

(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 104163833 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 26

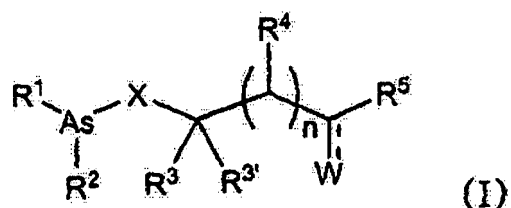
(21) 申请号	201310451346. 9	A61K 31/44 (2006. 01)
(22) 申请日	2005. 07. 15	A61P 35/00 (2006. 01)
(30) 优先权数据		A61P 35/02 (2006. 01)
	60/588, 596 2004. 07. 16 US	A61P 7/06 (2006. 01)
		A61P 7/00 (2006. 01)
(62) 分案原申请数据		
	200580030371. 3 2005. 07. 15	
(71) 申请人	得克萨斯州 A&M 大学系统	
地址	美国得克萨斯	
申请人	得克萨斯大学体系董事会	
(72) 发明人	R • A • 辛加罗 H • 达兹卡尔	
	E • J • 弗雷瑞克 H • 坎塔尔吉安	
	M • 索特罗 - 勒玛 S • 福斯托弗塞克	
	M • 高	
(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	王贵杰	
(51) Int. Cl.		
	C07F 9/72 (2006. 01)	
	C07F 9/74 (2006. 01)	
	C07F 9/82 (2006. 01)	
	A61K 31/285 (2006. 01)	

权利要求书3页 说明书30页 附图21页

(54) 发明名称
治疗癌症的化合物和方法

(57) 摘要
本发明涉及一种治疗癌症的化合物和方法。
本发明提供了有机砷化物。许多这样的化合物对
众多的实体或血液源性人肿瘤细胞系,以及对白
血病患者的有害血细胞都具有有效的体外细胞毒
性。

1. 一种具有通式 (I) 结构的化合物或其药学上可接受的盐



其中

X 是 S 或 Se ;

W 是 (R) (R), 其中出现的每个 R 独立地是 H 或 C₁₋₂ 烷基 ;

n 是 1 ;

R¹ 和 R² 分别独立地是 C₁₋₁₀ 烷基 ;

R³ 是 -H、C₁₋₁₀ 烷基, 或 C₀₋₆ 烷基 -COOR⁶ ;

R^{3'} 是 H、氨基、氰基、卤素、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、羧基、C₁₋₁₀ 烷基、C₁₋₁₀ 烯基、或 C₁₋₁₀ 炔基 ;

R⁴ 是 -OH、-H、-CH₃、氨基、-OC(O)C₁₋₁₀ 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 烷基、或 -OC(O) 芳基 ;

R⁵ 是 -OH、氰基、C₁₋₆ 烷氧基、氨基、O-C₁₋₁₀ 烷基、O- 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 烷基、或 -OC(O) 芳基、或甘氨酸取代基 ; 和

R⁶ 是 H 或 C₁₋₁₀ 烷基。

2. 权利要求 1 的化合物, 其中 R³ 和 R^{3'} 都是 H。

3. 权利要求 1 的化合物, 其中 R³ 是 C₀₋₆ 烷基 -COOR⁶, 选自 -COOR⁶、CH₂COOR⁶、CH₂CH₂COOR⁶、CH(CH₃)COOR⁶、CH(CH₂CH₃)COOR⁶、和 CH₂CH₂CH₂COOR⁶。

4. 权利要求 3 的化合物, 其中 R⁶ 是 C₁₋₁₀ 烷基。

5. 权利要求 1, 3 或 4 的化合物, 其中 R^{3'} 选自氨基、氰基、卤素、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、羧基、C₁₋₁₀ 烷基、C₁₋₁₀ 烯基、和 C₁₋₁₀ 炔基。

6. 前述权利要求任一项的化合物, 其中 X 是 S 并且 n 是 1。

7. 前述权利要求任一项的化合物, 其中 W 是 (R) (R) 并且出现的每个 R 都是 H。

8. 前述权利要求任一项的化合物, 其中 R¹ 和 R² 相同, 都选自甲基、乙基、丙基、和异丙基。

9. 前述权利要求任一项的化合物, 其中 R⁴ 和 R⁵ 分别独立地选自 -OH、-OC(O)C₁₋₁₀ 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 烷基、和 -OC(O) 芳基。

10. 前述权利要求任一项的化合物, 其中 R⁴ 和 R⁵ 相同并且都选自 -OH、-OC(O)C₁₋₁₀ 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 烷基、和 -OC(O) 芳基。

11. 权利要求 10 的化合物, 其中 R⁴ 和 R⁵ 是 OH。

12. 权利要求 1 的化合物, 其中 R³ 是 C₁₋₁₀ 烷基。

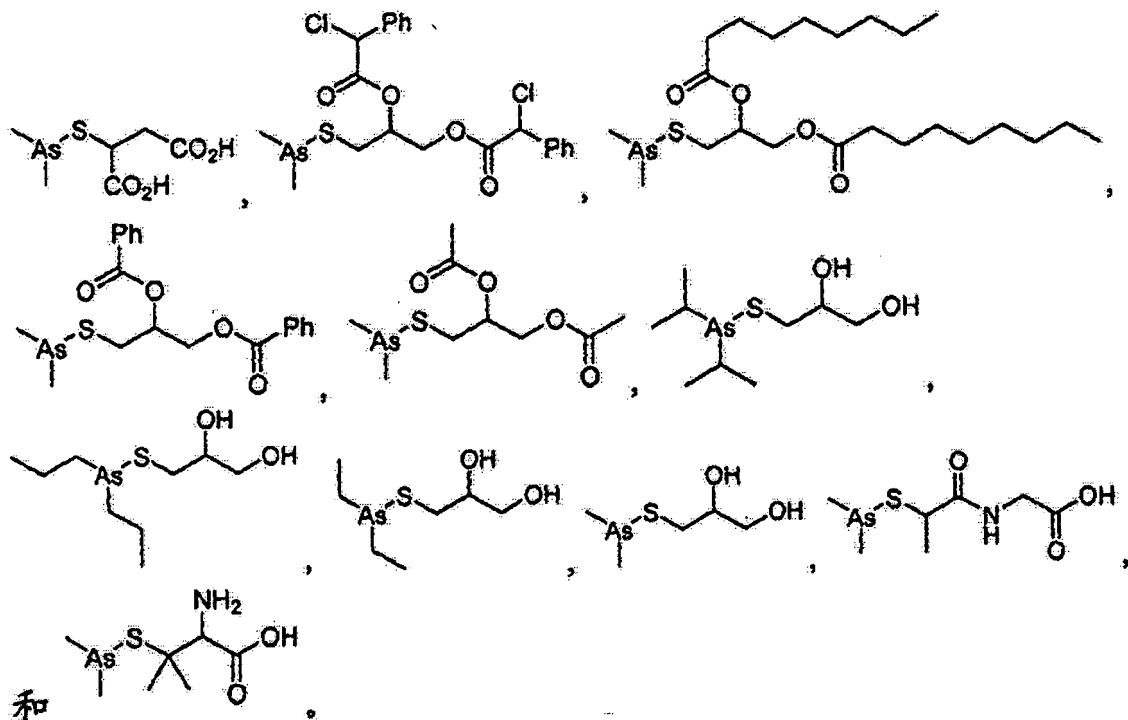
13. 权利要求 12 的化合物, 其中 R³ 选自甲基、乙基、丙基、和异丙基。

14. 权利要求 13 的化合物, 其中 R³ 是甲基。

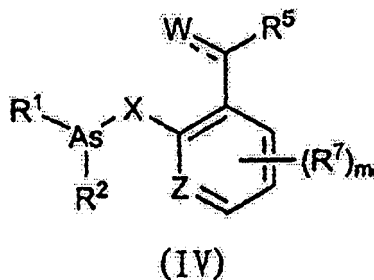
15. 权利要求 1 的化合物, 其中 R⁴ 是氨基。

16. 权利要求 15 的化合物, 其中 R⁴ 是 NH₂。

17. 权利要求 1 的化合物, 选自 :



18. 一种具有通式 (IV) 结构的化合物或其药学上可接受的盐



其中

X 是 S 或 Se ;

W 是 O、S 或 (R) (R), 其中出现的每个 R 独立地是 H 或 C₁₋₂ 烷基 ;

Z 是 CH 或 N ;

R¹ 和 R² 独立地是 C₁₋₁₀ 烷基, 优选 R¹ 和 R² 独立地选自甲基、乙基、丙基、和异丙基 ; 和

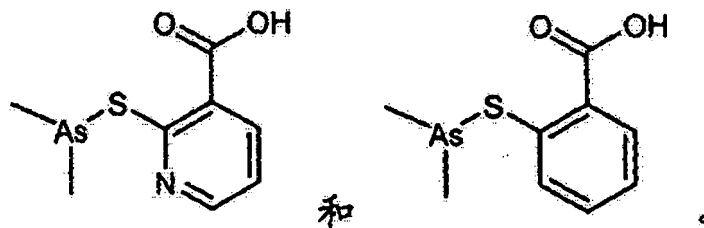
R⁵ 是 -OH、氰基、C₁₋₁₀ 烷氧基、氨基、O-芳烷基、O-芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 烷基、-OC(O) 芳基、或甘氨酸取代基 ;

R⁶ 是 H 或 C₁₋₁₀ 烷基 ;

R⁷ 选自卤素、-OH、C₀₋₆ 烷基 -COOR⁶、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、氨基、酰胺基、氰基、和硝基 ;

m 是 0 到 4 的整数。

19. 权利要求 18 的化合物, 选自



20. 一种治疗癌症的方法,包括施用治疗有效量的前述权利要求任一项的化合物。
21. 权利要求 20 的方法,其中所述癌症包含实体瘤。
22. 权利要求 21 的方法,其中所述癌症是脑、肺、肝、脾、肾、淋巴结、小肠、胰、血细胞、骨、结肠、胃、乳腺、子宫内膜、前列腺、睾丸、卵巢、中枢神经系统、皮肤、头和颈、食管或骨髓癌。
23. 权利要求 20 的方法,其中所述癌症是血液性癌症。
24. 权利要求 23 的方法,其中所述癌症是白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良、骨髓组织增生性疾病、或顽固性贫血。
25. 权利要求 24 的方法,其中所述癌症是急性早幼粒细胞性白血病。
26. 权利要求 20 到 25 任一项的方法,其中所述化合物是每日施用的。
27. 权利要求 20 到 26 任一项的方法,其中所述化合物是通过注射施用的。
28. 权利要求 20 到 27 任一项的方法,其中给所述患者施用一种另外的药剂。
29. 一种药物组合物,包含权利要求 1 到 19 任一项的化合物和药学上可接受的载体或稀释剂。
30. 权利要求 29 的药物组合物,其中所述组合物是 pH 大于 5 的水溶液。
31. 权利要求 29 或 30 的药物组合物,其中所述组合物是 pH 范围为 5 到 7 的水溶液。

治疗癌症的化合物和方法

[0001] 本申请是申请日为 2005 年 7 月 15 日、申请号为 200580030371.3、发明名称为“治疗癌症的化合物和方法”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明一般性涉及抗癌治疗领域。更具体地说，它提供了有机砷化合物和将它们用于治疗癌症（例如白血病和实体瘤）的方法。

背景技术

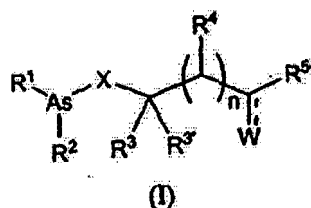
[0003] 尽管白血病治疗已经取得了进展，但大多数患有白血病的成年患者仍然会死于疾病的发展。已经证明，无机化合物三氧化二砷可以治疗复发性或顽固性急性早幼粒细胞白血病 (APL)，也对于它对其他类型的白血病的治疗进行了评价。但是，中国和近来在美国试验的初步数据指出，三氧化二砷在其他的血液性癌症中也具有作用。因此，近来作为抗白血病药的三氧化二砷的活性也在许多类型的白血病中进行了研究。尽管就所研究的一些白血病中应答率的结果看起来比较良好，但三氧化二砷的全身性毒性一直是个问题 (Soignet 等人, 1999 ; Wiernik 等人, 1999 ; Geissler 等人, 1999 ; Rousselot 等人, 1999)。

[0004] 所制备的人用有机砷化物仅有美拉肿醇，已经评价了其抗白血病活性 (W09924029, EP1002537)。不幸的是，当以治疗锥虫病的浓度使用时，该化合物对患有白血病的患者有非常大的毒性。因此，需要鉴别出这样的砷的衍生物，其可以用于一般性治疗血液性恶性肿瘤和癌症，其具有与三氧化二砷相似或更大的活性，并且毒性较低。

发明内容

[0005] 本发明提供一种具有抗癌性质的有机砷化合物。在一些实施方案中，本发明提供具有通式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐

[0006]



[0007] 其中

[0008] X 是 S 或 Se ;

[0009] W 是 O、S 或 (R) (R)，其中出现的每个 R 独立地是 H 或 C₁₋₂ 烷基；

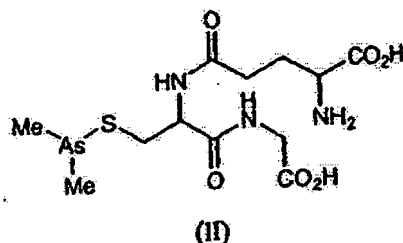
[0010] n 是 0 或 1；

[0011] R¹ 和 R² 分别独立地是 C₁₋₁₀ 烷基；

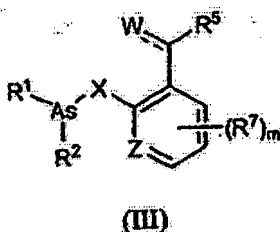
[0012] R³ 是 -H、C₁₋₁₀ 烷基，或 C₀₋₆ 烷基 -COOR⁶；

[0013] R^{3'} 是 H、氨基、氰基、卤素、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、羧基、C₁₋₁₀ 烷基、C₁₋₁₀ 烯基、或 C₁₋₁₀ 炔基，优选 H；

- [0014] R^4 是 $-OH$ 、 $-H$ 、 $-CH_3$ 、氨基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、或 $-OC(O)$ 芳基；
- [0015] R^5 是 $-OH$ 、氰基、 C_{1-10} 烷氧基、氨基、 O -芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、 $-OC(O)$ 芳基、或甘氨酸取代基；和
- [0016] R^6 是 H 或 C_{1-10} 烷基。
- [0017] 本发明的另一个方面是提供与盐酸吡啶结合的式 (II) 的化合物
- [0018]



- [0019] 或其药学上可接受的盐，其中晶体形式的该化合物的熔点大于 $125^\circ C$ 。
- [0020] 在一些实施方案中，该有机砷是具有通式 (III) 结构的化合物
- [0021]



- [0022] 其中
- [0023] X 是 S 或 Se ，优选是 S ；
- [0024] W 是 O 、 S 或 (R) (R)，其中出现的每个 R 独立地是 H 或 C_{1-2} 烷基，优选是 O ；
- [0025] Z 是 CH 或 N ，优选是 N ；
- [0026] R^1 和 R^2 独立地是 C_{1-10} 烷基，优选 R^1 和 R^2 独立地选自甲基、乙基、丙基、和异丙基；和
- [0027] R^5 是 $-OH$ 、氰基、 C_{1-10} 烷氧基、氨基、 O -芳烷基、 O -芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、 $-OC(O)$ 芳基、或甘氨酸取代基，优选是 OH ；
- [0028] R^6 是 H 或 C_{1-10} 烷基；
- [0029] R^7 选自卤素、 $-OH$ 、 C_{0-6} 烷基 $-COOR^6$ 、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、氨基、酰胺基、氰基、和硝基；
- [0030] m 是 0 到 4 的整数，优选是 0 。
- [0031] 本发明的其他目的、特征和优点将会通过下文的详述变得显而易见。应当理解的是，当说明本发明的优选实施方案时，给出的详细说明和特定实施例仅仅是用于解释说明，因为通过该详述，在本发明的精神和范围内的各种变更和改变将会对本领域的技术人员变得显而易见。

附图说明

- [0032] 下列的附图构成了本说明书的一部分，包括对本发明的某些方面的进一步解释。

通过参考一个或多个附图并结合本文对特定实施方案的详细描述,将可以更好地理解本发明。

[0033] 附图 1 显示的是人白血病细胞系 NB4 与所示浓度的 S- 二甲肿基 - 硫代琥珀酸 (MER1) 或三氧化二砷培养 3 天。

[0034] 附图 2 显示的是人白血病细胞系 AML2 与所示浓度的 MER1 或三氧化二砷培养 3 天。通过锥虫蓝排除法评价细胞存活。

[0035] 附图 3A 显示的是当用 MER1 处理时,人白血病细胞系的生长百分比。

[0036] 附图 3B 显示的是当用 MER1 处理时,人 CNS 细胞系的生长百分比。

[0037] 附图 3C 显示的是当用 MER1 处理时,人肾癌细胞系的生长百分比。

[0038] 附图 3D 显示的是当用 MER1 处理时,人非小细胞肺癌细胞系的生长百分比。

[0039] 附图 3E 显示的是当用 MER1 处理时,人黑素瘤细胞系的生长百分比。

[0040] 附图 3F 显示的是当用 MER1 处理时,人前列腺癌细胞系的生长百分比。

[0041] 附图 3G 显示的是当用 MER1 处理时,人结肠癌细胞系的生长百分比。

[0042] 附图 3H 显示的是当用 MER1 处理时,人卵巢癌细胞系的生长百分比。

[0043] 附图 3I 显示的是当用 MER1 处理时,人乳腺癌细胞系的生长百分比。

[0044] 附图 4 显示的是,用所示浓度的 S- 二甲肿基 -2- 硫代苯甲酸 (SAL1) 培养 3 天的 HL60 人白血病细胞的细胞存活。

[0045] 附图 5A 显示的是当用 SAL1 处理时,人白血病细胞系的生长百分比。

[0046] 附图 5B 显示的是当用 SAL1 处理时,人 CNS 细胞系的生长百分比。

[0047] 附图 5C 显示的是当用 SAL1 处理时,人肾癌细胞系的生长百分比。

[0048] 附图 5D 显示的是当用 SAL1 处理时,人非小细胞肺癌细胞系的生长百分比。

[0049] 附图 5E 显示的是当用 SAL1 处理时,人黑素瘤细胞系的生长百分比。

[0050] 附图 5F 显示的是当用 SAL1 处理时,人前列腺癌细胞系的生长百分比。

[0051] 附图 5G 显示的是当用 SAL1 处理时,人结肠癌细胞系的生长百分比。

[0052] 附图 5H 显示的是当用 SAL1 处理时,人卵巢癌细胞系的生长百分比。

[0053] 附图 5I 显示的是当用 SAL1 处理时,人乳腺癌细胞系的生长百分比。

[0054] 附图 6 用所示浓度的 S- 二甲肿基 - 谷胱甘肽 (SGLU1) 或三氧化二砷培养 3 天的 NB4 细胞的细胞存活。

[0055] 附图 7 显示的是用 HL60 细胞和 SGLU1 或三氧化二砷进行 5 天的克隆分析。

[0056] 附图 8A 显示的是当用 SGLU1 处理时,人白血病细胞系的生长百分比。

[0057] 附图 8B 显示的是当用 SGLU1 处理时,人 CNS 细胞系的生长百分比。

[0058] 附图 8C 显示的是当用 SGLU1 处理时,人肾癌细胞系的生长百分比。

[0059] 附图 8D 显示的是当用 SGLU1 处理时,人非小细胞肺癌细胞系的生长百分比。

[0060] 附图 8E 显示的是当用 SGLU1 处理时,人黑素瘤细胞系的生长百分比。

[0061] 附图 8F 显示的是当用 SGLU1 处理时,人前列腺癌细胞系的生长百分比。

[0062] 附图 8G 显示的是当用 SGLU1 处理时,人结肠癌细胞系的生长百分比。

[0063] 附图 8H 显示的是当用 SGLU1 处理时,人卵巢癌细胞系的生长百分比。

[0064] 附图 8I 显示的是当用 SGLU1 处理时,人乳腺癌细胞系的生长百分比。

[0065] 附图 9 显示的是来自急性髓细胞样白血病 (AML) 患者的用所示浓度的 MER1 或三

氧化二砷培养 3 天的单核细胞的细胞存活。

[0066] 附图 10 显示的是来自 AML 患者的用所示浓度的 MER1 或三氧化二砷培养 4 天的单核细胞的细胞存活。

[0067] 附图 11 显示的是来自 AML 患者的用所示浓度的 MER1 或三氧化二砷培养 5 天的单核细胞的细胞存活。

[0068] 附图 12 显示的是来自慢性髓细胞样白血病 - 急变期 (CML-BP) 患者的用所示浓度的 MER1 或三氧化二砷培养 3 天的单核细胞的细胞存活。

[0069] 附图 13 显示的是来自急性成淋巴细胞性白血病 (ALL) 患者的用所示浓度的 MER1 或三氧化二砷培养 4 天的单核细胞的细胞存活。

[0070] 附图 14 来自正常供体的用所示浓度的 MER1 或三氧化二砷培养 5 天的单核细胞的细胞存活。

[0071] 附图 15 显示的是用正常供体细胞和 MER1 或三氧化二砷进行 8 天的克隆分析。

[0072] 附图 16 显示的是来自慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 患者的用所示浓度的 SGLU1 或三氧化二砷培养 5 天的单核细胞的细胞存活。

[0073] 附图 17 显示的是使用 AML 患者的单核细胞和 SGLU1 或三氧化二砷进行 8 天的克隆分析。

[0074] 附图 18 显示的是使用正常供体细胞和 SGLU1 或三氧化二砷进行 8 天的克隆分析。

[0075]

[0076]

[0077]

[0078]

[0079]

[0080]

[0081]

[0082]

[0083]

[0084]

[0085]

[0086]

[0087]

[0088]

[0089]

[0090]

[0091]

[0092]

[0093]

[0094]

[0095]

[0096]

[0097]

[0098]

[0099]

[0100]

[0101]

[0102]

[0103]

[0104]

[0105]

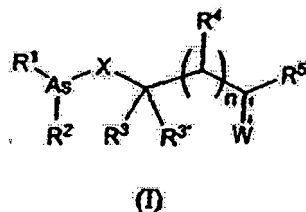
[0106]

