



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112353796 A

(43) 申请公布日 2021.02.12

(21) 申请号 202011320148.5

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2017.10.10

A61K 31/40 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 45/06 (2006.01)

62/406,859 2016.10.11 US

A61K 31/519 (2006.01)

62/457,759 2017.02.10 US

A61K 31/506 (2006.01)

62/502,299 2017.05.05 US

A61P 35/00 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 35/04 (2006.01)

201780073528.3 2017.10.10

A61P 5/00 (2006.01)

(71) 申请人 杜克大学

地址 美国北卡罗来纳州

(72) 发明人 K·安德烈亚诺 C-y·常

D·P·麦克唐奈 S·L·盖拉德

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 刘盈盈

权利要求书1页 说明书41页

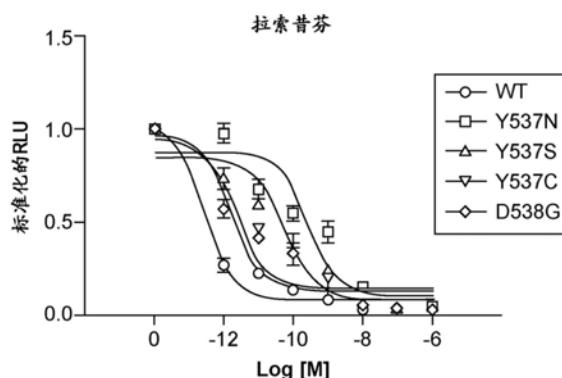
序列表3页 附图3页

(54) 发明名称

ER<sup>+</sup>乳腺癌的拉索昔芬治疗

(57) 摘要

本公开提供了用有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物治疗妇女的雌激素受体阳性(ER<sup>+</sup>)癌症的方法。本公开还包括对导致内分泌抗性的雌激素受体1(ESR1)基因突变的检测和对内分泌抗性ER<sup>+</sup>癌症的治疗。



1. 拉索昔芬或其药学上可接受的盐在制备用于减少患者的雌激素受体阳性(ER<sup>+</sup>)局部晚期或雌激素受体阳性(ER<sup>+</sup>)转移性乳腺癌的恶化的药物中的用途,其中所述癌在雌激素受体1(ESR1)基因的配体结合结构域(LBD)内具有至少一个功能获得性错义突变。
2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述癌之前已经被确定为在所述雌激素受体1(ESR1)基因的所述配体结合结构域(LBD)内具有至少一个功能获得性错义突变。
3. 根据权利要求1所述的用途,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在ER $\alpha$ 蛋白的氨基酸D538、Y537、L536、P535、V534、S463、V392和E380中的任一个处。
4. 根据权利要求3所述的用途,其中所述至少一个功能获得性错义突变是D538G、Y537S、Y537N、Y537C、Y537Q、L536R、L536Q、P535H、V534E、S463P、V392I或E380Q。
5. 根据权利要求3所述的用途,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在所述ER $\alpha$ 蛋白的氨基酸D538或Y537处。
6. 根据权利要求1所述的用途,其中所述患者之前已经用一线或多线内分泌疗法进行治疗。
7. 根据权利要求6所述的用途,其中所述患者之前已经进行治疗的所述内分泌疗法是除拉索昔芬以外的选择性ER调节剂(SERM)、选择性ER降解剂(SERD)或芳香化酶抑制剂(AI)。
8. 根据权利要求7所述的用途,其中所述患者之前已经进行治疗的所述内分泌疗法是芳香化酶抑制剂。
9. 根据权利要求8所述的用途,其中所述芳香化酶抑制剂是依西美坦,来曲唑或阿那曲唑。
10. 根据权利要求6所述的用途,其中所述患者在内分泌疗法后已经具有疾病恶化。
11. 根据权利要求1所述的用途,其中所述患者是绝经后。
12. 根据权利要求1所述的用途,其中拉索昔芬为拉索昔芬酒石酸盐。
13. 根据权利要求1所述的用途,其中拉索昔芬通过口服施用。
14. 根据权利要求13所述的用途,其中拉索昔芬以5毫克/天口服施用。
15. 根据权利要求1所述的用途,其中拉索昔芬与有效量的细胞周期蛋白依赖性激酶4/6(CDK4/6)抑制剂一起施用。

## ER<sup>+</sup>乳腺癌的拉索昔芬治疗

[0001] 本申请是申请日为2017年10月10日、申请号为201780073528.3、发明名称为“ER<sup>+</sup>乳腺癌的拉索昔芬治疗”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2017年5月5日提交的美国临时申请号62/502,299和于2017年2月10日提交的62/457,759;和于2016年10月11日提交的62/406,859的权益,其全部内容通过引用并入本文。

[0004] 序列表

[0005] 本申请包括已经通过EFS-Web提交的序列表,并且其全部内容通过引用并入本文。于2017年10月9日创建的所述ASCII拷贝被命名为33498PCT\_CRF\_序列表.txt,并且大小为2,119字节。

### 背景技术

[0006] 雌激素受体阳性(ER<sup>+</sup>)乳腺癌是一类表达雌激素受体α(ERα)的乳腺癌。大约70%的乳腺癌是ER<sup>+</sup>并且因此以内分泌疗法进行治疗。内分泌疗法通过降低雌激素的水平或阻断雌激素的信号传导,已经为患有ER<sup>+</sup>乳腺癌的妇女带来效果的显著改善。然而,其有效性受到固有的和获得性内分泌抗性的限制。

[0007] 近来的研究已经显示功能性雌激素受体1(ESR1)基因突变作为在ER<sup>+</sup>乳腺癌发展过程中内分泌抗性的潜在驱动的时间(temporal)选择的证据。参见Jeselsohn等,Cancer Research 20 (7) :1757-1767 (2014)。ESR1(编码ERα的基因)的突变改变ERα蛋白的构象,增加其与共激活子(co-activators)的相互作用,在不存在激素的情况下促进受体的活性形式,并协助肿瘤细胞避开激素治疗。参见Thomas and Gustafsson,Trends in Endocrinology and Metabolism 26 (9) :467-476 (2015)。

[0008] 因此,仍然存在开发有效治疗具有ESR1基因突变的肿瘤并因此可以用于治疗已发展出内分泌抗性或处于发展内分泌抗性的风险的乳腺癌患者的新治疗策略的需要。

### 发明内容

[0009] 我们工程化了ERα表达构建体以表达在ERα蛋白的配体结合结构域(LBD)中的四种ESR1突变(Y537S、Y537N、Y537C和D538G)并将这些表达构建体导入培养的细胞内。这些突变是在已经接受内分泌治疗的ER<sup>+</sup>转移性乳腺癌患者中发现的。参见Jeselsohn等,Nature Reviews Clinical Oncology 12 (10) :573-583 (2015);Jeselsohn等,Cancer Research 20 (7) :1757-1767 (2014);Robinson等,Nature Genetics 45 (12) :1446-1451 (2013);Thomas and Gustafsson,Trends in Endocrinology and Metabolism 26 (9) :467-476 (2015)和Toy等,Nature Genetics 45 (12) :1439-1445 (2013)。

[0010] 使用雌激素受体响应性报告子的构建体,我们在卵巢细胞系和乳腺癌细胞系中确认所有突变体相比于野生型ERα都具有组成型活性。随后我们用拉索昔芬(lasofloxifene)(选择性ER调节剂(SERM))处理细胞,并且发现拉索昔芬在临床可达到的浓度下以剂量-响

应的方式有效地抑制ER $\alpha$ LBD突变体的转录活性。

[0011] 在第二系列的实验中,我们确认,拉索昔芬在临床可达到的浓度下能够降低以Y537S或D538G ESR1突变受体稳定转染的乳腺癌细胞系MCF7的存活。

[0012] 因此,在第一个方面,提出了治疗女性局部晚期或转移性乳腺癌的方法。所述方法包括选择已经被诊断为雌激素受体阳性(ER $^+$ )局部晚期或转移性乳腺癌的患者进行治疗,和向所选择的患者施用有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物。

[0013] 在实施方式中,选择的患者之前已经用一线或多线内分泌疗法进行治疗。在某些实施方式中,患者之前已经用多线内分泌疗法进行治疗。

[0014] 在一些实施方式中,患者之前已经进行治疗的内分泌疗法是选择性ER调节剂(SERM)。在某些实施方式中,SERM是他莫昔芬(tamoxifen)、雷洛昔芬(raloxifene)、巴西多昔芬(bazedoxifene)、托瑞米芬(toremifene)或欧司哌米芬(ospemifene)。

[0015] 在一些实施方式中,患者之前已经进行的内分泌疗法是选择性ER降解剂(SERD)。在某些实施方式中,SERD是氟维司群(fulvestrant)、RAD1901、ARN-810(GDC-0810)或AZD9496。

[0016] 在一些实施方式中,患者之前已经进行的内分泌疗法是使用芳香化酶抑制剂。在某些实施方式中,芳香化酶抑制剂为依西美坦(Aromasin $^{\circledR}$ )、来曲唑(Femara $^{\circledR}$ )或阿那曲唑(Arimidex $^{\circledR}$ )。

[0017] 在一些实施方式中,患者在内分泌疗法后具有疾病恶化。在一些实施方式中,患者对内分泌疗法具有抗性。

[0018] 在实施方式中,患者的癌症在雌激素受体1(ESR1)基因的配体结合结构域(LBD)内具有至少一个功能获得性错义突变。在一些实施方式中,患者之前已经被确定为在雌激素受体1(ESR1)基因的配体结合结构域(LBD)内具有至少一个功能获得性错义突变。在某些实施方式中,所述方法还包括确定患者在雌激素受体1(ESR1)基因的配体结合结构域(LBD)内具有至少一个功能获得性错义突变的更早的步骤。

[0019] 在一些实施方式中,至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸D538、Y537、L536、P535、V534、S463、V392和E380中的任一个处。

[0020] 在某些实施方式中,至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸D538处。在一些优选的实施方式中,突变为D538G。

[0021] 在某些实施方式中,至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸Y537处。在一些实施方式中,突变为Y537S、Y537N、Y537C或Y537Q。在一些优选的实施方式中,突变为Y537C。

[0022] 在某些实施方式中,至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸L536处。在一些实施方式中,突变为L536R或L536Q。

[0023] 在某些实施方式中,至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸P535处。在一些实施方式中,突变为P535H。

[0024] 在某些实施方式中,至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸V534处。在一些实施方式中,突变为V534E。

[0025] 在某些实施方式中,至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸S463处。在一些实施方式中,突变为S463P。

[0026] 在某些实施方式中,至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸V392处。在一些实施方式中,突变为V392I。

[0027] 在某些实施方式中,至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸E380处。在一些实施方式中,突变为E380Q。

[0028] 在一些实施方式中,患者的血清雌二醇水平为至少0.35ng/dL。在一些实施方式中,患者的血清雌二醇水平为约0.30ng/dL至约0.35ng/dL。在一些实施方式中,患者的血清雌二醇水平为约0.25ng/dL至约0.30ng/dL。

[0029] 在实施方式中,将拉索昔芬作为拉索昔芬酒石酸盐施用给选择的ER<sup>+</sup>局部晚期或转移性乳腺癌患者。在实施方式中,拉索昔芬通过口服、静脉、经皮、阴道局部或阴道环施用。在某些实施方式中,拉索昔芬通过口服施用。在这些实施方式的一些实施方式中,拉索昔芬以约0.5mg/d口服(p.o.)至约10mg/d口服施用。在某些实施方式中,拉索昔芬以约0.5mg/d口服至约5mg/d口服施用。在某些实施方式中,拉索昔芬以约1mg/d口服至约5mg/d口服施用。在某些实施方式中,拉索昔芬以约5mg/d口服施用。在实施方式中,拉索昔芬以每天一次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次、或每月一次施用。

[0030] 在某些实施方式中,所述方法还包括用至少一种另外的内分泌疗法治疗患者。在一些实施方式中,以原始剂量用另外的内分泌疗法治疗患者。在一些其他的实施方式中,以高于原始剂量的剂量用另外的内分泌疗法治疗患者。在某些实施方式中,另外的内分泌疗法是用除拉索昔芬以外的选择性ER调节剂(SERM)进行治疗。在某些实施方式中,另外的内分泌疗法是用选择性ER降解剂(SERD)进行治疗。在某些实施方式中,另外的内分泌疗法是用芳香化酶抑制剂进行治疗。

[0031] 在实施方式中,所述方法还包括向ER<sup>+</sup>局部晚期或转移性乳腺癌患者施用有效量的周期蛋白依赖性激酶4/6(CDK4/6)抑制剂。在某些实施方式中,CDK4/6抑制剂为帕博西尼(palbociclib)、阿贝西尼(abemaciclib)或瑞伯西尼(ribociclib)。在一些实施方式中,所述方法还包括向患者施用有效量的哺乳动物雷帕霉素靶标(mTOR)抑制剂。在某些实施方式中,mTOR抑制剂为依维莫司(Everolimus)。在一些实施方式中,所述方法还包括向患者施用有效量的磷酸肌醇3激酶(PI3K)抑制剂或热休克蛋白90(HSP90)抑制剂。在一些实施方式中,所述方法还包括向患者施用有效量的人表皮生长因子受体2(HER2)抑制剂。在某些实施方式中,HER2抑制剂为曲妥珠单抗(Herceptin<sup>®</sup>)或ado-trastuzumab emtansin(Kadcyla<sup>®</sup>)。在一些实施方式中,所述方法还包括向患者施用有效量的组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂。在这些实施方式的一些实施方式中,HDAC抑制剂为vorinostat(Zolinza<sup>®</sup>)、romidepsin(Istodax<sup>®</sup>)、chidamide(Epidaza<sup>®</sup>)、panobinostat(Farydak<sup>®</sup>)、belinostat(Beleodaq<sup>®</sup>、PXD101)、丙戊酸(Depakote<sup>®</sup>、Depakene<sup>®</sup>、Stavzor<sup>®</sup>)、mocetinostat(MGCD0103)、abexinostat(PCI-24781)、entinostat(MS-275)、pracinostat(SB939)、resminostat(4SC-201)、givinostat(ITF2357)、quisinostat(JNJ-26481585)、kevetrin、CUDC-101、AR-42、tefinostat(CHR-2835)、CHR-3996、4SC202、CG200745、rocilinostat(ACY-1215)或萝卜硫素。在一些实施方式中,所述方法还包括向患者施用有效量的检查点抑制剂。在这些实施方式的一些实施方式中,检查点抑制剂是特异于程序性

细胞死亡蛋白1 (PD-1)、程序性死亡配体1 (PD-L1) 或细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4) 的抗体。在某些实施方式中,PD-1抗体是pembrolizumab ( Keytruda<sup>®</sup> ) 或nivolumab ( Opdivo<sup>®</sup> )。在某些实施方式中,CTLA-4抗体是易普利姆玛 ( ipilimumab ) ( Yervoy<sup>®</sup> )。在一些实施方式中,所述方法还包括向患者施用有效量的癌症疫苗。

[0032] 在一些实施方式中,患者处于绝经前 (premenopausal)。在某些实施方式中,患者患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>/HER2-乳腺癌。在这些实施方式的一些实施方式中,患者在其用非甾体芳香化酶抑制剂 (AI)、氟维司群、AI与CDK4/6抑制剂的组合或氟维司群与CDK4/6抑制剂的组合的第一次激素治疗中已经恶化。

[0033] 在一些实施方式中,患者处于围绝经期 (perimenopausal)。在某些实施方式中,患者患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>/HER2-乳腺癌。在这些实施方式的一些实施方式中,患者在其用非甾体芳香化酶抑制剂 (AI)、氟维司群、AI与CDK4/6抑制剂的组合或氟维司群与CDK4/6抑制剂的组合的第一次激素治疗中已经恶化。

[0034] 在一些实施方式中,患者处于绝经后 (postmenopausal)。在某些实施方式中,患者患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>/HER2-乳腺癌。在这些实施方式的一些实施方式中,患者在其用非甾体芳香化酶抑制剂 (AI)、氟维司群、AI与CDK4/6抑制剂的组合或氟维司群与CDK4/6抑制剂的组合的第一次激素治疗中已经恶化。

[0035] 在另一个方面,提出了治疗女性原发性乳腺癌的方法。所述方法包括选择已经被诊断为雌激素受体阳性 (ER<sup>+</sup>) 原发性乳腺癌的患者进行治疗,并向所选择的患者施用有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物。

[0036] 在实施方式中,将拉索昔芬作为拉索昔芬酒石酸盐施用给选择的ER<sup>+</sup>原发性乳腺癌患者。在一些实施方式中,拉索昔芬通过口服、静脉、经皮、阴道局部或阴道环施用。在某些实施方式中,拉索昔芬通过口服施用。在这些实施方式的一些实施方式中,拉索昔芬以约0.5mg/d口服至约10mg/d口服施用。在某些实施方式中,拉索昔芬以约0.5mg/d口服至约5mg/d口服施用。在某些实施方式中,拉索昔芬以约1mg/d口服至约5mg/d口服施用。在某些实施方式中,拉索昔芬以约1mg/d口服施用。在某些实施方式中,拉索昔芬以约5mg/d口服施用。在实施方式中,拉索昔芬以每天一次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次、或每月一次施用。

[0037] 在实施方式中,治疗ER<sup>+</sup>原发性乳腺癌的方法还包括用至少一种另外的内分泌疗法治疗患者。在一些实施方式中,以原始剂量用另外的内分泌疗法治疗患者。在一些其他的实施方式中,以高于原始剂量的剂量用另外的内分泌疗法治疗患者。在某些实施方式中,另外的内分泌疗法是用除拉索昔芬以外的选择性ER调节剂 (SERM) 进行治疗。在某些实施方式中,另外的内分泌疗法是用选择性ER降解剂 (SERD) 进行治疗。在某些实施方式中,另外的内分泌疗法是用芳香化酶抑制剂进行治疗。

[0038] 在实施方式中,所述方法还包括向ER<sup>+</sup>原发性乳腺癌患者施用有效量的周期蛋白依赖性激酶4/6 (CDK4/6) 抑制剂。在某些实施方式中,CDK4/6抑制剂为帕博西尼、阿贝西尼或瑞伯西尼。在一些实施方式中,所述方法还包括向患者施用有效量的哺乳动物雷帕霉素靶标 (mTOR) 抑制剂。在某些实施方式中,mTOR抑制剂为依维莫司 (Everolimus)。在一些实施

