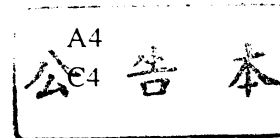


申請日期	89.7.8
案號	89115757
類別	C07D 333/64 A61K 31/57



(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	6-羥基-3-(4-[2-(六氫吡啶-1-基)乙氧基]苯氧基)-2-(4-甲氧基)苯并[b]噻吩氫氯化物之新穎晶形
	英 文	"A NOVEL CRYSTALLINE FORM OF 6-HYDROXY-3-(4-[2-(PIPERIDIN-1-YL) ETHOXY] PHENOXY)-2-(4-METHOXYPHENYL) BENZO [b] THIOPHENE HYDROCHLORIDE"
二、發明 人	姓 名	1. 茉莉 凱 布希 2. 普萊斯頓 查爾斯 康萊德 3. 梅爾林 傑拉德 富羅姆 4. 偉恩 道格拉斯 路克
	國 籍	均美國
三、申請人	住、居所	1. 美國印第安那州費雪斯市紅莓路10671號 2. 美國印第安那州印第安那普利市營火路7336號 3. 美國印第安那州諾伯斯維爾市羅克斯伯利路404號 4. 美國印第安那州西拉法耶市珍寧街208號
	姓 名 (名稱)	美國禮來大藥廠
	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國印第安那州印第安那普利市禮來公司中心
	代 表 人 姓 名	彼得·G. 史君格

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期：

案號：

，☐有 ☐無主張優先權

美國

1999年07月29日

60/146,286

☒有 ☐無主張優先權

美國

1999年08月06日

60/147,570

☒有 ☐無主張優先權

美國

1999年08月19日

60/149,773

☒有 ☐無主張優先權

有關微生物已寄存於：

，寄存日期：

，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

五、發明說明(1)

發明範圍

在美國專利申請案第5,510,357號中最先概括說明6-羥基-3-(4-[2-(六氫吡啶-1-基)乙氧基]苯氧基)-2-(4-甲氧苯基)苯并[b]噻吩氫氯化物(阿諾西吩(arzoxifene))及特別揭示在美國專利申請案第5,723,474號('474)及歐洲專利申請案第0729956號。阿諾西吩是一種非類固醇混合之雌激素拮抗物/興奮劑,適用於例如降低血清膽固醇及抑制血內類脂質過多、骨質疏鬆症、與雌激素有關的癌症(如乳癌及子宮癌)、子宮內膜組織異位形成、CNS失調(包括阿耳滋海默氏病)、主動脈平滑肌細胞增殖及重狹窄症(restenosis)。

阿諾西吩特別適用於及以臨床評估於受體陽性轉移乳癌治療;依循適當的系統或局部診療之受體陽性病患之補助治療;減低侵入性及非侵入性乳癌之復發及減低侵入性乳癌與原位置導管癌瘤(DCIS)之發病率。阿諾西吩也適用於與放射療法、芳香酶抑制劑、LHRH類似物及乙醯膽鹼酯酶(AChE)抑制劑組合。

以在'474指導的步驟分離之整個阿諾西吩之X-射線粉末繞射法(XRD)、熱解重量分析法(TGA)、質子核磁共振法(^1H NMR)及卡爾費希爾法(Karl Fischer)(KF)分析稍後顯示該物質被水解,具有差的結晶及在其晶格中包括不同量的有機揮發物(醋酸乙酯)。

就配方處理而言,差的結晶物質典型比高結晶物質更不受期望。此外,通常不希望調配合大量有機溶劑(例如,醋酸乙酯)之藥物,因為對其服用者有潛在的溶劑毒性及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(2)

改變藥物因溶劑關係之效能。

雖然可將以'474指導的步驟製備之阿諾西吩當成藥物使用，但是，可能更希望及有利於找尋更具晶形之阿諾西吩，在其結晶格內不包括有機溶劑，可以商業標準再生及有效地製備該物質。

本發明概述

本發明係關於6-羥基-3-(4-[2-(六氫吡啶-1-基)乙氧基]苯氧基)-2-(4-甲氧苯基)苯并[b]噻吩氫氯化物(F-I)之非化學計量水合之新穎晶形，其具有在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 及 $35 \pm 10\%$ 相對濕度(RH)下自銅照射源獲得的X-射線繞射圖案，其包含在 2θ 中的以下高峰： 7.9 ± 0.2 、 10.7 ± 0.2 、 14.9 ± 0.2 、 15.9 ± 0.2 、 18.3 ± 0.2 及 $20.6 \pm 0.2^\circ$ 。

而且，本發明係關於含有F-I、一或數個製藥學載體、稀釋液或賦形劑及視需要之雌激素、視需要之孕激素、視需要之芳香酶抑制劑、視需要之LHRH類似物及視需要之乙醯膽鹼酯酶(AChE)抑制劑等之製藥學配方。

此外，本發明係關於利用F-I抑制病理狀態及利用F-I製造抑制該病理狀態之藥品之方法，如子宮纖維變性、子宮內膜組織異位形成、主動脈平滑肌細胞增殖症、重狹窄症、乳癌、子宮癌、攝護腺癌、良性攝護腺增殖症、骨質流失、骨質疏鬆症、心與血管疾病、血內類脂質過多、CNS失調及阿耳滋海默氏病。

本發明進一步係關於利用F-I向上調節膽鹼乙醯轉化酶(ChAT)及利用F-I製造向上調節膽鹼乙醯轉化酶之藥品之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (3)

方法。

圖形的簡要說明

圖 1 是 S-II 的代表性差示掃描量熱法 (DSC)/TGA 痕量。

圖 2 是 F-I 的代表性 (DSC)/TGA 痕量。

圖 3 是 F-II 的代表性 (DSC)/TGA 痕量。

圖 4 是 F-III 的代表性 (DSC)/TGA 痕量。

圖 5 描述 S-II 之解溶劑化與乾燥時'間及溫度之函數關係。

本發明的詳細說明

以 '474 指導的步驟 (實施例 41, 自乙醇與醋酸乙酯之混合物結晶, 在室溫下以過濾及在其空中將濾塊過濾成固定重量) 製備之整體阿諾西吩以 XRD 特徵化, 並發現其具有差的結晶度。經 ^1H NMR 確認整體物質包括 6% 之醋酸乙酯。

於是改良以 '474 指導的結晶步驟, 所以在醋酸乙酯回流時, 將乙醇加入粗阿諾西吩懸浮液中。一經冷卻及真空過濾時, 以該改良步驟生成之固體具有混合阿諾西吩之醋酸乙酯/水媒合物之高結晶度 (以下稱為 S-II), 後來發現其是 F-I 之起始物。

以真空乾燥/在上升的溫度下將 S-II 退火, 可自 S-II 晶格除去醋酸乙酯, 以製備 F-I。為了製備 F-I, 則使 S-II 退火所需要的時間及溫度會有很大的改變, 但典型是在約 100°C 下等於 5 天。需要以高溫度經由該步驟達到 S-II 轉換成 F-I, 因為在室溫下的水中泥漿 S-II 或在 98% RH 下貯存 3 週的樣品不會提供任何 F-I 的轉換。而且, 在高溫下的轉換烘箱中乾燥 S-II 不會使任何物質解溶劑化, 其暗示也需要以真空

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (4)

推出S-II晶格之醋酸乙酯。

較佳地是自四氫呋喃結晶阿諾西吩(或任何其多晶型物/媒合物)可輕易在室溫下製備及分離F-I。先將阿諾西吩溶解在四氫呋喃中(以體積計1-10%的水,以2.5-7.5%較佳及以4.5至5.5最佳),接著經由大氣蒸餾除去該水的方式進行該結晶。在以下的實施例2中詳細說明該結晶作用的實施例。在以該改良結晶步驟製備F-I時,則可預期總相關物質(TRS)量<0.5%。

適合於該結晶作用之阿諾西吩起始物包括(但不限於此)S-II、F-III、以'474指導的步驟製備的阿諾西吩或其任何混合物。阿諾西吩的起始形式不重要,因為根據本文說的步驟,自四氫呋喃結晶會生成F-I結晶。關於F-I合成作用的商業標準,可方便於以F-I種植結晶。

自異丙醇(IPA)與水的混合物之阿諾西吩(或任何其多晶型物/媒合物)結晶作用可輕易製備阿諾西吩的另一個非化學計量水合物,F-III。水對IPA(體積:體積)之比例通常是約1:1至9:1。以介於2.5與5.6:1之比例更佳。以介於3與5.6:1之比例最佳。IPA對水的比例對F-III結晶的影響不重要,但是,其確實會影響產量。關於F-III合成作用的商業標準,可方便於以F-III種植結晶。適合於以上結晶作用之阿諾西吩起始物包括(但不限於此)S-II、F-I、以'474指導的步驟製備的阿諾西吩或其任何混合物。

S-II、F-I及F-III之特徵及差異

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(5)

利用 DSC/TGA 及 XRD 法使 S-II、F-I 及 F-III 特徵化。TGA 時常適用於辨別物質不同的固體形式，因為使物質發生物理變化的溫度經常是多晶型物或媒合物的特徵。DSC 是常用於將多晶型物及媒合物形成作用之化合物分級的技術。最後，XRD 是偵測在結晶物質中的遠距離等級的技術。

以 '474 指導的步驟製備的阿諾西吩提供差的信號對雜訊比例及上升的基準線之 XRD 圖案，顯示差的結晶物質。因此，比較以 F-I 及 F-III 製成由以上討論的改良阿諾西吩結晶步驟(將乙醇加入在醋酸乙酯回流時的阿諾西吩懸浮液中)生產的物質(S-II)。

在圖 1、2 及 3 中分別展示 S-II、F-I 及 F-III 的代表性 DSC/TGA 痕量。S-II 之 DSC 痕量展示在約 62°C 開始的寬幅吸熱，對應於醋酸乙酯與水自晶格的損失。在約 152°C 開始的吸熱代表溶解。約 2.5% 的 TGA 重量損失同時發生在第一次轉變作用，同時剩餘的 0.5% 重量損失發生在直到開始溶解時，其暗示部份的溶劑分子會更緊密地束縛在晶格中。

