



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101528038 B

(45) 授权公告日 2011.05.11

(21) 申请号 200780039276.9

(22) 申请日 2007.10.23

(30) 优先权数据

60/862,984 2006.10.25 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.04.22

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/082286 2007.10.23

(87) PCT申请的公布数据

W02008/052005 EN 2008.05.02

(73) 专利权人 盛诺基医药科技有限公司

地址 中国香港轩尼诗道4号先施保险大厦  
B&C 单元8层

(72) 发明人 李靖 孟坤

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
11105

代理人 巫肖南

(51) Int. Cl.

A01N 43/42 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

(56) 对比文件

US 6750248 B2, 2004.06.15, 说明书第4栏  
第55-65行, 第13栏第24-34行.

US 6750248 B2, 2004.06.15, 说明书第4栏  
第55-65行, 第13栏第24-34行.

US 2005/0136140 A1, 2005.06.23, 说明书第  
10页 TABLEII, 第7页 TABLEI.

Wang Zhi-qiang et al. Prenylflavonoids  
as nonsteroidal phytoestrogens and  
related structure-activity relationships.  
《ChemMedChem》. 2006, 第1卷(第4期), 482-488.

Wang Zhi-qiang et al. Prenylflavonoids  
as nonsteroidal phytoestrogens and  
related structure-activity relationships.  
《ChemMedChem》. 2006, 第1卷(第4期), 482-488.

Myers J R et al. Should supplemental  
estrogens be used as steroid-sparing agents  
in asthmatic women?. 《Chest 1994 US》. 1994,  
第106卷(第1期), 318-319.

审查员 施捷

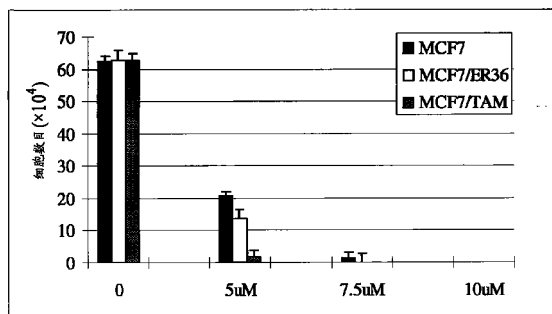
权利要求书 1 页 说明书 22 页 附图 18 页

(54) 发明名称

用于治疗与雌激素受体相关的疾病的化合物  
和方法

(57) 摘要

在本文某些实施方式中提供了用于调控雌激素受体  $\alpha$  36 的功能、预防和 / 或治疗与雌激素受体  $\alpha$  36 相关的疾病、预防和 / 或治疗诸如哮喘的呼吸系统疾病、诱导细胞死亡和 / 或抑制细胞增殖、以及预防和 / 或治疗诸如癌症的与异常细胞增殖相关的疾病的化合物、药物组合物和方法。



1. 包含选自 3,5,7-三羟基-2-(4-甲氧基苯基)-8-(3-甲基丁-2-烯基)-4H-色烯-4-酮、3,5-二羟基-2-(4-羟基苯基)-8,8-二甲基-9,10-二氢-4H,8H-吡喃并[2,3-f]色烯-4-酮和 3,5,7-三羟基-8-(3-羟基-3-甲基丁基)-2-(4-甲氧基苯基)-4H-色烯-4-酮的独立化合物的药物组合物在制备预防或治疗与表达 ER- $\alpha$  36 雌激素受体的细胞异常增殖有关的疾病的药物中的应用,其中所述与表达 ER- $\alpha$  36 雌激素受体的细胞异常增殖有关的疾病选自乳腺癌、肺癌、前列腺癌、宫颈癌和子宫内膜癌。

2. 如权利要求 1 所述的应用,其中所述与表达 ER- $\alpha$  36 雌激素受体的细胞异常增殖有关的疾病是乳腺癌。

3. 如权利要求 1 所述的应用,其中所述受试对象是哺乳动物。

4. 如权利要求 3 所述的应用,其中所述哺乳动物是人。

5. 如权利要求 1 所述的应用,其中所述药物组合物的剂型是口服施用剂型、经口腔施用剂型、经眼施用剂型、肠胃外施用剂型、经直肠施用剂型、脑池内施用剂型、阴道内施用剂型、腹腔内施用剂型、膀胱内施用剂型或经鼻施用剂型。

6. 如权利要求 5 所述的应用,其中所述药物组合物的剂型是肠胃外施用剂型。

## 用于治疗与雌激素受体相关的疾病的化合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2006 年 10 月 25 日提交的美国临时专利申请第 60/862,984 号的权益,本文通过参考引用其全部内容。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及用于预防和 / 或治疗与雌激素受体相关的疾病的化合物、药物组合物的方法。

### 背景技术

[0004] 雌激素是与人体中许多关键生理功能有关的一组激素。雌激素功能包括使雌性器官发育、为怀孕和分娩后的母乳喂养调理乳腺和子宫。雌激素还在维持正常心血管功能和骨密度中扮演着重要角色。已知雌激素会促进细胞增殖,并且可能增大女性罹患癌症(尤其是乳腺癌和子宫癌)的风险。

[0005] 雌激素与目标细胞中的雌激素受体相结合以调控细胞功能。在人细胞中发现了两种类型的雌激素受体, hER- $\alpha$  和 hER- $\beta$ 。它们享有共同的蛋白结构,各自拥有三个独立但相互作用的功能域: N 端域(A/B 域)、中心 DNA 结合域(C 域)和 C 端配体结合域(D/E/F 域)。N 端域具有非配体依赖性激活功能(AF-1),该功能与跟共激活因子的相互作用以及目标基因在配体不存在时的转录激活有关。DNA 结合域在受体二聚和与特定 DNA 序列的结合中扮演重要角色。C 端配体结合域介导配体结合,并且具有配体依赖性反式激活功能(AF-2),在配体存在时激活基因转录。

[0006] 全长 hER- $\alpha$  被鉴定为 66kDa 蛋白,并称作 hER- $\alpha$  66。hER- $\alpha$  66 含有所有三个功能域。后来发现了 hER- $\alpha$  66 的剪接变体,并将其命名为 hER- $\alpha$  46。hER- $\alpha$  46 具有约 46kDa 的分子量,且缺乏 hER- $\alpha$  66 的 N 端 AF-1 域。近来鉴定出了一种 36kDa 的新型 hER- $\alpha$  变体, hER- $\alpha$  36。该变体缺乏 hER- $\alpha$  66 的 N 端 AF-1 域和 C 端 AF-2 域(Wang 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 1023-1027 (2005))。

[0007] 据信 hER- $\alpha$  66 通过其目标基因的转录激活来介导受雌激素刺激的细胞增殖。雌激素与 hER- $\alpha$  66 的结合激活了 hER- $\alpha$  66 的反式激活域,由此刺激了下游目标基因的表达并最终导致细胞增殖。人们发现, hER- $\alpha$  46 介导由膜引发且受雌激素刺激的快速 NO 合成(Li 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 :4807-4812 (2003))。还显示, 缺乏 AF-1 域的 hER- $\alpha$  46 抑制 hER- $\alpha$  66 的 AF-1 活性(Flouriot, G., *EMBO*, 19, 4688-4700 (2000))。由于 hER- $\alpha$  36 缺乏 AF-1 和 AF-2 两个转录激活域,它起到 hER- $\alpha$  66 和 hER- $\beta$  的显性负性抑制剂的作用,从而同时抑制 hER- $\alpha$  和 hER- $\beta$  的 AF-1 和 AF-2 功能。另外, hER- $\alpha$  36 主要位于质膜上,并且介导膜引发的促有丝分裂雌激素信号传导,所述雌激素信号传导刺激细胞增殖。(Wang 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 1023-1027 (2005); Wang 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 :9063-9068 (2006))。

[0008] 大量研究显示,雌激素信号传导由经典核转录激活途径以及非经典膜引发信号传

导途径来介导。hER- $\alpha$  66 和 hER- $\alpha$  46 似乎主要在细胞核内起作用,而 hER- $\alpha$  36 似乎主要在细胞核外起作用。

[0009] 另据显示,hER- $\alpha$  36 缺乏其原始 hER- $\alpha$  66 的配体结合域的螺旋 8-12,这完全改变了 hER- $\alpha$  36 的配体结合特异性。因此,hER- $\alpha$  36 可能与 hER- $\alpha$  66 和 hER- $\beta$  结合不同的配体。

[0010] 淫羊藿 (Epimedium) 植物含有起激动剂或拮抗剂作用的类雌激素化合物。数千年来,若干不同品种的淫羊藿在传统中药中用作草药。淫羊藿药草被用于治疗各种各样的疾病,如阳痿、遗精、泌尿问题、腰膝酸软和疼痛、女性不育、闭经、老年抑郁症、风湿性关节炎、心血管功能衰竭、高血压、慢性支气管炎、心绞痛等 (Wu 等, Chemical and pharmacological investigations of Epimedium species :a survey, Prog Drug Res. 60 :1-57 (2003))。据报道,从淫羊藿药草中提取的混合物还可降低罹患与激素相关的癌症的风险 (U. S. 20030170292)。然而,尚不明确淫羊藿药草中的哪些成分可能具有这种功能。

[0011] 已经发现并表征了超过 20 个品种的淫羊藿,并且从淫羊藿植物中鉴定出了 130 种以上不同化合物 (Wu 等, Chemical and pharmacological investigations of Epimedium species :a survey, Prog Drug Res. 60 :1-57 (2003))。来自淫羊藿植物的化合物主要是黄酮苷类、黄酮类和淫羊藿次苷类。从淫羊藿植物中分离出的化合物的实例有芹菜素、大花旋覆花素、淫羊藿苷、山奈酚、木犀草素、槲皮素等等。

[0012] 淫羊藿苷是从淫羊藿植物中分离出的黄酮苷化合物。据显示,淫羊藿苷在体外对细胞增殖没有影响。然而,发现淫羊藿苷的两个代谢物——淫羊藿素和去甲淫羊藿素——极大地提高了乳腺癌细胞的增殖 (Liu 等, Pharmazie 60 :120-125 (2005) ;Wang 等, Europ. J. Pharm. 504 :147-153 (2004) ;Ye 等, Phytomedicine 12 :735-741 (2005) ;CN03129242)。

[0013] 由于雌激素和与雌激素受体相关的疾病持续影响许多个体,因此仍迫切需要发现可用于预防和 / 或治疗这些疾病的新型化合物和方法。

## 发明内容

[0014] 本发明的一个实施方式提供了用于调控新型雌激素受体变体 ER- $\alpha$  36 的功能的化合物及其衍生物、药物组合物和方法。本发明的另一实施方式提供了用于预防和 / 或治疗与 ER- $\alpha$  36 相关的疾病的化合物及其衍生物、药物组合物和方法。本发明的另一实施方式提供了用于诱导细胞死亡和 / 或抑制细胞增殖、以及用于预防和 / 或治疗诸如癌症的与异常细胞增殖相关的疾病的化合物及其衍生物、药物组合物和方法。另外,本发明的另一实施方式提供了用于预防和 / 或治疗哮喘和其它呼吸系统疾病的化合物及其衍生物、药物组合物和方法。

[0015] 本发明的某些实施方式提供了用于调控 ER- $\alpha$  36 的功能的化合物。本发明的某些实施方式提供了使用本发明的化合物调控 ER- $\alpha$  36 的功能的方法。本发明的某些实施方式提供了预防和 / 或治疗与 ER- $\alpha$  36 的功能相关的疾病的方法。

[0016] 本发明的某些实施方式提供了用于诱导细胞死亡的化合物。本发明的某些实施方式提供了使用本发明的化合物诱导细胞死亡的方法。

[0017] 本发明的某些实施方式提供了用于抑制细胞增殖的化合物。本发明的某些实施方式提供了使用本发明的化合物抑制细胞增殖的方法。

[0018] 本发明的某些实施方式提供了用于预防和 / 或治疗与异常细胞增殖有关的疾病的化合物。本发明的某些实施方式提供了使用本发明的化合物预防和 / 或治疗受试对象中与异常细胞增殖有关的疾病的方法。

[0019] 本发明的某些实施方式提供了用于预防和 / 或治疗哮喘和其它呼吸系统疾病的化合物。本发明的某些实施方式提供了使用本发明的化合物预防和 / 或治疗受试对象中的哮喘和其它呼吸系统疾病的方法。

[0020] 本发明的某些实施方式提供了包含本发明的化合物的药物组合物。

#### 附图说明

[0021] 图 1 显示了说明 ER- $\alpha$  66、ER- $\alpha$  46 和 ER- $\alpha$  36 在人乳腺癌样品中表达的蛋白免疫印迹结果。道 1 : 正常乳腺组织 ; 道 2 : 浸润性导管癌 ; 道 3 : 浸润性导管癌 ; 道 4 : 侵袭性导管癌 ; 道 5 : 浸润性小叶癌 ; 道 6 : 浸润性小叶癌 ; 道 7 : 非侵袭性导管癌。

[0022] 图 2 ( 上图 ) 显示了用与 ER- $\alpha$  36 特异性结合的抗体 ( ) 染色的 MDA-MB-231 细胞的免疫荧光染色结果 ( 在标以 “ER- $\alpha$  36” 的图中显示 : 阳性染色显示为绿色 ), 所述 MDA-MB-231 细胞是缺乏 ER- $\alpha$  66 和 ER- $\alpha$  46 的 ER 阴性乳腺癌细胞系。细胞核也用 4,6- 二脒 -2- 苯基吡啶染色 ( 在标以 “DAPI” 的道中显示 : 阳性染色显示为蓝色 )。融合染色信号在标以 “融合” 的道中显示。当将所述抗体与结合到所述抗体上的免疫原多肽预温育时观测到了阴性染色 ( 下图 )。

[0023] 图 3 是用浓度为 0、1  $\mu$ M、5  $\mu$ M 和 10  $\mu$ M 的淫羊藿素处理 1 周后的 MDA-MB-231 细胞的显微镜照片。

[0024] 图 4 是用浓度为 0、5  $\mu$ M、10  $\mu$ M、20  $\mu$ M、30  $\mu$ M、40  $\mu$ M 和 50  $\mu$ M 的他莫昔芬 (TAM)、ICI 182,780 (ICI)、木犀草素和淫羊藿素处理 10 天后的 MDA-MB-231 细胞的细胞群落数量的柱状图。

[0025] 图 5a 显示了用浓度为 0、5  $\mu$ M、10  $\mu$ M、15  $\mu$ M、20  $\mu$ M 和 25  $\mu$ M 的他莫昔芬 (TAM)、ICI 182,780 (ICI)、木犀草素和淫羊藿素处理 10 天后的 MCF7 细胞群落数量的柱状图。图 5b 显示了用浓度为 0、5  $\mu$ M、10  $\mu$ M、15  $\mu$ M、20  $\mu$ M 和 25  $\mu$ M 的淫羊藿素、IC 163 和 Y4 处理 2 周后的存活 MCF7 细胞数量的柱状图。

[0026] 图 6 是显示当 MCF7 细胞、过表达 ER- $\alpha$  36 的 MCF 细胞 (MCF/ER36) 和抗他莫昔芬 MCF7 细胞 (MCF7/TAM) 用浓度为 0、5  $\mu$ M、7.5  $\mu$ M 和 10  $\mu$ M 的淫羊藿素处理 2 周后的存活细胞数量的柱状图。

[0027] 图 7 显示了用浓度为 0、20  $\mu$ M 和 50  $\mu$ M 的淫羊藿素处理 2 周后的正常乳腺上皮 MCF10A 细胞的显微照片。

[0028] 图 8 显示了说明在用 17  $\beta$ - 雌二醇 (E2  $\beta$ )、他莫昔芬 (TAM)、血清和 ICI 182,780 处理最长达 36 小时后的 MCF7 细胞内 ER- $\alpha$  66、ER- $\alpha$  46 和 ER- $\alpha$  36 的表达模式的蛋白免疫印迹结果。

[0029] 图 9 显示了说明在用 0-25  $\mu$ M 的 ICI 182,780、淫羊藿素、IC 163 和 Y4 处理 12 小时后的 MCF7 细胞内 ER- $\alpha$  66、ER- $\alpha$  46 和 ER- $\alpha$  36 的表达的蛋白免疫印迹结果。

[0030] 图 10 是显示在用浓度为 0-10  $\mu$ M 的淫羊藿素处理 H226 肺癌细胞 ( 表达中等水平的 ER- $\alpha$  36 的肺上皮癌细胞系 )、LNCap 细胞 ( 表达中等水平的 ER- $\alpha$  36 的前列腺癌细胞

系)和 PC3 细胞(表达高水平的 ER- $\alpha$  36 的前列腺癌细胞系)后存活细胞数量的柱状图。

[0031] 图 11 显示了说明在用每只小鼠 5mg 淫羊藿素的剂量隔天一次地处理 30 天后的裸鼠中乳腺癌 MDA-MB-231 细胞异种移植体的尺寸减小的图片。图中显示了处理前和处理后的两只不同小鼠的两个代表性肿瘤。

[0032] 图 12 显示了说明在用每只小鼠 5mg 淫羊藿素的剂量隔天一次地处理 15 天后的小鼠中乳腺癌 MCF7 细胞异种移植体的尺寸减小的图片。图中显示了处理前和处理后的三只不同小鼠的三个代表性肿瘤。

[0033] 图 13 显示了 (a) 显示在用每只小鼠 1mg 淫羊藿素的剂量每周 2 次地处理 36 天后的小鼠中乳腺癌 MDA-MB-231 细胞异种移植体尺寸的图片,和 (b) 显示用淫羊藿素处理的肿瘤的重量变化的柱状图。所述淫羊藿素处理在所述乳腺癌细胞接种到小鼠内之后立即开始进行。G1 :用淫羊藿素处理的小鼠肿瘤。G2 :用玉米油处理的小鼠肿瘤。

[0034] 图 14 显示了植入人乳腺癌 BCAP-37 细胞的 BALB/c-nu 小鼠体内肿瘤的 (a) 平均肿瘤重量的柱状图和 (b) 肿瘤生长抑制速率的柱状图,其中所述小鼠分别用 0.35mg/鼠/日的他莫昔芬,0.7mg/鼠/日(高剂量)、0.35mg/鼠/日(中剂量)和 0.18mg/鼠/日(低剂量)的淫羊藿素以及 0.1mL 橄榄油(阴性对照)处理;且另外显示了植入人乳腺癌 BCAP-37 细胞的 BALB/c-nu 小鼠体内肿瘤的 (c) 平均肿瘤重量的柱状图和 (d) 肿瘤生长抑制速率的柱状图,其中所述小鼠分别用 0.35mg/鼠/日的他莫昔芬、0.7mg/鼠/日的 IC 163 和等体积的橄榄油(阴性对照)处理。

[0035] 图 15 是显示植入子宫颈癌 U14 细胞的 ICR 小鼠体内肿瘤的 (a) 平均肿瘤重量的柱状图和 (b) 肿瘤生长抑制速率的柱状图,其中所述小鼠分别用 0.35mg/鼠/日的他莫昔芬,0.7mg/鼠/日(高剂量)、0.35mg/鼠/日(中剂量)和 0.18mg/鼠/日(低剂量)的淫羊藿素以及 0.1mL 橄榄油(阴性对照)处理。

[0036] 图 16 是显示在 MCF7、PC3 前列腺癌细胞、H226 肺癌细胞和抗他莫昔芬 MCF7 细胞用浓度为 0-25  $\mu$ M 的 IC 163 处理后的存活细胞数量的柱状图。

[0037] 图 17 是显示在施用高剂量(4mg/kg/日)和低剂量(1mg/kg/日)IC-163 的第 4 天和第 6 天由卵白蛋白诱导的哮喘发作前的潜伏期的柱状图。