[0107] 发明详述

[0108] 本发明提供数量众多的有机砷化合物。

[0109] 在一些实施方案中。本发明的有机砷具有通式 (I) 的结构或其药学上可接受的盐

[0110]



[0111] 其中

[0112] X 是 S 或 Se, 优选是 S ;

[0113] W 是 O、S 或 (R) (R), 其中出现的每个 R 独立地是 H 或 C₁₋₂ 烷基, 优选是 O 或 (R) (R) ;

[0114] n 是 0 或 1, 优选是 1 ;

[0115] R¹ 和 R² 分别独立地是 C₁₋₁₀ 烷基, 优选 R¹ 和 R² 独立地选自甲基、乙基、丙基、和异丙基 ;[0116] R³ 是 -H、C₁₋₁₀ 烷基, 或 C₀₋₆ 烷基 -COOR⁶ ;[0117] R^{3'} 是 H、氨基、氰基、卤素、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、羧基、C₁₋₁₀ 烷基、C₁₋₁₀ 烯基、或 C₁₋₁₀ 炔基, 优选 H ;[0118] R⁴ 是 -OH、-H、-CH₃、氨基、-OC(O)C₁₋₁₀ 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 烷基、或 -OC(O) 芳基 ;[0119] R⁵ 是 -OH、氰基、C₁₋₁₀ 烷氧基、氨基、O-芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 烷基、-OC(O) 芳基、或甘氨酸取代基 ; 和[0120] R⁶ 是 H 或 C₁₋₁₀ 烷基, 优选是氢。[0121] 在一些实施方案中, W 是 (R) (R), 其中出现的每个 R 独立地是 H 或 C₁₋₂ 烷基。在一些实施方案中, 出现的每个 R 都是 H。[0122] 在一些实施方案中, R³ 是 -H 或 C₀₋₆ 烷基 -COOR⁶。在一些实施方案中, R³ 是 -COOR⁶、-CH₂COOR⁶、-CH₂CH₂COOR⁶、-CH(CH₃)COOR⁶、-CH(CH₂CH₃)COOR⁶、和 -CH₂CH₂CH₂COOR⁶, 其中 R⁶ 是 C₁₋₁₀ 烷基。[0123] 在一些实施方案中, R³ 是 C₁₋₁₀ 烷基。在一些优选的这样的实施方案中, R³ 选自甲

基、乙基、丙基、和异丙基，优选是甲基。

[0124] 在一些实施方案中， $R^{3'}$ 选自氨基、氰基、卤素、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、羧基、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 烯基、和 C_{1-10} 炔基。在优选的这样的实施方案中， $R^{3'}$ 选自芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、羧基、 C_{1-10} 烯基和 C_{1-10} 炔基。

[0125] 在一些优选的实施方案中， R^4 选自 $-OH$ 、 $-H$ 、 $-CH_3$ 、 $-OC(O)C_{1-10}$ 芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、和 $-OC(O)$ 芳基。在一些这样的实施方案中， R^4 选自 $-OC(O)C_{1-10}$ 芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、和 $-OC(O)$ 芳基。

[0126] 在一些优选的实施方案中， R^4 是氨基。在一些这样的实施方案中， R^4 是 NH_2 。

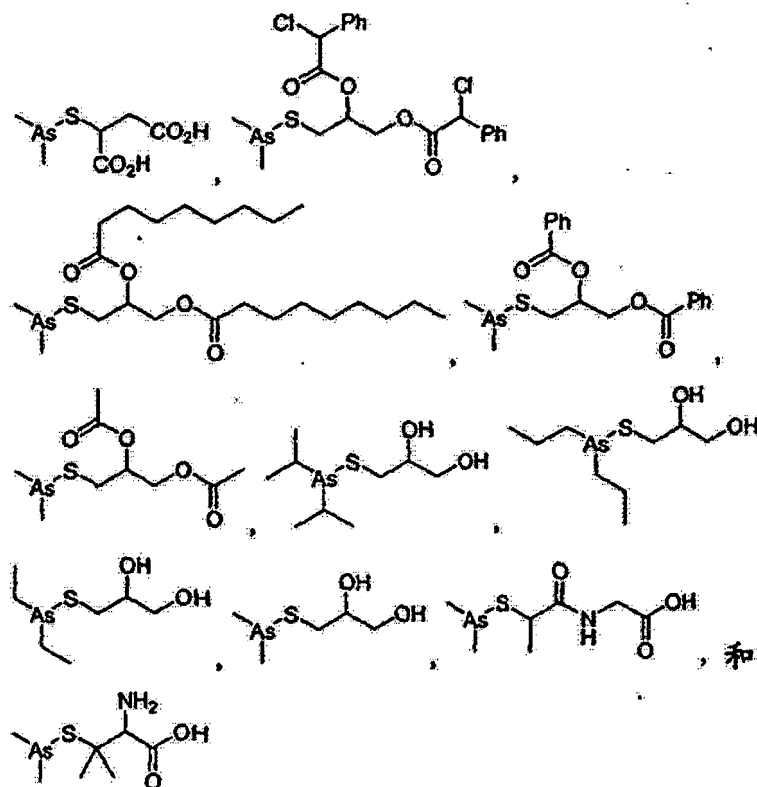
[0127] 在一些实施方案中， R^5 选自氰基、 C_{1-10} 烷氧基、氨基、 O -芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、和 $-OC(O)$ 芳基。

[0128] 在一些实施方案中，其中 X 是 S ， W 是 (R) ，其中出现的每个 R 都是 H ， n 是 1， R^1 和 R^2 独立地选自甲基、乙基、丙基、和异丙基， R^3 和 $R^{3'}$ 都是 H ， R^4 选自 $-OH$ 、 $-OC(O)C_{1-10}$ 芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、和 $-OC(O)$ 芳基，和 R^5 选自 $-OH$ 、 $-OC(O)C_{1-10}$ 芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、和 $-OC(O)$ 芳基。在一些实施方案中， R^1 和 R^2 相同，都选自甲基、乙基、丙基、和异丙基。

[0129] 在一些实施方案中， X 是 S ， W 是 O ， n 是 1， R^1 和 R^2 都是甲基， R^3 选自 H 和 $COOR^6$ ， $R^{3'}$ 是 H ，并且 R^4 选自 H 和甘氨酸取代基， R^5 选自 OH 和甘氨酸取代基。在一些实施方案中， R^3 是 $COOR^6$ ， R^4 是 H ， R^5 是 OH ，且 R^6 是 H 。

[0130] 在一些实施方案中，通式 (I) 的化合物选自

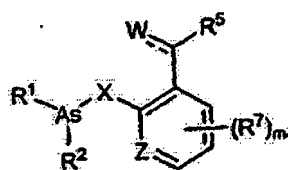
[0131]



[0132] 在一些实施方案中，通式 (I) 的化合物选自

[0133]

[0141]



(III)

[0142] 其中

[0143] X 是 S 或 Se, 优选是 S ;

[0144] W 是 O、S 或 (R) (R), 其中出现的每个 R 独立地是 H 或 C₁₋₂ 烷基, 优选是 O ;

[0145] Z 是 CH 或 N ;

[0146] R¹ 和 R² 独立地是 C₁₋₁₀ 烷基, 优选 R¹ 和 R² 独立地选自甲基、乙基、丙基、和异丙基 ;
和[0147] R⁵ 是 -OH、氰基、C₁₋₁₀ 烷氧基、氨基、O-芳烷基、O-芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 烷基、-OC(O) 芳基、或甘氨酸取代基, 优选是 OH ;[0148] R⁶ 是 H 或 C₁₋₁₀ 烷基 ;[0149] R⁷ 选自卤素、-OH、C₀₋₆ 烷基 -COOR⁶、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、氨基、酰胺基、氰基、和硝基 ;

[0150] m 是 0 到 4 的整数, 优选是 0。

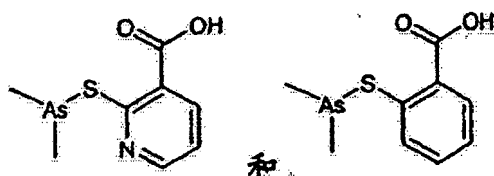
[0151] 在一些实施方案中, W 是 (R) (R), 其中出现的每个 R 独立地是 H 或 C₁₋₂ 烷基。在一些这样的实施方案中, 出现的每个 R 是 H。[0152] 在一些实施方案中, R⁵ 选自氰基、C₁₋₁₀ 烷氧基、氨基、O-芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 烷基、和 -OC(O) 芳基。[0153] 在一些实施方案中, X 是 S, W 是 O, R¹ 和 R² 独立地选自甲基、乙基、丙基、和异丙基, 并且 R⁵ 是 OH。在一些这样的实施方案中, R¹ 和 R² 相同, 都选自甲基、乙基、丙基、和异丙基。在一些这样的实施方案中, R¹ 和 R² 都是甲基。

[0154] 在一些实施方案中, Z 是 N。

[0155] 在一些实施方案中, Z 是 CH。

[0156] 在一些实施方案中, 通式 (III) 的化合物选自

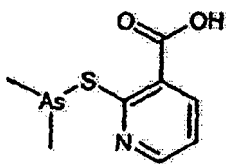
[0157]



[0158] 14 页上

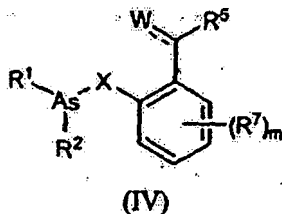
[0159] 在一些实施方案中, 通式 (III) 的化合物是

[0160]



[0161] 在另外的实施方案中,有机砷化物是具有通式 (IV) 结构的化合物

[0162]



[0163] 其中

[0164] X 是 S 或 Se, 优选是 S ;

[0165] W 是 O、S、或 (R) (R), 其中出现的每个 R 独立地是 H 或 C₁₋₂ 烷基, 优选是 O ;

[0166] R¹ 和 R² 独立地是 C₁₋₁₀ 烷基, 优选 R¹ 和 R² 独立地选自甲基、乙基、丙基、和异丙基 ; 和

[0167] R⁵ 是 -OH、氰基、C₁₋₁₀ 烷氧基、氨基、O-芳烷基、O-芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 烷基、-OC(O) 芳基、或甘氨酸取代基, 优选是 OH ;

[0168] R⁶ 是 H 或 C₁₋₁₀ 烷基 ;

[0169] R⁷ 选自卤素、-OH、C₀₋₆ 烷基 -COOR⁶、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、氨基、酰胺基、氰基、和硝基 ;

[0170] m 是 0 到 4 的整数, 优选是 0。

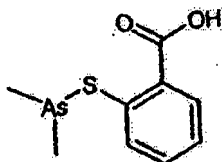
[0171] 在一些实施方案中, W 是 (R) (R), 并且出现的每个 R 独立地是 H 或 C₁₋₂ 烷基。在一些这样的实施方案中, 出现的每个 R 都是 H。

[0172] 在一些实施方案中, R⁵ 选自氰基、C₁₋₁₀ 烷氧基、氨基、O-芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 烷基、和 -OC(O) 芳基。

[0173] 在一些实施方案中, X 是 S, W 是 O, R¹ 和 R² 独立地选自甲基、乙基、丙基、和异丙基, 并且 R⁵ 是 OH。在一些这样的实施方案中, R¹ 和 R² 相同, 都选自甲基、乙基、丙基、和异丙基。在一些这样的实施方案中, R¹ 和 R² 都是甲基。

[0174] 在一些优选的实施方案中, 通式 (III) 的化合物具有下列结构 :

[0175]



[0176] 本发明的另一个方面涉及以与实施例 13 和以整体引入本文作为参考的 Banks, C. H., 等人 (J. Med. Chem. (1979) 22 :572-575) 所述类似的方式合成通式 (I) 的化合物的方法, 其中将具有下列通式结构的化合物

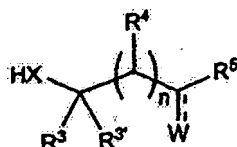
[0177] $(C_{1-10} \text{ 烷基})_2As(O)OH$

[0178] 溶解于 pH 调节到 3 的水 / 盐酸溶液中, 给溶液通入二氧化硫气流以得到具有下列通式结构的化合物

[0179] $(C_{1-10} \text{ 烷基})_2AsCl$

[0180] 其与具有下列通式结构的化合物反应

[0181]



[0182] 其中 X 是 S 或 Se, 优选是 S ;

[0183] W 是 O、S 或 (R) (R), 其中出现的每个 R 独立地是 H 或 C₁₋₂ 烷基, 优选是 O 或 (R) (R) ;

[0184] n 是 0 或 1, 优选是 1 ;

[0185] R³ 是 -H、C₁₋₁₀ 烷基, 或 C₀₋₆ 烷基 -COOR⁶ ;

[0186] R^{3'} 是 H、氨基、氰基、卤素、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、羧基、C₁₋₁₀ 烷基、C₁₋₁₀ 烯基、或 C₁₋₁₀ 炔基, 优选 H ;

[0187] R⁴ 是 -OH、-H、-CH₃、氨基、-OC(O)C₁₋₁₀ 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 烷基、或 -OC(O) 芳基 ;

[0188] R⁵ 是 -OH、氰基、C₁₋₁₀ 烷氧基、氨基、O- 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 烷基、-OC(O) 芳基、或甘氨酸取代基 ; 和

[0189] R⁶ 是 H 或 C₁₋₁₀ 烷, 优选是氢 ;

[0190] 其中每种化合物都用在可接受的有机溶剂中的吡啶处理, 以得到通式 (I) 的化合物。

[0191] 在一些实施方案中, W 是 (R) (R), 其中出现的每个 R 独立地是 H 或 C₁₋₂ 烷基。在一些实施方案中, 出现的每个 R 都是 H。

[0192] 在一些实施方案中, R³ 是 -H 或 C₀₋₆ 烷基 -COOR⁶。在一些实施方案中, R³ 选自 -COOR⁶、-CH₂COOR⁶、-CH₂CH₂COOR⁶、-CH(CH₃)COOR⁶、-CH(CH₂CH₃)COOR⁶、和 -CH₂CH₂CH₂COOR⁶, 其中 R⁶ 是 C₁₋₁₀ 烷基。

[0193] 在一些实施方案中, R³ 是 C₁₋₁₀ 烷基。在一些优选的这样的实施方案中, R³ 选自甲基、乙基、丙基、和异丙基, 优选是甲基。

[0194] 在一些实施方案中, R^{3'} 选自氨基、氰基、卤素、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、羧基、C₁₋₁₀ 烷基、C₁₋₁₀ 烯基、和 C₁₋₁₀ 炔基。在优选的这样的实施方案中, R^{3'} 选自芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、羧基、C₁₋₁₀ 烯基和 C₁₋₁₀ 炔基。

[0195] 在一些优选的实施方案中, R⁴ 选自 -OH、-H、-CH₃、-OC(O)C₁₋₁₀ 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 烷基、和 -OC(O) 芳基。在一些这样的实施方案中, R⁴ 选自 -OC(O)C₁₋₁₀ 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 烷基、和 -OC(O) 芳基。

[0196] 在一些实施方案中, R⁴ 是氨基。在一些这样的实施方案中, R⁴ 是 NH₂。

[0197] 在一些实施方案中, R⁵ 选自氰基、C₁₋₁₀ 烷氧基、氨基、O- 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 芳烷

基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、和 $-OC(O)$ 芳基。

[0198] 本发明进一步提供药物组合物, 包含通式 (I)、通式 (II)、通式 (III)、或通式 (IV) 或其药学上可接受的盐, 和药学上可接受的稀释剂或载体。在一些实施方案中, 该药物组合物是水溶液, 其 pH 大于约 5, 优选是约 5 到约 8 的范围, 更优选是约 5 到约 7 的范围。

[0199] 本发明的另一个目的是提供治疗癌症的方法, 包括使用治疗有效量的通式 (I)、通式 (II)、通式 (III)、或通式 (IV) 的化合物。

[0200] 本发明也涉及通式 (I)、通式 (II)、通式 (III)、或通式 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐在制备治疗癌症的药物中的应用。

[0201] 在一些实施方案中, 癌症选自实体瘤, 例如脑、肺、肝、脾、肾、淋巴结、小肠、胰、血细胞、骨、结肠、胃、乳腺、子宫内膜、前列腺、睾丸、卵巢、中枢神经系统、皮肤、头和颈、食管或骨髓, 或者血液性癌症, 例如白血病、急性早幼粒细胞性白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良、骨髓组织增生性疾病、或顽固性贫血。在一些这样的实施方案中, 所述癌症是选自急性和慢性白血病的白血病。

[0202] 因此, 在另一方面, 本发明包含治疗癌症患者的方法, 包括给该患者施用包含通式 I、通式 II 或通式 III 的化合物的组合物, 或如上所述的药物组合物。化合物的治疗有效量可以是 0.1-1000mg/kg, 1-500mg/kg, 或 10-100mg/kg。在具体的实施方案中, 该方法可以包括每日施用该组合物。进一步需要考虑的是, 治疗方法可以包括多次给药。该方法可以包括每日例如通过注射施用该化合物。也可以使用本说明书中所述的给药的可替代途径和方法, 给药方式主要取决于癌症的类型和位置。在一些实施方案中, 本发明进一步包含给患者施用一种或多种另外的试剂。该另外的试剂可以是全反式维甲酸、9-顺式维甲酸、Am-80 或抗坏血酸。也可以考虑将其它的辅助癌症疗法, 例如化学疗法、放射疗法、基因疗法、激素疗法或本领域已知的其他癌症疗法与本发明的方法联合使用。

[0203] 可以考虑施用的不同方法, 包括局部、全身、直接施用和通过输注。这些方法包括通过注射、口腔途径、静脉内、动脉内、瘤内、施用于肿瘤脉管系统、腹膜内、气管内、肌内、内镜下、伤口内、透皮、皮下、局部、鼻、含化、粘膜、阴肛部、直肠等等来施用。

[0204] 定义

[0205] 术语“ C_{x-y} 烷基”是指取代或非取代的饱和烃基, 包括在链中包含 x 到 y 个碳的直链烷基和支链烷基, 包括卤代烷基例如三氟甲基和 2,2,2-三氟乙基等等。 C_0 烷基代表当该基团在末端位置是氢, 如果在中间则是一个键。术语“ C_{2-y} 烯基”和“ C_{2-y} 炔基”涉及长度类似并可能被烷基取代的取代或非取代的不饱和脂基, 但其分别包含至少一个双键或三键。

[0206] 术语“ C_{1-6} 烷氧基”是指与一个氧相连的 C_{1-6} 烷基。代表性的烷氧基包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、叔丁氧基等等。“醚”是通过一个氧共价连接的两个烃。相应地, 使得烷基变成醚的该烷基的取代基就是或者类似于烷氧基。

[0207] 本文使用的术语“ C_{1-6} 芳烷基”是指由芳基取代的 C_{1-6} 烷基。

[0208] 本文使用的术语“芳基”包括 5-, 6- 和 7- 元取代或非取代的单环芳香基, 其中环上的每个原子都是碳。术语“芳基”也包括具有两个或更多环的多环系统, 其中两个或多个碳是两个相邻的环共有的, 其中至少一个环是芳香环, 例如, 其他的环可以是环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、和 / 或杂环。芳基包括苯、萘、菲、酚、苯胺等等。

[0209] 本文使用的短语“药学上可接受的”是指涉及的配体、物质、组合物、和 / 或剂型,

其在合理的医学判断范围内,适用于与人和动物的组织接触,而没有过度的毒性、刺激、变应性应答、或其他问题或并发症,并具有合理的益处/风险比。

[0210] 术语“预防”是领域内公认的,当用于疾病例如局部复发(例如,疼痛),疾病(例如癌症)、复杂的综合症(例如心力衰竭)或其他医学疾病时,其在本领域是很好理解的,包括施用一种组合物,与不接受该组合物的患者相比,在患者中施用该组合物降低了医学疾病的频率、推迟了发病、减少了症状。因此,癌症的预防包括,例如以统计学和/或临床上显著的量,例如,与未治疗的对照群体相比,在接受预防疗法的患者群体中降低了可检测的癌症生长,和/或与未治疗的对照群体相比,在接受预防疗法的患者群体中推迟了可检测的癌症生长。感染的预防包括,治疗的群体相对于未治疗的对照群体降低了感染的诊断数量,和/或治疗的群体相对于未治疗的对照群体推迟了感染症状的发病。疼痛的预防包括,例如,治疗的群体相对于未治疗的对照群体降低了患者感觉到的痛觉强度,或延迟了患者感觉到的痛觉。

[0211] 术语“预防性或治疗性”疗法是本领域公认的,包括给宿主施用一种或多种受试组合物。如果在不想要的状况(例如,疾病或其他宿主 动物不想有的状态)的临床表现前施用,那么该疗法就是预防性的,(即它保护了宿主免于发展成不想要的情况),反之当在不想要的状况表现出来以后施用,那么该疗法就是治疗性的,(即,它试图减小、改善、或稳定已存在的不想要的状况或其副作用)。

[0212] 术语“取代”是指在主链的一个或多个碳原子上具有取代了氢的取代基的部分。可以理解的是,“取代”或“由……取代”包括下列暗含条件:这些取代基符合所取代原子和取代基允许的原子价,取代产生了稳定的化合物,例如其不会通过例如重排、环化、消除等等而自发地转化。本文中使用的术语“取代”应当考虑是包含所有允许的有机化合物的取代基。在一个较广的方面,允许的取代基包括有机化合物的非环状和环状、支链和非支链、碳环和杂环、芳香族和非芳香族取代基。对于适当的有机化合物,这些允许的取代可以是一个或多个,并且相同或不同。为了实现本发明的目的,杂原子例如氮可以具有氢取代基和/或其他本文所述的有机化合物的任意允许的满足杂原子的原子价的取代基,取代基包括例如卤素、羟基、羰基(例如羧基、烷氧羰基、甲酰基、或酰基)、硫代羰基(例如硫酯、硫代乙酸盐、或硫代甲酸盐)、烷氧基、磷酰基、磷酸盐、膦酸盐、次膦酸盐、氨基、酰胺基、脒、亚胺、氰基、硝基、叠氮基、巯基、烷基硫、硫酸盐、磺酸盐、氨磺酰基、磺酰胺基、磺酰基、杂环基、芳烷基、或芳香环或杂芳香环部分。本领域技术人员将会意识到,如果合适,在烃链上取代的部分可以被自身所取代。

