



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101595115 B

(45) 授权公告日 2012. 07. 18

(21) 申请号 200780043989. 2

(22) 申请日 2007. 11. 01

(30) 优先权数据

2006906220 2006. 11. 01 AU

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 05. 27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/AU2007/001676 2007. 11. 01

(87) PCT申请的公布数据

W02008/052279 EN 2008. 05. 08

(73) 专利权人 新南部创新有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士

(72) 发明人 P·J·霍格 P·迪尔达

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限

公司 11285

代理人 张广育 刘文君

(51) Int. Cl.

C07F 9/74 (2006. 01)

C07F 9/76 (2006. 01)

A61K 31/285 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

A61P 35/02 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 7074766 B1, 2006. 07. 11, 全文.

CN 1742100 A, 2006. 03. 01, 全文.

Pierre J. Dilda, et al.. Optimization of the Antitumor Efficacy of a Synthetic Mitochondrial Toxin by Increasing the Residence Time in the Cytosol. 《Journal of Medicinal Chemistry》. 2009, 第 52 卷 (第 20 期), 6209, 6213-6215.

审查员 周付科

权利要求书 1 页 说明书 24 页 附图 12 页

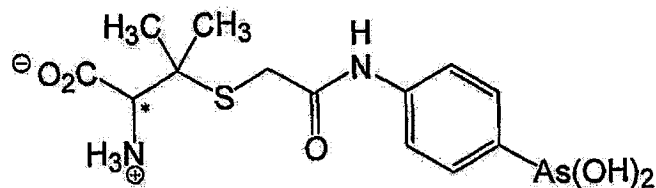
(54) 发明名称

有机-氧化砷化合物及其用途

(57) 摘要

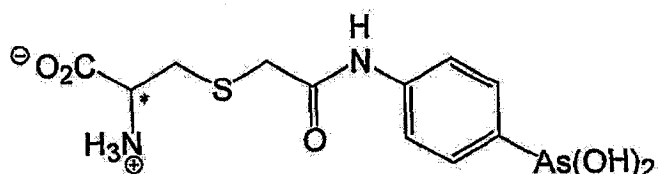
本发明涉及有机-氧化砷化合物及用于合成它们的方法。本发明包含还涉及包括这些化合物的药物组合物及它们在疾病和障碍特别是增殖性疾病和障碍的治疗中的用途, 所述疾病和障碍包括实体瘤和白血病的治疗。

1. 具有下述结构式的化合物或其盐：



其中在用 * 标出的手性碳原子处的立体化学为 (S)。

2. 具有下述结构式的化合物或其盐：



其中在用 * 标出的手性碳原子处的立体化学为 (S)。

3. 一种药物组合物, 包括至少一种根据权利要求 1 或 2 的化合物或者其盐, 以及一种可药用佐剂。

4. 一种药物组合物, 包括至少一种根据权利要求 1 或 2 的化合物或者其盐以及一种可药用赋形剂。

5. 一种药物组合物, 包括至少一种根据权利要求 1 或 2 的化合物或者其盐以及一种可药用稀释剂。

6. 根据权利要求 1 或 2 的化合物或者根据权利要求 3-5 之一的组合物用于制备治疗脊椎动物中细胞增殖性疾病的药物的用途。

7. 根据权利要求 6 的用途, 其中所述增殖性疾病为实体瘤。

8. 根据权利要求 1 或 2 的化合物或者根据权利要求 3-5 之一的组合物用于制备抑制脊椎动物中血管发生的药物的用途。

9. 根据权利要求 1 或 2 的化合物或者根据权利要求 3-5 之一的组合物用于制备选择性诱导脊椎动物增殖细胞发生线粒体通透性转运的药物的用途。

10. 根据权利要求 1 或 2 的化合物或者根据权利要求 3-5 之一的组合物用于制备诱导增殖的哺乳动物细胞发生凋亡的药物的用途。

11. 根据权利要求 6 的用途, 其中所述细胞为内皮细胞。

12. 根据权利要求 1 或 2 的化合物或者根据权利要求 3-5 之一的组合物用于制备治疗脊椎动物中白血病或骨髓增殖异常综合征的药物的用途。

13. 根据权利要求 12 的用途, 其中所述白血病为急性早幼粒细胞白血病或急性粒细胞白血病。

有机-氧化砷化合物及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及有机-氧化砷化合物及用于合成它们的方法。本发明还涉及包含这些化合物的药物组合物及它们在疾病和障碍的治疗中的用途,所述疾病和障碍包括增殖性疾病和障碍。

背景技术

[0002] 在过去,含砷化合物已经被用作治疗疾病的治疗剂。然而,含砷化合物的固有毒性以及它们的通常不利的治疗指数已经基本上使它们不可能被用作药物试剂。

[0003] W001/21628 中已经公开了有机-氧化砷化合物。这类化合物被描述为具有可用于治疗增殖性疾病的抗增殖性质。WO 04/042079 公开了有机-氧化砷化合物用于诱导线粒体通透性转运 (MPT) 的用途以及有机-氧化砷化合物用于诱发凋亡的用途,特别是在内皮细胞中。W001/21628 和 WO 04/042079 中所述的有机-氧化砷化合物具有经由连接基团连接到氧化砷基团之上的基本上不能渗透细胞膜的侧基。W001/21628 和 WO 04/042079 均没有具体地公开本发明的具有式 (I) 的化合物。

[0004] 患有急性早幼粒细胞白血病 (APL) 的患者在接受现有疗法 (全-反式视黄酸) 的治疗之后会遭受疾病复发。在这类情况下,考虑选择用三氧化二砷来进行治疗 (Reiter et al., 2004)。三氧化二砷为一种选择性杀死 APL 细胞的三价砷化物。三氧化二砷还表现出有用于治疗骨髓增生异常综合征——一种目前尚没有用于其的标准治疗方法的疾病——的前景 (Vey, 2004)。

[0005] 然而,人们一直认为当无机砷化物例如三氧化二砷在体内存在的水平超过身体解毒这种两性金属的能力时,它是毒药和致癌物并且与许多有害副作用有关。

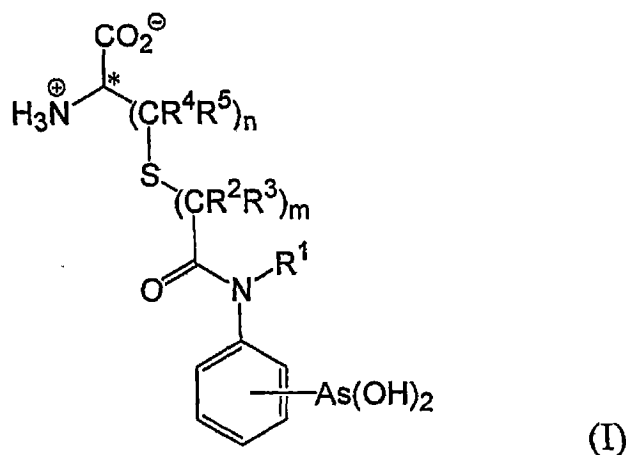
[0006] 需要用于治疗增殖性疾病的替代疗法,所述增殖性疾病例如癌症 (包括实体瘤的治疗) 和相关病症。具体而言,需要用于治疗 APL——包括急性粒细胞白血病 (AML)——的替代疗法。还需要用于骨髓增生异常综合征的治疗方法。

[0007] 本发明涉及一组氧化砷化合物,所述氧化砷化合物含有经由连接基团连接到苯基氧化砷基团之上的任选取代的氨基酸残基。本发明的化合物具有一种或多种优于已知含砷化合物例如三氧化二砷以及 W001/21628 或 WO 04/042079 中所公开的氧化砷化合物包括化合物 4-(N-(S-谷胱甘肽乙酰基)氨基)苯基氧化砷 (4-(N-(S-glutathionylacetyl)amino)phenylarsenoxide) (GSAO) 在内的优点,特别是用于治疗增殖性疾病例如癌症 (例如实体瘤) 时。

发明内容

[0008] 在第一方面中,本发明涉及一种具有通式 (I) 的化合物及其盐和水合物:

[0009]



[0010] 其中

[0011] 所述 $\text{As}(\text{OH})_2$ 基团可位于该苯环上 N 原子的邻位、间位或对位；

[0012] R^1 选自氢和 C_{1-3} 烷基；

[0013] R^2 和 R^3 可相同或不同，并且独立地选自氢、任选取代的 C_{1-3} 烷基、任选取代的环丙基、任选取代的 C_{2-3} 烯基和任选取代的 C_{1-3} 烷氧基；

[0014] R^4 和 R^5 可相同或不同，并且独立地选自氢、任选取代的 C_{1-3} 烷基、任选取代的环丙基、任选取代的 C_{2-3} 烯基和任选取代的 C_{1-3} 烷氧基；

[0015] n 为选自 1、2 和 3 的整数；

[0016] m 为选自 1、2 和 3 的整数；

[0017] * 表示手性碳原子。

[0018] 在第二方面中，本发明涉及一种药物组合物，包含至少一种本发明第一方面的具有式 (I) 的化合物，以及一种可药用赋形剂、稀释剂或佐剂。

[0019] 在另一方面中，本发明涉及一种治疗脊椎动物中增殖性疾病的方法，所述方法包括给予所述脊椎动物治疗有效量的一种本发明第一方面的具有式 (I) 的化合物或者一种本发明第二方面的组合物。所述增殖性疾病可为癌症，例如实体瘤。

[0020] 在另一方面中，本发明涉及一种抑制脊椎动物中血管发生的方法，包括给予所述脊椎动物有效量的一种本发明第一方面的具有式 (I) 的化合物或者一种本发明第二方面的组合物。

[0021] 在另一方面中，本发明涉及一种诱导脊椎动物发生线粒体通透性转变 (MPT) 的方法，包括给予所述脊椎动物治疗有效量的一种本发明第一方面的具有式 (I) 的化合物或者一种本发明第二方面的组合物。

[0022] 在另一方面中，本发明涉及一种诱导增殖的哺乳动物细胞发生凋亡的方法，包括给予所述哺乳动物可诱发凋亡量的一种本发明第一方面的具有式 (I) 的化合物或者一种本发明第二方面的组合物。

[0023] 在另一方面中，一种治疗脊椎动物中白血病或骨髓增殖异常综合征的方法，包括给予所述脊椎动物治疗有效量的一种本发明第一方面的具有式 (I) 的化合物或者一种本发明第二方面的组合物。

[0024] 在另一方面中，本发明涉及本发明第一方面的具有式 (I) 的至少一种化合物在制备一种用于治疗脊椎动物中增殖性疾病的药剂中的用途。所述增殖性疾病可为癌症，例如

实体瘤。

[0025] 在另一方面中,本发明涉及本发明第一方面的具有式 (I) 的至少一种化合物在制备一种用于抑制脊椎动物中血管发生的药剂中的用途。

[0026] 在又一方面中,本发明涉及本发明第一方面的具有式 (I) 的至少一种化合物在制备一种用于在脊椎动物中诱发 MPT 的药剂中的用途。

[0027] 在另一方面中,本发明涉及本发明第一方面的具有式 (I) 的至少一种化合物在制备一种用于诱导增殖的哺乳动物细胞发生凋亡的药剂中的用途。

[0028] 在另一方面中,本发明涉及本发明第一方面的具有式 (I) 的至少一种化合物在制备一种用于治疗脊椎动物中白血病的药剂中的用途。

[0029] 定义

[0030] 以下为一些可有助于理解本发明说明书的定义。这些定义意在作为一般性定义且不应将本发明的范围仅仅限定于这些术语,而是用于更高的理解下述说明。

[0031] 除非上下文另外要求或者明确说明相反,否则本文中所列举单数形式的整数、步骤或元件的本发明的整数、步骤或元件均明确地包括单数和复数两种形式的所列举的整数、步骤或元件。

[0032] 本说明书通篇中,除非上下文中另外要求,否则术语“包括”或其变化形式如“包含”或“含有”均应被理解为是指包括所说明的步骤或元件或整数或者步骤或元件或整数的群,但不排除任何其他步骤或元件或整数或者步骤或元件或整数的群。因此,在本说明书的上下文中,术语“含有”是指“主要但不必唯一包括”。

[0033] 本领域技术人员将会认识到本发明可以很容易进行变化和修改,而并不局限于本文所具体描述的这些实施方案。应理解本发明包括所有这些变化和修改。本发明还单独地或共同地包括本说明书中所涉及或指出的所有步骤、特性、组合物和化合物,以及所述步骤或特性的任何及所有组合或者任何两种或多种。

[0034] 在本发明的上下文中,BRAO 是指 4-(2- 溴乙酰基氨基)- 苯肿酸 (4-(2-bromoacetyl amino)-benzenearsonic acid);CAO 是指 4-(N-(S- 半胱氨酰乙酰基) 氨基)- 苯基卑肿酸 (4-(N-(S-cysteinyllacetyl) amino)-phenylarsinous acid);GSAO 是指 4-(N-(S- 谷胱甘肽乙酰基) 氨基) 苯基卑肿酸 (4-(N-(S-glutathionylacetyl) amino) phenylarsinous acid);和 PENA0 是指 4-(N-(S- 青霉氨基乙酰基) 氨基) 苯基卑肿酸 [“(S)- 青霉胺- 氧化砷”] (4-(N-(S-penicillaminyllacetyl) amino) phenylarsinous acid [“(S)-Penicillamine-arsenoxide”])。

[0035] 本文所用的术语“C₁₋₃ 烷基基团”的含义中包括具有 1-3 个碳原子的单价 (“烷基”) 和二价 (“亚烷基”) 直链或支链饱和脂肪族基团。因此,例如,术语 C₁₋₃ 烷基包括甲基、乙基、1- 丙基和异丙基。

[0036] 术语“C₂₋₃ 烯基基团”的含义包括具有 2-3 个碳原子并且在链中任意位置具有至少一个双键的单价 (“烯基”) 和二价 (“亚烯基”) 直链或支链不饱和脂肪烃基团。除非另外说明,否则关于每个双键的立体化学均可独立地为顺式或反式,或者适当时为 E 或 Z。烯基基团的实例包括次乙基、乙烯基、烯丙基、1- 甲基乙烯基、1- 丙烯基和 2- 丙烯基。

[0037] 本文所用的术语“C₂₋₃ 炔基基团”的含义包括具有 2-3 碳原子并且具有至少一个三键的单价 (“炔基”) 和二价 (“亚炔基”) 不饱和脂肪烃基团。炔基基团的实例包括但不

限于乙炔基、1-丙炔基。

[0038] 本文所用的术语“烷氧基”是指直链或支链烷基氧（即 O-烷基）基团，其中烷基为上文所定义的那些。烷氧基的实例包括甲氧基、乙氧基、正丙氧基和异丙氧基。

[0039] 本文所用的术语“氨基”是指 NR^aR^b 形式的基团，其中 R^a 和 R^b 均单独地选自氢、任选取代的 (C_{1-4}) 烷基、任选取代的 (C_{2-4}) 烯基、任选取代的 (C_{2-4}) 炔基、任选取代的 (C_{6-10}) 芳基和任选取代的芳烷基基团例如苯甲基。所述氨基基团可为伯、仲或叔氨基基团。

[0040] 在本说明的上下文中，术语“氧化砷”与“卑肿酸”为同义词，是指基团 $\text{As}(\text{OH})_2$ ，它还可以表示为 $\text{As} = \text{O}$ 。

[0041] 本文所用的术语“氨基酸”包括天然和非天然存在的氨基酸，以及它们的取代变体。因此，(L) 和 (D) 形式的氨基酸均包括在术语“氨基酸”范围之内。术语“氨基酸”的范围包括甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和组氨酸。氨基酸残基的主链可以被一个或多个独立地选自以下的基团所取代： (C_{1-6}) 烷基、卤素、羟基、羧基 (C_{1-6}) 烷基、芳基例如苯基、苯基 (C_{1-3}) 烷基例如苯甲基，以及 (C_{3-6}) 环烷基。

[0042] 本文所用的术语“ C_{6-10} 芳基”或其变化形式例如“亚芳基”是指具有 6-10 个碳原子的芳族烃的单价（“芳基”）和二价（“亚芳基”）的单环、多环、轭合和稠合的残基。芳族基团的实例包括苯基和萘基。

[0043] 本文所用的术语“芳基烷基”或其变化形式例如“芳烷基”的含义包括与二价的饱和的直链或支链烯基原子团连接的单价（“芳基”）和二价（“亚芳基”）的单环、多环、轭合和稠合的芳族烃原子团。芳基烷基基团的实例包括苯甲基。