F-I 之 DSC 痕量展示在約 75°C 開始的寬幅吸熱，接著在對應於熔融物的約 155°C 開始的第二次吸熱。F-I 之 DSC 痕量展示 0.3% 的漸進式重量損失，接著是 1.5% 的急速損失，其同樣代表晶格的脫水作用。第一次 DSC 轉變作用的開始及對應的 TGA 重量損失會有些微相抵，因為加熱速度的差異。初重量損失代表以水合作用弱束縛的水，而第二次重量損失等於在非常低的相對濕度下(低於 5% - 參考濕度吸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(6)

著數據)在晶格中存在0.5莫耳的水。

F-III之DSC痕量特點是在約30°C時的寬幅低溫吸熱，接著在約70°C開始的第二次寬幅及相對弱吸熱與在對應於熔融物的約146°C開始的最終轉變作用。與TGA中第一次吸熱符合的1.5% (~0.5莫耳)急速重量損失對應於弱束縛之水分子的損失，而在大於60°C時另外的~1.6%重量損失代表更緊密束縛的水分子的損失，即在非常低的相對濕度下存在的那些水分子。在大於170°C時發現的重量損失對應於F-III的分解作用。

F-I及F-III的XRD圖案特點是陡峭的高峰及平坦的基準線，其代表高結晶物質。將F-I、F-III及S-II之代表性樣品之 2θ 中的尖角高峰位置與對應的 I/I_0 數據製成表I的圖表。雖然許多強反射通常是在類似的繞射角度上，但是，每一個晶形提供不同的粉末圖案，允許清楚的區分S-II、F-I及F-III。

在結晶學技藝中熟知可以改變任何既定的多晶型物之繞射峰相對強度，因為較佳的定向作用起因於結晶形態學之類的因素。在較佳的形態學效應存在之處會改變高峰強度，但是，不會改變多晶型物之特徵性高峰位置。例如，參考United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18第1843-1844頁，1995年。因此，在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 及 $35 \pm 10\%$ 相對濕度下自銅照射源獲得圖案時，以高峰強度與高峰位置為基礎，可以在 2θ 內存在於 7.9 ± 0.2 、 10.7 ± 0.2 、 14.9 ± 0.2 、 15.9 ± 0.2 、 18.3 ± 0.2 、及 $20.6 \pm 0.2^\circ$ 的高峰證實F-I。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (7)

表 1

S-II		F-I		F-III	
2θ (°)	I/I ₀ (%)	2θ (°)	I/I ₀ (%)	2θ (°)	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
28.10	1.8			29.89	8.9
28.73	10.9			30.24	18.7
29.42	3.2			30.88	5.8
30.00	3.7			31.44	7.6
30.89	2.1			33.06	4.5
31.34	2.4			34.36	6
31.70	1.1				
32.81	1				
32.91	0.8				
33.48	2				
26.05	4				
26.63	5.5				
27.01	3.1				
27.49	2.8				

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (8)

F-I及F-III的進一步特徵

在F-I及F-III上進行收濕性研究。在圖4中展示F-I及F-III之濕度吸著等溫線。一旦將樣品初曝露於約5% RH時，則F-I及F-III分別會有1.5%及1.7%水份的立即重量收獲，相當於約0.5莫耳的水。兩種晶形展示在整個濕度範圍的連續性水份吸著作用，其有可能是因為晶格中併入的水份子。

在兩種晶形中吸收的水份差異有可能反映出可併入兩種晶格中的水量(即在晶格中可容納水分子之有效空間量)。在F-I及F-III的吸著-脫附等溫線中無滯後現象顯示晶形會在任何既定的濕度下迅速平衡。

F-I及F-III的水份吸著輪廓顯示這些晶形基本上是非化學計量之水合物。在室內相對濕度下(約50% RH)，F-I包括約1.7%水份，對應於0.5莫耳的水，而F-III吸著約3.0%水份，其對應於約0.85莫耳的水。F-I及F-III的整體晶形會與大氣迅速平衡，所以以分析技術發現的水含量是反映在收集數據時間下的相對濕度。在DSC數據中發現的組-對-組差異有可能起因於樣品不同的水合程度，因為不同的室內貯存條件。

以在不同的相對濕度下(0、22、50及80%)貯存的F-I及F-III樣品獲得XRD圖案。當相對濕度增加時，則在 2θ 內約13.8、17.6、18.0、20.5及24°的初F-III高峰(0% RH)會漸進式偏移與強度較低的高峰會輕度偏移。在F-III的XRD圖案中觀察的這些變化代表在相對濕度增加時，單位細胞尺寸正在改變，推測其會適應於弱束縛的水分子。因濕度關

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (9)

係的高峰連續偏移與展示在整個該RH範圍內漸進式重量收穫之水份吸著數據有完全的相互關連，為不同的水合物形成作用提出證實。

在F-I上進行類似的實驗，以決定改變相對濕度是否可能在其晶格上具有類似的效果(0、25、52、73及95% RH)。當相對濕度增加時，則發現在 2θ 內約7.7、18.3、18.5, 20.5及加20.8°的0% RH高峰有非常輕度的偏移。在約7.7、20.8及24.1出現稍微變寬的高峰及在較高的相對濕度下比較不溶解，其代表水正被吸著在非晶形組份中(或使固體增塑)，特別是在73及95% RH下。在F-I之XRD圖案中的高峰偏移沒有在將F-III曝露於不同的相對濕度下觀察的高峰偏移明顯。其暗示F-I晶格不會進行與F-III晶格相同的膨脹及/或收縮。

發現F-I及F-III在整個相對濕度範圍內具有安定性，雖然F-III的水吸著能力是F-I的兩倍。發現該兩種晶格具有可比較的結晶尺寸、型態學、水溶解度及溶解速度。

以進行乾燥研究監控以乾燥時間與溫度為函數關係之S-II解溶劑化作用(參考圖5)。在解溶劑化作用實驗期間的各種時間點上製作XRD圖案。來自S-II的解溶劑化作用研究的許多繞射峰出現在與F-I相似的角度上，其證實S-II與F-I之晶格非常相似。在僅以最低程度的乾燥之後，在 2θ 內約6.8、7.2及14.0°消失的繞射峰暗示這些反射可能是由含有醋酸乙酯分子部份的電子密度之結晶學平面造成的。

在高溫的真空下延長經媒合之物質的退火會得到F-I。以

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (10)

該方式製備的F-I以XRD展示出高度的結晶度。因此，根據'474的指導，自乙醇與醋酸乙酯之溶液結晶及接著以僅數小時的真空乾燥產生的物質會展示非常差的結晶度，因為這些步驟會生成部份解溶劑化之S-II。

F-I及F-III具有許多優點，超過以上說明的先前技藝之阿諾西吩晶形。比較以'474的指導步驟產生的阿諾西吩，F-I及F-III在室溫下更安定及因此更適用於製藥發展，即劑量配方的發展。此外，F-I及F-III具有比'474揭示的晶形更高的結晶度。晶形物質通常比非晶形物質更不具收濕性及更安定(例如，較不易化學降解，維持一致的效能)，並因此更具配方處理的需求。而且，不像以'474的指導步驟產生的阿諾西吩晶形(包在其晶格中包括醋酸乙酯及水)，F-I及F-III只包括水。

特徵化方法

在附加至熱分析3100及具備經冷藏的冷卻系統之TA儀器2920調整型DSC上進行DSC測量。將樣品(3-5毫克)在捲曲的鋁盤中以2°C/分鐘的加熱速度自10°C加熱至240°C。

在附加至熱分析3100之TA儀器2050熱解重量分析儀上進行TGA分析。將樣品(5-10毫克)在敞口盤中以5°C/分鐘的加熱速度自25°C加熱至250°C。

在具備CuK α 源($\lambda=1.54056$ 埃)及在50 kV及40毫安培下操作的Kevex固態偵測器之Siemens D5000 X-射線粉末繞射計上獲得XRD圖案。將每一個樣品在 2θ 中的4°至35°之間掃描。在收集數據之前，允許樣品在預期的溫度及/或

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (11)

相對濕度下經至少30分鐘達到平衡。

利用以下的VTI方法進行F-I及F-III的收濕性測量。將每一個樣品在60°C的真空下乾燥，直到未測出任何進一步的重量損失為止，在該時間下將樣品室調至0%相對濕度。利用具有以下條件之VTI真空水份天平在25°C下獲得水份吸著等溫線：樣品尺寸10-15毫克，吸附/脫附範圍0-95%相對濕度，步驟間隔5%，樣品間隔10分鐘。

由以下的實施例進一步例證製備本發明水合物的方法。不是企圖以實施例限制在任何關係中的這些方法的範圍，並且不應該被如此限制。

製備作用

製備作用1

S-II

將粗阿諾西吩(以美國專利申請案第5,723,474號中的實施例41之步驟製備1.58公克之物質，將該指導併入本文以供參考)懸浮在25毫升醋酸乙酯中及加熱至回流。加入乙醇(18毫升)，以達到溶解作用。將溶液維持在回流下20分鐘及接著允許冷卻至室溫。將沉澱物以真空過濾分離，並以30毫升醋酸乙酯清洗，以得到1.05公克的白色固態粉末。

實施例

實施例1

來自S-II之F-I

在100°C下的真空烘箱(-25英吋汞柱)中將S-II經118小時

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (12)

乾燥，以得到F-I。

實施例 2

自阿諾西吩製備F-I之改良步驟

將25.0公克之阿諾西吩、475毫升之四氫呋喃及25毫升之水裝入配備回流濃縮器及架空攪動器之1公升的3頸圓底燒瓶。接著將反應容器裝設簡單的蒸餾作用。將反應混合物加熱至回流及取出250毫升蒸餾物。迅速除去熱，並將250毫升新鮮的無水四氫呋喃加入容器中。持續以大氣蒸餾取出另外的250毫升蒸餾物。迅速除去熱，加入250毫升新鮮的四氫呋喃及取出另外的250毫升蒸餾物。

