

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00814800.7

[51] Int. Cl.

A61K 31/00 (2006.01)
A61K 31/7052 (2006.01)
A61K 31/7076 (2006.01)
A61K 31/708 (2006.01)
A61K 31/706 (2006.01)
A61P 39/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 1 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 100358512C

[51] Int. Cl. (续)

A61P 35/00 (2006.01)

[22] 申请日 2000.9.8 [21] 申请号 00814800.7

[30] 优先权

[32] 1999.9.10 [33] IL [31] 131864

[32] 1999.12.23 [33] IL [31] 133680

[86] 国际申请 PCT/IL2000/000550 2000.9.8

[87] 国际公布 WO2001/019360 英 2001.3.22

[85] 进入国家阶段日期 2002.4.24

[73] 专利权人 坎-菲特生物药物有限公司

地址 以色列佩塔提克瓦

[72] 发明人 P·菲施曼

[56] 参考文献

WO9850047A 1998.11.12

WO9421195A 1994.3.29

WO9902143A 1999.1.21

WO9502604A 1995.1.26

GB2289218A 1995.11.15

WO9920284A 1999.4.29

WO9906053A 1999.2.11

US5688774A 1997.11.18

审查员 王海鹏

[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 唐晓峰

权利要求书 5 页 说明书 33 页 附图 15 页

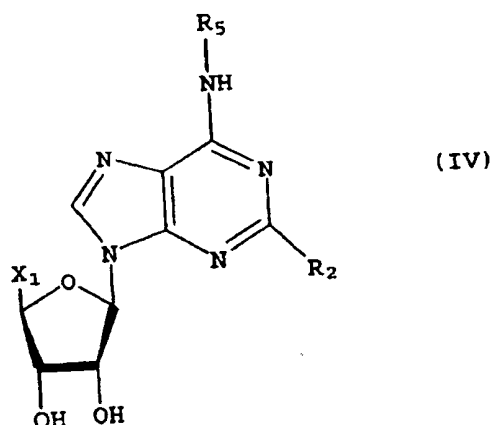
[54] 发明名称

包含腺苷受体激动剂或拮抗剂的药物组合物

[57] 摘要

腺苷受体激动剂，尤其是与 A3 腺苷受体结合的激动剂，被用于诱导体内 G-CSF 的产生或分泌，预防或治疗药物的毒副作用，或预防或治疗白细胞减少症，尤其是由药物诱发的白细胞减少症；和抑制异常细胞的生长和增殖。

1、有效量的活性成分在制备达到某一治疗效果的药物组合物的用途，所述疗效包括诱导 G-CSF 分泌或生产，其中所说的活性成分是如下通式 (IV) 所示的核苷衍生物：

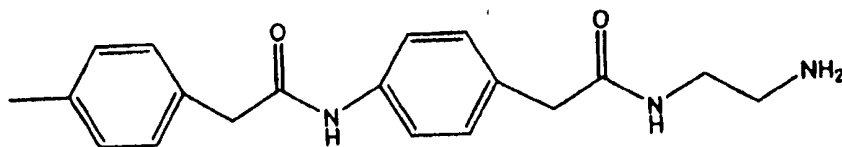


-X₁ 是 H、C₁-C₁₀ 烷基、R^aR^bNC(=O)-或 HOR^c-, 其中 R^a和 R^b可能是相同或不同的基团，选自氢、C₁-C₁₀ 烷基、氨基、C₁-C₁₀ 卤代烷基、C₁-C₁₀ 氨基烷基、C₁-C₁₀BOC-氨基烷基或 C₃-C₁₀ 环烷基，或相互连接形成一个包含 2 至 5 个碳原子的杂环，和 R^c是选自 C₁-C₁₀ 亚烷基、-NH-、C₁-C₁₀ 卤代亚烷基、C₁-C₁₀ 氨基亚烷基、C₁-C₁₀BOC-氨基亚烷基以及 C₃-C₁₀ 环亚烷基；

-R₂ 选自氢、卤素、C₁-C₁₀ 烷基醚、氨基、酰肼基、C₁-C₁₀ 烷基氨基、C₁-C₁₀ 烷氧基、C₁-C₁₀ 硫代烷氧基、硫代吡啶基、C₂-C₁₀ 链烯基；C₂-C₁₀ 炔基、巯基或 C₁-C₁₀ 烷基硫基；

-R₅ 选自取代基在一个或多个位置未取代的或取代的 R-和 S-1-苯乙基、苯甲基、苯乙基或酰基苯氨基，所说的取代基选自 C₁-C₁₀ 烷基、氨基、卤素、C₁-C₁₀ 卤代烷基、硝基、羟基、乙酰氨基、C₁-C₁₀ 烷氧基以及磺酸或它们的盐；或 R₅ 是苯并二噁烷甲基、呋喃甲基、L-丙基丙氨酰氨基苯甲基、β-丙氨酰氨基-苯甲基、T-BOC-β-丙氨酰氨基-

苯甲基、苯基氨基、氨基甲酰基、苯氧基或 C_1-C_{10} 环烷基；或 R_5 是如下分子式的基团：



或上面所定义的化合物的合适的盐，如三乙胺盐；或

R_5 是选自取代的或未取代的杂芳基- $NR^1-C(Z)-$ 、杂芳基- $C(Z)-$ 、烷芳基- $NR^1-C(Z)-$ 、烷芳基- $C(Z)-$ 、芳基- $NR-C(Z)-$ 和芳基- $C(Z)-$ 基；其中 Z 为 O 、 S 或 NR^1 ， R^1 的含义同上。

2、一种如权利要求 1 所述的用途，其中用于制备口服给药的药物组合物。

3、一种如权利要求 1 所述的用途，其中所说的活性成分是 N^6 -苯甲基腺苷-5'-糖醛酰胺衍生物。

4、一种如权利要求 3 所述的用途，其中所说的活性成分选自 N^6 -2-(4-氨基苯基)乙基腺苷， N^6 -(4-氨基-3-碘苯甲基)腺苷-5'-(N -甲基糖醛酰胺)和 N^6 -(3-碘苯甲基)-腺苷-5'- N -甲基糖醛酰胺和 2-氯- N^6 -(3-碘苯甲基)-腺苷-5'- N -甲基-糖醛酰胺。

5、一种如权利要求 1 所述的用途，其中所说的活性成分是 N^6 -苯甲基腺苷-5'-烷基糖醛酰胺- N^1 -氧化物或 N^6 -苯甲基腺苷-5'- N -二烷基糖醛酰胺- N^1 -氧化物。

6、一种如权利要求 1-5 任一项所述的用途，其中所说的治疗效果是抵消药物诱导的骨髓中毒。

7、一种如权利要求 6 所述的用途，其中所说的药物是在抗癌治疗中给予受治疗者的化疗药物。

8、有效量活性成分制造用于达到某种治疗效果的药物组合物的用途，所述治疗效果包括诱导骨髓或白细胞增殖或分化，其中所说活性成分是如权利要求 1-5 任一项所定义的腺苷 A_3 受体激动剂，其通过

A3受体来发挥主要作用。

9、一种如权利要求8所述的用途，其中用于制备口服给药的药物组合物。

10、有效量活性成分制造用于预防或治疗白细胞减少症的药物组合物的用途，其中所说活性成分如权利要求1-5任一项所定义的腺苷A3受体激动剂，其通过A3受体来发挥主要作用。

11、如权利要求10所述的用途，用于预防或治疗药物诱导的白细胞减少症。

12、有效量活性成分制造用于预防或治疗药物毒副作用的药物组合物的用途，其中所说活性成分如权利要求1-5任一项所定义的腺苷A3受体激动剂，其通过A3受体来发挥主要作用。

13、如权利要求12所述的用途，其中所说的药物毒副作用表现为体重降低。

14、如权利要求10-13任意一项所述的用途，其中所说的药物是化疗药物。

15、一种如权利要求10所述的用途，用于制备达到某种治疗效果的药物组合物，所述治疗效果包括提高受治疗者体内循环白血细胞的水平。

16、一种如权利要求10所述的用途，其中用于制备口服给药的药物组合物。

17、有效量活性成分制造药物组合物的用途，其中所说活性成分如权利要求1-5任一项所定义的腺苷A3受体激动剂，其通过A3受体来发挥主要作用，其中所说的制造包括将所说的活性成分与能引起受治疗者毒副作用的药物混合。

18、一种如权利要求17所述的用途，其中所说的药物是化疗药物。

19、如权利要求17或18所述的用途，其中用于制备口服给药的药物组合物。

20、有效量活性成分用于制造达到某种治疗效果的药物组合物的用途，所述治疗效果包括选择性的抑制异常细胞生长，该活性成分是

如权利要求 1-5 任一项所定义的腺苷 A3 受体激动剂，其通过 A3 受体来发挥主要作用。

21、如权利要求 20 所述的用途，其中治疗效果包括选择性的抑制肿瘤细胞生长或增殖。

22、如权利要求 20 或 21 所述的用途，其中用于制备口服给药的药物组合物。

23、如权利要求 20-22 任一项所述的用途，其中的药物组合物被用于与化疗药物结合给药。

24、有效量腺苷 A3 受体激动剂用于制造治疗受治疗者所患癌症、产生抑制癌症细胞增殖和抵消治疗相同受治疗者的化疗药物的毒副作用的双重疗效的药物组合物的用途，其中腺苷 A3 受体激动剂如权利要求 1-5 任一项所定义，其通过 A3 受体来发挥主要作用。

25、如权利要求 24 所述的用途，其中的腺苷 A3 受体激动剂与所说的药物协同作用，得到更强的抗肿瘤效果。

26、如权利要求 24 或 25 所述的用途，其中活性成分被制备用于口服给药。

27、如权利要求 1-26 任意一项所述的用途，其中腺苷 A3 受体激动剂的给药剂量是少于 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重。

28、如权利要求 27 所述的用途，其中给药剂量是少于 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重。

29、如权利要求 28 所述的用途，其中给药剂量是 $1-10\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重。

30、如权利要求 1-29 任意一项所述的用途，其中所述的活性成分选自通式(IV)所定义的那些，其中：

X_1 是 $R^a R^b \text{NC}(=O)$ ，其中 R^a 和 R^b 可能是相同或不同的基团，选自氢、 C_1-C_{10} 烷基、氨基、 C_1-C_{10} 卤代烷基、 C_1-C_{10} 氨基烷基或 C_3-C_{10} 环烷基； R_2 选自氢、卤素、 C_1-C_{10} 烷氧基、氨基、 C_2-C_{10} 链烯基或 C_2-C_{10} 链炔基；以及 R_3 选自 R-和 S-1-苯乙基、未取代的苯甲基、和在一个或多个位置被取代基取代的苯甲基，其中的取代基选自 C_1-C_{10} 烷基、氨基、卤

素、 C_1-C_{10} 卤代烷基、硝基、羟基、乙酰氨基、 C_1-C_{10} 烷氧基以及磺酸。

31、如权利要求 30 所述的用途，其中所述的活性成分选自通式 (IV) 所定义的那些，其中：

R^a 和 R^b 可能是相同或不同的基团，选自氢或 C_1-C_{10} 烷基，并且 R_2 是氢或卤素；

R^a 是氢， R_2 是氢，并且 R_5 是未取代的苯甲基；

R^b 是 C_1-C_{10} 烷基或 C_3-C_{10} 环烷基，并且 R_5 是 R-或 S-1-苯乙基、或在一个或多个位置被取代基取代的苯甲基，其中的取代基选自卤素、氨基、乙酰氨基、 C_1-C_{10} 卤代烷基以及磺酸，其中所述磺酸衍生物是盐；

R_2 是通式 $R^d-C\equiv C-$ 所示的 C_2-C_{10} 炔，其中 R^d 是 C_1-C_8 烷基；或

R_2 是卤素， C_1-C_{10} 烷基氨基，或 C_1-C_{10} 烷硫基， R^a 是氢， R^b 是 C_1-C_{10} 烷基，并且 R_5 是取代的苯甲基。

32、如权利要求 1-5 或 30-31 任意一项所述的用途，其中所述的活性成分是三乙胺盐形式。

包含腺苷受体激动剂或拮抗剂的药物组合物

本发明的技术领域

本发明属于癌症的领域，与癌症的治疗或想要消除癌症治疗中的副作用的治疗有关。

现有技术

下面列出一些与描述本发明工艺状况相关的现有技术。通过下列所列出的文献的黑体字部分可以得到这里所列举的参考文献。

1. Linden J. The FASEB J. 5: 2668-2676 (1991);
2. Stiles G. L. Clin. Res. 38: 10-18 (1990);
3. Stolfi R. L., 等. Cancer Res. 43: 561-566 (1983);
4. Belardinelli L. 等 Prog. Cardiovasc. Dis. 32: 73-97 (1989);
5. Collis M. G., Pharmacol. Ther. 41: 143-162 (1989);
6. Clark B.和 Coupe M. Int. J. Cardiol. 23: 1-10 (1989);
7. Dubey R. K. 等 Circulation 96: 2656-2666 (1997)
8. Soderback U. 等 Clin. Sci. 81: 691-694 (1994);
9. Gilbertsen R. B. Agents actions 22: 91-98 (1987);
10. Bouma M. G.等. J. Immunol. 153: 4159-4168 (1994);
11. Rozengurt E. Exp. Cell Res. 139: 71-78 (1982);
12. Gonzales F. A., 等, PNAS USA 87: 9717-9721 (1990);
13. Sandberg G.和 Fredholm B. B., Thymus 3: 63-75 (1981);
14. Pastan I. H. 等 Annu. Rev. Biochem. 44: 491-495 (1975);
15. WO 99/02143;
16. Fishman P., 等 Cancer Res. 58: 3181-3187 (1998);
17. Djaldetti M. 等 Clin. Exp. Metastasis 14: 189-196 (1996);
18. Fishman P. 等 Cancer Research 58: 3181-3187 (1998).

本发明的背景

骨髓中毒是一种最常见的、严重的化疗并发症，是限制化疗药物给药剂量的因素之一。它导致的病人生命危险的发病率和实际的死亡率高于其它的化疗副作用，并且还会导致住院天数的增加。此外，药物诱导的骨髓抑制限制了大量的、对患有恶性肿瘤病人可能更有效的化疗剂量的给药。解决这种不利后果的几种方法包括使用锂、前列腺 E、干扰素、乳铁传递蛋白和粒细胞-巨噬细胞菌群刺激因子生长因子 (GM-CSF) 和粒细胞-菌落刺激因子生长因子 (G-CSF)。到目前为止，生长因子例如 G-CSF 的使用是治疗患有噬中性白细胞细胞减少症病人的一种权威的方法。它可以刺激造血原始粒子的增殖和分化，还能控制噬中性粒细胞和巨噬细胞的功能活性。但是，G-CSF 的治疗很昂贵，并且，由于它是一种重组细胞蛋白，所以它有伴随的副作用。

腺苷是一种内源性嘌呤核苷，普遍存在于哺乳动物细胞中。腺苷存在于血浆和其它细胞外液体介质中，它的多数生理学效应通过细胞表面的受体而发挥出来，是一种重要的调节蛋白。它由代谢活跃或受应力的细胞释放进入细胞外环境。已知它是通过跟与 A1, A2 和 A3 膜受体有关的 G-蛋白结合来起效的⁽¹⁻²⁾。腺苷与其受体的相互作用引发了信号渗出途径，主要是腺苷酸环化酶受动器系统，它利用 cAMP 作为第二信使。虽然与 Gi 蛋白结合的 A1 和 A3 受体抑制了腺苷酸环化酶并导致细胞内 cAMP 的水平下降，但是与 Gs 蛋白结合的 A2 受体可以激活腺苷酸环化酶，从而增加 cAMP 的水平⁽³⁾。

由于几乎在所有的细胞中都可以发现腺苷的特定表面受体，所以几乎所有的机体器官系统在某种程度上都要受其局部释放的调节。这包括心脏电生理学性质的调节，神经递质释放的镇静和抑制以及高血压蛋白原酶释放的调节和肾中血管紧张的调节⁽⁴⁻⁷⁾。腺苷对免疫系统发挥着各种作用，包括通过抑制细胞因子释放而发挥的抗炎活性，抑制血小板凝聚的作用，诱导促红细胞生成素的产生和调节淋巴细胞功能⁽⁸⁻¹⁰⁾的作用。此外，发现腺苷在一些中枢神经系统 (CNS) 的调节、伤口痊愈、利尿和控制疼痛中也有一定的作用。还证明腺苷能诱导正常细

胞的广泛增殖⁽¹¹⁻¹⁴⁾。这种细胞生长的调节作用可能是间接的通过上述的腺苷酸环化酶受动器系统来实现的。

在最近的研究中发现腺苷作为一种化学保护剂，其活性可能与其能刺激骨髓细胞的增殖有关。此外，还发现腺苷对肿瘤细胞有抑制作用，这种作用显然是通过 G0/G1 细胞循环抑制和减少端粒信号(telomeric signal)来实现的⁽¹⁷⁻¹⁸⁾。这种双重作用使腺苷变成了癌症治疗的很有吸引力的设想。

