

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

A61K 31/275

[12] 发明专利申请公开说明书

A61K 31/415 A61K 31/425

A61K 31/44

[21] 申请号 97198596.0

[43]公开日 1999 年 10 月 20 日

[11]公开号 CN 1232392A

[22]申请日 97.8.14 [21]申请号 97198596.0

[30]优先权

[32]96.8.14 [33]IL [31]119069

[86]国际申请 PCT/IL97/00276 97.8.14

[87]国际公布 WO98/06391 英 98.2.19

[85]进入国家阶段日期 99.4.6

[71]申请人 摩尔研究应用有限公司

地址 以色列吉瓦特施缪尔

共同申请人 耶路撒冷希伯来大学伊森姆研究发展公司

[72]发明人 A·诺沃格洛德斯凯 A·勒维茨基

A·加兹特

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

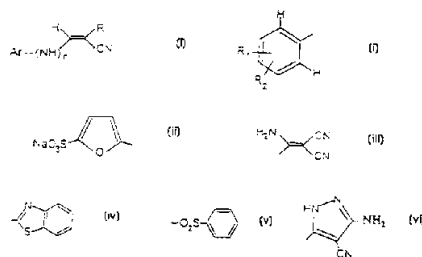
代理人 吴玉和 周慧敏

权利要求书 6 页 说明书 40 页 附图页数 25 页

[54]发明名称 包含 Tyrphostin 化合物的药物组合物

[57]摘要

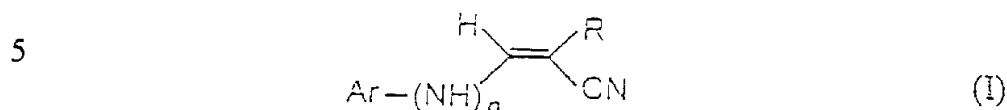
用于对抗不希望有的细胞,组织或器官毒性作用的化合物,具有式(I)的结构,其中:Ar 是结构式(i)或(ii)的基团,n 是 0,或者当 Ar 是上面结构式(i),则 n 也可以是 1,R 是 CN, -C(S)NH₂, -C(O)NHR₃,或者当 R₁是 4-NO₂,R₂是 H 或 3-OH 时,则 R 也可以是结构式(iii),(iv),(v),(vi)的基团,在此 R₃是 H,苯基,苯基(低级烷基),或吡啶甲基;R₁和 R₂各自独立地是 H,OH,NO₂,或者当 R 是 CN,也可以是 CH₃,F,或 CF₃,条件是 R₁和 R₂不同时是 H。



ISSN 1008-4274

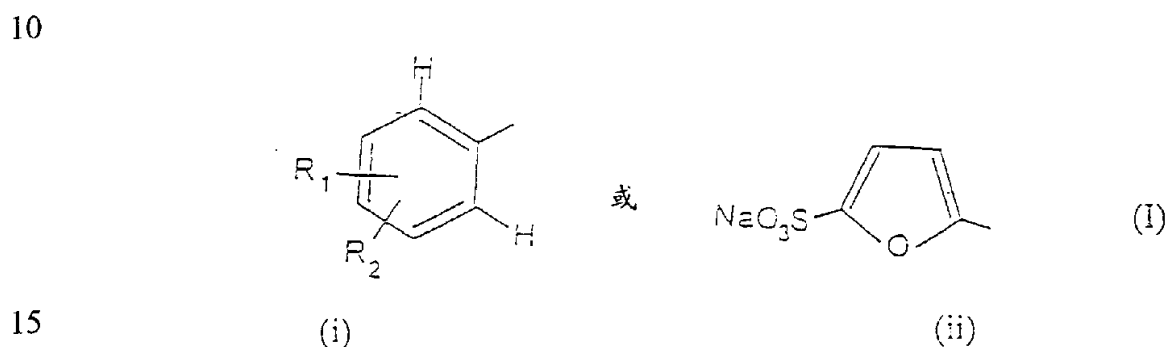
权 利 要 求 书

1. 用于对抗对细胞或组织损害的药物组合物, 它含有效量的如下通式 I 的化合物, 以及可药用载体,

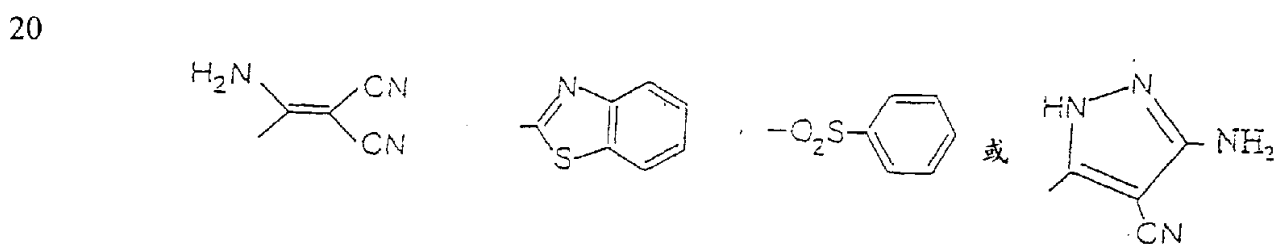


其中:

— Ar 是如下结构式的基团,



— n 是 0, 或者当 Ar 是上面结构式 (i) 时, 则 n 也可以是 1,
R 是 CN, $-\text{C}(\text{S})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}_3$, 或者当 R_1 是 4- NO_2 , 以及 R_2 是 H 或 3-OH 时, 则 R 也可以是如下结构式的基团,

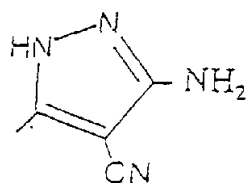


25 在此 R_3 是 H, 苯基, 苯基 (低级烷基) 或吡啶甲基;

— R_1 和 R_2 各自独立地是 H, OH, NO_2 , 或者 R 是 CN 时, 也可以是 CH_3 , F, 或 CF_3 , 条件是 R_1 和 R_2 不同时为 H。

2. 权利要求 1 的药物组合物, 包含结构式 I 的化合物, 其中 R 是 CN, $-\text{C}(\text{S})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, 或如下结构式的基团,

30



5

并且 n 是 0, R_1 是 4- NO_2 , R_2 是 H。

3. 权利要求 1 或 2 的药物组合物, 是用于对抗由细胞毒性药物引起的损害。

4. 权利要求 3 的药物组合物, 是用于对抗由抗肿瘤药物引起的损害。

5. 权利要求 3 或 4 的药物组合物, 包含与细胞毒性药物组合的有效量的权利要求 1 中的结构式 I 化合物。

6. 权利要求 3 - 5 的任一药物组合物, 其中的药物选自顺铂, 阿霉素, 环磷酰胺, 丝裂霉素 - C 和 5 - 氟尿嘧啶。

7. 权利要求 1 - 6 的任一药物组合物, 是用于对抗骨髓毒性和淋巴毒性。

8. 上述权利要求的任一药物组合物, 是适合于静脉内给药的剂型。

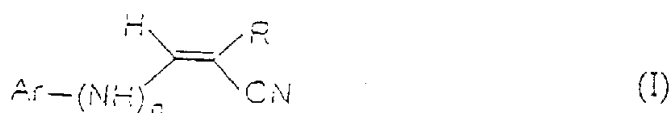
9. 上述权利要求的任一药物组合物, 是适合于口服给药的剂型。

10. 权利要求 1 或 2 的药物组合物, 可用于体外保存细胞, 组织或器官。

11. 权利要求 1 或 2 的药物组合物, 可用于对抗由免疫介导或炎症反应引起的损伤。

12. 权利要求 1 - 10 的任一药物组合物, 是用于对抗有害的程序性死亡。

13. 一种用于治疗个体, 对抗对细胞, 组织或器官损害的方法, 该方法包括给予此个体有效量的如下通式 1 的化合物, 以及可药用载体,

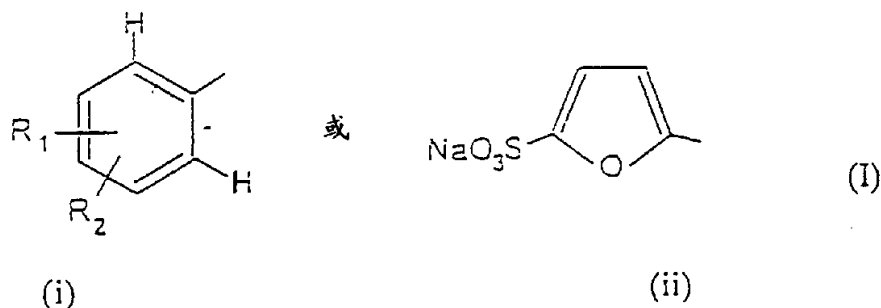


30

其中:

— Ar 是如下结构式的基团,

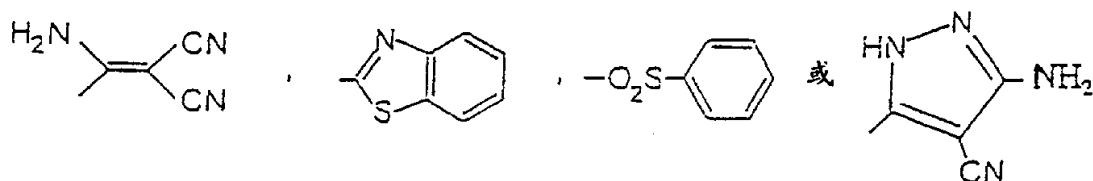
5



10

— n 是 0, 或者当 Ar 是上面结构式 (i) 时, 则 n 也可以是 1, R 是 CN, $-C(S)NH_2$, $-C(O)NHR_3$, 或者当 R_1 是 4- NO_2 , 以及 R_2 是 H 或 3-OH 时, 则 R 也可以是如下结构式的基团,

15



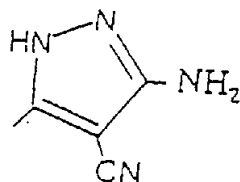
在此 R_3 是 H, 苯基, 苯基 (低级烷基) 或吡啶甲基;

20

— R_1 和 R_2 各自独立地是 H, OH, NO_2 , 或者 R 是 CN 时, 也可以是 CH_3 , F, 或 CF_3 , 条件是 R_1 和 R_2 不同时是 H。

14. 权利要求 13 的方法, 其中结构式 I 的化合物中, R 是 CN, $-C(S)NH_2$, $-C(O)NHCH_2C_6H_5$, 或如下结构式的基团,

25



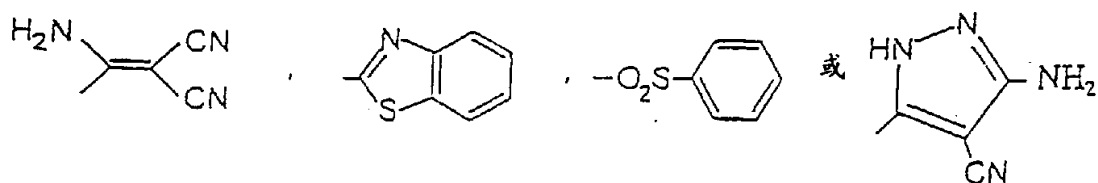
并且 n 是 0, R_1 是 4- NO_2 , R_2 是 H。

30

15. 权利要求 13 或 14 的方法, 其中有害的药物是细胞毒性药物。

16. 权利要求 15 的方法, 其中的细胞毒性药物是抗肿瘤药物。

17. 权利要求 16 的方法, 其中的细胞毒性药物选自顺铂, 阿霉素, 环磷酰胺, 丝裂霉素 - C 和 5 - 氟尿嘧啶。

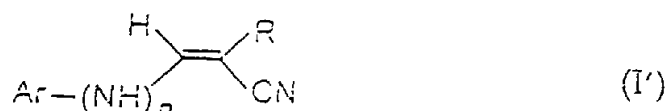


5

在此 R_3 是 H, 苯基, 苯基 (低级烷基) 或吡啶甲基;
— R_1 和 R_2 各自独立地是 H, OH, NO_2 , 或者 R 是 CN 时, 也可以是 CH_3 , F, 或 CF_3 , 只要 R_1 和 R_2 不同时是 H。

26. 通式 I' 的化合物,

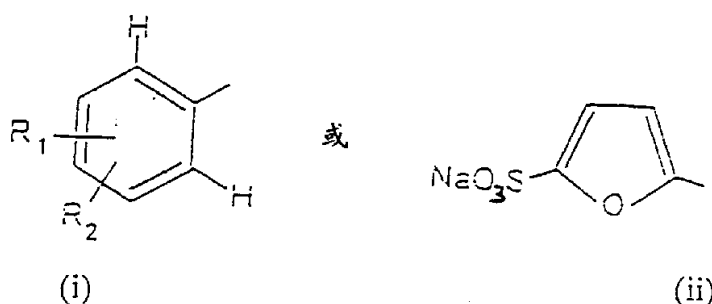
10



其中:

15

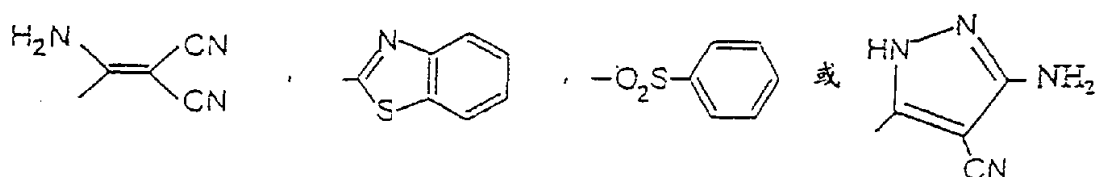
— Ar 是如下结构式的基团,



20

— n 是 0, 或者当 Ar 是上面结构式 (i) 时, 则 n 也可以是 1,
— R 是 CN, $-\text{C}(\text{S})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}_3$, 或者当 R_1 是 4- NO_2 , R_2 是 H 时, 则 R 也可以是如下结构式的基团,

25



30

R_1 和 R_2 各自独立地是 H, OH, NO_2 , 或者当 R 是 CN 时, 也可以是 CH_3 , F 或 CF_3 , 并且

The diagram shows a 3D coordinate system with axes labeled x , y , and z . A rectangular prism is positioned in the first octant, with its base on the xy -plane. The edges of the prism are labeled with a and b . The top surface of the prism is labeled $z = h$. The prism is divided into several smaller rectangular regions by dashed lines, representing a discretization of the volume. The regions are defined by their coordinates along the x , y , and z axes.

R₃ 是 H, 苯基, 苄基 (低级烷基) 或吡啶甲基;

但条件是：

a) 当 R 是 CN 和 n 是 0 时, 则

(aa) 如果 R_1 和 R_2 之一是 H 或 OH, 则另一个不能是 NO_2 ,

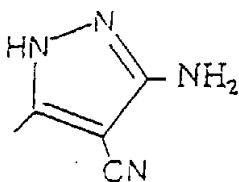
5

(ab) 如果 R_1 和 R_2 之一是 H 或 F, 则另一个不能是 H 或 F, 并且

b) 当 R_1 是 4- NO_2 , R_2 是 H, 以及 n 是 0 时, 则 R 不能是 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, 或 $-\text{C}(\text{S})\text{NH}_2$ 。

27. 权利要求 26 的化合物, 其中 R 是 CN, $-C(S)NH_2$,

10 $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ 或如下结构式的基团,



15

并且 n 是 0, R_1 是 4-NO₂, R_2 是 H 和 n 是 0。



说明书

包含 Tyrphostin 化合物的药物组合物

5 发明领域

本发明是关于一类可用于对抗有害药物试剂引起损害的组合物，这种有害药物试剂特别包括用于癌症治疗的抗肿瘤药物如细胞毒性药物。本发明中损害意指对细胞，组织或者是器官的有害作用。本发明还涉及对抗这种损害的治疗方法。并且，本发明还提供了几种用于这种组合物和治疗方法的新型化合物。

发明背景

绝大多数常用的抗肿瘤治疗，包括化疗和放疗，都显示对分裂的细胞和某些器官功能的有害的毒性作用。特别易受这种治疗影响的细胞是骨髓细胞，皮肤细胞和胃肠道上皮细胞。此外，这种治疗还经常引起特定的器官损伤，如肾脏和肝脏。由于这种毒性作用，从而限制了这种治疗的治疗指数（therapeutic index）。

长时间以来医学研究的一个愿望是，试验和开发既不影响药物治疗活性，又能降低有害毒副作用的治疗方式和方法，从而提高这种药物的治疗指数。

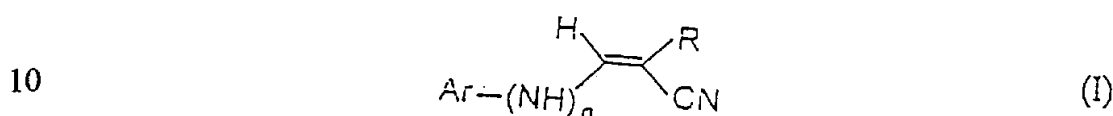
程序性（apoptosis）或渐进性细胞死亡，是在胚胎发育和机体正常体内平衡过程中细胞死亡的基本生理学调节机制。最近的研究资料指出，许多化学治疗剂的抗肿瘤作用，都与它们能够诱发程序性细胞死亡有关。这些药物试剂的毒性也可能与它们诱导正常细胞程序性细胞死亡有关。

已有初步报告论述，多种药物试剂可用于防止使用抗癌药引起的肾毒性（Skinner, R., Current Opinion in Oncology, 7: 310-315, 1995）。尝试对抗因使用细胞毒性药物顺铂引起的严重慢性近曲小管毒性。在对大鼠进行的体内试验中，对-氨基苯甲酸（PABA）与顺铂一起共同给药，导致顺铂的肾毒性降低，而不降低其抗肿瘤活性。其它一些药物试剂如 mitimazole，氯丙嗪和 L-精氨酸，也用于在各种与顺铂毒性有关的体内试验中对动物给药，仅得到了一些初步的不明确的结果。

被脱磷酸产生巯基部分的药物氨磷汀也被用于降低抗肿瘤药物的毒性作用 (Cancer Res. 55: 4069, 1995)。

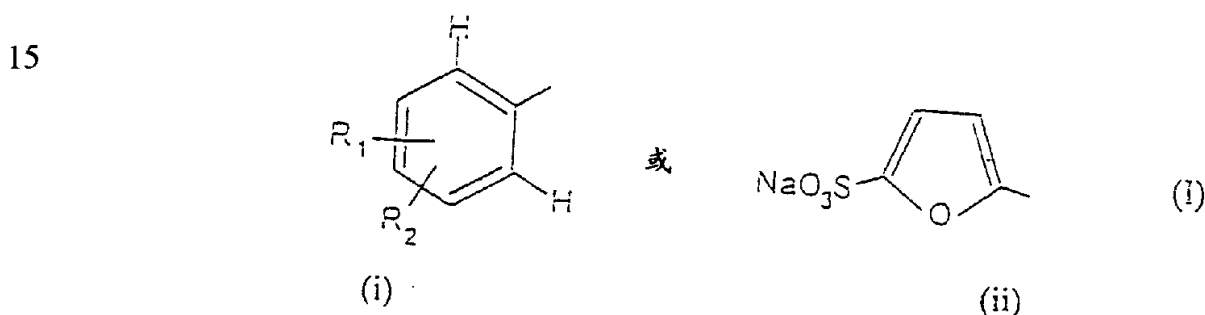
本发明概述

- 5 首先, 本发明提供了一种药物组合物, 用于对抗, 即降低或者防止对细胞或组织的损害, 此组合物含有作为活性剂的有效量的通式 I 的化合物以及可药用载体:

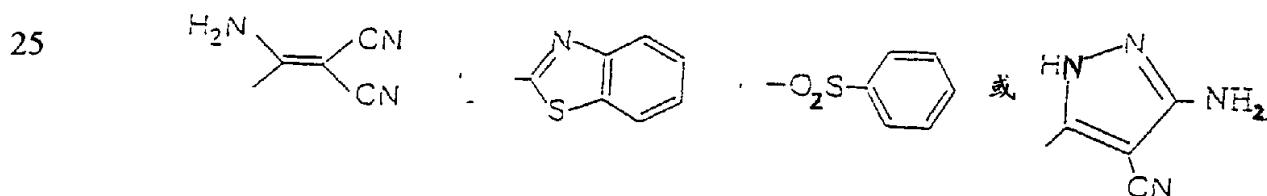


其中:

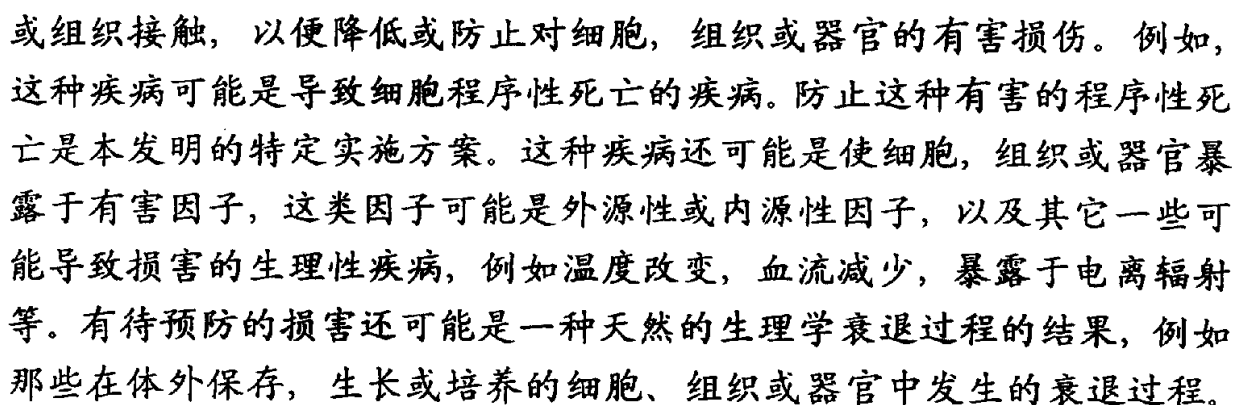
— Ar 是下式基团,



- 20 — n 是 0, 或者当 Ar 是上面结构式 (i) 时, 则 n 也可以是 1, R 是 CN, $-\text{C}(\text{S})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}_3$, 或者当 R_1 是 4- NO_2 , 以及 R_2 是 H 或 3-OH 时, R 也可以是下式基团,



- 30 在此 R_3 是 H, 苯基, 苯基 (低级烷基) 或吡啶甲基;
— R_1 和 R_2 各自独立是 H, OH, NO_2 , 或者 R 是 CN 时, 也可以是 CH_3 , F, 或 CF_3 , 条件是 R_1 和 R_2 不要同时是 H。
该活性剂和药物组合物, 可以在各种疾病中给药, 或者使之与细胞



本发明还提供了一种用于治疗病人, 对抗细胞, 组织, 器官损害的方法, 包括对病人给予有效量的通式 (I) 化合物。

名词“有效量”应该被理解为意指对抗损害有效的活性化合物的量，而这种损害表现为对正常（无病的）细胞的破坏或者对组织或器官的损伤。

有害因子可能是外源性因素例如具有细胞毒性作用的治疗药物(如抗肿瘤药), 放射作用, 有毒的化学药品等。此外, 有害的因子也可能是内源性的, 如在多种代谢过程中或其它紊乱中升高水平的自由基, 自身抗体, 细胞因子等。

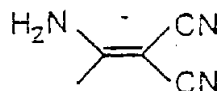
本发明的药物组合物还可用于如下范围：治疗多种疾病，紊乱或病症，如 AIDS，导致肝中毒的病症，辐射损伤，减少或抑制由于移植排斥作用对移植细胞或组织的损伤，用于治疗中毒如扑热息痛中毒，对抗治疗药物中有毒溶剂和载体的有害作用，对抗酒精引起的损害等。并且，该组合物还可以用于对抗不需要的免疫中介反应或炎症反应，如脓毒性休克，减少自身免疫反应引起的损伤，等等。最后，本发明的药物组合物还可以用于在体外保存将用作移植的细胞或组织，减少或防止在移植之前的体外保存过程中将发生的细胞或组织的衰退或死亡等。

本发明的药物组合物在对抗细胞毒性药物或抗代谢药物的,特别是例如用于癌症治疗药物的毒性作用中是非常有用的。有时,本发明的药物组合物将和此细胞毒性药物一起共同给药。据此实施方案的药物组合物可能含有这种药物和上述结构式I的化合物。

结构式 I 的化合物属于 Tyrphostin 化合物 (Levitzki, A., 和 Gazit, A., Science, 267: 1782, 1995)。在下面的叙述中, 结构式 I 的化合物将被称为 “ Tyrphostin ”, 而含有这种化合物的组合物常常被称为 “ Tyrphostin 组合物”。

在来自结构式 I 的 Tyrphostin 化合物中, 有一些是已知的, 但它们具有不同于本发明所提供的用途, 而另一些是新颖的。这些新颖的 Tyrphostin 化合物构成了本发明的另一独立方面, 它们是如下的结构式 I 化合物, 其中 Ar, R_1 , R_2 和 R_3 定义同上, 但条件是:

5 a) R 不能是

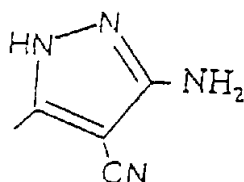


b) 当 R 是 CN, 并且 n 是 0 时, 那末

10 (ba) 如果 R_1 和 R_2 中的一个 H 或 OH, 则另一个不能是 NO_2 ,
 (bb) 如果 R_1 和 R_2 中的一个 H 或 F, 则另一个不能是 H 或 F,
 以及

c) 当 R_1 是 4- NO_2 , R_2 是 H, 和 n 是 0 时, 则 R 不能是 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$,
 或 $-\text{C}(\text{S})\text{NH}_2$ 。

