



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0136525
(43) 공개일자 2014년11월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07F 9/72 (2006.01) A61K 31/285 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7030246(분할)
(22) 출원일자(국제) 2005년07월15일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2014-7000020
원출원일자(국제) 2005년07월15일
심사청구일자 2014년01월29일
(85) 번역문제출일자 2014년10월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/025192
(87) 국제공개번호 WO 2006/020048
국제공개일자 2006년02월23일
(30) 우선권주장
60/588,596 2004년07월16일 미국(US)

(71) 출원인
더 텍사스 에이 & 엠 유니버시티 시스템
미국 77843-3369 텍사스주 칼리지 스테이션 티에
이엠유 3369
보드 오브 리전츠, 더 유니버시티 오브 텍사스 시
스템
미국 텍사스주 78701 오스틴 웨스트 7번 스트리트
201
(72) 발명자
장가로, 랄프, 에이.
미국 77840 텍사스주 칼리지 스테이션 메디나 드
라이브 1813
더츠케일, 하티스
미국 77054 텍사스주 휴스턴 #2835 팬닝 스트리트
8181
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장수길, 김영

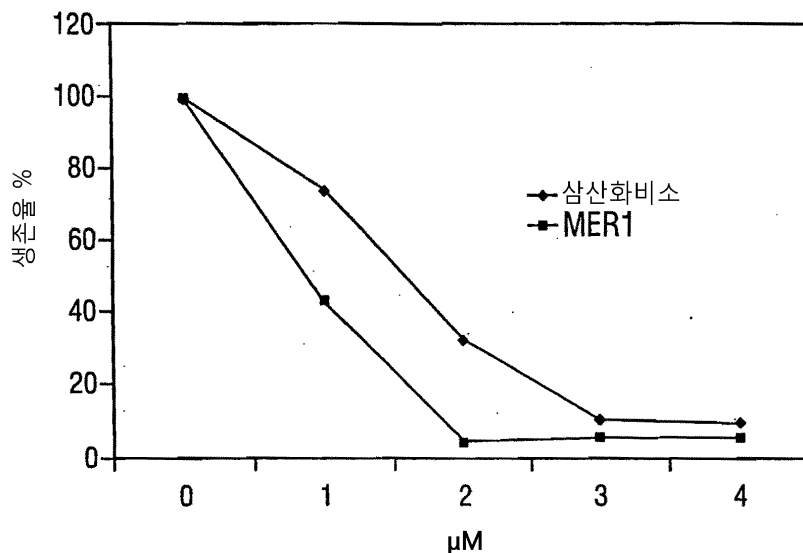
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 암 치료를 위한 화합물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 유기 비소 화합물을 제공한다. 다수의 이들 화합물은 고형 및 혈액 기원의 다수의 인간 종양 세포주, 및 백혈병 환자의 악성 혈액 세포에 대하여 강력한 시험관내 세포독성 활성을 나타낸다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

프리레이치, 에밀, 제이.

미국 77024 텍사스주 휴스턴 몬테 셀로 810

칸타르지안, 하급

미국 77401 텍사스주 벨레어 올랜더 4510

소텔로-라마, 페리다

멕시코 83249 소노라 헤르모실로

콜로니아스타우스-유니온 에퀴나 피시코스 #25 아
마가도스

베르스토프세크, 소르단

미국 77030 텍사스주 휴스턴 유닛 428 홀콤비 블러
바드1515

가오, 밍쯔향

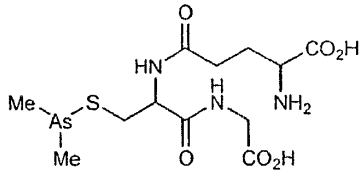
미국 46202-2111 인디애나주 인디애나폴리스
엘3-202웨스트 16번 스트리트 1345

특허청구의 범위

청구항 1

125℃ 초과와 융점을 갖는 결정형 형태의 하기 화학식 II의 구조를 갖는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

<화학식 II>



청구항 2

제1항에 있어서, 결정질 형태의 융점이 135℃ 초과인 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서, 결정질 형태의 융점이 130 내지 145℃의 범위인 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서, 화학식 II의 화합물에 피리딘 염산염이 없는 것인 화합물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 화합물을 포함하는, 암의 치료를 위한 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 암이 고형 종양을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 암이 뇌암, 폐암, 간암, 비장암, 신장암, 림프절암, 소장암, 췌장암, 혈구암, 뼈암, 결장암, 위암, 유방암, 자궁내막암, 전립선암, 고환암, 난소암, 중추신경계암, 피부암, 두경부암, 식도암 또는 골수암인 약학 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 암이 혈액암인 약학 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 암이 백혈병, 림프종, 다발골수종, 척수형성이상증, 골수증식질환 또는 불응성 백혈병인 약학 조성물.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 화합물이 매일 투여되는 것인 약학 조성물.

청구항 11

제6항에 있어서, 상기 화합물이 주사에 의해 투여되는 것인 약학 조성물.

청구항 12

제6항에 있어서, 추가의 작용제 또는 요법과 조합하여 암을 치료하기 위한 약학 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 5 초과 pH를 갖는 수용액인 약학 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서, 5 내지 7 범위의 pH를 갖는 수용액인 약학 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 항암 요법의 분야에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 백혈병 및 고형 종양과 같은 암을 치료하는데 사용하기 위한 유기 비소 화합물 및 방법을 제공한다.

배경기술

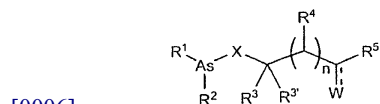
[0002] 백혈병 치료법의 진보에도 불구하고, 대부분의 성인 백혈병 환자는 여전히 질환의 진행으로 인해 사망한다. 무기 화합물인 삼산화비소는 재발성 또는 불응성 급성 전골수구성 백혈병(APL) 환자의 치료법으로 승인되었고, 다른 백혈병 유형의 치료법으로서 평가중이다. 그러나, 중국으로부터의 예비 자료 및 미국에서의 최근의 경험에 의하면, 다른 혈액암에서도 삼산화비소의 역할이 제한된다. 따라서, 항백혈병제로서의 삼산화비소의 활성은 현재 많은 유형의 백혈병에서 조사되고 있다. 그 결과는 조사중인 일부 백혈병 유형의 반응율의 면에서 유리한 것으로 보이지만, 삼산화비소의 전신성 독성이 문제이다(소이그네트(Soignet) 등의 문헌(1999); 위어니크(Wiernik) 등의 문헌(1999); 가이슬러(Geissler) 등의 문헌(1999); 루셀로트(Rousselot) 등의 문헌(1999) 참조).

[0003] 인체에 사용하기 위하여 제조된 유일한 유기 비소 화합물(OA)인 멜라소프롤이 항백혈병 활성에 대하여 평가된 바 있다(WO 9924029호, EP 1002537호). 불행하게도, 이 화합물은 파동편모충증의 치료에 사용되는 농도에서는 백혈병 환자에게 지나치게 독성이다. 따라서, 삼산화비소와 활성이 유사하거나 그보다 크고 독성이 낮은, 일반적으로 혈액 악성종양 및 혈액암의 치료에 사용될 수 있는 비소 유도체를 밝히는 것이 필요하다.

발명의 내용

[0004] 본 발명은 항암 특성을 갖는 유기 비소 화합물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 하기 화학식 I의 구조를 갖는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:

[0005] <화학식 I>



[0007] 상기 식에서,

[0008] X는 S 또는 Se이고;

[0009] W는 O, S, 또는 (R)(R)이고, 이때 각 R은 독립적으로 H 또는 C₁₋₂알킬이고;

[0010] n은 0 또는 1이고;

[0011] R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 C₁₋₁₀알킬이고;

[0012] R^3 은 -H, C_{1-10} 알킬, 또는 C_{0-6} 알킬-COOR⁶이고;

[0013] $R^{3'}$ 은 H, 아미노, 시아노, 할로젠, 아릴, 아르알킬, 헤테로아릴, 헤테로아르알킬, 카르복실, C_{1-10} 알킬, C_{1-10} 알케닐, 또는 C_{1-10} 알키닐이고, 바람직하게는 H이고;

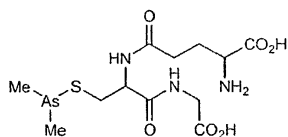
[0014] R^4 는 -OH, -H, -CH₃, 아미노, -OC(O) C_{1-10} 아르알킬, -OC(O) C_{1-10} 알킬, 또는 -OC(O)아릴이고;

[0015] R^5 는 -OH, 시아노, C_{1-10} 알콕시, 아미노, O-아르알킬, -OC(O) C_{1-10} 아르알킬, -OC(O) C_{1-10} 알킬, -OC(O)아릴, 또는 글리신 치환체이고;

[0016] R^6 은 H 또는 C_{1-10} 알킬이다.

[0017] 본 발명의 다른 양상은 피리딘 염산염과 회합되어 있는 하기 화학식 II의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염이고, 이때 결정질 형태의 이 화합물의 융점은 125℃보다 높다:

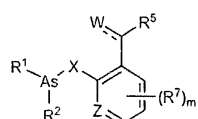
[0018] <화학식 II>



[0019]

[0020] 임의의 실시양태에서, 유기 비소 화합물은 하기 화학식 III의 구조를 갖는 화합물이다:

[0021] <화학식 III>



[0022]

[0023] 상기 식에서,

[0024] X는 S 또는 Se, 바람직하게는 S이고;

[0025] W는 O, S, 또는 (R)(R)(이때, 각 R은 독립적으로 H 또는 C_{1-2} 알킬임)이고, 바람직하게는 O이고;

[0026] Z는 CH 또는 N, 바람직하게는 N이고;

[0027] R^1 및 R^2 는 독립적으로 C_{1-10} 알킬이고, 바람직하게는 R^1 및 R^2 는 독립적으로 메틸, 에틸, 프로틸 및 이소프로필 중에서 선택되고;

[0028] R^5 는 -OH, 시아노, C_{1-10} 알콕시, 아미노, O-아르알킬, -OC(O) C_{1-10} 아르알킬, -OC(O) C_{1-10} 알킬, -OC(O)아릴, 또는 글리신 치환체이고, 바람직하게는 OH이고;

[0029] R^6 은 H 또는 C_{1-10} 알킬이고;

[0030] R^7 은 할로젠, -OH, C_{0-6} 알킬-COOR⁶, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, 아미노, 아미도, 시아노 및 니트로 중에서 선택되고;

[0031] m은 정수 0 내지 4, 바람직하게는 0이다.

[0032] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 이점은 하기 발명의 상세한 설명을 보면 분명해질 것이다. 그러나, 당업자라면 발명의 상세한 설명으로부터 본 발명의 요지 및 범주내의 다양한 변화 및 변경을 알게 되기 때문에, 발명의 상세한 설명 및 구체적인 실시예는 본 발명의 바람직한 실시양태를 가리키기는 하지만, 단지 설명을 위하여 제공될 뿐임을 알아야 한다.

도면의 간단한 설명

[0033]

하기 도면은 본 명세서의 일부를 형성하며, 본 발명의 임의의 양상을 추가로 나타내기 위하여 포함된다. 본 발명은 하나 이상의 이들 도면과 본원에 제공된 구체적인 실시양태의 상세한 설명을 함께 참조하면 더 잘 이해될 수 있다.

도 1은 인간 백혈병 세포주 NB4를 지시된 농도의 S-디메틸아르시노-티오숙신산(MER1) 또는 삼산화비소와 함께 3일동안 배양하였음을 나타낸다.

도 2는 인간 백혈병 세포주 AML2를 지시된 농도의 MER1 또는 삼산화비소와 함께 3일동안 배양하였음을 나타낸다. 트립판-블루 제외 방법에 의해 세포 생존율을 평가하였다.

도 3a는 MER1로 처리된 인간 백혈병 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 3b는 MER1로 처리된 인간 CNS 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 3c는 MER1로 처리된 인간 신장암 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 3d는 MER1로 처리된 인간 비소세포 폐암 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 3e는 MER1로 처리된 인간 흑색종 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 3f는 MER1로 처리된 인간 전립선암 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 3g는 MER1로 처리된 인간 결장암 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 3h는 MER1로 처리된 인간 난소암 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 3i는 MER1로 처리된 인간 유방암 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 4는 지시된 농도의 S-디메틸아르시노-2-티오벤조산(SAL1)과 함께 3일동안 배양된 HL60 인간 백혈병 세포의 세포 생존율을 나타낸다.

도 5a는 SAL1로 처리된 인간 백혈병 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 5b는 SAL1로 처리된 인간 CNS암 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 5c는 SAL1로 처리된 인간 신장암 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 5d는 SAL1로 처리된 인간 비소세포 폐암 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 5e는 SAL1로 처리된 인간 흑색종 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 5f는 SAL1로 처리된 인간 전립선암 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 5g는 SAL1로 처리된 인간 결장암 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 5h는 SAL1로 처리된 인간 난소암 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 5i는 SAL1로 처리된 인간 유방암 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 6은 지시된 농도의 S-디메틸아르시노-2-글루타티온(SGLU1) 또는 삼산화비소와 함께 3일동안 배양된 NB4 세포의 세포 생존율을 나타낸다.

도 7은 HL60 세포 및 SGLU1 또는 삼산화비소를 사용하여 5일 클론원성 분석을 수행하였음을 나타낸다.

도 8a는 SGLU1로 처리된 인간 백혈병 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 8b는 SGLU1로 처리된 인간 CNS 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 8c는 SGLU1로 처리된 인간 신장암 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 8d는 SGLU1로 처리된 인간 비소세포 폐암 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 8e는 SGLU1로 처리된 인간 흑색종 세포주의 증식율을 나타낸다.

도 8f는 SGLU1로 처리된 인간 전립선암 세포주의 증식율을 나타낸다.

- 도 8g는 SGLU1로 처리된 인간 결장암 세포주의 증식율을 나타낸다.
- 도 8h는 SGLU1로 처리된 인간 난소암 세포주의 증식율을 나타낸다.
- 도 8i는 SGLU1로 처리된 인간 유방암 세포주의 증식율을 나타낸다.
- 도 9는 지시된 농도의 MER1 또는 삼산화비소와 함께 3일동안 배양된 급성 골수성 백혈병(AML) 환자의 단핵 세포의 세포 생존율을 나타낸다.
- 도 10은 지시된 농도의 MER1 또는 삼산화비소와 함께 4일동안 배양된 AML 환자의 단핵 세포의 세포 생존율을 나타낸다.
- 도 11은 지시된 농도의 MER1 또는 삼산화비소와 함께 5일동안 배양된 AML 환자의 단핵 세포의 세포 생존율을 나타낸다.
- 도 12는 지시된 농도의 MER1 또는 삼산화비소와 함께 3일동안 배양된 만성 골수성 백혈병-급성 전환기(CML-BP) 환자의 단핵 세포의 세포 생존율을 나타낸다.
- 도 13은 지시된 농도의 MER1 또는 삼산화비소와 함께 4일동안 배양된 급성 림프모세포성 백혈병(ALL) 환자의 단핵 세포의 세포 생존율을 나타낸다.
- 도 14는 지시된 농도의 MER1 또는 삼산화비소와 함께 5일동안 배양된 정상 공여자의 단핵 세포의 세포 생존율을 나타낸다.
- 도 15는 정상 공여자 세포, 및 MER1 또는 삼산화비소를 사용하여 8일 클론원성 분석을 수행하였음을 나타낸다.
- 도 16은 지시된 농도의 SGLU1 또는 삼산화비소와 함께 5일동안 배양된 만성 림프구성 백혈병(CLL) 환자의 단핵 세포의 세포 생존율을 나타낸다.
- 도 17은 AML 환자의 단핵 세포를 SGLU1 또는 삼산화비소와 함께 사용하여 수행된 8일 클론원성 분석을 나타낸다.
- 도 18은 정상 공여자 세포, 및 SGLU1 또는 삼산화비소를 사용하여 수행된 8일 클론원성 분석을 나타낸다.
- 도 19는 HL60 세포 및 MER-1을 가지고 트립판 블루 분석을 사용한 MER-1 배합물의 안정성을 나타낸다.
- 도 20은 MER1로 1일, 2일 또는 3일동안 처리한 H1-60 세포에서 아넥신 V 분석에 의해 평가된 세포자멸을 나타낸다.
- 도 21은 MER1로 1일, 2일 또는 3일동안 처리한 H1-60 세포에서 프로피듐 요오드 분석에 의해 평가된 사균수를 나타낸다.
- 도 22는 MER1로 1일, 2일 또는 3일동안 처리한 HL60 세포에서 트립판-블루 제외 방법에 의해 평가된 세포 생존율을 나타낸다.
- 도 23A는 48시간째에 MER1, SGLU1 또는 산화비소로 처리된 HL-60 세포의 아넥신 V 분석을 나타낸다.
- 도 23D는 72시간째에 MER1, SGLU1 또는 산화비소로 처리된 HL-60 세포의 아넥신 V 분석을 나타낸다.
- 도 23B는 48시간째에 MER1, SGLU1 또는 산화비소로 처리된 HL-60 세포의 카스파제 분석(파이-파이-룩스(phi-pi-lux) 염색)을 나타낸다.
- 도 23E는 72시간째에 MER1, SGLU1 또는 산화비소로 처리된 HL-60 세포의 카스파제 분석을 나타낸다.
- 도 23C는 48시간째에 MER1, SGLU1 또는 산화비소로 처리된 HL-60 세포의 CMXRos/MT-Green 분석을 나타낸다.
- 도 23F는 72시간째에 MER1, SGLU1 또는 산화비소로 처리된 HL-60 세포의 CMXRos/MT-Green 분석을 나타낸다.
- 도 24는 성숙에 대한 삼산화비소, SGLU1 및 MER1의 영향에 대하여 분석된 NB4 세포를 나타낸다.
- 도 25A는 MER1의 영향에 대하여 분석된 HL60 세포를 나타낸다.
- 도 25B는 SGLU1의 영향에 대하여 분석된 HL60 세포를 나타낸다.
- 도 25C는 삼산화비소의 영향에 대하여 분석된 HL60 세포를 나타낸다.

도 26A는 PML/Rar 알파 유전자의 역할을 분석하기 위하여 아연의 존재 및 부재하에 삼산화비소로 처리된 U937/9PR 세포에서의 3일 MTT 분석을 나타낸다.

도 26B는 PML/Rar 알파 유전자의 역할을 분석하기 위하여 아연의 존재 및 부재하에 SGLU1로 처리된 U937/9PR 세포에서의 3일 MTT 분석을 나타낸다.

도 26C는 PML/Rar 알파 유전자의 역할을 분석하기 위하여 아연의 존재 및 부재하에 MER1로 처리된 U937/9PR 세포에서의 3일 MTT 분석을 나타낸다.

도 27A는 HL60 세포에 대한 삼산화비소 및 GMZ27의 세포독성을 나타낸다.

도 27B는 AML 환자의 세포의 콜로니 증식에 대한 ATO 및 GMZ27의 영향을 나타낸다.

도 28A는 아넥신 V 결합의 평가에 의한, HL60 AML 세포에서 ATO 및 GMZ27에 의해 유도된 세포자멸의 흐름세포측정(flow cytometry) 평가를 나타낸다.

도 28B는 카스파제 3의 활성화의 평가에 의한, HL60 AML 세포에서 ATO 및 GMZ27에 의해 유도된 세포자멸의 흐름세포측정 평가를 나타낸다.

도 28C는 미토콘드리아 막 전위 변화의 평가에 의한, HL60 AML 세포에서 ATO 및 GMZ27에 의해 유도된 세포자멸의 흐름세포측정 평가를 나타낸다.

도 29는 HL60 AML 세포에서 GMZ27에 의해 영향받는 세포자멸 관련 단백질의 웨스턴 블로팅(Western blotting) 분석을 나타낸다.

도 30A는 세포를 BSO로 전처리한, 72시간 MTS 분석을 나타낸다.

도 30B는 세포를 DTT로 전처리한, 72시간 MTS 분석을 나타낸다.

도 30C는 NAC로 전처리한 후의 초산화물 생성을 나타낸다.

도 31A는 초산화물 생성을 흐름세포측정에 의해 감시하였을 때, ATO 및 GMZ27의 ROS 생성을 나타낸다. 세포를 1시간동안 배양하였다.

도 31B는 초산화물 생성을 흐름세포측정에 의해 감시하였을 때, ATO 및 GMZ27의 ROS 생성을 나타낸다. 세포를 3시간동안 배양하였다.

도 32는 48시간 배양기가 끝난 후 NB4 APL 세포의 성숙/분화에 대한 ATO 및 GMZ27의 영향을 나타낸다.

도 33A는 상이한 투여량의 GMZ27로 24시간동안 처리된 HL60 세포의 프로피듐 요오드 염색을 나타낸다.

도 33B는 상이한 투여량의 GMZ27로 48시간동안 처리된 HL60 세포의 프로피듐 요오드 염색을 나타낸다.

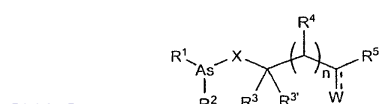
도 34는 정상 공여자의 1차 세포의 콜로니 증식에 대한 ATO 및 GMZ27의 영향을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 본 발명은 다수의 유기 비소 화합물을 제공한다.

