

公 告 本

申請日期	840220
案 號	84101576
類 別	A61K 31/56

Int. Cl⁶

A4
C4

314468

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書		
一、發明 名稱	中 文	由馬烯離固酮酸性異構化製得馬烯離固酮雙鍵異構物
	英 文	An Equilin Double Bond Isomer from the Acid Isomerization of Equilin
二、發明 創作人	姓 名	1. 小佛萊德瑞克Q·吉姆米爾 (Frederick Q. Gemmill, Jr.) 2. 契斯特E·歐吉克(Chester E. Orzech) 3. 史蒂芬J·亞德爾曼(Steven J. Adelman)
	國 籍	1-3 皆屬美國
	住、居所	1. 美國紐約州12979羅什斯點湖泊街158號 2. 美國紐約州12979羅什斯點史密斯街20號 3. 美國賓夕法尼亞州18901道爾鎮溫蒂跑道342號
三、申請人	姓 名 (名稱)	美國家庭產品股份有限公司 American Home Products Corporation
	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國紐澤西州07940-0874曼迪森5 吉拉德農場
	代 表 人 姓 名	依岡E·貝格(Egon E. Berg)

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

314468

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6
B6

本案已向：

美國(地區) 申請專利，申請日期：1994年 4月 8日 案號：08/224,849，有 無主張優先權

有關微生物已寄存於：，寄存日期：，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

本發明係關於 8α -3-羥基雌-1,3,5(10),9(11)-四烯-17-酮 (Δ 9(11)-去氫-8-異雌酮)(VI)及其製程，係關於含該 8α -3-羥基雌-1,3,5(10),9(11)-四烯-17-酮 (Δ 9(11)-去氫-8-異雌酮)(VI)的藥學成份以及該 8α -3-羥基雌-1,3,5(10),9(11)-四烯-17-酮 (Δ 9(11)-去氫-8-異雌酮)(VI)在修正骨頭製造及骨頭耗損間平衡與在包含類的宿主動物內當作抗氧化劑的用途。

發明背景

骨質疏鬆症為一種骨骼病症，其特徵為全身骨頭密度減少，事實上，骨頭礦物質(磷酸鈣，稱為“羥基磷灰石”)及骨頭母質(主要蛋白質稱為“膠原”)均逐漸流失。此現象可能在人類30歲時開始發生。一般而言，在停經婦女此過程較男性更快速。然而，超逾80歲後，在骨質疏鬆症的發生上就沒有性別上的差異。骨質流失之10年-20年間，可能有背痛的症狀及脊椎變形之X光片之證明。更年長時，由於近側股骨(“髖部”)容易骨折，骨頭易碎度因而顯現出來。骨質疏鬆症為超逾45歲者骨折最常見的原因。

雖然骨質疏鬆症的原因未知，人們認為骨頭製造及骨頭耗損(骨頭衰退)之間存在著不平衡。骨頭在動物一生中保持為一動態組織。那表示新的骨頭一直持續地形成而舊的骨頭在持續地耗損。然而，在罹患骨質疏鬆症的動物體內，淨骨頭耗損超逾骨頭的形成。

一調查顯示在美國，可能有一千五百萬至二千萬人民

五、發明說明(2)

罹患骨質疏鬆症 [W. A. Peck (Chairman), NIH Osteoporosis Consensus Conference, J. Am. Med. Assoc., 10, 252 : 799-802 (1984)]。根據其被認為是病因之特殊情況來表示不同形成的骨質疏鬆症：老年(衰老)；停經(女性喪失製造雌激素能力)；廢棄未用(disuse)(慢性癱瘓)(chronic immobilization)；類固醇(關節炎長期施予類固醇治療)。骨質疏鬆症也可能出現在牙齒的問題上，因下頷骨較任何其他骨頭更易流失質量。因此，伴隨成人牙齒鬆落的牙周病可能為骨質疏鬆症的早期徵兆。

目前對骨質流失的機制不甚明瞭。此外，目前的治療方法通常是不令人滿意地。這些包括合成代謝劑(anabolic agents)，包括磷，維生素D，鈣鹽，氟化物以及降血鈣素(calcitonin)。

雌激素置換治療法(Estrogen replacement therapy)為治療停經婦女骨質疏鬆症的選擇之一。

物理治療為目前用以治療骨質疏鬆症的另一種方法，因為在任何年齡，癱瘓會造成骨質疏鬆症。因此，許多醫師認為運動及物理治療能防止老年病患疾病的惡化。然而，物理治療對骨折病患會造成傷害，此外，過度激烈的運動會造成病患骨折部位嚴重骨質疏鬆。

其他治療方法，包括施予氟鹽，如氟化鈉，其藉由刺激膠質的合成而能在臨床上，明顯地促進骨頭生長。然而，一嚴重的副作用是不充份石灰化及不規則骨頭的生長，另一治療之含輸入鈣及維生素D以中和某些老年患

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(3)

者鈣缺乏或鈣質吸收減弱之徵候。然而，尚無鈣高攝取量能預防骨質疏鬆症或增加成人骨頭的質量的證明。

治療骨質疏鬆症最有前途的療法是施予能修正骨頭製造速度及骨頭耗損速度間之不平衡的藥劑，其使前者與後者的比例升高而致使沒有淨骨頭流失。在先前產生之骨頭流失回復後，達到一穩定狀態，其時骨頭製造速度與骨頭耗損速度相等。如此之修正法可能藉由刺激骨頭沈積的生理機制，那表示骨頭形成，或藉由延遲骨頭耗損之機制，或兩者而達成。目前使用或在實驗階段用以達成這些目的藥物包括磷、降血鈣素及光輝黴素

(mithramycin)。然而，這些藥物都有嚴重的缺失。

光輝黴素為一種抗生素，具抗腫瘤活性及低血鈣活性，導致血清中鈣的減少，其被認為是表示骨頭耗損相對進度降低-那表示，骨頭耗損相對於骨頭製造。然而副作用包括有腎及肝的毒性以及反胃。同樣地，有機磷具有包括骨骼外石灰化，低血壓及腎衰竭的副作用。降血鈣素呈現免疫的問題，因其通常由非人類來源衍生。因此，沒有一個前述藥劑適於目前單獨使用在骨質疏鬆症的治療上。

先前技術

先前技術係關於馬烯離固酮(equilin)本身。

Budavari S(1989). The Merck Index 11th ed.

