  
 生之粉紅色泡沫(EM-652)溶於乙醇(2 毫升)加入2N之氫氯  
 酸(400 mL，0.08毫莫耳)，攪拌1小時，加入蒸餾水(5毫升  
 )，於空氣中乾燥然後於一高真空(65 $^{\circ}$ C)產生一乳霜狀粉末  
 (276毫克，77 %)：細純白粉末；溶於甲醇10毫克/毫升。掃  
 20 瞄卡路里儀：熔解峰值起動於219 $^{\circ}$ C，DH=83 J/g；  
 [ $\alpha$ ] $^{24}_{\text{D}}$ =154 $^{\circ}$ C； $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta$ (ppm)1.6  
 (broad, 2H, H-4'''), 1.85 (broad, 4H, H-3'''' and 5''''), 2.03  
 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.0 and 2.45 (broad, 4H, H-2'''' and 6''''), 3.47  
 (t, J=4.9Hz, 2H, H-3'''), 4.26 (t, J=4.9Hz, 2H, H-2'''), 5.82

(s, 1H, H-2), 6.10 (d, J=2.3Hz, 1H, H-8), 6.35 (dd, J=8.4, 2.43 Hz, 1H, H-6), 6.70 (d, J=8.6 Hz, 2H, H-3', and H-5'), 6.83 (d, J=8.6Hz, 2H, H-2'' and H-6'') ;  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), 75 MHz) 計 ppm 14.84, 22.50, 23.99, 54.78, 57.03, 62.97, 81.22, 104.38, 109.11, 115.35, 116.01, 118.68, 125.78, 126.33, 130.26, 130.72, 131.29, 131.59, 134.26, 154.42, 157.56, 158.96, 159.33。元素組成物：C, H, N, Cl：理論值：70.51, 6.53, 2.84, 7.18, %, 實際值：70.31, 6.75, 2.65, 6.89 %。

10 實施例5顯示制止LHRH-A誘導之脂肪增加其係以EM-652.HCl，其為一本發明之化合物，單獨或組合有DHEA，其為一性荷爾蒙前驅物，於卵巢完整之雌性大鼠。能夠看見的是6個月大之LHRH-A處理顯著增加卵巢完整之雌性大鼠之58 %體脂肪百分比，然而於EM-652.HCl或DHEA同  
15 時投藥，此增加分別僅為35 %和19 %。組合兩藥物，觀察到無脂肪增加於LHRA-A處理之後。

於實施例6，制止肥胖產生於雌性大鼠在20天之期間內是顯現的。卵巢切除增加總體脂肪和腹膜後脂肪組織之百分比分別是20%和68%。這些增加被制止且甚至體脂肪和腹膜後  
20 脂肪組織減少是由投藥：EM-652.HCl、雌二醇、DHEA或組合之EM-652.HCl與DHEA或EM-652.HCl與雌二醇產生分別為46 %，46 %，59 %，56 %，和45 %之減少於體脂肪方面，及產生分別為59 %，78 %，75 %，69 %，和68 %之減少於腹膜後脂肪組織方面。一類似之試驗顯示於實施例7。

於此實施例中，制止肥胖是追蹤於34週然後體脂肪和腹膜後脂肪組織之百分比是大約增加60 %經由卵巢切除。此增加之制止是由投藥：ethynyl雌二醇，雷洛賽芬(EM-1105)，EM-652.HCl(EM-1538)，DHEA或EM-652.HCl與DHEA之

5 組合。

實施例8A(雄性)和實施例8B(雌性)的結果報告數據是本發明之效力於制止和治療肥胖。於瘦和肥胖之盧克(Zucker)雄性和雌性大鼠進行投藥：EM-652.HCl 2.5毫克/每公斤/每天共20天。制止之模式是以無脂肪之瘦大鼠代表而處理之模式是以原來就肥胖之大鼠代表。數據為體重之增加，脂蛋白脂肪酶活性於白色腹膜後之脂肪組織與比目魚肌，還有血漿之胰島素、葡萄糖、總膽固醇、和三酸甘油酯濃度均結果報告於表7為雄性和表8為雌性動物(參閱實施例3有關該等參數之顯著性說明)。

15 抗雌激素EM-652.HCl之顯著降低體重增加是38 %於無脂肪之瘦雄性大鼠和35 %於肥胖之雄性大鼠而脂蛋白脂肪活性於白色腹膜後之脂肪組織與比目魚肌無任何變化於兩種不同之性別。血漿胰島素的降低是35 %，57 %和48%分別為瘦的雄性大鼠，肥胖的雄性大鼠和瘦的雌性大鼠，而肥胖之雌性大鼠顯示一較高濃度之胰島素，且EM-652.HCl無顯著之作用。血漿膽固醇於肥胖組中較高也是會受EM-652.HCl投藥所降低。血清葡萄糖不受EM-652.HCl處理之影響。

於實施例9中EM-652.HCl，DHEA或二者之組合的作用

於卵巢完整或卵巢切除之雌性大鼠該大鼠係給予一富含蔗糖和脂肪之食物的結果報告是作用產生於總重量、重量和鼠蹊部及腹膜後之白色脂肪組織，棕色脂肪組織，比目魚肌和股肌外側肌肉(VLM)的脂蛋白活性。血漿胰島素、葡萄糖、總膽固醇、三酸甘油酯和leptin，及肝臟膽固醇和三酸甘油酯也一併有結果報告。

實施例10結果報告的是作用產生於重量增加和於脂質-脂蛋白質代謝於大鼠的處理之後該處理係以不同之選擇性雌二醇受體調節劑該等係描述於文獻(為ERA-923，拉梭福賽芬 Lasofoxifene，LY353381和雷洛賽芬)還有EM-652.HCl，其為本發明之理想化合物。測試化合物之投藥是以口服強行餵入共20天(0.5毫克/每隻大鼠餵給之每一種化合物)溶於0.4 %甲基纖維素餵食給卵巢切除之雌性大鼠。卵巢完整之對照組，卵巢切除(OVX)之對照組和以17 $\beta$ -雌二醇(E<sub>2</sub>)OVX大鼠使用為參考組。體重和食物消耗之增加係由於卵巢切除其顯著降低是由測試化合物之處理其程度同卵巢完整之對照組。重量和鼠蹊部與腹膜後脂肪組織之脂蛋白脂肪酶活性的減少是由以上之處理(除了ERA-923和LY353381對白色之鼠蹊部脂肪組織及ERA-923和拉梭福賽芬對鼠蹊部之脂蛋白脂肪酶活性)而棕色脂肪組織和肌肉似乎沒有顯著之影響。能夠看見的是所有測試化合物顯著降低血漿膽固醇、三酸甘油酯之濃度但不影響葡萄糖濃度。血漿胰島素之降低是由處理OVX大鼠以EM-652.HCl，ERA-923，拉梭福賽芬，LY 353381和雷洛賽芬。

於實施例11和12，生物體外之效率於雌二醇倚賴性細胞株產生係以已知之抗雌激素和本發明之化合物做結果報告。抗雌激素之作用產生於鹼性磷酸酶活性於人體之子葉內膜腺癌Ishikawa細胞的結果顯示於實施例10之表11。抗雌

5 激素活性的列出報告於最後一欄係以IC<sub>50</sub>表示其單位為nM係為抑制受1nM E<sub>2</sub>刺激之鹼性磷酸酶而測試化合物本體之雌激素活性列出報告於倒數第二欄以受1nM E<sub>2</sub>刺激之鹼性磷酸酶活性的百分比。能夠看出最具活性之抗雌激素是EM-652.HCl，LY 353381，雷洛賽芬，拉梭福賽芬，和

10 ERA-923。其他則至少小10倍活性。然而，當中最具活性之化合物，某些具有一顯著之殘基之非希望之雌激素活性：LY 353381(16 %)，拉梭福賽芬(18 %)，和雷洛賽芬(13 %)。因此，顯示之數據指出化合物EM-652.HCl和ERA-923並未顯示顯著之雌激素活性於Ishikawa細胞。於實施例12中一

15 比較為EM-652.HCl，我們理想之化合物，和ERA-923於人體乳癌MCF-7細胞顯示出EM-652.HCl之優點。因此，EM-652.HCl是比四倍更高之更具活性當相較於ERA-923做為一抗雌激素藥物(抑制作用之EC<sub>50</sub>(50 %有效濃度)為0.8 nM對3.7 nM)(表12)。

20 於實施例13，作用為20天之處理係以EM-652.HCl，ERA-923或雷洛賽芬而作用產生於體重，腹膜後之脂肪組織，子宮之重量和膽固醇含量做評估於卵巢切除雌性大鼠其飼食的是一販售之齧齒動物飼料。卵巢切除誘導17 %和19 %之增加分別於總體重和腹膜後之脂肪組織之重量，而

投藥0.5毫克之EM-652.HCl，ERA-923或拉梭福賽芬制止之體重增加分別為64%，59%和127%，且引發脂肪組織重量之值低於卵巢完整對照組所觀察之值是指所有試驗之化合物。投藥EM-652.HCl和ERA-923不具作用於子宮之重量當  
5 相較於卵巢切除對照組之動物。然而，投藥0.5毫克之拉梭福賽芬產生一62%之增加( $p<0.01$ )於子宮之重量此增加被完全逆轉是以同時投藥2.5毫克之EM-652.HCl，係因此闡釋拉梭福賽芬之一雌激素活性。最後，OVX誘導之增加於總血清膽固醇含量被完全制止是以投藥EM-652.HCl和  
10 ERA-923和拉梭福賽芬且引發膽固醇之含量值顯著低於卵巢完整對照組所觀察之值。

#### 實施例5

作用產生於脂肪積聚是以EM-652.HCl和DHEA之處理，投藥是單獨或組合，投藥於卵巢完整之雌性大鼠其接受  
15 或無一LHRH-A。

URMA-r-04-99

本試驗之目的是測定作用其產生於脂肪係以以EM-652.HCl和脫氫上雄固酮(DHEA)之處理於卵巢完整之雌性大鼠其接受或無一黃體荷爾蒙釋放荷爾蒙同效劑  
20 (LHRH-A，LHRH-乙基乙醯胺)。為此目的，卵巢完整之雌性大鼠，其處理有或無LHRH-A( $1\mu\text{g}$ /每隻大鼠)，接受每日投藥為EM-652.HCl (2.5毫克/每公斤)和DHEA(100毫克/每公斤)，單獨或組合，共6個月。EM-652.HCl之投藥是口服，DHEA是使用於局部而HRH-A是以皮下注射。所有之處



理是投藥每日一次。

### 測試動物

品種：*Rattus norvegicus*

品系：Sprague-Dawley 大鼠(Crt：CD<sup>®</sup>(SD)BR VAF/Plus<sup>™</sup>)

5 性別：雌性

年齡：於開始給藥，大鼠是大約10-12週大。

### 動物房和飼養

#### a) 動物房：

大鼠之動物房是個別於不鏽鋼籠子於適應和試驗之期間  
10 。

#### b) 溫度和濕度：

環境狀態(溫度和濕度)於大鼠動物房是持續記錄使用一  
電腦化自動系統。目標設定狀態是 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 和 $50 \pm 20\%$   
之相對濕度。

#### 15 c) 光-暗循環：

光週期是12小時光亮和12小時黑暗。這些參數是持續  
記錄使用一有效之電腦化自動系統。光亮自07:15至19:15  
。

#### d) 飲食：

20 有認證之啮齒動物飼料(Lab Diet # 5002，丸狀)和自來水  
的提供是採不限制之供給。

#### 亂數分配：

大鼠被指定至每一組是以亂數於適應之期間內。

### 方法和試驗設計

測試分組：

120隻大鼠區分至8組每組15隻動物供進行試驗摘要於下：

| 處理                     | 懸浮液劑量<br>口服投藥 |               | 溶液劑量<br>局部使用  |               | LHRH-A<br>(皮下注射) |
|------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|------------------|
|                        | 劑量<br>(毫克/公斤) | 體積/大鼠<br>(毫升) | 劑量<br>(毫克/公斤) | 體積/大鼠<br>(毫升) | 劑量<br>(1μg/大鼠)   |
| 卵巢完整                   | -             | 0.5           | -             | 0.5           | -                |
| EM-652.HCl             | 2.5           | 0.5           | -             | 0.5           | -                |
| DHEA                   | -             | 0.5           | 100           | 0.5           | -                |
| DHEA+<br>EM-652.HCl    | 2.5           | 0.5           | 100           | 0.5           | -                |
| LHRH-A                 | -             | 0.5           | -             | 0.5           | 0.5 ml           |
| LHRH-A+<br>EM-652.HCl  | 2.5           | 0.5           | -             | 0.5           | 0.5 ml           |
| LHRH-A+<br>DHEA        | -             | 0.5           | 100           | 0.5           | 0.5 ml           |
| LHRH-A+DHEA+EM-652.HCl | 2.5           | 0.5           | 100           | 0.5           | 0.5 ml           |

#### 5 測試動物之準備：

LHRH-A是配製為溶液其濃度是1.0毫克/毫升。我們將稀釋此濃縮溶液(以得到一最終濃度為0.002毫克/毫升)我們使用下列載劑：0.3 %氯化鈉和0.25 %磷酸鈉單一鹼基，單一結晶水溶於水中。氫氧化鈉(溶液)被使用來調整酸鹼值介於5.6-6.2之間。

劑量之懸浮液/溶液的製備是每隔兩週依據最新測量之體重(組平均)除外的是LHRH-A溶液。對EM-652.HCl之口服投藥，載劑(0.4 %甲基纖維素)被添加至測試化合物，之前先稱重至一玻璃瓶，至少48小時於第一個劑量日之前。

15 確定劑量懸浮液之均一度，該懸浮液至少攪拌48小時於2-8

℃。劑量懸浮液保存於2-8℃。對DHEA溶液之局部使用，乙醇被添加至DHEA然後混合物搖晃直至DHEA溶解。然後，聚乙二醇被添加至溶液並搖晃至均勻。劑量溶液保存於2-8℃。(一部份之溶液能夠被保存於室溫以促進局部使用於

5 動物體。對LHRH-A溶液之皮下注射，一濃縮溶液之稀釋液其稀釋係使用適當之載劑該稀釋液的製備是每個月一次。劑量溶液保存於2-8℃。

#### 動物之準備：

於第一個劑量日之前及所需於試驗期間，一部份之背部皮膚(大約5 x 5 公分)剃毛供局部使用DHEA。

10

#### 劑量：

測試化合物或載劑之投藥是開始於試驗程序之試驗日1。測試化合物的給藥是以藥物溶於0.4 %甲基纖維素之懸浮液以強行餵食(0.5毫升/每次強行餵食/每隻大鼠)每日一次或局部使用溶於50 %乙醇-50 %丙二醇(0.5毫升/每次使用/每隻大鼠)每日一次。第5-8組之大鼠同時接受LHRH-A每日一次以皮下注射及/或單獨之局部接受適當的載劑。

