



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102159553 B

(45) 授权公告日 2016. 02. 17

(21) 申请号 200980136332. X

(22) 申请日 2009. 07. 17

(30) 优先权数据

61/081, 585 2008. 07. 17 US

61/158, 569 2009. 03. 09 US

61/178, 570 2009. 05. 15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 03. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/051004 2009. 07. 17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/009405 EN 2010. 01. 21

(73) 专利权人 匹兹堡大学

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 P·温普弗 M·C·弗兰特兹

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 过晓东

(51) Int. Cl.

C07D 235/18(2006. 01)

C07D 263/56(2006. 01)

C07D 403/04(2006. 01)

C07D 403/02(2006. 01)

C07D 207/444(2006. 01)

C07D 403/14(2006. 01)

C07D 403/12(2006. 01)

A61K 31/454(2006. 01)

A61P 17/18(2006. 01)

(56) 对比文件

Peter Wipf, et al., .Mitochondrial Targeting of Selective Electron Scavengers: Synthesis and Biological Analysis of Hemigramicidin-TEMPO Conjugates. 《J. A. C. S. 》. 2005, 第 127 卷 (第 36 期), 第 12460-12461 页.

审查员 李伟

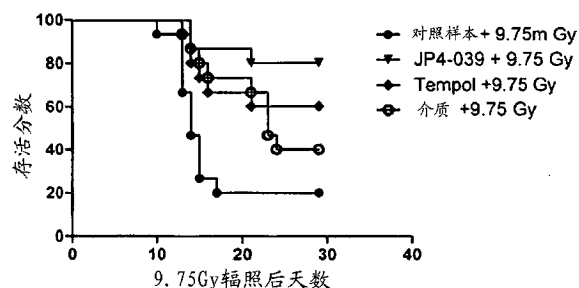
权利要求书4页 说明书71页 附图39页

(54) 发明名称

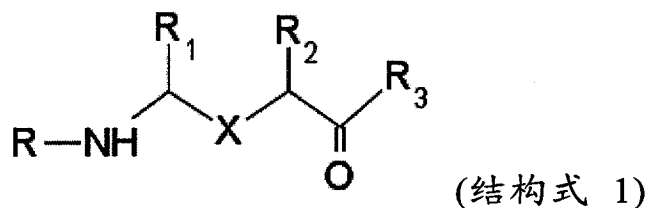
靶向氧氮自由基药剂

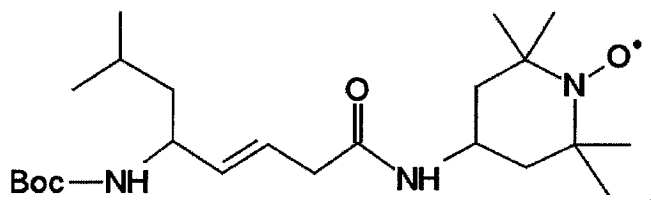
(57) 摘要

本发明提供了组合物和对清除自由基, 尤其是对于线粒体选择性的有用的方法。该化合物包括一个连接在线粒体靶向基团上的含有氮氧自由基的基团。该化合物可以交联成二聚体而不丧失活性。本发明还提供了预防、缓解和治疗辐射引起的损伤的方法。根据本发明所述, 该方法包括以有效预防、缓解或治疗辐射引起的损伤的一定数量和给药方案的方式将一种化合物输送给患者。

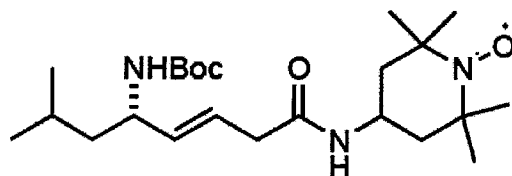


1. 一种化合物具有结构：





5. 根据权利要求 4 所述的化合物,其特征在于具有结构



JP4-039

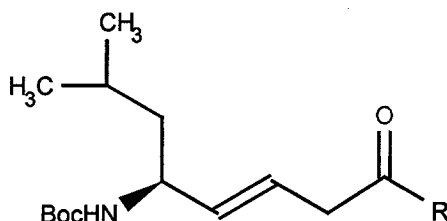
6. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中 R 是 Ac, Boc 或 Cbz。

7. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中 R_1 , R_4 和 R_6 是独立地选自氢、甲基、乙基、丙基、2-丙基、丁基、t-丁基、戊基、己基、苄基和羟苄基。

8. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中当 X 是 $-\text{CH}=\text{CR}_4-$ 时, R_4 是氢、甲基或乙基。

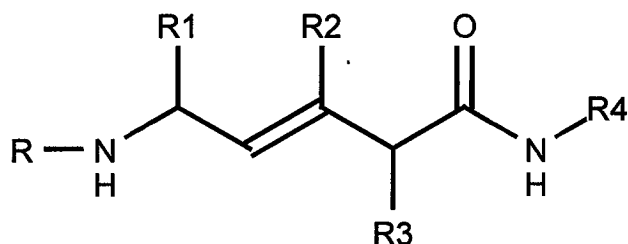
9. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中 R_5 是 2,2,6,6-四甲基-4-哌啶 1-氧基、1-甲基 2-氮杂金刚烷 N-氧基或 1,1,3,3-四甲基异吲哚啉-2-基氧杂。

10. 一种化合物,其具有结构:



其中 R 是 $-\text{NH}-R_1$ 、 $-\text{O}-R_1$ 或 $-\text{CH}_2-R_1$, 且 R_1 是含 $-\text{N}-\text{O}\cdot$ 、 $-\text{N}-\text{OH}$ 或 $\text{N}=\text{O}$ 的基团。

