

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，
其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

美國、2004.7.16、60/588,596

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明一般係關於抗癌治療的領域。詳細而言，本發明提供了有機含砷化合物及其用於治療癌症諸如白血病和固態腫瘤的用途。

【先前技術】

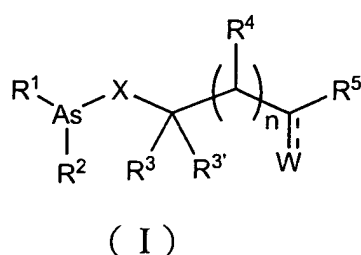
儘管白血病治療有所進步，大部分患有白血病的成人患者仍然死於疾病惡化。三氧化二砷是一種無機的化合物，已被批准用於治療患有復發或頑固性急性前骨髓性白血病（APL）的患者並且已被評估作為其他白血病類型的治療。然而，來自中國的初步數據以及近來美國的經驗也提出了三氧化二砷在其他血液癌症中扮演一個的角色。所以，三氧化二砷作為抗白血病藥劑的活性近來在許多類型的白血病中被研究。雖然就一些被研究的白血病類型的反應速率而論，結果是好的，但是三氧化二砷的全身性毒性是一個問題（Soignet 等人，1999；Wiernik 等人，1999；Geissler 等人，1999；Rousselot 等人，1999）。

唯一製造用於人類的有機砷劑（OA）米拉蘇普路（Melarsoprol）已被評估其抗白血病的活性（WO9924029、EP1002537）。不幸的，這個化合物在用於治療錐蟲病的濃度時對白血病患者有極度的毒性。因此，需要鑑認出能用於一般性治療血液腫瘤以及癌症的含砷衍生物，其具有與三氧化二砷相似的或較大活性和較低毒性。

【發明內容】

發明簡述

本發明提供具有抗癌性質的有機砷劑。在一些具體實例中，本發明提供具有式 (I) 結構的化合物或其醫藥上可接受的鹽



其中

X 是 S 或 Se；

W 是 O、S、或 (R) (R)，其中各個出現的 R 是獨立的為 H 或 C₁₋₂ 烷基；

n 是 0 或 1；

R¹ 以及 R² 是各自獨立的為 C₁₋₁₀ 烷基；

R³ 是 -H、C₁₋₁₀ 烷基、或 C₀₋₆ 烷基-COOR⁶；

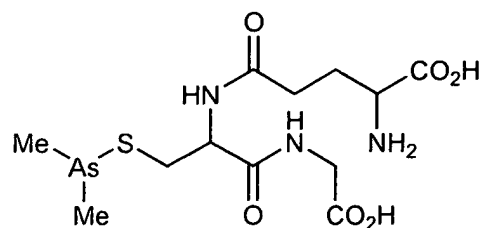
R^{3'} 是 H、胺基、氰基、鹵素、芳基、芳烷基、雜芳基、雜芳烷基、羧基、C₁₋₁₀ 烷基、C₁₋₁₀ 烯基、或 C₁₋₁₀ 炔基，較佳的是 H；

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

R⁵ 是 -OH、氰基、C₁₋₁₀ 烷氧基、胺基、O-芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 烷基、-OC(O) 芳基、或甘胺酸取代基；以及

R^6 是 H 或 C_{1-10} 烷基。

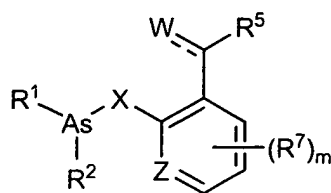
本發明的另一方面係關於式 (II) 的化合物



(II)

或其醫藥上可接受與吡啶鹽酸鹽相關的鹽，其中結晶形式之化合物的熔點是大於 125°C 。

在一些具體實例中，有機的砷劑是具有式 (III) 結構的化合物



(III)

其中

X 是 S 或 Se，較佳的是 S；

W 是 O、S、或 (R) (R)，其中各個出現的 R 是獨立的為 H 或 C_{1-2} 烷基，較佳的是 O；

Z 是 CH 或 N，較佳的是 N；

R^1 以及 R^2 是獨立的為 C_{1-10} 烷基， R^1 及 R^2 較佳的是獨立的選自甲基、乙基、丙基、和異丙基；以及

R^5 是 -OH、氟基、 C_{1-10} 烷氧基、胺基、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、或甘胺酸取代基，較佳的是 OH；

R^6 是 H 或 C_{1-10} 烷基；

R^7 是選自鹵素、 $-OH$ 、 C_{0-6} 烷基、 $-COOR^6$ 、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、胺基、醯胺基、氰基、以及硝基；

m 是從 0 至 4 的整數，較佳的是 0。

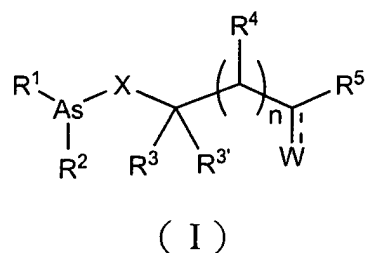
本發明的其他目的、特徵、及優點從下面的詳述中會更明顯。然而，應了解，當指出本發明較佳具體實例時，詳述以及特定的實施例只是作為說明，因為由這些詳述中，在本發明精神和範疇內的各種改變和修飾對熟習此項技術者是顯而易見的。

【實施方式】

發明詳述

本發明提供一些有機的含砷化合物。

在一些具體實例中，本發明的有機砷劑具有式 (I) 結構或其醫藥上可接受的鹽



其中

X 是 S 或 Se ，較佳的是 S ；

W 是 O 、 S 、或 $(R)(R)$ ，其中各個出現的 R 是獨立的為 H 或 C_{1-2} 烷基，較佳的是 O 或 $(R)(R)$ ；

n 是 0 或 1，較佳的是 1；

R^1 和 R^2 是獨立的為 C_{1-10} 烷基， R^1 與 R^2 較佳的是獨立的選自甲基、乙基、丙基、以及異丙基；

R^3 是 $-H$ 、 C_{1-10} 烷基、或 C_{0-6} 烷基 $-COOR^6$ ；

$R^{3'}$ 是 H 、胺基、氰基、鹵素、芳基、芳烷基、雜芳基、雜芳烷基、羧基、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 烯基、或 C_{1-10} 炔基，較佳的是 H ；

R^4 是 $-OH$ 、 $-H$ 、 $-CH_3$ 、胺基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、或 $-OC(O)$ 芳基；

R^5 是 $-OH$ 、氰基、 C_{1-10} 烷氧基、胺基、 O -芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、 $-OC(O)$ 芳基、或甘胺酸取代基；以及

R^6 是 H 或 C_{1-10} 烷基，較佳的是 H 。

在一些具體實例中， W 是 $(R)(R)$ 且各個出現的 R 是獨立的為 H 或 C_{1-2} 烷基。在一些此類具體實例中，各個出現的 R 是 H 。

在一些具體實例中， R^3 是 $-H$ 或 C_{0-6} 烷基 $-COOR^6$ 。在一些此類具體實例中， R^3 是選自 $-COOR^6$ 、 $-CH_2COOR^6$ 、 $-CH_2CH_2COOR^6$ 、 $-CH(CH_3)COOR^6$ 、 $-CH(CH_2CH_3)COOR^6$ 、或 $-CH_2CH_2CH_2COOR^6$ ，其中 R^6 是 C_{1-10} 烷基。

在一些具體實例中， R^3 是 C_{1-10} 烷基。在一些較佳的此類具體實例中， R^3 是選自甲基、乙基、丙基、以及異丙基，較佳的是甲基。

在一些具體實例中， $R^{3'}$ 是選自胺基、氰基、鹵素、芳基、芳烷基、雜芳基、雜芳烷基、羧基、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 烯基、以及 C_{1-10} 炔基。在一些較佳的此類具體實例中， $R^{3'}$ 是選自芳基、芳烷基、雜芳基、雜芳烷基、羧基、 C_{1-10} 烯

基、以及 C_{1-10} 炔基。

在一些具體實例中， R^4 是選自 $-OH$ 、 $-H$ 、 $-CH_3$ 、 $-OC(O)C_{1-10}$ 芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、以及 $-OC(O)$ 芳基。在一些此類具體實例中， R^4 是選自 $-OC(O)C_{1-10}$ 芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、以及 $-OC(O)$ 芳基。

在一些具體實例中， R^4 是胺基。在一些此類具體實例中， R^4 是 NH_2 。

在一些具體實例中， R^5 是選自 氰基、 C_{1-10} 烷氧基、胺基、 O -芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、以及 $-OC(O)$ 芳基。

在一些具體實例中， X 是 S ， W 是 $(R)(R)$ ，其中各個出現的 R 是 H ， n 是 1 ， R^1 以及 R^2 是獨立的選自 甲基、乙基、丙基、以及異丙基， R^3 和 $R^{3'}$ 是 H ， R^4 是選自 OH 、 $-OC(O)C_{1-10}$ 芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、以及 $-OC(O)$ 芳基，且 R^5 是選自 OH 、 $-OC(O)C_{1-10}$ 芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、以及 $-OC(O)$ 芳基。在一些此類具體實例中， R^1 以及 R^2 是相同的且是一起選自 甲基、乙基、丙基、以及異丙基。

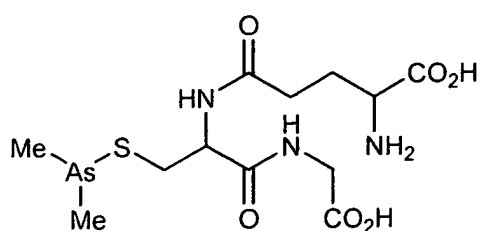
在一些具體實例中， X 是 S ， W 是 O ， n 是 1 ， R^1 以及 R^2 都是 甲基， R^3 是選自 H 和 $COOR^6$ ， $R^{3'}$ 是 H ，且 R^4 是選自 H 和 麩醯胺酸取代基，且 R^5 是選自 OH 和 甘胺酸取代基。在一些此類具體實例中， R^3 是 $COOR^6$ ， R^4 是 H ， R^5 是 OH ，以及 R^6 是 H 。

在一些具體實例中，式 (I) 化合物是選自



•



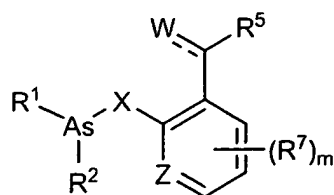


(II)

或其醫藥上可接受的鹽，其中結晶形式之化合物的熔點是大於 125 °C，更佳的是大於 130 °C，以及最佳的是大於 135 °C。在一些具體實例中，結晶形式之化合物的熔點是在約 125-150 °C 的範圍內，較佳的是在約 130-145 °C 的範圍內，更佳的是在約 135-140 °C 的範圍內。在一些具體實例中，其中式 (II) 化合物是與吡啶鹽酸鹽結合的，兩化合物是以 1:0.9 至 1:1.1 的比例存在，較佳的是約 1:1。在一些此類具體實例中，兩化合物會形成含有一個分子各個化合物的複合物。未料到的，頃發現當吡啶鹽酸鹽對式 (II) 化合物的比例減少時，對癌症的生物活性會維持，其係與相同的砷劑相比較，其中吡啶鹽酸鹽的量是增加的。

當對掌性中心存在時，所有的異構形式都在本發明的範疇內。關於立體化學，是依據決定絕對立體化學的 Cahn-Ingold-Prelog 法則。這些法則被描述在(例如)Organic Chemistry，Fox 以及 Whitesell；Jones 和 Bartlett 出版商，波士頓，MA (1994)；第 5-6 章，第 177-178 頁，該章節在此併入作為參考。

在一些具體實例中，有機的砷劑是具有式 (III) 結構的化合物



(III)

其中

X 是 S 或 Se，較佳的是 S；

W 是 O、S、或 (R) (R)，其中各個出現的 R 是獨立的為 H 或 C₁₋₂ 烷基，較佳的是 O；

Z 是 CH 或 N；

R¹ 以及 R² 是獨立的為 C₁₋₁₀ 烷基，R¹ 以及 R² 較佳的是獨立的選自甲基、乙基、丙基、和異丙基；以及

R⁵ 是 -OH、氟基、C₁₋₁₀ 烷氧基、胺基、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、或甘胺酸取代基，較佳的是 OH；

R⁶ 是 H 或 C₁₋₁₀ 烷基；

R⁷ 是選自鹵素、-OH、C₀₋₆ 烷基-COOR⁶、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、胺基、鹽胺基、氟基、以及硝基；

m 是從 0 至 4 的整數，較佳的是 0。

在一些具體實例中，W 是 (R) (R) 以及各個出現的 R 是獨立的為 H 或 C₁₋₂ 烷基。在一些此類具體實例中，各個出現的 R 是 H。

在一些具體實例中，R⁵ 是選自氟基、C₁₋₁₀ 烷氧基、胺基、O-芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 烷基、以及 -OC(O)芳基。

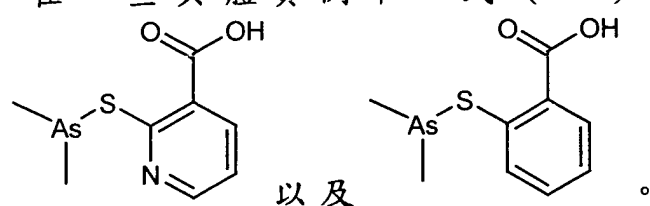
在一些具體實例中，X 是 S，W 是 O，R¹ 和 R² 是獨立

的選自甲基、乙基、丙基、以及異丙基，且 R^5 是 OH。在一些此類具體實例中， R^1 和 R^2 是相同的且是一起選自甲基、乙基、丙基、以及異丙基。在一些此類具體實例中， R^1 以及 R^2 都是甲基。

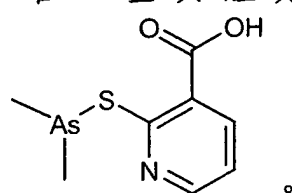
在一些具體實例中，Z 是 N。

在一些具體實例中，Z 是 CH。

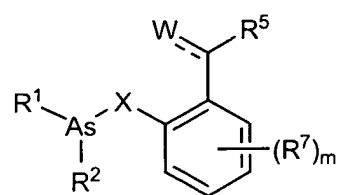
在一些具體實例中，式 (III) 化合物是選自



在一些具體實例中，式 (III) 化合物是



在其他具體實例中，有機的砷劑是具有式 (IV) 結構的化合物



(IV)

其中

X 是 S 或 Se，較佳的是 S；

W 是 O、S、或 (R) (R)，其中各個出現的 R 是獨立的為 H 或 C_{1-2} 烷基，較佳的是 O；

R^1 以及 R^2 是獨立的為 C_{1-10} 烷基， R^1 和 R^2 較佳的是獨

立的選自甲基、乙基、丙基、以及異丙基；且

R^5 是 $-OH$ 、氰基、 C_{1-10} 烷氧基、胺基、 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、或甘胺酸取代基，較佳的是 OH ；

R^6 是 H 或 C_{1-10} 烷基；

R^7 是選自鹵素、 $-OH$ 、 C_{0-6} 烷基、 $-COOR^6$ 、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、胺基、醯胺基、氰基、以及硝基；

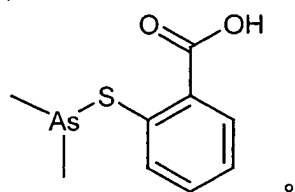
m 是從 0 至 4 的整數，較佳的是 0。

在一些具體實例中， W 是 $(R)(R)$ 以及各個出現的 R 是獨立的為 H 或 C_{1-2} 烷基。在一些此類具體實例中，各個出現的 R 是 H 。

在一些具體實例中， R^5 是選自氰基、 C_{1-10} 烷氧基、胺基、 O -芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、以及 $-OC(O)$ 芳基。

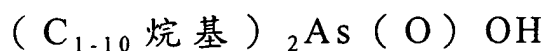
在一些具體實例中， X 是 S ， W 是 O ， R^1 和 R^2 是獨立的選自甲基、乙基、丙基、以及異丙基，且 R^5 是 OH 。在一些此類具體實例中， R^1 和 R^2 是相同的且是一起選自甲基、乙基、丙基、以及異丙基。在一些此類具體實例中， R^1 以及 R^2 都是甲基。

在一些較佳的具體實例中，式 (III) 化合物具有下列結構

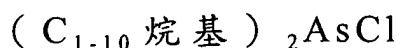


本發明的另一方面係關於合成式 (I) 化合物的方法，

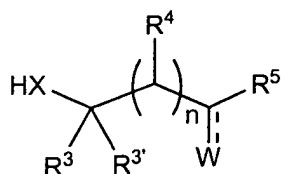
是以相似於實施例 13 以及 Banks, C.H. 等人 (J. Med. Chem. (1979) 22: 572-575) 之描述的方式，其全部內容在此併入作為參考，其中具有下式結構



的化合物被溶於調整至 pH 3 的水/鹽酸溶液中，並將二氧化硫流通過該溶液以得到具有下式結構的化合物



，其與下式結構



的化合物反應，

其中

X 是 S 或 Se，較佳的是 S；

W 是 O、S、或 (R) (R)，其中各個出現的 R 是獨立的為 H 或 C_{1-2} 烷基，較佳的是 O 或 (R) (R)；

n 是 0 或 1，較佳的是 1；

R^3 是 -H、 C_{1-10} 烷基、或 C_{0-6} 烷基-COOR⁶；

$R^{3'}$ 是 H、胺基、氰基、鹵素、芳基、芳烷基、雜芳基、雜芳烷基、羧基、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 烯基、或 C_{1-10} 炔基，較佳的是 H；

R^4 是 -OH、-H、-CH₃、胺基、-OC(O) C_{1-10} 芳烷基、-OC(O) C_{1-10} 烷基、或 -OC(O) 芳基；

R^5 是 -OH、氰基、 C_{1-10} 烷氧基、胺基、O-芳烷基、-OC(O) C_{1-10} 芳烷基、-OC(O) C_{1-10} 烷基、-OC(O) 芳基、

或甘胺酸取代基；以及

R^6 是 H 或 C_{1-10} 烷基，較佳的是 H；

其中兩化合物都在可接受之有機溶劑中以吡啶處理以得到式 (I) 化合物。

在一些具體實例中，W 是 (R) (R) 以及各個出現的 R 是獨立的為 H 或 C_{1-2} 烷基。在一些此類具體實例中，各個出現的 R 是 H。

在一些具體實例中， R^3 是 -H 或 C_{0-6} 烷基 -COOR⁶。在一些此類具體實例中， R^3 是選自 -COOR⁶、-CH₂COOR⁶、-CH₂CH₂COOR⁶、-CH(CH₃)COOR⁶、-CH(CH₂CH₃)COOR⁶、或 -CH₂CH₂CH₂COOR⁶，其中 R^6 是 C_{1-10} 烷基。

在一些具體實例中， R^3 是 C_{1-10} 烷基。在一些較佳的此等具體實例中， R^3 是選自甲基、乙基、丙基、以及異丙基，較佳的是甲基。

在一些具體實例中， $R^{3'}$ 是選自胺基、氰基、鹵素、芳基、芳烷基、雜芳基、雜芳烷基、羧基、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 烯基、以及 C_{1-10} 炔基。在較佳的此等具體實例中， $R^{3'}$ 是選自芳基、芳烷基、雜芳基、雜芳烷基、羧基、 C_{1-10} 烯基、以及 C_{1-10} 炔基。

在一些具體實例中， R^4 是選自 -OH、-H、-CH₃、-OC(O) C_{1-10} 芳烷基、-OC(O) C_{1-10} 烷基、以及 -OC(O) 芳基。在一些此類具體實例中， R^4 是選自 -OC(O) C_{1-10} 芳烷基、-OC(O) C_{1-10} 烷基、以及 -OC(O) 芳基。

在一些具體實例中， R^4 是胺基。在一些此類具體實例

中， R^4 是 NH_2 。

在一些具體實例中， R^5 是選自氰基、 C_{1-10} 烷氧基、胺基、O-芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、以及 $-OC(O)$ 芳基。

本發明進一步提供含有式 (I)、式 (II)、式 (III)、或式 (IV)、或其醫藥上可接受的鹽、以及醫藥上可接受的稀釋劑或載劑的醫藥組成物。在一些具體實例中，該醫藥組成物是水性溶液，具有 pH 大於約 5，較佳的是在從約 5 至約 8 的範圍內，更佳的是在從約 5 至約 7 的範圍內。

本發明另一方面提供用於治療癌症的方法，該方法包含給藥醫藥上有效量的式 (I)、式 (II)、式 (III)、或式 (IV) 化合物。

本發明亦關於式 (I)、式 (II)、式 (III)、或式 (IV) 化合物、或其醫藥上可接受之鹽的用途，其係用於製造用於治療癌症的醫藥品。

在一些具體實例中，癌症是選自固態腫瘤，諸如腦部、肺部、肝、脾、腎、淋巴節、小腸、胰、血球細胞、骨、結腸、胃、胸、子宮內膜、前列腺、睪丸、卵巢、中樞神經系統、皮膚、頭以及頸、食道、或骨髓的癌症、或血液的癌症、諸如白血病、急性前骨髓性白血病、淋巴瘤、多發性骨髓瘤、脊髓發育不全、骨髓增殖性疾病、或頑固性貧血。在一些此類具體實例中，該癌症是選自急性以及慢性白血病的白血病。

所以，在另一方面，本發明包括治療患有癌症之患者

的方法，該方法包含給藥給患者含有式 I、式 II、或式 III 化合物的組成物、或如上述的醫藥組成物。醫藥上有效量的化合物可以是 0.1 - 1000 毫克/公斤、1 - 500 毫克/公斤、或 10 - 100 毫克/公斤。在特定的具體實例中，該方法可包含天天給藥該組成物。該方法進一步涵蓋可涉及多次給藥的治療方法。方法可包含藉由諸如注射來天天給藥該化合物。也可以使用說明書中所描述之替代性的給藥途徑以及方法，而給藥的方式主要是取決於癌症的類型以及位置。在一些具體實例中，該方法進一步包含給藥給患者一或更多額外的藥劑。額外的藥劑可以是全-反式-視黃酸、9-順式視黃酸、Am-80、或抗壞血酸。其他附屬癌症治療的使用，諸如化學治療、放射線治療、基因治療、荷爾蒙治療、以及其他技藝中已知的癌症治療也關聯到本發明的方法而被涵蓋。

本發明涵蓋多種給藥的方法，包括局部、全身性、直接給藥以及藉由灌注。這些方法包括藉由注射、口部途徑、靜脈內、動脈內、腫瘤內給藥、給藥到腫瘤脈管系統、腹腔、氣管內、肌肉內、內視鏡的 (endoscopical)、疾病部位內 (Intralesional)、經皮 (percutaneous)、皮下、局部、鼻、頰、黏膜、陰部肛門的、直腸給藥以及類似者。

定義

術語「 C_{x-y} 烷基」係指經取代的或未經取代的飽和碳氫化合物基團，包括鏈上含有從 x 至 y 個碳的直鏈烷基以及支鏈烷基基團，包括鹵烷基基團諸如三氟甲基以及 2,2,2-

三氟乙基等等。當 C_0 烷基在端點位置時表示該基團是氫，當在中間時表示一鍵結。術語「 C_{2-y} 烯基」以及「 C_{2-y} 炔基」係指與上述烷基在長度以及（可能）取代方面相似的經取代的或未經取代的未飽和脂肪族基團，，但分別含有至少一個雙鍵或三鍵。

術語「 C_{1-6} 烷氧基」係指有氧原子連接於其上的 C_{1-6} 烷基基團。代表性的烷氧基基團包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、第三丁氧基以及相似者。「醚」是兩個碳氫化合物藉由氧共價結合在一起。所以，使烷基成為醚的該烷基的取代基是或類似烷氧基。

本文所用的術語「 C_{1-6} 芳烷基」係指經芳基基團取代的 C_{1-6} 烷基基團。

本文所用的術語「芳基」包括 5-、6-、以及 7-員經取代的或未經取代的單環芳香族基團，其中環上各原子是碳。術語「芳基」也包括具有二或更多個環狀環的多環狀環系統，其中二或更多個碳是兩個鄰接的環所共用，其中至少一個環是芳香族，例如其他環狀環可以是環烷基、環烯基、環炔基、芳基、雜芳基、及/或雜環。芳基基團包括苯、萘、菲、酚、苯胺、以及相似物。

本文所用的術語「醫藥上可接受的」是指在合理的醫療判定範圍內，那些適合用於與人類以及動物組織接觸而不會有過度毒性、刺激、過敏反應、或其他問題或併發症的配體、物質、組成物、及/或劑型，相稱地具有合理的優點/危險比例。

術語「防止」是技藝中已認知的，且當與症狀諸如局部復發（例如疼痛）、疾病諸如癌症、綜合徵諸如心臟衰竭或任何其他醫療上症狀聯用時，是技藝中所理解的，且包括給藥組成物，相對於沒有接受該組成物的個體，該組成物會降低個體的醫療症狀頻率、或延遲發病、症狀。所以，防止癌症包括例如在統計及/或臨床上有顯著程度的（例如）減少接受預防治療的患者群體之可偵測的癌成長數，相對於未治療的控制組群體，及/或延遲受治療之群體的可偵測的癌成長發生，相對於未治療的控制組群體。防止感染包括（例如）使受治療之群體減少感染的診斷數，相對於未治療的控制組群體，及/或延遲受治療之群體感染症狀的發作，相對於未治療的控制組群體。防止病痛包括（例如）減少受治療之群體中的個體所經歷到的痛覺的程度、或者延遲痛覺，相對於未治療的控制組群體。

術語「預防或治療」處理是技藝中所認知的，且包括給藥給宿主一或更多主題組成物。若是在臨床顯現不想要的症狀（例如疾病或宿主動物其他不想要的狀態）之前給藥的話，則該處理是預防，（即它保護宿主對抗不想要的症狀發展），而若是在不想要的症狀顯現之後給藥，則該處理是治療，（即他試圖降低、改善、或穩定已存在的不想要的症狀或其副作用）。