方式中,所述方法还包括向患者施用有效量的磷酸肌醇3激酶(PI3K)抑制剂或热休克蛋白90(HSP90)抑制剂。在一些实施方式中,所述方法还包括向患者施用有效量的人表皮生长因子受体2(HER2)抑制剂。在某些实施方式中,HER2抑制剂为曲妥珠单抗( Herceptin<sup>®</sup> )或 ado-trastuzumab emtansin( Kadcyla<sup>®</sup> )。在一些实施方式中,所述方法还包括向患者施用有效量的组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂。在这些实施方式的一些实施方式中,HDAC抑制剂为 vorinostat( Zolinza<sup>®</sup> )、romidepsin( Istodax<sup>®</sup> )、chidamide( Epidaza<sup>®</sup> )、panobinostat( Farydak<sup>®</sup> )、belinostat( Beleodaq<sup>®</sup> 、PXD101)、丙戊酸( Depakote<sup>®</sup> 、Depakene<sup>®</sup> 、Stavzor<sup>®</sup> )、mocetinostat( MGCD0103 )、abexinostat( PCI-24781 )、entinostat( MS-275 )、pracinostat( SB939 )、resminostat( 4SC-201 )、givinostat( ITF2357 )、quisinostat( JNJ-26481585 )、kevetrin、CUDC-101、AR-42、tefinostat( CHR-2835 )、CHR-3996、4SC202、CG200745、rocilinostat( ACY-1215 )或萝卜硫素。在一些实施方式中,所述方法还包括向患者施用有效量的检查点抑制剂。在这些实施方式的一些实施方式中,检查点抑制剂是特异于程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)、程序性死亡配体1(PD-L1)或细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)的抗体。在某些实施方式中,PD-1抗体是 pembrolizumab( Keytruda<sup>®</sup> )或 nivolumab( Opdivo<sup>®</sup> )。在某些实施方式中,CTLA-4抗体是易普利姆玛(ipilimumab)( Yervoy<sup>®</sup> )。在一些实施方式中,所述方法还包括向患者施用有效量的癌症疫苗。

[0039] 在某些实施方式中,患者处于绝经前。在某些实施方式中,患者处于围绝经期。在某些实施方式中,患者处于绝经后。

[0040] 在另一个方面,提出了雌激素受体阳性(ER<sup>+</sup>)乳腺癌的辅助疗法的方法。所述方法包括向已经接受ER<sup>+</sup>乳腺癌的主要(primary)治疗的患者施用有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物与芳香化酶抑制剂的组合。

[0041] 在一些实施方式中,拉索昔芬在施用芳香化酶抑制剂的过程中被连续施用。在一些实施方式中,拉索昔芬在施用芳香化酶抑制剂的过程中被循环施用。在某些实施方式中,拉索昔芬的给药(dosing)方案不同于芳香化酶抑制剂的给药方案。

[0042] 在实施方式中,拉索昔芬以拉索昔芬酒石酸盐作为辅助疗法与芳香化酶抑制剂联合施用。在一些实施方式中,芳香化酶抑制剂为依西美坦( Aromasin<sup>®</sup> )、来曲唑( Femara<sup>®</sup> )或阿那曲唑( Arimidex<sup>®</sup> )。在一些实施方式中,拉索昔芬通过口服、静脉、经皮、阴道局部或阴道环施用。在某些实施方式中,拉索昔芬通过口服施用。在这些实施方式的一些实施方式中,拉索昔芬以约0.5mg/d口服至约10mg/d口服施用。在某些实施方式中,拉索昔芬以约0.5mg/d口服至约5mg/d口服施用。在某些实施方式中,拉索昔芬以约1mg/d口服至约5mg/d口服施用。在某些实施方式中,拉索昔芬以约1mg/d口服施用。在某些实施方式中,拉索昔芬以约5mg/d口服施用。在实施方式中,拉索昔芬以每天一次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次、或每月一次施用。

[0043] 在实施方式中,所述雌激素受体阳性(ER<sup>+</sup>)乳腺癌的辅助疗法的方法还包括用至少一种另外的内分泌疗法治疗患者。在某些实施方式中,另外的内分泌疗法是用选择性ER降解剂(SERD)进行治疗。

[0044] 在实施方式中,所述雌激素受体阳性(ER<sup>+</sup>)乳腺癌的辅助疗法的方法还包括向患者施用有效量的周期蛋白依赖性激酶4/6(CDK4/6)抑制剂。在某些实施方式中,CDK4/6抑制剂为帕博西尼、阿贝西尼或瑞伯西尼。在一些实施方式中,所述方法还包括向患者施用有效量的哺乳动物雷帕霉素靶标(mTOR)抑制剂。在某些实施方式中,mTOR抑制剂为依维莫司(Everolimus)。在一些实施方式中,所述方法还包括向患者施用有效量的磷酸肌醇3激酶(PI3K)抑制剂或热休克蛋白90(HSP90)抑制剂。在一些实施方式中,所述方法还包括向患者施用有效量的人表皮生长因子受体2(HER2)抑制剂。在某些实施方式中,HER2抑制剂为曲妥珠单抗(Herceptin<sup>®</sup>)或ado-trastuzumab emtansin(Kadcyla<sup>®</sup>)。在一些实施方式中,所述方法还包括向患者施用有效量的组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂。在这些实施方式的一些实施方式中,HDAC抑制剂为vorinostat(Zolinza<sup>®</sup>)、romidepsin(Istodax<sup>®</sup>)、chidamide(Epidaza<sup>®</sup>)、panobinostat(Farydak<sup>®</sup>)、belinostat(Beleodaq<sup>®</sup>、PXD101)、丙戊酸(Depakote<sup>®</sup>、Depakene<sup>®</sup>、Stavzor<sup>®</sup>)、mocetinostat(MGCD0103)、abexinostat(PCI-24781)、entinostat(MS-275)、pracinostat(SB939)、resminostat(4SC-201)、givinostat(ITF2357)、quisinostat(JNJ-26481585)、kevetrin、CUDC-101、AR-42、tefinostat(CHR-2835)、CHR-3996、4SC202、CG200745、rocilinostat(ACY-1215)或萝卜硫素。在一些实施方式中,所述方法还包括向患者施用有效量的检查点抑制剂。在这些实施方式的一些实施方式中,检查点抑制剂是特异于程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)、程序性死亡配体1(PD-L1)或细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)的抗体。在某些实施方式中,PD-1抗体是pembrolizumab(Keytruda<sup>®</sup>)或nivolumab(Opdivo<sup>®</sup>)。在某些实施方式中,CTLA-4抗体是易普利姆玛(ipilimumab)(Yervoy<sup>®</sup>)。在一些实施方式中,所述方法还包括向患者施用有效量的癌症疫苗。

[0045] 在一些实施方式中,拉索昔芬以足以提高骨量的量和时间表(schedule)施用。在一些实施方式中,拉索昔芬以足以改善VVA的症状的量和时间表施用。

[0046] 在某些实施方式中,患者处于绝经前。在某些实施方式中,患者处于围绝经期。在某些实施方式中,患者处于绝经后。

[0047] 在另一个方面,提出了一种治疗妇女的除乳腺癌以外的癌症的方法。所述方法包括选择已经被诊断为除乳腺癌以外的雌激素受体阳性(ER<sup>+</sup>)癌症并且在雌激素受体1(ESR1)基因中具有至少一个功能获得性突变的患者进行治疗,和向所选择的患者施用有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物。在一些实施方式中,所述患者已经被诊断为ER<sup>+</sup>卵巢癌。在一些其他的实施方式中,所述患者已经被诊断为ER<sup>+</sup>肺癌。

[0048] 在实施方式中,将拉索昔芬作为拉索昔芬酒石酸盐施用给选择的患有除乳腺癌以外的ER<sup>+</sup>癌症的患者。在一些实施方式中,拉索昔芬通过口服、静脉、经皮、阴道局部或阴道环施用。在某些实施方式中,拉索昔芬通过口服施用。在这些实施方式的一些实施方式中,

拉索昔芬以约0.5mg/d口服至约10mg/d口服施用。在某些实施方式中，拉索昔芬以约0.5mg/d口服至约5mg/d口服施用。在某些实施方式中，拉索昔芬以约1mg/d口服至约5mg/d口服施用。在某些实施方式中，拉索昔芬以约5mg/d口服施用。在实施方式中，拉索昔芬以每天一次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次、或每月一次施用。

[0049] 在实施方式中，所述治疗除乳腺癌以外的ER<sup>+</sup>癌症的方法还包括用至少一种另外的内分泌疗法治疗患者。在一些实施方式中，以原始剂量用另外的内分泌疗法治疗患者。在一些其他的实施方式中，以高于原始剂量的剂量用另外的内分泌疗法治疗患者。在某些实施方式中，另外的内分泌疗法是用除拉索昔芬以外的选择性ER调节剂(SERM)进行治疗。在某些实施方式中，另外的内分泌疗法是用选择性ER降解剂(SERD)进行治疗。在某些实施方式中，另外的内分泌疗法是用芳香化酶抑制剂进行治疗。

[0050] 在实施方式中，所述方法还包括向患有除乳腺癌以外的ER<sup>+</sup>癌症的患者施用有效量的周期蛋白依赖性激酶4/6(CDK4/6)抑制剂。在某些实施方式中，CDK4/6抑制剂为帕博西尼、阿贝西尼或瑞伯西尼。在一些实施方式中，所述方法还包括向患者施用有效量的哺乳动物雷帕霉素靶标(mTOR)抑制剂。在某些实施方式中，mTOR抑制剂为依维莫司(Everolimus)。在一些实施方式中，所述方法还包括向患者施用有效量的磷酸肌醇3激酶(PI3K)抑制剂或热休克蛋白90(HSP90)抑制剂。在一些实施方式中，所述方法还包括向患者施用有效量的人表皮生长因子受体2(HER2)抑制剂。在某些实施方式中，HER2抑制剂为曲妥珠单抗(Herceptin<sup>®</sup>)或ado-trastuzumab emtansin(Kadcyla<sup>®</sup>)。在一些实施方式中，所述方法还包括向患者施用有效量的组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂。在这些实施方式的一些实施方式中，HDAC抑制剂为vorinostat(Zolinza<sup>®</sup>)、romidepsin(Istodax<sup>®</sup>)、chidamide(Epidaza<sup>®</sup>)、panobinostat(Farydak<sup>®</sup>)、belinostat(Beleodaq<sup>®</sup>、PXD101)、丙戊酸(Depakote<sup>®</sup>、Depakene<sup>®</sup>、Stavzor<sup>®</sup>)、mocetinostat(MGCD0103)、abexinostat(PCI-24781)、entinostat(MS-275)、pracinostat(SB939)、resminostat(4SC-201)、givinostat(ITF2357)、quisinostat(JNJ-26481585)、kevetrin、CUDC-101、AR-42、tefinostat(CHR-2835)、CHR-3996、4SC202、CG200745、rocilinostat(ACY-1215)或萝卜硫素。在一些实施方式中，所述方法还包括向患者施用有效量的检查点抑制剂。在这些实施方式的一些实施方式中，检查点抑制剂是特异于程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)、程序性死亡配体1(PD-L1)或细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)的抗体。在某些实施方式中，PD-1抗体是pembrolizumab( Keytruda<sup>®</sup>)或nivolumab( Opdivo<sup>®</sup>)。在某些实施方式中，CTLA-4抗体是易普利姆玛(ipilimumab)(Yervoy<sup>®</sup>)。在一些实施方式中，所述方法还包括向患者施用有效量的癌症疫苗。

[0051] 在某些实施方式中，患者处于绝经前。在某些实施方式中，患者处于围绝经期。在某些实施方式中，患者处于绝经后。

[0052] 在另一个方面，提供了治疗处于在雌激素受体1(ESR1)基因的配体结合结构域(LBD)内发生功能获得性错义突变的风险的患有乳腺癌的女性患者的方法。所述方法包括

向所述女性患者施用有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前药。

[0053] 在另一个方面,提出了治疗处于获得对内分泌疗法的抗性的风险的患有乳腺癌的女性患者的方法。所述内分泌疗法任选地为: (i) 选择性ER调节剂(SERM)疗法, (ii) 选择性ER降解剂(SERD)疗法, (iii) 芳香化酶抑制剂疗法, 或 (iv) (i)、(ii) 和/或 (iii) 的任意组合。所述方法包括向所述女性患者施用有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物。

[0054] 在一些实施方式中,患者患有原发性乳腺癌。在这些实施方式的一些实施方式中,原发性乳腺癌为局部晚期。

[0055] 在实施方式中,患者已经用内分泌疗法进行治疗,任选地其中所述内分泌疗法为: (i) 选择性ER调节剂(SERM)疗法, (ii) 选择性ER降解剂(SERD)疗法, (iii) 芳香化酶抑制剂(AI)疗法, 或 (iv) (i)、(ii) 和/或 (iii) 的任意组合。

[0056] 在另一个方面,提出了治疗患有雌激素受体阳性(ER<sup>+</sup>)原发性乳腺癌的女性患者的方法。所述方法包括向女性患者施用有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物。

[0057] 在一些实施方式中,患者处于获得对内分泌疗法的抗性的风险,任选地其中所述内分泌疗法为: (i) 选择性ER调节剂(SERM)疗法, (ii) 选择性ER降解剂(SERD)疗法, (iii) 芳香化酶抑制剂(AI)疗法, 或 (iv) (i)、(ii) 和/或 (iii) 的任意组合。

[0058] 在某些实施方式中,原发性乳腺癌为局部晚期。

[0059] 在一些实施方式中,患者已经用内分泌疗法进行治疗,任选地其中所述内分泌疗法为: (i) 选择性ER调节剂(SERM)疗法, (ii) 选择性ER降解剂(SERD)疗法, (iii) 芳香化酶抑制剂(AI)疗法, 或 (iv) (i)、(ii) 和/或 (iii) 的任意组合。

[0060] 在另一个方面,提出了治疗患有雌激素受体阳性(ER<sup>+</sup>)局部晚期或转移性乳腺癌的女性患者的方法。所述方法包括向所述女性患者施用有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物。

[0061] 在实施方式,选择的患者之前已经用一线或多线内分泌疗法进行治疗。在某些实施方式中,患者已经用多线内分泌疗法进行治疗。

[0062] 在一些实施方式中,患者之前已经进行治疗的内分泌疗法是选择性ER调节剂(SERM)。在某些实施方式中,SERM是他莫昔芬(tamoxifen)、雷洛昔芬(raloxifene)、巴西多昔芬(bazedoxifene)、托瑞米芬(toremifene)或欧司哌米芬(ospemifene)。

[0063] 在一些实施方式中,患者之前已经进行的内分泌疗法是选择性ER降解剂(SERD)。在某些实施方式中,SERD是氟维司群(fulvestrant)、RAD1901、ARN-810(GDC-0810)或AZD9496。

[0064] 在一些实施方式中,患者之前已经进行的内分泌疗法是使用芳香化酶抑制剂。在某些实施方式中,芳香化酶抑制剂为依西美坦(Aromasin<sup>®</sup>)、来曲唑(Femara<sup>®</sup>)或阿那曲唑(Arimidex<sup>®</sup>)。

[0065] 在一些实施方式中,患者在内分泌疗法后具有疾病恶化。在一些实施方式中,患者对内分泌疗法具有抗性。

[0066] 在实施方式中,患者的癌症在雌激素受体1(ESR1)基因的配体结合结构域(LBD)内

具有至少一个功能获得性错义突变。在一些实施方式中，患者之前已经被确定为在雌激素受体1(ESR1)基因的配体结合结构域(LBD)内具有至少一个功能获得性错义突变。在某些实施方式中，所述方法还包括确定患者在雌激素受体1(ESR1)基因的配体结合结构域(LBD)内具有至少一个功能获得性错义突变的更早的步骤。

[0067] 在一些实施方式中，至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸D538、Y537、L536、P535、V534、S463、V392和E380中的任一个处。

[0068] 在某些实施方式中，所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸D538处。在一些优选的实施方式中，突变为D538G。

[0069] 在某些实施方式中，至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸Y537处。在一些实施方式中，突变为Y537S、Y537N、Y537C或Y537Q。在一些优选的实施方式中，突变为Y537C。

[0070] 在某些实施方式中，至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸L536处。在一些实施方式中，突变为L536R或L536Q。

[0071] 在某些实施方式中，至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸P535处。在一些实施方式中，突变为P535H。

[0072] 在某些实施方式中，至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸V534处。在一些实施方式中，突变为V534E。

[0073] 在某些实施方式中，至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸S463处。在一些实施方式中，突变为S463P。

[0074] 在某些实施方式中，至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸V392处。在一些实施方式中，突变为V392I。

[0075] 在某些实施方式中，至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸E380处。在一些实施方式中，突变为E380Q。

[0076] 在实施方式中，将拉索昔芬作为拉索昔芬酒石酸盐施用给选择的ER<sup>+</sup>局部晚期或转移性乳腺癌患者。在实施方式中，拉索昔芬通过口服、静脉、经皮、阴道局部或阴道环施用。在某些实施方式中，拉索昔芬通过口服施用。在这些实施方式的一些实施方式中，拉索昔芬以约0.5mg/d口服至约10mg/d口服施用。在某些实施方式中，拉索昔芬以约0.5mg/d口服至约5mg/d口服施用。在某些实施方式中，拉索昔芬以约1mg/d口服至约5mg/d口服施用。在某些实施方式中，拉索昔芬以约1mg/d口服施用。在某些实施方式中，拉索昔芬以约5mg/d口服施用。在实施方式中，拉索昔芬以每天一次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次、或每月一次施用。

[0077] 在某些实施方式中，所述方法还包括用至少一种另外的内分泌疗法治疗患者。在一些实施方式中，以原始剂量用另外的内分泌疗法治疗患者。在一些其他的实施方式中，以高于原始剂量的剂量用另外的内分泌疗法治疗患者。在某些实施方式中，另外的内分泌疗法是用除拉索昔芬以外的选择性ER调节剂(SERM)进行治疗。在某些实施方式中，另外的内分泌疗法是用选择性ER降解剂(SERD)进行治疗。在某些实施方式中，另外的内分泌疗法是用芳香化酶抑制剂进行治疗。

[0078] 在实施方式中，所述方法还包括向ER<sup>+</sup>局部晚期或转移性乳腺癌患者施用有效量的周期蛋白依赖性激酶4/6(CDK4/6)抑制剂。在某些实施方式中，CDK4/6抑制剂为帕博西尼、阿贝西尼或瑞伯西尼。在一些实施方式中，所述方法还包括向患者施用有效量的哺乳动

物雷帕霉素靶标 (mTOR) 抑制剂。在某些实施方式中, mTOR抑制剂为依维莫司 (Everolimus)。在一些实施方式中, 所述方法还包括向患者施用有效量的磷酸肌醇3激酶 (PI3K) 抑制剂或热休克蛋白90 (HSP90) 抑制剂。在一些实施方式中, 所述方法还包括向患者施用有效量的人表皮生长因子受体2 (HER2) 抑制剂。在某些实施方式中, HER2抑制剂为曲妥珠单抗 (Herceptin<sup>®</sup>) 或 ado-trastuzumab emtansin (Kadcyla<sup>®</sup>)。在一些实施方式中, 所述方法还包括向患者施用有效量的组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 抑制剂。在这些实施方式的一些实施方式中, HDAC抑制剂为 vorinostat (Zolinza<sup>®</sup>)、romidepsin (Istodax<sup>®</sup>)、chidamide (Epidaza<sup>®</sup>)、panobinostat (Farydak<sup>®</sup>)、belinostat (Beleodaq<sup>®</sup>、PXD101)、丙戊酸 (Depakote<sup>®</sup>、Depakene<sup>®</sup>、Stavzor<sup>®</sup>)、mocetinostat (MGCD0103)、abexinostat (PCI-24781)、entinostat (MS-275)、pracinostat (SB939)、resminostat (4SC-201)、givinostat (ITF2357)、quisinostat (JNJ-26481585)、kevetrin、CUDC-101、AR-42、tefinostat (CHR-2835)、CHR-3996、4SC202、CG200745、rocilinostat (ACY-1215) 或萝卜硫素。在一些实施方式中, 所述方法还包括向患者施用有效量的检查点抑制剂。在这些实施方式的一些实施方式中, 检查点抑制剂是特异于程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1)、程序性死亡配体1 (PD-L1) 或细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4) 的抗体。在某些实施方式中, PD-1抗体是 pembrolizumab (Keytruda<sup>®</sup>) 或 nivolumab (Opdivo<sup>®</sup>)。在某些实施方式中, CTLA-4抗体是易普利姆玛 (ipilimumab) (Yervoy<sup>®</sup>)。在一些实施方式中, 所述方法还包括向患者施用有效量的癌症疫苗。