11. 一种化合物,其具有结构:



(结构式 2)

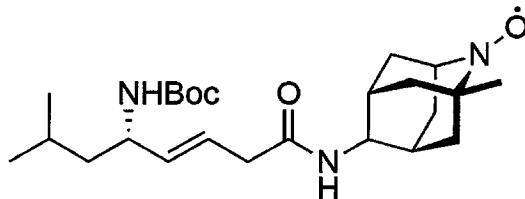
其中 R_1 和 R_2 是,独立地,选自氢、 C_1-C_6 直链或支链烷基、或包含未被取代或被甲基、羟基或氟取代的苯基 ($-\text{C}_6\text{H}_5$) 的直链或支链烷基; R_3 是氢; R_4 是包含 $-\text{N}-\text{O}\cdot$ 、 $-\text{N}-\text{OH}$ 或 $\text{N}=\text{O}$ 的基团; R 是 $-\text{P}(\text{O})-\text{Ph}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{R}_5$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{R}_5$ 、或 $-\text{P}(\text{O})-(\text{R}_5)_2$, 其中 R_5 是 $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ 直链或支链烷基、或包含未被取代或被甲基、乙基、羟基或氟取代的苯基 ($-\text{C}_6\text{H}_5$) 的直链或支链烷基。

12. 根据权利要求 11 所述的化合物,其中 R 是 Ac, Boc 或者 Cbz。

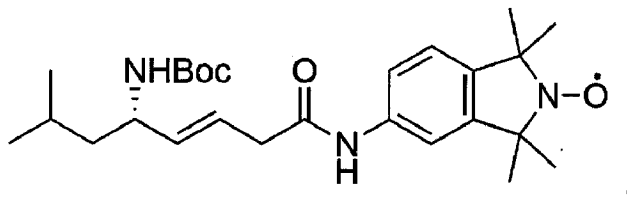
13. 根据权利要求 11 所述的化合物, 其特征在于 R_1 和 R_2 各自是甲基、乙基、丙基、2-丙基、丁基、t-丁基、戊基、己基、苄基, 和羟苄基。

14. 根据权利要求 11 所述的化合物, 其中 R_4 是 2,2,6,6-四甲基-4-哌啶 1-氧基、1-甲基-2-氮杂金刚烷 N-氧基或 1,1,3,3-四甲基异吲哚啉-2-基氧杂。

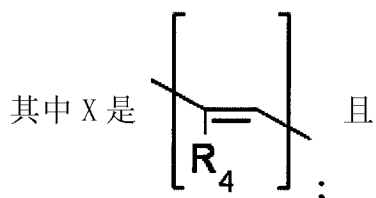
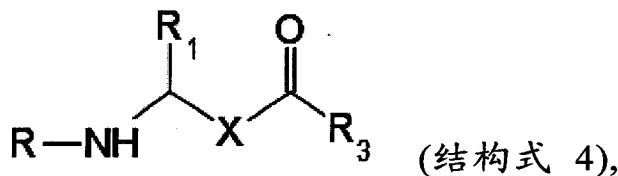
15. 一种化合物, 其具有结构



16. 一种化合物, 其具有结构

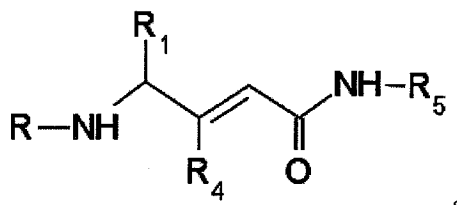


17. 一种化合物具有结构

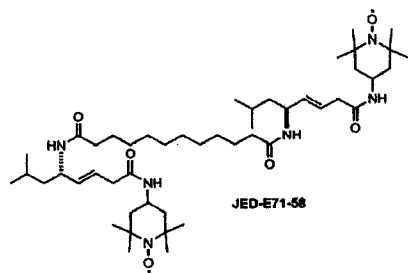


R_1 是氢、 $C_1 \sim C_6$ 直链或支链烷基、或 $C_1 \sim C_6$ 直链或支链烷基进一步包含一个未被取代或被甲基、羟基或氟取代的苯基 (C_6H_5) ; R_4 是氢、 $C_1 \sim C_6$ 直链或支链烷基、或 $C_1 \sim C_6$ 直链或支链烷基进一步包含一个未被取代或被甲基、羟基或氟取代的苯基 (C_6H_5) ; R_3 是 $-NH-R_5$ 、 $-O-R_5$ 或 $-CH_2-R_5$, 且 R_5 是包含 $-N-O \cdot$ 、 $-N-OH$ 或 $N=O$ 的基团 ; 且 R 是 $-C(O)-R_6$ 、 $-C(O)O-R_6$ 、或 $-P(O)-(R_6)_2$, 其中 R_6 是 $C_1 \sim C_6$ 直链或支链烷基、或 $C_1 \sim C_6$ 直链或支链烷基进一步包含一个或多个各自未被取代或被甲基、羟基或氟取代的苯基 (C_6H_5)。

