

(19)



(10) **LT 4790 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **4790**

(51) Int. Cl. ⁷: **C07D333/64**
C07D409/12
C07D413/12
A61K 31/445

(21) Paraiškos numeris: **2000 076**

(22) Paraiškos padavimo data: **2000 07 28**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2001 02 26**

(45) Patent paskelbimo data: **2001 05 25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: **146286, 1999 07 29, US**
147570, 1999 08 06, US
149773, 1999 08 19, US

(72) Išradėjas:

Julie Kay BUSH, US
Preston Charles CONRAD, US
Merlyn Gerard FLOM, US
Wayne Douglas LUKE, US

(73) Patent savininkas:

ELI LILLY AND COMPANY an Indiana Corporation, Lilly Corporate Center,
Indianapolis, IN 46285, US

(74) Patentinis patikėtinis:

Marius JAKULIS JASON, A.A.A. Baltic Service Company, Rūdninkų g. 18/2,
2001 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Nauja 6-hidroksi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)-etoksi]fenoksi)-2-(4-
metoksifenil)benzo[b]tiofeno hidrochlorido kristalinė forma

(57) Referatas:

Šis išradimas yra skirtas naujam kristaliniam 6-hidroksi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoksi]fenoksi)-2-(4-metoksifenil)benzo[b]tiofeno hidrochloridui ir jo panaudojimui, įskaitant inhibavimą ligų, susijusių su estrogeno stygiumi, įskaitant širdies ir kraujagyslių ligas, hiperlipidemiją ir osteoporozę; ir inhibavimą kitų patologinių būklių,

tokių kaip endometriozė, gimdos fibrozė, nuo estrogeno priklausomas vėžys (įskaitant krūties ir gimdos vėžį), prostatos vėžys, gėrybinė prostatos hiperplazija, CNS sutrikimai, įskaitant Alzheimerio ligą; krūties vėžio profilaktiką ir ChAT sureguliovimą.

5 **Išradimo prielaidos**

6-Hidroksi-3-(4--[2-(piperidin-1-il)-etoksi]fenoksi)-2-(4-metoksifenil)benzo-
[b]tiofeno hidrochloridas (arzoksifenas) pirmą kartą buvo aprašytas JAV patente
Nr. 5510357 ir tiksliai atskleistas JAV patente Nr. 5723474 ('474) ir Europos
10 patento paraiškoje Nr. 0729956. Arzoksifenas yra nesteroidinis mišrus estrogeno
antagonistas/agonistas, galintis, be kita ko, pažeminti serumo cholesterolio lygį ir
inhibuoti hiperlipidemiją, osteoporozę, nuo estrogeno priklausomą vėžį, įskaitant
krūties ir gimdos vėžį, endometriozę, CNS susirgimus, įskaitant Alzheimerio ligą,
aortos lygiųjų raumenų ląstelių proliferaciją ir restenozę.

15 Konkrečiai, arzoksifenas yra naudingas ir klinikiniu požiūriu įvertintas gydant
metastazinį krūties vėžį; kaip pagalbinę priemonę gydant pacientus po tam tikros
sisteminės arba vietinės terapijos; sumažinant invazinio ir neinvazinio krūties vėžio
paplitimą; sumažinant invazinio krūties vėžio ir latakų karcinomos *in situ*
paplitimą. Arzoksifenas taip pat naudingas kartu su radioterapija, aromatazės
20 inhibitoriais, LHRH analogais ir acetilcholino esterazės (AChE) inhibitoriais.

Arzoksifeno, išskirto pagal metodikas, aprašytas '474, miltelių Rentgeno
spinduliuotės difrakcija (XRD), termogravimetrija (TGA), protonų magnetinis
rezonansas (¹H BMR) ir Karl Fischer (KF) analizė vėliau parodė, kad minėta
medžiaga yra hidratuota, menkai kristalinė ir kristale turi įvairius kiekius organinių
25 lakių medžiagų (etilo acetato).

Kompozicijos sudaryme menkai kristalinės medžiagos paprastai mažiau
pageidautinos nei gerai kristalinės. Be to, paprastai nepageidautina įtraukti į
kompoziciją farmacinės medžiagas, turinčias žymų organinio tirpiklio (pavyzdžiui,
etilo acetato) kiekį dėl potencialaus tirpiklio toksiškumo kompozicijos vartotojui ir
30 farmacinės medžiagos veikimo pakitimų dėl tirpiklio buvimo.

Nors arzoksifenas, pagamintas pagal '474 aprašytas metodikas, galėtų būti vartojamas kaip vaistinė medžiaga, būtų labai pageidautina ir naudinga turėti daugiau arzoksifeno kristalinių formų, kurios neturėtų kristalo viduje organinio tirpiklio ir būtų atsikartojančiai ir efektyviai gaminamos komerciniu mastu.

5

Išradimo santrauka

Šis išradimas susijęs su nauja 6-hidroksi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)-etoksi]fenoksi)-2-(4-metoksifenil)benzo**[b]**tiofeno hidrochlorido (F-I)
 10 nestechiometriškai hidratuota kristaline forma, turinčia Rentgeno spinduliuotės difrakcijos spektre, gautame su vario radiacijos šaltiniu, tokius maksimumus: $7,9 \pm 0,2$, $10,7 \pm 0,2$, $14,9 \pm 0,2$, $15,9 \pm 0,2$, $18,3 \pm 0,2$ ir $20,6 \pm 0,2$, esant 2θ .

Šis išradimas dar susijęs su farmacine kompozicija, susidedančia iš F-I; vieno arba daugiau farmacinių nešiklių, skiediklių arba užpildų; pasirinktinai, estrogeno,
 15 pasirinktinai, progestino, pasirinktinai, aromatazės inhibitoriaus, pasirinktinai, LHRH analogo ir, pasirinktinai, acetilcholinesterazės (AChE) inhibitoriaus.

Be to, šis išradimas yra susijęs su F-I panaudojimo inhibuoti patologines būkles, tokias kaip gimdos fibrozė, endometrioze, aortos lygiųjų raumenų ląstelių proliferacija, restenozė, krūties vėžys, gimdos vėžys, prostatos vėžys, gėrybinė
 20 prostatos hiperplazija, kaulų išretėjimas, osteoporozė, širdies ir kraujagyslių susirgimas, hiperlipidemija, CNS sutrikimai ir Alzheimerio liga, būdais ir su F-I panaudojimu gaminti medikamentus tų pačių būklių inhibavimui.

Šis išradimas dar susijęs su F-I panaudojimo cholino acetiltransferazės (ChAT) sureguliuavimui būdais ir su panaudojimu gavimui medikamentų, skirtų
 25 šiam sureguliuavimui.

Trumpas brėžinių aprašymas

Fig.1 yra S-II diferencinės skenuojančios kalorimetrijos (DSC)/TGA vaizdas.

Fig.2 yra F-I (DSC)/TGA vaizdas.

Fig.3 yra F-III (DSC)/TGA vaizdas.

Fig.4 vaizduoja F-I ir F-III drėgmės sugėrimo izotermas.

Fig.5 vaizduoja S-II desolvatacijos priklausomybę nuo džiovinimo laiko ir
5 temperatūros.

Smulkus išradimo aprašymas

Arzoksifenas, pagamintas pagal '474 aprašytą metodiką (41 pavyzdys,
10 kristalinimas iš etanolio ir etilo acetato mišinio, filtravimas ir nufiltruotos
medžiagos džiovinimas vakuume kambario temperatūroje iki pastovios masės),
buvo charakterizuotas XRD duomenimis ir nustatyta, kad medžiaga yra menkai
kristalinė. ¹H BMR duomenys patvirtino, kad visoje medžiagoje yra 6 % etilo
acetato.

15 Kristalinimo metodika, aprašyta '474, toliau modifikuota tokiu būdu, kad
etanolis pridedamas į nevalyto arzoksifeno suspensiją verdančiame etilo acetate.
Atšaldžius ir nufiltravus vakuume, šioje modifikuotoje procedūroje gauta kietą
medžiaga yra gerai kristalinis arzoksifeno mišrus solvatas su etilo acetatu ir
vandeniu (toliau vadinamas S-II), kuris vėliau tapo pradine medžiaga F-I
20 gamyboje.

F-I gali būti pagamintas pašalinat etilo acetatą iš S-II kristalų džiovinant S-II
vakuume/atkaitinant paaukštintose temperatūrose. Laikas ir temperatūra,
reikalingi atkaitinti S-II, siekiant gauti F-I, skirsis įvairiuose mėginiuose, tačiau
tipiškai yra 5 dienų ir maždaug 100 °C eilės. Kad S-II virstų šioje procedūroje į F-I,
25 reikalingos aukštos temperatūros, kadangi S-II sumaišius su vandeniu kambario
temperatūroje arba palaikius 3 savaites 98 % santykinio drėgnumo aplinkoje,
negauta jokio virtimo į F-I. Be to, S-II džiovinimas konvekciniame krosnyje aukštos
temperatūrose taip pat nedesolvatoja medžiagos, kas leidžia manyti, jog etilo
acetato išstūmimui iš S-II kristalų reikalingas vakuumas.

Geriausia, F-I lengvai gaunamas ir išskiriamas kambario temperatūroje kristalinant arzoksifeną (arba bet kokį jo polimorfą/solvatą) iš tetrahidrofurano. Geriausia, kai šis kristalinimas vykdomas pradžioje ištirpinant arzoksifeną nedžiovintame tetrahidrofurane (1-10 tūrio % vandens, geriau 2,5-7,5 %, geriausia 4,5-5,5 %), po to pašalinant minėtą vandenį distiliuojant atmosferos slėgyje. Šio kristalinimo pavyzdys atskleistas toliau 2 pavyzdyje. Kai F-I gaminamas pagal šią pagerintą kristalinimo metodiką, galima tikėtis, jog visas susijusios medžiagos (TRS) kiekis bus <0,5 %.

Šiam kristalinimui tinkama pradinė arzoksifeno medžiaga apima, bet neapsiriboja, S-II, F-II, pagal '474 metodikas pagamintą arzoksifeną, arba bet kokį jų mišinį. Nesvarbu, nuo kokios arzoksifeno formos pradedama, kadangi kristalinimas iš tetrahidrofurano pagal čia aprašytą metodiką duoda F-I kristalus. Komercinės apimties F-I sintezei gali būti naudinga inicijuoti kristalinimąsi F-I.

Kitas arzoksifeno nestechiometrinis hidratas, F-III, lengvai gaunamas ir išskiriamas kambario temperatūroje kristalinat arzoksifeną (arba bet kokį jo polimorfą/solvatą) iš izopropilo alkoholio (IPA) ir vandens mišinio. Vandens santykis su IPA (t/t) paprastai yra maždaug 1:1 iki 9:1. Geriau, kai santykis yra tarp 2,5 ir 5,6:1. Geriausia, kai santykis yra tarp 3 ir 5,6:1. IPA santykis su vandeniu neturi lemiamos įtakos kristalinimuisi, tačiau jis įtakoja išeigą. Komercinės apimties F-III sintezei gali būti naudinga inicijuoti kristalinimąsi F-III. Šiam kristalinimui tinkama pradinė arzoksifeno medžiaga apima, bet neapsiriboja, S-II, F-I, pagal '474 metodikas pagamintą arzoksifeną, arba bet kokį jų mišinį.

S-II, F-I ir F-III charakterizavimas ir identifikavimas

25

S-II, F-I ir F-III charakterizuoti naudoti DSC/TGA ir XRD metodai. TGA dažnai gerai tinka skirtingų kietos medžiagos formų identifikavimui, kadangi temperatūra(os), kurioje vyksta medžiagos fizikiniai pokyčiai, paprastai yra polimorfinės formos arba solvato charakteristika. DSC yra metodas, dažnai

naudojamas atrinkti junginius pagal polimorfizmo ir solvato susidarymo požymį. Be to, XRD metodas leidžia kristalinėje medžiagoje nustatyti dideles tvarkingas struktūras.

Arzoksifenas, pagamintas pagal '474 aprašytas metodikas, duoda XRD spektrą su prastu signalo-triukšmo santykiu ir aukšta fono linija, kas rodo esant menkai kristalinę medžiagą. Todėl atlikti F-I ir F-III palyginimai su medžiaga (S-II), gauta pagal modifikuotą arzoksifeno kristalinimo metodiką (etanolio pridėjimas į virinamą arzoksifeno suspensiją etilo acetate).

Charakterizuojančios S-II, F-I ir F-III DSC/TGA kreivės parodytos, atitinkamai, Fig. 1, 2 ir 3. S-II DSC kreivėje matyti plati endoterma, prasidedanti ties maždaug 62 °C, atitinkanti etilo acetato ir vandens pašalinimą iš kristalo. Endoterma, prasidedanti ties maždaug 152 °C, atspindi lydymąsi. Maždaug 2,5 % masės sumažėjimas pagal TGA vyksta kartu su pirmu perėjimu, tuo tarpu likęs 0,5 % masės praradimas vyksta iki pat lydymosi pradžios, kas leidžia manyti, kad kai kurios tirpiklio molekulės yra tvirčiau surištos kristale.

