(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108348485 A
(43)申请公布日 2018.07.31

(21)申请号 201680067055.1

(22)申请日 2016.10.14

(30)优先权数据
15306649.3 2015.10.15 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.05.17

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2016/074697 2016.10.14

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/064247 EN 2017.04.20

(71)申请人 高级生物设计公司
地址 法国圣普列斯特

(72)发明人 I·塞兰 G·夸拾
M·佩雷斯阿莱阿 G·马丁

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 李华英

(51)Int.Cl.
A61K 31/131(2006.01)
A61K 31/137(2006.01)
A61K 31/136(2006.01)
A61K 31/4453(2006.01)
A61K 31/5375(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
G01N 33/50(2006.01)

权利要求书2页 说明书25页 附图7页

(54)发明名称

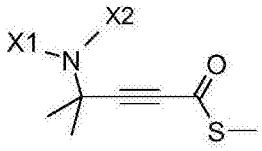
用于治疗癌症的氨基硫羟酸酯化合物或其药学上可接受的盐

(57)摘要

本发明涉及使用氨基硫羟酸酯化合物或其药学上可接受的盐、特别是使用S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯或其药学上可接受的盐、更具体地使用4-(二甲氨基)-4-甲基-2-戊炔硫代酸S-甲基酯富马酸盐治疗受试者的癌症的方法，其中所述受试者的癌细胞过度产生H_2O_2并且对于25000个细胞具有低于0.5nmol的GSH水平。本发明还涉及用于筛选受试者的方法，该受试者患有癌症并且极会可能得益于使用氨基硫羟酸酯化合物或其药学上可接受的盐、特别是使用S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯或其药学上可接受的盐、更具体地使用4-(二甲氨基)-4-甲基-2-戊炔硫代酸S-甲基酯富马酸盐治疗。

CN 108348485 A

1.用于治疗受试者的癌症的式(I)的化合物:



(I)

其中X1和X2相同或不同,其选自C_1-C_7烷基、苯基、苄基、或X1和X2与它们所连接的氮原子一起形成杂环,特别是哌啶或吗啉;

或其药学上可接受的盐;

其中所述受试者的癌细胞:

-与对照值相比过度产生H_2O_2;和

-具有低于0.5nmol GSH/25000个细胞的水平。

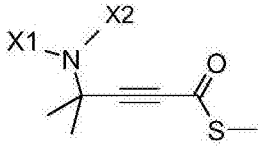
2.根据权利要求1的用于所述用途的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其中通过测定所述受试者的癌细胞中的H_2O_2水平和GSH水平来鉴定所述受试者。

3.根据权利要求2的用于所述用途的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其中通过对荧光强度水平定量来确定所述H_2O_2水平。

4.根据权利要求3的用于所述用途的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述H_2O_2水平高于20000相对荧光强度。

5.根据权利要求1-3任一项的用于所述用途的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其中在体外用式(I)的化合物或其药学上可接受的盐处理后,所述受试者的癌细胞还具有高于75ng MDA-加合物/μg总蛋白质的水平和/或高于1μg HNE-加合物/μg总蛋白质的水平。

6.用于筛选患有癌症并且极会能够得益于用式(I)的化合物或其药学上可接受的盐治疗的患者的方法:



(I)

其中X1和X2相同或不同,其选自C_1-C_7烷基、苯基、苄基、或X1和X2与它们所连接的氮原子一起形成杂环,特别是哌啶或吗啉;

其中该方法包含:

a.测定所述受试者的癌细胞样品中的H_2O_2水平;

b.比较步骤a.得到的水平与对照值;和

测定所述受试者的癌细胞样品中的GSH水平;

其中:

-所述受试者的所述癌细胞样品的H_2O_2水平高于对照值,且

-对于25 000个细胞所述受试者的所述癌细胞样品的GSH水平低于0.5nmol,

表明该受试者可能得益于用所述化合物或其药学上可接受的盐治疗。

7.根据权利要求6的方法,其中该方法包含:

a)测定所述受试者的癌细胞样品中的H_2O_2水平；

b)比较步骤a.得到的水平与对照值；

c)测定所述受试者的癌细胞样品中的GSH水平；和

d)在体外在所述受试者的癌细胞样品中用式(I)的化合物或其药学上可接受的盐处理后，测定MDA-加合物和/或HNE-加合物水平；

其中：

-所述受试者的所述癌细胞样品的H_2O_2水平高于对照值；

-对于25 000个细胞所述受试者的所述癌细胞样品的GSH水平低于0.5nmol；且

-高于75ng MDA-加合物/μg总蛋白质的水平和/或高于1μg HNE-加合物/μg蛋白质的水平，

表明该受试者可能得益于用所述化合物或其药学上可接受的盐治疗。

8.根据权利要求6或7任一项的方法，其中高于20000相对荧光强度的H_2O_2水平表明所述受试者可能得益于用式(I)的化合物或其药学上可接受的盐治疗。

9.根据权利要求2-5任一项的用于所述用途的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、或根据权利要求6-8任一项的方法，其中根据发光测定GSH水平。

10.根据权利要求5的用于所述用途的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、或根据权利要求7-9任一项的方法，其中通过免疫监测测定MDA-加合物水平和/或HNE-加合物水平。

11.根据权利要求1-5和9-10任一项的用于所述用途的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或根据权利要求6-10任一项的方法，其中所述癌症选自膀胱癌、脑瘤、乳腺癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、白血病、淋巴瘤、前列腺癌、宫颈癌、胃癌、肝癌、舌癌、卵巢癌、胰腺癌、肾癌、胸膜间皮瘤、骨肉瘤，肌肉癌、肺癌、肾癌、头颈癌、结肠癌、血癌、中枢神经系统癌症和肉瘤。

12.根据权利要求1-5和9-11任一项的用于所述用途的化合物或根据权利要求6-11任一项的方法，其中在所述式(I)的化合物中，X1和X2相同或不同，其选自甲基、苯基、苄基，X1或X2的至少一个为甲基，或X1和X2与它们所连接的氮原子一起形成哌啶或吗啉。

13.根据权利要求1-5和9-12任一项的用于所述用途的化合物或根据权利要求6-12任一项的方法，其中式(I)的化合物选自：

-S-甲基4-甲基-4-(哌啶-1-基)戊-2-炔硫代酸酯；

-S-甲基4-[苄基(甲基)氨基]-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯；

-S-甲基4-甲基-4-[甲基(苯基)氨基]戊-2-炔硫代酸酯；

-S-甲基4-甲基-4-(吗啉-4-基)戊-2-炔硫代酸酯；和

-S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯。

14.根据权利要求1-5和9-13任一项的用于所述用途的化合物或根据权利要求6-13任一项的方法，其中所述式(I)的化合物是S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯或其药学上可接受的盐。

15.根据权利要求14的用于所述用途的化合物或根据权利要求14的方法，其中所述药学上可接受的盐是4-(二甲氨基)-4-甲基-2-戊炔硫代酸S-甲基酯富马酸盐。

用于治疗癌症的氨基硫羟酸酯化合物或其药学上可接受的盐

技术领域

[0001] 本发明涉及使用氨基硫羟酸酯化合物或其药学上可接受的盐、特别是使用S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯或其药学上可接受的盐、更具体地使用4-(二甲氨基)-4-甲基-2-戊炔硫代酸S-甲基酯富马酸盐治疗受试者的癌症的方法，其中所述受试者的癌细胞过度产生H_2O_2并且对于25 000个细胞具有低于0.5nmol的GSH水平。本发明还涉及用于筛选受试者的方法，该受试者患有癌症并且极会可能得益于使用氨基硫羟酸酯化合物或其药学上可接受的盐、特别是使用S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯或其药学上可接受的盐、更具体地使用4-(二甲氨基)-4-甲基-2-戊炔硫代酸S-甲基酯富马酸盐治疗。

背景技术

[0002] 细胞的氧化还原平衡对于正常细胞生理学而言是关键。它由3个系统维持:GSH/GSSG;NADPH/NADP;硫氧还蛋白(还原)/硫氧还蛋白(氧化)。在这3个系统中,GSH/GSSG因其牵涉患病状态和合理的治疗方法的研发而得到最广泛研究(Townsend,A.J.,Leone-Kabler,S.,Haynes,R.L.,Wu,Y.,Szweda,L.和Bunting,K.D.(2001).Selective protection by stably transfected human ALDH3A1(but not human ALDH1A1)against toxicity of aliphatic aldehydes in V79cells.130-132,261-273)。与GSH/GSSG失调相关的患病状态包括大量的病理学情况,如癌症(Estrela,J.M.,Ortega,A.和Obrador,E.(2006).Glutathione in cancer biology and therapy.Crit.Rev.Clin.Lab.Sci.43,143-181;O'Brien,M.L.,and Tew,K.D.(1996).Glutathione and related enzymes in multidrug resistance.Eur.J.Cancer Oxf.Engl.1990 32A,967-978)。它们的一种常见病因学在于由ROS和/或活性氮(RNS)带来的氧化性应激,所述ROS和/或活性氮(RNS)首先导致谷胱甘肽(GSH)减少,这归因于ROS和RNS的直接解毒作用。这种初始的GSH减少后伴随GSH合成的代偿性增加,即细胞开始起作用以持续进行ROS/RNS的解毒、和因ROS攻击细胞脂质产生的新形成的亲电体产物(例如4-羟基壬烯醛(HNE)和丙二醛(MDA))的解毒(Esterbauer,H.,Schaur,R.J.和Zollner,H.(1991).Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal,malonaldehyde and related aldehydes.11,81-128)。

[0003] 已经报道了在不同的人癌症中ROS增加(Reuter,S.,Gupta,S.C.,Chaturvedi,M.M.和Aggarwal,B.B.(2010).Oxidative stress,inflammation,and cancer:how are they linked?Free Radic.Biol.Med.49,1603-1616)。

[0004] 癌细胞中的GSH奇异现象在于并非可以预期的胞内GSH缺乏,而是在许多不同癌细胞中确切地发现相反情况(Estrela,J.M.,Ortega,A.和Obrador,E.(2006).Glutathione in cancer biology and therapy.Crit.Rev.Clin.Lab.Sci.43,143-181)。但这种GSH增加具有负面的治疗反响,因为它防止癌细胞受到化疗和放疗影响(Carretero,J.,Obrador,E.,Esteve,J.M.,Ortega,A.,Pellicer,J.A.,Sempere,F.V.和Estrela,J.M.(2001).Tumoricidal activity of endothelial cells.Inhibition of endothelial nitric

oxide production abrogates tumor cytotoxicity induced by hepatic sinusoidal endothelium in response to B16melanoma adhesion in vitro.J.Biol.Chem.276,25775-25782)。

[0005] 此外,如果在癌细胞中必须获得低水平的GSH以使化学疗法有效,正常细胞则并非这种情况,因为正常细胞不会对其诱导附带损伤。

[0006] 目前用于降低细胞GSH的治疗方法在于对抗癌细胞的化学抗性、靶向GSH本身或涉及GSH合成、GSH降解和GSH流出的酶。已有10种GSH降低化合物作为抗癌剂处于临床试验的I、II和III期中(Tew,K.和Townsend D(2011)Redox platforms in cancer drug discovery and development.Curr.Opin.Chem.Biol.15,156-161)。

[0007] 但是,它们都必须与标准的抗癌药物联合施用,例如,环磷酰胺,泰素,长春新碱,美法仑等。

[0008] 此外,这些降低GSH的药物靶向的酶是参与GSH合成(γ谷氨酰基半胱氨酸连接酶)、GSH降解(γ-谷氨酰基转肽酶)和GSH流出(GSH-S-转移酶)的那些酶。然而,这些相同的酶对于保护正常细胞免受ROS攻击是必需的。因此,对正常细胞的附带损伤存在强烈的可能性,因为药物不能被选择性地递送至癌细胞和仅被递送至癌细胞。

[0009] 鉴于此,需要寻找其它特异性和选择性地靶向癌细胞中的GSH的治疗性解决方案。

发明内容

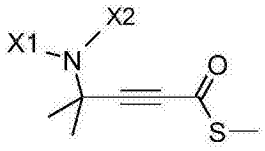
[0010] 本发明的发明人已经令人意外地发现,氨基硫羟酸酯化合物或其药学上可接受的盐、特别是S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯或其药学上可接受的盐能够治疗受试者的癌症,其中所述受试者的癌细胞过度产生H_2O_2。特别地,他们发现,氨基硫羟酸酯化合物或其药学上可接受的盐、特别是S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯或其药学上可接受的盐能够治疗受试者的癌症,其中所述受试者的癌细胞过度产生H_2O_2并且具有低于0.5nmol/25 000个细胞的GSH水平。