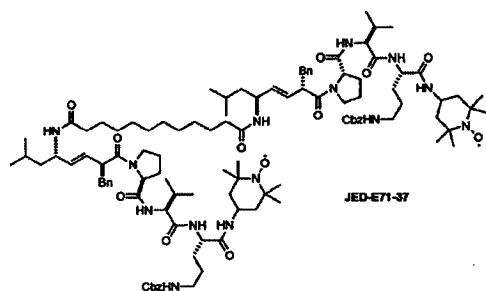
18. 根据权利要求 17 所述的化合物, 其特征在于具有结构



19. 一种化合物, 该化合物是 JED-E71-58



和 JED-E71-37



其中之一。

靶向氧氮自由基药剂

技术领域

[0001] 本发明提供了新型化合物和由含有一个氧氮自由基载体基团（也称含氧氮自由基基团）和一个线粒体靶向基团（也称靶向基团）的物质构成的组合物。该靶向基团被认为是不受任何限制的，具有将该组合物选择性的传递到线粒体的能力，同时可以将该氧氮自由基基团的抗氧化剂和自由基清除活性传递到细胞，包括然而并非仅限于在线粒体内富集。这些化合物一般可用作抗氧化剂，并具有自由基清除能力，而且，特别地，例如并且没有限制，具有辐射防护能力，同时能够预防并缓解退行性疾病。

背景技术

[0002] 细胞内的氧化应激一般是通过生成活性氧类物质（“ROS”）和活性氮类物质（“RNS”）的方法来表达它自己。特别地，细胞呼吸途径会在细胞的线粒体膜内产生 ROS 和 RNS，见 kelso 等人，具有氧化还原活性的泛醌对于细胞内线粒体的靶向选择性：抗氧化剂和抗细胞凋亡特性，J Biol Chem. 276 :4588 (2001)。活性氧类物质包括自由基，含氧原子的活性阴离子，以及含有既可以产生自由基也可以被自由基进行化学活化的氧原子的分子。具体的例子包括超氧阴离子，羟自由基和氢过氧化物。许多疾病状态下，对于 ROS 和 RNS 产生的正常反应减弱了。

[0003] 自然产生的酶，比如超氧化物歧化酶（“SOD”）和过氧化氢酶补救 ROS 和 RNS 自由基以使正常代谢活动得以进行。细胞稳态的重大偏差，比如失血性休克，会导致氧化应激状态，从而造成线粒体膜“电子漏”（“electron leakage”）。“电子漏”产生过量的 ROS 致使细胞天然抗氧化剂无法补偿。特别地，SOD 不能容纳与通过细胞凋亡最终导致早发性线粒体机能障碍和细胞死亡的失血性休克有关的过剩的 ROS，参见 Kentner 等人，在失血性休克早期利用 TEMPOL 抗氧化剂治疗提高小鼠存活率，J Trauma Inj Infect Crit Care. , 968 (2002)。

[0004] 心磷脂（“CL”）是只在真核细胞的线粒体内膜中发现的一种阴离子磷脂，见 Iverson, S. L. 和 S. Orrenius, 心磷脂与细胞色素 C 之间的相互作用和细胞凋亡的线粒体调控, Arch Biochem. 423 :37-46 (2003)。在正常状态下，促细胞凋亡蛋白质细胞色素 C 是通过与 CL 结合锚定在线粒体内膜上的，见 Tuominen, E. K. J., 等人。磷脂与细胞色素 c 的相互作用：扩展脂质锚定的证据，JBiol Chem. , 277 :8822-8826 (2002)。CL 的酰基部分很容易受到活性氧类物质过氧化作用的影响。当线粒体内产生过量的 ROS 时，连接在 CL 上的细胞色素 C 可以起到氧化酶的作用，导致线粒体膜内的 CL 的大量过氧化反应，见 Kagan, V. E. 等人。细胞色素 c 用作释放促细胞凋亡因子所必需的心磷脂加氧酶，Nat Chem Biol. 1 : 223-232 (2005)；还有 Kagan, V. E. 等人，细胞凋亡的氧脂组学：细胞色素 c 对心磷脂和磷脂酰丝氨酸的氧化还原催化作用，Free Rad Biol Med. 37 :1963-1985 (2005)。

[0005] CL 的过氧化反应减弱了 CL 和细胞色素 C 之间的键合作用，见 Shidoji, Y. 等人，脂质过氧化作用引起的细胞色素 C 和心磷脂之间的分子间相互作用的减弱，Biochem Biophys Res Comm. 264 :343-347 (1999)。这导致细胞色素 C 释放进入线粒体膜间腔，导致细胞程序

性死亡。并且,CL 的过氧化反应能有效的打开线粒体通透性转换孔 (“MPTP”),见 Dolder, M. 等人,接触位点的线粒体肌酸激酶:与孔蛋白和腺嘌呤核苷酸转位酶的相互作用,在通透性转换过程中的作用和对氧化损伤的敏感性, *Biol Sign Recept.*, 10 :93-111(2001); 也参见 Imai, H. 等人,利用线粒体 / 磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶防止低血糖致细胞凋亡过程中腺嘌呤核苷酸转运体的失活, *Biochem J.*, 371 :799-809(2003)。因此,线粒体膜膨胀和释放细胞色素 C 进入胞液。胞液内的过量的细胞色素 C 会导致细胞凋亡,见 Iverson, S.L. 等人,心磷脂 - 细胞色素 C 之间的相互作用和细胞凋亡的线粒体调控, *Arch Biochem Biophys.* 423 :37-46(2003)。

[0006] 此外,线粒体机能障碍和细胞死亡最终可能导致多脏器功能衰竭,尽管进行了复苏治疗或补充供氧,参见 Cairns, C,生命机器的紊乱:失血性休克的代谢途径, *Curr Crit Care.*, 7 :437(2001)。因此,需要有一种能够清除 ROS 并由此减少氧化应激的抗氧化剂。减少氧化应激可以延迟,甚至抑制,否则可能发生的诸如组织缺氧之类的生理状况。