術語「經取代的」係指具有取代基的部分（moiety），該取代基置換了骨架上一或更多個碳上的氫。應了解「取代作用」或「經...取代的」包括了內含的附帶條件是此取

代作用是依照經取代之原子以及取代基可允許的價數，且該取代作用會造成穩定的化合物，例如不會自發的諸如藉由再排列、環化、移除等等進行轉換（transformation）。本文所用的術語「經取代的」是涵蓋包括所有可允許的有機化合物取代基。廣義方面，可允許的取代基包括有機化合物的非環狀以及環狀、分支的以及未分支的、碳環狀以及雜環狀、芳香族以及非芳香族取代基。可允許的取代基可以是一或更多且相同的或不同的合適的有機化合物。為了本發明的目的，雜原子諸如氮可以具有氮取代基及/或任何可允許的本文所述符合雜原子價數之有機化合物取代基。取代基可包括（例如）鹵素、羥基、羰基（諸如羧基、烷氧基羰基、甲醯基、或醯基）、硫代羰基（諸如硫酯、硫代乙酸酯、或硫代甲酸酯）、烷氧基、磷酸基、磷酸根、磷酸鹽、元磷酸鹽、胺基、醯胺基、脒基、亞胺基、氰基、硝基、疊氮基、硫氮基、烷硫基、硫酸鹽、磺酸鹽、胺磺醯基、磺醯胺基、磺醯基、雜環、芳烷基、或芳香族或雜芳香族部分。熟習此項技術者可以了解取代在碳氮化合物鏈上的部分其本身若需要的話是可以被取代的。

關於主題治療方法中化合物的「醫藥上有效量的」係指化合物（等）在調配物中的量，其當給藥（至哺乳動物，較佳是人類）作為所欲劑量攝生法時會減輕病徵、改善症狀、或延緩疾病症狀的發生，其係根據對所治療的疾病或症狀或美容目的之臨床上可接受的標準，例如有適用於任何醫學治療之合理的優點/危險比例。

本文所用的術語「治療 (treating)」或「治療 (treatment)」包括以改善或穩定個體的症狀的方式逆轉、減少、或遏止症狀的病徵、臨床徵兆、以及潛在的病狀。

無機 vs. 有機砷劑的毒性

三氧化二砷的用途受限於它的毒性。另一方面，OA 則毒性小多了，使得在體內將無機含砷化合物甲基化成為 OA 已被認為是一種去毒性反應。OA 單甲基砷酸以及二甲基砷酸是無機含砷化合物的初級代謝物 (Hughes 等人, 1998)。無機砷劑 (包括三氧化二砷) 對許多器官系統有多樣化的影響，包括心血管系統、胃腸道、腎、皮膚、神經系統、以及血液。無機砷劑尤其對肝有毒性，會造成浸潤、中央壞死、以及硬化 (IARC, 1980; ACGIH, 1991; Beliles 等人, 1994; Goyer 等人, 1996)。現在有足夠的證據顯示無機含砷化合物是人類皮膚以及肺的致癌物質 (Goyer 等人, 1996)。

特定砷劑的毒性是與其從體內移除的速率以及與其在組織內累積的程度相關 (Beliles 等人, 1994)。通常，增加：有機砷劑 $< \text{As}^{5+} < \text{As}^{3+}$ (包括三氧化二砷) $< \text{As}^0$ 。不像無機砷劑，文獻中並沒有報導因於 OA 的死亡與毒性之嚴重案例。所以，在哺乳動物中，無機含砷化合物的甲基化被認為是去毒性的機制，因為甲基化的 OA 有較低的毒性，以及它快速的排泄和低滯留性 (Beliles 等人, 1994; Goyer 等人, 1996)。一個好的例子是二甲基砷酸，它是一種有機化合物，是大多數哺乳動物在曝露於無機砷 (包括三氧

化二砷) 之後所排泄出來的主要泌尿系統代謝物。在小鼠活體內毒性研究中，在腹腔給藥三氧化二砷之後，LD₅₀ (因為急性毒性而使 50% 的動物死亡的劑量) 是 10 毫克/公斤，(Investigator's Brochure, 1998)，而在給藥二甲基胂酸之後，LD₅₀ 是 500 毫克/公斤 (MSDS, 1998)。

癌症治療

本發明有機的砷劑可以被用於治療各種癌症，包括所有固態腫瘤及所有血液癌症，包括白血病、淋巴瘤、多發性骨髓瘤、脊髓發育不全、或骨髓增生性疾病。OA 也可以被用於治療對其他形式的治療而言是頑固性的血液癌症。

白血病是一種血液形成組織的惡性腫瘤，其特徵在於白血球不正常的增生，而且是四個主要癌症類型之一。白血病是根據最主要牽涉到的白血球類型來分類的。急性白血病主要是未分化的細胞族群，而慢性白血病具有較多成熟的細胞形式 (WO9924029)。

急性白血病被分為成淋巴細胞 (lymphoblastic, ALL) 以及非成淋巴細胞 (ANLL) 類型，且可以根據 French-American-British 分類法藉由型態及細胞化學表徵或根據其類型和分化程度進一步再區分。特定的 B-和 T-細胞、以及骨髓細胞表面標誌/抗原也被用於分類。ALL 主要是兒童疾病，而 ANLL (也稱為急性骨髓性白血病) 是在成人中較常見的急性白血病。

慢性白血病被分為淋巴細胞 (CLL) 以及骨髓 (CML)

類型。CLL 特徵在於血中、骨髓、以及淋巴器官有增加數量的成熟淋巴細胞。大部分 CLL 患者會殖系擴增 (clonal expansion) 具有 B 細胞特徵的淋巴細胞。CLL 是年長者的疾病。在 CML 中，顆粒細胞 (granulocytic cell) 在分化所有時期中佔血以及骨髓大多數，但也可能影響肝、脾、以及其他器官。其他可以被本發明之 OA 治療的惡性血液疾病包括 (但不限於) 脊髓發育不全、骨髓增殖性疾病、淋巴瘤、以及多發性骨髓瘤。

醫藥組成物

熟習此項技術者根據本文的揭示可以知道含有至少一種有機砷劑或額外活性成分的醫藥組成物的製備，如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990 所例示，併入本文做為參考。此外，對動物 (例如人類) 給藥而言，會理解製劑需要符合 FDA 生物標準局的無菌、熱原 (pyrogenicity)、一般性安全以及純度標準。

本文所用的「醫藥上可接受的載劑」包括熟習此項技術者所知的任何以及所有溶劑、散佈媒劑、塗覆物、表面活性劑、抗氧化劑、防腐劑 (例如抗菌劑、抗真菌劑)、等張劑、吸收延遲劑、鹽類、防腐劑、藥物、藥物安定劑、凝膠、黏結劑、賦形劑、崩解劑、潤滑劑、甜味劑、風味劑、染劑、此類物質、以及其組合 (參見 (例如) Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329, 在此併入作為參考)。除非任何習

知載劑與活性成分有不相容，否則本發明涵蓋其在醫療或醫藥組成物上的用途。

有機的砷劑可以根據它要被以固體、液體或氣霧形式給藥以及是否如注射方式給藥需要殺菌而與不同類型的載劑混合在一起。本發明可以靜脈內、皮內、動脈內、腹腔、疾病部位內 (Intralesionally)、顱內、關節內、前列腺內、胸腔內、氣管內、鼻內、玻璃體內 (intravitreally)、陰道內、直腸內、局部、腫瘤內、肌肉內、腹腔、皮下、結膜下、小泡內 (intravesicularlly)、黏膜、心包膜內、臍內、眼內、口、局部、區域、注射、灌入、持續灌入、直接局部灌注浴標的細胞、經由導管、經由灌洗 (lavage)、在液態組成物中 (例如脂質體) 給藥，或藉由其他方法或熟習此項技術者所知的任何前述的組合給藥 (參見例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990，在此併入作為參考)。

實際給藥給患者之本發明組成物的劑量可以藉由物理以及生理因子來決定，諸如體重、症狀嚴重性、所要治療之疾病的類型、先前或同時的治療介入、患者的自發症以及給藥方式。負責給藥的醫療人員無論如何會針對各個個體來決定組成物中活性成分的濃度以及合適的劑量。

在一些具體實例中，醫藥組成物可包含 (例如) 至少約 0.1% 的有機含砷化合物。在其他具體實例中，活性化合物可佔介於約 2% 至約 75% 之間單位重、或介於約 25% 至約 60% 之間、(例如) 以及其中任何可推論的範圍。在其

他非限制性實施例中，每給藥一劑也可以包含從約 0.1 毫克/公斤/體重、0.5 毫克/公斤/體重、1 毫克/公斤/體重、約 5 毫克/公斤/體重、約 10 毫克/公斤/體重、約 20 毫克/公斤/體重、約 30 毫克/公斤/體重、約 40 毫克/公斤/體重、約 50 毫克/公斤/體重、約 75 毫克/公斤/體重、約 100 毫克/公斤/體重、約 200 毫克/公斤/體重、約 350 毫克/公斤/體重、約 500 毫克/公斤/體重、約 750 毫克/公斤/體重、至約 1000 毫克/公斤/體重或更多，以及其中任何可推論的範圍。根據上述的數字，在此處所列之數字推論範圍的非限制性實施例中，可以給藥在約 10 毫克/公斤/體重至約 100 毫克/公斤/體重等等範圍。

在任何例子中，組成物可包含各種抗氧化劑以減緩一或更多成分的氧化。此外，防止微生物作用可藉由防腐劑達成，諸如各種抗菌以及抗真菌劑，包括但不限於對羥苯甲酸酯（paraben）（例如對羥苯甲酸甲酯、對羥苯甲酸丙酯）、氯丁醇、酚、山梨酸、硫柳汞（thimerosal）、或其組合。

有機砷劑可以自由鹼、中性或鹽形式被調配到組成物中。醫藥上可接受的鹽包括與自由羧基基團所形成的鹽類，其係衍生自無機的鹽基諸如（例如）鈉、鉀、銨、鈣或氫氧化鐵；或有機鹽基如異丙胺、三甲胺、組胺酸或普魯卡因。

在組成物是在液體形式中的具體實例中，載劑可以是溶劑或分散介質，其包含（但不限於）水、乙醇、多元醇

(例如甘油、丙二醇、液體聚乙二醇等等)、脂質(例如三甘油酯、植物油、脂質體)、以及其組合。適當流動性的維持可以(例如)藉由使用塗覆物諸如卵磷脂;藉由分散在載劑諸如(例如)液體多元醇或脂質中維持所需的顆粒大小;藉由使用表面活性劑諸如(例如)羥丙基纖維素;或該些方法的組合。在許多例子中,更佳的是包括等張劑,諸如(例如)糖類、氯化鈉、或其組合。

無菌之可注射的溶液的製備是藉由將活性化合物根據需要併入所需含量之合適的溶劑以及各種上述之其他成分中,然後過濾殺菌。通常,分散液的製備是藉由將各種無菌的活性成分併入含有基礎分散介質及/或其他成分的無菌基礎劑中。在用於製備無菌之可注射的溶液、懸浮液或乳劑的無菌粉末的例子中,較佳的製備方法是真空乾燥或冷凍乾燥技術,該技術可以從先前無菌過濾過的液體基質中得到活性成分以及任何額外的想要之成分的粉末。若需要的話,該液體介質應該經由適度的緩衝,且液體稀釋劑必須在注射之前以足夠的鹽水或葡萄糖先使其等張化。本發明也涵蓋了用於直接注射之高度濃縮組成物的製備,其中將 DMSO 作為溶劑來使用會得到非常快速的滲透性,會將高濃度的活性藥劑遞送到小區域。

組成物在製造以及儲存的條件下必須是穩定的,且其保存要避免微生物諸如細菌和真菌的污染。所以,較佳的組成物具有大於約 5 的 pH,較佳的是從約 5 至約 8,更佳的是從約 5 至約 7。應體認內毒素的污染必須保持在最低,

其安全含量（例如）少於 0.5 毫微克/毫克蛋白質。

在特定的具體實例中，可注射之組成物的延長吸收可藉由在組成物中使用延遲吸收劑諸如（例如）單硬脂酸鋁、明膠或其組合來達成。

組合治療

本發明的一個方面是有機的砷劑可以和另一種藥劑或治療方法（較佳的是另一種癌症治療）組合使用。有機的砷劑可以在另一藥劑治療之前或之後使用，間隔範圍從幾分鐘至幾週。在另一藥劑及表現構築體是分開施用到細胞中的具體實例中，通常應確保各遞送時間之間隔時間不過久，使得藥劑以及表現構築體仍能對細胞發揮有益的組合功效。舉例而言，在這個例子中，涵蓋了可以將二、三、四或更多種用藥方法（modality）和有機的砷劑實質上同時（即在少於約一分鐘之內）與細胞、組織或生物接觸。在其他方面，一或更多種藥劑可以在有機砷劑給藥之前及/或之後約 1 分鐘、約 5 分鐘、約 10 分鐘、約 20 分鐘、約 30 分鐘、約 45 分鐘、約 60 分鐘、約 2 小時、約 3 小時、約 4 小時、約 5 小時、約 6 小時、約 7 小時、約 8 小時、約 9 小時、約 10 小時、約 11 小時、約 12 小時、約 13 小時、約 14 小時、約 15 小時、約 16 小時、約 17 小時、約 18 小時、約 19 小時、約 20 小時、約 21 小時、約 22 小時、約 23 小時、約 24 小時、約 25 小時、約 26 小時、約 27 小時、約 28 小時、約 29 小時、約 30 小時、約 31 小時、約 32 小時、約 33 小時、約 34 小時、約 35 小時、約 36

小時、約 37 小時、約 38 小時、約 39 小時、約 40 小時、約 41 小時、約 42 小時、約 43 小時、約 44 小時、約 45 小時、約 46 小時、約 47 小時、至約 48 小時或更久之內給藥。在一些其他的具體實例中，藥劑可以在有機砷劑給藥之前及/或之後從約 1 天、約 2 天、約 3 天、約 4 天、約 5 天、約 6 天、約 7 天、約 8 天、約 9 天、約 10 天、約 11 天、約 12 天、約 13 天、約 14 天、約 15 天、約 16 天、約 17 天、約 18 天、約 19 天、約 20、至約 21 天之內給藥。然而，在一些情形下，明顯延長個別給藥之間的治療期間成為數週（例如約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7 或約 8 週或更久）可以是所欲的。

可以使用各種組合，有機的含砷化合物是「A」，而第二藥劑（可以是任何其他治療藥劑）是「B」。

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

給藥會依照化學治療之一般規則將本發明的治療組成物給藥給一患者，並考慮到毒性，如果有的話。需要時將治療的循環重複是可被預期的。本發明也涵蓋可以將各種標準治療或附屬癌症治療、以及手術介入與所述的含砷藥劑合併使用。這些治療包括但不限於化學治療、放射線治療、免疫治療、基因治療以及手術。下面的章節描述了一些附屬癌症治療：

化學治療

癌症治療也包括許多化學和放射線為基礎之治療的組合治療。組合化學治療包括（例如）順鉑（cisplatin，（CDDP）、卡鉑（carboplatin）、丙卡巴肼（procarbazine）、二氯甲基二乙酸（mechlorethamine）、環磷醯胺（cyclophosphamide）、喜樹鹼（camptothecin）、異環磷醯胺（ifosfamide）、美法倫（melphalan）、苯丁酸氮芥（chlorambucil）、白消安（busulfan）、亞硝脲（nitrosurea）、放線菌素（dactinomycin）、柔紅黴素（daunorubicin）、多柔比星（doxorubicin）、平陽黴素（bleomycin）、plicomycin、絲裂黴素（mitomycin）、依託泊苷（etoposide）（VP16）、三苯氧胺（tamoxifen）、拉樂西芬（raloxifene）、雌性素受體結合劑、紫杉醇（taxol）、gemcitabien、溫諾平（navelbine）、法呢基（farnesyl）蛋白質轉移酶抑制劑、transplatinum、5-氟尿嘧啶、長春新鹼（vincristin）、長春鹼（vinblastin）以及甲氨蝶呤、或上述的任何相似物或衍生變異物。

放射線治療

會造成 DNA 損傷以及已被廣泛使用的其他因子包括熟知的 γ 射線、X 射線、及/或將放射線同位素指引遞送至腫瘤細胞。其他形式的 DNA 損傷因子也被涵蓋，諸如微波和 UV-輻射。所有這些因子很有可能會對 DNA、DNA 前驅物、DNA 複製與修復以及對染色體組裝和維持有大範圍的損傷。X 射線的劑量範圍從長期（3 至 4 週）的每日劑量 50 至 200 倫琴，到單一劑量 2000 至 6000 倫琴。放

射線同位素的劑量範圍差異性大，且取決於同位素的半衰期、所放出之放射線的強度以及類型、還有瘤細胞的吸收。當用在細胞時，本文的術語「接觸」以及「曝露」是描述治療構築物和化學治療或放射線治療藥劑被遞送到標的細胞或與標的細胞並置的過程。為了達到毒殺細胞或停止，兩藥劑都被遞送到細胞，其合併含量係足以殺死細胞或防止細胞分裂。

免疫治療

免疫治療通常靠使用免疫作用細胞和分子來設定目標以及摧毀癌細胞。免疫作用因子 (effector) 可以是 (例如) 對腫瘤細胞表面的一些標記有專一性的抗體。單抗體就可以作為治療的作用因子或可聚集其他細胞以實際造成細胞毒殺作用。抗體也可以結合到藥物或毒素上 (化學治療劑、放射線核苷酸、蓖麻毒素 A 鏈、霍亂毒素、百日咳毒素等等) 以及僅僅作為設定目標用的藥劑。或者，作用因子可以是帶有與標的腫瘤細胞直接或間接交互作用之表面分子的淋巴細胞。多種作用細胞包括細胞毒素 T 細胞以及 NK 細胞。

所以，免疫治療可以被作為組合治療的一部分，與基因治療結合。一般組合治療的方法在下面討論。通常，腫瘤細胞必須具有一些作為標靶的標誌，即在大多數其他細胞上不存在的。有許多腫瘤標誌存在，且任何這些標誌都可以適合用來作為本發明的標靶。常見的腫瘤標誌包括癌胚抗原、前列腺專一性抗原、泌尿腫瘤相關抗原、胚胎抗

原、酪胺酸酶 (p97)、gp68、TAG-72、HMFG、Sialyl Lewis 抗原、MucA、MucB、PLAP、雌激素受體、層黏蛋白受體、*erb B* 以及 p155。

基因治療

在又另一個具體實例中，第二治療是第二基因治療，其中治療的聚核苷酸是在第一治療藥劑之前、之後、或同時給藥。將治療藥劑與編碼有基因產物的載體一起遞送會對標的組織有聯合的抗過度增生效用。

手術

大約 60% 的癌症病人會進行某些類型的手術，其包括防止性、診斷性或階段性、治療性以及緩和性手術。治療性手術是一種可與其他治療（諸如本發明的治療、化學治療、放射線治療、荷爾蒙治療、基因治療、免疫治療及/或替代療法）組合使用的癌症治療。治療性手術包括身體上移除、割去及/或摧毀所有或部分癌組織的切除。腫瘤切除係指身體上移除至少部分的腫瘤。除了腫瘤切除，手術治療還包括雷射手術、冷凍手術、電燒、以及顯微控制手術（Mohs' 手術）。本發明進一步涵蓋可與移除淺表性癌症、前期癌（precancer）、或正常組織額外量合併使用。

實施例

下面的實施例是被包括以證明本發明較佳的具體實例。熟習此項技術者應了解實施例中所揭露之遵照發明人所發現的代表性技術以使本發明實施的更好的技術，因此可被視為構成了實施的較佳方式。然而，熟習此項技術者

根據本揭示可理解到可以對所揭示的特定具體實例作許多變化且仍會得到類似或相似的結果而不偏離本發明的精神和範疇。

實施例 1

合成 S-二甲肼-硫代琥珀酸 (MER1)、S-二甲肼-水楊酸 (SAL1)、以及 S-(二甲肼)麩胱甘肽 (SGLU1)

MER-1：在 250 毫升圓底燒瓶中將巰基丁二酸 (Mercaptosuccinic acid) 4.5 公克放到 100 毫升的乙二肼 (1,2-二甲氧基乙烷) 裡。逐滴添加 4 毫升的二甲基氯肼 (0.03 莫耳)，然後也是逐滴添加 4 毫升的二乙胺 (0.04 莫耳)。於室溫攪拌反應混合物 20 小時。形成白色的二乙胺鹽酸鹽沉澱物，並以過濾分離之。藉由減壓蒸發大大的將在乙二肼中的 MER1 溶液體積減少。經由過濾將白色的 MER1 結晶分離出來並以冷蒸餾水沖洗。然後將無色的結晶產物從乙醇-水中再結晶至固定熔點 150 °C。

SAL-1：在 100 毫升燒瓶中放入 5 公克的 2-巰基苯甲酸 (硫代水楊酸)、75 毫升的乙二肼、5 毫升的二甲基氯肼、以及 5 毫升的二乙胺。在氮氣中將混合物回流 1 小時，並於室溫攪拌隔夜。藉由過濾將二乙胺鹽酸鹽沉澱物分離出來。在減壓下緩慢蒸發濾液直到結晶產物分離。在冰中冷卻含有產物之蒸發溶液並過濾冷卻的溶液。從乙醇中再結晶結晶產物至固定熔點 97 °C。

SGLU-1：將麩胱甘肽 (14.0 公克，45.6 毫莫耳) 於乙二肼中快速攪拌，逐滴添加二甲基氯肼 (6.5 公克，45.6

毫莫耳)。然後將吡啶(6.9 公克, 91.2 毫莫耳)添加至漿液中, 隨後將混合物加熱以回流。立即移除加熱並於室溫攪拌混合物 4 小時。將所得到的不溶性固體分離並從乙醇中再結晶得到吡啶鹽酸鹽錯合物(產量 75%): 熔點 115-118 °C; NMR(D_2O) δ 1.35(s, 6H), 1.9-4.1(m's, 10H), 7.8-9.0(m, 5H); 質譜儀(m/e) 140、125、110、105、79、52、45、36。此物質並無用於本文的實施例中, 但已如 Banks, C.H. 等人所述(J. Med. Chem. (1979) 22: 572-575) 被用於生物實驗, 該文獻全文在此併入作為參考。

合成 MER-1、SGLU-1 以及 SAL-1 的研究是由德州休士頓 Robert A. Welch 基金會提供資金給發明人 Ralph Zingaro。

實施例 2

試管內評估試驗

使用了許多試管內試驗來決定癌症細胞對本發明含砷化合物、組成物、及/或調配物的反應。受測的一些反應包括細胞存活性、細胞週期、細胞凋亡、以及成熟。發明人也設計了一試驗以評估癌症細胞中 PML/RAR 阿法基因對於本發明含砷組成物之敏感性的必要性。下面提供了這些試驗的描述:

磺醯羅丹明 B (Sulforhodamine B) 試驗

將各種人類癌症細胞培養在微滴定盤上 48 小時, 含有或不含所指定的 MER1、SAL1、或 SGLU1 濃度, 然後添加磺醯羅丹明 B 染劑至培養物中。磺醯羅丹明 B 染劑是一

種與蛋白質結合的染劑並且會標記活細胞。結果是以受處理的細胞的生長百分比來表示，其係與未受處理的控制組細胞（陰性數據表示細胞死亡）相較。

MTT 以及錐藍（trypan）分析

在這些試驗中，用 Ficoll Hipaque 分餾法將來自白血病患者以及正常捐者之週邊血樣本的單核細胞分離，並且再懸浮於 DMEM 完全培養基中。或者，在有些例子中使用細胞系細胞。將來自各種人類細胞系的惡性細胞（通常為 5×10^4 個細胞/毫升）或來自白血病患者以及健康捐者之週邊血的單核細胞（ 1×10^6 個細胞/毫升）培養在阿法 MEM 或 RPMI 1640 中，其含有或不含多種濃度的 MER1、SAL1、或 SGLU1。各實驗條件進行三重複。在曝露至 MER1、SAL1、或 SGLU1 所示的天數之後（通常 3 天），藉由添加染劑（MTT 或錐藍）至槽中以測量細胞存活。MTT 染劑會取決於槽中活細胞的存在而改變其顏色。受到 MTT 處理的細胞存活係以控制組細胞生長的百分比來評估。錐藍染劑會穿過死細胞，而活細胞可在顯微鏡下計數並估計存活百分比。

成群落分析（clonogenic assay）

生成細胞群落（clonogenicity）或細胞群落形成（colony formation）的分析是藉由獲得週邊血單核細胞（來自正常捐者或白血病患者），該些細胞係被再懸浮於含有重組細胞素的半固體培養基中，且塗佈四重複於 0.1 毫升/槽的 96 槽微滴定盤中，密度為 4×10^4 細胞/0.1 毫升。在 ~10 天 5% CO_2

潮濕氣壓 37 °C 的培養之後，含有多於 50 個細胞的細胞聚集被計數為一個細胞群落。生長抑制作用是被測量為細胞群落生長的百分比，其與控制組（無藥物）樣本的細胞群落生長相較。

分析細胞凋亡

藉由分析細胞凋亡路徑的不同項目，使用三種不同的方法來分析細胞凋亡。由本發明之含砷衍生物所誘導的凋亡細胞百分比是用流式細胞儀來分析的。使用不同的方法染色細胞凋亡的細胞來分析不同方面的凋亡聯級（cascade）。

1. 膜聯蛋白 V (annexin V) 以及碘化丙啶 (PI) 染色。膜聯蛋白 V 會與細胞膜外層上表現有縮醛磷脂醯絲胺酸的細胞結合，而碘化丙啶會染色具有受損 (compromised) 細胞膜之細胞的細胞 DNA。這使得活細胞（沒有被任一螢光染料染色的）可以與凋亡細胞（只被膜聯蛋白 V 染色的）以及壞死細胞（被膜聯蛋白以及 PI 染色）區分開來。

以所指定之本發明含砷化合物處理培養物中的細胞一指定時間之後，以磷酸鹽緩衝溶液 (PBS) 清洗細胞，並再懸浮於 100 微升的含有膜聯蛋白 V-FITC (Travigene) 的結合緩衝液中，以及在黑暗中培養 15 分鐘。於添加 PI 之後用流式細胞儀分析細胞。

2. 粒線體膜電位的細胞螢光測定術。為了測量粒線體膜電位的改變，在以含砷衍生物處理指定的時間之後，將細胞培養在次微莫耳 (submicromolar) 濃度的 MitoTracker

探針中。MitoTracker 探針被動的擴散通過細胞膜並且累積在活性的粒線體中。用兩種顏色染細胞：MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes) 以及 MitoTracker Green FM (Molecular Probes)。以 PBS 清洗細胞，用 MitoTracker 染劑染細胞，以及將細胞於 37 °C 黑暗中培養 1 小時。CMXRos 靠粒線體膜電位被送進粒線體中且與硫醇類殘基反應以形成共價硫醇酯鍵。不論粒線體的膜電位，MitoTracker Green FM 染劑優先累積在粒線體中，因此使其成為一種決定粒線體質量的有用方法。