[0011] 不受任何理论的束缚,这些化合物,且特别是S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯或其药学上可接受的盐将增加由H_2O_2攻击产生的胞内代谢产物水平,同时GSH因此会在这些亲电子代谢产物的解毒中被消耗。因此,GSH不足可以被利用作为H_2O_2的清除剂起作用。因此,H_2O_2的水平应当增加并且应当触发细胞凋亡的线粒体(内在)途径中的H_2O_2-依赖性机制。因此,除了由于线粒体ETC(电子传递链)功能障碍导致的癌细胞中存在高水平的H_2O_2外,这些化合物且特别是S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯或其药学上可接受的盐还可以诱导H_2O_2的额外表达,导致癌细胞超过其凋亡阈值。相反,在未受H_2O_2攻击的正常细胞中,胞内GSH水平已经很高(由于不存在H_2O_2),使得不存在H_2O_2-诱导的亲电体,这些亲电体将被用于在其癌症对应物中特异性增加它们的疗法靶向。

[0012] 这种新疗法呈现以下优点:正常细胞被幸免,因为它们较少受到H_2O_2攻击,并且可以被比拟为已知的GSH体内平衡pertubators(例如胡椒亭(PLM)和小白菊内酯(partenolide)(PTL))((Pei,S等人J.Biol.Chem.(2013)Targeting aberrant glutathione metabolism to eradicate human acute myelogenous leukemic cells;288,33542.-33548),它们处于临床试验中并且与标准化疗剂组合使用,本发明的化合物且特别是S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯或其药学上可接受的盐作为单一-药

物疗法是有效的。

[0013] 因此，本发明涉及用于治疗受试者的癌症的(I)的化合物或其药学上可接受的盐：

[0014] 

(I)

[0015] 其中X1和X2相同或不同，其选自C_1-C_7烷基、苯基、苄基，或X1和X2与它们所连接的氮原子一起形成杂环，特别是哌啶或吗啉；

[0016] 其中所述受试者的癌细胞：

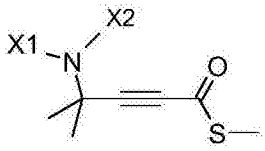
[0017] -与对照值相比过度产生H_2O_2；和/或

[0018] -具有低于0.5nmol/25 000个细胞的GSH水平。

[0019] 特别地，在体外用式(I)的化合物或其药学上可接受的盐处理后，所述受试者的癌细胞还具有高于75ng MDA-加合物/μg总蛋白质的水平和/或高于1μg HNE-加合物/μg总蛋白质的水平。

[0020] 特别地，通过测定所述受试者的癌细胞中的H_2O_2水平和GSH水平鉴定所述受试者。

[0021] 本发明还涉及用于筛选受试者的方法，所述受试者患有癌症并且极会能够得益于使用式(I)的化合物或其药学上可接受的盐治疗：

[0022] 

(I)

[0023] 其中X1和X2相同或不同，其选自C_1-C_7烷基、苯基、苄基、或X1和X2与它们所连接的氮原子一起形成杂环，特别是哌啶或吗啉；

[0024] 其中该方法包含：

[0025] a)测定所述受试者的癌细胞样品中的H_2O_2水平；

[0026] b)将步骤a.得到的水平与对照值进行比较；和

[0027] c)测定所述受试者的癌细胞样品中的GSH水平；

[0028] 其中：

[0029] -所述受试者的所述癌细胞样品的H_2O_2水平高于对照值，和

[0030] -所述受试者的所述癌细胞样品的GSH水平低于0.5nmol/25000个细胞，

[0031] 这表明该受试者极会能够得益于使用所述化合物或其药学上可接受的盐治疗。

[0032] 在一个实施方案中，所述方法包含：

[0033] a)测定所述受试者的癌细胞样品中的H_2O_2水平；

[0034] b)将步骤a.得到的水平与对照值进行比较；

[0035] c)测定所述受试者的癌细胞样品中的GSH水平；和/或

[0036] d)测定在体外用本发明式(I)的化合物或其药学上可接受的盐处理后所述受试者的癌细胞样品中的MDA-加合物水平和/或HNE-加合物水平；

[0037] 其中：

[0038] -所述受试者的所述癌细胞样品的H_2O_2水平高于对照值；

[0039] -所述受试者的所述癌细胞样品的GSH水平低于0.5nmol/25000个细胞；和/或

[0040] -高于75ng MDA-加合物/μg总蛋白质的水平、和/或高于1μg HNE-加合物/μg蛋白质的水平，

[0041] 这表明该受试者极会能够得益于使用所述化合物或其药学上可接受的盐治疗。

[0042] 如本文所述，“H_2O_2”是指“过氧化氢”并且是本领域技术人员众所周知的。它代表含有氧的化学活性分子。它作为氧的正常代谢的天然副产物而形成，并且在细胞信号传导和体内平衡中具有重要作用。然而，在环境压力期间(例如UV或热暴露)，其水平可能显著增加。这可能会导致对细胞结构的显著损害。累积地，这称作氧化性应激。过氧化氢也由外源(如电离辐射)产生。

[0043] 特别地，高于包含在2 000至400 000之间的相对荧光强度(例如10 000至100 000之间的相对荧光强度、或15 000至100 000相对荧光强度、且更特别是高于20000相对荧光强度、甚至更特别是高于21 598相对荧光强度)的值的H_2O_2水平表明所述受试者会能够得益于使用式(I)的化合物或其药学上可接受的盐治疗。

[0044] 具体地，高于在2 000至400 000之间的相对荧光强度(例如10 000至100 000之间的相对荧光强度、或15 000至100 000相对荧光强度的值的水平、且更特别是高于20 000相对荧光强度、甚至更特别是高于21 598相对荧光强度)的H_2O_2水平使用总ROS/过氧化物检测试剂盒(Enzo life science)测定，更特别地如用Appl iskan荧光微量平板读数器(Thermo Scientific)(Ex/Em＝488/520nm和Ex/Em＝550/610nm)所测定的。

[0045] 如果通过测定荧光强度在本文和本说明书的其它部分给出H_2O_2的截断值水平，则该方法是非排他性的，并且可以通过本领域技术人员可利用的任意其它方法来测定H_2O_2的截断值水平，确定将截断值设置在何处的参数是本发明的产品的IC_{50}与H_2O_2的水平之间的相关性。IC_{50}是本领域技术人员公知的量度。

[0046] 如本文所述，“GSH”是指“谷胱甘肽”并且是本领域技术人员众所周知的。它是在谷氨酸侧链的羧基与半胱氨酸的胺基之间具有γ肽键的三肽，并且半胱氨酸的羧基通过正常肽键与甘氨酸连接。

[0047] 特别地，在本发明的范围内，对于25,000个细胞，GSH水平低于0.5nmol，特别是对于25,000个细胞低于0.45nmol，且更具体地对于25,000个细胞低于0.4nmol。

[0048] GSH的水平由本领域技术人员可利用的任意方法测定。例如，GSH的水平由发光确定，例如用Promega GSH-Glo试剂盒(Promega)测定。

[0049] 如果GSH的截断值水平通过发光形式在本文和本说明书的其它部分给出，则该方法是非排他性的，并且可以通过本领域技术人员可利用的任意其它方法来测定GSH的截断值水平。

[0050] 如本文所述，“MDA”用于“丙二醛”，即具有式$CH_2(CHO)_2$的有机化合物。该反应种类是本领域技术人员众所周知的且天然存在，并且是细胞中的标记脂质过氧化物。另外，本发明的“MDA-加合物”是在MDA与癌细胞的蛋白质之间以及与癌细胞的DNA之间形成的加合物。

[0051] 特别地，在本发明范围内，用本发明的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐体外处理后的MDA-加合物水平高于75ng/μg总蛋白质，特别是高于90ng/μg总蛋白质，且更具体地为高于100ng/μg总蛋白质。MDA-加合物的水平通过本领域技术人员可利用的任意方法测

定。例如,MDA-加合物的水平通过免疫监测测定,例如使用OxiSelect™MDA-加合物竞争性ELISA试剂盒(CELL BIOLABS)。

[0052] 如本文所述,“HNE”用于“4-羟基-2-壬烯醛”,即“式$C_9H_{16}O_2$”的有机化合物。该反应种类是本领域技术人员众所周知的且天然存在,并且是细胞中的标记脂质过氧化物。

[0053] 另外,本发明的“HNE-加合物”是HNE与癌细胞蛋白质之间形成的加合物以及与癌细胞的GSH形成的加合物。

[0054] 特别地,在本发明范围内,用本发明式(I)的化合物或其药学上可接受的盐体外处理后的HNE-加合物水平高于750ng/μg总蛋白质,特别是高于900ng/μg总蛋白质,更特别是高于1μg/μg总蛋白质。

[0055] HNE-加合物的水平通过本领域技术人员可用的任何方法确定。例如,HNE-加合物的水平通过免疫监测确定,例如用OxiSelect™HNE-加合物竞争性ELISA试剂盒(CELL BIOLABS)。

[0056] 所述“总蛋白”是指癌细胞总蛋白的含量。

[0057] 所述“体外使用本发明式(I)的化合物或其药学上可接受的盐处理”是指在体外对受试者的癌细胞样品的处理步骤后测定的MDA-加合物的水平和/或HNE-加合物的水平,例如,在实验部分中所述的条件下,考量了本发明式(I)的化合物或其药学上可接受的盐的剂量,可以将其施用至60μM。

[0058] 所述“C_1-C_7烷基”是指可以为直链或支链的在链上具有1-7个碳原子的脂族-烃基,另有指定的除外。具体地,烷基在链上具有1-3个碳原子(C_1-C_3烷基)。支链是指一个或多个烷基例如甲基、乙基或丙基连接至直链烷基链。示例性的烷基包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、2,2-二甲基丁基、正戊基、正己基、辛基,特别是甲基。

[0059] 特别地,式(I)的化合物是如上所述的化合物,其中X1和X2相同或不同,其选自甲基、苯基、苄基,X1或X2的至少一个为甲基,或其中X1和X2与它们所连接的氮原子一起形成哌啶或吗啉。

[0060] 更具体地,所述化合物选自:

[0061] -S-甲基4-甲基-4-(哌啶-1-基)戊-2-炔硫代酸酯;

[0062] -S-甲基4-[苄基(甲基)氨基]-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯;

[0063] -S-甲基4-甲基-4-[甲基(苯基)氨基]戊-2-炔硫代酸酯;

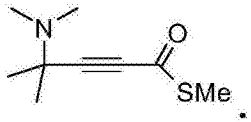
[0064] -S-甲基4-甲基-4-(吗啉-4-基)戊-2-炔硫代酸酯;和

[0065] -S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯。

[0066] 在一个优选的实施方案中,所述化合物是S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯。

[0067] 可以通过本领域技术人员众所周知的方法制备这些化合物。特别地,可以由BuLi、COS和MeI依次处理的相应的炔胺制备这些化合物。详细的制备方法可以在例如G.Quash等人,European Journal of Medicinal Chemistry 43(2008)906-916中找到,其内容通过引用并入,特别是材料和方法章节的第2部分。

[0068] S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯(CAS编号350229-29-7,分子量:185.29g.mol^{-1},分子式:$C_9H_{15}NOS$),也在DIMATE下已知的是式(II)的化合物:

[0069] 

(II)

[0070] 该化合物及其制备方法描述在专利EP1296946中(特别是实施例1),其内容通过引用并入。

[0071] 所述式(I)的化合物的“药学上可接受的盐”是指通过形成其酸式或碱式盐修饰的化合物。药学上可接受的盐包括化合物的常规的无毒性盐或季铵盐,例如来自无毒性无机或有机酸。例如,这类常规的无毒性盐包括那些如富马酸盐,磷酸盐,柠檬酸盐,盐酸盐(chlorydrate)等。式(I)的化合物的药学上可接受的盐可以通过常规化学方法由母体化合物合成。通常,这类盐可以通过使这些化合物的游离酸或碱形式与化学计量量的适当的碱或酸在水中或在有机溶剂中或在这两者的混合物中反应来制备。通常,非水介质如乙醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈是优选的。适合的盐的清单可以在Remington's Pharmaceutical Sciences,第17版,Mack Publishing Company,Easton,PA,1985,p.1418中找到。

[0072] 特别地,式(I)的化合物是S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯,且其药学上可接受的盐是其富马酸盐,即4-(二甲氨基)-4-甲基-2-戊炔硫代酸S-甲基酯富马酸盐(分子量:301.4g.mol^{-1},分子式:$C_{13}H_{19}NO_5S$)。这类富马酸盐可以由S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯在无水乙醚中通过添加富马酸在无水乙醇中的溶液来制备。单-富马酸盐通过过滤采集,用乙醚洗涤并干燥。