[0213] 涉及治疗的试验方法的化合物的“治疗有效量”是指当作为需要的给药方案的一部分施用(于动物,优选是人)时,根据对所治疗的疾病或状况的临床可接受的标准或美容的目的,在制剂中的一种或多种化合物的量以适合于任何药物治疗的合理的益处/风险比、减轻了症状、改善了状况、或延缓了疾病情况的发病。

[0214] 本文使用的术语“治疗”包括以某种方式逆转、降低、或阻止了疾病的症状、临床表现、和根本的病理,以改善或稳定患者的状况。

[0215] 无机砷化物与有机砷化物的毒性比较

[0216] 毒性限制了三氧化二砷的使用。另一方面,OA的毒性要小得多,人们认为在体内无机砷甲基化成OA是一种解毒反应。OA单甲砷酸和二甲砷酸是有机砷的主要代谢产

物 (Hughes 等人, 1998)。无机砷化物, 包括三氧化二砷对于许多的器官系统 (包括心血管系统、胃肠道、肾、皮肤、神经系统和血液) 具有不同的作用。无机砷化物对肝是特别有毒性的, 会导致渗透、中心性坏死、和肝硬化 (IARC, 1980; ACGIH, 1991; Beliles 等人, 1994; Goyer 等人, 1996)。现在有充分的证据表明, 无机砷化合物是人皮肤和肺的致癌物 (Goyer 等人, 1996)。

[0217] 给定砷化物的毒性与它从体内的排除率和它的组织蓄积程度有关 (Beliles 等人, 1994)。一般地, 毒性按照下列的顺序增加: 有机砷化物 < As^{5+} < As^{3+} (包括三氧化二砷) < 砷。与无机砷化物不同, 在文献中没有报道过由于 OA 而导致中毒的死亡或严重情况。因此, 在哺乳动物中, 认为无机砷化物的甲基化是解毒的机理, 这是因为甲基化 OA 较低的毒性以及它们的快速排泄和较少的保留 (Beliles 等人, 1994; Goyer 等人, 1996)。一个好的例子是二甲砷酸, 其是一种有机化合物, 是暴露于无机砷化物 (包括三氧化二砷) 后大多数哺乳动物排泄的主要的尿代谢产物。在小鼠的体内毒性研究中, 在腹膜内施用三氧化二砷后, LD_{50} (50% 的动物由于急性毒性而死亡的剂量) 是 10mg/kg (Investigator's Brochure, 1998), 而在施用二甲砷酸后, LD_{50} 是 500mg/kg (MSDS, 1998)。

[0218] 癌症治疗

[0219] 本发明的有机砷化合物可以用于治疗各种的癌症, 包括所有的实体瘤和所有的血液性癌症, 包括白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良、或骨髓增生障碍。OA 也可以用于治疗已经对其他形式的疗法变得耐受的血液性癌症。

[0220] 白血病是一种血液形成组织的恶性肿瘤, 其特征是白血球异常增殖, 是癌症的四种主要类型之一。根据最主要涉及的白血球的类型对白血病进行分类。急性白血病主要是非分化细胞群, 慢性白血病具有更成熟的细胞形式 (WO9924029)。

[0221] 急性白血病分为成淋巴细胞性 (ALL) 和非成淋巴细胞性 (ANLL), 可以根据法国-美国-英国分类法或根据它们的类型和分化程度通过形态学和细胞化学现象进一步细分。特定的 B- 和 T- 细胞, 以及髓样细胞表面标记 / 抗原也可以用于分类。ALL 主要是一种儿童疾病, 而 ANLL, 也称作急性髓样白血病, 是在成年人中更常见的急性白血病。

[0222] 慢性白血病分为淋巴细胞性 (CLL) 和髓样性 (CML)。CLL 的特征是血液、骨髓和淋巴样器官中成熟淋巴细胞的数目增加。大多数 CLL 患者具有 B 细胞性质的淋巴细胞的克隆扩张。CLL 是一中老年人的疾病。在 CML 中, 粒细胞在血液和骨髓分化的所有阶段都占据优势, 但是也作用于肝、脾、和其他器官。其他可以用本发明的 OA 治疗的恶性血液性疾病包括但不限于: 脊髓发育不良、骨髓增生性疾病、淋巴瘤、和多发性骨髓瘤。

[0223] 药物组合物

[0224] 根据现有的公开, 制备包含至少一种有机砷化物或其他活性成分的药物组合物对于本领域技术人员来说是已知的, 例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, 在此通过参考引入本文。此外, 对于动物 (例如人) 的施用, 可以理解的是, 该制剂应当符合 FDA 生物标准所要求的无菌、致热原性、一般的安全性和纯度标准。

[0225] 本文使用的“药学上可接受的载体”包括任何和全部溶剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂 (例如, 抗菌剂、抗真菌剂)、等张剂、延迟吸收剂、盐、防腐剂、药物、药物稳定剂、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润湿剂、甜味剂、芳香剂、染料、类似的物质及其

组合,这些都是本领域普通技术人员已知的(参见,例如, Remington' s Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, 第 1289-1329 页,在此通过参考引入本文)。除了任意常规载体与活性成分的不相容性以外,也应当考虑其在治疗或药物组合物中的用途。

[0226] 根据是否以固体、液体或气雾剂形式施用,和是否需要灭菌以用于所施用的途径(例如注射),将该有机砷化物和不同类型的载体混合。本发明可以静脉内、皮内、动脉内、腹膜内、伤口内、颅内、关节内、前列腺内、胸膜内、器官内、鼻内、玻璃体内、阴道内、直肠内、局部、瘤内、肌内、腹膜内、皮下、结膜下、囊内(Intravesicularlly)、粘膜、心包内、脐内、眼内、口腔、局部、部位、注射、输注、连续输注、直接集中灌注冲洗靶细胞、经导管、经灌注、在液体组合物(例如,脂质体)或通过其他方法或本领域普通技术人员已知的上述方法的任意组合来施用(参见,例如, Remington' s Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, 在此通过参考引入本文)。

[0227] 给患者施用的本发明的组合物的实际剂量可以通过身体和生理因素例如体重、情况的严重性、要治疗疾病的类型、与先前或同时治疗物的相互作用、患者的特发病和给药途径来确定。负责给药的医生无论如何将会确定在组合物中活性成分的浓度和对于个体患者的适当剂量。

[0228] 在一些实施方案中,药物组合物可以包含,例如至少约 0.1% 的有机砷化物。在其他的实施方案中,例如每单位可以包含约 2% 到约 75% 重量,或约 25% 到约 60% 重量和例如任意可推论范围的活性化合物。在其他非限制性的例子中,一个剂量可以包含每次施用约 0.1mg/kg/ 体重、0.5mg/kg/ 体重、1mg/kg/ 体重、约 5mg/kg/ 体重、约 10mg/kg/ 体重、约 20mg/kg/ 体重、约 30mg/kg/ 体重、约 40mg/kg/ 体重、约 50mg/kg/ 体重、约 75mg/kg/ 体重、约 100mg/kg/ 体重、约 200mg/kg/ 体重、约 350mg/kg/ 体重、约 500mg/kg/ 体重、约 750mg/kg/ 体重、到约 1000mg/kg/ 体重或更多,以及任意可推论的范围。在本文数字可推论范围的非限制性例子中,根据上述的数字,可以施用的范围是约 10mg/kg/ 体重到约 100mg/kg/ 体重等等。

[0229] 在任何情况下,所述组合物可以包含各种的抗氧化剂以阻止一种或多种组分的氧化。此外,防腐剂(例如各种的抗菌剂和抗真菌剂),包括但不限于尼泊金类(例如尼泊金甲酯、尼泊金丙酯)、三氯叔丁醇、酚、抗坏血酸、硫柳汞或其组合可以带来对微生物活动的预防作用。

[0230] 可以将有机砷化物配制成游离碱、中性或盐形式的组合物。药学上可接受的盐包括由游离羧基形成的盐的形式,所述游离羧基是由无机碱例如氢氧化钠、钾、铵、钙或铁;或有机碱例如异丙胺、三甲胺、组氨酸或普鲁卡因得到的。

[0231] 在组合物是液体形式的实施方案中,载体可以是溶剂或分散介质,包括但不限于,水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等等)、脂类(例如,甘油三酯、植物油、脂质体)及其组合。保持适当的流动性,包括使用包衣,例如卵磷脂;通过分散在载体(例如液体多元醇或脂类)中保持需要的粒径;使用表面活性剂,例如羟丙基纤维素;或这些方法的组合。在许多情况中,优选其包含等渗剂,例如糖类、氯化钠或其组合。

[0232] 无菌注射溶液的制备,包括将在需要量的适当溶剂中的活性化合物与各种上述列举的成分混合,如果需要,然后过滤灭菌。一般地,分散体的制备包括将各种无菌的活性成

分掺入到包含基本分散介质和 / 或其他成分的无菌载体中。在用于制备无菌溶液、混悬液或乳剂的无菌粉末的情况下,制备的优选方法是真空干燥或冷冻干燥技术,可以从先前的无菌过滤的液体介质中获得活性成分和其他任意的所需成分的粉末。如果必需液体基质应当是适当缓冲的,在与足够的盐水或葡萄糖注射前,液体稀释剂首先要成为等张的。直接注射的高浓度组合物的制剂也是应当考虑的,其中设想使用 DMSO 作为溶剂以产生极快的渗透,将高浓度的活性剂递送到较小的区域。

[0233] 该组合物在生产和贮存条件下必须是稳定的,避免微生物(例如细菌和真菌)的污染作用。因此优选的组合物的 pH 大于约 5,优选约 5 到约 8,更优选约 5 到约 7。应当意识到,内毒素污染应当最低限度保持在安全水平下,例如,低于 0.5ng/mg 蛋白质。

[0234] 在特定的实施方案中,注射组合物的延长吸收可以通过使用含延迟吸收的试剂(例如,单硬脂酸铝、明胶或其组合)的组合物来实现。

[0235] 联合治疗

[0236] 本发明的一个方面是所述有机砷化物可以用于与其他试剂或治疗方法(优选另一种癌症疗法)联合使用。该有机砷化物可以在另一种试剂治疗前或后的几分钟到几周的间隔范围内施用。在其它试剂和表达结构分别应用于细胞的实施方案中,一般可以确认在每次递送的时间之间不会消耗足够的时间,以便该试剂和表达构造仍然能够对细胞发挥有利的联合作用。例如在一些情况中,需要考虑的是,一种物质可能以两种、三种、四种或更多的方式与有机砷化物基本上同时(即,在约 1 分钟以内)接触细胞、组织或器官。在其他方面,在施用有机砷化物前或后的约 1 分钟,约 5 分钟,约 10 分钟,约 20 分钟,约 30 分钟,约 45 分钟,约 60 分钟,约 2 小时,约 3 小时,约 4 小时,约 5 小时,约 6 小时,约 7 小时,约 8 小时,约 9 小时,约 10 小时,约 11 小时,约 12 小时,约 13 小时,约 14 小时,约 15 小时,约 16 小时,约 17 小时,约 18 小时,约 19 小时,约 20 小时,约 21 小时,约 22 小时,约 23 小时,约 24 小时,约 25 小时,约 26 小时,约 27 小时,约 28 小时,约 29 小时,约 30 小时,约 31 小时,约 32 小时,约 33 小时,约 34 小时,约 35 小时,约 36 小时,约 37 小时,约 38 小时,约 39 小时,约 40 小时,约 41 小时,约 42 小时,约 43 小时,约 44 小时,约 45 小时,约 46 小时,约 47 小时,到约 48 小时或更长的时间里施用一种或多种试剂。在一些其他的实施方案中,在施用有机砷化物前或后的约 1 天,约 2 天,约 3 天,约 4 天,约 5 天,约 6 天,约 7 天,约 8 天,约 9 天,约 10 天,约 11 天,约 12 天,约 13 天,约 14 天,约 15 天,约 16 天,约 17 天,约 18 天,约 19 天,约 20,到约 21 天施用一种或多种试剂。在一些情况中,可能需要足够地延长治疗时间,但是在各次施用之间可以间隔数周(例如,约 1,约 2,约 3,约 4,约 5,约 6,约 7 或约 8 周或更长)。

[0237] 可以使用各种组合,有机砷化物是“A”,可以是其他任何治疗剂的第二种试剂是“B”:

[0238] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/BB/A/B/B

[0239] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/AB/B/A/A

[0240] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0241] 给患者施用本发明的治疗组合物应当遵循化学疗法给药的一般方案,如果有的话,还要说明毒性。可以预料的是,如果需要可以重复治疗周期。也应当考虑的是各种标准疗法或辅助癌症疗法,以及外科手术可以与所述的砷试剂联合使用。这些疗法包括但不限于

于,化学疗法、放射疗法、免疫疗法、基因疗法和手术。下面的部分描述了一些辅助的癌症疗法。

[0242] 化学疗法

[0243] 癌症疗法也包括基于化学和放射治疗的各种联合疗法。联合的化学治疗药包括,例如,顺铂 (CDDP)、卡铂、丙卡巴肼、氮芥、环磷酰胺、喜树碱、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、硝基脲、放线菌素 D、多柔比星、博来霉素、plicomycin、丝裂霉素、依托泊苷 (VP16)、他莫昔芬、雷洛昔芬、雌激素受体结合剂、紫杉醇、吉西他滨、诺维本、法呢基-蛋白质转移酶抑制剂、顺铂 (transplatinum)、5-氟尿嘧啶、长春新碱、长春碱、和甲氨蝶呤,或上述物质的任意类似物或衍生物变体。

[0244] 放射疗法

[0245] 导致 DNA 损害和已经广泛使用的其他因子包括一般称作 γ -射线、X-射线、和 / 或直接递送到肿瘤细胞上的放射线同位素。也应当考虑其他形式的 DNA 损害因子,例如微波和 UV- 照射。最可能的是,所有这些因子作用于较宽范围的对 DNA、DNA 前体、DNA 的复制和修复、以及同源染色体的装配和维持的损害。X-射线的剂量范围是用于较长时间 (3 到 4 周) 的每日剂量 50 到 200 伦琴,至单剂量的 2000 到 6000 伦琴。放射性同位素的剂量范围可以大不相同,取决于同位素的半衰期、所发射的辐射强度和类型、和赘生细胞的吸收。在本文中使用的术语“接触”和“暴露”当用于细胞时,是描述了下列的过程:递送一种治疗性构造和化学疗法或放射疗法的试剂到靶细胞或将其直接与靶细胞并置。为了实现细胞的杀灭或停滞,这两种试剂都以组合量递送到细胞上,以杀死该细胞或阻止其分裂。

[0246] 免疫疗法

[0247] 免疫疗法,一般依靠使用免疫效应细胞和分子以靶向和破坏癌症细胞。该免疫效应子可以是例如,肿瘤细胞表面的一些标记的特殊抗体。该抗体可以单独作为治疗的效应子,或者它可以补充其他细胞至实际作用的要杀死的细胞上。该抗体也可以与药物或毒素 (化学治疗药、放射核苷酸、蓖麻毒素 A 链、霍乱毒素、百日咳毒素等等) 结合,或仅作为靶试剂。可替代地,该效应子可以是载有表面分子的淋巴细胞,其中该表面分子直接或间接地与肿瘤靶细胞相互作用。不同效应细胞包括细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞。

[0248] 因此,免疫疗法可以用作联合治疗的一部分,与基因疗法相结合。联合治疗的一般途径将在下文讨论。一般地,肿瘤细胞具有若干标记,其负责进行靶向作用,即其不存在于大多数的其他细胞中。许多肿瘤标记都是存在的,其中的任何一个都可以适用于本发明的靶向作用。通常的肿瘤标记包括癌胚抗原、前列腺特异抗原、泌尿肿瘤相关抗原、胎儿抗原、酪氨酸酶 (p97)、gp68、TAG-72、HMFG、Sialyl Lewis 抗原、MucA、MucB、PLAP、雌激素受体、层粘连蛋白受体、erb B 和 p155。

[0249] 基因疗法

[0250] 在另一个实施方案中,第二种治疗是次级基因疗法,其中治疗性的多核苷酸在第一治疗剂施用前、后或与其同时施用。与编码基因产物的载体结合的治疗性试剂的递送将会对靶组织具有抗过度增殖作用。

[0251] 手术

[0252] 约 60% 患有癌症的人都经受了一些类型的外科手术,包括预防性、诊断性或分阶段性、治疗性和治标性手术。治疗性手术是一种癌症治疗,其可以用于与其他疗法联合使

用,例如本发明的治疗、化学疗法、放射疗法、激素疗法、基因疗法、免疫疗法和 / 或替代疗法。治疗性手术包括切除术,其中物理除去、切除和 / 或破坏癌性组织的全部或部分。肿瘤切除术涉及物理除去至少一部分的肿瘤。除了肿瘤切除术,手术治疗包括激光手术、冷冻手术、电外科、和用显微镜控制的手术 (Mohs' surgery)。需要进一步考虑的是,本发明可以用于与表面癌症、初期癌、或偶然量的正常组织的除去联合使用。

具体实施方式

[0253] 实施例

[0254] 下面所包括的实施例是用于说明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当理解,在实施例中所公开的技术代表的是本发明人发现的技术,可以在本发明的实施中很好地实现其功能,因此,可以认为是实施的优选方式。但是,根据所公开的内容,本领域的技术人员将会意识到,对所公开的特定实施方案可以做出许多的改变,并仍然获得相似或类似的结果,而不脱离本发明的精神和范围。

[0255] 实施例 1

[0256] S-二甲肼基-硫代琥珀酸 (MER1), S-二甲肼基-水杨酸 (SAL1) 和 S-(二甲肼基)谷胱甘肽 (SGLU1) 的合成

[0257] MER-1:取巯基琥珀酸 4.5g 置于 100mL 的聚乙烯醚 (1,2-乙二醇二甲醚) 的 250m 圆底烧瓶中。滴加 4mL 的二甲基氯肼 (0.03mol), 然后再滴加 4mL 的二乙胺 (0.04mol)。将反应混合物在室温下搅拌 20 小时。形成了盐酸二乙胺的白色沉淀物,过滤分离。减压蒸发极大地减小了 MER1 的聚乙烯醚溶液的体积。过滤分离 MER1 的白色晶体,用冷的蒸馏水洗涤。然后在乙醇和水中再结晶该无色的晶体产物,得到恒定的熔点 150°C。

[0258] SAL-1:在 100mL 的烧瓶中,放入 5g 的 2-巯基苯甲酸 (硫代水杨酸)、75mL 的聚乙烯醚,5mL 的二甲基氯肼,和 5mL 的二乙胺。混合物在氮气大气下回流 1 小时,在室温下搅拌过夜。过滤分离盐酸二乙胺的沉淀物。减压下缓慢蒸发滤液,直至分离出产物的晶体。在冰中冷冻包含产物的蒸发溶液,过滤该冷溶液。在乙醇中再结晶产物的晶体,得到恒定的熔点 97°C。

[0259] SGLU-1:谷胱甘肽 (14.0g, 45.6mmol) 在聚乙烯醚中快速搅拌,同时滴加入二甲基氯肼 (6.5g, 45.6mmol)。然后将吡啶 (6.9g, 91.2mmol) 加入到浆体中,然后加热回流该混合物。立即移除热源。在室温下搅拌混合物 4 小时。分离所得到的不溶性固体,从乙醇中再结晶,得到 4, 盐酸吡啶复合物 (75% 收率): mp 115-118°C; NMR(D₂O) δ 1.35(s, 6H), 1.9-4.1(m', 10H), 7.8-9.0(m, 5H); 质谱 (m/e) 140, 125, 110, 105, 79, 52, 45, 36。该物质不能用于本文所述的实施例,但可以用于 Banks, C. H. 等人. (J. Med. Chem. (1979) 22: 572-575) 所述的生物分析,在此通过参考将其整体引入本文。

[0260] Robert A. Welch foundation of Houston, Texas 资助了对 MER-1、SGLU-1 和 SAL-1 合成的研究,并批准了发明人 Ralph Zingaro 的要求。

[0261] 实施例 2

[0262] 体外评价的分析

[0263] 使用各种的体外分析来确定癌症细胞对于本发明的砷化合物、组合物和 / 或制剂的应答。所分析的一些应答包括细胞存活、细胞周期、凋亡、和成熟。本发明人也设计了测

定来评价在癌症细胞中对本发明的砷化合物敏感的 PML/RAR α 基因的需求量。下面提供对这些分析的描述：

[0264] 磺酰罗丹明 (sulforhodamine) B 分析

[0265] 取不同的人癌细胞在微量滴定板上、在有或没有所示浓度的 MER1、SAL1、或 SGLU1 情况下培养 48 小时,然后向培养基中加入磺酰罗丹明 B 染料。磺酰罗丹明 B 染料是蛋白结合的染料,标记肝细胞。当与未治疗的对照细胞相比(阴性数据表明了细胞的杀灭)时,结果用所处理细胞的生长百分比表示。

[0266] MTT 和锥虫蓝分析

[0267] 对于这些分析,通过聚蔗糖-泛影葡胺 (FicollHypaque) 分离法来从白血病患者和正常供体的外周血样品中分离单核细胞,并再悬浮于 DMEM 完全培养基中。或者,在一些情况中可以使用细胞系细胞。来自不同人细胞系的恶性细胞(通常是 5×10^4 个细胞/mL)或来自白血病患者和健康供体 (1×10^6 个细胞/mL) 的外周血的单核细胞在 α MEM 或 RPMI1640 中,在有或没有不同浓度的 MER1、SAL1、或 SGLU1 存在下进行培养。以一式两份的形式完成每种试验的情况。在暴露于 MER1、SAL1、或 SGLU1 中所示的天数(通常是 3 天)后,通过向细胞中加入染料(MTT 或锥虫蓝)来评价细胞存活。MTT 染料改变了它的颜色,这是因为在孔中存在肝细胞。在 MTT 处理下的细胞的存活用对照细胞生长的百分比来评价。锥虫蓝染料穿透了死亡的细胞,可以在显微镜下计数肝细胞,并评价存活的百分比。

