



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1013410A3

NUMERO DE DEPOT : 2000/0477

Classif. Internat. : C07D A61K A61P

Date de délivrance le : 04 Décembre 2001

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 28 Juillet 2000 à 14H50 à l'Office de la Propriété Industrielle

ARRETE :

ARTICLE 1.- Il est délivré à : ELI LILLY AND COMPANY
Lilly Corporate Center Indianapolis, INDIANA 46285(ETATS-UNIS D'AMERIQUE)

représenté(e)s par : QUINTELIER Claude, GEVERS & VANDER HAEGHEN, Rue de Livourne 7, -B 1060 BRUXELLES.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : NOUVELLE FORME CRISTALLINE DU CHLORHYDRATE DE
6-HYDROXY-3-(4-(2-(PIPERIDIN-1-YL)ETHOXY)PHENOXY)-2-(4-METHOXYPHENYL)BENZO(b)THIOPHENE

INVENTEUR(S) : Bush Julie Kay, 10671 Red Berry Court, Fishers, Indiana 46038 (US); Conrad Preston Charles, 7336 Campfire Run, Indianapolis, Indiana 46236 (US); Flom Merlyn Gerard, 404 Roxbury Lane, Noblesville, Indiana 46060 (US)

PRIORITE(S) 29.07.99 US USA 146184 06.08.99 US USA 147642 19.08.99 US USA 149820

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeurs(s).

Bruxelles, le 04 Décembre 2001
PAR DELEGATION SPECIALE :

E. WUYTS
Directeur

5

10 NOUVELLE FORME CRISTALLINE DU CHLORHYDRATE
DE 6-HYDROXY-3-(4-[2-(PIPERIDIN-1-YL)ETHOXY]PHENOXY)-2-
(4-METHOXYPHENYL)BENZO[b]THIOPHENE

Fondement de l'invention

15 Le chlorhydrate de 6-hydroxy-3-(4-[2-(pipéridin-1-yl)éthoxy]phénoxy)-2-(4-méthoxyphényl)benzo[b]thiophène (arzoxifène) a été décrit pour la première fois d'un point de vue générique dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique US-A-5.510.357 et a été révélé de manière spécifique dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique US-A-5.723.474
20 ('474) et dans la demande de brevet européen EP-A-0 729 956. L'arzoxifène est un antagoniste/agoniste des œstrogènes mixte non stéroïdien utile entre autres pour diminuer le taux de cholestérol sérique et pour inhiber l'hyperlipidémie, l'ostéoporose, les cancers dépendant des œstrogènes y compris le cancer du sein et de l'utérus, l'endométriose, les
25 troubles du système nerveux central y compris la maladie d'Alzheimer, la prolifération des cellules des muscles lisses de l'aorte et la resténose.

De manière spécifique, l'arzoxifène est utile pour le traitement du cancer du sein métastatique positif quant aux récepteurs, pour le traitement adjuvant de patients positifs quant aux récepteurs, suite à une
30 thérapie systémique ou locale appropriée, pour la réduction de la récurrence du cancer du sein invasif et non invasif et pour la réduction de

l'incidence du cancer du sein invasif et du carcinome canalaire in situ (DCIS), et a fait l'objet d'une évaluation clinique pour ces traitements et pour ces réductions. L'arzoifène est également utile en combinaison avec un traitement radiothérapeutique, avec des inhibiteurs de l'aromatase, avec des analogues de la LH-RH (hormone de libération de la lutéinostimuline) et avec des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE).

Le radiodiagramme de poudre (XRD), l'analyse thermogravimétrique (TGA), la résonance magnétique nucléaire protonique (1H RMN) et les analyses de Karl Fischer (KF) de l'arzoifène brut isolé par les procédés révélés dans le brevet '474 ont indiqué ultérieurement que ladite matière était hydratée, faiblement cristalline et contenait des quantités variables d'un composé organique volatil (acétate d'éthyle) dans son réseau.

Des matières faiblement cristallines sont spécifiquement moins désirables que des matières fortement cristalline pour le traitement de formulation. En outre, il n'est généralement pas souhaitable de formuler des produits pharmaceutiques contenant des quantités importantes de solvants organiques (par exemple, l'acétate d'éthyle) à cause de la toxicité potentielle du solvant pour son receveur et à cause de changements en ce qui concerne l'activité pharmaceutique qui dépendent du solvant.

Bien que l'arzoifène préparé par les procédés révélés dans le brevet '474 ait pu être utilisé comme produit pharmaceutique, il serait très souhaitable et avantageux de trouver une forme plus cristalline de l'arzoifène qui ne contient pas de solvant organique dans son réseau cristallin et qui peut être préparé de manière reproductible et économique à l'échelle industrielle.

Sommaire de l'invention

La présente invention concerne une nouvelle forme cristalline hydratée non stœchiométrique du chlorhydrate de 6-hydroxy-3-(4-[2-(pipéridin-1-yl)éthoxy]phénoxy)-2-(4-méthoxyphényl)benzo[b]thiophène

(F-III) possédant un diagramme de diffraction des rayons X qui comprend les pics ci-après: $4,6 \pm 0,2$, $7,8 \pm 0,2$, $9,3 \pm 0,2$, $14,0 \pm 0,2$, $17,6 \pm 0,2$, $20,8 \pm 0,2$ et $24,3 \pm 0,2^\circ$ dans 2θ , lorsqu'on l'obtient à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ et sous une humidité relative (RH) de $35 \pm 10\%$.

5 En outre, la présente invention concerne une formulation pharmaceutique comprenant F-III; un ou plusieurs supports, diluants ou excipients pharmaceutiques et le cas échéant, des œstrogènes, le cas échéant des progestatifs, le cas échéant un inhibiteur de l'aromatase, le cas échéant un analogue de la LH-RH et le cas échéant un inhibiteur de
10 l'acétylcholinestérase (AChE).

 En outre, la présente invention concerne des procédés pour utiliser F-III dans le but d'inhiber des états pathologiques tels que la subinvolution de l'utérus, l'endométriose, la prolifération des cellules du muscle lisse de l'aorte, la resténose, le cancer du sein, le cancer de l'utérus, le cancer de
15 la prostate, l'hypertrophie de la prostate, la raréfaction osseuse, l'ostéoporose, des maladies cardio-vasculaires, l'hyperlipidémie, les troubles du système nerveux central et la maladie d'Alzheimer et pour utiliser F-III pour la fabrication d'un médicament en vue d'inhiber les états pathologiques mentionnés.

20 La présente invention concerne en outre des procédés pour utiliser F-III dans le but d'obtenir une régulation positive de la choline-acétyltransférase (ChAT) et pour utiliser F-III pour la fabrication d'un médicament pour la régulation positive de l'enzyme mentionné.

Brève description des figures

25 La figure 1 est un tracé représentatif de S-II obtenu par calorimétrie par analyse différentielle (DSC)/TGA.

 La figure 2 est un tracé représentatif de F-I via DSC/TGA.

 La figure 3 est un tracé représentatif de F-III via DSC/TGA.

30 La figure 4 décrit des courbes isothermes d'absorption de l'humidité pour F-I et F-III.

La figure 5 décrit la désolvatation de S-II en fonction du temps de séchage et de la température.

Description détaillée de l'invention

On caractérise par la technique XRD de l'arzoxifène brut préparé
5 par le procédé révélé dans le document '474 (exemple 41, cristallisation dans un mélange d'éthanol et d'acétate d'éthyle, filtration et séchage du gâteau de filtre sous vide jusqu'à ce que l'on obtienne un poids constant à la température ambiante) et il s'avère être faiblement cristallin. L'analyse 1H RMN confirme que la matière brute contient de l'acétate d'éthyle à
10 concurrence de 6%.

Le procédé de cristallisation révélé dans le document '474 a été modifié par la suite de telle sorte que l'on ajoute de l'éthanol à une suspension d'arzoxifène brut dans de l'acétate d'éthyle chauffé à reflux. Après refroidissement et filtration sous vide, le produit solide que l'on
15 obtient à partir de ce procédé modifié est un produit de solvatisation mixte d'acétate d'éthyle/eau d'arzoxifène à cristallinité élevée (désigné ci-après par l'abréviation S-II) qui s'est avéré ultérieurement être une matière de départ pour F-I (une autre forme cristalline hydratée non stœchiométrique de l'arzoxifène).

20 On peut préparer F-I en éliminant l'acétate d'éthyle du réseau cristallin de S-II par séchage sous vide/recuit de F-II à des températures élevées. Le laps de temps et la température requis pour le recuit de S-II dans le but de préparer F-I varieront d'un lot à l'autre, mais ils se situent de manière spécifique dans l'ordre de 5 jours à environ 5°C. Des
25 températures élevées sont nécessaires pour obtenir la conversion de F-II en F-I via ce procédé, étant donné que la transformation de F-II en pâte épaisse à la température ambiante ou l'entreposage d'un échantillon sous une humidité relative de 98% pendant trois semaines ne donne pas lieu à une conversion en F-I. En outre, le séchage de F-II dans un four de
30 convection à des températures élevées ne donne pas lieu à une

désolvatation de la matière, ce qui donne à penser qu'un vide est également requis pour retirer l'acétate d'éthyle du réseau S-II. De préférence, on prépare aisément F-I et on l'isole à la température ambiante par cristallisation d'arzoxyfène (ou de n'importe quelle variété polymorphique/produit de solvatation de ce dernier) dans du tétrahydrofuranne.

Conformément à la présente invention, une forme particulièrement préférée d'arzoxyfène est F-III. On prépare aisément F-III et on l'isole à la température ambiante. Des conditions de séchage seulement modérées sont requises pour éliminer de faibles teneurs en solvant résiduel de cristallisation dans la préparation de F-III. Ces conditions de séchage modérées donnent lieu de manière constante à un produit solide de pureté élevée (c'est-à-dire exempt de solvant organique résiduel) et de cristallinité élevée, si bien que l'utilisation de F-III élimine les problèmes toxicologiques associés au solvant organique résiduel présent dans le réseau cristallin. En outre, la préparation de F-III est simple et efficace, c'est-à-dire peut être aisément réalisée à l'échelle industrielle.

On prépare aisément F-III et on l'isole à la température ambiante par cristallisation d'arzoxyfène (ou de l'une quelconque de ses variétés polymorphiques ou de l'un quelconque de ses produits de solvatation) à partir d'un mélange d'alcool isopropylique (IPA) et d'eau. De manière spécifique, on peut mettre l'arzoxyfène en suspension dans un mélange de IPA et d'eau et chauffer le mélange dans le but d'obtenir une dissolution de la matière de départ d'arzoxyfène. Une fois que la dissolution est arrivée à son terme, on laisse la solution se refroidir lentement à la température ambiante, puis ultérieurement (à l'aide d'un bain de glace ou d'une réfrigération) à une température entre 0 et 5°C. Après qu'un laps de temps suffisant se soit écoulé pour obtenir une cristallisation, on peut récolter les cristaux par filtration sous vide et les sécher jusqu'à ce que

l'on obtienne un poids constant sous vide pour obtenir F-III avec des rendements supérieurs à 80%.

5 Une matière de départ d'arzoifène appropriée pour la cristallisation indiquée ci-dessus englobe, sans y être limité, S-II, F-I, l'arzoifène préparé par le procédé révélé dans le document '474 ou l'un quelconque de leurs mélanges. La forme de départ de l'arzoifène n'est pas importante, étant donné que la cristallisation dans de l'IPA et de l'eau conformément au procédé décrit ici donne lieu à des formations de cristaux de F-III. Le rapport de l'eau au IPA (v:v) se situe généralement d'environ 1:1 à 9:1. De manière plus préférée, le rapport se situe entre 2,5 et 5,6:1. De manière de loin préférée, le rapport se situe entre 3 et 5,6:1. Après récolte des cristaux par filtration sous vide, on peut laver le gâteau humide de F-III avec de l'eau froide déminéralisée avant de le sécher sous vide. En outre, on préfère des températures de séchage légèrement élevées (environ 50°C pendant un laps de temps de 12 à 24 heures). Pour une synthèse de F-III à l'échelle industrielle, il peut s'avérer avantageux d'ensemencer la cristallisation avec F-III.

15 Dans un procédé préféré, on prépare, on isole et on purifie F-III de manière contiguë avec l'élimination chimique du groupe protecteur du groupe hydroxyle du groupe isopropyle en position 6 du chlorhydrate de 20 6-isopropoxy-3-(4-[2-(pipéridin-1-yl)éthoxy]phénoxy)-2-(4-méthoxyphényl)benzo[b]thiophène (précurseur A). On surveille la réaction de déprotection à des fins d'élimination complète du groupe de protection du groupe isopropyle et après avoir déterminé que l'élimination est essentiellement complète, le traitement du mélange réactionnel englobera de préférence une cristallisation dans les conditions qui procurent F-III comme mentionné ci-dessus et ci-dessous. Des procédés pour préparer le précurseur A et pour éliminer le groupe isopropyle sont disponibles dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique US-A-5.723.474 dont les 25 enseignements sont incorporés ici à titre de référence.

30

Dans un autre procédé préféré, on prépare F-III, on l'isole et on le purifie de manière contiguë avec la réduction chimique du S-oxyde et avec l'élimination chimique du groupe protecteur du groupe benzyle du groupe hydroxyle en position 6 dans le 6-benzyloxy-3-(4-[2-(pipéridin-1-yl)éthoxy]-phénoxy)-2-(4-méthoxyphényl)benzo[b]thiophène (S-oxyde) (précurseur B). On surveille les réactions de réduction et de déprotection pour constater la réduction complète du sulfoxyde en sulfure et l'élimination complète du groupe protecteur du groupe hydroxyle du groupe benzyle. Après avoir déterminé que le processus de réduction/élimination est essentiellement achevé, le traitement du mélange réactionnel englobera de préférence une cristallisation dans les conditions qui fournissent F-III comme indiqué ici. Des procédés pour préparer le précurseur B, pour éliminer le groupe benzyle et pour réduire le groupe sulfoxyde en position 1 en sulfure correspondant sont également disponibles dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique US-A-5.723.474 incorporé ci-dessus à titre de référence.