3. 偵測天冬胺酸特異性半胱胺酸蛋白酶 (*caspase*) 的活性。為了用流式細胞儀監測天冬胺酸特異性半胱胺酸蛋白酶的活性，使用會產生螢光的物質 PhiPhiLux G1D1 (Oncoimmunin)。PhiPhiLux G1D1 是一種用於偵測及測量活細胞中天冬胺酸特異性半胱胺酸蛋白酶 3 以及類天冬胺酸特異性半胱胺酸蛋白酶 3 活性的物質。在以本發明之含砷衍生物處理指定的時間之後，以 PBS 清洗細胞，將細胞再懸浮於 5 微升的基質溶液中，以及將細胞於 37 °C 黑暗中培養 1 小時。經過培養之後，清洗細胞，在流式細胞儀分析之前幾分鐘添加 PI 以在分析時排除壞死細胞。

細胞週期分析

細胞週期是如下分析的：經過與本發明不同的含砷化合物培養 72 小時之後，將細胞 (1×10^6) 在 PBS 中清洗兩次。將細胞團塊 (pellet) 再懸浮於含有低張溶液 (RNase 溶液、Triton X-100、檸檬酸鈉、PEG) 以及 PI (25 微克/

毫升) 的染色溶液中。將細胞於黑暗室溫中培養 15 分鐘，然後用流式細胞儀分析，使用 CellQuest 軟體 (Becton-Dickinson)。

成熟分析

人類急性前淋巴細胞白血病細胞系 NB4 被用來測試本發明之砷劑對白血病細胞成熟的影響。與藻紅素 (Phycoerythrin) 結合的抗 CD11b 單株抗體 (Becton-Dickinson) 被用作為成熟骨髓細胞的標誌。經過與藥物培養 72 小時之後，在 PBS 中清洗細胞。然後將密度為 1×10^6 個細胞/毫升的細胞與稀釋 1:10 之單株抗體培養在一起，於黑暗室溫中 15 分鐘。經過培養之後，細胞在 PBS 中清洗，將團塊再懸浮於 500 微升的 PBS 中。為了排除非專一性結合，以相同的方式製備合適的同型 (isotypic) 控制組。用流式細胞儀分類細胞並使用 CellQuest Document Analysis 分析細胞。

PML/Rar 阿法蛋白質的角色

三氧化二砷被核准作為急性前淋巴細胞白血病的治療，且會殺死 APL 細胞，其主要是因為該些細胞表現 PML/Rar 阿法基因及蛋白質。下面的系統是用來建立白血病細胞中 PML/RAR 阿法融合蛋白質的存在是否與所觀察到之白血病細胞對 SGLU 以及 MER1 的敏感性有關：用 PML/RAR 阿法基因轉染已知對三氧化二砷有抗性的 U937 細胞。經轉染的細胞 (U937/PR9) 是由 Michael Andreeff 博士所提供 (M.D. 安德森癌症中心)。PML/RAR 阿法基

因在鋅的存在下變得有功能性。U937/PR9 細胞系之 Zn^{2+} -可誘導的 PML/RAR 阿法基因表現描述在 Grignani 等人 (Cell, (1993) 74:423-431) 中。為了建立 PML/RAR 阿法表現，在添加含砷化合物 72 小時之前，用 0.1 mM ZnSO_4 處理細胞 3 小時。PML/RAR 阿法表現典型的是在添加鋅於細胞中之後三小時被建立，且可穩定 48 小時。

實施例 3

試管內分析 MER1、SAL1、以及 SGLU1 的抗癌活性

MER1 的抗白血病活性是用 3 天的 MTT 試驗/錐藍排除法 (trypan blue exclusion) 針對六種不同的人類白血病細胞系：AML2、AML3 和 HL60(一種 AML 衍生的細胞系)、NB4 (一種 APL 衍生的細胞系)、K562 (一種 CML-BP 衍生的細胞系)、以及 KBM7 (一種 AML 衍生的細胞系) 進行評估的。MER1 對於 NB4 細胞最有效， IC_{50} (使得 50% 細胞存活的濃度，與未經處理的控制組細胞相較) 為 1 μM (圖 1)。以 MER1 處理其他細胞系顯示 IC_{50} 值範圍在 1.5-4 μM ，包括以 MTT 試驗分析 AML2 細胞以及 KBM7 細胞，還有以錐藍試驗分析 AML2 細胞 (參見圖 2)、AML3 細胞、K562 細胞、以及 HL60 細胞。這個活性與三氧化二砷對這些細胞系的活性 (三氧化二砷活性的例子顯示在圖 1 和圖 2) 相似。國家健康組織 (National Institute Of Health; NIH) 也使用磺醯羅丹明 B 試驗在試管內針對 60 種腫瘤細胞系 (圖 3) 測試了 MER1 的抗癌活性。顯示化合物在低濃度時對許多腫瘤細胞系有活性跡象，特別是對所測試的

白血病細胞。當 MER1 濃度為 1 μ M 時，所有受測試的六種白血病細胞系之生長都顯著被阻礙 (<20% 生長；圖 3 第一圖)。

SAL1 的抗白血病活性是用 3 天的錐藍分析針對兩種人類細胞系：HL60 細胞（繪於圖 4）、以及 Z138（一種 ALL 細胞系）進行分析的。NIH 也使用磺醯羅丹明 B 試驗在試管內針對 60 種腫瘤細胞系（圖 5）測試了 SAL1 的抗癌活性。顯示化合物在低濃度時對許多腫瘤細胞系有活性跡象。

SGLU1 的抗白血病活性是藉由 3 天的 MTT 試驗針對九種人類白血病細胞系：NB4、CAG（多發性骨髓瘤細胞系）、JURKAT 以及 RAJI（淋巴瘤細胞系）、HL60、AML2、AML3、KBM5（CML-BP 衍生的細胞系）、和 KBM7 進行分析的。細胞系 NB4 的結果繪於圖 6。也用三天的錐藍排除法針對六種人類白血病細胞系：NB4、CAG、JURKAT、HL60、KBM3（AML 細胞系）、以及 Z119（一種 ALL 細胞系）分析 SGLU1 的抗白血病活性，顯示有類似的結果。其活性與三氧化二砷活性相似，如圖 6 所繪。也用五天的成細胞群落分析針對 HL60 人類白血病細胞分析 SGLU1 的抗白血病活性（圖 7）。NIH 也在試管內針對 60 種腫瘤細胞系使用磺醯羅丹明 B 試驗分析 SGLU1 的抗癌活性（圖 8）。顯示化合物在低濃度時對許多腫瘤細胞系有活性跡象。

實施例 4

MER1 以及 SGLU1 對惡性和正常血球細胞的毒性測定

將 MER1 針對來自五位白血病患者（三人有 AML、一人有 CML-BP、以及一人有 ALL；圖 9-13）的血球單核細胞（>80%母細胞(blast)）進行測試。在短期的細胞培養期中，MER1 與三氧化二砷一樣有效（圖 9、10、以及 12）。此外，分析 MER1 對來自四個健康捐者的樣本之正常週邊血單核細胞的毒性。在短期的細胞懸浮培養期的 MTT 試驗中，MER1 對正常細胞比對來自白血病患者的惡性細胞毒性低（圖 14）。最重要的是，長期的細胞群落分析中，MER1 比三氧化二砷對正常細胞的毒性更低（圖 15）。

將 SGLU1 針對來自三位白血病患者的血球單核細胞進行測試，包括有一位 CLL 患者（圖 16 顯示了與三氧化二砷的比較）、以及兩位具有 AML 的患者（圖 17）。在長期的成細胞群落分析中，SGLU1 比三氧化二砷對正常細胞的毒性更低（圖 18）。除了圖 18 所示的八天成細胞群落分析，也進行了 9 天以及 13 天成細胞群落分析。

實施例 5

MER1 調配物以及安定性

所得到的數據顯示當 MER1 溶於磷酸鹽緩衝溶液中時至少會安定兩個月，而這期間透過試管內實驗可知溶液維持了同樣的細胞毒性（圖 19）。此外，進行了詳細的 MER1 和 SGLU1 的醫藥分析。

1. MER-1 的醫藥分析

頃發現 MER-1 具有足夠的溶解性和安定性而可以被接

受作為臨床應用的給藥（參見下面的數據）。它也足夠穩定，所以溶液可以即席的混合用於動物測試以及也許於早期的第 I 期研究。然而，溶液的安定性並不足以製造較大量的液體劑量形式以用於較大的臨床試驗以及需要長期儲存的商業市場銷售。這些應用涵蓋了在使用時才恢復原狀的凍乾劑量形式。製備此類凍乾組成物是技藝中所熟知的。

A. 溶解性

MER-1 的水溶性為約 15 毫克/毫升。可以達到高達約 150 毫克/毫升的較高 MER-1 濃度，其藉由使用 0.1 N 的氫氧化鈉來調整 pH 到 6。在乙醇中，MER-1 的溶解度高於 100 毫克/毫升。

B. 溶液 pH

MER-1 水溶液的自然 pH 值如下：

0.1 毫克/毫升	pH 3.7
-----------	--------

1 毫克/毫升	pH 3.1
---------	--------

10 毫克/毫升	pH 2.3
----------	--------

C. 溶液安定性

在濃度為 10 毫克/毫升之 0.9% 氯化鈉注射液中分析多種 pH 值的影響。在冷藏下對 pH 為 2.3（自然 pH）以及用氫氧化鈉調整至 pH 5、7.1、和 8.5 的樣本進行三個月的分析。pH 5 的樣本有較佳的安定性，可在三個月後維持約 89% 的起始濃度。在十四天之後，pH 7.1 以及 8.5 的溶液分別維持約 92% 以及 96%，但在那之後就低於 90%。pH 2.3 的

樣本可穩定 7 天，但在那之後會形成沉澱物。參見表 2。

較低濃度的 MER-1 在水溶液中是較不穩定的，但隨著濃度升高而增加穩定性。在水中 0.1 毫克/毫升時，約 40% 的藥物會在一小時之內損失掉。當在 0.9% 氯化鈉中的注射液濃度從 1 增加到 10 毫克/毫升時，該藥物可穩定較長時間。在冷藏下，10 毫克/毫升的濃度可穩定至三個月，但是在那之後會有不可接受的降解發生。參見表 3。

表 2. 在 0.9% 氯化鈉中注射液之 10 毫克/毫升 MER-1 的 pH 安定性狀況

分析間隔 (天)	剩餘的 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		

表 3. 在 0.9% 氯化鈉中注射液之各種濃度的 MER-1
溶液安定性

分析間隔 (天)	剩餘的 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

^a 在水中。

^b 在 60 分鐘內發生約 40% 損失。

^c 在此期間沒有測量。

II. SGLU-1 的醫藥分析

頃發現 SGLU-1 具有足夠的溶解性和安定性而可以被接受作為臨床應用的給藥。它也足夠穩定，所以溶液可以即席的混合用於動物測試以及也許於早期的第 I 期研究。然而，溶液的安定性並不足以製造較大量的液體劑量形式

以用於較大的臨床試驗以及需要長期儲存的商業市場銷售。這些應用中涵蓋了在使用時才恢復原狀的凍乾劑量形式。

A. 溶解性

SGLU-1 的水溶解性約 60 毫克/毫升。可以藉由使用 0.1 N 氫氧化鈉增加溶液 pH 以達到更高的 SGLU-1 濃度。然而，但是藥物在鹼性環境中並不安定。SGLU-1 不溶於乙醇。

B. 溶液 pH

SGLU-1 水溶液的自然 pH 值為：

0.1 毫克/毫升	pH 3.9
1 毫克/毫升	pH 3.2
2.5 毫克/毫升	pH 3.0
60 毫克/毫升	pH 2.7

C. 溶液安定性

在濃度為 2.5 毫克/毫升之 0.9% 氯化鈉注射液中分析多種 pH 值的影響。在冷藏下對 pH 為 3（自然 pH）以及用氫氧化鈉調整至 pH 5 和 7 的樣本進行 30 天的分析。pH 5 的樣本有稍微較佳的安定性，可在 30 天後維持約 90% 的濃度。pH 3 以及 7 的溶液分別維持約 84% 以及 82%。參見表 4。

對在 0.9% 氯化鈉注射液中已調整至 pH 5 的濃度為 20 毫克/毫升以及 50 毫克/毫升的 SGLU-1 進行安定性測試。在冷藏下經過 60 天儲存，損失少於 10%。安定性結果顯示於表 5。

SGLU-1 在較低濃度時較不安定。水中 0.1 毫克/毫升時，室溫 24 小時內有超過 10% 降解發生。

表 4. 在 0.9% 氯化鈉中注射液之 2.5 毫克/毫升 SGLU-1 的 pH 安定性狀況

分析間隔 (天)	剩餘的 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

表 5. 於 4 °C 時 20 毫克/毫升以及 50 毫克/毫升

SGLU-1 於 0.9%氯化鈉注射液中的安定性

剩餘的 SGLU-1 (%)		
分析間隔 (天)	20 毫克/毫升	50 毫克/毫升
7	101	97
14	98	98
30	94	94
60	92	93
90	85	87

實施例 6

MER1、SAL1、以及 SGLU1 的機制

誘導細胞凋亡、影響細胞週期、誘導成熟、以及異常 PML/Rar 阿法融合蛋白的降解都顯示是三氧化二砷作用的機制。本發明試驗了 MER1 誘導 HL60 人類白血病細胞細胞凋亡的潛力（試驗時間 1-3 天）。細胞凋亡的誘發緊接著存活細胞的百分比降低（圖 20、21 和 22）。使用 MER1 以及 SGLU 兩者的額外研究證實這些化合物所誘發的細胞凋亡（膜聯蛋白 V 染色）牽涉到粒線體膜電位的改變（CMXRos 染色）以及天冬胺酸特異性半胱胺酸蛋白酶（PhiPhiLux 染色）的活化，參見圖 23A、23B、23C、23D、23E、以及 23F。



已有報導說三氧化二砷會誘發表現 PML/Rar 阿法基因的細胞之成熟作用。為了測試 SGLU 以及 MER1 是否具有類似的能力，使用 NB4 細胞（會表現 PML/Rar 阿法基因），且在暴露於砷劑 3 天之後，用流式細胞儀量測細胞表面上 CD11b 的表現。CD11b 是骨髓細胞成熟的標誌。數據顯示在圖 24，顯示 SGLU 以及 MER1 並沒有誘發成熟作用。以本發明不同的砷劑所處理過的 HL60 細胞之可能的細胞週期擾亂係用流式細胞儀以及碘化丙啶染色來分析。發現 SGLU 會造成顯著的細胞累積在細胞週期 S 期，而 MER1 會造成較輕微的相似影響（圖 25A、25B）。圖 25C 繪示三氧化二砷所造成的 S 期細胞累積。

為了確認白血病細胞中 PML/Rar 阿法融合蛋白質的存在是否導致了所觀察到之白血病細胞對 SGLU 以及 MER1 的敏感性，使用下面的系統：以 PML/Rar 阿法基因轉染已知對三氧化二砷有抗性的 U937 細胞。這個基因在鋅的存在下會變得有功能性。所以，用不同的砷劑以及含或不含鋅來處理經轉染的 U937 細胞（U937/PR9）。結果顯示在圖 26A、26B、和 26C，顯示功能性 PML/Rar 阿法基因的存在是細胞對三氧化二砷有敏感性的必要條件，但對於細胞對 SGLU 以及 MER1 的敏感性沒有影響。

實施例 7

體內分析 MER1、SAL1、以及 SGLU1 的治療潛力

人類白血病的動物模型是由具有人類白血病細胞的嚴重聯合免疫缺陷（SCID）小鼠來代表。這個模型的獨特性

在於它可以與患者中所見之相似模式讓人類白血病在動物中成長。它提供了快速試驗不同劑量和計劃的新藥在體內之功效的機會。此外，不僅可以監測動物的存活，也可以監測治療對該疾病散佈模式的影響。SCID 小鼠的治療通常是在接種人類白血病細胞兩天之後開始。在注射了一種人類白血病細胞系之 SCID 小鼠中的起始體內實驗會決定另一個小鼠模型與起始人類試驗之 MER1、SAL1、或 SGLU1 的劑量以及計劃表。

天天監測動物，並在即將死亡或完成研究時犧牲之（通常是控制組存活期的兩倍時間）。對存活長時間的動物進行屍體解剖，並用對 HLA-DQ α 之 DNA 序列有專一性的引子以聚合酶連鎖反應來分析組織中人類 DNA 的存在。因為白血病是全身性的疾病，所以檢查來自不同小鼠組織之 DNA 的 HLA-DQ α ，以研究微量殘存惡性細胞（minimal residual disease）的存在。

SCID 小鼠之體內治療研究的先決條件是 1) 確認動物中有白血病細胞植入以及 2) 決定所測試之化合物的急性毒性（決定最大容許劑量）。

I. 確認動物中有白血病細胞植入。第一個體內實驗涉及到四組 SCID 小鼠。每一組有五隻小鼠被腹腔接種不同類型的人類白血病細胞：HL60(AML)、KBM5(CML-BP)、KBM7-急性骨髓性白血病、以及 Z119(ALL)。HL60 和 KBM5 細胞顯示有傑出的植入：在接種之後，HL60 組中所有小鼠都在第 31 天至第 36 天內死亡，而 KBM5 組的小鼠

則在第 34 天至第 36 天死亡。植入是用 PCR 來確認的，其係測試人類 HLA-DQ α 的 DNA 序列（所有小鼠之所有組織的試驗都是陽性的）。在第 100 天時，KBM7 組的五隻小鼠中仍有四隻存活，而 Z119 組的五隻小鼠有五隻存活。在那一天犧牲所有小鼠，並用 PCR 分析所有組織的 HLA-DQ α 。試驗呈陰性，顯示沒有白血細胞植入。需要同類型之替代細胞系以進行治療的研究。

II. 決定所測試之化合物的急性毒性。在毒物學測試中，使用免疫勝任（immunocompetent）的 Swiss Webster 小鼠。確認三氧化二砷的 LD₅₀ 濃度是 10 毫克/公斤。

A. SLGU1 在 Swiss-Webster 小鼠中的簡易毒性測試。對 Swiss-Webster 小鼠進行兩個實驗以試驗 SGLU1 的毒性。在第一個實驗中，SGLU1 的給藥劑量是 178 毫克/公斤、285 毫克/公斤、以及 357 毫克/公斤，經由 IP 途徑。毒性是由小鼠的死亡率來測量的。發現小鼠相當能忍受 178 毫克/公斤以及 285 毫克/公斤劑量的 SGLU1。這個實驗的數據總括在表 6。

表 6. SLGU1 的簡易毒性測試

	劑量（毫克/公斤）		
IP 給藥	178	285	357
死亡/總數	0/5	1/5	5/5

在第二個實驗中，經由 IP 以及 IV 途徑給藥劑量 318 毫克/公斤和 375 毫克/公斤的 SGLU1 來研究對各隻經秤重的小鼠之毒性。所以，得到 SGLU1 的 LD₅₀ 濃度為 350 毫

克/公斤。結果總括在表 7。

表 7. 各隻經秤重的小鼠之較佳表現

	劑量 (毫克/公斤)	
	318	375
IP 給藥的死亡數 / IP 給藥的總數	0/5	4/5
IV 給藥的死亡數 / IV 給藥的總數	1/5	5/5

B. MER-1 在 Swiss-Webster 小鼠中的簡易毒性測試。

對 Swiss-Webster 小鼠進行兩個實驗以試驗 MER-1 的毒性。在第一個實驗中，MER-1 的給藥劑量是 71 毫克/公斤、107 毫克/公斤、以及 143 毫克/公斤，經由 IP 途徑。毒性是由小鼠的死亡率來測量的。發現小鼠相當能忍受 71 毫克/公斤以及 107 毫克/公斤劑量的 MER-1，沒有死亡。這個實驗的數據總括在表 8。

表 8. MER-1 的簡易毒性測試

	劑量 (毫克/公斤)		
	71	107	143
IP 給藥			
死亡/總數	0/5	0/5	5/5

在第二個實驗中，經由 IP 以及 IV 途徑給藥劑量 125 毫克/公斤、156 毫克/公斤、和 170 毫克/公斤的 MER-1 來研究對各隻經秤重的小鼠之毒性。所以，發明人得到 MER-1 的 LD₅₀ 濃度為 150 毫克/公斤。結果總括在表 9。

表 9. 各隻經秤重的小鼠之較佳表現

	劑量 (毫克/公斤)		
	125	156	170
IP 給藥的死亡數 /IP 給藥的總數	0/5	2/5	5/5
IV 給藥的死亡數 /IV 給藥的總數	0/5	0/5	5/5

C. SAL1 在 Swiss-Webster 小鼠中的簡易毒性測試。

與上述實驗相似，簡單的 SAL1 的毒性測試得到 SAL1 的 LD₅₀ 濃度為 50 毫克/公斤。

實施例 8

MER1、SAL1、以及 SGLU1 的藥物動力學

MER1、SAL1、以及 SGLU1 的藥物動力學模式是在小鼠中分析的，其係透過尾巴靜脈的靜脈給藥。先實驗接近先前決定之 MTD 的劑量。血液樣本是在給藥（8 隻小鼠/時間點）之後不同的取樣時間點（0（預先）、5、10、15、30、45、60 分鐘以及 2、3、4、6、8、12、16、24、48、72 小時）取得的。取血時，小鼠以吸入 CO₂ 安樂死，然後斬首並放血以收集血液。血液樣本被收集在含有肝素的試管中，經離心、和血漿分離並保存在 -80 °C 直到進行分析。重複實驗，血漿超濾液是透過在 Amicon Centrifree 微分隔單元中以 2000g x 20 分鐘離心血漿所收集到的。將超濾液儲存在 -80 °C 直到進行分析。在所選的組別裡，各種組織是在死後收集的，並且冷凍以用於分析組織的狀況。血漿以及超濾液樣本中的砷含量是藉由石墨爐（無火焰）原子

吸收光譜法進行測量的。所測得的藥物濃度是被分為若干部分以分析得到藥物動力學參數。

實施例 9

毒物學研究

多劑量毒物學研究

MER-1 以及 SGLU-1 組的小鼠中進行進一步的研究，以決定多劑量給藥的劑量限制毒性。

分析了每天 110、120、130、140、以及 150 毫克/公斤 x5 的 MER1 多劑量 I.V.毒物學研究的結果總結如下：該研究著重在顯微鏡分析心臟、肺臟、肝臟、以及腎臟。冠狀動脈的中央增生（medial hyperplasia）通常是在雄性小鼠中比雌性小鼠中更常見的自發性器官損害。腎臟以及肝臟的發炎損傷（例如淋巴細胞聚集）推斷是與 MER1 無關的偶然發現。肝細胞過度生長和腎小管的急性壞死是不確知重要性的損傷，在受治療的兩種性別小鼠中皆不一致地被看到。在雄性小鼠中較高劑量時所觀察到的全小葉過度生長（panlobular hypertrophy）有時是與微泡空泡狀態（microvesicular vacuolation）有關，顯示可能有肝毒性。這些動物通常是在單一劑量後瀕死時犧牲的。雖然血管病變在 MER1 單一劑量實驗中是常見的，但是當出現時，肺血管損傷在這些多劑量之小鼠中並不一致或顯著。雄性小鼠忍受較低劑量以及有較大的死亡率顯示雄性對這個化合物的毒性更敏感。

SGLU-1 多劑量 I.V.的結果總結如下：五隻小鼠/性別

每天透過尾巴靜脈的靜脈注射給藥劑量為 50、100、150、200、250、300、以及 350 毫克/公斤/天的 SGLU。所有存活的小鼠留下 28 天、犧牲、以及取得所指定的組織、福馬林固定、並且檢查。

死亡發生在 250、300、以及 350 毫克/公斤/天，雌性小鼠比雄性更易受影響。顯微鏡觀察發現了與化合物有關的肺、肝、胸腺、以及睪丸的損傷。在這個實驗中，雌性小鼠的無效應劑量 (no-observable-effect level) 是 150 毫克/公斤，是根據 1/5 雌性小鼠在 200 毫克/公斤/天的肝細胞中央小葉肥大。在這個實驗中，雄性小鼠的無效應劑量 (NOEL) 是 100 毫克/公斤/天，是根據 1/5 雄性小鼠在 150 毫克/公斤/天的睪丸輸精管退化。

實施例 10

HPLC 分析方法的開發以及確認

HPLC 被用在開發和確認有機砷劑之用途的方法中。HPLC 法包括：標準曲線與線性、再現性(最少 10 次注射)、敏感性(最低可計量濃度；最低可測得濃度)、準確度(例如使用三個獨立製備的 0.025 毫克/毫升、0.1 毫克/毫升、1 毫克/毫升溶液)、因熱的有意降解、鹼性溶液酸性溶液以及 H_2O_2 、以及完整藥物的波峰定義、主體不純度 (bulk impurity) 和起始物質、還有降解產物。大量的原料藥物是透過 HPLC 在參考標準批中分析純度、乾燥時的損失、光學旋轉、熔點、以及視覺外觀。

實施例 11

劑量形式的開發

有機砷劑的劑量是根據藥理實驗室（Pharmacology Laboratory）所研發的調配物溶劑系統而開發的。這包括決定潛在水性載劑中以及過濾的安定性、選擇目標濃度以進行進一步研發、當需要時測試與調整滲透壓和 pH、選擇套裝以及結束的外觀、決定熱安定性（高壓蒸氣處理）、測試視覺外觀和微粒負載並且決定目標 pH 值和可接受的目標濃度範圍。

實施例 12

臨床試驗

這個實施例是關於人類治療操作的開發，係使用砷劑（MER1、SGLU 以及 SAL-1）還有本發明的組成物或其醫藥調配物。這些組成物是用在多種癌症包括白血病和其他形式之固體癌症與腫瘤的臨床治療上。

根據本發明的揭示，各種執行臨床試驗的要素都是熟習此項技藝者所知的，包括患者治療以及監測。下面的資訊是提供作為使用本發明組成物於建立臨床試驗時的一般性指引。

第 1 期臨床試驗的候選人是接受了所有習知治療都無效的患者。MER1、SAL-1、或 SGLU-1 的醫藥調配物是靜脈內給藥，每四週五天的起始計劃。熟習此項技藝者能了解本發明的調配物可以藉由任何替代途徑（依據適合該損傷的本質而定）給藥，包括任何方法的給藥，包括局部、區域、或全身給藥。也涵蓋經口以及局部施用。本發明的

