



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102099040 B

(45) 授权公告日 2013.06.19

(21) 申请号 200980114979.2

A61P 35/00(2006.01)

(22) 申请日 2009.04.27

A61K 31/4196(2006.01)

(30) 优先权数据

61/048,452 2008.04.28 US

(56) 对比文件

WO 9741145 A1, 1997.11.06,

WO 2007103510 A2, 2007.09.13,

WO 0174840 A2, 2001.10.11,

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.10.27

审查员 李钢

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/041836 2009.04.27

(87) PCT申请的公布数据

W02009/134723 EN 2009.11.05

(73) 专利权人 利普生物药剂公司

地址 美国德克萨斯州

(72) 发明人 J·S·波多尔斯基 R·D·维勒

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 关立新 刘健

(51) Int. Cl.

A61K 31/56(2006.01)

权利要求书2页 说明书35页 附图3页

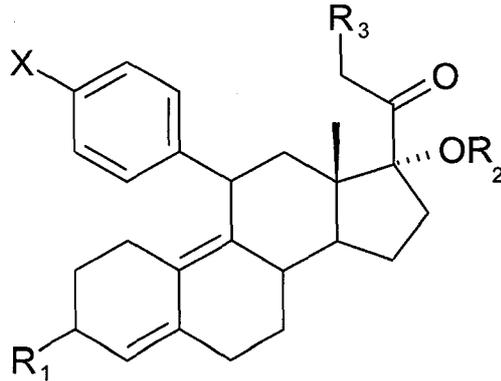
(54) 发明名称

用于治疗乳腺癌的孕酮拮抗剂, 例如
CDB-4124

(57) 摘要

本发明的标的物与癌症治疗领域有关。特别是, 本发明与治疗和 / 或预防病人的乳腺癌有关。本发明同时列出用于执行治疗方案的组合物, 包括选定孕酮受体效应物, 以用作子宫内的孕酮激动剂, 并作为乳腺组织内的孕酮拮抗剂, 同时, 仅具备较低的糖皮质激素和雌激素受体亲和性。本发明的实施例, 同时列出用于预防接受激素替代治疗或雌激素治疗的病人体内形成乳腺癌的方法。

1. 乳腺癌组织增殖抑制剂量的通式如下的化合物：



或其药学上可接受的盐在制造用于治疗女性乳腺癌的药物中的应用，其中：

X 表示 N, N- 二甲基氨基或 N- 甲基氨基；

R₁ 表示 = 0；

R₂ 表示乙酰；和

R₃ 表示甲氧基、甲酸基、醋酸基、或乙氧基；

其中所述化合物与有效数量的芳香化酶抑制剂同时、单独或连续给药。

2. 根据权利要求 1 的应用，其中所述化合物指 CDB-4124 或 CDB-4059。

3. 根据权利要求 2 的应用，其中所述化合物指 CDB-4124。

4. 根据权利要求 2 的应用，其中所述的乳腺癌组织增殖抑制剂量是 0.5-500mg/kg。

5. 根据权利要求 1 的应用，其中所述化合物的对孕酮受体的结合亲和性，比该化合物对糖皮质激素受体的结合亲和性，至少大 1.5 倍。

6. 根据权利要求 1 的应用，其中所述化合物可将乳腺癌细胞系中的每百个细胞的增殖细胞数量，至少减少 20%。

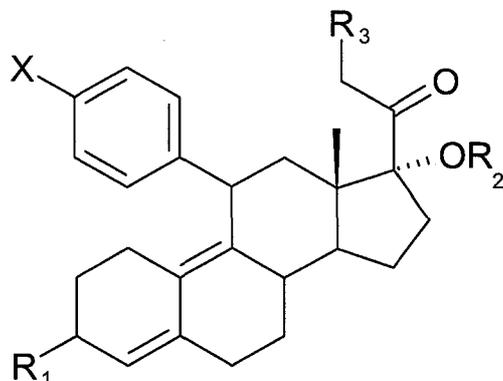
7. 根据权利要求 1 的应用，其中女性体内的孕酮水平未因该药物而明显增加。

8. 根据权利要求 2 的应用，其中该药物施用给接受激素替代治疗的女性。

9. 根据权利要求 2 的应用，其中该药物施用给接受雌激素治疗的女性。

10. 根据权利要求 1 的应用，其中该芳香化酶抑制剂从阿那曲唑、来曲唑、依西美坦及 DL- 氨基乙哌啶酮中选择。

11. 芳香化酶抑制剂和增殖抑制剂的以下通式化合物：



或其药学上可接受的盐在制造用于抑制乳腺癌组织增殖的药物中的应用，其中：

X 表示 N, N- 二甲基氨基或 N- 甲基氨基；

R_1 表示 = 0 ;

R_2 表示乙酰 ; 和

R_3 表示甲氧基、甲酸基、醋酸基或乙氧基。

12. 根据权利要求 11 的应用, 其中所述化合物指 CDB-4124 或 CDB-4059。

13. 根据权利要求 11 的应用, 其中所述芳香化酶抑制剂从阿那曲唑、来曲唑、依西美坦及 DL- 氨基乙哌啶酮中选择。

用于治疗乳腺癌的孕酮拮抗剂, 例如 CDB-4124

[0001] 交叉参考相关申请

[0002] 本申请享有于 2008 年 4 月 28 日提交之美国临时申请 61/048, 472 号的利益, 且随附该临时申请的相关内容供参考。

技术领域

[0003] 本发明涉及治疗乳腺癌的组合物及方法。更准确地说, 本发明涉及包括一种或多种用于治疗乳腺癌并具备较低的糖皮质激素活性的孕酮受体效应物的组合物。

背景技术

[0004] 2007 年, 大约有 200, 000 名美国女性被诊断患有乳腺癌。最新数据表明, 孕酮与此类疾病的发生发展有关。

[0005] 若干研究对孕酮在子宫和乳房内起到的反作用提供有力证明: 孕酮可作为抑制子宫内雌激素增殖活动的分化因子, 并作为乳房内的有丝分裂因子。试验表明, 孕酮可增加狗和老鼠体内自发乳房肿瘤的发生率。并且, 对孕酮受体灭活鼠的研究表明, 专门针对乳腺的化学致癌物取决于孕酮受体。此外, 组织培养试验表明, 孕酮的作用可能局限于阻滞后的一轮增殖。研究已证实, 孕酮可向上调控 EGF、c-erbB2 及 c-erbB3 的受体, 或增强它们的增长因素结合的下游活性。因此, 孕酮具备“填充”组织以完成增殖的可能性, 并可从激素依赖切换至增长因素依赖状态

[0006] 此外, 妇女健康倡议 (WHI) 近期开展的一项大型临床研究表明, 孕酮对乳腺癌的发展起到一定作用, 并且, “百万妇女研究”支持下述结论, 即接受包括共轭雌激素 (CEE) 和醋酸甲羟孕酮 (MPA) 结合安慰剂的激素替代治疗 (HRT) 的女性, 患上乳腺癌的风险有所增加。在“百万妇女研究”中, 使用雌激素和其中一种孕酮拮抗剂 (MPA、诺塞甾酮、甲基炔诺酮 / 左炔诺孕酮) 的风险要高于单独使用雌激素, 并且, 风险将随用药的持续时间而增加。对于使用醋酸甲羟孕酮 (MPA) 作为 HRT 一部分的女性, 出现更大程度的终末导管小叶单位增殖, 组织学数据同时支持此类统计数据。此外, 对猕猴进行手术绝经的实验数据表明, 雌激素和孕激素联用方案使乳房增殖和增生的程度高于单独使用雌激素的方案。在后续研究中, Cline 等发现 MPA 组合物和共轭雌激素 (即女性体内的标准 HRT 组合物) 可增加乳腺上皮的比例, 及猕猴乳房上皮细胞中的 Ki-67 染色 (增殖) 现象。

[0007] 孕激素通过与称为“配合基依赖转录因子” (R. M. Evans, Science, 240, 889, 1988), 属于结构性相关基因调节器类型的孕酮受体 (PR) 的相互影响而发挥作用。孕酮受体集群是细胞内受体集群 (包括雌激素受体 (ER)、雄激素受体 (AR)、糖皮质激素受体 (GR) 及盐皮质激素受体 (MR)) 的亚单位。细胞内孕酮受体 (PR) 对多数孕酮活动起支配作用。在人体内, 有两种不同的 PR 异构重整: PR-A 及 PR-B。两种 PR 均为激素激活转录因子, 激活时, 能够直接与转录调节基因组测序和其它转录因子发生相互作用。PR 转录功能取决于与孕酮的相互作用。处于生殖年龄的女性的孕酮响应组织, 在月经周期, PR 的表现水平有较大不同。

[0008] 业内已知的多种不同化合物, 能够对 PR 的孕激素依赖活性化产生影响。某些此

类化合物可阻滞所有组织内的孕酮作用。此类化合物称作纯拮抗剂, 应与选择性孕酮受体效应物 (SPRM) 进行区分, 后者可根据组织, 作为孕酮激动剂或孕酮拮抗剂。业内已知的 SPRM 实例包括抗孕激素 RU 486 和 ZK112993。

[0009] 对试验鼠进行辐射诱发癌肿后, 在 3 周内每日使用 RU 486 (米非司酮), 配合 7, 12, -二甲基苯并 (a) 蒽 (DMBA), 经观察, 可延迟肿瘤的发生。相对于已生成肿瘤的动物体内的对照物, RU 486 亦能够减少肿瘤的大小。但是, 减少肿瘤大小时, 血清 ER 和孕酮水平将随之提高。通过对患有新陈代谢乳腺癌的女性进行两次小型临床试验, 表明 RU486 对抑制疾病能起到一定作用, 虽然大型二期试验未能验证上述结论。在后期研究中, 观察到肾上腺机能不全的症状。由于 RU 486 具备极强的抗糖皮质激素活性, 并有可能提升血清 ER, 此类副作用较为常见, 因此不建议女性长期使用。

[0010] 统计数据表明, 2005 年诊断患有乳腺癌的 200,000 名美国女性, 在接受手术时, 有近 60% 未出现新陈代谢疾病, 虽然同一组中有近 30% 将最终复发。对于出现含雌激素受体 (ER) 和孕酮受体 (PR) 的原发性损害的女性, 主用通过使用抗-ER (如三苯氧胺或芳香化酶抑制剂) 的激素疗法进行治疗。近 70% ER 和 PR 呈阳性的病人对抑制剂有反应。虽然 ER 和 PR 的存在是出现反应并让 ER 引导 PR 的关键, 但是, 由于乳腺癌效应物可能发生与发展, 因此转而研发抗孕激素时, 投入的精力相对而言较少。因此, 使用对人体乳腺癌易起反应的孕酮, 在治疗激素响应乳腺癌时具备较大优势。根据国家癌症协会 (NCI) 于 1998 年发表的共同声明, 三苯氧胺有助于预防乳腺癌。此类疗法对防止接受 HRT 治疗的病人患上乳腺癌特别有效。正常情况下, 此类疗法可避免与多数抗孕激素化合物有关的高度抗糖皮质激素活性。

发明概要

[0011] 本发明涉及使用抗孕激素以治疗女性激素响应乳腺癌的方法。更准确地说, 本发明将具备较低亲和性的抗孕激素用于糖皮质激素受体, 并通过较低的雌激素 / 抗雌激素活性以抑制乳房组织的增殖。抗孕激素可以是纯粹的抗孕激素或选择性孕酮受体效应物 (SPRM), 但是, 抗孕激素必须对糖皮质激素受体具备较低的亲和性, 且用药剂量应足以抑制乳房组织的增殖。本发明的方法可用于防止接受激素治疗 (如绝经激素替代治疗) 的病人体内出现过量增殖并诱发乳腺癌。

[0012] 本发明的组合物也可用于治疗其它病症, 如子宫内膜过量增殖、精神抑郁、胆囊疾病、高血压症、葡萄糖耐量异常及凝固性过高的症状。

[0013] 图片概述

[0014] 图 1 用于说明未接受治疗 (C = 对照物), 使用 10 毫克 RU-486 (RU) 进行治疗, 使用 10 毫克孕酮 (P4) 进行治疗, 使用 20 毫克、10 毫克、2 毫克、1 毫克、0.1 毫克 CDB-4124 (4124) 进行治疗, 及使用浓度相同的 CDB-4124+10 毫克孕酮 (4124+P4) 进行治疗时, 实验鼠的肿瘤生长特征。经过 28 天的观察期, 截面积增加至少 33% 的肿瘤, 可视为肿瘤增殖 (黑框)。对于在相同时期内, 面积减少 33% 的肿瘤, 可视为肿瘤消退 (白框)。其它可视为静态 (灰框)。图表显示出现肿瘤的每个治疗组的每种生长特征的百分比。

[0015] 图 2 用于说明浓度为 1 微米、2 微米、3 微米、4 微米及 5 微米的 CDB-4124, 对专为表达高水平芳香化酶 (T47D_{芳香} 细胞) 而设计的 T47D (人体乳腺癌) 细胞的影响。未处理细

胞用作对照物。图表说明使用 CDB-4124 进行治疗,能够以剂量依赖方式,抑制 T47D_{芳烃} 细胞的增殖。

[0016] 图 3 用于说明 50 微米、75 微米、100 微米,或 150 微米 DL-氨基乙哌啶酮 (AGM) 在结合 1 纳米睾丸激素的情况下,对 T47D_{芳烃} 细胞的影响。

[0017] 图 4 用于说明 (1) 100 微米 DL-氨基乙哌啶酮 (AGM)+1 微米

[0018] CDB-4124 ;(2) 100 微米 DL-氨基乙哌啶酮 (AGM)+2 微米 CDB-4124 ;(3) 100 微米 DL-氨基乙哌啶酮 (AGM)+3 微米 CDB-4124 ;或 (4) 100 微米 DL-氨基乙哌啶酮 (AGM)+4 微米 CDB-4124,在使用 1 纳米睾丸激素的情况下,对 T47D_{芳烃} 细胞的影响。图表说明 AGM 和 CDB-4124 的组合物,对抑制乳腺癌细胞表达芳香化酶的增殖所起到的增效作用。使用 4 微米 CDB-4124 和 100 微米 AGM 组合物,可抑制近 70% 的细胞增殖,而分别使用浓度一样的相同化合物,只能抑制低于 30% 的细胞增殖。

[0019] 本发明的详细说明

[0020] “有效剂量”指治疗特定病症所需组合物有效成分的数量。

[0021] “选择性孕激素受体调节剂”是指以组织特异性的方式影响孕激素受体功能的化合物。在某些组织(如,乳腺组织)中,该等化合物作为孕激素受体拮抗剂,而在其它组织(如,子宫)中,则作为孕激素受体激动剂。

[0022] 本文中的“治疗”,指对生长停滞衰竭、细胞凋亡或增殖衰老相关的病症或疾病进行的任何治疗,并包括(但不限于)抑制病症或疾病,阻滞病症或疾病的发展;缓解病症或疾病,例如,导致病症或疾病的消退;或缓解由疾病或病症造成的病况,缓解疾病或病症的症状。

[0023] “预防”与生长停滞衰竭、细胞凋亡或增殖衰老有关的病症或疾病,指未发病时,如何防止病症或病情的发作,或已出现病症或疾病时,如何防止病症或疾病的进一步发展。例如,本发明的组合物可用于预防肿瘤复发。由于显微镜可见的肿瘤细胞的残余组或簇随之扩大为临床可见肿瘤,因此可能发生肿瘤复发。

[0024] “孕酮促效剂”指与孕酮受体结合并模仿天然激素作用的化合物。

[0025] “孕酮拮抗剂”指与孕酮受体结合并抑制孕酮作用的化合物。

[0026] 本文所述与子宫内膜组织增殖有关的“抑制”,指相对于相同病况下未经治疗的子宫内膜组织的子宫内膜组织的有丝分裂增殖由于服用孕酮拮抗剂而得到抑制,并不同于细胞死亡(如细胞凋亡)。孕酮拮抗剂对抑制子宫内膜有丝分裂增殖的作用,可在子宫细胞系(举例来说)中进行测试,或(举例来说)通过在使用孕酮拮抗剂进行治疗的细胞中加入溴脱氧尿苷(BrdU),并对比对照(未经治疗的)细胞。

[0027] 本文所述女性身体中的激素水平“无明显减少”,指在服用发明药物期间,激素水平维持在正常范围内。因此,只要激素水平维持在正常范围内,则可以认为激素水平可能出现某种程度的减低。

[0028] 本文所述的女性身体中的激素水平“无明显增加”,指在服用发明药物期间,激素水平维持在正常范围内。因此,只要激素水平维持在正常范围内,则可以认为激素水平可能出现某种程度的提升。

[0029] 本发明涉及使用含一种或多种抗孕激素的组合物,通过有效剂量抑制乳腺癌组织的增殖,以治疗乳腺癌的方法。本方法源自特定抗孕激素能够有效诱发乳腺癌组织中的细

胞凋亡并抑制乳腺癌组织增殖的意外发现,因此,此类化合物不同于其它抗孕激素(如 RU 486),后者能够诱发乳腺癌组织中的细胞凋亡,但却无法抑制相同组织中的增殖。因此,本发明的抗孕激素对减少现有肿瘤的生长,并防止乳房组织中形成新的肿瘤,效果较为明显。抗孕激素可以是纯粹的抗孕激素,或者是特定的孕酮受体效应物(SPRM),但抗孕激素必须具备较低的糖皮质激素活性。优选情况下,抗孕激素应具备较低的雌激素/抗雌激素活性,以便在使用抗孕激素后,病人体内能够保持充足的雌激素水平。

[0030] 本发明的一方面,是让患有乳腺癌的病人使用含一种或多种抗孕激素的有效剂量的本发明组合物,以治疗乳腺癌。抗孕激素的剂量应能够有效抑制乳腺癌组织的增殖。

[0031] 在相关方面,本发明提供使用抗孕激素以抑制乳腺癌细胞增殖的方法。乳腺癌细胞可以是哺乳动物乳腺癌细胞,如人体乳腺癌细胞。乳腺癌细胞也可能对抗雌激素(如三苯氧胺)有抗力。

