



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102427822 A

(43) 申请公布日 2012.04.25

(21) 申请号 201080021634.5

A61P 29/00(2006.01)

(22) 申请日 2010.05.17

(30) 优先权数据

61/179147 2009.05.18 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011.11.17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CN2010/000690 2010.05.17

(87) PCT申请的公布数据

W02010/133087 EN 2010.11.25

(71) 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

(72) 发明人 邝沃林

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 柯珂 刘健

(51) Int. Cl.

A61K 33/36(2006.01)

A61P 19/02(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 15 页

(54) 发明名称

治疗炎症性关节炎的组合物和方法

(57) 摘要

治疗或预防类风湿性关节炎或其他类型的炎症性关节炎的一种或更多种症状的方法,涉及向受影响的患者施用含有有效量三氧化二砷的组合物。包含三氧化二砷的组合物可以口服地施用,例如,作为溶液、悬浮液、糖浆、乳剂、片剂或胶囊剂。

1. 一种治疗或预防类风湿性关节炎和其他炎症性关节炎的一种或更多种症状的方法,包括向需要它的受试者以有效量施用包含三氧化二砷的组合物,来降低或治疗类风湿性关节炎的一种或更多种症状。

2. 一种降低或抑制滑膜细胞的增殖或促进滑膜细胞的细胞凋亡的方法,包括使滑膜细胞与有效地降低或抑制它们的增殖或促进它们的细胞凋亡的量的三氧化二砷接触。

3. 一种降低细胞中 IL-6 受体的细胞表面表达的方法,包括使所述细胞与通过将 IL-6 受体靶向溶酶体而有效地促进 IL-6 受体降解的量的三氧化二砷接触。

4. 权利要求 3 的方法,其中所述 IL-6 受体在滑膜细胞中表达。

5. 权利要求 2 或 4 的方法,其中所述滑膜细胞处在患有类风湿性关节炎的患者中。

6. 权利要求 2 或 4 的方法,其中所述滑膜细胞处在患有炎症性关节炎的患者中。

7. 权利要求 5 的方法,其中所述三氧化二砷口服地施用给所述患者。

8. 权利要求 5 的方法,其中所述三氧化二砷向滑膜关节局部地施用。

9. 权利要求 1 的方法,进一步包括施用甾族的或非甾族的抗炎症试剂。

10. 一种用于治疗受试者中类风湿性关节炎或其他炎症性关节炎的一种或更多种症状的药物组合物,包括抑制滑膜细胞的增殖或促进滑膜细胞的细胞凋亡的有效量的三氧化二砷,以及任选地,药学上可接受的赋形剂。

11. 权利要求 10 的药物组合物,其中所述三氧化二砷处于用于口服施用的药学上可接受的载体中。

12. 权利要求 10 的药物组合物,其中所述三氧化二砷处于用于向滑膜关节局部施用的药学上可接受的载体中。

13. 权利要求 10-12 的任一项的药物组合物,其中所述三氧化二砷以 1 到 10 mg 的量存在。

14. 权利要求 13 的任一项的药物组合物,其中所述三氧化二砷以 5 到 10 mg 的量存在。

15. 权利要求 10 的药物组合物,处于用于口服施用的单位剂型中,其中所述单位剂型选自由溶液、悬浮液、乳剂、糖浆、片剂和胶囊构成的组。

16. 三氧化二砷在制备用于治疗或预防类风湿性关节炎和其他炎症性关节炎的一种或更多种症状的药物中的用途。

17. 三氧化二砷在制备用于降低或抑制滑膜细胞的增殖或促进滑膜细胞的细胞凋亡的药物中的用途。

18. 三氧化二砷在制备用于降低细胞中 IL-6 受体的细胞表面表达的药物中的用途。

19. 权利要求 18 的用途,其中所述 IL-6 受体在滑膜细胞中表达。

20. 权利要求 17 或 19 的用途,其中所述滑膜细胞处在患有类风湿性关节炎的患者中。

21. 权利要求 17 或 19 的用途,其中所述滑膜细胞处在患有炎症性关节炎的患者中。

22. 权利要求 20 的用途,其中所述三氧化二砷口服地施用给所述患者。

23. 权利要求 20 的用途,其中所述三氧化二砷局部地向滑膜关节施用。

24. 权利要求 16 的用途,进一步包括施用甾族的或非甾族的抗炎症试剂。

治疗炎症性关节炎的组合物和方法

发明领域

[0001] 当前的公开一般地涉及利用三氧化二砷治疗类风湿性关节炎和其他炎症性关节炎的方法的领域。

[0002] 发明背景

类风湿性关节炎(RA)是与全身的炎症性表现相关的自体免疫性关节炎。在RA中,滑膜关节的内衬,滑膜是异常的。存在着急性炎性细胞在滑膜中的浸润,其经历过度生长,引起关节的渗漏。增生的滑膜还可能导致邻近的软骨和骨的侵蚀,引起关节破坏。最终结果是关节炎、渗漏、关节和邻近韧带的破坏、关节变形以及最后功能的损失。RA是最常见的炎症性关节炎,在世界上影响了基本上所有的群体。它是严重的世界范围的健康难题。

[0003] 传统的RA治疗集中于使用抗炎性药物来抑制关节炎和细胞因子的产生。免疫调节药物也可能是有效的,包括免疫抑制药物,例如皮质类固醇、甲氨蝶呤和环孢霉素(Tarner, et al., *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, 3:336-45 (2007))。也可以使用其他疾病调修药物,包括青霉胺和金。

[0004] RA的病理是复杂的,没有被完全确定。然而,许多细胞因子,包括白细胞介素(IL)-6、IL-15、IL-17和肿瘤坏死因子已经与引起关节和全身性炎症相联系(Tarner, et al., *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, 3:336-45 (2007))。涉及RA病理的细胞因子信号转导途径包括肿瘤坏死因子 α (TNF- α)途径、分裂素活化的蛋白激酶(MAPK)途径、Janus激酶(JAK)途径、以及转录作用的信号转导物和激活物(STAT)途径。TNF- α 途径的重要的下游分子是转录因子核因子 κ B(NF κ B)。这些途径在RA特征性的滑膜增殖以及随后的关节破坏中起到重要的作用。(Tarner, et al., *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, 3:336-45 (2007))。

[0005] 近来,还已经显示的是滑膜在关节炎中起到活跃作用。成纤维细胞样滑膜细胞是滑膜的最重要的细胞成分。滑膜细胞是RA中观察到的炎症的起始和增殖所必需的,调节软骨破坏以及急性和慢性炎症(Lipsky, *N. Engl. J. Med.*, 356:2419-20 (2007))。滑膜细胞的重要性由以下发现进一步显示,其中功能性滑膜有缺陷的小鼠模型对实验性关节炎有抗性(Amano, et al., *Genes Dev.*, 17:2436-49 (2003); Lee, et al., *Science*, 315:1006-10 (2007))。

[0006] 推测地涉及RA病理的两个关键途径的靶向显示了这可能是潜在的治疗策略(Choy, et al., *N. Engl. J. Med.*, 344:907-16(2001))。用英夫利昔单抗(infliximab),一种针对TNF- α 的嵌合单克隆抗体治疗,引起了关节炎的显著改善,停止了关节破坏的发展(Lisky, et al., *N. Engl. J. Med.*, 343:1594-602(2000))。用tocilizumab,一种针对IL-6受体(IL-6R)的抗体治疗,引起了RA患者中症状的显著的控制(Smolens, et al., *Lancet*, 371:987-97 (2008))。

[0007] 然而,英夫利昔单抗的使用已经与肺结核(Keane, et al., *N. Engl. J. Med.*, 345:1098-104(2001))和其他机会性感染包括卡氏肺囊虫病(Harigai, et al., *N. Engl. J. Med.*, 357:1874-6 (2007))以及脑弓形体病(Young, et al., *N. Engl. J. Med.*,

353:1530-1(2005))相关联。tocilizumab 治疗的患者碰巧也具有严重的感染(Nishimoto, et al., *Ann. Rheum Dis.*, (2008))。这些药物也是昂贵的。此外,由于它们是静脉内地给予的,它们对于患者是昂贵的和麻烦的。

[0008] 因此,本发明的目的是提供用于抑制类风湿性关节炎中滑膜细胞的生长和活性的组合物和方法。由于滑膜细胞还在其他炎症性关节炎中起到重要的致病作用,本发明的另一个目的是提供用于抑制其他炎症性关节炎中滑膜细胞的生长和活性的组合物和方法。

[0009] 本发明的又一个目的是提供用于治疗炎症性关节炎的组合物和方法。

[0010] 发明概述

已经发现的是,As₂O₃ 降低与类风湿性关节炎相关的滑膜细胞的生长。通过将 gp130 靶向溶酶体中破坏,As₂O₃ 引起 gp130 水平的降低, gp130 是 IL-6 受体复合物的成分,从而破坏滑膜细胞中自分泌 IL-6 环路。提供了使用 As₂O₃ 抑制或降低滑膜细胞生长的方法。还提供的是使用含有 As₂O₃ 的组合物治疗或预防类风湿性关节炎和其他炎症性关节炎的一种或更多种症状的方法。

[0011] 具体地,当前的应用提供了以下的实施方式:

实施方式 1. 一种治疗或预防类风湿性关节炎和其他炎症性关节炎的一种或更多种症状的方法,包括向需要它的受试者以有效量施用包含三氧化二砷的组合物,来降低或治疗类风湿性关节炎的一种或更多种症状。

[0012] 实施方式 2. 一种降低或抑制滑膜细胞的增殖或促进滑膜细胞的细胞凋亡的方法,包括使滑膜细胞与有效地降低或抑制它们的增殖或促进它们的细胞凋亡的量的三氧化二砷接触。

[0013] 实施方式 3. 一种降低细胞中 IL-6 受体的细胞表面表达的方法,包括使所述细胞与通过将 IL-6 受体靶向溶酶体而有效地促进 IL-6 受体降解的量的三氧化二砷接触。

[0014] 实施方式 4. 实施方式 3 的方法,其中所述 IL-6 受体在滑膜细胞中表达。

[0015] 实施方式 5. 实施方式 2 或 4 的方法,其中所述滑膜细胞处在患有类风湿性关节炎的患者中。

[0016] 实施方式 6. 实施方式 2 或 4 的方法,其中所述滑膜细胞处在患有炎症性关节炎的患者中。

[0017] 实施方式 7. 实施方式 5 的方法,其中所述三氧化二砷口服地施用给所述患者。

[0018] 实施方式 8. 实施方式 5 的方法,其中所述三氧化二砷向滑膜关节局部地施用。

[0019] 实施方式 9. 实施方式 1 的方法,进一步包括施用甾族的或非甾族的抗炎剂。

[0020] 实施方式 10. 一种用于治疗受试者中类风湿性关节炎或其他炎症性关节炎的一种或更多种症状的药物组合物,包括抑制滑膜细胞的增殖或促进滑膜细胞的细胞凋亡有效量的三氧化二砷,以及任选地,药学上可接受的赋形剂。