加入另外的250毫升四氫呋喃，並將反應混合物維持在回流下。以加入四氫呋喃形成白色沉澱物。允許攪動的反應混合物以3小時緩慢冷卻，在此期間加入固態沉澱物及使泥漿達到室溫。將結晶泥漿過濾，並在50°C下以沖入微量N₂經48小時真空乾燥。產量是22.50公克(90.0%)。XRD分析顯示濕塊之光譜，並與無水固體完全一樣，而且與先前製備的F-I完全一樣。DSC分析提供157°C的熔點，同時TGA分析顯示在室溫與100°C之間的1.5%質量損失。以自由鹼計算的HPLC純度是88.1%，相對於92.9%的理論效能。HPLC分析顯示0.44%之總相關物質量。

實施例 3

來自6-苄氧基-3-(4-[2-(六氫吡啶-1-基)乙氧基]苯氧基)-
2-(4-甲氧苯基)苯并[b]噻吩(S-氧化物)之F-I

將四氫呋喃(261毫升)、水(45毫升)、濃縮的硫酸(6.14

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (13)

公克)及6-[苄氧基-3-[4-[2-(六氫吡啶-1-基)乙氧基]苯氧基]-2-(4-甲氧苯基)]苯并[b]噻吩(S-氧化物)(HPLC效能99%, HPLC總相關物質0.35%)組合及攪拌,直到均勻為止。加入具有5毫升水洗液之10% Pd/C(以在22毫升水中成泥漿的5.6公克)。將生成之泥漿抽空及覆蓋60磅/平方英吋之氫氣。將反應溫度調整至30°C。在2小時之後。加熱具有水(30毫升)的10% Pd/C。使在60磅/平方英吋及30°C下的氫化作用再持續22小時。另外加入在30毫升水中的4.40公克之10% Pd/C,並使在60磅/平方英吋及30°C下的氫化作用再持續2.5小時。將催化劑以過濾除去,並以50%氫氧化鈉將濾液之pH調整至7.24。加入溶解在水(18毫升)中的氯化鈉(8.66公克),並將雙相溶液攪拌30分鐘。將相分離及以50毫升之四氫呋喃萃取出水相。將有機相組合,並以大氣蒸餾方式濃縮成體積50毫升。將180毫升甲醇在24°C下以超過1小時加至濃縮液中。將生成之結晶泥漿在24°C下攪拌30分鐘,冷卻至0°C及攪拌1小時。將固體以過濾分離及接著以39毫升水與39毫升甲醇清洗,然後在50°C下經隔夜真空乾燥。產量是15.52公克(67.8%)。

根據實施例2的說明,將來自以上的部份產物(10公克)自四氫呋喃再結晶。

實用語

根據本文使用的"有效量"術語代表能夠抑制本文說明的症狀或其不利影響之F-I量。當F-I與雌激素、孕激素、芳

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (14)

香酶抑制劑，LHRH類似物或AChE抑制劑共同投藥時，則"有效量"也代表能夠產生其意圖效果之這種試劑量。

"抑制的"及"抑制"術語包括其統稱可接受的意義，即本文說明的預防、禁止、限制、減輕、改善、減緩、終止或消退病理學症狀或其後遺症的程度或嚴重性。

"預防(preventing)"、"預防的(prevention of)"、"預防(prophylaxis)"、"預防(prophylactic)"及"預防(prevent)"等術語在本文可交換使用，並代表降低F-I服用者將遭遇或發生本文說明的任何病理學症狀或其後遺症的可能性。

"喪失雌激素"及"雌激素喪失"術語代表或自然發生或臨床上引發的症狀，使女人不可能產生足夠的內生性雌激素內泌素，以維持與雌激素有關的功能，例如，月經、骨量等穩性、神經功能、心與血管症狀等。這些喪失雌激素的情況會因絕經期及外科或化學卵巢切除術而上升(但不限於此)，包括其功能上的同等物，例如，芳香酶抑制劑、GnRH興奮劑或拮抗劑、ICI 182780及類似物之藥物治療。與喪失雌激素狀態有關連的疾病狀態包括骨質流失、骨質疏鬆症、心與血管疾病及同等性疾病及血內類脂質過多，但不限於此。

根據本文使用的"雌激素"術語包括具有雌激素活性之類固醇化合物，如舉例的 17β -雌二醇、雌素、共軛的雌激素(結合型雌激素(Premarin[®]))、馬雌激素 17β 乙炔基雌二醇及類似物。較佳以雌激素為主之化合物是結合型雌激素(Premarin[®])及異炔諾酮。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (15)

根據本文使用的"孕激素"術語包括具有孕前活性之化合物，如舉例的孕酮、異炔諾酮、nongestrel、甲地孕酮、炔諾酮及類似物。炔諾酮是較佳的以孕激素為主之試劑。

根據本文使用的"芳香酶抑制劑"術語包括能夠抑制芳香酶之化合物，包括可自商業上取得的抑制劑，如氨基導眠能(CYTANDREN®)、Anastrozole (ARIMIDEX®)、Letrozole (FEMARA®)、Formestane (LENATRON®)、Exemestane (AROMASIN®)及類似物。

根據本文使用的"LHRH類似物"術語係指抑制在停經女性中的雌激素產生的黃體化內分泌素釋出之內分泌素之類似物，包括Goserlin (ZOLADEX®)、Leuprolide (LUPRON®)及類似物。

根據本文使用的"AChE抑制劑"包括抑制乙醯膽鹼酯酶之化合物，包括水楊酸毒扁豆鹼、他克林(tacrine)氫氯化物、當皮左(donepezil)氫氯化物及類似物。

根據本文使用的"向上調節ChAT"術語係指增加ChAT酵素活性，即促進膽鹼化成乙醯膽鹼。該促進作用可能包括增加ChAT及膽鹼之反應效率及/或速度及/或增加在活性位置上存在的ChAT量。增加存在的酵素量可能是因為基因調節或酵素形成的其它合成步驟及/或降低酵素去活性作用及新陳代謝。

經選擇之試驗步驟

一般的老鼠準備步驟：自查理河(Charles River)實驗室(Portage, MI)取得75天壽命(除非有其它的指定)的Sprague

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (16)

Dawley母鼠(200至225公克之重量範圍)。將動物或兩邊卵巢切除(OVX)或曝露於在查理河實驗室的Sham外科手術及接著在一週之後運出。在抵達之後，將其關在金屬吊籠中飼養，每籠3或4隻一組，並以ad libitum進食(約0.5%之鈣含量)及進水一週。室溫維持在 $22.2^{\circ} \pm 1.7^{\circ}\text{C}$ ，具有40%的最低相對濕度。在室內的光期是12小時的光線及12小時的黑暗。

給藥攝取組織的收集：在一週的環境適應期之後(因此，在OVX兩週之後)，開始每天供給F-I。以在1%羧甲基纖維素的懸浮液或溶解在20%環糊精中的 17α -乙炔基雌激素或F-I以口服方式給藥。動物經四天的每天給藥。在給藥攝取之後，將動物稱重及以氯胺酮：甲苯噻嗪(2:1，體積：體積)混合物麻醉，並以心臟刺針收集血液樣品。接著以 CO_2 窒息方式殺掉動物，並經由中線切開術取出子宮，並稱出濕子宮重量。可自Sigma化學公司(Louis，密蘇里州)取得 17α -乙炔基雌激素。

心與血管疾病及血內類脂質過多

允許由以上取得的血液樣品在室溫下經2小時凝結，並接著在3000轉/分鐘下經10分鐘離心取得血清。利用Boehringer Mannheim Diagnostics高性能膽固醇分析決定血清膽固醇。迅速將膽固醇氧化成膽甾-4-烯-3-酮及過氧化氫。接著將過氧化氫與酚及4-胺基非那宗在過氧化物酶的存在下反應，以產生對-苯醌亞胺染料，其在以分光光度方式的500毫微米下測得。接著以標準曲線計算膽固醇濃

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (17)

度。利用 Biomek 自動化工作站自動做全部分析。

子宮嗜伊紅體過氧化酶(EPO)分析

將以上的子宮保存在 4°C 下，直到以酵素分析的時間。接著將子宮在含有 0.005% Triton X-100 之體積 50 之 50 毫克分子量 Tris 緩衝液 (pH-8.0) 中均化。一旦在 Tris 緩衝液中加入 0.01% 過氧化氫及 10 毫克分子量 O- 苯二胺 (最終濃度) 時，則在 450 毫微米下以每分鐘監控增加的吸收度。在子宮中存在的嗜伊紅體是化合物的雌激素活性的指示。以反應曲線的整個初線型部份決定 15 秒間隔之最大速度。

抑制骨質流失(骨質疏鬆症)試驗步驟

在以上說明的一般的準製備步驟之後，將老鼠經每天治療達 35 天 (每個治療小組有 6 隻老鼠)，並在第 36 天時以二氧化碳麻醉犧牲。根據以上的測量，35 天的時間期限足以允許使骨質密度的降低達到最大。在殺掉時割取子宮，解剖外部組織，並在決定濕重量之前逐出流體量，以確定與完成卵巢切除術有關連的雌激素缺乏。對應於卵巢切除術之子宮重量會例行減少約 75%。然後將子宮放入 10% 中性緩衝的福馬林中，以允許後續的組織學分析。

將右股骨割掉，並以在末梢幹骨端上以影像分析程式 (NIH 影像) 產生及分析數字化的 X-射線。也以定量估算之局部 X 射線機掃描來自這些動物脛骨之基部面貌。根據以上的步驟，將在 20% 羥丙基 β -環糊精中的 F-I 或乙炔基雌二醇 (EE₂) 以口服方式投藥，以測試動物。F-I 也適合與雌激素或孕激素組合。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (18)

