[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl[6]
C07D473/04
A61K 31/52

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 93103684.4

[45]授权公告日 1998 年 11 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1040646C

[22]申请日 93.3.4 [24]颁证日 98.6.27
[21]申请号 93103684.4
[30]优先权
[32]92.3.4 [33]US[31]07/846,354
[32]92.8.7 [33]US[31]07/926,665
[73]专利权人 细胞治疗有限公司
地址 美国华盛顿
[72]发明人 J·A·比安科 P·伍德森
D·波卢伯克 J·辛格
[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 黄革生
[56]参考文献
US4833146 1989.5.23 C07D473/06
审查员 43 20

权利要求书 3 页 说明书 61 页 附图页数 22 页

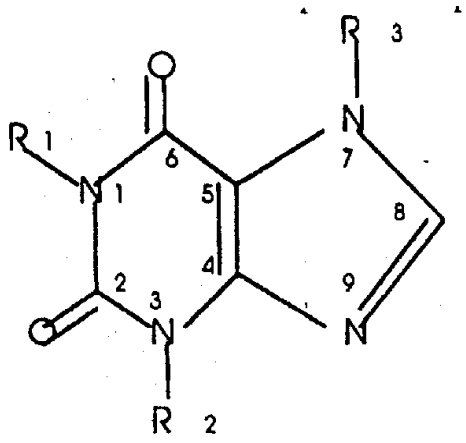
[54]发明名称 对映体羟基化黄嘌呤化合物

[57]摘要

本发明公开了在 3，7-二取代黄嘌呤的 1 位上具有被直链烷基（C_{5-8}）取代的 W-1 醇的拆分 R 或 S（优选 R）对映体的化合物和药组合物。本发明化合物能有效调节细胞对外部或原位刺激的应答，以及对给这种化合物的特定方式应答。

权利要求书

1．一种包含下式结构的取代黄嘌呤化合物：



其中R_1代表独立的实质上不含其它异构体的拆分对映体ω－1仲醇取代的烷基（C_{3-8}），并且各个R_2和R_3独立表示可任意含有一个或两个非相邻的取代替了其中碳原子的氧原子的烷基（C_{1-12}）。

2．权利要求1的化合物，其中R_1代表R－对映体形式具有羟基的C_6烷基。

3．权利要求2的化合物，包括R－1－（5－羟基己基）可可碱。

4．权利要求1的化合物，其中R_1代表R－异构体的6－羟基－庚基或7－羟基辛基。

5．一种药物组合物，包括权利要求1的化合物和药学上可接受的赋形剂，其中药物组合物可被制成适合病人口服，非肠道，活体外或局部给药的制剂。

6．权利要求5的药物组合物，其中化合物的口服剂量为每天约

500mg 至 1500mg，分二或三次给用，非肠道剂量为 24 小时时间内给用约 1.0g 至 5.0g（静脉注射，腹膜内给药，肌内注射，或 S.C.），局部制剂浓度为约 1 % 至 4 % 重量比，且体外培养物浓度为约 10μM 至 500μM .

7.权利要求 1 的化合物在制备用于治疗疾病的药物中的应用.

8.权利要求 7 所述的应用，其中所述疾病通过抑制对外部或原位初次刺激的免疫应答来表征或被治疗，其中所述细胞应答通过特异性磷脂碱化的第二信使作用相邻的细胞的细胞膜的内部小叶来传递.

9.权利要求 7 所述的应用，其中所述疾病选自应答活化致肿瘤基因的肿瘤细胞增生；细胞减少疗法引起的血细胞减少；T 细胞应答或 B 细胞应答和抗体产物引起的自身免疫病；败血性休克；间质细胞对肿瘤坏死因子（TNF）的抵抗；平滑肌细胞，内皮细胞，成纤维细胞及其它细胞种类应答生长因子的增生；动脉粥样硬化，再狭窄，冠状动脉疾病，血管病，人免疫缺陷病毒感染，应答 IL－1 mip-1α，PDGF 或 FGF 的肾小球膜细胞增生；炎症；应答环孢菌素 A 或两性霉素 B 治疗的肾小球或肾小管毒性；应答细胞减少疗法的器官毒性；非烷基化抗肿瘤剂的增大抗肿瘤效应；应答由细胞表面金属蛋白酶的产生表征的或由应答 IgE 的肥大细胞和嗜碱细胞的失粒表征的炎性刺激的变应性，由过多的破骨细胞的破骨细胞活化因子（OAF）引起的骨病，由降低神经肾上腺素和乙酰胆碱的信号传导而引起的 CNS 病，以及它们的结合病症。

10.权利要求 7 所述的应用，它包括制备用于治疗或预防败血性综合症，包括败血性休克的药物.

11.权利要求 7 所述的应用，它包括制备用于治疗或预防由细胞减少疗法引起的白细胞减少或器官毒性的药物.

12.权利要求 7 所述的应用，它包括制备用于治疗或预防由免疫抑制剂，包括环孢菌素 A 和 FK506 引起的副作用的药物.

13.权利要求 7 所述的应用，它包括制备用于治疗由细胞减少疗法引起的秃头，头发损伤或 allopecia .

14.权利要求 7 所述的应用，它包括制备用于治疗疾病的药物，其中所述疾病选自肿瘤负担，激素有关疾病，神经疾病，自身免疫疾病，炎症，再狭窄，高血压，不需要的免疫应答，病毒感染，肾炎，粘膜炎，变应性应答，以及中枢神经系统疾病.

说　明　书

对映体羟基化黄嘌呤化合物

本发明是有关羟基取代的黄嘌呤化合物异构体的发现，该化合物是调节细胞对通过立体专一的细胞第二信使途径传导的刺激的应答的有效剂。更具体讲，本发明化合物是在3，7－二取代的黄嘌呤的1位上具有直链烷基（C_{5-8}）取代的ω－1醇的R或S（优选R）对映体。本发明化合物是控制特异性sn－2不饱和磷脂酸以及应答细胞增生刺激和通过磷脂酸（PA）传导而产生的相应的磷脂酸衍生的二酰基丙三醇的细胞体内含量的有用拮抗剂。

己酮可可碱（1－（5－氧代乙基）－3，7－二甲基黄嘌呤）（简称PTX）是医学上广泛用于增加血流量的黄嘌呤衍生物。美国专利3，422，307和3，737，443公开了PTX。PTX的代谢产物的总结见Davis 等的Applied Environment Microbiol . 48：327，1984。PTX的一种代谢产物为1－（5－羟己基）－3，7－二甲基黄嘌呤（称作M1），以外消旋混合物形式存在。M1（外消旋混合物）已在美国专利4，515，795和4，576，947中被公开用作增加大脑血流量（与仅增加血流量不同）。此外，美国专利4，833，146和5，039，666公开了黄嘌呤的短链叔醇类似物用于增加大脑血流量。在以后的代谢研究中发现能够发生代谢变化的PTX是S对映体。

此外，美国专利4，636，507描述了PTX和M1（外消

旋混合物）对多形核白细胞应答趋化性刺激素的刺激趋化性能力。PTX和有关的叔醇取代的黄嘌呤抑制某些影响趋化性的细胞因子活性（美国专利4，965，271和5，096，906）。进行同种异体骨髓移植时给用PTX和GM－CSF可以降低病人的肿瘤坏死因子（TNF）浓度（Bianco et al. Blood 76：Supplement 1（522A），1990）。降低TNF的可测浓度能够降低与骨髓移植相关的并发症。但是对于正常自愿者，TNF浓度高于这些PTX受者。因而TNF浓度的升高不是产生这种并发症的主要原因。

通常的作法是将具有手性中心的药物以外消旋体形式销售。M1代谢产物除其手性之外仅被公开。事实上，M1显示出仅仅或主要以S异构体形式被制备（在人体内代谢）。以外消旋混合物形式制备和配料药物的方法意味着每种药物的各种剂量被等量通常没有治疗价值但可能会引起意料不到的副作用的异构体污染。例如，镇静药酰胺哌啶酮以外消旋体形式销售。所需的镇静活性属于R－异构体，但污染物S－异构体是致畸胎物，使用这种药物在婴儿生产时会对母亲产生分娩缺损。结核菌抑制药乙胺丁醇的R，R－对映体能够致盲。与非甾族抗炎药苯噁丙酸（Oraflex®）有关的致死副作用已被通过出售纯对映体形式的药物而被避免。

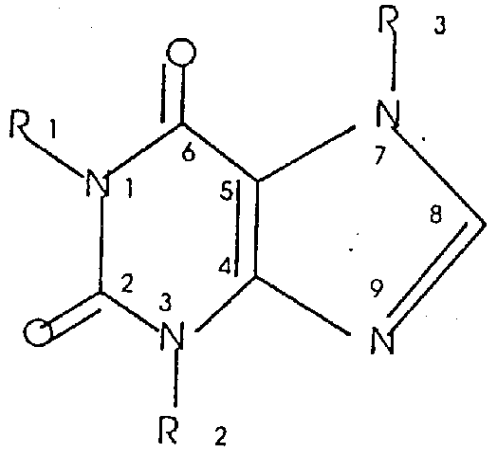
对映体纯的问题并不仅局限于药学领域。例如，ASANA（^{i}Pr二异丙基）是一合成拟除虫菊酯杀虫剂，包含有两个不对称中心。有效的杀虫活性主要归属四种可能的立体异构体中一种。并且三种无杀虫活性的立体异构体对某些植物种类显示出毒性。因此，ASANA仅能以单一立体异构体形式出售，这是由于混合的立体异构体是不合适的。

因此，需要寻求一种对人或动物给药既安全又有效的有效治疗化合物，并能维持各种炎性刺激的表面内细胞体内平衡，并且活性归属于单一异构体的对映体纯。本发明提供了寻找这种化合物的方法。

我们已发现本文所述化合物可用于维持与各种炎症和增生刺激应答的各种靶细胞的体内平衡。此外，本发明化合物和药物组合物适于常规途径治疗给药（如口服，局部和非肠道给药）并提供有效剂量。

本发明化合物和药物组合物为拆分的在3，7－二取代黄嘌呤的1－位上具有直链烷基（C_{5-8}）取代的ω－1醇的R或S（优选R）对映体。本发明化合物能有效地调节细胞对外部或原位的初次刺激的应答，以及对给用有效量这种化合物的具体给药方式的应答。

本发明化合物包括具有下式黄嘌呤母核化合物的化合物和药物组合物：



其中R_1独立表示实质上不含其它异构体的拆分的对映体ω－1仲醇取代的烷基（C_{5-8}），并且R_2和R_3各自独立表示可任意含有一个或两个非相邻的代替碳原子的氧原子的烷基（C_{1-12}）。优选的R_1是具有羟基的C_6烷基的R对映体。

本发明还进一步提供了包含有一种本发明化合物和药学上可接受的赋形剂的药物组合物，其中药物组合物可被制成适于病人口服，非肠道或局部给药的剂型。

本发明进一步提供了治疗患有各种疾病病人的方法，其中所述疾病可通过抑制对外部或原位初次刺激的免疫应答或细胞应答来表征或治疗，其中所述的细胞应答通过特异性磷脂碱化的第二信使作用相邻的细胞的细胞膜的内部小叶来传递。第二信使途径通过应答各种疾病状态的不同有毒或增生刺激特性被活化，这种第二信使途径的生化性质在此处被描述。更具体地说，本发明提供了通过利用此处所述的第二信使途径抑制细胞信号反射来治疗或预防各种疾病状态的临床症状的方法或降低其它疗法的毒性。疾病状态或由治疗诱导的毒性症状选自应答活化致肿瘤基因的肿瘤细胞增生；由细胞减少疗法引起的或由微生物因子感染引起的血细胞减少；由T细胞应答或B细胞应答以及抗体产物引起的自身免疫疾病；败血性休克；间质细胞对肿瘤坏死因子（TNF）的抵抗；细胞活化非调节或非调节细胞生长，如平滑肌细胞，内皮细胞，纤维细胞及其它细胞种类应答生长因子如PDGF-AA，BB，FGF，EGF等而增生（即动脉粥样硬化，再狭窄，中风，以及冠状动脉疾病）；人免疫缺陷病毒感染（艾滋病及艾滋病有关征候群）；应答IL-1，mip-1α，PDGF或FGF的肾小球膜细胞增生导致的各种肾病，炎症；应答环孢菌素A或两性霉素B治疗的肾小球或肾小管毒性；应答细胞减少治疗（如细胞毒性药物或辐射）的器官毒性（如胃肠或肺上皮毒性）；应答由细胞表面金属蛋白酶的产生表征的或由应答Ig.E的肥大细胞和嗜碱细胞的失粒表征的炎性刺激的变应性，由过多的破骨细胞活化因子（OAF）引起的

骨病，由降低神经肾上腺素和乙酰胆碱的信号传导而引起的ＣＮＳ病，以及它们的结合病症。

当细胞被刺激去表示特定的细胞因子或应答增生性或有害刺激的增生时，该过程通过特异性磷脂碱化的第二信使信号途径传递。这种第二信使途径引起含有sn－２非花生四烯酸酯不饱和现象的磷脂酸（ＰＡ）的亚群浓度升高，所述磷脂酸迅速转换成其相应的二酰基丙三醇（ＤＡＧ）。本发明化合物和药物组合物特别抑制在上述第二信使途径中所涉及的立体专一酶而不影响在细胞正常辅助功能中所涉及的其它第二信使途径，如磷脂酰肌醇（ＰＩ）途径。抑制一种或几种在此处所述的第二信使途径中所涉及的酶的结果就是靶细胞对刺激，尤其是有害刺激的应答的“调节”。生物化学活动（即抑制应答初次刺激的第二信使途径酶如细胞因子的活性）产生细胞信号并引起一种对多种可变化疾病的作用，这种作用是反常的，炎性或有害细胞信号机理的结果。

附图１说明了ＣＴ１５０１Ｒ（Ｒ－（－）（５－羟基己基）－可可碱）和ＰＴＸ的混合淋巴反应。混合淋巴反应说明在用两种方式混合的淋巴反应下所测定的ＰＢＭＣ（末梢血液单核细胞）对同种刺激作用的增生性应答。ＣＴ１５０１Ｒ和ＰＴＸ在该免疫调节活性试验过程中都显示出剂量应答。

附图２显示了ＣＴ１５０１Ｒ对由抗鼠（anti－mu）抗体交联和／或白细胞介素－４（ＩＬ－４）刺激的鼠Ｂ－细胞增生的抑制作用。附图２说明ＣＴ１５０１Ｒ可以抑制由表现的增生性信号引起的Ｂ－细胞增生。

附图３显示了ＣＴ１５０１Ｒ抑制由伴刀豆球蛋白Ａ（ConＡ）

和白细胞介素－1α（ＩＬ－1α）或白细胞介素2（ＩＬ－2）引起的增生效果。在用ConA和ＩＬ－1α或ＩＬ－2活化之前两小时向细胞中加入预定剂量的ＣＴ１５０１Ｒ。如附图3所示CT１５０１Ｒ抑制胸腺细胞以剂量应答方式增生。本底计数少于２００cpm。

附图4显示了ＣＴ１５０１Ｒ和ＰＴＸ对由ＰＤＧＦ（血小板来源的生长因子）和ＩＬ－1刺激产生的平滑肌增生的抑制作用。在用ＰＤＧＦ和ＩＬ－1活化之前两小时将ＣＴ１５０１Ｒ和ＰＴＸ分别加入到细胞中。如附图4所示，在较高剂量试验时，两种药抑制平滑肌细胞增生。ＣＴ１５０１Ｒ比ＰＴＸ具有较高活性。

附图5显示了ＣＴ１５０１Ｒ对由内毒性诱发的老鼠致死率的抑制，以多达6组独立试验中老鼠的累积的百分存活率表示（Ｎ＝试验编号）。动物用１０μg／gm ＬＰＳ处理（静脉注射），立即将经过ＬＰＳ（ｔ＝０），ＬＰＳ后2小时（ｔ＝２）或ＬＰＳ后4小时（ｔ＝４）的老鼠进行它们的第一次用ＣＴ１５０１Ｒ（１００mg／Kg，腹膜内）处理的处理。然后老鼠用ＣＴ１５０１Ｒ每天处理三次，观察动物的存活率。

附图6显示了经内毒素处理后鼠血清ＴＮＦ－α含量。各点代表根据二乘平均ＥＬＩＳＡ测量法计算的两次试验的平均值，且各个试验点表示取自三只老鼠的混合血浆。

附图7图示了由老鼠血浆ＩＬ－1α· ＥＬＩＳＡ测量法所得数据，数据采用单一试验利用二乘平均ＥＬＩＳＡ测量法计算得到，且各点代表取自三只老鼠的混合血清。

附图8图示了由鼠血浆ＩＬ－6　ＥＬＩＳＡ测量法所得数值。数值采用单一试验利用二乘平均ＥＬＩＳＡ测量法计算得到，各点表

示取自三只老鼠的混合血浆。

附图9图示了CT1501R大规模合成步骤I艺流程图。

附图10图示了在第0天用5－氟尿嘧啶处理，从第1天开始用CT1501R或载体对照物每天处理二次的老鼠的平均WBC值。该试验（见附图10－13中所述）为体内血细胞生成模型。在每一时点对含四只老鼠的小组进行静脉切开放血术。图中数值代表平均值±1SD。

附图11图示了在第0天用5－氟尿嘧啶处理，从第0天开始每天用CT1501R或载体对照物处理两次的老鼠的血小板平均数量。在每一时点对四只老鼠的小组进行静脉切开放血术。图中数据代表平均值±1SD。

附图12图示了从第0天起每天两次用CT1501R或载体对照物处理的老鼠的平均绝对中性白细胞数。在每一时点对四只老鼠的小组进行静脉切开放血术。图中数据代表平均值±SD。

附图13图示了在第0天用5－氟尿嘧啶处理，从第0天开始每天用CT1501R或载体对照物处理两次的老鼠的平均CFU－GM／股骨。在各时点将四只老鼠组杀死并收集其中一只股骨。图中数据代表在三种相同培养基中的一种内试验的每次每个单体的集群的平均数的平均值±1SD。

附图15和16图示了CT1501R与Genentech 制备的另一种败血症休克药物双功能TNT受体的公开结果（Ashkenazi et al.，proc. Natl. Acad. Sci. USA 88：10535，1991）的比较。两种药物在给用致死的LPS（内毒素）后几乎同时服用（附图15）或两小时给用（附图16）。在该系列体内比较试验中，

与药物服用时间无关，ＣＴ１５０１Ｒ始终比Genentech's ＴＮＦ受体具有较高的改进存活率。

附图１７图示了ＣＴ１５０１Ｒ，其Ｓ异构体ＣＴ１５０１Ｓ，以及ＰＴＸ对溶血磷脂酸酰基转移酶（ＬＰＡＡＴ）（一种在第二信使信号中所涉及的酶）的体外抑制比较。如图所示，仅有CT１５０１Ｒ在临床应用中可使用的ＩＣ$_{50}$浓度时能明显抑制酶活性。LPAAT 的活性在使用ＩＬ－１β刺激３Ｔ３ Ｒas－变化的成纤维细胞的情况下测量。

附图１８图示了ＣＴ１５０１Ｒ对从ＬＰＳ活化的老鼠腹膜巨噬细胞中释放的ＴＮＦ－α抑制的剂量应答。分离细胞并在ＬＰＳ活化（１０mg／ml）前一小时使用或不用不同浓度的ＣＴ１５０１Ｒ处理。２４小时后收集上层前液利用ＥＬＩＳＡ测定ＴＮＦ－α（＋／－ＳＤ）。

附图１９图示了ＣＴ１５０１Ｒ对ＴＮＦ－α从ＬＰＳ活化的ＰＥＣ中释放抑制。将细胞分离并在用１０μg／ml ＬＰＳ活化前一小时使用或不用２５０μM ＣＴ１５０１Ｒ处理。不同时间后，采集上层清液并利用ＥＬＩＳＡ测定ＩＬ－α（＋／－ＳＤ）。

附图２０图示了ＴＮＦ－α从ＩＬ－１－α活化的鼠腹膜巨噬细胞中释放的抑制。将细胞分离并在ＩＬ－１－α活化前１小时使用或不用ＣＴ１５０１Ｒ（２５０μM）处理。在活化后２４，４８或７２ hrs 收集上层清液，利用ＥＬＩＳＡ测定ＴＮＦ－α（＋／－ＳＤ）。

附图２１图示了Ｕ９３７细胞对活化的ＨＵＶＥＣ粘连的抑制。ＨＵＶＥＣ用或者ＩＬ－１－α（１００ｎｇ／ml）；ＴＮＦ－α

（10ng／ml）或者LPS（10mg／ml）刺激，在加入所述刺激物之前1小时加入或不加入250μM CT1501R。12小时后，测定细胞对载有BCECF的U937细胞的粘连。附图21为各处理组的相对BCECF荧光（+／－SD）。

附图22图示了抑制活化U937细胞对HUVEC的粘连。U937细胞用不同浓度的IL－1－α刺激，在加入IL－1－α之前一小时先加入或不加入250μM CT1501R。十二小时后，U937细胞用BCECF染色，并允许与HUVEC粘连。附图22表示各个处理组的相对BCECF荧光（+／－SD）。

本发明目的在于限定能够通过二次信使途径系统的特定期来控制细胞行为的本发明化合物的种类（Bursten et al.。J.Biol. Chem. 266：20732，1991）。第二信使为脂类或磷脂并使用下列缩写词：

PE＝磷脂酰乙醇胺

LPE＝溶血磷脂酰乙醇胺（lysophosphoethanolamine）

PA＝磷脂酸

LPA＝溶血磷脂酸

DAG＝二酰基丙三醇

LPLD＝溶血磷脂酶D

LPAAT＝溶血磷脂酸酰基转移酶

PAPH＝磷脂酸磷酸水解酶

PLA2＝磷脂酶A－2

PLD＝磷脂酶D

PAA＝磷酸花生四烯酸

PLA－2＝磷脂酶A 2

PC＝磷脂酰胆碱

“重组”（“remodeled”）PA，环路二PAA，LPA，PA和DAG中间体，它们在指示sn－1和sn－2位置被L－饱和的，2－亚油酰基或1，2－dileolyl／1，2－sn－二亚油酰基取代。

“经典PI途径”＝被1－硬脂酰基，2－花生四烯酰基脂肪酰基侧链取代的PI，DAG，PA中间体。

“PLD导致的PA”＝被，例如，1，2－sn－dileolyl－，1－烷基，2－亚油酰基－，以及1－烷基，2－二十二碳六烯酰基侧链取代的PE，PC，LPA，PA和DAG中间体。

溶血磷脂酸转移酶（LPAAT）影响通过结合酰基CoA 中的酰基基团由溶血磷脂酸（LPA）到磷脂酸的合成。通过PA磷酸水解酶（PAPH）水解磷酸酯部分导致DAG形成。该途径的这些方面可通过初次刺激物（例如细胞因子如IL－1，IL－2或TNF）对细胞表面上的受体作用的刺激立即活化（一分钟内）。中间体可检测的现象是PA和DAG的浓度增大。给用本发明化合物可逆转这种升高。

本发明化合物和药物组合物包括LPAAT亚种对具有1，2－二不饱和的以及1－烷基，2－不饱和的亚种的中间体具有酶作用物特异性的PHPH酶中的抑制剂。这种抑制剂（但不属于本发明化合物种类）的一个代表性例子为PTX。PTX以特异活化途径阻滞PAPH，所述途径不涉及PI而由主要由1，2－二不饱和的和1－烷基，2－不饱和的亚种组成的PA衍生得到。这种结果例如可通过在没有PTX存在和PTX存在下用TNF刺激人肾小球膜细胞从

ＰＩ和再生ＰＩ生成的ＤＡＧ证明显示。在后一种体系中，没有证据证明ＰＡ或ＤＡＧ是从ＰＩ除外的来源衍生得到。应当强调的是本发明化合物影响与ｓｎ－２位上具有不饱和脂肪酸而不是花生四烯酸酯的酶作用物有关的ＰＡＰＨ和ＬＰＡＡＴ亚群，而不影响那些适合ＰＩ 途径的酶的辅助形式。

由于血浆膜的环状重组以及各个亚类的循环使得各个磷脂亚种膜（如ＰＡ，ＰＩ，ＰＥ，ＰＣ和ＰＳ）获达稳定含量的特异脂肪酰基侧链。ＰＡ通常是稳定的，但存在量相对较小。休止细胞中的ＰＡ主要由饱和酰基链组成，所述酰基链通常包括十四（烷）酸盐，硬脂酸盐和十六（烷）酸。在休止细胞内，ＰＣ酰基侧链主要包括在sn－１位上的酰基十六烷酸和ｓｎ－２位上的油酸盐。ＰＥ和ＰＩ主要由ｓｎ－１硬脂酸盐和ｓｎ－２花生烯酸盐组成。