[0021] 实施方式 11. 实施方式 10 的药物组合物,其中所述三氧化二砷处于用于口服施用的药学上可接受的载体中。

[0022] 实施方式 12. 实施方式 10 的药物组合物,其中所述三氧化二砷处于用于向滑膜关节局部施用的药学上可接受的载体中。

[0023] 实施方式 13. 实施方式 10-12 的任一项的药物组合物,其中所述三氧化二砷以 1 到 10 mg 的量存在。

[0024] 实施方式 14. 实施方式 13 的药物组合物,其中所述三氧化二砷以 5 到 10 mg 的量存在。

[0025] 实施方式 15. 实施方式 10 的药物组合物,处于用于口服施用的单位剂型中,其中所述单位剂型选自由溶液、悬浮液、乳剂、糖浆、片剂和胶囊构成的组。

[0026] 实施方式 16. 三氧化二砷在制备用于治疗或预防类风湿性关节炎和其他炎症性关节炎的一种或更多种症状的药物中的用途。

[0027] 实施方式 17. 三氧化二砷在制备用于降低或抑制滑膜细胞的增殖或促进滑膜细胞的细胞凋亡的药物中的用途。

[0028] 实施方式 18. 三氧化二砷在制备用于降低细胞中 IL-6 受体的细胞表面表达的藥物中的用途。

[0029] 实施方式 19. 实施方式 18 的用途,其中所述 IL-6 受体在滑膜细胞中表达。

[0030] 实施方式 20. 实施方式 17 或 19 的用途,其中所述滑膜细胞处在患有类风湿性关节炎的患者中。

[0031] 附图的简要描述

附图 1A 是线形图,显示了通过 MTT 分析评估的,当处理 24 (-●-),48 (-▲-) 或 72 (-■-) 小时时,浓度提高的三氧化二砷(As_2O_3)对 MH7A 细胞的生长的作用。数据表示为细胞生存力(%)作为 As_2O_3 浓度(μM)的函数。误差线代表平均值的标准误差(SEM) ($n=3$) ($\# = P<0.001$)。

[0032] 附图 1B 是柱形图,显示了不存在或存在 5 μM As_2O_3 的情况下细胞凋亡的百分比,在碘化丙锭(PI)和膜联蛋白-V 染色之后 MH7A 细胞的 FACS 分析所测定的。

[0033] 附图 1C 是线形图,显示了存在(-●-)或不存在(-■-) pan-胱天蛋白酶(pan-caspase)抑制物 Z-VAD-FMK (25 μM)的情况下,以及在存在浓度提高的 As_2O_3 的情况下 72 小时 MH7A 细胞的生存力,通过 MTT 分析评估的。数据表示为细胞生存力(%)作为 As_2O_3 浓度(μM)的函数。误差线代表平均值的标准误差(SEM) ($n=3$) (** = $P<0.01$)。

[0034] 附图 2A 是柱形图,显示了在存在浓度提高的 IL-6 的情况下 72 小时 MH7A 细胞的生存力,通过 MTT 分析评估的。数据表示为细胞生存力(%)作为 IL-6 浓度(ng/ml)的函数。误差线代表平均值的标准误差(SEM) ($n=3$)。

[0035] 附图 2B 是柱形图,显示了在存在浓度提高的抗-IL-6 Ab 的情况下 6 天 MH7A 细胞的生存力,通过 MTT 分析评估的。数据表示为细胞生存力(%)作为抗-IL-6 Ab 浓度($\mu g/ml$)的函数。误差线代表平均值的标准误差(SEM) ($n=3$) (** = $P<0.001$)。

[0036] 附图 2C 是线形图,显示了当处理 24 小时时浓度提高的 As_2O_3 对 gp130 表达的作用,通过 Western 印迹评估的。数据表示为 gp130 表达(%)作为 As_2O_3 浓度(μM)的函数。误差线代表平均值的标准误差(SEM) ($n=3$) ($\# = P<0.001$; ** = $P<0.01$)。

[0037] 附图 2D 是线形图,显示了当处理 0、3、6、12 或 24 小时时 5 μM 的 As_2O_3 对 gp130 表达的作用,通过 Western 印迹评估的。数据表示为 gp130 表达(%)作为时间(小时)的函数。误差线代表平均值的标准误差(SEM) ($n=3$) (** = $P<0.01$)。

[0038] 附图 2E 是柱形图,显示了当处理 0、3、6、12 或 24 小时时,5 μM As_2O_3 对 gp130 的表达的作用,通过定量聚合酶链式反应(Q-PCR)评估的。误差线代表平均值的标准误差(SEM) ($n=3$)。

[0039] 附图 3A 是柱形图,显示了溶酶体抑制物 NH₄Cl (2.5 mM)对 5 μM As₂O₃ 的 gp130 表达抑制的作用。误差线代表平均值的标准误差(SEM) (n=3) (* = P<0.05)。

[0040] 附图 3B 是线形图,显示了在用 100 μM As₂O₃ 处理 0、4 或 6 小时之后从 MH7A 细胞免疫沉淀(IP)的 gp130 的水平。针对 gp130 的抗体用于总细胞溶胞产物的免疫沉淀(IP),随后是用抗遍在蛋白抗体 FK1 和 FK2 的 Western 印迹分析。使用非免疫性兔血清(NIS)的 IP 充当对照。As₂O₃- 诱导的 gp130 遍在化由 FK2 显示,FK2 识别单体和聚合的遍在化的蛋白质,FK1 没有显示,FK1 识别聚合的遍在化的蛋白质。误差线代表平均值的标准误差(SEM) (n=3) (* = P<0.05 ;# = P<0.001)。

[0041] 附图 4A 是线形图,显示了当用 5 μM 的 As₂O₃ 处理 MH7A 细胞 0、3、6、12 或 24 小时后 JNK 的磷酸化,通过 Western 印迹测定的。值代表平均信号密度 ±SEM (n = 3) (* = P<0.05 ;** = P<0.01)。

[0042] 附图 4B 是柱形图,显示了在存在或缺少 JNK 抑制物 SP600125 (30 μM)的情况下和在存在 0、30 或 100 μM As₂O₃ 的情况下超过 24 小时 MH7A 细胞的生存力,通过 MTT 分析评估的。数据表示为细胞生存力(%)。误差线代表平均值的标准误差(SEM) (n=3) (** = P<0.01)。

[0043] 附图 5A 是柱形图,显示了溶酶体抑制物 NH₄Cl (2.5 mM)对 5 μM As₂O₃ 的 JNK 磷酸化的活化的作用。误差线代表平均值的标准误差(SEM) (n=3) (* = P<0.05)。

[0044] 附图 5B 是线形图,显示了 MH7A 细胞用 0.5 μg/ml 抗 -IL-6 Ab 处理 24 小时对 JNK 的磷酸化的影响,通过 Western 印迹测定的。误差线代表使用 Dunnett' s post-tests 的单向 ANOVA (n=3) (* = P<0.05)。

[0045] 附图 5C 是柱形图,显示了 JNK 抑制物 SP600125 (30 μM)对 5 μM As₂O₃ 的丝氨酸 -46 上 p53 的磷酸化的影响,通过 Western 印迹测定的。误差线代表使用 Dunnett' s post-tests 的单向 ANOVA (n=3) (* = P<0.05)。

[0046] 附图 6A 是线形图,显示了当处理 24 小时时浓度提高的 As₂O₃ 对 NFκB 表达的作用,通过 Western 印迹评估的。数据表示为作为 As₂O₃ 浓度(μM)的函数的 NFκB 表达(%)。误差线代表平均值的标准误差(SEM) (n=3) (# = P<0.001 ;** = P<0.01)。

[0047] 附图 6B 是线形图,显示了当处理 0、6、12 或 24 小时时,5 μM As₂O₃ 对 NFκB 的表达的影响,通过 Western 印迹评估的。数据表示为作为时间(小时)的函数的 NFκB 表达(%)。误差线代表平均值的标准误差(SEM) (n=3) (# = P<0.001 ;** = P<0.01)。

[0048] 发明的详细说明

I. 包含三氧化二砷的组合物

A. 三氧化二砷

三氧化二砷在急性骨髓性白血病的难治的早幼粒细胞(M3)亚型的治疗中是非常有用的。口服三氧化二砷(As₂O₃)对于复发的急性早幼粒细胞白血病是高度有效的。(Au, et al., *Blood*, 112:3587-90 (2008))口服 As₂O₃ 引起 QT 间隔时间的较少的延长,因而是治疗白血病的安全得多的药物。近来,还展现了的是,口服 As₂O₃ 产生心脏中最小的 QT 延长,意味着对于延长的使用它是安全的(Siu, et al., *Blood*, 108:103-6 (2006))。

[0049] B. 组合物

以下递送系统是用于施用 As₂O₃ 的组合物的代表。

[0050] 1. 胃肠外的组合物

可注射的药物递送系统包括药学上可接受的溶液、悬浮液、凝胶、微球体和植入物。一般地,这些将是蒸馏水、磷酸盐缓冲盐水或用于静脉内或皮下注射的其他载体的形式。

[0051] 2. 肠内的组合物

口服递送系统包括溶液、悬浮液和固体剂型,例如片剂(例如,压制片剂、糖包被的片剂、膜包被的片剂和肠溶包被的片剂)、胶囊剂(例如,硬或软的明胶或非明胶胶囊)、发泡药和扁囊剂。这些可以含有赋形剂,例如粘合剂(例如,羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、其他纤维素材料和淀粉)、稀释剂(例如,乳糖和其他糖类、淀粉、磷酸二钙和纤维素材料)、崩解剂(例如,淀粉聚合物和纤维素材料)以及润滑剂(例如,硬脂酸酯和滑石粉)。固体剂型可以使用本领域公知的包被物和技术来包被。

[0052] 口服液体剂型包括溶液、糖浆、悬浮液、乳剂、酞剂(例如,水醇的溶液)以及用于可重建的递送系统的粉剂。组合物可以含有一种或更多种载体或赋形剂,例如,悬浮剂(例如,胶、zanthans、纤维素塑料和糖类)、湿润剂(例如,山梨醇)、增溶剂(例如,乙醇、水、PEG、甘油和丙二醇)、表面活性剂(例如,十二烷基硫酸钠、Spans、TWEENS 和十六烷基吡啶)、乳化剂、防腐剂、和抗氧化剂(例如,对羟苯甲酸、维生素 E 和 C、以及抗坏血酸)、抗结块试剂、包被试剂、螯合剂(例如,EDTA)、香味素、着色剂,以及其组合。

[0053] 3. 外用 (topical) 组合物

穿粘膜的递送系统包括贴片、片剂、栓剂、阴道栓剂、凝胶和乳膏剂,可以含有赋形剂例如增溶剂和增强剂(例如,丙二醇、胆汁盐和氨基酸)以及其他载体(例如,聚乙二醇、脂肪酸酯和衍生物,以及亲水性聚合物,例如羟丙基甲基纤维素和透明质酸)。

[0054] 真皮的递送系统包括,例如,水性和非水性的凝胶、乳膏剂、多重乳剂、微乳剂、脂质体、软膏剂、水性和非水性的溶液、洗液、气雾剂、烃基质和粉剂,可以含有赋形剂例如增溶剂、渗透增强剂(例如,脂肪酸、脂肪酸酯、脂肪醇和氨基酸)以及亲水性聚合物(例如,聚卡波非和聚乙烯吡咯烷酮)。在一个实施方式中,所述药学上可接受的载体是脂质体或穿表皮增强剂。

[0055] II. 处理方法

A. 类风湿性关节炎的处理

包含 As_2O_3 的组合物以有效量施用给患有 RA 的个体来抑制或降低滑膜细胞的增殖、抑制或降低滑膜细胞中 IL-6 受体的细胞表面表达,或以有效量来处理或降低发生类风湿性关节炎的一种或更多种症状的风险。包含 As_2O_3 的公开的组合物可以治疗性地或预防性地施用。

[0056] 包含 As_2O_3 的公开的组合物的治疗有效量是指有效延迟发展、加快症状缓解、诱导症状缓解、加强症状缓解、加快恢复、提高可选择的治疗剂的效力或降低对其的抗性或这些的组合的量。治疗有效量可以是在降低症状的严重度、降低急性发作的严重度、减低症状的量、降低疾病相关症状的发生率、降低症状的潜伏期、改善症状、降低次级症状、降低次级感染、延长患者存活、或这些的组合方面有效的。

[0057] 包含 As_2O_3 的组合物预防有效量是指延迟症状的发作、阻止疾病的复发、降低复发发作的量或频率、提高症状发作之间的潜伏期、或它们的组合的有效量。

[0058] 以下的实施例使用 MH7A 作为 RA 滑膜的模型,因为 MH7A 保持了成纤维细胞样滑

膜细胞的大部分生物学性质,包括表面免疫表型和对细胞因子的应答(Miyazawa, et al., *J. Biochem.*, 124:1153-62(1998))。MH7A 细胞的细胞信号转导和基因表达模式也类似于原代 RA 滑膜细胞(Kitano, et al., *Arthritis Rheum.*, 54:742-53 (2006))。使用这个模型,发现的是,As₂O₃ 对抑制类风湿性关节炎的发生中涉及的成纤维细胞滑膜细胞的增殖是有效的。