MCF-7增殖分析

將MCF-7乳腺癌細胞(ATCC HTB 22)保持在MEM中(最低的基本介質,以10%胎牛血清(FBS)(體積/體積)補充的自由酚紅, Sigma, St. Louis, 密蘇里州)、L-谷氨酸(2毫克分子量)、丙酮酸鈉(1毫克分子量)、HEPES {(N-[2-羥乙基]哌嗪-N'-[2-乙烷磺酸]10毫克分子量)、非基本胺基酸及牛胰導素(1微克/毫升)(維護介質)。在分析前10天,將MCF-7細胞轉移至以10%葡聚糖塗佈經木炭汽提之胎牛血清分析介質補充之維護介質中(取代10% FBS),以耗盡類固醇的內貯存。利用細胞解離介質(以10毫克分子量之HEPES及2毫克分子量之EDTA補充之無Ca⁺⁺/Mg⁺⁺之HBSS(自由酚紅))自維護介質中取出MCF-7細胞。將細胞以分析介質清洗兩次及調整至80,000細胞/毫升。將約100毫升(8,000細胞)加入平底微培養井中(Costar 3596),並在37°C的5% CO₂濕度化培育器中培育48小時,以允許在轉移後的細胞黏附及平衡。在分析介質中製備一系列當成稀釋控制液之藥物或DMSO稀釋液,並將50毫升轉移成三倍微培養物及接著是50毫升之分析介質,使最終體積是200毫升。在37°C的5% CO₂濕度化培育器中再培育48小時之後,將微培養物以氙化的胸腺定(1μCi/井)經4小時脈衝。以在-70°C下冷凍4小時及接著融解與利用Skatron半自動細胞割取機割取微培養物的方式終止培養。利用Wallac BetaPlaceβ計數器之液體閃爍現像計算樣品。

DMBA-誘導的乳房腫瘤抑制作用

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (19)

在購自印第安那州Indianapolis的哈蘭(Harlan)實驗室之Sprague-Dawley母鼠中生成與雌激素有關的乳房腫瘤。在約55天的壽命之後，使老鼠接受29毫克7,12-二甲基苯并[a]蒽(DMBA)之單一口服進料。在服用DMBA之後約6週，在每週以觸診乳腺之腫瘤外觀。無論何時出現一或數個腫瘤時，以美規測徑值測量每一個腫瘤的最大及最小直徑，記錄測量值，並選擇該動物做實驗。企圖將各種尺寸的腫瘤均勻分布在欲治療及控制的鼠群中，使得平均尺寸的腫瘤平均分布在試驗群之間中。每個實驗的控制群及試驗群包括5-9隻動物。

將F-I或在2%金合歡中經由腹膜內注射，或以口服投藥。將經口服投藥之化合物或溶解或懸浮在0.2%玉米油中。對每一個試驗動物每天進行一次治療(包括金合歡及玉米油控制治療)。在初腫瘤測量及選擇試驗動物之後，以以上的方法每週測量腫瘤。持續3至5週的動物治療及測量，決定每次的腫瘤最終面積。關於每一個化合物及控制治療，決定平均腫瘤的變化。

子宮纖維變性測試步驟

試驗1：使介於3至20個具有子宮纖維變性之婦女服用F-I。服用的化合物量是從0.1至1000毫克/天，服藥期間是3個月。觀察在服藥期間及在停藥之後至多3個月時的婦女在子宮纖維變性的效果。

試驗2：利用與試驗1相同的步驟，除了服藥期間是6個月之外。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (20)

試驗3：利用與試驗1相同的步驟，除了服藥期間是1年之外。

試驗4：利用延長的雌激素激發作用誘導在性成熟的幾內亞母豬中的平滑肌瘤。對動物每週以注射方式施以類固醇3-5次，經2-4個月或直到長出腫瘤為止。每天服用由F-I或媒劑組成的治療經3-16週，並接著殺掉動物及割取出子宮與分析腫瘤進度。

試驗5：將來自人類平滑肌瘤之組織植入性成熟的除卵巢之無毛母鼠之腹膜腔及/或子宮肌層內。提供外雌激素誘導移植的組織成長。在一些情況中，在移植之前，先將割取的腫瘤細胞在真空中培養。以洗胃法以每天為基礎提供3-16週由F-I或媒劑組成的治療，並取出移植及測量成長或進度。在殺掉時割取子宮，以評定器官的狀態。

試驗6：將割自人類子宮纖維狀的腫瘤保持在真空中，當成未變性培養物。將外科樣品推過無菌網目或篩，或選擇以針撥開周圍的組織，以產生單一細胞懸浮液。將細胞保存在含有10%血清及抗生素之介質中。決定在有或沒有雌激素的存在下之成長速度。分析細胞產生互補組份C3的能力及其對應的成長因素與成長內泌素。評定由以下的孕激素、GnRH、F-I及媒劑治療在真空中的培養物的增殖反應。評定每週的類固醇內泌素受體量，以決定在真空中是否會維持重要的細胞特徵。利用取自5-25個病患的組織。

試驗7：根據Fuchs-楊(Young)等人在"以選擇的雌激素受體調節劑對子宮平滑肌瘤受雌激素刺激成長的抑制作用

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (21)

(Inhibition of Estrogen-Stimulated Growth of Uterine Leiomyomas by Selective Estrogen Receptor Modulators)", Mol. Car., 17(3): 151-159 (1996年)中的說明，確實測量F-I抑制以平滑肌瘤衍生的ELT細胞線受雌激素刺激增殖的能力，將該指導併入本文以供參考。

子宮內膜組織異位形成試驗步驟

試驗1：利用12至30個CD株母成鼠當成試驗動物。將其平分成相同數量的三群。監控所有動物的春情期循環。在春情前期的時候對每一隻母鼠進行手術。切除在每一群中的母鼠左子宮角，切片成小的平方塊，並將平方塊緊密地縫合在鄰近於腸膜血流處的各個位置上。此外，切除在群2中的母鼠卵巢。在手術後隔天，將群1及2的動物接受14天的腹膜內水注射，反而將群3的動物在同樣的期間內接受以每公斤體重計1.0毫克之F-I的腹膜內注射。在14天的治療之後，將每一隻母鼠殺掉及切除適用的子宮內膜切片移植、腎上腺、殘餘的子宮及卵巢，並製備成供組織學檢查用。將卵巢及腎上腺稱重。

試驗2：利用12至30個CD株母成鼠當成試驗動物。將其平分成相同數量的兩群。監控所有動物的春情期循環。在春情前期的時候對每一隻母鼠進行手術。切除在每一群中的母鼠左子宮角，切片成小的平方塊，並將平方塊緊密地縫合在鄰近於腸膜血流處的各個位置上。在手術後約50天，指派群1的動物接受21天的腹膜內水注射，反而將群2的動物在同樣的期間內接受以每公斤體重計1.0毫克之F-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (22)

III的腹膜內注射。在21天的治療之後，將每一隻母鼠殺掉及切除子宮內膜活體移植及腎上腺，並稱重。將活體移植當成成長指標測量。監控春情期循環。

試驗3：利用子宮內膜組織之劃皮現象誘導在老鼠及/或兔子中的子宮內膜組織異位形成。將在生殖成熟期的母性動物進行雙邊卵巢切除術，並由體外供應雌激素，因此提供特殊且固定的內分泌值。將自體的子宮內膜組織植入5-150隻動物的腹膜中，並供應雌激素誘導活體移植組織成長。以洗胃法以每天為基礎提供3-16週由本發明組成的治療，並取出移植及測量成長或進度。在殺掉時割取子宮，以評定子宮內膜的狀態。

試驗4：將來自人類子宮內膜病變之組織植入性成熟的除卵巢之無毛母鼠之腹膜內。提供體外雌激素誘導活體移植的組織成長。在一些情況中，在移植之前，先將割取的子宮內膜細胞在真空中培養。以洗胃法以每天為基礎提供3-16週由F-I或媒劑組成的治療。在殺掉時割取子宮，以評定完整的子宮內膜的狀態。

試驗5：將割自人類子宮內膜病變的組織保持在真空中，當成未變性培養物。將外科樣品推過無菌網目或篩，或選擇以針撥開周圍的組織，以產生單一細胞懸浮液。將細胞保存在含有10%血清及抗生素之介質中。決定在有或沒有雌激素的存在下之成長速度。分析細胞產生互補組份C3的能力及其對應的成長因素與成長內分泌。評定由以下的孕激素、GnRH、F-I及媒劑處理真空中的培養物的增殖反

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (23)

應。評定每週的類固醇內分泌素受體量，以決定在真空中是否會維持重要的細胞特徵。利用取自5-25個病患的組織。

包括阿耳滋海默氏病之CNS失調

以雌激素(如 17β -類固醇)與位於特定細胞群之胞體漿中的雌激素受體(ER)結合的方式調節基因轉錄。ER的配體活性是複合物核子轉移的必備要素，在此與13個基本對復發DNA同感順序(雌激素反應元件或ERE)之結合啟動轉錄裝置之組合，其會在適當的目標基因活化作用中達到顛峰。已證實各種以雌激素調節之基因。這些包括細胞支架蛋白質、神經遞質生物合成及代謝酵素及受體、與其它內分泌素及神經肽。已在許多雌激素反應基因中證實ERE，包括卵黃基因、c-fos、泌乳素及黃體化內分泌素。

在 $p75^{ngf}$ 及 $trkA$ 中已證實在中樞神經系統中重要的以ERE順序，兩者具有當成神經營養素(神經成長因子(NGF)、腦衍生之神經成長因子(BDNF)及神經營養素-3)之標記分子的作用。

BDNF與NGF已展現出會促進培養物中的膽素激導性神經單位之活存率。其前提是假設在神經營養素與雌激素之間的交互作用具有使基礎前腦神經單位發展及存活的重要性(其會惡化阿耳滋海默氏病)，接著可將雌激素缺乏(因為在絕經期之後)的臨床症狀歸因於喪失這些神經單位。

在卵巢切除之老鼠中(如以上的說明準備)進行以下的實驗，以決定在影響各個腦區域中基本表現時介於F-III與雌激素之間的相似點及/或差異。將6週壽命的老鼠每天以皮

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (24)

下注射服用類固醇苯甲酸酯(0.03毫克/公斤)、F-I或媒劑(控制品)。在治療5週之後，將動物殺掉，並取出腦及以微解剖收集海馬。將海馬在液態氮中快速冷凍及貯存在-70℃下。自適當的治療群及控制群的共同組織製備總RNA，並利用選自特殊的mRNA(多-A+)群數之3'寡核苷酸起動劑反相轉錄。在由無規5'寡核苷酸(10個基本對長度；總共150)、反應緩衝劑、Taq聚合酶及³²PdTCP組成的混合液中進行聚合酶鏈反應(PCR)。