Merck & Co Inc, Rahway, New Jersey, p.3582

及關於另一已知馬烯離固酮之異構物，3-羥基離-1,3,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(4)

5(10),9(11)-四烯-17-酮(D9(11)-去氫雌酮)(II), 其揭示於

Magerlein BJ, Hogg JA (1958). Preparation and reactions of 11-substituted 1,3,5(10)-estratrienes. I. 11-Oxygenated estrones and estradiols. *J Am Chem Soc* 80:2220-2225.

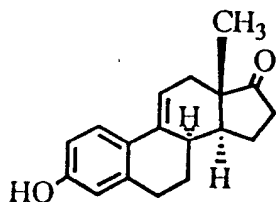
Schering A-G (by Weiske R) (1964). *Ger Offen* 1,177,636. *Chem Abstr* 61:14748h.

Collins DJ, Sjövall J (1983). The structure and function of oestrogens. IV. Synthesis of 17 α -ethynylestradiol specifically polydeuterated in ring C. *Aust J Chem* 36:339-360.

發明要旨

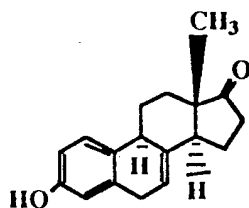
發明敘述

本發明係關於化學式(VI)的化合物或其藥學容許鹽



Δ 9(11)-去氫-8-異雌酮(VI)

本發明之化合物(VI)為以化學式(III)表示之馬烯雌固酮的雙鍵異構物, 且藉由在非質子媒質(aprotic media)中以



馬烯雌固酮(III)

(Δ 7-去氫雌酮)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(5)

酸處理馬烯雌固酮製備，本發明之化合物(VI)用於

- 1) 治療或預防雌激素缺乏引起之骨質流失
- 2) 減低心血管血小板的形成，其導致死亡率降低
- 3) 停經雌激素缺乏徵候的舒緩，包括但不限於，血管舒縮神經激烈收縮(vasomotor hot flashes)，鬱悶及失眠
- 4) 預防尿失禁
- 5) 治療牙周病
- 6) 當作抗氧化劑

本發明的另一標的是提供一個方法，罹患骨質疏鬆症之包括人類的宿主動物因而被治療以修正該動物宿主骨頭沈積及骨頭耗損速度間之不平衡，後者與前者的比例因而降低。

同樣地，本發明的另一標的是提供一種宿主動物的療程，以預防該宿主動物既存健康骨頭組織退化。這些藥劑也可能用於治療惡性疾病的高血鈣症，柏哲德氏病(Paget's disease)以及關節炎疹。

本發明更進一步的標的是提供一種牙周病的療程。

本發明的另一標的是使用本發明的化合物(VI)作為一抗氧化劑。

發明詳述

本發明化學式(VI)的化合物可單獨使用或與藥學上容許載體合併使用，其比例由化合物的溶解度及化學特性，選擇之給藥路徑及標準醫療慣例決定。例如，他們以

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(6)

膠囊，錠劑，懸浮液或溶液形式口服給藥或可能以膠胃外注射。膠囊及錠劑為給藥的較佳形式。至於腸胃外給藥，他們可以用含其他溶質，如足夠之鹽水或葡萄糖使溶液等滲壓，之滅菌溶液的形式使用。

膠囊及錠劑成份含有與適合膠囊及錠劑製造之藥學賦形劑混合之有效成份，適當的藥學賦形劑有，如澱粉、乳糖、特定種類的石膏等等。錠劑可以是未包覆的或是可以藉已知技術包覆者，以延遲腸胃道中的分解及吸收，因此提供一在較長時間內效用的維持。

化學式(VI)之化合物的水性懸浮液含有與一種或多種已知適於水性懸浮液製造之無毒性藥學賦形劑混合之有效成份。適當的賦形劑有，如，甲基纖維素，藻朊酸鈉(sodium alginate)，阿拉伯膠(gum acacia)，卵磷脂等等。水性懸浮液也可包含一種或多種保存劑，一種或多種著色劑，一種或多種香料及一種或多種甜味料。

非水性懸浮液可藉將有效成份懸浮於植物油，如花生油，橄欖油，芝麻油，或椰子油，或於礦物油，如液狀石蠟調配而成，懸浮液可能含有增稠劑，如蜜蠟，硬狀石蠟或十六烷基醇。這些成份也可含有甜味料、香料及抗氧化劑。

化學式(VI)之化合物的劑量隨著給藥型式及所選擇之特定化合物而有所不同。再者，隨著特定個體，年齡，體重，治療下個體之狀況以及症狀的特性與程度而不同。一般而言，治療以較化合物最佳劑量小的劑量開始。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(7)