[0038] 图 18 是显示在施用高剂量(4mg/kg/日)和低剂量(1mg/kg/日)IC-163 的第 6 天在受检豚鼠的血液中嗜酸性细胞百分比的柱状图。

[0039] 图 19 是显示在施用高剂量(4mg/kg/日)和低剂量(1mg/kg/日)IC-163 的第 6 天在受检豚鼠内组胺的血浓度的柱状图。

[0040] 图 20 是显示在施用高剂量(4mg/kg/日)和低剂量(1mg/kg/日)IC-163 的第 6 天在受检豚鼠的血液中的 IgE 的血浓度的柱状图。

[0041] 图 21 是显示在其中用不同浓度的他莫昔芬或淫羊藿素来处理人子宫内膜癌 Hec1A 细胞的溶液中颜色变化的光密度的线形图。

## 具体实施方式

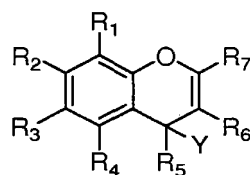
[0042] 化合物及其衍生物

[0043] 在本文某些实施方式中提供了用于调控新型雌激素受体 ER- $\alpha$  36 的功能、预防和/或治疗与 ER- $\alpha$  36 有关的疾病、诱导细胞死亡、抑制细胞增殖、预防和/或治疗诸如癌症的

与异常细胞增殖相关的疾病、以及 / 或者预防和 / 或治疗哮喘和其它呼吸系统疾病的化合物及其衍生物以及药物组合物。

[0044] 在某些实施方式中,提供了式 (I) 的化合物:

[0045]



(I)

[0046] 及其立体异构体或前药,或所述化合物、立体异构体和前药的可药用盐,其中:

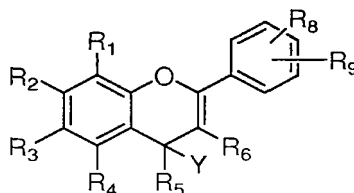
[0047]  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_6$  和  $R_7$  独立地是氢、卤原子、羟基、氨基、 $-SO_3H$  或其盐 (包括但不限于  $-SO_3Na$ 、 $-SO_3K$ 、 $-SO_3Ca_{1/2}$ 、 $-SO_3Mg_{1/2}$ )、 $(C_1-C_6)$  烷基、 $(C_2-C_6)$  烯基、 $(C_2-C_6)$  炔基、 $(C_1-C_6)$  烷氧基、 $(C_1-C_6)$  烷基  $-(C=O)-$ 、甲酰基、甲酰胺基、氰基、硝基、 $HO-(C=O)-$ 、 $(C_1-C_6)$  烷氧基羰基、氨基羰基、氨基  $(C_1-C_6)$  烷基、 $N-(C_1-C_6)$  烷基氨基羰基、 $N,N-[(C_1-C_6)$  烷基] $_2$  烷基氨基羰基、 $N-(C_6-C_{10})$  芳基氨基羰基、 $N,N-[(C_6-C_{10})$  芳基] $_2$  氨基羰基、 $N-(C_1-C_6)$  烷基  $-N-(C_1-C_6)$  烷基氨基羰基、 $N-(C_1-C_6)$  烷基  $-N-(C_6-C_{10})$  芳基氨基羰基、 $(C_6-C_{10})$  芳基 (包括取代芳基)、 $(C_6-C_{10})$  芳氧基、 $(C_5-C_9)$  杂芳基 (包括取代杂芳基)、 $(C_5-C_9)$  杂芳氧基、吗啉基羰基、 $(C_1-C_6)$  烷氧基氨基羰基、 $(C_1-C_6)$  烷基羰基氨基、 $(C_3-C_8)$  环烷基、 $(C_3-C_8)$  环烷基甲基、 $(C_3-C_8)$  杂环烷基、 $(C_3-C_8)$  杂环烷基甲基,或  $R_1$  和  $R_2$  共同形成为  $-CH_2CH_2C(CH_3)_2O-$ ,且  $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_6$  和  $R_7$  同上述定义。

[0048] 当 Y 是氢时,  $R_5$  是氢、卤原子、羟基、氨基、 $(C_1-C_6)$  烷基、 $(C_2-C_6)$  烯基、 $(C_2-C_6)$  炔基、 $(C_1-C_6)$  烷氧基、 $(C_1-C_6)$  烷基  $-(C=O)-$ 、甲酰基、甲酰胺基、氰基、硝基、 $HO-(C=O)-$ 、 $(C_1-C_6)$  烷氧基羰基、氨基羰基、氨基  $(C_1-C_6)$  烷基、 $N-(C_1-C_6)$  烷基氨基羰基、 $N,N-[(C_1-C_6)$  烷基] $_2$  氨基羰基、 $N-(C_6-C_{10})$  芳基氨基羰基、 $N,N-[(C_6-C_{10})$  芳基] $_2$  氨基羰基、 $N-(C_1-C_6)$  烷基  $-N-(C_1-C_6)$  烷基氨基羰基、 $N-(C_1-C_6)$  烷基  $-N-(C_6-C_{10})$  芳基氨基羰基、 $(C_6-C_{10})$  芳基、 $(C_6-C_{10})$  芳氧基、 $(C_5-C_9)$  杂芳基、 $(C_5-C_9)$  杂芳氧基、吗啉基羰基、 $(C_1-C_6)$  烷氧基氨基羰基、 $(C_1-C_6)$  烷基羰基氨基、 $(C_3-C_8)$  环烷基、 $(C_3-C_8)$  环烷基甲基、 $(C_3-C_8)$  杂环烷基、 $(C_3-C_8)$  杂环烷基甲基,或 Y 和  $R_5$  共同形成为氧代 ( $=O$ )。

[0049] 当  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$  或  $R_7$  是  $(C_1-C_6)$  烷基基团时,所述  $(C_1-C_6)$  烷基基团上的每个碳原子可以选择性地被一至三个取代基取代,所述取代基独立地选自氢、卤原子、 $(C_1-C_6)$  烷基、 $(C_2-C_6)$  烯基、 $(C_2-C_6)$  炔基、 $(C_1-C_6)$  烷氧基、 $(C_1-C_6)$  烷基  $-(C=O)-$ 、甲酰基、甲酰胺基、氰基、硝基、 $HO-(C=O)-$ 、 $(C_1-C_6)$  烷氧基羰基、氨基羰基、氨基  $(C_1-C_6)$  烷基、 $N-(C_1-C_6)$  烷基氨基羰基、 $N,N-[(C_1-C_6)$  烷基] $_2$  氨基羰基、 $N-(C_6-C_{10})$  芳基氨基羰基、 $N,N-[(C_6-C_{10})$  芳基] $_2$  氨基羰基、 $N-(C_1-C_6)$  烷基  $-N-(C_1-C_6)$  烷基氨基羰基、 $N-(C_1-C_6)$  烷基  $-N-(C_6-C_{10})$  芳基氨基羰基、 $(C_6-C_{10})$  芳基、 $(C_6-C_{10})$  芳氧基、 $(C_5-C_9)$  杂芳基、 $(C_5-C_9)$  杂芳氧基、吗啉基羰基、 $(C_1-C_6)$  烷氧基氨基羰基、 $(C_1-C_6)$  烷基羰基氨基、 $(C_3-C_8)$  环烷基、 $(C_3-C_8)$  环烷基甲基、 $(C_3-C_8)$  杂环烷基、 $(C_3-C_8)$  杂环烷基甲基。

[0050] 本发明的一个实施方式包括称作 IA1 化合物组的一组式 (I) 的化合物,其中所述化合物组具有下式:

[0051]



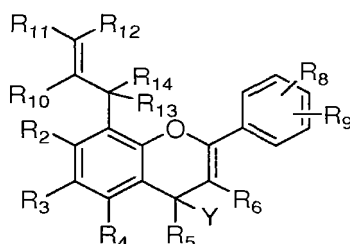
IA1

[0052] 其中  $R_8$  和  $R_9$  独立地是氢、卤原子、羟基、氨基、 $(C_1-C_6)$  烷基、 $(C_2-C_6)$  烯基、 $(C_2-C_6)$  炔基、 $(C_1-C_6)$  烷氧基、 $(C_1-C_6)$  烷基  $-(C=O)-$ 、甲酰基、甲酰胺基、氰基、 $-SO_3H$  及其盐（包括但不限于  $-SO_3Na$ 、 $SO_3K$ 、 $SO_3Ca_{1/2}$ 、 $SO_3Mg_{1/2}$ ）、硝基、 $HO-(C=O)-$ 、 $(C_1-C_6)$  烷氧基羰基、氨基羰基、氨基  $(C_1-C_6)$  烷基。

[0053]  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $Y$  同上述定义。

[0054] 本发明的另一实施方式包括称作 IA2 化合物组的一组式 (I) 的化合物，其中所述化合物组具有下式：

[0055]



IA2

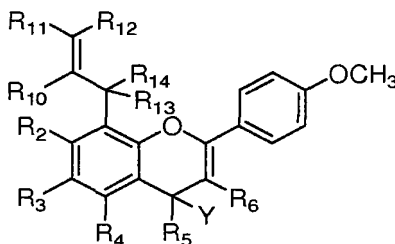
[0056] 其中  $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$  独立地是氢、卤原子、 $(C_1-C_6)$  烷基、 $(C_2-C_6)$  烯基、 $(C_2-C_6)$  炔基、 $(C_1-C_6)$  烷氧基、氰基、硝基。

[0057]  $R_{13}$  和  $R_{14}$  独立地是氢、 $(C_1-C_6)$  烷基、 $(C_2-C_6)$  烯基、 $(C_2-C_6)$  炔基、 $(C_1-C_6)$  烷氧基，或共同形成为氧代 ( $=O$ )。

[0058]  $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_8$ 、 $R_9$ 、 $Y$  同上述定义。

[0059] 本发明的另一实施方式包括称作 IA3 化合物组的一组式 (I) 的化合物，其中所述化合物组具有下式：

[0060]

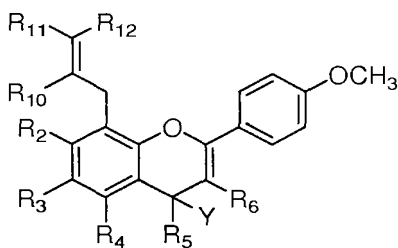


IA3

[0061]  $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 、 $Y$  同上述定义。

[0062] 本发明的另一实施方式包括称作 IA4 化合物组的一组式 (I) 的化合物，其中所述化合物组具有下式：

[0063]

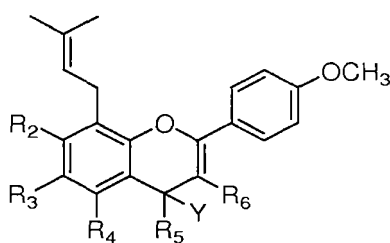


IA4

[0064] 其中  $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$  和 Y 同上述定义。

[0065] 本发明的另一实施方式包括称作 IA5 化合物组的一组式 (I) 的化合物, 其中所述化合物组具有下式:

[0066]

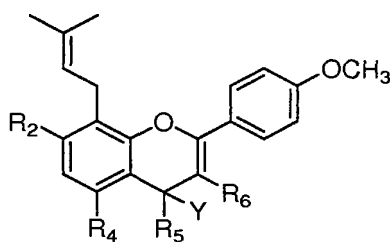


IA5

[0067] 其中  $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$  和 Y 同上述定义。

[0068] 本发明的另一实施方式包括称作 IA6 化合物组的一组式 (I) 的化合物, 其中所述化合物组具有下式:

[0069]



IA6

[0070] 其中  $R_2$  是  $-SO_3H$  或其盐、 $-OH$  或其盐。[0071]  $R_4$  是  $-OH$  或其盐。[0072]  $R_5$  和 Y 共同形成为氧代 ( $=O$ )。[0073]  $R_6$  是  $-OH$  或其盐。

[0074] 特别优选的式 (I) 的化合物的实例包括但不限于下列化合物:

[0075] 5,7-二羟基-2-(8-(2-羟基-3-甲基丁-3-烯基))-2,2-二甲基-2H-色烯-6-基)-4H-色烯-4-酮;

[0076] 5,7-二羟基-2-(4-羟基-3-(2-羟基-3-甲基丁-3-烯基))-5-(4-甲基戊-3-烯基)苯基)-4H-色烯-4-酮;

[0077] 5,7-二羟基-2-(8-羟基-2,2-二甲基-2H-色烯-6-基)-4H-色烯-4-酮;

[0078] 5,7-二羟基-2-(2,2-二甲基-2H-色烯-6-基)-4H-色烯-4-酮;

- [0079] 5,7-二羟基-2-(4-羟基-3-(4-甲基戊-3-烯基)苯基)-4H-色烯-4-酮；
- [0080] 3,5,7-三羟基-2-(4-羟基苯基)-8-(3-甲基丁-2-烯基)-4H-色烯-4-酮；
- [0081] 3,5,7-三羟基-2-(4-甲氧基苯基)-8-(3-甲基丁-2-烯基)-4H-色烯-4-酮；
- [0082] 2-(3-氨基-4-甲氧基苯基)-3,5-二羟基-8-((3,3-二甲基环氧乙烷-2-基)-4-氧代-4H-色烯-7-基硫酸氢盐)；3,5-二羟基-2-(4-甲氧基苯基)-8-(3-甲基丁-2-烯基)-4-氧代-4H-色烯-7-基硫酸氢盐；
- [0083] 3,5-二羟基-2-(4-甲氧基-3-硝基苯基)-8-(3-甲基丁-2-烯基)-4-氧代-4H-色烯-7-基硫酸氢盐；
- [0084] 2-(3-氨基-4-甲氧基苯基)-3,5-二羟基-8-(3-甲基丁-2-烯基)-4-氧代-4H-色烯-7-基硫酸氢盐；
- [0085] 3,5-二羟基-2-(4-甲氧基苯基)-8-((3,3-二甲基环氧乙烷-2-基)甲基)-4H-色烯-4-酮；
- [0086] 3,5-二羟基-2-(4-甲氧基-3-硝基苯基)-8-((3,3-二甲基环氧乙烷-2-基)甲基)-4-氧代-4H-色烯-7-基硫酸氢盐；
- [0087] 3,5-二羟基-8-(2,3-二羟基-3-甲基丁基)-2-(4-甲氧基苯基)-4-氧代-4H-色烯-7-基硫酸氢盐；
- [0088] 3,5-二羟基-8-(2,3-二羟基-3-甲基丁基)-2-(4-甲氧基-3-硝基苯基)-4-氧代-4H-色烯-7-基硫酸氢盐；
- [0089] 2-(3-氨基-4-甲氧基苯基)-3,5-二羟基-8-(2,3-二羟基-3-甲基丁基)-4-氧代-4H-色烯-7-基硫酸氢盐；
- [0090] 5,7-二羟基-2-(4-甲氧基苯基)-8-(3-甲基丁-2-烯基)-4H-色烯-4-酮；
- [0091] 5,7-二羟基-2-(4-羟基苯基)-8-(3-甲基丁-2-烯基)-4H-色烯-4-酮；
- [0092] 2,3-二氢-5,7-二羟基-2-(4-羟基苯基)-8-(3-甲基丁-2-烯基)色烯-4-酮；
- [0093] 7-羟基-2-(4-羟基苯基)-8-(3-甲基丁-2-烯基)-4H-色烯-4-酮；
- [0094] 5,7-二羟基-2-(3,4-二羟基苯基)-4H-色烯-4-酮；
- [0095] (2S)-2,3-二氢-7-羟基-2-(4-羟基苯基)-6-(3-甲基-2-丁烯基)-4H-1-苯并吡喃-4-酮；
- [0096] (2S)-2,3-二氢-2-(4-羟基苯基)-7-甲氧基-6-(3-甲基-2-丁烯基)-4H-1-苯并吡喃-4-酮；
- [0097] 3,5-二羟基-2-(4-羟基苯基)-8,8-二甲基-9,10-二氢-4H,8H-吡喃并[2,3-f]色烯-4-酮(本文中称作Y4)；
- [0098] 3,5-二羟基-2-(4-甲氧基苯基)-8,8-二甲基-9,10-二氢-4H,8H-吡喃并[2,3-f]色烯-4-酮；
- [0099] 3,5,7-三羟基-8-(3-羟基-3-甲基丁基)-2-(4-羟基苯基)-4H-色烯-4-酮；
- [0100] 3,5,7-三羟基-8-(3-羟基-3-甲基丁基)-2-(4-甲氧基苯基)-4H-色烯-4-酮(本文中称作IC 163)。
- [0101] 本文中提供的化合物和衍生物可以根据 IUPAC(国际纯粹与应用化学联合会)或 CAS(化学文摘服务社, Columbus, OH) 命名系统命名。
- [0102] 本文中的各种包含烃类的部分的碳原子含量可以通过标明所述部分中的最小和

最大碳原子数的前缀来表明,例如,前缀(C<sub>a</sub>-C<sub>b</sub>)烷基表明具有包括整数“a”、“b”在内的“a”至“b”个碳原子的烷基部分。因此,例如,(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基指具有1-6个碳原子的烷基基团。

[0103] 术语“烷氧基”指与一个氧原子键合的直链的或支链的、单价的、饱和脂肪族碳原子链。烷氧基基团的实例包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、异丁氧基、叔丁氧基等等。

[0104] 术语“烷基”指直链的或支链的、单价的、饱和脂肪族碳原子链,并且包括,例如,甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、戊基、异戊基、己基等等。

[0105] 术语“烯基”表示含一个或多个双键的直链或支链烃类,并且包括,例如,乙烯基、烯丙基等等。

[0106] 术语“芳基”表示环状芳香烃类。芳基基团的实例包括苯基、萘基、蒽基、菲基等等。

[0107] 术语“环烷基”表示饱和的单环或多环环烷基基团,其任选地与芳香烃基团稠合。环烷基基团的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、茛满基、四氢萘基等等。

[0108] 术语“卤素”或“卤原子”表示氯、溴、氟和碘原子。

[0109] 术语“杂芳基”表示其中一个或多个碳原子已被诸如氮、氧或硫的杂原子替代的单环或多环芳香烃基团。如果杂芳基基团含有多于一个的杂原子,所述杂原子可以相同或不同。杂芳基基团的实例包括苯并咪唑基、苯并噁吩基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、色烯基、呋喃基、咪唑基、吡唑基、中氮茛基、吡啶基、异苯并咪唑基、异吡啶基、异喹啉基、异噻唑基、异噁唑基、萘啶基、噁二唑基、噁嗪基、噁唑基、酞嗪基、蝶啶基、嘌呤基、吡喃基、哌嗪基、吡唑基、哒嗪基、吡啶并[3,4-b]吡啶基、吡啶基、嘧啶基、吡咯基、喹啉基、喹啉基、噻二唑基、噻三唑基、噻唑基、噻吩基、三嗪基、三唑基、咕吨基等等。

[0110] 术语“杂环烷基”表示饱和的单环或多环环烷基基团,其任选地与芳香烃基团稠合,其中至少一个碳原子被诸如氮、氧或硫的杂原子替代。如果杂环烷基基团含有多于一个的杂原子,所述杂原子可以相同或不同。这类杂环烷基基团包括氮杂双环庚烷基、氮杂环丁烷基、吡啶基、吗啉基、哌嗪基、哌啶基、吡咯烷基、四氢呋喃基、四氢喹啉基、四氢吡啶基、四氢吡啶基、四氢异喹啉基、四氢吡喃基、四氢喹啉基、四氢噻喃基、噻唑烷基、硫代吗啉基、噻吨基、噻噁烷基等等。

[0111] 环状基团可以以一种以上的方式与另一个基团键合。如果没有指定特定的键合排列,则所有可能的排列均在预料之中。例如,术语“吡啶基”包括2-、3-或4-吡啶基,而术语“噻吩基”包括2-或3-噻吩基。

[0112] 术语“氧代”是指碳原子和氧原子化合形成的羰基基团。

[0113] 术语“前药”指作为在向受试对象施用后在体内通过化学或生理过程(例如,被置于生理pH条件下或通过酶的活性)释放药物的药物前体的化合物。在ACS Symposium Series vol. 14中T. Higuchi和W. Stella所著的“Prodrugs as Novel Delivery Systems”以及Edward B. Roche所著的Bioreversible Carriers in Drug Design, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987中提供了前药合成和使用的讨论,本文通过参考引用了上述两者。术语“前药”可包括本发明的化合物的代谢前体。所述前药在向受试对象施用时可以为非活性的,但在体内被转化为本发明的化合物。所述前药可以是天然存在的化合物或合成化合物。