[0035] 임의의 실시양태에서, 본 발명의 유기 비소 화합물은 하기 화학식 I의 구조 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 갖는다:

[0036] <화학식 I>



[0038] 상기 식에서,

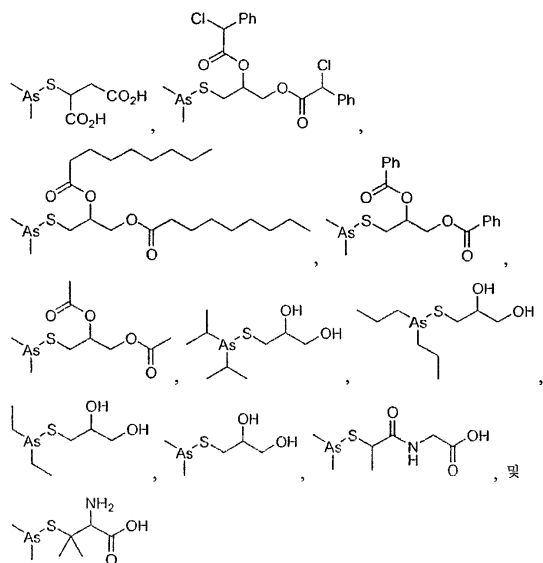
[0039] X는 S 또는 Se, 바람직하게는 S이고;

[0040] W는 O, S, 또는 (R)(R)(이때, 각 R은 독립적으로 H 또는 C₁₋₂알킬임)이고, 바람직하게는 O 또는 (R)(R)이고;

- [0041] n 은 0 또는 1, 바람직하게는 1이고;
- [0042] R^1 및 R^2 는 독립적으로 C_{1-10} 알킬이고, 바람직하게는 R^1 및 R^2 는 독립적으로 메틸, 에틸, 프로필 및 이소프로필 중에서 선택되고;
- [0043] R^3 은 $-H$, C_{1-10} 알킬, 또는 C_{0-6} 알킬- $COOR^6$ 이고;
- [0044] $R^{3'}$ 은 H , 아미노, 시아노, 할로젠, 아릴, 아르알킬, 헤테로아릴, 헤테로아르알킬, 카르복실, C_{1-10} 알킬, C_{1-10} 알케닐, 또는 C_{1-10} 알키닐이고, 바람직하게는 H 이고;
- [0045] R^4 는 $-OH$, $-H$, $-CH_3$, 아미노, $-OC(O)C_{1-10}$ 아르알킬, $-OC(O)C_{1-10}$ 알킬, 또는 $-OC(O)$ 아릴이고;
- [0046] R^5 는 $-OH$, 시아노, C_{1-10} 알콕시, 아미노, O -아르알킬, $-OC(O)C_{1-10}$ 아르알킬, $-OC(O)C_{1-10}$ 알킬, $-OC(O)$ 아릴, 또는 글리신 치환체이고;
- [0047] R^6 은 H 또는 C_{1-10} 알킬, 바람직하게는 H 이다.
- [0048] 임의의 실시양태에서, W 는 $(R)(R)$ 이고, 각 R 은 독립적으로 H 또는 C_{1-2} 알킬이다. 임의의 이러한 실시양태에서, 각 R 은 H 이다.
- [0049] 임의의 실시양태에서, R^3 은 $-H$ 또는 C_{0-6} 알킬- $COOR^6$ 이다. 임의의 이러한 실시양태에서, R^3 은 $-COOR^6$, $-CH_2COOR^6$, $-CH_2CH_2COOR^6$, $-CH(CH_3)COOR^6$, $-CH(CH_2CH_3)COOR^6$, 또는 $-CH_2CH_2CH_2COOR^6$ 이고, 이때 R^6 은 C_{1-10} 알킬이다.
- [0050] 임의의 실시양태에서, R^3 은 C_{1-10} 알킬이다. 임의의 바람직한 이러한 실시양태에서, R^3 은 메틸, 에틸, 프로필 및 이소프로필 중에서 선택되고, 바람직하게는 메틸이다.
- [0051] 임의의 실시양태에서, $R^{3'}$ 은 아미노, 시아노, 할로젠, 아릴, 아르알킬, 헤테로아릴, 헤테로아르알킬, 카르복실, C_{1-10} 알킬, C_{1-10} 알케닐 및 C_{1-10} 알키닐 중에서 선택된다. 바람직한 이러한 실시양태에서, $R^{3'}$ 은 아릴, 아르알킬, 헤테로아릴, 헤테로아르알킬, 카르복실, C_{1-10} 알케닐 및 C_{1-10} 알키닐 중에서 선택된다.
- [0052] 임의의 실시양태에서, R^4 는 $-OH$, $-H$, $-CH_3$, $-OC(O)C_{1-10}$ 아르알킬, $-OC(O)C_{1-10}$ 알킬 및 $-OC(O)$ 아릴 중에서 선택된다. 임의의 이러한 실시양태에서, R^4 는 $-OC(O)C_{1-10}$ 아르알킬, $-OC(O)C_{1-10}$ 알킬 및 $-OC(O)$ 아릴 중에서 선택된다.
- [0053] 임의의 실시양태에서, R^4 는 아미노이다. 임의의 이러한 실시양태에서, R^4 는 NH_2 이다.
- [0054] 임의의 실시양태에서, R^5 는 시아노, C_{1-10} 알콕시, 아미노, O -아르알킬, $-OC(O)C_{1-10}$ 아르알킬, $-OC(O)C_{1-10}$ 알킬 및 $-OC(O)$ 아릴 중에서 선택된다.
- [0055] 임의의 실시양태에서, X 는 S 이고, W 는 $(R)(R)$ 이고, 이때 각 R 은 H 이고, n 은 1이고, R^1 및 R^2 는 독립적으로 메틸, 에틸, 프로필 및 이소프로필 중에서 선택되고, R^3 및 $R^{3'}$ 은 H 이고, R^4 는 OH , $-OC(O)C_{1-10}$ 아르알킬, $-OC(O)C_{1-10}$ 알킬 및 $-OC(O)$ 아릴 중에서 선택되고, R^5 는 OH , $-OC(O)C_{1-10}$ 아르알킬, $-OC(O)C_{1-10}$ 알킬 및 $-OC(O)$ 아릴 중에서 선택된다. 임의의 이러한 실시양태에서, R^1 및 R^2 는 동일하고, 동시에 메틸, 에틸, 프로필 및 이소프로필 중에서 선택된다.
- [0056] 임의의 실시양태에서, X 는 S 이고, W 는 O 이고, n 은 1이고, R^1 및 R^2 는 둘다 메틸이고, R^3 은 H 및 $COOR^6$ 중에서 선택되고, $R^{3'}$ 은 H 이고, R^4 는 H 및 글루타민 치환체 중에서 선택되고, R^5 는 OH 및 글리신 치환체 중에서 선택된다.

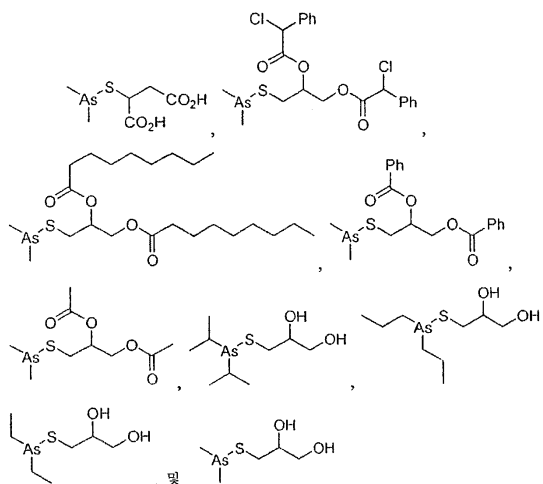
임의의 이러한 실시양태에서, R³은 COOR⁶이고, R⁴는 H이고, R⁵는 OH이고, R⁶은 H이다.

[0057] 임의의 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은

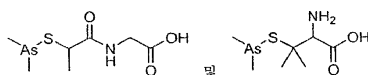


[0058] 중에서 선택된다.

[0059] 임의의 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은



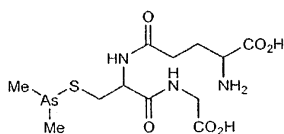
[0060] 중에서 선택된다.



[0061] 임의의 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , 및 R^6 중에서 선택된다.

[0062] 본 발명의 다른 양상은 하기 화학식 II의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것으로, 결정질 형태의 이 화합물의 용점은 125℃보다 높고, 더 바람직하게는 130℃보다 높고, 가장 바람직하게는 135℃보다 높다:

[0063] <화학식 II>



[0064]

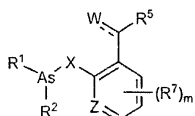
[0065] 임의의 실시양태에서, 결정질 형태의 이 화합물의 융점은 약 125 내지 150℃, 바람직하게는 약 130 내지 145℃, 더 바람직하게는 약 135 내지 140℃이다. 임의의 실시양태에서, 화합식 II의 화합물은 피리딘 염산염과 혼합되

어 있고, 이들 두 화합물은 1:0.9 내지 1:1.1, 바람직하게는 약 1:1의 비로 존재한다. 임의의 이러한 실시양태에서, 이들 두 화합물은 각 화합물을 1분자씩 포함하는 착체를 형성한다. 예상외로, 피리딘 염산염 대 화학식 II의 화합물의 비가 감소되는 경우, 피리딘 염산염의 양이 증가된 동일한 비소 화합물의 경우에 비하여, 암에 대한 생물학적 활성이 유지된 것으로 밝혀졌다.

[0066] 키랄 중심이 존재하는 경우, 모든 이성질체 형태는 본 발명의 범주에 속한다. 입체화학에 관해서는, 절대 입체 화학을 결정하기 위한 칸-인골드-프레로그(Cahn-Ingold-Prelog) 규칙을 따른다. 이 규칙은, 예를 들어 본원에 참조로 인용된 문헌[Organic Chemistry, Fox and Whitesell; Jones and Barlett Publishers, Boston, MA(1994); Section 5-6, pp.177-178]에 기술되어 있다.

[0067] 임의의 실시양태에서, 유기 비소 화합물은 하기 화학식 III의 구조를 갖는 화합물이다:

[0068] <화학식 III>



[0069]

[0070] 상기 식에서,

[0071] X는 S 또는 Se, 바람직하게는 S이고;

[0072] W는 O, S, 또는 (R)(R)(이때, 각 R은 독립적으로 H 또는 C₁₋₂알킬임)이고, 바람직하게는 O이고;

[0073] Z는 CH 또는 N이고;

[0074] R¹ 및 R²는 독립적으로 C₁₋₁₀알킬이고, 바람직하게는 R¹ 및 R²는 독립적으로 메틸, 에틸, 프로틸 및 이소프로필 중에서 선택되고;

[0075] R⁵는 -OH, 시아노, C₁₋₁₀알콕시, 아미노, O-아르알킬, -OC(O)C₁₋₁₀아르알킬, -OC(O)C₁₋₁₀알킬, -OC(O)아릴, 또는 글리신 치환체이고, 바람직하게는 OH이고;

[0076] R⁶은 H 또는 C₁₋₁₀알킬이고;

[0077] R⁷은 할로젠, -OH, C₀₋₆알킬-COOR⁶, C₁₋₆알킬, C₁₋₆알콕시, 아미노, 아미도, 시아노 및 니트로 중에서 선택되고;

[0078] m은 정수 0 내지 4, 바람직하게는 0이다.

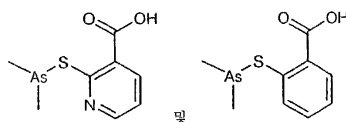
[0079] 임의의 실시양태에서, W는 (R)(R)이고, 각 R은 독립적으로 H 또는 C₁₋₂알킬이다. 임의의 이러한 실시양태에서, 각 R은 H이다.

[0080] 임의의 실시양태에서, R⁵는 시아노, C₁₋₁₀알콕시, 아미노, O-아르알킬, -OC(O)C₁₋₁₀아르알킬, -OC(O)C₁₋₁₀알킬 및 -OC(O)알킬 중에서 선택된다.

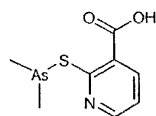
[0081] 임의의 실시양태에서, X는 S이고, W는 O이고, R¹ 및 R²는 독립적으로 메틸, 에틸, 프로필 및 이소프로필 중에서 선택되고, R⁵는 OH이다. 임의의 이러한 실시양태에서, R¹과 R²는 동일하고, 동시에 메틸, 에틸, 프로필 및 이소프로필 중에서 선택된다. 임의의 이러한 실시양태에서, R¹ 및 R²는 둘다 메틸이다.

[0082] 임의의 실시양태에서, Z는 N이다.

[0083] 임의의 실시양태에서, Z는 CH이다.



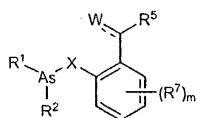
[0084] 임의의 실시양태에서, 화학식 III의 화합물은 R^1 중에서 선택된다.



[0085] 임의의 실시양태에서, 화학식 III의 화합물은 이다.

[0086] 다른 실시양태에서, 유기 비소 화합물은 하기 화학식 IV의 구조를 갖는 화합물이다:

[0087] <화학식 IV>



[0088]

[0089] 상기 식에서,

[0090] X는 S 또는 Se, 바람직하게는 S이고;

[0091] W는 O, S, 또는 (R)(R)(이때, 각 R은 독립적으로 H 또는 C₁₋₂알킬임)이고, 바람직하게는 O이고;

[0092] R¹ 및 R²는 독립적으로 C₁₋₁₀알킬이고, 바람직하게는 R¹ 및 R²는 독립적으로 메틸, 에틸, 프로틸 및 이소프로필 중
에서 선택되고;

[0093] R⁵는 -OH, 시아노, C₁₋₁₀알콕시, 아미노, O-아르알킬, -OC(O)C₁₋₁₀아르알킬, -OC(O)C₁₋₁₀알킬, -OC(O)아릴, 또는 클리신 치환체이고, 바람직하게는 OH이고;

[0094] R⁶은 H 또는 C₁₋₁₀알킬이고;

[0095] R⁷은 할로젠, -OH, C₀₋₆알킬-COOR⁶, C₁₋₆알킬, C₁₋₆알콕시, 아미노, 아미도, 시아노 및 니트로 중에서 선택되고;

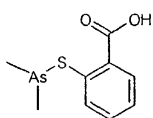
[0096] m 은 정수 0 내지 4, 바람직하게는 0이다.

[0097] 임의의 실시양태에서, W는 (R)(R)이고, 각 R은 독립적으로 H 또는 C₁₋₂알킬이다. 임의의 이러한 실시양태에서, 각 R은 H이다.

[0098] 임의의 실시양태에서, R⁵는 시아노, C₁₋₁₀알콕시, 아미노, 0-아르알킬, -OC(O)C₁₋₁₀아르알킬, -OC(O)C₁₋₁₀알킬 및 -OC(O)아릴 중에서 선택된다.

[0099] 임의의 실시양태에서, X는 S이고, W는 O이고, R¹ 및 R²는 독립적으로 메틸, 에틸, 프로필 및 이소프로필 중에서 선택되고, R⁵는 OH이다. 임의의 이러한 실시양태에서, R¹과 R²는 동일하고, 동시에 메틸, 에틸, 프로필 및 이소프로필 중에서 선택된다. 임의의 이러한 실시양태에서, R¹ 및 R²는 둘다 메틸이다.

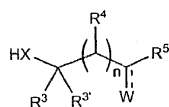
[0100] 임의의 바람직한 실시양태에서, 화학식 III의 화합물은 하기 구조를 갖는다:



[0101]

[0102] 본 발명의 다른 양상은 실시예 13에 나타낸, 뱅크스(Banks, C. H.) 등의 문헌[J. Med. Chem. (1979) 22: 572-575](본원에 참조로 인용됨)에 기술된 것과 유사한 방식의 화학식 I의 합성 방법에 관한 것인데, 이때 화학식

(C₁₋₁₀알킬)₂As(O)OH의 구조를 갖는 화합물을 pH 3으로 조절된 물/염산 용액에 용해시키고, 이 용액에 이산화황 기류를 통과시켜, 화학식 (C₁₋₁₀알킬)₂AsCl의 구조를 갖는 화합물을 제공하고, 이를 하기 화학식의 구조를 갖는 화합물과 반응시키는데, 이때 이들 두 화합물을 허용가능한 유기 용매내 피리딘으로 처리하여 화학식 I의 화합물을 제공한다:



[0103]

상기 식에서,

[0104]

X는 S 또는 Se, 바람직하게는 S이고;

[0105]

W는 O, S, 또는 (R)(R)(이때, 각 R은 독립적으로 H 또는 C₁₋₂알킬임)이고, 바람직하게는 O 또는 (R)(R)이고;

[0106]

n은 0 또는 1, 바람직하게는 1이고;

[0107]

R³은 -H, C₁₋₁₀알킬 또는 C₀₋₆알킬-COOR⁶이고;

[0108]

R^{3'}은 H, 아미노, 시아노, 할로젠, 아릴, 아르알킬, 헤테로아릴, 헤테로아르알킬, 카르복실, C₁₋₁₀알킬, C₁₋₁₀알케닐 또는 C₁₋₁₀알키닐이고, 바람직하게는 H이고;

[0109]

R⁴는 -OH, -H, -CH₃, 아미노, -OC(O)C₁₋₁₀아르알킬, -OC(O)C₁₋₁₀알킬 또는 -OC(O)아릴이고;

[0110]

R⁵는 -OH, 시아노, C₁₋₁₀알콕시, 아미노, O-아르알킬, -OC(O)C₁₋₁₀아르알킬, -OC(O)C₁₋₁₀알킬, -OC(O)아릴, 또는 글리신 치환체이고;

[0111]

R⁶은 H 또는 C₁₋₁₀알킬, 바람직하게는 H이다.

[0112]

임의의 실시양태에서, W는 (R)(R)이고, 각 R은 독립적으로 H 또는 C₁₋₂알킬이다. 임의의 이러한 실시양태에서, 각 R은 H이다.

[0113]

임의의 실시양태에서, R³은 -H 또는 C₀₋₆알킬-COOR⁶이다. 임의의 이러한 실시양태에서, R³은 -COOR⁶, -CH₂COOR⁶, -CH₂CH₂COOR⁶, -CH(CH₃)COOR⁶, -CH(CH₂CH₃)COOR⁶, 및 -CH₂CH₂CH₂COOR⁶ 중에서 선택되고, 이때 R⁶은 C₁₋₁₀알킬이다.

[0114]

임의의 실시양태에서, R³은 C₁₋₁₀알킬이다. 임의의 바람직한 이러한 실시양태에서, R³은 메틸, 에틸, 프로필 및 이소프로필 중에서 선택되고, 바람직하게는 메틸이다.

[0115]

임의의 실시양태에서, R^{3'}은 아미노, 시아노, 할로젠, 아릴, 아르알킬, 헤테로아릴, 헤테로아르알킬, 카르복실, C₁₋₁₀알킬, C₁₋₁₀알케닐 및 C₁₋₁₀알키닐 중에서 선택된다. 바람직한 이러한 실시양태에서, R^{3'}은 아릴, 아르알킬, 헤테로아릴, 헤테로아르알킬, 카르복실, C₁₋₁₀알케닐 및 C₁₋₁₀알키닐 중에서 선택된다.

[0116]

임의의 실시양태에서, R⁴는 -OH, -H, -CH₃, -OC(O)C₁₋₁₀아르알킬, -OC(O)C₁₋₁₀알킬 및 -OC(O)아릴 중에서 선택된다. 임의의 이러한 실시양태에서, R⁴는 -OC(O)C₁₋₁₀아르알킬, -OC(O)C₁₋₁₀알킬 및 -OC(O)아릴 중에서 선택된다.

[0117]

임의의 실시양태에서, R⁴는 아미노이다. 임의의 이러한 실시양태에서, R⁴는 NH₂이다.

[0118]

임의의 실시양태에서, R⁵는 시아노, C₁₋₁₀알콕시, 아미노, O-아르알킬, -OC(O)C₁₋₁₀아르알킬, -OC(O)C₁₋₁₀알킬 및 -OC(O)아릴 중에서 선택된다.