15

#### 體脂肪測量

身體組成物的測量是於全身骨骼和動物之右股骨於吸入性麻醉劑愛舒福能麻醉下使用雙倍數能量x射線吸光分析儀(型號：DEXA；QDR 4500A)於適應期和處理六個月之後。

20

#### 結果

表4

| 處理                         | 脂肪(%)      |
|----------------------------|------------|
| 卵巢完整                       | 23.1 ± 1.6 |
| EM-652.HCl                 | 19.1 ± 1.4 |
| DHEA                       | 20.2 ± 2.3 |
| DHEA+EM-652.HCl            | 18.8 ± 1.3 |
| LHRH-A                     | 36.4 ± 2.2 |
| LHRH-A+ EM-652.HCl         | 31.2 ± 2.0 |
| LHRH-A+ DHEA               | 27.4 ± 2.1 |
| LHRH-A+DHEA+<br>EM-652.HCl | 25.0 ± 1.7 |

### 實施例6

作用是一20天之處理該處理係以EM-652.HCl雌二醇和DHEA，產生作用於卵巢切除之雌性大鼠之體脂肪和體重參數。

URMA-r-27-00

本試驗之目的是評估作用其產生於體脂肪和體重參數係以EM-652.HCl和雌二醇和DHEA投藥為口服之單一或組合，至卵巢切除之雌性大鼠其接受一富含碳水化合物之飼料。

### 測試動物

品種：Rattus norvegicus

品系：Sprague-Dawley 大鼠(Crt：CD<sup>®</sup>(SD)BR VAF/Plus<sup>™</sup>)

性別：雌性

15 體重：劑量開始時，體重大約是200-250公克。

### 動物房和飼養

a)動物房：

大鼠之動物房是個別於不鏽鋼籠子於適應和試驗之期間。

b) 溫度和濕度：

環境狀態(溫度和濕度)於大鼠動物房是持續記錄使用一電腦化自動系統。目標設定狀態是 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 和 $50 \pm 20\%$ 之相對濕度。

5 c) 光-暗循環：

光週期是12小時光亮和12小時黑暗。這些參數是持續記錄使用一有效之電腦化自動系統。光亮自07:15至19:15。

d) 飲食：

10 有保證之齧齒動物飼料(Lab Diet # 5002，丸狀)和自來水的提供是採不限制之供給於適應之期間。試驗期間，大鼠將接受一富含碳水化合物之飼料以不限制之供給。營養飼料(Diet #3)之組成是(公克/每公克)：玉米澱粉，31.2；葡萄糖，31.2；酪蛋白，20.0；玉米油，6.4；dl-甲硫胺酸，  
15 0.3；混合維生素，1.0；AIN-76混合礦物質，4.9和纖維素，5.0。

解剖前一天，大鼠絕食(只允許飲水)至下午結束(共約16小時)。

亂數分配：

20 大鼠被指定至每一組是以亂數於試驗之第0日。

方法和試驗設計

## 測試分組：

80隻大鼠區分至8組每組15隻動物供進行試驗摘要於下：

| 處理 | 懸浮液劑量<br>口服投藥 |
|----|---------------|
|----|---------------|

|                                   | 劑量<br>(毫克/公斤) | 體積/大鼠<br>(毫升) |
|-----------------------------------|---------------|---------------|
| 卵巢完整                              | 0             | 0.5 ml        |
| OVX                               | 0             | 0.5 ml        |
| OVX + EM-652.HCl                  | 0.5           | 0.5 ml        |
| OVX + E <sub>2</sub>              | 100           | 0.5 ml        |
| OVX + EM-652.HCl + DHEA           | 0.5 + 100     | 0.5 + 0.5 ml  |
| OVX + EM-652.HCl + E <sub>2</sub> | 0.5 + 0.5     | 0.5 + 0.5 ml  |

#### 動物之準備：

於試驗第0日，第2至8組之大鼠做卵巢切除，以雙側切除，於吸入性麻醉劑愛舒福能麻醉下進行。大鼠自第1組開始皆做虛擬手術。

#### 劑量：

測試化合物或載劑之投藥是開始於試驗日1 (該日為卵巢切除之次一日)。測試化合物的給藥是以藥物溶於0.4 % 甲基纖維素之懸浮液強行餵食(0.5毫升/每次強行餵食)共20天。

#### 身體組成物之測量

於試驗之第21日(解剖之前)，身體組成物的測量是於全身骨骼於吸入性麻醉劑愛舒福能麻醉下使用雙倍數能量x射線吸光分析儀(型號：DEXA；QDR 4500A)以測定處理作用產生於脂肪之百分比。

#### 器官和組織之收集

右側和左側之腹膜後的脂肪組織被收集並稱重。

#### 結果

表5

| 處理                                | 脂肪<br>%   | 腹膜後的脂肪組織<br>公克 |
|-----------------------------------|-----------|----------------|
| 卵巢完整                              | 15.7±0.8  | 2.20±0.20      |
| OVX                               | 18.9± 1.5 | 3.70±0.41      |
| OVX +EM-652.HCl                   | 10.2±1.2  | 1.52±0.18      |
| OVX + E <sub>2</sub>              | 10.3±0.6  | 0.81±0.17      |
| OVX + DHEA                        | 7.8±0.8   | 0.92±0.17      |
| OVX + EM-652.HCl + DHEA           | 8.4±0.9   | 1.15±0.17      |
| OVX + EM-652.HCl + E <sub>2</sub> | 10.4±0.7  | 1.17±0.19      |

### 實施例7

作用是一34週之處理該處理係以乙炔基雌二醇，  
EM-652.HCl，雷洛賽芬，和DHEA作用產生於卵巢切除雌  
5 性大鼠之體脂肪和身體重量參數。

URMA-r-42-98

本試驗之目的是評估一組合處理之作用該處理係以  
EM-652.HCl，和DHEA其作用產生於卵巢切除大鼠之體脂  
肪和體重。為此目的，卵巢切除之大鼠接受每日之投藥是  
10 EM-652.HCl (1毫克/每公斤)，和DHEA (80毫克/每公斤)單  
一或組合共34週。EM-652.HCl的投藥是以口服而DHEA是  
局部使用於背部皮膚。一組動物是口服處理其係以17a-乙  
炔基雌二醇 (0.1毫克/每公斤)和雷洛賽芬 (EM-1105；1毫  
克/每公斤)供做比較。

### 15 材料與方法

#### 動物和處理

10-12週大之雌性 Sprague-Dawley 大鼠 (品系 Crt :  
CD<sup>®</sup>(SD)BR)體重大約是200-250公克於處理開始時使用。

80隻大鼠以亂數區分至7組每組11至12隻動物說明如下：1) 卵巢完整之對照組；2)OVX對照組；3)OVX + EE<sub>2</sub> (0.1毫克/每公斤) 4) OVX +雷洛賽芬(1毫克/每公斤)；5) OVX +EM-652.HCl (1 毫克/每公斤)；6) OVX +DHEA (80毫克/每公斤)；7)OVX +EM-652.HCl +DHEA。試驗之第1日，條件相符之組別的動物進行雙側卵巢切除(OVX) 其切除手術於吸入性麻醉藥：愛舒活能麻醉下進行。EM-652.HCl，雷洛賽芬，和EE<sub>2</sub> (Steraloids)之投藥是每日一次由口服強行餵食藥物是藥物溶於0.4 %甲基纖維素之懸浮液(0.5 毫升/每隻大鼠)共34週而DHEA是局部使用每日一次於背部皮膚是一藥物溶於50 %乙醇-50 %丙二醇 (0.5毫升/每隻大鼠)於相同之期間。最後一次劑量後大約24小時，隔夜停飼動物之處死是以放血法其係於吸入性麻醉劑愛舒福能麻醉下由腹部主動脈處放血。右側和左側之腹膜後的脂肪組織被收集並稱重。

#### 身體組成物之測量

處理34週之後，每隻大鼠於吸入性麻醉劑愛舒福能麻醉下進行全身骨骼使用雙倍數能量x射線吸光分析儀(型號：DEXA；QDR 4500A，Hologic， Waltham， MA)並使用一局部高解析度之掃描軟體。身體組成物(包含脂肪百分比)由此測得。

#### 統計分析

數據表示為平均±標準差。

#### 結果



表 6

| 處理                         | 右側腹膜後<br>之<br>脂肪組織 | 左側腹膜後之<br>脂肪組織 | 脂肪       |
|----------------------------|--------------------|----------------|----------|
| 卵巢完整對照組                    | 1.43±0.12          | 1.80±0.26      | 25.7±2.5 |
| OVX對照組                     | 2.53±0.24          | 2.64±0.18      | 42.1±1.5 |
| OVX +EE <sub>2</sub>       | 1.29±0.22          | 1.15±0.18      | 19.8±1.9 |
| (0.1毫克/公斤)                 | 1.29±0.12          | 1.41±0.13      | 22.8±1.6 |
| OVX + 雷洛賽芬                 |                    |                |          |
| (1毫克/公斤)                   | 2.07±0.18          | 2.19±0.28      | 27.7±1.8 |
| OVX + EM-652.HCl           |                    |                |          |
| (1毫克/公斤)                   | 2.16±0.25          | 1.98±0.17      | 26.8±2.3 |
| OVX + DHEA                 |                    |                |          |
| (80毫克/公斤)                  | 1.62±0.18          | 1.47±0.18      | 25.1±1.8 |
| OVX + EM-652.HCl<br>+ DHEA |                    |                |          |

實施例 8A

EM-652.HCl的作用產生於瘦和肥胖盧克雄性大鼠之能

5 量平衡和脂肪-脂蛋白質代謝。

URMA-r-61-99

本試驗之目的是測定EM-652.HCl的作用產生於瘦和肥胖盧克雄性大鼠之能量平衡和脂肪-脂蛋白質代謝。為此目的，EM-652.HCl(2.5毫克/每公斤)進行投藥以口服(強行餵食)每日一次共14天至卵巢完整之瘦和肥胖盧克雄性大鼠。

10 食)每日一次共14天至卵巢完整之瘦和肥胖盧克雄性大鼠。

測試動物

品種：*Rattus norvegicus*

品系：盧克

性別：雄性

15 體重：於開始給藥，體重是大約：

瘦大鼠：175±15公克；肥胖大鼠：235±15公克

### 環境調適

大鼠調適至實驗室狀態至少於開始試驗前5天。

### 動物房和飼養

#### 5 a) 動物房：

大鼠之動物房是個別於不鏽鋼籠子於適應和試驗之期間。

#### b) 溫度：

溫度於大鼠動物房之記錄是每日一次。目標設定溫度是  
10  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$

#### c) 光-暗循環：

光週期是10小時光亮和14小時黑暗。燈亮自07:00，然後  
燈關於17:00。

#### d) 飲食：

15 於調適期，大鼠將得到一販賣之之啮齒動物飼料(Purina  
，# 5075)和自來水是採不限制之供給。於試驗期間，大  
鼠將得到下列飼料(diet#3)組成為公克/每100公克)：澱粉  
，31.2；葡萄糖，31.2；酪蛋白，20.0；玉米油，6.4；  
dl-甲硫胺酸，0.3；混合維生素，1.0；AIN-76混合礦物  
20 質，4.9和纖維素，5.0。

大鼠停飼(只允許飲水)於解剖當天早上7h00。

### 亂數分配：

第一個劑量日之前一日，大鼠稱重然後指定至每一組  
以使各組具有相當之平均體重。

#### 25 方法和試驗設計

測試組：

16隻瘦和肥胖之卵巢完整之雄性大鼠被指定至4組其每組有8隻大鼠以供進行試驗其摘要如下

| 大鼠數量/每組 | 大鼠狀態 | 處理         | 劑量<br>(毫克/每公斤) |
|---------|------|------------|----------------|
| 8       | 瘦    | EM-652.HCl | 2.5            |
| 8       | 肥胖   | EM-652.HCl | 2.5            |
| 8       | 瘦    | 對照組        | 0              |
| 8       | 肥胖   | 對照組        | 0              |

給藥劑量

- 5 測試化合物或載劑之投藥開始於試驗之第1天。測試化合物EM-652.HCl之給藥是藥物溶於0.4 % 甲基纖維素之懸浮液由口服強行餵食藥物(0.5 毫升/每次強行餵藥/每隻大鼠)每日一次是共14天。對照組之大鼠接受單純載劑(0.5 毫升/每次強行餵藥/每隻大鼠)於相同之期間內。

10 體重

於適應期間，動稱重於開始給藥之前一天以供亂數分配。然後，大鼠稱重於給藥之第一天和此後之每隔兩天及解剖當天。體重之記錄精確至1公克。

食物之消耗

- 15 食物消耗之評估是以每隔兩天一次於試驗之期間。

動物犧牲之方法

緊接於大約6小時之停飼期，動物進行解剖(大約30小時於最後一次給藥之後)。動物以麻醉藥物易他明-來拉辛(ketamine-xylazine)麻醉下以心臟壓縮機將血液抽出。

20 血液樣品

血液脂質(總膽固醇(CHOH)和三酸甘油酯(TG)及葡萄糖的測定是以冷凍血漿樣品其分析是以 Boehringer Mannheim 診斷分析儀(型號：Hitachi 911)(製造商：Boehringer Mannheim Diagnostic Laboratory Systems)。體循環之荷爾蒙和受質(Leptin，胰島素)之測定是以冷凍血漿樣品使用下列套組：

Leptin：Linco 放射性免疫分析套組

胰島素：Linco 放射性免疫分析套組

# 器官和組織之收集

一葉肝臟(約1克)置入液態氮供進一步測定TG和CHOL之含量(佛氏測定法，Folch's method)腹膜後之脂肪組織和比目魚(肌)收集並置入液態氮供進一步測定脂蛋白脂肪酶(LPL)活性。腹部之前列腺，睪丸(左側和右側一起)和右側半月vesicle(排空液體)進行稱重。丟棄右側半月vesicle。

表 7

## 雄性盧克大鼠

| 組別  |                             | 體重增加      | 脂蛋白脂肪酶活性<br>於白色腹膜背面 | 脂蛋白脂肪酶活性<br>於比目魚肌 | 血漿胰島素        | 血漿葡萄糖      | 血漿所有之膽固醇  | 血漿三酸甘油酯   |
|-----|-----------------------------|-----------|---------------------|-------------------|--------------|------------|-----------|-----------|
| 外表型 | 處理                          | G         | μU/ 每公克蛋白質          | μ U/每公克蛋白質        | nmol/L       | nmol/L     | nmol/L    | nmol/L    |
| 瘦   | 對照組                         | 73.0±4.2  | 2066±353            | 71.7±7.9          | 0.095±0.0025 | 10.74±0.87 | 2.10±0.15 | 1.47±0.20 |
| 瘦   | EM-652.H<br>Cl<br>2.5 mg/Kg | 44.9±3.5  | 1701±348            | 69.5±8.4          | 0.062±0.005  | 9.35±0.51  | 1.18±0.09 | 1.52±0.13 |
| 肥胖  | 對照組                         | 110.5±6.7 | 7233±511            | 51.9±8.8          | 1.092±0.369  | 11.06±0.84 | 5.07±0.28 | 4.21±0.78 |