[0059] 以下的实施例也展现了,通过 IL-6 和 IL-6 受体两者的表达所显示的,在 MH7A 细胞中自分泌 IL-6 循环起作用,以及 IL-6 中和显著地抑制 MH7A 细胞增殖。IL-6 通过与 IL-6 受体复合物结合来发出信号,IL-6 受体复合物包含 80-kDa 的 IL-6 结合蛋白(IL-6 受体 α)和 130 kDa 的信号转导物 gp130 (Naka and Kishimoto, *Arthritis Res.*, 4:154-6 (2002))。

[0060] 实施例还展现了,通过 IL-6 和 IL-6 受体两者的表达所显示的,在 MH7A 细胞中自分泌 IL-6 循环起作用,以及 IL-6 中和显著地抑制 MH7A 细胞增殖。IL-6 通过与 IL-6 受体复合物结合来发出信号,IL-6 受体复合物包含 80-kDa 的 IL-6 结合蛋白(IL-6 受体 α)和 130 kDa 的信号转导物 gp130 (Naka and Kishimoto, *Arthritis Res.*, 4:154-6 (2002))。实施例展现了,As₂O₃ 处理引起转录后 gp130 细胞表面表达的时间和剂量依赖性的降低。通过使用特异性抑制物,实施例显示了,As₂O₃ 介导的 gp130 降低受到溶酶体的调节,不受蛋白酶体或胱天蛋白酶系统的调节。实施例还显示了,gp130 降解由单-遍在化所启动,单-遍在化是一种提供生物信号的过程,引起对于溶酶体中的降解的受体分选(Marmor and Yarden, *Oncogene*, 23:2057-70 (2004))。

[0061] B. 施用方法

包含 As₂O₃ 的组合物可以在与类风湿性关节炎相关的症状开始之前、期间或之后施用。本领域普通技术人员已知的任何可接受的方法可以用于向受试者施用所公开的包含 As₂O₃ 的组合物。

[0062] 施用可以是局部的 (localized) (即,向特定的区域、生理学系统、组织、器官或细胞类型)或全身性的。包含 As₂O₃ 的组合物可以通过不同的途径,例如,口服、胃肠外和外用的途径来施用。包含 As₂O₃ 的组合物还可以直接向关节,特别是滑膜关节施用。选择的特定施用途径将取决于一些因素,例如,特定的组合物、要治疗的受试者的状态的严重度,以及诱导有效的免疫反应所需的剂量。在优选的实施方式中,包含 As₂O₃ 的组合物口服地施用。As₂O₃ 的实际口服剂量从约 0.5 mg 到约 1 到 10 mg,一般地约 5 到 10 mg,取决于年龄,如果受试者和他们的肾脏有功能。As₂O₃ 通过肾脏分泌,因而必需根据肾脏的功能调整 As₂O₃ 剂量,当患者的肾脏功能受损时降低剂量。

[0063] 包含 As₂O₃ 的组合物的有效水平理想地可以在单次施用之后获得。在某些情况下,有益地是施用两次或更多次剂量的包含 As₂O₃ 的组合物。

[0064] C. 组合治疗

包含 As₂O₃ 的组合物可以单独地或与一种或更多种其他治疗或预防试剂组合地施用,或可以与外科的、放射的或其他疗法组合以实现处理。例如,包含 As₂O₃ 的组合物可以与一种或更多种抗炎症试剂组合施用。

[0065] 抗炎症试剂可以是非甾族的、甾族的,或其组合。非甾族抗炎症试剂的代表性的实施例包括,无限制地,昔康类,例如,吡罗昔康、伊索昔康、替诺昔康、舒多昔康;水杨酸类,例

如,阿司匹林、disalcid、扑炎痛、曲利塞特、safapryn、solprin、二氟尼柳和芬度柳;乙酸衍生物,例如,双氯芬酸、芬氯酸、吲哚美辛、舒林酸、托美汀、伊索克酸、吠罗芬酸、硫平酸、齐多美辛、阿西美辛、芬替酸、佐美酸、clindanac、奥昔平酸、联苯乙酸和酮咯酸;芬那酯类,例如,甲芬那酸、甲氯芬那酸、氟芬那酸、尼氟酸和托芬那酸;丙酸衍生物,例如,布洛芬、萘普生、苯埭洛芬、氟比洛芬、酮洛芬、非诺洛芬、芬布芬、indoprofen、吡洛芬、卡洛芬、奥沙普秦、普拉洛芬、咪洛芬、硫埭洛芬、舒洛芬、阿明洛芬和 tiaprofenic;吡唑类,例如,保泰松、羟布宗、非普拉宗、阿扎丙宗和三甲保泰松。也可以采用这些非甾族抗炎试剂的混合物。

[0066] 甾族抗炎性药物的代表性的实例包括,无限制地,皮质类固醇类,例如氢化可的松、羟基-曲安西龙、 α -甲基地塞米松、磷酸地塞米松、二丙酸氯地米松、戊酸氯倍他索、地奈德、去氧米松、醋酸去氧皮质酮、地塞米松、二氯松、双醋酸二氟拉松、戊酸二氟可龙、fludrenolone、氟氯奈德、氟氢可的松、戊酸氟米松特、fluosinolone 丙酮化合物、氟新诺龙酯、flucortine butylesters、氟可龙、乙酸氟泼尼定(氟泼尼立定)、氟氢缩松、哈西奈德、醋酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、甲泼尼龙、曲安奈德、可的松、可托多松、flucetonide、氟氢可的松、双醋酸 difluorosone、fluradrenolone、氟氢可的松、双醋酸 difluorosone、fluradrenolone 丙酮化合物、甲羟松、amcinafel、安西非特、倍他米松和其酯的平衡物、氯泼尼松、乙酸氯泼尼松、clocortelone、clescinolone、二氯松、diflurprednate、氟氯奈德、氟尼缩松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼龙、戊酸氢化可的松、环戊基丙酸氢化可的松、氢可他酯、甲泼尼松、帕拉米松、泼尼松龙、泼尼松、二丙酸氯地米松、曲安西龙和其混合物。

实施例

[0067] 实施例 1. As_2O_3 的 MH7A 细胞增殖抑制作用

材料和方法:

成纤维细胞样滑膜细胞 MH7A 细胞系

MH7A 购自 Riken BioResource Center (Tsukuba, Japan)。细胞在 37°C、5 % CO₂ 下维持在补充有 10% 热灭活的胎儿牛血清(FBS; Invitrogen) 的 RPMI1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 中。

[0068] 试剂和抗体

试剂包括 As_2O_3 和二甲基亚砷(DMSO) (Sigma, St. Louis, MO, USA)、氯化铵(NH₄Cl) (Amresco, Solon, OH, USA)、蛋白酶体抑制物 MG115、pan- 胱天蛋白酶抑制物 Z-VAD-FMK、JNK 抑制物 SP600125 和它的阴性对照(Merck, Darmstadt, Germany) 和重组人类 IL-6 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA)。初级抗体包括兔抗 IL-6 受体 α (IL-6R α) 和 gp130 (C-20) 抗体(Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、兔-IL-6 抗体(Merck)、兔抗-磷酸化的 JNK (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵)、抗-胱天蛋白酶 3、抗- β -肌动蛋白和抗 NF κ B 抗体(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), 以及小鼠抗-遍在蛋白抗体 FK1 和 FK2 (Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA)。次级抗体包括辣根过氧化物酶合的山羊抗-兔 IgG 和兔抗-小鼠 IgG (Invitrogen)。

[0069] MTT 分析

通过MTT分析评估细胞增殖(GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)(Cheung et al., *Cancer Lett.*, 246:122-8(2007))。细胞(96孔平板中 2×10^4 个细胞/反应孔)孵育过夜,之后用对照或试剂处理 2-6 天。处理的细胞然后与 MTT 标记溶液($10 \mu\text{L}$ /反应孔)孵育。在 4 小时孵育之后,裂解细胞,在 37°C 下 formazan 晶体溶解过夜。在 570 nm ($\mu\text{-quant}^{\text{TM}}$ 微板光谱仪, Bio-Tek Instruments Inc., VT, USA)检测 Formazan 信号。获得的数据通过 KC junior 软件(BLD Science, Garner, NC, USA)分析。

[0070] Western 印迹分析

进行 Western 印迹分析(Pang et al., *Gastroenterology*, 132:1088-103 (2007))。细胞裂解和蛋白质采集根据标准方案进行。蛋白质样品(一般 $30 \mu\text{g}$)通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)在 12% 分辨凝胶中分离,电转移到硝化纤维膜上(400 mA 2 小时)。在用含有 5% 无脂奶的 Tris-缓冲盐水-TWEEN (TBS-T)在室温下阻断 30 分钟之后,膜与初级抗体和具有 5% 牛血清白蛋白的 TBS-T 在 4°C 孵育过夜。膜然后用 TBS-T 洗涤三次,在室温下与 1:2000 辣根过氧化酶结合的次级抗体(Amersham-Pharmacia Biotechnology, Piscataway, NJ, USA)孵育 1 小时。免疫反应性条带使用 SuperSignal West Pico 化学发光底物(Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA)用化学发光来检测,显现在 X 射线底片上。条带信号的密度定量使用 ImageJ 1.36b 软件(National Institutes of Health, USA)进行。所有实验一式三份进行。

[0071] 膜联蛋白 V 细胞凋亡分析

对于细胞凋亡分析, 1×10^6 个细胞在 10-cm 平板中孵育过夜,之后用对照或试剂处理 24 小时。细胞然后胰蛋白酶化,用冰冷的磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤两次,重悬浮在 $500 \mu\text{L}$ 结合缓冲液中,在冰上与 FITC 结合的膜联蛋白-V 和碘化丙锭(PI) (Immunotech; Fullerton, CA, USA)孵育 10 分钟。细胞凋亡的细胞(膜联蛋白-V-阳性,PI-阴性)在合适的补色下通过流式细胞术(Epics, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)一式三份地计数。数据分析通过 WinMDI 2.8 软件(The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA)进行。

[0072] 结果:

As_2O_3 诱导了 MH7A 细胞的剂量和时间依赖性抑制作用(附图 1A),50% 抑制浓度是约 $5 \mu\text{M}$ 。流式细胞计分析确认了,细胞生长的抑制作用是由细胞凋亡的诱导所介导的。MH7A 细胞与 As_2O_3 ($5 \mu\text{M}$)孵育 0-24 小时,用碘化丙锭(PI)和膜联蛋白-V 染色以区分细胞凋亡的细胞和死亡的细胞。在代表性的分析中,13% 的对照细胞是膜联蛋白-V 阳性、碘化丙锭阴性的(细胞凋亡的),2.36% 是膜联蛋白-V 阳性、碘化丙锭阳性的(死亡的),而 38.2% 的处理的细胞是膜联蛋白-V 阳性、碘化丙锭阴性的(细胞凋亡的),5.76% 是膜联蛋白-V 阳性、碘化丙锭阳性的(死亡的)。FACS 分析的结果显示了在 As_2O_3 处理之后细胞凋亡细胞的提高。

[0073] Western 印迹分析显示了, As_2O_3 诱导了胱天蛋白酶 3 的剂量和时间依赖性的活化。胱天蛋白酶 3 被胱天蛋白酶抑制剂 Z-VAD-FMK ($25 \mu\text{M}$)的抑制显著地降低了,但是不能完全地改善 As_2O_3 的细胞毒性效应(附图 1B)。结果意味着, MH7A 中 As_2O_3 诱导的细胞毒性同时涉及胱天蛋白酶依赖性和胱天蛋白酶独立性的途径。

[0074] 实施例 2. IL-6 中和抗体的 MH7A 细胞增殖抑制作用

材料和方法:

逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)总 RNA 使用 TRIzol (Invitrogen) 制备。进行逆转录 PCR (RT-PCR) (Cheung, et al., *Cancer Lett.*, 246:122-8 (2007))。根据厂家的说明书,用 Superscript™ III 第一链合成系统(Invitrogen) 逆转录 RNA。反应混合物含有 1.2 μ L 的 cDNA、18 μ L 的 Platinum® PCR Supermix (Invitrogen) 和 200 nM 每对引物。对于每组引物,退火温度和进行的扩增循环数在下表中列出。

[0075] 表 1. RT-PCR 的引物和条件。

基因	引物	序列	温度	循环	大小
IL-6	IL-6-F	5'- ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GC -3'	58°C	35	628bp
	IL-6-R	5'- GAA GAG CCC TCA GGC TGG ACT G -3'			
GAPDH	GAPDH-F	5'-AAC GGA TTT GGC CGT ATT GG- 3'	58°C	35	657bp
	GAPDH-R	5'-CTT CCC GTT CAG CTC TGG G- 3'			
gp130	gp130-F	5'-GAG GTG TGA GTG GGA TGG TGG- 3'	58°C	30	810bp
	gp130-R	5'-GCT GCA TCT GAT TIG CCA AC- 3'			
IL-6R α	IL-6R α -F	5'- CAG CTG AGA ACG AGG TGT CC -3'	58°C	35	219bp
	IL-6R α -R	5'- GCA GCT TCC ACG TCT TCT TGA -3'			
Q-PCR					
	GAPDH-F	5'- GAA GGT GAA GGT CGG AGT C- 3'			
	GAPDH-R	5'- GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC- 3'			
	报告物染料: FAM	5'- CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC- 3'			

[0076] 免疫印迹分析

用 gp130 遍在化进行免疫印迹分析。MH7A 细胞与 100 μ M As₂O₃ 孵育 0、4 或 6 小时。针对 gp130 的抗体用于总细胞溶胞产物的免疫沉淀(IP),随后是用抗遍在蛋白抗体 FK1 和 FK2 的 Western 印迹分析。非免疫性兔血清(NIS)的 IP 充当对照。

[0077] 定量的 RT-PCR

根据厂家的说明书,用 Assays-on - Demand™ 基因表达系统(AssayID : Hs00174360_m1, PE Biosystems, Foster City , CA, USA) 进行 GP130 的定量 RT-PCR (Q-PCR)。反应混合物含有 2 μ L cDNA、10 μ L TaqMan® Universal PCR 主混合物、1 μ L Assay-on - demand™ 基因表达分析混合物和无 RNase 的水到体积 20 μ L。用 ABI Prism 7700 序列检测器(PE Biosystems) 进行 Q-PCR。用 50°C 的起始设置启动热循环 2 分钟,随后在 95°C 的首次变性步骤 10 分钟,然后是 95°C 15 秒(变性)和 60°C 1 分钟(退火和延伸)的 40 个循环。GAPDH 用作 cDNA 输入的内部对照物。对于 GAPDH,用 50°C 2 分钟的起始步骤进行扩增,首次变性步骤加热到 95°C 10 分钟,然后 95°C 20 秒(变性)和 62°C 1 分钟(退火和延伸)的 40 个循环。实时 PCR 扩增数据用 ABI Prism 7700 序列检测器连续地采集和分析。针对内部对照物标准化的、与对照校准物的相对基因表达通过 $\Delta\Delta C_T$ 方法(ABI user bulletin number 2, PE Biosystem) 计算(Cheung, et al., *Cancer Lett.*, 246:122-8

(2007))。所有实验一式三份进行。

[0078] 结果:

为了研究 MH7A 增殖是否可能是 IL-6 依赖性的,研究 IL-6 对细胞增殖的作用。外源的 IL-6 不提高 MH7A 细胞的增殖(附图 2A)。然后研究 IL-6 中和抗体对细胞增殖的作用。有趣地,结果表明,IL-6 中和引起了 MH7A 增殖的显著的抑制(附图 2B)。As₂O₃- 诱导的 gp130 遍在化由 FK2 显示,FK2 识别单体和聚合的遍在化的蛋白质,FK1 没有显示,FK1 识别聚合的遍在化的蛋白质。这些结果展现了, gp130 是单 - 遍在化的。

[0079] 半定量的逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)确认了 IL-6 基因在 MH7A 细胞中活跃地转录。这些结果表明,自分泌 IL-6 回路可能涉及 MH7A 的增殖。

[0080] 实施例 3. As₂O₃ 转录后地减量调节 IL-6 受体复合物的 gp130

材料和方法:

材料和方法是如上文的实施例 1-3 中描述的。

[0081] 结果:

为了研究 As₂O₃ 的抑制作用是否可以通过 IL-6 自分泌途径的靶向来介导,首先研究了 As₂O₃ 对 IL-6 转录作用的影响。结果显示, As₂O₃ 不影响 IL-6 基因转录作用。然后检查了 As₂O₃ 对 IL-6 受体,包括两种亚基 IL-6 受体 α 和 gp130 的作用。Western 印迹分析显示了两种亚基都表达。用 As₂O₃ 处理引起 gp130 的剂量和时间依赖性的降低,IL-6 α 保持不变。半定量的 RT-PCR 显示了,IL-6 受体 α 和 gp130 活跃地转录,用 As₂O₃ 处理对于两种基因的转录没有影响。为了进一步验证这些结果,进行了 GP130 基因的实时定量聚合酶链式反应。结果确认了, As₂O₃ 处理对于 GP130 基因转录作用没有影响(附图 2E)。这些发现意味着,通过在转录后水平上减量调节 IL-6 受体复合物的 gp130 成分, As₂O₃ 靶向 MH7A 中的 IL-6 信号转导途径。

[0082] 实施例 4. As₂O₃ 通过溶酶体途径诱导 gp130 的降解

材料和方法:

材料和方法如上文实施例 1-3 描述的。

[0083] 结果:

As₂O₃ 介导的 gp130 转录后减量调节提示了 gp130 的降解可能被增强。为了解决这个问题,检查了三种蛋白质降解途径,溶酶体、蛋白酶体和胱天蛋白酶依赖性蛋白水解作用。MH7A 细胞与溶酶体抑制物 2.5 mM NH₄Cl 的预孵育显著地阻止了 gp130 的 As₂O₃ 诱导的降低(附图 3A)。另一方面,与蛋白酶体抑制物 MG115 (10 μ M)和胱天蛋白酶抑制物 Z-VAD-FMK (25 μ M)预孵育对 As₂O₃ 诱导的 gp130 降低没有作用。这些发现表明, As₂O₃ 诱导的 gp130 降低中涉及溶酶体降解。

[0084] 实施例 5. As₂O₃ 诱导 gp130 的遍在化

材料和方法:

免疫沉淀

通过标准方法进行免疫沉淀(Pang et al., *Gastroenterology*, 132:1088-103 (2007))。细胞用补充有 1 mM 原钒酸钠和 Complete 蛋白酶抑制物混合物(Complete ;Roche Molecular Biochemicals)的冰冷的 PBS 洗涤,用缓冲液(50 mM Tris-HCl, pH : 7.5, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 4 μ g/mL 抑肽酶,100 μ M 苯甲基磺基氟化物,200 μ M 原钒

酸钠, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 亮抑酶肽, 1mM 二硫苏糖醇 和 1X Complete) 在 4°C 裂解 15 分钟。采集溶胞产物并离心。分析蛋白质 (Bio-Rad Protein Assay Kit, Philadelphia, PA, USA), 调节到 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (一般 800 到 1000 μg)。通过与合适的抗体 (一般 4 μg) 或对照非免疫性血清在 4°C 柔和摇动过夜孵育蛋白质样品, 预先形成免疫沉淀。抗体-蛋白质复合物通过与 30 μL 的 rec-Protein G SEPHAROSE 珠子® (Invitrogen) 在 4°C 柔和摇动孵育 2 小时来沉淀。蛋白质 G 珠子然后用 500 μL 冰冷的裂解缓冲液洗涤 3 次。吸出上清液, 添加 50 μL 的 2X Laemmli 缓冲液。通过在 95°C 加热 10 分钟从珠子释放抗体-蛋白质复合物。然后通过 Western 印迹一式三份地分析免疫沉淀。

[0085] 结果:

单-遍在蛋白部分向蛋白质的添加允许它分选到溶酶体中, 在此它最终被降解。为了研究 As_2O_3 是否提高 gp130 遍在化, 来自 As_2O_3 处理之前和之后的 MH7A 细胞的细胞溶胞产物用抗-gp130 抗体免疫沉淀, 随后用识别聚合-遍在化的蛋白质的抗体 FK1, 以及同时识别单-遍在化的和聚合-遍在化的蛋白质的 FK2 来 Western 印迹。结果显示, 仅在 FK2 的免疫印迹中检出遍在化的 gp130 (作为高分子量污斑), 而用 FK1 没有。因而, As_2O_3 诱导 gp130 的单-遍在化。此外, 用更久的 As_2O_3 处理获得了提高量的遍在化的 gp130, 表明时间依赖性的单-遍在化 (附图 3B)。这些发现进一步确认了 As_2O_3 诱导 gp130 的溶酶体降解。

[0086] 实施例 6. IL-6 信号转导的抑制涉及 c-Jun-末端-N 激酶 (JNK) 的 As_2O_3 活化

材料和方法:

材料和方法是如上文实施例 1-5 所描述的。

[0087] 结果:

重要的 IL-6 信号级联之一是 MAPK 途径, 包括 JNK 的活化 (Heinrich, et al., *Biochem. J.*, 374:1-20 (2003))。有趣地, 在其他细胞系统中, 也已经显示了砷活化 JNK (Davison, et al., *Blood*, 103:3496-502 (2004))。因而, 研究了在 MH7A 细胞中 As_2O_3 诱导的 IL-6 信号转导抑制中可能涉及的 JNK 活化。 As_2O_3 处理引起了 JNK 磷酸化的显著提高, 因此 JNK 活化 (附图 4A)。用 JNK 抑制物 SP600125 (30 μM) 预处理阻止了 As_2O_3 诱导的 JNK 磷酸化提高。JNK 活化是生物学相关的, 因为对 As_2O_3 诱导的 JNK 活化的抑制作用显著地阻止了 As_2O_3 介导的对 MH7A 细胞增殖的抑制 (附图 4B)。

[0088] 为了检查 JNK 活化是否与 IL-6 信号转导的抑制相关, MH7A 细胞用溶酶体抑制物 NH_4Cl (2.5 mM) 处理, 早先显示了 NH_4Cl 将 gp130 从 As_2O_3 诱导的抑制中拯救出来。在存在 NH_4Cl 的情况下, As_2O_3 诱导的 JNK 活化几乎被完全地消除 (附图 5A), 表明经由 gp130 降解的 IL-6 信号转导途径抑制是 JNK 活化所必需的。通过用 IL-6 中和抗体 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理 MH7A 细胞直接地展现了这一点。如附图 5B 中所示, IL-6 中和诱导了 JNK 活化。这些结果表明, IL-6 信号转导的破坏是 MH7A 细胞中 JNK 活化所需的。

[0089] 实施例 7. As_2O_3 诱导的 JNK 活化可能通过 p53 途径诱导生长延滞

材料和方法:

细胞周期分析

如所描述的进行细胞周期分析 (Pang et al., *J. Pathol.* 210:19-25, (2006))。细胞被胰蛋白酶化, 用冰冷的 PBS 洗涤两次, 重新悬浮在 500 μL PBS 中, 在冰上用 PI 染色 10 分钟 (DNA Prep™, Beckman Coulter)。细胞周期通过流式细胞术测定, 通过 WinMDI 2.8

