

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/565

A61K 31/35 A61P 15/12

A61P 19/10



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01804028.4

[43] 公开日 2003 年 3 月 5 日

[11] 公开号 CN 1400904A

[22] 申请日 2001.1.26 [21] 申请号 01804028.4

[30] 优先权

[32] 2000. 1.28 [33] US [31] 60/178,601

[86] 国际申请 PCT/CA01/00086 2001.1.26

[87] 国际公布 WO01/54699 英 2001.8.2

[85] 进入国家阶段日期 2002.7.23

[71] 申请人 恩多研究公司

地址 加拿大魁北克省

[72] 发明人 F·拉布里

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

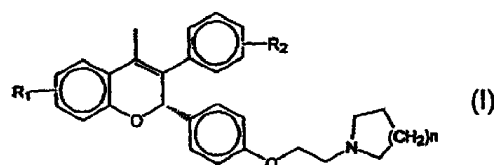
代理人 杨九昌

权利要求书 12 页 说明书 76 页 附图 34 页

[54] 发明名称 与雌激素联合的选择性雌激素受体调节剂

[57] 摘要

公开了在易感的温血动物包括人类中降低或消除热潮红和绝经症状发生率、同时降低患乳腺癌或子宫内膜癌的危险、此外还治疗和/或抑制以下疾病发展的新方法:骨质疏松、血胆固醇过多、血脂过多、动脉粥样硬化、高血压、胰岛素抵抗、糖尿病、肌肉质量损失、肥胖、不规则月经、早老性痴呆或阴道干燥;所述方法包括给予选择性雌激素受体调节剂(特别是具有通用结构(I)的化合物)和一定量的雌激素或混合雌激素/雄激素化合物。尤其公开了进一步给予二膦酸盐或性类固醇前体,用于药物治疗和/或抑制这些上述疾病中某些疾病的发展。也公开了可用于本发明的用于传递有效成分的药用组合物和试剂盒。



1. 一种降低或消除绝经症状发生率的方法，所述方法包括给予需要所述消除或降低的患者治疗有效量的雌激素或其前药并结合给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂或其前药，所述调节剂是不同于所述雌激素的化合物并且不是苯并噻吩衍生物。

2. 一种治疗下述病症或降低患下述病症危险的方法：骨质疏松、血胆固醇过多、血脂过多、动脉粥样硬化、高血压、老年性痴呆、胰岛素抵抗、糖尿病、肌肉质量损失、肥胖、激素替代疗法诱发的阴道出血和激素替代疗法诱发的乳房触痛；所述方法包括给予需要所述消除或降低的患者治疗有效量的雌激素或其前药并结合给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂或其前药，所述调节剂是不同于所述雌激素的化合物并且不是苯并噻吩衍生物。

3. 一种治疗骨质疏松或降低患骨质疏松危险的方法，所述方法包括给予需要所述消除或降低的患者治疗有效量的雌激素或其前药并结合给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂或其前药，所述调节剂是不同于所述雌激素的化合物并且是不同于以下物质的化合物：苯并噻吩衍生物、萘衍生物、异喹啉衍生物或具有超过 10% 的 2R 构型对映体的 3-苯基喹啉衍生物、3-苯硫基苯并二氢吡喃衍生物、3-苯基苯并二氢吡喃衍生物的对映体混合物。

4. 一种药用组合物，所述药用组合物包含：

- a) 一种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体；
- b) 治疗有效量的至少一种雌激素或其前药；和
- c) 治疗有效量的至少一种选择性雌激素受体调节剂或其前药，其中所述调节剂是不同于所述雌激素的化合物，并且所述调节剂不是苯并噻吩衍生物、萘衍生物、异喹啉衍生物或具有超过 10% 的 2R 构型对映体的 3-苯基喹啉衍生物、3-苯硫基苯并二氢吡喃衍生物、3-苯基苯并二氢吡喃

衍生物的对映体混合物。

5. 一种试剂盒，所述试剂盒包括一个第一容器，所述第一容器含有一种包含治疗有效量的至少一种雌激素或其前药的药用制剂；并且所述试剂盒还包括一个第二容器，所述第二容器含有一种包含治疗有效量的至少一种选择性雌激素受体调节剂或其前药的药用制剂，所述调节剂不是苯并噻吩衍生物。

6. 一种药用组合物，所述药用组合物包含：

- a) 一种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体；
- b) 治疗有效量的至少一种雌激素或其前药；
- 10 c) 治疗有效量的至少一种选择性雌激素受体调节剂或其前药，其中所述调节剂是不同于所述雌激素的化合物；和
- d) 治疗有效量的至少一种另外的选自下列的药物：二膦酸盐、雄激素类药、睾酮、脱氢表雄酮、硫酸脱氢表雄酮、雄-5-烯-3 β ,17 β -二醇、4-雄烯-3,17-二酮和任一上述另外的药物的前药。

7. 权利要求 2 的方法，其中所述方法还包括给予治疗有效量的二膦酸盐作为联合疗法的一部分的步骤。

8. 一种降低或消除绝经症状发生率的方法，所述方法包括给予需要所述危险消除或降低的患者治疗有效量的雌激素或其前药并结合给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂或其前药，所述调节剂是不同于所述雌激素的化合物，还包括作为联合疗法的一部分给予治疗有效量的至少一种选自下列的另外药物的步骤：脱氢表雄酮、硫酸脱氢表雄酮、雄激素类药、睾酮、雄-5-烯-3 β ,17 β -二醇、4-雄烯-3,17-二酮和任一上述另外药物的前药。

9. 一种治疗下述病症或降低患下述病症危险的方法：骨质疏松、血胆固醇过多、血脂过多、动脉粥样硬化、高血压、早老性痴呆、胰岛素抵抗、糖尿病、肌肉质量损失、肥胖、激素替代疗法诱发的阴道出血和激素替代疗法诱发的乳房触痛；所述方法包括给予需要

所述消除或降低的患者治疗有效量的雌激素或其前药并结合给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂或其前药，所述调节剂是不同于所述雌激素的化合物，还包括作为联合疗法的一部分给予治疗有效量的至少一种选自下列的另外药物的步骤：脱氢表雄酮、
5 硫酸脱氢表雄酮、雄-5-烯-3 β ,17 β -二醇、雄激素类药、睾酮、4-雄烯-3,17-二酮和任一上述另外药物的前药。

10. 一种试剂盒，所述试剂盒包括一个第一容器，所述第一容器含有一种包含治疗有效量的至少一种雌激素或其前药的药用制剂；并且所述试剂盒还包括一个第二容器，所述第二容器含有一种包含
10 治疗有效量的至少一种选择性雌激素受体调节剂或其前药的药用制剂，所述试剂盒包括至少一个另外的容器，所述另外的容器含有治疗有效量的至少一种选自下列的另外的药物：脱氢表雄酮、硫酸脱氢表雄酮、雄-5-烯-3 β ,17 β -二醇、雄激素类药、睾酮、4-雄烯-3,17-二酮和任一上述另外药物的前药。

15 11. 可用于治疗骨质疏松或降低患骨质疏松危险的权利要求 5 或权利要求 10 的试剂盒，所述试剂盒包括至少一个另外的容器，所述容器含有一种包含治疗有效量的至少一种二膦酸盐的药用制剂。

12. 权利要求 1 的方法，所述方法还包括作为联合疗法的一部分给予治疗有效量的一种雄激素类药。

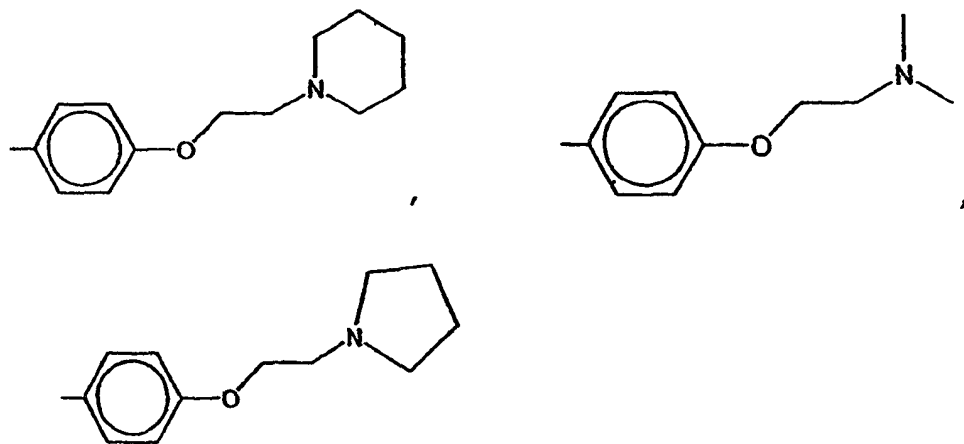
20 13. 权利要求 1-12 中任一项的方法、药用组合物或试剂盒，其中所述选择性雌激素受体调节剂的分子式具有以下特征：

a) 由 1-2 个间插碳原子间隔的两个芳环，两个芳环或者是未取代的，或者被一个羟基或一个在体内转变为羟基的基团取代；

b) 具有一个芳环和一个叔胺官能或其盐的侧链；

25 并且其中所述调节剂不是苯并噻吩衍生物、萘衍生物、异喹啉衍生物或具有超过 10% 的 2R 构型对映体的 3-苯基喹啉衍生物、3-苯硫基苯并二氢吡喃衍生物、3-苯基苯并二氢吡喃衍生物的对映体混合物。

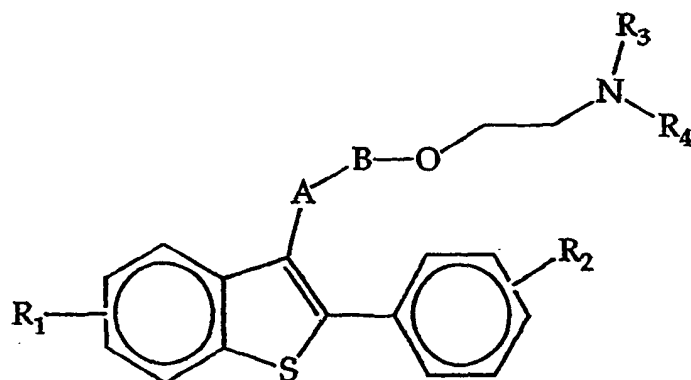
14. 权利要求 13 的方法、药用组合物或试剂盒，其中所述侧链选自：



和

15. 权利要求 13 的方法、药用组合物或试剂盒，其中所述选择性雌激素受体调节剂选自：三苯乙烯衍生物、吲哚衍生物、苯并吡喃衍生物、HMR 3339、HMR 3656、LY 335124、LY 326315、SH 646、ERA 923 和苯并二氢吡喃(centchroman)衍生物。

16. 权利要求 6 的药用组合物、权利要求 8 和 9 的方法或权利要求 10 的试剂盒，其中所述选择性雌激素受体调节剂是下式的苯并噻吩衍生化合物：



其中 R_1 和 R_2 独立选自氢、羟基和在体内转变为羟基的部分；

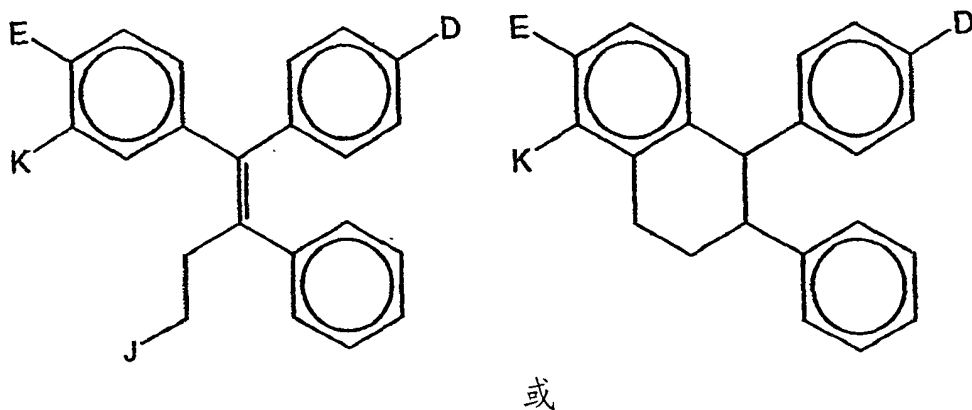
其中 R_3 和 R_4 或者(a)独立地为 C1-C4 烷基，或者(b)是与它们连接的氮结合为选自下列的部分：吡咯烷基、二甲基-1-吡咯烷基、甲基-1-吡咯烷基、哌啶基、六亚甲基亚氨基和吗啉代；

其中 A 选自 -CO-、-CHOH 和 -CH₂-;

其中 B 选自亚苯基、亚吡啶基和 -环 C₄H₂N₂-。

17. 权利要求 16 的方法、药用组合物或试剂盒, 其中所述选择性雌激素受体调节剂选自雷洛昔芬、LY 353381 和 LY 335563。

5 18. 权利要求 13 的方法、药用组合物或试剂盒, 其中所述选择性雌激素受体调节剂是下式的三苯乙烯或二苯基氢化萘衍生化合物:

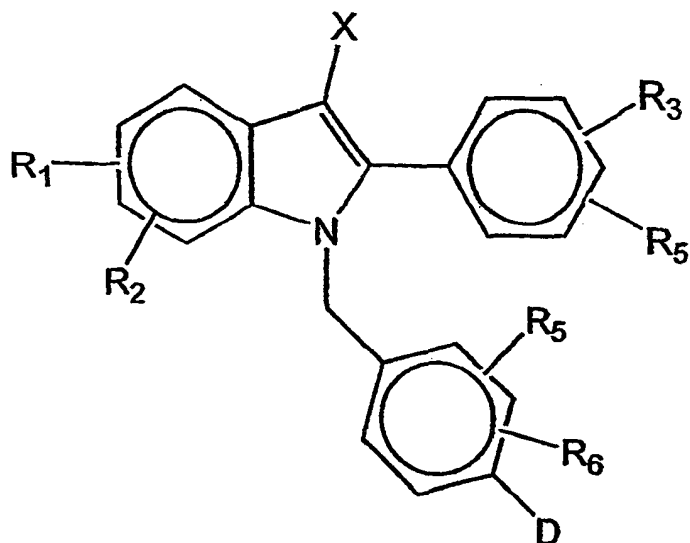


10 其中 D 是 -OCH₂CH₂N(R₃)R₄、-OCH₂CH₂OH 或 -CH=CH-COOH (R₃ 和 R₄ 或者独立选自 C1-C4 烷基, 或者 R₃、R₄ 以及与它们连接的氮原子一起为选自下列的环结构: 吡咯烷基、二甲基-1-吡咯烷基、甲基-1-吡咯烷基、哌啶子基、六亚甲基亚氨基和吗啉代);

15 其中 E 和 K 独立地为氢或羟基、磷酸酯或低级烷基, 其中 J 为氢或卤素。

19. 权利要求 1-14 中任一项的方法、药用组合物或试剂盒, 其中选择性雌激素受体调节剂是 OH-他莫昔芬、屈洛昔芬、托瑞米芬、艾多昔芬、Lasofoxifene、iproxifene、FC 1271 和 GW5638。

20 20. 权利要求 13 的方法、药用组合物或试剂盒, 其中所述选择性雌激素受体调节剂是下式的吲哚衍生化合物:



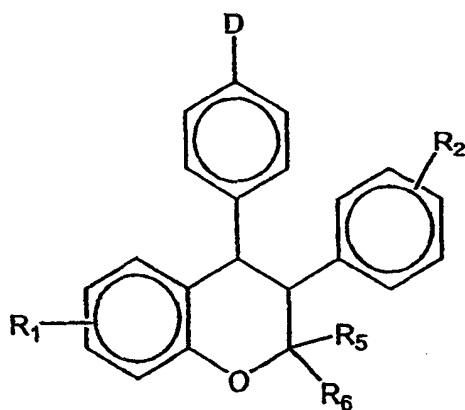
其中 D 选自 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_7)\text{R}_8$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CON}(\text{R}_7)\text{R}_8$ 、 $-\text{CC}-(\text{CH}_2)_n-\text{N}(\text{R}_7)\text{R}_8$ (R_7 和 R_8 或者独立选自 C_1-C_6 烷基, 或者 R_7 、 R_8 以及
与它们连接的氮原子一起为选自下列的环结构: 吡咯烷基、二甲基-1-
吡咯烷基、甲基-1-吡咯烷基、哌啶子基、六亚甲基亚氨基、吗啉代);

5 其中 X 选自氢和 C_1-C_6 烷基;

其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 和 R_6 独立选自氢、羟基、 C_1-C_6 烷基
和在体内转变为羟基的部分。

21. 权利要求 20 的方法、药用组合物或试剂盒, 其中所述选择
性雌激素受体调节剂是 TSE 424 (2-(4-羟基苯基)-3-甲基-1-[[4-[2-(1-哌
10 啶基)乙氧基]苯基]甲基]-1H-吡啶-5-醇)。

22. 权利要求 13 的方法、药用组合物或试剂盒, 其中所述选择
性雌激素受体调节剂是下式的苯并二氢吡喃衍生化合物:



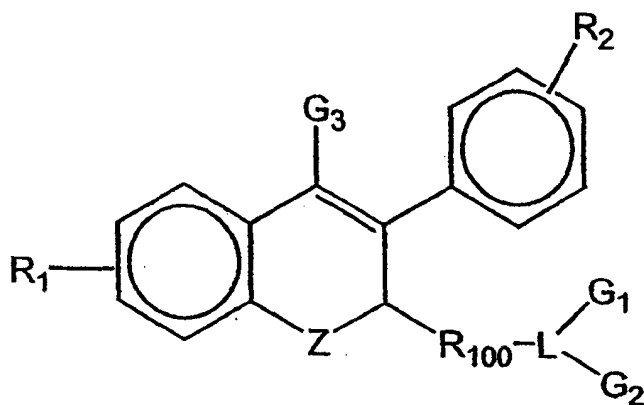
其中 R_1 和 R_2 独立选自氢、羟基和在体内转变为羟基的部分；

其中 R_5 和 R_6 独立地为氢或 C_1 - C_6 烷基；

- 5 其中 D 是 $-OCH_2CH_2N(R_3)R_4$ (R_3 和 R_4 或者独立选自 C_1 - C_4 烷基，或者 R_3 、 R_4 以及与它们连接的氮原子一起为选自下列的环结构：吡咯烷基、二甲基-1-吡咯烷基、甲基-1-吡咯烷基、哌啶子基、六亚甲基亚氨基、吗啉代)。

23. 权利要求 22 的方法、药用组合物或试剂盒，其中所述苯并二氢吡喃衍生物为(3,4-反式-2,2-二甲基-3-苯基-4-[4-(2-(2-(吡咯烷-1-基)乙氧基)苯基]-7-甲氧基苯并二氢吡喃)。

- 10 24. 权利要求 13 的方法、药用组合物或试剂盒，其中所述选择性雌激素受体调节剂具有以下结构式：



其中 R_1 和 R_2 独立选自氢、羟基和在体内转变为羟基的部分；

其中 Z 或者不存在或者选自 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 和 $-NR_3-$ (R_3 为氢或

低级烷基);

其中 R_{100} 为使 L 离开所述 B-环 4-10 个间插原子的二价部分;

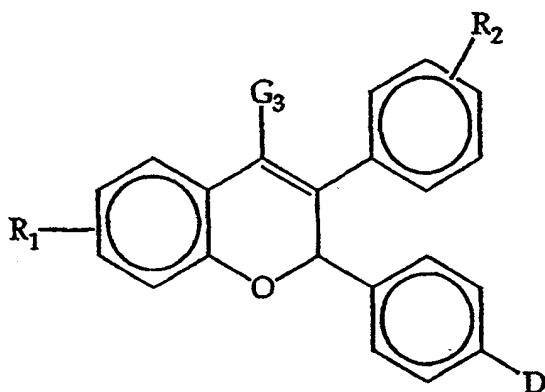
其中 L 为选自 -SO-、-CON-、-N< 和 -SON< 的二价或三价部分;

其中 G_1 选自氢、 C_1 - C_5 烃、与 G_2 和 L 结合在一起为一个 5-7 元杂环的二价部分和上述基团的卤代衍生物或不饱和衍生物;

其中 G_2 或者不存在或者选自氢、 C_1 - C_5 烃、与 G_1 和 L 结合在一起为一个 5-7 元杂环的二价部分和上述基团的卤代衍生物或不饱和衍生物;

其中 G_3 选自氢、甲基和乙基。

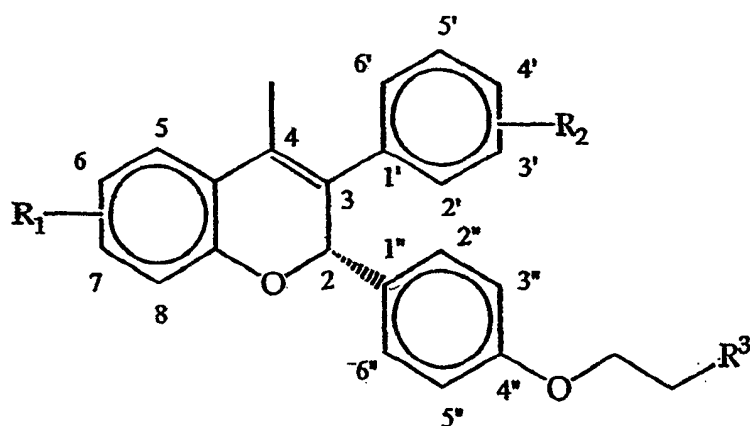
25. 权利要求 24 的方法、药用组合物或试剂盒, 其中所述化合物是具有以下通用结构的苯并吡喃衍生物或其药学上可接受的盐:



其中 D 是 $-OCH_2CH_2N(R_3)R_4$ (R_3 和 R_4 或者独立选自 C_1 - C_4 烷基, 或者 R_3 、 R_4 以及与它们连接的氮原子一起为选自下列的环结构: 吡咯烷基、二甲基-1-吡咯烷基、甲基-1-吡咯烷基、哌啶子基、六亚甲基亚氨基、吗啉代);

其中 R_1 和 R_2 独立选自氢、羟基和在体内转变为羟基的部分。

26. 权利要求 25 的方法、药用组合物或试剂盒, 其中所述苯并吡喃衍生物由于大多数其立体异构体在碳 2 上具有绝对构型 S 而具有旋光性, 所述化合物具有以下分子结构:



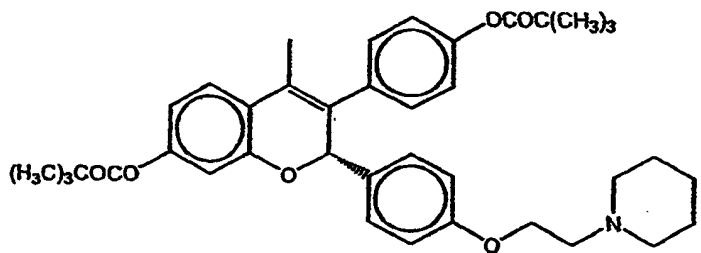
其中 R_1 和 R_2 独立选自羟基和在体内转变为羟基的部分；

其中 R^3 是选自以下的种类：饱和、不饱和或取代的吡咯烷基，
饱和、不饱和或取代的哌啶基，饱和、不饱和或取代的哌啶基，
饱和、不饱和或取代的吗啉代，含氮环部分，含氮多环部分，和 $NRaRb$
5 (Ra 和 Rb 独立地为氢、直链或支链 C_1 - C_6 烷基、直链或支链 C_2 - C_6 链
烯基和直链或支链 C_2 - C_6 链炔基)。

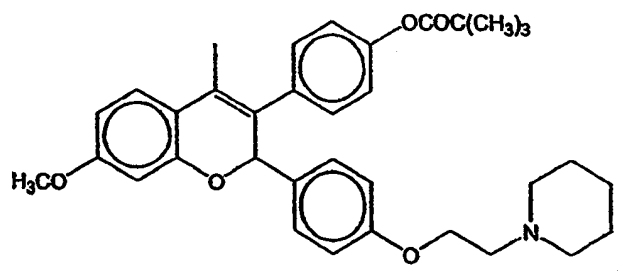
27. 权利要求 26 的方法、药用组合物或试剂盒，其中所述化合物或盐基本缺乏(2R)-对映体。

28. 权利要求 26 的方法、药用组合物或试剂盒，其中所述选择
10 性雌激素受体调节剂选自：

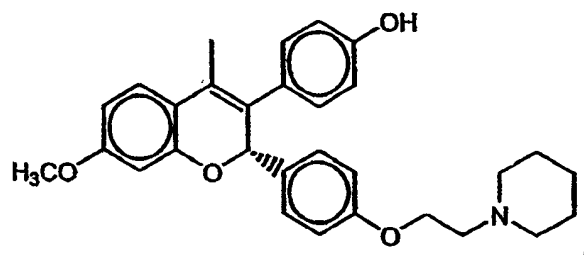
EM-800



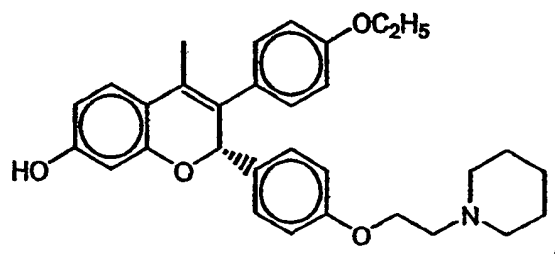
EM-1520



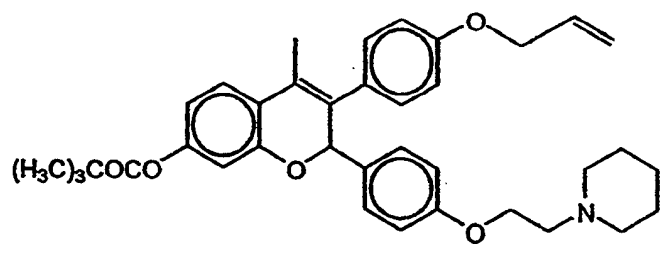
EM-1872



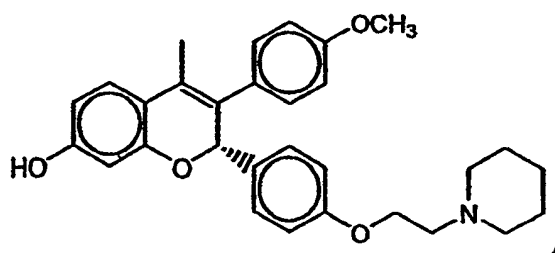
EM-1900



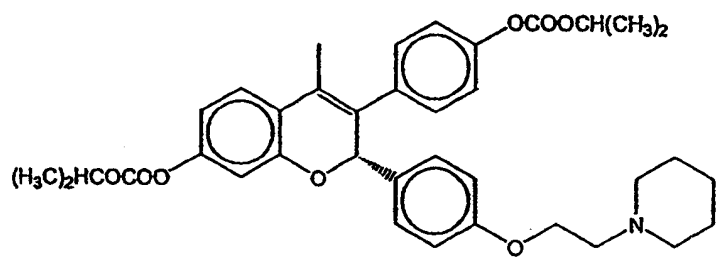
EM-1901

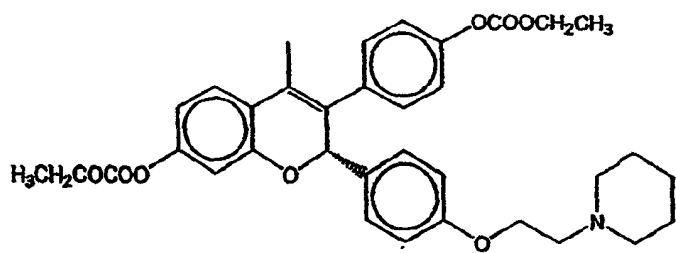


EM-1903

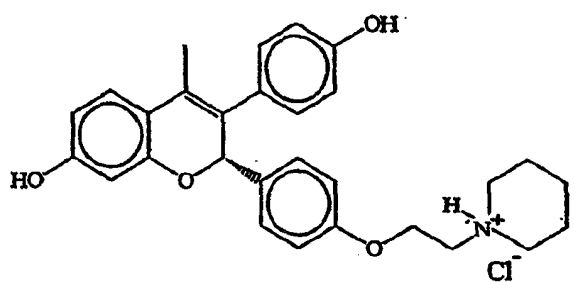


EM-1533



EM-1518

和

EM-652.HCl
(EM-1538)

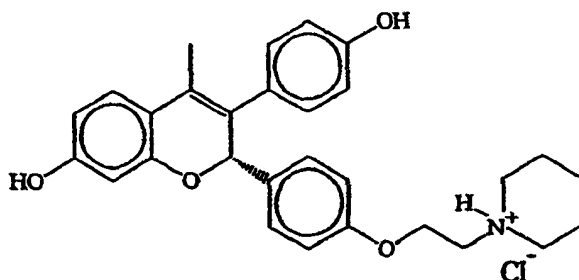
其中指出其立体化学的所有上述分子结构由于大多数其立体异构体具有 2S 构型而具有旋光性。

- 5 29. 权利要求 26 的方法、药用组合物或试剂盒，其中所述苯并吡喃衍生物是选自以下的一种酸的盐：乙酸、己二酸、苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、柠檬酸、富马酸、氢碘酸、氢溴酸、盐酸、氢氯噻嗪酸、羟基萘甲酸、乳酸、马来酸、甲磺酸、甲基硫酸、1,5-萘二磺酸、硝酸、棕榈酸、新戊酸、磷酸、丙酸、琥珀酸、硫酸、酒石酸、对苯二甲酸、对甲苯磺酸和戊酸。
- 10

30. 权利要求 29 的方法、药用组合物或试剂盒，其中所述酸是盐酸。

31. 权利要求 1-12 中任一项的方法、药用组合物或试剂盒，其中所述选择性雌激素受体调节剂是：

EM-652.HCl
(EM-1538)



并且由于大多数其立体异构体具有 2S 构型而具有旋光性；和

其中所述雌激素选自 17 β -雌二醇、17 β -雌二醇酯、17 α -雌二醇、17 α -雌二醇酯、雌三醇、雌三醇酯、雌酮、雌酮酯、结合雌激素、马烯雌酮、马烯雌酮酯、17 α -乙炔基雌二醇、17 α -乙炔基雌二醇酯、美雌醇和美雌醇酯。

32. 权利要求 1-12 中任一项的方法、药用组合物或试剂盒，其中所述雌激素选自 17 β -雌二醇、17 β -雌二醇酯、雌三醇、雌三醇酯、雌酮、雌酮酯、结合雌激素、马烯雌酮、马烯雌酮酯、17 α -乙炔基雌二醇、17 α -乙炔基雌二醇酯、美雌醇、美雌醇酯、苯雌酚 (chemestrogen)、DES、植物雌激素、替勃龙、2'-乙基雌激素噁唑 (ethylestrogenoxazole) 和炔诺醇。

33. 权利要求 1、2、3、8 和 9 中任一项的方法，其中所述选择性雌激素受体调节剂在乳房组织或子宫内膜组织中没有雌激素活性。

34. 权利要求 1-12 中任一项的方法、药用组合物或试剂盒，其中所述雌激素是一种混合雌激素/雄激素化合物。

35. 权利要求 34 的方法，其中所述混合雌激素/雄激素化合物是替勃龙。

36. 权利要求 1 和 8 的方法，其中绝经症状选自热潮红、血管舒缩症状、不规则月经、阴道干燥、头痛和睡眠障碍。

37. 权利要求 1 的方法，其中所述治疗降低所述患者患乳腺癌或子宫内膜癌的危险。

与雌激素联合的选择性雌激素受体调节剂

5

发明领域

本发明涉及生理活性化合物的新组合。具体地说，所述组合包括与一种雌激素联合的一种选择性雌激素受体调节剂(SERM)。在某些实施方案中，所述组合包括一种选择性雌激素受体调节剂(SERM)、一种雌激素和一种性类固醇前体或雄激素化合物。本发明也提供用于实施上述组合的试剂盒和药用组合物。将上述组合给予患者以减轻或消除热潮红(hot flash)、血管舒缩症状、阴道干燥或其它绝经症状的发生。认为接受这种联合疗法的患者患乳癌和/或子宫内膜癌的危险降低。也提供治疗骨质疏松、血胆固醇过多、血脂过多、动脉粥样硬化、高血压、老年性痴呆、失眠、心血管疾病、胰岛素抵抗、糖尿病和肥胖(尤其是腹部肥胖)或降低患上上述病症的可能性的方法。

15

背景

已知许多疾病、病症和不希望有的症状对于给予外源性性类固醇或其前体反应良好。例如，据认为雌激素降低骨丢失的速率，而雄激素显示出通过刺激骨生成建立骨质。激素替代疗法(例如给予雌激素)可以用来治疗绝经症状。孕酮常常用来抵抗子宫内膜增生和雌激素诱发子宫内膜癌的危险。应用雌激素、雄激素化合物和/或孕酮治疗或预防因多种无力而受损害的各种各样的症状和疾病。用雄激素化合物治疗女性可能有引起某些男性化副作用的不希望有的副作用。此外，给予患者性类固醇，可能增加患者患某些疾病的危险。例如，女性乳癌由于雌激素活性而恶化。前列腺癌和良性前列腺增生都因雄激素活性而恶化。

25

需要更为有效的激素疗法并且降低副作用和危险。

认为本发明的联合疗法和可以用于这些疗法的药用组合物和试剂盒可满足这些需要。

发明概述

5 本发明的一个目的是提供一种治疗热潮红、血管舒缩症状、骨质疏松、心血管疾病、血胆固醇过多、血脂过多、动脉粥样硬化、高血压、胰岛素抵抗、糖尿病、肥胖(尤其是腹部肥胖)、不规则月经和阴道干燥或降低上述疾病的发病率或患上上述疾病危险的方法。

10 本发明的另一个目的是提供一种治疗上述疾病或降低患上上述疾病危险、而将不希望有的副作用减至最小的方法。

 本发明的另一目的是提供适用于上述方法的试剂盒和药用组合物。

 在一个实施方案中，本发明提供一种降低或消除绝经症状发生率的方法，所述方法包括给予需要所述消除或降低的患者治疗有效量的雌激素或其前药并结合给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂或其前药，所述调节剂是不同于所述雌激素的化合物。

20 在另一实施方案中，本发明提供一种治疗骨质疏松、血胆固醇过多、血脂过多、动脉粥样硬化、高血压、老年性痴呆、胰岛素抵抗、糖尿病、肌肉质量损失、肥胖、激素替代疗法诱发的阴道出血和激素替代疗法诱发的乳房触痛或降低患上上述病症的危险的方法，所述方法包括给予需要所述消除或降低的患者治疗有效量的雌激素或其前药并结合给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂或其前药，所述调节剂是不同于所述雌激素的化合物。

25 在另一实施方案中，本发明提供一种药用组合物，所述药用组合物包含：

- a) 一种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体；
- b) 治疗有效量的至少一种雌激素或其前药；和
- c) 治疗有效量的至少一种选择性雌激素受体调节剂或其前

包括给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂(SERM)作为联合疗法的一部分。

在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗失眠或降低发生失眠危险的方法,所述方法包括给予所述患者治疗有效量的雌激素,还包括给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂(SERM)作为联合疗法的一部分。

在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗认知功能的丧失或降低发生认知功能丧失危险的方法,所述方法包括给予所述患者治疗有效量的雌激素,还包括给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂(SERM)作为联合疗法的一部分。

在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗早老性痴呆或降低患早老性痴呆危险的方法,所述方法包括给予所述患者治疗有效量的雌激素,还包括给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂(SERM)作为联合疗法的一部分。

在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗糖尿病或降低患糖尿病危险的方法,所述方法包括给予所述患者治疗有效量的雌激素,还包括给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂(SERM)作为联合疗法的一部分。