F-I DSC kreivėje matyti plati endoterma, prasidedanti ties maždaug 75 °C, ir antra endoterma, prasidedanti ties maždaug 150 °C, kuri atspindi lydymąsi. F-I TGA kreivė rodo tolygų masės mažėjimą 0,3 % su po to sekančiu staigiu masės sumažėjimu 1,5 %, kai abu mažėjimai rodo kristalo dehidrataciją. Pirmo perėjimo DSC pradžia ir atitinkamas masės sumažėjimas TGA dėl skirtingų kaitinimo greičių yra menkai subalansuoti. Pradinis masės praradimas atspindi silpnai surištą hidratacinį vandenį, tuo tarpu antras masės praradimas susijęs su maždaug 0,5 molio vandens, esančio kristale prie labai mažo drėgnumo (mažiau 5 % - žiūr. drėgmės sugėrimo duomenis).

F-III DSC kreivėje matyti plati žematemperatūre endoterma ties maždaug 30 °C, po to antra plati ir santykinai silpna endoterma, prasidedanti ties maždaug 70 °C ir galutinis perėjimas, prasidedantis ties maždaug 146 °C, atitinkantis lydymąsi. Staigus 1,5 % (~ 0,5 molio) masės praradimas, TGA sutampantis su pirma endoterma, atitinka silpnai surištų vandens molekulių praradimą, tuo tarpu

papildomas ~1,6 % masės praradimas virš 60 °C atspindi stipriau surištų vandens molekulių praradimą, t.y., tų, kurios yra esant labai mažam santykiniam drėgnumui. Masės praradimas, stebimas virš 170 °C, atitinka F-III skilimą.

5 F-I ir F-III XRD spektre matyti ryškūs maksimumai ir žema bazinė linija, kas rodo gerai kristalinę medžiagą. Maksimumų kampo padėtys, esant 2θ ir atitinkami I/I₀ duomenys F-I, F-III ir S-II pavyzdžiams pateikti 1 lentelėje. Nors daugelis intensyvių atspindžių paprastai turi panašius difrakcijos kampus, kiekviena iš formų duoda skirtingą miltelių spektrą, kas leidžia aiškiai atskirti S-II, F-I ir F-III.

Kristalografijoje gerai žinoma, kad bet kurios polimorfinės formos difrakcijos
10 maksimumų santykiniai intensyvumai gali skirtis dėl vyraujančios orientacijos, atsirandančios dėl tokių faktorių kaip kristalo morfologija. Ten, kur pasireiškia vyraujančios orientacijos efektas, maksimumų intensyvumas yra padidintas, bet charakteringų polimorfinės formos maksimumų padėtis lieka nepakitusi. Žiūr., pavyzdžiui, The United States Pharmacopeia # 23, National Formulary # 18, p.
15 1843-1844, 1995. Tokiu būdu, maksimumų intensyvumo ir jų padėties pagrindu F-I gali būti identifikuotas maksimumų ties $7,9 \pm 0,2$; $10,7 \pm 0,2$; $14,9 \pm 0,2$; $15,9 \pm 0,2$; $18,3 \pm 0,2$ ir $20,6 \pm 0,2^\circ$, esant 2θ , pagalba, kai spektras gautas su vario radijacijos šaltiniu.

20

25

30

1 LENTELĖ

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

Tolimesnis F-I ir F-III charakterizavimas

Ištirtas F-I ir F-III higroskopiškumas. F-I ir F-III drėgmės sugėrimo izotermos pateiktos Fig. 4. Pradžioje palaikius pavyzdžius 5 % santykinio drėgnumo aplinkoje, F-I ir F-III masė iškart nepadidėjo, palaikius atitinkamai 1,5 % ir 1,7 % santykinio drėgnumo aplinkoje, ekvivalentiškoje atitinkamai 0,5 molio vandens. Abiejų formų atveju stebimas tolygus drėgmės sugėrimas per visą drėgnumo intervalą, kas matyt susiję su vandens molekulių įtraukimu į kristalą.

Skirtumas tarp dviejų formų drėgmės sugėrimo, matyti, atspindi kiekį vandens, kuris gali būti įtrauktas į kristalą (t.y., kristale esančios erdvės, kuri galėtų talpinti vandens molekules, kiekį). Histerezės nebuvimas F-I ir F-III sorbcijos-desorbcijos izotermose rodo, jog tarp kristalų formų greitai nusistovi pusiausvyra esant bet kokiam drėgnumui.

F-I ir F-III drėgmės sugėrimo profiliai rodo, kad šios formos yra iš esmės nestechiometriniai hidratai. Esant įprastam santykiniam drėgnumui (apie 50 %), F-I turi maždaug 1,7 % vandens, kas atitinka 0,5 molio vandens, tuo tarpu F-III yra sugėręs apie 3 % vandens, kas atitinka maždaug 0,85 molio vandens. Tarp F-I ir F-III bei atmosferos greitai nusistovi pusiausvyra, taigi vandens kiekis, stebimas analitiniais metodais, atspindi santykinį drėgnumą tyrimų momentu. Skirtumai tarp atskirų serijų DSC duomenų, matyti, kyla dėl to, kad atskiri pavyzdžiai dėl skirtingų laikymo sąlygų yra nevienodai hidratuoti.

Gauti F-I ir F-III, laikytų skirtingose santykinio drėgnumo sąlygose (0, 22, 50 ir 80 %) XRD spektrai. Stebimas palaipsnis F-III maksimumų ties maždaug 13,8, 17,6, 18,0, 20,5 ir 24,0°, esant 2θ, pasislinkimas lyginant su pradiniais (0 % santykinio drėgnumo), taip pat didėjant santykiniam drėgnumui šiek tiek slenkasi mažiau intensyvūs maksimumai. Šie F-III XRD spektre stebimi pokyčiai rodo, jog didėjant santykiniam drėgnumui elementarios gardelės matmenys keičiasi, matyt, kad įjungtų silpnai surištas vandens molekules. Nuoseklus maksimumų pasislinkimas keičiantis drėgnumui gerai koreliuoja su sorbcijos duomenimis, kurie rodo laipsnišką masės didėjimą šiame santykinio drėgnumo intervale.

Panašus eksperimentas atliktas su F-I, siekiant nustatyti, ar santykinio drėgnumo kitimai darys panašią įtaką jo kristalui (0, 25, 52, 73 ir 95 % santykinio drėgnumo). Didėjant santykiniam drėgnumui, stebimas labai mažas maksimumų esant 0 % santykinio drėgnumo ties maždaug 7,7; 18,3; 18,5; 20,5; 20,8°, esant 20
5 pasislinkimas. Maksimumai ties maždaug 7,7; 20,8 ir 24,1 esant didesniems drėgnumams taip pat tampa šiek tiek platesni ir silpniau išreikšti, kas rodo, jog vandenį sugeria amorfiniai komponentai (arba plastifikuoja kietą medžiagą), ypač esant 73 ir 95 % santykiniam drėgnumui. Maksimumų pasislinkimas F-I XRD spektre mažiau ryškus nei stebimas F-III atveju skirtinguose santykiniuose
10 drėgnumuose. Tai leidžia manyti, kad F-I atveju nevyksta tokie kristalo išsiplėtimai ir/arba susitraukimai kaip F-III atveju.

Nustatyta, kad F-I ir F-III yra stabilūs visame santykinio drėgnumo intervale, nepaisant F-III sugebėjimo sugerti dukart tiek vandens. Nustatyta, kad abi formos turi palyginamus kristalų dydžius, morfologiją, tirpumą ir tirpimo greitį.

15 Atlikti džiovavimo eksperimentai, siekiant nustatyti S-II desolvacijos priklausomybę nuo džiovavimo laiko ir temperatūros (žiūr. Fig.5). Desolvacijos eksperimento įvairiais momentais užrašyti XRD spektrai. S-II desolvacijos tyrimuose daugelis difrakcijos maksimumų yra prie tų pačių kampų, kaip ir F-I, kas patvirtina, jog S-II ir F-I kristalai yra labai panašūs. Tai, kad po minimalaus
20 džiovavimo išnyksta difrakcijos maksimumai ties maždaug 6,8; 7,2 ir 14,0°, esant 20, leidžia manyti, kad šie atspindžiai susiję su kristalografinėmis plokštumomis, turinčiomis dalį etilo acetato molekulių elektroninio tankio.

Solvatuotos medžiagos atkaitinimas vakuume aukštoje temperatūroje davė F-I. Šiuo būdu gautas F-I pagal XRD duomenis pasižymi dideliu kristališkumu.
25 Todėl medžiaga, gauta kristalinant iš etanolio ir etilo acetato ir po to džiovinta vakuume tik keletą valandų, kaip aprašyta '474, pasižymi labai menku kristališkumu, kadangi pagal šią procedūrą gaunamas dalinai desolvatuotas S-II.

Palyginus su aukščiau aprašyta iš technikos lygio žinoma arzoksifeno forma, F-I ir F-III turi keletą privalumų. Lyginant su pagal '474 metodikas gautu

arzoksifenu, F-I ir F-III yra stabilesni aplinkos temperatūroje, todėl labiau pasiduodantis farmaciniam patobulinimams, t.y., dozuotų kompozicijų patobulinimams. Be to, F-I ir F-III yra labiau kristališki negu '474 aprašyta forma. Kristalinės medžiagos paprastai yra mažiau higroskopiškos ir stabilesnės
5 (pavyzdžiui, mažiau linkusios chemiškai skilti, išlaiko pastovų veikimą) negu amorfinės medžiagos ir todėl geriau tinka kompozicijų sudarymui. Be to, priešingai negu pagal '474 metodikas pagamintas arzoksifenas, kuris savo kristaluose turi etilo acetato ir vandens, F-I ir F-III turi tik vandens.

10 Charakterizavimo metodai

DSC matavimai atlikti TA Instruments 2920 Modulated DSC, sujungtu su Thermal Analyst 3100 ir turinčiu aušinimo sistemą. Mėginiai (3-5 mg) buvo kaitinami gofruotuose aliuminio tigluose nuo 10 iki 240 °C, kaitinimo greičiui
15 esant 2 °C/min.

TGA analizė atlikta TA Instruments 2050 termogravimetriniu analizatorium, sujungtu su Thermal Analyst 3100. Mėginiai (5-10 mg) kaitinti atviruose tigluose nuo 25 °C iki 250 °C, kaitinimo greičiui esant 5 °C/min.

XRD spektrai gauti Siemens D5000 miltelių Rentgeno spinduliotės difraktometru, turinčiu $\text{CuK}\alpha$ šaltinį ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) ir Kevex kieto būvio detektoriumi, dirbančiu prie 50 kV ir 40 mA. Kiekvienas pavyzdys skanuojamas tarp 4° ir 35° su 2θ. Prieš registruojant duomenis, pavyzdžiui leidžiama pasiekti pusiausvyrą mažiausiai per 30 minučių norimoje temperatūroje ir/arba santykiname drėgnume.

25 F-I ir F-III higroskopiškumo matavimai atlikti naudojant VTI metodą kaip aprašyta toliau. Kiekvienas mėginys džiovinamas vakuume 60 °C temperatūroje, kol masė nustoja mažėti ir tuo metu tyrimo kameroje padaromas 0 % santykinis drėgnumas. Drėgmės sugėrimo izotermos gautos 25 °C temperatūroje, naudojant VTI vakuumines drėgmės svarstyklės, esant tokioms sąlygoms: pavyzdžio dydis 10-

15 mg, adsorbcijos/desorbcijos intervalas 0-95 %, santykinis drėgnumas, žingsnio intervalas 5 %, mėginio intervalas 10 minučių.

Toliau pateikti pavyzdžiai iliustruoja hidratų gavimo būdą pagal šį išradimą. Pavyzdžiai jokių požiūriu neriboja šių būdų apimties.

5

Gavimas

1 sintezė

S-II

10

Nevalytas arzoksifenas (1,58 g medžiagos, gautos pagal JAV patente Nr. 5723474, kurio metodikos čia pateikiamos kaip nuorodos, 41 pavyzdyje aprašytą metodiką) suspenduojamas 28 ml etilo acetato ir virinama su grįžtamu šaldytuvu. Ištirpimo palengvinimui pridedama 18 ml etanolio. Leidžiama virti su grįžtamu šaldytuvu 20 minučių, po to paliekama atvėsti kambario temperatūroje. Iškritusios nuosėdos atskiriamos filtruojant vakuume, praplaunamos 30 ml etilo acetato ir gauna 1,05 g baltos miltelių pavidalo kietos medžiagos.

