

[19] Patents Registry
The Hong Kong Special Administrative Region
香港特別行政區
專利註冊處

[11] 1245276 B
CN 107353313 B

[12] **STANDARD PATENT (R) SPECIFICATION**
轉錄標準專利說明書

[21] Application no. 申請編號 18104469.4
[51] Int. Cl. C07F 19/00 (2006.01) A61K 31/555 (2006.01)
[22] Date of filing 提交日期 04.04.2018
A61P 35/00 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)

[45] CALMANGAFODIPIR, A NEW CHEMICAL ENTITY, AND OTHER MIXED METAL COMPLEXES, METHODS OF PREPARATION, COMPOSITIONS, AND METHODS OF TREATMENT
新化學實體鈣錳福地吡和其他混合金屬配合物、製備方法、組合物以及治療方法

[30] Priority 優先權
05.01.2012 US 61/583,377
06.06.2012 US 61/656,178
06.07.2012 US 61/668,679
02.11.2012 US 61/721,575
[43] Date of publication of application 申請發表日期
24.08.2018
[45] Date of publication of grant of patent 批予專利的發表日期
08.05.2020
CN Application no. & date 中國專利申請編號及日期
CN 201710588057.1 04.12.2012
CN Publication no. & date 中國專利申請發表編號及日期
CN 107353313 17.11.2017
Date of grant in designated patent office 指定專利當局批予專利日期
09.04.2019

[73] Proprietor 專利所有人
PLEDPHARMA AB
普萊制藥公司
Grev Turegatan 7
S-114 46 Stockholm
SWEDEN
瑞典
斯德哥爾摩
[72] Inventor 發明人
KARLSSON, Jan, Olof 揚 . 奧洛夫 . 卡爾松
REINEKE, Karl 卡爾 . 賴內克
KURZ, Tino 蒂諾 . 庫爾茨
ANDERSSON, Rolf 羅爾夫 . 安德森
HALL, Michael 邁克爾 . 哈爾
MCLAUGHLIN, Christina 克里斯蒂娜 . 麥克勞克林
JACOBSSON, Sven 斯文 . 雅各布松
NAESTROEM, Jacques 雅克 . 內斯特倫
[74] Agent and / or address for service 代理人及/或送達地址
集佳知識產權有限公司
香港
九龍旺角洗衣街 39-55 號
金雞廣場 12 層 1201 室



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107353313 B

(45)授权公告日 2019.04.09

(21)申请号 201710588057.1

(22)申请日 2012.12.04

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107353313 A

(43)申请公布日 2017.11.17

(30)优先权数据
61/583,377 2012.01.05 US (续)

(62)分案原申请数据
201280070691.1 2012.12.04

(73)专利权人 普莱制药公司
地址 瑞典斯德哥尔摩

(72)发明人 扬·奥洛夫·卡尔松
卡尔·赖内克 蒂诺·库尔茨 (续)

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 张福誉

(51)Int.Cl.
C07F 19/00(2006.01) (续)

(56)对比文件
US 4933456 A,1990.06.12,
US 2009155184 A1,2009.06.18,
CN 102481295 A,2012.05.30, (续)
审查员 梁清刚

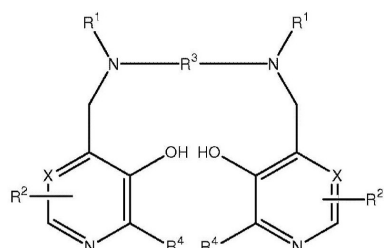
权利要求书2页 说明书24页 附图21页

(54)发明名称

新化学实体钙锰福地吡和其他混合金属配合物、制备方法、组合物以及治疗方法

(57)摘要

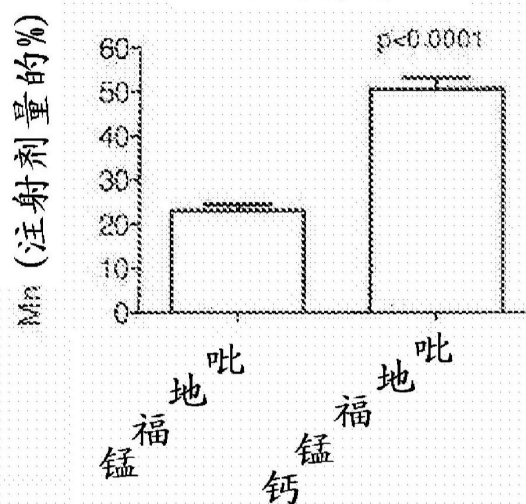
本申请涉及新化学实体钙锰福地吡和其他混合金属配合物、制备方法、组合物以及治疗方法。从第III-XII族过渡金属、第II族金属和式I化合物的溶液进行一步式结晶产生式I化合物或其盐的混合金属配合物,其中所述混合金属包含第III-XII族过渡金属和第II族金属:(式I)(I)其中X、R¹、R²、R³和R⁴如本文所定义。用于治疗患者中病理学状态(例如由氧衍生自由基的存在导致的病理学状态)的方法包括向所述患者施用所述混合金属配合物。



(I)

CN 107353313 B

24小时肾排泄



[接上页]

(30) 优先权数据

61/656,178 2012.06.06 US

61/668,679 2012.07.06 US

61/721,575 2012.11.02 US

(72) 发明人 罗尔夫·安德森 迈克尔·哈尔
克里斯蒂娜·麦克劳克林
斯文·雅各布松 雅克·内斯特伦

(51) Int. Cl.

A61K 31/555(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

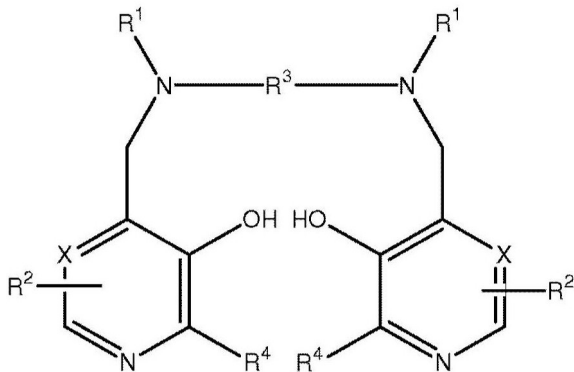
A61P 1/16(2006.01)

(56) 对比文件

Scott M. Rocklage等.Manganese(II) N,
N-Dipyridoxylethylenediamine-N,N-
diacetate 5,5-Bis(phosphate). Synthesis
and Characterization of a Paramagnetic
Chelate for Magnetic Resonance Imaging
Enhancement.《Inorg. Chem.》.1989,

1. 药物组合物,其通过将式I化合物或其盐的混合金属配合物混悬或溶解在液体介质中而形成,任选地所述药物组合物包含一种或更多种可药用赋形剂,其中所述混合金属包含钙和锰,并且其中钙与锰的摩尔比为1至10:

式I



其中,

X表示CH,

每一个R¹表示-CH₂COOH;

每一个R²独立地表示CH₂R⁶;

R⁶是OR⁸或OP(O)(OR⁸)R⁷;

R⁷是羟基或C₁-8烷基;

R⁸是氢原子或C₁-8烷基;

R³表示亚乙基;并且

每一个R⁴独立地表示氢或C₁-3烷基。

2. 根据权利要求1的药物组合物,其中R⁶是OP(O)(OR⁸)R⁷。

3. 根据权利要求1的药物组合物,其中所述式I化合物是N,N'-双-(吡哆醛-5-磷酸)-乙二胺-N,N'-二乙酸或N,N'-二吡哆基乙二胺-N,N'-二乙酸,或其可药用盐。

4. 根据权利要求1的药物组合物,其中Ca²⁺/Mn²⁺摩尔比为4。

5. 根据权利要求1至4中任一项的药物组合物,其中所述配合物在混悬或溶解在所述液体介质中之前是冻干的。

6. 根据权利要求1至4中任一项的药物组合物,其中所述一种或更多种可药用赋形剂包含一种或更多种稳定剂、抗氧化剂、渗透压调节剂、缓冲剂、或pH调节剂。

7. 根据权利要求1至4中任一项的药物组合物,其中所述液体介质包含盐水。

8. 根据权利要求1至7中任一项的药物组合物在制备用于治疗患者中由氧化应激导致之病理学状态之药物中的用途。

9. 根据权利要求8的用途,其中所述由氧化应激导致之病理学状态是由超氧化物导致的,所述超氧化物导致随后的脂质过氧化和/或蛋白质硝化。

10. 根据权利要求8的用途,其中所述病理学状态是细胞毒或细胞生长抑制药物损伤。

11. 根据权利要求10的用途,其中所述细胞毒或细胞生长抑制药物是癌症治疗药物。

12. 根据权利要求10的用途,其中所述细胞毒或细胞生长抑制药物包含阿霉素、表柔比星、奥沙利铂、卡铂、顺铂、5-氟尿嘧啶、多西他赛或紫杉醇中的至少一种。

13. 根据权利要求8的用途,其中所述病理学状态是骨髓抑制或神经毒性,或者骨髓抑

制和神经毒性二者。

14. 根据权利要求8的用途,其中所述病理学状态是局部缺血-再灌注诱发的损伤。

15. 根据权利要求8的用途,其中所述病理学状态与动脉粥样硬化和/或糖尿病有关。

16. 根据权利要求8的用途,其中所述病理学状态与溶解血栓治疗、心肺分流术或经皮腔内血管成形术有关,或者为心脏或器官移植手术或中风的结果。

17. 根据权利要求8的用途,其中所述病理学状态是对乙酰氨基酚诱发的急性肝功能衰竭。

18. 根据权利要求8的用途,其中所述病理学状态是铁超载或铜超载的病理学状态。

19. 根据权利要求8的用途,其中所述病理学状态是地中海贫血、镰状细胞性贫血、输血性含铁血黄素沉着或威尔逊氏病。

20. 根据权利要求8的用途,其中所述病理学状态是肝炎诱发的肝硬化、非酒精性脂肪性肝炎或病毒诱发的慢性肝炎。

21. 根据权利要求8的用途,其中所述病理学状态是辐射诱发的损伤。

22. 根据权利要求8的用途,其中所述由氧化应激导致之病理学状态是低锰超氧化物歧化酶活性。

23. 根据权利要求8的用途,其中所述病理学状态是非小细胞肺癌、结直肠癌、前列腺癌、乳腺癌、胰腺癌或恶性黑色素瘤。

24. 根据权利要求8至23中任一项的用途,其中用0.01至50 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重的所述混合金属配合物形成所述药物组合物。

25. 根据权利要求8至23中任一项的用途,其中用0.1至10 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重的所述混合金属配合物形成所述药物组合物。

26. 根据权利要求8至23中任一项的用途,其中用0.1至5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重的所述混合金属配合物形成所述药物组合物。

新化学实体钙锰福地吡和其他混合金属配合物、制备方法、组合物以及治疗方法

[0001] 本申请是申请日为2012年12月4日、申请号为“201280070691.1”、发明名称为“新化学实体钙锰福地吡和其他混合金属配合物、制备方法、组合物以及治疗方法”的中国专利申请的分案申请,原申请是国际申请PCT/IB2012/056959的中国国家阶段申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及二吡哆基(dipyridoxyl)化合物(如N,N'-双-(吡哆醛-5-磷酸)-乙二胺-N,N'-二乙酸(DPDP或福地吡(fodipir))或者其他式I化合物(下文吡哆基乙二胺衍生物或PLED衍生物))的混合金属配合物,其中所述混合金属包含第III-XII族过渡金属和第II族金属。在具体实施方案中,混合金属配合物是钙和锰配合物。本发明还涉及包含这样的混合金属配合物的组合物、用于在例如单步结晶中制备这样的混合金属配合物的方法和使用这样的混合金属配合物的治疗方法。这样的治疗方法包括常规地使用锰-DPDP配合物用于治疗作用的方法。在一个具体实施方案中,所述组合物可用于治疗体内由氧衍生自由基的存在导致的病理学状态中(即,氧化应激)。混合金属配合物,特别是本文所述混合的钙锰配合物钙锰福地吡(calmangafodipir)构成了新化学实体。

背景技术

[0003] 氧化应激始于作为正常细胞功能的一部分的活性氧物质(reactive oxygen species,ROS)和活性氮物质(reactive nitrogen species,RNS)的产生。ROS的产生具有多种细胞来源,但是最重要的来源是线粒体电子传递复合体I和III、内质网中的P450酶以及膜结合NADPH氧化酶。可通过细胞因子、炎症、病毒蛋白质和其他机制(如化学治疗药物、局部缺血-再灌注、以及铁和铜超载)刺激每一种这些来源产生ROS。重要的是,这些过程最初产生自由基超氧化物($\cdot O_2^-$),其随后被还原以形成过氧化氢、羟基自由基以及最终的水。然而,在高氧化应激以及因此大量产生超氧化物的条件下,这些活性中间体容易与其他分子相互作用以形成次级的有害ROS,例如脂质过氧化产物和过氧亚硝酸盐(Singal等,Liver Int.2011;31:1432-1448)。这表明了将细胞的超氧化物量保持在严格控制下的重要性。在正常条件下,这通过超氧化物歧化酶(SOD)实现。尽管SOD具有已知酶中最快的反应速率,但是在高氧化应激的条件下,这些酶可能被ROS和RNS超出以及甚至是不可逆地不可逆失活。这进而开启了模拟SOD酶的低分子药物(即,所谓的SOD模拟物)与病理性氧化应激斗争的治疗用途。

[0004] 很久前就已知短寿命但是高活性的氧衍生自由基参与病理性组织损伤,特别是在癌症患者中在利用细胞毒素/细胞生长抑制剂和放射疗法治疗的过程中(Towart等,Arch Pharmacol 1998;358(Suppl 2):R626,Laurent等,Cancer Res 2005;65:948-956,Karlsson等,Cancer Res 2006;66:598,Alexandre等,J Natl Cancer Inst 2006;98:236-244,Doroshov,J Natl Cancer Inst 2006;98:223-225,Citrin等,Oncologist,2010;15:360-371,Kurz等,Transl Oncol 2012;5:252-259)、对乙酰氨基酚诱发的肝功能衰竭

(Bedda等, *J Hepatol* 2003;39:765-772; Karlsson, *J Hepatol* 2004;40:872-873) 中、局部缺血性心脏病 (Cuzzocrea等, *Pharmacol Rev* 2001;53:135-159) 中和多种神经退行性疾病中, 包括阿尔兹海默病 (Alzheimer's disease)、肌萎缩性侧索硬化 (ALS)、帕金森氏病 (Parkinson's disease) 和多发性硬化 (Knight, *Ann Clin Lab Sci*.1997;27:11-25)。氧衍生自由基的过量产生还与铁超载的病理学状态有关 (Rachmilewitz等, *Ann N Y Acad Sci*.2005;1054:118-23), 例如在地中海贫血症、镰状细胞性贫血和输血性含铁血黄素沉着中。氧衍生自由基还与肝炎诱发的肝硬化 (Farrell等, *Anat Rec* 2008;291:684-692) 和噪音诱发的听力损失 (Wong等, *Hear Res* 2010;260:81-88) 有关。

[0005] 基于二吡哆基的螯合剂及其金属螯合物以及某些含锰化合物 (特别是锰螯合物) 在医学中的用途是已知的。例如, 参见EP 0910360、US 6147094、EP 0936915、US 6258828、EP 1054670、US 6310051、EP 1060174和US 6391895, 其公开了某些螯合剂、特别是二吡哆基螯合剂及其金属螯合物在治疗或预防人和动物中的以下疾病中有效: 蒽环霉素诱发的心脏中毒、辐射诱发的中毒、局部缺血-再灌注诱发的损伤和扑热息痛 (对乙酰氨基酚) 诱发的肝功能衰竭, 或者从更一般的观点来说, 由于氧衍生自由基的存在导致的每一种病理学状态, 即氧化应激。此外, 已经另外并且出乎意料地发现二吡哆基化合物锰福地吡 (MnDPDP) 对癌细胞具有细胞毒性效应 (EP 16944338)。但是, 如在WO 2009/078794 A1和Kurz等, 2012中描述的, 这是福地吡 (DPDP) 本身或其脱磷酸对应物DPMP和PLED的固有性质, 而不是金属配合物MnDPDP或其脱磷酸对应物MnDPMP和MnPLED的性质。

[0006] MnPLED衍生物的一种, 即锰N,N'-双-(吡哆醛-5-磷酸)-乙二胺-N,N'-二乙酸 (锰二吡哆基二磷酸盐 (Manganese DiPyridoxyl DiPhosphate); MnDPDP), 也被称为锰福地吡, 已经被批准在人中用作诊断性MRI造影剂。有趣的是, 已经表明锰福地吡保护小鼠免受多种细胞毒/细胞生长抑制药物 (阿霉素、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶和紫杉醇) 的严重副作用, 而不会不利地干扰这些药物的抗癌作用 (Towart等, 1998, Laurent等, 2005, Karlsson等, 2006, Alexandre等, 2006, Doroshov, 2006, Kurz等, 2012)。在正在利用亚叶酸、5-氟尿嘧啶和奥沙利铂的组合进行姑息治疗的一个结肠癌患者中测试了锰福地吡 (Yri等, *Acta Oncol*.2009;48:633-635)。来自该单个患者的临床前数据和结果如此有前景以致于已经在癌症患者中开始了临床测试。就奥沙利铂的最麻烦的副作用 (即, 奥沙利铂诱发的感觉神经毒性) 而言, 据我们所知, 不存在显示锰福地吡保护作用的临床前数据 (Karlsson等, *Transl Oncol*.2012;5:32-38)。Yri等, 2009描述了患者接受15个全剂量“Nordic FLOX”。在14个所述周期中, 患者接受锰福地吡的预防治疗。患者接受1275mg/m²奥沙利铂的累积剂量, 这是可能产生神经毒性症状的剂量。除在有意排除锰福地吡并且患者产生了外周感觉神经病变的第5个周期期间之外, 未检测到神经毒性症状。这表明锰福地吡可保护免受外周神经毒性。在5个周期后, 患者的体力状态显著改善, 对镇痛剂的需要显著降低。在任何化学治疗周期中, 都未发生中性白细胞减少症。

[0007] 已经完成了第一可行性研究 (MANFOL I), 并且向Swedish Medical Agency报道和公开了阳性结果 (包括骨髓保护作用) (Karlsson等, 2012)。

[0008] 还已经描述了锰福地吡保护小鼠免受小鼠中的对乙酰氨基酚诱发的急性肝功能衰竭 (acute liver failure, ALF) (Bedda等, 2003; Karlsson, 2004)。ALF以大量肝细胞死亡、谷胱甘肽耗尽导致的病症、氧衍生自由基和线粒体损伤为特征。

[0009] 锰福地吡是前药,就此而言,其可能需要被代谢成N,N'-二吡哆基乙二胺-N,N'-二乙酸(MnPLED),之后其可在体内状态中发挥细胞保护作用(例如,参见Karlsson等,Acta Radiol 2001;42:540-547;Kurz等,2012)。锰是必需的金属,也是有潜在的神经毒性的金属。许多年前已经知道在长期暴露于高水平的锰的状态下,频繁发生锥体束外功能紊乱的综合征,这是与帕金森氏综合征类似,但是临床上不同的疾病实体(参见Scheuhammer&Cherian,Arch Environm Contam Toxicol 1982;11:515-520)。当向人静脉内注射诊断性MR成像剂量的锰福地吡时,约80%所施用锰被释放(Toft等,Acta Radiol 1997;38:677-689)。顺磁性锰的释放实际上是锰福地吡的诊断性MR成像性质的前提(Wendland,NMR Biomed 2004;17:581-594)。Elizondo等,1991(Radiology 1991;178:73-78)提出福地吡部分与肝细胞上的吡哆酰基5'磷酸酯受体结合并且确保肝中锰福地吡的高细胞内浓度。最近在Coriat等的论文中也提出了这种假设(PLoS One 2011;6:1-6,e27005)。这是一种好的假设,但是遗憾的是未经证明并且是非常不可能的一种,其在提出后不久就不流行了。当静脉内(i.v.)注射锰福地吡时,约80%的金属配合物崩解(Toft等,Radiol 1997),在每一等摩尔Mn剂量下,MnCl₂具有与锰福地吡相等或更好的肝MR成像对比效力(Southon等,Acta Radiol 1997)。此外,在注射锰福地吡之后,几乎所有的福地吡都回收在尿(其大部分作为PLED)中,而大部分锰回收在粪便中(Hustvedt等,Acta Radiol 1997;38:690-699)。另一方面,锰福地吡(MnDPDP)及其脱磷酸对应物MnDPMP(N,N'-二吡哆基乙二胺-N,N'-二乙酸-5-磷酸)和MnPLED的治疗作用依赖于完整的金属配合物(Brurok等,Biochem Biophys Res Commun.1999;254:768-721,Karlsson等2001;42:540-547)。