Indépendamment du procédé chimique utilisé dans les étapes de déprotection et de réduction, la cristallisation de l'arxoxifène à partir des solutions de IPA/eau révélée ici procure de manière constante des cristaux de F-III avec une pureté élevée.

Caractérisation et différenciation de S-II, de F-I et de F-III

On utilise des procédés DSC/TGA et XRD pour caractériser S-II, F-I et F-III. La TGA est souvent très utile pour opérer une distinction entre différentes formes solides d'une matière étant donné que la ou les températures auxquelles a lieu un changement physique de la matière sont habituellement caractéristiques de la variété polymorphique ou du produit de solvatation. La DSC représente une technique que l'on utilise souvent pour détecter des composés en ce qui concerne leur variation polymorphique et leur solvatation. Enfin, la XRD est une technique qui détecte un ordre à longue distance dans une matière cristalline.

L'arzoixifène préparé par les procédés révélés dans le document '474 fournit des modèles XRD possédant des rapports signal-bruit médiocres et une ligne de base surélevée, ce qui indique une matière faiblement cristalline. En conséquence, on procède à des comparaisons de F-I et de F-III avec la matière (S-II) préparée par le procédé modifié de cristallisation de l'arzoixifène mentionné ci-dessus (addition d'éthanol à une suspension d'arzoixifène dans de l'acétate d'éthyle chauffé à reflux).

Dans les figures 1, 2 et 3 respectivement, on indique des tracés représentatifs de S-II, de F-I et de F-III via la DSC/TGA. Le tracé DSC pour S-II indique un large endotherme commençant à environ 62°C qui correspond à la perte de l'acétate d'éthyle et de l'eau à partir du réseau. L'endotherme commençant à environ 152°C représente une masse fondue. La perte de poids d'approximativement 2,5% indiquée par la TGA apparaît de manière simultanée avec la première transition tandis que la perte de poids restante de 0,5% en poids apparaît avec le déclenchement de la mise en fusion, ce qui suggère qu'un certain nombre de molécules du solvant se maintiennent plus fermement dans le réseau.

Le tracé DSC de F-I présente un large endotherme commençant à environ 75°C, suivi d'un second endotherme commençant à environ 155°C correspondant à une masse fondue. Le tracé TGA de F-I représente une perte de poids progressive de 0,3% suivi d'une perte brutale de 1,5% qui représentent de manière conjointe la déshydratation du réseau. Le déclenchement de la première transition DSC et la perte de poids TGA correspondante sont légèrement décalés à cause des différences de vitesses de chauffage. La perte de poids initiale représente de l'eau d'hydratation qui se maintient faiblement, tandis que la deuxième perte de poids correspond à une quantité d'approximativement 0,5 mole d'eau présente dans le réseau à des humidités relatives très faibles (en dessous de 5% - voir les données d'absorption de l'humidité).

Le tracé DSC de F-III indique un large endotherme de basse température à environ 30°C suivi d'un deuxième endotherme plus large et relativement faible commençant à environ 70°C, ainsi qu'une transition finale commençant à environ 146°C correspondant à une masse fondue.

5 La perte de poids brutale de 1,5 % ($\approx 0,5$ mole) dans la TGA coïncidant avec le premier endotherme correspond à la perte des molécules d'eau qui se maintiennent faiblement, tandis que la perte de poids supplémentaire d'environ 1,6 % au-dessus de 60°C représente la perte des molécules d'eau qui se maintiennent plus fermement, c'est-à-dire

10 celles qui sont présentes à des humidités relatives très faibles. La perte de poids observée après 170°C correspond à la décomposition de F-III.

Les diagrammes XRD de F-I et de F-III sont caractérisés par des pics bien marqués et par une ligne de base plate indiquant des matières fortement cristallines. Les positions angulaires des pics dans 2θ et les

15 données I/I_0 correspondantes pour des échantillons représentatifs de F-I, de F-III et de S-II sont reprises dans le tableau 1. Bien qu'un grand nombre des réflexions intenses forment généralement des angles de diffraction similaires, chacune des formes fournit un radiogramme de poudre différent, ce qui permet d'opérer une distinction claire entre S-II, F-

20 I et F-III.

Il est bien connu dans la technique de la cristallographie que, pour n'importe quelle variété polymorphique donnée, les intensités relatives des pics des diffraction peuvent varier en fonction de l'orientation préférée résultant de facteurs tels que la morphologie du cristal. Lorsque les effets

25 de l'orientation préférée sont présents, les intensités des pics se modifient, mais les positions des pics caractéristiques de la variété polymorphe restent inchangées. Voir, par exemple, The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18, pages 1843-1844, 1995. Ainsi, en se basant sur les intensités des pics, ainsi que sur les positions

30 des pics, on peut identifier F-III par la présence de pics à $4,6 \pm 0,2$, $7,8 \pm$

0,2, $9,3 \pm 0,2$, $14,0 \pm 0,2$, $17,6 \pm 0,2$, $20,8 \pm 0,2$, et $24,3 \pm 0,2$ dans 2θ ; lorsqu'on obtient le diagramme à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ et sous une humidité relative de $35 \pm 10\%$ à partir d'une source de raies au cuivre.

Tableau 1

S-II		F-I		F-III	
2 θ (°)	I/I ₀ (%)	2 θ (°)	I/I ₀ (%)	2 θ (°)	I/I ₀ (%)
4.67	1.3	4.92	2.6	4.63	20.8
5.03	6	7.69	34.6	7.82	100
6.83	5.8	7.91	100	9.29	16.9
7.17	16.1	9.89	2.5	10.16	22.7
7.73	100	10.22	2	10.35	5.4
9.03	1.3	10.74	7.4	13.77	10.7
9.31	1.7	14.86	9.1	13.97	15.2
9.66	2.4	15.45	2.3	15.06	6.9
10.27	1.6	15.92	15.9	15.71	22.3
10.47	2.2	16.67	1.7	15.87	7.4
10.91	6.3	16.98	3.1	16.35	34.5
13.63	2.1	18.28	17.8	16.77	12.3
14.09	4.6	18.56	7	17.28	10
15.10	4.1	20.58	13.1	17.62	47.9
15.52	10.5	20.85	8.8	18.09	43.9
16.45	9.1	21.64	3.9	20.43	42
16.67	7.6	22.19	4.8	20.80	33.6
17.21	4.9	22.65	2.9	21.31	42.7
17.53	2.4	23.28	3.4	21.71	13
18.33	28.2	23.97	11.8	21.85	14.5
18.69	11.1	24.31	6.3	22.13	12.8
19.37	3.5	25.52	3.9	22.26	16.3
20.29	8.6	26.20	3.4	23.51	13.2
20.64	17.2	26.47	3.1	23.69	15.9
21.02	12.7	28.84	6.4	23.91	25.6
21.68	5.1	30.13	3.5	24.31	38.7
22.01	8.3	31.12	2.9	25.22	8
22.29	8			25.67	8.9
23.17	7.8			27.05	18.9
23.39	9.1			27.89	13.3
24.30	13.6			28.24	8.6
25.76	3.4			28.71	21.3
26.05	4			29.89	8.9
26.63	5.5			30.24	18.7
27.01	3.1			30.88	5.8
27.49	2.8			31.44	7.6
28.10	1.8			33.06	4.5
28.73	10.9			34.36	6
29.42	3.2				

Tableau 1 (suite)

S-II		F-I		F-III	
2 θ (°)	I/I ₀ (%)	2 θ (°)	I/I ₀ (%)	2 θ (°)	I/I ₀ (%)
30.00	3.7				
30.89	2.1				
31.34	2.4				
31.70	1.1				
32.81	1				
32.91	0.8				
33.48	2				

Caractérisation ultérieure de F-I et de F-III

On procède à des études d'hygroscopicité sur F-I et sur F-III. Les isothermes d'absorption de l'humidité pour F-I et pour F-III sont représentés en figure 4. Lors de l'exposition initiale des échantillons à une humidité relative d'approximativement 5%, on constate un gain de poids immédiat de 1,5 % et une humidité de 1,7% pour F-I et pour F-III, respectivement, équivalant à approximativement 0,5 mole d'eau. Les deux formes présentent une absorption de l'humidité en continu à travers tout l'intervalle d'humidité, qui est vraisemblablement due à l'incorporation de molécules d'eau dans les réseaux.

La différence d'absorption de l'humidité manifestée par les deux formes reflète vraisemblablement la quantité d'eau qui peut être incorporée dans les deux réseaux (c'est-à-dire la quantité d'espace disponible dans le réseau dans lequel peuvent venir se loger des molécules d'eau). Un manque d'hystérèse dans les isothermes d'absorption-désorption de F-I et de F-III indique que les formes cristallines s'équilibrent rapidement à n'importe quelle humidité donnée.

Les profils d'absorption de l'humidité pour F-I et pour F-III révèlent que ces formes représentent des hydrates essentiellement non stœchiométriques. A une humidité relative ambiante (humidité relative d'environ 50%), F-I contient approximativement 1,7% d'eau, correspondant à 0,5 mole d'eau, tandis que, pour F-III, on constate une

absorption d'eau à concurrence d'environ 3,0% qui correspond à environ 0,85 mole d'eau. Les formes brutes de F-I et de F-III s'équilibrent rapidement avec l'atmosphère, si bien que la teneur en eau observée par des techniques analytiques reflète l'humidité relative lors de la récolte des données. Des différences d'un lot à l'autre, observées dans les données DSC proviennent vraisemblablement du fait que les échantillons ont été hydratés dans des mesures différentes, du fait de conditions ambiantes différentes lors de l'entreposage.

On obtient des diagrammes XRD pour des échantillons de F-I et de F-III entreposés sous différentes humidités relatives (0, 22, 50 et 80%). On constate un décalage progressif des pics initiaux de F-III (humidité relative de 0%) à environ 13,8, 17,6, 18,0, 20,5 et 24,0° dans 2θ , ainsi qu'un léger décalage des pics moins intenses, au fur et à mesure que l'humidité relative augmente. Ces changements observés dans les diagrammes XRD de F-III indiquent que les dimensions des cellules unitaires se modifient vraisemblablement pour prendre en compte des molécules d'eau qui se maintiennent faiblement au fur et à mesure que l'humidité relative augmente. Le décalage continu des pics avec l'humidité manifeste une bonne corrélation avec les données d'absorption de l'humidité qui indiquent un gain de poids progressif dans cet intervalle d'humidité relative; on dispose ainsi de la preuve d'une formation d'hydrate variable.

On procède à une expérience similaire sur F-I pour déterminer si oui ou non le fait de faire varier l'humidité relative aura un effet similaire sur son réseau (humidités relatives de 0, 25, 52, 73 et 95%). On observe un très léger décalage des pics d'humidité relative à 0% à environ 7,7, 18,3, 18,5, 20,8° dans 2θ , au fur et à mesure que l'humidité relative augmente. Les pics à environ 7,7, 20,8 et 24,1 manifestent également un léger élargissement et une résolution inférieure à des humidités relatives supérieures, indiquant que l'eau est absorbée dans les composants

amorphes (ou plastifie le produit solide) en particulier sous des humidités relatives de 73 et de 95%. Le décalage des pics dans le diagramme XRD de F-I est moins spectaculaire que le décalage des pics observés lorsqu'on expose F-III à différentes humidités relatives. Cette différence suggère que le réseau F-I ne subit pas la même dilatation et/ou la même contraction que le réseau F-III.

F-I et F-III s'avèrent stables à travers tout l'intervalle d'humidité relative malgré l'aptitude manifestée par F-III à absorber approximativement une quantité double d'eau. Les deux formes s'avèrent posséder une dimension de cristal, une morphologie, des solubilités aqueuses et des vitesses de dissolution comparables.

On procède à une étude du séchage pour surveiller la désolvatation de S-II en fonction du temps de séchage et de la température de séchage (voir la figure 5). On construit des diagrammes XRD à divers moments au cours des expériences de désolvatation. Un grand nombre de pics de diffraction à partir de l'étude de désolvatation de S-II apparaissent en formant des angles similaires à ceux de F-I confirmant que les réseaux de S-II et de F-I sont très similaires. La disparition des pics de diffraction à environ 6,8, 7,2 et 14,0° dans 2 θ après un séchage seulement minimal suggère que ces réflexions peuvent être attribuées à des plans cristallographiques contenant une densité électronique partielle de molécules d'acétate d'éthyle.

La prolongation du recuit de la matière soumise à une solvation sous vide à des températures élevées fournit F-I. F-I préparé de cette manière manifeste un degré de cristallinité élevée via XRD. En conséquence, une matière générée par cristallisation à partir d'une solution d'éthanol et d'acétate d'éthyle suivie par un séchage sous vide pendant seulement quelques heures comme révélé dans le document '474 manifeste une cristallinité très médiocre étant donné qu'un tel procédé donne lieu à du S-II ayant subi une désolvatation partielle.

F-I et F-III présentent divers avantages par rapport à la forme d'arzoifène de la technique antérieure décrite ci-dessus. Par rapport à l'arzoifène préparé via les procédés révélés dans le document '474, F-I et F-III sont plus stables à la température ambiante et sont par conséquent plus à même de subir un développement pharmaceutique c'est-à-dire un développement d'une formulation posologique. En outre, F-I et F-III sont beaucoup plus cristallins que la forme révélée dans le document '474. Des matières cristallines sont généralement moins hygroscopiques et plus stables (par exemple; sont moins sensibles à la dégradation chimique et maintiennent une activité constante) que des matières amorphes et sont par conséquent plus désirables pour le traitement lié à une formulation. En outre, contrairement à la forme d'arzoifène produite par les procédés révélés dans le document '474, qui contient de l'acétate d'éthyle et de l'eau dans son réseau, F-I et F-III contiennent seulement de l'eau.

15 Procédés de caractérisation

On procède aux mesures DSC sur une DSC modulée 2920 de TA Instruments fixée à un Thermal Analyst 3100 équipée d'un système de refroidissement par réfrigération. On chauffe les échantillons (3 - 5 mg) dans des cuvettes serties en aluminium en passant d'une température de 10 à 240°C à une vitesse de chauffage de 2°C/min.

On procède aux analyses TGA sur un Thermogravimetric Analyzer 2050 de TA Instruments fixé à un Thermal Analyst 3100. On chauffe les échantillons (5 - 10 mg) dans des cuvettes ouvertes en passant de 25°C à 250°C à une vitesse de chauffage de 5°C/min.