[0079] 在一些实施方式中, 患者处于绝经前。在某些实施方式中, 患者患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>/HER2-乳腺癌。在这些实施方式的一些实施方式中, 患者在其用非甾体芳香化酶抑制剂 (AI)、氟维司群、AI与CDK4/6抑制剂的组合或氟维司群与CDK4/6抑制剂的组合的第一次激素治疗中已经恶化。

[0080] 在一些实施方式中, 患者处于围绝经期。在某些实施方式中, 患者患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>/HER2-乳腺癌。在这些实施方式的一些实施方式中, 患者在其用非甾体芳香化酶抑制剂 (AI)、氟维司群、AI与CDK4/6抑制剂的组合或氟维司群与CDK4/6抑制剂的组合的第一次激素治疗中已经恶化。

[0081] 在一些实施方式中, 患者处于绝经后。在某些实施方式中, 患者患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>/HER2-乳腺癌。在这些实施方式的一些实施方式中, 患者在其用非甾体芳香化酶抑制剂 (AI)、氟维司群、AI与CDK4/6抑制剂的组合或氟维司群与CDK4/6抑制剂的组合的第一次激素治疗中已经恶化。

[0082] 本发明还涉及以下项目:

[0083] 1. 一种治疗患有雌激素受体阳性 (ER<sup>+</sup>) 乳腺癌的女性患者的方法, 其包括:

[0084] 向女性患者施用有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物。

[0085] 2. 根据项目1所述的方法, 其还包括选择已经被诊断为雌激素受体阳性 (ER<sup>+</sup>) 乳腺癌的患者进行治疗。

[0086] 3. 根据项目1或项目2所述的方法, 其还包括向所述患者施用选自芳香化酶抑制

剂、CDK4/6抑制剂、mTOR抑制剂、PI3K抑制剂、HSP90抑制剂、HER2抑制剂和HDAC抑制剂的药剂。

[0087] 4. 根据项目1至3中任一项所述的方法,其中拉索昔芬或其药学上可接受的盐或前体药物被施用作为辅助疗法。

[0088] 5. 根据项目1至4中任一项所述的方法,其中所述患者的乳腺癌对内分泌疗法具有抗性。

[0089] 6. 根据项目1至5中任一项所述的方法,其中所述患者的癌症在雌激素受体1(ESR1)基因的配体结合结构域(LBD)内具有至少一个功能获得性错义突变。

[0090] 7. 根据项目6所述的方法,其中所述患者之前已经被确定为在所述雌激素受体1(ESR1)基因的所述配体结合结构域(LBD)内具有至少一个功能获得性错义突变。

[0091] 8. 根据项目7所述的方法,其还包括确定所述患者在所述雌激素受体1(ESR1)基因的所述配体结合结构域(LBD)内具有至少一个功能获得性错义突变的更早的步骤。

[0092] 9. 根据项目6至8中任一项所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸D538、Y537、L536、P535、V534、S463、V392和E380中的任一个处。

[0093] 10. 根据项目9所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸D538处。

[0094] 11. 根据项目10所述的方法,其中所述突变为D538G。

[0095] 12. 根据项目9所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸Y537处。

[0096] 13. 根据项目12所述的方法,其中所述突变为Y537S、Y537N、Y537C或Y537Q。

[0097] 14. 根据项目13所述的方法,其中所述突变为Y537C。

[0098] 15. 根据项目9所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸L536处。

[0099] 16. 根据项目15所述的方法,其中所述突变为L536R或L536Q。

[0100] 17. 根据项目9所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸P535处。

[0101] 18. 根据项目17所述的方法,其中所述突变为P535H。

[0102] 19. 根据项目9所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸V534处。

[0103] 20. 根据项目19所述的方法,其中所述突变为V534E。

[0104] 21. 根据项目9所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸S463处。

[0105] 22. 根据项目21所述的方法,其中所述突变为S463P。

[0106] 23. 根据项目9所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸V392处。

[0107] 24. 根据项目23所述的方法,其中所述突变为V392I。

[0108] 25. 根据项目9所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸E380处。

[0109] 26. 根据项目25所述的方法,其中所述突变为E380Q。

[0110] 27. 根据项目1至4中任一项所述的方法,其中所述患者处于获得对内分泌疗法的抗性的风险,任选地其中所述内分泌疗法为: (i) 选择性ER调节剂(SERM)疗法, (ii) 选择性ER降解剂(SERD)疗法, (iii) 芳香化酶抑制剂疗法,或(iv) (i)、(ii) 和/或 (iii) 的任意组合。

[0111] 28. 根据项目27所述的方法,其中所述患者处于在雌激素受体1(ESR1)基因的配体结合结构域(LBD)内发生功能获得性错义突变的风险。

[0112] 29. 根据项目27或28所述的方法,其中所述患者之前已经用一线或多线内分泌疗法进行治疗。

[0113] 30. 根据项目29所述的方法,其中所述患者已经接受在前内分泌疗法作为所述乳腺癌的主要疗法或辅助疗法。

[0114] 31. 根据项目1至30中任一项所述的方法,其中所述ER<sup>+</sup>乳腺癌为原发性乳腺癌。

[0115] 32. 根据项目1至30中任一项所述的方法,其中所述ER<sup>+</sup>乳腺癌为局部晚期乳腺癌。

[0116] 33. 根据项目1至30中任一项所述的方法,其中所述ER<sup>+</sup>乳腺癌为转移性乳腺癌。

[0117] 34. 一种治疗妇女的除乳腺癌以外的癌症的方法,其包括:

[0118] a) 选择已经被诊断为除乳腺癌以外的雌激素受体阳性(ER<sup>+</sup>)癌症并且在雌激素受体1(ESR1)基因中具有至少一个功能获得性突变的患者进行治疗;和

[0119] b) 向所选择的患者施用有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物。

## 附图说明

[0120] 本发明的这些和其他特征、方面和优点将在以下描述和附图中得到更好的理解:

[0121] 图1A和图1B显示拉索昔芬对Caov2卵巢癌细胞中的ESR1配体结合结构域("LBD")突变的作用,图1A证实突变受体具有组成型活性而不响应17-β雌二醇("E2"),而图1B证实拉索昔芬以剂量-响应的方式抑制突变受体的活性。

[0122] 图2A和图2B显示拉索昔芬对SKBR3乳腺癌细胞中的ESR1LBD突变的作用,图2A证实突变受体具有组成型活性而不响应17-β雌二醇(E2),而图2B证实拉索昔芬以剂量-响应的方式抑制突变受体的活性。

[0123] 图3A和图3B显示拉索昔芬对稳定转染的MCF7乳腺癌细胞中的ESR1 LBD突变的作用,图3A证实拉索昔芬以增加的剂量滴定抑制Y537S突变受体的活性,图3B证实拉索昔芬以增加的剂量滴定抑制D538G突变受体的活性。

## 具体实施方式

[0124] 内分泌疗法常用于ER<sup>+</sup>乳腺癌的治疗和预防。不同类型的内分泌疗法包括选择性ER调节剂(SERM),例如他莫昔芬;选择性ER降解剂(SERD),例如氟维司群;和芳香化酶抑制剂(AI)。尽管内分泌疗法已经为患有ER<sup>+</sup>乳腺癌的妇女带来效果的显著改善,但其有效性受到固有的和获得性内分泌抗性的限制。关于内分泌抗性机理的近期研究已经表明,在某些情况下雌激素受体1(ESR1)基因突变导致ER $\alpha$ 蛋白的构象朝着组成型活性的状态变化,并且导致对他莫昔芬、氟维司群和雌激素剥夺具有相对抗性的配体非依赖性活性。参见Jeselsohn等,Clinical Cancer Research 20(7):1757-1767(2014)。

[0125] 拉索昔芬是非甾体选择性ER调节剂(SERM)。它对雌激素受体具有高结合亲和力,

并且可作为组织选择性雌激素激动剂或拮抗剂。在双盲、安慰剂对照、随机的采用拉索昔芬的绝经后评估和风险降低 (PEARL) 试验中,发现拉索昔芬可以降低骨质疏松的风险。参见 Cummings 等,The New England Journal of Medicine 326 (8) :686-696 (2010)。在PEARL试验中,还发现拉索昔芬降低具有骨质疏松的绝经后妇女的乳腺癌的风险。参见LaCroix 等,Journal of the National Cancer Institute 102 (22) :1706-1715 (2010)。然而,之前尚未确定拉索昔芬作为乳腺癌的治疗的效果及其对具有内分泌抗性的癌症的作用。

[0126] 使用具有在ESR1基因上的工程化突变的细胞系,我们发现拉索昔芬在临床可以达到的浓度下以剂量-响应的方式抑制突变受体的活性,使用其有效性不受内分泌抗性的阻碍的拉索昔芬来治疗ER<sup>+</sup>局部晚期或转移性乳腺癌、ER<sup>+</sup>原发性乳腺癌和其他ER<sup>+</sup>癌症(包括具有ESR1突变的癌症)的新做的可能方法。

[0127] 6.1治疗方法

[0128] 因此,在第一个方面,本文公开了治疗女性癌症的方法,包括选择已经被诊断为雌激素受体阳性 (ER<sup>+</sup>) 癌症的患者进行治疗。所选择的患者用有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物进行治疗。

[0129] 6.1.1 ER<sup>+</sup>癌症患者

[0130] 在实施方式中,患者已经通过在所述患者的癌症的样本上进行的免疫组织化学 (IHC) 被诊断为ER<sup>+</sup>癌症。在一些实施方式中,患者已经被诊断为局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>乳腺癌。在一些实施方式中,患者已经被诊断为ER<sup>+</sup>原发性乳腺癌。在一些实施方式中,患者已经被诊断为除乳腺癌以外的ER<sup>+</sup>癌症。在这些实施方式的一些实施方式中,患者已经被诊断为ER<sup>+</sup>卵巢癌。在这些实施方式的一些实施方式中,患者已经被诊断为ER<sup>+</sup>肺癌。

[0131] 在一些实施方式中,患者的癌细胞已经在雌激素受体1 (ESR1) 基因的配体结合结构域 (LBD) 内发生功能获得性错义突变。

[0132] 在一些实施方式中,患者处于获得对内分泌疗法的抗性的风险。在特别的实施方式中,患者由于雌激素受体的表达增加而处于获得对内分泌疗法的抗性的风险。在特别的实施方式中,患者由于雌激素受体的共激活子的表达增加而处于获得对内分泌疗法的抗性的风险。在特别的实施方式中,患者由于雌激素受体及其共激活子的磷酸化水平和活性增加而处于获得对内分泌疗法的抗性的风险。在特别的实施方式中,患者由于肿瘤微环境和其他宿主相关因素改变而处于获得对内分泌疗法的抗性的风险。在一些优选的实施方式中,患者由于雌激素受体1 (ESR1) 基因中的突变而处于获得对内分泌疗法的抗性的风险。

[0133] 在这些实施方式的一些实施方式中,患者处于获得对其抗性的风险的内分泌疗法为: (i) 选择性ER调节剂 (SERM) 疗法, (ii) 选择性ER降解剂 (SERD) 疗法, (iii) 芳香化酶抑制剂疗法, 或 (iv) (i)、(ii) 和/或 (iii) 的任意组合。

[0134] 6.1.2之前采用内分泌疗法的治疗

[0135] 在实施方式中,ER<sup>+</sup>癌症患者之前已经用一线或多线内分泌疗法进行治疗。在某些实施方式中,患者之前已经用一线内分泌疗法进行治疗。在某些其他的实施方式中,患者之前已经用多线内分泌疗法进行治疗。在一些实施方式中,患者之前已经用两线内分泌疗法进行治疗。在一些实施方式中,患者之前已经用三线内分泌疗法进行治疗。在一些实施方式中,患者之前已经用四线或更多线内分泌疗法进行治疗。

[0136] 在一些实施方式中,患者之前已经进行治疗的内分泌疗法是选择性ER调节剂

(SERM)。在一些实施方式中,选择性ER调节剂选自他莫昔芬、雷洛昔芬、巴西多昔芬、托瑞米芬和欧司哌米芬。在某些实施方式中,选择性ER调节剂为他莫昔芬。

[0137] 在一些实施方式中,患者之前已经进行治疗的内分泌疗法是选择性ER降解剂(SERD)。在实施方式中,选择性ER降解剂结合雌激素受体并且导致该受体的蛋白酶体降解。在一些实施方式中,选择性ER降解剂选自氟维司群、RAD1901、ARN-810 (GDC-0810) 和AZD9496。在某些实施方式中,选择性ER降解剂为氟维司群。

[0138] 在一些实施方式中,患者之前已经进行治疗的内分泌疗法是芳香化酶抑制剂(AI)。在实施方式中,芳香化酶抑制剂阻断雌激素的产生。在一些实施方式中,芳香化酶抑制剂选自依西美坦( Aromasin<sup>®</sup> )、来曲唑( Femara<sup>®</sup> )和阿那曲唑( Arimidex<sup>®</sup> )。

[0139] 在一些实施方式中,患者之前已经进行治疗的内分泌疗法是卵巢抑制。在某些实施方式中,卵巢抑制通过卵巢切除术实现。在某些实施方式中,卵巢抑制通过施用GnRH拮抗剂实现。

[0140] 在某些实施方式中,患者的癌症在之前的内分泌疗法治疗后已经复发或恶化。在一些实施方式中,患者的癌症在他莫昔芬治疗后已经复发或恶化。在一些实施方式中,患者的癌症在氟维司群治疗后已经复发或恶化。在一些实施方式中,患者的癌症在芳香化酶抑制剂治疗后已经复发或恶化。在这些实施方式的一些实施方式中,患者的癌症在多线内分泌疗法治疗后已经复发或恶化。

[0141] 在一些实施方式中,ER<sup>+</sup>癌症患者之前尚未用内分泌疗法进行治疗。

[0142] 在某些实施方式中,患者对除拉索昔芬以外的内分泌疗法具有抗性。在一些实施方式中,患者具有固有的内分泌抗性。在一些实施方式中,患者具有获得性内分泌抗性。在特别的实施方式中,患者由于雌激素受体的表达增加而具有对内分泌疗法的抗性。在特别的实施方式中,患者由于雌激素受体的共激活子的表达增加而具有对内分泌疗法的抗性。在特别的实施方式中,患者由于雌激素受体及其共激活子的磷酸化作用水平和活性增加而具有对内分泌疗法的抗性。在特别的实施方式中,患者由于肿瘤微环境和其他宿主相关因素改变而具有对内分泌疗法的抗性。在一些优选的实施方式中,患者由于雌激素受体1(ESR1)基因中的基因突变而具有对内分泌疗法的抗性。

[0143] 在实施方式中,患者对临床剂量的除拉索昔芬以外的一种或多种的SERM具有抗性。在这些实施方式的一些实施方式中,患者对临床剂量的他莫昔芬具有抗性。在实施方式中,患者对临床剂量的一种或多种SERD具有抗性。在这些实施方式的一些实施方式中,患者对临床剂量的氟维司群具有抗性。在实施方式中,患者对临床剂量的一种或多种芳香化酶抑制剂具有抗性。在实施方式中,患者对高于临床剂量的除拉索昔芬以外的一种或多种的SERM具有抗性。在这些实施方式的一些实施方式中,患者对高于临床剂量的他莫昔芬具有抗性。在实施方式中,患者对高于临床剂量的一种或多种SERD具有抗性。在这些实施方式的一些实施方式中,患者对高于临床剂量的氟维司群具有抗性。在实施方式中,患者对高于临床剂量的一种或多种芳香化酶抑制剂具有抗性。

[0144] 在某些实施方式中,ER<sup>+</sup>癌症患者尚未证实具有内分泌抗性。在这些实施方式的一些实施方式中,患者由于检测方法的局限而尚未证实具有内分泌抗性。

[0145] 在一些实施方式中,在癌症治疗完成后向ER<sup>+</sup>癌症患者施用拉索昔芬。在这些实施方式的一些实施方式中,向患者施用拉索昔芬以治疗隐匿性微转移。

[0146] 6.1.3 绝经状态

[0147] 在一些实施方式中,ER<sup>+</sup>癌症患者处于绝经前。在具体的实施方式中,患者处于绝经前并且患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>癌症。在特别的实施方式中,患者处于绝经前并且患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>乳腺癌。

[0148] 在某些实施方式中,ER<sup>+</sup>癌症患者处于围绝经期。在具体的实施方式中,患者处于围绝经期并且患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>癌症。在特别的实施方式中,患者处于围绝经期且患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>乳腺癌。

[0149] 在典型的实施方式中,ER<sup>+</sup>癌症患者处于绝经后。在具体的实施方式中,患者处于绝经后并且患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>癌症。在特别的实施方式中,患者处于绝经后并且患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>乳腺癌。

[0150] 在某些实施方式中,将拉索昔芬施用给局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>/HER2-乳腺癌的绝经前妇女。在某些实施方式中,将拉索昔芬施用给患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>/HER2-乳腺癌的绝经前妇女,该妇女在其用非甾体芳香化酶抑制剂(AI)、氟维司群、AI与CDK4/6抑制剂的组合或氟维司群与CDK4/6抑制剂的组合的第一次激素治疗中已经恶化。

[0151] 在某些实施方式中,将拉索昔芬施用给患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>/HER2-乳腺癌的围绝经期妇女。在某些实施方式中,将拉索昔芬施用给患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>/HER2-乳腺癌的围绝经期妇女,该妇女在其用非甾体芳香化酶抑制剂(AI)、氟维司群、AI与CDK4/6抑制剂的组合或氟维司群与CDK4/6抑制剂的组合的第一次激素治疗中已经恶化。

[0152] 在某些实施方式中,将拉索昔芬施用给患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>/HER2-乳腺癌的绝经后妇女。在某些实施方式中,将拉索昔芬施用给患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>/HER2-乳腺癌的绝经后妇女,该妇女在其用非甾体芳香化酶抑制剂(AI)、氟维司群、AI与CDK4/6抑制剂的组合或氟维司群与CDK4/6抑制剂的组合的第一次激素治疗中已经恶化。