[0044] 本文所用的术语“ C_{3-8} 杂环烷基”的含义包括具有 3-8 个环原子的单价（“杂环烷基”）和二价（“杂环亚烷基”）的饱和的单环、双环、多环或稠合的烃原子团，其中 1-5 或 1-3 个环原子为独立地选自 O、N、NH 或 S 的杂原子。所述杂环烷基基团可为 C_{3-6} 杂环烷基。所述杂环烷基基团可为 C_{3-5} 杂环烷基。杂环烷基基团的实例包括氮丙定基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、奎宁环基、氮杂环丁烷基、吗啉基、四氢噻吩基、四氢呋喃基、四氢吡喃基等。

[0045] 本文所用的术语“ C_{5-20} 杂芳族基团”及其变化形式例如“杂芳基”或“杂亚芳基”的含义包括具有 5-20 个原子的单价（“杂芳基”）和二价（“杂亚芳基”）的单环、多环、轭合和稠合的芳族原子团，其中 1-6 个原子或 1-4 个或 1-2 个环原子为独立地选自 O、N、NH 和 S 的杂原子。所述杂芳族基团可为 C_{5-10} 杂芳族基团。所述杂芳族基团可为 C_{5-8} 杂芳族基团。杂芳族基团的实例包括吡啶基、嘧啶基、哒嗪基、吡嗪基、2,2'-二吡啶基、菲咯啉基、喹啉基、异喹啉基、咪唑啉基、噻唑啉基、吡咯基、呋喃基、噻吩基、噁唑基、异噁唑基、异噻唑基、三唑基等。

[0046] 本文所用的术语“卤素”或其变化形式例如“卤化物”或“卤”是指氟、氯、溴和碘。

[0047] 本文所用的术语“杂原子”或其变化形式例如“杂-”是指 O、N、NH 和 S。

[0048] 本文所用的术语“任选取代的”是指本术语所指的基团可以是未被取代的或者可以是被一种或多种独立地选自以下的基团所取代：烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、杂环烷基、卤素、卤代烷基、卤代炔基、羟基、羧基、烷氧基、硫代烷氧基、烯氧基、卤代烷氧基、卤代烯氧基、 NO_2 、 NR^aR^b 、硝基烷基、硝基烯基、硝基炔基、硝基杂环基、烷氨基、二烷氨基、烯

基氨基、炔基氨基、酰基、烯酰基、炔酰基、酰氨基、二酰胺基、酰氧基、烷基磺酰氧基、杂环氧基、杂环氨基、卤代杂环烷基、烷基亚磺酰基、烷基羰氧基、烷硫基、乙酰硫基、含磷基团例如膦酰基和氧膦基、芳基、杂芳基、烷基芳基、芳烷基、烷基杂芳基、氰基、氰酸基、异氰酸基、 CO_2H 、 CO_2 烷基、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{烷基})$ 和 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{烷基})_2$ 。优选的取代基包括 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 烷氧基、 $-\text{CH}_2-(\text{C}_{1-3})$ 烷氧基、 C_{6-10} 芳基例如苯基和 $-\text{CH}_2-$ 苯基、卤素、羟基、羟基 (C_{1-3}) 烷基, 以及卤代 (C_{1-3}) 烷基例如 CF_3 和 CH_2CF_3 。特别优选的取代基包括 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 烷氧基、卤素、羟基、羟基 (C_{1-3}) 烷基例如 CH_2OH , 以及卤代 (C_{1-3}) 烷基例如 CF_3 、 CH_2CF_3 。

[0049] 在本说明书的上下文中, 术语“给予”及其变化形式包括“给药”和“投药”, 包括通过任何适宜的手段将本发明的化合物或组合物接触、施加、递送或提供给生物体或表面。

[0050] 在本说明书的上下文中, 术语“脊椎动物”包括人以及任何具有社会、经济或研究价值的物种的个体, 包括但不限于羊类、牛类、马类、猪类、猫类、犬类、灵长类 (包括人和非人灵长类)、啮齿类、鼠类、羊类、鼠类和鸟类的成员。在一个优选的实施方案中, 所述脊椎动物为人。

[0051] 在本发明的上下文中, 术语“治疗”是指无论以任何方式治疗疾病状态或症状、预防疾病的建立, 又或者预防、妨碍、延缓或逆转疾病或其它令人不快症状的进展的任何和所有用法。

[0052] 在本说明书的上下文中, 术语“有效量”的含义包括本发明的化合物或组合物的足以提供所需效果但无毒的量。因此, 术语“治疗有效量”的含义包括本发明的化合物或组合物的足以提供所需治疗效果但无毒的量。所需的准确量将会根据受试者而变化, 取决于以下因子: 例如正在治疗的物种, 受试者的性别、年龄和一般身体状况, 正在治疗的病症的严重程度、正在给予的具体试剂、给药模式等。因此, 不可能规定准确的“有效量”。然而, 对于任何给定情况, 适宜的“有效量”可以由本领域普通技术人员仅使用常规实验来确定。

附图说明

[0053] 图 1. (S)-青霉胺-氧化砷 (“PENAO”) 的结构。

[0054] 图 2. (S)-青霉胺-氧化砷的 ^1H -NMR 谱。

[0055] 图 3. (S)-青霉胺-氧化砷的二维 ^1H - ^{13}C 多键相关数据。观察到 4-(2-溴乙酰基氨基)-苯肿酸 (“BRAO”) 的酰基氢 (δ 3.55) 和青霉胺季碳 (δ 46.75) 之间的远程偶合。所述 NMR 谱是在 300MHz Bruker (双通道探针 NMR 光谱仪) 上以 D_2O 记录的。

[0056] 图 4. 质谱: 在 413.011678 处观察到的钠质谱峰 (计算得到 δ 1.5ppm)。快速烷基酯形成的发生取决于所使用的醇溶剂, 例如如果使用甲醇上样所述样品, 则所观察到的主峰为 +15 或 +30 个质量单位。

[0057] 图 5. (S)-青霉胺-氧化砷以 $0.4\text{ }\mu\text{m}$ 的 IC_{50} 抑制 BAE 细胞的增殖。五价含砷化合物 (S)-青霉胺-砷酸 ((S)-Penicillarnine-arsenonic acid) 对增殖没有作用。数据点为进行三次重复的三次实验的平均值 $\pm$ SD。

[0058] 图 6. (S)-青霉胺-氧化砷对 BAE 增殖和生存力的作用的比较。数据点为进行三次重复的三次实验的平均值 $\pm$ SD。

[0059] 图 7. (S)-青霉胺-氧化砷是与三氧化二砷一样有效的 APL 细胞增殖抑制剂。在于浓度不断增加的三氧化二砷、青霉胺-氧化砷或 GSAO 孵育 72 小时后的仍然存活的 NB4

细胞的数目。数据点为三次重复测定的平均值 $\pm$ SD。

[0060] 图 8. (S)-青霉胺-氧化砷在诱导线粒体通透性转变方面比 GSAO 更有效。由 100 μ M GSAO 或 (S)-青霉胺-氧化砷诱导的线粒体膨胀通过 30 分钟内 520nm 处光散射的下降测得。迹线代表对两个不同线粒体制品重复进行两次的两个实验。

[0061] 图 9. (S)-青霉胺-氧化砷在 BAE 细胞中的积累速率比 GSAO 快约 70 倍。将 BAE 细胞在存在 50 μ M GSAO 或 (S)-青霉胺-氧化砷的情况下孵育最长达 4 小时,并且通过诱导性偶联的电感耦合等离子体光谱测量胞内的砷。数据点和误差棒是三次重复测定的平均值 $\pm$ SD 并且代表两次实验。

[0062] 图 10. 细胞表面 OATP 的抑制减弱 (S)-青霉胺-氧化砷的细胞积累和抗增殖活性。A. 利用 OATP 抑制剂 DIDS 抑制 (S)-青霉胺-氧化砷在内皮细胞中的积累。将细胞使用或未使用 500 μ M DIDS 预处理 30 分钟,然后用 20 μ M (S)-青霉胺-氧化砷孵育 2 小时。砷含量为利用 ICPMS 测定的。值为三次测定的平均值 $\pm$ SD。结果代表两次实验。*: $p < 0.01$ 。B. DIDS 减弱 GSAO 在内皮细胞中的抗增殖活性。将 BAE 细胞使用或未使用 300 μ M DIDS 预处理 30 分钟,然后用 1.5 μ M (S)-青霉胺-氧化砷孵育 24 小时。细胞生存力是使用 MTT 测定的。结果表达为对照的百分数。值为三次重复测定的平均值 $\pm$ SD。结果代表两次实验。*: $p < 0.01$ 。

[0063] 图 11. (S)-青霉胺-氧化砷是由 MRP1/2 从细胞中泵出来的。在不存在或存在 4H10 (5 μ M) 或 MK-571 (25 μ M) 的情况下,将 BAE 细胞用 50 μ M (S)-青霉胺-氧化砷孵育最长达 2 小时,并且通过诱导性偶联的电感耦合等离子体光谱测量胞内的砷。数据点和误差棒是四次重复测定的平均值并且代表两次实验。B. MRP1/2 抑制剂 4H10 (2 μ M) 和 MK-571 (25 μ M) 对于 BAE 细胞增殖的青霉胺-氧化砷 (0.3 μ M) 抑制的影响。将 MRP 抑制剂与所述细胞孵育 30 分钟,然后将所述细胞用 (S)-青霉胺-氧化砷孵育 72 小时。数据点和误差棒为三次重复测定的平均值 $\pm$ SD。***为 $p < 0.001$,**为 $p < 0.01$ 。

[0064] 图 12. 细胞谷胱甘肽的消耗增加了 (S)-青霉胺-氧化砷的抗增殖活性。将 BAE 细胞用 (S)-青霉胺-氧化砷和所示浓度的 BSO 共同处理 72 小时,并且计算增殖抑制的 IC_{50} 。数据点和误差棒为进行三次重复的两次实验的平均值 $\pm$ SD。

[0065] 图 13. 通过持续皮下给予 (S)-青霉胺-氧化砷来抑制人胰腺癌肿瘤生长。BxPC-3 肿瘤是在 7-9 周龄雌性 Balbc 裸鼠的近中线处形成的。在带有 $\sim 50mm^3$ 肿瘤的小鼠的肋腹皮下植入 28 天 alzet 微型渗透压泵。所述泵递送剂量为 0.25、0.5 或 1mg/kg/天的溶于 100mM 甘氨酸(载体)的 (S)-青霉胺-氧化砷。

[0066] 图 14. 通过酶切割 GSAO 来生产 CAO。

[0067] 图 15. GSAO 和 CAO 的 HPLC 分析。将 5nmole 的 GSAO(A 部分)或 CAO(B 部分)用 C18 反相柱解析,并且监测 256nm 处的吸光度。

[0068] 图 16. 与 GSAO 相比,CAO 在细胞中积累得更快并且抗增殖活性更高。A. CAO 在细胞中的积累速率比 GSAO 快得多。将 BAE 细胞与 50 μ M GSAO 或 CAO 孵育 4 小时。细胞砷水平是通过 ICPMS 测定的。GSAO 和 CAO 的积累速率分别为 0.03 和 0.20nmol As 原子/ 10^6 细胞。数据点为三次测定的平均值 $\pm$ SD。结果代表两次实验。B. CAO 是由多药耐药相关蛋白 1 从细胞中输出的。将用 10 μ M 的 MRP-1 抑制剂 4H10 预处理 30min 的 BAE 细胞与 50 μ M GSAO 或 CAO 孵育 2 小时。细胞砷水平是通过 ICPMS 测定的。数据点为三次测定的平均值

±SD。结果代表两次实验。C. 内皮细胞的增殖抑制的 GSAO 和 CAO IC₅₀ 值。将 BAE 细胞与 0.8-100 μM GSAO 或 CAO 孵育 24、48 或 72 小时。细胞生存力是使用 MTT 测定的。结果表达为对照的百分数。值为三次重复测定的平均值 ±SD。结果代表三次实验。

[0069] 图 17. CAO 触发线粒体通透性转变。将线粒体与 nil (•)、150 μM Ca²⁺ 和 6mM Pi (o) 或 200 μM CAO (▲) 一起孵育, 并且利用 60 分钟内 520nm 处光散射的下降来监测膨胀。迹线代表两次实验。

具体实施方式

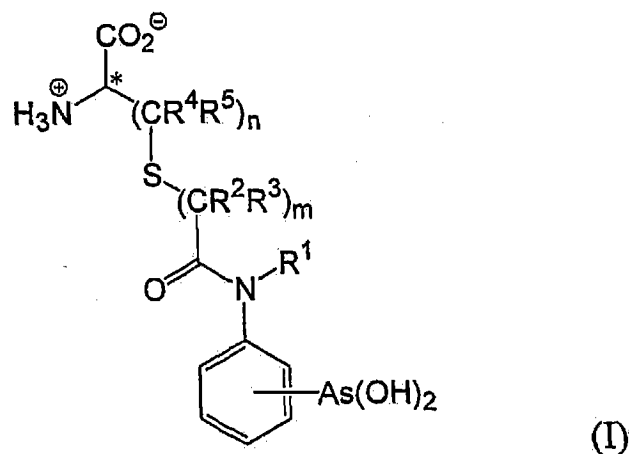
[0070] 本发明涉及有机-氧化砷化合物, 含有经由连接基团连接到苯基氧化砷基团之上的任选取代的氨基酸基团。

[0071] 本发明的有机-氧化砷化合物具有取代的或未取代的氨基酸基团。氨基酸基团的实例包括半胱氨酰基、取代的半胱氨酰基例如青霉胺基 (也称为 β, β-二甲基半胱氨酰基或 3-巯基缬氨酰基)、任选取代的丙氨酰基、任选取代的巯基丙氨酰基、任选取代的缬氨酰基、任选取代的 4-巯基缬氨酰基、任选取代的亮氨酰基、任选取代的 3-或 4-或 5-巯基亮氨酰基、任选取代的异亮氨酰基, 或者任选取代的 3-、4-或 5-异亮氨酰基。在本发明的一个优选实施方案中, 所述氨基酸基团为 β, β-二甲基半胱氨酰基 (“青霉胺基”)。在本发明的另一个实施方案中, 所述氨基酸基团为 (S)-青霉胺基。在本发明的另一个实施方案中, 所述氨基酸基团为半胱氨酰基。所述氨基酸基团可具有 (L)、(D)、(R) 或 (S) 构型。任选的取代基包括 C₁₋₃ 烷基、环丙基、C₁₋₃ 烷氧基、-CH₂-(C₁₋₃) 烷氧基、C₆₋₁₀ 芳基、-CH₂-苯基、卤素、羟基、羟基 (C₁₋₃) 烷基, 以及卤代-(C₁₋₃) 烷基例如 CF₃、CH₂CF₃。在优选的实施方案中, 任选的取代基独立地选自羟基、甲氧基、卤素、甲基、乙基、丙基、环丙基、CH₂OH 和 CF₃。

[0072] 本发明的有机氧化砷化合物的连接基团为取代的或未取代的乙酰胺基基团。在一个实施方案中, 所述连接基团为未取代的乙酰胺基基团。

[0073] 具体而言, 本发明涉及具有通式 (I) 的化合物以及其盐和水合物:

[0074]



[0075] 其中

[0076] 所述 As(OH)₂ 基团位于该苯环上 N 原子的邻位、间位或对位;

[0077] R¹ 选自氢和 C₁₋₃ 烷基;

[0078] R² 和 R³ 可相同或不同, 并且独立地选自氢、任选取代的 C₁₋₃ 烷基、任选取代的环丙基、任选取代的 C₂₋₃ 烯基和任选取代的 C₁₋₃ 烷氧基;

[0079] R^4 和 R^5 可相同或不同,并且独立地选自氢、任选取代的 C_{1-3} 烷基、任选取代的环丙基、任选取代的 C_{2-3} 烯基;和任选取代的 C_{1-3} 烷氧基;

[0080] m 为选自 1、2 和 3 的整数;

[0081] n 为选自 1、2 和 3 的整数;*表示手性碳原子。

[0082] 具有通式 (I) 的化合物的优选实施方案如下文所述。应该理解的是,本文所公开的实施方案的一个或多个可与任何其他一个或多个实施方案(包括一个或多个优选的实施方案)结合。

[0083] 任选的取代基可相同或不同,并且独立地选自 C_{1-3} 烷基、环丙基、 C_{1-3} 烷氧基、 $-\text{CH}_2-(C_{1-3})$ 烷氧基、 C_{6-10} 芳基、 $-\text{CH}_2-$ 苯基、卤素、羟基、羟基(C_{1-3}) 烷基,以及卤代- (C_{1-3}) 烷基例如 CF_3 、 CH_2CF_3 。在一个实施方案中,任选的取代基独立地选自羟基、甲氧基、卤素、甲基、乙基、丙基、环丙基、 CH_2OH 和 CF_3 。在一个实施方案中,没有任选的取代基。

[0084] 所述 $\text{As}(\text{OH})_2$ 基团可位于该苯环上 N 原子的邻位或对位。在一个实施方案中,所述 $\text{As}(\text{OH})_2$ 基团位于该苯环上 N 原子的对位。在一个实施方案中,所述 $\text{As}(\text{OH})_2$ 基团位于该苯环上 N 原子的邻位。

