[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 31/34 (2006.01)
C07D 307/77 (2006.01)

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380106129.0

[43] 公开日 2006 年 1 月 25 日

[11] 公开号 CN 1726025A

[22] 申请日 2003.12.16
[21] 申请号 200380106129.0
[30] 优先权
[32] 2002.12.17 [33] US [31] 60/434,203
[86] 国际申请 PCT/US2003/040104 2003.12.16
[87] 国际公布 WO2004/058246 英 2004.7.15
[85] 进入国家阶段日期 2005.6.15
[71] 申请人 泛华医药公司
地址 美国加利福尼亚
[72] 发明人 D·戴 J·H·马瑟

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 程 伟 鲍 玲

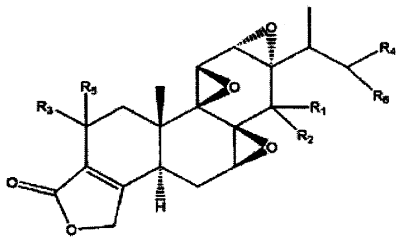
权利要求书 3 页 说明书 19 页 附图 2 页

[54] 发明名称

作为免疫调节剂和抗癌剂的雷公藤内酯醇衍生物

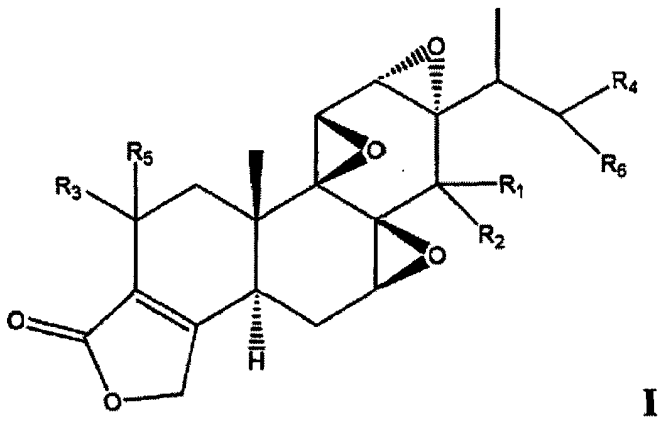
[57] 摘要

本发明涉及对诱导细胞死亡(凋亡)和免疫抑制有效的具有结构 I 的化合物。 在结构 I 中，R^1 是 H 或 R，R 选自低级烷基、烯基、炔基或丙二烯基，或者，R^1 加 R^2 为 =O(氧代)；R^2 =OH，或者，R^1 和 R^2 一起为 =O(氧代)；CR^3R^5 和 CR^4R^6 选自 CH^2，CHOH，或 CROH；R^1、R^5 和 R^6 中至少一个是 R；并且 CR^3R^5 和 CR^4R^6 中至少一个是 CH^2。



(I)

1. 一种具有结构 I 的化合物：



I

其中：

R^1 是 H 或 R，其中 R 选自低级烷基，烯基，炔基，或丙二烯基，或者，R^1 加 R^2=O(氧代)；

R^2=OH 或者 R^1 和 R^2 一起为=O(氧代)；

CR^3R^5 和 CR^4R^6 选自 CH_2，CHOH，或 CROH；

R^1、R^5 和 R^6 中至少一个是 R；并且

CR^3R^5 和 CR^4R^6 中至少一个是 CH_2。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物，其中 R 选自甲基，烯丙基，或 2-丙炔基。

3. 根据权利要求 2 所述的化合物，其中 R 是甲基。

4. 根据权利要求 1 所述的化合物，其中 R^1 加 R^2 为=氧代，CR^3R^5 和 CR^4R^6 之一是 CROH，另一个是 CH_2。

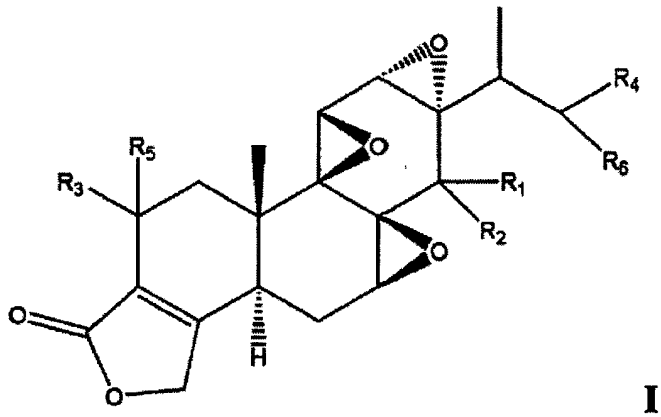
5. 根据权利要求 1 所述的化合物，其中 R^1 是 H，R^2 是 OH，CR^3R^5 和 CR^4R^6 之一是 CROH，另一个是 CH_2。

6. 根据权利要求 1 所述的化合物，其中 R^1 是 R 且 R^2 是 OH。

7. 根据权利要求 6 所述的化合物，其中 CR^3R^5 和 CR^4R^6 的每一个均是 CH_2。

8. 根据权利要求 7 所述的化合物，其中 R 是甲基。

9. 一种对免疫抑制有效的方法，包括对需要这种治疗的受体使用在药学上可接受的载体中的有效量的具有结构 I 的化合物：



I

其中：

R^1 是 H 或 R，其中 R 选自低级烷基，烯基，炔基，或丙二烯基，或者 R^1 加 R^2 为=O(氧代)；

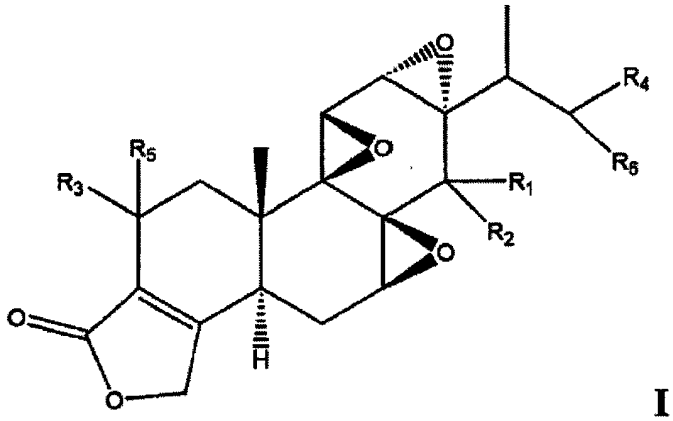
R^2=OH 或者 R^1 和 R^2 一起为=O(氧代)；

CR^3R^5 和 CR^4R^6 选自 CH_2，CHOH，或 CROH；

R^1、R^5 和 R^6 中至少一个是 R；并且

CR^3R^5 和 CR^4R^6 中至少一个是 CH_2。

10. 一种在细胞中诱导凋亡的方法，包括使有效量的具有结构 I 的化合物与所述细胞接触：



I

其中：

R^1 是 H 或 R，其中 R 选自低级烷基，烯基，炔基，或丙二烯基，或者 R^1 加 R^2 为=O(氧代)；

R^2=OH 或者 R^1 和 R^2 一起=O(氧代)；

CR^3R^5 和 CR^4R^6 选自 CH_2，CHOH，或 CROH；

R^1、R^5 和 R^6 中至少一个是 R；并且

CR^3R^5 和 CR^4R^6 中至少一个是 CH_2。

作为免疫调节剂和抗癌剂的雷公藤内酯醇衍生物

发明领域

本发明涉及对免疫抑制、抗炎和抗癌剂均有效的化合物。

参考文献

Gleichmann, E.等, *Immunol. Today* 5: 324 (1984).

Jung, M. J.等人, US 5,972, 998 (1999).

Jung, M. J.等人, US 6,004, 999 (1999).

Korngold, R.和 Sprent, J. , *J. Exp. Med.* **148**: 1687 (1978).

Kupchan, S. M.等人, *J. Am. Chem. Soc.* **94**: 7194 (1972).

Kupchan, S. M.等人, U. S.专利第 4,005, 108 号(1977).

Lipsky 等人, U. S.专利第 5,294, 443 号(1994).

Ma 等人, *J. Chin. Pharm. Sci.* **1**: 12 (1992).

Murase, N.等人, *Transplantation* **55**: 701 (1993).

Ono 和 Lindsey, *J.Thor. Cardiovasc. Surg.* **57** (2): 225-29 (1969).

Panchagnula, R.和 Thomas, N.S., *Intl J of Pharmaceutics* **201** (2):131-150 (2000).

Pu, L.等人, *Zhongguo Yaoli Xuebao* **11**: 76 (1990).

Qi, Y.等人, U. S.专利 5,663, 335 (1997).