因为这种在ｓｎ－１和ｓｎ－２位置上酰基基团的特定成份，任何ＰＡ种的起源可从它的ｓｎ－１和ｓｎ－２位置上的酰基基团的化学性质推断得到。例如，如果ＰＡ是通过酶ＰＬＤ的作用从ＰＣ衍生得到，则ＰＡ将含有ＰＣ酶作用物的特性酰基侧链，所述酶作用物通过第二信使途径传递。并且，任何１，２－ｓｎ－酶作用物种类的起源可被识别出其来源。然而，重要的是要知道是还是不是每种磷脂种类在水解成ＤＡＧ之前通过ＰＡ型传递。能被转换成ＰＡ并因此转换成ＤＡＧ的溶血磷脂酸可用于证明。这种第二信使途径的复杂性可通过在第二信使途径的刺激作用后的不同时刻，经对细胞内中间体的脂肪酰基侧链化学性质的适当分析（即采用薄层色谱或高压液相色谱法分析）来分类。

要某些系膜细胞，如中性白细胞和鼠或人系膜细胞中，几种信号

途径可一前一后地，同时或二者都存在情况下被活化。例如，在中性白细胞内，通过ＰＬＤ的作用，Ｆ－Met－Leu－Phe 刺激ＰＡ的形成，一段时间后继之通过ＰＡＰＨ的作用形成ＤＡＧ。几分钟后，通过经典磷酸肌醇途径由ＰＩ产生ＤＡＧ。在许多细胞内，ＤＡＧ是从两种通过环路，利用它，ＰＡＡ被ＰＬＡ－２在ｓｎ－２水解，继之被ＬＰＡＡＡ在ｓｎ－２进行转酰作用，以及由通过ＰＬＤ从ＰＥ或ＰＣ或两种酶作用物产生的ＰＡ制备的ＰＬＤ途径被重组的ＰＡ衍生得到。

根据酰基链的组成此处所述的方法能够区分ＰＡ和ＤＡＧ的不同亚种。该方法可以区分那些能将该第二信使途径从其它途径，如经典ＰＩ途径中活化（以及抑制活化）的化合物。该第二信使途径包含在ｓｎ－２位上具有不饱和脂肪酸而非花生四烯酸盐的酶作用物以及那些在正常细胞辅助功能中不涉及的ＰＡＰＨ和ＬＰＡＡＴ亚种，正常细胞辅助功能是经典ＰＩ途径的一部分。包含在该第二信使途径中的ＰＡＰＨ和ＬＰＡＡＴ酶对不同的酰基侧链和酶作用物的异构体形式具有强烈的立体专一性。因此本发明化合物为基本上对映体纯，且在与羟基键合的手性碳子上优选Ｒ对映体。例如，ＣＴ１５０１的Ｒ和Ｓ异构体具有不同的ＬＰＡＡＴ抑制活性（如附图１２所示）。并且，ＣＴ１５０１的Ｒ对映体（例如ＣＴ１５０１Ｒ）的活性比外消旋混合物（此处称作Ｍ１）高二至三倍，比相应的Ｓ对映体高若干倍。此外，当在人体内代谢时ＰＴＸ几乎仅转换成Ｍ１的Ｓ对映体或ＣＴ１５０１Ｓ。

利用ＰＡ／ＤＡＧ途径，在高ＰＴＸ浓度下（大于病人体内能得到的并没有剂量限制副作用的ＰＴＸ浓度）通过阻滞在ＬＰＡＡＴ中

PA亚种的形成，PTX（体内）阻滞重组PA形成。即使在PTX存在下，通过PLD的作用，细胞继续形成PA，通过磷脂酶C对PC和PI的作用，DAG也被形成。本发明化合物或PTX不抑制后一种途径。在PTX处理过的细胞内，DAG通过重组得到且由PLA产生的PA减少（如1，2－sn－dioleoyl DAG，1－烷基，2－亚油酰基DAG以及1－烷基，2－docosahexaneolyl DAG）。因此，通过选择抑制特异性第二信使途径，本发明化合物和PTX抑制仅仅一定的PA和DAG种类的形成，所述第二信使途径仅在细胞中通过有毒刺激被活化，但不用于传递正常细胞辅助功能信号。

对由各种有毒性刺激初次活化的特异性第二信使途径的活化的专一性抑制使得本发明化合物具有用于治疗多种临床指症的能力。此外，此处所提供的体内和体外资料对具有共同的特异性第二信使途径的活化特征的多种临床指症提供了预见性资料，由通过，例如，炎性细胞因子传递的有毒刺激而活化的特异性第二信使途径被本发明化合物专一抑制。事实上，本发明化合物的这种作用机理能够解释为什么本发明化合物能够对多种不同临床指症有治疗能力。该第二信使途径的活化是应答有毒刺激的主要传递器并产生导致，例如，炎症，免疫应答，抑制血细胞再生和癌细胞生长的细胞信号。但是，不是所有抑制剂能抑制所有这种第二信使途径酶。本发明化合物是最有效的炎症和抑制血细胞再生的传递器。这种第二信使途径传递的信号包括，例如，那些对LPS的直接细胞应答，由抗原产生的T细胞活化，由抗原产生的B细胞活化，对通过IL－1. 1型受体（非IL－1 2型受体）传递的IL－1的细胞应答，TNF 1型受体，活化致癌基因（如

ras，abl，her 2 －neu 等等），低类缘ＧＭ－ＣＳＦ（粒细胞巨噬细胞集落生长刺激因子）受体，以及由ＰＤＧＦ，ｂ－ＦＧＦ和ＩＬ－１刺激引起的平滑肌细胞增生。还有一些其它不是通过这种第二信使途径传递的信号，这些信号包括由Ｇ－ＣＳＦ（粒细胞集落生长刺激因子），白细胞间素３（ＩＬ－３），ＳＣＦ（干细胞因子）和ＧＭ－ＣＳＦ诱导的血细胞生成的细胞增生；由白细胞间素８（ＩＬ－８）或白细胞三烯Ｂ４诱导的中性白细胞增生；应答ＩＬ－２的Ｔ细胞增生；以及应答酸性ＦＧＦ（成纤维细胞生长因子）的内皮细胞增生。

在体外，本发明化合物：（１）阻滞通过如所示的１型受体的ＩＬ－１信号转动变异，例如，通过防止ＩＬ－１和ＩＬ－１外加ＰＤＧＦ（血小板源生长因子）诱导的平滑肌细胞和肾小球膜细胞的增生来阻滞ＩＬ－１信号转动变异；（２）抑制如所示的粘连分子的调节，例如，通过在中性细胞中阻滞ＣＤ１８内皮细胞内的ＶＣＡＭ来抑制；（３）抑制ＴＮＦ和ＩＬ－１诱导的金属蛋白酶（一种炎症模型）；（４）阻滞ＬＰＳ诱导的细胞活化（用于预防和治疗败血性休克）；（５）抑制由抗原或交联ＣＤ３复症引起的Ｔ细胞和Ｂ细胞活化；（６）抑制由ＩｇＥ引起的肥大细胞；以及（７）抑制转移细胞（transformed cells）和肿瘤细胞系中的恶性显型。

上述的体外作用产生下述体内生物作用，包括，但不仅限于此，保护和治疗内毒性素休克，抑制肿瘤细胞生长，通过细胞减少疗法刺激血细胞生长，对防治ＧＶＨＤ（移植物抗宿主病）的协同免疫抑制，通过apoptotic 过程逆转刺激头发生长。这里所提供的体内试验资料表明对裸鼠模型具有保护和治疗内毒性休克，经细胞减少疗法刺激血

细胞生长以及刺激头发生长。本发明化合物，尤其是CT1501R在局部用于刺激血细胞生长，防治和治疗败血性休克以及刺激头发生长时最有效。对于免疫抑制，急性炎症，慢性炎症以及GVHD，尽管所述的第二信使途径的抑制剂具有这种活性，但本发明化合物活性较低并需要较高摩尔浓度。

本发明化合物也可用作佐剂以抑制药物的毒性副作用，药物的副作用是通过所述的第二信使途径传递。这些副作用包括，例如，白细胞介毒－2（IL－2）副作用，环孢菌素A和FK506的肾副作用，以及两性霉素B的副作用。应该注意本发明化合物象环孢菌素或FK506一样抑制抗原诱导的T细胞活化，但与环孢菌素或FK506不一样的是不防止NK和LAK细胞的产生，不抑制T细胞中IL－2释放以及不抑制IL－8释放。

金属蛋白酶间接组织损伤如肾小球疾病，关节的关节炎损伤，以及肺的肺气肿损伤对肿瘤转移起一定作用。三种金属蛋白酶例子包括由TNF，IL－1及PDGF加上bFGF诱导的92KD　V型明胶酶，通常由TNF或IL－1组成并诱导的72KD　IV型明胶酶，以及由TNF和IL－1诱导的stromelysin／PUMP－1。此外，CT1501R将由100U／ml　IL－1诱导的PUMP－1活性降低至其对照浓度的15%。相反在同一试验中，PTX仅将PUMP－1的活性抑制至其对比浓度的95%，这是不明显的。因此，本发明化合物能防止某些由IL－1或TNF诱导的金属蛋白酶的诱导，且基本上不涉及包含在正常组织重组中产生的蛋白酶（如，72KD　IV型明胶酶）。

本发明化合物可以抑制由I型IL－1受体传递的信号转动变异，

并因而被认作ＩＬ－１拮抗剂。最近标题为“The Role of Interleukin－１ in Disease”（Dinarello and Wolff N．Engl．J．Med．３２８，１０６，Jan．１４，１９９３）的综述论文描述了ＩＬ－１作为“一种重要的快速直接疾病决定簇”的作用，“例如，对于败血性休克，ＩＬ－１直接对血管作用，通过迅速产生血小板因子和氧化氮诱导血管舒张，而对于自身免疫疾病，ＩＬ－１通过刺激其它细胞来作用，产生细胞因子或酶。产生的细胞因子或酶然后对靶组织作用”。该论文描述了一组由ＩＬ－１传导的疾病，包括浓毒病综合症，类风湿性关节炎、炎症性肠病，急性和髓细胞性白细胞，胰岛素依赖性糖尿病晚期合并症，动脉粥样硬化以及其它包括移植排斥，移植物抗宿主病（ＧＶＨＤ），牛皮癣，哮喘，骨质疏松，牙周炎，自身免疫性甲状腺炎，酒精中毒性肝炎，早产后子宫感染（Premature labor Secondary to uterine infection）以及连续睡眠症（even sleep disorders）等疾病。由于本发明化合物能抑制通过ＩＬ－１　１型受体的细胞信号并为ＩＬ－１拮抗剂，因此本发明化合物可用于治疗所有上述疾病。

例如，对于浓毒性综合症，“ＩＬ－１诱导休克的机理被认为是ＩＬ－１增大介体小分子的血浆浓度的能力，这些小分子如血小板活化因子，前列腺素和氧化氮。这些物质对实验动物是有效的血管舒张药并能诱导休克症。阻滞ＩＬ－１作用可以防止合成以及释放这些介体。对于动物，单独静脉注射ＩＬ－１能降低平均动脉压，降低系流血管阻力以及诱导白细胞减少和血小板减少。对于人，静脉给用ＩＬ－１也能迅速降血压，但每千克体重３００ng 或更大剂量可能引起严重高血压”，“阻滞ＩＬ－１作用的治疗优点归属于可防止其有害

的生物作用，而不影响在体内平衡起作用的分子产生”。本发明化合物通过抑制仅通过ＩＬ－１　Ｉ型受体而不通过ＩＬ－１　Ⅱ型受体的细胞信号编址由Dinarello 发现的需要。

对于类风湿性关节炎，Dinarello 指出：“在患有类风湿性关节炎病人的滑液衬里（Syn ovial lining）和滑液中存在有白细胞介素－１，从这类病人体内移出滑液组织在体内产生ＩＬ－１。白细胞介素１的关节内排斥对动物诱导白细胞浸润，软骨断裂，以及关节周骨改型。在体外分离的软骨和骨细胞内，白细胞介素１触发基因对明胶酶以及磷脂酶和环氧合酶的表现，并阻滞其作用，降低老鼠细菌性细胞壁诱导的关节炎”。因此，本发明化合物作为ＩＬ－１拮抗剂可用于治疗和预防类风湿性关节炎。

关于炎症性肠病，溃疡性结肠炎和Crohn 病特征在于含有活化的中性白细胞和巨噬细胞的肠的浸润性损伤。ＩＬ－１能够刺激炎性廿烷类产生，所述廿烷类如前列腺素E_2（PGE_2）和白细胞三烯B_4（LTB_4）以及ＩＬ－８（一种具有中性白细胞化学吸引剂和中性白细胞刺激物特性的炎性细胞因子）。ＰＧＥ２和ＬＴＢ４的组织浓度与患溃疡性结肠炎的病人的病情有关，患有炎症性肠病的病人具有高的ＩＬ－１和ＩＬ－８的组织浓度。因此，ＩＬ－１拮抗剂，如本发明化合物，能够有效治疗炎症性肠病。

对于急性和慢性髓细胞性白血病，越来越多的证据表明对于这种肿瘤细胞，ＩＬ－１相当于一生长因子。因此本发明化合物应当能有效防止急性和慢性髓细胞性白血病的恶化。

胰岛素依赖性糖尿病晚期合并症（ＩＤＤＭ）被认为是由免疫活性细胞传递的胰岛内β细胞变性的自身免疫病。患有自发性ＩＤＤＭ

的动物（如ＢＢ鼠或ＮＯＤ鼠）的小岛中存在着含有ＩＬ－１的炎性细胞。因此本发明化合物应当能用于预防和治疗ＩＤＤＭ。

ＩＬ－１也对动脉粥样硬化的发育起一定的作用。内皮细胞为ＩＬ－１靶。ＩＬ－１刺激血管平滑肌细胞增生。泡沫细胞从含有ＩＬ－１β和ＩＬ－Ｉβ信使ＲＮＡ的血胆固醇过多的鼠的脂肪动脉斑中分离得到。这些细胞摄取周围血单核细胞导致ＩＬ－１产物产生。ＩＬ－１也刺激ＰＤＧＦ的产生。总之，ＩＬ－１对动脉粥样硬化的发育起部分作用。因此，ＩＬ－１拮抗剂，如本发明化合物应能够用于预防和治疗动脉粥样硬化。

体外测试本发明化合物的生理及药理效应试验

利用不同的细胞类型，多种体外试验可用于测定本发明化合物调节（module）免疫活性以及抗肿瘤活性的效应。例如，混合淋巴细胞反应（ＭＬＲ）提供了一种有价值的测定各个发明化合物生物活性的荧光屏检查工具。在ＭＬＲ中，ＰＢＭＣs（周围血单核细胞）通过在肝素化容器中从健康自愿者体中抽出全部血液而得到，并用等体积控制（hanks）平衡盐溶液（ＨＢＳＳ）稀释。在室温或冷却下将该混合物经蔗糖密度梯度法，如Ficoll Hypaque® 梯度（比重１.０８）分层，并在１０００×ｇ下离心２５分钟。ＰＢＭＣ从血浆－Ficoll界层间的带状物中得到，分离并用盐水溶液如ＨＢＳＳ至少洗涤两次。溶解污染的红细胞，如用ＡＣＫ在３７℃溶解１０分钟，ＰＢＭＣs用ＨＢＳＳ洗涤两次。将纯化ＰＢＭＣs 小丸再悬浮在全培养基中，如ＲＰＭＩ１６５４０加上２０％人灭活血清。ＰＢＭＣ对同种刺激应答增生可用在一９６孔微量滴定离心板中进行的两种方式ＭＬＲ测定。简言之，将处在２００μl 全培养基中的大约１０^{5} 试验用纯化

ＰＢＭＣ细胞用约１０^5 自身固有的（对照培养物）或同种的（刺激培养物）ＰＢＭＣ细胞共同培养，其中同种细胞来自ＨＬＡ不同单体。在细胞加到微量滴定离心板中时加入变剂量的化合物（药物）。培养物在５％CO_2 气氛中于３７℃温育６天。在温育终结时加入氚化胸苷（例如，４０至６０Ci／mmole 的１μCi／well）。通过液态闪烁计数测定增生。

胸腺细胞辅助刺激因子试验旨在评估本发明化合物抑制由ConA和白细胞介素１（ＩＬ－１），或白细胞介素２（ＩＬ－２）刺激引起的胸腺细胞的活化和增生。胸腺从老鼠（如雌性Blab／Ｃ鼠）中获得，将胸腺切除并离解到培养基中（如无血清附加物的ＲＰＭＩ１６４０）。离解的胸腺组织和细胞悬浮液转移至离子管中使其静置沉淀，用ＨＢＳＳ洗涤，然后再悬浮在有血清补充的培养基（如具有１０％胎儿腓肠血清的ＲＰＭＩ １６４０）。溶解任何污染的红细胞，将活细胞再悬浮并计数。平皿培养胸腺细胞（如密度为２×10^5 细胞／每孔的９６孔滴定板），向孔中加入刺激物，如ConA，ＩＬ－１（如ＩＬ－１α）或ＩＬ－２。该细胞在３７℃温育４天，在第四天，细胞用氚代胸苷脉冲并测定细胞增生。本发明化合物在刺激剂加入时加入。

通过测定生物活性试验的适宜剂量以及防止体外活性试验中的细胞毒性反应研究了本发明的各个化合物的细胞毒性。将细胞（如NIH－３Ｔ３，Ras 变形３Ｔ３细胞，恶性黑素瘤ＬＤ２细胞，等）加到微量滴定离心板内，平皿培养约二天后加入药物。利用荧光活性染剂（如２′，７′－二－（２－羟乙基）－５－（和－６）－羟基荧光生乙酰氧甲基酯（２′，７′－bis－（２－carboroxyethyl）－

5－（and－6）－carboxyfluorescein acetoxymethyl ester），BCECF在488nm 激发，525nm 放射），在药物加入后24，48或72小时测定细胞活力。

另一种测量本发明化合物活性的试验包括利用人源间质细胞测定PDGF（血小板源生长因子）增生应答。将人间质细胞在规定培养基（如69%McCoy 培养基，12.5%胎儿腓膀血清，12.5%马血清，1%抗生素，1%谷氨酰胺，1%维它命附加物，0.8%必需氨基酸，1%丙酮酸钠，1%碳酸氢钠，0.4%非必需氨基酸和0.36%氢化可的松）中平皿培养（如每孔约2000细胞）。二至三天后，间质细胞在无血清培养基中禁食。二十四小时后，细胞用刺激剂如PDGF－AA，PDGF－BB或具有或没有IL－1α或TNF的基础GFG（纤维母细胞生长因子），以及氚化胸苷处理。利用液态闪烁计数法测定细胞增生。

B 细胞增生试验测定本发明化合物对由抗mu 抗体（40μg／ml），IL－4或PMA（2.5mM）刺激的刺激B细胞增生的抑制效应。分支B细胞肿瘤细胞或鼠脾细胞用刺激剂，一种本发明化合物和氚化胸苷温育，测量对由刺激剂引起的细胞增生的抑制。

也可通过测量刺激细胞内血管细胞粘连分子（VCAM）的浓度来测量药物抑制活性。将早期传代（Early passage）人脐静脉内皮样细胞（HUVEC）（从商业供应得到，如Cell Systems，Inc. or Clonetics）在含有10%胎儿腓膀血清的培养基（如Hepes 缓冲培养基，Cell Systems）中培养，并补充有刺激剂，这种刺激剂如纤维母细胞生长因子（基础FGF，Cell Systems Inc.）或TNF。细胞在微量滴定离心板的孔中培养（如每孔5×10^4）并在37℃

温育72hrs。移出休止细胞（如用0．4%EDTA处理20－30分钟），在培养基（如磷酸盐缓冲盐水加上含有0．01%叠氮化钠的0．1%牛血清蛋白）中洗涤并标记在含有能识别人VCAM的单克隆抗体（“第一抗体”）的冰上（如1μg 能识别人VCAM的单克隆抗体，Genzyme）。在冰上60分钟后，细胞用凉洗涤培养基洗涤（最好两次）并使用能识别第一抗体的抗体温育（如1μg 与藻红蛋白结合的山羊抗鼠IgG，Cal Tag，Inc）。在冰上30分钟后，将细胞洗涤两次并利用流动白细胞计数器（Coulter Elite® ）在适当的放射和激发波长分析（如对于藻红蛋白使用在488nm 激发和525nm 的发射）。

一种体外试验用于测量相关酶溶血磷脂酸酰基转移酶（LPAAT）和磷脂酸磷酸水解酶（PAPH）的抑制。该试验包括在可变剂量浓度的一种本发明化合物的存在下或无本发明化合物存在下用一种初次刺激（如各种细胞因子，生长因子，肿瘤基因产物，公认治疗剂，辐射，病毒感染，毒素，细菌感染及其产物，以及任何，如果不对抗，对靶细胞有有害作用的刺激）温育靶细胞。靶细胞包括，例如，亚细胞体，如由间质和／或外胚层细胞衍生的微粒体，特别是从骨髓基质细胞或人或鼠的肾小球膜细胞衍生的微粒体；由脑衍生的微粒体或突触体；富含质膜的微粒体（plasma membraneenriched microsomes），质膜－膜按Bursten 等（J．Biol．Chem．226：20732－20743，1991）所述取得，或去污加溶微粒体，突触体，和膜或其它利用，例如，NP－40，Miranal，SDS或其它中性去污剂加溶的细胞制品；以及去污加溶，重组体，或进一步纯化的细胞蛋白质制品，包括蛋白质LPAAT和／或PAPH。短时间温育后，

提取细胞脂质并按照常规方法利用薄层色谱测定。简言之，将脂质用例如氯仿：甲醇2：1（V／V）提取，提取物然后按照Bursten 和Harris，Biochemistry 30：6195－6203，1991中所述进行HPLC。使用含有3：4己烷：丙醇有机载体的Raining® mu－Porasil 柱，在分离的起初10分钟内用1－10%水梯度洗脱，洗脱曲线中峰通过检测孤立双键在紫外线范围内的吸收来检测。相关的不饱和PA和DAG的峰见洗脱曲线中所示。重要的是应注意该试验方法允许区别PA和DAG的不同形式，这样那些与本发明的（R）或（S）化合物所影响的途径有关的PA和DAG可直接被测量。利用快原子轰击质谱确定这些组份的酰基取代基性质。因而可以检测相关的不饱和（非花生四烯酸类）PA和DAG亚种。所用时间周期为刺激刺激物如细胞因子刺激后5－60秒。这种技术容许评估各种脂质体组分的浓度与时间的函数关系。

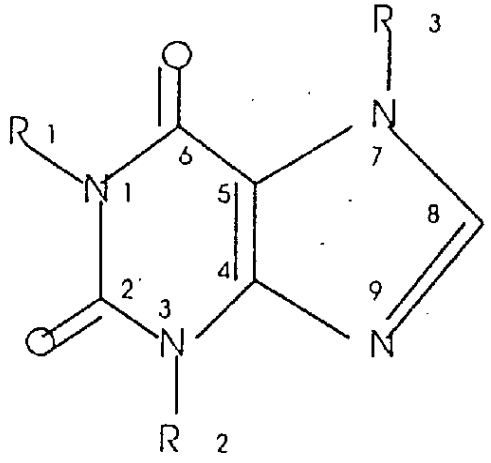
可以测试本发明化合物保护TNF传递的细胞因子的活性。在该试验中，将L929鼠成纤维细胞（每孔$1\ 0^4$ 细胞）用可变剂量的化合物或培养基对照物温育2小时。加入浓度为500pg／ml 的TNF－α（R& D Systems），该浓度为TNF的LD50（125 pg／ml）的四倍。含有（或不含）药物以及含有TNF的细胞在37℃温育40hrs。将培养基移去并用含有20%血清和10μg／ml BCECF荧光染料的新鲜培养基取代，再温育30分钟。将包含荧光染料的培养基移去并用PBS（磷酸盐缓冲盐水）取代，测试各孔的荧光。

另一种试验测量药物抑制U.937细胞对TNF活化的HUVEC 细胞沾连的效果。在该实验中，HUVEC细胞用人TNF－α（20

ng／ml）和可变浓度的药物诱导14－16hrs。将U937细胞（一种人单核细胞细胞系）温育并用BCECF（10μg／ml）（一种荧光染料）标记。U937细胞制品（每孔2．5×10^4细胞）在活化HUVEC细胞顶端分层。将细胞反向旋转以除去部分粘连和非粘连的U937细胞。利用荧光板读数器（fluorescence plate reader）所记载的荧光测量粘连U937细胞。

本发明化合物和药物组合物为在3，7－二取代黄嘌呤的1－位上被直链烷基（C_{5-8}）取代的ω－1醇的拆分R或S（优选R）对映体。本发明化合物能有效调节细胞对外部或原位刺激的应答，以及对给用有效量这种化合物的特定给药方式应答。

本发明化合物包括具有下式黄嘌呤母核化合物的化合物和药物组合物：



其中R_1代表独立的基本上不含其它对映体的拆分对映体ω－1仲醇取代的烷基（C_{5-8}），并且其中各个R_2和R_3独立表示可任意含有一个或两个非相邻的取代其中碳原子的氧原子的烷基（C_{1-12}）。优选的R_1是具有羟基的C_5烷基的R对映体。