25 On obtient des diagrammes XRD sur un radiogramme de poudre D5000 de Siemens équipé d'une source de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) et d'un détecteur monolithique Kevex travaillant à 50 kV et 40 mA. On balaie chaque échantillon entre 40 et 350 dans 2θ . On laisse les échantillons s'équilibrer pendant un laps de temps d'au moins 30 minutes à la

température désirée et/ou à l'humidité relative désirée avant de récolter les données.

On procède aux mesures d'hygroscopicité pour F-I et pour F-III en utilisant le procédé VTI comme suit. On sèche chaque échantillon sous vide à 60°C jusqu'à ce qu'on ne détecte plus de perte de poids ultérieure, moment auquel on amène la chambre d'échantillonnage à une humidité relative de 0%. On obtient les isothermes d'absorption de l'humidité à 25°C en utilisant un dispositif d'équilibrage de l'humidité sous vide VTI présentant les conditions ci-après: taille de l'échantillon 10 - 15 mg, intervalle d'adsorption/désorption d'humidité relative de 0 - 95 %, intervalle de 5 % entre les étapes, intervalle de 10 minutes entre les échantillons.

Les exemples ci-après illustrent plus en détail les procédés pour préparer les hydrates de la présente invention. Les exemples ne sont pas destinés à limiter le cadre de ces procédés en aucune façon et ne doivent pas être considérés de la sorte.

Exemples

Exemple 1

F-III à partir du chlorhydrate de 6-isopropoxy-3-(4-[2-(pipéridin-1-yl)éthoxy]phénoxy)-2-(4-méthoxyphényl)benzo[b]thiophène

A une solution dans du chlorure de méthylène (100 mL) du chlorhydrate de 6-isopropoxy-3-(4-[2-(pipéridin-1-yl)éthoxy]phénoxy)-2-(4-méthoxyphényl)-benzo[b]thiophène (10 g, 18 mmoles) sous atmosphère d'azote, à une température de -10°C à -20°C, on ajoute du BCl₃(g) (4,23 g, 34 mmoles) à un débit qui maintient la température du mélange réactionnel à une valeur inférieure à -10°C. Au terme de l'addition, on laisse le mélange réactionnel s'agiter pendant 2 heures supplémentaires. Au mélange réactionnel, on ajoute lentement de l'alcool isopropylique (IPA) (12,35 mL, 167 mmoles) à une température inférieure à -10°C et on poursuit l'agitation pendant 30 minutes. On charge un ballon séparé avec 100 mL d'eau et on le refroidit avec un bain de glace à une température

d'approximativement 0°C. On transfère la solution de produit à de l'eau via une canule tout en maintenant une agitation vigoureuse. On laisse la pâte épaisse résultante de couleur blanche s'agiter à 0°C pendant 1 heure. On récupère le produit par filtration et on le rince avec 25 mL de CH₂Cl₂ à 5 40%/eau, puis avec 25 mL d'eau froide. On met le produit en suspension dans 60 mL de IPA et dans 60 mL d'eau et on chauffe à 60°C. On obtient une solution à une température de 48°C. On ajoute une quantité supplémentaire d'eau (120 mL). On laisse la solution se refroidir à 35°C et on refroidit davantage la pâte épaisse lentement jusqu'à une température 10 de 0 à 5°C, et on agite pendant plusieurs heures. On isole le produit par filtration et on le lave avec de l'eau froide déminéralisée (25 mL). On sèche le gâteau humide de F-III jusqu'à ce que l'on obtienne un poids constant sous vide à 50°C pendant un laps de temps de 12 à 24 heures pour obtenir F-III.

15 Exemple 2

F-III à partir du 6-benzyloxy-3-(4-[2-(pipéridin-1-yl)éthoxy]phénoxy)-2-(4-méthoxyphényl)benzo[b]thiophène-(S-oxyde)

Dans un flacon de Parr de 250 mL, on ajoute de l'eau déminéralisée (5,25 mL), du HCl 1M (7,74 mL, 7,75 mmoles), du charbon palladié à 10% (type A32110, 1,37 g, 1,29 mmoles de Pd), du 6- 20 benzyloxy-3-(4-[2-(pipéridin-1-yl)éthoxy]phénoxy)-2-(4-méthoxyphényl)benzo[b]thiophène-(S-oxyde) (3 g, 5,16 mmoles) et de l'alcool isopropylique (32 mL) à la température ambiante. On équipe le flacon d'un agitateur de Parr, on procède à une purge et à une 25 gazéification successives à deux reprises avec de l'azote, puis on purge et on remplit avec de l'hydrogène gazeux jusqu'à ce que l'on obtienne une pression de 30 psig. On déclenche l'agitateur et on chauffe le mélange réactionnel à 60°C. On détermine l'achèvement de la réaction par analyse HPLC après approximativement 4 heures. On filtre le mélange réactionnel 30 à travers un tampon de terres d'infusoires et on lave le tampon avec du

HCl 0,1M (2 x 10 mL). On élimine le solvant sous vide à une température d'approximativement 50°C. On dissout le résidu obtenu dans 50 % d'alcool isopropylique/eau déminéralisée (30 mL) et on chauffe modérément sur un bain de vapeur jusqu'à ce que l'on obtienne une solution. A la solution, on ajoute de l'eau déminéralisée (22 mL) et on laisse la solution refroidir à la température ambiante. On refroidit davantage jusqu'à 0°C le produit obtenu sous forme d'une pâte épaisse. On isole le produit par filtration, on le lave avec de l'eau froide déminéralisée (2 x 15 mL) et on le sèche sous vide à 50°C pour obtenir un poids constant donnant lieu à F-III.

Exemple 3

F-III à partir du 6-isopropoxy-3-[4-[2-(pipéridin-1-yl)éthoxy]phénoxy]-2-(4-méthoxyphényl)]benzo[b]thiophène-(S-oxyde)

On combine du chlorure de méthylène (105 L) et du 6-isopropoxy-3-[4-[2-(pipéridin-1-yl)éthoxy]phénoxy]-2-(4-méthoxyphényl)]benzo[b]thiophène-(S-oxyde) (10,5 kg) et on refroidit à une température de -15 à -20°C. On ajoute du trichlorure de bore (4,6 kg) tout en maintenant la température du mélange réactionnel entre -10 et -20°C. On poursuit l'agitation jusqu'à ce que l'aire en pour cent par HPLC occupée par la matière de départ soit inférieure à 1 %. On utilise le système HPLC suivant (colonne Zorbax SB-Phényle à 30°C d'un diamètre interne de 46 mm x 25 cm, méthanol:acide sulfurique 0,01N dans le rapport 70:30; débit de 1,5 mL/min; détecteur à 300 nm). On ajoute de l'isopropanol (10,28 kg) tout en maintenant la température réactionnelle entre -10 et -20°C. On agite le mélange réactionnel pendant un laps de temps de 30 à 45 minutes. On isole le produit réactionnel brut par addition du mélange réactionnel à une quantité supplémentaire de 105 litres d'eau soumise à un refroidissement préalable de 2 à 7°C tout en maintenant la température du mélange réactionnel à une valeur de 2 à 7°C. On fait suivre l'addition d'un rinçage avec du chlorure de méthylène (20 litres)

soumis à un refroidissement préalable de 7 à 2°C. On agite la pâte épaisse cristalline pendant un laps de temps de 2 à 3 heures et on la filtre, puis on la lave successivement avec du chlorure de méthylène (26 kg) soumis à un refroidissement préalable de 7 à 2°C et avec de l'eau (53 L)

5 soumise à un refroidissement préalable de 7 à 2°C. On combine le gâteau humide avec de l'eau (42 L) et avec de l'isopropanol (40 L) et on le chauffe à une température de 65 à 70°C pour obtenir une dissolution. On filtre la solution chaude. La filtration est suivie d'un rinçage avec un mélange d'isopropanol (20 L) et d'eau (21 L) chauffée à une température

10 de 65 à 70°C et d'un rinçage avec de l'eau (126 L) soumise à un réchauffement préalable de 65 à 70°C. On refroidit la solution à une température de 40 à 45°C, on l'ensemence et on l'agite à cette température pendant un laps de temps de 2 à 3 heures pour permettre la croissance des cristaux. On refroidit la pâte épaisse jusqu'à une

15 température de 0 à 5°C, on l'agite pendant un laps de temps de 3 à 4 heures et on la filtre. On lave le gâteau de filtre avec de l'eau (122,6 L) soumise à un réchauffement préalable de 2 à 7°C. On sèche le produit sous vide à une température maximale de 50°C jusqu'à ce que le changement de poids du gâteau soit inférieur à 0,05 kg pendant un laps

20 de temps de 2 à 4 heures. On obtient 8,468 kg (correspondant à un rendement de 87,3 % de la théorie). Activité par HPLC: 98,5 %. Teneur en eau via le procédé de Karl Fischer: 3,0 %. Teneur totale en substances apparentées via HPLC: 1,79 %.

Exemple 4

25 F-III à partir du 6-benzyloxy-3-[4-[2-(pipéridin-1-yl)éthoxy]phénoxy]-2-(4-méthoxyphényl)]benzo[b]thiophène-(S-oxyde)

On combine du tétrahydrofurane (261 mL), de l'eau (45 mL), de l'acide sulfurique concentré (6,14 g) et du 6-benzyloxy-3-[4-[2-(pipéridin-1-yl)éthoxy]phénoxy]-2-(4-méthoxyphényl)]benzo[b]thiophène-(S-oxyde)

30 (activité par HPLC: 99 %; teneur totale en substances apparentées via

HPLC: 0,35 %) et on agite la combinaison jusqu'à ce que l'on obtienne une combinaison homogène. A du charbon palladié à 10 % (5,6 g transformé en pâte épaisse dans 22 mL d'eau), on ajoute 5 mL d'eau de rinçage. On fait le vide dans la pâte épaisse résultante et on la recouvre

5 de 60 psi d'hydrogène. On règle la température du mélange réactionnel à 30°C. Après 2 heures, on ajoute de l'eau (30 mL) à du charbon palladié à 10% (5,6 g). On poursuit l'hydrogénation à 60 psi et à 30°C pendant 22 heures supplémentaires. On ajoute une quantité supplémentaire de 4,40 g de charbon palladié à 10% dans 30 mL d'eau et on poursuit

10 l'hydrogénation à 60 psi et à 30°C pendant 2,5 heures supplémentaires. On élimine le catalyseur par filtration et on règle le pH du filtrat à 7,24 avec de l'hydroxyde de sodium à 50%. On ajoute du chlorure de sodium (8,66 g) dissous dans de l'eau (18 mL) et on agite la solution biphasique pendant 30 minutes. On sépare les phases et on extrait la phase aqueuse

15 en retour avec 50 mL de tétrahydrofurane. On combine les phases organiques et on les concentre par distillation sous pression atmosphérique jusqu'à ce que l'on obtienne un volume de 50 mL. Au concentrat à 24°C, on ajoute du méthanol (180 mL) pendant un laps de temps de 1 heure. On agite la pâte épaisse cristalline résultante pendant

20 30 minutes à 24°C, on refroidit à 0°C et on agite pendant une heure. On isole les produits solides par filtration et on les lave successivement avec 39 mL d'eau et avec 39 mL de méthanol, puis on sèche sous vide pendant une nuit à 50°C. On obtient 15,50 g correspondant à un rendement de 67,8 % de la théorie.

25 On combine de l'isopropanol (33 mL), de l'eau (66 mL) et 10 g de produits solides isolés à partir du produit ci-dessus. Au mélange agité, à une température de 25°C, on ajoute du HCl 1,8M (21 mL). On obtient une dissolution rapide des produits solides, suivie d'une reprecipitation du sel chlorhydrate. Après agitation pendant 30 minutes, on chauffe la pâte

30 épaisse à 70°C pour obtenir une dissolution de tous les produits solides.

On refroidit la solution à 60°C et on ajoute 33 mL d'eau. On refroidit la solution résultante à 25°C pendant un laps de temps de 3 heures, période au cours de laquelle le sel chlorhydrate précipite. On agite la pâte épaisse pendant approximativement 3 heures à 25°C, on la filtre, on la lave avec de l'eau (30 mL), on la sèche sous vide pendant une nuit à 50°C pour obtenir 8,9 g (correspondant à un rendement de 82,7 % de la théorie) de F-III. Activité par HPLC: 96,5 %. Teneur en eau via le procédé de Karl Fischer: 2,44 %. Teneur en substances apparentées par HPLC: 1,09 %.

Utilités

10 Telle qu'on l'utilise ici, l'expression "quantité efficace" signifie une quantité de F-III qui est capable d'inhiber les affections décrites ici ou leurs effets néfastes. Lorsqu'on administre F-III de manière conjointe avec des œstrogènes, des progestatifs, un inhibiteur de l'aromatase, un analogue de la LH-RH ou un inhibiteur de AChE, l'expression "quantité efficace" signifie également une quantité d'un tel agent capable de produire l'effet recherché.

Les termes "inhibant" et "inhibe" englobent leur signification généralement admise, c'est-à-dire la prévention, la prohibition, la restriction, le soulagement, l'amélioration, le ralentissement, l'arrêt ou la réversion de la progression ou de la gravité d'une affection pathologique, ou de ses séquelles, telle que décrite ici.

Les expressions "manifestant une carence en œstrogènes" et "manque d'œstrogènes" désignent un état, soit existant naturellement, soit induit par voie clinique, dans lequel une femme ne peut produire une quantité suffisante d'hormones sexuelles femelles endogènes pour maintenir les fonctions dépendant des œstrogènes, par exemple la menstruation, l'homéostasie de la masse osseuse, les fonctions neuronales, l'état cardio-vasculaire, etc. De telles situations de carence en œstrogènes proviennent, sans y être limitées, de la ménopause et d'une ovariectomie chirurgicale ou chimique, y compris ses équivalents

fonctionnels par exemple une médication avec un inhibiteur de l'aromatase, des agonistes ou des antagonistes de la GnRH (la gonadolibérine), ICI 182780 et analogues. Des états de maladie associés à une carence en œstrogènes englobent sans y être limités: la raréfaction osseuse, l'ostéoporose, les maladies cardio-vasculaires et l'hyperlipidémie.