Qi, Y.等人, U. S.专利 5,962, 516 (1999).

Wang, J.和 Morris, R. E., *Transplantation Proc.* **23**: 699 (1991).

发明背景

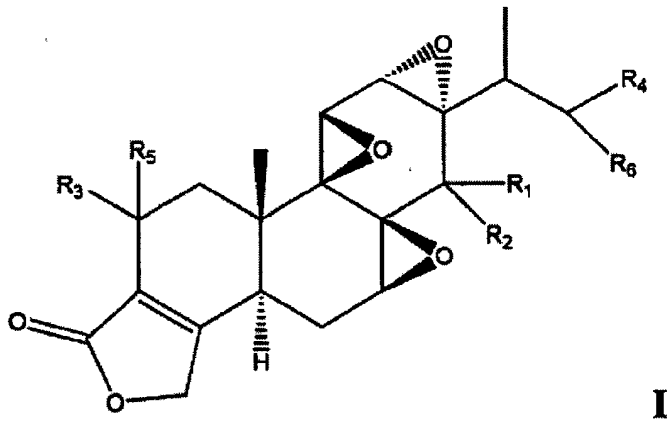
免疫抑制剂可以广泛地用于自身免疫性疾病的治疗以及治疗或预防移植排斥(transplantation rejection)，包括治疗移植物抗宿主病(GVHD)中。通常的免疫抑制剂包括硫唑嘌呤、皮质类固醇、环磷酰胺、氨甲蝶呤、6-巯基嘌呤、长春新碱和环孢菌素 A。一般来说，这些药物并不是完全有效的，而且大多数会受到严重毒性的限制。例如，环孢菌素 A，

一种广泛使用的药剂，对于肾脏具有显著毒性。此外，作为有效治疗所需的剂量可能会增加病人对由多种条件性病原微生物侵入病菌引起感染的易感性。

已经在例如自身免疫性疾病的治疗，以及治疗或预防移植排斥，包括移植物抗宿主病(GVHD)的治疗中，其中的情况为一种移植骨髓细胞攻击受者细胞的病症，鉴别出大量的源于中药材雷公藤(Tripterygium wilfordii (TW))的化合物具有免疫抑制活性。参见，例如共有的美国专利第 6,150,539 号(具有高水溶性的雷公藤内酯醇前药)，第 5,962,516 号(免疫抑制化合物和方法)，第 5,843,452 号(免疫治疗组合物和方法)，第 5,759,550 号(抑制异种移植排斥的方法)，第 5,663,335 号(免疫抑制化合物和方法)，和第 5,648,376 号(免疫抑制剂二萜化合物)，且其中引用的参考文献。而且所报道的这些化合物还显示出抗癌活性。参见，例如，Kupchan 等人，1972，1977，以及共同未决的和共有的 US 申请第 09/766,156 号，2001 年 1 月 19 日提交，并且于 2002 年 7 月 25 日作为 US 申请第 2002/99051 号所公布的，其通过参考引入本文。

发明概述

一方面，本发明提供对免疫抑制、抗炎和抗癌治疗有效的化合物。所述化合物为由式 I 表示的雷公藤内酯醇(triptolide)的衍生物：



I

其中：

R^1 是 H 或 R，其中 R 选自低级烷基，烯基，炔基，或丙二烯基(allenyl)，或者 R^1 加 R^2 为=O(氧代)；

R^2=OH 或者和 R^1 一起为=O(氧代)；

CR^3R^5 和 CR^4R^6 选自 CH_2，CHOH 和 CROH；

R^1、R^5和R^6中至少一个是R；并且

CR^3R^5和CR^4R^6中至少一个是CH_2。

在选择的实施方案中，R选自甲基，烯丙基，或2-丙炔基；在一项实施方案中，R是甲基。在一项实施方案中，其包括C2-或C16-修改(modified)的雷公藤内酯酮(Triptonide)，R^1和R^2一起为=氧代，CR^3R^5和CR^4R^6之一是CROH，另一个是CH_2。另一实施方案中，其包括C2-或C16-修改的雷公藤内酯醇，R^1是H，R^2是OH，CR^3R^5和CR^4R^6之一是CROH，另一个是CH_2。

在进一步的实施方案中，其包括C14-修改的雷公藤内酯醇，R^1是R且R^2是OH。还可以在C2或者C16位上修改这样的化合物；在一项实施方案中，没有修改这些位点中的任何一个；即，CR^3R^5和CR^4R^6每个均是CH_2。当R是甲基时，这种实施方案包括本文指定为PG670的化合物。

另一方面，本发明提供一种对免疫抑制有效的方法，包括对需要这种治疗的受体使用在药学上可接受的载体中的有效量的具有如上所述的结构I的化合物，包括上述具体实施方案中的任何一种。本发明还通过使有效量的具有如上所述结构I的化合物，包括上述具体实施方案中的任何一种，与细胞接触，来提供一种诱导细胞凋亡的方法。特别地，这种化合物可以是本文指定为PG670的化合物。

当阅读以下本发明详细描述连同附图时，本发明的这些和其它目的会变成更为完全明显。

附图简要说明

图1表示与雷公藤内酯醇(实施例2B)比较，在Jurkat细胞中由本发明化合物(PG670)导致凋亡的剂量依赖性诱导；和

图2表示与雷公藤内酯醇(实施例3)比较，在Jurkat细胞中由本发明化合物(PG670)导致的IL-2生成的抑制性。

发明详细描述

I. 定义

如果不另外指示，下面的术语具有以下含义，

“烷基”指含有碳和氢的完全饱和的脂肪族单价基团，并且其可以是环状，支链或直链的。烷基基团的例子是甲基，乙基，正丁基，叔丁基，正庚基，和异丙基。优选地，烷基基团具有一至八个碳原子。“低级烷基”指一至六个碳原子的烷基基团，例如甲基，乙基，正丁基，异丁基，叔丁基，异戊基(isoamyl)，正戊基，和异戊基(isopentyl)，通常为一至四个碳原子。

“烯基”指单价或二价不饱和，优选单-不饱和，含有碳和氢的基团，并且其可以是环状，支链或直链的。优选地，烯基基团具有一至八个碳原子。“低级烯基”指具有一至六个，通常为一至四个碳原子的烯基基团。

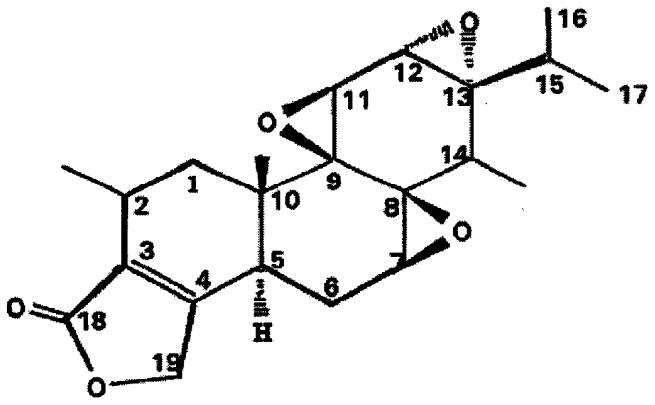
“炔基”指单价或二价不饱和，优选单-不饱和，含有碳和氢的基团，且具有至少一个碳-碳三键。优选地，炔基具有一至八个碳原子。“低级炔基”指具有一至六个，通常为一至四个碳原子的炔基基团。

“丙二烯基(Allenyl)”指包含-CH=C=CH_2部分的取代基。

术语“药学上可接受的盐”包含具有有机和无机阳离子的羧酸盐，例如碱和碱土金属阳离子(例如，锂，钠，钾，镁，钡和钙)；铵；或者有机阳离子，例如，二苄基铵，苄基铵，2-羟乙基铵，双(2-羟乙基)铵，苯乙基苄基铵，二苄基乙烯二铵等等。其它的包含在以上术语中的阳离子包括质子化形式的普鲁卡因、奎宁和 N-甲基葡糖胺，和质子化形式的碱性氨基酸，例如甘氨酸、鸟氨酸、组氨酸、苯基甘氨酸、赖氨酸和精氨酸。

该术语还包括以碱性基团，例如氨基基团，通过标准酸-碱反应形成的盐，其具有得自有机或无机酸的平衡离子。这样的平衡离子包括氯化物，硫酸根，磷酸根，乙酸根，琥珀酸根，枸橼酸根，乳酸根，马来酸根，延胡索酸根，棕榈酸根，胆酸根，谷氨酸根，戊二酸根，酒石酸根，硬脂酸根，水杨酸根，甲磺酸根，苯磺酸根，山梨酸根，苦味酸根，苯甲酸根，肉桂酸根等等。

