

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02809426.3

A61K 31/20

A61K 31/23

A61K 31/255

A61K 31/7024

A61P 7/06

A61K 31/18

A61K 31/194

[43] 公开日 2005 年 6 月 29 日

[11] 公开号 CN 1633286A

[22] 申请日 2002.4.18 [21] 申请号 02809426.3

[30] 优先权

[32] 2001.4.18 [33] US [31] 60/284,458

[86] 国际申请 PCT/CA2002/000535 2002.4.18

[87] 国际公布 WO2002/083120 英 2002.10.24

[85] 进入国家阶段日期 2003.11.5

[71] 申请人 普罗米蒂克生物科学公司

地址 加拿大魁北克

[72] 发明人 L·加尼翁 J·巴拉比 P·劳林

C·彭尼 B·扎卡里

[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 李华英

C07H 15/04 C07C233/18 C07C233/47

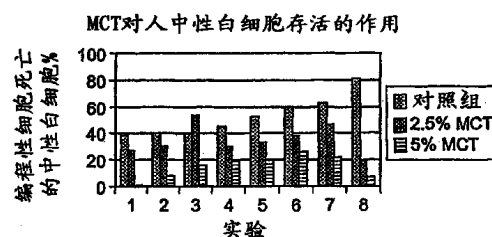
C07C235/06 C07C235/08 C07C237/22

权利要求书 8 页 说明书 40 页 附图 7 页

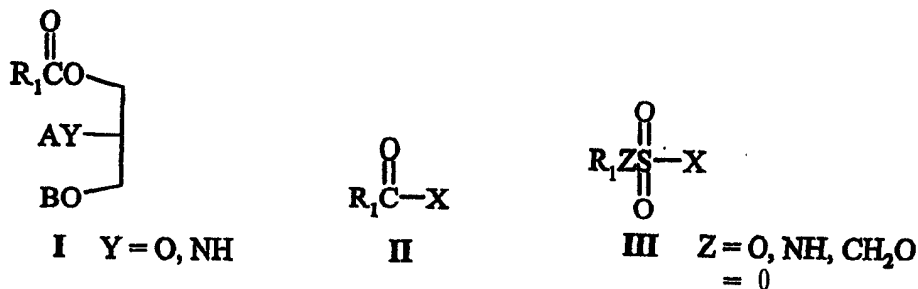
[54] 发明名称 作为中性白细胞存活和激活因子的
中链长度的脂肪酸、甘油酯和类似
物

[57] 摘要

本发明提供了用于促进中性白细胞存活和活化的组合物和方法,诸如作为化疗和放疗的不需要的副作用产生的中性白细胞减少的治疗方法。根据人和动物的治疗需要对其给予足以减少和消除中性白细胞减少用量的组合物,该组合物含有诸如癸酸和辛酸这样的中链脂肪酸或其盐或其甘油三酯或其甘油单酯或甘油二酯或其它类似物或中链甘油三酯(MCT)。给予有效治疗该病用量的所述组合物。该方法还用于处理骨髓移植和治疗各种中性白细胞减少性疾病。



1. 根据治疗需要刺激患者血细胞生成的方法, 所述方法包括对所述患者给予药物有效量的组合物的步骤, 该组合物包括一种或多种通式 I 描述的化合物、一种或多种通式 II 描述的化合物、一种或多种通式 III 描述的化合物或其组合:



其中

R_1 是直链或支链的饱和或不饱和 C7-C11 烷基;

A 和 B 独立为氢或 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1\text{-C} \end{array}$,

且 A 不必与 B 相同; 且

X 是羟基、含有金属一价或二价抗衡阳离子的负氧离子或含有直链或支链 C1-C4 烷基部分的烷氧基。

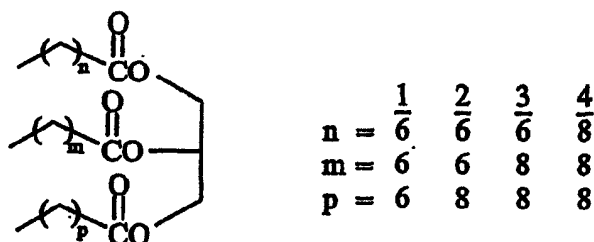
2. 权利要求 1 所述方法, 其中所述组合物包括至少两种由通式 I 描述的化合物的混合物, 这些化合物是中链甘油三酯(MCTs), 其中 $\text{A} = \text{B} = \text{R}_1$ 分别是直链或支链的饱和或不饱和 C7 和 C9 烷基。

3. 权利要求 2 所述方法, 其中所述混合物由两种甘油三酯组成, 其中第一种 MCT 由通式 I 描述且 $\text{A} = \text{B} = \text{R}_1 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_6-$, 而第二种 MCT 由通式 I 描述且 $\text{A} = \text{B} = \text{R}_1 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_8-$ 。

4. 权利要求 2 所述方法, 其中所述组合物进一步包括各自为 0.1% - 3% 的由通式 I 描述且 $\text{A} = \text{B} = \text{R}_1 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_4-$ 的第三种化合物和由通

式 I 描述且 $A = B = R_1 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}-$ 的第四种化合物。

5. 权利要求 2 所述方法, 其中所述混合物包括由下列通式描述的 C8 和 C10 脂肪酸甘油三酯的 4 种几何异构体:



6. 权利要求 1 所述方法, 其中所述组合物包括由通式 II 描述且 X 是 OH 的一种或多种化合物, 它是中链脂肪酸。

7. 权利要求 1 所述方法, 其中所述组合物包括由通式 III 描述且 X 是 OH 的一种或多种化合物。

8. 权利要求 1 所述方法, 其中所述组合物包括由通式 II 描述且 X 是含有金属抗衡离子的负氧离子的一种或多种化合物, 所述金属抗衡离子选自钙、镁、钾和钠。

9. 权利要求 1 所述方法, 其中所述组合物包括由通式 III 描述且 X 是含有金属抗衡离子的负氧离子的一种或多种化合物, 所述金属抗衡离子选自钙、镁、钾和钠。

10. 权利要求 6 所述方法, 其中所述一种或多种化合物是辛酸或癸酸。

11. 权利要求 8 所述方法, 其中所述一种或多种化合物是辛酸钠或癸酸钠。

12. 权利要求 8 所述方法, 其中所述一种或多种化合物是辛酸钙或癸酸钙。

13. 权利要求 1 所述方法, 其中所述一种或多种化合物是辛酸甘油三酯或癸酸甘油三酯。

14. 权利要求 1 所述方法, 其中所述一种或多种化合物具有大于 1 μM 的血药浓度。

15. 权利要求 1 所述方法, 其中刺激血细胞生成可治疗因所述患者化疗导致的骨髓抑制。

16. 权利要求 1 所述方法, 其中刺激血细胞生成可治疗因所述患者放疗导致的骨髓抑制。

17. 权利要求 1 所述方法, 其中刺激血细胞生成可治疗所述患者体内的慢性中性白细胞减少。

18. 权利要求 1 所述方法, 其中刺激血细胞生成可治疗所述患者体内的短暂中性白细胞减少。

19. 权利要求 1 所述方法, 其中刺激血细胞生成可治疗因血液病导致所述患者体内的中性白细胞减少。

20. 权利要求 1 所述方法, 其中刺激血细胞生成可治疗所述患者体内药物诱发的中性白细胞减少。

21. 权利要求 1 所述方法, 其中刺激血细胞生成可治疗因营养缺乏导致所述患者体内的中性白细胞减少。

22. 权利要求 1 所述方法，其中刺激血细胞生成可治疗因感染导致所述患者体内的中性白细胞减少。

23. 权利要求 1 所述方法，其中刺激血细胞生成可治疗因放疗导致所述患者体内的中性白细胞减少。

24. 权利要求 1 所述方法，其中刺激血细胞生成可使所述患者伤口愈合。

25. 权利要求 1 所述方法，其中刺激血细胞生成可诱导中性白细胞转移以有利于所述患者的骨髓移植。

26. 权利要求 1 所述方法，进一步包括给予药物有效量的人集落刺激因子的步骤，其中所述药物有效量在有一种或多种化合物存在的情况下得到降低。

27. 权利要求 26 所述方法，其中所述集落刺激因子是 G-CSF 或 GM-CSF。

28. 权利要求 1 所述方法，进一步包括在给予一种或多种化合物之前和/或之后单独给予药物有效量的人集落刺激因子的步骤，但不同时给药。

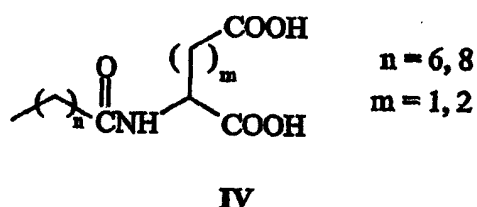
29. 权利要求 28 所述方法，其中所述集落刺激因子是 G-CSF 或 GM-CSF。

30. 权利要求 1 所述方法，进一步包括同时给予药物有效量的人细胞因子的步骤。

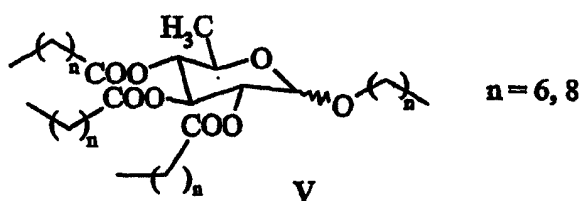
31. 权利要求 30 所述方法, 其中所述细胞因子是白细胞介素 2 或白细胞介素 15。

32. 含有辛酸甘油三酯或癸酸甘油三酯氮杂类似物的化合物, 其中氮杂类似物是 1, 2, 3-O, N, 0-三辛酰基丝氨酸或 1, 2, 3-O, N, 0-十三酰基丝氨酸。

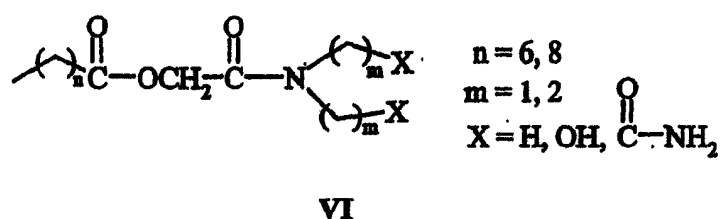
33. 混有一种或多种任选的稀释剂、载体和/或赋形剂且用量或剂量足以制成药物制剂的由通式 IV 描述的化合物:



34. 混有一种或多种任选的稀释剂、载体和/或赋形剂且用量或剂量足以制成药物制剂的由通式 V 描述的化合物:



35. 混有一种或多种任选的稀释剂、载体和/或赋形剂且用量或剂量足以制成通过在体内降解而释放权利要求 1 所述药物的药物制剂的由通式 VI 描述的化合物:



36. 根据患者对治疗的需要刺激其体内血细胞生成的方法，所述方法包括给予药物有效量的权利要求 32-35 中任意一项的一种或多种化合物的步骤。

37. 权利要求 36 所述方法，其中刺激血细胞生成可治疗因所述患者化疗导致的骨髓抑制。

38. 权利要求 36 所述方法，其中刺激血细胞生成可治疗因所述患者放疗导致的骨髓抑制。

39. 权利要求 36 所述方法，其中刺激血细胞生成可治疗所述患者体内的慢性中性白细胞减少。

40. 权利要求 36 所述方法，其中刺激血细胞生成可治疗所述患者体内的短暂中性白细胞减少。

41. 权利要求 36 所述方法，其中刺激血细胞生成可治疗因血液病导致所述患者体内的中性白细胞减少。

42. 权利要求 36 所述方法，其中刺激血细胞生成可治疗所述患者体内药物诱发的中性白细胞减少。

43. 权利要求 36 所述方法，其中刺激血细胞生成可治疗因营养缺乏导致所述患者体内的中性白细胞减少。

44. 权利要求 36 所述方法，其中刺激血细胞生成可治疗因感染导致所述患者体内的中性白细胞减少。

45. 权利要求 36 所述方法, 其中刺激血细胞生成可治疗因放疗导致所述患者体内的中性白细胞减少。

46. 权利要求 36 所述方法, 其中刺激血细胞生成可使所述患者伤口愈合。

47. 权利要求 36 所述方法, 其中刺激血细胞生成可诱导中性白细胞转移以有利于所述患者体内的骨髓移植。

48. 权利要求 36 所述方法, 进一步包括同时给予药物有效量的人集落刺激因子的步骤, 其中所述药物有效量在有一种或多种化合物存在的情况下得到降低。

49. 权利要求 48 所述方法, 其中所述集落刺激因子是 G-CSF 或 GM-CSF。

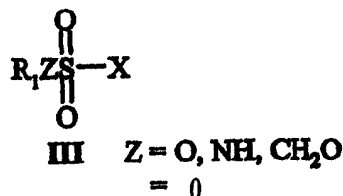
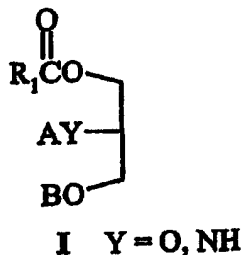
50. 权利要求 36 所述方法, 进一步包括在给予一种或多种化合物之前和/或之后单独给予药物有效量的人集落刺激因子的步骤, 但不同时给药。

51. 权利要求 50 所述方法, 其中所述集落刺激因子是 G-CSF 或 GM-CSF。

52. 权利要求 36 所述方法, 进一步包括同时给予药物有效量的人细胞因子的步骤。

53. 权利要求 52 所述方法, 其中所述细胞因子是白细胞介素 2 或白细胞介素 15。

54. 一种或多种化合物在制备用于刺激血细胞生成的药物中的用途, 所述一种或多种化合物选自由通式 I、II、III 描述的化合物及其组合:



其中

R₁ 是直链或支链的饱和或不饱和 C7-C11 烷基;

A 和 B 独立为氢或 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1\text{C}, \end{array}$

且 A 不必与 B 相同; 且

X 是羟基、含有金属一价或二价抗衡阳离子的负氧离子或含有直链或支链 C1-C4 烷基部分的烷氧基。

55. 权利要求 1 所述方法, 其中刺激血细胞生成可治疗因船运或运输产生的压力所致的动物体内短暂中性白细胞减少。

56. 权利要求 36 所述方法, 其中刺激血细胞生成可治疗因船运或运输产生的压力而所致的动物体内短暂中性白细胞减少。

作为中性白细胞存活和激活因子的 中链长度的脂肪酸、甘油酯和类似物

发明领域

本发明涉及中性白细胞减少的预防和/或治疗方法。该方法包括治疗与使用化疗和放疗有关的中性白细胞减少和治疗因感染、血液病和营养缺乏导致的中性白细胞减少。本发明还一般涉及降低药物毒性和提高药物功效。本发明特别涉及中链长度的脂肪酸、诸如癸酸、辛酸或其盐和甘油三酯或其甘油单酯和甘油二酯或其它类似物作为中性白细胞存活和激活因子或骨髓干细胞增殖因子的应用。