[0010] PLED-衍生物模拟线粒体酶锰超氧化物歧化酶(MnSOD)(Brurok等,1999)。MnSOD保护哺乳动物细胞免受超氧自由基,超氧自由基为来自氧代谢的副产物,其在正常需氧条件下以相当高的量产生,没有哺乳动物能够在无功能性MnSOD的情况下存活。MnSOD具有任何已知酶中最快的转换数(对于其底物的反应速率)($>10^9\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)(Fridovich,J Exp Biol.1998;201:1203-1209)。低分子量MnSOD模拟物可具有接近天然MnSOD的转换率(Cuzzocrea等,2001)。有趣的是,含有过渡金属(如锰)的生理缓冲液可具有类似的高转换数(Culotta等,Biochim Biophys Acta.2006;1763:747-758)。但是,天然SOD酶的重要性与选择过程一致,该选择过程有利于采用手段将用于超氧化物歧化作用的过渡金属催化剂定位在高度需要这样的歧化作用的细胞部分(如线粒体)的生物。此外,来自麻醉的猪的心肌局部缺血-再灌注的结果不可避免地显示是完整的MnPLED而不是锰本身保护免受氧化应激,如由梗死面积的降低可见(Karlsson等,2001)。超氧化物的有效失活对防止产生非常有破坏性的羟基自由基和过氧亚硝酸盐是必要的(Cuzzocrea等,2001)。在病理性氧化应激期间,超氧自由基的形成通常超过内源失活能力。此外,超氧化物刺激产生过氧亚硝酸盐,其硝化内源MnSOD。这种蛋白质被过氧亚硝酸盐在Tyr-34硝化(Radi,Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:4003-4008)。一旦被硝化,MnSOD就失去其酶活性,这是有利于超氧化物和超氧化物驱动的伤害积累的事件(Muscoli等,Br J Pharmacol 2003;140:445-460)。

[0011] 最近的结果表明,MnSOD通过硝化失活是扑热息痛诱发的肝毒性中的早期事件(Agarwal等,J Pharmacol Exp Ther 2011;337:110-116)。此外,以前的结果表明MnSOD的硝化和失活参与人移植肾的慢性排斥(MacMillan-Crow等,Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:11853-11858)。还可能相关的是,注意到在镰状细胞性贫血中肌动蛋白(其构成了

细胞蛋白质的5%或更多)被严重硝化,观察到的硝化的程度足以诱发细胞骨架聚合(Radi, 2004)。此外,3-硝基酪氨酸的循环水平可作为评价动脉粥样硬化风险的生物标志物。此外,除动脉粥样硬化之外,认为过氧亚硝酸盐和3-硝基酪氨酸参与心肌局部缺血、脓毒性和损伤性肺(septic and distressed lung)、炎症肠病、肌萎缩性侧索硬化(Beckman等,Am J Physiol 1996;271:C1424-C1437)和糖尿病(Fönstermann等,Br J Pharmacol.2011;164:213-223)。

[0012] 抗氧化防御机制的受损(包括SOD活性降低和随后过氧亚硝酸盐的产生增加)可能是非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的发病机理的重要因素(Koruk等,Ann Clin Lab Sci.2004;34:57-62)。乙肝或丙肝病毒感染与慢性肝炎的发生和肝细胞癌的出现之间的显著流行病学和临床关联是明显的。有趣的是,在具有慢性病毒性肝炎的患者中,过氧亚硝酸盐诱发的酪氨酸硝化显著增加(Garcia-Monzon等,J Hepatol.2000;32:331-338)。当前,通常引用的在威尔逊氏病(Wilson's disease)中的病理学发生机制包括因铜超载导致的氧化损伤。在肝中已经检测到活性氧物质(ROS)的产生以及脂质氧化和DNA损伤(Burkhead等,Biomaterials 2011;24:455-466),特别是在这种疾病的晚期阶段。

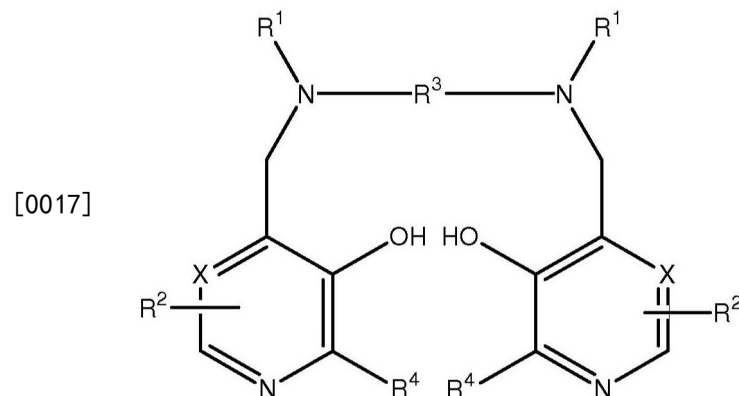
[0013] MnPLED衍生物不是过氧亚硝酸盐的靶标,并且在这种情况下添加外源MnPLED衍生物可重建保护潜能。此外,如在EP 1054670、US 6310051和Rocklage等(Inorg Chem 1989;28:477-485)中描述的,PLED衍生物是强的铁结合剂,并且一些MnPLED衍生物可具有过氧化氢酶和谷胱甘肽还原酶活性(Laurent等,2005),这可进一步提高其抗氧化能力。

[0014] 对于诊断成像用途和其他零星的用途,锰从锰福地吡离解不产生大的毒性问题。但是,由于摄取到CNS中,所以对于更频繁的使用,例如在治疗用途中,累积的锰毒性可产生严重的神经毒性问题(Crossgrove等,NMR Biomed.2004;17:544-53)。因此,对于更频繁的治疗用途,应避免容易解离出锰的化合物,需要开发用于获得期望的治疗效果同时降低了与这样的治疗用途有关的不期望的副作用的方法。

发明内容

[0015] 本发明的配合物、组合物和方法提供了在制备和使用PLED衍生物的金属配合物中的改进。在一个实施方案中,本发明涉及式I化合物或其盐的混合金属配合物,其中,所述混合金属包含第III-XII族过渡金属和第II族金属:

[0016] 式I



[0018] 其中,X表示CH或N,

- [0019] 每一个 R^1 独立地表示氢或 $-\text{CH}_2\text{COR}^5$;
- [0020] R^5 表示羟基, 任选地羟基化的烷氧基、氨基或烷基酰氨基;
- [0021] 每一个 R^2 独立地表示 ZYR^6 , 其中Z表示键或者任选地被 R^7 取代的 C_{1-3} 亚烷基或氧代亚烷基;
- [0022] Y表示键、氧原子或 NR^6 ;
- [0023] R^6 是氢原子、 COOR^8 、烷基、烯基、环烷基、芳基或芳烷基, 任选地被选自 COOR^8 、 CONR^8_2 、 NR^8_2 、 OR^8 、 $=\text{NR}^8$ 、 $=\text{O}$ 、 $\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^8)$ R^7 和 OSO_3M 的一个或更多个基团取代;
- [0024] R^7 是羟基, 任选地羟基化、任选地烷氧基化的烷基或氨基烷基;
- [0025] R^8 是氢原子或任选地羟基化、任选地烷氧基化的烷基;
- [0026] M是氢原子或一当量(equivalent)的生理可耐授阳离子;
- [0027] R^3 表示任选地被 R^7 取代的 C_{1-8} 亚烷基、1,2-亚环烷基(1,2-cykloalkylene)或1,2-亚芳基; 并且
- [0028] 每一个 R^4 独立地表示氢或 C_{1-3} 烷基,
- [0029] 或其盐。
- [0030] 在另一个实施方案中, 本发明涉及式I化合物的钙和锰配合物。本文描述的混合金属配合物, 特别是混合钙锰配合物钙锰福地吡构成了新化学实体。
- [0031] 本发明还涉及产生混合金属配合物的方法, 其包括从第III-XII族过渡金属、第II族金属和式I化合物的溶液进行一步式结晶。
- [0032] 在另一个实施方案中, 本发明涉及治疗患者中的病理学状态的方法, 其包括向患者施用根据本发明的混合金属配合物, 任选地与一种或更多种生理上可接受的载体和/或赋形剂一起。
- [0033] 根据本发明的配合物的优点在于, 第II族金属使配合物稳定而免于释放第III-XII族过渡金属。这降低了与使用之前的第III-XII族过渡金属配合物(例如MnPLED衍生物(如锰福地吡))相关的毒性作用。本发明的配合物还可表现出对病理学状态, 特别是由于氧衍生自由基的存在导致的那些病理学状态(即氧化应激)的改进的治疗和/或预防。通过以下给出的发明详述, 本发明另外的改进和优点将更明显。

附图说明

- [0034] 通过附图, 将更全面地理解以下的发明详述:
- [0035] 图1示出了在根据本发明的一步式结晶方法中获得的具有约4:1的Ca:Mn摩尔比的福地吡(DPDP)的钙锰配合物(在本文中称为“钙锰福地吡”)的三种晶型的X射线粉末衍射(XRPD)图, 如在实施例1中所述。
- [0036] 图2示出了钙福地吡(calfodipir)和锰福地吡(mangafodipir)的混合物而非根据本发明的配合物的XRPD图, ; 这些XRPD图表明所有产物都是无定形的并且被证明迅速吸水, 如在实施例2中所述。
- [0037] 图3示出了钙锰福地吡lot#7755-C-R0-01-30-01的傅里叶变换红外(FT-IR)吸收光谱, 其具有实施例3中所述的特征性红外吸收带(波数)和相应归属(assignment)。
- [0038] 图4A和4B示出了钙锰福地吡lot#7755-C-R0-01-30-01(600-850m/z)的质谱(图4A)和扩展的质谱(图4B), 如在实施例3中所述。

[0039] 图5示出了钙锰福地吡的化学结构,如在实施例3中所述。

[0040] 图6A示出了来自利用分别含有 $2.59\mu\text{mol}$ 和 $2.52\mu\text{mol}$ Mn的锰福地吡或钙锰福地吡注射的大鼠的0至24小时尿中锰(Mn)含量的增加,表示为Mn的总含量减去Mn的基线含量。图6B示出了表示为注射剂量的百分比的尿中Mn含量的增加。图6C示出了相同动物中24小时尿中锌含量的增加。结果表示为平均值 \pm S.E.M.;每组中 $n=4$ 。这些图在实施例4中更详细描述。

[0041] 图7A至7D分别示出了在注射后第3和第6天的单次静脉注射增加剂量(7.5、10.0和12.5mg/kg)的奥沙利铂对白细胞(WBC)、淋巴细胞(LYM)、中心粒细胞(NEU)和血小板(PLC)的骨髓抑制(myelosuppressive)作用。结果表示为平均值 \pm S.E.M.;每组中 $n=5$,如在实施例5中所述。

[0042] 图8A至8D分别示出了在奥沙利铂单独或与钙锰福地吡或锰福地吡组合治疗后balb/c小鼠中的WBC、LYM、NEU和PLC。对照仅接受载剂治疗。结果表示为平均值 \pm S.E.M.;每组中 $n=5$,如在实施例5中所述。

[0043] 图9A至9B示出了增加浓度的多种PLED衍生物和 CaCl_2 对结肠癌CT26细胞的细胞毒活性。结果表示为平均值 \pm S.D.; $n=3$),如实施例6中所述。

[0044] 图10A示出了在不存在和存在相对高剂量的钙锰福地吡(50mg/kg)的情况下CT26同系balb/c小鼠中高剂量奥沙利铂(20mg/kg)的抗肿瘤作用。图10B示出了在不存在和存在相对低剂量的钙锰福地吡的情况下低剂量奥沙利铂(10mg/kg)的抗肿瘤作用。结果表示为平均值 \pm S.E.M.;在图10A的载剂和奥沙利铂20mg/kg组中 $n=10$,在所有其他组中 $n=5$,如实施例7中所述。

[0045] 图11A至11C分别示出了在39剂量的NaCl(对照)、锰福地吡或钙锰福地吡(在这两种情况下相当于 $2800\mu\text{mol/kg}$ 锰的累积剂量)之后在脑、胰腺和肝中的Mn含量。结果表示为平均值 \pm S.E.M.;每组中 $n=17\sim 18$,如实施例8中所述。

[0046] 图12A至12D分别示出了注射后第3和第6天的单次静脉内注射增加剂量(75、100和125mg/kg)的卡铂对白细胞(WBC)、淋巴细胞(LYM)、中心粒细胞(NEU)和血小板(PLC)的骨髓抑制作用。结果表示为平均值 \pm S.E.M.;每组中 $n=5$,如实施例9中所述。

[0047] 图13A至13D分别示出了balb/c小鼠中与钙锰福地吡组合的卡铂之后的WBC、LYM、NEU和PLC。对照仅接受载剂治疗。结果表示为平均值 \pm S.E.M.;每组中 $n=5$,如实施例9中所述。

[0048] 图14示出了在不存在和存在相对低剂量的钙锰福地吡的情况下,在CT26有免疫能力的balb/c小鼠和免疫缺陷的裸balb/c小鼠(nu/nu)中低剂量的奥沙利铂(10mg/kg)的抗肿瘤作用。结果表示为平均值 \pm S.E.M.;每组中 $n=5$,如实施例10中所述。

[0049] 图15A和15B分别示出了在非小细胞肺癌细胞U1810和LLC1中钙锰福地吡和锰福地吡的细胞毒活性。结果表示为平均值 \pm S.D.;每组中 $n=3$,如实施例11中所述。

[0050] 通过实施例,可更全面地理解附图。

具体实施方式

[0051] 本发明的配合物、组合物和方法提供了在制备和使用PLED衍生物(即吡哆酰基乙二胺衍生物)的金属配合物方面的改进,但是应认识到,所述衍生物还可充当PLED的前药,

因为其在体内可代谢形成PLED。

[0052] WO 2011/004325 A1证明了如何向锰福地吡 (MnDPDP) 添加的过剩的福地吡 (DPDP) 使其在施用后稳定而不释放锰, 从而降低CNS的摄取, 从而显著降低锰福地吡的神经毒潜力。由于是完整的含锰配合物发挥SOD模拟和细胞保护作用, 因此过剩的福地吡将不仅降低神经毒潜力, 并且还显著提高细胞保护效力。

[0053] 锰从MnPLED衍生物, 包括锰N,N'-双-(吡哆醛-5-磷酸)-乙二胺-N,N'-二乙酸(锰福地吡)的体内释放依赖于体内游离或易离解的锌的存在。锌对福地吡或其脱磷酸对应物的亲和力比锰高约1000倍 (Rocklage等, 1989)。实验研究表明在体内锰从锰福地吡释放在超过 $5\mu\text{mol}/\text{kg}$ 的剂量下饱和 (Southon等, 1997)。在健康受试者中利用锰福地吡的心脏和肝成像表明在男性中类似的饱和剂量 (Skjold等, J. Magn. Reson. Imaging 2004; 20: 948-952, Toft等, 1997)。

[0054] 在WO 2011/004325 A1中描述的发明中, 假定通过在即用溶液中混合两种活性药物成分(API) (如锰福地吡和福地吡) 或者将其分开施用来获得特定的治疗组合物。证明福地吡在约5至 $10\mu\text{mol}/\text{kg}$ 剂量水平对锰福地吡具有显著的体内稳定作用。第一临床体验 (Yri等, 2009和Karlsson等, 2011) 表明在男性中锰福地吡在2至 $10\mu\text{mol}/\text{kg}$ 之间某处的剂量水平是治疗有效的。考虑到锰福地吡加上福地吡更高的效力, 合理地假设在患者中锰福地吡在接近 $1\mu\text{mol}/\text{kg}$ 剂量水平下应该是治疗有效的。这转而教导我们(福地吡+锰福地吡)/锰福地吡比接近5, 即, 含有4倍于锰福地吡的福地吡的即用制剂应该是有效的。这进一步暗示含有40mM福地吡和10mM锰福地吡的即用制剂——每千克体重施用0.1至0.2ml这种制剂——可导致1至 $2\mu\text{mol}/\text{kg}$ 锰福地吡和4至 $8\mu\text{mol}/\text{kg}$ 福地吡的剂量。

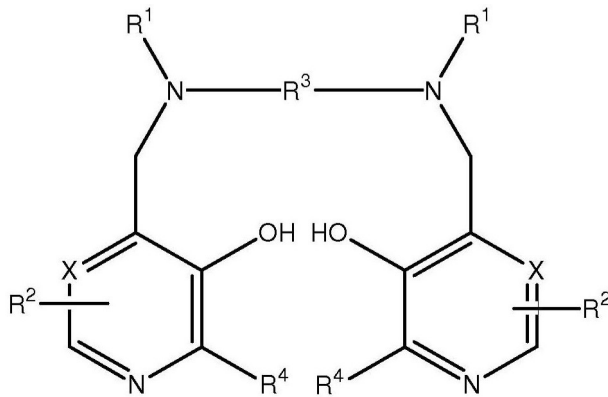
[0055] 钙对福地吡的亲和力比锌低约 10^9 倍, 对福地吡的亲和力比锰低约 10^6 倍。但是, 考虑到钙以比锌和锰以高得多的细胞外浓度存在, 所以快速静脉内团注施用福地吡可诱导游离钙的细胞外浓度急剧降低。因为心脏的血液泵送活性绝对依赖于细胞外钙, 所以游离钙细胞外含量的降低可转而诱发急性心力衰竭。但是, 如在WO 2011/004325 A1中讨论的, 这个问题可通过使用钙络合的DPDP即CaDPDP容易地解决。

[0056] 出乎意料地, 已经发现CaDPDP可用与PLED衍生物中的锰一起用在配合物中。此外, 出乎意料地, 可获得钙和锰的配合物, 例如钙锰福地吡以及其他第II族金属和第III-XII族过渡金属的配合物。

[0057] 因此, 根据一个方面, 本发明涉及式I化合物的混合金属配合物或其盐, 其中所述混合金属包含第III-XII族过渡金属和第II族金属:

[0058] 式I

[0059]



[0060] 其中，

[0061] X表示CH或N，

[0062] 每一个R¹独立地表示氢或-CH₂COR⁵；

[0063] R⁵表示羟基，任选地羟基化的烷氧基、氨基或烷基酰氨基；

[0064] 每一个R²独立地表示ZYR⁶，其中Z表示键或者任选地被R⁷取代的C₁-₃亚烷基或氧代亚烷基；

[0065] Y表示键、氧原子或NR⁶；

[0066] R⁶是氢原子、COOR⁸、烷基、烯基、环烷基、芳基或芳烷基，任选地被选自COOR⁸、CONR⁸₂、NR⁸₂、OR⁸、=NR⁸、=O、OP(O)(OR⁸)R⁷和OSO₃M的一个或多个基团取代；

[0067] R⁷是羟基，任选地羟基化、任选地烷氧基化的烷基或氨基烷基；

[0068] R⁸是氢原子或任选地羟基化、任选地烷氧基化的烷基；

[0069] M是氢原子或一当量的生理可耐离子；

[0070] R³表示任选地被R⁷取代的C₁-₈亚烷基、1,2-亚环烷基或1,2-亚芳基；并且每一个R⁴独立地表示氢或C₁-₃烷基。

[0071] 本文使用的术语“烷基”和“亚烷基”包括直链和支链、饱和和不饱和烃。术语“1,2-亚环烷基”包括具有5至8个碳原子的顺式和反式亚环烷基二者以及烷基取代的亚环烷基。术语“1,2-亚芳基”包括苯基和萘基及其具有6至10个碳原子的烷基取代的衍生物。除非另有说明，否则任何烷基、亚烷基或烯基部分可优选地包含1至20个，更特别地1至8个，更特别地1至6个，甚至更特别地1至4个碳原子。环烷基部分可优选地包含3至18个环原子，特别地5至12个环原子，甚至更特别地5至8个环原子。包括苯基或萘基的芳基部分是优选的。对于芳烷基，苯基C₁-₈烷基，特别是苄基是优选的。当基团可任选地被羟基取代时，可以是单取代或多取代，并且在多取代的情况下，烷氧基取代基可以携带烷氧基和/或羟基取代基。

[0072] 式I化合物在两个吡啶环上可具有相同或不同的R²基团，并且它们可连接在相同或不同的环位置。在一个具体实施方案中，取代在5位和6位，或者更特别地，6位，即羟基的对位。在一个具体实施方案中，R²基团相同并且同位，更特别地，在6,6'-位。在又一些更具体的实施方案中，每一个R⁶是单或多(羟基或烷氧基化的)烷基或为具有式OP(O)(OR⁸)R⁷的基团。

[0073] 在另一个实施方案中，本发明涉及式I化合物的钙和锰配合物。在一个实施方案中，R⁵是羟基、C₁-₈烷氧基、乙二醇、甘油、氨基或C₁-₈烷基酰氨基；Z是键或选自CH₂、(CH₂)₂、CO、CH₂CO、CH₂CH₂CO和CH₂COCH₂的基团；Y是键；R⁶是单或多(羟基或烷氧基化的)烷基或者式