本发明进一步提供了包含有一种本发明化合物和药学上可接受的赋形剂的药物组合物，其中药物组合物可被制成适于病人口服，非肠道或局部给药的剂型。

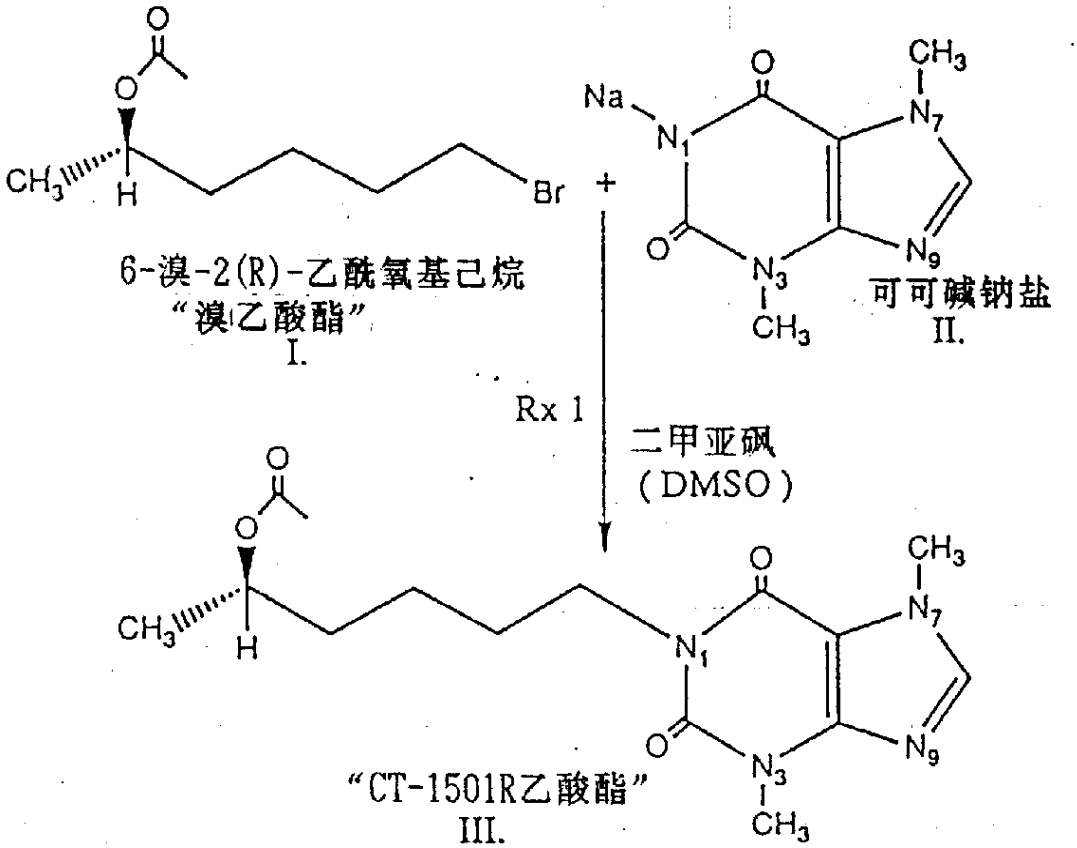
本发明进一步包括一种药物组合物，该组合物由一种或多种本发明化合物及药学上可接受的载体或赋形剂组成。使用本发明化合物或药物组合物治疗的个体可以在体外治疗中与本发明化合物在体外培养物中接触，或者通过对细胞需要处理的受治疗者给用（口服，非肠道或局部）本发明化合物或药物组合物而治疗。

1－（5－羟基－正己基）－3，7－二甲基黄嘌呤的（R）或（S）对映体是已知的，可通过本专业已知的常规方法制备，这些方法包括微生物技术，如Davis et al.，Xenobiotica，15：1001，1985和Davis et al.，Applied and Environmental Microbiology，48：327，1984中所述，例如，利用Rhodotorula rubra，将与光活性酸如（R）－α－甲氧基－α－三氟甲基－苯乙酸（（γ）－MTFPA）和其它上述Davis 等的文献中所用的光活性酸形成的非对映体酯形式的外消旋体拆分，直接化学合成法：按欧洲专利公开0435153中所述，将（R）或（S）－S－羟基－正己基残基导入二甲基黄嘌呤的1位，将对映体选择性转换，例如将其中对映体酯与叔膦，偶氮二甲酸二烷基酯和羧酸一同加热，或将对映体醇在任意的质子惰性溶剂中在碱存在下转换成有机磺酸酯。产生的脂族碳酸酯在碱存在下于含醇或含水溶剂中溶剂分解（如在碳酸钾存在下甲醇分解）得到如欧洲专利说明书435153或435152中所述的对映体醇。

一种制得（R）或（S）对映体的特别优选方法是根据J．Org．

Chem．５５：２２７４，１９９０中公开的方法而改进的直接合成法并如附图９所示。在该方法中，将４－溴－１－丁烯与三氯化硼和三乙基甲硅烷在惰性烃类溶剂如戊烷中于约－１０℃至－７８℃低温条件下一同加热，生成４－溴－１（二氯）丁硼烷。该产物然后在同样的低温条件下用（Ｒ）－或（Ｓ）－蒎烷二醇在惰性溶剂如乙醚或二甘醇二甲醚中处理，得到（Ｒ）－或（Ｓ）－蒎烷二醇４－溴丁基硼酸酯。该产物在惰性气氛如氩气中，在－１００℃（或者稍微加热）于惰性溶剂如四氢呋喃中用$LiCHCl_2$处理，随后加入无水氯化锌，生成（Ｒ）－或（Ｓ）－蒎烷二醇５－溴－１－氯戊基硼酸酯。所得的这种产物在四氢呋喃中于约－１０℃至－７８℃下用溴化甲基镁处理，得到Ｒ或Ｓ蒎烷二醇５－溴－１－甲基戊基硼酸酯。该产物在二甲亚砜（ＤＭＳＯ）中于约－１０℃至０℃下用可可碱处理，随后在约２８℃和５毫米汞柱下蒸去ＤＭＳＯ，产生相应的１－Ｎ－烷基化黄嘌呤，产率高达９５％。随后用强碱溶液如过量氢氧化钠水溶液氧化水解除去硼原子和（Ｒ）－或（Ｓ）－蒎烷二醇残基。按照常规回收方法如从象异丙醇这种溶剂中重结晶的方法得到所要产物。下述反应图也用以说明该优选合成方法。

从“溴乙酸酯”和可可碱合成ＣＴ－１５０１Ｒ的反应图：



6-溴-2(R)-乙酰氧基己烷
“溴乙酸酯”
I.

可可碱钠盐
II.

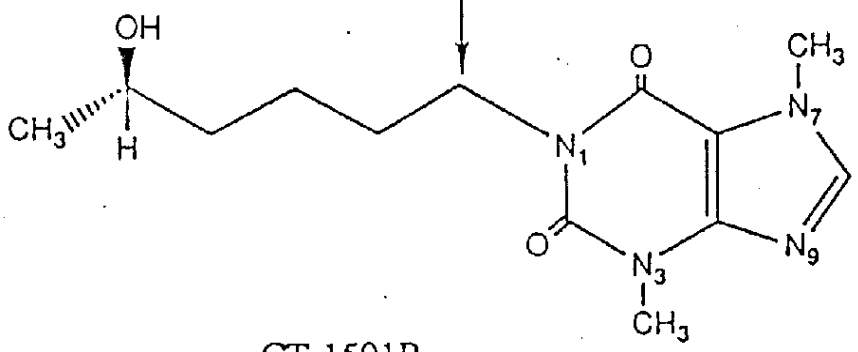
Rx 1　二甲亚砜（DMSO）

“CT-1501R乙酸酯”
III.

Rx 2　HCl, MeOH

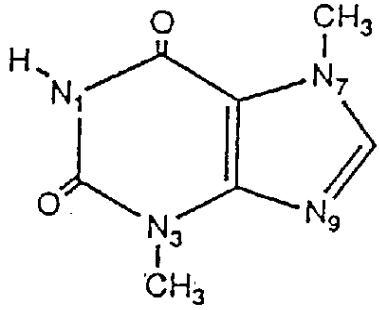
"CT-1501R 氢氯化物
IV.

Rx 3　Na_2CO_3 /　异丙醇ol / 回流



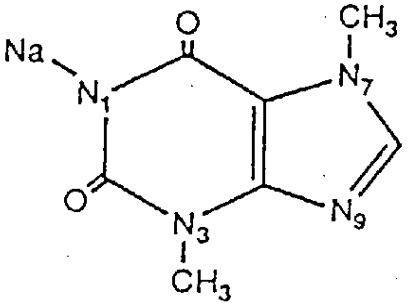
CT-1501R
1-(5R-羟基己基)-3,7-二甲基黄嘌呤

合成可可碱钠（II）的反应略图：



可可碱(原料)

Rx 4　　乙醇　　乙醇钠 /



可可碱钠II.

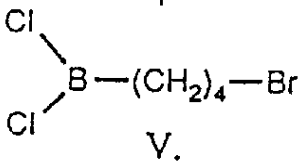
II.

合成溴乙酸酯的反应略图 (I)：



4-溴-1-丁烯(原料)　　+　　BCl_3　　+　　Et_3SiH

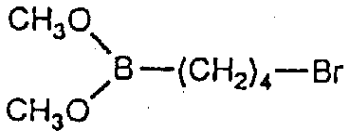
Rx 5 | 己烷



V.

V. + 甲醇

Rx 6 | 甲醇

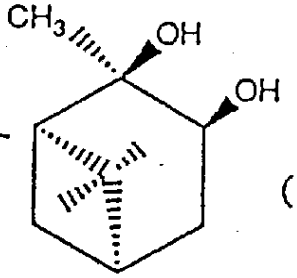


4-溴-1-(二甲氧基硼)-丁烷 VI.

VI.

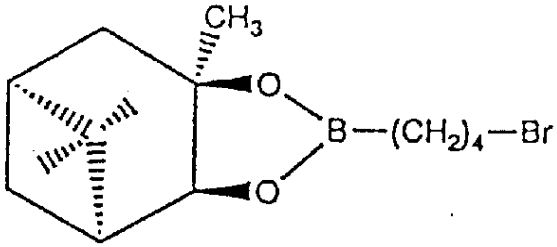
Rx 7

四氢呋喃
(THF)



(手性源)

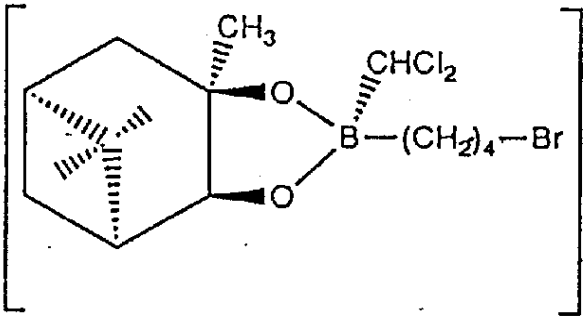
(1R,2R,3S,5R)-(-)-蒎烷二醇



4-溴-1-(蒎烷二氧代硼)-丁烷 VII.

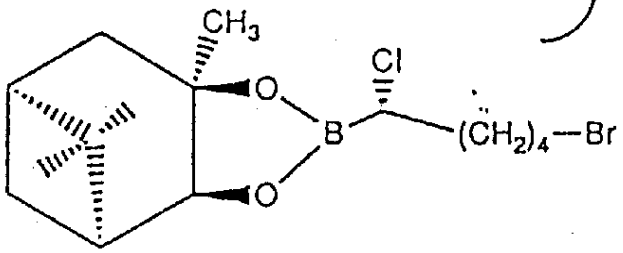
VII. + CH_2Cl_2 + $((CH_3)_2CH)_2NLi$
(LDA)

Rx 8 | THF / -30°C



“同相”反应

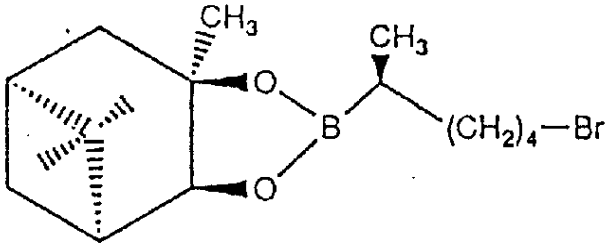
Rx 8 cont. | 0.9 eqs. $ZnCl_2$
25 °C



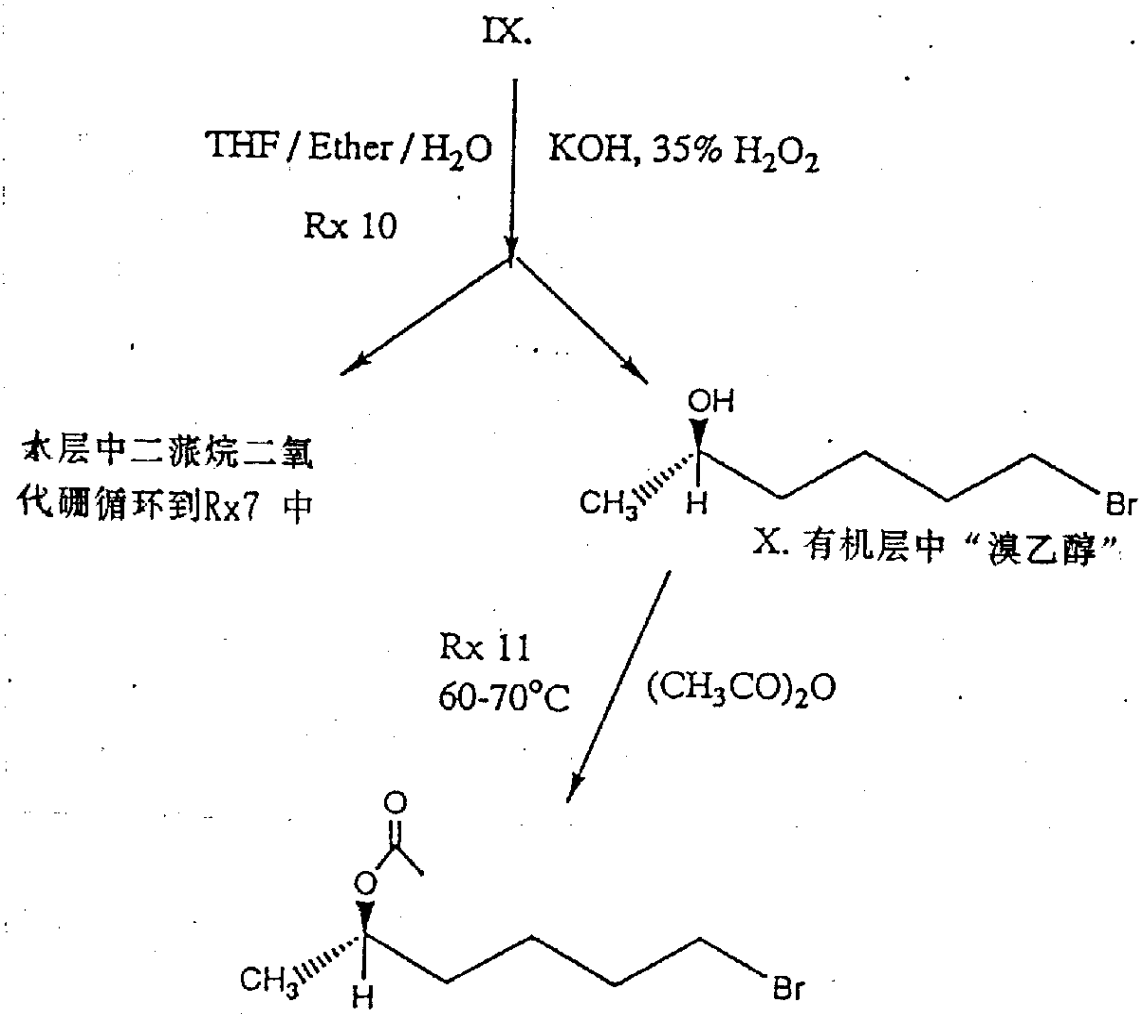
VIII. (未分离)

MeMgCl / THF

Rx 9



6-溴-2(R)-(蒎烷二氧代硼)-己烷 IX.(未分离)

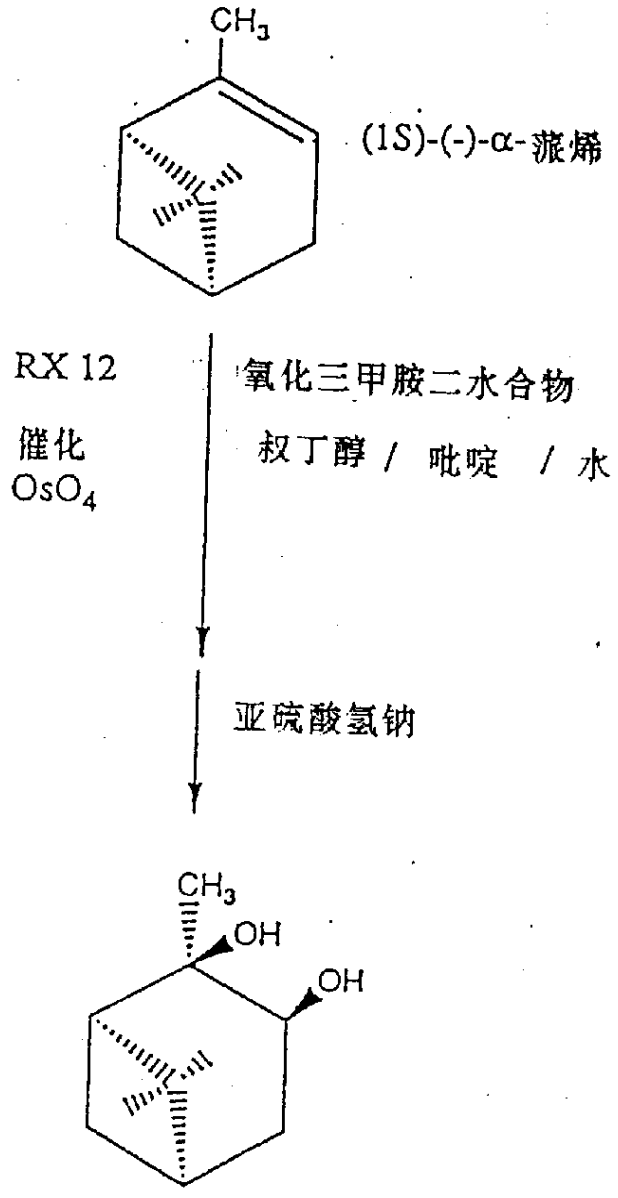


通过在0.7mm 汞柱，60℃
加热温度下蒸馏纯化

作为参考，反应5至9参见：
J.Am.Chem.Soc. Vol.108, No.4,1986,
Matteson,Sadhu & Peterson.

优选的合成方法中所用的蒎烷二醇为手性源。蒎烷二醇可按下述合成步骤合成。

合成蒎烷二醇(手性源)的反应略图：



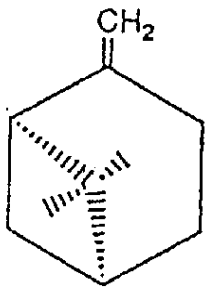
(1R,2R,3S,5R) -(-)- 蒎烷二醇

对于大于99% ee 的产物，

$[\alpha]^{21}=-8.6°$ (C=6.5,甲苯)

合成步骤中使用（－）－α－蒎烯，该化合物通常不可能以工业规模数量买到。但是，－（－）－α－蒎烯可按下述步骤制备。

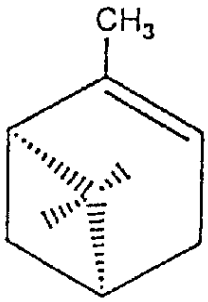
α－蒎烯合成略图：



(1S)-(-)-β-蒎烯（原料）100% ee
化合物的旋光度=-22.8°

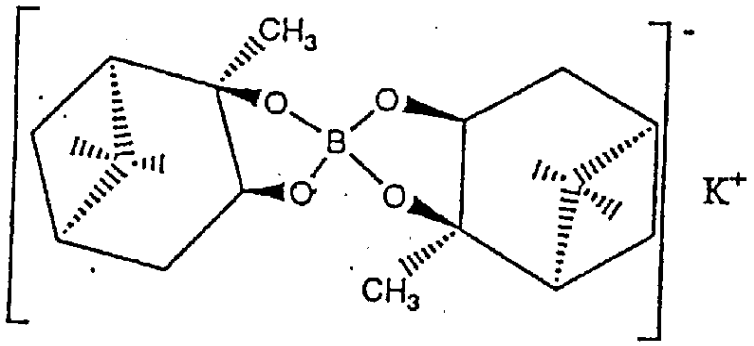
Rx 11
0°C

3-氨基丙基胺 (APA) / KH ⟶
[3-氨基丙基氨化钾(KAPA)]



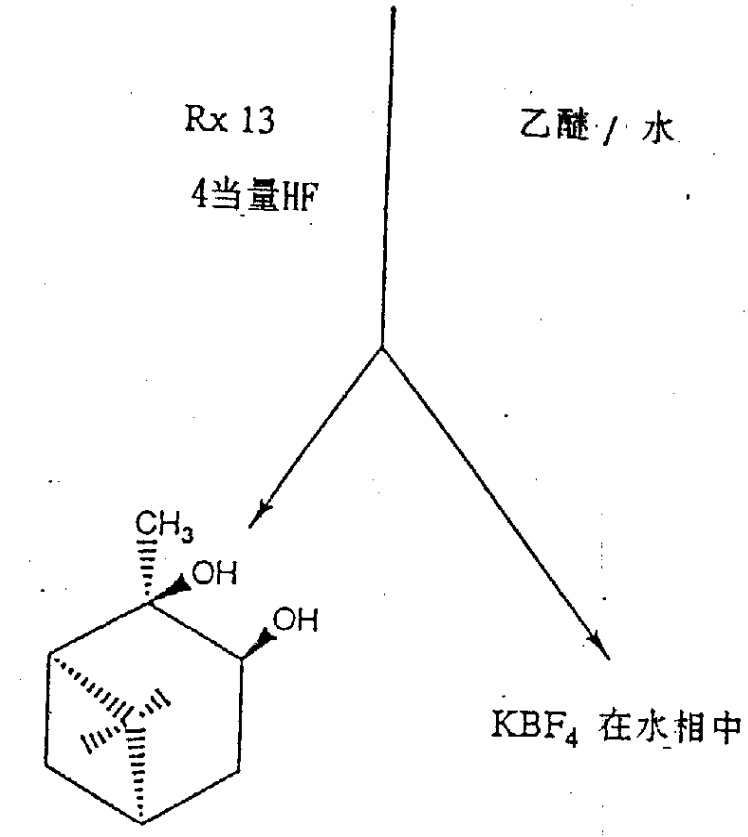
(1S)-(-)-α-蒎烯
100% ee 该化合物
的旋光度=-51.7°

同样重要的是根据反应 1 0 再生蒎烷二醇，回收这种在许多反应中重复使用的有价值的原料和手性源。优选的回收再生蒎烷二醇的方法如下图解。



二蒎烷二醇硼

该式中蒎烷二醇由反应10分离



蒎烷二醇有机相中

本发明化合物和药物制剂的用途

本发明化合物提供了一种通过减轻初级刺激对在两次初级刺激之间引发的第二信号途径的作用从而保持被初级刺激接触的细胞体内平衡的机理。例如，体内或体外施用本发明化合物提供了一种改变细胞行为的方法，该方法包括接触的细胞（体内或体外）的行为用有效量的本发明化合物或其药物组合物来改变，所述方法是：（1）．一种抑制肿瘤细胞增生的方法，其用量应足以抑制所述的增生；或（2）．一种促进血细胞生成的干细胞分化成红血细胞、血小板、淋巴细胞和粒细胞的方法，其用量应足以促进所述的分化；或（3）．一种抑制抗原或IL－2刺激T细胞活化的方法，其用量应足以抑制所述的活化；或（4）．一种抑制内毒素，TNF，IL－1或GM－CSF刺激单核细胞／巨噬细胞活化的方法，其用量应足以抑制所述的活化；或（5）．一种提高间充质细胞对肿瘤坏死因子的细胞毒素作用的抵抗力的方法，其用量应足以提高所述的抵抗力；或（6）．一种抑制B细胞对抗原、IL－4或CD40配位体应答产生抗体的方法，其用量应足以抑制所述的抗体的产生；或（7）．一种抑制对能够刺激增生的生长因子应答的平滑肌细胞的增生的方法，其用量应足以抑制所述的增生；或（8）．一种降低由内皮细胞导致的系统血管抵抗力的方法，其量应足以减少诱导高血压的物质的释放；或（9）．一种降低由内皮细胞诱导的系统血管抵抗力的方法，其用量应足以提高抗高血压物质的释放；或（10）．一种降低由增强剂诱导的粘连分子出现的方法，其用量应足以降低所述的出现；或（11）．一种抑制HIV活化T细胞的方法，其用量应足以抑制所述的活化从而抑制病毒复制；或（12）．一种抑制应答IL－1和／或mip－1α和／