[0119]

- [0120] 본 발명은 또한 화학식 I, 화학식 II, 화학식 III 또는 화학식 IV, 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염, 및 약학적으로 허용가능한 희석제 또는 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 임의의 실시양태에서, 약학 조성물은 pH가 약 5보다 큰, 바람직하게는 약 5 내지 약 8, 더 바람직하게는 약 5 내지 약 7인 수용액이다.
- [0121] 본 발명의 다른 양상은 치료유효량의 화학식 I, 화학식 II, 화학식 III 또는 화학식 IV의 화합물을 투여함을 포함하는, 암의 치료 방법을 제공한다.
- [0122] 본 발명은 또한 암의 치료를 위한 약제의 제조에서, 화학식 I, 화학식 II, 화학식 III 또는 화학식 IV의 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염의 용도에 관한 것이다.
- [0123] 임의의 실시양태에서, 암은 고형 종양(예: 뇌, 폐, 간, 비장, 신장, 림프절, 소장, 췌장, 혈구, 뼈, 결장, 위, 유방, 자궁내막, 전립선, 고환, 난소, 중추신경계, 피부, 두경부, 식도 또는 골수) 및 혈액암(예: 백혈병, 급성 전골수구성 백혈병, 림프종, 다발골수종, 척수형성이상증, 골수증식질환 또는 불응성 빈혈) 중에서 선택된다. 임의의 이러한 실시양태에서, 암은 급성 및 만성 백혈병 중에서 선택되는 백혈병이다.
- [0124] 따라서, 다른 양상에서, 본 발명은 암 환자에게 화학식 I, 화학식 II 또는 화학식 III의 화합물을 포함하는 조성물, 또는 전술된 약학 조성물을 투여함을 포함하는, 암 환자의 치료 방법을 포함한다. 화합물의 치료유효량은 0.1 내지 1000mg/kg, 1 내지 500mg/kg 또는 10 내지 100mg/kg일 수 있다. 특정 실시양태에서, 이 방법은 조성물을 매일 투여함을 포함할 수 있다. 또한 치료 방법은 다수회 투여를 필요로 할 수 있다고 생각된다. 이 방법은 화합물을, 예를 들어 주사에 의해 매일 투여함을 포함할 수 있다. 명세서에 기술된 또 다른 투여 경로 및 방법이 또한 사용될 수 있고, 투여 방식은 주로 암의 유형과 위치에 따라 좌우될 것이다. 임의의 실시양태에서, 이 방법은 또한 환자에게 1종 이상의 추가의 체제를 투여함을 포함한다. 추가의 체제는 모든 트랜스-레티노산, 9-시스 레티노산, Am-80, 또는 아스코르브산일 수 있다. 다른 보조 암 치료법, 예를 들어 화학요법, 방사선요법, 유전자요법, 호르몬요법 및 당업계에 공지된 기타 암 치료법도 또한 본 발명의 방법과 함께 고려된다.
- [0125] 국부적, 전신적, 직접 투여 및 관류를 포함한 다양한 투여 방법이 고려된다. 이러한 방법으로는 주사, 경구 경로, 정맥내, 동맥내, 종양내, 종양 혈관계, 복강내, 기관내, 근육내, 내시경, 병변내, 경피, 피하, 국소, 비강, 협측, 점막, 향문, 직장 투여 등이 있다.
- [0126] 정의
- [0127] " C_{x-y} 알킬"이란 용어는쇄의 탄소수가 x 내지 y 인 직쇄 알킬 및 분지쇄 알킬 기, 및 할로알킬 기(예: 트리플루오로메틸 및 2,2,2-트리플루오로에틸 등)를 포함한, 치환되거나 치환되지 않은 포화 탄화수소 기를 가리킨다. C_0 알킬은 이 기가 말단 위치에 있을 때는 수소를 나타내고, 내부에 있다면 결합을 나타낸다. " C_{2-y} 알케닐" 및 " C_{2-y} 알키닐"이란 용어는 전술된 알킬과 길이 및 가능한 치환의 면에서 유사하지만 각각 하나 이상의 이중결합 또는 삼중결합을 함유하는, 치환되거나 치환되지 않은 불포화 지방족 기를 가리킨다.
- [0128] " C_{1-6} 알콕시"란 용어는 산소가 결합되어 있는 C_{1-6} 알킬 기를 가리킨다. 대표적인 알콕시 기로는 메톡시, 에톡시, 프로톡시, 3급-부톡시 등이 있다. "에테르"는 산소에 의해 공유 결합된 두 탄화수소이다. 따라서, 에테르의 알킬을 제공하는 알킬의 치환체는 알콕시이거나 알콕시와 비슷하다.
- [0129] 본원에 사용된 " C_{1-6} 아르알킬"이란 용어는 아릴 기로 치환된 C_{1-6} 알킬 기를 가리킨다.
- [0130] 본원에 사용된 "아릴"이란 용어는 5원, 6원 및 7원의 치환되거나 치환되지 않은 1환 방향족 기(고리의 각 원자는 탄소임)를 포함한다. "아릴"이란 용어는 또한 1개 이상의 고리가 방향족인(예컨대, 다른 환상 고리는 시클로알킬, 시클로알케닐, 시클로알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 및(또는) 헤테로시클릴일 수 있음) 두 인접한 고리에서 2개 이상의 탄소가 공통인 환상 고리를 2개 이상 갖는 다환상 고리 시스템을 포함한다. 아릴 기로는 벤젠, 나프탈렌, 페난트렌, 페놀, 아닐린 등이 있다.
- [0131] "약학적으로 허용가능한"이란 말은 본원에서 옳은 의학적 판단의 범주내에서 지나친 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 기타 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직에 접촉하여 사용하기에 적합한, 적당한 이점/위험비에 상응하는 리간드, 물질, 조성물 및(또는) 투여형을 가리킨다.
- [0132] "예방"이란 용어는 당업계에서 인정되는 것으로서, 국소 재발(예컨대, 동통), 질환(예: 암), 복합 증후군(예: 심부전) 또는 임의의 다른 의학적 상태와 같은 상태에 관하여 사용되는 경우 당업계에서 잘 이해되고, 조성물을

투여받지 않은 환자에 비하여 환자의 의학적 상태의 증상의 발생 빈도를 줄이거나, 그 개시를 지연시키는 조성물의 투여를 포함한다. 따라서, 암의 예방은, 예를 들어 치료하지 않은 대조군에 비하여 예방적 치료를 받은 환자군에서 검출가능한 암 증식의 수를 감소시키고(감소시키거나), 치료하지 않은 대조군에 비하여 치료한 군에서 검출가능한 암 증식의 출현을, 예컨대 통계적으로 또한(또는) 임상적으로 유의적인 정도로 지연시킴을 포함한다. 감염의 예방은, 예를 들어 치료하지 않은 대조군에 비하여 치료한 군에서 감염의 진단 횟수를 감소시키고(감소시키거나), 치료하지 않은 대조군에 비하여 치료한 군의 감염증의 증상 개시를 지연시킴을 포함한다. 동통의 예방은, 예를 들어 치료하지 않은 대조군에 비하여 치료한 군의 환자가 경험하는 동통 느낌의 크기를 감소시키거나, 또 다르게는 동통 느낌을 지연시킴을 포함한다.

[0133] "예방적 또는 치료적" 치료란 용어는 당업계에서 인정되는 것으로서, 숙주에 대한 하나 이상의 본 발명의 조성물의 투여를 포함한다. 원치않는 상태(예컨대, 숙주 동물의 질환 또는 다른 원치않는 상태)의 임상 증상이 나타나기 전에 조성물이 투여되면, 치료는 예방적이고(즉, 숙주가 원치않는 상태를 발병하지 않도록 막음), 반면에 원치않는 상태가 나타난 후에 조성물이 투여되면, 치료는 치료적이다(즉, 존재하는 원치않는 상태 또는 그의 부작용을 줄이거나, 개선시키거나 또는 안정화할 것임).

[0134] "치환된"이란 용어는 주쇄 중 1개 이상의 탄소에서 수소를 대체하는 치환체를 갖는 잔기에 적용된다. "치환" 또는 "~로 치환된"이란 이러한 치환이 치환된 원자의 허용된 원자가 및 치환체에 따르고, 치환에 의해, 예컨대 재배열, 환화, 제거 등과 같은 변환을 자발적으로 겪지 않는 안정한 화합물이 생성된다는 내재적 조건을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 본원에 사용된 바와 같이, "치환된"이란 용어는 유기 화합물의 모든 가능한 치환체를 포함하는 것으로 생각된다. 넓은 양상에서, 허용가능한 치환체로는 유기 화합물의 비환상 및 환상, 분지형 및 비분지형, 탄소환상 및 헤테로환상, 방향족 및 비방향족 치환체를 포함한다. 허용가능한 치환체는 적당한 유기 화합물에 대하여 하나 이상이고 동일하거나 상이할 수 있다. 본 발명에 있어서, 질소와 같은 헤테로원자는 수소 치환체, 및(또는) 헤테로원자의 원자수를 만족시키는 본원에 기술된 유기 화합물의 임의의 허용가능한 치환체를 가질 수 있다. 치환체는, 예를 들어 할로젠, 히드록실, 카르보닐(예: 카르복실, 알콕시카르보닐, 포르밀 또는 아실), 티오키르보닐(예: 티오에스테르, 티오아세테이트 또는 티오포름에이트), 알콕실, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 포스피네이트, 아미노, 아미도, 아미딘, 이민, 시아노, 니트로, 아지도, 술폰히드릴, 알킬티오, 술페이트, 술포네이트, 술포모일, 술폰아미도, 술폰닐, 헤테로시클릴, 아르알킬, 또는 방향족 또는 헤테로방향족 잔기를 포함할 수 있다. 당업자라면 탄화수소 쇄상의 치환된 잔기는, 적당한 경우, 그 자체가 치환될 수 있음을 알 것이다.

[0135] 본 발명의 치료 방법에 있어서 화합물의 "치료유효량"이란, 바람직한 투여법의 일부로서 (포유동물, 바람직하게는 인간에게) 투여될 때, 치료할 장애 또는 상태의 임상적으로 허용가능한 기준 또는 화상 목적에 따라, 예컨대 임의의 의학적 치료에 적용가능한 적당한 이점/위험 비로, 증상을 완화시키거나, 상태를 개선시키거나, 또는 질환 상태의 개시의 늦추는 제제내 화합물(들)의 양을 가리킨다.

[0136] 본원에 사용된 바와 같이, "치료함" 또는 "치료"란 용어는 증상, 임상적 징후 및 상태의 근본적인 병리를 환자의 상태를 개선하거나 안정화하도록 역전시키거나, 감소시키거나 또는 중지시킴을 포함한다.

[0137] 무기 비소 화합물의 독성 대 유기 비소 화합물의 독성

[0138] 삼산화비소의 사용은 그의 독성에 의해 제한된다. 반면에, OA는 OA내로의 생체내 무기 비소의 메틸화가 해독 반응으로 간주될 정도로 훨씬 덜 독성이다. OA 모노메틸아르신산 및 디메틸아르신산은 무기 비소의 1차 대사산물이다(휴즈(Hughes) 등의 문헌, 1998). 삼산화비소를 포함하나 무기 비소 화합물은 심혈관계, 위장관, 신장, 피부, 신경계 및 혈액을 포함한 다수의 기관 시스템에 다양한 영향을 준다. 무기 비소 화합물은 특히 간에 독성이어서, 침윤, 중심 괴사 및 경화증을 일으킨다(문헌[IARC, 1980]; 문헌[ACGIH, 1991]; 벨라일스(Beliles) 등의 문헌, 1994; 고이어(Goyer) 등의 문헌, 1996). 현재 무기 비소 화합물이 인간의 피부 및 폐의 발암원이라는 증거가 충분히 있다.

[0139] 주어진 비소 화합물의 독성은 비소 화합물이 몸으로부터 제거되는 속도 및 그의 조직 축적 정도와 관련있다(벨라일스 등의 문헌, 1994). 일반적으로 독성은 다음과 같은 순서로 증가한다: 유기 비소 화합물 <As⁵⁺ <As³⁺ (삼산화비소 포함) <아르신. 무기 비소 화합물과 달리, OA로 인한 사망 또는 중증의 독성은 문헌에 보고된 바 없다. 따라서, 포유동물에서 무기 비소의 메틸화는 메틸화 OA의 더 낮은 독성, 및 그의 신속한 배출 및 낮은 보유율 때문에 해독 메커니즘으로 여겨졌다(벨라일스 등의 문헌, 1994; 고이어 등의 문헌, 1996). 좋은 예는 삼산화비소를 포함한 무기 비소에 노출된 후 대부분의 포유동물에 의해 배설되는 주된 뇨 대사산물인 유기화합물 디메

틸아르신산이다. 쥐에서의 생체내 독성 실험에서, 삼산화비소의 복강내 투여 후 LD₅₀(급성 독성으로 인해 동물의 50%가 죽는 투여량)은 10mg/kg이었지만(문헌[Investigator's Brochure, 1998]), 디메틸아르신산을 투여한 후 LD₅₀은 500mg/kg이었다(문헌[MSDS, 1998]).

[0140] 암 치료

[0141] 본 발명의 유기 비소 화합물을 사용하여 백혈병, 림프종, 다발골수종, 척수형성이상증 또는 골수증식 장애를 포함한 모든 고형 종양 및 모든 혈액암을 포함한 다양한 암을 치료할 수 있다. 또한 다른 형태의 치료에 불응성으로 된 혈액암을 치료하는데 OA를 사용할 수 있다.

[0142] 백혈병은 백혈구의 비정상적인 증식을 특징으로 하는 조혈 조직의 악성 신생물이고, 4가지의 주요 암 유형 중 하나이다. 백혈병은 가장 두드러지게 관련된 백혈구의 유형에 따라 분류된다. 급성 백혈병은 주로 미분화된 세포군이고, 만성 백혈병은 더 성숙한 세포 형태를 갖는다(WO 9924029호).

[0143] 급성 백혈병은 림프모구성(ALL) 및 비림프모구성(ANLL)으로 나뉘어지고, 프랑스-미국-영국 분류(French-American-British classification)에 따라 또는 이들의 분화 유형 및 정도에 따라 형태학적 외관 및 세포화학적 외관으로 추가로 더 나뉘어질 수 있다. 골수세포 표면 표지/항원은 물론, 특정 B세포 및 T세포가 또한 분류에 사용된다. ALL은 주로 소아기 질환이지만, 급성 골수성 백혈병으로도 알려져 있는 ANLL은 성인들 사이에 더 흔한 급성 백혈병이다.

[0144] 만성 백혈병은 림프성(CLL) 및 골수성(CML)으로 나뉘어진다. CLL은 혈액, 골수 및 림프양 기관에서 증가된 수의 성숙한 림프구를 특징으로 한다. 대부분의 CLL 환자는 B세포 특징을 갖는, 클론 확장된 림프구를 갖는다. CLL은 노인 질환이다. CML에서, 과립구는 혈액 및 골수의 모든 분화 단계에서 두드러지게 존재하지만, 간, 비장 및 다른 기관에 영향을 줄 수 있다. 본 발명의 OA로 치료될 수 있는 다른 악성 혈액 질환으로는 비제혈적으로 척수형성이상증, 골수증식 질환, 림프종 및 다발골수종이 있다.

[0145] 약학 조성물

[0146] 당업자라면 본 명세서에 비추어 본원에 참조로 인용된 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990]에 예시된 바와 같이, 1종 이상의 유기 비소 화합물 또는 추가의 활성 성분을 함유하는 약학 조성물의 제조에 대하여 알 것이다. 또한, 동물(예컨대, 인간) 투여에 있어서, 제조는 FDA 생물제제 기준 부서에서 요구하는 멸균성, 발열원성, 일반 안전도 및 순도 기준을 충족시켜야 함을 알 것이다.

[0147] 본원에 사용된 바와 같이, "약학적으로 허용가능한 담체"란 당업자라면 알고 있을 임의의 또한 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 계면활성제, 산화방지제, 방부제(예컨대, 항세균제, 항진균제), 등장제, 흡수지연제, 염, 방부제, 약물, 약물안정제, 겔, 결합제, 부형제, 붕해제, 활택제, 감미제, 향료, 염료, 이와 같은 물질 및 이들의 혼합물을 포함한다(예를 들어, 본원에 참조로 인용된 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp.1289-1329] 참조). 임의의 통상적인 담체가 활성 성분과 비상용성인 경우를 제외하고는, 치료적 또는 약학 조성물에서의 그의 사용이 기대된다.

[0148] 유기 비소 화합물은 고체, 액체 또는 에어로졸 형태로 투여될 것인지 및 주사와 같은 투여 경로에 맞게 멸균이어야 할지에 따라 상이한 유형의 담체와 혼합될 수 있다. 본 발명은 정맥내, 피부내, 동맥내, 복강내, 병변내, 두개내, 관절내, 전립선내, 흉막내, 기관내, 비강내, 유리체내, 질내, 직장내, 국소, 종양내, 근육내, 복강내, 피하, 결막내, 혈관내, 점막내, 심장막내, 배꼽내, 안내, 경구, 국소, 국부, 주사, 주입, 연속 주입, 표적 세포의 직접적인 국소 관류 찌질, 카테터, 세척, 지질 조성물내(예컨대, 리포솜), 또는 당업자라면 알고 있을 다른 방법 또는 상기 방법의 임의의 혼합 방법에 의해 투여될 수 있다(본원에 참조로 인용된 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990] 참조).

[0149] 환자에게 투여되는 본 발명의 조성물의 실제 투여량은 체중, 상태의 위중도, 치료할 질환의 유형, 선행 또는 병행되는 치료 개입, 환자의 특발증 및 투여 경로와 같은 물리적 및 생리학적 인자에 의해 결정될 수 있다. 투여를 담당하는 진료의는 여하튼 조성물내 활성 성분(들)의 농도 및 개별 환자에 적당한 투여량을 결정할 것이다.

[0150] 임의의 실시양태에서, 약학 조성물은, 예를 들어 유기 비소 화합물 약 0.1% 이상을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 활성 화합물은 단위 중량의 약 2 내지 약 75%, 또는 예를 들어 약 25 내지 60%, 및 유도할 수 있는 그 안의 임의의 범위를 차지할 수 있다. 다른 비제한적인 예에서, 투여량은 또한 투여당 약 0.1mg/kg/체중, 0.5mg/kg/체중, 1mg/kg/체중, 약 5mg/kg/체중, 약 10mg/kg/체중, 약 20mg/kg/체중, 약 30mg/kg/체중, 약 40mg/kg/체중, 약 50mg/kg/체중, 약 75mg/kg/체중, 약 100mg/kg/체중, 약 200mg/kg/체중, 약 350mg/kg/체중, 약 500

mg/kg/체중, 약 750mg/kg/체중, 약 1000mg/kg/체중 또는 그 이상, 및 유도할 수 있는 그 안의 임의의 범위를 차지할 수 있다. 본원에 기재된 숫자로부터 이끌어내는 범위의 비제한적인 예에서, 전술된 숫자에 근거하여, 약 10mg/kg/체중 내지 약 100mg/kg/체중 등의 범위가 투여될 수 있다.

- [0151] 어느 경우에서나, 조성물은 1종 이상의 성분의 산화를 지연시키기 위하여 다양한 산화방지제를 포함할 수 있다. 또한, 미생물 작용의 방지는 파라벤(예컨대, 메틸파라벤, 프로필파라벤), 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 또는 이들의 혼합물을 포함한(비제한적임) 다양한 항세균제 및 항진균제와 같은 방부제에 의해 일어날 수 있다.
- [0152] 유기 비소 화합물은 유리 염기 형태, 중성 형태 또는 염 형태로 조성물에 배합될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 염은 무기 염기(예: 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 철 수산화물); 또는 유기 염기(예: 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘 또는 프로카인)로부터 유도되는 유리 카르복실 기로 형성되는 염을 포함한다.
- [0153] 조성물이 액체 형태인 실시양태에서, 담체는 물, 에탄올, 폴리올(예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 액체(예컨대, 트리글리세라이드, 식물유, 리포솜) 및 이들의 혼합물을 포함하는(비제한적임) 용매 또는 분산매질일 수 있다. 적당한 유동성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅제의 사용에 의해; 담체(예: 액체 폴리올 또는 지질)내 분산에 의한 필요한 입도의 유지에 의해; 계면활성제(예: 히드록시프로필셀룰로오즈)의 사용에 의해; 또는 이들 방법의 혼합 방법에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우에서, 당, 염화나트륨 또는 이들의 혼합물과 같은 등장제를 포함시키는 것이 바람직할 것이다.
- [0154] 멸균 주사액은 필요량의 적당한 용매에 활성 화합물을 상기에 열거한 다양한 기타 성분과 함께 도입하고, 필요하다면 여과 멸균함으로써 제조한다. 일반적으로, 분산액은 염기성 분산매질 및(또는) 다른 성분들을 함유하는 멸균 매개체내에 다양한 멸균 활성 성분을 도입함으로써 제조된다. 멸균 주사 용액, 현탁액 또는 유화액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에서, 바람직한 제조 방법은 진공-건조 및 동결-건조 기술로서, 이들 기술은 사전에 멸균-여과시킨 액체 매질로부터 활성 성분 및 임의의 추가의 바람직한 성분의 분말을 생성한다. 액체 매질은 필요하다면 적합하게 완충되어야 하고, 액체 희석제는 주사 이전에 먼저 충분한 식염수 또는 글루코오스에 의해 등장성으로 된다. 직접 주사를 위한 매우 농축된 조성물의 제조도 또한 고려되는데, 이때 용매로서 DMSO를 사용하면 매우 빠른 침투가 일어나, 작은 면적으로의 고농도 활성 성분의 전달이 기대된다.
- [0155] 조성물은 제조 및 보관 조건하에 안정하여야 하고, 세균 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용에 대하여 방부되어야 한다. 따라서, 바람직한 조성물은 pH가 약 5보다 크고, 바람직하게는 약 5 내지 약 8이고, 더 바람직하게는 약 5 내지 약 7이다. 내독소 오염은 안전한 수준으로, 예를 들어 0.5ng/mg단백질보다 적게, 최소로 유지되어야 함이 이해될 것이다.
- [0156] 특정 실시양태에서, 주사 조성물의 장기간 흡수는 조성물에 흡수지연제(예: 알루미늄 모노스테아레이트, 젤라틴 또는 이들의 혼합물)를 사용함으로써 일어날 수 있다.
- [0157] 복합 요법
- [0158] 본 발명의 양상은 유기 비소 화합물을 다른 제제 또는 치료 방법, 바람직하게는 다른 암 치료법과 병용할 수 있다는 것이다. 유기 비소 화합물은 수분 내지 수주의 간격을 두고 다른 제제 치료보다 앞서거나 뒤따를 수 있다. 다른 제제 및 발현 구성물이 세포에 따로 적용되는 실시양태에서, 일반적으로 각 전달 시간 사이에 상당한 시간이 경과하지 않으므로 그 제제 및 발현 구성물은 여전히 세포에 유리하게 혼합 효과를 발휘할 수 있음이 보장된다. 예를 들어, 그러한 경우에서, 세포, 조직 또는 유기체를 유기 비소 화합물과 실질적으로 동시에(즉, 약 1분 이내에) 2가지, 3가지, 4가지 이상의 양식으로 접촉시킬 수 있다고 생각된다. 다른 양상에서, 1종 이상의 제제는 유기 비소 화합물을 투여하기 전 및(또는) 후 약 1분, 약 5분, 약 10분, 약 20분, 약 30분, 약 45분, 약 60분, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 8시간, 약 9시간, 약 10시간, 약 11시간, 약 12시간, 약 13시간, 약 14시간, 약 15시간, 약 16시간, 약 17시간, 약 18시간, 약 19시간, 약 20시간, 약 21시간, 약 22시간, 약 23시간, 약 24시간, 약 25시간, 약 26시간, 약 27시간, 약 28시간, 약 29시간, 약 30시간, 약 31시간, 약 32시간, 약 33시간, 약 34시간, 약 35시간, 약 36시간, 약 37시간, 약 38시간, 약 39시간, 약 40시간, 약 41시간, 약 42시간, 약 43시간, 약 44시간, 약 45시간, 약 46시간, 약 47시간 내지 약 48시간 또는 그 이상 이내에 투여될 수 있다. 임의의 다른 실시양태에서, 제제는 유기 비소 화합물을 투여하기 전 및(또는) 후 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일, 약 14일, 약 15일, 약 16일, 약 17일, 약 18일, 약 19일, 약 20일 내지 약 21일 이내에 투여될 수 있다. 일부 상황에서는 치료 기간을 유의적으로 연장하는 것이 바람직할 수 있지만, 이때 개개의

투여 사이에 몇주(예컨대, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주 또는 약 8주 또는 그 이상)가 경과한다.

[0159] 다양한 혼합물이 사용될 수 있는데, 유기 비소 화합물은 "A"이고, 임의의 다른 치료제일 수 있는 제2 제제는 "B"이다:

[0160] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0161] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0162] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0163] 환자에 대한 본 발명의 치료 조성물의 투여는 독성을 고려하여(있다면) 화학요법제 투여의 일반적인 프로토콜을 따를 것이다. 치료 주기는 필요에 따라 반복될 것으로 예상된다. 수술적 개입은 물론, 다양한 표준 치료법 또는 보조 암 치료법이 전술된 비소 제제와 함께 혼합물에 적용될 수 있음이 또한 기대된다. 이들 치료법으로는 비제한적으로 화학요법, 방사선요법, 면역요법, 유전자요법 및 수술이 있다. 하기 부분은 몇몇 보조 암 치료법을 기술한다.