15 用于该组合物的优选的式 I 化合物, 是那些其中 R 是 CN, $-\text{C}(\text{S})\text{NH}_2$,
 $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ 或如下结构式的基团

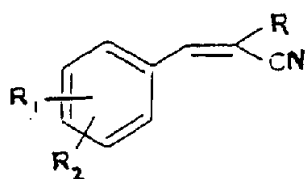


20

并且 n 是 0, R_1 是 4- NO_2 , R_2 是 H。

tyrphostin 化合物实例被列举在化合物表 1 中。列举在化合物表 1 中的一些 tyrphostin 化合物是新颖的, 这些新颖的 tyrphostin 化合物也被
 25 列举在化合物表 II 中。

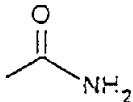
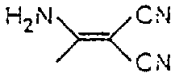
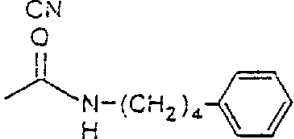
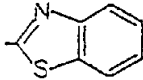
化合物表 I



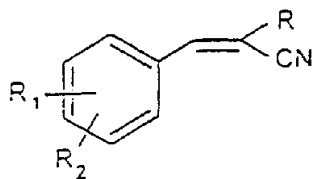
化合物号	R	R1	R2	熔点℃	参考文献 ¹
AG1714	CN	4-NO ₂	H	153	1
AG1791		4-NO ₂	H	238	2
AG1744		4-NO ₂	H	277	3
AG1820		4-NO ₂	H	103	4
AG1822		4-NO ₂	H	220	-
AG1801		4-NO ₂	H	161	-
AG1824		4-NO ₂	H	238	-
AG1823		4-NO ₂	H	187	-
AG1798		4-NO ₂	H	98	-
AG1745		4-NO ₂	H	148	-
AG1843		4-NO ₂	H	-	-

¹ 该号码指下文所附的参考文献号

化合物表 I (续)

化合物号	R	R1	R2	熔点℃	参考文献 ¹
AG126	CN	4-NO ₂	3-OH	176	5
AG1719		4-NO ₂	3-OH	215	-
AG1720		4-NO ₂	3-OH	105	-
AG1759	CN	4-NO ₂	3-CH ₃	97	-
AG1762	CN	4-NO ₂	3-F	120	-
AG1606		4-NO ₂	3-OH	148	-
AG1821	- 	4-NO ₂	3-OH	178	6
AG1781	CN	3-NO ₂	H	90	10
AG127	CN	3-NO ₂	4-OH	175	11
AG178	CN	4-F	H	114	11,12
AG1754	CN	3-F	4-F	57	13
AG1755	CN	H	4-CF ₃	95	-
AG1799	CN	4-NO ₂	O ₂ S- 	158	-

化合物表 II (新化合物)



5

化合物号	R	R1	R2	熔点℃
AG1822		4-NO ₂	H	220
AG1801		4-NO ₂	H	161
AG1824		4-NO ₂	H	238
AG1823		4-NO ₂	H	187
AG1798		4-NO ₂	H	98
AG1745		4-NO ₂	H	148
AG1843		4-NO ₂	H	-
AG1719		4-NO ₂	3-OH	215
AG1720		4-NO ₂	3-OH	105
AG1759	CN	4-NO ₂	3-CH ₃	97
AG1762	CN	4-NO ₂	3-F	120
AG1606		4-NO ₂	3-OH	148
AG1755	CN	H	4-CF ₃	95
AG1799	CN	4-NO ₂		158

本发明所使用的某些已知化合物的参考文献列表

1. Mowry, D. T., J. Am. Chem. Soc., 67: 1050, 1945.
2. Zabichy, J., J. Chem. Soc., 683, 1961.
3. Bronskill, J. S., Dc A., and Ewing, D.F., J. Chem. Soc. Perkin, Trans. I., 629, 1978.
4. Junck, H., and Wolny, B., Monat. Chem., 107: 999, 1976.
5. Novogrodsky, A., Vanichkin, A., Patya, M., Gazit, A., Osherov, N. and Levitzki, A., Science, 264: 1319, 1994.
6. Sakamoto, M., et al., J. Chem. Soc., Perkin Trans I., 1759, 1995.
7. (a) Flenner, A.L., C. A. 63: 13,278, 1965.
(b) Lythgoe, K., Todd, A. and Tapham, C. J. Chem. Soc., 515, 1944
8. Drabek, J. and Meyer, A., C. A., 89: 152,719, 1978.
9. Gazit, A., et al., J. Med. Chem., 34: 1896, 1991.
10. Carson, B. B., and Staughton, R. W., J. Am. Chem. Soc., 50: 2825, 1928.
11. Gazit, A., et al., J. Med. Chem., 32:2344, 1989.
12. Weinberger, M. A., and Higgin, R.M., Can, J. Chem., 43: 2585, 1965.
13. Blox Ram, J., Dell, C.P., and Smith, C.W., Heterocycles, 38: 400, 1994.

25 本发明特别优选的 tyrphostin 化合物，是在上面“化合物表 I”中被指定为 AG1714，AG1744，AG1801 和 AG1843 的化合物。这四个化合物中，后二个是新的。

式 I 的 tyrphostin 化合物可以同另一种治疗剂结合对病人给药，例如同细胞毒性药物或放疗剂结合。在这种协同治疗中， tyrphostin 化合物可以同其它治疗同时进行，或者不同时间进行，以便产生最大的效果。一个特别的例子是在给予其它治疗之前给予 tyrphostin 化合物，例如在放疗或给予细胞毒性药物之前几小时给药。

本发明发现, 当把结构式 I 的 tyrphostin 化合物同另一种治疗剂—

起给药时，它们不会降低另一种活性剂的治疗活性，而是有助于降低对正常细胞或组织不希望有的毒副作用。这意味着，以相同剂量的治疗剂，仍然可达到所希望的相同治疗效果。例如，在使用化疗药物的情况下，以一定的给药剂量给予 tyrphostin 化合物，对药物降低肿瘤重量或者阻止肿瘤生长或复发的作用没有影响，或者可能只有极小的影响。但是，在某些情况下，给予 tyrphostin 化合物甚至会增强这种治疗作用。因此在这种组合治疗中，tyrphostin 化合物的总体作用是增加另一种治疗的治疗指数，也就是说，增加其治疗作用与其有害毒副作用之间的比率。治疗指数增加有时可能对增加治疗剂的剂量是有利的，例如，增加细胞毒性剂或放疗剂的剂量，而不会同时增加有害的毒副作用。

本发明的 tyrphostin 可以是一次给药，或者在一段时间内，例如，在以细胞毒性剂治疗或放疗之前，之中和之后重复给药。

tyrphostin 对人的优选给药方式是静脉内给药，尽管如此通过适当地配制，也可以按其它方式给药，例如肌肉注射，腹膜内注射或口服给药。

虽然 tyrphostin 组合物一般都包含一个 tyrphostin 化合物，但有时也可能以组合物和/或共同给药的形式，包含 2 个或几个 tyrphostin 化合物，它们以协同或补充的方式共同发挥用来对抗由例如治疗过程引起的损伤。

附图简述

图 1A 图解显示用阿霉素处理的小鼠死亡率，与在用阿霉素处理之前二小时接受一次 AG1714 注射给药的小鼠死亡率相比较。

图 1B 图解显示用顺铂处理的小鼠死亡率，与在用顺铂处理之前二小时接受一次 AG1714 注射给药的小鼠死亡率相比较；

图 2 图解显示 21 天内接受 10 次腹膜内注射阿霉素（5 mg/kg，累积剂量 50 mg/kg）的小鼠死亡率，与同样处理，并且在每次阿霉素注射之前二小时接受一次 AG1714 腹膜内注射（5 mg/kg）的小鼠死亡率相比较；

图 3 图解显示仅用顺铂处理的，或者在顺铂给药后的 10 天时间内以顺铂和 AG1801 处理的小鼠死亡率；

图 4 图解显示仅用阿霉素处理的，或者在阿霉素给药后 10 天的时

间内以 tyrphostin 化合物和阿霉素处理的小鼠死亡率;

图 5 图解显示多种 tyrphostin 化合物对顺铂处理小鼠肾毒作用的影响。这种毒性作用是通过检测被处理小鼠血清中肌酸酐的水平来测定的, 高水平肌酸酐表明肾脏受损伤 (肾毒性);

5 图 6 图解显示对小鼠仅给予顺铂或 AG1714, 或者合并给予顺铂和 AG1714 后, 血清中的肌酸酐 (图 6A) 和血脲氮 (BUN) (图 6B) 水平 (它们表明肾毒性)。此肌酸酐和 BUN 水平与只给予赋形剂的对照小鼠血清中相同物质的水平相比较;

10 图 7 的照片显示对仅给予顺铂的小鼠, 或在给予顺铂之前先给予 tyrphostin AG1714 的小鼠所进行的肾脏 (图 7A-C) 和小肠 (图 7D-F) 的组织病理学分析。最后的放大倍数为 $\times 400$;

图 7A - 未处理的正常小鼠肾组织;

图 7B - 仅给予顺铂的小鼠肾组织, 显示近曲小管内有蛋白质大斑块;

15 图 7C - 在给予顺铂之前先给予 AG1714 的小鼠肾组织, 显示正常的肾组织结构;

图 7D - 未处理的小鼠小肠组织;

图 7E - 仅给予顺铂的小鼠小肠组织, 显示严重的坏死和损伤;

20 图 7F - 在给予顺铂之前先给予 AG1714 的小鼠小肠组织, 显示正常的小肠组织结构;

图 8 图解显示仅给予抗 - FAS 抗体注射液的小鼠, 或者合并给予 tyrphostin AG1801 的小鼠血清中二种转氨酶, 天冬氨酸转氨酶 (AST) 和丙氨酸转氨酶 (ALT) 的水平。转氨酶的高水平表明抗 - FAS 抗体诱发了对肝脏的损伤 (肝毒性),

25 图 9 图解显示, 仅给予抗 - FAS 抗体注射液的小鼠, 或者合并给予 tyrphostin AG1714 的小鼠血清中二种转氨酶 AST 和 ALT 的水平, 转氨酶的高水平表明抗 - FAS 抗体诱发了对肝脏的损伤 (肝毒性);

图 10 图解显示, 仅用 Con A 处理的小鼠, 或者合并给予 AG1714 的小鼠血清中 AST 和 ALT 水平;

30 图 11 图解显示用 TNF/GalN 处理的小鼠, 或者合并给予 tyrphostin AG1714 的小鼠血清中 AST 和 ALT 水平;

图 12 图解显示, 仅以阿霉素处理的, 仅以 AG1714 处理的, 或者

以它们合并处理的小鼠股骨骨髓中，具核骨髓细胞的数量（图 12A），或集落形成单位（CFU）（图 12B）的数量；

图 13 图解显示，仅以阿霉素处理的，或者以 AG1714 和阿霉素处理的小鼠骨髓中具核细胞的数量；

5 图 13A 显示给予不同剂量阿霉素的小鼠骨髓中具核细胞的数量；

图 13B 显示用阿霉素处理后，在不同时间被处理小鼠的骨髓中具核细胞的数量；

图 14 图解显示，仅以阿霉素处理的，或者在阿霉素给药之前先以 AG1714 处理的小鼠脾重量（图 14A）和胸腺重量（图 14B）；

10 图 15 图解显示仅以 5FU 处理的，或者以 5FU 和 AG1714 处理的小鼠股骨中具核骨髓细胞的数量；

图 16 图解显示仅以丝裂霉素 - C 处理的，或者以丝裂霉素 - C 和 AG1714 处理的小鼠股骨中具核骨髓细胞的数量；

15 图 17 图解显示仅以阿霉素处理的，或者在阿霉素给药之前不同时间以 AG1801 处理的小鼠骨髓中具核细胞的数量；

图 18 图解显示放射性照射的小鼠（300R）和照射之前先以 tyrphostin AG1714 处理的小鼠骨髓中具核细胞的数量；

图 19 图解显示放射性照射的小鼠（450R）和照射之前先以 tyrphostin AG1714 处理的小鼠骨髓中细胞的数量；

20 图 20 图解显示以致死剂量照射（800R）后小鼠的死亡率，同在照射之前用 tyrphostin AG1714 处理的小鼠死亡率相比较，显示照射后 23 天内的死亡率；

25 图 21 图解显示以 MCA-105 肌纤维瘤细胞（图 21A），路易士肺癌细胞（图 21B），或 B-16 黑素瘤细胞（图 21C）接种的，并且用顺铂或 AG1714 单独治疗，或者用顺铂和 AG1714 合并治疗的小鼠肺重量；

图 22 图解显示负有 SK-28 人黑素瘤细胞肿瘤的，并且用阿霉素，AG1714 或用它们合并治疗的裸鼠肺重量；

30 图 23 图解显示在用顺铂或 AG1714 单独治疗，或者用它们合并治疗的小鼠中，人卵巢癌肿瘤（OVCAR-3）的体积；

图 24 图解显示，在上面图 23 中所述的，反复接受给药治疗的小鼠中，OVCAR-3 肿瘤的体积；

图 25 图解显示, 在用顺铂或 AG1801 单独治疗, 或用此二者合并治疗的 (图 25A), 或者用阿霉素, 或 AG1801 单独治疗, 或用它们合并治疗的 (图 25B) 负有 MCA-105 肌纤维瘤的小鼠中肺的重量;

图 26 图解显示用顺铂或 AG1801 单独治疗的, 或者用此二者合并治疗的小鼠肺重量;

图 27 图解显示, 在含有或不含有各种浓度 AG1714 下生长的骨髓细胞培养物中, 集落形成单位 (CFU) 的数量;

图 28 图解显示, 存在或不存在 AG1714 下生长的胸腺细胞, 在对细胞加入 AG1714 后不同时间的生存能力;

图 29 图解显示, 作为细胞生存能力指示的, 存在或不存在 AG1714 下生长的培养心肌细胞每分钟的搏动次数;

图 30 图解显示, 存在或不存在 AG1714 时, 以鼠腹膜渗出物胞毒淋巴细胞 (PEL) 胞溶 EL-4 靶细胞而导致其特异性 ^{51}Cr 释放的百分数来测定的细胞溶解百分数。

制备实施例

在下面的制备实施例中, 示范性地制备了几个上述的新颖化合物。在下面所有的实施例中, 这种新颖化合物是通过醛与丙二腈或其取代的酰胺, 进行 Knoevenagel 缩合反应来合成的。

实施例 1 - AG1801:

将 0.45 g, 3 mM 对 - 硝基苯甲醛, 0.61 g, 3.5 mM N - (氯基乙酰) 苯酰胺 (参考文献 9) 和 50 mg β - 丙氨酸在 20 ml 乙醇中回流加热 5 小时。冷却, 过滤后得到 0.67 g 淡黄色固体物, 产率 73 %, mp -164°。NMR(CDCl_3) δ 8.44(1H, s, 乙烯基), 8.35, 8.07(4H, AB, $J_{AB}=8.8$ Hz), 7.35(5H, m), 6.6(1H, br. t, NH), 4.63(2H, d, $J=5.8$ Hz)。

MS-m/e 307(M^+ , 50%), 290(M-HCN, 63), 260(M-H- NO_2 , 91), 201(M-NHCH $_2$ C $_6$ H $_5$, 15), 173 (M-CONHCH $_2$ C $_6$ H $_5$, 13), 155(22), 127(21), 105(100)。

实施例 2 - AG1798:

将 0.4 g 2.65 mM 对 - 硝基苯甲醛, 0.57 g, 2.8 mM N (氯基乙酰)

3 - 丙苯酰胺 (参考文献 9) 和 40 mg β - 丙氨酸在 30 ml 乙醇中回流加热 4 小时。然后通过蒸发使此溶液浓缩, 冷却, 过滤后得到 0.38 g 淡黄色固体物, 产率 43 %, mp -98°。

NMR(CDCl₃) δ 8.38 (1H, S, 乙烯基), 8.35, 8.06 (4H, ABq, J_{AB}=8.6 Hz), 7.3(5H, m), 3.50(2H, J=8.0 Hz), 2.74(2H, t, J=8.0 Hz), 2.0(2H, 五重峰, J=8.0 Hz)。

实施例 3 - AG1719:

将 146 mg, 0.87 mM 3 - 羟基 4 - 硝基苯甲醛, 48 mg, 0.89 mM 丙二腈二聚物和 20 mg β 丙氨酸, 在 10 ml 乙醇中回流加热 1 小时。蒸发后以 CH₂Cl₂- 己烷研磨, 过滤得到 190 mg 黄色固体物, 产率 78 %, mp -105°。NMR(丙酮 d₆) δ 8.32(1H, d, J=8.6 Hz), 8.20(1H, S, 乙烯基), 7.77 (1H, d, J=2.2 Hz), 7.65(1H, dd, J=8.6, 2.2 Hz)。

15 实施例 4 - AG1762:

将 170 mg, 1 mM 3 - 氟 4 - 硝基苯甲醛, 80 mg, 1.2 mM 丙二腈和 15 mg β - 丙氨酸回流加热 1 小时, 蒸发后以己烷研磨, 过滤得到 202 mg, 粉红色固体, 产率 93 % mp -120°。NMR(CDCl₃) δ 8.22(1H, m), 7.83(3H, m)。

20 MS-m/e 217(M⁺, 100), 187(M-NO, 78), 171(M-NO₂, 19), 159(M-NO-HCN-H, 80), 151(M-NO₂-HF, 33), 144(M-NO₂-HCN, 71), 132(75), 124(M-NO₂-HCN-HF, 81)。

实施例 5 - AG1799:

25 将 0.4 g 2.65 mM 4 - 硝基苯甲醛, 0.51 g, 2.8 mM 苯磺酰乙腈和 40 mg β - 丙氨酸, 在 30 ml 乙醇中回流加热 4 小时。冷却后过滤, 并用乙醇洗, 得到 0.68 g 淡黄色固体, 产率 82 %, mp -158°。NMR(CDCl₃) δ 8.36(2H, d, J=8.6 Hz), 8.31(1H, S, 乙烯基), 8.07(4H, m), 7.70(3H, m)。

30 生物活性和治疗活性实施例

在下面的非限制性实施例中, 将必要时参照附图, 对可用于本发明组合物的某些化合物的生物活性和治疗作用, 作例证性说明。

I. 用 tyrphostin 化合物降低由阿霉素或顺铂引起的小鼠死亡率

实施例 6

将 6 周龄的雌性 CD1 小鼠如下分组:

- 5 i. 腹膜内注射 (i. p) 阿霉素 (20 mg/kg) 的小鼠,
- ii. 腹膜内注射顺铂 (14 mg/kg) 的小鼠,
- iii. 在给予阿霉素之前 2 小时, 一次腹膜注射 AG1714 (20 mg/kg)
的小鼠,
- 10 iv. 在给予顺铂之前 2 小时, 一次腹膜注射 AG1714 (20 mg/kg)
的小鼠。

如图 1 中可见, 与仅给予阿霉素的小鼠死亡率 ($P \leq 0.001$) (图 1A), 或仅给予顺铂的小鼠死亡率 ($P \leq 0.005$) (图 1B) 相比较, 以 AG1714 处理的小鼠, 显著地降低了小鼠的死亡率。

15 实施例 7

将 6 周龄的雌性 CD1 小鼠分为如下二组:

- i. 在 21 天内, 以每次注射 5 mg/kg 的剂量, 进行 10 次腹膜内阿霉素注射 (累积剂量为 50 mg/kg) 的小鼠,
- 20 ii. 在 21 天内, 以 5 mg/kg 的剂量进行 10 次腹膜内阿霉素注射, 并
在每次阿霉素注射之前 2 小时, 补充一次腹膜内注射 AG1714 (5
mg/kg) 的小鼠。

每组由 10 只小鼠组成, 并如上面所述, 对每组小鼠的死亡百分率进行检验。

- 25 如图 2 中可见, 与仅用阿霉素处理的小鼠的高死亡率相比较, 在每
次阿霉素给药之前给予 AG1714 注射液的小鼠的死亡率显著降低了。

实施例 8

- 30 对二组 CD1 小鼠如上所述注射顺铂 14mg/kg。其中一组在给予顺
铂注射液之前 2 小时, 以 1 mg/kg 的低剂量腹膜内给予一次 AG1801 注
射液。如在图 2 中可见, 仅给予顺铂组中的所有小鼠, 在注射后 10 天
内全死亡。与此对比, 在顺铂注射之前给予一次低剂量 AG1801 注射液
的小鼠组中, 死亡率仅为 20 %。

实施例 9

将 CD1 小鼠分成如下 5 组:

- i. 腹膜内一次注射阿霉素 20 mg/kg 的小鼠,
- 5 ii. 腹膜内一次注射 AG1714 20 mg/kg 的小鼠, 并在 2 小时后腹膜内注射阿霉素 20 mg/kg,
- iii. 腹膜内一次注射 AG1782 20 mg/kg, 并在 2 小时后腹膜内注射阿霉素 20 mg/kg 的小鼠,
- 10 iv. 腹膜内一次注射 AG126 20 mg/kg, 并在 2 小时后腹膜内注射阿霉素 20 mg/kg 的小鼠。

通过每天记录死亡小鼠的数目, 直到注射后 10 天, 来确定上面各组小鼠的百分死亡率。

如图 10 所示, 在仅给予阿霉素的小鼠组 (i) 中, 在注射后的 1 周内, 90 % 的小鼠死亡了。在阿霉素给药之前给予 tyrphostin 化合物的
15 其它小鼠组中, 死亡率降低到 50 % (iii) - 10 % (ii)。

II. 用 tyrphostin 化合物降低多种有害药物试剂对受处理小鼠

器官 (肾, 肝, 肠, 心) 的毒性作用

实施例 10

20 对每组包括 3 只小鼠的多组 CD1 小鼠, 以 14 mg/kg 的剂量腹膜内注射顺铂。在注射顺铂之前 2 小时, 对除 1 组以外的各级小鼠以 10 mg/kg 的剂量腹膜内注射了一次 tyrphostin 化合物。为了测定顺铂对受处理小鼠肾的毒性作用 (肾毒性), 顺铂给药后 4 天, 用 Sigma 生产的商品试剂盒, 检测了每只小鼠血清中肌酸酐的水平。

25 如在图 5 中可见, 在仅给予顺铂的小鼠血清中检测的肌酸酐水平是大约 2 mg/dl, 表明这些小鼠的肾功能降低了大约 50 %。与仅给予顺铂的小鼠血清中肌酸酐水平相比较, 在顺铂注射给药之前给予 tyrphostin 化合物注射液的许多小鼠血清中, 测定到较低水平的肌酸酐。这表明, 在顺铂注射给药之前注射 tyrphostin 化合物, 可降低顺铂
30 对肾功能的毒性作用。不同的 tyrphostin 化合物对降低顺铂肾毒性的作用各不相同。例如, AG1824, AG1744, AG1751, AG1714, AG1823, AG1782, AG1801 明显地降低了顺铂的肾毒性, 使血清中

这些结果表明，由于给予小鼠顺铂，既产生了肾毒性，又导致了肝损伤。如图 6 和表 2 所示，在注射顺铂之前 2 小时给予 AG1714，导致所有 4 个检测参数降低至对照小鼠所测定的正常水平。

5

表 2

AG1714 对顺铂诱发的肾和肝损伤的预防作用

处理	ALT u/L	AST u/L
对照 (赋形剂)	30±4.7	58±1.5
顺铂(14 mg/kg)	73.5±2.1	209±16.0
顺铂(14 mg/kg) +AG1714 (20mg/kg)	36±3.6	70±14.0

实施例 13

对 CD1 小鼠以 14 mg/kg 顺铂注射给药，或者先腹腔内注射一次 tyrphostin AG1714，2 小时后注射 14 mg/kg 顺铂。用甲醛固定的组织切片，以苏木精伊红染色，对未经处理和经处理小鼠的肾和小肠进行了组织病理学分析。

如图 7 中所示，在仅给予顺铂的小鼠肾脏，近曲小管中显示有大的蛋白质斑块（7B），以及在柱状上皮中显示有颗粒状物质。与此相对照，在给予顺铂之前注射 AG1714 的小鼠肾脏（7C）没有显示出损伤，它们的结构与对照小鼠的（7A）相似。

也如图 7 中所示，仅给予顺铂的小鼠小肠（7E）显示有小肠柱状上皮细胞严重坏死和瓦解，相比之下，在顺铂给药之前给予 AG1714 的小鼠小肠（7F），显示出类似于在未受处理的小鼠小肠（7D）中所见到的正常结构。

实施例 14

为了测定 AG1714 对阿霉素诱发的心脏毒性的预防作用，按照标准化程序（在如下文献中所述：毒物学体外试验，模型系统和方法，McQueen. Telford Press New Jersey 出版，1990，163 页，新生大鼠心肌细胞的初级培养物；和 Kessler-Icekson, G., J. Mol Cell Cardiol. 20:



649-755, 1988) 制备了 7 天的初级大鼠心肌细胞培养物。

将此心肌细胞培养物分成如下 4 组:

i. 仅给予赋形剂的细胞 (对照),

ii. 以 20 μM 最后浓度给予 AG1714 的细胞,

5 iii. 以 10 μM 的浓度给予阿霉素的细胞, 和

iv. 以 20 μM 最后浓度给予 AG1714 后 1 小时再加入阿霉素 (10 μM) 的细胞。

开始温育后 24 小时测定心肌细胞丛 (“微小的心脏”) 的搏动速度。

10 如表 3 中所示, 在仅以阿霉素温育的细胞培养物中, 每分钟搏动次数显著地降低至仅以赋形剂温育的对照培养物搏动次数的大约 20 %。相比之下, 在以阿霉素和 AG1714 一起温育的培养物中, 每分钟搏动的次数类似于在对照培养物中每分钟搏动的次数。在温育后 16 小时和 40 小时, 在上面的心肌细胞培养物中也看到了类似的结果 (未报告)。因此, 在加入阿霉素之前 1 小时以 AG1714 温育此培养物, 可预防阿霉素对细胞培养物的心脏毒性作用。