[0114] 在某些实施方式中,本发明包括了可以在体内被转化为3,5,7-三羟基-2-(4-羟基苯基)-8-(3-甲基丁-2-烯基)-4H-色烯-4-酮、3,5,7-三羟基-2-(4-甲氧基苯

基)-8-(3-甲基丁-2-烯基)-4H-色烯-4-酮、3,5,7-三羟基-8-(3-羟基-3-甲基丁基)-2-(4-羟基苯基)-4H-色烯-4-酮或3,5,7-三羟基-8-(3-羟基-3-甲基丁基)-2-(4-甲氧基苯基)-4H-色烯-4-酮的前药。在本发明中包括了这些前药及其体内代谢物。

[0115] 本发明的前药的实例包括但不限于下列化合物：

[0116] 3-[(6-脱氧-a-L-吡喃甘露糖基)氧基]-7-(b-D-吡喃葡萄糖氧基)-5-羟基-2-(4-甲氧基苯基)-8-(3-甲基-2-丁烯基)-4H-1-苯并吡喃-4-酮；

[0117] 7-(b-D-吡喃葡萄糖氧基)-3,5-二羟基-2-(4-甲氧基苯基)-8-(3-甲基-2-丁烯基)-4H-1-苯并吡喃-4-酮；

[0118] 3-[(6-脱氧-a-L-吡喃甘露糖基)氧基]-5,7-二羟基-2-(4-甲氧基苯基)-8-(3-甲基-2-丁烯基)-4H-1-苯并吡喃-4-酮；

[0119] 3-[[4-O-乙酰基-3-O-(6-O-乙酰基-b-D-吡喃葡萄糖基)-6-脱氧-a-L-吡喃甘露糖基]氧基]-7-(b-D-吡喃葡萄糖氧基)-5-羟基-2-(4-甲氧基苯基)-8-(3-甲基-2-丁烯基)-4H-1-苯并吡喃-4-酮；

[0120] 3-[(6-脱氧-2-O-b-D-吡喃葡萄糖基-a-L-吡喃甘露糖基)氧基]-5,7-二羟基-2-(4-甲氧基苯基)-8-(3-甲基-2-丁烯基)-4H-1-苯并吡喃-4-酮；

[0121] 2-[4-[(6-脱氧-a-L-吡喃甘露糖基)氧基]苯基-3,5,7-三羟基-8-(3-甲基-2-丁烯基)-4H-1-苯并吡喃-4-酮；

[0122] 3,5-二羟基-2-(4-甲氧基苯基)-8-(3-甲基丁-2-烯基)-7-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟基甲基)环氧乙烷-2-基]氧基-色烯-4-酮；

[0123] 3-[(2S,3R,4R,5S,6S)-4,5-二羟基-6-甲基-3-[(2S,3R,4R,5S,6S)-3,4,5-三羟基-6-甲基-环氧乙烷-2-基]氧基-环氧乙烷-2-基]氧基-5-羟基-2-(4-甲氧基苯基)-8-(3-甲基丁-2-烯基)-7-[(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟基甲基)环氧乙烷-2-基]氧基-色烯-4-酮；

[0124] 在本发明中包括了上面所列前药及其体内代谢物。

[0125] 短语“可药用”表示指定载体、载剂、稀释剂、赋形剂和/或盐通常与构成所述制剂的其它成分是化学和/或物理相容的，且与其接受对象是生理相容的。

[0126] 术语“盐”和“可药用盐”指式(I)的化合物或其立体异构体或前药的有机盐或无机盐。这些盐可以在化合物的最后分离和纯化时原位制备，或通过将式(I)的化合物或其立体异构体或前药独立地与合适的有机或无机的酸或碱反应并分离因此所形成的盐来制备。代表性盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、硝酸盐、乙酸盐、草酸盐、苯磺酸盐、软脂酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、硼酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲苯磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘二甲酸盐、甲磺酸盐、葡庚糖酸盐、乳糖酸盐和十二烷基磺酸盐以及类似物。这些盐也可包括基于碱金属和碱土金属的阳离子，诸如钠、锂、钾、钙、镁等等，以及无毒的铵离子、季铵离子和胺阳离子，包括但不限于铵、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等等。更多实例参见例如，本文通过参考引用的 Berge 等, J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977)。

[0127] 式(I)的化合物的盐可以通过将式(I)的化合物溶液与所需酸或碱适当的混合从而容易地制备。所述盐可从溶液中析出并通过过滤收集或可通过蒸发溶剂来回收。

[0128] 术语“取代的”是指分子中的氢原子已被不同原子或分子替代。替代氢原子的所述原子或分子称作“取代基”。

[0129] 式 (I) 的化合物可以包含不对称或手性中心,从而以不同立体异构形式存在。可预期的是,所有式 (I) 的化合物的立体异构形式及其混合物,包括外消旋混合物构成本发明的一部分。此外,也设想了所有的几何和位置异构体。例如,如果式 (I) 的化合物含有双键,则顺式和反式两种形式及其混合物也都包括在本发明的范围内。

[0130] 非对映异构混合物可以通过本领域普通技术人员熟知的方法(如色谱和/或分级结晶)基于它们的物理化学差异来分离为它们的各个非对映异构体。对映异构体可以通过将对映异构混合物经与合适的光学活性化合物反应来转化为非对映异构混合物,分离非对映异构体并将各个非对映异构体转化(例如,水解)为相应的纯对映异构体而得到分离。另外,某些式 (I) 的化合物可以为阻转异构体(例如,取代联芳烃)且也认作本发明的一部分。

[0131] 式 (I) 的化合物可以以非溶剂化形式或与诸如水、乙醇等等可药用溶剂的溶剂化形式存在,且可预期的是本发明包括所有溶剂化和非溶剂化的形式。

[0132] 式 (I) 的化合物还可以作为处于平衡中的互变异构体存在,且所有这些形式都包括在本发明的范围内。

[0133] 在某些实施方式中,提供了同位素标记的式 (I) 的化合物,所述同位素标记化合物与本文中所列化合物相同,但一个或多个原子被具有与通常发现于自然界的原子质量或质量数不相同的原子质量或质量数的原子所替代。可以引入式 (I) 的化合物中的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、氟和氯的同位素,分别诸如  $^2\text{H}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{31}\text{P}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{18}\text{F}$  和  $^{36}\text{Cl}$ 。含有上述同位素和/或其它原子的其它同位素的式 (I) 的化合物及其立体异构体和前药,以及所述化合物、立体异构体或前药的可药用盐预期包括在本发明的范围内。

[0134] 某些同位素标记的式 (I) 的化合物,例如引入了诸如  $^3\text{H}$  和  $^{14}\text{C}$  的放射性同位素的化合物,可用于化合物和/或底物组织分布分析。氚(即  $^3\text{H}$ ) 和碳-14(即  $^{14}\text{C}$ ) 同位素因其相对容易制备和易于检测而特别优选。另外,诸如氘(即  $^2\text{H}$ ) 的较重同位素的可由于更高的代谢稳定性(如增加的体内半衰期或减少的剂量要求)从而提供某些治疗优势,因此可在某些情况下优选。所述同位素标记的式 (I) 的化合物一般可用本领域普通技术人员已知的方法诸如用同位素标记的试剂替代非同位素标记的试剂来制备。

[0135] 使用方法

[0136] 在某些实施方式中,本发明的化合物是 ER- $\alpha$  36 的选择性调控剂,并可用于调控体外和体内细胞内的 ER- $\alpha$  36 功能。所述化合物还可用于预防和/或治疗与 ER- $\alpha$  36 功能相关的疾病。在某些实施方式中,本发明的化合物可诱导细胞死亡和/或抑制细胞增殖并因此可用于预防和/或治疗与异常细胞增殖相关的疾病。在某些实施方式中,本发明的化合物可用于预防和/或治疗哮喘和其它呼吸系统疾病。

[0137] 在某些实施方式中,提供了调控细胞中 ER- $\alpha$  36 功能的方法,所述方法包括将表达 ER- $\alpha$  36 的细胞暴露于式 (I) 的化合物。所述细胞可以通过基因工程来内源性或外源地表达 ER- $\alpha$  36。在一个实施方式中,所述细胞内源地表达 ER- $\alpha$  36。在优选实施方式中,所述细胞是内源地表达 ER- $\alpha$  36 的癌细胞。表达 ER- $\alpha$  36 的癌细胞实例为乳腺癌细胞、白血病细胞、肺癌细胞、骨髓瘤细胞、前列腺癌细胞、卵巢癌细胞、结肠癌细胞和胃癌细胞。

在更优选的实施方式中,所述表达 ER- $\alpha$  36 的细胞是内源地表达 ER- $\alpha$  36 的乳腺癌细胞。表达 ER- $\alpha$  36 的乳腺癌细胞实例为 MCF7 和 MDA-MB-231 细胞。内源性 ER- $\alpha$  36 的表达可以通过用一种或多种试剂处理而增加或减少。这些试剂的实例为血清、E2 $\beta$  (17 $\beta$ -雌二醇)、他莫昔芬和 ICI 182,780。

[0138] 在另一实施方式中,细胞经基因工程改变以表达外源性 ER- $\alpha$  36。表达外源性 ER- $\alpha$  36 的细胞可用本领域普通技术人员已知的基因工程方法制备(参见 Sambrook 等, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2dEd. 1989) (Cold Spring Harbor Laboratory))。简言之,制备外源性 ER- $\alpha$  36 基因并将其嵌入表达载体中,将所述表达载体转染到寄主细胞内,所述寄主细胞在适于表达所述外源性 ER- $\alpha$  36 的培养溶液中生长。人 ER- $\alpha$  36 的基因序列实例公开在 Wang 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 1023-1027 (2005) (GenBank 登录号 BX640939)。表达外源性 ER- $\alpha$  36 的细胞可以表达或不表达内源性 ER- $\alpha$  36。细胞中内源性或外源性 ER- $\alpha$  36 的表达水平可以通过用一种或多种其它试剂处理而增加或减少。这些试剂的实例为血清、E2 $\beta$  (17 $\beta$ -雌二醇)、他莫昔芬和 ICI 182,780。

[0139] 表达 ER- $\alpha$  36 的细胞可以表达或不表达诸如 ER- $\alpha$  66、ER- $\alpha$  46 和 ER- $\beta$  的其它雌激素受体。

[0140] 在某些实施方式中,提供了预防和/或治疗受试对象内与 ER- $\alpha$  36 相关的疾病的方法,所述方法包括对所述受试对象施用包含式 (I) 化合物的药物组合物。与 ER- $\alpha$  36 相关的疾病的实例包括但不限于骨质流失、骨折、骨质疏松、转移性骨病、帕哲氏病、牙周病、软骨退变、子宫内膜异位症、子宫肌瘤病、潮热、LDL 胆固醇水平升高、心血管病、认知功能障碍、大脑退行性病变、术后再狭窄、男性乳房发育症、血管平滑肌细胞增殖、肥胖、尿失禁、焦虑、雌激素缺乏造成的抑郁、围绝经期抑郁、产后抑郁、经前期综合征、躁郁、焦虑、痴呆、强迫症、注意力不足症、睡眠障碍、易怒、冲动、免疫缺陷、自身免疫性疾病、愤怒控制、多发性硬化症和帕金森症、炎症、炎症性肠病、呼吸系统疾病、性功能障碍、高血压、视网膜变性、哮喘和癌症。优选的是,与 ER- $\alpha$  36 相关的疾病包括骨质流失、骨折、骨质疏松、绝经、经前期综合征、子宫内膜异位症、子宫疾病、阳痿、性功能障碍、LDL 胆固醇水平升高、心血管病、血管平滑肌细胞增殖、雌激素缺乏造成的抑郁、围绝经期抑郁、产后抑郁、免疫缺陷、自身免疫性疾病、炎症、哮喘和癌症。更优选的是,与 ER- $\alpha$  36 相关的疾病包括骨质流失、骨质疏松、阳痿、心血管病、免疫缺乏、炎症、哮喘和癌症。所述受试对象可以为哺乳动物,如狗、猫、牛、羊、马或人,优选人。所述方法的必需治疗量根据具体疾病不同而变化并且可由获益于本公开的本领域普通技术人员容易地确定。

[0141] 在某些实施方式中,提供了诱导细胞死亡的方法,所述方法包括将细胞暴露于有效量的式 (I) 的化合物。另外,本发明的某些实施方式提供了抑制细胞增殖的方法,所述方法包括将细胞暴露于有效量的式 (I) 的化合物。所述细胞可以正常或异常生长。异常细胞生长可以为良性或恶性的。在一个实施方式中,所述细胞为癌细胞。在优选的实施方式中所述癌症为肛门癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、肠癌(结肠癌、直肠癌)、脑癌、乳腺癌、类癌、宫颈癌、内分泌癌、子宫内膜癌、眼癌、胆囊癌、头颈部癌、卡波济肉瘤癌、肾癌、喉癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、骨髓瘤、神经内分泌癌、食管癌、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、前列腺癌、皮肤癌、软组织肉瘤癌、脊髓癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、阴道癌、外阴癌或

子宫癌。在更优选的实施方式中,所述癌症为乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、白血病、肝癌、肺癌、骨髓瘤、卵巢癌、前列腺癌、胃癌或子宫癌。在更加优选的实施方式中,所述癌症为乳腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、肺癌、子宫癌或前列腺癌。在某些实施方式中,所述细胞可以内源性或外源地表达雌激素受体,尤其是 ER- $\alpha$  36。在优选的实施方式中,所述细胞内源地表达 ER- $\alpha$  36。

[0142] 用于诱导细胞死亡和 / 或细胞增殖的式 (I) 的化合物的有效量根据具体细胞类型和治疗条件的不同而变化。该有效量可由享有本公开的益处的本领域普通技术人员容易地确定。在一个实施方式中,细胞暴露于的式 (I) 的化合物的有效量为至少约  $5 \mu\text{M}$  的浓度。在另一个实施方式中,细胞暴露于的式 (I) 的化合物的浓度在约  $5 \mu\text{M}$ - $100 \mu\text{M}$  范围内。优选的是,所述有效量是在约  $5 \mu\text{M}$ - $50 \mu\text{M}$  或约  $5 \mu\text{M}$ - $30 \mu\text{M}$  或约  $5 \mu\text{M}$ - $25 \mu\text{M}$  或约  $5 \mu\text{M}$ - $20 \mu\text{M}$  或约  $5 \mu\text{M}$ - $10 \mu\text{M}$  范围内的化合物浓度。

[0143] 在某些实施方式中,提供了预防和 / 或治疗受试对象中与异常细胞增殖相关的疾病的方法,所述方法包括对受试对象施用治疗有效量的包含式 (I) 化合物的药物组合物。

[0144] 所述异常细胞增殖可为良性细胞生长或癌性的。在一个实施方式中,所述与异常细胞增殖相关的疾病是癌症。在优选的实施方式中,所述癌症是肛门癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、肠癌 (结肠癌、直肠癌)、脑癌、乳腺癌、类癌、宫颈癌、内分泌癌、子宫内膜癌、眼癌、胆囊癌、头颈部癌、卡波济肉瘤癌、肾癌、喉癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑色素癌、间皮癌、骨髓瘤、神经内分泌癌、食管癌、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、前列腺癌、皮肤癌、软组织肉瘤癌、脊髓癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、阴道癌、外阴癌或子宫癌。在更优选的实施方式中,所述癌症是乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、白血病、肝癌、肺癌、骨髓瘤、卵巢癌、前列腺癌、胃癌或子宫癌。在更加优选的实施方式中,所述癌症是乳腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、肺癌、子宫癌或前列腺癌。

[0145] 在某些实施方式中,提供了预防和 / 或治疗受试对象中哮喘和其它呼吸系统疾病的方法,所述方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的包含式 (I) 化合物的药物组合物。哮喘指可逆性气流阻塞的气道炎症。其它呼吸系统疾病可包括呼吸道和肺功能障碍诸如支气管炎、囊性纤维化、肺气肿、肺炎、鼻炎和鼻窦炎。

[0146] 所述受试对象优选的是哺乳动物。在一个实施方式中,所述哺乳动物是狗、猫、牛、羊、马或人。在优选的实施方式中,所述哺乳动物是人。

[0147] 式 (I) 的化合物可以通过任何能使所述化合物输送到作用位点的方法来施用于受试对象。这些方法包括但不限于口服施用、经口腔施用、舌下施用、经眼施用、局部施用 (topical) (例如,透皮施用)、肠胃外施用 (例如,静脉施用、肌肉施用、或皮下施用、血管内施用或输注)、经直肠施用、脑池内施用、阴道内施用、腹腔内施用、膀胱内施用或经鼻施用方法。

[0148] 式 (I) 的化合物可以以每日约  $0.1\text{mg}$ -约  $3,000\text{mg}$  范围内的剂量水平施用于受试对象,优选的是约  $0.1\text{mg}/\text{日}$ -约  $1,000\text{mg}/\text{日}$ ,或约  $1\text{mg}/\text{日}$ -约  $500\text{mg}/\text{日}$ ,或约  $1\text{mg}/\text{日}$ -约  $300\text{mg}/\text{日}$ ,或约  $10\text{mg}/\text{日}$ -约  $300\text{mg}/\text{日}$ ,或约  $10\text{mg}/\text{日}$ -约  $200\text{mg}/\text{日}$ ,或约  $20\text{mg}/\text{日}$ -约  $200\text{mg}/\text{日}$ ,或约  $30\text{mg}/\text{日}$ -约  $200\text{mg}/\text{日}$ ,或约  $40\text{mg}/\text{日}$ -约  $200\text{mg}/\text{日}$ ,或约  $50\text{mg}/\text{日}$ -约  $200\text{mg}/\text{日}$ ,或约  $50\text{mg}/\text{日}$ -约  $100\text{mg}/\text{日}$ 。对于体重约  $70\text{kg}$  的正常成年人,每  $\text{kg}$  体重约  $0.01\text{mg}$ -约  $100\text{mg}$  范围内的剂量通常足够,且优选的是约  $0.1\text{mg}/\text{kg}$ -约  $100\text{mg}/\text{kg}$ ,或

约 0.5mg/kg- 约 100mg/kg, 或约 1mg/kg- 约 100mg/kg, 或约 1mg/kg- 约 75mg/kg, 或约 1mg/kg- 约 50mg/kg, 或约 1mg/kg- 约 25mg/kg, 或约 1mg/kg- 约 10mg/kg, 或约 2mg/kg- 约 5mg/kg。然而, 一般剂量范围可能需要一些变化, 这取决于受治疗的受试对象的年龄和质量、预期施用途径、具体施用化合物等等。获益于本公开的本领域普通技术人员有能力确定用于具体哺乳动物受试对象的剂量范围和最佳剂量。

[0149] 在某些实施方式中, 本发明的一种或多种化合物可以彼此联合使用。任选的是, 本发明的化合物可以与任何其它用于调控细胞功能或治疗疾病的活性试剂联合使用。如果使用活性化合物的组合, 则它们可同时、分别或依次地施用。

[0150] 在某些实施方式中, 本发明的化合物可以与一种或多种其它抗癌剂联合使用。适合的抗癌剂包括但不限于烷基化剂、氮芥、叶酸拮抗剂、嘌呤拮抗剂、嘧啶拮抗剂、纺锤体毒素、拓扑异构酶抑制剂、凋亡诱导剂、血管生成抑制剂、鬼臼毒素、亚硝基脲、抗代谢物、蛋白合成抑制剂、激酶抑制剂、抗雌激素、顺铂、卡铂、干扰素、天冬酰胺酶、亮丙瑞林、氟他胺、甲地孕酮、丝裂霉素、博来霉素、阿霉素、依立替康和紫杉醇。在一个实施方式中, 所述抗癌剂是诸如他莫昔芬和 ICI 182,780 的抗雌激素。