Tel qu'utilisé ici, le terme "œstrogène" englobe des composés stéroïdiens possédant une activité oestrogénique tels que par exemple le 17 β -oestradiol, l'oestrone, des œstrogènes conjugués (Premarin®), les œstrogènes équins, le 17 β -éthynyl-oestradiol, et analogues. Un composé préféré à base d'œstrogènes est Premarin® et le noréthynodrel.

Tel qu'on l'utilise ici le terme "progestatifs" englobe des composés possédant une activité progestative, tels que par exemple la progestérone, le noréthynodrel, le nongestrel, l'acétate de megestrol, la noréthindrone, et analogues. La noréthindrone représente un agent préféré à base de progestatifs.

Telle qu'on l'utilise ici, l'expression "inhibiteur de l'aromatase" englobe des composés capables d'inhiber l'aromatase, par exemple des inhibiteurs disponibles dans le commerce tels que l'aminoglutemide (CYTANDREN®), l'anastrazole (ARIMIDEX®), le létrozole (FEMARA®), le formestane (LENATRON®), l'exémestane (AROMASIN®), et analogues.

Telle qu'utilisée ici, l'expression "analogue de la LH-RH" désigne un analogue de l'hormone de libération de la lutéinostimuline qui inhibe la production d'œstrogènes chez les femmes préménopausiques, y compris par exemple la goserline (ZOLADEX®), le leuprolide (LUPRON®) et analogues.

Telle qu'utilisée ici, l'expression "inhibiteur de l'acétylcholinestérase (AChE)" englobe des composés qui inhibent l'acétylcholinestérase, par

exemple le salicylate de physostigmine, le chlorhydrate de tacrine, le chlorhydrate de donepezil et analogues.

Telle qu'utilisée ici, l'expression "régulation positive de la ChAT" désigne l'augmentation de l'activité enzymatique de la ChAT, c'est-à-dire le fait de favoriser la conversion de choline en acétylcholine. Cet effet favorable englobe une augmentation de l'efficacité et/ou de la vitesse de réaction de la ChAT et de la choline et/ou une augmentation de la quantité de la ChAT présente au site d'action. Cette augmentation de la quantité de l'enzyme présente peut être due à une régulation génique ou à une autre étape de synthèse de la formation enzymatique et/ou à une diminution de la désactivation et du métabolisme enzymatique.

Procédés d'essais sélectionnés

Procédé général de préparation des rats: On se procure des rats femelles Sprague Dawley âgés de 75 jours (sauf indication contraire) (domaine de poids moyen de 200 à 225 g) auprès du Charles River Laboratories (Portage, MI). Les animaux ont été soumis, soit à une ovariectomie bilatérale (OVX), soit à une opération chirurgicale factice aux laboratoires Charles River, puis ils ont été expédiés après une semaine. A leur arrivée, on les place dans des cages en métal suspendues par groupes de 3 ou 4 par cage et on leur laisse un accès libre à de la nourriture (teneur en calcium approximativement 0,5%) et à de l'eau pendant une semaine. On maintient la température ambiante à $22,2^{\circ} \pm 1,7^{\circ}\text{C}$ sous une humidité relative minimale de 40%. La période d'éclairage dans la pièce comprend 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité.

Dosage posologique - récolte de tissus: Après une période d'acclimatation d'une semaine (par conséquent, deux semaines après la OVX), on déclenche une posologie quotidienne avec F-III. On administre du 17α -éthynyl-oestradiol ou bien du F-III par voie orale, sauf indications contraires, sous forme d'une suspension dans de la carboxyméthylcellulose à 1% ou sous forme d'une solution dans de la

cyclodextrine à 20%. On soumet les animaux à cette posologie quotidienne pendant 4 jours. Suite au schéma posologique, on pèse les animaux et on les anesthésie avec un mélange de kétamine:xylazine (2:1, volume:volume). On récolte un échantillon de sang par ponction cardiaque. Ensuite, on sacrifie les animaux par asphyxie avec CO₂, on retire l'utérus via une incision médiane et on détermine le poids de l'utérus à l'état humide. On se procure le 17 α -éthynyl-oestradiol auprès de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

Maladies cardio-vasculaires/hyperlipidémie

On laisse les échantillons de sang ci-dessus coaguler à la température ambiante pendant 2 heures et on obtient du sérum après centrifugation pendant 10 minutes à 3000 tours/minute. On détermine la teneur en cholestérol sérique en utilisant un dosage du cholestérol haute performance de Boehringer Mannheim Diagnostics. Pour le dire brièvement, on oxyde le cholestérol pour obtenir la cholest-4-én-3-one et du peroxyde d'hydrogène. On fait alors réagir le peroxyde d'hydrogène avec du phénol et de la 4-aminophénazone en présence de peroxydase pour obtenir un colorant de p-quinone-imine que l'on lit par voie spectrophotométrique à 500 nm. Ensuite, on calcule la concentration de cholestérol par rapport à une courbe d'étalonnage. L'ensemble du dosage est réalisé de manière automatique en utilisant un Biomek Automated Workstation.

Dosage de la peroxydase des éosinophiles (EPO) dans l'utérus

On maintient les utérus à 4°C jusqu'à ce que l'on procède à l'analyse enzymatique. On homogénéise ensuite les utérus dans 50 volumes de tampon Tris 50 mM (pH 8,0) contenant Triton X-100 à concurrence de 0,005%. Après addition de peroxyde d'hydrogène à raison de 0,01% et de la o-phénylènediamine 10 mM (concentrations finales) dans le tampon Tris, on surveille l'augmentation de l'absorption pendant 1 minute à 450 nm. La présence d'éosinophiles dans l'utérus constitue une

indication de l'activité œstrogène d'un composé. On détermine la vitesse maximale sur un intervalle de 15 secondes par rapport à la portion linéaire initiale de la courbe réactionnelle.

Procédé d'essai d'inhibition de la raréfaction osseuse (ostéoporose)

5 En suivant le procédé de préparation général décrit ci-dessus, on soumet les rats à un traitement quotidien pendant 35 jours (six rats par groupe de traitement) et on les sacrifie par asphyxie au dioxyde de carbone au 36ème jour. Le laps de temps de 35 jours est suffisant pour
10 permettre une réduction maximale de la densité osseuse, telle qu'on la mesure comme décrit ici. Au moment du sacrifice, on retire les utérus, on les sépare du tissu étranger par dissection et on expulse le fluide qu'ils contiennent avant la détermination du poids à l'état humide dans le but de confirmer une déficience en œstrogènes associée à une ovariectomie complète. Habituellement, le poids de l'utérus subit une réduction
15 d'environ 75% en réponse à l'ovariectomie. On place ensuite les utérus dans de la formaline tamponnée neutre à 10% pour permettre une analyse histologique ultérieure.

On excise les fémurs droits et on numérise les rayons X générés, puis on les analyse via un programme d'analyse d'image (image NIH) à la
20 métaphyse distale. On balaie également l'aspect proximal des tibias de ces animaux par tomographie quantitative. Conformément aux procédés décrits ci-dessus, on administre par voie orale à des animaux d'essais du F-III ou de l'éthynyl-oestradiol (EE2) dans de l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine à 20%. F-III est également utile en combinaison avec des
25 œstrogènes ou des progestatifs.

Dosage de la prolifération des MCF-7

On maintient des cellules MCF-7 de l'adénocarcinome du sein (ATCC HTB 22) dans un milieu MEM (milieu essentiel minimal exempt de rouge de phénol, Sigma, St. Louis, MO) auquel on a ajouté du sérum
30 bovin foetal (FBS) à concurrence de 10% (volume/volume), de la L-

glutamine (2 mM), du pyruvate de sodium (1 mM), de l'HEPES {(acide N-[2-hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[2-éthanesulfonique]10 mM)}, des acides aminés non essentiels et de l'insuline bovine (1 µg/ml) (milieu de maintien). Dix jours avant le dosage, on fait passer les cellules MCF-7 dans un milieu de maintien auquel on a ajouté, à concurrence de 10%, un milieu de dosage contenant du sérum bovin fœtal purifié avec du charbon de bois enduit de dextran (DCC-FBS) au lieu de FBS à 10% pour appauvrir les stocks internes des stéroïdes. On retire les cellules MCF-7 des ballons de maintien en utilisant un milieu de dissociation cellulaire (HBSS exempt de Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ (exempt de rouge de phénol) auquel on a ajouté 10 mM de HEPES et 2 mM de EDTA). On lave les cellules à deux reprises avec le milieu de dosage et on règle la concentration pour obtenir 80.000 cellules/ml. On ajoute approximativement 100 µL (8.000 cellules) à des cupules de microculture à fond plat (Costar 3596) et on les incube à 37°C dans un incubateur humidifié avec du CO₂ à 5%, pendant 48 heures, pour permettre l'adhérence des cellules et l'équilibrage après transfert. On prépare des dilutions en série de médicaments, ou de DMSO à titre de diluant témoin, dans le milieu de dosage et on transfère 50 µL à des microcultures en triple exemplaire, puis 50 µL du milieu de dosage pour obtenir un volume final de 200 µL. Après 48 heures supplémentaires à 37°C, dans un incubateur humidifié avec du CO₂ à 5%, on soumet les microcultures à des impulsions avec de la thymidine marquée au tritium (1 µCi/puits) pendant 4 heures. On met fin aux cultures par congélation à -70°C pendant 24 heures, puis par décongélation et on récolte des microcultures en utilisant un dispositif de récolte de cellules semi-automatique Skatron. On compte les échantillons par scintillation de liquide en utilisant un compteur BetaPlace β de Wallac.

Inhibition d'une tumeur mammaire induite par le DMBA

On produit des tumeurs mammaires dépendant des œstrogènes chez des rats Sprague-Dawley femelles que l'on se procure auprès de

Harlan, Industries, Indianapolis, Indiana. Une fois âgés d'approximativement 55 jours, les rats reçoivent une administration unique par voie orale de 20 mg du 7,12-diméthylbenz[a]anthracène (DMBA). Approximativement 6 semaines après l'administration du DMBA, on palpe
5 les glandes mammaires à des intervalles de 1 semaine pour détecter l'apparition de tumeurs. Chaque fois qu'une ou plusieurs tumeurs apparaissent, on mesure les diamètres maximaux et minimaux de chaque tumeur avec un palpeur métrique, on enregistre les mesures et on sélectionne cet animal pour l'expérimentation. On tente de distribuer de
10 manière uniforme les différentes tailles des tumeurs dans les groupes traités et dans les groupes témoins de telle sorte que des tumeurs de taille moyenne sont distribuées de manière équivalente entre les groupes d'essais. Les groupes témoins et les groupes d'essais pour chaque expérience comprennent de 5 à 9 animaux.

15 On administre F-III, soit via des injections par voie intrapéritonéale dans de la gomme d'acacia à 2%, soit par voie orale. Les composés administrés par voie orale sont, soit dissous, soit mis en suspension dans 0,2 mL d'huile de maïs. On administre chaque traitement, y compris les traitements témoins à la gomme d'acacia et à l'huile de maïs une fois par
20 jour à chaque animal d'essai. Après la mesure initiale de la tumeur et la sélection des animaux d'essais, on mesure les tumeurs chaque semaine en utilisant le procédé mentionné ci-dessus. On poursuit le traitement et les mesures des animaux pendant un laps de temps de 3 à 5 semaines, après quoi, on détermine les aires de surface finales correspondant aux
25 tumeurs. Pour chaque traitement avec un composé et pour chaque traitement témoin, on détermine le changement de l'aire de surface moyenne occupée par la tumeur.

Procédés d'essais de subinvolution de l'utérus

Essai 1: A un nombre entre 3 et 20 femmes souffrant d'une
30 subinvolution de l'utérus, on administre F-III. La quantité du composé

administré s'élève de 0,1 à 1000 mg/jour et la période d'administration s'élève à 3 mois. On observe les femmes pendant la période d'administration et jusqu'à 3 mois après avoir mis un terme à l'administration pour détecter les effets sur la subinvolution de l'utérus.

5 Essai 2: On utilise le même procédé que dans l'essai 1, avec cette exception que la période d'administration s'étend sur 6 mois.

Essai 3: On utilise le même procédé que dans l'essai 1, avec cette exception que la période d'administration s'étend sur 1 an.

10 Essai 4: On utilise une stimulation prolongée des œstrogènes dans des cobayes femelles en maturité génitale pour induire un léiomyome. On administre aux animaux une dose d'oestradiol 3 à 5 fois par semaine par injection pendant 2-4 mois ou jusqu'à apparition des tumeurs. On administre quotidiennement, pendant 3-16 semaines, des traitements constitués de F-III ou d'un véhicule, puis on sacrifie les animaux et on
15 récolte les utérus et on les analyse pour observer la régression des tumeurs.

Essai 5: On implante des tissus provenant de léiomyomes humains dans la cavité péritonéale et/ou dans la tunique musculaire de l'utérus de
20 souris femelles athymiques en maturité génitale et castrées. On introduit des œstrogènes étrangers pour induire la croissance du tissu implanté. Dans certains cas, on cultive in vitro, avant l'implantation, les cellules tumorales récoltées. On administre le traitement constitué de F-III ou d'un véhicule par lavage gastrique sur une base quotidienne pendant 3-
25 16 semaines et on retire les implants et on mesure leur croissance ou leur régression. Au moment du sacrifice, on récolte les utérus pour évaluer l'état de l'organe.

Essai 6: On récolte des tissus provenant de fibromes utérins humains et on les maintient in vitro sous forme de cultures primaires non transformées. On fait passer des échantillons chirurgicaux à travers un
30 tamis ou des mailles stériles ou, en variante, on les dissocie du tissu

environnant pour obtenir une suspension contenant uniquement des cellules. On maintient les cellules dans des milieux contenant du sérum à 10% et des antibiotiques. On détermine les taux de croissance en présence et en l'absence d'œstrogènes. On soumet les cellules à un dosage quant à leur aptitude à produire le composant du complément C3 et quant à leur réponse aux facteurs de croissance et à l'hormone de croissance. On analyse des cultures in vitro quant à leur réponse proliférante suite au traitement avec des progestatifs, avec la GnRH, avec F-III et avec un véhicule. On évalue les concentrations des récepteurs des hormones stéroïdiennes une fois par semaine pour déterminer le fait de savoir si les caractéristiques importantes des cellules sont conservées in vitro. On utilise des tissus provenant de 5-25 patients.