在放大40圈之後，將反應產物在6% TBE-尿素凝膠上以尺寸分級、乾燥及曝露於X-射線軟片。在治療群之間比較生成之mRNA展示圖案。

與雌激素共軛之F-I用途

絕經期間及絕經後婦女經常進行內分泌替補診療(HRT)，以抵抗與降低循環內生雌激素有關連的負結果，例如，治療燥熱症。但是，HRT已涉及增加特定的癌症風險，包括子宮癌及乳癌。可利用與HRT共軛之F-I抑制這些風險。

與芳香酶抑制劑共軛之F-I用途

根據定義，絕經後的婦女卵巢不具功能。其雌激素的唯一來源是經由在末稍組織(包括脂肪、肌肉及乳房腫瘤本身)發現的酵素芳香酶將腎上腺雄性素轉化成雌激素。因此，抑制芳香酶之藥物(芳香酶抑制劑)會使循環雌激素之絕經後的婦女放血。以芳香酶抑制作用的方式使雌激素喪失是轉移性乳癌病患的一項重要的治療選擇。在以芳香酶

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (25)

抑制劑診療期間，循環雌激素的缺乏可能造成負面的非預期副效果，例如，血清脂值。可利用F-I抑制這些負面效果。

與LHRH類似物共軛之F-I之用途

連續曝露於LHRH(黃體化內分泌素釋出內分泌素)類似物會以垂體腺脫敏感的方式抑制絕經後婦女的雌激素製造，其接著不再刺激卵巢製造雌激素。臨床上的結果是"醫學上的卵巢切除術"，一旦斷絕LHRH類似物時，其結果會反轉。在以LHRH類似物診療期間，循環雌激素的缺乏可能造成負面的非預期副效果，例如，血清脂值。可利用F-I抑制這些負面效果。

增加乙醯膽鹼值

已知感染阿耳滋海默氏病的病患在海馬中具有膽性激導性神經單位值遠低於無阿耳滋海默氏病族群之該值。這些膽性激導性神經單位漸進式的喪失會在這些病患中出現反射在記憶及思考功能會漸進式喪失。經判斷這些神經單位退化的一個原因是神經遞質，乙醯膽鹼的功能喪失或降低。

基本上以位於在其生物合成與生物降解之間的平衡決定在神經單位中的乙醯膽鹼值。酵素膽鹼乙醯轉化酶(ChAT)是主要負責其合成及其降解之乙醯膽鹼酯酶(AChE)。

爲了決定F-I對ChAT值的影響，進行以下的實驗：在以上說明的一般老鼠準備步驟之後，將40隻老鼠每天以皮下注射或經口灌食法服用在含有10%環糊精之媒劑中的3毫

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (26)

克/公斤/天之F-I、0.03或0.3毫克/公斤/天之類固醇苯甲酸酯或媒劑控制品。將動物治療3或10天。每一次劑量攝取法有20隻動物。在適當的時間間隔時，將動物殺掉及解剖其腦部。將腦的特殊部位均化及分析。處理來自海馬及額面皮質之均漿，並以乙醯膽鹼生物合成之放射標記分析進行ChAT活性測量。可在Schoepp等人的J. Neural Transmiss. 78: 183-193 (1989年)中發現該步驟，將該指導併入本文以供參考。

與模擬操作的控制品比較，在OVX動物中的ChAT值會如預期降低超過50% ($p < 0.001$)。

在本發明的另一個具體實施例中，利用與AChE抑制劑組合之F-I。利用F-I抑制劑會經由AChE的抑制作用阻擋其降解的方式增加乙醯膽鹼值。

良性攝護腺增殖症(BPH)

關於連結雌激素作用與治療BPH及攝護腺癌瘤之間的背景而言，參考PCT專利申請案第WO 98/07274號，國際公告日：1998年10月15日。

在以下說明的實驗中，評估將F-I結合在許多人類攝護腺癌細胞線中的雌激素受體上的能力。

在含有50毫微克分子量之Tris. HCl pH 7.4、1.5毫升之乙二胺四醋酸(EDTA)、0.4克分子量之KCl、10%之甘油、0.5毫克分子量之2-ME及10毫莫耳之鉬酸鈉與進一步包含蛋白酶抑制劑胃酶抑素(1毫克/毫升)、亮肽素(2毫克/毫升)、抑肽酶(5毫克/毫升)及苯基甲基磺醯氯(PMSF, 0.1

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (27)

毫克分子量(TEGP)之TEG介質中製備LNCaP、DU-45及PC-3人類攝護腺癌細胞線之溶胞產物。

將細胞溶胞產物離心，並將片錠再懸浮在冷的TEGP中(1毫升之TEGP/100毫克之片錠)及在Branson型450 Sonifier上聲波化30分鐘(負荷週期：70%，生產量1.8)。將溶胞產物在4°C下以10,000 x G離心15分鐘的方式製成片狀，然後抽出上層液，並或立即使用，或貯存在-70°C下。

競爭的結合分析：結合緩衝液是TEG，其中以50毫克分子量之NaCl取代0.4克分子量之KCl及進一步已加入1毫克/毫升之卵白(TEGO)。將F-I在TEGO中稀釋成20毫微克分子量，以其製備3倍的血清稀釋液。在三份小井中的圓底聚乙烯小平板中進行分析。每一個小井接收35毫升氘化之 17β -類固醇(0.5毫微克分子量，比活性60.1 Ci/毫莫耳，DuPont-New England Nuclear，波士頓，麻州)及35毫升冷的競爭劑試驗化合物(0.1毫微克分子量-5毫克分子量)或TEGO，並接著在4°C下以搖動的70毫升之MCF-7細胞線溶胞產物培育5分鐘。

將平板在4°C下培育24小時，接著將70毫升以葡聚糖塗佈的木炭(DCC)加入每一個井中，然後在4°C下劇烈搖動8分鐘。接著將平板在4°C下以1500 x G離心10分鐘。將自每一個井的上層液取入可撓性聚苯乙烯小平板中，在Wallac Micobeta 1450型計數器中以閃爍計數。在校正計數效率(35-40%)及背景之後，將放射性以每分鐘的裂變數表示。另外的控制品是總數量，並且以總數量+DCC定義

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (28)

DCC可引出數量的下限。利用以下的公式將這些競爭的結合分析結果以經結合之平均百分比(結合%)+/-標準偏差表示：

$$\text{結合 \%} = \frac{\text{DPM}_{\text{試驗化合物}} - \text{DPM}_{\text{總數+DCC}}}{\text{DPM}_{\text{無試驗化合物}} - \text{DPM}_{\text{總數+DCC}}} \times 100$$

乳癌的預防

本發明也關於將F-I投藥給發展再次乳癌風險的服用者。根據本文使用的"再次"術語代表正常的乳房細胞不會在初期變性或變化成癌症或惡性細胞。這樣的變性可能發生在其本人階段或經由進化過程至其女兒細胞，或可能發生在單一的中樞事件。該再次過程是與已變性或變化的細胞自原腫瘤位置至新位置之轉移、移生或擴散成對比。

對沒有任何特別會發展出乳癌風險的人是可能會發展再次乳癌及不具任何超過正常風險的疾病潛在性的證據或懷疑的人，並且是從不曾具有疾病診斷的人。助長乳癌發展的最大風險因素是遭受疾病的個人經歷或先前的疾病發病率，即使是弛緩至沒有任何疾病存在的證據。另一個風險因素是家族性疾病經歷。

以服用釀癌質N-亞硝基-N-甲基尿素的方式將乳癌引入老鼠中是乳房腫瘤研究完全可接受的動物型式，並已發現其適合於分析化學預防劑之效果。

在兩個分開的研究中，在進食摻在不同量的F-I'(Z)-2-[4-(1,2-二苯基-1-丁烯基)苯氧基]-N,N-二甲撐二胺鹼(三苯氧胺鹼)或控制品中的ad libitum食物之前，每週提供55天壽

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (29)

命之 Sprague-Dawley 母鼠以每公斤體重計 50 公克之 N-亞硝基-N-甲基尿素之靜脈內劑量(研究1)或腹膜內劑量(研究2)。

在研究1中，將以每公斤食物計 60 毫克之食物劑量及以每公斤食物計 20 毫克之食物劑量就每一個試驗樣品粗略地轉換成以每公斤體重計 3 及 1 毫克之比較性劑量。

在研究2中，將以每公斤食物計 20、6、2 及 0.6 毫克之食物劑量就每一個試驗樣品粗略地轉換成以每公斤體重計 1、0.3、0.1 及 0.03 毫克之比較性劑量。

觀察對老鼠的毒性證明，並以每週將老鼠稱重及以觸診腫瘤的形成作用。在 13 週(研究1)或 18 週(研究2)之後將老鼠殺掉，並以驗屍證實腫瘤及將腫瘤稱重。

配方

在本文將"製藥學的"術語當成形容詞使用時，其代表實質上對服用的哺乳動物沒有害處。以"製藥學配方"代表載體、稀釋液、賦形劑及活性成份(等)必須與配方的其它成份可相容，並不會對其服用者有害。

在投藥之前，先調配 F-I 較佳。應該由照料醫師考慮與測定有效量有關的上述因素決定配方的選擇。

在這些配方中的總活性成份包含從 0.1% 至 99.9 重量%之配方。在該配方中以不超過兩個以上的活性成份較佳。即以選自雌激素、孕激素、芳香酶抑制劑、LHRH 類似物及 AChE 抑制劑的第二個活性成份調配 F-I 較佳。最佳的配方是那些 F-I 是唯一的活性成份之配方。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (30)

以本發明已知的步驟利用熟知且易取得的成份製備本發明的製藥學配方。例如，特F-III或單獨，或與雌激素、孕激素、芳香酶抑制劑、LHRH類似物及AChE抑制劑的組合與常見的賦形劑、稀釋液或載體調配，並形成藥錠、膠囊、懸浮液、溶液、注射液、氣溶膠、粉末及類似物。