[0164] *화학요법*

[0165] 암 치료법은 또한 화학 및 방사선 기반 치료법과의 다양한 복합 요법을 포함한다. 복합 화학요법의 예로는 시스플라틴(CDDP), 카르보플라틴, 프로카르바진, 메클로레트아민, 시클로포스프아미드, 캄프토테신, 이포스프아미드, 멜팔란, 클로르람부실, 부술판, 니트로소우레아, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 블레오마이신, 플리코마이신, 미토마이신, 에토포시드(VP16), 타목시펜, 탈옥시펜, 에스테르젠 수용체 결합제, 탁솔, 챔시타비엔, 나벨빈, 파르네실-단백질 트랜스페라제 저해제, 트랜스플라티늄, 5-플루오로우라실, 빈크리스틴, 빈블라스틴 및 메토트렉세이트, 또는 전술한 것중 임의의 유사체 또는 유도체 변형물이 있다.

[0166] *방사선요법*

[0167] DNA 손상을 일으키고 광범위하게 사용되어 온 기타 인자로는 흔히 γ 선, X선의 지정 전달로 알려진 것, 및(또는) 종양 세포에 대한 방사성 동위원소가 있다. 극초단파 및 자외선 조사와 같은 DNA 손상 인자의 다른 형태도 또한 고려된다. 이들 모든 인자가 DNA, DNA의 선구체, DNA의 복제 및 복구, 및 염색체의 조립 및 유지에 광범위한 손상을 일으킨다는 것이 가장 그럴 듯하다. X선의 조사량 범위는 장기간동안(3 내지 4주) 매일 50 내지 200뢴트겐의 조사량 내지 1회 2000 내지 6000뢴트겐의 범위이다. 방사성 동위원소의 조사량 범위는 광범위하게 변하고, 동위원소의 반감기, 방출되는 방사선의 강도 및 유형, 및 종양 세포에 의한 흡수에 따라 좌우된다. "접촉" 및 "노출"이란 용어는, 세포에 적용되는 경우, 본원에서 치료적 구성물 및 화학요법제 또는 방사선요법제가 표적 세포에 전달되거나 또는 표적 세포와 나란히 놓여지는 방법을 기술하는데 사용된다.

[0168] *면역요법*

[0169] 면역요법제는 일반적으로 암 세포를 표적으로 삼아 파괴하기 위한 면역 작동 세포 및 분자의 사용에 의존한다. 면역 작동물질은, 예를 들어 종양 세포 표면의 몇몇 표지에 특이적인 항체일 수 있다. 항체는 단독으로 요법의 작동물질로서 작용할 수 있거나 또는 세포 사멸을 실제적으로 행하기 위하여 다른 세포를 모집할 수 있다. 항체는 또한 약물 또는 독소(화학요법제, 방사뉴클레오티드, 리신 A쇄, 콜레라 독소, 백일해 독소 등)에 콘쥬게이트화되거나 또는 단지 표적화제로서 작용할 수 있다. 또 다르게는, 작동물질은 종양 세포 표적과 직접적으로 또는 간접적으로 상호반응하는 표면 분자를 갖는 림프구일 수 있다. 다양한 작동세포로는 세포독성 T세포 및 NK 세포가 있다.

[0170] 따라서, 면역요법은 복합 요법의 일부로서 유전자요법과 함께 사용될 수 있을 것이다. 복합 요법에 대한 개략적인 접근법이 이하에 논의되어 있다. 일반적으로, 종양 세포는 표적화하기 쉬운, 즉 대부분의 다른 세포에는 존재하지 않는 몇몇 표지를 가져야 한다. 많은 종양 표지가 존재하며, 이들중 임의의 것은 본 발명과 관련하여 표적화하기에 적합할 수 있다. 일반적인 종양 표지로는 암배아항원, 전립선 특이 항원, 비뇨암 관련 항원, 태아 항원, 티로시나제(p97), gp68, TAG-72, HMF6, 시알릴 루이스(Sialyl Lewis) 항원 MucA, MucB, PLAP, 에스트로젠 수용체, 라미닌 수용체, *erb B* 및 p155가 있다.

[0171] *유전자요법*

[0172] 또 다른 실시양태에서, 2차 치료는 1차 치료제 투여 전, 투여 후 또는 투여와 동시에 치료적 폴리뉴클레오티드를 투여하는 2차 유전자요법이다. 유전자 생성물을 암호화하는 백터와 함께 치료제의 전달은 표적 조직에 대하

여 과증식방지 복합 효과를 나타낼 것이다.

[0173] 수술

[0174] 암환자의 약 60%는 예방적, 진단적 또는 병기결정(staging), 치료적 및 완화적 수술을 포함하는 몇몇 유형의 수술을 겪을 것이다. 치료적 수술은 다른 요법, 예를 들어 본 발명의 치료법, 화학요법, 방사선요법, 호르몬요법, 유전자요법, 면역요법 및(또는) 또 다른 요법과 함께 사용될 수 있는 암 치료법이다. 치료적 수술은 암 조직의 전부 또는 일부분을 물리적으로 제거, 절개 및(또는) 파괴하는 절제술을 포함한다. 종양 절제란 종양의 일부 이상을 물리적으로 제거함을 가리킨다. 종양 절제 외에, 수술에 의한 치료로는 레이저 수술, 냉동 수술, 전기 수술 및 현미경 제어 수술(모스(Mohs) 수술)이 있다. 본 발명은 표재성 암, 전암, 또는 부수적인 양의 정상 조직의 제거와 관련하여 사용될 수 있다.

[0175] 실시예

[0176] 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 실시양태를 나타내기 위하여 포함된다. 당업자라면 하기 실시예에 개시된 기법들이 본 발명의 실시에서 잘 기능하도록 본 발명자에 의해 개발된 기법을 대표하고 따라서 본 발명의 실시예에 바람직한 양식을 구성하는 것으로 생각될 수 있음을 알 것이다. 그러나, 당업자는 명세서에 비추어, 개시되어 있는 특정 실시양태에서 다수의 변화가 이루어질 수 있고, 본 발명의 요지 및 범주를 벗어남이 없이 비슷하거나 유사한 결과를 얻을 수 있다.

[0177] 실시예 1

[0178] S-디메틸아르시노-티오숙신산(MER1), S-디메틸아르시노-살리실산(SAL1), 및 S-(디메틸아르시노) 글루타티온(SGLU1)의 합성

[0179] MER-1: 250ml들이 환저 플라스크내 글림(1,2-디메톡시에탄) 100ml에 메르캅토숙신산 4.5g을 넣었다. 디메틸클로로아르신(0.03몰) 4ml를 적가한 후, 디에틸아민(0.04몰) 4ml를 다시 적가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 20 시간동안 교반하였다. 디에틸아민 염산염의 백색 침전물이 형성되었고 이를 여과에 의해 분리하였다. 글림내 MER1의 용액을 감압 증류에 의해 크게 감량시켰다. MER1의 백색 결정을 여과에 의해 분리하여 차가운 증류수로 세척하였다. 그 다음, 에탄올-물로부터 150℃의 일정한 융점까지 무색의 결정질 생성물을 재결정화하였다.

[0180] SAL-1: 100ml들이 플라스크에 2-메르캅토 벤조산(티오살리실산) 5g, 글림 75ml, 디메틸클로로아르신 5ml 및 디에틸아민 5ml를 넣었다. 이 혼합물을 질소 분위기하에 1시간동안 환류시키고 실온에서 밤새 교반하였다. 디에틸아민 염산염의 침전물을 여과에 의해 분리하였다. 생성물의 결정이 분리될 때까지 여액을 감압하에 서서히 증발시켰다. 생성물을 함유하는 증발된 용액을 얼음에서 냉각시키고 차가운 용액을 여과하였다. 에탄올로부터 97℃의 일정한 융점까지 생성물의 결정을 재결정화시켰다.

[0181] SGLU-1: 글림내에서 글루타티온(14.0g, 45.6밀리몰)을 고속으로 교반하면서, 디메틸클로로아르신(6.5g, 45.6밀리몰)을 적가하였다. 그 다음, 피리딘(6.9g, 91.2밀리몰)을 슬러리에 첨가한 후, 혼합물을 가열 환류시켰다. 열을 즉시 제거하고 혼합물을 실온에서 4시간동안 혼합하였다. 생성된 불용성 고체를 단리하고 에탄올로부터 재결정화하여 피리딘 염산염 착체로서 4를 얻었다(수율 75%): 융점 115-118℃; NMR(D₂O) δ 1.35(s, 6H), 1.9-4.1(m's, 10H), 7.8-9.0(m, 5H); 질량 스펙트럼(m/e) 140, 125, 110, 105, 79, 52, 45, 36. 이 물질은 본원에 기술된 실시예에 사용되지 않지만, 본원에 참조로 인용된 벅크스 등의 문헌[J. Med. Chem. (1979)22: 572-575]에 기술된 생물학적 분석에는 사용되었다.

[0182] MER-1, SGLU-1 및 SAL-1을 합성하는 실험은 발명자 랄프 징가로(Ralph Zingaro)에게 양도된, 미국 텍사스주 휴스턴 소재의 로버트 에이 웰치 재단(Robert A. Welch foundation)에 의해 투자되었다.

[0183] 실시예 2

[0184] 시험관내 평가를 위한 분석

[0185] 다양한 시험관내 분석을 사용하여 본 발명의 비소 화합물, 조성물 및(또는) 배합물에 대한 암 세포의 반응을 결정하였다. 분석된 반응중 일부는 세포 생존율, 세포 주기, 세포자멸 및 성숙도를 포함하였다. 본 발명자들은 또한 본 발명의 비소 조성물에 대한 민감성에 있어서 암 세포의 PML/RAR 알파 유전자의 필요성을 평가하는 분석을 설계하였다. 이러한 분석에 대한 기술이 이하에 제공된다.

[0186] **술포로다민 B 분석**

[0187] 다양한 인간 암 세포를 지시된 농도의 MER1, SAL1 또는 SGLU1의 존재하 또는 부재하에 48시간동안 미소적정 평판에서 배양한 다음, 술포로다민 B 염료를 배양물에 첨가하였다. 술포로다민 B 염료는 단백질 결합 염료로서, 생균을 표지한다. 결과는 처리되지 않은 대조 세포에 비하여 처리된 세포의 증식률로서 보고된다(음의 데이터는 세포 사멸을 나타냄).

[0188] **MTT 및 트립판 블루 분석**

[0189] 이 분석에 있어서, 백혈병 환자 및 정상 공여자의 말초혈액 샘플로부터 피콜 히파크(Ficoll Hipaque) 분별화에 의해 단핵 세포를 분리하고 DMEM 완전 배지에 재현탁시켰다. 또 다르게는, 일부 경우에 세포주를 사용하였다. 다양한 인간 세포주로부터 얻은 악성 세포(보통 5×10^4 세포/ml) 또는 백혈병 환자 및 건강한 공여자의 말초혈액 으로부터 얻은 단핵 세포(1×10^6 세포/ml)를 다양한 농도의 MER1, SAL1 또는 SGLU1의 존재하 또는 부재하에 알파 MEM 또는 RPMI 1640내에서 배양하였다. 각각의 실험 조건을 3조씩 수행하였다. MER1, SAL1 또는 SGLU1에 대한 지시된 노출 일수가 지난 후(보통 3일), 웰에 염료(MTT 또는 트립판-블루)를 첨가하여 세포 생존율을 평가하였다. MTT 염료는 웰내 생균의 존재에 따라 그 색이 변한다. MTT 처리하의 세포의 생존율은 대조 세포 증식의 비율로서 평가되었다. 트립판-블루 염료는 사균에 침투하며, 생균은 현미경하에 계수될 수 있고, 생존율을 계산하였다.

[0190] **클론원성 분석**

[0191] 클론원성 또는 콜로니 형성은, 재조합 시토킨을 함유하는 반고체 배지에 재현탁되어 4×10^4 세포/0.1ml 밀도로 96-웰 미소적정 평판에 4조 도말된 말초혈액 단핵 세포(정상 공여자 또는 백혈병 환자로부터 얻은)에 의해 분석되었다. 50개보다 많은 세포로 이루어진 세포 응집물은 37°C , 5% CO_2 가습 분위기에서 약 10일간 배양한 후 하나의 콜로니로서 계수되었다. 증식 저해는 대조(약물 비처리) 샘플의 콜로니 증식에 대한 콜로니 증식의 비율로서 평가되었다.

[0192] **세포자멸의 분석**

[0193] 3가지의 상이한 방법을 사용하여 세포자멸 경로의 상이한 사건을 분석함으로써 세포자멸을 분석하였다. 본 발명의 비소 유도체에 의해 유도되는 세포자멸성 세포의 비율은 흐름세포측정기를 사용하여 평가하였다. 상이한 사멸 세포 염색 방법을 사용하여 세포자멸 연속단계의 상이한 양상을 평가하였다.

[0194] 1. *아넥신 V 및 프로피듐 요오다이드(PI) 염색*. 아넥신 V는 세포막 외층의 포스파티딜세린을 발현하는 세포에 결합하고, 프로피듐 요오다이드는 기능저하된 세포막을 갖는 세포의 세포 DNA를 염색한다. 이는 생균(어느 플루오로코롬에 의해서도 염색되지 않음)을 세포자멸 세포(오직 아넥신 V에 의해서만 염색됨) 및 괴사 세포(아넥신과 PI 둘다에 의해서 염색됨)와 구별되게 한다.

[0195] 지시된 시간동안 본 발명의 지시된 비소 화합물로 배양물내의 세포를 처리한 후, 세포를 포스페이트-완충된 식염수(PBS)로 세척하고, 아넥신 V-FITC(트라비진(Travigen))을 함유하는 결합 완충제 $100\mu\text{l}$ 에 재현탁시키고, 암소에서 15분동안 배양하였다. PI를 첨가한 후 세포를 흐름세포측정기에서 분석하였다.

[0196] 2. *미토콘드리아 막 전위의 세포형광측정 분석*. 미토콘드리아 막의 전위 변화를 평가하기 위하여, 지시된 시간동안 비소 유도체로 처리한 후, 세포를 $1\mu\text{M}$ 미만 농도의 미토타랙커(MitoTracker) 프로브내에서 배양하였다. 미토타랙커 프로브는 수동적으로 세포막을 가로질러 확산하여 활성 미토콘드리아에 축적된다. 세포를 다음과 같은 2가지 색으로 염색하였다: 미토타랙커 레드 CMXRos(분자클러 프로브스(Molecular Probes)) 및 미토타랙커 그린 FM(분자클러 프로브스). 세포를 PBS로 세척하고, 미토타랙커 염료로 염색하고, 암소에서 37°C 에서 1시간동안 배양하였다. CMXRos는 미토콘드리아 막 전위에 의해 강제되어 미토콘드리아내로 도입되고, 티올 잔기와 반응하여 티올 에스테르 공유 결합을 형성한다. 미토타랙커 그린 FM 염료는 미토콘드리아 막 전위에 상관없이 미토콘드리아에 우선 축적되므로, 미토콘드리아 질량을 결정하기에 유용한 도구가 된다.

[0197] 3. *카스파제 활성의 검출*. 흐름세포측정법에 의해 카스파제 활성을 감시하기 위하여, 형광발생 기질인 PhiPhiLux G1D1(온코이뮤닌(Oncoimmunin))을 사용하였다. PhiPhiLux G1D1은 생균내 카스파제 3 및 카스파제 3형 활성을 검출 및 측정하기 위한 기질이다. 지시된 시간동안 본 발명의 비소 유도체로 처리한 후, 세포를 PBS로 세척하고, $5\mu\text{l}$ 의 기질 용액에 재현탁시키고, 37°C 에서 암소에서 1시간동안 배양하였다. 배양후 세포를 세척

하고, 흐름세포측정 분석하기 몇분 전에 PI를 첨가하여 분석하는 동안 괴사 세포를 제외시켰다.

[0198] **세포 주기 분석**

[0199] 세포 주기는 다음과 같이 분석하였다: 본 발명의 상이한 비소 화합물과 함께 72시간 배양한 후, 세포(1×10^6)를 PBS로 2회 세척하였다. 저장액(RNase 용액, 트리톤 X-100, 시트르산나트륨, PEG) 및 PI($25 \mu\text{g}/\text{mL}$)를 함유하는 염색 용액에 세포 펠렛을 재현탁시켰다. 세포를 실온의 암소에서 15분동안 배양한 다음, 셀퀘스트(CellQuest) 프로그램(벡톤-딤킨슨(Becton-Dickinson))을 사용하여 흐름세포측정기에 의해 분석하였다.

[0200] **성숙도 분석**

[0201] 인간 급성 전립프구성 백혈병 세포주 NB4를 사용하여 백혈병 세포의 성숙도에 대한 본 발명의 비소 화합물의 영향을 시험하였다. 성숙한 골수세포의 표지로서 피코에리트린-콘주게이트화 항-CD11b 단클론성 항체(벡톤-딤킨슨)를 사용하였다. 약물과 함께 72시간동안 배양한 후, 세포를 PBS에 세척하였다. 그 다음, 밀도 1×10^6 세포/ mL 의 세포를 단클론성 항체와 함께 1:10으로 희석하여 실온의 암소에서 15분동안 배양하였다. 배양후 세포를 PBS로 세척하고, 펠렛을 PBS $500 \mu\text{L}$ 에 재현탁시켰다. 비특이적 결합을 제외시키기 위하여, 적당한 동형 대조물을 동일한 방식으로 제조하였다. 흐름세포측정기를 사용하여 세포를 분류하고 셀퀘스트 다큐먼트 분석(CellQuest Document Analysis)을 사용하여 세포를 분석하였다.

[0202] **PML/Rar 알파 단백질의 역할**

[0203] 삼산화비소는 급성 전립프구성 백혈병의 치료법으로 인가되었고, PML/Rar 알파 유전자 및 단백질의 발현으로 인하여 APL 세포를 대부분 사멸시킨다. 하기 시스템을 사용하여 백혈병 세포내 PML/Rar 알파 융합 단백질의 존재가 SGLU 및 MER1에 대한 백혈병 세포의 관찰된 민감성에 기여하는지를 정하고, 삼산화비소에 내성인 것으로 알려진 U937 세포를 PML/Rar 알파 유전자로 형질감염시켰다. 형질감염된 세포(U937/PR9)는 친절하게도 마이클 안드리프(Michael Andreeff) 박사(M. D. 앤더슨 암센터(M. D. Anderson Cancer Center))로부터 제공받았다. PML/Rar 알파 유전자는 아연의 존재하에 기능성으로 된다. U937/PR9 세포주의 PML/Rar 알파 유전자의 Zn^{2+} -유도성 발현은 그리냐니(Grignani) 등의 문헌[Cell, (1993) 74:424-431]에 기술되어 있다. PML/Rar 알파 발현을 정하기 위하여, 세포를 0.1mM ZnSO_4 로 3시간동안 처리한 후에, 비소 화합물을 72시간동안 첨가하였다. PML/Rar α 발현은 전형적으로 세포에 아연을 첨가한 지 약 3시간 후에 이루어지고 48시간동안 안정하다.

[0204] 실시예 3

[0205] **MER1, SAL1 및 SGLU1의 항암 활성의 시험관내 평가**

[0206] MER1의 항백혈병 활성은 6가지의 상이한 인간 백혈병 세포주, 즉 AML2, AML3 및 HL60(AML 유도된 세포주), NB4(APL 유도된 세포주), K562(CML-BP 유도된 세포주), 및 KBM7(AML 유도된 세포주)에 대하여 3일 MTT 분석/트립판 블루 제외 방법에 의해 평가되었다. MER1은 NB4 세포에 대하여 가장 효과적이었고, IC_{50} (처리되지 않은 대조 세포에 비하여 세포를 50% 생존시키는 농도)가 $1 \mu\text{M}$ 이다(도 1). MTT 분석에 의한 AML2 세포 및 KBM7 세포의 분석, 및 트립판 블루 분석에 의한 AML2 세포(도 2 참조), AML3 세포, K562 세포, 및 HL60 세포의 분석을 포함한, 다른 세포주의 MER1 치료는 1.5 내지 $4 \mu\text{M}$ 의 IC_{50} 값을 나타내었다. 이 활성은 상기 세포주에 대한 삼산화비소의 활성과 유사하였다(삼산화비소 활성의 예는 도 1 및 도 2에 나타냄). MER1은 또한 항암 활성에 대하여 미국 국립보건원(National Institute Of Health, NIH)에 의해 술포로다민 B 분석을 사용하여 60개의 종양 세포주의 실험단에 대하여 시험관내 시험하였다(도 3). 본 화합물은 다양한 종양 세포주, 특히 시험된 백혈병 세포에 대하여 낮은 농도에서 활성의 증거를 나타내었다. MER1 $1 \mu\text{M}$ 의 농도에서, 시험된 6가지 모든 백혈병 세포주의 증식은 상당히 지연되었다(<20% 증식; 도 3, 제1 실험단).

[0207] SAL1의 항백혈병 활성은 2가지의 인간 세포주, 즉 HL60 세포(도 4에 기술됨), 및 Z138(ALL 세포주)에 대하여 3일 트립판 블루 분석에 의해 평가되었다. SAL1은 또한 술포로다민 B 분석을 사용하여 60가지의 종양 세포주의 실험단에 대하여 시험관내에서 NIH에 의해 항암 활성에 대하여 시험하였다(도 5). 본 화합물은 다양한 종양 세포주에 대하여 낮은 농도에서 활성의 증거를 나타내었다.

[0208] SGLU1의 항백혈병 활성은 9가지 인간 백혈병 세포주, 즉 NB4, CAG(다발골수종 세포주), JURKAT 및 RAJI(림프종 세포주), HL60, AML2, AML3, KBM5(CML-BP 유도된 세포주) 및 KBM7에 대하여 3일 MTT 분석에 의해 평가되었다. 세포주 NB4의 결과는 도 6에 기술되어 있다. SGLU1의 항백혈병 활성도 또한 6가지의 인간 백혈병 세포주, 즉

NB4, CAG, JURKAT, HL60, KBM3(AML 세포주), 및 Z119(ALL 세포주)에 대하여 3일 트립판 블루 제외 방법에 의해 평가되었는데, 유사한 결과를 나타내었다. 활성화는 도 6에 기술된 삼산화비소의 활성화와 유사하였다. SGLU1의 항백혈병 활성화는 또한 HL60 인간 백혈병 세포에 대하여 5일 클론원성 분석에 의해 평가되었다(도 7). SGLU1은 또한 술포로다민 B 분석을 사용하여, 60가지의 종양 세포주의 실험단에 대하여 시험관내 NIH에 의해 항암 활성화에 대하여 시험되었다. 본 화합물은 다양한 종양 세포주에 대하여 낮은 농도에서 활성화의 증거를 나타내었다.