本发明的概述

根据本发明可以发现腺苷 A3 受体激动剂(A3RAg)有一种双重功效，一方面它们可以抑制恶性细胞的增殖，另一方面它们可以抵消化疗的毒副作用。A3RAg 化合物可以明确地抑制肿瘤细胞的增殖和生长，与抗肿瘤细胞毒素的药物协同作用可以减少肿瘤负荷，可以诱导骨髓细胞和白细胞细胞的增殖和分化，并且能抵消其它药物尤其是化疗药物的毒副作用。而且，根据本发明还发现 A3RAg 可以通过一系列的给药形式包括非胃肠道给药，特别是口服给药的形式来发挥这些活性。依据本发明进一步发现一些 A3RAg 活性可以通过其它的腺苷 A1 或 A2 受体的激动剂和拮抗剂来进行模拟：腺苷 A1 受体激动剂(A1RAg)与 A3RAg 共同承担诱导 G-CSF 分泌的活性；腺苷 A2 受体激动剂(A2RAg)与 A3RAg 共同承担抑制恶性细胞增殖的活性；以及腺苷 A2 受体拮抗剂(A2RAn)与 A3RAg 共同承担抵消药物毒副作用的活性，例如治疗或预防白细胞减少症。

本发明在其最广泛的意义上涉及了活性成分得到下列治疗学/生物学效果之一的应用：诱导机体内 G-CSF 的产生或分泌；预防或治疗药物的毒副作用或预防或治疗白细胞减少症，尤其是药物诱发的白细胞减少症；以及抑制异常细胞的生长和增殖。活性成分可以是 A3RAg 或可以产生这些治疗效果的腺苷受体系统激动剂或拮抗剂，该效果是指通过使用 A3RAg 而可以得到的效果。

本发明提供了一些具体的实施方案。第一个实施方案被称为

“G-CSF-诱导实施方案”，包括活性成分的应用，所说的活性成分可以是能够在受治疗者机体内导致 G-CSF 分泌的 A3RAg 或 A1RAg。已知 G-CSF 可以刺激造血原细胞的增殖和分化，并且能够控制噬中性粒细胞和巨噬细胞的功能活性。因此，G-CSF 诱导剂例如上面提及的这些诱导剂，可能具有很高的治疗学价值，例如，在抵消（即预防、减少或改善）骨髓中毒性方面。

以这个实施方案为依据的是一种诱导受治疗者机体内 G-CSF 分泌的方法，包括给予受治疗者一定数量的活性成分，该活性成分包括 A3RAg、A1RAg 以及 A3RAg 与 A1RAg 的联合构成的组。

与这个实施方案相一致的还有另外一种治疗处理的方法，该方法包括给予受治疗者所需有效量的所说的活性成分以达到治疗作用，所说的治疗作用包括诱 G-CSF 的产生或分泌。通过这一实施方案进一步提供了一种用所说的活性成分制造一种可诱导 G-CSF 分泌的药物组合物的应用。通过这一实施方案也提供了一种用于在机体内诱导 G-CSF 产生或分泌的药物组合物，该组合物包含可药用的负载的有效量的所述活性成分。

根据本发明的另外一个实施方案，在这里被称为“白细胞减少症-预防实施方案”或更明确的称为“噬中性白细胞细胞减少症-预防实施方案”，活性成分被用于由骨髓中毒导致的白细胞减少症的预防或治疗，所说的活性成分可以是 A3RAg，或 A2Ran。

根据这一实施方案，可以提供一种诱导受治疗者骨髓或白细胞细胞增殖或分化的方法，该方法包括给予受治疗者有效量的活性成分，该活性成分选自由 A3RAg、腺苷 A2Ran 以及 A3RAg 或 A2Ran 的联用组成的组。通过这一实施方案还提供了一种预防或治疗白细胞减少症的方法，方法包括给予受治疗者所需有效量的所说的活性成分。这一实施方案进一步提供了一种所说的活性成分用来制造一种诱导骨髓或白细胞细胞增殖或分化的药物组合物的应用。这一实施方案还进一步提供了一种所说的活性成分用来制造一种预防或治疗白细胞减少症的药物组合物的应用。该药物组合物可以被用于预防或治疗白细胞减少症。

根据被称为“毒性预防实施方案”的具体实施方案，上述的活性成分(即 A3RAg 或 A2Ran, 以及其结合三者其中之一)被用于抵消药物例如化疗药物或 nemoleptic 药物的毒副作用。

后一实施方案提供了一种用于预防或治疗药物毒副作用的方法，该方法包括给予受治疗者所需有效量的活性成分，该活性成分选自由 A3RAg, A2Ran 和 A3RAg 与 A2Ran 的组合组成的组。这一实施方案也提供了一种所说的活性成分用来制造用于预防或治疗药物诱导毒性的药物组合物的应用。这一实施方案还进一步提供了一种用于预防或治疗药物毒副作用的药物组合物，该组合物包括有效量的所说活性成分和可药用载体。

通常来说为了抵消药物诱导的白细胞减少症或药物诱导的大多数毒副作用，人们有时希望能制备一种具有这样的毒副作用药物与所说的活性成分二者一起给药。因此本发明也提供了一种药物组合物，该组合物中包含能对受治疗的患者引起所说的毒副作用的药物和所说的活性成分；本发明还提供了一种所说的活性成分用来制造一种这样的药物组合物的应用。包括在所说的组合物中的所说的活性成分是预防或治疗该毒副作用的有效量。

根据被称为“增殖-抑制实施方案”的另一实施方案，活性成分可以被用于选择性的抑制异常细胞的生长，例如肿瘤细胞的生长，所说的活性成分可以是 A3RAg, A2RAg, 或二者的组合。

依据这一实施方案可以提供一种抑制受治疗者体内异常细胞生长的方法，该方法包括给予受治疗者治疗量的活性成分，该活性成分选自由 A3RAg, A2RAg 以及 A3RAg 和 A2RAg 的组合组成的组。这一实施方案也提供了一种所说的活性成分用于制造一种抑制异常细胞生长的药物组合物的应用。这一实施方案还进一步提供了一种用于抑制异常细胞生长的药物组合物，该组合物包含所说的活性成分和可药用载体。

在本发明的实施方案中，给药的活性成分想要达到双重的治疗效果：抑制异常细胞的生长和减少能引起这种毒副作用的药物的毒副作用。

本发明优选的活性成分为 A3RAg。本发明优选的活性成分给药途径为口服给药。但是这种优选并没有将其它活性成分或活性成分的给药途径排除在外。

活性成分的给药剂量，尤其当其中的活性成分为 A3RAg 时，优选地少于 100 μ g/kg 体重，典型的是少于 50 μ g 和更理想的是 1-10 μ g/kg 体重。

本发明的详细描述

根据本发明，某种活性成分，尤其是腺苷受体激动剂和拮抗剂，能够提供新的治疗用途。在一个实施方案，G-CSF-诱导实施方案中，一些这样的活性成分被用于间接的从细胞中产生和分泌 G-CSF。在另外一个实施方案，毒性预防实施方案中，一些这样的活性成分被用于抵消药物如化疗或 nemoleptic 药物的毒副作用。在进一步的实施方案，白细胞减少症-预防实施方案中，一些这样的活性成分被用于抵消白细胞减少症，尤其是药物诱发的白细胞减少症。还是依据本发明的实施方案，增殖抑制实施方案，一些这样的活性成分被用于选择性地抑制异常细胞的生长。

在这里所使用的“白细胞减少症”的定义涉及循环的白细胞数量的减少。虽然白细胞减少症的特征是血液中的噬中性粒细胞数目减少(噬中性白细胞细胞减少症)，但是有时会可能也发现出现淋巴细胞、单核细胞、噬酸性细胞或噬碱性细胞的数目减少。

由噬中性粒细胞的产生减少或过量脾分离产生的白细胞减少症可能是由遗传性或先天性疾病引起的。然而白细胞减少症主要是在用药物进行治疗后被观察到的，所用的药物如细胞减少(cytoreductive)的癌症药物、抗甲状腺的药物、吩噻嗪、抗惊厥药、青霉素、磺胺和氯霉素。一些抗肿瘤药造成的白细胞减少症是一种可以预测的副作用。

在下文中，由于药物造成的白细胞数量或噬中性白细胞数量的减少在此将被定义为“药物诱导的白细胞减少症”或“药物诱导的中性白细胞减少症”。而且不论何时提及细胞减少症，都应明白特别涉及的是

“噬中性白细胞细胞减少症”。

此外，“白细胞减少症的预防和治疗”的定义应当理解为白细胞数量减少的过程被减少，完全预防或如果此类减少已经发生时，一种增加白细胞数量的操作，其中所说的白细胞数量减少否则可能发生。白细胞减少症可以通过一系列的副作用而表现出来，例如被一些重要的感染物和其它感染物感染的可能性增加。“白细胞减少症的预防或治疗”的定义也可以理解为改进代表白细胞减少症结果的这样的参数的意思。

此处药理学上或治疗学上的“有效量”是由一些可能是现有技术中已知的因素来决定的。该量必须能有效的达到想要的治疗效果，取决于治疗的类型和方法。对于熟练的技术人员而言，该量显然是能有效的改善生存率、使病人快速痊愈、使症状得到改善或消除的数量，或者是本领域熟练的技术人员选择的其它合适的指标。例如，当所说的活性成分被给药用于诱导 G-CSF 的产生时，活性成分的有效量可以是能从外周血液单核细胞、内皮细胞或成纤维细胞中产生和分泌 G-CSF 的量，G-CSF 在这些细胞中被制造，例如，刺激成熟的粒细胞原始粒子转换成成熟的噬中性粒细胞。在将活性成分给药用于抵消药物诱导的白细胞减少症的情况中，活性成分的有效量可以是使个体免于遭受由药物诱导的白细胞数量减少，尤其是噬中性粒细胞数量减少的情况的量；可以是使已经减少的该类细胞增加，如恢复到正常水平或有时高于正常水平的活性成分的量；等等。在将活性成分给药用于减少药物的毒副作用的情况中，活性成分的量可以是例如有效的恢复由于用药而导致的体重减少的量。在将活性成分给药用于抑制异常细胞生长的情况中，正如下文中详细描述的那样，有效量可以是抑制受治疗者体内该类细胞增殖以及甚至消除肿瘤的量。在将活性成分给药用于增强抗癌的化疗药物的作用的情况中，有效量可以是增强化疗处理的癌症特效药毒性的量；或者是达到想要达到的效果但减少了所需减少化疗药物或药物组合物的量的量，即减少了肿瘤负载；等等。一个有效量的实施方案是每天 A3RAg 的给药量少于 100 μ g/kg 体重，典型的为少

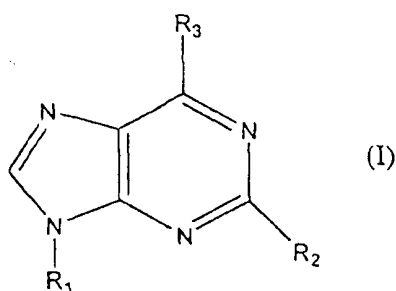
于 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重和优选的少于 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重, 例如约 $3\text{--}6\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重。尽管有时可以将这样的日剂量分成几个剂量在一天内给药或将几天的剂量合成一个单剂量每隔几天给病人用一次药, 尤其实缓释制剂的情况, 但是这样的 A3RAg 量仍是有代表性的每日给药单剂量。

根据本发明, 活性成分优选 A3RAg。A3RAg 是一种非选择性激动剂 (any agonist), 它与 A3 受体结合, 然后将 A3 受体激活就得到本发明的一种治疗效果。应当注意的是有时 A3 受体也与其它受体如 A1 和 A2 受体相互作用。但是, 依据本发明所使用的 A3RAg 通过 A3 受体来发挥主要作用 (即可以通过与其它腺苷受体相互作用而发挥一些次要作用)。

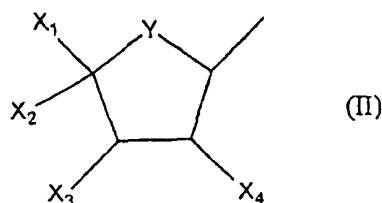
通过实施方案, 以本发明为依据的活性成分是一种核苷衍生物。术语“核苷”意指包含糖, 优选核糖或脱氧核糖, 或嘌呤或嘧啶碱或糖与嘌呤或嘧啶碱优选经由 N-糖基键连接的结合物的任何化合物。“核苷衍生物”的定义在这里表示如上文所定义的天然的核苷, 合成的核苷或通过对其进行基团的插入、删除或环外的和内环的化学修饰而得到的核苷或通过构象修饰而得到的有想要的生物学作用的衍生物。

本发明优选的活性成分的实施方案为 A3RAg。

以本发明的实施方案为依据, 活性成分是如下通式 (I) 所示的核苷衍生物:



其中 R^1 是 $C_1\text{--}C_{10}$ 烷基, $C_1\text{--}C_{10}$ 羟基烷基, $C_1\text{--}C_{10}$ 羧烷基或 $C_1\text{--}C_{10}$ 氰基烷基或如下通式 (II) 所示的基团:



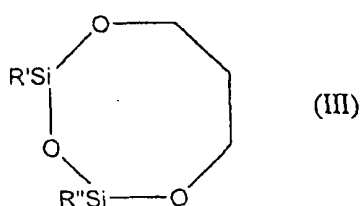
其中:

- Y 是氧、硫或碳原子;

- X_1 是 H、 C_1-C_{10} 烷基、 $R^a R^b NC(=O)-$ 或 HOR^c- , 其中 R^a 和 R^b 可能是相同或不同的基团, 选自氢、 C_1-C_{10} 烷基、氨基、 C_1-C_{10} 卤代烷基、 C_1-C_{10} 氨基烷基、 $C_1-C_{10}BOC-$ 氨基烷基、和 C_3-C_{10} 环烷基或相互连接形成一个包含 2 至 5 个碳原子的杂环, 和 R^c 选自 C_1-C_{10} 烷基、氨基、 C_1-C_{10} 卤代烷基、 C_1-C_{10} 氨基烷基、 $C_1-C_{10}BOC-$ 氨基烷基以及 C_3-C_{10} 环烷基;

- X_2 是 H、羟基、 C_1-C_{10} 烷基氨基、 C_1-C_{10} 烷基酰氨基或 C_1-C_{10} 羟基烷基;

- X_3 和 X_4 分别是氢、羟基、氨基、酰氨基、叠氨基、卤素、烷基、烷氧基、羧基、次氨基、硝基、三氟基、芳基、烷芳基、巯基、硫代酸酯、硫醚、 $-OCOPh$ 、 $-OC(=S)OPh$ 或 X_3 和 X_4 都是与 $>C=S$ 相连形成 5 元环的氧、或 X_2 和 X_3 形成分子式如 (III) 所示的环:

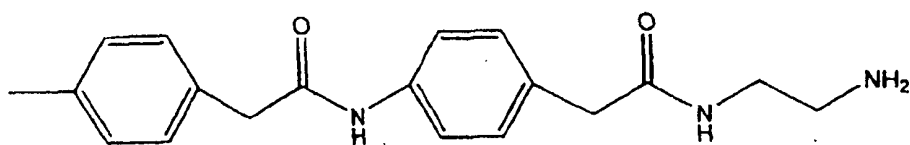


其中 R' 和 R'' 分别是 C_1-C_{10} 烷基;

- R_2 选自氢、卤素、 C_1-C_{10} 烷基醚、氨基、酰肼基、 C_1-C_{10} 烷基氨基、 C_1-C_{10} 烷氧基、 C_1-C_{10} 硫代烷氧基、硫代吡啶基、 C_2-C_{10} 链烯基; C_2-C_{10} 炔基、巯基以及 C_1-C_{10} 硫代烷基; 以及

R_3 是 $-NR_4R_5$ 基, R_4 是氢或选自烷基、取代烷基或芳基 $-NH-C(Z)-$, Z 是 O、S、或 NR^a , R^a 的含义同上,

-和 R_5 , 在 R_4 是氢的情况下, R_5 选自取代基在一个或多个位置未取代的或取代的 R-和 S-1-苯乙基、苯甲基、苯乙基或酰基苯氨基, 所说的取代基选自 C_1-C_{10} 烷基、氨基、卤素、 C_1-C_{10} 卤代烷基、硝基、羟基、乙酰氨基、 C_1-C_{10} 烷氧基以及磺酸或它们的盐; 或 R_4 是苯并二噁烷甲基、呋喃甲基、L-丙基丙氨酰氨基苯甲基、 β -丙氨酰氨基-苯甲基、T-BOC- β -丙氨酰氨基-苯甲基、苯基氨基、氨基甲酰基、苯氧基或 C_1-C_{10} 环烷基; 或 R_5 是如下分子式的基团:

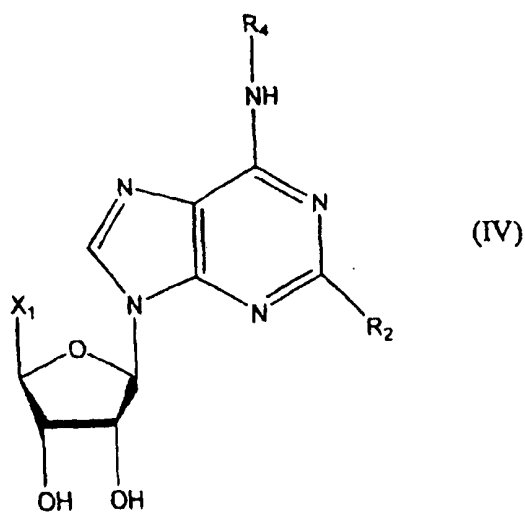


或上面所定义的化合物的合适的盐, 如三乙胺盐; 或

当 R_4 选自烷基、取代的烷基、或芳基-NH-C(Z)-的基团时, R_5 就是选自取代的或未取代的杂芳基-NR'-C(Z)-、杂芳基-C(Z)-、烷芳基-NR'-C(Z)-、烷芳基-C(Z)-、芳基-NR-C(Z)-和芳基-C(Z)-的基团;