組成物典型上是經口或非經腸胃以含有標準、熟知的無毒之想要的生理可接受的載劑、佐藥、以及媒介的計量單位調配物給藥。本文所用的術語非經腸胃的包括皮下注射、靜脈內、肌肉內、動脈注射、或灌注技術。

為了監測疾病的進展以及分析抗腫瘤反應，每個月測量患者之適當的腫瘤標誌。為了評估藥物的功效，監測下面的參數：腫瘤大小及/或癌細胞的骨髓浸潤。用來監測患者進展和治療功效的試驗可包括：體檢、X 光、血液檢查以及其他臨床實驗室方法。在第 1 期研究所給的劑量是逐步上升的，就如同標準第 1 期臨床階段試驗所做的，即劑量會逐步上升直到到達最大可耐受範圍。

臨床反應可以用可接受的方式來定義。例如，完全反應可以定義為癌症細胞跡象消失至少兩個月。而部分反應可以定義為癌症細胞減少 50% 至少兩個月。

臨床試驗的進行可以藉由單獨使用本發明的治療劑或與技藝中所用之其他抗癌藥物以及其他標準癌症治療合併使。本發明的治療組成物可以在其他抗癌劑之前、之後、或同時給藥給患者。

典型的治療療程會因個別患者以及所治療的疾病而異，是熟習此項技藝者所知的方式。例如，具有白血病的患者可以以四週的週期被治療，然而當患者被觀察到有副作用時可以使用較長的持續時間，且如果患者能如預期的忍受該治療，則也可用較短期的治療。各週期含有 5 個個別劑，然而這也可以依據臨床狀況而改變。一旦被臨床醫

生選擇使用，該攝生法可以連續每三週五劑或頻率少一些。當然，這些只是例示的治療時間，熟習此項技藝者可以容易的了解有許多其他的時間療程是可能的。

患者可能已（但不必要）受到先前化學-、放射線-或基因治療的治療了。理想上，患者會展現足夠的骨髓功能（定義為週邊粒細胞絕對數 $> 2,000/\text{mm}^3$ 以及血小板數 $100,000/\text{mm}^3$ ，足夠的肝功能（膽紅素 1.5mg/dl ）與足夠的腎功能（肌酸酐 1.5mg/dl ）。

在一具體實例中，給藥只需要注射治療組成物至腫瘤。在另一項具體實例中，導管被插到腫瘤的位置，而腔室可以持續傾注一段想要的時間。

當然，上述的治療攝生法可以根據臨床前試驗所獲得的知識而被改變。熟習此項技藝者可以採用本說明所揭露的資訊並根據說明書中所述的臨床試驗將治療攝生法最適化。

實施例 13

S-二甲砷麩胱甘肽的替代合成

下面的程序描述了製備 S-二甲砷麩胱甘肽的方法。所使用的數量可以被倍增或分割，如果維持各自的比例，則仍能得到相同的成功。

二甲基砷

二甲基砷酸， $(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{O})\text{OH}$ ，是由以色列的 Luxembourg Chemical Co., Tel Aviv 所提供。該產品附有其純度說明以及是以 99.7% 的純度供應的。將二甲基砷酸

溶於水-鹽酸中至 pH 3。將二氧化硫流通過這個溶液約一小時。分離出來的二甲基氯胂是重、無色油。用分液漏斗分離水 / $(\text{CH}_3)_2\text{AsCl}$ 兩液相。氯化二甲基胂被萃取到二乙醚中，且該醚溶液用無水硫酸鈉乾燥。把經乾燥的溶液換到蒸餾燒瓶中，緩慢加熱以蒸發掉醚。藉由蒸餾來純化剩下來的液體二甲基氯胂。收集在 106-109 °C 沸騰的部分。無色的油狀產物在 1.65 ppm 有單純的 ^1H NMR 共振。

S-二甲胂麩胱甘肽

在 500 毫升燒瓶中放入 7 公克的麩胱甘肽，該麩胱甘肽是從 Aldrich Chemical Co. 取得，純度 98%，並且溶於 250 毫升的 1,2-二甲氧基乙烷中。在這個溶液中加入 3.3 公克的二甲基氯胂。然後添加 3.5 公克的吡啶（經由 NaOH 團快乾燥後再二次蒸餾）。將溶液回流一小時，然後於室溫攪拌三小時。

分離出來的想要的產物 S-二甲胂麩胱甘肽是吡啶鹽酸鹽錯合物。用過濾移出固體並以 1,2-二甲氧基乙烷徹底清洗。然後用無水氯化鈣於真空乾燥。所得到的 S-二甲胂麩胱甘肽吡啶鹽酸鹽為 10.3 公克，熔點為 135-140 °C。這個物質被用於上述實施例 2 至 12 的生物試驗中。

實施例 14

無吡啶鹽酸鹽的 S-二甲胂麩胱甘肽 (GLU) 合成

二甲胂麩胱甘肽的製備是用調整過的 Chen 方式 (Chen, G. C. 等人 Carbohydrate Res. (1976) 50: 53-62)，其內容在此以其全文併入作為參考。簡單的說，是將二硫代雙（二

甲肈麩醯胺) 在氮氣下溶於二氯甲烷中。逐滴將四甲基二肈加到溶液中，並且於室溫氮氣下攪拌該反應物隔夜，然後暴露於空氣一小時。接下來蒸發該混合物至乾燥，用水清洗殘餘物並乾燥得到粗固體，將固體從甲醇中再結晶以得到 S-二甲肈麩胱甘肽。

實施例 15

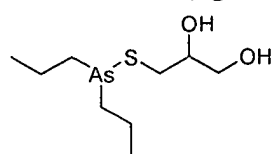
無吡啶鹽酸鹽之 S-二甲肈麩胱甘肽 (GLU) 的第三個合成

S-二甲肈麩胱甘肽的製備是用 Cullen 等人的方法 (J. Inorg. Biochem. (1984) 21: 179-194)，其內容在此以其全文併入作為參考。簡單的說，是將二甲基肈酸以及麩胱甘肽在氮氣下溶於水中並攪拌。將所得到的溶液攪拌 12 小時，然後減壓蒸發不加熱至乾燥以得到固體，用冷甲醇萃取之。然後在減壓下將甲醇溶液蒸發至乾燥，將所得到的固體從甲醇/水中再結晶、收集、並乾燥以得到 S-二甲肈麩胱甘肽。

實施例 16

試管內分析 GMZ27 的抗癌活性

GMZ27 是一種具有下面結構的有機肈



，用 72 小時的 MTS 試驗針對不同的人類急性骨髓性白血病 (AML) 細胞系測試，發現 IC_{50} 是 0.56-0.86 μM 。這活性比三氧化二砷對這些細胞系的活性還要高 (圖

27A)。然後作長時間（7天）的群落形成試驗分析 GMZ27 的抗白血病活性，其中細胞是生長在半固體培養基中。GMZ27 比三氧化二砷對人類白血病細胞系以及來自患有急性或慢性白血病之患者的白血病細胞有顯著較高的活性（圖 27B）。

然後比較 GMZ27 和三氧化二砷的抗癌活性機制。在除了 APL 以外的細胞中，三氧化二砷（ATO）會透過數種機制發揮其抗白血病的活性，該些機制包括誘發細胞凋亡、改變會造成細胞 GSH 氧化還原系統之調節作用的細胞內 ROS 的製造、細胞分化/成熟以及對細胞週期調控可能的影響。

GMZ27 能比 ATO 更有效的誘發細胞凋亡。結果顯示它會活化粒線體凋亡路徑，因為它改變了粒線體的膜電位以及切割了天冬胺酸特異性半胱胺酸蛋白酶 9，但也藉由替代的、外在的、路徑，因為它切割了天冬胺酸特異性半胱胺酸蛋白酶 8。這導致了天冬胺酸特異性半胱胺酸蛋白酶 3 活性的誘發、PARP 的切割、以及膜聯蛋白 V 結合至細胞（圖 28 和 29）。

用丁基硫堇亞胺（buthionine sulfoximine, BSO）預處理白血病細胞使他們對 GMZ27 更敏感；而用二硫蘇糖醇（dithiothreitol, DTT）或 N-乙酰半胱胺酸（NAC）預處理之會增加細胞內 GSH，使得細胞較不敏感（圖 30）。這說明了 GMZ27（就像 ATO）會調節白血病細胞中的 GSH 氧化還原系統，然而，它比 ATO 更早作用以及程度更大（圖

31)。

GMZ27 在低劑量被發現會部分誘發細胞的分化/成熟，這是由細胞表面 CD11b 成熟標誌的誘發所斷定的。相較於 ATO，這個影響是不重要的（圖 32）。GMZ27 對細胞週期的進展沒有影響（圖 33）。

用長時間的群落形成試驗分析 GMZ7 對健康捐者週邊血單核細胞的毒性。GMZ27 比 ATO 對正常細胞的毒性更低（圖 34）。

在正常 Swiss-Webster 小鼠中進行決定 GMZ27 單一劑量注射之毒性的試驗。毒性的測量是根據死亡率。發現殺死 50% 小鼠 (LD_{50}) 的 GMZ27 濃度是 100 毫克/公斤。相對的，ATO 的 LD_{50} 低多了，只有 10 毫克/公斤。

實施例 17

製備 N-（2-S-二甲肈硫代丙醯）甘胺酸

將 N-（2-肈基丙醯）甘胺酸（0.02 莫耳，3.264 公克）置於 1,2-二甲氧基乙烷（50 毫升）中，並且逐滴添加二甲基肈（0.025 莫耳，3.52 公克）。於室溫攪拌反應混合物四小時。然後藉由過濾分離出白色的三乙基胺鹽酸鹽沉澱物，在減壓蒸發下減少溶液的體積。將所得到的殘餘物用管柱層析法純化以得到想要的產物（3.5 公克）。

實施例 18

製備 2-（S-二甲肈）硫代菸鹼酸

將 2-肈基菸鹼酸（0.02 莫耳，3 公克）置於二氯甲烷（50 毫升）中，並逐滴添加二甲基肈（0.025 莫耳，3.52

公克)。將反應物攪拌回流四小時。藉由蒸餾移除二氯甲烷，將殘餘物溶於二乙醚(50毫升)中，並以水沖洗(3x)。溶液用 Na_2SO_4 乾燥，經過濾，減壓濃縮之後可得到想要的產物，是淡黃色固體。

實施例 19

L-(+)-2-胺基-3-(二甲胂)硫代-3-甲基丁酸

將 L-(+)-2-胺基-3-巰基-3-甲基丁酸(0.01 莫耳，1.55 公克)置於二氯甲烷(50 毫升)中，逐滴添加於二氯甲烷(5 毫升)中的二甲基氯胂(0.015 莫耳，2.1 公克)，然後逐滴添加三乙基胺(1.6 公克)。攪拌混合物四小時，在過濾反應混合物之後，想要的產物會以漂浮的白色結晶固體出現。依序用二氯甲烷、乙酸乙酯、以及丙酮清洗結晶固體以得到想要的產物(1.6 公克；熔點 107-109 °C)。

均等物

熟習此項技藝者不需使用例行程序實驗就會知道、或能夠確知許多本文所描述之化合物以及其使用方法的均等物。這些均等物是被認為落於本發明的範疇內的，且是被後面的申請專利範圍所涵蓋的。熟習此項技藝者也會知道本文所述之具體實例的所有組合也在本發明的範疇內。

於 2002 年 1 月 7 日所提申的美國申請案序列號 60/346,492 以及於 2003 年 1 月 7 日所提申的 WO 2003/057012 在此以其全文併入作為參考。所有上述所引用的參考資料和出版物在此併入作為參考。

【圖式簡單說明】

下面的圖式構成了本說明書的一部分，且被包括在內以進一步證明本發明的一些方面。本發明可參照一或更多的這些圖示配合本文所提供的特定具體實例的詳述而被更加了解。

圖 1 顯示人類白血病細胞系 NB4 在所指定的 S-二甲肈-硫代琥珀酸 (MER1) 或三氧化二砷濃度下培養 3 天。

圖 2 顯示人類白血病細胞系 AML2 在所指定的 MER1 或三氧化二砷濃度下培養 3 天。細胞存活是用錐藍排除法 (trypan blue exclusion) 評估。

圖 3A 顯示當以 MER1 處理時人類白血病細胞系的生長百分比。

圖 3B 顯示當以 MER1 處理時人類 CNS 細胞系的生長百分比。

圖 3C 顯示當以 MER1 處理時人類腎臟癌細胞系的生長百分比。

圖 3D 顯示當以 MER1 處理時人類非小細胞肺癌細胞系的生長百分比。

圖 3E 顯示當以 MER1 處理時人類黑素瘤細胞系的生長百分比。

圖 3F 顯示當以 MER1 處理時人類前列腺癌細胞系的生長百分比。

圖 3G 顯示當以 MER1 處理時人類結腸癌細胞系的生長百分比。

圖 3H 顯示當以 MER1 處理時人類卵巢癌細胞系的生長百分比。

圖 3I 顯示當以 MER1 處理時人類乳癌細胞系的生長百分比。

圖 4 顯示在所指定的 S-二甲肈-2-硫代苯甲酸 (SAL1) 濃度下培養 3 天的 HL60 人類白血病細胞細胞存活。

圖 5A 顯示當以 SAL1 處理時人類白血病細胞系的生長百分比。

圖 5B 顯示當以 SAL1 處理時人類 CNS 癌症細胞系的生長百分比。

圖 5C 顯示當以 SAL1 處理時人類腎臟癌細胞系的生長百分比。

圖 5D 顯示當以 SAL1 處理時人類非小細胞肺癌細胞系的生長百分比。

圖 5E 顯示當以 SAL1 處理時人類黑素瘤細胞系的生長百分比。

圖 5F 顯示當以 SAL1 處理時人類前列腺癌細胞系的生長百分比。

圖 5G 顯示當以 SAL1 處理時人類結腸癌細胞系的生長百分比。

圖 5H 顯示當以 SAL1 處理時人類卵巢癌細胞系的生長百分比。

圖 5I 顯示當以 SAL1 處理時人類乳癌細胞系的生長百分比。

圖 6 顯示以所指定的 S-二甲肼-麩胱甘肽 (SGLU1) 或三氧化二砷濃度培養 3 天之 NB4 細胞的細胞存活。

圖 7 顯示五天的細胞群落分析 (clonogenic assay)，其係使用 HL60 細胞和 SGLU1 或三氧化二砷進行的。

圖 8A 顯示以 SGLU1 處理的人類白血病細胞系生長百分比。

圖 8B 顯示以 SGLU1 處理的人類 CNS 細胞系生長百分比。

圖 8C 顯示以 SGLU1 處理的人類腎臟癌細胞系生長百分比。

圖 8D 顯示以 SGLU1 處理的人類非小細胞肺癌細胞系生長百分比。

圖 8E 顯示以 SGLU1 處理的人類黑素瘤細胞系生長百分比。

圖 8F 顯示以 SGLU1 處理的人類前列腺癌細胞系生長百分比。

圖 8G 顯示以 SGLU1 處理的人類結腸癌細胞系生長百分比。

圖 8H 顯示以 SGLU1 處理的人類卵巢癌細胞系生長百分比。

圖 8I 顯示以 SGLU1 處理的人類乳癌細胞系生長百分比。

圖 9 顯示以所指定之 MER1 或三氧化二砷濃度培養三天之來自急性骨髓性白血病 (AML) 患者的單核細胞的細

胞存活。

圖 10 顯示以所指定之 MER1 或三氧化二砷濃度培養四天之來自 AML 患者的單核細胞的細胞存活。

圖 11 顯示以所指定之 MER1 或三氧化二砷濃度培養五天之來自 AML 患者的單核細胞的細胞存活。

圖 12 顯示以所指定之 MER1 或三氧化二砷濃度培養三天之來自慢性骨髓性白血病急變期 (chronic myeloid leukemia - blastic stage, CML-BP) 患者的單核細胞的細胞存活。

圖 13 顯示以所指定之 MER1 或三氧化二砷濃度培養四天之來自急性成淋巴性白血病 (ALL) 患者的單核細胞的細胞存活。

圖 14 顯示以所指定之 MER1 或三氧化二砷濃度培養五天之來自正常捐者的單核細胞的細胞存活。

圖 15 顯示八天的細胞群落分析，其係使用正常捐者細胞以及 MER1 或三氧化二砷進行的。

圖 16 顯示以所指定之 SGLU1 或三氧化二砷濃度培養五天之來自慢性淋巴性白血病 (CLL) 患者的單核細胞的細胞存活。

圖 17 顯示八天的細胞群落分析，其係使用來自 AML 患者的單核細胞，與 SGLU1 或三氧化二砷進行的。

圖 18 顯示八天的細胞群落分析，其係使用正常捐者細胞以及 SGLU1 或三氧化二砷進行的。

圖 19 顯示 MER-1 調配物的安定性，其係使用錐藍分

析 HL60 細胞以及 MER-1。

圖 20 顯示由膜聯蛋白 V 試驗所評估之以 MER1 處理 H1-60 細胞 1、2、或 3 天的細胞凋亡。

圖 21 顯示由碘化丙啶 (propidium iodide) 試驗所評估的以 MER1 處理 H1-60 細胞 1、2、或 3 天的死亡細胞數。

圖 22 顯示由錐藍排除法 (trypan blue exclusion) 所評估的以 MER1 處理 HL60 細胞 1、2、或 3 天的細胞存活。

圖 23A 顯示 HL-60 細胞的膜聯蛋白 V 試驗，其係在第 48 小時被 MER1、SGU1、或氧化砷處理。

圖 23D 顯示 HL-60 細胞的膜聯蛋白 V 試驗，其係在第 72 小時被 MER1、SGU1、或氧化砷處理。

圖 23B 顯示 HL-60 細胞的天冬胺酸特異性半胱胺酸蛋白酶試驗 (caspase assay; phi-phi-lux 染色)，其係在第 48 小時被 MER1、SGU1、或氧化砷處理。

圖 23E 顯示 HL-60 細胞的天冬胺酸特異性半胱胺酸蛋白酶試驗，其係在第 72 小時被 MER1、SGU1、或氧化砷處理。

圖 23C 顯示 H1-60 細胞的 CMXRos/MT-綠試驗，其係在第 48 小時被 MER1、SGU1、或氧化砷處理。

圖 23F 顯示 H1-60 細胞的 CMXRos/MT-綠試驗，其係在第 72 小時被 MER1、SGU1、或氧化砷處理。

圖 24 顯示測試三氧化二砷、SGLU1 以及 MER1 對 NB4 細胞成熟作用的影響。

圖 25A 顯示 MER1 對 HL60 細胞的影響。

圖 25B 顯示 SGLU1 對 HL60 細胞的影響。

圖 25C 顯示三氧化二砷對 HL60 細胞的影響。

圖 26A 顯示對 U937/9PR 細胞之三天的 MTT 試驗，細胞係以三氧化二砷含以及不含鋅來分析 PML/Rar 阿法基因的角色。

圖 26B 顯示對 U937/9PR 細胞之三天的 MTT 試驗，細胞係以 SGLU1 含以及不含鋅來分析 PML/Rar 阿法基因的角色。

圖 26C 顯示對 U937/9PR 細胞之三天的 MTT 試驗，細胞係以 MER1 含以及不含鋅來分析 PML/Rar 阿法基因的角色。

圖 27A 顯示三氧化二砷和 GMZ27 對 HL60 細胞的細胞毒性。

圖 27B 顯示 ATO 以及 GMZ27 對來自 AML 患者之細胞的群落生長的影響。

圖 28A 顯示被 STO 以及 GMZ27 誘發之 HL60 AML 細胞之細胞凋亡的流式細胞儀評估，係藉由膜聯蛋白 V 結合來評估。

圖 28B 顯示被 STO 以及 GMZ27 誘發的 HL60 AML 細胞之細胞凋亡之流式細胞儀評估，係藉由天冬胺酸特異性半胱胺酸蛋白酶 3 (caspase 3) 的活化來評估。

圖 28C 顯示被 STO 以及 GMZ27 誘發之 HL60 AML 細胞之細胞凋亡的流式細胞儀評估，係藉由粒線體膜電位改變來評估。

圖 29 顯示 HL60 AML 細胞中受 GMZ27 影響的細胞凋亡相關蛋白質的西方點墨分析。

圖 30A 顯示 72 小時的 MTS 試驗，其中細胞被 BSO 預先處理。

圖 30B 顯示 72 小時的 MTS 試驗，其中細胞被 DTT 預先處理。

圖 30C 顯示在以 NAC 預先處理之後超氧化物的產生。

圖 31A 顯示 ATO 以及 GMZ27 的 ROS 產生，其中超氧化物的生成是以流式細胞儀監測。細胞被培養 1 小時。

圖 31B 顯示 ATO 以及 GMZ27 的 ROS 產生，其中超氧化物的生成是以流式細胞儀監測。細胞被培養 3 小時。

圖 32 顯示 ATO 以及 GMZ27 在 48 小時的培養期間之後對 NB4 APL 細胞成熟/分化的影響。

圖 33A 顯示 HL60 細胞的碘化丙啶 (propidium iodine) 染色，細胞被不同劑量的 GMZ27 處理 241 小時。

圖 33B 顯示 HL60 細胞的碘化丙啶 (propidium iodine) 染色，細胞被不同劑量的 GMZ27 處理 48 小時。

圖 34 顯示 ATO 以及 GMZ27 對來自正常捐者之初代細胞 (primary cell) 群落成長的影響。

【主要元件符號說明】

無

五、中文發明摘要：

本發明提供有機的砷劑。許多這些化合物對固體和血液來源的很多人類腫瘤細胞系、以及對來自患有白血病之患者的惡性血球細胞具有有效的試管內細胞毒性活性。

六、英文發明摘要：

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.

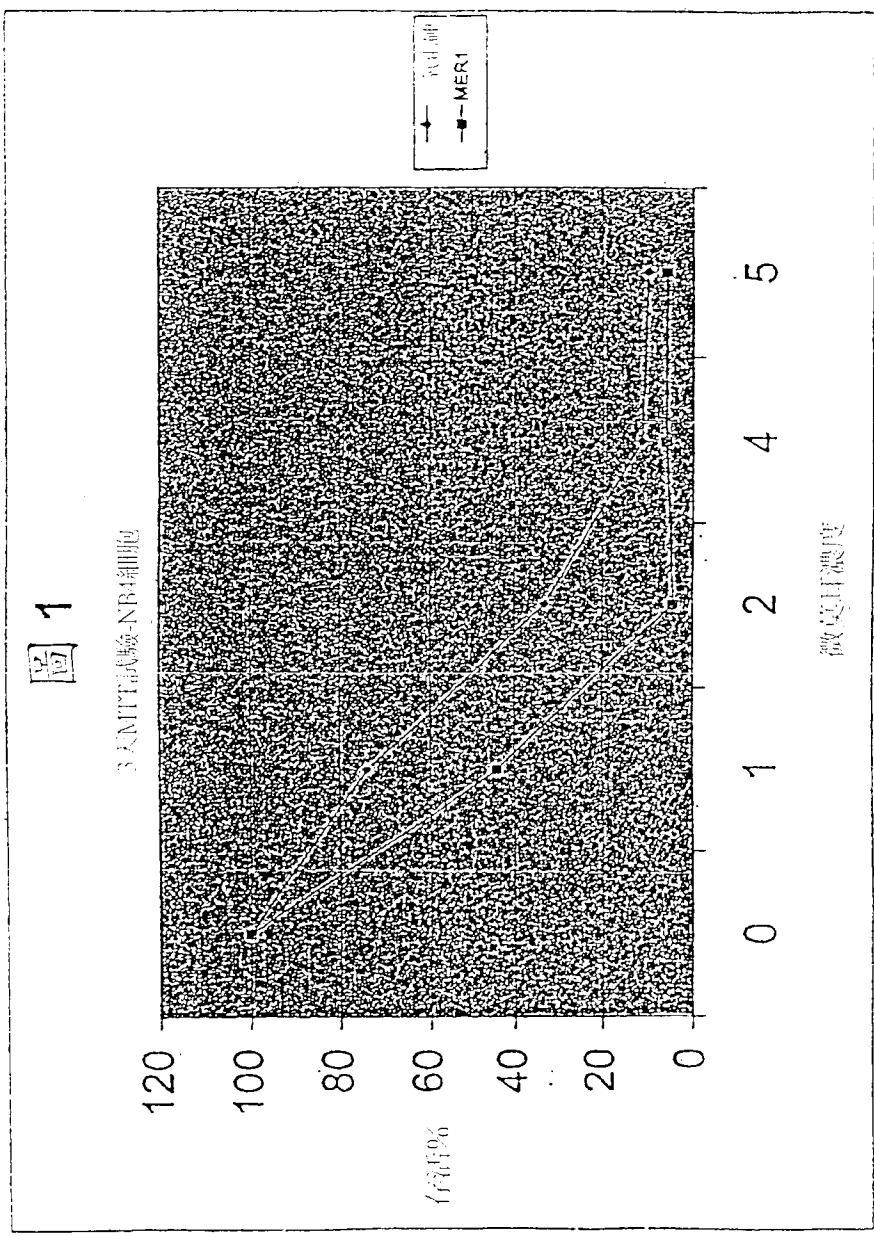
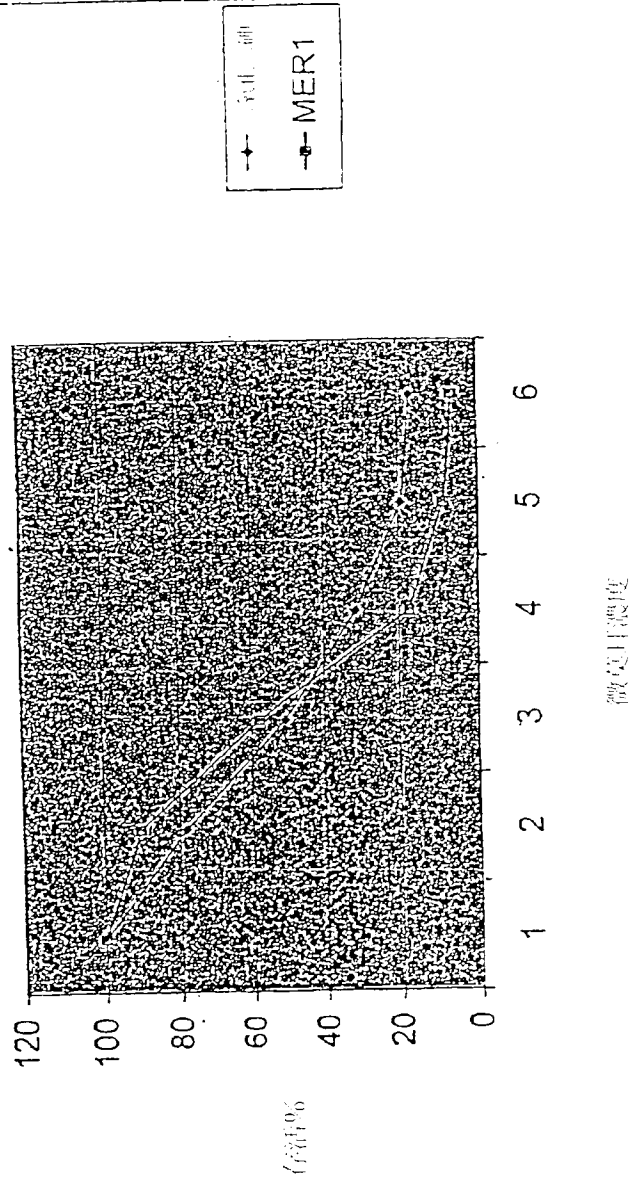