[0085] R^1 可为氢、甲基或乙基。在一个实施方案中, R^1 为氢。

[0086] R^2 和 R^3 可相同或不同。 R^2 和 R^3 可独立地选自氢、 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、 C_{1-3} 烷氧基、卤代(C_{1-3}) 烷氧基、羟基(C_{1-3}) 烷基和卤代(C_{1-3}) 烷基。在一个优选的实施方案中, R^2 和 R^3 可独立地选自氢、甲基、乙基、甲氧基、乙烯基、 CH_2OH 、 CF_3 和 OCF_3 。在另一个优选的实施方案中, R^2 和 R^3 可独立地选自氢、甲基和乙基。在另一个实施方案中, R^2 为甲基且 R^3 为氢。在另一个实施方案中, R^2 和 R^3 均为氢。

[0087] R^4 和 R^5 可相同或不同。 R^4 和 R^5 可独立地选自氢、 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、 C_{1-3} 烷氧基、卤代(C_{1-3}) 烷氧基、羟基(C_{1-3}) 烷基和卤代- (C_{1-3}) 烷基。在一个优选的实施方案中, R^4 和 R^5 可独立地选自氢、甲基、乙基、甲氧基、乙烯基、羟基(C_{1-3}) 烷基、 CF_3 和 OCF_3 。在另一个优选的实施方案中, R^4 和 R^5 可独立地选自氢、甲基、乙基和 CH_2OH 。在另一个实施方案中, R^4 为甲基或乙基,并且 R^5 为氢或甲基。在另一个实施方案中, R^4 为甲基且 R^5 为氢。在另一个实施方案中, R^4 和 R^5 均为氢。在另一个实施方案中, R^4 和 R^5 均为甲基。

[0088] 在一个实施方案中, m 为 1 或 2。在另一个实施方案中, n 为 1 或 2。在另一个实施方案中, m 和 n 均为 1。

[0089] 在具有通式 (I) 的化合物的一个实施方案中,所述 $\text{As}(\text{OH})_2$ 基团位于该苯环上 N 原子的邻位或对位; R^1 为氢或甲基; R^2 和 R^3 均独立地选自氢、 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、 C_{1-3} 烷氧基、卤代- (C_{1-3}) 烷氧基、羟基(C_{1-3}) 烷基和卤代(C_{1-3}) 烷基; R^4 和 R^5 均独立地选自氢、 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、 C_{1-3} 烷氧基、卤代(C_{1-3}) 烷氧基、羟基(C_{1-3}) 烷基和卤代(C_{1-3}) 烷基; m 为 1 或 2;并且 n 为 1 或 2。

[0090] 在具有通式 (I) 的化合物的另一个实施方案中,所述 $\text{As}(\text{OH})_2$ 基团位于该苯环上 N 原子的邻位或对位; R^1 为氢或甲基; R^2 和 R^3 均独立地选自氢、甲基、乙基、甲氧基、乙烯基、 CH_2OH 、 CF_3 和 OCF_3 ; R^4 和 R^5 均独立地选自氢、甲基、乙基、 CH_2OH 、甲氧基、乙烯基、 CF_3 和 OCF_3 ; m 为 1;并且 n 为 1。

[0091] 在具有通式 (I) 的化合物的另一个实施方案中,所述 $\text{As}(\text{OH})_2$ 基团位于该苯环上 N 原子的邻位或对位; R^1 为氢或甲基; R^2 和 R^3 均独立地选自氢、甲基和乙基; R^4 和 R^5 均独立地

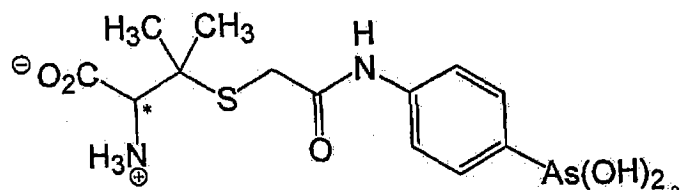
选自氢、甲基和乙基；m 为 1；并且 n 为 1。

[0092] 在具有通式 (I) 的化合物的另一个实施方案中，所述 $\text{As}(\text{OH})_2$ 基团位于该苯环上 N 原子的邻位或对位； R^1 为氢或甲基； R^2 为氢或甲基； R^3 为氢或甲基； R^4 为氢、甲基或乙基； R^5 为氢或甲基；m 为 1；并且 n 为 1。

[0093] 在具有通式 (I) 的化合物的另一个实施方案中，所述 $\text{As}(\text{OH})_2$ 基团位于该苯环上 N 原子的对位； R^1 为氢； R^2 为氢或甲基； R^3 为氢； R^4 为氢或甲基； R^5 为氢或甲基；m 为 1；并且 n 为 1。

[0094] 在本发明的一个具体实施方案中，具有式 (I) 的化合物为：

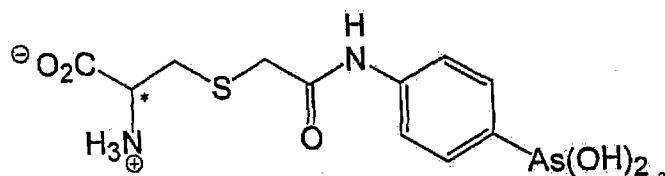
[0095]



[0096] 该化合物在本文中被称为“青霉胺-氧化砷”。

[0097] 在本发明的另一个实施方案中，具有式 (I) 的化合物为：

[0098]



[0099] 该化合物在本文中被称为“半胱氨酰基-苯基氧化砷”。

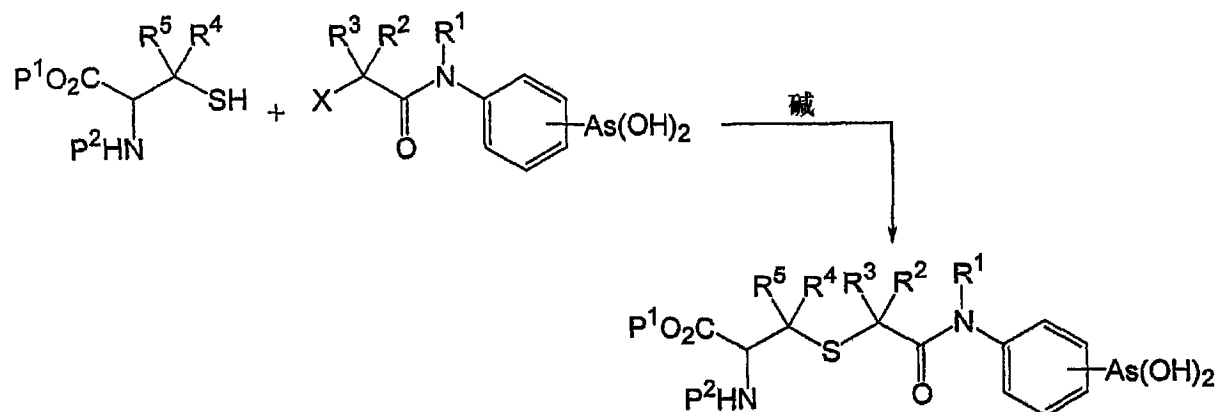
[0100] 具有式 (I) 的化合物的合成

[0101] 具有式 (I) 的化合物可以很容易地由本领域技术人员使用本领域中已知的方法和材料并且参考标准教科书来制备，所述标准教科书例如“Advanced Organic Chemistry”by Jerry March (third edition, 1985, John Wiley and Sons) 或“Comprehensive Organic Transformations”by Richard C. Larock (1989, VCH Publishers)。

[0102] 用于制备具有式 (I) 的化合物的代表性方案如下文所示：

[0103] 方案 1

[0104]



[0105] 其中 X 为离去集团，并且 P^1 和 P^2 为氢或保护基团。

[0106] 在方案 1 中, X 为能够在亲核反应中被亲核基团置换的离去基团。适合的离去基团包括卤素例如碘、溴和氯。其他适合的离去基团是本领域技术人员已知的。根据本发明, 所述亲核基团可以为巯基。-SH 可被碱去质子化, 所述碱例如氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸氢钠、碳酸钠等。氨基基团和 / 或羧酸基团可能会被保护。适合的保护基团是本领域技术人员已知的, 并且可以参考“Protective Groups in Organic Synthesis” by Theodora Greene and Peter Wuts (third edition, 1999, John Wiley and Sons)。

[0107] 在一个备选的合成方法中, 本发明的具有式 (I) 的化合物可以通过对有机 - 氧化砷化合物的肽基残基进行酶法切割来制备。可以根据所述肽基残基组分来选择一种或多种适合的酶。因此, 例如, 当一种有机 - 氧化砷起始化合物包括一个三肽残基例如谷胱甘肽, 具有式 (I) 的化合物可以通过下述方法来制备: 用 γ -谷氨酰转肽酶 (例如羊肾 γ -谷氨酰转肽酶 I 型) 对末端 γ -谷氨酰残基进行酶法切割, 然后使用氨肽酶 (例如猪肾氨肽酶) 对甘氨酸残基进行切割以使半胱氨酰基氨基酸残基离去。

[0108] 式 (I) 中由 * 表示的手性碳原子处的立体化学可以为 (R) 或 (S)。本发明包括对映异构体纯级形式的具有式 (I) 的化合物、以任何比率的对映异构体的混合物, 以及外消旋化合物。在本发明的一个实施方案中, 通式 (I) 中由 * 表示的手性碳原子处的立体化学为 (R)。在本发明的另一个实施方案中, 式 (I) 中由 * 表示的手性碳原子处的立体化学为 (S)。

[0109] 在本发明的另一个优选实施方案中, 具有式 (I) 的化合物为 (S)-青霉胺-氧化砷。在本发明的另一个优选实施方案中, 具有式 (I) 的化合物为 (R)-青霉胺-氧化砷。在另一个实施方案中, 具有式 (I) 的化合物包括青霉胺-氧化砷的 (R) 和 (S) 对映异构体的混合物。在另一个实施方案中, 所述青霉胺-氧化砷的 (R) 和 (S) 对映异构体的混合物为外消旋混合物。

[0110] 在本发明的一个优选实施方案中, 具有式 (I) 的化合物为 (S)-半胱氨酰基-苯基氧化砷。在本发明的另一个优选实施方案中, 具有式 (I) 的化合物为 (R)-半胱氨酰基-苯基氧化砷。在另一个实施方案中, 具有式 (I) 的化合物包括半胱氨酰基-苯基氧化砷的 (R) 和 (S) 对映异构体的混合物。在另一个实施方案中, 所述半胱氨酰基-苯基氧化砷的 (R) 和 (S) 对映异构体的混合物为外消旋混合物。

[0111] 还包括在本发明的范围之内的是具有式 (I) 的化合物的所有立体异构体、几何异构体和互变异构形式 (包括表现出多种类型异构现象的化合物), 以及其一种或多种的混合物。还包括的是其中反荷离子是有旋光活性的酸加成盐或碱加成盐例如 d-乳酸盐或 l-赖氨酸, 或者外消旋体例如 d,l-酒石酸盐或 d,l-精氨酸。

[0112] 顺式 / 反式 (E/Z) 同分异构体可以通过本领域技术人员公知的常规技术来分离, 例如色谱法和分级结晶。

[0113] 用于制备 / 分离各对映异构体的常规技术包括用适合的旋光纯前体的手性合成或者使用例如手性高压液相色谱 (HPLC) 解析外消旋化合物 (或者盐或衍生物的外消旋化合物)。

[0114] 或者, 外消旋化合物 (或者外消旋前体) 可以与适合的具有旋光活性的化合物例如醇反应, 或者在式 (I) 的化合物含有酸性或碱性基团的情况下与碱或酸例如 l-苯乙胺或酒石酸反应。所得的非对映混合物可通过色谱法和 / 或分级结晶来分离, 并且所述非对映体之一或两者均可通过技术人员公知的手段转化为相应的纯对映异构体。

[0115] 本发明手性化合物（以及其手性前体）可以通过色谱法（通常为 HPLC）用由以下物质组成的流动相在不对称树脂上来获得（富含对映异构体的形式），所述物质为含有 0-50 体积%的异丙醇（通常 2% -20%）、0-5 体积%的烷基胺（通常 0.1%的二乙胺）的烃，通常为庚烷或己烷。对洗脱物的浓缩可以提供得到丰富的混合物。

[0116] 治疗应用

[0117] 本发明的具有式 (I) 的化合物以及其可药用盐和水合物均能够结合增殖性内皮细胞中线粒体腺嘌呤核苷酸转运体 (ANT) 的半胱氨酸残基，从而诱导线粒体通透性转变 (MPT)。因此，本发明的具有式 (I) 的化合物可用于诱发增殖抑制和细胞死亡。有利的是，与其他细胞（例如肿瘤细胞）相比，具有式 (I) 的化合物可以在增殖性内皮细胞中有选择地诱发 MPT。因此，具有式 (I) 的化合物可以用于治疗增殖性疾病。

[0118] 有利的是，具有式 (I) 的化合物（例如青霉胺-氧化砷和半胱氨酰基-苯基氧化砷）可以比已知的氧化砷化合物更有效地抑制细胞增殖（特别是内皮细胞的增殖）和 / 或降低内皮细胞的生存力，所述已知的氧化砷化合物包括 WO 01/21628 中公开的有机-氧化砷化合物例如化合物 4-(N-(S-谷胱甘肽乙酰基)氨基)苯基氧化砷（“GSAO”）。在本发明的上下文中，“降低内皮细胞的生存力”可以包括细胞死亡或向细胞死亡的进展。例如，具有式 (I) 的化合物在抑制内皮细胞的增殖和 / 或降低内皮细胞的生存力方面比 GSAO 更有效约 5 倍、约 10 倍、约 15 倍、约 20 倍、约 25 倍、约 30 倍、约 40 倍、约 50 倍、约 75 倍或约 100 倍。在一个具体的实施方案中，具有式 (I) 的化合物在抑制内皮细胞的增殖和 / 或降低内皮细胞的生存力方面比 GSAO 更有效约 5-50 倍。在另一个实施方案中，具有式 (I) 的化合物在抑制内皮细胞的增殖和 / 或降低内皮细胞的生存力方面比 GSAO 更有效约 10-30 倍。在另一个实施方案中，具有式 (I) 的化合物在抑制内皮细胞的增殖和 / 或降低内皮细胞的生存力方面比 GSAO 更有效约 20-25 倍。

[0119] 有利的是，具有式 (I) 的化合物（例如青霉胺-氧化砷和半胱氨酰基-苯基氧化砷）在诱导线粒体通透性转变 (MPT) 方面比已知氧化砷化合物例如 GSAO 更有效。例如，与其他氧化砷化合物例如 GSAO 相比，具有式 (I) 的化合物使分离的线粒体发生半最大膨胀的时间可以更快约 2- 约 20 倍、约 2- 约 15 倍、约 2- 约 10 倍、约 2- 约 8 倍、约 2- 约 6 倍或约 2- 约 4 倍。在本发明的一个具体实施方案中，具有式 (I) 的化合物在诱发 MPT 方面比其他氧化砷化合物例如 GSAO 更快约 2- 约 10 倍。在另一个实施方案中，具有式 (I) 的化合物在诱发 MPT 方面比其他氧化砷化合物例如 GSAO 更快约 2- 约 6 倍。在另一个实施方案中，具有式 (I) 的化合物在诱发 MPT 方面比其他氧化砷化合物例如 GSAO 更快约 4 倍。

[0120] 本发明的具有式 (I) 的化合物抑制增殖内皮细胞效率的增加可能是由于在细胞内的积累增加。例如，具有式 (I) 的化合物在内皮细胞中的积累速率比其他氧化砷化合物例如 GSAO 快。因此，具有式 (I) 的化合物可能是比其他有机-氧化砷化合物例如 GSAO 更有效的细胞增殖抑制剂。

[0121] 因此，本发明的另一个实施方案涉及一种治疗脊椎动物中细胞增殖性疾病的方法，所述方法包括给予所述脊椎动物治疗有效量的至少一种具有式 (I) 的化合物或者其盐或水合物或者其药物组合物。所述细胞可以是内皮细胞。具有式 (I) 的化合物对增殖性内皮细胞有选择性。与化合物 GSAO 相比，具有式 (I) 的化合物可对增殖性细胞表现出更高的选择性。所述增殖性疾病可为癌症，例如实体瘤。因此，本发明的一个具体的实施方案涉

及一种治疗实体瘤的方法,所述方法包括给予所述脊椎动物治疗有效量的至少一种具有式 (I) 的化合物或者其盐或水合物或者其药物组合物。在优选的实施方案中,具有式 (I) 的化合物可为青霉胺-氧化砷或半胱氨酰基-苯基氧化砷。