OP(O)(OR⁸)R⁷的基团;并且R⁷是羟基或者未经取代的烷基或氨基烷基。在一个更具体的实施方案中,R³是亚乙基,并且每一个基团R¹表示-CH₂COR⁵,其中R⁵是羟基。在另一个实施方案中,式I化合物是N,N'-双-(吡哆醛-5-磷酸)-乙二胺-N,N'-二乙酸(DPDP)或其可药用盐。在又一些实施方案中,药学物质是N,N'-双-(吡哆醛-5-磷酸)-乙二胺-N,N'-二乙酸或其盐的混合锰钙配合物。

[0074] 混合金属配合物可包含来自所指示之族金属的任意组合。在一个具体实施方案中,第III-XII族过渡金属是Mn²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺和/或Ni²⁺,第II族金属是Ca²⁺和/或Mg²⁺。在一个更具体的实施方案中,第III-XII族过渡金属是Mn⁺,第II族金属是Ca²⁺或Ca²⁺与Mg的混合物。在一些更具体的实施方案中,第II族金属是Ca²⁺和Mg²⁺的混合物,Ca²⁺/Mg²⁺摩尔比为约0.1至50,更特别地,约0.1至10。

[0075] 在又一些实施方案中,所述混合金属配合物包含摩尔比为约1至10的第II族金属和第III-XII族过渡金属。在一个具体实施方案中,第III-XII族过渡金属是Mn²⁺,第II族金属是Ca²⁺,并且Ca²⁺/Mn²⁺摩尔比为约4。在一个更具体的实施方案中,第III-XII族过渡金属是Mn²⁺,第II族金属是Ca²⁺,Ca²⁺/Mn²⁺摩尔比为约4,式I化合物是DPDP,即,所述配合物是本文所述化合物钙锰福地吡。

[0076] 在另一个方面,本发明涉及在一步式制备/结晶步骤中产生本发明的混合金属配合物的方法。所述方法包括从第III-XII族过渡金属、第II族金属和式I化合物的溶液进行一步式结晶。在一个具体实施方案中,从锰、钙和式I化合物的溶液进行一步式结晶。在一个更具体的实施方案中,所述溶液的(Ca+Mn)/Mn比接近(4+1)/1=5,即组合物化学计量接近Ca₄Mn(DPDP)₅。

[0077] X射线粉末衍射(XRPD)是鉴定和表征结晶固体中最广泛使用的,其每一种均产生独特的衍射图案。线的位置(对应于晶格间距)和相对强度二者都指示特定的相和物质,提供用于比较的“指纹”。如实施例1所示,钙锰福地吡的XRPD分析毋庸置疑地证明钙锰福地吡是一种化学实体,即配合物,而不是简单的混合物,参见实施例1。图1示出了根据环境湿度相互转变的钙锰福地吡的三种晶型的叠置的曲线。可变湿度XRPD分析证明形式B在超过40%的相对湿度(RH)下稳定,形式A在0至10%RH下稳定,形式C在6至36%RH下稳定。在38至44%RH下观察到形式B和形式C的混合物,在10mg规模下在3小时内观察到形式转变的发生。

[0078] 可利用或不利用加晶种实施一步式制备,但是加晶种(如实施例1中所示例的)能够更好地控制结晶。

[0079] 以上简单提到的一步式制备优于将单独金属配合物混合的制备。因此,在一个具体实施方案中,钙和锰的配合物是结晶物质并且容易与期望量的锰福地吡(MnDPDP)和钙福地吡(CaDPDP)的简单混合物区分,如实施例2中所示。

[0080] 所述实施例还示出了如用钙-锰配合物钙锰福地吡表示的根据本发明的配合物的改进和优点。至于体内锰稳定性,如在实施例4中证明的,钙锰福地吡至少与锰福地吡和福地吡的真正混合物一样稳定。这将导致显著更少的锰保留在脑中,如在实施例8中证明的。由于细胞保护作用主要依赖于完整的锰配合物锰福地吡或其脱磷酸对应物MnDPMP和MnPLED,所以钙锰福地吡的效力优于锰福地吡,如在实施例5中所示例的。此外,出乎意料地发现锰福地吡对癌细胞(如CT26细胞)具有细胞毒性作用(Laurent等,2005;Alexandre等,2006;EP 16944338)。但是,如在WO 2009/078794 A1和Kurz等,2012中描述的,这是福地吡

或本身其脱磷酸对应物DPMP和PLED的固有性质,而不是完整的金属配合物锰福地吡或其脱磷酸对应物MnDPMP和MnPLED的。在实施例6中,表明在CT26结肠癌细胞的杀伤中,福地吡比锰福地吡有效约20倍,并且实施例11表明在杀伤U1810非小细胞肺癌细胞中钙锰福地吡比锰福地吡有效约28倍。在体外条件下,锰在一定程度上从福地吡离解,最可能地解释了锰福地吡的癌症杀伤效力。另一方面,与等摩尔锰浓度的锰福地吡相比,实施例1、2和3所述的钙锰福地吡与单独福地吡一样有效,即,钙锰福地吡的杀伤效力比等摩尔锰浓度的锰福地吡高得多。该发现暗示了两个重要性质。首先,脱磷酸的PLED可能与其磷酸化的对应物福地吡在癌细胞杀伤能力方面一样有效,其次,与锰福地吡相比,MnPLED更低的稳定性(Rocklage等,1989)可能解释了MnPLED更高的效力。ZnDPDP和ZnPLED不具有任何细胞毒活性是因为这些配合物比其锰对应物稳定性高1000倍(Rocklage等,1989)。

[0081] 在开发锰福地吡作为MRI造影剂的过程中,发现MnDPDP在大鼠中导致胎儿骨骼异常,但是在兔中不会。重要的是,在大鼠中见到的该致畸作用不是由完整的锰福地吡本身导致的,而是由离解的锰导致的(Grant等,Acta Radiol.1997;38:759-769)。尽管不确定锰是否会在人胎儿中导致骨骼异常,但是当然必需要保护可能怀孕的妇女不暴露于锰福地吡。这代表了对于大部分临床应用来说是小问题,但是却是主要的职业问题,特别是在生产的过程中,不得不采取昂贵的措施以保护能生育和可能怀孕的妇女不暴露于锰福地吡。重要的是,当意外地被吸收到体内后,钙锰福地吡将比锰福地吡释放少得多程度的锰,这将毫无疑问地大幅降低胎儿出现骨骼畸形的风险。其次,由于钙锰福地吡比等摩尔锰剂量的锰福地吡显著更有效,对于产生的每一剂量钙锰福地吡,锰的需求被大幅降低,其将导致在生产过程中更少的锰暴露。

[0082] 此外,制备单活性药物成分降低了生产治疗剂量的成本。此外,对于单物质的剂量的需要降低了产品配制中出错的可能性。在稳定性测试中,结晶产物的稳定性被证明优于无定形物质,例如通过喷雾干燥两种API的混合物形成的那些。如实施例2所说明的,由喷雾干燥获得的无定形物质被证明为迅速吸收水,在暴露于25°C/60%RH和40°C/75%RH下24小时内形成融合颗粒和/或粘性固体。相比之下,结晶钙锰福地吡即使在相同的暴露条件下7天后也保持自由流动的固体。

[0083] 如W0 2011/004325 A1中所述,已经发现向MnPLED衍生物治疗剂中添加过量的不含锰的PLED衍生物(如DPDP),保护锰福地吡在体内不释放神经毒性的锰。尽管对于锰被摄取到脑中背后的机制尚未完全清楚,但是与含有锰的PLED衍生物(如锰福地吡)组合施用过量的不含锰的PLED衍生物(如福地吡)显著降低了脑对锰的摄取。尽管不希望受到理论的约束,但是认为根据发明W0 2011/004325 A1的组合保持了MnPLED的螯合剂形式,从而提高了排泄可用的螯合物的量并且降低了摄取到脑和其他器官中的游离Mn的量。低分子量锰螯合物(如MnPLED衍生物)及其Zn对应物将容易地通过肾排泄,这受肾小球过滤率(GFR)的管控,而未与小分子量螯合剂结合的锰将在体内保留相当长一段时间,缓慢并且主要通过胆途径排泄(Toft等,1997)。如在下文实施例8中所示,重复地(3个月内39次)向大鼠中静脉内注射高剂量(假定临床假定剂量的36倍)的钙锰福地吡,与锰福地吡导致的结果相比,其导致脑中保留的锰显著更低。在两种情况下,总剂量相当于约2800 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 的锰。该实施例还表明胰腺在较大程度上摄取并保持离解的锰,这是之前由Ni等(Acta Radiol 1997;38:700-707)描述的性质并用作有希望的胰腺诊断MRI方法(Ahlström等,Acta Radiol 1997;

38:660-664)。与利用锰福地吡治疗的那些相比,钙锰福地吡治疗之大鼠的胰腺中显著更低的锰水平进一步证实了钙锰福地吡改进的毒理学谱。尽管在锰福地吡组中肝中Mn含量在统计学上显著提升,但是相对提升度比脑和胰腺中的那些低得多。已知单个诊断剂量的锰福地吡($5\mu\text{mol/kg b.w.}$)导致大鼠的胰腺和肝中Mn含量迅速升高——2小时后,胰腺的Mn含量比基线值高约10倍,肝的对应值升高约2倍(Ni等,1997)。而Ni等发现24小时后胰腺中的Mn含量依然是提升的(基线值的约5倍),在该时间点肝中的Mn含量返回基线。这可能反映了肝高的处理锰的能力及其在锰内稳态中的重要生理作用。这进一步得到本发明结果的支持,其显示在重度暴露于锰福地吡之后肝中Mn仅适度提高。本文实施例8清楚地说明了钙锰福地吡的改进的毒理学谱。

[0084] 当使用临床剂量的MnPLED衍生物(如锰福地吡)(即, 5 至 $10\mu\text{mol/kg b.w.}$,静脉内施用)作为人中的MRI造影剂时,约80%与福地吡(DPDP)结合的锰与锌交换(Toft等,1997)。当施用了较小剂量的锰福地吡时,离解的锰的百分比将甚至更大。在这个观点上,锰福地吡在大鼠和狗中以类似的方式作用(Hustvedt等,1997);但是,当将化合物施用到猪中时,锰福地吡中几乎所有的锰都与锌交换,因此在猪中没有细胞保护作用(Karlsson等,2001)。另一方面,在猪中施用低剂量的MnPLED导致广泛的细胞保护作用,由显著降低局部缺血-再灌注时的心肌梗死面积可见。尽管已报道 Mn^{2+} 和PLED之间的稳定常数比 Mn^{2+} 和福地吡的对应数字大幅降低(Rocklage等,1989),但是MnPLED因为一些未知的未进行金属交换。锰的替换是用作MRI造影剂的先决条件并且因此是期望的,例如,用于肝和胰腺诊断目的。但是,对抗多种形式的氧化应激的模拟SOD的治疗效果完全依赖于完整的锰PLED衍生物配合物(Brurok等,1999;Karlsson等,2001)。例如,尽管体内施用锰福地吡保护免受多种氧化应激源(例如局部缺血-再灌注、细胞毒/细胞生长抑制剂和对乙酰氨基酚中毒),但是其不保护猪心脏免受局部缺血-再灌注诱发的心肌梗死(Karlsson等,2001),因其结果可推断MnPLED衍生物的体内细胞保护作用是完整锰配合物的固有性质。

[0085] 如在钙锰福地吡中,Ca以超过Mn约4倍存在,使配合物或其脱磷酸对应物在注射后极度稳定而不释放锰,因此提供了另一个重要优点,即提高治疗效力。例如,当静脉内注射临床相关成像剂量的MnDPDP(5 至 $10\mu\text{mol/kg}$)时,约80%最初与DPDP结合的锰被释放,有助于成像功效。因此,小于20%保持与DPDP或其脱磷酸对应物结合,有助于MnDPDP的治疗活性。由于在钙锰福地吡中,比Mn过量约4倍的Ca可有效地降低锰从配合物的释放,这意味着对于相等的治疗效果,可大幅减少锰,如在本发明中清楚示例的。在较低以及在某些实施方案中在较高治疗相关剂量下,Ca的稳定作用将甚至更强。这转而意味着使用钙锰福地吡将比锰福地吡对神经毒潜力具有深刻的影响,这是因为具有接近 Ca_4Mn (DPDP)₅的化学计量组成的新药物钙锰福地吡的体内稳定作用和提高了的治疗效力二者。

[0086] 锌存在于全身的组织 and 体液中。已估计人中的全身锌含量为2至3g(Folin等, BioMetals 1994;7:75-79)。血浆锌占全身锌含量的约0.1%,并且在施用后,主要是这一小部分锌与锰竞争性结合福地吡或其脱磷酸对应物DPMP和PLED。通过肠胃吸收和排泄的协同调节,人体具有非常高的保持锌内稳态的能力(King等, J Nutr 2000;130:1360S-1366S)。

[0087] 尽管不希望受到理论的约束,但是通过临床前工作(Southon等,1997)和临床工作(Skjold等,2004),可合理地假设身体含有 5 至 $10\mu\text{mol/kg}$ 体重(b.w.)的容易与MnPLED衍生物(如锰福地吡)中的锰交换的锌。这基本符合上述血浆的锌含量。PLED衍生物(如福地吡)

每分子含有一个锰/锌结合位点。因此,鉴于锌与螯合剂的亲和力高1000倍,钙锰福地吡中与锰相比以约4倍比率存在的钙将保护在向患者肠胃外施用后不释放锰。

[0088] 在另一个实施方案中,本发明涉及通过施用所述配合物来治疗患者中的病理学状态的方法,包括但不限于由氧衍生自由基的存在导致的病理学状态(即,氧化应激)。在一个具体实施方案中,所述病理学状态由超氧化物导致,所述超氧化物随后引起脂质过氧化和/或蛋白质硝化。在一个具体实施方案中,可施用所述配合物以治疗性治疗人类患者或其他哺乳动物中这样的病理学状态。在另一个具体实施方案中,施用根据本发明的配合物以治疗哺乳动物中由氧衍生自由基的存在导致的病理学状态(即,氧化应激)。

[0089] 在一个实施方案中,将所述配合物用在细胞毒或细胞生长抑制药物的治疗中,其中施用所述配合物以提供保护而免受细胞毒/细胞生长抑制药物(例如,癌症患者中的一种或更多种癌症药物)的不利副作用。在一个更具体的实施方案中,细胞毒或细胞生长抑制药物包含阿霉素、表柔比星、奥沙利铂、卡铂、顺铂、5-氟尿嘧啶、多西他赛或紫杉醇中的至少一种。在另一些实施方案中,所述病理学状态是骨髓抑制(myelosuppression)或神经毒性,或者骨髓抑制和神经毒性二者。

[0090] 根据本发明的方法还可包括,但不限于,治疗对乙酰氨基酚诱发的肝功能衰竭、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、病毒诱发的慢性肝炎、威尔逊氏病、糖尿病,局部缺血性心脏病(包括急性环境和选择性环境(elective setting)二者下的局部缺血-再灌注诱发的损伤或心肌局部缺血-再灌注诱发的损伤),与溶解血栓治疗、心肺分流术或经皮腔内血管成形术相关的病症,或者因心脏或器官移植手术或中风引起的病症。在另一些实施方案中,根据本发明的方法还可包括治疗:铁相关病症,包括铁超载,例如地中海贫血、镰状细胞性贫血或输血性含铁血黄素沉着;肝炎诱发的肝硬化;辐射诱发的损伤,例如放射治疗引起的损伤;多种神经退行性疾病,包括阿尔兹海默病、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、帕金森病和多发性硬化等。

[0091] 在又一些实施方案中,施用根据本发明的方法来作为低锰超氧化物歧化酶(MnSOD)活性的病理学状态(例如,在多种形式的癌症中发生的)的替代治疗(Buettner, *Anticancer Agents Med Chem.* 2011;11:341-346)。因此,在一个实施方案中,本发明涉及通过施用本发明的配合物或更具体地说钙锰福地吡来治疗非小细胞肺癌的方法。在另外一些实施方案中,本发明涉及通过施用本发明的配合物或更具体地说钙锰福地吡来治疗结肠癌、前列腺癌、乳腺癌、胰腺癌或恶性黑色素瘤的方法。

[0092] 如实施例5以及Laurent等,2005和Alexandre等,2006所示,锰福地吡的抗肿瘤作用的一个有意思并且可能重要的性质可能是其淋巴细胞保护性能。尽管氧化应激继发的炎性过程对正常组织有损伤,但是实际上其可能通过产生富含生长因子的微环境和促进癌性克隆的生长而对肿瘤组织有益(Anscher, *Oncologist* 2010;15:350-359;Kareva, *Transl Oncol* 2011;4:266-270;Kerker等, *Cancer Res* 2012;72:3125-3130)。一个显著的实例是存在优先聚集在较少血管化的肿瘤区域并且分泌实际上促进肿瘤生长的细胞因子的肿瘤相关巨噬细胞。此外,这些生长因子不仅可促进肿瘤生长,并且它们还已示出对在肿瘤消除中最有效的CD8+ T淋巴细胞活性的抑制。实际上,为了癌症化学治疗的结果,对于T淋巴细胞介导的免疫应答的重要性越来越感兴趣(Zitvogel等, *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:151-160;Kerker等,2012)。已知严重的淋巴细胞减少症(<1000细胞/ μ l)不利地影响化学

治疗响应。小鼠癌症的集合,包括CT26结肠癌、MCA205纤维肉瘤、TSA细胞系乳腺癌、GOS细胞系骨肉瘤和EL4胸腺瘤,当其被植入到同系能够免疫的小鼠中时,比植入到免疫缺陷宿主(即,裸小鼠)中时对利用阿霉素和奥沙利铂的化学治疗的响应有效得多(Zitvogel等,2011)。这符合揭示IFN- γ 产生性CD8⁺T-淋巴细胞是有效的癌症免疫效应器的临床研究。此外,高中性粒细胞/淋巴细胞比率与具有晚期结直肠癌的患者的低的总存活率有关(Chua等,Br J Cancer 2011;104:1288-1295)。考虑到锰福地吡以及特别地钙锰福地吡是化学治疗中的高效淋巴细胞保护剂,似乎合理的是,该性质在体内病症的过程中特别重要。

[0093] 为了临床可用,用于癌症患者中的化学治疗保护剂或放射治疗保护剂应满足三个标准:(i) 药剂应保护正常组织免受化学治疗/放射治疗诱发的毒性,但是不保护肿瘤组织(至少不在任何更大的程度上),否则将不能获得益处;(ii) 药剂应相对容易递送并具有最小毒性;并且(iii) 药剂应保护正常组织免受剂量限制性毒性或显著降低生活质量的那些(Citrin等,2010)。如本文实施例证明的,本发明的化合物以及特别地钙锰福地吡满足所有这些标准。为何锰福地吡和钙锰福地吡保护非恶性细胞但是损伤癌细胞的原因似乎自相矛盾。尽管不希望受到理论的约束,但是可能的是对非恶性细胞的保护和对癌细胞的细胞毒作用正好是一枚硬币的两面。提升的氧化态是刺激转化细胞进行有丝分裂必不可少的(Irani等,Science 1997;275:1649-1652)。若干研究已经报道活性氧物质(ROS)在促进肿瘤转移中具有重要作用(例如,Behrend等,Mol Cell Biol 2005;25:7758-7769)。这些数据与大量的文献一致,表明许多上皮肿瘤细胞的氧化还原平衡有利于提升的氧化剂设定点(set point)(Doroshov,2006),包括CT26细胞(Laurent等,2005;Alexandre等,2006)。MnSOD抑制多种癌细胞系和小鼠模型中的细胞生长。此外,MnSOD的过表达诱导人结直肠癌细胞系HCT116中生长停滞并增加诱导p53所需的衰老(Behrend等,2005)。在癌细胞中引入正常MnSOD基因改变了表型,并且细胞失去了其在培养物中形成群落和在裸小鼠中形成肿瘤的能力(Church等,Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:3113-3117)。在癌细胞中可见的提升的氧化态通常导致 $\cdot\text{O}_2^-$ 的产生增加,其容易与 $\cdot\text{NO}$ 反应形成高毒性ONOO⁻,导致酪氨酸硝化, $\cdot\text{NO}$ 的“丑陋”一面(Beckman等,1996;Radi,2004)。有趣的是,令人信服的证据表明酪氨酸硝化参与肿瘤中CD8⁺淋巴细胞介导的免疫应答的上述抑制(Bronte等,J Exp Med 2005;201,1257-1268;Molon等,J Exp Med 2011;208:1949-1962)。可能是钙锰福地吡通过其SOD模拟活性抑制了ONOO⁻产生和由此的免疫抑制,解释了在能够免疫的小鼠中可见但是在不能免疫之小鼠中不可见的提高的抗肿瘤作用,如实施例10证明的。过氧亚硝酸盐不能直接硝化蛋白质,通常需要氧化还原活性过渡金属如铁或铜(甚至是锰也可满足该需要)(Radi,2004)。福地吡及其脱磷酸代谢物对Fe³⁺具有极高的亲和力(Rocklage等,1989)。除了钙锰福地吡的SOD模拟活性外,该性质对抗肿瘤活性可能特别重要。除T淋巴细胞依赖作用外,DPDP和PLED的不依赖于免疫的直接作用可能是由于抑制拓扑异构酶II,如Kurz(2012)的最近论文表明的。