而後，劑量以微小增加量逐漸增加直至在該狀況下達到最佳效果。大體而言，本發明之化合物最佳給藥濃度為其產生有效的結果而無導致任何有害或有毒的副作用。舉例而言，口服給藥之化合物的有效量範圍通常以單一劑量或分次劑量為200毫克至1200毫克/每天，雖然如前述，會有所變動。然而，為還有效的目的，口服給藥較希望以單一劑量或分次劑量範圍約500毫克至900毫克/每天的劑量施藥。8 α -3-羥基雌-1,3,5(10),9(11)-四烯-17-酮(D9(11)-去氫-8-異雌酮)(VI)可以200毫克至1200毫克的每日劑量對人類給藥。

下列實施例用以說明製備及測試本發明化合物之方法。這些實施例不以任何形式被認為是本發明幅員及範圍的限制，實施例中的溫度以攝氏度數表示。

實施例 1

一般方法

熔點利用湯瑪士-虎佛毛細管熔點裝置(Thomas-Hoover Capillary Melting Point apparatus)測定且未經更正。特定旋光 $[\alpha]_D$ 可在室溫下以柏金-艾碼型號241(Perkin-Elmer model 241)之偏振計及小型管槽取得。除非特別標示，否則該濃度約為1%在二噁烷(dioxane)中。紫外線(UV)光譜以在USP醇中由惠普型號8452二極排列分光光度計測得。紅外線(IR)光譜利用KBr丸以尼可雷特(Nicolet)20DX FTIR分光計取得。 ^1H 核磁共振(NMR)光譜利用在含氘氯仿中(除非特別言明其他種類)以布魯克

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(8)

(Bruker)AM 400分光計取得且以自四甲基硅烷下方範圍(downfield)每百萬分之部分來表示。質譜利用電子撞擊離子化,以芬尼更(Finnigan)-MAT型號8230雙聚焦磁場儀器(double focusing magnetic sector instrument)或惠普型號5994單四極儀器(Single quadripole instrument)測得。

3-羥基雌-1,3,5(10),8(9)-四烯-17-酮的製程(Δ 8(9)-去氫異雌酮)(I)

在 -50°C 下,添加5g(18.7 μmoles)的馬烯雌固酮(II)於一含有125ml液態氟化氫的攪拌聚乙炔反應容器(500ml)。混合物在 -50°C 下攪拌24小時而後倒入2L的冰水中,所得固體經過濾,以水洗滌及在 P_2O_5 之上真空乾燥。利用氣體色譜法(使用The United States Pharmacopeia 22nd ed. suppl 1(1990). Mack, Easton, Pennsylvania, p2127的步驟),粗製產物(4.8g, 96%產率)為90%3-羥基雌-1,3,5(10),8(9)-四烯-17-酮(I)及10%的另一種產物(VI)。自熱苯-己烷(1:1)再結晶無法去除(VI)。粗製混合物(500毫克)分兩部分在交聯聚葡萄糖(Sephadex[®]) LH-20管柱(5 \times 50公分填充至47公分高度)進行層析,以環己烷/苯/甲醇(500:150:75)洗脫(使用Krol GJ, Masserano RP, Carney JF, Kho BT(1970). Quantitative separation of free estrogens by liquid partition chromatography. J Pharm Sci 59:1483-1487的步驟)。流速為4ml/min且洗脫液在270nm下監測。分幾個部分收

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

水

五、發明說明(9)

集，並以氣體色譜法分析。含(I)之部分在約2350ml時洗脫出來。類似成份及純度的部分合併並蒸發至乾以取得350mg不含其他產物(VI)的(I)。此經層析的物質再以溶於熱苯中，而後添加己烷至濁點純化。溶液冷卻至室溫，而後保存在4℃24小時。產物經過濾，風乾而溶於熱乙醇，添加活性碳於熱溶液中，再過濾，添加熱水至濁點。在冷卻至室溫後，置於4℃60小時，過濾並風乾可得300毫克熔點229-230℃帶有分解(熔化前為棕色)的純(I)。光譜及其他數據參考表1。

保留含產物(VI)的部分以進行進一步的作業。

3-羥基雌-1,3,5(10),9(11)-四烯-17-酮的製程(Δ 9(11)-去氫雌酮)(II)

在0℃下，添加6g(22.4mmoles)的馬烯雌固酮(III)於一含150ml液態氟化氫的攪拌之聚乙烯反應容器(500ml)中。混合物在0℃下攪拌0.5小時，去除一50ml部分並倒入1ℓ冰水中。所得固體經過濾，以水洗滌並在P₂O₅之上真空乾燥。粗製產物的氣體色譜(使用The United States Pharmacopeia 22nd ed. Suppl 1(1990)Mack, Easton, Pennsylvania, p.2127的步驟)顯現有三種成份：38% 3-羥基雌-1,3,5(10),9(11)-四烯-17-酮(II)，55% 3-羥基雌-1,3,5(10),8(9)-四烯-17-酮(I)及7%相同於自(I)合成的產物(VI)。剩餘的反應混合物在0℃下再攪拌1小時，去除另一50ml部分。以上述方法操作，氣體色譜顯現三種相同的成分存在，其比例為55%

五、發明說明(10)

3-羥基雌-1,3,5(10),9(11)-四烯-17-酮(Ⅲ), 40% 3-羥基雌-1,3,5(10),8(9)-四烯-17-酮(Ⅰ)及5%相同於自(Ⅰ)合成的產物(Ⅵ)。剩餘的50ml混合物在0℃下再攪拌2小時,反應混合物以上述方法操作,氣體色譜顯示粗製產物為100%的3-羥基雌-1,3,5(10),9(11)-四烯-17-酮(Ⅰ),將此物質(1.6g, 80%產率)溶解於60ml沸騰甲醇/丙酮(2:1)中並添加活性碳。溶液趁熱過濾以去除活性碳,再添加10ml蒸餾水於沸騰溶液中。溶液冷卻至室溫而後保存在4℃下48小時。將產物過濾並風乾可得1.2g,熔點255-257℃帶有分解的純3-羥基雌-1,3,5(10),9(11)-四烯-17-酮(Ⅰ)。光譜及其他數據參考表1。