[0032] 本发明的另一方面,是让患有乳腺癌,且有一个或多个肿瘤对抗雌激素治疗有抗力的病人,使用含一种或多种抗孕激素的有效剂量的本发明组合物,以治疗乳腺癌。例如,本发明的组合物对治疗病人体内的抗三苯氧胺乳腺癌特别有效。

[0033] 本发明的另一方面,是使用含一种或多种可有效抑制乳腺癌组织增殖的抗孕激素的本发明组合物,作为治疗乳腺癌的联合治疗方案之一部分。在此方面,本发明的组合物可在使用任何治疗剂以直接治疗乳腺癌之前、期间或之后使用。例如,本发明的抗孕激素可用于结合抗雌激素、抗雄激素、选择性雌激素受体效应物(如三苯氧胺)、芳香化酶抑制剂(如阿那曲唑、来曲唑、依西美坦或 DL-氨基乙哌啶酮)、化疗剂(如蒽环类、紫杉烷类、烷化剂、甲氨蝶呤、长春碱、长春新碱、顺铂)或上述化合物的任何组合物。本发明的组合物可配合其它活化剂(如抗雌激素、抗雄激素、芳香化酶抑制剂)以抑制病人体内的乳腺癌细胞增殖。在优选实施例中,本发明的组合物结合一种或多种芳香化酶抑制剂,以治疗女性患者的乳腺癌。本发明同时考虑到含有效剂量抗孕激素和芳香化酶抑制剂的组合物。优选组合物含 CDB-4124 以及从包括阿那曲唑、来曲唑、依西美坦或 DL-氨基乙哌啶酮的一组化合物中选择的芳香化酶抑制剂。

[0034] 本发明的另一方面,是让接受激素治疗的女性使用含一种或多种可有效抑制乳腺癌组织增殖的抗孕激素的本发明组合物,以防止形成乳腺癌。例如,本发明的组合物可用于接受激素替代治疗的女性,以防止形成乳腺癌。本发明的组合物也可用于接受激素治疗的女性,以防止形成乳腺癌。

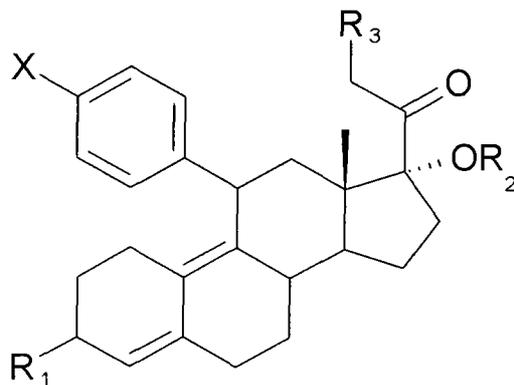
[0035] 本发明的化合物适合接受激素阻滞治疗的乳腺癌病人长期使用,因为化合物仅有较低的糖皮质激素受体结合活性,因此,化合物不会与糖皮质激素受体的机能相抵触。因此,使用化合物可降低副作用,如情绪波动、精神疲劳及体重减轻,当使用对糖皮质激素受体具有较高亲和性的抗孕激素时,上述症状较为常见。优选情况下,本发明的化合物同时具有较低的(或基本上没有)雌激素、抗雌激素和抗雄激素活性。在此方面,优选抗孕激素为 CDB-4124 和 CDB-4059,这两种化合物均具有较低的抗糖皮质激素活性,并已证实在至少 6 个月的用药期间,可让女性体内的雌激素水平保持在正常范围内。

[0036] 发明方法可能包括在至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31 天或更多天的用药期间,使用含有效剂量的抗孕激素的组合物。组合物也可能用在至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 或更多个月的用

药期间。组合物也可能用在至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多年的用药期间。在用药期间,可每日或定期(如每隔一天、隔月,依此类推)使用组合物。组合物也可间断使用。例如,在 1、2、3、4、5 或更多个月的用药期间(诸如此类)之后,并在停止用药一段时间后,可在 1、2、3、4、5 或更多个月的用药期间继续使用组合物。

[0037] 任何具备上述化合物特性的已知抗孕激素,均可由技术人员用于本发明。特别有用的化合物包括美国专利号 6,861,415 中列出的化合物(以引用的方式全部列入本文中),此类化合物为使用通用分子式的 21- 代用类 19- 去甲孕甾烷类:

[0038]



[0039] 其中:

[0040] X 可能是,例如烷基、烯基、炔基、氢、卤、单烷基氨基或二烷基氨基,例如 N,N- 二甲基乙胺;

[0041] R₁ 可能是,例如 H、OH 或 NO- 甲基;

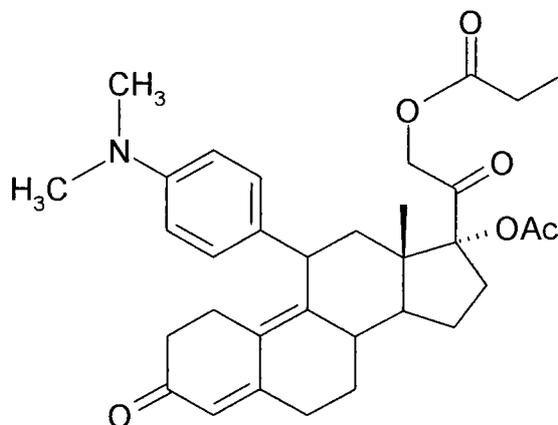
[0042] R₂ 可能是,例如氢或醋酸基;而

[0043] R₃ 可能是,例如甲氧基、甲酸基、醋酸基、酸基、S- 炔氧基、乙酰亚硫酸基、甘氨酸酯、乙烯基醚、乙酰氧甲基、碳酸甲酯、卤化物、甲基、羟基,和乙氧基。

[0044] 21- 替代类 19- 去甲孕甾烷类的实例包括(但不限于)下列 24 种化合物。

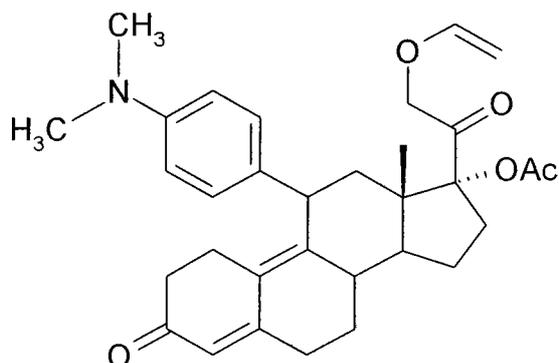
[0045] 1. CDB-4247 (21- 丙酸基 -17 α - 醋酸基 -11 β - (4N, N- 二甲氨基苯基) -19- 去甲孕甾 -4,9- 二烯 -3,20- 二酮) 及以下结构分子式:

[0046]



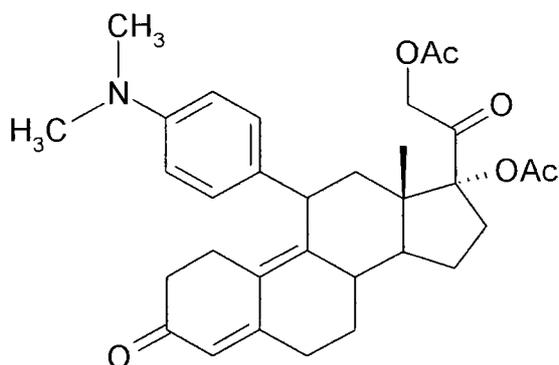
[0047] 2. CDB-4361 (21- 乙烯基醚 -17 α - 醋酸基 -11 β - (4N, N- 二甲氨基苯基) -19- 去甲孕甾 -4,9- 二烯 -3,20- 二酮) 及以下结构分子式:

[0048]



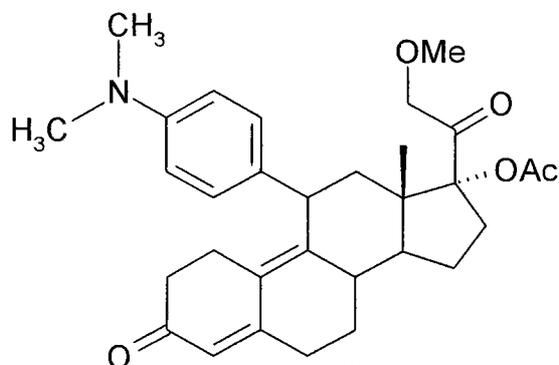
[0049] 3. CDB-4059 (21- 醋酸基 -17 α - 醋酸基 -11 β - (4N, N- 二甲氨基苯基) -19- 去甲孕甾 -4,9- 二烯 -3,20- 二酮) 及以下结构分子式:

[0050]



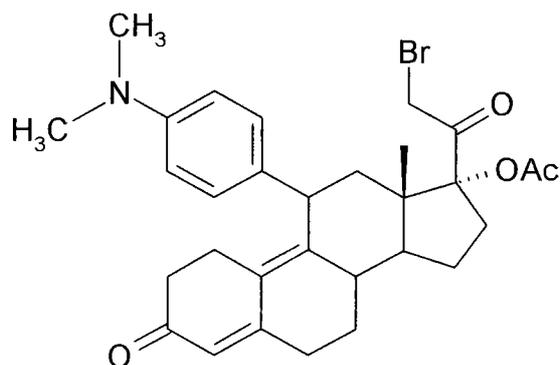
[0051] 4. CDB-4124 (21- 甲氧基 -17 α - 醋酸基 -11 β - (4N, N- 二甲氨基苯基) -19- 去甲孕甾 -4,9- 二烯 -3,20- 二酮) 及以下结构分子式:

[0052]



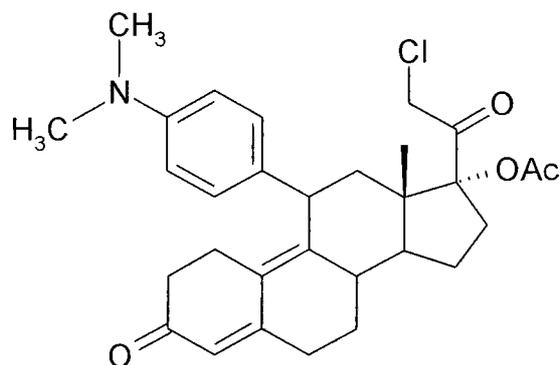
[0053] 5. CDB-4031 (21- 溴 -17 α - 醋酸基 -11 β - (4N, N- 二甲氨基苯基) -19- 去甲孕甾 -4,9- 二烯 -3,20- 二酮) 及以下结构分子式:

[0054]



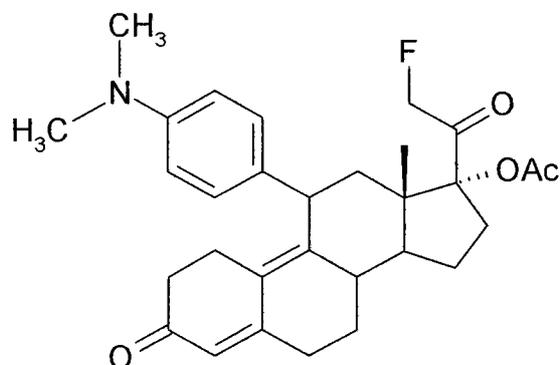
[0055] 6. CDB-3876 (21- 氯 -17 α - 醋酸基 -11 β -(4N, N- 二甲氨基苯基)-19- 去甲孕甾 -4,9- 二烯 -3,20- 二酮) 及以下结构分子式:

[0056]



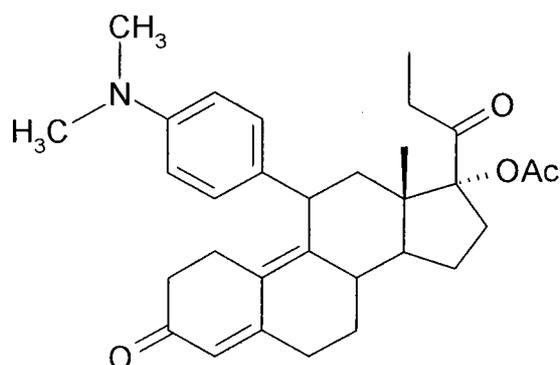
[0057] 7. CDB-4058 (21- 氟 -17 α - 醋酸基 -11 β -(4N, N- 二甲氨基苯基)-19- 去甲孕甾 -4,9- 二烯 -3,20- 二酮) 及以下结构分子式:

[0058]



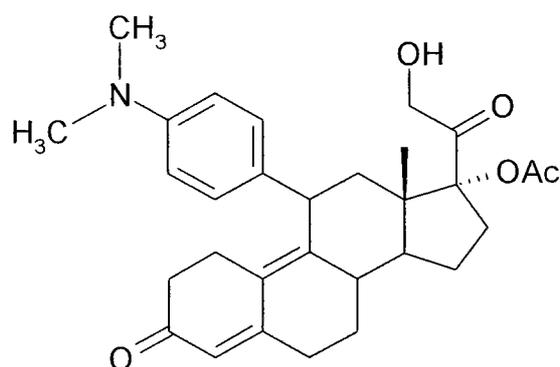
[0059] 8. CDB-4030 (21- 甲基 -17 α - 醋酸基 -11 β -(4N, N- 二甲氨基苯基)-19- 去甲孕甾 -4,9- 二烯 -3,20- 二酮) 及以下结构分子式:

[0060]



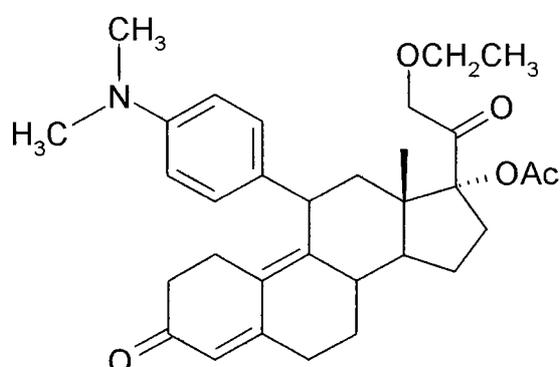
[0061] 9. CDB-4152 (21-羟基-17 α -醋酸基-11 β -(4N,N-二甲氨基苯基)-19-去甲孕甾-4,9-二烯-3,20-二酮) 及以下结构分子式:

[0062]



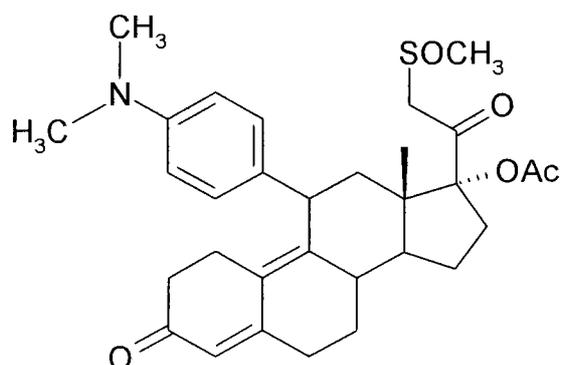
[0063] 10. CDB-4167 (21-乙氧基-17 α -醋酸基-11 β -(4N,N-二甲氨基苯基)-19-去甲孕甾-4,9-二烯-3,20-二酮) 及以下结构分子式:

[0064]



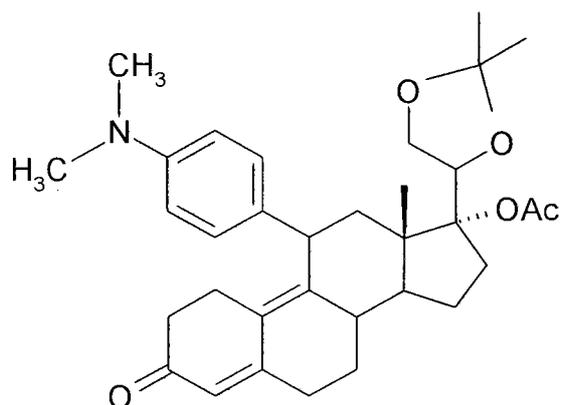
[0065] 11. CDB-4101 (21-甲氧基-17 α -醋酸基-11 β -(4N,N-二甲氨基苯基)-19-去甲孕甾-4,9-二烯-3,20-二酮) 及以下结构分子式:

[0066]



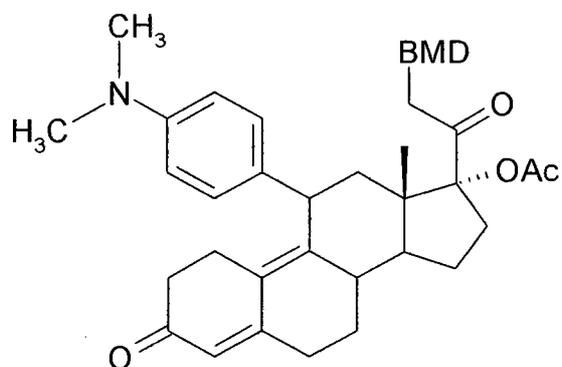
[0067] 12. CDB-4110 (21-丙酮化合物-17 α -醋酸基-11 β -(4N,N-二甲氨基苯基)-19-去甲孕甾-4,9-二烯-3,20-二酮) 及以下结构分子式:

[0068]



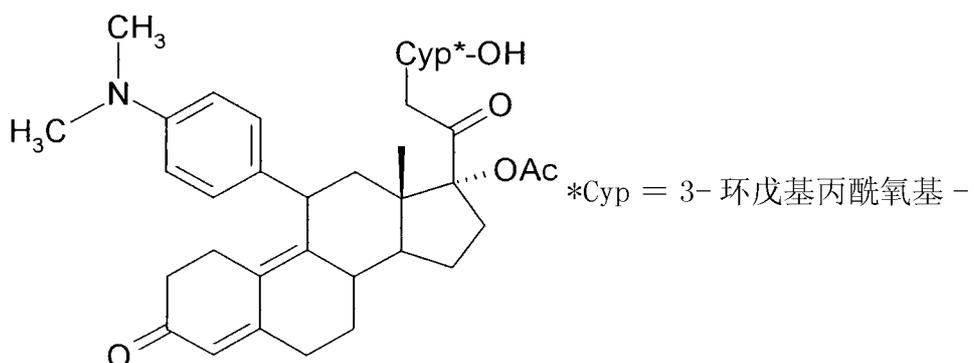
[0069] 13. CDB-4111 (21-BMD-17 α -醋酸基-11 β -(4N,N-二甲氨基苯基)-19-去甲孕甾-4,9-二烯-3,20-二酮) 及以下结构分子式:

[0070]



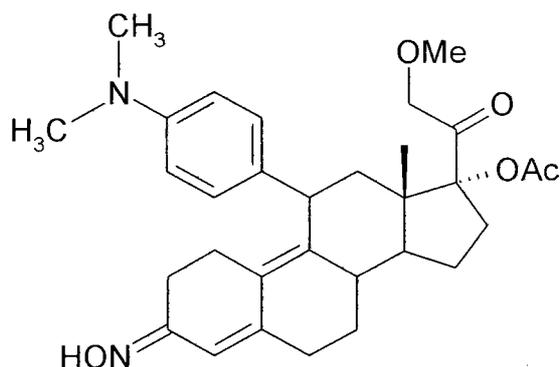
[0071] 14. CDB-4125 (21-(Cyp*-羟基)-17 α -醋酸基-11 β -(4N,N-二甲氨基苯基)-19-去甲孕甾-4,9-二烯-3,20-二酮) 及以下结构分子式:

[0072]



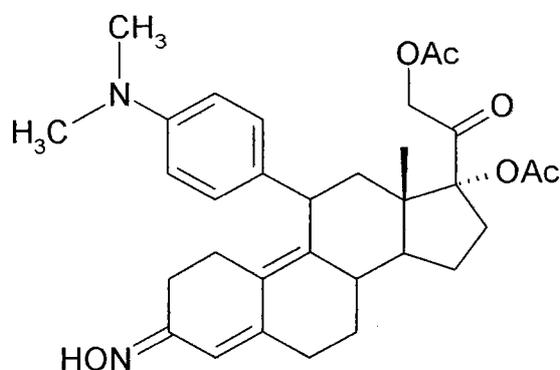
[0073] 15. CDB-4205 (3-羟氨酸-21-甲氧基-17 α -醋酸基-11 β -(4N, N-二甲氨基苯基)-19-去甲孕甾-4,9-二烯-3,20-二酮) 及以下结构分子式:

[0074]



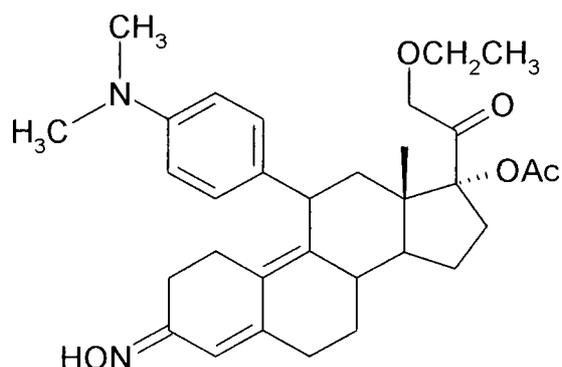
[0075] 16. CDB-4206 (3-羟氨酸-21-醋酸基-17 α -醋酸基-11 β -(4N, N-二甲氨基苯基)-19-去甲孕甾-4,9-二烯-3,20-二酮) 及以下结构分子式:

[0076]



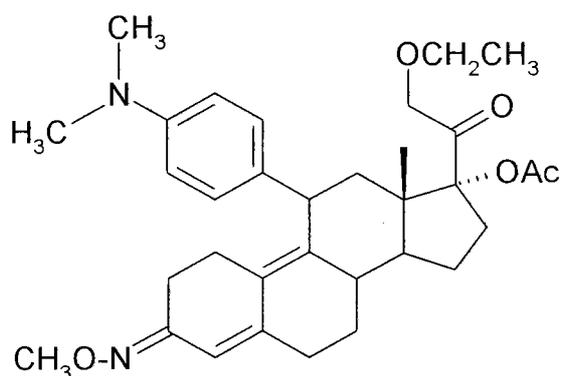
[0077] 17. CDB-4226 (3-羟氨酸-21-乙氧基-17 α -醋酸基-11 β -(4N, N-二甲氨基苯基)-19-去甲孕甾-4,9-二烯-3,20-二酮) 及以下结构分子式:

[0078]



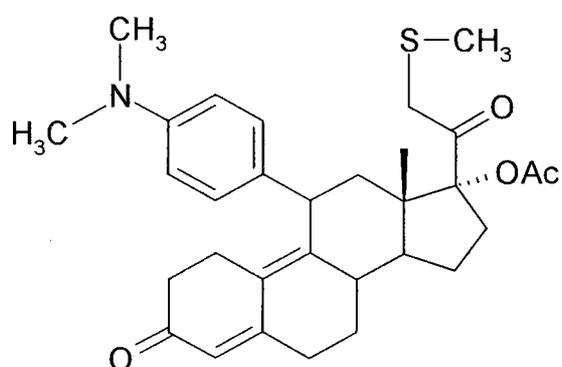
[0079] 18. CDB-4262 (3- 甲氧基氨基 -21- 乙氧基 -17 α - 醋酸基 -11 β - (4N,N- 二甲氨基苯基) -19- 去甲孕甾 -4,9- 二烯 -3,20- 二酮) 及以下结构分子式:

[0080]



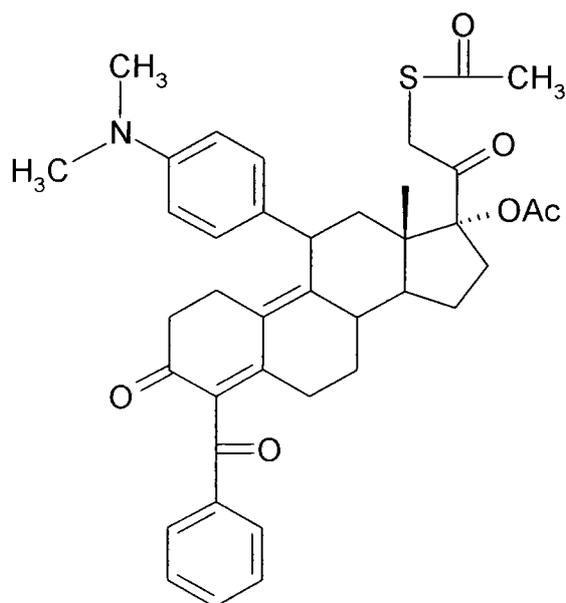
[0081] 19. CDB-4223 (21- 甲硫基 -17 α - 醋酸基 -11 β - (4N,N- 二甲氨基苯基) -19- 去甲孕甾 -4,9- 二烯 -3,20- 二酮) 及以下结构分子式:

[0082]



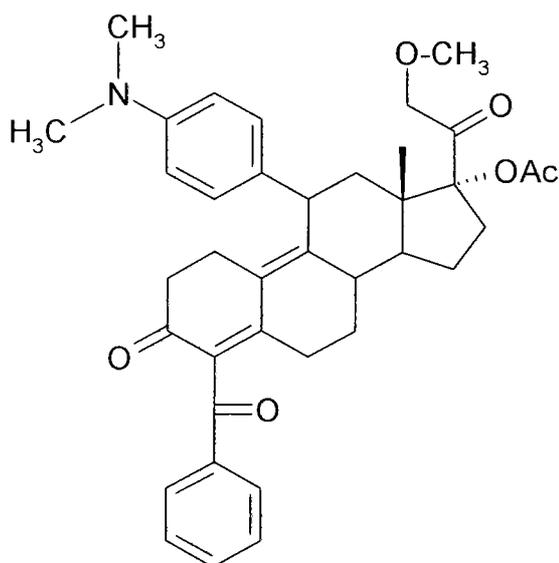
[0083] 20. CDB-4119 (4- 二苯乙醇酮 -21- 乙酰巯基 -17 α - 醋酸基 -11 β - (4N,N- 二甲氨基苯基) -19- 去甲孕甾 -4,9- 二烯 -3,20- 二酮) 及以下结构分子式:

[0084]



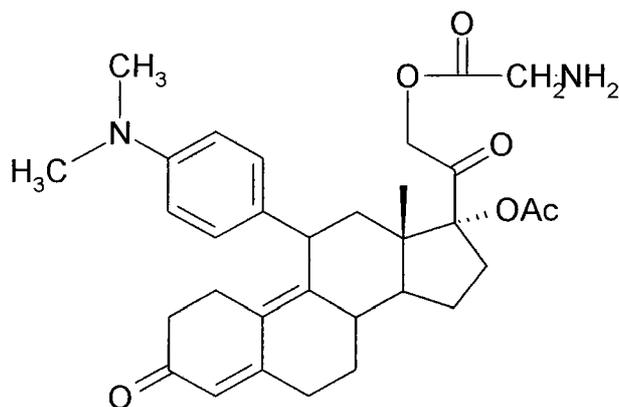
[0085] 21. CDB-4239(4-二苯乙醇酮-21-甲氧基-17 α -醋酸基-11 β -(4N,N-二甲氨基苯基)-19-去甲孕甾-4,9-二烯-3,20-二酮)及以下结构分子式:

[0086]



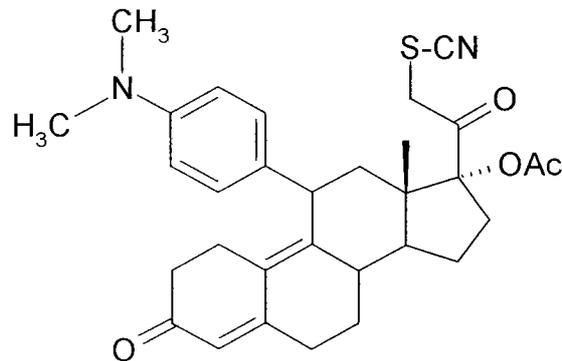
[0087] 22. CDB-4306(21-甘氨酸酯-17 α -醋酸基-11 β -(4N,N-二甲氨基苯基)-19-去甲孕甾-4,9-二烯-3,20-二酮)及以下结构分子式:

[0088]



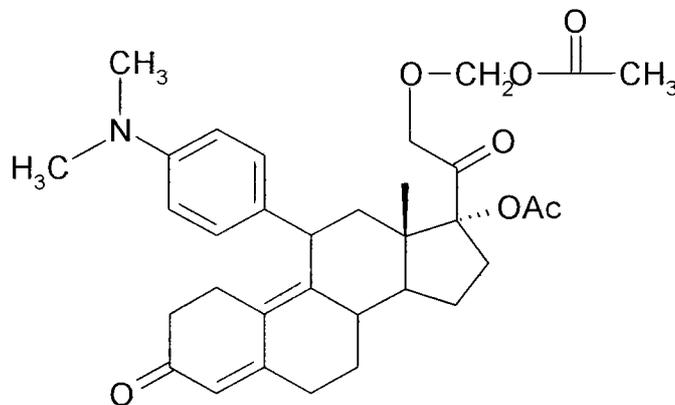
[0089] 23. CDB-4352(21- 氰基硫 -17 α - 醋酸基 -11 β - (4N, N- 二甲氨基苯基)-19 去甲孕甾 -4,9- 二烯 -3,20- 二酮) 及以下结构分子式:

[0090]



[0091] 24. CDB-4362(21- 甲氧基乙酰 -17 α - 醋酸基 -11 β - (4N, N- 二甲氨基苯基)-19- 去甲孕甾 -4,9- 二烯 -3,20- 二酮) 及以下结构分子式:

[0092]



[0093] 11 β - 上述 24 种化合物的去甲基衍生物 (即, X 为 N- 甲基氨基酸) 在实施本发明时亦特别有用。在此情况下, CDB-4453(21- 甲氧基 -17 α - 醋酸基 -11 β - (4N, N- 二甲氨基苯异氰酸酯)-19- 去甲孕甾 -4,9- 二烯 -3,20- 二酮), CDB-4124 的去甲基衍生物, 具备比亲体更低的抗糖皮质激素活性。Attardi 等, 2002 年, Mol. Cell. Endocrin. 188 :111-123, 其内容以引用的方式列入本文中。

[0094] 虽然应优先选用使用上述通用分子式的化合物及其去甲基衍生物, 但任何抗孕激素均可用于实施本发明, 只要抗孕激素能抑制乳腺癌细胞组织扩散。优选情况下, 抗孕激素同样具有较低的抗糖皮质激素活性。优选情况下, 抗孕激素具有最低的雌激素和抗雌激素活性。

[0095] 对发明可能有用的抗孕激素包括 (但不限于) 选择性黄体酮受体调节剂 (asoprisnil) (苯甲醛, 4-[(11 β , 17 β)-17- 甲氧基 -17-(甲氧基甲)-3- 氧代雌 -4,9- 二亚乙基三胺 -11- 基]-1-(E)- 肟; J867), 其代谢物 J912(4-[17 β - 羟基 -17 α - (甲氧基甲基)-3- 氧代雌 -4,9- 二亚乙基三胺 -11 β - 基] 苯甲醛 -(1E)- 肟), 及 DE 4332283 和 DE 4332284 中所述的其它化合物; CDB-2914(17 α - 醋酸基 -11 β - (4-N, N- 二甲氨基苯基)-19- 去甲孕甾 -4,9- 二亚乙基三胺 -3,20- 二酮) 及 Stratton 等, 2000 年, Hu. Reprod. 15 :1092-1099 中所述的其它化合物; JNJ-1250132 及 Allan 等, 2006 年, Steroids 71 :949-954 中所述的其它化合物; Zhi 等, 1998 年, J. Med. Chem. 41 :291-302 中

所述的 5-芳基-1,2-二氢化色烯并[3,4-f]喹啉;美国专利号:6,509,334、6,566,358 及 6,713,478 至 Zhang 等中所述的 1,4-二氢苯并恶唑[d][1,3]恶嗪-2-酮;美国专利号 6,391,907 至 Fensome 等中所述的 1,3-二氢吡啶-2-酮;美国专利号 6,417,214 至 Ulrich 等中所述的 2,3-二氢-1H-吡啶;美国专利号 6,380,235 至 Zhang 等中所述的苯并咪唑酮及相似物;美国专利号 6,339,098 至 Collins 等中所述的 2,1-苯并咪唑酮 2,2-二氧化物;美国专利号:6,306,851 和 6,441,019 至 Santilli 等中所述的环氨基甲酸酯及环酰胺;美国专利号 6,369,056 至 Zhang 等中所述的环尿和环酰胺衍生物;以及美国专利号 6,358,948 至 Zhang 等中所述的喹啉酮及苯并恶嗪衍生物。

[0096] 可用于发明的其它抗孕激素包括(但不限于)(6 α ,11 β ,17 β)-11-(4-二甲氨基苯基)-6-甲基-4',5'-二氢螺环[雌甾-4,9-二烯-17,2'(3'H)-呋喃]-3-酮(ORG-31710)及美国专利号 4,871,724 中所述的其它化合物;(11 β ,17 α)-11-(4-乙酰苯基)-17,23-环氧树脂-19,24-二去甲基胆甾-4,9,20-三亚乙基四胺-3-酮(ORG-33628);(7 β ,11 β ,17 β)-11-(4-二甲氨基苯基-7-甲基)-4',5'-二氢螺环[雌甾-4,9-二烯-17,2'(3'H)-呋喃]-3-酮(ORG-31806)及美国专利号 4,921,845 中所述的其它化合物;ZK-112993 及 Michna 等,1992 年, J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 41:339-348;ORG-31376;ORG-33245;ORG-31167;ORG-31343;RU-2992;RU-1479;RU-25056;RU-49295;RU-46556;RU-26819;LG1127;LG120753;LG120830;LG1447;LG121046;CGP-19984A;RTI-3021-012;

[0097] RTI-3021-022;RTI-3021-020;RWJ-25333;ZK-136796;ZK-114043;ZK-230211;ZK-136798;ZK-98229;ZK-98734;和 ZK-137316 中所述的其它化合物。

[0098] 此外,可用于本发明的其它抗孕激素包括,但不限于,美国专利号:4,386,085、4,447,424、4,519,946 及 4,634,695 中所述的其它化合物;Jiang 等,2006 年, Steroids 71:949-954 中所述的磷系 17 β -侧链米芬普利斯顿类似物;奥那司酮(11 β -[p-(二甲氨基)苯基]-17 α -羟基-17-(3-羟丙基)-13 α -雌甾-4,9-二烯-3-酮)及美国专利号 4,780,461 中所述的其它化合物;利洛司酮(((Z)-11 β -[(4-二甲氨基)苯基]-17- β -羟基-17 α -(3-羟基-1-丙烯基)雌甾-4,9-二烯-3-酮)及美国专利号 4,609,651 中所述的其它化合物;11 β -替代物 19-去甲甾类,如 Belagner 等,1981 年, Steroids 37:361-382 中所述的 11 β -(4-甲氧基苯基)-17 β -羟基-17 α -乙炔基-4,9-雌甾二烯-3-酮;11 β -芳基-4-雌甾,如美国专利号 5,728,689 中所述的 (Z)-11 β -[(4-二甲氨基)苯基]-17 β -羟基-17 α -(3-羟基-1-丙烯基)雌-4-甾-3-酮;11 β -芳基-雌甾,如美国专利号 5,843,933 和 5,843,931 中所述的 11-芳基-雌甾衍生物;11-苯甲醛肟-雌甾二烯衍生物,如美国专利号 5,693,628 中所述的 4-[17 β -甲氧基-17 α -(甲氧基甲基)-3-氧化雌-4,9-二烯-11 β -基]苯甲醛-1-(E)-肟;11-苯甲醛肟-17 β -甲氧基-17 α -甲氧基甲基-雌甾二烯衍生物,如美国专利号 5,576,310 中所述的 4-[17 β -甲氧基-17 α -(甲氧基甲基)-3-氧化雌-4,9-二烯-11 β -基]苯甲醛-1-(E)-[O-(乙胺基)羰基]肟;S-替代物 11 β -苯甲醛肟-雌甾-4,9-二烯-碳酸巯基酯酶,如 W099/45023 中所述的 4-[17 β -甲氧基-17 α -(甲氧基甲基)-3-氧化雌-4,9-二烯-11 β -基]苯甲醛-1-(E)-[O-(乙硫基)羰基]肟;甾类酯,如 DE 19652408、DE 4434488、DE 4216003、DE 4216004 及 W0 98/24803 中所述的 (Z)-6'-(4-苯腈)-9,11 α -二氢-17 β -羟