[0073] 在本发明的范围内,式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯或其药学上可接受的盐、特别是4-(二甲氨基)-4-甲基-2-戊炔硫代酸S-甲基酯富马酸盐可以与术语“本发明的化合物”互换使用。

[0074] 如本文所用,作为名词或动词使用的术语“治疗”是指治疗性治疗,其目的是消除或减轻症状。有益的或期望的临床结果包括但不限于症状的消除,症状的减轻,病症程度的降低,病症状况的稳定(即,不恶化),病症的延迟或减缓,疾病或障碍或其一种或多种症状的发作、复发或扩散的预防。在某些实施方案中,该术语是指在症状发作之前用本文提供的化合物治疗或施用该化合物。该术语包括抑制或减轻特定疾病的症状。在某些实施方案中,具有疾病家族史的受试者特别是治疗方案的候选者。此外,在某些实施方案中,已显示特定疾病的遗传倾向的受试者是治疗方案的候选者。此外,有复发症状史的受试者也是治疗的潜在候选者。在这方面,术语“治疗”可以与术语“预防性治疗”互换使用。

[0075] 如本文所用且除非另有定义,否则"癌症"是指体内异常细胞的生长、分裂或增殖。本发明的癌症是这样的癌症,其中与对照值相比观察到H_2O_2过度产生,特别是这样的癌症,其中既存在与对照值相比观察到H_2O_2过度产生,又存在对于25000个细胞低于0.5nmol的GSH水平。这类癌症包括、但不限于膀胱癌、脑瘤、乳腺癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、白血病、淋巴瘤、前列腺癌、宫颈癌、胃癌、肝癌、舌癌、卵巢癌、胰腺癌、肾癌、胸膜间皮瘤、骨肉瘤、肌肉癌、肺癌、肾癌、头颈癌、结肠癌、血癌、中枢神经系统癌症和肉瘤;更具体地选自膀胱癌、脑瘤、多发性骨髓瘤、宫颈癌、胃癌、肝癌、舌癌、卵巢癌、胰腺癌、肾癌、胸膜间皮瘤、骨肉瘤,肌肉癌、肾癌、头颈癌、结肠癌、血癌、白血病、中枢神经系统癌症和肉瘤。

[0076] 照此，本发明还涉及式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，特别是S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯或其药学上可接受的盐，其用于本发明的用途或本发明的方法，其中所治疗的癌症选自膀胱癌、脑瘤、乳腺癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、白血病、淋巴瘤、前列腺癌、宫颈癌、胃癌、肝癌、舌癌、卵巢癌、胰腺癌、肾癌、胸膜间皮瘤、骨肉瘤，肌肉癌、肺癌、肾癌、头颈癌、结肠癌、血癌、中枢神经系统癌症和肉瘤；特别是选自膀胱癌、脑瘤、多发性骨髓瘤、宫颈癌、胃癌、肝癌、舌癌、卵巢癌、胰腺癌、肾癌、胸膜间皮瘤、骨肉瘤、肌肉癌、肾癌、头颈癌、结肠癌、血癌、白血病、中枢神经系统癌症和肉瘤。

[0077] 仍然特别地，所述癌症是化疗抗性的和/或放疗抗性的癌症。

[0078] 所述“化疗抗性”是指如本文所述的针对化疗不起作用或停止作用的癌症。

[0079] 所述“放疗抗性”是指如本文所述的针对放疗不起作用或停止作用的癌症。

[0080] 特别地，所述癌症是这样的癌症，其中在用式(I)的化合物或其药学上可接受的盐体外处理后，观察到MDA-加合物水平高于75ng/μg总蛋白质、和/或HNE-加合物水平高于1μg/μg总蛋白质。

[0081] 如本文所用，术语“受试者”是指患有或可能患有一种或多种如本文所述的疾病和病症的温血动物，例如哺乳动物、动物或人类，特别是人类，且患有一种或多种本文所述的疾病和病症或具有患所述疾病或病症的可能性，且更具体地，其中与对照值相比，癌细胞过度产生H_2O_2，并且甚至更具体地，其中癌细胞与对照值相比过度产生H_2O_2、并且对于25,000个细胞具有低于0.5nmol的GSH水平。仍然具体地，与对照值相比过度产生H_2O_2的所述受试者的、并且对于25,000个细胞具有低于0.5nmol的GSH水平的癌细胞是化疗抗性的和/或放疗抗性的癌细胞。甚至更具体地，与对照值相比过度产生H_2O_2的所述受试者的、更具体地与对照值相比过度产生H_2O_2、并且对于25,000个细胞具有低于0.5nmol的GSH水平的癌细胞，还具有在体外用式(I)的化合物或其药学上可接受的盐进行处理后高于75ng MDA-加合物/μg总蛋白质的水平、和/或高于1μg HNE-加合物/μg总蛋白质的水平。

[0082] 如本文所用，术语“过度产生”描述一种情况，其中在患病细胞或组织中，与称作对照值的相应的对照细胞或组织相比，化合物以过多的形式产生。

[0083] 特别地，本发明由此涉及用于本发明用途的化合物，其中通过测定所述受试者的癌细胞中的H_2O_2水平和GSH水平来鉴定所述受试者。在一个实施方案中，在体外使用本发明式(I)的化合物或其药学上可接受的盐处理后，还通过测定MDA-加合物水平和/或HNE-加合物水平来鉴定所述受试者。

[0084] 例如，可以通过本领域技术人员已知的任意方法测定H_2O_2水平，例如，通过测定相对荧光强度水平，其可以例如使用总ROS/超氧化物检测试剂盒(Enzo life science)进行，特别地如使用Appl iskan荧光微量平板读数器(Thermo Scientific)(Ex/Em＝488/520nm和Ex/Em＝550/610nm)所测定的。

[0085] 特别地，本发明由此涉及用于本发明用途的化合物，其中所述H_2O_2水平通过定量荧光强度水平来确定。

[0086] 更具体地，本发明涉及用于本发明用途的化合物，其中所述H_2O_2水平高于包含在2 000-400 000相对荧光强度(例如10 000-100 000相对荧光强度或15 000-100 000相对荧光强度)范围内的值，且更具体地，H_2O_2水平高于20 000相对荧光强度，甚至更具体地，高于21 598相对荧光强度。

[0087] 本领域技术人员易于理解，适合于测定细胞H_2O_2水平的任意其它参数可以与本发明结合使用。

[0088] 因此，可以在不脱离本发明范围的情况下使用本领域技术人员已知用于检测H_2O_2水平的任意其它方法。

[0089] 特别地，本发明由此涉及用于本发明用途的化合物，其中通过定量荧光强度水平来测定所述H_2O_2水平，这归因于使用了总ROS/超氧化物检测试剂盒(Enzo life science)，更具体地，如使用Appl iskan荧光微量平板读数器(Thermo Scientific)(Ex/Em＝488/520nm和Ex/Em＝550/610nm)所测定的。

[0090] 如果实验部分中所用的方法为根据平均荧光强度确定H_2O_2水平，则还认为该方法是非排他性的，并且可以通过本领域技术人员任意其它可利用的方法测定H_2O_2水平。

[0091] 可以通过本领域技术人员可利用的任意方法测定GSH水平。例如，根据发光确定GSH水平，例如使用Promega GSH-Glo试剂盒(Promega)。

[0092] 本领域技术人员易于理解，适合于测定细胞GSH水平的任意其它参数可以与本发明结合使用。

[0093] 因此，可以在不脱离本发明范围的情况下使用本领域技术人员已知用于检测GSH水平的任意其它方法。

[0094] 特别地，本发明由此涉及用于本发明用途的化合物，其中所述GSH水平根据发光确定，更具体地为使用Promega GSH-Glo试剂盒(Promega)。

[0095] 可以通过本领域技术人员可利用的任意方法测定MDA-加合物水平。例如，通过免疫监测测定MDA-加合物水平，例如使用OxiSelect™MDA-加合物竞争性ELISA试剂盒(CELL BIOLABS)。

[0096] 本领域技术人员易于理解，适合于测定细胞MDA-加合物水平的任意其它参数可以与本发明结合使用。

[0097] 因此，可以在不脱离本发明范围的情况下使用本领域技术人员已知用于检测MDA-加合物水平的任意其它方法。

[0098] 因此，在一个实施方案中，在体外用本发明式(I)的化合物或其药学上可接受的盐处理后测定MDA-加合物水平。

[0099] 可以通过本领域技术人员可利用的任意方法测定HNE-加合物水平。例如，通过免疫监测测定HNE-加合物水平，例如使用OxiSelect™HNE-加合物竞争性ELISA试剂盒(CELL BIOLABS)。

[0100] 本领域技术人员易于理解，适合于测定细胞HNE-加合物水平的任意其它参数可以与本发明结合使用。

[0101] 因此，可以在不脱离本发明范围的情况下使用本领域技术人员已知用于检测HNE-加合物水平的任意其它方法。

[0102] 因此，在一个实施方案中，在体外用本发明式(I)的化合物或其药学上可接受的盐处理后测定HNE-加合物水平。

[0103] 如本文所用，术语"样品"是指生物来源的物质。生物样品的实例包括、但不限于体液样品和活检样品。体液包括血液、尿、唾液或任意其它身体分泌物或其衍生物。如本文所用，"血液"包括全血、血浆、血清、循环上皮细胞、血液成分或任意血液衍生物。本发明的生

物样品可以通过本领域技术人员已知的任意适合的采样方式得自受试者。

[0104] 为了测定癌细胞中的H_2O_2水平、GSH水平和/或MDA-加合物和/或HNE加合物水平，样品特别是肿瘤活检组织，例如膀胱肿瘤、脑瘤、乳腺肿瘤、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、白血病肿瘤、淋巴瘤、前列腺肿瘤、宫颈瘤、胃瘤、肝肿瘤、舌瘤、卵巢肿瘤、胰腺肿瘤、肾肿瘤、胸膜间皮瘤、骨肉瘤、肌肉肿瘤、肺肿瘤、肾肿瘤、头颈癌肿瘤、结肠肿瘤、血液肿瘤、中枢神经系统肿瘤和肉瘤的活检组织。

[0105] 在H_2O_2水平的比较方面，优选在与癌细胞样品或癌样品相同组织来源的样品中、且更优选在与癌细胞样品或相同受试者的癌样品相同组织来源的样品中测定对照值。

[0106] 优选地，“对照值”相当于H_2O_2的正常水平。

[0107] 如本文所预期的，H_2O_2的“正常水平”是指样品中H_2O_2的水平在H_2O_2的标准截断值内。该标准取决于样品类型以及用于测定样品中H_2O_2水平的方法。特别地，H_2O_2的参比值由此可以相当于正常细胞中、优选相同组织且更优选相同受试者的相同组织中不存在H_2O_2、或H_2O_2的基线水平、或相当于与NAC一起温育的癌细胞、优选相同组织且更优选相同受试者的相同组织中的H_2O_2值。

[0108] NAC是羟自由基的强力(avid)清除剂(速率常数：$1.36x10^{10}M^{-1},s^{-1}$)，但它与过氧化氢缓慢地反应(速率常数：$0.38XM^{-1},s^{-1}$)，并且未表现出与超氧阴离子反应(Aruoma等人；Free Radic Biol Med,(1989)The antioxidant activity of N-acetyl cysteine:its reaction with hydrogen peroxide,hydroxy radical,superoxide anion,and hypochlorous acid:,6,593-597)。

[0109] 如果受试者的癌样品中的H_2O_2水平增加至高于H_2O_2的正常水平，则水平被视为具有统计学较高的水平。特别地，如果与H_2O_2水平的对照值相比，患者的癌样品中的H_2O_2水平增加约至少10或15或20或25或30或35或40或45或50或60或70或80或90或100或200或300或400或500或600％，则H_2O_2的水平被视为统计学较高的水平。

[0110] 按照相同方式，如果受试者的癌样品中的H_2O_2水平增加至高于H_2O_2的正常水平，更具体地，与H_2O_2水平的对照值相比增加约至少10或15或20或25或30或35或40或50或60或70或80或90或100或200或300或400或500或600％，特别是增加约300％，则水平被视为产生过度的。

[0111] 如果受试者的癌样品中的H_2O_2水平增加至高于与NAC一起温育的癌细胞中的H_2O_2水平，则水平被视为具有统计学较高的水平。特别地，如果与和NAC一起温育的癌样品、优选相同组织样品且更优选相同受试者的相同组织的H_2O_2水平值相比，患者的癌样品中的H_2O_2水平增加约至少10或15或20或25或30或35或40或50或60或70或80或90或100或200或300或400或500或600％，则H_2O_2的水平被视为统计学较高的水平。