圖 2

3天MTT試驗-AML2細胞



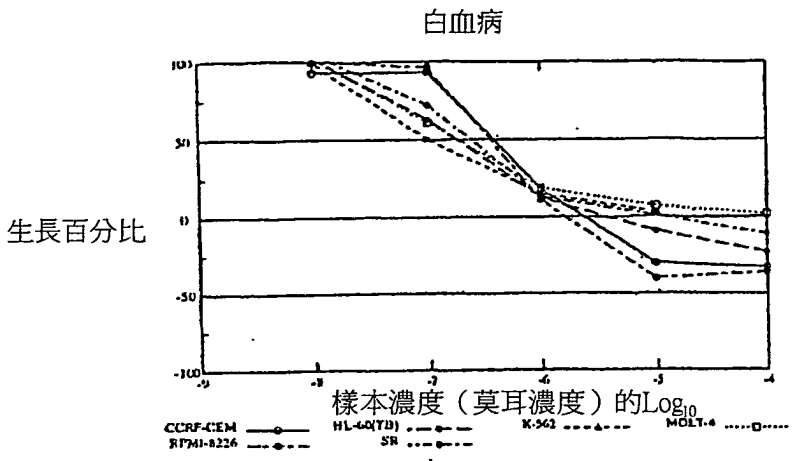


圖 3A

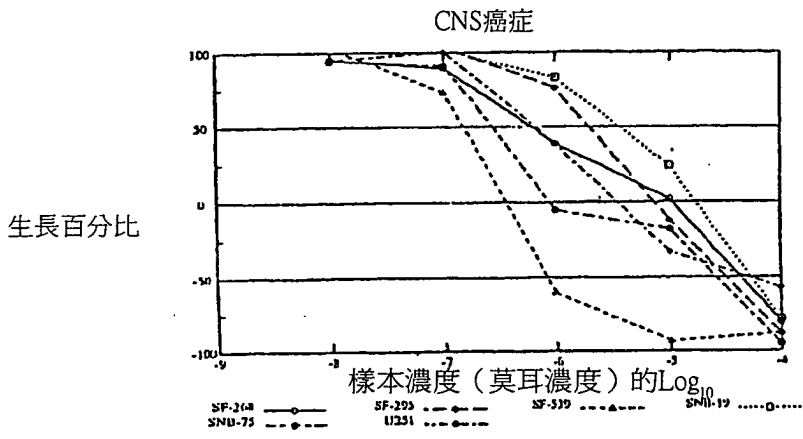


圖 3B

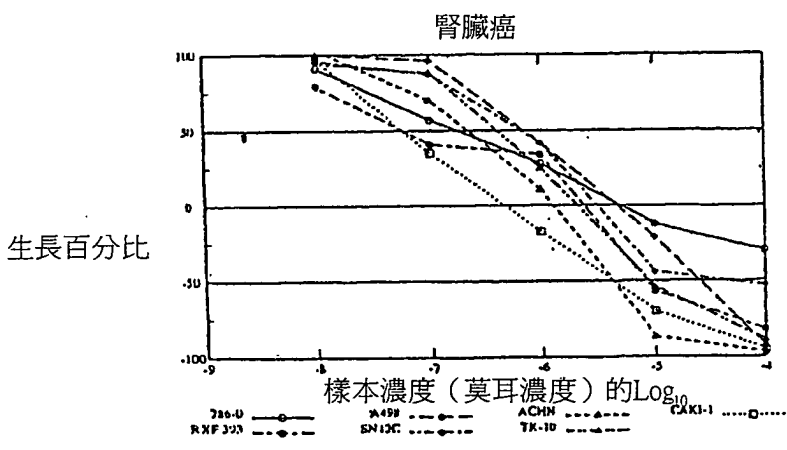


圖 3C

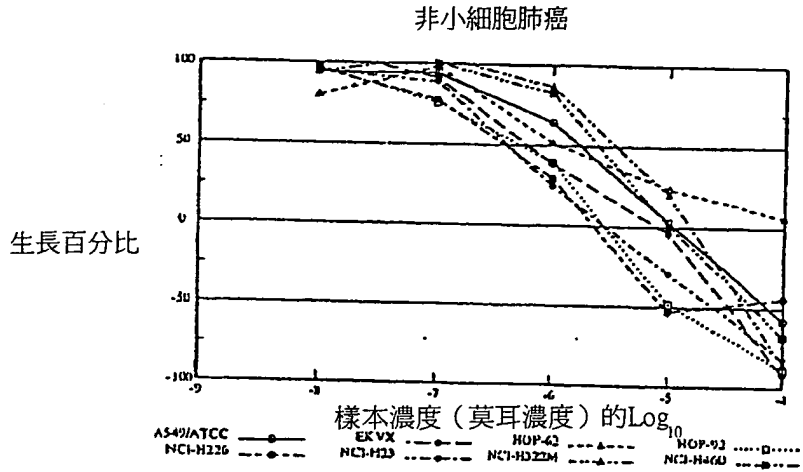


圖 3D

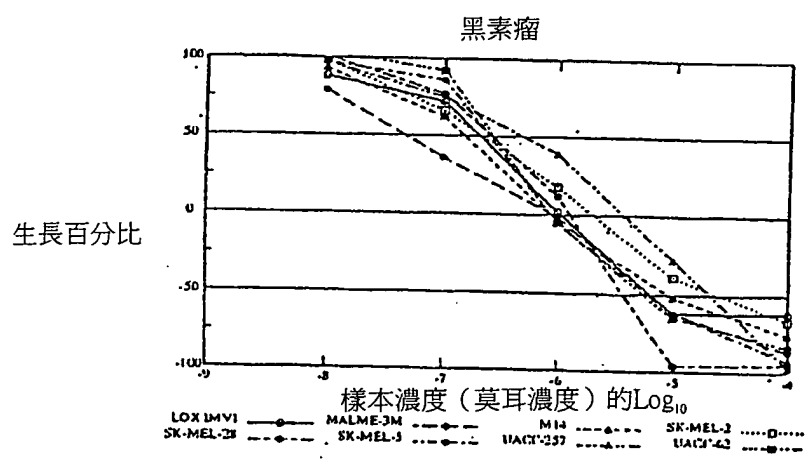


圖 3E

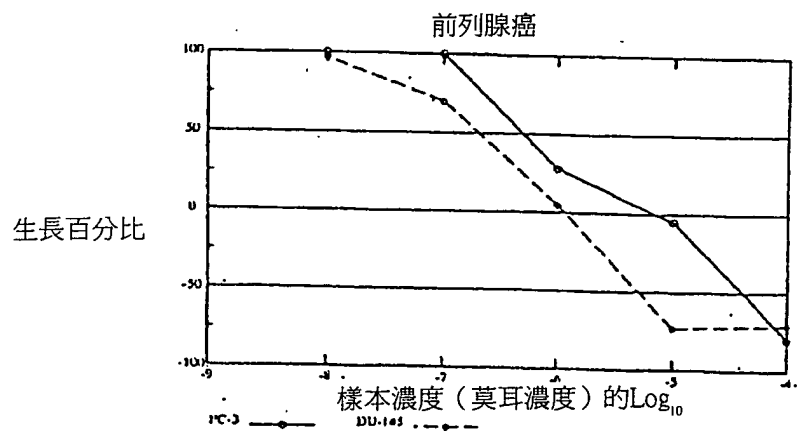


圖 3F

圖 3G

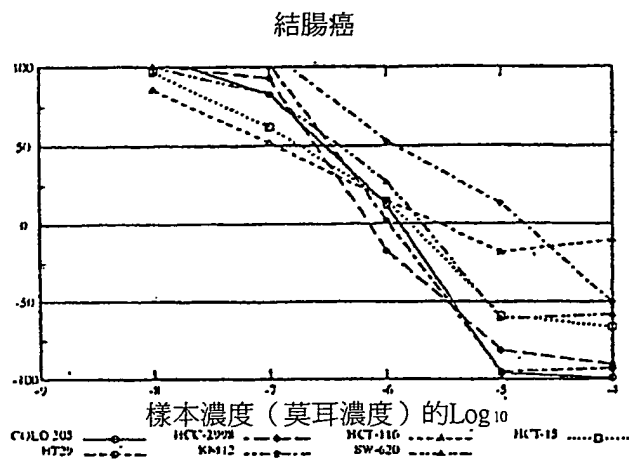


圖 3H

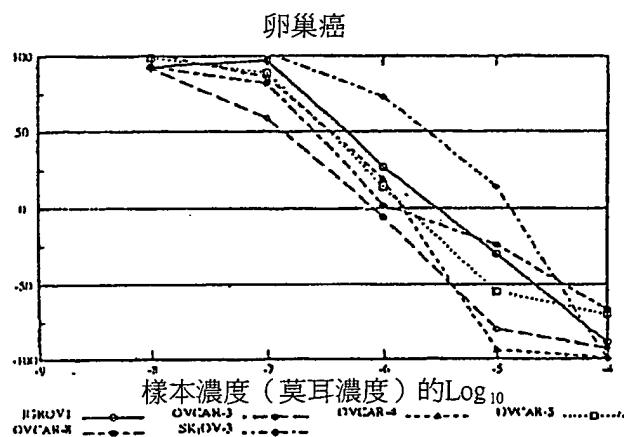
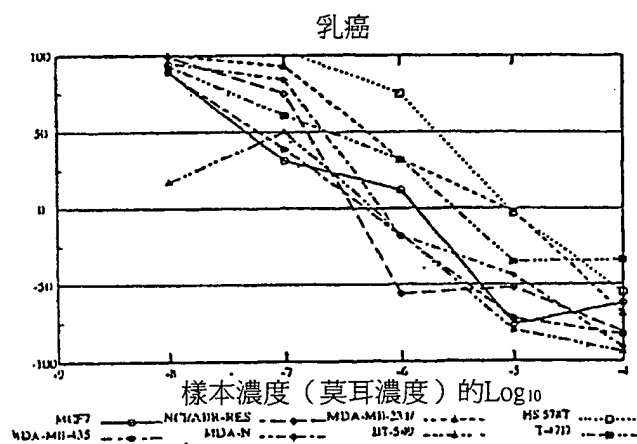
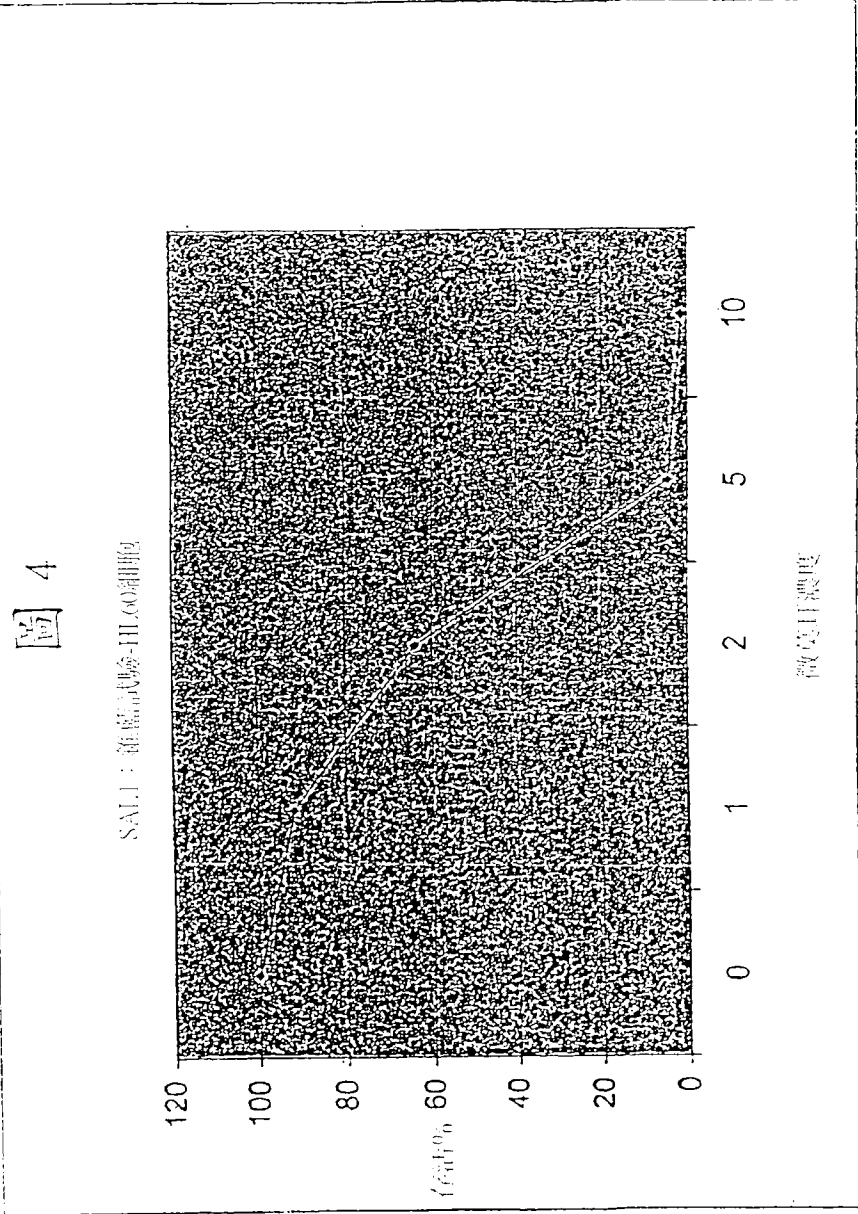


圖 31





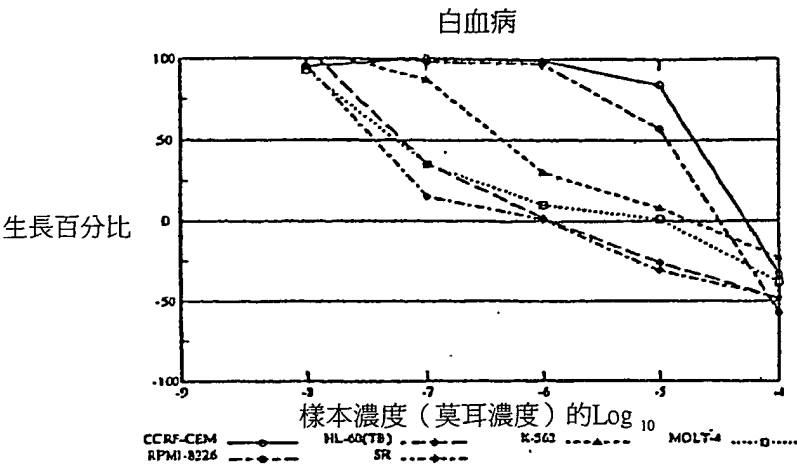


圖 5A

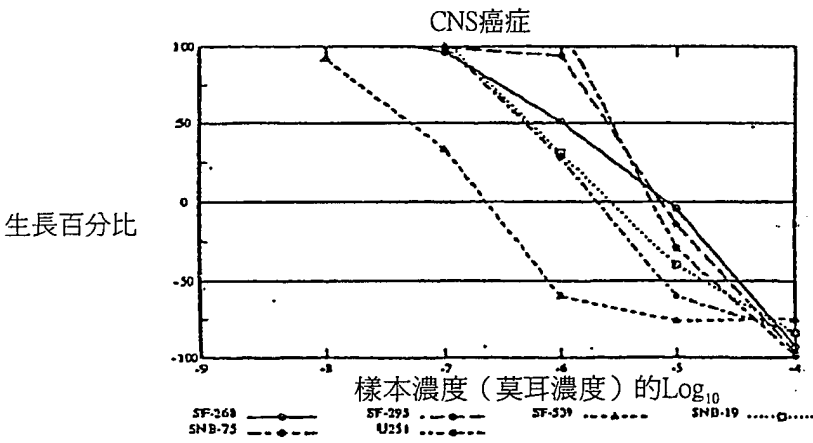


圖 5B

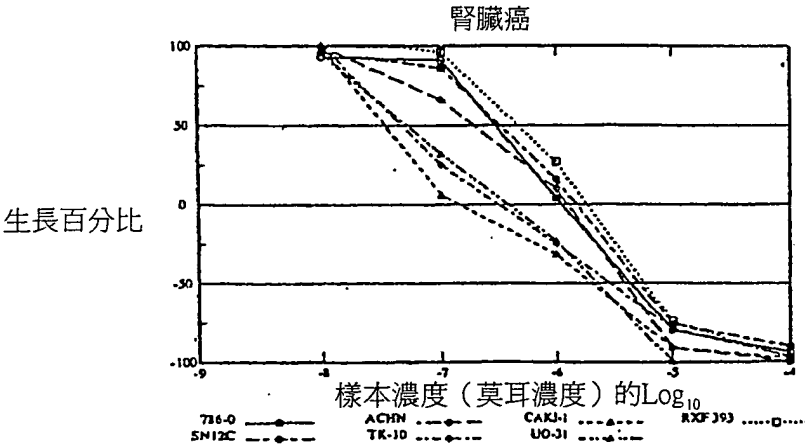


圖 5C

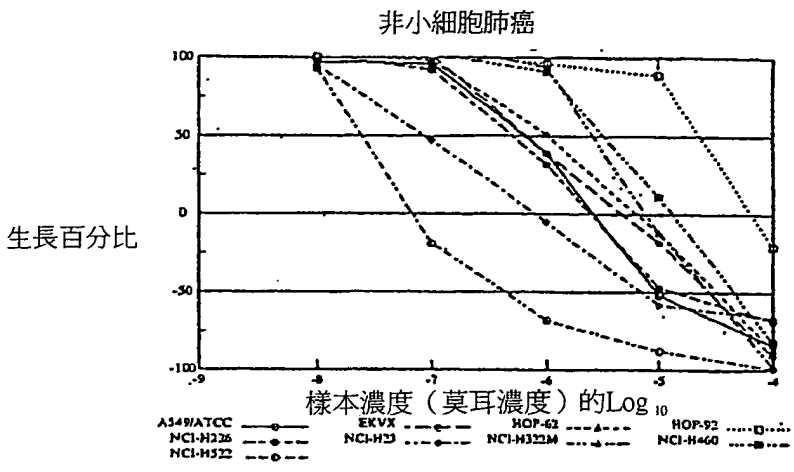


圖 5D

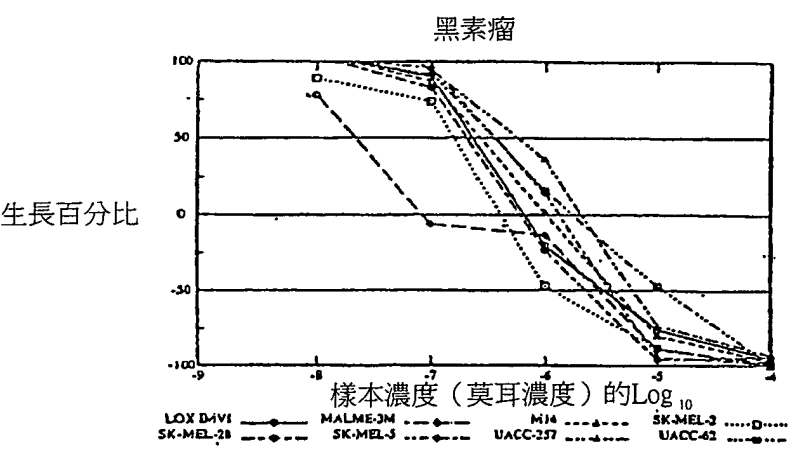


圖 5E

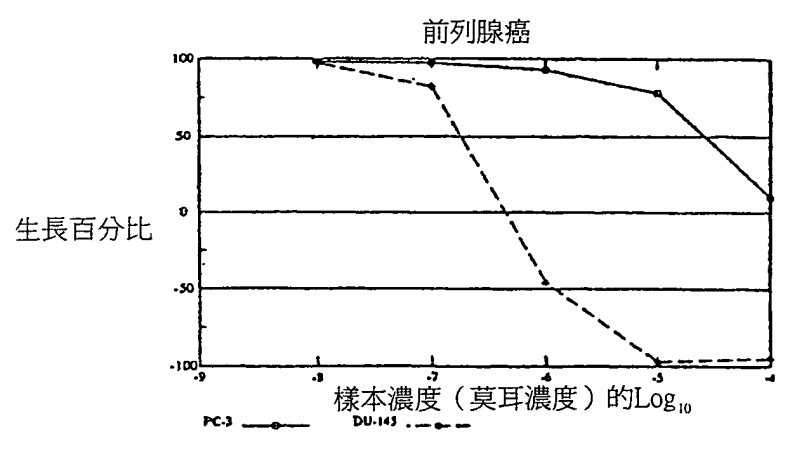


圖 5F

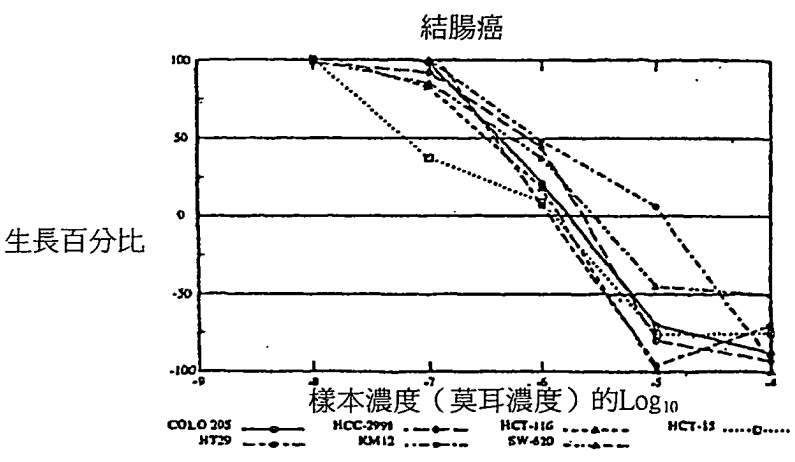


圖 5G

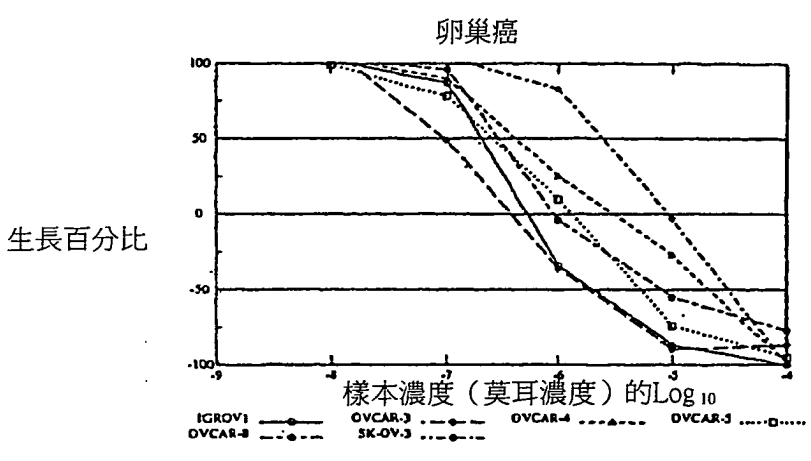


圖 5H

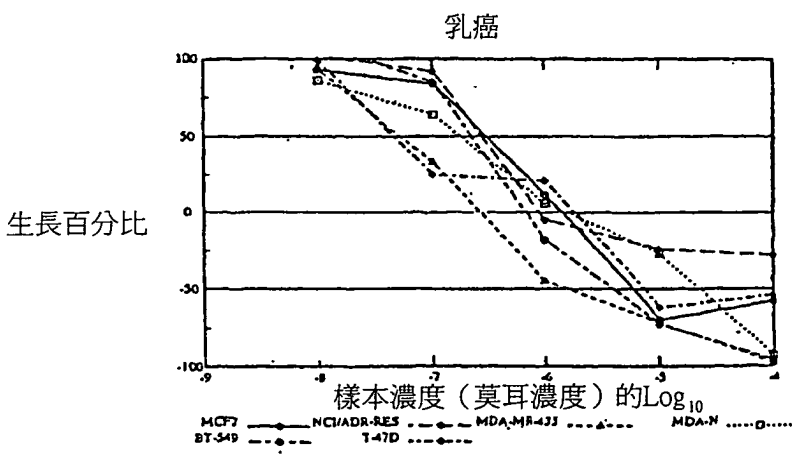


圖 5I

圖 6

3-MITT試驗-NB4細胞

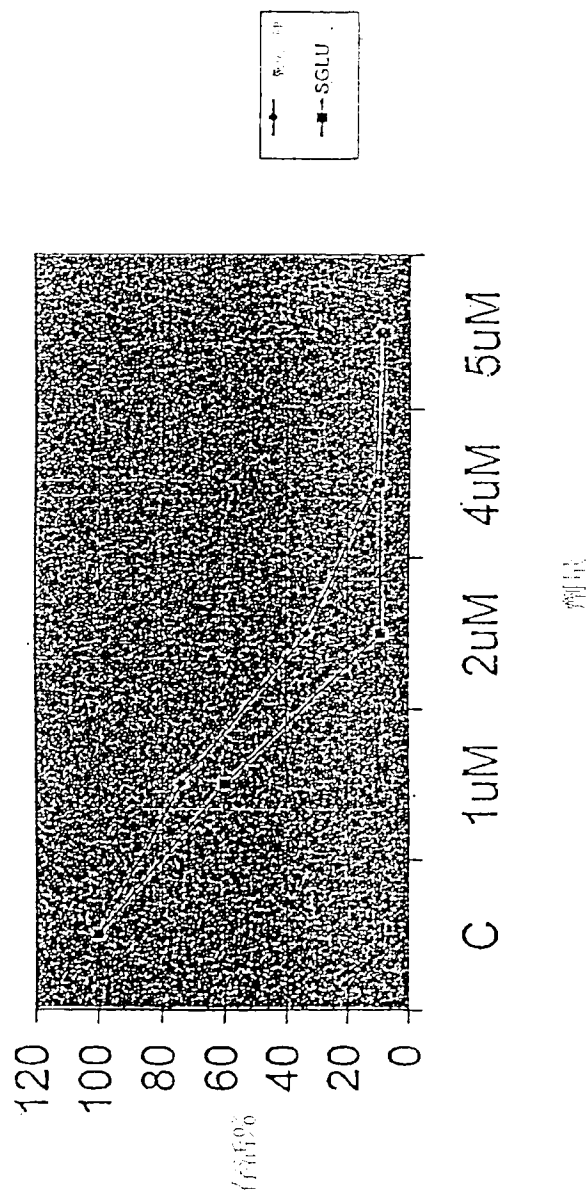
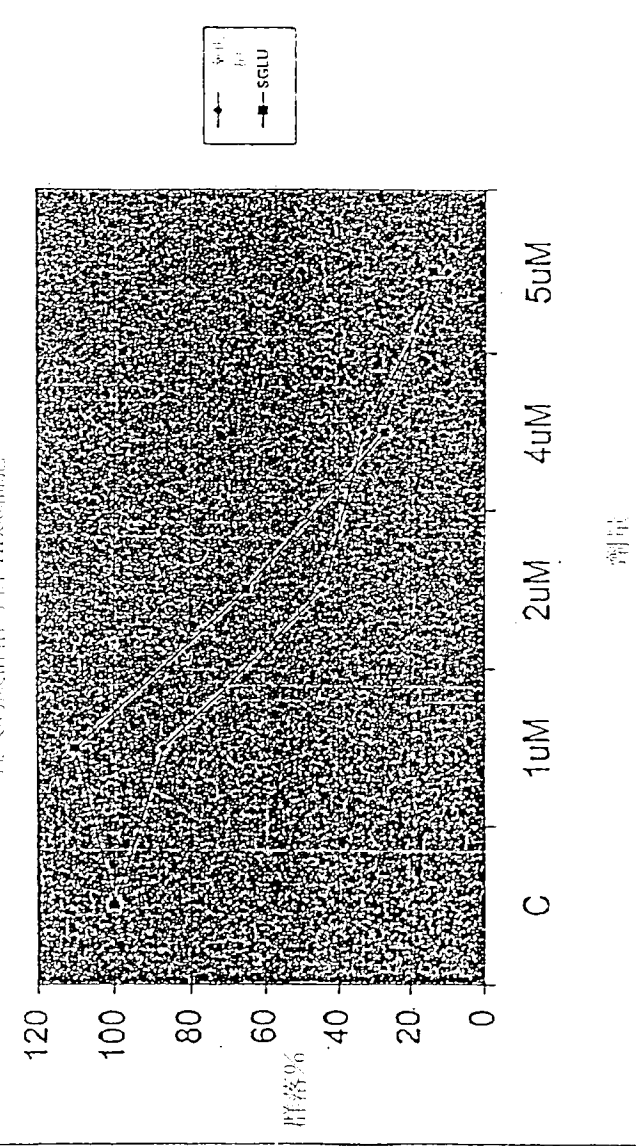