其中 Z 的定义同上。

根据本发明的这一实施方案, 活性成分优选如通式 (IV) 所示的核苷衍生物:

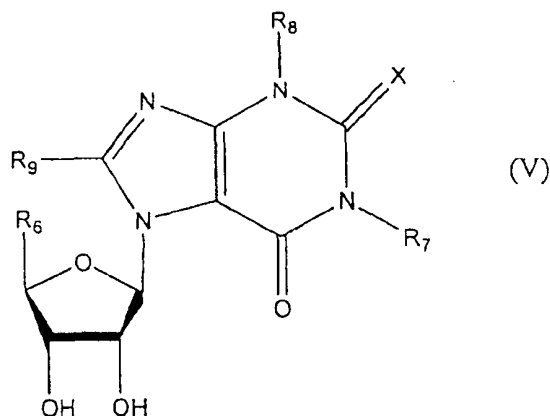


其中 X_1 、 R_2 和 R_4 的定义同上。

依据本发明的这一实施方案优选的活性组分一般而言为 N^6 -苯甲基腺苷-5'-糖醛酰胺及其有 A3-选择性腺苷受体激动剂功能的衍生物。该类衍生物的例子如 N^6 -2-(4-氨基苯基)乙基腺苷 (APNEA)、 N^6 -(4-氨基-3-碘苯甲基)腺苷-5'-(N-甲基糖醛酰胺) (AB-MECA) 和 1-脱氧-1-{6-[(3-碘苯基)甲基]氨基}-9H-嘌呤-9-基}-N-甲基- β -D-呋喃核糖-酰胺, 后者在本领域也被称为 N^6 -3-碘苯甲基-5'-甲基羧酰氨腺苷, N^6 -(3-碘苯甲基)腺苷-5'-N-甲基糖醛酰胺和本文的前文和下文中缩写为 IB-MECA 或 IB-MECA 的氯化衍生物 ($R_2=Cl$), 后者在这里被称为 Cl-IB-MECA, IB-MECA 和 Cl-IB-MECA 是本发明尤其优选的。

根据本发明的另一个实施方案, 活性成分可以是一般被称为 N^6 -苯甲基-腺苷-5'-烷基糖醛酰胺-N-氧化物或 N^6 -苯甲基腺苷-5'-N-二烷基糖醛-酰胺- N^1 -氧化物的腺苷衍生物。

更进一步地, 活性成分可以是如下通式 (V) 所示的黄嘌呤-7-核糖核苷衍生物:



其中 X 是 O 或 S;

R_6 是 $R^a R^b NC(=O)-$ 或 HOP^c- , 其中

$-R^a$ 和 R^b 可以是相同或不同的基团, 选自氢、 C_1 - C_{10} 烷基、氨基、 C_1 - C_{10} 卤代烷基、 C_1 - C_{10} 氨基烷基以及 C_3 - C_{10} 环烷基, 或连接在一起形成一个包含 2 至 5 个碳原子的杂环; 以及

$-R^c$ 是选自 C_1 - C_{10} 烷基、氨基、 C_1 - C_{10} 卤代烷基、 C_1 - C_{10} 氨基烷基、

C_1-C_{10} BOC-氨基烷基和 C_3-C_{10} 环烷基;

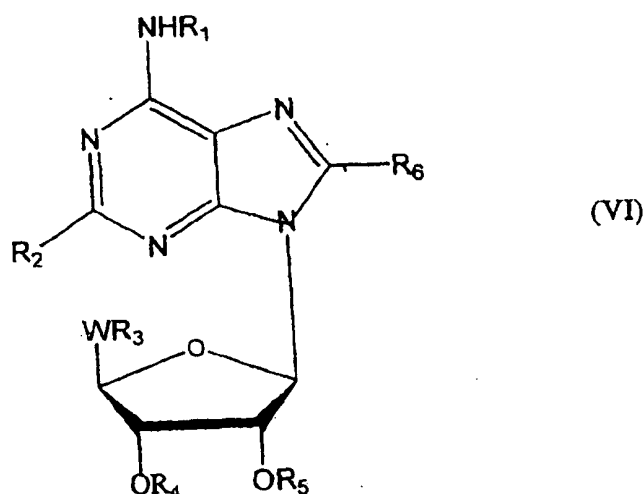
$-R_7$ 和 R_8 可以是相同或不同的基团, 选自烷基、 C_1-C_{10} 环烷基、R-或 S-1-苯乙基、未取代的苯甲基或酰基苯氨基以及苯基在一个或多个位置被取代基取代的苯基醚, 其中的取代基选自 C_1-C_{10} 烷基、氨基、卤素、 C_1-C_{10} 卤代烷基、硝基、羟基、乙酰氨基、 C_1-C_{10} 烷氧基以及磺酸;

$-R_9$ 可选择的基团包括卤素、苯甲基、苯基、 C_3-C_{10} 环烷基以及 C_1-C_{10} 烷氧基;

或这种化合物的盐, 如它们的三乙胺盐。

上述定义的化合物中的一部分以及它们的合成方法详见 US 5, 688, 744; US 5, 773, 423, US 6, 048, 865, WO 95/02604, WO 99/20284 以及 WO 99/06053, 在这里列出这些文献作为参考。

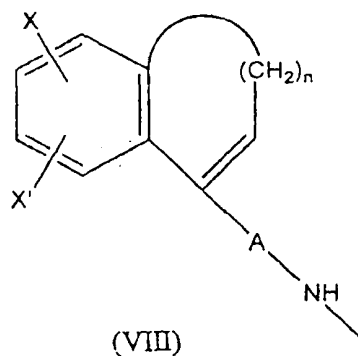
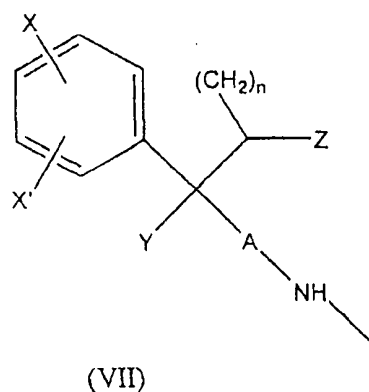
在 GSP 诱导实施方案情况中的活性成分可以是 AlRag。它是一种有如下分子式的有代表性的腺苷衍生物



$-R_1$ 代表低级的烷基、环烷基, 优选 C_3-C_8 环烷基 (包括熟知的环己基和环戊基包括衍生物, 分别被记作 CPA 和 CHA), 环烷基可以被取代, 例如可以被羟基或低级的烷基取代; R_1 也可以代表羟基或羟基烷基; 苯基、酰基苯胺、或低级的烷苯基, 所有的基团都可以被一个或多个取代基取代, 如卤素、低级烷基、卤代烷基如三氟基甲基、硝基、氟

基、 $-(CH_2)_mCO_2R^a$ 、 $-(CH_2)_mCONR_2R^aR^b$ 、 $-(CH_2)_mCOR^a$ ，其中 m 代表一个从 1 到 6 的整数； $-SOR^c$ 、 $-SO_2R^c$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_2NR^aR^b$ 、 $-OR^a$ 、 $-SR^a$ 、 $-NHSO_2R^c$ 、 $-NHCOR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 或 $-NHR^aCO_2R^b$ ；其中

$-R^a$ 和 R^b 分别代表氢、低级烷基、烷酰基、苯基或萘基(后者可以是部分饱和的)，烷基可以被取代或未取代的苯基或苯氧基随意取代；或当 R_1 代表 $-NR^aR^b$ 时，所说的 R^a 和 R^b 与氮原子一起形成 5-或 6-元杂环，该杂环可任意的包含选自氧或氮的第二杂原子，其中的第二个氮杂原子可以任意的进一步被氢或低级的烷基取代；或 $-NR^aR^b$ 是如下通式(VII)或(VIII)所示的基团：



其中 n 是一个从 1 到 4 的整数；

$-Z$ 是氢、低级的烷基或羟基；

$-Y$ 是氢、低级的烷基、或 OR' ，其中 R' 是氢、低级的烷基或低级的烷酰基；

$-A$ 是一个键或低级链烯基，优选 C1-C4 链烯基；以及

$-X$ 和 X' 分别是氢、低级烷基、低级烷氧基、羟基、低级烷酰基、硝基、卤代烷基例如三氟基甲基、卤素、氨基、单-或双-低级烷氨基，或当 X 和 X' 结合成亚甲二氧基；

$-R^c$ 代表低级烷基；

R_2 代表氢、卤素、取代的或未取代的低级烷基或链烯基、低级卤代烷基或卤代链烯基、氰基、乙酰氨基、低级烷氧基、低级烷基氨

基, NR^dR^e , 其中的 R^d 和 R^e 分别是氢、低级烷基、苯基或被低级烷基取代的苯基、低级烷氧基、卤素或卤代烷基例如三氟基甲基或烷氧基, 或 $-\text{SR}^f$, 其中的 R^f 是氢、低级烷基、低级烷酰基、苯甲酰基或苯基; $-\text{W}$ 代表 $-\text{OCH}_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2-$ 、 $-\text{SCH}_2-$ 或 $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})-$;

$-\text{R}_3$ 、 R_4 和 R_5 分别代表氢、低级烷基或低级链烯基、支链或直链 C_1 - C_{12} 烷酰基、苯甲酰基或被低级烷基取代的苯甲酰基、低级烷氧基、卤素, 或 R_4 和 R_5 形成一个五元环, 该五元环可以随意的被低级的烷基或链烯基取代; 此外 R_3 还可以单独代表磷酸盐、一氢或二氢磷酸盐、或其碱金属或铵或二碱金属或二铵盐;

$-\text{R}_6$ 代表氢、卤素原子或

一部分 R 基团 (即 R_1 至 R_6) 是分子式为 $\text{R}^g-\text{SO}_3-\text{R}^h$ 的磺基碳氢化合物, 其中的 R^g 代表的基团选自 C_1 - C_{10} 脂肪族化合物、苯基和被芳香基取代的低级烷基, 其中作为取代基的芳香基可以是取代或未取代的芳香基, R^h 代表一个一价阳离子。合适的一价阳离子包括锂、钠、钾、铵或三烷基铵, 它们在生理条件下可以发生解离。剩余的 R 基是氢或卤素原子、未取代的碳氢化合物或其它任何包含如上所定义基团的非硫物。

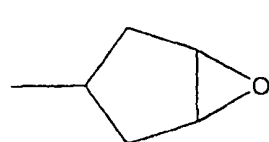
这里所使用的碳氢化合物链可以是直链或支链。尤其要注意的是, 这里使用的定义“烷基”或“链烯基”指的是直链或支链的烷基或链烯基。“低级烷基”或“低级链烯基”的定义分别指的是 C_1 - C_{10} 烷基或 C_2 - C_{10} 链烯基, 优选 C_1 - C_6 烷基和 C_2 - C_6 链烯基。

优选的分子式为 (VI) 的腺苷衍生物是 N^6 -环戊基腺苷 (CPA), 2-氯-CPA (CCPA), 和 N^6 -环己基腺苷 (CHA) 衍生物, 这些化合物的制备对于本领域熟练技术人员而言是众所周知的。其它的公知的选择 A1 受体的腺苷衍生物是其中的 R_1 是酰基苯氨基的化合物, 其中的酰基苯氨基可以是未取代或取代的, 例如可以被羟基、烷基、烷氧基或 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}''$ 取代, 其中的 R'' 是羟基、 $-\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ 、(乙基甘氨酸盐)、tuloidide (其中的甲基部分也可以被卤代烷基替代)、或 $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NHC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}'''$, 其中的 R''' 代表一个能得到甲氧基取代基的基团、酰胺取代基 (例如 R''' 是 $-\text{NHCH}_3$), 或 R''' 是酰肼、1, 2-二乙

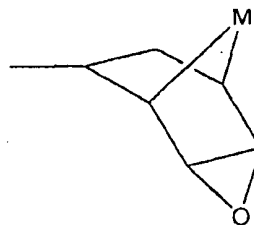
胺、 $-\text{NHC}_2\text{H}_5\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_3$ 、4- (羟基-苯基)丙酰、生物素化的乙二胺或其它任何合适的可以表示上述化合物和 A1 激动剂的碳氢化合物。

根据本发明，被用作活性成分的 N^6 -取代的腺苷衍生物也可以是这些含有环氧化物部分的化合物，更特别的可以是包含腺苷衍生物的环烷基环氧(如氧杂二环或氧杂三环，前者如降冰片基，后者如金刚烷基)。其中一些此类的化合物可以用通式(I)来定义，

其中的 R_1 是如下通式(IXa)和(IXb)所表示的基团：



(IXa)



(IXb)

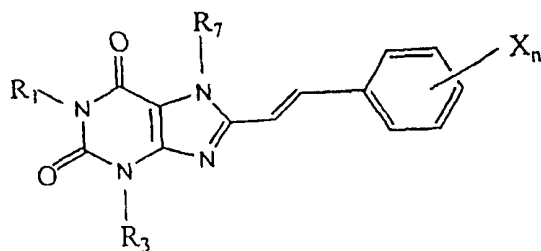
其中的 M 是如上所定义的低级烷基。

有环氧化 N^6 -降冰片基的激动剂化合物的实施方案包括内和外型异构体，更特别的可以是下列四种异构体之一：2R-外，2R-内，2S-外和2S-内。

另外一个 N^6 -降冰片基衍生物的实施方案是在嘌呤环 N^1 -位包含一个氧原子。这一化合物被称为 N^6 -(5,6-环氧降冰片-2-基)腺苷-1-氧化物。

有时，A1Rag 可以是腺嘌呤衍生物，其中腺苷的 β -D-ribofuranosyl 部分可以被氢或苯基替代。

A2Ran，根据本发明可以被使用的是如下分子式(X)所示的 1,3,7-被取代的黄嘌呤的 8-苯乙烯基衍生物(X)：



其中 R_1 和 R_3 是 C_1 - C_4 烷基、烯丙基或炔丙基

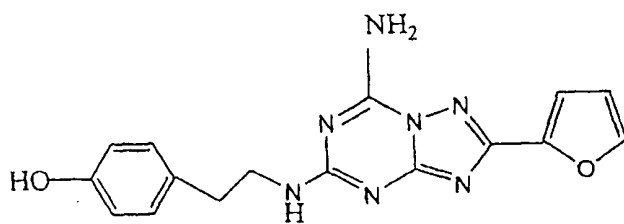
R_7 是 H、甲基或 C_2 - C_8 烷基

n 是 1 到 3

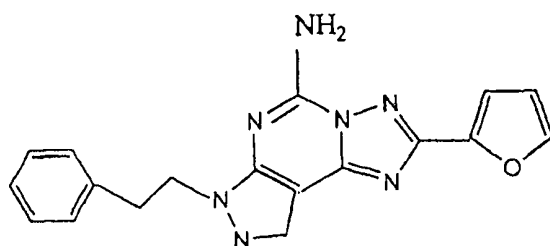
以及 X 是卤素、三氟基烷基、烷氧基、羟基、硝基、氨基、二烷基氨基、重氮、异硫氰酸根、苄氧基、氨基烷氧基、烷氧基羰基氨基、乙酰氧基、乙酰氨基、琥珀酰氨基、4-(4- NH_2 -反- $CH_2CH=CHCH_2O$ -3,5-(MeO) $_2$)-4-(4-AcNH-反- $CH_2CH=CHCH_2O$)-3,5-(MeO) $_2$ 、4-(4-叔-BOC-NH-反- $CH_2CH=CHCH_2O$)-3,5-(MeO) $_2$

分子式为 (X) 的化合物的具体例子是 (3,7-二甲基-1 炔丙基-xantane)。

A2Ran 可以是如下分子式所示的化合物:



或



正如所领会的那样，本发明并不仅限于上面提及的 A3Rag、A2Rag 或 A2Ran 化合物。

以本发明为依据的化合物可以是如上所规定的化合物，或也可以是其盐或溶剂化物的形式，尤其是其在生理学上可接受的盐和溶剂化物。此外，当包含一个或多个不对称碳原子时，活性成分可以包括上述活性成分的异构体和非对应立体异构体或其混合物。

上述活性成分可药用的盐包括这些活性成分与可药用的有机酸和无机酸形成的盐。合适的酸的例子包括烟酸、氢溴酸、磺酸、硝酸、高氯酸、富马酸、马来酸、磷酸、羧乙酸、乳酸、水杨酸、琥珀酸、对甲苯磺酸、醋酸柠檬酸、甲磺酸、甲酸、苯甲酸、丙二酸、萘-2-磺酸和苯磺酸。

活性成分可以作为无活性的物质(如前体药物)给药，然后在受治疗者的特定部位通过其本能的处理对其进行进一步的修改而将其激活。在一些情况中，衍生物的诸如本发明这样的药物组合物的治疗学功能被保留。这些前体药物也属于这里所使用的“活性成分”的定义范畴。同样，“A3Rag”“A1Rag”“A1Ran”“A2Rag”和“A2Ran”的定义也应被理解为包括前体药物，虽然它们是前体，缺乏拮抗或拮抗活性(如情况可以是)，但是它们在体内有活性。