Essai 7: On mesure l'aptitude de F-III à inhiber une prolifération stimulée par des œstrogènes de lignées cellulaires ELT dérivées de léiomyomes essentiellement comme décrit dans Fuchs-Young et collaborateurs "Inhibition of Estrogen-Stimulated Growth of Uterine Leiomyomas by Selective Estrogen Receptor Modulators", Mol. Car., 17(3):151-159 (1966), dont les enseignements sont incorporés ici à titre de référence.

20 Procédés d'essais d'endométriose

Essai 1: A titre d'animaux d'essais, on utilise de 12 à 30 rats femelles adultes de souche CD. On les répartit en trois groupes contenant un nombre égal d'animaux. On surveille le cycle œstral de tous les animaux. Au jour du pro-œstrus, on procède à une opération chirurgicale sur chaque femelle. On enlève aux femelles de chaque groupe, la trompe de Fallope gauche, on la sectionne en petits carrés et on suture légèrement les carrés à divers sites adjacents à l'écoulement du sang méésentérique. En outre, on retire les ovaires des femelles du groupe 2. Au lendemain de l'opération chirurgicale, les animaux correspondant aux groupes 1 et 2 reçoivent des injections d'eau par voie intrapéritonéale pendant 14 jours,

tandis que les animaux du groupe 3 reçoivent des injections par voie intrapéritonéale de 1,0 mg de F-III par kg de poids du corps au cours de la même période. Après 14 jours de traitement, on sacrifie chaque femelle et on retire les explants endométriaux, les glandes surrénales, les restes d'utérus et les ovaires, en fonction des cas, et on les prépare pour un examen histologique. On pèse les ovaires et les glandes surrénales.

5
Essai 2: A titre d'animaux d'essais, on utilise de 12 à 30 rats femelles adultes de souche CD. On les répartit en deux groupes égaux. On surveille le cycle œstral de tous les animaux. Au jour du pro-oestrus, on procède à une opération chirurgicale sur chaque femelle. On retire aux femelles, dans chaque groupe, la trompe de Fallope gauche, on la sectionne en petits carrés et on suture légèrement les carrés à divers sites adjacents à l'écoulement du sang mésentérique. Approximativement 50 jours après l'opération chirurgicale, les animaux attribués au groupe 1 reçoivent des injections d'eau par voie intrapéritonéale pendant 21 jours, tandis que les animaux du groupe 2 reçoivent des injections par voie intrapéritonéale de 1,0 mg de F-III par kg de poids du corps au cours de la même période. Après 21 jours de traitement, on sacrifie chaque femelle et on retire et on pèse les explants endométriaux et les glandes surrénales. On mesure les explants pour obtenir une indication de la croissance. On surveille les cycles oestriques.

15
Essai 3: On utilise des autogreffes de tissu endométrial pour induire l'endométriose chez des rats et/ou chez des lapins. On soumet des animaux femelles en maturité reproductrice à une ovariectomie bilatérale et on introduit des œstrogènes par voie exogène pour ainsi obtenir une concentration spécifique et constante des hormones. On implante un tissu endométrial autologue dans le péritoine de 5-150 animaux et on introduit des œstrogènes pour induire la croissance du tissu explanté. On applique le traitement constitué d'un composé de la présente invention par lavage gastrique sur une base quotidienne pendant 3-16 semaines et on retire

les implants, puis on les mesure pour détecter la croissance ou la régression. Au moment du sacrifice, on récolte la trompe de Fallope intacte pour évaluer l'état de l'endomètre.

5 Essai 4: On implante des tissus provenant de lésions endométriales humaines dans le péritoine de souris femelles athymiques en maturité génitale et castrées. On introduit des œstrogènes exogènes pour induire la croissance du tissu explanté. Dans certains cas, on cultive in vitro, avant l'implantation, les cellules endométriales récoltées. On administre le traitement constitué de F-III administré via un lavage gastrique sur une
10 base quotidienne pendant 3-16 semaines, on retire les implants et on les mesure pour détecter la croissance ou la régression. Au moment du sacrifice, on récolte les utérus pour évaluer l'état de l'endomètre intact.

Essai 5: On récolte des tissus de lésions endométriales humaines et on les maintient in vitro sous forme de cultures primaires non
15 transformées. On fait passer des échantillons chirurgicaux à travers un tamis ou des mailles stériles ou, en variante, on les dissocie du tissu environnant pour obtenir une suspension contenant uniquement des cellules. On maintient les cellules dans des milieux contenant du sérum à 10% et des antibiotiques. On détermine les taux de croissance en
20 présence et en l'absence d'œstrogènes. On soumet les cellules à un dosage quant à leur aptitude à produire le composant du complément C3 et quant à leur réponse aux facteurs de croissance et à l'hormone de croissance. On analyse des cultures in vitro quant à leur réponse proliférante suite au traitement avec des progestatifs, avec la GnRH, avec
25 F-III et avec un véhicule. On évalue les concentrations des récepteurs des hormones stéroïdiennes une fois par semaine pour déterminer le fait de savoir si des caractéristiques importantes des cellules sont conservées in vitro. On utilise des tissus provenant de 5-25 patients.

Troubles du système nerveux central y compris la maladie d'Alzheimer

Les œstrogènes, tels que le 17β -œstradiol, régulent la transcription génique en se liant aux récepteurs des œstrogènes (ER) qui résident dans le cytoplasme de certaines populations cellulaires. L'activation du ligand des ER constitue un préalable pour le transport nucléaire du complexe dans lequel la liaison à un palindrome consensus d'ADN de 13 paires de bases (élément de réponse aux œstrogènes ou ERE) entame l'assemblage d'un appareil de transcription, qui culmine dans l'activation de gènes cibles appropriés. On a identifié une variété de gènes qui sont régulés par les œstrogènes. Ils englobent des protéines cytotoxiques, des enzymes et des récepteurs biosynthétiques et métaboliques faisant office de neurotransmetteurs, ainsi que d'autres hormones et neuropeptides. Les ERE ont été identifiés dans un grand nombre de gènes de réponse aux œstrogènes, y compris la vitellogénine, le gène c-fos, la prolactine et l'hormone lutéinisante.

Des séquences analogues aux ERE, importantes dans le système nerveux central, ont été identifiées dans p75^{ngf} et trkA qui font tous deux office de molécules de signalisation pour les neurotrophines: le facteur de croissance des cellules nerveuses (NGF), le facteur de croissance des cellules nerveuses dérivé du cerveau (BDNGF) et la neurotrophine-3.

Le BDNGF au même titre que le NGF se sont avérés favoriser la survie de neurones cholinergiques en culture. On formule l'hypothèse que si les interactions entre les neurotrophines et les œstrogènes sont importantes pour le développement et la survie des neurones de base du cerveau antérieur (qui manifestent une dégénérescence dans la maladie d'Alzheimer) des conditions cliniques dans lesquelles existe une carence en œstrogènes (comme c'est le cas après la ménopause) peuvent contribuer à une perte de ces neurones.

L'expérience ci-après a été réalisée sur des rats ovariectomisés (préparés comme décrit ci-dessus) dans le but de déterminer les similitudes et/ou les différences entre F-III et les œstrogènes en ce qui concerne la façon dont ils affectent l'expression génique dans différentes régions du cerveau. A des rats âgés de 6 semaines, on administre des doses quotidiennes de benzoate d'oestradiol (0,03 mg/kg), de F-III ou de véhicule (témoin) via des injections par voie sous-cutanée. Après 5 semaines de traitement, on sacrifie les animaux, on retire leurs cerveaux et on récolte leurs hippocampes par microdissection. Les hippocampes sont soumis à une congélation éclair dans de l'azote liquide et sont entreposés à une température de -70°C. On prépare de l'ARN total à partir de tissu rassemblé à partir des groupes de traitement et des groupes témoins appropriés et on le soumet à une transcription inverse en utilisant une amorce oligonucléotidique 3' qui a été sélectionnée pour des populations d'ARNm spécifiques (polyA+). On procède à des réactions d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) dans un cocktail constitué par: des oligonucléotides aléatoires 5' (possédant une longueur de 10 paires de base; 150 au total), un tampon de réaction, la polymérase Taq et un ³²PdTCP.

Après 40 cycles d'amplification, on soumet les produits de la réaction à un fractionnement en fonction de la dimension sur un gel de TBE à 6%-urée, on les sèche et on les expose à un film radiographique. On compare les modèles d'affichage d'ARNm résultants entre les groupes de traitement.

Utilisation de F-III de manière conjointe avec des œstrogènes

Des femmes péri- et postménopausiques sont souvent soumises à une hormonothérapie suppléative (HRT) pour lutter contre les conséquences négatives associées à la chute du nombre d'œstrogènes endogènes en circulation, par exemple pour traiter des bouffées de chaleurs. Toutefois, les HRT sont associées à une augmentation des

risques liés à certains cancers y compris le cancer de l'utérus et le cancer du sein. F-III peut être utilisé de manière conjointe avec une HRT pour inhiber ces risques.

Utilisation de F-III de manière conjointe avec un inhibiteur de l'aromatase

5 Par définition, les ovaires d'une femme postménopausique ne sont plus en fonction. Sa seule source d'œstrogènes dépend de la conversion d'androgènes surrénaliens en œstrogènes via l'enzyme aromatase que l'on trouve dans des tissus périphériques (y compris, les graisses, les muscles et la tumeur cancéreuse elle-même). Ainsi, des médicaments qui inhibent l'aromatase (inhibiteurs de l'aromatase) épuisent les œstrogènes en circulation chez la femme postménopausique. La carence d'œstrogènes par inhibition de l'aromatase représente une option de traitement importante pour des patients souffrant d'un cancer métastatique du sein. Lors d'une thérapie avec un inhibiteur de l'aromatase, le manque d'œstrogènes en circulation peut donner lieu à des effets secondaires négatifs inattendus par exemple sur le taux des lipides sériques. F-III peut être utilisé pour inhiber ces effets négatifs.

Utilisation de F-III de manière conjointe avec un analogue de la LH-

20 RH

Une exposition en continu à un analogue de la LH-RH (hormone de libération de l'hormone lutéinisante) inhibe la production d'œstrogènes chez les femmes préménopausiques par désensibilisation de l'hypophyse qui ne stimule plus les ovaires pour produire des œstrogènes. L'effet clinique est une "ovariectomie médicale" qui est réversible lorsqu'on met fin à l'exposition à l'analogue de la LH-RH. Au cours d'une thérapie avec un analogue de la LH-RH, un manque d'œstrogènes en circulation peut donner lieu à des effets secondaires négatifs inattendus par exemple sur le taux des lipides sériques. F-III peut être utilisé pour inhiber ces effets négatifs.

Augmentation des taux d'acétylcholine

Il est connu que des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer manifestent un taux de neurones cholinergiques dans l'hippocampe remarquablement inférieur à celui de leur pairs ne souffrant pas de la maladie d'Alzheimer. La perte progressive de ces neurones cholinergiques reflète la perte progressive de la mémoire et de la fonction cognitive chez ces patients. On pense qu'une raison expliquant le déclin de ces neurones est la perte ou la diminution de la fonction de l'acétylcholine faisant office de neurotransmetteur.

Le taux d'acétylcholine dans un neurone est fondamentalement déterminé par l'endroit où intervient l'équilibre entre sa biosynthèse et sa biodégradation. L'enzyme choline-acétyltransférase (ChAT) est principalement responsable de sa synthèse et l'acétylcholinestérase (AChE) est principalement responsable de sa dégradation.

Dans le but de déterminer l'effet de F-III sur les taux de ChAT, on procède à l'expérience ci-après: en suivant le procédé de préparation générale des rats décrit ci-dessus, on administre à 40 rats une dose quotidienne, par injection par voie sous-cutanée ou par gavage oral, de F-III à raison de 3 mg/kg/jour dans un véhicule contenant de la cyclodextrine à 10 %, de benzoate d'oestradiol à raison de 0,03 ou de 0,3 mg/kg/jour ou d'un véhicule témoin. On traite les animaux pendant un laps de temps de 3 jours ou de 10 jours. Vingt animaux sont concernés par chaque schéma posologique. A des intervalles de temps appropriés, les animaux sont sacrifiés et leurs cerveaux sont disséqués. Les portions particulières des cerveaux sont homogénéisées et dosées. On traite des produits d'homogénéisation provenant de l'hippocampe et du cortex frontal et on détermine l'activité de la ChAT à l'aide d'un dosage radiomarqué de la biosynthèse de l'acétylcholine. Ce procédé est disponible dans Schoepp et collaborateurs, J. Neural Transmiss., 78:183-193, 1989, dont les enseignements sont incorporés ici à titre de référence.

Comme on pouvait s'y attendre, dans les animaux OVX, les taux de ChAT manifestent une réduction $> 50\%$ ($p < 0,001$) par rapport aux témoins soumis à une opération factice.

5 Dans une autre forme de réalisation de l'invention, on utilise F-III en combinaison avec un inhibiteur de la AChE. L'utilisation d'un inhibiteur de la AChE augmente les taux d'acétylcholine en bloquant sa dégradation par inhibition de la AChE.

Hypertrophie de la prostate (BPH)

10 Pour obtenir des informations concernant la liaison entre l'action des œstrogènes et le traitement du BPH et du carcinome de la prostate, on se référera à la demande PCT n° WO 98/07274, date de publication internationale: 15 octobre 1998.

15 Dans les expériences décrites ci-dessous, on évalue l'aptitude de F-III à se lier à des récepteurs des œstrogènes dans différentes lignées de cellules humaines du cancer de la prostate.

On prépare des lysats des lignées cellulaires humaines du cancer de la prostate LNCaP, DU-45 et PC-3 dans un milieu TEG comprenant 50 nM de Tris.HCl, pH 7,4, 1,5 mM d'acide éthylènediaminetétracétique (EDTA), 0,4 M de KCl, 10% de glycérol, 0,5 mM de 2-ME et 10 mM de molybdate de sodium contenant en outre les inhibiteurs de la protéase ci-après: la pepstatine (1 mg/ml), la leupeptine (2 mg/ml), l'aprotinine (5 mg/ml) et le fluorure de phényl-méthylsulfonyle (PMSF, 0,1 mM) (TEGP).