表 3

AG1714 对阿霉素诱导的心脏
毒性的预防作用, 体外试验

20

处理	细胞搏动 (搏动数/分)
对照 (赋形剂)	78 $\pm$ 2.0
AG1714(20 μM)	68 $\pm$ 2.2
阿霉素(10 μM)	15 $\pm$ 1.3
阿霉素 +AG1714	62 $\pm$ 2.6

实施例 15

FAS 抗原是一种细胞表面蛋白, 属于双因子/神经生长因子受体家族, 已显示具有介导细胞程序性死亡的作用 (Itoh, N, 等人, Cell. 66: 233-243 (1991))。对小鼠腹膜内给予抗 - FAS 抗体, 导致严重的细胞

程序性死亡的肝损伤。

为了测定 tyrphostin AG1801 和 AG1714 对于抗 - FAS 抗体诱发肝毒性的作用, 给 Balb/C 小鼠腹膜内注射 AG1801 (5 mg/kg) 或 AG1714 (5 mg/kg)。2 小时后以 5 μ g/只小鼠的剂量腹膜内注射抗 - FAS 抗体。另一组小鼠仅给予抗 - FAS 抗体注射液, 预先未接受 tyrphostin 处理。注射抗 - FAS 抗体后 5 小时将动物处死, 测定处死小鼠血清中二种转氨酶 AST 和 ALT 的水平: 这一种转氨酶的高水平可指示肝毒性 (Ogasaware, J. 等人, Nature, 364: 806-809, 1993)。

如图 8 和 9 中所示, 仅以抗 - FAS 抗体处理的小鼠血清中 AST 和 ALT 的水平非常高, 表明 FSA 抗体诱发了肝毒性。

对比之下, 在注射抗 - FAS 之前以 AG1801 (图 8) 或 AG1714 (图 9) 处理的小鼠血清中, 二种转氨酶 AST 和 ALT 的水平显著降低。因此, 对小鼠给予 tyrphostin 化合物, 可使之产生对抗由抗 - FAS 抗体诱发的肝毒性的作用。

实施例 16

T - 细胞介导的肝毒性是多种紊乱的疾病如乙型肝炎病毒感染的并发症。这种肝毒性可通过注射伴刀豆球蛋白 A (Con A) 来诱发。按如下方法 (见 Tiegs, G. 等人, J. Clin. Invest. 90: 196-203, 1992) 测定了 AG1714 对 Con A 诱发的小鼠肝毒性的作用。

将 CD1 小鼠分成如下各组:

- i. 小鼠仅给予赋形剂注射液 (对照组);
- ii. 小鼠腹膜内注射 AG1714 (10 mg/kg);
- iii. 小鼠静脉内注射 Con A (35 mg/只); 和

iv. 小鼠腹膜内注射 AG1714 (10 mg/kg), 2 小时后静脉内注射 Con A (35 mg/只)。

小鼠注射 Con A 之后 6 小时, 如上所述测定经处理小鼠血清中肝脏酶 AST 和 ALT 的水平。这二种酶血清中含量增加反映出肝损伤。

如图 10 中所示, 单独给予 AG1714 对小鼠没有影响, 而注射 Con A 对小鼠引起了显著的肝毒性。Con A 给药之前给予 AG1714, 显著地降低了 Con A 对这些小鼠诱发的肝毒性。

5 体内注射半乳糖胺和 TNF - α 诱发肝损伤 (见 Leist, M. 等人, J. Immunol. 153: 1778-1788, 1994)。

将小鼠分成如下 4 组:

- 10 ii. 腹膜内注射 1 次 AG1714 (10 mg/kg) 的小鼠;
iii. 静脉内注射人 TNF - α (0.25 μ g/只) 并同时腹膜内注射半乳糖胺 (Gal N) (18 ml/只) 的小鼠; 和
iv. 接受如上述第 iii 组处理的小鼠, 在注射 TNF/Gal N 之前 2 小时, 腹膜内注射 1 次 AG1714 (10 mg/kg)。

15 注射 TNF/Gal N 之后 7 小时, 如上所述测定各处理组小鼠血清中肝脏酶 AST 和 ALT 的水平。

如图 11 中可见, 在对小鼠给予 TNF/Gal N 之前注射 AG1714, 显著地降低了由于 TNF/Gal N 给药诱发的肝毒性。因此, tyrphostin 化合物可用于减少由变种免疫机制诱发的肝损伤。

III. 用 tyrphostin 化合物可降低多种有害药物活性剂对具核骨髓细胞和淋巴细胞的毒性作用 (骨髓毒性和淋巴毒性)

实施例 18

将 CD1 小鼠分成如下各组:

- 25 i. 小鼠仅腹膜内注射阿霉素 (10 mg/kg) ,
 ii. 小鼠先腹膜内注射 AG1714 (20 mg/kg) , 2 小时后腹膜内注射阿霉素 (10 mg/kg) , 和
 iii. 小鼠先注射一次赋形剂, 2 小时后腹膜内注射阿霉素 (10 mg/kg) 。

30 三天后测定受处理小鼠股骨中具核骨髓细胞和集落形成单位 (CFU) 的数量 (Nikerich, D. A. 等人 J. Immunopharmacol. 8: 299-313, 1986)。每组包括 3 只小鼠, 结果以平均值 $\pm$ SD 表示。

如图 12 中所示, 对小鼠注射阿霉素, 3 天后引起了骨髓毒性, 表现为具核细胞数量减少了 47 % (图 12A), CFU 减少了 55 % (图 12B)。在注射阿霉素之前 2 小时以 AG1714 预处理的小鼠, 完全防止了这种骨髓毒性作用。

5

实施例 19

还研究了 AG1714 对由不同剂量阿霉素诱发的骨髓毒性的作用。按实施例 18 中所述方法处理小鼠。在阿霉素给药后 3 天 (图 13A) 和不同的时间 (图 13B), 测定受处理的小鼠中股骨具核骨髓细胞的数量。

10 如图 13A 中所示, 以 10 mg/kg 和 15 mg/kg 的剂量对小鼠给予阿霉素, 在受处理小鼠中诱发了骨髓毒性。以 AG1714 预处理, 显著地降低了阿霉素诱发的骨髓毒性。

如图 13B 中所示, 以 AG1714 预处理的阿霉素给药小鼠, 也可导致阿霉素给药后骨髓细胞迅速恢复正常。单独用阿霉素 (15 mg/kg) 处理时, 5 天后受处理小鼠股骨中骨髓细胞的数量仍然相当低。在阿霉素给药之前以 AG1714 预处理小鼠, 在此时, 它们的骨髓细胞已完全再生了。

实施例 20

20 CD1 小鼠受腹膜内注射 1 次阿霉素 (10 mg/kg), 或者先腹膜内注射 1 次 AG1714 (20 mg/kg), 2 小时后腹膜内注射阿霉素 (10 mg/kg)。阿霉素给药后 72 小时处死小鼠, 测量小鼠的脾重量和胸腺重量, 作为淋巴毒性的参数。每个实验组由 3 只小鼠组成, 结果以细胞平均数 $\pm$ SD 表示。以仅接受赋形剂注射, 而不接受阿霉素注射的小鼠作为对照。

25

如下面图 14 中所示, 单独给予阿霉素, 导致小鼠的脾重量 (图 14A) 和胸腺重量 (图 14B) 显著减少。通过在给予阿霉素之前 2 小时给予小鼠 AG1714, 显著地降低了阿霉素的这种骨髓毒性和淋巴毒性作用。

30

实施例 21

对 CD1 小鼠以 50 mg/kg 的剂量腹膜内注射 1 次环磷酰胺, 并分成

如下几组:

i. 小鼠在给予环磷酰胺之前 2 小时, 仅接受 1 次赋形剂腹膜内注射,

5 ii. 小鼠在给予环磷酰胺之前 2 小时, 接受 1 次 AG1714 (20 mg/kg) 腹膜内注射,

iii. 小鼠在给予环磷酰胺之前 2 小时, 接受 1 次 AG1801 (2.5 mg/kg) 腹膜内注射。

10 环磷酰胺给药后 72 小时处死小鼠, 对小鼠骨髓中的具核细胞数量, 脾和胸腺的重量进行测定。每个实验组由 3 只小鼠组成, 结果以各组细胞平均数 $\pm$ SD 表示。

15 如表 4A 和 4B 中可见, 给予环磷酰胺导致骨髓、脾和胸腺中具核细胞数量显著减少, 指示环磷酰胺的骨髓毒性和淋巴毒性作用。在给予环磷酰胺之前给予 tyrphostin AG1714 或 AG1801, 导致环磷酰胺在上述 3 个器官中的骨髓毒性和淋巴毒性作用降低。虽然以 tyrphostin 化合物处理的小鼠骨髓, 脾和胸腺中具核细胞的数量尚未达到对照鼠的水平, 与仅接受环磷酰胺的小鼠相比较, 这些小鼠器官中具核细胞的数量较高。

表 4a 和 4b
AG1714 和 AG1801 防止环磷酰胺诱发的骨髓毒性和淋巴毒性

处理	骨髓中具核细胞数量 ($\times 10^6$)		脾 (mg)		胸腺 (mg)	
	AG1714 (20 mg/kg)					
赋形剂	-	+	-	+	-	+
	17.3±1.33	17.9±1.1	109±20.0	112±11.3	75±4.0	71±9.8
环磷酰胺(50mg/kg)	6.2±0.31	11.2±0.6	52±2.5	87±2.0	39±6.1	57±3.6

处理	骨髓中具核细胞数量 ($\times 10^6$)		脾 (mg)		胸腺 (mg)	
	AG1801 (2.5 mg/kg)					
赋形剂	-	+	-	+	-	+
	17.3 $\pm$ 1.33	18.6 $\pm$ 1.0	109 $\pm$ 20.0	97 $\pm$ 1.52	75 $\pm$ 4.0	74 $\pm$ 7.9
环磷酰胺(50mg/kg)	6.2 $\pm$ 0.31	10.9 $\pm$ 0.9	52 $\pm$ 2.5	69 $\pm$ 0.58	39 $\pm$ 6.1	57 $\pm$ 5.6

实施例 22

将 CD1 雌性小鼠分成如下各组:

- i. 对照组仅 1 次腹膜内注射赋形剂（助溶剂：丙烯碳酸酯 - Cremophor - 生理盐水），
- 5 ii. 小鼠以 80 mg/kg 的剂量接受 1 次腹膜内注射 5 - 氟尿嘧啶（5FU）。
- iii. 小鼠以 20 mg/kg 的剂量接受 1 次腹膜内注射 AG1714，
- iv. 小鼠以 2.5 mg/kg 的剂量接受 1 次腹膜内注射 AG1801，
- v. 小鼠以 5 mg/kg 的剂量接受 1 次腹膜内注射 AG1843，
- 10 vi. 小鼠先接受 1 次腹膜内 AG1714（20 mg/kg）注射，2 小时后腹膜内注射 1 次 5FU（80 mg/kg），
- vii. 小鼠先接受 1 次腹膜内 AG1801（2.5 mg/kg）注射，2 小时后腹膜内注射 1 次 5FU（80 mg/kg），
- viii. 小鼠先接受 1 次腹膜内 AG1843（5 mg/kg）注射，2 小时后
- 15 腹膜内注射 1 次 5FU（80 mg/kg）。

对小鼠 5FU 给药后 5 天, 将小鼠处死, 测定一根股骨的骨髓中具核细胞的数量。每组由 2 只或 3 只小鼠组成, 结果以细胞平均数 $\pm$ SD 表示。

如图 15 中所示。给予 5FU 导致这些小鼠骨髓中具核细胞数量减少。在给予 5FU 之前先给予 AG1714，导致显著较低小鼠的骨髓中细胞数量减少。因此，AG1714 降低了 5FU 对这些小鼠的骨髓毒性作用。

实施例 23

将 CD1 雌性小鼠分成如下各组:

- 25 i. 对照组仅接受 1 次腹膜内注射赋形剂（助溶剂：丙烯碳酸酯 - Cremophor - 生理盐水），
- ii. 小鼠以 2 mg/kg 的剂量接受 1 次腹膜内注射丝裂霉素 - C，
- iii. 小鼠以 20 mg/kg 的剂量接受 1 次腹膜内注射 AG1714，
- iv. 小鼠先接受 1 次腹膜内 AG1714 注射（20 mg/kg），2 小时后
- 30 腹膜内注射 1 次丝裂霉素 - C（2mg/kg）。

如上面实施例 22 中所述, 给予小鼠丝裂霉素 - C 5 天后将小鼠处死, 测定 1 根股骨的骨髓中具核细胞的数量。每组由 2 只或 3 只小鼠组

成，结果以所计数的细胞平均数 $\pm$ SD 表示。

如图 16 中所示，仅给予丝裂霉素 - C 的小鼠显示出非常低的骨髓中具核细胞计数。虽然单独给予 AG1714 对小鼠没有作用，但是，在给予丝裂霉素 - C 之前先给予 AG1714，导致降低了丝裂霉素 - C 对这些小鼠的骨髓毒性作用，几乎提供了对丝裂霉素 - C 有害毒性的完全预防作用，使这些小鼠骨髓中具核细胞的计数达到仅给予助溶剂的对照小鼠的水平。

实施例 24

- 10 测定了不同剂量的 AG1801 对抗阿霉素诱发小鼠骨髓毒性的作用。将 CD1 小鼠分成如下 5 组：
 - i. 小鼠仅接受赋形剂，
 - ii. 小鼠仅接受阿霉素（10 mg/kg），
 - 15 iii. 小鼠在给予阿霉素之前 2 小时，先接受腹膜内注射 AG1801（0.5 mg/kg），
 - iv. 小鼠在给予阿霉素之前 2 小时，先接受腹膜内注射 AG1801（1 mg/kg），
 - v. 小鼠在给予阿霉素之前 2 小时，先接受腹膜内注射 AG1801（2mg/kg）。
- 20 阿霉素给药三天之后将小鼠处死，如上所述测定骨髓中具核细胞的数量。

如图 17 中所示，给予小鼠 AG1801，具有剂量相关的对抗阿霉素诱发骨髓毒性的预防作用。

25 IV. 用 tyrphostin 化合物可降低放射作用诱发的毒性

实施例 25

为了测定 tyrphostin AG1714 对受放射处理小鼠的防御活性，将用钴源以 300R 放射性剂量照射的 CD1 小鼠分成如下二组：

- ii. 小鼠未接受其它处理，和
- 30 ii. 小鼠在受照射之前 2 小时接受 1 次 20 mg/kg 剂量的 tyrphostin AG1714 腹膜内注射。

第 3 组小鼠仅接受 1 次 AG1714（20 mg/kg）注射，第 4 组小鼠未

作处理，作为正常对照小鼠。

在照射后不同的时间处死小鼠，测定 1 根股骨的骨髓中细胞的数量。

如图 18 中所示，与未受处理的小鼠，或仅以 AG1714 处理的小鼠相比较，用 300 R 照射小鼠，引起这些小鼠骨髓中细胞数量减少了。大约放射处理后 5 天，受照射小鼠骨髓中开始细胞再生。以 AG1714 预处理受照射的小鼠，可防止受照射小鼠骨髓中细胞数量减少，并引起了小鼠骨髓中细胞数量非常显著地增加。因此，tyrphostin AG1714 对放射处理引起的骨髓毒性具有预防作用。

10

实施例 26

如上面实施例 25 中所述方法，测定了 tyrphostin AG1714 对大剂量照射（450R）引起的骨髓毒性的预防作用，不同的是照射剂量是 450R 而不是 300R。

如图 19 中所示，以 450R 照射的小鼠，照射后 5 天骨髓中的细胞数量显著减少了，表明这种照射对小鼠具有严重的骨髓毒性作用。照射后 5 天骨髓中的细胞数量开始再生，但是，照射后 18 天受照射小鼠骨髓中的细胞数量仍然显著低于未受处理的小鼠或仅给予 AG1714 的小鼠骨髓中的细胞数量。对于照射之前给予 AG1714 的小鼠骨髓，直到照射后 5 天骨髓毒性作用仍然可见。但是 5 天后，可见这些小鼠骨髓中的细胞数量显著地恢复，到照射后 18 天，给予 AG1714 的受照射小鼠骨髓中的细胞数量已高于对照小鼠的细胞数量。因此，给予 AG1714 可促进受大剂量照射的小鼠骨髓中细胞数量的再生。

25 实施例 27

用钴源以致死剂量 800R 照射 CD1 小鼠，小鼠被分成 2 组：

i. 小鼠仅接受照射处理；和

ii. 小鼠在受照射之前 1 小时，接受 1 次 20 mg/kg 剂量的 AG1714 腹膜内注射。

每组由 10 只小鼠组成，通过记录照射后每天死亡小鼠的数目，测定每组的死亡率。

如图 20 所示，接受 800 R 照射的小鼠组，照射后 10 天小鼠开始死

亡，照射后 23 天这组小鼠的死亡率达到 80 %。相比之下，在照射之前接受 AG1714 的小鼠组，照射之后 20 天其死亡率显著地降低为 20 %。

这二组的死亡率直到照射之后 50 天未进一步改变。

5 V. tyrphostin 化合物对化学治疗剂抗肿瘤活性的影响

实施例 28

应用多种小鼠肿瘤实验模型测定了 AG1714 对化学治疗剂抗肿瘤作用的影响。

10 分别在 C57 BL 小鼠尾静脉注射 MCA-105 肌纤维瘤细胞或 Lewis 肺癌细胞 2×10^5 /只，以及 B-16 黑素瘤细胞 5×10^4 /只。

肿瘤细胞接种后 4 天腹膜内注射顺铂（4 mg/kg）。给予顺铂之前 2 小时腹膜内注射 AG1714（20 mg/kg）或赋形剂。肿瘤细胞接种后 24 天处死小鼠，测定肺的重量和转移病灶数量。每组包括 5 只小鼠，结果以平均肺重量 $\pm$ SE 表示。

15 从图 21A 可见，顺铂明显地抑制了 MCA-105 肌纤维瘤的生长。AG1714 本身也具有轻微的抗肿瘤作用。以 AG1714 和顺铂合并治疗，象单独给予顺铂一样，有效地抑制了已形成的 MCA-105 肺转移病灶的生长。顺铂和 AG1714 本身都对 Lewis 肺癌具有部分抗肿瘤作用。以 AG1714 和顺铂合并治疗也比顺铂能更有效地抑制已形成的这种肿瘤肺
20 转移病灶的生长（图 21B）。

顺铂（4 mg/kg）或 AG1714（20 mg/kg）单独对已形成的 B-16 黑素瘤肺转移都没有效果（图 21C）。以这二种药物合并治疗，比以每一种药物单独治疗都更有效。

25 实施例 29

按如下方法测定阿霉素和 AG1714 对裸鼠体内 SK-28 人黑素瘤细胞异种移植瘤的作用：

30 以 SK-28 人黑素瘤细胞 4×10^5 /只，静脉注射接种无胸腺 CD1 小鼠（nu/nu）。肿瘤接种后 4 天腹膜内注射阿霉素（4 mg/kg）。在给予阿霉素之前 2 小时注射 AG1714（20 mg/kg）或赋形剂。肿瘤接种后 24 天，测定经治疗小鼠的肺重量和肺内转移病灶数量。每组包括 5 只小鼠，结果以平均值 $\pm$ SE 表示。

从图 22 中可见,阿霉素明显地抑制了 SK-28 肿瘤的生长,而 AG1714 本身也具有轻微的抗肿瘤作用。以 AG1714 预处理不会削弱阿霉素单独抑制这种肿瘤生长的作用。

5 实施例 30

以人卵巢癌 (OVCAR-3) 细胞皮下注射接种无胸腺小鼠 (3×10^6 个细胞/部位)。肿瘤接种后 4 天注射顺铂 (4 mg/kg)。在给予顺铂之前 2 小时腹膜内注射 AG1714 (20 mg/kg) 或赋形剂。在肿瘤接种后

$$10 \quad 20 \text{ 天, 测定肿瘤的短径 (S) 和长径 (L), 并按公式: } V = \frac{[S^2 \times L]}{2}$$

计算肿瘤的体积 (V)。每组包括 5 只小鼠, 结果以平均值 $\pm$ SE 表示。

如图 23 中所示, 顺铂对负有 OVCAR-3 肿瘤的小鼠其有明显的抗肿瘤作用, 而 AG1714 本身效果较小。给予 AG1714 不会削弱顺铂的化学治疗作用。

从图 24 中可见, 与仅反复注射顺铂或仅反复注射 AG1714 的小鼠肿瘤体积相比较, 反复注射顺铂和 AG1714 的小鼠肿瘤体积较小。

实施例 31

20 通过测定负有 B-16 黑素瘤小鼠的死亡率和它们肺中转移病灶的数量或肺重量, 检测了 AG1714 对大剂量阿霉素效果的影响。

对小鼠静脉内注射 2×10^5 B-16 黑素瘤细胞, 肿瘤接种后 4 天, 对每只小鼠腹膜内注射 1 次阿霉素 (4 mg/kg 或 8 mg/kg)。在注射阿霉素之前 2 小时, 对每只小鼠以 20 mg/kg 的剂量腹膜内注射 AG1714。

25 如表 5A 和 5B 所示, 二组如上所述完成的实验中, 给予小剂量阿霉素, 引起较低的死亡率和显著的治疗作用。给予大剂量阿霉素产生了显著高得多的治疗效果, 但对治疗小鼠引起了高死亡率。AG1714 单独给药也显示它本身有一些治疗作用。以大剂量阿霉素同 AG1714 一起合并给药, 产生了大剂量阿霉素的高治疗效果, 但是, 小鼠的死亡率显著
30 降低了。

表 5

AG1714 对大剂量阿霉素效力和对负有
B-16 黑素瘤小鼠死亡率的影响

5

A.

治疗	肺转移病灶的数目 (+SD)	死亡率 (死亡数/总数)
赋形剂	29±9	0/4
AG1714 (20 mg/kg)	16±5	0/4
阿霉素(4 mg/kg)	7±4	0/4
阿霉素(4 mg/kg) + AG1714 (20 mg/kg)	7±6	0/4
阿霉素(8 mg/kg)	1	3/4(75%)
阿霉素(8 mg/kg) + AG1714 (20 mg/kg)	2±1	0/4
无肿瘤	-	0/4

B.

治疗	肺重量 (mg + SEM)	死亡率 (死亡数/总数)
赋形剂	976±142	0/6
AG1714 (20 mg/kg)	870±178	0/6
阿霉素(4 mg/kg)	306±12	0/6
阿霉素(4 mg/kg) + AG1714 (20 mg/kg)	303±28	0/6
阿霉素(8 mg/kg)	-	7/8(88%)
阿霉素(8 mg/kg) + AG1714 (20 mg/kg)	246±10	2/8(25%)
无肿瘤	232±12	0/3

因此，AG1714 与阿霉素一起合并给药，可导致增强阿霉素的化学治疗作用。与 AG1714 合并给药，大剂量阿霉素的显著治疗作用可以达到，而大剂量阿霉素引起的高死亡率，通过合并给药被中和了。

这种增强作用也可以在以如下方式治疗的，负有 MCA-105 肌纤维瘤的小鼠中看见：仅以阿霉素治疗（表 6A）或仅以顺铂治疗（表 6B），或者以上而每种药物与 AG1714 合并治疗。

表 6

AG1714 对大剂量阿霉素效力和对负有 MCA-105 肌纤维瘤小鼠死亡率的影响

A.

治疗	肺重量 (mg + SEM)	死亡率 (死亡数/总数)
赋形剂	908±107	0/8
AG1714 (20 mg/kg)	632±74	0/6
阿霉素(4 mg/kg)	47±119	0/5
阿霉素(4 mg/kg) + AG1714 (20 mg/kg)	494±137	0/5
阿霉素(8 mg/kg)	170±4	5/8(62.5%)
阿霉素(8 mg/kg) + AG1714 (20 mg/kg)	172±6	2/8(25%)
无肿瘤	161±12	0/4

B.