[0094] 可在药物组合物中施用所述配合物。任选地,本发明的药物组合物可以以本领域技术人员公知的方式包含一种或更多种生理上可接受的载体和/或赋形剂。在一个实施方案中,可将所述配合物例如混悬或溶解在液体介质中,任选地添加可药用赋形剂。适合所述药物组合物的赋形剂包括任何常规的药物或兽医制剂赋形剂,包括,但不限于:稳定剂、抗氧化剂、渗透压调节剂、缓冲剂、pH调节剂、粘合剂、填充剂等。药物组合物可以是适合于

施用的形式,包括肠胃外施用和肠道施用二者。在一个具体实施方案中,所述组合物是适合于例如注射或输注的形式。因此,本发明的药物组合物可以是常规药物施用形式,例如片剂、胶囊剂、散剂、溶液剂、混悬剂、分散剂、糖浆剂、栓剂、气雾剂、软膏剂、硬膏剂等。在另一个实施方案中,所述配合物是冻干形式,并且若需要,可在施用前复溶。冻干配合物可以是包含一种或更多种稳定剂和/或其他已知用于冻干之赋形剂的冻干组合物。

[0095] 根据本发明,可通过多种途径施用这样的组合物,例如,经口、经皮、直肠、鞘内、经表面,或者通过吸入或注射,特别是皮下、肌内、腹膜内或静脉内注射。也可使用其他施用途径,包括鼓室内和鼻内,优选提高产品的效力、生物利用度或耐受性的途径。本领域技术人员可根据所使用的特定制剂选择最合适的途径。相对于所选择的治疗,合适的剂量将是明显的。在一个实施方案中,根据本发明的治疗方法包括施用约0.01至50 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重的混合金属配合物。在一个更具体的实施方案中,根据本发明的治疗方法包括施用约0.1至10 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 或约0.1至5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重的混合金属配合物。

[0096] 以下实施例论证了本发明的多个实施方案和方面。

[0097] 实施例1

[0098] 方法

[0099] 向用 N_2 冲洗的100L有套反应器中添加福地吡(DPDP)(4.0kg无水基,6.27mol,1当量)和去离子(DI)水(19.2L,4.88体积)。利用稀NaOH(总计8.9L,17.5mol NaOH,2.8当量,由1.41kg 50重量%NaOH和8.0L DI水制备)经过35分钟(21.0至23.3 $^{\circ}\text{C}$,外部冷却)将该批次的pH调节到5.7。将浆体在20 $^{\circ}\text{C}$ 至25 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌1小时,在这段时间中形成了溶液。向该溶液中相继添加 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (361.1g,4.87mol,0.78当量)、L-抗坏血酸(55.1g,0.313mol,5摩尔%) and MnO (80g,1.13mol,0.18当量)。在添加每一种试剂后,将该批次在20 $^{\circ}\text{C}$ 至25 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌30至60分钟,并测量pH(在 $\text{Ca}=6.24$ 后,稍浑浊的淡黄色至铁锈色;在抗坏血酸=6.28后,较少浑浊的铁锈色;在 $\text{Mn}=6.38$ 后,浑浊的铁锈色至黄绿色)。将浑浊的批次在20 $^{\circ}\text{C}$ 至25 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌16小时,测量pH(6.36)并将该批次通过0.3 μ 串联过滤器过滤到洁净的100L反应器中。同时,利用丙酮(5.9L,1.47体积)和EtOH(74L,18.5体积)制备乙醇(EtOH) 23A溶液。将一部分EtOH 23A溶液(8.0L,2体积)在20 $^{\circ}\text{C}$ 至25 $^{\circ}\text{C}$ 下经过30分钟添加到所述批次中,在这段时间期间溶液变得浑浊。利用钙锰福地吡(40g,1重量%)向批次中加晶种并在20 $^{\circ}\text{C}$ 至25 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌30分钟以确保固体持续。

[0100] 将该批次温度经过1小时调节到15 $^{\circ}\text{C}$,然后在13.8 $^{\circ}\text{C}$ 至15.5 $^{\circ}\text{C}$ 下老化30分钟。向该批次中经过10小时添加EtOH 23A(56L,14体积)(11 $^{\circ}\text{C}$ 至14 $^{\circ}\text{C}$)。将浆体在5 $^{\circ}\text{C}$ 至10 $^{\circ}\text{C}$ 下混合13小时,然后过滤以收集固体。用冷冻(0 $^{\circ}\text{C}$ 至10 $^{\circ}\text{C}$)的EtOH 23A(14L,3.5体积)冲洗反应器和固体,使固体适应2小时然后在真空烘箱中于45 $^{\circ}\text{C}$ 干燥72小时,得到4.819kg(93%产率,调节含水量)作为黄色固体的钙锰福地吡(lot#11AK0105B)。HPLC分析表明纯度为98.8%。Oven Karl Fisher分析(@170 $^{\circ}\text{C}$)表明10.1%水。ICP分析指示4.27%Ca、1.37%Mn、8.64%Na,Ca/Mn比为4.27,即具有接近 $\text{Ca}_4\text{Mn}(\text{DPDP})_5$ 的化学计量组成。

[0101] 结果

[0102] 进行XRPD(X射线粉末衍射)分析,图1中示出了所得图。XRPD图证明钙锰福地吡是单一的化学实体而不是简单的掺合物。图1示出了钙锰福地吡的根据环境湿度互变的三种已知晶型的叠置曲线。可变湿度XRPD分析表明形式B在超过40%RH下稳定,形式A在0至10%

RH下稳定,形式C在6至36%RH下稳定。在38至44%RH下观察到了形式B和形式C的混合物,并且在10mg规模下在3小时内观察到形式转变的发生。

[0103] 结论

[0104] XRPD出乎意料地证明钙锰福地吡是一种化学实体而不是简单的掺合物(图1)。

[0105] 实施例2

[0106] 方法

[0107] 在室温下将比率为4:1的约200mg钙福地吡(CaDPDP)和50mg锰福地吡(MnDPDP)称量到40mL小瓶中并溶解在40mL DI水中以产生黄色溶液。用Buchi Mini-Spray Dryer B-290将所述黄色水溶液喷雾干燥同时连接在作为空气调节器的Buchi除湿器B-296上,以允许从实验室吸入空气。利用不同进料速率(20%、30%、40%、50%和60%)在升高的入口温度(220°C)下实施喷雾干燥优化实验。回收产物180至230mg。

[0108] 结果

[0109] 通过XRPD分析所得物质(图2),其表明所有产物是无定形的并被证明为迅速吸收水,暴露于25°C/60%RH和40°C/75%RH下在24小时内形成融合颗粒和/或粘性固体。

[0110] 实施例3

[0111] 本实施例通过使用以下手段来阐明新化学实体钙锰福地吡的结构:红外吸收光谱、质谱和元素分析。由于Mn的顺磁性,不能使用NMR分析来分析钙锰福地吡。

[0112] 方法

[0113] 对根据本文所述一步式方法产生的产物进行本实施例所述分析。产物被鉴定为lot#7755-C-R0-01-30-01,基本如实施例1所述制备。该产物的一部分被证明是钙锰福地吡的参考标准。

[0114] 红外吸收光谱。使用衰减全反射(ATR)在Thermo-Nicolet Avatar 370光谱仪上获得钙锰福地吡lot#7755-C-R0-01-30-01的傅里叶变换红外(FT-IR)吸收光谱。

[0115] 质谱。在Waters Q-ToF Micro MS/MS系统上获得钙锰福地吡lot#7755-C-R0-01-30-01的质谱。选择电喷雾离子化(ESI)(阳离子极性模式)用于MS分析。将样品以10µg/mL的浓度溶解在50:50乙腈/水+0.1%甲酸的溶液中。将溶液以10µl/分钟的速率直接输注到源中。

[0116] 元素分析。使用4.26摩尔比的Ca/Mn和2.8mol Na/摩尔的福地吡制造钙锰福地吡lot#7755-C-R0-01-30-01。具有该组成的配合物的理论金属含量是1.41%Mn、4.38%Ca和8.69%Na。

[0117] 结果

[0118] 图3中示出了红外吸收光谱,并且特征性红外吸收带(波数)和对应归属如下:

[0119]

波数 (cm ⁻¹)	归属
3250	N-H
3027-2848	C-H
1581	C=O
1528	C=C
1471,1437	CH ₂ ,CH ₃

1383	CH ₃
1277	P=O
1092	P-OH
1038,977,933,913	P-O-C
827,813,770,751	芳族C-H

[0120] 图4A和4B分别示出了样品的质谱和扩大的质谱。所述谱表现为钙福地吡的和锰福地吡的彼此叠加。完全质子化的钙福地吡的精确质量是676,并且观察到[M+1]为677的质量。一钠、二钠、三钠和四钠的精确质量分别为698、720、742和764。所述谱表明每一种物质的[M+1]分别在699、721、743和765处。完全质子化的锰福地吡的精确质量为691,相应一钠、二钠、三钠和四钠物质分别在713、735、757和779处。所述谱表现为每一种物质的[M+1]质量在692、714、736、758和780处。

[0121] lot#7755-C-R0-01-30-01的金属含量结果为1.48%Mn、4.44%Ca和8.56%Na,与预期值一致,证实锰和钙二者都是络合的,以钠作为平衡离子,很少或不存在仅简单地作为平衡离子的钙。

[0122] 结论

[0123] 这些结果与图5中示出的结构一致。图5示出了理想和一般的4:1Ca/Mn,以3个Na作为平衡离子,其给出了图5中所示745.43的分子量。如所述制备并在本实施例中研究的物质的平均分子量具有4.26Ca/Mn比率和2.8个Na作为平衡离子,具有740.89的分子量。

[0124] 实施例4

[0125] 本实施例测量了在以Mn等摩尔剂量接受钙锰福地吡或锰福地吡的动物中锰(Mn)和锌(Zn)的尿排泄。

[0126] 方法

[0127] 利用含有约10mM Mn和40mM Ca的0.25ml 50mM钙锰福地吡(lot#11AK0105B)溶液或者含有10mM Mn的0.25ml 10mM锰福地吡(lot#02090106)通过一尾部静脉经静脉内注射八只雄性Wistar大鼠(约250g)。注射后,立即将大鼠放在代谢笼中,用于0至24小时时间段的尿液收集。为了获得尿中锰(Mn)和锌(Zn)的基线含量,使两只另外的(对照)大鼠接受0.25ml生理盐水并放在代谢笼中,用于相同时间段的尿液收集。然后将尿样在-80℃储存直到Mn分析。在分析之前,将样品解冻并进行充分摇动以获得均匀样品。从每个样品中取出5ml等份试样并添加5ml浓硝酸。然后将样品在微波炉中溶解(resolve),然后利用蒸馏水稀释到50ml终体积。通过ICP-MS(电感耦合等离子体质谱)分析每一样品的Mn含量。将与注射到大鼠中的那些(即,0.25ml)相同的钙锰福地吡和锰福地吡样品吸出并注射到试管中。将这些样品与尿样品以相同的方式进行处理并分析其Mn含量。结果表示为总0至24小时尿Mn含量(表示为 $\mu\text{mol}/\text{kg} \pm \text{S.E.M.}$)和注射剂量的百分比($\pm \text{S.E.M.}$)。对于锰在尿中的排泄,通过未配对学生t检验来检验接受钙锰福地吡和锰福地吡的动物之间的统计学差异。低于0.05的p值被认为是统计学上的显著差异。

[0128] 结果

[0129] 结果在图6A、6B和6C中给出。在iv注射含有 $2.59\mu\text{mol}$ 锰(Mn)的0.25ml 10mM锰福地吡24小时后,在尿中回收 $0.60 \pm 0.04\mu\text{mol}$ Mn(图6A),相当于注射剂量的 $23.1 \pm 1.4\%$ (在减去 $0.035\mu\text{mol}$ 的基线排泄之后,图6B)。在注射含有 $2.52\mu\text{mol}$ Mn的0.25ml 50mM钙锰福地吡

之后,相应数字为 $1.27 \pm 0.07 \mu\text{mol Mn}$ (图6A),相当于注射剂量的 $50.5 \pm 2.6\%$ (图6B)。锰福地吡和钙锰福地吡之间的差异高度显著($p < 0.0001$)。肾Mn排泄的差异或多或少地反映在锌(Zn)的肾排泄差异中;表示为增加的Zn排泄,即,减去基线24小时排泄($0.068 \mu\text{mol}$) (图6C)。

[0130] 结论

[0131] 因此,在相等Mn剂量下,钙锰福地吡尿中Mn排泄是锰福地吡的2倍。静脉注射锰福地吡后0至24小时中在尿中排泄的Mn的百分比非常好地符合之前在大鼠(Hustvedt等,1997)和人(Toft等,1997)中报道的数字。本结果证明与锰福地吡相比,钙锰福地吡在体内条件下释放少得多的Mn。这提供了以下的显著优点:减少了脑和其他器官可摄取的游离Mn的量,显著提高了治疗指数,因为在体内可利用更多治疗性锰福地吡或其脱磷酸对应物MnDPMP和MnPLED。因此,钙锰福地吡提供了大幅降低了毒性并且比锰福地吡有效得多的治疗性治疗。

[0132] 实施例5

[0133] 本实施例比较了钙锰福地吡与锰福地吡和MnPLED在balb/c小鼠中的奥沙利铂的骨髓抑制作用方面的细胞保护作用。

[0134] 方法

[0135] 在第一系列实验中,利用奥沙利铂分别以7.5、10.0和12.5mg/kg奥沙利铂对3组每组5只雌性balb/c小鼠进行一次腹膜内治疗。在奥沙利铂治疗前一天(基线)以及3天后和6天后,利用玻璃毛细管从眼窝静脉丛采集 $50 \mu\text{l}$ EDTA血样。使用自动化系统**CELL-DYN®** Emerald (Abbott Diagnostics) 分析血样的白细胞(WBC)、淋巴细胞(LYM)、中性粒细胞(NEU)和血小板(PLC)的含量。由结果(图7A至7D)推断,应在12.5mg/kg奥沙利铂下进行进一步实验,测试钙锰福地吡、锰福地吡和MnPLED的骨髓保护作用,并且应当在每只小鼠中施用奥沙利铂前一天和6天后进行血细胞样品分析。在施用奥沙利铂(12.5mg/kg)30分钟前和24小时后,小鼠经静脉内接受盐水、钙锰福地吡(5mg/kg; lot#11AK0105B)、锰福地吡(1和10mg/kg; lot#02090106)或MnPLED(1mg/kg) (每组5只小鼠)。5mg/kg剂量的钙锰福地吡与1mg/kg剂量的锰福地吡含有相同量的锰,即, $1.3 \mu\text{mol}$; 1mg/kg的MnPLED含有稍多的锰(约 $2 \mu\text{mol}$)。对照组替代地接受奥沙利铂载剂(5%葡萄糖)和盐水。结果表示为多种治疗和血细胞从基线的相对变化的曲线(\pm S.E.M.)。适当时,通过非配对学生t检验检验治疗组之间的统计学差异。低于0.05的p值被认为是统计学上的显著差异。

[0136] 结果

[0137] 图8A至8D给出了结果。在相等Mn剂量下,即,5mg/kg钙锰福地吡在保护小鼠免受奥沙利铂诱发的白细胞(WBC)总数降低方面比1mg/kg锰福地吡在统计学上显著更有效(图8A)。12.5mg/kg的单次剂量奥沙利铂导致WBC降低超过80%,而利用钙锰福地吡治疗的动物中仅降低约25%。在利用1或10mg/kg锰福地吡治疗的小鼠中的相应降低为约50%。这些结果可能也表明MnDPDP必须脱磷酸成为MnPLED才能发挥其骨髓保护作用;与钙锰福地吡一样,1mg/kg MnPLED比1和10mg/kg锰福地吡在保护WBC方面显著更有效。在奥沙利铂治疗之后,在淋巴细胞(LYM;图8B)和中性粒细胞(NEU;图8C)中发现了类似的降低。当分析中性粒细胞(NEU)时,也观察到了定性的类似结果。对于血小板(PLC;图7D和8D),与WBC、LYM和NEU相比,其在对奥沙利铂的敏感性和测试物质的细胞保护作用二者方面都有差异。

[0138] 结论

[0139] 在等摩尔锰剂量下,钙锰福地吡比锰福地吡在保护balb/c小鼠对抗抗癌药物奥沙利铂的骨髓抑制作用方面更有效。

[0140] 实施例6

[0141] 钙锰福地吡与锰福地吡、福地吡、MnPLED、ZnPLED、ZnDPDP、钙福地吡 (CaDPDP)、PLED和CaCl₂相比在小鼠结肠癌细胞中的细胞毒活性。

[0142] 方法

[0143] 使用MTT测定测量细胞的生存力。简要地说,将8,000个CT26(小鼠结肠癌)细胞接种在96孔板上的每个孔中并在具有5%CO₂的潮湿空气中于37°C在RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640培养基中过夜生长,所述培养基含有10%胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺、100U/ml青霉素和100µg/ml链霉素。然后将细胞在37°C下暴露于1至1,000µM钙锰福地吡 (lot#11AK0105B)、福地吡 (DPDP; lot#RDL02090206)、PLED (lot#KER-A0-122 (2))、钙福地吡 (CaDPDP)、锰福地吡 (lot#02090106)、MnPLED、ZnPLED、ZnDPMP和CaCl₂48小时。然后通过添加5mg/ml噻唑蓝 (methylthiazolotetrazolium, MTT) 至0.5mg/ml终浓度并将细胞在37°C下再孵育4小时来评估细胞的生存力。然后通过添加10%SDS和10mM HCl至5%SDS和5mM HCl的终浓度来将通过存活细胞的线粒体脱氢酶形成的蓝色甲瓚在37°C下溶解过夜。最后,利用与Apple Macintosh计算机连接的酶标仪Spectramax 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 以670nm为参照在570nm处阅读溶液的吸光度,所述计算机运行程序Softmax Pro V1.2.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)。

[0144] 结果

[0145] 福地吡、PLED、钙福地吡或钙锰福地吡的细胞毒活性是锰福地吡的细胞毒活性的约20倍(图9A和9B)。在其杀伤CT26癌细胞的能力方面,MnPLED的效力几乎是锰福地吡的10倍(图9A)。在所有的使用浓度下,ZnDPDP、ZnPLED或CaCl₂均未表现出任何细胞毒活性(图9A和9B)。

[0146] 结论

[0147] 当将钙锰福地吡与锰福地吡进行比较时,在杀伤CT26癌细胞方面,发现钙锰福地吡的效力是锰福地吡的约20倍。锰在一定程度上从福地吡的离解可能解释了锰福地吡的癌症杀伤效力。另一方面,在锰等摩尔浓度下,如实施例1和3限定的钙锰福地吡与单独福地吡一样有效,即钙锰福地吡的杀伤效力比等摩尔锰浓度的锰福地吡高得多。该发现表明两个重要性质。首先,脱磷酸PLED可能与其磷酸化对应物福地吡在癌细胞杀伤能力方面一样有效,其次,与锰福地吡相比MnPLED更低的稳定性 (Rocklage等,1989) 可能解释了MnPLED更高的效力。ZnDPDP和ZnPLED不具有任何细胞毒活性可能是由于这些配合物的稳定性是其锰对应物的1000倍 (Rocklage等,1989)。

[0148] 实施例7

[0149] 本实施例比较了在存在和不存在钙锰福地吡的情况下,在具有小鼠结肠癌 (CT26) 的小鼠模型中奥沙利铂的抗肿瘤活性。

[0150] 方法

[0151] 在具有5%CO₂的潮湿空气中于37°C下在75cm²培养瓶中的RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640培养基中生长CT26细胞,所述培养基含有10%胎牛血清、2mM L-