[0151] 本发明的化合物可以用表达外源性 ER- $\alpha$  36 的重组细胞来检测其诱导细胞死亡或抑制细胞增殖的能力。为了制备所述重组细胞, 制备外源性 ER- $\alpha$  36 基因并将其嵌入表达载体中, 然后用所述表达载体转染不表达或低水平表达内源性 ER- $\alpha$  36 的宿主细胞, 然后选出稳定转染的宿主细胞作为用于所述检测试验的重组细胞。所述重组细胞在有本发明的化合物或没有本发明的化合物的情况下温育。比较在使用或不用本发明的化合物处理的试验中存活的细胞数。当在用所述测试化合物处理的试验中存活的细胞数低于不用所述测试化合物处理的试验中存活的细胞数时, 所述测试化合物可以诱导细胞死亡和 / 或抑制细胞增殖。

[0152] 上面所讨论的重组细胞还可用于检测本发明的化合物调控 ER- $\alpha$  36 功能的能力。在相同条件下用所述检测化合物处理表达外源性 ER- $\alpha$  36 的重组细胞和未转染的宿主细胞。使用本领域普通技术人员已知的方法观察并分析所关注的 ER- $\alpha$  36 功能。所述功能包括但不限于诸如丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK/ERK) 途径或 Jun NH<sub>2</sub> 端激酶 (JNK) 途径的活化的 ER- $\alpha$  36 刺激其下游信号传导途径的能力。

[0153] 药物组合物

[0154] 在本发明的方法的某些实施方式中, 式 (I) 的化合物或其立体异构体或前药, 或所述化合物、立体异构体或前药的可药用盐可以以包含可药用载体、载剂或稀释剂的药物组合物的形式来进行施用。于是, 式 (I) 的化合物或其立体异构体或前药、或所述化合物、立体异构体或前药的可药用盐可以以任何传统剂型分别或一起对受试对象施用, 所述剂型包括口服剂型、经口腔剂型、舌下剂型、经眼剂型、局部剂型、肠胃外剂型、经直肠剂型、脑池内剂型、阴道内剂型、腹腔内剂型、膀胱内剂型、局域剂型 (例如, 粉末剂、软膏剂或滴剂) 或经鼻剂型。

[0155] 适用于肠胃外注射的药物组合物可以包括可药用无菌水溶液或非水溶液、分散液、悬浮液或乳液, 以及用于即时复水为无菌可注射性溶液或分散液的无菌粉末。适合的水性或非水性载体、载剂和稀释剂包括水、乙醇、多元醇 (诸如丙二醇、聚乙二醇、甘油等等)、上述物质的适当混合物、植物油 (诸如橄榄油) 和可注射性有机酯诸如油酸乙酯。通过例

如使用诸如卵磷脂的包衣、在分散液的情形中保持必需的颗粒大小、以及使用表面活性剂可以保持适当的流动性。

[0156] 在某些实施方式中,本发明的药物组合物还可包含佐剂,诸如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。对所述组合物受微生物污染的预防可以由各种抗菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等等来完成。另外理想的是包含例如糖、氯化钠等等的等渗剂。可注射的药物组合物的延长吸收可受到使用例如单硬脂酸铝和明胶的能延缓吸收的试剂的影响。

[0157] 口服施用的固体剂型可包括胶囊剂、片剂、粉末剂和颗粒剂。在这些固体剂型的某些实施方式中,活性化合物与至少一种惰性传统药物赋形剂(或载体)诸如柠檬酸钠或磷酸氢钙,或(a)填料或增量剂,例如,淀粉、乳糖、蔗糖、甘露醇或硅酸;(b)粘合剂,例如,羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖或阿拉伯胶;(c)保湿剂,例如,甘油;(d)崩解剂,例如,琼脂、碳酸钙、土豆淀粉或木薯淀粉、海藻酸、某些复合硅酸盐或碳酸钠;(e)溶液缓凝剂,例如,石蜡;(f)吸收促进剂,例如季铵盐化合物;(g)润湿剂,例如,十六醇或甘油单硬脂酸酯;(h)吸附剂,例如,高岭土或膨润土;和/或(i)润滑剂,例如,滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠或上述物质的混合物进行共混。在胶囊剂和片剂的情形中,剂型可另外包含缓冲剂。

[0158] 在某些实施方式中,固体剂型可与充当释放速率修饰剂的其他赋形剂一起配制为包含诸如上文详述的用于立即释放剂型的那些赋形剂的缓释剂型和脉冲释放剂型,所述其他赋形剂被涂覆于装置体之上和/或包括在装置体之中。释放速率修饰剂包括但不限于羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、乙基纤维素、醋酸纤维素、聚氧化乙烯、黄原胶、聚甲基丙烯酸铵酯、氢化蓖麻油、巴西棕榈蜡、石蜡、邻苯二甲酸醋酸纤维素、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素、甲基丙烯酸共聚物以及上述物质的混合物。缓释剂型和脉冲释放剂型可以含有一种释放速率修饰赋形剂或释放速率修饰赋形剂的组合。

[0159] 在某些实施方式中,本发明的药物组合物可另外包含快速分散或快速溶解剂型(FDDF),所述FDDF含有下列成分:阿斯巴甜、乙酰磺胺酸钾、柠檬酸、交联甲羧纤维素钠、交联聚乙烯吡咯烷酮、二聚抗坏血酸、丙烯酸乙酯、乙基纤维素、明胶、羟丙基甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露醇、甲基丙烯酸甲酯、薄荷香料、聚乙二醇、熏硅、二氧化硅、羧甲基淀粉钠、硬脂酰富马酸钠、山梨醇、木糖醇。本文用于描述FDDF的术语分散或溶解取决于所用药物的溶解度,即当所述药物不溶时,可制备快速分散剂型,而当所述药物可溶时,可制备快速溶解剂型。

[0160] 相似类型的固体组合物也可在软填充或硬填充明胶胶囊中用作填料,所述胶囊使用诸如乳糖或奶糖以及高分子量聚乙二醇和类似物质的辅料。

[0161] 在某些实施方式中,固体剂型诸如片剂、糖衣丸剂、胶囊剂和颗粒剂可以制成带包衣和外壳,诸如肠溶衣和其它本领域普通技术人员熟知的包衣和外壳。所述固体剂型还可包含遮光剂,并且也可含有以延迟、持续或受控方式释放活性化合物的组合物。可采用的包埋组合物的实例是聚合物和蜡。所述活性化合物也可具有包含一种或多种上述赋形剂(如果合适的话)的微胶囊化形式。

[0162] 在某些实施方式中,用于口服施用的液体剂型包括可药用乳液剂、溶液剂、悬浮剂、糖浆剂和酏剂。除活性化合物以外,所述液体剂型可包含本领域常用的惰性稀释剂,诸

如水或其它溶剂、增溶剂和 / 或乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油类(特别是棉籽油、花生油、玉米胚芽油、橄榄油、蓖麻油或芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇或脱水山梨醇脂肪酸酯,或这些物质的混合物,等等。

[0163] 除这些惰性稀释剂以外,所述药物组合物也可包括佐剂,诸如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、增味剂和增香剂。所述药物组合物还可包括悬浮剂,例如,乙氧基化异十八醇、聚氧乙烯山梨醇酯和聚氧乙烯脱水山梨醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄芪胶,或上述物质的混合物等等。

[0164] 在某些实施方式中,还可将本发明的药物组合物配置用于兽医用途的治疗中,其中本发明的化合物、或其可兽医药用盐、或其可兽医药用溶剂化物或前药根据普通兽医实践来作为适合的可用配方用药并且所述兽医实践者将确定对特定动物最适当的给药方案和施用途径。

[0165] 如果以活性剂的组合来用药,则它们可以同时、分开或依次用药。

[0166] 式(I)的化合物可以通过遵循现有技术以及用其它传统有机制备方法来制备(Yu, L. J. ;Hu, Y. Z. China Pharm. J. 2005, 40, 1029 和本文引用的参考文献。Nikaido, T. ;Ohmoto, T. ;Kinoshita, T. ;Sankawa, U. ;Monache, F. D. ;Botta, B. ;Tomimori, T. ;Miyachi, Y. ;Shirataki, Y. ;Yokoe, I. ;Komatsu, M. Chem. Pharm. Bull. 1989, 37, 1392 和本文引用的参考文献)。

[0167] 实施例

[0168] 下列实施例是对本发明的进一步说明,但不应理解为对本发明的范围的限制。

[0169] 实施例 1. ER- $\alpha$  变体在人乳腺癌试样中的表达

[0170] 预先印迹了人乳腺癌组织的膜购自 ProSci 公司 (Poway, CA)。所述膜用特异性识别 ER- $\alpha$  36 的抗 ER- $\alpha$  36 抗体和 HRP 共轭第二抗体进行检测,并用增强化学发光 (ECL) 检测剂 (Amersham Pharmacia Biotech) 进行显像。将同样的膜剥离用识别 ER- $\alpha$  所有三种亚型——ER- $\alpha$  66、ER- $\alpha$  46 和 ER- $\alpha$  36 的抗雌激素受体 - $\alpha$  抗体 H222 (Novocastra Laboratories Ltd, UK) 进行检测。图 1 显示了 ER- $\alpha$  66、ER- $\alpha$  46 和 ER- $\alpha$  36 没有在正常乳腺组织中表达 (道 1) 但在浸润性导管癌的一个试样 (道 2)、浸润性小叶癌的一个试样 (道 5) 和非侵袭性导管癌 (道 7) 中表达。另外, ER- $\alpha$  36 在侵袭性导管癌 (道 4) 和浸润性小叶癌的另一试样 (道 6) 中表达。道 2 和道 3 分别来自 2 个不同患者的浸润性导管癌。道 5 和道 6 分别来自 2 个不同患者的浸润性小叶癌。此结果表明 ER- $\alpha$  36 在正常乳腺组织中不表达但在不表达 ER- $\alpha$  66 和 ER- $\alpha$  46 的 ER 阴性乳腺癌样本中表达。

[0171] 实施例 2. ER- $\alpha$  36 在 ER 阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 中表达

[0172] 众所周知 MDA-MB-231 细胞系缺乏 ER- $\alpha$  66 和 ER- $\alpha$  46 (Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. Marc Lacroix, Guy Leclercq, Brest Cancer Research and Treatment 83:249-289 (2004))。MDA-MB-231 细胞来自美国菌种保藏中心 (ATCC)。MDA-MB-231 细胞在 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 气氛的 8 孔 BIOCOAT 室玻片 (BD Science Discovery Labware) 上的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM) 和 10% 胎牛血清中生长 12 小时。然后所述细胞用无菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 2 次,并在室温用 4% 低聚甲醛的 PBS (pH 7.4) 溶液固定 30 分钟。其后,所述细胞用 PBS 冲洗,并用 0.5% (体积 / 体积) Triton X-100 透化 10 分钟。所述细胞再用 PBS 冲洗,并用 3% 血清的 PBS 溶液在室

温下阻断 1 小时。所述室玻片与 ER- $\alpha$  36 特异性抗体或与结合到该抗体的免疫原多肽预温育了 30 分钟,相同抗体在室温下温育 1 小时并用含 0.5% Triton X-100 的 PBS(PBST) 冲洗 3 次,然后与异硫氰酸荧光素 (FITC) 共轭第二抗体温育。最后,所述玻片用 PBST 冲洗 3 次,PBS 冲洗 1 次,然后覆以抗褪色培养基 (Molecular Probes,Eugene,OR) 并在 NikonE600 显微镜下检测并通过 MRC-1024 共聚焦成像系统 (Bio-Rad) 采集图像。图 2(上图) 显示了 MDA-MB-231 细胞被抗 ER- $\alpha$  36 抗体阳性染色。和与所述免疫原多肽预温育的相同抗体的温育没有显示任何染色(图 2,下图),表明所述抗体的特异性。

[0173] 实施例 3. 淫羊藿素诱导 ER 阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中的细胞死亡

[0174] 将 MDA-MB-231 细胞保持在 37°C,5% CO<sub>2</sub> 气氛中的 DMEM 和 10% 胎牛血清中。所述细胞以每个 60mm 皿中  $1 \times 10^5$  个细胞的密度点板。用溶于 DMSO 中浓度为 0、1  $\mu$ M、5  $\mu$ M 和 10  $\mu$ M 的淫羊藿素处理 MDA-MB-231 细胞。淫羊藿素购自上海友思生物技术有限公司。处理后的细胞在 Nikon TS100 倒置显微镜下检测并对形态变化照相。图 3 显示当用 10  $\mu$ M 的淫羊藿素处理后,所述细胞表现出凋亡细胞的特征并且存活细胞数显著减少。

[0175] 另外,用浓度为 0.5  $\mu$ M、10  $\mu$ M、20  $\mu$ M、30  $\mu$ M、40  $\mu$ M 和 50  $\mu$ M 的他莫昔芬、ICI 182,780、木犀草素、淫羊藿素处理 MDA-MB-231 细胞以检测这些化合物对 MDA-MB-231 细胞生长的影响。他莫昔芬和木犀草素购自 Sigma, St. Louis, MO.; ICI 182,780 购自 Tocris Bioscience, Ellisville, MO。这些化合物溶解于 DMSO 中。将所述 MDA-MB-231 细胞以每 60mm 皿 500 细胞进行分种并分别与不同化合物温育 10 天。在所述化合物处理下存活的细胞形成了细胞群落。对所述细胞群落用 0.5mL 0.02% 结晶紫、20% 乙醇、0.74% 甲醛和 80% H<sub>2</sub>O 染色 10 分钟。在光学显微镜下对染色的群落计数。图 4 显示了经 5  $\mu$ M 淫羊藿素、木犀草素、他莫昔芬或 ICI 182,780 处理后 MDA-MB-231 细胞群落的数量减少。经 10  $\mu$ M 淫羊藿素或他莫昔芬处理后 MDA-MB-231 细胞群落的数量进一步减少至接近于 0。当用木犀草素处理时,在浓度 40  $\mu$ M 时 MDA-MB-231 细胞群的数量减至接近于 0。然而,当用 ICI 182,780 处理时,在浓度 50  $\mu$ M 时所述细胞群的数量仍保持高水平。

[0176] 实施例 4. 淫羊藿素诱导 ER 阳性乳腺癌 MCF7 细胞中的细胞死亡

[0177] MCF7 细胞系是强表达 ER- $\alpha$  66、ER- $\alpha$  46 和 ER- $\alpha$  36 的乳腺癌细胞系 (Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours :anupdate. Marc Lacroix, Guy Leclercq, Brest Cancer Research and Treatment (2004) 83, 249-289 ;Wang 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103 :9063-9068 (2006))。将来自 ATCC 的 MCF7 细胞保持在 37°C,5% CO<sub>2</sub> 气氛中的添加了 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基 (Invitrogen) 中。对所述 MCF7 细胞用浓度为 0-25  $\mu$ M 的他莫昔芬、ICI 182,780、木犀草素和淫羊藿素处理 10 天以检测这些化合物对 MCF7 细胞生长的影响。所述实验用与上述实施例 3 中图 4 的实验相同的方法进行。图 5a 显示了他莫昔芬、木犀草素和淫羊藿素随着它们的浓度升高明显减少了 MCF7 细胞群的数量。ICI 182,780 即使在 25  $\mu$ M 下仍仅诱导细胞群落的有限减少。

[0178] 在另一实验中,分别用淫羊藿素、IC 163 和 Y4 处理 MCF7 细胞以比较这些化合物对 MCF7 细胞生长的影响。IC 163 和 Y4 购自上海友思生物技术有限公司。将所述 MCF7 细胞以每个 100-mm 皿中  $1 \times 10^5$  细胞的密度点板并用浓度为 0-25  $\mu$ M 的每个化合物处理 2 周。使用血细胞计数器对存活细胞数进行计数。对于每个浓度值对 5 个皿的细胞进行计数。图 5b 显示了每个化合物在浓度为 5  $\mu$ M 及以上时明显减少了存活的 MCF7 细胞数。

[0179] 实施例 5. 淫羊藿素在过表达 ER- $\alpha$  36 的 MCF7 细胞和抗他莫昔芬 MCF7 细胞中诱导细胞死亡

[0180] 过表达 ER- $\alpha$  36 的 MCF7 细胞通过用 ER- $\alpha$  36 表达载体稳定转染 MCF7 细胞而制得。所述 ER- $\alpha$  36 表达载体通过将 1.1-kb 的 ER- $\alpha$  36cDNA 片段从 pBluescript 质粒克隆到哺乳动物表达载体 pCB6+ 中来构建,如前所述 (Wang 等,2005, BBRC, 336 :1023-1027)。所构建的 ER- $\alpha$  36 表达载体含有巨细胞病毒 (CMV) 早期启动子。使用 FuGene6 转染试剂 (RocheMolecular Biochemicals) 将所述 ER- $\alpha$  36 表达载体转染到 MCF7 细胞。转染后 48 小时,将所述细胞重新点板并用 500  $\mu$ g/mL G418 (Invitrogen) 选取约 2 周直至出现细胞群落。然后将所述克隆体汇集并培养以通过蛋白免疫印迹分析确认 ER- $\alpha$  36 的表达。

[0181] 抗他莫昔芬 MCF7 细胞通过将 MCF7 细胞在含 5  $\mu$ M 他莫昔芬的培养基中温育 3 个月而制得。将 3 个月后仍存活的 MCF7 细胞汇集并进一步培养为抗他莫昔芬 MCF7 细胞。蛋白免疫印迹分析表明这些细胞高度表达了 ER- $\alpha$  36 (数据未示出)。

[0182] 将所述细胞系保持在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 气氛中的添加了 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中。将细胞以每个 100-mm 皿中  $1 \times 10^5$  细胞的密度点板并用浓度 0-10  $\mu$ M 的淫羊藿素处理 2 周。对 2 周后的存活细胞数计数。对于每个浓度值对 5 个皿的细胞进行计数。图 6 显示在淫羊藿素为 5  $\mu$ M 时,所有 3 种类型细胞的生长都被明显的抑制,且在过表达 ER- $\alpha$  36 的 MCF7 细胞和抗他莫昔芬 MCF7 细胞中的抑制要强于在 MCF7 细胞中的抑制。在 10  $\mu$ M 时,淫羊藿素将所有 3 种类型的细胞数量减少至接近于 0。

[0183] 实施例 6. 正常乳腺上皮细胞生长不受淫羊藿素影响

[0184] 正常乳腺上皮细胞 MCF 10A 来自 Karmanos Cancer Institute, Detroit, MI。这些 MCF10A 细胞不表达任何 ER 同工型, ER- $\alpha$  36、ER- $\alpha$  46 和 ER- $\alpha$  66。将所述 MCF10A 细胞保持在 37 $^{\circ}$ C, 10% CO<sub>2</sub> 气氛中的添加了 5% 马血清、L- 谷氨酰胺 (2mM)、青霉素 (100U/mL)、链霉素 (100  $\mu$ g/mL)、氢化可的松 (0.5  $\mu$ g/mL)、胰岛素 (10  $\mu$ g/mL)、EGF (2ng/mL)、霍乱毒素 (0.1  $\mu$ g/mL) 和两性霉素 B (0.5  $\mu$ g/mL) 的 DMEM/F12 培养基中。将所述 MCF10A 细胞以每个 100-mm 皿中  $1 \times 10^5$  细胞的密度点于分别含 0、20  $\mu$ M 和 50  $\mu$ M 淫羊藿素的板上 2 周。然后所述细胞在 Nikon TS100 倒置显微镜下检测并对形态变化照相。图 7 显示了 MCF10A 细胞的形态在浓度高达 50  $\mu$ M 的淫羊藿素处理下没有改变。

[0185] 实施例 7. 不同试剂对 ER- $\alpha$  变体表达的调节

[0186] 用不同试剂处理 MCF7 细胞并通过蛋白免疫印迹分析来分析 ER- $\alpha$  66、ER- $\alpha$  46 和 ER- $\alpha$  36 的表达。