或ＰＤＧＦ和／或ＦＧＦ刺激肾小球膜细胞增生的方法，其用量应足以抑制所述的增生；或（１３）．一种提高肾小球或小管细胞对环胞霉素Ａ或两性霉素Ｂ的抵抗力的方法，其用量应足以提高所述的抵抗力；或（１４）．一种防止在ＴＮＦ处理的骨髓间质状细胞中生长刺激因子产生的抑制的方法，其用量应足以防止所述的抑制；或（15）．一种防止ＩＬ－１，ＴＮＦ或内毒素刺激的单核细胞和巨噬细胞释放mip－１α的方法；或（１６）．一种防止ＩＬ－１，ＴＮＦ或内毒素处理的巨核细胞，或纤维细胞和巨噬细胞释放血小板活化因子的方法；或（１７）．一种防止在ＴＮＦ处理的血细胞生成的原本细胞中的细胞活素受体的降低调节的方法，其用量应足以防止所述的降低调节；或（１８）．一种抑制在ＩＬ－１刺激或ＴＮＦ刺激的小球上皮细胞或滑液细胞中产生金属蛋白酶的方法，其用量应足以抑制所述的产生；或（１９）．一种提高胃肠的或肺的上皮细胞对细胞毒素药物或放射疗法的抵抗力的方法，其用量应足以提高所述的抵抗力；或（２０）．一种提高非烷基化抗肿瘤剂的抗肿瘤作用的方法，其用量应足以提高所述的作用；或（２１）．一种抑制应答ＩＬ－１产生破骨细胞活化因子的方法，其用量应足以抑制所述的产生；或（２２）．一种抑制应答IgＥ去粒的方法，其用量应足以抑制所述的去粒；或（２３）．一种提高肾上腺素能神经递质，多巴胺，去甲肾上腺素或肾上腺素或神经递质，乙酰胆碱的释放的方法，其用量应足以提高所述的释放，或（２４）．一种调节肾上腺素能神经递质、多巴胺、肾上腺素或去甲肾上腺素，或神经递质乙酰胆碱的突触后的“慢流”作用的方法，其用量应足以调节所述的慢流。

例如，本发明的化合物用于进行骨髓移植（ＢＭＴ）的病人，不

管ＢＭＴ是选配的同种异体，非选配的同种异体或是自身的。接受自身移植的病人可辅助以本发明化合物的治疗，尽管他们不必服用免疫抑制剂，因为他们不会产生移植－排斥－宿主病（ＧＶＨＤ）。然而，用于与移植完成后有关的疾病的化学疗法或放射疗法的毒作用构成了对病人细胞的负刺激。

通常，进行ＢＭＴ的所有病人需要全身照射或非全身照射的化疗量超过正常骨髓恢复的致死量。这提供了使用贮存的病人骨髓或供体骨髓救治病人的基本原理。通常，在新的或贮存的骨髓注入之前，给病人进行化学疗法和放射疗法连续７－１０天。将骨髓给予病人的这天作为移植的０天，在此之前病人接受化疗／放疗的天数作为负数，在此之后的天数作为正数。

在ＢＭＦ受体中发生阴性应答的中间时间是在移植后的第一个１００天。因此，从统计上看，如果病人生存１００天，那么连续生存的机率会显著地提高。本发明化合物能够增加病人生存的百分数。在认为可接受的第一个１００天内的死亡百分数对于“十分危险”的病人来说为１５－２０％，对于“高危”病人来说为３０－４０％。死亡是由于高剂量的化疗／放疗的直接作用所造成的。此外，在同种异体骨髓受体中ＧＶＨＤ也增加了死亡率。

可服用本发明化合物的其他指征包括存在肿瘤负担，与激素有关的疾病，神经病，自体免疫病，炎症，再狭窄，冠状动脉病，动脉粥样硬化，高血压，非需要的免疫应答，病毒传染病，肾炎，粘膜炎和各种变态反应。防止变态反应包括防止急性变态反应，因此减轻或防止鼻溢，窦导液，弥散的组织水肿和扩散的瘙痒。慢性变态反应的其他症状包括上述症状，头晕，腹泻，组织充血和局部淋巴细胞浸润的

泪肿胀。变态反应也与白细胞三烯释放和其末梢作用有关，如哮喘症状包括气道阻塞的发展，ＴＥＶＩ减少，肺活量变化和过多的粘液的产生。

可服用本发明化合物的其他合适受体包括为治疗肿瘤服用细胞减少剂如化疗剂或放疗剂的病人，以及用生物应答调节剂如ＩＬ－２和肿瘤抑制细胞如淋巴因子激活杀伤细胞（ＬＡＫ）和浸润于肿瘤的淋巴细胞（ＴＩＬ细胞）治疗的病人；患有瘤形成的病人，通常不管是否进行其他治疗，瘤形成包括急性和慢性骨髓性白血病，毛细胞性白血病，淋巴瘤，巨核细胞白血病等；由细菌、真菌、原虫或病毒传染引起的病症的病人；以例如再狭窄形式表现出非需要的平滑肌细胞增生的病人，如进行心脏外科手术的病人；遭受自体免疫病，因而需要使Ｔ和Ｂ细胞失活的病人；以及有神经病的病人。

本发明化合物还能够降低由于用乙酰胆碱和／或肾上腺素刺激突触小体所升高的有关ＰＡ和ＤＡＧ的浓度。这表明本发明化合物既能提高抑制神经递质如多巴胺的释放，也能调节这些神经递质的末梢“慢流”作用。

因此，本发明的药物还用于提高发作阈，稳定对神经毒素如马钱子碱的突触，增强抗帕金森药物如Ｌ多巴的作用，增强催眠化合物的作用，减轻由于服用安定药的运动病，减少或防止与进行性神经死亡接着大脑血管活动如中风有关的神经元过热。此外，本发明化合物可用于治疗去甲肾上腺素缺损抑郁症和与内生的糖肾上腺皮质激素释放有关的抑郁症。防止地塞米松或甲基去氢氢化可的松对中枢神经系统的毒性作用，以及治疗没有药瘾的慢性痛。此外，本发明化合物可用于治疗患有学习和注意力缺陷的小孩，通常能改善患有器质性缺陷的

受体包括阿尔茨海默病的病人的记忆力。

尽管剂量可以变化，但当本发明化合物给需要如此治疗的人受体以有效的口服、肠胃外或静脉内亚致死量每天约２００mg 至约5000 mg（取决于病人的体重）给药时，可达到治疗功效。特别优选的治疗白血病的规则是４－５０mg／Kg 体重。然而，显而易见对于任何具体的受体，特殊的剂量规则应根据个体的需要和管理或监督本发明化合物给药的人的职业判断而调节。

与Ｐ－４５０抑制剂共给药

由于本发明的化合物具有较长的半衰期，因此本发明化合物与Ｐ－４５０抑制剂体内共给药可提高药效。体内的药效是由于本发明的化合物特别是在黄嘌呤环的Ｎ７位的脱烷基化的化合物抑制了脱粒途径。例如，ＮＩＨ３Ｔ３－Ｄ５Ｃ３细胞被用于单独的本发明化合物和与Ｐ４５０抑制剂结合的对照效果，它是通过单独用本发明化合物培养和用本发明化合物和Ｐ４５０酶抑制剂共培养比较转形变异表现型的控制。

抑制Ｐ－４５０化合物包括例如（每天剂量范围mg），萘心安（２０－１００），metaprolol（２０－１００）；戊脉安（１００－４００），硫氮䓬酮（１００－４００），硝苯吡啶（６０－１００），甲氯咪胍（４００－２，４００）；ciprofloxacin（５００－２０００），enoxacin（５００－２，０００），norfloxacin（５００－２０００），ofloxacin（５００－２,000），哌氟喹酸（５００－２，０００）；红霉素（１００－１，０００），三乙酰竹桃霉素（１００－１，０００）；Ketoconizole（１００－２，０００），噻苯咪唑（１００－１，０００）；异烟肼（１００

－１０００）；慢心利（１００－１，０００）；和地塞米松（１－１００mg）。

合适的制剂取决于所治疗的疾病的性质，所选择的药剂的性质以及主治医师的诊断。通常，本发明化合物可配制成注射或口服形式，尽管其他给药方式如转移粘膜或转移皮肤途径也可使用。这些化合物的合适的制剂如在Remington's Pharmaceutical Sciences（Latest edition），Mack Publishing Company，Easton，ＰＡ，中所示。

剂量取决于所选择的本发明化合物，并且通过与Ｐ－４５０抑制剂如喹诺酮共给药而显著地减少，另外，用这些喹诺酮可得到较强的增效作用。

下列实施例用于说明本发明而不是对本发明的任何限制。在这些实施例中ＰＴＸ为己酮可可碱。

实施例１

本实施例说明通过拆分外消旋的Ｍ１合成ＣＴ１５０１Ｒ。向乙醚饱和的Ｍ１反应管形瓶中加入３．０当量吡啶（从氢化钙中新蒸馏出的）和３当量Ｒ－（＋）－１－甲氧基－１－三氟甲基苯基乙酸（（＋）－ＭＴＦＰＡ）的酰基氯溶液。将反应管形瓶密封，在５０℃下加热１小时，置于氮气氛下至干，然而用７５％MeOH／H_2O分配。用９０％（７５％MeOH／水），３％乙腈（AcN），７％水的异构化体系以３．０ml／min 流速通过２５０×１０mm Ultremex ５Ｃ－１８柱（Phenomenex，Torrance，ＣＡ９０５０１）进行分离。用１０％ＭＴＦＰＡ－Ｍ１的７５％MeOH／水的溶液制成试样，每７分钟注射１００μl 等分试样，历时２１分钟（４次注射）。在29.8分钟洗脱的化合物为（Ｓ－Ｍ１）－ＭＴＦＰＡ，在３１．４分钟洗脱

的化合物为（R－M1）－MTFPA，95%的已分离。用Dale等描述的方法（J．Org．Chem．34：2543，1969），用NMR确定绝对构型的排布。合并收集的组分，用旋转蒸发器减少体积。试样用氯仿萃取后，开始蒸发仅除去MeOH 和AcN，将溶剂干燥并真空除去。之后，在研究表明对除去水所需的温度的较少的提高，酯是稳定的时，可以略去萃取步骤。

（＋）－MTFPA－M1立体异构体的水解：

为了监测MTFPA酯的水解过程，必须设计一种直接定量测定存在的M1和总的酯的测试方法。使用梯度法，即在注射后1．0－8．0min 间改变流动相从40%（75%MeOH／水）10%AcN 50%水至40%（75%MeOH／水）60%AcN。最终条件保持3分钟后，将柱再回到初始条件。在280nm 处监测洗脱液，对于游离的和衍生的M1来说，保留时间分别为6．5分钟和12．3分钟。使用这种体系，不需要分离衍生的M1的立体异构体，所以它可用于监测MTFPA酯的水解的测定。

向30mg 纯MTFPA－M1酶（R或S衍生物）的4．0ml EtOH 溶液中加入约40mg 硼氢化钠（NaBH），将此混合物在油浴中加热至70℃。每4小时加入另外的硼氢化钠（20mg）历时一天。54小时后，反应完成几乎90%（通过HPLC），此时M1＋M1－酯的总峰面积没有损失；反应用磷酸－钠／水终止，用HCl 调节至pH3．5，真空除去EtOH，用氯仿萃取未反应的酯和M1。氯仿用硫酸钠干燥并真空除去。粗产物用制备型色谱纯化，用上述M1所用的溶剂梯度洗脱，用流速为3．0ml／min，250×10mm 柱。收集的馏分真空减少体积至干，用乙醚研制，分析对映体过量（＞95%

两种异构体）。在氮气氛下除去乙醚，将所得的晶体溶于少量体积的生理盐水中。用生理盐水稀释此标准溶液制得每一对映体的10mM溶液。对映体的鉴定通过重组的MTFPA酯的HPLC来证实。

实施例2

本实施例说明在实验范围内用R蒎烷二醇作为手性源制备（R）1-（5-羟庚基）-3，7-二甲基黄嘌呤）（CT1501R）的方法。在500ml 园底烧瓶中将三乙基硅烷（83.49g，0.718mol）和4-溴-1-丁烯（97g，0.718mol）混合，并冷却至-78℃。在1升园底烧瓶中，将三氯化硼（84.13g，0.718mol）气体在-78℃下冷凝，然后加入400ml 戊烷。在搅拌、氮气氛下，通过套管将硅烷／丁烯混合物滴加到三氯化硼溶液中，同时保持内部温度为-78℃。加完后，向此溶液中滴加入三当量甲醇，然后加热至室温，在氮气氛、大气压下蒸馏出戊烷、HCl 和过量的甲醇。残余物真空蒸馏得到4-溴丁基硼酸二甲酯；（bp 70-7.9℃，在0.9托下，得到127.5g，85%产率）。

在500ml 园底烧瓶中，将（R）-蒎烷二醇（62g；0.365mol）和4-溴丁基硼酸二甲酯（75g；0.359mol）与200ml 乙醚一起搅拌。30分钟后，真空除去乙醚，残余物蒸馏得到（R）-蒎烷二醇-4-溴丁基硼酸酯（bp 134-141℃，在1.6-1.9托下，110.85g，98%产率）。

为了进行同系化反应，在带有侧臂的1升园底烧瓶中，在氮气氛、搅拌下将二氯甲烷（31.47g；0.370mol）和500ml 无水THF冷却至-100℃。向该冷却的溶液中，通过烧瓶的侧臂滴

加入212ml 正丁基锂（1.4N的己烷溶液），历时45分钟，并且在氮气氛下搅拌，同时保持内部温度为－100℃。加完后，将溶液搅拌20分钟。将蒎烷二醇4－溴丁基硼酸酯（77.82g；0.247mol）与100ml 无水THF混合，冷却至－78℃，然后滴加入甲基二氯锂，同时保持内部温度为100℃。加完后，加入严格干燥的氯化锌（30.29g；0.222mol）。氮气氛下搅拌溶液10小时，然后加热至室温，真空除去溶剂。向残余物中加入500ml 石油醚和300ml 饱和的氯化铵水溶液。分离有机相，用饱和的氯化铵洗涤（2×250ml）。合并水相，用石油醚洗涤（2×250ml）。合并有机相，用硫酸钠干燥，过滤并蒸发得到粗蒎烷二醇（R）－溴戊基硼酸酯，粗产物重92.13g（102%）。

在500ml 园底烧瓶中，将300ml 无水THF和上述反应得到的粗的蒎烷二醇（R）－1－氯－5－溴戊基硼酸酯（假定89g，0.247mol）混合并冷却至－78℃，同时在氮气氛下搅拌。向此溶液中加入甲基溴化镁（3.26N，79.6ml）。将溶液加热至室温过夜。加入石油醚（500ml）和饱和的氯化铵（250ml），从而形成乳液。分出水相，有机相用饱和的氯化铵（2×250ml）洗涤，使乳液消散。合并的水相用石油醚（2×250ml）洗涤。合并的有机相用硫酸钠干燥、过滤并真空干燥得到85.85g粗蒎烷二醇（R）－5－溴－1－甲基戊基硼酸酯。

在5升烧瓶中，在氮气氛、搅拌下将2升DMSO和可可碱（44.51g，0.247mol）混合。将氢化钠（9.9g；0.247mol）分两批加入到溶液中，进行搅拌至可可碱溶解。3小时后，将上述反应得到的蒎烷二醇（R）－5－溴－1－甲基戊基

硼酸酯（84.75g，0.247mol）滴加到该溶液中，并搅拌12小时。

从溶液中蒸馏出DMSO（可以循环使用），残余物用500ml二氯甲烷和500ml 水处理。除去水相，有机相用水洗涤（3×750ml）。合并水相，用2×500ml 二氯甲烷萃取。合并有机相，用硫酸钠干燥，过滤并真空除去溶剂，得到88.14g，80%产率，蒎烷二醇（R）-5-（3，7-二甲基黄嘌呤）-1-甲基戊基硼酸酯。

在氮气氛、搅拌下，将硼酸酯溶于THF／水（每次300ml），将混合物冷却至0℃。保持内部温度为0℃，滴加入95ml 3N氢氧化钾，接着滴加入30%过氧化氢。将混合物搅拌2小时，滤出固体。加入水和二氯甲烷（每次300ml）。分离各相，水相用二氯甲烷洗涤4×100ml。合并的有机相用硫酸钠干燥，过滤并蒸发。用少量二氯甲烷和大量乙醚重结晶。得到46.3g（87%）（R）-1-（5-羟己基）-3，7-二甲基黄嘌呤，m.p. 105-108℃，[α]D=-5.63，ca. 96%ee

实施例3

本实施例说明用DICHED作为手性源制备（R）-1-（5-羟己基）-3，7-二甲基黄嘌呤（CT1501R）的方法：用（1S，2S）-（1，2）-二环己基乙二醇（DICHED）代替实施例2所述的蒎烷二醇手性源。该手性源比蒎烷二醇更易回收。根据sharpless 等，J. Org. Chem. 57：2768，1992所述方法制备DICHED。将上述制备的二甲基-4-溴丁基硼酸酯

（10.1g，48.06mmol）与10.54g（46.6mmol）（S，S）-DICHED的1000ml 乙醚溶液混合。30分钟后，除去乙醚，残余物通过10g硅胶短柱，用石油醚／乙醚（9：1）洗脱，得到17.8g（S，S）DICHED 4－溴丁基硼酸酯类似物。

用下列试剂量按实施例2所述方法进行同系化反应：17.8g DICHED 4－溴丁基硼酸酯；6.11g二氯甲烷；41.2ml 1.4N正丁基锂；100ml THF和5.89g无水氯化锌。

用下列试剂量按实施例2所述方法进行格利雅反应：DICHED（R）－1－氯－5－溴戊基硼酸酯，20.04g；3.0N甲基溴化镁，16.7ml；150mlTHF。在50ml 烧瓶中，将DICHED 5－溴－1－甲基戊基硼酸酯溶于THF（10ml）中，氧化DICHED硼酸酯得到（R）－6－溴己－2－醇。将水（10ml）加至该溶液中。溶液冷却至0℃同时在氮气氛下搅拌。加入碳酸钠（16.5ml，3M溶液）。接着加入8ml 30%过氧化氢。将溶液过滤，加入20ml 戊烷，再次过滤。分出水相，用戊烷（2×10ml）洗涤。有机相用硫酸钠干燥，过滤，蒸发溶剂得到（R）－6－溴－己－2－醇，粗产量8.9g，真空蒸馏得到产量7.1g（84%）纯物质，旋光度为－13.89 $[\alpha]_{549}$。

将（R）－溴醇加至可可碱中，可可碱（2.02g，11.2mmol）与DMSO（30ml）的混合物搅拌，加入282mg 氢化钠（11.8mmol）。反应混合物剧烈搅拌80分钟。滴加入溴醇（2.03g，11.2mmol），继续搅拌21小时。用高真空泵蒸出DMSO。加入水（100ml）。混合物用25%乙醇／二氯甲烷

（3×50ml）萃取，合并的萃取液用硫酸镁干燥并蒸发。将残余物溶于20ml 二氯甲烷中，加入150ml 乙醚。得到米黄色晶体（R）－1－（5－羟己基）－3，7－二甲基黄嘌呤（1.5g，5.36mmol，47.8%产率）。将另外500mg 产物结晶24小时得到总产量2g（64%总量），ee 大于94%（通过层析）。

实施例4

本实施例说明合成（R或S）－1－（6－羟庚基）－3，7－二甲基－10－黄嘌呤或（R或S）－7－羟辛基－3，7－二甲基黄嘌呤的方法。用上述方法，使用合适的溴烷二醇和DICHED，用长链溴烯，5－溴－1－戊烯和6－溴－1－己烯分别作为起始原料制备这些化合物。

实施例5

本实施例说明CT1501R和PTX的混合淋巴细胞反应。混合淋巴细胞反应表示PBMC（外周血液单核细胞）对同种异体刺激的增生应答，它是用双路混合淋巴细胞反应测定的。用这种免疫调节活性测定方法测定的CT1501R和PTX的活性如图1所示。

实施例6

本实施例表示CT1501R对波交联的抗鼠抗体和／或白细胞介素－4（IL－4）刺激的鼠B－细胞增生的抑制作用。图2表示CT1501R抑制由表现为增生信号引起的B细胞增生。

图3表示CT1501R抑制由伴刀豆球蛋白A（Con A）和白

细胞介素－1α（IL－1α）或白细胞介素－2（IL－2）引起的增生的作用。在用Con A和IL－1α或IL－2活性化之前2小时将CT1501R以所示剂量加到细胞中。CT1501R以剂量－应答方式抑制胸腺细胞增生如图3所示。底数小于200cpm。

图4表示CT1501R和PTX对由PDGF（血小板来源的生长因子）和IL－1刺激的平滑肌增生的抑制作用。在用PDGF和IL－1活化之前2小时将CT1501R和PTX分别加到细胞中。两种药剂均以较高剂量抑制平滑肌细胞增生如图4所示，CT1501R活性高于PTX。

实施例7

本实施例说明CT1501R的体外作用，包括抑制细胞因子释放和细胞粘连。测定CT1501R对内毒素，TNF－α或IL－1α刺激的细胞因子的释发，对活化的人脐内皮细胞的粘连的作用。

通过灌注小鼠腹膜分离出鼠腹膜渗出细胞的巨噬细胞（PEC），并以每井5×10^5细胞装入96井盘中。细胞用5μg／ml由马流产沙门氏菌衍生的内毒素（LPS；Sigma Chemical Co.，L－1887）或50μg／ml IL－1α（Genzyme；Cambridge，MA）刺激，在加入刺激物之前一小时向培养液中加入或不加入CT1501R。在此后的各种时间，除去上层清液，用商品96井微型免疫测定包（Genzyme；TNF；Endogen，Boston，MA；IL－1α），根据制造商的说明书测定TNF－α或IL－1α的浓度。为了进行粘连研究，将由商品供应者（Clonetics，San Diego，CA或Cell Systems，Seattle WA）得到早期继代移植的人脐静脉内皮细胞

（ＨＵＶＥＣ），并在加有酸性ＦＧＦ（Cell Systems cat ４０１－１１１）的确定的、Hepes 缓冲的血清游离培养基（Cell，Systems，cat ３０１－１８０）中培养。将４０００个细胞装入９６井微型盘的每一井中并在３７℃下培养７２小时。在加有１０％胎腓肠血清的ＲＰＭＩ１６４０培养基中刺激组织细胞的白血病细胞系Ｕ９３７。用ＬＰＳ，ＩＬ－１α或ＴＮＦ－α刺激ＨＵＶＥＣ或Ｕ９３７细胞１２小时。为了进行粘连测定，Ｕ９３７细胞用荧光成活的着色剂，２′，７′－双（２－羧乙基）－５（和－６）－羧荧光素乙酸基甲酯（ＢＣＥＣＦ）进行标记。简单地说，细胞用10μｇ／ml ＢＣＥＣＦ的ＲＰＭＩ－１６４０培养基加上１０％胎腓肠血清在３７℃下标记３０分钟。细胞用整个培养基洗涤一次，将５０，０００个细胞／井加至ＨＵＶＥＣ培养物中。试样在３７℃培养３０分钟，在４００×ｇ下转化和离心１０分钟，在加入１００ml Hanks平衡盐水溶液（ＨＢＳＳ）后，用Millipore Cytofluor 荧光板读出器（激励４８３nm；发射５２５nm）分析微型板。一系列细胞稀释剂的荧光表示在很宽的细胞浓度每井２０至１００，０００个细胞范围内线性浓度关系（没有数据表示）。所有实验重复至少两次，所有结果均证实了所示的发现。

ＣＴ１５０１Ｒ抑制ＬＰＳ刺激ＰＥＣ细胞释放的ＴＮＦ－α。细胞用２５０mM ＣＴ１５０１Ｒ预处理，在ＬＰＳ刺激后，用ＥＬＩＳＡ以释放的ＴＮＦ－α用为时间的函数测定上清液。在所有所测的时间点，ＣＴ１５０１Ｒ明显地抑制了ＴＮＦ－α的释放，从在６－２４小时的约５０％ＬＰＳ诱导深度至在４８小时的约７０％。ＣＴ１５０１Ｒ对释放的ＴＮＦ的作用的剂量反应如图１８所示。

ＰＥＣ细胞用ＬＰＳ刺激１小时后，接着用各种浓度的ＣＴ１５０１Ｒ处理。ＣＴ１５０１Ｒ５０%抑制的浓度为大约３０μＭ。在５００μＭ时，ＣＴ１５０１Ｒ的抑制作用是最大ＬＰＳ刺激（1428 pg／ml）的大约４０%。

ＬＰＳ刺激腹膜巨噬细胞的ＩＬ－１α释放，在ＬＰＳ刺激后，在１２小时内增加至浓度为２４pg／ml，在４８小时内至３１pg／ml（图１９）。加入ＣＴ１５０１Ｒ在１２－４８小时内明显地减少了ＩＬ－１α的释放，在２４小时，最大的抑制率为约５０%。如果腹膜巨噬细胞用５０ng／ml ＩＬ－１α刺激而不是用ＬＰＳ刺激（图２０），ＣＴ１５０１Ｒ也能抑制ＴＮＦ－α的释放（图２０）。在测定时间点，加入ＣＴ１５０１Ｒ产生ＴＮＦ－α诱导浓度的５０%－７０%抑制率。