软件分析数据。

[0090] **结果：**

为了研究 As_2O_3 诱导的 JNK 活化的生长抑制效果是否可能通过胱天蛋白酶 -3 介导，在 As_2O_3 处理之前用 JNK 抑制物 SP600125 (30 μM) 处理 MH7A 细胞。JNK 抑制作用不影响 As_2O_3 诱导的胱天蛋白酶 -3 活化，表明 As_2O_3 诱导的 JNK 活化中可能涉及引起生长抑制的胱天蛋白酶独立性的途径。这些观察结果与附图 1 显示的结果一致。由于已知 JNK 使 p53 磷酸化，p53 的磷酸化是诱导生长延滞中的关键步骤(Wu, *Cancer Biol. Ther.*, 3:156-61 (2004))，检查了 As_2O_3 对 p53 磷酸化的影响。如附图 5C 中所示， As_2O_3 处理显著地提高了 p53 在丝氨酸 46 处的磷酸化，丝氨酸 46 是促细胞凋亡基因的反式激活的重要位点(Wu, *Cancer Biol. Ther.*, 3:156-61(2004))。SP600125 对 JNK 活化的抑制作用显著地抑制了 As_2O_3 介导的 p53 磷酸化，确认了 p53 磷酸化是 As_2O_3 诱导的 JNK 活化的下游效应。细胞周期分析显示了， As_2O_3 处理引起显著的 G2M 延滞(附图 5D)。直方图用于显示用 5 μM As_2O_3 处理 MH7A 细胞 24 小时的作用，通过用 PI 标记细胞和流式细胞术来测定的。

[0091] 实施例 8. As_2O_3 抑制 JNK 的交叉对话(cross-talk)配体核因子 kappaB (NF κ B)。

[0092] **材料和方法：**

材料和方法是如上文实施例 1-7 所描述的。

[0093] **结果：**

JNK 的另一个重要的交叉对话配体是 NF κ B (Liu and Lin, *Oncogene*, 26:3267-78 (2007))。NF κ B 也是关节炎中重要的促炎性因子(Simmonds, et al., *Rheumatology*, 47:584-90(2008))。如附图 6 中所示，NF κ B 在 MH7A 中组成型表达。 As_2O_3 处理以剂量(附图 6A)和时间(附图 6B)依赖性方式显著地降低 NF κ B 的水平。