[0209] 실시예 4

[0210] 악성 및 정상 혈액세포에 대한 MER1 및 SGLU1의 독성 결정

[0211] 5명의 백혈병 환자(3명은 AML, 1명은 CML-BP 및 1명은 ALL임; 도 9 내지 도 13)의 혈액 단핵 세포(>80% 모세포)에 대하여 MER1을 시험하였다. 단기간의 세포 배양물에서, MER1은 삼산화비소만큼 유효하였다(도 9, 도 10 및 도 12). 또한, 4명의 건강한 공여자로부터의 샘플에서 정상 말초혈액 단핵 세포에 대한 MER1의 독성을 평가하였다. 단기간의 세포 현탁 배양물에서, MTT 분석에 의하면 MER1은 백혈병 환자의 악성 세포보다 정상 세포에 대하여 독성이 덜하였다(도 14). 가장 중요하게는, 장기간의 클론원성 분석에서 MER1은 삼산화비소보다 정상 세포에 대하여 독성이 덜하였다(도 15).

[0212] 1명의 CLL 환자(삼산화비소에 대한 비교를 나타낸 도 16) 및 2명의 AML 환자(도 17)를 포함한 3명의 백혈병 환자로부터의 혈액 단핵 세포에 대하여 SGLU1을 시험하였다. 장기간의 클론원성 분석에서 SGLU1은 삼산화비소보다 정상 세포에 대하여 독성이 덜하였다(도 18). 도 18에 나타난 8일 클론원성 분석 이외에, 9일 및 13일 클론원성 분석도 또한 수행하였다.

[0213] 실시예 5

[0214] MER1의 제형화 및 안정성

[0215] MER1이 인산염 완충된 식염수에 용해되었을 때 MER1이 2개월 이상 안정함을 나타내는 데이터가 얻어졌는데, 이 용액은 같은 기간 수행된 시험관내 실험에서 세포독성 활성화가 동일한 수준으로 유지되었기 때문이다(도 19). 또한, MER1 및 SGLU1의 상세한 약학적 평가가 수행되었다.

[0216] I. MER-1의 약학적 평가

[0217] MER-1은 임상 환경에서 투여하는데 허용가능하기에 충분한 용해도 및 안정성을 갖는 것으로 밝혀졌다(하기 데이터 참조). 또한 용액은 동물 실험 혹은 초기 I 연구에 사용하기 위하여 임시 배합될 수 있도록 충분히 안정하다. 그러나, 용액 안정성은 더 큰 규모의 임상 실험 및 장기간 보관이 요구되는 시장에서의 유통에 사용하기 위한 액체 투여형의 더 큰 배치를 제조하기에 부적절하다. 이러한 용도에 있어서 사용시에 재구성되는 동결건조 투여형이 고려된다. 이러한 동결건조 조성물의 제조는 당업계에 널리 알려져 있다.

[0218] A. 용해도

[0219] MER-1은 수용해도가 약 15mg/ml이다. 약 150mg/ml 이하의 더 높은 MER-1 농도는 pH를 6으로 조절하기 위하여 0.1N 수산화나트륨을 사용함으로써 달성될 수 있다. 에탄올내에서, MER-1의 용해도는 100mg/ml보다 크다.

[0220] B. 용액 pH

[0221] MER-1 수용액의 본래의 pH 값은 다음과 같다:

[0222] 0.1mg/ml pH 3.7

[0223] 1mg/ml pH 3.1

[0224] 10mg/ml pH 2.3

[0225] C. 용액 안정성

[0226] 다양한 pH 값의 효과를 0.9% 염화나트륨 주사액내 10mg/ml의 농도에서 평가하였다. pH가 2.3이고(본래 pH) 수산화나트륨으로 pH 5, 7.1 및 8.5로 조절된 샘플을 냉장하에 3개월에 걸쳐 평가하였다. pH 5의 샘플은 3개월후 초기 농도의 약 89%를 유지하는 더 우수한 안정성을 나타내었다. pH 7.1 및 8.5에서의 용액은 14일후 각각 92% 및 96%를 유지하였으나, 그 후에는 90% 미만으로 떨어졌다. pH 2.3의 샘플은 7일동안 안정하였으나, 그 후에는 침전물을 형성하였다. 하기 표 2를 참조한다.

[0227] MER-1은 더 낮은 농도의 수용액내에서 덜 안정하였지만, 더 높은 농도에서는 점차 안정하였다. 물내 0.1mg/ml

에서, 1시간 정도만에 약물의 약 40%가 손실되었다. 농도를 0.9% 염화나트륨 주사액내 1mg/ml로부터 10mg/ml로 증가시키에 따라, 약물은 점차 장기간동안 안정하였다. 10mg/ml 농도는 냉장하에 3개월까지 안정하였지만, 그 후에는 허용불가능한 분해가 일어났다. 하기 표 3을 참조한다.

표 2

0.9% 염화나트륨 주사액내 MER-1 10mg/ml의 pH 안정성 프로필

분석 간격 (일)	잔여 MER-1(%)			
	pH 2.3	pH 5.0	pH 7.1	pH 8.5
0	100	100	100	100
7	102	105	96	97
14	침전	101	92	96
30		100	80	82
60		91		
90		91		
180		87		

표 3

0.9% 염화나트륨 주사액내 다양한 농도에서의 MER-1 용액 안정성

분석 간격 (일)	잔여 MER-1(%)			
	0.1mg/ml ^a	1mg/ml	2mg/ml	10mg/ml
0	60 ^b	100	100	100
7		94	99	105
14		89	102	101
21		81	96	102
30		79	98	100
60			88	91
90			84	91
180				87
^a 물내				
^b 60분만에 약 40%의 손실이 일어남.				
^c 이 간격에서 결정되지 않음.				

II. SGLU-1의 약학적 평가

SGLU-1은 임상 환경에서 투여하는데 허용가능하기에 충분한 용해도 및 안정성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 또한 용액은 동물 실험 혹은 초기 I 연구에 사용하기 위하여 임시 배합될 수 있도록 충분히 안정하였다. 그러나, 용액 안정성은 더 큰 규모의 임상 실험 및 장기간 보관이 요구되는 시장에서의 유통에 사용하기 위한 액체 투여형의 더 큰 배치를 제조하기에는 부적절하다. 이러한 용도에 있어서 사용시에 재구성되는 동결건조 투여형이 고려된다.

A. 용해도

SGLU-1은 수용해도가 약 60mg/ml이다. 더 높은 SGLU-1 농도는 용액 pH를 높이기 위하여 0.1N 수산화나트륨을 사용함으로써 달성될 수 있다. 그러나, 이 약물은 알칼리 환경에서 불안정한 것으로 나타났다. SGLU-1은 에탄올내에서 불용성이었다.

B. 용액 pH

SGLU-1 수용액의 본래의 pH 값은 다음과 같다:

0.1mg/ml pH 3.9

[0237] 1mg/ml pH 3.2

[0238] 2.5mg/ml pH 3.0

[0239] 60mg/ml pH 2.7

[0240] **C. 용액 안정성**

[0241] 다양한 pH 값의 영향을 0.9% 염화나트륨 주사액내 2.5mg/ml의 농도에서 평가하였다. pH가 3이고(본래 pH) 수산화나트륨으로 pH 5 및 7로 조절된 샘플을 냉장하에 30일에 걸쳐 평가하였다. pH 5의 샘플은 30일후 약 90%의 농도를 유지하는 약간 더 우수한 안정성을 나타내었다. pH 3 및 7에서의 용액은 각각 약 84% 및 82%를 유지하였다. 하기 표 4를 참조한다.

[0242] pH 5로 조절된 0.9% 염화나트륨 주사액내 20mg/ml 및 50mg/ml의 농도의 SGLU-1을 안정성 시험하였다. 냉장하에 60일 보관하는 동안 10% 미만의 손실이 일어났다. 안정성 결과는 하기 표 5에 나타내었다.

[0243] SGLU-1은 농도가 낮아질수록 덜 안정하였다. 물내 0.1mg/ml에서, 실온에서 24시간만에 10%보다 많이 분해되었다.

표 4

[0244] 0.9% 염화나트륨 주사액내 SGLU-1 2.5mg/ml의 pH 안정성 프로필

분석 간격 (일)	잔여 SGLU-1(%)		
	pH 3.0	pH 5.0	pH 7.0
0	100	100	100
3	104	101	97
5	100	99	93
7	100	97	91
14	97	97	91
21	87	93	84
30	84	91	82

표 5

[0245] 4℃, 0.9% 염화나트륨 주사액내 SGLU-1 20mg/ml 및 50mg/ml일 때의 안정성

분석 간격 (일)	잔여 SGLU-1(%)	
	20mg/ml	50mg/ml
7	101	97
14	98	98
30	94	94
60	92	93
90	85	87

[0246] 실시예 6

[0247] **MER1, SAL1 및 SGLU1의 메카니즘**

[0248] 세포자멸의 유도, 세포 주기에 대한 영향, 성숙의 유도, 및 이상 PML/Rar 알파 융합 단백질의 분해는 모두 삼산화비소의 작용 메카니즘인 것으로 나타났다. 본 발명자들은 HL60 인간 백혈병 세포에서 세포자멸을 유도하는 MER-1의 가능성을 조사하였다(분석 기간 1 내지 3일). 세포자멸의 유도는 생존 세포의 비율이 감소되면 꼭 뒤따라 일어난다(도 20, 도 21 및 도 22). MER1 및 SGLU를 사용한 추가의 실험 결과, 이들 화합물에 의한 세포자멸(아넥신 V 염색)의 유도는 미토콘드리아 막의 전위 변화(CMXRos 염색) 및 카스파제의 활성화(PhiPhiLux 염색)를 수반하는 것으로 나타났다. 도 23A, 도 23B, 도 23C, 도 23D, 도 23E 및 도 23F 참조.

[0249] 보고에 의하면, 삼산화비소는 PML/Rar 알파 유전자를 발현하는 세포의 성숙을 유도하였다. SGLU 및 MER1이 유사한 능력을 가지는지를 시험하기 위하여, NB4 세포(PML/Rar 알파 유전자를 발현함)를 사용하였고, 비소 화합물에 3일 노출시킨 후, 세포 표면에서의 CD11b의 발현을 흐름세포측정기에 의해 측정하였다. CD11b는 골수 세포

의 성숙도 표지이다. 데이터는 도 24에 제공되어 있는데, 이는 SGLU 및 MER1은 성숙을 유도하지 않음을 나타낸다. 본 발명의 상이한 비소 화합물로 처리된 HL60 세포에서의 가능한 세포 주기 혼란은 흐름세포측정기를 사용하고 프로피듐 요오다이드로 염색하여 평가하였다. SGLU는 세포 주기의 S-기에서 세포를 현저하게 축적시켰고, MER1은 더 적은 정도로 유사한 결과를 가져왔다(도 25A, 도 25B). 도 25C는 삼산화비소에 응하는 세포의 S-기 축적을 기술한다.

[0250] 백혈병 세포내 PML/Rar 알파 융합 단백질의 존재가, SGLU 및 MER1에 대한 백혈병 세포의 관찰된 민감성에 기여하는지를 정하기 위하여, 다음의 시스템을 사용하였다: 삼산화비소에 내성인 것으로 알려진 U937 세포를 PML/Rar 알파 유전자로 형질감염시켰다. 이 유전자는 아연의 존재하에 기능성으로 된다. 따라서, 형질감염된 U937 세포(U937/PR9)를 아연의 존재하 또는 부재하에 상이한 비소 화합물로 처리하였다. 결과는 도 26A, 도 26B 및 도 26C에 나타내었는데, 기능성 PML/Rar 알파 유전자의 존재는 세포가 삼산화비소에 대하여 민감성으로 되기 위한 필수조건이지만, SGLU 및 MER1에 대한 세포의 민감성에 영향을 주지 않은 것으로 나타났다.

[0251] 실시예 7

[0252] **MER1, SAL1 및 SGLU1의 치료 가능성의 생체내 평가**

[0253] 인간 백혈병의 동물 모델은 인간 백혈병 세포를 갖고 있는 복합면역결핍(SCID) 쥐에 의해 대표되었다. 이 모델은 동물내 인간 백혈병이 환자에게서 보여진 것과 유사한 방식으로 증식한다는 점에서 독특하였다. 상이한 투여량 수준 및 일정의 신규 약물의 생체내 효능을 재빨리 시험하기 위한 기회가 주어져다. 또한, 동물 생존을 감시할 수 있을 뿐만 아니라, 질환의 전이 패턴에 대한 치료 효과를 감시할 수 있다. SCID 쥐의 치료는 전형적으로 인간 백혈병 세포를 접종한 지 2일 후에 시작하였다. 초기 인간 실험에서와 같이 다른 쥐 모델에 있어서 1종의 인간 백혈병 세포주를 주사한 SCID 쥐에서의 초기 생체내 실험은 MER1, SAL1 또는 SGLU1의 투여량 및 일정을 결정하였다.

[0254] 동물을 매일 감시하고, 다 죽어갈 때 또는 실험이 끝날 때 죽었다(보통 대조군의 생존 시간의 2배). 장시간동안 살아남은 동물에 대하여 부검을 수행하고, HLA-DQ α의 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 사용하는 중합연쇄반응(PCR)에 의해 인간 DNA의 존재에 대하여 분석하였다. 백혈병은 전신성 질환이기 때문에, 최소 잔여 질환의 존재는 상이한 쥐 조직의 DNA내 HLA-DQ α를 확인함으로써 조사된다.

[0255] SCID 쥐의 생체내 치료 실험의 전제조건은 1) 동물내 백혈병 세포 접종의 검증 및 2) 시험된 화합물의 급성 독성의 결정(최대 내약 투여량의 정의)이다.

[0256] **I. 동물에서 백혈병 세포 혼입(engraftment)의 검증.** 처음의 생체내 실험은 4개 군의 SCID 쥐를 포함하였다. 군당 5마리의 쥐에게 상이한 유형의 인간 백혈병 세포를 복강내 접종하였다: HL60(AML), KBM5(CML-BP), KBM7-급성 골수성 백혈병, 및 Z119(ALL). HL60 및 KBM5 세포는 우수한 혼입을 나타내었는데, HL60군에서 모든 쥐는 접종한 지 31일 내지 36일 이내에 죽었고, KBM5군의 쥐는 34일 내지 36일 이내에 죽었다. 혼입은 인간 HLA-DQ α의 DNA 서열에 대하여 PCR을 수행함으로써 검증되었다(시험은 모든 쥐의 모든 조직에서 양성이었음). 100일째에, KBM7에서 쥐 5마리 중 4마리가 여전히 살아 있었고, Z119군에서는 쥐 5마리 중 5마리가 살아 있었다. 100일째에, 모든 쥐를 죽이고, HLA-DQ α에 대하여 조직을 PCR에 의해 분석하였다. 시험은 음성이었었는데, 이는 백혈병 세포 혼입이 없음을 나타낸다. 치료 실험에 동일한 유형의 또 다른 세포주가 필요하다.

[0257] **II. 시험된 화합물의 급성 독성에 대한 결정.** 독성학 시험을 위하여, 면역적격 스위스 웹스터(Swiss Webster) 쥐를 사용하였다. 삼산화비소의 LD₅₀ 농도가 10mg/kg인 것으로 확인되었다.

[0258] **A. 스위스-웹스터 쥐에서의 SGLU1의 간단 독성 시험.** SGLU1의 독성을 시험하기 위하여 스위스-웹스터 쥐에 대하여 2가지의 실험을 수행하였다. 제1 실험에서, SGLU1을 IP 경로를 통하여 178mg/kg; 285mg/kg; 및 357mg/kg의 투여량으로 투여하였다. 독성은 쥐의 사망률에 의해 측정되었다. 쥐가 투여량 178mg/kg 및 285mg/kg의 SGLU1을 잘 견딘 것으로 밝혀졌다. 이 실험의 데이터를 하기 표 6에 요약하였다.

표 6

[0259] SGLU1의 간단 독성 시험

	투여량(mg/kg)		
투여된 IP	178	285	357
사망수/총수	0/5	1/5	5/5

[0260] 제2 실험에서, 칭량된 각 쥐의 독성은 IP 및 IV 경로에 의한 318mg/kg 및 375mg/kg 투여량에서의 SGLU1의 투여에 대한 실험이었다. 따라서, SGLU1의 LD₅₀ 농도는 350mg/kg인 것으로 확인되었다. 결과를 하기 표 7에 요약하였다.

표 7

[0261] 칭량된 각 쥐의 더 우수한 성능

	투여량(mg/kg)	
	318	375
IP 투여의 사망수/총수	0/5	4/5
IV 투여의 사망수/총수	1/5	5/5

[0262] B. 스위스-웹스터 쥐에서의 MER-1의 간단 독성 시험. MER-1의 독성을 시험하기 위하여 스위스-웹스터 쥐에 대하여 2가지 실험을 수행하였다. 제1 실험에서, MER-1을 IP 경로를 통하여 71mg/kg; 107mg/kg; 및 143mg/kg의 투여량으로 투여하였다. 독성은 쥐의 사망물에 의해 측정되었다. 쥐는 투여량 71mg/kg 및 107mg/kg의 MER-1을 사망없이 잘 견딘 것으로 밝혀졌다. 이 실험의 데이터를 하기 표 8에 요약하였다.

표 8

[0263] MER-1의 간단 독성 시험

	투여량(mg/kg)		
	71	107	143
투여된 IP			
사망수/총수	0/5	0/5	5/5

[0264] 제2 실험에서, 칭량된 각 쥐의 독성은 125mg/kg; 156mg/kg; 및 170mg/kg 투여량에서의 IP 및 IV 경로에 의한 MER-1의 투여에 대한 실험이었다. 따라서, 본 발명자들은 MER1의 LD₅₀ 농도가 150mg/kg인 것을 확인하였다. 결과를 하기 표 9에 요약하였다.

표 9

[0265] 칭량된 각 쥐의 더 우수한 성능

	투여량(mg/kg)		
	125	156	170
IP 투여의 사망수/총수	0/5	2/5	5/5
IV 투여의 사망수/총수	0/5	0/5	5/5

[0266] C. 스위스-웹스터 쥐에서의 SAL1의 간단 독성 시험. 상기 실험과 유사하게, SAL1의 간단 독성 시험 결과, SAL1의 LD₅₀ 농도는 50mg/kg인 것으로 확인되었다.

[0267] 실시예 8

[0268] MER1, SAL1 및 SGLU1의 약물동력학

[0269] 쥐 꼬리 정맥을 통해 정맥내 투여한 후 쥐의 MER1, SAL1 및 SGLU1의 약물동력학적 경향을 평가하였다. 초기에는 앞서 결정된 MTD에 가까운 투여량을 실험한다. 약물 투여 후 상이한 샘플채취 시점(0(투여전), 5, 10, 15, 30, 45, 60분 및 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 48, 72시간)에서 혈액 샘플을 채취하였다. 혈액 채취를 위하여, 쥐를 CO₂ 흡입에 의해 안락사시킨 다음, 목을 베고, 채혈에 의해 혈액을 채취하였다. 혈액 샘플은 헤파린을 함유하는 시험관에 채취하여, 원심분리하고, 혈장을 분리시키고, 분석할 때까지 -80℃에서 보관하였다. 실험을 반복하고, 아미콘(Amicon) 센트리프리(Centrifree) 미소분배 장치에서 2000g×20분에서 혈장을 원심분리하여 혈장 한외여과물을 채취한다. 한외여과물을 분석할 때까지 -80℃에서 보관하였다. 선택된 군에서, 조직 경향을 분석하기 위하여 다양한 조직을 사후 수확하여 동결시켰다. 혈장 및 한외여과물 샘플내 비소 함량을 흑연로(불

꽃이 없는) 원자 흡수 분광법에 의해 측정하였다. 측정된 약물 농도는 약물동력학적 변수를 얻기 위하여 나누어 분석한다.

[0270] 실시예 9

[0271] 독성학 실험

[0272] 다수회 투여 독성학 실험

[0273] MER-1 및 SGLU-1의 쥐 군에서 반복 투여와 관련된 투여량-한정 독성을 결정하기 위하여 추가의 실험을 수행하였다.

[0274] 1일 5회 110, 120, 130, 140 및 150mg/kg을 평가하는 MER1 다수회 투여 I.V. 독성학 실험의 결과를 다음과 같이 요약한다. 심장, 폐, 간 및 신장에 대한 현미경 검사에 중점을 두었다. 관상동맥의 안쪽 과다형성증은 보통 암컷 쥐에서보다 수컷 쥐에서 더 흔한 자연 병변이다. 신장 및 간의 염증 병변, 예컨대 림프구 응집은 MER1과 관계없는 우연한 소견인 것으로 결론내려졌다. 간세포 비대증 및 콩팥세관의 급성 괴사는 처리된 암컷 수컷 쥐 모두에서 일관성없이 발견되는 불확실한 병변이었다. 더 다량의 투여량에서 수컷에서 관찰되는 범소엽성 비대증은 때때로 가능한 간 독성을 나타내는 미세혈관 공포형성과 관련되었다. 이들 동물은 일반적으로 1회 투여 후 죽음에 임하여 죽었다. 이러한 다수회 투여 쥐의 폐에서의 혈관 병변은 존재하는 경우 일치하거나 두드러지지 않았지만, 혈관병증은 MER1의 1회 투여 실험에서 흔하였다. 수컷 쥐에서의 더 적은 투여량 및 더 큰 사망률의 허용은 수컷이 이 화합물의 독성 효과에 대하여 더 민감함을 나타내었다.

[0275] SGLU-1 다수회 투여 I.V.의 결과를 다음과 같이 요약한다. 성별로 5마리의 쥐에게 꼬리 정맥을 통하여 50, 100, 150, 200, 250, 300 및 350mg/kg/일의 투여량으로 SGLU를 1일 5회 정맥 주사 투여하였다. 살아남은 모든 쥐를 28일동안 가두고, 죽여서, 지정된 조직을 모으고, 포르말린 고정시켜, 검사하였다.