谷氨酰胺、100U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素。当细胞达到~50%汇合(confluency)时,通过胰蛋白酶消化来收集细胞。简要地说,将细胞用基于磷酸盐的盐水(PBS)(pH 7.3)洗涤并在37 $^{\circ}$ C下暴露于0.05%胰蛋白酶/0.53mM EDTA约5分钟。通过添加RPMI1640培养基终止胰蛋白酶消化。对细胞计数并在200 \times g下离心5分钟。然后,将其在PBS中洗涤、再次离心并以2 \times 10⁶/350 μ l的浓度重悬在PBS中用于向小鼠注射。如Laurent等,2005所述,使用6至8周龄的balb/c雌性小鼠。简要地说,在第0天,对每只小鼠在后颈部皮下注射2 \times 10⁶的CT26细胞。7天后(第7天),当肿瘤可检测时,利用卡尺测定肿瘤尺寸并将小鼠分组(每组5只),从而使每一组中肿瘤尺寸没有统计学上的差异。注射奥沙利铂±钙锰福地吡(lot#11AK0105B),一组小鼠接受单独载剂(0.9%盐水+5%葡萄糖)治疗。在第一系列实验中,对小鼠i.v.注射盐水或50mg/kg钙锰福地吡,30分钟之后i.p.施用20mg/kg奥沙利铂(在5%葡萄糖中稀释)或5%葡萄糖。在24小时后(第8天),这些小鼠接受额外的盐水或50mg/kg钙锰福地吡。在另一系列实验中,对小鼠i.v.注射盐水或5mg/kg钙锰福地吡,30分钟后10mg/kg奥沙利铂(在5%葡萄糖中稀释)或5%葡萄糖,24小时后(第8天)盐水或5mg/kg钙锰福地吡。在第10天处死小鼠,切下肿瘤并测定湿重。当适当时,通过未配对学生t检验检验治疗组之间的统计学差异。低于0.05的p值被认为是统计学上的显著差异。

[0152] 结果

[0153] 结果在图10A和10B中给出。在第一系列实验中,小鼠接受20mg/kg奥沙利铂,其接近于最高耐受剂量。利用奥沙利铂单次治疗导致统计学显著的肿瘤重量超过50%的降低。利用钙锰福地吡(50mg/kg)的治疗对高剂量的奥沙利铂的抗肿瘤作用没有任何不利影响(图10A)。但是,在第二系列实验中,其中使用10mg/kg奥沙利铂,利用相对低剂量钙锰福地吡(5mg/kg)的治疗导致在统计学上显著更好的抗肿瘤作用(图10B),10mg/kg奥沙利铂加上5mg/kg钙锰福地吡的组合作用几乎与单独的20mg/kg奥沙利铂一样有效。

[0154] 结论

[0155] 钙锰福地吡不会不利地干扰奥沙利铂的抗肿瘤活性,并且相反地,在相对低剂量的奥沙利铂(10mg/kg)下,钙锰福地吡实际上提高抗肿瘤效力。

[0156] 实施例8

[0157] 本实施例比较了在大鼠脑、胰腺和肝中重复地静脉内注射钙锰福地吡和锰福地吡(33周内39次)后锰的水平。

[0158] 方法

[0159] 利用0.9%NaCl、72.0 μ mol/kg锰福地吡(lot#02090106;对应于72 μ mol/kg锰)或374.4 μ mol/kg钙锰福地吡(lot#11AK0105B;对应于72 μ mol/kg锰)每周3次地静脉内注射Wistar雄性和雌性大鼠,注射13周(每个治疗组由9只雄性+9只雌性组成)。各钙锰福地吡剂量相当于假定临床剂量(assumed clinical dose,ACD)的约36倍。在13周的施用时期之后,将所述大鼠处死并切下脑和胰腺,冷冻保存约0.5g样品直到Mn分析。通过ICP-MS分析各样品的Mn含量。结果表示为 μ g/g湿重 \pm S.E.M。对于Mn含量,通过配对学生t检验检验锰福地吡组和钙锰福地吡组之间的统计学差异。低于0.05的p值被认为是统计学上的显著差异。

[0160] 结果

[0161] 结果在图11A至C中给出。在NaCl治疗的对照大鼠、锰福地吡治疗的大鼠和钙锰福地吡治疗大鼠中脑Mn含量分别为0.38 \pm 0.01、0.99 \pm 0.02和0.74 \pm 0.01 μ g/g w.w.。胰腺中

相应的Mn含量分别为 1.66 ± 0.06 、 5.54 ± 0.45 和 $3.35 \pm 0.19 \mu\text{mol/kg}$ 。尽管肝的Mn含量在锰福地吡组统计学上显著地提升(图11C),然而相对提升度比在脑和胰腺中可见的提升度低得多。

[0162] 结论

[0163] 向大鼠中施用高累积剂量的钙锰福地吡导致与锰福地吡相比显著更少的锰保留在脑和胰腺中(在这两种情况下,总剂量相当于约 $2800 \mu\text{mol/kg}$ 锰)。这些结果证明钙锰福地吡比锰福地改进的毒理学谱。

[0164] 实施例9

[0165] 本实施例示出了钙锰福地吡在balb/c小鼠中卡铂的骨髓抑制作用方面的细胞保护作用。

[0166] 方法

[0167] 在第一系列实验中,分别利用75、100和125mg/kg卡铂对每组由5只雌性balb/c小鼠组成的3个组进行一次腹膜内卡铂治疗。在卡铂治疗前一天(基线)以及3天后和6天后,利用玻璃毛细管从眼窝静脉丛采集 $50 \mu\text{l}$ EDTA血样。使用自动化系统 **CELL-DYN®** Emerald (Abbott Diagnostics) 分析血样的白细胞(WBC)、淋巴细胞(LYM)、中性粒细胞(NEU)和血小板(PLC)的含量。由结果(图12A至12D)推断,应在125mg/kg卡铂下进行进一步实验,测试钙锰福地吡的骨髓保护作用,并且在WBC、NEU和LYM的情况下,应在卡铂施用前一天和3天后进行血细胞样品分析,而在PLC的情况下,应在卡铂施用前一天和6天后进行血细胞样品分析。在施用卡铂(125mg/kg)30分钟前和24小时后,小鼠接受盐水或钙锰福地吡(1、3、10或30mg/kg; lot#11AK0105B)。对照组接受载剂(盐水)并用盐水代替卡铂。结果表示为多种治疗从基线的相对变化的曲线(平均值 \pm S.E.M.)。适当时,通过非配对学生t检验检验治疗组之间的统计学差异。低于0.05的p值被认为是统计学上的显著差异。

[0168] 结果

[0169] 结果在图13A至13D中给出。卡铂(125mg/kg)导致WBC、NEU和LYM降低约50%。利用3mg/kg剂量之钙锰福地吡的治疗消除了这些降低。在每一种情况下,钙锰福地吡的剂量-响应表现出钟形外观,与之前所述锰福地吡在CD小鼠中对抗阿霉素的保护作用的方式类似(Kurz等, Transl Oncol 2012;5:252-259)。

[0170] 至于血小板(PLC,图12D和13D),与WBC、LYM和NEU相比,其在对于卡铂的敏感性方面不同。

[0171] 结论

[0172] 钙锰福地吡对balb/c小鼠提供对抗癌药物卡铂的骨髓抑制作用的显著保护。

[0173] 实施例10

[0174] 本实施例比较了在存在和不存在钙锰福地吡的情况下,在具有结肠癌(CT26)的能够免疫的balb/c小鼠和免疫缺陷裸balb/c小鼠(nu/nu)中奥沙利铂的抗肿瘤活性。

[0175] 方法

[0176] 在具有5%CO₂的潮湿空气中于37°C下在75cm²培养瓶中在RPMI1640培养基中生长CT26细胞,所述培养基含有10%胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺、100U/ml青霉素和100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素。当细胞达到~50%汇合时,通过胰蛋白酶消化来收集细胞。简要地说,将细胞用PBS(pH 7.3)洗涤并在37°C下暴露于0.05%胰蛋白酶/0.53mM EDTA约5分钟。通过添加RPMI

1640培养基终止胰蛋白酶消化。对细胞计数并在 $200 \times g$ 下离心5分钟。然后,将其在PBS中洗涤、再次离心并以 $2 \times 10^6/350\mu\text{l}$ 的浓度重悬在PBS中用于向小鼠注射。如Laurent等,2005所述,使用6至8周龄的能够免疫的balb/c雌性小鼠 (balb/c) 和不能免疫的裸雌性balb/c小鼠 (balb/c nu/nu)。简要地说,在第0天,对每只小鼠在后颈部皮下注射 2×10^6 的CT26细胞。7天后(第7天),当肿瘤可检测时,利用卡尺测定肿瘤尺寸并将小鼠分组(每组5只),从而使得每一组中肿瘤尺寸在统计学上没有差异。对各组小鼠(每组5只,如图14所示) i.v. 注射盐水或5mg/kg钙锰福地吡 (lot#11AK0105B), 30分钟之后 i.p. 施用10mg/kg奥沙利铂(在5%葡萄糖中稀释) 或5%葡萄糖。小鼠在24小时后(第8天)接受额外的盐水或5mg/kg钙锰福地吡。在第10天处死小鼠,切下肿瘤并测定湿重。结果表示为针对多个治疗的曲线(平均值 \pm S.E.M.)。当适当时,通过未配对学生t检验检验治疗组之间的统计学差异。低于0.05的p值被认为是统计学上的显著差异。

[0177] 结果

[0178] 结果在图14中给出。在免疫缺陷balb/c小鼠中比在能够免疫的balb/c nu/nu小鼠中肿瘤具有生长得更大的明显趋势,但是这种差异未达到统计学上的显著($p=0.0870$)。利用10mg/kg奥沙利铂单次治疗导致在能够免疫的和免疫缺陷balb/c小鼠中肿瘤重量在统计学上不显著地降低20%至30%。在能够免疫的或不能免疫的小鼠中,利用5mg/kg钙锰福地吡的治疗对于奥沙利铂的抗肿瘤效果没有任何不利影响。与对照相比,在利用5mg/kg钙锰福地吡治疗的能够免疫的小鼠中,平均肿瘤重量实际上统计学显著地降低。但是,在免疫缺陷小鼠中未看到这样的降低。

[0179] 结论

[0180] 在能够免疫或免疫缺陷的小鼠中,钙锰福地吡不会不利地干扰奥沙利铂的抗肿瘤活性,但是仅在能够免疫的小鼠中,钙锰福地吡实际上提高抗肿瘤效力。

[0181] 实施例11

[0182] 比较了钙锰福地吡和锰福地吡对人非小细胞肺癌(NSCLC)U1810细胞和小鼠非小细胞肺癌(LLC1)的细胞毒活性。

[0183] 方法

[0184] 使用MTT测定测量细胞的生存力。简要地说,将8,000个人U1810NSCLC或LLC1 NSCLC细胞接种在96孔板上的每个孔中并在具有5%CO₂的潮湿空气中于37°C在RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640培养基中过夜生长,所述培养基含有10%胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺、100U/ml青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素。然后将细胞暴露于1至1,000 μM 钙锰福地吡 (lot#11AK0105B) 或锰福地吡 (lot#02090106) 48小时。然后通过添加5mg/ml噻唑蓝(MTT) 至0.5mg/ml终浓度并将细胞在37°C下再孵育4小时来评估细胞的生存力。然后通过添加10%SDS和10mM HCl至5%SDS和5mM HCl的终浓度来使通过存活细胞的线粒体脱氢酶形成的蓝色甲瓚在37°C下溶解过夜。最后,利用与Apple Macintosh计算机连接的酶标仪Spectramax 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 以670nm为参照在570nm处阅读溶液的吸光度,所述计算机运行程序Softmax Pro V1.2.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)。在升高的浓度的钙锰福地吡或锰福地吡的存在下,U1810或LLC1细胞的生存力表现为浓度响应曲线(平均值 \pm S.D.)。将单个曲线拟合为S形可变斜率响应逻辑斯谛方程(logistic equation) (Graphpad Prism, 版本5.02)。由该分析,计算测试物质的

导致50%抑制的浓度(IC₅₀)。

[0185] 结果

[0186] 钙锰福地吡和锰福地吡对NSCLC U1810和LLC1细胞的细胞毒活性在图15A和15B中示出。计算出的锰福地吡和钙锰福地吡的IC₅₀比率(0.0006329/0.00002274)表明钙锰福地吡在杀伤U1810细胞方面效力是锰福地吡的约28倍(图15A)。尽管在杀伤LLC1细胞方面钙锰福地吡比锰福地吡显著更强效,但是由于锰福地吡曲线的模糊外观(图15B),计算锰福地吡和钙锰福地吡之间的IC₅₀比率是无意义的。

[0187] 结论

[0188] 结果表明了在杀伤非小细胞肺癌细胞U1810和LLC1方面,钙锰福地吡比锰福地吡具有更优异的效力。

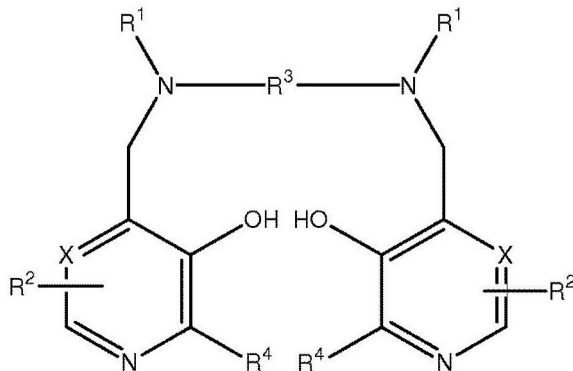
[0189] 本文给出的实施例和具体实施方案在本质上仅是说明性的,而不应被认为限制由下面的权利要求限定的本发明的范围。由本公开内容,本发明的另外的具体实施方案和优点将是明显的,并且其也在本发明要求保护的范围内。

[0190] 本发明还涉及以下实施方案:

[0191] 1. 式I化合物或其盐的混合金属配合物,其中所述混合金属包含第III-XII族过渡金属和第II族金属:

[0192] 式I

[0193]



[0194] 其中,

[0195] X表示CH或N,

[0196] 每一个R¹独立地表示氢或-CH₂COR⁵;

[0197] R⁵表示羟基,任选地羟基化的烷氧基、氨基或烷基酰氨基;

[0198] 每一个R²独立地表示ZYR⁶,其中Z表示键或者任选地被R⁷取代的C₁₋₃亚烷基或氧代亚烷基;

[0199] Y表示键、氧原子或NR⁶;

[0200] R⁶是氢原子、COOR⁸、烷基、烯基、环烷基、芳基或芳烷基,任选地被选自COOR⁸、CONR⁸₂、NR⁸₂、OR⁸、=NR⁸、=O、OP(O)(OR⁸)₂和OSO₃M的一个或多个基团取代;

[0201] R⁷是羟基,任选地羟基化、任选地烷氧基化的烷基或氨基烷基;

[0202] R⁸是氢原子或任选地羟基化、任选地烷氧基化的烷基;

[0203] M是氢原子或一当量的生理可耐受体阳离子;

[0204] R³表示任选地被R⁷取代的C₁₋₈亚烷基、1,2-亚环烷基或1,2-亚芳基;并且

[0205] 每一个R⁴独立地表示氢或C₁₋₃烷基。

[0206] 2. 根据实施方案1的混合金属配合物,其中 R^5 是羟基、 C_{1-8} 烷氧基、乙二醇、甘油、氨基或 C_{1-8} 烷基酰氨基; Z 是键或选自 CH_2 、 $(CH_2)_2$ 、 CO 、 CH_2CO 、 CH_2CH_2CO 和 CH_2COCH_2 的基团; Y 是键; R^6 是单或多(羟基或烷氧基化的)烷基或者具有式 $OP(O)(OR^8)R^7$;并且 R^7 是羟基,或者未经取代的烷基或氨基烷基。

[0207] 3. 根据实施方案1或2的混合金属锰配合物,其中 R^3 是亚乙基,并且每一个基团 R^1 表示 $-CH_2COR^5$,其中 R^5 是羟基。

[0208] 4. 根据实施方案1的混合金属配合物,其中所述式I化合物是 N,N' -双-(吡哆醛-5-磷酸)-乙二胺- N,N' -二乙酸(DPDP)或 N,N' -二吡哆基乙二胺- N,N' -二乙酸(PLD),或其可药用盐。

[0209] 5. 根据实施方案1至4中任一项的混合金属配合物,其中所述第III-XII族过渡金属是 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和/或 Ni^{2+} ,并且所述第II族金属是 Ca^{2+} 和/或 Mg^{2+} 。

[0210] 6. 根据实施方案1至5中任一项的混合金属配合物,其中所述第III-XII族过渡金属是 Mn^{2+} ,并且所述第II族金属是 Ca^{2+} 或 Ca^{2+} 与 Mg^{2+} 的混合物。

[0211] 7. 根据实施方案6的混合金属配合物,其中所述第II族金属是 Ca^{2+} 与 Mg^{2+} 的混合物, Ca^{2+}/Mg^{2+} 摩尔比为约0.1至50。

[0212] 8. 根据实施方案1至7中任一项的混合金属配合物,其中第II族金属与第III-XII族过渡金属的摩尔比为约1至10。

[0213] 9. 根据实施方案1至5中任一项的混合金属配合物,其中所述第III-XII族过渡金属是 Mn^{2+} ,所述第II族金属是 Ca^{2+} ,并且 Ca^{2+}/Mn^{2+} 摩尔比为约4。

[0214] 10. 根据实施方案1至9中任一项的混合金属配合物,其中所述配合物是冻干的。

[0215] 11. 一种药物组合物,其包含根据实施方案1至9中任一项的混合金属配合物以及一种或更多种生理上可接受的载体和/或赋形剂。

[0216] 12. 一种生产根据实施方案1至9中任一项的混合金属配合物的方法,其包括从第III-XII族过渡金属、第II族金属和式I化合物或其盐之溶液进行一步式结晶。

[0217] 13. 根据实施方案12的方法,其中通过从钙、锰和式I化合物或其盐的溶液进行一步式结晶来生产钙锰配合物。

[0218] 14. 一种治疗患者中病理学状态的方法,其包括向所述患者施用根据实施方案1至10中任一项的混合金属配合物,任选地与一种或更多种生理上可接受的载体和/或赋形剂一起。

[0219] 15. 根据实施方案14的方法,其中所述病理学状态是由氧衍生自由基的存在导致的。

[0220] 16. 根据实施方案14的方法,其中所述病理学状态是由超氧化物导致的,所述超氧化物导致随后的脂质过氧化和/或蛋白质硝化。

[0221] 17. 根据实施方案14的方法,其中所述病理学状态是细胞毒或细胞生长抑制药物损伤。

[0222] 18. 根据实施方案17的方法,其中所述细胞毒或细胞生长抑制药物是癌症治疗药物。

[0223] 19. 根据实施方案17的方法,其中所述细胞毒或细胞生长抑制药物包含阿霉素、表柔比星、奥沙利铂、卡铂、顺铂、5-氟尿嘧啶、多西他赛或紫杉醇中的至少一种。

- [0224] 20. 根据实施方案14的方法,其中所述病理学状态是骨髓抑制或神经毒性,或者骨髓抑制和神经毒性二者。
- [0225] 21. 根据实施方案14的方法,其中所述病理学状态是局部缺血-再灌注诱发的损伤。
- [0226] 22. 根据实施方案14的方法,其中所述病理学状态与动脉粥样硬化和/或糖尿病有关。
- [0227] 23. 根据实施方案14的方法,其中所述病理学状态与溶解血栓治疗、心肺分流术或经皮腔内血管成形术有关,或者为心脏或器官移植手术或中风的结果。
- [0228] 24. 根据实施方案14的方法,其中所述病理学状态是对乙酰氨基酚诱发的急性肝功能衰竭。
- [0229] 25. 根据实施方案14的方法,其中所述病理学状态是铁或铜的病理学状态。
- [0230] 26. 根据实施方案14的方法,其中所述病理学状态是地中海贫血、镰状细胞性贫血、输血性含铁血黄素沉着或威尔逊氏病。
- [0231] 27. 根据实施方案14的方法,其中所述病理学状态是肝炎诱发的肝硬化、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 或病毒诱发的慢性肝炎。
- [0232] 28. 根据实施方案14的方法,其中所述病理学状态是辐射诱发的损伤。
- [0233] 29. 根据实施方案14的方法,其中所述病理学状态是低锰超氧化物歧化酶 (MnSOD) 活性。
- [0234] 30. 根据实施方案14的方法,其中所述病理学状态是非小细胞肺癌、结直肠癌、前列腺癌、乳腺癌、胰腺癌或恶性黑色素瘤。
- [0235] 31. 根据实施方案14至31中任一项的方法,其包括施用约0.01至50 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重的所述混合金属配合物。