依据本发明，A3Rag 可以通过筛选来选择性质与 IB-MECA 活性相类似的化合物。例如，根据白细胞减少症抑制实施方案，可以使用的此类化合物可以根据其刺激骨髓细胞和白细胞增殖的能力和随后其在体内发挥效力的能力为依据来进行选择。对于在增殖抑制实施方案中的化

合物，可以根据其抑制肿瘤细胞增殖的能力以及随后在体内发挥这一活性的能力来进行筛选。

A1RAn 和 A2Ran 的活性可以进行测定，可以用所描述的与 A3RAg 相类似的方法，进行必要的修改，进行筛选。

本发明的药物组合物可以只包含活性成分本身，也可能是活性成分与其它一些成分结合，其中所说的其它一些成分如可药用载体，稀释剂，赋形剂，添加剂和/或辅剂，一些本领域熟练技术人员所熟知的成分，例如为了某种目的而加的调味剂，着色剂，润滑剂以及一些其它的药学组分。很明显，本发明所使用的可药用载体、稀释剂、赋形剂、添加剂通常是惰性、无毒的固体或液体填料，稀释剂或胶囊材料，优选不与本发明的组合物反应的物质。

此外，活性成分也可以与化疗药物结合给药，尤其是在白细胞减少症预防实施方案的情况中。因此，本发明的药物组合物除了所说的活性成分外还可以包含一种化疗药物。根据本发明的一些实施方案，所说的化疗药物是抗癌的化疗药物。应当清楚的是该术语意味着任意一种细胞毒素药物或为了减少病人的肿瘤肿块而给予病人的含有两种或多种细胞毒素药物混合物的合剂。

本发明发现 A3RAg 口服可生物利用，口服给药时可发挥其双重疗效(减少异常细胞增殖和预防或减少白细胞减少症)。因此，根据优选的实施方案，本发明的药物组合物被制备用于口服给药。这种口服组分可以进一步包含适用于口服给药的可药用载体、稀释剂、赋形剂、添加剂或辅剂。

在本发明的 G-CSF-诱导实施方案中，被公开的药物组合物被特别地用于增加从细胞分泌的 G-CSF 水平。此类化合物可以被用于促进化疗和骨髓移植后噬中性白细胞的恢复或抑制异常细胞的生长。到目前为止，此种治疗包进行生长因子给药，已知这种治疗方法具有一些不想要的副作用。此外，众所周知，G-CSF 治疗的平均花费是很高的。

在本发明的白细胞减少症预防实施方案或毒性预防实施方案的范畴中，公开的药物组合物被用于提高循环系统中白细胞的水平或抵消

其它的一些毒副作用，例如体重减轻。本发明的这一点可以被用于多种临床情况。很显然循环系统中白细胞尤其是噬中性粒细胞的减少会导致免疫系统弱化。可以用本发明的这一点进行治疗的免疫系统弱化的例子是癌症前期经常发生的或由药物诱导的白细胞减少症或药物诱导的噬中性白细胞细胞减少症。

增殖抑制实施方案对治疗与细胞异常生长有关的多种异常是有效的，如癌症，牛皮癣和一些自身免疫性疾病。本发明的组合物尤其可用于抑制肿瘤细胞的增殖，优选用于抗癌治疗。

当用 A3RAg 治疗淋巴肿瘤组织细胞时，这些细胞增殖的抑制作用远远显著于用腺苷或 A1' 或 A2' 激动剂的抑制作用，虽然用 A2Rag 也可以发现有一些活性(参见例图 5A)。这些结果表明肿瘤细胞增殖的抑制应该主要归咎于 A3RAg 与其受体的结合，但在一定程度上也可以由 A2Rag 来模拟。因此，上述令人惊讶的结果为未来的抗癌细胞抑制剂药物提供了一个新的治疗学目标。

此外，进一步发现 A3RAgs 还可以有效的抑制除淋巴瘤之外其它肿瘤细胞的生长，如黑素瘤或结肠瘤(参见例图 6)。本领域熟练技术人员能清楚的预见到用能抑制异常分裂细胞生长同时能通过诱导骨髓细胞增殖来重建患者免疫系统的非特异性抗癌药对患者进行治疗的优点。

图 7A-7B，例如，表明了 A3RAg 的不同作用。在这种特定的情况中，评估了 IB-MECA 对肿瘤和正常细胞的作用。与腺苷相比，使用 A3RAg 获得的更显著的效果可以通过这些结果更清楚地表现出来。当使用 A3 受体拮抗药，MRS-1220 时，A3RAg 的治疗效果是可逆的。

体内研究证实了体外研究的结果，将用 A3RAg 和一种细胞毒剂对小鼠同时进行治疗的结果与只用细胞毒素药物对小鼠进行治疗的结果相比，A3RAg 对小鼠表现出一种化学保护作用(参见例图 8)。此外，发现在用 A3RAg 治疗的小鼠的体内的病灶数下降，表明了 A3RAg 的化疗活性(参见例图 9)。图 10A-10B 和 19A 和 19B，例如，表明仅用细胞毒素药物进行治疗的荷瘤小鼠出现外周血液中白细胞和噬中性粒细胞

下降的情况，而在化疗之后进行 A3RAg 给药，产生的结果是白细胞总数恢复，噬中性粒细胞百分数增加。

因此，可以得出 A3RAg 具有双重疗效的结论，它可以作为化疗药物，也可以作为化学保护剂。很显然，A3RAg 的这种双重作用的应用也在本发明的保护范围之内。

无论如何，本发明的药物组合物的给药和剂量应与良好的医学实践相一致，同时考虑每个病人的临床情况，给药的部位和方法，给药的时间安排，病人的年龄性别、体重和其它一些医学执业人员公知的因素。

本发明的组合物可以以各种方法给药。可以口服给药，皮下给药，非胃肠道给药包括静脉内给药、动脉内给药，肌肉内给药，腹膜内给药，或通过鼻内给药，以及鞘内给药和本领域数量人员公知的输液给药。

众所周知，人的治疗过程通常长于动物的治疗过程，例如这里例举的小鼠。治疗的时间与疾病进程和活性成分的效力相对应。治疗方案包括在几天或更长的时间用单剂量或多剂量进行治疗。治疗时间一般附随于疾病进程过程、活性成分效力和被治疗的病人种类。

当本发明的组合物采用非胃肠道给药时，一般被制成单位剂量可注射的形式(溶液，混悬液，乳剂)。适于注射的药物制剂包括灭菌水溶液或分散液和可重新组成灭菌水溶液或分散液的灭菌粉末。可被用作溶剂和分散介质的载体包括，例如水、乙醇、多元醇(如丙三醇、丙二醇、液体聚乙二醇等等)、其适当地混合物以及植物油。

非水赋形剂，有时也可以被用作活性成分的溶剂系统，如棉籽油、芝麻油、橄榄油、大豆油、玉米油、向日葵油、或花生油和酯，如肉豆蔻酸异丙酯。

此外，也可以添加能加强组合物的稳定性、无菌性和等渗性的各种添加剂，包括抗菌防腐剂、抗氧剂、螯合剂和缓冲剂。预防微生物的作用可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂而得到加强，例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸等等。

为了口服给药, 活性成分可以被制成片剂、混悬液、溶液、乳剂、胶囊剂、散剂、糖浆剂等等形式, 这是药师通过众所周知的技术可以获得和使用的。

本发明是通过权利要求定义的, 其内容被认为已经在说明书中进行了公开, 现在将通过实施例并比照附图进行描述。应当清楚的是所使用的术语是想尽量是说明书单词的本意而不是限制因素。

虽然前面的说明书详细描述了本发明的少数特定的实施方案, 但是本领域熟练技术人员应当明白, 本发明并不仅限于此, 可能会进行其它一些形式和细节的变化, 这些变化仍不会离开此处公开的本发明的范围和要旨。

附图简要说明

为了理解本发明以及明白实际如何实施, 现在将要通过一些非限制性的实施例, 比照附图, 对优选的实施方案进行描述, 其中:

图 1 是一个表示体外试验的结果的柱形图, 表明了在该体外试验中腺苷(Ad)、DPCPX(一种 A1RAn)、CPA 和 CCPA(二者都是 A1RAg)或 IB-MECA(一种 A3RAg)对 G-CSF 产生的作用。将培养物用改性的 RPMI 进行处理作为对照。所得结果用对照的百分数表示(对照=100%)。

图 2 是一个表示通过 $[H^3]$ -胸腺嘧啶核苷结合试验获得的试验结果的柱形图, 该试验用腺苷、CPA 或 IB-MECA 来刺激骨髓细胞的增殖, 加入((+)G-CSFAb 浅色柱)或不加入((-)G-CSFAb-深色柱)抗体来拮抗 G-CSF 来进行试验。试验结果表明了抗-g-CSF 抗体的中和作用。所得结果用所定义的对照的百分数表示(对照=100%)。

图 3A 和 3B 是一个表示通过 $[H^3]$ -胸腺嘧啶核苷结合试验获得的试验结果的柱形图, 在该试验中在存在腺苷、腺苷受体激动剂(图 3A)或与腺苷受体拮抗剂结合的腺苷(图 3B)时进行骨髓细胞增殖试验。受体激动剂试验(图 3A)是 CPA(一种 A1RAg)和 IB-MECA(一种 A3RAg);受体拮抗剂试验(图 3B)是 DPCPX(一种 A1RAn)、DMPX(一种 A2RAn)和 MRS(一种 A3RAn)。所得结果用在对照上结合的胸腺嘧啶核苷的增长百分数来

表示(对照=0%)。

图 4 表示体外试验结果的柱形图, 表明了在不同浓度的 IB-MECA (0.01 μ M, 0.1 μ M 和 1.0 μ M) 下进行的骨髓细胞增殖试验。所得结果用在对照上结合的 [H^3]-胸腺嘧啶核苷百分数来进行表示(对照=0%)。柱形下面的数字是 IB-MECA 的浓度(μ M)。

图 5A 和 5B 是表示两个试验结果的柱形图, 二者都是在体外试验中进行的, 是以细胞计数试验为基础, 对腺苷以及其拮抗剂对淋巴组织瘤细胞(Nb2-11C)生长的作用进行了实验。在图 5A 表示的试验中, 对腺苷、CPA (一种 A1RAg)、DMPA (一种 A2RAg) 或 IB-MECA (一种 A3RAg) 对淋巴组织瘤细胞生长的作用进行了试验。在图 5B 表示的试验中, 对腺苷、DPCPX (一种 A1RAn)、DMPX (一种 A2RAn) 或 MRS-1220 (一种 A3RAn) 对淋巴组织瘤细胞生长的作用进行了试验。将用 RPMI 处理过的淋巴组织瘤细胞作为对照。所得结果相对对照用抑制生长的百分数来进行描述(对照 = 0%)。

图 6 是表示不同的肿瘤细胞类型(B16 黑素瘤, HTC-116 结肠癌, Nb2-11C 淋巴瘤)在存在 A3RAg IB-MECA 时生长情况的体外试验柱形图。将用 RPMI 处理过的淋巴组织瘤细胞作为对照。所得结果相对对照用抑制百分数来进行描述(对照 = 0%)。

图 7A 和 7B 是表示腺苷或 A3RAg、IB-MECA 对肿瘤细胞 (Nb2-11C 淋巴瘤, 图 7A) 或骨髓细胞(试验图 7B)生长的作用的体外试验的柱形图。图 7A 和 7B 的结果分别与对照相比用抑制百分数和刺激百分数来表示 (对照=0%)。

图 8 是表示在用化疗药物(环磷酰胺)进行治疗 5 天和 9 天后外周白血细胞(WBC)数的体内试验的柱形图。环磷酰胺可以单独(灰色柱)或在开始给予化疗药物 24 小时后结合给予 IB-MECA, 每天口服(以 1ml 的溶液)给药。将用 PBS 处理过的小鼠作为对照。将 WBC 数用百分比表示, 相对对照(对照 = 0%)。

图 9 是表示对小鼠接种 2×10^5 的黑素瘤细胞, 用环磷酰胺(CHEMO)、IB-MECA、A3RAg 与 IB-MECA 和 CHEMO 结合进行化疗治疗后小鼠黑素瘤

病灶数的体内试验的柱形图，用磷酸生理盐水缓冲液作为对照。

图 10A 和 10B 是表示 IB-MECA 化疗活性的体内试验的柱形图。表明了将在化疗药物环磷酰胺 (CHEMO) 结合 (CHEMO+IB-MECA) 或不结合 IB-MECA 给药后，白血细胞 (WBC, 图 10A) 和噬中性粒细胞 (图 10B) 与时间的函数关系。将用 PBS 处理过的荷瘤小鼠作为对照。与对照相比噬中性白细胞数用百分比来表示 (对照=0%)。

图 11 表示了开始治疗 (给予 5-FU、C1-IB-MECA 或 5-FU 和 C1-IB-MECA 的结合) 后第 7, 10 和 14 天裸鼠体重的对照百分比 (未治疗小鼠=100%)。治疗包括 5-FU 给药 (黑色柱)、5-FU 与 C1-IB-MECA (一种 A3Rag) 结合给药 (灰色柱) 和 C1-IB-MECA 单独给药 (白色柱)。

图 12A 和 12B 表示了 C1-IB-MECA 对减轻阿霉素诱导的骨髓中毒的作用的试验结果。试验采用 ICR 小鼠。图 12A 表示白血细胞 (WBC) 数而图 12B 表示成核的骨髓细胞数。在图 12A 中，表明了四个不同时期的两种治疗的结果，对照的水平用短划线表示，而在图 12B 中，表明了两个不同时期的治疗结果，对照水平用左手边的柱形表示。

图 13 表示了抗-G-CSF 抗体对对照小鼠、用化疗药物进行治疗的小鼠和用化疗药物结合 C1-IB-MECA 进行治疗的小鼠的白血细胞 (WBC) 数的作用，这些药物均为口服给药 ($6\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重，在 0.2ml PBS 中)。在注射抗-G-CSF 抗体后的 WBC 数用浅色柱表示。所有的结果都用对照的百分比来表示。(对照=100%)。

图 14 表示了注射 HCT-116 人结肠瘤细胞后对照组和治疗组 (C1-IB-MEC 口服给药) 裸鼠肿瘤大小的发展情况。

图 15 表示了与图 14 类似的试验结果，其中对注射 HCT-116 人结肠瘤细胞后裸鼠肿瘤的大小变化进行了测定。进行了四组试验：对照组，接受 5-FU 治疗的组，C1-IB-MECA 口服给药的组和接受 5-FU 和 C1-IB-MECA 联合治疗的组。

图 16 是表示在如图 15 所描述的试验进行了 30 天后肿瘤大小的柱形图。

图 17 是表示不同浓度 ($0.05\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$) 的抗-G-CSF 抗体

(0-无抗体)下测定的 C1-IB-MECA 诱导的骨髓细胞增殖试验结果的柱形图。增殖通过 $[^3\text{H}]$ -胸腺嘧啶核苷结合试验来进行测定。

图 18 表示测定 B-16 黑素瘤和骨髓细胞增殖的体外实验的试验结果。增殖通过 $[^3\text{H}]$ -胸腺嘧啶核苷结合试验来进行测定。细胞暴露于 $0.01\mu\text{M}$ 和 $0.1\mu\text{M}$ C1-IB-MECA 结合(白色柱)或不结合(黑色柱)A3Rag-MRS-1523。所得结果以对照百分数来进行表述(对照 = 100%)。

图 19A 和 19B 表示了与图 10A 和 10B 类似的实验的试验结果, 用 C1-IB-MECA 来进行。

图 20 表示了测定由 IB-MECA 或 C1-IB-MECA 诱导的骨髓细胞增殖的体外实验的试验结果。将两种 A3Rag 以 1nM 或 10nM 的浓度加入骨髓细胞培养物中, 分为加拮抗剂(灰色柱-“(+)拮抗剂”)或不加拮抗剂(黑色柱-“(-)拮抗剂”)。一种 A3Ran, MRS-1523, 浓度为 10nM 。增殖通过 $[^3\text{H}]$ -胸腺嘧啶核苷结合试验来进行测定。所得结果相对对照用刺激的百分数来进行表示(未处理的骨髓细胞作为对照, 对照 = 0%)。

试验结果

肿瘤细胞

使用鼠的肿瘤细胞株(B-16 黑素瘤和 Nb2 11c 大鼠淋巴瘤)。B-16 黑素瘤细胞由美国模式培养物保藏所(ATCC), Rockville, Maryland 获得。Nb2-11C 大鼠淋巴瘤细胞[Pines M. 和 Gertler A. J. of Cellular Biochem., 37:119-129(1988)]由 Dr. A. Gertler, Hebrew 大学, Israel 友情提供。

还使用结肠癌细胞(HCT-116), 由 ATCC 获得。

在含有 10%胎牛血清(FBS, Biological Industries, Beit Haemek, Israel)的 RPMI 培养基中对细胞进行常规培养。对细胞进行一周两次的转移, 将其转移到新准备的介质中。

正常细胞

使用从 C57BL/6J 小鼠股骨获得的骨髓细胞。细胞的制备如前所述

[17].

