



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104208069 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 17

(21) 申请号 201410192569. 2

(22) 申请日 2014. 05. 08

(71) 申请人 上海市计划生育科学研究所

地址 200032 上海市徐汇区斜土路 2140 号 2
栋 502 室

(72) 发明人 杨军 施惠娟 徐文平

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

代理人 刘慧 杨青

(51) Int. Cl.

A61K 31/56(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

A61P 15/12(2006. 01)

A61P 1/16(2006. 01)

A61P 3/04(2006. 01)

A61P 3/06(2006. 01)

A61P 19/10(2006. 01)

权利要求书2页 说明书41页 附图19页

(54) 发明名称

双炔失碳酯组合物和疾病治疗方法

(57) 摘要

本发明提供了用于治疗癌症、减轻副作用和减轻绝经后症状的方法和组合物,所述组合物包含单独的双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)或其与至少一种选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂的组合。

1. 有效量的双炔失碳酯或其类似物在制备用于在个体中治疗癌症的药物中的应用。
2. 权利要求 1 的应用,其中所述药物与有效量的至少一种选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂组合给药。
3. 有效量的双炔失碳酯或其类似物在制备用于减轻选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂的副作用的药物中的应用。
4. 权利要求 2 或 3 的应用,其中所述其他药剂是他莫昔芬。
5. 权利要求 2 或 3 的应用,其中所述其他药剂是雷洛昔芬或其功能等同物。
6. 权利要求 2 或 3 的应用,其中所述其他药剂是雷洛昔芬。
7. 权利要求 2 或 3 的应用,其中所述其他药剂选自雷洛昔芬、拉索昔芬、巴多昔芬、阿佐昔芬、奥美昔芬、奥培米芬和左美洛昔芬。
8. 权利要求 2 或 3 的应用,其中所述其他药剂是芳香化酶抑制剂。
9. 权利要求 8 的应用,其中所述芳香化酶抑制剂是阿那曲唑。
10. 权利要求 8 的应用,其中所述芳香化酶抑制剂选自阿那曲唑、来曲唑、依西美坦、伏氯唑、福美坦和法偈唑。
11. 权利要求 1-10 任一项的应用,其中所述癌症选自乳腺癌、肺癌、胰腺癌、胃癌、结肠癌、肝癌和 CLL。
12. 权利要求 2-11 任一项的应用,其中当所述其他药剂不与双炔失碳酯组合给药时,所述癌症对使用所述其他药剂的治疗有抗性。
13. 权利要求 1-12 任一项的应用,其中所述个体为膜结合型雌激素受体阳性。
14. 权利要求 1-13 任一项的应用,其中所述个体为 VEGFR 或 EGFR 阳性。
15. 权利要求 2-14 任一项的应用,其中所述双炔失碳酯和其他药剂顺序给药。
16. 权利要求 2-14 任一项的应用,其中所述双炔失碳酯和其他药剂同时给药。
17. 权利要求 1-16 任一项的应用,其中所述个体是人类。
18. 权利要求 1-17 任一项的应用,其中所述双炔失碳酯或其类似物是双炔失碳酯。
19. 有效量的双炔失碳酯或其类似物在制备用于在个体中减轻绝经后症状的药物中的应用。
20. 权利要求 19 的应用,其中所述药物与有效量的至少一种其他药剂组合给药,其中所述其他药剂是雷洛昔芬或其功能等同物。
21. 权利要求 20 的应用,其中所述其他药剂是雷洛昔芬。
22. 权利要求 20 的应用,其中所述其他药剂选自雷洛昔芬、拉索昔芬、巴多昔芬、阿佐昔芬、奥美昔芬、奥培米芬和左美洛昔芬。
23. 权利要求 19-22 任一项的应用,其中所述绝经后症状选自脂肪肝、体重增加、高血液甘油三酯、以及骨质疏松和器官萎缩。
24. 权利要求 20-23 任一项的应用,其中所述双炔失碳酯和其他药剂顺序给药。
25. 权利要求 20-23 任一项的应用,其中所述双炔失碳酯和其他药剂同时给药。
26. 权利要求 19-25 任一项的应用,其中所述个体是人类。
27. 权利要求 19-26 任一项的应用,其中所述双炔失碳酯或其类似物是双炔失碳酯。
28. 一种药物组合物,其包含双炔失碳酯或其类似物以及至少一种选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂。

29. 权利要求 28 的药物组合物,其中所述其他药剂是他莫昔芬。
30. 权利要求 28 的药物组合物,其中所述其他药剂是雷洛昔芬或其功能等同物。
31. 权利要求 28 的药物组合物,其中所述其他药剂是雷洛昔芬。
32. 权利要求 28 的药物组合物,其中所述其他药剂选自雷洛昔芬、拉索昔芬、巴多昔芬、阿佐普芬、奥美昔芬、奥培米芬和左美洛昔芬。
33. 权利要求 28 的药物组合物,其中所述其他药剂是芳香化酶抑制剂。
34. 权利要求 33 的药物组合物,其中所述芳香化酶抑制剂是阿那曲唑。
35. 权利要求 33 的药物组合物,其中所述芳香化酶抑制剂选自阿那曲唑、来曲唑、依西美坦、伏氯唑、福美坦和法倔唑。
36. 权利要求 28-35 任一项的药物组合物,其还包含脂质。
37. 权利要求 28-36 任一项的药物组合物,其还包含酪蛋白。
38. 权利要求 28-37 任一项的药物组合物,其中所述组合物中双炔失碳酯与其他药剂的摩尔比为约 10:1 至约 1:10。
39. 一种口服单位剂型,其包含权利要求 28-38 任一项的药物组合物。
40. 权利要求 39 的口服单位剂型,其中所述单位剂型为片剂的形式。

双炔失碳酯组合物和疾病治疗方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于治疗癌症和其他疾病的方法和组合物,包含单独的双炔失碳酯(anordrin)或其类似物(例如双炔失碳酯)或其与其他药剂的组合。

背景技术

[0002] 在哺乳动物生殖和发育期间,雌激素与其受体结合,在许多组织中调控 RNA 转录、刺激细胞增殖并调节代谢信号传导。已经鉴定到三个雌激素结合蛋白的基因,其编码雌激素受体(ER) α 和 β 以及 G 蛋白偶联的雌激素受体 1(GPER1)。ER- α 和 ER- β 具有相似的结构和功能域,其包含激活功能域 1(AF-1)、DNA 结合结构域(DBD)、二聚化结构域和作为配体结合结构域(LBD)的激活功能域 2(AF-2)。它们两者都属于配体依赖性转录因子的核超家族,并具有高度保守的 DBD 和 LBD 区(95%)。它们在配体结合后调控 RNA 转录,所述配体结合产生配体-受体复合物,其可以二聚化并易位到核中,在那里它们结合于在雌激素响应性基因的启动子中存在的雌激素响应元件(ERE)。这种调节类型通常被称为经典雌激素途径。ER- α 和 ER- β 还通过膜引发的雌激素信号传导(MIES),通过与它们的配体结合结构域相互作用而与细胞质膜结合,来调控多种多样的生物功能。通过膜结合型 ER 的信号传导的详细分子机制仍不清楚。由膜结合型受体介导的雌激素对细胞增殖、基质/迁移、代谢和葡萄糖稳态的调节效果,已被综述(1,2)。此外,关于 ER 敲除小鼠的研究表明,与 ER- β 相比,ER- α 是起主要功能的雌激素受体。已发现 ER- α 的三种转录变体,即 ER- α -66、ER- α -46 和 ER- α -36。ER- α -36 缺少 AF-1 结构域并含有一部分配体结合结构域。已发现它局限于细胞膜和细胞溶质。由于 ER- α -36 仅限于调节 MIES,并且发现它仅在抗他莫昔芬的癌细胞例如 MDA-MB-231 和 Hec1A 中表达,因此认为由膜结合型 ER 调节的 MIES 造成了某些研究人员所发现的对抗雌激素疗法的抗性(3,4)。

[0003] 已发现,孤儿 G 蛋白偶联受体 30(GPER1) 结合 E2(5) 并调节细胞增殖,引起对抗雌激素疗法的抗性。然而,在其他研究人员中,它的生理功能仍有争议(3)。已显示,GPER1 敲除小鼠表现出心血管和代谢缺陷,对生育力没有明显影响(6)。因此,GPER1 可能参与雌激素介导的代谢信号传导的调节。

[0004] 在绝经后女性中雌激素的生产降低,引起可能不利地影响她们的生活质量历时几十年的症状。自从 1940s 以来,已利用激素(雌激素)替代疗法(HRT/ERT)来治疗这些症状。研究显示,乳腺癌和子宫癌的风险以及血栓栓塞发病率的增加与 HRT 有关,这导致近来 HRT 的使用减少,并且绝经后症状仍然是许多老年女性的问题。自从 1990s 以来,已利用选择性雌激素受体调节剂(SERM)作为疗法来调控雌激素信号传导。然而,对所涉及的分子机制缺乏更完全的理解以及选择性调节剂与不同雌激素受体之间的干扰性串扰,使得难以设计在临床使用期间避免抗药性发生和严重副作用的治疗方式。

[0005] 他莫昔芬作为雌激素经典途径的拮抗剂上市,用于治疗乳腺癌患者,并且据报道也是 ER- α -36 的激动剂,可能引起抗雌激素疗法的抗性,同时刺激子宫内膜上皮细胞的生长,引起子宫内膜癌(7,8)。雷洛昔芬作为他莫昔芬的升级版上市,具有较低的副作用以

及抑制癌细胞迁移和防止绝经后症状例如骨质疏松的缺点。然而,雷洛昔芬仍可以引起他莫昔芬治疗所常见的严重副作用,例如血栓栓塞和 NASH(9,10)。造成由雷洛昔芬或他莫昔芬引起的副作用的详细机制仍不清楚。伊普黄酮是植物激素的衍生物,它的代谢物以比 E2 更低的亲和性结合于 ER- α LBD,表现出降低的雌激素效应。伊普黄酮和异黄酮的代谢物对 ER- β 显示出与 E2 可比的结合亲和性和活性,并且它们在某些国家已被用作药物来预防骨质疏松。然而,在至少一个临床试验中,它们的有效性没有得到支持(11)。此外,对于某些研究人员来说,使用传统 HRT 时观察到的潜在副作用仍然是一种顾虑(12)。

[0006] 在 1960 年代,Pincus 等首次报道了 $2\beta,7\alpha$ -二乙基-A-失碳- 5α -雄甾烷- $2\alpha,17\beta$ -二醇(双炔失碳醇)具有抗雌激素活性(13,14)。1969 年,李瑞麟使用丙酸酯化双炔失碳醇来合成双炔失碳醇二丙酸酯(双炔失碳酯,ANO)。1976 年开始,双炔失碳酯在中国使用商品名 AF-53 作为抗生育药销售。已知雌激素引起激素诱导的癌症,并且在后来发现,作为雌激素受体拮抗剂的双炔失碳酯抑制恶性细胞生长(15,16,17)。在中国,作为非处方药,中国医生在法律许可的条件下将它用作抗肿瘤药剂接近十年。然而,在临床治疗期间,出现了许多令人困惑的结果。在 1998 年,在中国引入临床试验法之后,它作为抗肿瘤药剂的临床使用被停止,并且所有相关临床数据从未被收集和研究。

[0007] 本文中参考的所有出版物、专利、专利申请和公布的专利申请的公开内容,以其全文通过参考并入本文。

发明内容

[0008] 一方面,本申请提供了在个体中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述个体给药:a)有效量的双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯);以及任选地 b)有效量的至少一种选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂。在某些实施方式中,提供了通过双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)来降低至少一种其他药剂的副作用的方法,所述方法包括向所述个体给药与所述其他药剂组合的有效量的双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯),其中所述其他药剂选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂。在某些实施方式中,所述其他药剂是他莫昔芬。在某些实施方式中,所述其他药剂是雷洛昔芬或其功能等同物(例如雷洛昔芬、拉索昔芬或巴多昔芬)。在某些实施方式中,所述其他药剂是芳香化酶抑制剂,例如阿那曲唑。

[0009] 在上述实施方式的任一种的某些实施方式中,所述癌症选自乳腺癌、肺癌、胰腺癌、胃癌、结肠癌、肝癌和 CLL。在某些实施方式中,当不与双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)组合给药时,所述癌症对使用所述其他药剂的治疗有抗性。

[0010] 在上述实施方式的任一种的某些实施方式中,所述个体为膜结合型雌激素受体阳性。在某些实施方式中,所述个体为 VEGFR 或 EGFR 阳性。

[0011] 另一方面,提供了在个体中减轻绝经后症状的方法,所述方法包括向所述个体给药:a)有效量的双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯);以及任选地 b)有效量的选自雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的至少一种其他药剂。在某些实施方式中,所述其他药剂是雷洛昔芬或其功能等同物(例如雷洛昔芬、拉索昔芬或巴多昔芬)。在某些实施方式中,所述其他药剂是芳香化酶抑制剂,例如阿那曲唑。在某些实施方式中,所述绝经后症状选自脂肪肝、体重增加、高血液甘油三酯、以及骨质疏松和器官萎缩。

[0012] 在上述实施方式的任一种的某些实施方式中,所述双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂顺序给药。在某些实施方式中,所述双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂同时给药。

[0013] 在上述实施方式的任一种的某些实施方式中,所述个体是人类。

[0014] 另一方面,提供了一种药物组合物,其包含双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和至少一种选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂。在某些实施方式中,所述其他药剂是他莫昔芬。在某些实施方式中,所述其他药剂是雷洛昔芬或其功能等同物(包括例如雷洛昔芬、拉索昔芬或巴多昔芬)。在某些实施方式中,所述其他药剂是芳香化酶抑制剂,例如阿那曲唑。

[0015] 在某些实施方式中,所述药物组合物还包含脂质(例如玉米油)。在某些实施方式中,所述药物组合物还包含蛋白质(例如酪蛋白)。

[0016] 在某些实施方式中,所述组合物中双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)与所述其他药剂的重量比为约 10:1 至约 1:10。

[0017] 所述药物组合物可以以单位剂型例如口服单位剂型存在,例如胶囊、片剂、丸剂、囊片、凝胶、液体(例如悬浮剂、溶液、乳剂)、粉剂或其他颗粒剂等。

[0018] 还提供了使用本文描述的藥物组合物治疗癌症、减轻副作用和减轻本文所述的绝经后症状的方法。

[0019] 从下文的详细描述和权利要求书,本发明的这些和其他方面和优点将变得显而易见。应该理解,本文中描述的各种实施方式的一个、一些或所有性质可以组合,以形成本发明的其他实施方式。

附图说明

[0020] 图 1:双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)不结合于 ER(偶联在珠子上的 2 μ g GST 融合蛋白)的配体结合结构域(LBD),导致不能调节雌激素经典途径。A:在与 E2、TAM 或 ANO 竞争后结合于 ER- α -LBD 的 3 H-E2 的百分数,在减去空白后用单独的 3 H-E2 进行归一化;B:用考马斯蓝 R250 染色的 10% SDS-PAGE,示出了通过谷胱甘肽珠子纯化的 GST 融合蛋白;C:凝胶 1 使用 western 印迹并用抗 Bcl-2 抗体探测,示出了在用 TAM、ANO 或空白处理的 MCF-7 细胞中 Bcl-2 的表达;凝胶 2 示出了每个样品中肌动蛋白的量;凝胶 3 是凝胶 1 的更长时间的暴露。

[0021] 图 2:双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)阻断 3 H-E2 结合于在 HEK-293 细胞中表达的 ER- α -36,并通过整合蛋白 β 1 在细胞质膜上的分布抑制 MDA-MB-231 细胞生长和迁移。图 2A:结合于在 HEK-293 中表达并与 ANO 或 TAM 竞争的 ER- α -36 的 3 H-E2 的百分数,用空白进行归一化;图 2B:通过 western 印迹,使用抗 ER- α 抗体检测 ER- α -36 在 HEK-293 细胞中的表达;图 2C:与 TAM(蓝色柱)相比,ANO 剂量依赖性地显著地抑制 MDA-MB-231 细胞生长(红色柱);图 2D:ANO 和 EGF 一起抑制 MDA-MB-231 细胞生长;图 2E:6 μ M[ANO] 抑制 MDA-MB-231 细胞迁移,使用 8 μ m transwell 进行试验;图 2F:6 μ M[ANO]+10ng/ml[EGF] 抑制 MDA-MB-231 细胞迁移,使用 8 μ m transwell 进行试验;图 2G:6 μ M[ANO] 在 MDA-MB-231 细胞中抑制整合蛋白 β 1 在细胞质膜上的分布;图 2H:6 μ M[ANO] 在 MCF-7 细胞中抑制整合蛋白 β 1 在细胞质膜上的分布。

[0022] 图 3 :双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 在细胞中促进葡萄糖消耗并在小鼠中降低血糖。图 3A :与 TAM 的抑制相比, ANO 在 MCF-7 细胞中增加葡萄糖消耗 ;图 3B :250nM[ANO] 在 MCF-7 细胞中不仅中和了 $1\mu\text{M}$ [TAM] 对葡萄糖消耗的抑制, 而且提高到高于基础水平 ;图 3C :ANO 可以显著降低雌性 db/db 小鼠的血糖浓度。

[0023] 图 4 :在 OVX 小鼠或用他莫昔芬治疗的正常小鼠中, 双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 防止体重增加和甘油三酯在肝脏中的积累。图 4A :在 OVP 小鼠中, 与伊普黄酮 (IP) 相比, ANO 显著阻断体重增加 ;图 4B :ANO 显著阻断 TAM 诱导的体重增加 ;图 4C 和图 4D :肝脏的石蜡切片显示, 在 OVX 小鼠的肝脏中, 与相同剂量的 IP 相比, ANO 能够显著降低甘油三酯积累 ;图 4E 和图 4F :肝脏的石蜡切片显示, 在正常小鼠的肝脏中, 与相同量的 IF 相比, ANO 能够显著降低甘油三酯的量和由 TAM 诱导的 NASH ;图 4G :在更接近毛细血管的肝细胞中 NASH 的等级提高。

[0024] 图 5 :双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 降低由他莫昔芬诱导的血清 TG 和粘度。

[0025] 图 6 :双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) ($7.5\mu\text{M}$) 在 T47D 细胞中阻断 EGF (10ng/ml) 诱导的细胞生长。

[0026] 图 7 :双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 抑制 HepG2 细胞生长并诱导 ERK 的磷酸化。

[0027] 图 8 :双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 在切除卵巢的或用他莫昔芬治疗的小鼠中防止子宫和阴道萎缩。

[0028] 图 9 :双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 在小鼠中引起子宫内膜上皮细胞肥大 (增加细胞尺寸同时保持单层), 但是不诱导子宫内膜上皮细胞增殖。

[0029] 图 10 :双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 的玉米油和酪蛋白配方 (柱 oc) 与甲基纤维素 (柱 mc) 相比, 提高它防止小鼠子宫萎缩的能力。

[0030] 图 11 :双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 在切除卵巢的小鼠中防止骨质疏松。

[0031] 图 12 :双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 抑制 ^3H -E2 结合于在 HEK-293 细胞中表达的 ER- β 和 GPER1 融合蛋白。

[0032] 图 13 :双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 抑制 MCF-7 细胞生长但是不影响 BRCA1 的转录激活, 而他莫昔芬抑制细胞生长以及 BRCA1 和 COX7a mRNA 的合成。

[0033] 图 14 :双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 抑制 Hec1A 和 Ishikawa 细胞生长。

[0034] 图 15 :在 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞两者中, $6\mu\text{M}$ [ANO] 不改变整合蛋白 $\beta 1$ 的表达水平。将 MCF-7 细胞收获并在 RIPA 缓冲液中裂解。将 $40\mu\text{g}$ 总蛋白的细胞裂解液用于 Western 印迹, 以确定整合蛋白 $\beta 1$ 的表达水平。上方凝胶显示了整合蛋白 $\beta 1$ 的表达水平 ;下方凝胶显示了肌动蛋白的量。

[0035] 图 16 :在我们的试验条件下, 在所有实验组中, ANO 不显著改变食物摄取。A :在 db/db 小鼠中, ANO 不显著改变食物摄取 ;B :在 OVX 小鼠中, 与其他组相比, ANO 不显著改变食物摄取 ;C :在正常小鼠中, 与 TAM 组相比, ANO 不显著改变食物摄取。

[0036] 图 17 :肝脏中的总胆固醇。A :OVX 组的肝脏中的总胆固醇 ;B :TAM/ANO 组的肝脏中

的总胆固醇。

[0037] 图 18 :双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 导致 MCF-7 培养基具有降低的 pH, 变为黄色。将 MCF-7 细胞以每孔 5×10^5 个细胞的密度接种到 24 孔板中培养 24 小时, 每个孔在 0.75ml 培养基中含有指定浓度的药物。使用 pH 计测量培养基的 pH。

[0038] 图 19 :双炔失碳酯的氢离子是负责抑制细胞增殖的主要位点。将乙炔用 C2-18 的烷基或烯基胺代替, 以合成双炔失碳醇的衍生物。使用 MDA-MB-231 细胞来测量药物活性。图 19A :MDA-MB-231 细胞的浓度依赖性形态变化和死亡 ;图 19B :活性药物和浓度范围。

[0039] 图 20 : ^3H -E2 不结合于可溶性 ER- α -36。

[0040] 发明详述

[0041] 本申请提供了用于组合疗法的方法和组合物, 包含双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 与第二药剂的组合, 用于治疗癌症、减轻副作用和减轻绝经后症状。本发明是基于双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 的独特性质和作用机制的发现。在大规模筛选后, 我们令人吃惊地发现, 双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 是膜结合型雌激素结合蛋白的特异性的选择性雌激素受体调节物。另一方面, 双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 结合于 GPER1 并作为激动剂作用于 GPER1 途径, 所述途径调节代谢信号以平衡生物能量的消耗。因此, 双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 的有益效果包括 : i) 通过雌激素介导的 HER/VEGFR 途径抑制由膜结合型雌激素受体调控的恶性细胞迁移和生长, ii) 作为激动剂调节雌激素代谢效应, 引起绝经后症状例如脂肪肝、体重增加、高血液甘油三酯、以及骨质疏松和器官萎缩的减轻, iii) 中和由药物例如他莫昔芬、雷洛昔芬和阿那曲唑引起的有害效应, 所述有害效应包括例如骨质疏松、NASH、器官萎缩和子宫内膜癌。

[0042] 因此, 一方面, 本发明提供了用于治疗癌症的方法, 所述方法包括给药单独的或与至少一种选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂组合的双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯)。

[0043] 另一方面, 提供了通过给药与至少一种选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂组合的双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯), 来减轻所述其他药剂的副作用的方法。

[0044] 另一方面, 提供了通过给药单独的或与至少一种其他药剂组合的双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯), 来减轻绝经后症状的方法, 其中所述其他药剂是雷洛昔芬或其功能等同物。

[0045] 另一方面, 提供了通过给药单独的或与至少一种其他药剂组合的双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯), 来降低血液粘度和血栓栓塞的方法, 其中所述其他药剂是雷洛昔芬或其功能等同物。

[0046] 还提供了药物组合物, 其包含双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 和至少一种选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂。

[0047] 定义

[0048] 本领域普通技术人员应该理解, 本文描述的组合治疗方法需要将一种药剂或组合物与其他药剂组合给药。“组合”是指除了一种治疗方式之外还执行另一种治疗方式, 例如除了给药第二药剂之外, 还向同一个体给药本文所描述的双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯)。因此, “组合”是指在向个体提供一种治疗方式之前、期间或之后执行另一种治

疗方式。

[0049] 本文中描述的方法通常可用于疾病治疗。当在本文中使用时,“治疗”是获得有益或所需临床结果的方法。例如,对于癌症治疗来说,有益或所需的临床结果包括但不限于下列任一种或多种:一种或多种症状的缓解,疾病程度的降低,阻止或延迟疾病的扩散(例如转移,例如转移至肺或淋巴结),阻止或延迟疾病的复发,延迟或减缓疾病进展,疾病状态的改善,和缓解(部分或完全)。“治疗”还涵盖增殖性疾病的病理结果的减轻。本发明的方法考虑到了这些治疗情况中的任一种或多种。

[0050] 在本文中使用时,患有“三阴性乳腺癌”的个体是指在临床上对雌激素受体(ER)、孕酮受体(PR)和HER2蛋白的表达为阴性的个体。

[0051] “mER”是指膜结合型雌激素受体。通过ER的雌激素结合结构域(LBD)的半胱氨酸残基处的棕榈酰基化修饰,促进ER出现在细胞质膜上。ER- α -36是截短的ER- α 变体。它保留棕榈酰基化基序(445-453),并在C-端具有独特的27个氨基酸来代替全长ER- α 的140个氨基酸的区域(456-595)。由于ER- α -36具有部分LBD并主要位于细胞质膜和细胞溶质处,因此它不与雌激素结合,导致丧失雌激素经典途径的调节能力。

[0052] 本文中使用的“mER”、“EGFR阳性”、“VEGFR阳性”是指在临床上对膜结合型雌激素受体、表皮生长因子受体(EGFR)或血管表皮生长因子受体(VEGFR)为阳性的个体。

[0053] 本文中使用的术语“有效量”是指足以治疗特定障碍、病症或疾病,例如改善、缓解、减轻和/或延迟其一种或多种症状的化合物或组合物的量。对于癌症来说,有效量包括足以使肿瘤缩小和/或降低肿瘤的生长速率(例如抑制肿瘤生长)或阻止或延迟其他不想要的细胞增殖的量。

[0054] 术语“个体”是哺乳动物,包括人类。个体包括但不限于人类、牛、马、猫、狗、啮齿类或灵长类动物。在某些实施方式中,个体是人类。

[0055] 方法可以在辅助场景中实践。“辅助场景”是指其中个体具有增殖性疾病、尤其是癌症的病史,并且通常(但不一定)对包括但不限于手术(例如手术切除)、放疗和化疗的疗法具有响应性的临床场景。然而,由于他们的增殖性疾病(例如癌症)的病史,这些个体被认为处于发生疾病的风险中。在“辅助场景”中的治疗或给药是指随后的治疗方式。风险度(即当辅助场景中的个体被认为具有“高风险”或“低风险”时)取决于几种因素,最通常的是首次治疗时的疾病程度。

[0056] 本文提供的方法也可以在“新辅助场景”中实践,即方法可以在主要/决定性治疗之前进行。在某些实施方式中,个体以前已经历过治疗。在某些实施方式中,个体以前尚未治疗过。在某些实施方式中,治疗是第一线疗法。

[0057] “烷基”是直链或支链饱和烃。例如,烷基可以具有1至12个碳原子(即(C₁-C₁₂烷基))或1至10个碳原子(即(C₁-C₁₀烷基))或1至8个碳原子(即(C₁-C₈烷基))或1至6个碳原子(即(C₁-C₆烷基))或1至4个碳原子(即(C₁-C₄烷基))。适合的烷基的实例包括但不限于甲基(Me, -CH₃)、乙基(Et, -CH₂CH₃)、1-丙基(n-Pr, 正丙基, -CH₂CH₂CH₃)、2-丙基(i-Pr, 异丙基, -CH(CH₃)₂)、1-丁基(n-Bu, 正丁基, -CH₂CH₂CH₂CH₃)、2-甲基-1-丙基(i-Bu, 异丁基, -CH₂CH(CH₃)₂)、2-丁基(s-Bu, 仲丁基, -CH(CH₃)CH₂CH₃)、2-甲基-2-丙基(t-Bu, 叔丁基, -C(CH₃)₃)、1-戊基(正戊基, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃)、2-戊基(-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃)、3-戊基(-CH(CH₂CH₃)₂)、2-甲基-2-丁基(-C(CH₃)₂CH₂CH₃)、3-甲基-2-丁基(-CH(CH₃)CH(CH₃)₂)、

3-甲基-1-丁基 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、2-甲基-1-丁基 ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$)、1-己基 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、2-己基 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、3-己基 ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)$)、2-甲基-2-戊基 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、3-甲基-2-戊基 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$)、4-甲基-2-戊基 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、3-甲基-3-戊基 ($-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$)、2-甲基-3-戊基 ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、2,3-二甲基-2-丁基 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、3,3-二甲基-2-丁基 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$) 和辛基 ($-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$)。