治疗	肺重量 (mg + SEM)	死亡率 (死亡数/总数)
赋形剂	982±102	0/6
AG1714 (20 mg/kg)	656±127	0/6
阿霉素(4 mg/kg)	420±69	0/6
阿霉素(4 mg/kg) + AG1714 (20 mg/kg)	216±33	0/6
阿霉素(8 mg/kg)	186±16	5/7(71%)
阿霉素(8 mg/kg) + AG1714 (20 mg/kg)	167±5	2/6(33%)
无肿瘤	161±6	0/6

实施例 32

5 按如下方法测定了 AG1801 对顺铂对于负有 MCA-105 肌纤维瘤的小鼠已形成的肺转移病灶，抗转移活性的作用：

将 C57BL 小鼠分成如下几组：

i. 小鼠在 6 周龄时静脉内注射 2×10^5 肌纤维瘤 MCA105 细胞，4 天后接受 1 次仅含有赋形剂的注射，

10 ii. 小鼠在 6 周龄时静脉内注射 2×10^5 肌纤维瘤 MCA105 细胞，4 天后注射 10 mg/kg 顺铂，

iii. 小鼠在 6 周龄时静脉内注射 2×10^5 肌纤维瘤 MCA105 细胞，4 天后注射 10 mg/kg 阿霉素，

15 iv. 小鼠在 6 周龄时静脉内注射 2×10^5 肌纤维瘤 MCA105 细胞，4 天后注射 5 mg/kg AG1801，

v. 小鼠在 6 周龄时静脉内注射 2×10^5 肌纤维瘤 MCA105 细胞，4 天后先注射 5 mg/kg AG1801，2 小时后注射 10 mg/kg 顺铂，

vi. 小鼠在 6 周龄时静脉内注射 2×10^5 肌纤维瘤 MCA105 细胞，4 天后先注射 5 mg/kg AG1801，2 小时后注射 10 mg/kg 阿霉素，

20 vii. 未处理的 C57BL 小鼠。



如图 25A 和 25B 中所示，负有肿瘤的小鼠肺的重量显著地大于对照小鼠。虽然单独注射 AG1801 对肺重量没有影响，但注射顺铂（图 25A）或阿霉素（图 25B），可使小鼠肺的重量减少至接近于未负有肿瘤的对照小鼠的肺重量。合并注射顺铂和 AG1801（图 25A）和合并注射阿霉素和 AG1801（图 25B），导致小鼠肺中肿瘤负荷减少，类似于仅给予顺铂的小鼠肿瘤负荷减少。

上述 4 个实施例的结果清楚地表明，对负有肿瘤的小鼠，以 tyrphostin 化合物和顺铂一起给药，不会影响顺铂的抗肿瘤作用，并且在某些情况下甚至可增加这种作用。

实施例 33

如上面实施例 29 所述方法，测定了顺铂和 AG1801 对裸鼠体内 SK-28 人黑素瘤异种移植肿瘤的作用。

如图 26 所示，单独给予顺铂在一定程度上减少了负有肿瘤小鼠肺的重量，而给予 AG1801，它本身没有治疗作用。AG1801 同顺铂合并给药则显著地减少了受治疗小鼠肺的重量，因此，在给予顺铂之前给予 AG1801，可增强它的治疗作用。

上述实施例清楚地表明，对负有肿瘤的小鼠，同顺铂或阿霉素一起给予 tyrphostin 化合物，不会削弱这些治疗剂的抗肿瘤作用，并且有时甚至可增强这种作用。因此，tyrphostin 化合物可用于提高和增强这些药物的化学治疗作用和效力。

VI. 按如下方法测定了 AG1714 对各种细胞在体外生存能力的作用

实施例 34

通过在 histopaque 上作梯度离心，制备鼠骨髓具核细胞。然后将细胞分为二组：

i. 细胞仅在生长培养基中温育 1 小时（对照），

ii. 细胞在加有不同浓度（ $5\mu\text{M}$ ， $10\mu\text{M}$ 或 $20\mu\text{M}$ ）tyrphostin AG1714 的生长培养基中温育 1 小时。

然后将细胞在半固体琼脂板上作平板培养，温育 14 天之后，测定集落形成单位（CFU）的数量（参见：Nikerich 等人，同上，1986）。

如图 27 所示，与仅在生长培养基中培育的细胞相比较，加入

AG1714 的培养物平板培养效力（以每 10^5 具核细胞的 CFU 数量表示）显著地提高了。因此，tyrphostin AG1714 能较长时间保存骨髓细胞培养物。

5 实施例 35

在含有 5 % FCS 的 RPNI 1640 生长培养基中，从 CD1 幼小鼠的胸腺，制备浓度为 3×10^6 个细胞/ml 的胸腺细胞。将此细胞如下分成二组：

- i. 细胞仅在生长培养基中生长；和
- ii. 细胞在加有 AG1714 的生长培养基中生长。

10 应用胰蛋白酶兰色排除试验，在对细胞加入 AG1714 之后不同时间，测定上面每组培养物中胸腺细胞的细胞生存能力。

如图 28 所示，对培养的胸腺细胞加入 AG1714，显著地增强了它们的生存能力。

15 实施例 36

如在 Kessler-Iceksan. G., J. Mol, Cell. Cardiol. 20: 649-755, 1988 中所述，从大鼠制备了初级大鼠肌细胞培养物。将心肌细胞在培养基内培养 7 天，然后将此培养物分成二组：

- i. 培养物仅在生长培养基中培养，
- 20 ii. 培养物在加有 20 μ M tyrphostin AG1714 的生长培养基中培养。

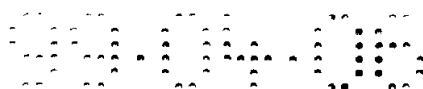
在对细胞加入 tyrphostin 化合物之后 16 小时和 40 小时，测定每组培养物中肌细胞丛每分钟的搏动次数。

25 如图 29 所示，与仅在生长培养基中培养的心肌细胞培养物中每分钟的搏动次数相比较，加入 tyrphostin AG1714 的心肌细胞培养物中每分钟的搏动次数显著地较多。AG1714 增强了培养的心肌细胞的生存活力。

VII. 对 tyrphostin 化合物的毒性研究

实施例 37

30 为了研究 tyrphostin AG1714 和 AG1801 的毒性作用，将此 tyrphostin 化合物给 ICR 小鼠每周注射 3 次，持续 5 周。每次注射包含 20 ml tyrphostin 化合物，它们是在以生理盐水/碳酸氢盐 1:20 稀释的赋形剂丙



烯碳酸酯:cremophore (40/60) 中制备的。

为了测定 tyrphostin 化合物累积性给药的毒性作用, 对被注射小鼠的多种参数进行测定, 包括它们的体重, 内部器官(胸腺, 脾, 肾)的重量, 全血化学, 骨髓细胞数量等。

- 5 如下面表 7 中所示, 与仅注射生理盐水或赋形剂的对照小鼠的相同参数相比较, 注射 tyrphostin AG1714 和 AG1801 未引起对被注射小鼠所测定的这些参数发生显著的改变。因此, 在对小鼠累积性给药之后, 这些 tyrphostin 化合物未显示出任何毒性作用。此外, 注射 tyrphostin 化合物未引起小鼠死亡。

表 7

亚慢性腹膜内注射给予 AG1714 和 AG1801
(ICR 雌性小鼠, 每周注射 3 次共 5 周)

	对照 1 生理盐水	对照 2 赋形剂	AG1714 20mg/kg ×15	AG1801 5mg/kg ×15
体重(g)		29.3±3.1	28.6±2.3	29.1±1.7
胸腺(mg)		50.2±7.7	53.8±12.3	57±9.3
脾(mg)		118±27	136±16	119±19.6
肾(mg)		176±21	162±12	164±9.8
白细胞(k/ul)	6.1±2.3	5.5±0.98	4.9±2.3	6.8±3.3
淋巴细胞(%)	88.1±2.35	83.3±4.12	81.5±2.35	80.4±6.1
嗜中性细胞(%)		4.2±1.4	4.2±1.2	5.3±1.2
单核细胞(%)		10.6±2.6	11.9±1.3	12.3±5.2
嗜酸性细胞(%)		0.2±0.1	0.1±0.05	0.3±0.23
嗜碱性细胞(%)		0.22±0.08	0.24±0.11	0.3±0.07
红细胞(M/ul)		8.4±0.33	9.0±0.33	8.4±0.3
血红蛋白(g/dl)	14.0±2.5	14.2±0.5	14.9±0.56	14.5±0.67
PLT(K/ul)	1236±176	1229±12.7	1475±252	1309±304
葡萄糖(mg/dl)	147±11.3	177±2.4	144±17	177±20.5
血尿素氮(mg/dl)	22±4.4	21±2.9	25.2±3.3	24.2±2.2
肌酸酐(mg/dl)	0.4±0.0	0.42±0.04	0.46±0.05	0.42±0.04
总蛋白(g/dl)	5.4±0.17	5.6±0.2	5.8±0.2	5.6±0.08
白蛋白(g/dl)	3.1±0.0	3.1±0.09	3.2±0.13	3.1±0.07
钙(mg/dl)	9.9±0.4	9.9±0.26	9.9±0.3	9.8±0.36
肌苷磷酸(mg/dl)	8.5±0.7	8.0±0.75	8.4±0.43	7.9±1.1
尿酸(mg/dl)	1.1±0.21	2.0±0.44	1.8±0.18	2.0±0.36

表 7 (续)

	对照 1 生理盐水	对照 2 赋形剂	AG1714 20mg/kg × 15	AG1801 5mg/kg × 15
总胆红素(mg/dl)	0.23±0.06	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0
碱性磷酸酶(U/l)	110±23.8	79±17	67±12.8	69.6±0.26
乳酸脱氢酶(U/l)	545±157	996±235	960±226	972±238
谷草转氨酶(U/l)	67±11	71.4±6.5	70±18	68±12
谷丙转氨酶(U/l)	30±4.6	28.8±3.1	25.6±4.2	28±5.5
肌酸磷酸激酶(U/l)	461±179	604±115	659±486	582±127
淀粉酶(U/l)	2451±176	2211±352	2392±230	2169±222
胆固醇(mg/dl)	115±25	98.8±17.5	99±5.7	90±6.1
甘油三酯(mg/dl)	216±84	125±17.9	155±54	138±50
具核骨髓细胞×10 ⁶	16.3±0.7	15.2±2.0	18.6±3.6	16.5±0.87
集落数(股骨内)		12790±1620	17600±2590	15690±2040
丛集数(股骨内)		8170±697	15000±2140	13410±1740

赋形剂: 生理盐水和碳酸氢盐按 1: 20 稀释的丙烯碳酸酯: Cremophore (40/60)。

VIII. 对特异性免疫活性的抑制作用

5 实施例 38

如在 Lavy, R, 等人 J. Immunol 154: 5039-5048, 1955, 中所述方法制备能够特异性溶解 EL-4 细胞的鼠腹膜渗出细胞毒性淋巴细胞 (PEL), 并进行测定。将 EL-4 细胞分为如下各组: 仅同 PEL 共同温育的细胞, 先同 AG1714 (20μM) 共同温育, 然后同 PEL 共同温育的细胞, 以及
10 先同 AG1714 (50μM) 共同温育, 然后同 PEL 共同温育的细胞。应用特异性 ⁵¹Cr 释放检测法, 测定对靶细胞 EL-4 的细胞溶解作用。

如图 30 所示, 加入 AG1714 降低了 PEL 对靶细胞 EL-4 的特异性细胞毒活性。AG1714 的这种抑制作用是剂量依赖性的。

上述结果表明, tyrphostin 化合物对降低免疫介导的移植排异作用
15 可能是有用的, 还可能用于自身免疫性疾病以及同细胞特异性免疫活性有关的病症 (例如在 AIDS 情况下的抗-CD4 细胞)。

IX. tyrphostin 化合物的抗炎症作用

个体炎症反应的主要并发症之一是导致败血性休克，它起因于由细胞因子如 TNF 和 IL-1 介导的免疫反应的过度作用。如下测定了 tyrphostin 化合物对 TNF 和 IL-1 相关的免疫反应的影响。

5

实施例 39

A. 小鼠成纤维细胞与 TNF- α 共同温育将导致这些细胞程序性死亡。为了测定 tyrphostin 化合物对 TNF- α 诱导的细胞程序性死亡的作用，将 A9 小鼠成纤维细胞与放线菌酮 (50 $\mu\text{g/ml}$) 共温育 2 小时，然后以 20 μM 的最终浓度加入各种 tyrphostin 化合物，只有 AG1801 是以 5 μM 的最终浓度加入。与 tyrphostin 化合物共温育 1 小时之后，以 0.2ng/ml 的浓度对细胞加入 TNF- α ，并将此细胞再温育 10 小时。在 10 小时之末，用 propidium 碘化物，通过 FACS 对培养细胞进行分析，并且测定每组培养细胞程序性死亡的程度 (观察 DNA 片段) (参见 Novogrodsky A. 等人 Science, 264: 1319-1322, 1994)。

15

如下表 8 中所示，对与 TNF 共温育的小鼠成纤维细胞加入各种 tyrphostin 化合物，显著地减弱了 TNF 使细胞程序性死亡的作用。不同的 tyrphostin 化合物减弱 TNF 使细胞程序性死亡的作用的程度稍微不同。

20

表 8

tyrphostin 化合物对 TNF- α 诱导的小鼠
成纤维细胞 (A-9) 程序性死亡的预防作用

Tyrphostins*	程序性死亡 (%)	
	TNF- α (0.2 ng/ml)	
	-	+
无(赋形剂)	9.3	28.7
AG1714	4.5	9.9
AG1801	6.6	10.2
AG126	8.3	19.4
AG1802	7.6	17.2

表 10

tyrphostin 化合物对 TNF 诱导的细胞毒性的作用(体外试验), 以及对 LPS 诱导的致死性毒性的作用(体内试验)

5

A

体外试验, (活细胞, 对照的百分数) TNF				
AG(20 μ M)	无	0.05ng/ml	0.2ng/ml	1.0ng/ml
Control	100	41	19	6
AG1714	119	102	90	62
AG1719	102	83	58	41
AG26	107	86	64	31
AG126	107	75	49	33
AG1641	102	70	41	21
AG1720	104	53	26	11

B

体内试验	
存活数/总数	存活小鼠的百分数
4/10	40
5/5	100
4/5	80
4/5	80
4/5	80
3/5	60
2/5	40

10 实施例 41

IL-1 是体内败血性休克的主要介导剂之一。为了测定 AG1714 对于从与 LPS 共同温育的细胞产生 IL-1 的抑制活性, 将人外周血单核细胞 (PBM) 以 2×10^6 个细胞/ml 的浓度分为如下几组:

- i. 细胞仅在生长培养基中培养,
- ii. 细胞在加入 AG1714 (20 μ M) 的生长培养基中培养,
- iii. 细胞在加入 LPS (10 mg/ml) 的生长培养基中培养,
- iv. 细胞在加有 LPS (10 mg/ml) 和 AG1714 (20 μ M) 的生长培

5 培养基中培养。

将这些细胞温育 24 小时, 用 Genzyme ELISA 试剂盒测定 IL-1 β 的量。

如表 II 所示, 它显示了如上所述进行的 2 组实验, 对与 LPS 共同温育的细胞加入 AG1714, 显著地减少了细胞产生 IL-1 β 的量。

10

表 11

AG1714 抑制人外周血单核细胞中
LPS 诱导的 IL-1 β 产生

		IL-1 β pg/ml AG1714 (20 μ M)	
实验 1		-	+
	无	2522	1174
	LPS (10 μ g/ml)	10187	1230
实验 2		-	-
	无	583	648
	LPS (10 μ g/ml)	9309	970

15 上面的结果表明, tyrphostin 化合物可用于减少在败血性休克中 IL-1 介导的不希望有的作用。

上面 3 个实施例的结果表明, tyrphostin 化合物可用于减少或防止在炎症反应的过程中形成败血性休克。 tyrphostin 化合物还可以用作抗炎药物, 以及用于对抗如在自身免疫反应中发生的, 由各种细胞因子
20 (例如 TNF 和 IL-1) 介导的致病作用。

说明书附图

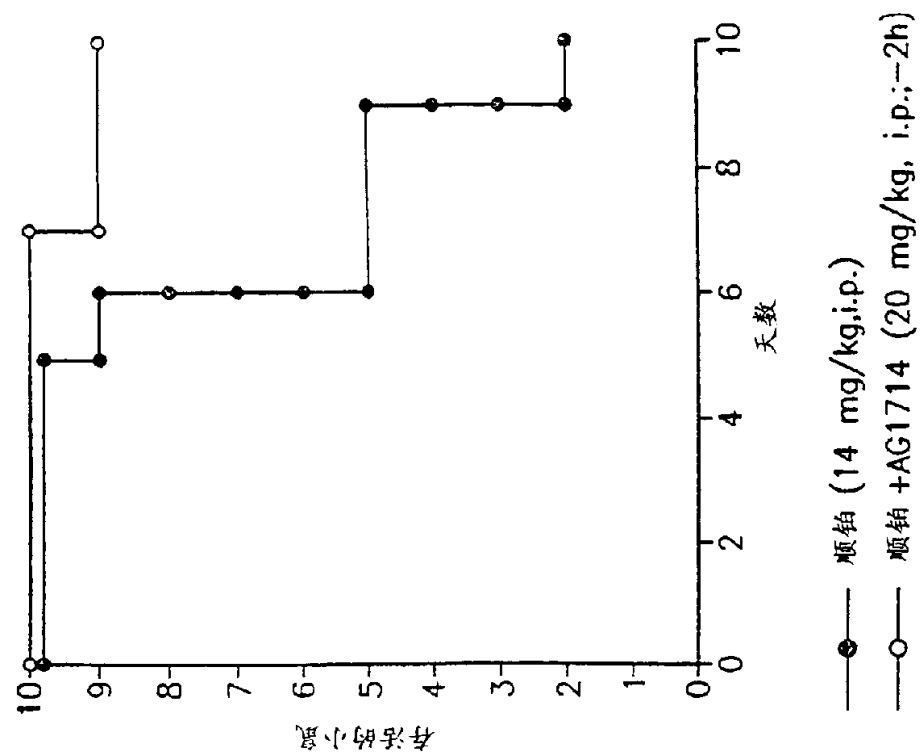


图 1A

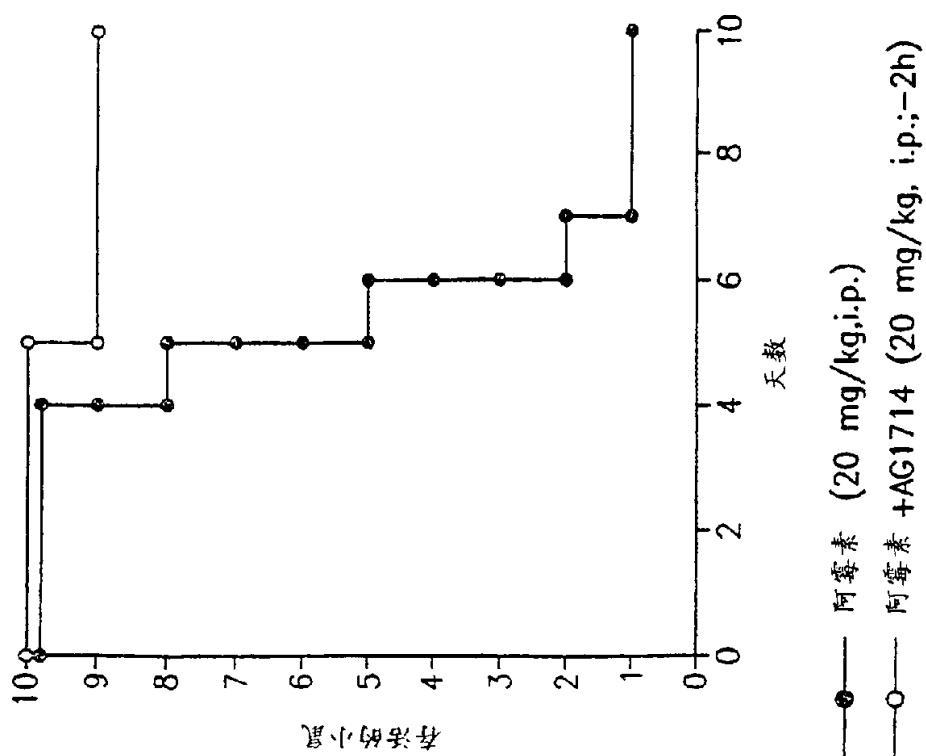
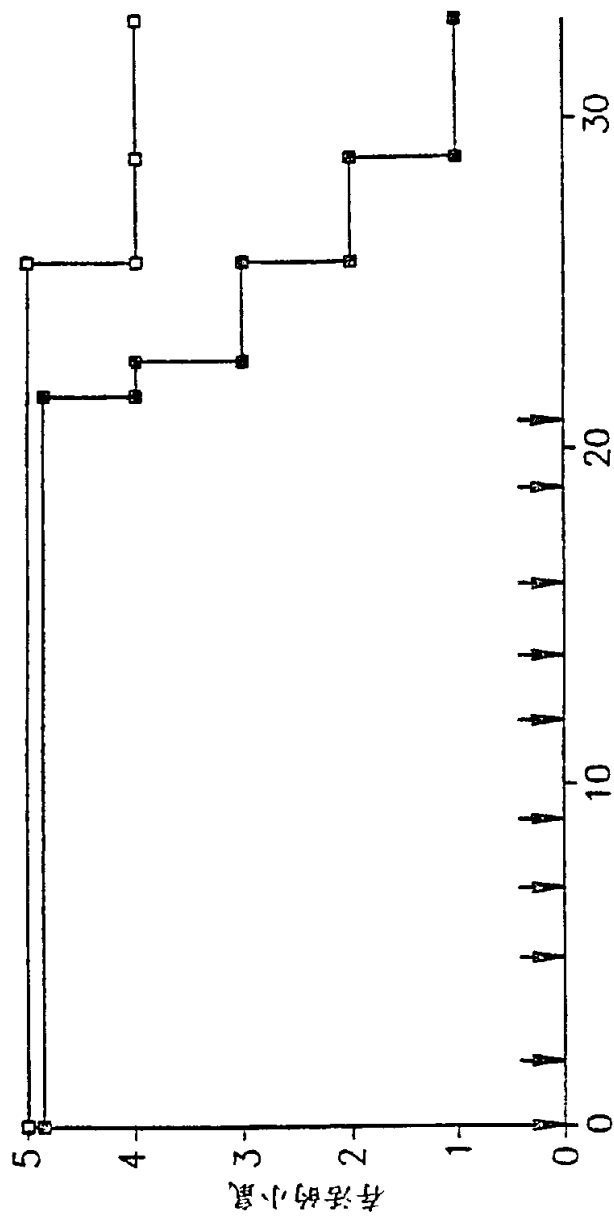


图 1B



—■— 阿霉素 (累积剂量50mg/kg, 每次i. p注射5mg/kg)

---□--- 阿霉素 + AG1714 (累积剂量50mg/kg, 每次i. p注射5mg/kg, -2h)