药物/化合物

使用的药物有：腺苷；腺苷 A1 受体激动剂：CCPA [2-氯-N⁶-环戊基-腺苷]、CPA (N-环戊基腺苷)；A1Ran: DPCPX (1, 3-二丙基-8-环戊基黄嘌呤)；腺苷 A2 受体激动剂：DMPA (N⁶-[2-(3, 5-二甲氧基苯基)-2-(2-甲基苯基)-乙基]腺苷)；A2Ran: DMPX (3, 7-二甲基-1-呋丙基-xantane)；A3Rag: IB-MECA (1-脱氧-1-{6-[(3-碘苯基)甲基]氨基}-9H-嘌呤-9-基)-N-甲基-β-D-呋喃核糖醛酰胺))、C1-IB-MECA (2-氯-N⁶-3-碘苯甲基)-腺苷-5'-N-甲基-糖醛酰胺；和腺苷 A3 受体拮抗剂：MRS-1523 (5-丙基-2-乙基-4-丙基-3-乙硫基羰基)-6-苯基吡啶 5-羧酸盐)和 MRS-1200 (9-氯-2-(2-呋喃基)-5-[(苯基乙酰基)氨基][1, 2, 4,]-三唑基[1, 5-c]噻唑啉)。

使用抗-鼠科动物 G-CSF 抗体 (兔血清通过使用柱色谱进行蛋白纯化, Cytolab LTD, Weizmann Institute of Science, Israel)。

环磷酰胺购自 Taro 药物实业有限公司. Haifa Bay, Israel.

小鼠

使用 3 个月大的, 平均体重为 25gr 的雌性 ICR, C57BL/6J 小鼠或 (BALB/C 血统) 小鼠。小鼠由 Harlan 实验室购得, Jerusalem, ISRAEL。给小鼠提供标准的颗粒状食物和自来水。

实施例 1: 腺苷和腺苷受体拮抗剂以及激动剂对 G-CSF 制造和骨髓细胞增殖的作用

为了验证腺苷通过刺激 G-CSF 制造而发挥作用的假设, 在存在腺苷或腺苷激动剂或拮抗剂的情况下进行正常细胞培养。

为此目的, 从 C57BL/6J 或 ICR 小鼠股骨获得的骨髓细胞首先通过 25G 的探针进行分散。然后将细胞 (3×10^5 cells/well, 在 96 孔微量培养板中) 用含有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI 培养基在有腺苷 (25 μM) 存

在的情况下对细胞进行培养。腺苷或 A1 和 A3 腺苷受体激动剂-CPA(一种 A1RAg, 0.01 μ M), CCPA(一种 A1RAg, 0.01 μ M), 或 IB-MECA(一种 A3RAg, 0.01 μ M)在没有腺苷存在的情况下被加入到骨髓培养物中;一种 A1 腺苷受体拮抗剂, DPCPX(0.1 μ M)在存在腺苷(25 μ M)的情况下被加入到骨髓培养物中。

用含有 RPMI 培养基细胞混悬液和 5%FBS 的培养物作为上述试验的对照。

用 [3 H]-胸腺嘧啶核苷结合试验来评价骨髓细胞的增殖。为此, 在培养 30 小时之后, 每孔用 1 μ Ci [3 H]-胸腺嘧啶核苷进行脉冲调制。在培养 48 小时之后, 进行细胞收获, 用液体闪烁计数器(LKB, Piscataway, NJ, USA)测定 [3 H]-胸腺嘧啶核苷吸收。该试验结果如图 1 所示, 该图表明 A1RAg 或 A3RAg 具有 G-CSF 的制造功能, 这一点与用腺苷获得的结果相似。

为了证明腺苷及其激动剂可以通过刺激 G-CSF 制造而发挥作用, 进行了一个进一步的试验, 在该试验中, 在存在腺苷(25 μ M)、CPA (0.01 μ M)或 IB-MECA (0.01 μ M)情况下将抗-G-CSF 抗体(62.5ng/ml)加入到加入到骨髓细胞培养物中。用如上所述的方法评价细胞增殖情况。本试验的结果如图 2 所示, 该图表明了 G-CSF 的抗体抑制了腺苷及其激动剂对骨髓细胞增殖的刺激作用。这一结果表明至少有一部分与腺苷受体相互作用有关的活性是通过 G-CSF 的制造而发挥出来的。

当使用 A1RAg 和 A3RAg(CPA 和 IB-MECA)结合物时, 对骨髓细胞增殖的累计作用进行了评估。该试验的操作作用与如图 1 所表明的实验结果相类似的试验来完成。在被分散之后, 在存在腺苷(25 μ M)、CPA(0.01 μ M)、IB-MECA(0.01 μ M)或 IB-MECA 和 CPA 联用(各自的浓度为 0.01 μ M)的情况下对细胞进行培养, 然后用上述的方法进行进一步的处理。所得结果如图 3A 所示, 该图表明了 IB-MECA 和 CPA 合用作用加强。

为了比较在采用上述的方法之后腺苷受体拮抗剂对骨髓细胞增殖的作用, 单独用腺苷或采用腺苷与 DMPX(一种 A2RAn)、DPCPX(一种 A1RAn)、MRS-1220 (一种 A3RAn)或 DPCPX 和 MRS-1220 的结合物相结

合进行细胞培养。结果如图 3B 所示。正如所看到的, A2 受体被 DMPX 阻断也可以导致骨髓细胞增殖的增加, 这一作用甚至超过了单独使用腺苷时的作用。与之相比, 用 DPCPX 或 MRS-1220 的增殖与单独使用腺苷相比, 其增加减少了 50%, 而 DPCPX 与 MRS-1220 结合则完全抑制了增殖。

采用不同浓度的 IB-MECA ($1\mu\text{M}$, $0.1\mu\text{M}$ 或 $0.01\mu\text{M}$) 对如上所述的被预先处理过的细胞进行培养。用 $[\text{H}^3]$ -胸腺嘧啶核苷结合试验测定刺激百分数。结果如图 3 所示, 该图表明 IB-MECA 以剂量依赖的方式刺激骨髓的增殖。

实施例 2: 腺苷及其激动剂对肿瘤细胞生长的调节

Nb2-11C 大鼠淋巴瘤细胞 (1.2×10^4 个细胞/ml) 用 96 孔微量培养板, 1ml 含有 5% 胎牛血清的 RPMI 培养基培养 48 小时。向其中加入 $25\mu\text{M}$ 腺苷, $0.01\mu\text{M}$ 腺苷受体激动剂 (CPA, 一种 A1Rag; DPMA, 一种 A2Rag 或 IB-MECA, 一种 A3Rag) 或与腺苷 ($25\mu\text{M}$) 结合的 $0.1\mu\text{M}$ 腺苷受体拮抗剂 (DPCPX, 一种 A1Ran; DMPX, 一种 A2Ran; 或 MRS-1220, 一种 A3Ran)。

用含有 5%FBS 的 RPMI 培养基细胞混悬液的培养物作为上述试验的对照。细胞增殖程度用细胞计数分析来测定。

与腺苷抑制作用的比较结果见图 5A 和 5B。正如所看到的这样, 在用 IB-MECA, 一种 A3Rag 进行培养之后, Nb2-11C 细胞的增殖被明显的抑制。在用 CPA, 一种 A1Rag 时观察不到生长抑制, 在使用 DPMA, 一种 A2Ran 时, 可以发现较弱的生长抑制。CPA 不能抑制这两种肿瘤细胞的增殖, 表明腺苷 A1 受体不具有这种活性。但是, DMPA 和 IB-MECA 的抑制作用表明 A2 和 A3 腺苷受体分别在抑制作用中担当一定的角色。

此外, 可以看出当存在 DPCPX, 一种 A1Ran, 本质上没有效果, 而在存在 MRS-1220, 一种 A3Ran 时, 腺苷对 Nb2-11C 细胞增殖的作用基本上被取消。DMPA, 一种 A2Ran, 可以发挥次要的但是仍然很重要的作用。由这些发现可以得出肿瘤细胞的生长可以被 A3Rag 或 A2Ran 有效

抑制的结论。

用与上面所描述的方法相同的方法，评价 A3RAg, IB-MECA 对 B-16 黑素瘤、HCT-116 结肠瘤和 Nb2-11C 淋巴瘤生长的抑制。结果见图 6，用抑制或增殖的百分数表示。

实施例 3：腺苷 A3 受体激动剂对肿瘤细胞和正常细胞的不同作用

用如上所述的试验方法，检验了腺苷、A3RAns 和 A3RAgs 对肿瘤细胞生长的作用。

简要地说，在有腺苷，或 IB-MECA 的情况下进行 Nb2-11C 淋巴瘤或骨髓细胞培养。A3RAg 的双重效果如图 7A 和 7B 所示，在刺激骨髓细胞增殖的同时抑制了肿瘤细胞的生长。

实施例 4：体内研究

将 40 只 C57BL6/J 小鼠分成四组，每组都用下列方案之一进行处理：

1. 对照组：从肿瘤接种的第一天开始到小鼠被处死为止，每只小鼠每天腹腔内 (i. p.) 注射 1ml 生理盐水；

2. 化疗组：一方面在接种肿瘤细胞 24 小时后 i. p. 注射环磷酰胺，同时从肿瘤接种的第一天开始到小鼠被处死为止，每只小鼠每天 i. p. 注射 1ml 生理盐水；

3. 腺苷 A3 受体激动剂 (A3RAg) 组：从肿瘤接种的那一天开始到小鼠被处死为止，IB-MECA 每天口服给药

4. A3RAg+化疗组：一方面在接种肿瘤细胞 24 小时后 i. p. 注射环磷酰胺，同时每天以 $3\mu\text{g/kg}$ 体重进行 IB-MECA 口服给药

在第 5 天和第 9 天从小鼠的尾静脉取血，为计数白细胞 (WBC) 数获得血样。结果如图 8 所示。

此外，在 18 天后处死小鼠，计算其肺部的黑素瘤肿瘤病灶。结果如图 9 所示。

为了评估 A3RAg 的化学保护作用，又进一步的进行了试验。小鼠用环磷酰胺 (50mg/kg 体重，在 0.3mlPBS 中) 进行治疗。在给予细胞毒素

药物 48 和 72 小时后, 小鼠被 i. p. 注射腺苷 ($25 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重) 或 IB-MECA (3 或 $6 \mu\text{g}/\text{kg}$, 在 0.2mlPBS 中)。检验白血细胞 (WBC) 数和噬中性粒细胞数。结果分别如图 10A (WBCs) 和 10B (噬中性粒细胞) 所示。

正如所看到的, 与仅仅用 IB-MECA 进行治疗的小鼠相比, 仅仅用环磷酸胺进行治疗的小鼠外周血液中白血细胞和噬中性粒细胞的数目下降。当腺苷或 IB-MECA 被给药时, 白血细胞总数被恢复, 后者有十分显著的作用, 在 168 小时 (7 天) 后完全恢复。

实施例 5: 腺苷 A3 受体激动剂防止用化疗药物进行治疗的小鼠的体重降低

四组裸鼠 (BALB/C 血统), 每组 10 只, 进行如下处理:

组 1: 不进行治疗的小鼠 [请求确认]。

组 2: 小鼠连续 5 天腹膜内 (i. p.) 注射 5-氟-尿嘧啶 (5-FU, $30\text{mg}/\text{kg}$ 体重, 在 PBS 中)

组 3: 小鼠和第二组一样 i. p. 注射 5-FU, 但是是从第二天开始, 以后每隔一天给小鼠口服 C1-IB-MECA ($6\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重, 在 0.2mlPBS 中)。

组 4: 小鼠如上接受 C1-IB-MECA 给药。

在第 7, 10 和 14 天测量小鼠的重量, 结果如图 11 所示。

正如所看到的, 与对照相比, 5-FU 对小鼠重量有明显的作用, 在 C1-IB-MECA 与 5-FU 结合给药时, 可以部分防止其重量的降低。C1-IB-MECA 本身本质上并不能引起体重下降。本试验表明 A3 腺苷受体激动剂对化疗的一些毒性效应有全面的保护作用。

实施例 6: C1-IB-MECA 保护小鼠不受化疗药物阿霉素的骨髓毒性作用

ICR 小鼠用阿霉素进行治疗 (i. p. 注射, $10\text{mg}/\text{kg}$ 在 0.5mlPBS 中)。在细胞毒素药物给药后 24, 48 和 72 小时, C1-IB-MECA ($6 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重) 小鼠口服给药。在 72 小时, 96 小时, 120 小时和 144 小时, 将小鼠处死, 取血样。此外, 从小鼠的股骨吸取骨髓, 在用 Coumassile 蓝对制剂进行染色后, 对吸取的制剂进行成核细胞的细胞计数。

用三组小鼠进行试验:

组 1: (对照)小鼠仅仅用 PBS 给药。

组 2: 小鼠仅用阿霉素进行治疗。

组 3: 和上文一样进行阿霉素给药, 同时结合 C1-IB-MECA 给药。

白细胞计数结果见图 12A, 骨髓成核细胞计数结果见图 12B。这些结果清楚的表明, 在 C1-IB-MECA 给药时, 外周白细胞数和骨髓成核细胞数都有显著的增加。这是 A3RAg 明显具有对抗阿霉素的骨髓毒性作用的保护作用

实施例 7: 抗 G-CSF 抗体中和 C1-IB-MECA 的骨髓保护作用

ICR 小鼠被分成如下的六组:

组 1: 对照组-仅进行赋形剂给药。

组 2: 用抗-G-CSF 抗体 (5 μ g/小鼠) 进行调节。

组 3: 化疗组-进行环磷酰胺 (CYP-50mg/kg 体重) 给药。

组 4: 化疗 (50mg/kg 体重 CYP)+抗-G-CSF 抗体 (5 μ g/小鼠)。

组 5: 化疗 (50mg/kg 体重 CYP)+C1-IB-MECA (6 μ g/kg 体重)+抗-G-CSF 抗体 (5 μ g/小鼠)

组 6: 化疗 (50mg/kg 体重 CYP)+C1-IB-MECA (6 μ g/kg 体重)+抗-G-CSF 抗体 (5 μ g/小鼠)

每组有 10 只小鼠, 试验重复进行两次。

CYP 为腹膜内注射, 用 0.2mlPBS 作为载体。

在环磷酰胺给药后 48 和 72 小时, C1-IB-MECA 口服给药 (用 0.2mlPBS)。

在化疗药物给药后 72 小时, 抗-G-CSF 抗体静注给药 (用 0.2mlPBS)。

在化疗 124 小时后采集血样。用 Coulter 计数器确定白血细胞 (WBC) 数, 用被 May-Grundvald-Giemsa 溶液染色的涂片制剂完成不同的细胞计数。

WBC 计数结果见图 13。可以发现, 仅用环磷酰胺治疗的小鼠表现出

外周血液 WBC 数目下降。在用 C1-IB-MECA 治疗的组, WBC 数和噬中性粒细胞百分数显著高于化疗治疗的组(没有表明噬中性粒细胞的转移结果)。当将抗-G-CSF 抗体给予对照组或化疗组时, 可以观察到预期的 WBC 数目的下降。将抗-G-CSF 抗体给予用化疗药物和 C1-IB-MECA 治疗的小鼠, 可以消除 C1-IB-MECA 的保护作用, 这一点可以清楚的从图 13 看出来。由这些结果可以得出 C1-IB-MECA 对免疫系统的保护作用是通过 C1-IB-MECA 促进 G-CSF 产生和分泌的活性而发挥出来的结论。

实施例 8: C1-IB-MECA 抑制裸鼠体内 HCT-116 人结肠癌的发育

通过向裸鼠(BALB/C 血统)皮下注射 1×10^6 HCT-116 人结肠癌细胞形成肿瘤 (Harlan, Jerusalem, Israel)。每隔一天, 小鼠口服 $6 \mu\text{g/kg}$ 体重的 C1-IB-MECA(用 0.2mlPBS)来进行治疗。仅用赋形剂(PBS)进行治疗的小鼠。每组有 10 只小鼠。通过一周两次测定每一肿瘤相互垂直的直径来测定肿瘤的生长速率, 根据公式 $\pi/6[D_1D_2]$ 估计肿瘤的大小。结果见图 14。可以看到, 治疗组对肿瘤生长有显著的抑制。

用另外一套独立的实验对 C1-IB-MECA 和 5-氟尿嘧啶(5-FU)结合治疗进行试验。将 1×10^6 HCT-116 细胞给裸鼠皮下注射。一天以后, 腹膜内注射 5-FU(30mg/kg 体重, 用 0.2mlPBS), 随后再连续进行 4 天。每隔一天, 小鼠以 $5 \mu\text{g/kg}$ 体重口服 C1-IB-MECA(用 0.2mlPBS)。将仅用赋形剂(PBS)或 5-FU 进行治疗的小鼠作为对照。每组 10 只小鼠。通过一周两次测定每一肿瘤相互垂直的直径来测定肿瘤的生长速率, 根据公式 $\pi/6[D_1D_2]$ 估计肿瘤的大小。

结果见图 15 和 16。可以观察到用 5-FU, C1-IB-MECA 以及 C1-IB-MECA 和 5-FU 结合治疗的肿瘤的生长都显著的被抑制。20 天后, 通过注意肿瘤的质量可以清楚的看到 C1-IB-MECA 和 5-FU 协同作用, 尤其如图 16 所示(图 16 代表的是第 30 天的结果)。