[0276] 수컷보다 더 민감성인 암컷 쥐의 경우, 250, 300 및 350mg/kg/일에서 죽음에 이르렀다. 현미경 관찰 결과, 폐, 간, 가슴샘 및 고환에서 화합물 관련 병변이 나타났다. 이 실험에서 암컷 쥐의 경우 무독성량(no-observable-effect level, NOEL)은 150mg/kg이고, 이는 암컷 쥐 5마리 중 1마리에서 200mg/kg/일에서 간세포의 중심소엽 비대증에 근거하였다. 이 실험에서 수컷 쥐의 무독성량(NOEL)은 100mg/kg/일이고, 수컷 쥐 5마리 중 1마리에서 150mg/kg/일에서 고환 정세관 퇴행에 근거하였다.

[0277] 실시예 10

[0278] HPLC 분석 방법 개발 및 확인

[0279] HPLC는 유기 비소 화합물의 사용에 대한 방법 개발 및 확인에 사용된다. HPLC 방법은 표준곡선 및 선형성, 재현성(최소 10회 주사), 민감성(최소의 정량가능한 농도; 최소의 검출가능한 농도), 정확성(예를 들어, 0.025mg/ml, 0.1mg/ml, 1mg/ml의 3가지 독립적으로 준비된 용액을 사용하여), 열, 염기성 용액, 산성 용액 및 H₂O₂에 의한 의도적인 변성, 및 완전 약물의 최고점 정의, 덩어리 불순물 및 출발 물질, 및 분해 생성물을 포함한다. 원료 약물을 순도의 HPLC 분석, 건조 손실률, 선광도, 융점 및 시각적 외관을 통해 참조 표준 로트(reference standard lot)에서 분석한다.

[0280] 실시예 11

[0281] 투여형 개발

[0282] 유기 비소 화합물의 투여형은 약리학 실험실에 의해 개발된 제형화 용매 시스템에 따라 개발되었다. 이는 가능한 수성 매개체내 안정성 및 여과 안정성의 결정, 추가 개발을 위한 표적 농도 선택, 삼투압과 pH의 시험 및 조절(필요한 경우), 포장 및 폐쇄 형태 선택, 열안정성 결정(고압멸균), 시각적 외관 및 미립자 부하(particulate burden)의 시험, 및 표적 pH 값 및 허용가능한 표적 농도 범위의 결정을 포함한다.

[0283] 실시예 12

[0284] 임상실험

[0285] 이 실시예는 비소 화합물, MER1, SGLU 및 SAL-1, 및 본 발명의 조성물 또는 그의 약학 배합물을 사용하는 인간 치료 프로토콜의 개발에 관한 것이다. 이들 조성물은 백혈병 및 다른 형태의 고형 암 및 종양을 포함한 다양한 암의 임상 치료에서 유용하다.

- [0286] 환자 치료 및 감시를 포함한 임상실험 수행의 여러 요소는 본 명세서를 고려하여 당업자에게 알려져 있다. 하기 정보는 본 발명의 조성물을 사용하여 임상실험을 실시하는데 사용되는 일반 지침으로서 제공되고 있다.
- [0287] 1기 임상실험의 후보는 모든 통상적인 치료법이 실패한 환자이다. MER1, SAL-1 또는 SGLU-1의 약학 배합물을 4주마다 5일의 초기 일정으로 정맥내 투여한다. 당업자라면, 국소, 국부 또는 전신 투여를 포함한 임의의 방법에 의한 투여를 포함한, 병변의 성질에 따라 적합한 임의의 선택적인 경로에 의해 본 발명의 치료적 배합물을 투여할 수 있음을 알 것이다. 경구 및 국소 적용도 또한 고려된다. 본 발명의 조성물은 전형적으로 표준의, 널리 알려진 생리적으로 허용가능한 무독성 담체, 보조제 및 매개체(경우에 따라)를 함유하는 투여단위 배합물로 경구 또는 비경구 투여된다. 본원에 사용된 비경구란 용어는 피하 주사, 정맥내 주사, 근육내 주사, 동맥내 주사 또는 주입 기법을 포함한다.
- [0288] 질환 과정을 감시하고 항종양 반응을 평가하기 위하여, 환자를 적당한 종양 표지에 대하여 매달 검사한다. 약물의 효능을 평가하기 위하여, 다음과 같은 변수를 감시한다: 종양 크기 및(또는) 암세포의 골수 침윤. 환자의 진행 및 치료 효능을 감시하는데 사용되는 시험법은 진찰, X-선, 피검사 및 기타 임상적 실험 방법을 포함할 수 있다. 1기 실험에 주어진 투여량을 표준의 1기 임상실험에서 수행되는 것과 같이 상승시킨다. 즉, 투여량을 최대 허용 범위에 도달할 때까지 증가시킬 것이다.
- [0289] 임상 반응은 허용가능한 기준에 의해 정의될 수 있다. 예를 들어, 완전반응은 암세포의 증거가 2개월 이상 완전 소멸된 것으로 정의될 수 있다. 반면에, 부분반응은 2개월 이상 암세포가 50% 감소된 것으로 정의될 수 있다.
- [0290] 임상실험은 본 발명의 치료제를 단독으로 사용하거나 다른 항암 약물 및 당업계에서 사용되는 다른 표준의 암 치료법과 병용하여 수행될 수 있다. 본 발명의 치료적 조성물은 다른 항암제 적용 전, 적용 후 또는 그와 동시에 환자에게 전달될 수 있다.
- [0291] 치료의 전형적인 과정은 당업자에게 공지된 방식으로 개별 환자 및 치료중인 질환에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 백혈병 환자는 4주 주기로 치료될 수 있지만, 환자에게 부작용이 관찰된다면 더 긴 기간이 사용될 수 있고, 환자가 바라는 대로 치료를 견딘다면 치료 기간이 더 짧아질 수 있다. 각각의 주기는 5회의 개별 투여로 이루어지지만, 이 역시 임상 상황에 따라 변할 수 있다. 치료법은 임상시에 의해 선택될 때 3주마다 5회 투여로 또는 덜 빈번하게 계속될 수 있다. 물론, 이는 예시적인 치료 회수 뿐이며, 숙련된 의사라면 다수의 기타 시간-과정이 가능함을 쉽게 인지할 것이다.
- [0292] 환자는 선행 화학요법, 방사선요법 또는 유전자요법을 받을 수 있지만, 받을 필요가 없다. 최선으로는, 환자는 적절한 골수 기능($>2,000$ 개/ mm^3 의 말초 절대 과립구 및 $100,000$ 개/ mm^3 의 혈소판 계수로서 정의됨), 적절한 간 기능(빌리루빈 1.5mg/dl) 및 적절한 신장 기능(크레아티닌 1.5mg/dl)을 나타낸다.
- [0293] 하나의 실시양태에서, 투여는 간단하게는 종양내로의 치료 조성물의 주사를 수반한다. 다른 실시양태에서, 카테터를 종양 부위내로 삽입하고, 바람직한 시간동안 공동에 계속 관류시킬 수 있다.
- [0294] 물론, 전술된 치료법은 임상전실험으로부터 얻은 지식에 따라 변할 수 있다. 당업자라면 본 명세서에 개시된 정보를 취하여 본 명세서에 기술된 임상실험에 근거하여 치료법을 최적화할 것이다.
- [0295] 실시예 13
- [0296] **S-디메틸아르시노글루타티온의 교대 합성**
- [0297] 하기 과정은 S-디메틸아르시노글루타티온의 제조 방법을 기술한다. 사용량은 개별 비율이 유지된다면 똑같은 성공물로 배가되거나 나눌 수 있다.
- [0298] 디메틸클로로아르신
- [0299] 디메틸아르신산 $(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{O})\text{OH}$ 는 이스라엘 텔 아비브 소재의 룩셈부르크 케미칼 캄파니(Luxembourg Chemical Co.)에 의해 공급되었다. 이 제품에는 그의 순도 보고가 수반되어 있고, 순도 99.7%로서 공급되었다. 디메틸아르신산을 물-염산에 용해시켜 pH 3이 되게 하였다. 이 용액에 이산화황 기류를 약 1시간동안 통과시켰다. 디메틸클로로아르신은 무거운 무색 오일로서 분리되었다. 분리 깔때기를 사용하여 두 액상 물/ $(\text{CH}_3)_2\text{AsCl}$ 을 분리하였다. 클로로디메틸아르신을 디에틸에테르내로 추출하고, 에테르 용액을 무수 황산나트륨상에서 건조시켰다. 건조된 용액을 증류 플라스크로 옮기고 서서히 가열하여 에테르를 증발시켰다. 남은 액상의 디메틸클로로아르신을 증류에 의해 정제하였다. 106 내지 109℃에서 끓는 분획을 모았다. 무색 오일인 생성물은 1.65ppm에

서 간단한 ^1H NMR 공명을 나타낸다.

[0300] S-디메틸아르시노글루타티온

[0301] 500ml들이 플라스크에서, 알드리히 케미칼 캠페니(Aldrich Chemical Co.)로부터 받은, 순도 98%의 글루타티온 7g을 사용하고 1,2-디메톡시에탄 250ml에 용해시켰다. 그 다음, 피리딘(NaOH 펠렛상에서 건조시킨 후 재증류시킴) 3.5g을 첨가하였다. 이 용액을 1시간동안 재환류시킨 후, 3시간동안 실온에서 교반하였다.

[0302] 바람직한 생성물인 S-디메틸아르시노글루타티온이 피리딘 염산염 착체로서 분리되었다. 이 고체를 여과에 의해 제거하고 1,2-디메톡시에탄으로 철저히 세척하였다. 그 다음, 무수 염화칼슘상에서 진공 건조시켰다. S-디메틸아르시노글루타티온 피리딘 염산염의 수득량은 10.3g이었고, 융점은 135 내지 140°C이었다. 이 물질을 실시예 2 내지 12에 기술된 생물학적 분석에 사용하였다.

[0303] 실시예 14

[0304] **S-디메틸아르시노글루타티온(GLU)의 피리딘 염산염 비함유 합성**

[0305] 디메틸아르시노글루타티온은 본원에 참조로 인용된 첸(Chen, G. C.) 등의 문헌[Carbohydrate Res. (1976) 50: 53-62]을 적합화하여 제조한다. 간단하게는, 디티오비스(디메틸아르시노글루타민)을 질소하에 디클로로메탄에 용해시킨다. 이 용액에 테트라메틸디아르신을 적가하고, 반응물을 질소하에 실온에서 밤새 교반시킨 다음, 1시간동안 공기에 노출시킨다. 그 다음, 혼합물을 증발에 의해 건조시키고, 잔류물을 물로 세척하고, 건조시켜, 조질의 고체를 얻고, 이를 메탄올로부터 재결정화하여 S-디메틸아르시노글루타티온을 얻는다.

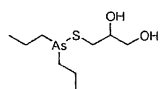
[0306] 실시예 15

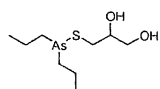
[0307] **피리딘 염산염 비함유 S-디메틸아르시노글루타티온(GLU)의 3차 합성**

[0308] S-디메틸아르시노글루타티온은 본원에 참조로 인용된 쿨렌(Cullen) 등의 문헌[J. Inorg. Biochem. (1984) 21: 179-1984]의 과정을 사용하여 제조한다. 간단하게는, 디메틸아르신산 및 글루타티온을 질소 분위기하에 물에 용해시키고 교반한다. 생성된 용액을 12시간동안 교반한 다음, 감압하에 가열없이 증발 건조시켜 고체를 얻고, 이를 차가운 메탄올로 추출한다. 그 다음, 메탄올 용액을 감압하에 증발 건조시키고, 생성된 고체를 메탄올/물로부터 재결정화하고, 모으고, 건조시켜, S-디메틸아르시노글루타티온을 얻는다.

[0309] 실시예 16

[0310] **GMZ27의 항암 활성의 시험관내 평가**



[0311] 화학식 의 구조를 갖는 유기 아르신 GMZ27을 상이한 인간 급성 골수구성 백혈병(AML) 세포주에 대하여 72시간 MTS 분석에서 시험하였고, IC_{50} 이 0.56 내지 0.86 μM 인 것으로 나타났다. 이 활성은 이들 세포주에 대한 삼산화비소의 활성보다 컸다(도 27A). 그 다음, GMZ27의 항백혈병 활성을 장기(7일) 콜로니-형성 분석에서 평가하였고, 이때 세포를 반고체 배지에서 증식시킨다. GMZ27은 인간 백혈병 세포주 및 급성 또는 만성 백혈병 환자로부터 얻은 백혈병 세포에 대하여 삼산화비소보다 상당히 큰 활성을 나타내었다(도 27B).

[0312] 그 다음, GMZ27 및 삼산화비소의 항암 활성의 메카니즘을 비교하였다. 삼산화비소(ATO)는 세포자멸의 유도, 세포 GSH 산화환원 시스템의 조절을 일으키는 세포내 ROS의 생성 변화, 세포 분화/성숙 및 세포 주기 조절에 대한 가능한 작용을 포함한 몇몇 메카니즘을 통해, APL이 아닌 세포에서 항백혈병 활성을 발휘하였다.

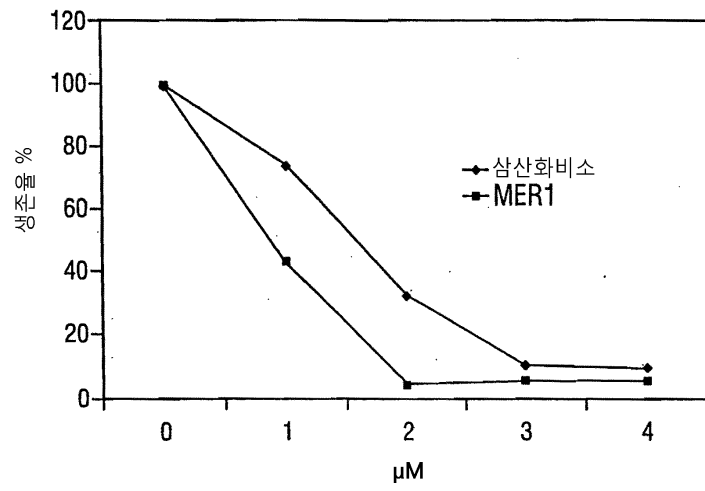
[0313] GMZ27은 ATO보다 세포자멸을 유도하는데 더 강력하였다. GMZ27은 미토콘드리아 막 전위를 변화시키고 카스파제 9는 물론 또 다른 외부 경로에 의해 카스파제 8을 절단하기 때문에, 미토콘드리아 세포자멸 경로를 활성화한다는 결과가 나타났다. 이로써 카스파제 3 활성의 유도, PARP의 절단, 및 세포에 대한 아넥신 V의 결합이 일어났다(도 28 및 도 29).

[0314] 백혈병 세포를 부티오닌 술폭스이민(BSO)으로 전처리하면 백혈병 세포는 GMZ27에 대하여 더 민감해지지만; 디티오프레이톨(DTT) 또는 N-아세틸시스테인(NAC)으로 전처리하면 세포내 GSH를 증가시켜 세포가 덜 민감해질 수 있다(도 30). 이로부터, GMZ27은 ATO와 마찬가지로 백혈병 세포의 GSH 산화환원 시스템을 조절하지만, GMZ27은 매우 초기에, ATO보다 더 크게 조절함을 알 수 있다(도 31).

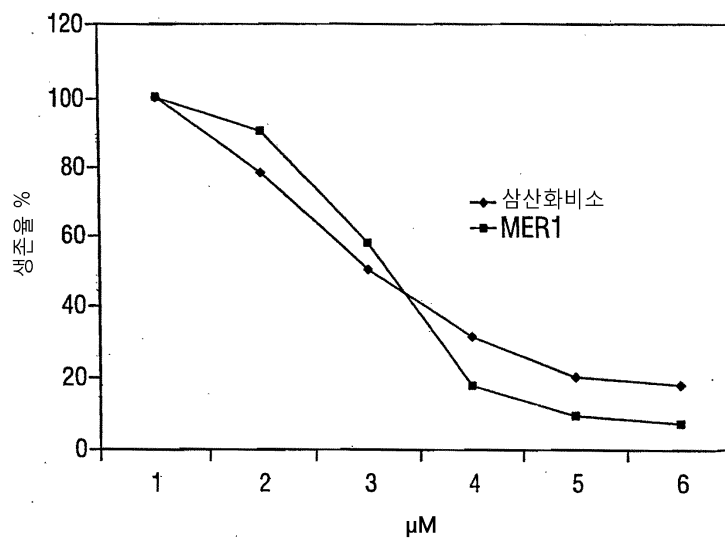
- [0315] 낮은 투여량의 GMZ27은 세포 표면의 CD11b 성숙 표지의 유도에 의해 판단되는 세포 분화/성숙을 부분적으로 유도하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 결과는 ATO의 경우에 비하면 근소한 것이었다(도 32). GMZ27은 세포 주기 진행에 대하여 영향을 주지 않았다(도 33).
- [0316] 건강한 공여자의 말초혈액 단핵 세포에 대한 GMZ27의 독성을 장기간 콜로니 형성 분석에서 평가하였다. GMZ27은 ATO보다 정상 세포에 대하여 독성이 덜하다(도 34).
- [0317] GMZ27의 1회 투여 주사의 독성을 결정하는 실험을 정상 스위스-웹스터 쥐에서 수행하였다. 독성은 사망률에 근거하여 측정하였다. 쥐의 50%를 죽이는 GMZ27의 농도(LD₅₀)는 100mg/kg인 것으로 나타났다. 대조적으로, ATO의 LD₅₀은 10mg/kg 정도로 훨씬 더 적었다.
- [0318] 실시예 17
- [0319] **N-(2-S-디메틸아르시노티오프로피오닐)글리신의 제조**
- [0320] N-(2-메르캅토프로피오닐)글리신(0.02몰, 3.264g)을 1,2-디메톡시에탄(50ml)에 넣고, 디메틸클로로아르신(0.025몰, 3.52g)을 적가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 4시간동안 교반하였다. 그 다음, 트리에틸아민 염산염의 백색 침전물을 여과에 의해 분리하고, 용액을 감압하에 증발시켜 체적을 감소시켰다. 얻어진 잔류물을 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 원하는 생성물(3.5g)을 얻었다.
- [0321] 실시예 18
- [0322] **2-(S-디메틸아르시노)티오니코틴산의 제조**
- [0323] 2-메르캅토니코틴산(0.02몰, 3g)을 디클로로메탄(50ml)에 넣고, 디메틸클로로아르신(0.025몰, 3.52g)을 적가하였다. 반응물을 4시간동안 환류하면서 교반하였다. 그 다음, 디클로로메탄을 증류에 의해 제거하고, 잔류물을 디에틸 에테르(50ml)에 용해시키고, 물로 세척하였다(3회). 이 용액을 Na₂SO₄상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압하에 농축시킨 후, 연황색 고체로서 원하는 생성물을 얻었다.
- [0324] 실시예 19
- [0325] **L-(+)-2-아미노-3-(디메틸아르시노)티오-3-메틸부탄산**
- [0326] L-(+)-2-아미노-3-메르캅토-3-메틸부탄산(0.01몰, 1.55g)을 디클로로메탄(50ml)에 넣고, 디클로로메탄(5ml)내 디메틸클로로아르신(0.015몰, 2.1g)을 적가한 후, 트리에틸아민(1.6g)을 적가하였다. 이 혼합물을 4시간동안 교반하고, 반응 혼합물을 여과시키면, 부유 백색 결정질 고체로서 원하는 생성물이 나타났다. 결정질 고체를 디클로로메탄, 에틸 아세테이트 및 아세톤으로 순서대로 세척하여 원하는 생성물을 제공하였다(1.6g; 융점 107-109℃).
- [0327] **등가물**
- [0328] 당업자라면 단지 일상적인 실험을 사용하여 본원에 기술된 화합물 및 그의 사용 방법에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 본 발명의 범주에 속하는 것으로 여겨지며, 하기 청구의 범위에 포함된다. 당업자라면 또한 본원에 기술된 실시양태의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속함을 알 것이다.
- [0329] 2002년 1월 7일자로 출원된 미국 특허출원 제60/346,492호 및 2003년 1월 7일자로 출원된 WO 2003/057012호는 본원에 참조로 인용된다. 상기 인용된 모든 참조문헌 및 공개문헌은 본원에 참조로 인용된다.