[0007] 同样,还存在改善抗氧化剂穿过细胞膜的渗透性的需要。SOD 的局限性之一是它不能轻易穿过细胞膜。然而,氮氧自由基,如 TEMPO(2,2,6,6-四甲基哌啶-N-氧)及其衍生物,已被证明比 SOD 更易穿过细胞膜。而且,例如但不仅限于氮氧自由基,TEMPO 可以抑制 ROS 的生成,特别是超氧化物,这是由于线粒体电子传递链对羟胺自由基清除剂的还原作用,见 Wipf, P. 等人,选择性电子清除剂的线粒体靶向性:半短杆菌肽-TEMPO 轭合物的合成和生物学分析, *J Am Chem Soc.* 127 :12460-12461。因此,TEMPO 衍生物选择性传递可以导致有积极治疗意义的 ROS 的减少,而且由于细胞氧化应激的减少可以延迟或抑制细胞死亡。

[0008] 选择性传送可以通过许多不同途径实现 - 例如,通过具有能够穿透细胞膜,并最终被线粒体膜捕获的特定靶向序列的生物学或化学成分实现。已经证实氮氧自由基 SOD 模拟化合物选择性传递进入线粒体膜是很难实现的。因此,需要能够有效和有选择性地将抗氧化剂传递给准确定位的线粒体及其膜和膜间隙,以帮助减少 ROS 类物质和 RNS 类物质。抗氧化剂也有助于抑制通常由活性氧类物质增加造成的细胞和线粒体的细胞凋亡活性,见 Kelso. 等人,具有氧化还原活性的泛醌对于细胞内线粒体的靶向选择性:抗氧化剂和抗细胞凋亡特性, *J Biol Chem.*, 276 :4588(2001)。美国专利 NO. 20070161573 和 20070161544 的文献中描述了有关线粒体靶向抗氧化剂的示例。

[0009] 目前仍然是非常需要一种可以传递不同类型载体到线粒体的组合物及其相关方法。在一个实施方案中,提供了一种包括具有很强的将线粒体连接到载体上的亲和力的膜活性肽基片段的组合物。载体的选择范围很大。需要有一种能够有效治疗线粒体膜内过量的线粒体 ROS 和 RNS 产物引起的疾病的组合物和方法。还需要有一种可以防止动物细胞和组织遭受辐射损伤的化合物。

[0010] 辐照

[0011] 暴露于致电离辐射 (IR) 的生物学后果包括基因组不稳定性和细胞死亡 (Little JB, Nagasawa H, Pfenning T, 等人,辐射致基因组不稳定:X 射线和 α 粒子的延时致突性和细胞遗传学效应. *Radiat Res* 1997 ;148 :299-307)。据推测,辐解产生的自由基是红外损伤 (IR) 的主要原因。水直接辐解和次级短寿命 ($10^{-10} \sim 10^{-6}$ s) 活性中间体介导的化学反应会导致细胞大分子,包括 DNA 和蛋白质,以及膜磷脂的损伤 (Mitchell JB, Russo A, Kuppusamy

P, 等人, 辐射、自由基及其成像, *Ann N Y Acad Sci* 2000 ;899 :28-43)。DNA 被认为是自由基的主要攻击目标, 导致 DNA 单, 双链断裂 (Bryant PE. 哺乳动物细胞 DNA 的酶限制 : 潜在致命性病变的双链断裂的证据, *Int J Radiat Biol* 1985 ;48 :55-60)。为了保持基因组的完整性, DNA 修复和细胞周期检验点调控的多种途径应辐射致 DNA 损伤而被激活 (Elledge SJ. 细胞周期检验点 : 防止身份危机。 *Science* 1996 ;274 :1664-1672)。这些修复和调控系统发生故障导致遗传毒性, 恶性病变和细胞死亡 (Sachs RK, Chen AM, Brenner DJ. 致电离辐射产生的染色体畸变的邻近效应。 *Int J Radiat Biol* 1997 ;71 :1-19)。

[0012] IR 致细胞死亡的主要机制之一是细胞凋亡, 最常见的是通过线粒体依赖性内在途径实现 (Newton K, Strasser A. 致电离辐射和化疗药物在无 Fas 或 FADD/MORT1 信号条件下引起淋巴细胞凋亡。 *癌症治疗医学 J Exp Med* 2000 ;191 :195-200)。后者包括继之以作为死亡程序执行的关键事件的细胞色素 C 和其他促细胞凋亡因子 (Smac/Diablo [第二线粒体衍生的半胱天冬酶 (caspase, 全称是天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶) 激活剂 / 低 pI 细胞凋亡结合蛋白的直接抑制剂], EndoG [内切酶 G], Omi/HtrA2 [丝氨酸蛋白酶], 和 AIF [细胞凋亡诱导因子]) 的释放进入胞液的线粒体的通透性。细胞色素 c 的释放有利于通过与细胞凋亡蛋白酶活化因子 1 (Apaf-1) 相互作用形成凋亡小体, 然后募集并活化半胱天冬酶 -9 的前体 (procaspase-9) 和启动蛋白质水解级联反应, 最终导致细胞分裂。促凋亡因子和半胱天冬酶 (caspase) 的激活释放意味着不可逆细胞凋亡过程的开始。因此, 以防止这些病症的发生为目的的药物开发研究是很有意义的, 特别是预防线粒体损伤表达的临界点的出现 (Szewczyk A, Wojtczak L, 作为药理学靶点的线粒体。 *Pharmacol Rev* 2002 ;54 :101-127)。然而, 对于细胞色素 c 从线粒体释放的确切机制仍然知之甚少。据推测, 可能通过干扰电子传递而产生的活性氧类物质 (ROS) 对于促进细胞色素 c 从线粒体释放具有关键性作用 (Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. 在有 Ca^{2+} 存在条件下, 通过解偶联或无机磷酸盐开启线粒体通透性转换孔取决于线粒体产生的活性氧类物质。 *FEBS Lett* 1996 ;378 :150-152)。显而易见, ROS 能够致使体外和体内线粒体膜产生通透性, 并且线粒体膜转换孔被证明具有氧化还原敏感性 (Kroemer G, Reed JC, 细胞死亡的线粒体调控。 *Nat Med* 2000 ;6 :513-519)。