[0058] “烯基”是具有至少一个碳-碳双键的直链或支链烃。例如，烯基可以具有 2 至 12 个碳原子（即 C_2 - C_{12} 烯基）或 2 至 10 个碳原子（即 C_2 - C_{10} 烯基）或 2 至 8 个碳原子（即 C_2 - C_8 烯基）或 2 至 6 个碳原子（即 C_2 - C_6 烯基）或 2 至 4 个碳原子（即 C_2 - C_4 烯基）。适合的烯基的实例包括但不限于乙烯或乙烯基 ($-\text{CH}=\text{CH}_2$)、烯丙基 ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) 和 5-己烯基 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)。

[0059] 应该理解，本文中描述的本发明的方面和实施方式包括“由其构成”或“基本上由其构成”的方面和实施方式。

[0060] 本文中对值或参数指称的“约”，包括（并描述）了涉及该值或参数本身的变化形式。例如，指称“约 X”的描述包括“X”的描述。

[0061] 当在本文和权利要求书中使用时，除非另有指明，否则单数形式包括其复数指称物。应该理解，本文描述的本发明的方面和变化形式包括“由其构成”或“基本上由其构成”的方面和变化形式。

[0062] 癌症治疗方法

[0063] 一方面，本发明提供了在个体中治疗癌症的方法，所述方法包括向所述个体给药有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）。在某些实施方式中，提供了在个体中治疗癌症的方法，所述方法包括向所述个体给药：a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）；以及 b) 有效量的至少一种选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂。在某些实施方式中，提供了在个体中治疗癌症的方法，所述方法包括向所述个体给药：a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）；以及 b) 有效量的雷洛昔芬。在某些实施方式中，提供了在个体中治疗癌症的方法，所述方法包括向所述个体给药：a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）；以及 b) 有效量的他莫昔芬。在某些实施方式中，提供了在个体中治疗癌症的方法，所述方法包括向所述个体给药：a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）；以及 b) 有效量的拉索昔芬或巴多昔芬。在某些实施方式中，提供了在个体中治疗癌症的方法，所述方法包括向所述个体给药：a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）；以及 b) 有效量的阿那曲唑。在某些实施方式中，双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）和其他药剂两者口服给药。在某些实施方式中，双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）和其他药剂存在于单一组合物（例如本文中所描述的药物组合物）中，例如为口服剂型的形式。

[0064] 在某些实施方式中，所述癌症选自乳腺癌、肺癌（例如小细胞肺癌和非小细胞肺癌）、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、脑癌、结肠直肠癌、白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。在某些实施方式中，所述个体为 mER 阳性。在某些实施方式中，所述个体为 EGFR 阳性。在某些实施方式中，所述个体为 VEGFR 阳性。在某些实施方式中，所述个体具有实体肿瘤。

[0065] 在某些实施方式中,提供了在个体中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述个体给药:a)有效量的双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯);以及b)有效量的至少一种其他药剂,其中所述其他药剂是EGFR抑制剂。在某些实施方式中,提供了在个体中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述个体给药:a)有效量的双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯);以及b)有效量的至少一种其他药剂,其中所述其他药剂是VEGFR抑制剂。在某些实施方式中,提供了在个体中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述个体给药:a)有效量的双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯);以及b)有效量的至少两种其他药剂,其中所述至少两种其他药剂是EGFR抑制剂和VEGFR抑制剂。在某些实施方式中,所述方法还包括向所述个体给药选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂。在某些实施方式中,所述癌症为EGFR阳性。在某些实施方式中,所述癌症为VEGFR阳性。在某些实施方式中,所述癌症为mER阳性。在某些实施方式中,所述癌症为EGFR阳性和VEGFR阳性。在某些实施方式中,所述癌症为mER阳性、EGFR阳性和VEGFR阳性。

[0066] 适合的EGFR抑制剂包括例如西妥昔单抗、帕尼单抗、厄洛替尼、吉非替尼和凡德他尼。适合的VEGFR抑制剂包括例如贝伐单抗、帕唑帕尼、瑞格菲尼和索拉非尼。

[0067] 在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂顺序给药。在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂同时给药。

[0068] 在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂同时给药。例如,在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂的给药在大约同一时间(例如,在1、2、3、4、5、6或7天任一天之内)开始。在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂的给药在大约同一时间(例如,在1、2、3、4、5、6或7天任一天之内)结束。在某些实施方式中,在双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)的给药结束后,其他药剂的给药继续进行(例如历时大约0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月的任一时段)。在某些实施方式中,在双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)的给药开始后(例如在大约0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月中的任一时段之后)开始其他药剂的给药。在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂的给药在大约同一时间开始和结束。在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂的给药在大约同一时间开始,并且在双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)的给药结束后,其他药剂的给药继续进行(例如历时大约0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月中的任一时段)。在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂的给药在大约同一时间停止,并且在双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)的给药开始后(例如在大约0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月中的任一时段之后)开始其他药剂的给药。在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂的给药在大约同一时间停止,并且在其他药剂的给药开始后(例如在大约0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月中的任一时段之后)开始双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)的给药。

[0069] 本文中描述的双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂可以是所述药剂本身、其可药用盐及其可药用酯,以及立体异构体、对映异构体、消旋混合物等。所描述的一种或多种其他药剂也可以作为含有所述药剂的药物组合物给药,其中所述药物组合物

包含可药用载体介质等。

[0070] 本文中描述的方法要求以有效量给药双炔失碳酯和 / 或其类似物 (例如双炔失碳酯) 和其他药剂。在某些实施方式中, 有效量是足以延迟疾病发生的量。在某些实施方式中, 有效量是足以阻止或延迟疾病复发的量。有效量的给药可以分一次或多次给药进行。在癌症的情形中, 药物或组合物的有效量可以: (i) 减少癌细胞数量; (ii) 减小肿瘤尺寸; (iii) 抑制、迟滞、在一定程度上减缓并优选地停止癌细胞在外周器官中的浸润; (iv) 抑制 (即在一定程度上减缓并优选地停止) 肿瘤转移; (v) 抑制肿瘤生长; (vi) 阻止或延迟肿瘤的出现和 / 或复发; 和 / 或 (vii) 在一定程度上缓解与癌症相关的一种或多种症状。

[0071] 因此, 在某些实施方式中, 提供了在个体中抑制细胞增殖 (例如肿瘤生长) 的方法, 所述方法包括向所述个体给药: a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯), 以及任选地 b) 有效量的至少一种选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂。在某些实施方式中, 有效量的双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 和其他药剂协同地抑制细胞增殖 (例如肿瘤细胞生长)。在某些实施方式中, 至少约 10% (包括例如至少约 20%、30%、40%、60%、70%、80%、90% 或 100% 中的任一者) 的细胞增殖被抑制。

[0072] 在某些实施方式中, 提供了在个体中抑制肿瘤转移 (例如乳腺癌 的转移、肺部转移或向淋巴结的转移) 的方法, 所述方法包括向所述个体给药: a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯), 以及任选地 b) 有效量的至少一种选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂。在某些实施方式中, 有效量的双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 和其他药剂协同地抑制肿瘤转移。在某些实施方式中, 至少约 10% (包括例如至少约 20%、30%、40%、60%、70%、80%、90% 或 100% 中的任一者) 的转移被抑制。在某些实施方式中, 提供了抑制向淋巴结的转移的方法。在某些实施方式中, 提供了抑制向肺的转移的方法。

[0073] 在某些实施方式中, 提供了在个体中减少现存肿瘤转移 (例如肺部转移或向淋巴结的转移) 的发生或负荷的方法, 所述方法包括向所述个体给药: a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯), 以及任选地 b) 有效量的至少一种选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂。

[0074] 在某些实施方式中, 提供了在个体中减小肿瘤尺寸的方法, 所述方法包括向所述个体给药: a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯), 以及任选地 b) 有效量的至少一种选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂。在某些实施方式中, 肿瘤尺寸减小至少约 10% (包括例如至少约 20%、30%、40%、60%、70%、80%、90% 或 100% 中的任一者)。

[0075] 在某些实施方式中, 提供了在个体中延长癌症的疾病发展时间的方法, 所述方法包括向所述个体给药: a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯), 以及任选地 b) 有效量的至少一种选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂。在某些实施方式中, 所述方法将疾病发展时间延长至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 周中的任一者。

[0076] 在某些实施方式中, 提供了延长患有增殖性疾病 (例如癌症) 的个体的存活的方法, 所述方法包括向所述个体给药: a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳

酯),以及任选地 b) 有效量的至少一种选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂。在某些实施方式中,所述方法将所述个体的存活延长至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18 或 24 个月中的任一者。

[0077] 在某些实施方式中,所述方法被用于治疗原发性肿瘤。在某些实施方式中,提供了治疗转移性癌症(即从原发性肿瘤转移的癌症)的方法。在某些实施方式中,所述方法用于治疗晚期疾病或较低程度的疾病,例如低肿瘤负荷。在某些实施方式中,提供了治疗晚期癌症的方法。在某些实施方式中,所述方法用于治疗早期乳腺癌。所述方法可以在辅助场景中实践。本文提供的方法也可以在新辅助场景中实践,即所述方法可以在主要/决定性疗法之前进行。在某些实施方式中,所述方法还包括在治疗完成之后对个体进行手术。例如,在癌症是乳腺癌的某些实施方式中,可以在新辅助化疗完成后约 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 周内进行保乳手术乳房切除术。

[0078] 在某些实施方式中,所述个体以前已经历过治疗。在某些实施方式中,所述个体以前没有治疗过。在某些实施方式中,所述治疗是第一线疗法。在某些实施方式中,所述乳腺癌在缓解后复发。

[0079] 在某些实施方式中,所述癌症是乳腺癌。这些方法可用于例如治疗、稳定、防止和/或延迟任何类型或阶段的乳腺癌,例如早期乳腺癌、非转移性乳腺癌、晚期乳腺癌、IV 期乳腺癌、局部晚期乳腺癌、转移性乳腺癌、缓解中的乳腺癌、辅助场景中的乳腺癌或新辅助场景中的乳腺癌。在某些实施方式中,所述方法可用于手术前系统疗法(PST)。

[0080] 在某些实施方式中,提供了治疗乳腺癌(其可以是 HER2 阳性或 HER2 阴性的)包括例如晚期乳腺癌、IV 期乳腺癌、局部晚期乳腺癌 和转移性乳腺癌的方法。在某些实施方式中,乳腺癌是腺腔 B 型乳腺癌。在某些实施方式中,乳腺癌是基底细胞样乳腺癌。在某些实施方式中,个体被诊断为具有 T2、T3 或 T4 病变或 N、M0 或 T1c、N1-3 和 M0 期。在某些实施方式中,个体具有 0-1 的 ECOG 功能状态。在某些实施方式中,个体具有向同侧乳房的皮肤转移。在某些实施方式中,个体以前经历过疗法(例如激素疗法)。在某些实施方式中,个体以前未经历过疗法(例如激素疗法)。在某些实施方式中,个体正等待决定性手术。在某些实施方式中,乳腺癌是切除过的乳腺癌。在某些实施方式中,乳腺癌是未切除的乳腺癌,例如未切除的 II 或 III 期乳腺癌。

[0081] 在某些实施方式中,所述方法用于治疗具有一个或多个这些风险因子,导致与不具有这些风险因子的个体相比发生乳腺癌的可能性更高的个体。这些风险因子包括但不限于年龄、性别、种族、饮食、既往病史、前体疾病的存在、遗传考虑因素和环境暴露。在某些实施方式中,个体可以是在遗传上或其他方面对发展乳腺癌易感,并且已被或尚未被诊断为患有乳腺癌的人类。具有乳腺癌风险的个体包括例如有亲戚经历过这种疾病的个体,以及风险通过遗传或生物化学标志物的分析得以确定的个体。例如,所述个体可以是具有与乳腺癌相关的基因、遗传突变或多态性(例如 BRCA1、BRCA2、ATM、CHEK2、RAD51、AR、DIRAS3、ERBB2 和/或 TP53)或具有一个或多个额外的基因拷贝(例如一个或多个额外的 HER2 基因拷贝)的个体。在某些实施方式中,所述乳腺癌为 HER2 阴性。在某些实施方式中,所述乳腺癌为 ER 阴性。在某些实施方式中,所述乳腺癌为 PR 阴性。在某些实施方式中,所述乳腺癌为 ER 阴性和 HER2 阴性。在某些实施方式中,所述乳腺癌为 PR 阴性和 HER2 阴性。在某些实施方式中,所述乳腺癌为 ER 阴性和 PR 阴性。在某些实施方式中,所述乳腺癌为 ER 阴

性、PR 阴性和 HER2 阴性。

[0082] 本文描述的方法还可用于治疗其他实体肿瘤（例如晚期实体肿瘤）。在某些实施方式中，提供了治疗肺癌包括例如非小细胞肺癌（NSCLC，例如晚期 NSCLC）、小细胞肺癌（SCLC，例如晚期 SCLC）和肺中的晚期实体肿瘤恶化的方法。在某些实施方式中，提供了治疗任何卵巢癌、头颈癌、胃恶性肿瘤、黑素瘤（包括转移性黑素瘤和恶性黑素瘤）、卵巢癌、结肠直肠癌和胰腺癌的方法。

[0083] 在某些实施方式中，所述方法可用于治疗下列一种或多种疾病：皮肤 T 细胞淋巴瘤（CTCL），白血病，滤泡性淋巴瘤，霍奇金淋巴瘤和急性髓性白血病。

[0084] 在某些实施方式中，所述疾病是下列任一种的癌症：基底细胞癌，成神经管细胞瘤，成胶质细胞瘤，多发性骨髓瘤，慢性粒细胞性白血病（CML），急性粒细胞性白血病，胰腺癌，肺癌（小细胞肺癌和非小细胞肺癌），食管癌，胃癌，胆管癌，前列腺癌，肝癌，肝细胞癌，胃肠癌，胃癌，以及卵巢和膀胱癌。在某些实施方式中，所述癌症选自胰腺导管腺癌、结肠腺癌和卵巢囊腺癌。在某些实施方式中，所述癌症是胰腺导管腺癌。在某些实施方式中，所述癌症是灌注不良和 / 或血管化不良的肿瘤。

[0085] 在某些实施方式中，所述癌症是胰腺癌，包括例如胰腺腺癌、胰腺腺鳞癌、胰腺鳞状细胞癌和胰腺巨细胞癌。在某些实施方式中，所述胰腺癌是外分泌胰腺癌。在某些实施方式中，所述胰腺癌是内分泌胰腺癌（例如胰岛细胞癌）。在某些实施方式中，所述胰腺癌是晚期转移性胰腺癌。

[0086] 可以通过本发明的方法治疗的癌症的其他实例包括但不限于肾上腺皮质癌、特发性骨髓外化生、AIDS 相关的癌症（例如 AIDS 相关的淋巴瘤）、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤（例如小脑星形细胞瘤和大脑星形细胞瘤）、基底细胞癌、胆管癌（例如肝外胆管癌）、膀胱癌、骨癌（骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤）、脑肿瘤（例如神经胶质瘤、脑干神经胶质瘤、小脑或大脑星形细胞瘤（例如毛细胞型星形细胞瘤、弥漫性星形细胞瘤、间变性（恶性）星形细胞瘤）、恶性神经胶质瘤、室管膜瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、颅咽管瘤、成血管细胞瘤、成神经管细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤、视觉通路和下丘脑神经胶质瘤和成胶质细胞瘤）、乳腺癌、支气管腺瘤 / 类癌瘤、类癌肿瘤（例如胃肠类癌肿瘤）、原发性不明的癌、中枢神经系统淋巴瘤、宫颈癌、结肠癌、结肠直肠癌、慢性骨髓增生性障碍、子宫内膜癌（例如子宫癌）、室管膜瘤、食管癌、尤文家族肿瘤、眼癌（例如眼内黑素瘤和视网膜细胞瘤）、胆囊癌、胃癌、胃肠类癌肿瘤、胃肠间质瘤（GIST）、胚细胞肿瘤（例如颅外、性腺外、卵巢）、妊娠性滋养层细胞肿瘤、头颈癌、肝细胞（肝）癌（例如肝癌和肝细胞瘤）、下咽癌、胰岛细胞癌（内分泌胰腺）、喉癌、喉癌、白血病、唇和口腔癌、口腔癌、肝癌、肺癌（例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌）、淋巴样肿瘤（例如淋巴瘤）、成神经管细胞瘤、卵巢癌、间皮瘤、转移性颈部鳞状细胞癌、口嘴癌、多发性内分泌肿瘤综合征、骨髓异常增生综合征、骨髓增生异常 / 骨髓增殖性疾病、鼻腔和鼻窦癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、神经内分泌癌、口咽癌、卵巢癌（例如卵巢上皮癌、卵巢胚细胞肿瘤、卵巢低恶性潜能肿瘤）、胰腺癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、腹膜癌、咽喉癌、嗜铬细胞瘤、成松果体细胞瘤和幕上原始神经外胚层肿瘤、垂体肿瘤、胸膜肺母细胞瘤、淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤（小神经胶质细胞瘤）、肺淋巴管肌瘤病、直肠癌、肾癌、肾盂和输尿管癌（过渡细胞癌）、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、皮肤癌（例如非黑素瘤（例如鳞状细胞癌）、黑素瘤和 M_crk₆1 细胞癌）、小肠癌、鳞状细

胞癌、睾丸癌、喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、结节性硬化症、尿道癌、阴道癌、外阴癌、肾母细胞瘤、以及移植后淋巴组织增生性障碍 (PTLD)、与母斑细胞病、水肿 (例如与脑肿瘤相关的) 和美格氏综合征相关的异常血管增殖。

[0087] 在某些实施方式中,所述癌症是实体肿瘤 (例如晚期实体肿瘤)。实体肿瘤包括但不限于肉瘤和癌,例如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、卡波斯肉瘤、软组织肉瘤、子宫滑膜肉瘤、间皮瘤、尤文氏肿瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌 (包括例如腺癌、透明细胞肾细胞癌、乳头状肾细胞癌、嫌色细胞肾细胞癌、收集管肾细胞癌、粒状肾细胞癌、混合粒状肾细胞癌、肾血管肌脂瘤或纺锤肾细胞癌)、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、维尔姆斯氏肿瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤和成视网膜细胞瘤。

[0088] 在某些实施方式中,淋巴样肿瘤 (例如淋巴瘤) 是 B- 细胞赘生物。B- 细胞赘生物的实例包括但不限于前体 B- 细胞赘生物 (例如前体 B- 成淋巴细胞白血病 / 淋巴瘤) 和外周 B- 细胞赘生物 (例如 B- 细胞慢性淋巴细胞白血病 / 幼淋巴细胞白血病 / 小淋巴细胞淋巴瘤 (小淋巴细胞 (SL) NHL)、淋巴浆细胞样淋巴瘤 / 免疫细胞瘤、套细胞淋巴瘤、滤泡中心淋巴瘤、滤泡淋巴瘤 (例如细胞学等级: I (小细胞)、II (混合的小细胞和大细胞)、III (大细胞) 和 / 或亚型: 弥漫性和主要地小细胞型)、低级别 / 滤泡性非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、中间级别 / 滤泡性 NHL、边缘区 B- 细胞淋巴瘤 (例如结外 (例如 MALT- 型 +/- 单核细胞样 B 细胞) 和 / 或节 (例如 +/- 单核细胞样 B 细胞))、脾边缘区淋巴瘤 (例如, +/- 绒毛淋巴细胞)、毛细胞白血病、浆细胞瘤 / 浆细胞性骨髓瘤 (例如骨髓瘤和多发性骨髓瘤)、弥漫性大 B- 细胞淋巴瘤 (例如原发性纵隔 (胸腺) B- 细胞淋巴瘤)、中间级别弥漫性 NHL、伯基特淋巴瘤、高级别 B- 细胞淋巴瘤、伯基特样、高级别成免疫细胞 NHL、高级别成淋巴细胞 NHL、高级别小型无裂隙细胞 NHL、肿块性病变 NHL、AIDS 相关淋巴瘤和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症)。

[0089] 在某些实施方式中,淋巴样肿瘤 (例如淋巴瘤) 是 T- 细胞和 / 或推断的 NK- 细胞赘生物。T- 细胞和 / 或推断的 NK- 细胞赘生物的实例包括但不限于前体 T- 细胞赘生物 (前体 T- 成淋巴细胞淋巴瘤 / 白血病) 和外周 T- 细胞和 NK- 细胞赘生物 (例如 T- 细胞慢性淋巴细胞白血病 / 幼淋巴细胞白血病和大颗粒淋巴细胞白血病 (LGL) (例如 T- 细胞型和 / 或 NK- 细胞型)、皮肤 T- 细胞淋巴瘤 (例如蕈样真菌病 / 塞扎里综合征)、非特异的原发性 T- 细胞淋巴瘤 (例如细胞学类别 (例如中等大小的细胞、混合的中等细胞和大细胞)、大细胞、淋巴上皮细胞、亚型肝脾 γ δ T- 细胞淋巴瘤和皮下脂膜炎 T- 细胞淋巴瘤)、血管免疫母细胞性 T- 细胞淋巴瘤 (AILD)、血管中心淋巴瘤、肠 T- 细胞淋巴瘤 (例如 +/- 肠病相关的)、成人 T- 细胞淋巴瘤 / 白血病 (ATL)、间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL) (例如 CD30+、T- 和裸细胞型)、间变性大细胞淋巴瘤和霍奇金样)。

[0090] 在某些实施方式中,淋巴样肿瘤 (例如淋巴瘤) 是霍奇金病。例如,霍奇金病可以是淋巴细胞为主型、结节硬化型、混合细胞型、淋巴细胞贫化型和 / 或淋巴细胞富集型。

[0091] 在某些实施方式中,癌症是白血病。在某些实施方式中,白血病是慢性白血病。慢性白血病的实例包括但不限于慢性髓细胞性 I (粒细胞性) 白血病、慢性骨髓性白血病和慢性淋巴细胞白血病 (CLL)。在某些实施方式中,白血病是急性白血病。急性白血病的实例包括但不限于急性淋巴细胞白血病 (ALL)、急性粒细胞白血病、急性淋巴细胞性白血病和急性髓性白血病 (例如成髓细胞性、前髓细胞性、髓单核细胞性、单核细胞性和红白血病)。

[0092] 在某些实施方式中,癌症是液体肿瘤 (liquid tumor) 或浆细胞瘤。浆细胞瘤包括但不限于骨髓瘤。骨髓瘤包括但不限于髓外浆细胞瘤、孤立性骨髓瘤和多发性骨髓瘤。在某些实施方式中,浆细胞瘤是多发性骨髓瘤。

[0093] 在某些实施方式中,癌症是多发性骨髓瘤。多发性骨髓瘤的实例包括但不限于 IgG 多发性骨髓瘤、IgA 多发性骨髓瘤、IgD 多发性骨髓瘤、IgE 多发性骨髓瘤和非分泌性多发性骨髓瘤。在某些实施方式中,多发性骨髓瘤是 IgG 多发性骨髓瘤。在某些实施方式中,多发性骨髓瘤是 IgA 多发性骨髓瘤。在某些实施方式中,多发性骨髓瘤是隐袭性 (smoldering) 或无痛性 (indolent) 多发性骨髓瘤。在某些实施方式中,多发性骨髓瘤是进行性多发性骨髓瘤。在某些实施方式中,多发性骨髓瘤可能对药物具有抗性,所述药物例如但不限于硼替佐米、地塞米松 (Dex-)、阿霉素 (Dox-) 和美法仑 (LR)。

[0094] 在某些实施方式中,提供了通过双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 来减少至少一种其他药剂的副作用的方法,所述方法包括向所述个体给药与其他药剂组合的有效量的双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯),其中所述其他药剂选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂。在某些实施方式中,个体为 mER 阳性。在某些实施方式中,个体为 EGFR 阳性。在某些实施方式中,个体为 VEGFR 阳性。

[0095] 他莫昔芬的副作用包括例如子宫癌、NASH、心血管和心脏病发作、腹泻、恶心、头痛、潮热、鼻窦炎、体重增加、腿部抽筋和踝部肿胀。雷洛昔芬的副作用包括例如血液甘油三酯降低、NASH、心血管和心脏病发作、血凝块、卒中、深部静脉栓塞和肺栓塞。阿那曲唑的副作用包括例如腹泻、恶心、头痛、潮热、鼻窦炎、体重增加、肌肉痛、器官萎缩和骨质疏松。

[0096] 在某些实施方式中,使用 mER 状态作为基础来选择用于癌症治疗 (或降低其他药剂在癌症治疗中的副作用) 的个体。mER 的水平可用于例如确定 (和帮助评估) 下列任一项或多项 :a) 个体对最初接受的治疗的可能的适合性 ;b) 个体对最初接受的治疗的可能的不适合性 ;c) 对治疗的响应性 ;d) 个体对继续接受治疗的可能的适合性 ;e) 个体对接受治疗的可能的不适合性 ;f) 调整剂量 ;g) 预测临床益处的可能性。本申请涵盖了这些方法的任一种。

[0097] 例如,在某些实施方式中,提供了在个体 (例如人类个体) 中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述个体给药 :a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) ;以及任选地 b) 有效量的至少一种选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂,其中所述个体具有高 mER 水平。在某些实施方式中,提供了在个体 (例如人类个体) 中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述个体给药 :a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) ;以及任选地 b) 有效量的至少一种选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂,其中使用 mER 的水平作为选择用于治疗的个体的基础。在某些实施方式中,如果个体具有高 mER 水平,则选择所述个体用于治疗。在某些实施方式中,mER 水平通过免疫组织化学方法来测定。在某些实施方式中,mER 的水平是

基于蛋白表达水平。在某些实施方式中, mER 的水平是基于 mRNA 水平。在某些实施方式中, mER 的水平是基于对雌激素刺激做出响应的 Ca^{2+} 信号。在某些实施方式中, 所述方法还包括在治疗之前测定 mER 的水平。在某些实施方式中, 所述方法还包括根据 mER 水平来选择用于治疗的个体。

[0098] 当与对照样品相比时, mER 的水平可能是高水平或低水平。在某些实施方式中, 将个体中的 mER 水平与对照样品中的 mER 水平进行比较。在某些实施方式中, 将对象中的 mER 水平与多个对照样品中的 mER 水平进行比较。在某些实施方式中, 使用多个对照样品来产生统计数据, 并将其用于分类患有癌症的个体中的 mER 水平。

[0099] mER 水平的分类或排序 (即高或低) 可以相对于对照水平的统计分布来确定。在某些实施方式中, 所述分类或排序相对于从个体获得的对照样品。在某些实施方式中, 将 mER 水平相对于对照水平的统计分布来分类或排序。在某些实施方式中, 将 mER 水平相对于来自于从对象获得的对照样品的水平来分类或排序。

[0100] 对照样品可以使用与非对照样品相同的来源和方法来获得。在某些实施方式中, 对照样品从不同个体 (例如未患癌症的个体和 / 或具有相似种族、年龄和性别特性的个体) 获得。在样品是肿瘤组织样品的某些实施方式中, 对照样品可以是来自于同一个体的非癌样品。在某些实施方式中, 使用多个对照样品 (例如来自于不同个体) 来确定特定组织、器官或细胞群体中 mER 的水平范围。在某些实施方式中, 对照样品是已被确定为是正确对照的组织的组织或细胞。在某些实施方式中, 对照是不表达 mER 的细胞。在某些实施方式中, 使用归一化试验中的临床可接受的正常水平作为用于确定 mER 水平的对照水平。在某些实施方式中, 根据评分系统例如基于免疫组织化学的评分系统, 将对象中的 mER 参比水平分类为高、中或低。

[0101] 在某些实施方式中, 通过测量个体中的 mER 水平并与对照或参比 (例如给定患者群体的中位数水平或第二个体的水平) 进行比较, 来确定 mER 水平。例如, 如果确定单个个体的 mER 水平高于患者群体的中位数水平, 则将该个体确定为具有高的 mER 表达。或者, 如果确定单个个体的 mER 水平低于患者群体的中位数水平, 则将该个体确定为具有低的 mER 表达。在某些实施方式中, 将个体与对治疗具有响应性的第二个体个体和 / 或患者群体进行比较。在某些实施方式中, 将个体与对治疗没有响应性的第二个体和 / 或患者群体进行比较。在本文中的任何实施方式中, 所述水平通过测量 mER 的水平来确定。例如, 如果确定单个个体的编码 mER 的 mRNA 的水平高于患者群体的中位数水平, 则将该个体确定为具有高水平的编码 mER 的 mRNA。或者, 如果确定单个个体的编码 mER 的 mRNA 的水平低于患者群体的中位数水平, 则将该个体确定为具有低水平的编码 mER 的 mRNA。