[0122] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种抑制脊椎动物中血管发生的方法,包括给予所述脊椎动物有效量的至少一种具有通式 (I) 的化合物或者其盐或水合物或者其药物组合物。

[0123] 本发明的另一个实施方案涉及一种选择性诱导脊椎动物增殖细胞发生 MPT 的方法,包括给予所述脊椎动物治疗有效量的至少一种具有式 (I) 的化合物或者其盐或水合物或者其药物组合物。本发明的具有式 (I) 的化合物可通过结合到线粒体腺嘌呤核苷酸转运体的半胱氨酸残基之上来诱发 MPT。具有式 (I) 的化合物在诱导增殖性细胞发生 MPT 方面比化合物 GSAO 更有效约 2- 约 20 倍、约 2- 约 10 倍、约 2- 约 5 倍例如约 4 倍。

[0124] 本发明的另一个实施方案涉及一种诱导哺乳动物中的增殖细胞发生凋亡的方法,包括给予所述哺乳动物可诱发凋亡量的至少一种具有式 (I) 的化合物或者其盐或水合物或者其药物组合物。与正常细胞相比,具有式 (I) 的化合物可选择性地在增殖性细胞诱发凋亡。具有通式 (I) 的化合物在诱发增殖细胞中凋亡方面比化合物 GSAO 更有效。

[0125] 本发明的具有式 (I) 的化合物还具有用于治疗急性早幼粒细胞白血病 (APL) 的潜力。APL 的现有治疗方法为靶向基本的分子损伤并且使白血病原始细胞分化为成熟的粒细胞的全反式视黄酸 (ATRA) 疗法 (Reiter et al., 2004)。然而,使用 ATRA 的疗法会产生导致死亡的视黄酸综合征。疾病复发也是一个问题。在疾病复发的患者中,考虑选择用三氧化二砷来进行治疗 (Reiter et al., 2004)。然而,当无机砷化物例如三氧化二砷用于治疗时,具有数种缺点。例如,人们一直认为当无机砷化物例如三氧化二砷在体内存在的水平超过身体解毒这种两性金属的能力时,它是毒药和致癌物。三氧化二砷在 2 小时内通过静脉输注给予,以使副作用最小,所述副作用包括 QTc 间期延长、APL 分化综合征、外周神经病、肝功能障碍和肠胃反应 (Evens et al., 2004)。需要更安全的砷化物来治疗 APL (包括 AML) 和骨髓增生异常综合征。

[0126] 因此,本发明的另一个实施方案涉及一种治疗脊椎动物中白血病或骨髓增生异常综合征的方法,方法包括给予所述脊椎动物治疗有效量的至少一种具有式 (I) 的化合物或者其盐或水合物或者其药物组合物。在一个实施方案中,所述白血病为急性早幼粒细胞白血病 (APL)。在另一个实施方案中,所述白血病为急性粒细胞白血病 (AML)。根据本发明,具有式 (I) 的化合物在抑制 APL 细胞方面至少与三氧化二砷一样有效。在一个实施方案中,具有式 (I) 的化合物在治疗 APL 方面比三氧化二砷更有效。有利的是,具有式 (I) 的化合物可表现出低于三氧化二砷的副作用。具有式 (I) 的化合物在治疗 APL、AML 和 / 或骨髓增生异常综合征方面比其他有机氧化砷化合物例如 GSAO 更有效。

[0127] 本发明的具有式 (I) 的化合物另一特征为它们与例如三氧化二砷相比可具有降低的脂溶性。具有式 (I) 的化合物的水溶性使得它们穿透组织的能力下降并且极有可能被限制在血管内区室中。因此,有利的是,具有式 (I) 的化合物可导致比其他砷化物例如三氧化二砷更低的副作用。

[0128] 治疗优势可以通过组合方案来实现。在组合疗法中,可以同时或以任何顺序序贯给予各个试剂。因此,本发明的治疗方法可包括给予一种或多种具有式 (I) 的化合物。一

种或多种具有式 (I) 的化合物可以与常规疗法例如放射疗法、化学疗法、外科手术或其他形式的医疗干预结合给予。化疗试剂的实例包括阿霉素、紫杉醇、氟尿嘧啶、美法仑、顺铂、奥沙利铂、 α 干扰素、长春新碱、长春碱、angioinhibin、TNP-470、戊聚糖聚硫酸盐、血小板因子 4、血管他丁、LM-609、SU-101、CM-101、Techgalan、沙利度胺、SP-PG 等。其他化疗试剂包括烷化剂,例如氮芥 (nitrogen mustard) 包括氮芥 (mechloethamine)、马法兰、苯丁酸氮芥、环磷酰胺和异环磷酰胺,亚硝基脲包括卡莫司汀、洛莫司汀、司莫司汀和链佐星;烷基磺酸酯包括白消安;三嗪包括氮烯咪胺;氮丙啶包括塞替派和六甲密胺;叶酸类似物包括甲氨蝶呤;嘧啶类似物包括 5- 氟尿嘧啶、阿糖胞苷;嘌呤类似物包括 6- 巯基嘌呤和 6- 硫代鸟嘌呤;抗肿瘤抗生素包括放线菌素 D;蒽环类包括多柔比星、博来霉素、丝裂霉素 C 和光辉霉素 (methramycin);激素和激素拮抗剂包括他莫昔芬和皮质类固醇,以及其他药剂 (miscellaneous agent) 包括顺铂和布喹那,以及治疗方案例如 COMP (环磷酰胺、长春新碱、甲氨蝶呤和泼尼松)、依托泊苷、mBACOD (甲氨蝶呤、博来霉素、多柔比星、环磷酰胺、长春新碱和地塞米松) 和 PROMACE/MOPP (泼尼松、甲氨蝶呤 (w/ 麦清蛋白拯救 (leucovin rescue))、多柔比星、环磷酰胺、紫杉醇、依托泊苷 / 氮芥、长春新碱、泼尼松和丙卡巴肼)。

[0129] 药物和 / 或治疗制剂

[0130] 通常,对于医学用途来说,本发明的化合物的盐是可药用盐;但是其他盐可用于制备本发明的化合物或者制备其可药用盐。可药用盐是指这些盐:在正确的医学判断的范围内,适合用于与人和低等动物的组织接触而无过度毒性、刺激、变态反应等,并且与合理的效益 / 风险比相称。可药用盐在本领域中是公知的。

[0131] 具有式 (I) 的化合物的可药用盐可以通过本领域技术人员已知的方法制备,包括例如, (i) 通过使具有式 (I) 的化合物与所需的酸或碱反应; (ii) 通过从具有式 (I) 的化合物的适合前体上移除酸或碱不稳定的保护基团或者通过使用所需酸或碱使适合的环状前体 (例如内酯或内酰胺) 开环;或 (iii) 通过与适宜的酸或碱反应或者通过适合的离子交换柱将一种具有式 (I) 的化合物的盐转化为另一种具有式 (I) 的化合物的盐。

[0132] 所有三种反应通常是在溶液中进行的。所得的盐可沉淀析出,并且通过过滤来收集或者可以通过蒸发所述溶剂来回收。所得的盐中离子化的程度可在完全离子化至几乎未离子化之间有所变化。

[0133] 因此,例如,本发明化合物的适合的可药用盐可以通过使可药用酸与本发明的化合物混合来制备,所述可药用酸例如盐酸、硫酸、甲磺酸、琥珀酸、延胡索酸、马来酸、苯甲酸、正磷酸、乙酸、草酸、碳酸、酒石酸或柠檬酸。因此,本发明化合物的适合的可药用盐包括酸加成盐。

[0134] S. M. Berge 等人在 J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66:1-19. 中详细描述了可药用盐。所述盐可以在本发明化合物的最终分离和纯化过程中原位制备,或者通过使所述游离碱性官能团与适合的有机酸反应单独制备。代表性酸加成盐包括乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、重硫酸盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、二葡萄糖酸盐、环戊丙酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、延胡索酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、碘酸盐、2- 羟基 - 乙磺酸盐、乳糖醛酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2- 萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、扑酸盐、果冻酸盐、

过硫酸盐、3- 苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、特戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一酸盐、戊酸盐等。代表性的碱或碱土金属盐包括钠盐、锂盐、钾盐、钙盐、镁盐等, 以及无毒铵盐、季铵盐和胺阳离子, 包括但不限于铵、四甲铵、四乙铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺、三乙醇胺等。

[0135] 方便的给药模式包括注射(皮下、静脉内等)、口服给药、吸入、经皮肤施加、外用乳膏或凝胶或粉末或者直肠给药。在一个实施方案中, 给药模式为肠胃外给药。在另一个实施方案中, 给药模式为口服给药。根据给药途径, 所述制剂和/或化合物可以用某种材料来包被以保护所述化合物免遭酶、酸和其他可以使所述化合物的治疗活性失活的天然条件的作用。所述化合物还可以为肠胃外给药或腹膜内给药。

[0136] 还可以使用甘油、液体聚乙二醇和它们的混合物以及油来制备本发明化合物的分散液。在通常的贮藏和使用条件下, 药物制品可含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0137] 适合用于注射的药物组合物包括无菌水溶液(当可溶于水时)或分散液, 以及用于即时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。理想地, 所述组合物在制备和贮藏条件下是稳定的, 并且可包括防腐剂以稳定所述组合物免遭微生物例如细菌和真菌的污染作用。

[0138] 一种或多种本发明的化合物可以——例如与惰性稀释剂或可消化的食用载体一起——通过口服给药。一种或多种所述组合物及其他成分还可以被包封在硬壳明胶胶囊或软壳明胶胶囊中、压成片剂或者直接掺入到个体的饮食中。对于口服治疗给药, 可以将一种或多种所述化合物与赋形剂混合, 并且以可摄取的片剂、口含片剂、锭剂、胶囊、酏剂、悬液、糖浆、薄片形式使用。适合地, 这类组合物和制品可含有至少 1 重量%的活性化合物。一种或多种具有式(I)的化合物在药物组合物及制品中的百分数当然可有所变化, 并且例如变化范围可方便地为所述单位剂量重量的约 2% - 约 90%、约 5% - 约 80%、约 10% - 约 75%、约 15% - 约 65%; 约 20% - 约 60%、约 25% - 约 50%、约 30% - 约 45% 或者约 35% - 约 45%。化合物在可用于治疗的组合物中的量使得可获得适合的剂量。

[0139] 语言“可药用载体”意在包括溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等。这类介质和试剂用于药物活性物质的用途在本领域中是公知的。只要常规介质或药剂与所述化合物相容, 就考虑到其在治疗用组合物以及治疗和预防方法中的应用。还可在本发明的组合物中掺入补充的活性化合物。将肠胃外组合物配制成单位剂量以便于给药和使剂量均匀是特别有利的。本文所用的“单位剂量形式”是指适合于对待治疗个体单式给药的在物理学层面的离散单位; 计算每个含有预定量的一种或多种化合物的单位以便与所需药物载体一起产生希望的疗效。可以将有效量的一种或多种所述化合物与适合的可药用载体配制为可用的单位剂量以便方便且有效的给药。对于含有补充的活性成分的组合物情况, 可以参考通常剂量以及所述成分的给药方式来确定剂量。

[0140] 在一个实施方案中, 所述载体为一种经口服给药的载体。

[0141] 药物组合物的另一种形式为被配制成适合于口服给药的肠包衣颗粒、片剂或胶囊的剂型。

[0142] 本发明的范围内还包括缓释制剂。

[0143] 本发明的具有式(I)的化合物还可以“前药”形式来给药。前药是可在体内转化为活性形式的无活性形式的化合物。适合的前药包括所述活性形式的化合物的酯、磷酸酯

等。

[0144] 在一个实施方案中,具有式 (I) 的化合物可通过注射来给药。对于可注射溶液的情况,所述载体可以为溶剂或分散介质,包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其适合的混合物和植物油。例如通过使用包衣如卵磷脂、可以通过维持所需的粒度(在使用分散液的情况下)以及通过使用表面活性剂来维持适合的流动性。对微生物作用的防止可以通过包含各种抗菌剂和/或抗真菌剂来实现。适合的试剂是本领域技术人员所公知的,并且包括例如对羟苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、苯甲醇、抗坏血酸、硫柳汞等。在许多情况下,所述组合物中优选地包括等渗剂,例如糖、多元醇(例如甘露醇和山梨糖醇)、氯化钠。所述可注射组合物的延长吸收可以通过在所述组合物中包含可延缓吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来实现。

[0145] 无菌的可注射溶液可以通过以下方法来制备,将所需量的所述类似物掺入具有上文所列举的一种成分或一组合成分(根据需要)的适宜的溶剂中,然后进行无菌过滤。通常,分散液通过下述方法来制备,即将所述类似物掺入含有基本分散介质和所需其他上文所列举的成分的无菌载体中。

[0146] 片剂、锭剂、丸剂、胶囊等还可以含有以下物质:粘合剂,例如黄耆胶、阿卡胶、玉米淀粉或明胶;赋形剂例如磷酸二钙;崩解剂例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸等;润滑剂例如硬脂酸镁;以及甜味剂例如蔗糖、乳糖或糖精,或者调味剂例如薄荷、冬青油或樱桃香精。当所述单位剂型为胶囊时,除上述类型的物质外,它还可以含有液体载体。各种其他物质可以作为包衣存在或者可以用于改变所述单位剂量的物理形式。例如,片剂、丸剂或胶囊可以被虫胶和/或糖所包被。糖浆或酏剂可以包含所述类似物、作为甜味剂的蔗糖、作为防腐剂的 4-羟基苯甲酸甲酯和 4-羟基苯甲酸丙酯、染料以及例如樱桃或甜橙香精的调味剂。当然,用于制备任何单位剂型的任何物质均应是药物纯级的并且以所用量应用时基本无毒。此外,所述类似物可以被掺入到持续释放的制品和制剂中。

[0147] 优选地,所述药物组合物可进一步包括用于使酸水解最小化的适合的缓冲剂。适合缓冲剂是本领域技术人员所公知的,并且包括但不限于磷酸盐、柠檬酸盐、碳酸盐及它们的混合物。

[0148] 可以对本发明的化合物和/或药物组合物进行单次或多次给药。本领域技术人员能够利用常规实验来确定本发明的化合物和/或组合物的有效且无毒的剂量水平,以及适合用于治疗所述化合物和组合物适用的疾病和/或感染的给药模式。

[0149] 此外,对于本领域普通技术人员来说显而易见的是,可以使用疗法确定试验的常规疗程来确定疗法的最佳疗程,例如在确定天数内每天给予的本发明的化合物或组合物的剂量数。

[0150] 通常,每 24 小时的有效剂量范围可为约 0.0001mg- 约 1000mg/kg 体重;例如,约 0.001mg- 约 750mg/kg 体重;约 0.01mg- 约 500mg/kg 体重;约 0.1mg- 约 500mg/kg 体重;约 0.1mg- 约 250mg/kg 体重;或者约 1.0mg- 约 250mg/kg 体重。更合适地,每 24 小时的有效剂量范围可为约 1.0mg- 约 200mg/kg 体重;例如,约 1.0mg- 约 100mg/kg 体重;约 1.0mg- 约 50mg/kg 体重;约 1.0mg- 约 25mg/kg 体重;约 5.0mg- 约 50mg/kg 体重;约 5.0mg- 约 20mg/kg 体重;或者约 5.0mg- 约 15mg/kg 体重。

[0151] 或者,有效剂量最高可到约 500mg/m²。例如,预期的有效剂量范围通常为约 25- 约

500mg/m²、约 25- 约 350mg/m²、约 25- 约 300mg/m²、约 25- 约 250mg/m²、约 50- 约 250mg/m² 和约 75- 约 150mg/m²。

[0152] 在另一个实施方案中,具有式 (I) 的化合物可以下述剂量范围给药,即约 100- 约 1000mg/ 天,例如约 200- 约 750mg/ 天、约 250- 约 500mg/ 天、约 250- 约 300mg/ 天或者约 270- 约 280mg/ 天。

[0153] 本发明的化合物可作为治疗方案的一部分与其他药物一起给药。合乎需要的是给予活性化合物的结合物来例如治疗具体的疾病或病症。因此,在本发明的范围之内的是,可将两种或多种药物组合物——其中至少一种含有本发明的具有式 (I) 的化合物——联合成为适合用于共同给予所述组合物的试剂盒形式。

[0154] 现在将参考下述实施例仅通过举例说明的方式更加详细地描述本发明。所述实施例意在用于举例说明本发明,并且不应被理解为限制本说明书通篇中所描述的公开内容的一般性。