도면

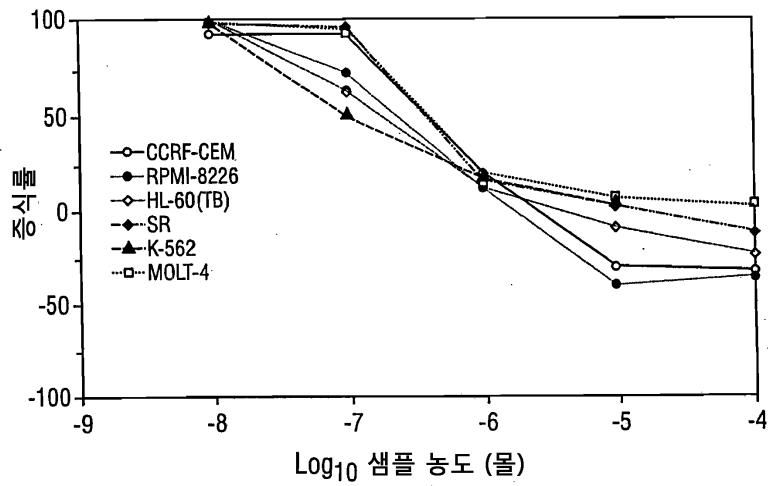
도면1



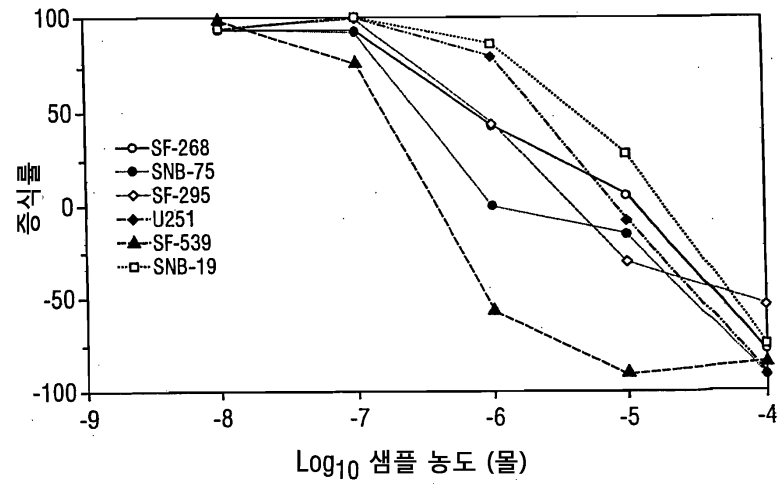
도면2



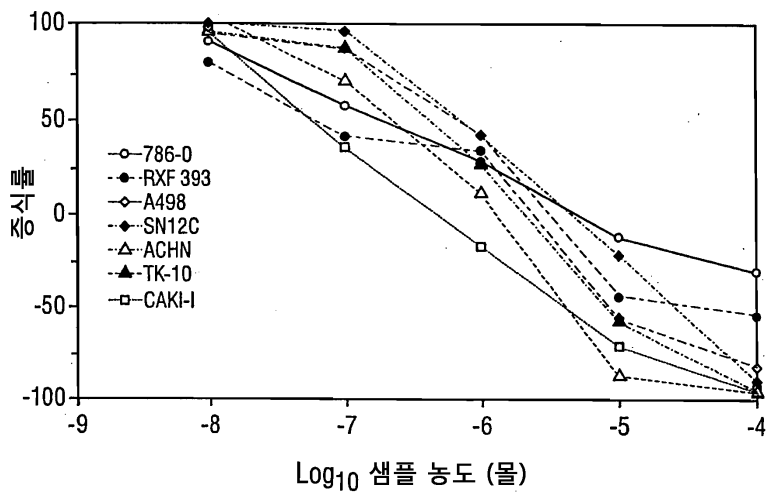
도면3a



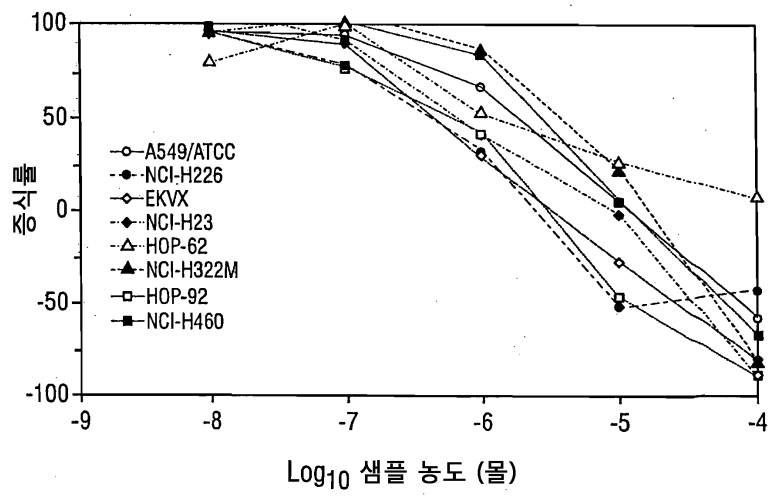
도면3b



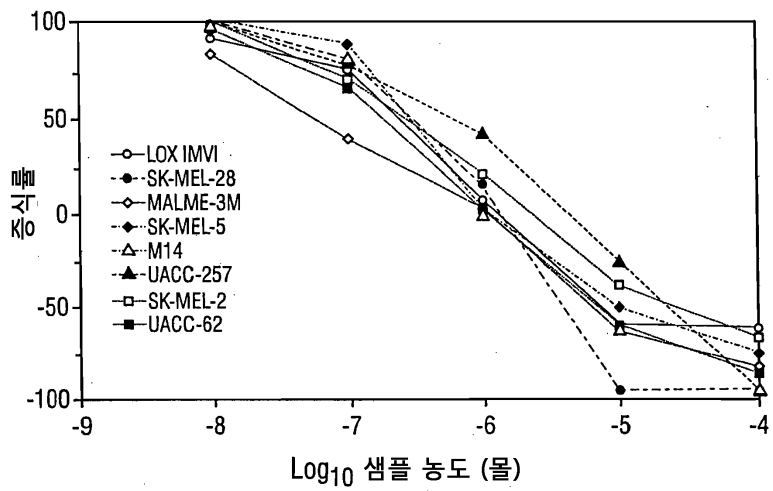
도면3c



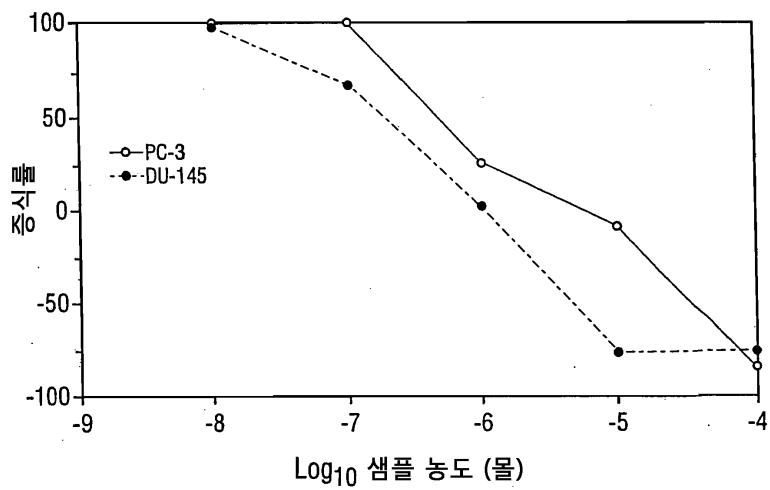
도면3d



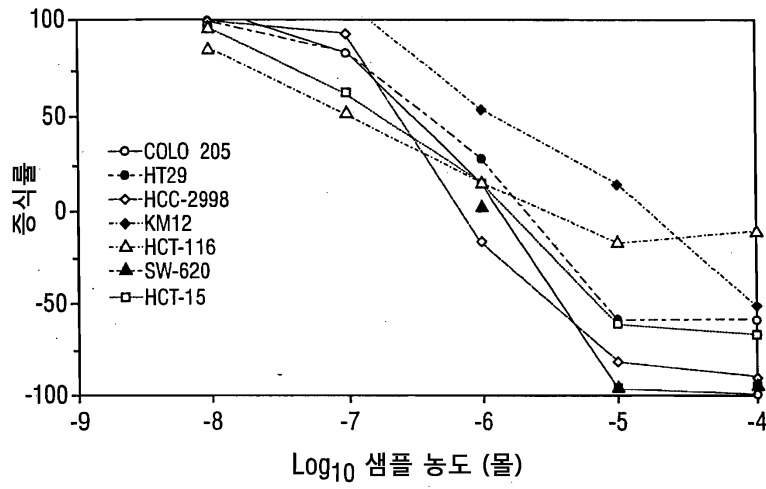
도면3e



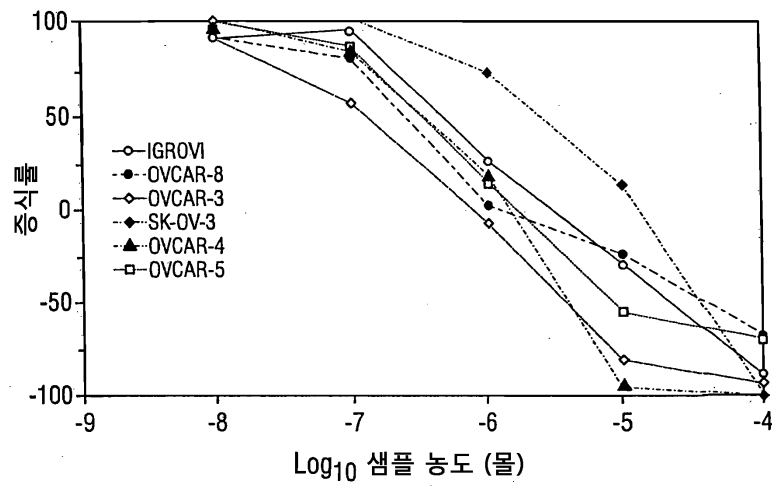
도면3f



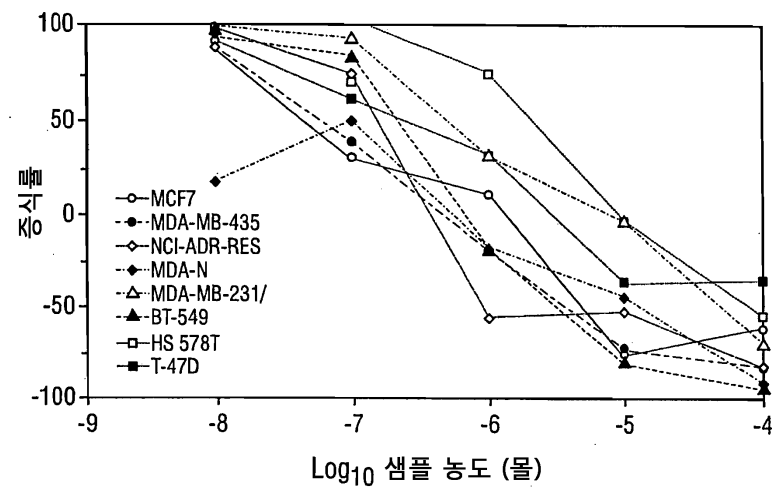
도면3g



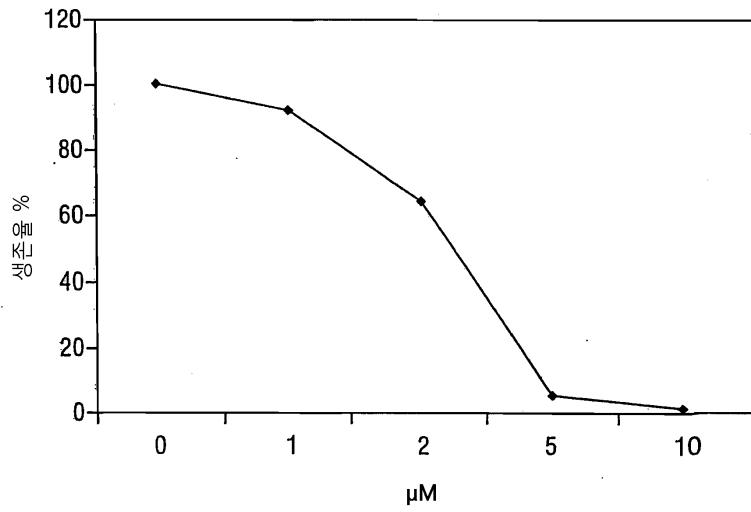
도면3h



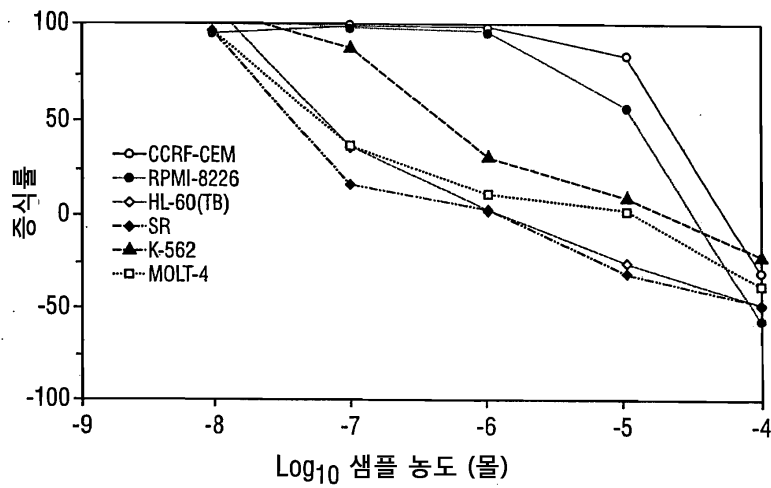
도면3i



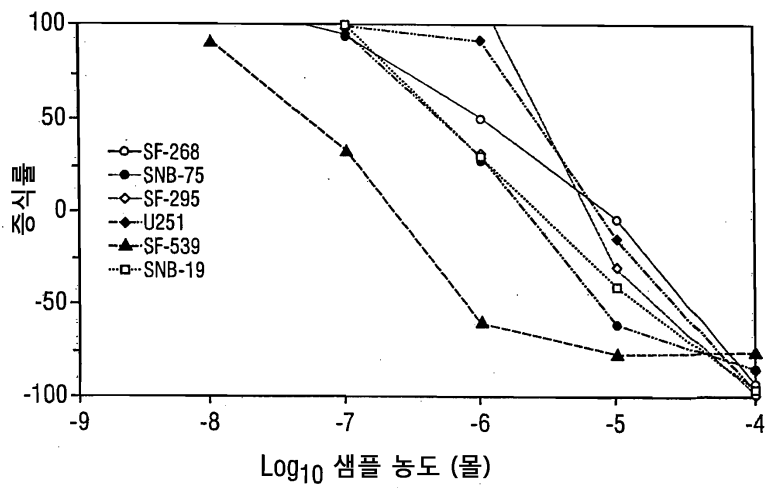
도면4



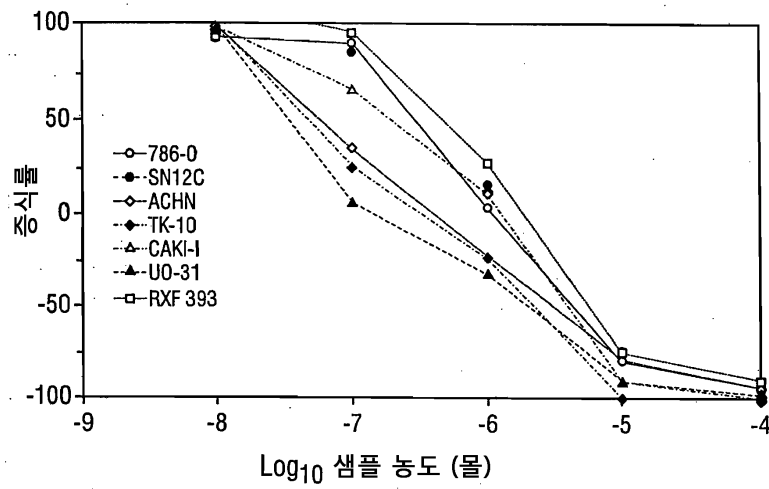
도면5a



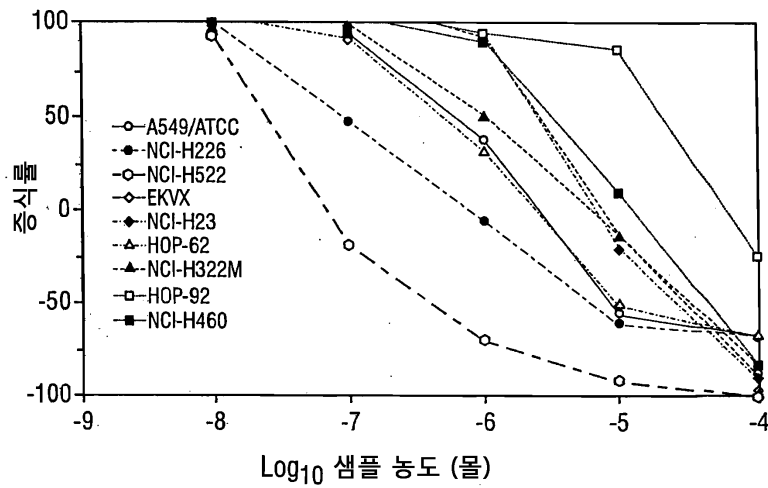
도면5b



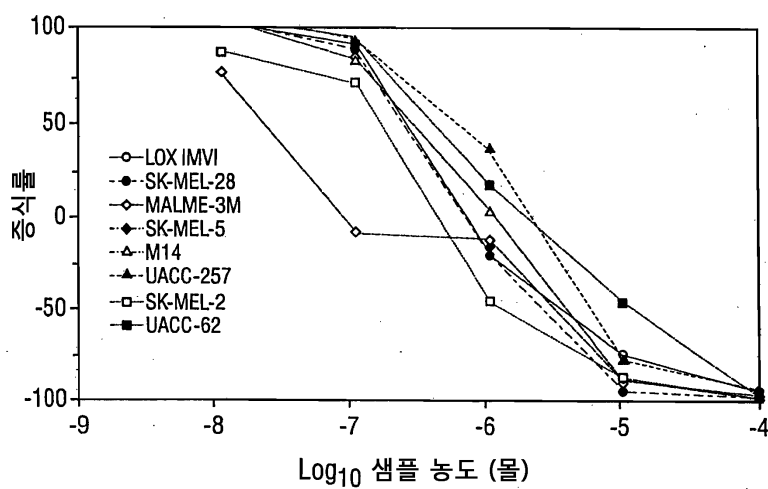
도면5c



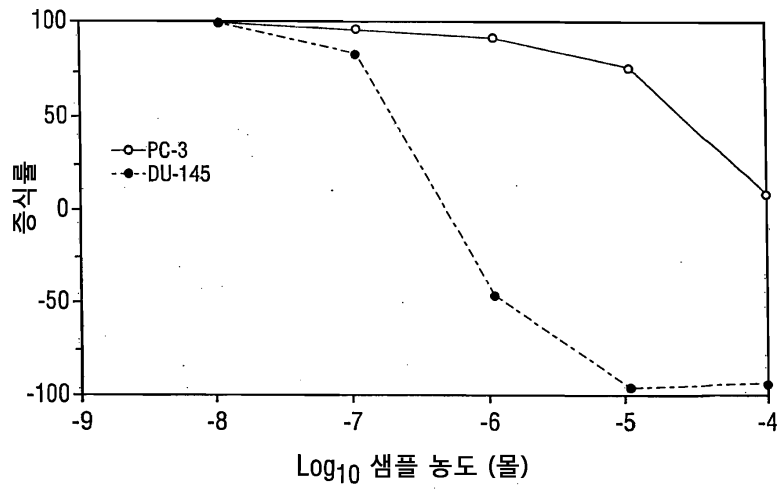
도면5d



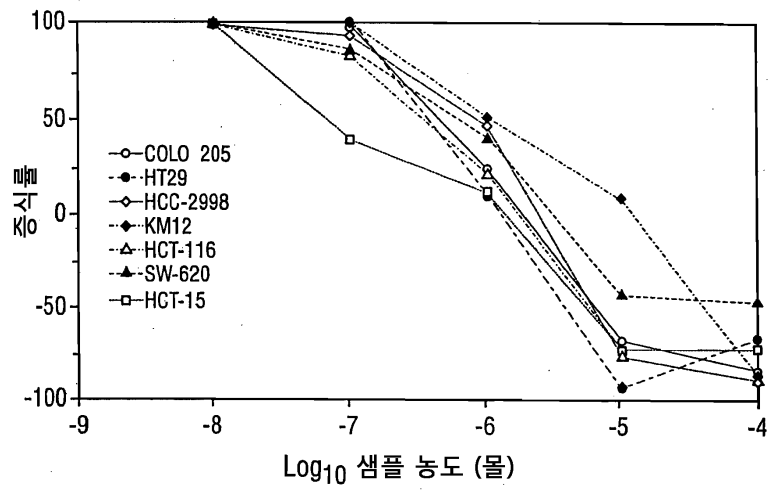
도면5e



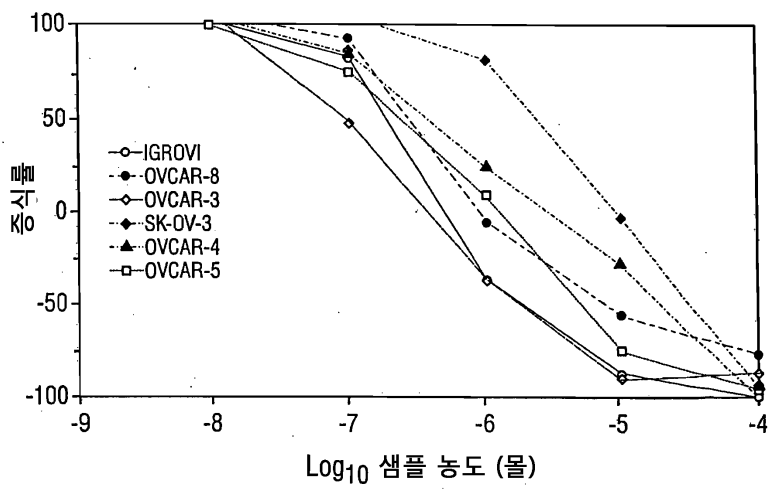
도면5f



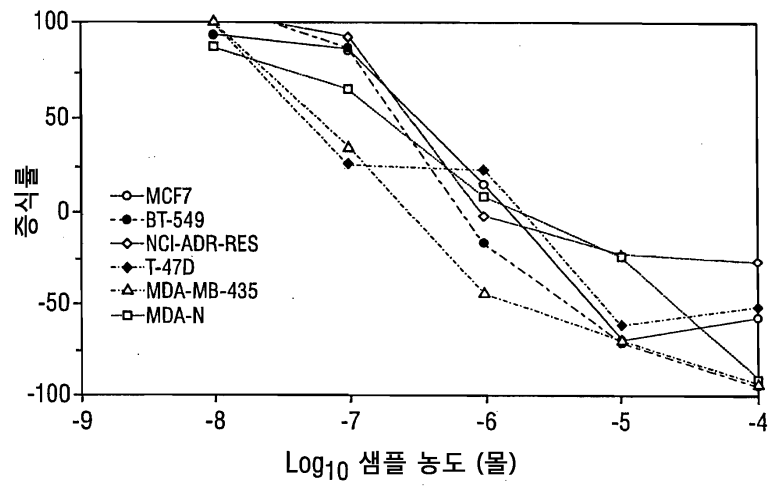
도면5g



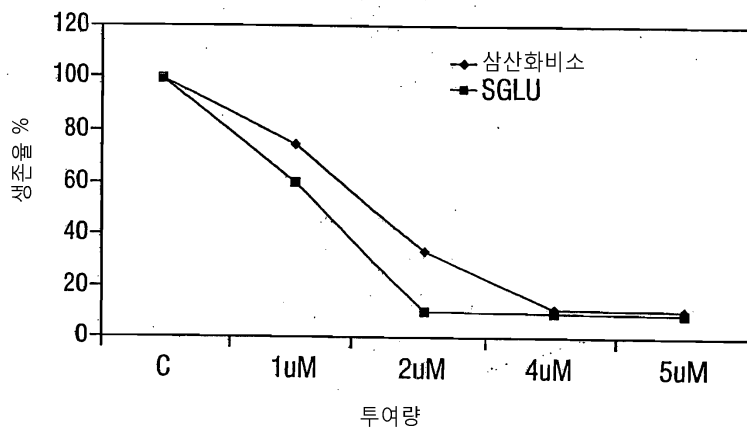