基-17 α -[4-(1-氧化-3-甲基丁氧基)-1-丁烯基]4'-H-萘并[3',2',1';10,9,11]雌-4-甾-3-酮;氟化17 α -烷基链甾族化合物,如WO 98/34947中所述的11 β -(4-乙酰苯基)-17 β -羟基-17 α -(1,1,2,2,2-氟乙基乙烯基醚)雌甾-4,9-二烯-3-酮;17-螺吡喃-3'-甲叉基甾族化合物,如美国专利号5,292,878中所述的11 β -(4-乙酰苯基)-19,24-二去甲基-17,23-环氧-17 α -胆甾-4,9,20-三亚乙基四胺-3-酮;(Z)-11 β ,19-[4-(3-磺胺吡啶)-邻-亚苯基]-17 β -羟基-17 α -[3-羟基-1-丙烯基]-4-雄甾烯-3-酮,及美国专利号5,439,913中所述的其它化合物;13-烃基-11- β -苯基甾烷,如美国专利号5,446,036中所述的11 β -[4-(1-甲基乙烯基)苯基]-17 α -羟基-17 β -(3-羟丙基)-13 α -雌甾-4,9-二烯-3-酮;11-芳基甾族化合物,如美国专利号4,921,845中所述的4',5'-二氢-11 β -[4-(二甲基氨基)苯基]-6 β -甲基螺[雌甾-4,9-二烯-17 β ,2'(3'H)-咪喃]-3-酮;如美国专利号4,829,060、4,814,327及5,089,488中所述的11- β -芳基-雌甾二烯;美国专利号5,739,125、5,407,928及5,273,971中所述的11- β -芳基-4,9雌烯及11- β -芳基-13-烃基-4,9-雌烯;EP 289073中所述的11- β -芳基-6-烃基(或烯基或炔基)甾族化合物;美国专利号5,093,507中所述的10- β ,11- β -桥甾族化合物;美国专利号5,244,886中所述的11- β -芳基-14- β -甾族化合物;美国专利号5,095,129、5,446,178、5,478,956及5,232,915中所述的19,11- β -桥甾族化合物;美国专利号5,684,151中所述的1-芳基磺酰基、芳甲酰基及1-芳基膦酰基-3-苯基-1,4,5,6-四氢吡嗪;美国专利号5,753,655中所述的1-芳基磺酰基、芳甲酰基及芳基硫代羰基吡啶衍生物;美国专利号5,688,808、5,693,646、5,693,647、5,696,127、5,696,130及5,696,133中所述的1,2-二氢-[1,2-g]喹啉衍生物及1,2-二氢-苯并吡喃-[3,4-f]喹啉衍生物;Kang等,2007年,Bioorg. Med. Chem. Lett. 15:907-910中所述的源出(8S,13S,14R)-7-乙二酸-雌甾-4,9-二烯-3,17-二酮1的乙二酸-甾族化合物6;及Kang等,2007年,Bioorg. Med. Chem. Lett. 17:2531-2534中所述的7-乙二酸-甾族化合物4。

[0099] 在优选实施例中,抗孕激素为CDB-4059(21-甲氧基-17 α -醋酸基-11 β -(4N,N-二甲基氨基苯基)-19-去甲孕甾-4,9-二烯-3,20-二酮)。

[0100] 在特定的优选实施例中,抗孕激素为CDB-4124(21-甲氧基-17 α -醋酸基-11 β -(4N,N-二甲基氨基苯基)-19-去甲孕甾-4,9-二烯-3,20-二酮)。

[0101] 优选情况下,抗孕激素可将乳腺癌细胞系中每百个细胞的增殖细胞数量至少减少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。乳腺癌细胞系可能对三苯氧胺(如MCF-7)敏感,或对三苯氧胺(如LY-2)有抗力。

[0102] 在另一个实施例中,本发明提供用于确认化合物是否具备选择性孕酮受体结合活性的方法。此类方法包括受体结合和体内生物检定,如抗-McGinty、抗-Clauberg、糖皮质激素、雌激素、雄激素、抗糖皮质激素(AG)、抗雌激素、抗雄激素活性,以及性交后和抗排卵活性,其中,本发明的化合物作为参考。

[0103] 在另一个实施例中,本发明表明,通过对潜在抗孕激素进行分析,可了解它们对人体细胞内转录活性的影响。当本发明中所列的抗孕激素用作参考时,此分析可提供以下相关信息:(1) 候选化合物与孕酮受体的相互作用,(2) 激活孕酮受体与其它转录因素的相互

影响,及(3)孕酮应答元件(PRE)转录合成物的激活。在此类实验中,当PRE-依赖启动子进入HeLa、HepG2或T47D细胞时,质粒表达人体PR-B异构重整(hPR-B)能够与相关领域技术人员所熟知的任何报告体发生共转染。报告体可能包括(但不限于)荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、绿色荧光蛋白质、红色荧光蛋白质或黄色荧光蛋白质。转染后,使用测试化合物或本应用抗孕激素所列化合物的其中一种,作为阳性对照物。治疗后,检定细胞以报告表达。

[0104] 在另一个实施例中,本发明表明,通过对预期抗孕激素进行测试,可了解它们对抑制人体淋巴细胞系CEM-7中的地塞米松引导细胞死亡的能力,并与本规格标准中所列抗孕激素的效果进行对比。在此类实验中,可添加一定浓度的地塞米松,以有效杀死细胞。然后,使用RU486、本发明的抗孕激素之一,或浓度在 10^{-6} 和 10^{-8} M之间的测试化合物,以处理细胞。

[0105] 依据本发明进行使用的抗孕激素化合物,可使用业内公认的合成化学技术(如美国专利号6,861,415中所列的技术)进行合成。需要注意的是,在反应条件下,特定功能团可能与其它反应体或反应剂相抵触,因此可能需要采取临时防护措施。保护基的使用如“有机合成中的保护基”的第2版,T. W. Greene&P. G. M. Wutz, Wiley-Interscience(1991)中所述。

[0106] 在一个实施例中,发明组合物包括一种或多种抗孕激素,或药学上允许的盐。取决于处理条件,获得的盐化合物可能是中性或盐形态。盐形态包括水合及其它溶剂化物,以及多晶型物。此类最终产品的游离基和盐,均可依据发明进行使用。

[0107] 在某种意义上,使用基础因子(如碱)或通过离子交换作用,可将酸加成盐转化为游离基。获得的游离基也可以和有机或无机酸共同形成盐。

[0108] 在配置酸加成盐的过程中,最好使用可形成药学上允许的盐形态的酸剂。例如,此类酸剂可以是盐酸、硫酸、磷酸、硝酸、脂族酸、环酸或磺酸,如蚁酸、醋酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、葡萄糖醛酸、延胡索酸、马来酸、羟基丙二酸、丙酮酸、天门冬氨酸、谷氨酸、对羟基苯甲酸、扑酸、乙基磺酸、羟乙基磺酸、苯乙酸、扁桃酸、卤素和苯磺酸、甲苯磺酸、粘酸、半乳糖醛酸或萘磺酸。依据发明,可使用所有多晶形物。

[0109] 依据发明也可使用基加成盐,并将游离酸形态与剂量充分的选定基剂接触进行制备,形成传统意义上的盐。通过让盐形态接触酸,可再生游离酸形态,并离析传统意义上的游离酸。药学上允许的基加成盐可通过金属或胺形成,如碱和碱土金属或有机胺。例如,作为阳离子的金属可以是钠、钾、钙、镁等。一些适用的胺为氨基酸,如赖氨酸、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、N-甲基葡萄糖胺等。

[0110] 本发明的组合物能够以剂量单位或适合于口服、肠胃外给药、透皮给药、直肠给药、穿粘膜给药或局部给药的方式进行制备。肠胃外给药包括(但不限于)静脉注射、动脉注射、腹膜内注射、皮下注射、肌内注射、鞘内注射、关节内注射、脑池内注射及心室内注射。

[0111] 本文中的“口服”或“口服给药”,包括通过任何形式,让受试者服用治疗剂或其组合物,其中,药剂或组合物应置于受试者口中,无论药剂或组合物是否被吞入。因此,“口服”包括口腔和舌下以及食管(如吸入)给药。

[0112] 同样,在另一个实施例中,本发明的组合物作为直肠栓进行配制,并可能含栓剂基质,包括(但不限于)可可脂或脂肪酸丙酯。

[0113] 本发明的组合物也可配制为吸入物,并以包括(但不限于)液剂、悬浮液,或乳剂

的形式,作为干燥粉进行给药,或以使用压缩气体(如一氟二氯甲烷或三氯氟甲烷)的气雾剂的形式。

[0114] 本发明的组合物也可针对透皮给药形式进行配制,例如,可作为乳膏剂、软膏剂、药水、膏剂、凝胶、医用硬膏剂、贴片,或薄膜。此类组合物可能包括任何适用的赋形剂,如透皮吸收促进剂等。

[0115] 本发明的组合物也可针对肠胃外给药进行配制,包括(但不限于)针剂或持续输液。注射制剂可能使用悬浮物、液剂,或油性乳剂或水成赋形剂的形式。此类组合物也可通过粉末的形式提供,并使用合适的媒介物(包括,但不限于,灭菌无热原水、WFI等)进行重新配制。

[0116] 本发明的组合物作为长效制剂进行配制,并通过植入或肌肉注射的方法进行给药。此类组合物可使用合适的聚合或疏水材料(例如,作为食用油中的乳剂)、离子交换树脂,或作为微溶衍化物(例如,作为微溶盐)进行配制。

[0117] 本发明的组合物也可作为脂质体制剂进行配制。脂质体制剂可包括用于渗入特定细胞或角质层并与细胞膜融合,进而将脂质体内容物送入细胞的脂质体。例如,可使用如美国专利号 5,077,211 至 Yarosh、美国专利号 4,621,023 至 Redziniak 等,或美国专利号 4,508,703 至 Redziniak 等中所述的脂质体。

[0118] 本发明的组合物可采用固体剂量单位的形式,如药片(如,混悬型药片、咬合混悬型药片、速释药片、咀嚼药片、泡腾片剂、双层药片等)、胶囊药片、胶囊剂(如,软胶囊或硬胶囊)、剂粉(如,封包剂粉、可分发的剂粉或泡腾剂粉)、锭剂、囊剂、扁囊剂、片剂、药丸、糖丸、微粒、胶囊微粒、粉末气雾制剂,或其它任何适宜合理给药的固体剂型。

[0119] 药片可根据多种相关、公认的配药技术进行制备。在一个实施例中,药片或其它固体剂型可通过结合一种或多种方法进行制备,此类方法包括(但不限于)(1)干拌混合、(2)直接压制、(3)研磨、(4)干燥或非水制粒、(5)湿式制粒,或(6)融合。

[0120] 制备片剂的湿法成粒程序所采用的独立步骤,通常包括研磨和筛选配料、混合干燥粉、湿重处理、颗粒化及最终研磨。干法成粒包括将粉末混合物压入未加工的片剂中,或在大功率旋转压片机上进行“击压”。然后通过研磨操作(通常使用摇摆式颗粒机),将坯料粉碎成颗粒状。独立步骤包括混合粉末、压制(击压)并研磨(坯料粉碎或颗粒化)。通常,上述步骤无需使用湿粘合剂或湿气。

[0121] 在另一个实施例中,可通过混合抗孕激素与一种或多种药用赋形剂以制备固体剂型,并形成基本同系的预制混合物。然后,可细分预制混合物,并可选择进行进一步处理(如,压制、包胶、封包、分发等。)以提供合适的剂型。

[0122] 通过压制粉末或颗粒化本发明的组合物,可制备片剂。“压制片剂”通常指适合口服的普通、无包衣药片,通过单次挤压,或在最终挤压后经过预压拌合进行制备。本发明的片剂可经过包衣或混合处理,以提供有利于改进加工或耐储存特性的剂型。在一个实施例中,选择此类包衣时,应确保不会影响到本发明组合物对受试者的治疗效果。本文中的“混悬片剂”指置于水中可迅速分解的压制片剂。

[0123] 本发明组合物的适用液态剂型包括液剂、水成伙油质混悬物、酞剂、糖浆剂、乳剂、液态气雾剂、凝胶剂、乳膏剂、软膏剂等。此类组合物也可配置为干式产品,并在使用前与水或其它适用媒介物混合。

[0124] 在一个实施例中,将液态或半固态组合物储存在密闭容器中,并置于室温、冷却(如大约 5-10℃)温度,或冷冻温度下,时间持续大约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个月,形成至少约 90%、至少约 92.5%、至少约 95%、或至少约 97.5% 的原型抗孕激素化合物。

[0125] 必要时,本发明的组合物可包括一种或多种药学上可接受的赋形物。本文中的“赋形剂”,指作为载体或媒介物,以向受试者输送治疗剂,或添加至药用组合物,以改进组合物的加工和耐储存性,或允许或促成组合物单位剂量的确立的任何物质(本身并非治疗剂)。例证式赋形剂可包括(但不限于),稀释液、崩解剂、粘合剂、胶粘剂、润湿剂、润滑剂、助流剂、表面改良剂或表面活性剂、芳香剂、悬浮剂、乳化剂、非水媒介物、防腐剂、抗氧化剂、胶合剂、用于调整 pH 值和克分子渗透压浓度的附加剂(如缓冲剂)、防腐剂、增稠剂、甜味剂、增香剂、掩味剂、着色剂或染料、透皮吸收促进剂,以及可改进组合物外观的物质。

[0126] 本发明的组合物可选用的赋形剂可以是固态、半固态、液态或多种形态的组合。含赋形剂的发明组合物,可利用已知的制药技术,通过混合赋形剂与药物或治疗剂进行制备。

[0127] 本发明的组合物可选包括一种或多种药学上可接受的稀释剂作为赋形剂。可单独或组合使用的例证性适用稀释剂包括,乳糖,包括无水乳糖和一水乳糖;淀粉,包括直接压制淀粉和水解淀粉(如, Celutab™ 和 Emdex™);甘露醇;山梨醇;木糖醇;葡萄糖(如, Cerelease™ 2000) 和一水葡萄糖;二盐基磷酸钙二水合物;蔗糖基稀释剂;混合药剂的糖类;一盐基硫酸钙一水合物;硫酸钙二水合物;粒性乳酸钙三水合物;葡萄糖结合剂;肌糖;谷物水解固形物;多糖;纤维素,包括微晶纤维素、 α 的食品级原料及非晶态纤维素(如, Rexcel™) 及粉末纤维素;碳酸钙;糖胶;膨润土;聚乙烯吡咯烷酮等。此类稀释剂(如使用)占组合物总重量的约 5% 至约 99%、约 10% 至约 85%、或约 20% 至约 80%。任何稀释剂或优选稀释剂均具有合适的流动性和(适合制备片剂的)可压性。

[0128] 使用超粒度微晶纤维素(亦即,经干燥处理后,向湿粒状组合物添加微晶纤维素)可提高硬度(用于片剂)和/或缩短崩解时间。

[0129] 本发明的组合物可选包括一种或多种药学上可接受的崩解剂作为赋形剂,特别是用于制备片剂、胶囊剂或其它固态剂型时。可单独或组合使用的适用崩解剂包括,淀粉,包括羟基乙酸淀粉钠(如, PenWest 的 Explotab™) 和预胶化玉米淀粉(如, National™ 1551、National™ 1550, 及 Colocorn™ 1500), 粘土(如, Veegum™ HV), 纤维素,如纯净纤维素、微晶纤维素、纤维素甲醚、羧甲基纤维素和羧甲基纤维素钠、交联羧甲基纤维素钠(如, FMC 的 Ac-Di-Sol™), 海藻酸盐, 交联聚维酮, 和树胶, 如琼胶、瓜耳树胶、黄原胶、槐豆胶、刺梧桐树胶、果胶和黄蓍胶。

[0130] 崩解剂可在制备组合物的过程中,于任何合适的步骤进行添加,特别是在颗粒化之前,或在压制前的润滑过程中。此类崩解剂(如使用)占组合物总重量的约 0.2% 至约 30%、约 0.2% 至约 10%、或约 0.2% 至约 5%。

[0131] 本发明的组合物可选包括一种或多种药学上可接受的粘合剂或胶粘剂作为赋形剂,特别是用于制备片剂。此类粘合剂和胶粘剂应能够充分粘合需制成片剂的粉末,以便进行正常加工,如上胶料、润滑、压制和包装,并且,应确保片剂在服用后可崩解,组合物可被吸收。可单独或组合使用的适用粘合剂和胶粘剂包括,阿拉伯树胶;黄芪胶;蔗糖;凝胶;葡萄糖;淀粉,如(但不限于)预胶凝淀粉(如, National™ 1511 和 National™ 1500);纤维

素,如(但不限于)纤维素甲醚和羧甲基纤维素钠(如,Tylose™);海藻酸和海藻酸盐;镁铝硅酸盐;PEG;瓜尔豆胶;多聚糖酸;膨润土;聚维酮,如聚维酮K-15、K-30和K-29/32;聚甲基丙烯酸酯;HPMC;羟丙基纤维素(如,Klucel™);和乙基纤维素(如,Ethocel™)。此类粘合剂和/或胶粘剂(如使用)占组合物总重量的约0.5%至约25%、约0.75%至约15%、或约1%至约10%。