[0102] 在某些实施方式中, mER 的参比水平通过获得 mER 水平的统计分布来确定。

[0103] 在某些实施方式中, 将生物信息学方法用于 mER 水平的确定和分类。已开发了大量可选替的生物信息学方法, 使用基因表达情况分析数据来评估基因集的表达情况。方法包括但不限于在下述文献中描述的方法: Segal, E. 等, Nat. Genet. 34:66-176 (2003); Segal, E. 等, Nat. Genet. 36:1090-1098 (2004); Barry, W. T. 等, Bioinformatics 21:1943-1949 (2005); Tian, L. 等, Proc Nat'l Acad Sci USA 102:13544-13549 (2005); Novak B A 和 Jain A N., Bioinformatics 22:233-41 (2006); Maglietta R 等, Bioinformatics 23:2063-72 (2007); Bussemaker H J, BMC

Bioinformatics8Suppl6:S6(2007)。

[0104] 在某些实施方式中,测定 mRNA 水平,并且低水平是低于被认为是临床上正常的水平或从对照获得的水平的约 1.1、1.2、1.3、1.5、1.7、2、2.2、2.5、2.7、3、5、7、10、20、50、70、100、200、500、1000 倍或小于 1000 倍的 mRNA 水平。在某些实施方式中,高水平是高于被认为是临床上正常的水平或从对照获得的水平的约 1.1、1.2、1.3、1.5、1.7、2、2.2、2.5、2.7、3、5、7、10、20、50、70、100、200、500、1000 倍或大于 1000 倍的 mRNA 水平。

[0105] 在某些实施方式中,通过例如免疫组织化学测定蛋白质表达水平。例如,用于低或高水平的判据,可以根据例如使用特异性识别 mER 蛋白的抗体时阳性染色的细胞数量和/或染色的强度来做出。在某些实施方式中,如果少于约 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或 50%的细胞具有阳性染色,则水平为低。在某些实施方式中,如果染色的强度比阳性对照染色低 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或 50%,则水平为低。

[0106] 在某些实施方式中,如果超过约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或 90%的细胞具有阳性染色,则水平为高。在某些实施方式中,如果染色强度与对照染色相同,则水平为高。在某些实施方式中,如果染色强度为阳性对照染色的 80%、85%或 90%,则水平为高。

[0107] 在某些实施方式中,强染色、中等染色和弱染色是染色的校准水平,其中确定一个范围并将染色强度在所述范围内分档。在某些实施方式中,强染色是高于强度范围的 75 百分位数的染色,中等染色是强度范围的 25 至 75 百分位数的染色,弱染色是低于强度范围的 25 百分位数的染色。在某些情况下,熟悉特定染色技术的本领域技术人员调整档的大小并确定染色类别。

[0108] 在某些实施方式中,通过例如 Ca^{2+} 振荡或电生理膜片钳来确定雌激素敏感水平。例如,可以根据例如使用雌激素时阳性细胞的 Ca^{2+} 浓度或响应性信号的变化,来制造低或高水平的判据。在某些实施方式中,如果少于约 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或 50%的细胞具有阳性敏感性,则水平为低。在某些实施方式中,如果 Ca^{2+} 浓度或响应性信号的变化强度比阳性对照敏感性低 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或 50%,则水平为低。

[0109] 在某些实施方式中,如果超过约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或 90%的细胞具有阳性变化,则水平为高。在某些实施方式中,如果敏感性强度与阳性对照敏感性相同,则水平为高。在某些实施方式中,如果所述变化的强度为阳性对照的 80%、85%或 90%,则水平为高。

[0110] 在某些实施方式中,强敏感性、中度敏感性和弱敏感性是细胞中 Ca^{2+} 信号的校准水平,其中确定一个范围并将 Ca^{2+} 信号的强度在所述范围内分档。在某些实施方式中,强敏感性是高于强度范围的 75 百分位数的 Ca^{2+} 信号变化,中等敏感性是强度范围的 25 至 75 百分位数的 Ca^{2+} 信号变化,弱敏感性是经测量低于强度范围的 25 百分位数的 Ca^{2+} 信号变化。在某些情况下,熟悉特定灌注技术的本领域技术人员调整档的大小并确定信号记录类别。

[0111] 减轻绝经后综合征的方法

[0112] 在某些实施方式中,提供了在个体中减轻绝经后症状的方法,所述方法包括向所

述个体给药有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）。

[0113] 在某些实施方式中，提供了在个体中减轻绝经后症状的方法，所述方法包括向所述个体给药：a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）；以及 b) 有效量的选自雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的至少一种其他药剂。在某些实施方式中，双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）和其他药剂顺序给药。在某些实施方式中，双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）和其他药剂同时给药（例如在单一组合物例如本文所描述的药物组合物中）。

[0114] 本文所描述的绝经后综合征包括但不限于脂肪肝、体重增加、高血液甘油三酯、以及骨质疏松和器官萎缩。

[0115] 因此，例如，在某些实施方式中，提供了在个体中预防骨质疏松（或减轻其症状）的方法，所述方法包括向所述个体给药有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）。在某些实施方式中，提供了在个体中预防骨质疏松（或减轻其症状）的方法，所述方法包括向所述个体给药：a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）；以及 b) 有效量的至少一种其他药剂，其中所述其他药剂选自雷洛昔芬或其功能等同物。在某些实施方式中，所述其他药剂是雷洛昔芬。在某些实施方式中，所述其他药剂选自雷洛昔芬、拉索昔芬、巴多昔芬、阿佐昔芬、奥美昔芬、奥培米芬和左美洛昔芬。在某些实施方式中，提供了在个体中预防骨质疏松（或减轻其症状）的方法，所述方法包括向所述个体给药：a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）；以及 b) 有效量的至少一种其他药剂，其中所述其他药剂是芳香化酶抑制剂。在某些实施方式中，所述其他药剂是阿那曲唑。在某些实施方式中，方法还包括向所述个体给药有效量的钙。钙的适合的量包括但不限于约 1mg/ 天至约 500mg/ 天，例如约 10mg/ 天至约 200mg/ 天、约 50mg/ 天至约 1500mg/ 天。在某些实施方式中，方法还包括向所述个体给药有效量的维生素 D。维生素 D 的适合的量包括但不限于约 400IU/ 天至约 800IU/ 天，例如约 500IU/ 天至约 600IU/ 天。

[0116] 在某些实施方式中，提供了在个体中预防脂肪肝（或减轻其症状）的方法，所述方法包括向所述个体给药有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）。在某些实施方式中，提供了在个体中预防脂肪肝（或减轻其症状）的方法，所述方法包括向所述个体给药：a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）；以及 b) 有效量的至少一种其他药剂，其中所述其他药剂是雷洛昔芬或其功能等同物。在某些实施方式中，所述其他药剂是雷洛昔芬。在某些实施方式中，所述其他药剂选自雷洛昔芬、拉索昔芬、巴多昔芬、阿佐昔芬、奥美昔芬、奥培米芬和左美洛昔芬。在某些实施方式中，提供了在个体中预防脂肪肝（或减轻其症状）的方法，所述方法包括向所述个体给药：a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）；以及 b) 有效量的至少一种其他药剂，其中所述其他药剂是芳香化酶抑制剂。在某些实施方式中，所述其他药剂是阿那曲唑。

[0117] 在某些实施方式中，提供了在个体中预防器官萎缩（或减轻其症状）的方法，所述方法包括向所述个体给药有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）。在某些实施方式中，提供了在个体中预防器官萎缩（或减轻其症状）的方法，所述方法包括向所述个体给药：a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）；以及 b) 有效量的至少一种其他药剂，其中所述其他药剂是雷洛昔芬或其功能等同物。在某些实施方式中，所述其他药剂是雷洛昔芬。在某些实施方式中，所述其他药剂选自雷洛昔芬、拉索昔芬、巴多昔芬、阿

佐普芬、奥美昔芬、奥培米芬和左美洛昔芬。在某些实施方式中，提供了在个体中预防器官萎缩（或减轻其症状）的方法，所述方法包括向所述个体给药：a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）；以及 b) 有效量的至少一种其他药剂，其中所述其他药剂是芳香化酶抑制剂。在某些实施方式中，所述其他药剂是阿那曲唑。

[0118] 在某些实施方式中，提供了在个体中预防体重增加（或减轻其症状）的方法，所述方法包括向所述个体给药有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）。在某些实施方式中，提供了在个体中预防体重增加（或减轻其症状）的方法，所述方法包括向所述个体给药：a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）；以及 b) 有效量的至少一种其他药剂，其中所述其他药剂是雷洛昔芬或其功能等同物。在某些实施方式中，所述其他药剂是雷洛昔芬。在某些实施方式中，所述其他药剂选自雷洛昔芬、拉索昔芬、巴多昔芬、阿佐普芬、奥美昔芬、奥培米芬和左美洛昔芬。在某些实施方式中，提供了在个体中预防体重增加（或减轻其症状）的方法，所述方法包括向所述个体给药：a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）；以及 b) 有效量的至少一种其他药剂，其中所述其他药剂是芳香化酶抑制剂。在某些实施方式中，所述其他药剂是阿那曲唑。

[0119] 在某些实施方式中，提供了在个体中降低血液甘油三酯的方法，所述方法包括向所述个体给药有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）。在某些实施方式中，提供了在个体中降低血液甘油三酯的方法，所述方法包括向所述个体给药：a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）；以及 b) 有效量的至少一种其他药剂，其中所述其他药剂是雷洛昔芬或其功能等同物。在某些实施方式中，所述其他药剂是雷洛昔芬。在某些实施方式中，所述其他药剂选自雷洛昔芬、拉索昔芬、巴多昔芬、阿佐普芬、奥美昔芬、奥培米芬和左美洛昔芬。在某些实施方式中，提供了在个体中降低血液甘油三酯的方法，所述方法包括向所述个体给药：a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）；以及 b) 有效量的至少一种其他药剂，其中所述其他药剂是芳香化酶抑制剂。在某些实施方式中，所述其他药剂是阿那曲唑。

[0120] 在某些实施方式中，提供了在个体中降低血液粘度和 / 或血栓栓塞的方法，所述方法包括向所述个体给药有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）。在某些实施方式中，提供了在个体中降低血液粘度和 / 或血栓栓塞的方法，所述方法包括向所述个体给药：a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）；以及 b) 有效量的至少一种其他药剂，其中所述其他药剂是雷洛昔芬或其功能等同物。在某些实施方式中，所述其他药剂是雷洛昔芬。在某些实施方式中，所述其他药剂选自雷洛昔芬、拉索昔芬、巴多昔芬、阿佐普芬、奥美昔芬、奥培米芬和左美洛昔芬。在某些实施方式中，提供了在个体中降低血液粘度和 / 或血栓栓塞的方法，所述方法包括向所述个体给药：a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）；以及 b) 有效量的至少一种其他药剂，其中所述其他药剂是芳香化酶抑制剂。在某些实施方式中，所述其他药剂是阿那曲唑。

[0121] 给药方式

[0122] 在组合疗法的情形中，包含双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）和其他药剂的组合物可以同时给药和 / 或顺序给药。在某些实施方式中，双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）和其他药剂（包括本文中描述的指定药剂）同时给药。当在本文中使用时，术语“同时给药”是指双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）和其他药剂以不超过约

15 分钟,例如不超过约 10、5 或 1 分钟中的任一者的时间间隔给药。当药物同时给药时,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂可以被包含在同一组合物(例如包含双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂两者的组合物,例如本文中包含的药物组合物)或分开的组合物(例如双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂被包含在分开的组合物中)中。

[0123] 在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂顺序给药。当在本文中使用时,术语“顺序给药”是指双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂中的药物以超过约 15 分钟,例如超过约 20、30、40、50、60 或更多分钟中的任一者的时间间隔给药。可以首先给药双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)或其他药剂中的任一者。双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂被包含在分开的组合物中,其可以被包含在相同或不同包装中。

[0124] 在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂的给药是同时进行的,即双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂的给药期彼此交叠。在某些实施方式中,在其他药剂给药之前,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)已给药至少一个周期(例如至少 2、3 或 4 个周期中的任一者)。在某些实施方式中,其他药剂被给药至少 2、3、或 4 周中的任一者。在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂的给药在大约同一时间开始(例如,在 1、2、3、4、5、6 或 7 天中的任一者之内)。在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂的给药在大约同一时间结束(例如,在 1、2、3、4、5、6 或 7 天中的任一者之内)。在某些实施方式中,在双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)的给药结束之后,其他药剂的给药继续进行(例如历时约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个月中的任一者)。在某些实施方式中,在双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)的给药开始之后(例如约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个月中的任一者之后),开始其他药剂的给药。在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂的给药在大约同一时间开始和结束。在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂的给药在大约同一时间开始,并且在双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)的给药结束之后,其他药剂的给药继续进行(例如历时约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个月中的任一者)。在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂的给药在大约同一时间停止,并且在双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)的给药开始之后(例如约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个月中的任一者之后),开始其他药剂的给药。

[0125] 双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和/或其他药剂的给药频率可以在治疗过程中,根据给药医生的判断进行调整。当分开给药时,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂可以以不同的给药频率或时间间隔给药。例如,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)可以每周给药,而其他药剂可以以更高或更低的频率给药。用于实现持续释放的各种制剂和装置在本领域中是已知的。示例性的给药频率在本文中进一步提供。

[0126] 双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂可以使用相同的给药途径或不同的给药途径来给药。示例性的给药途径在本文中进一步提供。在某些实施方式中(对于同时和顺序给药两者来说),双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂

以预定的比例给药。例如,在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)与其他药剂的重量比为约 1 比 1。在某些实施方式中,所述重量比可以在约 0.001 比约 1 至约 1000 比约 1 之间,或约 0.01 比约 1 至 100 比约 1 之间。在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)与其他药剂的重量比低于约 100:1、50:1、30:1、10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1 和 1:1 中的任一者。在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)与其他药剂的重量比高于约 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、30:1、50:1、100:1 中的任一者。还设想其他比例。

[0127] 双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和/或其他药剂所需的剂量可能(但不一定)低于每种药剂单独给药时正常需要的剂量。因此,在某些实施方式中,在双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和/或其他药剂中,给药低于治疗的量的药物。“低于治疗的量”或“低于治疗的水平”是指低于治疗量,即低于当双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和/或其他药剂中的药物单独给药时通常使用的量的量。所述降低可以反映为给定给药时给药的量和/或在给定时段内给药的量(频率降低)。

[0128] 在某些实施方式中,给药足够的其他药剂,以便允许将实现同样治疗程度所需的双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)的正常剂量减少至少约 5%、10%、20%、30%、50%、60%、70%、80%、90% 中的任一者或更多。在某些实施方式中,给药足够的双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯),以便允许将实现同样治疗程度所需的其他药剂的正常剂量减少至少约 5%、10%、20%、30%、50%、60%、70%、80%、90% 的任一者或更多。

[0129] 在某些实施方式中,与单独给药时每种药剂的相应正常剂量相比,减少双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂两者的剂量。在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和其他药剂两者以低于治疗的、即降低的水平给药。在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和/或其他药剂的剂量明显低于已确立的最高毒性剂量(MTD)。例如,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和/或其他药剂的剂量低于 MTD 的约 50%、40%、30%、20% 或 10%。

[0130] 在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)的剂量和/或其他药剂的剂量高于当每种药剂单独给药时通常所需的剂量。例如,在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和/或其他药剂的剂量明显高于已确立的最高毒性剂量(MTD)。例如,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)和/或其他药剂的剂量高于单独给药时药剂的 MTD 的约 50%、40%、30%、20% 或 10%。

[0131] 在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)的量(单独与其他药剂组合)被包含在下列任一范围内:约 0.1 至约 0.5mg,约 0.5 至约 5mg,约 5 至约 10mg,约 10 至约 15mg,约 15 至约 20mg,约 20 至约 25mg,约 20 至约 50mg,约 25 至约 50mg,约 50 至约 75mg,约 50 至约 100mg,约 75 至约 100mg,约 100 至约 125mg,约 125 至约 150mg,约 150 至约 175mg,约 175 至约 200mg,约 200 至约 225mg,约 225 至约 250mg,约 250 至约 300mg,约 300 至约 350mg,约 350 至约 400mg,约 400 至约 450mg 或约 450 至约 500mg。在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)的量(例如单位剂型)在约 5mg 至约 500mg,例如约 30mg 至约 300mg 或约 50mg 至约 200mg 的范围之内。

[0132] 在某些实施方式中,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)的量(单独与其他药剂组合)包括至少约 0.01mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg

kg、2.5mg/kg、3.5mg/kg、5mg/kg、6.5mg/kg、7.5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg 或 20mg/kg 中的任一者。在某些实施方式中，双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）的量（单独与其他药剂组合）包括至少约 0.01mg/kg/天、0.05mg/kg/天、0.1mg/kg/天、0.25mg/kg/天、0.5mg/kg/天、1mg/kg/天、2.5mg/kg/天、3.5mg/kg/天、5mg/kg/天、6.5mg/kg/天、7.5mg/kg/天、10mg/kg/天、15mg/kg/天或 20mg/kg/天中的任一者。

[0133] 在某些实施方式中，其他药剂的量包括至少约 0.01mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2.5mg/kg、3.5mg/kg、5mg/kg、6.5mg/kg、7.5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg 或 20mg/kg 中的任一者。在某些实施方式中，双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）的量（单独与其他药剂组合）包括至少约 0.01mg/kg/天、0.05mg/kg/天、0.1mg/kg/天、0.25mg/kg/天、0.5mg/kg/天、1mg/kg/天、2.5mg/kg/天、3.5mg/kg/天、5mg/kg/天、6.5mg/kg/天、7.5mg/kg/天、10mg/kg/天、15mg/kg/天或 20mg/kg/天中的任一者。

[0134] 对于双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）（和其他药剂）来说，示例性的给药频率包括但不限于每两周一次、每三周一次、每四周一次、每六周一次或每八周一次。在某些实施方式中，组合物每周给药至少约 1 次、2 次、3 次、4 次、5 次、6 次或 7 次（即每日）中的任一者，或每日三次、每日两次给药。在某些实施方式中，每次给药之间的时间间隔小于约 6 个月、3 个月、1 个月、20 天、15 天、12 天、10 天、9 天、8 天、7 天、6 天、5 天、4 天、3 天、2 天或 1 天中的任一者。在某些实施方式中，每次给药之间的时间间隔大于约 1 个月、2 个月、3 个月、4 个月、5 个月、6 个月、8 个月或 12 个月中的任一者。在某些实施方式中，在给药日程安排中没有中断。在某些实施方式中，每次给药之间的时间间隔不超过约一周。

[0135] 双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）（和其他药剂）的给药可以在延长时段内延长，例如约一个月直到约七年。在某些实施方式中，组合物在至少约 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18、24、30、36、48、60、72 或 84 个月中的任一者的时段内给药。

[0136] 在某些实施方式中，个体被治疗至少约 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个治疗周期中的任一者。

[0137] 其他药剂的给药频率与双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）的给药频率可以相同或不同。示例性的频率在上文中提供。

[0138] 本文描述的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）（和其他药剂）可以通过各种途径给药于个体（例如人类），所述途径包括例如经口、静脉内、动脉内、腹膜内、肺内、吸入、囊内、肌肉内、气管内、皮下、眼内、鞘内、透粘膜和透皮。在某些实施方式中，可以使用组合物的连续持续释放制剂。

[0139] 可以使用本文所描述的给药配置的组合。本文所描述的组合治疗方法可以单独地或与另一种疗法例如手术、辐射、化疗、免疫治疗、基因疗法等组合来进行。此外，具有发生增殖性疾病的较高风险的人可以接受治疗，以抑制和 / 或延迟所述疾病的发生。

[0140] 正如本领域普通技术人员将会理解的，其他药剂的适合剂量将近似于在所述其他药剂单独与其他药剂组合给药的临床疗法中已经使用的剂量。取决于待治疗的病症，可能发生剂量的变化。如上所述，在某些实施方式中，所述其他药剂可以以降低的水平给药。

[0141] 组合物、套包 (kit) 和医药

[0142] 本发明还提供了可用于本文所描述的方法的组合物（例如药物组合物）、医药、套包和单位剂型。还提供了本文所描述的任何用途，不论是在作为药物的用途和 / 或用于制

造药物的用途的情形中。

[0143] 本申请的方法包括双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）的给药。适合的双炔失碳酯或其类似物在下文中更详细描述。

[0144] 在某些情况下，本申请的方法包括雷洛昔芬或其功能等同物的给药。当在本文中使用“其功能等同物”是指通过与雷洛昔芬相同的机制起作用的化合物。例如，雷洛昔芬的功能等同物包括但不限于拉索昔芬、巴多昔芬、阿佐昔芬、奥美昔芬、奥培米芬和左美洛昔芬。

[0145] 另一方面，所述方法包括芳香化酶抑制剂的给药。“芳香化酶抑制剂”是指一类抑制芳香化酶活性的试剂。芳香化酶抑制剂已被用于在绝经后女性中治疗乳腺癌和卵巢癌，以减少在使用外部睾酮的循环期间雌激素转化率的提高。适合的芳香化酶抑制剂包括但不限于阿那曲唑 (Arimidex)、来曲唑 (Femara)、依西美坦 (Aromasin)、伏氯唑 (Rivizor)、福美坦 (Lentaron) 和法倔唑 (Afema)。

[0146] 另一方面，提供了一种药物组合物，其包含双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）和至少一种选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂。在某些实施方式中，提供了一种包含双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）和至少一种其他药剂的药物组合物，其中所述其他药剂是他莫昔芬。在某些实施方式中，提供了一种包含双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）和至少一种其他药剂的药物组合物，其中所述其他药剂是雷洛昔芬。在某些实施方式中，提供了一种包含双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）和至少一种其他药剂的药物组合物，其中所述其他药剂是阿那曲唑。

[0147] 在某些实施方式中，所述药物组合物还包含脂质，所述脂质包括但不限于玉米油。脂质可以以例如约 1% -5% (w/w) 的量存在。

[0148] 在某些实施方式中，所述药物组合物还包含蛋白质（例如酪蛋白）。蛋白质（例如酪蛋白）可以以例如约 5% -50% (w/w) 的量存在。

[0149] 在某些实施方式中，组合物中双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）与其他药剂的重量比为 1 比 1。在某些实施方式中，所述重量比在约 0.001 比约 1 至约 1000 比约 1 之间，或约 0.01 比约 1 至 100 比约 1 之间。在某些实施方式中，双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）与其他药剂的重量比低于约 100:1、50:1、30:1、10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1 和 1:1 中的任一者。在某些实施方式中，双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）与其他药剂的重量比高于约 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、30:1、50:1、100:1 中的任一者。在某些实施方式中，组合物中双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）与其他药剂的重量比为约 10:1 至约 1:10。

[0150] 在某些实施方式中，组合物可以存在于单位剂型（例如口服单位剂型）中。适合的单位剂型包括但不限于胶囊、片剂、丸剂、囊片、凝胶、液体（例如悬浮剂、溶液、乳剂）、粉剂或其他颗粒剂等。

[0151] 另一方面，提供了包含在分开的容器中或同一容器中的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）和其他药剂的套包。本发明的套包包括一个或多个容器，所述容器包含双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）（或单位剂型和 / 或制品）和 / 或至少一种其他药剂，并且在某些实施方式中，还包含按照本文中描述的任何方法使用的说明书。套包还可以包含选择适合的个体或治疗的描述。本发明的套包中提供的说明书通常是标签或包装

说明书（例如套包中包含的纸张）上的书面说明书，但是是机器可读的说明书（例如磁或光存储盘上携带的说明书）也是可以接受的。

[0152] 在某些实施方式中，套包包含 a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯），以及 b) 有效量的至少一种选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂。在某些实施方式中，套包包含 :a) 有效量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯），以及 b) 有效量的至少一种选自他莫昔芬、雷洛昔芬或其功能等同物和芳香化酶抑制剂的其他药剂，以及 c) 用于同时、顺序或共同给药双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）和其他药剂，用于治疗癌症（或本文中描述的其他用途）的说明书。

[0153] 双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）和其他药剂可以存在于分开的容器中或单一的容器中。应该理解，套包可以包含一种不同的组合物或两种或更多种组合物，其中一种组合物包含双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯），以及一种组合物包含其他药剂。

[0154] 本发明的套包在适合的包装中。适合的包装包括但不限于小管、瓶、罐、柔性包装（例如密封的 Mylar 或塑料袋）等。套包可以任选地提供其他组分例如缓冲剂和解释性信息。因此，本申请还提供了制造品，其包括小管（例如密封小管）、瓶、罐、柔性包装等。

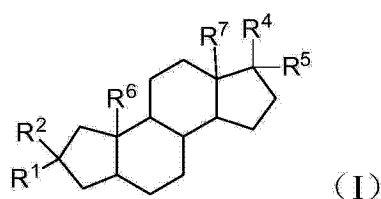
[0155] 与双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）的使用相关的说明书通常包括关于用于目的治疗的剂量、给药日程安排和给药途径的信息。容器可以是单位药剂、散装包装（例如多药剂包装）和分单位药剂。例如，可以提供含有如本文中所公开的足够剂量的双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）（例如双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯））的套包，所述剂量足以在长时段例如 1 周、2 周、3 周、4 周、6 周、8 周、3 个月、4 个月、5 个月、7 个月、8 个月、9 个月中的任一者或更长时间内提供个体的有效治疗。套包还可以包括双炔失碳酯或其类似物（例如双炔失碳酯）和药物组合物的多个单位药剂和使用说明书，并以足以用于在药房例如医院药房和配药房中储存和使用的量包装。

[0156] 双炔失碳酯及其类似物

[0157] 本申请提供了包含双炔失碳酯或其类似物的方法和组合物。

[0158] 在某些实施方式中，双炔失碳酯或其类似物由式 (I) 的结构或其可药用盐表示

[0159]



[0160] 其中

[0161] R^1 是羟基或 $-O(CO)R^{1a}$ ，其中 R^{1a} 是 C_1-C_4 烷基；

[0162] R^2 是 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{2a})_2$ 、 $-\text{P}(\text{R}^{2a})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{2a})\text{R}^{2b}$ 或 $-\text{P}(\text{R}^{2a})\text{R}^{2b}$ ；其中 R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是氢、 C_1-C_{12} 烷基、 C_2-C_{12} 烯基或苯基；

[0163] R^4 是羟基或 $-O(CO)R^{4a}$ ，其中 R^{4a} 是 C_1-C_4 烷基；

[0164] R^5 是 $-\xi \equiv$ 、 $-\xi \begin{smallmatrix} \text{N} \\ \text{R}^{5a} \\ \text{R}^{5b} \end{smallmatrix}$ 、 $-\xi \begin{smallmatrix} \text{P} \\ \text{R}^{5a} \\ \text{R}^{5b} \end{smallmatrix}$ 、 $-\xi \begin{smallmatrix} \text{N} \\ \text{R}^{5a} \\ \text{R}^{5b} \end{smallmatrix}$ 或 $-\xi \begin{smallmatrix} \text{P} \\ \text{R}^{5a} \\ \text{R}^{5b} \end{smallmatrix}$ ，其中 R^{5a} 和 R^{5b} 独立地

是氢、 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_{12} 烯基或苯基；

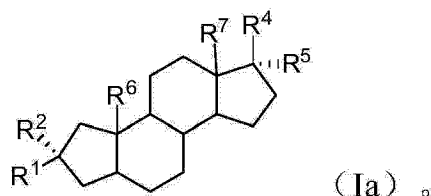
[0165] R^6 是 C_1 - C_6 烷基或 C_2 - C_6 烯基；并且

[0166] R^7 是 C_1 - C_6 烷基或

[0167] C_2 - C_6 烯基。

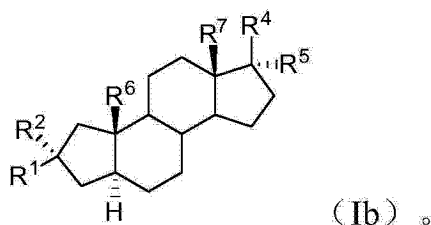
[0168] 在某些实施方式中，式 (I) 是式 (Ia)：

[0169]