用於非經腸投藥方式之本發明的製藥學組合物包含無菌水或非水溶液、分散液、懸浮液或乳液與在使用之前立即再結構成無菌溶液或懸浮液之無菌粉末。適合的無菌水或非水載體、稀釋液或媒劑包括水、生理食鹽水、乙醇、多元醇(如甘油、乙二醇、聚(乙二醇)及類似物)、及適合的其混合物、植物油(如橄欖油)及可注射的有機酯(如油酸乙酯)。例如，以使用塗料物質(如卵磷脂)、以在分散液及懸浮液的實例中維持適當的顆粒尺寸及以使用界面活性劑等維持適當的流動性。

非經腸組合物也可以包括佐劑，如防腐劑、濕潤劑、乳化劑及分散劑。以包含抗微生物試劑及抗真菌劑(例如，苯甲酸酯、氯丁醇、酚山梨酸及類似物)保證微有機體活性的保護作用。也可以要求包括等滲劑，如糖、氯化鈉及類似物。以包含延緩吸收之試劑(如單硬脂酸鋁及明膠)可達到延長可注射配方之吸收作用。

在一些實例中，爲了延長藥物效用，可要求在皮下或肌肉內注射之後減慢藥物的吸收。這可由使用低水溶解度之結晶物質的液體懸浮液或以在油媒劑中溶解或懸浮藥物的方式達成。在含有低水溶解度的藥物形式之懸浮液的皮下

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (31)

或肌肉內注射之實例中，藥物的吸收速度與其溶解速度有關。

以在可生物降解的聚合物中，如在聚(乳酸)、聚(乙醇酸)、乳酸與乙醇酸的共聚物、聚(原酸酯)及聚(酐)中(這些是本技藝中說明的物質)形成藥物的微包膠化介質的方式製成F-I的可注射"積貯"配方。根據藥物對聚合物的配方及所使用的特殊聚合物特徵而定，可控制藥物釋出速度。

例如，以經過細菌留置濾紙的過濾方式，或在製造時的摻合之前或正在投藥之前(如在雙瓶針筒包裝的實例中)，先將混合物組份預消毒的方式將可注射配方消毒。

用於口服投藥方式之固態劑量形狀包括膠囊、片錠、丸錠、粉末及粒錠。在這些固態劑量形狀中，將F-I與至少一種惰性的製藥學載體(如檸檬酸鈉或磷酸二鈣)及/或(a)填料或增效劑，如澱粉、包括乳糖及葡萄糖的糖類、甘露糖醇及矽酸；(b)結合劑，如羧甲基纖維素及其它纖維素衍生物、藻朊酸鹽、明膠、聚(乙烯基環吡啶)、蔗糖及金合歡；(c)潤濕劑，如甘油；(d)粉碎劑，如洋菜、碳酸鈣、碳酸氫鈉、馬鈴薯或木薯澱粉、藻朊酸、矽酸鹽及碳酸鈉；(e)保濕劑，如甘油；(d)溶液阻滯劑，如石蠟；(g)吸收加速劑，如四價銨化合物；(h)濕潤劑，如鯨蠟醇及甘油單硬脂酸酯；(i)吸收劑，高嶺土及膨潤黏土及(j)潤滑劑，如滑石粉、硬脂酸鈉、硬脂酸鎂、固態聚(乙二醇)、月桂基硫酸鈉及其混合物。在膠囊、藥錠及丸錠的實例中，劑

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (32)

量形狀也可以包括緩衝劑。

類似型式之固態組合物也包括在軟或硬明膠膠囊中利用賦形劑之填充物，如乳糖與高分子量聚(乙二醇)及類似物。

也可以如腸塗料或在製藥學配方技藝中熟知的其它塗料之類的塗料或殼製備固態劑量形狀，如藥錠、糖衣藥丸、膠囊、丸錠及顆粒。塗料可以包括消光劑或會在消化追蹤的特殊部位中釋出活性成份(等)之試劑，如舉例會在胃中釋出活性成份(等)之酸溶性塗料或會在腸追蹤中釋出活性成份(等)之鹼溶性塗料。

也可以將活性成份(等)微包膠在持續釋出之塗料中，具有以微膠囊製成的膠囊配方丸錠的一部份。

用於F-I之口服投藥方式之液態劑量形狀包括溶液、乳液、懸浮液、糖漿及酏劑。除了活性成份之外，液態配方也包括常在本技藝中使用的惰性稀釋液，如水或其它製藥學溶液、溶解劑及乳化劑，如乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、醋酸乙酯、苜醇、苯甲酸苜酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲醯胺、油(特別是棉籽、落花生、玉米、胚芽、橄欖、蓖麻及芝麻油)、甘油、四氫呋喃醇、聚(乙二醇)、山梨醇的脂肪酸酯及其混合物等。

除了惰性稀釋液之外，液態口服配方也可以包括佐劑，如濕潤劑、乳化及懸浮劑與甜味劑、香味劑及芳香試劑。

除了活性成份(等)之外，液態懸浮液可以包括懸浮劑，如乙氧基化硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇及山椒聚精酯、微結

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (33)

晶纖維素、偏氫氧化鋁、膨潤黏土、洋菜及黃嗜膠與其混合物等。

將F-I與適合的無刺激性賦形劑(如椰子油、聚乙二醇或任何栓劑蠟，其在室溫下是固體，但在體溫下是液體，並因此會溶解在直腸或陰道腔中，以釋出活性組份(等)混合，以製備用於直腸或陰道內投藥方式之組合物。將化合物溶解在熔融蠟中，形成預期的形狀，並允許硬化成最終的栓劑配方。

也可以將F-I以微脂粒形狀投藥。根據本技藝已知，微脂粒通常衍生自磷脂或其它脂類物質。以分散在水介質中的單-或多薄層水合液態結晶形成微脂粒配方。可以使用任何能夠形成微脂粒之無毒、製藥學及可代謝的脂類。除了F-I之外，在微脂粒形狀中的本發明組合物可以包括安定劑、賦形劑、防腐劑及類似物。較佳的脂類是同時天然及合成的磷脂及磷脂鹽膽鹼(卵磷脂)。

在本技藝中已知形成微脂粒的方法，如舉例在Prescott版，Methods in Cell Biology，第十四冊，Academic出版，紐約市紐約州(1976年)第33頁等之中的說明。

以下的配方實施例只是例證而已，並不是企圖限制本發明的範圍。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (34)

配方 1：明膠膠囊

利用以下的成份製備硬明膠膠囊	量(毫克/膠囊)
F-I	0.1-1000
澱粉	0-650
可流動澱粉粉末	0-650
矽酮流體350釐沱	0-15

可配合所提供合理的變數改變以上的配方。

利用以下的成份製備藥錠配方：

配方 2：藥錠

成份	量(毫克/藥錠)
F-I	2.5-1000
纖維素，微結晶	200-650
二氧化矽，發烟的	10-650
硬脂酸	5-15

可將組份摻合及壓縮，以形成藥錠。

配方 3：可由以下製備分別含有 10 及 50 毫克 F-I 之藥錠：

成份	量(毫克/藥錠)	量(毫克/藥錠)
F-I	11.3	56.5
乳糖酐	176.8	128.2
乳糖噴霧乾燥之特製品	44.2	32.0
Povidone	11.0	13.0
聚山梨酸酯 80	2.5	2.6
Crosspovidone(內)	6.25	6.24
Crosspovidone(外)	6.25	6.5
硬脂酸鎂	1.5	1.7
微結晶纖維素(外)	0.0	13.0

可將組份摻合及壓縮，以形成藥錠。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (35)

可選擇由以下製成分別包括 2.5-1000 毫克 F-I 之藥錠：

配方 4：藥錠

成份	量(毫克/藥錠)
F-I	25-1000
澱粉	45
纖維素，微結晶	35
聚乙烯基環吡啶(成爲在水中的10%溶液)	4
羧甲基鈉纖維素	4.5
硬脂酸鎂	0.5
滑石粉	1

將 F-I、澱粉及纖維素通過 45 號網目之美國篩及完全混合。將聚乙烯基環吡啶與生成之粉末混合，接著將其通過 14 號網目之美國篩。將如此產生的顆粒在 50° - 60°C 下乾燥及通過 18 號網目之美國篩。接著將事先通過 60 號網目之美國篩之羧甲基鈉纖維素澱粉、硬脂酸鎂及滑石粉加入顆粒中，在混合之後，將其在藥錠機上壓縮，以產生藥錠。

由以下製備每 5 毫升劑量分別包括 0.1-1000 毫克藥劑之懸浮液：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (36)

配方 5：懸浮液

成份	量 (毫克/5 毫升)
F-I	0.1-1000
羧甲基鈉纖維素	50 毫克
糖漿	1.25 毫克
苯甲酸溶液	0.10 毫升
香料	q.v.
著色劑	q.v.
以純化的水加至	5 毫升

將藥劑通過 45 號網目之美國篩，並與羧甲基鈉纖維素及糖漿混合，以形成平滑的泥漿。將苯甲酸溶液、香料及著色劑以一些水稀釋及以攪拌乾燥。接著加入足夠的水，以產生預期的體積。

製備含有以下成份的氣溶膠溶液：

配方 6：氣溶膠

成份	量 (% 以重量計)
F-I	0.25
乙醇	25.75
推進劑 22 (氯二氟甲烷)	70.00

將 F-I 與乙醇混合，並將混合物加至部份的推進劑 22 中，冷卻至 30°C 及轉移制填充裝置中。接著將需要的量進料至不銹鋼容器中及以殘餘的推進劑稀釋。接著將閥單位配備至容器上。

根據以下製備栓劑：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (37)

配方 7 : 栓劑

成份	量 (毫克 / 栓劑)
F-I	250
飽和的脂肪酸甘油酯	2,000

將 F-I 通過 60 號網目之美國篩，並懸浮在利用最低必要的熱事先熔融的飽和的脂肪酸甘油酯中。接著將混合傾倒至通稱 2 公克容量之栓劑模型中，並允許其冷卻。

根據以下製備靜脈內配方：

配方 8 : 靜脈內溶液

成份	量
F-I	25 毫克
等滲食鹽水	1,000 毫升

將以上成份的溶液以每分鐘約 1 毫升的速度以靜脈內的方式投藥予病患。

配方 9 : 組合膠囊 I

成份	量 (毫克 / 膠囊)
F-I	50
結合型雌激素	1
Avicel pH 101	50
澱粉 1500	117.50
矽酮油	2
Tween 80	0.50
Cab-O-Sil	0.25