在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗绝经症状或降低发生绝经症状危险的方法,所述方法包括给予所述患者治疗有效量的雌激素,还包括给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂(SERM)作为联合疗法的一部分。

在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗肥胖(尤其是腹部肥胖)或降低患肥胖(尤其是腹部肥胖)危险的方法,所述方法包括给予所述患者治疗有效量的雌激素,还包括给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂(SERM)作为联合疗法的一部分。

在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗绝经症状或降低发生绝经症状危险的方法,所述方法包括给予所述患者治疗有效量的雌激

药，其中所述调节剂是不同于所述雌激素的化合物。

在另一实施方案中，本发明提供一种试剂盒，所述试剂盒包括一个第一容器，所述第一容器含有一种包含治疗有效量的至少一种雌激素或其前药的药用制剂；并且所述试剂盒还包括一个第二容器，所述
5 第二容器含有一种包含治疗有效量的至少一种选择性雌激素受体调节剂或其前药的药用制剂。

在一个实施方案中，本发明提供一种治疗骨质疏松或降低患骨质疏松危险的方法，所述方法包括给予所述患者治疗有效量的雌激素，还包括给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂(SERM)
10 作为联合疗法的一部分。

在另一个实施方案中，本发明提供一种治疗心血管疾病或降低患心血管疾病危险的方法，所述方法包括给予所述患者治疗有效量的雌激素，还包括给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂(SERM)作为联合疗法的一部分。

在另一个实施方案中，本发明提供一种治疗血胆固醇过多或降低患血胆固醇过多危险的方法，所述方法包括给予所述患者治疗有效量的雌激素，还包括给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂(SERM)作为联合疗法的一部分。
15

在另一个实施方案中，本发明提供一种治疗血脂过多或降低患血脂过多危险的方法，所述方法包括给予所述患者治疗有效量的雌激素，还包括给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂(SERM)作为联合疗法的一部分。
20

在另一个实施方案中，本发明提供一种治疗动脉粥样硬化或降低患动脉粥样硬化危险的方法，所述方法包括给予所述患者治疗有效量的雌激素，还包括给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂(SERM)作为联合疗法的一部分。
25

在另一个实施方案中，本发明提供一种治疗高血压或降低患高血压危险的方法，所述方法包括给予所述患者治疗有效量的雌激素，还

素，还包括给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂(SERM)作为联合疗法的一部分。

5 在另一个实施方案中，本发明提供一种治疗由激素替代疗法诱发的乳房触痛或降低发生所述乳房触痛危险的方法，所述方法包括给予所述患者治疗有效量的雌激素，还包括给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂(SERM)作为联合疗法的一部分。

10 在另一个实施方案中，本发明提供一种治疗由激素替代疗法诱发的阴道出血或降低发生所述病症危险的方法，所述方法包括给予所述患者治疗有效量的雌激素，还包括给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂(SERM)作为联合疗法的一部分。

15 在另一个实施方案中，本发明提供一种治疗骨质疏松或降低骨质疏松发生率的方法，所述方法包括在需要所述治疗或所述降低的患者体内提高选自下列的性类固醇前体的水平：脱氢表雄酮(DHEA)、硫酸脱氢表雄酮(DHEA-S)、雄烯二酮和雄-5-烯-3 β ,17 β -二醇(5-diol)，还包括给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂(SERM)和治疗有效量的雌激素作为联合疗法的一部分。

20 在另一个实施方案中，本发明涉及一种治疗热潮红和出汗或降低热潮红和出汗发生率的方法，所述方法包括在需要所述治疗或所述降低的患者体内提高选自下列的性类固醇前体的水平：脱氢表雄酮(DHEA)、硫酸脱氢表雄酮(DHEA-S)和雄-5-烯-3 β ,17 β -二醇(5-diol)，还包括给予所述患者治疗有效量的选择性雌激素受体调节剂(SERM)和治疗有效量的雌激素作为联合疗法的一部分。

25 在另一个实施方案中，本发明提供一种治疗上述疾病或降低患上所述疾病危险的方法，所述方法包括给予所述患者治疗有效量的激动/拮抗雌激素(混合 SERM)，还包括给予所述患者治疗有效量的纯选择性雌激素受体调节剂(纯 SERM)或雌激素作为联合疗法的一部分。本文所用的“混合 SERM”是指所述 SERM 在乳腺组织和子宫内膜组织中具有某些生理学或药理学浓度的雌激素活性。本文所用的“纯 SERM”是

指所述 SERM 在乳腺组织和子宫内膜组织中没有任何生理学或药理学浓度的雌激素活性。

在另一实施方案中，本发明提供一种试剂盒，所述试剂盒包括一个含有治疗有效量的至少一种雌激素的第一容器，并且还包括一个包含治疗有效量的至少一种选择性雌激素受体调节剂的第二容器。

在另一实施方案中，本发明提供一种药用组合物，所述药用组合物包含：a) 一种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体；b) 治疗有效量的至少一种雌激素；和 c) 治疗有效量的至少一种选择性雌激素受体调节剂。

如本文所用的，“结合”其它化合物给予患者的化合物的给予与
所述其它化合物的给予足够接近，即使两种化合物给予的时间并不接近，但也使得患者同时获得两种化合物的生理学效应。当作为联合疗法的一部分给予化合物时，将它们相互结合给予。

雌激素替代疗法常用于绝经后妇女，以预防和治疗由绝经所致的疾病，即骨质疏松、热潮红、冠心病(Cummings 1991)，但却有与长期雌激素给予相关的某些不希望有的效应。特别是，已感觉到的由雌激素引起的子宫癌和/或乳癌危险的增加(Judd, Meldrum 等 1983; Colditz, Hankinson 等 1995)是这种疗法的主要缺点。本发明的作者已经发现，在雌激素给药中加入选择性雌激素受体调节剂(SERM)，抑制了这些不希望有的效应。

本发明提供一种治疗由激素替代疗法(HRT)诱发的乳房触痛或降低患所述乳房触痛危险的方法，因为所述 SERM 会引起乳腺上皮萎缩，而不是 HRT 引起的刺激，所以乳房触痛将被减轻或消除。

本发明也提供一种预防和治疗由激素替代疗法(HRT)诱发的阴道出血的方法。因为所述 SERM 将引起子宫内膜萎缩，所以不会发生阴道出血。

另一方面，单独的 SERM 对某些绝经症状如热潮红和出汗的有益效应很少或没有。本申请人认为，将雌激素加入绝经症状的 SERM 治

疗中，减轻或甚至消除热潮红和出汗。重要的是注意到，热潮红和出汗是绝经的最先表现，而患者接受或不接受绝经治疗常常取决于热潮红和出汗减轻的成功与否。

如本文所用的，选择性雌激素受体调节剂(SERM)是这样的化合物，它们在乳腺组织中或者直接或者通过其活性代谢物作为雌激素受体拮抗剂(“抗雌激素”)起作用，还对骨组织和血清胆固醇水平提供雌激素或雌激素样效应(即通过降低血清胆固醇)。在体外或在人类或大鼠乳腺组织中作为雌激素受体拮抗剂非类固醇化合物(尤其是当所述化合物对人类乳腺癌细胞用作抗雌激素时)有可能作为 SERM 起作用。相反，类固醇抗雌激素往往不作为 SERM 起作用，因为它们往往不显示出对血清胆固醇的任何有益效应。我们已经测试和发现作为 SERM 起作用的非胆固醇抗雌激素包括 EM-800、EM-652.HCl、雷洛昔芬、他莫昔芬、4-羟基-他莫昔芬、托瑞米芬、4-羟基-托瑞米芬、屈洛昔芬、LY 353 381、LY 335 563、GW-5638、Lasofoxifene、TSE 424 和艾多昔芬，但不限于这些化合物。

但我们也发现，不是所有的 SERM 都以相同方式反应，可以将它们分为两个亚类：“纯 SERM”和“混合 SERM”。因此，某些 SERM 如 EM-800 和 EM-652.HCl 在乳腺组织和子宫内膜组织中没有任何生理学或药理学浓度的雌激素活性，而在大鼠中具有降低血中胆固醇和降低血甘油三酯的效应。这些 SERM 可以被称为“纯 SERM”。理想的 SERM 是 EM-652.HCl 类型的纯 SERM，因为它在乳腺中有有效的纯抗雌激素活性。其它的 SERM，如雷洛昔芬、他莫昔芬、屈洛昔芬、4-羟基-他莫昔芬(1-(4-二甲氨基乙氧基苯基)-1-(4-羟基苯基)-2-苯基-丁-1-烯)、托瑞米芬、4-羟基-托瑞米芬 [(Z)-(2)-2-[4-(4-氯-1-(4-羟基苯基)-2-苯基-1-丁烯基)苯氧基]-N,N-二甲基乙胺)、LY 353 381、LY 335 563、GW-5638 和艾多昔芬在乳腺和子宫内膜中具有某些雌激素活性。这种第二类 SERM 可以被称为“混合 SERM”。这些“混合 SERM”的不想要的雌激素活性可以如图 6 和图 7 中的乳癌体外试验以及图 9 中的

乳癌体内试验所示, 通过加入纯“SERM”来加以抑制。由于裸鼠中的人类乳癌异种移植物是最接近的可利用的人类乳癌模型, 因此, 我们已经比较了单独的和联合的 EM-800 和他莫昔芬对裸鼠体内 ZR-75-1 乳癌异种移植物生长的影响。

5 对于本文所述的所有组合, 考虑了给予所述组合每个部分的单独化合物, 除非另有陈述。因此, 例如, 给予 SERM 和雌激素是指给予两种不同的化合物, 而不是指给予具有某些雌激素特性的 SERM 的单一化合物。

10 本申请人认为, 非常重要, 的是, 本发明的 SERM 在乳腺组织、子宫组织和子宫内膜组织中起纯抗雌激素的作用, 因为 SERM 必须抵抗雌激素的可能增加这些组织中癌症危险的潜在副作用。特别是, 本申请人认为, 在 2 位具有绝对构型 2S 的本发明的苯并吡喃衍生物比其外消旋混合物更合适。因此, 在 US 6,060,503 中, 公开了用以治疗雌激素恶化的乳癌和子宫内膜癌的具有 2S 构型的旋光性苯并吡喃抗雌激素, 并且这些化合物显示出比外消旋混合物显著更为有效(参见 US
15 6,060,503 的图 1-5)。

2S 构型的对映体在工业上难以作为纯状态获得, 本申请人认为, 5R 对映体的污染最好低于 10%、优选低于 5%、更优选低于 2%(重量)。

20

附图简述

图 1 显示了用单独的 DHEA (10 mg, 经皮, 每日一次)或 EM-800 (75 μ g, 口服, 每日一次)治疗或联合治疗 9 个月对大鼠体内血清甘油三酯(A)和胆固醇(B)水平的影响。数据以均数 $\pm$ SEM 表示。**: $P < 0.01$ 实验相对于相应的对照。

25

图 2 显示: A) 每日两次经皮给予增加剂量的 DHEA (0.3 mg、1.0 mg 或 3.0 mg)对补充雌酮的卵巢切除的(OVX)裸鼠体内 ZR-75-1 肿瘤平均大小的影响。仅接受溶媒的对照 OVX 小鼠用作另外的对照。将原始肿瘤大小作为 100%。DHEA 在 0.02 ml 50%乙醇-50%丙二醇的溶液

中经皮(p.c.)应用于背侧皮肤。B) 用增加剂量的单独的 DHEA 或 EM-800 治疗或联合治疗 9.5 个月对补充雌酮的 OVX 裸鼠体内 ZR-75-1 肿瘤重量的影响。**, $p < 0.01$, 经治疗的小鼠相对于补充雌酮的对照 OVX 小鼠。

5 图 3 显示了口服增加剂量的抗雌激素 EM-800 (15 μg 、50 μg 或 100 μg) (B)或经皮给予增加剂量的 DHEA (0.3、1.0 或 3.0 mg)联合 EM-800 (15 μg)或单独的 EM-800 (A) 9.5 个月对补充雌酮的卵巢切除(OVX)裸鼠体内 ZR-75-1 肿瘤平均大小的影响。将原始肿瘤大小作为 100%。仅接受溶媒的对照 OVX 小鼠用作另外的对照。雌酮以 0.5 μg 的剂量每日皮下给予一次, 而 DHEA 溶于 50%乙醇-50%丙二醇中, 每日两次以 10 0.02 ml 的体积应用于背侧皮肤区。也与仅接受溶媒的 OVX 动物进行比较。

 图 4 显示了用抗雌激素 EM-800 以 0.25 mg/Kg 体重和 2.5 mg/Kg 体重的剂量治疗 65 天(口服, 每日一次)或用醋酸甲羟孕酮(MPA, 1 mg 15 s.c., 每日两次)治疗 65 天或用 EM-800 (0.25 mg/Kg 体重)和 MPA 联合治疗 65 天对卵巢切除的大鼠体内 E_1 (1.0 μg , s.c., 每日两次)刺激的 DMBA 诱发性乳癌的生长的影响。肿瘤大小的改变以原始肿瘤大小的百分率表示。数据以均数 $\pm$ SEM 表示。

 图 5 显示了用给予的增加剂量(0.01、0.03、0.1、0.3 和 1 mg/kg) 20 的 EM-800 或雷洛昔芬治疗 37 周对卵巢切除的大鼠体内总血清胆固醇水平的影响。将带有 17β -雌二醇(E_2)植入物的无伤大鼠和卵巢切除大鼠进行比较; ** $p < 0.01$, 实验大鼠相对于 OVX 对照大鼠。

 图 6 显示了增加浓度的 EM-800、(Z)-4-OH-他莫昔芬、(Z)-4-OH-托瑞米芬和雷洛昔芬对人 Ishikawa 细胞中碱性磷酸酶活性的影响。在 25 存在或缺乏 1.0 nM E_2 的情况下暴露于增加浓度的指定化合物 5 天后, 测量碱性磷酸酶的活性。数据以 4 个孔的均数 $\pm$ SEM 表示。当 SEM 与所用的符号重叠时, 仅显示所述符号(Simard, Sanchez 等, 1997)。

 图 7 显示了在人 Ishikawa 癌细胞中抗雌激素 EM-800 阻断 (Z)-4-

OH-他莫昔芬、(Z)-4-OH-托瑞米芬、屈洛昔芬和雷洛昔芬对碱性磷酸酶活性的刺激效应。在存在或缺乏 30 nM 或 100 nM EM-800 的情况下暴露于 3 nM 或 10 nM 指定化合物 5 天后，测量碱性磷酸酶活性。数据以 8 个孔的均数 $\pm$ SD 表示，对照组除外，对照组的数据得自 16 个孔 (Simard, Sanchez 等, 1997)。

图 8 显示了标准 HRT (雌激素) 和 SERM (EM-652) 对绝经参数影响的比较。将 SERM 加入标准 HRT 中，将抵抗雌激素的潜在副作用。

图 9 显示了他莫昔芬对人乳癌 ZR-75-1 异种移植物生长的刺激效应因同时给予 EM-652.HCl 而被完全阻断。EM-652.HCl 本身根据纯抗雌激素活性，在缺乏他莫昔芬的情况下对肿瘤生长无影响。

图 10 显示了大鼠乳腺的切片。

A. 未经治疗的动物。小叶(L)由几个小泡组成。插入。高放大倍数显示的小泡。

B. 用 EM-800 (0.5 mg/kg, b w/日) 治疗 12 周的动物。小叶(L)的大小减小。插入。高放大倍数显示的萎缩小泡细胞。

图 11 显示了大鼠子宫内膜的切片。

A. 未经治疗的动物。腔上皮(LE)的特征为柱状上皮细胞，而腺上皮(GE)呈立方形。基质含有几种细胞组分和胶原纤维。

B. 在 12 周内用 EM-800 (0.5 mg/kg, b w per day) 治疗的动物。腔上皮的高度显著减少。腺上皮细胞具有不染色的胞质，且无活性的迹象。基质由于基质的胞间组分减少而呈高度细胞性的。

图 12 显示了给同时用雌酮治疗的卵巢切除小鼠口服 9 天增加浓度的 EM-652.HCl、lasofoxifene (游离碱；活性和无活性对映体) 和雷洛昔芬对子宫重量的影响。* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，相对于 E_1 治疗的对照。

图 13 显示了给同时用雌酮治疗的卵巢切除小鼠口服 9 天增加浓度的 EM-652.HCl、lasofoxifene (游离碱；活性和无活性对映体) 和雷洛昔芬对阴道重量的影响。** $p < 0.01$ ，相对于 E_1 治疗的对照。

图 14 显示了给卵巢切除小鼠口服 9 天 1 μ g 和 10 μ g EM-652.HCl、

**p<0.01 相对于 OVX。在无雌激素刺激下，抗雌激素以 100 µg/小鼠的剂量每日口服一次。

图 19B 显示了抗雌激素对 ZR-75-1 肿瘤生长的影响。用 7 种抗雌激素治疗 161 天对卵巢切除裸鼠体内人 ZR-75-1 乳房肿瘤生长的影响。肿瘤大小以原始肿瘤面积的百分率表示(第 1 天=100%)。数据以均数±SEM 表示(n = 18-30 个肿瘤/组); ## p<0.01, 相对于 EM-652.HCl; **p<0.01 相对于 OVX。在无雌激素刺激下，抗雌激素以 200 µg/小鼠的剂量每日口服一次。

图 20A 显示了抗雌激素对反应类别的影响。给予 7 种抗雌激素 161 天对卵巢切除裸鼠体内人 ZR-75-1 乳房肿瘤反应类别的影响。完全消退确定了在治疗结束时检测不到的那些肿瘤; 部分消退相当于其原始大小消退≥ 50%的肿瘤; 稳定的反应是指消退< 50%或发展≤ 50%的肿瘤; 而发展是指与其原始大小相比, 肿瘤发展超过 50%。在通过用含有 1:25 比率的雌酮和胆固醇的皮下 0.5 cm 硅橡胶植入物获得的雌酮刺激下, 抗雌激素以 50 µg/小鼠的剂量每日口服一次。

图 20B 显示了抗雌激素对反应类别的影响。给予 7 种抗雌激素 161 天对卵巢切除裸鼠体内人 ZR-75-1 乳房肿瘤反应类别的影响。完全消退确定了在治疗结束时检测不到的那些肿瘤; 部分消退相当于其原始大小消退≥ 50%的肿瘤; 稳定的反应是指消退< 50%或发展≤ 50%的肿瘤; 而发展是指与其原始大小相比, 肿瘤发展超过 50%。在无雌激素刺激下, 抗雌激素以 200 µg/小鼠的剂量每日口服一次。

图 20C 显示了抗雌激素对反应类别的影响。给予 7 种抗雌激素 161 天对卵巢切除裸鼠体内人 ZR-75-1 乳房肿瘤反应类别的影响。完全消退确定了在治疗结束时检测不到的那些肿瘤; 部分消退相当于其原始大小消退≥ 50%的肿瘤; 稳定的反应是指消退< 50%或发展≤ 50%的肿瘤; 而发展是指与其原始大小相比, 肿瘤发展超过 50%。在无雌激素刺激下, 抗雌激素以 200 µg/小鼠的剂量每日口服一次。

图 21 显示了在每日口服补充 17β-雌二醇(2 mg/kg)的卵巢切除大

lasofoxifene (游离碱; 活性和无活性对映体)和雷洛昔芬对子宫重量的影响。 ** $p<0.01$, 相对于 OVX 对照。

图 15 显示了给卵巢切除小鼠口服 9 天 1 μg 和 10 μg EM-652.HCl、lasofoxifene (游离碱; 活性和无活性对映体)和雷洛昔芬对阴道重量的影响。 ** $p<0.01$, 相对于 OVX 对照。

图 16 显示了用 E_2 、EM-652.HCl、 $\text{E}_2 + \text{EM-652.HCl}$ 、DHEA、DHEA + EM-652.HCl 和 DHEA + EM-652.HCl + E_2 治疗 26 周对已确立骨质减少的 OVX 大鼠腰椎 BMD 的影响。对照组包括无伤的对照和 OVX 对照动物。

图 17 显示了用 E_2 、EM-652.HCl、 $\text{E}_2 + \text{EM-652.HCl}$ 、DHEA、DHEA + EM-652.HCl 和 DHEA + EM-652.HCl + E_2 治疗 26 周对已确立骨质减少的 OVX 大鼠股骨 BMD 的影响。对照组包括无伤的对照和 OVX 对照动物。

图 18 显示了用 E_2 、EM-652.HCl、 $\text{E}_2 + \text{EM-652.HCl}$ 、DHEA、DHEA + EM-652.HCl 和 DHEA + EM-652.HCl + E_2 治疗 26 周对已确立骨质减少的 OVX 大鼠总机体脂肪的影响。对照组包括无伤的对照和 OVX 对照动物。

图 19A 显示了抗雌激素对 ZR-75-1 肿瘤生长的影响。用 7 种抗雌激素治疗 161 天对卵巢切除裸鼠体内雌酮诱发的人 ZR-75-1 乳房肿瘤生长的影响。肿瘤大小以原始肿瘤面积的百分率表示(第 1 天=100%)。数据以均数 $\pm$ SEM 表示($n = 18-30$ 个肿瘤/组); ## $p<0.01$, 相对于 EM-652.HCl; ** $p<0.01$ 相对于 OVX。在通过用含有 1:25 比率的雌酮和胆固醇的皮下 0.5 cm 硅橡胶植入物获得的雌酮刺激下, 抗雌激素以 50 μg /小鼠的剂量每日口服一次。

图 19B 显示了抗雌激素对 AR-75-1 肿瘤生长的影响。用 7 种抗雌激素治疗 161 天对卵巢切除裸鼠体内人 ZR-75-1 乳房肿瘤生长的影响。肿瘤大小以原始肿瘤面积的百分率表示(第 1 天=100%)。数据以均数 $\pm$ SEM 表示($n = 18-30$ 个肿瘤/组); ## $p<0.01$, 相对于 EM-652.HCl;

鼠体内以 0.01 mg/kg 至 10 mg/kg 的增加的日剂量范围给予 EM-652.HCl 2 周对子宫重量的影响。无伤的动物用作另外的对照。

图 22 显示了在每日口服补充 17 β -雌二醇(2 mg/kg)的卵巢切除大鼠体内以 0.01 mg/kg 至 10 mg/kg 的增加的日剂量范围给予 EM-652.HCl 2 周对子宫内膜上皮高度的影响。无伤的动物用作另外的对照。

图 23. 大鼠子宫的苏木精和曙红染色切片, 显示了得自无伤对照 (A)、OVX 对照(B)、OVX + E₂ (2 mg/kg) (C)和 OVX + E₂ + EM-652.HCl (3 mg/kg)治疗 14 天的大鼠的上皮衬细胞。雌二醇对子宫内膜上皮细胞的刺激效应因同时给予 EM-652.HCl 而被逆转。(放大倍数: $\times 700$)。BM: 基底膜。

图 24 显示了在每日口服补充 17 β -雌二醇(2 mg/kg)的卵巢切除大鼠体内以 0.01 mg/kg 至 10 mg/kg 的增加的日剂量范围给予 EM-652.HCl 2 周对阴道重量的影响。无伤的动物用作另外的对照。

图 25 显示了在每日口服补充 17 β -雌二醇(2 mg/kg)的卵巢切除大鼠体内以 0.01 mg/kg 至 10 mg/kg 的增加的日剂量范围给予 EM-652.HCl 2 周对血清胆固醇的影响。无伤的动物用作另外的对照。

发明详述

在图 9 中可以看出, 他莫昔芬对肿瘤生长的约 100%刺激效应因用 EM-652.HCl 同时治疗而被完全阻断。EM-652.HCl 根据其纯的抗雌激素活性, 对裸鼠体内人乳癌 ZR-75-1 异种移植物的生长不会施加任何刺激效应(图 9)。

我们已经测试了类固醇抗雌激素 ICI 182,780, 发现它不起 SERM 的作用。按照本发明的 SERM 甚至在本领域将其用作代替 SERM 的抗雌激素的情况下, 也可以以本领域已知的相同剂量给予。

我们也注意到, SERM 对血清胆固醇的有益效应对骨的雌激素或雌激素样效应之间有相关性。SERM 对高血压、胰岛素抵抗、糖尿病和肥胖(尤其是腹部肥胖)也有有益效应。虽然不希望受理论的束

及其预防乳癌和子宫内膜癌的能力。I 期研究已经表明, EM-800 和 EM-652.HCl 给出了几乎重叠的 EM-652 的血清水平。

通过本发明中使用的组合, 也以协同方式减轻了不希望有的效应。对于本文讨论的所有疾病而言, 在其它情况下可能由以替代剂量的雌激素所致的对乳腺组织的任何其它效应, 都被所述 SERM 在乳腺组织中的抗雌激素效应有效地阻断, 正如在图 2 和图 3 中所见的。从图 10 中可以得出同样的结论。

在优选实施方案中, 加入性类固醇前体(脱氢表雄酮、硫酸脱氢表雄酮、雄-5-烯-3 β ,17 β -二醇、4-雄烯-3,17-二酮和其前药)或雄激素类药物, 以提供有益的雄激素效应, 尤其是在降低患骨病危险或治疗骨病方面有益的雄激素效应。SERM 和雌激素联合用于治疗骨质疏松, 减少或甚至停止了骨的降解。而进一步加入雄激素或 DHEA (和性类固醇的其它前体)允许重建受损伤的骨组织, 但在血胆固醇过多、血脂过多、绝经症状、老年性痴呆、心血管疾病、乳癌、子宫癌和卵巢癌的治疗方面有其它有益效应的性类固醇前体, 可以与 SERM 和雌激素组合协同作用, 以更好地治疗上述疾病。这种协同效应是由于雄激素(或在外周组织中代谢为雄激素的性类固醇前体)和雌激素或 SERM 通过不同机制起作用的事实所致。

在某些实施方案中, 加入孕酮以提供其它雄激素效应。孕酮可以以本领域已知的低剂量使用, 而不会不利地影响所述雄激素受体以外的受体(例如糖皮质激素受体)。它们也相对无不想要的雄激素副作用(例如女性患者面部的毛)。

热潮红、心血管症状、老年性痴呆、认知功能的丧失和失眠肯定涉及位于中枢神经系统的雌激素受体。脑中低水平的雌激素可能至少部分解释这些病症。外源雌激素、尤其是雌二醇可能穿过脑屏障, 并与所述雌激素受体结合, 以恢复正常的雌激素作用。另一方面, 如实施例 9 中所示, 本发明的 SERM、更优选 EM-652.HCl 类的 SERM 不能穿过脑屏障。因此, 它们不能拮抗雌激素在脑中的正效应, 但它们

缚, 但认为 SERM 中的许多最好具有 1-2 个碳原子连接的两个芳环, 预期 SERM 借助所述分子中被雌激素受体最佳识别的上述部分而与雌激素受体相互作用。优选的 SERM 具有侧链, 所述侧链可以选择性地在乳腺组织和通常的子宫组织中引起拮抗剂特性, 而在其它组织中没有显著的拮抗剂特性。因此, 所述 SERM 可能理想地在乳腺中起抗雌激素的作用, 而在骨和血液(其中脂质和胆固醇的浓度受有利的影响)中意外和理想地起雌激素的作用(或提供雌激素样活性)。对胆固醇和脂质的有利效应转变为对动脉粥样硬化的有利效应, 动脉粥样硬化已知受胆固醇和脂质水平不当的不利影响。

另一方面, 骨质疏松、血胆固醇过多、血脂过多、认知和动脉粥样硬化对雌激素活性或雌激素样活性有利地反应。通过按照本发明将雌激素与 SERM 联合应用, 在靶组织中提供所需效应, 而在某些其它组织中无不希望有的效应。例如, 雌激素和 SERM 的组合可以在骨(或对脂质或胆固醇)有有利的雌激素效应, 而在乳腺和子宫中避免了不利的雌激素效应, 因为所述 SERM 将充当雌激素拮抗剂, 有效地阻断了雌激素在乳腺和子宫内膜中的效应, 如图 10 和图 11 中可以看到。

如图 10 中所表明的, 虽然 17β -雌二醇的循环水平从无伤动物的 95.9 ± 32.4 pg/ml 升至用每日口服 0.5 mg/kg EM-800 达 12 周治疗的动物中的 143.5 ± 7.8 pg/ml (50%升高), 但观察到乳腺显著萎缩。同样, 在图 11 中, 在接受 EM-800 (0.5 mg/kg) 的动物中观察到子宫内膜显著萎缩。在接受纯抗雌激素 EM-800 的这些无伤动物中, 消除了雌激素在下丘脑-脑垂体水平的抑制效应, 因此引起 LH 增加, 然后继发引起卵巢的 17β -雌二醇分泌增加。

在每日接受相同的 0.5 mg/kg 剂量的 EM-652 的无伤大鼠中进行 6 个月的研究中, 测量到抗雌激素 EM-652 的循环浓度为 0.4 ng/ml (URMA-05-011-94)。因为在接受每日 20 mg 口服剂量的 EM-800 的妇女体内的 EM-652 平均血清浓度测量为 7.3 ± 0.77 ng/ml, 所以显然在绝经后妇女中给予雌激素替代疗法, 不会影响 EM-652 的有效抑制效应

拮抗雌激素在乳腺、子宫和子宫内膜组织中的负效应，使得这一组合 (SERM + 雌激素) 对于治疗上述病症或降低患上上述病症危险而言特别有吸引力。

5 联合雌激素和 SERM 的总体相加益处

妇女绝经时请教其医师的主要原因是发生热潮红，这是众所周知可由雌激素替代疗法消除的问题。因为引起热潮红的部位是中枢神经系统(CNS)，并且 EM-652 对于 CNS 的可及性非常差(数据已包括)，所以预期给予雌激素将控制热潮红，而不受所述 SERM 的干扰。另一方面，所述 SERM 将消除雌激素在其它部位的所有负效应，尤其是乳癌和子宫癌的危险。事实上，将 EM-652 加入雌激素，阻断了雌激素对乳腺和子宫的刺激效应，而在其它组织中，EM-652 将发挥其自身的有益效应，例如对骨的有益效应，在骨中它部分逆转卵巢切除对骨盐密度的效应。

15 观察到 EM-652 对任何参数均无不利影响，而对于预防和治疗乳腺癌和子宫癌而言，它应该发挥显著的有益效应。

本发明数据表明，加入 EM-652 阻断了雌激素对乳腺和子宫的刺激效应(实施例 4、8 和 10)，而在其它组织中，EM-652.HCl 发挥其自身的有益效应。例如，在骨中(实施例 5)，EM-652 部分逆转了卵巢切除对骨盐密度的效应。这样一种效应已经导致用于治疗绝经后妇女骨质疏松的雷洛昔芬的商业化。事实上，已经发现雷洛昔芬预防大鼠体内 BMD 丧失的效力比 EM-652 效力低 3-10 倍(Martel 等, J Steroid Biochem Molec Biol 2000:74, 第 45-56 页)。虽然 SERM 对 BMD 的效应正如其它 SERM 如雷洛昔芬所示的，没有用雌激素获得的效应完全，但已经发现，在绝经后妇女中观察到的对骨折的效应与雌激素和 SERM 雷洛昔芬相同。因此，预期虽然 EM-652 或其它 SERM 不完全逆转 BMD，但作为反应的最为重要的参数 - 对骨折的效应，与应用雌激素后观察到的一样重要。此外，正如所提出的，非常有可能 BMD

的测量不能提供一种化合物对骨生理学效应的完整的说明。

重要的方面是，虽然用 SERM 治疗对骨发挥有益效应，但主要用以阻断热潮红的它与雌激素的组合，使得可以降低与仅应用雌激素相关的乳癌和子宫癌的危险。

- 5 本文讨论的优选的 SERM 涉及：(1) 对本发明敏感的所有所述疾病；(2) 治疗和预防应用；和(3) 优选的药用组合物和试剂盒。

需要治疗特定疾病或降低发生特定疾病危险的患者是或者诊断有这种疾病的患者，或者是易患这种疾病的患者。

- 10 除非另有说明，本发明活性混合物的优选剂量(浓度和给药模式对于治疗和预防目的而言是相同的。本文所述每种活性组分的剂量是相同的，与待治疗的疾病(或待降低发病可能性的疾病)无关。

- 15 除非另有说明或从正文中明显看出，本文所述的剂量是指不受药用赋形剂、稀释剂、载体或其它组分影响的活性化合物的重量，虽然理想的是包括这类其它成分，正如本文的实施例中所示。通常用于制药业的任何剂型(胶囊、片剂、注射液等)适用于此，并且术语“赋形剂”、“稀释剂”或“载体”包括诸如在制药业中通常与这类剂型中与有效成分一起包括的这些非有效成分。例如，可以包括典型的胶囊、丸剂、肠衣片、固体或液体稀释剂或赋形剂、调味剂、防腐剂等。

- 20 用于本文所述任一疗法的所有有效成分均可以配制在药用组合物中，所述药用组合物也包括一种或多种所述其它有效成分。或者，可以将它们每种分别给予或在时间上足够同时给予，使得患者的血液水平最终提高，或者使得患者同时享受每种所述有效成分(或策略)的益处。在本发明的某些优选实施方案中，例如，将一种或多种有效成分配制在单一的药用组合物中。在本发明的其它实施方案中，提供包括至少两个单独容器的试剂盒，其中至少一个容器中的内容物与至少一个其它容器中的内容物在其中所含的有效成分方面完全或部分不同。
- 25

本文所述联合疗法也包括应用一种有效成分(组合)生产治疗所述

疾病(或降低其危险)的药物, 其中所述治疗或预防还包括按照本发明的组合的另一有效成分。例如, 在一个实施方案中, 本发明提供应用 SERM 制备与雌激素及其体内转变为雌激素的前药联合应用的药物, 来治疗本发明的联合疗法认为对其有效的任一疾病(即骨质疏松、心血管疾病、血胆固醇过多、血脂过多、动脉粥样硬化、高血压、胰岛素抵抗、糖尿病、肥胖、热潮红、出汗、不规则月经、早老性痴呆、认知问题、与绝经有关的任何症状以及阴道干燥)。在另一实施方案中, 本发明提供应用选自下列的雌激素以制备与 SERM 联合用于治疗任何所述疾病的药物: 17 β -雌二醇、17 β -雌二醇酯(即苯甲酸酯、环戊丙酸酯(cypionate)、dienanthate、戊酸酯等)、17 α -雌二醇、17 α -雌二醇酯、雌三醇、雌三醇酯、雌酮、雌酮酯、结合雌激素、马烯雌酮、马烯雌酮酯、17 α -乙炔基雌二醇、17 α -乙炔基雌二醇酯、己二烯雌酚、美雌醇、美雌醇酯、DES、植物雌激素、替勃龙、炔诺醇。

众所周知, 雌激素刺激乳腺上皮细胞增生, 细胞增生本身被认为通过积累可能导致瘤形成的随机遗传错误而增加了癌症的危险(Preston Martin 等, Cancer. Res. 50: 7415-21, 1990)。基于这一概念, 已经引入了抗雌激素, 以预防乳癌, 目的是降低雌激素刺激的细胞分裂速率。

在雌性 Sprague-Dawley 大鼠 10 月龄后发现的卵巢周期性的丧失, 伴随有血清雌激素和催乳激素水平的增加和血清雄激素和孕激素浓度的降低(Lu 等, 61st Annual Meeting of the Endocrine Society 106 (摘要第 134 号), 1979; Tang 等, Biol. Reprod. 31: 399-413, 1984; Russo 等, Monographs on Pathology of Laboratory Animals: Integument and Mammary Glands 252-266, 1989; Sortino 和 Wise, Endocrinology 124: 90-96, 1989; Cardy, Vet. Pathol. 28: 139-145, 1991)。在衰老中的雌性大鼠中自发发生的这些激素的改变, 与多灶性增生和腺泡/小泡组织分泌活性增加以及乳腺腺管扩张和囊肿形成有关(Boorman 等, 433, 1990; Cardy, Vet. Pathol. 28: 139-145, 1991)。应该提到, 大鼠乳腺增生和瘤形