[0170] 在某些实施方式中，式 (I) 是式 (Ib)：

[0171]



[0172] 在某些实施方式中， R^1 是 $-O(CO)R^{1a}$ ，其中 R^{1a} 是 C_1 - C_4 烷基（例如 C_1 烷基、 C_2 烷基、 C_3 烷基或 C_4 烷基）。在某些实施方式中， R^{1a} 是 C_1 - C_4 烷基，例如 C_1 - C_3 烷基或 C_1 - C_2 烷基。在某些实施方式中， R^{1a} 是甲基。在某些实施方式中， R^{1a} 是乙基。在某些实施方式中， R^1 是羟基。

[0173] 在某些实施方式中， R^2 是 $-\xi \equiv$ 。

[0174] 在某些实施方式中， R^2 是 $-\xi \begin{smallmatrix} \text{N} \\ \text{R}^{2a} \\ \text{R}^{2b} \end{smallmatrix}$ ，其中 R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是氢、 C_1 - C_{12} 烷基（例如 C_1 烷基、 C_2 烷基、 C_3 烷基、 C_4 烷基、 C_5 烷基、 C_6 烷基、 C_7 烷基、 C_8 烷基、 C_9 烷基、 C_{10} 烷基、 C_{11} 烷基或 C_{12} 烷基）、 C_2 - C_{12} 烯基（例如 C_2 烯基、 C_3 烯基、 C_4 烯基、 C_5 烯基、 C_6 烯基、 C_7 烯基、 C_8 烯基、 C_9 烯基、 C_{10} 烯基、 C_{11} 烯基或 C_{12} 烯基）或苯基。

[0175] 在某些实施方式中， R^2 是 $-\xi \begin{smallmatrix} \text{N} \\ \text{R}^{2a} \\ \text{R}^{2b} \end{smallmatrix}$ ，其中 R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是氢、 C_1 - C_{12} 烷基（例如 C_1 烷基、 C_2 烷基、 C_3 烷基、 C_4 烷基、 C_5 烷基、 C_6 烷基、 C_7 烷基、 C_8 烷基、 C_9 烷基、 C_{10} 烷基、 C_{11} 烷基或 C_{12} 烷基）、 C_2 - C_{12} 烯基（例如 C_2 烯基、 C_3 烯基、 C_4 烯基、 C_5 烯基、 C_6 烯基、 C_7 烯基、 C_8 烯基、 C_9 烯基、 C_{10} 烯基、 C_{11} 烯基或 C_{12} 烯基）或苯基。

[0176] 在某些实施方式中， R^2 是 $-\xi \begin{smallmatrix} \text{P} \\ \text{R}^{2a} \\ \text{R}^{2b} \end{smallmatrix}$ ，其中 R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是氢、 C_1 - C_{12} 烷基（例如 C_1 烷基、 C_2 烷基、 C_3 烷基、 C_4 烷基、 C_5 烷基、 C_6 烷基、 C_7 烷基、 C_8 烷基、 C_9 烷基、 C_{10} 烷基、 C_{11} 烷

基或 C₁₂ 烷基)、C₂-C₁₂ 烯基(例如 C₂ 烯基、C₃ 烯基、C₄ 烯基、C₅ 烯基、C₆ 烯基、C₇ 烯基、C₈ 烯基、C₉ 烯基、C₁₀ 烯基、C₁₁ 烯基或 C₁₂ 烯基)或苯基。

[0177] 在某些实施方式中, R² 是 $\text{---}\text{P}\begin{matrix} \text{R}^{2a} \\ \text{R}^{2b} \end{matrix}$, 其中 R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是氢、C₁-C₁₂ 烷基(例如 C₁ 烷基、C₂ 烷基、C₃ 烷基、C₄ 烷基、C₅ 烷基、C₆ 烷基、C₇ 烷基、C₈ 烷基、C₉ 烷基、C₁₀ 烷基、C₁₁ 烷基或 C₁₂ 烷基)、C₂-C₁₂ 烯基(例如 C₂ 烯基、C₃ 烯基、C₄ 烯基、C₅ 烯基、C₆ 烯基、C₇ 烯基、C₈ 烯基、C₉ 烯基、C₁₀ 烯基、C₁₁ 烯基或 C₁₂ 烯基)或苯基。

[0178] 在某些实施方式中, R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是氢、C₁-C₁₂ 烷基或 C₂-C₁₂ 烯基。在某些实施方式中, R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是氢或 C₁-C₁₂ 烷基。在某些实施方式中, R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是氢或 C₂-C₁₂ 烯基。

[0179] 在某些实施方式中, R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是氢、C₁-C₄ 烷基或 C₂-C₄ 烯基。在某些实施方式中, R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是氢或 C₁-C₄ 烷基。在某些实施方式中, R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是氢或 C₂-C₄ 烯基。

[0180] 在某些实施方式中, R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是氢、C₁₀-C₁₂ 烷基或 C₁₀-C₁₂ 烯基。在某些实施方式中, R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是氢或 C₁₀-C₁₂ 烷基。在某些实施方式中, R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是氢或 C₁₀-C₁₂ 烯基。

[0181] 在某些实施方式中, R^{2a} 是氢, 并且 R^{2b} 是 C₁-C₁₂ 烷基, 例如 C₁-C₄ 烷基、C₁-C₃ 烷基、C₁-C₂ 烷基或 C₁₀-C₁₂ 烷基。在某些实施方式中, R^{2a} 是氢, 并且 R^{2b} 是 C₂-C₁₂ 烯基、例如 C₂-C₄ 烯基、C₂-C₃ 烯基、C₂ 烯基或 C₁₀-C₁₂ 烯基。

[0182] 在某些实施方式中, R⁴ 是 -O(CO)R^{4a}, 其中 R^{4a} 是 C₁-C₄ 烷基(例如 C₁ 烷基、C₂ 烷基、C₃ 烷基或 C₄ 烷基)。在某些实施方式中, R^{4a} 是 C₁-C₄ 烷基, 例如 C₁-C₃ 烷基或 C₁-C₂ 烷基。在某些实施方式中, R^{4a} 是甲基。在某些实施方式中, R^{4a} 是乙基。在某些实施方式中, R⁴ 是羟基。

[0183] 在某些实施方式中, R⁵ 是 $\text{---}\text{C}\equiv\text{C}$ 。

[0184] 在某些实施方式中, R⁵ 是 $\text{---}\text{N}\begin{matrix} \text{R}^{5a} \\ \text{R}^{5b} \end{matrix}$, 其中 R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、C₁-C₁₂ 烷基(例如 C₁ 烷基、C₂ 烷基、C₃ 烷基、C₄ 烷基、C₅ 烷基、C₆ 烷基、C₇ 烷基、C₈ 烷基、C₉ 烷基、C₁₀ 烷基、C₁₁ 烷基或 C₁₂ 烷基)、C₂-C₁₂ 烯基(例如 C₂ 烯基、C₃ 烯基、C₄ 烯基、C₅ 烯基、C₆ 烯基、C₇ 烯基、C₈ 烯基、C₉ 烯基、C₁₀ 烯基、C₁₁ 烯基或 C₁₂ 烯基)或苯基。

[0185] 在某些实施方式中, R⁵ 是 $\text{---}\text{N}\begin{matrix} \text{R}^{5a} \\ \text{R}^{5b} \end{matrix}$, 其中 R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、C₁-C₁₂ 烷基(例如 C₁ 烷基、C₂ 烷基、C₃ 烷基、C₄ 烷基、C₅ 烷基、C₆ 烷基、C₇ 烷基、C₈ 烷基、C₉ 烷基、C₁₀ 烷基、C₁₁ 烷基或 C₁₂ 烷基)、C₂-C₁₂ 烯基(例如 C₂ 烯基、C₃ 烯基、C₄ 烯基、C₅ 烯基、C₆ 烯基、C₇ 烯基、C₈ 烯基、C₉ 烯基、C₁₀ 烯基、C₁₁ 烯基或 C₁₂ 烯基)或苯基。

[0186] 在某些实施方式中, R⁵ 是 $\text{---}\text{P}\begin{matrix} \text{R}^{5a} \\ \text{R}^{5b} \end{matrix}$, 其中 R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、C₁-C₁₂ 烷基(例如 C₁ 烷基、C₂ 烷基、C₃ 烷基、C₄ 烷基、C₅ 烷基、C₆ 烷基、C₇ 烷基、C₈ 烷基、C₉ 烷基、C₁₀ 烷基、C₁₁ 烷基

基或 C₁₂ 烷基)、C₂-C₁₂ 烯基(例如 C₂ 烯基、C₃ 烯基、C₄ 烯基、C₅ 烯基、C₆ 烯基、C₇ 烯基、C₈ 烯基、C₉ 烯基、C₁₀ 烯基、C₁₁ 烯基或 C₁₂ 烯基)或苯基。

[0187] 在某些实施方式中, R⁵ 是 $\begin{array}{c} \text{R}^{5a} \\ \diagup \\ \text{---P---} \\ \diagdown \\ \text{R}^{5b} \end{array}$, 其中 R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、C₁-C₁₂ 烷基(例如 C₁ 烷基、C₂ 烷基、C₃ 烷基、C₄ 烷基、C₅ 烷基、C₆ 烷基、C₇ 烷基、C₈ 烷基、C₉ 烷基、C₁₀ 烷基、C₁₁ 烷基或 C₁₂ 烷基)、C₂-C₁₂ 烯基(例如 C₂ 烯基、C₃ 烯基、C₄ 烯基、C₅ 烯基、C₆ 烯基、C₇ 烯基、C₈ 烯基、C₉ 烯基、C₁₀ 烯基、C₁₁ 烯基或 C₁₂ 烯基)或苯基。

[0188] 在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、C₁-C₁₂ 烷基或 C₂-C₁₂ 烯基。在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢或 C₁-C₁₂ 烷基。在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢或 C₂-C₁₂ 烯基。

[0189] 在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、C₁-C₄ 烷基或 C₂-C₄ 烯基。在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢或 C₁-C₄ 烷基。在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢或 C₂-C₄ 烯基。

[0190] 在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、C₁₀-C₁₂ 烷基或 C₁₀-C₁₂ 烯基。在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢或 C₁₀-C₁₂ 烷基。在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢或 C₁₀-C₁₂ 烯基。

[0191] 在某些实施方式中, R^{5a} 是氢, 并且 R^{5b} 是 C₁-C₁₂ 烷基, 例如 C₁-C₄ 烷基、C₁-C₃ 烷基、C₁-C₂ 烷基或 C₁₀-C₁₂ 烷基。在某些实施方式中, R^{5a} 是氢, 并且 R^{5b} 是 C₂-C₁₂ 烯基, 例如 C₂-C₄ 烯基、C₂-C₃ 烯基、C₂ 烯基或 C₁₀-C₁₂ 烯基。

[0192] 在某些实施方式中, R⁶ 是 C₁-C₆ 烷基(例如 C₁ 烷基、C₂ 烷基、C₃ 烷基、C₄ 烷基、C₅ 烷基或 C₆ 烷基)。在某些实施方式中, R⁶ 是 C₁-C₆ 烷基, 例如 C₁-C₃ 烷基或 C₁-C₂ 烷基。在某些实施方式中, R⁶ 是甲基。在某些实施方式中, R⁶ 是乙基。在某些实施方式中, R⁶ 是 C₂-C₆ 烯基(例如 C₂ 烯基、C₃ 烯基、C₄ 烯基、C₅ 烯基或 C₆ 烯基)。

[0193] 在某些实施方式中, R⁷ 是 C₁-C₆ 烷基(例如 C₁ 烷基、C₂ 烷基、C₃ 烷基、C₄ 烷基、C₅ 烷基或 C₆ 烷基)。在某些实施方式中, R⁷ 是 C₁-C₆ 烷基, 例如 C₁-C₃ 烷基、C₁-C₂ 烷基或 C₃-C₆ 烷基。在某些实施方式中, R⁷ 是甲基。在某些实施方式中, R⁷ 是乙基。在某些实施方式中, R⁷ 是 C₁-C₂ 烷基。在某些实施方式中, R⁷ 是 C₃-C₆ 烷基。

[0194] 在某些实施方式中, 所述化合物可能具有任一个或多个下列结构特点。在某些实施方式中, R¹ 和 R⁴ 是相同组成部分, 并且 R² 和 R⁵ 是相同组成部分。

[0195] a) R¹ 是 -O(CO)R^{1a}, 其中 R^{1a} 是 C₁-C₄ 烷基;

[0196] b) R⁴ 是 -O(CO)R^{4a}, 其中 R^{4a} 是 C₁-C₄ 烷基;

[0197] c) R² 是 $\begin{array}{c} \text{R}^{2a} \\ \diagup \\ \text{---N---} \\ \diagdown \\ \text{R}^{2b} \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} \text{R}^{2a} \\ \diagup \\ \text{---P---} \\ \diagdown \\ \text{R}^{2b} \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} \text{R}^{2a} \\ \diagup \\ \text{---N---} \\ \diagdown \\ \text{R}^{2b} \end{array}$ 或 $\begin{array}{c} \text{R}^{2a} \\ \diagup \\ \text{---P---} \\ \diagdown \\ \text{R}^{2b} \end{array}$; 其中 R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是氢、C₁-C₁₂ 烷基(例如 C₁-C₄ 烷基或 C₁₀-C₁₂ 烷基)、C₂-C₁₂ 烯基(例如 C₂-C₄ 烯基或 C₁₀-C₁₂ 烯基)或苯基; 并且

[0198] d) R⁵ 是 $\begin{array}{c} \text{R}^{5a} \\ \diagup \\ \text{---N---} \\ \diagdown \\ \text{R}^{5b} \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} \text{R}^{5a} \\ \diagup \\ \text{---P---} \\ \diagdown \\ \text{R}^{5b} \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} \text{R}^{5a} \\ \diagup \\ \text{---N---} \\ \diagdown \\ \text{R}^{5b} \end{array}$ 或 $\begin{array}{c} \text{R}^{5a} \\ \diagup \\ \text{---P---} \\ \diagdown \\ \text{R}^{5b} \end{array}$; 其中 R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、C₁-C₁₂ 烷基(例如 C₁-C₄ 烷基或 C₁₀-C₁₂ 烷基)、C₂-C₁₂ 烯基(例如 C₂-C₄ 烯基或 C₁₀-C₁₂

烯基)或苯基。

[0199] 在某些实施方式中,所述化合物可能具有任一个或多个下列结构特点。在某些实施方式中, R^1 和 R^4 是相同组成部分。

[0200] a) R^1 是 $-O(CO)R^{1a}$, 其中 R^{1a} 是 C_1-C_4 烷基;

[0201] b) R^4 是 $-O(CO)R^{4a}$, 其中 R^{4a} 是 C_1-C_4 烷基;

[0202] c) R^2 是 $-\text{C}\equiv\text{C}-$; 并且

[0203] d) R^5 是 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 。

[0204] 在某些实施方式中,所述化合物可能具有任一个或多个下列结构特点。在某些实施方式中, R^1 和 R^4 是相同组成部分,并且 R^2 和 R^5 是相同组成部分。

[0205] a) R^1 是 $-O(CO)R^{1a}$, 其中 R^{1a} 是 C_1-C_4 烷基;

[0206] b) R^4 是 $-O(CO)R^{4a}$, 其中 R^{4a} 是 C_1-C_4 烷基;

[0207] c) R^2 是 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{2a})\text{R}^{2b}-$ 、 $-\text{P}(\text{R}^{2a})\text{R}^{2b}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{2a})\text{R}^{2b}-$ 或 $-\text{P}(\text{R}^{2a})\text{R}^{2b}-$; 其中 R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是氢、 C_1-C_4 烷基、 C_2-C_4 烯基或苯基; 并且

[0208] d) R^5 是 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{5a})\text{R}^{5b}-$ 、 $-\text{P}(\text{R}^{5a})\text{R}^{5b}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{5a})\text{R}^{5b}-$ 或 $-\text{P}(\text{R}^{5a})\text{R}^{5b}-$; 其中 R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、 C_1-C_4 烷基、 C_2-C_4 烯基或苯基。

[0209] 在某些实施方式中,所述化合物可能具有任一个或多个下列结构特点。在某些实施方式中, R^1 和 R^4 是相同组成部分,并且 R^2 和 R^5 是相同组成部分。

[0210] a) R^1 是 $-O(CO)R^{1a}$, 其中 R^{1a} 是 C_1-C_4 烷基;

[0211] b) R^4 是 $-O(CO)R^{4a}$, 其中 R^{4a} 是 C_1-C_4 烷基;

[0212] c) R^2 是 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{2a})\text{R}^{2b}-$ 、 $-\text{P}(\text{R}^{2a})\text{R}^{2b}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{2a})\text{R}^{2b}-$ 或 $-\text{P}(\text{R}^{2a})\text{R}^{2b}-$; 其中 R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是氢、 $C_{10}-C_{12}$ 烷基、 $C_{10}-C_{12}$ 烯基或苯基; 并且

[0213] d) R^5 是 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{5a})\text{R}^{5b}-$ 、 $-\text{P}(\text{R}^{5a})\text{R}^{5b}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{5a})\text{R}^{5b}-$ 或 $-\text{P}(\text{R}^{5a})\text{R}^{5b}-$; 其中 R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、 $C_{10}-C_{12}$ 烷基、 $C_{10}-C_{12}$ 烯基或苯基。

[0214] 在某些实施方式中,所述化合物可能具有任一个或多个下列结构特点。在某些实施方式中, R^2 和 R^5 是相同组成部分。

[0215] a) R^2 是 $-\text{N}(\text{R}^{2a})\text{R}^{2b}-$ 、 $-\text{P}(\text{R}^{2a})\text{R}^{2b}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{2a})\text{R}^{2b}-$ 或 $-\text{P}(\text{R}^{2a})\text{R}^{2b}-$; 其中 R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是氢、 C_1-C_{12} 烷基(例如 C_1-C_4 烷基或 $C_{10}-C_{12}$ 烷基)、 C_2-C_{12} 烯基(例如 C_2-C_4 烯基或

[0216] $C_{10}-C_{12}$ 烯基)或苯基;

[0217] b) R^5 是 $-\text{N}(\text{R}^{5a})\text{R}^{5b}-$ 、 $-\text{P}(\text{R}^{5a})\text{R}^{5b}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{5a})\text{R}^{5b}-$ 或 $-\text{P}(\text{R}^{5a})\text{R}^{5b}-$; 其中 R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、 C_1-C_{12} 烷基(例如 C_1-C_4 烷基或 $C_{10}-C_{12}$ 烷基)、 C_2-C_{12} 烯基(例如 C_2-C_4 烯基或 $C_{10}-C_{12}$ 烯基)

或苯基；

[0218] c) R^1 是羟基；并且

[0219] d) R^4 是羟基。

[0220] 在某些实施方式中，所述化合物可能具有任一个或多个下列结构特点。在某些实施方式中， R^2 和 R^5 是相同组成部分。

[0221] a) R^2 是 $\begin{array}{c} \text{---} \text{N} \text{---} \text{R}^{2a} \\ | \\ \text{---} \text{R}^{2b} \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} \text{---} \text{P} \text{---} \text{R}^{2a} \\ | \\ \text{---} \text{R}^{2b} \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} \text{---} \text{N} \text{---} \text{R}^{2a} \\ | \\ \text{---} \text{R}^{2b} \end{array}$ 或 $\begin{array}{c} \text{---} \text{P} \text{---} \text{R}^{2a} \\ | \\ \text{---} \text{R}^{2b} \end{array}$ ；其中 R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是氢、 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烯基或苯基；

[0222] b) R^5 是 $\begin{array}{c} \text{---} \text{N} \text{---} \text{R}^{5a} \\ | \\ \text{---} \text{R}^{5b} \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} \text{---} \text{P} \text{---} \text{R}^{5a} \\ | \\ \text{---} \text{R}^{5b} \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} \text{---} \text{N} \text{---} \text{R}^{5a} \\ | \\ \text{---} \text{R}^{5b} \end{array}$ 或 $\begin{array}{c} \text{---} \text{P} \text{---} \text{R}^{5a} \\ | \\ \text{---} \text{R}^{5b} \end{array}$ ；其中 R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烯基或苯基；

[0223] c) R^1 是羟基；并且

[0224] d) R^4 是羟基。

[0225] 在某些实施方式中，所述化合物可能具有任一个或多个下列结构特点。在某些实施方式中， R^2 和 R^5 是相同组成部分。

[0226] a) R^2 是 $\begin{array}{c} \text{---} \text{N} \text{---} \text{R}^{2a} \\ | \\ \text{---} \text{R}^{2b} \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} \text{---} \text{P} \text{---} \text{R}^{2a} \\ | \\ \text{---} \text{R}^{2b} \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} \text{---} \text{N} \text{---} \text{R}^{2a} \\ | \\ \text{---} \text{R}^{2b} \end{array}$ 或 $\begin{array}{c} \text{---} \text{P} \text{---} \text{R}^{2a} \\ | \\ \text{---} \text{R}^{2b} \end{array}$ ；其中 R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是氢、 C_{10} - C_{12} 烷基、 C_{10} - C_{12} 烯基或苯基；

[0227] b) R^5 是 $\begin{array}{c} \text{---} \text{N} \text{---} \text{R}^{5a} \\ | \\ \text{---} \text{R}^{5b} \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} \text{---} \text{P} \text{---} \text{R}^{5a} \\ | \\ \text{---} \text{R}^{5b} \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} \text{---} \text{N} \text{---} \text{R}^{5a} \\ | \\ \text{---} \text{R}^{5b} \end{array}$ 或 $\begin{array}{c} \text{---} \text{P} \text{---} \text{R}^{5a} \\ | \\ \text{---} \text{R}^{5b} \end{array}$ ；其中 R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、 C_{10} - C_{12} 烷基、 C_{10} - C_{12} 烯基或苯基；

[0228] c) R^1 是羟基；并且

[0229] d) R^4 是羟基。

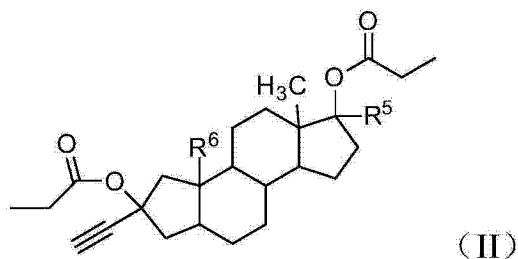
[0230] 在某些实施方式中，所述化合物可能具有任一个或多个下列结构特点：

[0231] a) R^6 是 C_1 - C_6 烷基（例如甲基或乙基）；并且

[0232] b) R^7 是甲基或乙基。

[0233] 在某些实施方式中，所述双炔失碳酯或其类似物由式 (II) 的结构或其可药用盐表示，

[0234]



[0235] 其中

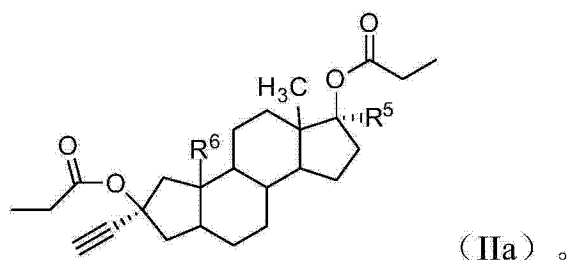
[0236] R^5 是 $\begin{array}{c} \text{---} \text{N} \text{---} \text{R}^{5a} \\ | \\ \text{---} \text{R}^{5b} \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} \text{---} \text{P} \text{---} \text{R}^{5a} \\ | \\ \text{---} \text{R}^{5b} \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} \text{---} \text{N} \text{---} \text{R}^{5a} \\ | \\ \text{---} \text{R}^{5b} \end{array}$ 或 $\begin{array}{c} \text{---} \text{P} \text{---} \text{R}^{5a} \\ | \\ \text{---} \text{R}^{5b} \end{array}$ ；其中 R^{5a} 和 R^{5b} 独立地

是氢、 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_{12} 烯基或苯基；并且

[0237] R^6 是 C_1 - C_6 烷基或 C_2 - C_6 烯基。

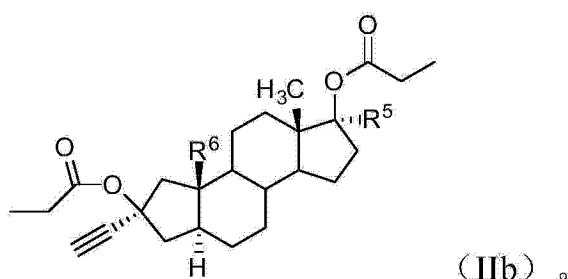
[0238] 在某些实施方式中，式 (II) 是式 (IIa)：

[0239]



[0240] 在某些实施方式中，式 (II) 是式 (IIb)：

[0241]



[0242] 在某些实施方式中， R^5 是 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 。

[0243] 在某些实施方式中， R^5 是 $-\text{N}(\text{R}^{5a})(\text{R}^{5b})-$ ，其中 R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、 C_1 - C_{12} 烷基（例如 C_1 烷基、 C_2 烷基、 C_3 烷基、 C_4 烷基、 C_5 烷基、 C_6 烷基、 C_7 烷基、 C_8 烷基、 C_9 烷基、 C_{10} 烷基、 C_{11} 烷基或 C_{12} 烷基）、 C_2 - C_{12} 烯基（例如 C_2 烯基、 C_3 烯基、 C_4 烯基、 C_5 烯基、 C_6 烯基、 C_7 烯基、 C_8 烯基、 C_9 烯基、 C_{10} 烯基、 C_{11} 烯基或 C_{12} 烯基）或苯基。

[0244] 在某些实施方式中， R^5 是 $-\text{N}(\text{R}^{5a})(\text{R}^{5b})-$ ，其中 R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、 C_1 - C_{12} 烷基（例如 C_1 烷基、 C_2 烷基、 C_3 烷基、 C_4 烷基、 C_5 烷基、 C_6 烷基、 C_7 烷基、 C_8 烷基、 C_9 烷基、 C_{10} 烷基、 C_{11} 烷基或 C_{12} 烷基）、 C_2 - C_{12} 烯基（例如 C_2 烯基、 C_3 烯基、 C_4 烯基、 C_5 烯基、 C_6 烯基、 C_7 烯基、 C_8 烯基、 C_9 烯基、 C_{10} 烯基、 C_{11} 烯基或 C_{12} 烯基）或苯基。

[0245] 在某些实施方式中， R^5 是 $-\text{P}(\text{R}^{5a})(\text{R}^{5b})-$ ，其中 R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、 C_1 - C_{12} 烷基（例如 C_1 烷基、 C_2 烷基、 C_3 烷基、 C_4 烷基、 C_5 烷基、 C_6 烷基、 C_7 烷基、 C_8 烷基、 C_9 烷基、 C_{10} 烷基、 C_{11} 烷基或 C_{12} 烷基）、 C_2 - C_{12} 烯基（例如 C_2 烯基、 C_3 烯基、 C_4 烯基、 C_5 烯基、 C_6 烯基、 C_7 烯基、 C_8 烯基、 C_9 烯基、 C_{10} 烯基、 C_{11} 烯基或 C_{12} 烯基）或苯基。

[0246] 在某些实施方式中， R^5 是 $-\text{P}(\text{R}^{5a})(\text{R}^{5b})-$ ，其中 R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、 C_1 - C_{12} 烷基（例如 C_1 烷基、 C_2 烷基、 C_3 烷基、 C_4 烷基、 C_5 烷基、 C_6 烷基、 C_7 烷基、 C_8 烷基、 C_9 烷基、 C_{10} 烷基、 C_{11} 烷基或 C_{12} 烷基）、 C_2 - C_{12} 烯基（例如 C_2 烯基、 C_3 烯基、 C_4 烯基、 C_5 烯基、 C_6 烯基、 C_7 烯基、 C_8 烯基、 C_9 烯基、 C_{10} 烯基、 C_{11} 烯基或 C_{12} 烯基）或苯基。

基、C₉ 烯基、C₁₀ 烯基、C₁₁ 烯基或 C₁₂ 烯基) 或苯基。

[0247] 在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、C₁-C₁₂ 烷基或 C₂-C₁₂ 烯基。在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢或 C₁-C₁₂ 烷基。在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢或 C₂-C₁₂ 烯基。