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (38)

配方 10 : 組合膠囊 II

成份	量 (毫克 / 膠囊)
F-I	50
異炔諾酮	5
Avicel pH 101	82.50
澱粉 1500	90
矽酮油	2
Tween 80	0.50

配方 11 : 組合藥錠

成份	量 (毫克 / 膠囊)
F-I	50
結合型雌激素	1
玉米澱粉 NF	50
Povidone, K29-32	6
Avicel pH 101	41.50
Avicel pH 102	136.50
Crospovidone XL10	2.50
硬脂酸鎂	0.50
Cab-O-Sil	0.50

劑量

以圍繞每一種情況的特殊環境決定根據本發明以 F-I 投藥的特殊劑量。這些環境包括投藥路徑、服用者先前的用藥經歷、欲治療之病理學症狀或癥候、欲治療之症狀 / 癥候的嚴重性及服用者的年齡與性別。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (39)

通常F-I有效的最低每日劑量是約1、5、10、15或20毫克。典型有效的最大劑量是800、100、60、50或40毫克。最典型的劑量範圍介於15毫克至60毫克之間。可以"劑量滴定"服用者的醫學技藝中根據標準的實例決定確實的劑量；即初期投以低劑量化合物及逐漸增加劑量，直到發現預期的治療效果為止。

雖然可能有必要以劑量滴定關於以上討論的組合治療之服用者，但是，除了F-I之外，典型的活性成份劑量如下：乙炔基雌激素(0.01-0.03毫克/天)、炔雌醇甲醚(0.05-0.15毫克/天)、共軛雌激素內泌素(例如，結合型雌激素[®]，Wyeth-Ayerst；0.3-2.5毫克/天)、6 α -甲-17-羥孕酮(2.5-10毫克/天)、異炔諾酮(1.0-10.0毫克/天)、炔諾酮(0.5-2.0毫克/天)、氨基導眠能(250-1250毫克/天，以每天四次250毫克較佳)、anastrozole (1-5毫克/天，以每天一次5毫克較佳)、letrozole (2.5-10毫克/天，以每天一次2.5毫克較佳)、formestane (250-1250毫克/週，以每週兩次250毫克較佳)、exemestane (25-1250毫克/天，以每天一次25毫克較佳)、goserlin (3-15毫克/三個月，以每三個月一次3.6-7.2毫克較佳)及leuprolide (3-15毫克/月，以每月一次3.75-7.5毫克較佳)。

投藥路徑

可以各種路徑投藥F-III，包括口服、經直腸、經皮質、皮下、靜脈內、肌肉內及鼻內。每一種以雌激素及以孕激素為主之試劑的投藥方法與本技藝已知的方法一致。將單

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (40)

獨或與雌激素、孕激素或AChE抑制劑等組合之F-I單獨以熟知的配方投藥。

可將本發明的製藥學組合物以口服、經直腸、經陰道內、非經腸、局部、經口腔或經舌下或經鼻的方式投藥予人類及其它哺乳動物(例如，狗、貓、馬、豬及類似物)。以"非經腸投藥"術語係指本文的投藥模式，其包括靜脈內、肌肉內、腹膜內、intrastrernal、皮下或關節內注射或擴散。

投藥模式/長度

關於本發明大部份的方法，將F-I以每天從1至3次連續投藥或每當需要時輸入有效量的F-I予服用者。週期性治療對子宮內膜組織異位形成之治療特別有用，並可在疾病的痛苦攻擊期間可立即使用。在重狹窄症的實例中，可將治療限制在醫療步驟之後(如血管成形術)的短期間內(1-6個月)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

四、中文發明摘要 (發明之名稱: 6-羥基-3-(4-[2-(六氫吡啶-1-基)乙氧基]苯氧基)-2-(4-甲氧苯基)苯并[b]噻吩氫氯化物之新穎晶形)

本發明係專注於6-羥基-3-(4-[2-(六氫吡啶-1-基)乙氧基]苯氧基)-2-(4-甲氧苯基)苯并[b]噻吩氫氯化物之新穎結晶水合物及其用途，包括與雌激素喪失有關連的疾病症狀之抑制作用(包括心與血管疾病、血內類脂質過多及骨質疏鬆症)及其它病理學狀態之抑制作用，如子宮內膜組織異位形成、子宮纖維變性、與雌激素有關的癌症(如乳癌及子宮癌)、攝護腺癌、良性攝護腺增殖、CNS失調(包括阿耳滋海默氏病)、預防乳癌及向上調節ChAT。

英文發明摘要 (發明之名稱: "A NOVEL CRYSTALLINE FORM OF 6-HYDROXY-3-(4-[2-(PIPERIDIN-1-YL) ETHOXY] PHENOXY)-2-(4-METHOXYPHENYL) BENZO [b] THIOPHENE HYDROCHLORIDE")

The present invention is directed to a novel crystalline hydrate of 6-hydroxy-3-(4-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]phenoxy)-2-(4-methoxyphenyl)benzo[b]thiophene hydrochloride and uses for same, including inhibition of disease states associated with estrogen deprivation including cardiovascular disease, hyperlipidemia, and osteoporosis; and inhibition of other pathological conditions such as endometriosis, uterine fibrosis, estrogen-dependent cancer (including breast and uterine cancer), prostate cancer, benign prostatic hyperplasia, CNS disorders including Alzheimer's disease, prevention of breast cancer, and up-regulating ChAT.