图 2

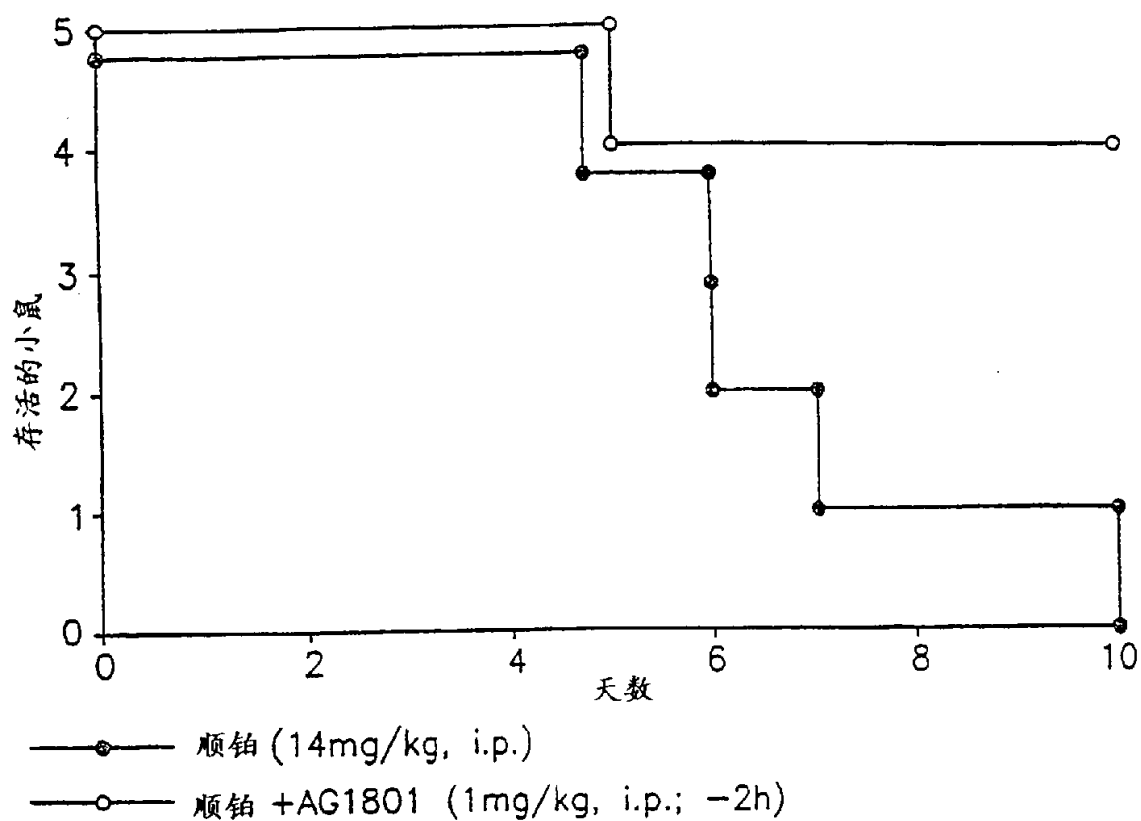


图 3

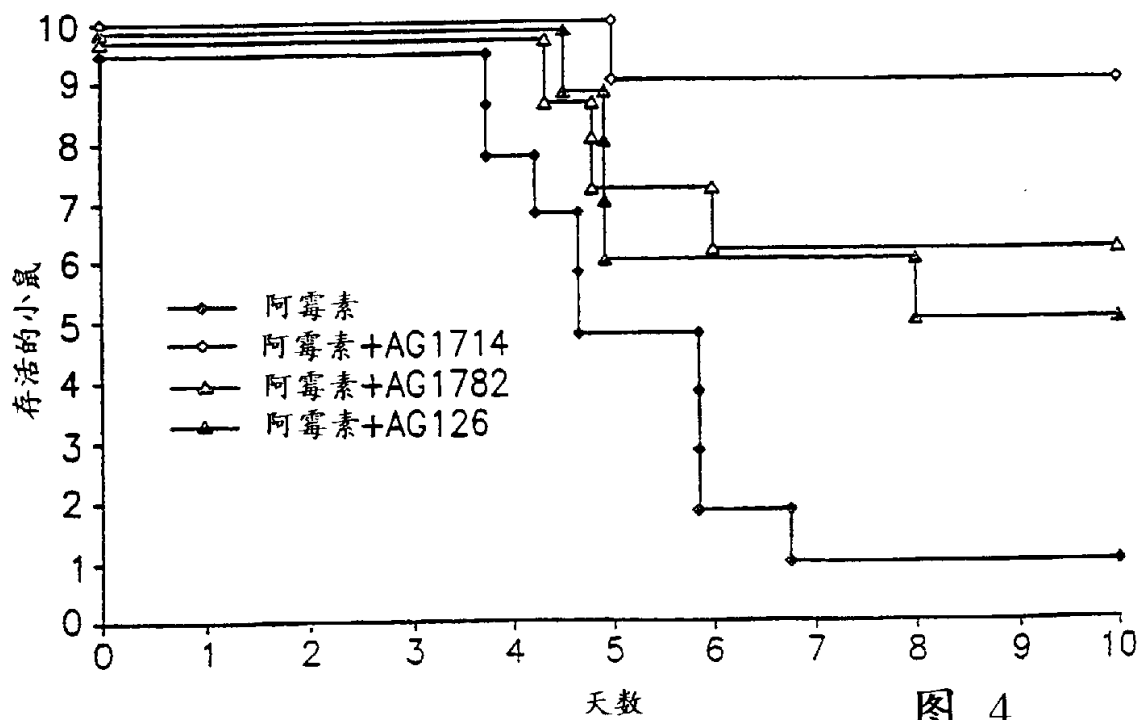


图 4

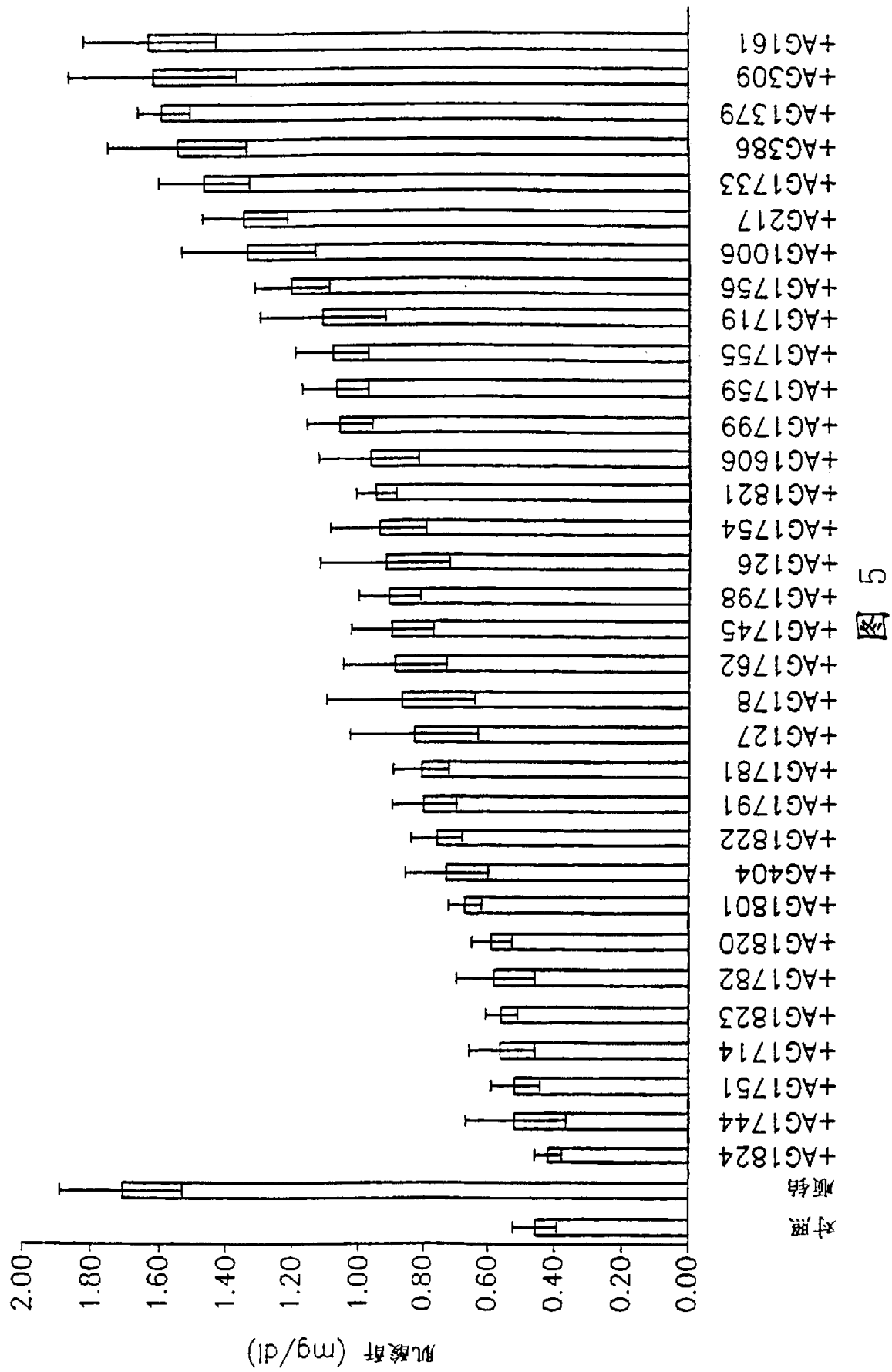


图 6A

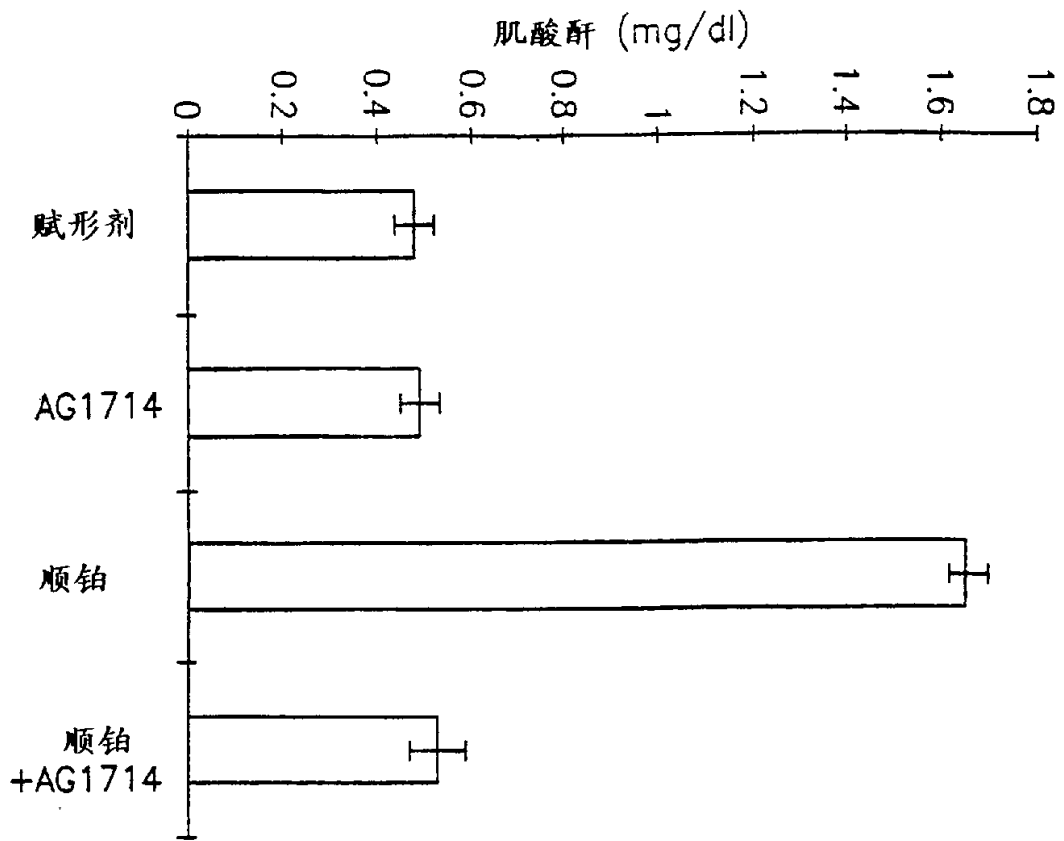


图 6B

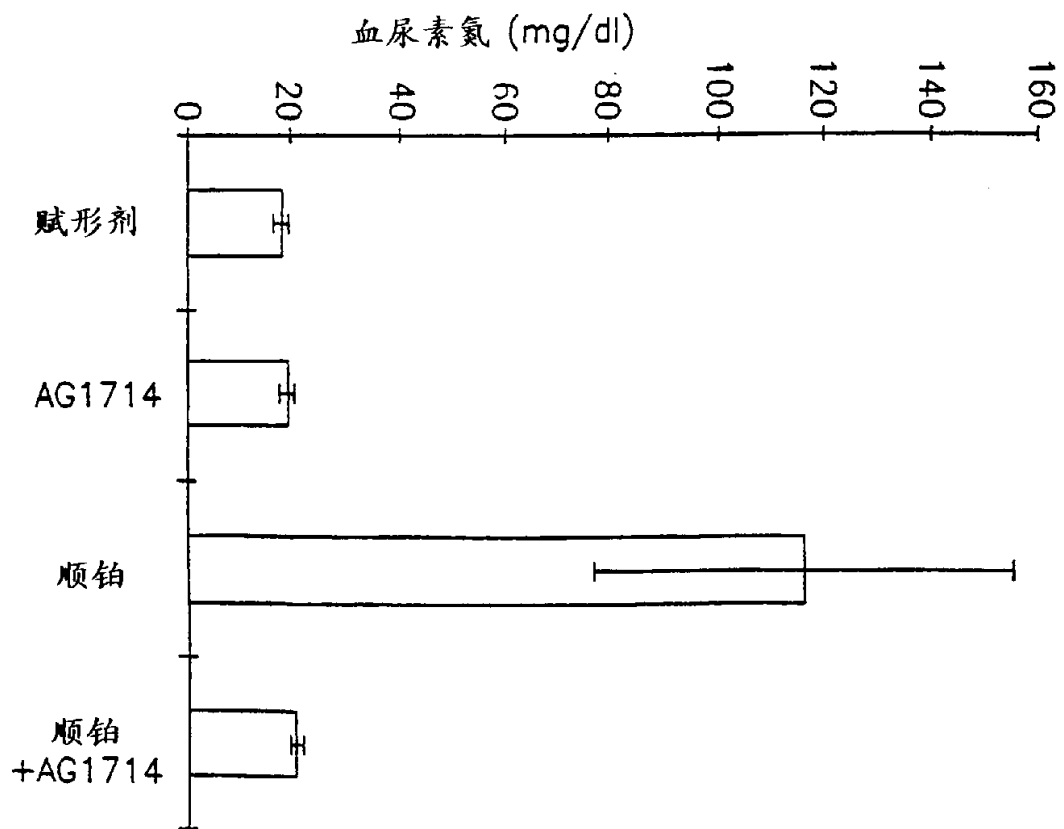




图 7A

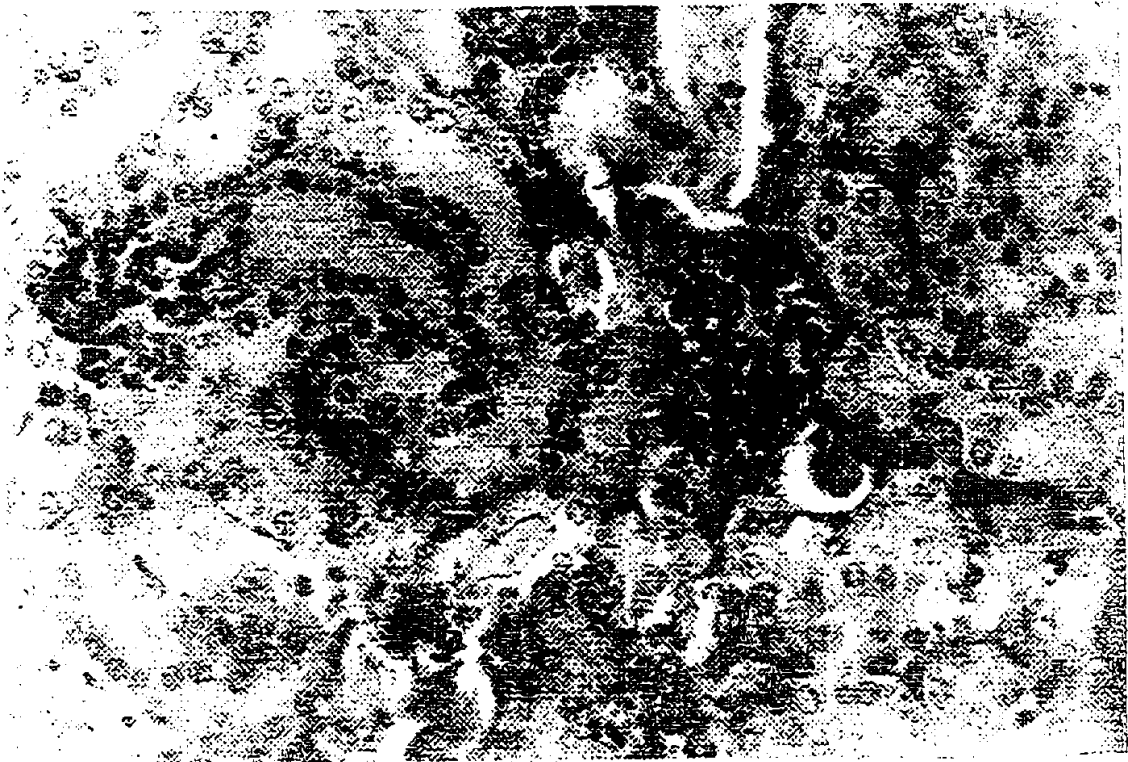


图 7B



图 7C

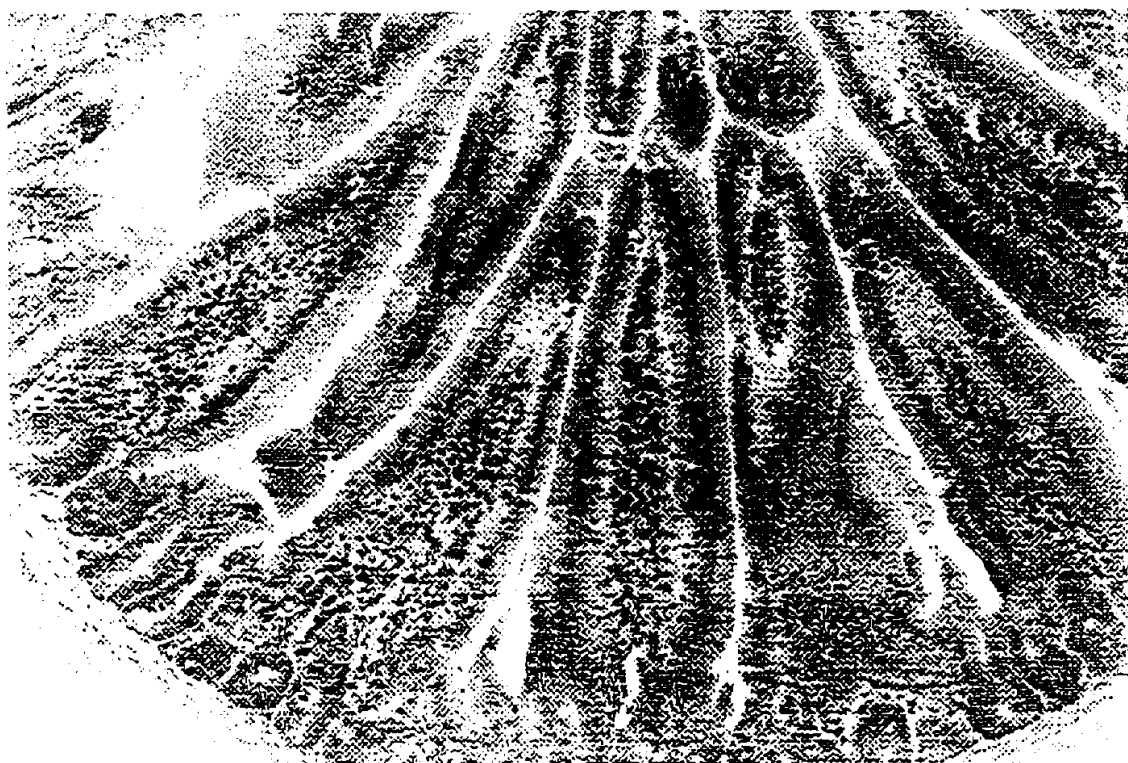


图 7D

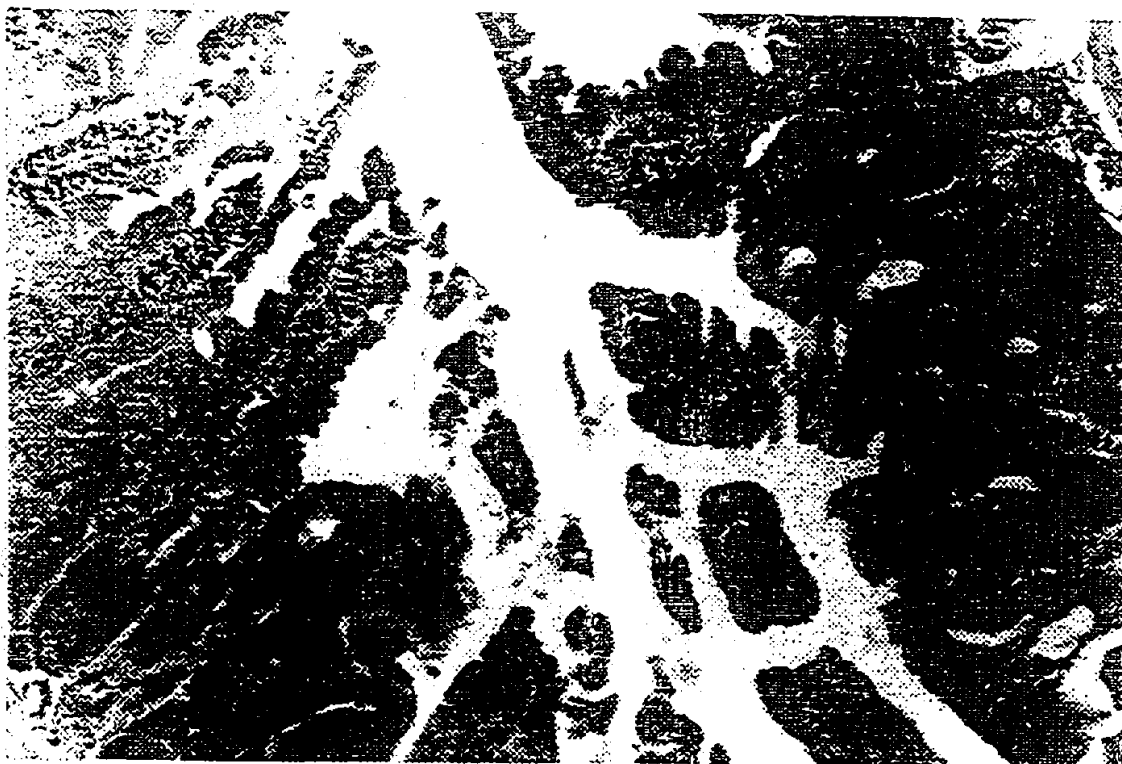


图 7E



图 7F

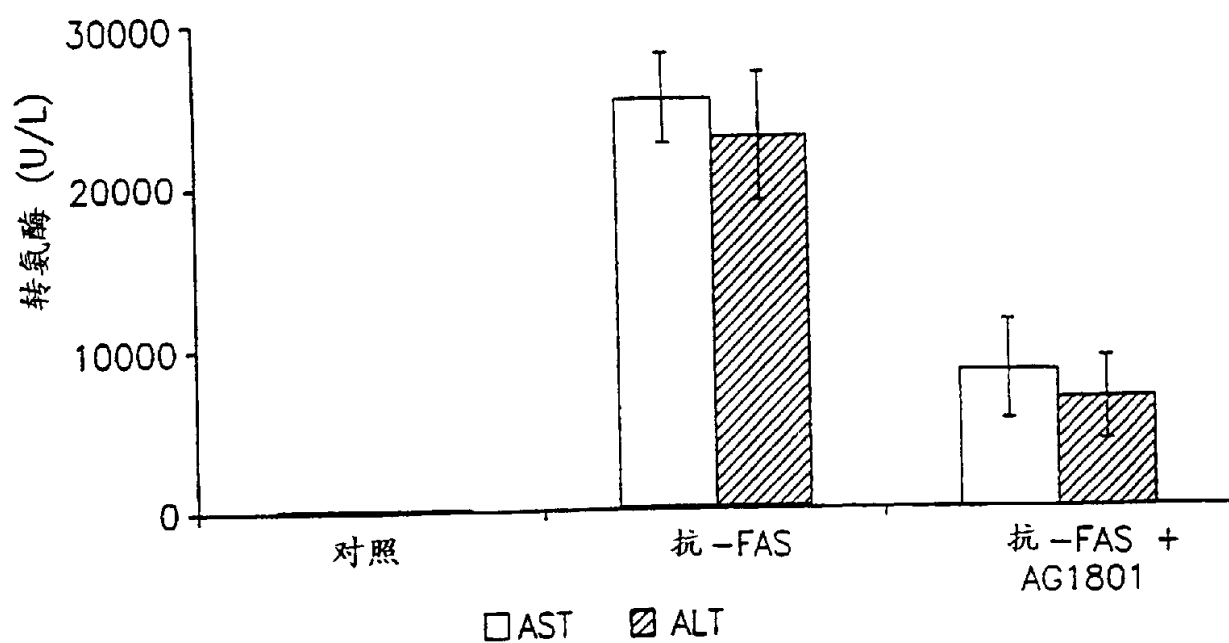


图 8