[0013] 相反, 抗氧化剂和还原剂, 锰超氧化物歧化酶 (MnSOD) (Wong GH, Elwell JH, Oberley LW, 等人。含 Mn^{2+} 超氧化物歧化酶是细胞抵抗肿瘤坏死因子的细胞毒性细胞必不可少的。 *Cell* 1989 ;58 :923-931), 和硫氧还蛋白 (Iwata S, Hori T, Sato N, 等人。成人型 T 细胞白血病 (ATL) - 衍生因子 / 人类硫氧还蛋白可以抑制由于 L- 胱氨酸和谷胱甘肽耗竭导致的淋巴样细胞的细胞凋亡 : 硫醇介导的氧化还原作用可能参与调控促氧化状态引起的细胞凋亡, *J Immunol* 1997 ;158 :3108-3117) 的超量表达可以延迟或抑制细胞凋亡。以往的研究表明, 在细胞凋亡早期, 线粒体专有磷脂 - 心磷脂 (CL) 的从线粒体膜内移位到线粒体膜外, 然后活化的细胞色素 c 进入 CL 专有过氧化物酶 (Fernandez MG, Troiano L, Moretti L, 等。细胞凋亡过程中线粒体内心磷脂分布的早期变化, *Cell Growth Differ* 2002 ;13 :449-455 以及 Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, 等。作为促细胞凋亡因子释放所必须的心磷脂加氧酶的细胞色素 c。 *Nat Chem Biol* 2005 ;1 :223-232)。活化的细胞色素 c 利用产生的 ROS 进一步催化 CL 的氧化 (Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, 等人。作为促细胞凋亡因子释放所必须的心磷脂加氧酶的细胞色素 c。 *Nat Chem Biol* 2005 ;1 :223-232)。最重要的是,

氧化CL是线粒体释放细胞色素c一个重要来源(Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, 等, 作为促细胞凋亡因子释放所必须的心磷脂加氧酶的细胞色素c。Nat Chem Biol 2005 ;1 :223-232 和 Petrosillo G, Casanova G, Matera M, 等人。过氧化心磷脂与鼠心肌细胞线粒体膜的相互作用 :通透性转换和细胞色素c释放的诱导。FEBS Lett 2006 ;580 :6311-6316), 这可能是由于这种磷脂和细胞色素c之间相互作用的微环境的变化造成的(Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, 等人。细胞色素c从线粒体释放分两个步骤进行。Proc Natl Acad Sci USA 2002 ;99 :1259-1263 和 Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, 等人。线粒体释放细胞色素C的机制。Cell Death Differ 2006 ;13 :1423-1433) 和 / 或氧化CL会同Bcl-2家族蛋白(Bid, Bax/Bak), 以及腺嘌呤核苷酸转位分子(ANT)和压敏性阴离子通道(VDAC), 参与线粒体通透性转换孔(MTP)的形成(Petrosillo G, Casanova G, Matera M, 等。过氧化心磷脂与鼠心肌细胞线粒体膜的相互作用 :通透性转换和细胞色素c释放的诱导。FEBS Lett 2006 ;580 :6311-6316。FEBS Lett 2006 ;580 :6311-6316和Gonzalvez F, Gottlieb E. 心磷脂:设置细胞凋亡过程。Apoptosis 2007 ;12 :877-885)。除了其在细胞凋亡信号通路的重要作用外, ROS还涉及旁观者效应的永久性(Narayanan PK, Goodwin EH, Lehnert BE. α 粒子启动人类细胞中超氧化物阴离子和过氧化氢的生物生产。Cancer Res 1997 ;57 :3963-3971 和 Iyer R, Lehnert BE. 通过旁观者对 α 粒子的反应而与细胞生长相关的潜在因素, Cancer Res 2000 ;60 :1290-1298)和辐照后基因组的不稳定性(Spitz DR, Azzam EI, Li JJ, 等。代谢氧化/还原反应与致电离辐射的细胞反应:一种应激反应生物学的统一概念。Cancer Metastasis Rev 2004 ;23 :311-322; Limoli CL, Giedzinski E, Morgan WF, 等。染色体不稳定的细胞中的持久性氧化应激。Cancer Res 2003 ;63 :3107-3111; 以及 Kim GJ, Chandrasekaran K, Morgan WF. 线粒体机能障碍, 活性氧类物质和辐射致基因组不稳定性水平的持续升高:综述。Mutagenesis 2006 ;21 :361-367)。因此, 通过抗氧化剂清除细胞内ROS, 尤其是它的主要来源, 线粒体ROS, 的抗氧化剂, 可能是一个发展辐射防护药剂和辐射缓解药剂的重要机遇。防红外抗氧化剂的研究已经超过50年(Weiss JF, Landauer MR. 辐射防护抗氧化剂。Ann N Y Acad Sci 2000 ;899 :44-60)。