发明背景

化疗指的是诸如但不限于环磷酰胺、阿霉素、道诺红菌素、长春花碱、长春花新碱、博来霉素、依托泊苷、托泊替康、伊立替康、泰索帝、紫杉醇、5-氟尿嘧啶、甲氧蝶呤、吉西他滨、顺铂、卡铂或苯丁酸氮芥这样的细胞毒性剂在根除癌细胞和肿瘤中的应用。然而，这些活性剂是非特异性的且它们特别在高剂量下对正常和快速分裂的细胞具有毒性。这一结果通常在进行化疗和放疗的患者中产生各种副作用。骨髓中血细胞产生严重下降的骨髓抑制是这类副作用之一。其特征在于白细胞减少、中性白细胞减少和血小板减少。重度慢性中性白细胞减少(恶性中性白细胞减少症、周期性中性粒细胞减少症和先天性中性白细胞减少症)的特征还在于循环的中性白细胞数量选择性下降且对细菌感染的敏感性增强。

使用化疗药治疗癌症的实质在于将细胞毒性机制与对宿主细胞中高度增殖的肿瘤细胞的选择性机制合并。然而，对化疗药而言难以具有这类选择性。化疗剂的细胞毒性限制了给药剂量、影响了治疗周期且严重危害了肿瘤患者的生命质量。

尽管还可能对其它正常组织产生不良影响，但是骨髓对诸如化疗和放疗这样的增殖特异性治疗特别敏感。急性和慢性骨髓毒性是导致血细胞计数下降和贫血、白细胞减少、中性白细胞减少、粒细胞缺乏症和血小板减少的癌症疗法中的常见副作用。这类副作用的一个原因是由细胞毒性剂和放射对造血细胞(例如多能干细胞和其它祖细胞)的致命作用和由多成熟髓室缺失诱导的负反馈机制引起的干细胞分化所导致的造血细胞数量下降。第二个原因是干细胞自我更新的能力下降，它还涉及直接(突变)和间接(干细胞群老化)作用。(Tubiana, M. 等, 《放疗和肿瘤学》(Radiotherapy and Oncology) 29: 1-17, 1993)。因此，癌症的治疗通常导致多形核中性粒细胞(PMN)或中性白细胞减少。PMN 是防御侵入病原体的第一道防线且在急性炎症过程中起关键作用，其主要功能是吞噬和杀伤感染病原体。为了完成这一作用，PMN 脱离循环作为对趋化因子的反应进入受侵害区域以发挥其生物功能。在表现出正常血细胞计数的个体中，中性白细胞约占总白细胞的 60%。(SI Units Conversion Guide, 66-67 (1992), 《新英格兰药物杂志书》(New England Journal of Medicine Books))。然而，多达三分之一的接受癌症化疗的患者可以患有中性白细胞减少。健康成年人的平均正常白细胞计数约为 4400 个细胞/ μL ，范围在 1800-7700 个细胞/ μL 。计数为 1,000 个细胞 - 500 个细胞/ μL 属于中度白细胞减少，而计数为 500 个细胞/ μL 或 500 个细胞/ μL 以下属于重度白细胞减少。处于骨髓抑制状态的患者易受感染且通常患有血液凝固障碍而需要住院。中性白细胞和血小板缺乏是癌症治疗后发病率和死亡率的主要原因且导致癌症疗法的高成本。在上述这些情况中，能够抑制中性白细胞编程性细胞死亡或刺激中性白细胞活化和转移的任意活性剂的应用可能具有治疗价值。化疗后恢复患者免疫系统的努力包括使用造血生长因子刺激剩余的干细胞增殖并分化成成熟的抗感染细胞。

在骨髓移植过程中，利用称作“转移”的现象从外周血液中募集较大数量的干细胞/祖细胞。这种方法通常用于自体或同种异体骨髓移植。生长因子用于增加重度骨髓抑制疗法和输注先祖干细胞前募集的

外周先祖干细胞的数量。

骨髓移植疗法后也可能遇到中性白细胞减少。然而，这些治疗需要 10-15 天的治疗期，在此期间患者易受感染。能够刺激骨髓干细胞的活性剂可以有利于和加速干细胞移入，由此缩短骨髓移植后的中性白细胞减少的时限。

尽管诸如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 这样的造血生长因子可以发挥这类作用，但是其应用因它们必须通过重组技术产生而成本昂贵。这类治疗后起改善作用的治疗法并非必不可少，条件是“化学保护”患者不受免疫抑制。

因此，对减少因化疗和放疗诱发的骨髓抑制状态的不需要的副作用的新组合物和方法存在需求。

发明概述

本发明通过提供刺激包括人的哺乳动物体内造血系统的新方法而满足了对化学保护剂的需求。本发明还提供了化疗和放疗中的骨髓抑制作用的新治疗方法，而在任意其它情况中，对造血系统的刺激可能具有价值，诸如、但不限于骨髓移植和慢性中性白细胞减少以及因感染、血液病和营养缺乏导致的中性白细胞减少。该方法有助于进行这类治疗的患者的造血系统抵抗骨髓抑制、增加中性白细胞存活和活化。

按照本方法，对哺乳动物、特别是人给予在药物上可接受载体中含有一种或多种中链长度脂肪酸、诸如癩酸、辛酸或其盐或其甘油三酯或甘油单酯或甘油二酯或其它类似物的组合物，其用量可有效预防或治疗中性白细胞减少，诸如减少化疗和放疗的副作用和治疗因感染、血液病和营养缺乏导致的中性白细胞减少。

因此，本发明的一个目的是提供使用癩酸、辛酸、月桂酸或其金属盐(钠、钾、钙、镁)或其甘油三酯或其甘油单酯或甘油二酯或其它类似物生产化学保护药物组合物作为单一活性剂或作为两种或多种活性剂与和/或不与其它化疗剂或诱发骨髓抑制状态的这类药物的组合的组合物。

本发明的另一个目的涉及癸酸、辛酸或其钠盐或甘油三酯或其甘油单酯或甘油二酯或相关化合物作为造血刺激因子的应用。

此外，本发明包括含有癸酸、辛酸或其钠盐或甘油三酯或其甘油单酯或甘油二酯或其它类似物的组合物和这类化合物在治疗骨髓抑制和随后的免疫抑制中的应用。

本发明的一个目的还涉及癸酸、辛酸或其钠盐或甘油三酯或其甘油单酯或甘油二酯或其它类似物在治疗患有重度慢性中性白细胞减少的患者中的应用。

本发明的另一个目的涉及癸酸、辛酸或其钠盐或甘油三酯或其甘油单酯或甘油二酯或其它类似物作为中性白细胞存活和激活因子的应用。

本发明还涉及癸酸、辛酸或其钠盐或甘油三酯或其甘油单酯或甘油二酯或其它类似物在中性白细胞转移可以在诸如自体或同种异体骨髓移植中具有治疗价值的疾病中的应用。

本发明的一个目的是对包括人的哺乳动物提供有效化学保护的方法。

本发明的另一个目的是提供有效增加对包括人的哺乳动物化疗和放疗的有效性的方法。

本发明的另一个目的是提供实现更好的治疗有益效果而同时避免副作用增加所并必不可少的常用剂量、乃至增加剂量的化疗组合物的使用方法。

本发明的另一个目的是提供有效减少或消除化疗诱发的包括人的哺乳动物体内中性白细胞减少的方法。

本发明的另一个目的是提供用于因血液病、诸如慢性特发性中性白细胞减少症、周期性中性粒细胞减少症、懒惰白细胞综合征、切迪阿克-东综合征白血病和再生障碍性贫血而导致的中性白细胞减少的治疗方法。

本发明的另一个目的是提供因感染、诸如病毒(例如 HIV、麻疹、肝炎、黄热病、单核细胞增多症)和细菌(例如伤寒、副伤寒、布氏菌

病)感染而导致的中性白细胞减少的治疗方法。

最后,本发明的另一个目的是提供使接受者副作用减少到最低限度或没有副作用的方法。

在综述所公开实施方案的详细描述和带审权利要求后显然可以得出本发明的这些和其它目的、特征和优点。

附图简述

附图 1 表示 MCT 对 PMN 编程性细胞死亡的作用。

附图 2 表示 MCT 对 PMN 吞噬的作用。

附图 3A 和 3B 表示阿霉素对 PMN 编程性细胞死亡的作用。

附图 4A 代表 MCT 对阿霉素治疗的中性白细胞的时间过程反应。

附图 4B 代表 MCT 对阿霉素治疗的中性白细胞的时间过程反应。

附图 5 表示 MCT 和三癸精对骨髓增殖的作用。

附图 6 表示 MCT 对免疫抑制动物体内骨髓细胞计数的作用。

附图 7 表示 MCT 免疫抑制动物体内脾细胞计数的作用。

附图 8 表示 MCT 和 GM-CSF 对正常小鼠胸腺重量的作用。

附图 9 表示 MCT、辛酸钠和癸酸钠对免疫抑制动物体内骨髓细胞计数的作用。

附图 10 代表 MCT 与亚治疗浓度的阿霉素联用在 B16F10 骨髓瘤模型中的化学保护作用 and 抗肿瘤功效。

附图 11 代表 MCT 与亚治疗浓度的环磷酰胺或泰索帝联用在 DA-3 乳腺癌模型中的化学保护作用 and 抗肿瘤功效。

附图 12 表示 MCT 与治疗浓度的环磷酰胺或泰索帝联用在 DA-3 乳腺癌模型中的化学保护作用 and 抗肿瘤功效。

发明详述

高剂量化疗和放疗破坏骨髓中的造血细胞,使患者中性白细胞和血小板严重缺失。在这类治疗后,患者因中性白细胞减少而导致的感染和发热而需要在重症监护病房中进行几周的加强护理。血小板减少

导致凝血时间延长和需要输血小板的出血疾患。骨髓抑制是癌症治疗中限制剂量的因素且中性白细胞和血小板缺乏是这些癌症治疗后发病率和死亡率的主要原因。

在骨髓移植中，可以使用两种手段。在移植前，刺激骨髓可以增加外周先祖干细胞的数量。然而，新近移植的骨髓不含足够成熟的中性白细胞或中性白细胞中间体以恢复患者的免疫系统。这使患者有一段时间对感染敏感性增加且凝血时间延长。包括中性白细胞刺激和激活的疗法通过减少中性白细胞减少和血小板减少而增加了骨髓移植后的恢复。

本发明涉及促进受治疗者中性白细胞存活和活化的方法。目前的方法涉及恢复受治疗者造血系统。目前用于这类治疗的造血生长因子是粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、干细胞因子(SCF)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。G-CSF和GM-CSF可以缩短中性白细胞减少和血小板减少的总期限，而仍然会保留患者存在凝血缺陷且易受感染过程中的显著时限。

还将骨髓移植过程中的“转移”用于从外周血液中采集较高数量的干细胞/祖细胞。在用生长因子治疗后骨髓中的造血干细胞迁移入血液。用于这类治疗的生长因子包括白细胞介素-3(IL-3)、G-CSF、GM-CSF、SCF和具有IL-3和GM-CSF的活性部分的重组融合蛋白。随后在用生长因子治疗后移入的干细胞被采集且在下一周期的高剂量化疗或放疗后再输入患者体内以恢复患者的中性白细胞和血小板。

中链甘油三酯(本文中也称为“MCT”)由用带有8(C8,辛酸)和10(C10,癸酸)碳链长度的脂肪酸酯化的甘油组成。MCT通常含有C8和C10脂肪酸甘油酯的混合物。然而，MCT也可以含有少量(各 $2\pm 1\%$)的C6(己酸)和C12(十二烷酸或月桂酸)的甘油酯。CRODAMOL™是商购自Croda Ltd., Toronto (Canada)的MCT。正如实施例1中所示，CRODAMOL™是含有不同比例的C8和C10脂肪酸甘油三酯的MCT。然而，CRODAMOL™不含任何C6或C12脂肪酸酯。另一方面，长链甘油三酯(在本文中也称为“LCT”)由用带有12个以上的碳链长度的脂肪酸酯化的

甘油组成。LCT 中所含的典型脂肪酸包括棕榈酸(C16)和硬脂酸(C18)。不同于 MCT, LCT 是膳食脂肪的主要成分。实际上, MCT 和 LCT 具有明显不同的生物特性。MCT 与 LCT 之间的某些生理差异描述在 Harrison 的《药物内在机理》(Principles of Internal Medicine), 第 8 版, 1520-1521 (1977), McGraw Hill Book Company; 或第 15 版, 1668-1669 (2001) 中。例如, 与 LCT 相反, MCT 不需要通过胰脂肪酶水解, 这是因为它们可以被肠上皮细胞吸收。

MCT 及其组成成分中链脂肪酸是用于食品和药物工业的无毒性物质。例如 K. A. Traul 等在《食品与化学毒理学》(Food and Chemical Toxicology) 38:79-98 (2000) 中描述已经将 MCT 用于增加数量的食品和营养应用中, 这是因为它们提供了许多超过 LCT 的优点。MCT 还主要用作各种人和兽用药物制剂和化妆品中的乳化剂。它们涉及大量支持 MCT 安全性的毒理学研究。例如, 注意到已经在临床试验中证实了人膳食中消耗达 1 g/kg 水平的 MCT 的安全性。C8 和 C10 脂肪酸具有相似的安全性和应用。例如, 在 Merck Index 第 11 版 266 (1989) 中报导了辛酸具有的基本上无毒性的 LD_{50} (口服, 大鼠) = 10.08 g/kg。实际上, 按照联邦法规条例 (Code of Federal Regulations (CFR)) 第 184 章的规定, 美国联邦药品管理局 (U. S. Federal Drug Agency) (FDA) 已经批准了辛酸的 GRAS (一般认为安全) 结论。类似地, 按照第 172 章 (CFR) 的规定, 将游离脂肪酸 (例如癩酸、辛酸) 及其金属盐看作是用于食品的安全添加剂。正如 D. Dimitrijevic 等在《药物学和药理学杂志》(Journal of Pharmacy and Pharmacology) J 53: 149-154 (2001) 中注意到的, 日本和瑞典将癩酸 (钠盐) 批准为人用直肠药物产品的吸收促进剂。美国专利 US 4, 602, 040 (1986) 中描述了将 MCT 用作药物赋形剂。近来 PCT 申请 WO 01/97799 中描述了将中链脂肪酸、特别是辛酸和癩酸用作抗菌剂。

然而, 截至到本文公开的意外发现为止, 尚不了解中链脂肪酸、诸如癩酸、辛酸或其金属盐或其甘油单酯、甘油二酯或甘油三酯 (MCT) 作为中性白细胞存活和激活因子的有效性。正如本文所述, MCT 含有

C8 (辛酸)和 C10 (癸酸)脂肪酸甘油三酯, 它们构成至少 98%涉及刺激血细胞生成和中性白细胞成熟的活性。D. Waitzberg 等在《营养》(Nutrition) 13: 128-132 (1997)中描述了脂类乳剂 (LCT 和 MCT) 仅适当减少中性白细胞杀菌功能且对单核细胞没有作用。实际上, 仅有一篇含糊地指出 MCT 可以影响中性白细胞减少的公开文献描述了给予 MCT 与 LCT 和单独给予 LCT 比较的临床研究。没有单独使用 MCT 进行研究且由此对免疫功能的作用尚不明确。然而, 由 S. Demirer 等在《临床营养》(Clinical Nutrition) 19: 253-258 (2000)报导的结果教导了当将 MCT 与 LCT 联用时和相对于 LCT 单独使用, MCT 使中性白细胞减少恶化。即提示 MCT 抑制中性白细胞功能和/或存活。作为对该意见的一定程度的支持, PCT 公开号 WO 95/30413 断言不饱和长链脂肪酸、诸如亚油酸 (linoleic acid) 以及饱和长链 (C16 或 C16 以上) 脂肪酸可以起增强造血干细胞增殖的作用。