[0112] 按照相同方式，如果受试者的癌样品中的H_2O_2水平增加至高于与NAC一起温育的癌细胞中的H_2O_2水平，更具体地，与H_2O_2水平的对照值相比增加约至少10或15或20或25或30或35或40或45或50或60或70或80或90或100或200或300或400或500或600％，则水平被视为产生过度的。

[0113] 可以将对照值确定为基于在对照细胞群(即正常细胞)中测定的H_2O_2水平确定的单一值或数值范围，特别是在作为癌细胞的相同组织来源的正常细胞群中所测定的，并且更具体地来自相同的受试者，即与NAC一起温育的癌细胞，特别是在与NAC一起温育的具有相

同组织来源且更具体地是来自相同受试者的癌细胞群中。

[0114] 根据本发明待治疗的受试者的鉴定依赖于来自癌细胞样品的H_2O_2水平与如上所述的对照值的比较。其中对照值可以是预定值或与测量值一起确定的值。

[0115] 典型地，基于测定的H_2O_2水平将分析的群分成分位数。可以将对照值定义为中位数，或第二个三分位数，或第二或第三个四分位数，或第三个或第四个五分位数等。

[0116] H_2O_2的对照值可以根据用于测定的方法的不同而改变。

[0117] 在一个实施方案中，当所治疗的癌症是白血病时，使用HL60细胞中的H_2O_2水平测定参比值。HL60细胞系是已建立的本领域技术人员众所周知的人前髓细胞性白血病细胞系。

[0118] 特别地，在所述实施方案中，如果“y”高于2x/3，“x”为HL60细胞中的H_2O_2水平，且“y”为受试者的癌样品中的H_2O_2水平，则H_2O_2的水平被视为统计学较高的水平或产生过度的。

[0119] 可以将对照值确定为基于在对照细胞群(即HL60细胞)中测定的H_2O_2水平确定的单一值或数值范围。

[0120] 典型地，基于测定的H_2O_2水平将分析的群分成分位数。可以将对照值定义为中位数，或第二个三分位数，或第二或第三个四分位数，或第三个或第四个五分位数等。H_2O_2的对照值可以根据用于测定的方法的不同而改变。

[0121] 当所治疗的癌症是白血病时，与对于HL60细胞描述相同的比较方法适用于下表1中提及的癌症类型，其中以下相应的细胞系作为参比值。

[0122] 表1

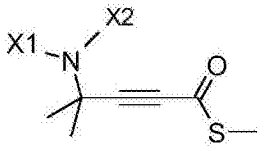
[0123]

癌症类型	参比的细胞系
膀胱	HT-1197
血液	HL-60
脑	CGL-1
乳腺	MDA-MB-231
结肠	Lovo
头颈	Fadu

[0124] 本发明还涉及治疗受试者的癌症的方法，其中所述受试者的癌细胞与对照值相比过度产生H_2O_2，且特别是与对照值相比过度产生H_2O_2并且对于25 000个细胞具有低于0.5nmol的GSH水平，该方法包含施用治疗有效量的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，特别是S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯或其药学上可接受的盐，更具体地为4-(二甲氨基)-4-甲基-2-戊炔硫代酸S-甲酯富马酸盐。

[0125] 在一个实施方案中，所述受试者的所述癌细胞在体外用式(I)的化合物或其药学上可接受的盐处理后还具有高于75ng MDA-加合物/μg总蛋白质的水平、和/或高于1μg HNE-加合物/μg总蛋白质的水平。

[0126] 在一个实施方案中，本发明还涉及用于筛选患有癌症并且极会能够得益于使用式(I)的化合物或其药学上可接受的盐治疗的受试者的方法：

[0127] 

(I)

[0128] 其中X1和X2相同或不同，其选自C_1-C_7烷基、苯基、苄基、或X1和X2与它们所连接的氮原子一起形成杂环，特别是哌啶或吗啉；

[0129] 其中所述方法包含：

[0130] a.测定所述受试者的癌细胞样品中的H_2O_2水平；

[0131] b.将步骤a.得到的水平与对照值进行比较；和

[0132] c.测定所述受试者的癌细胞样品中的GSH水平；

[0133] 其中如果：

[0134] -所述受试者的癌细胞样品的H_2O_2水平高于对照值；且

[0135] -所述受试者的所述癌细胞样品的GSH水平低于0.5nmol/25000个细胞，

[0136] 则所述方法还包含：

[0137] d)用式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、特别是S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯或其药学上可接受的盐治疗所述受试者。

[0138] 在一个实施方案中，所述方法包含：

[0139] a.测定所述受试者的癌细胞样品中的H_2O_2水平；

[0140] b.将步骤a.得到的水平与对照值进行比较；

[0141] c.测定所述受试者的癌细胞样品中的GSH水平；和/或

[0142] c’测定体外用本发明式(I)的化合物或其药学上可接受的盐处理后所述受试者的癌细胞样品中的MDA-加合物和/或HNE-加合物水平；

[0143] 其中，如果：

[0144] -所述受试者的癌细胞样品的H_2O_2水平高于对照值；

[0145] -所述受试者的所述癌细胞样品的GSH水平低于0.5nmol/25000个细胞；和/或

[0146] -MDA-加合物水平高于75ng/μg总蛋白质、和/或HNE-加合物水平高于1μg/μg蛋白质，

[0147] 则所述方法还包含：

[0148] d)用式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、特别是S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯或其药学上可接受的盐治疗所述受试者。

[0149] 本发明的化合物可以通过不同的合成路径制备。试剂和原料是商购的或易于通过本领域技术人员众所周知的技术合成。

[0150] 需要治疗本文所述疾病和病症的受试者的鉴定如上所述进行，并且在本领域技术人员的能力和知识范围内。本领域技术人员可以通过上述举出的技术容易地识别需要这类治疗的那些受试者。

[0151] 通过使用常规技术并观察在类似情况下获得的结果，作为本领域技术人员的主治诊断医师可以容易地确定治疗有效量。在确定治疗有效量的过程中，主治诊断医师考虑许多因素，包括但不限于：受试者的种类；其身材大小、年龄和一般健康状况；所涉及的特定疾

病;疾病的牵涉程度或严重程度;个体受试者的反应;所施用的具体化合物;施用模式;所施用制剂的生物利用度特征;所选剂量方案;伴随药物的应用;以及其它相关情况。

[0152] 如本文所用,“治疗有效量”是指有效减少、消除、治疗或控制本文所述疾病和病症的症状的量。术语“控制”旨在指代所有的过程,其中可以为减缓、中断、阻止或停止本文所述的疾病和病症的进展,但并不一定表示完全消除所有疾病和病症症状,并且意在包括预防性治疗和长期使用。

[0153] 达到所期望的生物效应所需的本发明的化合物的量将根据许多因素而变化,包括待施用药物的剂量,所用化合物的化学特性(例如疏水性),化合物的效力,疾病的类型,患者的患病状态和施用途径。

[0154] 可以通过与一种或多种药学上可接受的赋形剂混合将根据本发明的化合物配制成药物组合物。

[0155] 如本文所用,“药学上可接受的赋形剂”是指当适当时对哺乳动物、尤其是人施用时不产生不良反应、过敏反应或其它不利反应的分子实体和组合物。药学上可接受的赋形剂是指任何类型的无毒性固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包封材料或制剂助剂。

[0156] 可以制备这类用于口服施用的组合物,特别是片剂或胶囊形式,特别是口腔可分散的(lyoc)片剂形式;或胃肠外施用的组合物,特别是液体溶液、混悬液或乳剂的形式。

[0157] 可以通过制药领域中众所周知的任意方法制备,例如如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版;Gennaro,A.R.,Ed.;Lippincott Williams&Wilkins:Philadelphia,PA,2000中所述。可以包括药学上相容的粘合剂和/或助剂材料作为组合物的组成部分。口服组合物通常包括惰性稀释剂载体或可食用载体。它们可以以单位剂量形式施用,其中术语“单位剂量”是指能够施用于患者并且易于处理和包装的单一剂量,保持为物理和化学稳定的单位剂量,其包含活性化合物本身或作为药学上可接受的组合物,如下文所述。

[0158] 片剂、丸剂、粉末剂、胶囊剂、锭剂等可包含任何以下组分或类似性质的化合物的一种或多种:粘合剂如微晶纤维素或黄蓍树胶;稀释剂如淀粉或乳糖;崩解剂例如淀粉和纤维素衍生物;润滑剂例如硬脂酸镁;助流剂如胶体二氧化硅;甜味剂如蔗糖或糖精;或矫味剂如薄荷或甲基水杨酸甲酯。胶囊可以是硬胶囊或软胶囊的形式,其通常由任选与增塑剂共混的明胶配混物以及淀粉胶囊制成。另外,剂量单位形式可以包含改变剂量单位的物理形式的各种其它材料,例如糖、虫胶或肠溶剂的包衣衣料。其它口服剂型糖浆或酏剂可包含甜味剂、防腐剂、染料、着色剂和调味剂。另外,可以将活性化合物掺入快速溶解、缓释或持续释放制剂中,且其中这类缓释制剂优选是双峰态的。

[0159] 液体制剂,特别是用于静脉内或口服施用的液体制剂,包括无菌水溶液或非水溶液、混悬液和乳剂。液体组合物还可以包括粘合剂,缓冲剂,防腐剂,螯合剂,甜味剂,调味剂和着色剂等。非水溶剂包括醇,丙二醇,聚乙二醇,丙烯酸酯共聚物,植物油如橄榄油,和有机酯如油酸乙酯。水性载体包括醇和水的混合物,水凝胶,缓冲介质和盐水。特别地,生物相容性、生物可降解的丙交酯聚合物、丙交酯/乙交酯共聚物或聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物可以是有用的赋形剂以控制活性化合物的释放。静脉内载体可以包括流体和营养补充剂,电解质补充剂,例如基于林格氏右旋糖的那些等。

[0160] 施用模式的实例包括肠胃外,例如皮下,肌内,静脉内,皮内以及口服施用。它特别

地包括作为用于口服施用的片剂或作为用于静脉内施用的注射用溶液的粉剂的制剂。

[0161] 在本发明范围内，应当理解，“用于用途的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐”等同于“式(I)的化合物或其药学上可接受的盐的用途”，且特别是“用于治疗中的用途的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐”等同于“式(I)的化合物或其药学上可接受的盐在治疗中的用途”和“式(I)的化合物或其药学上可接受的盐在制备预期用于治疗的药物中的用途”。

[0162] 通过下列附图和实施例进一步示例本发明。

附图说明

[0163] 图1：S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯(存活率测定(刃天青，XTT或MTT)对不同癌细胞系的效能。

[0164] 图2：H_2O_2/S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯IC_{50}相关性：以μM计的S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯IC_{50}与癌细胞中内源性H_2O_2活性水平之间的相关性。

[0165] 图3：H_2O_2/S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯IC_{50}相关性：截断值的测定。

[0166] 图4：H_2O_2/S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯IC_{50}相关性：通过组织来源研究。

[0167] 图5：黑色素瘤细胞(癌细胞)与黑素细胞(相应的正常细胞)的H_2O_2水平比较。

[0168] 图6：S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯在过度产生H_2O_2并且具有或不具有低于0.5nmol/25 000个细胞的GSH水平的HL60癌细胞中的作用。

[0169] 图7：S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯通过提高具有H_2O_2过度产生的细胞中的GSH水平的抑制效能。

[0170] 图8：S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯在具有H_2O_2过度产生和高于5nmol/25 000个细胞的GSH水平的Colo357细胞中的效能。

[0171] 图9：在敏感性和抗性细胞中观察到的以nmol/25000个细胞计的总GSH水平。

[0172] 图10：24小时过程中用S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯5或10μmol.L^{-1}处理的S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯敏感细胞(HL-60，NT2/D1)(A)和S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯抗性细胞(MSC)(B)中MDA和HNE加合物的定量。

[0173] 注意：在上述举出的所有附图中：对于S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯指定DIMATE。

具体实施方案

[0174] 实施例1

[0175] 材料和方法

[0176] 细胞系

[0177] 已经筛选代表10种组织类型的一个52种人肿瘤细胞小组以覆盖广泛组的不同癌基因并且依据其对不同标准化疗剂的反应。细胞得自美国典型培养物保藏中心(American