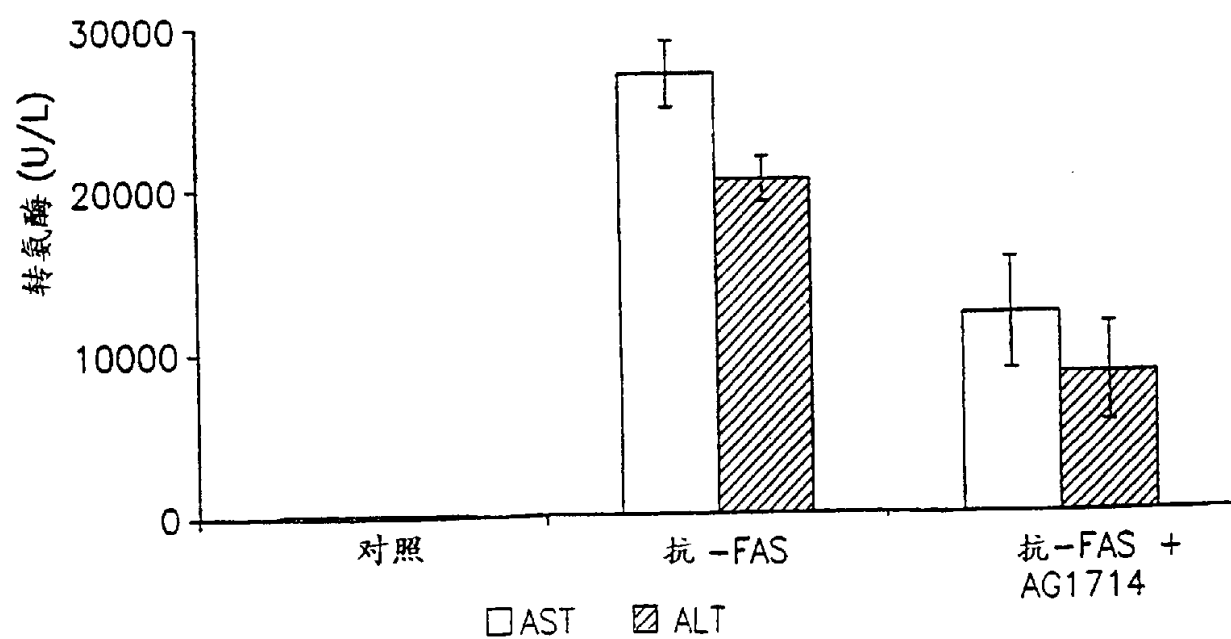


图 9

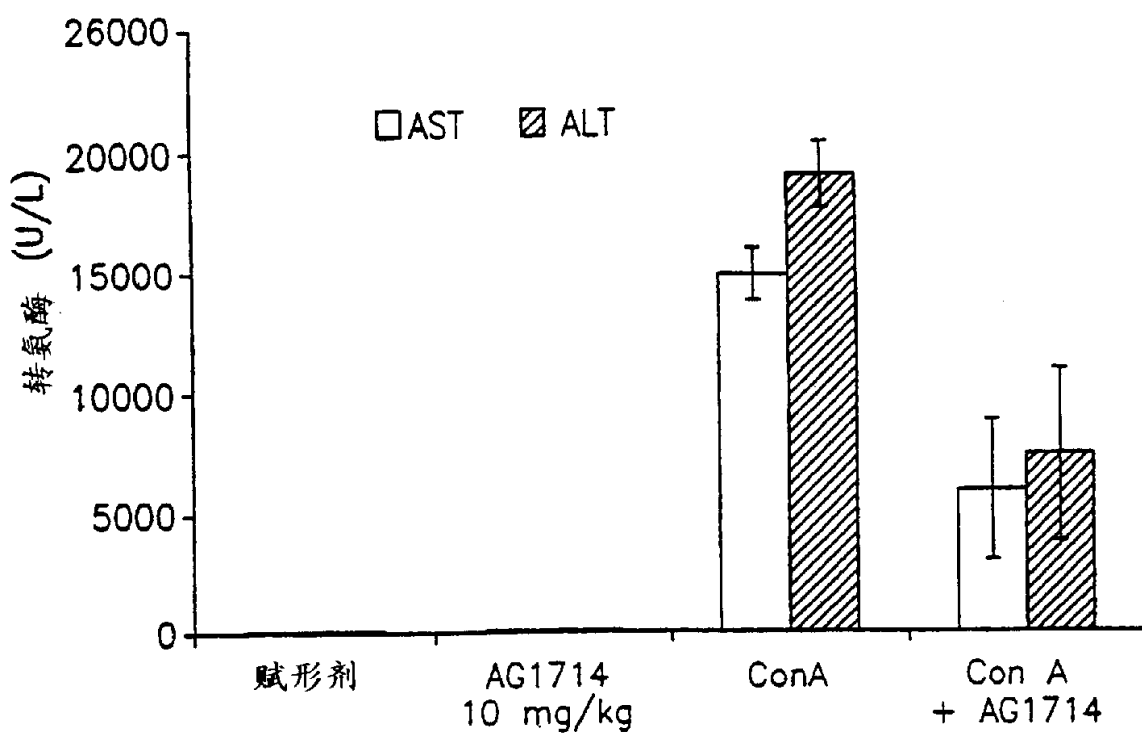


图 10

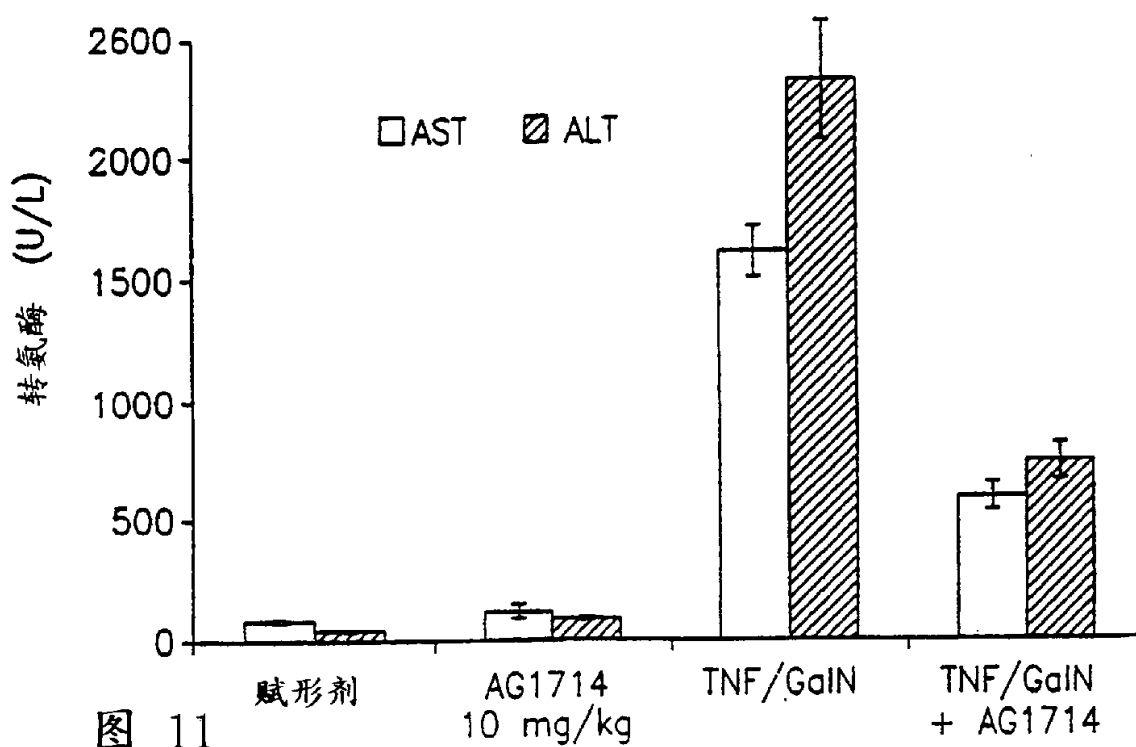


图 11

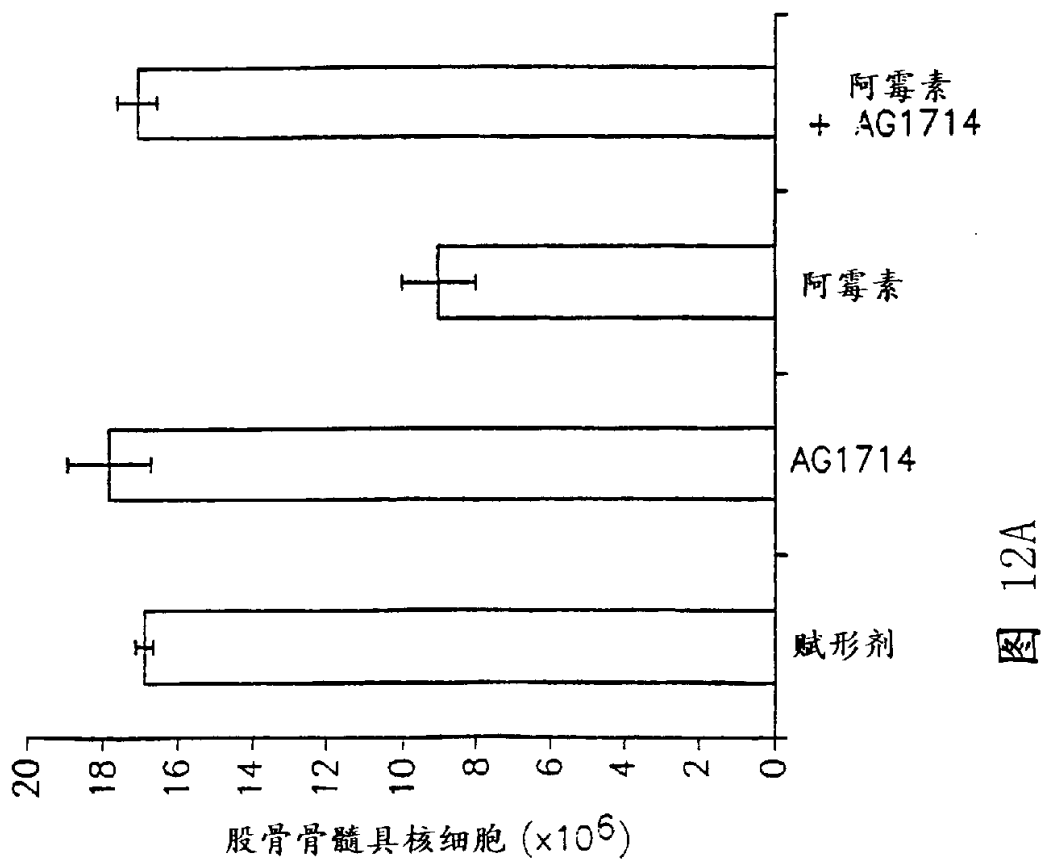


图 12A

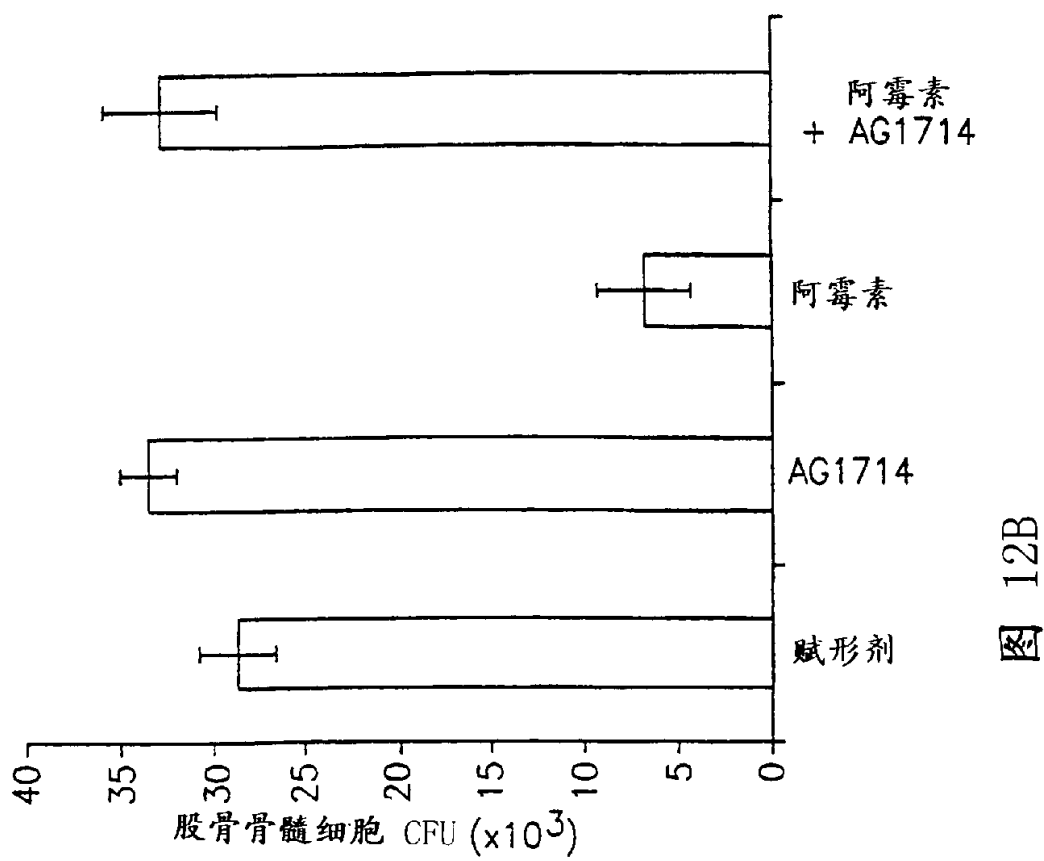


图 12B

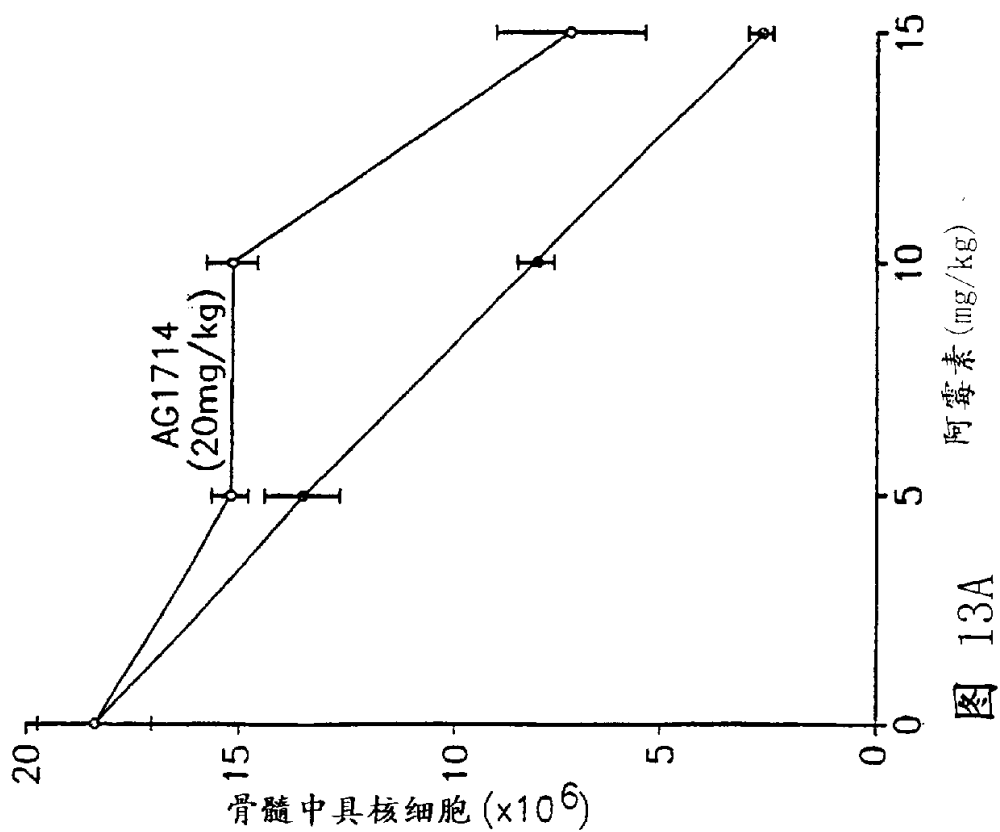


图 13A

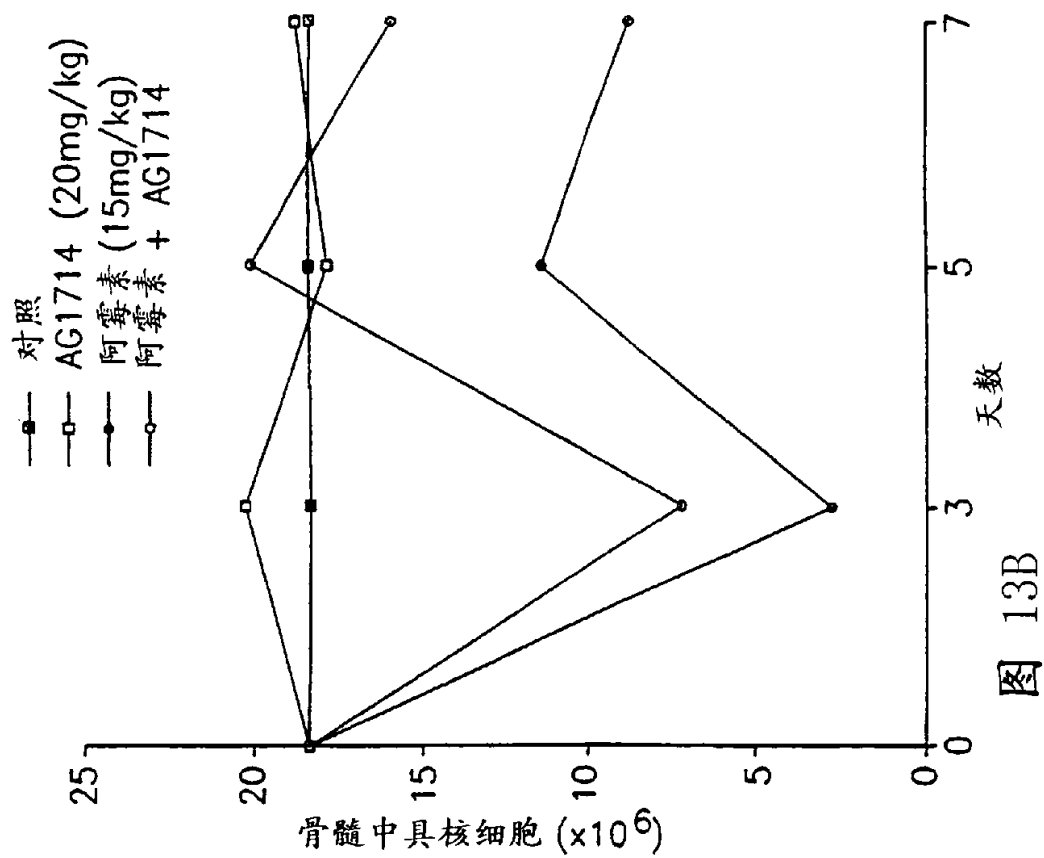


图 13B

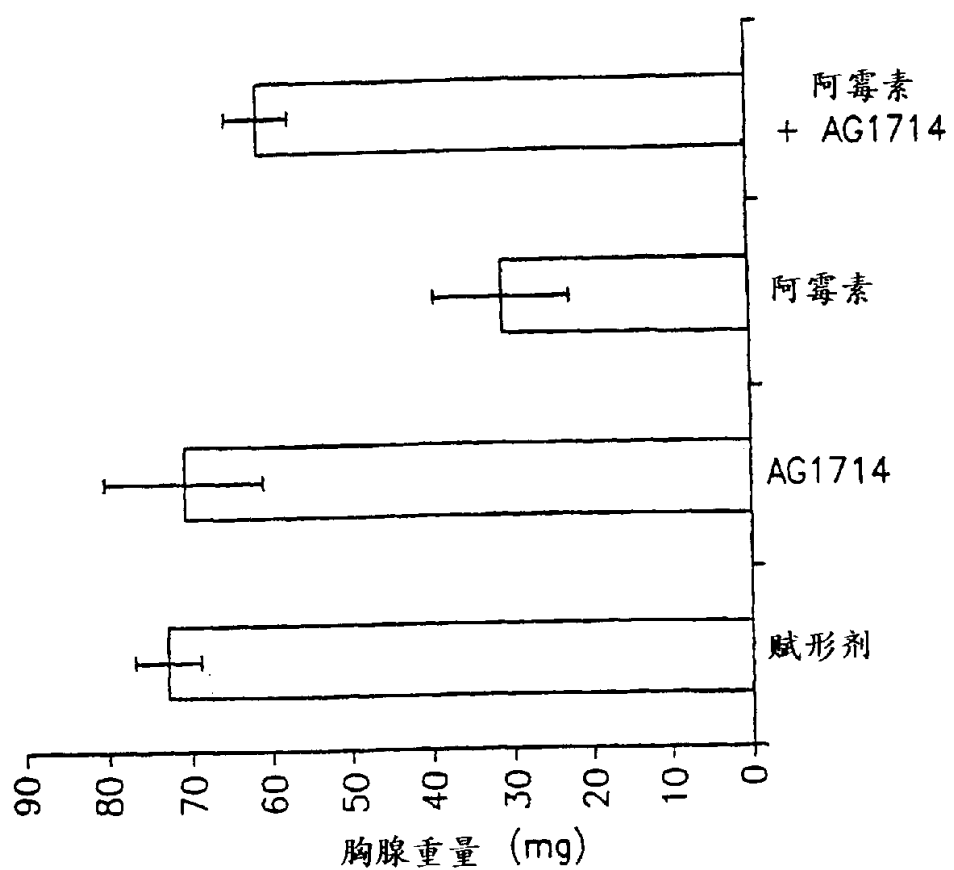


图 14B

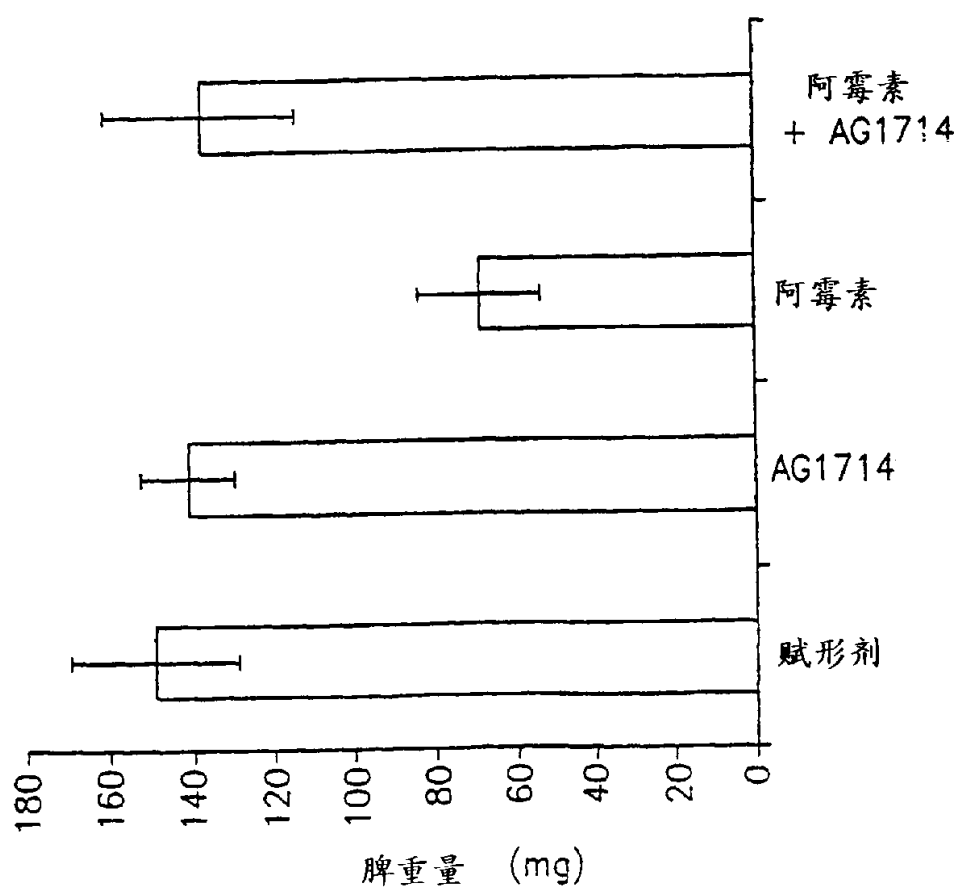


图 14A

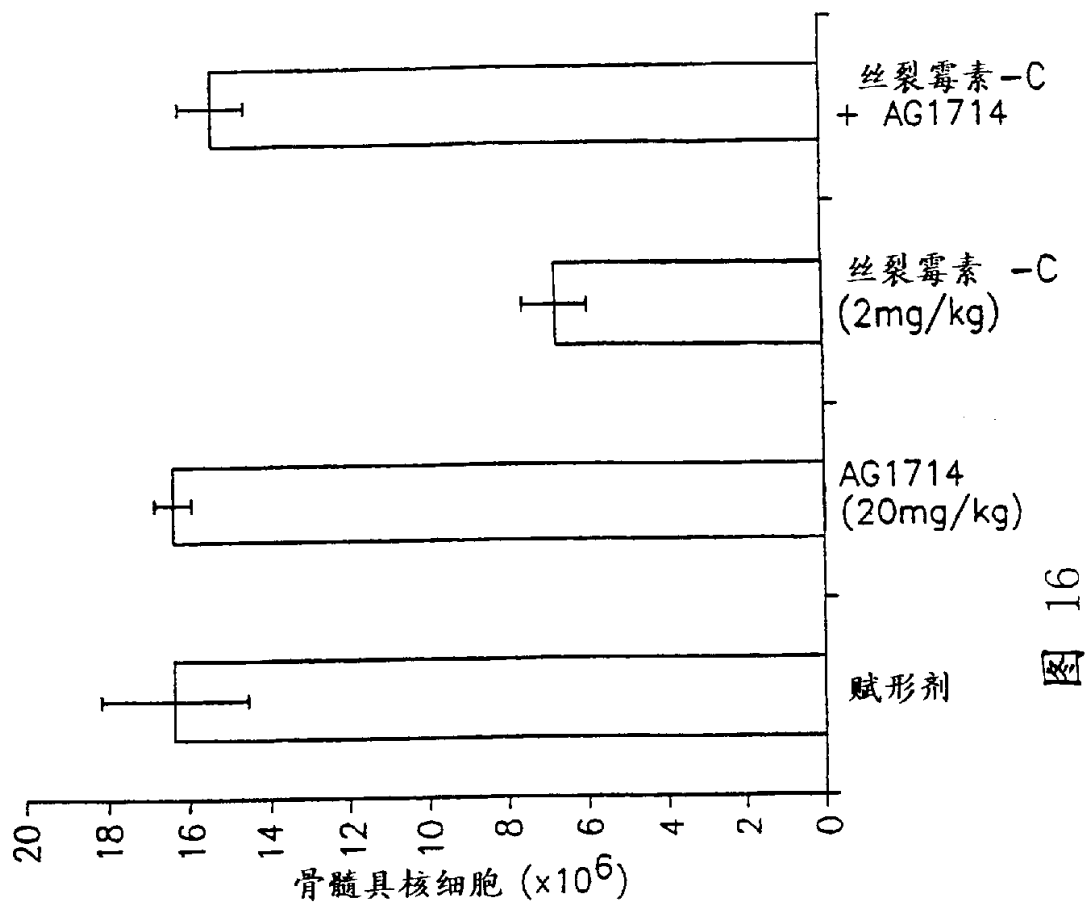