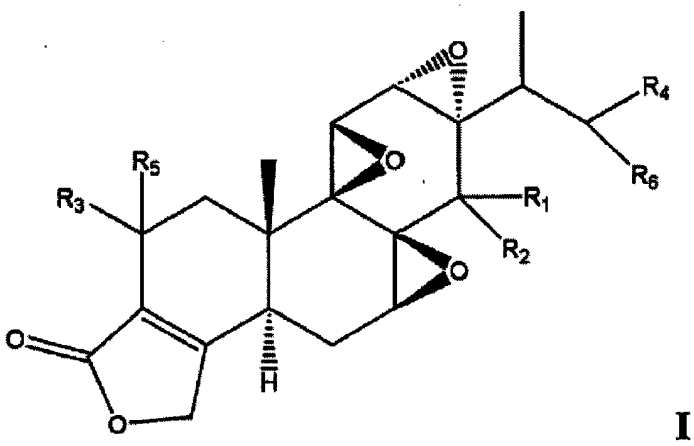
为了当前公开的目的，以下编号图用于雷公藤内酯醇和雷公藤内酯醇衍生物：



II. 雷公藤内酯醇衍生物

本发明的化合物是雷公藤内酯醇衍生物，如本文进一步所述，其是通过将碳亲核试剂加入至羰基基团中，在 C2、C14 和/或 C16 上进行烷基化而产生的。可由雷公藤内酯醇、雷公藤羟内酯(tripdiolide)或 16-羟基雷公藤内酯醇制备本发明的化合物。雷公藤内酯醇可得自中药材雷公藤(Tripterygium wilfordii (TW))的根木质部或者其它已知来源。TW 植物发现于福建省和中国其它南方省份；通常可从中国或者美国的商业途径得到 TW 植物原料。制备雷公藤内酯醇、雷公藤羟内酯和 16-羟基雷公藤内酯醇的方法是本领域已知的，并且描述于，例如，Kupchan 等人. (1972,1977)；Lipsky 等人. (1994)；Pu 等人. (1990)；和马等人. (1992)中。

本发明的化合物由以下通式 I 表示：



I

其中：

R^1 是 H 或 R，其中 R 选自低级烷基，烯基，炔基，或丙二烯基，或者 R^1 加 R^2 为=O(氧代)；

R^2=OH 或者 R^1 和 R^2 一起为=O(氧代)；

CR^3R^5 和 CR^4R^6 选自 CH_2，CHOH 或 CROH；

R^1、R^5 和 R^6 中至少一个是 R；并且

CR^3R^5 和 CR^4R^6 中至少一个是 CH_2。

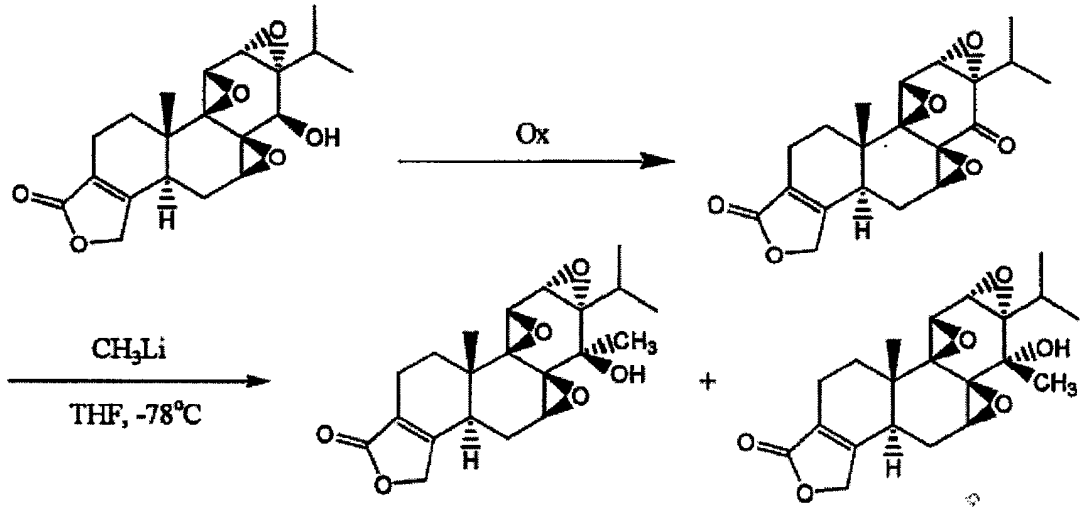
在所选的实施方案中，R 选自甲基，烯丙基，或 2-丙炔基；在一项实施方案中，R 为甲基。在一项实施方案中，其包括 C2-或 C16-修改的雷公藤内酯酮，R^1 和 R^2 一起为=氧代，CR^3R^5 和 CR^4R^6 之一是 CROH，另一个是 CH_2。另一实施方案中，其包括 C2-或 C16-修改的雷公藤内酯醇，R^1 是 H，R^2 是 OH，CR^3R^5 和 CR^4R^6 之一是 CROH，另一个是 CH_2。

在进一步的实施方案中，其包括 C14-修改的雷公藤内酯醇，R^1 是 R 且 R^2 是 OH。还可以在 C2 或者在 C16 位修改这样的一种化合物；在一项实施方案中，没有修改这些这些位点中的任何一个；即，CR^3R^5 和 CR^4R^6 中的每个是 CH_2。当 R 是甲基时，这种实施方案包括本文指定为 PG670 的化合物。

优选地，当 CR^3R^5 或者 CR^4R^6 是 CHOH 或 CROH 时，分别地，C2 或 C14 位上的立体化学使羟基被描绘在页面平面之上。

通过将一个或多种羟基氧化成酮或醛基，接着与如有机锂或有机镁卤化物(格式)试剂的碳亲核试剂反应，由已知化合物雷公藤内酯醇、雷公藤羟内酯和 16-羟基雷公藤内酯醇制备式 I 化合物。在例如 M. Hudlicky, Oxidations in Organic Chemistry (ACS Monograph Series 186, 1990), R. C. Larock, Comprehensive Organic Transformations (第 2 版, Wiley, 1999), 或者 J. March, Advanced Organic Chemistry (第 4 版, Wiley, 1992)的参考文献中，提供了对氧化剂和适用于醇选择性氧化的方法的描述。应当避免强酸性或碱性条件。如果需要，使用如 HPLC，从任何副产物中分离出所需产物。以下为给出的几个例子。

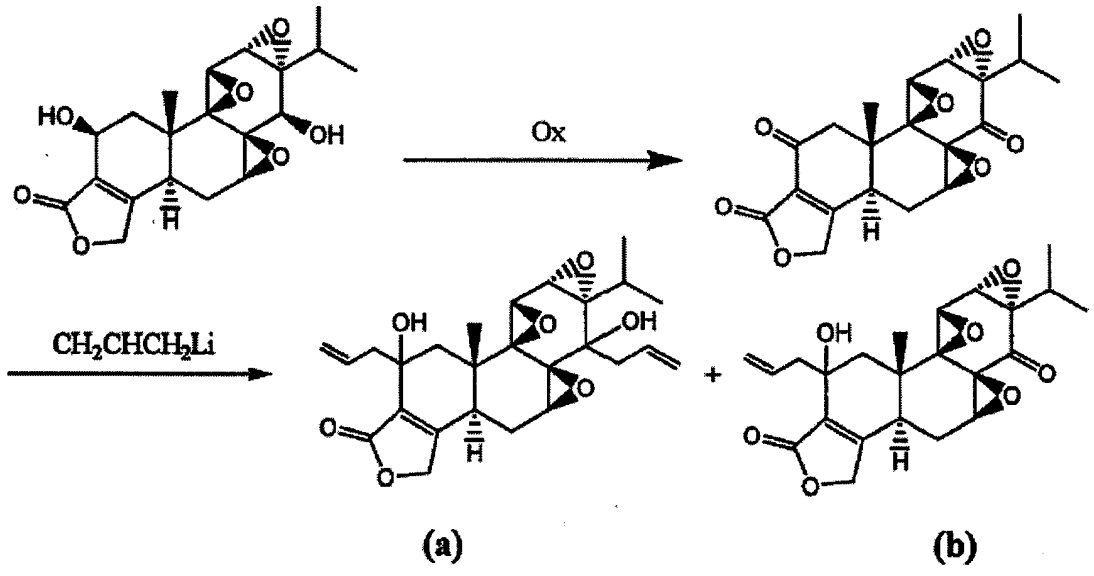
在方案 1 中，使用如三氧化铬-吡啶络合物，CrO_2Cl_2/氧化铝，或者可比的氧化剂，将雷公藤内酯醇在 C14 位上的仲醇氧化成酮(通称是雷公藤内酯酮)。且与甲基锂(CH_3Li)反应生成 14-C-甲基雷公藤内酯醇。在实施例 1 中进一步描述这种化合物的制备和特征。