本发明涉及中链脂肪酸或其金属盐或甘油三酯或其甘油单酯或甘油二酯或类似物或 MCT 作为血细胞生成活化或生长因子和中性白细胞存活和激活因子的应用。当用于化疗和放疗时, 在治疗前、过程中和/或之后给予含有中链脂肪酸或其金属盐或其甘油三酯或其甘油单酯或甘油二酯或类似物或 MCT 的组合物以缩短中性白细胞减少时限并加速造血系统的补充。此外, 能够在相对于使用化疗和放疗的多点治疗时使用中链脂肪酸与其金属盐或其甘油三酯或其甘油单酯或甘油二酯或类似物和/或 MCT 的组合(例如在使用 MCT 治疗前后使用脂肪酸)。另一方面, 能够在使用化疗和放疗前、过程中和/或之后同时给予该组合。在重度中性白细胞减少中, 将含有中链脂肪酸或其金属盐或甘油三酯或其甘油单酯或甘油二酯或类似物或 MCT 的组合物用作治疗剂。在骨髓移植过程中, 将中链脂肪酸或其金属盐或甘油三酯或其甘油单酯或甘油二酯或类似物或 MCT 用于增加强度放疗或化疗后移植用的外周干细胞数量。也可以在骨髓移植后使用中链脂肪酸或其金属盐或甘油三酯或其甘油单酯或甘油二酯或类似物或 MCT 以便刺激骨髓干细胞, 由此缩短从中性白细胞减少中恢复的时间期限。

该方法由此用于刺激血细胞生成以治疗因化疗或放疗导致的骨髓抑制、慢性或短暂中性白细胞减少、药物诱发的中性白细胞减少和因血液病、营养缺乏、感染或放疗导致的中性白细胞减少。短暂中性白细胞减少可能因船运动物或转运人或动物产生的压力所致。该方法还用于刺激血细胞生成以愈合患者伤口并诱导中性白细胞转移以有利于患者骨髓移植。

本文所用的术语“一种”可以指一种或多种，这取决于上下文中使用的含义。

本文所用的“中链脂肪酸、诸如癩酸或辛酸或其金属盐或其甘油三酯或其甘油单酯或甘油二酯或类似物或 MCT 组合物”指的是包括所述活性组分和一种或多种药物上可接受的载体的组合物。

本文所用的术语“药物上可接受的载体”指的是不干扰中链脂肪酸、诸如癩酸或辛酸或其金属盐或其甘油三酯或其甘油单酯或甘油二酯或类似物或 MCT 的生理作用且对包括人的哺乳动物而言无毒性的物质。

使用癩酸或辛酸或其盐或其甘油三酯或其甘油单酯或甘油二酯或其它类似物或 MCT 和药物上可接受的载体、通过本领域中公知的方法配制本发明的癩酸或辛酸或其盐或其甘油三酯或其甘油单酯或甘油二酯或其它类似物或 MCT 组合物(MERCK INDEX, Merck & Co., Rahway, NJ)。这些组合物包括单不限于液体、油剂、乳剂、气溶胶、吸入剂、胶囊、丸剂、贴剂和栓剂。

所有方法均包括将所述活性组分混入构成一种或多种辅助组分的载体中的步骤。

本文所用的术语“化疗”指的是使用细胞毒性剂杀伤增殖细胞的过程。术语“化疗过程中”指的是所给予的细胞毒性剂持续作用的期限。另一方面，术语“化疗后”用以覆盖给予细胞毒性剂后给予组合物的所有情况而与任何预先给予的相同细胞毒性剂无关、也与所给予的细胞毒性剂的持久性无关。

当将本发明方法用于化疗时，可以在化疗前、过程中或化疗后(即

在给予细胞毒性剂之前、过程中或之后)给予癸酸或辛酸或其盐或其甘油三酯或其甘油单酯或甘油二酯或其它类似物或 MCT。

所谓“细胞毒性剂”指的是高度杀伤增殖细胞、例如肿瘤细胞、病毒感染细胞或造血细胞的活性剂。可以用于本发明的细胞毒性剂的实例包括但不限于环磷酰胺、阿霉素、道诺红菌素、长春花碱、长春花新碱、博来霉素、依托泊苷、托泊替康、伊立替康、泰索帝、紫杉醇、5-氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、吉西他滨、顺铂、卡铂或苯丁酸氮芥和上述化合物中任意一种的兴奋剂。细胞毒性剂还可以是抗病毒剂，例如 AZT (即 3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷)或 3TC/拉米夫定(即 3-噻胞苷)。

本文所用的术语“白细胞减少”指的是血液中白细胞数量异常下降。

本文所用的术语“中性白细胞减少”指的是血液中存在异常少量的中性白细胞。

在一个优选的实施方案中，所述药物组合物是任意适合于口服、舌下给药或吸入(鼻部喷雾)、静脉内、肌内、皮下的用于治疗中性白细胞减少、血小板减少或作为中性白细胞存活和激活因子的组合物形式。

可以理解的是用于治疗所需的本发明组合物用量随给药途径、所治疗疾病的性质、患者年龄和情况而改变且最终由参与的临床医师决定。所需剂量易于以单剂量或分次剂量存在，在适当间隔时服用，例如每天两次、三次、四次或四次以上。

尽管为用于疗法而能够将癸酸或辛酸或其金属盐或甘油三酯或其甘油单酯或甘油二酯或其它类似物或 MCT 作为化学原料给药，但是优选将所述活性组分制成药物制剂。

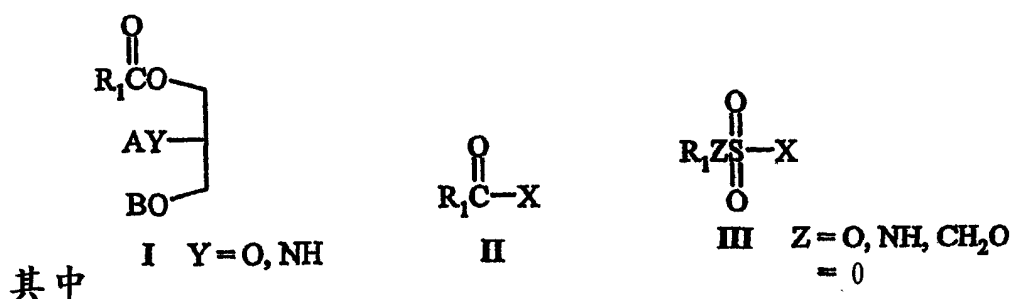
在本发明的一个优选的实施方案中，给予活性组分的用量使得血药浓度(游离和/或结合血清清蛋白)大于 1 μM 。在一个特别优选的实施方案中，血药浓度大于 1 mM 。

在另一个实施方案中，所述药物组合物是口服(包括舌下)或非肠道(包括肌内、皮下、直肠和静脉内)给药剂型。如果合适，可以将这

些制剂制成分散剂型且可以通过制药领域众所周知的任意方法制备。所有方法均包括将活性化合物混入液体载体或固体载体细粉或它们两者且如果必要随后将产物形成所需制剂的步骤。如果需要, 可以使用适合于使活性组分缓释的上述制剂。

还可以将中链脂肪酸或其盐或其甘油三酯或其甘油单酯或甘油二酯或其它类似物或 MCT 与其它治疗活性剂联用, 诸如抗癌细胞毒性剂或其它抗癌剂(免疫调制或调节药或治疗疫苗或抗血管生成药等); 免疫抑制药(包括消炎药); 生长因子, 诸如集落刺激因子(优选 GM-CSF 或 G-CSF); 细胞因子, 诸如白细胞介素 2 或白细胞介素 15; 或其组合。可以以单独或组合的药物制剂形式依次(之前或之后)或同时给予这类组合中的各个成分。上述组合易作为药物剂型使用且由此本发明的另一个发明包括含有上述所定义的组合及其药物上可接受载体的药物制剂。

在根据治疗需要刺激患者血细胞生成的方法的优选实施方案中, 给予含有下列化合物中的一种或多种或其组合的药物有效量的组合物:



R_1 是直链或支链的饱和或不饱和 C7-C11 烷基;

A 和 B 独立为氢或 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1-\text{C} \end{array}$,

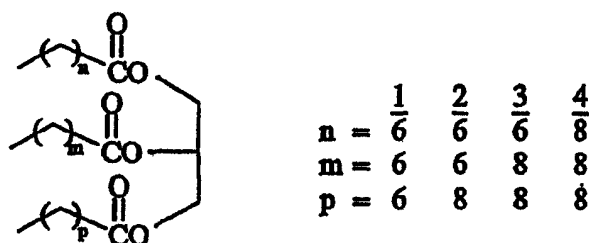
且

X 是羟基、含有金属一价或二价抗衡阳离子的负氧离子或含有直链或支链 C1-C4 烷基部分的烷氧基。

本领域技术人员可以理解在通式 III 中, 术语“Z=O”指的是可变的 Z 是可选的且可以不存在或被氢取代。

在可选的优选实施方案中, 所述组合物含有由通式 I 所述至少两

种化合物的混合物, 这些化合物是中链甘油三酯(MCTs), 其中 A、B 和 R_1 相同且分别是直链或支链的饱和或不饱和 C7 和 C9 烷基。另一方面, 该组合物含有两种甘油三酯的混合物, 其中第一种 MCT 由通式 I 所述, 其中 A、B 和 R_1 是 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6$, 而第二种 MCT 由通式 I 所述, 其中 A、B 和 R_1 是 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8$ 。另一方面, 该组合物进一步含有各自为 0.1% - 3% 的由通式 I 所述第三种化合物、其中 A、B 和 R_1 是 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$ 和由通式 I 所述第四种化合物、其中其中 A、B 和 R_1 是 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}$ 。另一方面, 该组合物是含有由下列通式描述的 C8 和 C10 脂肪酸甘油三酯的 4 种几何异构体的混合物:



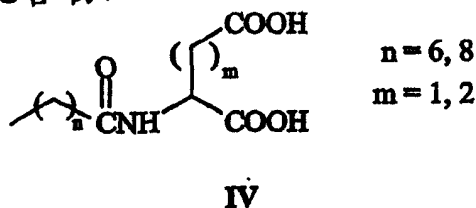
在另一个优选的实施方案中, 所述组合物含有一种或多种由通式 II 或通式 III 描述的化合物, 其中 X 是 OH 或 X 是含有诸如钙、镁、钾和钠这样的金属抗衡离子的负氧离子。

在一个更优选的实施方案中, 所述组合物是辛酸、癸酸、癸酸钠、辛酸钠、辛酸钙、癸酸钙、辛酸甘油三酯或癸酸甘油三酯。

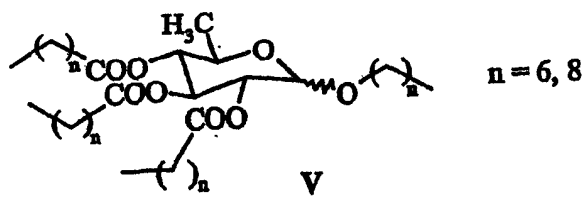
本文所述组合物和方法包括下列类似物和化合物:

辛酸甘油三酯和癸酸甘油三酯的氮杂类似物, 优选其中的氮杂类似物是 1, 2, 3-O, N, 0-三辛酰基丝氨酸或 1, 2, 3-O, N, 0-十三酰基丝氨酸;

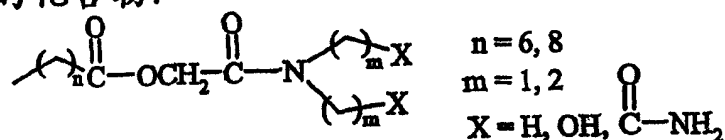
通式 IV 描述的化合物:



通式 V 描述的化合物:



通式 VI 描述的化合物:



将这些化合物制成通过在体内降解以释放上述活性物质的药物制剂。

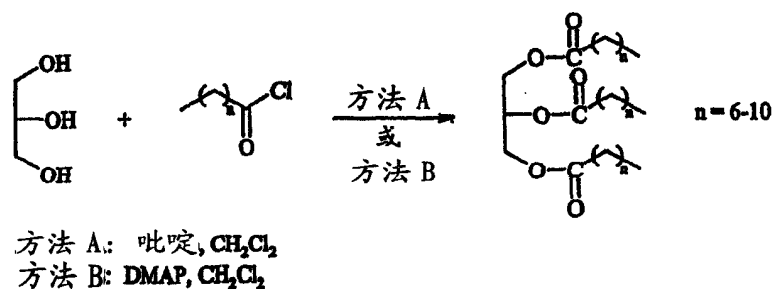
下列实施例进一步解释本发明的实施方案，但并不用来限定本发明。可以理解的是对给予任意个体患者(人或动物)的中链脂肪酸、或其盐或其甘油三酯或其甘油单酯或甘油二酯或其它类似物或 MCT 以及相关药物制剂的剂量的选择属于参与的临床医师的决定范围、按照相同方式开据适宜剂量的处方且取决于疾病阶段等仅属于参与的临床医师范围的因素。

实施例 1: 对 CRODAMOL™ (MCT: 辛酸/癸酸甘油三酯) 的分析

通过气相色谱法分析来自 Croda Ltd. (Toronto, Canada) 的 CRODAMOL™ GTCC 批号 T1033-1299. GC FID-分析, 梯度条件: 100℃ - 250℃, 10 分钟内, 然后在 250℃ 下 25 分钟; FID 250℃. 观察到 4 个峰: 22.04 分钟 (26%), 25.07 分钟 (43%), 29.16 分钟 (25%) 和 34.75 分钟 (5%).