[0187] 用 10  $\mu$ M 的 17 $\beta$ -雌二醇 (E2 $\beta$ )、他莫昔芬或 ICI 182,780 或血清 (20%) 以不同时间周期处理贫血清 MCF7 细胞。用 PBS 冲洗所处理细胞并用裂解缓冲液 (50mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 0.25mM EDTA pH8.0, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 50mM NaF, 和来自 Sigma 的蛋白酶抑制剂混合物) 裂解。将裂解液在 SDS 凝胶加样缓冲液 (25mM Tris-ClpH 6.8; 10% SDS; 2% 甘油; 20%  $\beta$ -巯基乙醇; 0.01% 溴酚蓝) 中煮沸 5min 然后在 10% SDS-PAGE 凝胶上分离。经电泳后,将蛋白转移至 PVDF 膜 (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA)。用抗雌激素受体- $\alpha$  抗体 H222 检测所述膜。然后将所述膜与 HRP 共轭第二抗体一起温育并用 ECL 检测试剂显像。图 8 显示了 E2 $\beta$  处理显著降低了 ER- $\alpha$  66 和 ER- $\alpha$  46 两者的表达但诱导了 ER- $\alpha$  36 的表达。血清处理具有相似效果。然而,他莫昔芬稳

定了 ER- $\alpha$  66 和 ER- $\alpha$  46 的表达水平而且还提高了 ER- $\alpha$  36 的表达水平。ICI 182,780 显著降低了 ER- $\alpha$  66 和 ER- $\alpha$  46 水平,并同时提高了 ER- $\alpha$  36 的表达水平。

[0188] 另外,MCF7 细胞经不同浓度的 ICI 182,780、淫羊藿素、IC 163 或 Y4 处理了 12 小时。用蛋白免疫印迹分析来分析 ER- $\alpha$  66、ER- $\alpha$  46 和 ER- $\alpha$  36 的表达,如上所述。图 9 显示了 ICI 182,780 处理随着其浓度增加降低了 ER- $\alpha$  66 和 ER- $\alpha$  46 的表达但提高了 ER- $\alpha$  36 的表达。然而,在高浓度下,淫羊藿素明显降低了所有三种同工型即 ER- $\alpha$  66、ER- $\alpha$  46 和 ER- $\alpha$  36 的表达水平。IC 163 或 Y4 处理也极大降低了所有 3 种 ER 同工型的表达。

[0189] 实施例 8. 淫羊藿素诱导肺癌细胞和前列腺癌细胞中的细胞死亡

[0190] H226 肺癌细胞,LnCap 细胞和 PC3 细胞各自以每个 30-mm 皿中  $1 \times 10^4$  细胞的密度点板。所述细胞用淫羊藿素处理 2 周。用血细胞计数器对存活细胞数进行计数。淫羊藿素处理分别在 0、1.0  $\mu$ M、2.5  $\mu$ M、5.0  $\mu$ M、7.5  $\mu$ M 和 10  $\mu$ M 浓度下测试。对于每个浓度值对 5 个皿的细胞进行计数。图 10 显示了所有细胞系的细胞数都在 5  $\mu$ M 淫羊藿素处理下减少。在 10  $\mu$ M 时,所有细胞系的细胞数进一步减少。因此,淫羊藿素也诱导了肺癌细胞和前列腺癌细胞中的细胞死亡。

[0191] 实施例 9. 淫羊藿素抑制裸鼠中的 ER 阳性和 ER 阴性乳腺癌异种移植体的生长

[0192] 施用于动物的淫羊藿素制备于玉米油中。为将淫羊藿素制备到玉米油中,将 5mL 玉米油置于闪烁管中,并在 42°C 下加热 30 分钟。将 100mg 淫羊藿素加入预热的 5mL 玉米油中至最终浓度 20mg/mL。所述闪烁管用铝箔包裹并置于 37°C 下的摇杆上数小时。所述淫羊藿素溶液储存于 4°C 以备用于动物施用。使用管饲技术向小鼠施用所述淫羊藿素溶液。我们使用动物饲养针头 (Popper ;cat No. 9921,尺寸 :20GX1.1/2) 进行管饲。

[0193] 分析了雌性无胸腺裸鼠 (6 周龄,品系 CDI nu/nu, Charles RiverBreeding Laboratory) 中肿瘤的形成。通过乳腺脂肪垫注射将 MCF7 细胞或 MDA-MB-231 细胞以每 200  $\mu$ L 基质胶 (Matrigel) (BD Biosciences)  $1 \times 10^7$  细胞的浓度注射到小鼠中。将每种乳腺癌细胞注射到一组 5 只小鼠中。对于 MCF7 细胞,在皮下植入 1.7mg/60 天释放的 E2  $\beta$  丸 (60 天中每天能释放一定量 E2  $\beta$  的慢速释放 E2  $\beta$  丸) 5 天后进行接种,所述 E2  $\beta$  丸购自 Innovative Research of American, Sarasota, FL。用动物饲养针头通过管饲技术对肿瘤大小直径约 0.5cm 的动物施用淫羊藿素的玉米油溶液。对于接种了 MCF7 细胞的小鼠,对每只小鼠在 15 天中隔天喂以 5mg 淫羊藿素。对于接种了 MDA-MB-231 细胞的小鼠,对每只小鼠在 30 天中隔天喂以 5mg 淫羊藿素。通过触诊来确定肿瘤消失,并且还通过隔天用游标卡尺测量 2 个垂直直径来监测并照相记录肿瘤尺寸。图 11 和图 12 分别显示了在淫羊藿素处理前和处理后 MDA-MB-231 和 MCF7 细胞异种移植体中肿瘤尺寸减小的图片。该结果显示在淫羊藿素处理后在两种乳腺癌细胞异种移植体中肿瘤尺寸明显减小。

[0194] 实施例 10. 当移植后立即使用淫羊藿素时淫羊藿素抑制裸鼠中 ER 阴性乳腺癌异种移植体的生长

[0195] 分析了雌性无胸腺裸鼠 (6 周龄,品系 CDI nu/nu, Charles RiverBreeding Laboratory) 中肿瘤的形成。通过乳腺脂肪垫注射将 MDA-MB-231 细胞以每 200  $\mu$ L 基质胶 (BD Biosciences)  $1 \times 10^7$  细胞的浓度注射到小鼠中。将所述乳腺癌细胞注射到一组 5 只小鼠中。注射后立即用淫羊藿素处理所述小鼠。对每只小鼠在 36 天中每周 2 次喂以 1mg 淫羊藿素。其后杀死小鼠并从小鼠中解剖出肿瘤组织然后照相并称重。图 13 显示了用淫羊

藜素处理的 MDA-MB-231 细胞异种移植体中肿瘤尺寸的减小。

[0196] 实施例 11. 淫羊藜素和 IC 163 抑制裸鼠中人乳腺癌 BCAP-37 细胞异种移植体的生长

[0197] 用淫羊藜素处理带乳腺癌异种移植体的裸鼠以检验其对抑制肿瘤生长的效果。带 BCAP-37 乳腺癌的原始裸鼠由中国医学科学院药物研究所提供。从小鼠中取出肿瘤组织并切割为小块。将数块肿瘤组织植入雌性裸鼠（由北京大学医学院实验动物部提供）的右前肢腋窝内。在移植后，在 6 天中以  $7 \mu\text{g}/\text{鼠}$  的剂量每天一次对所述小鼠喂以 E2  $\beta$  溶液以促进接收小鼠中的肿瘤生长。从第 7 天开始，对所述小鼠喂以 3 种剂量的淫羊藜素。高剂量为  $0.7\text{mg}/\text{鼠}/\text{日}$ （约  $33\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ ）。中等剂量为  $0.35\text{mg}/\text{鼠}/\text{日}$ （约  $16.5\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ ）。低剂量为  $0.18\text{mg}/\text{鼠}/\text{日}$ （约  $8.25\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ ）。以  $0.35\text{mg}/\text{鼠}/\text{日}$  的剂量使用他莫昔芬作为阳性对照。橄榄油被用作阴性对照，其中对每只小鼠喂以  $0.1\text{mL}$  橄榄油。用与上述实施例 9 中所述相同的方法将淫羊藜素制备为橄榄油溶液。在 15 天中对所述小鼠每天给服一次所述不同剂量的淫羊藜素、他莫昔芬或橄榄油。然后杀死小鼠并从小鼠中解剖出肿瘤组织并称量。对所述测试进行了两次平行实验。对所述两次平行实验之一，每种测试化合物和每种剂量使用十只雌性 BALB/c-nu 小鼠。对另一平行实验，每种测试化合物和每种剂量使用八只雌性 BALB/c-nu 小鼠。图 14a 显示了用高、中和低剂量淫羊藜素处理的小鼠与阴性对照相比具有减少的肿瘤重量。图 14b 显示了在不同剂量下的肿瘤生长抑制速率。肿瘤生长抑制速率是使用下式计算的百分比：肿瘤生长抑制速率 = (对照中的肿瘤平均重量 - 用淫羊藜素处理的肿瘤平均重量) / 对照中的肿瘤平均重量。用高剂量淫羊藜素处理的小鼠中的肿瘤重量具有与所述阳性对照相似的肿瘤重量减少。

[0198] 在与上述相同的试验中测试了 IC 163 对抑制乳腺癌生长的效果。IC 163 以  $0.7\text{mg}/\text{鼠}/\text{日}$ （约  $35\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ ）的剂量进行测试。他莫昔芬以 IC163 剂量的一半作为阳性对照进行测试。橄榄油用作阴性对照。

[0199] 实施例 12. 淫羊藜素抑制 ICR 鼠中小鼠宫颈癌 U14 细胞异种移植体的生长

[0200] 含宫颈癌 U14 细胞系的原始 ICR 鼠由中国医学科学院药物研究所提供。从所述小鼠下腹抽取  $5\text{mL}$  腹腔液。将所述液体与生理盐水以 1 : 5 的比例稀释。将  $0.2\text{mL}$  所述稀释腹腔液皮下注射到雌性 ICR 鼠（由北京大学医学院实验动物部提供）的右前肢和胸腔内。移植后，将所述小鼠立即分别用淫羊藜素、他莫昔芬和橄榄油处理。淫羊藜素给以 3 种剂量。高剂量为  $0.7\text{mg}/\text{鼠}/\text{日}$ （约  $33\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ ）。中等剂量为  $0.35\text{mg}/\text{鼠}/\text{日}$ （约  $16.5\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ ）。低剂量为  $0.18\text{mg}/\text{鼠}/\text{日}$ （约  $8.25\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ ）。以  $0.35\text{mg}/\text{鼠}/\text{日}$ （约  $16.5\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ ）的剂量使用他莫昔芬作为阳性对照。橄榄油被用作阴性对照，其中对每只小鼠喂以  $0.1\text{mL}$  橄榄油。用与上述实施例 9 中相同的方法将淫羊藜素制备为橄榄油溶液。在 14 天期间对小鼠每天给服一次所述不同剂量的淫羊藜素、他莫昔芬或橄榄油。然后杀死小鼠并从小鼠中解剖出肿瘤组织并称量。每种测试化合物和剂量使用 10 只雌性 ICR 鼠。进行 3 次平行实验。图 15a 显示了用高、中和低剂量淫羊藜素处理的小鼠与阴性对照相比具有减少的肿瘤重量。用高剂量淫羊藜素处理的小鼠中的肿瘤重量具有与所述阳性对照相似的肿瘤重量减少。图 15b 显示了不同剂量下的肿瘤生长抑制速率。使用与实施例 11 中相同的公式来计算肿瘤生长抑制速率。

[0201] 实施例 13. IC 163 诱导乳腺癌、肺癌和前列腺癌细胞的细胞死亡

[0202] 用 IC 163 处理 MCF7 细胞、PC3 前列腺癌细胞、H226 肺癌细胞和 MCF7/TAM 细胞以测试所述化合物对抑制癌细胞生长的效果。用与实施例 8 中相同的方法进行所述实验。结果显示于图 16 中。在  $5 \mu\text{M}$  时,某些细胞系的细胞数开始减少。在  $10 \mu\text{M}$  时,所有测试细胞系的细胞数都减少并随着 IC 163 浓度的增加而继续减少。

[0203] 实施例 14. IC-163 对延缓豚鼠中卵白蛋白诱导的哮喘发作的效果

[0204] 250-300g 的豚鼠由北京海淀兴旺动物养殖场提供。将 1mL 10% 卵白蛋白 (Sigma Cat. No. A5253) 一次注射到豚鼠腹部。注射后的第 15- 第 17 天,对所述豚鼠通过鼻腔喷雾给以约 20 秒 1% 雾化卵白蛋白以诱导哮喘发作。测量了根据卵白蛋白施用后至豚鼠惊厥虚脱的时间计算的哮喘发作前的潜伏期。如果豚鼠在卵白蛋白施用后 150 秒内没有惊厥虚脱,则该豚鼠被取消进一步测试的资格。

[0205] 在注射后的第 17 天,将合格豚鼠分为 3 组,高剂量 IC-163 组 (4/mg/kg/ 日)、低剂量 IC-163 组 (1/mg/kg/ 日) 和对照组。每组由 10 只豚鼠组成。由 8 只没有注射任何 10% 卵白蛋白的正常豚鼠组成的正常组也进行了测试。在 6 天中每天以每 4mg/kg 体重 / 日 (高剂量组) 或 1mg/kg 体重 / 日 (低剂量组) 经肌肉注射对所述豚鼠施用一次 IC-163,而正常组和对照组的豚鼠则用生理盐水注射。在药物施用的第 4 和第 6 天,用与上述相同的方法对所述豚鼠诱导哮喘发作。测量哮喘发作前的潜伏期。如果潜伏期持续超过 5 分钟,则将该潜伏期记录为 5 分钟。在第 6 天,从四组中的豚鼠抽取血液以检测血液中嗜酸性细胞百分比、组胺和 IgE 的浓度。通过在显微镜下对每 200 个白细胞中的嗜酸性细胞数计数来测量嗜酸性细胞百分比。通过双抗体夹心 ELISA (酶联免疫吸附试验) 来测量组胺和 IgE 浓度。

[0206] 图 17 显示了向豚鼠施用高剂量和低剂量 IC-163 的第 4 天和第 6 天由卵白蛋白诱导的哮喘发作前的潜伏期。当施用高剂量 IC-163 时,潜伏期与对照组相比在药物施用第 4 天延长了 72.9%,第 6 天延长了 63.5%。当施用低剂量 IC-163 时,潜伏期与对照组相比在第 4 天延长了 83.4% 而第 6 天延长了 72.7%。所述结果表明高剂量和低剂量的 IC-163 施用能明显延迟豚鼠中卵白蛋白诱导的哮喘发作。

[0207] 图 18 显示了当对豚鼠施用高剂量和低剂量 IC-163 时血液中嗜酸性细胞的百分比。正常组的嗜酸性细胞百分比为约 5.3% 而对照组的百分比则高达 9.9%。当 IC-163 以高剂量和低剂量施用,嗜酸性细胞百分比分别降低至约 8.6% 和 7.8%。该图表明高剂量和低剂量的 IC-163 能明显降低受检豚鼠中嗜酸性细胞的百分比。

[0208] 在正常组、对照组、高剂量 IC-163 组和低剂量 IC-163 组中对豚鼠血液中的组胺浓度进行了测量。图 19 中的结果显示,高剂量和低剂量 IC-163 施用能明显降低豚鼠中组胺的血浓度。

[0209] 还测量了四组豚鼠血液中的 IgE 浓度,结果如图 20 中所示。所述结果显示了高剂量和低剂量 IC-163 施用能明显降低受检豚鼠中的 IgE 浓度。

[0210] 实施例 15. 淫羊藿素抑制人子宫内膜癌 Hec1A 细胞生长

[0211] 将人子宫内膜癌 Hec1A 细胞 (ATCC No. :HTB-112<sup>TM</sup>) 以  $5 \times 10^3$  细胞 / 孔的浓度分种于 96 孔培养板上并在含高葡萄糖培养基的 DMEM (HyClone, SH30022.01B) 中培养。细胞经血清饥饿处理过夜并暴露在不同浓度的他莫昔芬或淫羊藿素中 24 小时。他莫昔芬或淫羊藿素的浓度分别为  $0 \mu\text{M}$ 、 $0.001 \mu\text{M}$ 、 $0.01 \mu\text{M}$ 、 $0.1 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、 $3 \mu\text{M}$  和  $5 \mu\text{M}$ 。然后将所述细

胞与 0.5mg/mL 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化鎓盐 (MTT) 一起在 37°C 培养 4 小时,其中 MTT 被活细胞中的活性线粒体还原酶还原为不溶紫色甲贖。然后从反应混合物中除去过量液态 MTT。加入 150  $\mu$ L DMSO 以将紫色甲贖溶解为有色溶液。所述有色溶液的光密度与溶液中的细胞数呈线性关系,从而能准确定量细胞。

[0212] 图 21 显示了所述 MTT 试验的结果。光密度随着 Hec1A 细胞暴露在浓度逐渐增高的淫羊藿素中而平滑降低。与此相反,光密度随着 Hec1A 细胞暴露在浓度从 0.001  $\mu$ M-3  $\mu$ M 增高的他莫昔芬中而升高。该图表明淫羊藿素对 Hec1A 细胞生长有明显抑制效果而他莫昔芬在 3  $\mu$ M 浓度以下具有促进 Hec1A 细胞生长的相反效果。