20

On centrifuge les lysats cellulaires et on remet en suspension les pastilles dans du TEGP froid (1 ml de TEGP/100 mg de pastille) et on soumet à un traitement aux ultrasons pendant 30 secondes (cycle de travail: 70 %, sortie: 1,8) sur un dispositif de traitement aux ultrasons de Branson Modèle 450. On pastille les lysats par centrifugation à 10.000 x g pendant 15 minutes à 4°C; après quoi, on retire les produits surnageants et, soit on les utilise immédiatement, soit on les entrepose à -70°C.

25

Dosage faisant appel à une liaison compétitive entre deux substances: le tampon de liaison est TEG dans lequel on remplace le KCl 0,4 M par du NaCl 50 mM et auquel on ajoute ultérieurement 1 mg/ml d'ovalbumine (TEGO). On dilue F-III jusqu'à 20 nM dans TEGO, puis on
5 prépare des dilutions successives en triple. On procède aux dosages dans des microplaques en polypropylène à fond rond dans des micropuits en triple exemplaire. On introduit dans chaque puits 35 µl de 17β-oestradiol marqué au tritium (0,5 nM, activité spécifique 60,1 Ci/mmmole, Dupont-New England Nuclear, Boston, MA) et 35 µl de composé d'essai
10 de compétition froid (0,1 nM - 5 mM) ou de TEGO et, suite à une incubation pendant 5 minutes à 4°C tout en agitant, 70 µl de lysat de la lignée cellulaire MC-7.

On incube les plaques pendant 24 heures à 4°C; après quoi, on ajoute 70 µl de charbon enduit de dextran (DCC) dans chaque puits et on
15 agite vigoureusement pendant 8 minutes à 4°C. On centrifuge ensuite les plaques à 1500 x g pendant 10 minutes à 4°C. On récolte le produit surnageant de chaque puits dans une microplaque flexible en polystyrène à des fins de comptage par scintillation dans un compteur Wallac Micobeta Modèle 1450. On exprime la radioactivité par le nombre de
20 désintégrations par minute (DPM) après avoir procédé à une correction pour prendre en compte l'efficacité du comptage (35 - 40 %) et le bruit de fond. On utilise des témoins supplémentaires sous la forme de comptages totaux et de comptages totaux + DCC pour définir la limite inférieure des comptages extractibles de DCC. Les résultats de ces dosages faisant
25 appel à une liaison compétitive entre deux substances sont exprimés comme moyenne en pour cent à l'état lié (pour cent lié) +/- écart-type en se référant à la formule:

$$\% \text{ lié} = \frac{\text{DPM}_{\text{composé d'essai}} - \text{DPM}_{\text{comptage total + DCC}}}{\text{DPM}_{\text{composé d'essai}} - \text{DPM}_{\text{comptage total + DCC}}} \times 100$$

5 Prévention du cancer du sein

La présente invention concerne également l'administration de F-III à un receveur qui présente un risque de développer de novo un cancer du sein. L'expression "de novo" telle qu'utilisée ici désigne le manque de transformation ou de métamorphose des cellules normales du sein en
 10 cellules cancéreuses ou malignes en première instance. Une telle transformation peut apparaître par étapes dans les mêmes cellules ou dans des cellules filles via un processus évolutif ou bien elle peut apparaître lors d'un seul événement essentiel. Ce processus de novo s'oppose à la métastase, à la colonisation ou à la prolifération de cellules
 15 déjà transformées ou malignes depuis le site tumoral primaire jusqu'à de nouveaux endroits.

Une personne qui ne présente aucun risque particulier de développer un cancer du sein est une personne qui peut développer un cancer du sein de type de novo, qui ne présente aucun signe ou aucune
 20 suspicion en ce qui concerne le fait de développer potentiellement la maladie, au-dessus du risque normal, et qui n'a jamais présenté un diagnostic révélateur de la maladie. Le facteur de risque maximal contribuant au développement du carcinome du sein est le fait d'avoir été atteint par la maladie au cours de son histoire personnelle ou encore une
 25 manifestation antérieure de la maladie, même si elle est en rémission ou sans aucune preuve de sa présence. Un autre facteur de risque concerne des antécédents familiaux liés à la maladie.

L'induction de tumeurs mammaires dans des rats par administration de N-nitroso-N-méthylurée à titre de carcinogène est un modèle animal

bien admis pour l'étude du cancer du sein et elle s'est avérée appropriée pour analyser l'effet d'agents de prévention chimiothérapeutiques.

5 Dans deux études séparées, on administre par voie intraveineuse (étude 1) ou par voie péritonéale (étude 2) une dose de 50 mg de N-nitroso-N-méthylurée par kg de poids du corps, une semaine avant de les alimenter ad libitum avec un régime dans lequel on mélange diverses quantités de F-III, de base (Z)-2-[4-(1,2-diphényl-1-butényl)phénoxy]-N,N-diméthyléthanamine (base de tamoxifen) ou un témoin.

10 Dans l'étude 1, les doses alimentaires de 60 mg/kg de régime alimentaire et de 20 mg/kg de régime alimentaire se traduisent en doses grosso modo comparables de 3 et de 1 mg/kg de poids du corps pour les animaux d'essai.

15 Dans l'étude 2, les doses alimentaires de 20, 6, 2 et 0,6 mg/kg de régime alimentaire se traduisent en doses grosso modo comparables de 1, 0,3, 0,1 et 0,03 mg/kg de poids du corps pour les animaux d'essai.

20 On observe les rats pour détecter une manifestation de toxicité et on les pèse et on les palpe pour détecter la formation de tumeurs une fois par semaine. On sacrifie les animaux après treize semaines (étude 1) ou après dix-huit semaines (étude 2) et on confirme la présence de tumeurs et on les pèse après autopsie.

Formulations

25 Le terme "pharmaceutique" lorsqu'on l'utilise ici comme adjectif signifie essentiellement le fait d'être inoffensif pour le mammifère receveur. Par l'expression "formulation pharmaceutique", on veut dire que le support, le diluant, les excipients, l'ingrédient ou les ingrédients actifs doivent être compatibles avec les autres ingrédients de la formulation et être inoffensifs pour leur receveur.

De préférence, on formule F-III avant l'administration. La sélection de la formulation doit être laissée à la décision du médecin traitant en

prenant en compte les mêmes facteurs que ceux impliqués lors de la détermination de la quantité efficace.

Les ingrédients actifs dans leur totalité comprenant dans de telles formulations de 0,1 % à 99,9 % en poids de la formulation. De préférence, ladite formulation ne contient pas plus de deux ingrédients actifs. On veut dire par là qu'on préfère formuler F-III avec un second ingrédient actif choisi parmi le groupe comprenant un œstrogène, un progestatif, un inhibiteur de l'aromatase, un analogue de la LH-RH et un inhibiteur de la AChE. Des formulations de loin préférées sont celles dans lesquelles F-III représente le seul ingrédient actif.

On prépare les formulations pharmaceutiques de la présente invention via des procédés connus dans la technique en utilisant des ingrédients bien connus et aisément disponibles. Par exemple, on formule F-III, soit seul, soit en combinaison avec un œstrogène, avec un progestatif, avec un inhibiteur de l'aromatase, avec un analogue de la LH-RH ou avec un inhibiteur de la AChE, avec des excipients, des diluants ou des supports courants et on les transforme en comprimés, en capsules, en suspensions, en solutions, en produits injectables, en aérosols, en poudres et analogues.

Des compositions pharmaceutiques de la présente invention destinées à une administration par voie parentérale comprennent des solutions, des dispersions, des suspensions ou des émulsions aqueuses ou non aqueuses stériles, ainsi que des poudres stériles qui sont reconstituées immédiatement avant l'emploi pour obtenir des solutions ou des suspensions stériles. Des exemples de supports, de diluants, de solvants ou de véhicules aqueux et non aqueux stériles appropriés englobent l'eau, une solution salée physiologique, l'éthanol, des polyols (tels que le glycérol, le propylèneglycol, le polyéthylèneglycol, et analogues), ainsi que des mélanges appropriés de ces polyols, des huiles végétales (telles que l'huile d'olive) et des esters organiques injectables

tels que l'oléate d'éthyle. On maintient une fluidité appropriée, par exemple en utilisant des matières d'enrobage telles que la lécithine, en maintenant une granulométrie appropriée dans le cas de dispersions et de suspensions et en utilisant des agents tensioactifs.

5 Des compositions pour une administration par voie parentérale peuvent également contenir des adjuvants tels que des conservants, des agents mouillants, des émulsifiants et des agents de mise en dispersion. On garantit une protection contre l'action des micro-organismes par l'inclusion d'agents anti-bactériens et antifongiques, par exemple des
10 para-hydroxybenzoates de méthyle et de propyle, le chlorobutanol, le phénol, l'acide sorbique et analogues. Il peut également s'avérer souhaitable d'englober des agents isotoniques tels que des sucres, le chlorure de sodium et analogues. Une absorption prolongée de formulations injectables peut être fournie par l'inclusion d'agents qui
15 retardent l'absorption tels que le monostéarate d'aluminium et la gélatine.

Dans certains cas, dans le but de prolonger l'effet du médicament, il est souhaitable de ralentir l'absorption du médicament suite à l'injection par voie sous-cutanée ou par voie intramusculaire. Ce ralentissement peut être réalisé en utilisant une suspension liquide d'une matière cristalline
20 possédant une faible solubilité dans l'eau ou en dissolvant ou encore en mettant le médicament en suspension dans un véhicule huileux. Dans le cas d'une injection par voie sous-cutanée ou par voie intramusculaire d'une suspension contenant une forme du médicament possédant une faible solubilité dans l'eau, la vitesse d'absorption du médicament dépend
25 de sa vitesse de dissolution.

On prépare des formulations injectables de F-III "à effet retard" en formant des matrices microencapsulées du médicament dans des polymères biodégradables tels que l'acide polylactique, l'acide polyglycolique, des copolymères d'acide lactique et d'acide glycolique, des
30 polyorthoesters et des polyanhydrides, ces matières étant décrites dans la

technique. En fonction du rapport du médicament au polymère et des caractéristiques du polymère particulier utilisé, on peut régler la vitesse de libération du médicament.

5 On stérilise des formulations injectables par exemple par filtration à travers des filtres retenant les bactéries ou par stérilisation préalable des composants du mélange avant de les mélanger soit au moment de leur fabrication, soit juste avant leur administration (comme c'est le cas par exemple dans un conditionnement de seringue à deux chambres).

10 Des formes posologiques solides pour une administration par voie orale englobent des capsules, des comprimés, des pilules, des poudres et des granulés. Dans des formes posologiques solides de ce type, on mélange F-III avec au moins un support pharmaceutique inerte tel que le citrate de sodium ou le phosphate dicalcique et/ou (a) des matières de charge ou des matières d'allongement telles que des amidons, des sucres
15 y compris le lactose et le glucose, le mannitol et l'acide silicique, (b) des liants tels que la carboxyméthyl-cellulose et d'autres dérivés de la cellulose, des alginates, la gélatine, la polyvinylpyrrolidone, le sucrose et la gomme d'acacia, (c) des agents humidifiants tels que le glycérol, (d) des agents de désagrégation tels que l'agar-agar, le carbonate de calcium, le bicarbonate de sodium, l'amidon de pomme de terre ou de
20 tapioca, l'acide alginique, des silicates et le carbonate de sodium, (e) des agents d'hydratation tels que le glycérol, (f) des agents retardant la mise en solution tels que la paraffine, (g) des agents accélérant l'absorption tels que des composés d'ammonium quaternaires, (h) des agents mouillants
25 tels que l'alcool cétylique et le monostéarate de glycérol, (i) des agents d'absorption tels que le kaolin et l'argile de bentonite et (j) des lubrifiants tels que le talc, le stéarate de calcium, le stéarate de magnésium, des polyéthylèneglycols solides, le laurylsulfate de sodium et leurs mélanges. Dans le cas de capsules, de comprimés et de pilules, la forme
30 posologique peut également contenir des agents faisant tampon.

Des compositions solides de type similaire peuvent également comprendre le remplissage de capsules en gélatine molle ou dure en utilisant des excipients tels que le lactose, ainsi que des polyéthylèneglycols à poids moléculaires élevés et analogues.

5 Des formes posologiques solides telles que des comprimés, des dragées, des capsules, des pilules et des granulés peuvent également être préparées à l'aide d'enrobages ou d'enveloppes tels que des enrobages gastrorésistants et entérosolubles ou d'autres enrobages bien connus dans la technique de formulation des produits pharmaceutiques.
10 les enrobages peuvent contenir des agents opacifiants ou des agents qui libèrent l'ingrédient ou les ingrédients actifs dans une partie particulière du tube digestif, comme par exemple des enrobages solubles dans des acides pour libérer l'ingrédient ou les ingrédients actifs dans l'estomac ou des enrobages solubles dans des bases pour libérer l'ingrédient ou les
15 ingrédients actifs dans l'intestin.

L'ingrédient ou les ingrédients actifs peuvent également être microencapsulés dans un enrobage à libération prolongée, les microcapsules faisant partie d'une formulation de pilule ou de capsule.

Des formes posologiques liquides pour une administration de F-III
20 par voie orale englobent des solutions, des émulsions, des suspensions, des sirops et des élixirs. En plus des composants actifs, les formulations liquides peuvent englober des diluants inertes couramment utilisés dans la technique tels que l'eau ou d'autres solvants pharmaceutiques, des agents de solubilisation et des émulsifiants tels que l'éthanol,
25 l'isopropanol, le carbonate d'éthyle, l'acétate d'éthyle, l'alcool benzylique, le benzoate de benzyle, le propylèneglycol, le 1,3-butylèneglycol, le diméthylformamide, des huiles (en particulier, l'huile de semences de coton, l'huile de noix broyée, l'huile de maïs, l'huile de germes, l'huile d'olive, l'huile de castor et l'huile de sésame), le glycérol, l'alcool
30 tétrahydrofurfurylique, des polyéthylèneglycols, des esters d'acides gras

de sorbitol et leurs mélanges. Outre des diluants inertes, les formulations liquides à administrer par voie orale peuvent également englober des adjuvants tels que des agents mouillants, des émulsifiants et des agents de mise en suspension, ainsi que des édulcorants, des aromatisants et des parfumants.