[0153] 6.1.4 ESR1基因的突变

[0154] 在实施方式中,患者具有ER<sup>+</sup>癌症,其细胞在编码雌激素受体α(ERα)蛋白的雌激素受体1(ESR1)基因中具有至少一个突变。在一些实施方式中,突变导致雌激素受体的配体非依赖性活性。在一些实施方式中,突变导致雌激素受体的增强的配体刺激活性。在一些实施方式中,突变导致对内分泌疗法的抗性。在一些实施方式中,突变促进肿瘤生长。在一些实施方式中,突变增强癌症的转移活性。在一些优选的实施方式中,突变增强ER<sup>+</sup>转移性乳腺癌的转移活性。

[0155] 在一些实施方式中,突变源自罕见且无法检测到的预先存在的克隆。在一些实施方式中,突变是在内分泌疗法的治疗过程中从头(de novo)获得的。在一些优选的实施方式中,突变是在乳腺癌的内分泌疗法的治疗过程中从头获得的。在一些实施方式中,突变是在多线内分泌疗法治疗后从头获得的。在一些实施方式中,突变是在对转移性乳腺癌进行多线内分泌疗法治疗后从头获得的。在实施方式中,突变克隆在连续线的内分泌疗法过程中扩增变为更具优势的克隆。

[0156] 在一些实施方式中,ESR1基因中的突变为错义点突变。在一些实施方式中,ESR1基因中的突变为截短突变。在一些实施方式中,ESR1基因中的突变为基因扩增。在一些实施方式中,ESR1基因中的突变为基因组重排。

[0157] 在一些优选的实施方式中,患者患有在ESR1基因的配体结合结构域(LBD)内具有

至少一个功能获得性错义突变的ER<sup>+</sup>癌症。在实施方式中,突变中的至少一个是在选自D538、Y537、L536、P535、V534、S463、V392和E380中的氨基酸上(根据NCBI登记号NP\_000116.2的ESR1蛋白对氨基酸进行编号)。

[0158] 在特别的实施方式中,突变增加ER $\alpha$ 蛋白的螺旋12的激动剂构象的稳定性。在这些实施方式的一些实施方式中,突变增加了雌激素受体与其共激活子的结合。在这些实施方式的一些实施方式中,突变导致雌激素受体的激素非依赖性活性。在这些实施方式的一些实施方式中,突变导致对他莫昔芬、氟维司群和/或芳香化酶抑制剂的抗性。

[0159] 在某些实施方式中,突变是在氨基酸D538处。在某些优选的实施方式中,突变为D538G。

[0160] 在某些实施方式中,突变是在氨基酸Y537处。在这些实施方式的一些实施方式中,突变为Y537S、Y537N、Y537C或Y537Q。在某些优选的实施方式中,突变为Y537C。

[0161] 在一些实施方式中,突变是在氨基酸L536处。在某些实施方式中,突变为L536R或L536Q。

[0162] 在一些实施方式中,突变是在氨基酸P535处。在某些实施方式中,突变为P535H。

[0163] 在一些实施方式中,突变是在氨基酸V534处。在某些实施方式中,突变为V534E。

[0164] 在一些实施方式中,突变是在氨基酸S463处。在某些实施方式中,突变为S463P。

[0165] 在一些实施方式中,突变是在氨基酸V392处。在某些实施方式中,突变为V392I。

[0166] 在一些实施方式中,突变是在氨基酸E380处。在某些实施方式中,突变为E380Q。

[0167] 6.1.4.1 ESR1基因突变的检测

[0168] 在实施方式中,患者之前已经被确定为在ESR1基因中具有至少一个突变。本文所描述的方法的一些实施方式还包括检测ESR1基因的突变的步骤。

[0169] 在一些实施方式中,大规模平行下一代测序(NGS)被用于检测患者的癌症中的雌激素受体突变。在某些实施方式中,对整个基因组进行测序。在某些实施方式中,对癌症相关基因的选择的基因组合(gene panels)进行测序。在某些实施方式中,对给定组的基因内的所有编码外显子进行测序。在某些实施方式中,对给定组的基因内的已知“热点”区域进行测序。然而,目前下一代测序技术的固有误差率高达1%,限制了检测的灵敏度和特异性。在一些实施方式中,使用靶向测序来检测ESR1突变的存在。虽然靶向测序允许更深的测序,但它目前也受到1%误差率的限制。在一些实施方式中,使用具有降低的测序误差率的方法。在特别的实施方式中,使用对每个模板分子进行标记以允许罕见变体的可靠识别的安全测序系统(Safe-SeqS)。参见Kindred等,Proceedings of the National Academy of Sciences 108(23):9530-9535(2011)。在特别的实施方式中,采用对DNA双链的两条链的每一条独立地进行标记和测序的超灵敏双链测序。参见Schmitt等,Proceedings of the National Academy of Sciences 109(36):14508-14513(2012)。在一些实施方式中,使用数字微滴PCR,其将DNA乳化成数千至数百万个微滴以包封用突变的特定引物设计的单个DNA分子。参见Vogelstein和Kinzler,Proceedings of the National Academy of Sciences 96(16):2322-2326(1999)和Huggett等,Clinical Chemistry 61(1):79-88(2014)。

[0170] 在一些实施方式中,ESR1突变的检测发生在初始诊断时。在一些实施方式中,突变的检测发生在病情恶化、复发或重现时。在一些实施方式中,突变的检测发生在病情恶化

时。在一些实施方式中,突变的检测发生在当疾病稳定时。

[0171] 在一些实施方式中,获取一个或多个组织标本用于检测突变。在某些实施方式中,组织标本为肿瘤活检。在某些实施方式中,组织标本是转移瘤的活检。在一些其他的实施方式中,获取液体活检用于检测突变。在某些实施方式中,液体活检是循环肿瘤细胞(CTC)。在某些其他的实施方式中,液体活检是来自血液样本中的无细胞(cell-free)DNA。

[0172] 在具体的实施方式中,通过循环肿瘤DNA(ctDNA)的分析监测ESR1突变。在一些实施方式中,在整个治疗过程中进行ctDNA分析。在这些实施方式的一些实施方式中,ctDNA从患者血液样本中提取。在某些实施方式中,通过对ESR1突变的数字PCR分析评估ctDNA。

#### [0173] 6.1.5 雌二醇水平

[0174] 在实施方式中,对基于ESR1基因突变的存在而选择进行治疗的患者基于血清雌二醇水平进行进一步选择。

[0175] 在某些实施方式中,患有具有ESR1基因突变的ER<sup>+</sup>癌症的患者的血清雌二醇水平为至少0.20ng/dL,例如至少0.25ng/dL、至少0.30ng/dL、至少0.35ng/dL、至少0.40ng/dL、至少0.45ng/dL、至少0.50ng/dL、至少0.55ng/dL、至少0.60ng/dL、至少0.65ng/dL、至少0.70ng/dL、至少0.75ng/dL、至少0.80ng/dL、至少0.85ng/dL、至少0.90ng/dL、至少0.95ng/dL或至少1.0ng/dL。

[0176] 在某些实施方式中,具有ESR1基因突变的患者的血清雌二醇水平为约0.20ng/dL至约1.0ng/dL,例如约0.20ng/dL至约0.25ng/dL、约0.25ng/dL至约0.30ng/dL、约0.30ng/dL至约0.35ng/dL、约0.35ng/dL至约0.40ng/dL、约0.40ng/dL至约0.45ng/dL、约0.45ng/dL至约0.50ng/dL、约0.50ng/dL至约0.55ng/dL、约0.55ng/dL至约0.60ng/dL、约0.60ng/dL至约0.65ng/dL、约0.65ng/dL至约0.70ng/dL、约0.70ng/dL至约0.75ng/dL、约0.75ng/dL至约0.80ng/dL、约0.80ng/dL至约0.85ng/dL、约0.85ng/dL至约0.90ng/dL、约0.90ng/dL至约0.95ng/dL、约0.95ng/dL至约1.0ng/dL。

#### [0177] 6.1.6 辅助治疗

[0178] 在实施方式中,将拉索昔芬作为辅助治疗施用给患者。在某些实施方式中,将拉索昔芬作为单独的辅助疗法施用给患者。在某些其他的实施方式中,将拉索昔芬作为辅助疗法与其他内分泌疗法联合施用给患者。在一些实施方式中,在主要治疗后将拉索昔芬施用给患者。在这些实施方式的一些实施方式中,在癌症的外科手术去除或减积(debulking)后将拉索昔芬施用给患者。

[0179] 在一些实施方式中,将拉索昔芬作为辅助疗法与芳香化酶抑制剂(AI)联合施用给患者。在实施方式中,芳香化酶抑制剂为依西美坦(Aromasin<sup>®</sup>)、来曲唑(Femara<sup>®</sup>)或阿那曲唑(Arimidex<sup>®</sup>)。

[0180] 在实施方式中,芳香化酶抑制剂使患者易于发生与骨骼相关的毒性作用。在一些实施方式中,芳香化酶抑制剂使患者易于患有骨质疏松。在一些实施方式中,芳香化酶抑制剂使患者易于骨质流失。在一些实施方式中,芳香化酶抑制剂使患者易于骨折。在一些实施方式中,芳香化酶抑制剂使患者易于发生骨痛。

[0181] 在实施方式中,芳香化酶抑制剂使患者易于发生外阴阴道萎缩(VVA)。

[0182] 在一些实施方式中,拉索昔芬在施用芳香化酶抑制剂的过程中被连续施用。在一

些其他的实施方式中,拉索昔芬在施用芳香化酶抑制剂的过程中被循环施用。在一些实施方式中,拉索昔芬和芳香化酶抑制剂被一起(同时)施用。在一些其他的实施方式中,拉索昔芬和芳香化酶抑制剂被分开(顺序)施用。

[0183] 在某些实施方式中,拉索昔芬的给药方案不同于芳香化酶抑制剂的给药方案。在这些实施方式的一些实施方式中,拉索昔芬的给药量不同于芳香化酶抑制剂的给药量。在一些实施方式中,拉索昔芬的给药时间表不同于芳香化酶抑制剂的给药时间表。在一些实施方式中,拉索昔芬的施用途径不同于芳香化酶抑制剂的施用途径。

[0184] 在某些实施方式中,拉索昔芬的给药方案与芳香化酶抑制剂的给药方案相同。在一些实施方式中,拉索昔芬的给药量与芳香化酶抑制剂的给药量相同。在一些实施方式中,拉索昔芬的给药时间表与芳香化酶抑制剂的给药时间表相同。在一些实施方式中,拉索昔芬的施用途径与芳香化酶抑制剂的施用途径相同。

[0185] 在一些实施方式中,将拉索昔芬作为辅助疗法与芳香化酶抑制剂联合施用给患者一年。在一些实施方式中,将拉索昔芬作为辅助疗法与芳香化酶抑制剂联合施用给患者两年。在一些实施方式中,将拉索昔芬作为辅助疗法与芳香化酶抑制剂联合施用给患者三年。在一些实施方式中,将拉索昔芬作为辅助疗法与芳香化酶抑制剂联合施用给患者四年。在一些实施方式中,将拉索昔芬作为辅助疗法与芳香化酶抑制剂联合施用给患者五年。在一些实施方式中,将拉索昔芬作为辅助疗法与芳香化酶抑制剂联合施用给患者六年。在一些实施方式中,将拉索昔芬作为辅助疗法与芳香化酶抑制剂联合施用给患者七年。在一些实施方式中,将拉索昔芬作为辅助疗法与芳香化酶抑制剂联合施用给患者八年。在一些实施方式中,将拉索昔芬作为辅助疗法与芳香化酶抑制剂联合施用给患者九年。在一些实施方式中,将拉索昔芬作为辅助疗法与芳香化酶抑制剂联合施用给患者十年。在一些其他的实施方式中,将拉索昔芬作为辅助疗法与芳香化酶抑制剂联合施用给患者超过十年。在某些实施方式中,将拉索昔芬作为辅助疗法与芳香化酶抑制剂联合施用直至患者的癌症在疗法中恶化。

[0186] 在一些实施方式中,将拉索昔芬作为辅助疗法与芳香化酶抑制剂联合施用以提高乳腺癌患者的无病存活。在一些实施方式中,拉索昔芬作为辅助疗法与芳香化酶抑制剂联合施用以降低对侧乳腺癌的发病率。在一些实施方式中,将拉索昔芬作为辅助疗法与芳香化酶抑制剂联合施用以预防癌症的重现或恶化。

[0187] 6.2 拉索昔芬

[0188] 在实施方式中,选择的患者用有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物进行治疗。在一些优选实施方式中,拉索昔芬作为拉索昔芬酒石酸盐被施用给选择的患者。

[0189] 术语“药学上可接受的盐”意指非毒性的药学可接受的盐。参见Gould, International Journal of Pharmaceutics 33:201-217 (1986) 和Berge等, Journal of Pharmaceutical Sciences 66 (1) :1-19 (1977)。然而,可以使用本领域技术人员公知的其他盐。代表性的有机或无机酸包括但不限于:盐酸、氢溴酸、碘氢酸、高氯酸、硫酸、硝酸、磷酸、醋酸、丙酸、乙醇酸、乳酸、琥珀酸、马来酸、延胡索酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、扁桃酸、甲磺酸、羟乙基磺酸、苯磺酸、草酸、扑酸(pamoic)、2-萘磺酸、对甲苯磺酸、环己烷氨基磺酸(cyclohexanesulfamic)、水杨酸、糖精酸或三氟乙酸。代表性的有机或无机碱包

括但不限于：碱性或阳离子盐，例如苄星青霉素、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、葡甲胺 (meglumine)、普鲁卡因、铝、钙、锂、镁、钾、钠和锌。

[0190] 实施方式还包括本文所公开的化合物的前体药物。一般来说，这些前体药物将是化合物的功能衍生物，其在体内很容易转化为所必需的化合物。因此，在本发明的治疗方法中，术语“施用”应当包括用具体公开的化合物或用可能未具体公开但在施用给受试者后在体内转化为特定化合物的化合物治疗所描述的各种各样的疾病。用于选择和制备合适的前体药物衍生物的常规程序描述于例如“Design of Prodrugs”, H. Bundgaard, Elsevier, 1985。

[0191] 化合物的一些结晶形式可以以多晶型存在，并且旨在将其包括在本发明中。此外，一些化合物可以与水或常见的有机溶剂形成溶剂化物(即，水合物)，并且这些溶剂化物旨在被一些实施方式涵盖。

[0192] 用于本文所公开的化合物的制备的方法产生立体异构体的混合物，这些异构体可以通过常规技术例如制备色谱法进行分离。所述化合物可以通过立体定向合成或通过拆分制备成外消旋形式或作为单个对映体或非对映体。例如，所述化合物可以通过标准技术拆分成其组分对映体或非对映体，例如通过与具有光学活性的碱的盐形成的立体异构体对的形成，然后是分步结晶和游离酸的再生。所述化合物也可以通过形成立体异构的酯或酰胺，然后进行色谱分离和去除手性助剂来拆分。或者，可以用手性HPLC柱对所述化合物进行拆分。应当理解，所有立体异构体、外消旋混合物、非对映体、顺式反式异构体及其对映体都被一些实施方式涵盖。

### [0193] 6.3药物组合物

[0194] 治疗雌激素受体阳性 (ER<sup>+</sup>) 癌症的方法包括施用治疗有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物。本发明的拉索昔芬、药学上可接受的盐或前体药物可以被配制成药物组合物。除了拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物，所述组合物还包含药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或本领域技术人员所公知的其他材料。这些材料应该是无毒的并且不应该干扰有效成分的功效。载体或其他材料的确切性质可以取决于施用途径，例如口服、静脉、经皮、阴道局部或阴道环。

[0195] 用于口服施用的药物组合物可以为片剂、胶囊、粉末或液体形式。片剂可以包括固体载体，例如明胶或佐剂。液体药物组合物一般包括液体载体，例如水、石油、动物油、植物油、矿物油或合成油。也可以包括生理盐水溶液、右旋糖或其他糖类溶液或二醇例如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。

[0196] 对于非消化道 (parenteral) 施用，拉索昔芬将以无热原并且具有合适的pH、等渗压和稳定性的非消化道可接受的水溶液形式存在。本领域技术人员能够很好地利用例如等渗介质例如氯化钠注射液、林格氏注射液、乳酸林格氏注射液来制备合适的溶液。根据需要，可以包括防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂。

[0197] 用于阴道局部施用的药物组合物可以是软膏、乳液、凝胶或洗剂的形式。用于阴道局部施用的药物组合物通常包括水、酒精、动物油、植物油、矿物油或合成油。也可以包括碳氢化合物(石蜡)、羊毛脂、蜂蜡、聚乙二醇 (macrogols)、乳化蜡或溴棕三甲铵。

[0198] 取决于待治疗的状况，组合物可以单独、或与其他治疗联合或同时或顺序地施用。

### [0199] 6.4治疗方案

[0200] 在如上所描述以药物组合物的形式施用有效量的拉索昔芬的用于治疗ER<sup>+</sup>癌症的方法中,本文的术语“治疗”、“处理”等通常用于意指获得期望的药理学和/或生理学效果。效果就完全或部分预防疾病、状况或其症状而言可以是预防性的,和/或就部分或完全治愈疾病或状况和/或由该疾病或状况引起的不利影响例如症状而言,效果也可以是治疗性的。本文使用的“治疗”包括对哺乳动物,特别是人类的疾病或状况的任何治疗,并且包括: (a) 防止疾病或状况发生在可能易于患该疾病或状况但尚未被诊断为患有该疾病或状况的受试者上; (b) 抑制疾病或状况(例如,阻止其发展); 或 (c) 减轻疾病或状况(例如,引起疾病或状况退化,提供对一种或多种症状的改善)。根据本领域的标准方法和已知的技术,可以很容易评估任何状况的改善。用疾病的方法进行治疗的受试者的群体包括患有不期望的状况或疾病的受试者,以及处于状况或疾病的发展的风险的受试者。

[0201] 术语“有效量”意指产生施用以获得期望效果的剂量。确切的剂量将取决于治疗的目的,并且将由本领域技术人员使用已知技术来确定。参见Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999)。