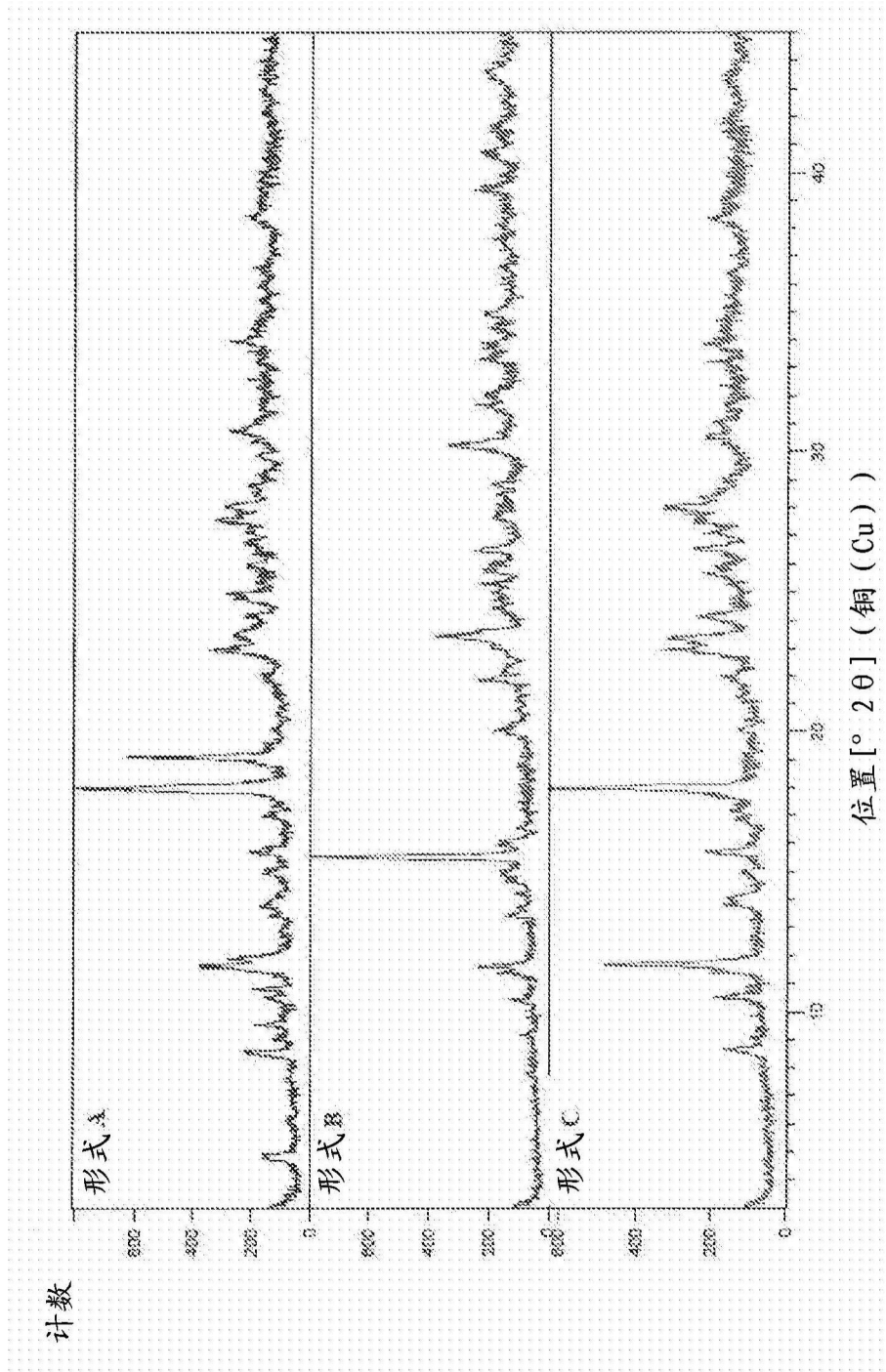


图1

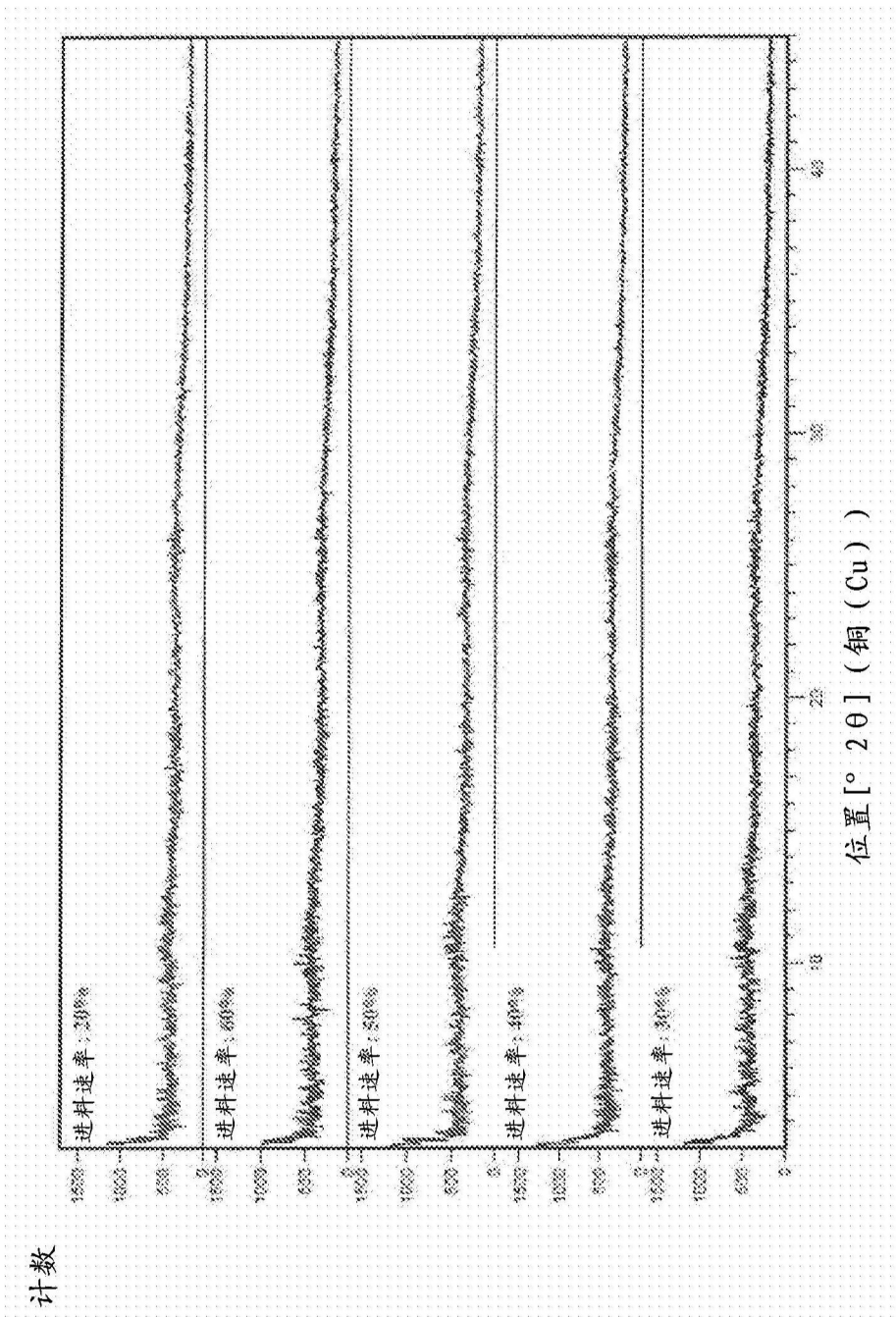


图2

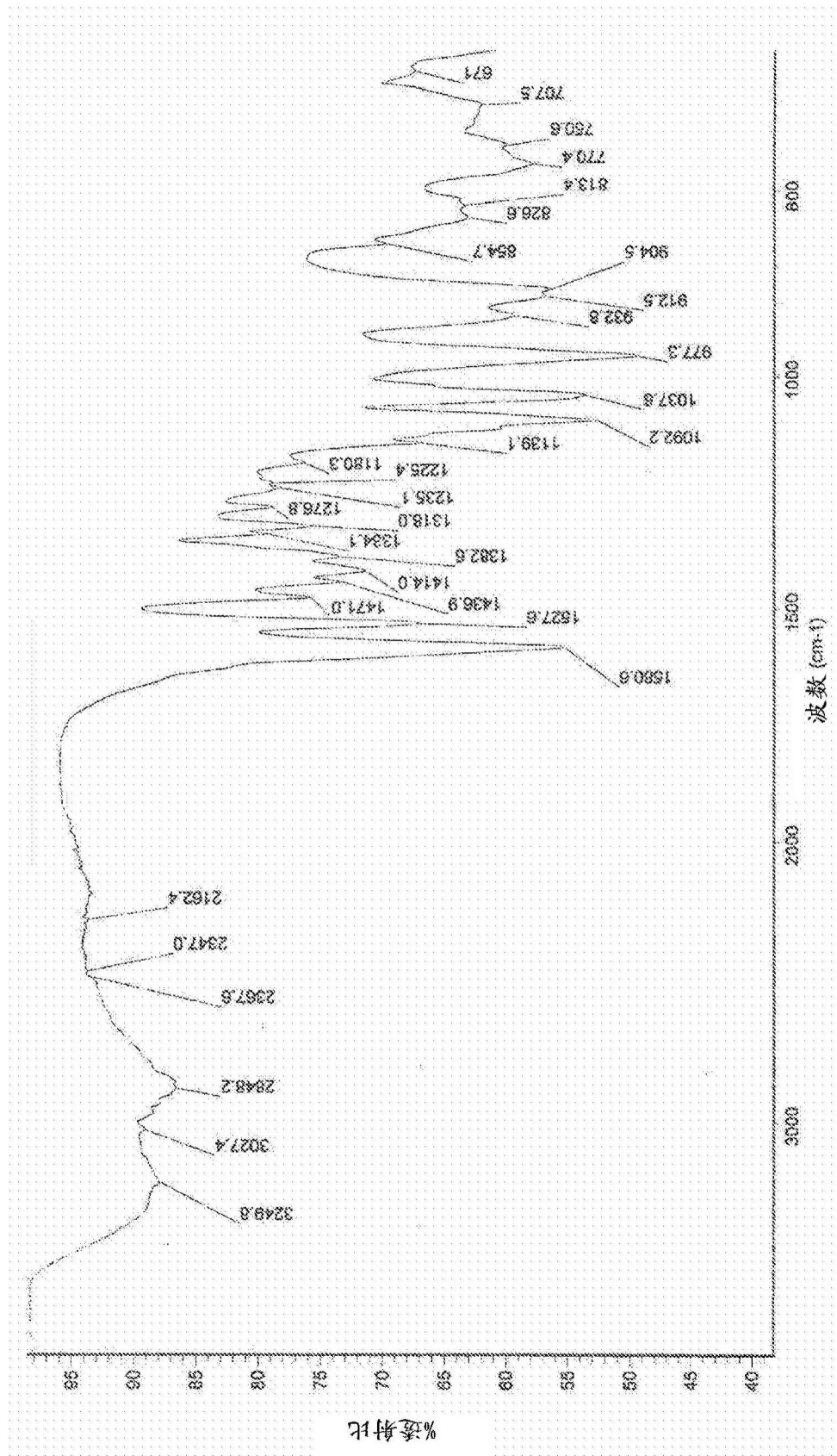


图3



图4A

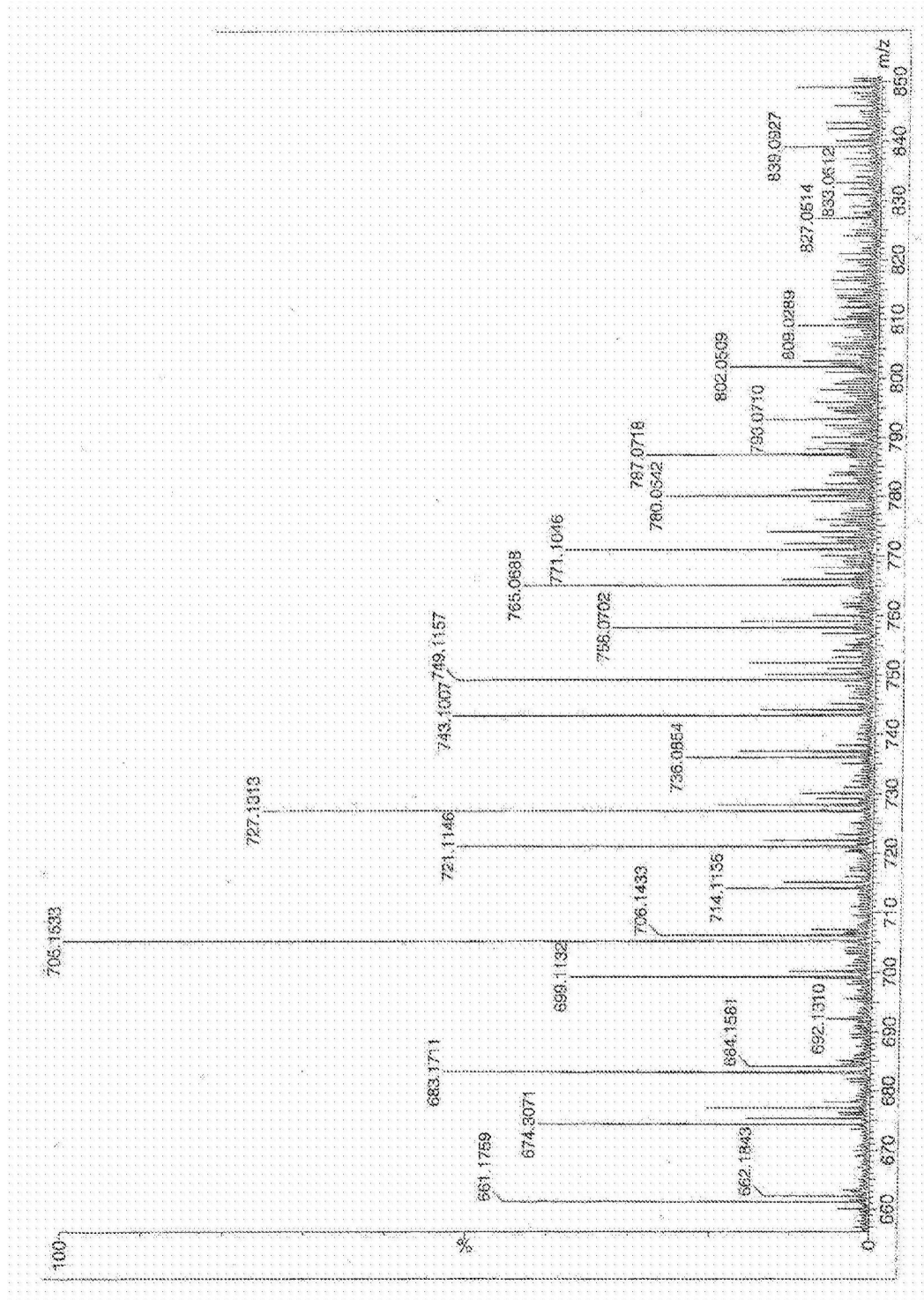


图4B

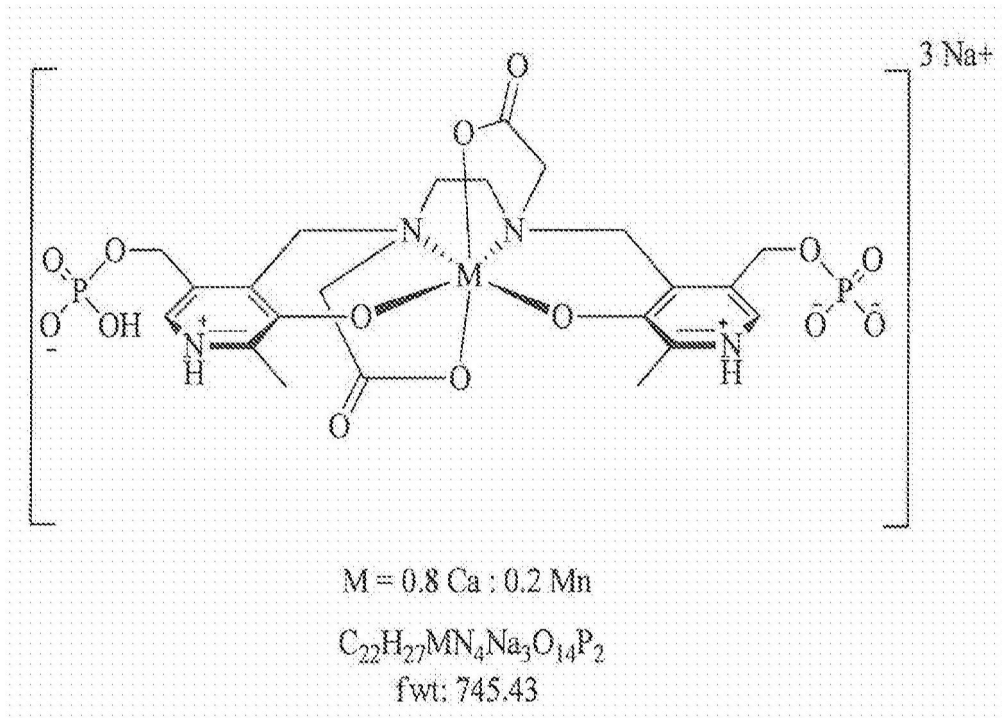


图5

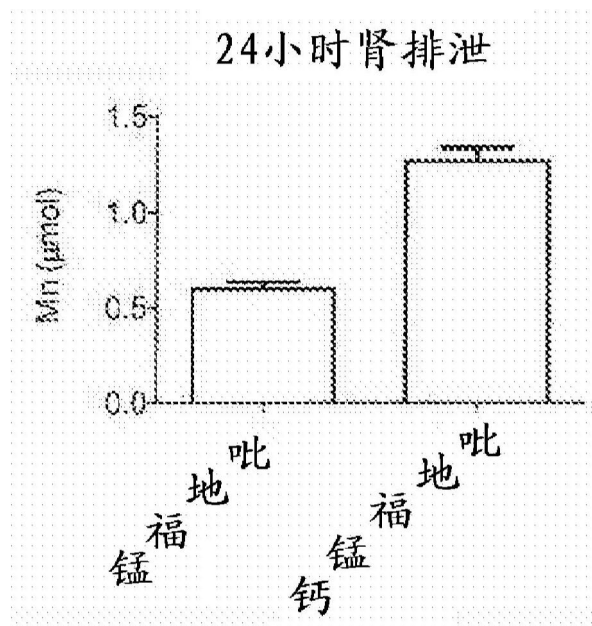


图6A

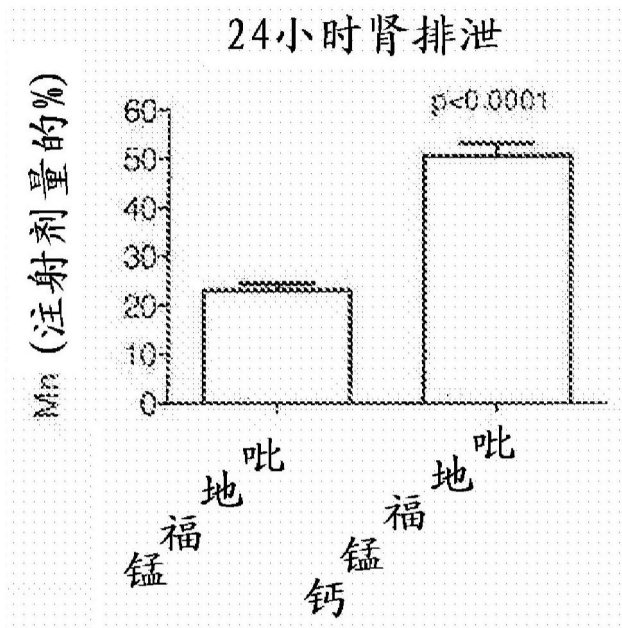


图6B

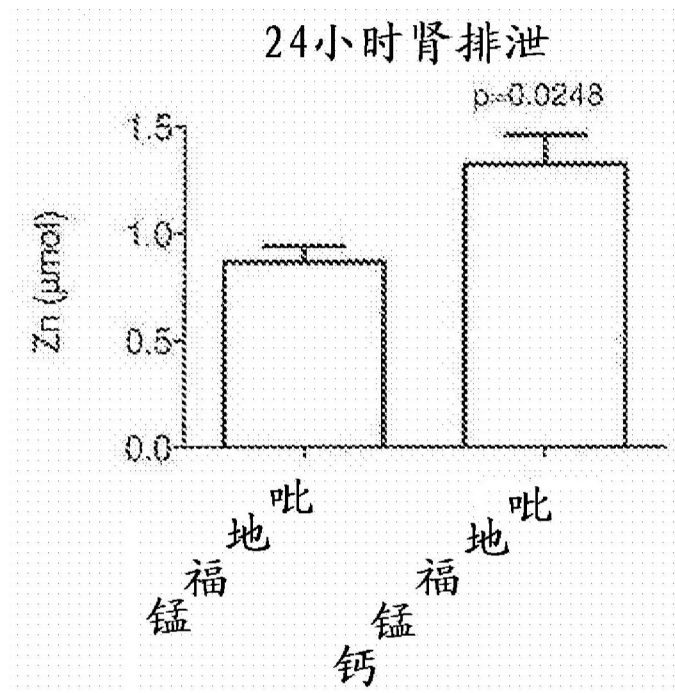


图6C

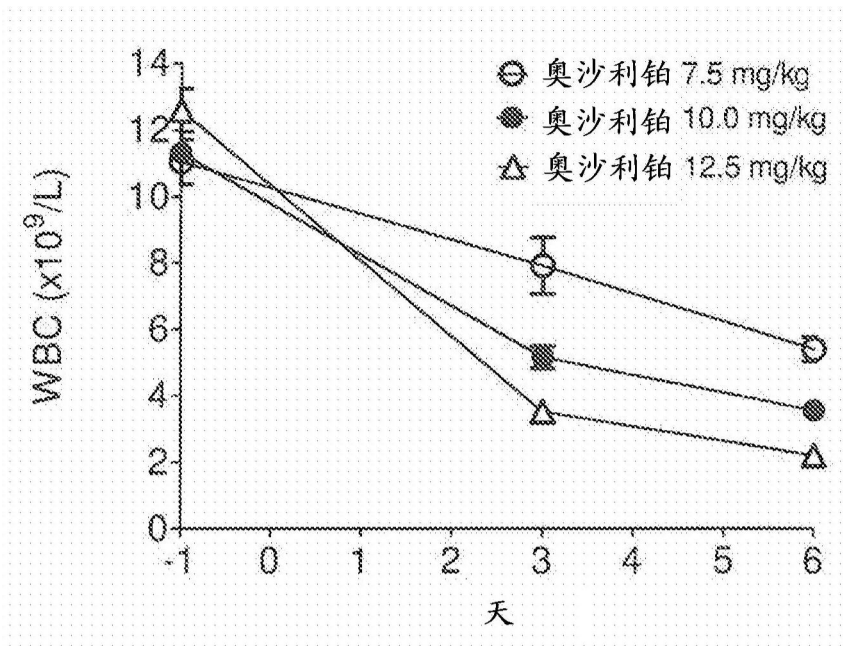


图7A

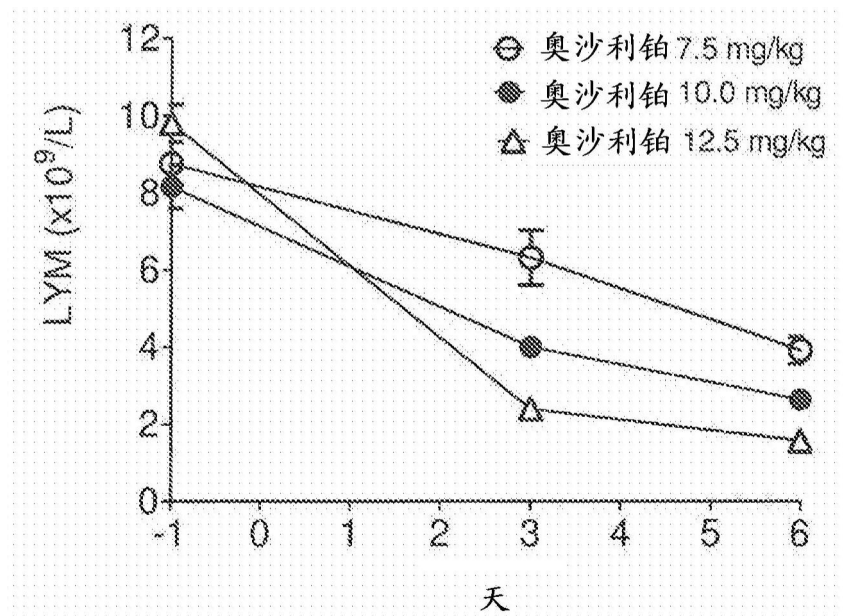


图7B

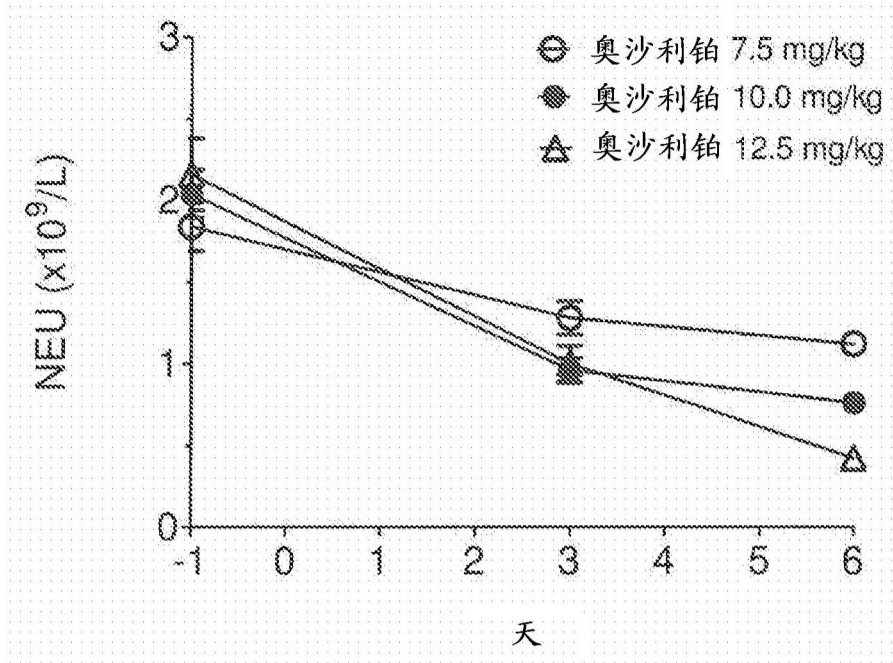