[0248] 在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、C₁-C₄ 烷基或 C₂-C₄ 烯基。在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢或 C₁-C₄ 烷基。在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢或 C₂-C₄ 烯基。

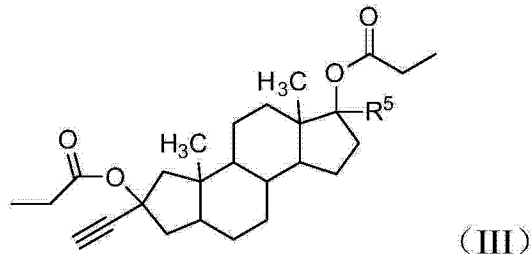
[0249] 在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、C₁₀-C₁₂ 烷基或 C₁₀-C₁₂ 烯基。在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢或 C₁₀-C₁₂ 烷基。在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢或 C₁₀-C₁₂ 烯基。

[0250] 在某些实施方式中, R^{5a} 是氢, 并且 R^{5b} 是 C₁-C₁₂ 烷基, 例如 C₁-C₄ 烷基、C₁-C₃ 烷基、C₁-C₂ 烷基或 C₁₀-C₁₂ 烷基。在某些实施方式中, R^{5a} 是氢, 并且 R^{5b} 是 C₂-C₁₂ 烯基, 例如 C₂-C₄ 烯基、C₂-C₃ 烯基、C₂ 烯基, 或 C₁₀-C₁₂ 烯基。

[0251] 在某些实施方式中, R⁶ 是 C₁-C₆ 烷基 (例如 C₁ 烷基、C₂ 烷基、C₃ 烷基、C₄ 烷基、C₅ 烷基或 C₆ 烷基)。在某些实施方式中, R⁶ 是 C₁-C₆ 烷基, 例如 C₁-C₃ 烷基或 C₁-C₂ 烷基。在某些实施方式中, R⁶ 是甲基。在某些实施方式中, R⁶ 是乙基。在某些实施方式中, R⁶ 是 C₂-C₆ 烯基 (例如 C₂ 烯基、C₃ 烯基、C₄ 烯基、C₅ 烯基或 C₆ 烯基)。

[0252] 在某些实施方式中, 双炔失碳酯或其类似物由式 (III) 的结构或其可药用盐表示,

[0253]



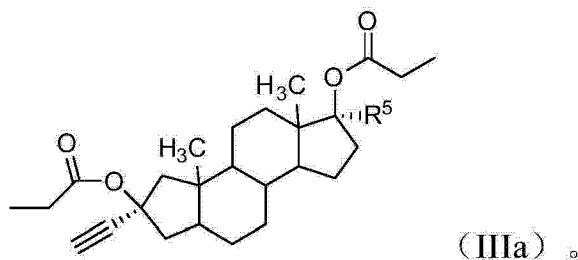
[0254] 其中

[0255] R⁵ 是 $\text{---}\equiv$ 、 $\text{---}\text{N}(\text{R}^{5a})\text{R}^{5b}$ 、 $\text{---}\text{P}(\text{R}^{5a})\text{R}^{5b}$ 、 $\text{---}\text{N}(\text{R}^{5a})\text{R}^{5b}$ 或 $\text{---}\text{P}(\text{R}^{5a})\text{R}^{5b}$; 其中 R^{5a} 和 R^{5b} 独立地

是氢、C₁-C₁₂ 烷基、C₂-C₁₂ 烯基或苯基。

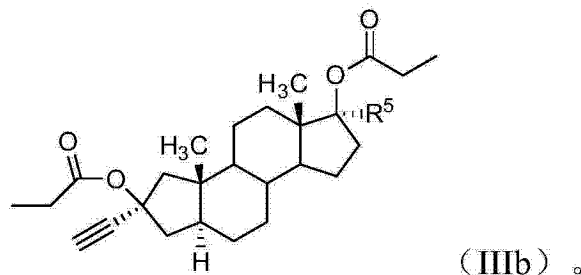
[0256] 在某些实施方式中, 式 (III) 是式 (IIIa) :

[0257]



[0258] 在某些实施方式中, 式 (III) 是式 (IIIb) :

[0259]



[0260] 在某些实施方式中, R^5 是 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 。

[0261] 在某些实施方式中, R^5 是 $-\text{N}(\text{R}^{5a})(\text{R}^{5b})-$, 其中 R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、 C_1 - C_{12} 烷基 (例如 C_1 烷基、 C_2 烷基、 C_3 烷基、 C_4 烷基、 C_5 烷基、 C_6 烷基、 C_7 烷基、 C_8 烷基、 C_9 烷基、 C_{10} 烷基、 C_{11} 烷基或 C_{12} 烷基)、 C_2 - C_{12} 烯基 (例如 C_2 烯基、 C_3 烯基、 C_4 烯基、 C_5 烯基、 C_6 烯基、 C_7 烯基、 C_8 烯基、 C_9 烯基、 C_{10} 烯基、 C_{11} 烯基或 C_{12} 烯基) 或苯基。

[0262] 在某些实施方式中, R^5 是 $-\text{N}(\text{R}^{5a})(\text{R}^{5b})-$, 其中 R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、 C_1 - C_{12} 烷基 (例如 C_1 烷基、 C_2 烷基、 C_3 烷基、 C_4 烷基、 C_5 烷基、 C_6 烷基、 C_7 烷基、 C_8 烷基、 C_9 烷基、 C_{10} 烷基、 C_{11} 烷基或 C_{12} 烷基)、 C_2 - C_{12} 烯基 (例如 C_2 烯基、 C_3 烯基、 C_4 烯基、 C_5 烯基、 C_6 烯基、 C_7 烯基、 C_8 烯基、 C_9 烯基、 C_{10} 烯基、 C_{11} 烯基或 C_{12} 烯基) 或苯基。

[0263] 在某些实施方式中, R^5 是 $-\text{P}(\text{R}^{5a})(\text{R}^{5b})-$, 其中 R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、 C_1 - C_{12} 烷基 (例如 C_1 烷基、 C_2 烷基、 C_3 烷基、 C_4 烷基、 C_5 烷基、 C_6 烷基、 C_7 烷基、 C_8 烷基、 C_9 烷基、 C_{10} 烷基、 C_{11} 烷基或 C_{12} 烷基)、 C_2 - C_{12} 烯基 (例如 C_2 烯基、 C_3 烯基、 C_4 烯基、 C_5 烯基、 C_6 烯基、 C_7 烯基、 C_8 烯基、 C_9 烯基、 C_{10} 烯基、 C_{11} 烯基或 C_{12} 烯基) 或苯基。

[0264] 在某些实施方式中, R^5 是 $-\text{P}(\text{R}^{5a})(\text{R}^{5b})-$, 其中 R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、 C_1 - C_{12} 烷基 (例如 C_1 烷基、 C_2 烷基、 C_3 烷基、 C_4 烷基、 C_5 烷基、 C_6 烷基、 C_7 烷基、 C_8 烷基、 C_9 烷基、 C_{10} 烷基、 C_{11} 烷基或 C_{12} 烷基)、 C_2 - C_{12} 烯基 (例如 C_2 烯基、 C_3 烯基、 C_4 烯基、 C_5 烯基、 C_6 烯基、 C_7 烯基、 C_8 烯基、 C_9 烯基、 C_{10} 烯基、 C_{11} 烯基或 C_{12} 烯基) 或苯基。

[0265] 在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、 C_1 - C_{12} 烷基或 C_2 - C_{12} 烯基。在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢或 C_1 - C_{12} 烷基。在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢或 C_2 - C_{12} 烯基。

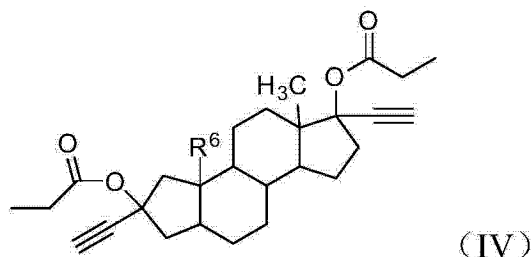
[0266] 在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、 C_1 - C_4 烷基或 C_2 - C_4 烯基。在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢或 C_1 - C_4 烷基。在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢或 C_2 - C_4 烯基。

[0267] 在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢、 C_{10} - C_{12} 烷基或 C_{10} - C_{12} 烯基。在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢或 C_{10} - C_{12} 烷基。在某些实施方式中, R^{5a} 和 R^{5b} 独立地是氢或 C_{10} - C_{12} 烯基。

[0268] 在某些实施方式中, R^{5a}

[0269] 是氢, 并且 R^{5b} 是 C_1 - C_{12} 烷基, 例如 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_3 烷基、 C_1 - C_2 烷基或 C_{10} - C_{12} 烷基。在某些实施方式中, R^{5a} 是氢, 并且 R^{5b} 是 C_2 - C_{12} 烯基, 例如 C_2 - C_4 烯基、 C_2 - C_3 烯基、 C_2 烯基或 C_{10} - C_{12} 烯基。

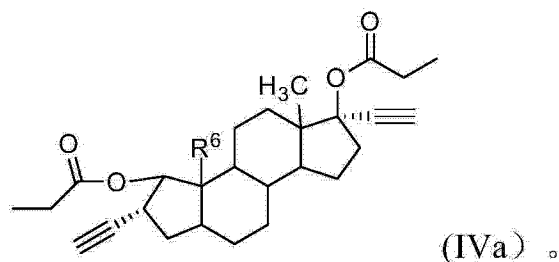
[0270] 在某些实施方式中, 双炔失碳酯或其类似物由式 (IV) 的结构或其可药用盐表示,
[0271]



[0272] 其中 R^6 是 C_1 - C_6 烷基或 C_2 - C_6 烯基。

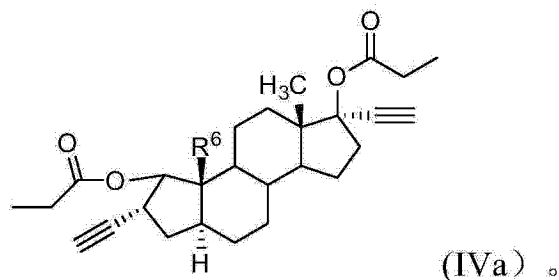
[0273] 在某些实施方式中, 式 (IV) 是式 (IVa) :

[0274]



[0275] 在某些实施方式中, 式 (IV) 是式 (IVa) :

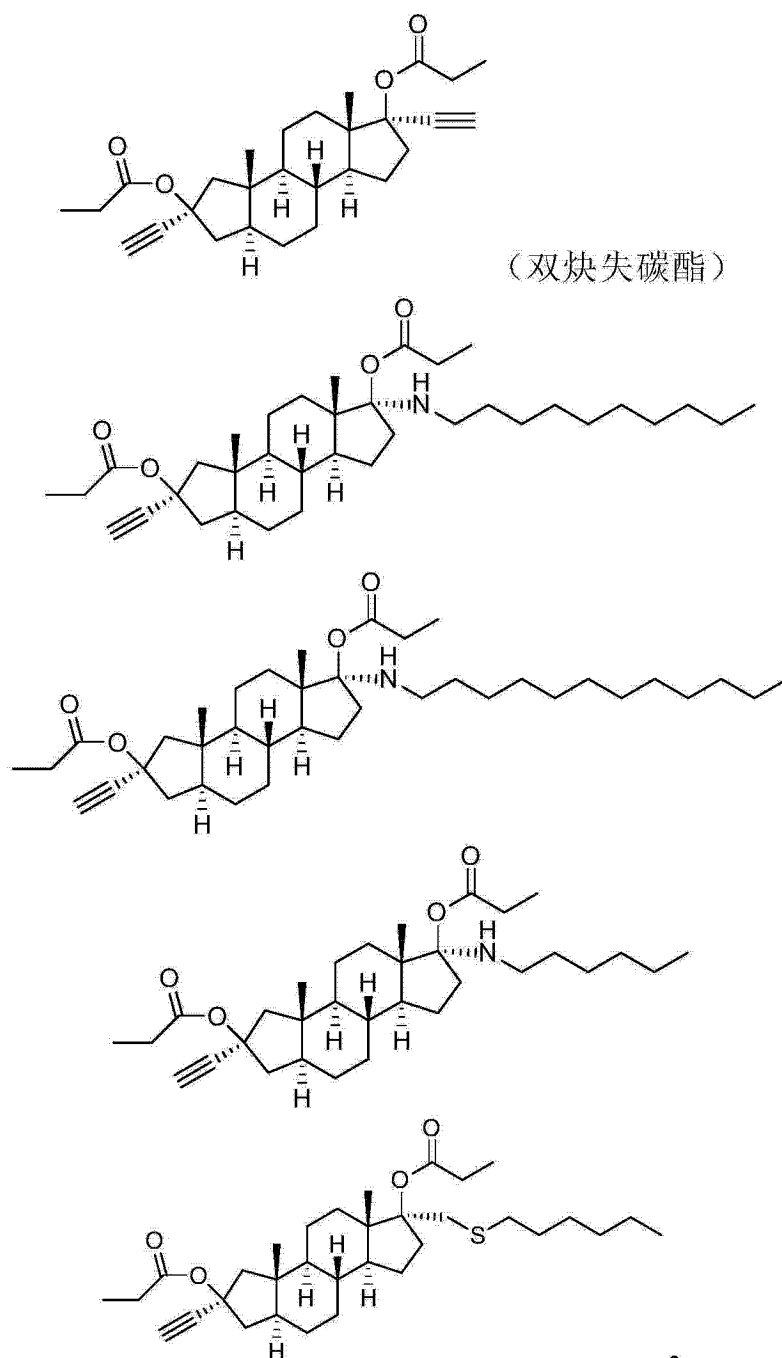
[0276]



[0277] 在某些实施方式中, R^6 是 C_1 - C_6 烷基 (例如 C_1 烷基、 C_2 烷基、 C_3 烷基、 C_4 烷基、 C_5 烷基或 C_6 烷基)。在某些实施方式中, R^6 是 C_1 - C_6 烷基, 例如 C_1 - C_3 烷基或 C_1 - C_2 烷基。在某些实施方式中, R^6 是甲基。在某些实施方式中, R^6 是乙基。在某些实施方式中, R^6 是 C_2 - C_6 烯基 (例如 C_2 烯基、 C_3 烯基、 C_4 烯基、 C_5 烯基或 C_6 烯基)。

[0278] 在某些实施方式中, 双炔失碳酯或其类似物是双炔失碳酯。在某些实施方式中, 双炔失碳酯或其类似物具有以下所示的结构的化合物。

[0279]



[0280] 本领域技术人员将会认识到,在本发明的范围和精神之内,几种实施方式是可能的。现在将参考下面的非限制性实施例对本发明进行更详细地描述。下面的实施例进一步说明本发明,但是当然不应被解释为以任何方式限制其范围。

实施例

[0281] 实施例 1.

[0282] Mehta 等 (18) 报道了在子宫细胞溶质中的两种雌激素结合复合体,根据超速离心沉降速率命名为 4S 和 8S。已发现,双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)的未酯化的活性代谢物双炔失碳醇以约 $2 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ 的亲合性优先结合 8S 复合体。相比之下,已发现他莫昔芬结合两种雌激素结合复合体。双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)与仅仅一种

雌激素结合性子宫细胞溶质复合体的选择性结合,表明双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)可能调节由雌激素调控的特定生物功能。目前存在两条已知的受雌激素调节的用于调控特定生物功能的途径。我们首先检验双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)是否参与雌激素调节的经典途径。将 ER- α 配体结合结构域在大肠杆菌中表达为 GST 融合蛋白(GST-ER- α -LBD),并使用谷胱甘肽珠子进行纯化。使用 ^3H -E2 竞争测定法比较双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)、他莫昔芬和 E2 对 ER- α LBD 的结合亲和性。已发现,50nM 双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)不能抑制 0.5nM ^3H -E2 与 2 μg GST-ER- α -LBD 的结合。相比之下,同样浓度的他莫昔芬或 E2 阻断超过 60% 的 ^3H -E2 结合于 GST-ER- α LBD(图 1A)。根据这些结果,我们假定双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)不参与通过雌激素信号传导的经典途径来调控基因表达。

[0283] Bcl-2 是抗凋亡蛋白家族的关键成员。已经将它的过表达与人类中许多类型的癌症相关联。Bcl-2 启动子含有 ERE 序列,并且已发现在 MCF-7 细胞中, Bcl-2mRNA 的表达受 E2 正调控并且被他莫昔芬抑制(19)。与 Nehra 的结果相一致,我们发现雌激素提高 Bcl-2 蛋白的表达水平(图 1C,第 1 和 4 道),并且发现 7.5 μM 他莫昔芬抑制 Bcl-2 表达(图 1C,第 2 道)。相比之下,在用 7.5 μM 双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)处理的 MCF-7 细胞中,Bcl-2mRNA(数据未示出)或蛋白(图 1C,第 3 道)的表达水平不受影响。已发现,在使用炭剥离过的 FBS 的无酚红 DMEM 培养基中培养的细胞中,他莫昔芬和双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)都不影响 Bcl-2 蛋白的表达(图 1C,分别为第 5 和 6 道)。已报道,在 MCF-7 细胞中, BRCA1mRNA 的表达处在雌激素的控制之下(20)。我们进一步证实,在 MCF-7 细胞中双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)不显著影响 BRCA1 的 mRNA 水平,正如使用 RT-qPCR 所测量的,而在相同条件下他莫昔芬显著抑制 BRCA1mRNA 的合成(图 13B,第 2 和 4 列)。这些结果进一步支持了双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)不参与雌激素调控的经典途径。有趣的是,尽管双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)显得不通过经典 ER 途径调节基因转录,但我们确实发现 7.5 μM 双炔失碳酯能够将 MCF-7 细胞生长抑制超过 50%(图 13A,第 1 列,第 1 和 2 行)。此外,用 7.5 μM 双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)处理 T47D 细胞不仅阻断了由 10ng/ml EGF 诱导的细胞生长的增加,而且导致进一步降低至低于基础水平(图 6)。

[0284] 胰岛素(IL)结合于胰岛素受体(IR),通过胰岛素样生长因子受体 1(IGFR1)途径刺激胰岛素受体底物(IRS)的磷酸化。磷酸化的 IRS 与雌激素-ER 复合体相互作用,所述复合体然后可以易位到核中,通过雌激素经典途径调控 RNA 转录。MCF-7 细胞的增殖受到 IL 调节,并且发现在从培养基暂时除去 IL 之后(21)或在使用 IRS 特异性 siRNA 瞬时抑制 IRS 表达时(22),这些细胞对他莫昔芬的敏感性提高。因此,IL-IRS-IGFR1-ER 途径在 MCF-7 增殖的调控中发挥重要作用。IL-IRS-IGFR1-ER 途径的中断将导致 MCF-7 细胞的增殖更多地依赖于 MIES。因此,IL-IRS-ER 途径被破坏的 MCF-7 细胞的他莫昔芬敏感性将会降低,而对 MIES 调节物的响应将会提高。为了试验这种假说,我们在不含 IL 的培养基中将 MCF-7 细胞诱导两个月。通过在温育 144h 后计数细胞数量,来试验细胞生长的药物敏感性(图 1-表 1)。关于 MCF-7 细胞生长的 IC_{50} 的数据表明,IL 提高 MCF-7 细胞对他莫昔芬的敏感性(第 2 列),同时降低对双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)的敏感性(第 1 列)。此外,在培养基中存在 200nM 双炔失碳酯,不影响他莫昔芬抑制 MCF-7 细胞生长的能

力(第2列-第1行相比于第4行)。这些结果进一步说明双炔失碳酯的活性不依赖于经典途径。此外,它们表明双炔失碳酯可能通过 MIES 途径的抑制来抑制 MCF-7 细胞生长。

[0285] MIES 通过一系列支架蛋白复合体来执行它们对细胞增殖、迁移、细胞-细胞连接和基质以及能量代谢的调控。通过在 LBD 中 C447 残基处的棕榈酰基化来促进 ER- α 与细胞质膜的结合。ER- α -36 是截短的 ER- α 变体,保留了所述棕榈酰基化基序(445-453),并具有独特的 C-端 27 个氨基酸序列以代替全长 ER- α 的典型的 140 个氨基酸(456-595)(1)。由于 ER- α -36 具有部分 LBD 并主要定位于细胞质膜和细胞溶质,因此它可能具有受损的雌激素结合,导致丧失雌激素经典途径的调节能力。为了证实这一点,我们测量了 ^3H -E2 与从大肠杆菌表达并纯化的 GST-ER- α -36 的结合亲和性。结果表明,从大肠杆菌表达的 GST-ER- α -36 不结合于 ^3H -E2(图 20)。相比之下, ^3H -E2 结合于 GST-ER- α -LBD。接下来,我们证实了在 HEK293 细胞中表达的 ER- α -36 以与 Kang(23,数据未示出)所发现的相近的亲和性($K_d \approx 1.9\text{nM}$)结合于 ^3H -E2。有趣的是,双炔失碳酯对 ^3H -E2 与 ER- α -36 的结合表现出双相效果,在低浓度下阻断 ^3H -E2 结合于 ER- α -36,并在较高浓度下促进结合(图 2A)。合在一起,有鉴于已发表的关于 ER- α -36 的研究,我们的数据表明它可能专有地参与 MIES 途径。我们进一步利用 ER- α -36 来研究 E2 和 SERM 对 MIES 的调节的生理结果。

[0286] ER- α -36 是在 MDA-MB-231 和 Hec1A 细胞中独特且高表达的 ER- α 变体,并被证实通过 MAPK/ERK(1/2)途径的调节来调控细胞增殖(23)。我们检查了 MDA-MB-231 细胞生长对双炔失碳酯的敏感性。我们的细胞计数结果表明,6 μM 双炔失碳酯显著抑制 MDA-MB-231 细胞生长,而他莫昔芬处理没有影响(图 2C)。还发现,在 2-8 μM 范围内的剂量下,双炔失碳酯处理抑制 Hec1A 和 Ishikawa 细胞两者的增殖(图 14)。此外, HepG2 细胞的双炔失碳酯处理显示出以双相剂量响应性为特征的细胞生长抑制,其中 7 μM 左右的中等浓度显示出最大的抑制程度(图 7A)。在 HepG2 细胞中,ERK 的磷酸化对双炔失碳酯处理显示出类似的非单调剂量响应,其中最大磷酸化出现在 10 μM 双炔失碳酯的浓度下(图 7B),表明双炔失碳酯可能通过 ERK 途径起作用来介导它对细胞生长的抑制效应。基于我们的发现。我们预测了通过 MIES 调节的作用路线,并提出了双炔失碳酯在组合疗法流程中用于废除由传统的雌激素阻断治疗所诱导的副作用的有用应用。

[0287] 与细胞质膜结合的 E2-ER 复合体可以调节支架蛋白的生物功能,所述支架蛋白例如 Cas 结合性底物(p130Cas),其在人类中也称为乳腺癌抗雌激素抗性蛋白 1(BCAR1)。整合蛋白-p130Cas 复合体在细胞外基质(ECM)和癌细胞迁移和侵入的调控中发挥基础作用。以前已显示,ER- α -36 调节 MDA-MB-231 细胞迁移(24)。由于已报道双炔失碳酯作为抗血管生成剂,导致细胞迁移和侵入的抑制(16),因此我们使用基质胶来研究它调节 MDA-MB-231 细胞的能力。在底部孔中,将 MDA-MB-231 细胞暴露于 10nM E2 或 10ng/ml EGF 与双炔失碳酯或介质对照的组合。20 小时后,将迁移的细胞染色并使用读板器在 560nm 下定量。我们发现,E2 和 EGF 两者略微增加 MDA-MB-231 细胞的迁移。在含有 E2 或 EGF 的培养基中,6 μM 双炔失碳酯显著抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移效率(图 2E 和 F)。有趣的是,与由 E2 介导的细胞迁移相比,双炔失碳酯更有效地抑制由 EGF 介导的 MDA-MB-231 细胞迁移。整合蛋白向细胞表面的易位受到 p130Cas 支架蛋白复合体的调控,在细胞附着和迁移中发挥基础作用。已报道,整合蛋白 $\alpha 3 \beta 1$ 参与 MCF-7 细胞附着以及 MDA-MB-231 细胞迁移(25,26)。我们的结果建议了双炔失碳酯通过 E2-ER-p130cas-整合蛋白信号传导途径的负调节,作为

整合蛋白在细胞膜上的分布的可能的下调物的作用。为了验证这一假说,我们将 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞用 $6\ \mu\text{M}$ 双炔失碳酯处理 16 小时,并使用 FITC 标记的抗整合蛋白 $\beta 1$ 抗体测量细胞表面整合蛋白 $\beta 1$ 的分布。我们发现,双炔失碳酯下调整合蛋白 $\beta 1$ 向 MCF-7 (图 2H) 和 MDA-MB-231 (图 2G) 细胞的细胞质膜的分布。然而,它在 MCF-7 或 MDA-MB-231 细胞中不影响整合蛋白 $\beta 1$ 的表达水平 (图 15)。合在一起,我们得出结论,双炔失碳酯或其类似物 (例如双炔失碳酯) 结合于膜结合型 ER 以抑制细胞迁移和增殖。

[0288] 在雌性哺乳动物中,雌激素还在能量平衡的控制中发挥重要作用。代谢信号传导的雌激素调节影响中枢神经系统、肝脏、骨骼肌、骨骼、肾脏、心血管系统等。雌激素与其受体的复合体,与胰岛素 (IL)-胰岛素受体 (IR) 复合体或瘦蛋白 / 神经肽 Y (NPY) 及其受体相互沟通,调控食物摄入、葡萄糖代谢和脂肪细胞组成。在研究双炔失碳酯和他莫昔芬对 MCF-7 细胞生长的影响时,我们发现用双炔失碳酯处理的细胞的培养基更黄,表明 pH 降低 (图 18)。造成这一点的一个原因是与用他莫昔芬处理的细胞相比,在双炔失碳酯处理的细胞中葡萄糖消耗增加。为了确定情况是否如此,我们将 MCF-7 细胞用不同浓度的双炔失碳酯或他莫昔芬处理 60 小时。使用葡萄糖测定试剂盒测量培养基中的葡萄糖浓度。图 3A 显示,与来自于他莫昔芬处理的细胞的培养基相比,来自于双炔失碳酯处理的细胞的培养基的葡萄糖浓度更低。接下来,我们试验了双炔失碳酯是否能够在 he 莫昔芬处理的 MCF-7 细胞中提高葡萄糖代谢。将在含有 $1\ \mu\text{M}$ 他莫昔芬和 200nM 双炔失碳酯的 $100\ \mu\text{l}$ 培养基中的 2×10^4 个 MCF-7 细胞接种到 96 孔板的每个孔。60 小时后测量培养基中的葡萄糖浓度。图 3B 显示, 200nM 双炔失碳酯不仅逆转了 $1\ \mu\text{M}$ 他莫昔芬对葡萄糖代谢的抑制效应,而且与对照相比进一步提高了葡萄糖消耗 (图 4B, TAM 列相比于 TAM+ANO 列)。在瘦蛋白抗性的小鼠模型 (db/db) 中,已显示 E2 增加能量消耗,导致体重减轻 (28)。我们将双炔失碳酯 (悬浮在 $200\ \mu\text{l}$ 含有 2.5% 甲基纤维素的无菌水中) 每日以 $0.45\ \mu\text{g/g}$ 体重的剂量给药于 db/db 小鼠,并使用葡萄糖测定试剂盒每周测量全血葡萄糖,共四周。结果显示与对照 (第 2 组) 相比,在双炔失碳酯处理的雌性小鼠 (第 1 组) 中葡萄糖消耗增加 (图 3C)。在试验期间,食物摄入和体重没有显著变化 (图 16A)。有趣的是,在雄性 db/db 小鼠中,双炔失碳酯对葡萄糖消耗没有影响 (数据未示出)。