[0202] 6.4.1施用的途径

[0203] 在实施方式中,拉索昔芬通过口服、静脉、经皮、阴道局部或阴道环施用。

[0204] 在一些实施方式中,拉索昔芬通过口服施用向患者施用。在某些实施方式中,拉索昔芬以约0.5mg/d口服至约10mg/d口服施用,例如约0.5mg/d口服至约5mg/d口服、约0.5mg/d口服至约5mg/d口服、约1mg/d口服至约5mg/d口服、约2mg/d口服至约5mg/d口服、约3mg/d口服至约5mg/d口服、约4mg/d口服至约5mg/d口服、约0.5mg/d口服至约4mg/d口服、约1mg/d口服至约4mg/d口服、约2mg/d口服至约4mg/d口服、约3mg/d口服至约4mg/d口服、约0.5mg/d口服至约3mg/d口服、约1mg/d口服至约3mg/d口服、约2mg/d口服至约3mg/d口服、约0.5mg/d口服至约2mg/d口服、约1mg/d口服至约2mg/d口服、或约0.5mg/d口服至约1mg/d口服。在一些实施方式中,拉索昔芬以约0.5mg/d口服施用。在一些实施方式中,拉索昔芬以约1mg/d口服施用。在一些实施方式中,拉索昔芬以约1.5mg/d口服施用。在一些实施方式中,拉索昔芬以约2mg/d口服施用。在一些实施方式中,拉索昔芬以约2.5mg/d口服施用。在一些实施方式中,拉索昔芬以约3mg/d口服施用。在一些实施方式中,拉索昔芬以约3.5mg/d口服施用。在一些实施方式中,拉索昔芬以约4mg/d口服施用。在一些实施方式中,拉索昔芬以约4.5mg/d口服施用。在一些实施方式中,拉索昔芬以约5mg/d口服施用。在一些实施方式中,拉索昔芬以约6mg/d口服施用。在一些实施方式中,拉索昔芬以约7mg/d口服施用。在一些实施方式中,拉索昔芬以约8mg/d口服施用。在一些实施方式中,拉索昔芬以约9mg/d口服施用。在一些实施方式中,拉索昔芬以约10mg/d口服施用。在一些其他的实施方式中,拉索昔芬以超过10mg/d口服施用。

[0205] 在某些实施方式中,当将拉索昔芬施用给其癌症尚未获得内分泌抗性的患者时,拉索昔芬可以以低于0.5mg/d口服施用用于预防内分泌抗性。在某些实施方式中,当将拉索昔芬作为辅助治疗施用给癌症患者时,拉索昔芬可以以低于0.5mg/d口服施用用于预防内分泌抗性。

[0206] 在某些实施方式中,拉索昔芬以每天一次施用。在某些实施方式中,拉索昔芬以每两天一次施用。在某些实施方式中,拉索昔芬以每三天一次施用。在某些实施方式中,拉索昔芬以每四天一次施用。在某些实施方式中,拉索昔芬以每五天一次施用。在某些实施方式

中,拉索昔芬以每六天一次施用。在某些实施方式中,拉索昔芬以每周一次施用。在某些实施方式中,拉索昔芬以每两周一次施用。在某些实施方式中,拉索昔芬以每三周一次施用。在某些实施方式中,拉索昔芬以每月一次施用。

[0207] 在一些实施方式中,拉索昔芬通过阴道环施用被施用给患者。在这些实施方式的一些实施方式中,拉索昔芬以每两周一次施用。在这些实施方式的一些实施方式中,拉索昔芬以每三周一次施用。在这些实施方式的一些实施方式中,拉索昔芬以每月一次施用。在这些实施方式的一些实施方式中,拉索昔芬以每两个月一次施用。在这些实施方式的一些实施方式中,拉索昔芬以每三个月一次施用。在这些实施方式的一些实施方式中,拉索昔芬以每四个月一次施用。

[0208] 在一些实施方式中,将拉索昔芬施用给ER<sup>+</sup>癌症患者一年。在一些实施方式中,将拉索昔芬施用给患者两年。在一些实施方式中,将拉索昔芬施用给患者三年。在一些实施方式中,将拉索昔芬施用给患者四年。在一些实施方式中,将拉索昔芬施用给患者五年。在一些实施方式中,将拉索昔芬施用给患者超过五年。在某些实施方式中,将拉索昔芬施用给患者直至患者的癌症在疗法中恶化。

#### [0209] 6.4.2 组合疗法

[0210] 在实施方式中,拉索昔芬单独或与其他疗法联合施用。在某些实施方式中,拉索昔芬与至少一种其他疗法联合施用。在一些实施方式中,拉索昔芬与其他疗法一起(同时)施用。在一些其他的实施方式中,拉索昔芬与其他疗法在不同时间(顺序)施用。

[0211] 在特别的实施方式中,患者进行治疗的另外的疗法是内分泌疗法。在实施方式中,患者用至少一线另外的内分泌疗法进行治疗。在一些实施方式中,患者用一线另外的内分泌疗法进行治疗。在一些其他的实施方式中,患者用多线另外的内分泌疗法进行治疗。

[0212] 在一些实施方式中,以原始剂量用另外的内分泌疗法治疗患者。在一些其他的实施方式中,以高于原始剂量的剂量用另外的内分泌疗法治疗患者。在某些实施方式中,以低于原始剂量的剂量用另外的内分泌疗法治疗患者。

[0213] 在某些实施方式中,另外的内分泌疗法是用除拉索昔芬以外的选择性ER调节剂(SERM)进行治疗。在这些实施方式的一些实施方式中,选择性ER调节剂选自他莫昔芬、雷洛昔芬、巴西多昔芬、托瑞米芬和欧司哌米芬。在某些实施方式中,选择性ER调节剂为他莫昔芬。

[0214] 在某些实施方式中,另外的内分泌疗法是用选择性ER降解剂(SERD)进行治疗。在这些实施方式的一些实施方式中,选择性ER降解剂选自氟维司群、RAD1901、ARN-810(GDC-0810)和AZD9496。在某些实施方式中,选择性ER降解剂为氟维司群。

[0215] 在某些实施方式中,另外的内分泌疗法是用芳香化酶抑制剂进行治疗。在这些实施方式的一些实施方式中,芳香化酶抑制剂选自依西美坦(Aromasin<sup>®</sup>)、来曲唑(Femara<sup>®</sup>)和阿那曲唑(Arimidex<sup>®</sup>)。

[0216] 在实施方式中,另外的疗法是向患者施用有效量的细胞周期抑制剂。在某些实施方式中,另外的疗法是施用有效量的周期蛋白依赖性激酶4/6(CDK4/6)抑制剂。在一些实施方式中,另外的疗法是选自帕博西尼、阿贝西尼和瑞伯西尼的CDK4/6抑制剂。

[0217] 在一些实施方式中,另外的疗法是向患者施用交叉对话并激活ER转录活性的通路

的抑制剂。在某些实施方式中，另外的疗法是哺乳动物雷帕霉素靶标(mTOR)抑制剂。在具体的实施方式中，mTOR抑制剂为依维莫司。在这些实施方式的一些实施方式中，将拉索昔芬与依维莫司联合施用给患有晚期或转移性乳腺癌的绝经后妇女，该妇女在用非甾体AI和/或氟维司群作为单独疗法或与CDK4/6抑制剂的组合中已经恶化。在实施方式中，另外的疗法为磷酸肌醇3激酶(PI3K)抑制剂或热休克蛋白90(HSP90)抑制剂。

[0218] 在实施方式中，另外的疗法为向患者施用有效量的生长因子抑制剂。在某些实施方式中，另外的疗法为人表皮生长因子受体(HER2)抑制剂。在一些实施方式中，HER2抑制剂为曲妥珠单抗(Herceptin<sup>®</sup>)。在一些其他的实施方式中，HER2抑制剂为ado-trastuzumab emtansin(Kadcyla<sup>®</sup>)。

[0219] 在一些实施方式中，另外的疗法为向患者施用有效量的组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂。在实施方式中，HDAC抑制剂为vorinostat(Zolinza<sup>®</sup>)、romidepsin(Istodax<sup>®</sup>)、chidamide(Epidaza<sup>®</sup>)、panobinostat(Farydak<sup>®</sup>)、belinostat(Beleodaq<sup>®</sup>、PXD101)、丙戊酸(Depakote<sup>®</sup>、Depakene<sup>®</sup>、Stavzor<sup>®</sup>)、mocetinostat(MGCD0103)、abexinostat(PCI-24781)、entinostat(MS-275)、pracinostat(SB939)、resminostat(4SC-201)、givinostat(ITF2357)、quisinostat(JNJ-26481585)、kevetrin、CUDC-101、AR-42、tefinostat(CHR-2835)、CHR-3996、4SC202、CG200745、rocilinostat(ACY-1215)或萝卜硫素。在某些实施方式中，HDAC抑制剂为entinostat(MS-275)，前提条件是患者未用HER2抑制剂进行治疗。在某些其他的实施方式中，HDAC抑制剂为vorinostat(Zolinza<sup>®</sup>)。而在某些其他的实施方式中，HDAC抑制剂为romidepsin(Istodax<sup>®</sup>)。

[0220] 在一些实施方式中，另外的疗法是向患者施用有效量的检查点抑制剂。在某些实施方式中，检查点抑制剂是抗体。在这些实施方式的一些实施方式中，检查点抑制剂为是特异于程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)、程序性死亡配体1(PD-L1)或细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)的抗体。在一些实施方式中，PD-1抗体是pembrolizumab(Keytruda<sup>®</sup>)或nivolumab(Opdivo<sup>®</sup>)。在一些实施方式中，CTLA-4抗体是易普利姆玛(Yervoy<sup>®</sup>)。

[0221] 在某些实施方式中，另外的疗法是向患者施用有效量的癌症疫苗。

[0222] 在一些实施方式中，另外的疗法是向患者施用有效量的狄诺塞麦(denosumab)。

[0223] 在一些实施方式中，另外的疗法为向患者施用有效量的5-羟色胺-去甲肾上腺素再摄取抑制剂(SNRI)、选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)或加巴喷丁。在某些实施方式中，SNRI是文拉法辛(Effexor<sup>®</sup>)。

[0224] 6.4.3临床终点

[0225] 6.4.3.1主要临床终点

[0226] 在实施方式中，所述方法包括以有效增加ER<sup>+</sup>癌症患者的无病存活的量施用拉索昔芬。在一些实施方式中，所述方法包括以有效减少ER<sup>+</sup>癌症的重现的量施用拉索昔芬。在一些实施方式中，所述方法包括以有效延长ER<sup>+</sup>癌症再现的时间的量施用拉索昔芬。在一些实施方式中，所述方法包括以有效减少ER<sup>+</sup>癌症的转移的量施用拉索昔芬。在一些实施方式

中,所述方法包括以有效增加ER<sup>+</sup>癌症患者的无恶化存活的持续时间的量施用拉索昔芬。

[0227] 在实施方式中,所述方法增加ER<sup>+</sup>癌症患者的无病存活。在某些实施方式中,所述方法减少ER<sup>+</sup>乳腺癌的重现。在某些实施方式中,所述方法延长ER<sup>+</sup>乳腺癌的再现的时间。在某些实施方式中,所述方法减少ER<sup>+</sup>乳腺癌向骨的转移。在某些实施方式中,所述方法减少ER<sup>+</sup>乳腺癌向除骨之外的组织的转移。在某些实施方式中,所述方法增加ER<sup>+</sup>乳腺癌患者的无恶化存活的持续时间。

[0228] 在实施方式中,所述方法增加具有内分泌抗性的ER<sup>+</sup>癌症患者的无病存活。在一些实施方式中,所述方法减少具有内分泌抗性的患者的癌症的再现。在一些实施方式中,所述方法延长具有内分泌抗性的患者的癌症的再现的时间。在一些实施方式中,所述方法减少具有内分泌抗性的患者的癌症转移。在一些实施方式中,所述方法增加具有内分泌抗性的ER<sup>+</sup>癌症患者的无恶化存活的持续时间。

[0229] 在一些优选的实施方式中,所述方法对已经发展出内分泌抗性的患有ER<sup>+</sup>局部晚期或转移性乳腺癌的患者增加无病存活、减少再现、延长再现的时间、减少转移和/或增加无恶化存活的持续时间。在特别的实施方式中,乳腺癌通过获得一个或多个本文所讨论的ESR1突变而发展出内分泌抗性。在一些实施方式中,所述方法降低选择压力并在治疗期间阻止ER<sup>+</sup>局部晚期或转移性乳腺癌的内分泌抗性克隆的扩增。

[0230] 6.4.3.2次要临床终点

[0231] 在一些实施方式中,所述方法有效防止同时用一种或多种引起或使易于骨质疏松的药物进行治疗的妇女发生骨折和骨质流失。

[0232] 在一些实施方式中,所述方法对同时用一种或多种引起或使易于外阴阴道萎缩(VVA)的药物进行治疗的妇女有效降低阴道pH值、增加阴道润滑和/或提高阴道细胞成熟指数有效。

[0233] 在一些实施方式中,所述方法减少同时用一种或多种引起或使易于性功能障碍的药物进行治疗的妇女的性功能障碍的一种或多种症状。

[0234] 在一些实施方式中,所述方法治疗同时用一种或多种引起或使易于潮热的药物进行治疗的妇女的潮热。

[0235] 在一些实施方式中,所述方法提高选自关节疼痛、泌尿生殖症状、骨质流失和骨折中的一项或多项生活质量指标。

[0236] 6.5其他实施方式

[0237] 以下编号的实施方式中提供了其他实施方式。

[0238] 1. 一种治疗女性局部晚期或转移性乳腺癌的方法,其包括:

[0239] a) 选择已经被诊断为雌激素受体阳性(ER<sup>+</sup>)局部晚期或转移性乳腺癌的患者进行治疗;和

[0240] b) 向所选择的患者施用有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物。

[0241] 2. 根据实施方式1所述的方法,其中所述患者之前已经用一线或多线内分泌疗法进行治疗。

[0242] 3. 根据实施方式2所述的方法,其中所述患者之前已经用多线内分泌疗法进行治疗。

[0243] 4. 根据实施方式2或实施方式3所述的方法,其中所述患者之前已经进行治疗的所

述内分泌疗法是选择性ER调节剂(SERM)。

[0244] 5. 根据实施方式4所述的方法,其中所述SERM是他莫昔芬、雷洛昔芬、巴西多昔芬、托瑞米芬或欧司哌米芬。

[0245] 6. 根据实施方式2或实施方式3所述的方法,其中所述患者之前已经进行治疗的所述内分泌疗法是选择性ER降解剂(SERD)。

[0246] 7. 根据实施方式6所述的方法,其中所述SERD是氟维司群、RAD1901、ARN-810 (GDC-0810) 或AZD9496。

[0247] 8. 根据实施方式2或实施方式3所述的方法,其中所述患者之前已经进行治疗的所述内分泌疗法是芳香化酶抑制剂。

[0248] 9. 根据实施方式8所述的方法,其中所述芳香化酶抑制剂为依西美坦(Aromasin<sup>®</sup>)、来曲唑(Femara<sup>®</sup>)或阿那曲唑(Arimidex<sup>®</sup>)。

[0249] 10. 根据实施方式2至9中任一项所述的方法,其中所述患者在内分泌疗法后具有疾病恶化。

[0250] 11. 根据实施方式1至10中任一项所述的方法,其中所述患者的局部晚期或转移性癌症对除拉索昔芬以外的内分泌疗法有抗性。

[0251] 12. 根据实施方式1至11中任一项所述的方法,其中所述患者的局部晚期或转移性癌症在雌激素受体1(ESR1)基因的配体结合结构域(LBD)内具有至少一个功能获得性错义突变。

[0252] 13. 根据实施方式12所述的方法,其中所述患者之前已经被确定为在所述雌激素受体1(ESR1)基因的所述配体结合结构域(LBD)内具有至少一个功能获得性错义突变。

[0253] 14. 根据实施方式13所述的方法,其还包括确定所述患者在所述雌激素受体1(ESR1)基因的所述配体结合结构域(LBD)内具有至少一个功能获得性错义突变的更早的步骤。

[0254] 15. 根据实施方式12至14中任一项所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸D538、Y537、L536、P535、V534、S463、V392和E380中的任一个处。

[0255] 16. 根据实施方式15所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸D538处。

[0256] 17. 根据实施方式16所述的方法,其中所述突变为D538G。

[0257] 18. 根据实施方式15所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸Y537处。

[0258] 19. 根据实施方式18所述的方法,其中所述突变为Y537S、Y537N、Y537C或Y537Q。

[0259] 20. 根据实施方式19所述的方法,其中所述突变为Y537C。

[0260] 21. 根据实施方式15所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸L536处。

[0261] 22. 根据实施方式21所述的方法,其中所述突变为L536R或L536Q。

[0262] 23. 根据实施方式15所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸P535处。

[0263] 24. 根据实施方式23所述的方法,其中所述突变为P535H。

[0264] 25. 根据实施方式15所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨

基酸V534处。

[0265] 26. 根据实施方式25所述的方法,其中所述突变为V534E。

[0266] 27. 根据实施方式15所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸S463处。

[0267] 28. 根据实施方式27所述的方法,其中所述突变为S463P。

[0268] 29. 根据实施方式15所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸V392处。

[0269] 30. 根据实施方式29所述的方法,其中所述突变为V392I。

[0270] 31. 根据实施方式15所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸E380处。

[0271] 32. 根据实施方式31所述的方法,其中所述突变为E380Q。

[0272] 33. 根据实施方式12至32中任一项所述的方法,其中所述患者的血清雌二醇水平为至少0.35ng/dL。

[0273] 34. 根据实施方式12至32中任一项所述的方法,其中所述患者的血清雌二醇水平为约0.30ng/dL至约0.35ng/dL。

[0274] 35. 根据实施方式12至32中任一项所述的方法,其中所述患者的血清雌二醇水平为约0.25ng/dL至约0.30ng/dL。

[0275] 36. 根据实施方式1至35中任一项所述的方法,其中拉索昔芬作为拉索昔芬酒石酸盐被施用。

[0276] 37. 根据实施方式1至36中任一项所述的方法,其中拉索昔芬通过口服、静脉、经皮、阴道局部或阴道环施用被施用。

[0277] 38. 根据实施方式37所述的方法,其中拉索昔芬通过口服施用被施用。

[0278] 39. 根据实施方式38所述的方法,其中拉索昔芬以约0.5mg/d口服至约10mg/d口服施用。

[0279] 40. 根据实施方式39所述的方法,其中拉索昔芬以约0.5mg/d口服至约5mg/d口服施用。

[0280] 41. 根据实施方式40所述的方法,其中拉索昔芬以约1mg/d口服至约5mg/d口服施用。

[0281] 42. 根据实施方式40所述的方法,其中拉索昔芬以1mg/d口服施用。

[0282] 43. 根据实施方式40所述的方法,其中拉索昔芬以5mg/d口服施用。

[0283] 44. 根据实施方式1至43中任一项所述的方法,其中拉索昔芬以每天一次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次、或每月一次施用。

[0284] 45. 根据实施方式1至44中任一项所述的方法,其还包括用至少一种另外的内分泌疗法治疗所述患者。

[0285] 46. 根据实施方式45所述的方法,其中所述患者以原始剂量用所述另外的内分泌疗法进行治疗。

[0286] 47. 根据实施方式45所述的方法,其中所述患者以高于原始剂量的剂量用所述另外的内分泌疗法进行治疗。

[0287] 48. 根据实施方式45至47中任一项所述的方法,其中所述另外的内分泌疗法是用除拉索昔芬以外的选择性ER调节剂(SERM)进行治疗。

[0288] 49. 根据实施方式45至47中任一项所述的方法,其中所述另外的内分泌疗法是用选择性ER降解剂(SERD)进行治疗。

[0289] 50. 根据实施方式45至47中任一项所述的方法,其中所述另外的内分泌疗法是用芳香化酶抑制剂进行治疗。

[0290] 51. 根据实施方式1至44中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的周期蛋白依赖性激酶4/6(CDK4/6)抑制剂。