图7C

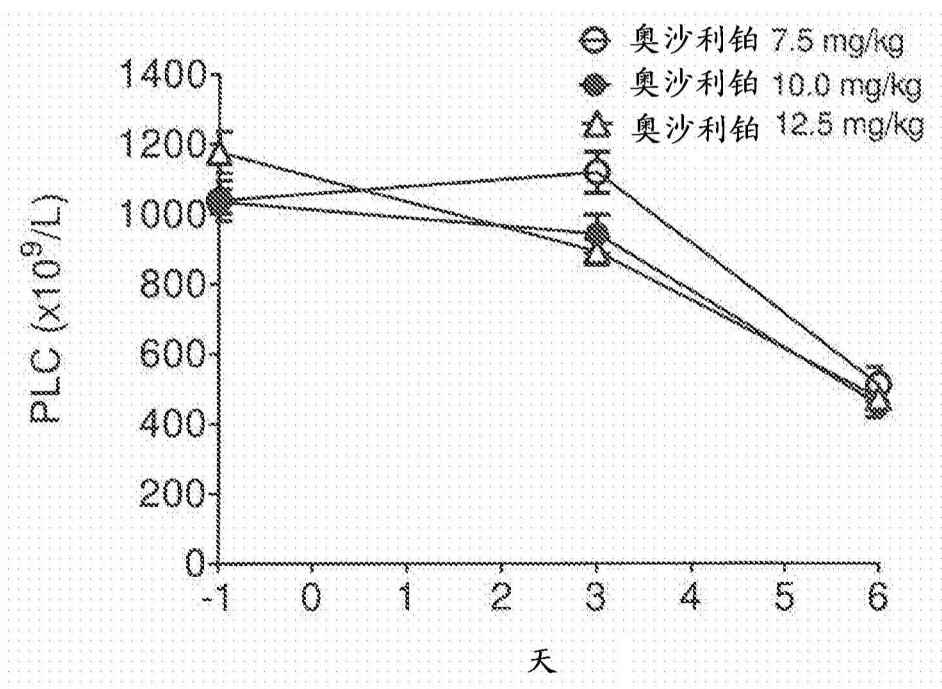


图7D

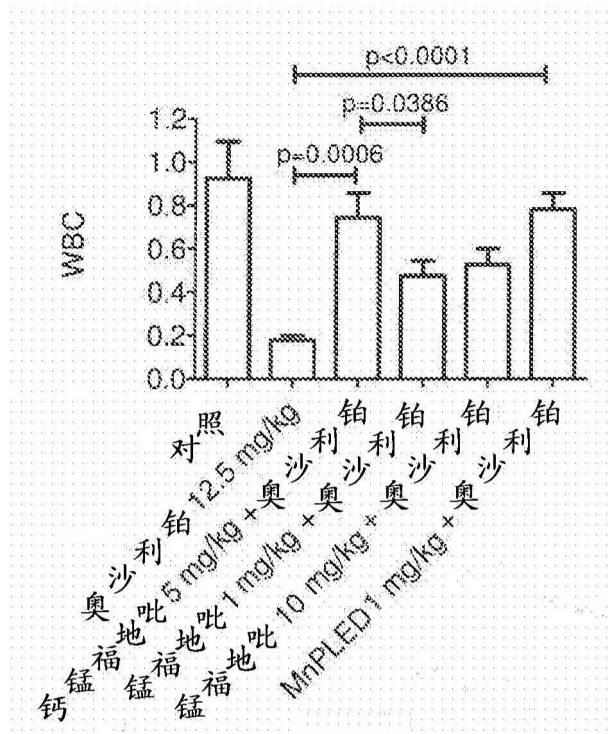


图8A

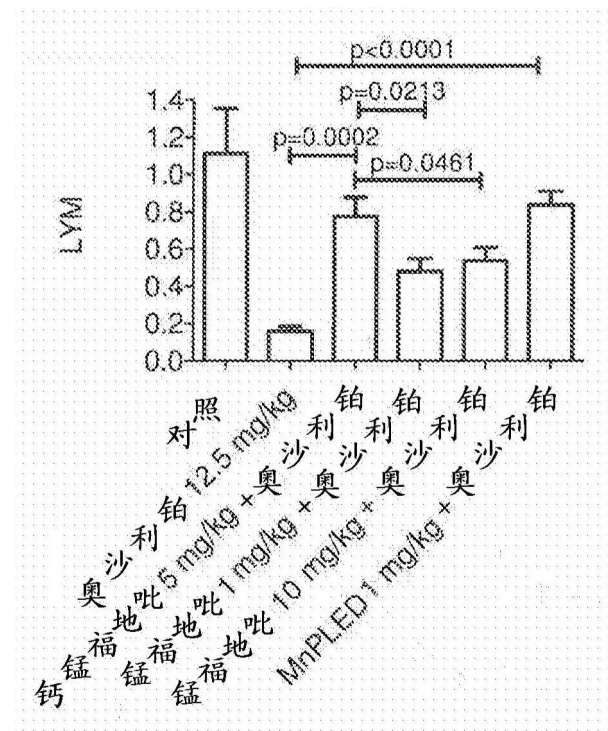


图8B

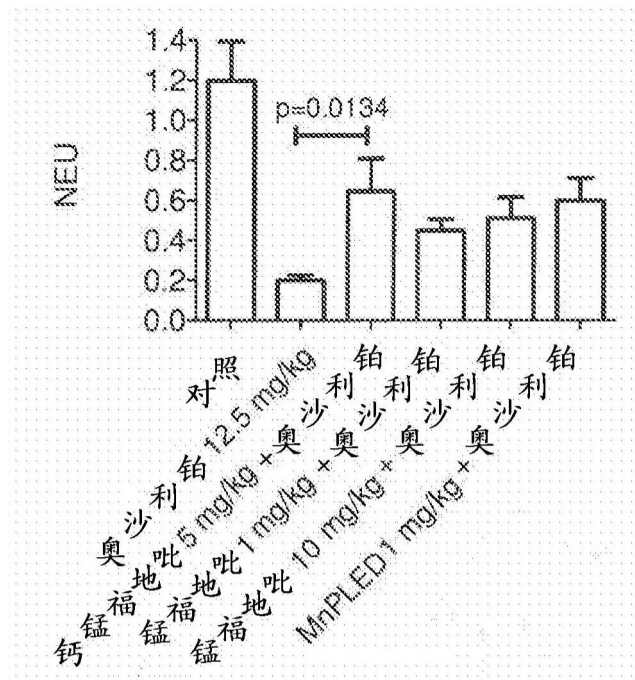


图8C

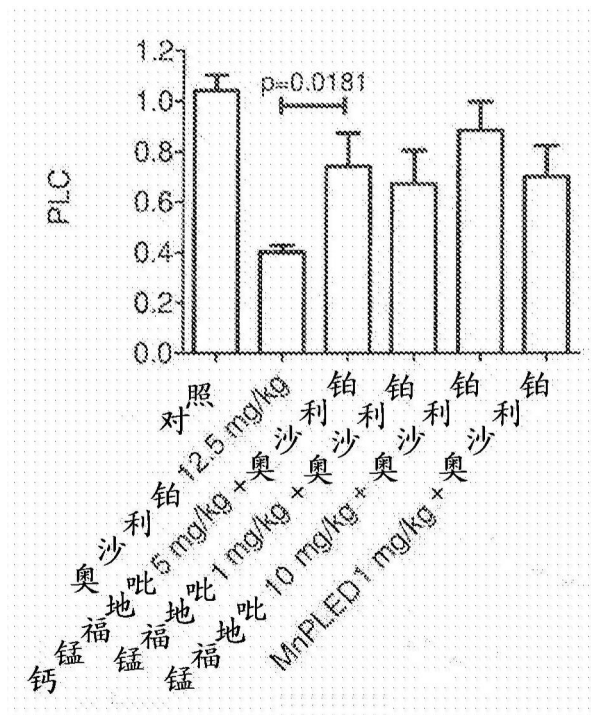


图8D

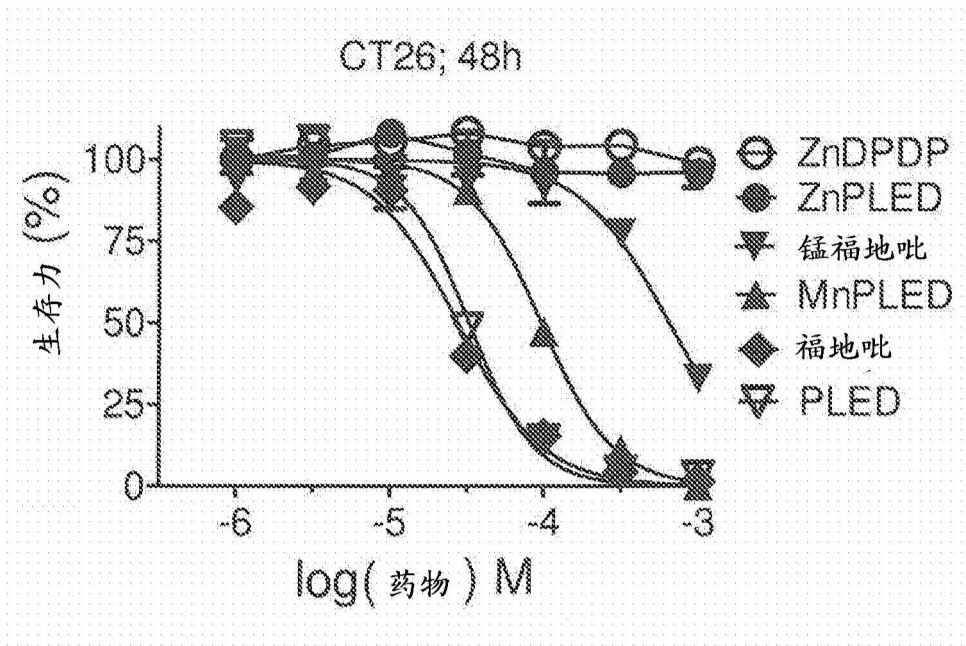


图9A

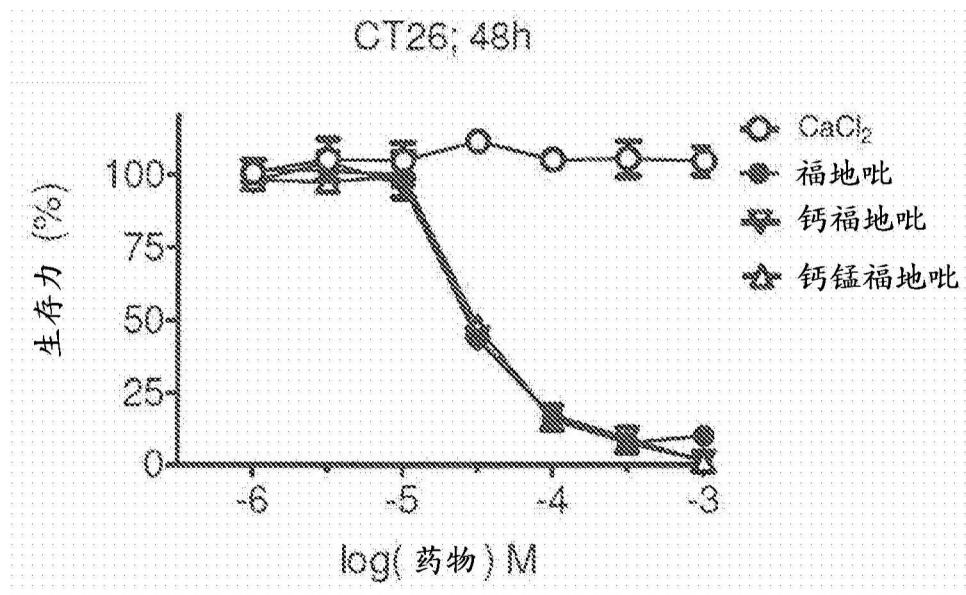


图9B

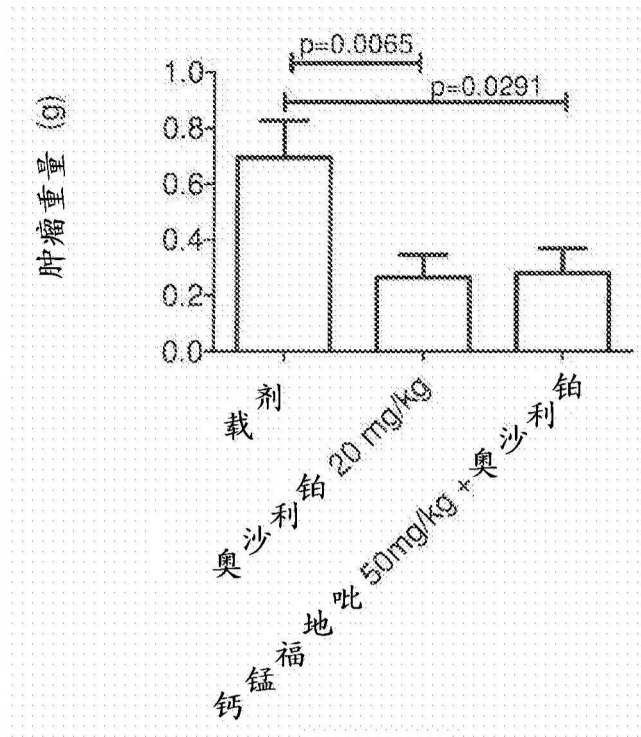


图10A

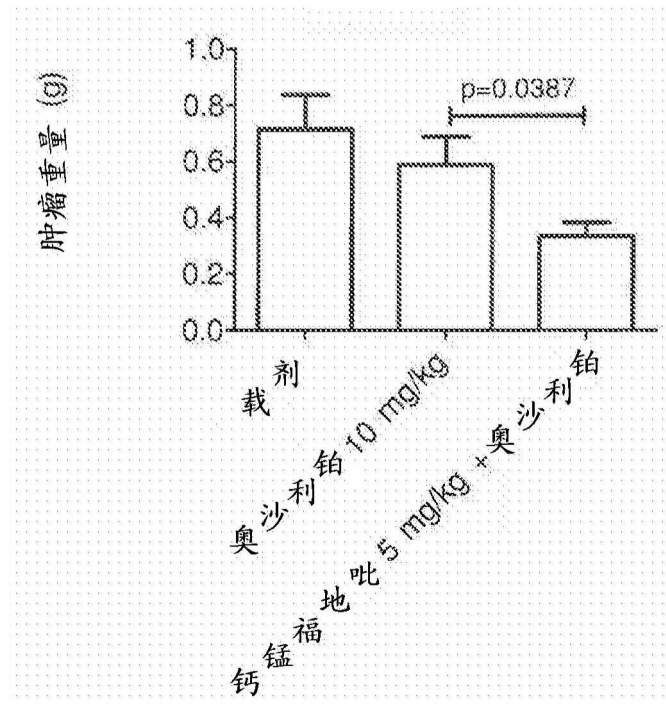


图10B

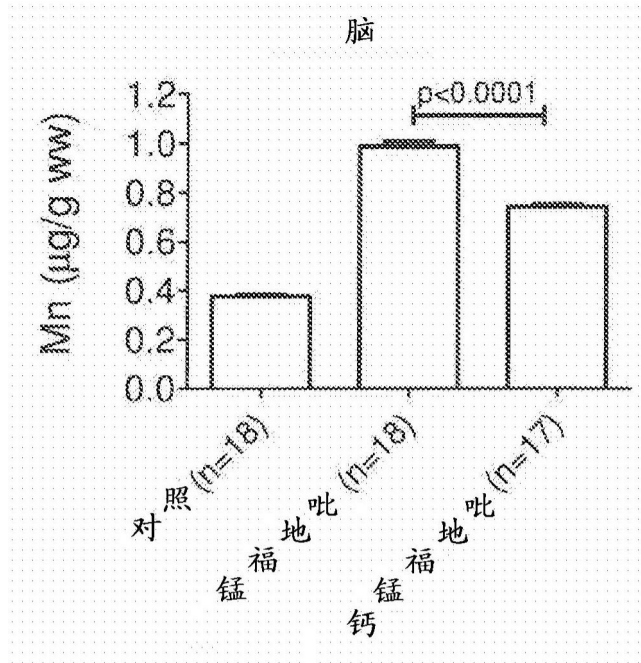


图11A