Type Culture Collection)(ATCC)、欧洲细胞培养物保藏中心(European Collection of Cell Cultures)(ECACC)和来源于患者肿瘤的癌细胞初级培养物(Research Institute of Vall d'Hebron(VHIR),Barcelone,Spain;Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO),Barcelone,Spain;Oncotest,Freiburg,Germany;Oncodesign,Dijon,France; UniversitáDegli Studi di Palermo,Oncology and Surgical Sciences,Palermo, Italy;和Institute of Predictive and Personalized Medicine of Cancer(IMPPC), Barcelona,Spain(参见表3的肿瘤细胞组描述)。

[0178] 表2

[0179]

组织	特征	细胞	细胞系类型
膀胱		UM-UC-3	已建立的细胞系
膀胱		HT-1197	已建立的细胞系
膀胱		LB831-BLC	已建立的细胞系
膀胱		RT112	已建立的细胞系
膀胱		T24	已建立的细胞系
血液		HL-60	已建立的细胞系
血液		OCI-AML2	已建立的细胞系
血液		Raji	已建立的细胞系
血液		U-937	已建立的细胞系
血液		Kasumi-1	已建立的细胞系
血液		MOLM-14	已建立的细胞系
血液		KG-1	已建立的细胞系
血液		K-562/伊马替尼	已建立的细胞系
血液		THP-1	已建立的细胞系
脑		CGL-1	已建立的细胞系
脑		SK-N-AS	已建立的细胞系
脑		U-87	已建立的细胞系
脑		BrG12	已建立的细胞系
脑		BrG13	已建立的细胞系
脑		BrG16	已建立的细胞系
脑		BrA1	已建立的细胞系
脑		CGL-9	已建立的细胞系

[0180]

乳腺		SK-BR-3	已建立的细胞系
乳腺		BT-20	已建立的细胞系
乳腺		BT-474c	已建立的细胞系
乳腺		MCF-7	已建立的细胞系
乳腺		MDA-MB-231	已建立的细胞系
乳腺		MDA-MB-468	已建立的细胞系
乳腺		BA-pt1102	已建立的细胞系
乳腺		MBC-pt1106	已建立的细胞系
乳腺		BA-pt1201	已建立的细胞系
乳腺		BA-pt1202	已建立的细胞系
乳腺		BA-pt1205	已建立的细胞系
子宫颈		Hela	已建立的细胞系
结肠		LoVo	已建立的细胞系
结肠		SW620	已建立的细胞系
结肠		COLO-205	已建立的细胞系
结肠		HCT-15	已建立的细胞系
结肠		CRA07	已建立的细胞系
结肠		CRA11	已建立的细胞系
结肠		CRA13	已建立的细胞系
头颈		LB1617-HNSCC	已建立的细胞系
头颈		Fadu	已建立的细胞系
头颈		KB	已建立的细胞系
肾		Caki-1	已建立的细胞系
肾		A-498	已建立的细胞系
肝		Hep G2	已建立的细胞系
肝		Hep 3B2.1-7	已建立的细胞系
肺		A-549	已建立的细胞系
肺		A-549	已建立的细胞系
肺		H-522	已建立的细胞系

[0181]

肺		PC-9	已建立的细胞系
肺		HCC4006	已建立的细胞系
肺		HCC2935	已建立的细胞系
肺		H1975	已建立的细胞系
肺		H1650	已建立的细胞系
肺		H820	已建立的细胞系
肺		H2935	已建立的细胞系
肺		HCC4006	已建立的细胞系
肺		HCC827	已建立的细胞系
肺		H1299	已建立的细胞系
肺		Hop62	已建立的细胞系
肺		H522	已建立的细胞系
肺		H23	已建立的细胞系
肺		H460	已建立的细胞系
肺		H441	已建立的细胞系
黑色素瘤		SKMEL-103	已建立的细胞系
黑色素瘤		SKMEL-147	已建立的细胞系
黑色素瘤		MLMN-9	已建立的细胞系
黑色素瘤		MLMN-10	已建立的细胞系
黑色素瘤		UACC-903	已建立的细胞系
黑色素瘤		SKMEL-28	已建立的细胞系
黑色素瘤		MBrM12	已建立的细胞系
肌肉		A-673	已建立的细胞系
正常		HMVEC	已建立的细胞系
正常		HUV-EC-C	已建立的细胞系
正常		MRC-5	已建立的细胞系
正常		HSC CD34+	已建立的细胞系
正常		MSC	已建立的细胞系
骨肉瘤		OS-0411	已建立的细胞系

卵巢		PD-OVC-17	已建立的细胞系
卵巢		A2780	已建立的细胞系
卵巢		A2780/Cis	已建立的细胞系
卵巢		IGROV-1	已建立的细胞系
卵巢		SK-OV-3	已建立的细胞系
卵巢		OVCAR-3	已建立的细胞系
卵巢		OVCAR-4	已建立的细胞系
卵巢		PD-OVC-11	已建立的细胞系
卵巢		PD-OVC-02	已建立的细胞系
卵巢		PD-OVC-05	已建立的细胞系
胰腺		Capan-1	已建立的细胞系
胰腺		Capan-2	已建立的细胞系
卵巢		PD-OVC-17	已建立的细胞系
胰腺		MIA PaCa-2	已建立的细胞系
前列腺		22Rv1	已建立的细胞系
前列腺		LNCap	已建立的细胞系
前列腺		PC3	已建立的细胞系
前列腺		DU145	已建立的细胞系
胃		KATO III	已建立的细胞系
膀胱		1036	PDC
膀胱		1218	PDC
膀胱		1228	PDC
膀胱		1258	PDC
膀胱		1352	PDC
膀胱		439	PDC
中枢神经系统		498	PDC
子宫颈		1729	PDC
子宫颈		1783	PDC
子宫颈		2025	PDC

[0182]

[0183]

子宫颈		280	PDC
子宫颈		742	PDC
子宫颈		94	PDC
子宫颈		975	PDC
胃	亚洲人	3013	PDC
亚洲人胃	亚洲人	3044	PDC
亚洲人胃	亚洲人	3052	PDC
胃	白种人	1172	PDC
胃	白种人	214	PDC
胃	白种人	251	PDC
头颈	白种人	1842	PDC
肺	腺	1041	PDC
肺	腺	1584	PDC
肺	腺	1647	PDC
肺	腺	289	PDC
肺	腺	526	PDC
肺	腺	623	PDC
肺	腺	629	PDC
肺	腺	629	PDC
肺	腺	923	PDC
肺	腺	983	PDC
肺	表皮样瘤	1422	PDC
肺	表皮样瘤	397	PDC
肺	大细胞	1072	PDC
肺	大细胞	1121	PDC
肺	大细胞	1674	PDC
肺	大细胞	430	PDC
肺	大细胞	529	PDC
乳腺		1162	PDC

[0184]

乳腺		1322	PDC
乳腺		1384	PDC
乳腺		583	PDC
乳腺		713	PDC
乳腺		MX1	已建立的细胞系
黑色素瘤		1765	PDC
黑色素瘤		1792	PDC
黑色素瘤		274	PDC
黑色素瘤		276	PDC
黑色素瘤		462	PDC
黑色素瘤		520	PDC
黑色素瘤		622	PDC
黑色素瘤		672	PDC
卵巢		1023	PDC
卵巢		1353	PDC
卵巢		1544	PDC
卵巢		899	PDC
胰腺		1872	PDC
胰腺		1900	PDC
胰腺		1986	PDC
胰腺		2033	PDC
胰腺		2082	PDC
胰腺		2116	PDC
胰腺		546	PDC
前列腺		DU-145	已建立的细胞系
前列腺		MRI-H-1579	已建立的细胞系
前列腺		PC-3M	已建立的细胞系
胸膜间皮瘤		1752	PDC
胸膜间皮瘤		541	PDC

[0185]

肾		1114	PDC
肾		1183	PDC
肾		1393	PDC
肾		486	PDC
肾		616	PDC
肉瘤		1937	PDC
结肠		CXF 1297	PDC
结肠		CXF 243	PDC
结肠		CXF 280	PDC
结肠		CXF 647	PDC
结肠		CXF 676	PDC
胃	亚洲人	GXA 3011	PDC
胃	亚洲人	GXA 3023	PDC
胃	白种人	GXF 97	PDC
头颈	白种人	HNXF 536	PDC
头颈	白种人	HNXF 908	PDC
肺	腺	LXFA 400	PDC
肺	腺	LXFA 586	PDC
乳腺		MAXF 449	PDC
乳腺		MAXF 508	PDC
乳腺		MAXF 583	PDC
乳腺		MAXF 713	PDC
乳腺		MAXF MX1	PDC
黑色素瘤		MEXF 1829	PDC
黑色素瘤		MEXF 989	PDC
卵巢		OVXF 1023	PDC
卵巢		OVXF 1353	PDC
卵巢		OVXF 1544	PDC
卵巢		OVXF 899	PDC

[0186]

胰腺		PAXF 1998	PDC
胰腺		PAXF 2005	PDC
胰腺		PAXF 2045	PDC
胰腺		PAXF 2046	PDC
胰腺		PAXF 2053	PDC
胰腺		PAXF 2059	PDC
胰腺		PAXF 2094	PDC
胰腺		PAXF 546	PDC
肾		RXF 1220	PDC
肾		RXF 1781	PDC
肾		RXF 631	PDC
皮肤		SXFS 117	PDC

[0187] 根据供应商的建议在适合的培养基中培养全部细胞。

[0188] 用S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯处理

[0189] 将细胞以在实验结束时确保对照(未处理的细胞)中约80％汇合率所需的浓度接种到96-孔细胞培养板中(0.5×10^4个-5×10^4个细胞/孔)。使用不同浓度的药物(0.01至100μM)测定对S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯的敏感性。在48小时后,使用阿拉玛蓝、根据制造商的说明分析药物的生长-抑制作用。基于在先的观察结果使用阿拉玛蓝测定法:用阿拉玛蓝、四唑还原(XTT测定法)发现类似的结果。为了确保良好的数据质量和最大限度地减少移液误差的影响,基于来自8个独立孔的平均荧光强度评估每种特定药物浓度。通过每种特定细胞系的半数最大抑制浓度(IC_{50})对药物响应进行量化,并通过对数-剂量/响应曲线的非线性回归分析来确定。通过统计学方式测定了对S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯的抗性截断值(>2S.D.,高于IC_{50}几何平均值)。将对药物超敏反应的体外阈值定义为<IC_{50}几何平均值。

[0190] 3D形成无性系的测定,96孔板

[0191] 在96孔板格中进行形成无性系的测定试验。对于每一测试,将从肿瘤异种移植物制备的冷冻等分试样的肿瘤细胞融化并且如下制备测定板:每个测试孔含有3层等体积,2层半固体培养基(底层和顶层)和一层培养基上清液,有或没有测试化合物。底层由补充有20％(v/v)胎牛血清(Sigma)、0.01％(w/v)庆大霉素(Invitrogen)和0.75％(w/v)琼脂(BD Biosciences)的0.05mL/孔Iscove改进的Dulbecco培养基)(Invitrogen)组成。将肿瘤细胞加入到0.05mL补充有0.4％(w/v)琼脂的相同培养基中并铺在底层上。24h后,在用DMSO连续稀释后加入测试化合物并转入细胞培养基中,并在实验期间保留在细胞上(连续暴露,0.05mL药物覆盖层)。每个培养皿包括6个未处理的对照孔和10个浓度的一式二份药物处理组。将培养物在37℃和7.5％CO_2的加湿气氛中温育8至13天,并使用倒置显微镜密切监测集落生长。在此期间,离体肿瘤生长导致具有超过50μm的直径的集落形成。在最大集落形成

时，使用自动图像分析系统进行计数。在评估之前24h，用2-(4-碘苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-苯基四唑鎓氯化物(1mg/mL，100μL/孔)的无菌水溶液对重要集落染色。使用4参数非线性曲线拟合(Oncotest Warehouse Software)将S形浓度-响应曲线调整到每个肿瘤模型获得的数据点。将IC_{50}值报道为相对IC_{50}值，即在S形浓度-响应曲线的顶部和底部坪值之间(曲线的拐点)的一半给出响应(集落形成/活力的抑制)的测试化合物浓度，或者报道为绝对IC_{50}值，即在具有T/C＝50％的浓度-响应曲线的交叉点处的测试化合物的浓度。为了计算平均IC_{50}值，使用几何平均值。结果以如所测试的所有肿瘤模型内的平均值示意图或热图(相对于几何平均IC_{50}值的各IC_{50}值)表示。