15

Pavyzdžiai

20

1 pavyzdys

F-I gavimas iš S-II

S-II džiovinamas vakuuminėje krosnyje ($-0,863 \text{ kg/cm}^2 = -25 \text{ coliai Hg}$) 100°C temperatūroje 118 val., ir gauna F-I.

25

2 pavyzdys

Geresnė F-I gavimo iš arzoksifeno metodika

Į trigurklę apvaliadugnę 1 l kolbą su grįžtamu šaldytuvu ir maišymu iš viršaus sudedama 25,0 g arzoksifeno, 475 ml tetrahidrofurano ir 25 ml vandens. Tada prijungiamas distiliavimo perėjimas, reakcijos mišinys užvirinamas ir nudistiliuojama 250 ml. Kaitinimas staigiai nutraukiamas ir į kolbą pridedama 250 ml šviežio bevandenio tetrahidrofurano. Tęsiamas distiliavimas atmosferos slėgyje ir nudistiliuojama dar 250 ml. Vėl kaitinimas staigiai nutraukiamas ir į kolbą pridedama 250 ml šviežio bevandenio tetrahidrofurano. Tęsiamas distiliavimas atmosferos slėgyje ir nudistiliuojama dar 250 ml. Papildomai pridedama 250 ml tetrahidrofurano ir reakcijos mišinys virinamas su grįžtamu šaldytuvu. Po šio tetrahidrofurano pridėjimo susidaro baltos nuosėdos. Maišomas reakcijos mišinys paliekamas lėtai atvėsti per 3 val., per tą laiką iškrenta daugiau nuosėdų ir tiršta suspensija atvėsta iki kambario temperatūros. Kristalinės nuosėdos nufiltruojamos ir išdžiovinamos vakuumė 50 °C per 48 val. po silpna azoto srove. Išeiga 22,50 g (90,0 %). XRD spektrų analizė parodė, kad drėgnos masės ir išdžiovintos kietos medžiagos spektrai iš esmės yra identiški, ir iš esmės sutampa su anksčiau gauto F-I spektrais. DSC analizė duoda lydymosi temperatūrą 157 °C, tuo tarpu TGA analizė rodo 1,5 % masės praradimą kaitinant nuo kambario temperatūros iki 100 °C. Pagal HPLC duomenis medžiagos grynumas, perskaičiavus į gryną bazę, yra 88,1 %, teoriškai turėtų būti 92,9 %. HPLC duomenys parodė, kad bendras surištų medžiagų kiekis yra 0,44 %.

3 pavyzdys

F-I gavimas iš [6-benziloksi-3-[4-[2-(piperidin-1-il)etoksi]fenoksi]-2-(4-metoksifenil)]benzo[b]tiofeno S-oksido

25

Sumaišoma 261 ml tetrahidrofurano, 45 ml vandens, 6,14 g koncentruotos sulfato rūgšties ir [6-benziloksi-3-[4-[2-(piperidin-1-il)etoksi]fenoksi]-2-(4-metoksifenil)]benzo[b]tiofeno S-oksido (pagal HPLC duomenis grynumas 99 %,

bendras surištų medžiagų kiekis 0,35 %) ir maišoma, kol pasidaro homogeniškas mišinys. Pridedama 10 % Pd/C (5,6 g suspensija 22 ml vandens) ir praplaunama 5 ml vandens. Susidariusi suspensija vakuumuojama ir paleidžiama 60 psi (413,6 kPa) slėgio vandenilio srovė. Reakcijos temperatūra nustatoma 30 °C. Po 2 val
5 pridedama 10 % Pd/C (5,6 g) kartu su 30 ml vandens. Hidrinimas 60 psi (413,6 kPa) slėgyje ir 30 °C temperatūroje tęsiamas dar 22 val. Papildomai pridedama 4,40 g 10 % Pd/C 30 ml vandens ir hidrinimas 60 psi (413,6 kPa) slėgyje ir 30 °C temperatūroje tęsiamas dar 2,5 val. Katalizatorius atskiriamas filtruojant, filtrato pH nustatomas 7,24 50 % natrio hidroksido pagalba. Pridedama 8,66 g natrio
10 chlorido, ištirpinto 18 ml vandens ir dvifazis tirpalas maišomas 30 minučių. Fazės atskiriamos, vandeninė fazė ekstrahuojama 50 ml tetrahidrofurano. Organinės fazės sujungiamos ir sukonzentruojamos distiliuojant atmosferos slėgyje iki 50 ml tūrio. Į koncentratą per 1 val 24 °C temperatūroje pridedama 180 ml metanolio. Susidariusi kristalinė suspensija 30 min. maišoma 24 °C temperatūroje, atšaldoma
15 iki 0 °C ir maišoma 1 val. Kieta medžiaga atskiriama filtruojant ir nuosekliai praplaunama 39 ml vandens ir 39 ml metanolio, po to džiovinama vakuume per naktį 50 °C temperatūroje. Išeiga 15,52 g (67,8 %).

Aukščiau aprašyto produkto 10 g porcija perkristalinama iš tetrahidrofurano ir vandens, kaip aprašyta 2 pavyzdyje.

20

Parankiniai terminai

Čia vartojamas terminas “efektyvus kiekis” reiškia tokį F-I kiekį, kuris sugeba inhibuoti čia aprašytas būkles arba jų neigiamą poveikį. Kai F-I skiriamas kartu su
25 estrogenų, progestinų, aromatazės inhibitorium, LHRH analogu, AChE inhibitorium, terminas “efektyvus kiekis” taip pat reiškia tokio agento kiekį, kuris sukuria siekiamą efektą.

Terminai “inhibuojantis” ir “inhibuoti” apima jų paprastai priimtas reikšmes, t.y., užkertantis kelią, sutrukdamas, apribojantis, palengvinantis, pagerinantis

sulėtinantis, sustabdantis, sustabdantis progresavimą ar patologinės būklės rimtumą, ar jos pasekmes, čia aprašytus.

Terminai “užkertantis kelią”, “prevencija”, “profilaktika”, “profilaktinis” ir “užkirsti kelią” čia vartojami kaip pakeičiantys vienas kitą ir reiškia sumažėjimą tikimybės, kad F-I recipientas susirgs arba jam išsivystys bet kokia patologinė būseną ar jos pasekmės, čia aprašytos.

Terminai “netekęs estrogeno” ir “estrogeno nepriteklius” reiškia būklę, tiek natūraliai atsiradusią, tiek kliniškai indukuotą, kai moters organizmas negali išskirti pakankamai endogeninių estrogeninių hormonų, kad palaikytų nuo estrogeno priklausančias funkcijas, pavyzdžiui, menstruacijas, kaulų masės homeostazę, neuronų funkcijas, širdies ir kraujagyslių būklę, ir t.t. Tokios estrogeno trūkumo situacijos kyla dėl menopauzės ir chirurginio ar cheminio kiaušidžių pašalinimo, įskaitant jų funkcinius ekvivalentus, pavyzdžiui, gydymą aromatazės inhibitoriais, GnRH agonistais arba antagonistais, ICI, ir panašiai, tačiau šiomis priemonėmis neapsiriboja. Ligos būklės, susijusios su estrogeno nepritekliu, apima kaulų masės praradimą, osteoporozę, širdies ir kraujagyslių susirgimus ir hiperlipidemiją, tačiau tuo neapsiriboja.

Čia vartojamas terminas “estrogenas” apima steroidinius junginius, pasižyminčius estrogeniniu aktyvumu, tokie kaip, pavyzdžiui, 17β -estradiolis, etronas, konjuguotas estrogenas (Premarin®), serumo estrogenas 17β -etinilestradiolis, ir pan. Geriausias junginys estrogeno pagrindu yra Premarin® ir noretinodrelis.

Čia vartojamas terminas “progestinas” apima junginius, pasižyminčius nėštumą išsaugančiu aktyvumu, tokius kaip, pavyzdžiui, progesteronas, noretinodrelis, nongestrelis, megestolio acetatas, noretindronas ir pan. Noretindronas yra geriausias agentas progestino pagrindu.

Čia vartojamas terminas “aromatazės inhibitorius” apima junginius, gebančius inhibuoti aromatazę, pavyzdžiui, prekyboje esančius inhibitorius, tokius kaip aminoglutemidas (CYTANDREN®), Anastrozolis (ARIMIDEX®),

Letrozolis (FEMARA®), Formestanas (LENATRON®), Eksemestanas (AROMASIN®) ir pan.

Čia vartojamas terminas "LHRH analogas" reiškia liuteinizuojantį hormoną atlaisvinančio hormono analogą, kuris inhibuoja estrogeno gamybą moteriai premenopauzės būklėje, įskaitant, pavyzdžiui, goserliną (ZOLADEX®), leuprolidą (LUPRON®) ir pan.

Čia vartojamas terminas "AChE inhibitorius" apima junginius, kurie inhibuoja acetilcholinesterazę, pavyzdžiui, fizostigmino salicilatą, takrino hidrochloridą, donepezilo hidrochloridą ir pan.

Terminas "sureguliuoti ChAT" reiškia ChAT fermentinio aktyvumo padidinimą, t.y., cholino virtimo į acetilcholiną skatinimą. Šis skatinimas apima ChAT ir cholino reakcijos greičio ir/arba efektyvumo padidinimą ir/arba ChAT kiekio, esančio reakcijos vietoje, padidinimą. Šis reakcijos vietoje esančio fermento kiekio padidėjimas gali būti genų reguliavimo dėka arba dėka kitokio fermento susiformavimo sintezės žingsnio ir/arba dėl fermento deaktyvacijos sumažėjimo ir metabolizmo.

Parinktos tyrimų metodikos

Bendra žiurkių paruošimo procedūra: septyniasdešimt penkių dienų amžiaus (jei nenurodyta kitaip) Sprague Dawley žiurkių patelės (masė nuo 200 iki 225 g) buvo gautos iš Charles River Laboratories (Portage, MI). Gyvuliukams arba pašalintos abi kiaušidės (OVX), arba jiems atlikta Sham chirurginė procedūra Charles River laboratorijoje, iš kur jie atvežti po savaitės. Atvežus, jie patalpinami metaliniuose kabančiuose narveliuose grupėmis po 3 arba 4 į narvelį ir vieną savaitę turi *ad libitum* priejimą prie maisto (kalcio kiekis apie 0,5 %) ir vandens. Kambario temperatūra palaikoma $22,2 \pm 1,7$ °C, minimalus santykinis drėgnumas 40 %. Kambario fotoperiodas buvo 12 val. šviesa ir 12 val. tamsa.

Dozavimo režimas ir audinių paėmimas: po vienos savaitės aklimatizacijos (taigi, po dviejų savaičių nuo OVX) pradedamas F-I kasdieninis dozavimas. 17α -

etinilestradiolis arba F-I įvedamas peroraliai, jei nenurodyta kitaip, suspensijos 1% karboksimetilceliuliozės pavidale arba ištirpintas 20 % ciklodekstrine. Gyvuliukams preparatas įvedamas kasdien 4 dienas. Baigus įvedimą, gyvuliukai pasveriami, anestezuojami ketamino:ksilazino mišiniu (2:1, t/t) ir paimamas kraujo mėginys

5 padarant širdies punkciją. Tada gyvuliukai numarinami uždusinant CO₂, gimda pašalinama per vidurio pjūvį, nustatomas šlapios gimdos masė. 17α-etinilestradiolis gautas iš Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

Širdies ir kraujagyslių ligos/hiperlipidemija

10 Aukščiau aprašytiems kraujo mėginiams leidžiama krešėti kambario temperatūroje 2 val., nucentrifugavus 10 min. 3000 aps/min greičiu, atskiriamas serumas. Serumo cholesterolis nustatomas naudojant Boehringer Mannheim

15 Diagnostics didelio tikslumo cholesterolio tyrimo metodiką. Trumpai tariant, cholesterolis oksidinamas iki cholest-4-en-3-ono ir vandenilio peroksido. Tada vandenilio peroksidas reaguoja su fenoliu ir 4-aminofenazonu, dalyvaujant peroksidazei, kad susidarytų p-chinono imino dažas, kuris nuskaitomas spektrofotometriškai ties 500 nm. Cholesterolio koncentracija apskaičiuojama pagal kalibracinę kreivę. Visas tyrimas yra automatizuotas Biomek Automated Workstation aparatūros pagalba.

20

Gimdos eozinofilų peroksidazinis tyrimo metodas

Aukščiau aprašyta gimda laikoma 4 °C temperatūroje iki tyrimo fermentiniu metodu laiko. Gimda homogenizuojama 50 tūrių 50 mM Tris buferio (pH 8,0), kuris turi 0,005 % Triton X-100. Pridėjus 0,01 % vandenilio peroksido ir 10 mM o-

25 fenilendiamino Tris-buferyje (galutinės koncentracijos), per vieną minutę matuojamas absorbcijos padidėjimas ties 450 nm. Eozinofilų buvimas gimdoje yra junginio estrogeninio aktyvumo matas. Iš pradinės tiesialinijinės reakcijos kreivės atkarpos per 15 s nustatomas maksimalus reakcijos greitis.