通过气相色谱法分析获自 Sigma-Aldrich 批号 079H1212 的辛酸甘油三酯 (三辛精) 样品. GC FID-分析, 梯度条件: 100℃ - 250℃, 10 分钟内, 然后在 250℃ 下 25 分钟; FID 250℃. 在 22.31 分钟 (98%) 时观察到一个主要的峰。

实施例 2: 使用酰基氯和吡啶碱酰化醇



一般方法 A (吡啶)

在氮气环境中将醇 (~ 0.1 M) 溶于干 CH_2Cl_2 和吡啶 (4: 1) 所得到的溶液冷却至 0°C 并用酰基氯 (1.2 当量) 处理。将该反应体系缓慢温至环境温度并搅拌过夜。TLC 分析 (SiO_2 , EtOAc 1: 9 己烷) 显示没有剩余的醇。将该反应混合物用 CH_2Cl_2 稀释并用饱和 NH_4Cl 水溶液洗涤。将水相用 CH_2Cl_2 (x 1) 和己烷 (x 1) 提取并用饱和 NaCl 水溶液洗涤合并的有机相、用 Na_2SO_4 干燥、过滤并在真空中蒸发至得到粗产物。

一般方法 B (DMAP)

在氮气环境中将醇 (~ 0.1 M) 溶于干 CH_2Cl_2 所得到的溶液冷却至 0°C 并用 DMAP (1.3 当量) 和酰基氯 (1.2 当量) 处理。将该反应体系缓慢温至环境温度并搅拌过夜。TLC 分析 (SiO_2 , EtOAc 1: 9 己烷) 显示没有剩余的醇。将该反应混合物用 CH_2Cl_2 稀释并用饱和 NH_4Cl 水溶液洗涤。将水相用 CH_2Cl_2 (x 1) 和己烷 (x 1) 提取并用饱和 NaCl 水溶液洗涤合并的有机相、用 Na_2SO_4 干燥、过滤并在真空中蒸发至得到粗产物。

实施例 3: 壬酸甘油三酯

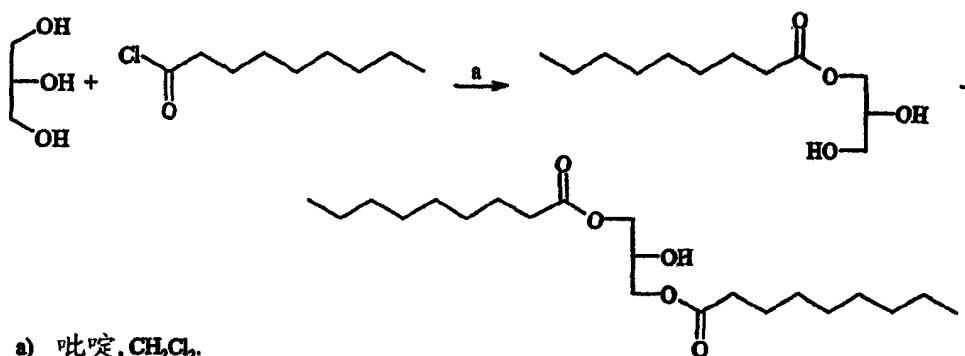
用壬酰氯 (751 μl , 4.16 mmol) 按照实施例 2 的一般方法 A 酰化甘油 (120 mg, 1.30 mmol)。通过柱层析法纯化 (Isolute™ SiO_2 , 用 0-5% EtOAc 的己烷溶液洗脱) 而得到含有级分的两种产物, 在真空中蒸发至得到所需产物、为无色液体, 纯度分别为 89% (127 mg, 19%) 和 93% (475 mg, 71%) (GC/FID)。 R_f 0.46 (SiO_2 , 10% 乙酸乙酯的己烷溶液);

¹H

NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ_{H} = 5.27 (m, 1H), 4.29 (dd, 2H), 4.14 (dd, 2H), 2.31 (m, 6H), 1.61 (m, 6H), 1.27 (m, 30H), 0.88 (t, 9H); MS (FAB⁺) m/z = 510(M-H⁺);

; GC FID-分析, 条件: 10 分钟内梯度 100 °C-250 °C, 然后 250 °C 下 25 分钟; FID 250 °C; 27.25 分钟。

实施例 4: 壬酸甘油二酯和壬酸甘油单酯



a) 吡啶, CH₂Cl₂.

用一个当量的壬酰氯(205 μ l, 1.09 mmol)按照实施例 2 的一般方法 A 酰化甘油(100 mg, 1.09 mmol)。通过 BiotageTM 纯化(40S, SiO₂, 用 10% 乙酸乙酯的己烷-100%乙酸乙酯溶液洗脱)而得到含无色油状物。得到两种不同的化合物:

得到壬酸甘油二酯(73 mg, 18%)、为白色固体。mp 24-26 °C; R_f 0.52 (用 Et₃N、30%乙酸乙酯的己烷溶液预处理的 SiO₂);

¹H NMR

(CDCl₃, 300 MHz) δ_{H} = 4.17 (m, 5H), 2.35 (t, 4H), 1.63 (m, 4H), 1.27 (m, 20H), 0.88 (t, 6H); MS (FAB⁺) m/z = 373 (M+H⁺).

得到壬酸甘油单酯(85 mg, 34%)、为白色固体。mp 37-38.5 °C; R_f 0.08 (用 Et₃N、30%乙酸乙酯的己烷溶液预处理的 SiO₂);

¹H

NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ_{H} = 4.18 (m, 2H), 3.94 (m, 1H), 3.69 (m, 1H), 3.62 (m, 1H), 2.36 (t, 2H), 1.62 (m, 2H), 1.28 (m, 10H), 0.88 (t, 3H); MS (FAB⁺) m/z = 233 (M+H⁺).

实施例 5: 1, 2, 3-O, N, O-十三酰基丝氨酸

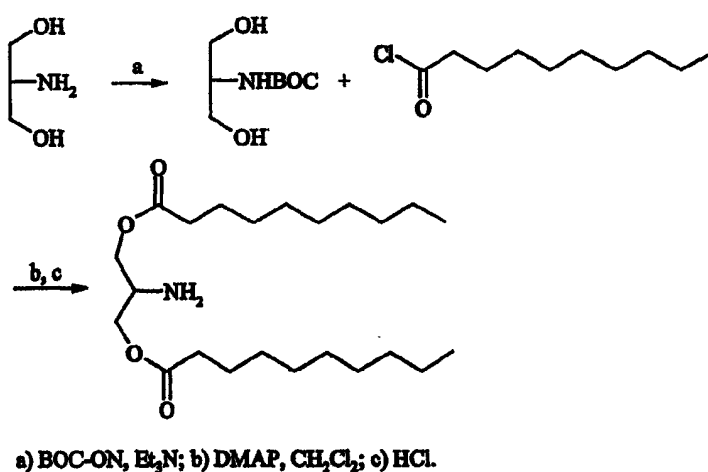
用十三酰氯(372 μ l, 1.76 mmol)按照实施例 2 的一般方法 B 酰化丝氨酸(51 mg, 0.56 mmol)。通过 MPLC 纯化(SiO_2 , 用 0、然后用 10% EtOAc 的己烷溶液洗脱)得到所需产物、为白色固体(301 mg, 97%). mp 54 $^{\circ}\text{C}$; TLC, R_f 0.85 (SiO_2 , EtOAc 2: 3 己烷);

¹H

NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ_H 0.84 (9H, t), 1.20-1.27 (36H, m), 1.52-1.60 (6H, m), 2.13 (2H, t), 2.28 (4H, t), 4.03 (2H; 2 x A of 2 x ABX), 4.19 (2H, 2 x B of 2 x ABX), 4.41-4.46 (1H, m), 5.70 (1H, d);

对 $\text{C}_{33}\text{H}_{63}\text{NO}_5$ 计算的 HRMS m/e 553.4706; 测定值: 553.4713. GC FID-分析, 条件: 10 分钟内梯度 100 $^{\circ}\text{C}$ -250 $^{\circ}\text{C}$, 然后 250 $^{\circ}\text{C}$ 下 25 分钟; FID 250 $^{\circ}\text{C}$. 在 14.80 分钟(98%)时主要存在一个峰。

实施例 6: 1,3-0,0-二癸酰基丝氨酸



a) BOC-ON, Et_3N ; b) DMAP, CH_2Cl_2 ; c) HCl.

用三乙胺(3.60 ml, 25.9 mmol)和 BOC-ON (4.67 gm, 19.0 mmol)处理丝氨酸(1.57 gm, 17.2 mmol)溶于丙酮(17 ml)和水(17 ml)所得到的溶液并在氮气环境中将该反应体系搅拌过夜。在真空中蒸发丙酮并使粗混合物分配在 EtOAc 与水之间。用 EtOAc (x 3)提取水相并用 Na_2SO_4 干燥合并的有机提取物、过滤并在真空中蒸发而得到黄色固体。通过 MPLC (SiO_2 , 用 40-80% EtOAc 的己烷溶液洗脱)而得到 N-BOC-二醇中间体、为白色结晶固体(2.10 gm, 64%)。TLC, R_f 0.15 (SiO_2 ,

EtOAc 4: 1 己烷) ;

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ_{H}

1.40 (9H, s), 3.54-3.56 (5H, m).

用癸酰氯(173 μl , 0.83 mmol)按照一般方法 B 酰化 N-BOC-二醇中间体(50 mg, 0.26 mmol). 通过 MPLC (SiO_2 , 用 0、然后 10% EtOAc 的己烷溶液洗脱)而得到 N-BOC-二酰基中间体、为无色油状物(115 mg, 88%). TLC, R_f 0.80 (SiO_2 , EtOAc 2: 3 己烷) ;

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ_{H} 0.87 (6H, t), 1.23-1.30 (24H, m), 1.44 (9H, s), 1.56-1.70 (4H, m), 2.31 (4H, t), 4.04-4.21 (4H, m), 4.77-4.80 (1H, m), 6.73 (1H, d).

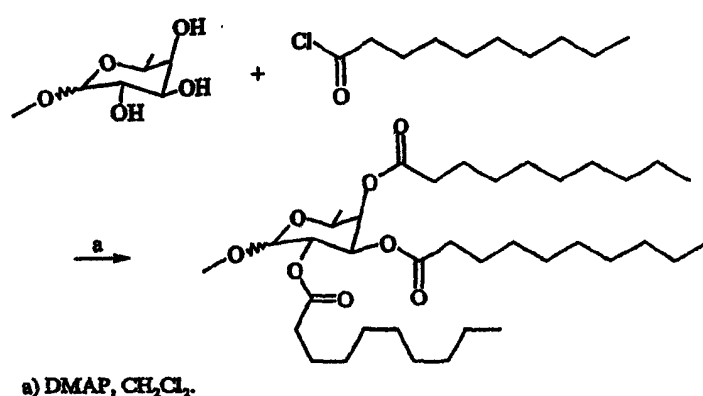
将 N-BOC-二酰基中间体(76 mg, 0.15 mmol)溶于干 CH_2Cl_2 (1.5 ml) 所得到的溶液冷却至 0 $^{\circ}\text{C}$ 并用 4.0 M 无水 HCl 溶于 1, 4-二噁烷(375 μl , 1.50 mmol ; 终浓度 0.8M)所得到的溶液处理。将该反应体系温至室温并在相同温度下搅拌 3 小时。再加入部分 4.0 M 无水 HCl 的 1, 4-二噁烷(375 μl , 1.50 mmol)溶液并将该反应体系再搅拌 2 小时。蒸发溶剂得到所需产物、为白色固体(69 mg, 100%). mp 101 $^{\circ}\text{C}$; TLC, R_f 0.40 (SiO_2 , EtOAc 2: 3 己烷) ;

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz)

δ_{H} 0.88 (6H, t), 1.20-1.29 (24H, m), 1.55-1.65 (4H, m), 2.45-2.52 (4H, m), 3.72-3.80 (1H, m), 4.30-4.51 (2H, m), 8.6-9.0 (3H, br m);

对 (M-HCl) 计算的 HRMS m/e , $\text{C}_{23}\text{H}_{45}\text{NO}_4$: 339.3348; 测定值: 339.3340; GC FID-分析, 梯度条件: 10 分钟内 100 $^{\circ}\text{C}$ -250 $^{\circ}\text{C}$, 然后 250 $^{\circ}\text{C}$ 下 25 分钟; FID 250 $^{\circ}\text{C}$. 在 17.14 分钟(94%)时主要存在一个峰。

实施例 7: α -和 β -1-O-甲基-2, 3, 4, -O, 0, 0-十三酰基-L-岩藻糖



按照 Levene & Muskat (《生物化学杂志》(J. Biol. Chem.) 105: 431-441, 1934) 的方法合成 1-O-甲基-L-岩藻糖(593 mg, 3.33 mmol)并用癸酰氯(2.90 ml, 14.0 mmol)按照实施例 2 的一般方法 B 酰化。通过 MPLC 纯化 (SiO₂, 用 0、然后 5% EtOAc 的己烷溶液洗脱) 而得到 α (1.18 gm, 55%)和 β (0.52 gm, 24%)的所需产物、为无色油状物。

α 端基异构体数据: TLC, R_f 0.45 (SiO₂, EtOAc 1: 9 己烷) ;

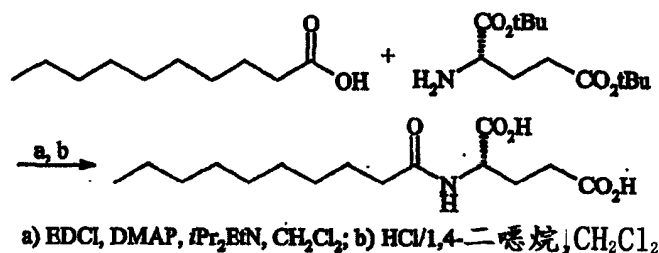
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ_H 0.87 (9H, t), 1.14 (3H, d), 1.20-1.35 (36H, m), 1.52-1.68 (4H, m), 2.18 (2H, t), 2.29 (1H, A of ABX₂), 2.32 (1H, B of ABX₂), 2.41 (2H, t), 3.38 (3H, s), 4.13 (1H, qd, J 6.5), 4.93 (1H, d), 5.15 (1H, dd), 5.30 (1H, dd), 5.36 (1H, dd);

对 (M-CH₃O) C₃₆H₆₅O₇ 计算的 HRMS m/e: 609. 4730; 测定值: 609. 4720.

β 端基异构体数据: TLC, R_f 0.40 (SiO₂, EtOAc 1: 9 己烷) ;

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ_H 0.87 (9H, t, J 6.5Hz), 1.22 (3H, d), 1.20-1.35 (36H, m), 1.49-1.67 (4H, m), 2.18 (2H, t), 2.25 (1H, A of ABX₂), 2.29 (1H, B of ABX₂), 2.34 (2H, t), 3.50 (3H, s), 3.81 (1H, qd), 4.35 (1H, d), 5.03 (1H, dd), 5.19 (1H, dd), 5.24 (1H, dd).

实施例 8: L-谷氨酸癸酰胺



在氮气环境中向癸酸(7.30 mmol, 1.26g)溶于干 CH_2Cl_2 (60 ml)所得到的溶液中加入 L-谷氨酸二叔丁酯 HCl 盐(6.09 mmol, 1.80 gm)、

DMAP (1.8 mmol, 0.22g)、二异丙基乙胺(18 mmol, 3 ml)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳化二亚胺 HCl 盐(EDCI) (7.30 mmol, 1.40 gm)。将所得的无色溶液在室温下搅拌 24 小时。然后在减压条件下除去溶剂而得到白色油状残余物。通过 Biotage™ 纯化(40S SiO_2 , 用 5% 乙酸乙酯的己烷溶液-30% 乙酸乙酯的己烷溶液洗脱)而得到无色油状物, 为 L-谷氨酸二叔丁酯癸酰胺(2.47 gm, 98%)。 R_f 0.56 (SiO_2 , 30% 乙酸乙酯的己烷溶液);

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ_{H} = 6.05 (d, 1H), 4.45 (m, 1H), 2.30 (m, 2H), 2.27 (m, 2H), 2.16 (t, 2H), 2.07 (m, 1H), 1.87 (m, 1H), 1.58 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.41 (s, 9H), 1.23 (m, 12H), 0.84 (t, 3H).