图 16

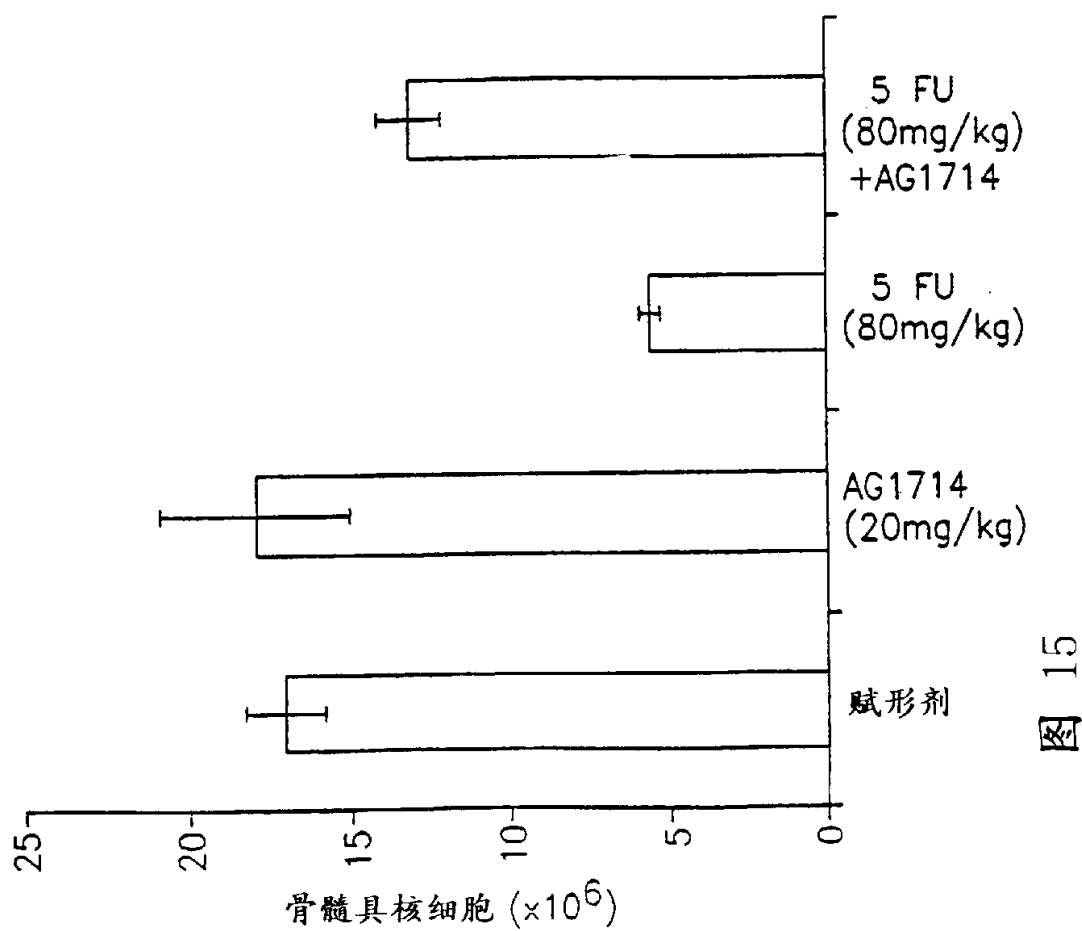


图 15

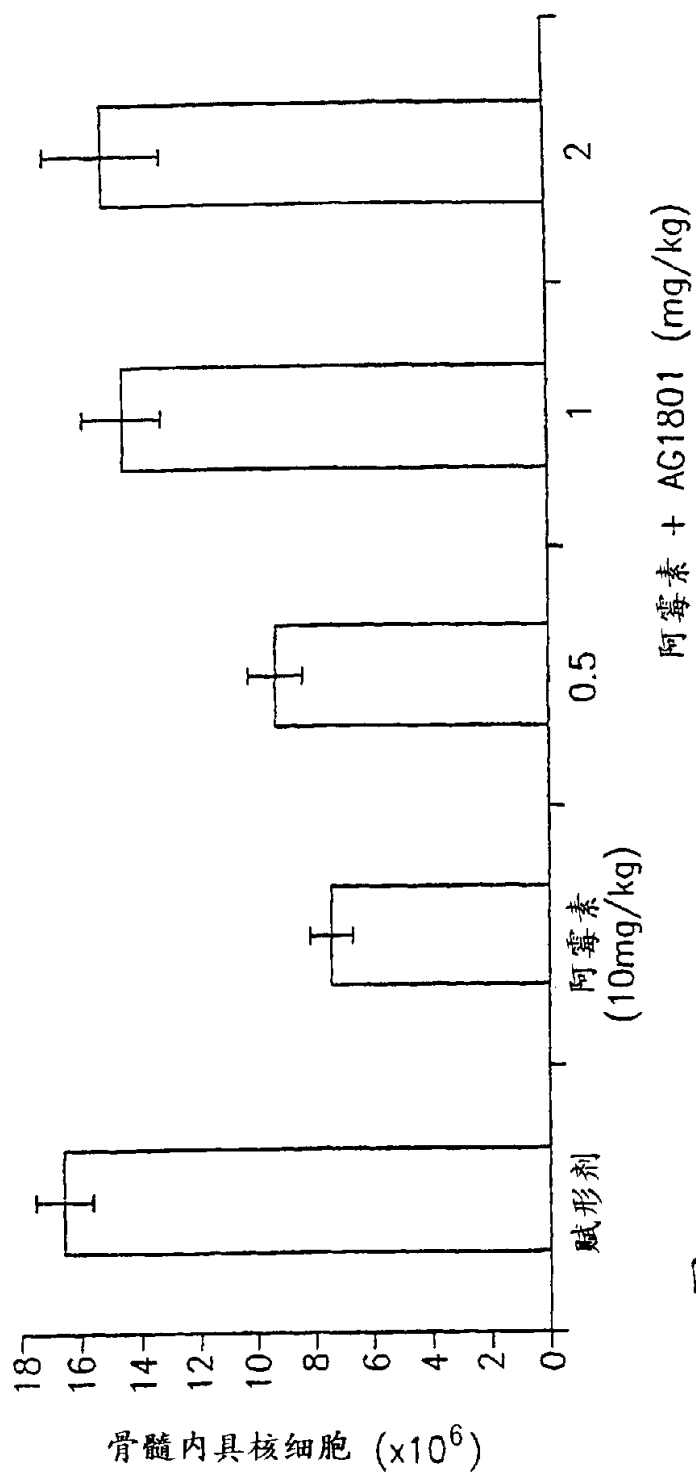


图 17

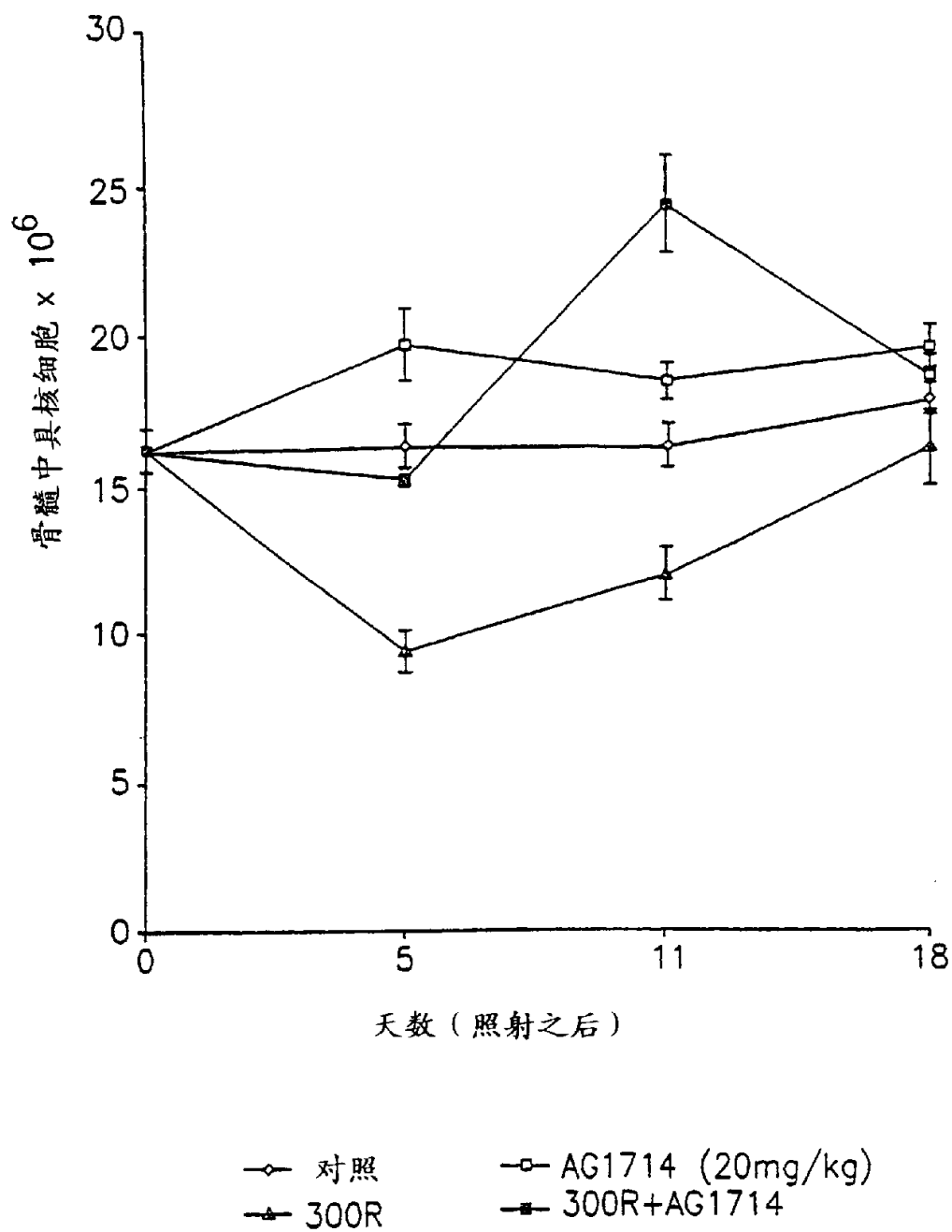


图 18

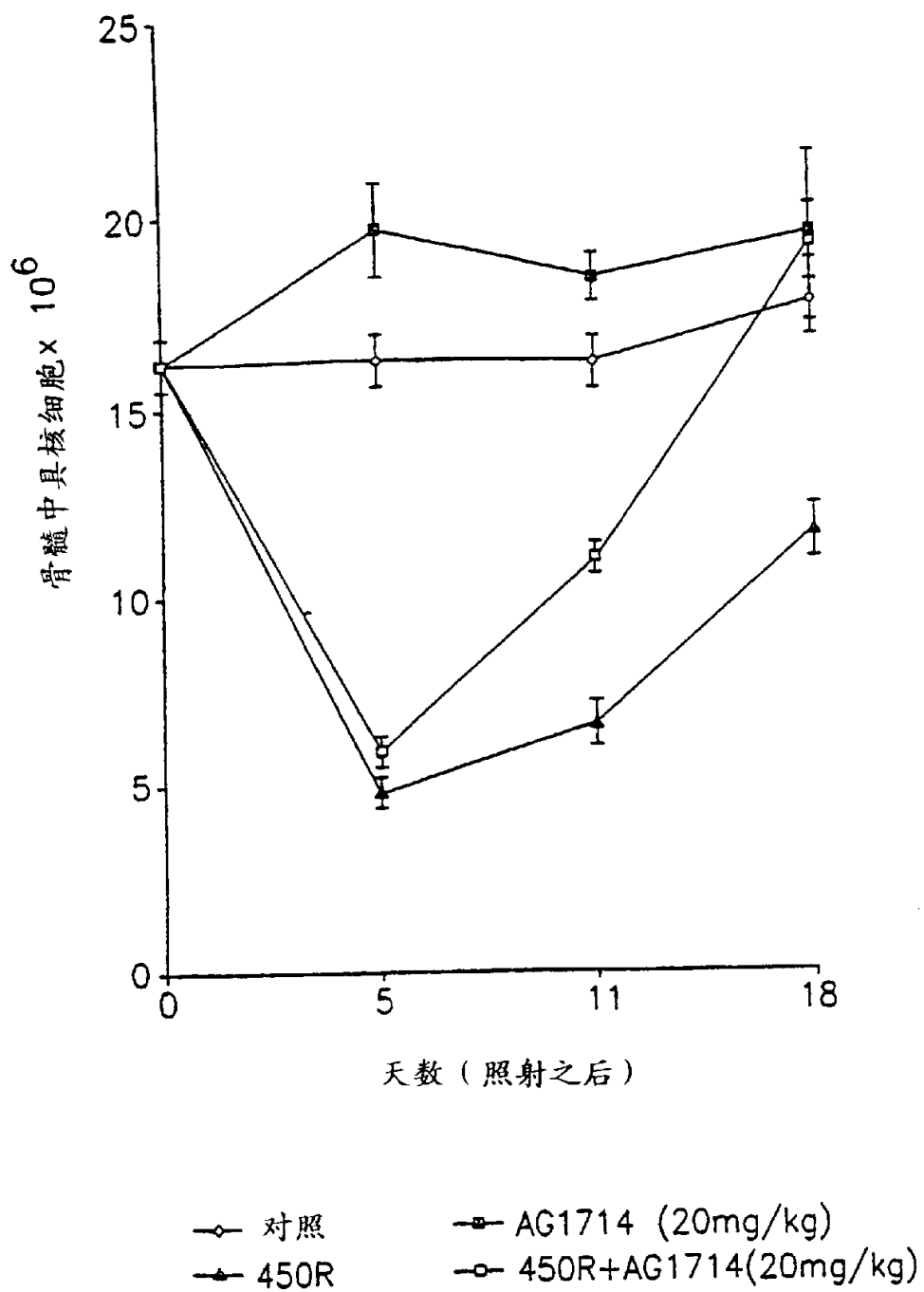


图 19

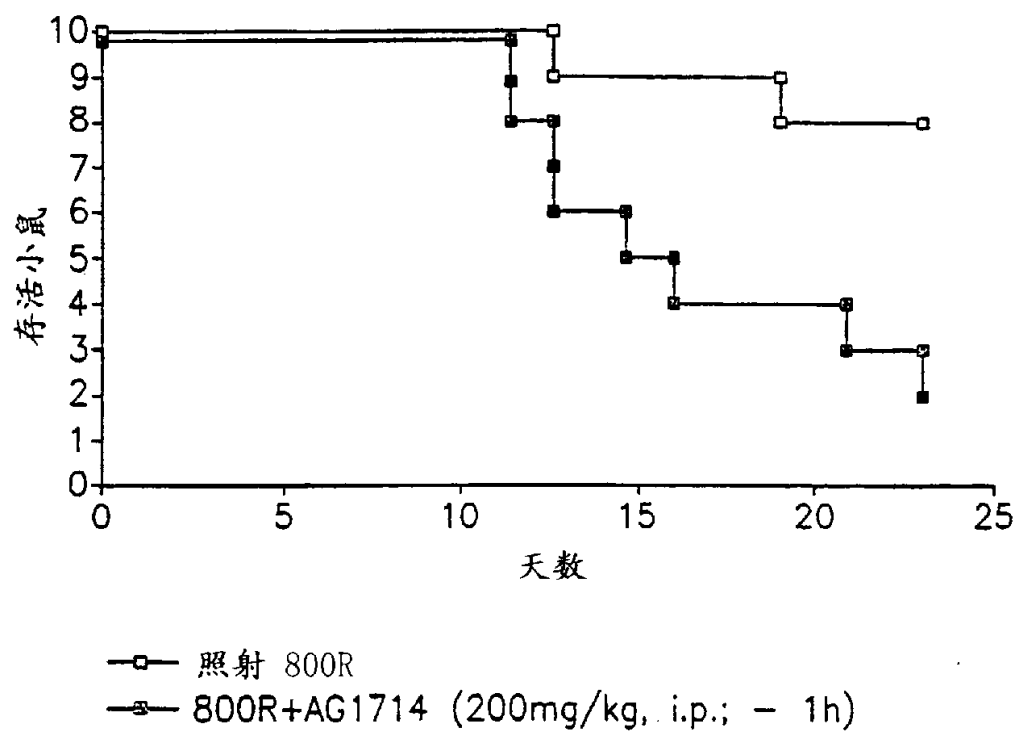


图 20

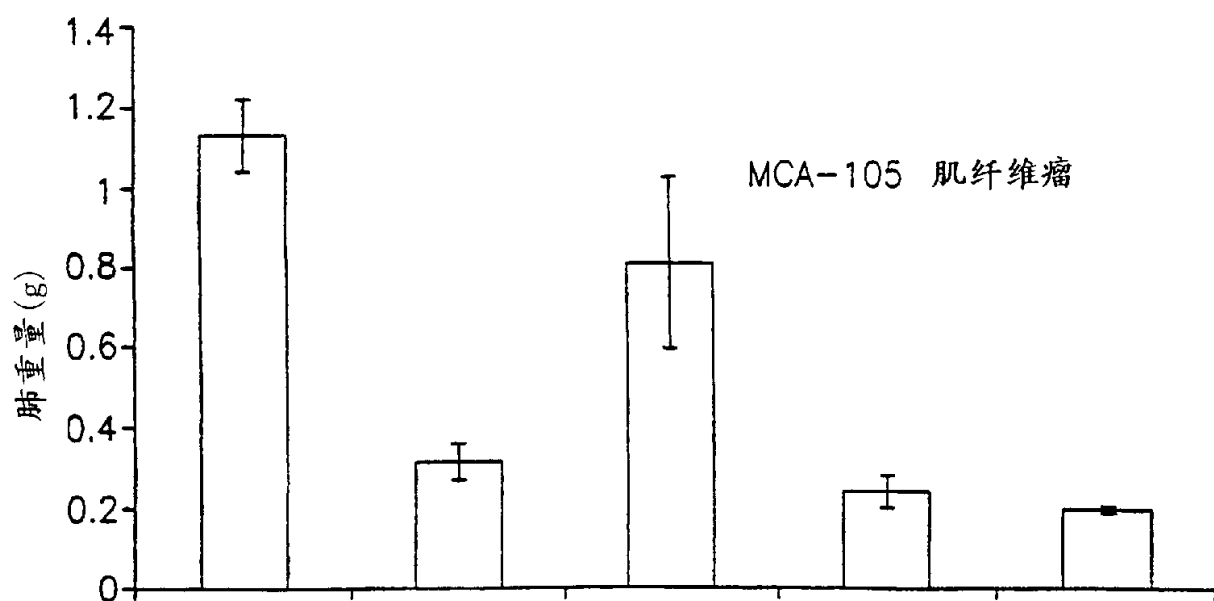


图 21A

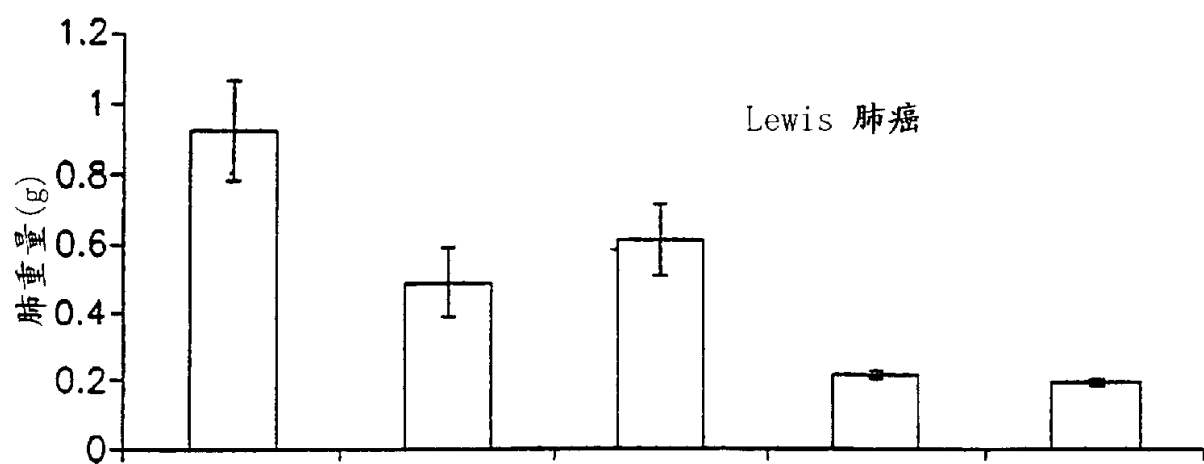


图 21B

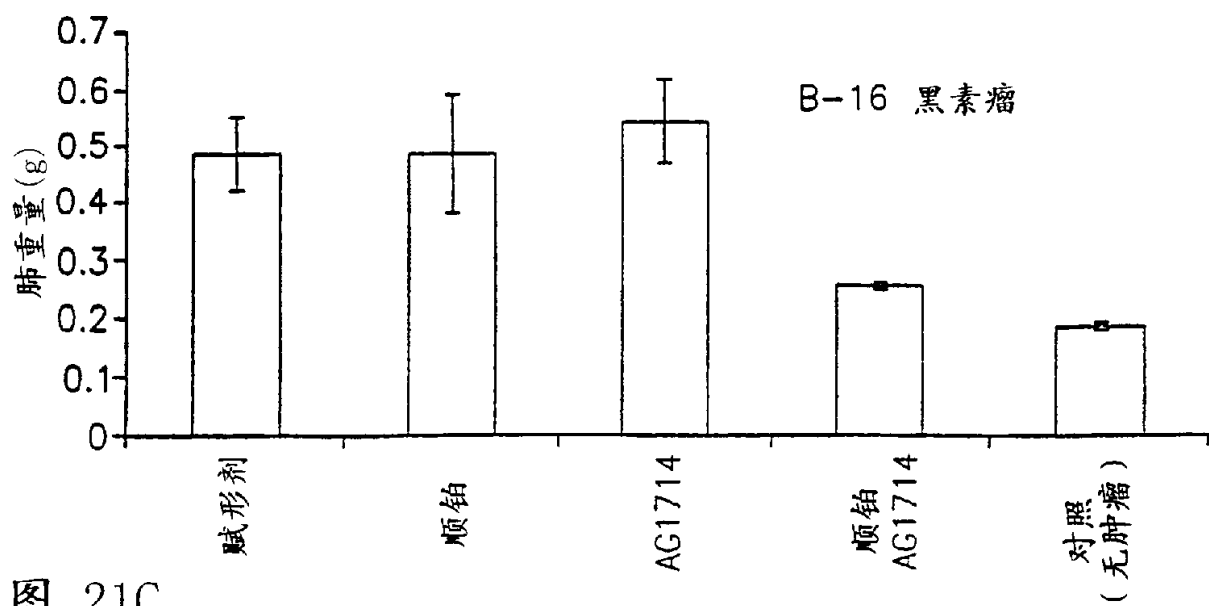
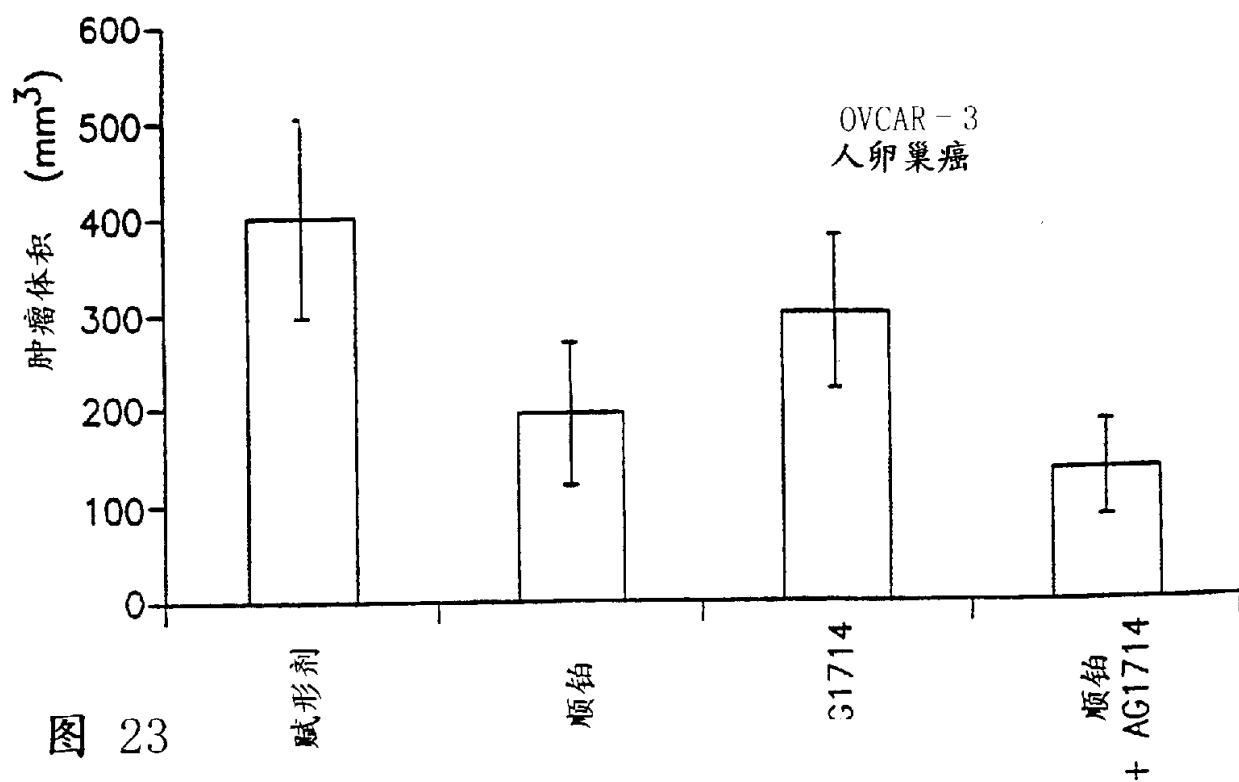
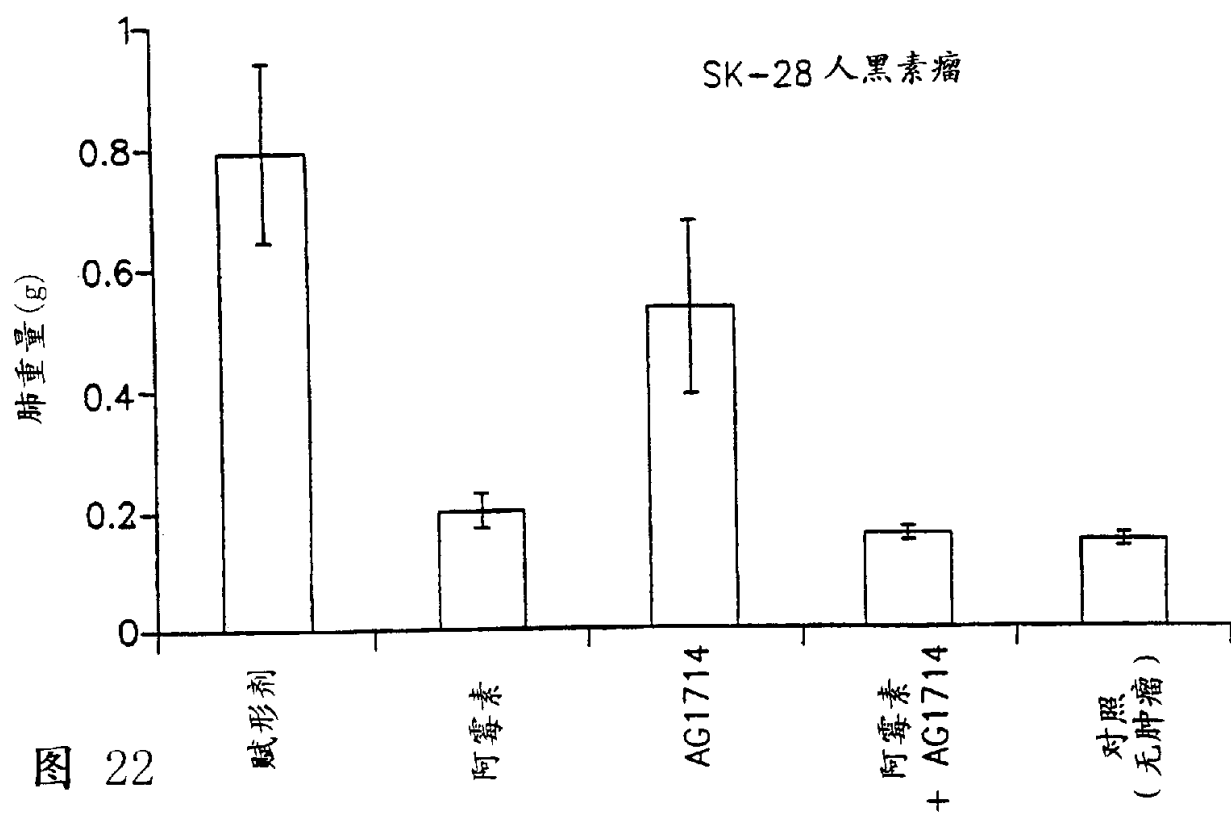