[0289] 雌激素是参与葡萄糖代谢的调控的关键脂肪因子,调节脂肪组织中 ATP 合成与脂肪沉积之间的平衡。降低雌激素水平可以在绝经后女性中引起脂肪储存增加和肥胖症,提高 II 型糖尿病和非酒精性脂肪肝 (NASH) 的发病率。因此,在乳腺癌患者中,抗雌激素疗法例如他莫昔芬提高 NASH 的发病率。我们的结果已显示双炔失碳酯在 MCF-7 细胞和 db/db 小鼠中增强葡萄糖代谢,并且我们预测它可以在切除卵巢的 (OVX) 小鼠中防止肝脏脂肪增加,并在正常小鼠中防止由 he 莫昔芬诱导的 NASH。为了试验这一点,通过手术切除 6 周龄小鼠的卵巢,并在手术后 3 天向它们提供伊普黄酮、E2、双炔失碳酯或介质对照的胃内注射。每周测量提供和食物摄入。我们发现,在 6 周后,在伊普黄酮和对照组中体重增加,但是在假手术、E2 和双炔失碳酯组中保持不变 (图 4A)。在任何组中,食物摄入不受影响 (图 16B),表明差异是由能量消耗的变化造成的。然后将小鼠处死以收获 30-50mg 肝脏,并使用 1ml 氯仿: 甲醇 (2:1) 的混合物和 0.5ml 生理盐水溶液提取总脂质。使用 TC 和 TG 测定试剂盒 (29) 测量有机相中的总胆固醇 (TC) 和甘油三酯 (TG) 水平。结果显示,对于双炔失碳酯和 E2 组来说,与对照相比,OVX 小鼠的肝脏中 TC 和 TG 的量减少,对于伊普黄酮组来说没

有变化(图 4D,图 17A)。来自于双炔失碳酯和 E2 组的肝脏的石蜡切片与来自于对照和伊普黄酮组的切片相比,表现出更少的脂肪沉积(图 4C)。为了进一步研究双炔失碳酯和他莫昔芬对葡萄糖代谢的影响,将正常的 6 周龄小鼠用单独或组合的药物进行处理。以每天 $4.5 \mu\text{g/g}$ 体重的剂量喂食他莫昔芬 9 周的小鼠,与对照小鼠相比显示出体重增加(图 4B)并具有更高的 NASH 综合征指标和肝脏 TG 水平(图 4, E 和 F)。在与剂量为 $0.45 \mu\text{g/g}$ 体重的双炔失碳酯相组合喂食如上所述的他莫昔芬的小鼠中,体重、NASH 综合征和肝脏 TG 表型被完全逆转(图 4, B、E 和 F)。在任何组之间,肝脏 TC 水平没有差异(图 17B)。我们还发现,双炔失碳酯可以逆转由他莫昔芬治疗诱导的血清粘度和 TG 水平的增加(图 5)。

[0290] 双炔失碳酯或其类似物(例如双炔失碳酯)在绝经后女性的治疗中也具有潜在治疗益处。已发现它在切除卵巢的小鼠中防止子宫萎缩(图 8B),并降低由他莫昔芬诱导的子宫和阴道萎缩的程度(图 8, A 和 C)。具体来说,与使用甲基纤维素的制剂相比,双炔失碳酯的玉米油和酪蛋白制剂提高了它在小鼠中防止子宫萎缩的活性(图 10)。重要的是,尽管双炔失碳酯在小鼠中引起子宫内膜上皮细胞肥大,但它不诱导子宫内膜上皮细胞增殖,并且上皮仍保持单层,相比之下,他莫昔芬和 E2 两者都诱导增殖和多层的发生(图 9, A 和 C)。使用双炔失碳酯和他莫昔芬的组合治疗既不引起肥大也不引起增殖的增加(图 9A)。骨质疏松是在绝经后女性中常见的进行性骨病,以骨质量和密度降低为特征。血清 $[\text{Ca}^{2+}]$ 降低和 $[\text{P}_i]$ 提高是用于指示其发展的临床诊断标志。已发现,双炔失碳酯在切除卵巢的小鼠中防止骨质疏松,正如由血清 Ca^{2+} 提高(图 11A)、 P_i 降低(图 11B)和骨密度增加(图 11, D 和 E)所指示的。还发现它阻止骨髓细胞减少(图 11C)。

[0291] 雌激素、他莫昔芬和雷洛昔芬都结合于 ER 的 LBD 以调节雌激素经典途径。雌激素替代疗法或使用他莫昔芬或雷洛昔芬的治疗能够增强 HDL 的一种组分 ApoD 的表达(图 13B, 第 3 列),可能引起血凝块形成。我们假设不调节雌激素的经典途径的 SERM 将不引起血凝块或血栓栓塞。在大规模筛选后,将双炔失碳酯鉴定为不调节 ER 经典途径并且还降低由他莫昔芬诱导的血清粘度的化合物。我们发现,双炔失碳酯的 R^6 中的甲基在与 dinordrin 相比阻断双炔失碳酯结合于 ER-LBD 中是必不可少的(图 1A, dinordrin 相比于双炔失碳酯)。因此,双炔失碳酯的 R^6 中的烷基或烯基对于防止血凝块和血栓栓塞来说是必需的。

[0292] 他莫昔芬作为 ER 经典途径的拮抗剂是有用的治疗剂,但是也是 mER 的激动剂,诱导子宫内膜上皮细胞的增殖。双炔失碳酯能够中和他莫昔芬诱导的子宫内膜上皮细胞的增殖,因此可用于组合疗法中。基于我们的发现,我们得出结论,双炔失碳酯是 mER 的拮抗剂。它不调节 ER 经典途径,但是它可以增强雌激素代谢信号传导。我们提出,双炔失碳酯是 GPER1 的激动剂,它通过 GPER1 调节雌激素代谢信号传导。相比之下,他莫昔芬是 GPER1 的拮抗剂并抑制雌激素代谢信号传导。

[0293] 讨论

[0294] 雌激素与其膜结合受体的结合能够引起细胞溶质的 Ca^{2+} 波动,向细胞外基质(EMC)发送信号并影响细胞迁移。 InsP_3R 是参与多样的信号传导途径的调控的主要 Ca^{2+} 通道之一。它已被报道参与雌激素调节的 Ca^{2+} 从内质网的释放(30),并且还已显示参与肌动蛋白丝的功能调控(31)。然而,隐含在这一作用之下的详细分子机制尚未被清楚地理解。已报道,E2-ER 复合体通过 c-Src 调控细胞迁移(32)。c-Src 是一种非受体酪氨酸激酶,其在细胞粘附、侵入、生长和分化的调控中发挥重要作用。c-Src 酪氨酸激酶的关键调控机制涉

及其磷酸化状态和激酶活性的控制,其可以受到由 E2 与 ER 的相互作用诱导的 Ca^{2+} 信号传导的调节。c-Src-FAK (粘着斑激酶)-p130Cas 支架与粘着斑复合体反应以调控肌动蛋白细胞骨架,引起细胞移动性和粘附的调节。p130Cas/BCAR1 复合体与整合蛋白相互作用以调节 ECM 和迁移。双炔失碳酯结合于膜结合型 ER 并阻断雌激素介导的整合蛋白易位的信号传导途径,引起细胞迁移的抑制。相比之下,他莫昔芬是这种信号传导途径的激动剂,并且作为该支架的核心组分的 BCAR1 据认为与乳腺癌患者治疗期间他莫昔芬抗药性的发生有牵连。此外,已报道 FAK-CDC42-ARHGAP21 途径调控整合蛋白-F-肌动蛋白支架复合体的形成,并因此调控成胶质细胞瘤细胞迁移 (33)。我们发现,ARHGAP21 的羧基端与 InsP_3R 的羧基端相互作用,通过 InsP_3R Ca^{2+} 通道增强 Ca^{2+} 从内质网的释放。ARHGAP21 与 InsP_3R 的相互作用调控 F-肌动蛋白的形成和 HEK-293 细胞迁移。因此,我们提出,雌激素结合于膜结合型 ER,通过 c-Src-CDC42-ARHGAP21- InsP_3R -整合蛋白途径调节 ECM 和细胞迁移 (图 12)。

[0295] EGF 结合于 Her1,引起 c-Src 磷酸化途径的激活以调控细胞增殖和迁移。还证实,细胞增殖和迁移的双炔失碳酯调节通过 c-Src 途径起作用。我们发现,双炔失碳酯能够在 MDA-MB-231 细胞中阻断 EGF 对细胞迁移的刺激效应,并在 T47D 细胞中阻断细胞生长。当在 1990 年代中使用双炔失碳酯作为抗肿瘤药物时,发现它改善患有潜在地由 EGF/her1 引起并且不能被 EGF 竞争物抑制的癌症的患者的生活质量,并增加所述患者的寿命。我们的结果建议,双炔失碳酯可用于抗肿瘤疗法中,以治疗肿瘤生长依赖于膜结合型 ER 和 her1-c-Src 途径的患者。

[0296] GPER1 主要被认为与生殖系统癌症中的抗雌激素抗性相关,因为已发现它在 ER 阴性但 GPER1 阳性的乳腺癌细胞系中参与 MAPK/ERK 和 PI3K/AKT 被雌激素通过 EGFR 途径的激活 (34)。随后,报道了它在来自于患者的生殖系统癌症的活检样本中丰富地表达。值得注意的是,它的表达与肿瘤尺寸、ER-阴性-her-2/neu 和乳房外转移相关 (35)。然而,报道显示,GPER1 的抑制不能与 ERK 活性相关联 (36)。GPER1 选择性激动剂 G1 也不能在子宫或乳腺中发挥雌激素效应 (37)。我们的结果显示,双炔失碳酯是膜结合型 ER 的纯粹拮抗剂,并起到 GPER1 激动剂的作用。相比之下,他莫昔芬表现出相反的性质。因此,基于我们的结果,双炔失碳酯和他莫昔芬的组合能够最小化他莫昔芬的副作用。

[0297] 已报道,能量平衡的雌激素调控主要由 ER- α 介导。已显示,ER- α 的敲除导致丧失肥胖症的雌激素调节 (39)。已显示,25% 的 GPER1 消除小鼠表现出肥胖症 (40)。相比之下,ER- β 敲除小鼠没有显示出肥胖症比率的增加 (41)。这些结果建议,ER- α 与 GPER1 之间的相互交流对于能量平衡的雌激素调控来说是重要的。GPER1 主要定位于内质网,在那里它产生磷脂酰肌醇 3, 4, 5-三磷酸 (IP_3) 信号,引起 Ca^{2+} 从 InsP_3R 的释放 (5)。White 等报道了 Ca^{2+} 从 InsP_3R 的释放增强线粒体的生物能学 (42)。在本实施例中,我们发现在 OVX 和他莫昔芬处理的小鼠两者中,脂质在肝细胞的核周围积累。合在一起,我们预测 GPER1 激动剂可能提高 InsP_3R 活性以将 Ca^{2+} 从内质网递送至线粒体,导致葡萄糖到 ATP 的线粒体代谢。还发现 GPER1 定位于细胞质膜。GPER1 与 IL-1R 复合体之间的相互交流尚未报道过。另一方面,雌激素-ER- α 不仅调控 Glut-4 表达及其向细胞膜的易位 (43),而且它与 IL-1R 复合体相互交流,在 MCF-7 和骨骼肌细胞中调控葡萄糖摄取 (44、45)。有趣的是,已发现他莫昔芬在临床使用期间防止骨质疏松。在我们的实验中也发现双炔失碳酯防止骨质疏松 (图 18)。

[0298] 材料和方法

[0299] 质粒构建、蛋白质表达、纯化和通过 LC-MSMS 的性质研究:将 ER- α 配体结合结构域和 ER- α -36 在 EcoRI 和 XhoI 位点处克隆到 pGEX-6P-1 中。使用 0.1 μ M IPTG 诱导 GST-ER 融合蛋白,并在大肠杆菌中在 25°C 下表达 3 小时。收获细菌。按照制造商的说明书纯化 GST 融合蛋白。使用 1X 样品缓冲液,在 100°C 下将 GST 珠子上的纯化蛋白洗脱 5 分钟。将上清液在 10% SDS-PAGE 上运行。使用考马斯蓝 R250 对凝胶进行染色。将蛋白条带切下并通过 LC-MSMS 进行性质研究。ER- α -36 和 GPER1cDNA 购自 YR gene,并分别亚克隆到 pRetro-AcGFP 和 pQXIX-EGFP 载体中 (Clontech)。

[0300] 细胞培养、包装反转录病毒、细胞分拣和稳定细胞系的构建以及药物抑制测定法:按照 ATCC 流程生长 MCF-7、T47D、MDA-MB-231、Hec-1A、CHO-K1 和 HEK-293 细胞。将 pVSV-G 蛋白 cDNA 与 ER- α -36 或 GPER1cDNA 的质粒共转染到 HEK-293 包装细胞中。转染 72 小时后,使用 25krpm 下 2 小时的超速离心进行上清液收获和浓缩。使用稳定细胞的培养基重新悬浮病毒。将细胞在 37°C 下用病毒感染 2 小时,生长 2 天,并以每个孔 1 个细胞的密度将 GFP 阳性细胞接种到 96 孔板中。使用 western 印迹检查 GFP 融合蛋白的表达。

[0301] 结合和竞争测定法:将 GST 和 GST-ER- α 融合蛋白在大肠杆菌中表达,并使用谷胱甘肽珠子进行纯化。将 1ml TE 缓冲液中的 2 μ g/ml GST (40-80nM) 融合蛋白与 1nM³H-E2 在 4°C 下混合 2h。使用 GM 仪测量珠子上的放射活性。对 HEK-293 细胞进行转染以表达 ER- β 或 GPER1 的 GST 融合蛋白。将细胞在含有蛋白酶抑制剂混合物 (sigma) 的 1X TE 缓冲液中,在冰上裂解 30min,加入 80% 甘油以达到 20% 甘油。将管以 300g 离心 5min 并收集上清液。通过 Bio-rad 蛋白质浓度测定试剂盒测量蛋白质浓度。向 1ml 裂解液 (5mg/ml 总蛋白) 加入 100nM 双炔失碳酯和 1nM³H-E2,4°C 下 2h。使用 GM 仪测量珠子上的放射活性。

[0302] 微粒体的分离和药物竞争测定法:收获细胞并将其在 TE 缓冲液 (50mM Tris(pH8.0),5mM EDTA,2mM PMSF 和蛋白酶抑制剂混合物 (Sigma)) 中裂解 30min,其中每 5min 进行涡旋振荡。向细胞裂解液加入 TE 缓冲液中的 80% 甘油以达到 20%,并以 800g 离心 5min。将上清液转移到新的管并将总蛋白浓度调整到 5mg/ml。向 1ml 蛋白溶液加入药物和 ³H-E2,并在 4°C 下温育 2 小时。以 25krpm 将微粒体沉淀 2 小时。使用 GM 仪测量结合的 ³H-E2。

[0303] 药物抑制测定法:将细胞接种到 24 孔板中,并使用规定浓度的药物进行处理。细胞数目使用细胞计数器 (Count Star) 来计数。

[0304] Transwell 和流式细胞术测定法:将细胞在含有 5% 炭剥离过的 FBS 的无酚红培养基中饥饿 48 小时,然后转移到无酚红培养基中继续 24 小时。Transwell 按照 Chemicon 套包说明书 (目录号 ECM551) 来进行。简单来说,将细胞用胰蛋白酶处理,使用含有 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 的 1X DPBS (Sigma) 清洗,并以 0.5 $\times$ 10⁶ 个细胞 /ml 的密度重悬浮在无血清和酚红的培养基中。在上层仓室中加入 200 μ l 含有药物的细胞悬液,并将其插入到含有 0.5ml 带有 10% FBS 的培养基的下层仓室中 16 小时。通过将细胞悬浮在无胰蛋白酶的细胞悬浮缓冲液 (Millipore) 中,按照公司的说明书用 FITC- 抗体 (millipore) 进行标记,来进行流式细胞术。

[0305] 葡萄糖浓度测定法:使用葡萄糖测定试剂盒,按照制造商的说明书 (Yicheng, Beijing) 来测量培养基或来自于小鼠尾的全血中的葡萄糖浓度。

[0306] OVX 小鼠模型的构建和药物给药 :通过手术切除 6 周龄小鼠的卵巢。手术后 3 天,每天通过胃道注射或与食物混合进行药物给药。

[0307] 石蜡切片的制备和 HE 染色 :通过手术切除小鼠组织并使用 1XPBS 中的 2.5% 甲醛进行固定。石蜡切片制备和 HE 染色按照来自于 GLPlaboratory of BK animal model, Inc. 的标准流程来进行。

[0308] 小鼠肝脏和血清中的 TC 和 TG 的测量 :通过手术切除 30-50mg 小鼠肝脏,在 1ml 氯仿 :甲醇 (2:1) 混合物中匀浆,并使用 0.5ml ddH₂O 提取。将有机相转移到新的管中并空气干燥。使用试剂盒,按照制造商的说明书测量 TC 和 TG 的量。使用内部标准对照来校正误差。

[0309] 使用 micro-CT 的骨密度测量法 :将股骨在含有 3% 甲醛的 1X DPBS 中固定两周。一周后更换固定溶液。通过 Siemens Inveon Micro-CT 测量股骨的密度。在下列测量条件下使用 Inveon Research Workplace (IRW) 来分析 HU2000 值 :80KVP, 500mA, 1500ms 暴露时间 ; CCD 读出器安装 :2048 轴, 2048 面元 ;跨轴 FOV :19.03mm, 轴 :19.03mm, 像素尺寸 :9.29 μ m。

[0310] 细胞裂解物的提取、Western 印迹、总 RNA 提取和 RT-qPCR :收获细胞并将其在含有 1% triton-x100 和蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 缓冲液或 1X DPBS 中裂解。使用 Bio-rad 蛋白质染色染料测量总蛋白浓度。Western 印迹使用硝酸纤维素膜 (Millipore) 和 Bio-rad 半干转移系统,按照标准流程来进行。总 RNA 使用 RNA 提取溶液 (sigma) 来提取。RT-qPCR 使用 Roche Sybr qPCR 套包和 ABI7900HT PCR 仪,使用下述程序来进行 :95°C 10min, 然后 40 个循环的 95°C 历时 10sec 和 60°C 历时 1min。

[0311] 统计分析 :在表和图中,结果被表示为平均值 +STDEV。星号表示使用双尾 student's t 检验计算的统计上显著的差异。

[0312] 实施例 2. 双炔失碳酯和 dinordrin 的结合测定法

[0313] Dinordrin 具有与双炔失碳酯类似的结果,区别在于它在 R6 位置处具有 -H。我们发现,50nM dinordrin 阻断 0.5nM [H³-E2] 与珠子上的 1 μ g GST-ER- α -LBD 的结合的 63.2 $\pm$ 5.7%。相比之下,双炔失碳酯不引起阻断 [H³-E2] 与 1 μ g GST-ER- α -LBD 的结合的抑制。

[0314] 此外,6 μ M dinordrin 使 Bcl-2mRNA 的转录增加 147.2% $\pm$ 22.73% (P<0.001)。相比之下,使用 RT-qPCR 在 MCF-7 细胞中测量到由双炔失碳酯引起的 3.18% $\pm$ 3.22% 的统计上不显著的差异。

[0315] 结果显示,R6 - CH3 (与 -H 相反) 对于双炔失碳酯的独特功能特征来说是必不可少的。

[0316] 参考文献

[0317] 1. Boonyaratanakornkit, V., Steroids. 76, 877-884, (2011).

[0318] 2. Mauvais-jarvis, F., Clegg, D.J. 和 Hevener, A.I., Endocrine Reviews. 34(3), 309-338 (2013)

[0319] 3. Kuang, L.G., Zhang, X.T., Xie, Y., 等, Molecular endocrinology. 24(4), 709-721 (2010)

[0320] 4. Rao, J., Jiang, X.M., Wang, Y. 和 Chen, B.. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 127, 231-237 (2011)

- [0321] 5. Revankar, CM., Cimino D., Sklar, LA., Arterburn, JB. 和 Prossnitz, ER.. Science. 307(11), 1625-1630 (2005)
- [0322] 6. Nilsson, BO., Olde, B. 和 Leeb-Lundberg, LF.. British Journal of Pharmacology. 163. 1131-1139 (2011)
- [0323] 7. Zhang, XT., Ding, L., Kang, LG. 和 Wang, Y.. PLoS one. 7(1), e30174 (2012)
- [0324] 8. O'Brien, JE., Peterson, TJ., Tong, MH., 等, J. of Biol. Chem. 281(36). 26683-26692 (2006)
- [0325] 9. Takamura, T., Shimizu, A., Kumura, T., Ando, K., Zen, Y., 等, Internal Med. 579-581 (2007)
- [0326] 10. Barrett-Connor, E., Mosca, L., Collins, P., 等, N. Engl. J. Med.. 355. 125-137 (2006)
- [0327] 11. Alexanderson, P., Toussaint, A., Christiansen, C., 等, JAMA. 285(11). 1482-8 (2001)
- [0328] 12. Herschberger, PA., Stabile, LP., Kanterewicz, B., 等, J. of Steroid Biochem. & Mol. Biol. 16. 102-9 (2009)
- [0329] 13. Bank, U. K. 和 Pincus, U., Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 111, 595 (1962).
- [0330] 14. Pincus, U. 和 Gordon, H. L., Steroids, 5, 193, (1965).
- [0331] 15. Xu, B., Zhou, P. Q. 和 Yu, W. J., Tumor, 9, 197 (1989).
- [0332] 16. Ma, Z. C., Lou, L. G., Zhang, Z. 和 Bin, X, Acta Pharmacol. Sin, 21, 939 (2000).
- [0333] 17. Li R. L., Lee, D. Y., Cheng, Q. L., 美国专利 5001120 (1991).
- [0334] 18. Mehta, R. R., Jenco, J. M. 和 Chatterton, R. T., Steroids, 38, 679 (1981).
- [0335] 19. Nehra, R., Riggins, RB., Shajahan, AN 等, FASEB J. 24(6). 2040-55 (2010)
- [0336] 20. Watanabe, T., Inoue, S., Hiroi, H., Orimo, A., 等, Mol. Cell. Biol. 18. 442-9 (1998)
- [0337] 21. Butler, WB., Kelsey, SJ., Castagna, M. 和 Blumberg, PM.. Cancer Res. 41(1). 82-8 (1981)
- [0338] 22. Cesarone G, Garofalo C, Abrams MT, 等, J. Cell Biochem. 98(2). 440-50 (2006)
- [0339] 23. Kang, LG., Zhang, XT., Xie, Y., Tu, YP., 等, Mol. Endocrinol.. 24(4). 709-21 (2010)
- [0340] 24. Zhang, J., Li, G., Li, Z., Yu, X., Zhang, H., 等, Steroids. 77(6). 666-73 (2012)
- [0341] 25. Melchiori, A., Mortarini, R., Carlone, S., 等, Exp. Cell Res., 219, 233 - 242 (1995).
- [0342] 26. Morini, M., Mottollese, M., Ferrari, N., Ghiorzo, F. 等, Int. J. Cancer: 87, 336 - 342 (2000)
- [0343] 27. Garrido P, Morán J, Alonso A, González S, 等, Endocrinology. 154(6): 1979 - 89 (2013)
- [0344] 28. Garri DR. 和 Garri, BL.. Cell Tissue Res. 319(2). 231-42 (2005)
- [0345] 29. Wang Q., Jiang, L., Wang, J. 等, Hepatology. 49. 1166-75 (2009)

- [0346] 30. Szatkowski C., Parys, JB., Quadid-Ahidouch, H., 等, Mol. Cancer. 9. 156 (2010)
- [0347] 31. Fukatsu K, Bannai H, Inoue T, Mikoshiba K. J Neurochem. 114(6):1720-33. (2010)
- [0348] 32. Cabodi, S., Moro, L., Baj, G., 等, J Cell Sci. 117. 1603-11 (2004)
- [0349] 33. Bigarella CL, Borges L, Costa FF, Saad ST. Biochim Biophys Acta. 1793(5):806-16. (2009)
- [0350] 34. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton Jr. AR. Mol. Endocrinol. 14:1649-60 (2000)
- [0351] 35. Filardo EJ, Graeber CT, Quinn JA 等, Clin. Cancer Res. 12:6359-66 (2006)
- [0352] 36. Pedram A, Razandi M, Levin ER. Mol. Endocrinol. 20:1996-2009 (2006)
- [0353] 37. Otto C, Rohde-schuzl B, Schwarz GFuchs I, 等, Endocrinology. 149:4846-56 (2008)
- [0354] 38. Edward J, Filardo 和 Thomas P. Endocrinology. 153(7):2953-62 (2012)
- [0355] 39. Geary, N., Asarian, L., Korach, KS 等, Endocrinology. 142, 4751-7 (2001)
- [0356] 40. Ohlsson, C., Hellberg, N., Parini, P. 等, Biochem. Biophys. Res. Commun. 278, 640-5 (2000)
- [0357] 41. Langer, G., Bader, B., Meoli, L., 等, Steroids. 75, 603-10 (2010)
- [0358] 42. White, C., Li, C., Yang, J., 等, Nat. Cell Biol. 7(10), 1021-8 (2005)
- [0359] 43. Muthusamy T, Murugesan P, Balasubramanian K. Metabolism. 58(11):1581-92 (2009)
- [0360] 44. Ceusta, PG., Suarez, JM., Garcia, AA. 等, Endocrinology. (2013)
- [0361] 45. Gorres, BK., Bomhoff, GL., Morris, JK. 和 Geiger, PC. J Physiol. (2013)