通过辨认和约束血管内皮细胞使免疫谱系细胞离开血液。因此免疫细胞在内皮细胞和周围组织之间移动。粘连在内皮细胞和渗出物上的免疫细胞试样提供了体内处理炎症和致动脉粥样化的应答的预想试样。用ＴＮＦ－α，ＩＬ－１α或ＬＰＳ活化内皮细胞向上调节了某些粘连分子，并增加了它们的淋巴细胞、单核细胞、嗜曙红细胞和中性白细胞的粘连力。细胞系Ｕ９３７用于试验ＣＴ１５０１Ｒ抑制对活化的ＨＵＶＥＣ的粘连。Ｕ９３７细胞表现出许多单核细胞的表现型特征，包括出现integrin ＶＬＡ－４（它通过血管粘连分子１（ＶＣＡＭ）使单核细胞连接内皮细胞），以及出现在内皮细胞上的一些免疫球蛋白总科。ＨＵＶＥＣ用选自ＩＬ－１α，ＴＮＦ－α或ＬＰＳ的活化剂处理过夜，在加入活化剂之前一小时加入或不加入２５０μＭ ＣＴ１５０１Ｒ。如图２１所示，通过加入ＣＴ1501Ｒ

U937细胞对HUVEC的本底附着没有明显的作用。然而，用CT1501R预处理能明显地抑制活化的HUVEC的相对粘连力。可观测到CT1501R能抑制用TNF-α，IL-1α或LPS刺激的HUVEC。

相反地，用IL-1α活化的U937也能增加未刺激的HUVEC的相对粘连力（图22）。用250μM CT1501R预处理U937细胞能有效地阻止IL-1α传导增大对HUVEC的粘连至接近本底浓度。

CT1501R抑制在腹膜巨噬细胞、人U937组织细胞的白血病细胞系和人脐静脉内皮细胞中LPS，TNF-α和IL-1α传导的炎症信号途径和伴发的细胞应答。CT1501R能明显地减少从用LPS刺激的腹膜巨噬细胞释放前炎症细胞因子TNF-α和IL-1α。用10μg/ml LPS刺激的TNF-α抑制的IC_{50}为大约30μM。CT1501R阻止IL-1α活化的PEC释放TNF-α。CT1501R抑制增大U937细胞对TNF-α，IL-1α或LPS活化的HUVEC的粘连。最后，CT1501R抑制IL-1α诱导的活化和增大U937细胞对未刺激的HUVEC 的粘连力。

实施例8

本实施例说明课体小鼠毛发研究包括CT1501R的表面应用。将来自Charles River Laboratories 的6至8周龄，雌性，nu/nu小鼠在Biosupport Research Support Services（Seattle，WA）的高压灭菌小型隔离单元中，用过氯化高压灭菌水、照射过的啮齿食

物喂养，并置于层流通风橱中。每周换一次笼子，每周换两次水。在开始每次研究之前，小鼠适应水土5天。

第一个表面制剂的制备是通过将CT1501R以1%浓度加到热的亲水的药膏中，并固化。

用无菌的涂药器将CT1501R的第一个表面制剂涂敷在裸鼠的左胁上，同样基质的其他化合物涂敷在右胁上，每天两次，历时16天。用带有面罩和无菌手套的涂药器在层流通风橱中处理小鼠。16天后，通过颈脱位使一只小鼠致死，在经处理的肩／胁区域和未处理的背侧骨盆（rump）区域进行皮肤活组织检查。将样品置于10%缓冲的福尔马林溶液中，活组织检查试样送至兽医皮肤病专家进行病理组织学研究，处理后6周，使另一只小鼠安然致死，与第一只一样进行活组织检查。试样也进行病理组织学研究。

第一只的试样的结果表明处理过的部分比未处理过的部分明显出现更多的毛囊。用CT1501R和其他化合物处理的部分大量毛干从毛囊中伸出，而未处理的部分则没有。

在第二次试验中，CT1501R的表面应用与已被批准为毛发生长指示剂商品的表面长压定制剂（Rogaine®，Upjohn）一起进行。将来自Bantin and Kingman Universal 的5至6周龄，雌性，nu／nu 小鼠在Biosupport Research Support Services（Seattle，WA）的高压灭菌小型隔离单元中，用过氯化高压灭菌水、照射过的啮齿食物喂养，并置于层流通风橱中。每周换一次笼子，每周换两次水。在开始每次研究之前，小鼠适应水土7天。

将CT1501R和其他两种化合物配制在60%ETOH，10%水和30%PEG的表面制剂中以及仅有一种载体的表面制剂

中。Minoxidil作为商品制剂Rogaine® 可从当地药房购买。Rogaine® 是以相同的制剂基准出售。对于每一特定试验带，小鼠用特殊的尾标记确定，每组两只小鼠用ＣＴ１５０１Ｒ和其他化合物处理，一只小鼠用载体和Minoxidil 之一处理。在层流通风橱中用带有面罩和无菌手套的涂药器处理小鼠。每只小鼠每天处理两次，并且用各自的无菌涂药器以避免溶液或小鼠的污染。所有的小鼠被涂以沿从头颅底部至尾底部的背部中心线的一条合适的试验带，约１．５cm 宽。３４天后，用过量的氟烷麻醉剂使所有小鼠安然致死。将７ 只小鼠的每一只在肩胛（大小约为１×１．５cm）之间颈的颈背进行皮肤活组织检查，所有试样吸附在纱布上，除去血液和液体，并固定在一片切开的木制压舌板中，将试样分别侧下置于有标记的含有１０%缓冲福尔马林容器中。试样送至兽医皮肤病专家进行定性病理组织学测定。

主观检查表明载体处理的小鼠（对照）仅有少量充分发育的毛囊。毛发对处理的反应在用Minoxidil 处理小鼠中非常明显。CT１５０１Ｒ和其他化合物处理的小鼠具有最大的毛囊密集度。另外，小鼠的可见检查表明ＣＴ１５０１Ｒ鼠是在ＣＴ１５０１Ｒ、Minoxidil 和对照中具有最多的“毛发”。因此，以这种模式促进毛发生长，ＣＴ１５０１Ｒ至少与Minoxidil 一样好。所以，１－４%CT１５０１Ｒ（重量）的表面制剂是治疗秃发和促进毛发生长的有效治疗组合物。

实施例９

本实施例说明ＣＴ１５０１Ｒ对给予致死剂量内毒素的小鼠的存活的作用。用鼠模型测定ＣＴ１５０１Ｒ是否能防止内毒素诱导的致死率。将内毒素注射给６－８周龄雌性Balb／c 鼠作为腐败性休克模

型，它类似于以前公开的报告（Ashkenazi 等，Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88：10535－10539，1991），报告的原始记录已被Animal Use Committee of the Biomembrane Institute，Seattle，WA批准。动物被静脉内（i.v）注射大约LD100剂量（10μg／g）马流产沙门氏菌衍生的内毒素（Sigma Chemical Co.，L－1887）的磷酸盐缓冲盐水（PBS）。CT1501R以剂量100μg／Kg 腹膜内（IP）注射每天3次（100ml／每次注射），对照鼠在同样时间用相同体积的载体对照样（PBS）注射，存活至少为72小时。

为了进行血浆中细胞因子浓度的ELISA测定，从麻醉的鼠的眶后或心脏穿刺收集血液，马上离心并将EDTA血浆贮存在－70℃。将颗粒状游离的血浆融化在冰上，用商品ELISA测定仪测定细胞因子的浓度，用正常鼠血浆绘出标准曲线。鼠肿瘤坏死因子－α和白细胞－1α包可分别从Genzyme（Cambridge，MA）和Endogen（Boston，MA）购买。每个数据点是由三只鼠的混合EDTA血浆的两次ELISA测定的平均值。总结在表3中的数据是由两次独立的实验完成的；表4和5的数据是由每个数据点三只鼠的单一实验得来的。

用与实验鼠一样的时间安排，将10只鼠每只单独用PBS或单独用CT1501R处理。在整个实验过程中（没有数据表示）没有明显的不利影响，存活率为100%。内毒素存活率数据是由总共6次独立实验所总结的。概括的表1详细地说明了6次实验的每一次的结果。累积的存活百分率在表2中给出并绘成图5。在图5中，每一时间点表示3次实验的最小值，该实验每组至少20只鼠。用Fisher

精确一尾试验进行存活数据的可靠性分析在表3中给出。在LPS处理后马上服用CT1501R呈现出明显的保护作用。用LPS处理后72小时累积的存活百分率为60%，而仅用LPS处理的动物为7%（P=<0.0005；表3）。

用LPS处理后，延迟CT1501R给药时间的作用也如图5所示。动物用LPS处理并在LPS处理后两小时或四小时施用CT1501R。CT1501R再一次表现出明显的保护作用。CT1501R处理的鼠的存活率在2小时内为55%，在4小时内为37%，与此相比，仅用LPS处理的鼠的存活率为7%（分别为P=0.0005和P=0.001；表3）。

测定鼠血浆中TNF-α，IL-1α和IL-6的浓度并作为用马流产沙门氏菌内毒素处理后的时间函数。这些数据与用内毒素处理动物接着马上单独腹膜内注射CT1501R的数据比较。TNF-α浓度在用内毒素处理后1小时内达到最高点（表4和图6）。在所有所测的时间点，用CT1501R处理鼠降低了内毒素处理鼠的EDTA血浆中TNF-α的浓度。特别是，内毒素处理后0.5和1小时的TNF-α最高浓度在CT1501R处理的鼠中分别降低了2.5和2.6倍。

用内毒素处理后马上用CT1501R处理也降低了血浆的IL-1α浓度（表5；图7）。特别是，用内毒素处理后的6，12和18小时所观察到的最高浓度分别降低了1.2，4.3和3.2倍。最后用同样的方法测定IL-6（表6，图8）。在CT1501R处理的动物中在3，6和12小时最高血浆浓度也降低了（分别降低了1.7，2.0和4.1倍）。

CT1501R明显地提高了接受使44只鼠中41只鼠致死的剂量内毒素的鼠的存活率。与对照样相比，在用内毒素刺激或用内毒素处理后2小时或4小时施用CT1501R，存活率提高了。在内毒素处理后马上施用单剂量的CT1501R明显地降低了最大的TNF-α，IL-1α和IL-6的血浆浓度。

表 1 . 6 次独立的鼠脓毒病实验的存活率数据

实验号	LPS处理后 CT-150R处理时间	LPS处理后时间 （存活数／总数）		
		24 Hr	48 Hr	72 Hr
1	仅用LPS	2/4	0/4	0/4
	t=0 Hr	4/5	4/5	4/5
	t=2 Hr	4/5	3/5	3/5
2	仅用LPS	0/5	0/5	0/5
	t=0 Hr	5/5	5/5	5/5
	t=2 Hr	5/5	5/5	5/5
3	仅用LPS	1/5	1/5	1/5
	t= 4 Hr	5/5	3/5	3/5
4	仅用LPS	1/10	1/10	1/10
	t= 4 Hr	7/10	5/10	5/10
5	仅用LPS	0/10	0/10	0/10
	t= 0 Hr	9/10	7/10	3/10
	t= 2 Hr	5/10	3/10	3/10
	t= 4 Hr	7/10	4/10	2/10
6	仅用LPS	3/10	1/10	1/10
	t= 4 Hr	3/10	3/10	3/10

表 2 . 由表 1 数据所得的总的鼠存活率

表 2 . 由表 1 数据所得的总的鼠存活率

实验号	Time of 处理时间 Post LPS	（存活数／总数）		
		24 Hr	48 Hr	72 Hr
n=6	仅用LPS	7/44	3/44	3/44
n=3	t= 0 Hr	18/20	16/20	12/20
n=3	t= 2 Hr	14/20	11/20	11/20
n=4	t= 4 Hr	22/35	15/35	13/35

表 3 . 表 2 中鼠脓毒病存活数据的Fisher 精确 P 值（一尾）

实验号	CT-150R 处理时间	P 值（LPS处理后时间）		
		24 Hr	48 Hr	72 Hr
n=6	仅用LPS			
n=3	t=0 Hr	<0.0005	<0.0005	<0.0005
n=3	t=2 Hr	<0.0005	0.0005	0.0005
n=4	t=4 Hr	<0.0005	0.0002	0.001

表4．鼠血浆TNF－α ELISA 测定的平均数据

LPS处理后时间	血浆TNF(pg/ml)	
	仅用LPS	LPS+CT-1501R
0	0	0
0.17	8	6
0.5	990	390
1	4480	1728
2	1585	940
4	655	400
6	545	350

表5．鼠血浆IL－1α ELISA 测定的数据

LPS处理后的时间	血浆IL-1(pg/ml)	
	仅用LPS	LPS+CT-1501R
0	0	0
0.17	0	0
0.5	0.01	22
1	2.25	10.8
3	41.3	33.2
6	166	133
12	139	32.3
18	150	46.7
24	16.6	43.5
36	all dead	18.8
48	all dead	0

表 6 . 鼠血浆 I L － 6 ELISA 测定的数据

LPS处理后的时间	血浆IL-6(pg/ml)	
	仅用LPS	LPS+CT-1501R
0	0	0
0.17	0.2	0.14
0.5	3.86	1
1	24	31.8
3	317	183
6	247	121
12	119	29.6
18	59	19.8
24	31	25.6
36	0	1.64
48	2	0.4

实施例 1 0

本实施例说明ＣＴ１５０１Ｒ对５－氟尿嘧啶（５－ＦＵ）诱导的鼠骨髓抑制的作用。用鼠模型测定ＣＴ１５０１Ｒ是否影响在具有细胞毒素作用的化疗后造血重组所需时间。将雌性Balb／c 鼠（VAF，Charles River Laboratories，６－８周龄，约１７．３－１８．５ｇ）用５－ＦＵ处理，在实验１中以剂量２００mg／Kg 腹膜内（i．p）注射，在实验２中剂量为１９０μg／Kg。ＣＴ１５０１Ｒ或载体对照样在５－ＦＵ处理前一天开始以剂量１００μg／Kg 腹膜内给药每天二次，继续给药直至在实验１的第１３天，在实验２的第１５天使最后一只鼠致死。对照样包括用ＣＴ１５０１Ｒ或载体而没有５－ＦＵ处理的鼠。在５－ＦＵ处理后的开始２天，通过在氟烷麻醉下进

行心脏穿刺接着使颈脱位而使鼠（每组4只）致死，进行总的白血细胞计数和分别计数。用相一对比显微镜对副本进行血小板计数。收集股骨，用美洲商陆有丝分裂源脾调节介质作为生长因子，用标准测试器（Terry Fox Laboratories，Vancouver，British Columbia）测定每股骨中粒细胞－巨噬细胞集落形成细胞（ＣＦＵ－ＧＭ）的数量。将每根股骨分别涂敷三次，计算每次试验点的平均值，用于统计分析的标准偏差是每根股内测定的集落的数量的平均值的偏差。

用载体对照样式ＣＴ１５０１Ｒ处理的鼠没有出现副作用。仅用载体对照样处理的鼠提高了绝对中性白细胞数（ＡＮＣ）和白血细胞数（ＷＢＣ），而此时在ＣＴ１５０１Ｒ处理的鼠中没有观察到。这些差异在4天和8天明显不同于0天的值（分别为Ｐ＝０．０１２和Ｐ＝０．０１６；二尾学生Ｔ试验）。与接受ＣＴ１５０１Ｒ的鼠相比，对照样处理的鼠在第4天明显具有较高的白血细胞数（Ｐ＝０．００９），在第１２天明显具有较高的中性白细胞数（Ｐ＝０．０２８）。与0天的值（Ｐ＝０．０２８）相比，对照样处理的鼠在第１２天明显提高了粒细胞数（Ｐ＝０．０２８）。CT１５０１Ｒ处理的鼠的ＷＢＣ和ＡＮＣ保持在对照样值的１ＳＤ内。

在第6和１０天，５－ＦＵ处理鼠的ＷＢＣ，在用载体处理对照样时明显低于ＣＴ１５０１Ｒ处理的鼠（分别为Ｐ＝０．０１９和０．０３６）（图１０）。对于不同血液计数，在第6和8天的两组，所有细胞具有淋巴细胞的形态。在第１０天，一些单核细胞和少量粒细胞出现在ＣＴ１５０１Ｒ处理的动物中。在第１３天，CT１５０１Ｒ具有平均值±ＳＤ ＡＮＣ４４０±１７／mm^3，而对照鼠具有１８０±１０／mm^3（Ｐ＝０．０５）（图１０）。

通过测定CFU－GM数量／股骨估计造血前体细胞的恢复。在5－FU处理后，用载体对照样和CT1501R处理的鼠抑制CFU－GM至接近不能测到的浓度，直至第8天当恢复开始时（图13）。到第13天，出现明显的偏离。在第13天，CT1501R处理的鼠具有的CFU－GM／股骨明显多于载体对照样动物（P＝0.024）和在0天处理前致死的动物（P＝0.05），从而表明出现前体恢复。

实验2类似于实验1，但下列除外：（1）5－FU剂量降至185mg／Kg；（2）在第10至第15天进行每天抽血。（3）进行血小板计数。实验2的结果用图10－13图形表示。与实验1一样，用CT1501R处理的鼠具有明显较高的WBC值（图10），在CT1501R处理的鼠的中性白细胞恢复加速（图12）。与载体对照样动物相比，血小板计数最低值与恢复速度也增加（图11）。与对照动物相比，在造血恢复中，每根股骨的细胞数增加，每根股骨的CFU－GM数也增加（图13）。

在接受较高骨髓抑制剂量的5－FU的鼠中，CT1501R处理提高了增加中性白细胞数的速度以及具有定型的骨髓前体细胞的骨髓的再生速度。在每一所测时间点，CT1501R抑制了5－FU诱导的总WBC的抑制。然而，直至第10天，在细胞中少量淋巴细胞形态出现增加。在实验1的第13天和在实验2的第10天，在用CT1501R处理的鼠中的中性白细胞明显高于对照处理的鼠。通过CT1501R刺激造血恢复也影响了巨核细胞系。试验动物的血小板最低数明显高于对照动物，并迅速增加血小板数且大大地超过载体对照动物。

刺激造血也可通过恢复骨髓细胞构成并定量计算骨髓前体细胞来证实。与对照动物相比，在造血恢复中，ＣＴ１５０１Ｒ处理的鼠几乎增加了二倍的ＣＦＵ－ＧＭ数／股骨。

在没有接受５－ＦＵ的动物中，用ＣＴ１５０１Ｒ处理防止了与载体对照样有关的ＡＮＣ上升和ＣＦＵ－ＧＭ／股骨上升。所有ＣＴ１５０１Ｒ处理的动物使ＡＮＣ保持在未注射的对照样的一个标准偏差内。很明显ＣＴ１５０１Ｒ防止了紧张诱导以及可能是细胞因子传导的对每天两次腹膜内注射的应答。

总之，这些数据支持在细胞毒性或细胞减少治疗后使用CT1501R和本发明化合物加速造血重组的方法。

说　明　书　附　图

图 1

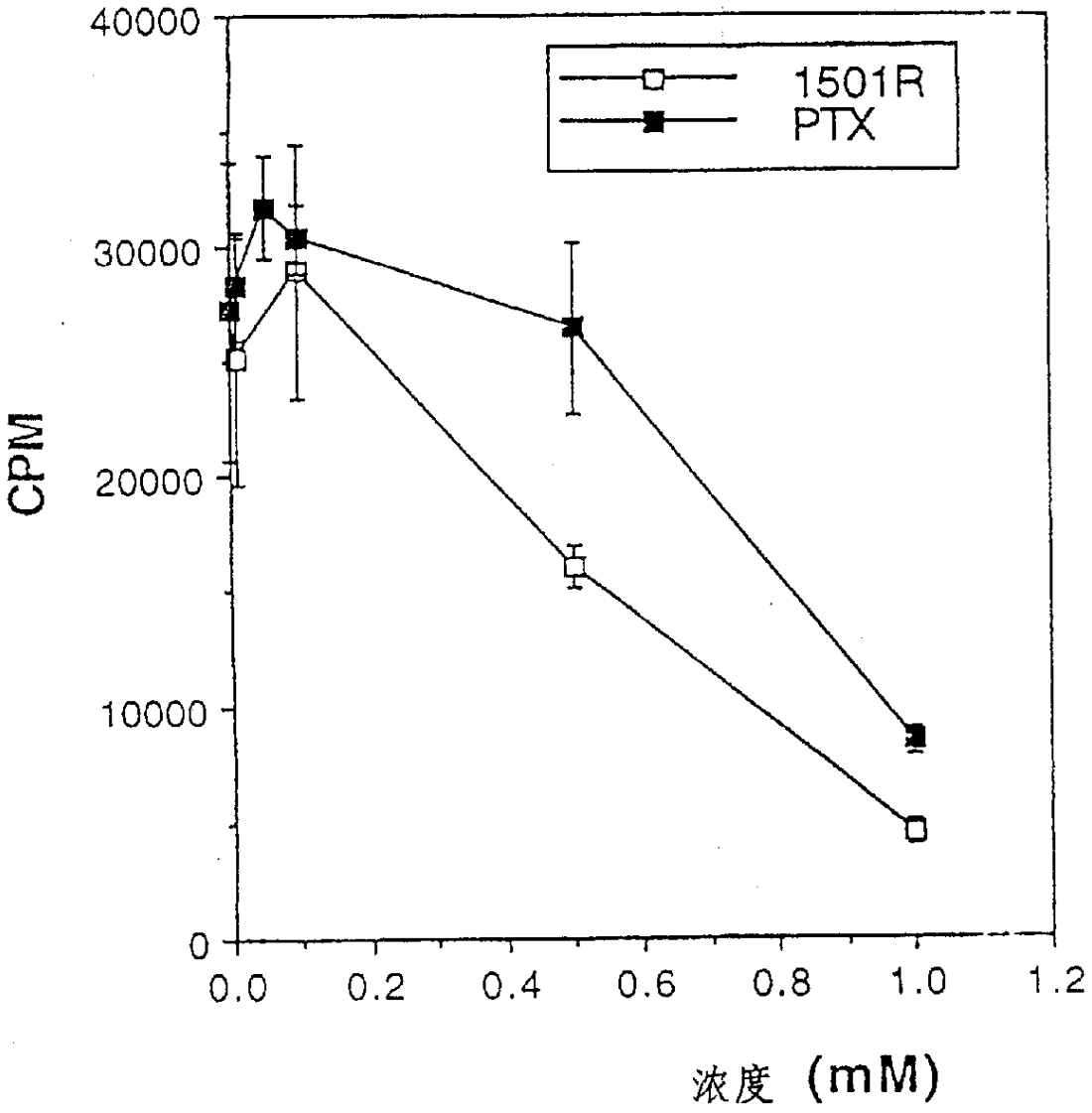

40000
30000
20000
10000
0
CPM
1501R
PTX
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
浓度 (mM)

图 2

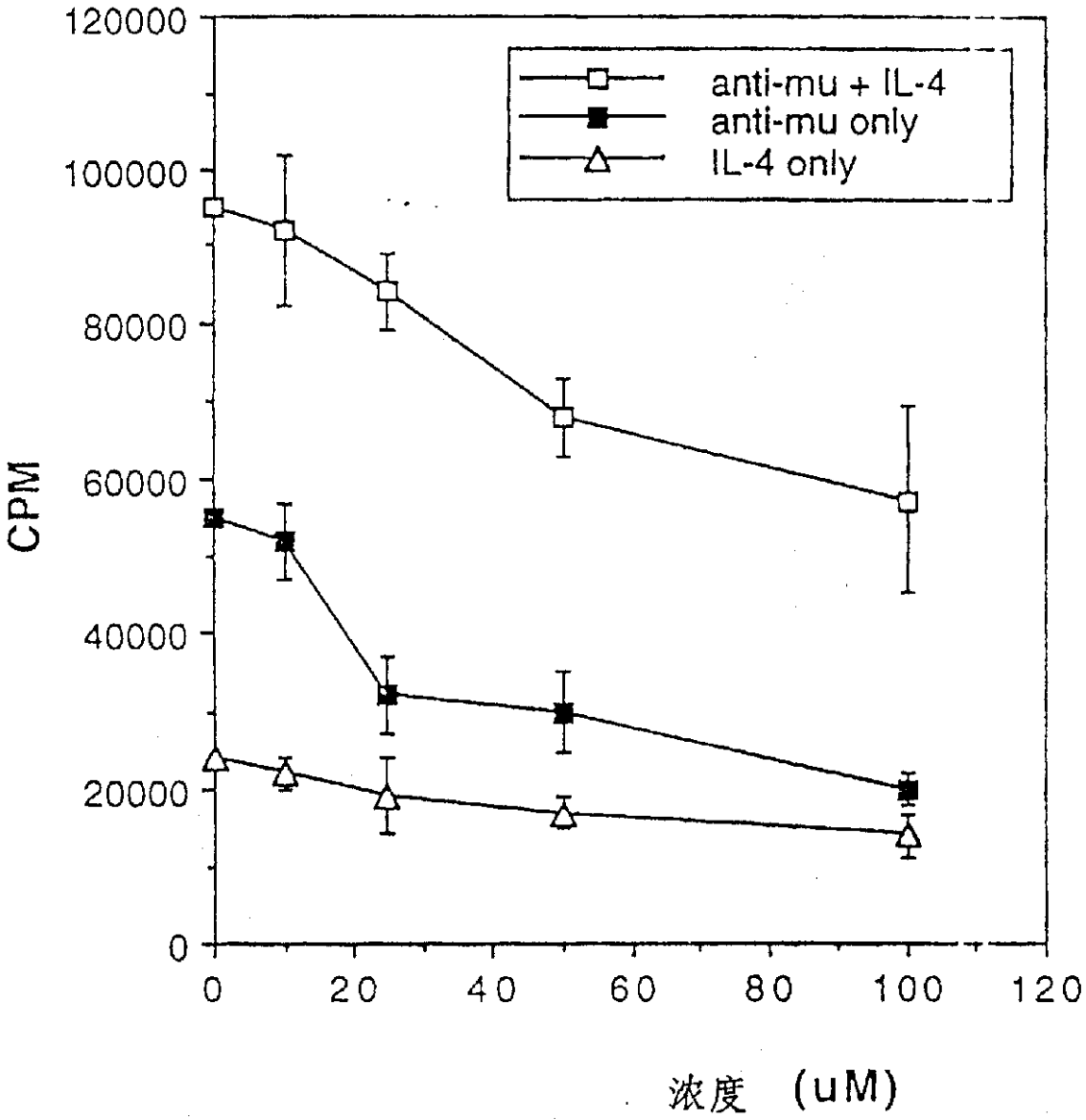

120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
CPM
anti-mu + IL-4
anti-mu only
IL-4 only
0
20
40
60
80
100
120
浓度 (uM)