[0268] 克隆分析

[0269] 通过获得外周血单核细胞(从正常供体或白血病患者中)来分析集落生成或菌落形成,其中所述单核细胞再悬浮于包含细胞因子的半固体培养基中,并以一式四份,0.1 mL/孔置于 96-孔微量滴定板上,密度为 4×10^4 个细胞/0.1 mL。在 37°C 下在 5% CO₂ 的增湿大气中培养~10 天后,将包括 50 个以上细胞的细胞团块计数为 1 个集落。用集落生长与对照(无药物)样品的集落生长相比的百分比来评价对生长的抑制作用。

[0270] 凋亡的分析

[0271] 用三种不同的方法通过分析在凋亡途径中的不同事件来分析凋亡。用流式细胞器评价由本发明的砷盐生物诱导的凋亡细胞的百分比。利用不同的细胞染色使其凋亡的方法来评价细胞凋亡级联的不同方面

[0272] 1. 膜联蛋白和碘化丙啶 (PI) 染色。膜联蛋白与在细胞膜外层表达磷脂酰丝氨酸的细胞结合,而碘化丙啶将具有缺乏抵抗力的细胞膜的细胞的 DNA 染色。这就从凋亡细胞(仅被膜联蛋白 V 染色)和坏死细胞(被膜联蛋白和 PI 染色)中鉴别出了肝细胞(没有被任何一个荧光染料染色)。

[0273] 在培养基中用所示的本发明的砷化物处理细胞如所示时间后,用磷酸盐-缓冲盐水 (PBS) 洗涤细胞,并再悬浮于 100 μ L 包含膜联蛋白-FITC (Travigene) 的结合缓冲液中,在黑暗中培养 15 分钟。加入 PI 后在流式细胞器上分析细胞。

[0274] 2. 线粒体膜电位的细胞荧光分析。为了评价线粒体膜电位的改变,在用砷衍生物处理所示的时间后,将细胞在亚微摩尔浓度的 MitoTracker 探针中培养。MitoTracker 探针被动地穿过质膜,并在活化的线粒体中蓄积。用两种颜色给细胞染色:MitoTracker Red CMXRos(分子探针)和 MitoTracker Green FM(分子探针)。用 PBS 洗涤分子,用 MitoTracker 染料染色,并且 37°C 下在黑暗中培养 1 小时。通过线粒体膜电位的推动将

CMXRos 掺入到线粒体中,与硫醇残基反应,形成共价硫酯键。不管线粒体膜电位如何,MitoTracker Green FM 染料都优先蓄积于线粒体中,这使得它成为了确定线粒体块的有用工具。

[0275] 3. 胱天蛋白酶的检测。为了用流式细胞器检测胱天蛋白酶的活性,使用氟代基因底物 PhiPhiLux G1D1(Oncoimmunin)。PhiPhiLuxG1D1 是用于在肝细胞中检测和测定胱天蛋白酶 3 和胱天蛋白酶 3 样活性的底物。在用本发明的砷衍生物处理所示的时间后,用 PBS 洗涤细胞,再悬浮于 5 μ L 底物溶液中,并且 37°C 下在黑暗中培养 1 小时。在洗涤所培养的细胞后,在流式细胞器分析前几分钟加入 PI,以在分析期间排除坏死的细胞。

[0276] 细胞周期分析

[0277] 如下所述分析细胞周期:用本发明的不同砷化合物培养 72 小时后,在 PBS 中将细胞 (1×10^6) 洗涤 2 次。细胞沉淀物再悬浮于染色溶液中,其中该染色溶液包含低张溶液(RNase 溶液、Triton X-100、柠檬酸钠、PEG)和 PI (25 μ g/mL)。室温下将细胞在黑暗中培养 15 分钟,然后通过流式细胞器用 CellQuest 程序 (Becton-Dickinson) 分析。

[0278] 成熟的分析

[0279] 使用人急性幼淋巴细胞白血病细胞系 NB4 来测定本发明的砷化物对于白血病细胞成熟的作用。用藻红蛋白结合的抗 -CD 11b 单克隆抗体 (Becton-Dickinson) 作为成熟髓细胞的标记。在与药物培养 72 小时后,用 PBS 洗涤细胞。然后室温下将密度为 1×10^6 个细胞/mL 的细胞与单克隆抗体按 1:10 稀释并在黑暗中培养 15 分钟。培养后用 PBS 洗涤细胞,沉淀物再悬浮于 500 μ L 的 PBS 中。为了排除非特异性结合,以相同的方式制备适当的同型对照物。用流式细胞器将细胞分类,用 CellQuest Document 分析进行分析。

[0280] PML/Rar α 蛋白的作用

[0281] 已经证明三氧化二砷是一种急性幼淋巴细胞性白血病的治疗剂,由于 PML/Rar α 基因和蛋白质的表达,它杀灭了大部分的 APL 细胞。用下面的系统来确定在白血病细胞中是否存在 PML/RAR α 融合蛋白,以促成了白血病细胞对 SGLU 和 MER1 的可观测的敏感度:用 PML/RAR α 基因转染 U937 细胞,已知后者对三氧化二砷是耐受的。Michael Andreeff 博士 (M. D. Anderson Cancer Center) 友情提供了转染的细胞 (U937/PR9)。PML/RAR α 在锌存在的条件下变成了官能化的。Grignani 等人 (Cell, (1993) 74:423-431) 描述了 PML/RAR α 基 因在 U937/PR9 细胞系中的 Zn²⁺ 诱导性表达。为了确定 PML/RAR α 的表达,在加入砷化合物 72 小时前,用 0.1mM ZnSO₄ 将细胞处理 3 小时。在细胞中加入锌 3 小时后,典型地确定了 PML/RAR α 的表达。其在 48 小时里是稳定的。

[0282] 实施例 3

[0283] MER1、SAL1 和 SGLU1 抗癌活性的体外评价

[0284] 通过 3 天的 MTT 分析 / 锥虫蓝排除法评价了 MER1 对于 6 种不同的人白血病细胞系的抗白血病活性:AML2、AML3 和 HL60 (来自 AML 的细胞系)、NB4 (来自 APL 的细胞系)、K562 (来自 CML-BP 的细胞系)、和 KBM7 (来自 AML 的细胞系)。MER1 对于 NB4 细胞是最有效的,其中 IC₅₀ (与未处理的对照细胞相比,导致 50% 细胞存活时的浓度) 为 1 μ M (附图 1)。MER1 处理的其他细胞系,包括通过 MTT 分析对 AML2 细胞和 KBM7 细胞的分析和通过锥虫蓝分析对 AML2 细胞 (见附图 2)、AML3 细胞、K562 细胞和 HL60 细胞的分析,显示了 IC₅₀ 值的范围是 1.5-4 μ M。该活性类似于三氧化二砷对于这些细胞系的活性 (三氧化二砷活性的例

子显示于附图 1 和 2)。美国国立卫生研究院 (NIH) 也用磺酰罗丹明 B 分析对 MER1 在体外对于一个板的 60 肿瘤细胞系的抗癌活性进行了实验 (附图 3)。低浓度的该化合物对于各种的肿瘤细胞系都显示了具有活性的证据,但特别是对所试验的白血病细胞具有活性。当 MER1 浓度为 $1\mu\text{M}$ 时,显著地阻止了试验的所有六种白血病细胞系的生长 (生长 $< 20\%$; 附图 3, 第一个格子)。

[0285] 通过 3 天的锥虫蓝法评价了 SAL1 对于 2 种不同的人细胞系的抗白血病活性:HL60 细胞 (在附图 4 中描述)、和 Z138 (ALL 细胞系)。NIH 也用磺酰罗丹明 B 分析对 SAL1 在体外对于一个板的 60 肿瘤细胞系的抗癌活性进行了实验 (附图 5)。低浓度的该化合物对于各种的肿瘤细胞系都显示了具有活性的证据。

[0286] 通过 3 天的 MTT 分析评价了 SGLU1 对于 9 种人白血病细胞系的抗白血病活性:NB4、CAG (多发性骨髓瘤细胞系)、JURKAT 和 RAJI (淋巴瘤细胞系、HL60、AML2、AML3、KBM5 (来自 CML-BP 的细胞系)、和 KBM7。对于 NB4 细胞系的结果在附图 6 中进行了描述。通过 3 天的锥虫蓝排除法评价了 SGLU1 对于 6 种人白血病细胞系的抗白血病活性:NB4、CAG、JURKAT、HL60、KBM3 (AML 细胞系)、和 Z119 (ALL 细胞系),显示出了类似的结果。如附图 6 所描述,该活性类似于三氧化二砷的活性。也通过 5 天的克隆分析评价了 SGLU1 对于 HL60 人白血病细胞的抗白血病活性 (附图 7)。NIH 也用磺酰罗丹明 B 分析对 SGLU1 在体外对于一个板的 60 肿瘤细胞系的抗癌活性进行了实验 (附图 8)。低浓度的该化合物对于各种的肿瘤细胞系都显示了具有活性的证据。

[0287] 实施例 4

[0288] MER1 和 SGLU1 对于恶性和正常血细胞的毒性的确定

[0289] 在 5 个白血病患者 (三个患 AML, 一个患 CML-BP, 另一个患 ALL; 附图 9-13) 中测定了 MER1 对血单核细胞 ($> 80\%$ 胚细胞) 的作用。在短期的细胞培养中, MER1 与三氧化二砷一样地有效 (附图 9, 10 和 12)。此外,在来自 4 个健康供体的样品中评价了 MER1 对于正常外周血单核细胞的毒性。在短期的细胞悬浮培养中,通过 MTT 分析, MER1 对于正常细胞的毒性小于对白血病患者的恶性细胞的毒性 (附图 14)。最重要的是,在长期的克隆分析中, MER1 对正常细胞的毒性小于三氧化二砷 (附图 15)。

[0290] 测定了 SGLU1 对于来自 3 个白血病患者的血单核细胞的作用,这三个包括 1 个患 CLL 的患者 (附图 16, 显示了与三氧化二砷的比较),和 2 个患 AML 的患者 (附图 17)。在长期的克隆分析中, SGLU1 对正常细胞的毒性小于三氧化二砷 (附图 18)。除了附图 18 所示的 8 天的克隆分析外,也进行了 9 天和 13 天的克隆分析。

[0291] 实施例 5

[0292] MER1 的组成和稳定性

[0293] 已经获得的数据表明,当溶解于磷酸盐缓冲盐水中时, MER1 在至少 2 个月是稳定的,因为在此期间该溶液在体外试验中保持了相同水平的细胞毒素活性。此外,进行了 MER1 和 SGLU1 的详细药理学评价。

[0294] I. MER-1 的药理学评价

[0295] 发现 MER-1 具有足够的溶解性和稳定性,对于在临床情况中的施用是可接受的 (见下列数据)。其也是十分稳定的,因此溶液可以不经准备地混合而用于动物试验,或可能的前期 I 期研究中。但是,溶液的稳定性对于在较大的临床试验中使用的较大批地生产

的液体剂型,以及分配到需要长期贮存的商业市场是不够的。可以考虑将使用时需要重新溶解的冻干剂型用于这些应用中。这些冻干组合物的制备是本领域公知的。

[0296] A. 溶解性

[0297] MER-1 在水中的溶解度是约 15mg/mL。通过使用 0.1N 的氢氧化钠调节 pH 至 6, MER-1 的较高浓度可以达到约 150mg/mL。在乙醇中, MER-1 的溶解度大于 100mg/mL。

[0298] B. 溶液的 pH

[0299] MER-1 的水溶液的自然 pH 值如下:

[0300] 0.1mg/mL pH3.7

[0301] 1mg/mL pH3.1

[0302] 10mg/mL pH2.3

[0303] C. 溶液的稳定性

[0304] 在 0.9% 的氯化钠注射液中以 10mg/mL 的浓度评价不同 pH 值的效果。冷冻下在 3 个月的时间里评价 pH2.3 (自然 pH) 并也用氢氧化钠调节 pH 至 5、7.1 和 8.5 的样品。pH5 的样品显示了较好的稳定性,在 3 个月后剩余了约 89% 的初始浓度。在 14 天后, pH7.1 和 8.5 的溶液 分别剩余了约 92% 和 96%,但是在那段时间后,降到了 90% 以下。pH2.3 的样品 7 天内是稳定的,但是在那段时间后产生了沉淀。见表 2。

[0305] 低浓度时 MER-1 在水溶液中稳定性较差,但是在高浓度时稳定性增强。在水中为 0.1mg/mL 时,在 1 小时内损失了约 40% 的药物。当在 0.9% 的氯化钠注射液浓度从 1 增加到 10mg/mL 时,药物在更长的时间里都是稳定的。冷冻下,10mg/mL 的浓度在高达 3 个月里都是稳定的,但是在那段时候后发生了不可接受的分解。见表 3。

[0306] 表 2. 在 0.9% 的氯化钠注射液中 10mg/mL 的 MER-1 的 pH 稳定性数据

[0307]

分析间隔 (天)	剩余的 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	ppt	101	92	96
30		100	80	82
60		91		
90		91		
180		87		

[0308] 表 3. 在 0.9% 的氯化钠注射液中不同浓度的 MER-1 溶液的稳定性

[0309]

分析间隔 (天)	剩余的 MER-1 (%)			
	0.1 mg/mL ^a	1 mg/mL	2 mg/mL	10 mg/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

[0310] ^a 在水中。

[0311] ^b 在 60 分钟里发生了约 40% 的损失。

[0312] ^c 在该间隔期内未确定。

[0313] II. SGLU-1 的药学评价

[0314] 发现 SGLU-1 具有显著的溶解性和稳定性, 对于在临床情况中的施用是可接受的 (见下列数据)。其也是十分稳定的, 因此溶液可以不经准备地混合而用于动物试验, 或可能的前期 I 期研究中。但是, 溶液的稳定性对于在较大的临床试验中使用的较大批地生产的液体剂型, 以及分配到需要长期贮存的商业市场是不够的。可以考虑将使用时需要重新溶解的冻干剂型用于这些应用中。

[0315] A. 溶解性

[0316] SGLU-1 在水中的溶解度是约 60mg/mL。通过使用 0.1N 的氢氧化钠升高溶液的 pH 可以达到较高的 SGLU-1 浓度。但是, 该药物在碱性环境中是不稳定的。SGLU-1 不溶于乙醇。

[0317] B. 溶液的 pH

[0318] SGLU-1 的水溶液的自然 pH 值时:

[0319]

0.1 mg/mL	pH 3.9
1 mg/mL	pH 3.2
2.5 mg/mL	pH 3.0
60 mg/mL	pH 2.7

[0320] C. 溶液的稳定性

[0321] 在 0.9% 的氯化钠注射液中以 2.5mg/mL 的浓度评价不同 pH 值的效果。冷冻下在 30 天的时间里评价 pH3 (自然 pH) 并也用氢氧化钠调节 pH 至 5 和 7 的样品。pH5 的样品显示了稍微好一点的稳定性, 在 30 天后剩余了约 90% 的初始浓度。pH3 和 7 的溶液分别剩余了约 84% 和 82%。见表 4。

[0322] 对在 0.9% 的氯化钠注射液中的 pH 调节至 5 的浓度 20mg/mL 和 50mg/mL 的 SGLU-1 进行了稳定性试验。冷冻贮存 60 天后发生了小于 10% 的损失。稳定性结果如表 5 所示。

[0323] SGLU-1 低浓度时稳定性较差。在水中为 0.1mg/mL 时, 室温下在 24 小时里超过 10% 发生了分解。

[0324] 表 4. 在 0.9% 的氯化钠注射液中 2.5mg/mL 的 SGLU-1 的 pH 稳定性数据

[0325]

分析间隔(天)	剩余的 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

[0326] 表 5. 4℃ 下在 0.9% 的氯化钠注射液中 20mg/mL 和 50mg/mL 的 SGLU-1 的稳定性

[0327]

分析间隔(天)	剩余的 SGLU-1 (%)	
	20 mg/mL	50 mg/mL
7	101	97
14	98	98
30	94	94
60	92	93
90	85	87

[0328] 实施例 6

[0329] MBR1、SAL1、和 SGLU1 的机制

[0330] 三氧化二砷的作用机制是诱导凋亡、影响细胞周期、诱导成熟、和分解变体的 PML/Rar α 融合蛋白。本发明人检验了 MER1 诱导 HL60 人白血病细胞的凋亡(分析时间 1-3 天)。诱导的凋亡密切地减少了存活细胞的百分比。使用 MER1 和 SGLU 的其它研究证明了, 这些化合物诱导的凋亡(膜联蛋白染色)包括改变线粒体膜的电位(CMXRos 染色)和活化胱天蛋白酶(PhiPhiLux 染色)。

[0331] 据报道, 三氧化二砷也诱导了表达 PML/Rar α 基因的细胞的成熟。为测定 SGLU 和 MER1 是否具有类似的能力, 使用了 NB4 细胞(表达 PML/Rar α 基因), 暴露于砷化物三天后, 用流式细胞器测定 CD11b 在细胞表面的表达。CD11b 是髓样细胞的成熟标记。数据表明, SGLU 和 MER1 没有诱导成熟。使用流式细胞器并用碘化丙啶染色, 以在用本发明的不同的砷化物处理的 HL60 细胞中评价可能的细胞周期紊乱。我们发现, 在细胞周期的 S- 相中 SGLU 导致了细胞的显著蓄积, 而 MER1 导致了程度较小的类似效果结果还显示三氧化二砷

导致的细胞的 S- 相蓄积。

[0332] 为确定白血病细胞中是否存在 PML/Rar α 融合蛋白,促成了白血病细胞对 SGLU 和 MER1 的可观测的敏感度,使用的是下列的系统:用 PML/Rar α 基因转染 U937 细胞,已知后者对三氧化二砷是耐受的。该基因在砷存在的条件下变成了官能化的。因此,用不同的砷化物在砷存在或不存在下处理转染的 U937 细胞 (U937/PR9)。结果表明,官能化的 PML/Rar α 基因的存在,是细胞对三氧化二砷变得敏感的必要条件,但是不会影响细胞对 SGLU 和 MER1 的敏感度。

[0333] 实施例 7

[0334] MER1、SAL1、和 SGLU1 的治疗性潜力的体内评价

[0335] 人白血病的动物模型包括具有人白血病细胞的重症联合免疫缺陷 (SCID) 的小鼠。该模型是唯一允许人白血病在动物中以与在患者中所见到的那样生长的模型。它提供了一种可能性,使得不同剂量水平和方案的新药物可以快速地试验在体内的有效性。此外,不仅可以检测存活的动物,也可以检测对传播性疾病的治疗效果。典型地,在用人白血病细胞培养 2 天后开始对 SCID 小鼠的治疗。在用人白血病细胞系注射的 SCID 小鼠中的初始体内试验确定了用于其它小鼠模型和初始人体试验时 MER1、SAL1、或 SGLU1 的剂量和方案。

[0336] 每日监测动物,并在其濒死或研究完成时处死 (通常 2 倍于对照组的存活时间)。在长期存活的动物上进行尸体剖检,使用对 HLA-DQ α 的 DNA 序列具有特异性的引发剂,通过多聚酶链式反应 (PCR) 分析组织中 DNA 的存在。由于白血病是一种系统性疾病,因此通过在不同的小鼠组织中检测 DNA 中的 HLA-DQ α 来研究轻微后遗症的存在。

[0337] 在 SCID 小鼠中进行体内治疗试验的必要条件是 1) 在动物中白血病细胞的移植物植入的确定和 2) 受试化合物的急性毒性的确定 (最大耐受量的确定)。

[0338] I. 在动物中白血病细胞的移植物植入的确定。第一个体内试验包括四组 SCID 小鼠。给每组的 5 只小鼠腹膜内接种不同类型的人白血病细胞:HL60 (AML)、KBM5 (CML-BP)、KBM7- 急性髓样白血病、和 Z119 (ALL)。HL60 和 KBM5 细胞,显示出良好的移植物植入:在 HL60 组,所有小鼠都在接种后 31 天到 36 天内死亡,而在 KBM5 组小鼠在第 34 到第 36 天内死亡。通过进行人 HLA-DQ α 的 DNA 序列的 PCR 证实了移植物植入 (在所有小鼠的所有组织中试验都是阳性的)。在 100 天时,在 KBM7 组 5 只中仍有 4 只小鼠活着,而在 Z119 组 5 只全都活着。在那天以后处死全部小鼠,通过 PCR 分析组织的 HLA-DQ α 。试验呈阴性,说明缺乏白血病细胞移植物植入。相同类型的可替代细胞系也需要用于治疗试验。

[0339] II. 受试化合物的急性毒性的确定。当进行毒理学试验时,使用免疫活性的 Swiss Webster 小鼠。经证实,三氧化二砷的 LD₅₀ 浓度是 10mg/kg。

[0340] A. 在 Swiss-Webster 小鼠中的 SGLU1 的简单毒性试验。对 Swiss-Webster 小鼠进行两项研究以测定 SGLU1 的毒性。在第一项研究中,经 IP 途径施用 178mg/kg;285mg/kg;和 357mg/kg 剂量的 SGLU1。通过小鼠的死亡率来测定毒性。我们发现,小鼠对 178mg/kg 和 285mg/kg 剂量的 SGLU1 耐受性良好。该研究的数据概述于表 6 中。

[0341] 表 6. SGLU1 的简单毒性试验

[0342]

	剂量 (mg/kg)		
IP 施用	178	285	357
死亡/总数	0/5	1/5	5/5

[0343] 在第二项研究中,研究经 IP 和 IV 途径以 318mg/kg 和 375mg/kg 剂量施用的 SGLU1 对每只已称重小鼠的毒性。因此,确定了 SGLU1 的 LD₅₀ 浓度是 350mg/kg。结果概述于表 7 中。

[0344] 表 7. 每只已称重小鼠的较好表现

[0345]

	剂量 (mg/kg)	
	318	375
IP 施用时的死亡/总数	0/5	4/5
IV 施用时的死亡/总数	1/5	5/5

[0346] B. 在 Swiss-Webster 小鼠中的 MER-1 的简单毒性试验。对 Swiss-Webster 小鼠进行两项研究以测定 MER-1 的毒性。在第一项研究中,经 IP 途径施用 71mg/kg ;107mg/kg ; 和 143mg/kg 剂量的 MER-1。通过小鼠的死亡率来测定毒性。我们发现,小鼠对 71mg/kg 和 107mg/kg 剂量的 MER-1 耐受性良好,死亡率为 0。该研究的数据概述于表 8 中。