Kaulų masės praradimo (osteoporozės) tyrimas

- Po aukščiau parašytos pagrindinės paruošimo procedūros žiurkės kasdien trisdešimt penkias dienas gydomos (6 žiurkės vienoje gydymo grupėje) ir 36-tą dieną numarinamos uždusinant anglies dioksidu. Trisdešimt penkių dienų laikas
- 5 yra pakankamas maksimaliam kaulų tankio sumažėjimui pasiekti, kuris matuojamas kaip čia aprašyta. Numarinimo metu pašalinama gimda, nupjaustomi pašaliniai audiniai, prieš nustatant šlapio masę išpilamas skystas turinys, siekiant patvirtinti estrogenų trūkumą dėl pilno kiaušidžių pašalinimo. Paprastai dėl kiaušidžių pašalinimo gimdos masė būna sumažėjusi maždaug 75 %.
- 10 Tada gimda patalpinama į neutralų formaliną iki tolimesnių histologinių tyrimų.

- Išpjauamas dešinysis šlaunikaulis ir tiriamas rentgeno spinduliais, generuojamais ir analizuojamais vaizdo anlizės programos pagalba (NIH vaizdas) prie distalinio metafizio. Šių gyvūnėlių blauzdikaulių proksimalūs vaizdai taip pat buvo skenuojami skaitmeninės kompiuterinės tomografijos pagalba. Tiriamiems
- 15 gyvuliukams pagal aukščiau aprašytas metodikas buvo peroraliai įvedama F-I arba etinilestradiolio (EE2) 20 % hidroksipropil-β-ciklodekstrine. F-I taip pat naudojamas deriniuose su estrogenu arba progestinu.

MCF-7 proliferacijos tyrimas

- 20 MCF-7 krūties adenokarcinomos ląstelės (ATCC HTB 22) palaikomos MEM (minimalioje esminėje terpėje, neturincioje fenolio raudonojo, Sigma, St.Louis, MO), papildytoje 10 % (t/t) fetalinio veršiuko serumo (FBS), L-glutaminu (2 mM), natrio piruvatu (1 mM), HEPES ({(N-[2-hidroksietil]piperazin-N'-[2-etansulfonrūgštis] 10 mM)}, pakeičiamosiomis aminorūgštimis ir jaučio insulinu (1
- 25 μg/ml) (palaikymo terpė). Dešimt dienų prieš tyrimus MCF-7 ląstelės perkeliama į palaikymo terpę, papildytą 10 % dekstranu padengtų anglies strypelių su fetaliniu veršelių serumu (DCC-FBS tyrimo terpė) vietoje 10 % FBS siekiant išsemti vidines steroidų atsargas. MCF-7 ląstelės pašalinamos iš palaikymo kolbų, naudojant ląstelių disocijacijos terpę (HBSS be $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$), neturinčią fenolio raudonojo,

papildytą 10 mM HEPES ir 2 mM EDTA. Ląstelės du kartus praplaunamos tyrimo terpe ir praskiedžiamos iki 80 000 ląstelių/ml. Maždaug 100 µl (8000 ląstelės) pridedama į plokščiadugnes mikrokultivavimo plokštelės duobutes (Costar 3596) ir inkubuojama 37 °C temperatūroje 5 % CO₂ drėkinamame inkubatoriuje 48 val. ,
5 kad ląstelės adsorbuotųsi ir nusistovėtų po pernešimo. Paruošiama serija vaistų arba DMSO, kaip kontrolės, praskiedimų tyrimo terpėje ir 50 µl perneštų mikrokultūrų, pridedant 50 µl tyrimo terpės, kad galutinis tūris būtų 200 µl. Po dar 48 val. 37 °C temperatūroje 5 % CO₂ drėkinamame inkubatoriuje, mikrokultūros švitinamos tričio timidinu (1 µCi/duobutei) 4 val. Kultūros užšaldomos -70 °C
10 temperatūroje 24 val., po to atitirpinamos ir auginamos naudojant Skarton pusiauautomatinį ląstelių auginimo aparatą. Pavyzdžiai įvertinami skysčių scintiliacijos metodu, naudojant Wallac BetaPlace β skaitiklį.

DMBA indukuojamo krūties auglio inhibavimas

15 Sprague-Dawley žiurkių patelėms, gautoms iš Harlan Industries, Indianapolis, Indiana, sukeliama nuo estrogeno priklausomi krūties augliai. Sulaukus maždaug 55 dienų amžiaus, žiurkėms vieną kartą sumaitinama 20 mg 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA). Po maždaug 6 savaičių nuo DMBA įvedimo pieno liaukos palpuojamos laukiant auglių pasirodymo. Kai atsiranda
20 vienas ar keli augliai, kiekvieno jų ilgesnysis ir trumpesnysis diametrai išmatuojami matavimo šakute, išmatavimai užrašomi, o gyvuliukas atrenkamas eksperimentui. Stengiamasi tolygiai paskirstyti įvairių išmatavimų auglius gydymo ir kontrolinėje grupėse, kad vidutinio dydžio augliai vienodai pasiskirstytų tyrimo grupėse. Kiekviename eksperimente kontrolinėse ir tyrimo grupėse buvo 5-9 gyvuliukai.

25 F-I įvedamas arba intraperitoninių injekcijų 2 % gumiarabike pavidale, arba peroraliai. Peroraliai įvedami junginiai ištirpinami arba suspenduojami 0,2 ml kukurūzų aliejaus. Kiekvienas gydymas, įskaitant kontrolinį veikimą gumiarabiku ir kukurūzų aliejumi, vyksta kasdien vieną kartą per dieną kiekvienam tiriamam gyvuliukui. Po pradinio auglių išmatavimo ir tiriamų gyvuliukų atrinkimo, augliai

matuojami kas savaitę aukščiau aprašytu būdu. Gyvuliukų gydymas ir matavimas tęsiasi 3-5 savaites, po to nustatomas galutinis auglių plotas. Kontroliniam gydymui ir gydymui kiekvienu junginiu nustatomas vidutinio auglio ploto pokytis.

5 Gimdos fibrozės tyrimo metodika

1 bandymas: 3-20 moterų, kurioms pasireiškia gimdos fibrozė, skiriamas F-I. Skiriamas junginio kiekis yra 0,1-1000 mg/dienai, o vartojimo trukmė 3 mėn. Moterys stebimos vartojimo metu ir 3 mėn. nutraukus vartojimą gimdos fibrozės atžvilgiu.

10 2 bandymas : naudojama ta pati metodika kaip ir 1 bandyme, tik vaisto vartojimo trukmė yra 6 mėn.

3 bandymas: naudojama ta pati metodika kaip ir 1 bandyme, tik vaisto vartojimo trukmė yra 1 metai.

15 4 bandymas: lytiškai subrendusių jūros kiaulyčių patelių lejomiomai indukuoti naudojamas ilgalaikis stimuliavimas estrogenu. Gyvuliukai gauna estradiolio injekcijų pavidale 3-5 kartus per savaitę 2-4 mėn. arba kol atsiranda auglys. Vaistas, susidedantis iš F-I arba nešiklio, įvedamas kasdien 3-16 savaičių, po to gyvuliukai numarinami, o gimda atskiriama ir nalizuojama auglio regresijos požiūriu.

20 5 bandymas: žmogaus lejomios audiniai implantuojami į lytiškai subrendusių kastruotų beplaukių pelių patelių pilvo ertmę ir/arba gimdos raumeninį audinį. Duodama egzogeninio estrogeno, siekiant indukuoti eksplantuoto audinio augimą. Kai kuriais atvejais atskirtos auglio ląstelės prieš implantavimą auginamos *in vitro*. Vaistas, susidedantis iš F-I arba nešiklio, 25 įvedamas kasdien 3-16 savaičių, implantai pašalinami ir išmatuojama, ar paaugo, ar sumažėjo. Numarinus gyvuliukus, gimdos išimamos, kad būtų galima įvertinti organo būklę.

6 bandymas: moters gimdos fibroidinio auglio audiniai atskiriami ir laikomi *in vitro* kaip pirminė netransformuota kultūra. Chirurginiai mėginiai praleidžiami per

sterilų sieta, arba, alternatyviai, pašalinami aplinkiniai audiniai, kad gautume vienu ląstelių suspensiją. Ląstelės auginamos terpėje, turinčioje 10 % serumo ir antibiotiko. Nustatomas augimo greitis esant ir nesant estrogeno. Ląstelės tiriamos jų sugebėjimo gaminti komplemento komponentę C3 požiūriu ir pagal jų atsaką į augimo faktorių ir augimo hormoną. *In vitro* kultūra įvertinama pagal jos išvešėjimą paveikus progestiniais, GnRH, F-I ir nešikliu. Steroidinio hormono receptorių kiekis įvertinamas kas savaitę, siekiant nustatyti, ar ši svarbi ląstelės savybė išlieka *in vitro*. Naudojami audiniai iš 5-25 pacientų.

7 bandymas: F-I sugebėjimas inhibuoti estrogeno stimuliuojamą išlejomios kilusių ELT ląstelių linijos proliferaciją išmatuojamas iš esmės taip pat kaip aprašyta Fuchs et al., "Inhibition of Estrogen-Stimulated Growth of Uterine Leiomyomas by Selective Estrogen Receptor Modulators", *Mol. Car.*, 17(3):151-159 (1996), kuris čia cituojamas.

15 Endometriozės tyrimo metodika

1 bandymas: tirta 12-30 suaugusių CD kamieno žiurkių patelių. Jos po lygiai padalinamos į tris grupes. Stebimas visų gyvuliukų estrogeninis ciklas. Ovuliacijos dieną kiekvienai patelei atliekama chirurginė operacija. Kiekvienos grupės patelėms išpjauamas kairysis gimdos ragas, supjaustomas smulkiais ploteliais, kurie laisvai prisiuvami įvairiose vietose, gretimose mezenterinei kraujosrovei. Be to, 2 grupės patelėms pašalintos kiaušidės. Kitą dieną po operacijos 1 ir 2 grupės gyvuliukai gavo intraperitonines vandens injekcijas 14 dienų, tuo tarpu 3 grupė gavo intraperitonines F-I 1,0 mg kilogramui kūno masės injekcijas. Po 14 dienų gydymo kiekviena patelė numarinama ir išimami gimdos gleivinės eksplantai, antinksčiai, likusi gimda ir kiaušidės, kur įmanoma, ir paruošiami histologiniam tyrimui. Kiaušidės ir antinksčiai pasveriami.

2 bandymas: tirta 12-30 suaugusių CD kamieno žiurkių patelių. Jos po lygiai padalinamos į tris grupes. Stebimas visų gyvuliukų estrogeninis ciklas. Ovuliacijos dieną kiekvienai patelei atliekama chirurginė operacija. Kiekvienos grupės

patelėms išpjaunamas kairysis gimdos ragas, supjaustomas smulkiais ploteliais, kurie laisvai prisiuvami įvairiose vietose, gretimose mezenterinei kraujui srovei. Po maždaug 50 dienų nuo operacijos 1 grupės gyvuliukai gavo vandens intraperitonines injekcijas 21 dieną, tuo tarpu 2 grupės gyvuliukai gavo intraperitonines F-I 1,0 mg kilogramui kūno masės injekcijas tokį pat laiką. Po 21 5 dienos gydymo patelės numarinamos, endometriumo eksplantai ir antinksčiai išimami ir pasveriami. Eksplantai išmatuojami augimo įvertinimui. Stebimas estrogeninis ciklas.

3 bandymas: endometriumo audinių autografai naudojami endometriozei 10 indukavimui žiurkėms ir/arba triušiams. Lytiškai subrendusioms patelėms pašalinamos abi kiaušidės, estrogenas tiekiamas egzogeniškai, tokiu būdu užtikrinant pastovų tam tikrą hormono lygį. 5-150 gyvuliukų į pilvo ertmę implantuojama endometriumo audinys, ir įvedama estrogeno eksplantuotų audinių augimui skatinti. Gydymo tikslais kasdien 3-16 savaičių per skrandžio zondą 15 įvedama šio išradimo junginio, po to implantai pašalinami ir vertinamas jų augimas ar regresija. Numarinus, paimama likusi gimdos dalis endometriumo būklės įvertinimui.

4 bandymas: moters endometriumo audiniai implantuoti į lytiškai subrendusių kastruotų plikųjų pelių patelių pilvo ertmę. Estrogenas tiekiamas 20 egzogeniškai eksplantuotų audinių augimo skatinimui. Kai kuriais atvejais endometriumo ląstelės prieš implantavimą kultivuojamos *in vitro*. Gydymo tikslais kasdien 3-16 savaičių per skrandžio zondą įvedama šio išradimo junginio, po to implantai pašalinami ir vertinamas jų augimas ar regresija. Numarinus, paimama gimda nepaliesto endometriumo būklės įvertinimui.