图 3

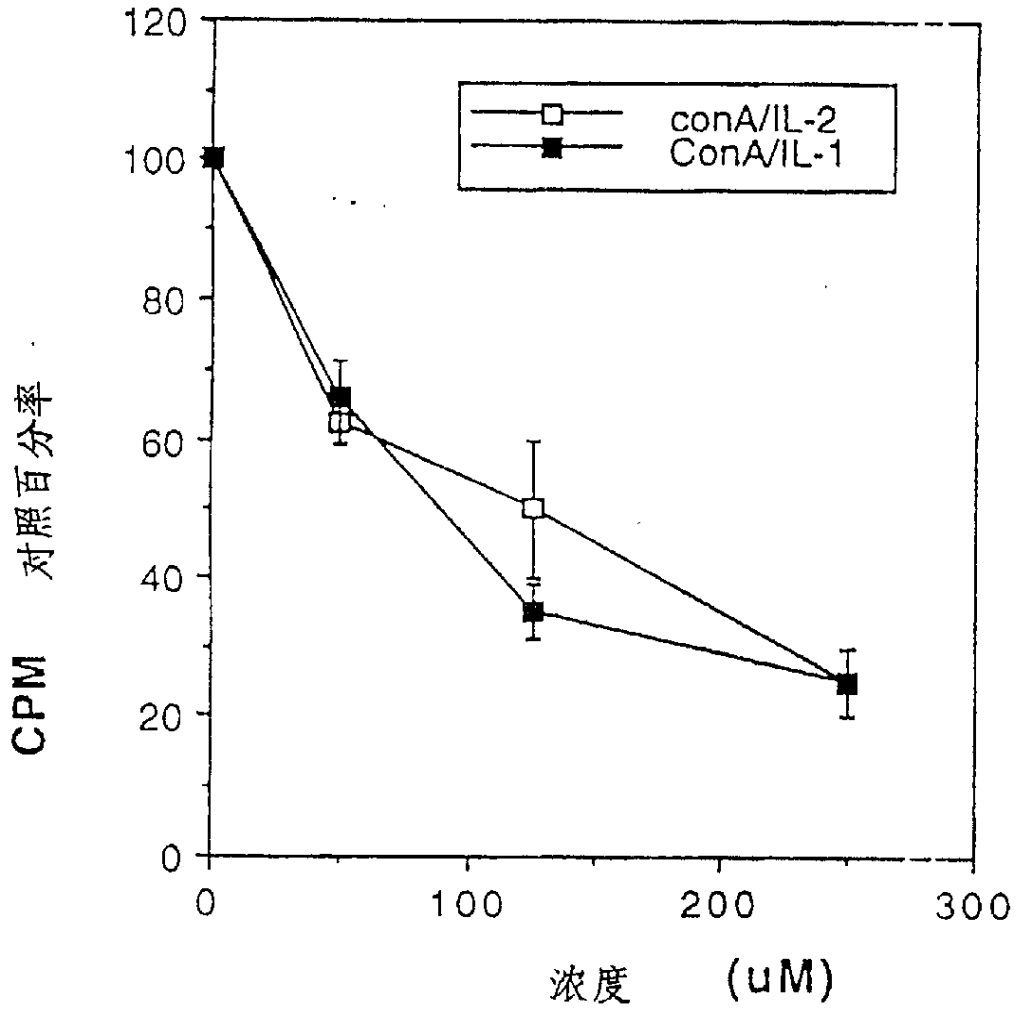

120
100
80
60
40
20
0
0
100
200
300
conA/IL-2
ConA/IL-1
CPM 对照百分率
浓度 (uM)

图 4

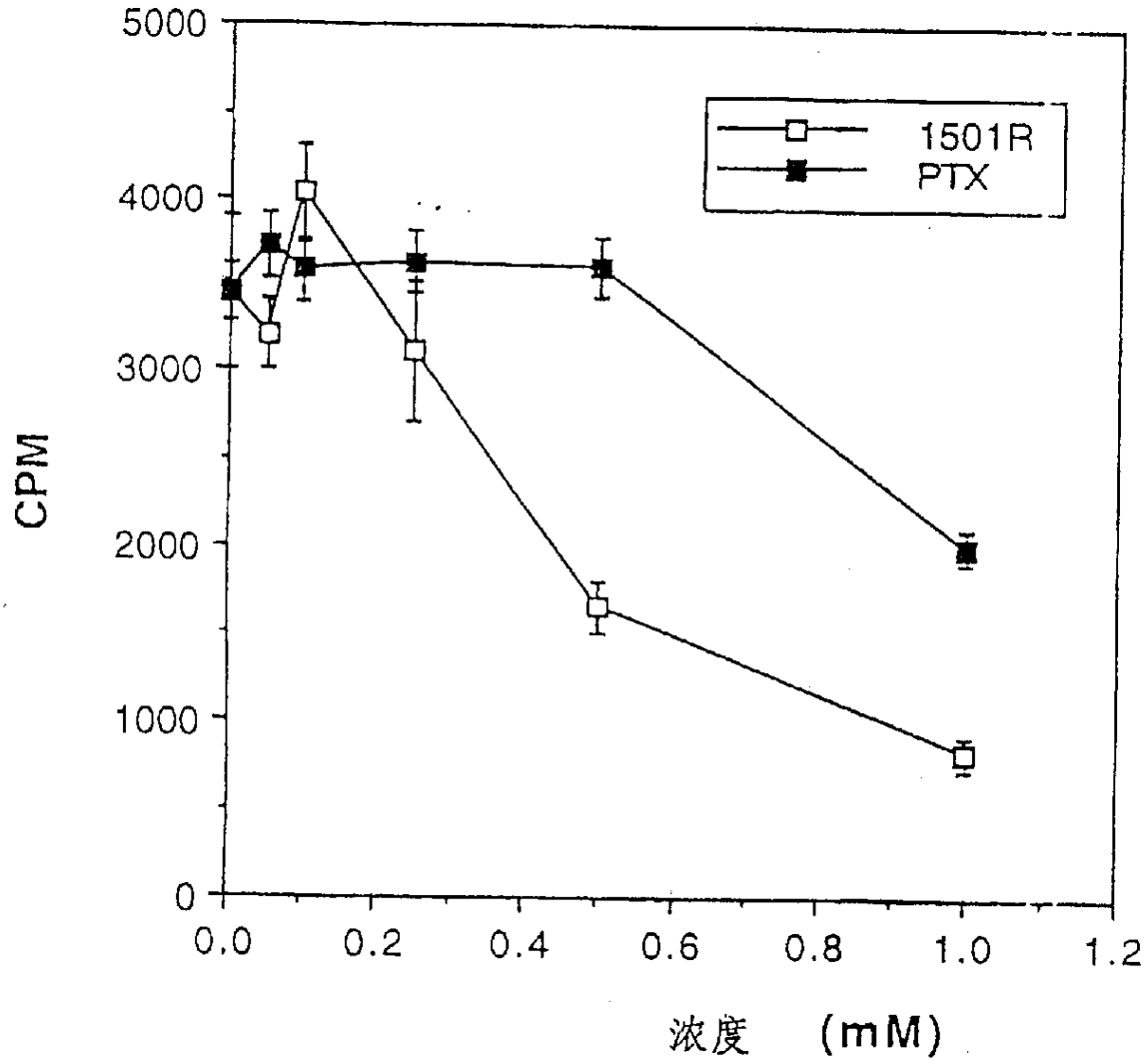

5000
4000
3000
2000
1000
0
CPM
1501R
PTX
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
浓度 (mM)

图 5

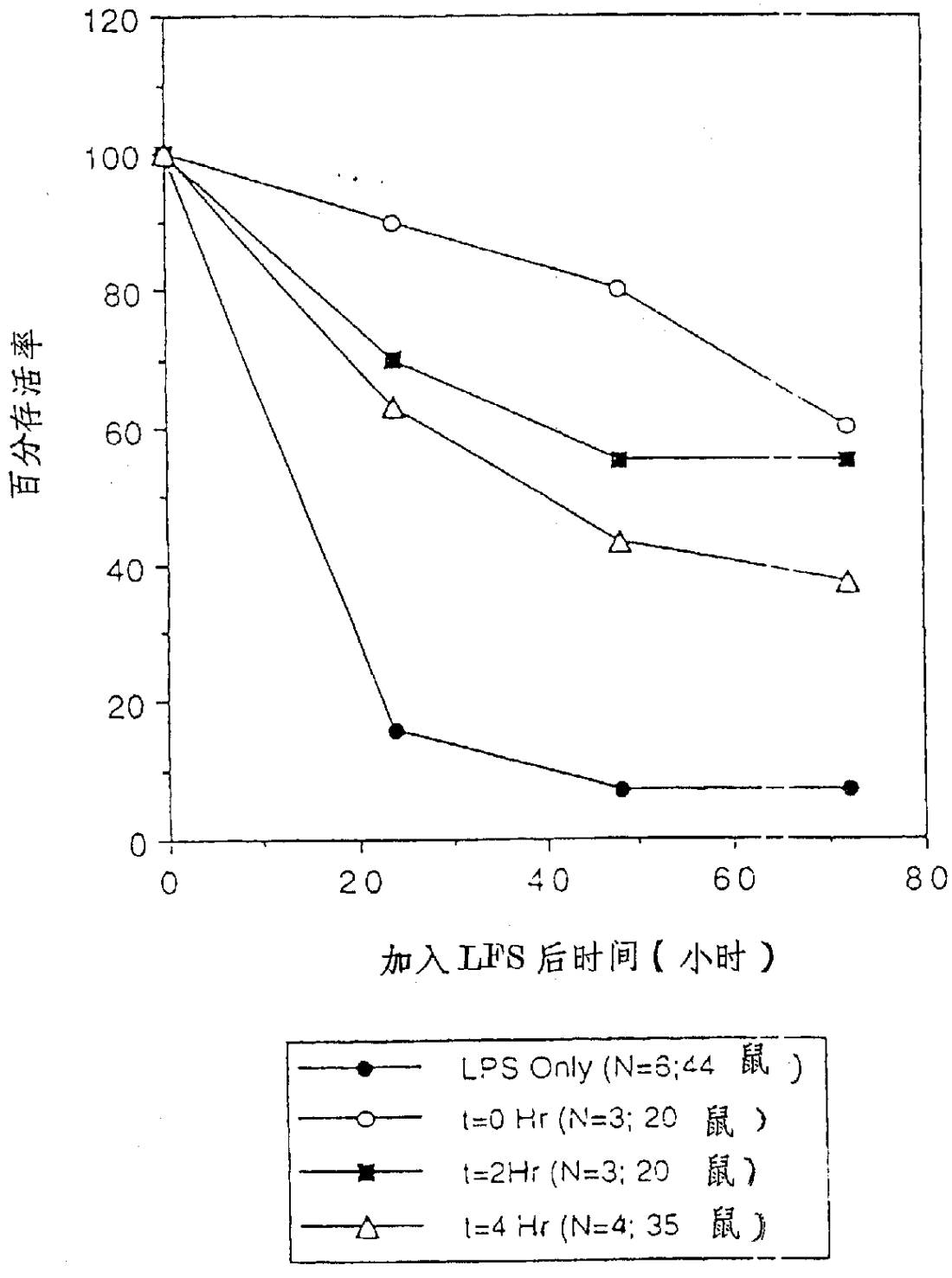

120
100
80
60
40
20
0
百分存活率
0
20
40
60
80
加入LPS后时间（小时）
LPS Only (N=6;44 鼠)
t=0 Hr (N=3; 20 鼠)
t=2Hr (N=3; 20 鼠)
t=4 Hr (N=4; 35 鼠)

图 6

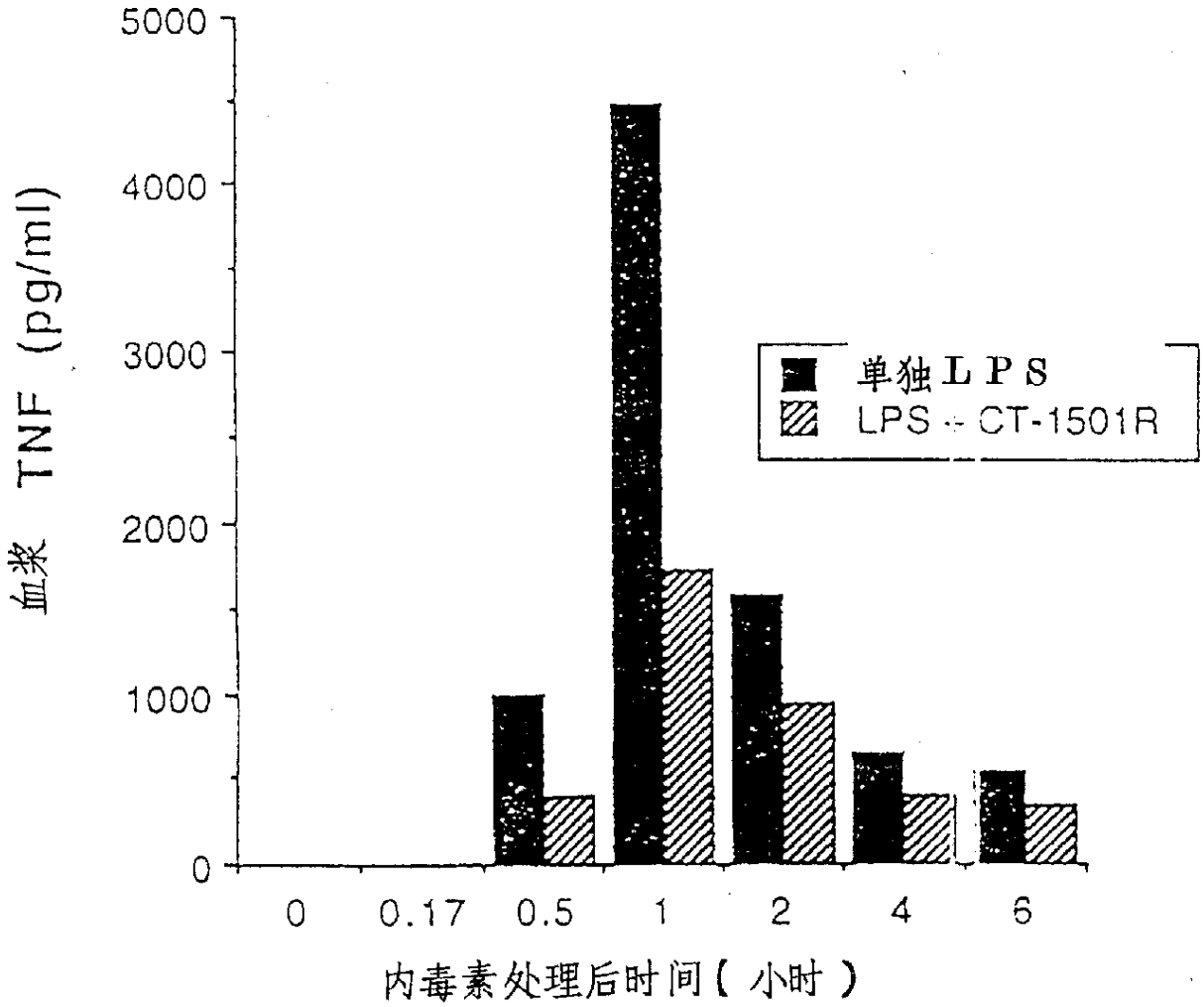

5000
4000
3000
2000
1000
0
血浆 TNF (pg/ml)
单独LPS
LPS + CT-1501R
0
0.17
0.5
1
2
4
6
内毒素处理后时间（小时）

图 7

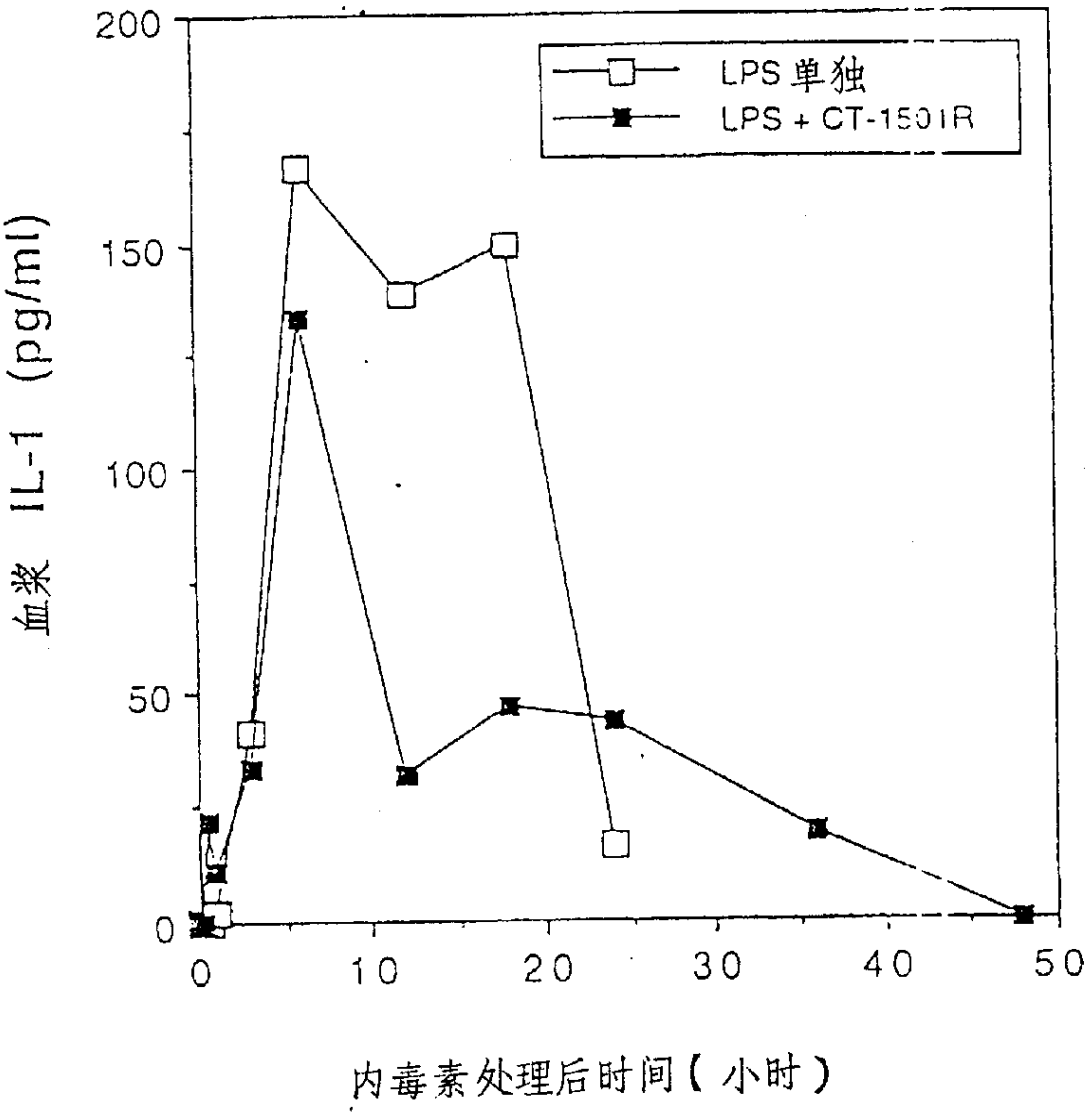

200
150
100
50
0
血浆 IL-1 (pg/ml)
LPS 单独
LPS + CT-1501R
0
10
20
30
40
50
内毒素处理后时间（小时）

图 8

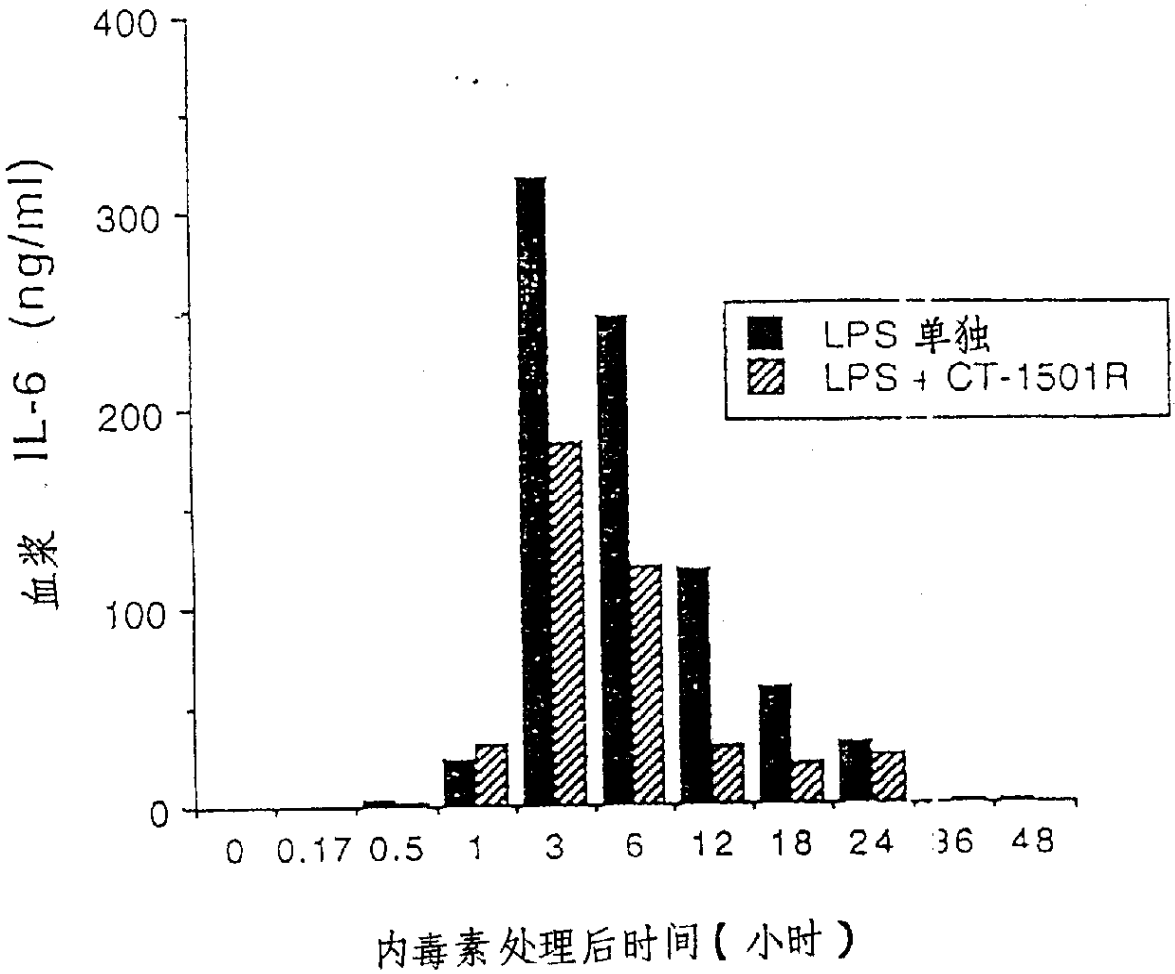

400
300
200
100
0
血浆 IL-6 (ng/ml)
LPS 单独
LPS + CT-1501R
0 0.17 0.5 1 3 6 12 18 24 36 48
内毒素处理后时间（小时）