[0291] 52. 根据实施方式51所述的方法,其中所述CDK4/6抑制剂为帕博西尼、阿贝西尼或瑞伯西尼。

[0292] 53. 根据实施方式1至44中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的哺乳动物雷帕霉素靶标(mTOR)抑制剂。

[0293] 54. 根据实施方式53所述的方法,其中所述mTOR抑制剂为依维莫司。

[0294] 55. 根据实施方式1至44中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的磷酸肌醇3激酶(PI3K)抑制剂或热休克蛋白90(HSP90)抑制剂。

[0295] 56. 根据实施方式1至44中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的人表皮生长因子受体(HER2)抑制剂。

[0296] 57. 根据实施方式56所述的方法,其中所述HER2抑制剂为曲妥珠单抗(Herceptin<sup>®</sup>)或ado-trastuzumab emtansin(Kadcyla<sup>®</sup>)。

[0297] 58. 根据实施方式1至44中任一项所述的方法,其还包括向患者施用有效量的组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂。

[0298] 59. 根据实施方式58所述的方法,其中所述HDAC抑制剂为vorinostat(Zolinza<sup>®</sup>)、romidepsin(Istodax<sup>®</sup>)、chidamide(Epidaza<sup>®</sup>)、panobinostat(Farydak<sup>®</sup>)、belinostat(Beleodaq<sup>®</sup>、PXD101)、丙戊酸(Depakote<sup>®</sup>、Depakene<sup>®</sup>、Stavzor<sup>®</sup>)、mocetinostat(MGCD0103)、abexinostat(PCI-24781)、entinostat(MS-275)、pracinostat(SB939)、resminostat(4SC-201)、givinostat(ITF2357)、quisinostat(JNJ-26481585)、kevetrin、CUDC-101、AR-42、tefinostat(CHR-2835)、CHR-3996、4SC202、CG200745、rocilinostat(ACY-1215)或萝卜硫素。

[0299] 60. 根据实施方式1至44中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的检查点抑制剂。

[0300] 61. 根据实施方式60所述的方法,其中所述检查点抑制剂是特异于程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)、程序性死亡配体1(PD-L1)或细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)的抗体。

[0301] 62. 根据实施方式61所述的方法,其中所述PD-1抗体是pembrolizumab( Keytruda<sup>®</sup>)或nivolumab(Opdivo<sup>®</sup>)。

[0302] 63. 根据实施方式61所述的方法,其中所述CTLA-4抗体是易普利姆玛(Yervoy<sup>®</sup>)。

[0303] 64. 根据实施方式1至44中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的癌症疫苗。

[0304] 65. 根据实施方式1至64中任一项所述的方法,其中所述患者处于绝经前。

[0305] 66. 根据实施方式65所述的方法,其中所述患者患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>/HER2-乳腺癌。

[0306] 67. 根据实施方式65所述的方法,其中所述患者在其用非甾体芳香化酶抑制剂(AI)、氟维司群、AI与CDK4/6抑制剂的组合或氟维司群与CDK4/6抑制剂的组合的第一次激素治疗中已经恶化。

[0307] 68. 根据实施方式1至64中任一项所述的方法,其中所述患者处于围绝经期。

[0308] 69. 根据实施方式68所述的方法,其中所述患者患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>/HER2-乳腺癌。

[0309] 70. 根据实施方式69所述的方法,其中所述患者在其用非甾体芳香化酶抑制剂(AI)、氟维司群、AI与CDK4/6抑制剂的组合或氟维司群与CDK4/6抑制剂的组合的第一次激素治疗中已经恶化。

[0310] 71. 根据实施方式1至64中任一项所述的方法,其中所述患者处于绝经后。

[0311] 72. 根据实施方式71所述的方法,其中所述患者患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>/HER2-乳腺癌。

[0312] 73. 根据实施方式72所述的方法,其中所述患者在其用非甾体芳香化酶抑制剂(AI)、氟维司群、AI与CDK4/6抑制剂的组合或氟维司群与CDK4/6抑制剂的组合的第一次激素治疗中已经恶化。

[0313] 74. 一种治疗女性原发性乳腺癌的方法,其包括:

[0314] a) 选择已经被诊断为雌激素受体阳性(ER<sup>+</sup>)原发性乳腺癌的患者进行治疗;和

[0315] b) 向所选择的患者施用有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物。

[0316] 75. 根据实施方式74所述的方法,其中拉索昔芬作为拉索昔芬酒石酸盐被施用。

[0317] 76. 根据实施方式74或实施方式75所述的方法,其中拉索昔芬通过口服、静脉、经皮、阴道局部或阴道环施用被施用。

[0318] 77. 根据实施方式76所述的方法,其中拉索昔芬通过口服施用被施用。

[0319] 78. 根据实施方式77所述的方法,其中拉索昔芬以约0.5mg/d口服至约10mg/d口服施用。

[0320] 79. 根据实施方式78所述的方法,其中拉索昔芬以约0.5mg/d口服至约5mg/d口服施用。

[0321] 80. 根据实施方式79所述的方法,其中拉索昔芬以约1mg/d口服至约5mg/d口服施用。

[0322] 81. 根据实施方式79所述的方法,其中拉索昔芬以1mg/d口服施用。

[0323] 82. 根据实施方式79所述的方法,其中拉索昔芬以5mg/d口服施用。

[0324] 83. 根据实施方式74至82中任一项所述的方法,其中拉索昔芬以每天一次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次、或每月一次施用。

[0325] 84. 根据实施方式74至83中任一项所述的方法,其还包括用至少一种另外的内分

泌疗法治疗所述患者。

[0326] 85. 根据实施方式84所述的方法,其中所述患者以原始剂量用所述另外的内分泌疗法进行治疗。

[0327] 86. 根据实施方式84所述的方法,其中所述患者以高于原始剂量的剂量用所述另外的内分泌疗法进行治疗。

[0328] 87. 根据实施方式84至86中任一项所述的方法,其中所述另外的内分泌疗法是用除拉索昔芬以外的选择性ER调节剂(SERM)进行治疗。

[0329] 88. 根据实施方式84至86中任一项所述的方法,其中所述另外的内分泌疗法是用选择性ER降解剂(SERD)进行治疗。

[0330] 89. 根据实施方式84至86中任一项所述的方法,其中所述另外的内分泌疗法是用芳香化酶抑制剂进行治疗。

[0331] 90. 根据实施方式74至83中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的周期蛋白依赖性激酶4/6(CDK4/6)抑制剂。

[0332] 91. 根据实施方式90所述的方法,其中所述CDK4/6抑制剂为帕博西尼、阿贝西尼或瑞伯西尼。

[0333] 92. 根据实施方式74至83中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的哺乳动物雷帕霉素靶标(mTOR)抑制剂。

[0334] 93. 根据实施方式92所述的方法,其中所述mTOR抑制剂为依维莫司。

[0335] 94. 根据实施方式74至83中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的磷酸肌醇3激酶(PI3K)抑制剂或热休克蛋白90(HSP90)抑制剂。

[0336] 95. 根据实施方式74至83中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的人表皮生长因子受体(HER2)抑制剂。

[0337] 96. 根据实施方式95所述的方法,其中所述HER2抑制剂为曲妥珠单抗(Herceptin<sup>®</sup>)或ado-trastuzumab emtansin(Kadcyla<sup>®</sup>)。

[0338] 97. 根据实施方式74至83中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂。

[0339] 98. 根据实施方式97所述的方法,其中所述HDAC抑制剂为vorinostat(Zolinza<sup>®</sup>)、romidepsin(Istodax<sup>®</sup>)、chidamide(Epidaza<sup>®</sup>)、panobinostat(Farydak<sup>®</sup>)、belinostat(Beleodaq<sup>®</sup>、PXD101)、丙戊酸(Depakote<sup>®</sup>、Depakene<sup>®</sup>、Stavzor<sup>®</sup>)、mocetinostat(MGCD0103)、abexinostat(PCI-24781)、entinostat(MS-275)、pracinostat(SB939)、resminostat(4SC-201)、givinostat(ITF2357)、quisinostat(JNJ-26481585)、kevetrin、CUDC-101、AR-42、tefinostat(CHR-2835)、CHR-3996、4SC202、CG200745、rocilinostat(ACY-1215)或萝卜硫素。

[0340] 99. 根据实施方式74至83中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的检查点抑制剂。

[0341] 100. 根据实施方式99所述的方法,其中所述检查点抑制剂是特异于程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)、程序性死亡配体1(PD-L1)或细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)的抗

体。

[0342] 101. 根据实施方式100所述的方法,其中所述PD-1抗体是pembrolizumab (Keytruda<sup>®</sup>)或nivolumab (Opdivo<sup>®</sup>)。

[0343] 102. 根据实施方式100所述的方法,其中所述CTLA-4抗体是易普利姆玛 (Yervoy<sup>®</sup>)。

[0344] 103. 根据实施方式74至83中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的癌症疫苗。

[0345] 104. 根据实施方式74至103中任一项所述的方法,其中所述患者处于绝经前。

[0346] 105. 根据实施方式74至103中任一项所述的方法,其中所述患者处于围绝经期。

[0347] 106. 根据实施方式74至103中任一项所述的方法,其中所述患者处于绝经后。

[0348] 107. 一种雌激素受体阳性(ER<sup>+</sup>)乳腺癌的辅助疗法的方法,其包括:

[0349] 向已经接受ER<sup>+</sup>乳腺癌的主要治疗的患者施用有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物与芳香化酶抑制剂的组合。

[0350] 108. 根据实施方式107所述的方法,其中拉索昔芬在施用所述芳香化酶抑制剂的过程中被连续施用。

[0351] 109. 根据实施方式107所述的方法,其中拉索昔芬在施用所述芳香化酶抑制剂的过程中被循环施用。

[0352] 110. 根据实施方式107至109中任一项所述的方法,其中拉索昔芬的给药方案不同于所述芳香化酶抑制剂的给药方案。

[0353] 111. 根据实施方式107至110中任一项所述的方法,其中拉索昔芬作为拉索昔芬酒石酸盐被施用。

[0354] 112. 根据实施方式107至111中任一项所述的方法,其中所述芳香化酶抑制剂为依西美坦(Aromasin<sup>®</sup>)、来曲唑(Femara<sup>®</sup>)或阿那曲唑(Arimidex<sup>®</sup>)。

[0355] 113. 根据实施方式107至112中任一项所述的方法,其中拉索昔芬通过口服、静脉、经皮、阴道局部或阴道环施用被施用。

[0356] 114. 根据实施方式113所述的方法,其中拉索昔芬通过口服施用被施用。

[0357] 115. 根据实施方式114所述的方法,其中拉索昔芬以约0.5mg/d口服至约10mg/d口服施用。

[0358] 116. 根据实施方式115所述的方法,其中拉索昔芬以约0.5mg/d口服至约5mg/d口服施用。

[0359] 117. 根据实施方式116所述的方法,其中拉索昔芬以约1mg/d口服至约5mg/d口服施用。

[0360] 118. 根据实施方式116所述的方法,其中拉索昔芬以1mg/d口服施用。

[0361] 119. 根据实施方式116所述的方法,其中拉索昔芬以5mg/d口服施用。

[0362] 120. 根据实施方式107至119中任一项所述的方法,其中拉索昔芬以每天一次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次、或每月一次施用。

[0363] 121. 根据实施方式107至120中任一项所述的方法,其还包括用另外的内分泌疗法

治疗所述患者。

[0364] 122. 根据实施方式121所述的方法,其中所述另外的内分泌疗法是用选择性ER降解剂(SERD)进行治疗。

[0365] 123. 根据实施方式107至120中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的周期蛋白依赖性激酶4/6(CDK4/6)抑制剂。

[0366] 124. 根据实施方式123所述的方法,其中所述CDK4/6抑制剂为帕博西尼、阿贝西尼或瑞伯西尼。

[0367] 125. 根据实施方式107至120中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的哺乳动物雷帕霉素靶标(mTOR)抑制剂。

[0368] 126. 根据实施方式125所述的方法,其中所述mTOR抑制剂为依维莫司。

[0369] 127. 根据实施方式107至120中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的磷酸肌醇3激酶(PI3K)抑制剂或热休克蛋白90(HSP90)抑制剂。

[0370] 128. 根据实施方式107至120中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的人表皮生长因子受体(HER2)抑制剂。

[0371] 129. 根据实施方式128所述的方法,其中所述HER2抑制剂为曲妥珠单抗(Herceptin<sup>®</sup>)或ado-trastuzumab emtansin(Kadcyla<sup>®</sup>)。

[0372] 130. 根据实施方式107至120中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂。

[0373] 131. 根据实施方式130所述的方法,其中所述HDAC抑制剂为vorinostat( Zolinza<sup>®</sup> )、romidepsin( Istodax<sup>®</sup> )、chidamide( Epidaza<sup>®</sup> )、panobinostat( Farydak<sup>®</sup> )、belinostat( Beleodaq<sup>®</sup> 、PXD101)、丙戊酸( Depakote<sup>®</sup> 、Depakene<sup>®</sup> 、Stavzor<sup>®</sup> )、mocetinostat( MGCD0103 )、abexinostat( PCI-24781 )、entinostat( MS-275 )、pracinostat( SB939 )、resminostat( 4SC-201 )、givinostat( ITF2357 )、quisinostat( JNJ-26481585 )、kevetrin、CUDC-101、AR-42、tefinostat( CHR-2835 )、CHR-3996、4SC202、CG200745、rocilinostat( ACY-1215 )或萝卜硫素。

[0374] 132. 根据实施方式107至120中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的检查点抑制剂。

[0375] 133. 根据实施方式132所述的方法,其中所述检查点抑制剂是特异于程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)、程序性死亡配体1(PD-L1)或细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)的抗体。

[0376] 134. 根据实施方式133所述的方法,其中所述PD-1抗体是pembrolizumab( Keytruda<sup>®</sup> )或nivolumab( Opdivo<sup>®</sup> )。

[0377] 135. 根据实施方式133所述的方法,其中所述CTLA-4抗体是易普利姆玛( Yervoy<sup>®</sup> )。

[0378] 136. 根据实施方式107至120中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的癌症疫苗。

[0379] 137. 根据实施方式107至136中任一项所述的方法,其中拉索昔芬以足以提高骨量

的量和时间表 (schedule) 施用。

[0380] 138. 根据实施方式107至136中任一项所述的方法, 其中拉索昔芬以足以改善VVA的症状的量和时间表施用。

[0381] 139. 根据实施方式107至136中任一项所述的方法, 其中所述患者处于绝经前。

[0382] 140. 根据实施方式107至136中任一项所述的方法, 其中所述患者处于围绝经期。

[0383] 141. 根据实施方式107至136中任一项所述的方法, 其中所述患者处于绝经后。

[0384] 142. 一种治疗妇女的除乳腺癌以外的癌症的方法, 其包括:

[0385] a) 选择已经被诊断为除乳腺癌以外的雌激素受体阳性 (ER<sup>+</sup>) 癌症并且在雌激素受体1 (ESR1) 基因中具有至少一个功能获得性突变的患者进行治疗, 和

[0386] b) 向所选择的患者施用有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物。

[0387] 143. 根据实施方式142所述的方法, 其中所述患者已经被诊断为ER<sup>+</sup>卵巢癌。

[0388] 144. 根据实施方式142所述的方法, 其中所述患者已经被诊断为ER<sup>+</sup>肺癌。

[0389] 145. 根据实施方式142至144中任一项所述的方法, 其中拉索昔芬作为拉索昔芬酒石酸盐被施用。

[0390] 146. 根据实施方式142至144中任一项所述的方法, 其中拉索昔芬通过口服、静脉、经皮、阴道局部或阴道环施用被施用。

[0391] 147. 根据实施方式146所述的方法, 其中拉索昔芬通过口服施用被施用。

[0392] 148. 根据实施方式147所述的方法, 其中拉索昔芬以约0.5mg/d口服至约10mg/d口服施用。

[0393] 149. 根据实施方式148所述的方法, 其中拉索昔芬以约0.5mg/d口服至约5mg/d口服施用。

[0394] 150. 根据实施方式149所述的方法, 其中拉索昔芬以约1mg/d口服至约5mg/d口服施用。

[0395] 151. 根据实施方式149所述的方法, 其中拉索昔芬以1mg/d口服施用。

[0396] 152. 根据实施方式149所述的方法, 其中拉索昔芬以5mg/d口服施用。

[0397] 153. 根据实施方式142至152中任一项所述的方法, 其中拉索昔芬以每天一次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次、或每月一次施用。

[0398] 154. 根据实施方式142至153中任一项所述的方法, 其还包括用至少一种另外的内分泌疗法治疗所述患者。

[0399] 155. 根据实施方式154所述的方法, 其中所述患者以原始剂量用所述另外的内分泌疗法进行治疗。

[0400] 156. 根据实施方式154所述的方法, 其中所述患者以高于原始剂量的剂量用所述另外的内分泌疗法进行治疗。

[0401] 157. 根据实施方式154至156中任一项所述的方法, 其中所述另外的内分泌疗法是用除拉索昔芬以外的选择性ER调节剂 (SERM) 进行治疗。

[0402] 158. 根据实施方式154至156中任一项所述的方法, 其中所述另外的内分泌疗法是用选择性ER降解剂 (SERD) 进行治疗。

[0403] 159. 根据实施方式154至156中任一项所述的方法, 其中所述另外的内分泌疗法是

用芳香化酶抑制剂进行治疗。

[0404] 160. 根据实施方式142至153中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的周期蛋白依赖性激酶4/6 (CDK4/6) 抑制剂。

[0405] 161. 根据实施方式160所述的方法,其中所述CDK4/6抑制剂为帕博西尼、阿贝西尼或瑞伯西尼。

[0406] 162. 根据实施方式142至153中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的哺乳动物雷帕霉素靶标 (mTOR) 抑制剂。

[0407] 163. 根据实施方式162所述的方法,其中所述mTOR抑制剂为依维莫司。

[0408] 164. 根据实施方式142至153中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的磷酸肌醇3激酶 (PI3K) 抑制剂或热休克蛋白90 (HSP90) 抑制剂。

[0409] 165. 根据实施方式142至153中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的人表皮生长因子受体 (HER2) 抑制剂。

[0410] 166. 根据实施方式165所述的方法,其中所述HER2抑制剂为曲妥珠单抗 (Herceptin<sup>®</sup>) 或ado-trastuzumab emtansin (Kadcyla<sup>®</sup>) 。

[0411] 167. 根据实施方式142至153中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 抑制剂。

[0412] 168. 根据实施方式167所述的方法,其中所述HDAC抑制剂为vorinostat (Zolinza<sup>®</sup>) 、romidepsin (Istodax<sup>®</sup>) 、chidamide (Epidaza<sup>®</sup>) 、panobinostat (Farydak<sup>®</sup>) 、belinostat (Bleodaq<sup>®</sup>、PXD101) 、丙戊酸 (Depakote<sup>®</sup>、Depakene<sup>®</sup>、Stavzor<sup>®</sup>) 、mocetinostat (MGCD0103) 、abexinostat (PCI-24781) 、entinostat (MS-275) 、pracinostat (SB939) 、resminostat (4SC-201) 、givinostat (ITF2357) 、quisinostat (JNJ-26481585) 、kevetrin、CUDC-101、AR-42、tefinostat (CHR-2835) 、CHR-3996、4SC202、CG200745、rocilinostat (ACY-1215) 或萝卜硫素。