成改变通常伴有雌激素和催乳激素水平的增加(Meites, J. Neural. Transm. 48: 25-42, 1980)。用本发明的一个 SERM-EM-800 治疗, 诱发特征为小叶结构大小和数目减少的乳腺萎缩, 并且无分泌活性的证据, 显示出 EM-800 在乳腺中的有效抗雌激素活性(Luo 等, 5 Endocrinology 138: 4435-4444, 1997)。

已知雌激素降低血清胆固醇水平, 但增加血清甘油三酯水平或对血清甘油三酯水平无影响(Love 等, Ann. Intern. Med. 115: 860-864, 1991; Walsh 等, New Engl. J. Med. 325: 1196-1204, 1991; Barrett-Connor Am. J. Med. 95 (增刊 5A): 40S-43S, 1993; Russell 等, Atherosclerosis 100: 10 113-122, 1993; Black 等, J. Clin. Invest. 93: 63-69, 1994; Dipippo 等, Endocrinology 136: 1020-1033, 1995; Ke 等, Endocrinology 136: 2435-2441, 1995)。图 3 显示, EM-800 在大鼠中既有降低血中胆固醇的效应, 又有降低血甘油三酯的效应, 因此表现出其对血清脂质分布型的特有作用, 其作用显然不同于其它 SERM 例如他莫昔芬(Bruning 等, Br. J. 15 Cancer 58: 497-499, 1988; Love 等, J. Natl. Cancer Inst. 82:1327-1332, 1990; Dipippo 等, Endocrinology 136: 1020-1033, 1995; Ke 等, Endocrinology 136: 2435-2441, 1995)、屈洛昔芬(Ke 等, Endocrinology 136: 2435-2441, 1995)和雷洛昔芬 (Black 等, J. Clin. Invest. 93: 63-69, 1994)。因此, 认为雌激素和 EM-800 的组合应该保持 EM-800 的降低 20 血中胆固醇和降低血甘油三酯的效应, 因此, 提示这样一种组合可能对血清脂质发挥有益作用。

应该提到, 血清脂质分布型在大鼠和人类之间显著不同。然而, 由于雌激素受体介导的机制涉及雌激素以及抗雌激素的降低胆固醇的效应(Lundeen 等, Endocrinology 138: 1552-1558, 1997), 所述大鼠仍是 25 用于研究雌激素和“抗雌激素”在人体中的降低胆固醇效应的有用模型。

我们也通过联合给予所述新的抗雌激素(EM-800)和性类固醇前体(DHEA), 研究了 EM-800 的抑制效应和 DHEA 对裸鼠体内人 ZR-75-1

乳癌异种移植物生长的抑制效应的潜在相互作用。图 2 和图 3 显示，DHEA 本身在所用的剂量下，引起对肿瘤生长的 50-80%抑制，而 DHEA 不影响用低剂量的所述抗雌激素达到的对肿瘤生长的近完全抑制。如图 4 所示，用 EM-800 和孕激素 MPA 在卵巢切除大鼠中观察到相似的对 DMBA 诱发性乳癌的 E₂ 刺激生长的影响。

骨盐密度(BMD)测量的基线是众所周知的。作为一个实例，BMD 测量在用类固醇抗雌激素 ICI 182780 治疗的大鼠中显示出没有变化 (Wakeling, Breast Cancer Res. Treat. 25: 1-9, 1993)，而通过组织形态计量法观察到抑制性改变 (Gallagher 等, Endocrinology 133: 2787-2791, 1993)。用他莫昔芬报道了相似的差异 (Jordan 等, Breast Cancer Res. Treat. 10: 31-35, 1987; Sibonga 等, Breast Cancer Res. Treatm. 41: 71-79, 1996)。

应该指出，骨盐密度降低不是与骨强度降低相关的唯一的异常 (Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis, Division of Metabolism and Endocrine Drug Products, FDA, 1994 年 5 月)。因此，重要的是分析由各种化合物和疗法诱发的骨代谢的生化参数的改变，以便获得对其作用的更好的了解。

特别重要的是指出，DHEA 和 EM-800 的组合对骨代谢重要的生化参数发挥出乎意料的有益效应。事实上，单独的 DHEA 不影响骨吸收的标志 - 尿羟脯氨酸/肌酸酐之比。而且，对每日尿钙或磷的排泄，不能检测到 DHEA 的影响 (Luo 等, Endocrinology 138: 4435-4444, 1997)。EM-800 将尿羟脯氨酸/肌酸酐之比降低 48%，而与 DHEA 相似，没有观测到 EM-800 对尿钙或磷排泄的影响。此外，EM-800 对骨生成的标记 - 血清碱性磷酸酶活性没有影响，而 DHEA 将该参数的数值提高约 75% (Luo 等, Endocrinology 138: 4435-4444, 1997)。

DHEA 和 EM-800 组合出乎意料的效应之一涉及尿羟脯氨酸/肌酸酐之比，这是骨吸收的标志，当 DHEA 和 EM-800 组合时将其降低

69%，这一数值与用单独的 EM-800 达到的 48%抑制在统计学上有差异($p<0.01$)，而单独的 DHEA 不显示出任何的效应。因此，将 DHEA 加入 EM-800 将 EM-800 对骨重吸收的抑制效应提高 50%。最为重要的是，将 DHEA 加入 EM-800 的另一出乎意料的效应是尿钙降低约 84% (从 23.17 ± 1.55 降至 3.71 ± 0.75 $\mu\text{mol}/24\text{h}/100\text{ g}$ ($p<0.01$)并且尿磷降低 55% (从 132.72 ± 6.08 降至 59.06 ± 4.76 $\mu\text{mol}/24\text{h}/100\text{ g}$ ($p<0.01$)) (Luo 等, Endocrinology 138: 4435-4444, 1997)。

表 1

组别	尿			血清
	钙 ($\mu\text{mol}/24\text{h}/100\text{g}$)	钙 ($\mu\text{mol}/24\text{h}/100\text{g}$)	HP/Cr ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)	tALP (IU/L)
对照	23.17 ± 1.55	132.72 ± 6.08	13.04 ± 2.19	114.25 ± 14.04
DHEA (10 mg)	25.87 ± 3.54	151.41 ± 14.57	14.02 ± 1.59	$198.38 \pm 30.76^*$
EM-800 (75 μg)	17.44 ± 4.5	102.03 ± 25.13	$6.81 \pm 0.84^{**}$	114.11 ± 11.26
DHEA + EM-800	$3.71 \pm 0.75^{**}$	$59.06 \pm 4.76^{**}$	$4.06 \pm 0.28^{**}$	$204.38 \pm 14.20^{**}$

此外，有意义的是注意到，用 DHEA 同时治疗不妨碍 EM-800 对血清胆固醇的有效抑制效应(Luo 等, Endocrinology 138: 4435-4444, 1997)。

虽然雷洛昔芬和相似化合物防止骨丢失并降低血清胆固醇(同雌激素一样)，但应该提到，当比较雷洛昔芬与 Premarin 对 BMD 的效应时，雷洛昔芬对 BMD 的效应的效力低于 Premarin 的效应(Minutes of the Endocrinology and Metabolism Drugs Advisory Committee, FDA Thursday, Meeting #68, 1997 年 11 月 20 日)。

认为在妇女绝经时观察到的骨丢失与骨吸收速率增加有关，继发的骨生成增加不可完全补偿骨吸收。事实上，骨生成和骨吸收的参数在骨质疏松中增加，而骨吸收和骨生成都被雌激素替代疗法所抑制。

因而,认为雌激素替代对骨生成的抑制效应是由骨吸收和骨生成之间偶联的机制所致,使得最初的雌激素诱发的骨吸收的减少,导致骨生成的减少(Parfitt, *Calcified Tissue International* 36 增刊 1: S37-S45, 1984)。

- 5 松质骨强度和随后的对骨折的抗性不仅仅取决于松质骨的总量,也取决于小梁微观结构,正如根据小梁的数目、大小和分布测定的。绝经后妇女卵巢功能的丧失伴随有小梁骨总体积的显著减少(Melsen 等, *Acta Pathologica & Microbiologica Scandinavia* 86: 70-81, 1978; Vakamatsou 等, *Calcified Tissue International* 37: 594-597, 1985), 主要与
10 小梁数目的减少、程度降低以及宽度减少有关(Weinstein 和 Hutson, *Bone* 8: 137-142, 1987)。

- 为了推进本发明的联合疗法方面,对于本文讨论的任何适应征而言,本发明均考虑了在单一组合物中包含所述 SERM 和所述雌激素用于同时给药的药用组合物。所述组合物可以适用于以任何传统方式给
15 药,包括但不限于口服、皮下注射、肌肉注射或经皮给药。在其它实施方案中,提供一种试剂盒,其中所述试剂盒包含在分开的容器中或在一个容器中的一种或多种 SERM 和雌激素。上述药用组合物和试剂盒当用于治疗或预防骨质疏松时,可以还包含一种二膦酸盐化合物。所述试剂盒可以包含用于口服的合适材料(例如片剂、胶囊、糖浆剂等)
20 和用于经皮给药的合适材料(例如软膏、洗剂、凝胶剂、乳油、缓释贴剂等)。

- 申请人认为,给予雌激素、SERM 和性类固醇前体,在骨质疏松发生、血胆固醇过多、血脂过多、动脉粥样硬化、高血压、胰岛素抵抗、糖尿病、肥胖、老年性痴呆以及在治疗热潮红和出汗和/或降低热
25 潮红和出汗的发生率方面有功效。本发明的有效成分(无论是雌激素、SERM 或前体还是其它的)可以以多种方式配制和给予。当按照本发明一起给予时,所述有效成分可以同时或分开给予。

用于经皮或经粘膜给药的有效成分最好是相对于所述药用组合

物总重量的 0.01%-20%(重量), 更优选为 2%和 10%之间。用于经皮给药的 17 β -雌二醇、雌酮、结合雌激素的浓度应该为 0.01%-1%, DHEA 或 5-diol 的浓度应该为至少 7%。或者, 可以将所述有效成分置于具有本领域已知结构的经皮贴剂中, 所述结构例如为欧洲专利第 0279982 号中所述的结构。

当配制为软膏、洗剂、凝胶剂或乳油等时, 将所述有效成分与同人皮肤或粘膜相容并且增强所述化合物经皮透过所述皮肤或粘膜的合适的载体混合。合适的载体是本领域已知的, 包括但不限于 Klucel HF 和 Glaxal 基质。某些是市售的, 例如 Glaxal 基质可得自 Glaxal Canada Limited Company。其它合适的载体可以在 Koller 和 Buri, S.T.P. Pharma 3(2), 115-124, 1987 中找到。所述载体最好是所述有效成分于周围温度下可以使用的有效成分浓度溶于其中的载体。所述载体应该具有足够的粘度, 以保持所述抑制剂在所述药用组合物施用的皮肤或粘膜局部区域上, 而不会流出或蒸发, 其保持时间足以允许所述前体基本透过皮肤或粘膜的所述局部区域而进入血流中, 在血流中引起所需要的临床效应。所述载体通常是几种组分(例如药学上可接受的溶剂和增稠剂)的混合物。有机溶剂和无机溶剂的混合物可以有助于亲水和亲脂的溶解性, 例如水和醇例如乙醇。

优选的性类固醇前体是脱氢表雄酮(DHEA) (可得自 Diosynth Inc., Chicago, Illinois, USA)。

所述载体也可以包括在化妆品和医药领域众所周知、并且通常用于软膏和洗剂中的各种添加剂。例如可以存在日用香料(fragrance)、抗氧化剂、香料、胶凝剂、增稠剂例如羧甲基纤维素、表面活性剂、稳定剂、润肤剂、着色剂和其它类似的药剂。当用于治疗系统性疾病时, 应用于皮肤的部位应该改变, 以便避免有效成分的局部浓度过高和可能的所述有效成分对皮肤的过度刺激。

按照本发明的治疗适用于不确定的情况。所述雌激素化合物、SERM 化合物和/或所述性类固醇前体和/或二膦酸盐也可以经口途径

给予，并且可以与常规的药用赋形剂例如喷干乳糖、微晶纤维素和硬脂酸镁一起配制为片剂或胶囊，以用于口服。

5 所述活性物质可以通过与固体粉状载体物质(例如柠檬酸钠、碳酸钙或磷酸二钙)和粘合剂(例如聚乙烯吡咯烷酮、明胶或纤维素衍生物)、可能也加入润滑剂(例如硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠、“Carbowax”或聚乙二醇)混合，制成片剂或锭剂核心。当然，在口服形式的情况下，可以加入味道改进物质。

10 作为其它形式，人们可以使用插入式胶囊(plug capsule)，例如硬明胶插入式胶囊以及包含软化剂或增塑剂(例如甘油)的封闭式软明胶胶囊。插入式胶囊含有优选为颗粒形式的所述活性物质，例如为与填料例如乳糖、蔗糖、甘露醇、淀粉如马铃薯淀粉或支链淀粉、纤维素衍生物或高度分散的硅酸的混合物。在软明胶胶囊中，所述活性物质优选溶于或悬浮于合适的液体例如植物油或液态聚乙二醇中。

15 所述洗剂、软膏、凝胶剂或乳油应该充分擦入皮肤中，使得不会过分清楚可见，并且皮肤的该区域不应该洗，直至大部分经皮透入至少4小时，更优选至少6小时。

经皮贴剂可以用来按照已知的技术来传递前体。通常应用长得多的时间，例如1-4天，但通常使有效成分与较小的表面积接触，使得缓慢而恒定的传递有效成分。

20 已经开发并且正在使用的许多经皮给药系统适合于传递本发明的有效成分。释放速率通常通过基质扩散或所述有效成分通过控制膜来控制。

25 经皮装置的机械方面是本领域众所周知的，例如在美国专利5,162,037、5,154,922、5,135,480、4,666,441、4,624,665、3,742,951、3,797,444、4,568,343、5,064,654、5,071,644、5,071,657中有解释，上述专利的公开内容通过引用结合到本文中。在欧洲专利0279982和英国专利申请2185187中提供了另外的背景。

所述装置可以是本领域已知的一般类型的任一种，包括粘胶骨架

型和贮库型经皮给药装置。所述装置可以包括掺入纤维、吸收所述有效成分和/或载体的含药物骨架。在贮库型装置中，所述贮库可以通过所述载体和所述有效成分不可透过的聚合物膜来限定。

5 在经皮装置中，所述装置本身保持将有效成分与所需的局部皮肤表面接触。在这种装置中，对于有效成分的载体的粘度的关注不如乳油或凝胶剂。经皮装置的溶剂体系可以包括例如油酸、直链醇乳酸酯和一缩二丙二醇，或包括本领域已知的其它溶剂体系。所述有效成分可以溶于或悬浮于所述载体中。

10 就贴附于皮肤而言，经皮贴剂可以固定在中间有穿孔的外科胶带上。所述胶带最好被一个释放衬垫覆盖，以在使用之前保护它。适用于释放的典型材料包括聚乙烯和聚乙烯涂布纸、最好涂有硅氧烷以便于除去。为了应用所述装置，简单地将所述释放衬垫剥去，将粘胶贴到患者的皮肤上。在美国专利 5,135,480 (其公开内容通过引用结合到本文中)中，Bannon 等描述了一种具有非粘胶装置、用于保证所述装置
15 接触皮肤的替代装置。

唯一必不可少的是，SERM、雌激素和最后的性类固醇前体给予的方式和剂量，要足以使得每种的血清浓度达到所需水平。按照本发明的联合疗法，所述 SERM 的浓度维持在所需的参数内，同时雌激素的浓度维持在所需参数内。

20 当使用雌二醇时，血清雌二醇浓度通常应该维持在每升 50 纳克和 300 纳克之间，优选在每升 100 纳克和 200 纳克之间，最优选在每升 150 纳克和 175 纳克之间。当使用另一种雌激素时，为了顾及相对于雌二醇的雌激素活性的差异以及为了达到正常的绝经前(permenopausal)雌激素水平，血清浓度可以按已知方式改变。例如，如果
25 使用美雌醇，则需要较低的浓度。也可以根据绝经症状的消失，评估合适的血清雌激素水平。所述联合疗法的第二种化合物(例如 EM-652.HCl)的血清浓度通常维持在每升 1 微克和 15 微克之间，或在某些实施方案中，为维持在每升 2 微克和 10 微克之间，或每升 5 微克和 10

微克之间。

所述雌激素最好是雌二醇，但可以是硫酸雌酮钠或起雌激素受体激动剂作用的任何其它化合物。当分开给予时，可以使用市售的雌激素增补剂，例如可得自 Ayerst (St-Laurent, Québec, Canada) 的“PREMARIN”。一种优选的性类固醇前体是 DHEA，虽然 DHEA-S 和以下讨论的类似物由于以下所述的原因也是特别有效的。对于典型的患者，当口服时，达到所需血清浓度的雌激素的合适剂量在每天每 50 kg 体重 0.3 毫克和 2.5 毫克 PREMARIN 之间。在本发明的某些实施方案中，所述雌激素可以是在贴剂中经皮给予的 17β -雌二醇，可得自 CIBA，名称为“ESTRADERM”，其中日剂量在每天每 50 kg 体重 0.05 毫克和 0.2 毫克之间。可得自 Squibb、商品名为“DELESTOGEN”的戊酸 17β -雌二醇通过注射给予。

其它优选的本发明雌激素药品是：含有 17β -雌二醇的贴剂，可得自 Berlex Canada，商品名为 CLIMARA，或可得自 Novartis Pharma，商品名为 VIVELLE；含有 17β -雌二醇的阴道装置，可得自 Pharmacia & Upjohn，商品名为 ESTRING；含有 17β -雌二醇的凝胶剂，可得自 Schering，商品名为 ESTROGEL；含有己二烯雌酚的乳油，可得自 JANSSEN-ORTHO，商品名为 ORTHO DINESTROL。

在某些实施方案中，口服给予所述优选的雌激素。例如微粉化 17β -雌二醇，可得自 Roberts，商品名为 ESTRACE；乙炔基雌二醇，可得自 Schering Canada，商品名为 ESTINYL；硫酸雌酮(estropipate)，可得自 PHARMACIA UPJOHN，商品名为 OGEN。

在某些实施方案中，优选使用混合的雌激素/雄激素化合物来代替雌激素。所述化合物之一是替勃龙[($7\alpha, (7\alpha)$ -17-羟基-7-甲基-19-去甲孕-5(10)-烯-20-炔-3-酮(-19-norpregn-5(10)-en-20-yn-3-one)；专利号 U.S. 3,340,279 (1967); U.S. 3,475,465 (1969)和 J. de Visser 等描述的内分泌学分布型, Arzneimittel-Forsch, 34, 1010, 1984)，可得自 ORGANON (荷兰)，商品名为 LIVIAL。

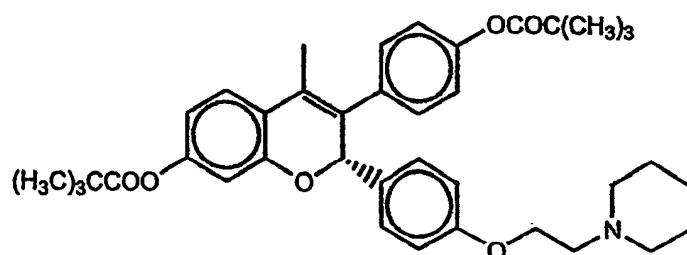
也优选含有雌激素和孕酮或雄激素的混合物的药品。所述药物可
得自 Novartis Pharma, 商品名为 ESTRACOM; 得自 Sabex, 商品名为
CLIMACTERON。

5 本发明的经皮或经粘膜给药系统也可以用作预防和/或治疗骨质
疏松或其它疾病的新型的改进给药系统。

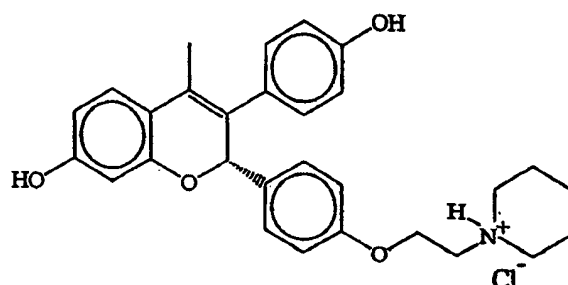
可以使用任何雌激素, 所述雌激素按照生产商的建议, 根据功效
需要使用。合适的剂量是本领域已知的。具有雌激素活性或类似活性
或对雌激素受体具有激动剂活性或类似活性的任何化合物或化合物的
混合物可以按照本发明使用(植物雌激素、合成雌激素等)。

10 本发明的选择性雌激素受体调节剂的分子式具有以下特征: a) 由
1-2 个间隔碳原子间隔的两个芳环, 两个芳环或者是未取代的, 或者被
一个羟基或一个在体内转变为羟基的基团取代; 和 b) 具有一个芳环和
一个叔胺官能或其盐的侧链。

15 一种优选的本发明 SERM 是 PCT/CA96/00097 (WO 96/26201) 中报
道的 EM-800。EM-800 的分子结构是:



另一种优选的本发明 SERM 是 EM-01538:



EM-1538 (也称为 EM-652.HCl)是与 EM-800 相比为有效的抗雌激素
EM-652 的盐酸盐, EM-1538 是一种更为简单、更易于合成的盐。它也

容易分离、纯化、可结晶和显示出良好的固态稳定性。当给予或者 EM-800 或者 EM-1538 时, 认为在体内产生相同的活性化合物。

其它优选的本发明 SERM 包括: 他莫昔芬((Z)-2-[4-(1,2-二苯基-1-丁烯基)苯氧基]-N,N-二甲基乙胺) (可得自 Zeneca, UK); 托瑞米芬
5 ((Z)-2-[4-(4-氯-1,2-二苯基-1-丁烯基)苯氧基]-N,N-二甲基乙胺) (可得自 Orion-Farmos Pharmaceuticla, Finland, 或可得自 Schering-Plough); 屈洛昔芬((E)-3-[1-[4-[2-(二甲氨基)乙氧基]苯基]-2-苯基-1-丁烯基]苯酚)和 CP-336,156 (Lasofoxifene) (顺式-1R[4'-吡咯烷基-乙氧基苯基]-2S-苯基-6-羟基-1,2,3,4-四氢化萘 D-(-)-酒石酸盐) (Pfizer Inc., USA); 雷洛昔芬
10 ([2-(4-羟基苯基)-6-羟基苯并[b]噻吩-3-基][4-[2-(1-哌啶基)乙氧基]苯基]-甲酮盐酸盐) (Eli Lilly and Co., USA)、LY 335563 (6-羟基-3-[4-[2-(1-哌啶基)乙氧基]苯氧基]-2-(4-羟基苯基)苯并[b]噻吩盐酸盐)和 LY 353381 (Arzoxifene, 6-羟基-3-[4-[2-(1-哌啶基)乙氧基]苯氧基]-2-(4-甲氧基苯基)苯并[b]噻吩盐酸盐) (Eli Lilly and Co., USA); 艾多昔芬((E)-
15 1-[2-[4-[1-(4-碘苯基)-2-苯基-1-丁烯基]苯氧基]乙基]吡咯烷) (SmithKline Beecham, USA); Levormeloxifene (3,4-反式-2,2-二甲基-3-苯基-4-[4-(2-(2-(吡咯烷-1-基)乙氧基)苯基]-7-甲氧基苯并二氢吡喃) (Novo Nordisk, A/S, Denmark), 它公开于 Shalmi 等 WO 97/25034, WO 97/25035, WO 97/25037, WO 97/25038; 和 Korsgaard 等 WO
20 97/25036); GW5638 (由 Willson 等描述, Endocrinology, 138(9), 3901-3911, 1997)和吲哚衍生物(由 Miller 等描述, EP 0802183A1); 和 TSE 424, 由 Wyeth Ayers (USA)研制, 公开于 JP10036347 (American home products corporation); 和 WO 97/32837 中描述的非类固醇雌激素衍生物。也包括得自 Taiho (日本)的 Iproxifen (TAT 59; 磷酸二氢(E)-4-[1-
25 [4-[2-(二甲氨基)乙氧基]苯基]-2-[4-(1-甲基乙基)苯基]-1-丁烯基]苯酚)、得自 Orion (芬兰)的 FC 1271 ((Z)-2-[4-(4-氯-1,2-二苯基-1-丁烯基)苯氧基]乙醇)、得自 Hoechst Marion Roussel 的 HMR 3339 和 HMR 3656、得自德国 Schering AG 的 SH 646、得自 Wyeth Ayerst (USA)的

ERA 923、得自 Eli Lilly (USA)的 LY 335124 和 LY 326315。

可以使用根据功效需要使用的任何 SERM，按照生产商的建议使用。合适的剂量是本领域已知的。可以按照本发明使用任何其它的市售非类固醇抗雌激素。可以使用具有类似 SERM 活性的任何化合物(例如：雷洛昔芬)。

按照本发明给予的 SERM 最好以下述剂量范围使用：对于平均体重的人而言，当口服时，优选为 0.01-10 mg/kg 体重/天(优选 0.05-1.0 mg/kg)、每天 5 mg，尤其是每天 10 mg，分为两个等分剂量；对于平均体重的人而言，当胃肠外给予(即肌肉、皮下或经皮给药)时，优选为 0.003-3.0 mg/kg 体重/天(优选 0.015-0.3 mg/ml)、每天 1.5 mg，尤其是每天 3.0 mg，分为两个等分剂量。最好是如下所述将所述 SERM 与药学上可接受的稀释剂或载体一起给予。

在用于治疗骨质疏松的联合疗法中作为有效成分给予的本发明的优选二膦酸盐包括：阿仑膦酸盐[(4-氨基-1-羟基亚丁基)二膦酸二钠盐水合物，可得自 Merck Shape and Dohme，商品名为 Fosamax；依替膦酸盐[(1-羟基亚乙基)二膦酸，2,2'-亚氨基二乙醇]，可得自 Procter and Gamble，商品名为 Didrocal 和 Didronel；氯膦酸[(二氯亚甲基)二膦酸二钠盐]，可得自 Rhône-Poulenc Rorer，商品名为 Bonefos，或可得自 Boehringer Mannheim，商品名为 Ostac；和帕米膦酸盐(3-氨基-1-羟基亚丙基)二膦酸二钠盐)，可得自 Geigy，商品名为 Aredia。利塞膦酸盐(1-羟基-2-(3-吡啶基)亚乙基二膦酸一钠盐)正在临床研制中。可以按照本发明使用任何其它的市售二膦酸盐，所有均按生产商建议的剂量使用。同样，可以以现有技术建议的剂量使用性类固醇前体，其剂量优选将循环水平恢复 20-30 岁健康男性水平或绝经前成年妇女的水平。

关于本文建议的所有剂量，主治医师应该监测各个患者的反应并据此调节剂量。

实施例

实施例 1

在乳腺中，雄激素由前体类固醇脱氢表雄酮(DHEA)生成。临床证据表明，雄激素对乳癌有抑制效应。另一方面，雌激素刺激乳癌的发生和生长。我们研究了单独 DHEA 或与新近描述的纯抗雌激素 EM-800 联合的 DHEA 对卵巢切除裸鼠中由人乳癌细胞系 ZR-75-1 形成的肿瘤异种移植物生长的影响。

小鼠在卵巢切除后立即每日接受皮下注射的 0.5 μg 雌酮(一种雌激素类激素)。每日口服 1 次 EM-800 (15、50 或 100 μg)。DHEA 或者单独或者结合 15 μg 每日口服剂量的 EM-800 每日两次应用(总剂量 0.3、1.0 或 3.0 mg)于背侧皮肤上。定期评价相对于第一天测量结果的对所述治疗反应的肿瘤大小的变化。实验结束时，解剖肿瘤并将其称重。

与没有接受雌酮的小鼠相比，在仅接受雌酮的卵巢切除小鼠中观察到 9.5 个月内肿瘤大小增加 9.4 倍。在补充雌酮的卵巢切除小鼠中给予 15、50 或 100 μg EM-800，导致对肿瘤大小的抑制分别为 88%、93% 和 94%。另一方面，0.3、1.0 或 3.0 mg 剂量的 DHEA 将终末肿瘤重量分别抑制 67%、82% 和 85%。用每日 15 μg 口服剂量的 EM-800 并且给予或不给予不同剂量的经皮 DHEA，获得相当的对肿瘤大小的抑制作用。

DHEA 和 EM-800 独立地抑制雌酮刺激的 ZR-75-1 小鼠异种移植肿瘤在裸鼠体内的生长。给予所述特定剂量的 DHEA 不改变 EM-800 的抑制效应。

材料和方法

ZR-75-1 细胞

ZR-75-1 人乳癌细胞得自美国典型培养物保藏中心(Rockville, MD)，常规按照已描述的方法(Poulin 和 Labrie, Cancer Res. 46: 4933-

4937, 1986; Poulin 等, Breast Cancer Res. Treat. 12: 213-225, 1988), 在 95%空气/5% CO₂ 的潮湿环境中、于 37℃ 在补充 2 mM L-谷氨酰胺、1 mM 丙酮酸钠、100 IU 青霉素/ml、100 µg 链霉素/ml 和 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中作为单层培养。用 0.05%胰蛋白酶:0.02% EDTA (w/v)处理之后, 将细胞每周传代。用于该报道中所述实验的细胞培养物得自细胞系 ZR-75-1 的第 93 代。

动物

雌性纯合 Harlan Sprague-Dawley (nu/nu)无胸腺小鼠(28-42 日龄)得自 HSD (Indianapolis, Indiana, USA)。小鼠关养在空气层流罩超净台中具有空气过滤罩的乙烯笼子中, 并且在限制病原体的条件下维持。笼子、褥草和食物在使用之前进行高压灭菌。将水高压灭菌, 酸化至 pH 2.8, 任意供应。

细胞接种

将小鼠两侧卵巢切除(OVX), 一周后在麻醉条件下, 通过腹膜内注射 0.25 ml/只动物的三溴乙醇(戊醇: 0.8 g/100 ml 0.9% NaCl; 和三溴乙醇: 2g/100 ml 0.9% NaCl)实现肿瘤细胞的接种。在用 0.05%胰蛋白酶/0.02% EDTA (w/v)处理单层后, 收获对数生长期的 1.5×10^6 ZR-75-1 细胞, 将所述细胞悬浮于 0.1 ml 含有 25% Matrigel 的培养基中, 用 1 英寸长的 20 号针头, 如先前描述的方法(Dauvois 等, Cancer Res. 51: 3131-3135, 1991), 皮下接种到动物的两侧胁腹。为了促进肿瘤的生长, 每只动物每日接受皮下注射由 0.9% NaCl 5%乙醇 1%明胶组成的溶媒中的 10 µg 雌二醇(E₂), 注射 5 周。出现触知的 ZR-75-1 肿瘤后, 用测径规测量肿瘤的直径, 选择肿瘤直径在 0.2 cm 和 0.7 cm 之间的小鼠进行该项研究。

激素治疗

- 除对照 OVX 组动物外, 所有动物每日接受皮下注射 0.2 ml 0.9% NaCl 5%乙醇 1%明胶中的 0.5 μg 雌酮(E_1)。在指定组中, 每日两次经皮给予 0.3、1.0 或 3.0 mg/只动物 DHEA, 将 0.02 ml 体积的 DHEA 应用于肿瘤生长区之外的背侧皮肤区。将 DHEA 溶于 50%乙醇 50%丙二醇中。如先前所描述(Gauthier 等, J. Med. Chem. 40: 2117-2122, 1997), 在 Laboratory of Molecular Endocrinology of the CHUL Research Center 的医药化学部, 合成 EM-800, 即((+)-7-新戊酰氧基-3-(4'-新戊酰氧基苯基)-4-甲基-2-(4''-(2'''-哌啶子基乙氧基)苯基)-2H-苯并吡喃)。将 EM-800 溶于 4% (v/v)乙醇 4% (v/v)聚乙二醇(PEG) 600 1% (w/v)明胶 0.9% (w/v) NaCl 中。指定组的动物接受口服日剂量为 15 μg 、50 μg 或 100 μg 单独的 EM-800 或联合 DHEA, 而 OVX 组的动物仅接受溶媒(0.2 ml 4%乙醇 4% PEG 600 1%明胶 0.9% NaCl)。每周一次用 Vernier 测径规测量肿瘤。记录以 cm 计的两个垂直的直径(L 和 W), 用以下公式计算肿瘤面积(cm^2): $L/2 \times W/2 \times \pi$ (Dauvois 等, Cancer Res. 51: 3131-3135, 1991)。将治疗的第一天测量的面积作为 100%, 以原始肿瘤面积的百分率表示肿瘤大小的变化。一般在皮下肿瘤的情况下, 不可能精确地获得肿瘤的三维体积, 因此, 仅测量肿瘤的面积。治疗 291 天(或 9.5 个月)之后, 处死所述动物。
- 按照已描述的方法(Dauvois 等, Breast Cancer Res. Treat. 14: 299-306, 1989; Dauvois 等, Eur. J. Cancer. Clin. Oncol. 25: 891-897, 1989; Labrie 等, Breast Cancer Res. Treat. 33: 237-244, 1995), 评估反应的类别。简而言之, 部分消退对应于消退等于或大于其原始大小的 50%的肿瘤; 稳定的反应是指消退小于原始大小的 50%或发展小于其原始大小的 50%的肿瘤, 而完全消退是指在治疗结束时检测不到的肿瘤。发展是指与其原始大小相比发展超过 50%的肿瘤。在实验结束时, 通过断头术杀死所有动物。立即取出肿瘤、子宫和阴道, 去除结缔组织和脂肪组织, 并称重。

统计学分析

用评估由 DHEA、EM-800 和时间所致效应的方差分析 (ANOVA)，评价治疗对肿瘤大小影响的统计学显著性，在治疗开始和结束时在相同的动物中进行重复测定(组内受治疗者因素)。0 时和治疗 9.5 个月后的重复度量构成动物的随机区组。因此，将时间作为区组内影响来分析，而将两种治疗作为区组间影响来评价。主要影响之间的所有相互作用都包括在该模型中。采用组内受治疗者作为误差项，分析治疗因素及其相互作用的显著性。将数据转化为 log。构成所述 ANOVA 基础的假设，假设残差正态性和方差齐性。

对于最小显著差数，采用费歇耳检验进行后验配对比较(*posteriori pairwise comparison*)。治疗对体重和器官重量的主要影响和相互作用采用标准两因素 ANOVA 与相互作用来分析。所有的 ANOVA 均采用 SAS 程序(SAS Institute, Cary, NC, USA)来进行。采用双尾检验，以 5% 的总体水平宣布差异的显著性。

对于有序聚类(*ordered categorical*)反应变量(完全反应、部分反应、稳定反应和肿瘤发展)，用 Kruskal-Wallis 检验分析聚类数据。在对治疗效应进行总体评价后，调节多重比较的 *p* 界值，分析表 4 所示结果的亚组(*subset*)。采用 StatXact 程序(Cytel, Cambridge, MA, USA)，计算 *p* 精确值。

数据以每组 12-15 只小鼠的均数±均数的标准误(SEM)表示。

结果

如图 2A 所示，在用皮下给予的 0.5 μg 日剂量雌酮治疗的卵巢切除裸鼠中，在 291 天(9.5 个月)内 ZR-75-1 肿瘤增加 9.4 倍，而在仅接受溶媒的对照 OVX 小鼠中，在该项研究期间肿瘤大小降至原始数值的 36.9%。

用增加剂量的经皮 DHEA 治疗，导致对 E_1 刺激的 ZR-75-1 肿瘤生长的进行性抑制。用每只动物 0.3 mg、1.0 mg 和 3.0 mg 日剂量的 DHEA