图 9

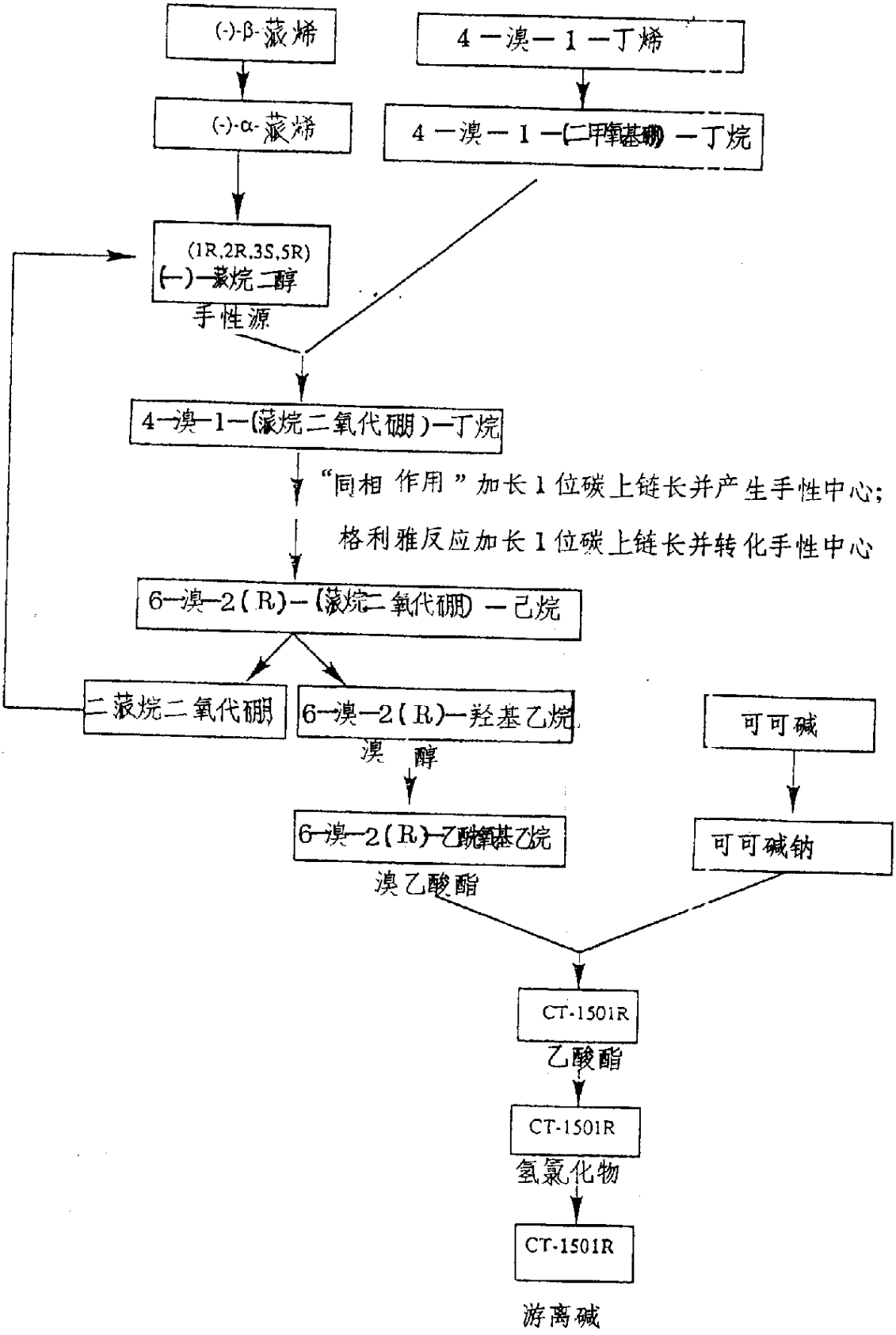

(-)-β-蒎烯
4－溴－1－丁烯
(-)-α-蒎烯
4－溴－1－(二甲氧基硼)－丁烷
(1R,2R,3S,5R)
(－)－蒎烷二醇
手性源
4－溴－1－(蒎烷二氧代硼)－丁烷
"同相作用"加长1位碳上链长并产生手性中心;
格利雅反应加长1位碳上链长并转化手性中心
6－溴－2(R)－(蒎烷二氧代硼)－己烷
二蒎烷二氧代硼
6－溴－2(R)－羟基乙烷
溴醇
可可碱
6－溴－2(R)－乙酰氧基乙烷
溴乙酸酯
可可碱钠
CT-1501R
乙酸酯
CT-1501R
氢氯化物
CT-1501R
游离碱

图１０

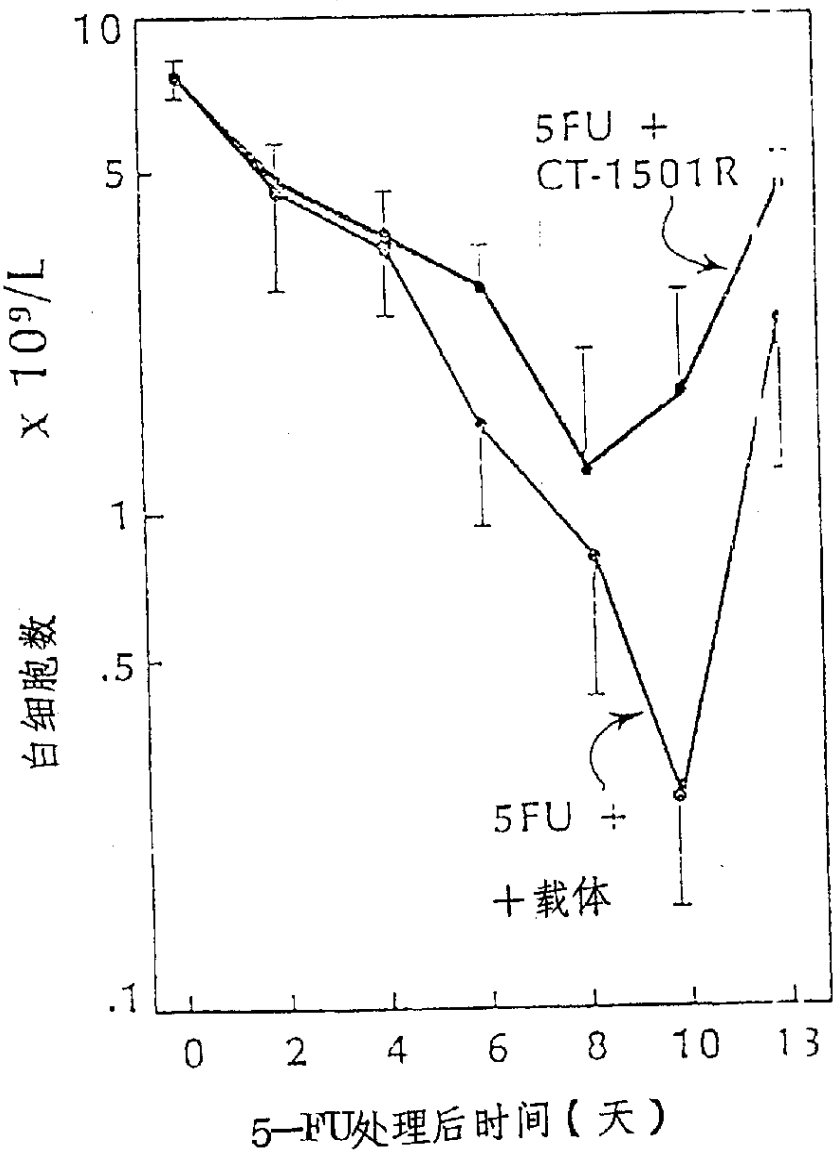


图 1 1

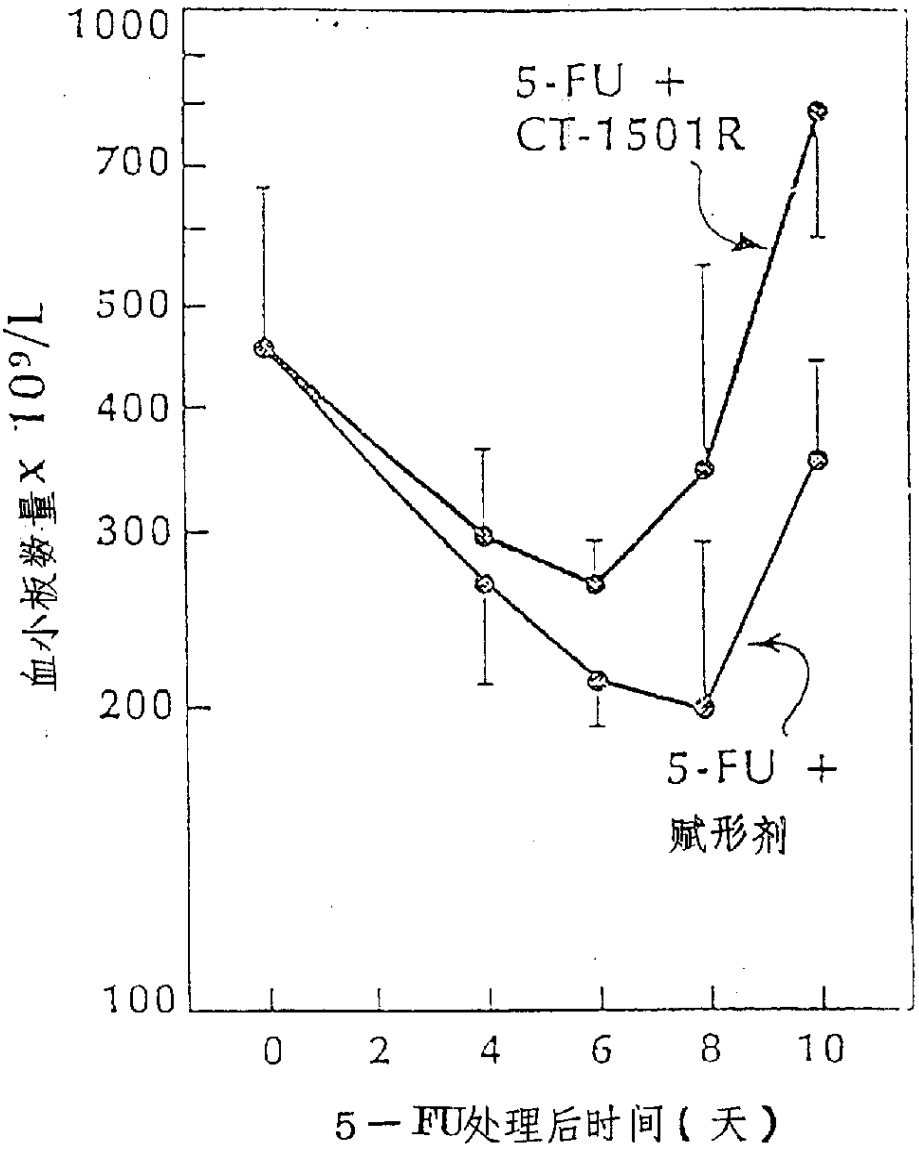

1000
700
500
400
300
200
100
血小板数量 x 10^9/L
5-FU +
CT-1501R
5-FU +
赋形剂
0
2
4
6
8
10
5－FU处理后时间（天）

图 12

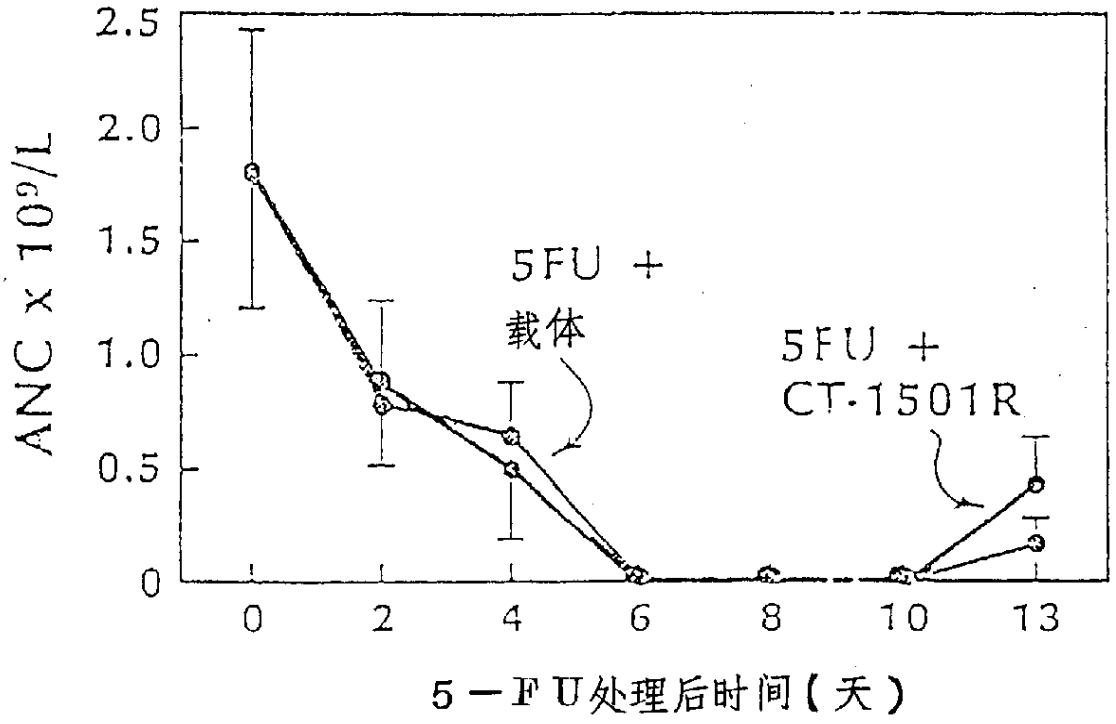

ANC x 10⁹/L
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
0
2
4
6
8
10
13
5FU +
载体
5FU +
CT-1501R
5－FU处理后时间（天）

图 13

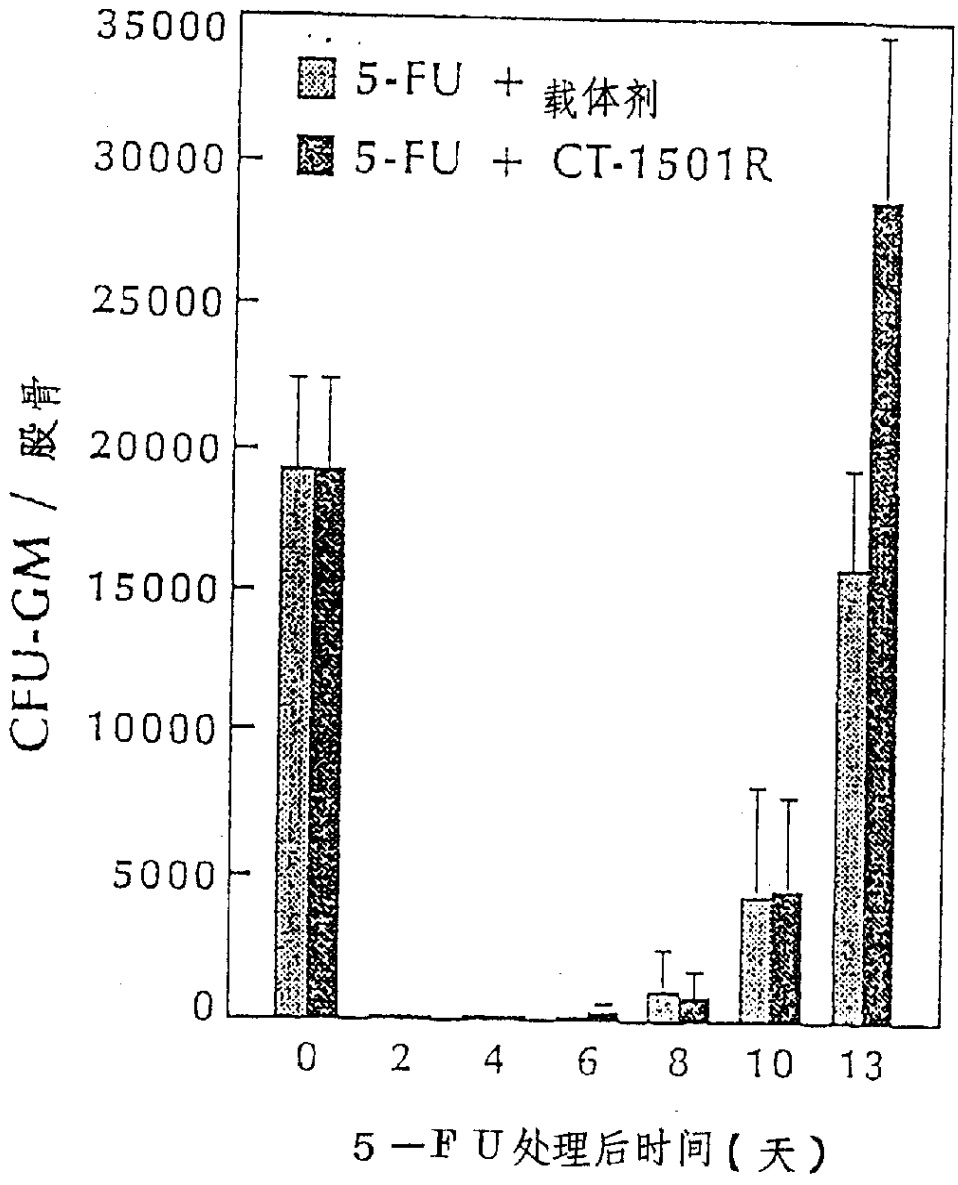
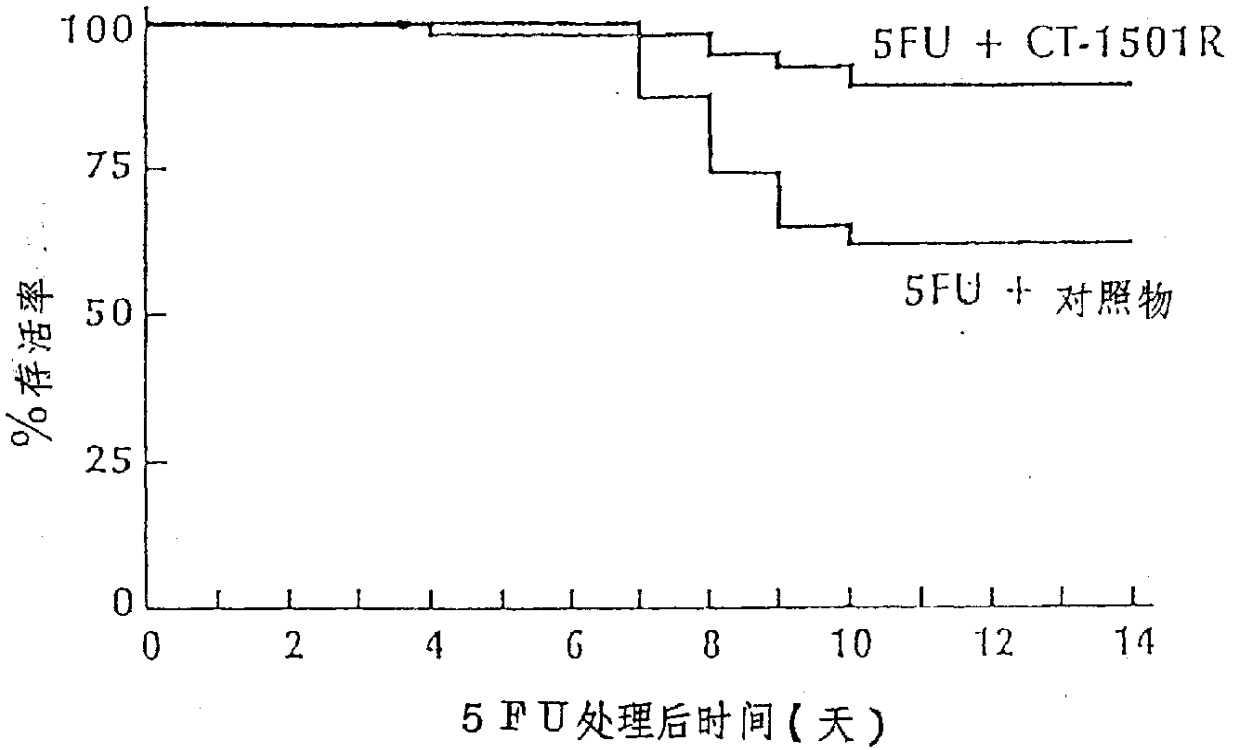

35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
CFU-GM / 股骨
5-FU + 载体剂
5-FU + CT-1501R
0
2
4
6
8
10
13
5－FU处理后时间(天)

图 1 4



老鼠数量＝８８幼物

图 15

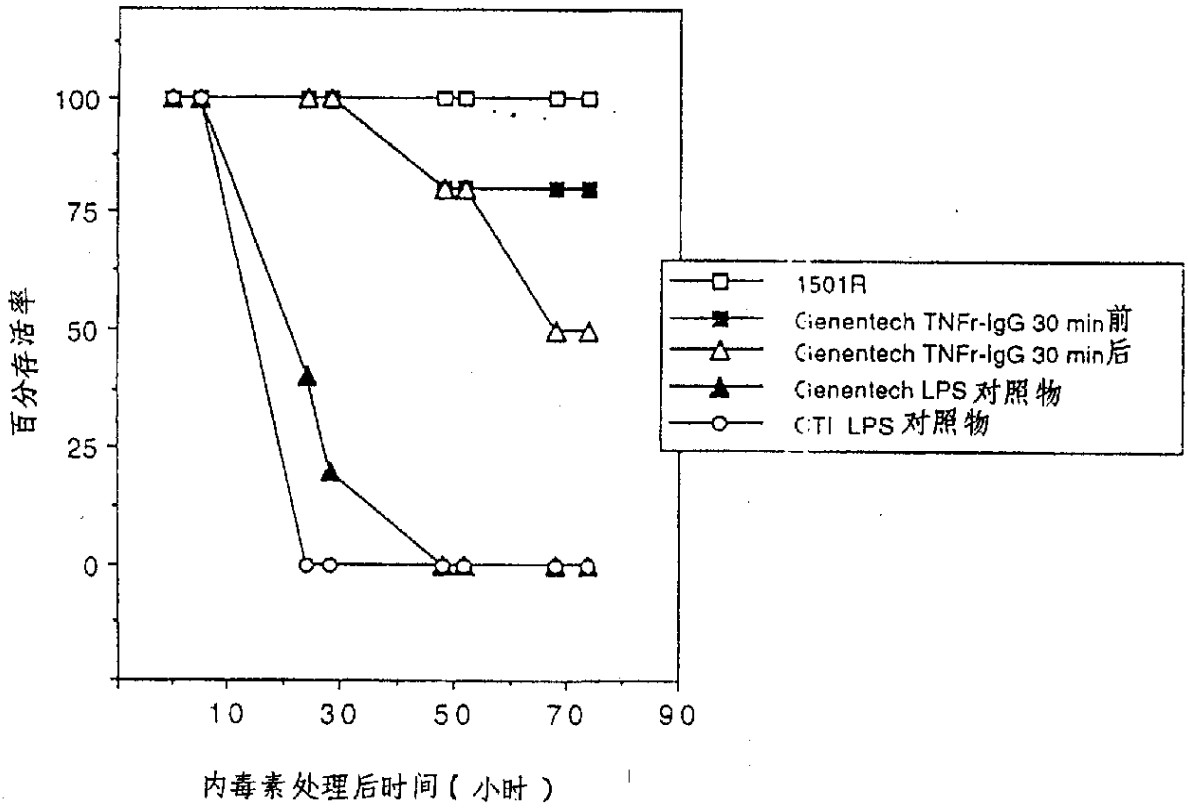

100
75
50
25
0
10
30
50
70
90
百分存活率
内毒素处理后时间（小时）
1501R
Cienentech TNFr-IgG 30 min前
Cienentech TNFr-IgG 30 min后
Cienentech LPS 对照物
CTI LPS 对照物

图 16

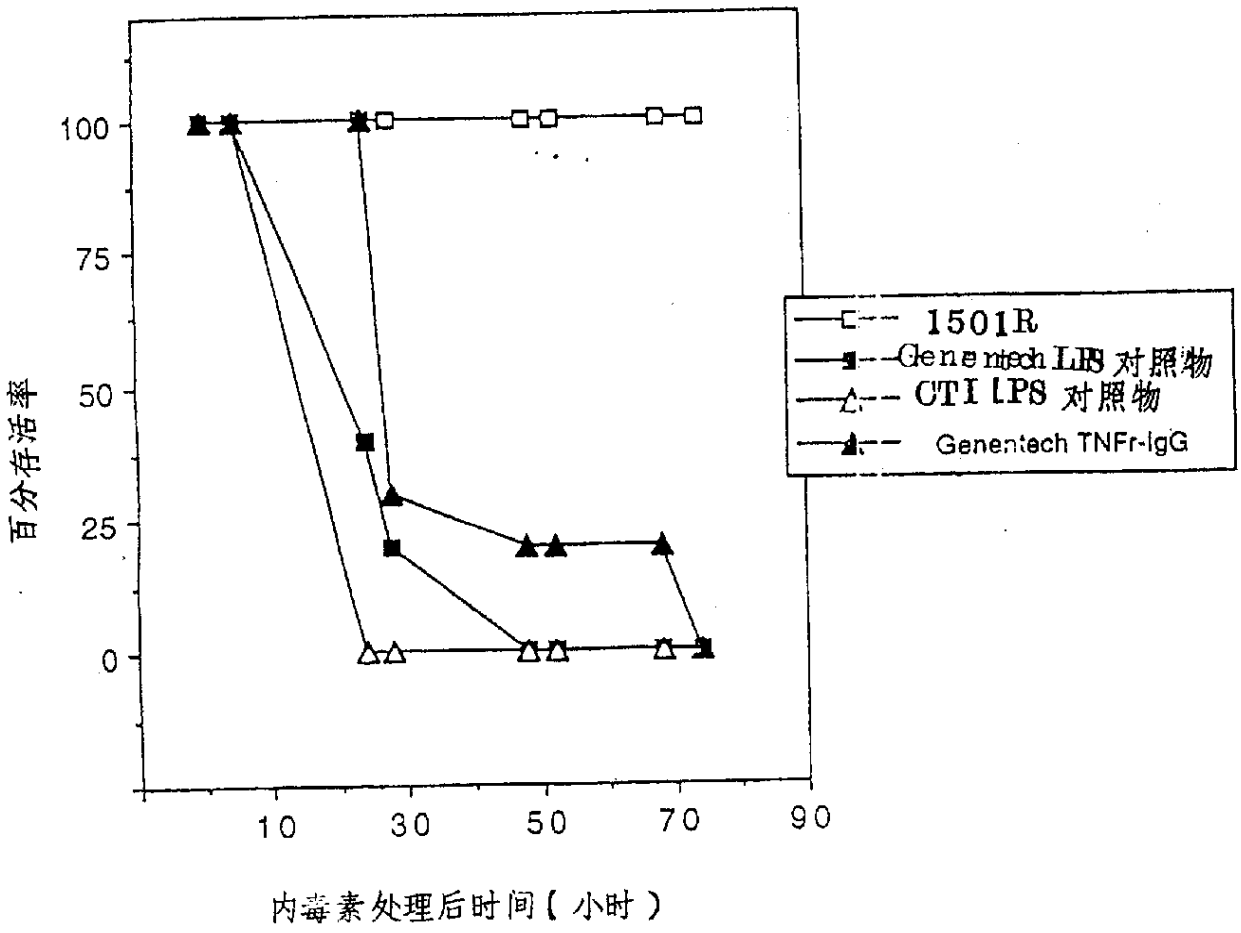

100
75
50
25
0
10
30
50
70
90
百分存活率
内毒素处理后时间（小时）
1501R
Genentech LPS 对照物
CTI LPS 对照物
Genentech TNFr-IgG