[0014] 致电离辐射诱导细胞死亡的主要机制之一是细胞凋亡, 这通常是通过线粒体依赖性内在途径实现。由细胞色素C("cyt c")催化心磷脂氧化反应, 细胞色素C和其他促凋亡因子释放进入胞液, 随后的半胱天冬酶(caspase)活化是在表明细胞凋亡不可逆阶段开始的死亡程序的执行中的关键事件。

[0015] 在Belikova, NA, 等人的文章中, (辐照致细胞凋亡过程中线粒体内细胞色素C的心磷脂专有过氧化物酶反应, Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., Vol. 69, No. 1, pp. 176-186, 2007), 一种用于处理细胞色素c含量较低的HeLa细胞(14%, HeLa1.2细胞)的小干扰RNA(siRNA)途径。细胞经 γ -射线处理(剂量为5-40Gy)。用电喷雾离子阱质谱分析法和高效液相色谱—Amplex Red荧光检测法分析脂质氧化。促凋亡因子(cyt c, Smac/DIABLO)的释放用蛋白质印迹法检测。细胞凋亡通过半胱天冬酶(caspase)-3/7活化和磷脂酰丝氨酸外翻表现出来。这表示辐照引起氢过氧化物选择性积累是在心磷脂(CL)内而不是在其他磷脂内。HeLa1.2细胞的反应是辐照致CL氧化产物的积累比亲代HeLa细胞低。在照射后的细胞色素C缺陷细胞中检测出促凋亡因子(Smac/DIABLO)的释放成比例下降。其结论是细胞色素C是CL过氧化反应的一种重要的催化剂, 对凋亡程序的执行至关

重要。辐照致细胞凋亡中细胞色素 C 的这种新的作用对于开发新的辐射防护药剂和放射增敏剂极为重要。

[0016] 重大的药物开发研究已经直接针对这些事件的预防,特别是代表一个重要的不可逆转点的线粒体损伤。虽然确切的机制仍然没有得到很好的理解,但是在细胞色素 c/ 心磷脂复合物的过氧化物酶作用下活性氧类物质的生成 (ROS) 和心磷脂的氧化被认为是在促进细胞色素 c 从线粒体中释放中起到了关键作用。ROS- 超氧自由基歧化 (通过超氧歧化酶) 生成 H_2O_2 - 以供过氧化物酶循环之用,并有利于氧化心磷脂的积累。因此,通过电子和自由基清除剂清除细胞内的 ROS,尤其是其主要来源 - 线粒体 ROS,为开发辐射防护药剂和辐射缓解药剂提供了很有希望的机遇。辐射防护领域中所进行的重大的研究是利用抗氧化剂对抗致电离辐射 (Weiss 等人,用抗氧化剂进行辐射防护。Ann N Y AcadSci 2000 ;899 : 44-60)。

[0017] 一类新型抗氧化剂,稳定的氮氧自由基,由于其直接清除自由基的多重性能以及类似催化酶的机制已被列为强力辐射防护药剂 (Saito 等。自旋标记物,TEMPOL 与 OH 自由基的两个反应位点。J Pharm Sci 2003 ;92 :275-280 ;Mitchell 等人。具有生物学活性的金属离子非依赖性超氧化物歧化酶模拟化合物。Biochemistry 1990 ;29 :2802-2807)。TEMPOL (4- 羟基 -2,2,6,6- 四甲基哌啶 -N- 氧基) 是一种已经被广泛研究的在体外和体内都具有辐射防护药剂特性的氮氧自由基 (Mitchell 等。氮氧自由基用作辐射防护药剂。Mil Med 2002 ;167 :49-50 ;Hahn 等人。体内辐射防护和稳定的氮氧自由基对血压的影响。Int J Radiat Oncol Biol Phys 1998 ;42 :839-842。Mitchell 等人。通过氮氧自由基超氧化物歧化酶模拟化合物 -tempol 抑制氧依赖性辐射致损伤,Arch Biochem Biophys 1991 ;289 : 62-70 ;Hahn 等人。Tempol, 一种稳定的自由基,是一种新的小鼠辐射防护药剂。Cancer Res 1992 ;52 :1750-1753)。目前,TEMPOL 在临床试验中,作为一种很受关注的辐射防护药剂用于癌症放射治疗过程中防止脱发。虽然被发现很有前途也较为有效,但是需要 TEMPOL 有高毫摩尔浓度,主要是由于其分配进入细胞和线粒体的量很少,这使其广泛应用受到限制 (Gariboldi 等。哌啶氮氧自由基 Tempol- 一种潜在的神经胶质瘤新型治疗剂在体外和体内作用的研究。Eur J Cancer 2003 ;39 :829-837)。此外,已经证实辐照过程中 TEMPOL 一定会发挥其辐射防护作用 (Mitchell 等。辐射,自由基及其成像。Ann NY Acad Sci 2000 ; 899 :28-43 ;Mitchell 等人。通过氮氧自由基超氧化物歧化酶模拟化合物 -tempol 抑制氧依赖性辐射致损伤。Arch Biochem Biophys 1991 ;289 :62-70),这表明,TEMPOL 的保护机制受限于它与产生与辐射产生的短寿命辐射中间体之间的相互作用。

[0018] 在自由基生成的部位的充足的抗氧化剂浓度对于优化保护策略是至关重要的。大量的研究表明,线粒体是 ROS 的第一来源和主要靶 (Orrenius S 评论。线粒体介导的细胞死亡过程中的活性氧类物质。Drug Metab Rev 2007 ;39 :443-455)。事实上,线粒体被看作是药物开发的重要靶已很久 (Szewczyk 等人,线粒体作为药理学靶。221 Pharmacol. Rev. 54 :101-127 ;2002 ;Garber K。靶向线粒体出现在治疗策略。J. Natl. Cancer Inst. 97 : 1800-1801 ;2005)。