方案 1

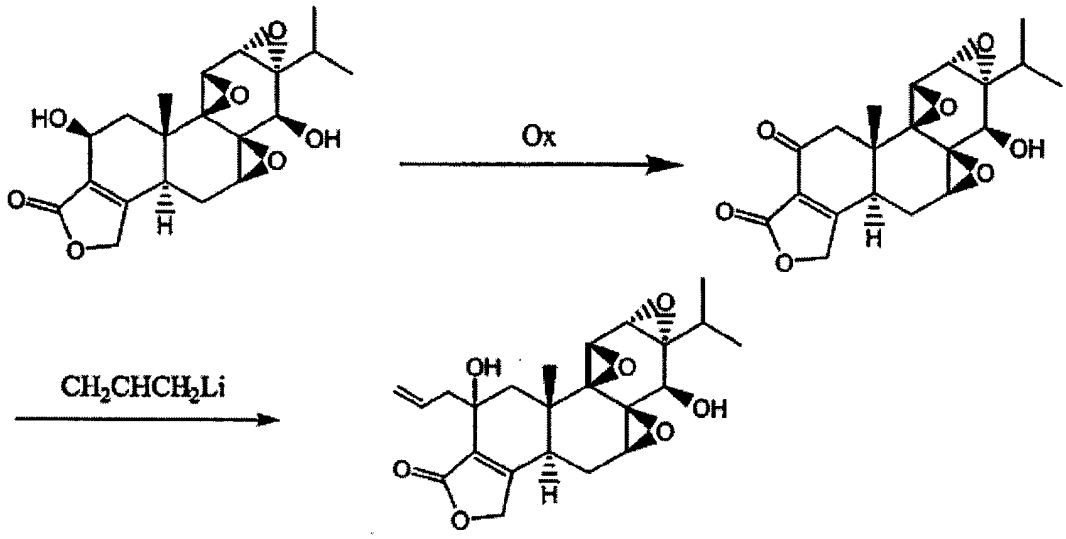
在以上的方案 1 中，在 C14 位上显示出两个立体化学，并且在以下方案中，并未描述出该反应位点的立体化学。但是，在产生了手性中心(即在 C14 和 C2 上的加成物)的反应中，在分子“以下” 得自加成的所述产物；也就是如方案 1 左侧的产物通常占绝大多数。这种产物也在以下实施例 1 中所示。

在方案 2 中，使用如上所述的氧化剂，将雷公藤羟内酯的仲醇均氧化成酮。且与烯丙基锂(CH_2=$CHCH_2Li$)反应产生由两种酮反应得到的二醇(a)，和仅在较少位阻酮反应而得到的酮醇(b)。



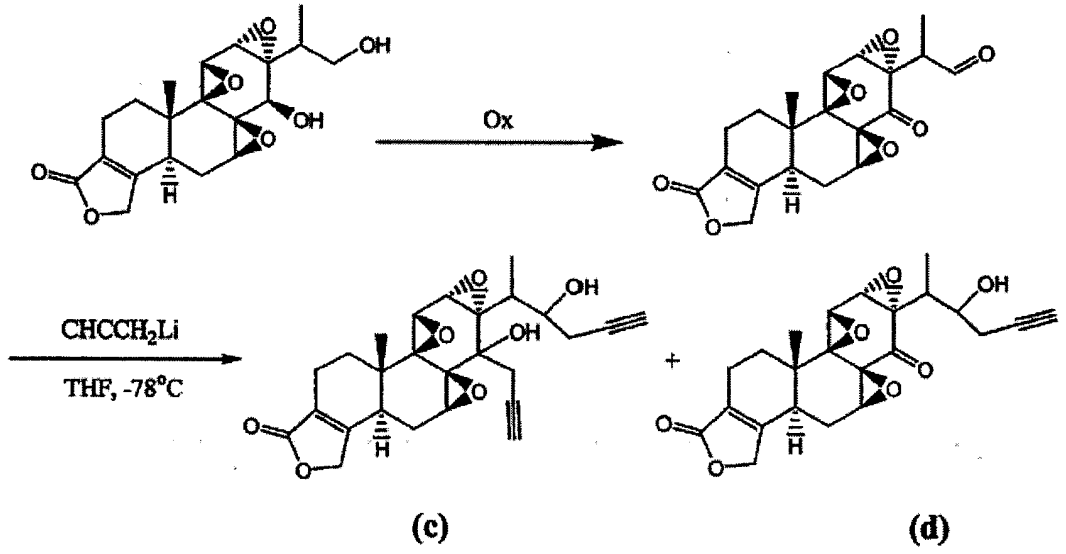
方案 2

在方案 3 中，在温和条件下，使用例如以上所述的化学计量试剂，将雷公藤羟内酯的 C2 位上的较少位阻醇氧化成酮。且与烯丙基锂反应在 C2 上产生叔醇。



方案 3

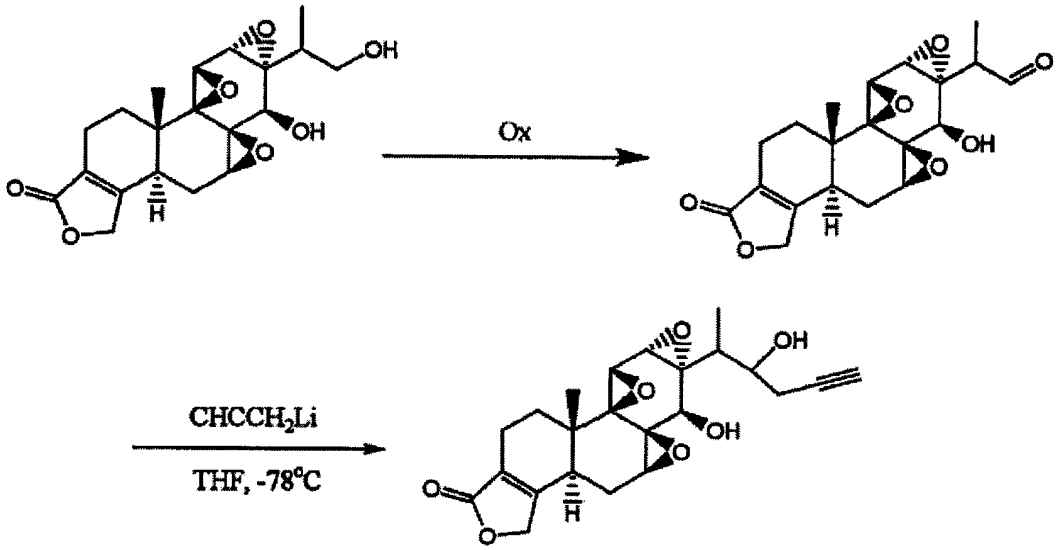
在方案 4 中，使用将不会进一步氧化产物醛的试剂，例如 DMSO，氯铬酸吡啶(Corey'试剂)，或者硝酸高铈铵，来对 16-羟基雷公藤内酯醇的仲和伯醇进行氧化，以产生酮醛中间体。使这种化合物与 2-丙炔基锂($CH{\equiv}CCH_2Li$)反应，产生二醇(c)和仅作为较少位阻醛反应结果的酮醇(d)。



(c) (d)