[0132] 本发明的组合物可选包括一种或多种药学上可接受的润湿剂作为赋形剂。可作为本发明组合物的润湿剂的表面活性剂的无限制实例包括季铵化合物,如苯扎氯铵,苄索氯铵及氯化十六烷吡啶,磺琥辛酯钠、烷基酚聚氧乙烯醚,如壬苯醇醚9,壬苯醇醚10,及辛苯聚糖9,泊洛沙姆(聚乙二醇和聚氧化丙烯嵌段共聚物),聚氧乙烯脂肪酸甘油酯和油剂,如聚氧乙烯(8)羊脂酸/羊蜡单-和二脂酸甘油酯(如,Gattefossé的Labrasol™),聚氧乙烯(35)蓖麻油和聚氧乙烯(40)氢化蓖麻油;聚氧乙烯烷基醚,如聚氧乙烯(20)鲸脂醚,聚氧乙烯脂肪酸酯,如聚氧乙烯(40)硬脂酸盐,聚氧乙烯山梨聚糖醚,如聚山梨酸酯20和聚山梨酸酯80(如,ICI的Tween™80),丙二醇脂肪酸酯,如丙二醇月桂酸脂(如,Gattefossé的Lauroglycol™),硫酸十二烷基酯钠,脂肪酸及其盐类,如油酸、油酸钠和油酸三乙醇胺酯,甘油基脂肪酸酯,如单硬脂酸甘油酯,山梨聚糖酯,如单月桂酸山梨醇酐酯、单油酸山梨醇酐酯、山梨聚糖甘油一棕榈酸酯和单硬脂酸山梨糖醇酐酯,四丁酚醇及其混合物。此类润湿剂(如使用)占组合物总重量的约0.25%至约15%、约0.4%至约10%、或约0.5%至约5%。

[0133] 本发明的组合物可选包括一种或多种药学上可接受的滑润剂(包括抗粘剂和/或助流剂)作为赋形剂。可单独或组合使用的适用滑润剂包括,甘油基必和佩特(behapate)(如,Compritol™888);硬脂酸及其盐类,包括镁(硬脂酸镁),硬脂酸钙和硬脂酸钠;氢化植物油(如,Sterotex™);胶体氧化硅;硅酸镁;石蜡;硼酸;苯甲酸钠;乙酸钠;富马酸钠;氧化钠;DL-亮氨酸;PEG(如,Carbowax™4000和Carbowax™6000);油酸钠;月桂基硫酸钠;和十二烷基硫酸镁。此类滑润剂(如使用)占组合物总重量的约0.1%至约10%、约0.2%至约8%、或约0.25%至约5%。

[0134] 适用的抗粘剂包括硅酸镁、玉米淀粉、DL-亮氨酸、月桂基硫酸钠和金属硬脂酸盐。例如,硅酸镁是一种抗粘剂或助流剂,可用于减少设备表面的配制粘性,并可减少混合物中的静态。一种或多种抗粘剂(如使用)占组合物总重量的约0.1%至约10%、约0.25%至约5%、或约0.5%至约2%。

[0135] 助流剂可用于促进固态剂型的粉末流。适用助流剂包括胶体二氧化硅、淀粉、硅酸镁、三碱式磷酸钙、粉末纤维素及三硅酸镁。建议使用胶体二氧化硅。

[0136] 本发明的组合物可包括一种或多种消泡剂。二甲基硅油是一种例证性消泡剂。消泡剂(如使用)占组合物总重量的约0.001%至约5%、约0.001%至约2%、或约0.001%至约1%。

[0137] 本发明所使用的例证性抗氧化剂包括(但不限于),丁基化羟氢甲苯、丁化羟基茴香醚、焦亚硫酸钾等。通常情况下,本发明组合物中的一种或多种抗氧化剂(如使用),占组合物总重量的约0.01%至2.5%,例如,约0.01%、约0.05%、约0.1%、约0.5%、约1%、约1.5%、约1.75%、约2%、约2.25%、或约2.5%。

[0138] 在多个的实施例中,本发明的组合物可包括防腐剂。适用防腐剂包括(但不限

于), 苯扎氯铵、甲基、乙烷基、丙基或对羟基苯甲酸丁酯、苯甲醇、苯基乙醇、苜蓿素、甲基或丙基对羟基苯甲酸及山梨酸或上述原料的组合物。通常, 可选防腐剂占组合物总重量的约 0.01% 至约 0.5% 或约 0.01% 至约 2.5%。

[0139] 在一个实施例中, 本发明的组合物可选包括缓冲剂。缓冲剂包括可减少 pH 值变化的附加剂。本发明的各种组合物所使用的不同等级的例证性缓冲剂, 包括 IA 组金属的盐类, 包括 (例如) IA 组金属的重碳酸盐、IA 组金属的碳酸盐、碱性或碱土金属缓冲剂、铝缓冲剂、钙缓冲剂、钠缓冲剂, 或镁缓冲剂。适用的缓冲剂包括碳酸盐、磷酸盐、重碳酸盐、柠檬酸盐、硼酸盐、醋酸盐、邻苯二甲酸盐、酒石酸盐、上述任何化合物的琥珀酸盐, 例如, 磷酸钠或磷酸钾、柠檬酸盐、硼酸盐、醋酸盐、重碳酸盐和碳酸盐。

[0140] 适用缓冲剂的非限制实例包括, 氢氧化铝、氢氧化镁、甘氨酸铝、醋酸钙、重碳酸钙、硼酸钙、碳酸钙、柠檬酸钙、葡萄糖酸钙、甘油磷酸钙、氢氧化钙、乳酸钙、酞酸钙、磷酸钙、丁二酸钙、酒石酸钙、磷酸二钠、磷酸氢二钾、磷酸二钾、磷酸氢二钠、琥珀酸二钠、干氢氧化铝凝胶、醋酸镁、铝酸镁、硼酸镁、碳酸氢镁、碳酸镁、柠檬酸镁、葡萄糖酸镁、氢氧化镁、乳酸镁、硅酸铝镁、氧化镁、酞酸镁、磷酸镁、硅酸镁、琥珀酸镁、酒石酸镁、醋酸钾、碳酸钾、碳酸氢钾、硼酸钾、柠檬酸钾、偏磷酸钾、酞酸钾、磷酸钾、聚磷酸钾、焦磷酸钾、丁二酸钾、酒石酸钾、乙酸钠、碳酸氢钠、硼酸钠、碳酸钠、柠檬酸钠、葡萄糖酸钠、磷酸氢二钠、氢氧化钠、乳酸钠、酞酸钠、磷酸钠、聚磷酸钠、焦磷酸钠、碳酸氢三钠、琥珀酸钠、酒石酸钠、三磷酸钠、合成水滑石、焦磷酸四钾、焦磷酸四钠、磷酸三钾、磷酸三钠, 及缓血酸铵。(部分基于 The Merck Index, Merck&Co. Rahway, N. J. (2001)

[0141] 中提供的列表)。并且, 任何两种或更多种上述缓冲剂的组合物或混合物, 可用于本文所述的药用组合物。本发明组合物中的一种或多种缓冲剂 (如使用), 占组合物总重量的约 0.01% 至约 5% 或约 0.01% 至约 3%。

[0142] 在多个实施例中, 本发明的组合物可包括一种或多种附加剂以增加粘性。用于增加粘性的例证性附加剂包括 (但不限于), 甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、乙基纤维素、卡拉胶、树脂胶, 和 / 或上述原料的组合物。通常, 本发明组合物中的一种或多种用于增加粘性的附加剂 (如使用), 占组合物总重量的约 0.1% 至约 10%, 或约 0.1% 至约 5%。

[0143] 在多个实施例中, 本发明的组合物包括“感官附加剂”, 以改进组合物的感官特性。本文中的“感官附加剂”, 指可以改进味道或气味, 或帮助掩蔽本发明组合物令人不快的味道或气味的任何赋形剂。此类附加剂包括增甜剂、增香剂和 / 或味觉掩蔽剂。适用的增甜剂和 / 或增香剂包括可为药用组合物增加甜味或香味的任何附加剂。本发明组合物中通常使用的可选感官附加剂, 占组合物总重量的约 0.1 毫克 / 毫升至约 10 毫克 / 毫升、约 0.5 毫克 / 毫升至 5 毫克 / 毫升或约 1 毫克 / 毫升。

[0144] 例证性增甜剂或增香剂包括 (但不限于), 阿拉伯胶糖浆、大茴香醚、茴香油、芳香酞剂、安息香醛、安息香醛酞剂、环化糊精、页蒿、页蒿籽油、豆蔻油、豆蔻籽、豆蔻醇、豆蔻酞、樱桃汁、樱桃糖浆、肉桂、肉桂油、肉桂汁、柠檬酸、柠檬酸糖浆、丁香油、可可、可可糖浆、胡荽油、葡萄糖、圣草、圣草流浸膏剂、圣草糖浆、芳香剂、醋酸乙脂、乙基香兰素、茴香油、姜、姜流浸膏剂、姜油树脂、右旋糖、葡萄糖、糖、麦芽糊精、甘油、甘草、甘草酞剂、甘草提炼物、甘草纯提炼物、甘草汁提炼物、甘草糖浆、蜂蜜、等醇酞剂、薰衣草油、柠檬油、柠檬酞剂、甘露醇、水杨酸甲酯、肉豆蔻油、苦柑橘、酞剂、苦柑橘油、柑橘花油、柑橘花汁、柑橘油、柑橘

皮、苦柑橘皮、甜柑橘皮、酞剂、柑橘醇、柑橘糖浆、薄荷、薄荷油、薄荷醇、薄荷汁、薄荷乙醇、覆盆子浆汁、覆盆子糖浆、迷迭香油、玫瑰油、玫瑰汁（更高浓度）、糖精、糖精钙、糖精钠、菝葜糖浆、菝葜、山梨（糖）醇溶液、留兰香、留兰香油、蔗糖、半乳蔗糖、糖浆、百里香油、妥鲁香油树脂、妥鲁香油树脂糖浆、香草、香草酞剂、香兰素、野樱桃糖浆，或上述原料的组合物。

[0145] 例证性掩味剂包括（但不限于），环化糊精、环化糊精乳状液、环化糊精颗粒、环化糊精合成物，或上述化合物的组合物。

[0146] 例证性悬浮剂包括（但不限于），山梨醇糖浆、甲基纤维素、葡萄糖 / 糖浆、凝胶、羟乙基纤维素、羧甲基纤维素、硬脂酸铝凝胶，和氢化食用脂肪。

[0147] 例证性乳化剂包括（但不限于），卵磷脂、山梨糖醇酐单油酸酯，及阿拉伯树胶。非水调和剂包括（但不限于），食油、杏仁油、分馏椰子油、油性酯、丙二醇和乙醇。

[0148] 上述赋形剂具备业界已知的多种作用。例如，淀粉可作为掺杂剂以及崩解剂。上述赋形剂的归类，未以任何方式进行限制。

[0149] 本发明的组合物能够以任何方式进行使用，包括（但不限于）口服、肠胃外给药、舌下给药、透皮给药、直肠给药、穿粘膜给药、局部给药、经由吸入剂、经由口腔用药，或上述方式的组合。肠胃外给药包括（但不限于）静脉注射、动脉注射、腹膜内注射、皮下注射、肌肉注射、鞘内注射、关节内注射、脑池内注射及心室内注射。

[0150] 治疗所需的组合物的治疗有效剂量，根据采用的特定化合物、给药方式、病症的严重程度、选择的治疗持续时间，连同其它因素而有所不同，并由主治医师最终确定。但是，一般而言，治疗病人的剂量通常在每天大约 0.001 毫克 / 公斤至大约 500 毫克 / 公斤之间，例如，每天大约 1 微克 / 公斤至大约 1 毫克 / 公斤或每天大约 1 微克 / 公斤至大约 100 微克 / 公斤。对于多数大型哺乳动物，每天总给药量为大约 1 至 100 毫克，建议给药量为大约 2 至 80 毫克。通过调整给药方案，以获得最佳的治疗效果。确定给药量后，可按合理的间隔时间，以单次或多次剂量进行合理用药，例如，每天服用 2 次、3 次、4 次或更多次。

[0151] 举例说明，受试者使用发明组合物时，可以按大约 1 微克 / 公斤至大约 1 毫克 / 公斤体重的用药量使用抗孕激素，例如、约 1 微克 / 公斤、约 25 微克 / 公斤、约 50 微克 / 公斤、约 75 微克 / 公斤、约 100 微克 / 公斤、约 125 微克 / 公斤、约 150 微克 / 公斤、约 175 微克 / 公斤、约 200 微克 / 公斤、约 225 微克 / 公斤、约 250 微克 / 公斤、约 275 微克 / 公斤、约 300 微克 / 公斤、约 325 微克 / 公斤、约 350 微克 / 公斤、约 375 微克 / 公斤、约 400 微克 / 公斤、约 425 微克 / 公斤、约 450 微克 / 公斤、约 475 微克 / 公斤、约 500 微克 / 公斤、约 525 微克 / 公斤、约 550 微克 / 公斤、约 575 微克 / 公斤、约 600 微克 / 公斤、约 625 微克 / 公斤、约 650 微克 / 公斤、约 675 微克 / 公斤、约 700 微克 / 公斤、约 725 微克 / 公斤、约 750 微克 / 公斤、约 775 微克 / 公斤、约 800 微克 / 公斤、约 825 微克 / 公斤、约 850 微克 / 公斤、约 875 微克 / 公斤、约 900 微克 / 公斤、约 925 微克 / 公斤、约 950 微克 / 公斤、约 975 微克 / 公斤或约 1 毫克 / 公斤体重。

[0152] 使用本发明组合物进行治疗的病人，应定期监控雌性激素和糖皮质激素水平。

[0153] 通过提供以下非限制范例，以帮助了解本发明的效用。

[0154] 范例 1。可用于制备药片的本发明配方。

[0155] 要获得药片以实施本发明，需将以下成分一起压入压片机中：

[0156] 10.0 毫克 CDB-4124

- [0157] 140.5 毫克 乳糖
- [0158] 69.5 毫克 玉米淀粉
- [0159] 2.5 毫克 聚-N- 乙烯基吡咯烷酮
- [0160] 2.0 毫克 氧相二氧化硅
- [0161] 0.5 毫克 硬脂酸镁
- [0162] 要获得双层药片以实施本发明,需将以下成分一起压入压片机中:
- [0163] 20.0 毫克 三苯氧胺
- [0164] 50.0 毫克 CDB-4124
- [0165] 105.0 毫克 乳糖
- [0166] 40.0 毫克 玉米淀粉
- [0167] 2.5 毫克 聚-N- 乙烯基吡咯烷酮 25
- [0168] 2.0 毫克 氧相二氧化硅
- [0169] 0.5 毫克 硬脂酸镁
- [0170] 要获得含抗雌激素的药片以实施本发明,举例来说,需将以下成分一起压入压片机中:
- [0171] 10.0 毫克 雷洛昔芬
- [0172] 30.0 毫克 CDB-4124
- [0173] 125.0 毫克 乳糖
- [0174] 50.0 毫克 玉米淀粉
- [0175] 2.5 毫克 聚-N- 乙烯基吡咯烷酮 25
- [0176] 2.0 毫克 氧相二氧化硅
- [0177] 0.5 毫克 硬脂酸镁
- [0178] 要获得油制剂以实施本发明,举例来说,需将以下成分彼此混合并装入安瓿中:
- [0179] 100.0 毫克 CDB-4124
- [0180] 343.4 毫克 蓖麻油
- [0181] 608.6 毫克 苯酸苄酯
- [0182] 范例 2。本发明的化合物可能仅具有较弱的抗糖皮质激素受体结合活性。
- [0183] 特定抗孕激素在受体结合测定中进行测试,以了解它们结合兔孕激素受体 (rbPR) 及糖皮质激素受体 (rbGR) 的能力。简而言之,含 PR 或 GR 的细胞液分别在以雌二酮作为引物的兔未成熟子宫或胸腺的 TEGMD 缓冲剂 (10 毫摩尔三羧甲基氨基甲烷, pH 7.2、1.5 毫摩尔 EDTA、0.2 毫摩尔钼酸钠、10% 丙三醇、1 毫摩尔 DTT) 中制备。对于 PR 结合,可使用 6 纳米 1,2-³H 孕酮 (50.0Ci/毫摩尔) 培养细胞液,并按 2 至 100 纳米的浓度添加竞争剂。为结合 GR,可使用 6 纳米 6,7-³H 地塞米松 (40Ci/毫摩尔) 培养细胞液,并按 20 至 100 纳米的浓度添加测试化合物。以 4°C 持续培养一整夜后,结合与非结合 ³H 甾类化合物通过添加葡聚糖被覆活性炭,并在 4°C 下以 2100xg 离心过滤 15 分钟。含 ³H-甾类化合物受体化合物的上清液,被移入含 4 毫升闪烁液 (Packard Instrument Co.) 的小瓶中,在 30 分钟的液体闪烁计时中,使液体呈涡流状,并使其均衡,然后计时 2 分钟。通过将计时数据输入四参数 S 形曲线计算机程序 (RiaSmart® 免疫测定数据简化程序, Packard Instrument Co., Meriden, Conn.), 以决定每条标准曲线和每条复曲线的 EC₅₀ (有效浓度)。使用以下等

式以计算每种化合物的相对结合亲和性 (RBA) :标准 EC_{50} / 测试化合物 $\times 100$ 的 EC_{50} 。PR 和 GR 分析标准分别为无标号孕酮和地塞米松。此类实验的结果汇总于表 1, 提供每种化合物的相对结合亲和性比率, 用于 rbPR 和 rbGR 受体 (rbPR/rbGR)。此差异反映拥有 2 个受体和必要的转录余因数的细胞或组织中化合物的相对活性。