[0019] 线粒体的靶向化合物的化学法包括使用蛋白质和肽,以及将有效成分负载于脂溶性阳离子化合物,磷酸三苯基磷,磺脲类药物,蒽环类药物,及其他经证实或推测对线粒体具有亲和力的药剂上 (Murphy MP。对线粒体具有靶向性生物活性的化合物。Trends

Biotechnol. 15 :326-330 ;1997 ;Dhanasekaran 等, 线粒体超氧化物歧化酶模拟化合物抑制过氧化物引起的氧化性损伤及细胞凋亡 :线粒体超氧化物的作用。Free Radic. Biol. Med. 157 :39 :567-583 ;2005 ;Hoye 等人, 靶向线粒体。Acc. Chem. Res. 41 :87-97, 2008)。然而, 在撰写本发明的时候, 尚无有关 GS- 氧氮自由基的证据被提供。

[0020] 发明概述

[0021] 目前仍然存在一种用于将各种类型的负载物, 特别是抗氧化剂传递到线粒体的一种组合物及其相关方法的非常现实的需要。此处提供的是一种含有靶向性基团的化合物和一种含氮氧自由基基团的负载物以及含有该化合物的组合物。如下面示例所述, 本发明所述的化合物和组合物可用于防护和治疗遭受致电离辐射, 抗衰老疗法以及, 受益于抗氧化剂治疗的常见疗法。这些化合物的示例见下文以及权利要求。

[0022] 例如, 抗 γ -射线的线粒体共轭氮氧自由基 (含 $-N-O\cdot$, $-N-OH$ or $N=O$ 的化合物和基团) 的有效线粒体浓度可增加到亲代非共轭氮氧自由基的 1000 倍 (并且其所要求的组织浓度可以从 10mM 减少 1000 倍到 10 μ M)。线粒体靶向氮氧自由基在线粒体内富集已被 EPR 光谱学证实, 并且用质谱分析了从用线粒体靶向氮氧自由基培养的细胞中获得的线粒体中的该氮氧自由基的含量。将线粒体靶向氮氧自由基输送到线粒体不依赖于线粒体膜电位。因此, 线粒体靶向氮氧自由基不仅可以在完整的线粒体内积累, 而且还可以在具有低膜电位的切断的或损伤的线粒体内积累。而且, 线粒体靶向氮氧自由基的轭合物被输送到线粒体内不会影响线粒体膜电位。因此, 他们不损害细胞内的主要线粒体功能和能量生产。此外, 共轭氮氧自由基提供了一种重要的新功能 - 辐照后保护。

[0023] 与其他氮氧自由基相似, 共轭线粒体靶向氮氧自由基可潜在降低血压和交感神经活性。然而, 与非共轭亲代氮氧自由基相比, 大量减少线粒体靶向氮氧自由基的剂量 (约 1000 倍), 可明显降低由其导致的副作用。

[0024] 附图简述

[0025] 图 1 提供了某些氮氧自由基的非限制性示例。logP 值采用 Molinspirations 网站 (www.molinspiration.com/cgi-bin/properties) 的分子性质和类药性在线计算器估算。TIPNO = t-丁基异丙基苯基氮氧自由基。

[0026] 图 2 提供了本发明所参考的某些线粒体靶向抗氧化剂的结构示例和 TEMPOL 的结构。

[0027] 图 3 描述了 TEMPO- 半短杆菌肽轭合物的合成途径的示例。

[0028] 图 4 显示了肌上皮细胞 (MECs) 内的氮氧自由基短杆菌肽 S 缩氨酸-TEMPO 轭合物的结合和还原的 EPR (电子顺磁共振) 分析。

[0029] 图 5 显示了异硫氰酸荧光素 - 葡聚糖 (FD4) 的读数, 反映了短杆菌肽-S TEMPO 轭合物对深度失血性休克的大鼠肠黏膜通透性的影响。图 5 显示了反映短杆菌肽-S TEMPO 轭合物对继深度失血性休克之后的大鼠肠黏膜通透性的影响的异硫氰酸荧光素 - 葡聚糖 (FD4) 读数。该数据表示为相对于休克阶段输入生理盐水的对照样本的检测值的渗透率变化的百分比。图 5A 显示出 TEMPOL 用于肠道粘膜保护检测的“阳性对照”的 FD4 读数。图 5B 显示出体现肠道粘膜保护的 TEMPO 共轭 XJB-5-208 的 FD4 读数。图 5C 显示出含有 TEMPO 的有效基团, 但是不能预防大出血引起的肠屏障功能障碍的 XJB-5-125 的 FD4 读数。图 5D 显示了不具有 TEMPO 的有效基团且不能预防大出血引起的肠屏障功能障碍的 XJB-5-127 的

FD4 读数。图 5E 显示出体现肠道黏膜保护的 TEMPO 共轭 XJB-5-131 的 FD4 读数。图 5F 显示出即使拥有与最活跃的化合物 XJB-5-131 相同的半短杆菌肽线粒体靶向基团,但不具有 TEMPO 的有效基团的 XJB-5-133 的 FD4 读数。图 5G 显示出具有 TEMPO 的有效基团但不能预防大出血引起的肠屏障功能障碍的 XJB-5-197 的 FD4 读数。图 5H 显示出不具有 TEMPO 的有效基团并且不能预防大出血引起的肠屏障功能障碍的 XJB-5-194 的 FD4 读数。