通过在 0℃ 下向所述二叔丁酯衍生物(5.75 mmol, 2.38 gm)溶于 CH_2Cl_2 (35 ml)所得到的溶液中缓慢加入 4.0 M HCl 的 1,4-二噁烷(23 ml)溶液使 BOC 基脱保护。将该无色溶液温至室温并再搅拌 20 小时。然后在减压条件下除去溶剂并将所得白色固体干燥至得到 L-谷氨酸癸酰胺(1.71 gm, 99%)。

^1H

NMR (CD_3OD , 300 MHz) δ_{H} = 4.39 (m, 1H), 3.27 (d, 1H), 2.36 (t, 2H), 2.20 (t, 2H), 2.13 (m, 1H), 1.90 (m, 1H), 1.58 (m, 2H), 1.27 (m 12H), 0.86 (t, 3H); MS (ES^+) m/z = 324 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 302 ($\text{M}+\text{H}^+$); MS (ES^-) m/z = 300 ($\text{M}-\text{H}^+$);

HPLC 分析, 条件: 10 分钟内梯度 0.01% TFA 的 10%-70% 乙腈溶液; 流速 1.0 ml/分钟; 210 nm; 8.93 分钟。

实施例 9: 癸酸 N, N-二甲基乙酰胺酯

在氮气环境中向癸酸(8.7 mmol, 1.5g)溶于无水 DMF (80 ml)所得到的溶液中加入碘化钠(0.87 mmol, 130 mg), 随后加入二甲基氯乙酰胺(9.6 mmol, 985 μ l)。然后加入碳酸钾(9.6 mmol, 1.3 g)并将所得混悬液在 90℃下搅拌 5 天。将该反应体系冷却至室温且与蒸馏水混合。用乙酸乙酯(x3)提取产物。用 NaHCO₃ 水溶液洗涤合并的有机相、用 Na₂SO₄ 干燥、过滤并在减压条件下浓缩。通过 Biotage™ 纯化所得的黄色液体(40M, SiO₂, 用 25%乙酸乙酯的己烷溶液-50%乙酸乙酯的己烷溶液洗脱)。得到癸酸 N, N-二甲基乙酰胺酯(2.03 gm, 92%)、为白色粉末。mp 42-42.5℃; R_f 0.55 (SiO₂, 乙酸乙酯);

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ_{H} = 4.64 (s, 2H), 2.92 (s, 3H), 2.91 (s, 3H), 2.38 (t, 2H), 1.62 (qt, 2H), 1.22 (m, 12H), 0.83 (t, 3H); MS (ES⁺) m/z = 537 (2M+Na⁺), 280 (M+Na⁺), 258 (M+H⁺).

实施例 10: 中性白细胞编程性细胞死亡和存活的体外试验

如 Lagraoui 和 Gagnon 所述测定中性白细胞存活率(《细胞分子生物学》(Cell. Mol. Biol.) 43: 313-318, 1997)。中性白细胞获自健康志愿者的外周血液。使血液与多淋巴细胞(lympholyte-poly)(Cedarlane, Hornby, Canada)一起进行梯度离心, 随后对污染的红细胞进行低渗裂解。使细胞悬浮于补充了 10% FBS (Hyclone, Logan USA)的 RPMI(Gibco, Burlington, Canada)中。最终的细胞制品由 > 95%的中性白细胞组成, 正如 Wright Giemsa 染色所测定的。正如台盘蓝排除法所测定的, 存活率大于 97%。多形核白细胞(PMN)具有短半衰期且快速进行以编程性细胞死亡为特征的特征化改变。按照 Nicoletti 等在《免疫学方法杂志》(J. Immunol. Meth.) 139: 271-279 (1991)中所述方法评价编程性细胞死亡。简单的说, 将新近分离的中性白细胞与不同浓度的 MCT 在 37℃下孵育 24 小时。孵育后用碘化丙锭(PI, Sigma)染色细胞并使用 XL 流式细胞仪(Coulter)

分析编程性细胞死亡。然后将数据表示为编程性细胞死亡百分比。

附图 1 代表几次实验的汇总, 其中在没有(对照组)或有不同浓度的 MCT 存在的情况下测定中性白细胞的编程性细胞死亡值。结果表明在体外有 MCT 存在的情况下, 中性白细胞的编程性细胞死亡受到达 90% 的抑制且这种抑制作用是剂量依赖性的。因此, MCT 可以增加中性白细胞存活率且可以用作中性白细胞存活因子。

实施例 11: PMN 吞噬作用的体外试验

在 37℃ 下和 5% CO₂ 和 95% 湿度条件下将中性白细胞 ($2 \times 10^6/\text{ml}$) 与不同浓度的 MCT 一起孵育 24 小时。24 小时后通过台盘蓝排除法测定存活率并用含有 2 mM 葡萄糖、1 mM MgCl₂ 和 1 mM CaCl₂ 的 PBS 洗涤 3 次。然后将细胞浓度调整至 1×10^6 个细胞/ml 且然后与 fluoresbrite carboxylate 微球体 (1/10 稀释) 一起孵育。孵育 30 分钟后, 洗涤中性白细胞并固定在 2% 低聚甲醛中。使用 XL 流式细胞仪 (Coulter) 分析固定的中性白细胞微球体摄取值。然后将数据表示为吞噬细胞百分比。

附图 2 代表在没有(对照组)或有不同浓度的 MCT 存在的情况下测定 PMN 吞噬活性的几次实验的汇总。结果表明 MCT 增强了人 PMN 的吞噬活性。这种吞噬活性最高为对照组数值的 2-3 倍且刺激程度取决于供体免疫状态。

实施例 12: 阿霉素对中性白细胞编程性细胞死亡的作用

如实施例 10 所述分离 PMN。在 37℃ 下和 5% CO₂ 和 95% 湿度条件下以及有不同浓度的化疗剂阿霉素存在的情况下将细胞 ($2 \times 10^6/\text{ml}$) 孵育 4 小时。如实施例 10 所述估计编程性细胞死亡的细胞。将数据表示为编程性细胞死亡百分比。附图 3A 和 3B 表示阿霉素诱导 PMN 编程性细胞死亡。

实施例 13: MCT 挽救阿霉素诱导的中性白细胞编程性细胞死亡

如实施例 10 所述分离 PMN。在 37℃ 下和 5% CO₂ 和 95% 湿度中以及有不同浓度的阿霉素存在的情况下将细胞 ($2 \times 10^6/\text{ml}$) 与或不与 MCT (2.5% 和 5.0%) 一起孵育 4 小时。如实施例 10 所述估计编程性细胞死亡的细胞。将数据表示为编程性细胞死亡百分比。

表 1 代表测定 MCT 对 PMN 的化学保护作用的两次实验。将结果表示为在有或没有阿霉素存在情况下与或不与 MCT 一起孵育 4 小时后编程性细胞死亡细胞的百分比。正如实施例 12 中所述, 阿霉素诱导体外 PMN 编程性细胞死亡。然而, 在有 MCT 存在的情况下, 阿霉素在 2.5% 和 5% (v/v) 浓度下的编程性细胞死亡作用受到抑制。因此, MCT 对 PMN 发挥了抗编程性细胞死亡作用。还使用膜联蛋白 V-FITC/PI (碘化丙锭) 方法、按照制造商 Biosources 的建议 (Apotarget Annexin-VFITC Apoptosis Kit#PHN 1018) 研究编程性细胞死亡。膜联蛋白 V 结合早期至晚期编程性细胞死亡过程中由膜内转移至膜外的磷脂酰丝氨酸。简单的说, 在有或没有不同浓度阿霉素和 MCT 存在的情况下孵育中性白细胞。24 小时后, 用 PBS 洗涤中性白细胞并用 2 μl 膜联蛋白 V-FITC 和 10 μl 的 PI (Sigma, 1 mg/ml) 染色 20 分钟。孵育后将染色的细胞固定在低聚甲醛 (1%) 中并使用 XL 流式细胞仪 (Coulter) 分析编程性细胞死亡。然后将数据表示为编程性细胞死亡细胞百分比。

附图 4A 代表 MCT 对阿霉素治疗的中性白细胞的时间过程反应。在阿霉素诱导的 ($5 \times 10^{-6}\text{M}$) 编程性细胞死亡之后 (孵育时间为 0) 0、30 分钟、1 小时、2 小时和 4 小时评价的 MCT 时间过程/反应。MCT 以时间依赖和剂量依赖性方式挽救了阿霉素诱导的人中性白细胞的编程性细胞死亡。

附图 4B 代表 MCT 对阿霉素治疗的中性白细胞的时间过程反应。在导入毒性剂 (阿霉素) 前达 4 小时, MCT 以剂量依赖性方式防止了中性白细胞的阿霉素诱导的编程性细胞死亡。

表 1

MCT 对阿霉素诱导的中性白细胞编程性细胞死亡的保护作用

阿霉素浓度	中性白细胞 (PMN) 编程性细胞死亡 %					
	实验 1			实验 2		
	对照组	MCT 2.5% (v/v)	MCT 5% (v/v)	对照组	MCT 2.5% (v/v)	MCT 5% (v/v)
0	12.4	9.5	12.3	49.6	23.6	4.6
10^{-10}M	9.3	11.7	7.4	60.6	14.7	23.9
10^{-8}M	18.7	14.2	8.3	59.2	32.5	14.8
10^{-6}M	23.2	12.7	3.5	55.0	21.6	16.9
10^{-5}M	23.8	12.3	8.3	66.2	74.7	12.1
10^{-4}M	27.5	35.2	17.1	53.2	58.6	55.7

实施例 14: MCT 挽救阿霉素诱导的中性白细胞编程性细胞死亡 :
与 GM-CSF 比较

表 2 代表 GM-CSF、MCT 和三辛精对阿霉素诱导的人中性白细胞编程性细胞死亡的作用。GM-CSF 和 MCT 能够挽救人中性白细胞的阿霉素诱导的编程性细胞死亡或保护人中性白细胞不受其影响。三辛精挽救了阿霉素诱导的编程性细胞死亡且进一步增强了人中性白细胞的存活力, 其强化程度高于在未治疗的中性白细胞(对照组, 不使用阿霉素)中观察到的程度。

表 2

MCT 和 GM-CSF 对阿霉素诱导的中性白细编程性细胞死亡的保护作用

	PMN 存活 %
对照组	35.9±0.71
阿霉素 (DOX) (10^{-5} M)	6.82±0.5
GM-CSF (10^{-7} M) + DOX	16.75 ± 2.05
GM-CSF (10^{-8} M) + DOX	6.99 ±0.23
MCT (24 mM) + POX	14.20 ±1.98
MCT (12 mM) + DOX	12.37 ±1.72
三辛精 (24 mM) + DOX	12.13 ± 1.25
三辛精 (12 mM) + DOX	42.95±6.15

实施例 15: MCT 和三癸精体外增加鼠骨髓增殖

骨髓细胞获自雌性 C57BL/6 小鼠(6-8 周龄)股骨。冲洗细胞并用 PBS 洗涤。离心采集的细胞并以 2×10^6 个细胞/ml 重新悬浮。在有或没有 MCT 或三癸精存在的情况下将 100 μ l 的细胞(2×10^5 个细胞)在 96-孔微量滴定板上孵育 48 小时。孵育后用 1 μ Ci 的 [3 H]-胸苷脉冲细胞 6 小时。将平板收集在 Tomteck 上并在 Microbeta β -计数器上计数。在 DNA 中掺入 [3 H]-胸苷是细胞增殖的直接指征。

附图 5 代表 MCT 和三癸精对骨髓增殖作用进行的典型实验。MCT 和三癸精将骨髓增殖比对照组增加了 3-5 倍。

实施例 16: 化学保护研究: MCT 体内诱导免疫细胞增殖或保护

通过在第 0 天时用静脉内给予 80 mg 5-氟尿嘧啶(5-FU)或 100-200 mg 环磷酰胺(CY) 或 12 mg 泰索帝(TX)治疗使 6-8 周龄的雌性 C57BL/6 小鼠受到免疫抑制。为了检验 MCT 或其它化合物的免疫保护作用, 在前 3 天、前 2 天和前 1 天时口服测试化合物预处理小鼠或是在第 0 天用测试化合物静脉内治疗。在第 5 天时通过心脏穿刺和脱颈椎处死小鼠。然后如下由胸腺、脾和骨髓制备细胞混悬液。

将组织在 PBS 缓冲液中破碎并使污染的红细胞在 ACK 缓冲液(155 mM NH_4Cl , 12 mM NaHCO_3 , 0.1 mM EDTA, pH 7.3)中裂解 5 分钟。然后通过离心收集细胞并在 PBS 中洗涤 3 次且重新悬浮于组织培养基中。在血细胞计数器上对细胞计数。

结果表明与单独载体相比, MCT 显著增加了正常和免疫抑制动物的免疫组织中的细胞数量, 正如下表和附图中所示。随实验和小鼠免疫状态的不同, MCT 可以增加骨髓细胞和/或脾细胞和/或胸腺细胞计数。

附图 6 表示 MCT 对免疫抑制动物体内骨髓细胞计数的作用。与对照组(无细胞毒性治疗)相比, 仅 CY 和 5-FU 降低了骨髓细胞计数。在小鼠中, 泰索帝治疗对骨髓细胞计数没有显著作用。在受到抑制的骨髓中, 在前 3 天、前 2 天和前 1 天时给予 MCT ($6.25 \mu\text{Mole}$ /小鼠)显著增加了骨髓细胞计数。

附图 7 代表 MCT 对接受 MCT/口服的免疫抑制小鼠体内脾细胞计数的作用。与对照组相比, 所有细胞毒性药物(CY、5-FU 和 TX)均显著减少了脾细胞减少。在前 3 天、前 2 天和前 1 天时给予 MCT ($6.25 \mu\text{Mole}$ /小鼠)显著增加了骨髓细胞计数, 其中就 CY、5-FU 和 TX 而言“P”分别小于 0.0017、0.009 和 0.0036。

此外, MCT 在第 0 天给予时显著增加了正常小鼠的骨髓细胞计数(表 3)。然而, 一次静脉内注射 MCT 不足以改善正常和免疫抑制小鼠体内的脾细胞计数。

表 3

环磷酰胺(CY)和 CY + MCT 对骨髓和脾细胞的作用(正常小鼠)

	骨髓		脾	
	#细胞($\times 10^6$)	P	#细胞($\times 10^6$)	P
对照组	16 $\pm$ 3.94		94 $\pm$ 11	-
CY	13 $\pm$ 3.92	0.17	60 $\pm$ 12	0.0014
CY+ MCT(50 μ mole)	17 $\pm$ 4.28	0.87	53 $\pm$ 10	0.0003
CY+ MCT(12.5 μ mole)	17 $\pm$ 6.15	0.95	51 $\pm$ 10	0.0002
MCT(50 μ mole)	41 $\pm$ 6.11	>0.0001	103 $\pm$ 7	0.19
MCT(12.5 μ mole)	27 $\pm$ 4.19	0.0018	101 $\pm$ 11	0.31