[0155] 实施例

[0156] 实施例 1——(S)-青霉胺-氧化砷(“PENAO”)的制备及效力材料和方法

[0157] (S)-青霉胺-氧化砷的合成及纯化：

[0158] 将对氨基苯腓酸(10g, 46.07mmol)溶于 1.18M Na₂CO₃ 溶液中,所述 Na₂CO₃ 溶液是通过将 Na₂CO₃(15g, 141.5mmol)溶于盛于 500mL 圆底烧瓶中的 H₂O(120mL)中制备的。将所述溶液在 4℃ 冰箱中冷却 2 小时,然后置于磁力搅拌器上的冰浴中。将溶于 CH₂Cl₂(14mL)中的溴乙酰溴(9mL, 101.4mmol)溶液分 4 等份加入到所述烧瓶中,同时剧烈搅拌所述混合物。加入耗时 1 分钟,同时伴有 CO₂ 释放。将所述混合物在冰浴中搅拌 5 分钟,然后在室温下搅拌 30 分钟直至 CO₂ 释放停止。将所述混合物倾注至 250mL 分液漏斗中。额外加入 CH₂Cl₂(10mL),并且使层分离约 10 分钟。分离所述 CH₂Cl₂ 层并且将所述水层置入 400mL 烧杯中。搅拌所述溶液并且用 98% H₂SO₄(2.8mL) 将其酸化至 pH 4。通过过滤收集所获得的白色沉淀(14.83g, 产率 95%)。将所得的 4-(2-溴乙酰基氨基)-苯腓酸(“BRAO”)(14.83g, 43.88mmol)溶于盛于 500mL 三口圆底烧瓶内的 1 : 1HBr/MeOH(210mL)中。加入 NaI(5mg)并且搅拌所述混合物。以约 2 个气泡 / 秒的速率冒泡通入 SO₂, 10 分钟后开始形成白色沉淀。再冒泡通入 SO₂ 20 小时,并且以中等速度搅拌所述混合物。通过过滤收集所述固体,将其用所述滤液冲洗,然后用水冲洗(30mL × 3),并且将其置于 50℃ 的旋转蒸发器上 5 小时以产生 4-(2-溴乙酰基氨基)-苯亚腓酸(6.04g, 产率 38.8%)。将一部分 4-(2-溴乙酰基氨基)-苯亚腓酸(500mg, 1.553mmol)溶于通入氮气的 DMSO(10mL)中,并且将其在约 1 分钟内逐滴加入至溶于 NaHCO₃(840mg, 10mmol)水溶液的 S-青霉胺(265mg, 1.77mmol)溶液中,所述 NaHCO₃ 水溶液使用氮气饱和的 H₂O(20mL)。所述加入是在 100mL 圆底烧瓶中进行的,并且在氩气气氛下,将所述澄清溶液以低速搅拌 4 小时。将所述溶液用 98% H₂SO₄(约 0.2mL)酸化至 pH 5。对丙酮(500mL)进行剧烈搅拌,并且在约 5 分钟的时间内逐滴加入所述酸化的溶液以产生白色沉淀。离心并倒出上清液,将所得白色固体用丙酮(20mL × 2)进一步清洗并且再次离心,用丙酮(40mL)转移至 100mL 梨形烧瓶中并且在 25℃ 下在旋转蒸发器上干燥 2 小时。利用内标 ¹H-NMR 发现青霉胺-氧化砷粗产品的纯度为约 30%。

[0159] 将(S)-青霉胺-氧化砷粗产品(100.2mg, 0.077mmol, 纯度为 30%)溶于氮气饱和的 H₂O(2.5mL)中,并且用低压液相色谱系统加以纯化。所使用的条件为内径为 1.25cm 的

30cm 柱、以氮气饱和的 H_2O 作为运行缓冲液、Biogel P-2 树脂且速率为 0.25mL/ 分钟。将第二个峰收集到 50mL Falcon 管中,用液氮冷冻,冷冻干燥 3 天,并且置入干燥器中 1 天以产生干燥的纯 (S)-青霉胺-氧化砷 (20.3mg, 0.052mmol)。使用更多的青霉胺-氧化砷粗产品 (总计 696mg) 重复进行该过程,并且这样产生纯化的 (S)-青霉胺-氧化砷 (114mg, 产率为 26.5%)。通过 MS、 ^1H -NMR 和 2D NMR 确认 (S)-青霉胺-氧化砷的结构 (图 1)。利用砷活性测定测得所获得纯度为 90%。主要杂质为水,因为终产物极其吸湿。(S)-青霉胺-氧化砷的分子量为 390.28g/ 摩尔。

[0160] ^1H -NMR (300MHz, D_2O) : δ 1.32 (s, 3H)、1.53 (s, 3H)、3.55 (d, $J = 3.4\text{Hz}$, 2H)、3.63 (s, 1H)、7.52 (d, $J = 8.3\text{Hz}$, 2H)、7.68 (d, $J = 8.3\text{Hz}$, 2H)。质子 NMR 谱 (图 2) 是使用 Bruker 双通道探针 NMR 波谱仪记录的。快速酮-烯醇互变异构以及随后的氘置换导致 1 小时后出现在 δ 3.5518 处的双峰丢失。这可以使用时间依赖性的 NMR 来监测。

[0161] ^{13}C -NMR (D_2O) : δ 23.15、26.83、33.12、46.75、61.36、121.62、130.04、139、144、170。

[0162] (S)-青霉胺-氧化砷的结构也可以通过 HMBC 实验 (2D ^1H - ^{13}C 多键耦合,参见图 3) 来确认。

[0163] MS :m/z 413.011678 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ ($\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{SO}_5\text{N}_2\text{AsNa}$ 要求 413.012285)。

[0164] (图 4)

[0165] 青霉胺-肿酸的合成

[0166] 将对氨基苯肿酸 (10g, 46.07mmol) 溶于 1.18M Na_2CO_3 溶液中,所述 Na_2CO_3 溶液是通过将 Na_2CO_3 (15g, 141.5mmol) 溶于盛于 500mL 圆底烧瓶内的 H_2O (120mL) 中制备的。将所述溶液在 4°C 冰箱中冷却 2 小时,然后置于磁力搅拌器上的冰浴中。将溶于 CH_2Cl_2 (14mL) 中的溴乙酰溴 (9mL, 101.4mmol) 溶液分 4 等份加入到所述烧瓶中,同时剧烈搅拌所述混合物。加入耗时 1 分钟,同时伴有 CO_2 释放。将所述混合物在冰浴中搅拌 5 分钟,然后在室温下搅拌 30 分钟直至 CO_2 释放停止。将所述混合物倾注至 250mL 分液漏斗中。额外加入 CH_2Cl_2 (10mL),并且使层分离约 10 分钟。分离所述 CH_2Cl_2 层并且将所述水层置入 400mL 烧杯中。搅拌所述溶液并且用 98% H_2SO_4 (2.8mL) 将其酸化至 pH 4。通过过滤收集所得的白色沉淀 4-(2-溴乙酰基氨基)-苯肿酸 (“BRAO”) (14.83g, 产率 95%)。

[0167] 将一部分 4-(2-溴乙酰基氨基)-苯肿酸 (500mg, 1.479mmol) 溶于 NaHCO_3 水溶液 (420mg, 4.999mmol, 溶于 10mL 水中) 中,并且将其在约 1 分钟内逐滴加入至溶于 NaHCO_3 水溶液 (640mg, 7.618mmol, 溶于 15mL 水中) 的 (S)-青霉胺 (265mg, 1.77mmol) 溶液中。所述加入是在 100mL 圆底烧瓶中进行的,并且将所述澄清溶液以低速搅拌 4 小时。将所述溶液用 98% H_2SO_4 (约 0.25mL) 酸化至 pH5。对 1 : 1 的丙酮 : 乙醇溶液 (500mL) 进行剧烈搅拌,并且在约 5 分钟的时间内逐滴加入所述酸化的溶液以产生白色沉淀。离心并倒出上清液,将所得白色固体用 1 : 1 的丙酮 : 乙醇 (25mL $\times$ 2) 进一步清洗并且再次离心,用 1 : 1 的丙酮 : 乙醇 (50mL) 转移至 100mL 梨形烧瓶中并且在 25°C 下在旋转蒸发器上干燥 2 小时。利用内标 ^1H -NMR 分光术发现所得的 (S)-青霉胺-肿酸的纯度为约 44%,并且直接使用而未进行进一步纯化 (1.022g, 产率为 75%)。通过 MS、 ^1H -NMR 和 2D NMR 确认 (S)-青霉胺-肿酸的结构。主要杂质为水,因为终产物极其吸湿。分子量为 406.28g/mole。

[0168] GSAO 的制备如前文所述 (Don et al., 2003)。

[0169] 通过将三氧化二砷固体 (Sigma, St. Louis, MO) 溶于去氧水制备的 3M NaOH 中来制备 1M 的三氧化二砷溶液。将所述溶液用去氧水稀释 10 倍, 使用 HCl 将 pH 调整至 7.0 并且于 4℃ 下贮藏在气密容器中直至使用。

[0170] 砷测定

[0171] 将 (S)-青霉胺-氧化砷溶于滴定缓冲液中, 无菌过滤, 并且通过用二巯基丙醇滴定和用 5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸) 计算残余的游离巯基来测定浓度。将所述溶液在 4℃ 下避光保存直至使用。当在这些条件下贮藏时, 所述砷化物储液的活性浓度至少在一个月没有明显损失。

[0172] 线粒体膨胀测定

[0173] 线粒体是按照前文所述 (Dilda et al., 2005a; Don et al., 2003) 使用差速离心从约 250g 雄性 Wister 大鼠的肝脏中分离的。将最终的线粒体沉淀重悬于 pH 7.0 的含有 213mM 甘露醇、71mM 蔗糖和 10mM 琥珀酸钠的 3mM HEPES-KOH 缓冲液中, 浓度为 30mg 蛋白/mL。通过在 25℃ 下将所述肝脏线粒体以 0.5mg 蛋白/mL 的浓度悬浮于 pH 7.0 的含有 75mM 甘露醇、250mM 蔗糖、10mM 琥珀酸钠和 2 μM 鱼藤酮的 3mM HEPES-KOH 缓冲液中通过分光光度法评估线粒体通透性转变诱导。通过使用 SpectraMax Plus 酶标仪 (Molecular Devices, Palo Alto, CA) 监测 520nm 处的相关光散射的降低来测量膨胀。

[0174] 细胞培养

[0175] BAE 细胞来自 Cell Applications, San Diego, CA, BxPC-3、HT1080、LLC、PANC-1、MCF-7、HCT116 和 K562 细胞来自 ATCC, Bethesda, MD。NB4 和 MDCK2 细胞来自 Shane Supple (Kanematsu Laboratories, Royal Prince Alfred Hospital, Sydney, Australia) 和 P. Borst (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands)。将 BAE、HT1080、Panc-1、MCF-7、HCT116、MDCK2 和 LLC 细胞在 DMEM 中培养。将 NB4、K562 和 BxPC-3 细胞在 RPMI 培养基中培养。给所述细胞补加 10% 胎牛血清 (FBS)、2mM L-谷氨酰胺和 1U/mL-1 青霉素/链霉素。细胞培养的塑料器具来自 Techno Plastic Products (Trasadingen, Switzerland)。所有其他细胞培养试剂均来自 Gibco (Gaithersburg, MD)。

[0176] 细胞增殖和生存力测定

[0177] 将 BAE、NB4、K562、MDCK2、HT1080、LLC、HCT116、Panc-1、MCF-7 和 BxPC-3 细胞分别以 1.5×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^2 、 2×10^3 、 5×10^2 、 5×10^2 、 6×10^3 、 6×10^3 和 1×10^4 细胞/孔的密度接种到 96 孔板中。使粘附细胞粘附过夜。然后将它们在含有 10% 胎牛血清和 (S)-青霉胺-氧化砷的培养基中培养 72 小时。活细胞是通过用四唑盐 MTT (Sigma, St. Louis, MO) 孵育细胞来测定的, 所述四唑盐 MTT 会被活细胞代谢形成不可溶的紫色甲晶体。加入 DMSO 以溶解细胞, 将孔中的内含物匀浆并且测量 550nm 处的吸光度。将未处理的对照中的细胞数目标准化为 100%, 并且将所有处理的活细胞数目表达为对照的百分数。(S)-青霉胺-氧化砷的细胞毒性作用是通过使用碘化丙啶的流式细胞术测定的。将 BAE 细胞以 5×10^4 细胞/孔的密度接种到 12 孔板中, 使其粘附过夜, 然后使用 GSAO 处理 48 小时。将粘附细胞用胰蛋白酶/EDTA 脱附, 并且与含有已经在处理过程中脱附的细胞的生长培养基合并。使合并的细胞沉淀, 重悬于 0.5mL 含有 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 碘化丙啶 (Molecular Probes, Eugene, OR) 的无血清培养基中, 并且利用流式细胞术进行分析。

[0178] (S)-青霉胺-氧化砷流

[0179] 将 BAE 细胞以 1.5×10^6 个细胞的密度接种到培养皿中,并且使其粘附过夜。将细胞在 37°C 下用 $50 \mu\text{M}$ (S)-青霉胺-氧化砷分别孵育不同时间(最长为 2 小时),然后用冰冷的 PBS 冲洗三次。将经冲洗的细胞用 1mL 70% w/w 硝酸裂解。然后将培养皿用 1mL 的 PBS 冲洗两次并且保持在 4°C 下直至使用。将样品稀释 10 倍,并且使用 Elan 6100 电感耦合等离子体光谱仪(Perkin Elmer Sciex Instruments, Shelton, CT) 分析砷原子。

[0180] 有机阴离子转运多肽(OATP)研究。将 75,000 个 BAE 细胞接种到含有 DMEM 和 10% 胎牛血清的 6 孔板中并且使其粘附过夜。将细胞使用或未使用 $500 \mu\text{M}$ 4,4'-二异硫氰基苯-2,2'-二磺酸(DIDS)预处理 30 分钟,然后将其用 $20 \mu\text{M}$ (S)-青霉胺-氧化砷在 37°C 下在 5% CO_2 中孵育 2 小时。然后将细胞用冰冷的 PBS 冲洗两次,并且用 70% 硝酸裂解。细胞砷水平通过 ICPMS 测定。

[0181] 将 5000 个 BAE 细胞接种到含有 DMEM 和 10% 胎牛血清的 96 孔板中并且使其粘附过夜。将该细胞使用或未使用 $300 \mu\text{M}$ DIDS 预处理 30 分钟,然后将其用 $1.5 \mu\text{M}$ (S)-青霉胺-氧化砷在 37°C 下在 5% CO_2 中孵育 24 小时。细胞生存力使用 MTT 测定。

[0182] 药物转运蛋白转染子。已经描述了 Madin-Darby 犬肾 II(MDCKII) 极化上皮细胞系的转染子——过表达多药耐药相关蛋白(MRP)1、2 或 3(Evers et al., 2000; Kool et al., 1999),以及过表达人 MDR1 或 BCRP 的 MEF/MDR1 克隆 H4(Dilda et al., 2005b)。使细胞在含有 10% 小牛血清(CosmicTM, Hyclone, Tauranga, New Zealand)、 $100 \mu\text{g/mL}$ 青霉素和 $60 \mu\text{g/mL}$ 链霉素的 DMEM 生长并且保持粘附单层形式。按照前人所述(Allen et al., 1999) 进行细胞毒性测定。

[0183] 原发性肿瘤生长测定。使用 7-9 周龄的雌性 Balb C 裸鼠(UNSW Biological Resource Centre)。将小鼠分组饲养,每组 3-5 只小鼠,饲养条件为:12 小时昼夜循环、不限量给予动物食物和水。将溶于 0.2mL PBS 的 2×10^6 个 BxPC-3 细胞的悬液经皮下注射到近中线处。使肿瘤形成并且生长到大小为约 50mm^3 ,之后将它们随机分为 4 组。使用关系式 $\text{长} \times \text{高} \times \text{宽} \times 0.523$ 来计算肿瘤体积。使用公式 $T_d = 0.693 / \ln(V_F/V_I)$ 由指数生长过程中的肿瘤生长速率曲线计算肿瘤体积倍增时间(T_d),其中 V_F 为最终的肿瘤体积而为 V_I 为初始时肿瘤体积(Wolff et al., 2004)。给动物的胁腹中皮下植入 28 天 alzet 型 1004 微型渗透压泵(ALZA Corporation, Palo Alto, CA)。所述泵递送剂量为 0.25、0.5 或 1mg/kg/天 的溶于 100mM 甘氨酸的 (S)-青霉胺-氧化砷。每 2 或 3 天测量肿瘤体积和动物体重。