도면5h



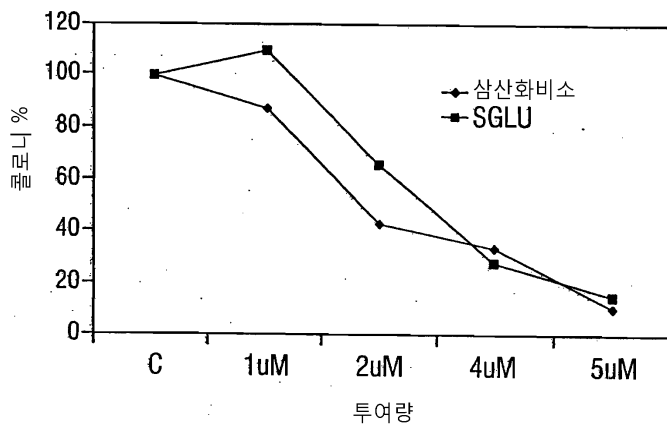
도면5i



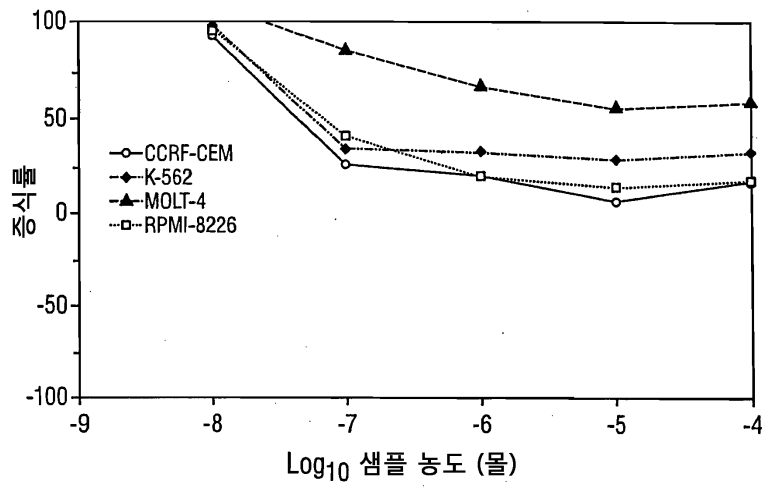
도면6



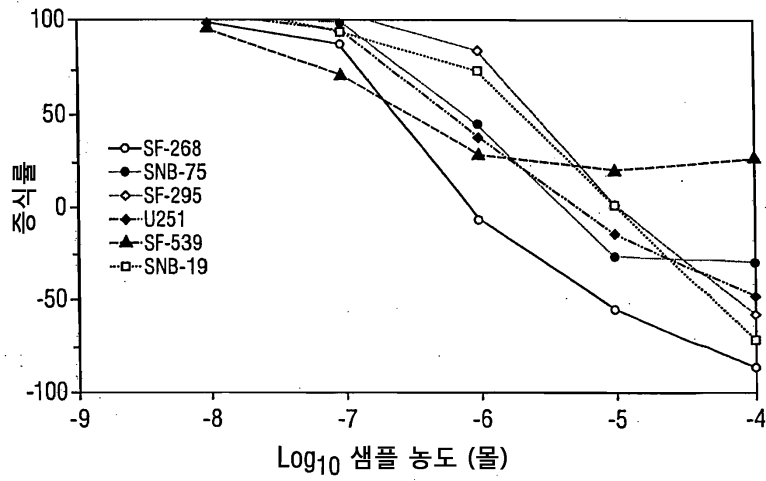
도면7



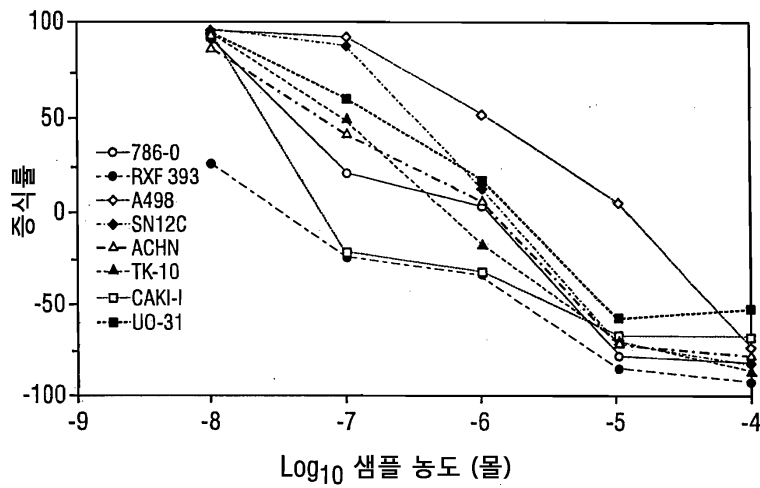
도면8a



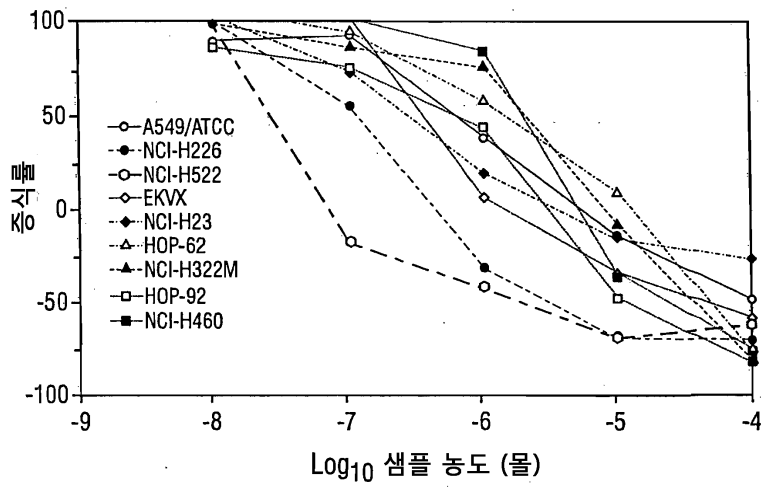
도면8b



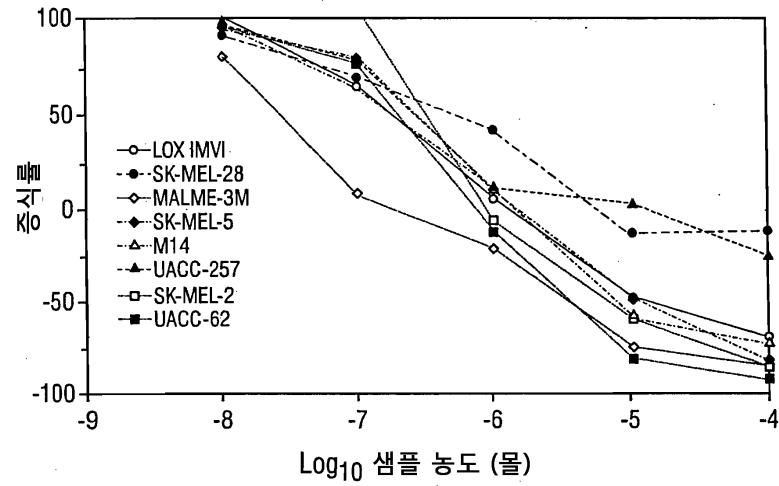
도면8c



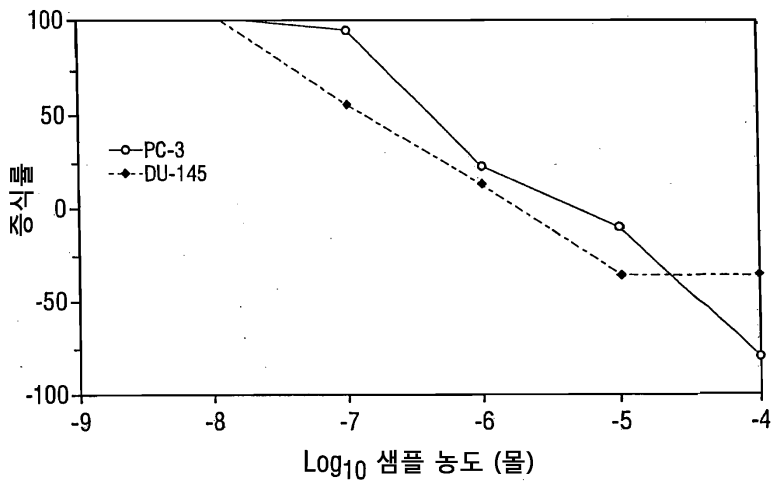
도면8d



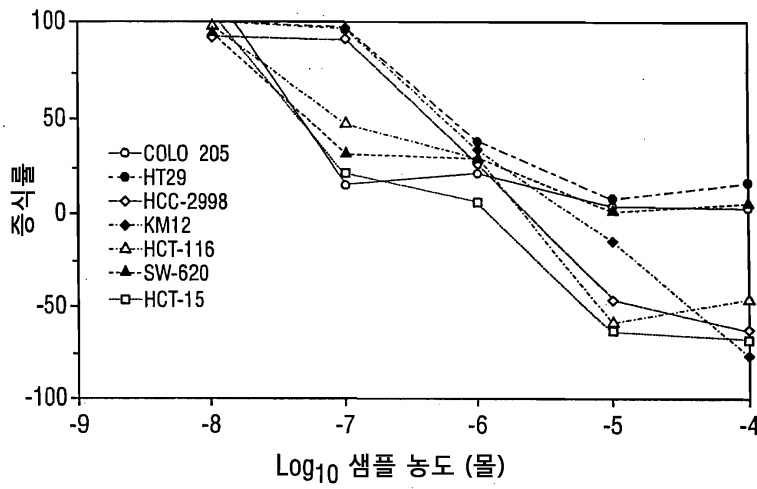
도면8e



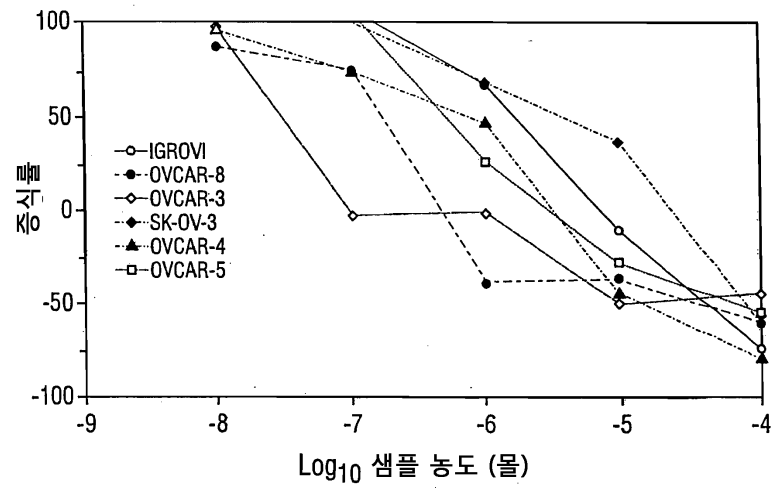
도면8f



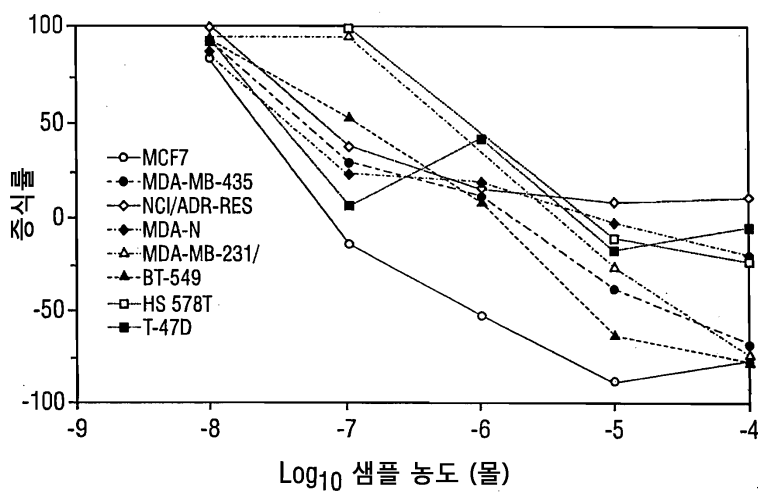
도면8g



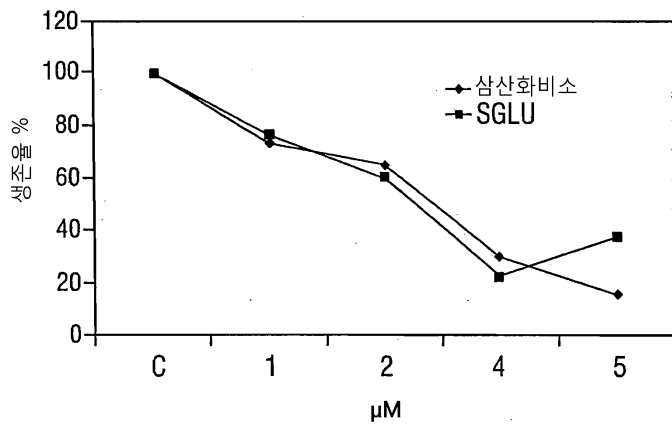
도면8h



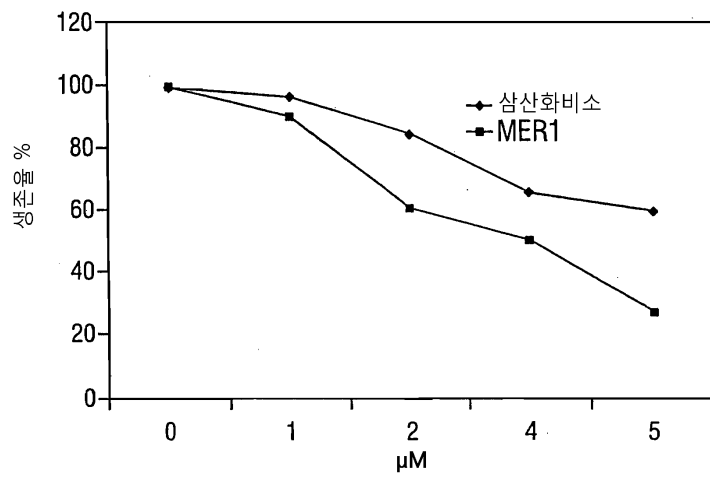
도면8i



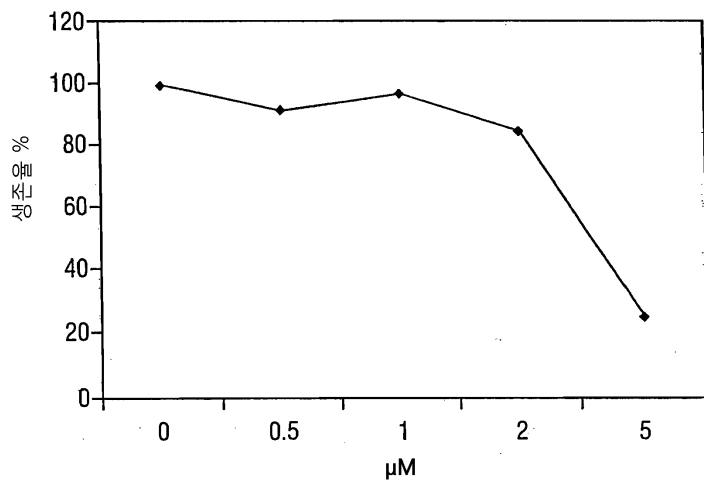
도면9



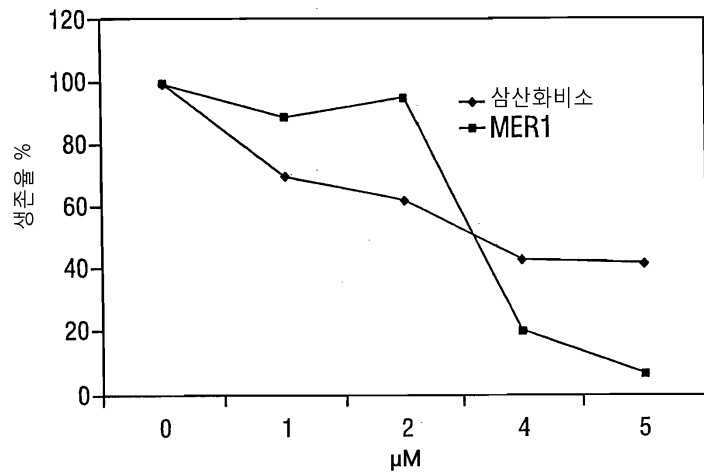
도면10



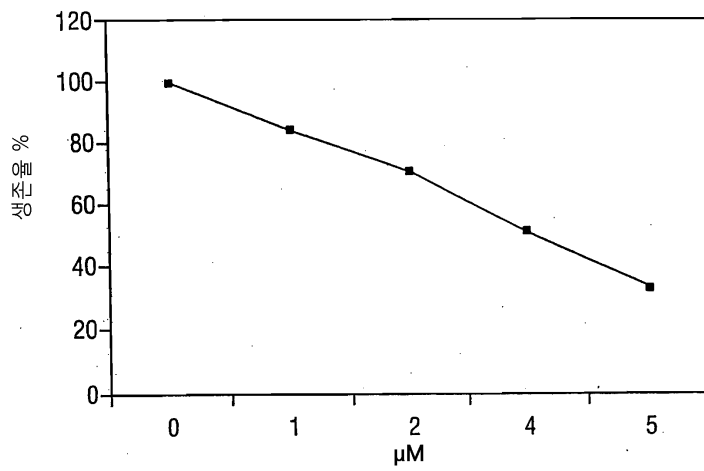
도면11



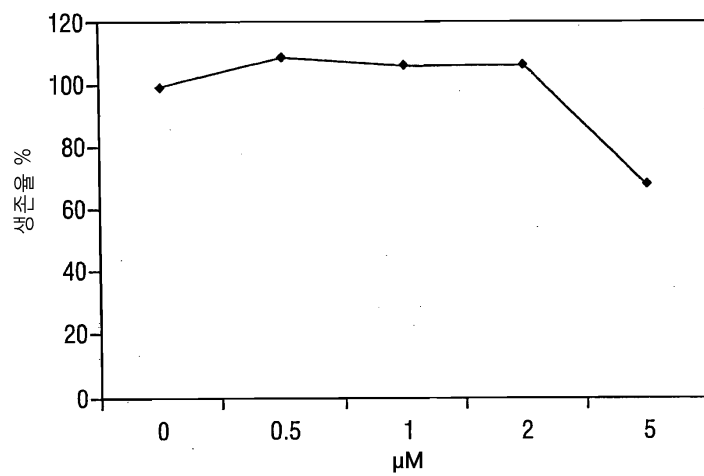
도면12



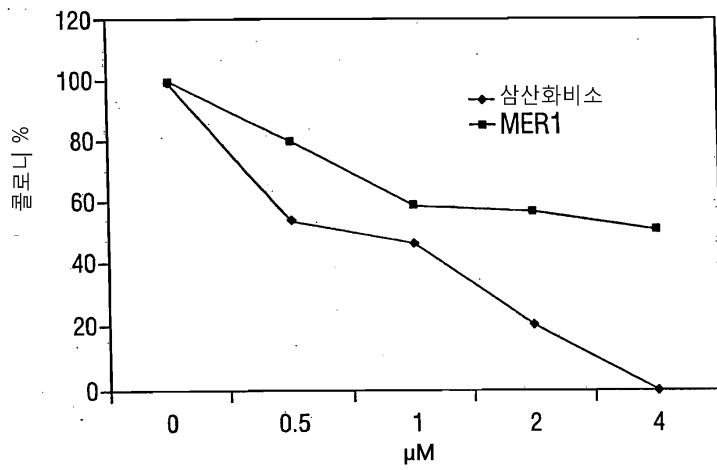
도면13



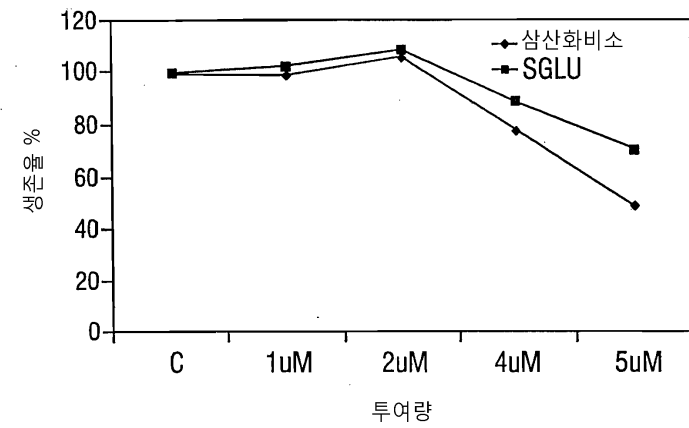
도면14



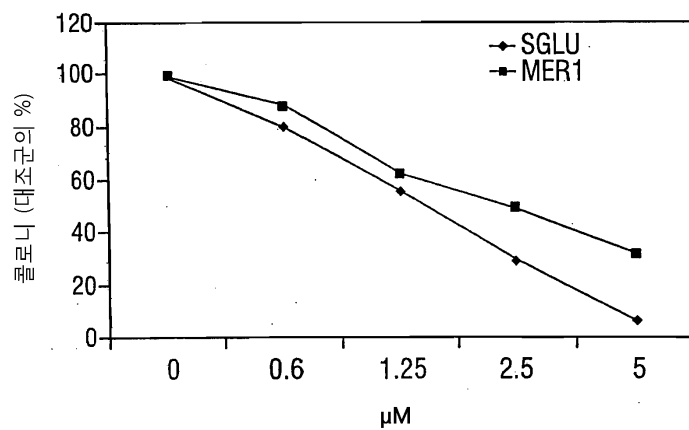
도면15



도면16



도면17



도면18