25 5 bandymas: paimami moters endometriumo audiniai ir jie auginami *in vitro* kaip pirminės netransformuotos kultūros. Chirurginiai mėginiai praleidžiami per sterilų sieta, arba, alternatyviai, pašalinami aplinkiniai audiniai, kad gautume vieno ląstelių suspensiją. Ląstelės auginamos terpėje, turinčioje 10 % serumo ir antibiotiko. Nustatomas augimo greitis esant ir nesant estrogeno. Ląstelės tiriamos

jų sugebėjimo gaminti komplemento komponentę C3 požiūriu ir pagal jų atsaką į augimo faktorių ir augimo hormoną. *In vitro* kultūra įvertinama pagal jos proliferaciją paveikus progestiniais, GnRH, F-I ir nešikliu. Steroidinio hormono receptorių kiekis įvertinamas kas savaitę, siekiant nustatyti, ar ši svarbi ląstelės savybė išlieka *in vitro*. Naudojami audiniai iš 5-25 pacientų.

CNS susirgimai, įskaitant Alzheimerio ligą

Estrogenai, tokie kaip 17 β -estradiolis, reguliuoja genų transkripciją susirišdami su estrogeno receptoriais (ER), kurių yra tam tikrų ląstelių populiacijų citoplazmoje. ER ligandų aktyvavimas yra būtina komplekso branduolių transporto sąlyga, kur susirišimas su 13 bazių porų pasikartojančia DNR seka (atsako į estrogeną elementas arba ERE) pradeda transkripcijos aparato sudarymą, kuris baigiasi atitinkamų tikslo genų aktyvavimu. Nustatyti įvairūs genai, kuriuos reguliuoja estrogenas. Jų tarpe yra citoskeleto baltymai, neurotransmiterių biosintetiniai ir metaboliniai fermentai ir receptoriai, taip pat kiti hormonai ir neuropeptidai. ERE buvo identifikuoti įvairiems nuo estrogeno priklausomiems genams, įskaitant vitelogeniną, c-fos, prolaktiną ir liuteinizuojantį hormoną.

ERE tipo sekos, reikšmingos centrinei nervų sistemai, buvo identifikuotos p75^{ngr} ir trkA, abiem atvejais veikė kaip signalinės neurotrofinų molekulės: nervų augimo faktoriaus (NGF), smegenų kilmės nervų augimo faktoriaus (BDNGF) ir neurotropino-3. Postuluojama, kad sąveika tarp neurotrofinų ir estrogenų yra svarbi bazalinių priekinių smegenų neuronų (kurie degeneruoja esant Alzheimerio ligai) išsivystymui ir išgyvenimui, taigi, klinikinės sąlygos, kuriose pasireiškia estrogeno deficitas (kaip po menopauzės) gali prisidėti prie šių neuronų praradimo.

Siekiant nustatyti panašumus ir/arba skirtumus tarp F-I ir estrogeno daromos įtakos genų ekspresijai įvairiose smegenų srityse, atliktas eksperimentas su žiurkėmis, kurioms pašalintos kiaušidės (paruoštomis kaip aprašyta aukščiau. Šešių savaičių amžiaus žiurkėms kasdien įvedama estradiolio benzoato (0,03 mg/kg), F-I

arba nešiklio (kontrolė) dozuota subkutaninė injekcija. Po penkių savaičių gydymo gyvuliukai numarinami, jų smegenys pašalinamos ir mikropjūvio pagalba atskiriamas hipokampus. Hipokampus iš karto atšaldomas skystu azotu ir laikomas -70 °C temperatūroje. Iš atitinkamą gydymą turėjusių ir kontrolinių grupių audinių išskiriama totalinė RNR, ir atliekama atvirkštinė transkripcija, naudojant 3' oligonukleotidinį praimerį, kuris yra parinktas specifinėms iRNR (poly-A+) populiacijoms. Polimerazinė grandinės sintezė (PGS) vykdoma mišinyje, susidedančiame iš atsitiktinių 5' oligonukleotidų (10 bazių porų ilgio; iš viso 150), reakcijos buferio, Taq polimerazės ir ³²PdTCP.

- 10 Po 40 amplifikacijos ciklų reakcijos produktai išskirstomi pagal dydį 6 % TBE-karbamido gelyje, išdžiovinami ir fotografuojami Rentgeno spinduliais. Gauti gydymo grupių iRNR vaizdai palyginami tarpusavyje.

F-I naudojimas kartu su estrogenu

- 15 Moterims peri- ir postmenopauzinėje fazėje dažnai skiriama pakaitinė hormonų terapija (PHT) negatyvių pasekmių, susijusių endogeninio estrogeno cirkuliacijos nutrūkimu, pavyzdžiui, karščio bangų, pašalinimui. Tačiau PHT siejasi su padidėjusia kai kurių vėžio rūšių, įskaitant gimdos ir krūties vėžį, rizika. F-I gali būti naudojamas kartu su PHT šios rizikos panaikinimui.

20

F-I naudojimas kartu su aromatazės inhibitoriumi

- Teoriškai moters postmenopauzėje kiaušidės nefunkcionuoja. Jos organizme vienintelis estrogeno šaltinis yra antinksčių androgenų virtimas į estrogenus, veikiant fermentui aromatazei, kuri randama periferiniuose audiniuose (įskaitant riebalus, raumenis ir patį auglį). Tokiu būdu, vaistai, inhibuojantys aromatazę (aromatazės inhibitoriai) išvalo moters postmenopauzėje organizmą nuo cirkuliuojančio estrogeno. Estrogeno pašalinimas inhibuojant aromatazę yra reikšmingas gydymo pasirinkimas pacientėms su metastaziniu krūties vėžiu. Gydant aromatazės inhibitoriumi, cirkuliuojančio estrogeno trūkumas gali sąlygoti

negatyvius nepageidautinus pašalinius efektus, pavyzdžiui, serumo lipidų lygį. F-I galima naudoti šių negatyvių efektų inhibavimui.

F-I naudojimas kartu su LHRH analogu

- 5 Pastovus LHRH (liutenizuojantį hormoną atlaisvinantis hormonas) analogo naudojimas inhibuoja estrogeno gamybą premenopauzėje esančios moters organizme, desensibilizuodamas hipofizę, kuri tuomet nustoja stimuliuoti estrogeno gamybą kiaušidėse. Klinikinis efektas yra "farmacinė ovariektomija", kuri yra grįžtama nutraukus LHRH naudojimą. Gydant LHRH analogu,
- 10 cirkuliuojančio estrogeno trūkumas gali sąlygoti negatyvius nepageidautinus pašalinius efektus, pavyzdžiui, serumo lipidų lygį. F-I galima naudoti šių negatyvių efektų inhibavimui.

Acetilcholino kiekio didinimas

- 15 Žinoma, kad pacientų, sergančių Alzheimerio liga, hipokampe yra žymiai mažesnis cholinerginių neuronų kiekis, lyginant su sveikais žmonėmis. Panašu, kad progresuojantis šių cholinerginių neuronų mažėjimas atspindi šių pacientų progresuojantį atminties ir pažinimo funkcijos praradimą. Manoma, kad šių neuronų kiekio mažėjimo viena iš priežasčių yra neurotransmiterio acetilcholino
- 20 kiekio arba funkcijos sumažėjimas.

Acetilcholino kiekis neuronuose paprastai nustatomas pagal tai, kur pasistūmusi pusiaulyra tarp jo biosintezės ir biosuskaidymo. Fermentas cholino acetiltransferazė (ChAT) tiesiogiai atsako už jo sintezę, o acetilcholinesterazė (AChE) už suskilimą.

- 25 Siekiant įvertinti F-I įtaką ChAT kiekiui, atliktas toks eksperimentas: paruošus žiurkes pagal aukščiau aprašytą metodiką, 40 žiurkių kasdien subkutaninės injekcijos būdu arba per skrandžio zondą įvedama 3 mg/kg/per dieną F-I nešiklyje, turinčiame 10 % ciklodekstrino, 0,03-0,3 mg/kg/per dieną, arba nešiklio kaip kontrolės. Gyvuliukai veikiami 3-10 dienų. Kiekviename dozavimo

režime buvo dvidešimt gyvuliukų. Tam tikrais laiko tarpais gyvuliukai numarinami ir smegenys išimamos. Hipokampus ir priekinės srities žievė homogenizuojama, ChAT aktyvumas nustatomas pagal acetilcholino biosintezę radioaktyvių žymių metodu. Ši metodika aprašyta Schoepp *et al.*, *J. Neural Transmiss.*, 78:183-193, 1989, kuris čia cituojamas.

Kaip ir buvo tikėtasi, OVX gyvuliukuose ChAT kiekis yra sumažintas >50 % ($p < 0,001$), lyginant su kontrole.

Kitame šio išradimo įgyvendinime F-I naudojamas derinyje su AChE inhibitoriumi. AChE inhibitoriaus naudojimas padidina acetilcholino kiekį, blokuodamas jo suskilimą per AChE inhibiciją.

Gėrybinė prostatos hiperplazija (BPH)

Ryšys tarp estrogeno veikimo ir BPH bei prostatos karcinomos gydymo bendrais bruožais aprašytas PCT paraiškoje Nr. WO 98/07274, tarptautinės publikacijos data 1998 spalio 15 d.

Toliau aprašytuose eksperimentuose keliose žmogaus prostatos vėžio ląstelių linijose įvertintas F-I sugebėjimas surišti estrogeno receptorius.

Žmogaus prostatos vėžio ląstelių linijų LNCaP, DU-45 ir PC-3 lizatai pagaminti TEG terpėje, susidedančioje iš 50 nM Tris•HCl pH 7,4, 1,5 mM etilendiamino tetraacto rūgšties (EDTA) 0,4 M KCl, 10 % glicerolio, 0,5 mM 2-ME ir 10 mM natrio molibdato ir dar turinčioje proteazės inhibitorius pepstatiną (1 mg/ml), leupeptiną (2 mg/ml), aprotininą (5 mg/ml) ir fenilmetilsulfonilfluoridą (PMSF 0,1 mM) (TEGP).

Ląstelių lizatai nucentrifuguojami, nuosėdos resuspenduojamos šaltame TEGP (1 ml TEGP/100 mg nuosėdų) ir 30 sekundžių veikiamos ultragarsu Branson Model 450 ultragarso aparatu. Lizatai nusodinami centrifuguojant 10000xG greičiu 15 minučių 4 °C temperatūroje, po to supernatantai atskiriami ir arba naudojami iškart, arba laikomi -70 °C temperatūroje.

Konkurencinio surišimo tyrimas: surišimo buferis yra TEG, kuriame 0,4 M KCl pakeistas 50 mM NaCl, ir į kurį dar pridėta 1 mg/ml ovalbumino (TEGO). F-I praskiedžiamas iki 20 nM TEGO, iš kurio paruošiamos triskartinio praskiedimo serijos. Analizė atliekama apvaliadugnėse polipropileno mikroplokštelės duobutėse, pakartojant tris kartus. Į kiekvieną duobutę įpilama 35 µl tričiu pakeisto 17β-estradiolio (0,5 nM, specifinis aktyvumas 60,1 Ci/mmol, DuPont-New England Nuclear, Boston, MA) ir 35 µl konkuruojančio tiriamojo junginio šalto tirpalo (0,1 nM - 5 mM) arba TEGO, ir po 5 min. inkubavimo 4 °C temperatūroje purtant pridedama 70 µl MCF-7 ląstelių linijos lizato.

- 10 Plokštelės 24 val. inkubuojamos 4 °C temperatūroje, po to į kiekvieną duobutę pridedama 70 µl dekstranu padengtos anglies (DCC) ir 4 °C temperatūroje energingai purtoma 8 minutes. Po to plokštelės 10 min. centrifuguojamos 1500xG greičiu 4 °C temperatūroje. Iš kiekvienos duobutės supernatantas surenkamas į polistireno mikroplokštelę scintiliacijos matavimams
- 15 Wallac Microbeta Model 1450 skaitikliu. Įvedus pataisą nuskaitymo efektyvumui (35-40 %) ir fonui, radioaktyvumas išreiškiamas skilimais per minutę (DPM). Papildoma kontrolė yra visų impulsų skaičius ir visų impulsų + DCC skaičius, siekiant įvertinti apatinę DCC ištraukiamų impulsų ribą. Šių konkuruojančio surišimo tyrimų rezultatai išreiškiami vidutiniu procentiniu surišimu (surišimo %
- 20 +/- standartinė paklaida, naudojant formulę:

$$\text{surišimo \%} = \frac{\text{DPM}_{\text{tir.jung.}} - \text{DPM}_{\text{visi imp. + DCC}}}{\text{DPM}_{\text{be jokio tir.jung.}} - \text{DPM}_{\text{visi imp. + DCC}}} \times 100$$

25

Krūties vėžio profilaktika

Šis išradimas taip pat susijęs su F-I skyrimu pacientams, turintiems *de novo* krūties vėžio išsivystymo rizikos faktorių. Čia vartojamas terminas *de novo* reiškia

normalių krūties ląstelių transformacijos arba metamorfozės į vėžines ar piktybines ląsteles nebuvimą. Tokia transformacija gali atsirasti pirminės ar dukterinės ląstelės stadijoje evoliucinio proceso metu, arba gali būti vienintelis lemiamas įvykis. Šis *de novo* procesas skiriasi nuo jau transformuotų arba supiktybėjusių ląstelių metastazavimo, kolonizacijos ar paplitimo iš pirminio auglio vietos į naujas vietas.