图 21C



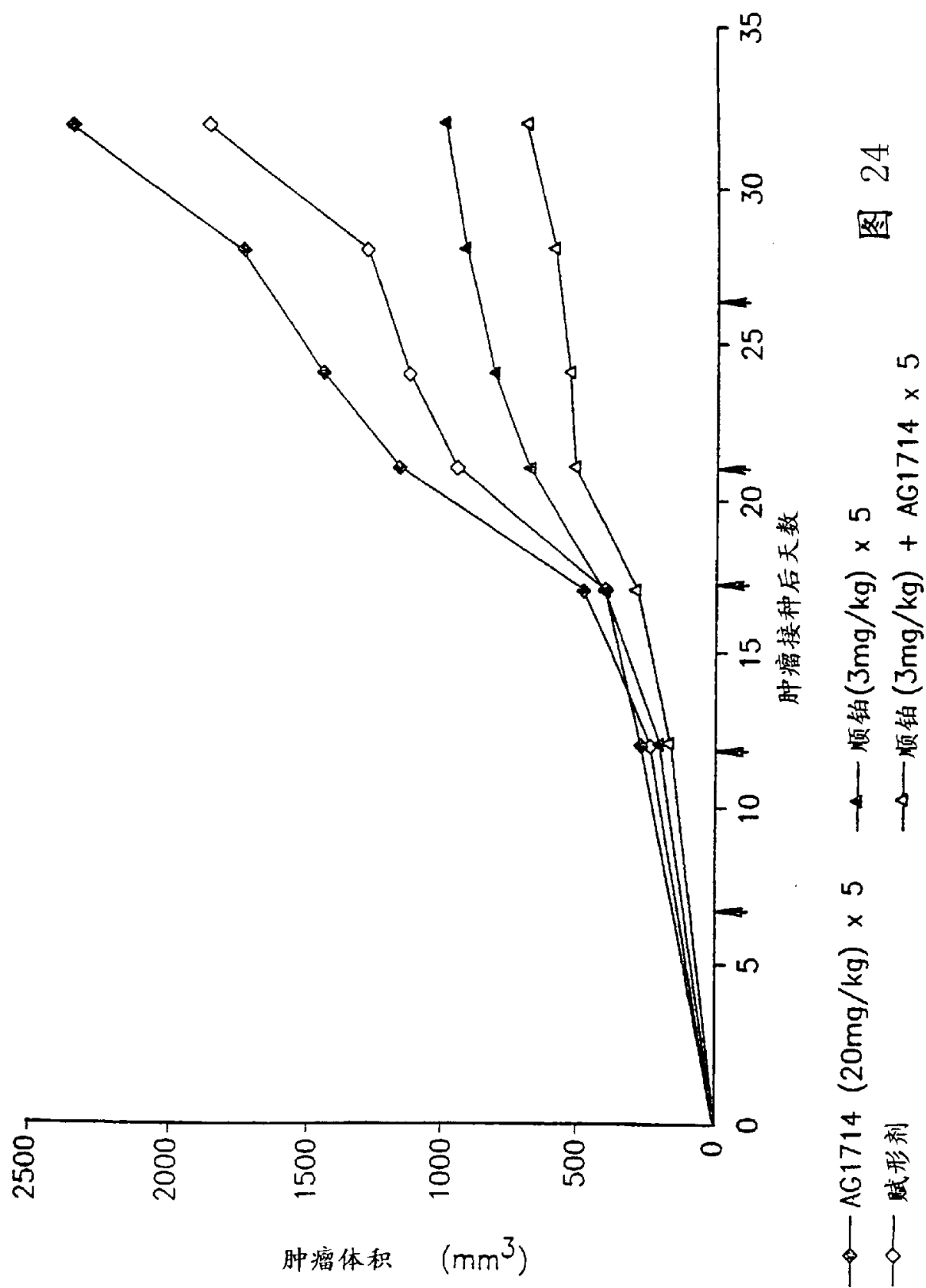


图 24

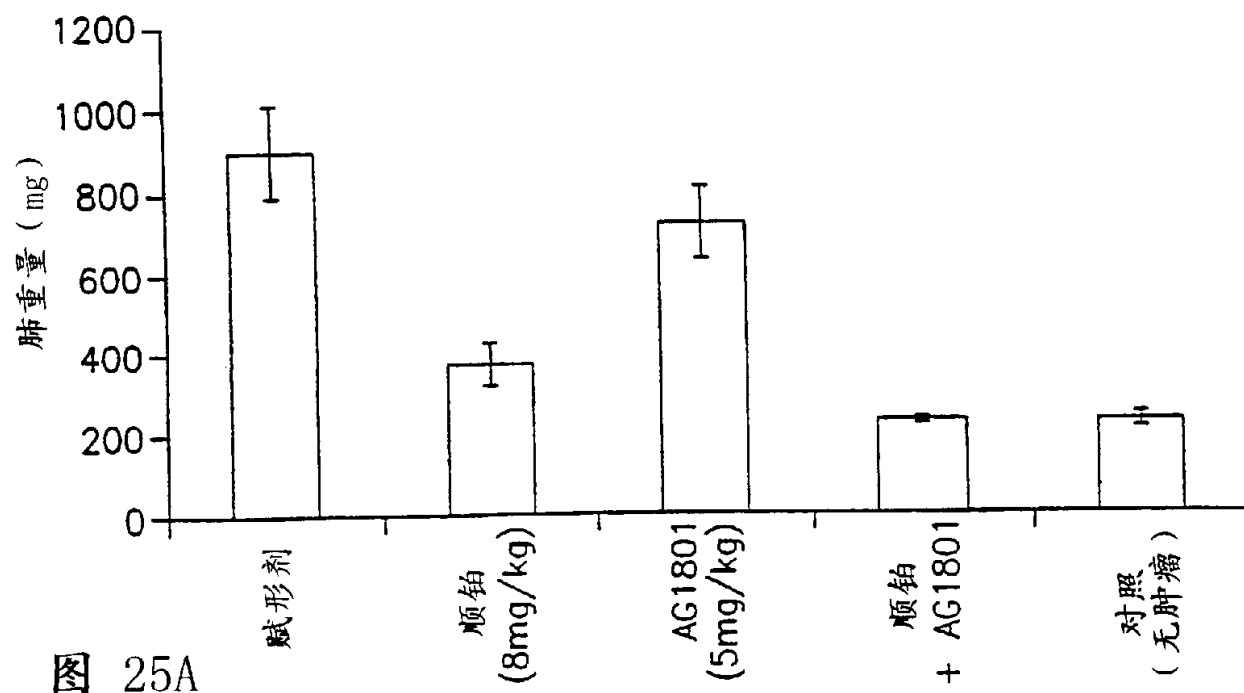


图 25A

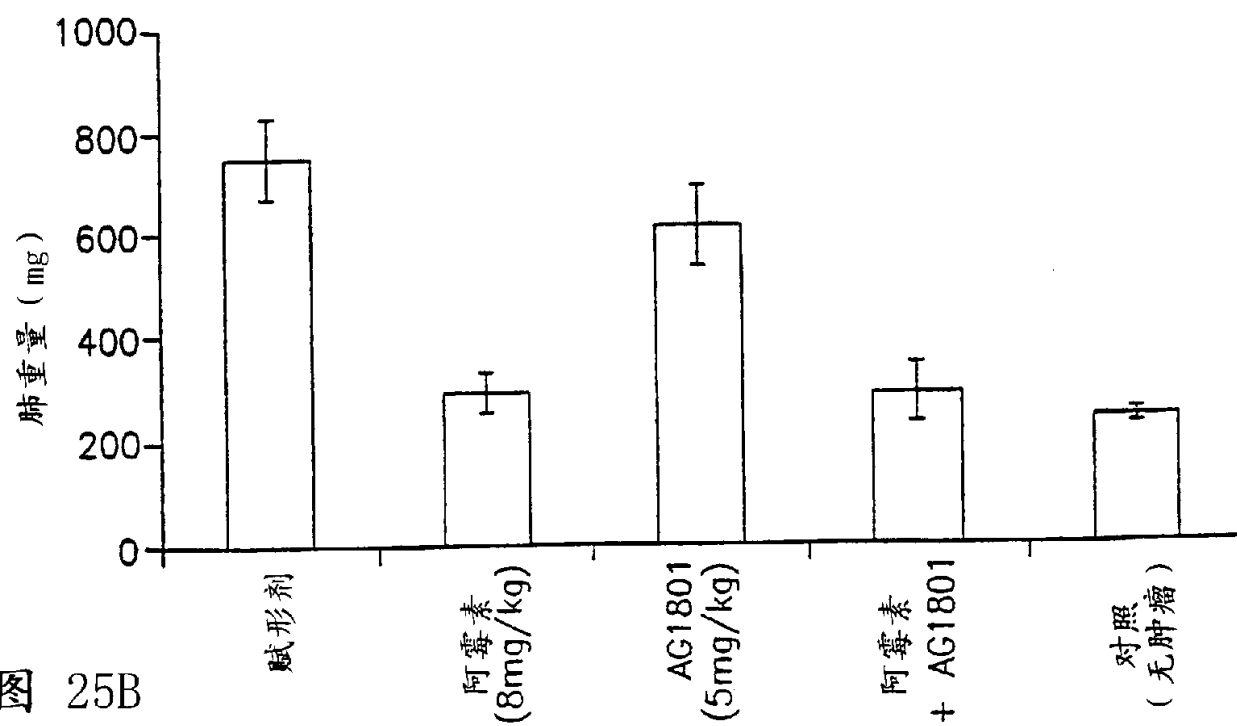


图 25B

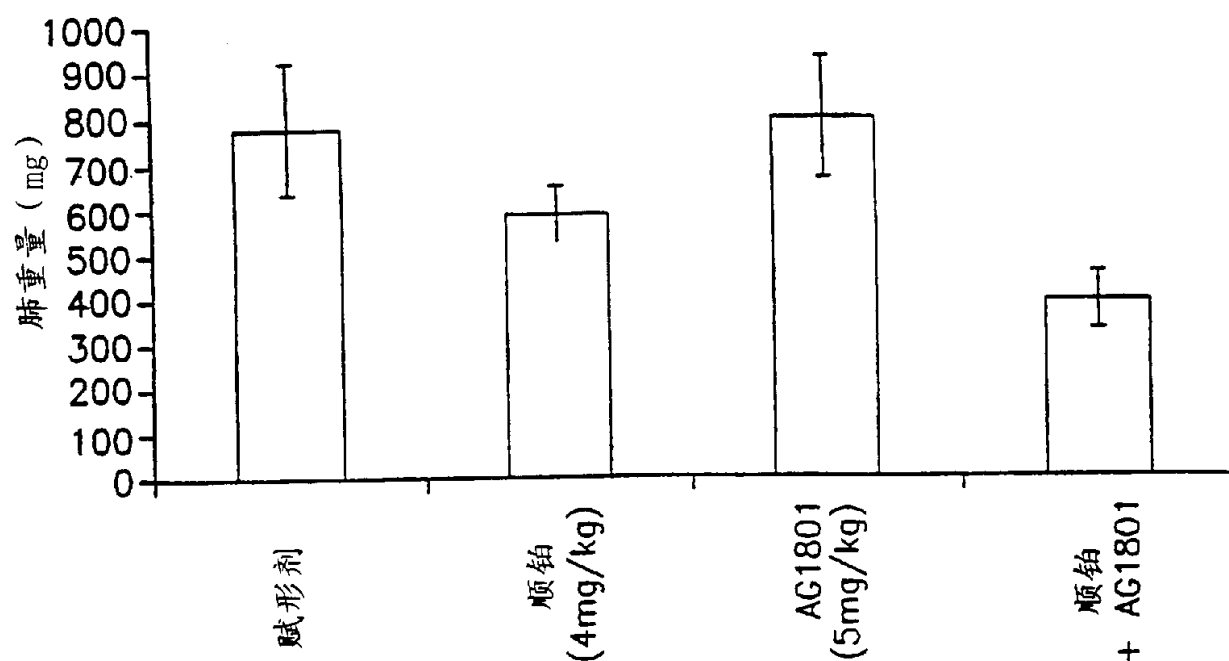


图 26

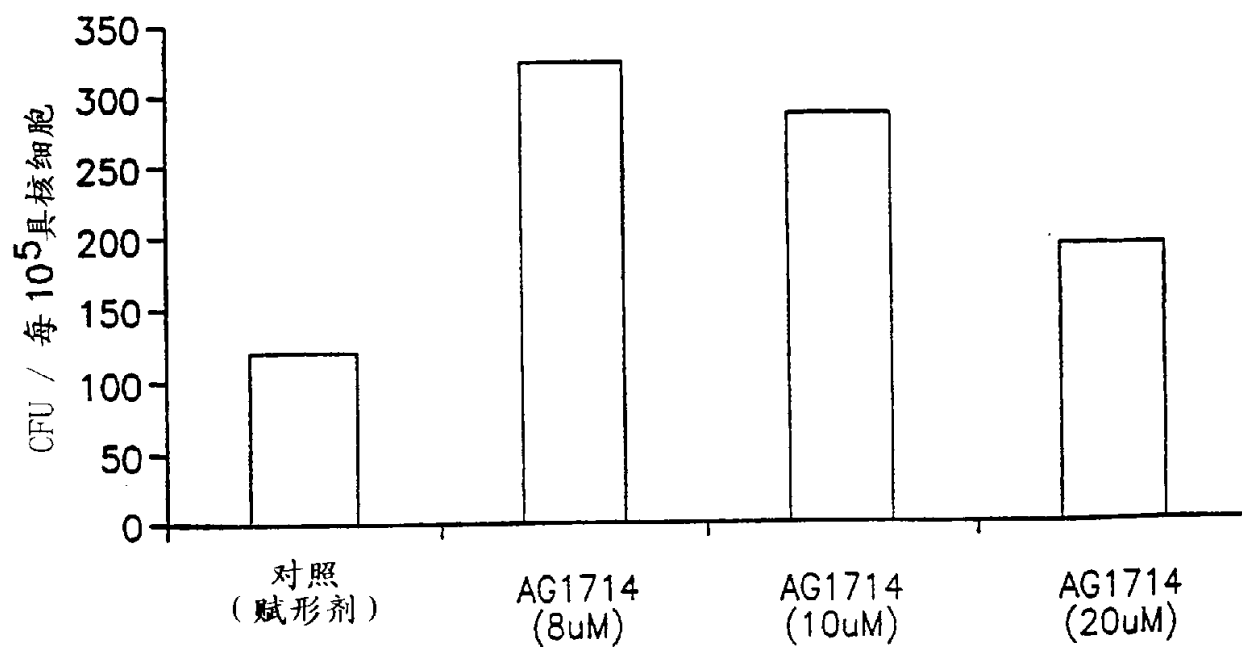
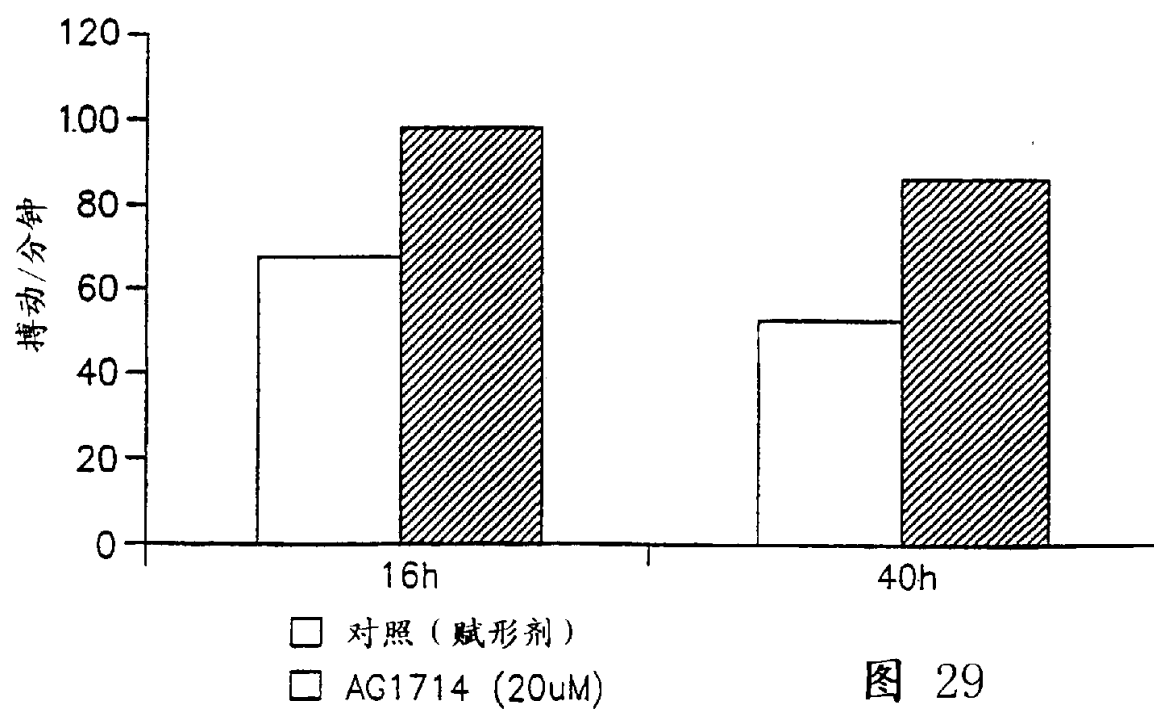
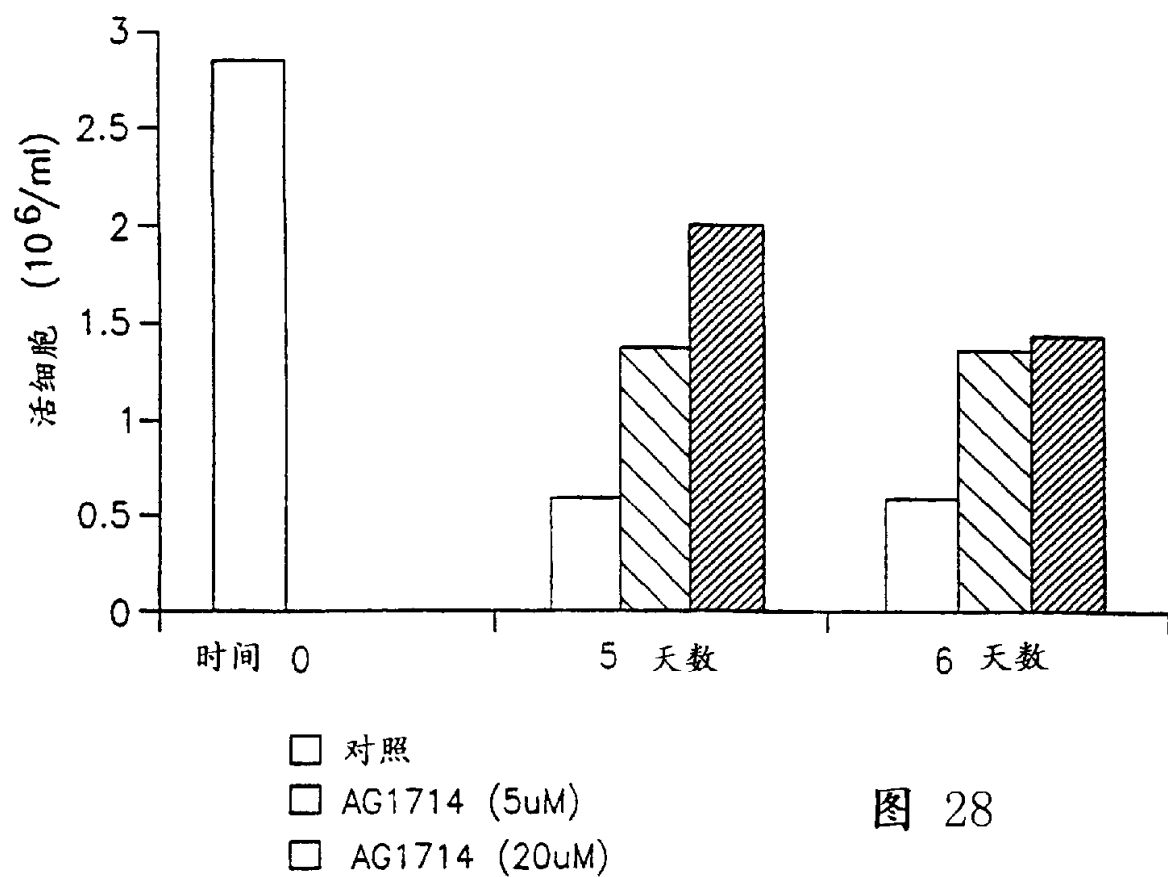


图 27



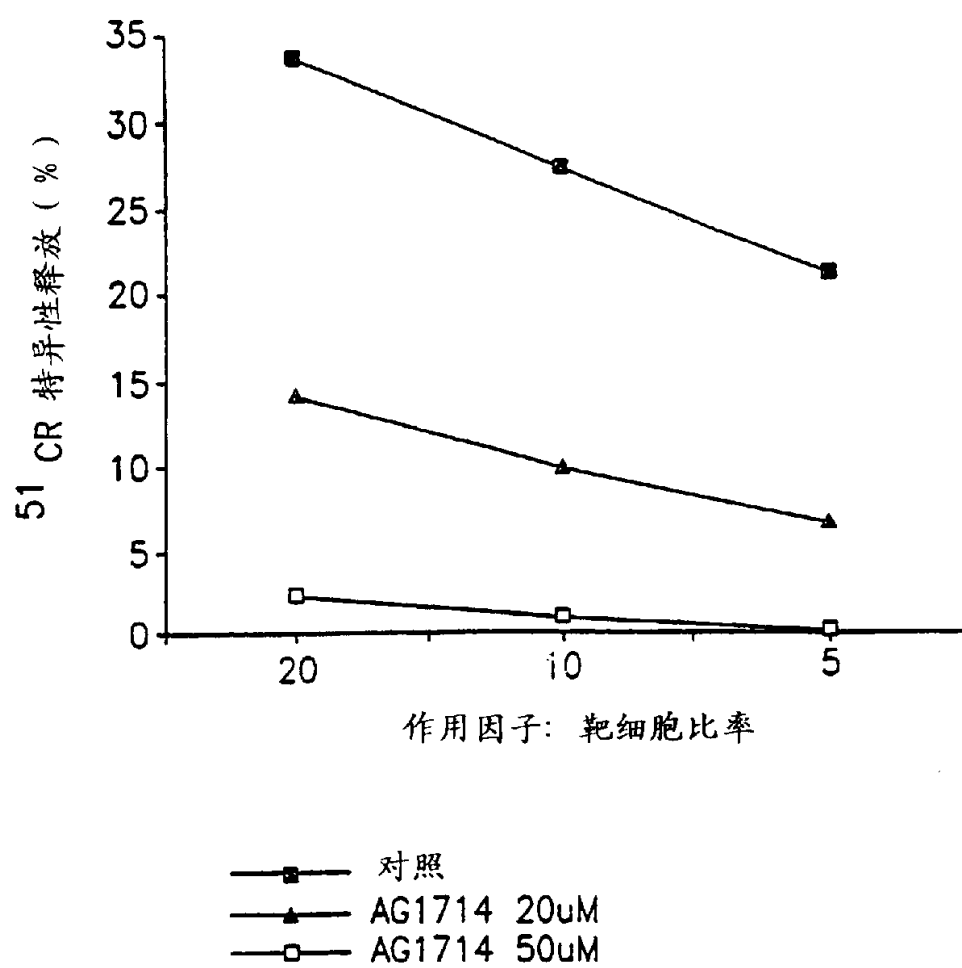


图 30