肥 EM-652.H 71.6±3.3 7046±1185 58.1±4.6 0.475±0.087 11.84±0.62 2.28±0.25 7.16±1.06  
 胖 Cl  
 2.5 mg/Kg

### 實施例8B

EM-652.HCl的作用產生於瘦和肥胖盧克雌性大鼠之能量平衡和脂肪-脂蛋白質代謝。

#### 5 URMA-r-47-99

本試驗之目的是測定EM-652.HCl的作用產生於瘦和肥胖盧克雌性大鼠之能量平衡和脂肪-脂蛋白質代謝。為此目的，EM-652.HCl(2.5毫克/每公斤)進行投藥以口服(強行餵食)每日一次共14天至卵巢完整之瘦和肥胖盧克雌性大鼠。

#### 10 測試動物

品種：*Rattus norvegicus*

品系：盧克

性別：雌性

體重：於開始給藥，體重是大約：

15 瘦大鼠：114±2公克；肥胖大鼠：182±6公克

#### 環境調適

大鼠調適至實驗室狀態至少於開始試驗前5天。

#### 動物房和飼養

a) 動物房：

20 大鼠之動物房是個別於不鏽鋼籠子於適應和試驗之期間。

b) 溫度：

溫度於大鼠動物房之記錄是每日一次。目標設定溫度是

22 ± 3°C

c) 光-暗循環：

光週期是10小時光亮和14小時黑暗。燈亮自07:00，然後燈關於17:00。

5 d) 飲食：

於調適期，大鼠將得到一販賣之之啮齒動物飼料(Purina，#5075)和自來水是採不限制之供給。於試驗期間，大鼠將得到下列飼料(diet#3)組成為公克/每100公克):澱粉，31.2；葡萄糖，31.2；酪蛋白，20.0；玉米油，6.4；  
10 dl-甲硫胺酸，0.3；混合維生素，1.0；AIN-76混合礦物質，4.9和纖維素，5.0。

大鼠停飼 (只允許飲水)於解剖當天早上7h00。

亂數分配：

第一個劑量日之前2日，大鼠稱重然後指定至每一組以  
15 使各組具有相當之平均體重。

## 方法和試驗設計

### 測試組：

16隻瘦和肥胖之卵巢完整之雌性大鼠被指定至4組其每組有8隻大鼠以供進行試驗其摘要如下

| 大鼠數量/每組 | 大鼠狀態 | 處理         | 劑量<br>(毫克/每公斤) |
|---------|------|------------|----------------|
| 8       | 瘦    | EM-652.HCl | 2.5            |
| 8       | 肥胖   | EM-652.HCl | 2.5            |
| 8       | 瘦    | 對照組        | 0              |
| 8       | 肥胖   | 對照組        | 0              |

### 5 給藥劑量

測試化合物或載劑之投藥開始於試驗之第1天。測試化合物EM-652.HCl之給藥是藥物溶於0.4 % 甲基纖維素之懸浮液由口服強行餵食藥物(0.5 毫升/每次強行餵藥/每隻大鼠)每日一次是共14天。對照組之大鼠接受單純載劑(0.5 毫升/每次強行餵藥/每隻大鼠)於相同之期間內。

### 體重

於適應期間，動稱重於開始給藥之前一天以供亂數分配。然後，大鼠稱重於給藥之第一天和此後之每隔兩天及解剖當天。體重之記錄精確至1公克。

### 15 食物之消耗

食物消耗之評估是以每隔兩天一次於試驗之期間。

### 動物犧牲之方法

緊接於大約6小時之停飼期，動物進行解剖(大約30小時於最後一次給藥之後)。動物以麻醉藥物易他明-來拉辛(ketamine-xylazine)麻醉下以心臟壓縮機將血液抽出。

### 血液樣品

血液脂質(總膽固醇(CHOL)和三酸甘油酯(TG)及葡萄糖的測定是以冷凍血漿樣品其分析是以 Boehringer Mannheim 診斷分析儀(型號：Hitachi 911)(製造商：Boehringer Mannheim Diagnostic Laboratory Systems)。體循環之荷爾蒙和受質(Leptin，胰島素)之測定是以冷凍血漿樣品使用下列套組：

Leptin：Linco 放射性免疫分析套組

胰島素：Linco 放射性免疫分析套組

### 10 器官和組織之收集

一葉肝臟(約1克)置入液態氮供進一步測定TG和CHOL之含量(佛氏測定法，Folch's method)腹膜後之脂肪組織和比目魚(肌)收集並置入液態氮供進一步測定脂蛋白脂肪酶(LPL)活性。子宮和卵巢進行收集，稱重並保存於10%緩衝液福馬林供進一步組織學檢測。左側和右側之卵巢(無卵巢切除者)一起稱重。



表 8

雌性盧克大鼠

| 組別                                | 體重增<br>加 | 脂蛋白脂<br>肪酶活性<br>於白色腹<br>膜背面 | 脂蛋白<br>脂肪酶<br>活性於<br>比目魚<br>肌 | 血漿胰島<br>素   | 血漿葡萄<br>糖  | 血漿所<br>有之膽<br>固醇 | 血漿三酸<br>甘油酯 |
|-----------------------------------|----------|-----------------------------|-------------------------------|-------------|------------|------------------|-------------|
| 外表處理<br>型態                        | g        | μU/ 每公克<br>蛋白質              | μU/每公克<br>蛋白質                 | nmol/L      | nmol/L     | nmol/L           | nmol/L      |
| 瘦 對照組                             | 175±4    | 1586±155                    | 55.8±8.1                      | 0.122±0.022 | 9.45±0.68  | 2.33±0.10        | 1.25±0.16   |
| 瘦 EM-652.<br>HCl<br>2.5<br>mg/Kg  | 154±5    | 1349±246                    | 60.8±11.1                     | 0.063±0.012 | 9.60±0.41  | 1.57±0.14        | 0.83±0.07   |
| 肥胖 對照組                            | 313±9    | 3980±327                    | 36.9±8.6                      | 0.410±0.033 | 10.63±0.55 | 4.83±0.27        | 12.51±3.25  |
| 肥胖 EM-652.<br>HCl<br>2.5<br>mg/Kg | 291±9    | 3819±485                    | 36.6±7.1                      | 0.515±0.091 | 11.70±0.47 | 3.27±0.97        | 22.20±4.44  |

實施例 9

- 5 EM-652.HCl和DHEA的作用，投藥是單一或組合，作用產生於大鼠之能量平衡和脂肪-脂蛋白質代謝。

URMA-r-03-99

- 本試驗之目的是測定EM-652.HCl的作用，投藥是單一或組合，作用產生於大鼠之能量平衡和脂肪-脂蛋白質代謝
- 10 。處理產生之評估係以數個參數於20天之處理：EM-652.HCl (0.5毫克/每隻大鼠，約2.5毫克/每公斤，每一個口服投藥) 和DHEA (20毫克/每隻大鼠，約100毫克/每公斤，局部使用)，投藥是單一或組合，投藥之動物是卵巢完整(INT)和卵巢切除(OVX)之雌性大鼠該大鼠係接受一高蔗糖-高脂肪之飼
- 15 料。為做比較，一卵巢完整和卵巢切除之對照組接受高營

養飼料而其他對照組動物(卵巢完整和OVX)將接受販售之齧齒動物飼料。

### 測試動物

品種：*Rattus norvegicus*

5 品系：Sprague-Dawley 大鼠(Crt：CD<sup>®</sup>(SD)BR VAF/Plus <sup>TM</sup>)

性別：雌性

年齡：於開始給藥，體重約190±220公克。

### 環境調適

大鼠調適至實驗室狀態至少於開始試驗前5天。

### 10 動物房和飼養

#### a) 動物房：

大鼠之動物房是個別於一般設計之不鏽鋼籠子於適應和試驗之期間。

#### b) 溫度：

15 溫度於大鼠動物房之記錄是每日一次。目標設定溫度是  
22 ± 3°C

#### c) 光-暗循環：

光週期是10小時光亮和14小時黑暗。燈亮自06:00，然後燈關於16h00。

#### 20 d) 飲食：

於調適期，大鼠將得到一販賣之齧齒動物飼料(Purina，# 5075)和自來水是採不限制之供給。於試驗期間，第1和2組之大鼠將得到販售之飼料而第3至10組將接受一高蔗糖-高脂肪之飼料組成為公克/每100公克)：蔗糖，

45；玉米油，10；豬油，10；酪蛋白，22.5；dl-甲硫胺酸，0.3；混合維生素，1.2；AIN-76混合礦物質，5.5和纖維素，5.5。

大鼠停飼（只允許飲水）於解剖前一天晚上22h00。

## 5 亂數分配：

於動物運抵後數日，大鼠稱重然後指定至每一組以使各組具有相當之平均體重。

## 方法和試驗設計

### 測試組：

10 80隻大鼠被指定至10組以供進行試驗其摘要如下。

| 飼料                | 處理                      | 劑量<br>(毫克/每公斤)  |      |
|-------------------|-------------------------|-----------------|------|
|                   |                         | 每一個<br>口服劑<br>量 | 局部使用 |
| 飼料 <sup>1</sup>   | INT                     | 0               | 0    |
|                   | OVX                     | 0               | 0    |
|                   | INT                     | 0               | 0    |
|                   | INT + EM-652.HCl        | 0.5             | 0    |
| 特殊飼料 <sup>2</sup> | INT + DHEA              | 0               | 20   |
|                   | INT + EM-652.HCl + DHEA | 0.5             | 20   |
|                   | OVX                     | 0               | 0    |
|                   | OVX + EM-652.HCl        | 0.5             | 0    |
|                   | OVX + DHEA              | 0               | 20   |
|                   | OVX + EM-652.HCl + DHEA | 0.5             | 20   |

<sup>1</sup>：販售之啮齒動物飼料

<sup>2</sup>：高蔗糖-高脂肪飼料

### 動物之準備：

15 於試驗之第0日，大鼠其屬於條件符合之組別進行卵巢切除以雙側切除，於吸入性麻醉劑愛舒福能麻醉下進行。卵巢完整之大鼠做虛擬手術。

### 給藥劑量

測試化合物或載劑之投藥開始於卵巢切除之隔日(第1日)。測試化合物EM-652.HCl之給藥是藥物溶於0.4 % 甲基纖維素之懸浮液由口服強行餵食藥物(0.5 毫升/每次強行餵藥/每隻大鼠)每日一次是共20天。而DHEA是局部使用於背部皮膚(0.5毫升/每次使用/每隻大鼠)每日一次於一相同之期間。對照組之大鼠接受單純載劑(每次口服投藥和局部使用)。大鼠犧牲於試驗之第21日於最後一次劑量後大約24小時。

### 10 體重

大鼠稱重於第0日(手術之日)，每隔2日於試驗期間和解剖當日。體重之記錄精確至1公克。

### 食物之消耗

食物消耗之評估是以每隔兩天一次於試驗之期間。

### 15 動物犧牲之方法

緊接於大約6小時之停飼期，動物進行解剖(大約30小時於最後一次給藥之後)。動物以麻醉藥物易他明-來拉辛(ketamine-xylazine)麻醉下以心臟壓縮機將血液抽出。

### 血液樣品

20 血液脂質(總膽固醇和三酸甘油酯)的測定是以冷凍血漿樣品其分析是以Boehringer Mannheim診斷分析儀(型號：Hitachi 911)(製造商：Boehringer Mannheim Diagnostic Laboratory Systems)。體循環之荷爾蒙和受質(胰島素，leptin，葡萄糖)之測定是以冷凍血漿樣品描述如下：

胰島素： Linco放射性免疫分析套組

葡萄糖：貝克曼自動葡萄糖分析儀

Leptin： Linco 放射性免疫分析套組

### 器官和組織之收集

5 下列組織進行收集並稱重係對於所有之動物體。

肌肉(比目魚肌和VLM)，脂肪(腹膜背面和鼠蹊部)，心臟，棕色脂肪組織和大腦皆一併收集。

一葉肝臟(約1克)置入液態氮供進一步測定TG和CHOL之含量(佛氏測定法，Folch's method)腹膜後之脂肪組織和  
10 比目魚(肌)收集並置入液態氮供進一步測定脂蛋白脂肪酶(LPL)活性。子宮(和卵巢於卵巢完整之組別)做移除，去除多餘之脂肪，稱重並保存於10%緩衝液福馬林。

表 9

| 組別    |                     | 總重量    | 鼠蹊部白色脂肪組織   |           | 鼠蹊部白色脂肪組織   |           | 腹膜背面色脂肪組織   |           |
|-------|---------------------|--------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|
|       |                     |        | 脂蛋白<br>重量   | 脂肪酶活<br>性 | 脂蛋白<br>重量   | 脂肪酶活<br>性 | 脂蛋白<br>重量   | 脂肪酶活<br>性 |
| 飼料    | 處理                  | g      | g           | μU/g      | g           | μU/g      | g           | μU/g      |
| 飼料    | 模擬對照組               | 239±6  | 0.410±0.043 | 252±55    | 0.983±0.104 | 1526±217  | 0.329±0.035 | 1053±138  |
| 飼料    | OVX 對照<br>組         | 294±6  | 0.888±0.146 | 570±100   | 1.472±0.199 | 2415±147  | 0.466±0.041 | 688±88    |
| 蔗糖+脂肪 | 模擬對照組               | 257±10 | 0.716±0.107 | 344±73    | 1.765±0.292 | 1470±242  | 0.376±0.033 | 1073±152  |
| 蔗糖+脂肪 | 模擬 +EM-652HCl       | 238±5  | 0.435±0.043 | 160±23    | 1.058±0.162 | 1277±56   | 0.306±0.044 | 1196±83   |
| 蔗糖+脂肪 | 模擬 +DHEA            | 252±5  | 0.659±0.075 | 194±45    | 1.067±0.149 | 1177±188  | 0.373±0.036 | 982±72    |
| 蔗糖+脂肪 | 模擬 +EM-652HCl+ DHEA | 249±4  | 0.489±0.083 | 224±45    | 0.909±0.124 | 1349±133  | 0.322±0.026 | 885±78    |
| 蔗糖+脂肪 | OVX 對照<br>組         | 316±8  | 1.800±0.251 | 725±106   | 3.058±0.297 | 2503±215  | 0.519±0.064 | 867±99    |
| 蔗糖+脂肪 | OVX+EM-652HCl       | 268±5  | 0.709±0.085 | 310±63    | 1.370±0.211 | 1612±186  | 0.408±0.025 | 678±65    |
| 蔗糖+脂肪 | OVX+ DHEA           | 274±9  | 0.885±0.156 | 583±134   | 10699±0.151 | 1905±112  | 0.342±0.049 | 1069±96   |
| 蔗糖+脂肪 | OVX+EM-652HCl+ DHEA | 263±5  | 0.658±0.088 | 306±42    | 10436±0.162 | 1542±118  | 0.373±0.040 | 876±75    |