[0413] 169. 根据实施方式142至153中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的检查点抑制剂。

[0414] 170. 根据实施方式169所述的方法,其中所述检查点抑制剂是特异于程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1) 、程序性死亡配体1 (PD-L1) 或细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4) 的抗体。

[0415] 171. 根据实施方式170所述的方法,其中所述PD-1抗体是pembrolizumab (Keytruda<sup>®</sup>) 或nivolumab (Opdivo<sup>®</sup>) 。

[0416] 172. 根据实施方式170所述的方法,其中所述CTLA-4抗体是易普利姆玛 (Yervoy<sup>®</sup>) 。

[0417] 173. 根据实施方式142至153中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的癌症疫苗。

[0418] 174. 根据实施方式142至173中任一项所述的方法,其中所述患者处于绝经前。

[0419] 175. 根据实施方式142至173中任一项所述的方法,其中所述患者处于围绝经期。

[0420] 176. 根据实施方式142至153中任一项所述的方法,其中所述患者处于绝经后。

[0421] 177. 一种治疗处于在雌激素受体1 (ESR1) 基因的配体结合结构域 (LBD) 内发生功能获得性错义突变的风险的患有乳腺癌的女性患者的方法, 其包括向所述女性患者施用有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物。

[0422] 178. 一种治疗处于获得对内分泌疗法的抗性的风险的患有乳腺癌的女性患者的方法, 任选地其中内分泌疗法为: (i) 选择性ER调节剂 (SERM) 疗法, (ii) 选择性ER降解剂 (SERD) 疗法, (iii) 芳香化酶抑制剂 (AI) 疗法, 或 (iv) (i)、(ii) 和/或 (iii) 的任意组合, 其包括向所述女性患者施用有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物。

[0423] 179. 根据实施方式177所述的方法, 其中所述患者患有原发性乳腺癌。

[0424] 180. 根据实施方式179所述的方法, 其中所述原发性乳腺癌为局部晚期。

[0425] 181. 根据实施方式177至180中任一项所述的方法, 其中所述患者已经用内分泌疗法进行治疗, 任选地其中所述内分泌疗法为: (i) 选择性ER调节剂 (SERM) 疗法, (ii) 选择性ER降解剂 (SERD) 疗法, (iii) 芳香化酶抑制剂 (AI) 疗法, 或 (iv) (i)、(ii) 和/或 (iii) 的任意组合。

[0426] 182. 一种治疗患有雌激素受体阳性 (ER<sup>+</sup>) 原发性乳腺癌的女性患者的方法, 其包括向女性患者施用有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物。

[0427] 183. 根据实施方式182所述的方法, 其中所述患者处于获得对内分泌疗法的抗性的风险, 任选地其中内分泌疗法为: (i) 选择性ER调节剂 (SERM) 疗法, (ii) 选择性ER降解剂 (SERD) 疗法, (iii) 芳香化酶抑制剂 (AI) 疗法, 或 (iv) (i)、(ii) 和/或 (iii) 的任意组合。

[0428] 184. 根据实施方式182或实施方式183所述的方法, 其中所述原发性乳腺癌为局部晚期。

[0429] 185. 根据实施方式182至184中任一项所述的方法, 其中所述患者已经用内分泌疗法进行治疗, 任选地其中内分泌疗法为: (i) 选择性ER调节剂 (SERM) 疗法, (ii) 选择性ER降解剂 (SERD) 疗法, (iii) 芳香化酶抑制剂 (AI) 疗法, 或 (iv) (i)、(ii) 和/或 (iii) 的任意组合。

[0430] 186. 一种治疗患有雌激素受体阳性 (ER<sup>+</sup>) 局部晚期或转移性乳腺癌的女性患者的方法, 其包括向女性患者施用有效量的拉索昔芬、其药学上可接受的盐或其前体药物。

[0431] 187. 根据实施方式186所述的方法, 其中所述患者之前已经用一线或多线内分泌疗法进行治疗。

[0432] 188. 根据实施方式186所述的方法, 其中所述患者已经用多线内分泌疗法进行治疗。

[0433] 189. 根据实施方式186至188中任一项所述的方法, 其中所述患者在内分泌疗法具有疾病恶化。

[0434] 190. 根据实施方式186至188中任一项所述的方法, 其中所述患者之前已经进行治疗的所述内分泌疗法是选择性ER调节剂 (SERM)。

[0435] 191. 根据实施方式190所述的方法, 其中所述SERM是他莫昔芬、雷洛昔芬、巴西多昔芬、托瑞米芬或欧司哌米芬。

[0436] 192. 根据实施方式186至188中任一项所述的方法, 其中所述患者之前已经进行治疗的所述内分泌疗法是选择性ER降解剂 (SERD)。

[0437] 193. 根据实施方式192所述的方法, 其中所述SERD是氟维司群、RAD1901、ARN-810

(GDC-0810) 或AZD9496。

[0438] 194. 根据实施方式186至188中任一项所述的方法,其中所述患者之前已经进行治疗的所述内分泌疗法是芳香化酶抑制剂。

[0439] 195. 根据实施方式194所述的方法,其中所述芳香化酶抑制剂为依西美坦 (Aromasin<sup>®</sup>)、来曲唑( Femara<sup>®</sup> )或阿那曲唑( Arimidex<sup>®</sup> )。

[0440] 196. 根据实施方式187至195中任一项所述的方法,其中所述患者在内分泌疗法后具有疾病恶化。

[0441] 197. 根据实施方式186至196中任一项所述的方法,其中所述患者的局部晚期或转移性癌症对除拉索昔芬以外的内分泌疗法有抗性。

[0442] 198. 根据实施方式186至197中任一项所述的方法,其中所述患者具有在所述雌激素受体1(ESR1)基因的所述配体结合结构域(LBD)内具有至少一个功能获得性错义突变的癌细胞。

[0443] 199. 根据实施方式198所述的方法,其中所述患者之前已经被确定为在所述雌激素受体1(ESR1)基因的所述配体结合结构域(LBD)内具有至少一个功能获得性错义突变。

[0444] 200. 根据实施方式197所述的方法,其还包括确定所述患者在所述雌激素受体1(ESR1)基因的所述配体结合结构域(LBD)内具有至少一个功能获得性错义突变的更早的步骤。

[0445] 201. 根据实施方式198至198中任一项所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸D538、Y537、L536、P535、V534、S463、V392和E380中的任一个处。

[0446] 202. 根据实施方式201所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸D538处。

[0447] 203. 根据实施方式202所述的方法,其中所述突变为D538G。

[0448] 204. 根据实施方式201所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸Y537处。

[0449] 205. 根据实施方式204所述的方法,其中所述突变为Y537S、Y537N、Y537C或Y537Q。

[0450] 206. 根据实施方式205所述的方法,其中所述突变为Y537C。

[0451] 207. 根据实施方式201所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸L536处。

[0452] 208. 根据实施方式207所述的方法,其中所述突变为L536R或L536Q。

[0453] 209. 根据实施方式201所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸P535处。

[0454] 210. 根据实施方式209所述的方法,其中所述突变为P535H。

[0455] 211. 根据实施方式201所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸V534处。

[0456] 212. 根据实施方式211所述的方法,其中所述突变为V534E。

[0457] 213. 根据实施方式201所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸S463处。

[0458] 214. 根据实施方式213所述的方法,其中所述突变为S463P。

[0459] 215. 根据实施方式201所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在

氨基酸V392处。

[0460] 216. 根据实施方式215所述的方法,其中所述突变为V392I。

[0461] 217. 根据实施方式201所述的方法,其中所述至少一个功能获得性错义突变是在氨基酸E380处。

[0462] 218. 根据实施方式217所述的方法,其中所述突变为E380Q。

[0463] 219. 根据实施方式177至218中任一项所述的方法,其中拉索昔芬作为拉索昔芬酒石酸盐被施用。

[0464] 220. 根据实施方式177至219中任一项所述的方法,其中拉索昔芬通过口服、静脉、经皮、阴道局部或阴道环施用被施用。

[0465] 221. 根据实施方式220所述的方法,其中拉索昔芬通过口服施用被施用。

[0466] 222. 根据实施方式221所述的方法,其中拉索昔芬以约0.5mg/d口服至约10mg/d口服施用。

[0467] 223. 根据实施方式222所述的方法,其中拉索昔芬以约0.5mg/d口服至约5mg/d口服施用。

[0468] 224. 根据实施方式223所述的方法,其中拉索昔芬以约1mg/d口服至约5mg/d口服施用。

[0469] 225. 根据实施方式223所述的方法,其中拉索昔芬以1mg/d口服施用。

[0470] 226. 根据实施方式223所述的方法,其中拉索昔芬以5mg/d口服施用。

[0471] 227. 根据实施方式177至226中任一项所述的方法,其中拉索昔芬以每天一次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次、或每月一次施用。

[0472] 228. 根据实施方式177至227中任一项所述的方法,其还包括用至少一种另外的内分泌疗法治疗所述患者。

[0473] 229. 根据实施方式228所述的方法,其中所述患者以原始剂量用所述另外的内分泌疗法进行治疗。

[0474] 230. 根据实施方式228所述的方法,其中所述患者以高于原始剂量的剂量用所述另外的内分泌疗法进行治疗。

[0475] 231. 根据实施方式228至230中任一项所述的方法,其中所述另外的内分泌疗法是用除拉索昔芬以外的选择性ER调节剂(SERM)进行治疗。

[0476] 232. 根据实施方式228至230中任一项所述的方法,其中所述另外的内分泌疗法是用选择性ER降解剂(SERD)进行治疗。

[0477] 233. 根据实施方式228至230中任一项所述的方法,其中所述另外的内分泌疗法是用芳香化酶抑制剂进行治疗。

[0478] 234. 根据实施方式177至227中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的周期蛋白依赖性激酶4/6(CDK4/6)抑制剂。

[0479] 235. 根据实施方式234所述的方法,其中所述CDK4/6抑制剂为帕博西尼、阿贝西尼或瑞伯西尼。

[0480] 236. 根据实施方式177至227中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的哺乳动物雷帕霉素靶标(mTOR)抑制剂。

- [0481] 237. 根据实施方式236所述的方法,其中所述mTOR抑制剂为依维莫司。
- [0482] 238. 根据实施方式177至227中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的磷酸肌醇3激酶(PI3K)抑制剂或热休克蛋白90(HSP90)抑制剂。
- [0483] 239. 根据实施方式177至227中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的人表皮生长因子受体(HER2)抑制剂。
- [0484] 240. 根据实施方式239所述的方法,其中所述HER2抑制剂为曲妥珠单抗(Herceptin<sup>®</sup>)或ado-trastuzumab emtansin(Kadcyla<sup>®</sup>)。
- [0485] 241. 根据实施方式177至227中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂。
- [0486] 242. 根据实施方式241所述的方法,其中所述HDAC抑制剂为vorinostat(Zolinza<sup>®</sup>)、romidepsin(Istodax<sup>®</sup>)、chidamide(Epidaza<sup>®</sup>)、panobinostat(Farydak<sup>®</sup>)、belinostat(Beleodaq<sup>®</sup>、PXD101)、丙戊酸(Depakote<sup>®</sup>、Depakene<sup>®</sup>、Stavzor<sup>®</sup>)、mocetinostat(MGCD0103)、abexinostat(PCI-24781)、entinostat(MS-275)、pracinostat(SB939)、resminostat(4SC-201)、givinostat(ITF2357)、quisinostat(JNJ-26481585)、kevetrin、CUDC-101、AR-42、tefinostat(CHR-2835)、CHR-3996、4SC202、CG200745、rocilinostat(ACY-1215)或萝卜硫素。
- [0487] 243. 根据实施方式177至227中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的检查点抑制剂。
- [0488] 244. 根据实施方式243所述的方法,其中所述检查点抑制剂是特异于程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)、程序性死亡配体1(PD-L1)或细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)的抗体。
- [0489] 245. 根据实施方式244所述的方法,其中所述PD-1抗体是pembrolizumab(Keytruda<sup>®</sup>)或nivolumab(Opdivo<sup>®</sup>)。
- [0490] 246. 根据实施方式244所述的方法,其中所述CTLA-4抗体是易普利姆玛(Yervoy<sup>®</sup>)。
- [0491] 247. 根据实施方式177至227中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用有效量的癌症疫苗。
- [0492] 248. 根据实施方式177至247中任一项所述的方法,其中所述患者处于绝经前。
- [0493] 249. 根据实施方式248所述的方法,其中所述患者患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>/HER2-乳腺癌。
- [0494] 250. 根据实施方式249所述的方法,其中所述患者在其用非甾体芳香化酶抑制剂(AI)、氟维司群、AI与CDK4/6抑制剂的组合或氟维司群与CDK4/6抑制剂的组合的第一次激素治疗中已经恶化。
- [0495] 251. 根据实施方式177至247中任一项所述的方法,其中所述患者处于围绝经期。
- [0496] 252. 根据实施方式251所述的方法,其中所述患者患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>/HER2-乳腺癌。
- [0497] 253. 根据实施方式252所述的方法,其中所述患者在其用非甾体芳香化酶抑制剂

(AI)、氟维司群、AI与CDK4/6抑制剂的组合或氟维司群与CDK4/6抑制剂的组合的第一次激素治疗中已经恶化。

[0498] 254. 根据实施方式177至247中任一项所述的方法,其中所述患者处于绝经后。

[0499] 255. 根据实施方式254所述的方法,其中所述患者患有局部晚期或转移性ER<sup>+</sup>/HER2-乳腺癌。

[0500] 256. 根据实施方式255所述的方法,其中所述患者在其用非甾体芳香化酶抑制剂(AI)、氟维司群、AI与CDK4/6抑制剂的组合或氟维司群与CDK4/6抑制剂的组合的第一次激素治疗中已经恶化。

[0501] 6.6实施例

[0502] 以下是用于实施本发明的具体实施方式的实施例。提供所述实施例仅用于说明目的,并非旨在以任何方式限制本发明的范围。已经努力确保关于所使用数字(例如,量、温度等)的准确性,但是当然应允许一些试验误差和偏差。

[0503] 除非另有说明,本发明的实践将采用在本领域技术范围内的分子生物学、细胞生物学、生物化学、遗传学、癌症生物学和药理学的常规方法。这些技术在文献中有充分的解释。

[0504] 6.6.1实施例1:拉索昔芬对ESR1 LBD突变的功效

[0505] 6.6.1.1方法

[0506] 6.6.1.1.1定点突变

[0507] 使用Pfu ultra taq聚合酶使用如下表1中所总结的相应引物在pENTR2B ER<sup>WT</sup>构建体上进行ExSite突变。引物被PNK磷酸化。PCR扩增后,将产物用DpnI在37℃下消化1小时,随后在16℃下连接过夜。将连接产物转化到DH5 $\alpha$ 细菌细胞中并且在卡那霉素抗性板上生长。通过测序验证pENTR克隆,然后使用Gateway系统(Invitrogen)将其交换到pcDNA-DEST载体中用于表达分析。

表1 用于突变的引物			
[0508]	ER Y537N For	AATGACCTGCTGCTGGAGATG	SEQ ID NO:1
	ER Y537N Rev	GAGGGGCACCACGTTCTGCA	SEQ ID NO:2
	ER Y537S For	GACCTGCTGCTGGAGATGCTG	SEQ ID NO:3
	ER Y537S Rev	GCTGAGGGGCACCACGTTCTT	SEQ ID NO:4
	ER Y537C For	TGTGACCTGCTGCTGGAGATG	SEQ ID NO:5
	ER Y537C Rev	GCTGAGGGGCACCACGTTCTT	SEQ ID NO:6
	ER D538G For	GGTCTGCTGCTGGAGATGCTG	SEQ ID NO:7
	ER D538G Rev	ATAGAGGGGCACCACGTTCTT	SEQ ID NO:8

[0509] 6.6.1.1.2细胞培养

[0510] Caov2卵巢癌细胞在添加8%胎牛血清(FBS)、丙酮酸钠(NaPyr)和非必需氨基酸

(NEAA) 的 RPMI-1640 培养基 (Gibco) 中生长并且每2-3天传代。SKBR3 乳腺癌细胞在添加8% 胎牛血清 (FBS) 、丙酮酸钠 (NaPyr) 和非必需氨基酸 (NEAA) 的 DMEM 培养基 (Gibco) 中生长并且每2-3天传代。在铺板用于实验的前一天将细胞转入添加8% 脱炭胎牛血清 (CFS) 、NaPyr 和 NEAA 的无酚红 RPMI-1640 培养基中。然后在转染前一天将细胞置于96孔板的无酚红培养基中用于实验。

[0511] 6.6.1.1.3 报告基因测试

[0512] 使用Fugene转染试剂 (Promega) 用7X-TK-ERE-TATA荧光素酶报告基因 (Nagel等, Endocrinology 142 (11) :4721-4728 (2001)) 和野生型或突变受体的表达构建体共转染 Caov2 细胞。在相同的条件下用3X-TK-ERE-TATA荧光素酶报告基因共转染SKBR3细胞。使用 pCMV-β-gal 作为转染效率的对照, 将pcDNA加入至最终DNA浓度为每个三重复 (triplicate) 组 75ng。转染后5小时用指定的配体处理细胞。在处理24小时后, 将细胞裂解并进行荧光素酶和β-gal 测试如先前 (Norris等, J Biol Chem 270 (39) :22777-22782 (1995)) 所描述, 并且在Fusiona-FP HT 读板仪上对板 (PerkinElmer Life Sciences) 进行读数。

[0513] 6.6.1.2 结果

[0514] ER $\alpha$ 表达构建体被工程化以表达在转移性乳腺癌患者中发现的四种不同的ESR1 LBD突变:Y537S、Y537N、Y537C和D538G。参见Jeselsohn等, Nature Reviews Clinical Oncology 12 (10) :573-583 (2015) ;Jeselsohn等, Clinical Cancer Research 20 (7) :1757-1767 (2014) ;Robinson等, Nature Genetics 45 (12) :1446-1451 (2013) ;Thomas and Gustafsson, Trends in Endocrinology and Metabolism 26 (9) :467-476 (2015) ;和Toy等, Nature Genetics 45 (12) :1439-1445 (2013) 。在Caov2卵巢癌细胞和SKBR3乳腺癌细胞的重构雌激素反应元件 (ERE)-荧光素酶报告子测试中评估这些突变体的活性。以野生型受体的“0”数据点 (无配体) 进行数据标准化。如先前所描述 (Jeselsohn等, 2014; Robinson等, 2013; Toy等, 2013) , 所有研究的突变体在不存在其配体:17-β雌二醇 (E2) 时与野生型 (WT) ER $\alpha$ 的活性相比均表现出实质的组成型活性。虽然WT ER $\alpha$ 以剂量-响应的方式响应于E2, 但突变体的转录活性并不响应于E2激活 (图1A和图2A) 。