[0347] 表 8. MER-1 的简单毒性试验

[0348]

	剂量 (mg/kg)		
IP 施用	71	107	143
死亡/总数	0/5	0/5	5/5

[0349] 在第二项研究中,研究经 IP 和 IV 途径以 125mg/kg ;156mg/kg ; 和 170mg/kg 剂量施用的 MER-1 对每只已称重小鼠的毒性。因此,发明人确定了 MER1 的 LD₅₀ 浓度是 150mg/kg。结果概述于表 9 中。

[0350] 表 9. 每只已称重小鼠的较好表现

[0351]

	剂量 (mg/kg)		
	125	156	170
IP 施用时的死亡/总数	0/5	2/5	5/5
IV 施用时的死亡/总数	0/5	0/5	5/5

[0352] C. 在 Swiss-Webster 小鼠中的 SAL1 的简单毒性试验。与上述试验类似, SAL1 的简单毒性试验确定了 SAL1 的 LD₅₀ 浓度是 50mg/kg。

[0353] 实施例 8

[0354] MER1、SAL1、和 SGLU1 药代动力学

[0355] 在经尾部血管的静脉内给药后在 小鼠中评价 MER1、SAL1、和 SGLU1 的药代动力学

分布。开始时研究在先前确定的 MTD 附近的剂量。给药后在不同采样时间点 (0 (开始时), 5, 10, 15, 30, 45, 60 分钟和 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 48, 72 小时) 收集血液样本 (8 只小鼠 / 时间点)。当收集血液时, 通过吸入 CO₂ 使小鼠窒息, 然后断头, 通过放血收集血液。将血液样本收集到包含肝素的试管中, 离心, 分离血浆, 在分析前贮存于 -80℃ 下。重复研究, 在 Amicon Centrifree micropartition 单元中, 以 2000g x20 分钟离心血浆来收集血浆的超过滤液。超过滤液在分析前贮存于 -80℃ 下。在选择的组中, 通过石墨反应堆 (火焰) 原子吸收光谱来测定血浆和超过滤样本中砷化物含量。分段分析测定的药物浓度, 获得药代动力学参数。

[0356] 实施例 9

[0357] 毒性研究

[0358] 多剂量毒理学研究

[0359] 进行进一步的研究, 以确定 MER-1 和 SGLU-1 的小鼠组中, 与重复 剂量给药有关的剂量限制性毒性。

[0360] 评估每日 110, 120, 130, 140, 和 150mg/kg x5 的 MER1 多剂量 I. V. 毒理学研究的结果概述如下: 该研究集中于心、肺、肝和肾的显微镜检查。冠状动脉的中间性超常增生通常是一种自发性损害, 其在雄性小鼠中比在雌性小鼠中更为常见。据推定, 肾和肝中的炎性损害, 例如淋巴细胞聚集是一种与 MER1 无关的偶然发现。肝细胞肥大和肾小管的急性坏死是在两种性别的已治疗小鼠中不一致地遇到的未确定其重要性的损害。高剂量时在雄性中观测到的全小叶肥大, 有时与微血管液泡化有关, 暗示可能有肝毒性。在单剂量后, 这些动物通常都在濒死时处死。在多剂量小鼠的肺中的血管病变并不是一定会出现的或当存在时也不是显著的, 尽管血管病变在 MER1 的单剂量研究中是常见的。在雄性小鼠中较低剂量的耐受性和较高的死亡率暗示, 雄性对于该化合物的毒性作用更为敏感。

[0361] SGLU-1 多剂量 I. V. 毒理学研究的结果概述如下: 给 5 只小鼠 / 性别经尾部血管以 50, 100, 150, 200, 250, 300, 和 350mg/kg/ 天的剂量每日 5 次静脉注射 SGLU。将所有存活的小鼠都保持 28 天, 处死, 收集指定的组织, 固定于福尔马林中, 并检查。

[0362] 雌性小鼠的死亡发生在 250, 300, 和 350mg/kg/ 天的剂量时, 这比雄性小鼠更为敏感。显微镜观测注意到, 与化合物有关的损害发生在肺、肝、胸腺和睾丸中。在该研究中, 雌性小鼠的非观测效应水平 (NOEL) 是 150mg/kg, 这是基于 200mg/kg/ 天的 1/5 雌性小鼠发生了肝细胞的小叶中心肥大。在该研究中, 雄性小鼠的非观测效应水平是 100mg/kg, 这是基于 150mg/kg/ 天的 1/5 雄性小鼠发生了睾丸输精管变性。

[0363] 实施例 10

[0364] HPLC 分析法发展和验证

[0365] 在开发和验证有机砷化物用途的方法中使用 HPLC。HPLC 法包括: 标准曲线和线性, 重现性 (最少 10 次注射), 敏感度 (最小可计量浓度; 最小可检测浓度), 精确度 (例如使用三种独立制备的 0.025mg/mL、0.1mg/mL、1mg/mL 的溶液), 加热故意分解, 碱性溶液酸性溶液和 H₂O₂, 和完整药物、大量杂质和起始物质的峰确定, 和分解产物。在参照标准批次中通过 HPLC 分析来分析大量的粗药物的纯度、干燥失重、旋光度、熔点和目视现象。

[0366] 实施例 11

[0367] 剂型的发展

[0368] 根据药理学实验室开发的组分溶剂系统,而开发有机砷化物的剂型。这包括确定在可能的水性载体中和过滤时的稳定性,为进一步开发选择靶浓度、实验重量克分子渗透压浓度和 pH、如果需要调节 pH、选择包装和封闭结构、确定热稳定性(高压灭菌)、试验目视现象和微粒负荷,和确定靶 pH 值和靶浓度可接受的范围。

[0369] 实施例 12

[0370] 临床试验

[0371] 本实施例涉及使用砷化合物、MER1、SGLU 和 SAL-1、和本发明的组合物或其药物制剂的人治疗方案的开发。这些组合物用于各种癌症的临床治疗,其中所述癌症包括白血病和其他形式的实体癌症和肿瘤。

[0372] 进行临床试验的不同因素(包括要治疗和检测的患者),根据现有的公开内容,是本领域技术人员已知的。下列的信息作为一般性指导,用于使用本发明组合物的确认性临床试验中。

[0373] 1 期临床试验的候选者是所有常规治疗已经失败的患者。根据初始的时间表,在每 4 周的 5 天中由静脉内施用 MER1、SAL-1、或 SGLU-1 的药物制剂。本领域技术人员将会认识到,可以以任何适当的可替代途径施用本发明的治疗性制剂,这取决于损害的性质,包括以任何方法,包括局部、区域、或全身性施用来给药。口服和局部应用也是可以考虑的。本发明的组合物典型地是在剂量单位制剂中口服或胃肠外给药的,如所要求,该制剂包含标准的、公知的非毒性生理可接受的载体、佐剂、和赋形物。本文中使用的术语胃肠外包括皮下注射、静脉内、肌内、动脉内注射、或输注技术。

[0374] 为了监测疾病过程和评价抗肿瘤应答,每个月检查患者的适当的肿瘤标记。为了评价药物的有效性,监测下列的参数:肿瘤大小和/或癌细胞的骨髓渗透。用于检测患者的发展和治疗的有有效性的试验包括:物理试验、X-射线、血操作和其他临床实验室方法。根据在标准 1 期临床期试验中完成的剂量,增大在 1 期研究中给定的剂量,即,增加剂量直至达到最大可耐受范围。

[0375] 通过可接受的测定来确定临床应答。例如,通过至少 2 个月里癌细胞完全消失的迹象可以确定完全应答。反之,在至少 2 个月里通过癌细胞减少 50% 可以确定部分应答。

[0376] 可以单独用本发明的治疗剂或与本领域使用的其他抗癌药或其他标准癌症疗法联用来进行临床试验。本发明的治疗性组合物可以在其他抗癌剂前、后或同时给患者递送。

[0377] 典型的治疗过程将会不同,这取决于患者个体和以本领域技术人员已知的方法治疗的疾病。例如,患白血病的患者可以以 4 周的周期治疗,尽管如果在患者中观测到有害效应可以使用较长的时间,如果患者不能忍受所希望的治疗,就使用短期的治疗。每个周期包括 5 个单独剂量,尽管这也可以根据临床情况而不同。通过临床医生的选择,可以每 3 周 5 个剂量或以较小的频率基础来继续该治疗。当然,这些仅仅是治疗的示例性次数,技术人员将会很容易意识到,许多其他次数-过程也是可能的。

[0378] 患者可以,但不是必需,在先前接受化学、放射或基因疗法的治疗。任选地,患者显示了适当的骨髓功能(定义为外周粒细胞绝对计数 $> 2,000/\text{mm}^3$ 和血小板计数 $100,000/\text{mm}^3$),适当的肝功能(肝红素 1.5mg/dl)和适当的肾功能(肌酸酐 1.5mg/dl)。

[0379] 在一个实施方案中,单独施用治疗性组合物的注射液到肿瘤中。在另一个实施方案中,向肿瘤位点中插入导管,可以在所需的一段时间里继续灌注该腔。

[0380] 当然,根据临床前试验得到的知识,可以改变上述的治疗方法。本领域技术人员将能够领会本发明公开的信息,并优化基于本说明书所述的临床试验的治疗方法。

[0381] 实施例 13

[0382] S-二甲胂基谷胱甘肽的可替代合成

[0383] 下列过程描述了制备 S-二甲胂基谷胱甘肽的方法。如果维持各自的比例,可以成功地将使用量提高几倍,或者等分。

[0384] 二甲基氯胂

[0385] Luxembourg Chemical Co., Tel Aviv, Israel 提供了二甲胂酸 $(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{O})\text{OH}$ 。产品上标明了其纯度情况,是 99.7% 纯度。取二甲胂酸溶解于 pH3 的水-盐酸中。向该溶液中通入二氧化硫气流约 1 小时。分离二甲基氯胂,得到重的、无色油状物。用分液漏斗分离两个液相—水 / $(\text{CH}_3)_2\text{AsCl}$ 。将二甲基氯胂萃取到乙醚中,在无水硫酸钠上干燥该醚溶液。将干燥后的溶液转移到蒸馏瓶中,缓慢加热蒸发醚。蒸馏纯化剩余的液体—二甲基氯胂。在 106-109°C 煮沸分馏来收集。无色油状的产品在 1.65ppm 显示了单一的 ^1H NMR 共振。

[0386] S-二甲胂基谷胱甘肽。

[0387] 在 500mL 烧瓶中,使用来自 Aldrich Chemical Co., 纯度 98% 的 7g 谷胱甘肽溶解于 250mL 的 1,2-乙二醇二甲醚中。向该溶液中加入 3.3g 的二甲基氯胂。然后加入 3.5g 的吡啶(在 NaOH 块上干燥后再蒸馏)。将溶液回流 1 小时,然后在室温下搅拌 3 小时。

[0388] 所需要的产物 S-二甲胂基谷胱甘肽以盐酸吡啶复合物的形式分离出来。过滤移出固体,并用 1,2-乙二醇二甲醚彻底洗涤。接着在无水氯化钙上真空干燥。收集的 S-二甲胂基谷胱甘肽盐酸吡啶是 10.3g,熔点是 135-140°C。将该物质用于实施例 2 到 12 所述的生物测定中。

[0389] 实施例 14

[0390] 不含盐酸吡啶的 S-二甲胂基谷胱甘肽 (GLU) 的合成

[0391] 用 Chen (Chen, G. C., 等人. Carbohydrate Res. (1976) 50 :53-62) 的方法来制备二甲胂基谷胱甘肽,在此通过参考将其内容以整体引入本文。简言之,在氮气下取二硫代联(二甲胂基谷氨酰胺)溶解于二氯甲烷中。向该溶液中滴加四甲二胂,氮气下将反应在室温下搅拌过夜,然后暴露在空气中 1 小时。然后将混合物蒸发至干燥,用水洗涤残留物,干燥得到粗固体,在甲醇中再结晶得到 S-二甲胂基谷胱甘肽。

[0392] 实施例 15

[0393] 不含盐酸吡啶的 S-二甲胂基谷胱甘肽 (GLU) 第三种合成

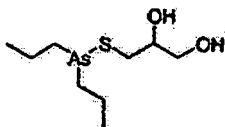
[0394] 用 Cullen 等人. (J. Inorg. Biochem. (1984) 21 :179-194) 等人的方法制备 S-二甲胂基谷胱甘肽,在此通过参考将其内容以整体引入本文。简言之。在氮气大气中取二甲胂酸和谷胱甘肽溶解于水中,并搅拌。将所得到的溶液搅拌 12 小时,然后减压蒸发至干燥,但不加热,得到固体,用冰甲酸进行萃取。然后将该甲酸溶液加压蒸发至干燥,所得到的固体在甲醇/水中再结晶,收集,并干燥,得到 S-二甲胂基谷胱甘肽。

[0395] 实施例 16

[0396] GMZ27 抗癌活性的体外评价

[0397] GMZ27 是一种具有下列结构的有机砷化物,

[0398]



[0399] 将其在 72 小时 MTS 分析中测定其对不同的人急性髓细胞样白血病 (AML) 细胞系的活性,发现 IC_{50} 是 0.56-0.86 μ M。该活性高于三氧化二砷对这些细胞系的活性。然后在长期 (7 天) 的集落形成测定中评价 GMZ27 抗白血病活性,其中细胞在半固体培养基中生长。对于从急性或慢性白血病患者中得到的人白血病细胞系和白血病细胞,GMZ27 都具有比三氧化二砷显著更高的活性。

[0400] 然后比较 GMZ27 和三氧化二砷的抗癌活性的机制。三氧化二砷 (ATO) 通过数种机制在 APL 以外的细胞中表现了其抗白血病活性,这些机制包括诱导凋亡、改变细胞内 ROS 的形成而导致细胞内 GSH 氧化还原系统的改变、细胞分化 / 成熟和对细胞周期调节可能具有作用。

[0401] GMZ27 比 ATO 更有效地诱导凋亡。结果表明,它激活了线粒体细胞凋亡途径,这是由于它改变了线粒体细胞膜电位和分裂了胱天蛋白酶 9,但是也通过交替激活了外部的细胞凋亡途径,因为它分裂了胱天蛋白酶 8。这导致了对胱天蛋白酶 3 的诱导,PARP 的分裂,和膜联蛋白与细胞的结合。

[0402] 用丁硫氨酸亚砷胺 (BSO) (buthionine sulfoximine) 预处理白血病细胞会使它们对 GMZ27 更为敏感;而用可以导致细胞内 GSH 增加的二巯苏糖醇 (DTT) 或 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 预处理,则会使细胞的敏感度降低。这表明,GMZ27 与 ATO 类似,是在白血病细胞中调节 GSH 氧化还原系统,但是,它比 ATO 作用的更早并且程度更大。

[0403] 我们发现,根据细胞表面的 CD11b 成熟标记的诱导来判断,低剂量的 GMZ27 部分地诱导了细胞的分化 / 成熟。与 ATO 相比,该作用是非常小的。GMZ27 对于细胞周期的发展没有影响。

[0404] 在长期的集落形成测定中评价了 GMZ27 对健康供体外周血单核细胞的毒性。GMZ27 对于正常细胞的毒性小于 ATO。

[0405] 在正常 Swiss-Webster 小鼠中进行研究来确定单剂量注射的 GMZ27 的毒性。根据死亡率来测定毒性。我们发现,杀死 50% 小鼠 (LD_{50}) 的 GMZ27 的浓度是 100mg/kg。相反,ATO 的 LD_{50} 要低得多,仅仅是 10mg/kg。

[0406] 实施例 17

[0407] N-(2-S-二甲基砷硫代丙酰基)甘氨酸的制备

[0408] 取 N-(2-巯丙酰基)甘氨酸 (0.02mol, 3.264g) 置于 1,2-乙二醇二甲醚 (50mL), 滴加入二甲基氯砷 (0.025mol, 3.52g)。在室温下搅拌反应混合物 4 小时。然后过滤分离三乙胺盐酸盐的白色沉淀,减压蒸发减小溶液的体积。通过柱色谱法纯化所得到的残留物,得到所需的产品 (3.5g)。

[0409] 实施例 18

[0410] 2-(S-二甲砷基)硫代烟酸的制备

[0411] 取 2-巯基烟酸 (0.02mol, 3g) 置于二氯甲烷 (50mL) 中,滴加入二甲基氯砷 (0.025mol, 3.52g)。回流下搅拌 4 小时进行反应。然后蒸馏除去二氯甲烷,残留物溶解于乙醚 (50mL) 中,然后用水 (3x) 洗涤。溶液在 Na_2SO_4 上干燥,过滤,减压浓缩后得到呈淡黄

色固体的所需产品。

[0412] 实施例 19

[0413] L-(+)-2-氨基-3-(二甲肼基)硫-3-甲基丁酸

[0414] 取 L-(+)-2-氨基-3-巯基-3-甲基丁酸 (0.01mol, 1.55g) 置于二氯甲烷 (50mL) 中, 滴加入在二氯甲烷 (5mL) 中的二甲基氯肼 (0.015mol, 2.1g), 然后滴加三乙胺 (1.6g)。将反应混合物搅拌 4 小时, 过滤反应混合物后, 所需的产品呈浮白色晶状固体。用二氯甲烷、乙酸乙酯和丙酮连续洗涤该晶状固体, 得到所需的产品 (1.6g; mp 107-109°C)。

[0415] 等效物

[0416] 本领域技术人员将会意识到, 或者能够用不超过常规试验的劳动即可确认本文所述的化合物和其使用方法的众多等效物。应当认为这些等效物也在本发明的范围内, 并被附属的权利要求所覆盖。本领域技术人员也将会意识到, 本文所述的实施方案的所有组合都在本发明的范围内。

[0417] 在此通过参考将 2002 年 1 月 7 日提交的 U. S. 申请序列号 60/346,492 和 2003 年 1 月 7 日提交的 W02003/057012 以整体引入本文。所有上文所引用的参考文献和出版物都通过参考引入本文。