| 組別    |                      | 比目魚肌肉       |              | Vastus Lateralis muscle |              |             |             |
|-------|----------------------|-------------|--------------|-------------------------|--------------|-------------|-------------|
|       |                      | 重量          | 脂蛋白<br>脂肪酶活性 | 重量                      | 脂蛋白<br>脂肪酶活性 | 總膽固醇        | 總膽固醇        |
| 飼料    | 處理                   | g           | μU/g         | g                       | μU/g         | mmol/L      | mmol/L      |
| 飼料    | 模擬對照組                | 0.106±0.002 | 62.7±3.0     | 0.872±0.027             | 11.7±3.5     | 0.076±0.004 | 0.134±0.019 |
| 飼料    | OVX 對照<br>組          | 0.116±0.005 | 43.8±3.3     | 1.000±0.042             | 13.1±3.7     | 0.082±0.004 | 0.169±0.027 |
| 蔗糖+脂肪 | 模擬對照組                | 0.096±0.005 | 55.0±5.1     | 0.927±0.04              | 13.1±3.2     | 0.083±0.002 | 0.123±0.014 |
| 蔗糖+脂肪 | 模擬 +EM-652.HCl       | 0.098±0.005 | 53.9±3.3     | 0.965±0.034             | 16.2±3.1     | 0.096±0.011 | 0.360±0.102 |
| 蔗糖+脂肪 | 模擬 +DHEA             | 0.105±0.004 | 53.6±7.5     | 0.893±0.043             | 11.5±2.0     | 0.068±0.003 | 0.038±0.007 |
| 蔗糖+脂肪 | 模擬 +EM-652.HCl+ DHEA | 0.098±0.005 | 56.6±4.5     | 0.971±0.029             | 19.5±3.5     | 0.101±0.008 | 0.184±0.033 |
| 蔗糖+脂肪 | OVX 對照<br>組          | 0.110±0.004 | 39.2±3.9     | 1.037±0.026             | 10.9±1.82    | 0.097±0.007 | 0.262±0.052 |
| 蔗糖+脂肪 | OVX+EM-652.HCl       | 0.104±0.004 | 39.1±5.0     | 0.944±0.030             | 10.8±3.2     | 0.092±0.006 | 0.348±0.078 |
| 蔗糖+脂肪 | OVX + EM             | 0.103±0.005 | 45.9±4.7     | 0.920±0.049             | 13.1±5.4     | 0.079±0.00  | 0.165±0.04  |

|       |                    |             |          |             |          |             |             |
|-------|--------------------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|-------------|
|       | -652.HCl +<br>DHEA |             |          |             |          | 5           | 7           |
| 蔗糖+脂肪 | OVX +<br>DHEA      | 0.101±0.001 | 48.4±4.8 | 0.929±0.038 | 11.0±4.1 | 0.106±0.008 | 0.273±0.031 |

| 組別                                  | 血漿<br>胰島素   | 血漿<br>葡萄糖  | 血漿<br>總膽固醇 | 血漿<br>三酸甘油酯 | 血漿<br>leptin |
|-------------------------------------|-------------|------------|------------|-------------|--------------|
| 飼料 處理                               | nmol/L      | nmol/L     | nmol/L     | Nmol/L      | nmol/L       |
| 飼料 模擬對照組                            | 0.071±0.010 | 7.56±0.24  | 1.61±0.17  | 0.49±0.12   | 1.404±0.224  |
| 飼料 OVX對照組                           | 0.146±0.027 | 8.69±0.57  | 2.10±0.10  | 0.68±0.10   | 2.388±0.737  |
| 蔗糖 + 脂肪 模擬對照組                       | 0.079±0.013 | 9.07±0.48  | 1.60±0.12  | 0.66±0.17   | 3.572±0.699  |
| 蔗糖 + 脂肪 模擬+EM -652.HCl              | 0.057±0.004 | 9.03±0.49  | 1.15±0.06  | 0.60±0.12   | 2.019±0.402  |
| 蔗糖 + 脂肪 模擬+DHEA                     | 0.048±0.012 | 8.05±0.51  | 1.59±0.17  | 0.61±0.11   | 1.977±0.255  |
| 蔗糖 + 脂肪 模擬+EM -652.HCl +<br>DHEA    | 0.049±0.013 | 7.99±0.44  | 0.93±0.08  | 0.95±0.21   | 1.071±0.162  |
| 蔗糖 + 脂肪 OVX對照組                      | 0.125±0.022 | 10.46±0.72 | 1.62±0.26  | 0.83±0.13   | 7.900±1.982  |
| 蔗糖 + 脂肪 OVX +<br>EM-652.HCl         | 0.089±0.013 | 9.06±0.30  | 1.15±0.11  | 0.97±0.16   | 1.989±0.326  |
| 蔗糖 + 脂肪 OVX + EM -652.HCl<br>+ DHEA | 0.052±0.009 | 8.64±0.24  | 1.57±0.12  | 0.62±0.08   | 2.757±0.631  |
| 蔗糖 + 脂肪 OVX +<br>DHEA               | 0.060±0.010 | 8.65±0.38  | 0.87±0.09  | 0.92±0.21   | 1.672±0.327  |

實施例 10

EM-652.HCl，ERA-923，拉梭福賽芬，LY 353381和雷洛賽芬的作用產生於卵巢切除之雌性大鼠之能量平衡和脂肪-脂蛋白質代謝。

5 脂肪-脂蛋白質代謝。

URMA-r-45-00

本試驗之目的測定作用產生於大鼠之能量平衡和脂肪-脂蛋白質代謝其處理係以不同之選擇性雌激素受體調節劑該等描述於文獻本試驗並比較得到之結果和EM-652.HCL之結果。為此目的，測試化合物之投藥是以口服強行餵食共20天(0.5毫克/每隻大鼠，對每一個化合物，

0.5毫升/每隻大鼠)藥物係溶解於0.4 %甲基纖維素再投藥給卵巢切除之雌性大鼠。卵巢完整對照組，卵巢切除(OVX)對照組和OVX大鼠以17 $\beta$ -雌二醇(E2)處理係為參考之用。

### 測試動物

5 品種：*Rattus norvegicus*

品系：Sprague-Dawley 大鼠(Crt：CD<sup>®</sup>(SD)BR VAF/Plus<sup>™</sup>)

性別：雌性

年齡：於開始給藥，體重約200-225公克。

### 動物房和飼養

10 a) 動物房：

大鼠之動物房是個別於一般設計之不鏽鋼籠子於適應和試驗之期間。

b) 溫度：

15 環境狀態(溫度和濕度)於大鼠動物房是持續記錄使用一電腦化自動系統。目標設定狀態是 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 和 $50 \pm 20\%$ 之相對濕度。

c) 光-暗循環：

光週期是10小時光亮和14小時黑暗。燈亮自07:15，然後燈關於17h15。

20 d) 飲食：

於調適期，大鼠接受一有認證之齧齒動物飼料(Lab Diet # 5002，丸狀)和自來水的提供是採不限制之供給。試驗期間，大鼠將接受一富含碳水化合物之飼料(Diet #3) 和自來水以不限制之供給。飼料之組成是(公克/每公克)：



玉米澱粉，31.2；葡萄糖，31.2；酪蛋白，20.0；玉米油，6.4；dl-甲硫胺酸，0.3；混合維生素，1.0；AIN-76混合礦物質，4.9和纖維素，5.0。大鼠停飼（只允許飲水）於解剖當天早上07h00。

#### 5 亂數分配：

大鼠被指定至每一組以使各組具有相當之平均體重。

#### 方法和試驗設計

##### 測試組：

77隻大鼠被指定至8組每組9-10隻大鼠以供進行試驗

10 其摘要如下。

| 大鼠數量 | 處理                       | 懸浮液劑量         |               |
|------|--------------------------|---------------|---------------|
|      |                          | 劑量<br>(毫克/大鼠) | 體積/大鼠<br>(毫升) |
| 9    | 卵巢完整                     | 0             | 0.5 ml        |
| 9    | OVX                      | 0             | 0.5 ml        |
| 10   | OVX + EM-652.HCl         | 0.5           | 0.5 ml        |
| 10   | OVX + ERA-923 (EM-3527)  | 0.5           | 0.5 ml        |
| 10   | OVX + 拉梭福賽芬<br>(EM-3555) | 0.5           | 0.5 ml        |
| 10   | OVX + LY 35381 (EM-1665) | 0.5           | 0.5 ml        |
| 10   | OVX + 雷洛賽芬(EM-1105)      | 0.5           | 0.5 ml        |
| 9    | OVX + E <sub>2</sub>     | 0.5           | 0.5 ml        |

#### 動物之準備：

於試驗之第0日，大鼠其屬於第2-8組進行卵巢切除(以雙側切除)，於吸入性麻醉劑愛舒福能麻醉下進行。大鼠其

15 屬於第1組做虛擬手術。

#### 體重

大鼠稱重於第0日(手術之日)，然後，每隔2日於試驗期間和解剖當日。

### 食物之消耗

食物消耗之評估是以每隔兩天一次於試驗之期間。

### 5 身體組成物(脂肪百分比)

為測定處理之作用產生於脂肪百分比，身體組成物測定於第17日使用雙倍數能量x射線吸光分析儀(型號：DEXA；QDR 4500A，Hologic，Waltham，MA)。

### 動物犧牲之方法

- 10 於試驗之第21日，大約24小時於最後一次給藥之後和6小時之停飼。動物以麻醉藥物易他明-來拉辛(ketamine-xylazine)麻醉下犧牲其方法是以腹部主動脈放血。

### 血液樣品

- 15 血液脂質(總膽固醇和三酸甘油酯)的測定是以冷凍血漿樣品其分析是以Boehringer Mannheim診斷分析儀(型號：Hitachi 911)(製造商：Boehringer Mannheim Diagnostic Laboratory Systems)。體循環之荷爾蒙和受質(胰島素和leptin)之測定是以冷凍血漿樣品描述如下：

- 20 胰島素： Linco放射性免疫分析套組  
Leptin： Linco 放射性免疫分析套組

### 器官和組織之收集

下列組織進行收集並稱重：

肌肉(比目魚肌和VLM)，脂肪(腹膜背面和鼠蹊部)，心

臟，棕色脂肪組織和大腦皆一併收集。

- 一葉肝臟(約1克)置入液態氮供之後測定TG和CHOL之含量(佛氏測定法，Folch's method)。一片約0.1克之所有組織(除了子宮和陰道)凍入液態氮供之後測定脂蛋白脂肪酶(LPL)活性。子宮和陰道保存於10%緩衝液福馬林供進一步組織學檢驗。動物之屍體置於一金屬盒並保存於-20°C直至能量平衡之測定。

### 結果

表 10

| 處理                   | 總重<br>量 | 鼠蹊部白色脂肪組織   |                  | 腹膜背面白色脂肪組織  |                  | 腹膜背面棕色脂肪組織  |                  |
|----------------------|---------|-------------|------------------|-------------|------------------|-------------|------------------|
|                      |         | 重量          | 脂蛋白<br>脂肪酶<br>活性 | 重量          | 脂蛋白<br>脂肪酶<br>活性 | 重量          | 脂蛋白<br>脂肪酶<br>活性 |
|                      |         | g           | μU/g             | g           | μU/g             | g           | μU/g             |
|                      |         |             |                  |             |                  |             |                  |
| 卵巢完整                 | 232±7   | 0.350±0.037 | 379±69           | 1.31±0.09   | 1537±253         | 0.410±0.030 | 973±115          |
| OVX                  | 284±5   | 0.320±0.048 | 797±97           | 1.55±0.15   | 2664±338         | 0.380±0.027 | 880±130          |
| OVX + EM-652.HCl     | 252±4   | 0.244±0.028 | 684±216          | 1.32±0.21   | 1917±365         | 0.339±0.038 | 900±91           |
| OVX + ERA-923        | 260±5   | 0.326±0.042 | 766±173          | 1.27±0.15   | 1750±140         | 0.350±0.019 | 1017±83          |
| OVX + 拉梭福賽芬          | 210±2   | 0.187±0.023 | 801±138          | 0.867±0.132 | 1417±163         | 0.244±0.022 | 982±98           |
| OVX + LY 353381      | 231±4   | 0.290±0.038 | 559±165          | 0.968±0.120 | 1365±119         | 0.368±0.031 | 888±65           |
| OVX + 雷洛賽芬           | 230±3   | 0.245±0.047 | 579±46           | 1.32±0.24   | 1510±52          | 0.307±0.26  | 960±116          |
| OVX + E <sub>2</sub> | 198±4   | 0.158±0.019 | 416±74           | 0.550±0.102 | 1442±243         | 0.211±0.021 | 1198±62          |

| 處理                   | 比目魚肌肉       |               | Vastus Laterralis muscle |               |
|----------------------|-------------|---------------|--------------------------|---------------|
|                      | 重量          | 脂蛋白<br>脂肪酶 活性 | 重量                       | 脂蛋白<br>脂肪酶 活性 |
|                      | g           | μU/g          | g                        | μU/g          |
| 卵巢完整                 | 0.113±0.020 | 17.2±2.2      | 0.924±0.031              | ND            |
| OVX                  | 0.108±0.006 | 17.6±3.9      | 0.963±0.045              | ND            |
| OVX + EM-652.HCl     | 0.118±0.018 | 14.5±4.1      | 1.000±0.047              | ND            |
| OVX + ERA-923        | 0.100±0.004 | 11.7±1.9      | 0.993±0.33               | ND            |
| OVX + 拉梭福賽芬          | 0.096±0.003 | 10.9±1.5      | 0.800±0.048              | ND            |
| OVX + LY 353381      | 0.92±0.002  | 10.1±1.0      | 0.955±0.20               | ND            |
| OVX + 雷洛賽芬           | 0.099±0.003 | 10.2±2.0      | 0.795±0.055              | ND            |
| OVX + E <sub>2</sub> | 0.086±0.003 | 10.9±2.0      | 0.718±0.026              |               |

| 處理                   | 累積     | 血漿          | 血漿        | 血漿        | 血漿        | 血漿          |
|----------------------|--------|-------------|-----------|-----------|-----------|-------------|
|                      | 食物攝取量  | 胰島素         | 葡萄糖       | 總膽固醇      | 三酸甘油酯     | leptin      |
|                      | g      | nmol/L      | nmol/L    | nmol/L    | nmol/L    | nmol/L      |
| 卵巢完整                 | 332±14 | 0.086±0.11  | 13.6±0.7  | 2.41±0.16 | 0.62±0.07 | 2.46±0.37   |
| OVX                  | 389±8  | 0.178±0.030 | 15.9±1.9  | 2.58±0.11 | 0.63±0.05 | 3.48±0.40   |
| OVX +                | 324±5  | 0.122±0.021 | 15.9±1.4  | 1.41±0.09 | 0.91±0.17 | 1.10±0.22   |
| EM-652.HCl           |        |             |           |           |           |             |
| OVX +                | 347±9  | 0.113±0.029 | 16.5±2.7  | 1.66±0.16 | 0.93±0.24 | 2.12±0.44   |
| ERA-923              |        |             |           |           |           |             |
| OVX +                | 283±14 | 0.095±0.017 | 15.8±1.32 | 1.29±0.06 | 0.81±0.21 | 0.97±0.29   |
| 拉梭福賽芬                |        |             |           |           |           |             |
| OVX +                | 312±7  | 0.104±0.11  | 17.1±0.72 | 1.15±0.08 | 1.23±.28  | 1.22±0.21   |
| LY 353381            |        |             |           |           |           |             |
| OVX +                | 307±8  | 0.077±0.10  | 13.8±1.2  | 1.19±0.08 | 1.20±0.35 | 1.39±.30    |
| 雷洛賽芬                 |        |             |           |           |           |             |
| OVX + E <sub>2</sub> | 255±9  | 0.070±0.007 | 11.8±1.35 | 2.03±0.15 | 0.43±0.04 | 0.309±0.097 |