[0515] 随后在相同条件下评估了拉索昔芬抑制ER $\alpha$ 突变体的转录活性的能力。所有抑制曲线均在存在  $10^{-9}$  (1nM) 17-β雌二醇的条件下进行。对于每个个体受体, 以“0”数据点 (无拉索昔芬) 进行数据标准化。图包含来自五个独立实验的数据, 并且每个数值是来自各个实验的三个重复的平均值。值得注意的是, 拉索昔芬以剂量-响应的方式有效抑制了所有测试的ER $\alpha$ LBD突变体的转录活性 (图1B和图2B) 。

[0516] 还在相同条件下评估了拉索昔芬在Caov2卵巢癌细胞和SKBR3乳腺癌细胞中的转录IC90值。参见Maximov等, Current Clinical Pharmacology 8 (2) :135-155 (2013) 。将评估的拉索昔芬的转录IC90值与这些化合物以在之前临床试验中使用并在欧洲被批准的剂量在血液中的C<sub>max</sub>值进行了比较。参见Fablyn, 2009 (EMA) 的评估报告。计算包括理论剂量为0.5mg和1mg时拉索昔芬的C<sub>max</sub>。包括拉索昔芬 (1mg) 的另外的剂量以评估拉索昔芬在更高浓度时的潜在临床功效。参见Gardner等, J Clin Pharmacol 46 (1) :52-58 (2006) 。来自 Caov2卵巢癌细胞和SKBR3乳腺癌细胞的结果总结在表2中。

表2						
IC90值与报告的Cmax值的比较						
WT						
化合物	报告的 Cmax	转换的 (M)Cmax	Caov2 IC90	Caov2比率 Cmax/IC90	SKBR3 IC90	SKBR3比 率 Cmax/IC90
拉索昔芬(0.5 mg)	3.6 ng/mL	9.00E-09	6.68E-12	1346.8	3.30E-09	2.73
拉索昔芬(1 mg)	6.43 ng/mL	1.55E-08	6.68E-12	2320.4	3.30E-09	4.69
Y537N						
化合物	报告的 Cmax	转换的 (M)Cmax	Caov2 IC90	Caov2比率 Cmax/IC90	SKBR3 IC90	SKBR3比 率 Cmax/IC90
拉索昔芬(0.5 mg)	3.6 ng/mL	9.00E-09	7.45E-10	12.08	1.30E-08	0.69
拉索昔芬(1 mg)	6.43 ng/mL	1.55E-08	7.45E-10	20.8	1.30E-08	1.19
Y537S						
化合物	报告的 Cmax	转换的 (M)Cmax	Caov2 IC90	Caov2比率 Cmax/IC90	SKBR3 IC90	SKBR3比 率 Cmax/IC90
拉索昔芬(0.5 mg)	3.6 ng/mL	9.00E-09	1.22E-08	0.74	8.00E-09	1.13
拉索昔芬(1 mg)	6.43 ng/mL	1.55E-08	1.22E-08	1.27	8.00E-09	1.94
Y537C						

[0517]

表2						
IC90值与报告的Cmax值的比较						
化合物	报告的Cmax	转换的(M)Cmax	Caov2 IC90	Caov2比率 Cmax/IC90	SKBR3 IC90	SKBR3比率 Cmax/IC90
[0518]	拉索昔芬(0.5 mg)	3.6 ng/mL	9.00E-09	2.04E-10	44.07	5.90E-09 1.53
	拉索昔芬(1 mg)	6.43 ng/mL	1.55E-08	2.04E-10	75.98	5.90E-09 2.63
D538G						
化合物	报告的Cmax	转换的(M)Cmax	Caov2 IC90	Caov2比率 Cmax/IC90	SKBR3 IC90	SKBR3比率 Cmax/IC90
[0519]	拉索昔芬(0.5 mg)	3.6 ng/mL	9.00E-09	1.88E-09	4.80	7.10E-09 1.27
	拉索昔芬(1 mg)	6.43 ng/mL	1.55E-08	1.88E-09	8.24	7.10E-09 2.18

[0519] 如所预期的,WT受体对抗雌激素治疗的响应最强,而每个突变体对拉索昔芬的抑制作用表现出降低的响应。重要的是,每个突变体的药理学均不同,这突显出为患者匹配最合适药物的需求。数据表明,对于肿瘤在卵巢和乳腺癌环境两者中表达突变的患者,1mg剂量的拉索昔芬是最有效的。

[0520] 6.6.2实施例2:拉索昔芬对稳定转染子中对ESR1 LBD突变Y537S和D538G的功效

[0521] MCF7雌激素受体 $\alpha$ 阳性(ER $^+$ )乳腺癌细胞被工程化为稳定表达含有配体结合结合域突变Y537S和D538G的强力霉素(DOX)诱导型的血凝素(HA)标签全长ER。通过Sanger测序、RNA测序、Western印迹确认突变体的导入和表达。

[0522] 剂量响应研究在完全培养基条件下进行。细胞用DOX处理以诱导HA标签的突变ER或用载体处理作为对照,并且以三个重复进行铺板。随后,在第5天,使用Celigo仪器进行细胞计数,用Hoechst染料染色以检测有核活细胞,用碘化丙啶以定量死亡细胞。治疗包括载体和从 $10^{-12}$ M开始以十倍增量至 $10^{-6}$ M的增加剂量的拉索昔芬。治疗功效与细胞计数结果成反比。

[0523] 在实施例1中鉴定的拉索昔芬在含有ER突变Y537S和D538G的乳腺癌模型中的抗雌激素活性通过拉索昔芬以增加的剂量滴定克服抗性并杀死稳定转染的细胞的能力得到了证实(图3A和图3B)。

[0524] 采用PRISM计算IC50值。结果总结在表3中。

[0525]

在不存在和存在 DOX的情况下 IC50 值的比较				
处理	等位基因	无 DOX ( 仅 wt )	DOX (ESR 突变)	倍数变化
拉索昔芬	Y537S	3.6E-10	4.1E-9	11.4
拉索昔芬	D538G	1E-10	1E-9	10

[0526] 结果确认拉索昔芬治疗对Y537S和D538G突变有效,尽管Y537S和D538G突变需要更高的浓度以克服抗性。

[0527] 7. 等同和通过引用并入

[0528] 尽管已经参考优选实施方式和各个替换实施方式具体示出和描述了本发明,但是本领域技术人员将理解,在不偏离本发明的精神和范围的情况下,可以在形式和细节上进行各种改变。

[0529] 出于所有目的,在本说明书的主体内容中引用的所有参考文献、授权专利和专利申请的全部内容均通过引用并入本文。

## 序列表

<110> 杜克大学

<120> 乳腺癌的拉索昔芬治疗

<130> 32524-33498/PCT

<140>

<141>

<150> 62/502, 299

<151> 2017-05-05

<150> 62/457, 759

<151> 2017-02-10

<150> 62/406, 859

<151> 2016-10-11

<160> 8

[0001]

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成引物

<400> 1

aatgacctgc tgctggagat g

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成引物

<400> 2  
gaggggcacc acgttcttgc a 21

<210> 3  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：合成引物

<400> 3  
gacctgctgc tggagatgct g 21

<210> 4  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

[0002] <220>  
<223> 人工序列的描述：合成引物

<400> 4  
gctgaggggc accacgttct t 21

<210> 5  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：合成引物

<400> 5  
tgtgacctgc tgctggagat g 21

<210> 6  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成引物

<400> 6

gctgagggc accacgttct t

21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成引物

[0003]

<400> 7

ggtctgctgc tggagatgct g

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成引物

<400> 8

atagagggc accacgttct t

21

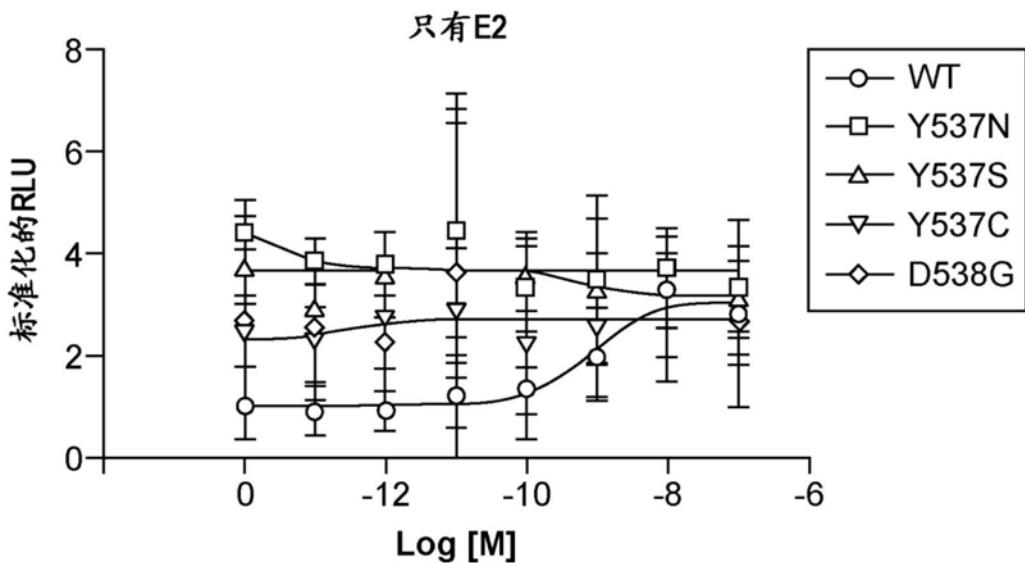


图1A

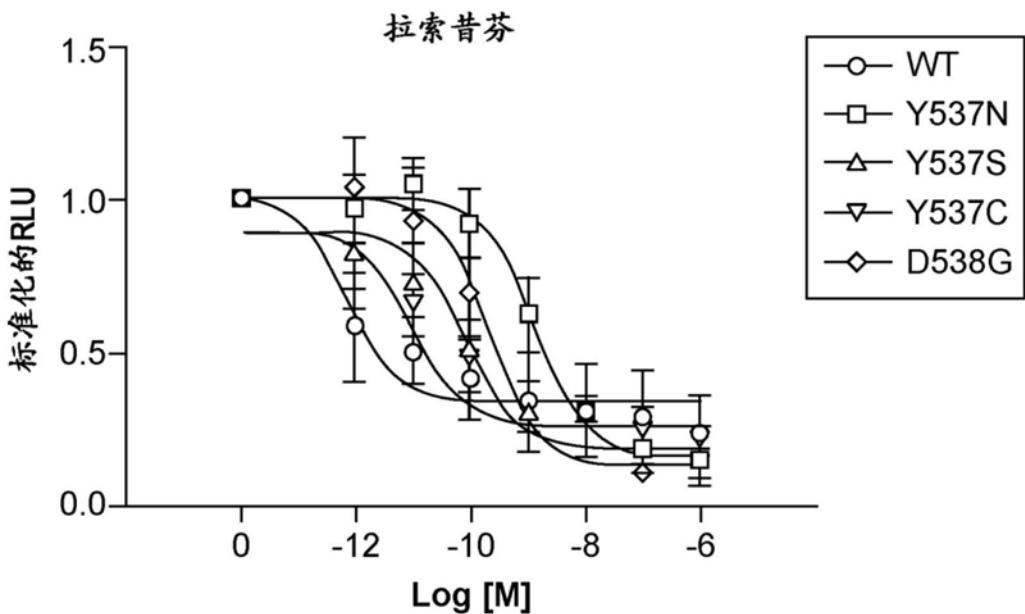


图1B

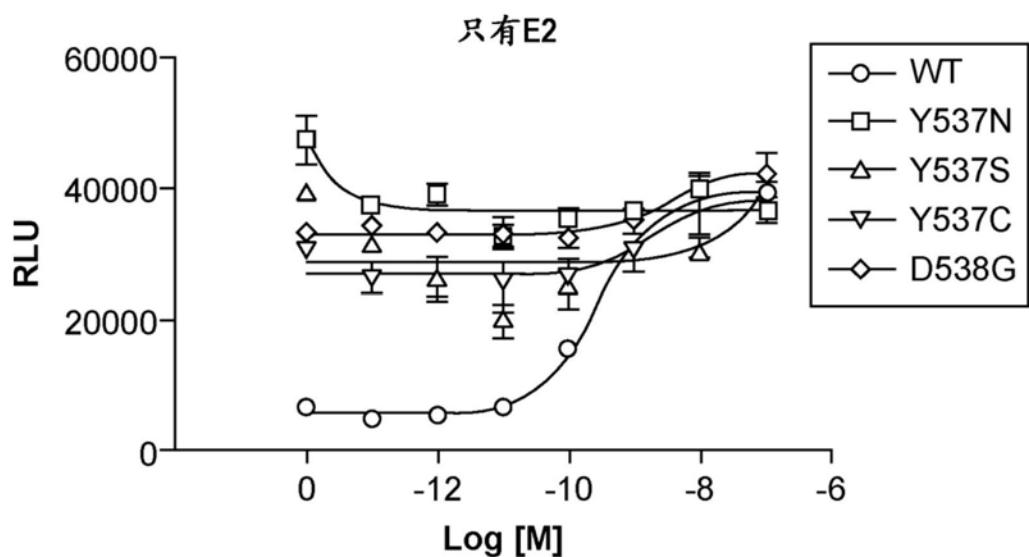


图2A

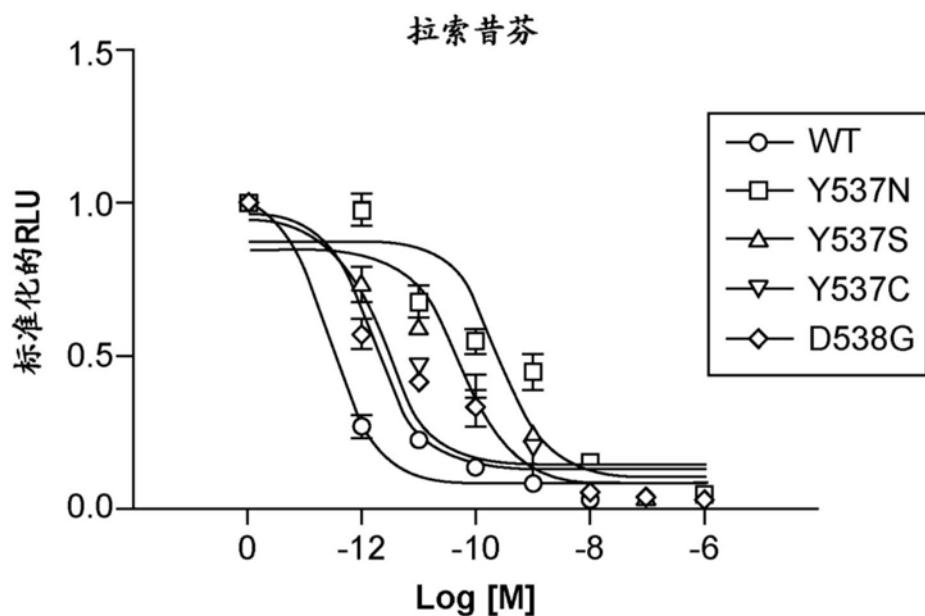


图2B

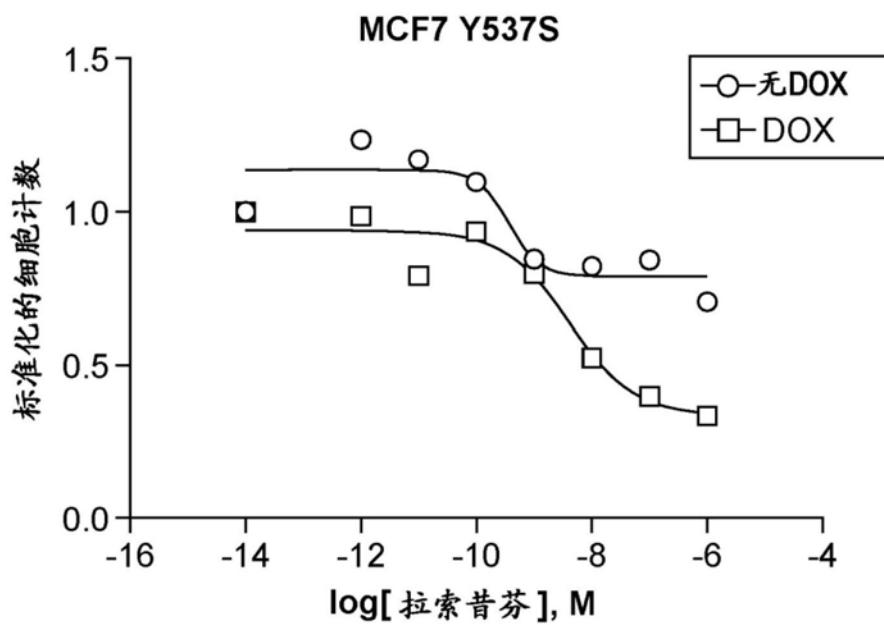


图3A

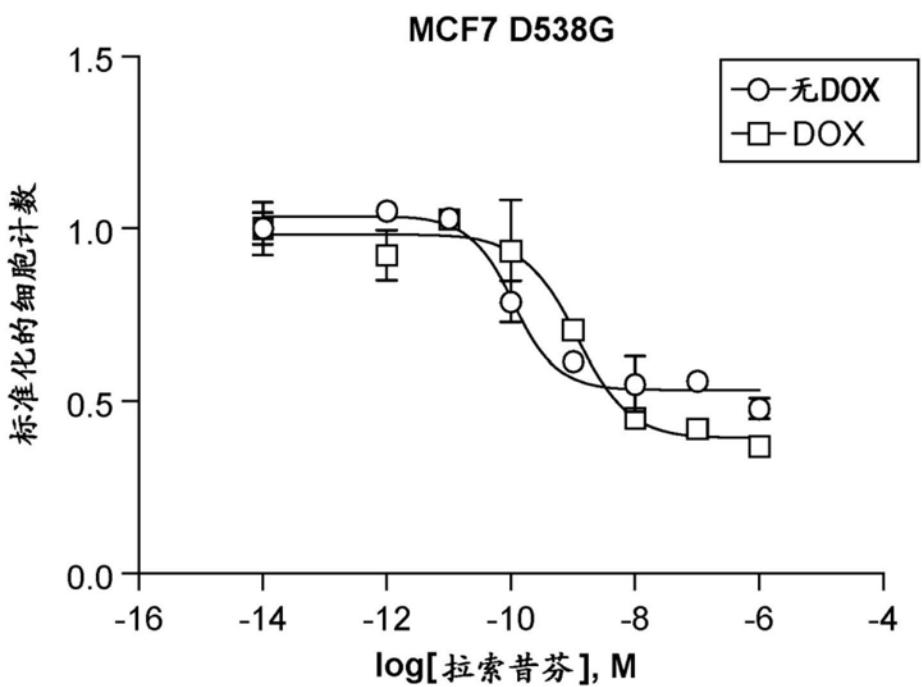


图3B