圖 7

五天的成膠落分中-HL60細胞



白血病

生長百分比

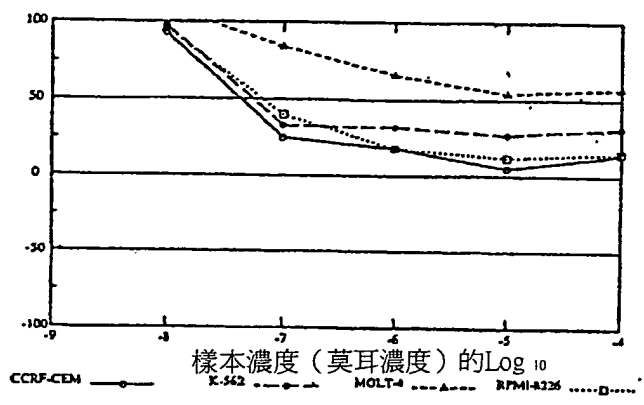


圖 8A

CNS癌症

生長百分比

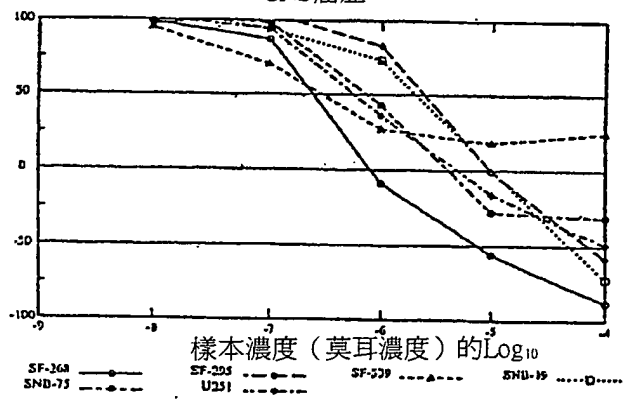


圖 8B

腎臟癌

生長百分比

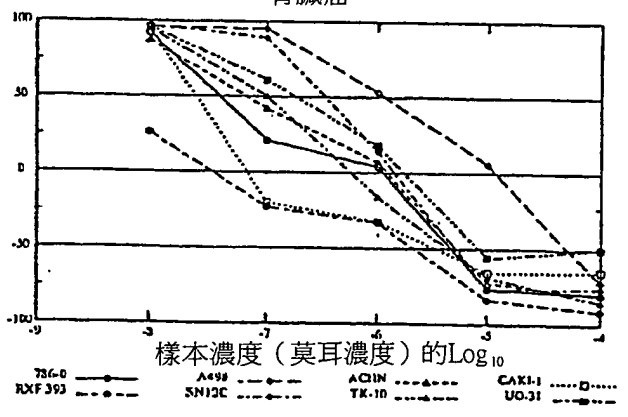


圖 8C

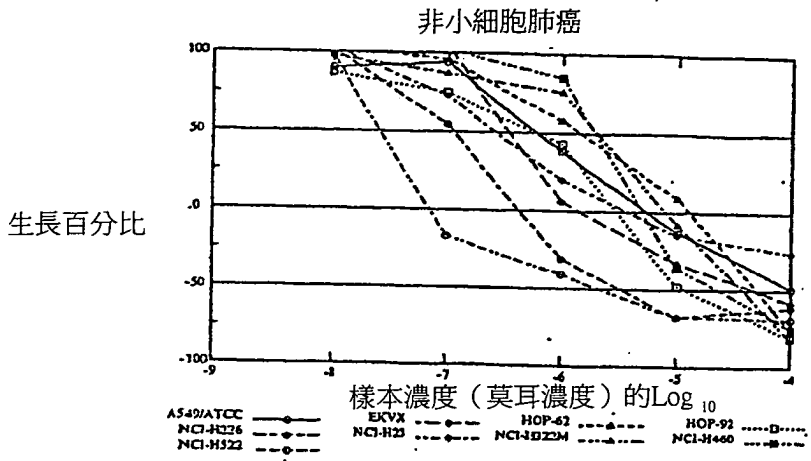


圖 8D

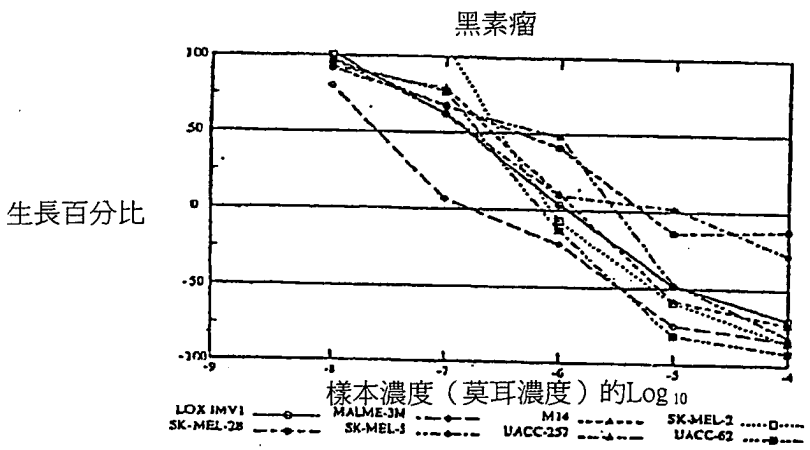


圖 8E

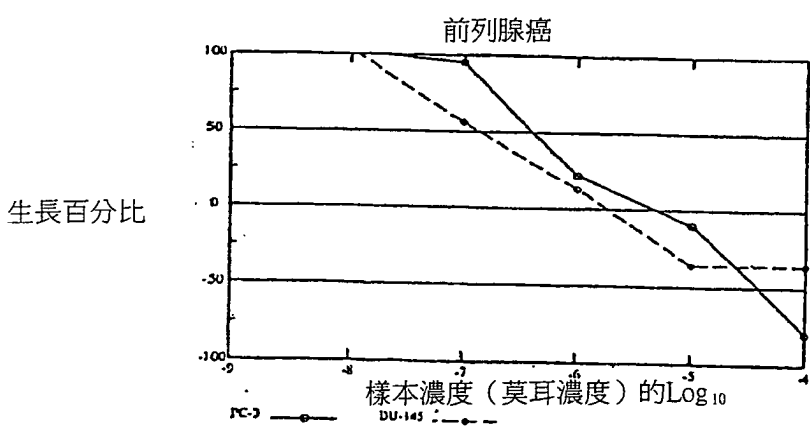


圖 8F

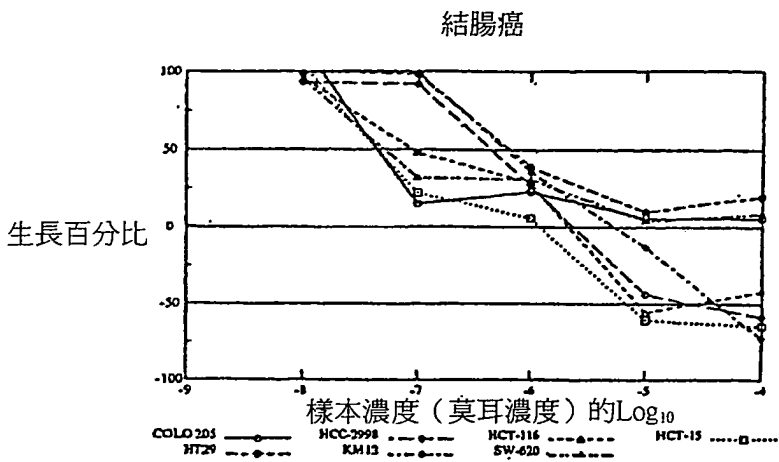


圖 8G

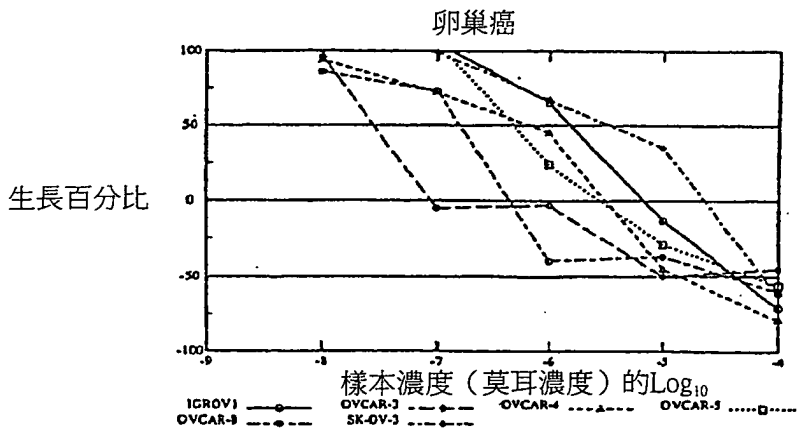


圖 8H

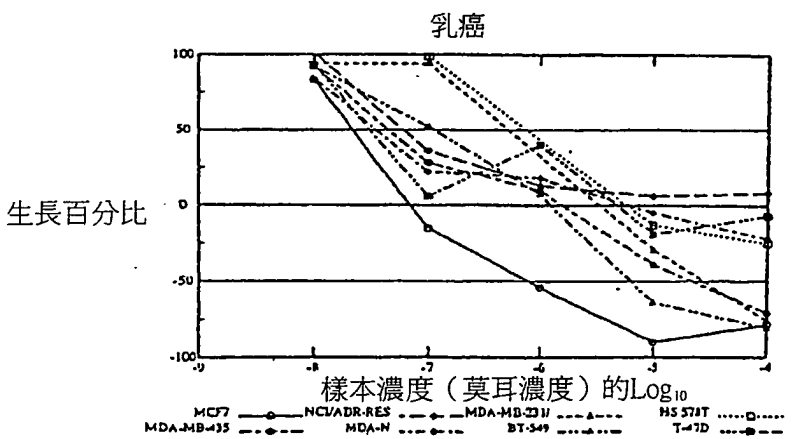
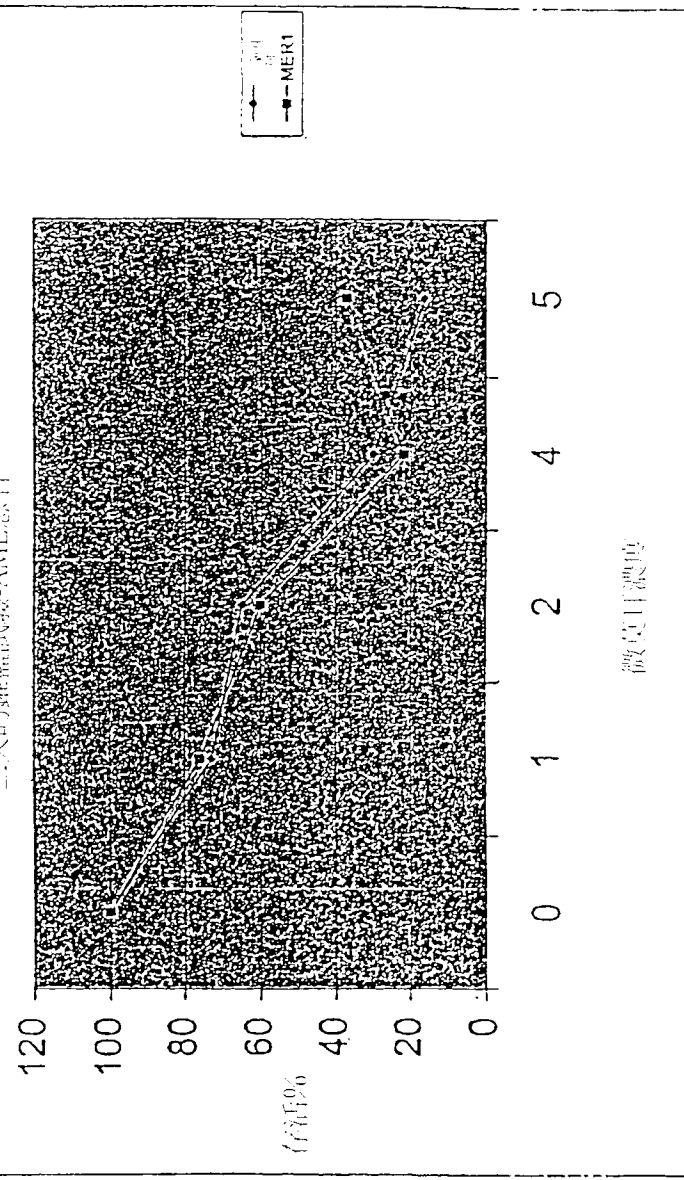