实施例 9: C1-IB-MECA 通过诱导 G-CSF 产生刺激骨髓细胞增殖

在 96 孔微量培养板中对骨髓细胞 (3×10^6 细胞/ml) 进行培养。向其中加入终浓度为 10nM 的 C1-IB-MECA, 其中含有或不含有终浓度为 0.05 和 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 的抗 G-CSF-抗体。用 [^3H]-胸腺嘧啶核苷结合试验测定细胞增殖。结果如图 17 所示。

可以看到, 抗-G-CSF 抗体以剂量依赖的方式抑制骨髓细胞增殖。这一实验也表明, C1-IB-MECA 的活性是通过 G-CSF 途径(包括 G-CSF 从细胞中分泌)而发挥出来的。

实施例 10: C1-IB-MECA 抑制肿瘤细胞生长以及刺激骨髓细胞增殖和分化

在 96 孔微量培养板中进行 B-16 黑素瘤细胞 (5×10^5 细胞/ml) 和骨髓细胞 (3×10^6 细胞/ml) 培养。培养物为用 10% FTS 作为补充的 RPMI 培养基。向其中加入终浓度为 $0.01 \mu\text{M}$ 或 $0.1 \mu\text{M}$ 的 C1-IB-MECA, 其中含有或不含有腺苷 A3 受体拮抗剂, MRS-1523。用前面提及的 [^3H]-胸腺嘧啶核苷结合试验测定细胞增殖。结果如图 18 所示。可以看到, 在有 MRS-1523 存在时, B-16 黑素瘤细胞和骨髓细胞的增殖与对照相比没有变化。与此相反, C1-IB-MECA 发挥了抑制 B-16 黑素瘤细胞增殖和刺激骨髓细胞的作用。

这些结果表明了 A3 腺苷受体激动剂的双重作用。

实施例 11: C1-IB-MECA 作为化学保护剂

用 C1-IB-MECA 进行与实施例 4 类似的实施例, 结果见图 19A 和 19B, 该图证明了 C1-IB-MECA 的化学保护活性。

实施例 12: IB-MECA 和 C1-IB-MECA 对骨髓细胞增殖的作用

用如上所述的方法培养鼠的骨髓细胞。在存在或不存在 A3RAn, MRS-1523 的情况下, 向其中加入浓度为 1 或 10nM 的 IB-MECA 或 C1-IB-MECA。以 10nM 的浓度加入拮抗剂。结果如图 20 所示。