实施例 17：化学保护研究：在前 3 天、前 2 天和前 1 天对正常小鼠给药时 MCT 诱导免疫细胞增殖的体内剂量反应

通过实施例 16 中所述方案评价 MCT 诱导正常小鼠体内免疫细胞增殖的体内剂量反应。

表 4 代表在前 3 天、前 2 天和前 1 天对正常小鼠口服给予 MCT 治疗的剂量反应。MCT 显著增加了骨髓和脾细胞计数。

表 4

MCT 对正常小鼠的作用

	骨髓		脾	
	#细胞 ($\times 10^6$)	P	#细胞 ($\times 10^6$)	P
对照组	45 $\pm$ 7.3		120 $\pm$ 12.9	—
MCT(3.15 μ mole)	52 $\pm$ 4.3	0.10	144 $\pm$ 15.8	0.018
MCT(6.25 μ mole)	59 $\pm$ 11.3	0.05	134 $\pm$ 13.9	0.129
MCT(12.5 μ mole)	54 $\pm$ 6	0.04	144 $\pm$ 19.8	0.04
MCT(25 μ mole)	56 $\pm$ 3.9	0.01	127 $\pm$ 17.0	0.48

实施例 18：化学保护研究：免疫细胞增殖或保护的体内诱导：MCT 与 GM-CSF 作用的比较

按照实施例 16 所述方案进行对诱导免疫细胞增殖/再生或保护的体内比较。对正常和免疫抑制动物进行 MCT 和 GM-CSF 的比较研究。与 MCT 相比，GM-CSF 对免疫抑制动物体内的骨髓和脾细胞计数不具有显著活性。仅观察到了 GM-CSF 对正常小鼠胸腺重量的显著作用(附图 8)。在这种情况下，MCT 显示出与 GM-CSF 相似的作用。

实施例 19：化学保护研究

通过实施例 16 中所述方案评价辛酸和癸酸对体内诱导免疫细胞增殖或保护的作用。正如表 5 中所示，仅癸酸显著增加了骨髓细胞计数。

与环磷酰胺治疗的小鼠相比，证实对脾细胞计数没有显著作用。

表 5

环磷酰胺(CY)、CY + 辛酸和 CY + 癸酸对骨髓和脾细胞的作用

	骨髓			脾		
	#细胞 ($\times 10^6$)	P/对照组	P/CY	#细胞 ($\times 10^6$)	P/对照组	P/CY
对照组	54 $\pm$ 5.9			66 $\pm$ 7.3		
CY	22 $\pm$ 5.7	>0.0001		23 $\pm$ 4.0	>0.0001	
CY+辛酸	26 $\pm$ 3.58	0.001	0.21	28 $\pm$ 6.4	>0.0001	0.17
CY+癸酸	32 $\pm$ 2.71	0.0004	0.006	27 $\pm$ 8.4	>0.0001	0.27

实施例 20：化学保护研究

通过实施例 16 中所述方案评价三辛酸和三癸精对体内诱导免疫细胞增殖或保护的作用。

三辛酸和三癸精均在使 CY-治疗的小鼠骨髓细胞计数增殖或保护它们方面有效(表 6)。与环磷酰胺治疗的小鼠相比，没有观察到对脾细胞计数的显著作用。

表 6

环磷酰胺(CY)、CY + 三辛酸和三癸精对骨髓和脾细胞的作用

	骨髓			脾		
	#细胞 ($\times 10^6$)	P/对照组	P/CY	#细胞 ($\times 10^6$)	P/对照组	P/CY
对照组	55 $\pm$ 9.3			113 $\pm$ 15.9		
CY	22 $\pm$ 5.8	0.0001		36 $\pm$ 13.6	>0.0001	
CY+三辛酸	34 $\pm$ 7.8	0.0033	0.022	37 $\pm$ 12.6	>0.0001	0.8
CY+三癸精	31 $\pm$ 3.8	0.0008	0.012	38 $\pm$ 6.8	>0.0001	0.7

实施例 21：化学保护研究

通过实施例 16 中所述方案评价壬酸和月桂酸对体内诱导免疫细胞增殖或保护的作用。

在 CY-治疗的小鼠中使用月桂酸预治疗观察到对骨髓和脾细胞计数的增殖或保护作用显著增加。然而，与环磷酰胺治疗的小鼠相比，壬酸对免疫细胞计数表现出弱(不显著)活性(表 7)。

表 7

环磷酰胺(CY)、CY +壬酸和 CY +月桂酸对骨髓和脾细胞的作用

	骨髓			脾		
	#细胞 ($\times 10^6$)	P/对照组	P/CY	#细胞 ($\times 10^6$)	P/对照组	P/CY
对照组	58 $\pm$ 11.8			99 $\pm$ 22		
CY	32 $\pm$ 6.3	0.0016	1.0	24 $\pm$ 6	0.0002	
CY+壬酸 (6.25 μ Mole)	36 $\pm$ 5.6	0.0044	0.26	28 $\pm$ 4	0.0004	0.27
CY+月桂酸 (6.25 μ Mole)	42 $\pm$ 7.8	0.0185	0.04	32 $\pm$ 5	0.0005	0.03

实施例 22：化学保护研究

通过实施例 16 中所述方案评价三月桂精和三肉豆蔻精对体内诱导免疫细胞增殖或保护的作用。

三月桂精和三肉豆蔻精对 CY-免疫抑制小鼠的骨髓和脾细胞计数具有弱(不显著)的活性(表 8)。

表 8

环磷酰胺(CY)、CY +三月桂精和 CY +三肉豆蔻精对骨髓和脾细胞的作用

	骨髓			脾		
	#细胞 ($\times 10^6$)	P/对照组	P/CY	#细胞 ($\times 10^6$)	P/对照组	P/CY
对照组	49 $\pm$ 7.3			105 $\pm$ 23		
CY	27 $\pm$ 2.8	0.0014		19 $\pm$ 6.5	0.0007	
CY+三月桂精 (6.25 μ Mole)	31 $\pm$ 6.8	0.0028	0.219	28 $\pm$ 19.5	0.0004	0.302
CY+三肉豆蔻精 (6.25 μ Mole)	31 $\pm$ 9.9	0.0067	0.402	15 $\pm$ 4.6	0.0007	0.314

实施例 23：化学保护研究

通过实施例 16 中所述方案评价三己精和己酸钠对体内诱导免疫细胞增殖或保护的作用。

三己精和己酸钠对 CY-免疫抑制小鼠的骨髓和脾细胞计数具有弱(不显著)的活性(表 9)。

表 9

环磷酰胺(CY)、CY +三己精和 CY +己酸钠对骨髓和脾细胞的作用

	骨髓			脾		
	#细胞 ($\times 10^6$)	P/对照组	P/CY	#细胞 ($\times 10^6$)	P/对照组	P/CY
对照组	48 $\pm$ 4.9			98 $\pm$ 24.2		
CY	25 $\pm$ 4.9	>0.0001		33 $\pm$ 13.2	0.0018	
CY+三己精 (6.25 μ Mole)	29 $\pm$ 4.1	0.0001	0.17	37 $\pm$ 8.7	0.0035	0.51
CY+己酸钠 (6.25 μ Mole)	39 $\pm$ 17.9	0.2403	0.09	35 $\pm$ 10.6	0.0026	0.77

实施例 24：化学保护研究

通过实施例 16 中所述方案评价辛酸钠和癸酸钠对体内诱导免疫细胞增殖或保护的作用。

在 CY-治疗小鼠中使用辛酸钠和癸酸钠预处理观察到对骨髓和脾细胞计数的增殖或保护作用显著增加（附图 9）。

实施例 25：化学保护研究：治疗后的方案

如实施例 16 所述进行化学保护研究,但在第 1、2、3 和 4 天用 MCT、辛酸钠、癸酸钠或癸酸口服(后)-治疗小鼠。

在 CY-治疗的小鼠中使用 MCT、辛酸钠和癸酸钠后治疗观察到骨髓细胞计数显著增加(表 10)。当用作后治疗时，癸酸诱导脾细胞计数显著增加和骨髓细胞计数弱幅度增加(表 11)。

表 10

环磷酰胺(CY)、CY + MCT、CY + 辛酸钠和 CY + 癸酸钠对骨髓和脾细胞后治疗的作用

	骨髓			脾		
	#细胞 ($\times 10^6$)	P	P/CY	#细胞 ($\times 10^6$)	P	P/CY
对照组	52 $\pm$ 6.17			110 $\pm$ 29.3		
CY	19 $\pm$ 4.99	>0.0001		30 $\pm$ 9.5	0.0007	
CY+MCT (12.5 μ Mole)	26 $\pm$ 3.70	>0.0001	0.0189	38 $\pm$ 7.2	0.0014	0.163
CY+辛酸钠 (12.5 μ Mole)	26 $\pm$ 5.33	>0.0001	0.0455	36 $\pm$ 12.5	0.0009	0.394
CY+癸酸钠 (12.5 μ Mole)	29 $\pm$ 4.45	0.0001	0.0140	28 $\pm$ 6.3	0.0007	0.696

表 11

环磷酰胺(CY)、CY + 癸酸对骨髓和脾细胞后治疗的作用

	骨髓			脾		
	#细胞 ($\times 10^6$)	P/对照组	P/CY	#细胞 ($\times 10^6$)	P/对照组	P/CY
对照组	48 $\pm$ 7.9			88 $\pm$ 15.9		
CY	31 $\pm$ 6.7	0.0026		21 $\pm$ 4.3	0.0001	
CY+癸酸 (3.125 μ Mole)	37 $\pm$ 7.8	0.0326	0.209	31 $\pm$ 8.7	0.0001	0.035
CY+癸酸 (6.25 μ Mole)	38 $\pm$ 4.6	0.0274	0.066	25 $\pm$ 6.3	0.0001	0.187
CY+癸酸 (12.5 μ Mole)	38 $\pm$ 7.4	0.0412	0.134	36 $\pm$ 7.8	0.0002	0.003

实施例 26：化学保护研究：免疫表型分型试验

使用不同浓度的 MCT 在前 3 天、前 2 天和前 1 天每天口服或在前 0 天静脉内预治疗雌性 6-8 周龄 C57BL/6 小鼠。还对免疫抑制小鼠进行免疫表型分型。使用 80 mg/kg 的 5-氟尿嘧啶(5-FU)或 100-200 mg/kg 的环磷酰胺(CY)或 12 mg/kg 的泰索帝(TX)在第 0 天时进行静脉内注射实现免疫抑制。在第 5 天时通过心脏穿刺处死小鼠。采集血液和脾脏并制备细胞混悬液且使红细胞在 ACK 缓冲液(155 mM NH_4Cl , 12 mM NaHCO_3 , 0.1 mM EDTA, pH 7.3)中裂解 5 分钟。将细胞在 pH 7.4 的 PBS 中洗涤 3 次并重新悬浮于组织培养基中。然后将细胞在冰上与缀合了细胞表面标记的异硫氰酸荧光素(FITC)或藻红素(PE)、按照制造商(Gibco/BRL, Cedarlane, Boehringer Mannheim)的建议一起孵育 45 分钟。然后将在细胞 PBS 中洗涤、用 1%低聚甲醛固定并使用 Coulter XL 流式细胞仪分析。通过测定如下的标准细胞表面标记对细胞亚群进行分析：TCR (T-细胞受体)；CD4 (T 辅助细胞)；CD8 (T 细胞毒性/抑制因子)；CD11b (巨噬细胞)；NK (NK 细胞)；和 Ly5 (B-细胞)。

如实施例 15 所述得到骨髓细胞。通过对 FITC 或 PE 缀合的细胞表面标记按照制造商的建议孵育 45 分钟对细胞染色。然后将细胞在 PBS 中洗涤、用 1%低聚甲醛固定并使用 Coulter XL 流式细胞仪分析。通过测定如下的标准细胞表面标记对细胞亚群进行分析：CD34（造血祖细胞）；CD41（血小板、巨核细胞）；CD 13（骨髓单核干细胞、髓细胞、幼单核细胞）；和 CD38（淋巴干细胞、pro-B、pre-B）。

表 12 代表 MCT 对正常小鼠血液和脾免疫表型分型的作用。在血液免疫表型分型时，MCT 增加 CD8+和 LY5+细胞亚群。在一些实验中，MCT 弱幅度地增加 LY5-TCR-亚群(数据未显示)。在脾免疫表型分型时，MCT 显著增加 LY5+TCR+和 CD4+细胞的相对百分比。LY5-TCR-是可以代表中性白细胞的 B-非 T-细胞。

当对免疫抑制小鼠给药时，与单独使用环磷酰胺相比，MCT 增加血液和脾免疫表型分型时 LY5-TCR-（可能是中性白细胞）和 CD11+（巨噬细胞）细胞的相对百分比。这些细胞亚群来源于髓样细胞前体(表 13)。

表 12

MCT 对正常小鼠血液和脾免疫表型分型的作用

细胞亚群	对照组	6.25 μ M	12.5 μ M	50 μ M
血液免疫表型分型				
CD8+	12.76 $\pm$ 1.23	16.41 $\pm$ 1.16 p $\leq$ 0.0004	—	13.18 $\pm$ 2.08 p = 0.68
LY5+	15.57 $\pm$ 6.91	24.0 $\pm$ 4.92 p < 0.037	—	26.75 $\pm$ 4.11 p < 0.01
脾免疫表型分型				
LY5-TCR-	13.02 $\pm$ 2.54	—	16.84 $\pm$ 0.83 p < 0.0257	
CD4+	19.9 $\pm$ 1.09	22.25 $\pm$ 1.64 p $\leq$ 0.013	—	22 $\pm$ 0.47 p < 0.091

表 13

MCT 对环磷酰胺 (CY, 200 mg/kg) 免疫抑制小鼠血液和脾免疫表型分型的作用

细胞亚群	对照组	6.25 μ M	12.5 μ M	50 μ M
血液免疫表型分型				
LY5-TCR-	36.82 $\pm$ 9.93	-	51.67 $\pm$ 11.10 p $\leq$ 0.05	46.32 $\pm$ 5.63 p = 0.1254
CD11+	26.41 $\pm$ 4.54	-	42.12 $\pm$ 8.77 p < 0.0119	42.56 $\pm$ 8.62 p < 0.0098
脾免疫表型分型				
LY5-TCR-	20.2 $\pm$ 4.05	23.92 $\pm$ 1.61 p < 0.07 (弱)	-	-
CD11+	16.31 $\pm$ 4.85	27.47 $\pm$ 11.48 p $\leq$ 0.06 (弱)	-	-

实施例 27: 化学保护研究: 免疫表型分型试验

按照实施例 26 中所述对三肉豆蔻精、三月桂精、癸酸和己酸钠进行免疫表型分型。

表 14 代表这些 MCT 类似物对血液和脾免疫表型分型的作用。与单独使用环磷酰胺相比, 三肉豆蔻精和三月桂精对血液没有显著作用。然而, 三肉豆蔻精和三月桂精可增加脾 CD11+ 的相对百分比。此外, 三月桂精诱导 LY5-TCR- 和 NK+ 细胞亚群显著增加。有意义的是癸酸和己酸钠显著增加血液 LY5-TCR- 的相对百分比。与单独使用环磷酰胺相比, 癸酸对脾没有显著作用。