治疗 9.5 个月时, 分别达到 50.4%、76.8%和 80.0%的抑制(图 2A)。与总肿瘤荷载减少一致, 用 DHEA 治疗导致在实验结束时肿瘤平均重量的显著降低。事实上, 平均肿瘤重量从对照补充 E_1 的卵巢切除裸鼠的 1.12 ± 0.26 g 降至分别接受 0.3 mg、1.0 mg 和 3.0 mg 日剂量 DHEA 的动物组中的 0.37 ± 0.12 g ($P=.005$)、 0.20 ± 0.06 g ($P=.001$)和 0.17 ± 0.06 g ($P=.0009$) (图 2B)。

当与对照动物 9.5 个月时的肿瘤大小比较时, 抗雌激素 EM-800 在 15 μ g、50 μ g 和 100 μ g 的日剂量下, 对雌激素刺激的肿瘤大小分别抑制 87.5% ($P<.0001$)、93.5% ($P<.0001$)和 94.0% ($P=.0003$) (图 3A)。用三种 EM-800 剂量达到的肿瘤大小的减少, 在相互之间没有显著性差异。如图 2B 所示, 9.5 个月的研究结束时肿瘤的重量从对照补充 E_1 的 OVX 小鼠的 1.12 ± 0.26 g 降至分别用 15 μ g、50 μ g 和 100 μ g 日剂量的 EM-800 治疗动物的 0.08 ± 0.03 g、 0.03 ± 0.01 g 和 0.04 ± 0.03 g (在所有剂量下的 EM-800 相对于补充 E_1 的 OVX, $P<.0001$)。

如上所述, 15 μ g 口服日剂量的抗雌激素 EM-800 引起在 9.5 个月时测量的对雌酮刺激的肿瘤生长的 87.5%的抑制。加入所用的三种剂量的 DHEA, 对用 15 μ g 日剂量的抗雌激素 EM-800 达到的对肿瘤大小的已经显著的抑制作用没有显著影响(图 5B)。因此, 平均肿瘤重量从补充雌酮的对照小鼠中的 1.12 ± 0.26 g 分别显著降至在接受单独的或与 0.3 mg、1.0 mg 和 3.0 mg 剂量的 DHEA 联合的 15 μ g 日剂量的所述抗雌激素的动物中的 0.08 ± 0.03 g ($P<.0001$)、 0.11 ± 0.04 g ($P=.0002$)、 0.13 ± 0.07 g ($P=.0004$)和 0.08 ± 0.05 g ($P<.0001$) (注意到在所述 4 组之间没有显著性差异) (图 2B)。

也有兴趣地研究了用上述治疗达到的反应类别。因此, 用增加剂量的 DHEA 的治疗虽然没有将进行性肿瘤的数目降至统计学显著性的水平($P=.088$), 但将进行性肿瘤的数目从补充雌酮的对照 OVX 动物中的 87.5%降至用 0.3 mg、1.0 mg 和 3.0 mg 日剂量的 DHEA 治疗动物中的 50.0%、53.3%和 66.7% (表 4)。另一方面, 完全反应从补充雌酮的

小鼠中的 0%提高至接受 0.3 mg、1.0 mg 和 3.0 mg 日剂量的经皮 DHEA 的动物中的 28.6%、26.7%和 20.0%。另一方面，在补充 E₁ 的对照小鼠和接受上述剂量的 DHEA 的三组动物中，稳定反应分别测定为 12.5%、21.4%、20.0%和 13.3%。在对照卵巢切除小鼠中，完全反应率、
5 部分反应率和稳定反应率分别测量为 68.8%、6.2%和 18.8%，而仅在 6.2%的肿瘤中观察到发展(表 2)。

在接受单独的(15 µg)抗雌激素 EM-800 (P=.0006)或与 0.3 mg、1.0 mg 和 3.0 mg 的 DHEA 联合的所述动物中，分别在 29.4%、33.3%、26.7%和 35.3%的肿瘤中达到完全反应或肿瘤消失(表 4)。另一方面，在上述
10 组的动物中，分别在 35.3%、44.4%、53.3%和 17.6%的肿瘤中观察到发展。在用单独或与 DHEA 联合的 EM-800 治疗的组之间，没有显著性差异。

对于根据肿瘤重量调节的体重，没有观察到 DHEA 或 EM-800 治疗的显著性效应。用雌酮治疗 OVX 小鼠，子宫重量从 OVX 对照小鼠的 28 ± 5 mg 增加至 132 ± 8 mg (P<.01)，而增加剂量的 DHEA 引起对雌酮刺激效应的进行性的但却相对小的抑制，所述抑制在所用的最高剂量 DHEA 下达到 26% (P=.0008)。在同一图中可以观察到，雌酮刺激的子宫重量从补充雌酮的对照小鼠中的 132 ± 8 mg 分别降至使用 15 µg、50 µg 或 100 µg 口服日剂量的 EM-800 的 49 ± 3 mg、 36 ± 2 mg 和
15 32 ± 1 mg (在所有剂量下，相对于对照，P<.0001) (总体上 P<.0001)。与 0.3 mg、1.0 mg 和 3.0 mg 日剂量的 DHEA 联合的 15 微克(15 µg) EM-800，测量到子宫重量分别为 49 ± 3 mg、 59 ± 5 mg 和 69 ± 3 mg。
20

另一方面，用雌酮治疗，将阴道重量从 OVX 动物的 14 ± 2 mg 增加至 31 ± 2 mg (P<.01)，而加入 DHEA 没有显著性效应。在用 15 µg、50 µg 或 100 µg 日剂量的 EM-800 治疗后，阴道重量则分别降低 23 ± 1 mg、 15 ± 1 mg 和 11 ± 1 mg (在所有剂量下，相对于对照而言，总体 p 和配对 P<.0001)。将 0.3 mg、1.0 mg 和 3.0 mg 剂量的 DHEA 与 EM-800 联合，阴道重量分别测量为 22 ± 1 mg、 25 ± 2 mg 和 23 ± 1 mg (相对于
25

15 μg EM-800, 所有的组均为 N.S.)。应该提到, 在所用的最高剂量即 100 μg 日剂量下, EM-800 将补充雌酮的 OVX 动物中的子宫重量降至不是与 OVX 对照有差异的数值, 而将阴道重量降低至在 OVX 对照中所测量数值以下($P<.05$)。DHEA 可能由于其雄激素效应, 部分抵消 EM-800 对子宫重量和阴道重量的影响。

表 2. 经皮给予 DHEA 或口服单独的或联合的 EM-800 达 9.5 个月对裸鼠中人 ZR-75-1 乳房肿瘤异种移植物反应(完全、部分、稳定和发展)的影响。

组别	动物总数	反应类别			
		完全	部分	稳定	发展
		数目和(%)			
OVX	16	11(68.8)	1(6.2)	3(18.8)	1 (6.2)
OVX + E1 (0.5 μg)	16	0 (0)	0 (0)	2(12.5)	14(87.5)
OVX + E1 (0.5 μg) + DHEA 0.3 mg	14	4 (28.6)	0 (0)	3(21.4)	7 (50.0)
1.0 mg	15	4 (26.7)	0 (0)	3(20.0)	8 (53.3)
3.0 mg	15	3 (20.0)	0 (0)	2(13.3)	10(66.7)
OVX + E1 (0.5 μg) + EM-800 15 μg	17	5 (29.4)	1(5.9)	5(29.4)	6 (35.3)
50 μg	16	4 (25.0)	3(18.8)	5(31.2)	4 (25.0)
100 μg	16	8 (50.0)	0 (0)	3(18.8)	5 (31.2)
OVX + E1 (0.5 μg) + EM-800 + DHEA 0.3 mg	18	6 (33.3)	0 (0)	4(22.2)	8 (44.4)
1.0 mg	15	4 (26.7)	0 (0)	3(20.0)	8 (53.3)
3.0 mg	17	6 (35.3)	0 (0)	8(47.1)	3 (17.6)

10

E₁ = 雌酮; DHEA = 脱氢表雄酮; OVX = 卵巢切除的

实施例 2

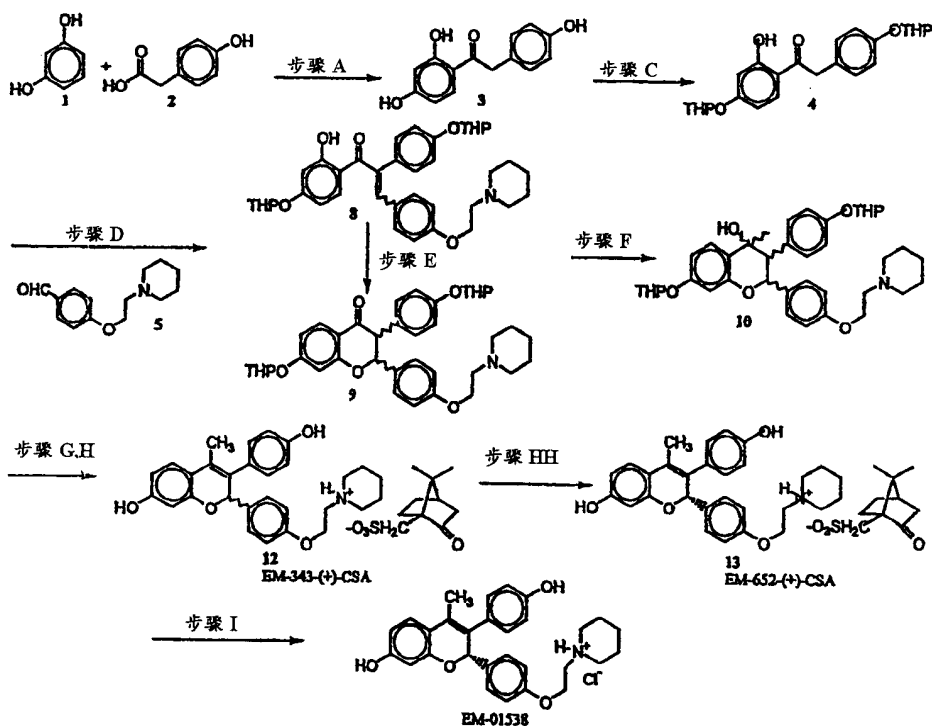
雄烯-3 β ,17 β -二醇(5-diol)具有固有的雌激素活性。另外,作为前体性类固醇,它在外周颅内组织中可以转化为活性雄激素和/或其它雌激素。为了评价 5-diol 对骨质作用的雄激素组分和雌激素组分的相对重要性,将 21 周龄大鼠卵巢切除,用每月经皮 1 次单独的 2、5 或 12.5 mg 5-diol 或与抗雄激素氟他胺(FLU, 10 mg, s.c., 每日一次)和/或抗雌激素 EM-800 (100 μ g, s.c., 每日一次)联合的 2、5 或 12.5 mg 5-diol 治疗 12 个月。治疗 11 个月后,测量骨盐密度(BMD)。卵巢切除(OVX)导致股骨 BMD 降低 12.8% ($p<0.01$), 而用最高剂量的 5-diol 治疗, 在 OVX 后 11 个月期间恢复 34.3% 的损失 的股骨 BMD ($p<0.01$)。与单独的 5-diol 的效应相比, 同时给予 FLU 完全防止了 5-diol 对股骨 BMD 的刺激效应, 而加入 EM-800 导致附加的 28.4% 的刺激。同时给予 5-diol、FLU 和 EM-800, 仅显示出 EM-800 (27%) 的效应, 因为 5-diol 的效应被 FLU 完全阻断。对腰椎 BMD 获得相当的结果, 虽然接受 12.5 mg 单独的 5-diol、12.5 mg 5-diol + EM-800 或 5-diol + FLU + EM-800 的 OVX 大鼠中, 腰椎 BMD 恢复至与无伤动物无显著性差异的数值。组织形态计量分析表明, 5-diol 对骨体积、小梁数目的刺激效应和对近端胫骨干骺端区的继发松质骨的小梁分离的抑制效应, 被 FLU 消除, 但被 EM-800 进一步增强。在用 5-diol 治疗后获得的血清碱性磷酸酶活性的显著刺激被同时给予 FLU 逆转 57% ($p<0.01$, 相对于 12.5 mg 单独的 5-diol)。用 5-diol 治疗对尿钙与肌酸酐之比没有统计学显著性抑制效应。最高剂量的 5-diol 引起血清胆固醇显著降低 23% ($p<0.01$), 而加入 EM-800 将血清胆固醇降低 62% ($p<0.01$)。本发明的数据清楚地显示出 5-diol 对骨生成的刺激效应, 并且提示, 虽然 5-diol 是一种弱雌激素, 但它对骨生成的刺激效应主要由雄激素效应介导。此外, EM-800 和 5-diol 对骨质的相加刺激效应证明了抗雌激素 EM-800 在大鼠中节约骨(bone-sparing)的效应。5-diol 和 EM-800 两者降低胆固醇的活性可能在心血管疾病预防方面有有趣的效用。

实施例 3

本发明优选化合物的合成实施例

(S)-(+)-7-羟基-3-(4'-羟基苯基)-4-甲基-2-(4''-(2'''-哌啶子基乙氧基)苯基)-2H-1-苯并吡喃盐酸盐 EM-01538 (EM-652, HCl)的合成

方案 1



步骤 A: $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, 甲苯; 100°C , 1 小时。

10 步骤 C: 3,4-二氢吡喃, 对甲苯磺酸一水合物, 乙酸乙酯; 25℃
氮气下, 16 小时, 然后在异丙醇中结晶。

步骤 D、E 和 F:

(1) 吡啶, 甲苯, Dean & Stark 仪器, 氮气下回流; (2) 1,8-二氮杂二环[5,4,0]十一-7-烯、DMF, 回流 3 小时;

15 (3) CH_3MgCl 、THF, -20 至 0℃, 然后室温 24 小时;

步骤 G、H: (1S)-(+)-10-樟脑磺酸, 丙酮, 水, 甲苯, 室温, 48 小时。

步骤 HH: 95%乙醇, 70°C, 然后室温 3 天。

步骤 HHR: 母液和步骤 HH 洗涤液的再循环

(S)-10-樟脑磺酸, 回流; 36 小时, 然后室温 16 小时。

步骤 I:

5 (1) DMF 水溶液, Na_2CO_3 , 乙酸乙酯;

(2) 乙醇, 稀盐酸;

(3) 水。

10 **2-四氢吡喃氧基-4-羟基-2'-(4''-四氢吡喃氧基苯基)苯乙酮(4)的合成。** 将 3,4-二氢吡喃(218 ml, 3.39 mole)和乙酸乙酯(520 ml)中的 2,4-二羟基-2'-(4''-羟基苯基)苯乙酮 **3** (97.6 g, 0.4 mole) (可得自 Chemsyn Science Laboratories, Lenexa, Kansas)的悬浮液用对甲苯磺酸一水合物(0.03 g, 0.158 mmole)于约 25°C 处理。将反应混合物在氮气、无外部加热下搅拌约 16 小时。然后用碳酸氢钠(1 g)和氯化钠(5 g)的水(100 ml)
15 溶液洗涤混合物。分离各相, 有机相用盐水(20 ml)洗涤。每次的洗涤液用 50 ml 乙酸乙酯反萃取。合并所有的有机相, 并通过硫酸钠过滤。

在大气压下经蒸馏除去溶剂(约 600 ml), 并加入异丙醇(250 ml)。在大气压下蒸馏出额外的溶剂(约 300 ml), 加入异丙醇(250 ml)。在大气压下蒸馏出额外的溶剂(约 275 ml), 加入异丙醇(250 ml)。约 12 小时
20 后, 将溶液于约 25°C 在搅拌下冷却, 滤出结晶固体, 用异丙醇洗涤并干燥(116.5 g, 70%)。

4-羟基-4-甲基-2-(4'-[2''-哌啶子基]乙氧基)苯基-3-(4'''-四氢吡喃氧基)苯基-7-四氢吡喃氧基-苯并二氢吡喃(10)的合成。 用 Dean & Stark 装置, 将 2-四氢吡喃氧基-4-羟基-2'-(4''-四氢吡喃氧基苯基)苯乙酮 **4** (1 kg, 2.42 mole)、4-[2-(1-哌啶子基)乙氧基]苯甲醛 **5** (594 g, 2.55 mole) (可得自 Chemsyn Science Laboratories, Lenexa, Kansas)和哌啶 (82.4 g, 0.97 mole)(可得自 Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee,

Wis)在甲苯(8L)中的溶液在氮气下回流,直至收集到一个相当量的水(44 ml)。

5 通过在大气压下蒸馏,除去溶液中的甲苯(6.5 L)。加入二甲基甲酰胺(6.5 L)和 1,8-二氮杂二环[5,4,0]十一-7-烯(110.5 g, 0.726 mole)。将溶液于室温搅拌约 8 小时,以将查耳酮 8 异构化为苯并二氢吡喃-4-酮 9,然后将其加入到水和冰(8 L)和甲苯(4 L)的混合物中。分离各相,甲苯层用水(5 L)洗涤。合并的水性洗涤液用甲苯(3 × 4 L)萃取。合并的甲苯萃取液最后用盐水(3 × 4 L)洗涤,在大气压下浓缩至 5.5 L,然后冷却至-10℃。

10 继续外部冷却并在氮气下搅拌,加入 3 M 氯化甲基镁的 THF 溶液(2.5 L, 7.5 mole) (可得自 Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, Wis.),将温度维持低于 0℃。加入所有的格氏试剂后,除去外部冷却,让混合物温至室温。将混合物在该温度下搅拌约 24 小时。

15 将混合物再次冷却至约-20℃,继续外部冷却和搅拌,缓慢加入饱和氯化铵溶液(200 ml),将温度维持低于 20℃。将混合物搅拌 2 小时,然后加入饱和氯化铵溶液(2 L)和甲苯(4 L),搅拌 5 分钟。分离各相,水层用甲苯(2 × 4 L)萃取。合并的甲苯萃取液用稀盐酸洗涤,直至溶液变为均一,然后用盐水(3 × 4 L)洗涤。甲苯溶液最终于大气压下浓缩至 2 L。该溶液直接用于下一步骤。

20

(2R,S)-7-羟基-3-(4'-羟基苯基)-4-甲基-2-(4''-[2'''-哌啶子基]乙氧基)苯基)-2H-1-苯并吡喃(1S)-10-樟脑磺酸盐(±12)的合成.向 4-羟基-4-甲基-2-(4'-[2''-哌啶子基]乙氧基)苯基-3-(4'''-四氢吡喃氧基)苯基-7-四氢吡喃氧基苯并二氢吡喃(10)的甲苯溶液中加入丙酮(6 L)、水(0.3 L)和(S)-10-樟脑磺酸(561 g, 2.42 mole) (可得自 Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, Wis.)。在氮气下将混合物搅拌 48 小时,此后过滤出固体(2R,S)-7-羟基-3-(4'-羟基苯基)-4-甲基-2-(4''-[2'''-哌啶子基]乙氧基)苯基)-2H-1-苯并吡喃(1S)-10-樟脑磺酸盐(12),用丙酮洗涤并干燥(883

25

g)。该物质不用进一步纯化，用于下一(HH)步骤。

(2R)-7-羟基-3-(4'-羟基苯基)-4-甲基-2-(4''-[2'''-哌啶子基]乙氧基)苯基)-2H-1-苯并吡喃(1S)-10-樟脑磺酸盐(13, (+)-EM-652(1S)-CSA 盐)的合成。将(2R,S)-7-羟基-3-(4'-羟基苯基)-4-甲基-2-(4''-[2'''-哌啶子基]乙氧基)苯基)-2H-1-苯并吡喃(1S)-10-樟脑磺酸盐±12 (759 g)在 95%乙醇中的悬浮液在搅拌下加热至约 70℃，直至固体溶解。让溶液下搅拌下冷却至室温，然后用少量用(2R)-7-羟基-3-(4'-羟基苯基)-4-甲基-2-(4''-[2'''-哌啶子基]乙氧基)苯基)-2H-1-苯并吡喃(1S)-10-樟脑磺酸盐13的晶体接种。将该溶液于室温下搅拌总共约 3 天。过滤出晶体，用 95%乙醇洗涤并干燥(291 g, 76%)。该产物的 de 为 94.2%，纯度为 98.8%。

(S)-(+)-7-羟基-3-(4'-羟基苯基)-4-甲基-2-(4''-(2'''-哌啶子基乙氧基)苯基)-2H-1-苯并吡喃盐酸盐 EM-01538 (EM-652, HCl)的合成。

将化合物 13 (EM-652-(+)-CSA 盐, 500 mg, 0.726 mmol)在二甲基甲酰胺(11 µl, 0.15 mmol)中的悬浮液用 0.5 M 碳酸钠水溶液(7.0 ml, 3.6 mmol)处理，并搅拌 15 分钟。该悬浮液用乙酸乙酯(7.0 ml)处理并在 4 小时内搅拌。然后，有机相用饱和碳酸钠水溶液(2 × 5 ml)和盐水(1 × 5 ml)洗涤，经硫酸镁干燥并浓缩。所得的粉红色泡沫(EM-652)在乙醇(2 ml)中的溶液用 2 N 盐酸(400 µl, 0.80 mmol)处理，搅拌 1 小时，用蒸馏水(5 ml)处理，在 30 分钟内搅拌。将所得的悬浮液过滤，用蒸馏水(5 ml)洗涤，风干并在高度真空(65℃)下干燥，得到奶油状粉末(276 mg, 77%)：细灰白色粉末；扫描量热法：熔点开始于 219℃， $\Delta H = 83 \text{ J/g}$ ； $[\alpha]^{24}_{\text{D}} = 154^\circ$ ，在 10 mg/ml 甲醇中； $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD)

δ (ppm) 1.6 (broad, 2H, H-4'''), 1.85 (broad, 4H, H-3'''' and 5''''), 2.03 (s, 3H, CH₃), 3.0 and 3.45 (broad, 4H, H-2'''' and 6'''), 3.47 (t, $J=4.9$ Hz, 2H, H-3'''), 4.26 (t, $J=4.9$ Hz, 2H, H-2'''), 5.82 (s, 1H, H-2), 6.10 (d, $J=2.3$ Hz, 1H, H-8), 6.35 (dd, $J=8.4$, 2.43 Hz, 1H, H-6), 6.70 (d, $J=8.6$ Hz, 2H, H-3' and H-5'), 6.83 (d, $J=8.7$ Hz, 2H, H-3'' and H-5''), 7.01 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, H-2' and H-6'), 7.12 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H-5), 7.24 (d, $J=8.6$ Hz, 2H, H-2'' and H-6''); ¹³C RMN (CD₃OD, 75 MHz) δ ppm 14.84, 22.50, 23.99, 54.78, 57.03, 62.97, 81.22, 104.38, 109.11, 115.35, 116.01, 118.68, 125.78, 126.33, 130.26, 130.72, 131.29, 131.59, 134.26, 154.42, 157.56, 158.96, 159.33. 元素组成: C, H, N, Cl: 理论值: 70.51, 6.53, 2.84, 7.18%; 实测值: 70.31, 6.75, 2.65, 6.89%。

实施例 4

5 材料和方法

动物

重 18-20 g 的雌性 BALB/c 小鼠(BLAB/cAnNCrIBR)得自 Charles-River, Inc. (St-Constant, Quebec, Canada), 在温度($23 \pm 1^\circ\text{C}$)和光(12 h 光照/天, 于 7:15 开灯)受控的环境中, 每只笼子关养 5 只。饲喂小鼠啮齿动物饲料, 并让其自由获取自来水。在异氟烷麻醉下, 通过两侧肋腹切开, 对动物进行卵巢切除(OVX), 随机指定到各组, 每组 10 只动物。10 只小鼠保持无伤作为对照。

治疗

15 在第一个实验(图 12-15)中, 从卵巢切除后 2 天开始, 通过管饲法, 每日一次以 1、3 或 10 μg /只动物的剂量口服试验化合物即 EM-652.HCl、lasofoxifene (作为游离碱; 活性和无活性对映体)和雷洛昔芬 9 天。在第二个实验(表 3)中, 从卵巢切除后 2 天开始, 通过管饲法, 每日一次以 1、3、10 或 30 μg /只动物的剂量口服 TSE 424 达 9 天。在
20 两个实验中, 为了评估抗雌激素活性, 在卵巢切除后 5 天开始用雌酮治疗(E₁, 0.06 μg , s.c.注射, 每日两次), 并给予 6 天。将化合物溶于乙

醇(4%终浓度),并在0.4%甲基纤维素中给予。无伤对照组和OVX对照组的小鼠在所述9天期间仅接受溶媒(4% ETOH-0.4%甲基纤维素)。在卵巢切除后第11天早晨,通过在腹主动脉进行驱血法杀死动物。快速解剖出子宫和阴道,称重,并将其保持在10%缓冲的福尔马林中,以供进一步的组织学检查。

结果

实验 1:

如图12所示,以1 μ g、3 μ g和10 μ g的口服日剂量给予的EM-652.HCl分别引起对雌酮刺激的子宫重量的24%、48%和72%的抑制(对于所有剂量而言,相对于对照, $p < 0.01$),而以相同剂量给予的雷洛昔芬分别引起该参数的6% (NS)、14% ($p < 0.01$)和43% ($p < 0.01$)的抑制。另一方面, lasofoxifene (作为游离碱)在所用的最低剂量下没有抑制效应,而它在3 μ g和10 μ g的日剂量下分别引起对雌酮刺激的子宫重量的25% ($p < 0.01$)和44% ($p < 0.01$)的抑制。lasofoxifene的无活性对映体在所用的任何剂量下都对该参数没有抑制效应。

上述化合物对阴道重量有相似的效应。每日口服EM-652.HCl在1 μ g、3 μ g和10 μ g剂量下分别引起对阴道重量的10% (NS)、25%和53%的抑制(对于两个最高剂量而言, $p < 0.01$) (图13),而雷洛昔芬仅在最高剂量(10 μ g)下对该参数有显著24% ($p < 0.01$)的抑制效应。与雷洛昔芬类似, lasofoxifene (作为游离碱)仅在所用的最高剂量下引起显著的37% ($p < 0.01$)的抑制效应,而无活性对映体在所用的任何剂量下对阴道重量都无抑制效应。当将化合物以1 μ g和10 μ g的口服日剂量单独给予卵巢切除小鼠时(在无雌酮的情况下),EM-652.HCl在所用的两种剂量下对子宫重量都无显著刺激效应,而用10 μ g lasofoxifene和雷洛昔芬治疗,分别引起对子宫重量的93% ($p < 0.01$)和85% ($p < 0.01$)的刺激(图14),因此表明后两种化合物对该参数有雌激素效应。同样,EM-652.HCl对阴道重量无显著的刺激效应(图15),而给予10 μ g

lasofoxifene 和雷洛昔芬, 分别引起对阴道重量的 73% ($p<0.01$)和 56% ($p<0.01$)的刺激。另一方面, lasofoxifene 的无活性对映体对子宫重量和阴道重量均无刺激效应。

5 实验 2:

如表 3 所示, 以 1 μg 、3 μg 、10 μg 或 30 μg 的口服日剂量给予的 TSE 424 分别引起对雌酮刺激的子宫重量的 12% (NS)、47%、74%和 94%的抑制(对于三种最高剂量而言, 相对于 E_1 对照, $p<0.01$)。另一方面, 以 3 μg 、10 μg 和 30 μg 的剂量每日口服 TSE 424, 分别引起对阴道重量的 16% (NS)、56% ($p<0.01$)和 93% ($p<0.01$)的抑制。

当以 3 μg 和 30 μg 的口服日剂量将所述化合物单独给予(在无雌酮的情况下)卵巢切除小鼠时, TSE 424 在所用的两种剂量下对子宫重量和阴道重量均无显著的刺激效应(表 3)。

表 3: 将增加浓度的 TSE 424 口服 9 天给予同时用或不用雌酮治疗的卵巢切除小鼠对子宫重量和阴道重量的影响。 ** $p<0.01$, 相对于 E_1 治疗的对照。

治疗	子宫重量 (mg)	阴道重量 (mg)
无伤的	$54.6 \pm 12.5^{**}$	$37.9 \pm 3.9^{**}$
OVX	$15.6 \pm 1.3^{**}$	$13.9 \pm 1.5^{**}$
OVX + E_1	118.3 ± 6.0	53.4 ± 2.8
OVX + E_1 + TSE 424 1 μg	105.5 ± 6.1	54.2 ± 3.0
OVX + E_1 + TSE 424 3 μg	$69.7 \pm 4.4^{**}$	47.2 ± 1.6
OVX + E_1 + TSE 424 10 μg	$42.1 \pm 2.7^{**}$	$31.1 \pm 2.3^{**}$
OVX + E_1 + TSE 424 30 μg	$21.7 \pm 1.7^{**}$	$16.7 \pm 1.8^{**}$
OVX + TSE 424 3 μg	18.3 ± 1.2	14.1 ± 1.2
OVX + TSE 424 30 μg	17.7 ± 1.6	15.3 ± 2.0

实施例 5

5A: 对骨丢失、血清脂质和总体脂肪的预防效应。

动物和治疗

使用在治疗开始时重约 220-270g 的 10-12 周龄雌性 Sprague-Dawley 大鼠(Crl:CD(SD)Br) (Charles River Laboratory, St-Constant, Canada)。在实验开始之前, 让动物适应环境条件(温度: $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$; 湿度: $50 \pm 20\%$; 12 h 光照-12 h 黑暗周期, 于 07:15 开灯)至少 1 周。将动物单独关养, 并让其自由获取自来水和粒状合格的啮齿动物饲料 (Lab Diet 5002, Ralston Purina, St-Louis, MO)。在 Canadian Council on Animal Care (CCAC)和 the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC)批准的动物设备中, 按照实验动物护理和使用的 CCAC 指南, 进行实验。

在第一个实验中, 将 154 只大鼠随机分配在每组 14 只动物的如下 11 个组中: 1)无伤对照; 2) OVX 对照; 3) OVX + E_2 (1 mg/kg); 4) OVX + EM-652.HCl (2.5 mg/kg); 5) OVX + E_2 + EM-652.HCl; 6) OVX + 脱氢表雄酮(DHEA; 80 mg/kg); 7) OVX + DHEA + EM-652.HCl; 8) OVX + DHEA + E_2 ; 9) OVX + DHEA + E_2 + EM-652.HCl; 10) OVX + GW 5638; 11) OVX + E_2 + GW 5638。该研究的第 1 天, 在异氟烷麻醉下, 将合适组别的动物的两侧卵巢切除(OVX)。将 DHEA 作为在 50%乙醇-50%丙二醇中的溶液, 局部应用于背侧皮肤, 而另一种试验化合物作为在 0.4%甲基纤维素中的悬浮液经管饲法口服。治疗始于该研究的第 2 天, 在 3 个月期间每日进行一次。

在第二个实验中, 将 132 只大鼠随机分配在每组 14 或 15 只动物的如下 9 个组中: 1)无伤对照; 2) OVX 对照; 3) OVX + Premarin (0.25 mg/kg); 4) OVX + EM-652.HCl (2.5 mg/kg); 5) OVX + Premarin + EM-652.HCl; 6) OVX + TSE 424 (2.5 mg/kg); 7) OVX + Premarin + TSE 424; 8) OVX + lasofoxifene (酒石酸盐; 外消旋物; 2.5 mg/kg); 9) OVX + Premarin + lasofoxifene。该研究的第 1 天, 在异氟烷麻醉下, 将合适

组别的动物的两侧卵巢切除(OVX)。试验化合物作为在 0.4%甲基纤维素中的悬浮液经管饲法口服。治疗始于该研究的第 2 天,在 26 周内每日进行一次。在两个实验中,在同一时期内,不接受试验物质的动物仅用合适的溶媒治疗。

5

骨盐密度的测量

治疗 3 个月(实验 1)或 26 周(实验 2)之后,用双能 x 射线吸收测量法(DEXA; QDR 4500A, Hologic, Waltham, MA)和区域高分辨率扫描软件,在异氟烷麻醉下对各只大鼠进行全身骨骼和腰椎扫描。测定腰椎(脊椎 L2 至 L4)的骨盐密度(BMD)和总机体组成(脂肪百分率)。

10

血清分析

治疗 3 个月(实验 1)或 26 周(实验 2)之后,从禁食过夜的动物在颈静脉收集血样(在异氟烷麻醉下)。加工样品以进行血清制备,将其于-80℃冷冻直至分析。用 Boehringer Mannheim Diagnostic Hitachi 911 分析仪(Boehringer Mannheim Diagnostic Laboratory Systems),测定血清胆固醇水平和碱性磷酸酶活性(ALP)。

15

统计学分析

数据以均数± SEM 表示。按照 Duncan-Kramer 的多重极差检验(multiple-range test) (Kramer CY; Biometrics 1956; 12: 307-310),测定统计学显著性。

20

结果

如表 4 所示,在卵巢切除 3 个月之后,腰椎 BMD 在 OVX 对照动物中比在无伤动物中低 10% ($p<0.01$)。在所用的剂量下,单独给予雌二醇和 EM-652.HCl,分别以 98% ($p<0.01$)和 65% ($p<0.05$)预防腰椎 BMD 损失,而用 E_2 与 EM-652.HCl 联合治疗,61%预防 OVX 诱发的

25

腰椎 BMD 降低($p<0.05$)。另一方面, 虽然单独给予 DHEA 43%预防腰椎 BMD 降低($p<0.05$), 用 DHEA + E_2 + EM-652.HCl 联合治疗, 91%预防 OVX 诱发的腰椎 BMD 降低, 并导致 BMD 数值与无伤对照没有差异。

5 在表 5 中, 卵巢切除后 26 周时, 与无伤对照相比, 腰椎 BMD 降低 18% ($p<0.01$)。单独给予的 Premarin、EM-652.HCl、TSE 424 和 lasofoxifene, 分别以 54%、62%、49%和 61%预防腰椎 BMD 的降低(相对于 OVX 对照, 所有化合物, $p<0.01$)。将 Premarin 加入 EM-652.HCl、TSE 424 或 lasofoxifene, 导致腰椎 BMD 的数值与通过给予每种单独的
10 SERM 获得的数值无显著性差异(表 5)。同样, 将 DHEA 加入 E_2 或 EM-652.HCl, 完全预防 OVX 诱发的腰椎 BMD 的降低(表 4)。DHEA 对 BMD 的正效应也得到其对骨生成和更新标记的血清碱性磷酸酶活性(ALP)的效应的支持。ALP 活性从 OVX 对照动物中的 73 ± 6 IU/L 分别增加至 DHEA、DHEA + EM-652.HCl、DHEA + E_2 以及 DHEA + E_2
15 + EM-652.HCl 治疗的动物中的 224 ± 18 IU/L、 290 ± 27 IU/L、 123 ± 8 IU/L 和 261 ± 20 IU/L (所有的, $p<0.01$), 因此, 表明 DHEA 对骨生成有刺激效应(表 6)。

除对骨丢失的预防效应外, 给予 EM-652.HCl、TSE 424、lasofoxifene、GW 5638、DHEA 和 E_2 , 对总体脂肪百分率和血清脂质
20 有某些有益效应。卵巢切除 3 个月后, 总体脂肪增加 22% ($p<0.05$; 表 6)。给予 EM-652.HCl 完全预防 OVX 诱发的脂肪百分率的增加, 而将 DHEA 和/或 E_2 加入所述 SERM 中, 导致脂肪百分率的数值低于在无伤对照动物中观察到的数值。卵巢切除 26 周后, 在给予 Premarin、EM-652.HCl、TSE 424 或 lasofoxifene 后, 雌激素缺乏诱发的 40%的脂肪增加分别被 74%、78%、75%和 114%逆转, 而将 Premarin 加入每种
25 SERM 中, 完全预防 OVX 诱发的脂肪百分率的增加(表 7)。