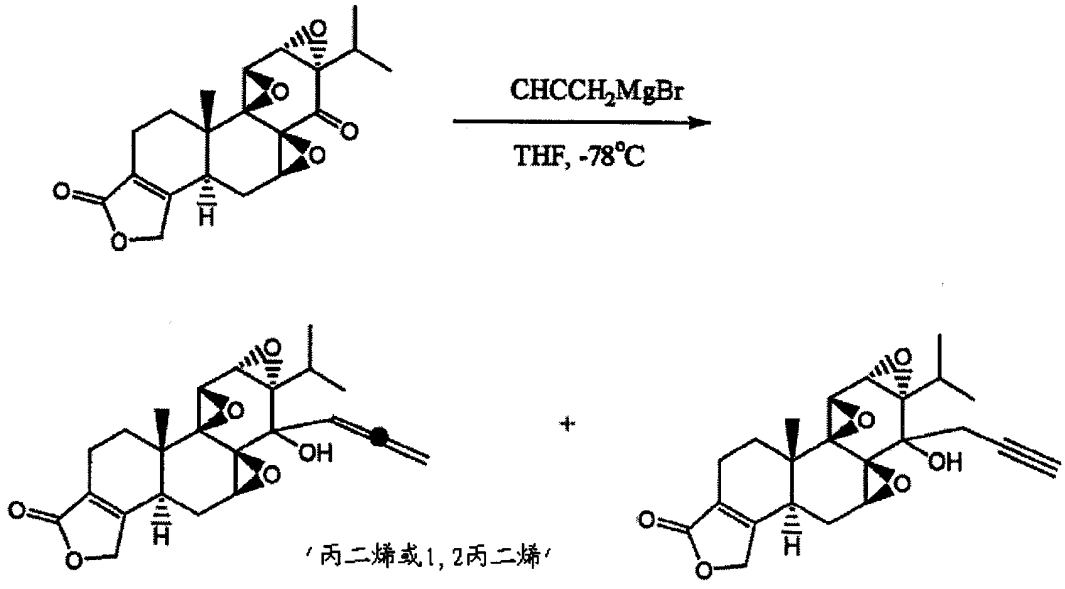
方案 4

在方案 5 中， 仅氧化 16-羟基雷公藤内酯醇的伯醇，使用选择性的氧化剂例如，如，$RuCl_2(PPh_3)_3$；$(Me_3SiO)_2$/催化的 $RuCl_2(PPh_3)_3$；DMSO/ClCOCOCl/Et_3N ；或者 DMSO/吡啶·SO_3/i-Pr_2NE_t (以上引用参见 Larock) 。且与 2-丙炔基锂反应产生所示的二醇。



方案 5

如方案 6 所示，以下与有机金属 2-丙炔基试剂的反应(这种情形下为雷公藤内酯酮)还可产生重排的丙二烯基产物。



方案 6

通过使用含 14C-的碳亲核试剂，本文所述的方法还可以用于同位

素标记的化合物的制备。

III. 治疗组合物

含有本发明雷公藤内酯醇衍生物的制剂可以为固体，半固体，冻干粉形式，或者液体剂型，例如片剂，胶囊剂，粉剂，缓释制剂，溶液，悬浮液，乳剂，软膏，洗剂，或气溶胶，优选适于精确剂量的简单使用的单位剂型。典型地，这种组合物包括常规的药物载体或赋形剂，并且还额外包括其它药剂、载体或助剂。

优选地，以重量计，这种组合物约为本发明化合物或本发明的多种化合物的 0.5%至 75%，剩余物由适当的药物赋形剂组成。为了口服使用，这类赋形剂包括制药级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、明胶、蔗糖、碳酸镁等等。如果需要，该组合物还可包含较小量的无毒辅助物质，例如润湿剂、乳化剂，或缓冲剂。

可以例如通过静脉内、皮下、腹膜内或肌肉注射，将这种组合物经口服、透皮或非肠道地用于受体。为了用于口服液体制剂，可将该组合物制成以液体形式或者以适于在水或生理盐水中水合的干燥形式供给的溶液、悬浮液、乳剂或糖浆。对于非肠道使用，典型地，适于非肠道使用的可注射组合物会在适合如无菌生理盐溶液的静脉溶液中包含雷公藤内酯醇衍生物。

可通过在药学上可接受的载体，例如，如盐水，葡萄糖溶液，甘油，或乙醇中溶解或分散雷公藤内酯醇衍生物(约 0.5%至约 20%)和任选的药物助剂来形成溶液或分散液以制备液体组合物。本发明的高水溶解度化合物令其特别适于以水溶液形式使用，例如通过腹膜内注射。尽管水溶液是优选的，但还可以在脂类(例如，甘油三酯，磷脂，或者聚乙氧基化蓖麻油，例如"CREMOPHOREL^{TM}")中，在脂质体悬浮液中，或者在含水乳剂中，将根据本发明的化合物配制成悬浮液。

还可通过吸入，以气溶胶颗粒形式，或者固体或者液体，优选能被吸入的尺寸使用这种化合物。这样的颗粒足够小而使吸入通过口腔和喉，并且进入支气管和肺的肺泡。一般来说，约 1 至 10 微米大小，优选小于约 5 微米的颗粒为能被吸入的。适于吸入的液体组合物包括

分散在含水载体中的活性剂，如无菌无热原盐水或者无菌无热原水。如需要，该组合物可与抛射剂混合以促使对该组合物进行喷射并形成气溶胶。

制备这种剂型的方法是已知的或者对本领域熟练技术人员是显而易见的；例如，参见 Remington's Pharmaceutical Sciences (第 19 版, Williams & Wilkins, 1995)。所使用的组合物会包含一些选定的适于在受体中对免疫抑制有效或者在靶细胞中对细胞凋亡有效的有效量化合物。

正如所述，例如，在 Panchagnula 等人 (2000)中，药剂的分配系数或 logP 能影响其对各种使用途径的适应性，包括口服生物利用度。本文描述的化合物具有比母体化合物，雷公藤内酯醇更高的计算 logP(参见表)，使其就口服生物利用度而言为更好地侯选物。(表中所代表的化合物是式 I 的化合物，其中 R^2 是 OH，CR^3R^5 和 CR^4R^5 都是 CH_2，R^1 如所示。如上所述，这些化合物在 C14 位上的立体化学使羟基被描绘在页面平面之上。)

化合物	$LogP^a$	$LogP^b$
雷公藤内酯醇(R^1=H)	-0.08	0.27
R^1=-CH_3(PG670)	0.14	0.34
R^1=-CH=C=CH_2	0.63	0.89
R^1=-CH_2CH=CH	0.77	0.99
R^1=-CH_2-C≡CH	0.30	0.53
R^1=-C≡CH	0.02	0.28
R^1=-CH=CH_2	0.49	0.74
R^1=-$(CH_2)_5CH_3$	2.30	2.40

a)按照 A. K. Ghose 和 G. M. Crippen, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 27: 21-35 (1987)计算; SD = 0.47

b)按照 V. N. Viswanadhan, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 29: 163 (1989)计算; SD = 0.49

IV. 免疫调节和抗炎治疗

已经显示出在广泛的自身免疫和慢性炎症疾病中存在免疫调节的

异常，包括系统性红斑狼疮，慢性风湿性关节炎，I 型和 II 型糖尿病，炎症性肠病，胆汁性肝硬化，葡萄膜炎，多发性硬化和其它病症，例如克罗恩氏病，溃疡性结膜炎，大疱性类天疱疮，肉样瘤病，牛皮癣，鱼鳞癣，格雷夫斯氏眼病和哮喘。尽管下面这些病症中每一个的发病机理可能是极不相同，但其共同具有多种自身抗体和自身反应性淋巴细胞的外观。这种自身反应性可以部分地归因于正常免疫系统在稳态控制下运行中稳态控制的丧失。

类似地，在骨髓或器官移植之后，宿主淋巴细胞识别外部组织抗原并开始产生引起移植排斥的抗体。

自身免疫或排斥过程的一项最终结果是由炎性细胞及其释放的媒介引起的组织破坏。例如非甾体抗炎药(NSAID's)的抗炎剂主要通过阻滞这些媒介的效果或分泌起作用，但不缓和疾病的免疫学基础。另一方面，例如环磷酰胺的细胞毒性剂以使正常和自身免疫反应均被切断的这一非特异性的方式来起作用。实际上，以这些非特异性免疫抑制剂治疗的病人与其患有的自身免疫性疾病一样，可能屈服于感染。

在在雷公藤内酯醇和其前药以及其它的衍生物已经证实为有用的应用，例如在免疫抑制治疗中，如在治疗自身免疫性疾病、预防移植排斥，或者治疗或预防移植物抗宿主病(GVHD)中，本发明的组合物是有效的。参见，例如，共有的 U.S.专利 No. 6, 150, 539 号，其通过参考并入本文。雷公藤内酯醇和现有的衍生物还对于其它炎性病症的治疗，例如外伤性炎症，以及在减小雄性生育力上是有效的。

对于抑制来自不相容人类供体的实体器官移植，组织移植，或者细胞移植排斥，所述方法是有效的，从而可延长移植物的成活率和功能，以及受体的成活率。这类用途包括，但不限于，实体器官移植(例如心脏、肾和肝)，组织移植(例如皮肤、肠、胰腺、性腺、骨，和软骨)，和细胞移植(例如来自胰腺、脑和神经组织的细胞，肌肉，皮肤，骨，软骨和肝)。

这种方法还对于抑制异种移植(种间)排斥有效；即在预防源于非人类动物的实体器官移植，组织移植，或细胞移植的排斥中有效，该非人类动物无论是在体质上是天然的情况中还是在生物工程化（bioengineered）(遗传基因控制)以表达人类基因，RNA，蛋白质，肽