通过图 20 可以看到, IB-MECA 和 C1-IB-MECA 的作用都是剂量依

赖性的。此外，还可以看到，这种作用在很大程度上可以被 A3Ran 所抑制。

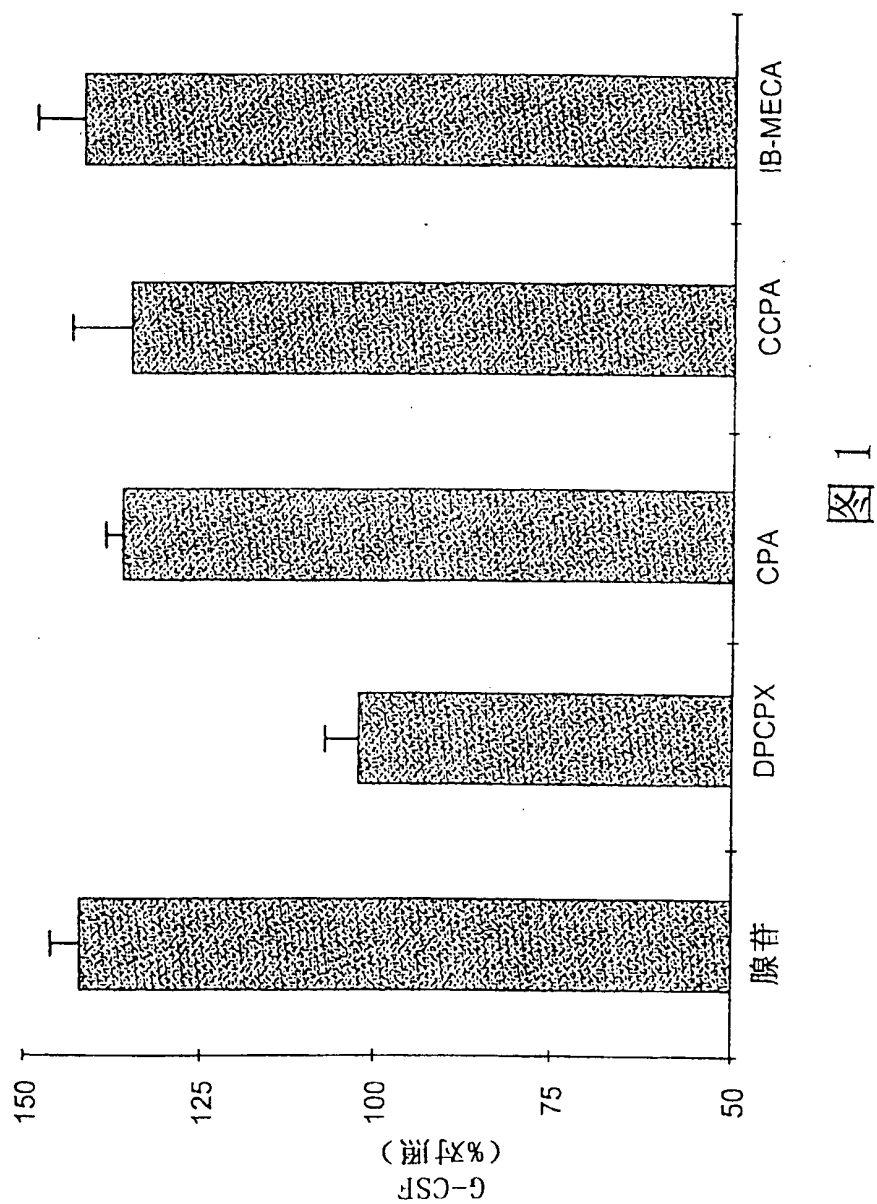


图 1

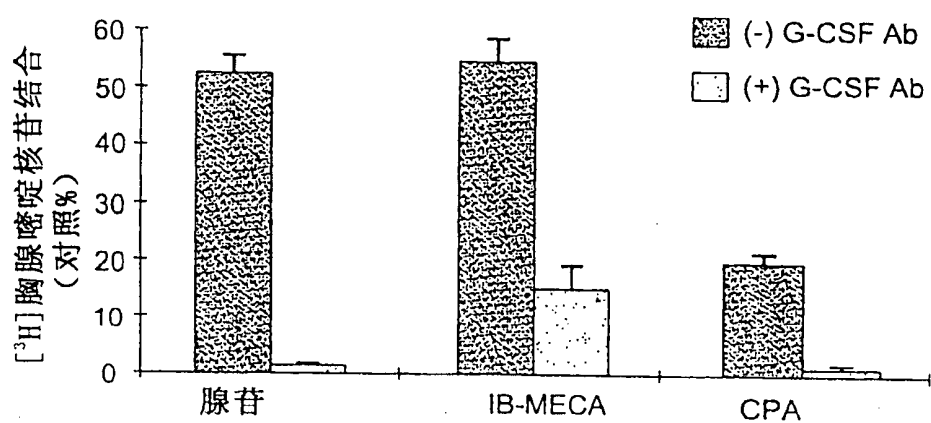


图 2

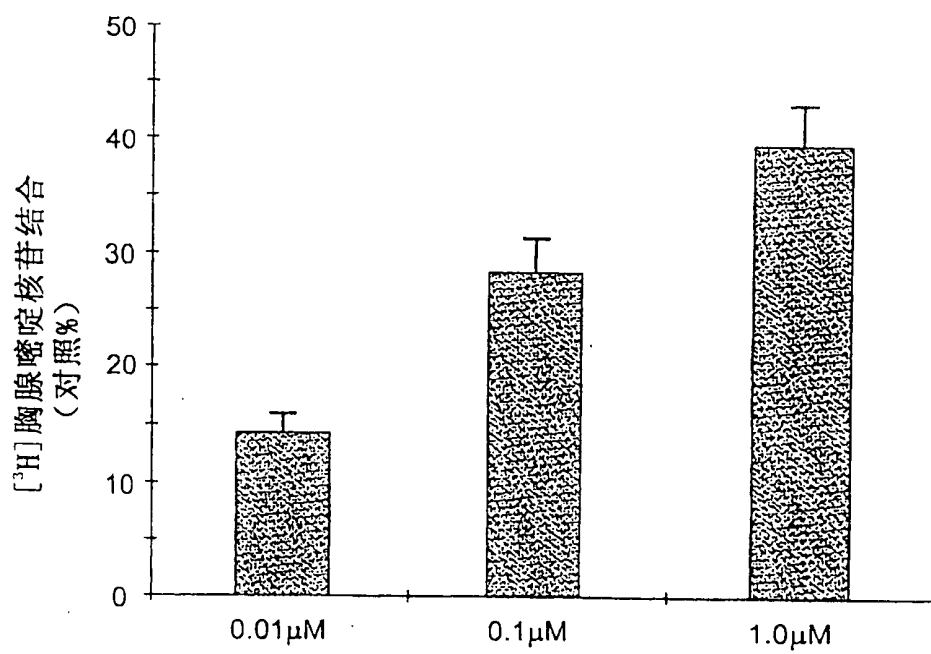


图 4

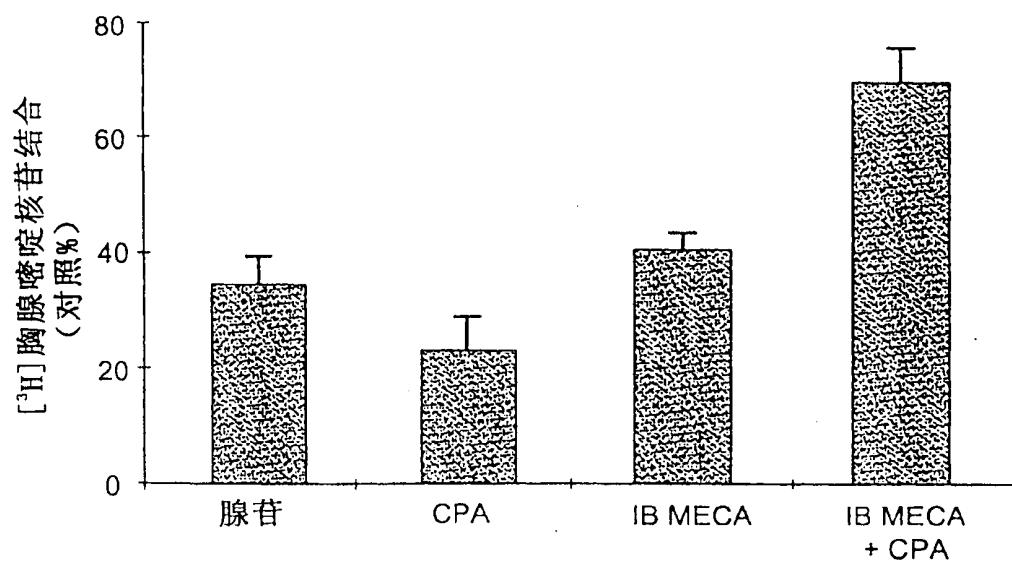


图 3A

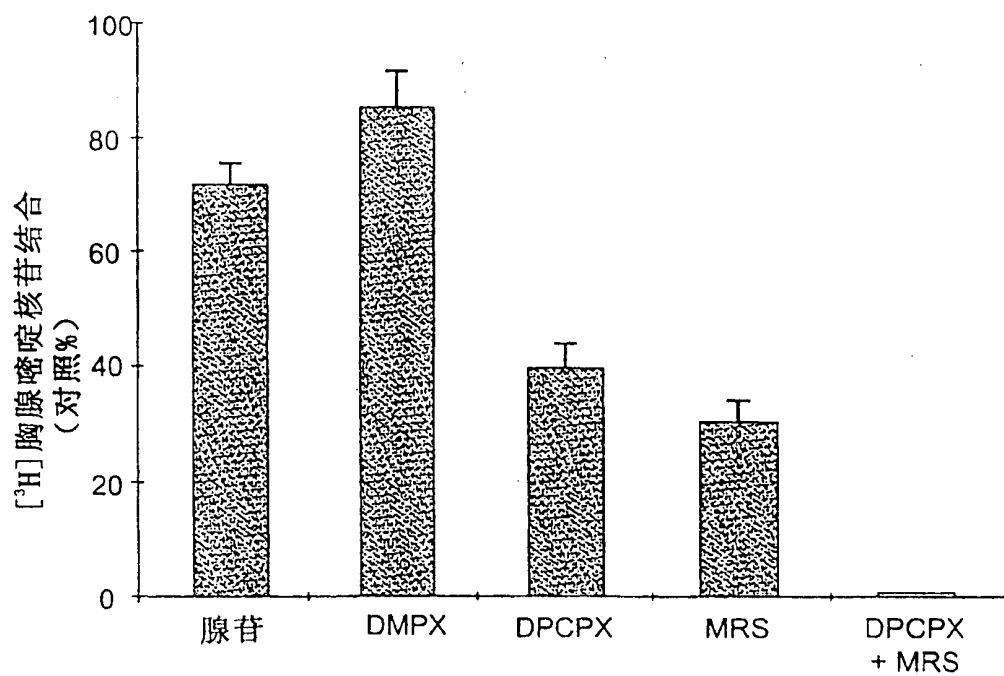


图 3B

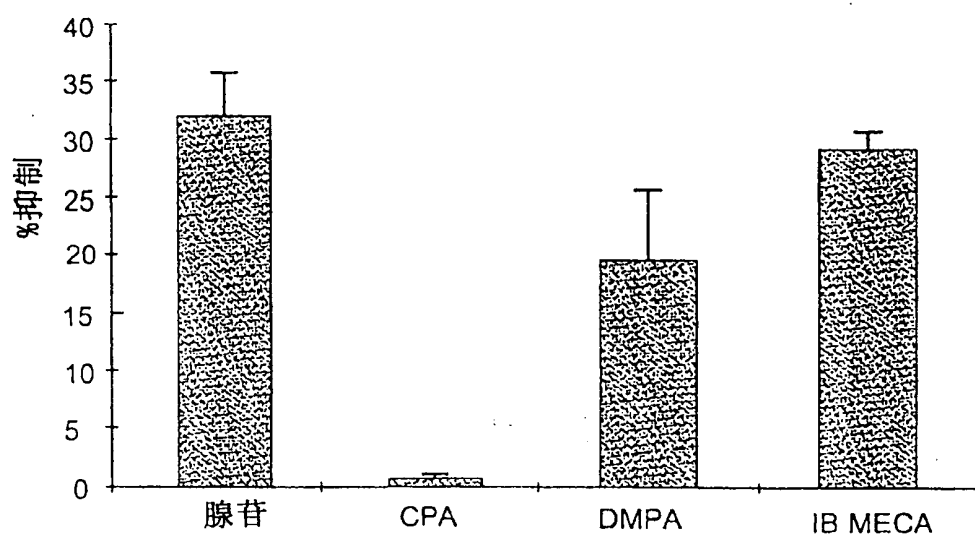


图 5A

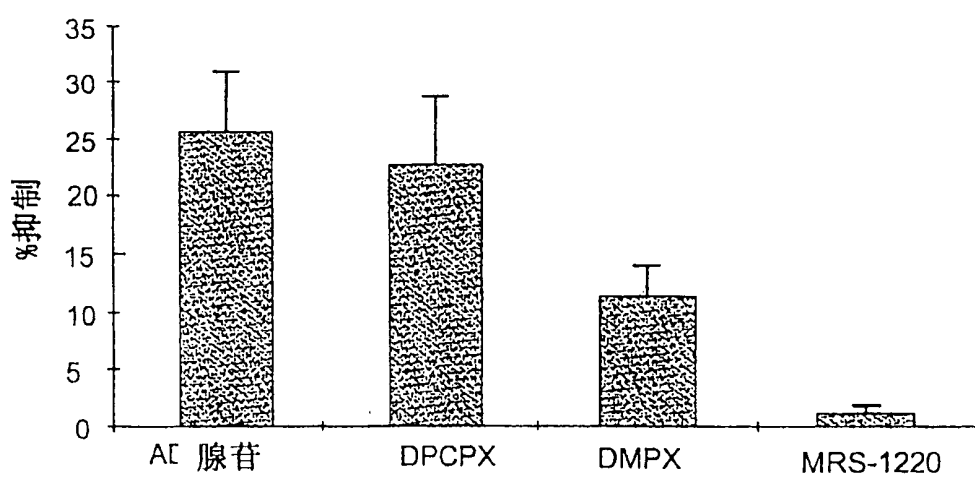


图 5B

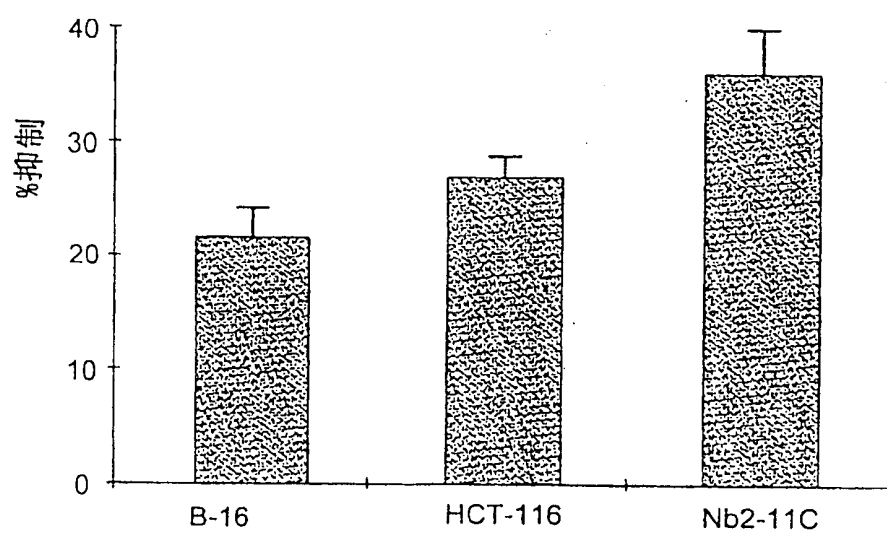


图 6

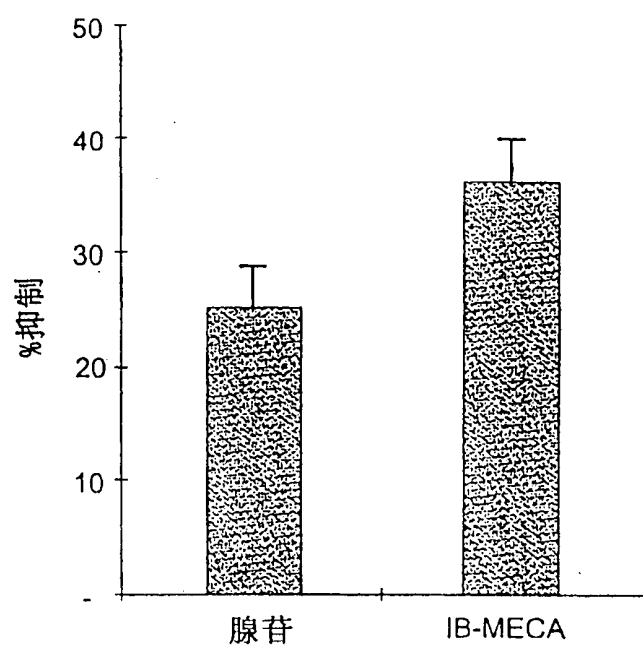


图 7A

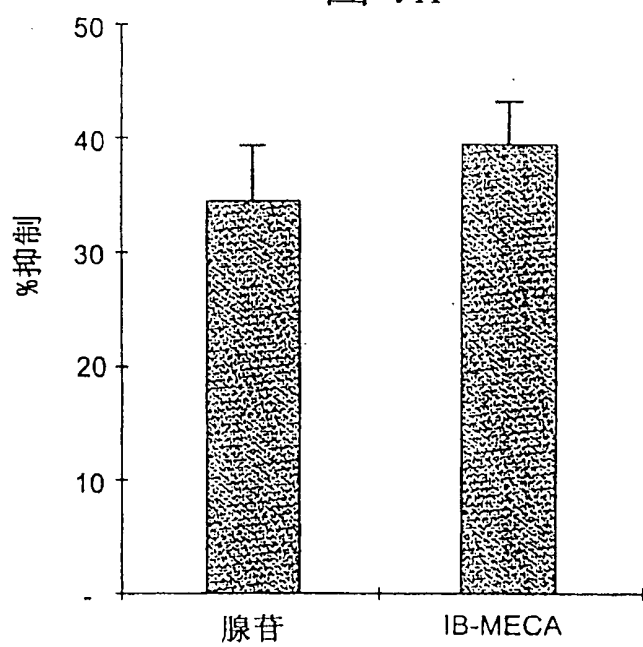


图 7B

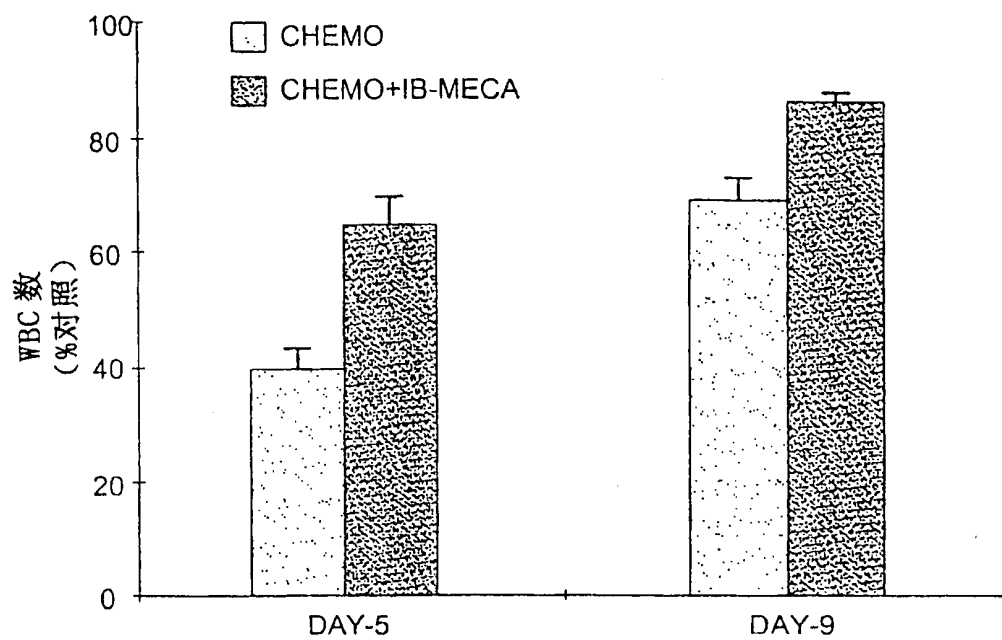


图 8

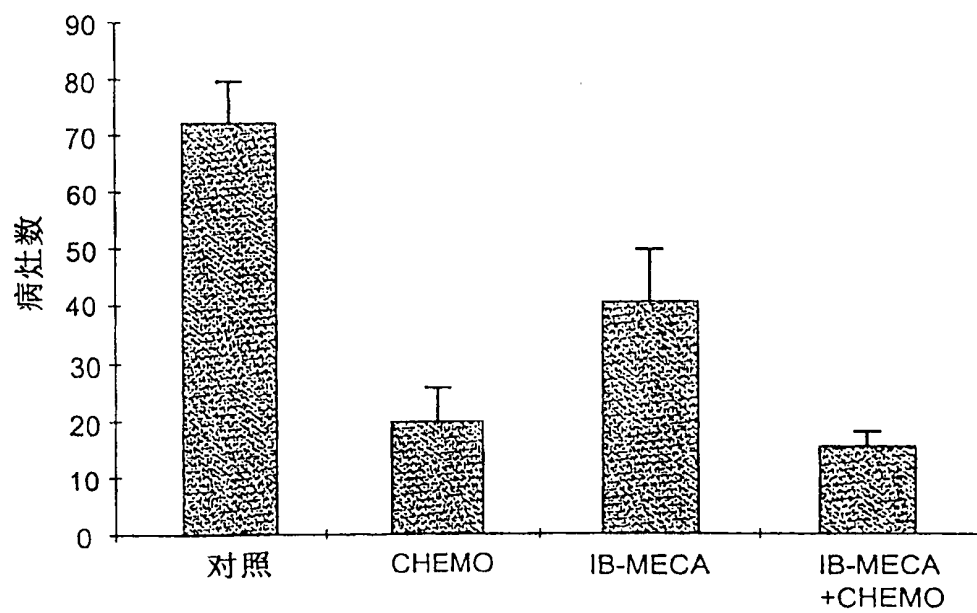


图 9