[0184] 通过抗 -McGinty 和抗 -Clauberg 分析, 表 1 中同时提供兔子宫内的相同化合物的相对生物活性。化合物 CDB-2914 (列于表格末端) 作用此类实验的对照或参考化合物 (兔生物活性 = 1.00), 因为使用 CDB-2914 的实验结果已在 (Hild-Petito 等, 1996 年 ; Passaro 等, 1997 年 ; Reel 等, 1998 年 ; Larner 等, 2000 年) 之前公布。在抗 -McGinty 测试中, 对未成熟雌兔连续 6 天每日皮下注射 5 微克雌二酮 (含 10% 乙醇 / 芝麻油)。到第 7 天, 通过结扎两个子宫角的 3-4 厘米分节, 对动物实施腹部绝育手术。将经过适当稀释的测试化合物通过管腔注入一个子宫角的结扎分节, 并将媒介物单独注入另一个子宫角。在接下来的 3 天内, 每天为每只兔子皮下注射孕酮的刺激性剂量 (267 微克 / 天), 以促使子宫内膜增殖。在第 10 天, 处死所有实验动物以摘除子宫, 并取出结扎中心分节, 置于 10% 中性缓冲福尔马林中, 以便进行组织学处理。使用显微镜观察染有苏木精和苦辛的 5 微米切片, 以确定子宫内膜腺的增殖程度。计算每只实验兔的子宫内膜增殖抑制百分比, 并对 5 只动物一组的记录值进行平均。在抗 -Clauberg 测试中, 对未成熟雌兔连续 6 天每日皮下注射 5 微克雌二酮 (含 10% 乙醇 / 芝麻油)。从第 7 天开始, 连续 5 天对动物皮下注射孕酮 (160 微克 / 天), 并通过皮下注射或以适合的媒介物口服试验化合物。一组实验兔仅使用孕酮。使用最后一剂药物后 24 小时, 处死所有实验动物以摘除子宫, 去除所有脂肪和连接组织后, 确保重量接近 0.2 毫克, 并将子宫放入 10% 中性缓冲福尔马林中, 以进行后续组织学处理。使用显微镜观察染有苏木精和曙红的 5 微米切片, 以确定子宫内膜腺的增殖程度。通过单独对比孕酮刺激动物, 取得测试化合物各种剂量水平的子宫内膜增殖抑制百分比。表 1 中显示的数据 (兔生物活性) 反映出通过与 CDB-2914 有关的抗 -McGinty 和抗 -Clauberg 分析得出的每种化合物的平均结果。

[0185] 如表 1 所列, 根据用于兔 PR 与兔 GR 的每种化合物的选择性, 对受测抗孕激素进行分级。同时, 根据兔子宫内的生物活性, 对抗孕激素进行分级。表 1 中显示的数据, 表明用于孕酮受体的导联化合物的亲和性, 比用于糖皮质激素受体的亲和性, 至少大 1.5 倍。

[0186] 此类研究的结果同时表明, 与 RU 486 和 CDB-2914 相比, 两种导联化合物 CDB-4124 和 CDB-4059 在兔子宫内具备较强的抗孕激素活性。两种化合物均缺少雌激素、雄激素、抗雌激素和抗雄激素活性。两种化合物均具备最小的抗糖皮质激素受体活性, 此特征有别于在糖皮质激素受体结合中具备中度活性的 RU 486 和 CDB-2914。在此类试验中, CDB-4124 的效用略优于 CDB-4059。

[0187] 表 1. - 抗孕激素的受体结合及生物活性

[0188]

<u>抗孕激素</u>	<u>rbPR/rbGR</u>	<u>兔生物活性</u>	<u>抗孕激素</u>	<u>rbPR/rbGR</u>	<u>兔生物活性</u>
<u>4239</u>	<u>14.80</u>	<u>0.60</u>	<u>4416</u>	<u>1.33</u>	<u>0.77</u>
<u>4241</u>	<u>9.10</u>	<u>0.34</u>	<u>4417</u>	<u>1.31</u>	<u>0.70</u>
<u>4361</u>	<u>7.20</u>	<u>3.03</u>	<u>4111</u>	<u>1.30</u>	<u>0.36</u>
<u>4306</u>	<u>5.90</u>	<u>0.95</u>	<u>4125</u>	<u>1.19</u>	<u>1.55</u>
<u>4363</u>	<u>5.75</u>	<u>2.53</u>	<u>4223</u>	<u>1.17</u>	<u>未提供</u>
<u>3875</u>	<u>5.11</u>	<u>1.40</u>	<u>4398</u>	<u>1.16</u>	<u>0.99</u>
<u>4362</u>	<u>4.74</u>	<u>1.25</u>	<u>4058</u>	<u>1.08</u>	<u>0.90</u>
<u>4352</u>	<u>4.21</u>	<u>0.57</u>	<u>4418</u>	<u>1.03</u>	<u>0.25</u>
<u>4176</u>	<u>3.83</u>	<u>0.20</u>	<u>4177</u>	<u>1.03</u>	<u>0.00</u>
<u>4243</u>	<u>2.90</u>	<u>0.00</u>	<u>4030</u>	<u>0.96</u>	<u>0.30</u>
<u>4119</u>	<u>2.60</u>	<u>0.10</u>	<u>4374</u>	<u>0.95</u>	<u>2.25</u>
<u>4324</u>	<u>2.16</u>	<u>1.10</u>	<u>4399</u>	<u>0.93</u>	<u>0.35</u>
<u>4247</u>	<u>2.06</u>	<u>1.70</u>	<u>4152</u>	<u>0.82</u>	<u>1.40</u>
<u>4205</u>	<u>1.99</u>	<u>1.00</u>	<u>4110</u>	<u>0.70</u>	<u>0.10</u>
<u>4059</u>	<u>1.89</u>	<u>2.90</u>	<u>4031</u>	<u>0.69</u>	<u>0.70</u>
<u>4400</u>	<u>1.76</u>	<u>2.29</u>	<u>4101</u>	<u>0.61</u>	<u>0.65</u>
<u>3247</u>	<u>1.74</u>	<u>0.10</u>	<u>4248</u>	<u>0.42</u>	<u>0.00</u>
<u>4167</u>	<u>1.69</u>	<u>1.50</u>	<u>4227</u>	<u>0.38</u>	<u>0.00</u>
<u>4124</u>	<u>1.58</u>	<u>3.60</u>	<u>4393</u>	<u>0.35</u>	<u>0.00</u>
<u>4226</u>	<u>1.51</u>	<u>0.54</u>	<u>4396</u>	<u>0.18</u>	<u>未提供</u>
<u>4206</u>	<u>1.44</u>	<u>0.68</u>	<u>2914</u>	<u>1.07</u>	<u>1.00</u>

[0189] 范例 3. 肿瘤诱发和肿瘤表现的潜伏期。

[0190] 要诱发乳腺肿瘤,可在 50 天的时间内对 Sprague-Dawley 雌鼠使用剂量为 10 毫克/公斤体重的 DMBA。在为期 50 天的时间内,对一组 14 只实验鼠(第 2 组)使用芝麻油而非 DMBA,以作为非 DMBA 对照物。每周对动物进行称重,并沿乳线进行触诊,检查是否有病变或发胀症状。使用圆规,每周记录并测量肿瘤球状体的两维尺寸。当肿瘤的任何一维达到 10-12 毫米时,将个别动物随机放入 14 组中的一组。使用口服强饲法后,在 39 天内形成肿瘤,最迟 194 天(较晚形成肿瘤的动物未包括在研究中)。肿瘤表现的平均潜伏期为 106 ± 30 天。就潜伏期而言,使用 DMBA 的各组之间并无差别 ($p = 0.545$, Kruskal-Wallis 检验)。

[0191] 在随后的计划中,对动物进行为期 28 天的治疗。第 1 组每日皮下 (s. c.) 注射赋形剂(含 10%乙醇的芝麻油)。第 2 组(无 DMBA 对照组 - 不会形成肿瘤)按事先确定的计

划使用赋形剂,以便在为期 3 个月的时间内模拟治疗的启动作用。第 3 组和第 4 组每日分别皮下注射 RU 486 或 10 毫克 / 公斤体重的微粉化孕酮。第 5 组至第 9 组分别使用 20 毫克 / 公斤、10 毫克 / 公斤、2 毫克 / 公斤、1 毫克 / 公斤及 0.1 毫克 / 公斤的 CDB-4124。第 10 组至第 14 组使用与第 5 组至第 9 组相同的治疗方法,但同时添加 10 毫克 / 公斤的微粉化孕酮,作为注射组合物的化合物。

[0192] 对动物进行三次评定,以了解它们的孕酮水平:第一次,在即将接受治疗时;第二次在接受治疗的 21 天后;第三次在最后一次 s. c. 注射后的 2-4 天并处罚死后。通过心脏穿刺取得所有血样;制备血清,并在 -40℃ 的温度下冷冻保存。甾类激素孕酮、皮质(甾)醇和肾上腺酮的水平通过 ELISA 确定。

[0193] 使用 Statgraphics Plus 执行分析。如果各组的处理得到有效实施,可通过 ANOVA 确定各组之间的差异。否则,应使用 Kruskal-Wallis 检验方法。如果各组均未符合 kurtotic 或 skewed 的标准,应使用学生 t- 检验方法以评估治疗方法之间的差异。否则,应使用非参数 Mann-Whitney-Wilcoxon 检验方法。如果连续评定相同的实验鼠,应使用配对 t- 检验方法。如果可以将数据应用至各组中进行对比,应采用 Fisher 精确检验方法。

[0194] 范例 5。通过尸检确定肿瘤数量和肿瘤类型。

[0195] 在为期 28 天的治疗结束后的 3-5 天内处死动物,抽血并摘除肿瘤,进行称重、测量、观察及部分冷冻,和 / 或置于 10% 的磷酸盐缓冲福尔马林中以进行组织学处理。将组织标本切片,并用苏木精和曙红染色,以进行组织学归类评估。

[0196] 从组织学角度来看,应确认 4 种类型的肿瘤(表 2):恶性腺瘤(ACA)、乳头状腺癌(PCA)、纤维肉瘤或腺纤维瘤(FA 或 AF),后两种肿瘤类型未被视为明显的恶性肿瘤。假定最大(“引导”)肿瘤伴有一个或多个未达到最小尺寸的较小肿瘤,则启动治疗的肿瘤最小数量为 ≥ 1 。表 2 对此类试验的结果进行汇总。在处死实验鼠时,单独使用赋形剂治疗实验鼠的 ACA+PCA 多重性,为每只鼠 2.7 个肿瘤(由于肿瘤可能为混合型,因此 ACA+PCA 列并不总是每只鼠的 ACA 及 PCA 列的附加列)

[0197] 如表 2 所示,第 2 组(未使用致癌物质 DMBA)未出现肿瘤。单独使用 DMBA 的实验鼠,每只鼠的平均肿瘤数量为 2.67 个。添加孕酮将使每只鼠的平均肿瘤数量增加至接近 5 个。使用 CDB-4124 进行治疗,对减少肿瘤数量效果明显。对于治疗最有效的 4 个试验组(即,使用 20、10、2、1 毫克 / 公斤 / 日),平均多重性为每只鼠 1.58 个肿瘤。肿瘤数量的减少,意味着 CDB-4124 不仅能够抑制现有肿瘤的生长,同时能够防止此类动物体内出现新的肿瘤,因为每只动物均基于发现一个特定尺寸的肿瘤进行随机治疗

[0198] 表 2- 针对肿瘤类型和肿瘤数量的治疗效果。

[0199]

试验组	治疗 ^a	肿瘤发生率 (%)	每只鼠使用的 ACA	每只鼠使用的 PCA	FA/AF 数量	每只鼠使用的 ACA + PCA
1	对照物(赋形物)	12/13 (92)	1.17	1	3	2.67
2	无 DMBA 对照物(赋形物)	0/10 (0)	0	0	0	0
3	RU486 (10 毫克) ^b	13/14 (93)	2.08	0.08	1	2.00
4	孕酮 (P) (10 毫克)	10/10 (100)	3.3	1.4	3	4.90
5	4124 (20 毫克)	13/13 (100)	1.31	0.08	3	1.38
6	4124 (10 毫克)	10/11 (91)	1.5	0.2	1	1.70
7	4124 (2 毫克)	11/12 (92)	1.45	0.09	2	1.55
8	4124 (1 毫克)	9/11 (82)	1.67	0.11	2	1.78
9	4124 (0.1 毫克)	12/12 (100)	1.17	0.83	3	2.25
10	4124 (20 毫克) + P (10 毫克)	8/10 (80)	1.89	0.11	1	2.00
11	4124 (10 毫克) + P (10 毫克)	10/12 (83)	1.2	0	3	1.30
12	4124(2 毫克) + P (10 毫克)	10/11 (91)	2.8	0.6	1	3.50
13	4124(1 毫克) + P (10 毫克)	14/15 (93)	2.43	0.86	1	3.29
14	4124 (0.1 毫克) + P (10 毫克)	11/11 (100)	2.55	1.09	0	3.73

[0200] ACA, 恶性肿瘤 ;PCA, 乳头状腺癌 ;FA, 纤维腺瘤 ;AF, 腺纤维瘤 ;DMBA, 7, 12- 二甲基苯并 (a) 蒽 ;形成首个肿瘤后, 使用^aTX, 时间持续 28 天 ;按 10 毫克 / 公斤体重的剂量使用^bTX

[0201] 范例 6。抗孕激素对肿瘤生长的影响。

[0202] 为评估 CDB-4124、RU486 和孕酮对肿瘤的形成和生长的影响, 应在治疗期间监控生长动力学和肿瘤尺寸。在研究过程中, 应使用圆规, 每周测量肿瘤动物的个别肿瘤的 2 维尺寸。此类试验的结果在图 1 中进行汇总。通过校正数据, 排除非致癌 FA/AF 肿瘤类型。经过 28 天的观察期, 截面积增加至少 33% 的肿瘤, 被视为肿瘤增殖 (图 1, 黑框)。对于截面

积减少近 33% 的肿瘤, 可视为肿瘤消退 (图 1, 白框)。其它可视为静态 (图 1, 灰框)。如图 1 所示, 使用孕酮将增加生长乳线肿瘤的数量。

[0203] 从统计数据来看, 虽然使用孕酮的试验组, 肿瘤消退比例 (8%) 与对照物相同, 但生长肿瘤的比例 (80%) 明显更高 ($p < 0.004$, Fisher 精确检验)。使用 RU 486 进行治疗, 将导致肿瘤消退的比例与对照物相比出现明显增加, 虽然从统计数据看并不明显。

[0204] 与孕酮不同, 按 10 毫克 / 公斤体重的剂量, 使用 CDB-4124 进行治疗, 将减少肿瘤的生长比例 ($p < 0.013$), 并增加肿瘤的消退比例 ($p < 0.003$)。结果显示, 使用 CDB-4124 进行治疗后, 肿瘤的消退比例达 70%。CDB-4124 具备明显的剂量依赖性, 并且, 仅使用最小剂量的 CDB-4124 对治疗无效。当以 5 倍或更高的比率, 另外使用孕酮治疗动物时, CDB-4124 将完全失效。按最低比率使用孕酮, 将无法替代 CDB-4124 的作用。就生长率而言, 与 20 毫克 / 公斤相比, 使用剂量为 10 毫克 / 公斤的 CDB-4124 更为有效, 这意味着高剂量 CDB-4124 具备某种孕酮拮抗剂活性, 虽然 20 毫克 / 公斤 CDB-4124 对肿瘤生长的影响, 与孕酮对肿瘤生长的影响仍有差距 ($p = 0.0008$, Fisher 精确检验, 双尾)。但是, 20 毫克 / 公斤剂量 (并非最低剂量) 同样能够明显增加循环的孕酮水平, 且治疗效果取决于剂量。因此, CDB-4124 能够抑制 DMBA 诱发的实验鼠乳腺肿瘤的生长, 并且, 此类抑制包括减少乳腺肿瘤的大小和数量。由于孕酮自身具备增殖性可并增强肿瘤, 因此必须抑制乳腺肿瘤已生成或处于生成过程的动物体内的孕酮。CDB-4059 的作用类似于前述 CDB-4124 的作用。因此, CDB-4059 的肿瘤抑制活性与 CDB-4124 相类似, 且两种化合物均比 RU 486 具备更强的肿瘤抑制活性。以中等浓度或超过孕酮的浓度单独使用 CDB-4124 时, 效果较为明显, 并可促进肿瘤消退。相反, 单独使用孕酮或剂量超过 CDB-4124 时, 孕酮将对肿瘤的生长起增强作用。

[0205] 范例 7。通过尸体剖检确定肿瘤数量、肿瘤大小和肿瘤负荷。

[0206] 表 3 显示孕酮、RU486 和 CDB-4124 对每只动物的中等肿瘤大小和肿瘤平均总重量的影响。表 3 中显示 ACA、PCA 及混合 ACA/PCA 的结果, 但不包括 FA 或 AF 肿瘤。

[0207] 表 3- 针对肿瘤数量、大小和肿瘤负荷的治疗效果。

[0208]

试验组	治疗 ^a	肿瘤数量	肿瘤负荷 (克/鼠)	肿瘤平均 (克)	中等肿瘤 (克)	MWW 测 试 ^b
1	对照物 (赋形物)	32	4.7	1.91	0.8	
2	无 DMBA 对照物 (赋形物)	0	0	0	0	
3	RU486 (10 毫克) ^c	27	2.47	1.19	0.16	p=0.012
4	孕酮 (P) (10 毫克)	49	7.34	1.5	0.5	p=0.42
5	4124 (20 毫克)	20	4.71	3.4	0.125	p=0.066
6	4124 (10 毫克)	18	0.48	0.26	0.075	p=0.0003
7	4124 (2 毫克)	17	4.61	2.98	0.09	p=0.012
8	4124 (1 毫克)	16	0.94	0.53	0.17	p=0.0009
9	4124 (0.1 毫克)	29	5.1	2.26	0.17	p=0.99
10	4124 (20 毫克) + P (10 毫克)	18	0.92	0.46	0.18	p=0.005
11	4124 (10 毫克) + P (10 毫克)	14	3.82	2.73	0.185	p=0.013
12	4124 (2 毫克) + P (10 毫克)	34	5.8	1.96	0.45	p=0.19
13	4124 (1 毫克) + P (10 毫克)	45	4.28	1.19	0.49	p=0.27
14	4124 (0.1 毫克) + P (10 毫克)	41	6.16	1.65	0.49	p=0.66