實施例 11

本發明化合物之作用和前置技藝之化合物其產生作用於人體之子宮內膜腺癌石川氏(Ishikawa)細胞之鹼性磷酸酶活性。

#### 材料

#### 5 維護保存株之細胞培養

人體石川氏細胞株係分離自一分化良好之子宮內膜腺癌細胞該細胞株是由 Erlio Gulpide 博士 (Mount Sinai Medical Center, New York, NY) 所慨然提供。石川氏細胞一般培養於伊果最低限必需培養基 (Eagle's Minimum Essential Medium)(MEM) 含有 5%(體積/體積)胎牛血清(FBS) 並補充有 100 U/毫升之盤尼西林, 100 µg/ml 鏈黴素, 0.1 mM 非必需胺基酸溶液。細胞植於商品名: Falcon T75 細胞培養瓶其培養濃度是  $1.5 \times 10^6$  培養溫度是 37°C。

#### 細胞培養之試驗

15 於一試驗開始前 24 小時, 幾近黏連稠密之石川氏細胞培養液置換為無雌激素之基礎培養液(EFBM)含有一無酚紅之商品名: Ham's F-12 和 Dulbecco 氏修改之伊果最低限必需培養基(DMEM)二者的 1:1(體積:體積)混合液補充有 100 U/毫升之盤尼西林, 100 µg/ml 鏈黴素, 2 nM 穀胺醯胺和 5% 胎牛血清此培養液以裹覆聚葡萄糖(dextran)之焦碳處理兩次以移除內含性之類固醇。然後細胞之收取是以 0.1 % 之胰酶(pancreatin)(製造商: Sigma)溶於 0.25 mM 之 HEPES 緩衝液, 再重新懸浮於 EFBM 並植於商品名: Falcon 96 凹槽平底式微量細胞培養盤培養之密度是  $2.2 \times 10^4$  個細胞/每一凹槽

且每一凹槽之體積是100  $\mu$ l然後以24小時使細胞黏附至培養盤表面。此後，培養液之置換是以新鮮之EFBM含有註明之化合物濃度其一最終體積為200  $\mu$ l。細胞培養共5日，置換培養液於每隔48小時之後。

5 鹼性磷酸酶分析測定

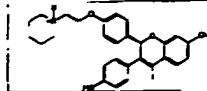
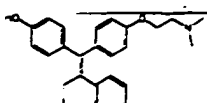
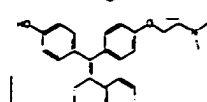
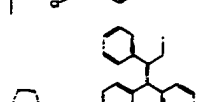
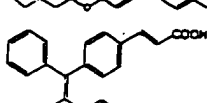
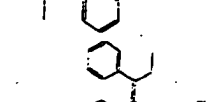
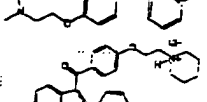
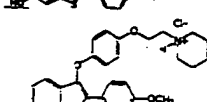
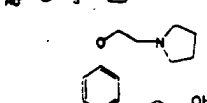
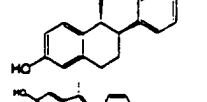
培養期終止時，微量細胞培養盤反轉倒置並丟棄生長培養液。細胞培養盤之沖洗是以每一凹槽200  $\mu$ L之磷酸鹽緩衝液(PBS)(0.15M 氯化鈉，10 mM磷酸鈉，pH 7.4)。PBS 10 移除自細胞培養盤並小心留下一點殘餘之PBS，然後沖洗步驟再重覆一次。緩衝之生理食鹽水於此時丟棄，且細胞培養盤反轉倒置之細胞培養盤小心拍乾於一紙巾。於置換一盤蓋後，細胞培養盤置放於-80°C 共15分鐘接著解凍於室溫 15 下10分鐘。細胞培養盤於此時放置於冰上，且添加50  $\mu$ L 之一冰冷溶液其含有5 mM對-硝基苯磷酸鹽，0.24 mM氯化鎂，和1 M二乙醇胺(pH 9.8)。細胞培養盤於此時回溫至室溫，然後黃色其來自對-硝基苯基之產物進行呈色(8分鐘)。細胞培養盤監測以波長：405 nm於一酵素連結免疫分析測定儀(製造商：BIO-RAD，機型：2550 EIA Reader)。

計算

20 劑量-反應曲線和IC<sub>50</sub>值之計算是使用一加權反覆非線性平方回歸法。

表 11

| 化學名 | 編碼名 | 結構 | 以測試化合物刺激                | 以測試化合物抑制1 nM E <sub>2</sub> |
|-----|-----|----|-------------------------|-----------------------------|
|     |     |    | 鹼性磷酸酶                   | 刺激之鹼性磷酸酶活性                  |
|     |     |    | 1 nM E <sub>2</sub> 刺激* | 之 IC <sub>50</sub> (nM)     |

|                   |                         |                                                                                     | %(試驗數量)           | (試驗數量)            |
|-------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|
| EM-652.HCl        | EM-652.HCl ;<br>EM-1538 |    | 1.88±0.26<br>(22) | 1.52±0.22<br>(18) |
| OH-檀莫賽芬           | EM-882                  |    | 32.4±2.2<br>(8)   | 31.9±6.0<br>(5)   |
| OH-托里美芬           | EM-880                  |    | 29.6±2.1<br>(6)   | 72.1±7.6<br>(3)   |
| OH-伊多賽芬           | EM-1750                 |    | 25.1±1.5<br>(5)   | >1000<br>(2)      |
| GW-5638           | EM-1796                 |    | 7.75±5.5          | 無抑制作用             |
| 爵洛賽芬              | EM-835                  |    | 23.8±3.1<br>(7)   | 291±115<br>(4)    |
| 雷洛賽芬<br>LY 156758 | EM-1105                 |    | 12.8±1.7<br>(8)   | 3.39±0.9<br>(6)   |
| LY 353381         | EM-1665                 |   | 15.5±0.25<br>(5)  | 1.87±0.07<br>(2)  |
| 拉梭福賽芬<br>(無鹼基)    | EM-3114                 |  | 17.9<br>(1)       | 42.4<br>(1)       |
| ERA-923           | EM-3527                 |  | 0.6<br>(1)        | 5.84<br>(1)       |

\*1 nM E<sub>2</sub>刺激\*之%=

化合物之OD 405 nm讀值-基準之OD 405 nm讀值/1  
nM E<sub>2</sub>之OD 405 nm讀值-基準之OD 405 nm讀值。請同時參  
閱Labrie 等人所發表之期刊EM-652(SCH 5768)，一第三代  
5 SERM作用如乳腺和子宮內膜之純抗雌激素，J. Steroid  
Biochem. and Mol. Bio. 69, 51-84, 1999。

### 實施例12

EM-652.HCl和ERA-923之作用產生於人體乳癌MCF-7  
細胞株。

## 方法

### 維護保存株之細胞培養

MCF-7 人體乳癌細胞係取自美國型態收集中心 #HTB22 之 147 號許可且常務性生長於無酚紅-Dulbecco's 修正 Eagle's-Ham's F12 培養液，補充物如以上所提及 5% 胎牛血清。MCF-7 人體乳腺癌細胞株係分離自一高加索 69 歲女性病患之肋膜滲出液。MCF-7 細胞使用係以介於 148 號許可和 165 號許可且每週增殖培養。

### 細胞增殖研究

- 10 細胞於其指數成長後期收取是以 0.1% 胰酶(pancreatin) (製造商：Sigma) 然後再懸浮於適當之培養液含有 50 ng 之胎牛胰島素和 5 % (體積/體積) FBS 以裹覆聚葡萄糖(dextran) 之焦碳處理兩次以移除內含性之類固醇。細胞植於 24 凹槽之商品名：Falcon 9 塑膠培養盤 (2 cm<sup>2</sup>/每一凹槽) 以指定之密度且以 72 小時使細胞黏附至培養盤表面。此後，培養液之置換是以新鮮之培養液含有註明之化合物濃度稀釋自 1000 倍貯存溶液含有 99% 二次蒸餾之乙醇含有或無 E<sub>2</sub>。對照組細胞接受只有乙醇載劑 (0.1 % EtOH，體積/體積)。細胞培養於專一之時間間隔是培養液更換為 2 或 3 天之間隔。細胞數量的測定是以 DNA 含量測定。
- 20

### 計算和統計分析

劑量-反應曲線和 IC<sub>50</sub> 值之計算是使用一加權反覆非線性平方回歸法。所有之結果的表示以平均 ± 標準差。

表 12



| 化學名        | 編碼名                     | 以測試化合物<br>刺激DNA<br>1 nM E <sub>2</sub> 刺激*之% | 以測試化合物抑<br>制1 nM E <sub>2</sub><br>刺激DNA<br>IC <sub>50</sub> (nM) |
|------------|-------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| EM-652.HCl | EM-652.HCl ;<br>EM-1538 | N.S.                                         | 0.796                                                             |
| ERA-923    | EM-3527                 | N.S.                                         | 3.68                                                              |

### 實施例 13

比較作用產生於子宮的重量，脂肪，和脂質該作用係由EM-652.HCl，ERA-923和拉梭福賽芬，投藥是單一投藥或組合有EM-652.HCl，投藥至卵巢切除之雌性大鼠。

URMA-r-44-00

本試驗之目標是比較作用產生於子宮和陰道組織學於EM-652.HCl，ERA-923和拉梭福賽芬處理下，投藥是單一投藥或組合有EM-652.HCl，投藥至卵巢切除之雌性大鼠。為此目的，每一個化合物的投藥是以口服共20日投藥至卵巢切除之雌性大鼠且於處理期結束時，子宮和脂肪做收集和稱重。

### 測試動物之專一性：

品種：*Rattus norvegicus*

品系：Sprague-Dawley 大鼠(Crt：CD<sup>®</sup>(SD)BR VAF/Plus <sup>TM</sup>)

性別：雌性

體重：劑量開始時，體重大約是200-250公克。

### 動物房和飼養

#### a) 動物房：

大鼠之動物房是個別於不鏽鋼籠子於適應和試驗之期間

。

b) 溫度和濕度：

環境狀態(溫度和濕度)於大鼠動物房是持續記錄使用一電腦化自動系統。目標設定狀態是 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 和 $50 \pm 20\%$ 之相對濕度。

c) 光-暗循環：

光週期是12小時光亮和12小時黑暗。這些參數是持續記錄使用一有效之電腦化自動系統。光亮自07:15至19:15。

10 d) 飲食：

有保證之齧齒動物飼料(Lab Diet # 5002，丸狀)和自來水的提供是採不限制之供給。

亂數分配：

大鼠被指定至每一組是以亂數於卵巢切除之時。

15 測試分組：

70隻大鼠區分至7組每組9-11隻動物供進行試驗摘要於下：

| 處理                            | 懸浮液劑量<br>(毫克/每隻大鼠) |
|-------------------------------|--------------------|
| 卵巢完整                          | -                  |
| OVX                           | -                  |
| OVX + EM-652.HCl              | 0.5                |
| OVX + EM-3527                 | 0.5                |
| OVX + EM-652.HCl +<br>EM-3527 | 2.5 + 0.5          |
| OVX + EM-3555                 | 0.5                |
| OVX + EM-652.HCl +<br>EM-3555 | 2.5 + 0.5          |

動物之準備：

第2-9組之動物進行卵巢切除手術於其切除手術於吸入性麻醉藥：愛舒活能Isoflurane麻醉下進行於試驗之第1日。

劑量：

載劑或測試化合物之給予是以懸浮劑溶於0.4%之甲基纖維素其以口服強行餵食(0.5毫升/強行餵食/每隻大鼠)從試驗第2至第21日。

10 體重：

大鼠稱重於試驗之第1日和解剖之日(第22日)。

動物犧牲之方法

最後一次給藥之後大約24小時，隔夜停飼大鼠以麻醉藥物愛舒福能(Isoflurane)誘導之麻醉下犧牲其方法是以腹部主動脈放血。

器官和組織之收集

子宮和腹膜背面之脂肪組織進行移除和稱重。

| 處理                                  | 最後之體重<br>(g) | 腹模背面之<br>脂肪組織(g) | 子宮重量<br>(mg)     | 膽固醇<br>(mmol/L) |
|-------------------------------------|--------------|------------------|------------------|-----------------|
| 卵巢完整                                | 232±5**      | 1.04±0.13**      | 485.8±28.4*<br>* | 1.52±0.09*<br>* |
| OVX                                 | 266±5        | 1.42±0.24        | 152.9±4.7        | 1.91±0.09       |
| OVX + EM-652.HCl                    | 238±4**      | 0.63±0.08**      | 173.0±7.1        | 1.00±0.11*<br>* |
| OVX +<br>ERA-923                    | 248±5**      | 0.84±0.09**      | 162.6±5.2        | 1.20±0.10*<br>* |
| OVX+ERA-923+EM-65<br>2.HCl (2.5 毫克) | 241±1**      | 0.91±0.17**      | 180.2±5.2        | 0.99±0.07*<br>* |

|                                      |         |             |             |            |
|--------------------------------------|---------|-------------|-------------|------------|
| OVX + 拉梭福賽芬                          | 210±3** | 0.52±0.05** | 274.4±9.1** | 0.95±0.09* |
| OVX + 拉梭福賽芬 +<br>EM-652.HCl (2.5 毫克) | 234±3** | 0.74±0.10** | 182.3±4.6   | 0.95±0.07* |