Asmuo, neturintis konkretaus krūties vėžio išsivystymo rizikos faktoriaus, yra toks, kuriam gali atsirasti *de novo* krūties vėžys ir kuris neturi jokių įrodymų ar įtarimo dėl potencialios galimybės ligai atsirasti bei kuriam niekada nebuvo diagnozuotas šis susirgimas. Didžiausias rizikos faktorius, įtakojantis krūties vėžio atsiradimui, yra asmeninė susirgimo šia liga istorija arba ankstesnis šios ligos pasirodymas, net jeigu liga yra remisijoje be jokių jos buvimo įrodymų. Dar vienas rizikos faktorius yra ligos buvimas giminėje.

Krūties auglių sukėlimas žiurkėms, įvedant joms karcinogeninio N-itrozo-N-metilkarbamido yra plačiai priimtas krūties vėžio tyrimo gyvuliukuose modelis, pripažintas tinkamu cheminių profilaktikos agentų įtakos tyrimui.

Dviejuose atskiruose tyrimuose 55 dienų amžiaus Sprague-Dawley žiurkės gavo intaveninę (1 tyrimas) arba intraperitoninę (2 tyrimas) 50 mg N-nitrozo-N-metilkarbamido dozę kilogramui kūno masės savaitę prieš pašeriant *ad libitum* maistu, į kurį primaišyti įvairūs kiekiai F-I, (Z)-2-[4-(1,2-difenil-1-butenil)fenoksi]-N,N-dimetiletanamino bazės (tamoksifeno bazė) arba kontrolės.

1 tyrime maisto kiekis 60 mg/kg ir 20 mg/kg atitinka apytikriai palyginamas dozes 3 ir 1 mg/kg kūno masės tiriamiems gyvuliukams.

2 tyrime maisto kiekis 20, 6, 2 mg/kg ir 0,6 mg/kg atitinka apytikriai palyginamas dozes 1, 0,3, 0,1 ir 0,03 mg/kg kūno masės tiriamiems gyvuliukams.

Žiurkės buvo stebimos dėl toksiškumo paisreiškimo ir kartą per savaitę sveriamos bei palpuojama laukiant auglio atsiradimo. Gyvuliukai numarinami po trylikos savaičių (1 tyrimas) arba aštuoniolikos savaičių (2 tyrimas), augliai identifikuojami ir po autopsijos pasveriami.

Kompozicijos

Čia vartojamas būdvardžiu terminas “farmacinis” reiškia, kad tai yra iš esmės nekenksminga recipientui-žinduoliui. “Farmacinė kompozicija” reiškia, kad
5 nešikliai, skiedikliai, užpildai ir aktyvus ingredientas(ai) turi būti suderinami su kitais kompozicijos ingredientais ir nekenksmingi jos vartotojui.

Geriausia, kai F-I yra įjungiamas į kompoziciją prieš įvedimą. Vaisto formos parinkimas turėtų būti nuspręstas gydančio gydytojo, remiantis tais pačiais faktoriais, kaip ir apsprendžiant efektyvų kiekį.

10 Visi aktyvūs ingredientai tokiose kompozicijose sudaro 0,01-99,9 % kompozicijos masės. Geriausia, kai minėtoje kompozicijoje yra ne daugiau kaip du aktyvūs ingredientai. Tai yra, teikiama pirmenybė sudaryti F-I kompoziciją su antru aktyviu ingredientu, parinktu iš estrogeno, progestino, aromatazės inhibitoriaus, LHRH analogo ir AChE inhibitoriaus. Geriausios kompozicijos yra tos, kuriose F-I
15 yra vienintelis aktyvus ingredientas.

Šio išradimo farmacinės kompozicijos sudaromos pagal metodikas, žinomas šioje srityje, naudojant gerai žinomus ir lengvai prieinamus ingredientus. Pavyzdžiui, F-I, tiek vienas, tiek derinyje su estrogenu, progestinu, aromatazės inhibitoriumi, LHRH analogu arba AChE inhibitoriumi, sudaro kompozicijas su
20 įprastais užpildais, skiedikliais arba nešikliais kurios suformuojamos į tabletes, kapsules, suspensijas, tirpalus, injekuojamus tirpalus, aerozolius, miltelius ir pan.

Šio išradimo farmacinės kompozicijos parenteraliniam įvedimui susideda iš sterilių vandeninių arba nevandeninių tirpalų, dispersijų, suspensijų arba emulsijų, taip pat iš sterilių miltelių, iš kurių prieš pat vartojimą pagaminamas sterilus
25 tirpalas arba suspensija. Tinkamų vandeninių ir nevandeninių nešiklių, skiediklių, tirpiklių arba rišiklių pavyzdžiai apima vandenį, fiziologinį druskos tirpalą, etanolį, poliolių (tokius kaip glicerolis, propilenglikolis, polietilenglikolis) ir pan., bei tinkamus jų mišinius, augalinius aliejus (tokius kaip alyvų aliejus), ir injekuojamus organinius esterius, tokius kaip etiloleatas. Tinkamas takumas palaikomas,

pavyzdžiui, naudojant padengiančias medžiagas, tokias kaip lecitinas, palaikant tinkamą dalelių dydį dispersijų ir suspensijų atveju, ir naudojant paviršiuje aktyvias medžiagas.

Parenterinės kompozicijos taip pat gali turėti pagalbinių medžiagų, tokių kaip
5 prezervantai, drėkinimo agentai, emulsikliai ir disperguojantys agentai. Apsauga
nuo mikroorganizmų poveikio užtikrinama įvedant antibakterinių ir priešgrybelinių
agentų, pavyzdžiui, parabeno, chlorbutanolio, fenolio, sorbo rūgšties, ir pan. Taip
pat gali būti naudinga įterpti izotoninius agentus, tokius kaip cukrai, natrio
chloridas ir pan. Ištesta injekuojamų kompozicijų absorbcija gali būti įgyvendinta
10 įjungiant agentus, kurie sulėtina absorbciją, tokius kaip aliuminio monostearatas ir
želatina.

Kai kuriais atvejais, siekiant prailginti vaisto veikimą, yra naudinga sulėtinti
vaisto, įvesto po oda ar į raumenis, absorbciją. Tai gali būti įgyvendinta naudojant
kristalinės medžiagos, mažai tirpstančios vandenyje, skystą suspensiją arba
15 ištirpinant ar resuspenduojant vaistą aliejingame nešiklyje. Injekuojant vaisto
formas, pasižyminčios žemu tirpumu vandenyje, suspensiją po oda arba į raumenis,
vaisto absorbcijos greitis priklauso nuo tirpimo greičio.

Injekuojama F-I "depo" kompozicija padaroma įterpiant vaistą į
biosuskaidomo polimero, tokio kaip polipieno rūgštis, poliglikolio rūgštis, pieno ir
20 glikolio rūgšties kopolimerai, medžiagų, žinomų šioje srityje, poliortoesteriai ir
polianhidridai, mikrokapsules. Vaisto atpalaidavimo greitis gali būti parenkamas
priklausomai nuo vaisto ir polimero santykio ir konkrečių naudojamų polimerų
charakteristikų.

Injekuojamos kompozicijos sterilizuojamos, pavyzdžiui, filtruojant per
25 bakterijas sulaikantį filtrą, arba pasterizuojant komponentus prieš jų sumaišymą,
arba gamybos metu, arba prieš pat įvedimą(kaip, pavyzdžiui, dviejų kamerų
švirkšto pakuotėje).

Kietos dozavimo formos peroraliniam įvedimui apima kapsules, tabletes,
piliules, miltelius ir granules. Tokiose kietose dozavimo formose F-I sumaišomas su

mažiausiai vienu inertišku farmaciniu nešikliu, tokiu kaip natrio citratas arba dikalcio fosfatas ir/arba a) užpildais, tokiais kaip krakmolai, cikrai, įskaitant laktozę ir gliukozę, manitolį ir silicio rūgštį, (b) rišikliais, tokiais kaip karboksimetilceliuliozė ir kiti celiuliozės dariniai, alginatai, želatina, polivinilpirolidonas, sacharozė ir gumiarabikas, (c) drėkikliais, tokiais kaip glicerolis, (d) dezintegruojančiais agentais, tokiais kaip agar-agaras, kalcio karbonatas, natrio bikarbonatas, bulvių arba tapijokos krakmolai, alginų rūgštys, silikatai ir natrio karbonatas, (e) drėkinančiais agentais, tokiais kaip glicerolis, (f) tirpimą stabdančiais agentais, tokiais kaip parafinas, (g) absorbciją spartinančiais agentais, tokiais kaip ketvirtiniai amonio junginiai, (h) drėkinančiomis medžiagomis, tokiomis kaip cetilo alkoholis ir glicerolio monostearatas, (i) absorbentais, tokiais kaip kaolinas ir bentonitas ir (j) lubrikantais, tokiais kaip talkas, kalcio stearatas, magnio stearatas, kieti polietilenglikoliai, natrio laurilsulfatas, bei jų mišiniais. Kapsulių, tablečių ir piliulių atvejais dozuota forma gali turėti buferinių agentų

Panašaus tipo kietos kompozicijos taip pat gali užpildyti minkštą arba kietą želatininę kapsulę, naudojant užpildus, tokius kaip laktozė, o taip pat didelės molekulinės masės polietilenglikoliai, ir pan.

Tokios kietos dozavimo formos kaip tabletės, dražetės, kapsulės, piliulės ir granulės taip pat gali būti pagamintos su dangomis arba apvalkalais, tokiais kaip enterinė danga, arba kitomis farmacinių kompozicijų sudarymo srityje gerai žinomomis dangomis. Dangos gali savo sudėtyje turėti drumstiklių arba agentų, atlaisvinančių aktyvų ingredientą(us) tam tikroje virškinamojo trakto dalyje, kaip, pavyzdžiui, rūgštyje tirpios dangos, atlaisvinančios aktyvų ingredientą(us) skrandyje, arba šarminėje terpėje tirpios dangos, atlaisvinančios aktyvų ingredientą(us) žarnyne.

Aktyvus(ūs) ingredientas taip pat gali būti mikrokapsulėse po sulėtinto atpalaidavimo danga, kai mikrokapsulė yra kapsulės vaisto formos piliulė.

Skystos F-I dozavimo formos peroraliniam vartojimui apima tirpalus, emulsijas, suspensijas, sirupus ir eliksyrus. Be aktyvių ingredientų skysta kompozicija gali taip pat apimti inertinius skiediklius, įprastus šioje srityje, tokius kaip vanduo arba kiti farmaciniai tirpikliai, tirpinančių agentų ir emulsiklių, tokių
5 kaip etanolis, izopropanolis, etilkarbonatas, etilacetatas, benzilo alkoholis, benzilbenzoatas, propilenglikolis, 1,3-butilenglikolis, dimetilformamidas, aliejai (konkrečiai, medvilnės, žemės riešutų, kukurūzų, gemalų, alyvų, ricinos ir sezamo aliejai), glicerolis, tetrahidrofurfurilo alkoholis, polietilenglikoliai, sorbitolio riebalų rūgščių esteriai ir jų mišiniai.

10 Be inertinių skiediklių, skystos peroralinės kompozicijos gali apimti pagalbines medžiagas, tokias kaip drėkinantys agentai, emulsikliai ir suspenduojantys agentai, bei saldiklius ir kvapą bei skonį suteikiančias medžiagas.

Skystos suspensijos be aktyvaus ingrediento(ų) gali turėti savyje suspenduojančius agentus, tokius kaip etoksilinti izostearilo alkoholiai,
15 polioksietileno sorbitolio ir sorbitano esteriai, mikrokristalinė celiuliozė, aliuminio metahidroksidas, bentonitas, agaras ir tragakantas, bei jų mišiniai.