[0209] DMBA, 7,12- 二甲基苯并 (a) 蒽; 形成第 1 个肿瘤后, 在为期 28 天的时间内使用^aTX; ^b 对比对照物中等肿瘤重量; ^c 按 10 毫克 / 公斤体重使用 TX

[0210] 孕酮可明显增加肿瘤负荷和肿瘤的中等大小。但是, 从统计数据来看, 对比对照物的结果 ($p > 0.4$, Mann-Whitney-Wilcoxon 检验), 数值并不明显。孕酮数据与抗孕激素的数据形成鲜明的对比。RU486 和 CDB-4124 可降低肿瘤负荷及中等肿瘤大小, 使用 RU486 ($p < 0.01$) 为 5 倍, 使用 CDB-4124 ($p < 0.001$) 为 10 倍。另一个试验组中, 肿瘤负荷与肿瘤大小的减少, 与使用剂量为 10、2 及 1 毫克 / 公斤的 CDB-4124 对肿瘤的影响相一致。CDB-4124 对最低治疗等级无效, 并且, 最高剂量的 CDB-4124 (20 毫克 / 公斤) 不如 10 毫克 / 公斤的剂量有效。应注意的是, 某些肿瘤完全消退, 且不再可触摸。对于治疗过程中进行跟踪的 11 个此类型的肿瘤, 我们在尸体剖检时发现结构囊充满出血性物质, 此情况可视为出现消退。此类结构仅出现于使用 RU486 ($n = 2$) 进行治疗, 及使用剂量为 20、10、2 或 1 毫克 / 公斤 ($n = 7$) 的 CDB-4124 进行治疗, 或使用 20 毫克 / 公斤的 CDB-4124 外加 10 毫克 / 公斤孕酮 (n

= 2) 进行治疗的试验组。由于未进行组织学评估,它们的同一性未得到确认。尽管如此,从此类结果仍可看出,抗孕激素能够使肿瘤完全消退。

[0211] 范例 8。研究过程中的动物体重。

[0212] 将对照动物的体重与接受激素治疗的动物体重做对比,以更好地评估化合物的毒性,尤其是 CDB-4124。在为期 27 周的研究过程中,每周为动物称重。在试验结束时,将接受治疗的动物的体重,与对照动物的体重进行对比,未发现明显差异,这意味着 CDB-4124 即使在高剂量水平亦无毒性。

[0213] 范例 9。肿瘤的增殖和细胞凋亡。

[0214] 为评估孕激素和抗孕激素对细胞增殖的影响,我们从 46 个实验鼠肿瘤和对照动物中获得组织切片,并使用 Ki-67 抗体 (NeoMarkers, Fremont, CA) 和免疫组织化学技术,通过测定增殖标示物 Ki-67 的表现进行检查。在第 3 组和第 6 组接受治疗后,尽管第 3 组和第 6 组中多数肿瘤的大小得到减少,且由于肿瘤太小而无法重新切片,但仍对第 1、3、4、6 和 11 组的 7-12ACA 进行重新切片。增殖试验的结果 (其中,按细胞表达 Ki-67 百分比对增殖进行测定) 在表 4 中进行汇总:

[0215] 表 4:依据 Ki-67 的增殖肿瘤细胞

[0216]

试验组	治疗	% 细胞试验阳性	对比对照物 t-检验	n
1	对照肿瘤	13.5 ± 7.8		12
3	RU 486 (10 毫克/公斤)	12.9 ± 7.0	p = 0.85	10
4	P4(孕酮)(10 毫克/公斤)	25.7 ± 5.8	p = 0.0007	9
6	4124 (10 毫克/公斤)	5.1 ± 4.2	p = 0.00	7
11	4124 + P4 (10 + 10)	15.5 ± 12.2	P = 0.66	8
	ANOVA	p = 0.0001	[P4 > 对照物, RU486, 4124+P4>4124]	

通过多程检验法进行事后分析

[0217] 与对照物和使用 CDB-4124 进行治疗的动物相比,孕酮可增加增殖细胞的百分比。孕酮导致最高比例的细胞增殖,并且,此类增长超过对照物、RU486,或 CDB-4124 外加孕酮试验组中的增长情况。单独使用 CDB-4124 进行治疗,将使得 Ki-67-阳性细胞的比例低于任何其它治疗方案,并且,比例小于对照物中的比例。从使用 CDB-4124 进行治疗的实验鼠中取得组织样本,比从使用 RU 486 (p = 0.021, t-检验) 进行治疗的实验鼠中取得的组织样本,增殖程度更低 (Ki-67-阳性细胞更少)。因此,CDB-4124 对于防止乳腺组织的增殖,比 RU 486 更有效 (p = 0.011, 单尾 t-检验)。CDB-4124 的治疗效果同样不同于 CDB-4124+P4 (p = 0.048, t-检验)。此外,使用 CDB-4124 加 P4 进行治疗,比起单独使用 P4,细胞增殖有所减少 (p = 0.030, t-检验)。试验组中的增殖减退如以下顺序所示:孕酮 (最大增殖) > 对照物 = RU486 = CDB-4124+孕酮 > 仅 CDB-4124。因此,即使增加相同剂量的孕酮,CDB-4124 也能够有效减少细胞增殖。

[0218] 使用细胞凋亡杂化试剂盒 (Oncor, Gaithersburg, MD),对细胞凋亡进行评估。对肿瘤外周和远离坏死部分的凋亡细胞进行评估。对每个肿瘤切面的至少 1,000 个细胞进行

评估。如表 5 中所示,相对于未经治疗的对照动物,试验组中存在明显差异:

[0219] 表 5:细胞凋亡(细胞程序死亡中的肿瘤细胞%)

[0220]

试验组	治疗	% 细胞试验阳性	对比对照物 t-检验
1	对照肿瘤	0.81 ± 0.31	
3	RU 486 (10 毫克/公斤)	3.34 ± 2.57	p = 0.003
4	P4(孕酮)(10 毫克/公斤)	1.28 ± 0.51	p = 0.015
6	4124 (10 毫克/公斤)	3.84 ± 3.10	p = 0.003
11	4124 + P4	3.78 ± 4.93	P = 0.0496
	ANOVA	p = 0.003	[4124+P4 > 对照物, P4; RU486, 4124+P4>4124, 对照物] 通过多程检验法进行事后分析

[0221] 通过多程检验法进行事后分析,表明 CDB-4124 加孕酮,比起对照物或使用孕酮进行治疗的动物,能够诱发更程度的细胞凋亡。并且,RU486、CDB-4124 及 CDB4124 加孕酮,比起在对照肿瘤中观察到的情况,能够诱发程度更高的凋亡性细胞死亡。使用 CDB-4124 的治疗效果与 RU486 相同 (p = 0.73, t- 检验)。同样,CDB-4124 的治疗效果与 CDB-4124+P4 相同 (p = 0.98, t- 检验)。此类结果表明,使用剂量近似相等的孕酮,肿瘤能够对抗孕激素 CDB4124 和细胞凋亡起反应。相反,与 P4 相比,CDB-4124 将导致细胞凋亡增加 (p = 0.020, t- 检验)。CDB-4124 和孕酮之间并未出现表面协同现象。CDB-4124 可减少增殖的能力,对 CDB-4124 的肿瘤抑制物活性较为重要,因为 CDB-4124 和 RU 486 之间的主要差异之一,是 CDB-4124 能够比 RU 486 更有效地减少增殖。通过中断或抑制孕酮较强增殖作用的貌似合理的机理,CDB-4124 能够减少增殖。

[0222] 范例 10。肿瘤组织中的雌激素和孕酮受体 (ERs 及 PRs) 的表达。

[0223] 对经过增殖和细胞凋亡评估的肿瘤,同时使用免疫组织化学技术 (IHC) 评估雌激素和孕酮受体的表达。确认并分析 ER 和 PR 的细胞阳性百分比。将肿瘤按组分为 4 个不同分类:具有 0%细胞表达 ER 的肿瘤,具有 10%细胞表达 ER 的肿瘤,具有 15 至 30%细胞表达 ER 的肿瘤,及具有 30-50%细胞表达 ER 的肿瘤。通常,未经治疗的肿瘤始终表达为 ER。接受分析的 12 个肿瘤全部表达为 ER。这 12 个肿瘤中,有 4 个含 30-50% ER- 阳性细胞。与未经治疗的对照肿瘤相比,7 个使用 CDB-4124 进行治疗并经过分析的肿瘤中,有 3 个不含 ER 表达细胞,所有肿瘤均未含 30-50%的 ER- 表达细胞,并且只有 1 个样本含 15-30%的 ER- 阳性细胞。因此,使用 RU 486 或 CDB-4124 进行治疗可降低表达 ER 的细胞数量。

[0224] 使用孕酮进行治疗,与从使用 CDB-4124 或 RU 486 进行治疗的动物中取得的样本,细胞表达 ER 的数量得到增加。结合 CDB-4124 与孕酮进行治疗,将趋向于产生更类似单独使用 CDB-4124 进行治疗的特性。此结果与结合 10 毫克/公斤 CDB-4124+10 毫克/公斤孕酮进行治疗所观察到的结果相一致,两者均具备肿瘤抑制作用,包括减少肿瘤数量,抑制肿瘤生长并减少肿瘤重量。通常,使用抗孕激素进行长期治疗,趋向于降低肿瘤内的 ER 水平,而孕酮趋向于产生反作用。

[0225] 范例 11。肿瘤中孕酮受体 (PR) 的表达。

[0226] 未经治疗的肿瘤始终表达为 PR(12/12 肿瘤)。通常, 未经治疗的肿瘤表达为受体、ER 和 PR, 因此, 多数恶性肿瘤可能是这两种转录因子的表达物。使用 RU 486 进行的治疗, 对 PR 表现为中性, 且 CDB-4124 可降低 PR 表达水平。值得注意的是, 在 3 个肿瘤中, RU486 导致 ER 损失, 但保持较低的阳性 PR 水平。孕酮趋向于增加 PR 表达。CDB-4124 和孕酮结合使用, 趋向于产生更类似单独使用 CDB-4124 的特性; 同样, 在肿瘤数量、生长特性和肿瘤重量上, 与结合使用 10 毫克 / 公斤 CDB-4124+10 毫克 / 公斤孕酮的效果相一致。通常, 使用 CDB-4124 进行长期治疗, 趋向于降低肿瘤内的 PR 水平, 而孕酮趋向于产生反作用。因此, 在使用孕酮的情况下, 肿瘤将保持孕酮应激性。

[0227] 范例 12。测试抗孕激素对血清激素水平的影响。

[0228] 在研究过程中, 三次确定甾类激素的浓度: 开始治疗前, 治疗 21 天后, 最后在处死并处理后, 即最后一次注射 s. c. 后的 2-4 天。所有样本均通过心脏穿刺取得。采集血清并置于 -40°C 的冷冻条件下。通过 ELISA 确定甾类激素的水平。

[0229] 实验鼠中的孕酮测量结果如表 6 所示:

[0230] 表 6: 治疗对血清孕酮的影响

[0231]

血清孕酮 @ 纳克 / 毫升					
试验组	治疗 (TX)		TX 之前	TX 期间	TX 之后
1	对照物	平均	53	42	46
	赋形物	sd	37	15	27
2	无 DMBA	平均	47	50	45
	赋形物	sd	18	25	18
3	RU 486	平均	58	72*	52
	10 毫克 / 公斤	sd	19	30	20
4	孕酮 (P4)	平均	51	55	54
	10 毫克 / 公斤	sd	18	21	11
5	4124	平均	61	96*	58
	20 毫克 / 公斤	sd	24	27	11
6	4124	平均	52	77*	43
	10 毫克 / 公斤	sd	28	21	33
7	4124	平均	59	74*	56
	2 毫克 / 公斤	sd	22	16	19
8	4124	平均	64	47	42
	1 毫克 / 公斤	sd	24	21	30
9	4124	平均	54	53	53
	0.1 毫克 / 公斤	sd	20	25	28
10	4124 + P4	平均	43	80=	66
	20 + 10	sd	16	21	32
11	4124 + P4	平均	52	74=	55
	10 + 10	sd	18	12	14
12	4124 + P4	平均	46	64	55
	2 + 10	sd	24	15	14
13	4124 + P4	平均	58	70	40
	1 + 10	sd	20	19	18
14	4124 + P4	平均	55	57	41
	0.1 + 10	sd	17	16	18
15	4059	平均	57	58	47
	10 毫克 / 公斤	sd	16	25	24

[0232] * $p < 0.05$ 对比对照物 (第 1 组) = $p < 0.05$, 对比 P4 (第 4 组)

[0233] 治疗前 ($p = 0.49$, ANOVA) 或治疗后 ($p = 0.35$, ANOVA), 各组之间的血清孕酮水平并无差异, 但通过治疗 ($p = 0.000$, ANOVA) 发现明显变化。与对照物相比, 多数治疗方案可提升孕酮水平, 尤其是使用最高剂量 RU486 及 CDB-4124 的试验组 (表 6)。在接受 21

天治疗的试验组中,出现明显差异,具体如下所示 ($p = 7 \times 10^{-6}$, Kruskal-Wallis 检验):RU 486, 三种最高剂量的 CDB-4124, 及两种最高剂量的 CDB-4124 外加孕酮。使用 10 毫克 / 公斤剂量进行检验,发现 CDB-4059 不会将血清孕酮水平提升至治疗前的水平。所有试验组的血清孕酮水平平均恢复至 0 天水平,但以 20 毫克 / 公斤剂量,使用 CDB-4124 的试验组除外,停止治疗后,这些试验组的血清孕酮并未出现下降 ($p = 0.004$, 配对 t- 检验,单尾)。单独使用孕酮未能提升血清浓度的情况令人感到困惑,原因可能是高外源性孕酮对内源性生产起抑制作用。外源性孕酮也可以在随后 20-24 小时执行 s. c. 注射和抽血之间产生代谢变化。10 毫克 / 公斤浓度的 CDB-4059,对女性体内的内源性孕酮不起作用,相比之下,使用相同浓度的 CDB-4124 具备一定优势。

[0234] 范例 13。测量皮质醇。

[0235] 多个不同实验系统支持 RU 486 增加皮质醇的结论,因为 RU 486 在人类和灵长类动物体内具备较强的抗糖皮质激素特性。

[0236] 但是,使用 RU 486,以 10 毫克 / 公斤的剂量进行治疗的实验鼠,皮质醇水平未出现显著差异。相反,使用 CDB-4124 或 CDB-4059,以相同剂量进行治疗的实验鼠,较之对照组的实验鼠,具备更高的血清皮质醇水平。

[0237] 最高水平在 3-4 微克 / 升 (30-40 纳克 / 毫升) 范围内。作用依据剂量而定,增加 CDB-4124 的剂量将导致皮质醇增加。

[0238] RU 486 与 CDB-4124 或 CDB-4059 对皮质醇水平的作用各有不同,并可通过下述方法进行说明,即假定慢性用药 21 天后,较之两种 CDB 化合物, RU 486 能够更好地被鼠肝脏所代谢。

[0239] 范例 14。测量皮质甾酮。

[0240] 皮质甾酮是鼠中数量最多的糖皮质激素。SPRM 对皮质醇的作用,可能次于对皮质甾酮的强烈作用。为更好地解释这一现象,应分组测量皮质甾酮水平,并以皮质醇水平显示最强的变化,如使用 CDB-4124,以 20 毫克 / 公斤或 10 毫克 / 公斤的剂量进行治疗。为进行比较,可同时测试以下分组:一组使用 20 毫克 / 公斤 CDB-4124 外加 10 毫克 / 公斤孕酮,一组使用 10 毫克 / 公斤 CDB-4124 外加 10 毫克 / 公斤孕酮,一组使用 10 毫克 / 公斤 RU 486,一组单独使用 10 毫克 / 公斤孕酮,一个对照组,以及一组不使用 DMBA 且无肿瘤。皮质甾酮水平比皮质醇水平高出 10-40 倍。但是,观察平均皮质甾酮水平时,各组之间几乎无差别。治疗前 ($p = 0.43$, Kruskal-Wallis 检验),治疗 21 天后 ($p = 0.57$, Kruskal-Wallis 检验),或治疗 28 天后并处死 ($p = 0.061$, Kruskal-Wallis 检验),这八组之间并无差别。从统计数据来看,在 21 天 ($p = 0.94$, t- 检验,双尾) 或处死时 ($p = 0.37$, t- 检验,双尾),有肿瘤和无肿瘤的动物之间,皮质甾酮水平并无差异。

[0241] 为评估外源性孕酮对血清皮质甾酮的作用,可对比 3 个配对组(它们之间的差别在于是否使用外源性孕酮)的皮质甾酮水平(如对比对照物和孕酮,或按 20 毫克 / 公斤使用 CDB-4124 与按 20 毫克 / 公斤使用 CDB-4124 外加孕酮,或按 10 毫克 / 公斤使用 CDB-4124 与按 10 毫克 / 公斤使用 CDB-4124 外加孕酮)。经统计,发现存在明显差异:使用孕酮进行治疗的动物,在治疗 21 天后 ($p = 0.029$, Mann-Whitney Wilcoxon 检验,双尾),皮质甾酮水平较低。此作用未在处死时取得的血清中加以验实。孕酮和 CDB-4124 组之间,孕酮和 RU-486 组之间,或 RU-486 组和 CDB-4124 组之间,血清皮质甾酮并无差别。