\*, p<0.05; \*\*, p<0.001, 試驗對比於OVX對照組

### 藥學組成物之實施例

於以下所列，是以實施例之方式而不做限制，是多種藥學組成物其使用是以理想之活性 SERM EM-800 或 EM-652.HCl 單獨或組合有一個理想之活性的一個性類固醇前驅物 DHEA，雄-5-烯-3b,17b-二醇 3-醋酸鹽或雄-5-烯-3b,17b-二醇二半琥珀鹽。活性成份之濃度可以變化於一很寬之範圍如在此所討論。其他成份之數量和型態其可能被包含者是技藝中所以知。

### 10 實施例 A

本發明理想之 SERMs 是以口服投藥

#### 藥錠

| 成份         | 重量%<br>(以所有之組成物之重量) |
|------------|---------------------|
| EM-652.HCl | 5.0                 |
| 明膠         | 5.0                 |
| 乳糖         | 73.5                |
| 澱粉         | 16.5                |

### 實施例 B

#### 膠囊

| 成份         | 重量%<br>(以所有之組成物之重量) |
|------------|---------------------|
| EM-652.HCl | 5.0                 |
| 水合乳糖       | 80.0                |

|        |     |
|--------|-----|
| 澱粉     | 4.8 |
| 纖維素微晶粒 | 9.8 |
| 硬脂酸鎂   | 0.4 |

### 藥學組成物供組合式處理

#### 實施例C

5

#### 藥錠

| 成份         | 重量%<br>(以所有之組成物之重量) |
|------------|---------------------|
| EM-652.HCl | 5.0                 |
| DHEA       | 15.0                |
| 明膠         | 5.0                 |
| 乳糖         | 58.5                |
| 澱粉         | 16.5                |

#### 實施例D

#### 明膠膠囊

| 成份         | 重量%<br>(以所有之組成物之重量) |
|------------|---------------------|
| EM-652.HCl | 5.0                 |
| DHEA       | 15.0                |
| 水合乳糖       | 65.0                |
| 澱粉         | 4.8                 |
| 纖維素微晶粒     | 9.8                 |
| 硬脂酸鎂       | 0.4                 |

### 10 套組之實施例

於以下所列，是以實施例之方式而不做限制，是多種套組其使用是以理想之活性SERM EM-800或EM-652.HCl單獨或組合有一個理想之活性的一個性類固醇前驅物

DHEA，雄-5-烯-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -二醇3-醋酸鹽或雄-5-烯-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -二醇二半琥珀酸鹽。

本發明其他之化合物或相關之組合，可以使用於(或添加於)EM-800或EM-652.HCl單獨或組合有一個理想之活性的一個性類固醇前驅物DHEA、雄-5-烯-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -二醇3-醋酸鹽或雄-5-烯-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -二醇二半琥珀酸鹽。活性成份之濃度可以變化於一很寬之範圍如在此所討論。其他成份之數量和型態其可能被包含者是技藝中所以知。

實施例A

SERM是口服投藥而性類固醇前驅物是經皮膚投藥。

SERM組成物供口服投藥(膠囊)

| 成份         | 重量%<br>(以所有之組成物之重量) |
|------------|---------------------|
| EM-652.HCl | 5.0                 |
| 水合乳糖       | 80.0                |
| 澱粉         | 4.8                 |
| 纖維素微晶粒     | 9.8                 |
| 硬脂酸鎂       | 0.4                 |

5

性類固醇前驅物組成物供局部投藥

(凝膠)

| 成份                               | 重量%<br>(以所有之組成物之重量) |
|----------------------------------|---------------------|
| DHEA                             | 10.0                |
| 癸基-癸酸 三酸甘油酯<br>(編碼名：Neobee M-5)  | 5.0                 |
| 全思庫妥(Transcotol)<br>(二乙二醇單甲基醚)   | 15.0                |
| 苯基乙醇                             | 5.0                 |
| 賽卡美塞康<br>(編碼名：Dow coring<br>345) | 2.0                 |
| 乙醇(純乙醇)                          | 56.0                |
| 羥基丙基纖維素<br>(1500 cps)(KLUCEL)    | 2.0                 |

實施例 B

SERM和性類固醇前驅物是以口服投藥。

非類固醇抗雌激素組成物係供口服投藥。

(膠囊)

| 成份         | 重量%<br>(以所有之組成物之重量) |
|------------|---------------------|
| EM-652.HCl | 5.0                 |
| 水合乳糖       | 80.0                |
| 澱粉         | 4.8                 |
| 纖維素微晶粒     | 9.8                 |
| 硬脂酸鎂       | 0.4                 |

5

10 %性類固醇前驅物組成物係供口服投藥

(明膠膠囊)

| 成份     | 重量%<br>(以所有之組成物之重量) |
|--------|---------------------|
| DHEA   | 15.0                |
| 纖維素微晶粒 | 84.6                |
| 硬脂酸鎂   | 0.4                 |

其他SERMs可以替代EM-800或EM-652.HCl於以上之  
 配方當中，與此相同的是其他性類固醇抑制劑可以替代  
 10 DHEA，雄-5-烯-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -二醇3-醋酸鹽或雄-5-烯-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -二  
 醇二半琥珀酸鹽。不止一個SERM或不止一個前驅物可以被  
 包含於此個例時組合之重量百分比之理想是等於重量百分  
 比供單一前驅物或單一SERM列於以上之實施例。

本發明之描述是以理想之具體例和實施例，但不因此  
 15 而有所限制。該等技藝中之技術將易於確認更廣範之可應  
 用性且本發明之範疇其限制僅由本專利案於此之申請專利  
 範圍。



### 【圖式簡單說明】

第1圖係顯示，以增高的劑量(0.01、 0.03、 0.1、 0.3、 1 mg/kg，口服，每天一次)之SERMs EM-800、雷洛賽芬、檀莫賽芬和一個無活性之鏡像異構物 EM-776 (EM-800之鏡像異構物)對於卵巢切除的大鼠來處理35週之整體體脂肪之作用。數據係以平均值±平均值之標準誤差(SEM)來表示。\*\*:  $P < 0.01$ 實驗組相對於個別之對照組。

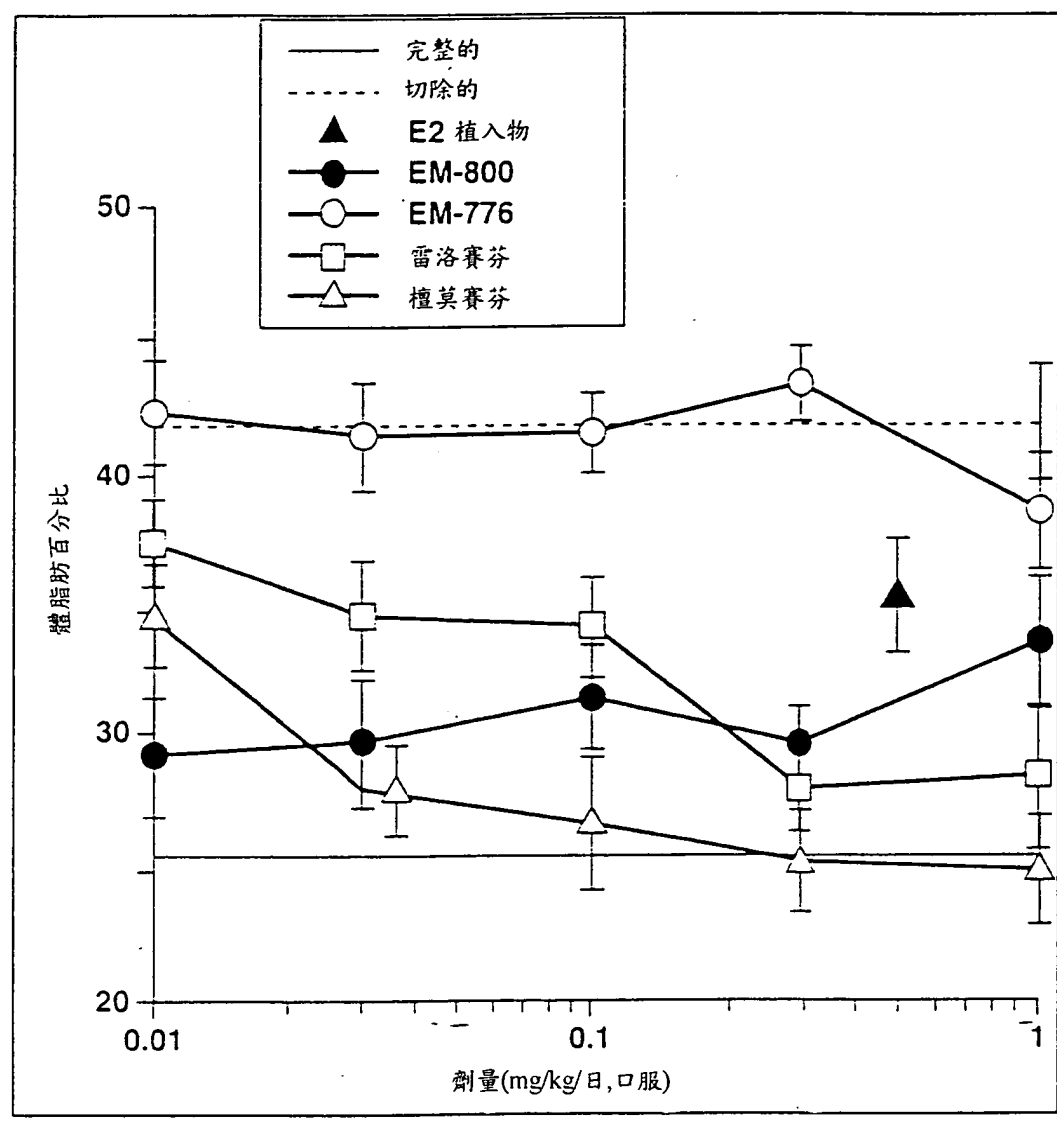
第2圖係顯示，卵巢完整之大鼠、卵巢切除的大鼠以及以SERM EM-652.HCl或雌二醇來處理之卵巢切除的大鼠，在一個20天之處理期下，對於體重增加(A)、蛋白質增加(B)以及脂肪增加(C)之作用。數據係以公克計之平均值±SEM來表示。\*  $P < 0.05$ 相對於卵巢完整組；+  $P < 0.05$ 相對於卵巢切除的(OVX)+雌二醇組(僅有關於EM-652.HCl組)。

第3圖係顯示，卵巢完整之大鼠、卵巢切除的大鼠以及以SERM EM-652.HCl或雌二醇來處理之卵巢切除的大鼠，在一個20天之處理期下，對於累積食物攝取量上之作用。數據係以公克來表示。

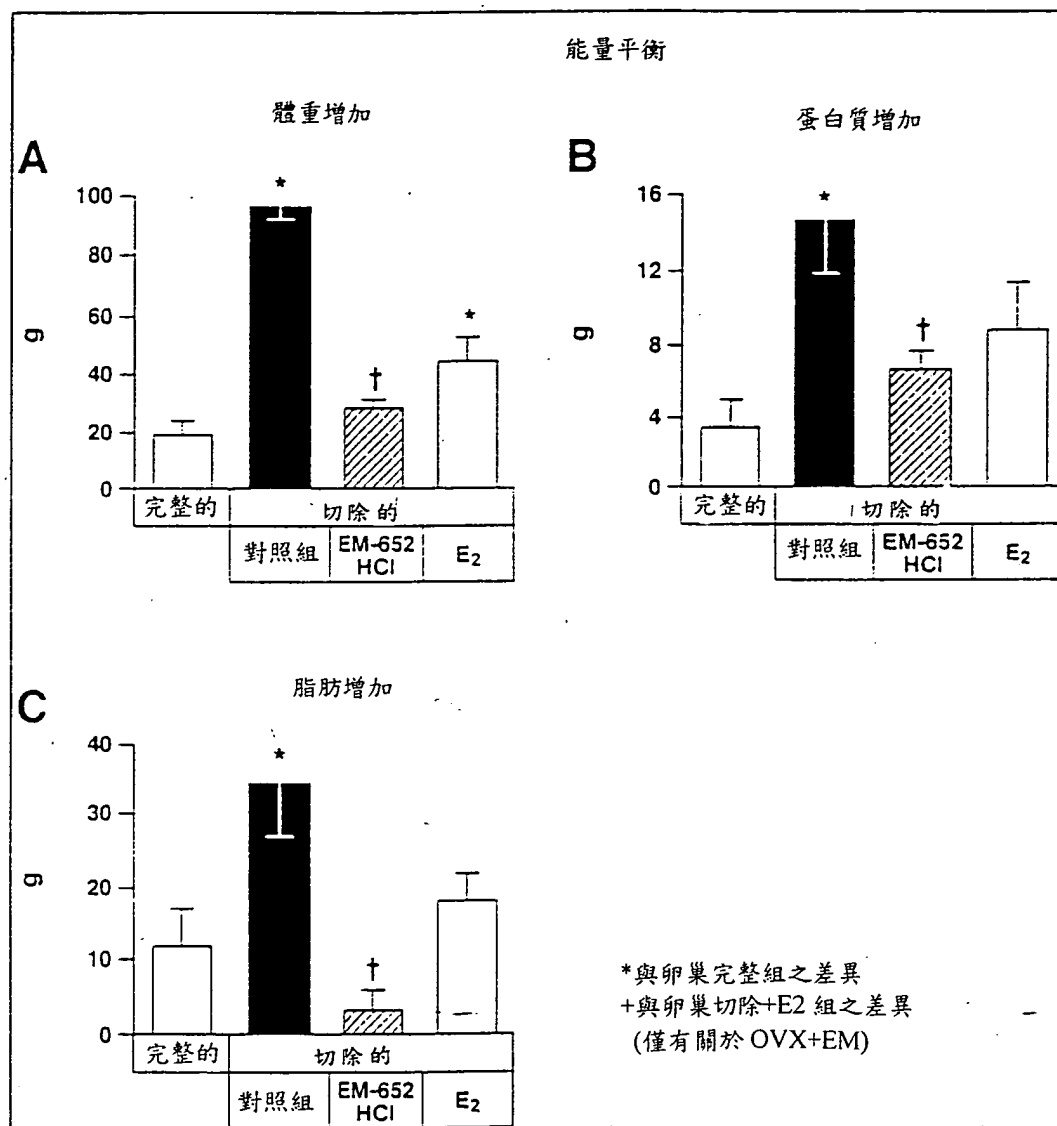
第4圖係顯示，卵巢完整之大鼠、卵巢切除的大鼠以及以SERM EM-652.HCl或雌二醇來處理之卵巢切除的大鼠，在一個20天之處理期下，對於當作蛋白質之身體能量(A)與當作脂肪(B)之身體能量的作用。數據係以千焦耳(kj)計之平均值±SEM來表示。\*  $P < 0.05$ 相對於卵巢完整組；+ $P < 0.05$ 相對於OVX+雌二醇組(僅有關於EM-652.HCl組)。