8 α -3-羥基雌-1,3,5(10),9(11)-四烯-17-酮的製程
(Δ 9(11)-去氫-8-異雌酮)(Ⅵ)

由(Ⅰ)的合成,將含(Ⅵ)的部分合併並使用相同管柱及洗脫溶劑再層析。收集各部分並以氣體色譜法分析。合併純的(Ⅵ)部分,蒸發至乾,並自乙醇/水再結晶可得120mg,熔點243.5-244.5℃帶有分解的產物,光譜及其他數據參考表1。

結果及討論

傑克西(Jacquesy)(參考 Jacquesy JC, Joly G, Gesson JP (1972). Reactions in hyperacidic media. Selective isomerization of equilin in acidic or hyperacidic media. Compt rend Acad 274:969-971)陳述:在0℃,Ⅲ)為唯一產物,而在-30℃,(Ⅰ)為

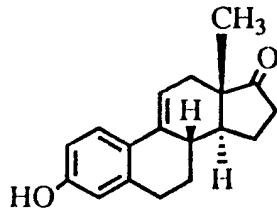
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

水

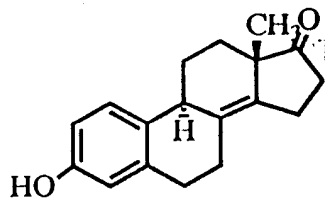
五、發明說明 (11)



△ 9(11)-去氫雌酮 (II)

唯一產物。由於設備的限制，(I) 的合成在 -50°C 下進行。 -50°C 粗製反應產物的分析顯示 9:1 (I) 與未知物，(VI) 的比例，其非起始物，(II)，也非 (IV)。又，若 0°C ，反應在反應完全以前終止，可發現 (I)、(II)、(III) 間各不同的比例。化合物 (VI) 在一大的交聯聚葡萄糖 (Sephadex[®]) LH-20 管柱中以液體色譜法分離 (使用 Krol GJ, Masserano RP, Carney JF, Kho BT (1970)).

Quantitative separation of free estrogens by liquid partition chromatography. J Pharm Sci 59: 1483-1478)。以質譜、IR、UV 及 ^1H NMR 分析 (VI) 可知其為馬烯雌固酮的異構物。根據異構化反應的傑克西 (Jacquesy) 理論處理，認為 (VI) 為 3-羥基雌-1,3,5(10),8(14)-四烯-17-酮 (△ 8(14)-去氫異雌酮) (V)



V

然而，(VI) 的核磁共振光譜顯示在 $6.00\text{ppm}\delta$ (CDCl_3) 有一質子多重譜線，其為乙烯基質子的表徵。除此之外，(VI) 的 ^1H NMR 光譜類似 (II) 的光譜，兩者均在近

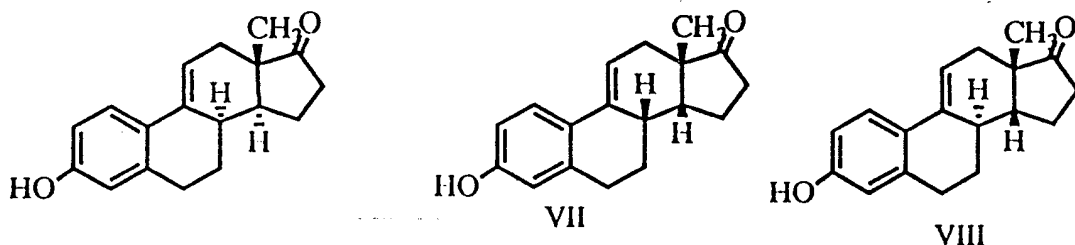
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(12)

6 ppm δ (CDCl_3) 處有一乙烯基質子多重譜線及類似的芳香煙分裂型式。(I)的芳香煙分裂型式迥異於(VI)的型式。既然-8-14雙鍵異構物不具有乙烯基質子，(V)被排除而支持，(II)在8及/或14位置具相反之質子旋轉的9-11雙鍵異構物(參考結構(VI)，(VII)及(VIII)9(11)雙鍵異構物，其只不同於8及14位置)。

 Δ 9(11)-去氫-8-異雌酮(VI)

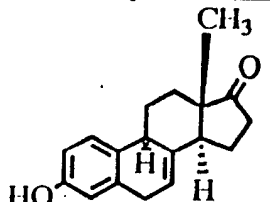
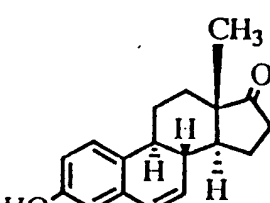
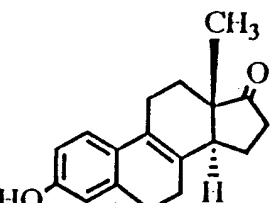
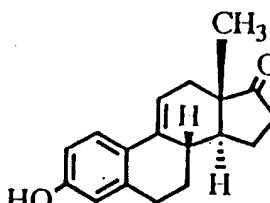
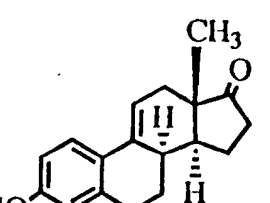
(VI)之UV光譜極類似於(I)的光譜，更進一步證明雙鍵在9-11位置。