[0192] H_2O_2产生的测定

[0193] 按照生产商的说明，使用总ROS/超氧化物检测试剂盒(Enzo life science)测定活细胞中的胞内H_2O_2产生量。该测定法使用特异性H_2O_2/RNS探针，其在与H_2O_2和RNS种类反应时迅速被氧化为高荧光化合物。荧光强度与样品内的总H_2O_2/RNS水平成正比。使用未处理的细胞或用S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯(1-5uM)、赋形剂HEPES、N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)[10mM]处理的细胞进行实验测试。进行分析的前一天，根据细胞供应商的说明，将细胞以2x 10^4的密度接种在96-孔黑色/透明底平板中的培养基内，该培养基中补充有FBS(10％v/v)、10个单位的青霉素/ml和100mg链霉素。将细胞保持在37℃、95％空气:5％CO_2的加湿空气中过夜。在分析当天，用100μL如上所述补充的无苯酚培养基替换细胞培养基，不进行任何处理，用S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯处理6小时，赋形剂HEPES处理6小时，或用不同对照试剂PCN和NAC处理20min。温育期后，将100μL含有相应处理剂或对照的H_2O_2检测溶液装载到孔中，并在37℃在黑暗中温育60min。为了进行背景荧光对照测定，有几个孔保持无细胞。使用Appliskan荧光微量平板读数器(Thermo Scientific)(ex＝560nm，Em＝600)读取平板。将数据表示为等量细胞产生的任意荧光单位的改变，并对照总蛋白质输入量校准。

[0194] GSH产生的测定

[0195] 将细胞接种在96-孔黑色板(5×10^4个细胞/mL)中并温育过夜以附着。用赋形剂，DMSO，BCNU 100μM，S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯20μM处理细胞24小时。根据试剂盒(GSH-Glo ™，Promega)的说明测定总谷胱甘肽，并获得25000个细胞的结果。

[0196] 通过ELISA定量测定HNE-蛋白质和MDA/蛋白质加合物

[0197] 用Oxiselect HNE Adduct Elisa试剂盒(Cell Biolabs，San Diego，CA)和OxiSelect MDA Adduct ELISA试剂盒(Cell Biolabs)分别定量HNE-加合物和MDA-加合物的形成。简言之，在用S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯处理24小时后，通过在还原性SDS样品缓冲液中超声处理裂解细胞。将匀化物稀释至10μg蛋白质/mL，并通过在37℃温育至少2小时将其吸附于96-孔蛋白结合板中。将孔用PBS洗涤两次，并在轨道摇床上在室温下再温育2小时。在PBS中洗涤三次后，向孔中加入100μL抗-HNE抗体或抗-MDA抗体，并在室温下温育1小时。随后，加入山羊抗-家兔二次抗体-HRP缀合物(用测定稀释剂按照1/1000稀释)并继续温育1小时。将孔用PBS洗涤5次并加入HRP-底物。用酸性溶液终止反应，并在450nm处用微量平板读数器读取吸光度。通过与由制造商提供的HNE-BSA和MDA-BSA标准品制备的标准曲线比较来确定HNE-加合物和MDA-加合物的水平

[0198] 对S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯处理的细胞的抗性诱导

[0199] 为了恢复S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯-诱导的细胞死亡，在浓度为10mM的还原型谷胱甘肽类似物谷胱甘肽单乙基酯(GSH-MEE)或其与S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯的组合的存在下，将药物敏感细胞HL-60暴露于S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯(10μM)。在100μL补充有10mM谷胱甘肽单乙基酯(GSH-MEE)的补充培养基中以$5x10^4$个细胞/孔的浓度将HL-60接种到96-孔板中。温育90分钟后，用PBS洗涤细胞，并使用不同浓度的药物(0.01至100μM)温育细胞。在24h和48h后，使用如上所述的刃天青(Rezasurin)测定法测定细胞存活率。

[0200] 统计学分析

[0201] 将数值表示为平均值±SD或频率和比例。如果适合，组间差异通过未配对t检验、卡方检验、Fisher精确检验或ANOVA确定。$P<0.05$被视为具有统计学显著性。使用GraphPad prism 5.0版(GraphPad software,San Diego California USA)和JMP软件12.01版(SAS Institute Inc.North Carolina USA)进行分析。

[0202] 结果

[0203] 得到的结果如图1-10中所示。

[0204] 体外S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯的效能

[0205] 如图1中所示，S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯在过度产生H_2O_2的很多种癌细胞系中有效(存活率测定-刃天青、XTT或MTT，如上述解释的)。

[0206] H_2O_2/S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯IC_{50}相关性

[0207] 图2显示在高H_2O_2活性与低IC_{50}之间观察到的相关性(如上所述通过总ROS/超氧化物检测试剂盒监测)。

[0208] 此外，图3显示通过用截断值(20 000相对荧光强度)将细胞分成两部分，揭示出S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯对H_2O_2高与H_2O_2低的敏感性差异(P值<0.05)。

[0209] 在图4中，高H_2O_2活性与低IC_{50}之间的相关性根据组织来源示例说明。

[0210] 此外，为了控制S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯对癌细胞的选择性，还通过使用与上述相同的方法用本发明化合物对正常细胞测试。结果表明，本发明化合物对正常细胞没有影响，如下表3所示。

[0211] 表3

[0212]

正常人初级细胞中的 S-甲基 4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯		
细胞系	描述	*IC50 (uM)*
hMCSs-BM	来自骨髓的人间质干细胞	>50
huvec	人脐静脉内皮细胞	>50
BEAS-2B	人支气管上皮细胞	>50
HPF	人肺成纤维细胞	>100
NHEM	正常人表皮黑素细胞	>100

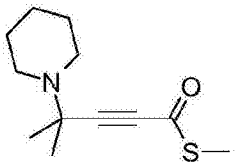
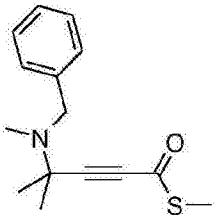
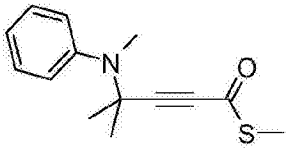
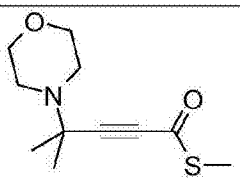
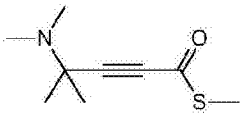
[0213] 另外，通过遵循上述材料和方法对表2中举出的细胞系DU145(前列腺癌细胞系)和

细胞系HL60(白血病)测试了本发明的其它化合物。

[0214] 有关那些化合物的效能的结果如下表4中所示。

[0215] 表4

[0216]

IUPAC名称	式		IC_{50} (DU145)	IC_{50} (HL-60)
S-甲基 4-甲基-4-(哌啶-1-基)戊-2-炔硫代酸酯		分子量: 225,4 分子式: $C_{12}H_{19}NOS$	22 μM	7.211 μM
S-甲基 4-[苄基(甲基)氨基]-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯		分子量: 261,4 分子式: $C_{15}H_{19}NOS$	1.4 μM	10.408 μM
S-甲基 4-甲基-4-[甲基(苯基)氨基]戊-2-炔硫代酸酯		分子量: 247,4 分子式: $C_{14}H_{17}NOS$	12.5 μM	24.8 μM
S-甲基 4-甲基-4-(吗啉-4-基)戊-2-炔硫代酸酯		分子量: 227,3 分子式: $C_{11}H_{17}NO_2S$	9.3 μM	30 μM
S-甲基 4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯		分子量: 185.28 富马酸盐 : 301.2 分子式: $C_9H_{15}NOS$	7.2 μM	7.6 μM

[0217] H_2O_2水平与GSH水平的相关性

[0218] 图6显示S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯在过度产生H_2O_2并具有或不具有低于0.5nmol/25 000个细胞的GSH水平的HL60癌细胞中的作用。

[0219] 特别地,图6(A)显示用S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯5μM处理24小时后,以相对荧光单位(RFU)计的H_2O_2活性水平增加。然而,用S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯与2.5mM N-乙酰-半胱氨酸(NAC)处理,没有观察到H_2O_2增加。在图6(B)中,用2.5mM NAC处理的HL-60细胞中GSH水平的量显著增加,并且因此细胞过度产生H_2O_2并且对于25,000个细胞具有高于0.5nmol的GSH水平。

[0220] 图6(C)显示用S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯(5,10μmol.L-1)和/或2.5mM NAC处理的HL-60细胞的存活率,并且在用NAC处理的HL-60细胞中显著地观察到S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯的效能抑制。

[0221] 另外,图7显示,在10mM GSH-MEE的预处理后,谷胱甘肽还原的乙酯(GSH-MEE)是可

用于部分补充GSH供应的GSH的膜/脂质可渗透衍生物，使用GSH-MEE处理HL-60细胞抑制S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯的细胞毒性作用。通过在细胞中添加更多的GSH，细胞的状态变为：过度产生H_2O_2且对于25 000个细胞GSH水平高于0.5nmol，并且S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-烯酸炔硫代酸酯并非更有效。

[0222] 此外，为了证实这些结果，图8显示：(A)用100μM卡莫司汀(BCNU)处理Colo357细胞使得GSH水平降低50％，并且在如下方面改变细胞状态：过度产生H_2O_2和对于25 000个细胞GSH水平低于0.5nmol；作为结果(B)S-4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-烯硫代酸甲酯对这些细胞有效，使存活率降低50％。

[0223] 在图9中，在敏感和抗性细胞中观察到以nmol/25000个细胞计的总GSH水平。观察到显著性差异(***，p值<0.001)。使用每25000个细胞0.5nmol的阈值区分GSH高与GSH低细胞，100％的敏感细胞是GSH低，并且100％的抗性细胞是GSH高。

[0224] 图10显示了用S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯5或10μmol.L^{-1}24小时过程中处理的S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯敏感细胞(HL-60，NT2/D1)(A)和S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯抗性细胞(MSC)(B)中MDA和HNE加合物的定量。对于MDA-加合物，在敏感性S-甲基4-(二甲氨基)-4-甲基戊-2-炔硫代酸酯细胞中，阈值高于100ng/μg总蛋白质，而在抗性细胞，阈值低于该阈值。对于HNE-加合物，可以进行相同的观察，其中阈值为1μg/μg总蛋白质。

[0225] 实施例2：

[0226] 将来自黑色素瘤细胞样品的H_2O_2水平与对照值进行比较以确定这些细胞是否符合用本发明化合物处理的标准。

[0227] 由此测定来自人类黑色素瘤细胞(如实施例1中所述获得的)的H_2O_2水平以及来自相应正常细胞的H_2O_2水平，在此为黑素细胞(来自青少年包皮的正常人上皮黑素细胞，用Promocell的黑素细胞生长培养基M2培养的Promocell(NHEM，库))。

[0228] 使用总ROS/超氧化物检测试剂盒(Enzo life science)Enzo生命科学)对两种样品进行H_2O_2水平测定。用Appliskan荧光微量平板读出器(Thermo Scientific)(Ex/Em＝488/520nm和Ex/Em＝550/610nm)测定两种样品的相对荧光强度。

[0229] 正如可以从图5观察到的，癌细胞样品的H_2O_2水平超过对照样品(即正常细胞)的H_2O_2水平280％。

[0230] 因此，这些癌细胞符合用本发明的化合物、特别是4-(二甲氨基)-4-甲基-2-戊炔硫代酸S-甲基酯富马酸盐处理的标准，条件是对于25000个细胞，GSH的水平同时低于5nmol。

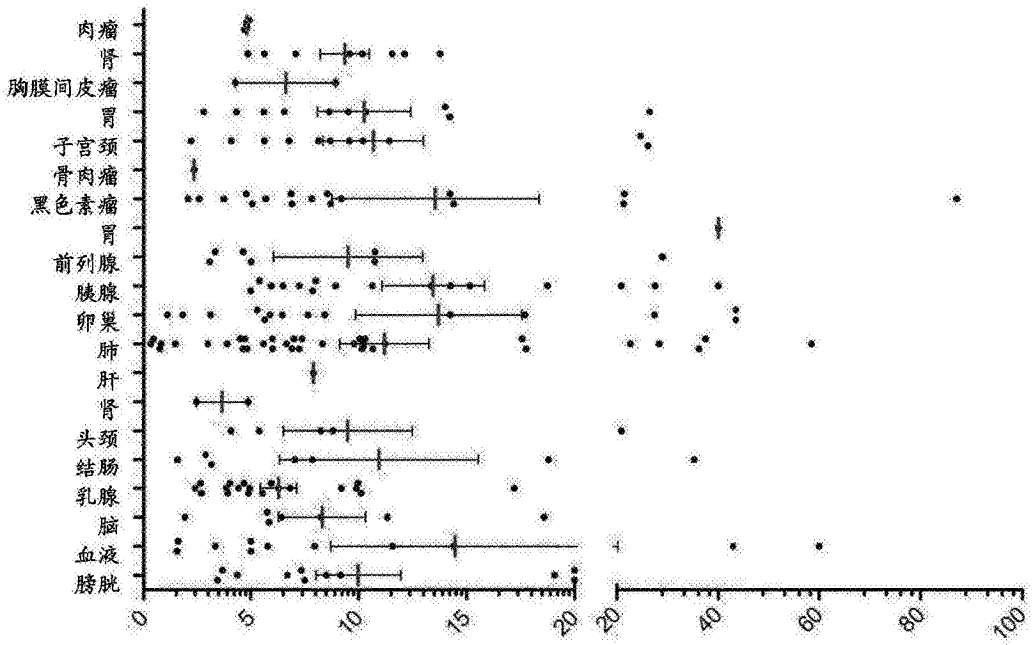

肉瘤
肾
胸膜间皮瘤
胃
子宫颈
骨肉瘤
黑色素瘤
胃
前列腺
胰腺
卵巢
肺
肝
肾
头颈
结肠
乳腺
脑
血液
膀胱
0
5
10
15
20
20
40
60
80
100
abs. IC50(μM) (几何平均值 7.35μM)