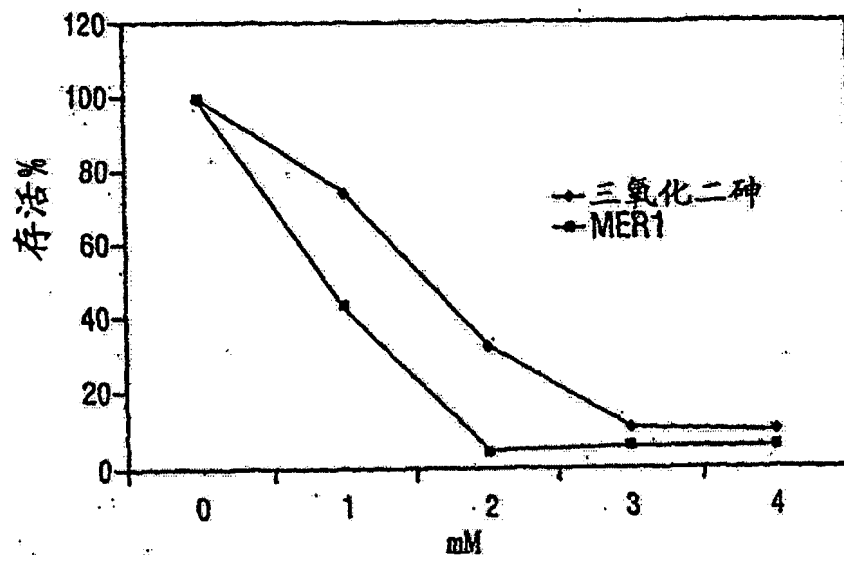


图 1

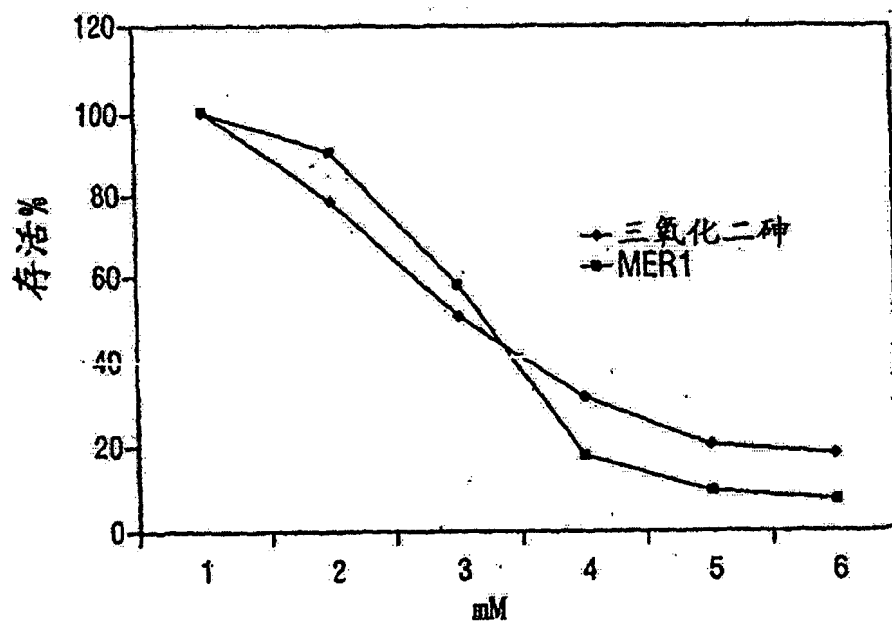


图 2

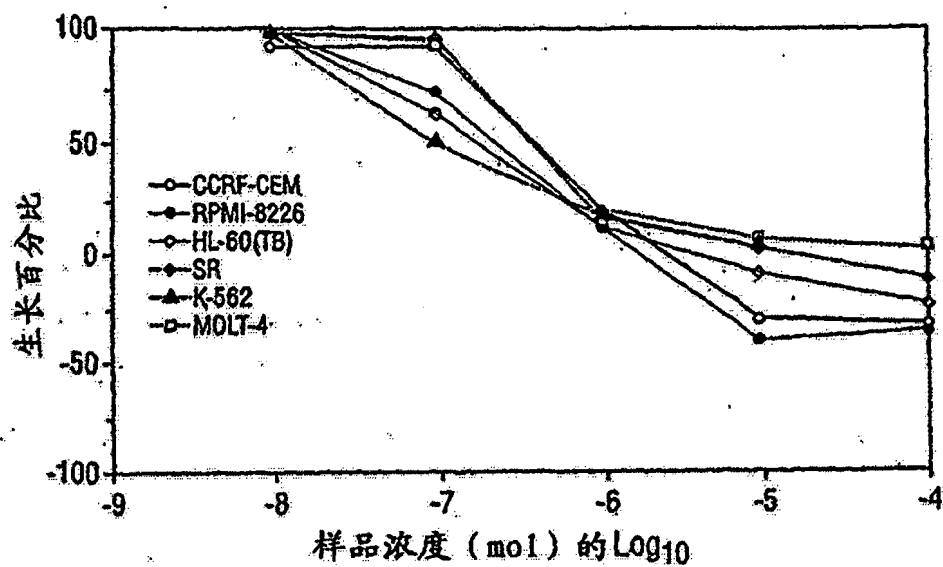


图 3A

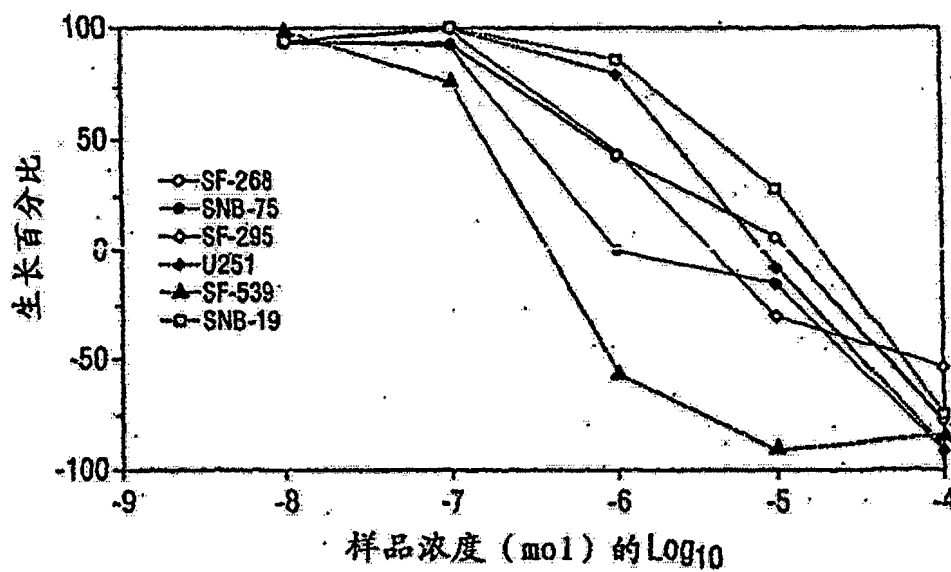


图 3B

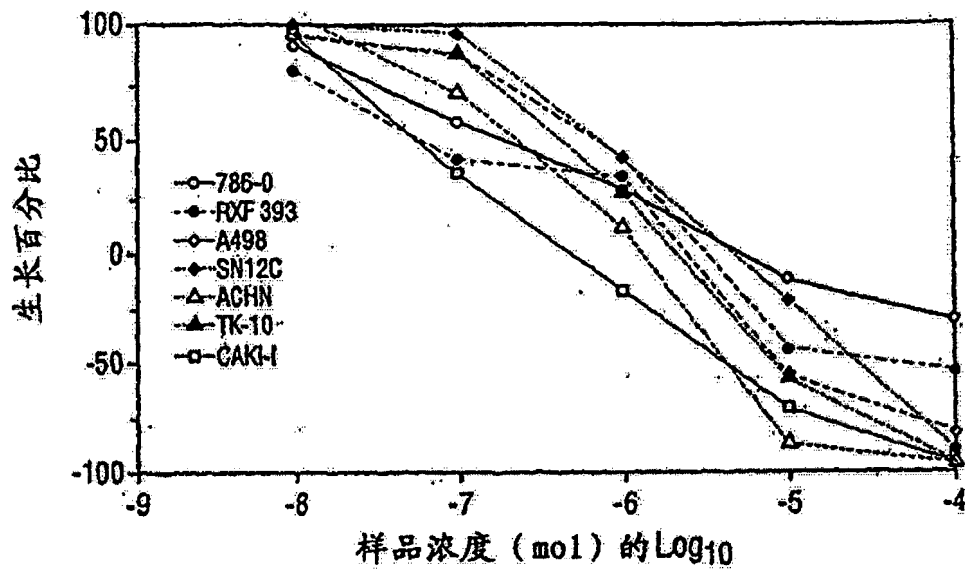


图 3C

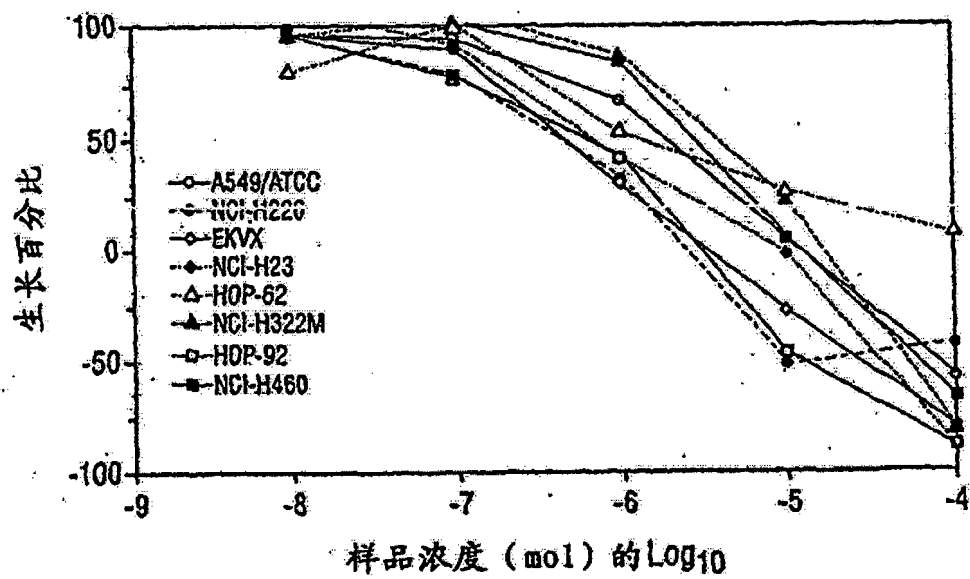


图 3D

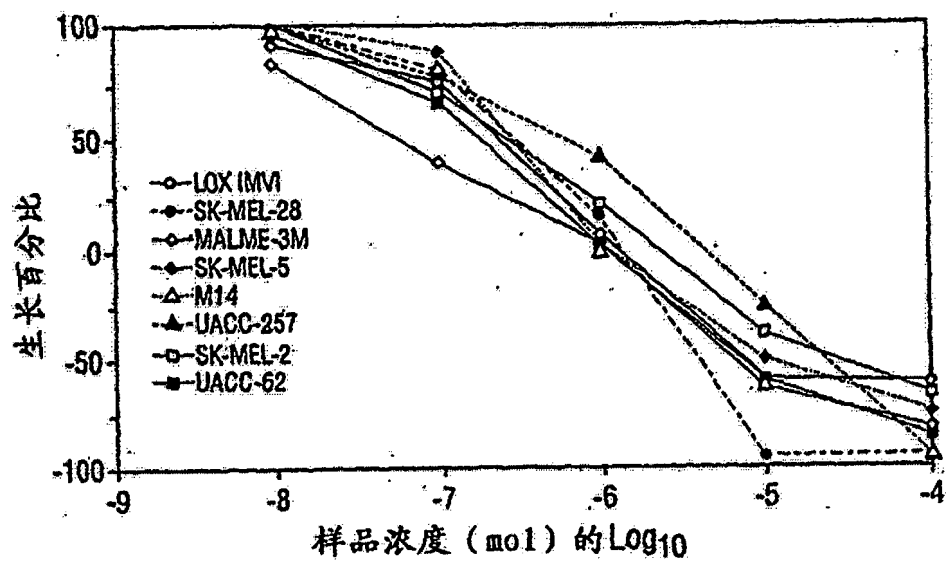


图 3E

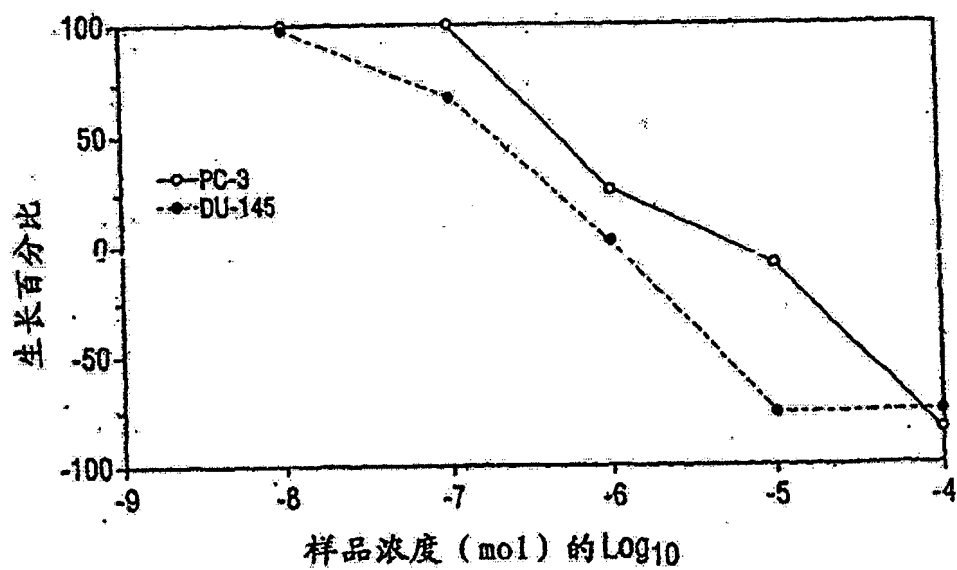


图 3F

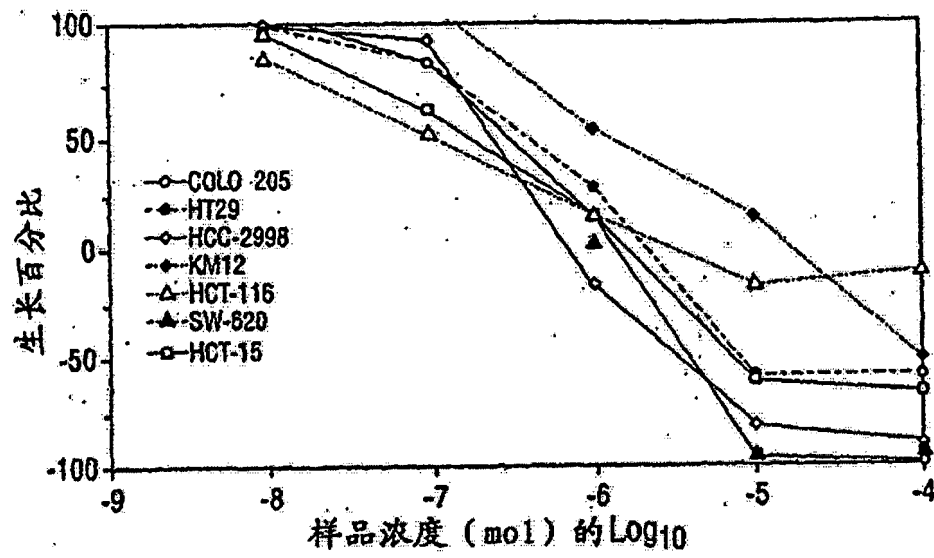


图 3G

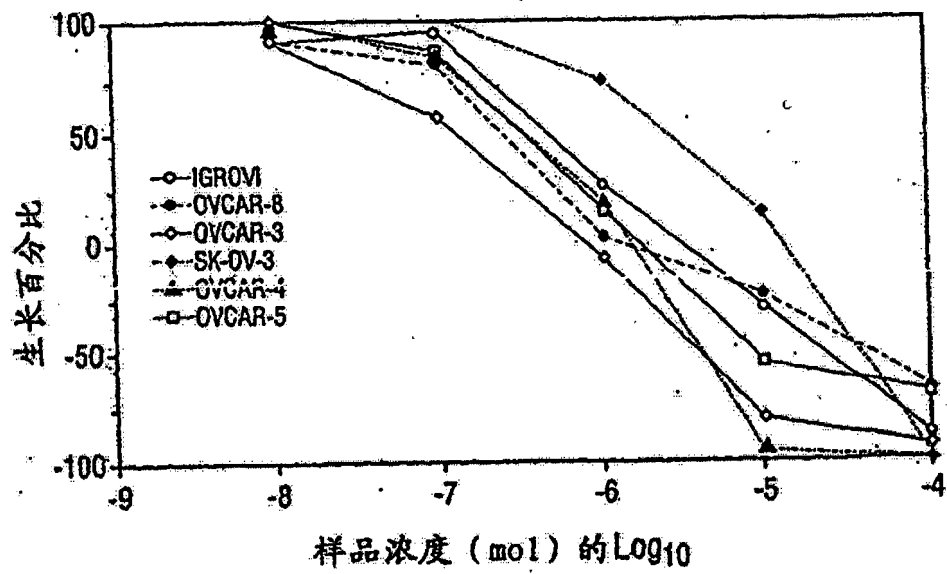


图 3H

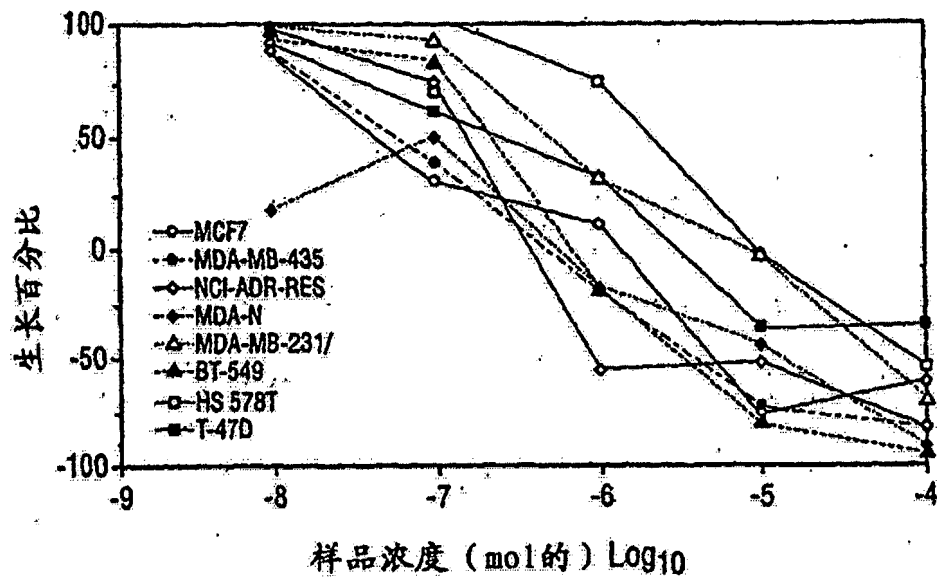


图 3I

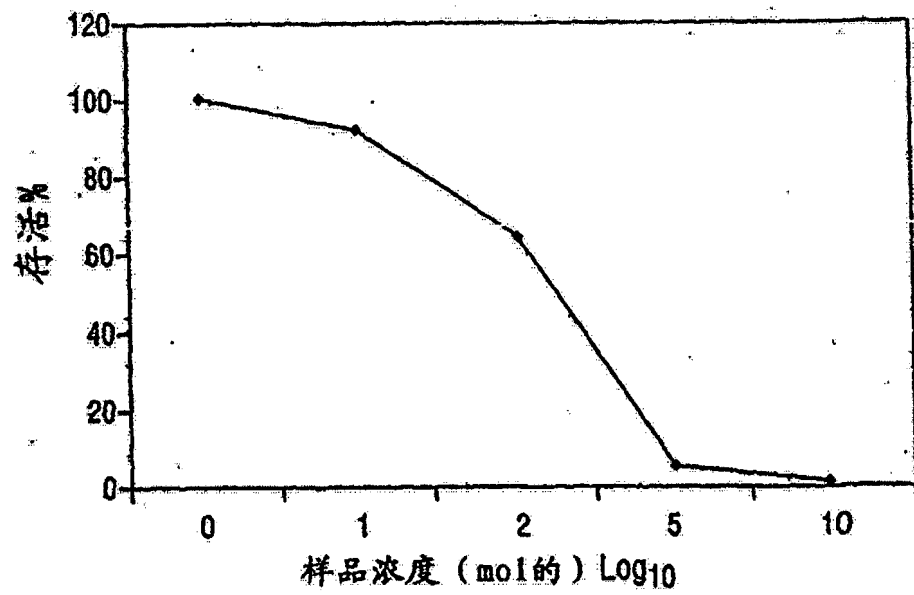


图 4

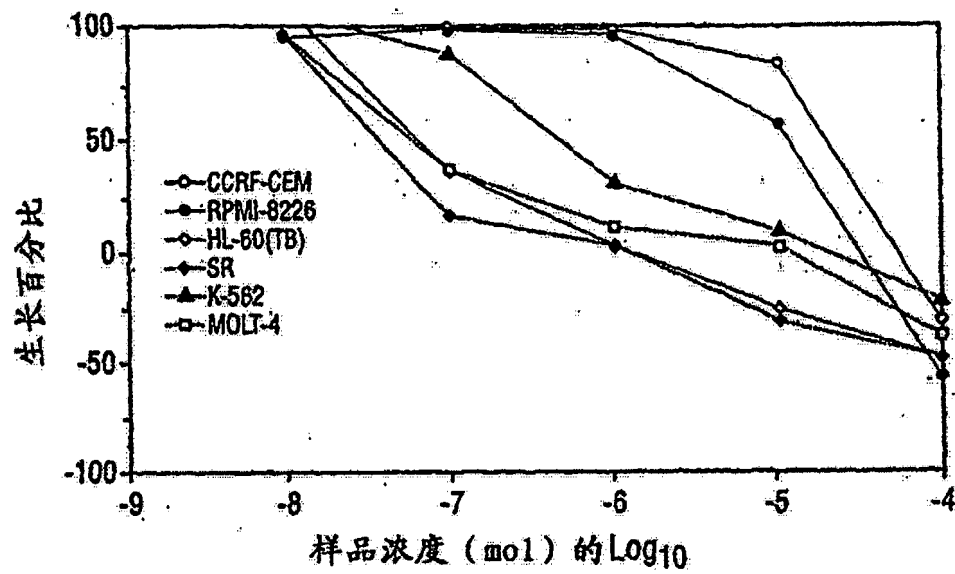


图 5A

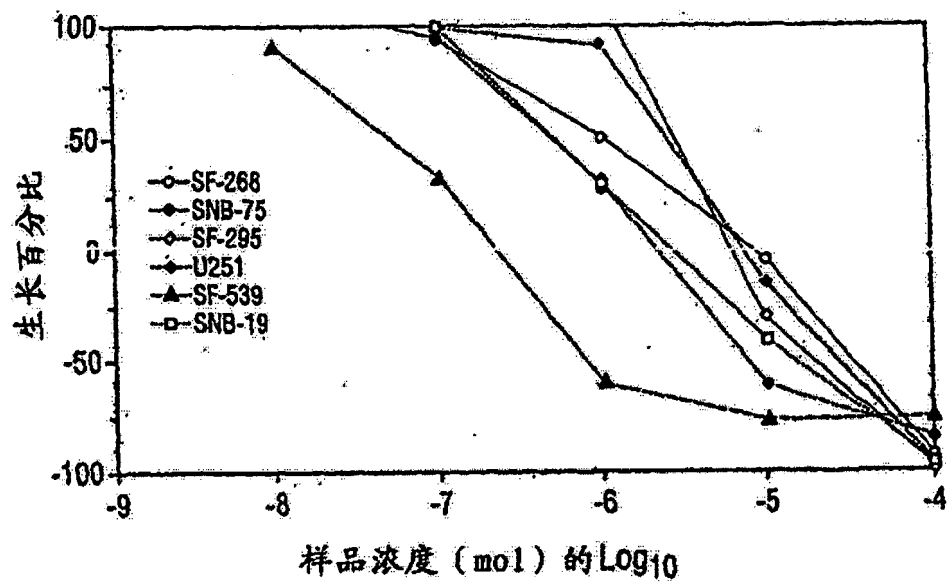


图 5B

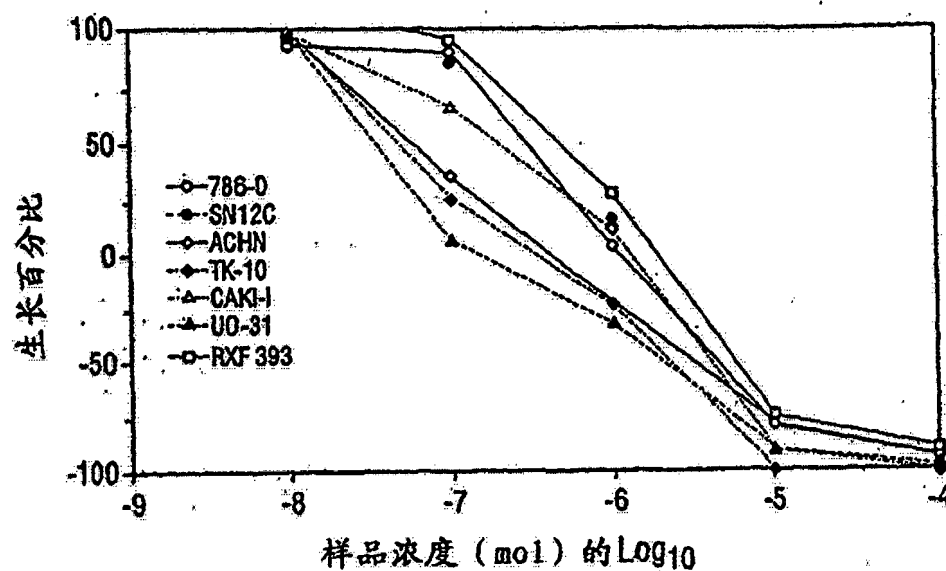


图 5C

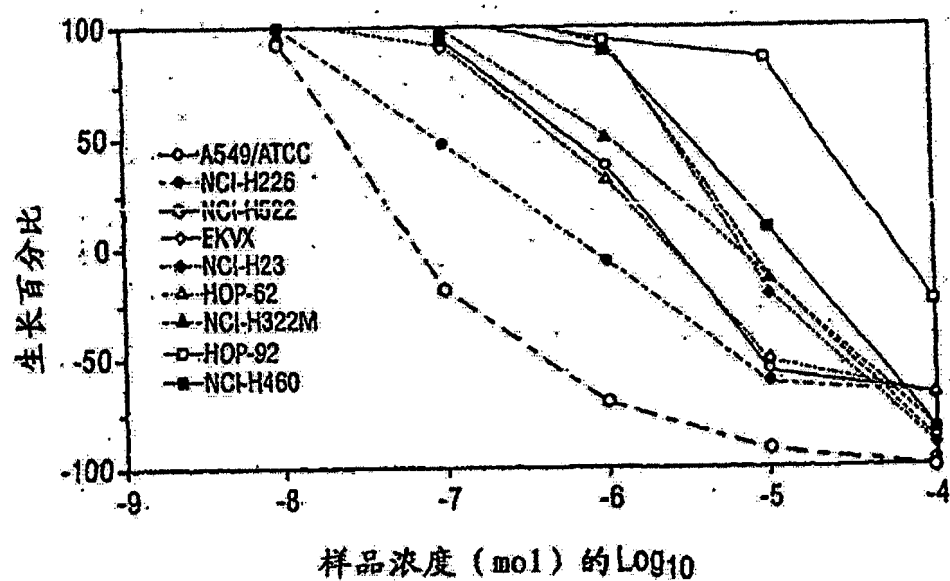


图 5D