如表 6 所示, 在卵巢切除后 3 个月, 与无伤对照相比, 在 OVX 对照大鼠中观察到血清胆固醇水平增加 22% ($p<0.01$)。事实上, 血清

表 5. 在用单独给予或联合 Premarin 给予的 Premarin、EM-652.HCl、TSE 424 或 lasofoxifene 治疗卵巢切除雌性大鼠 26 周后对预防骨丢失的影响

治疗	腰椎	
	BMD (g/cm ²)	骨丢失的预防 (%)
无伤的	0.2482 ± 0.0067**	100
OVX	0.2035 ± 0.0035	-
OVX + Premarin	0.2277 ± 0.0028**	54
OVX + EM-652.HCl	0.2311 ± 0.0040**	62
OVX + Premarin + EM-652.HCl	0.2319 ± 0.0057**	64
OVX + TSE 424	0.2252 ± 0.0058**	49
OVX + Premarin + TSE 424	0.2223 ± 0.0046**	42
OVX + lasofoxifene	0.2307 ± 0.0040**	61
OVX + Premarin + lasofoxifene	0.2357 ± 0.0035**	72

*, p<0.01, 实验大鼠相对于 OVX 对照大鼠。

胆固醇从无伤动物的 2.01 ± 0.11 mmol/L 增加至 OVX 对照中的 2.46 ± 0.08 mmol/L。仅给予 E₂ 或 DHEA，将血清胆固醇水平分别降至 1.37 ± 0.18 mmol/L 和 1.59 ± 0.10 mmol/L，而仅给予 EM-652.HCl 或联合 E₂ 和/或 DHEA 给予 EM-652.HCl，导致胆固醇水平显著低于(在 0.65 mmol/L 和 0.96 mmol/L 之间)无伤动物中发现的水平(2.01 ± 0.11 mmol/L)。同样，单独或联合 E₂ 或 Premarin 给予 GW 5638、TSE 424 和 lasofoxifene，完全预防 OVX 诱发的血清胆固醇水平增加，并导致数值低于在无伤动物中发现的数值(表 6 和表 7)。

表 4. 在用单独给予或联合给予的雌二醇、EM-652.HCl、GW 5638 或 DHEA 治疗卵巢切除雌性大鼠 3 个月 after 对预防骨丢失的影响

治疗	腰椎	
	BMD (g/cm ²)	骨丢失的预防 (%)
无伤的	$0.2461 \pm 0.0049^{**}$	100
OVX	0.2214 ± 0.0044	-
OVX + E ₂	$0.2457 \pm 0.0049^{**}$	98
OVX + EM-652.HCl	$0.2374 \pm 0.0027^{*}$	65
OVX + EM-652.HCl + E ₂	$0.2364 \pm 0.0037^{*}$	61
OVX + DHEA	0.2321 ± 0.0034	43
OVX + DHEA + EM-652.HCl	$0.2458 \pm 0.0037^{**}$	99
OVX + DHEA + E ₂	$0.2496 \pm 0.0029^{**}$	114
OVX + DHEA + E ₂ + EM-652.HCl	$0.2439 \pm 0.0043^{**}$	91
OVX + GW 5638	0.2299 ± 0.0060	34
OVX + GW 5638 + E ₂	0.2344 ± 0.0054	53

*, p<0.05; **, p<0.01, 实验大鼠相对于 OVX 对照大鼠。

表 6. 在用单独给予或联合给予的雌二醇、EM-652.HCl、GW 5638 或 DHEA 治疗卵巢切除雌性大鼠 3 个月后对总体脂肪百分率、血清胆固醇水平和碱性磷酸酶活性的影响

治疗	总脂肪 (%)	胆固醇 (mmol/L)	ALP (IU/L)
无伤的	24.0 ± 1.5*	2.01 ± 0.11**	39 ± 2**
OVX	29.2 ± 1.5	2.46 ± 0.08	73 ± 6
OVX + E ₂	19.5 ± 2.5**	1.37 ± 0.18**	59 ± 4
OVX + EM-652.HCl	23.2 ± 1.4**	0.87 ± 0.04**	91 ± 6*
OVX + EM-652.HCl + E ₂	20.4 ± 1.4**	0.96 ± 0.07**	92 ± 5*
OVX + DHEA	17.3 ± 1.5**	1.59 ± 0.10**	224 ± 18**
OVX + DHEA + EM-652.HCl	18.0 ± 1.1**	0.65 ± 0.06**	290 ± 27**
OVX + DHEA + E ₂	15.8 ± 1.3**	1.08 ± 0.08**	123 ± 8**
OVX + DHEA + E ₂ + EM-652.HCl	19.2 ± 1.6**	0.71 ± 0.08**	261 ± 20**
OVX + GW 5638	21.9 ± 1.4**	1.14 ± 0.08**	72 ± 6
OVX + GW 5638 + E ₂	23.2 ± 1.2**	0.91 ± 0.07**	80 ± 6

*, p<0.05; **, p<0.01, 实验大鼠相对于 OVX 对照大鼠。

表 7. 在用单独给予或联合 Premarin 给予的 Premarin、EM-652.HCl、TSE 424 或 lasofoxifene 治疗卵巢切除雌性大鼠 26 周后对总体脂肪百分率、血清胆固醇水平和碱性磷酸酶活性的影响

治疗	总脂肪 (%)	胆固醇 (mmol/L)	ALP (IU/L)
无伤的	25.5 ± 1.8**	2.11 ± 0.11**	33 ± 2*
OVX	35.7 ± 1.6	2.51 ± 0.09	60 ± 6
OVX + Premarin	28.2 ± 1.8**	1.22 ± 0.07**	49 ± 3
OVX + EM-652.HCl	27.7 ± 1.4**	0.98 ± 0.06**	78 ± 4
OVX + EM-652.HCl + Premarin	25.7 ± 2.2**	1.10 ± 0.07**	81 ± 6
OVX + TSE 424	28.0 ± 1.8**	1.15 ± 0.05**	85 ± 6
OVX + TSE 424 + Premarin	25.7 ± 1.7**	1.26 ± 0.14**	98 ± 22**
OVX + lasofoxifene	24.1 ± 1.3**	0.60 ± 0.02**	116 ± 9**
OVX + lasofoxifene + Premarin	23.8 ± 1.9**	0.81 ± 0.12**	107 ± 6**

*, p<0.05; **, p<0.01, 实验大鼠相对于 OVX 对照大鼠。

5

5B: 对骨丢失和总体脂肪的治疗效应

动物和治疗

在该实验中使用至多 9 月龄的雌性 Sprague-Dawley 大鼠 (CrI:CD(SD)Br) (Charles River Laboratory, St-Constant, Canada)。在卵巢切除之前, 让动物适应环境条件(温度: 22 ± 3℃; 湿度: 50 ± 20%; 12 h 光照-12 h 黑暗周期, 于 07:15 开灯)至少 1 周。在异氟烷麻醉下, 将动物两侧卵巢切除(OVX)。将 20 只动物保持无伤作为对照。将动物单独关养, 并让其自由获取自来水和粒状合格的啮齿动物饲料(Lab Diet 5002, Ralston Purina, St-Louis, MO)。在 Canadian Council on Animal Care (CCAC)和 the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC)批准的动物设备中, 按照实验动物护理和使用的 CCAC 指南, 进行实验。

10

15

在 OVX 后 10 周, 将 139 只大鼠随机分配在每组 17-20 只动物的

如下 8 个组中：1) 无伤对照；2) OVX 对照；3) OVX + E₂ (1 mg/kg)；4) OVX + EM-652.HCl (2.5 mg/kg)；5) OVX + E₂ + EM-652.HCl；6) OVX + 脱氢表雄酮(DHEA; 80 mg/kg)；7) OVX + DHEA + EM-652.HCl；8) OVX + DHEA + EM-652.HCl + E₂。将 DHEA 作为在 50%乙醇-50%丙二
5 醇中的溶液，局部应用于背侧皮肤，而 E₂ 和 EM-652.HCl 作为在 0.4% 甲基纤维素中的悬浮液经管饲法口服。在卵巢切除后 10 周开始治疗，并且在 26 周内每日进行一次治疗。在同一时期内，不接受试验物质的动物仅用合适的溶媒治疗。

10 骨盐密度的测量

在 OVX 之前、治疗第一天(OVX 后 10 周)之前以及在治疗 26 周之后,用双能 x 射线吸收测量法(DEXA; QDR 4500A, Hologic, Waltham, MA)和区域高分辨率扫描软件，在异氟烷麻醉下对各只大鼠进行全身骨骼、腰椎和右侧股骨扫描。测定腰椎(脊椎 L2 至 L4)、股骨的骨盐密
15 度(BMD)和总机体组成(脂肪百分率)。

统计学分析

数据以均数± SEM 表示。按照 Duncan-Kramer 的多重极差检验 (Kramer CY; Biometrics 1956; 12: 307-310)，测定统计学显著性。

20

结果

在以上描述的前项研究(实施例 5A)中，在 OVX 时开始给予试验化合物，以便研究对骨丢失的预防效应。在本项研究中，在 OVX 后 10 周开始给予试验化合物，以便研究所给予的治疗的可能的治疗效
25 应。在 OVX 之前(基线值)以及在开始治疗之前测量 BMD，以便确立在开始治疗之前存在骨质减少。如图 16 所示，卵巢切除 10 周后，腰椎 BMD 降低 8%，在 OVX 后动物仅接受溶媒的的另外 26 周之后，进一步降低 12% (对照组)。每日给予确立骨质减少的动物 E₂、EM-

652.HCl、E₂ + EM-652.HCl、DHEA 或 DHEA + EM-652.HCl 达 26 周，完全预防在 OVX 对照动物中观察到的腰椎 BMD 的进一步降低，而给予 E₂ + EM-652.HCl + DHEA，导致 BMD 值略高于在治疗开始之前观察到的 BMD 值。另一方面，如图 17 中所示，股骨 BMD 在卵巢切除后 10 周降低 4%，在仅用溶媒治疗的另外 26 周之后进一步降低 6%。与腰椎 BMD 相似，每日给予 E₂、EM-652.HCl、E₂ + EM-652.HCl、DHEA 或 DHEA + EM-652.HCl 达 26 周，完全预防在 OVX 对照动物中观察到的股骨 BMD 的进一步降低。另一方面，给予 E₂ + EM-652.HCl + DHEA，导致股骨 BMD 值甚至略高于在 OVX 之前观察到的 BMD 值，因此表明这种联合治疗对骨生成的有益效应。用 EM-652.HCl + E₂ + DHEA 联合治疗，不仅在骨质减少的动物完全预防进一步的 OVX 诱发的骨丢失，而且也有某些治疗效应。

除对骨的效应外，如图 18 中所示，给予 DHEA、E₂ 和/或 EM-652.HCl 预防 OVX 诱发的总体脂肪的增加。事实上，在 OVX 对照动物中，脂肪百分率在卵巢切除 10 周后增加 47%，在仅用溶媒治疗的 26 周内进一步增加 17% (对照组)。每日给予 E₂、DHEA、EM-652.HCl、E₂ + EM-652.HCl 或 DHEA + EM-652.HCl 达 26 周，预防在 OVX 对照组中观察到的 17% 的增加。另一方面，用 EM-652.HCl + E₂ + DHEA 联合治疗，完全逆转了 OVX 的效应，并且导致脂肪百分率数值与动物卵巢切除之前观测的数值相似，因而表明该疗法有治疗效应。

实施例 6

本发明化合物对人子宫内膜腺癌 Ishikawa 细胞中碱性磷酸酶活性的影响

25

材料

细胞储备培养物的保持

来源于很好分化的子宫内膜腺癌的人 Ishikawa 细胞系由 Erlio

Gurpide 博士(The Mount Sinai Medical Center, New York, NY)好意提供。Ishikawa 细胞常规在含有 5% (v/v) FBS (胎牛血清)并补充 100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、0.1 mM 非必需氨基酸溶液的 Eagle 极限必需培养基(MEM)中保持。将细胞以 1.5×10^6 细胞的密度, 于 37℃ 接种到 Falcon T75 摇瓶中。

细胞培养实验

在实验开始之前 24 小时, 将接近铺满的 Ishikawa 细胞的培养基更换为新鲜的无雌激素的基本培养基(EFBM), 该培养基由无酚红 Ham's F-12 和 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基(DMEM)的 1:1 (v:v)混合物组成, 并补充 100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、2 mM 谷氨酰胺和 5% FBS, 所述 FBS 用包有葡聚糖的活性炭处理两次, 以除去内源类固醇。然后, 用 0.1%胰酶制剂(Sigma)和 0.25 mM HEPES 收获细胞, 将其重悬于 EFBM 中, 并在 100 μ l 体积中以 2.2×10^4 细胞/孔的密度, 接种到 Falcon 96 孔平底微量滴定板中, 让其附着于平板表面达 24 小时。此后, 将培养基更换为含有指定浓度化合物的新鲜 EFBM, 终体积为 200 μ l。将细胞孵育 5 天, 48 小时后更换培养基。

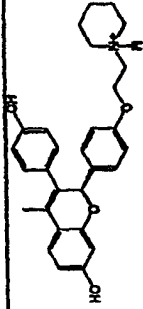
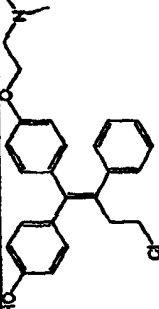
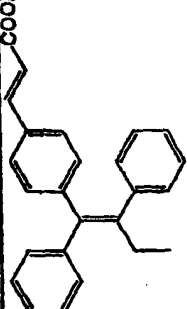
碱性磷酸酶测定

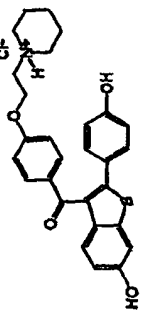
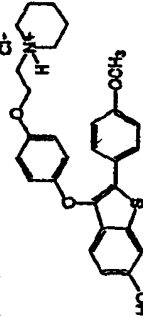
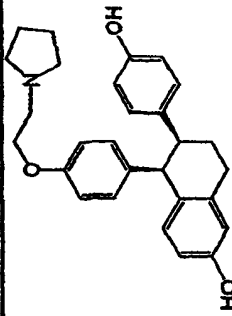
在孵育期结束时, 将微量滴定板倒置, 倾出生长培养基。用 200 μ l/孔 PBS (0.15M NaCl、10 mM 磷酸钠, pH 7.4)冲洗平板。然后从平板除去 PBS, 同时小心地留下一些残留的 PBS, 将洗涤步骤重复一次。然后倾出缓冲盐水, 将倒置的平板在纸巾上逐渐吸干。在将盖子复原后, 将板置于 -80℃ 达 15 分钟, 然后于室温解冻 10 分钟。然后将板置于冰上, 加入 50 μ l 含有 5 mM 磷酸对硝基苯酯、0.24 mM $MgCl_2$ 和 1 M 二乙醇胺的冰冷溶液(pH 9.8)。然后将板温至室温, 让由于产生对硝基苯酯而产生的黄色显色(8 分钟)。在酶联免疫吸附测定平板读出仪(BIO-RAD, 2550 型 EIA 读出仪)中, 于 405 nm 监测平板。

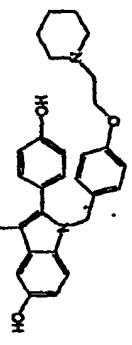
计算

运用加权迭代非线性平方回归，计算剂量反应曲线以及 IC_{50} 值。

表 8

名称	代号	结构	对碱性磷酸酶 的最大刺激	对 1nM E ₂ 诱发的 碱性磷酸酶刺激 的抑制	对 1nM E ₂ 诱发的 碱性磷酸酶刺激 的最大抑制
EM-652.HCl	EM-652.HCl; (EM-1538)		1.88±0.26 (22)	1.52±0.22 (18)	98.97±0.174 (18)
OH- 托瑞米芬	EM-880		29.6±2.1 (6)	72.1±7.6 (3)	75.73±3.52 (3)
GW-5638	EM-1796		7.75±5.5 (2)	无抑制	

名称	代号	结构	对碱性磷酸酶 的最大刺激 1nM E ₂ 刺激 的百分率* (实验编号)	对 1nM E ₂ 诱发 的碱性磷酸酶 刺激的抑制 IC ₅₀ (nM) (实验编号)	对 1nM E ₂ 诱发 的碱性磷酸酶 刺激的最大抑制 (实验编号)
雷洛昔芬 LY 156758	EM-1105		12.8±1.7 (8)	3.39±0.9 (6)	94.31±1.74 (5)
LY 353981	EM-1665		15.5±0.25 (5)	1.87±0.07 (2)	90.25±0.127 (2)
Lasofloxene (游离碱)	EM-3114		17.9 (1)	4.24 (1)	85.14 (1)

名称	代号	结构	对碱性磷酸酶 的最大刺激	对1nM E ₂ 诱发 的碱性磷酸酶 刺激的抑制	对1nM E ₂ 诱发 的碱性磷酸酶刺 激的最大抑制
TSE 424	EM-3527		1nM E ₂ 刺激 的百分率* (实验编号)	IC ₅₀ (nM) (实验编号)	(实验编号)
			0.6 (1)	5.84 (1)	100.16 (1)

* 1nM E₂ 刺激的百分率 = OD 405 nm 化合物 - OD 405 nm 基线 / OD 405 nm 1 nM E₂ - OD 405 nm 基线
请也参见 Labrie 等, EM-652 (SCH 57068), 在乳腺和子宫内膜中作为纯抗雌激素起作用的第三代 SERM, J. Steroid Biochem. and Mol.
Bio. 69, 51-84, 1999。

实施例 7

EM-652.HCl、TSE 424 和 lasofoxifene 对人乳癌 MCF-7 细胞增殖的影响

方法:

5 细胞储备培养物的保持

MCF-7 人乳癌细胞得自美国典型培养物保藏中心第 147 代 #HTB, 常规在无酚红 Dulbecco 改进的 Eagle's-Ham's F12 培养基、上述补充物和 5% FBS 中生长。MCF-7 人乳腺癌细胞系来源于一位 69 岁白种女患者的胸膜积液。使用第 148 代和 165 代之间的 MCF-7 细胞, 10 并且每周传代。

细胞增殖研究

用 0.1%胰酶制剂(Sigma)收获晚期对数生长期的细胞, 将其重悬于合适的培养基中, 所述培养基含有 50 ng 牛胰岛素/ml 和 5% (v/v) FBS, 15 所述 FBS 用包有葡聚糖的活性炭处理两次, 以除去内源类固醇。将细胞以指定的密度接种到 24 孔 Falcon 塑料培养板(2 cm²/孔)中, 让其附着于平板表面达 72 小时。此后, 将培养基更换为含有指定浓度化合物的新鲜培养基, 所述化合物是由在 99%重蒸乙醇中在存在或不存在 E₂ 的情况下的 1000 × 储备液稀释的。对照细胞仅接受所述乙醇溶媒(0.1% EtOH, v/v)。将细胞孵育指定的时间间隔, 以 2 天或 3 天的间隔更换培 20 养基。通过测量 DNA 含量, 测定细胞数目。

计算和统计学分析

运用加权迭代非线性最小平方回归, 计算剂量反应曲线以及 IC₅₀ 25 数值。所有结果均以均数±SEM 表示。

表 9

实验 1

名称	代号	试验化合物对 DNA 的最大刺激	试验化合物对 1nM E ₂ 刺激 DNA 的抑制
		1nM E ₂ 刺激的%*	IC ₅₀ (nM)
EM-652.HCl	EM-652.HCl (EM-1538)	N.S.	0.796
TSE 424	EM-3527	N.S.	3.68

实验 2

名称	代号	试验化合物对 DNA 的刺激	试验化合物对 1nM E ₂ 刺激 DNA 的抑制
		1nM E ₂ 刺激的%*	IC ₅₀ (nM)
EM-652.HCl	EM-652.HCl (EM-1538)	N.S.	0.205
Lasofloxifene (游离 碱)	EM-3114	N.S.	0.379

5

实施例 8

EM-652.HCl、他莫昔芬、托瑞米芬、屈洛昔芬、艾多昔芬、GW-5638 和雷洛昔芬对裸鼠体内人 ZR-75-1 乳房肿瘤生长影响的比较

该实施例的目的是比较 EM-652.HCl 和 6 种其它口服抗雌激素 (SERM)对很好表征的雌激素敏感性 ZR-75-1 乳癌异种移植瘤在卵巢切除裸鼠体内生长的激动剂效应和拮抗剂效应。

10

材料和方法

人 ZR-75-1 乳癌细胞

ZR-75-1 人乳癌细胞得自美国典型培养物保藏中心(Rockville, MD)，在无酚红 RPMI-1640 培养基中培养。为细胞补充 2 mM L-谷氨

15

酰胺、1 mM 丙酮酸钠、100 IU 青霉素/ml、100 µg 链霉素/ml 和 10% (v/v) 胎牛血清，在 95%空气/5% CO₂ 的潮湿环境中、于 37℃ 孵育。将细胞每周传代，并用 0.083%胰酶制剂/0.3mM EDTA 于 85-90%铺满时收获细胞。

5

动物和肿瘤接种

雌性纯合 nu/nu Br 无胸腺小鼠(28-42 日龄)得自 Charles River, Inc. (Saint-Constant, Québec, Canada)。小鼠(每个笼子 5 只)关养在保持在空气层流罩超净台中的具有空气过滤罩的乙烯笼子中，并且在限制病原体的条件下维持。光周期为 12 小时光照和 12 小时黑暗(于 07:15 开灯)。笼子、褥草和食物(Agway Pro-Lab R-M-H Diet #4018)在使用之前进行高压灭菌。将水高压灭菌，并且任意供应。在异氟烷诱导的麻醉下切除两侧卵巢。在卵巢切除时，皮下插入雌二醇(E₂)植入物，以刺激原始肿瘤生长。在 1 cm 长的硅橡胶管(内径: 0.062 英寸; 外径: 0.095 英寸)中制备 E₂ 植入物，该植入物含有 0.5 cm 的 1:10 (w/w)的雌二醇和胆固醇的混合物。卵巢切除后一周，将 0.1 ml RPMI-1640 培养基 + 30% Matrigel 中的 2×10^6 ZR-75-1 (第 93 代)细胞通过 2.5cm 长的 22 号针头皮下接种到每只卵巢切除(OVX)小鼠的两侧胁腹。4 周后，所有动物体内的 E₂ 植入物用相同大小的含雌酮植入物(E1:胆固醇, 1:25, w:w)取代。1 周后开始随机化和治疗。

15

治疗

在治疗开始前一天，将带有平均面积为 $24.4 \pm 0.4 \text{ mm}^2$ (范围为 $5.7\text{-}50.7 \text{ mm}^2$)的 ZR-75-1 肿瘤的 255 只小鼠随机指定到 17 个组(根据肿瘤大小)中，每组有 15 只小鼠(总共 29 或 30 个肿瘤)。这 17 个组包括 2 个对照组(OVX 和 OVX + 雌酮)、7 个补充雌酮植入物并用抗雌激素治疗的组、以及 8 个仅接受一种抗雌激素的其它组。然后从卵巢切除的对照组(OVX)和将仅接受所述抗雌激素的组的动物体内取出雌酮植入

25

物。此后,在9个其它组中的含雌酮植入物每6周进行更换。在Oncology and Molecular Endocrinology Research Center 的医药化学部,合成 EM-652.HCl、雷洛昔芬、屈洛昔芬、艾多昔芬和 GW 5638。他莫昔芬购自 Plantex (Netanya, Israël), 而柠檬酸托瑞米芬购自 Orion (Espoo, Finland)。在雌酮刺激下,以悬浮于 0.2 ml 0.4% (w/v) 甲基纤维素中的 50 µg (平均 2 mg/kg) 的口服日剂量给予所述抗雌激素。在无雌酮刺激的情况下,动物通过口服途径,每日一次用 200 µg (平均 8 mg/kg) 每种抗雌激素治疗。两个对照组中的动物仅接受 0.2 ml 的所述溶媒。每个月制备合适浓度的所述抗雌激素悬浮液,于 4℃ 贮存,并在恒定搅拌下使用。粉剂储备物密封贮存于 4℃ (艾多昔芬、雷洛昔芬、托瑞米芬、GW 5638、屈洛昔芬) 或室温 (他莫昔芬、EM-652.HCl)。

肿瘤测量和尸体剖检

记录两个垂直的直径,用以下公式计算肿瘤面积(mm²): $L/2 \times W/2 \times \pi$ 。将治疗的第一天测量的面积作为 100%。

治疗 161 天后,用异氟烷麻醉留下的动物,并通过断头术将其杀死。为了进一步鉴定所述雌激素和抗雌激素的效应,立即取出雌激素效应组织,例如子宫和阴道,去除结缔组织和脂肪组织,并称重。准备子宫,以通过用 Image Pro-Plus (Media Cybernetics, Maryland, USA) 进行的图象分析来评价子宫内膜厚度。简而言之,将子宫在 10% 福尔马林中固定,并包埋在石蜡中。分析小鼠子宫的苏木精染色和曙红染色的切片。每个子宫分析 4 个图象(每个子宫角 2 个图象)。在每组所有动物中测量平均上皮细胞高度。

反应标准

在研究结束时或在每只动物死亡时(如果这在实验过程中发生)评价肿瘤反应。在这种情况下,在所述肿瘤反应分析中,仅使用存活时间达该项研究的至少一半时间(84 天)的小鼠的数据。简而言之,完全

消退鉴别在实验结束时检测不到的肿瘤；部分消退对应于消退 $\geq$ 其原始大小的 50%的肿瘤；稳定反应是指消退 $<50\%$ 或发展 $\leq 50\%$ 的肿瘤；而发展是指与其原始大小相比发展 $\geq 50\%$ 的肿瘤。

5 统计学分析

按照用于重复度量的 ANOVA，分析第 1 天和第 161 天之间总肿瘤表面积的变化。该模型包括治疗、时间、和时间-治疗相互作用效应加上用于说明随机化所述层的项。因而，根据时间-治疗相互作用，检验 161 天时不同治疗效应的显著性。残差分析指出，对原始尺度的度量不适合于用 ANOVA 分析，也不适合于尝试的任何变换。因此根据所述分析，选择所述秩。治疗对上皮厚度的影响通过也包括随机化时的层的单因素 ANOVA 来评价。用最小平方均数统计，进行后验配对比较(*posteriori pairwise comparison*)。总体 1 型误差率(α)控制在 5%，以宣布所述差异的显著性。所有计算均采用 SAS 软件(SAS Institute, Carry, NC)上的 Proc MIXED 进行。

结果

对 ZR-75-1 肿瘤生长的拮抗剂效应

单独的雌酮(OVX+E₁)在 23 周治疗期内引起 ZR-75-1 肿瘤大小增加 707% (图 19A)。将 50 μ g 口服日剂量的纯抗雌激素 EM-652.HCl 给予雌酮刺激的小鼠，完全防止肿瘤生长。事实上，不仅防止肿瘤生长，而且在治疗 23 周后，肿瘤大小比治疗开始时的原始数值低 26% ($p<0.04$)。在用 EM-652.HCl 治疗后获得的这一数值与在仅卵巢切除(OVX)后观察到的数值没有统计学差异，在仅卵巢切除后，肿瘤大小比原始肿瘤大小降低 61%。在相同剂量(50 μ g)和治疗期下，所述 6 种其它抗雌激素没有降低原始平均肿瘤大小。在这些组中的肿瘤都显著高于 OVX 对照组和 EM-652.HCl 治疗组($p<0.01$)。事实上，与治疗前数值相比，用屈洛昔芬、托瑞米芬、GW 5638、雷洛昔芬、他莫昔芬

和艾多昔芬治疗 23 周，分别导致平均肿瘤大小高于治疗前数值 478%、230%、227%、191%、87%和 86%(图 19A)。

对 ZR-75-1 肿瘤生长的激动剂效应

5 在不补充雌酮的情况下，用 200 μg 日剂量的他莫昔芬治疗 161 天后，平均肿瘤大小增加至高于基线 196% ($p<0.01$ ，相对于 OVX) (图 19B)。另一方面，用艾多昔芬治疗的小鼠的平均肿瘤大小增加(125%) ($p<0.01$)，而在用托瑞米芬治疗的小鼠体内肿瘤大小增加 86% ($p<0.01$) (图 19B)。将 200 μg EM-652.HCl 加入 200 μg 他莫昔芬，完全抑制仅用
10 他莫昔芬观察到的增殖(图 19C)。另一方面，在实验结束时，与 OVX 对照组相比，用单独的 EM-652.HCl ($p=0.44$)、雷洛昔芬($p=0.11$)、屈洛昔芬($p=0.36$)或 GW 5638 ($p=0.17$)治疗，不显著改变 ZR-75-1 的肿瘤大小(图 19B)。

15 对反应类别的影响

在雌酮刺激时 50 μg 抗雌激素的影响

 除了对肿瘤大小的影响外，在实验结束时各个肿瘤达到的反应类别是疗效的一个重要参数。在卵巢切除小鼠中，分别在 21%、43%和 38%的肿瘤中达到完全反应、部分反应和稳定反应，而所述肿瘤没有
20 一个发展。另一方面，在补充雌酮的 OVX 动物中，100%的肿瘤已经发展(图 20A)。在 EM-652.HCl 治疗的补充雌酮的 OVX 动物组中，分别在 17%、17%和 60%的肿瘤中观察到完全反应、部分反应和稳定反应，而仅 7%的肿瘤(30 个肿瘤中的 2 个肿瘤)发展。在相同的雌酮刺激条件下，用 50 μg 日剂量的任一所述其它抗雌激素治疗不能将发展中
25 肿瘤的百分率降至低于 60%。事实上，在他莫昔芬治疗组中 65%的肿瘤(26 个中的 17 个)发展，而用托瑞米芬治疗有 89%的肿瘤(28 个中的 25 个)发展，用雷洛昔芬治疗有 81%的肿瘤发展(26 个中的 21 个)，用屈洛昔芬治疗 100%的肿瘤(23 个中的 23 个)发展，而用艾多昔芬治疗

有 71%的肿瘤(28 个中的 20 个)发展, 用 GW 5638 治疗有 77%的肿瘤(26 个中的 20 个)发展(图 20A)。

在无雌酮刺激下 200 μ g 抗雌激素对反应类别的影响

- 5 如图 20B 所示, 他莫昔芬、艾多昔芬和托瑞米芬在无雌酮刺激的情况下导致发展中肿瘤的比率高于使用所述其它抗雌激素的所述比率。事实上, 在他莫昔芬、艾多昔芬和托瑞米芬以 200 μ g 的日剂量治疗后, 分别有 62% (26 个中的 16 个)、33% (24 个中的 8 个)和 21% (28 个中的 6 个)的肿瘤属于发展类别。如图 20C 中可以见到的, 将 200 μ g EM-652.HCl 加入他莫昔芬中, 将仅用他莫昔芬的发展中肿瘤的百分率
- 10 从 62% (26 个中的 16 个)降至将 EM-652.HCl 加入他莫昔芬中时的 7% (28 个中的 2 个)。

抗雌激素对子宫上皮细胞厚度的影响

- 15 测量子宫内膜上皮细胞高度, 作为子宫内膜中每种化合物的激动剂效应和拮抗剂效应的最直接的参数。

在存在雌酮刺激时每日 50 μ g 抗雌激素对子宫上皮细胞厚度的影响

- 20 在 50 μ g 口服日剂量下, EM-652.HCl 将雌酮对上皮高度的刺激效应抑制 70%。所测试的 6 种其它抗雌激素的功效显著较低($p < 0.01$)。事实上, 屈洛昔芬、GW 5638、雷洛昔芬、他莫昔芬、托瑞米芬和艾多昔芬对雌酮刺激分别抑制 17%、24%、26%、32%、41%和 50% (表 10)。

在无雌酮刺激时每日 200 μ g 抗雌激素对子宫上皮细胞厚度的影响

- 25 无雌酮刺激时, EM-652.HCl 和屈洛昔芬是所测试的仅有的不显著增加上皮细胞高度的化合物(分别为 OVX 对照组数值的 114%和 101%)。他莫昔芬(155%)、托瑞米芬(135%)和艾多昔芬(176%)对子宫上皮高度有显著刺激作用($p < 0.01$, 相对于 OVX 对照组)。雷洛昔芬(122%)

实施例 9

在口服一剂 ^{14}C -EM-800 (20 mg/kg)后雌性大鼠脑中的放射性

实施例 9 显示了在口服一剂 ^{14}C -EM-800 (20 mg/kg)后大鼠脑中的放射性。为了比较,包括了得自这些动物中的每只的血液、血浆、肝和子宫的数值。这些结果来自 LREM 研究第 1129 号 - 在给雄性和雌性 Long-Evans 大鼠口服一剂 ^{14}C -EM-800 (20 mg/2 ml/kg)后放射性的组织分布和排泄。这些数字表明,雌性 Long-Evans 大鼠脑中来源于药物的总放射性量非常低(ng 相当物/g 组织),在给药后 12 小时后检测不到。2 小时时,脑中的放射性比肝中的放射性低 412 倍,比子宫中的放射性低 21 倍,比血液中的放射性低 8.4 倍,比血浆中的放射性低 13 倍。由于脑中总放射性的未知部分是由于血液放射性的污染所致,因此,表 1 中所示的脑放射性的数值过高地估计了脑组织自身中 ^{14}C (EM-800)相关的放射性水平。这样的数据提示,抗雌激素在脑组织中的水平(如果存在抗雌激素的话)太低,以致不能抵消外源雌激素的效应。重要的是注意到,在脑组织中检测到的一些放射性可能是由于组织中的残留血液所致。另外,用于该项研究的 ^{14}C -EM-800 的放射化学纯度最低为 96.25%。

和 GW 5638 (121%)对子宫上皮高度有统计学显著性的刺激作用 ($p<0.05$, 相对于 OVX 对照组) (表 10)。所测量的每种抗雌激素对子宫重量和阴道重量的激动剂效应和拮抗剂效应同对子宫上皮厚度所观察的模式一致(数据未显示)。

5

表 10

			子宫内膜上皮厚度		
组别		n	(μm)	±	SEM
OVX	+ 对照	14	18.31	±	0.04
OVX + E ₁	+ 对照	8	40.58 ^{b,d}	±	0.63
OVX + E ₁	+ EM-652.HCl	14	25.06 ^b	±	0.07
OVX + E ₁	+ 他莫昔芬	10	33.44 ^{b,d}	±	0.04
OVX + E ₁	+ 托瑞米芬	13	31.47 ^{b,d}	±	0.04
OVX + E ₁	+ 雷洛昔芬	12	34.72 ^{b,d}	±	0.06
OVX + E ₁	+ 屈洛昔芬	12	36.71 ^{b,d}	±	0.12
OVX + E ₁	+ 艾多昔芬	12	29.35 ^{b,d}	±	0.05
OVX + E ₁	+ GW 5638	12	35.30 ^{b,d}	±	0.07
OVX	+ EM-652.HCl	12	20.79	±	0.10
OVX	+ 他莫昔芬	11	28.47 ^{b,d}	±	0.05
OVX	+ EM-652.HCl + 他莫昔芬	13	27.95 ^{b,d}	±	0.06
OVX	+ 托瑞米芬	13	24.75 ^{b,c}	±	0.04
OVX	+ 雷洛昔芬	12	22.33 ^a	±	0.05
OVX	+ 屈洛昔芬	13	18.50	±	0.07
OVX	+ 艾多昔芬	11	32.14 ^{b,d}	±	0.05
OVX	+ GW 5638	13	22.22 ^a	±	0.05