圖 8I

圖 9

三天的維他命試驗-AML患者



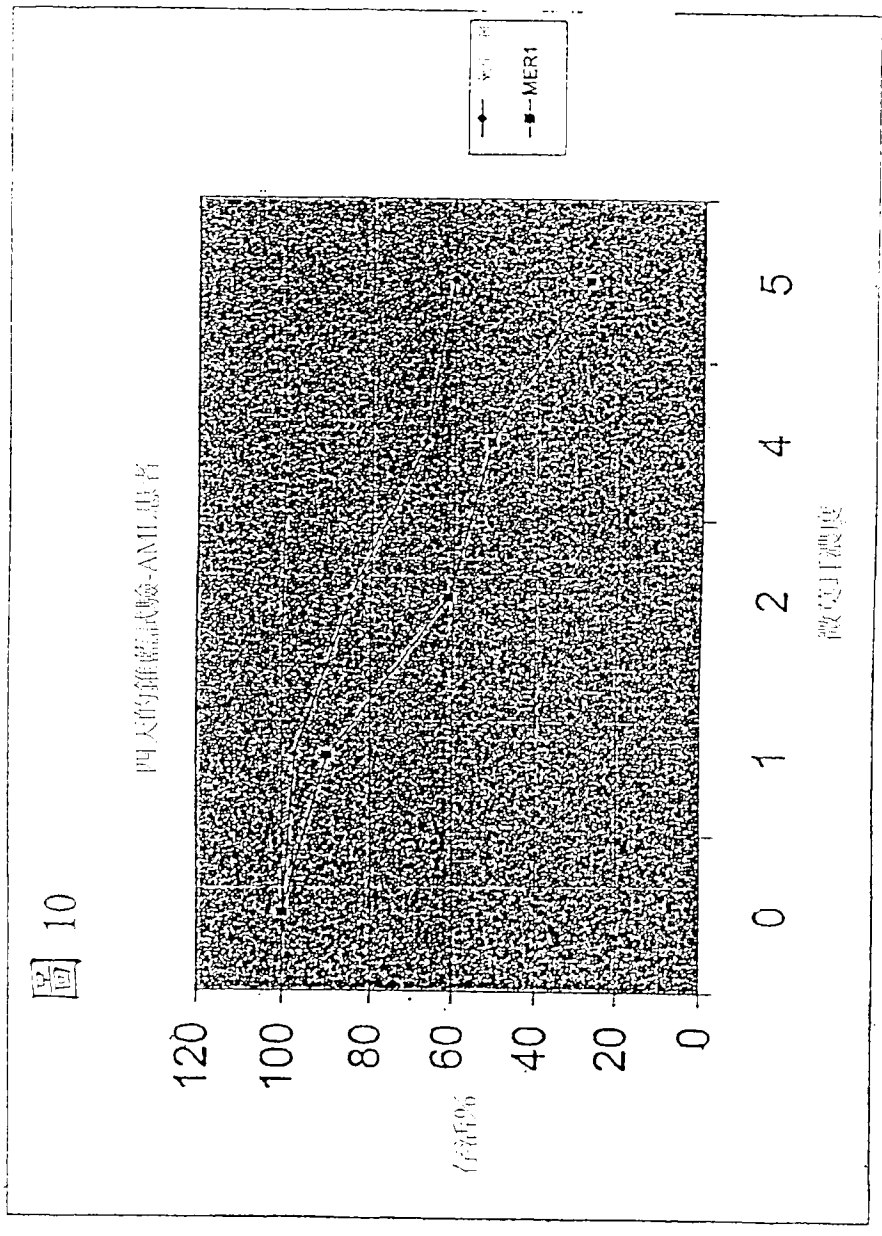


圖 11

MIRI：五天的錐監試驗-AML患者

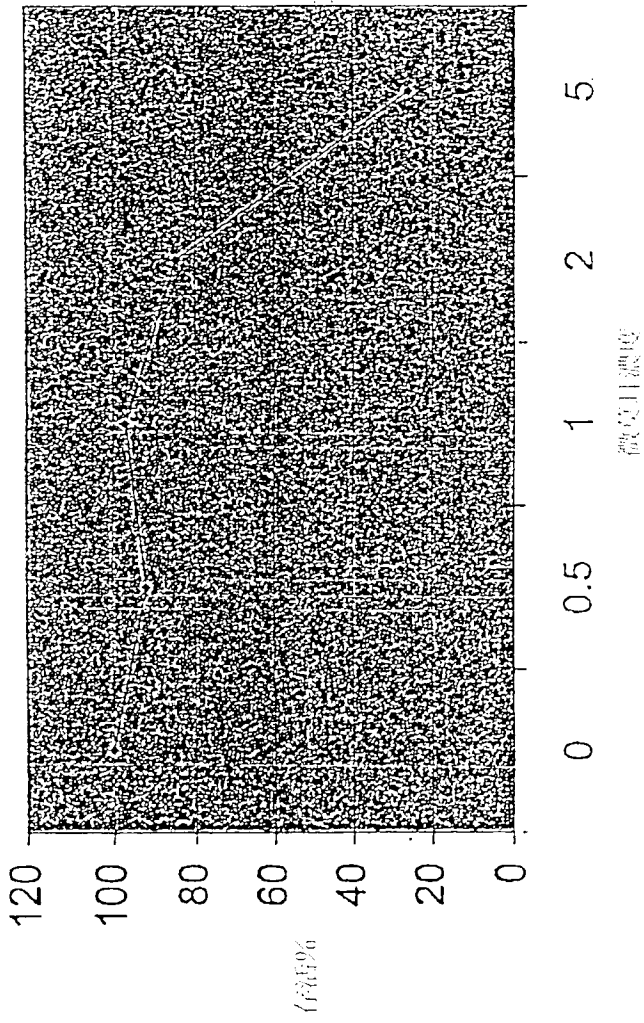


圖 12

3天的能藍試驗-CNIL-BP患者

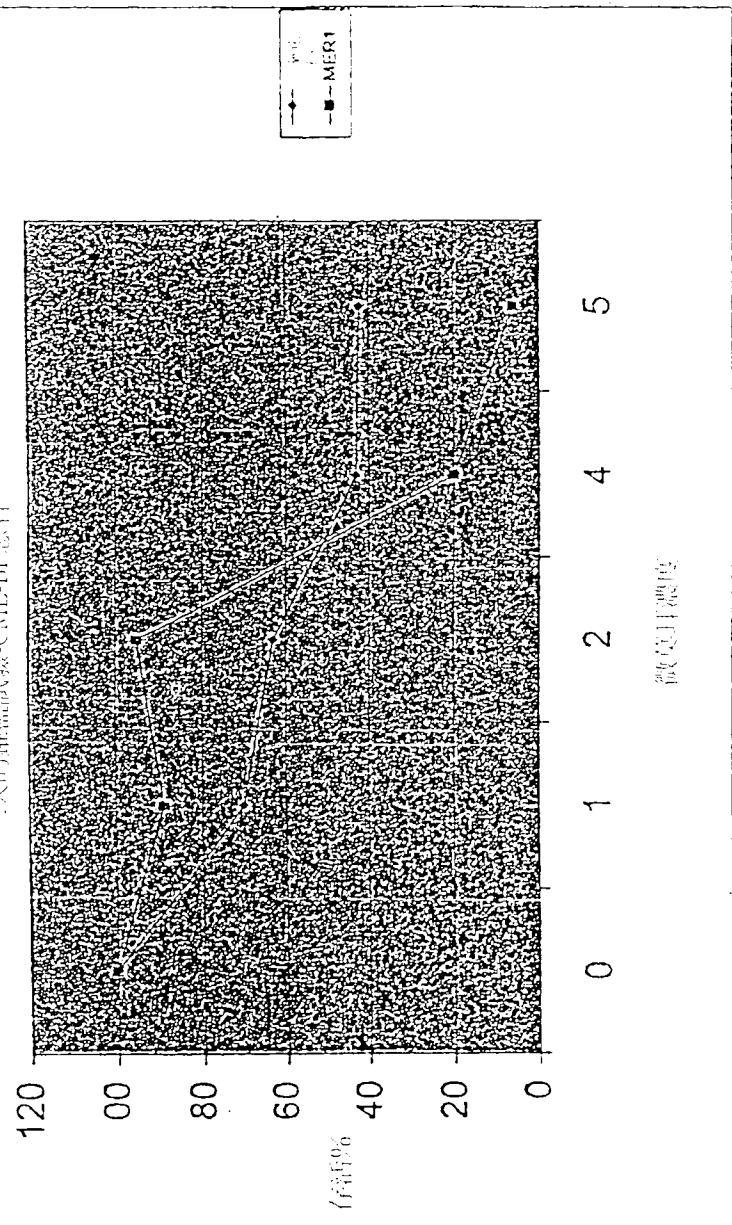


圖 13

MER1 : 阿夫的維維試驗-ALL患者

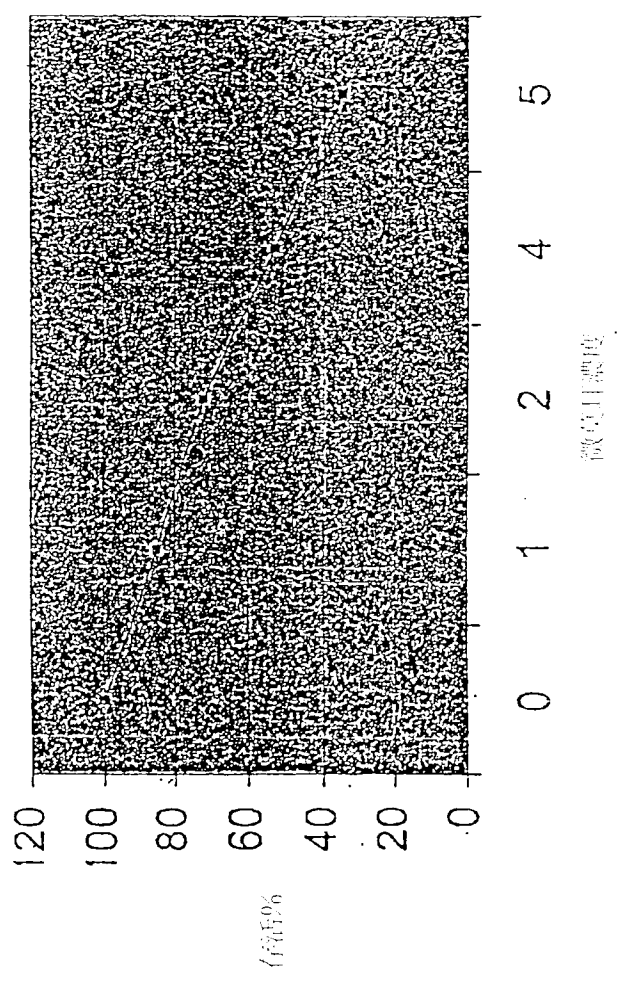


圖 14

MERT-5 左式的能試驗-正常指者

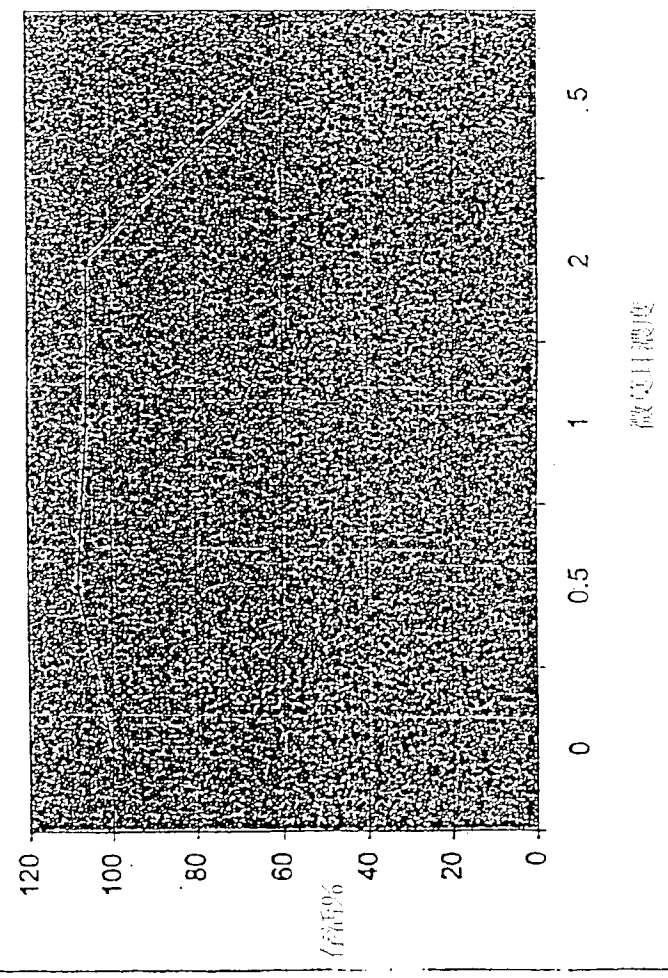


圖 15 八人的成群落分析-正常用者

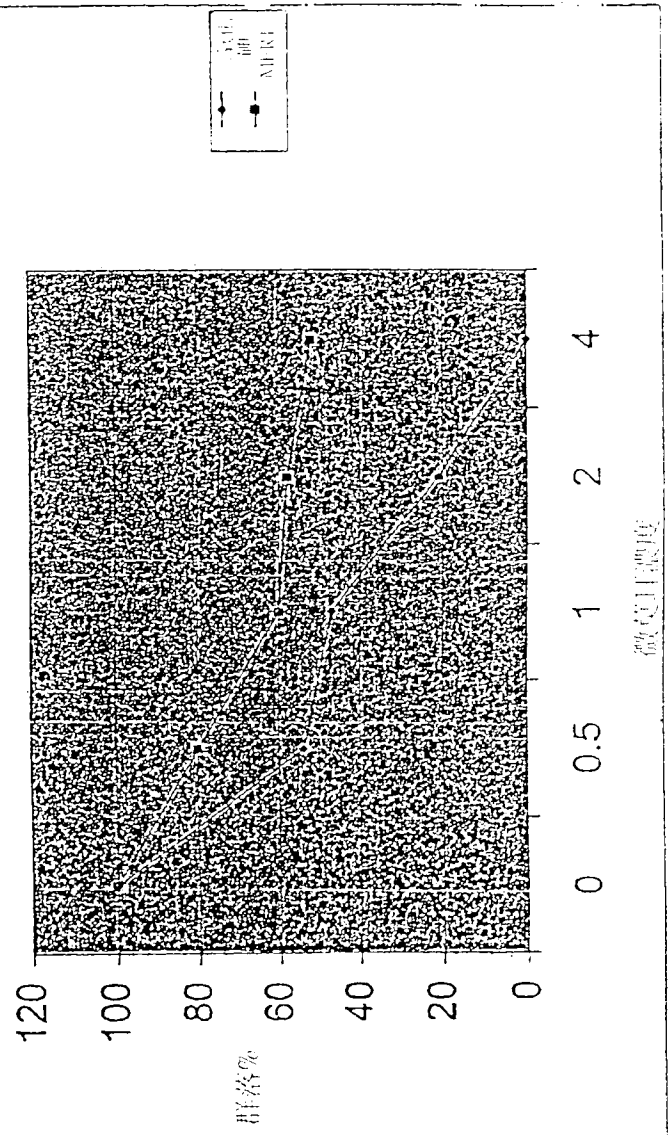
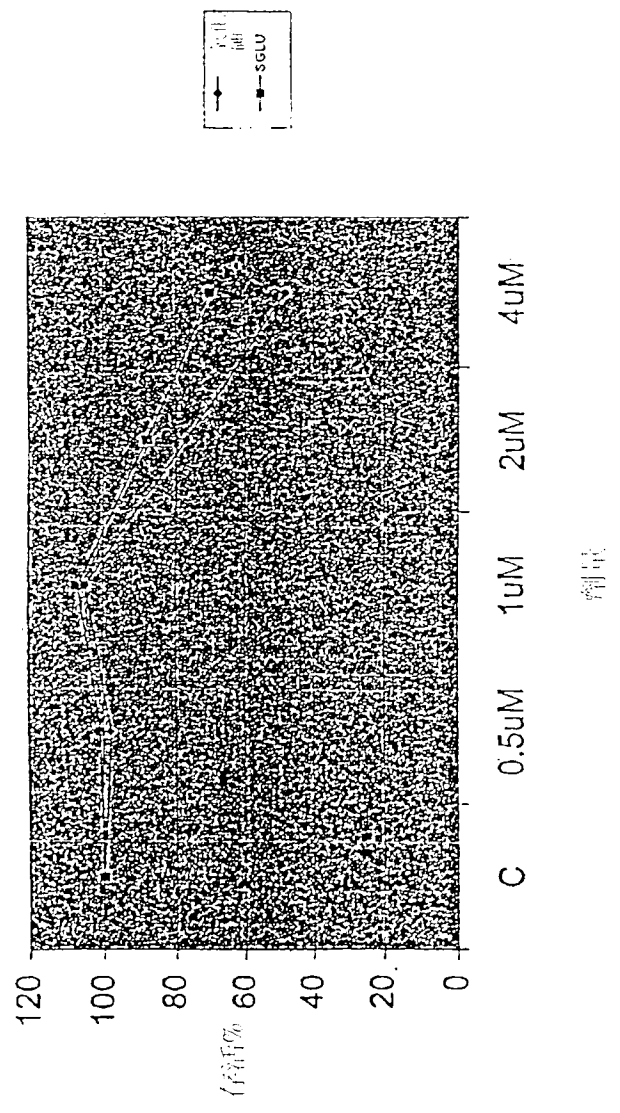


圖 16

左天的維維試驗-CTT患者



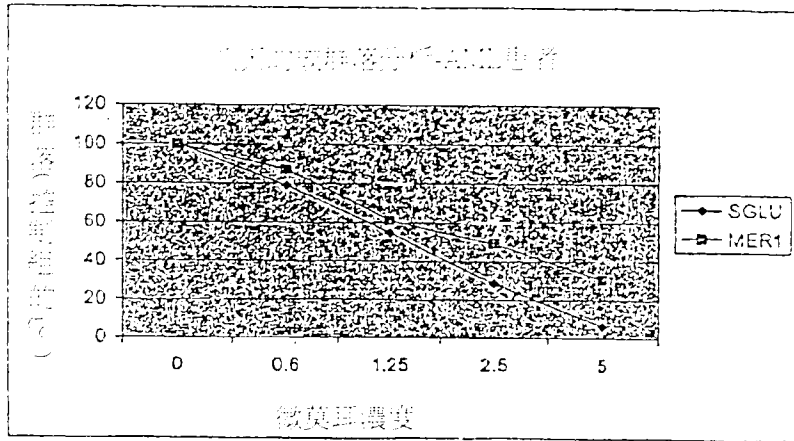
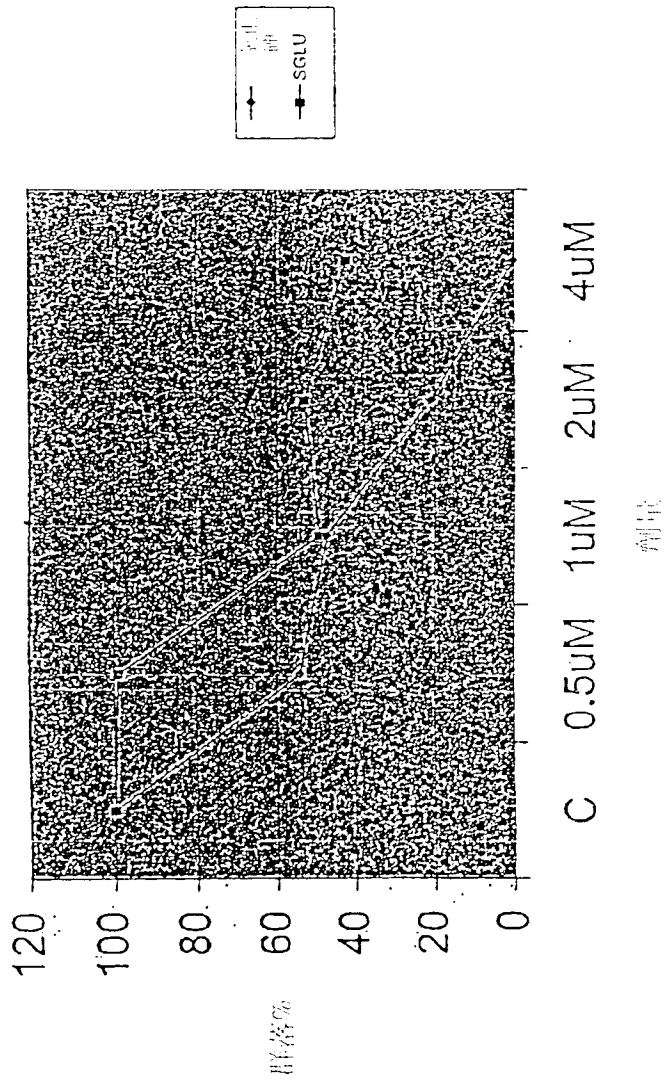


圖 18

八天的成脂落分脂-正滑脂者



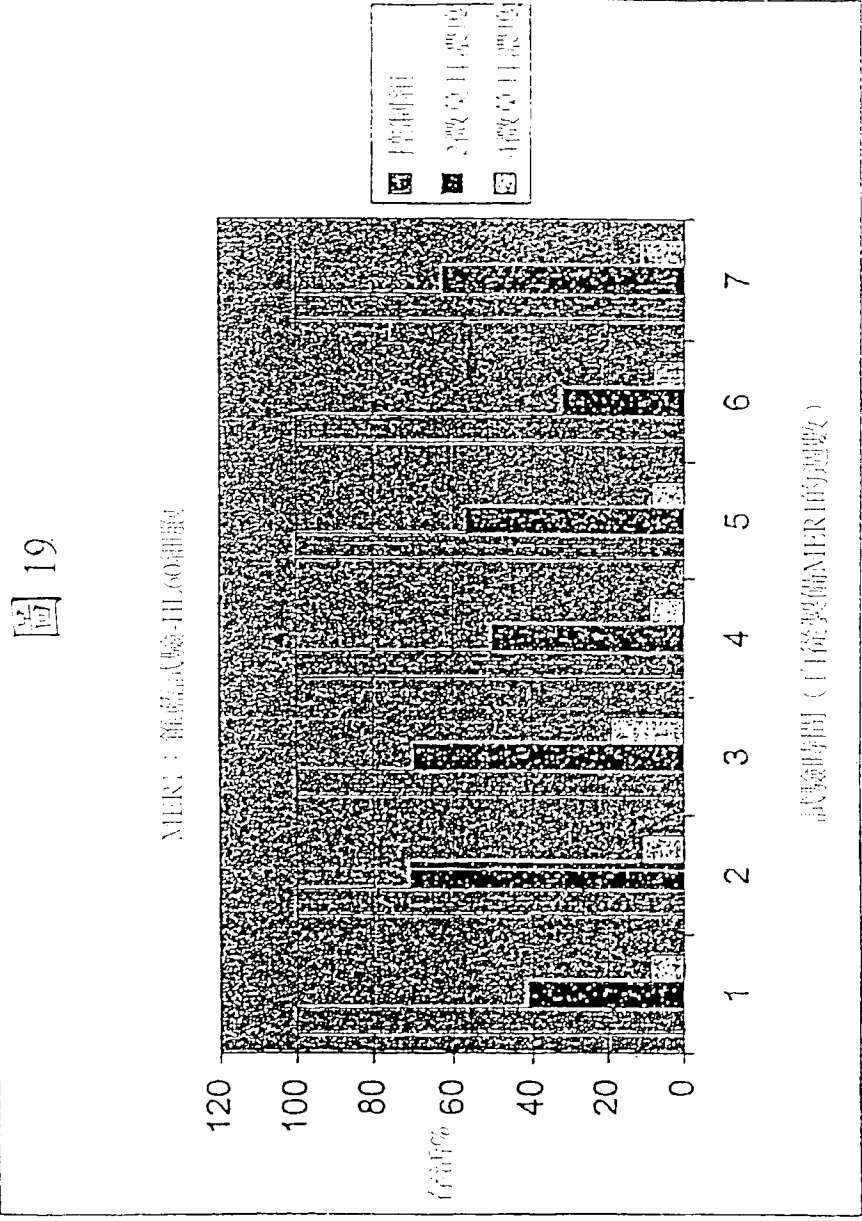


圖 20

MER1 + 膜肺蛋白A試驗-HL60細胞

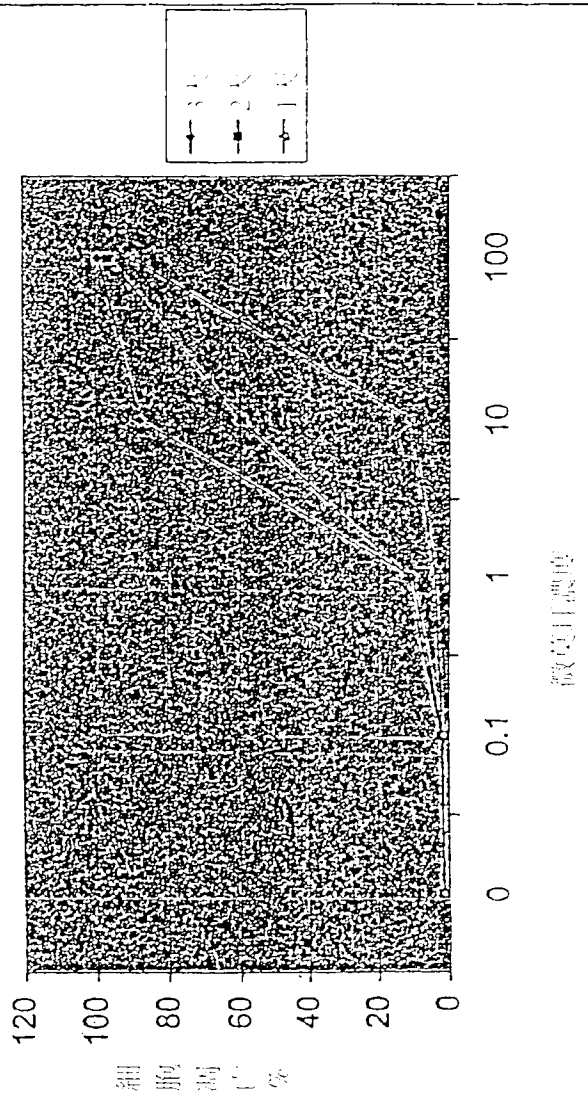


圖 21

MIER1-碘化苄基試驗-HL60細胞

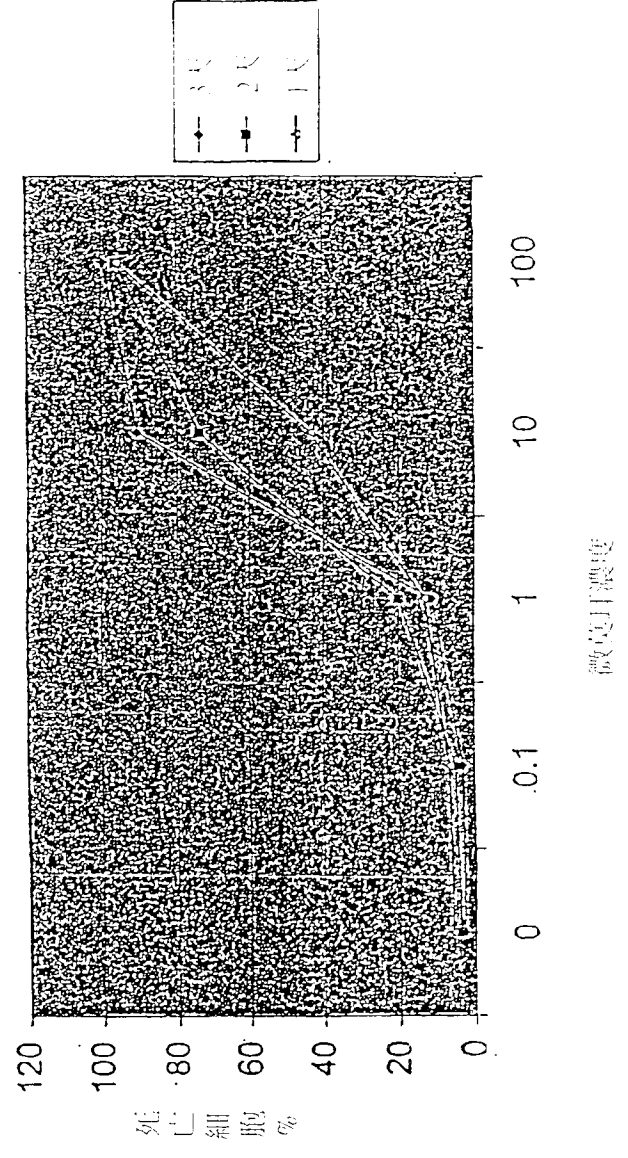
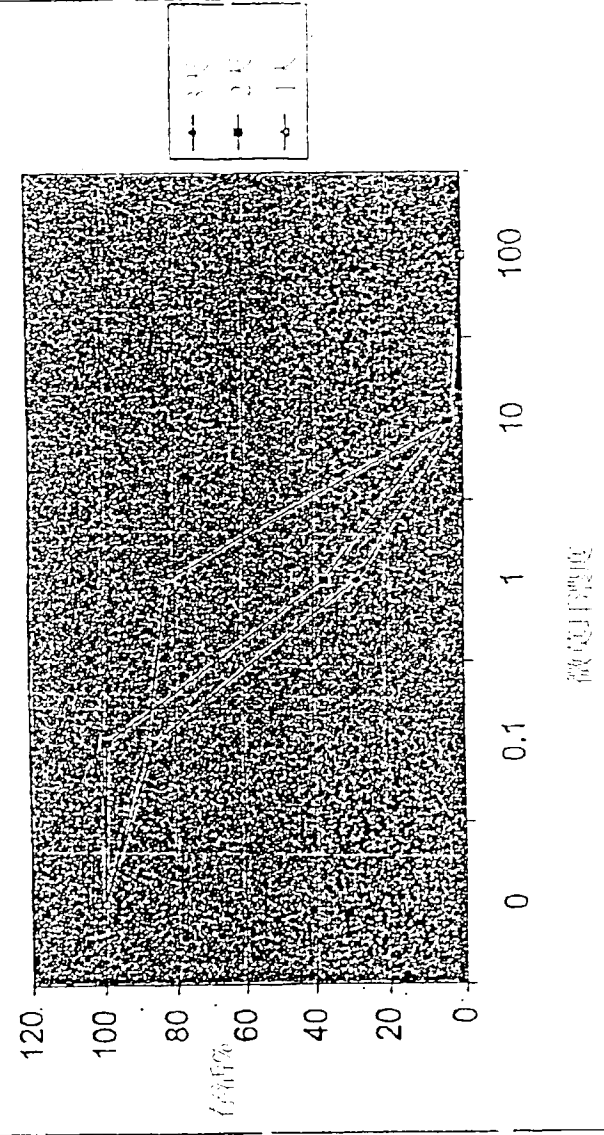