高場(High field) ^1H NMR報告顯示(VI)在氯仿溶液中自發回復至(I)，其顯現14-質子與所有其他動情類固醇相同為 α 並且8-質子已經翻轉。依此，認定其結構為8 α -3-羥基雌-1,3,5(10),9(11)-四烯-17-酮(Δ 9(11)-去氫-8-異雌酮)(VI)。

(VI)的分析及光譜數據，以及馬烯雌固酮及馬烯雌固酮異構物(I)，(II)及(IV)列於表1。

五、發明說明 (13)

表 1

化合物	熔點 (°C)	$[\alpha]^{RT}$ (度)	MS m/e	IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$
 馬烯雌固酮 (III) ($\Delta 7$ -去氫雌酮)	237-239 238-240 ¹⁰	+308 +308 ¹⁰	268 (M+)	1719 (C=O) 1615 (arom)
 $\Delta 6$ -去氫雌酮 (IV)	265-269 261-263 ¹¹ 265-266 ¹²	-129 -127 ¹¹	268 (M+)	1714, 1725 (C=O) 1615 (arom)
 $\Delta 8(9)$ -去氫雌酮 (I)	229-230 228-230 ¹³	+40.7 +86 ^{13,b}	268 (M+)	1717 (C=O) 1607 (arom)
 $\Delta 9(11)$ -去氫雌酮 (II)	255-257 257-259 ¹⁴	+295 +297.5 +299 ^b +301 ^{16,b}	268 (M+)	1721 (C=O) 1606 (arom)
 $\Delta 9(11)$ -去氫-8-異雌酮 (VI)	243.5-244.5	+182	268 (M+)	1719 (C=O) 1607 (arom)

a 乙醇

b 氯仿

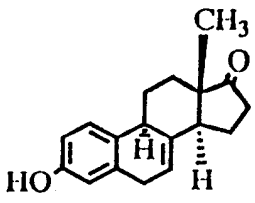
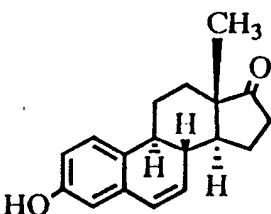
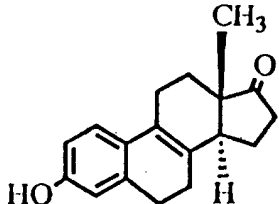
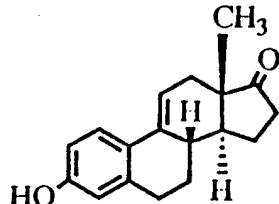
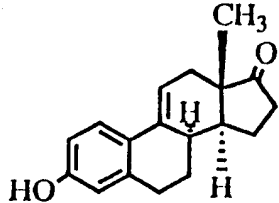
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (14)

表 1 (續)

化合物	UV (nm)		¹ H NMR (CDCl ₃ /TMS) δ (ppm)
	λ max	ε	
 馬烯雌固酮 (III) (Δ7-去氫雌酮)	281	1977	0.79 (s, 3H, 18-CH ₃), 5.52 (m, 1H, 7-H), 6.60 (d, 1H, 4-H), 6.70 (dd, 1H, 2-H), 7.26 (d, 1H, 1-H)
	282	2291 ^{17,a}	
 Δ6-去氫雌酮 (IV)	304	2522	0.81 (s, 3H, 18-CH ₃), 6.04 (dd, 1H, 7-H), 6.46 (dd, 1H, 6-H), 6.52 (d, 1H, 4-H), 6.57 (dd, 1H, 2-H), 7.01 (d, 1H, 1-H) ^b
	271	6096	
	262	7477	
	221	25731	
	304	2754 ^{11,a}	
	262	8913 ^{11,a}	
	220	30903 ^{11,a}	
 Δ8(9)-去氫雌酮 (I)	279	15565	0.90 (s, 3H, 18-CH ₃) 6.64 (s, 3/2H, 2-H, 3-H), 6.66 (D, 1/2 H, 2-H), 7.09 (d, 1H, 1-H)
	214	17229	
	275	15900 ^{3,a}	
 Δ9(11)-去氫雌酮 (II)	289	3334	0.94 (s, 3H, 18-CH ₃), 6.13 (m, 1H, 11-H), 6.57 (d, 1H, 4-H), 6.65 (dd, 1H, 2-H), 7.49 (d, 1H, 1-H)
	263	17913	
	298	3138 ^{16,a}	
	263.5	18073 ^{16,a}	
 Δ9(11)-去氫-8-異雌酮 (VI)	295	2580	0.97 (s, 3H, 18-CH ₃), 6.00 (m, 1H, 11-H), 6.58 (d, 1H, 4-H), 6.65 (dd, 1H, 2-H), 7.40 (d, 1H, 1-H)
	260	16943	

a 乙醇 ; b DMSO-d₆

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (15)