^{a, b} 实验小鼠相对于 OVX 对照小鼠: ^a $P<0.05$; ^b $P<0.01$ 。

^{c, d} 实验小鼠相对于 EM-652.HCl 治疗小鼠: ^c $P<0.05$; ^d $P<0.01$ 。

表 11

在口服一剂 ^{14}C -EM-800 (20 mg/kg)后在雌性 Long-Evans 大鼠的选定组织中来源于药物的放射性的平均浓度(ng EM-800 相当物/g 组织) ^a			
时间 (hr)	脑	血液	血浆
	均数 ^b (%CV)	均数 ^b (%CV)	均数 ^b (%CV)
2	17.6 (29)	148.7 (22)	224.6 (20)
4	17.1 (29)	66.9 (45)	103.2 (39)
6	15.6 (8)	48.3 (29)	74.1 (31)
8	16.8 (31)	41.1 (12)	64.1 (14)
12	10.0 ^c (87)	28.7 (54)	40.7 (55)
24	0 (NC)	4.7 ^d (173)	10.1 (86)
36	0 (NC)	0 (NC)	0 (NC)
48	0 (NC)	0 (NC)	0 (NC)
72	0 (NC)	0 (NC)	0 (NC)
96	0 (NC)	0 (NC)	0 (NC)
168	0 (NC)	0 (NC)	0 (NC)
a: 来自 LREM 1129 (EM-800: 在给雄性和雌性 Long-Evans 大鼠口服一剂 ^{14}C -EM-800 (20 mg/2 ml/kg)后放射性的组织分布和排泄)报道表的数值。 b: 1.2 ng EM-800 相当物的定量极限(LOQ)。 c: 一个样品低于所述 LOQ; 在均数计算时使用 0。 d: 两个样品低于所述 LOQ; 在均数计算时使用 0。 %CV: 变异系数以百分率表示, 其中 n=3。 NC: 未计算。			

表 12

在口服一剂 ^{14}C -EM-800 (20 mg/kg)后在雌性 Long-Evans 大鼠的选定组织中来源于药物的放射性的平均浓度(μg EM-800 相当物/g 组织) ^a					
时间 (hr)	脑	肝	子宫	血液	血浆
	均数 ^b (%CV)	均数 ^b (%CV)	均数 ^b (%CV)	均数 ^b (%CV)	均数 ^b (%CV)
2	0.0176 (29)	7.2547 (30)	0.3675 (36)	0.1487 (22)	0.2246 (20)
4	0.0171 (29)	3.2201 (48)	0.2866 (83)	0.0669 (45)	0.1032 (39)
6	0.0156 (8)	2.7462 (8)	0.2757 (19)	0.0483 (29)	0.0741 (31)
8	0.0168 (31)	2.7748 (8)	0.3332 (46)	0.0411 (12)	0.0641 (14)
12	0.0100 ^c (87)	1.8232 (38)	0.2407 (25)	0.0287 (54)	0.0407 (55)
24	0 (NC)	0.6391 (52)	0.0837 (54)	0.0047 ^d (173)	0.0101 (86)
36	0 (NC)	0.4034 (22)	0.0261 (15)	0 (NC)	0 (NC)
48	0 (NC)	0.2196 (37)	0.0238 (44)	0 (NC)	0 (NC)
72	0 (NC)	0.1326 (4)	0 (NC)	0 (NC)	0 (NC)
96	0 (NC)	0.0944 (15)	0 (NC)	0 (NC)	0 (NC)
168	0 (NC)	0.0348 (14)	0 (NC)	0 (NC)	0 (NC)

a:	来自 LREM 1129 (EM-800; 在给雄性和雌性 Long-Evans 大鼠口服一剂 ¹⁴ C-EM-800 (20 mg/2 ml/kg)后放射性的组织分布和排泄)报道表的数值。
b:	1.2 ng EM-800 相当物的定量极限(LOQ)。
c:	一个样品低于所述 LOQ; 在均数计算时使用 0。
d:	两个样品低于所述 LOQ; 在均数计算时使用 0。
%CV:	变异系数以百分率表示, 其中 n = 3。
NC:	未计算。

实施例 10

抗雌激素 EM-652.HCl 与雌二醇的组合保护抵抗子宫刺激

材料和方法

动物和治疗

5 使用在卵巢切除时重 215-265g 的 10-12 周龄雌性 Sprague-Dawley 大鼠(Crl:CD(SD)Br) (Charles River Laboratory, St-Constant, Canada)。将动物单独关养在环境受控的房间(温度: $22 \pm 3^\circ\text{C}$; 湿度: $50 \pm 20\%$; 12 h 光照-12 h 黑暗周期, 于 07:15 开灯)中。让动物自由获取自来水和合格的啮齿动物饲料(Lab Diet 5002 (粒料), Ralston Purina, St-Louis, MO)。在 Canadian Council on Animal Care (CCAC)和 the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC)批准的动物设备中, 按照实验动物护理和使用的 CCAC 指南, 进行实验。将 137 只大鼠随机分配在每组 13 或 14 只动物的如下 10 个组中: 1)无伤对照; 2) 卵巢切除(OVX)对照; 3) OVX + 17β -雌二醇(E_2 ; 2 mg/kg); 10 组 4-10) OVX + E_2 + EM-652.HCl (0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 或 10 mg/kg)。该研究的第 1 天, 在异氟烷麻醉下, 将合适组别的动物的两侧卵巢切除(OVX)。所述试验化合物作为在 0.4%甲基纤维素中的悬浮液(0.5 ml/大鼠)从该研究的第 1 天至第 14 天经管饲法每日口服一次。组 1 和组 2 的动物在所述同一时期内仅接受所述溶媒。在该研究的第 15 天, 给每组 4 只动物灌注 10%缓冲的福尔马林, 并加工组织以供组织学检查。在异氟烷麻醉下通过在腹主动脉进行驱血法杀死其它动物。取出子宫和阴道, 剥除剩余的脂肪并称重。将得自每个子宫的标本在 10%缓冲的福尔马林中固定, 以供采用计算机辅助程序(Software Image-Pro Plus)测定子宫内膜上皮细胞高度。

25

血清胆固醇水平

从禁食过夜的动物收集血清样品, 用 Boehringer Mannheim Diagnostic Hitachi 911 分析仪(Boehringer Mannheim Diagnostic

Laboratory Systems), 测定血清样品的总胆固醇。

统计学分析

数据以均数 $\pm$ SEM 表示。按照 Duncan-Kramer 的多重极差检验
5 (Kramer, Biometrics 12: 307-310, 1956;), 测定统计学显著性。

结果

通过每日口服给予 2 mg/kg 剂量的 17β -雌二醇(E_2), 完全逆转了在
卵巢切除后 2 周所观察到的子宫重量的 65%减少(490 ± 26 mg 相对于
10 480 ± 17 mg; N.S.) (图 21)。如同一图中所示, 用增加剂量 EM-652.HCl,
观察到 E_2 对子宫重量刺激效应的进行性抑制作用, 在 3 mg/kg 和 10
mg/kg 剂量的该抗雌激素下分别观察到对 E_2 效应的 84%和 87%的逆
转。对子宫内膜上皮高度获得了相当的结果(图 22)。事实上, E_2 刺激
的子宫内膜上皮高度被 3 mg/kg 和 10 mg/kg 剂量的所述抗雌激素分别
15 阻止了 83%和 93%。与无伤对照动物(31.1 ± 0.7 μ m)相比, 在用 E_2 化
合物治疗的 OVX 动物组(41.9 ± 1.2 μ m)中子宫内膜上皮高度较高
(34.7%, $p < 0.01$)(图 23)。

给 OVX 动物补充 E_2 , 导致阴道重量与无伤动物阴道重量相似
(149.9 ± 9.0 mg 相对于 145 ± 5.3 mg, N.S.)。在图 24 中可以看到, 在高
20 于对子宫重量所观察的剂量的 EM-652.HCl 下, 观察到对阴道重量的
抑制作用。事实上, 在至多 1 mg/kg 的所述化合物下, 没有观察到所
述抗雌激素对阴道重量的显著性抑制效应。事实上, 虽然 3 mg/kg 剂
量的 EM-652.HCl 引起对 E_2 刺激效应的统计学非显著性的 50%抑制,
但在 10 mg/kg 剂量的所述抗雌激素下, 观察到完全逆转了 E_2 对阴道重
25 量的效应。

在 OVX 后 2 周, 观察到血清胆固醇增加 37% ($p < 0.01$)。另一方面,
用 E_2 治疗 OVX 动物, 引起对血清胆固醇水平的 53%抑制($p <$
0.01)(图 25)。加入日剂量为 0.01 mg/kg 至 0.3 mg/kg 的 EM-652.HCl,

对 E₂ 的抑制作用没有统计学显著性的影响。另一方面, 1.0、3.0 和 10 mg/kg 剂量的 EM-652.HCl 将 E₂ 的效应分别降低 36%、30%和 50%。本发明的数据清楚地证明, 抗雌激素 EM-652.HCl 中和了雌激素在外周组织中作用的两个充分确定的参数 - E₂ 对子宫重量和子宫内膜上皮高度的刺激效应。这些数据清楚地表明, 在接受雌二醇以减轻血管舒缩症状的绝经后妇女中共同给予 EM-652. HCl 将预防雌激素对子宫内膜的刺激效应。

1.0 mg/kg、3.0 mg/kg 和 10 mg/kg 剂量的 EM-652.HCl 的抑制效应的 36%、30%和 50%逆转, 可能可以用所述抗雌激素的所述效应占优势来解释, 单独使用所述抗雌激素时也许引起同样程度的抑制。事实上, EM-652.HCl 对大鼠子宫 ER 的亲水性比 E₂ 本身对 ER 的亲水性高约 5 倍(Martel 等, J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 64: 199-205, 1998)。

药用组合物和试剂盒实施例

以下通过实施例来叙述, 但不限于所述实施例, 叙述几种利用优选的活性 SERM EM-800 或 EM-652.HCl (EM-1538)和优选的活性雌激素 17 β -雌二醇、乙炔基雌二醇或结合雌激素的药用组合物和试剂盒。可以使用本发明的其它化合物或其组合, 来取代 EM-800 或 EM-652.HCl 或 17 β -雌二醇或乙炔基雌二醇, 或者除 EM-800 或 EM-652.HCl 或 17 β -雌二醇或乙炔基雌二醇外, 使用本发明的其它化合物或其组合。有效成分的浓度可以在下文讨论的宽范围内变动。可以包括的其它成分用量和类型是本领域众所周知的。

实施例 A

用于口服的药用组合物(胶囊)

成分	重量百分率 (按总组合物的重量计)
EM-652.HCl	5.0
乙炔基雌二醇	0.02
含水乳糖	79.98
淀粉	4.8
微晶纤维素	9.8
硬脂酸镁	0.4

或

成分	重量百分率 (按总组合物的重量计)
EM-652.HCl	5.0
结合雌激素	0.2
含水乳糖	79.8
淀粉	4.8
微晶纤维素	9.8
硬脂酸镁	0.4

实施例 B**试剂盒**

口服所述 SERM 和雌激素

5 用于口服的非类固醇抗雌激素组合物(胶囊)

成分	重量百分率 (按总组合物的重量计)
EM-652.HCl	5.0
含水乳糖	80.0
淀粉	4.8
微晶纤维素	9.8
硬脂酸镁	0.4

用于口服的雌激素组合物

(明胶胶囊)

成分	重量百分率 (按总组合物的重量计)
乙炔基雌二醇	0.02
含水乳糖	84.98
淀粉	4.8
微晶纤维素	9.8
硬脂酸镁	0.4

10 其它 SERM 可以替代上述配方中的 EM-800 或 EM-01538, 而且其它雌激素可以替代 17 β -雌二醇、乙炔基雌二醇或结合雌激素。可以包括不止一种 SERM 或不止一种雌激素, 在这种情况下, 结合重量百分率最好是在上述实施例中给出的单一雌激素或单一 SERM 的重量百分率的结合重量百分率。

已经借助优选实施方案和实施例描述了本发明，但本发明不限于所述实施方案和实施例。本领域技术人员会容易认识到本发明更宽的应用性和范围，本发明的应用性和范围仅受本文专利的权利要求书的限定。