或其它非天然的、异种基因分子，或者生物工程化以缺少动物天然基因，RNA，蛋白质，肽或其它通常表达分子的表达的情况中。本发明还包括如上所述的组合物在延长这种源于非人类动物的实体器官移植，组织移植，或细胞移植的成活率方面的用途。

另一方面，本发明包括移植物抗宿主病的治疗或预防方法，其通过移植入受体匹配或不匹配的骨髓、脾细胞、胎儿组织、脐带血，或者流动的或以别的方式采集的干细胞而得到。剂量优选为 0.25-2mg/kg 体重/天的范围，优选 0.5-1mg/kg/天，经口服或非肠道使用。

本发明还包括自身免疫性疾病或者具有自身免疫表现的疾病的治疗方法，例如阿狄森氏病，自身免疫性溶血性贫血，自身免疫性甲状腺炎，克罗恩氏病，糖尿病(I 型)，格雷夫斯氏眼病，格林-巴利综合征，全身性红斑狼疮(SLE)，狼疮肾炎，多发性硬化，重症肌无力，牛皮癣，原发性胆汁性肝硬化，风湿性关节炎和葡萄膜炎，哮喘，动脉硬化症，I 型糖尿病，牛皮癣，和各种过敏症。在治疗自身免疫性病症中，在周期性的基础上，例如每周 1-2 次，以足以减少症状的和提高病人舒适的剂量水平使病人使用这种组合物。特别地，对于治疗风湿性关节炎，可以通过静脉注射或通过直接注射入受感染的关节来使用这种组合物。在病人的疾病症状开始之后的几周周期内，可以以至少 24 小时的重复间隔治疗病人。

通过利用本领域已知的动物模型评价体内化合物的免疫抑制活性。可以使用这类实验来评价免疫抑制化合物的相对有效性，并估计适于免疫抑制治疗的剂量。这些实验包括，例如，由 Ono 和 Lindsey (1969)所述的，用于同种移植物的良好特征大鼠模型系统，其中移植心脏与同种异体的受体动物的腹部大脉管相连，通过受体动物中心脏跳动的能力估计移植心脏的活力。Wang(1991)和 Murase (1993)描述了异种移植模型，其中受体动物为不同种类。一种评价抗 GVHD 疗效所用的模型包括用亲代脾细胞对正常 F1 小鼠的注射；小鼠显示出特征在于脾大且免疫抑制的 GVHD 综合征(Korngold, 1978; Gleichmann, 1984)。由单独脾脏制备单一的细胞悬浮液，并且在存有和不存有伴刀豆球蛋白 A 的条件下建立微孔培养物以估计致有丝分裂反应的程度。

对于在移植排斥中的治疗，特别地，所述方法试图用于心脏、肾、

肝、细胞和骨髓移植排斥的治疗，还可以用于 GVHD 的治疗。典型地，在外科手术移植操作稍前或稍后，在手术期间开始所述治疗，并且持续每天的给药方案，持续至少几周的周期，以便对急性移植排斥进行治疗。在治疗期间，例如，通过包括同种异体淋巴细胞的混合淋巴细胞反应，或者通过采取移植组织的活组织，定期测试病人免疫抑制水平。

此外，可以长期使用所述化合物以预防移植排斥，或者用于治疗晚期移植排斥的急性发作。如上所述，使用剂量优选为每天每 kg 病人体重 1-25mg，对于非肠道使用，优选为更低数量的剂量，对于口服使用，优选更高数量的剂量。根据病人的反应，和在治疗期内，病人抗感染的能力，剂量可适当增加或降低。

在本发明范围内还包括式 I 化合物和一种或多种常规免疫抑制剂的结合治疗。本发明范围内的这些免疫抑制剂包括，但不限于，IMUREK™ (硫唑嘌呤钠)，布喹那钠，SPANIDIN™ (胍立莫司三盐酸化物，还称为脱氧司加林)，咪唑立宾(还称为布雷青霉素)，CELLCEPT™ (霉酚酸吗啉乙酯)，NEORAL™ (环孢霉素 A；还在商标 SANDIMMUNE™ 下以不同的制剂所销售的)，PROGRAF™ (他克莫司，还称为 FK-506)，RAPIMMUNE™ (西罗莫司，还称为雷帕霉素)，来氟米特(还称为 HWA-486)，ZENAPAX™，糖皮质素，例如泼尼松龙和其衍生物，例如正克隆(OKT3)的抗体，和例如兔抗胸腺细胞球蛋白(thymoglobulins)的抗胸腺细胞球蛋白。当与另一种免疫抑制药物同时使用以进行如上讨论的免疫治疗时，所述化合物可作为增效剂来使用。因此，可以以比单独使用所述化合物时基本上更少的用量(例如标准剂量的 20%至 50%)，使用例如以上所述的常规免疫抑制药。或者，以使得到的免疫抑制远大于单独使用所述药物和雷公藤内酯醇衍生物而所希望的或获得的效果总和的剂量，使用雷公藤内酯醇衍生物和免疫抑制药。典型地，在至少 2 周的时期内，以固定间隔时间使用免疫抑制药和增效剂。

本发明所述的组合物和方法还对于炎性病症的治疗是有效的，例如哮喘，无论内在还是外在的表现。对于哮喘的治疗，优选地，所述组合物经吸入法使用，但是任何常规的使用途径均是有效的。所述组

合物和方法还用于其它炎症病症的治疗，包括外伤性炎，莱姆病炎症，牛皮癣，慢性支气管炎(慢性传染性肺病)，慢性窦炎，急性呼吸窘迫综合征相关的败血病，贝堤特氏病，肺肉瘤病，天疱疮，类天疱疮炎症性肠病，和溃疡性结肠炎。

本发明所述组合物还可与常规的抗炎药(或者药品)结合使用，这里药物或所使用的药物量，其本身对诱导炎症的适当抑制或制约是无效的。

优选地，使用剂量在每天每 kg 病人体重 1-25mg 的范围内，对于非肠道使用，优选为更低的数量，对于口服使用，优选为更高的数量。按照本领域已知的方法，通过常规实验可确定最优剂量。

V. 抗癌治疗

在癌症治疗中，雷公藤内酯醇衍生物已经显示出有效性。参见，例如，共有的 U.S.专利第 6, 620, 843 号，本文通过参考引入，其描述了在以 HT-29 人类肿瘤结肠癌细胞系的异种移植研究中，雷公藤内酯醇衍生物与 5-FU 和 CPT-11 相比，在抑制肿瘤生长中的高效力。雷公藤内酯醇衍生物(雷公藤内酯醇 14-琥珀酸盐) 与 5-FU 和 CPT-11 相比，在明显地更大程度上强有力地抑制肿瘤生长，并诱导肿瘤的缩小。

因此，本发明包括如上所述组合物在治疗癌症方面的用途，包括癌症，其含有源于生殖组织的细胞(例如塞尔托利细胞， 生殖细胞，发育的或更成熟的精原细胞，精细胞或精母细胞和营养细胞，卵巢的生殖细胞和其它细胞)，淋巴或免疫系统癌症(例如何杰金氏和非何杰金氏淋巴瘤)，造血系统和上皮(例如皮肤和胃肠道)、实体器官、神经系统及肌骨骨组织癌症的细胞。雷公藤内酯醇衍生物还适用于各种癌细胞类型的治疗，包括但不限于，乳房，结肠，小细胞肺，大细胞肺，前列腺，恶性黑色素瘤，肝，肾，胰腺，食管，胃，卵巢，子宫颈或淋马瘤。乳房、结肠、肺和前列腺肿瘤的治疗为特别注意的。还注意到对白血病的治疗。如上所论，可以通过任何常规使用途径对受癌症和/或白血病折磨的病人使用所述组合物。