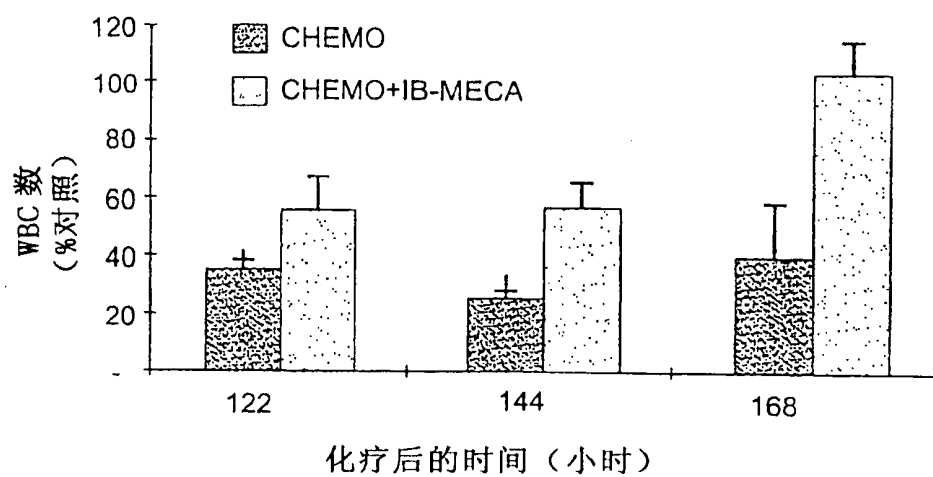


图 10A

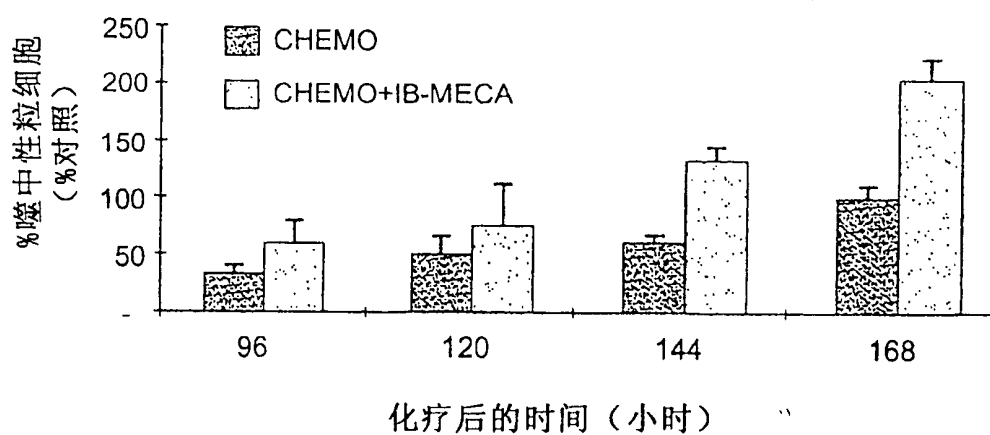


图 10B

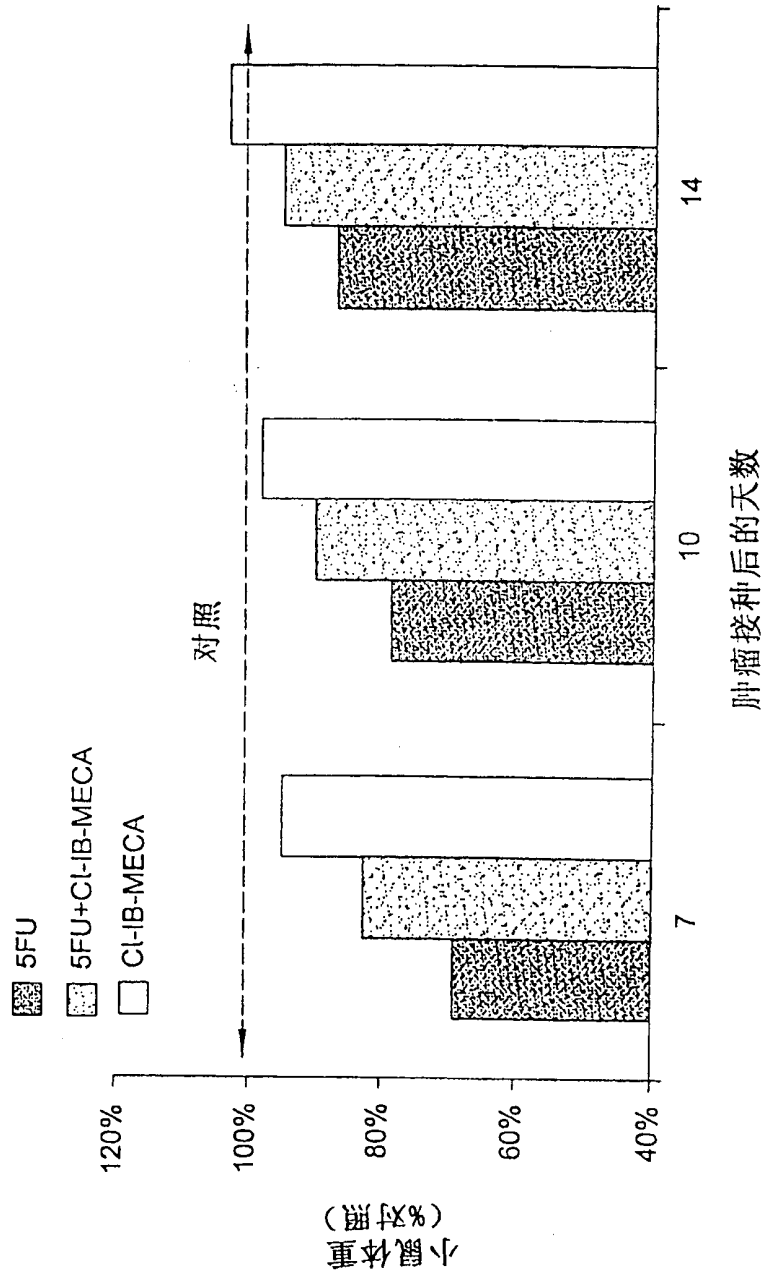


图 11

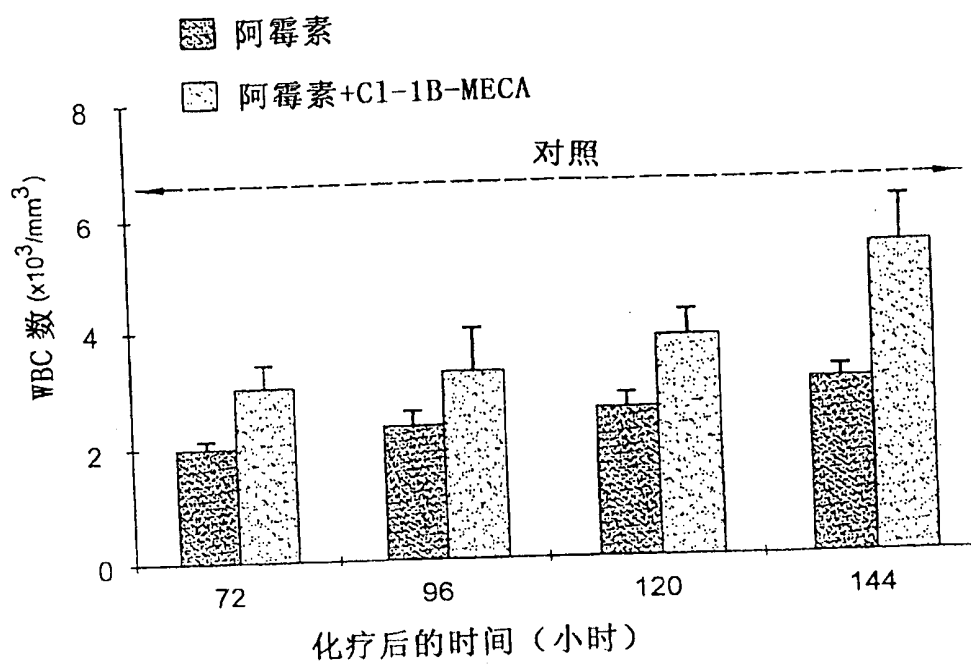


图 12A

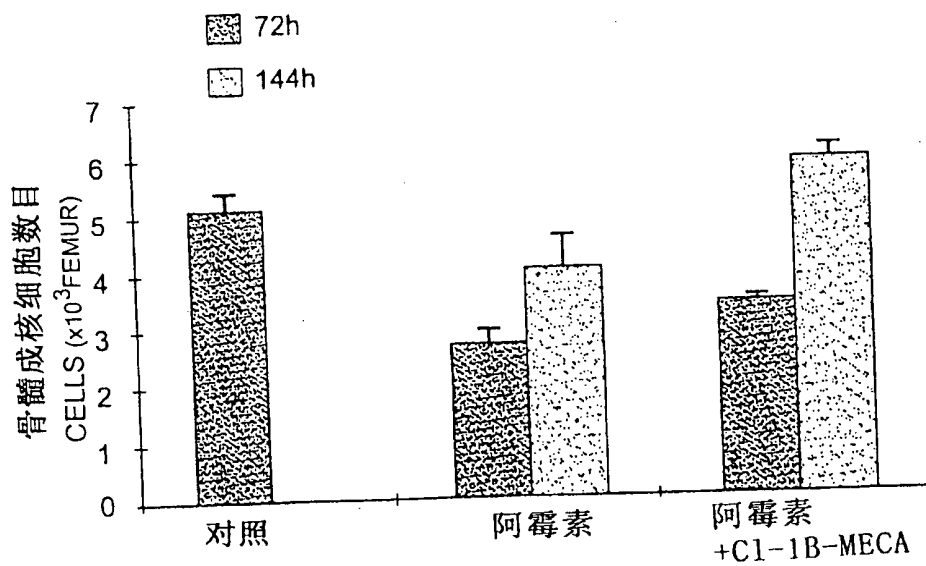


图 12B

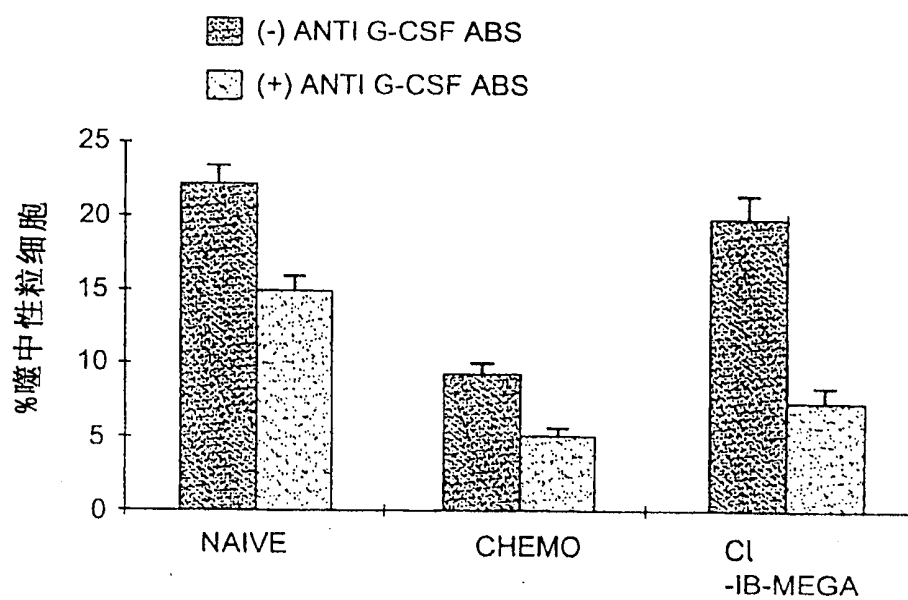


图 13

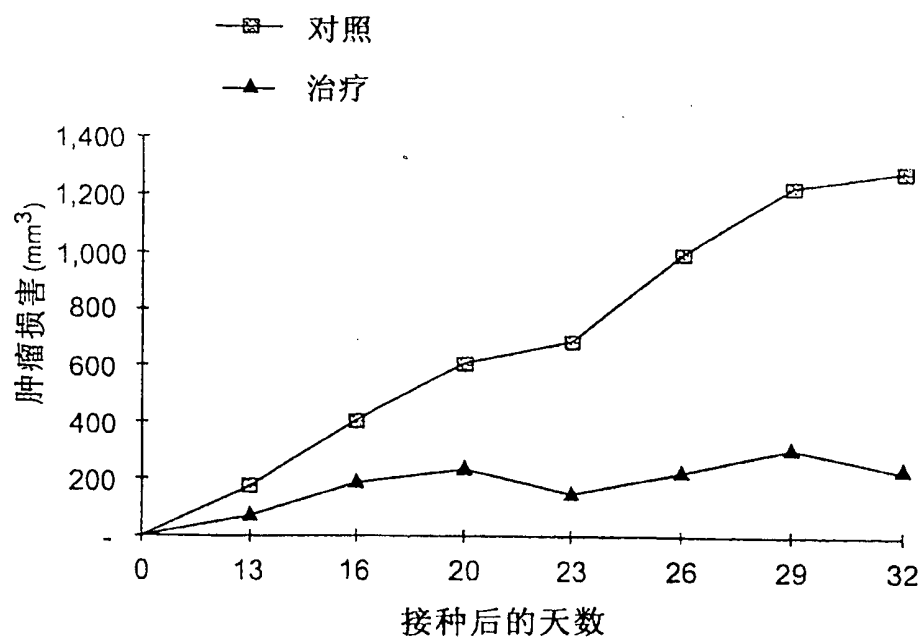


图 14

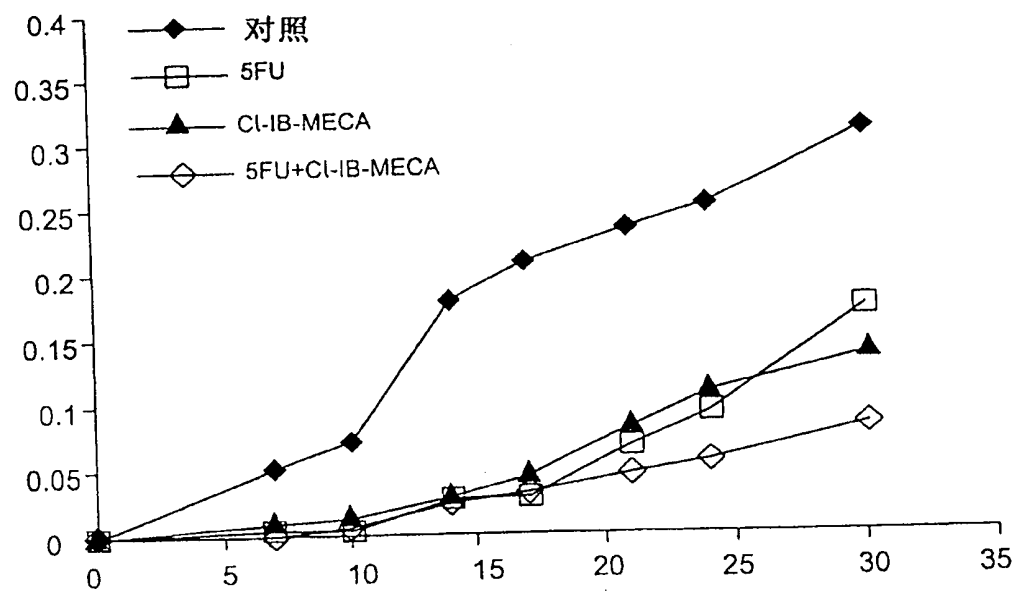


图 15

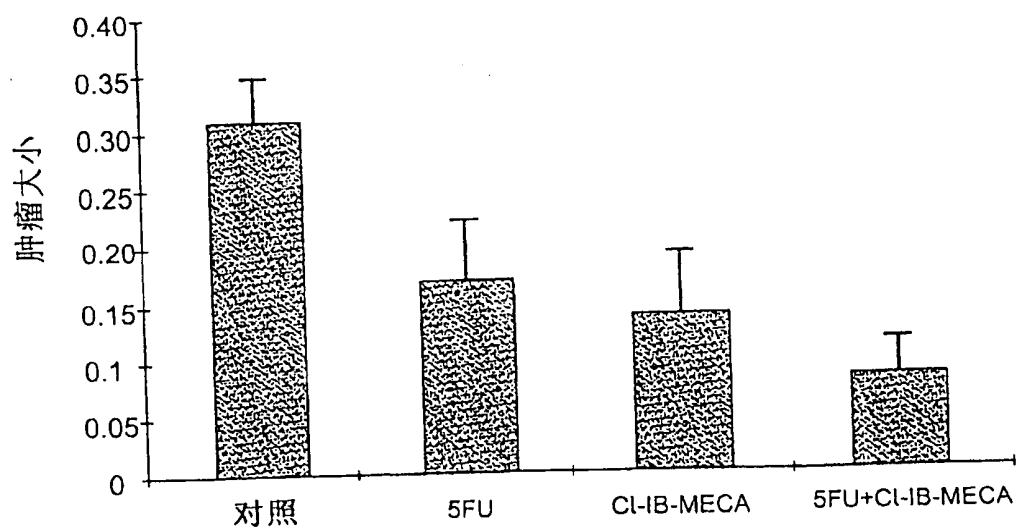


图 16

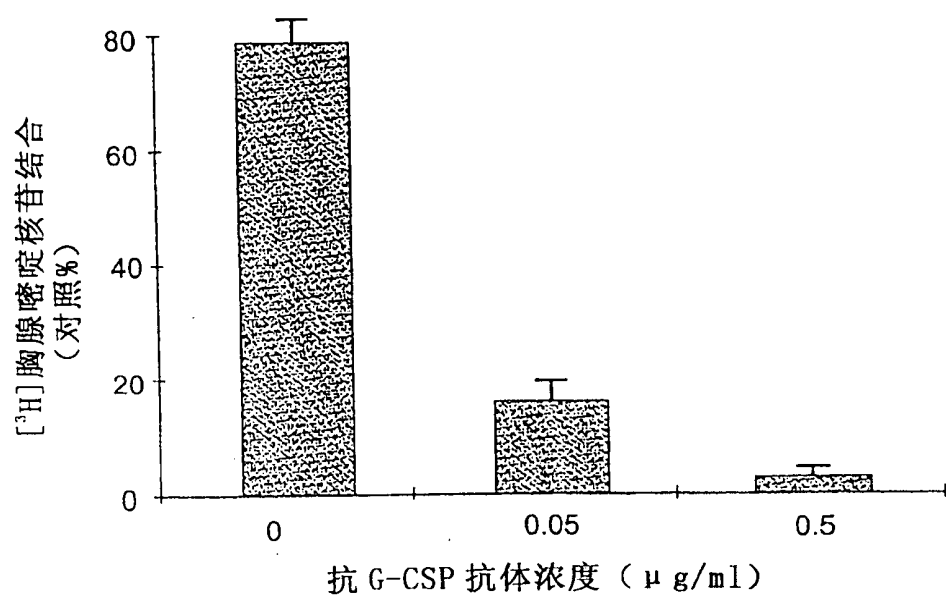


图 17

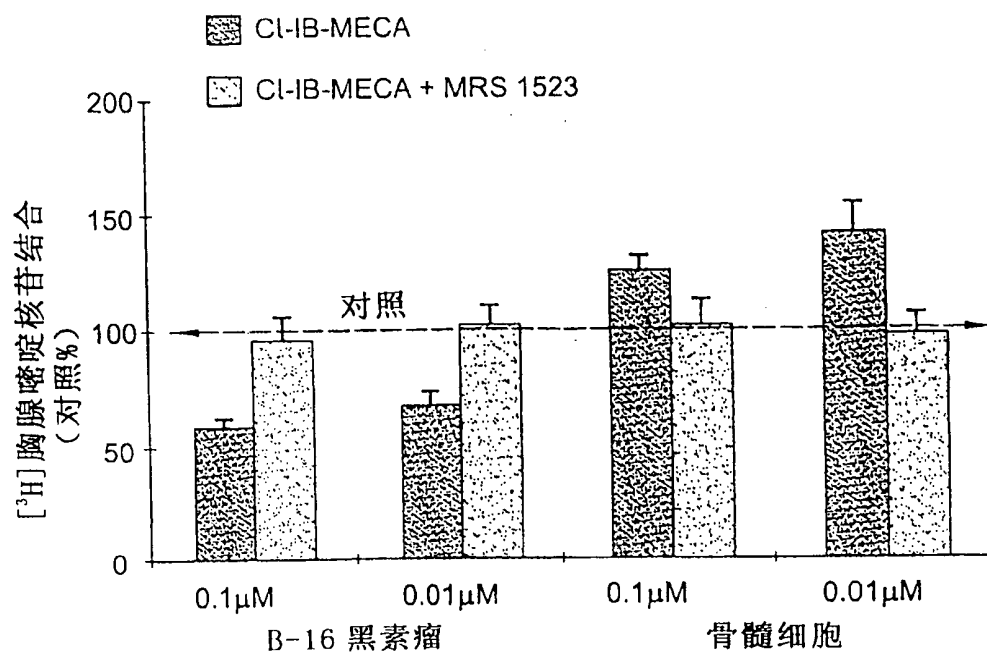


图 18

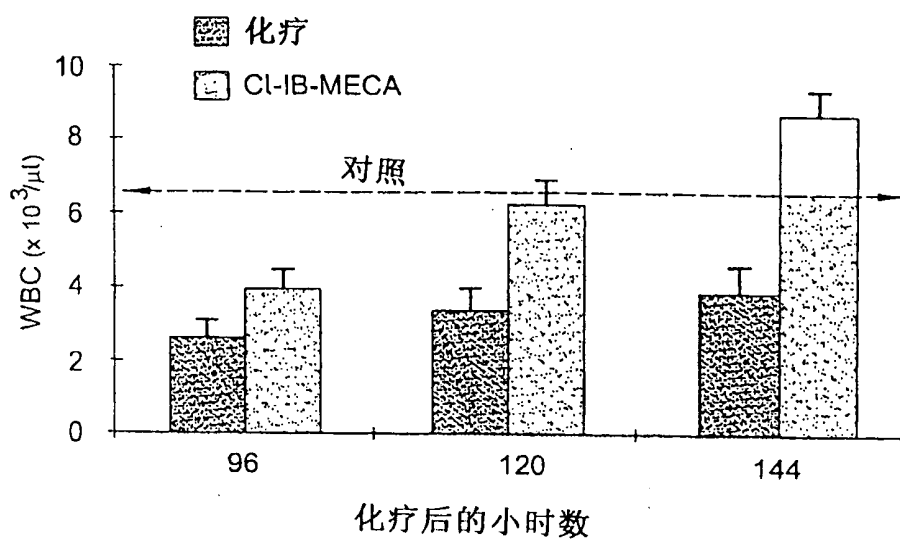


图 19A

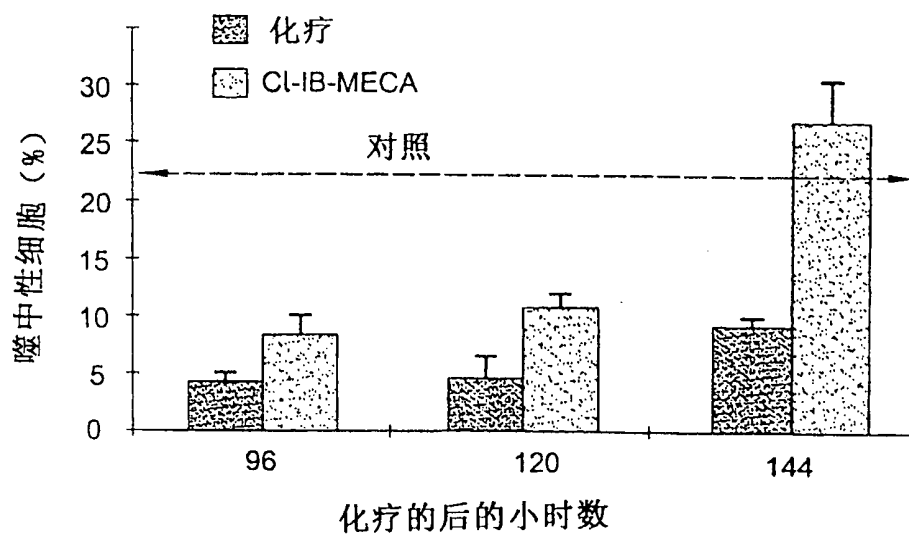


图 19B

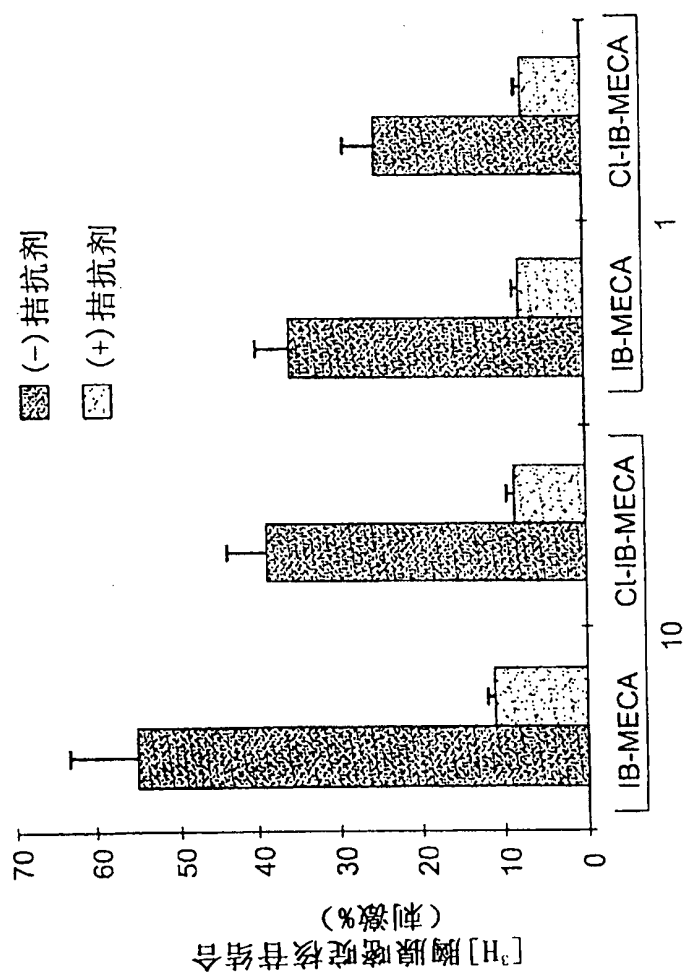


图 20