表 14

三肉豆蔻精、三月桂精、癸酸和己酸钠对环磷酰胺(CY, 200 mg/kg)免疫抑制小鼠血液和脾免疫表型分型的作用

化合物	细胞亚群	CY	6.25 μ M	12.5 μ M
血液免疫表型分型				
三肉豆蔻精	无显著作用			
三月桂精	无显著作用			
癸酸	LY5-TCR-	56.36 $\pm$ 7.26	61.52 $\pm$ 5.16 p=0.189	70.79 $\pm$ 3.95 p < 0.0029
己酸钠	LY5-TCR-	40.91 $\pm$ 8.84	52.43 $\pm$ 10.16 p =0.063 (弱)	-
脾免疫表型分型				
三肉豆蔻精	CD11+	16.31 $\pm$ 4.85	42.94 $\pm$ 8.45 p $\leq$ 0.0002	-
三月桂精	CD11+	16.31 $\pm$ 4.85	43.94 $\pm$ 4.78 p $\leq$ 0.0001	-
	LY5-TCR-	73.17 $\pm$ 1.41	77.86 $\pm$ 2.94 p $\leq$ 0.0097	-
	NK+	7.53 $\pm$ 2.52	17.46 $\pm$ 5.80 p $\leq$ 0.0067	-
癸酸	无显著作用			
己酸钠	未进行			

实施例 28:化学保护研究:骨髓免疫表型分型

按照实施例 26 中所述方案评价 MCT、辛酸钠、癸酸钠对骨髓免疫表型分型的作用。

用环磷酰胺治疗诱导所有研究亚群(CD34+、CD13+、CD41+和 CD38+)显著增加。添加 MCT 和辛酸钠或癸酸钠扩大了属于骨髓单核干细胞、髓细胞和幼单核细胞的 CD13+系的数量。这种 CD13+相对百分比的增加与单独使用环磷酰胺相比是显著的。结果清楚地证实 MCT 和其它相关化合物诱导骨髓细胞数量显著增加(如上述实施例所示例)且进一步增加吞噬细胞(PMN 和单核细胞)前体的相对百分比。这一结果可以导致从细胞毒性治疗中更好地恢复或预防感染病原体(表 15)。

表 15

MCT、辛酸钠和癸酸钠对环磷酰胺 (CY, 200 mg/kg)免疫抑制小鼠骨髓免疫表型分型的作用

细胞 %	CD34+	CD13+	CD41+	CD38+
对照组	1.1±0.3	0.8±0.2	1.6±0.2	29.8±6.5
环磷酰胺 (CY)	10±1.0	3.2±0.5	4.2±0.6	39.6±13.6
CY+MCT	11.2±1.3	4.5±0.5 p < 0.001	4.5±0.4	42±15.7
CY+辛酸钠	11.2±1.3	4.9±1.2 p < 0.017	4.6±1.3	36±9.7
CY+癸酸钠	9.1±3.1	4.7±1.7 p < 0.06	3.7±0.7	44.3±22.8

实施例 29：化学保护研究

通过实施例 16 中所述方案评价三癸酰基丝氨酸和二癸酰基丝氨酸对体内诱导免疫细胞增殖或保护的作用。

正如表 16 中所示，三癸酰基丝氨酸显著增加了脾细胞计数。证实对骨髓细胞计数没有显著作用。

表 16

环磷酰胺 (CY)、CY + 三癸酰基丝氨酸和 CY + 二癸酰基丝氨酸对骨髓和脾细胞的作用

	骨髓			脾		
	#细胞 (x10 ⁶)	P/对照组	P/CY	#细胞 (x10 ⁶)	P/对照组	P/CY
对照组	53±4.8			113±15.5		
CY	28±3.4	>0.0001		29±9.2	>0.0001	
CY+三癸酰基丝氨酸	28±4.6	>0.0001	0.95	42±8.4	>0.0001	0.035
CY+二癸酰基丝氨酸	30±3.8	>0.0001	0.54	36±9.9	>0.0001	0.27

实施例 30：化学保护研究

通过实施例 16 中所述方案评价 α -甲基三癸酰基-L-岩藻糖和 β -甲基三癸酰基-L-岩藻糖对体内诱导免疫细胞增殖或保护的作用。

正如表 17 中所示，与环磷酰胺治疗的小鼠相比， β -甲基三癸酰基-L-岩藻糖对骨髓细胞计数表现出弱(不显著)的活性。根据已知的 α -烷基吡喃糖苷的不稳定性预计 α -甲基端基异构体缺乏活性。

表 17
环磷酰胺 (CY)、CY+ α -甲基三癸酰基-L-岩藻糖和 CY + β -甲基三癸酰基-L-岩藻糖对骨髓的作用

	骨髓		
	#细胞 (x10 ⁶)	P/对照组	P/CY
对照组	53±8.0		
CY	26.2±2.6	0.0058	
CY+ α -甲基三癸酰基-L-岩藻糖	30.4±9.3	0.0133	0.334
CY+ β -甲基三癸酰基-L-岩藻糖	34.6±8.5	0.0068	0.061

实施例 31：化学保护研究

通过实施例 16 中所述方案评价癸酸乙酯和癸酸 N,N-二甲基乙酰胺酯对体内诱导免疫细胞增殖或保护的作用。

正如表 18 中所示，仅癸酸 N,N-二甲基乙酰胺显著增加骨髓细胞计数。经证实对脾细胞没有显著作用。

表 18

环磷酰胺 (CY)、CY+癸酸乙酯和 CY+癸酸 N,N-二甲基乙酰胺对骨髓的作用

	骨髓		
	#细胞 (x10 ⁶)	P/对照组	P/CY
对照组	50.2±4.8		
CY	27.5±8.0	0.0031	
CY+癸酸乙酯	27.5±4.4	0.0032	1.0
CY+癸酸 N,N-二甲基乙酰胺	37.4±5.9	0.042	0.036

实施例 32：抗肿瘤活性

在第 0 天给雌性 6-8-周龄 C57BL/6 小鼠静脉内注射购自 ATCC(细胞培养物来源, Dr. I. J. Fidler)的 1 x 10⁵ B 16F 10 黑素瘤细胞。然后在第 7、9、14 和 16 天给动物通过静脉内注射或不注射 MCT(25μMole/小鼠)并在第 10 和第 17 天静脉内注射 10 mg/kg 阿霉素。在第 22 天处死小鼠。记录体重和肿瘤体积。通过使用测径器进行二维参数测定、使用公式 0.4 (a x b²) 获得连续肿瘤体积, 其中“a”是大肿瘤直径且“b”是短垂径。

进行本实验以验证 MCT 是使非免疫细胞的癌细胞不恶化还是预防癌细胞。

附图 10 代表 MCT 与亚治疗浓度的阿霉素联用在 B16F10 黑素瘤模型中的化学保护作用 and 抗肿瘤功效。单独使用, MCT 与亚治疗浓度的阿霉素(T/C 约下降 25%)同样诱导肿瘤体积轻度下降(T/C 约 20%)。当将 MCT 与阿霉素联用时, 观察到作用增加 (T/C 约 45 - 50%)。这些结果表明当将 MCT 与亚治疗浓度的细胞毒性药物联用时能够获得治疗活性。

实施例 33：抗肿瘤活性

雌性 BALB/c 小鼠中同系基因型肿瘤 DMBA3 (DA-3, 乳腺癌模型) 产生自用 7, 12-二甲基苯并蒽治疗的肿瘤前损害。在塑料烧瓶内的含有 0.1 mM 非必需氨基酸、0.1 μ M 丙酮酸钠、2 mM L-谷氨酰胺和 100 μ g/ml 硫酸庆大霉素的 RPMI1640 中, DA-3 细胞作为单层培养物生长。给该培养基进一步补充 50 μ M 2-巯基乙醇和 10% 胎牛血清。通过给 6-8 周龄 BALB/c 小鼠皮下接种 5×10^5 个活肿瘤细胞使 DA-3 肿瘤产生局限化肿瘤而在体内连续传代。然后通过手工触摸连续监测动物证实存在肿瘤。通过使用测径器进行二维参数测定、使用公式 $0.4 (a \times b^2)$ 获得连续肿瘤体积, 其中“a”是大肿瘤直径且“b”是短垂径。一般在接种后 7-10 天可触摸到肿瘤。

将两种治疗方案用于 MCT 与环磷酰胺 (CY, 100 mg/kg) 和泰索帝 (TX, 20 mg/kg) 联用在 DA-3 肿瘤模型中的抗肿瘤功效和保护性评价。在第 0 天给 BALB/c 小鼠注射肿瘤细胞。在第 6、7 和 8 天、第 13、14 和 15 天、第 20、21 和 23 天口服 MCT 进行治疗, 随后在第 9 天和第 16 天给予 CY 或 TX 静脉内快速浓注进行治疗。从第 4 天开始到第 23 天监测体重和肿瘤体积。在第 23 天时, 处死全部动物。将 % T/C (治疗组比对照组) 计算为治疗组中终止日时的肿瘤体积除以对照组中相应的体积乘以 100 得到的比例。根据 NCI 标准, 如果 $T/C \leq 40\%$, 则认为产品有效。

进行本实验以验证 MCT 是使非免疫细胞的癌细胞不恶化还是预防癌细胞。附图 11 表示 MCT 与亚治疗浓度的 CY 和 TX 联用在 DA-3 乳腺癌模型中的化学保护作用 and 抗肿瘤功效。与对照组相比, MCT 诱导肿瘤体积轻度下降 (T/C 约 18%)。当 MCT 与 CY 或 TX 联用时, 没有观察到肿瘤体积增大。然而, 当与 CY 联用时, 观察到了治疗反应 ($T/C = 39.4\%$)。这些结果表明当 MCT 与亚治疗浓度的 CY 联用时可以获得治疗活性。这种作用可能是由于 MCT-治疗的动物中免疫细胞功效总体增加所致 (附图 11 和表 19)。

表 19

MCT 与亚治疗浓度的环磷酰胺 (CY, 100 mg/kg) 和泰索帝 (TX, 20 mg/kg) 联用对肿瘤体积的作用

	肿瘤体积	治疗组/对照组 (%)
对照组	58.8±60.1	
CY	27.5±15.9	46.8
TX	37.9 ±41.5	64.5
CY + MCT	23.2±13.1	39.4
TX + MCT	38.8±31.0	66.1
MCT	48.5±35.2	82.5

实施例 34：抗肿瘤活性

通过实施例 30 中所述方案评价抗肿瘤和化学保护功效，但使用治疗浓度的细胞毒性药 (环磷酰胺, 200 mg/kg; 泰索帝, 30 mg/kg)。

进行本实验以验证 MCT 是使非免疫细胞的癌细胞不恶化还是预防癌细胞。附图 12 表示 MCT 与治疗浓度的 CY 和 TX 联用在 DA-3 乳腺癌模型中的化学保护作用 and 抗肿瘤功效。与对照组相比，MCT 诱导肿瘤体积轻度下降。当 MCT 与 CY 或 TX 联用时，没有观察到肿瘤体积增大。当使用 CY 或 CY+MCT 治疗时，观察到肿瘤体积明显减小。此外，使用 MCT 与 TX 联用治疗与和对照组相比单独使用没有显著效果 (p = 0.1211) 的 TX 比较获得了肿瘤体积下降的显著反应 (p < 0.0327) (表 20)。这些结果表明当 MCT 与非显著治疗浓度的 TX 联用时可以获得治疗活性。这种作用可能是由于 MCT-治疗的动物中免疫细胞功效总体增加所致。

表 20

MCT 与治疗浓度的环磷酰胺 (CY, 100 mg/kg) 和泰索帝 (TX, 30 mg/kg) 联用对肿瘤体积的作用

治疗	T/C (%)	P/对照组	P/CY	P/TX
对照组				
MCT		0.4299		
CY	18.8	0.0337		
CY-MCT	22.1	0.0022	0.2928	
TX	64.7	0.1211		
TX-MCT	46.7	0.0327		0.5468