所述方法对于延缓肿瘤的生长，预防肿瘤生长，诱导肿瘤部分缩小，和诱导肿瘤完全缩小，至彻底消失均为有效。所述方法在预防源

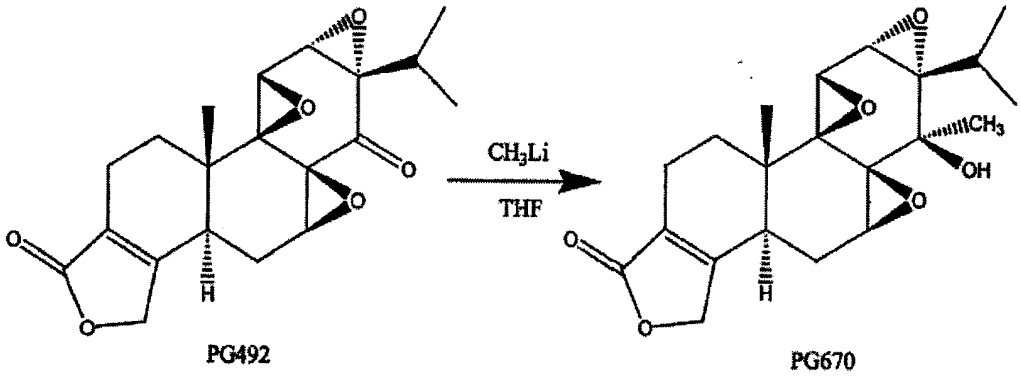
于实体瘤的转移瘤的赘疣中也是有效的。

可以作为单独治疗来使用本发明的组合物或与其它并未设计来在受体中具有抗癌作用的支持或治疗性治疗一起使用本发明的组合物。所述方法还包括使用与一种或多种常规抗癌药或生物蛋白制剂结合的本发明组合物，该组合物在受体中具有所需抗癌作用的有效量，其中药或制剂的数量对于诱导癌症生长的适当抑制本身是无效的。这类抗癌药包括放线菌素 D，喜树碱，卡铂，顺铂，环磷酰胺，阿糖胞苷，柔红霉素，多柔比星，依托泊苷，氟达拉滨，5-氟尿嘧啶，羟基脲，吉西他滨，伊立替康，甲氨蝶呤，丝裂霉素 C，米托蒽醌，紫杉醇，泰索帝，替尼泊苷，拓扑替康，长春碱，长春新碱，长春地辛和长春瑞宾。抗癌生物蛋白剂包括肿瘤坏死因子(TNF)，TNF-相关的凋亡诱导配体(TRAIL)，其它 TNF-相关或 TRAIL-相关的配体和因子，干扰素，白介素-2，其它白介素，其它细胞因子，趋化因子，和因子，对肿瘤相关分子或受体的抗体(例如抗-HER2 抗体)，和与这些制剂反应或结合的制剂 (例如 TNF 超家族受体的成员，其它受体，受体拮抗剂，和对这些制剂具有特异性的抗体)。

实施例

以下实施例用于举例说明但不以任何方式限制本发明。

实施例 1. 14-C-甲基雷公藤内酯醇(PG670)的制备



在-78℃的氮气下，向雷公藤内酯酮、PG492(60 mg, 0.17mmol)的 THF(5ml)溶液中加入 0.45ml 甲基锂(1.4 M 乙醚溶液，0.63 mmol, 3.7 当量)。溶液在-78° C 搅拌 2 小时 45 分钟，然后在室温下搅拌 2 小时，

这时 TLC 上的起始物料已经消失了。缓慢加入乙酸(1ml)。然后在真空下浓缩溶液。将粗品溶于二氯甲烷(3ml)并使其通过硅胶垫，然后将其用 5%甲醇乙酸乙酯溶液(80ml)洗涤。除去溶剂后，得到 78mg 粗品。将其溶于乙腈(0.6 ml)并过滤。使用均来自 Alltech 的 10×250mm Econosil C18 (5μ)柱和 Alltima C18 (5μ)卡套保护柱(7.5×4.6mm)，和流动相 CH_3CN/H_2O40/60，流速为 2.0ml/分钟，在 HPLC 上分离产品混合物。收集具有 32.13 分钟保留时间的第六峰，并将其真空浓缩。产品具有 m/z 374 (7.9mg, 收率：12.6%)。

由 NMR 鉴定结构。H^1 NMR (300MHz, $CDC1_3$)：δ=4.68 (2H, s, 19-CH_2), 3.95 (1H, d, 11-CH), 3.50 (1H, d, 12-CH), 3.49 (1H, s, 14-OH), 3.39 (1H, d, 7-CH), 2.69 (1H, m, 5-CH), 2.46 (1H, m, 15-CH), 2.33 (1H, m, 2-CHb), 2.12 (1H, m, 6-CHb), 1.97 (1H, m, 6-CHa), 1.57 (1H, dd, 1-CHb), 1.38 (1H, m, 2-CHa), 1.22 (1H, m, 1-CHa), 1.14 (3H, s, 14-CH_3 或 20-CH_3), 1.09 (3H, d, 17-CH_3), 1.08 (3H, s, 20-CH_3 或 14-CH_3), 0.81(3H, d, 16-CH_3) ppm。

实施例 2：细胞凋亡检测

A．对带有人血清的化合物的培育

在-80℃下，等分贮藏汇集的人血清。在 1.5ml 微量离心机的试管中将 20mM 化合物加入解冻的人血清中并以 37℃水浴培育 48 小时。将试样置于冰上直至稀释以便生物测定。由在完全组织培养基(RPMI 1640 培养基加 5%热钝化胎牛血清、1%HEPES、1%青霉素/链霉素(pen/strep)、1%谷氨酰胺)而非人血清中培育出的化合物组成对照物。

B．Annexin V 细胞凋亡检测

将试样(如 A 部分所述在人血清中培育的)在完全组织培养基中稀释至 1mM。将其等分置于微量培养板中并进行连续稀释，以使最后浓度包括在具有半对数(half-log)增量的 2 至 6000nM 范围内。从 Jurkat 人类 T 淋巴细胞系(#TIB-152 得自美国典型微生物菌种保藏中心，Manassas，VA)的指数增加培养物中收集细胞，通过离心对其进行一次洗涤并在完全组织培养基中稀释，稀释至 1×10^6 细胞/ml 浓度。将 100ml 体积的 Jurkat 细胞(1×105 细胞)加入到含有 100ml 已稀释化合物的孔

中，然后在 5%CO_2 培养箱中于 37° C 培育片板。

24 小时之后，对片板进行离心以使细胞成团，并且用 2%热钝化胎牛血清 PBS 液洗涤细胞两次。按照 Annexin V 检测步骤(BioVision, Inc., Mountain view, CA)，向每个孔中加入 500ml 结合缓冲液。然后，向每个孔中加入 5ml 异硫氰酸荧光素(FITC)的 Annexin V(BioVision, Inc.)共轭物，随后在黑暗中培养 5 分钟。在一些检测中，在此阶段加入碘化丙啶(BioVision, Inc.)以检查坏死细胞。将孔中的内容分别转移至试管，采用 FACSCalibur 流式细胞仪(BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA)分析细胞凋亡。认为与 Annexin V 结合为阳性的细胞是凋亡的，以凋亡细胞百分比计算数据。

以在血清中培育的化合物的浓度对凋亡细胞百分比将数据绘图。图 1 显示出与 PG490(雷公藤内酯醇)和溶剂对照物相比，PG670(14-甲基雷公藤内酯醇)的结果。

C. 末端脱氧核甘酸转移酶细胞凋亡检测

在这个检测中，如以上部分 A 所述制备试样并如部分 B 所述进行稀释。还如部分 B 所述，加入 Jurkat 人类 T 淋巴细胞，在 5%CO_2 培养箱中于 37° C 培育片板。24 小时之后，对片板进行离心以使细胞成团，用 PBS 洗涤细胞。用多聚甲醛固定、洗涤细胞，并用乙醇处理、洗涤，随后以酶末端脱氧核甘酸转移酶(TdT)和荧光素标记的脱氧尿苷(dUTP)培育细胞。所述方法使 DNA 分子的 3’末端标记在细胞凋亡的 DNA 裂解阶段期间缺口(末端核苷酸转移酶介导的脱氧三磷酸尿苷原位缺口末端标记法，TUNEL 标记法)。洗涤细胞，用核糖核酸酶对其进行处理，洗涤并在含有碘化丙啶的培养基中再悬浮，以辨别完整的凋亡细胞。将检测孔中的内容分别转移至试管，采用 FACSCalibur 流式细胞仪(BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA)分析细胞凋亡水平。认为对 Fl-dUTP 为阳性的细胞是凋亡的。

实施例 3：IL-2 生成检测

将如实施例 2A 所述在人血清中培育的试样，在完全组织培养基中稀释至 1mM。将其等分置于已经涂敷抗-CD3 抗体(用于通过 Jurkat 细胞刺激 IL-2 生成的)的微量培养板，并且进行连续稀释，以使最后浓度