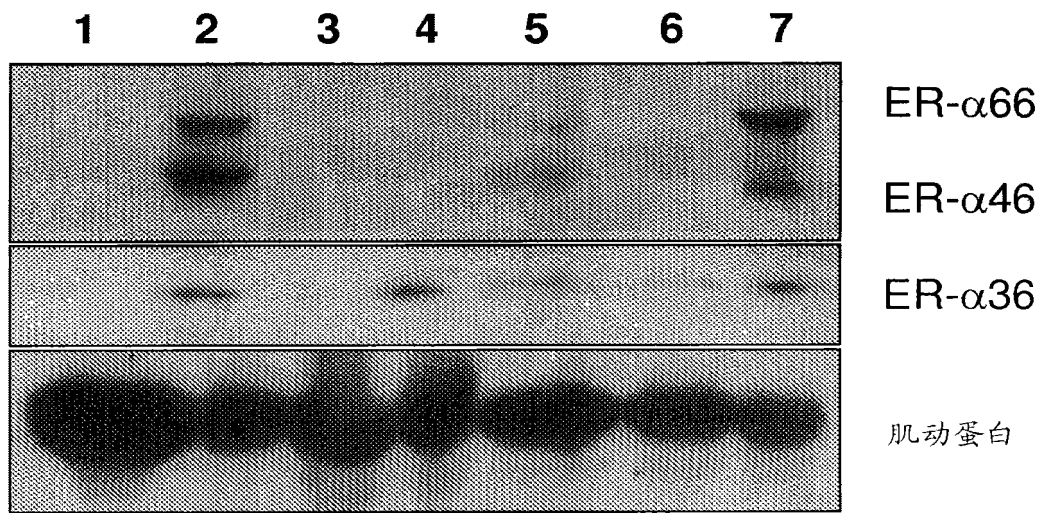


图 1

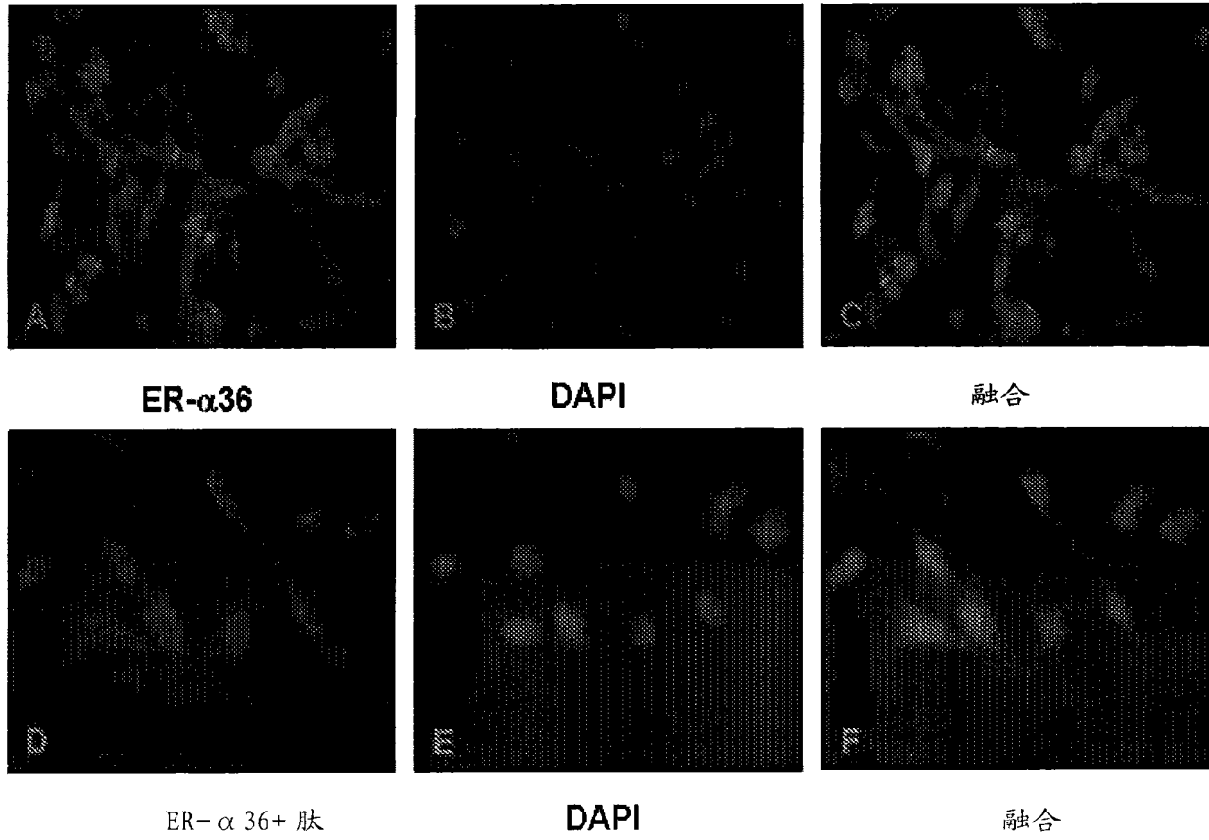


图 2

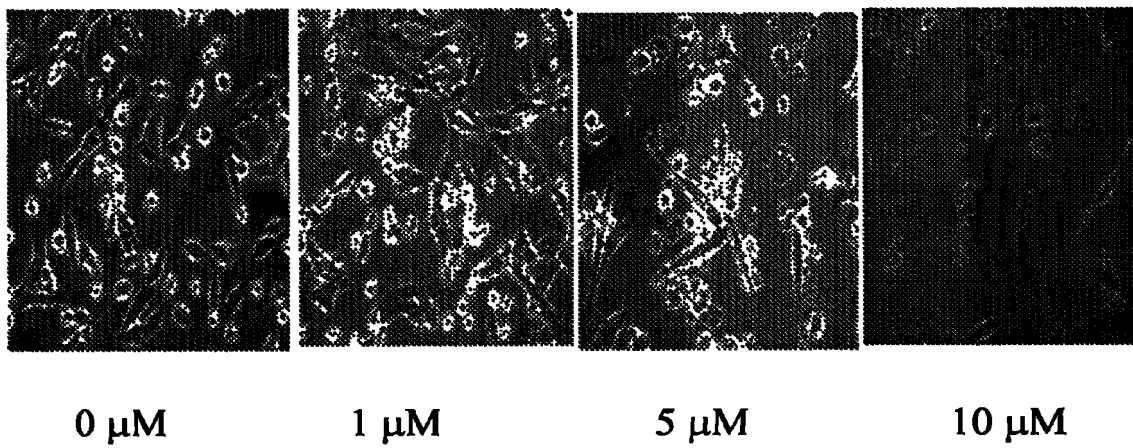


图 3

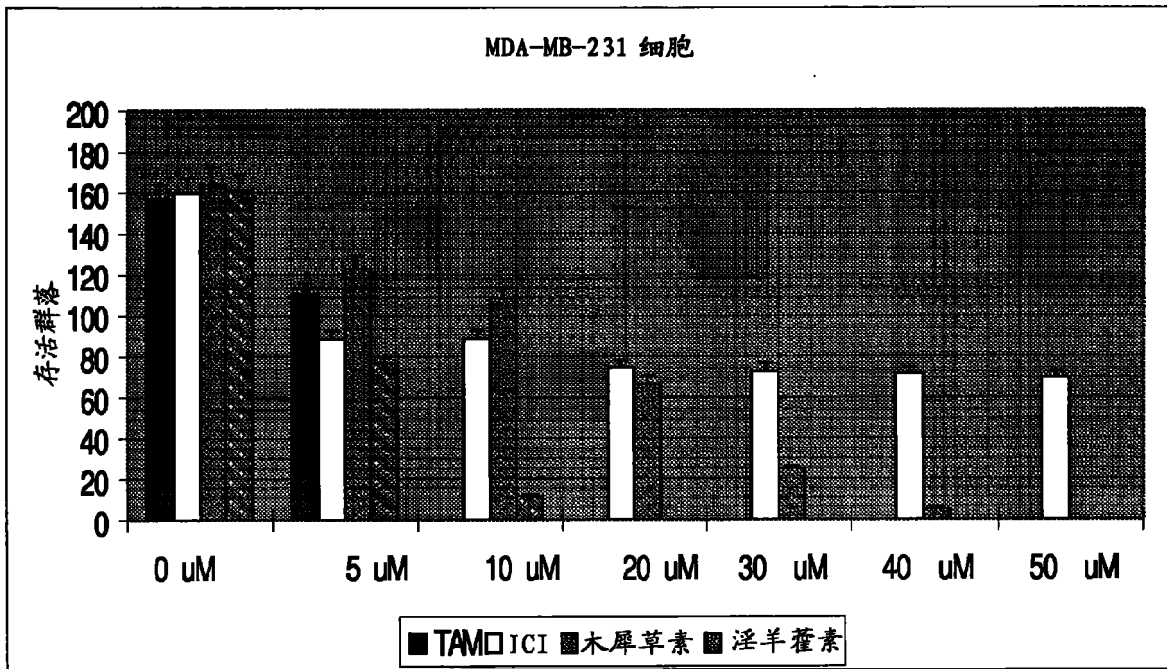


图 4

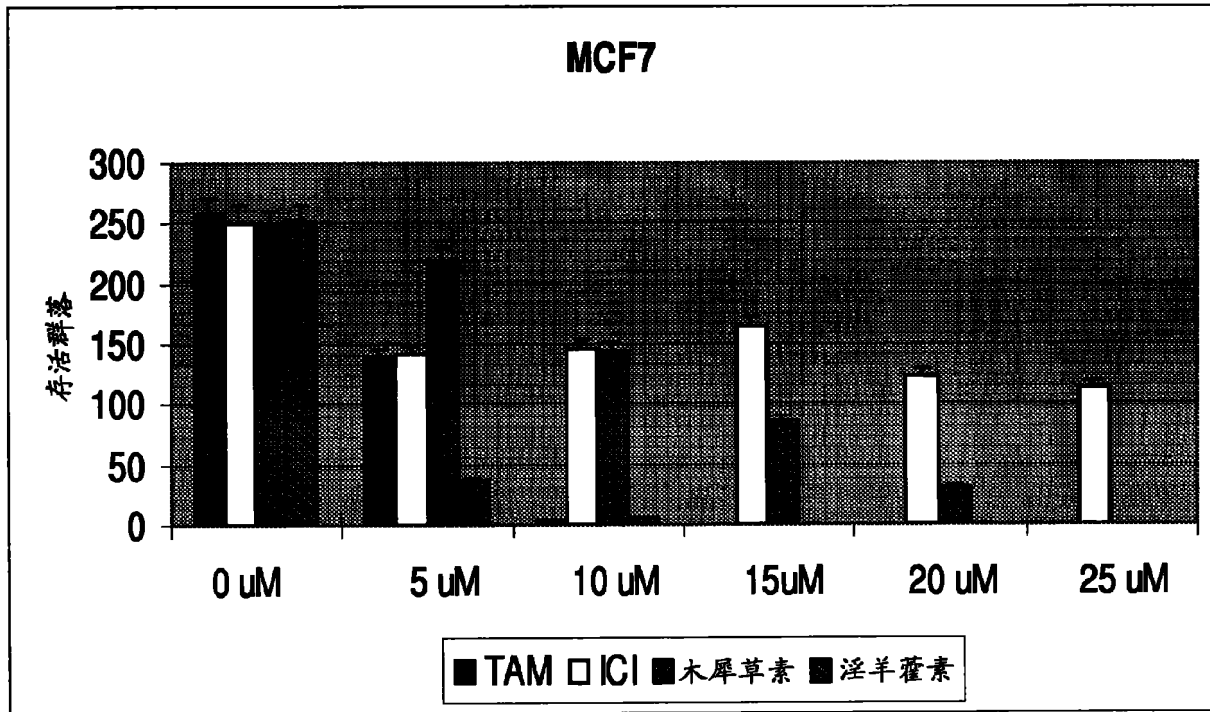


图 5a

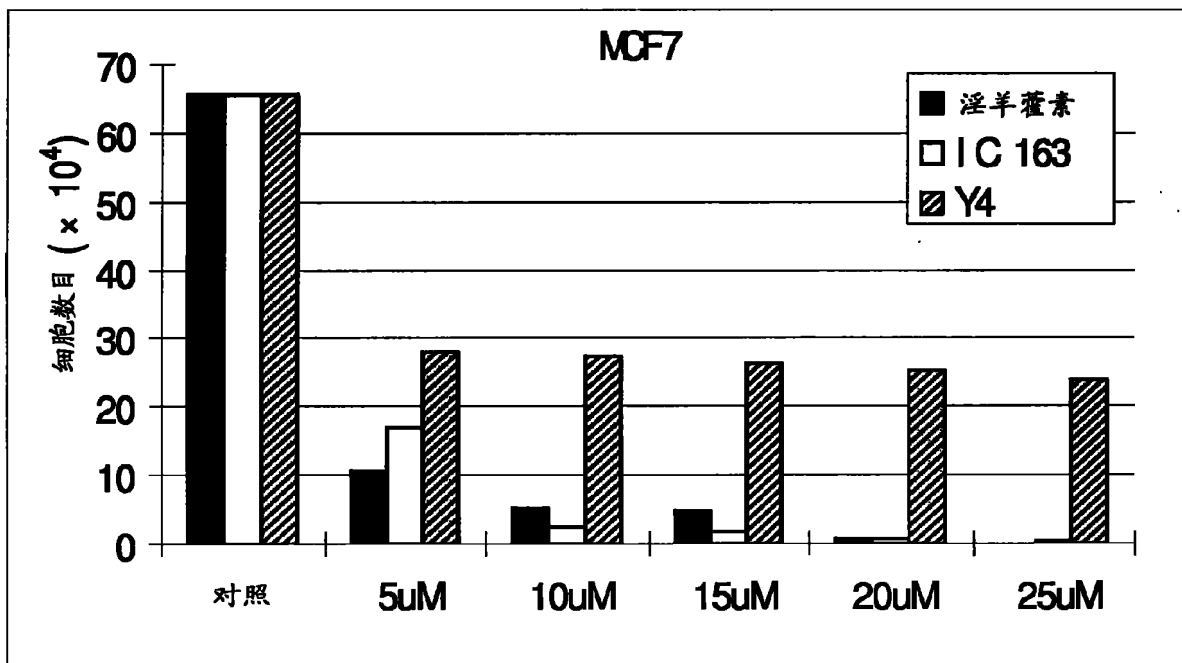


图 5b

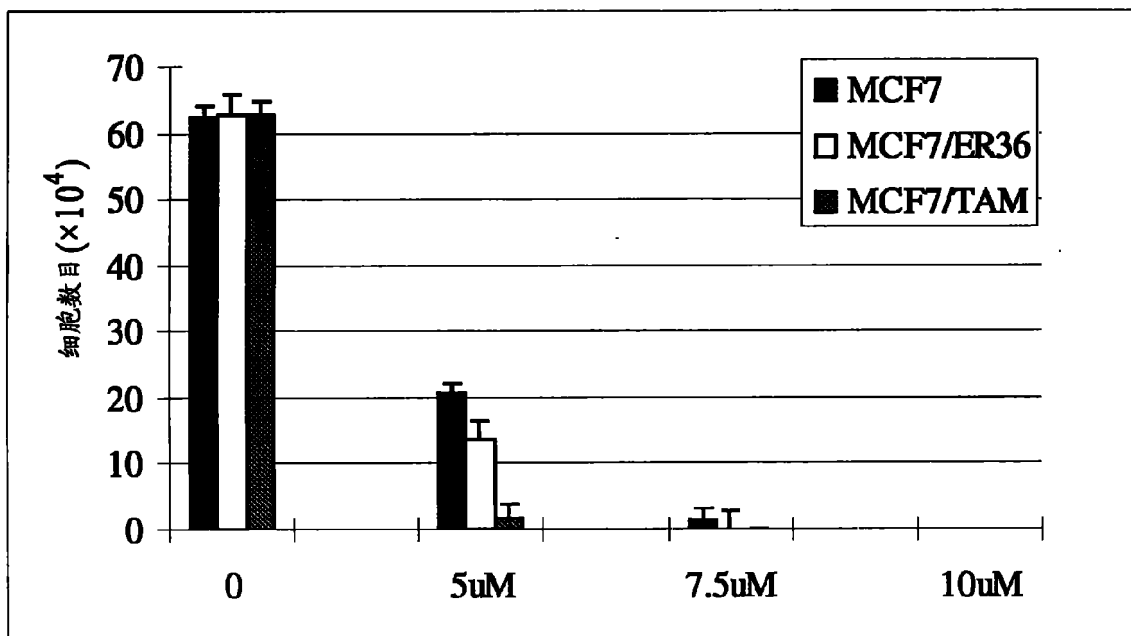


图 6

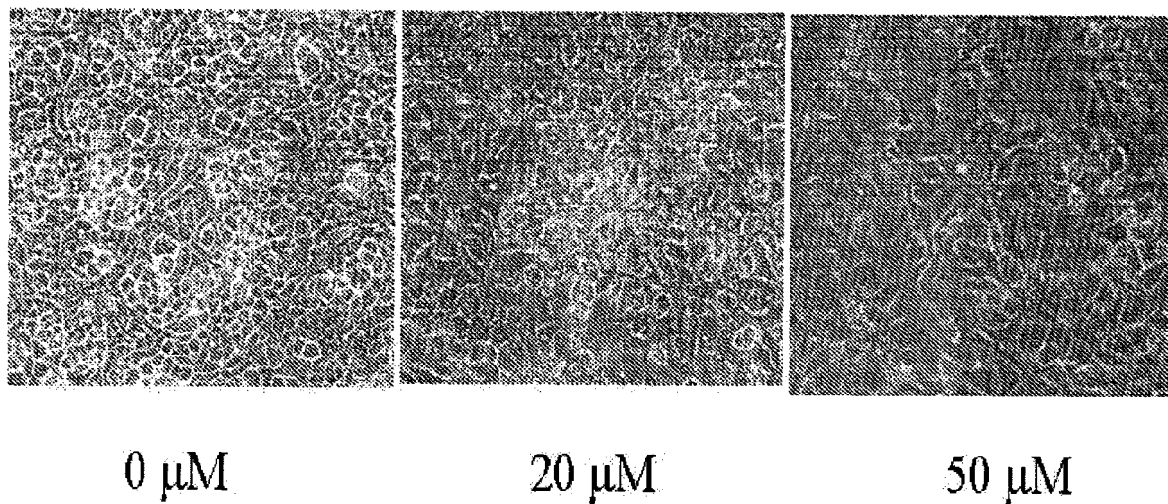


图 7

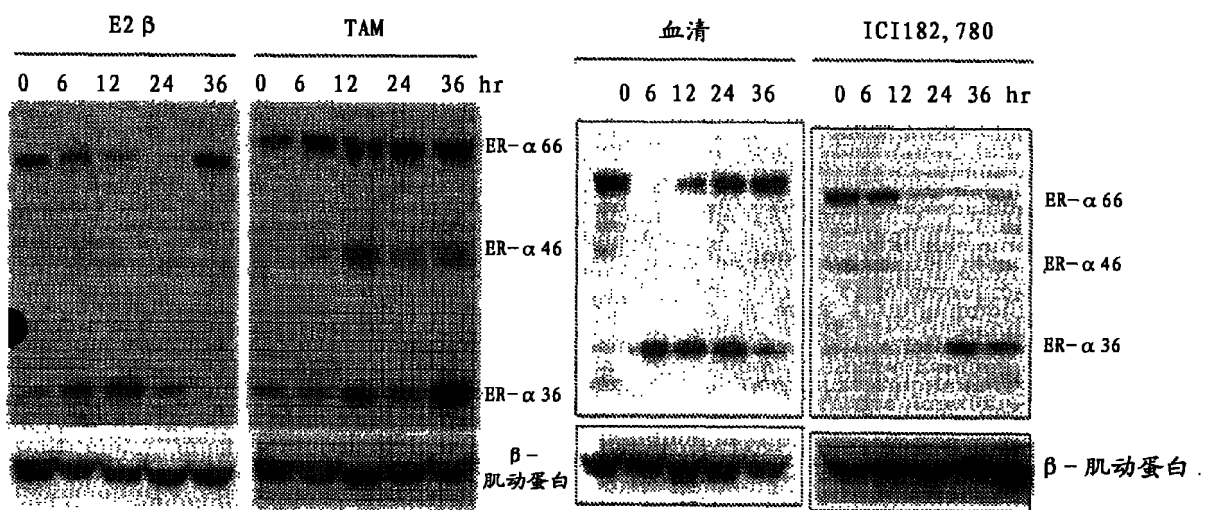