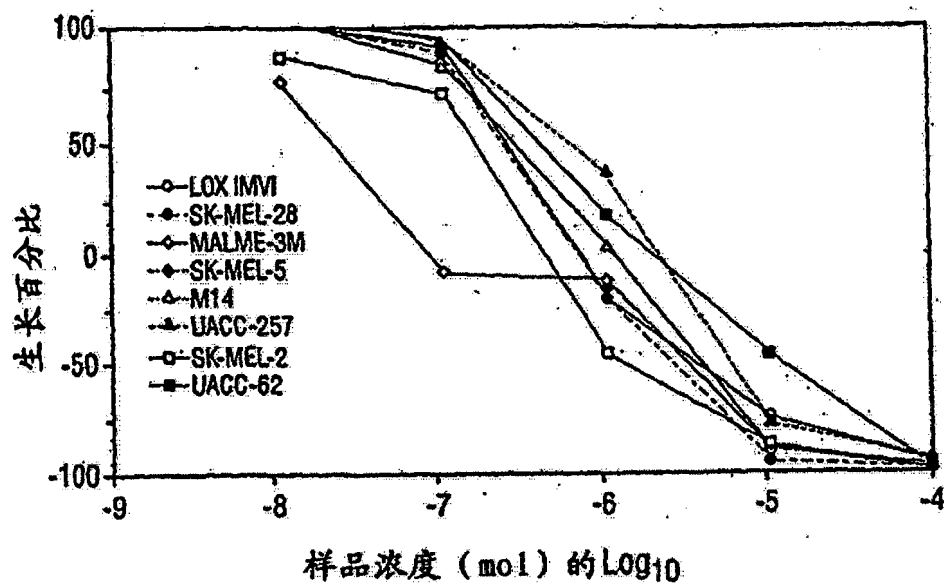


图 5E

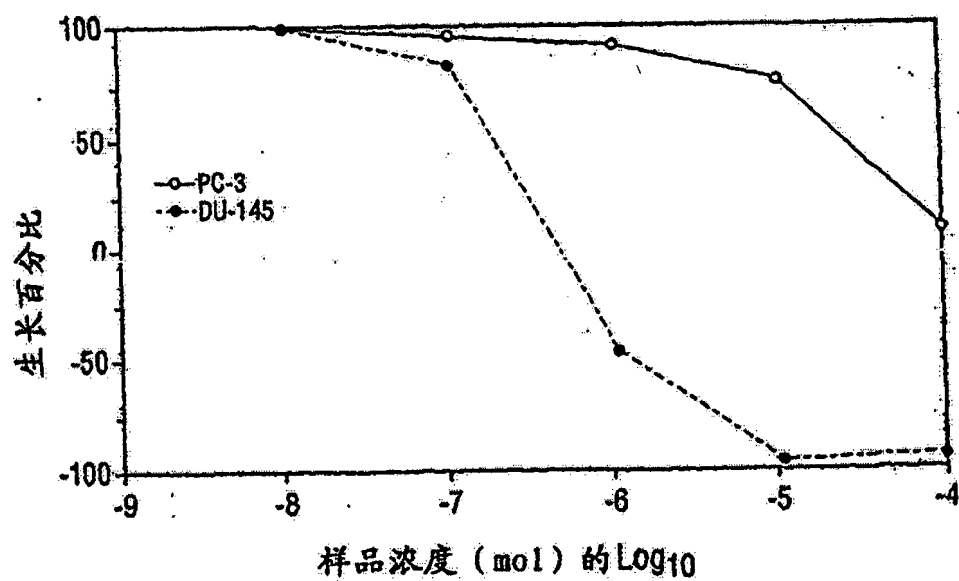


图 5F

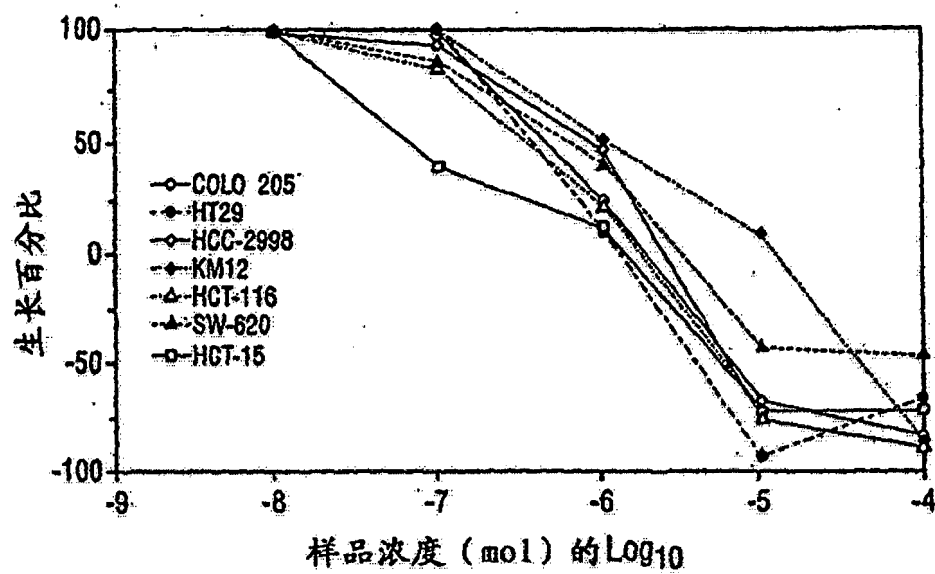


图 5G

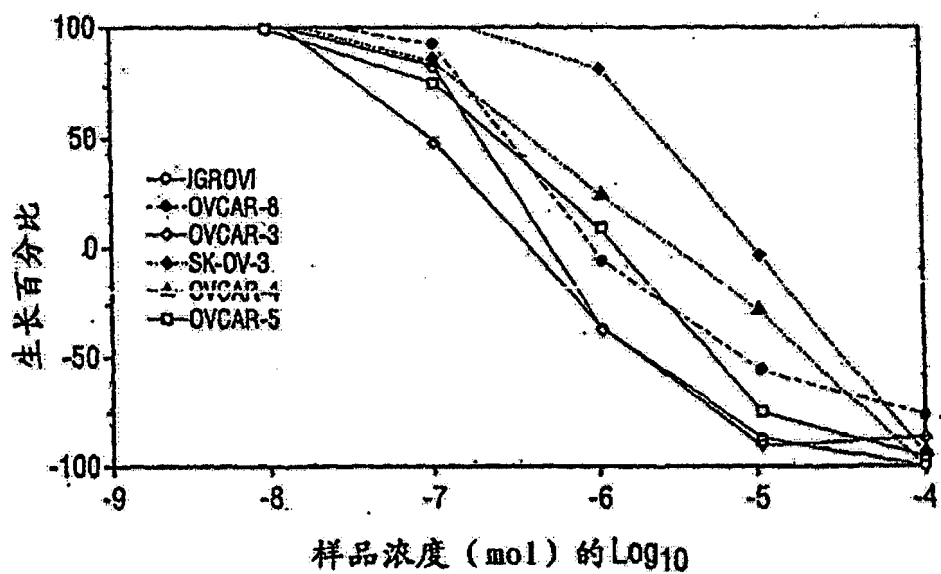


图 5H

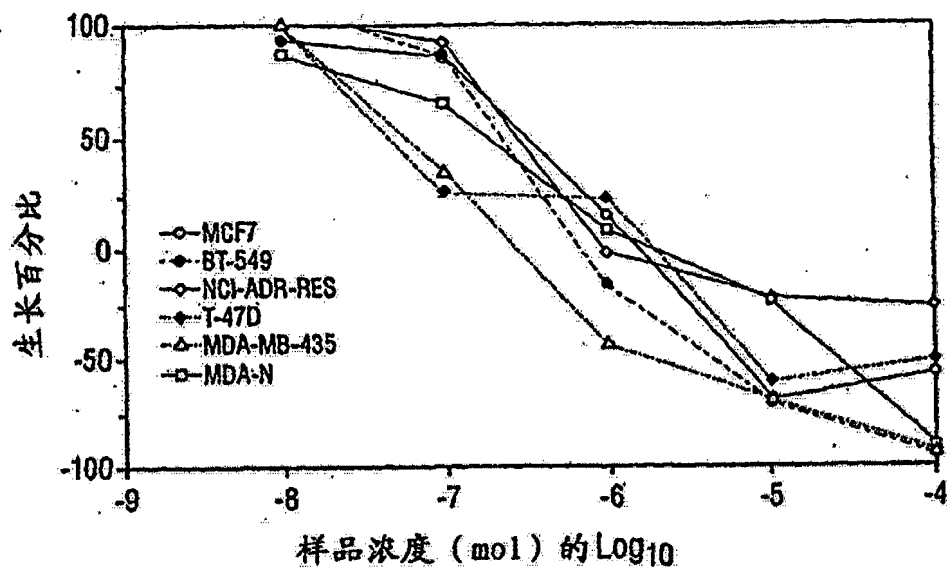


图 5I

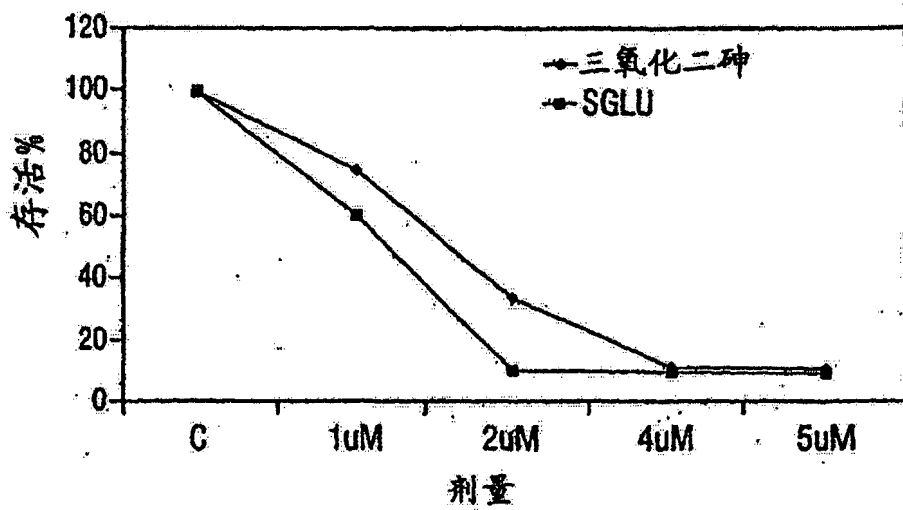


图 6

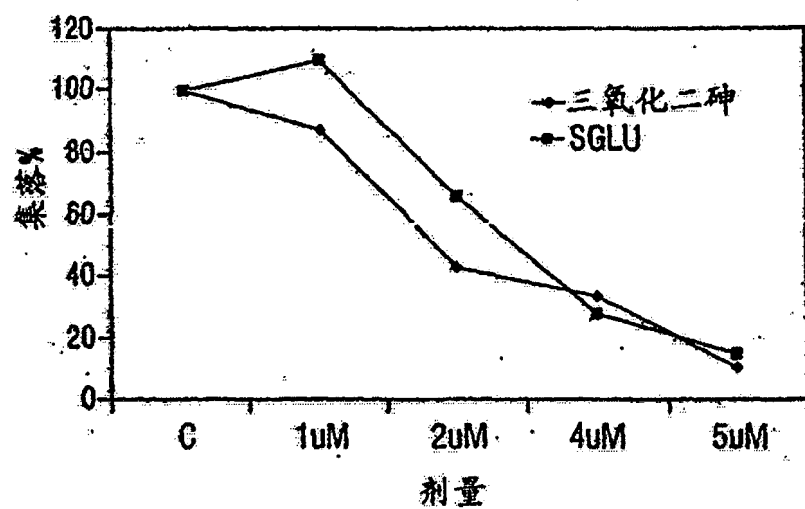


图 7

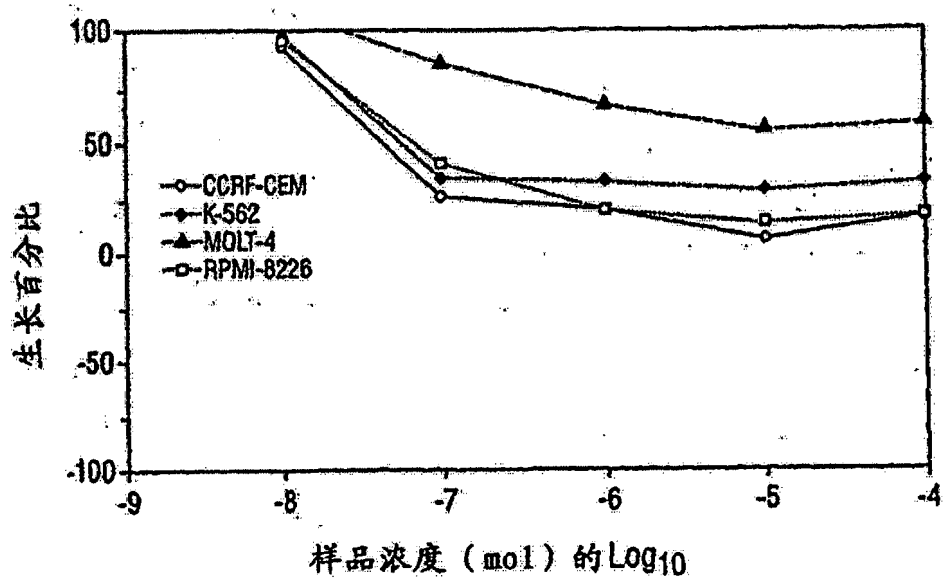


图 8A

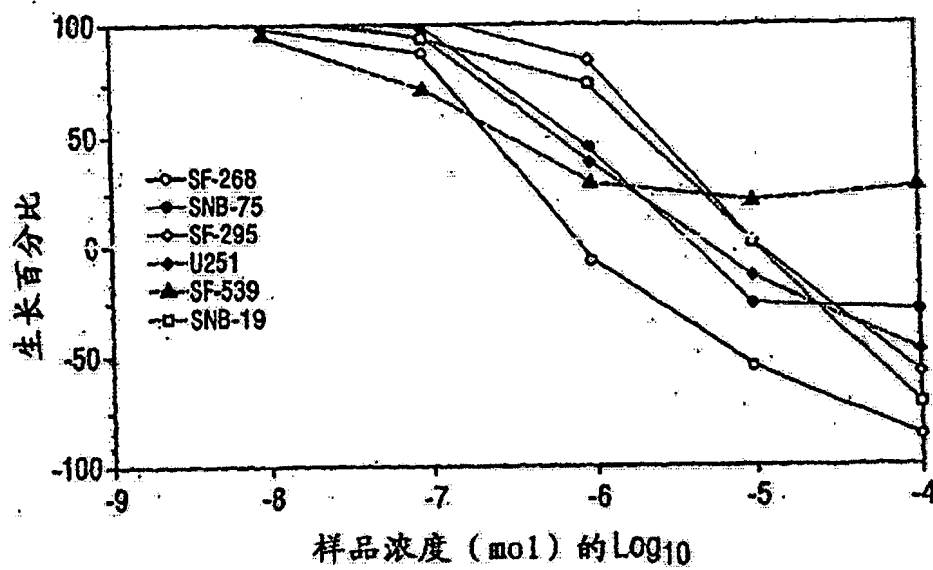


图 8B

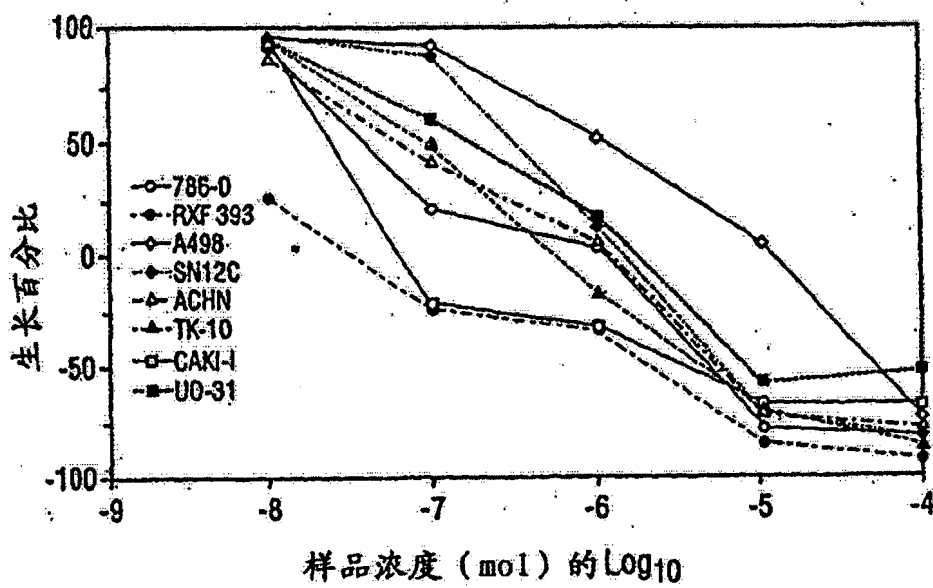


图 8C

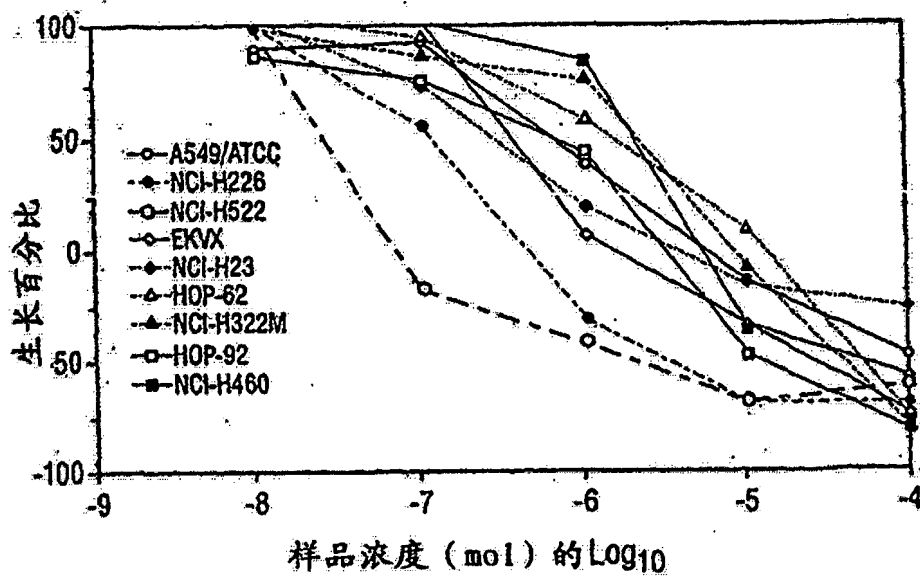


图 8D

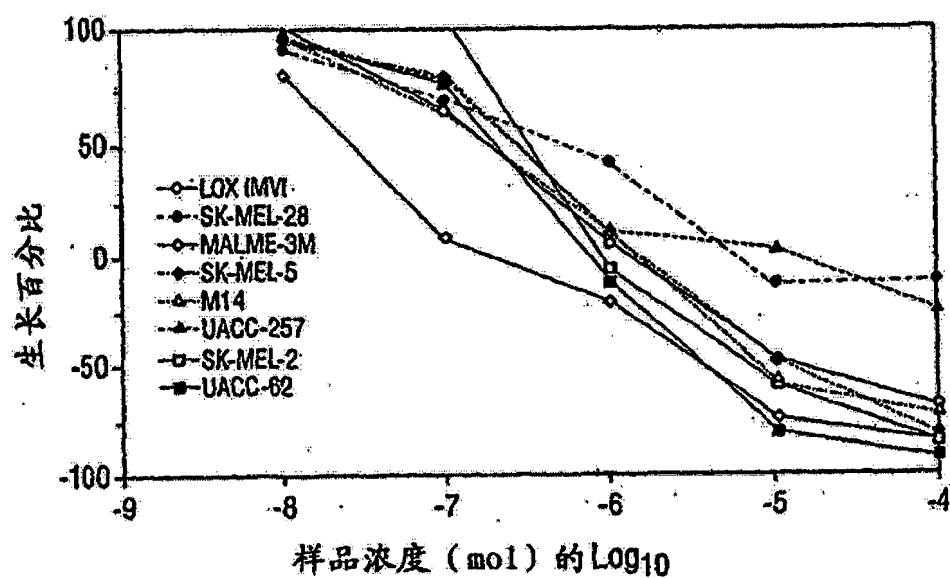


图 8E

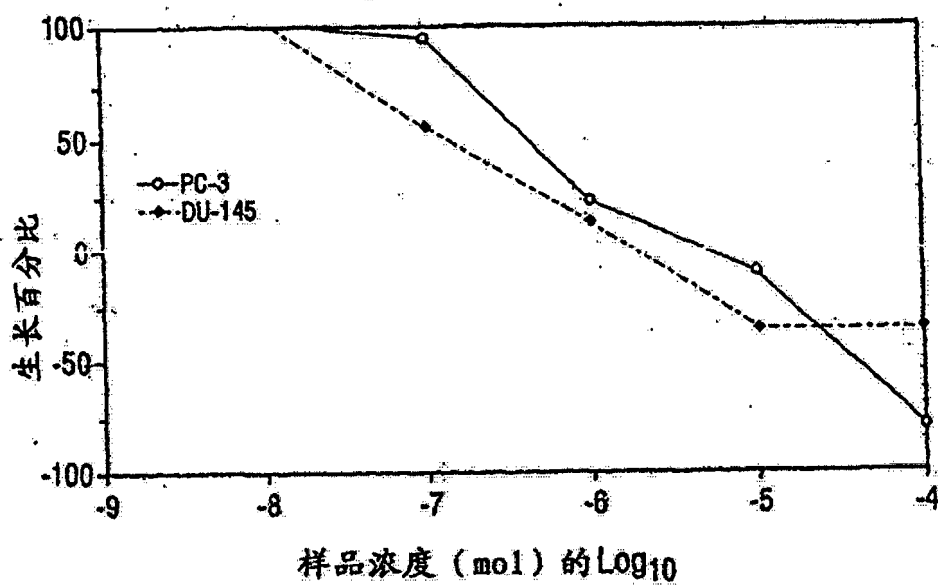


图 8F

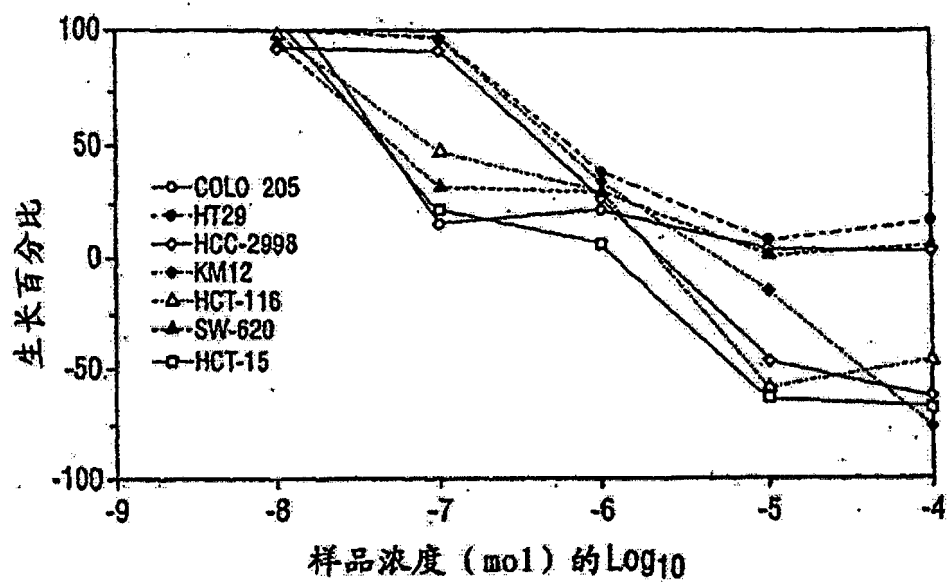


图 8G

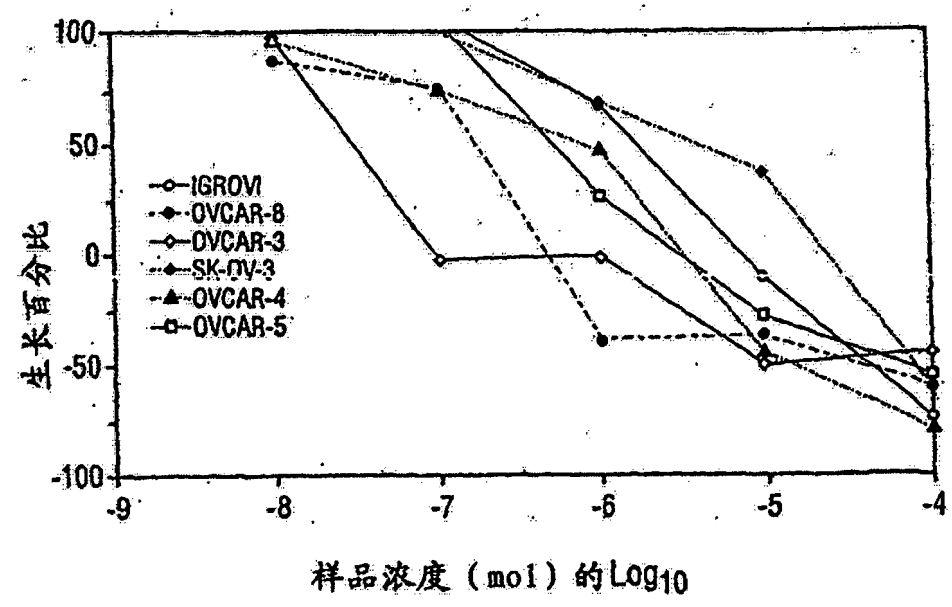


图 8H

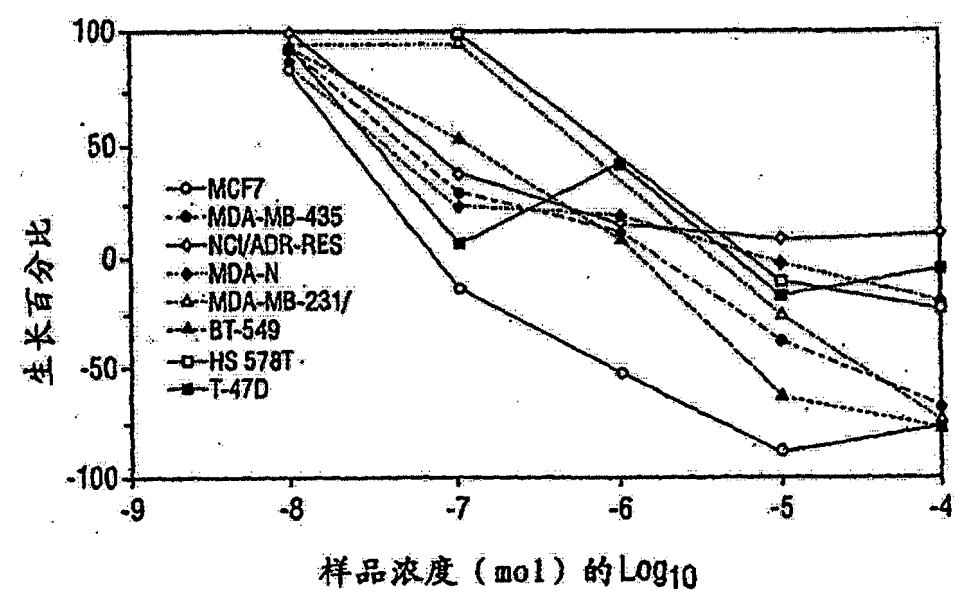