Des suspensions liquides peuvent contenir, en plus de l'ingrédient ou des ingrédients actifs, des agents de mise en suspension tels que l'alcool isostéarylique éthoxylé, le polyoxyéthylènesorbitol et des esters de sorbitanne, la cellulose microcristalline, le métahydroxyde d'aluminium, l'argile de bentonite, l'agar-agar et la gomme adragante, ainsi que leurs mélanges.

On prépare des compositions destinées à une administration par voie rectale ou par voie intravaginale, en mélangeant F-III avec des excipients appropriés non irritants tels que le beurre de cacao, le polyéthylèneglycol ou n'importe quelle cire pour suppositoire, qui est solide à la température ambiante, mais liquide à la température du corps et qui, par conséquent, fond dans la cavité rectale ou vaginale pour libérer le ou les composants actifs. Les composés sont dissous dans la cire fondue, sont façonnés pour obtenir la forme désirée et sont durcis pour obtenir la formulation de suppositoire prête à l'emploi.

F-III peut également être administré sous la forme de liposomes. Comme il est connu dans la technique, les liposomes dérivent en général de phospholipides ou d'autres substances lipidiques. On prépare des formulations de liposomes via des cristaux liquides hydratés monolamellaires ou multilamellaires que l'on disperse dans un milieu aqueux. On peut utiliser n'importe quel lipide non toxique, pharmaceutique et métabolisable capable de former des liposomes. Les compositions de la présente invention sous forme de liposomes peuvent contenir en plus de F-III des stabilisateurs, des excipients, des conservants et analogues.

Les lipides préférés sont des phospholipides et les phosphatidylcholines (lécithines), à la fois naturels et synthétiques.

Des procédés pour former des liposomes sont connus dans la technique, comme décrit par exemple dans Prescott, Ed., Methods in Cell Biology, volume XIV, Academic Press, New York, N. Y. (1976), pages 33 et suivantes.

Les exemples de formulations ci-après sont uniquement donnés à titre d'illustration et ne sont pas destinés à limiter le cadre de la présente invention.

10 Formulation 1: capsules de gélatine

On prépare des capsules de gélatine dure en utilisant les ingrédients ci-après:

Ingrédient	Quantité (mg/capsule)
F-III	0,1 - 1000
Amidon, NF	0 - 650
Poudre d'amidon apte à l'écoulement	0 - 650
Fluide de silicone 350 centistokes	0 - 15

15 La formulation ci-dessus peut être modifiée en respectant des variations raisonnables envisagées.

On prépare une formulation de comprimés en utilisant les ingrédients ci-dessous.

Formulation 2: comprimés

Ingrédient	Quantité (mg/comprimé)
F-III	2,5 - 1000
Cellulose microcristalline	200 - 650
Dioxyde de silicium fumé	10 - 650
Acide stéarique	5 - 15

On mélange intimement les composants et on les comprime pour obtenir des comprimés.

Formulation 3: on peut préparer comme suit des comprimés contenant approximativement 10 et 50 mg, respectivement de F-III:

5

Ingrédient	Quantité (mg/comprimé)	Quantité (mg/comprimé)
F-III	11,3	56,5
Lactose anhydre	176,8	128,2
Spray de lactose séché spécial	44,2	32,0
Povidone	11,0	13,0
Polysorbate 80	2,5	2,6
Crosspovidone (intérieur)	6,25	6,24
Crosspovidone (extérieur)	6,25	6,5
Stéarate de magnésium	1,5	1,7
Cellulose microcristalline (extérieur)	0,0	13,0

On mélange intimement les composants et on les comprime pour obtenir des comprimés.

En variante, on prépare comme suit des comprimés contenant chacun de 2,5 à 1000 mg de F-III:

10

Formulation 4: comprimés

Ingrédient	Quantité (mg/comprimé)
F-III	25 - 1000
Amidon	45
Cellulose microcristalline	35
Polyvinylpyrrolidone (sous forme d'une solution à 10% dans de l'eau)	4
Carboxyméthylcellulose de sodium	4,5
Stéarate de magnésium	0,5
Talc	1

On fait passer F-III, l'amidon et la cellulose à travers un tamis de 45 mesh U.S. et on mélange intimement. On mélange la solution de polyvinylpyrrolidone avec les poudres résultantes que l'on fait alors passer à travers un tamis de 14 mesh U.S. On sèche à 50°-60°C les granulés ainsi obtenus et on les fait passer à travers un tamis de 18 mesh U.S. On ajoute alors aux granulés le carboxyméthylamidon de sodium, le stéarate de magnésium et le talc, que l'on a fait préalablement passer à travers un tamis de 60 mesh U.S.; ensuite, on comprime les granulés, après les avoir mélangés, pour obtenir des comprimés sur une machine destinée à cet effet.

On prépare comme suit des suspensions contenant chacune de 0,1 à 1000 mg de médicament par dose de 5 mL:

Formulation 5: suspensions

Ingrédient	Quantité (mg/5 mL)
F-III	0,1 - 1000 mg
Carboxyméthylcellulose de sodium	50 mg
Sirop	1,25 mg
Solution d'acide benzoïque	0,10 mL
Aromatisant	à voir
Colorant	à voir
Eau purifiée pour compléter à	5 mL

15

On fait passer le médicament à travers un tamis de 45 mesh U.S. et on le mélange avec la carboxyméthylcellulose de sodium et le sirop pour obtenir une pâte uniforme. On dilue la solution d'acide benzoïque, l'aromatisant et le colorant avec une petite quantité de l'eau et on ajoute tout en agitant. On ajoute alors la quantité suffisante d'eau pour obtenir le volume requis.

20

On prépare une solution d'aérosol contenant les ingrédients ci-après:

Formulation 6: aérosol

Ingrédient	Quantité (% en poids)
F-III	0,25
Ethanol	25,75
Pulseur 22 (chlorodifluorométhane)	70,00

5 On mélange F-III avec l'éthanol et on ajoute le mélange à une portion du pulseur 22, on refroidit à 30°C et on le transfère dans un dispositif de remplissage. On achemine alors la quantité requise à un récipient en acier inoxydable et on dilue avec le reste du pulseur. On adapte alors les unités de soupape au récipient.

10 On prépare des suppositoires comme suit:

Formulation 7: suppositoires

Ingrédient	Quantité (mg/suppositoire)
F-III	250
Glycérides d'acides gras saturés	2000

15 On fait passer F-III à travers un tamis 60 mesh U.S. et on le met en suspension dans les glycérides d'acides gras saturés que l'on a préalablement fait fondre en utilisant la chaleur minimale nécessaire. On verse le mélange dans un moule pour suppositoires d'une capacité nominale de 2 g et on laisse refroidir.

20 On prépare une formulation à administrer par voie intraveineuse comme suit:

Formulation 8: solution pour administration par voie intraveineuse

Ingrédient	Quantité
F-III	50 mg
Solution saline isotonique	1.000 mL

5 On administre la solution des ingrédients ci-dessus par voie intraveineuse à une patiente à un débit d'environ 1 mL/min.

Formulation 9: capsule de combinaison I

Ingrédient	Quantité (mg/capsule)
F-III	50
Prémarin	1
Avicel pH 101	50
Amidon 1500	117,50
Huile de silicone	2
Tween 80	0,50
Cab-O-Sil	0,25

Formulation 10: capsule de combinaison II

10

Ingrédient	Quantité (mg/capsule)
F-III	50
Noréthylnodrel	5
Avicel pH 101	82,50
Amidon 1500	90
Huile de silicone	2
Tween 80	0,50

Formulation 11: comprimé de combinaison

Ingrédient	Quantité (mg/capsule)
F-III	50
Prémairin	1
Amidon de maïs NF	50
Povidone, K29-32	6
Avicel pH 101	41,50
Avicel pH 102	136,50
Crospovidone XL10	2,50
Stéarate de magnésium	0,50
Cab-O-Sil	0,50

Posologie

5 La dose spécifique de F-III administrée conformément à la présente invention, est déterminée par les circonstances particulières entourant chaque situation. Ces circonstances englobent la voie d'administration, l'histoire médicale antérieure du receveur, l'affection pathologique ou le symptôme en cours de traitement, la gravité de l'affection/du symptôme

10 en cours de traitement, ainsi que l'âge et le sexe du receveur.

En général, une dose minimale efficace quotidienne de F-III s'élève à environ 1, 5, 10, 15 ou 20 mg. De manière spécifique, une dose efficace maximale s'élève à environ 800, 100, 60, 50 ou 40 mg. De manière de loin spécifique, la dose se situe dans le domaine entre 15 mg et 60 mg. La

15 dose exacte peut être déterminée conformément à la pratique courante dans la technique médicale consistant à soumettre le receveur à une "augmentation de la dose"; on veut dire par là que l'on administre dans un premier temps une faible dose du composé et que l'on augmente

progressivement la dose jusqu'à ce que l'on observe l'effet thérapeutique désiré.

Bien qu'il puisse s'avérer nécessaire de soumettre le receveur à une "augmentation de la dose" par rapport aux thérapies de combinaison évoquées ci-dessus, des doses spécifiques d'ingrédients actifs autres que F-III sont les suivantes : éthynyl-œstrogène (0,01 - 0,03 mg/jour),
5 mestranol (0,05 - 0,15 mg/jour), hormones œstrogènes combinées (par exemple Premarin®, Wyeth-Ayerst; 0,3 - 2,5 mg/jour),
médroxyprogestérone (2,5 - 10 mg/jour), noréthynodrel (1,0 - 10,0
10 mg/jour), nonethindrone (0,5 - 2,0 mg/jour), aminoglutemide (250 - 1250 mg/jour, de préférence 250 mg quatre fois par jour), anastrozole (1 - 5 mg/jour, de préférence 1 mg une fois par jour), letrozole (2,5 - 10 mg/jour, de préférence 2,5 mg une fois par jour), formestane (250 - 1250 mg/semaine, de préférence 250 mg deux fois par semaine), exemestane
15 (25 - 100 mg/jour, de préférence 25 mg une fois par jour), goserlin (3 - 15 mg/trois mois, de préférence 3,6 - 7,2 mg une fois tous les trois mois) et leuprolide (3 - 15 mg/mois, de préférence 3,75 - 7,5 mg une fois par mois).

Voies d'administration

On peut administrer F-III via une variété de voies y compris la voie
20 orale, la voie rectale, la voie transdermique, la voie sous-cutanée, la voie intraveineuse, la voie intramusculaire et la voie intranasale. Le procédé d'administration de chaque agent à base d'œstrogènes et de progestatifs est conforme à ce qui est connu dans la technique. F-III, seul ou en combinaison avec un œstrogène, avec un progestatif ou avec un
25 inhibiteur de la AChE sera généralement administré dans une formulation adéquate.

Les compositions pharmaceutiques de la présente invention peuvent être administrées à des êtres humains et à d'autres mammifères (par exemple des chiens, des chats, des chevaux, des porcs et
30 analogues) par voie orale, par voie rectale, par voie intravaginale, par voie

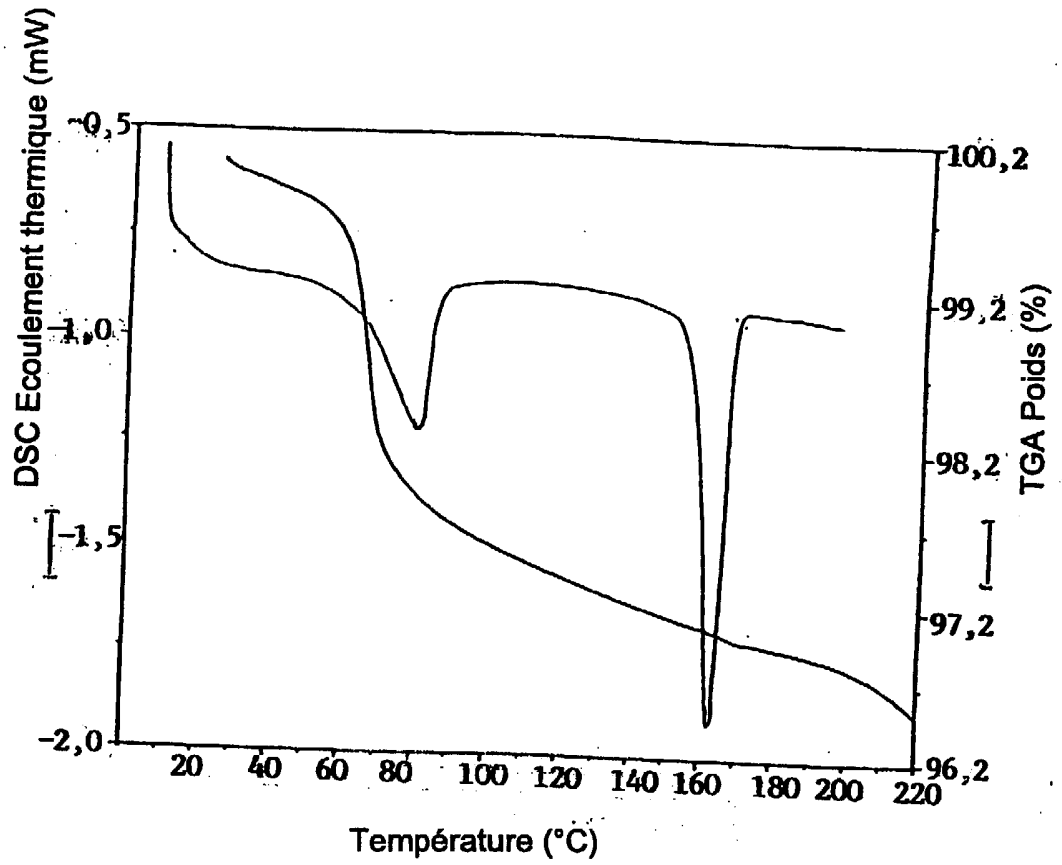
parentérale, par voie locale, par voie buccale ou par voie sublinguale, ou encore par voie nasale. l'expression "administration par voie parentérale" se réfère ici à des modes d'administration qui englobent des injections ou des perfusions par la voie intraveineuse, la voie intramusculaire, la voie intrapéritonéale, la voie intrasternale, la voie sous-cutanée ou la voie intraarticulaire.