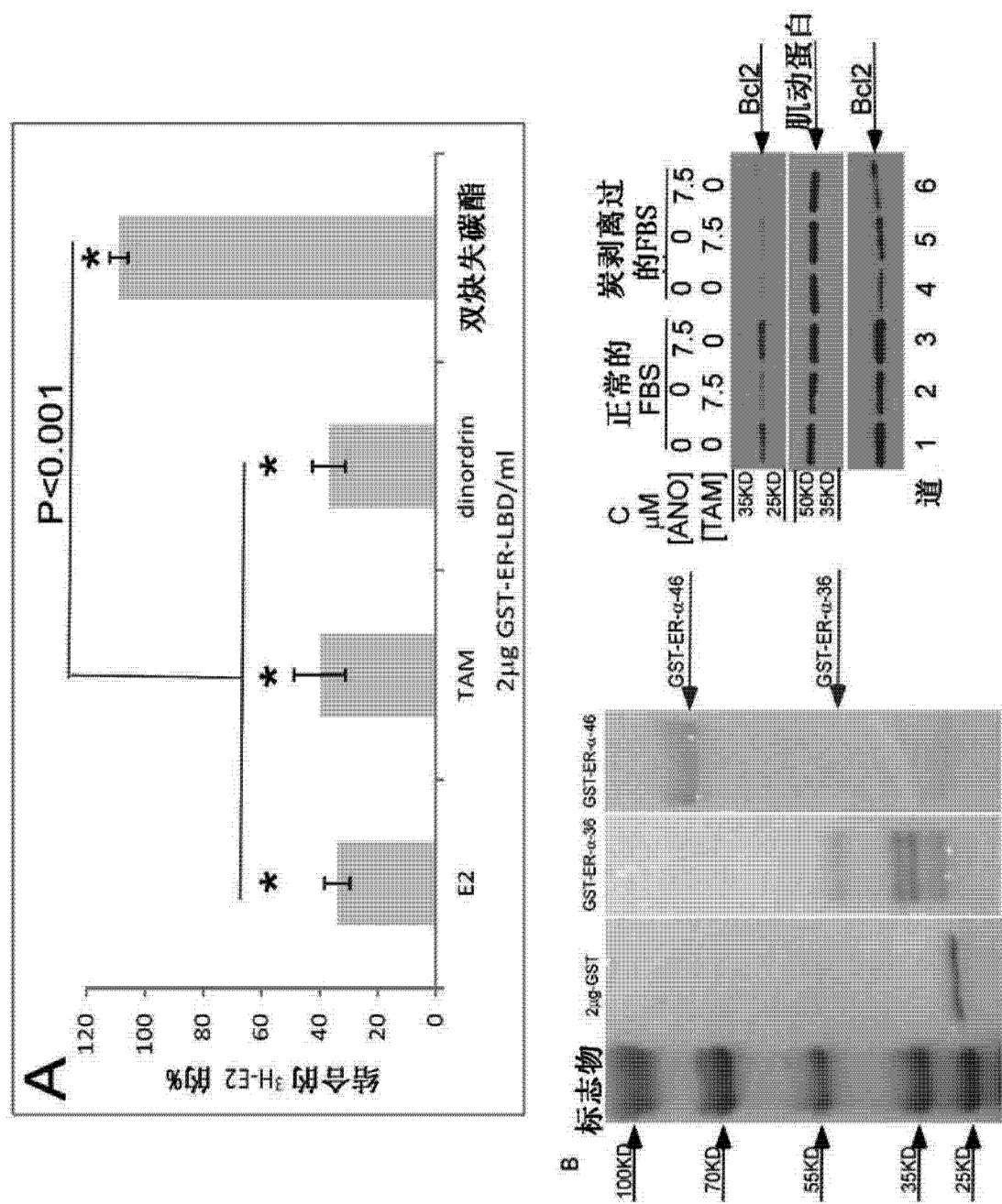


图 1

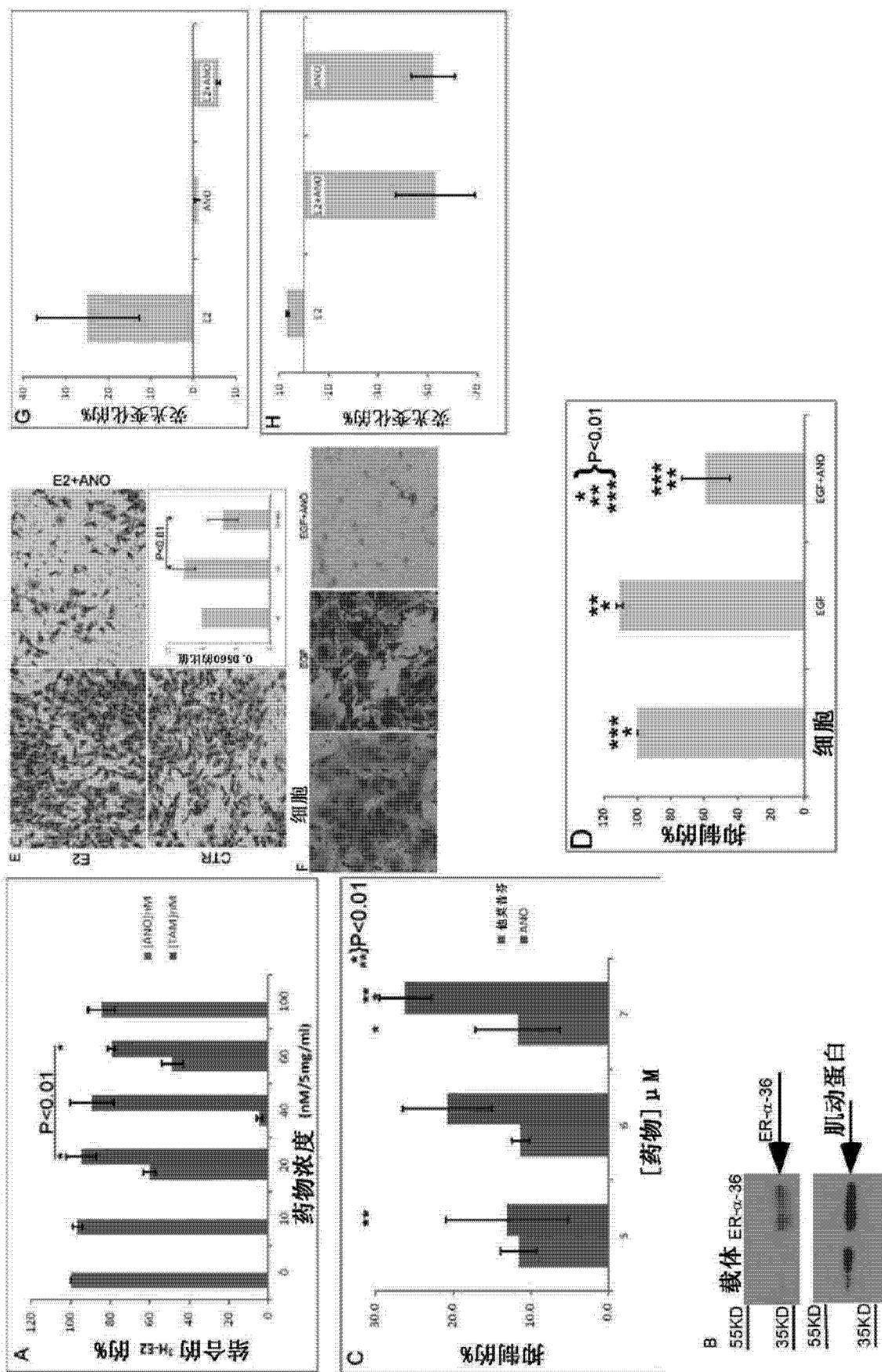


图 2

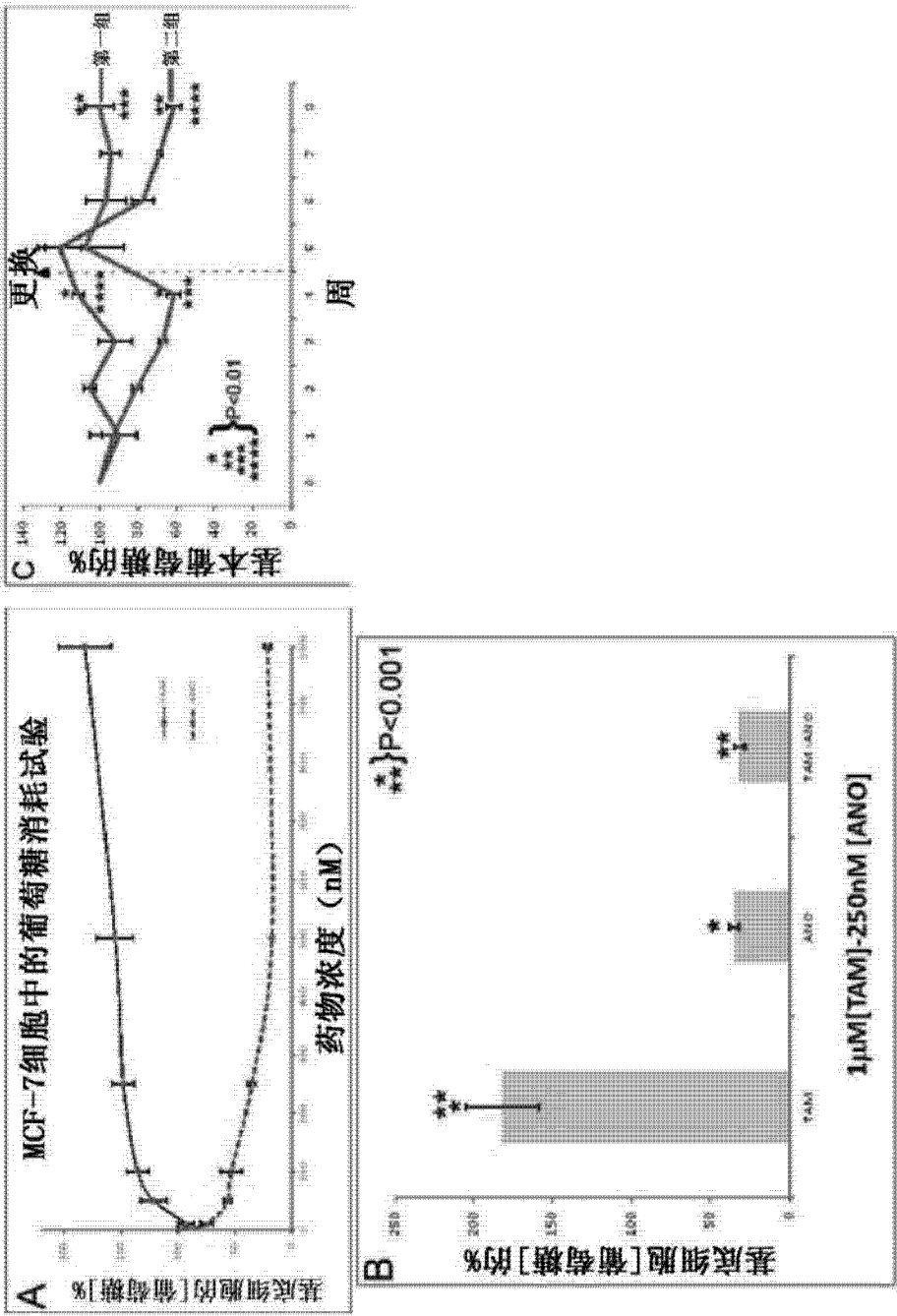


图 3

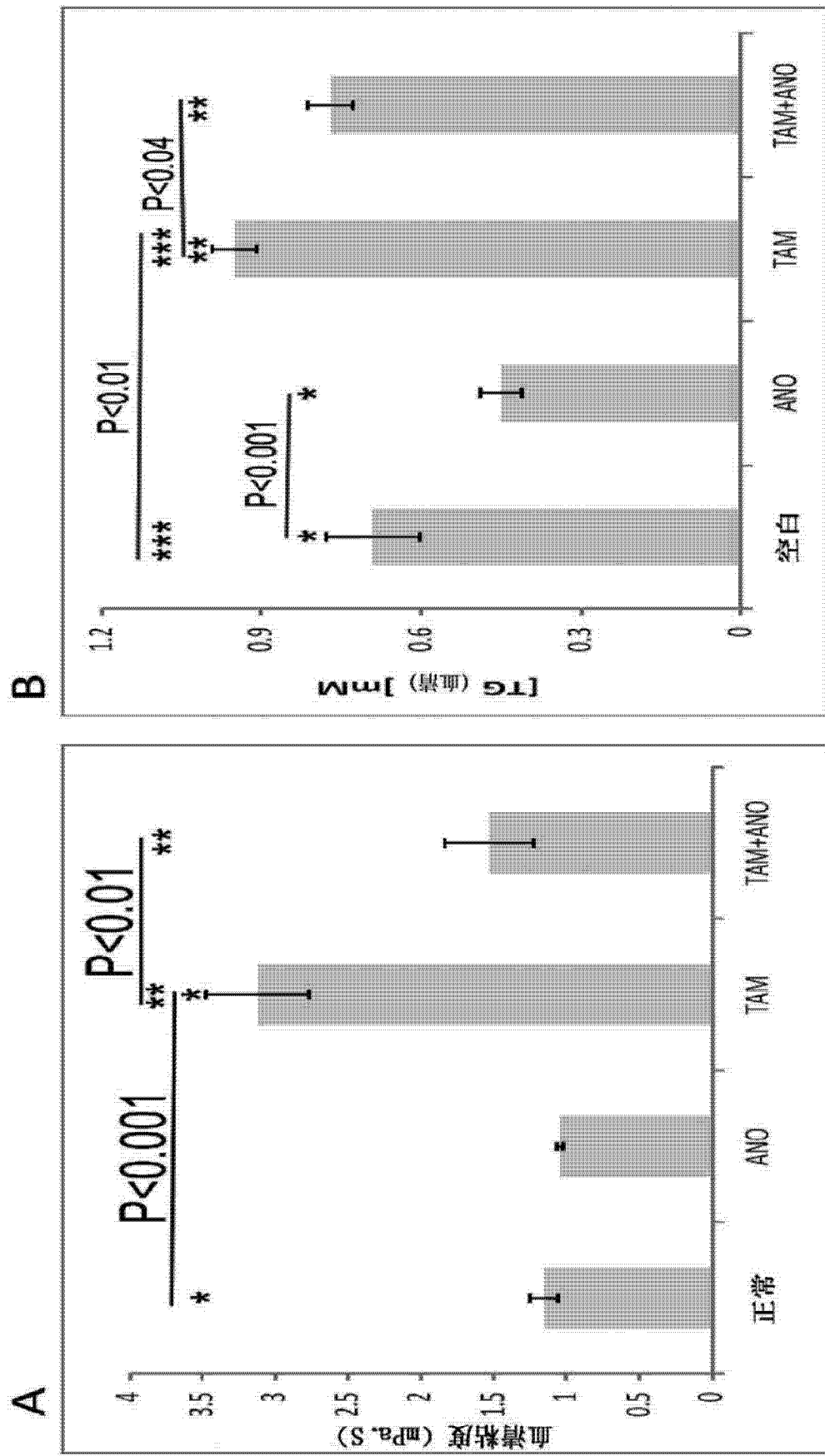


图 5

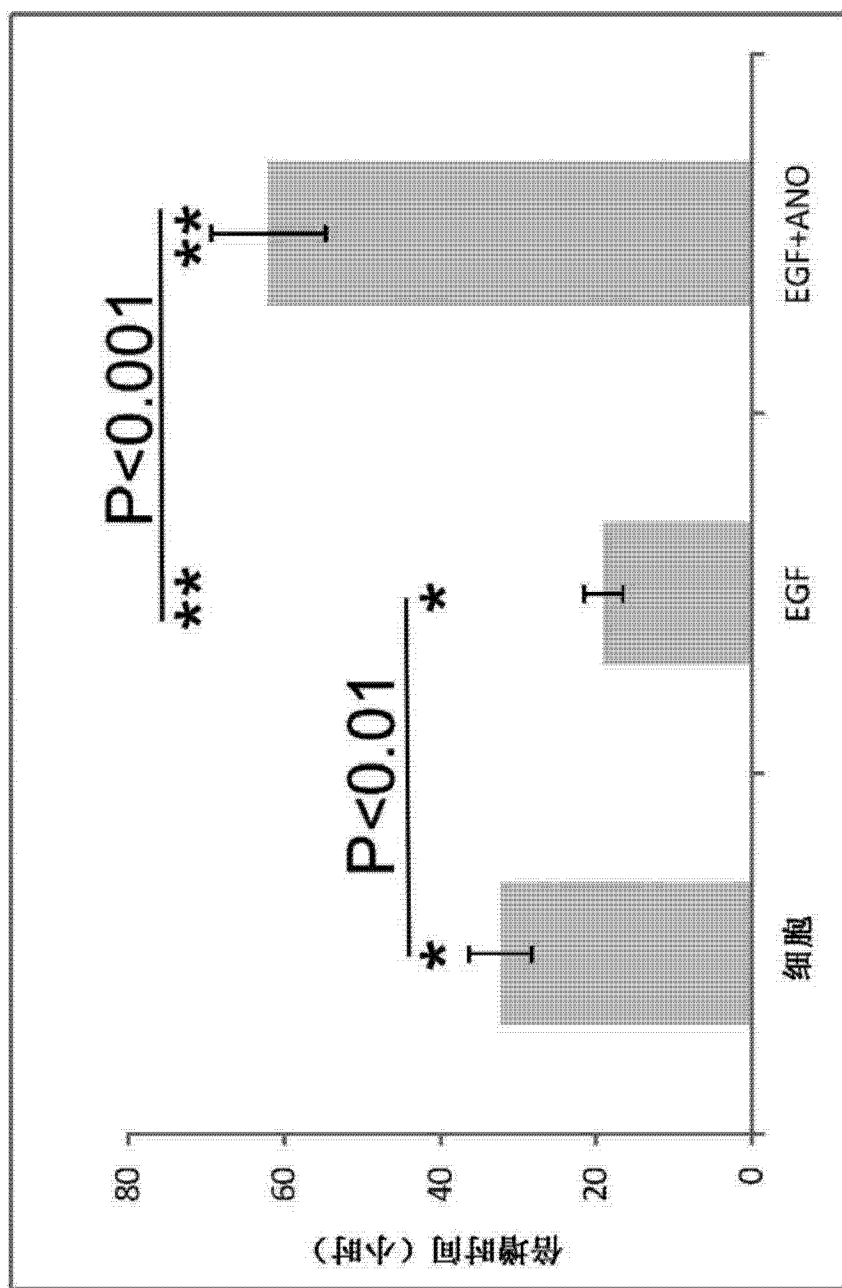


图 6

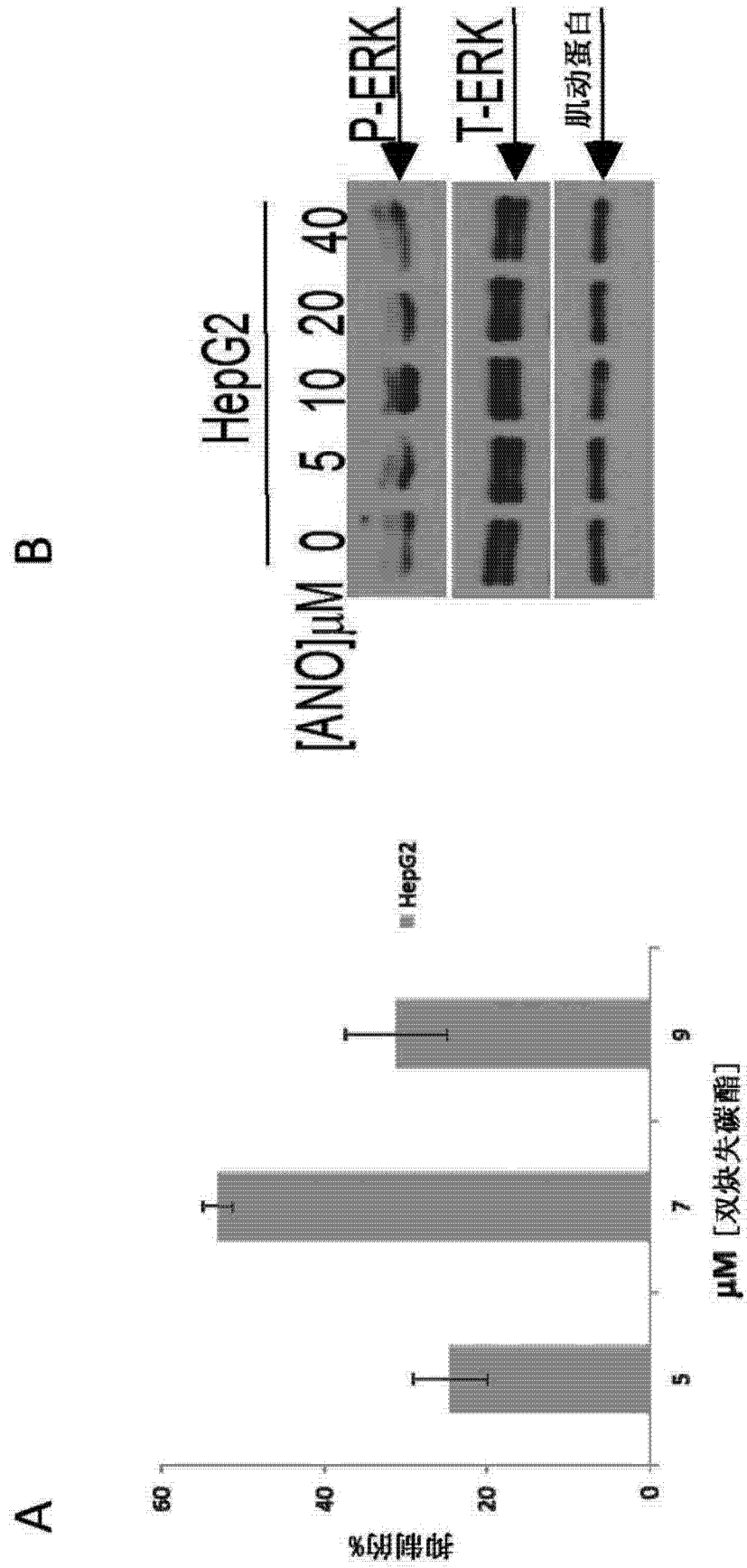


图 7

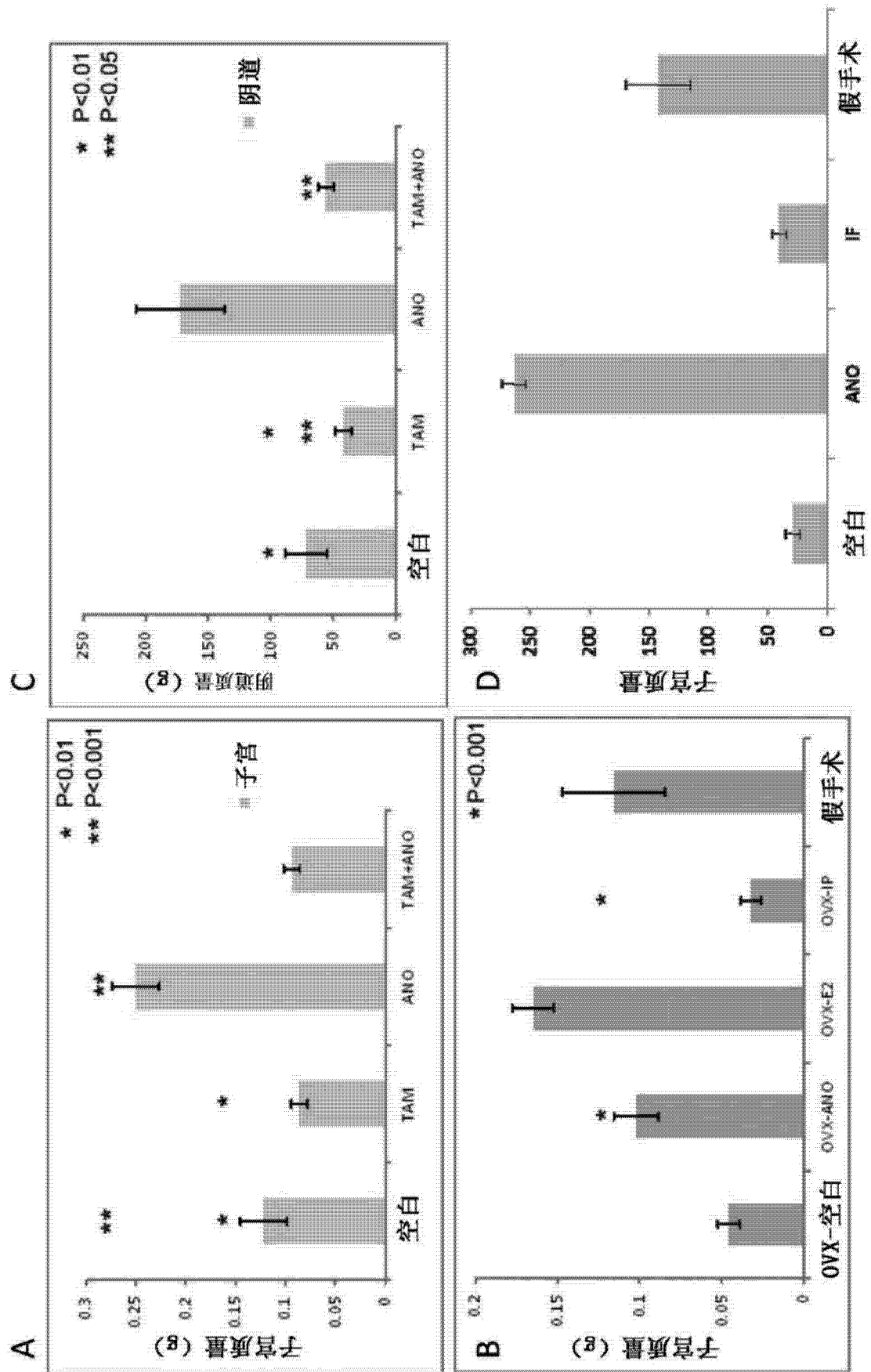


图 8

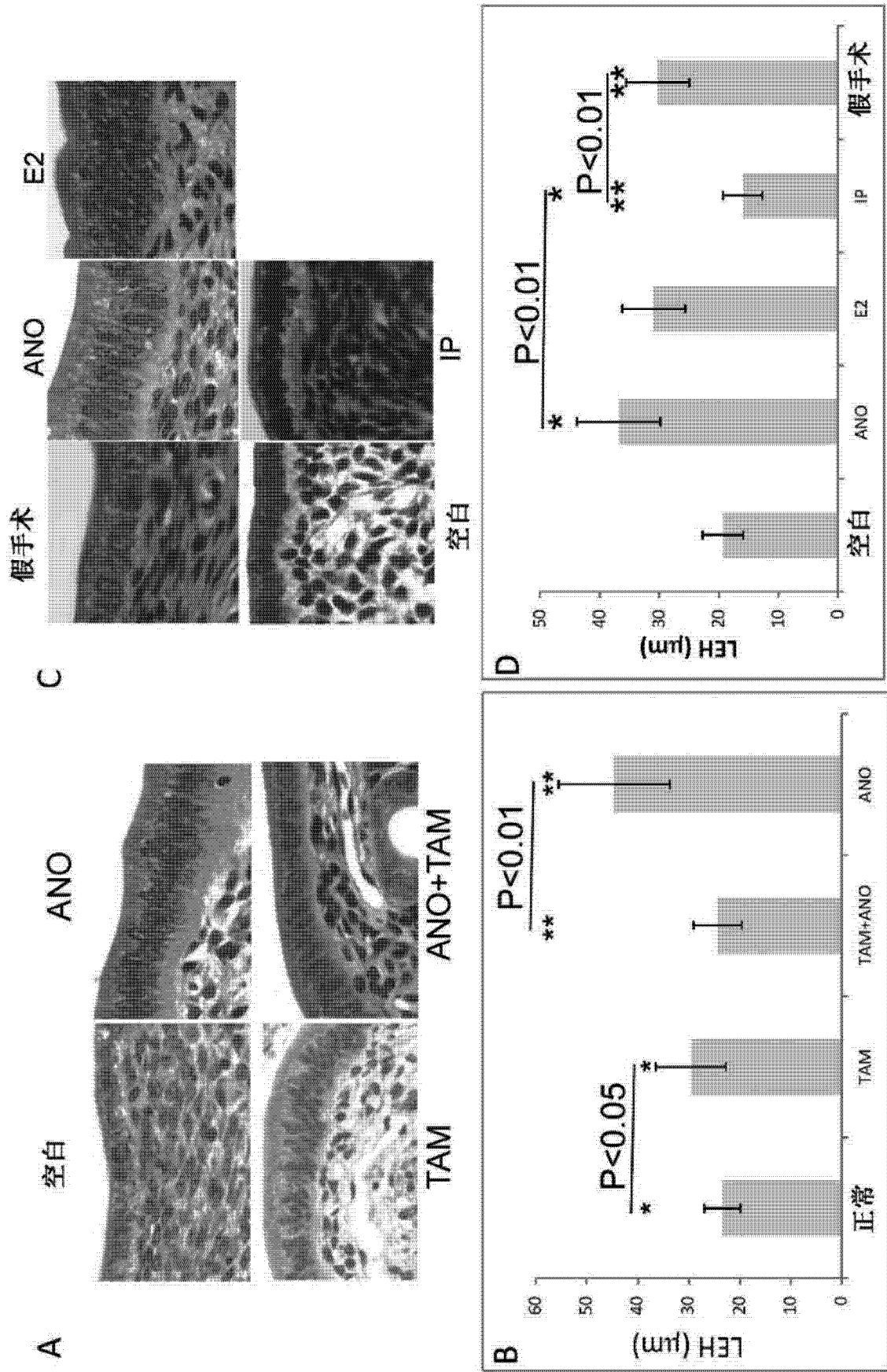


图 9

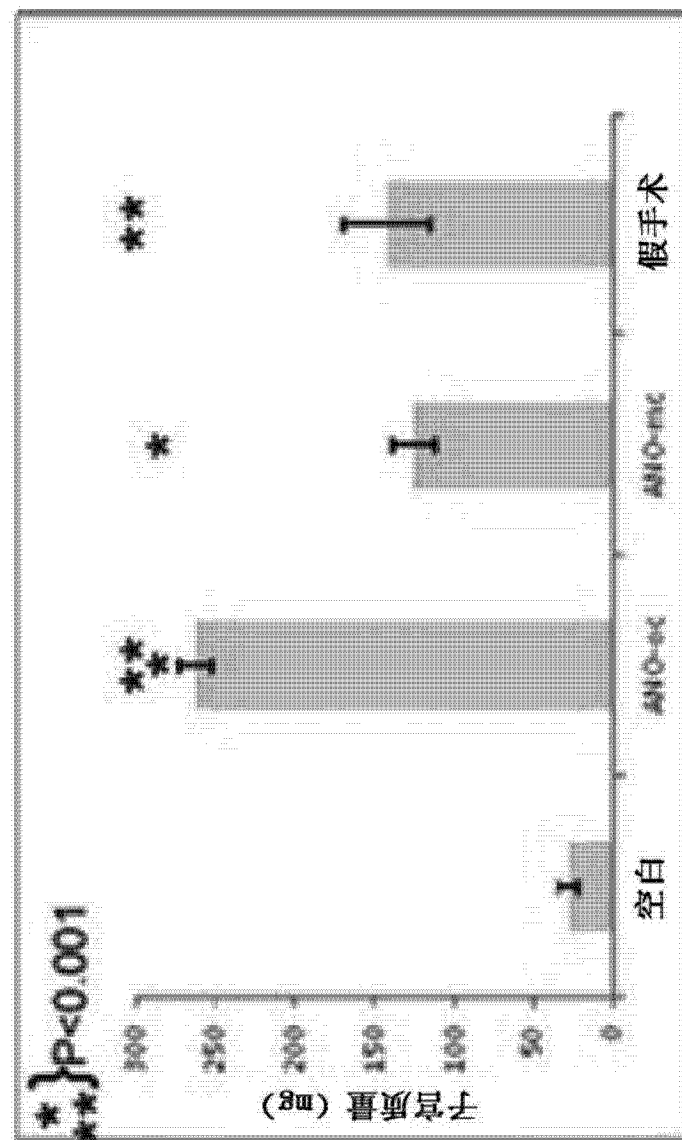


图 10

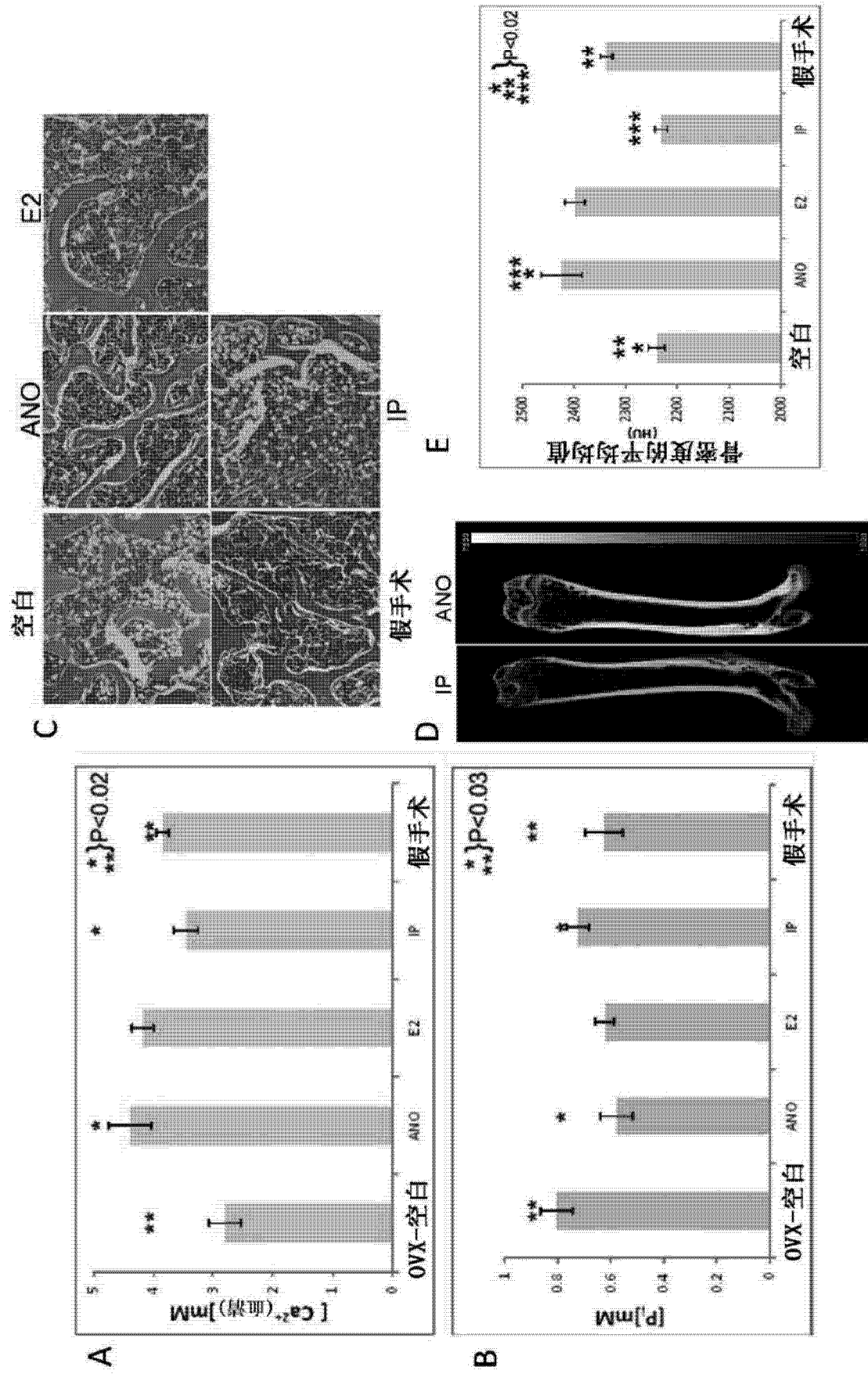


图 11

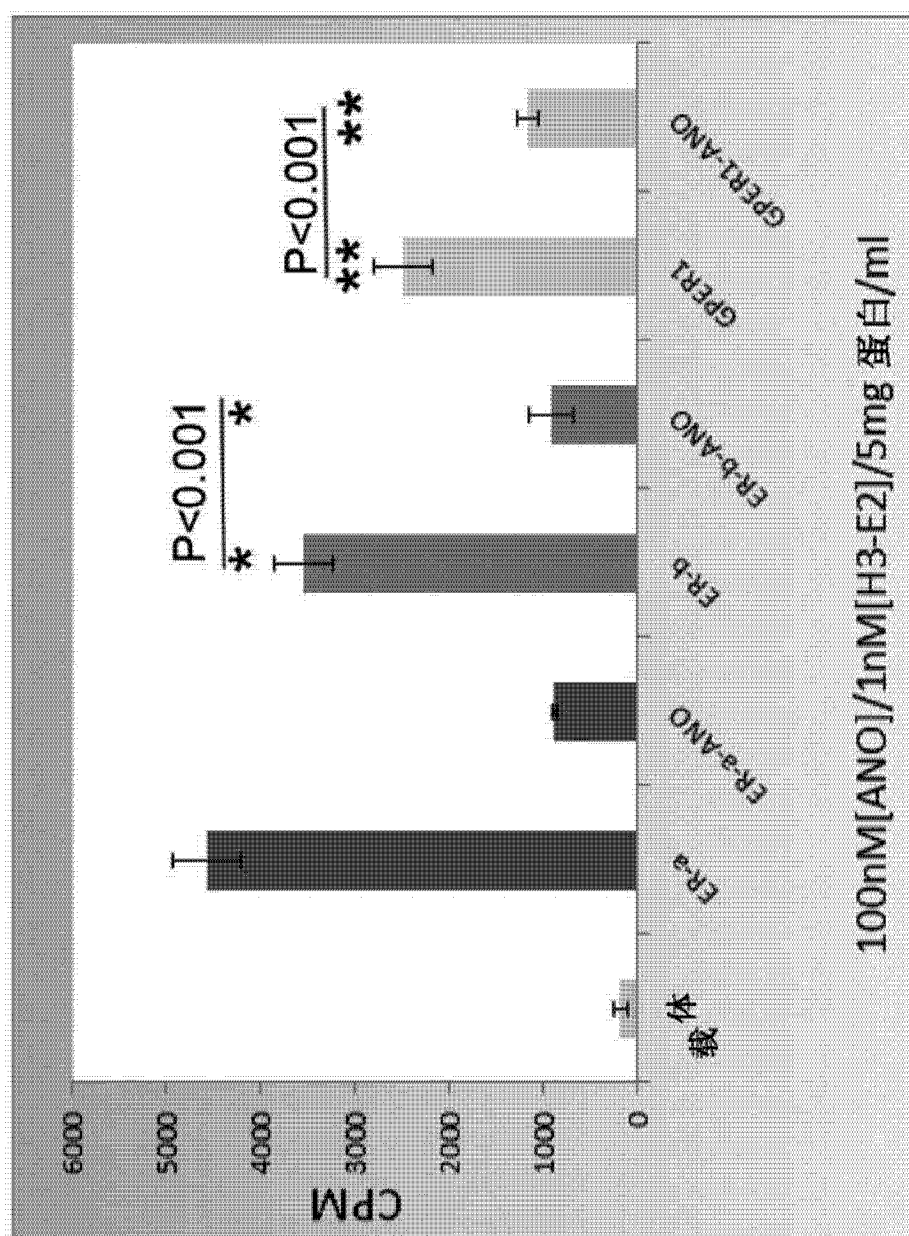


图 12

图13A		第1列	第2列	第3列	
MCF-7 144h 的 IC ₅₀ (n=3)	双袂失碳酸酯(μM)	他莫昔芬 (μM)	P-值		
	加	5.823±0.9214	1.361±0.284	0.00437	第1行
	减	3.847±0.737	6.277±0.614	0.03659	第2行