[0184] 统计学分析

[0185] 结果表示为平均值 $\pm$ SD。所有具有统计学显著性的检验均为双侧的,并且认为 P 值 < 0.05 为具有统计学显著性。

[0186] 结果和讨论

[0187] (S)-青霉胺-氧化砷抑制哺乳动物细胞的增殖

[0188] 报道的 GSAO 诱导的对牛主动脉内皮细胞(BAE)的增殖抑制和生存力丧失的 IC_{50} 值分别为 $10 \mu\text{M}$ 和 $75 \mu\text{M}$ (Dilda et al., 2005a; Don et al., 2003)。与 GSAO 对 BAE 细胞增殖抑制的 IC_{50} 为 $10 \mu\text{M}$ 相比,(S)-青霉胺-氧化砷的 BAE 细胞增殖抑制的 IC_{50} 为 $0.4 \mu\text{M}$ (图 5),而生存力丧失的 IC_{50} 值为 $3.5 \mu\text{M}$ (图 6)。因此,(S)-青霉胺-氧化砷在阻断内皮细胞的增殖和降低其生存力方面比 GSAO 更有效约 25 倍。

[0189] (S)-青霉胺-氧化砷是内皮细胞而非肿瘤细胞的选择性抑制剂。对内皮细胞和

上皮细胞与八种不同肿瘤细胞系相比的增殖抑制的 IC₅₀ 的比较示出于表 1 中。与内皮细胞相比,所有测试的肿瘤细胞对 (S)-青霉胺-氧化砷的抗性均高 1.6-30 倍。BAE 细胞对 (S)-青霉胺-氧化砷的敏感度还比肾上皮细胞高 5.6 倍。(S)-青霉胺-氧化砷在作用于 APL 细胞时与三氧化二砷等价,而 GSAO 的活性低约 10 倍 (图 7)。

[0190] 表 1. (S)-青霉胺-氧化砷对各种细胞系增殖抑制的 IC₅₀

[0191]

细胞类型	细胞系	IC ₅₀ , μM
牛主动脉内皮细胞	BAEC	0.43
人急性早幼粒细胞白血病	NB4	0.70
人慢性粒细胞白血病	K562	1.4
狗肾上皮细胞	MDCK2	2.4
人纤维肉瘤	HT1080	4.0
人肺癌	LLC	5.0
人结肠直肠癌	HCT1116	6.0
人胰腺癌	PANC-1	6.5
[0192] 人乳腺癌	MCF-7	9.0
人胰腺癌	BxPC-3	13

[0193] (S)-青霉胺-氧化砷在诱导线粒体通透性转变方面也比 GSAO 更有效。与 GSAO 类似,(S)-青霉胺-氧化砷以时间和浓度依赖性方式触发分离的大鼠肝脏线粒体的膨胀 (图 8)。与 GSAO 相比,(S)-青霉胺-氧化砷使分离的线粒体发生半最大膨胀的时间快约 4 倍。

[0194] 不希望受限于任何特定理论,(S)-青霉胺-氧化砷与 GSAO 相比抗增殖活性增加的一种可能机制是在细胞中的积累增加。该理论可以通过下述方法来测试,即通过测量砷的细胞积累来比较内皮细胞对这两种化合物的摄取。(S)-青霉胺-氧化砷在 BAE 细胞中的积累速率比 GSAO 快大约 70 倍 (图 9)。GSAO 和 (S)-青霉胺-氧化砷的初始积累速率分别为 1 和 69pmol/10⁶ 细胞 / 分钟。

[0195] OATP 参与跨质膜的 (S)-青霉胺转运

[0196] DIDS 是质膜有机阴离子转运多肽 (OATP) 的一种抑制剂 (Kobayashi et al., 2003)。该化合物抑制 BAE 细胞中的 (S)-青霉胺-氧化砷摄取 (图 10A) 并且降低其抗增殖活性 (图 10B),这一发现意味着该转运蛋白参与这些细胞对 (S)-青霉胺-氧化砷的摄取。

[0197] (S)-青霉胺-氧化砷由 MRP1 和 2 输出细胞

[0198] MRP1/2 介导 GSAO 从 BAE 细胞中输出 (Dilda et al., 2005b)。青霉胺-氧化砷也是 MRP1/2 的底物。在存在 MRP1/2 抑制剂 4H10 和 MK-571 的情况下,有更多的 (S)-青霉胺-氧化砷积累到 BAE 细胞中 (图 11A),这与更加有力的抗增殖作用相关 (图 11B)。所述抑制剂单独时对 BAE 细胞增殖没有影响 (数据未示出)。

[0199] 测试了过表达 MRP 1、2、3 或 6 或者 MDR1 或 BCRP 的哺乳动物细胞对 (S)-青霉

胺-氧化砷的抗性。MRP1、MRP2 或 MRP3 均在犬肾上皮细胞 MDCKII 细胞系中过表达,而 MRP6、MDR1 或 BCRP 均在鼠类胚胎成纤维细胞 MEF3.8 系中过表达。使细胞与所示浓度的 (S)-青霉胺-氧化砷接触 96 小时,测量活细胞数并以未处理细胞数的相对值进行表示。以 (S)-青霉胺-氧化砷对未转染母体细胞的增殖抑制的 IC_{50} 的相对值计算抗性因子。

[0200] 表 2. 过表达不同药物转运蛋白的哺乳动物细胞对 (S)-青霉胺-氧化砷的抗性
[0201]

转运蛋白	抗性因子
MD/MRP1	3.7
MD/MRP2	4.6
MD/MRP3	0.8
MEF/MRP6	1.3
MEF/MDR1	1.2
MEF/BCRP	1.1

[0202] 这些结果表明 GSAO 和 (S)-青霉胺-氧化砷均由 MRP1/2 从 BAE 细胞中输出。

[0203] 使用谷胱甘肽处理 BAE 细胞降低了 GSAO 对 BAE 细胞增殖的抑制,而使用丁硫氨酸亚砷亚胺 (BSO) (一种 γ -谷氨酰半胱氨酸合酶的抑制剂) 阻断谷胱甘肽从头合成可增强增殖抑制达几乎 100 倍 (Dilda et al., 2005b)。这些结果表明 MRP1/2 需要细胞谷胱甘肽来从细胞中有效转运 GSAO。与所述使用 GSAO 的发现类似,使用 BSO 处理 BAE 细胞增强了 (S)-青霉胺-氧化砷对增殖抑制的 IC_{50} 达到约 25 倍 (图 12)。

[0204] 这些结果表明 (S)-青霉胺-氧化砷是一种更为有效的内皮细胞抑制剂,因为它在所述细胞中的积累速率比 GSAO 快得多。

[0205] (S)-青霉胺-氧化砷的抗肿瘤活性

[0206] 给在近中线处携带有皮下人 BxPC-3 胰腺癌肿瘤的 BalbC 裸鼠的胁腹中皮下移植 28 天微型渗透压 alzet 泵。所述泵递送剂量为 0.25、0.5 或 1mg/kg/ 天的 (S)-青霉胺-氧化砷。BxPC-3 肿瘤的生长在接受 (S)-青霉胺-氧化砷的小鼠中明显受到抑制 (图 13)。对于以载体 (100mM 甘氨酸) 或者 0.25、0.5 和 1mg/kg/ 天的 (S)-青霉胺-氧化砷处理的组,肿瘤倍增时间分别为 9.2、8.3、13.9 和 16.2 天。

[0207] 与 (S)-青霉胺-氧化砷处理的动物相比,载体处理的动物的体重没有变化 (未示出)。在给予最高剂量的动物中,在所述泵递送部位有某种程度的皮肤毒性。在 10 只小鼠中有 3 只小鼠在所述递送部位有皮肤坏死,而在 1 只小鼠中存在结缔组织的积累。在给予较低剂量 (S)-青霉胺-氧化砷的偶见小鼠的所述递送部位处,存在某些结缔组织积累的证据。

[0208] 实施例 2-4-(N-(S-半胱氨酰乙酰基)氨基)-苯基卑肿酸 (“CAO”) 的制备和效力

[0209] 材料和方法

[0210] 细胞增殖测定

[0211] 牛主动脉内皮 (BAE) 细胞来自 Cell Application (San Diego, CA)。将 BAE 细胞在补加有 10% 胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺和 5 个单位 /mL 青霉素和链霉素的 DMEM (Gibco,

Gaithersburg, MD) 中培养。将细胞在 37℃ 下在 5% CO₂、95% 空气的气氛中培养。将 BAE 细胞接种到 96 孔板中 (5,000 个细胞每孔) 的 0.2ml 培养基中。生长 24 小时后,将所述培养基更换为补加有 GSAO、CAO 或 4H10 的新鲜培养基,并且将细胞再培养 24、48 或 72 小时。使用四唑盐 MTT (Sigma, St. Louis, MO) 按照生产商的说明书测定活的粘附细胞。结果表达为未处理对照的百分数。

[0212] CAO 的制备

[0213] 按照前人所述 (WO 01/21628) 利用 HPLC 生产 GSAO, 纯度 > 94%。50mM GSAO 溶液是通过将 GSAO 固体溶解于 pH 7.0 的含有 0.14M NaCl、20mM 甘氨酸和 1mM EDTA 的 20mM Hepes 缓冲液中制备的。4-(N-(S-半胱氨酰甘氨酰乙酰基)氨基)-苯基卑肿酸是通过用羊肾 γ -谷氨酰转肽酶 I 型 (Sigma, 产品号 G8040) 从 GSAO 上切割 γ -谷氨酰基团来产生的 (图 14)。将 10mM GSAO 溶液与溶于 pH 7.4 的含有 40mM 双甘氨酸的缓冲液中的 0.55 个单位/ml γ GT 在 30℃ 下孵育 1 小时。通过使用 YM3Microcon 膜 (Millipore, Billerica, MA) 过滤来从反应体系中移除 γ GT。

[0214] 4-(N-(S-半胱氨酰乙酰基)氨基)-苯基卑肿酸 (“CAO”) 是通过使用猪肾氨肽酶 N (IV-S 型, Sigma, 产品号 L5006) 从 4-(N-(S-半胱氨酰甘氨酰乙酰基)氨基)-苯基卑肿酸上切割甘氨酸来产生的 (图 14)。将所述滤液与 2 个单位/ml 氨肽酶 N 在 37℃ 下孵育 1 小时。通过使用 YM3Microcon 膜 (Millipore) 过滤来从反应体系中移除氨肽酶 N。CAO 的浓度可以通过以下方法来测量,即使用二巯基丙醇滴定并且使用 5,5'-二硫双 (2-硝基苯甲酸) 计算残余的游离巯基 (Don et al., 2003)。对经滴定的溶液进行无菌过滤并且在 4℃ 下避光贮藏直至使用。

[0215] HPLC 分析

[0216] GSAO 和 CAO 可通过 HPLC 来表征 (1200 系列; Agilent Technologies, Santa Clara, CA)。将样本在使用乙腈-水 (25 : 75vol/vol) 流动相的 Zorbax Eclipse XDB-C18 柱 (4.6×150mm, 5 μ m; Agilent Technologies) 解析, 流速为 0.5ml/分钟, 并且监测 256nm 处的吸光度 (图 15)。

[0217] GSAO 和 CAO 在 BAE 细胞中的积累

[0218] 根据实验类型, 1.6×10^6 或 7.5×10^5 个 BAE 细胞分别接种到培养皿或 6 孔板中, 并且粘附过夜。更换培养基, 并且在不存在或存在阿西维辛或 4H10 的情况下将所述细胞孵育 30 分钟。然后, 将所述细胞用 50 或 100 μ M GSAO 或 CAO 孵育 30 分钟或 4 小时。然后将细胞用冰冷的 PBS 冲洗两次, 并且用 1ml 70% w/w 硝酸裂解。将裂解产物稀释 30 倍, 并且使用 Elan 6100 电感耦合等离子体光谱仪 (Perkin Elmer Sciex Instruments, Shelton, CT) 分析砷原子。

[0219] 线粒体膨胀测定

[0220] 线粒体是按照前人所述 (Dilda et al., 2005a) 使用差速离心从约 20g 雌性 BalbC 裸鼠的肝脏中分离的。将最终的线粒体沉淀重悬于 pH 7.0 的含有 213mM 甘露醇、71mM 蔗糖和 10mM 琥珀酸钠的 3mM Hepes-KOH 缓冲液中, 浓度为 30mg 蛋白/mL。通过在 37℃ 下将所述肝脏线粒体以 1mg 蛋白/ml 的浓度悬浮于 pH 7.0 的含有 75mM 甘露醇、250mM 蔗糖、10mM 琥珀酸钠和 2mM 鱼藤酮的 3mM Hepes-KOH 缓冲液中来通过分光光度法评估线粒体通透性转变诱导 (Dilda et al., 2005a)。通过使用分子设备 M2 酶标仪 (Palo Alto, CA) 监测 520nm

处的相关光散射减少来测量膨胀。

[0221] 结果和讨论

[0222] 与 GSAO 相比, CAO 在细胞中积累得更快并且抗增殖活性更高。

[0223] 4-(N-(S-半胱氨酰乙酰基)氨基)-苯基卑肿酸(CAO)是通过对 GSAO 进行酶法切割来产生的,并且测量其在内皮细胞中的积累以及对细胞增殖的作用。4-(N-(S-半胱氨酰甘氨酰乙酰基)氨基)-苯基卑肿酸是通过使用羊肾 γ -谷氨酰转肽酶从 GSAO 上切割 γ -谷氨酰基团来产生的,并且 4-(N-(S-半胱氨酰乙酰基)氨基)-苯基卑肿酸(CAO)是通过使用猪肾氨肽酶 N 从该中间产物上切割氨基酸甘氨酸来产生的(图 14)。利用分子筛过滤将所述反应体系中移除所述酶。

[0224] CAO 在内皮细胞中积累的速率比 GSAO 快约 8 倍(图 16A)。这些代谢产物的细胞积累是细胞摄取速率和输出速率之间的平衡。GSAO 在细胞中的积累受到多药耐药相关蛋白(MRP)1 和 2 的输出速率的控制(Dilda et al., 2005b)。为了测试 CAO 是否也是由 MRP 输出的,测试 MRP-1 抑制剂 4H10 对内皮细胞中积累的影响。当 MRP-1 受到抑制时,CAO 的细胞积累分别增加了约 3 倍(图 16)。这一发现意味着 CAO 在内皮细胞中积累的增加主要是由于摄取速率增加。

[0225] 预期 CAO 在内皮细胞中的较快积累速率会导致抗增殖活性增加。GSAO 和 CAO 在 24、48 和 72 小时测定时的内皮细胞增殖抑制的 IC_{50} 在图 16C 中示出。由该结果显而易见的是, GSAO 的 IC_{50} 随孵育时间而显著降低,而 CAO 的 IC_{50} 随孵育时间的降低要小得多。例如,72 小时的 GSAO 的 IC_{50} 与 24 小时的 CAO 的 IC_{50} 相似。

[0226] CAO 触发线粒体通透性转变。

[0227] 已经证明 GSAO 会使线粒体内膜转运蛋白腺嘌呤核苷酸移位酶(ANT)失活,这会导致增殖抑制和细胞死亡(Don et al., 2003)。CAO 还会诱导线粒体通透性转变(图 17)。

[0228] 参考文献

[0229] Allen, J. D., Brinkhuis, R. F., Wijnholds, J., and Schinkel, A. H. (1999). The mouse Bcrp1/Mxr/Abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res* 59, 4237-4241.

[0230] Dilda, P. J., Decollogne, S., Rossiter-Thornton, M., and Hogg, P. J. (2005a). Para to ortho repositioning of the arsenical moiety of the angiogenesis inhibitor 4-(N-(S-glutathionylacetyl)amino)phenylarsenoxide results in a markedly increased cellular accumulation and antiproliferative activity. *Cancer Res* 65, 11729-11734.

[0231] Dilda, P. J., Don, A. S., Tanabe, K. M., Higgins, V. J., Allen, J. D., Dawes, I. W., and Hogg, P. J. (2005b). Mechanism of selectivity of an angiogenesis inhibitor from screening a genome-wide set of *Saccharomyces cerevisiae* deletion strains. *J Natl Cancer Inst* 97, 1539-1547.

[0232] Don, A. S., Kisker, O., Dilda, P., Donoghue, N., Zhao, X., Decollogne, S., Creighton, B., Flynn, E., Folkman, J., and Hogg, P. J. (2003). A peptide trivalent arsenical inhibits tumor angiogenesis by perturbing mitochondrial function in

angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell* 3,497-509.

[0233] Evens, A. M. , Tallman, M. S. , and Gartenhaus, R. B. (2004). The potential of arsenic trioxide in the treatment of malignant disease :past,present,and future. *Leuk Res* 28,891-900.

[0234] Evers, R. , Kool, M. , Smith, A. J. , van Deemter, L. , de Haas, M. , and Borst, P. (2000). Inhibitory effect of the reversal agents V-104, GF120918 and Pluronic L61on MDR1Pgp-, MRP1-and MRP2-mediated transport. *Br J Cancer* 83,366-374.

[0235] Kobayashi, D. , Nozawa, T. , Imai, K. , Nezu, J. , Tsuji, A. , and Tamai, I. (2003). Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B(SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. *J Pharmacol Exp Ther* 306,703-708.