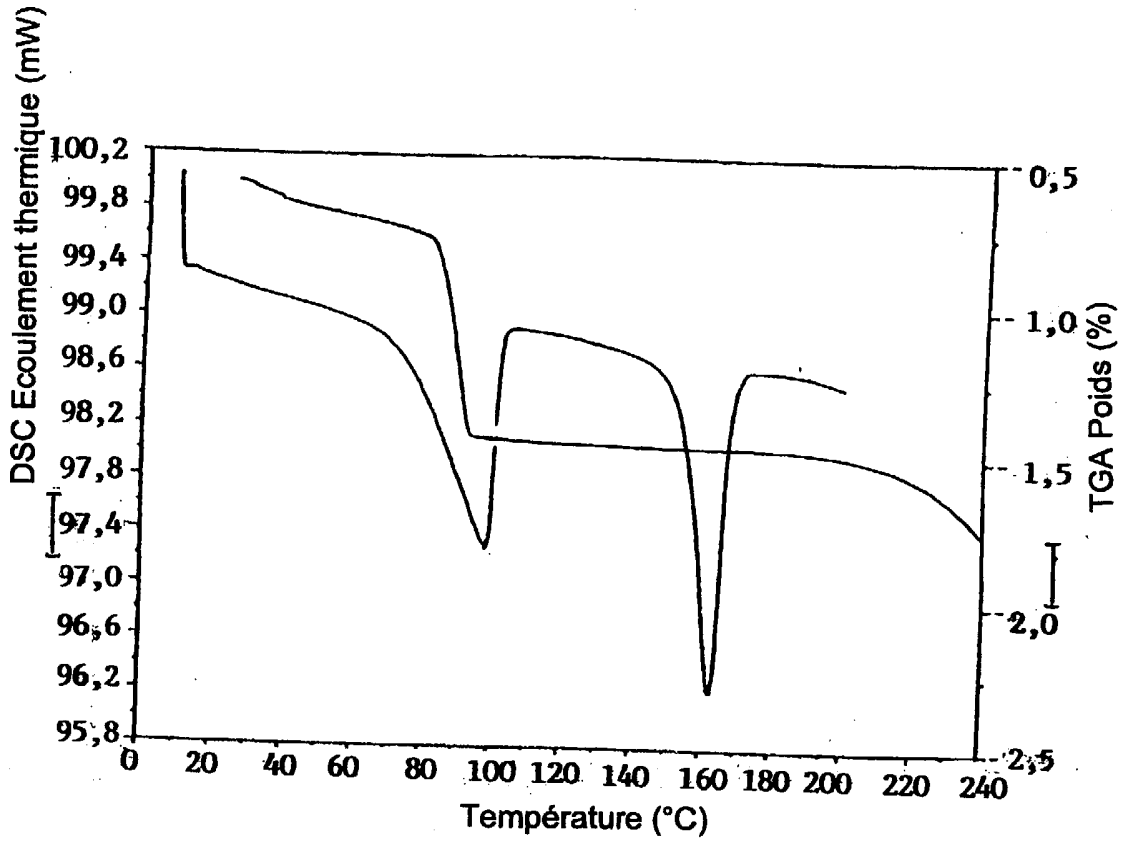
Mode/durée de l'administration

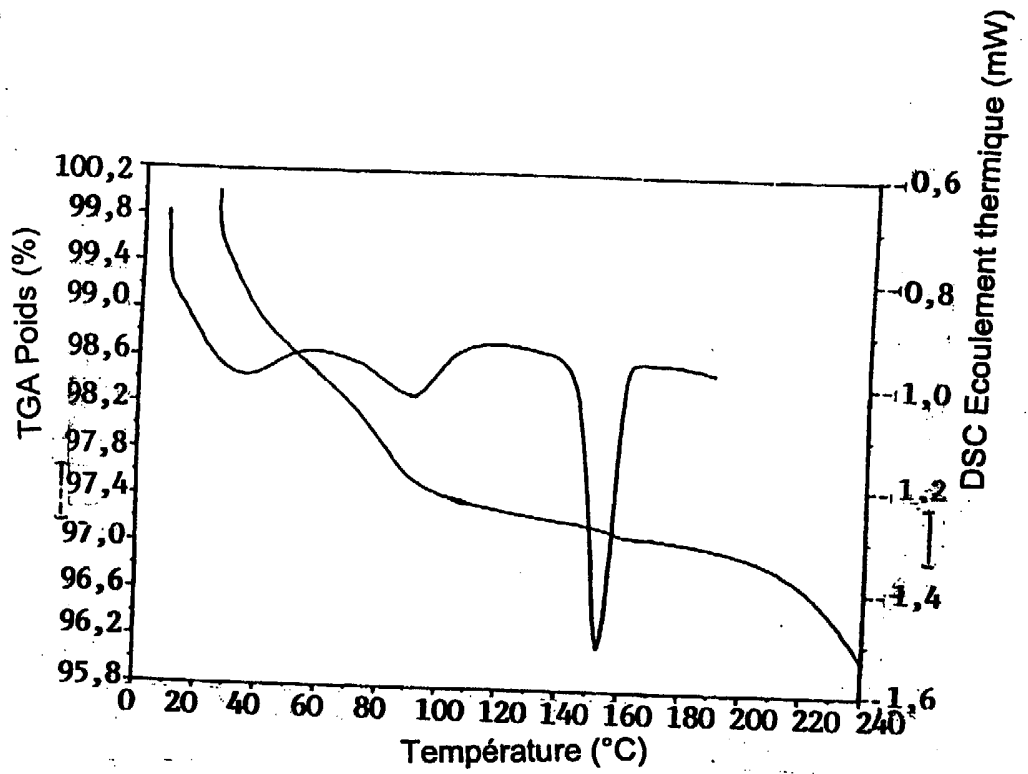
Pour la majeure partie des procédés de la présente invention, on administre F-III en continu, de 1 à 3 fois par jour ou bien aussi souvent que nécessaire pour distribuer une quantité efficace de F-III au receveur. Une thérapie cyclique peut s'avérer particulièrement utile dans le cas d'un traitement de l'endométriose ou bien on peut y recourir lors d'attaques de la maladie provoquant des douleurs aiguës. Dans le cas de la resténose, la thérapie peut être limitée à de courts intervalles (de 1 à 6 mois) suite à des interventions médicales telles que l'angioplastie.

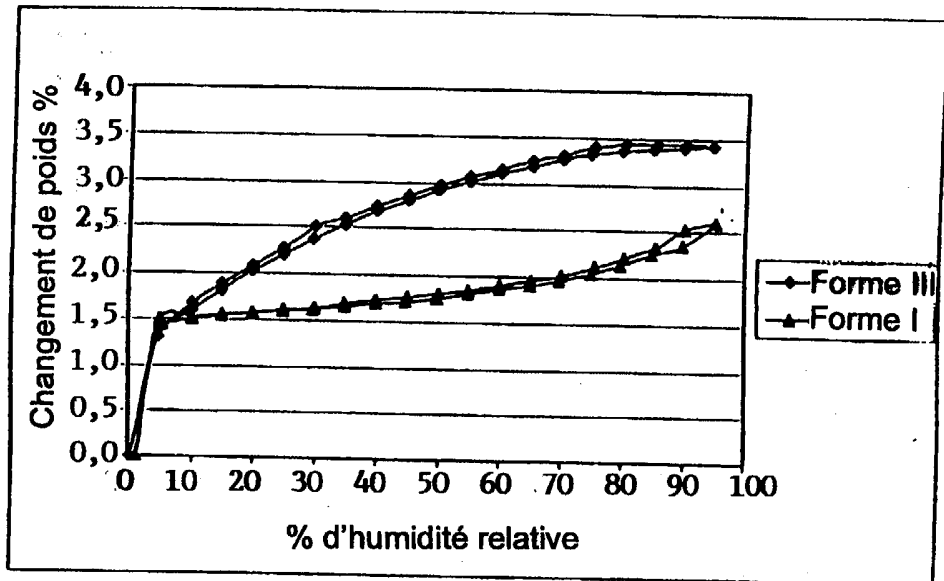
REVENDICATIONS

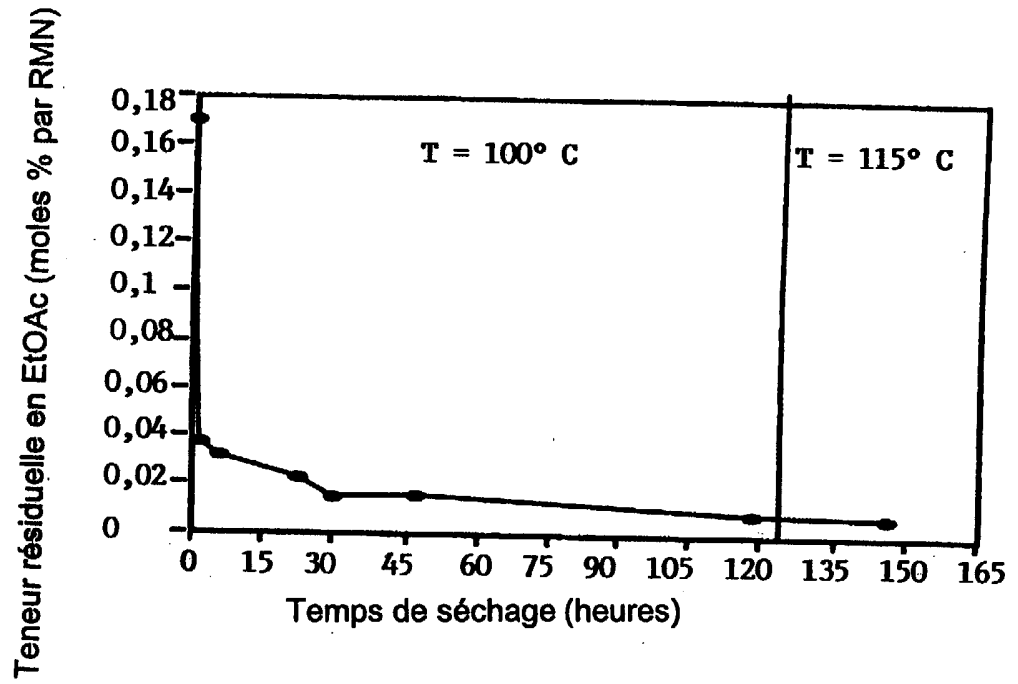
1. Procédé pour préparer une forme cristalline hydratée du chlorhydrate de 6-hydroxy-3-(4-[2-(pipéridin-1-yl)éthoxy]phénoxy)-2-(4-méthoxyphényl)benzo[b]thiophène (F-III) possédant un diagramme de diffraction des rayons X qui comprend les pics ci-après: $4,6 \pm 0,2$, $7,8 \pm 0,2$, $9,3 \pm 0,2$, $14,0 \pm 0,2$, $17,6 \pm 0,2$, $20,8 \pm 0,2$ et $24,3 \pm 0,2^\circ$ dans 2θ , lorsqu'on l'obtient à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ et sous une humidité relative de $35 \pm 10\%$ à partir d'une source de raies au cuivre, qui comprend la cristallisation du chlorhydrate de 6-hydroxy-3-(4-[2-(pipéridin-1-yl)éthoxy]phénoxy)-2-(4-méthoxyphényl)benzo[b]thiophène à partir d'un mélange d'isopropanol et d'eau.
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le rapport de l'eau à l'isopropanol (volume:volume) se situe entre 1 et 9 à 1.
3. Procédé selon la revendication 2, dans lequel le rapport se situe entre 2,5 et 5,6 à 1.
4. Procédé selon la revendication 3, dans lequel le rapport se situe entre 3 et 5,6 à 1.













Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

BO 7938
BE 20000477

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.CI.7)
A	WO 98 45287 A (ELI LILLY AND COMPANY, USA) 15 octobre 1998 (1998-10-15) * page 56; exemple 15 * * abrégé; revendications * ----	1	C07D333/64 A61K31/4535 A61P5/32
A	RABASEDA, X. ET AL: "Arzoxifene hydrochloride" DRUGS FUTURE (1999), 24(6), 599-604 , XP002159973 * le document en entier * ----	1	
A	EP 0 729 956 A (ELI LILLY AND COMPANY, USA) 4 septembre 1996 (1996-09-04) * page 56; exemple 41 * * page 2 - page 3; revendications * -----	1	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CI.7)
			C07D A61K A61P
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
15 février 2001		Paisdor, B	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arriere-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

2

EPO FORM 1503 03.82 (P04C48)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BO 7938
BE 20000477

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

15-02-2001

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9845287 A	15-10-1998	AU 7104998 A	30-10-1998
		CN 1260792 T	19-07-2000
		EP 0986556 A	22-03-2000
		NO 994901 A	09-12-1999
		PL 336701 A	03-07-2000
EP 0729956 A	04-09-1996	US 5510357 A	23-04-1996
		US 5998441 A	07-12-1999
		US 5977093 A	02-11-1999
		US 5856339 A	05-01-1999
		US 5919800 A	06-07-1999
		AU 699753 B	17-12-1998
		AU 4579796 A	05-09-1996
		BR 9600829 A	30-12-1997
		CA 2170479 A	29-08-1996
		CN 1159448 A	17-09-1997
		CZ 9600588 A	11-09-1996
		FI 960909 A	29-08-1996
		HU 9600448 A	28-09-1998
		HU 9600476 A	28-06-1999
		JP 9183776 A	15-07-1997
		NO 960796 A	29-08-1996
		NZ 286079 A	19-12-1997
		PL 312955 A	02-09-1996
		SG 64896 A	25-05-1999
		TR 960839 A	21-10-1996
		US 5985898 A	16-11-1999
		US 6030986 A	29-02-2000
		US 5969142 A	19-10-1999
		US 5981765 A	09-11-1999
		US 5986109 A	16-11-1999
		US 5492922 A	20-02-1996
		US 5488058 A	30-01-1996
US 5510498 A	23-04-1996		
US 5510358 A	23-04-1996		
US 5723474 A	03-03-1998		
US 5856340 A	05-01-1999		