P-值		0.04285	0.0163		第3行
MCF-7+200nM[ANO]的 IC50			1.137±0.201		第4行

第1列	第2列	第3列	第4列
药物	BRCA1	ApoD	COX2a
ANO	-1.815046	-1.369631	1.554124
TAM	-2.885235 ±0.545574 P<0.02	6.054308 ±0.240776 P<0.01	-3.183801 ±0.571488 P<0.01
RAL	-1.580719	3.347769 ±0.248253 P<0.01	-3.29644 ±0.641845 P<0.01

图 13

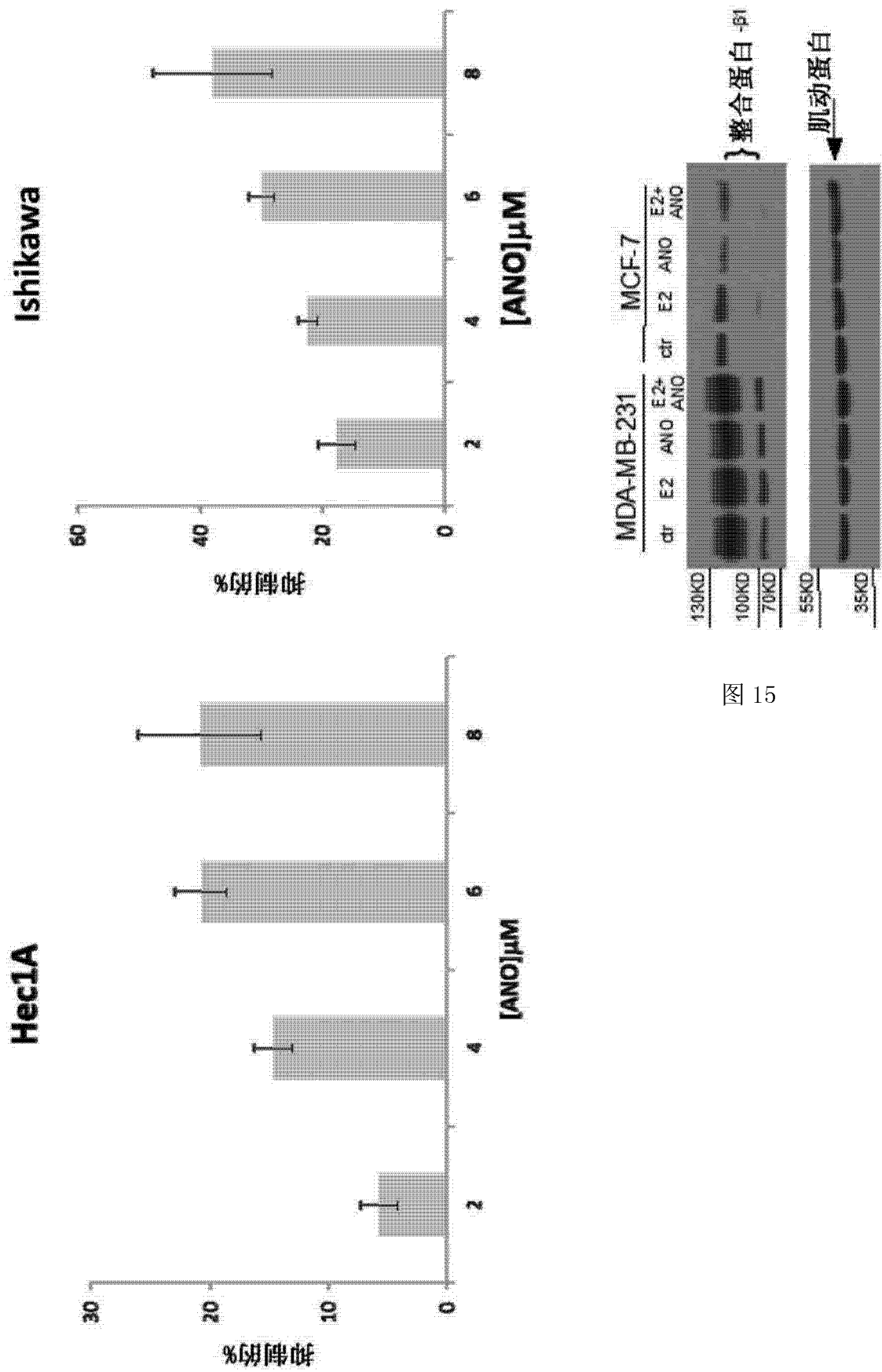


图 15

图 14

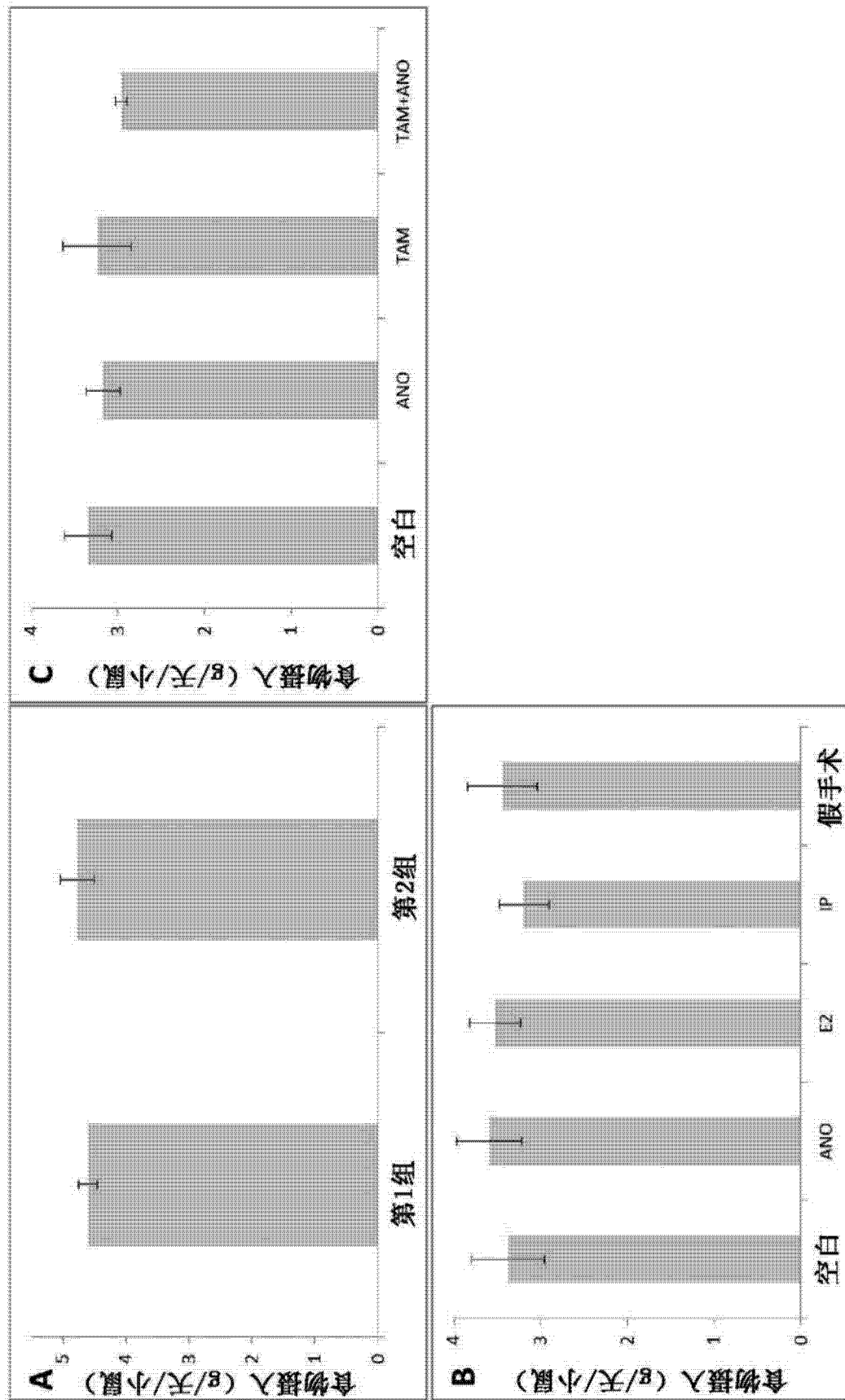


图 16

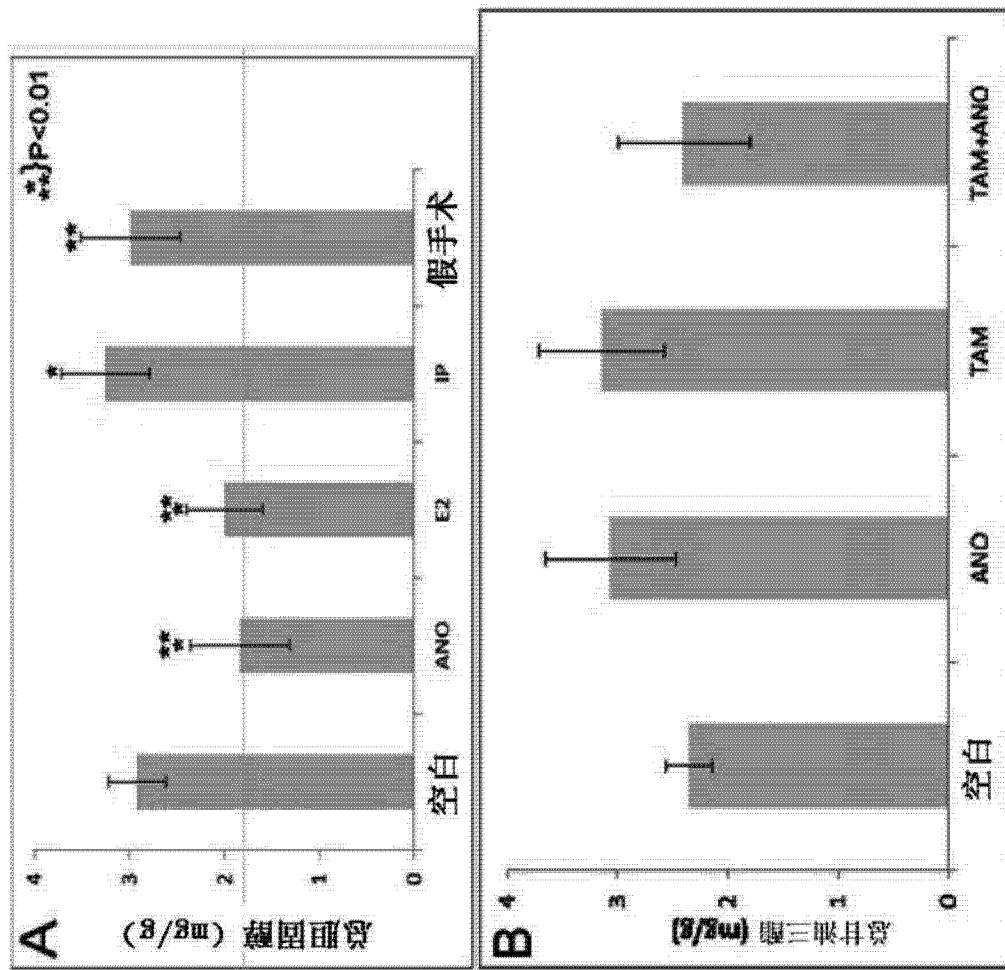


图 17

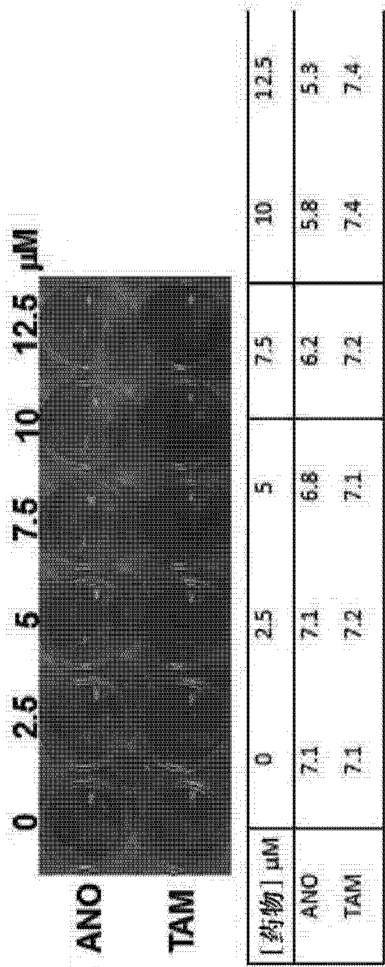
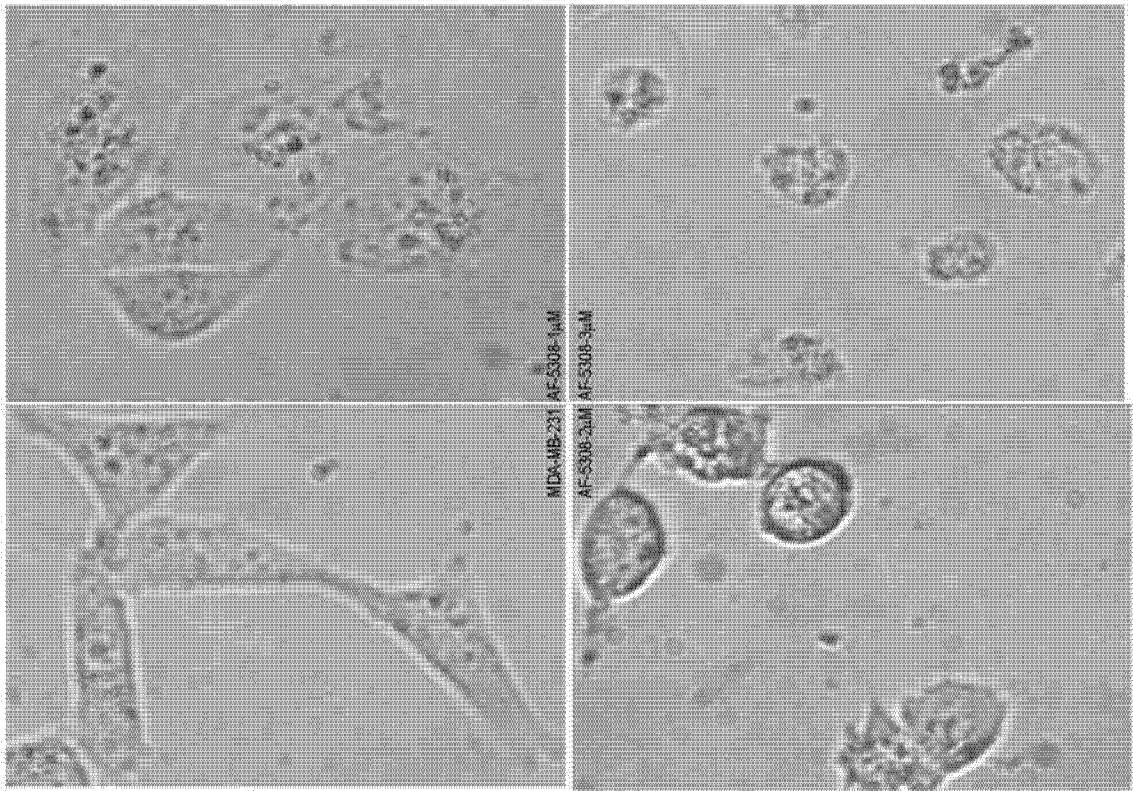


图 18

A



B

化合物	交换的基团	活性范围
AF-53-08	-NH-C10	1-3μM
AF-53-09	-NH-C12	6-15μM
AF-53-10	-NH-C6:1=2	2-4μM

图 19

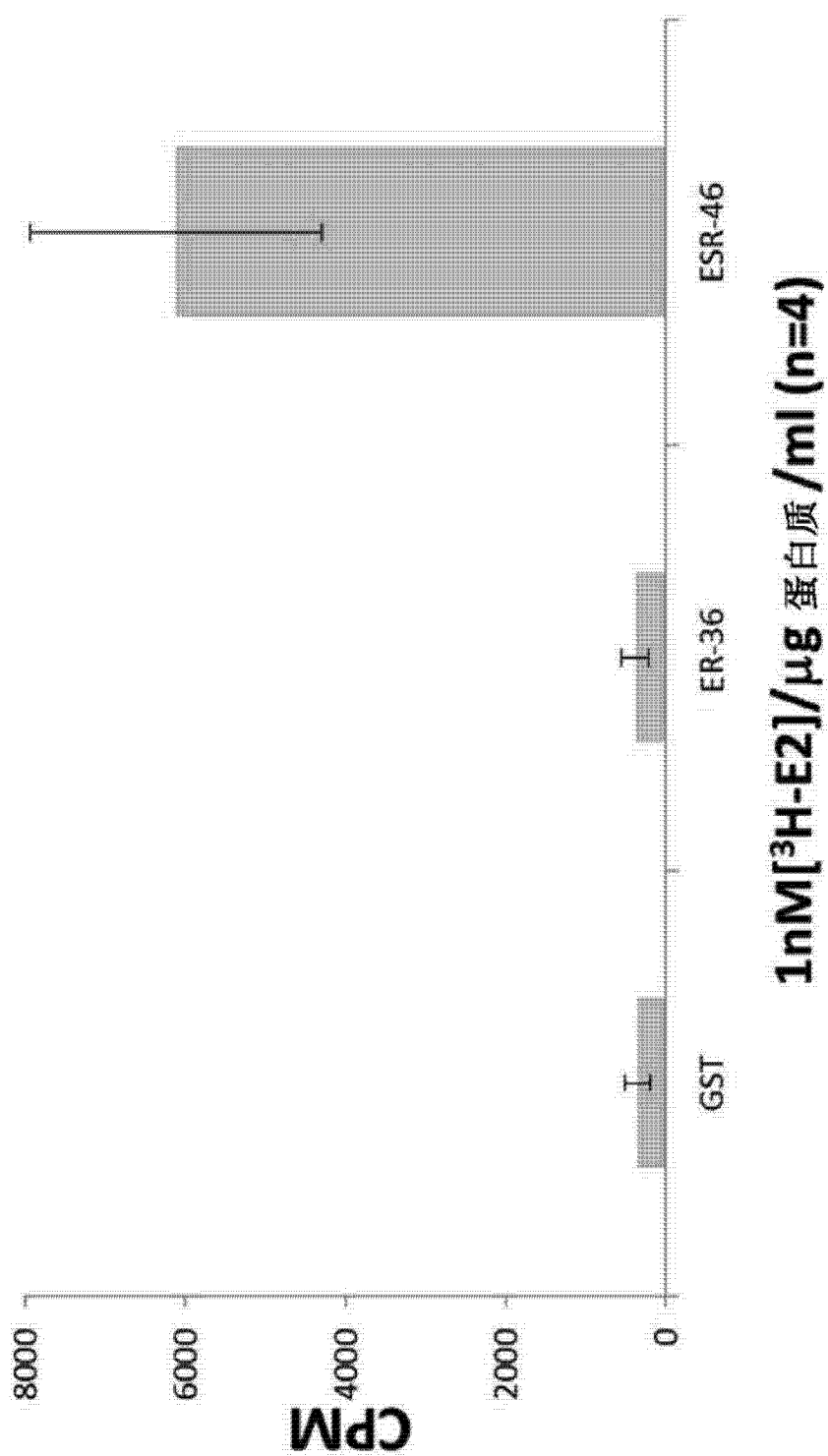


图 20