圖 22

MLER1-催乳素分泌素-HL60細胞



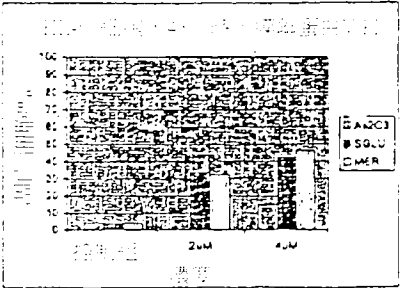


圖 23A

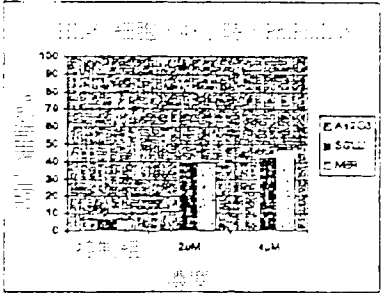


圖 23B

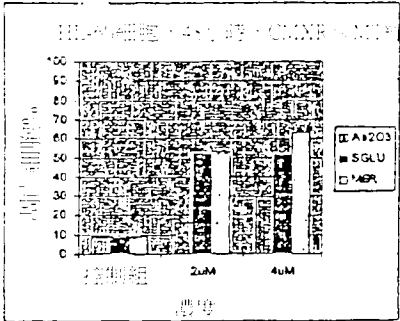


圖 23C

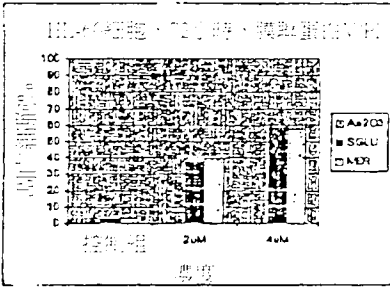


圖 23D

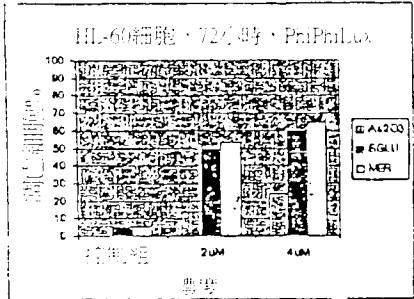


圖 23E

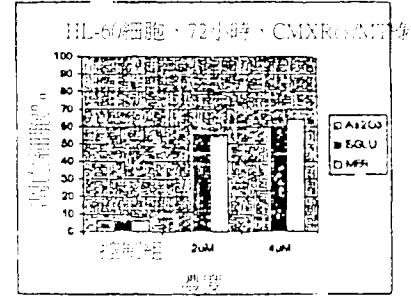


圖 23F

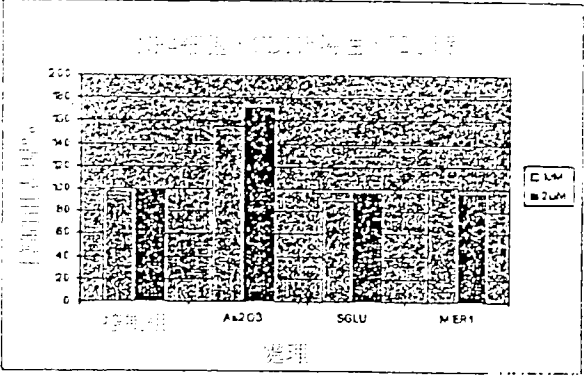


図 24

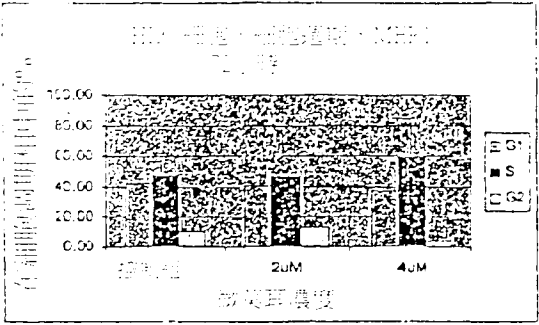


圖 25A

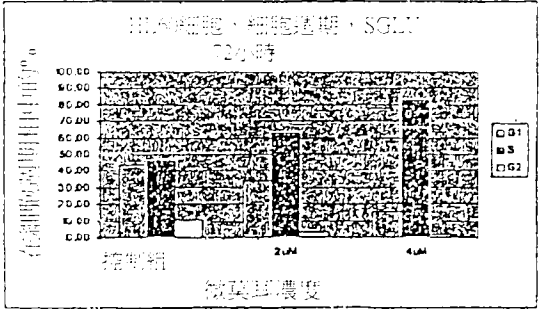


圖 25B

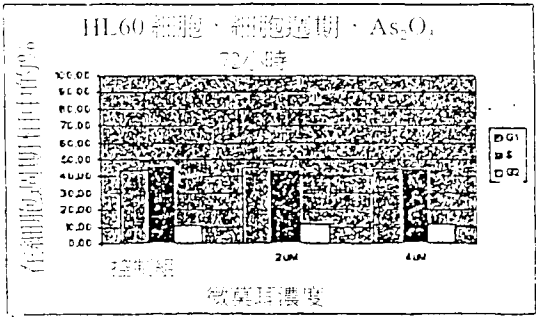


圖 25C

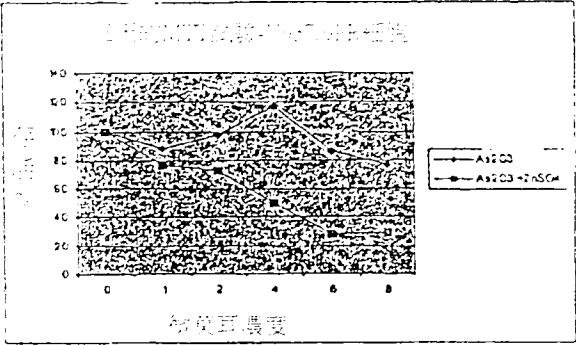


圖 26A

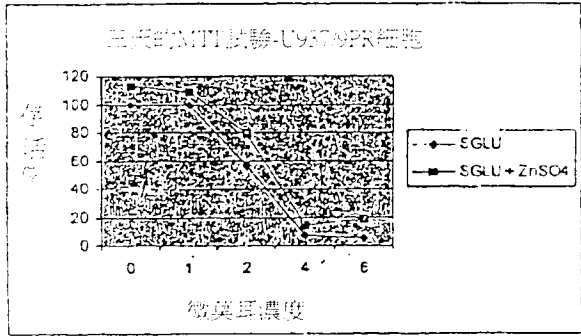


圖 26B

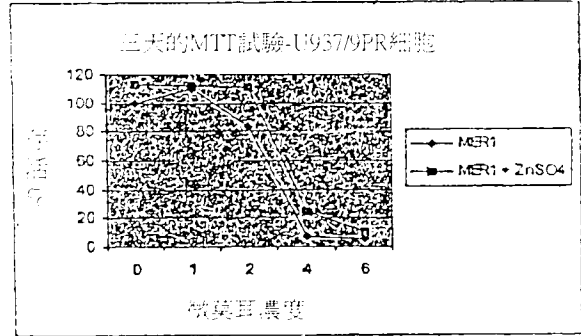


圖 26C

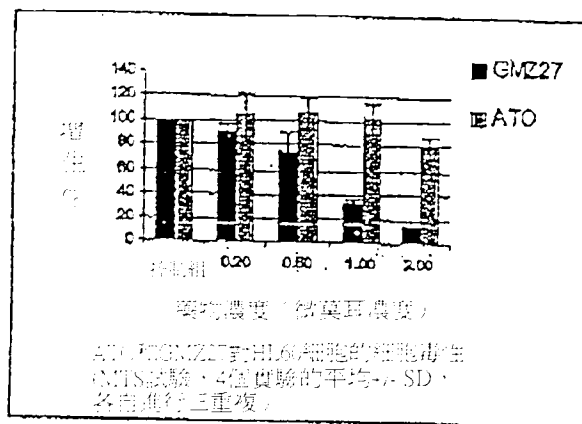


圖 27A

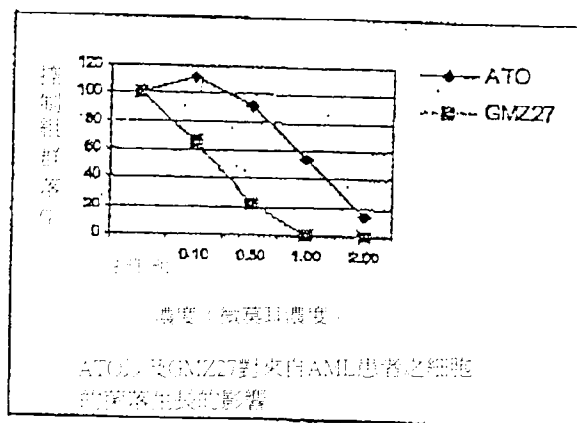


圖 27B

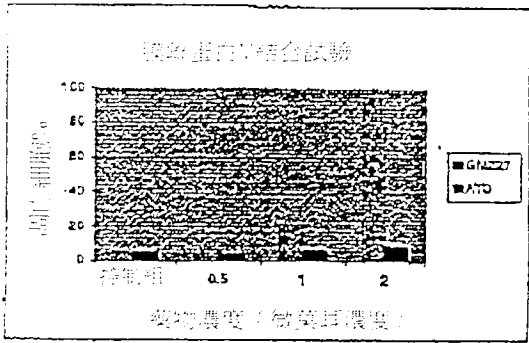


圖 28A

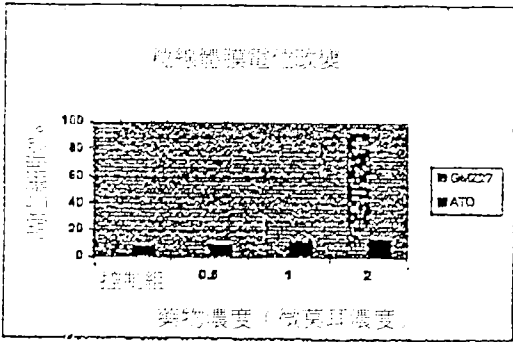


圖 28C

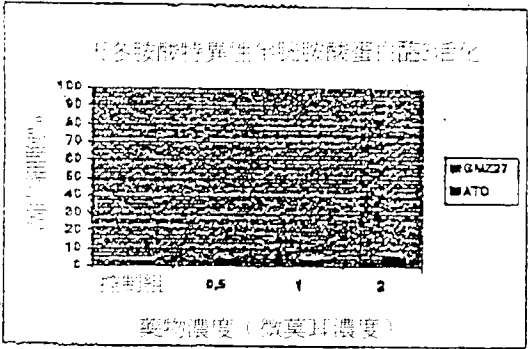
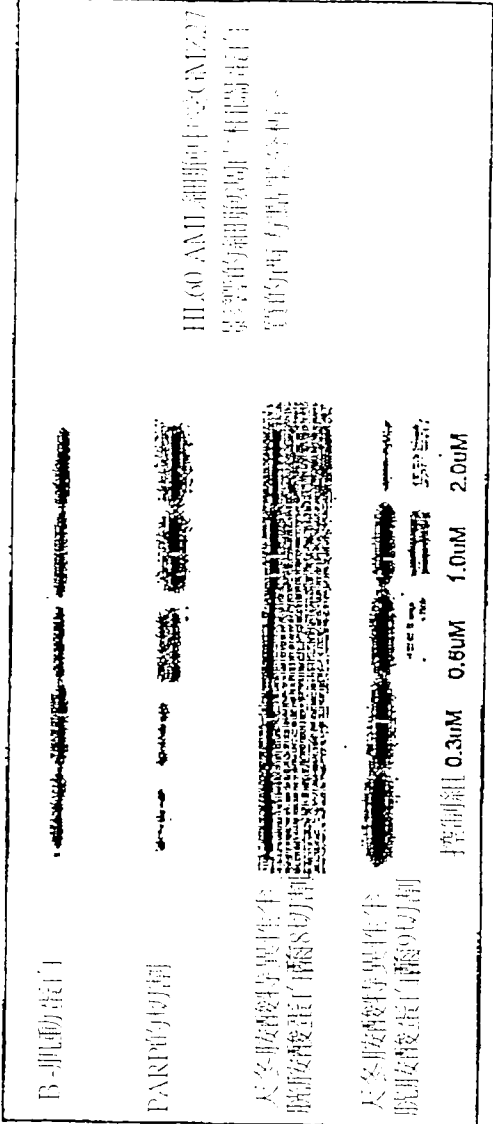
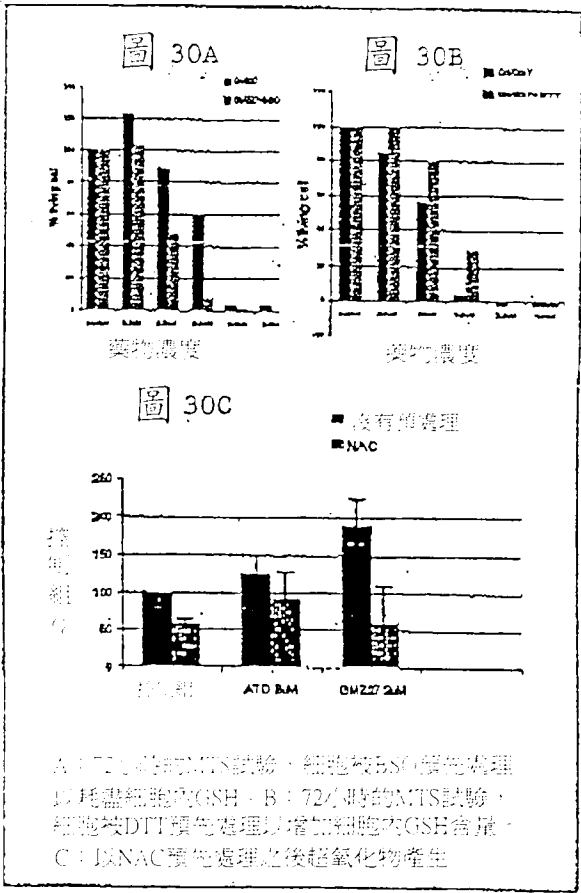


圖 28B

以流式細胞儀評估被ATO以及GMZ27誘發之HL60 AML細胞之細胞凋亡 (24小時培養)。
A圖：膜聯蛋白V結合。B圖：天冬胺酸特異性半胱胺酸蛋白酶3的活化。C圖：粒線體膜電位改變。





A: 72小時的MTS試驗，細胞被BSO預先處理以耗盡細胞內GSH。B: 72小時的MTS試驗，細胞被DTT預先處理以增加細胞內GSH含量。C: 以NAC預先處理之後超氧化物產生。

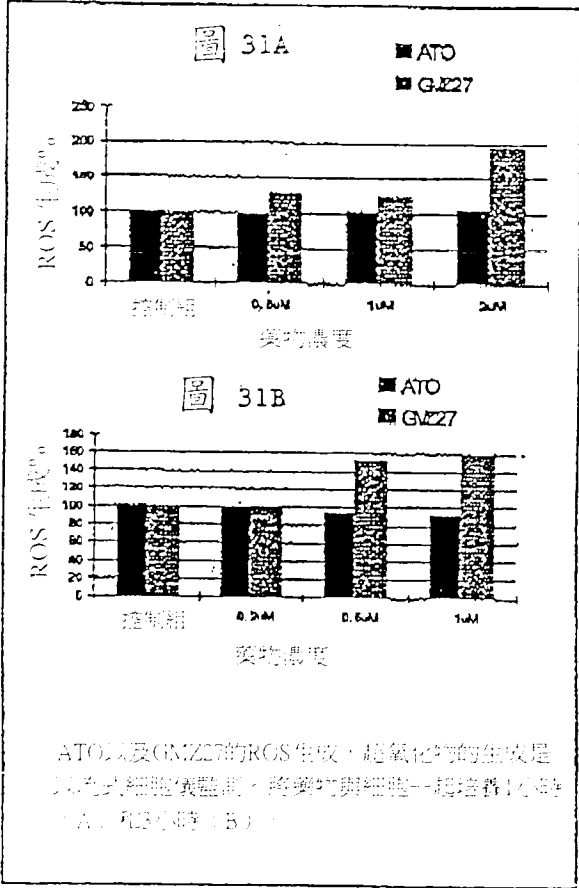
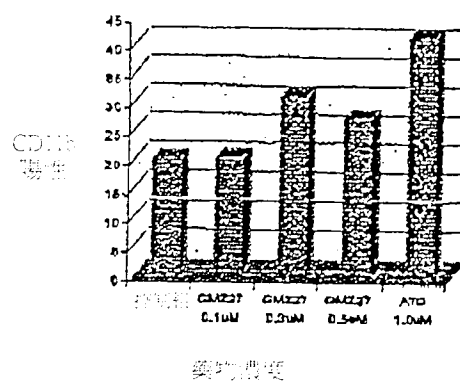
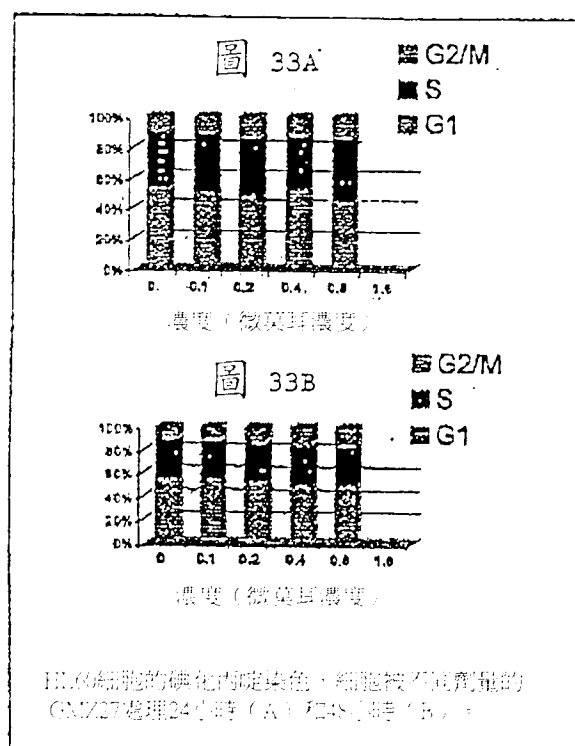
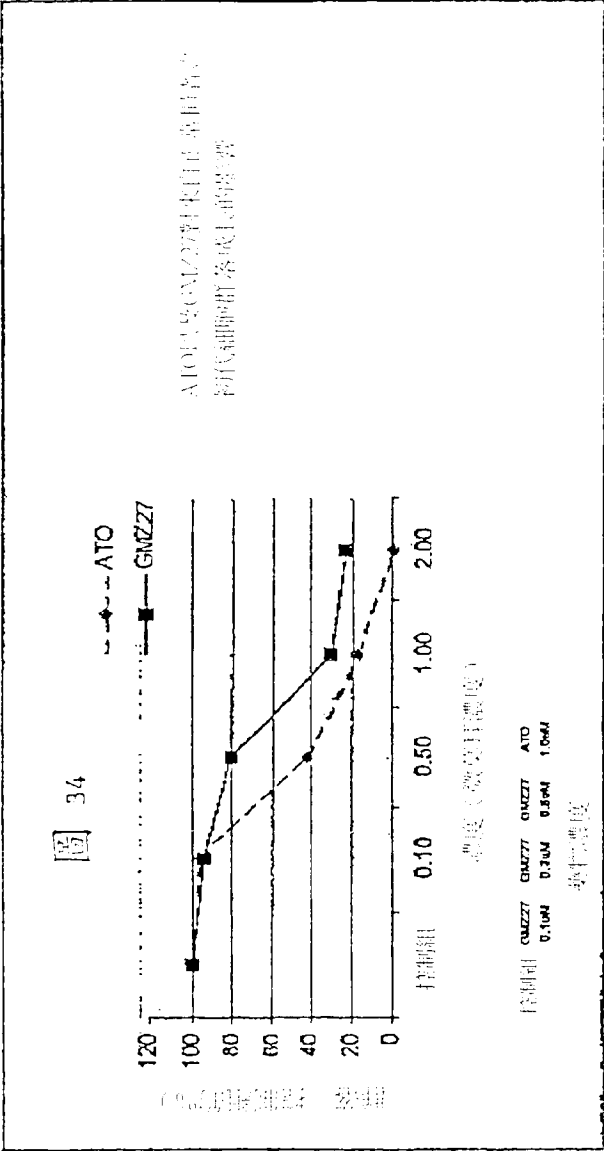


圖 32



ATO以及GMZD在48小時的培養期間之後對
NB4 APL細胞成熟/分化的影響。





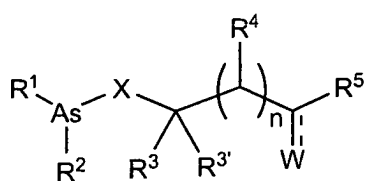
七、指定代表圖：

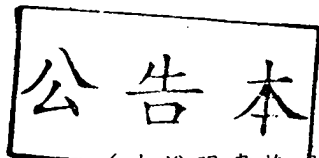
(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：





發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：94123873

※ 申請日期：94. 7. 14.

※IPC 分類：

C07F 9/60
A61K 33/36
A61P 35/60

一、發明名稱：(中文/英文)

有機砷化合物、其用於治療癌症之用途及包含其之醫藥組成物

ORGANIC ARSENIC COMPOUNDS, USES OF THE SAME IN

TREATING CANCER AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

COMPRISING THE SAME

二、申請人：(共 2 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

1. 德州農工大學體系 /

THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM

2. 德州系統大學，理事會 /

THE BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS

SYSTEM

代表人：(中文/英文)

1. 蓋 K. 德瑞屈 / DIEDRICH, GUY K.

2. 巴利 D. 波多夫 / BURGDORF, BARRY D.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 美國德州 77843-3369 學院市 TAMU 3369 號

3369 TAMU, College Station, Texas 77843-3369, U.S.A.

2. 美國德州 78701 奧斯汀市第七西街 201 號

201 West 7th Street, Austin, Texas 78701, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

1.2. 美國 / USA

07.1.22

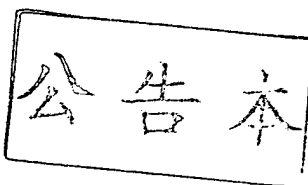
三、發明人：(共 7 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 瑞爾夫 A 辛加羅 / ZINGARO, RALPH A.
2. 哈提斯 杜卡爾 / DUZKALE, HATICE.
3. 埃米爾 J 費瑞須 / FREIREICH, EMIL J.
4. 哈高 坎塔吉安 / KANTARJIAN, HAGOP
5. 梅利達 梭特羅-雷瑪 / SOTELO-LERMA, MERIDA
6. 史丹 佛斯托瑟克 / VERSTOVSEK, SRDAN
7. 高明章 / GAO, MINGZHANG

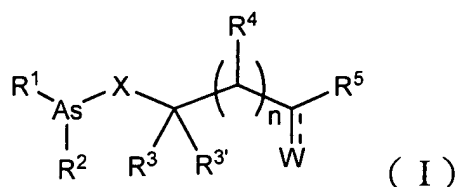
國 籍：(中文/英文)

1. 美國 / USA
2. 土耳其 / TURKEY
3. 美國 / USA
4. 美國 / USA
5. 墨西哥 / MEXICO
6. 美國 / USA
7. 中國大陸 / CHINA



十、申請專利範圍：

1. 一種具有式 (I) 之結構的化合物或其醫藥學上可接受之鹽，



其中

X 是 S 或 Se；

W 是 (R) (R)，其中各個出現的 R 獨立地為 H 或 C₁₋₂ 烷基；

n 是 0 或 1；

R¹ 以及 R² 各自獨立地為 C₁₋₁₀ 烷基；

R³ 是 -H 或 C₀₋₆ 烷基-COOR⁶；

R^{3'} 是 H、胺基、氰基、鹵素、芳基、C₁₋₁₀ 芳烷基、雜芳基、C₁₋₁₀ 雜芳烷基、羧基、C₁₋₁₀ 烷基、C₂₋₁₀ 烯基、或 C₂₋₁₀ 炔基；

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

R⁵ 是 -OH、氰基、C₁₋₆ 烷氧基、胺基、O-C₁₋₁₀ 烷基、O-C₁₋₁₀ 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 芳烷基、-OC(O)C₁₋₁₀ 烷基、-OC(O) 芳基、或甘胺酸取代基；以及

R⁶ 是 H 或 C₁₋₁₀ 烷基；

其中 C₁₋₁₀ 芳烷基為經芳基基團取代之 C₁₋₁₀ 烷基基團；

其中 C_{1-10} 雜芳烷基為經雜芳基基團取代之 C_{1-10} 烷基基團；

其中芳基為 C_{6-14} 芳基且雜芳基為 5 至 14 員雜芳基；且其中雜芳基中的雜原子係選自氮、硫及氧。

2.如申請專利範圍第 1 項之具有式 (I) 之結構的化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中 R^3 是選自下列之 C_{0-6} 烷基 $-COOR^6$ ： $-COOR^6$ 、 CH_2COOR^6 、 $CH_2CH_2COOR^6$ 、 $CH(CH_3)COOR^6$ 、 $CH(CH_2CH_3)COOR^6$ 、及 $CH_2CH_2CH_2COOR^6$ 。

3.如申請專利範圍第 2 項之具有式 (I) 之結構的化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中 R^6 是 C_{1-10} 烷基。

4.如申請專利範圍第 1 項之具有式 (I) 之結構的化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中 $R^{3'}$ 係選自胺基、氰基、鹵素、芳基、 C_{1-10} 芳烷基、雜芳基、 C_{1-10} 雜芳烷基、羧基、 C_{1-10} 烷基、 C_{2-10} 烯基、及 C_{2-10} 炔基；

其中 C_{1-10} 芳烷基為經芳基基團取代之 C_{1-10} 烷基基團；

其中 C_{1-10} 雜芳烷基為經雜芳基基團取代之 C_{1-10} 烷基基團；

其中芳基為 C_{6-14} 芳基且雜芳基為 5 至 14 員雜芳基；且其中雜芳基中的雜原子係選自氮、硫及氧。

5.如申請專利範圍第 1 項之具有式 (I) 之結構的化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中 R^4 係選自 $-OC(O)C_{1-10}$ 芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、及 $-OC(O)$ 芳基；

其中 C_{1-10} 芳烷基為經芳基基團取代之 C_{1-10} 烷基基團；
且其中芳基為 C_{6-14} 芳基。

6.如申請專利範圍第 1 項之具有式 (I) 之結構的化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中 R^5 係選自氰基、 C_{1-6} 烷氧基、胺基、 $O-C_{1-10}$ 烷基、 $O-C_{1-10}$ 芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 芳烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、及 $-OC(O)$ 芳基；

其中 C_{1-10} 芳烷基為經芳基基團取代之 C_{1-10} 烷基基團；
且其中芳基為 C_{6-14} 芳基。

7.如申請專利範圍第 1 項之具有式 (I) 之結構的化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中 X 為 S 且 n 為 1。

8.如申請專利範圍第 7 項之具有式 (I) 之結構的化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中 W 是 $(R)(R)$ 且各個出現的 R 為 H 。

9.如申請專利範圍第 8 項之具有式 (I) 之結構的化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中 R^1 及 R^2 是相同的且係一起選自甲基、乙基、丙基、以及異丙基。

10.如申請專利範圍第 9 項之具有式 (I) 之結構的化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中 R^3 及 $R^{3'}$ 皆為 H 。

11.如申請專利範圍第 10 項之具有式 (I) 之結構的化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中 R^4 及 R^5 係各自獨立地

其中 C₁₋₁₀ 芳烷基為經芳基基團取代之 C₁₋₁₀ 烷基基團；
且其中芳基為 C₆₋₁₄ 芳基。

其中 C₁₋₁₀ 芳烷基為經芳基基團取代之 C₁₋₁₀ 烷基基團；
且其中芳基為 C₆₋₁₄ 芳基。

14.如申請專利範圍第 1 項之具有式 (I) 之結構的化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其係選自



15.一種治療有效量的如申請專利範圍第 1 至 14 項中任一項之化合物的用途，該化合物係用於製造用於治療癌症之醫藥品。

16.如申請專利範圍第 15 項之用途，其中該癌症包含固態腫瘤。

17.如申請專利範圍第 16 項之用途，其中該癌症為腦、肺、肝、脾、腎、淋巴節、小腸、胰、血球細胞、骨骼、結腸、胃、乳房、子宮內膜、前列腺、睪丸、卵巢、中樞神經系統、皮膚、頭以及頸、食道、或骨髓癌症。

18.如申請專利範圍第 15 項之用途，其中該癌症為血液學癌症。

19.如申請專利範圍第 18 項之用途，其中該癌症為白血病、淋巴瘤、多發性骨髓瘤、脊髓發育不全、骨髓增殖性疾病、或頑固性貧血。

20.如申請專利範圍第 19 項之用途，其中該癌症為急性前骨髓性白血病。

21.如申請專利範圍第 15 項之用途，其中該治療有效量為 0.1-1000 mg/kg。

22.如申請專利範圍第 21 項之用途，其中該治療有效量為 1-500 mg/kg。

23.如申請專利範圍第 22 項之用途，其中該治療有效量為 10-100 mg/kg。

24.如申請專利範圍第 15 項之用途，其中該醫藥品係每日投予。

25.如申請專利範圍第 15 項之用途，其中該醫藥品係藉由注射投予。

26.如申請專利範圍第 15 項之用途，其中該醫藥品係與其他劑結合使用。

27.如申請專利範圍第 26 項之用途，其中該其他劑為全-反式-視黃酸、9-順式視黃酸、Am-80、或抗壞血酸。

28.一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 1 至 14 項中任一項之化合物及醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑。

29.如申請專利範圍第 28 項之醫藥組成物，其中該組成物為具有 pH 大於 5 之水溶液。

30.如申請專利範圍第 29 項之醫藥組成物，其中該組成物為具有 pH 在 5 至 8 的範圍內之水溶液。

31.如申請專利範圍第 30 項之醫藥組成物，其中該組成物為具有 pH 在 5 至 7 的範圍內之水溶液。

32.如申請專利範圍第 28 項之醫藥組成物，其用於治療癌症。

33.如申請專利範圍第 32 項之醫藥組成物，其中該癌症包含固態腫瘤。

34.如申請專利範圍第 33 項之醫藥組成物，其中該癌症為腦、肺、肝、脾、腎、淋巴節、小腸、胰、血球細胞、骨骼、結腸、胃、乳房、子宮內膜、前列腺、睪丸、卵巢、中樞神經系統、皮膚、頭以及頸、食道、或骨髓癌症。

35.如申請專利範圍第 32 項之醫藥組成物，其中該癌症為血液學癌症。

36.如申請專利範圍第 35 項之醫藥組成物，其中該癌症為白血病、淋巴瘤、多發性骨髓瘤、脊髓發育不全、骨髓增殖性疾病、或頑固性貧血。

37.如申請專利範圍第 36 項之醫藥組成物，其中該癌症為急性前骨髓性白血病。

38.如申請專利範圍第 32 項之醫藥組成物，其包含 0.1-1000 mg/kg 的治療有效量之如申請專利範圍第 1 至 14 項中任一項之化合物。

39.如申請專利範圍第 38 項之醫藥組成物，其包含 1-500 mg/kg 的治療有效量之如申請專利範圍第 1 至 14 項中任一項之化合物。

40.如申請專利範圍第 39 項之醫藥組成物，其包含
10-100 mg/kg 的治療有效量之如申請專利範圍第 1 至 14 項
中任一項之化合物。

41.如申請專利範圍第 32 項之醫藥組成物，其中該醫
藥組成物係每日投予。

42.如申請專利範圍第 32 項之醫藥組成物，其中該醫
藥組成物係藉由注射投予。

43.如申請專利範圍第 32 項之醫藥組成物，其中該醫
藥組成物係與其他劑結合使用。

44.如申請專利範圍第 43 項之醫藥組成物，其中該其
他劑為全-反式-視黃酸、9-順式視黃酸、Am-80、或抗壞血
酸。

十一、圖式：

如次頁