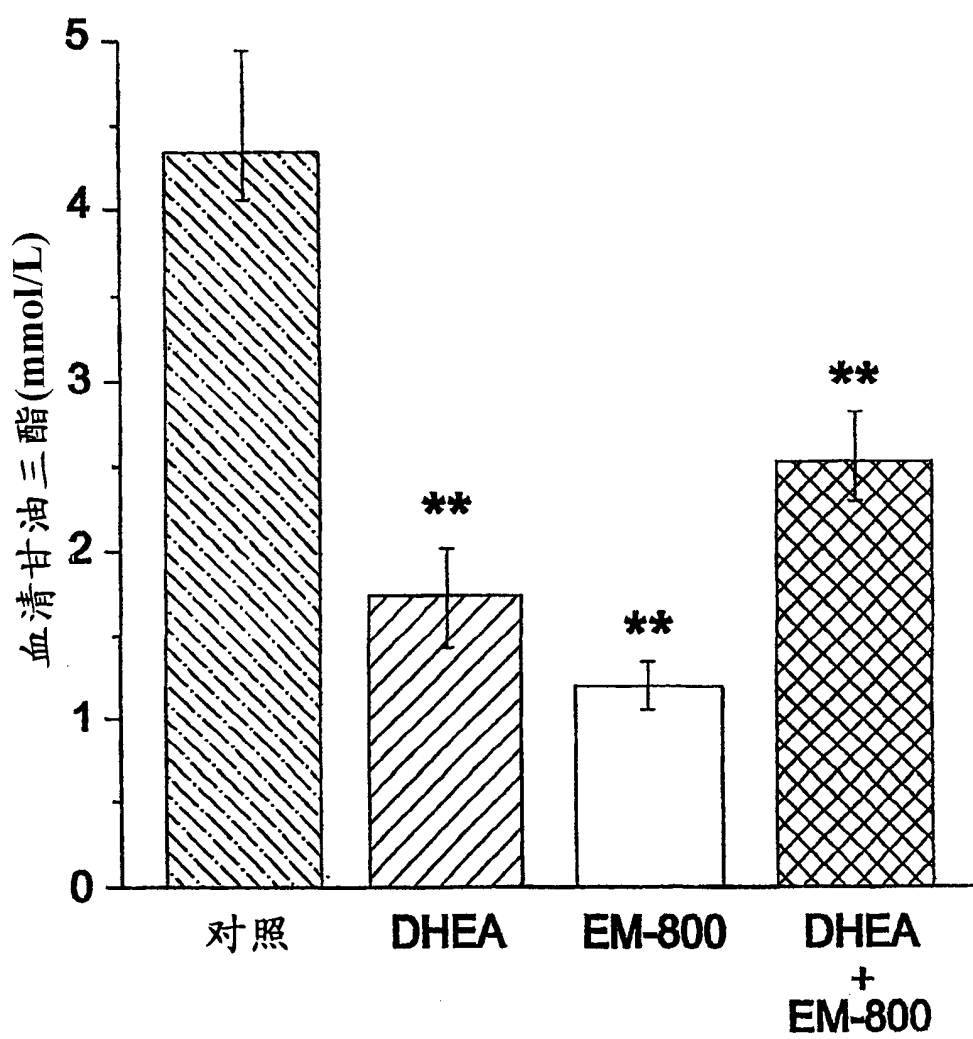


图 1A

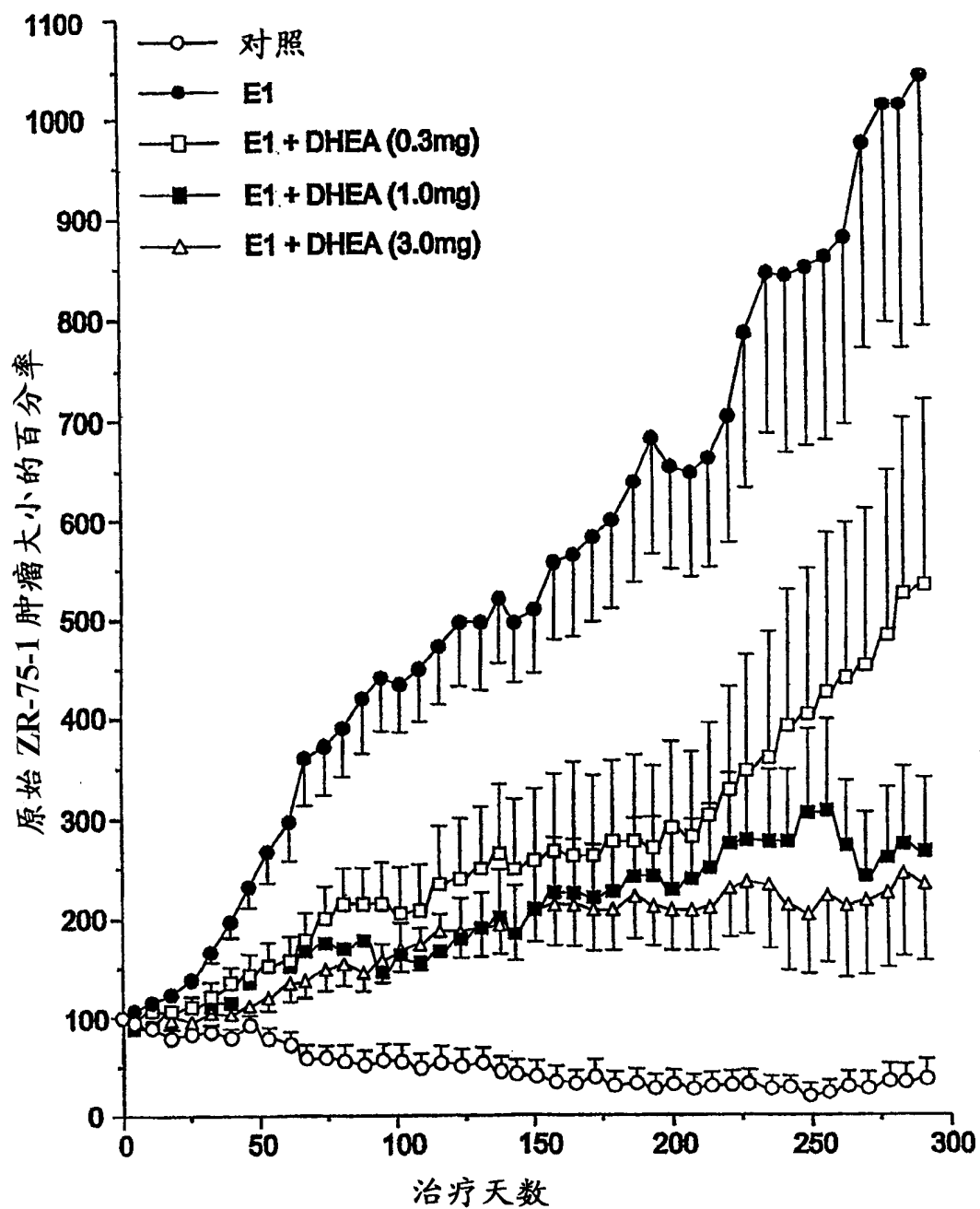


图 2A

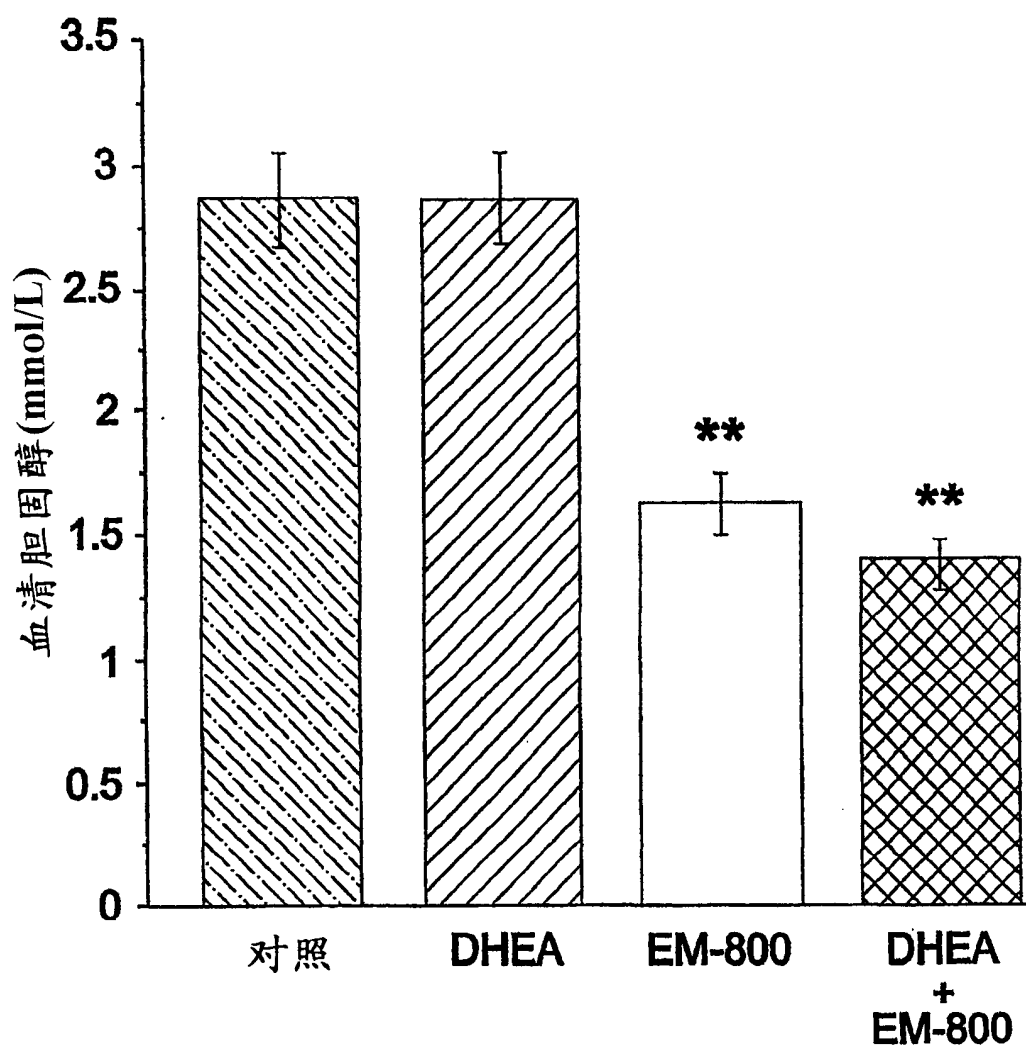


图 1B

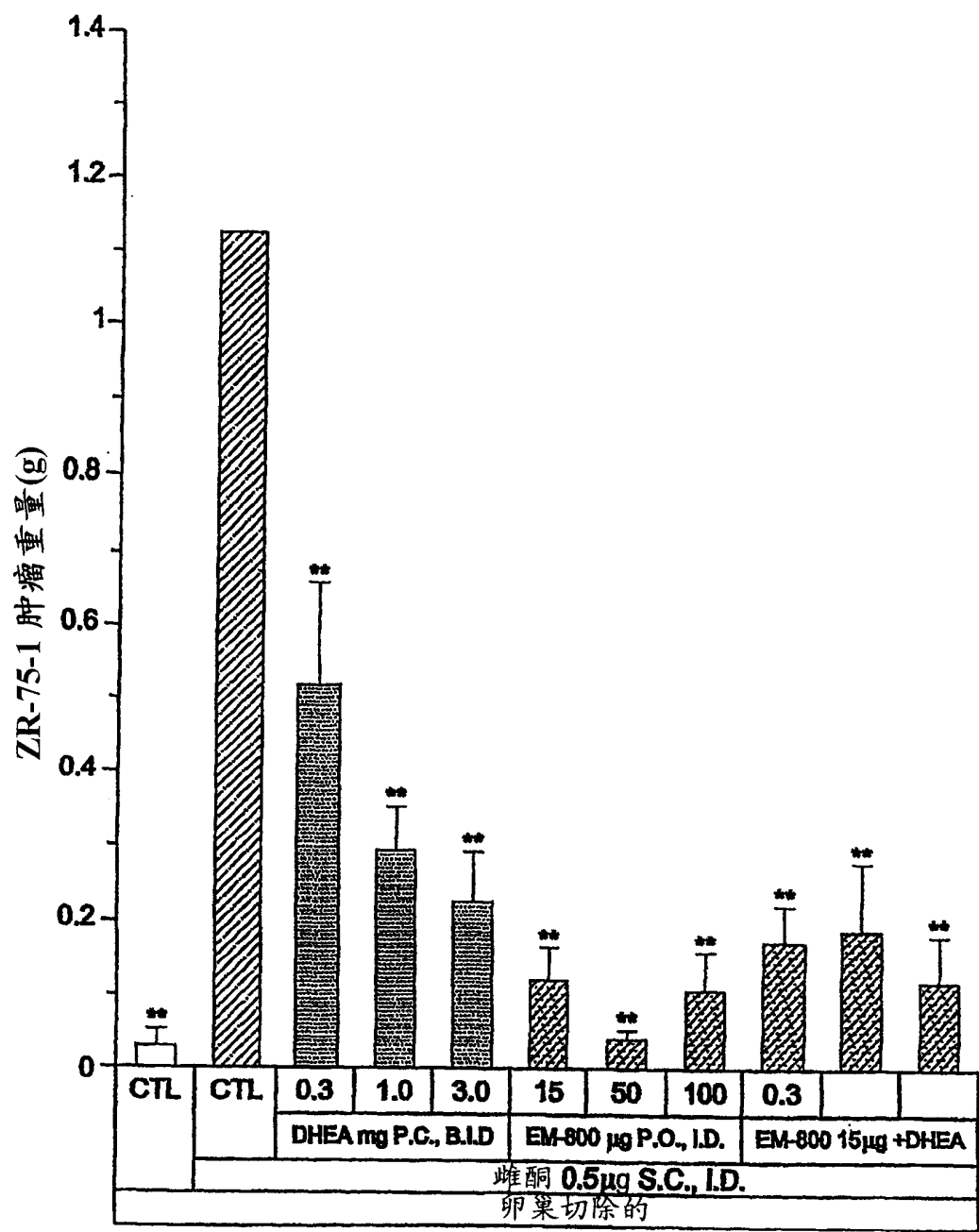


图 2B

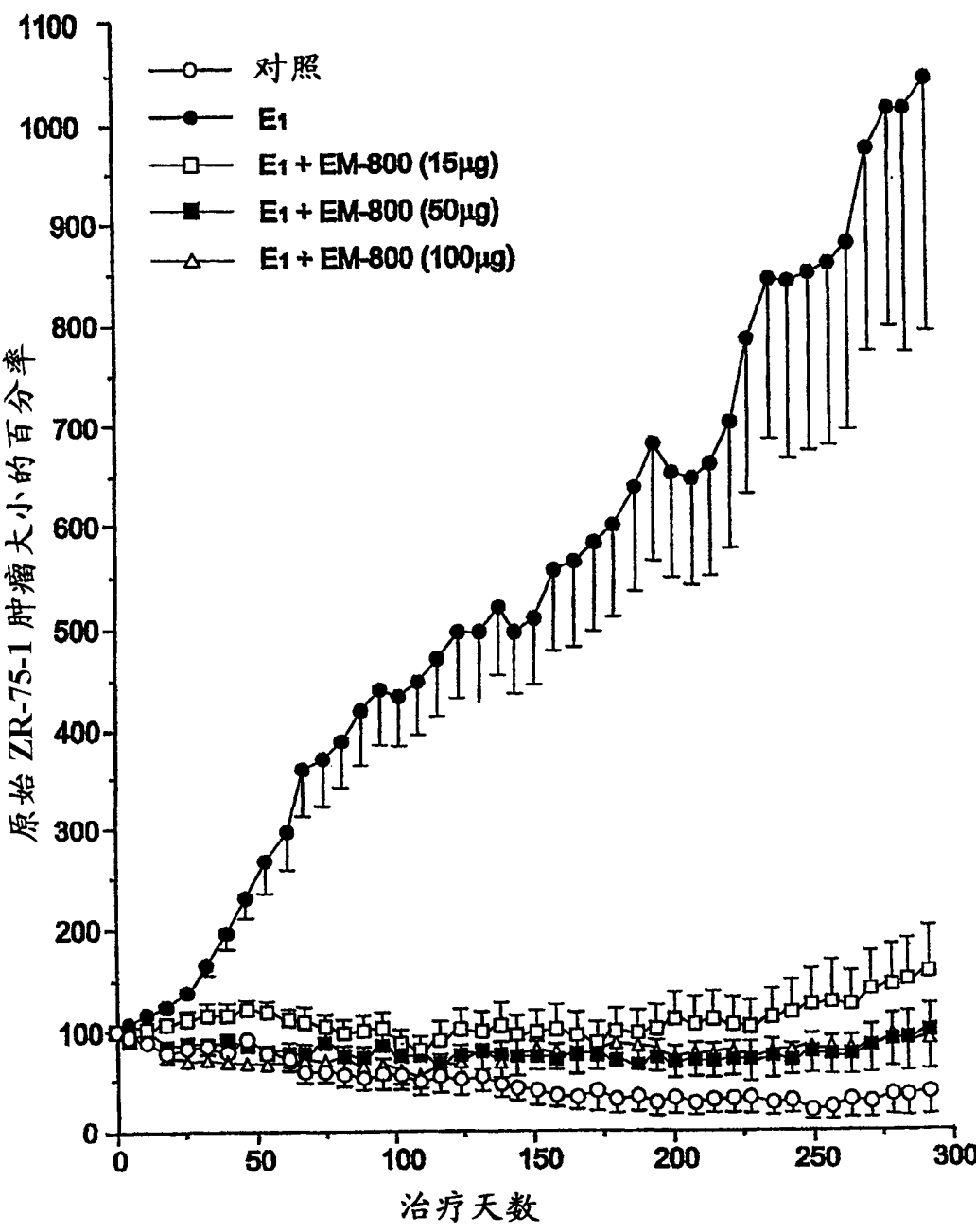


图 3A

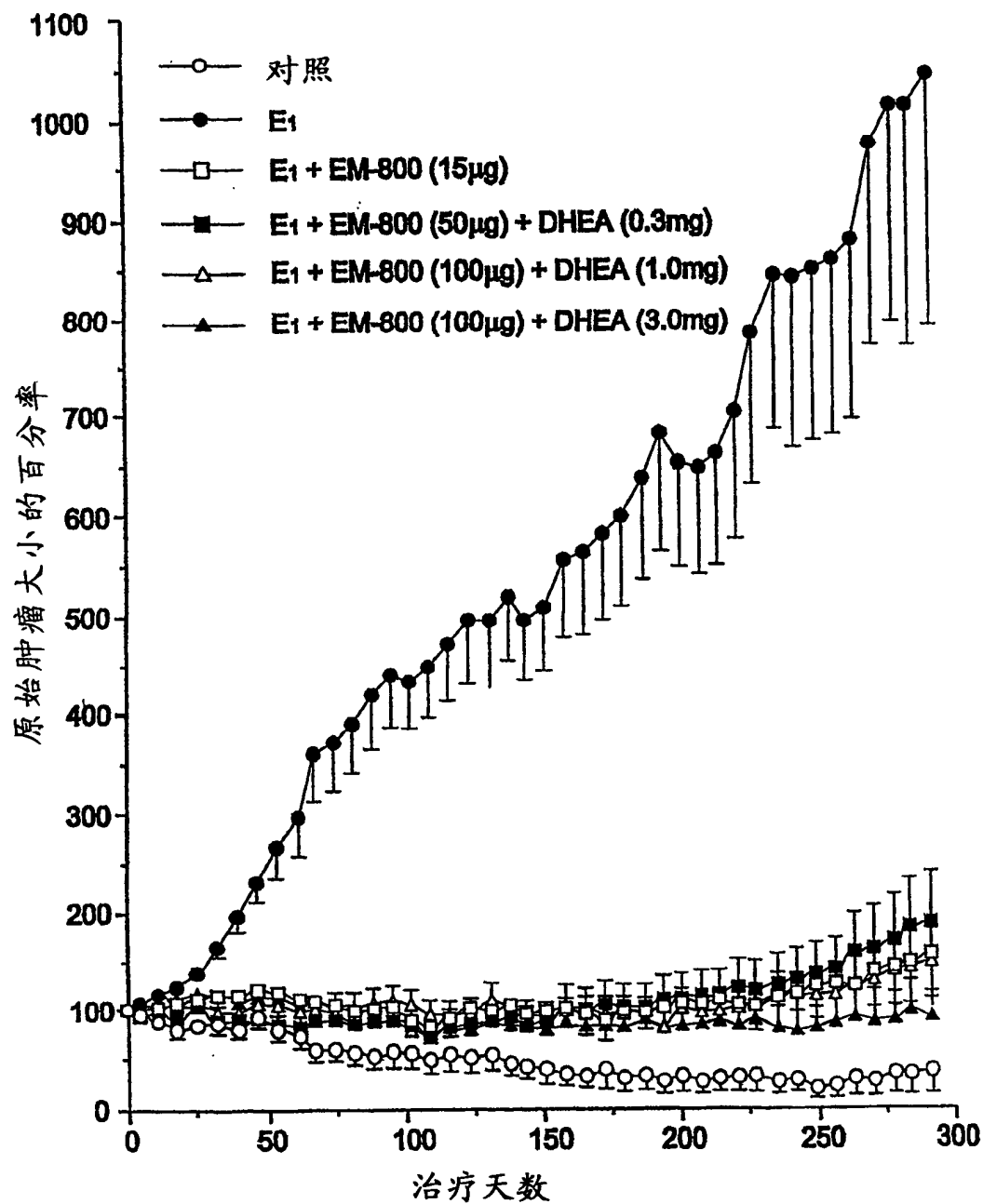


图 3B

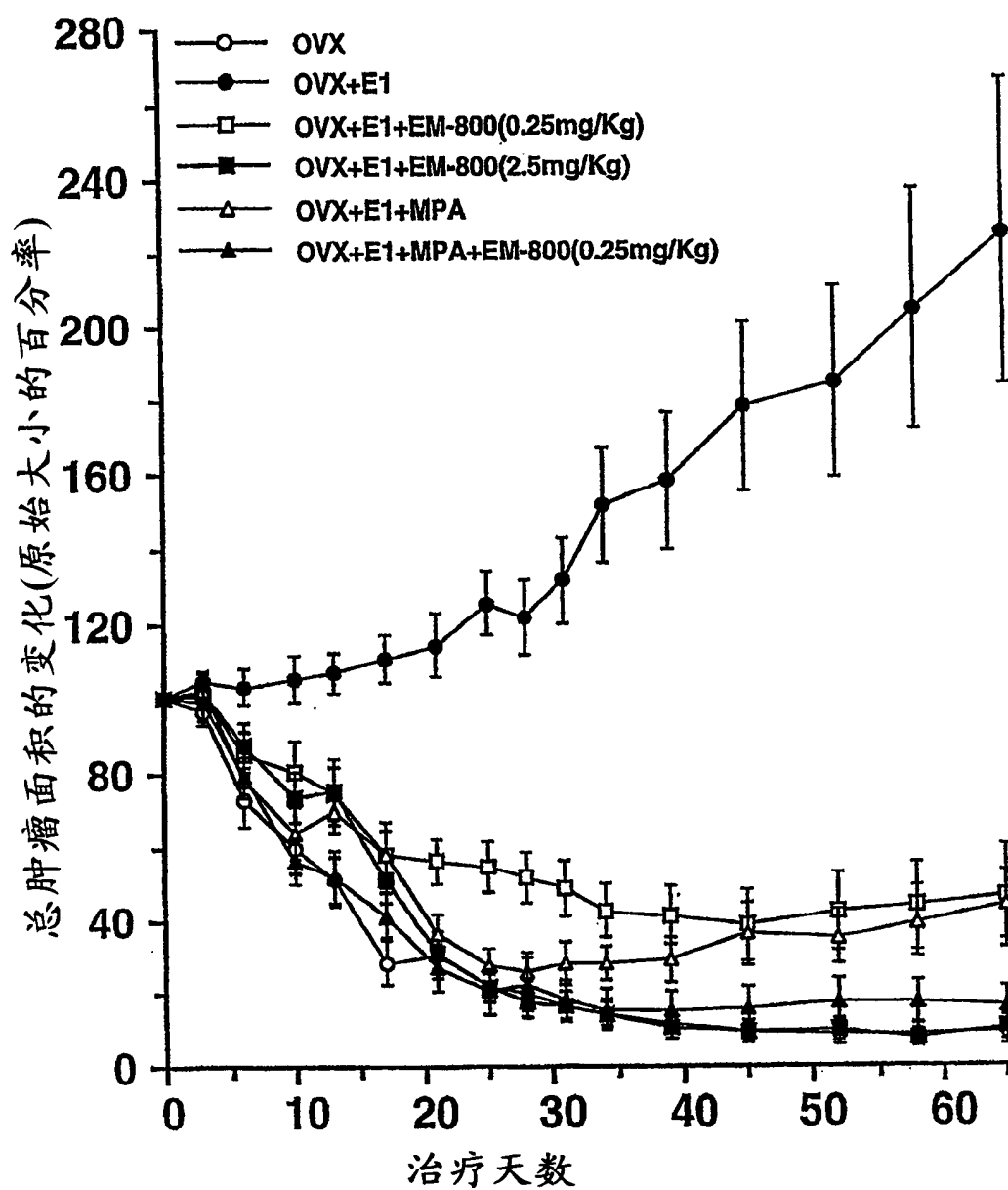


图 4

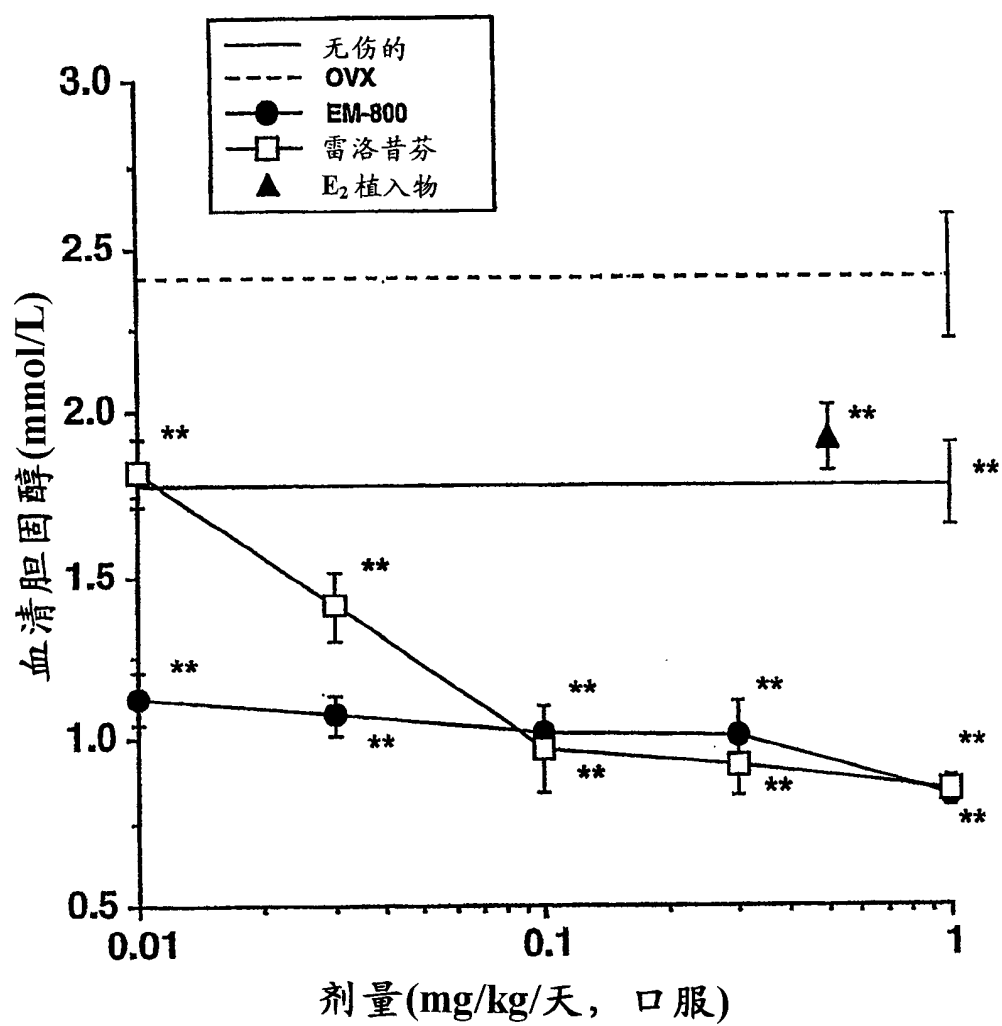


图 5

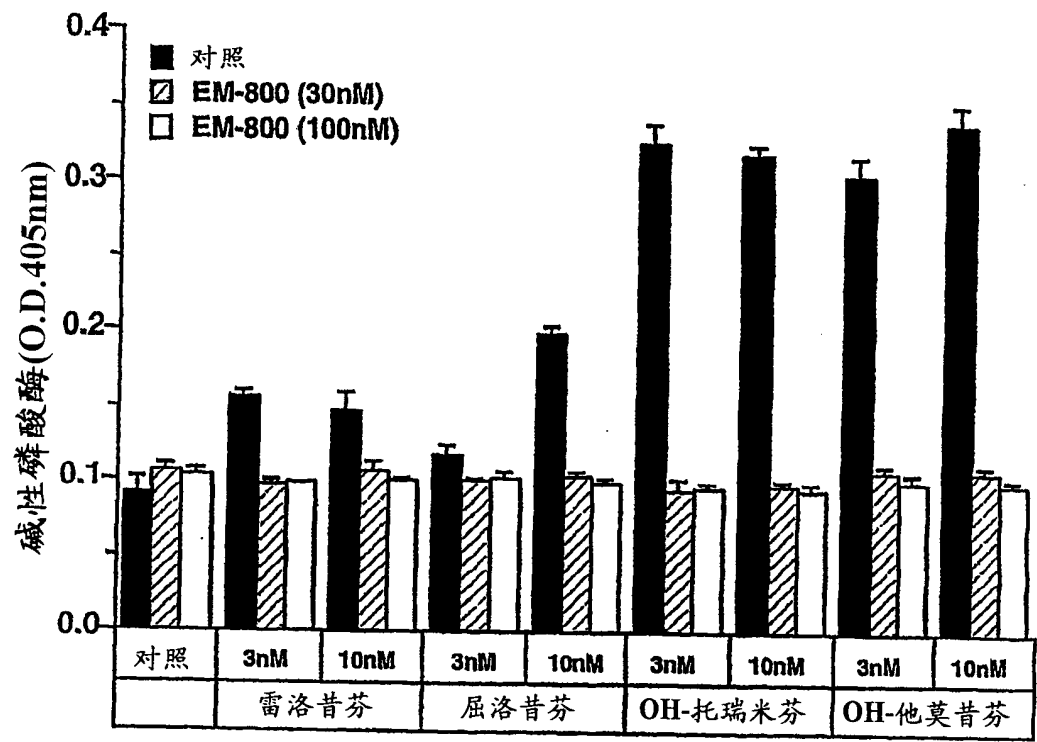


图 7

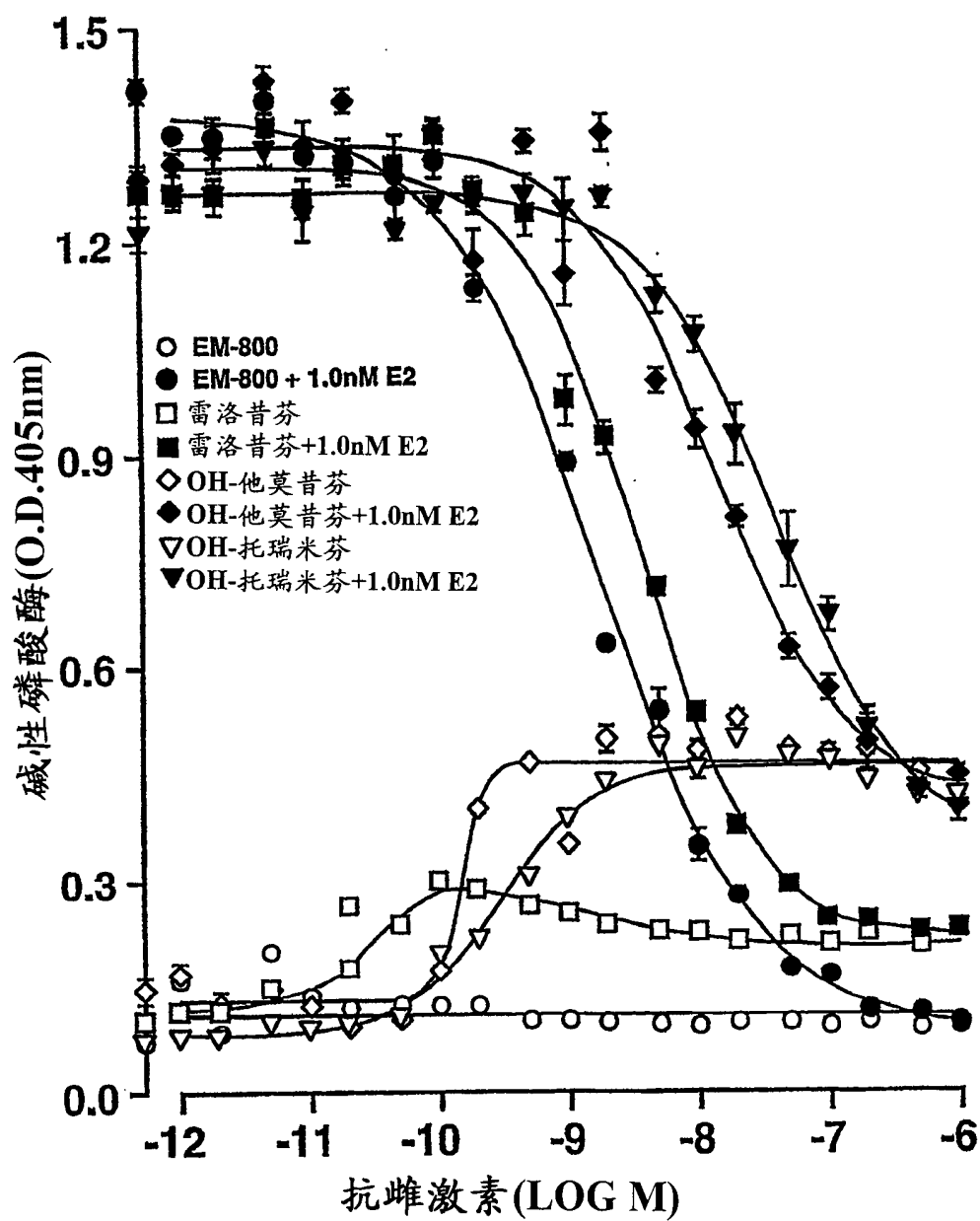


图 6

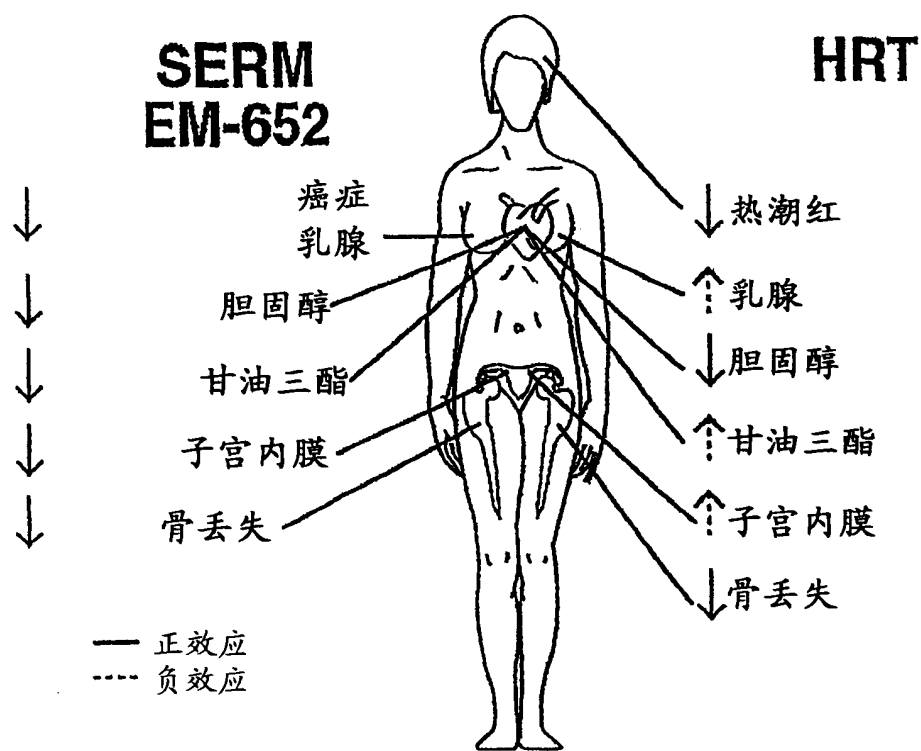


图 8

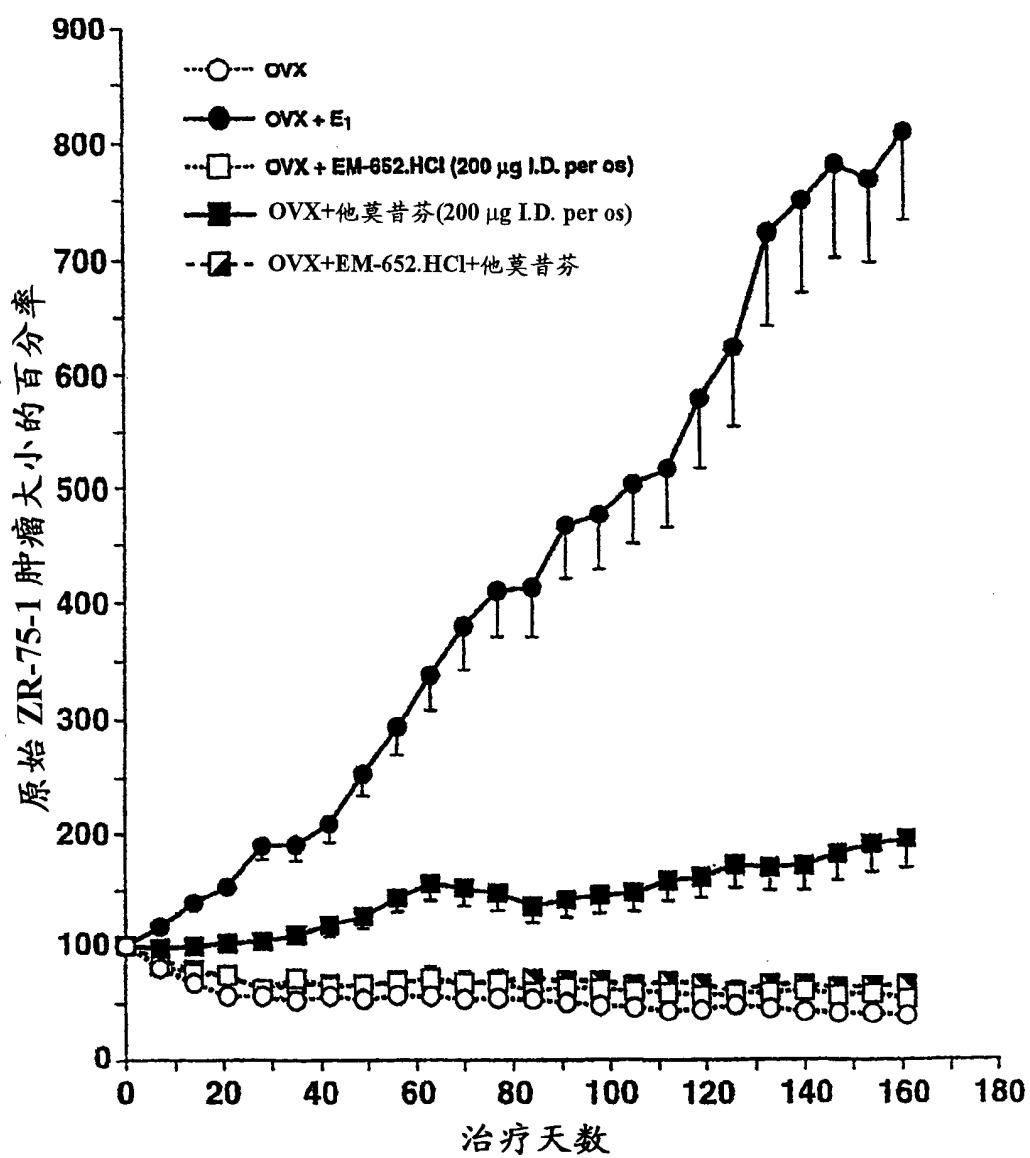


图 9

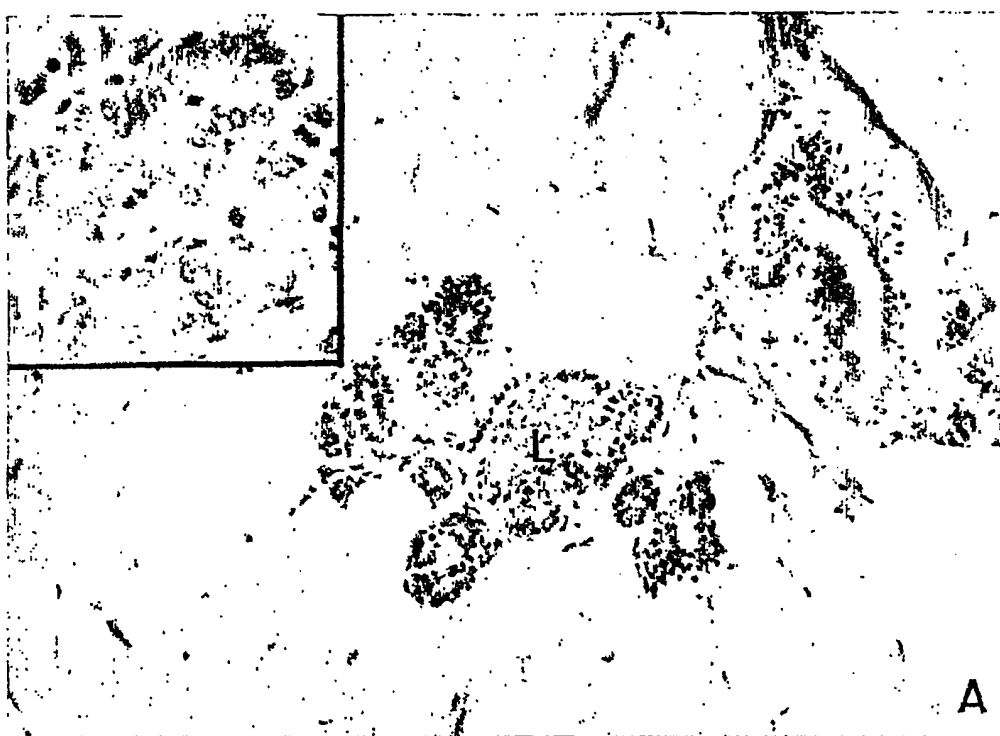


图 10A

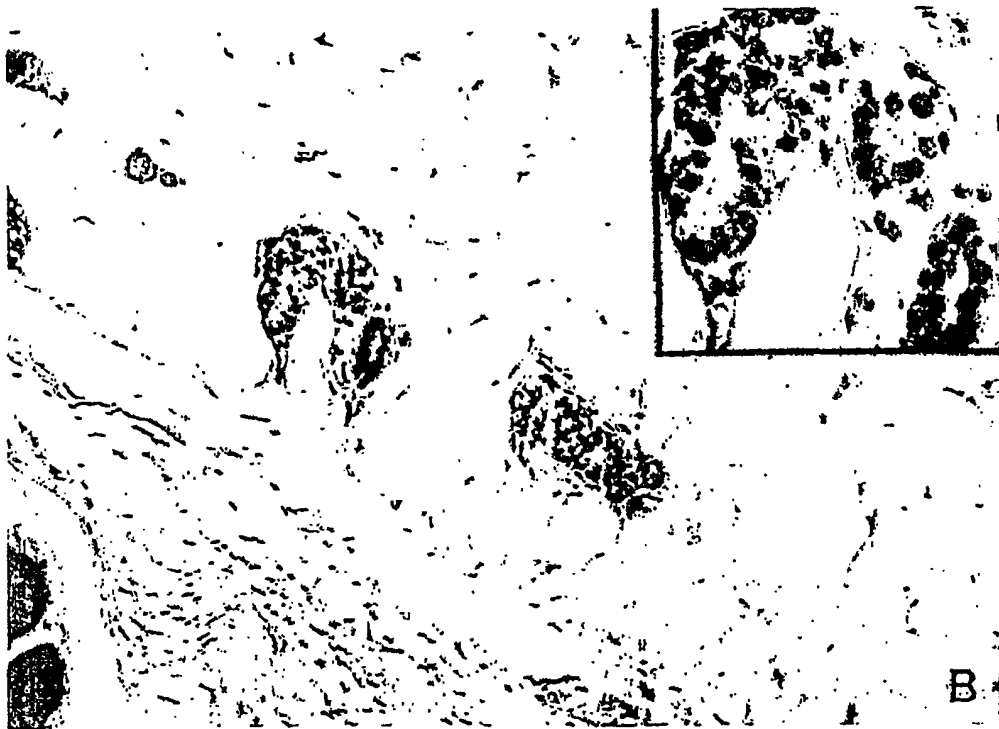


图 10B

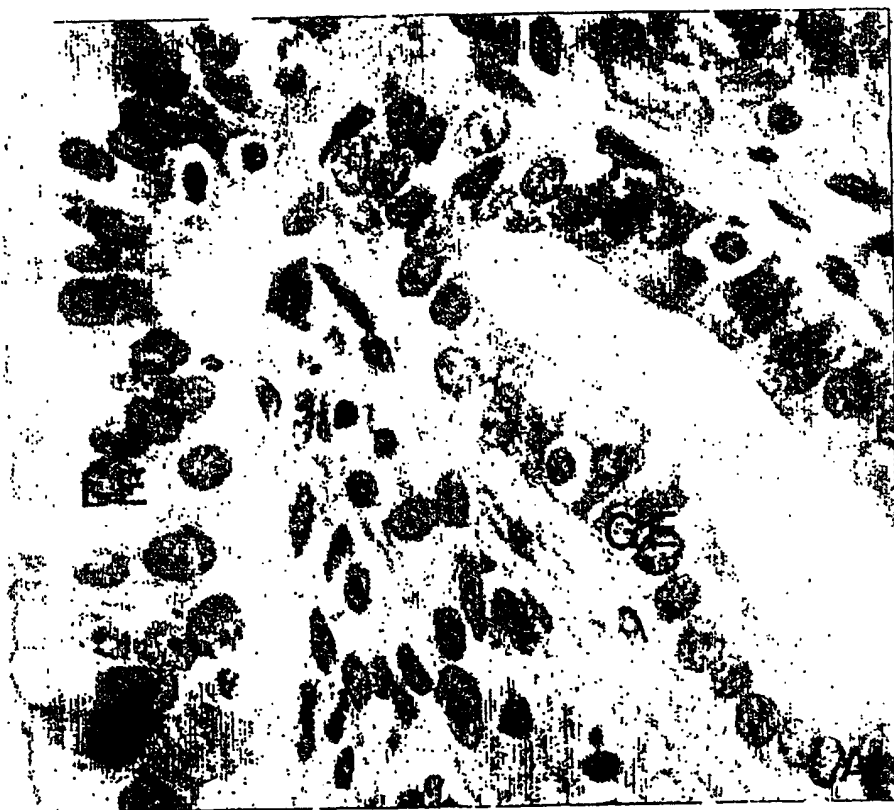


图 11A

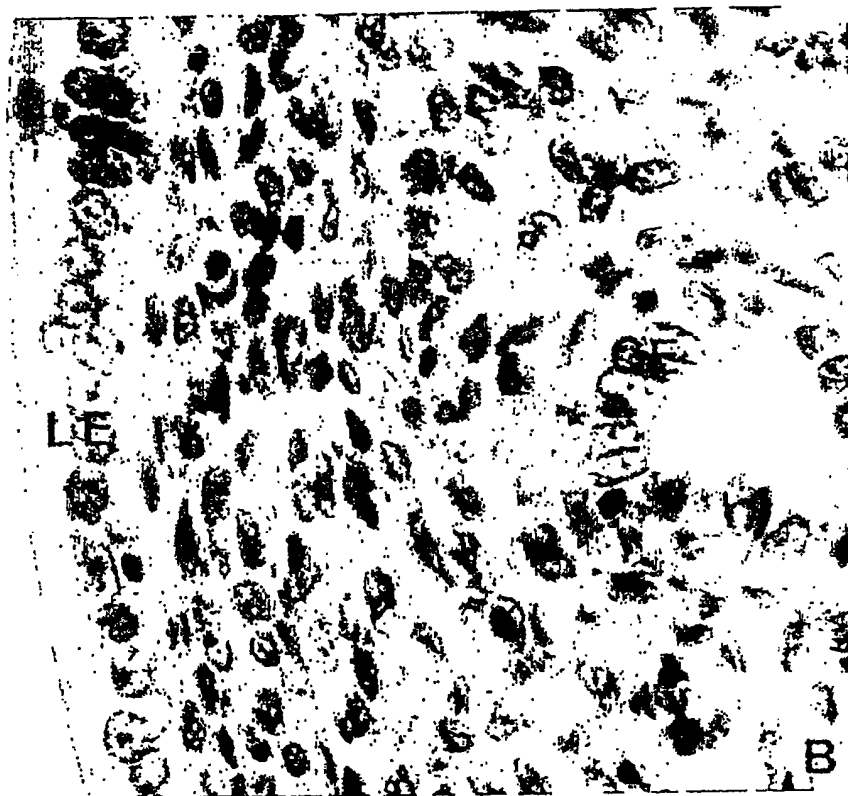


图 11B

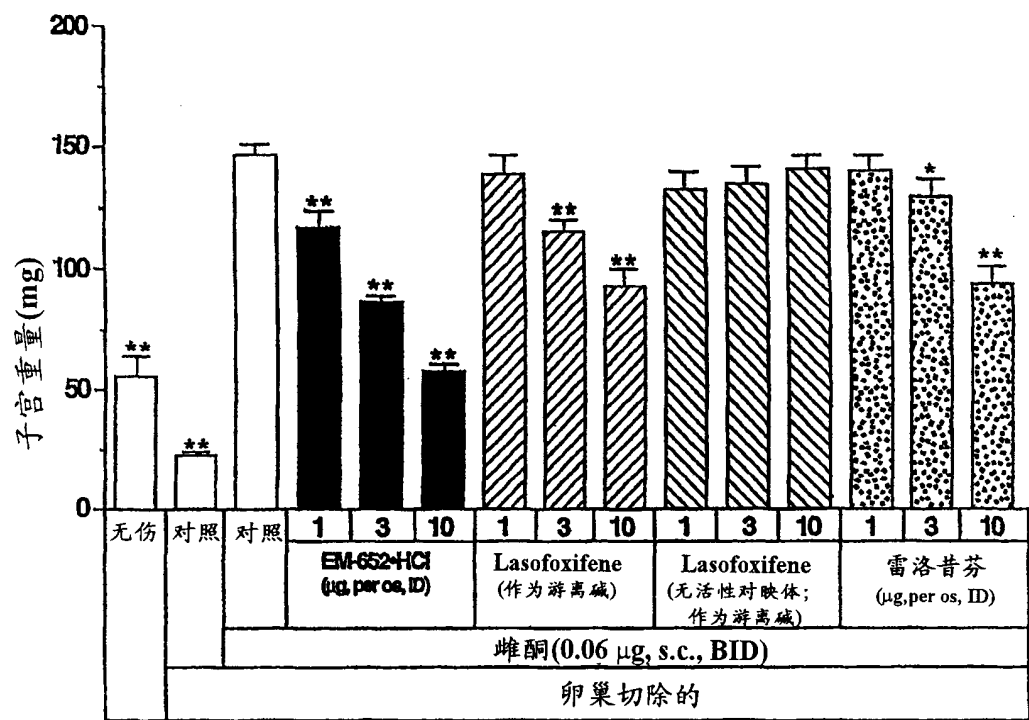


图 12