图 8

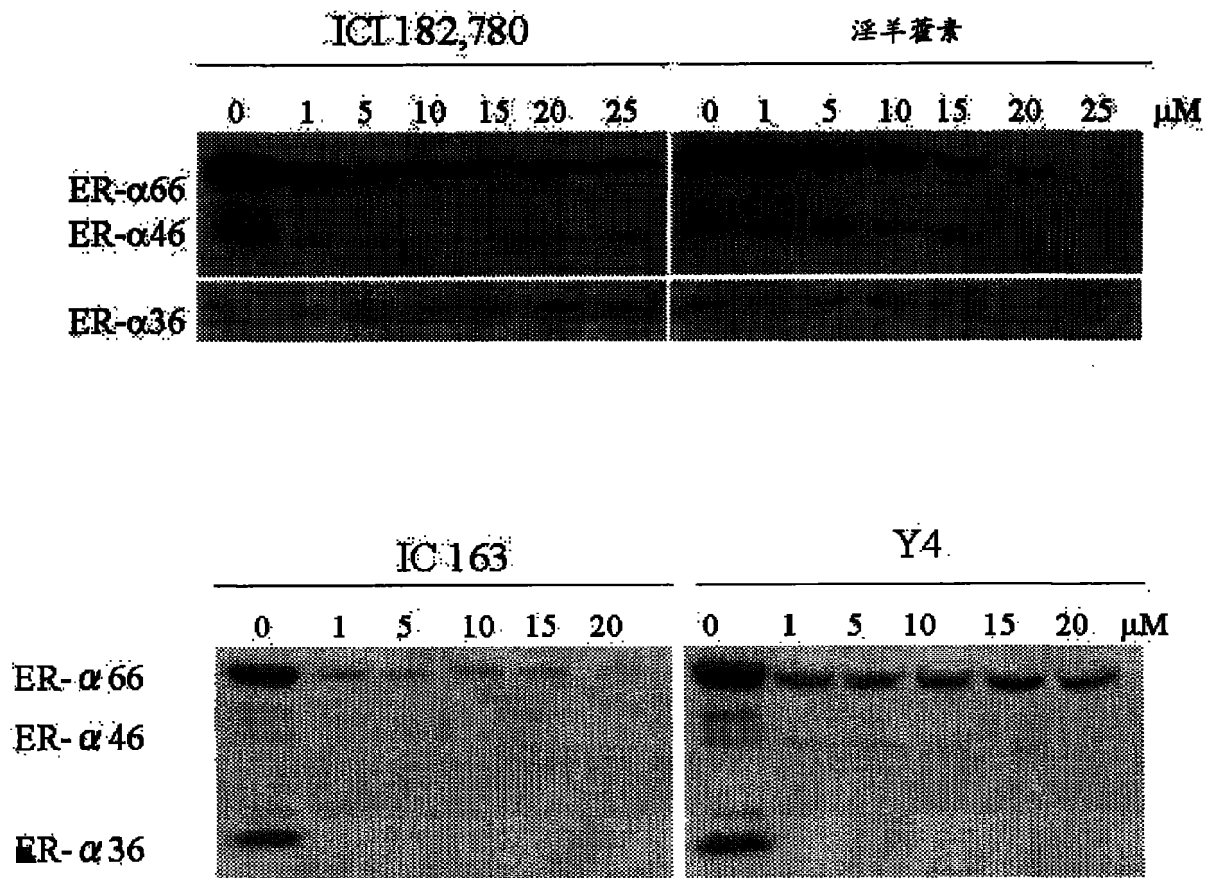


图9

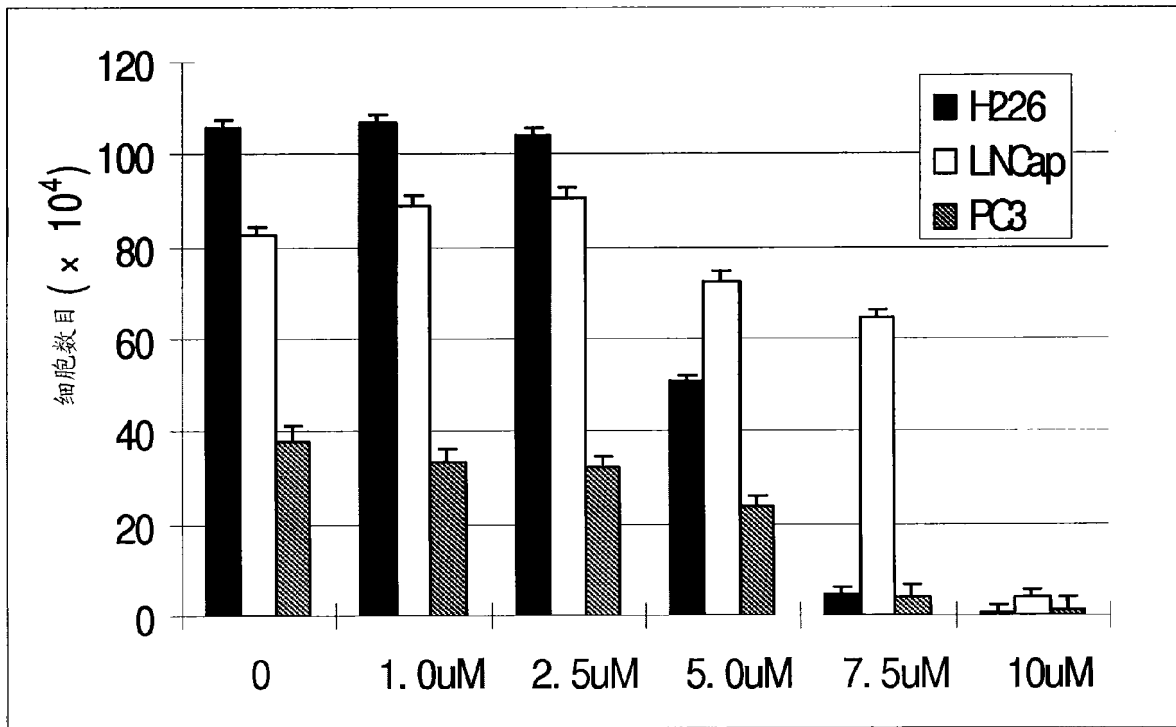


图 10

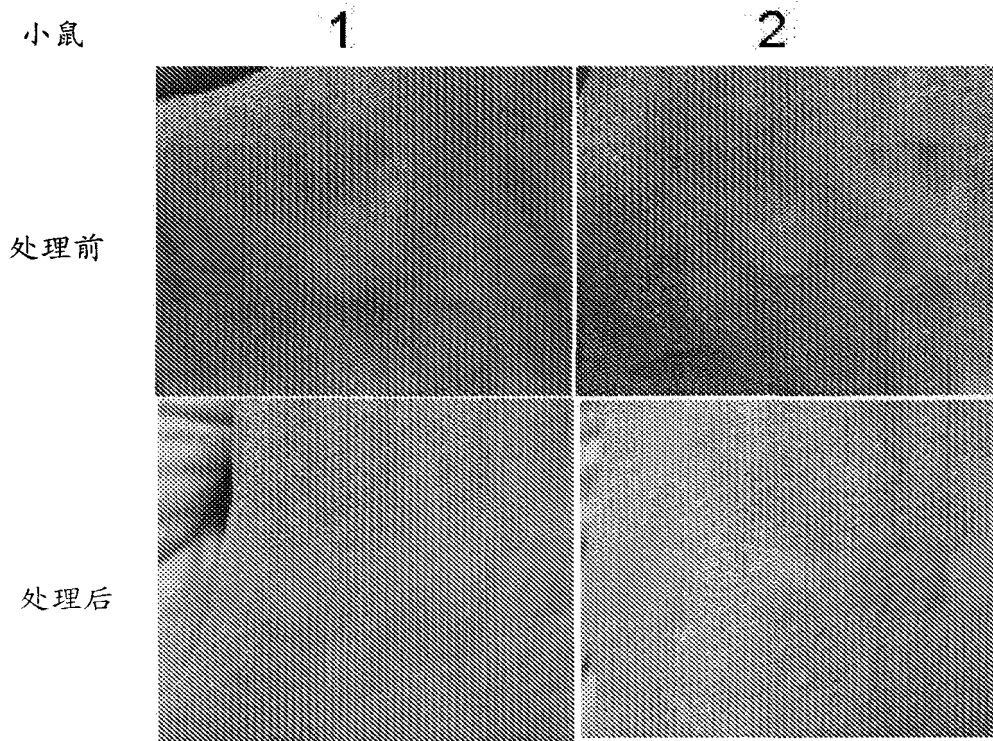


图 11

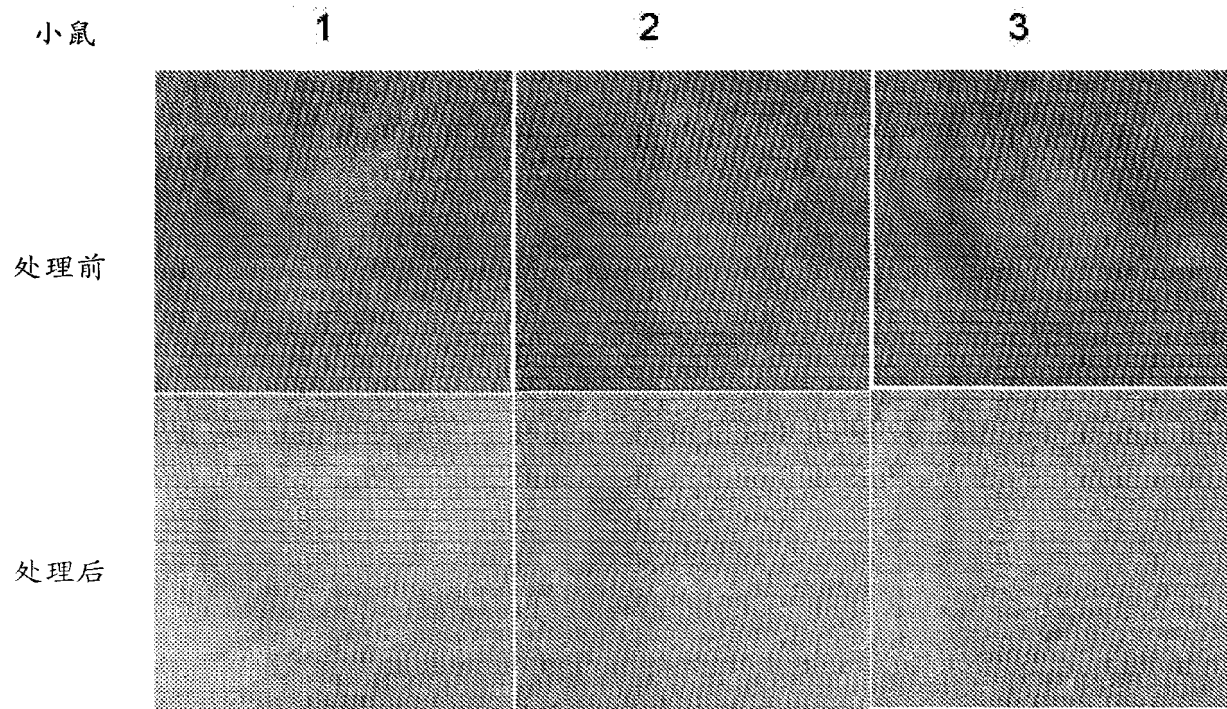


图 12

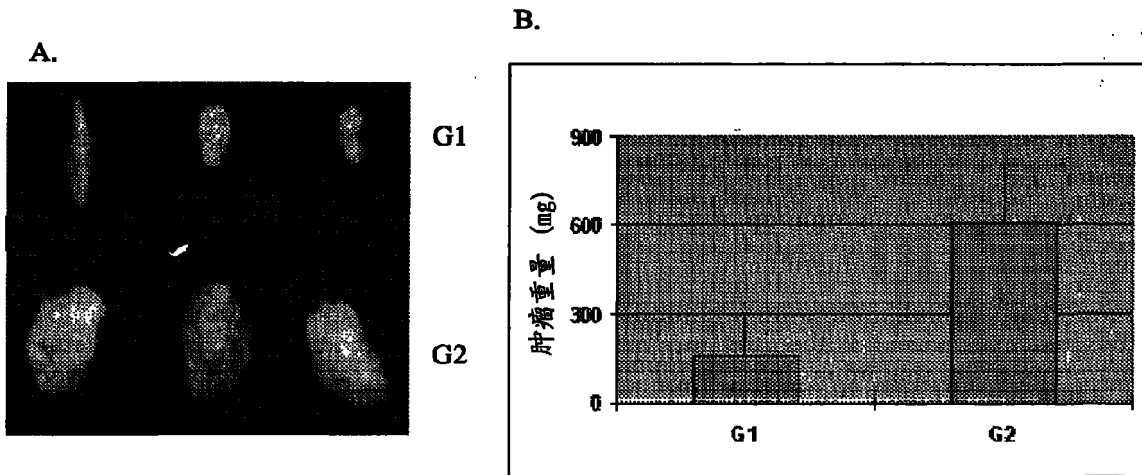


图 13

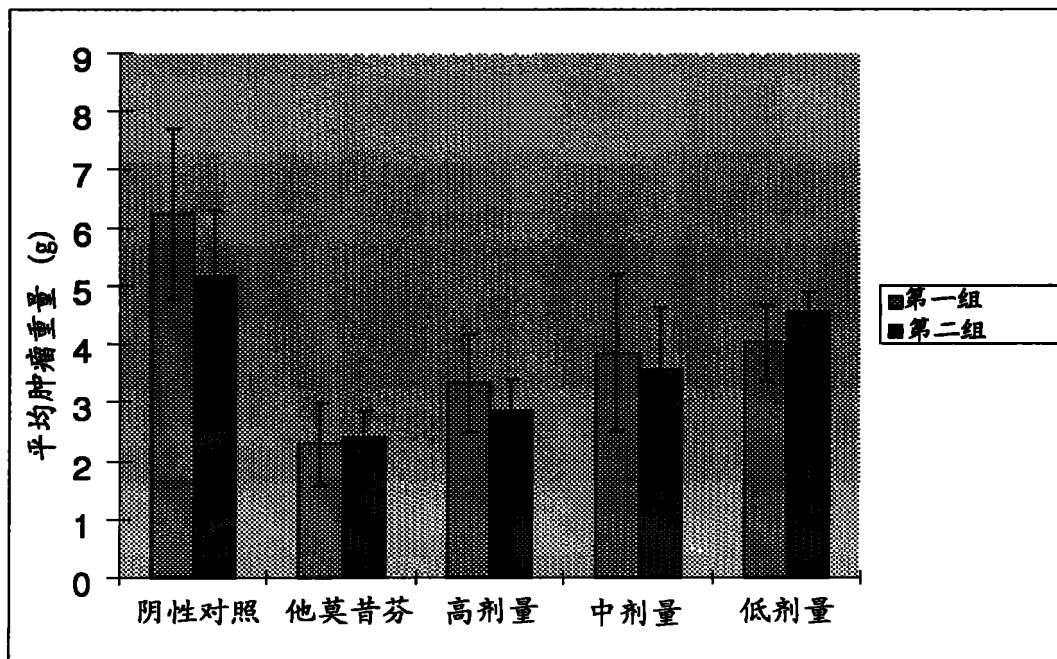


图 14a

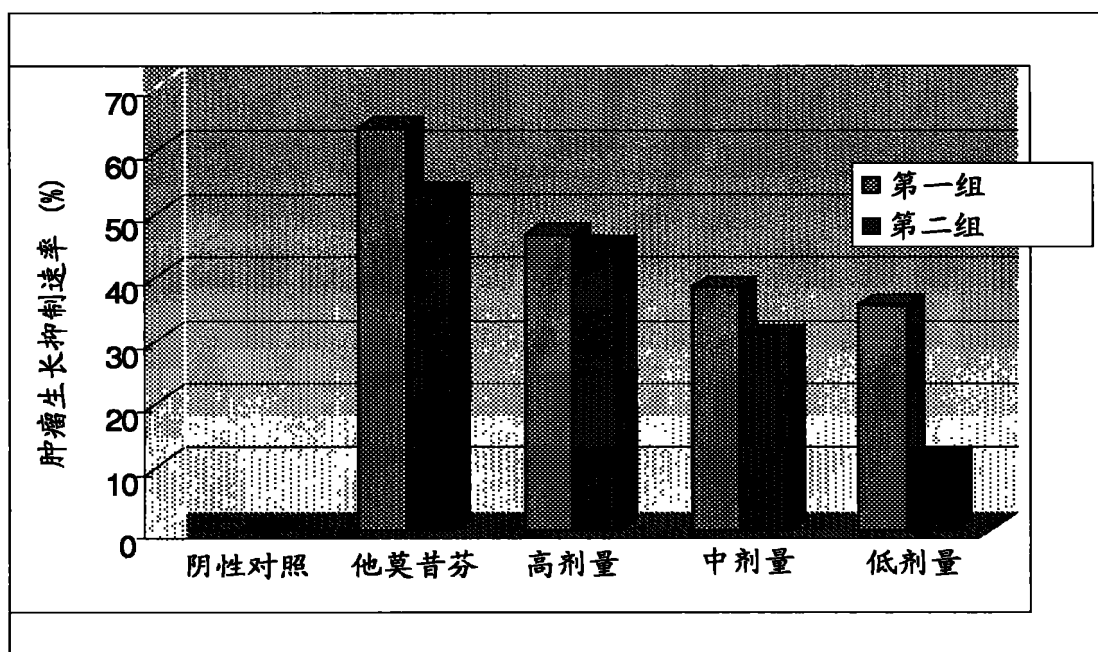


图 14b

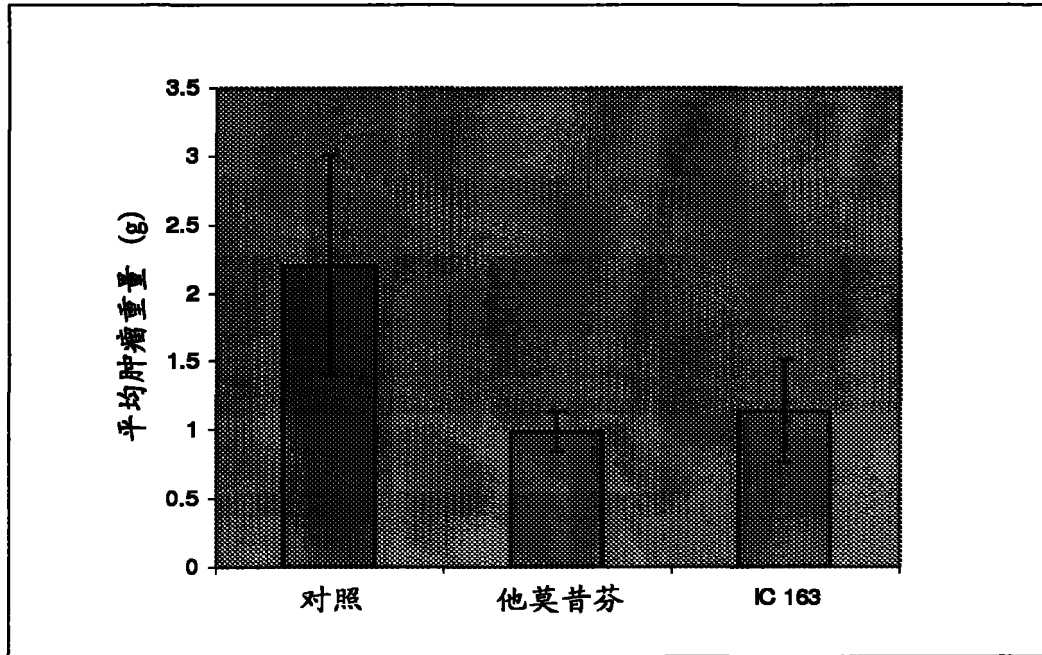


图 14c