第5圖係顯示，卵巢完整之大鼠、卵巢切除的大鼠以及

第 1 圖

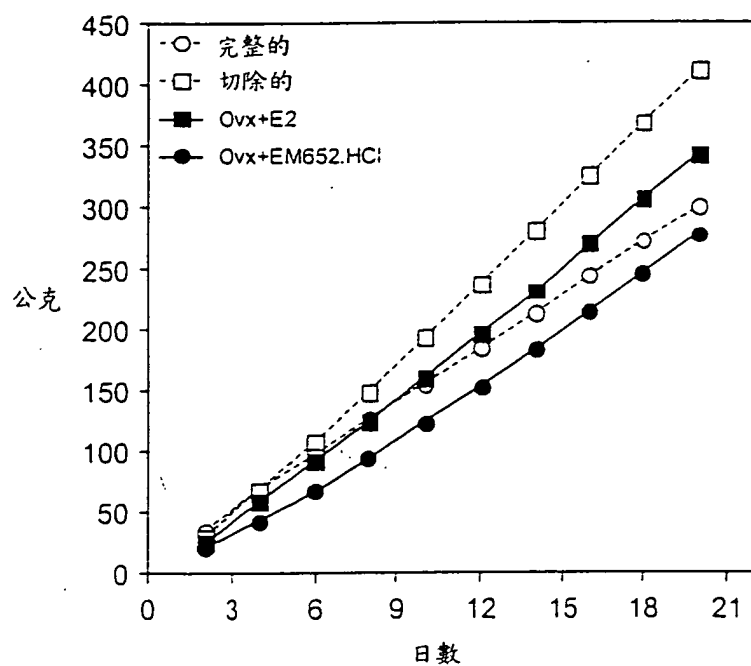


# 第 2 圖

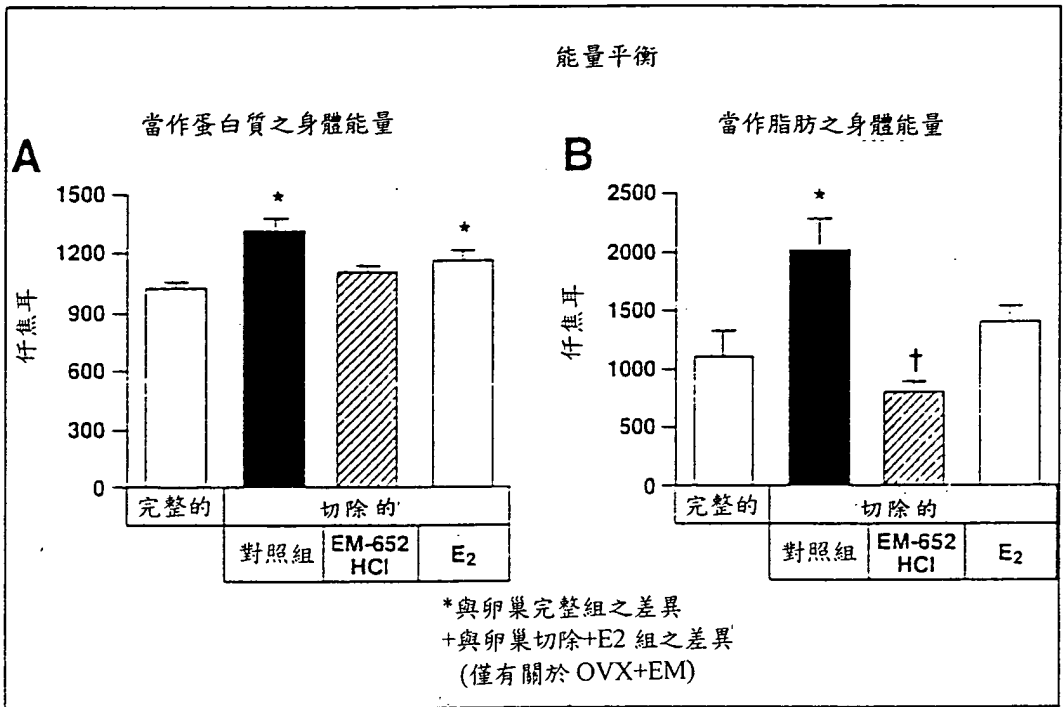


# 第 3 圖

累積之食物攝取



第 4 圖



七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (    ) 圖。(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

公告本

## 發明專利說明書

100.11.09  
修正  
補充  
頁

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：96104627 (由 89113329 分割)

※ 申請日期：89.7.5

※IPC 分類：A61K 31/352  
A61K 31/565  
A61P 3/04

## 一、發明名稱：(中文/英文)

用於治療或預防肥胖之藥學組成物

PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATMENT OR PREVENTION  
OF OBESITY

## 二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

加拿大商·安多瑞翠奇股份有限公司 / ENDORECHERCHE INC.

代表人：(中文/英文)

拉布瑞 佛納德 / LABRIE, FERNAND

住居所或營業所地址：(中文/英文)

加拿大魁北克省聖地佛伊·波米納迪路2989號/

2989 de la Promenade, Ste-Foy, Quebec G1W 2J5, Canada

國 籍：(中文/英文)

加拿大 / Canada

## 三、發明人：(共 5 人)

姓 名：(中文/英文)

(1)佛納德·拉布瑞 / Fernand Labrie

(2)伊維斯·迪夏伊斯 / Yves Deshaies

(3)丹尼斯·理察 / Denis Richard

(4)希里尼·馬提爾 / Celine Martel

(5)安德里·馬里提 / Andre Marette

國 籍：(中文/英文)

加拿大 / Canada

修正  
補充  
97年7月4日

第4圖係顯示，卵巢完整之大鼠、卵巢切除的大鼠以及以SERM EM-652.HCl或雌二醇來處理之卵巢切除的大鼠，在一個20天之處理期下，對於當作蛋白質之身體能量(A)與當作脂肪(B)之身體能量的作用。數據係以千焦耳(kj)計之平均值 $\pm$ SEM來表示。 $* P<0.05$ 相對於卵巢完整組； $+P<0.05$ 相對於OVX+雌二醇組(僅有關於EM-652.HCl組)。

第5圖係顯示，卵巢完整之大鼠、卵巢切除的大鼠以及以SERM EM-652.HCl或雌二醇來處理之卵巢切除的大鼠，在一個20天之處理期下，對於血清胰島素含量和血清葡萄糖含量之作用。數據係以nmol/L計之平均值 $\pm$ SEM來表示。 $* P<0.05$ 相對於卵巢完整組。

第6圖係顯示，動物為卵巢完整之大鼠，卵巢切除大鼠，以SERM EM-652.HCl或雌二醇治療之卵巢切除大鼠，在一個20天之處理期下，對於白色脂肪組織參數之作用：鼠蹊部的(A)和腹膜後的(C)脂肪組織重量(數據係以公克計之平均值 $\pm$ SEM來表示)，鼠蹊部的(B)和腹膜後的(D)白色脂肪組織脂蛋白脂肪酶活性(數據係以 $\mu$ U/g蛋白質計之平均值 $\pm$ SEM來表示； $+P<0.05$ 相對於OVX+雌二醇組(僅有關於EM-652.HCl組))。

第7圖係顯示，在一個20天週處理期下，對於肩胛骨間棕色脂肪組織之參數的作用：(A)棕色脂肪組織重量(數據係以公克(g)計之平均值 $\pm$ SEM來表示， $*P<0.05$ 相對於卵巢完整之大鼠之對照組； $+P<0.05$ 相對於OVX+雌二醇組(僅有關於EM-652.HCl組))；(B)蛋白質含量(數據單係以組織重量



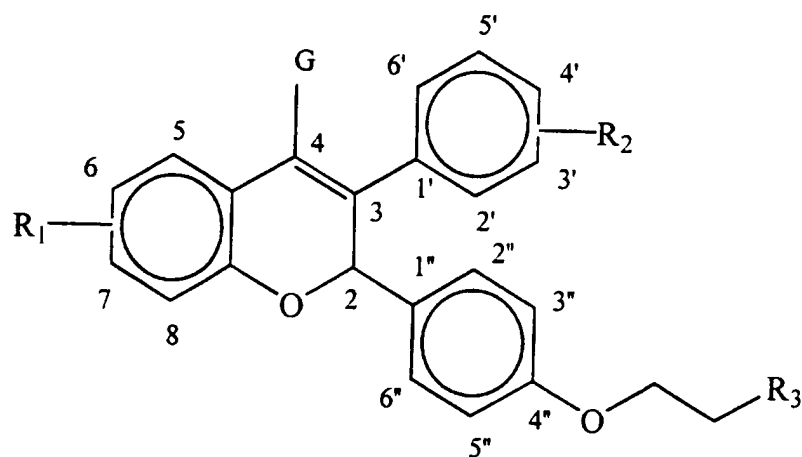
%計之平均值 $\pm$ SEM來表示；\*  $P<0.05$ 相對於卵巢完整組；  
+ $P<0.05$ 相對於OVX+雌二醇組(僅有關於EM-652.HCl組)，  
和(C)脂蛋白脂肪酶活性(數據係以 $\mu$ U/g蛋白質計來表示)。

第8圖係顯示，卵巢完整之大鼠、卵巢切除的大鼠以及  
5 以SERM EM-652.HCl或雌二醇來處理之卵巢切除的大鼠，  
在一個20天之處理期下，對於比目魚肌重量(數據係以公克  
計之平均值 $\pm$ SEM來表示)和脂蛋白脂肪酶活性(數據係以  
 $\mu$ U/g蛋白質計之平均值 $\pm$ SEM來表示；\*  $P<0.05$ 相對於卵巢  
完整組)之作用。

## 10 【實施方式】

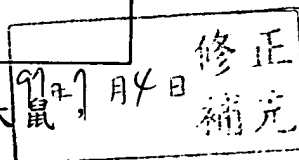
較佳實施例之詳細說明

較佳地是投藥一種藥學組成物，該組成物包含有一藥  
學上可接受之賦形劑、稀釋劑或載劑以及一治療有效量之  
一個具有下列通式I之選擇性雌激素受體調節劑：



15

其中 $R_1$ 和 $R_2$ 是各自選自於下列群組：氫、羥基、-OM (M  
係選自於群組由直鏈或支鏈 $C_1$ - $C_4$ 烷基、直鏈或支鏈 $C_3$ - $C_4$   
烯基、直鏈或支鏈 $C_3$ - $C_4$ 炔基所構成之群組中)和一個可於活  
體內轉化為羥基之部分；



以 SERM EM-652.HCl 或雌二醇來處理之卵巢切除的大鼠，  
在一個 20 天之處理期下，對於血清胰島素含量和血清葡萄糖含量之作用。數據係以 nmol/L 計之平均值  $\pm$  SEM 來表示。

\*  $P < 0.05$  相對於卵巢完整組。

- 5 第 6 圖係顯示，動物為卵巢完整之大鼠，卵巢切除大鼠，以 SERM EM-652.HCl 或雌二醇治療之卵巢切除大鼠，在一個 20 天之處理期下，對於白色脂肪組織參數之作用：鼠蹊部的 (A) 和腹膜後的 (C) 脂肪組織重量 (數據係以公克計之平均值  $\pm$  SEM 來表示)，鼠蹊部的 (B) 和腹膜後的 (D) 白色脂肪
- 10 組織脂蛋白脂肪酶活性 (數據係以  $\mu$ U/g 蛋白質計之平均值  $\pm$  SEM 來表示；+ $P < 0.05$  相對於 OVX+雌二醇組 (僅有關於 EM-652.HCl 組))。

- 第 7 圖係顯示，在一個 20 天週處理期下，對於肩胛骨間棕色脂肪組織之參數的作用：(A) 棕色脂肪組織重量 (數據
- 15 係以公克 (g) 計之平均值  $\pm$  SEM 來表示，\* $P < 0.05$  相對於卵巢完整之大鼠之對照組；+ $P < 0.05$  相對於 OVX+雌二醇組 (僅有關於 EM-652.HCl 組))；(B) 蛋白質含量 (數據單係以組織重量 % 計之平均值  $\pm$  SEM 來表示；\*  $P < 0.05$  相對於卵巢完整組；+ $P < 0.05$  相對於 OVX+雌二醇組 (僅有關於 EM-652.HCl 組)，
- 20 和 (C) 脂蛋白脂肪酶活性 (數據係以  $\mu$ U/g 蛋白質計來表示)。

第 8 圖係顯示，卵巢完整之大鼠、卵巢切除的大鼠以及以 SERM EM-652.HCl 或雌二醇來處理之卵巢切除的大鼠，在一個 20 天之處理期下，對於比目魚肌重量 (數據係以公克計之平均值  $\pm$  SEM 來表示) 和脂蛋白脂肪酶活性 (數據係以

第 96104627 號專利申請案 說明書修正頁 97 年 7 月

$\mu\text{U/g}$ 蛋白質計之平均值 $\pm\text{SEM}$ 來表示；\*  $P<0.05$ 相對於卵巢完整組)之作用。

【主要元件符號說明】

無

修正  
77年7月4日  
補充

## 五、中文發明摘要：

100年11月9日 修正補充頁

用於對易罹患之溫血動物(包括人類)來醫學治療及/或預防肥胖、腹部脂肪和胰島素抗性之新穎藥學組成物涉及到選擇性雌激素受體調節劑(SERMs)之投藥。本案亦揭示一個由SERM與一數量之雌激素或一性類固醇前驅物所構成之組合，該前驅物係選自於下列群組：脫氫異雄固酮、脫氫異雄固酮硫酸鹽、雄-5-烯-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -二醇，以及於活體內會轉化成為前述前驅物或雌激素之任一者的化合物。

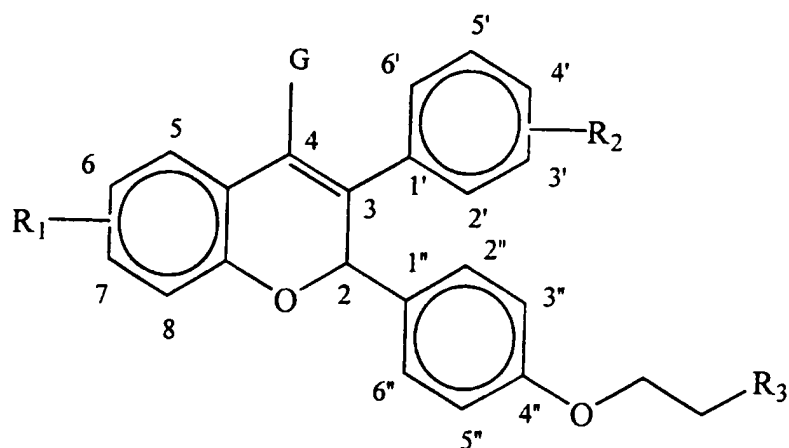
## 六、英文發明摘要：

Novel pharmaceutical composition for the medical treatment and/or prevention of obesity, abdominal fat, and insulin resistance in susceptible warm-blooded animals including humans involves the administration of selective estrogen receptor modulators (SERMs). A combination of a SERM with an amount of estrogen or a sex steroid precursor selected from the group consisting of dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, androst-5-ene-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol and compounds converted *in vivo* to one of the foregoing precursors or estrogen is also disclosed.