图 8I

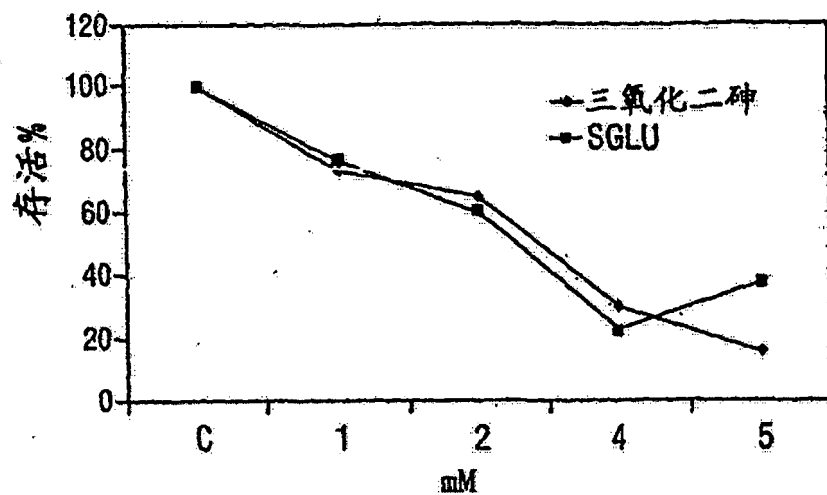


图 9

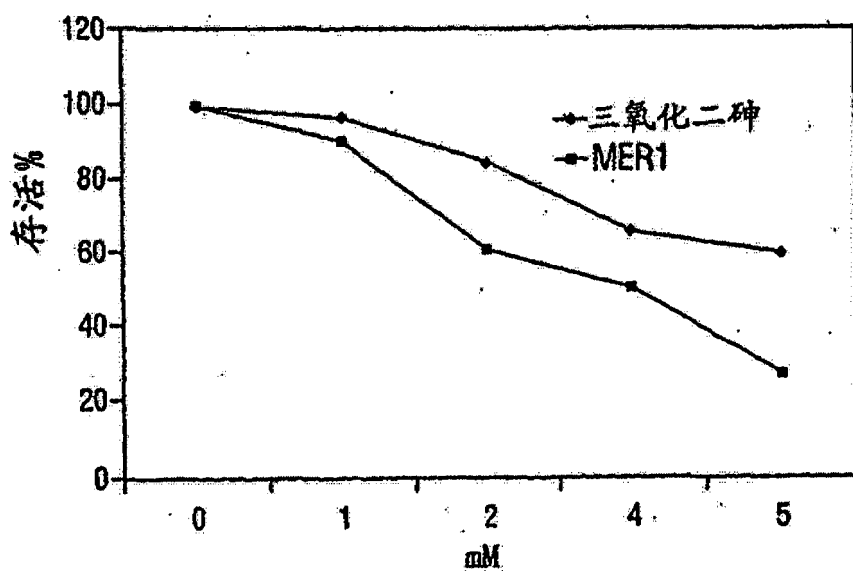


图 10

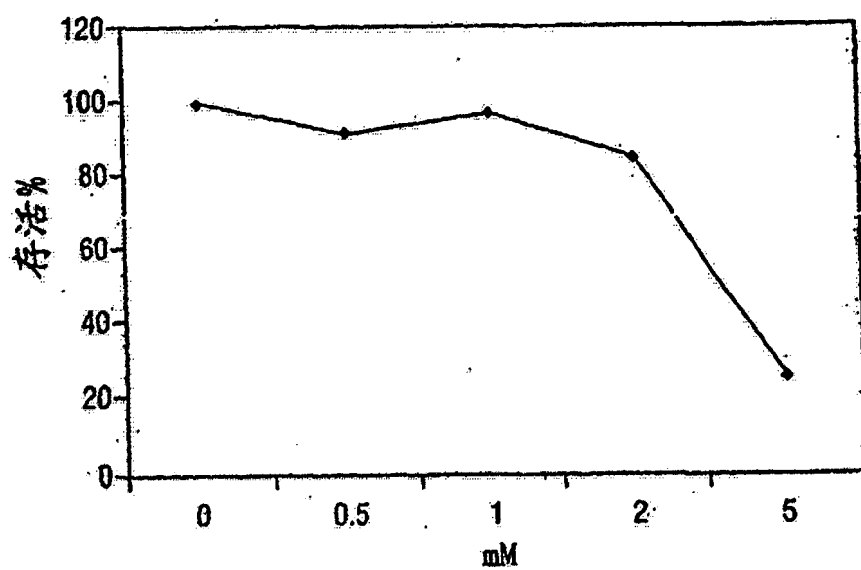


图 11

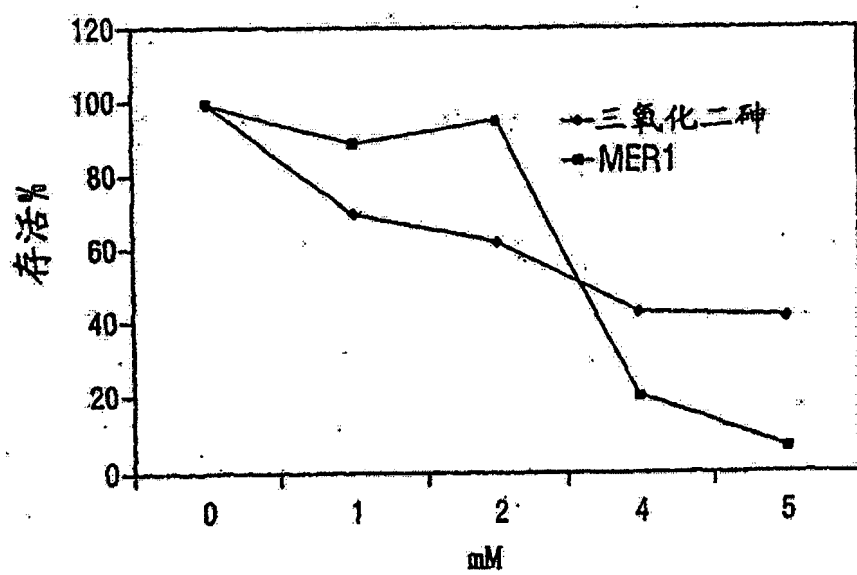


图 12

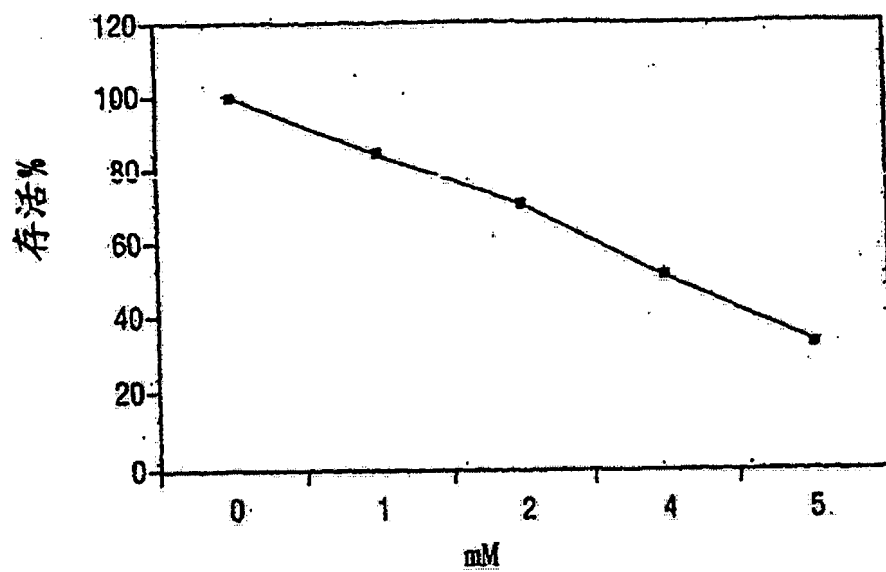


图 13

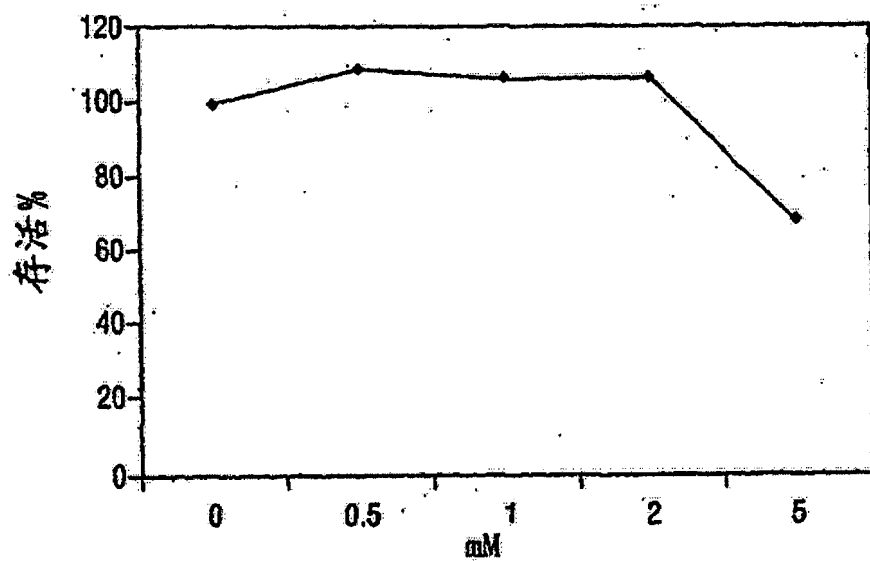


图 14

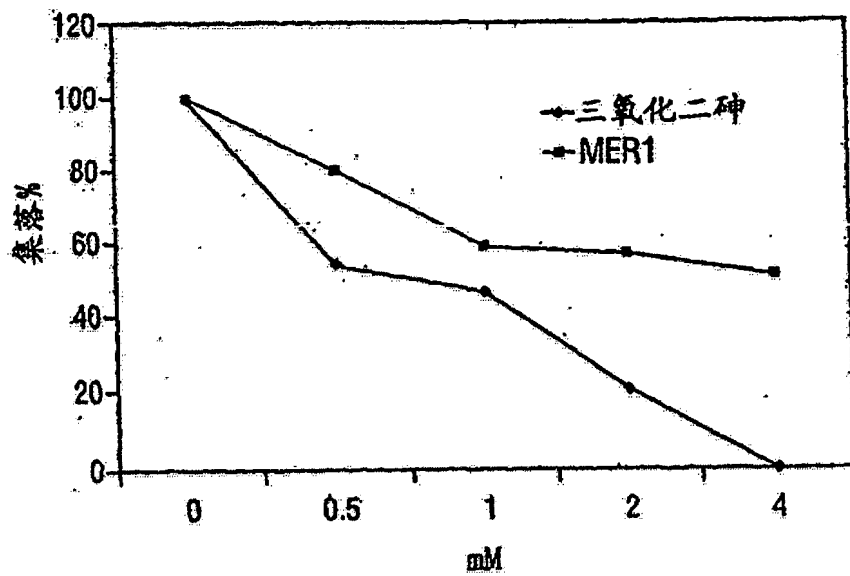


图 15

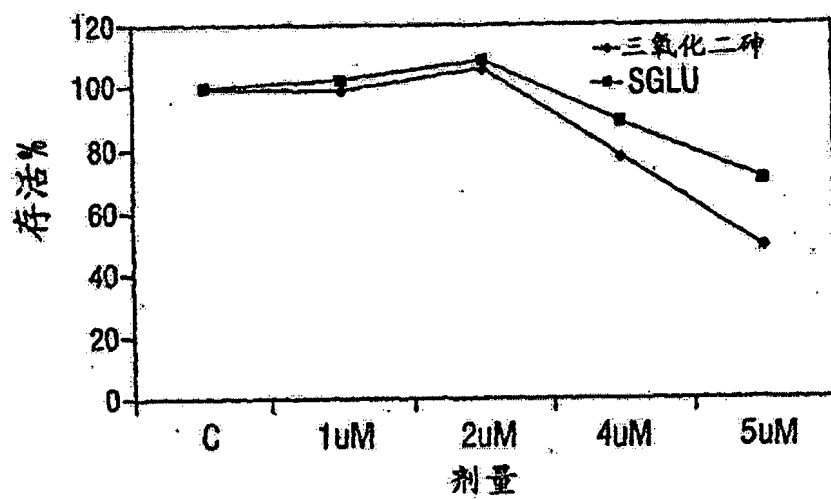


图 16

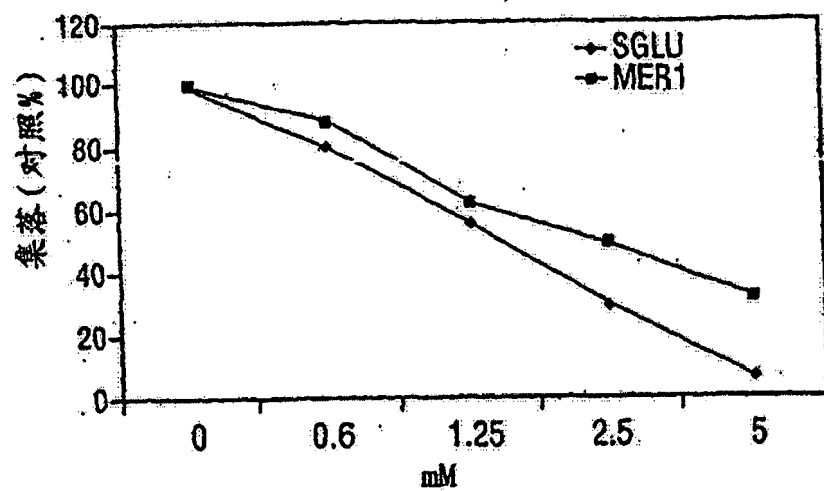


图 17

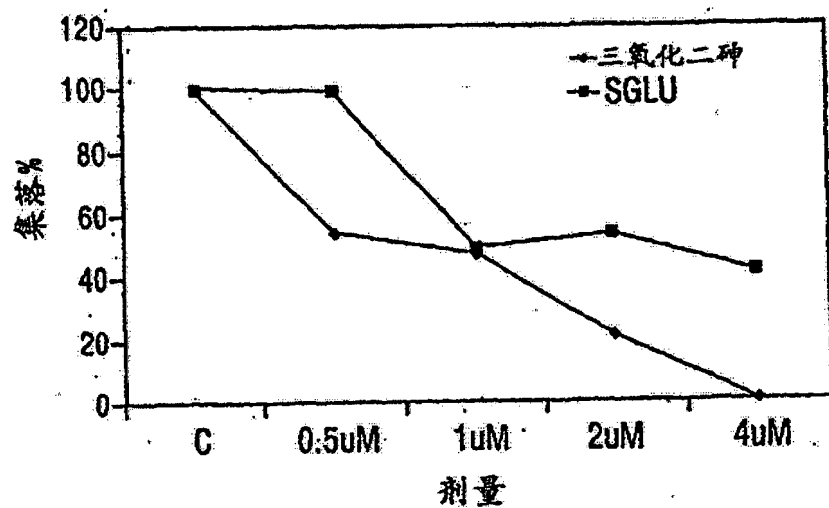


图 18

IHC150221 ABSTRACT

The present invention provides organic arsenicals. Many of these compounds have potent in vitro cytotoxic activity against numerous human tumor cell lines, both of solid and hematological origin, as well as against malignant blood cells from patients with leukemia.