[0094] 修饰和改变对于本领域技术人员将是明显的，意图被包括在附随的权利要求的范围内。

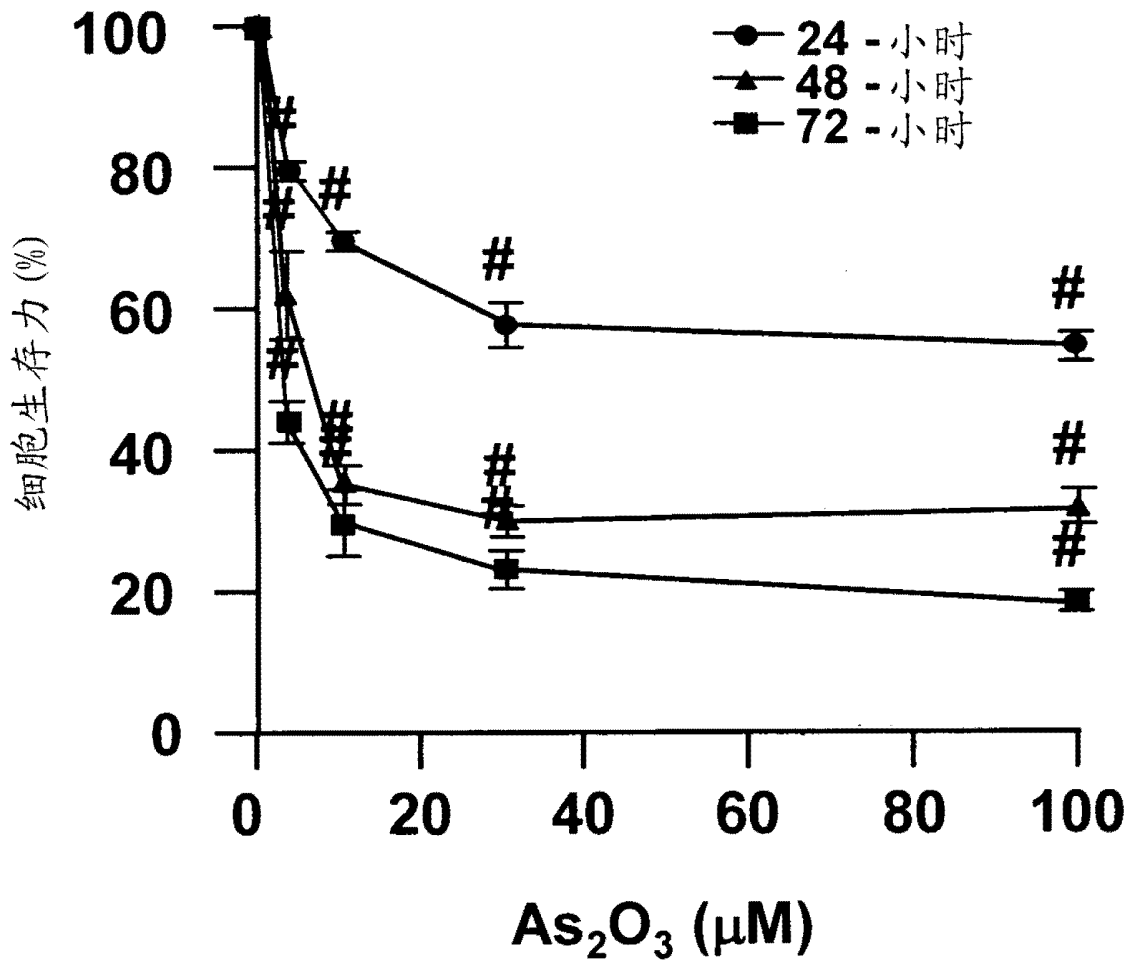


图 1A

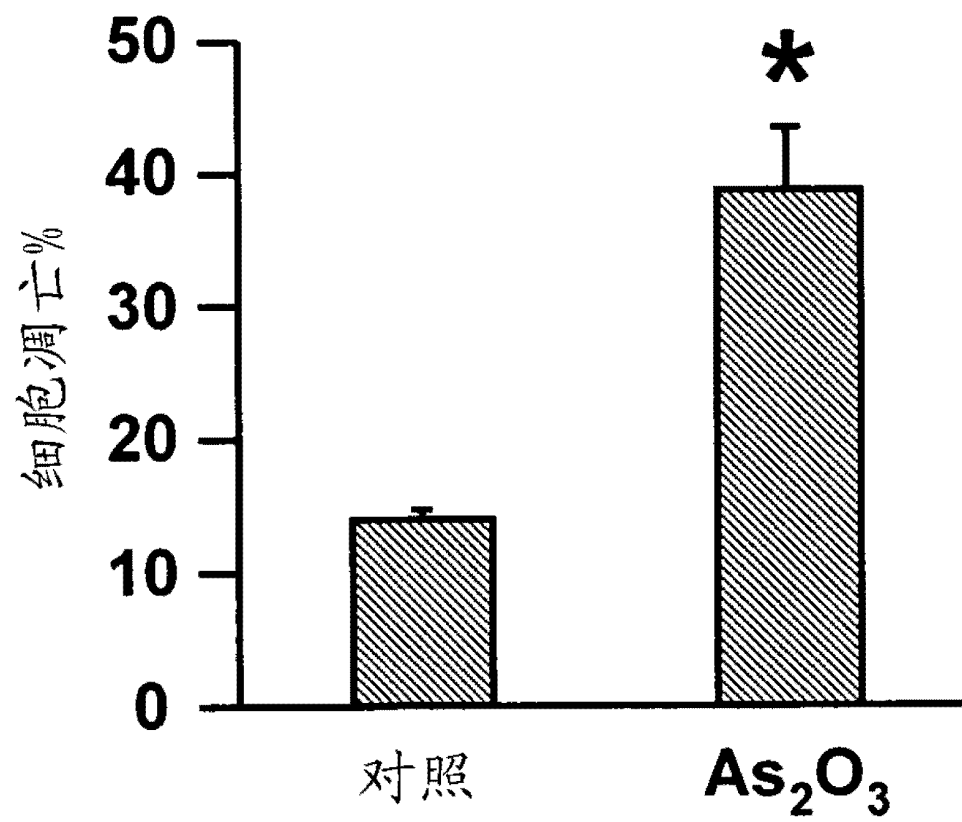


图 1B

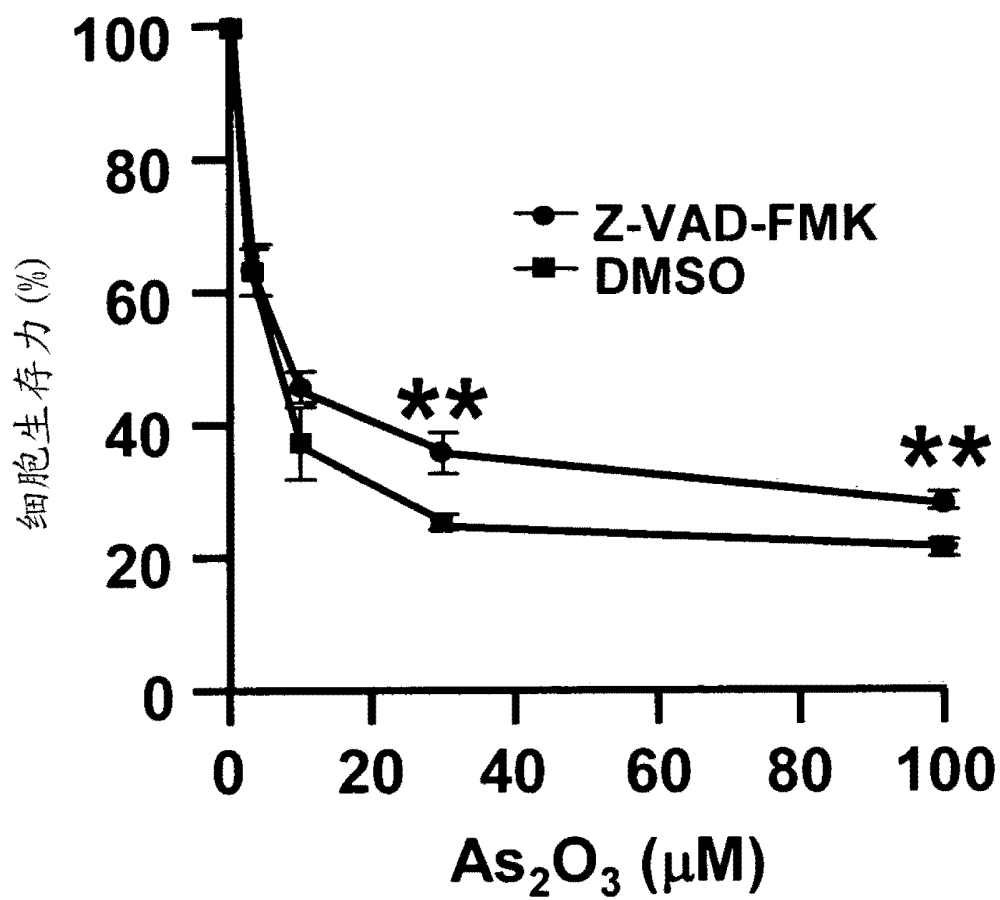


图 1C

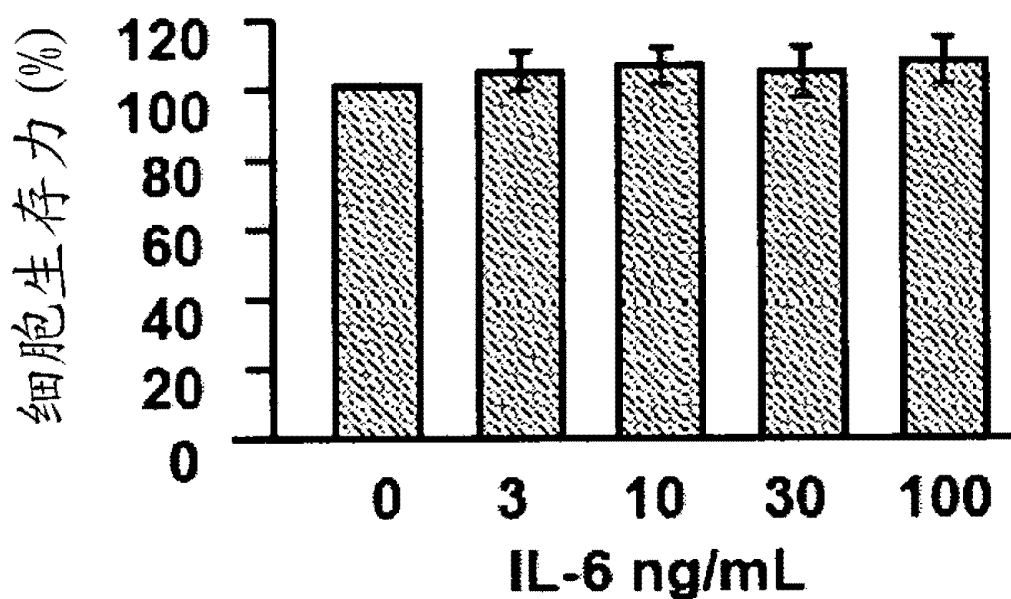


图 2A

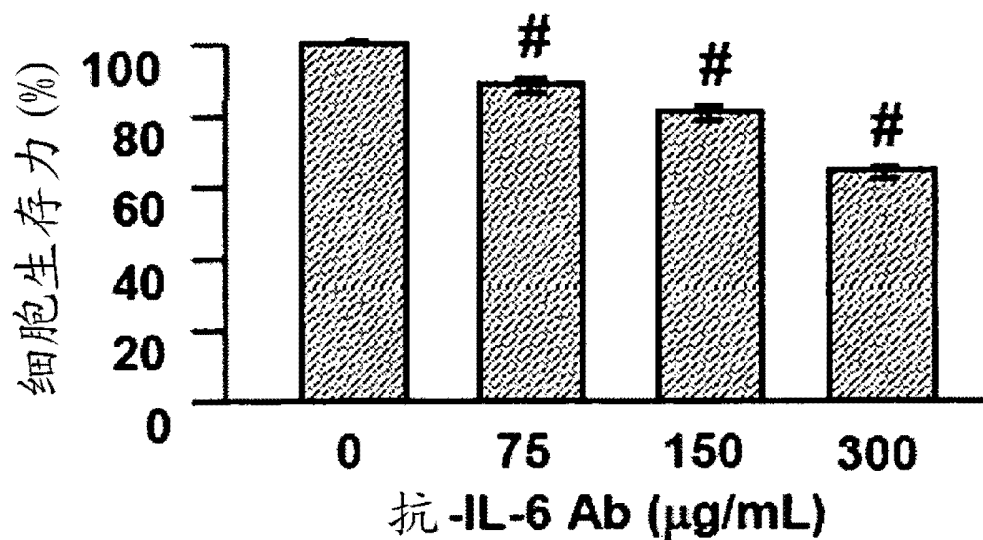


图 2B