图 17

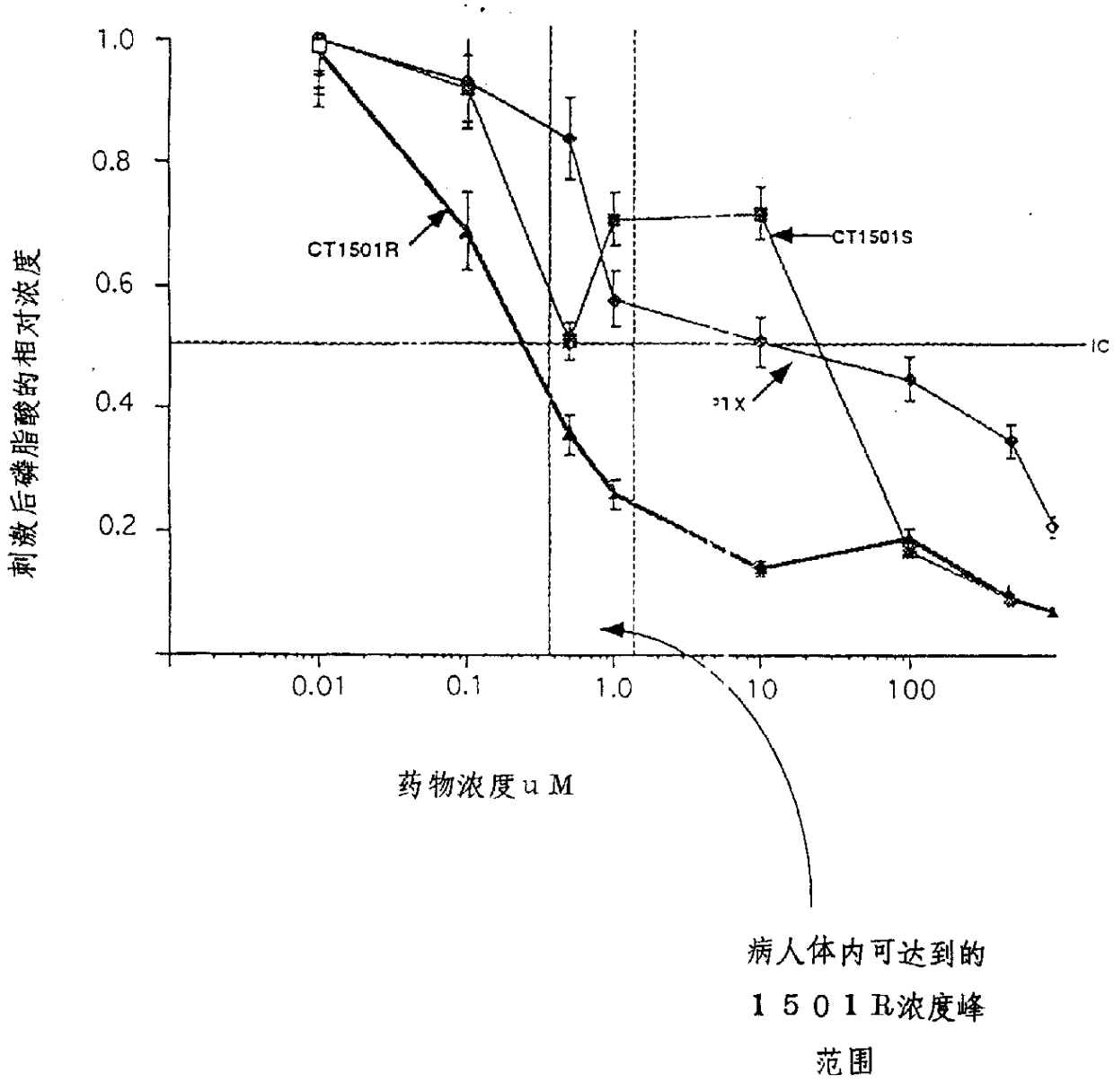

1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
刺激后磷脂酸的相对浓度
CT1501R
CT1501S
0.01
0.1
1.0
10
100
药物浓度u M
病人体内可达到的
1501R浓度峰
范围

图 18

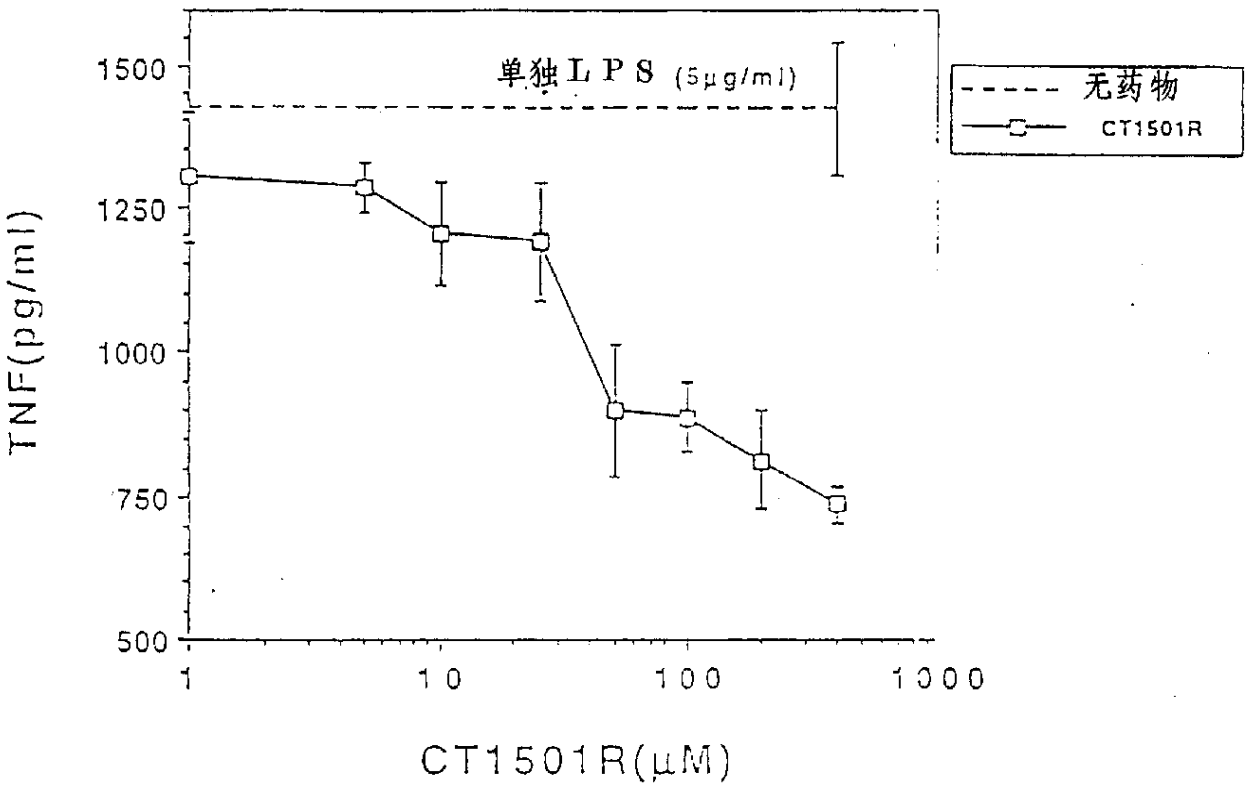

1500
1250
1000
750
500
TNF(pg/ml)
单独LPS (5μg/ml)
无药物
CT1501R
1
10
100
1000
CT1501R(μM)

图 1 9

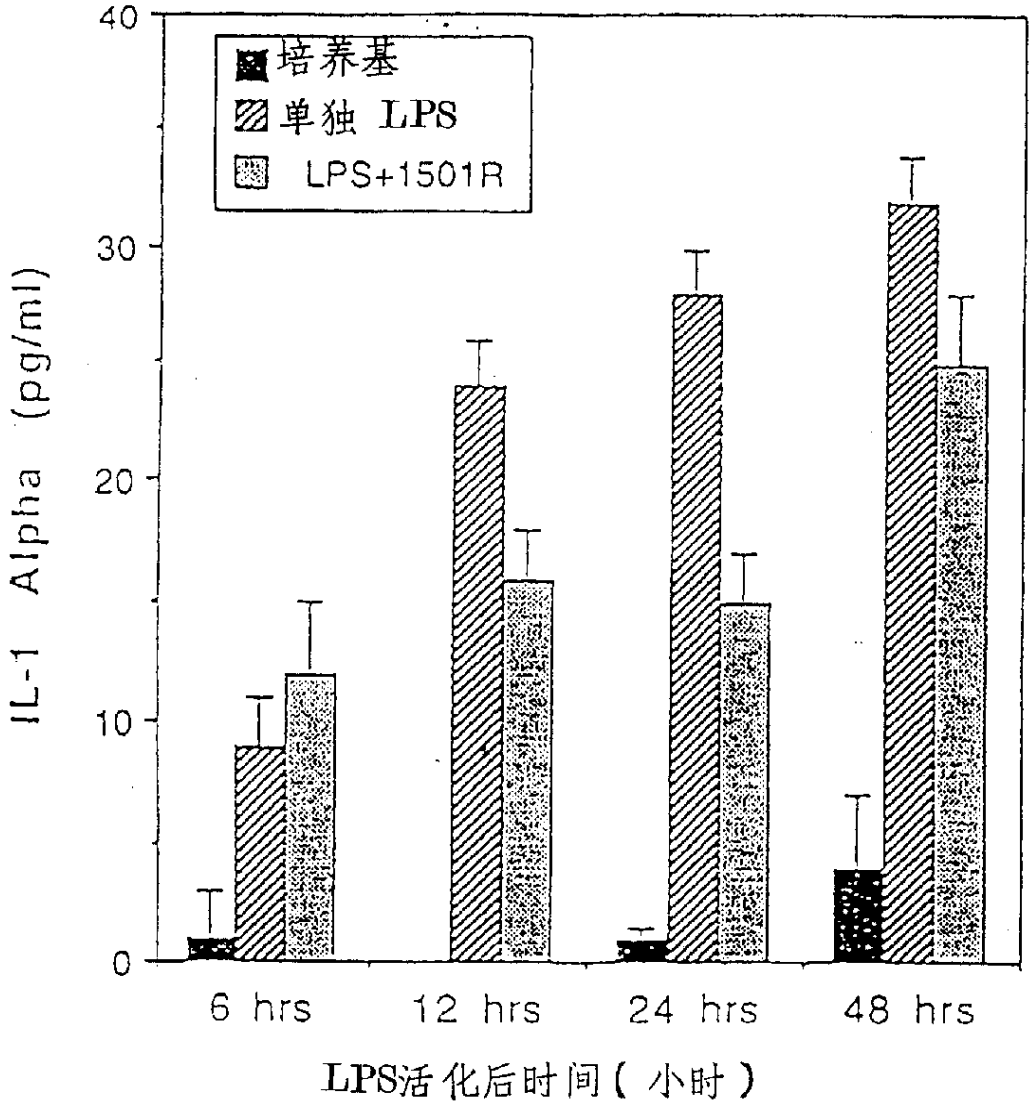

40
30
20
10
0
培养基
单独 LPS
LPS+1501R
IL-1 Alpha (pg/ml)
6 hrs
12 hrs
24 hrs
48 hrs
LPS活化后时间（小时）

图 20

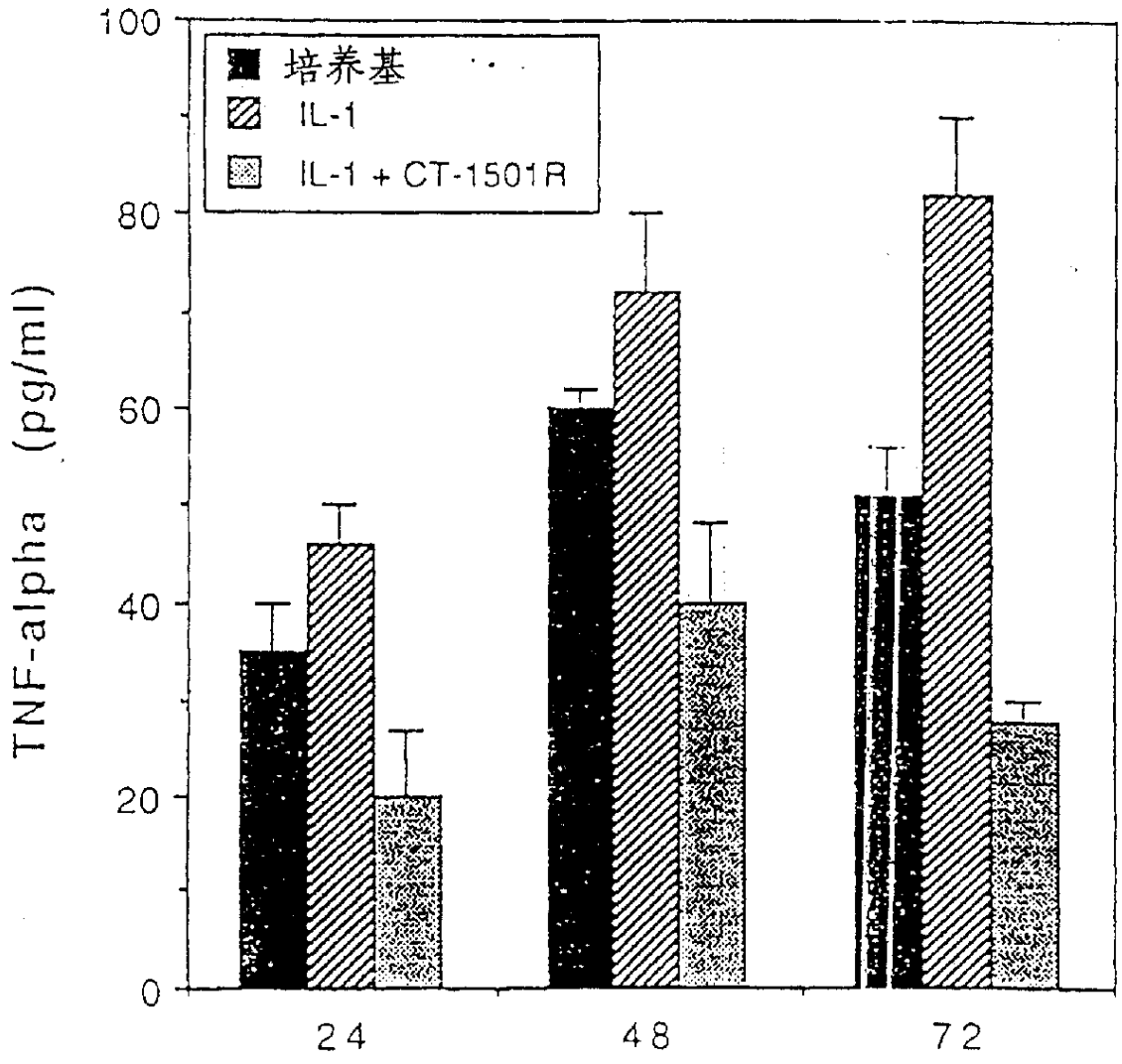

100
80
60
40
20
0
TNF-alpha (pg/ml)
培养基
IL-1
IL-1 + CT-1501R
24
48
72
IL--1活化后时间（小时）

图 21

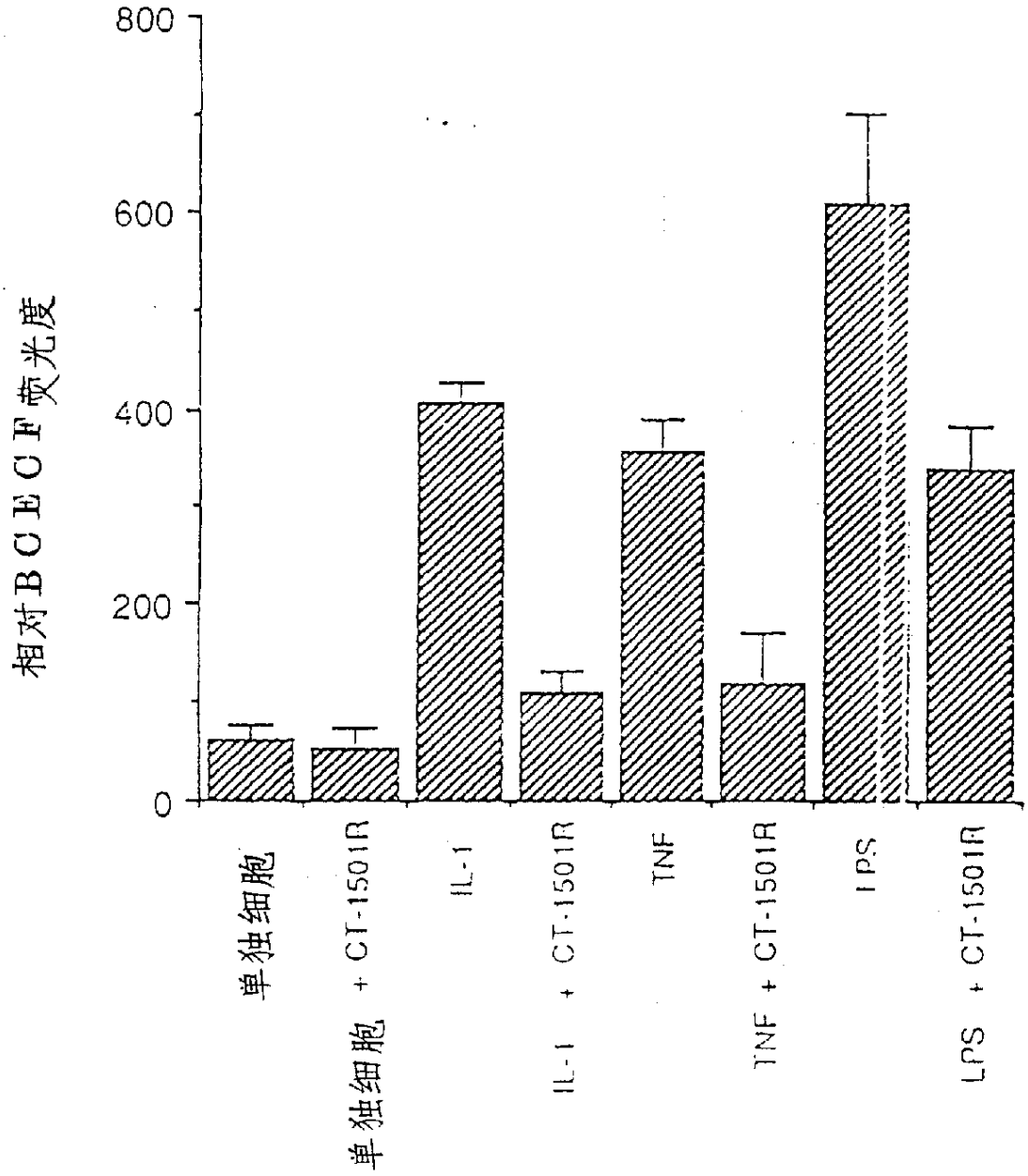
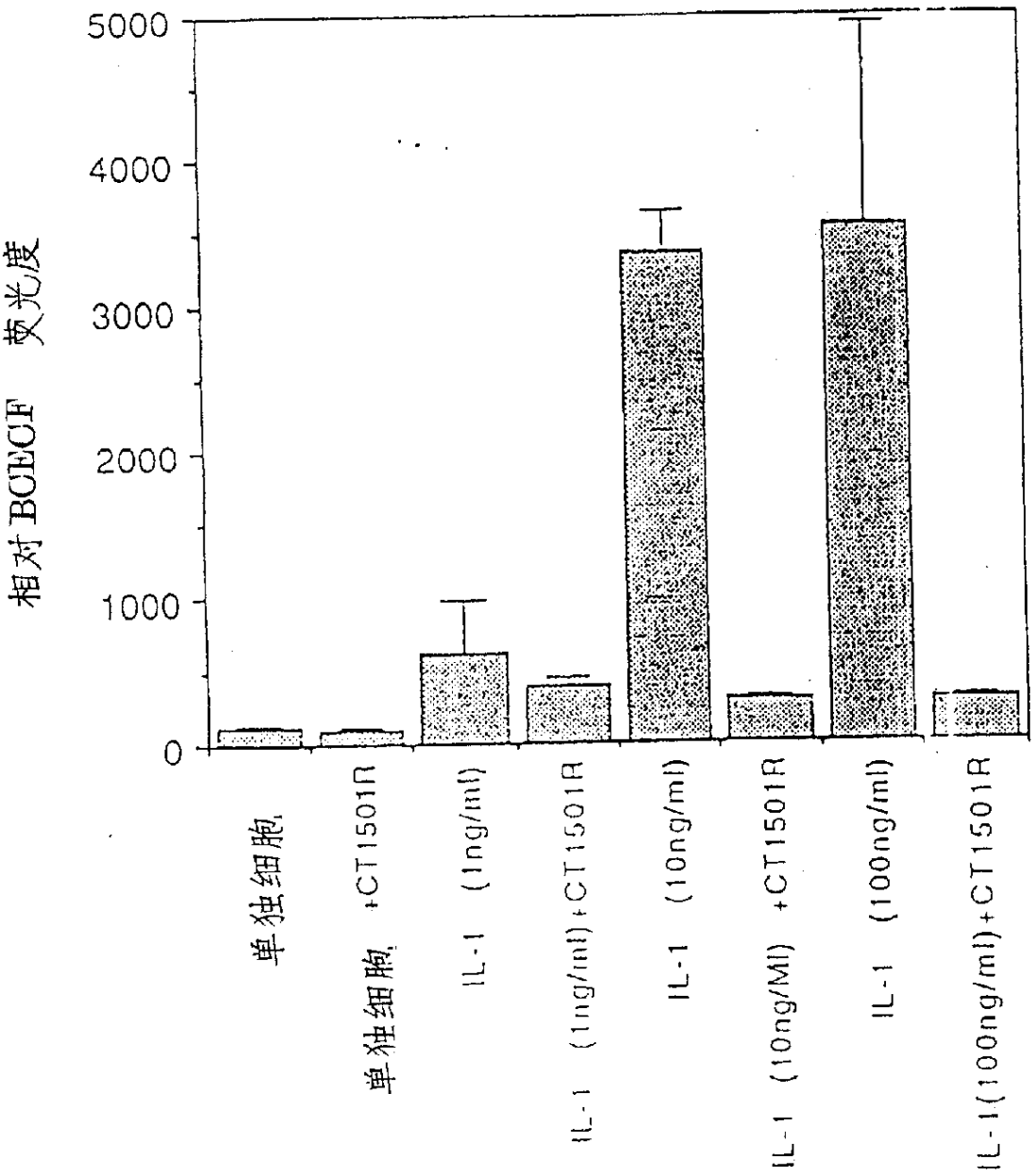

相对BCECF荧光度
800
600
400
200
0
单独细胞
单独细胞 + CT-1501R
IL-1
IL-1 + CT-1501R
TNF
TNF + CT-1501R
LPS
LPS + CT-1501R

图 22


相对 BCECF 荧光度
5000
4000
3000
2000
1000
0
单独细胞
单独细胞 +CT1501R
IL-1 (1ng/ml)
IL-1 (1ng/ml)+CT1501R
IL-1 (10ng/ml)
IL-1 (10ng/Ml) +CT1501R
IL-1 (100ng/ml)
IL-1(100ng/ml)+CT1501R