參考文獻

1. Budavari S (1989). *The Merck Index* 11th ed. Merck & Co Inc, Rahway, New Jersey, p. 3582.
2. Kaufmann St, Pataki J, Rosenkranz G, Romo J, Djerassi C (1950). Steroids VI. The Wohl-Ziegler bromination of steroidal 1,4-dien-3-ones. Partial synthesis of 6-dehydroestrone and equilenin. *J Am Chem Soc* 72:4531-4534.
3. Pearlman WH, Wintersteiner O (1940). Estrogens with oxygen in ring B. II. Δ^6 -Isoequilin from 7-hydroxyestrone. *J Biol Chem* 132:605-612.
4. Baner D, Carol J (1953). The constituents of isoequilin A. *J Biol Chem* 204:509-515.
5. Magerlein BJ, Hogg JA (1958). Preparation and reactions of 11-substituted 1,3,5(10)-estratrienes. I. 11-Oxygenated estrones and estradiols. *J Am Chem Soc* 80:2220-2225.
6. Schering A-G (by Weiske R) (1964). *Ger Offen* 1,177,636. *Chem Abstr* 61:14748h.
7. Collins DJ, Sjövall J (1983). The structure and function of oestrogens. IV. Synthesis of 17α -ethynyl- 17β -estradiol specifically polydeuterated in ring C. *Aust J Chem* 36:339-360.
8. Zderic JA, Carpio H, Bowers A, Djerassi C (1963). Steroids CCXXVIII. The synthesis of equilin. *Steroids* 1:233-249.

化學式 (VI) 化合物有效之骨質疏鬆症的活性以標準藥理試驗證實，例如，選定之試驗：骨頭耗損分析：老鼠肢骨 ^{45}Ca 之釋出 (Bone Resorption Assay: ^{45}Ca Release from Rat Limb Bones)。

此分析的目的為確認在培養物中抑制基體或受刺激之骨頭耗損的化合物

8α -3-羥基雌-1,3,5(10),9(11)-四烯-17-酮 ($\Delta^9(11)$ -去氫-8-異雌酮) (VI) 修正骨頭耗損過程的能力在本質

五、發明說明 (16)

上以 L.G. Raisz, Bone resorption in tissue culture. Factors influencing the response to parathyroid hormone. (J. Clin. Invest. 44:103-116, 1965) and P.H. Stern et al, Comparisons of fetal rat limb bones and neonatal mouse calvaria: Effects of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (Calcif. Tissue Int. 35:172-176, 1983).

所描述的方法評估。

步驟

肢骨製備

對懷孕第18天的史柏葛-多利 CD[®] 鼠 (Sprague-Dawley CD[®] rat) (查理士河) 皮下注射溶於 100 μ l 0.9% 鹽水中的 100 μ Ci ⁴⁵CaCl₂ (NEN 鈣-45NEZ-013)。第二天用 CO₂ 使老鼠窒息。取出胎兒，切下右前肢並置於含有冰冷移植植物培養基的培養皿中，該培養基由調至 pH7.3 並添加 10mM TES 之修正過 BGJ_b-費頓傑克遜 (BGJ_b-Fitton Jackson) 培養基 (慣用配方, Gibco No.78-0088) 組成，修正過之 BGJ_b 培養基取得時不含鹽，葡萄糖或碳酸氫鹽而在使用前，添加 0.1mM MgCl₂，1.25mM CaCl₂，5.3mM KCl，0.7mM MgSO₄，130mM NaCl，1.0mM NaH₂PO₄，1g/L 葡萄糖，50mg/L 醋酸鈉及 100U/ml 盤尼西林 G (penicillin G)。在解剖顯微鏡下，清除骨頭黏著性組織並去除軟骨末端。

培育及施藥

將中幹 (midshafts) 分別置於 3×3mm 方形濾紙 (Gelman GN-6 metricel 濾紙；孔徑 0.45 μ M) 上，其放置在含 0.5 ml 前培育培養基之 24-# 孔培養板的 # 孔中之不銹鋼網上。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

五、發明說明 (17)

在轉移骨頭之前，前培育培養基放置至 37℃。前培育培養基用修正過 BGJ。培養基(含如前述之鹽類及葡萄糖)，pH7.3，含 29mM NaHCO₃ 所組成。在 37℃，含 5%CO₂ 環境下培育 18-24 小時，骨頭在他們的網狀/濾紙支撐物上轉移至新的培養板上，該培養板含以補充 15% 熱鈍化馬血清 (heat inactivated horse serum) (Gibco No.230-6050) 前培育培養基稀釋的試驗化合物，pH7.3，具或不具骨頭耗損刺激劑(例如甲狀旁腺荷爾蒙 [PTH] 或間白素-1 (inter leukin-1) [IL-1])，其 37℃ 下總體積為 0.5ml / #孔。對於需非水性溶劑的化合物，由適當母液以培養基稀釋在這些例子中，包含暴露於一當量濃度之媒介物 (vehicle) 之受刺激的基體及骨頭耗損對照組。另一組煮沸 1 小時 (死亡對照組) (kill control) 的骨頭被用以建立背景數據，沒有細胞傳遞，⁴⁵Ca 的交換。使用自每個胎兒取下之右尺骨及橈骨。這兩種骨頭都接受相同的處理且每個處理組由 4 或更多胎兒的骨頭組成。處理方式利用臨床前統計程式 (Preclinical statistics program) (PS-ALLOC) 任意選定。在 37℃，含 5%CO₂ 環境下培育 48 小時，自培養基取出骨頭並在 0.5ml 0.1N HCl 中萃取 1 或更多天。作成兩份 150 μl 的培育培養基，骨頭萃取物在 5ml 液態閃爍合劑 (liquid scintillation cocktail) 中進行 ⁴⁵Ca 放射性分析。

計算

骨頭 ⁴⁵Ca 釋出至培養基的百分比由下式決定：

五、發明說明(18)

培養基中之 ^{45}Ca CPM

× 100

培養基中之 ^{45}Ca CPM + 骨頭中之 ^{45}Ca CPM

結果通常以實驗組 ^{45}Ca 釋出百分比對適當媒介控制組 (vehicle control) 的比例表示。

化學式 (VI) 之化合物的有效骨質疏鬆症的活性可進一步以指定之試驗證明：基體骨頭耗損分析：自鼠股骨 ^{45}Ca 之釋出 (Basal Bone Resorption Assay: ^{45}Ca Release from Rat Limb Bones)。