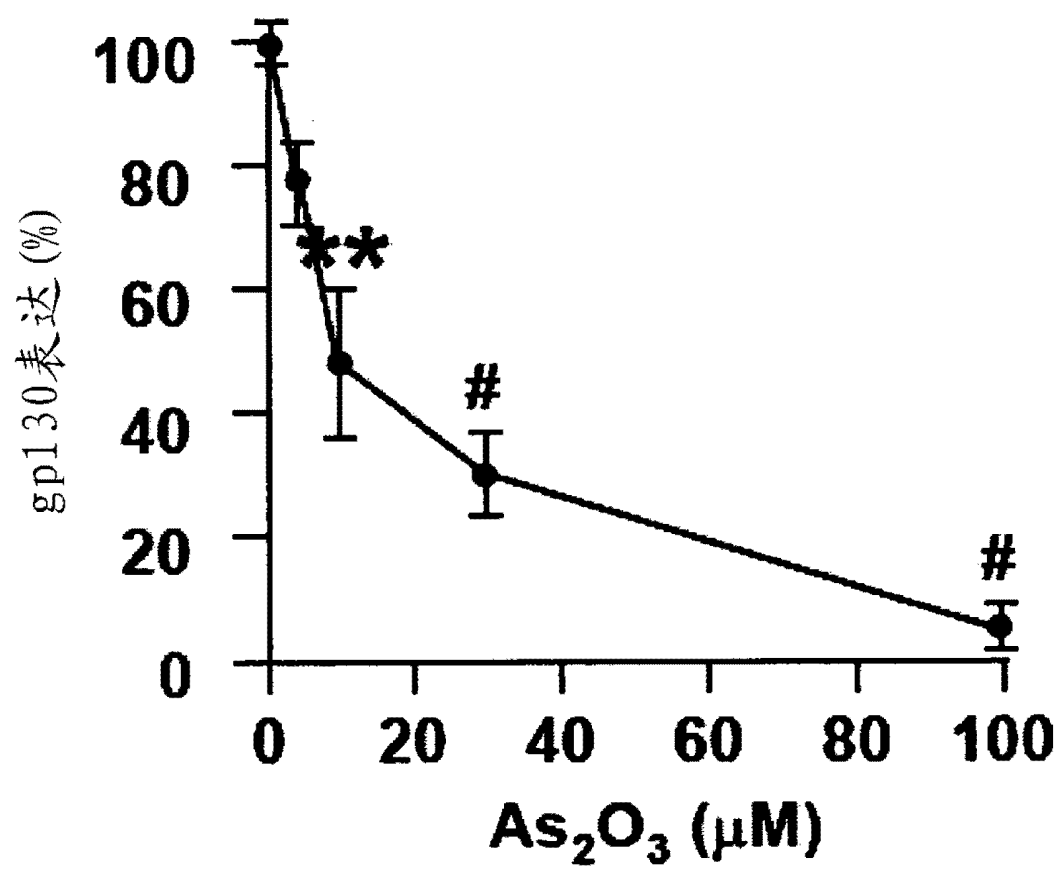


图 2C

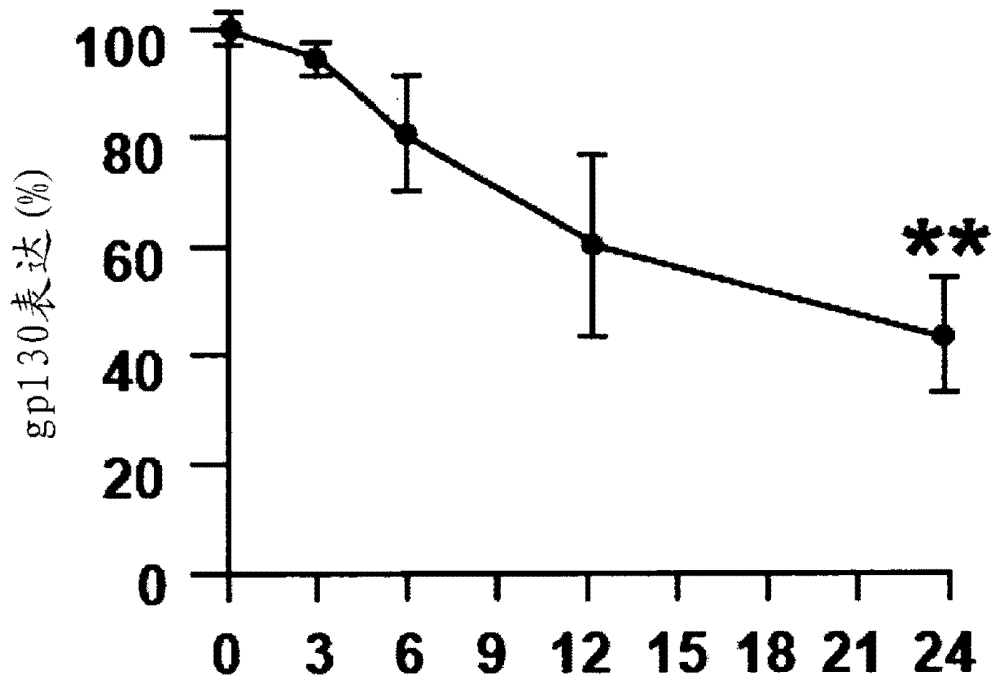


图 2D

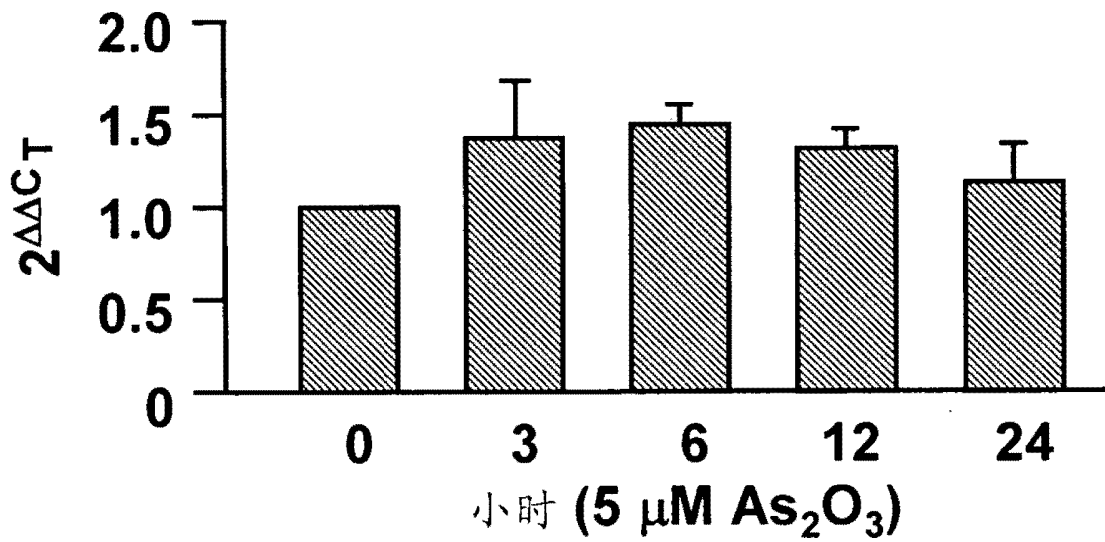


图 2E

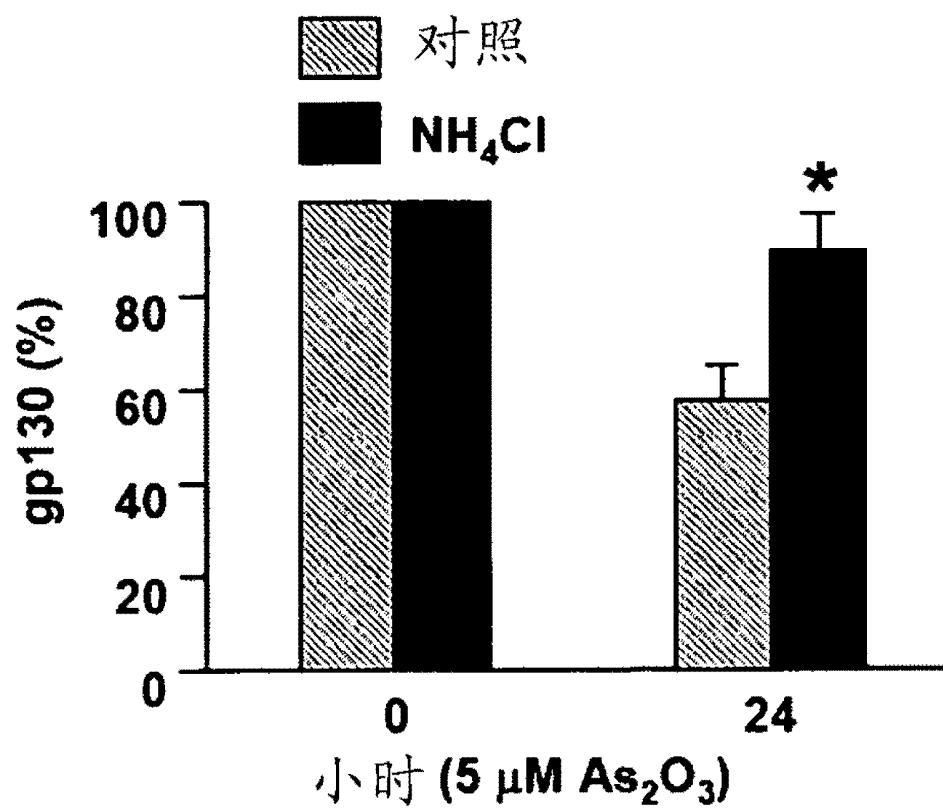


图 3A

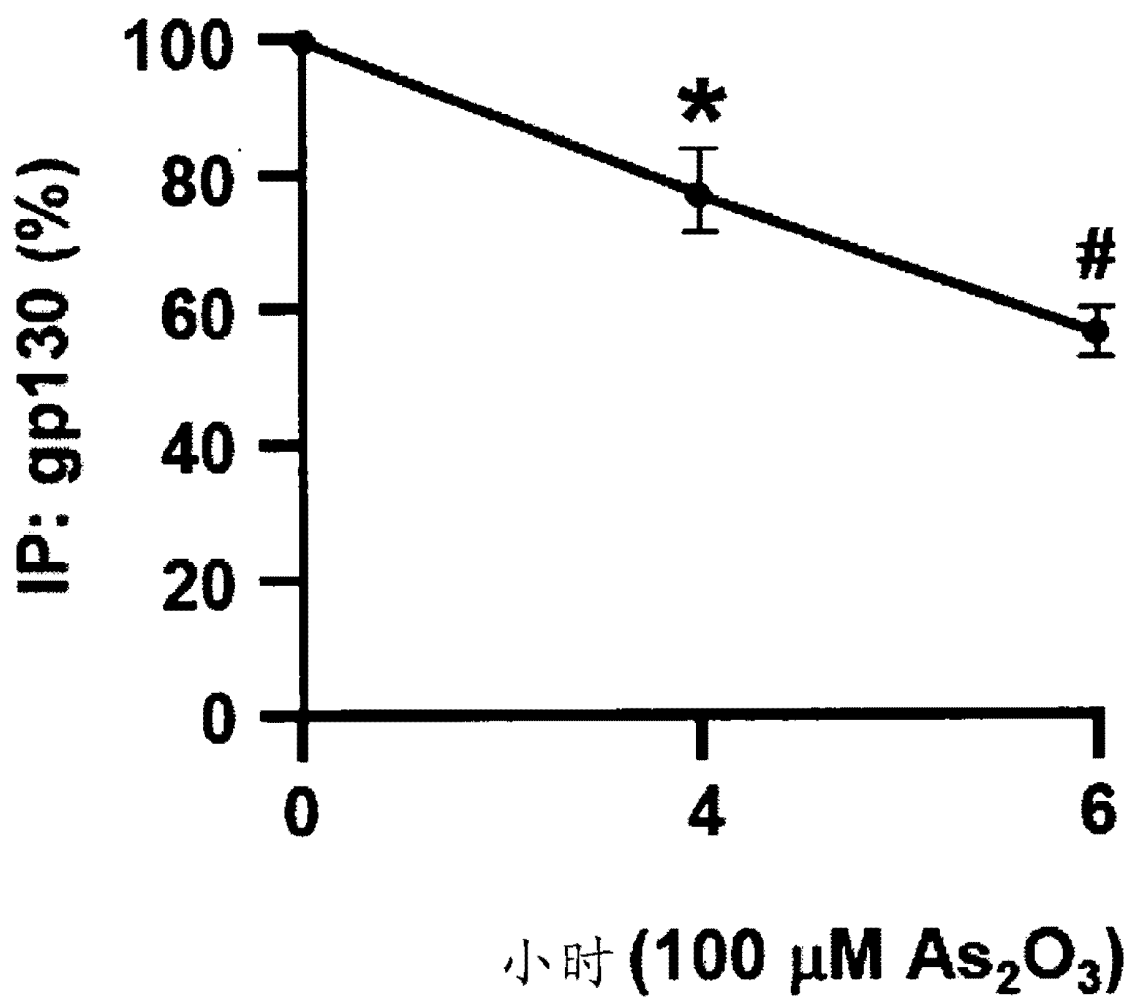


图 3B

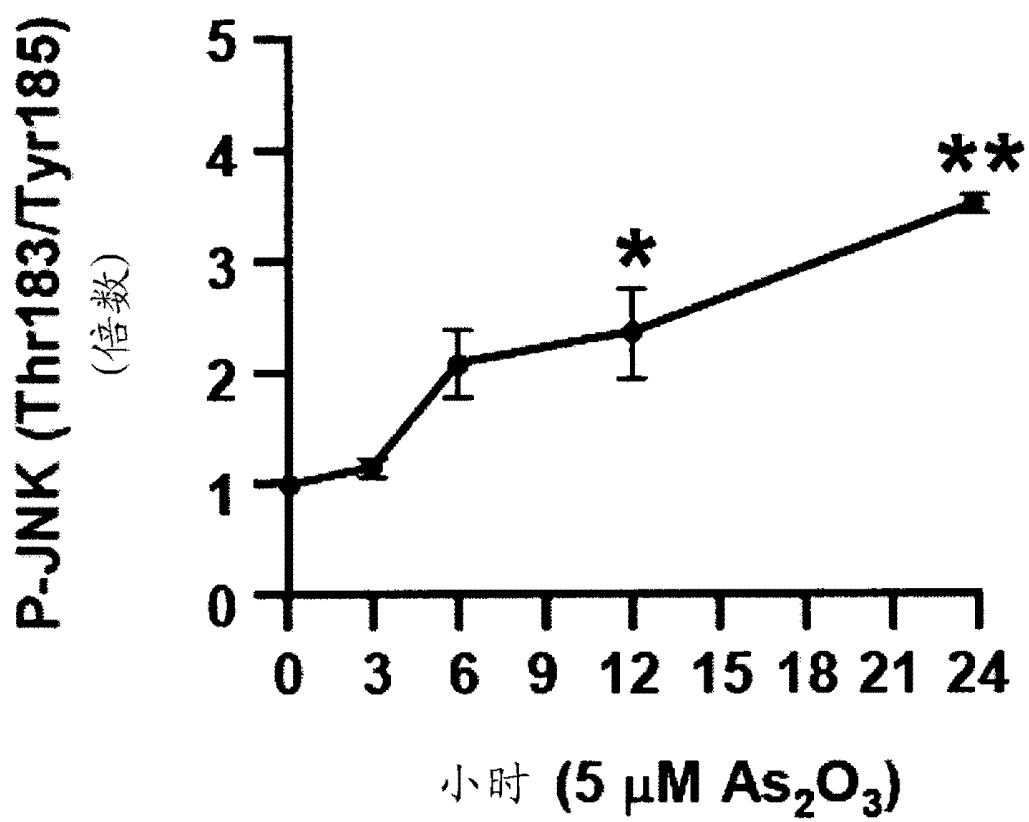


图 4A