[0236] Kool, M. , van der Linden, M. , de Haas, M. , Scheffer, G. L. , de Vree, J. M. , Smith, A. J. , Jansen, G. , Peters, G. J. , Ponne, N. , Scheper, R. J. , et al. (1999). MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 96,6914-6919.

[0237] Reiter, A. , Lengfelder, E. , and Grimwade, D. (2004). Pathogenesis, diagnosis and monitoring of residual disease in acute promyelocytic leukaemia. *Acta Haematol* 112,55-67.

[0238] Vey, N. (2004). Arsenic trioxide for the treatment of myelodysplastic syndromes. *Expert Opin Pharmacother* 5,613-621.

[0239] Wolff, N. C. , Randle, D. E. , Egorin, M. J. , Minna, J. D. , and Ilaria, R. L. , Jr. (2004). Imatinib mesylate efficiently achieves therapeutic intratumor concentrations in vivo but has limited activity in a xenograft model of small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 10,3528-3534.

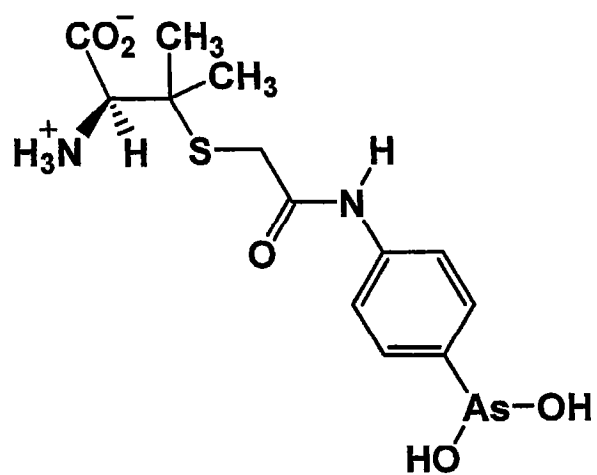


图 1

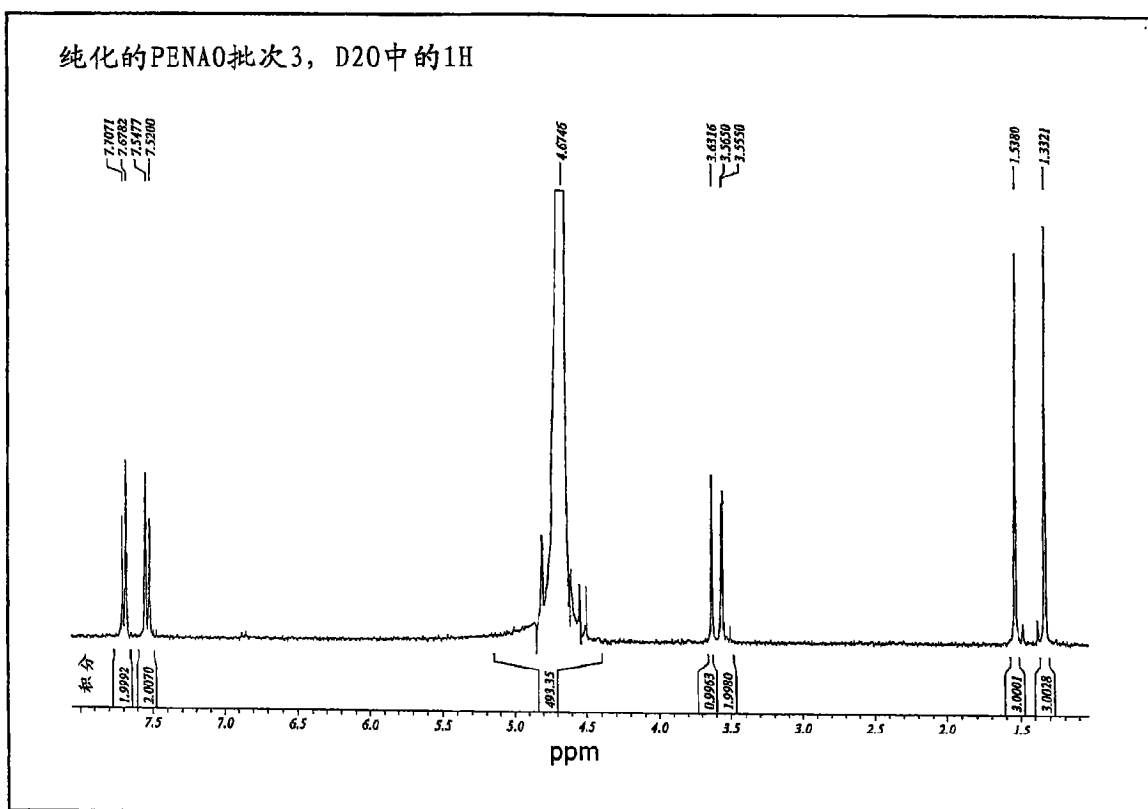


图 2

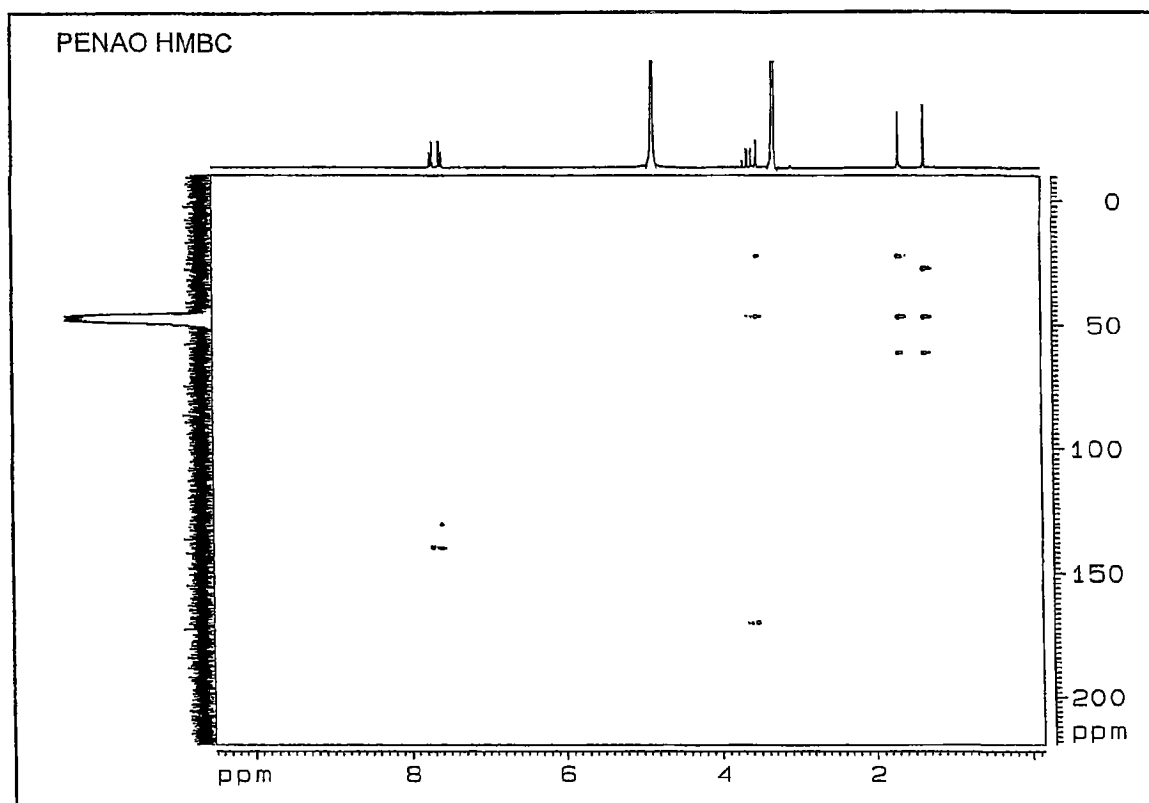


图 3

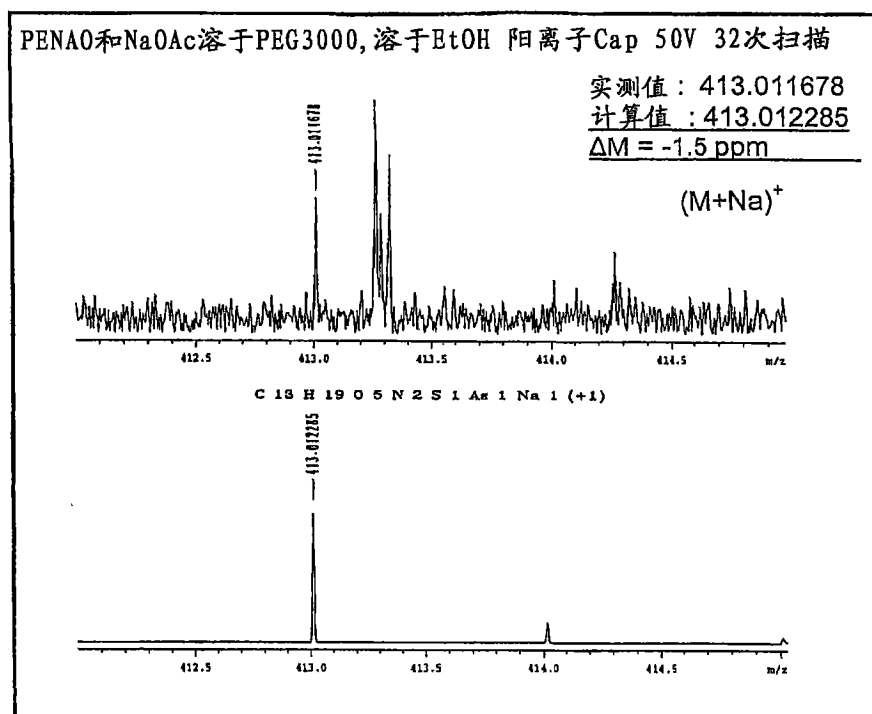


图 4

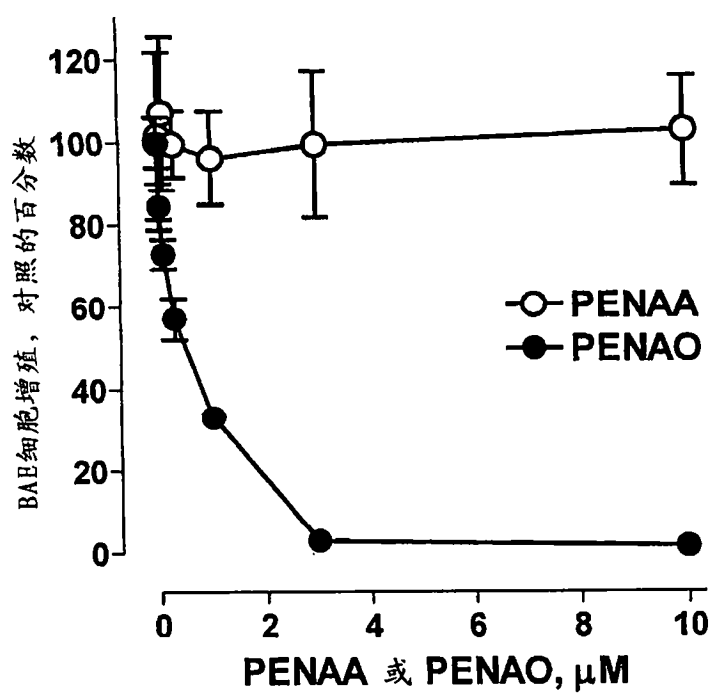


图 5

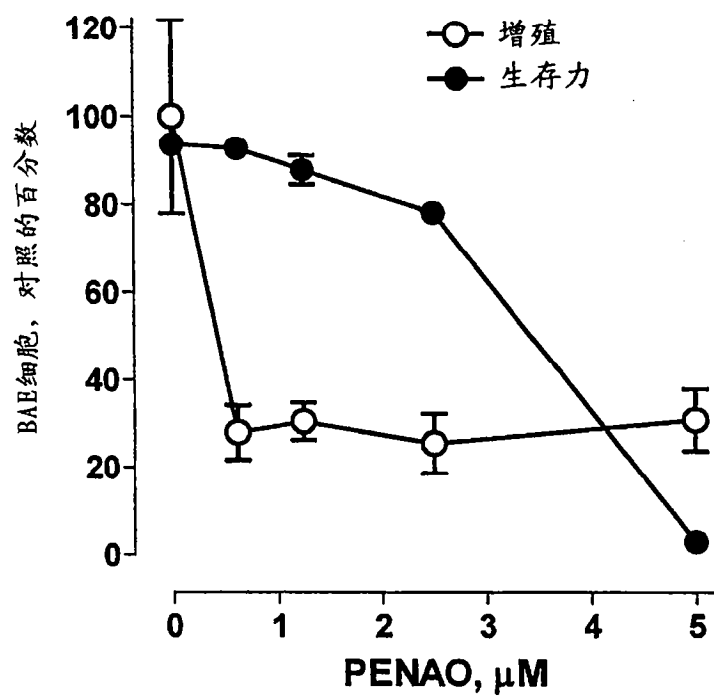


图 6

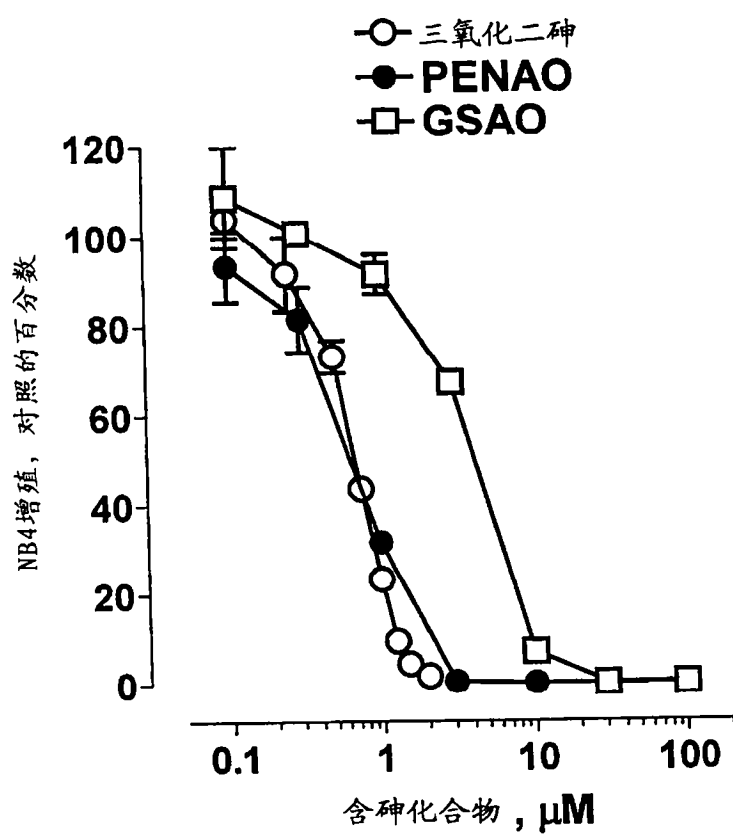


图 7

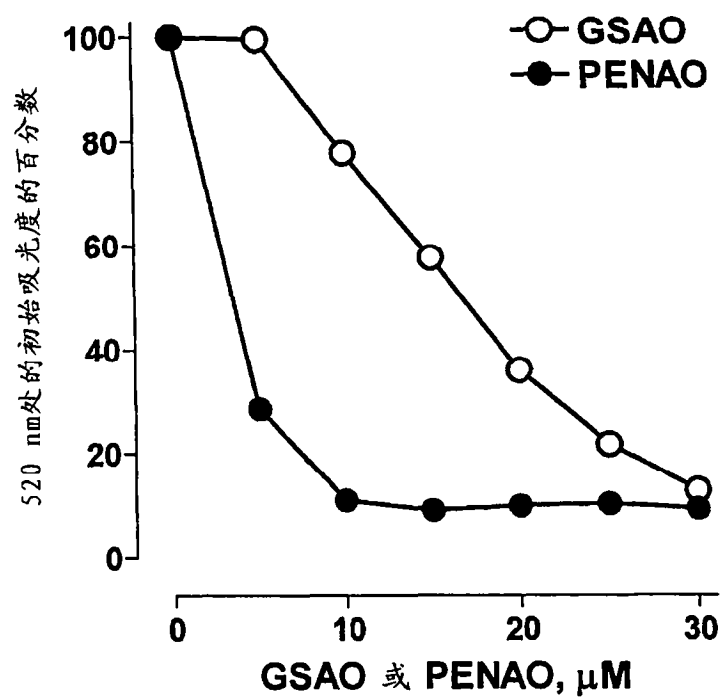


图 8

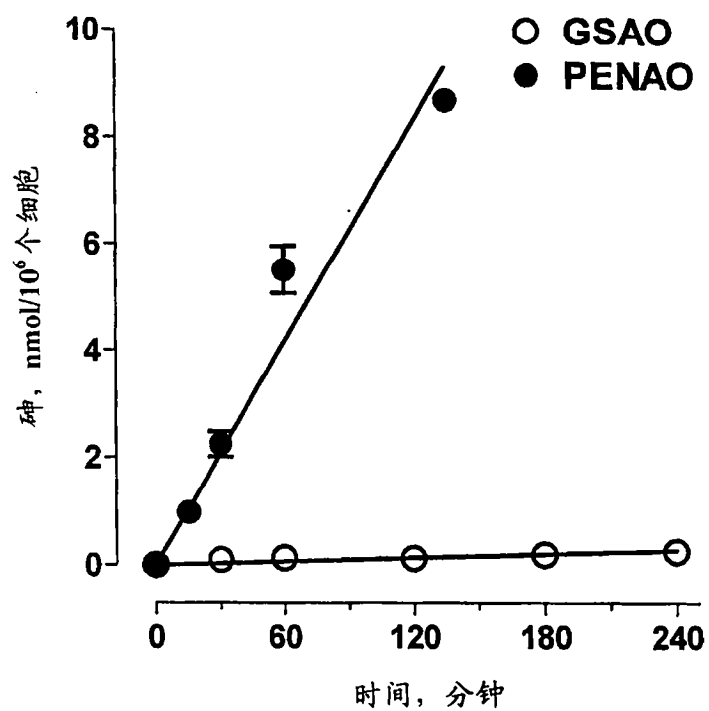


图 9



图 10

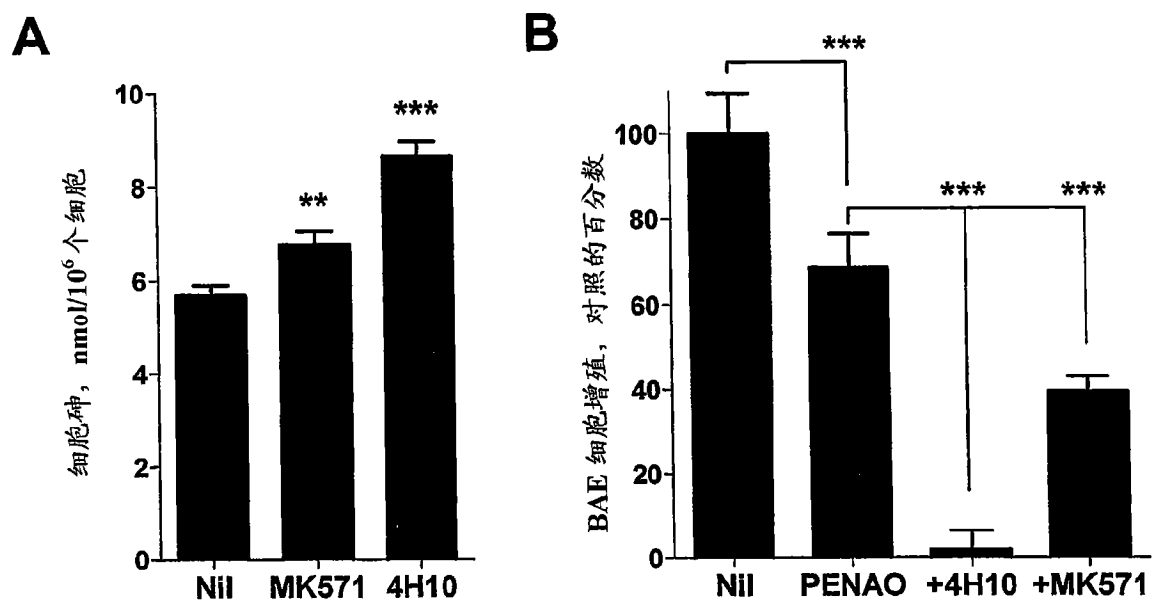


图 11

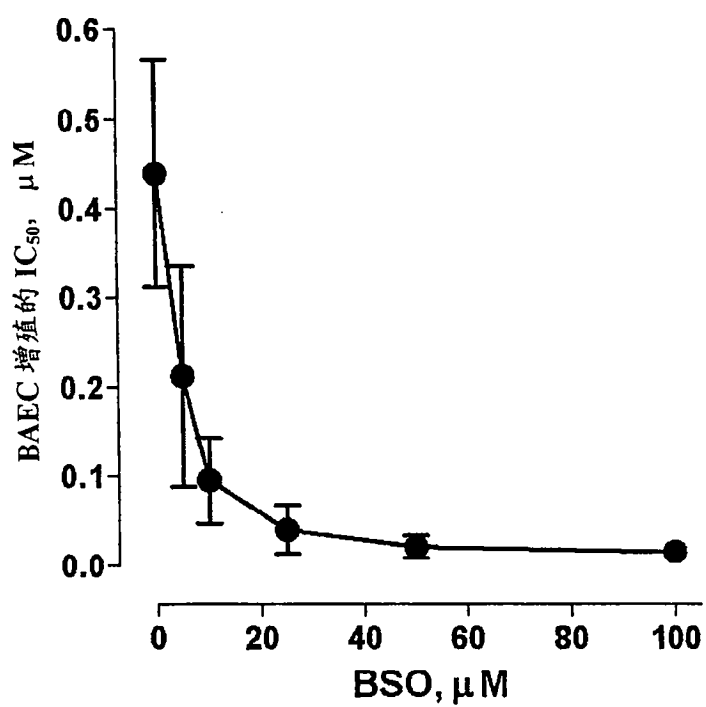


图 12

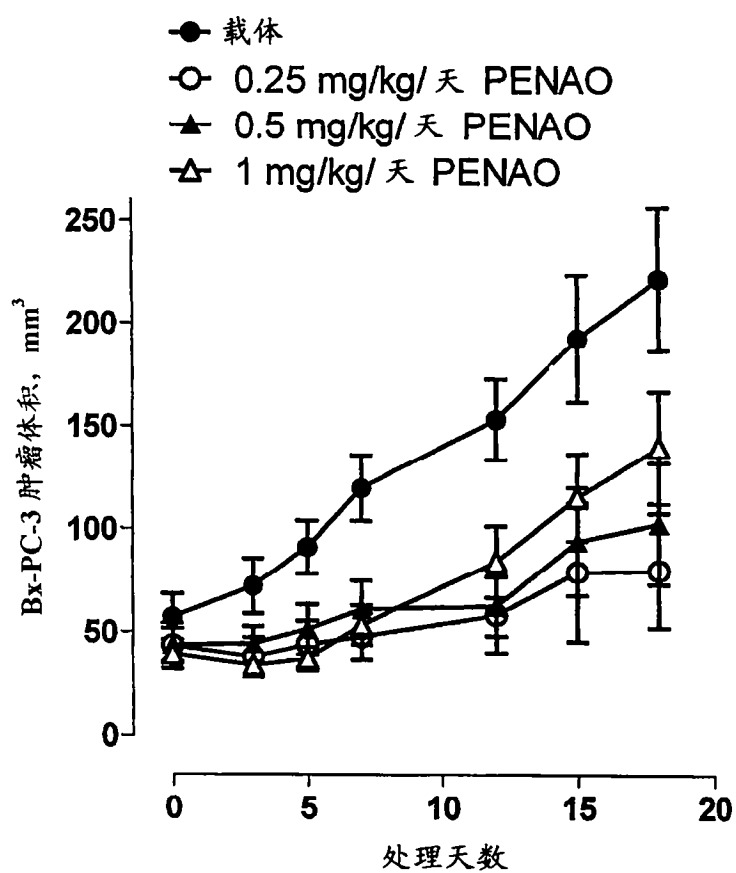


图 13

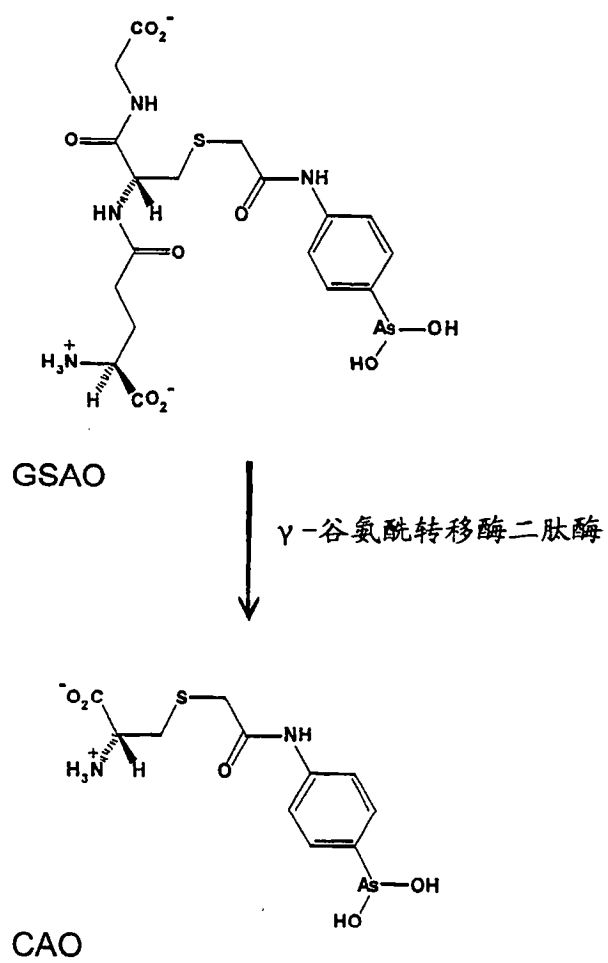


图 14

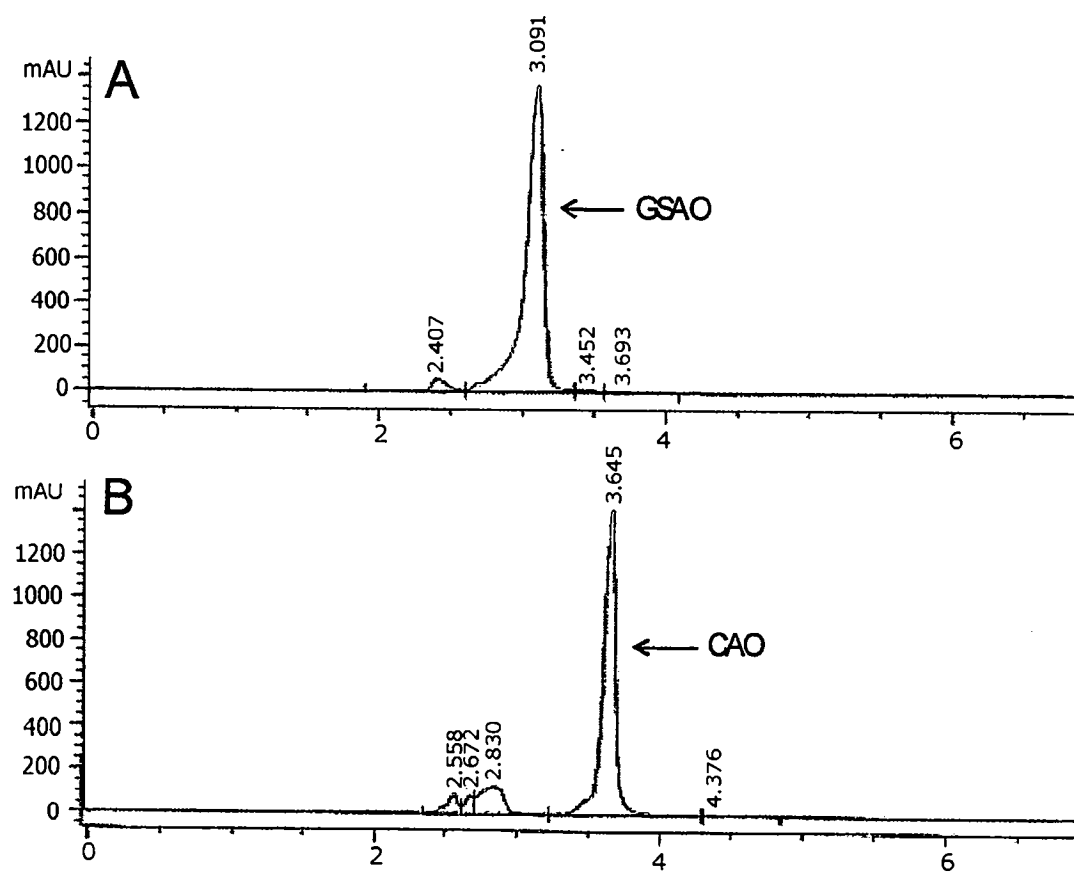


图 15

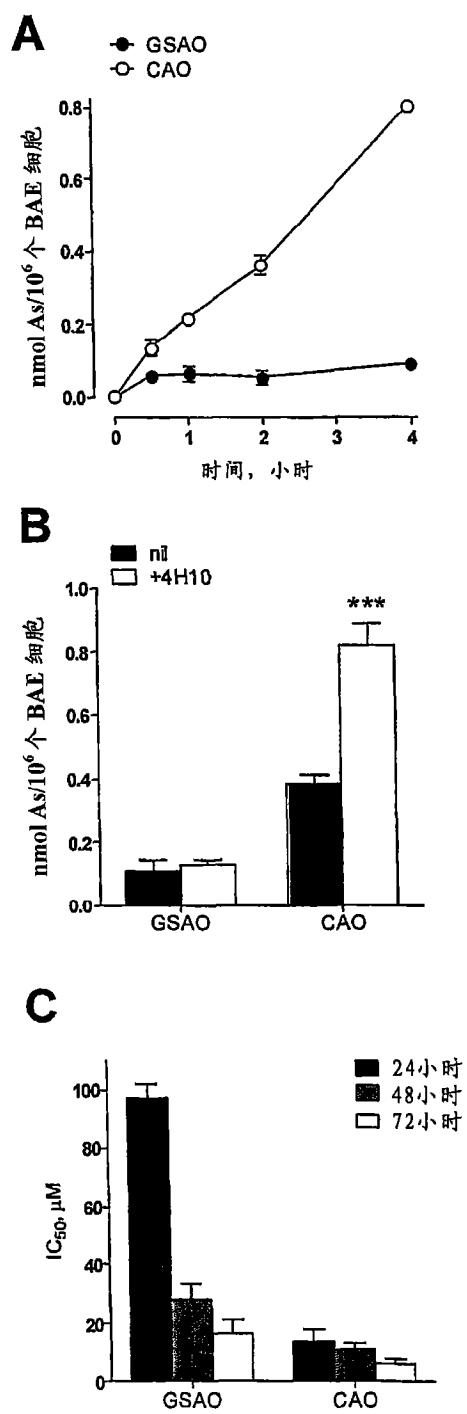


图 16

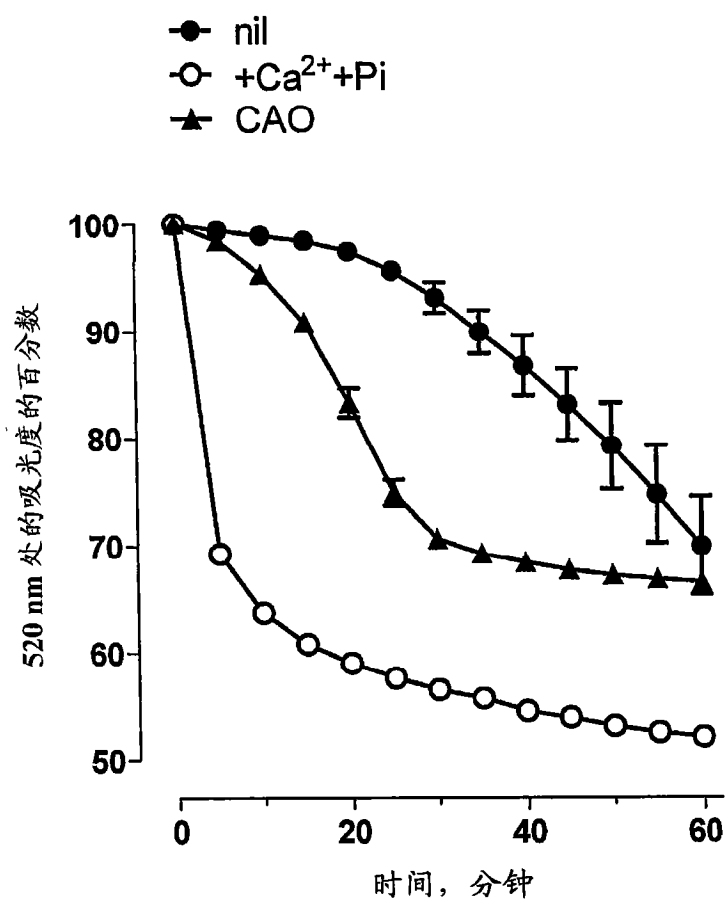


图 17