Kompozicijos rektaliniam arba intravaginaliniam įvedimui gaminamos sumaišant F-I su tinkamais nedaržinančiais užpildais, tokiais kaip kakavos sviestas, polietilenglikolis arba bet koks žvakučių vaškas, kuris yra kietas kambario
20 temperatūroje, bet suskystėja kūno temperatūroje ir todėl išsilydo tiesiojoje žarnoje arba makštyje, atlaisvindamas aktyvų komponentą(us). Junginiai ištirpinami išlydytame vaške, suteikiamas norimas pavidalas ir leidžiama sukietėti, sudarant išbaigtą žvakučių kompoziciją.

F-I taip pat gali būti įvedamas liposomų pavidale. Kaip yra žinoma šioje
25 srityje, liposomos paprastai sudarytos iš fosfolipidų ir kitų lipidinių medžiagų. Liposomų kompozicijas sudaro mono- arba multisluosniai hidratuoti skysti kristalai, kurie disperguojami vandeninėje terpėje. Liposomų suformavimui gali būti naudojami bet kurie netoksiški farmaciniai ir metabolizuojami lipidai. Šio išradimo kompozicijos liposomų pavidale be F-I gali turėti stabilizatorių, užpildų,

Liposomų suformavimo metodai yra žinomi šioje srityje, kaip aprašyta, pavyzdžiui, Prescott, ed., *Methods in Cell Biology*, Vol. XIV, Academic Press, New York, N.Y (1976), p.33 *et seq.*

5 Toliau pateikiami kompozicijų pavyzdžiai yra tik iliustracinio pobūdžio ir neriboja šio išradimo apimtį.

1 kompozicija: želatininė kapsulė

	Kiekis (mg/kapsulei)
F-I	0,1 - 1000
Kraskmolas, NF	0 - 650
Kraskmolo takūs milteliai	0 - 650
Silikono skystis, 350 centistoksai	0 - 15

10

Aukščiau pateikta kompozicija gali keistis, atsižvelgiant į pateiktas pagrįstas variacijas.

15 Tabletės kompozicija gaminama naudojant žemiau išvardintus ingredientus:

2 kompozicija: tabletės

Ingredientas	Kiekis (mg/tabletei)
F-I	2,5 - 1000
Celiuliozė, mikrokristalinė	200 - 650
Silicio dioksidas, išgarintas	10 - 650
Stearato rūgštis	5 - 15

20 Komponentai sumaišomi ir suspaudžiami į tabletes.

3 kompozicija: tabletės, turinčios maždaug 10 ir 50 mg, atitinkamai, F-I, gali būti pagamintos taip:

Ingredientas	Kiekis (mg/tabletei)	Kiekis (mg/tabletei)
F-I	11,3	56,5
Bevandenė laktozė	176,8	128,2
Laktozė, džiovinta purškiant	44,2	32,0
Povidonas	11,0	13,0
Polisorbatas 80	2,5	2,6
Krospovidonas (viduje)	6,25	6,24
Krospovidonas (išorėje)	6,25	6,5
Magnio stearatas	1,5	1,7
Mikrokristalinė celiuliozė (išorėje)	0,0	13,0

- 5 Komponentai sumaišomi ir suspaudžiami į tabletes.

Alternatyviai, tabletės, turinčios kiekviena 2,5-1000 mg F-I, gaminamos taip:

4 kompozicija: tabletės

Ingredientas	Kiekis (mg/tabletei)
F-I	25 - 1000
Krakmolas	45
Celiuliozė, mikrokristalinė	35
Polivinilpirolidonas (10 % tirpalas vandenyje)	4
Natrio karboksimetilceliuliozė	4,5
Magnio stearatas	0,5
Talkas	1

F-I, krakmolą ir celiuliozę praleidžiami per 45 mešų (JAV) sieta ir kruopščiai išmaišomi. Polivinilpirolidono tirpalas sumaišomas su gautais milteliais, kurie po to praleidžiami per 14 mešų (JAV) sieta. Taip gautos granulės
 5 džiovinamos 50-60 °C temperatūroje ir praleidžiamos per 18 mešų (JAV) sieta. Karboksimetilnatrio krakmolą, magnio stearatas ir talkas pridedami į granules, prieš tai juos praleidus per 60 mešų (JAV) sieta, ir, sumaišius, suspaudžiama į tabletes tablečių presavimo mašina.

10 Suspensijos, turinčios 0,1-1000 mg medikamento 5 ml dozėje, gaminamos taip:

5 kompozicija: suspensijos

Ingredientas	Kiekis (mg/5 ml)
F-I	0,1 - 1000 mg
Natrio karboksimetilceliuliozė	50 mg
Sirupas	1,25 mg
Benzenkarboksirūgšties tirpalas	0,10 ml
Kvapioji medžiaga	q.v.
Dažiklis	q.v.
Valytas vanduo, iki	5 ml

15 Medikamentas praleidžiamas per 45 mešų sieta (JAV) ir sumaišomas su natrio karboksimetilceliulioze ir sirupu, kad susidarytų tolydi pasta. Benzenkarboksirūgšties tirpalas, kvapioji medžiaga ir dažiklis praskiedžiami tam tikru vandens kiekiu ir pridedami maišant. Tada pridedamas pakankamas reikalaujamam tūriui gauti vandens kiekis.

20 Aerosolinis tirpalas, turintis šiuos ingredientus, gaminamas taip:

6 kompozicija: aerozolis

Ingredientas	Kiekis (masės %)
F-I	0,25
Etanolis	25,75
Disperguojanti medžiaga-22 (chlordifluormetanas)	70,00

- 5 F-I sumaišomas su etanolio ir mišinys pridedamas į dalį disperguojančios medžiagos-22, atšaldomas iki 30 °C ir pernešamas į užpildymo įrenginį. Po to reikalingas kiekis supilamas į plieninį konteinerį ir praskiedžiamas likusiu disperguojančios medžiagos kiekiu. Po to prie konteinerio pritvirtinamas vožtuvas.

Žvakutės gaminamos taip:

10 7 kompozicija: žvakutės

Ingredientas	Kiekis (mg/žvakutei)
F-I	250
Sočiųjų riebalų rūgščių gliceridai	2000

- 15 F-I praleidžiamas per 60 mešų sieta (JAV) ir suspenduojamas sočiųjų riebalų rūgščių gliceriduose, kurie prieš tai atsargiai išlydomi. Tada mišinys išpilamas į 2 g talpos liejimo formą ir atšaldomas.

Intraveninė kompozicija gaminama taip:

8 kompozicija: intraveninis tirpalas

Ingredientas	Kiekis
F-I	25 mg
Izotoninis tirpalas	1000 ml

Aukščiau išvardintų ingredientų tirpalas intraveniniu būdu įvedamas pacientui maždaug 1 ml per minutę greičiu.

9 kompozicija: derinio kapsulė I

5

Ingredientas	Kiekis (mg/kapsulei)
F-I	50
Premarinas	1
Avicel pH 101	50
Krakmolas 1500	117,50
Silikoninė alyva	2
Tween 80	0,50
Cab-O-Sil	0,25

10 kompozicija: derinio kapsulė II

Ingredientas	Kiekis (mg/kapsulei)
F-I	50
Noretinodrelis	5
Avicel pH 101	82,50
Krakmolas pH 101	90
Silikoninė alyva	2
Tween 80	0,50

10

11 kompozicija: derinio tabletė

Ingredientas	Kiekis (mg/tabletei)
F-I	50
Premarinas	1
Kukurūzų krakmolos, NF	50
Povidonas K29-32	6
Avicel pH 101	41,50
Avicel pH 102	136,50
Krospovidonas XL10	2,50
Magnio stearatas	0,50
Cab-O-Sil	0,50

5

Dozavimas

Pagal šį išradimą specifinės įvedamo F-I dozės nustatomos pagal konkrečias aplinkybes kiekvienoje situacijoje. Šios aplinkybės apima įvedimo būdą, ankstesnę recipiento gydymo istoriją, patologinę būklę ar simptomą, kurią gydome, gydomos būklės/simptomo rimtumą ir recipiento amžių bei lytį.

Efektyvi minimali F-I dienos dozė paprastai yra maždaug 1, 5, 10, 15 arba 20 mg. Tipiniu atveju maksimali efektyvi dozė yra maždaug 800, 100, 60, 50, ar 40 mg. Tipiškiausiu atveju dozė svyruoja 15-60 mg ribose. Sutinkamai su standartine medicinos srityje "dozės titravimo" recipientui praktika gali būti nustatyta tiksli dozė; t.y., pradžioje paskyrus mažą junginio dozę, dozė palaipsniui didinama, kol pasiekiamas norimas terapinis efektas.

Nors aukščiau aptartos terapijos deriniais atveju gali reikėti dozę titruoti, tipiškos kitų aktyvių ingredientų, išskyrus F-III, dozės yra tokios: etinilestrogeno (0,01-0,03 mg/per dieną), mestranolio (0,05-0,15 mg/dieną), konjuguotų

estrogeninių hormonų (pavyzdžiui., Premarin®, Wyeth-Ayerst; 0,3-2,5 mg/per dieną) medroksiprogesterono (2,5-10 mg/per dieną), noretinodrelis (1,0-10,0 mg/per dieną), nonetindrono (0,5-2,0 mg/per dieną), aminoglutemido (250-1250 mg/per dieną, geriausia po 250 mg keturis kartus per dieną), anastrozolo (1-5 mg/per dieną, geriausia 1 mg vieną kartą per dieną), letrozolo (2,5-10 mg/per dieną, geriausia 2,5 mg vieną kartą per dieną), formestano (250-1250 mg/per savaitę, geriausia po 250 mg dukart per savaitę, eksemestano (25-100 mg/per dieną, geriausia 25 mg vieną kartą per dieną), goserlino (3-15 per tris mėnesius, geriausia 3,6-7,2 mg kartą per tris mėnesius) ir leuprolido (3-15 mg/per mėnesį, geriausia 3,75-7,5 mg kartą per mėnesį).

Ivedimo būdas

F-I gali būti įvedamas įvairiais būdais, įskaitant peroralinį, rektalinį, transderminį, subkutaninį, intraveninį, į raumenis ir intranazalinį. Kiekvieno agento estrogeno arba progestino pagrindu įvedimo būdas priklauso nuo to, kas žinoma šioje srityje. F-I, tiek vienas ar derinyje su estrogenu, progestinu arba AChE inhibitoriumi, paprastai skiriamas įprastinės kompozicijos pavidale.

Šio išradimo farmacinės kompozicijos gali būti įvedamos žmonėms ir kitiems žinduoliams (pavyzdžiui, šunims, katėms, arkliams, kiaulėms ir pan.) peroraliniu, rektaliniu, intravaginaliniu, parenteraliniu, vietiniu būdu, per burną arba po liežuviu, arba per nosį. Terminas "parenteralinis įvedimas" reiškia įvedimo būdą, apimančią injekcijas arba infuzijas į veną, į raumenis, į pilvą, į krūtinkaulį, po oda, intraartikuliniu (į sanario vidų) būdu.

Ivedimo pobūdis ir trukmė

Daugeliu šio išradimo būdų F-I įvedamas pastoviai, nuo 1 iki 3 kartų per dieną, arba tokiu dažniu, kokio reikia įvesti recipientui efektyvų F-I kiekį. Ciklinė terapija gali būti ypač naudinga gydant endometriozę arba gali būti naudojama ūmiu skausmo priepuolio atveju. Restenozės atveju gydymas gali būti apribotas

trumpais intervalais (1-6 mėn.) po kitų medicininių procedūrų, tokių kaip angioplastija.

5

10

15

20

25

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Kristalinis 6-hidroksi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoksi]fenoksi)-2-(4-metoksifenil)benzo[b]tiofeno hidrochlorido hidratas (F-I), turintis Rentgeno spinduliuotės difrakcijos spektrą, gautą su vario spinduliuotės šaltiniu, kuris susideda iš tokių maksimumų: $7,9 \pm 0,2$, $10,7 \pm 0,2$, $14,9 \pm 0,2$, $15,9 \pm 0,2$, $18,3 \pm 0,2$ ir $20,6 \pm 0,2^\circ$, esant 2θ .

2. Farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad susideda iš kristalinio junginio pagal 1 punktą, vieno arba daugiau farmacinių nešiklių, skiediklių arba užpildų ir, pasirinktinai, estrogeno, pasirinktinai, progestino, pasirinktinai, aromatazės inhibitoriaus, pasirinktinai, LHRH analogo ir pasirinktinai, acetilcholino esterazės (AChE) inhibitoriaus.

3. Farmacinė kompozicija pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad susideda iš kristalinio junginio pagal 1 punktą, vieno arba daugiau farmacinių nešiklių, skiediklių arba užpildų ir estrogeno.

4. Farmacinė kompozicija pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad estrogenas yra Premarin®.

5. Farmacinė kompozicija pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad susideda iš kristalinio junginio pagal 1 punktą, vieno arba daugiau farmacinių nešiklių, skiediklių arba užpildų ir progestino.