## 十、申請專利範圍：

## 公告本

一種用於治療或預防至少一種選自於肥胖、腹部肥胖以及胰島素抗性的疾病之藥學組成物，其包含一藥學上可接受之賦形劑、稀釋劑或載劑，一治療上可接受量之一具有下列通式的選擇性雌激素受體調節劑：



其中

$R_1$ 和 $R_2$ 是各自選自於由下列所組成之群組：氫、羥基、-OM (M係選自於由直鏈或支鏈 $C_1$ - $C_4$ 烷基、直鏈或支鏈 $C_3$ - $C_4$ 烯基、直鏈或支鏈 $C_3$ - $C_4$ 炔基所構成之群組中)和一個可於活體內轉化為羥基之部分；

G是-H或- $CH_3$ ；

$R_3$ 是一個選自於由下列所組成之群組中之物種：

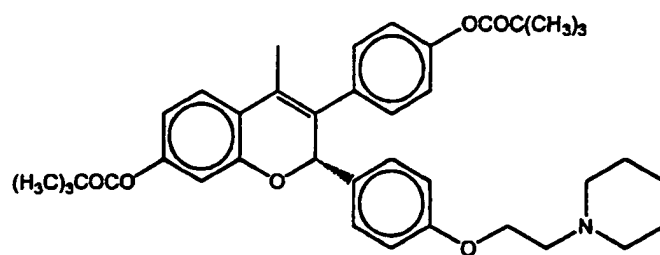
吡咯啶基、哌啶並基、嗎啉並基和NRaRb (Ra和Rb分別是氫、直鏈或支鏈 $C_1$ - $C_6$ 烷基、直鏈或支鏈 $C_3$ - $C_6$ 烯基、直鏈或支鏈 $C_3$ - $C_6$ 炔基)；以及

一性類固醇前驅物，該前驅物是選自於由下列所組成之群組：脫氫異雄固酮、脫氫異雄固酮硫酸鹽、雄-5-烯

-3b,17b-二醇和可於活體內轉化成為該等前驅物之任一者的化合物。

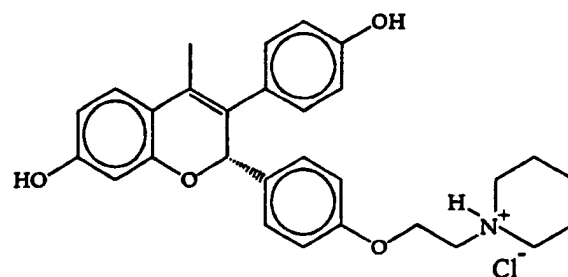
2. 如申請專利範圍第1項之藥學組成物，其中該選擇性雌激素受體調節劑是選自於由下列所組成之群組：

**EM-800**



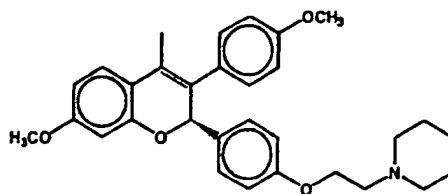
和

**EM-652.HCl**

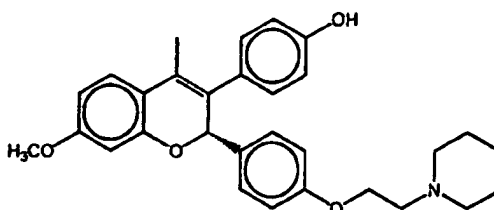


3. 如申請專利範圍第1項之藥學組成物，其中該選擇性雌激素受體調節劑是選自於由下列所組成之群組：

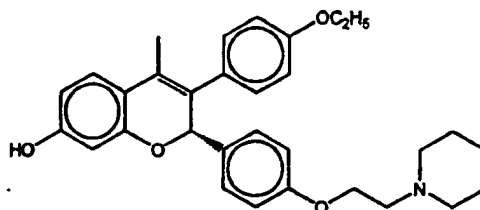
EM-01732



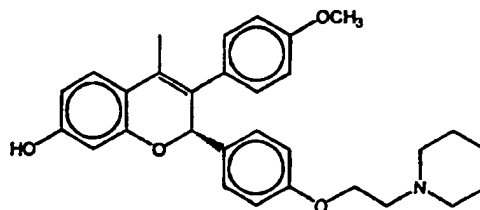
EM-01872-B



EM-01900-B



EM-01903-C

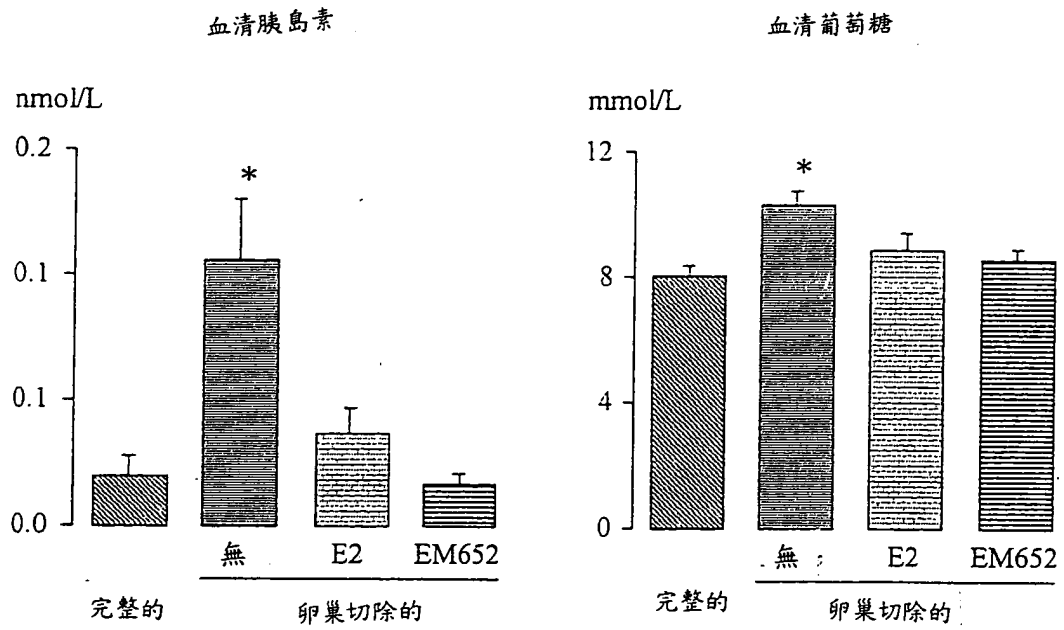


4. 一種用於在一需要的個體體內治療胰島素抗性或降低發展出胰島素抗性之風險的藥學組成物，其包含一治療有效量之一選擇性雌激素受體調節劑以及一治療有效量之一性類固醇前驅物，該前驅物係選自於下列群組：脫氫異雄固酮、脫氫異雄固酮硫酸鹽、雄-5-烯-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -二醇，和可於活體內轉化成為該等前驅物之任一者的化合物。

97年7月4日 修正 補充頁

第 96104627 號專利申請案 中文圖式修正頁 97 年 7 月

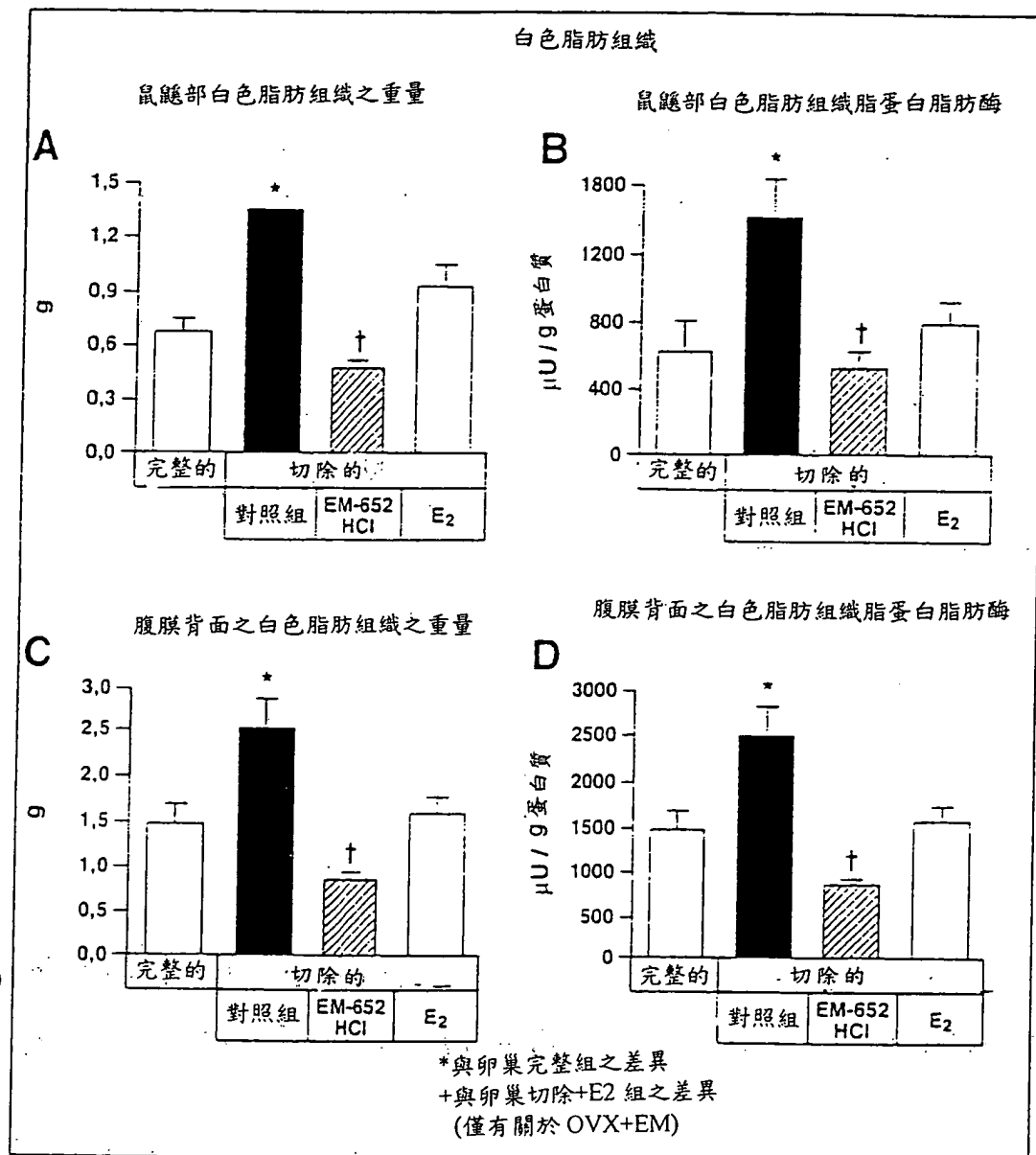
第 5 圖



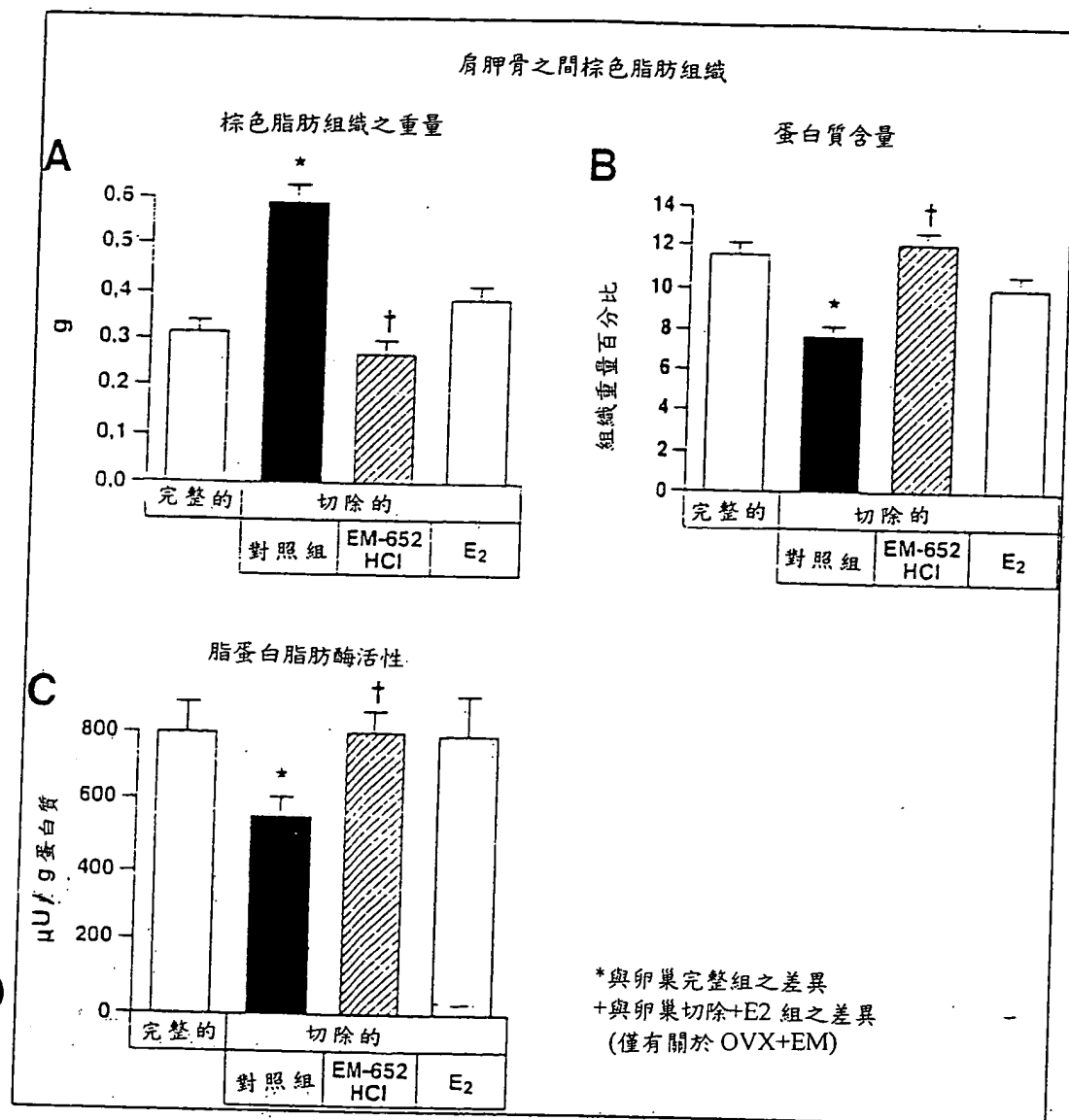
\*與卵巢完整組之差異  
+與卵巢切除+E2 之差異



第 6 圖



第 7 圖



第 8 圖