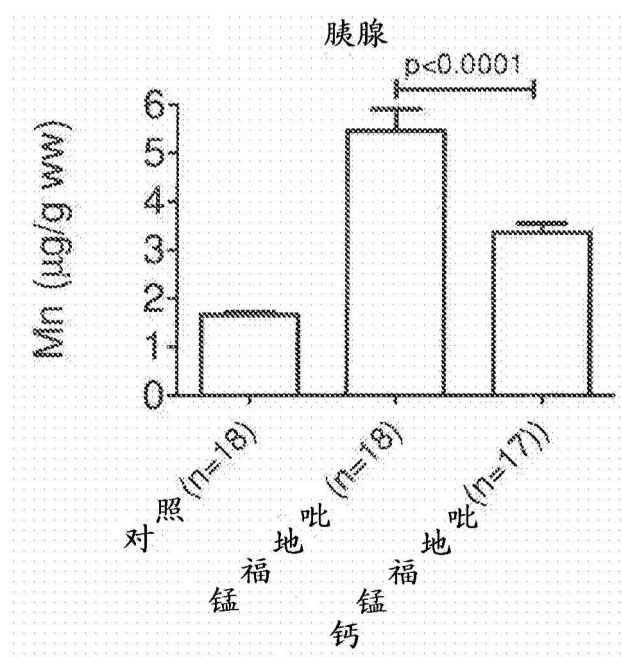


图11B

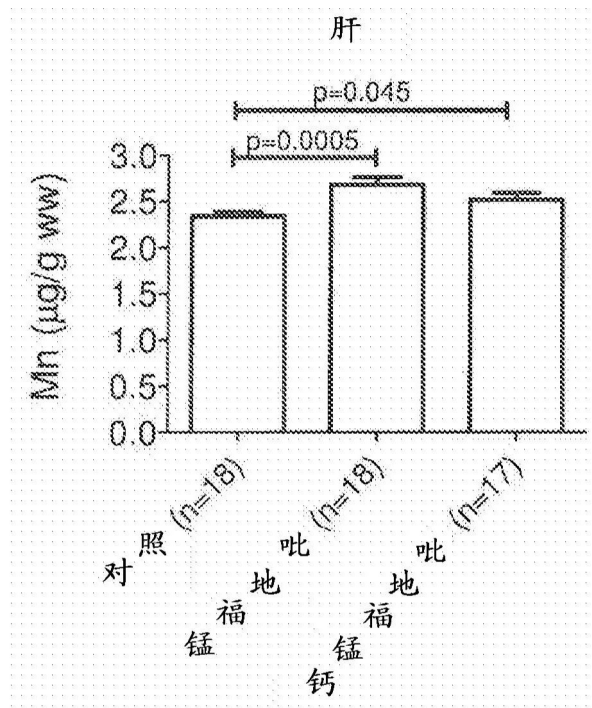


图11C

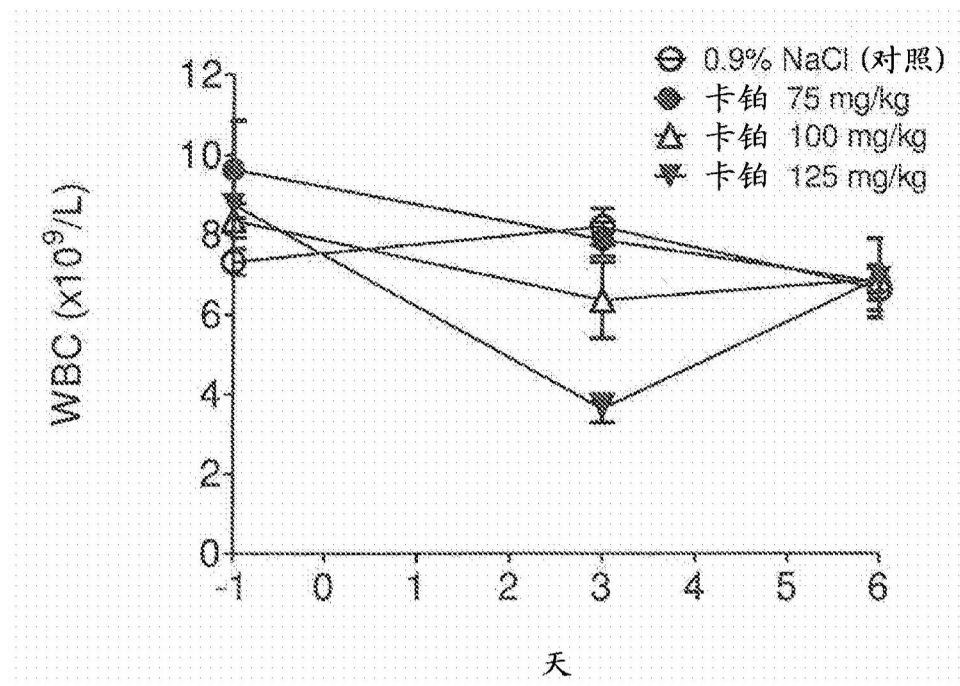


图12A

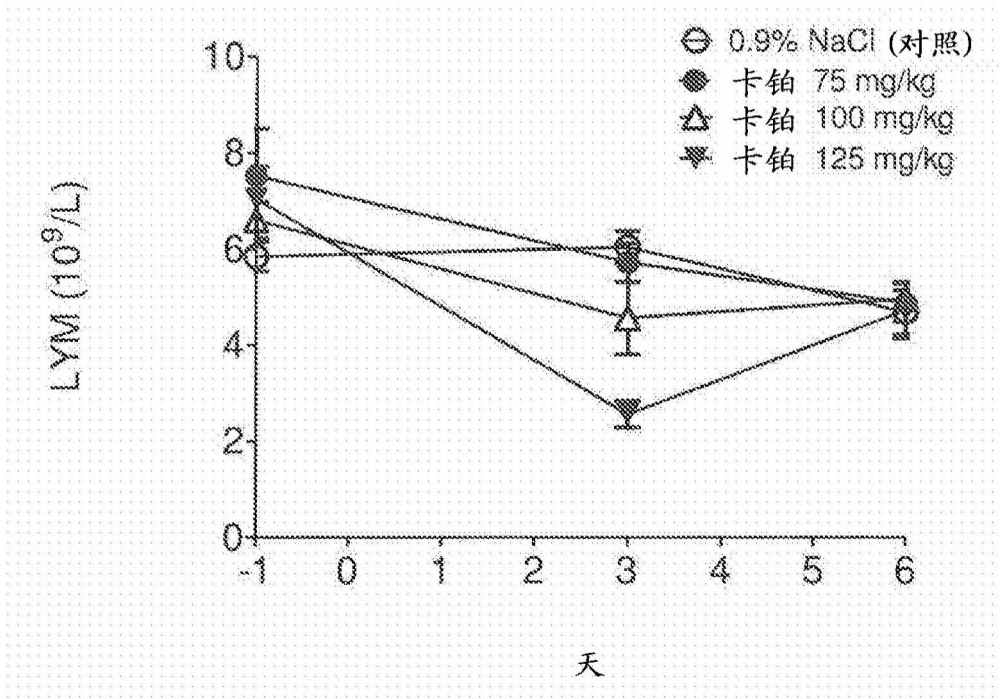


图12B

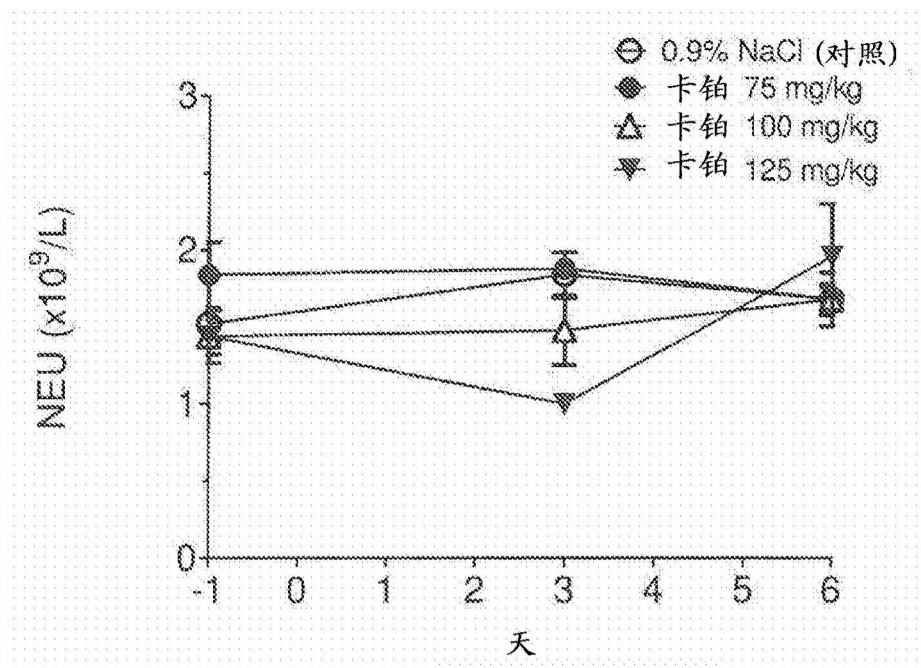


图12C

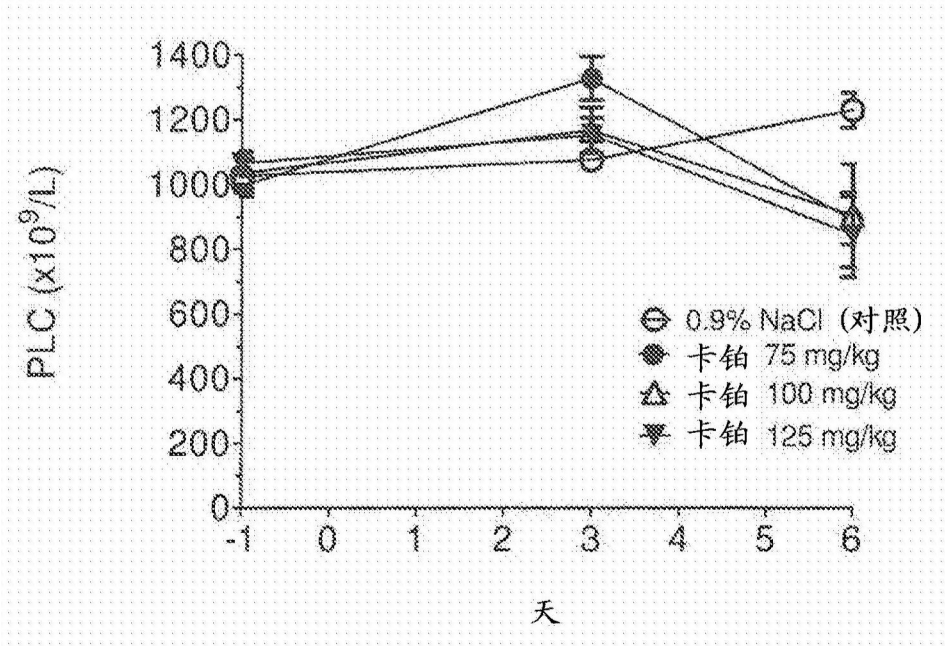


图12D

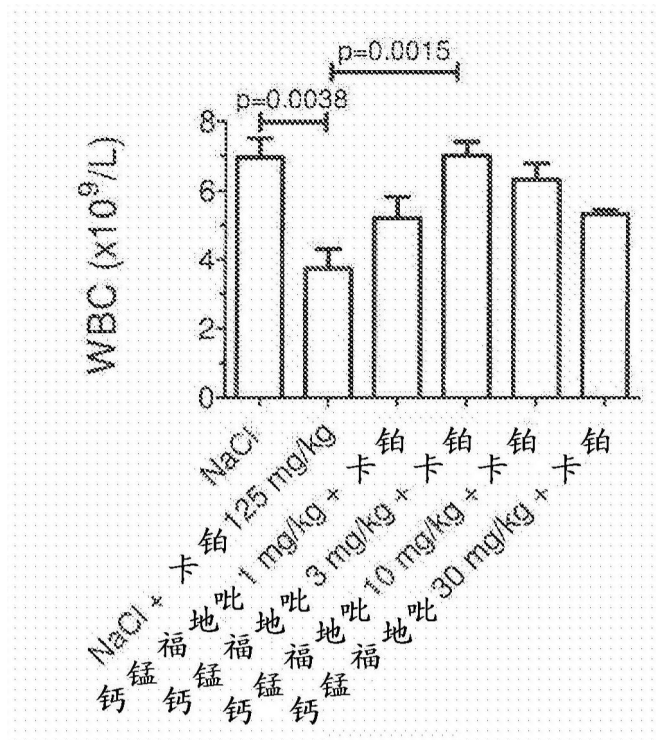


图13A

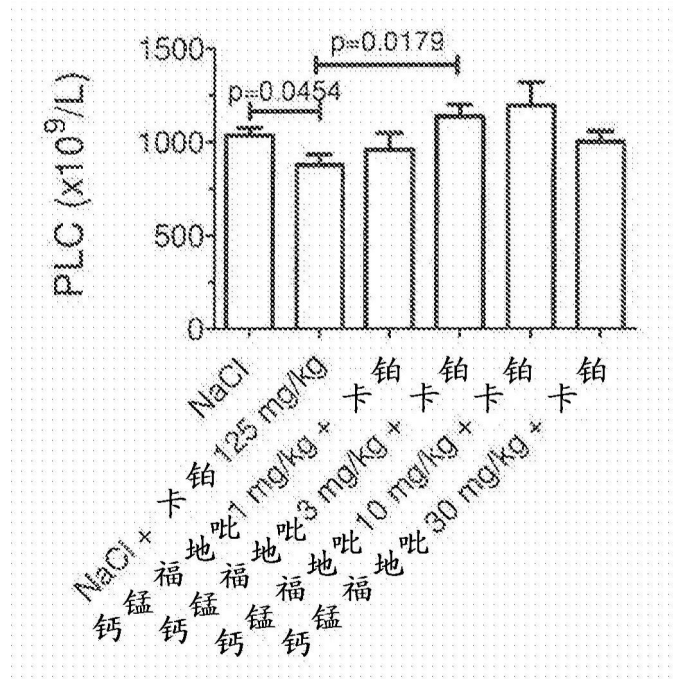


图13D

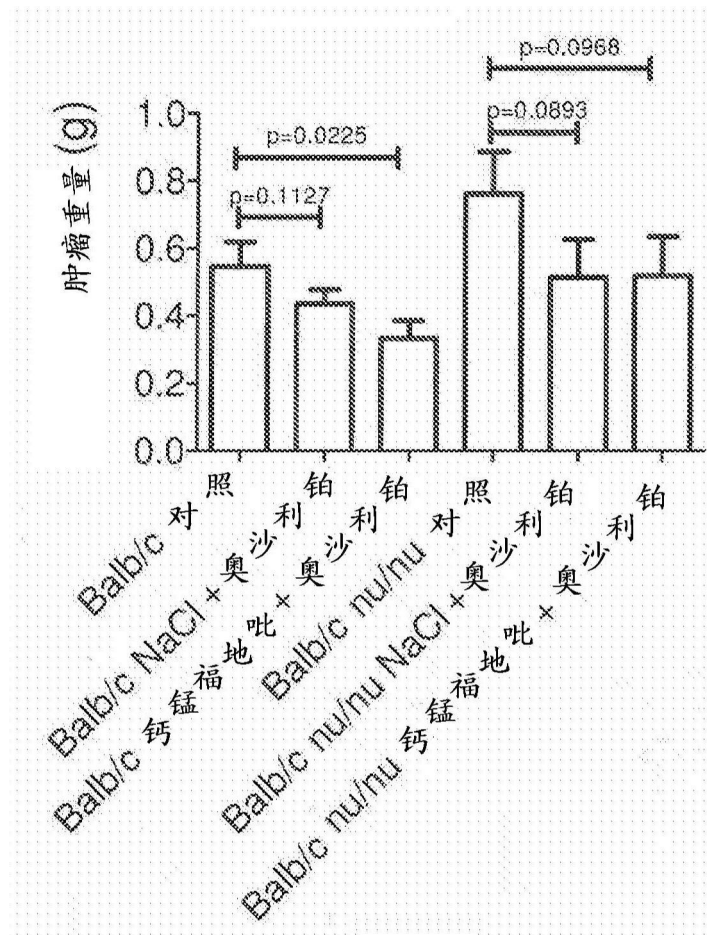


图14

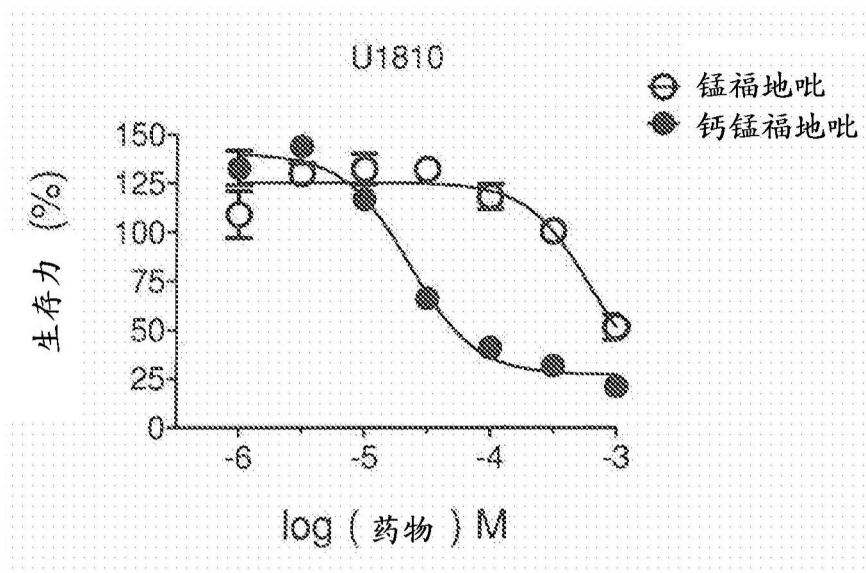


图15A

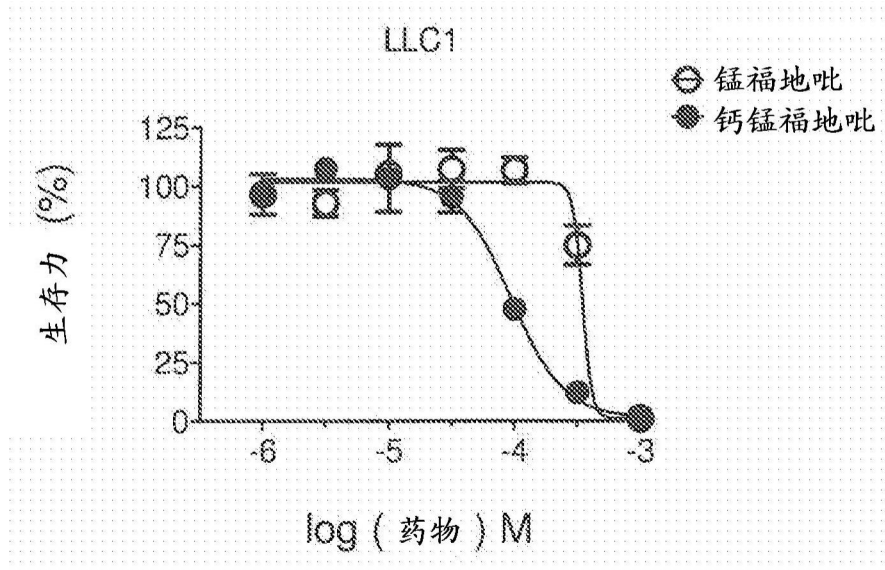


图15B