此分析的目的為活體外試驗骨頭耗損的刺激及抑制劑， ^{45}Ca 自活體外標記之鼠科骨頭移植物釋出至培養基中被認為是骨頭耗損的指標。

移植物製備

標記開始後兩天，母鼠以鹵神 (halothane) 麻醉並以頭部脫臼方式處死。小鼠以開刀切除並很快斬首。顱頂 (額骨及頂骨)，前肢 (含放線 (radii) 及尺骨) 及後肢 (脛骨) 被去除並置於培養皿中之對照組培養基內。藉由不銳利的切割，在吸收性紙張上溫和的轉動以去除骨頭彎的柔軟組織，注意不可攪動骨膜。軟骨末端自長骨切除，顱頂沿著中間縫合線切成兩半。骨頭分為三個種類：半顱骨，脛骨及尺骨 / 放線。八個 (每一個骨頭族群) 為一組的各族群任意置於含 0.5 ml 對照組培養基之 24-# 孔培養板。培養液置於含 95% 空氣：5% CO_2 的潮濕培育器中並保持在 37°C 。

五、發明說明(19)

這些骨頭培育24小時後，培養基自骨頭吸出並置換，含試驗化合物的新鮮培養基。每一個骨頭族群均有含數目8的對照組及含數目8的死亡對照組。喪失活性之培養以在55℃下，加熱培養基中骨頭60分鐘而取得。骨頭在37℃下再培育72小時。在培育終止時，100 μ l培養基被取出並置於閃爍(scintillation)玻璃瓶中，添加10ml艾槍索(Aquasol)，⁴⁵Ca以閃爍分光計定量。骨頭以鹽水洗滌，置於閃爍玻璃瓶(Scintillation vial)中，在室溫下0.75ml 6N HCl中水解過夜。水解的骨頭水溶液以添加2.25ml 2N NaOH中和，隨後添加10ml艾槍索(Aquasol)，⁴⁵Ca含量以閃爍分光計決定。

分析

24至96小時各時段⁴⁵Ca釋出至培養基個別與對照培養基中⁴⁵Ca釋出比較並與藉唐納特(Dunnett's test)試驗失去活性之骨頭比較。

化學式(VI)之化合物的有效骨質疏鬆症的活性可進一步由指定之試驗證明：老鼠神經切除法誘發之骨質流失(Denervation Induced Osteopenia in Rats)。

此分析的目的為評估老鼠內藥劑對藉由外科切除(神經切除)坐骨神經致使癱瘓所引發之骨質流失的效用。

自查理士河取得225至250g重，切除卵巢或完整之史柏葛-多利CD[®](Sprague Dawley CD[®])母鼠被使用。

動物收容於具備食物(rat purina 500 chow)及水的塑膠籠(4或5隻老鼠/籠)中，其飲食不受限制；14/

五、發明說明(20)

10白天/夜晚循環。

在一週的適應環境後，動物任意被分為6至10隻老鼠/每組的族群。每隻老鼠被稱重，以腹膜注射100mg/kg 氯胺酮(Bristol Laboratories, Syracuse, NY)及0.75mg/kg乙噻普馬嗪(Aveco, Ft. Dodge IA)麻醉。左後肢藉由對平行股骨進行側面切除及外科去除尾向旨方向股骨及內收短肌鄰近坐骨神經0.5cm。切除部位以創夾縫合。手術後，老鼠飼養在含吸收性墊草的籠內以減低癱瘓，肢體再受創傷至最小程度。在藥物治療開始前，有24小時的手術後恢復期。

藥物母液的濃度被計算為以0.1ml/100g體重的體積輸送藥液或均勻懸浮液在1%吐溫80(Tween 80)，一般鹽水中配製，每天(一週5次)以口服或腸胃外路徑給藥，持續4週。

礦化組織之連續性三倍標記被用以決定骨質變化(特別是骨頭形成)及礦化速度。每隻動物分別在研究前約21天，10天及2天皮下注射90mg/kg二甲酚橙(Xylenol Orange)(Fisher Scientific Company)，15mg/kg鈣黃綠素(Calcein)(Sigma Chemical Company)及腹膜注射15mg/kg去甲金霉素(Demeclocycline)。

四週末，每隻老鼠被稱重，以腹膜注射100mg/kg氯胺酮(ketamine)及0.75mg/kg乙噻普馬嗪(Acepromazine)麻醉，藉由心臟穿刺收集約4ml的血液，麻醉的老鼠因暴露於CO₂中致死。股骨及脛骨自雙股切除並去除軟組

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (21)

織。

(i) 使用消音火爐將股骨在 $\sim 1100^{\circ}\text{C}$ 下焚燒 16 小時至成灰。

(ii) 基部脛骨在甲基丙烯酸甲酯-乙二醇丙烯酸甲酯混合物中被固定，脫水及不脫鈣，縱行組織 (Longitudinal tissue) 部分 (10μ) 置於 Polycut S 超薄切片機上 (Reichert) 在非浮動部分上使用修正過高得納 (Goldner's) 染色進行染色，而後被裝載在台上並以玻片覆蓋。