包括在具有半对数(half-log)增量的 2 至 6000nM 的范围内。从 Jurkat 人类 T 淋巴细胞系(#TIB-152 得自美国典型微生物菌种保藏中心，Manassas，VA)的指数增加培养物中收集细胞，通过离心对其进行一次洗涤并在完全组织培养基中稀释，稀释至 2×106 细胞/ml 浓度。将 50ml 体积的 Jurkat 细胞(1×105 细胞)加入到含有 100ml 已稀释化合物的孔中，向每个孔中加入 50ml PMA(10ng/ml)，并且在 5%CO_2 培养箱中于 37℃培育片板。24 小时之后，对片板进行离心以使细胞成团，从每个孔中除去 150ml 上清液，在-20℃贮藏样品。使用 Luminex 100 (Luminex Corporation, Austin,TX)，与抗-IL-2 捕获抗体偶合的 Luminex 微球，和荧光物质-偶合的抗-IL-2 检测抗体对贮藏上清液的人 IL-2 浓度进行分析。以 IL-2 ng/ml 表示数据。

将数据以在血清中培育的化合物的浓度对 IL-2 浓度进行绘图。图 2 显示出与 PG490(雷公藤内酯醇)和溶剂对照物相比，PG670(14-甲基雷公藤内酯醇)的结果。

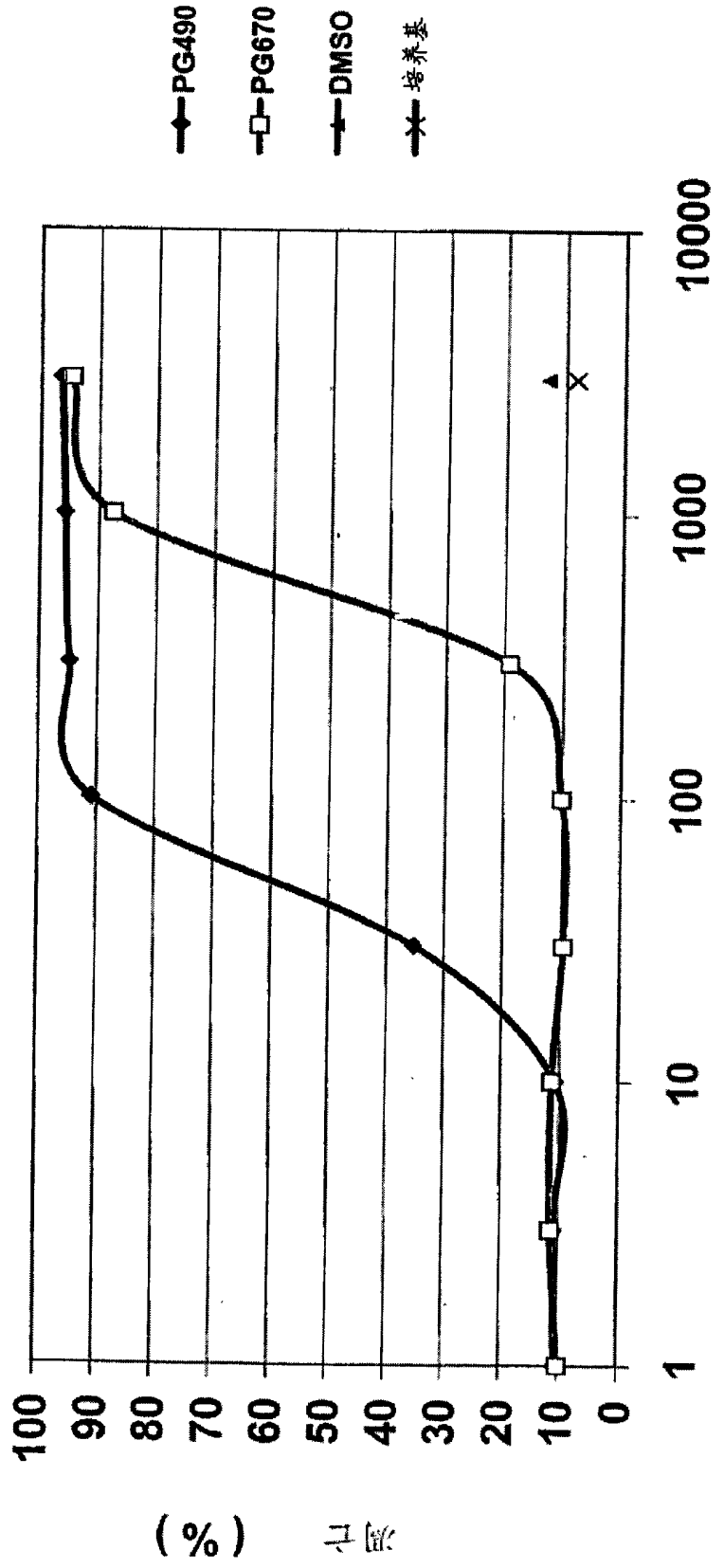

PG490
PG670
DMSO
培养基
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
10
100
1000
10000
浓度 (nM)
(%)

图1

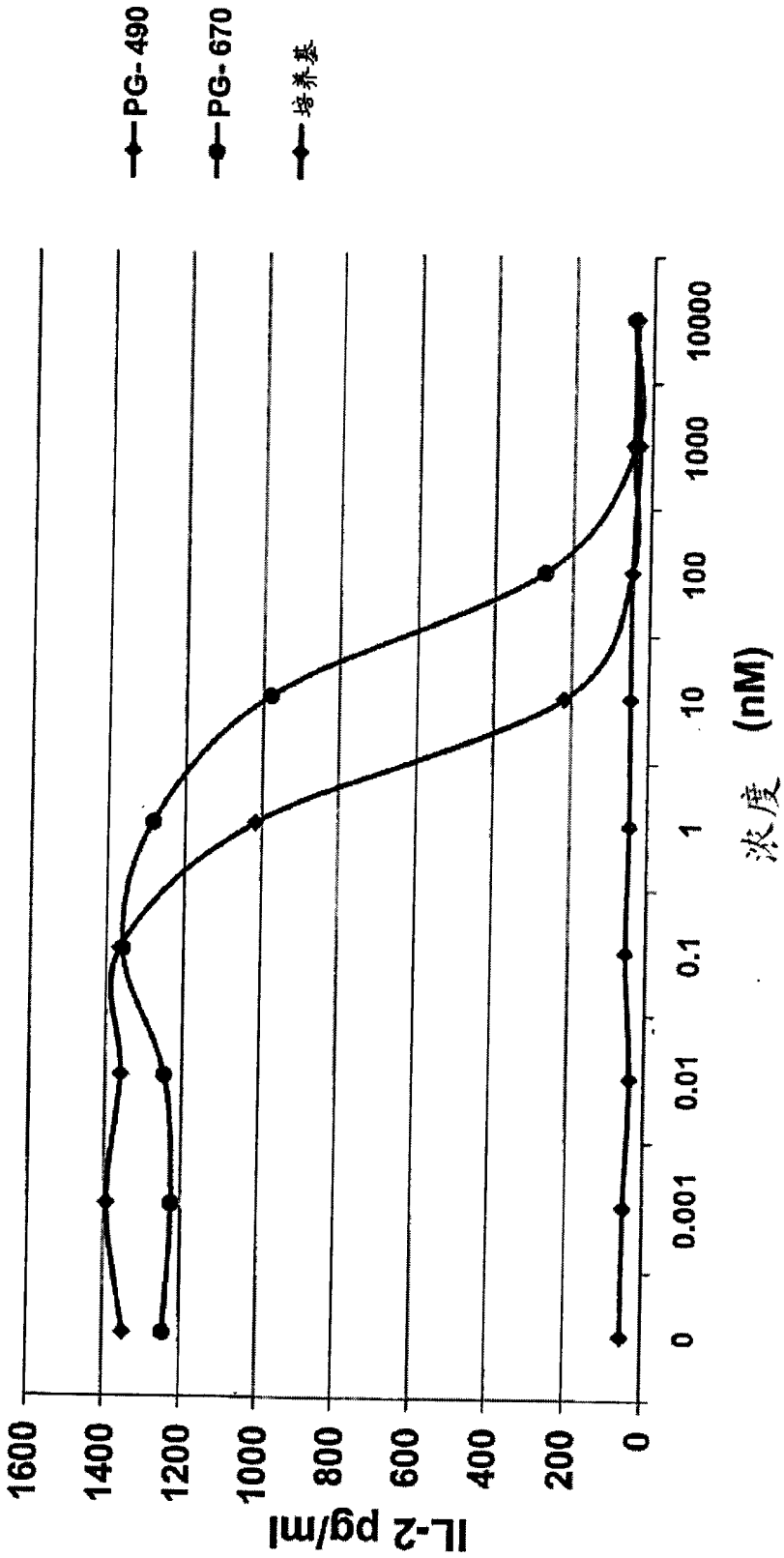

PG-490
PG-670
培养基
IL-2 pg/ml
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
浓度 (nM)

图 2