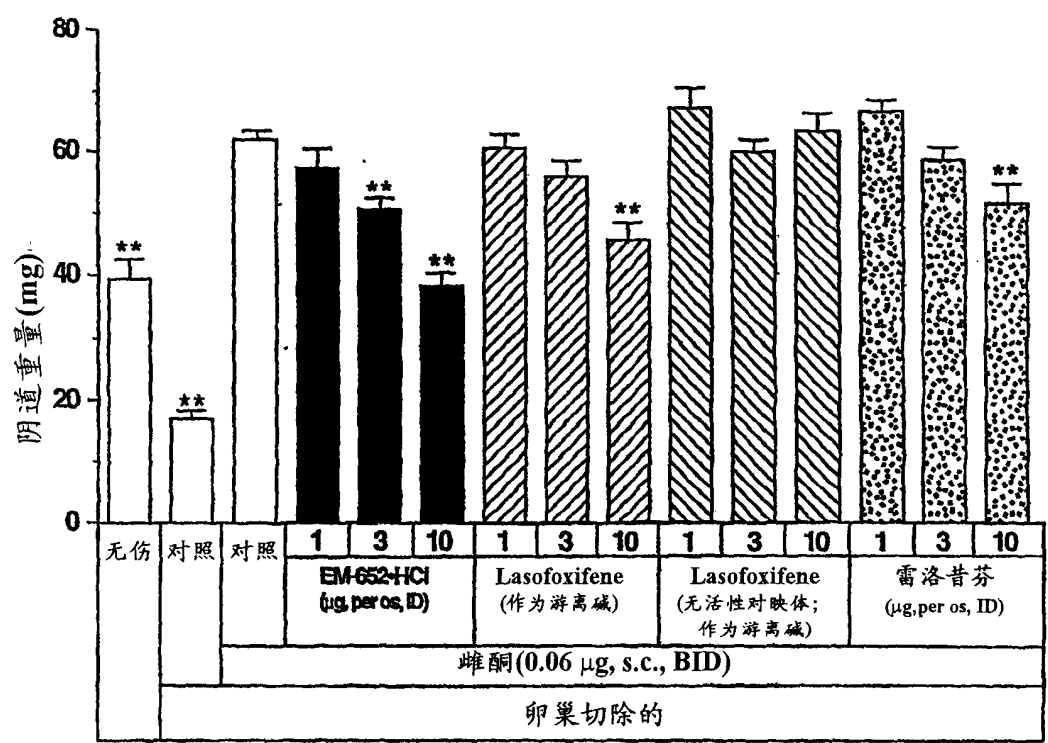


图 13

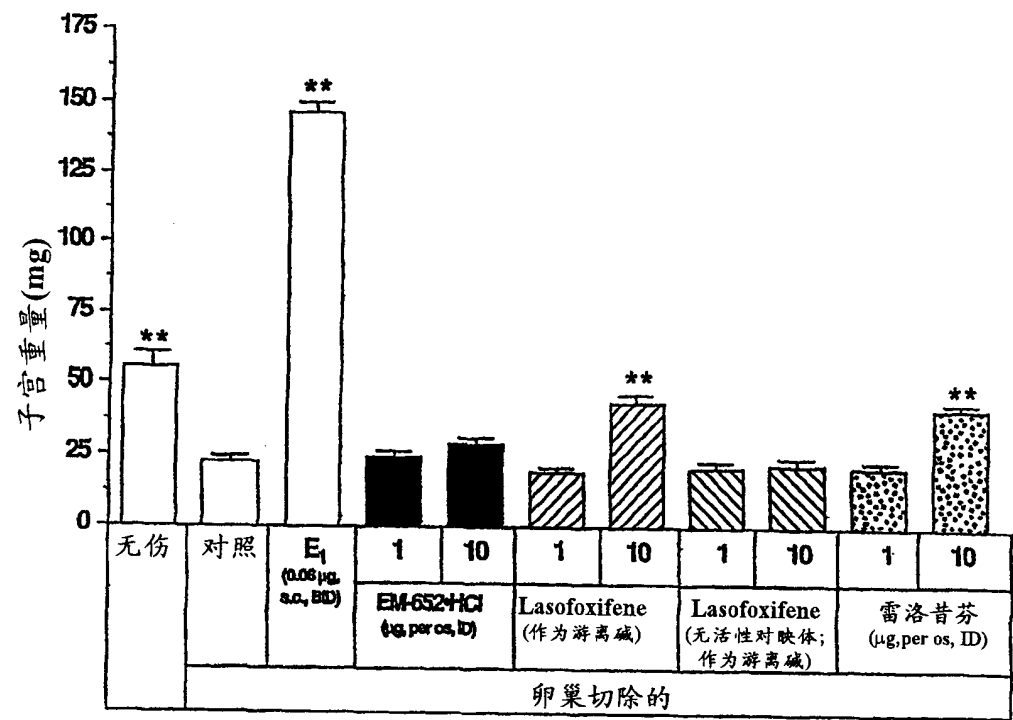


图 14

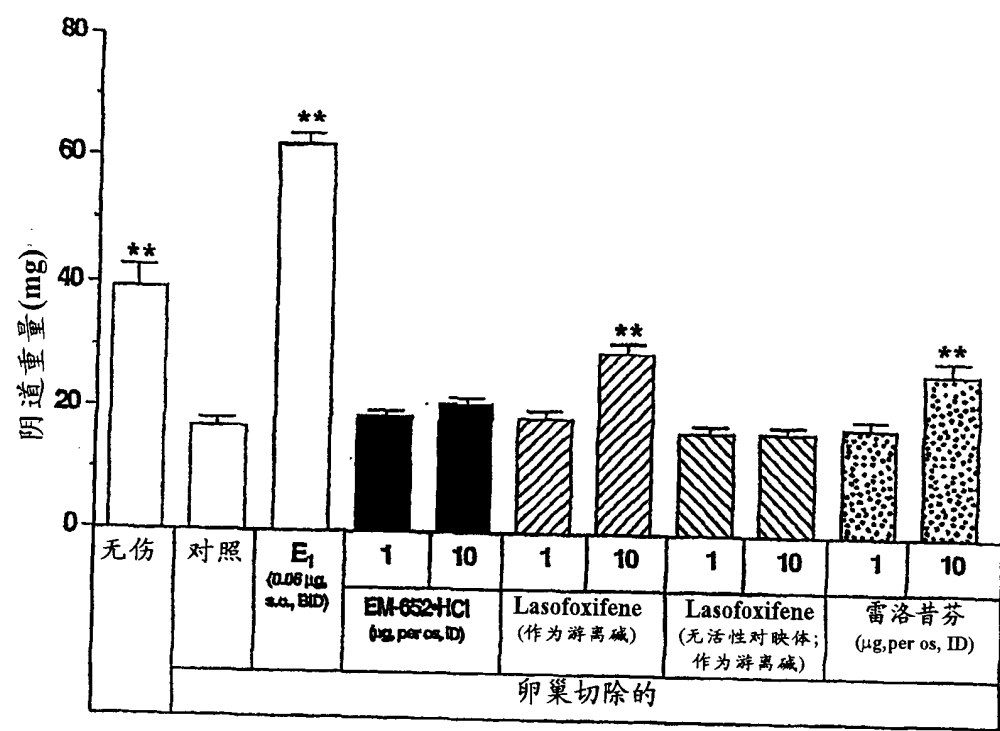


图 15

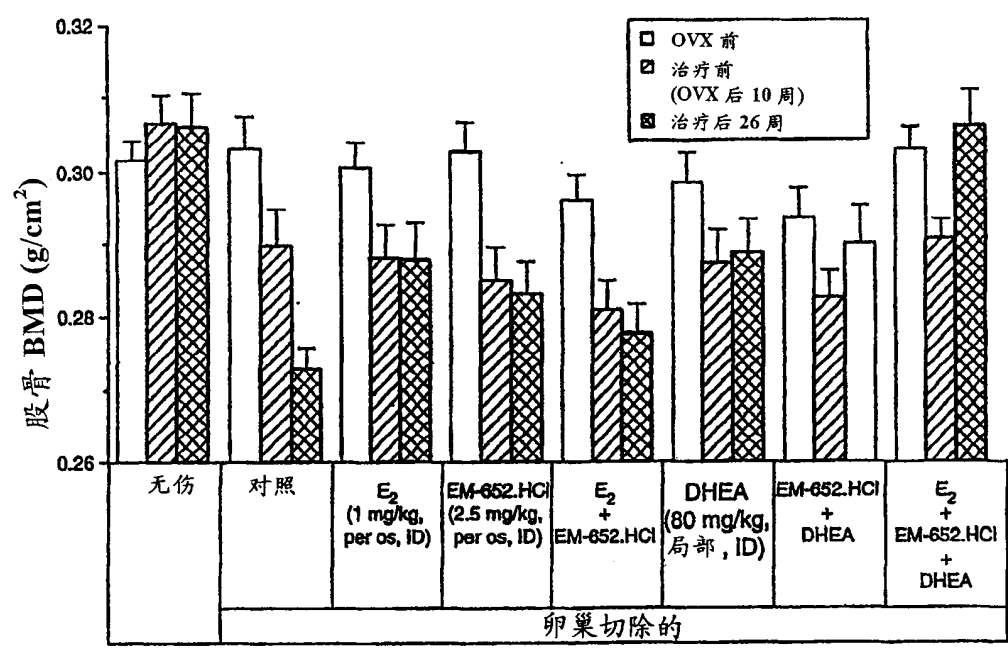


图 17

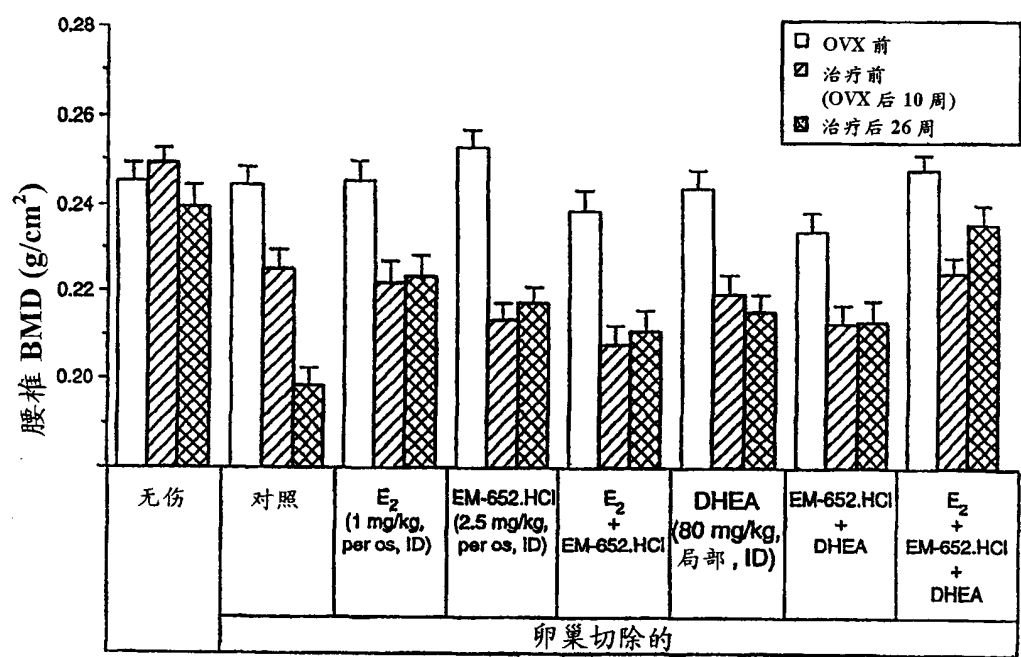


图 16

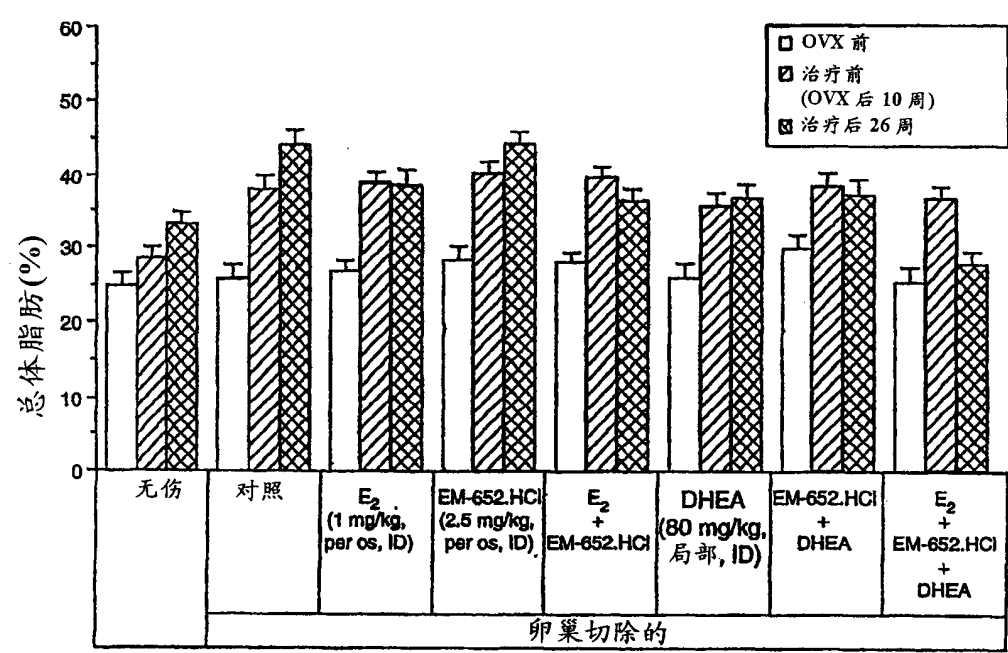


图 18

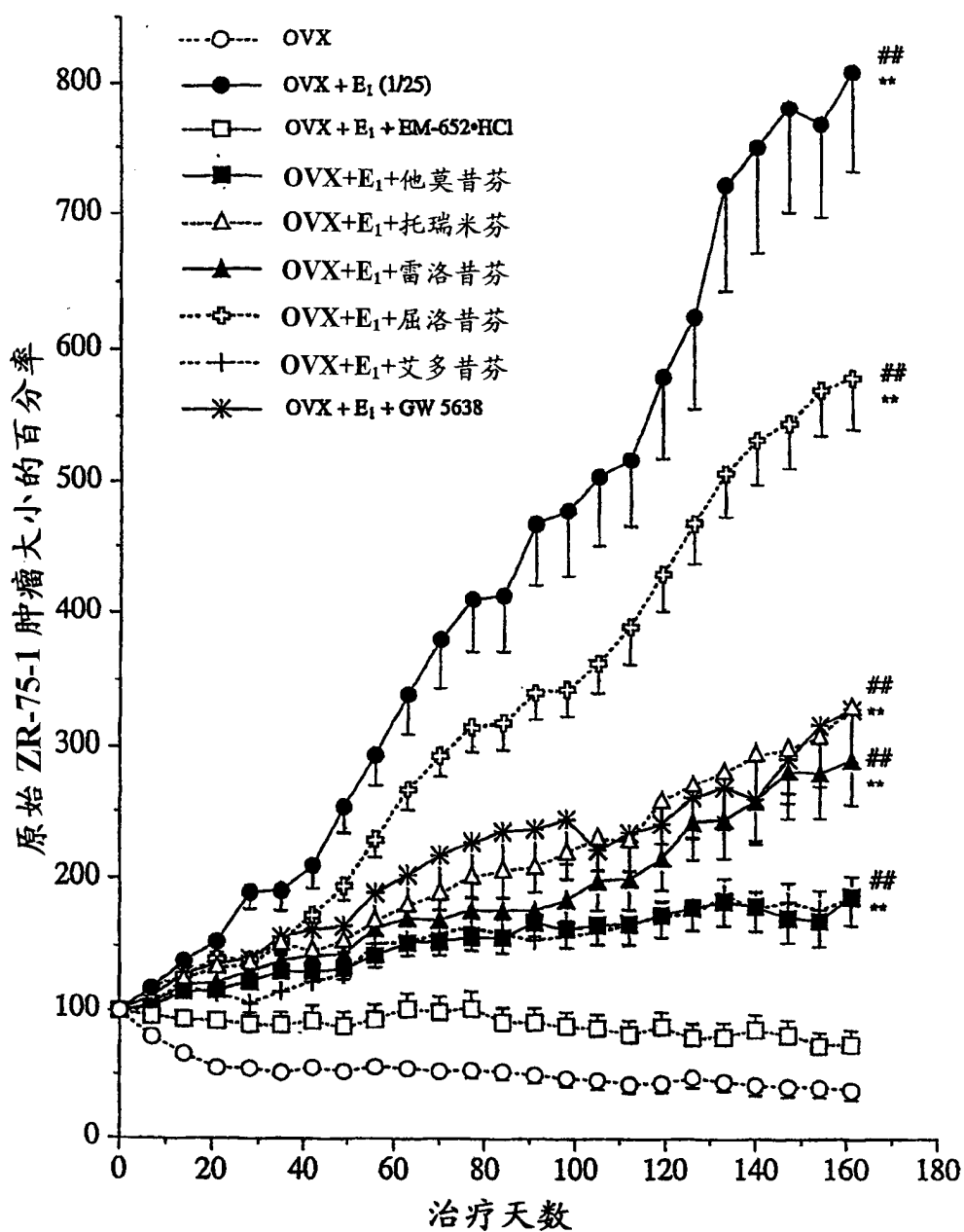


图 19A

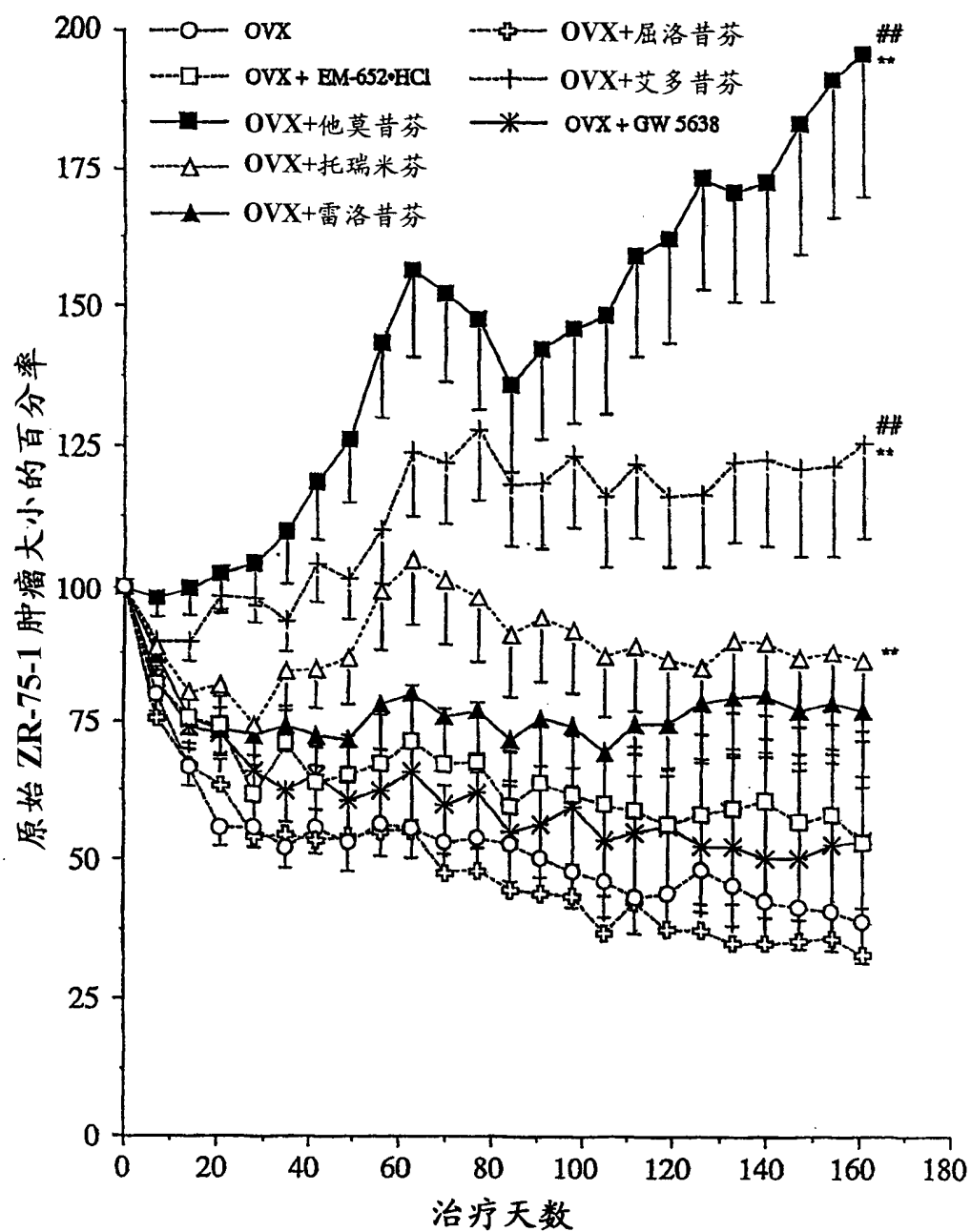


图 19B

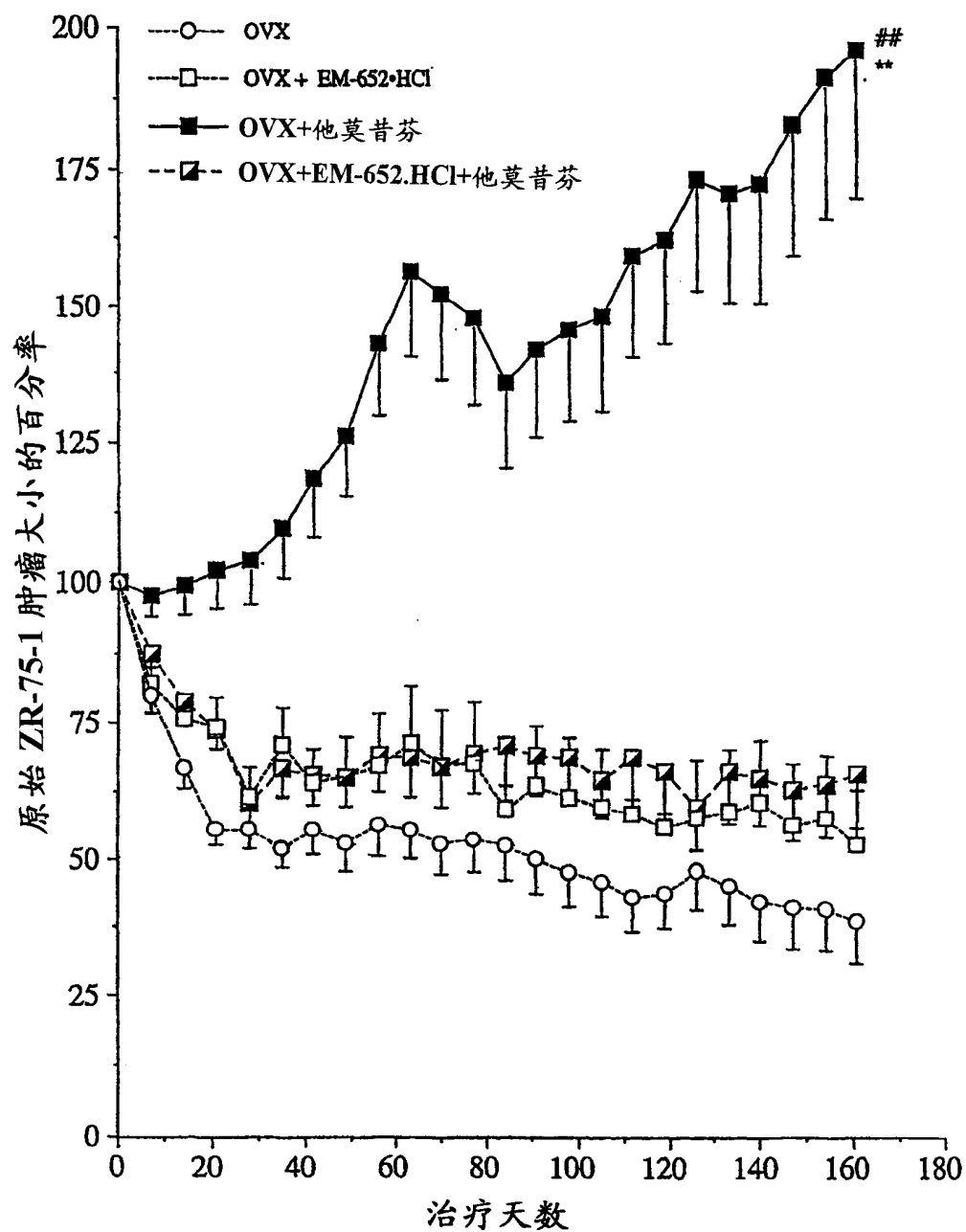


图 19C

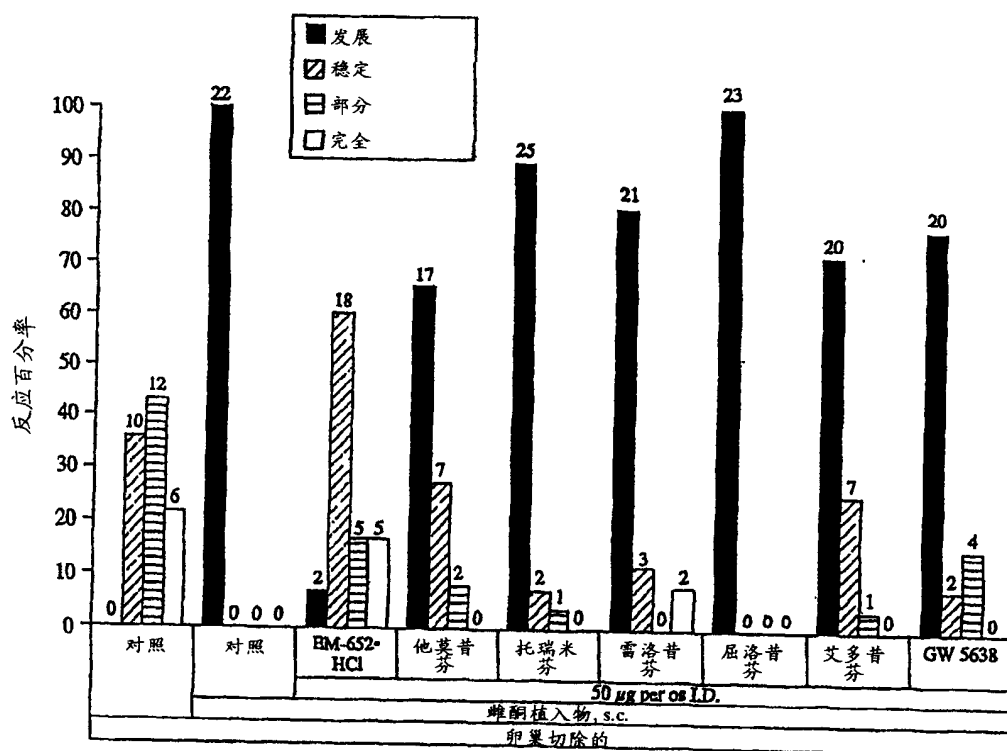


图 20A

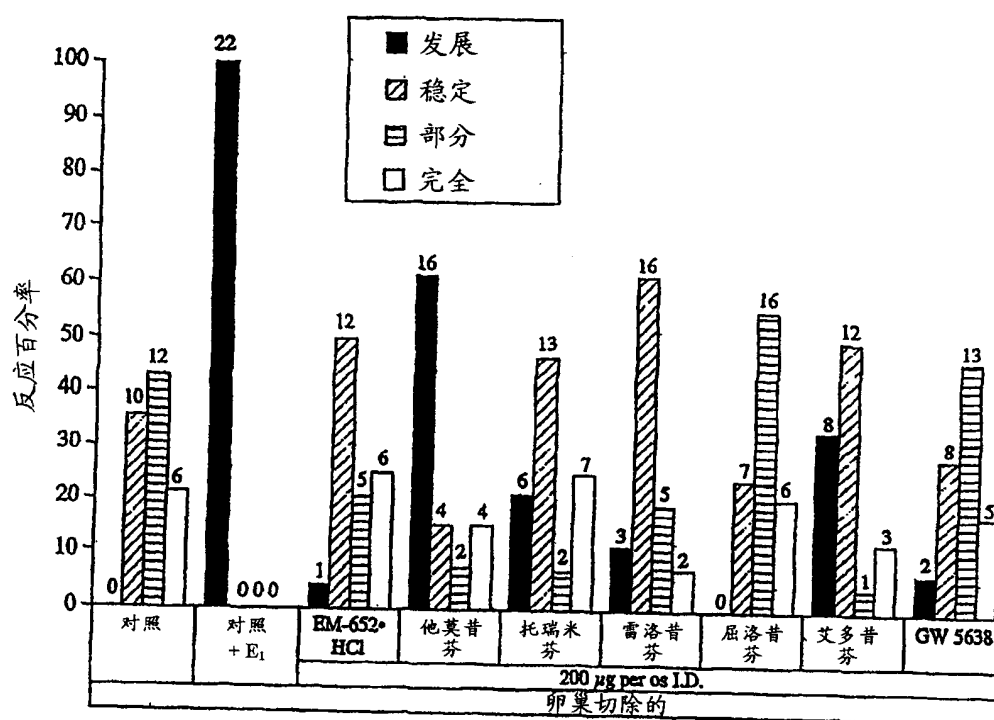


图 20B

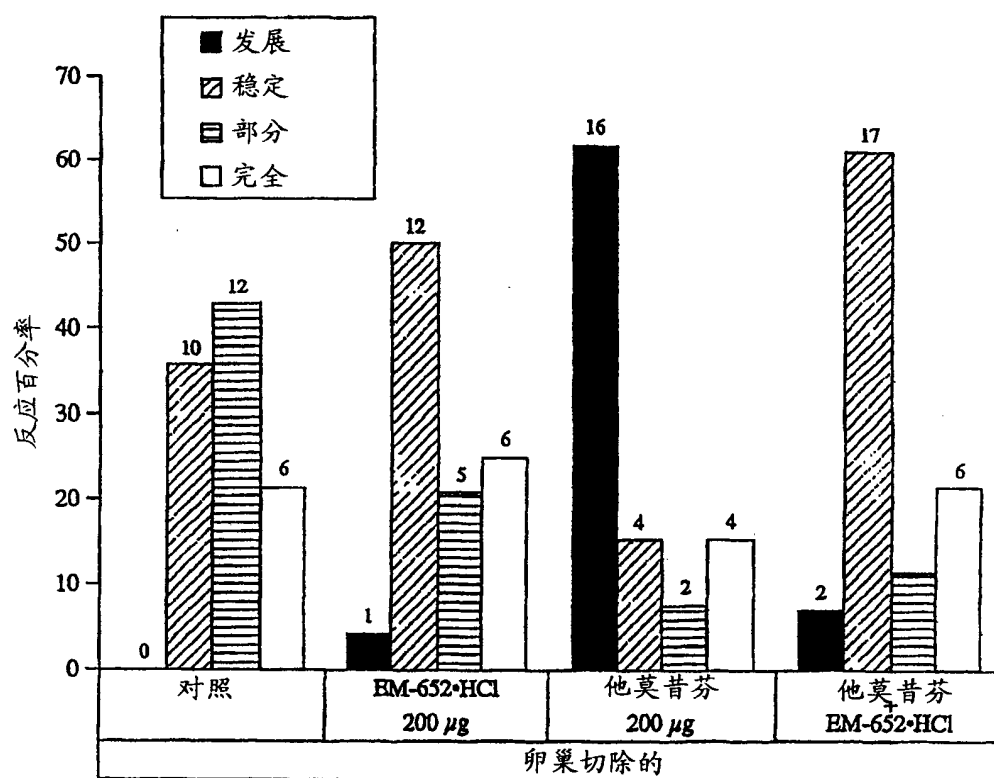


图 20C

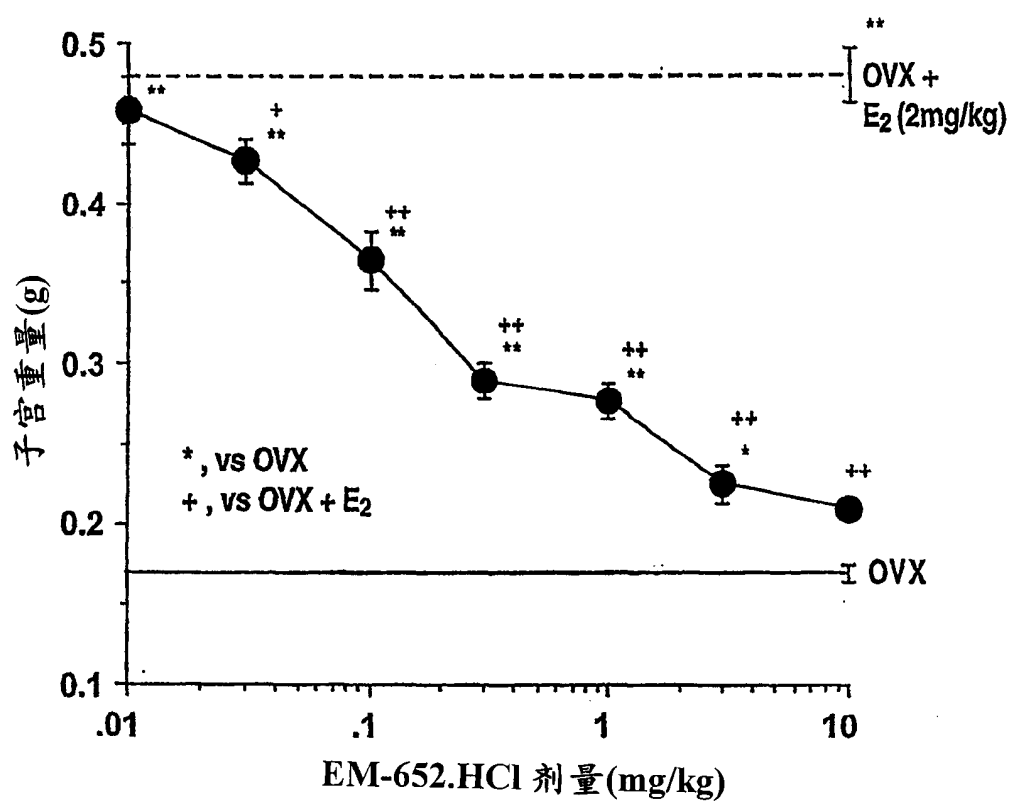


图 21

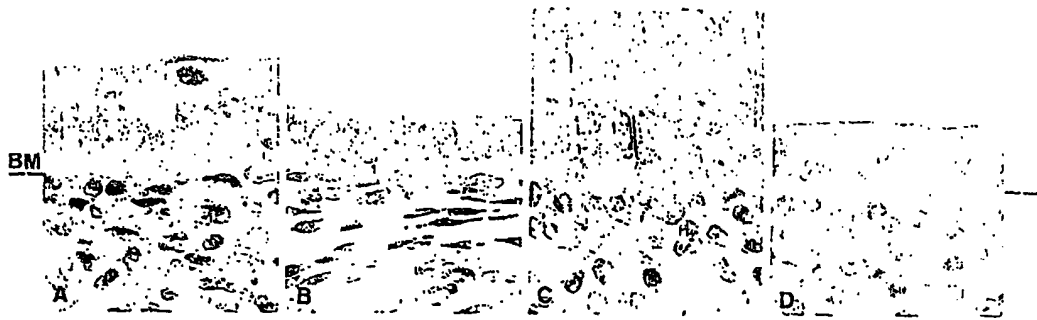


图 23

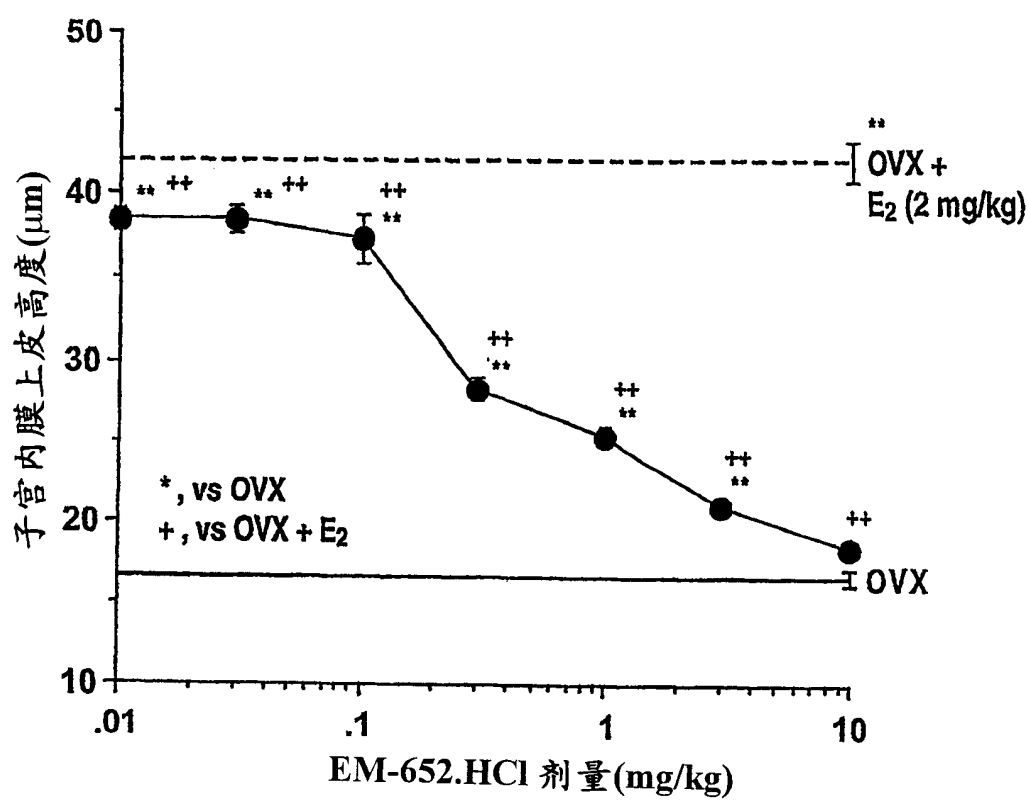


图 22

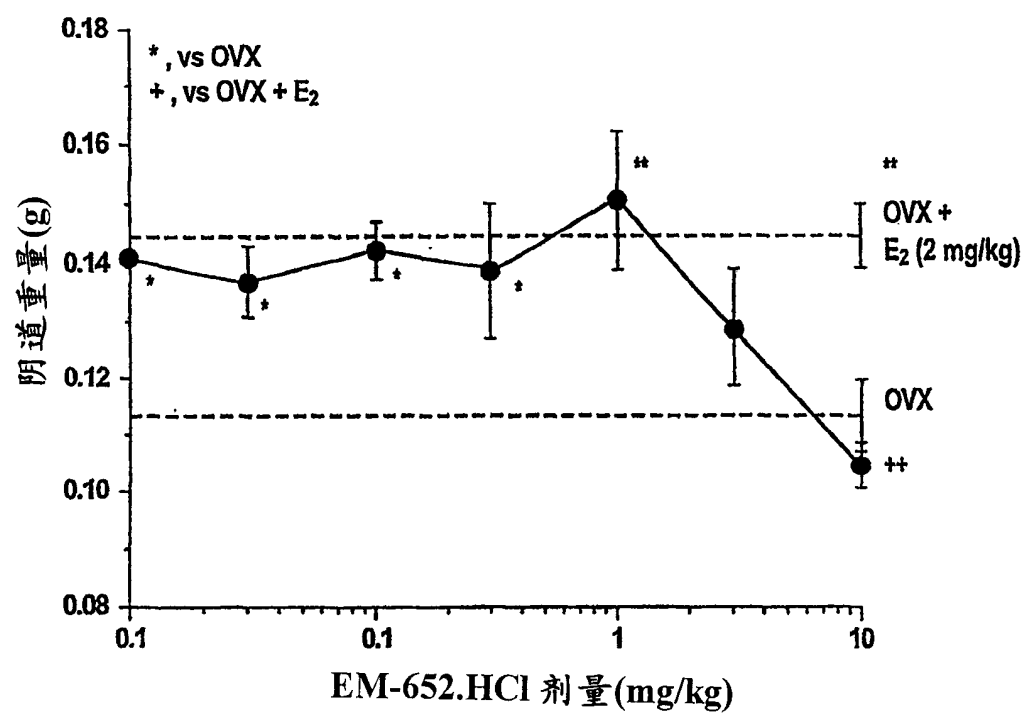


图 24

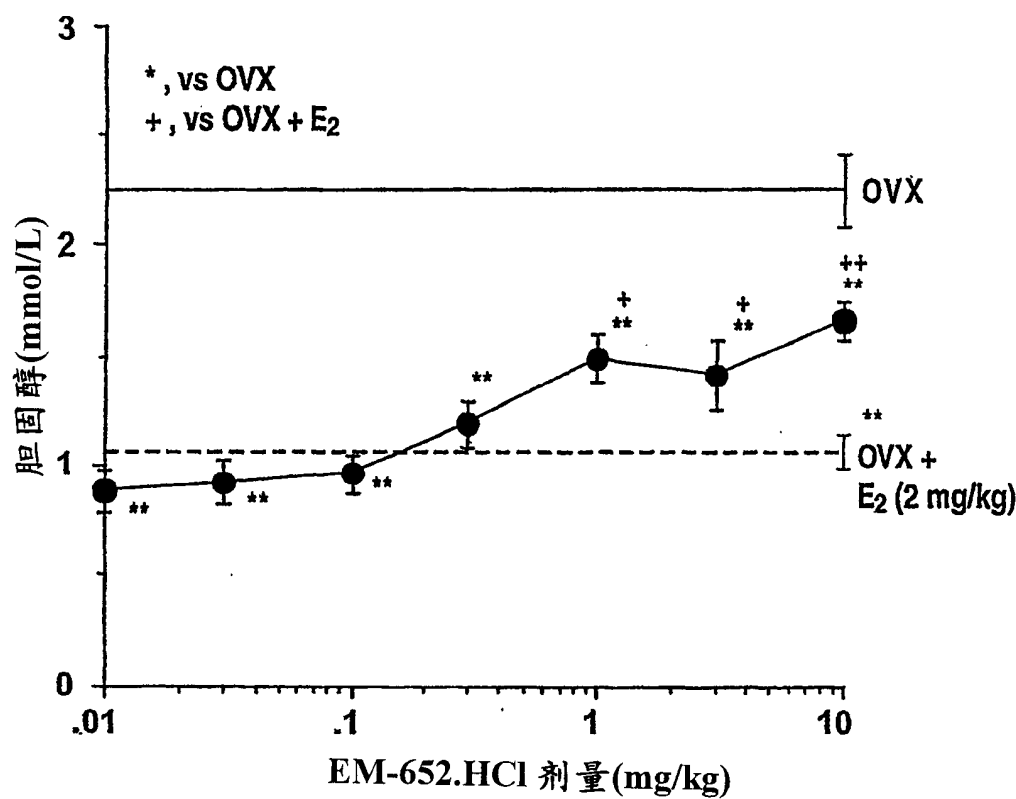


图 25