将本文献中引述的所有参考文献的全部内容引入本文作为参考。

本领域技术人员显然可以根据上述描述对本文所述组合物和方法作出修改和改变。这类修改和改变属于待批权利要求的范围。

图1

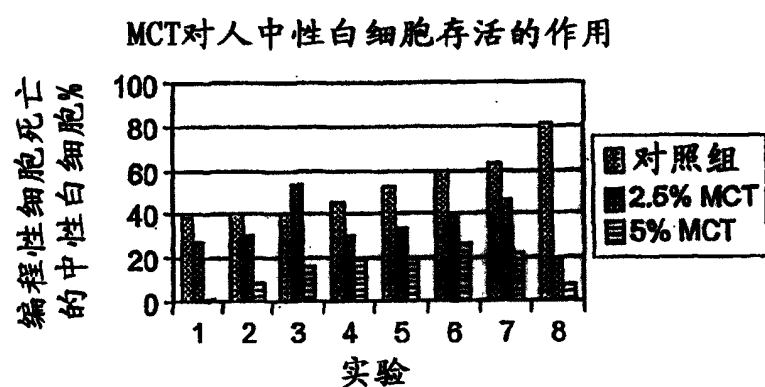


图2

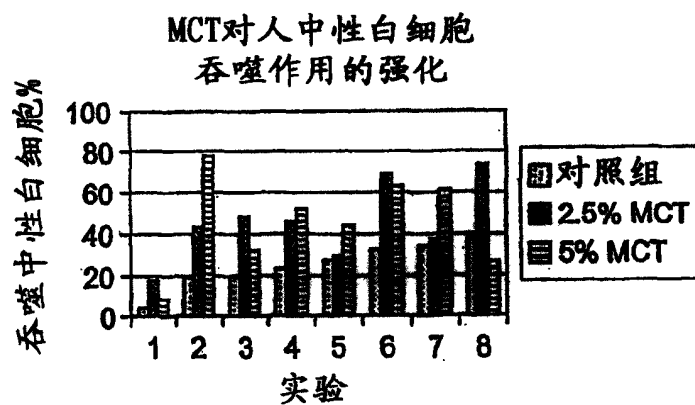


图 3A

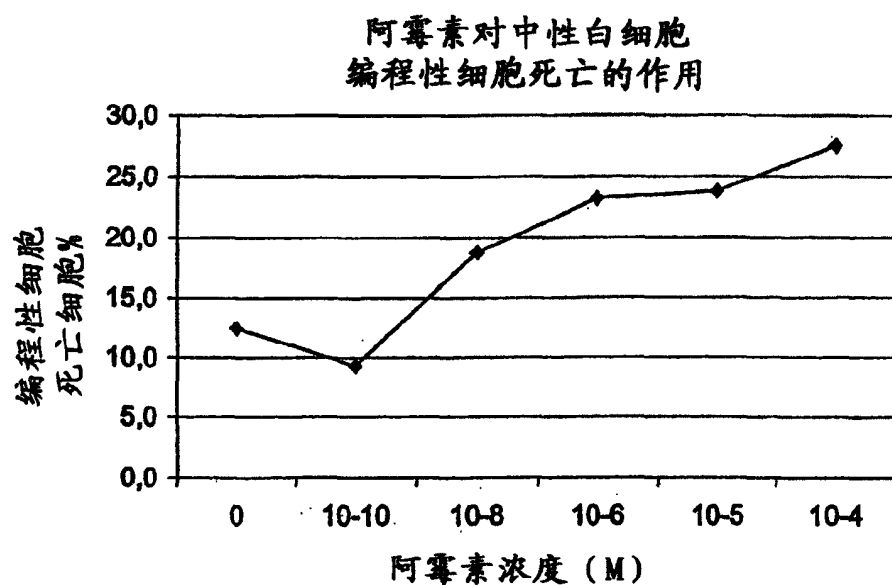


图 3B

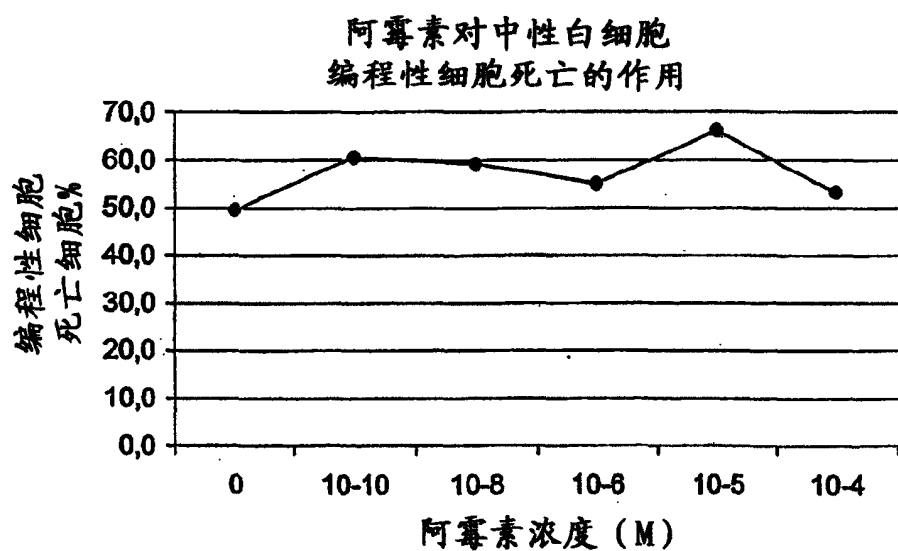


图 4A

MCT对阿霉素诱导的中性白细胞
编程性细胞死亡的作用

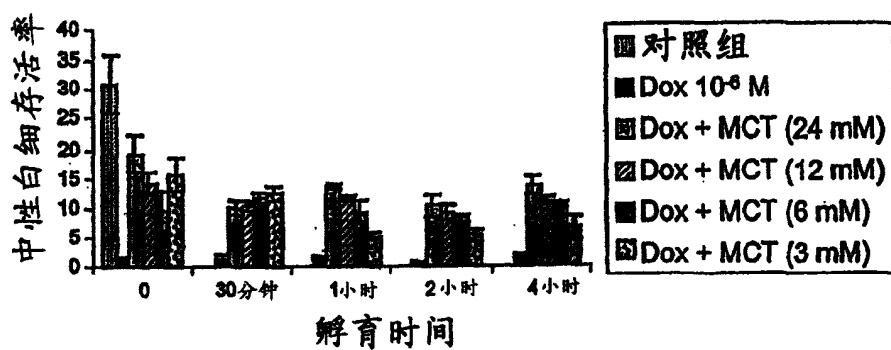


图 4B

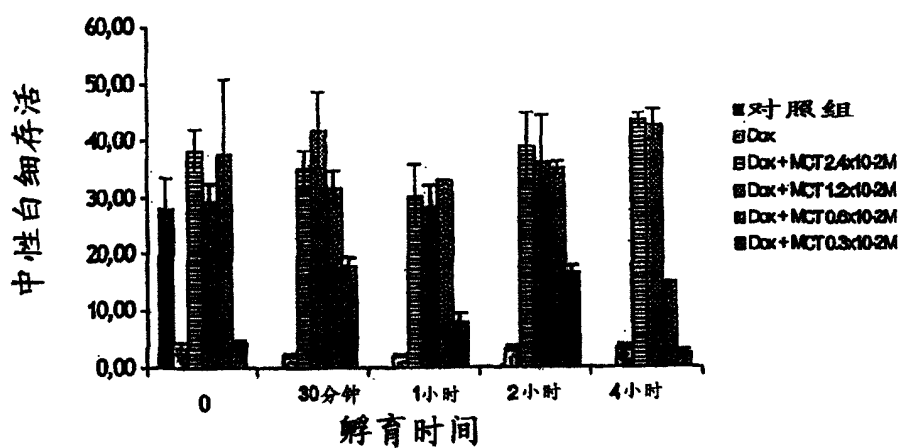


图 5

MCT和三癸精对C57BL/6小鼠骨髓
细胞增殖的作用

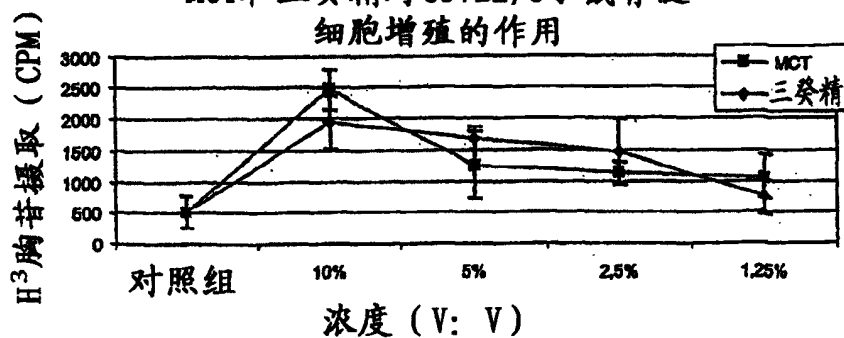


图6

MCT对免疫抑制动物
骨髓细胞的作用

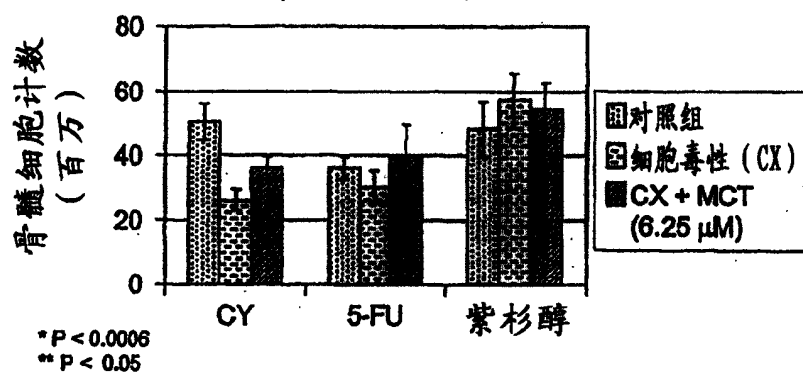


图7

MCT对免疫抑制动物
脾细胞的作用

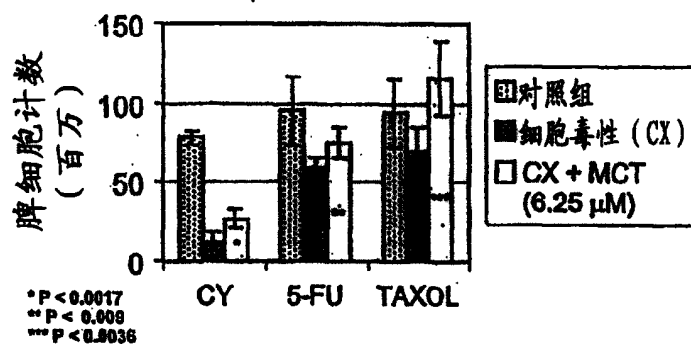


图 8

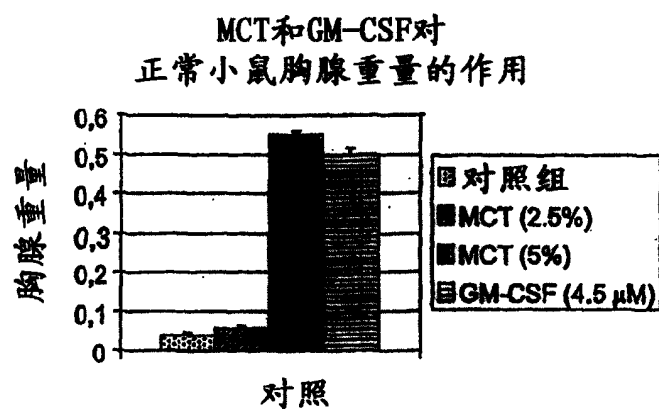


图 9

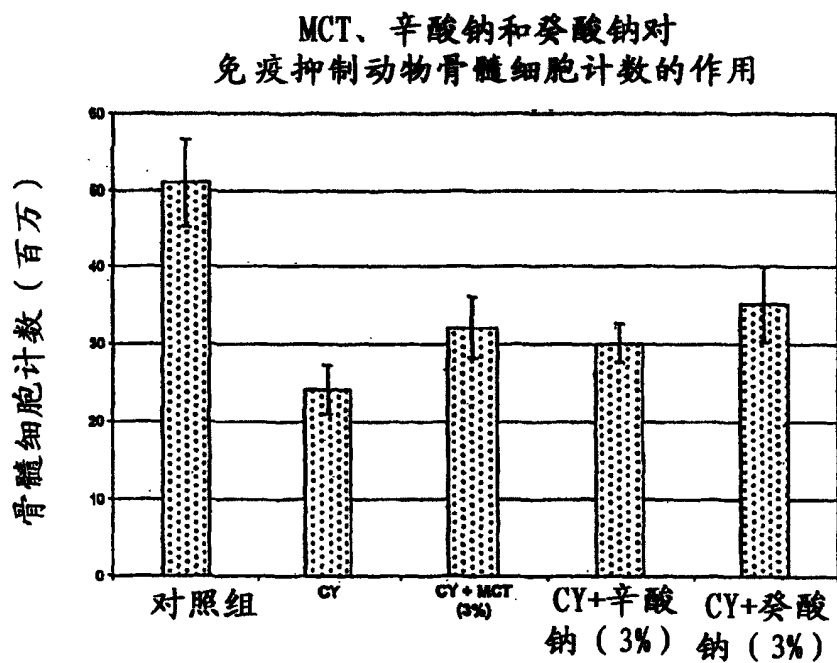


图10

MCT与亚治疗浓度的阿霉素 (Dox, 10mg/kg) 联用的化学保护作用和抗肿瘤功效 (B16F10黑素瘤模型)

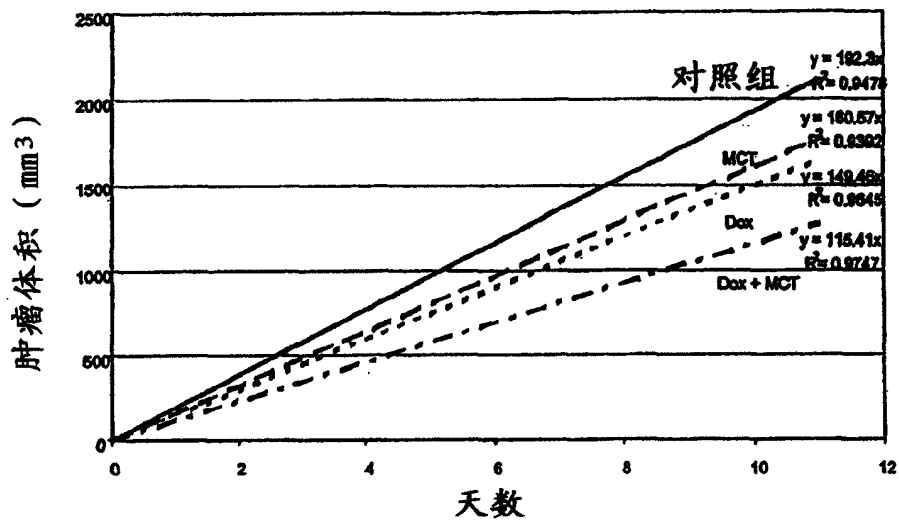


图11

MCT与亚治疗浓度的环磷酰胺 (CY, 100mg/kg) 或泰素帝 (TX, 20mg/kg) 在DA-3乳腺癌模型中的化学保护作用和抗肿瘤功率

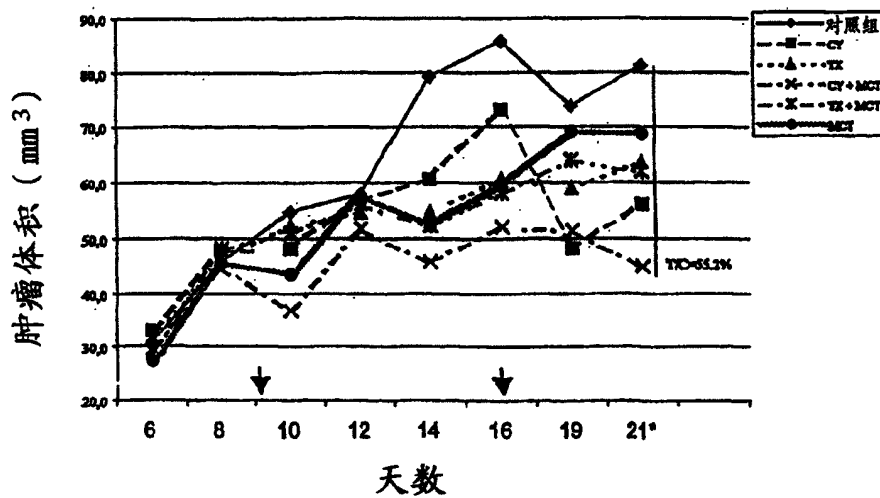
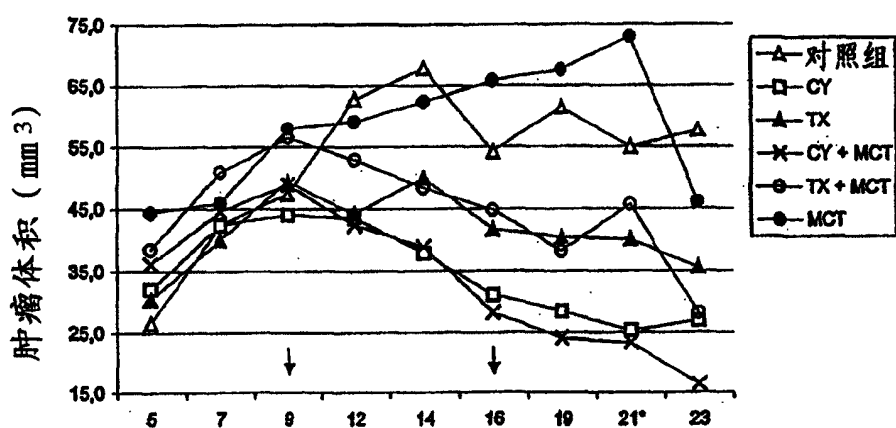


图12

治疗浓度的环磷酰胺 (CY, 200mg/kg) 或泰素帝 (TX, 30mg/kg) 在DA-3乳腺癌模型中的化学保护作用 and 抗肿瘤功效



*CY+MCT组比对照组N. B. 显著 ($P=0.0162$)。

箭头表示用细胞毒性药治疗的天数 (9和16)