图1

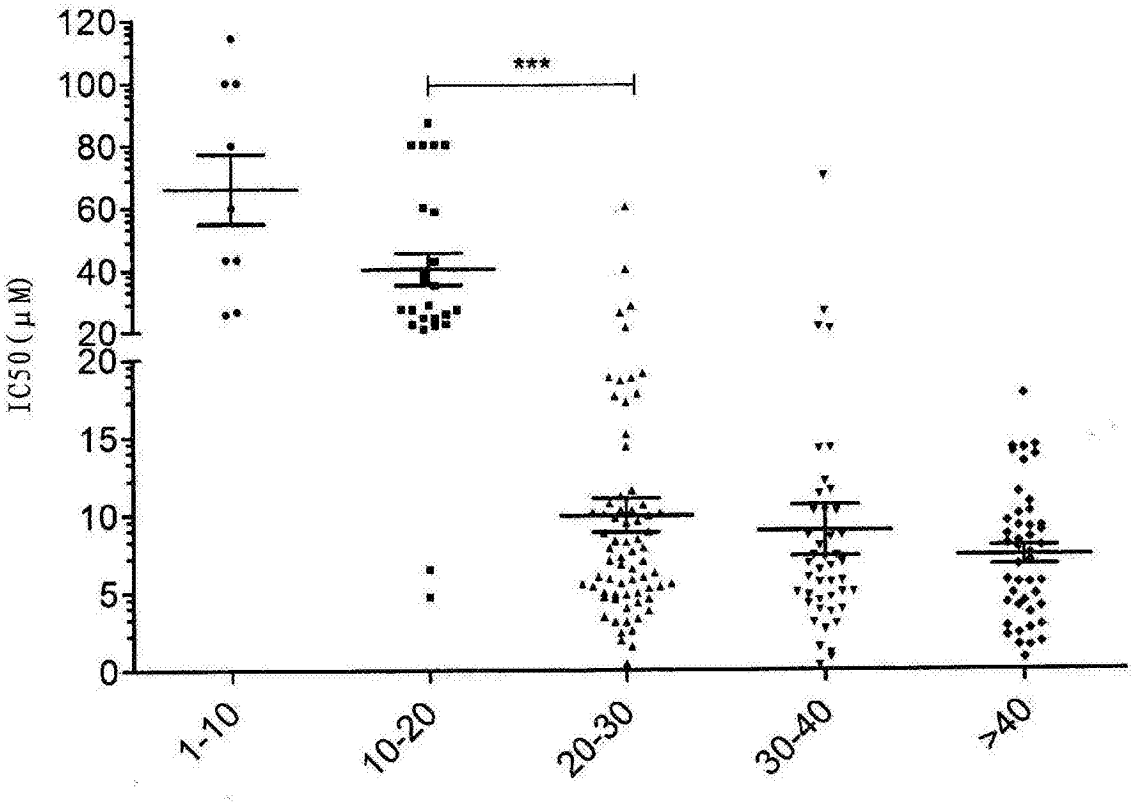

120
100
80
60
40
20
20
15
10
5
0
IC50(μM)
***
1-10
10-20
20-30
30-40
>40
H2O2活性水平(x10E3相对荧光单位(RFU))