近側脛骨中網眼狀骨質 (cancellous bone) 含量以影像分析處理裝置 (軟體由 Drexel University 開發) 定量。

被選擇做為網眼狀骨質含量評估的脛骨部位為主要及次要骨鬆質。為選擇並標準化評估的部位，將骨合成長板-幹骨合端接合處方向平行於數位化螢幕的橫座標。自成長板的骨頭成分 1.7mm (次要骨鬆質) 及 0.2mm (主要骨鬆質) [及腕腹皮質成分等距來] 以上述方法定量。評估的總面積為 2.30mm 寬及 1.45mm 深，組成 3.34mm^2 區域。

體重，股骨質量 (乾的或成灰的) 及小梁 (網眼狀骨頭礦物質面積 (B.Ar) 被決定。

完整 (對照) 及處理組切除神經股體在股骨質量及骨頭礦物質面積的差異性 (絕對量與改變量百分比) 與利用唐納特試驗或其他多重比較法進行，變異量單程分析的媒

五、發明說明(22)

介組(vehicle group)相比較。

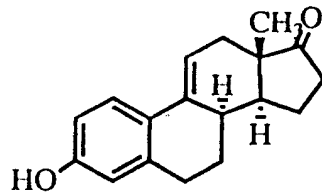
在骨頭耗損過程中，骨頭分解，而此導致後續骨質疏鬆症的發展，本發明提供修正宿主動物骨頭耗損速度及骨頭沈積速度間平衡的宿主動物治療法，骨頭耗損速度與骨頭沈積速度的比例因而降低，其包含施以該宿主動物足量的 8α -3-羥基雌-1,3,5(10),9(11)-四烯-17-酮(Δ 9(11)-去氫-8-異雌酮)(VI)以修正該平衡及降低該比例。

關於本發明 8α -3-羥基雌-1,3,5(10),9(11)-四烯-17-酮(Δ 9(11)-去氫-8-異雌酮)(VI)的給與可在骨質疏鬆症或牙周病的治療上補充其他服法。例如， 8α -3-羥基雌-1,3,5(10),9(11)-四烯-17-酮(Δ 9(11)-去氫-8-異雌酮)(VI)的給與可補充每日以磷酸鈣或碳酸鈣形式600mg至1200mg鈣的攝取。 8α -3-羥基雌-1,3,5(10),9(11)-四烯-17-酮(Δ 9(11)-去氫-8-異雌酮)(VI)的施與也可補充雌激素置換治療法，如每天0.625mg的共軛馬烯雌固酮雌激素。

本發明化合物(VI)也可用作抗氧化劑，由此用途，化合物(VI)可用以治療、抑制或改善動脈硬化，冠狀動脈疾病，心血管疾病，再狹窄症(特別是導因於氣球導管血管成形術步驟)，皮膚老化及皺紋以及阿滋海默氏病。由於其抗氧化劑之特性，本發明化合物(VI)也用於癌的治疗，由於其抗氧化劑之特性，本發明化合物(VI)也用以預防自由基的產生，因而用於由自由基產生之細胞內傷害的預防及延緩。

四、中文發明摘要 (發明之名稱：由馬烯雌固酮酸性異構化製得馬烯雌固酮雙鍵異構物)

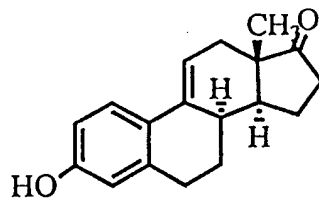
本發明係關於 8α -3-羥基雌-1,3,5(10),9(11)-四烯-17-酮 (Δ 9(11)-去氫-8-異雌酮) (VI) 及其製程，係關於含該 8α -3-羥基雌-1,3,5(10),9(11)-四烯-17-酮 (Δ 9(11)-去氫-8-異雌酮) (VI) 的藥學成份以及該 8α -3-羥基雌-1,3,5(10),9(11)-四烯-17-酮 (Δ 9(11)-去氫-8-異雌酮) (VI) 在修正骨頭製造及骨頭耗損間平衡與在包含人類的宿主動物內當作抗氧化劑的用途。



Δ 9(11)-去氫-8-異雌酮 (VI)

英文發明摘要 (發明之名稱：An Equilin Double Bond Isomer from the Acid Isomerization of Equilin)

This invention relates to 8α -3-hydroxyestra-1,3,5(10),9(11)tetraen-17-one (Δ 9(11)-dehydro-8-isoestrone) (VI),



Δ 9(11)-Dehydro-8-isoestrone (VI)

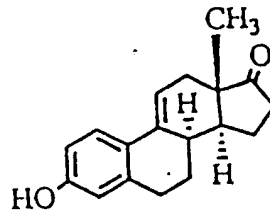
to the process for its preparation, to pharmaceutical compositions containing said 8α -3-hydroxyestra-1,3,5(10),9(11)tetraen-17-one (Δ 9(11)-dehydro-8-isoestrone) (VI) and to the use of said 8α -3-hydroxyestra-1,3,5(10),9(11)tetraen-17-one (Δ 9(11)-dehydro-8-isoestrone) (VI) for modifying the balance between bone production and bone resorption, and as an antioxidant in a host animal, including man.

六、申請專利範圍

第 84101526 號「由馬烯雌固酮酸性異構化製得馬烯雌固酮雙鍵異構物」專利案 (86 年 3 月修正)

六 申請專利範圍

1. 化合物 8α -3-經基雌-1,3,5(10),9(11)-四烯-17-酮
(Δ 9(11)-去氫-8-異雌酮)(VI)及其藥學容許鹽



Δ 9(11)-去氫-8-異雌酮(VI)

2. 一種用以修正宿主動物中骨頭耗損速度與骨頭形成速度間平衡而使骨頭耗損速度與骨頭形成速度的比例降低之藥學組成物，其包含如申請專利範圍第 1 項之化學式 (VI) 的化合物及藥學容許載體。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線