[0242] 同时将检查每组中的血清皮质醇和血清皮质甾酮之间的关系。按 20 毫克 / 公斤使用 CDB-4124 ($r^2 = 0.78$), 按 10 毫克 / 公斤使用 CDB-4124 ($r^2 = 0.82$), 及使用 RU 486 ($r^2 = 0.85$), 两者之间具备较强的正线性关联。向开头两个 CDB-4124 组添加孕酮, 将显著减弱两组之间的关系 (分别为, 第 10 组 $r^2 = 0.34$ 及第 11 组 $r^2 = 0.37$)。孕酮本身并不具备此类正关系 ($r^2 = -1.0$)。对照组显示两种糖皮质激素之间并无关系 ($r^2 = 0.064$)。因此, 使用 CDB-4124 的组中皮质醇水平出现增加, 与皮质甾酮水平有关, 原因可能是皮质甾酮在转化时得到某种程度的加强。这与上述 CDB-4124 的作用相一致: 作用于负责孕酮和皮质醇水平的代谢酶类。

[0243] 虽然未发现 CDB-4124 对实验鼠的主要糖皮质激素有较强影响, 但是, 出于安全原因, 应对在第一临床实验阶段使用 CDB-4124 或 CDB-4059 的病人进行监控, 观察病人可能出现的抗糖皮质激素反应, 包括皮质醇、皮质甾酮或 ACTH 可能增加的情况。

[0244] 范例 15。检验 SPRM 在抗三苯氧胺乳腺癌细胞中的抗增殖作用。

[0245] 使用两个细胞系: MCF-7 (对抗雌激素、三苯氧胺敏感的细胞系), 及 LY-2 (耐三苯氧胺的 MCF-7 变体)。在 96 微孔滴定板中测量增殖。向每个微孔加入 5×10^3 细胞。使用 Perkin Elmer CetusPRO/PETTE, 向微孔中添加培养基和药料溶液。培养基为 IMEM, 并添加 5% 胎牛血清。8 种药物浓缩物接受测试, 一式两份, 从 0.078 微米至 10 微米。测试实例包括单独测试三苯氧胺, 及测试本规格中的每种化合物连同三苯氧胺。

[0246] 经过 4 天的培育后, 用含药物的介质替换原有介质, 经过总共 7 天的培育后, 用三氯乙酸凝固细胞单层, 并用磺酰罗丹明染料进行染色。使用 Titertek Multiscan 微孔板读取器测量浸出染液的吸收度 (492 纳米)。绘制剂量反应曲线 (对照物吸收度与药片浓度的百分比), 以便评估用于抑制 50% 增殖, 并作为药片浓度 (微摩尔级) 进行定义的 IC_{50} 值。 IC_{50} 值与用于抑制细胞增殖的受测药物的效价强度有关, 并可提供用于确认化合物是否适于抑制子宫细胞过量增殖所需的信息。

[0247] 范例 16。CDB-4124 和芳香化酶 - 过量表达 T47D 乳腺癌细胞中的芳香化酶抑制剂 DL-氨基乙哌啶酮的抗增殖效果。

[0248] 芳香化酶抑制成为治疗甾类受体阳性乳腺癌病人的首选方案。确定体外芳香化酶抑制剂的效应力较为困难, 因为已知乳腺癌细胞仅表达极小的芳香化酶活性。因此, 通过将人体胎盘 cDNA 的芳香化酶基因 (hCYP 19A1) 克隆入哺乳动物的表达载体 pcDNA3.1, 以形成芳香化酶过量表达 T47D 细胞系, 并稳定转染 T47D 乳腺癌细胞, 同时始终将空载体作为对照物。携带 hCYP19A1 的重组细胞的 pcDNA3.1 排序数据表明, hCYP19A1 ORF 区域已被 100% 命中。芳香化酶转染细胞经过筛选, 以过量表达芳香化酶活性蛋白质。单细胞克隆的芳香化酶表达 (T47D_{芳烃}), 通过 RT-PCR, 蛋白质印迹, 雌激素 ELISA, 及细胞增殖测定法进行确定。RT-PCR 在 T47D_{芳烃} 中的芳香化酶 mRNA 表达, 比母细胞 T47D 高出大约 32 倍, 这表明, 无论是否使用睾丸激素诱导, 均具备较高的芳香化酶 mRNA 表达。58kD 芳香化酶蛋白质的表达, 通过蛋白质印迹分析, 使用鼠单克隆抗芳香化酶抗体进行确认。T47D 对照细胞中未检测到芳香化酶表达。T47D_{芳烃} 细胞中的高芳香化酶活性, 通过雌激素 ELISA 试剂盒进行确认。简而言之, 与 T47D 对照细胞相比, 使用 10 纳米雄烯二酮进行 24 小时的治疗, 检测到较高等级的雌激素。与 T47D 对照细胞相比, 雌激素 ELISA 在 450 纳米时对 T47D_{芳烃} 细胞具有较低的吸附性。

[0249] 将 T47D_{芳香} 细胞按 10,000 个细胞 / 孔的密度置于 24 微孔滴定板中, 培育 2 天后, 使用浓度为 1 微米、2 微米、3 微米、4 微米和 5 微米的 CDB-4124, 在正常培养 (10% 碳条 FBS/ 无苯酚 MEM 介质) 条件下, 进行为期 4 天的处理。未处理细胞用作对照物。使用结晶紫测定法以测量细胞增殖。此测定法中使用的染料 (结晶紫), 用于为 DNA 染色。溶液化后, 被细胞吸收的染料数量, 可通过分光光度计进行测定。使用 CDB-4124 进行治疗, 能够以剂量依赖方式, 抑制 T47D_{芳香} 细胞的增殖。请参阅图 2。

[0250] 然后, 以 10,000 个细胞 / 孔的密度, 将 T47D_{芳香} 细胞置于 24 微孔滴定板中进行处理, 经过 2 天的培育后, 使用 50 微米、75 微米、100 微米, 或 150 微米的 DL- 氨基乙哌啶酮 (AGM), 结合 1 纳米睾丸激素, 执行为期 4 天的正常培养, 并测定对细胞增殖的影响。结果如图 3 所示。

[0251] 然后, 以 10,000 细胞 / 孔的密度, 将 T47D_{芳香} 细胞置于 24 微孔滴定板中并进行处理, 经过 2 天的培育后, 使用: (1) 100 微米的 DL- 氨基乙哌啶酮 (AGM) + 1 微米 CDB-4124; (2) 100 微米的 DL- 氨基乙哌啶酮 (AGM) + 2 微米 CDB-4124; (3) 100 微米的 DL- 氨基乙哌啶酮 (AGM) + 3 微米 CDB-4124; 或 (4) 100 微米的 DL- 氨基乙哌啶酮 (AGM) + 4 微米 CDB-4124, 结合 1 纳米睾丸激素, 在正常培育条件下进行为期 4 天的培育, 并测定对细胞增殖的影响。结果如图 4 所示。在结合 AGM 和 CDB-4124 进行治疗期间, 细胞增殖的抑制呈剂量依赖性。观察到 AGM 和 CDB-4124 的组合物对抑制乳腺癌细胞表达芳香化酶增殖的增效作用, 令人感到意外。如图 4 所示, 使用 4 微米 CDB-4124 和 AGM 的组合物, 可抑制近 70% 的细胞增殖, 而分别使用浓度一样的相同化合物, 只能抑制低于 30% 的细胞增殖。换句话说, 使用 AGM 和 CDB-4124 的组合物进行治疗期间, 观察到的细胞增殖抑制作用, 大于单独使用 AGM 或 CDB-4124 所可能观察到的抑制作用。

[0252] 此类结果表明高剂量 CDB-4124 结合芳香化酶抑制, 为治疗乳腺癌提供协同增效化学治疗效果。CDB-4124 结合其它芳香化酶抑制剂时, 将对细胞增殖起到类似的协同作用。

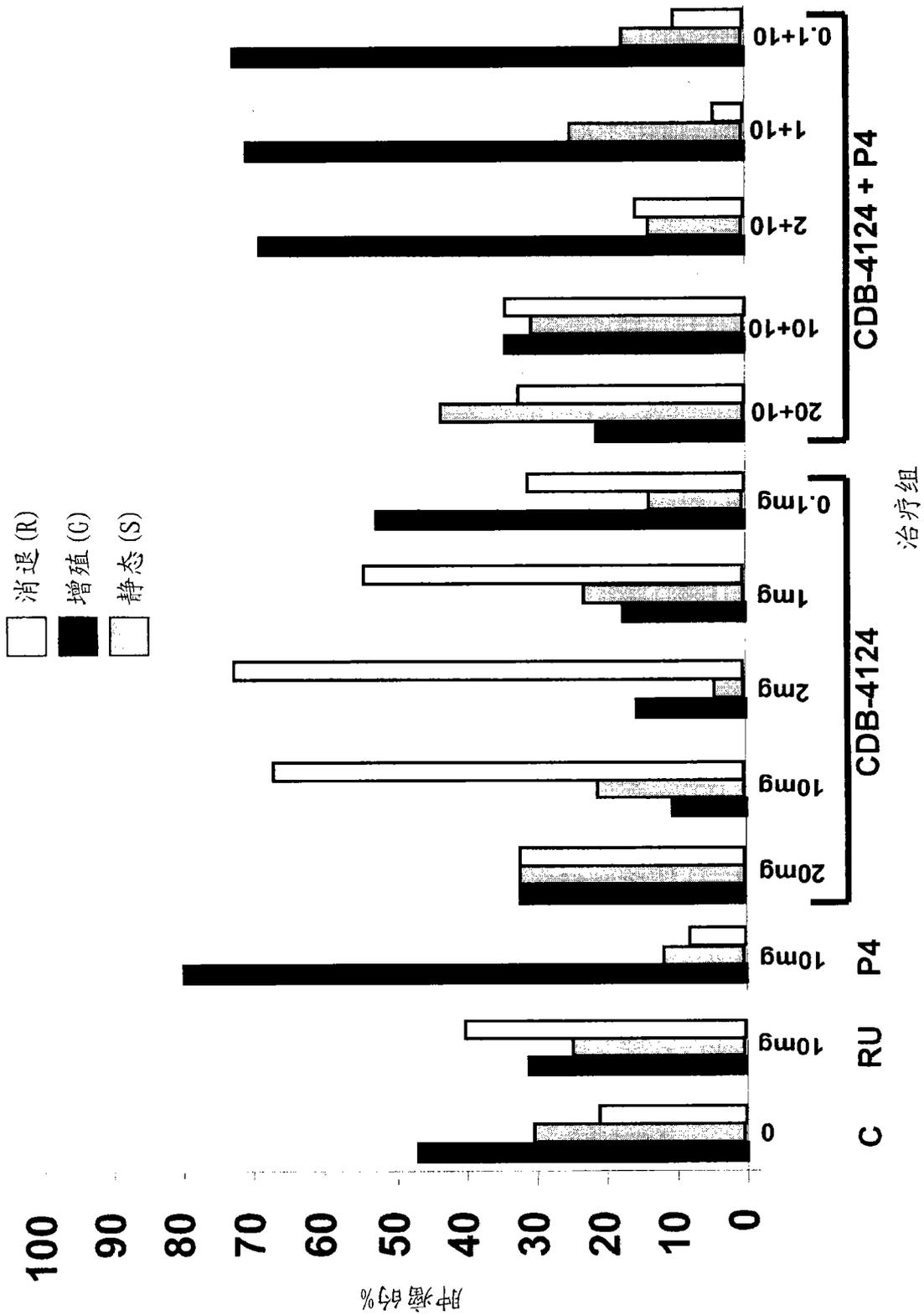


图 1

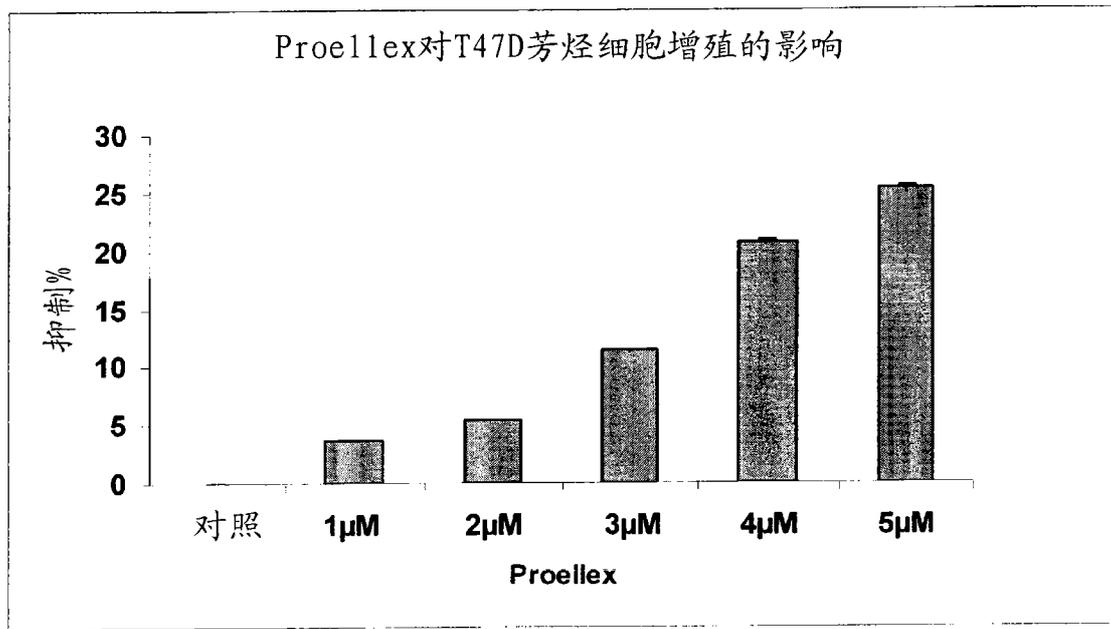


图 2

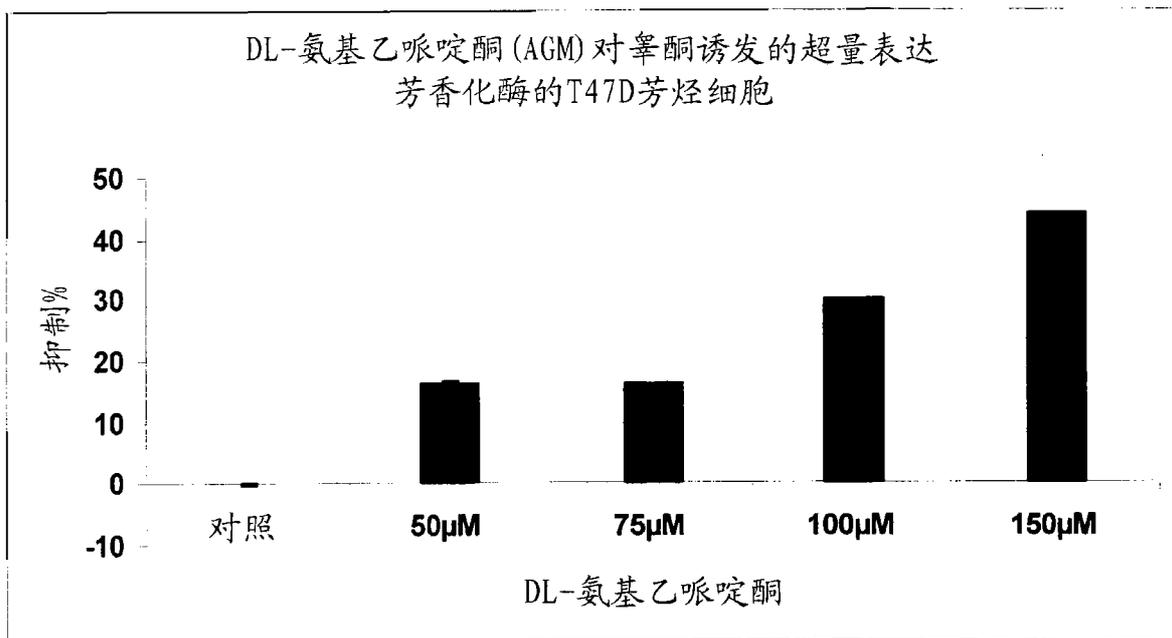


图 3

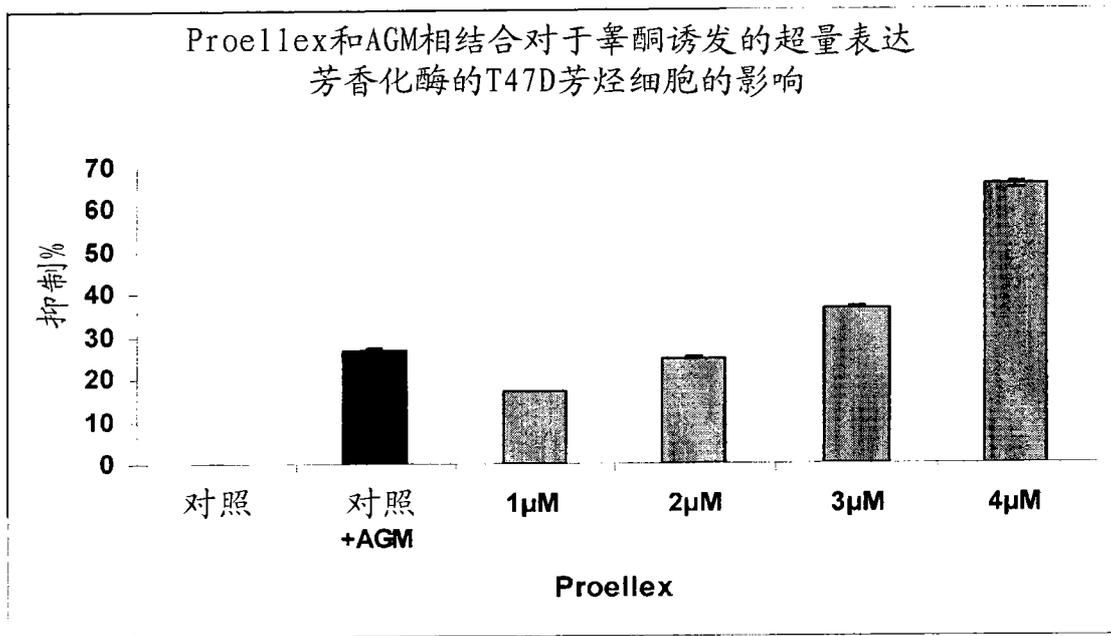


图 4