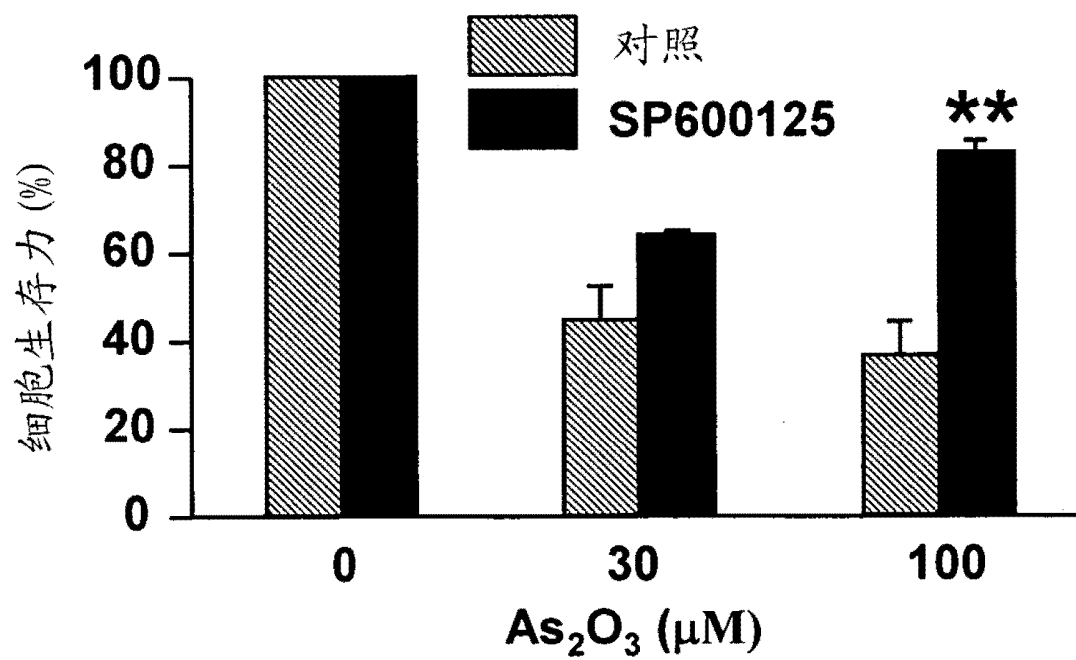


图 4B

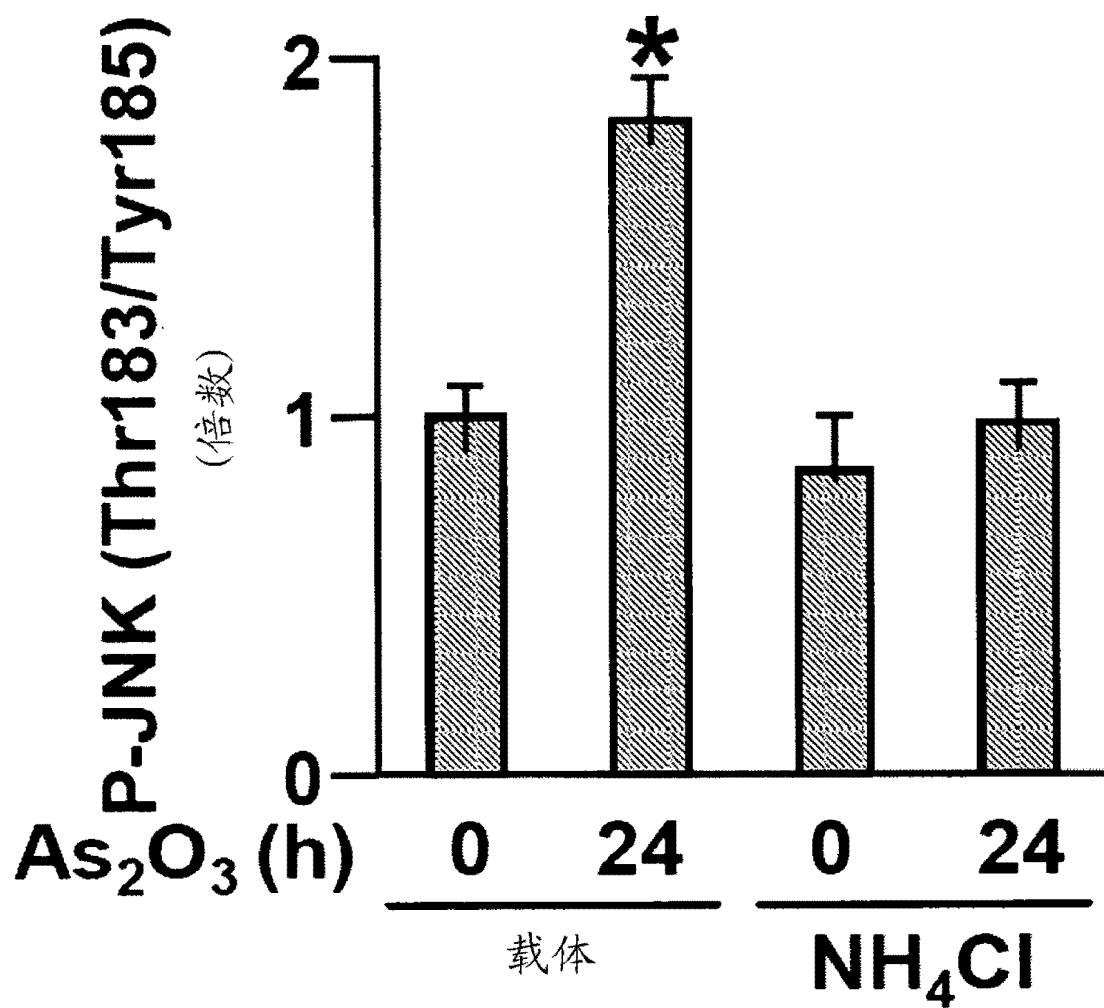


图 5A

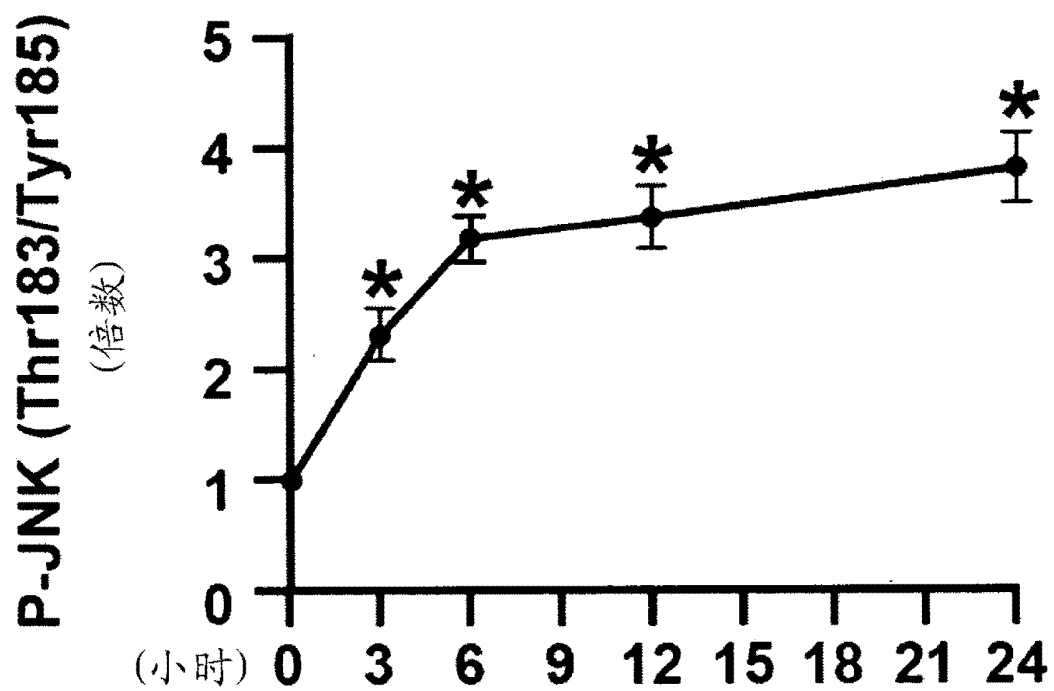


图 5B

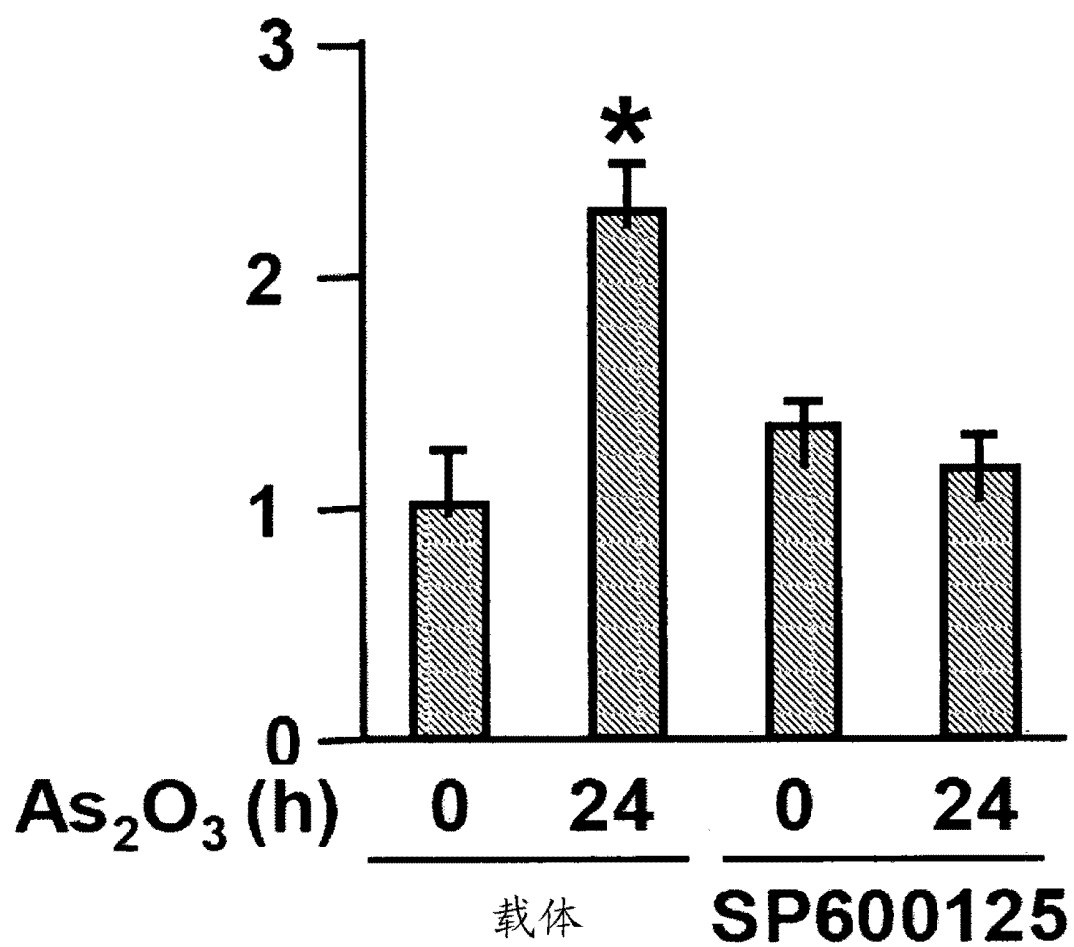


图 5C

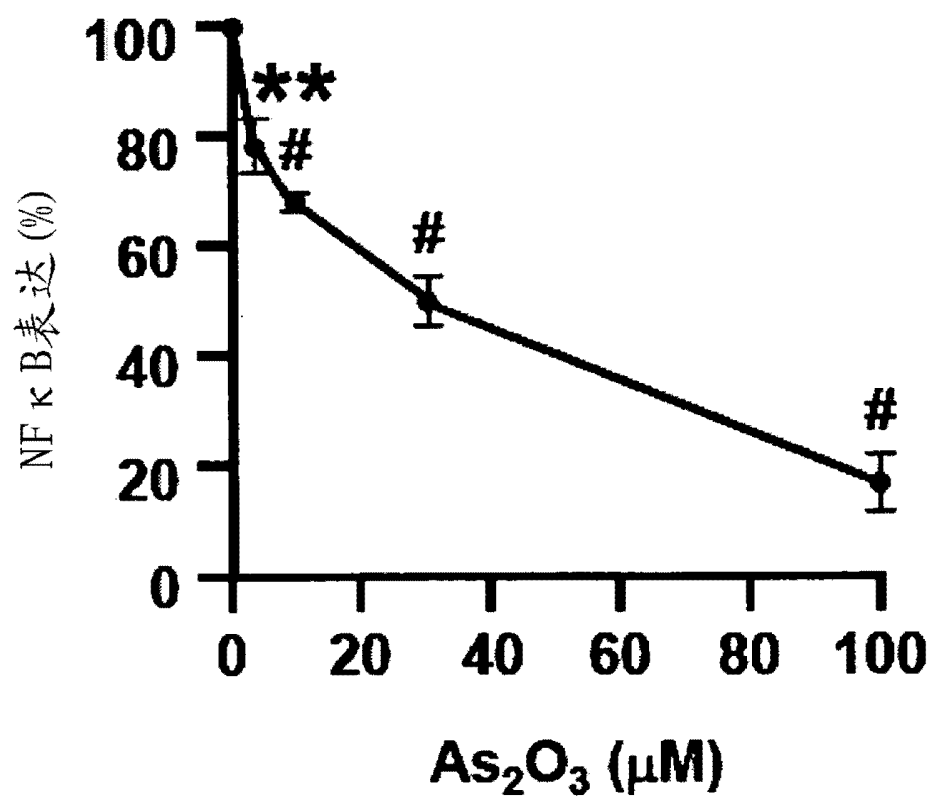


图 6A

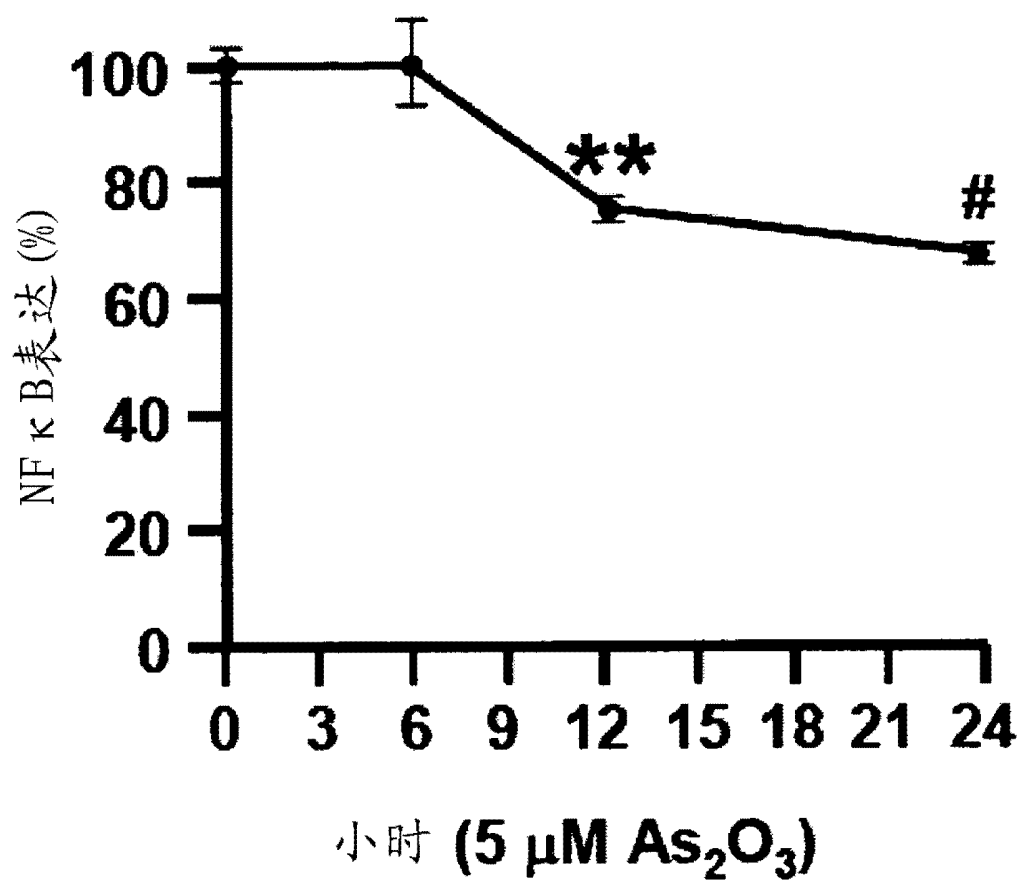


图 6B