图2

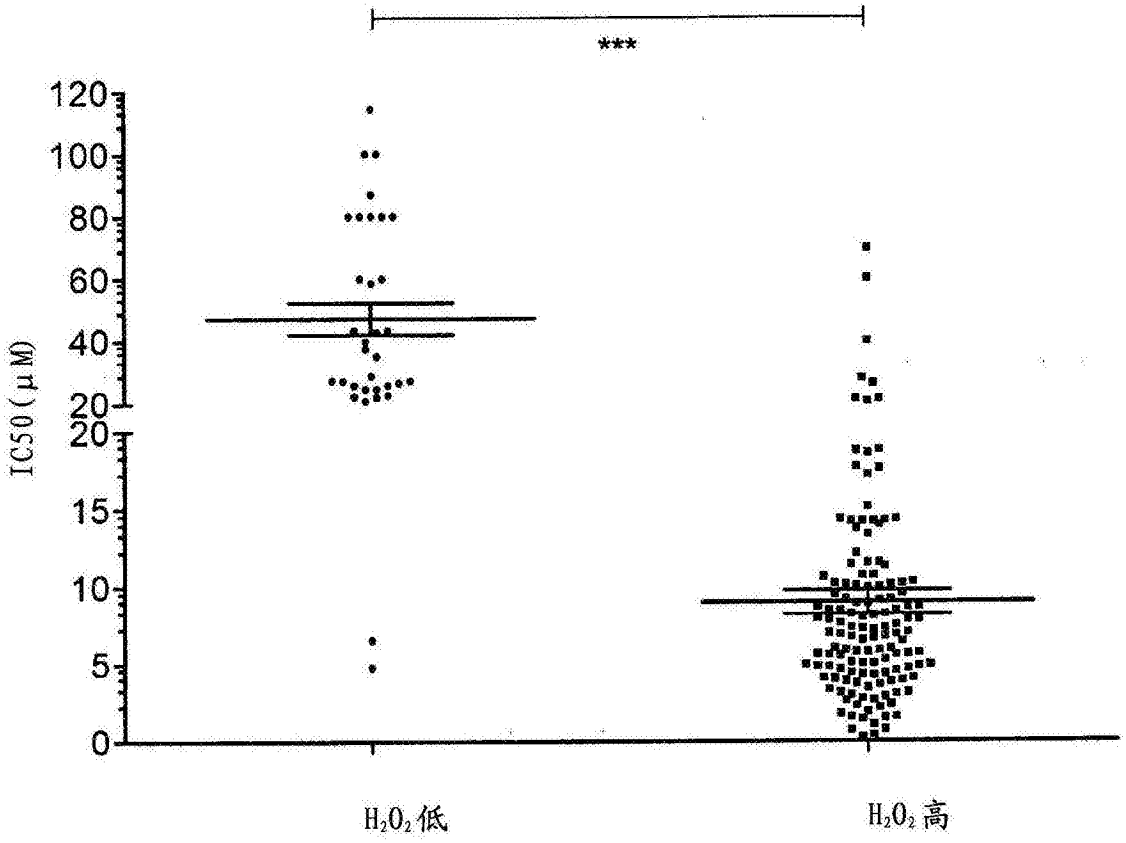


图3

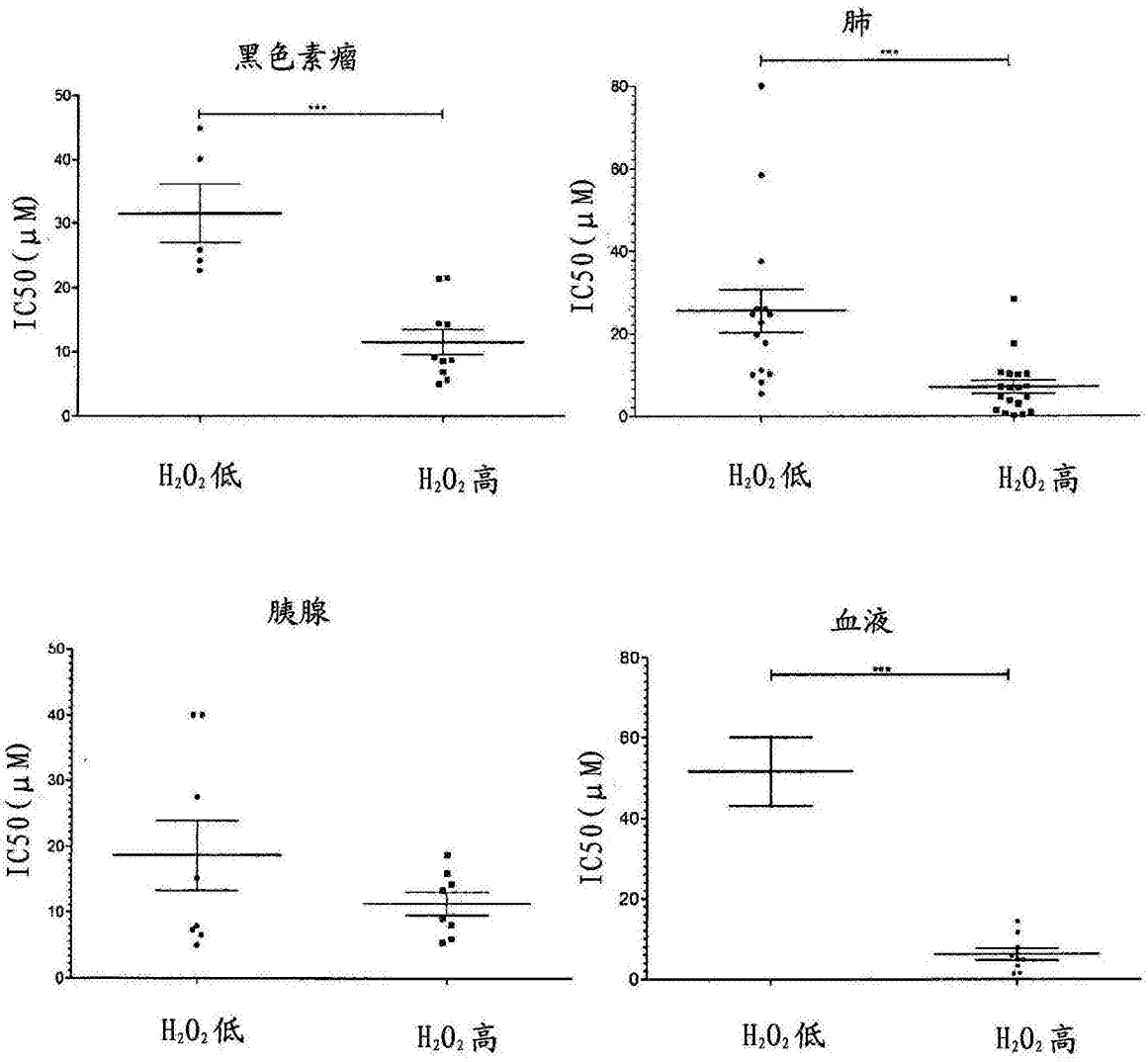


图4

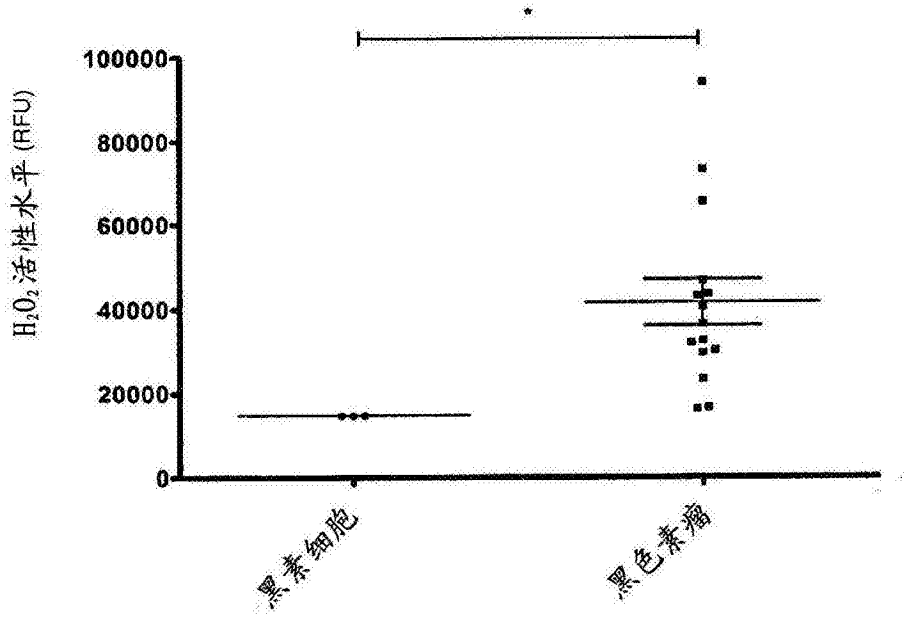

H_2O_2活性水平 (RFU)
100000
80000
60000
40000
20000
0
*
黑素细胞
黑色素瘤

图5

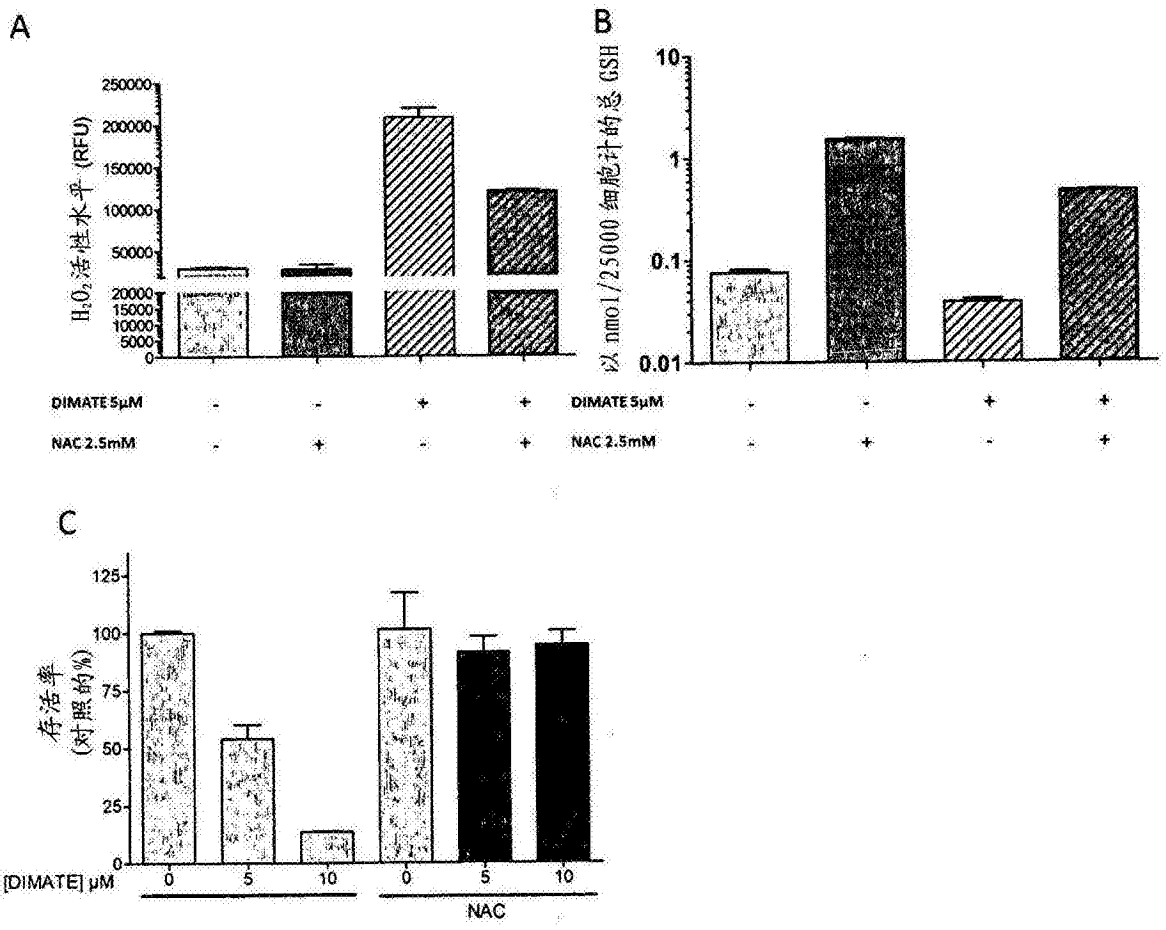

A
H_2O_2活性水平 (RFU)
250000
200000
150000
100000
50000
20000
15000
10000
5000
0
DIMATE 5μM - - + +
NAC 2.5mM - + - +
B
以 nmol/25000 细胞计的总 GSH
10
1
0.1
0.01
DIMATE 5μM - - + +
NAC 2.5mM - + - +
C
存活率 (对照的%)
125
100
75
50
25
0
[DIMATE] μM 0 5 10 0 5 10
NAC

图6

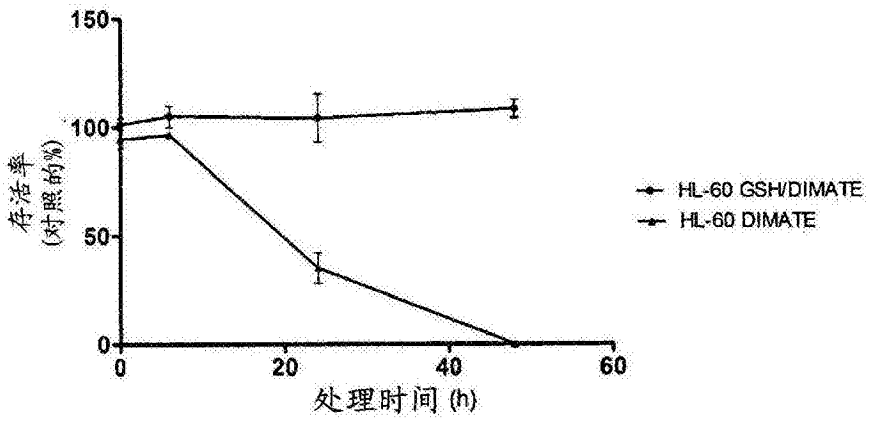

150
100
50
0
存活率
(对照的%)
0
20
40
60
处理时间 (h)
HL-60 GSH/DIMATE
HL-60 DIMATE

图7

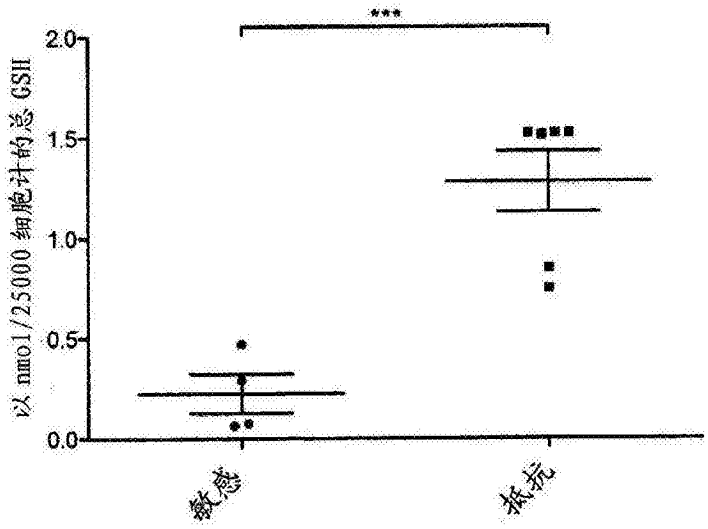

***
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
以 nmol/25000 细胞计的总 GSH
敏感
抵抗

图9

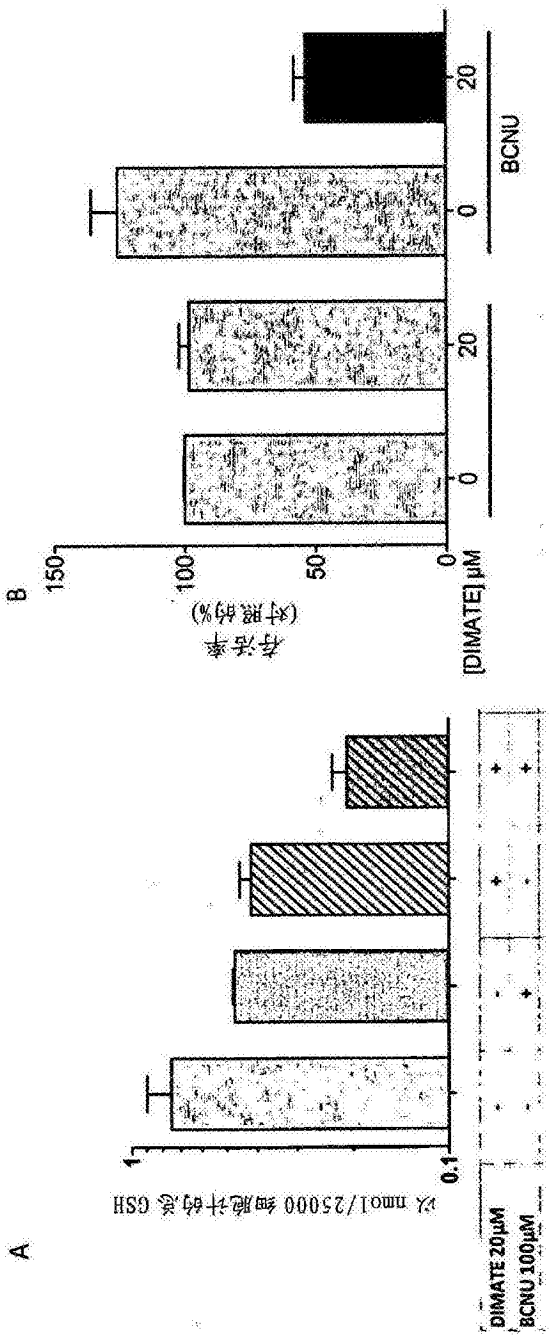


图8

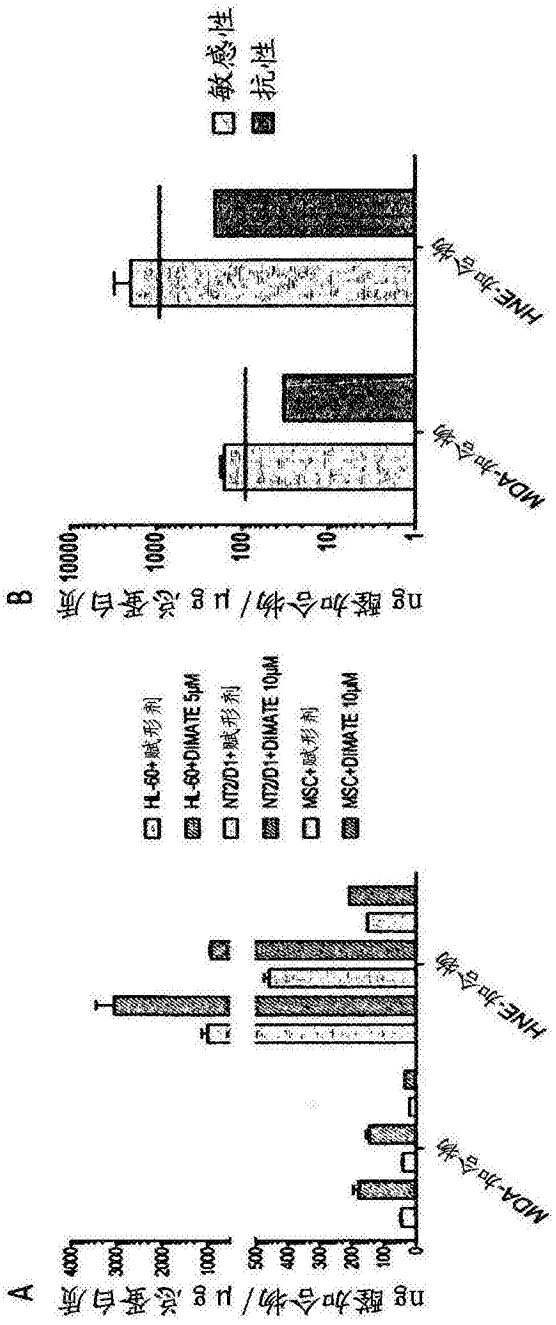

A
ng 醛加合物/μg总蛋白质
4000
3000
2000
1000
500
400
300
200
100
0
MDA-加合物
HNE-加合物
HL-60+赋形剂
HL-60+DIMATE 5μM
NT2/D1+赋形剂
NT2/D1+DIMATE 10μM
MSC+赋形剂
MSC+DIMATE 10μM
B
ng 醛加合物/μg总蛋白质
10000
1000
100
10
1
MDA-加合物
HNE-加合物
敏感性
抗性

图10