公告本

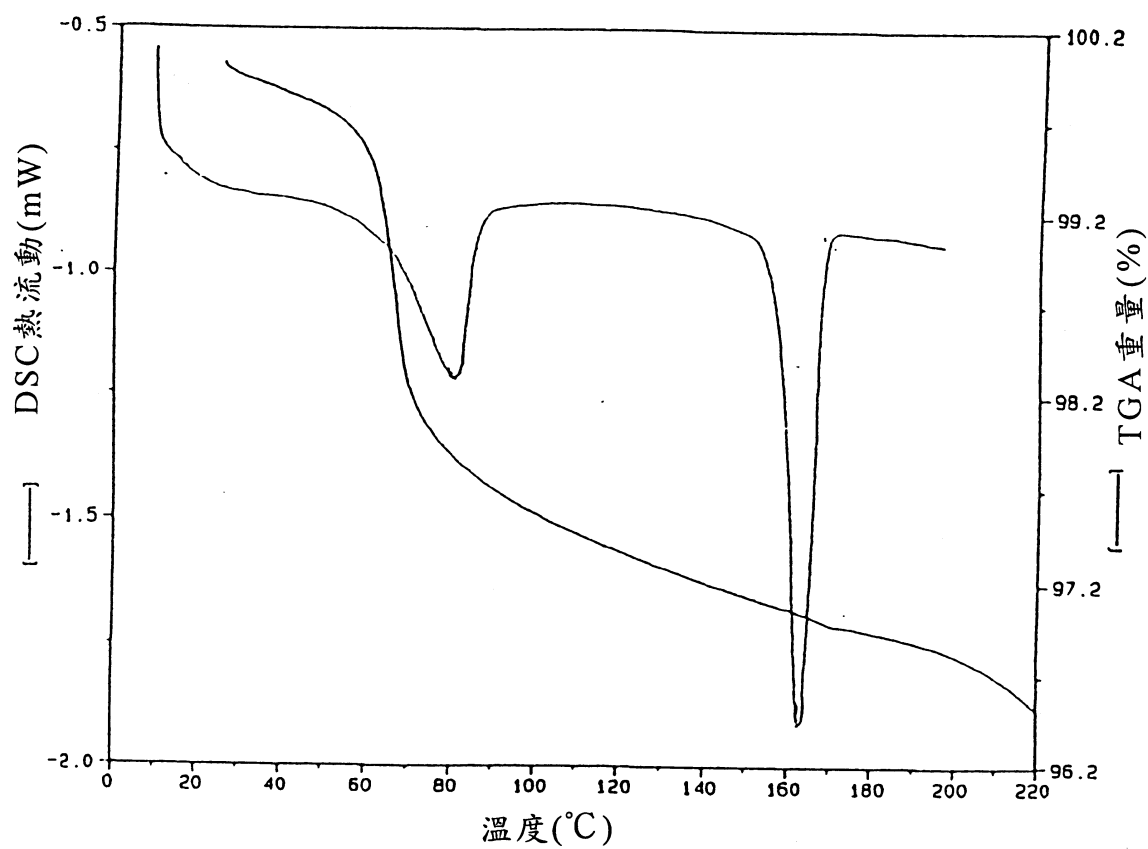


圖 1

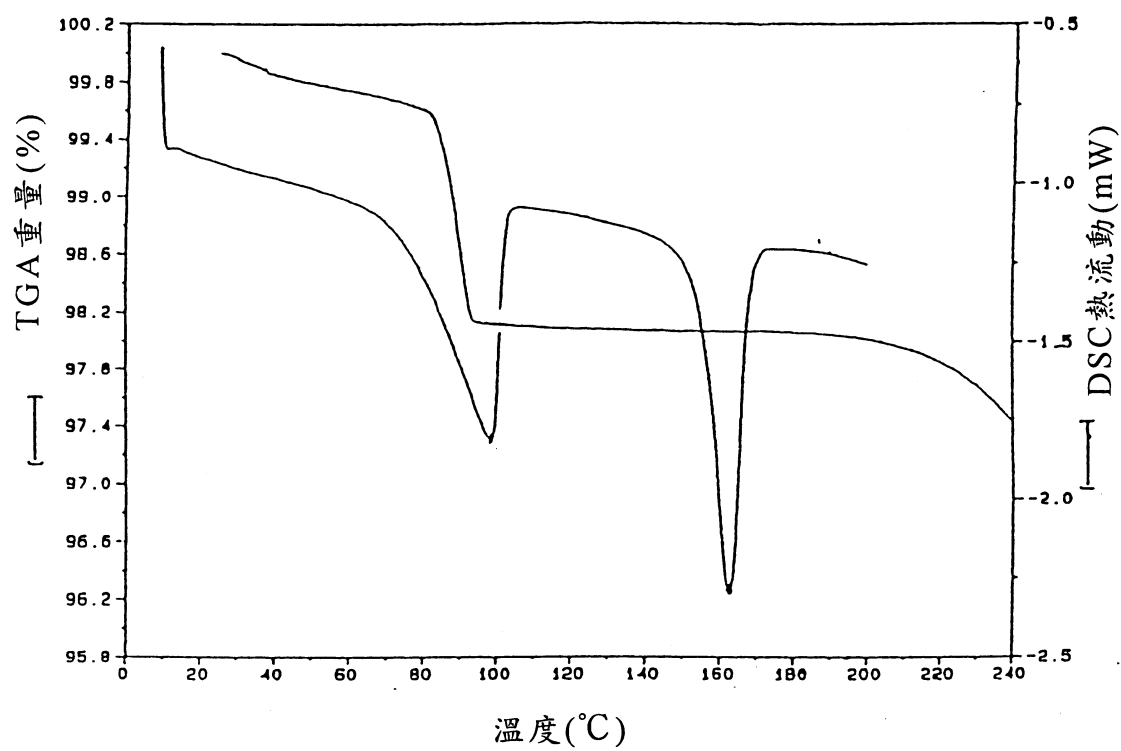


圖 2

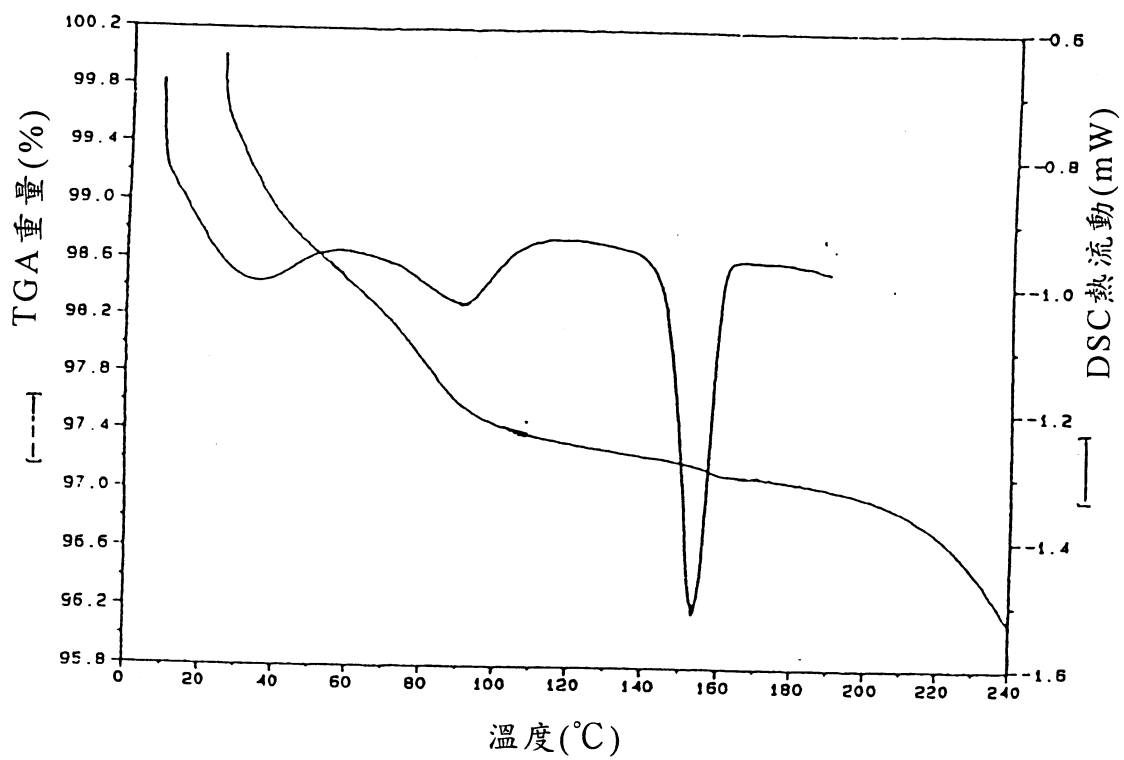


圖 3

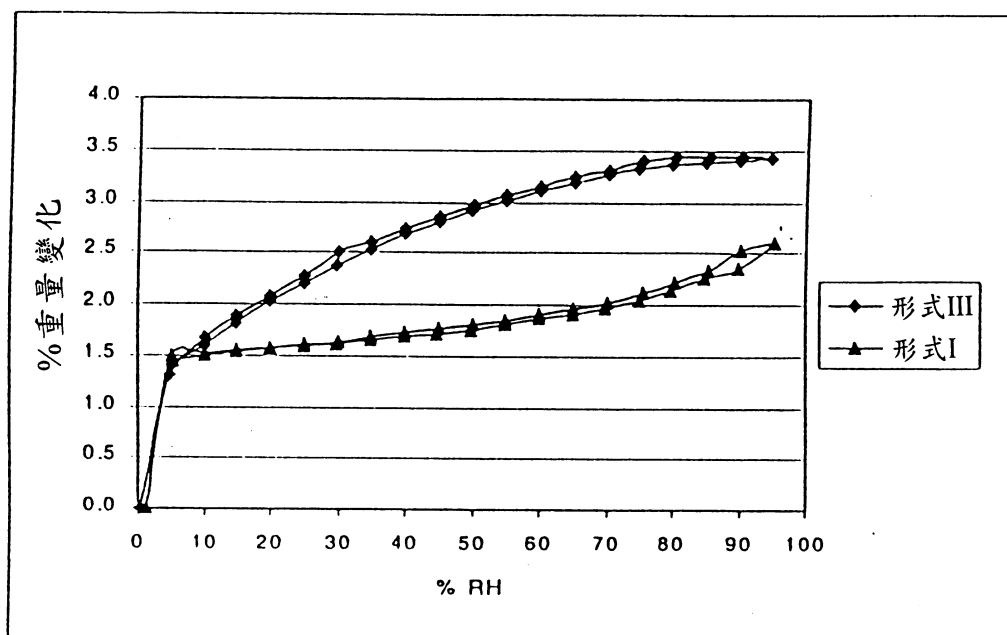


圖 4

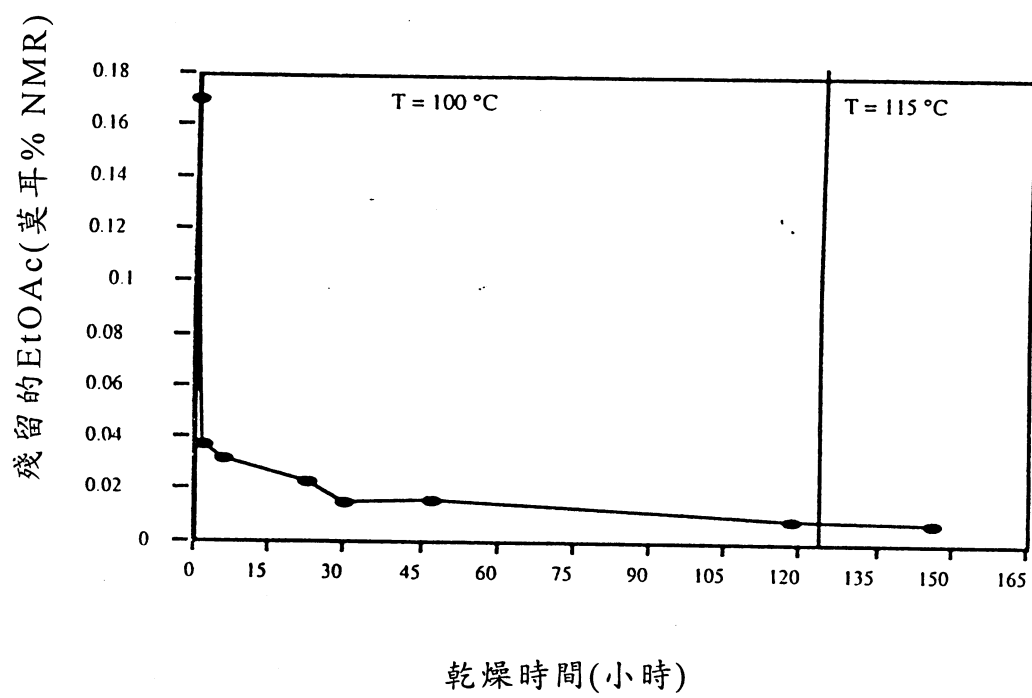


圖 5

六、申請專利範圍

公 告 本

修正
補充 本95年4月19日

1. 6-羥基-3-(4-[2-(六氫吡啶-1-基)乙氧基]苯氧基)-2-(4-甲氧苯基)苯并[b]噻吩氫氯化物(F-I)結晶，其具有以銅照射源(CuK α ； $\lambda=1.54056\text{\AA}$)獲得的X-射線繞射圖案，其包含以下的高峰：在 2θ 內的 7.9 ± 0.2 、 10.7 ± 0.2 、 14.9 ± 0.2 、 15.9 ± 0.2 、 18.3 ± 0.2 及 20.6 ± 0.2 。
2. 一種用於抑制選自乳癌、骨質疏鬆症、心與血管疾病與血內類脂質過多之病理學症狀之醫藥組合物，其包含申請專利範圍第1項之結晶化合物及一或數個製藥學載體、稀釋液或賦形劑。
3. 一種製備申請專利範圍第1項之化合物之方法，其包含自含以體積計1至10%的水之四氫呋喃結晶6-羥基-3-(4-[2-(六氫吡啶-1-基)乙氧基]苯氧基)-2-(4-甲氧苯基)苯并[b]噻吩氫氯化物。
4. 如申請專利範圍第3項之方法，其中四氫呋喃含以體積計2.5至7.5%的水。
5. 如申請專利範圍第4項之方法，其中四氫呋喃含以體積計4.5至5.5%的水。