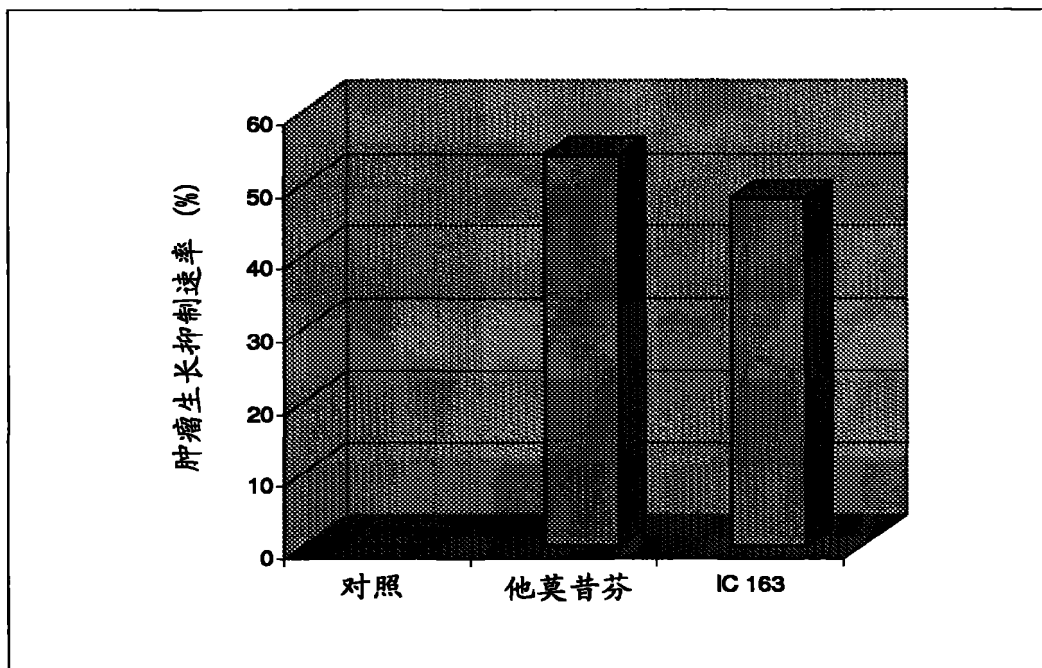


图 14d

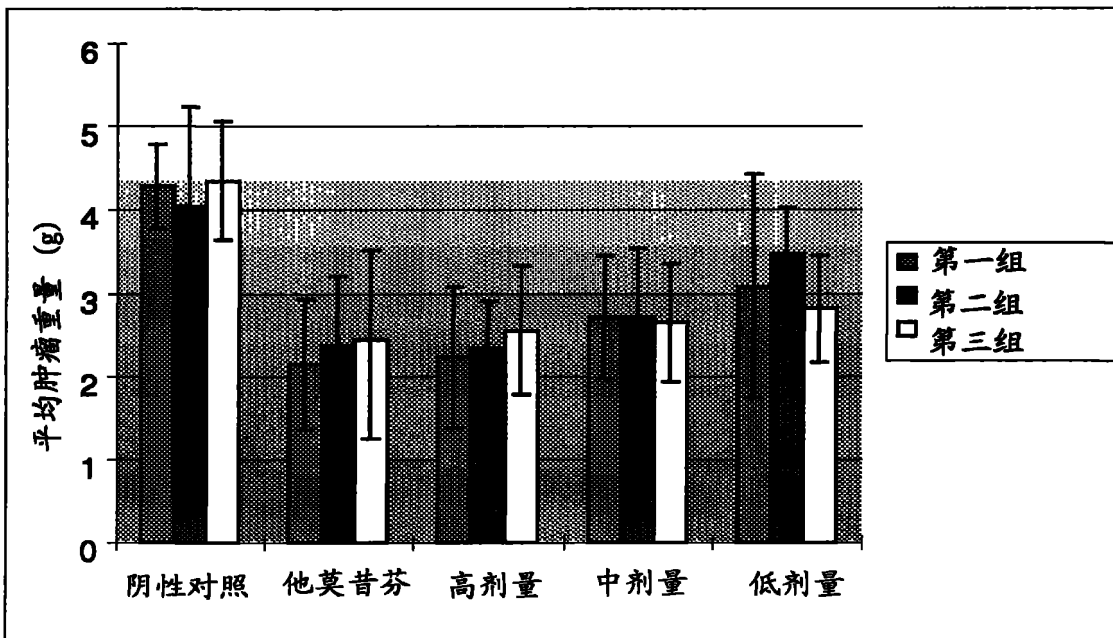


图 15a

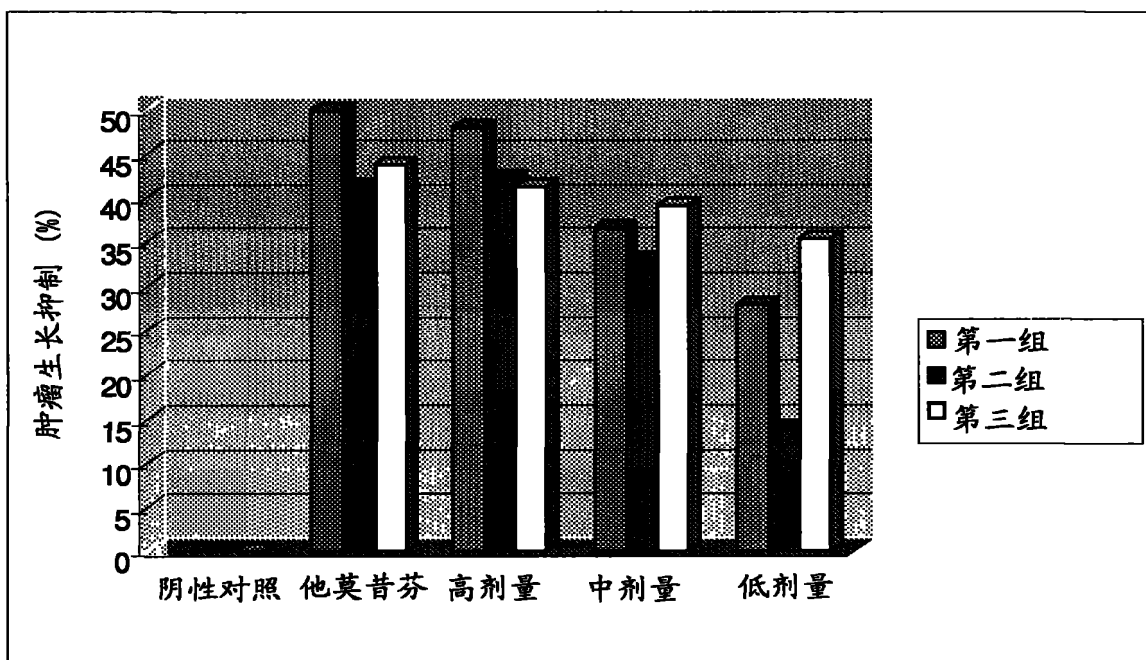


图 15b

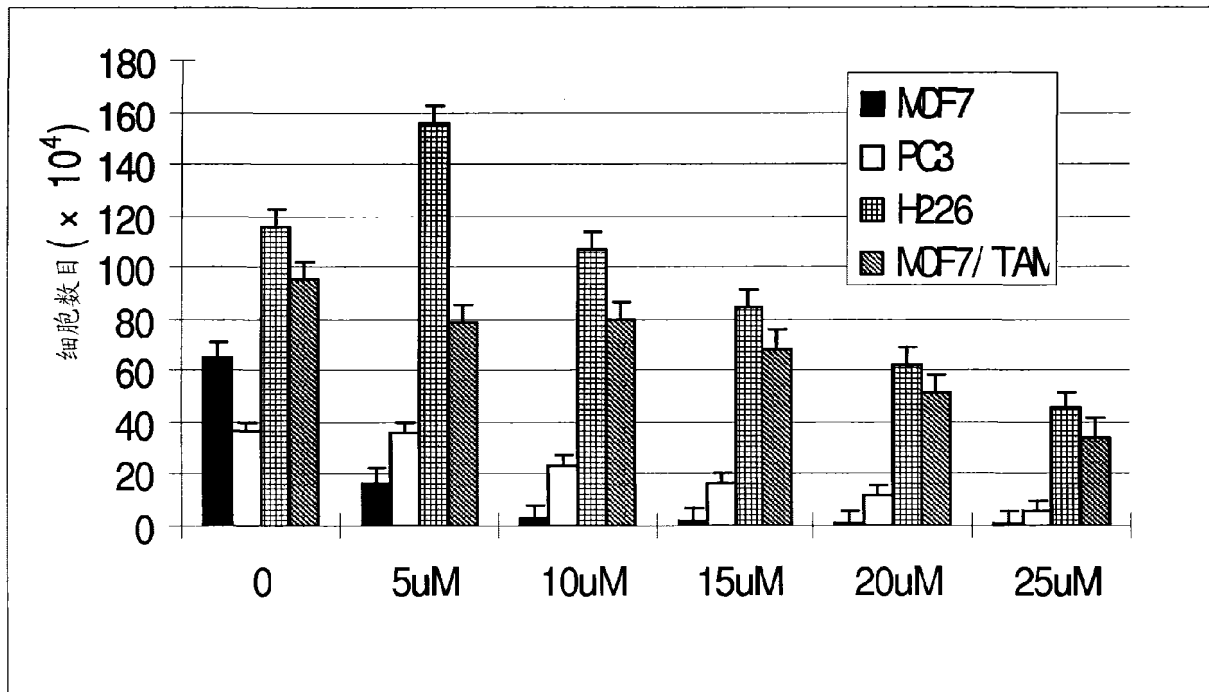


图 16

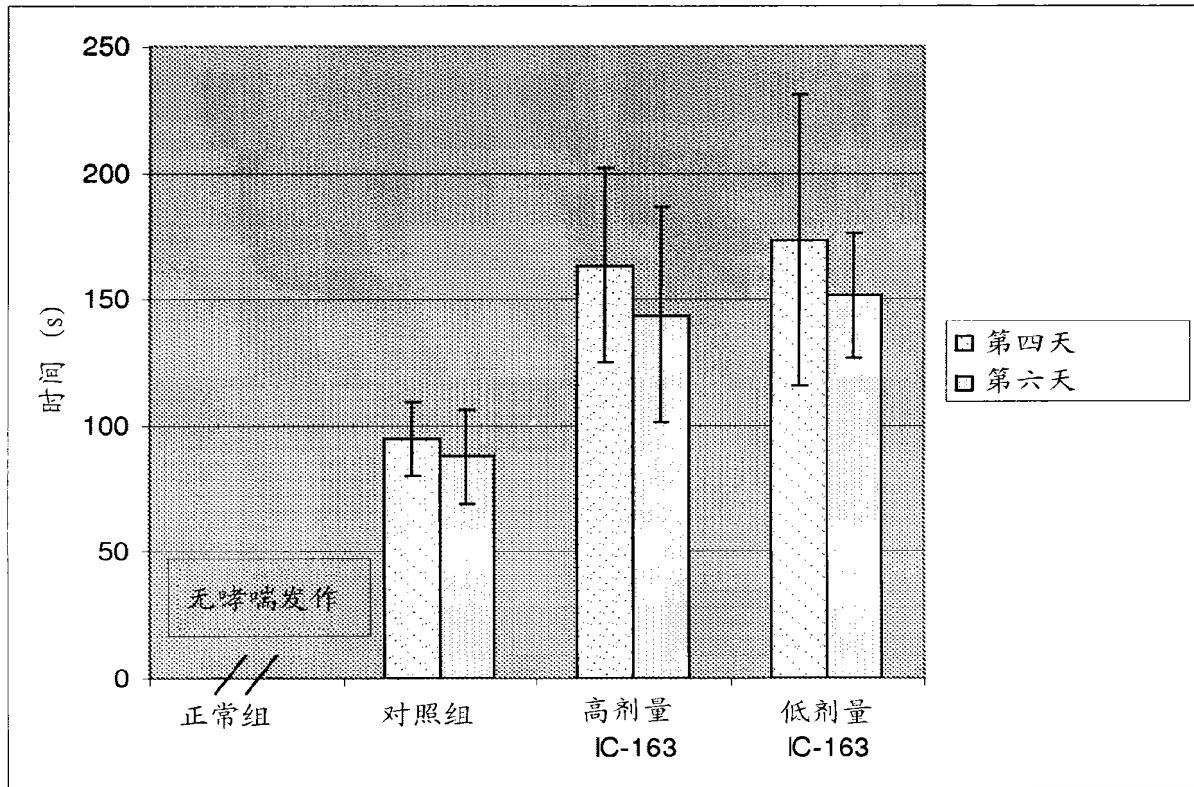


图 17

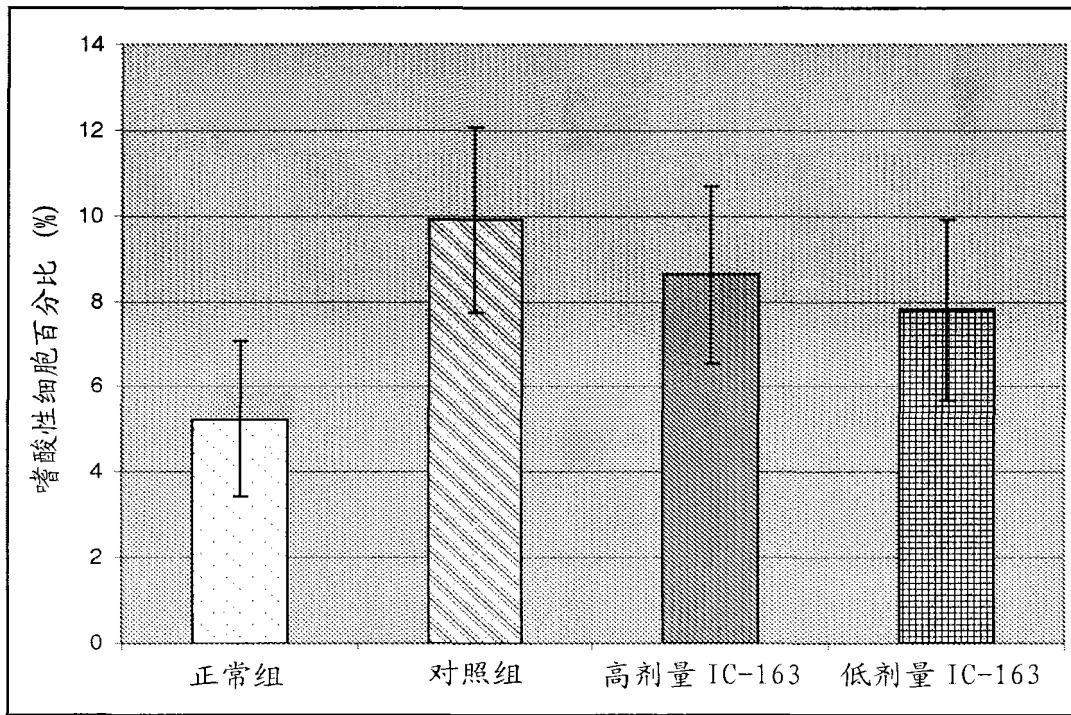


图 18

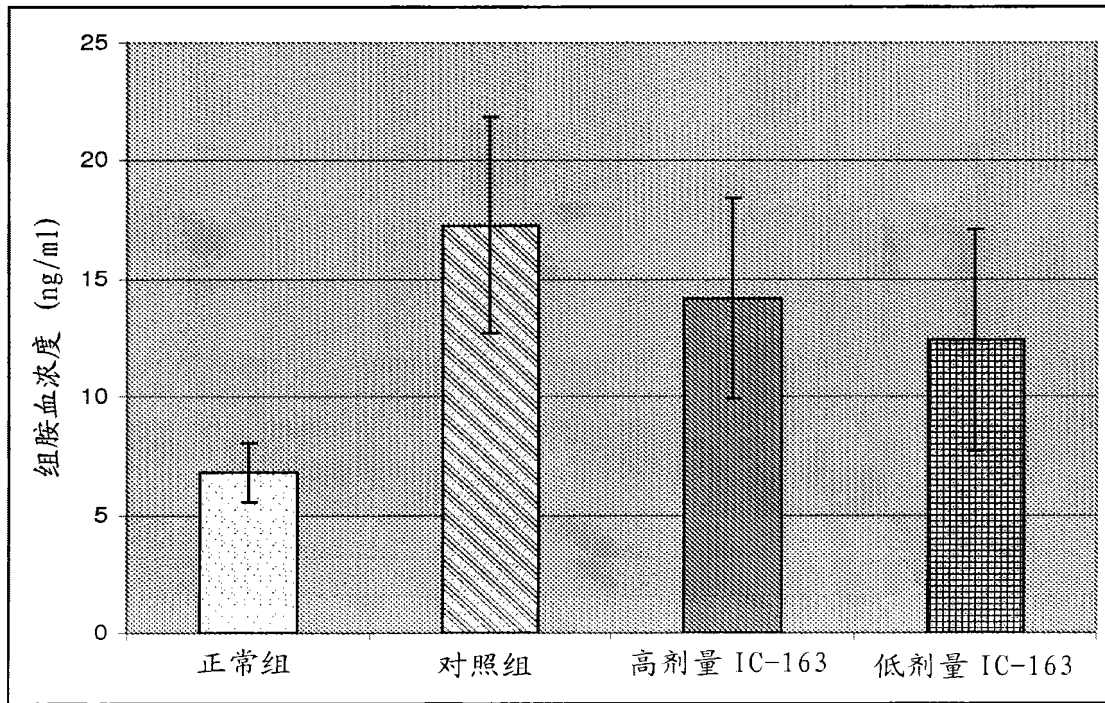


图 19

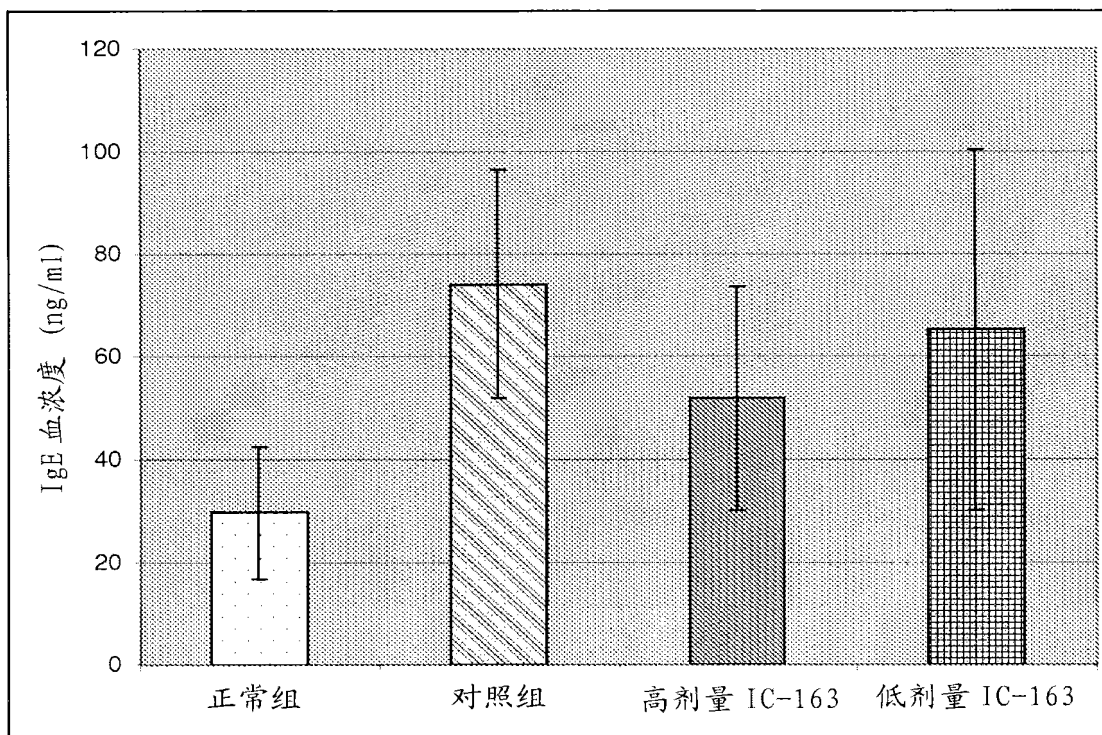


图 20

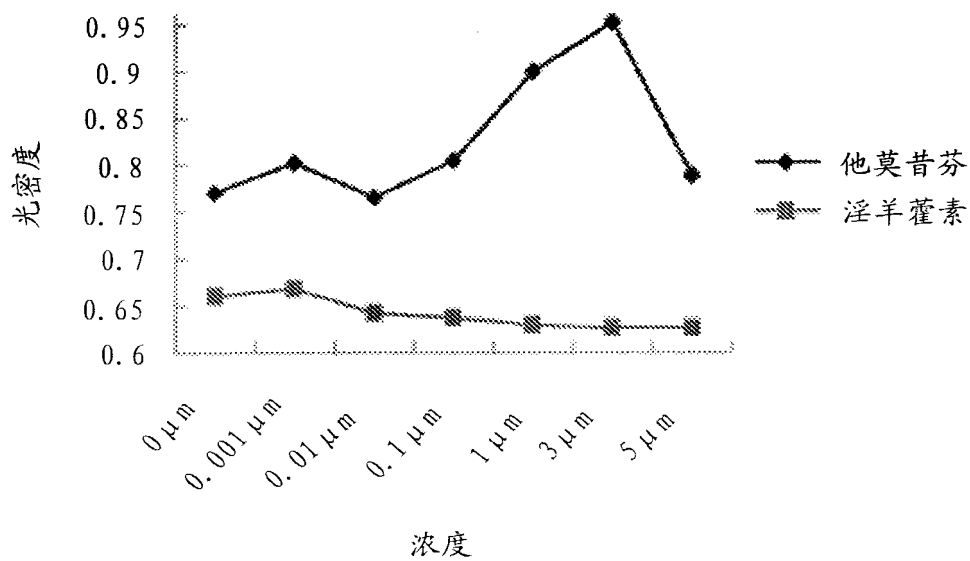


图 21