6. Farmacinė kompozicija pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad progestinas yra parinktas iš grupės, susidedančios iš noretilnodrelio ir noretindrono.

7. Farmacinė kompozicija pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad susideda iš kristalinio junginio pagal 1 punktą, vieno arba daugiau farmacinių nešiklių, skiediklių arba užpildų ir AChE inhibitoriaus.

5 8. Farmacinė kompozicija pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad AChE inhibitorius yra parinktas iš grupės, susidedančios iš fizostigmino salicilato, takrino hidrochlorido ir donepezilo hidrochlorido.

10 9. Farmacinė kompozicija pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad susideda iš kristalinio junginio pagal 1 punktą, vieno arba daugiau farmacinių nešiklių, skiediklių arba užpildų, estrogeno ir progestino.

15 10. Junginys pagal 1 punktą, skirtas patologinės būklės, parinktos iš grupės, susidedančios iš gimdos fibrozės, endometriožės, aortos lygiųjų raumenų ląstelių proliferacijos, restenozės, krūties vėžio, gimdos vėžio, prostatos vėžio, gėrybinės prostatos hiperplazijos, kaulų išretėjimo, osteoporozės, širdies ir kraujagyslių susirgimo, hiperlipidemijos, CNS susirgimo ir Alzheimerio ligos, inhibavimui.

20 11. Junginys pagal 10 punktą, skirtas krūties vėžio inhibavimui.

12. Junginys pagal 11 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad inhibavimo pobūdis yra profilaktinis.

25 13. Junginys pagal 10 punktą, skirtas kiaušidžių vėžio inhibavimui.

14. Junginys pagal 10 punktą, skirtas gimdos gleivinės vėžio inhibavimui.

15. Junginys pagal 1 punktą, skirtas cholinacetiltransferazės (ChAT) suregulavimui žinduoliuose.

16. Junginio pagal 1 punktą gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad susideda iš 6-hidroksi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoksi]fenoksi)-2-(4-metoksifenil)benzo[b]tio-feno hidrochlorido iškristalinimo iš tetrahidrofurano.

FIG. 1

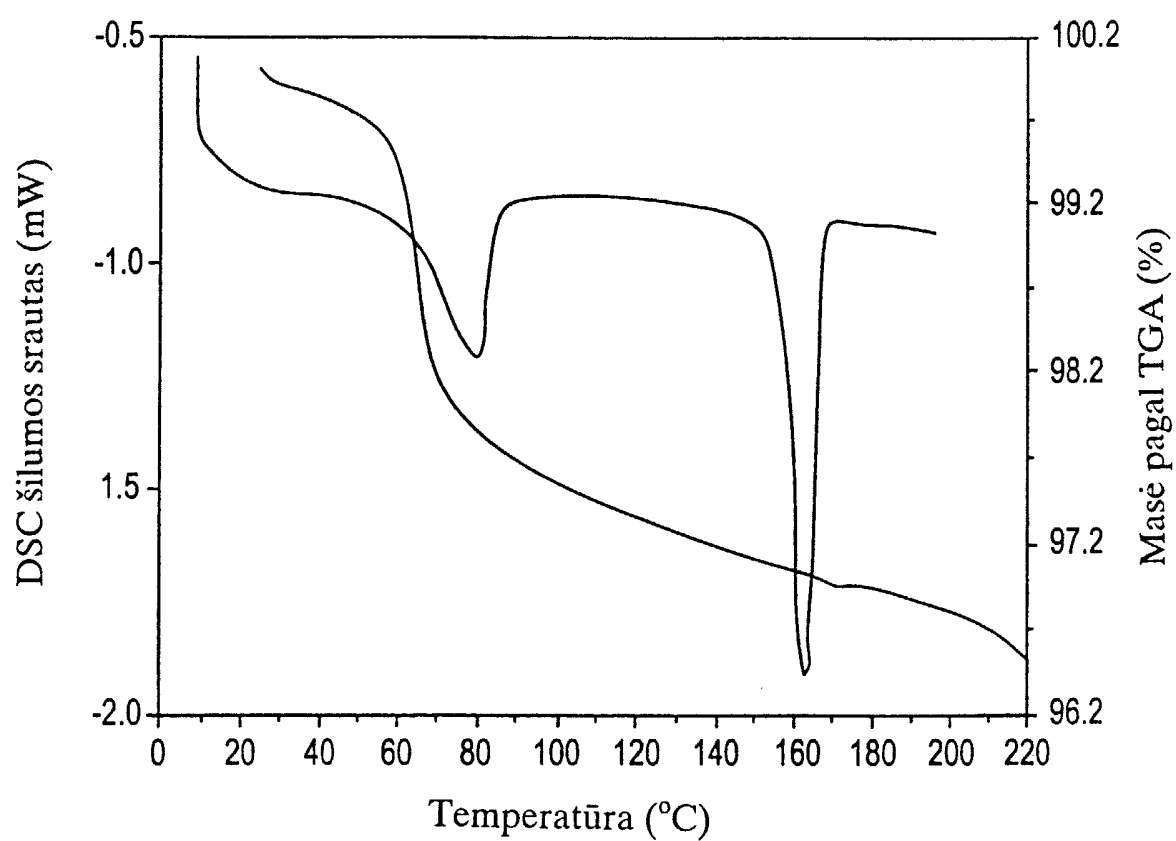


FIG. 2

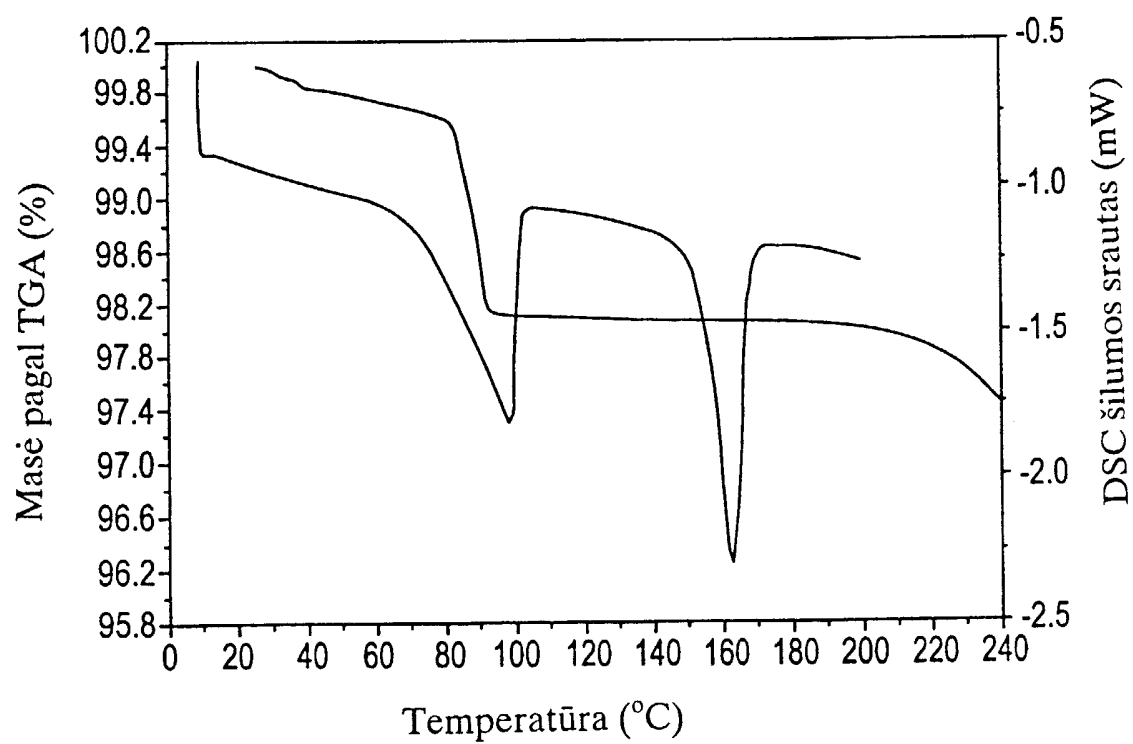


FIG. 3

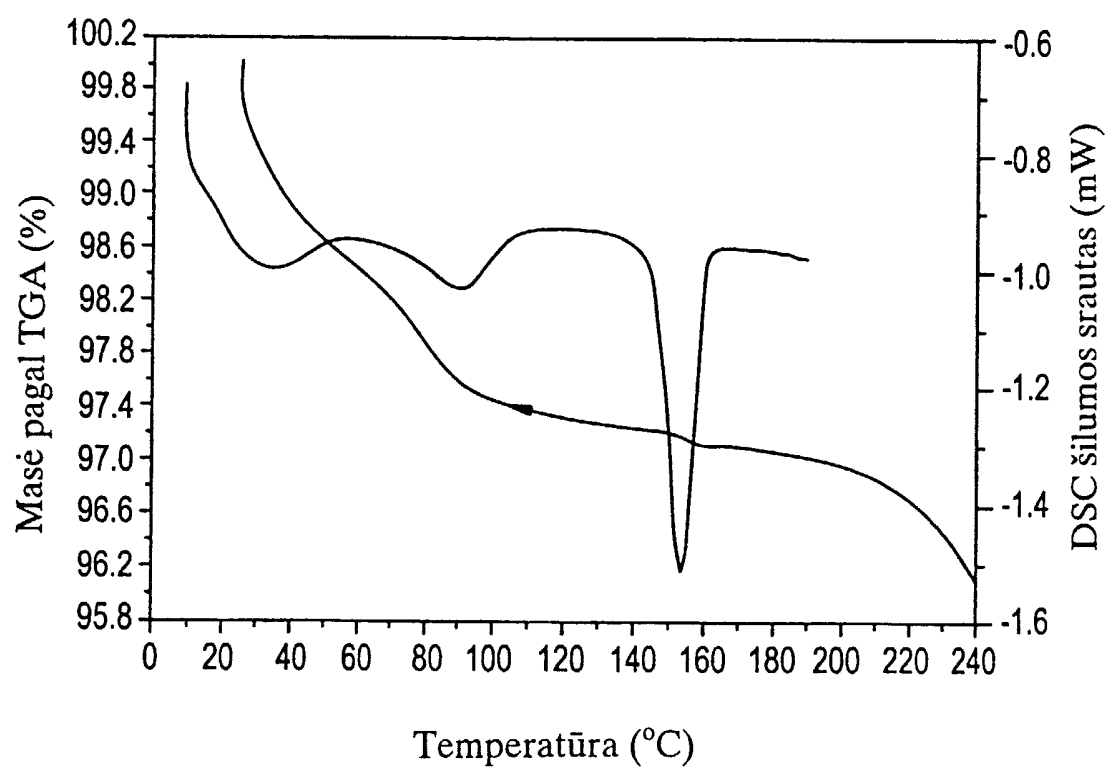


FIG. 4

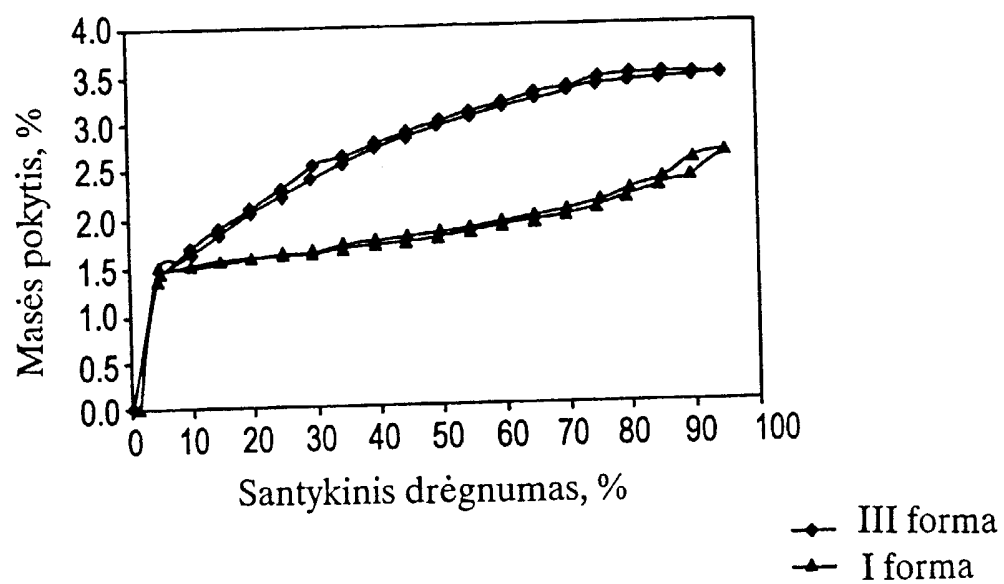


FIG. 5