[0030] 图 6 显示的氮氧自由基共轭物对放线菌素 D(ActD) 致细胞凋亡的影响示意图。图 6A 是从 10000 回肠细胞计算出的超氧化物产物的平均荧光强度的示意图。图 6B 是以膜联蛋白 V 阳性细胞百分率表示的磷脂酰丝氨酸外翻的示意图。图 6C 是以在其特异底物上的 Z-DVED-AMC 的量,以 nmol/mg 蛋白计,来表示的半胱天冬酶 -3(caspase-3) 活性的示意图。6D 是一个用碘化丙啶荧光法显示的 DNA 片段示意图。图 6E 是在不同浓度的化合物 5a(如图 3 所示)存在条件下 PS 外翻的示意图。图 6F 是在存在或不存在 5a 或 2-脱氧葡萄糖的情况下线粒体内三磷酸腺苷(ATP)的含量示意图。图 7 显示了腔内 XJB-5-131 对大出血致肠黏膜内磷脂过氧化反应的影响。图 7A 是卵磷脂(“PC”)过氧化反应的示意图。图 7b 是一个关于磷脂酰乙醇胺(“PE”)过氧化反应活性的示意图。图 7c 是一个关于磷脂酰丝氨酸(“PS”)过氧化反应活性的示意图。图 7D 是一个关于心磷脂(“CL”)过氧化反应活性的示意图。

[0031] 图 8 是腔内 XJB-5-131 的对半胱天冬酶 3 和 7(caspase3 和 7)活性的影响的示意图。

[0032] 图 9 是 XJB-5-131 对遭受到氧化应激的 Caco-2BBE 人类肠上皮样单层膜渗透性的示意图。该膜通透性以清除率($\text{pL} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^2$)表示。

[0033] 图 10A 是 XJB-5-131 静脉治疗对遭受容量控制失血性休克的大鼠的 MAP(平均动脉压,mm Hg)的影响示意图。图 10B 是 XJB-5-131 静脉治疗对遭受容量控制失血性休克的大鼠存活率的影响示意图。图 11A 是一个 JP4-039 合成途径示意图。图 1B 提供了结构式 4 中的化合物的合成路线如下。

[0034] 图 12 表明,氮氧自由基共轭物 XJB-5-125 融合到细胞和线粒体,比存在于小鼠胚胎干细胞中的其亲代非共轭 4-氨基-TEMPO 更有效。(A) 表明其与小鼠胚胎干细胞内其细胞和细胞线粒体融合效率,和 (B) 显示从线粒体回收的氮氧自由基的典型 EPR 谱图。

[0035] 图 13 显示氮氧自由基共轭 XJB-5-125 防止小鼠胚胎细胞因 γ 射线导致超氧化物的产生和磷脂过氧化反应。(A) 超氧化物的产生。细胞暴露于 10Gy γ 射线下。XJB-5-125(20 μM) 在辐照前 10min 或辐照后 1h 被添加到细胞内,并在培养 5h 后去除。细胞在指定的时间点用 5 μM 的二氢埃托啡(DHE)培养 30min。采用配有 CellQuest 软件的 FACSscan 流式细胞仪进行溴乙非啶荧光性分析。10000 个细胞的平均荧光强度是使用 585-nm 的带通滤波器取得的。(B) 心磷脂的氧化。心磷脂的氢过氧化物采用高效液相色谱一 Amplex Red 荧光检测法测定。数据以平均值 $\pm$ 标准差($n = 3$)的形式表示。 $^*p < 0.01$ 对未辐照细胞; $^*p < 0.01(0.05)$ 对在相同条件下经过 XJB-5-125 治疗的辐照细胞。插图是细胞内心磷脂的一个典型 2D-HPTLC(二维高效薄层色谱法)剖面。

[0036] 图 14 显示,显示氮氧自由基共轭 XJB-5-125 防止 γ 射线辐照引起细胞凋亡。(A) XJB-5-125 阻断 γ 射线辐照引起的细胞色素 c 在小鼠胚胎细胞的胞液中的积累。(B) 细胞色素 c/肌动蛋白的密度比。采用实验室工作图像采集和分析软件(Labworks

ImageAcquisition and Analysis Software, (UVP, Upland, CA)) 通过密度计量学对普带进行半定量分析。细胞色素 c 释放的水平表示为细胞色素 c/肌动蛋白的平均密度比。(C) 剂量 (5, 10 和 20 μM) 取决于 XJB-5-125 (预处理) 对 γ 射线辐照 (10Gy) 致磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻的辐射防护作用。在辐照后培养 48h 后, 取出细胞, 并在流式细胞仪分析前用 Annexin V-FITC 试剂和碘化丙啶 (PI) 染色。(D) 时间 (2, 3, 4, 5 和 6h) 取决于 XJB-5-125 (20 μM) 对 γ 射线辐照 (10Gy) 引起的小鼠胚胎细胞内磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻 (辐照后 48h) 的辐射防护效果。(E) XJB-5-125 对 γ 射线辐照 (10Gy) 引起的人类支气管上皮细胞系 BEAS-2B 细胞内磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻 (辐照后 48h) 的辐射防护效果。在辐照前 10min 或辐照后 1h, 细胞用 5-125 (5 或 10 μM) 处理。辐照后 72h 对 PS 外翻进行分析。数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($n = 3$) 的形式表示。*(&) $p < 0.01$ (0.05) 对辐照后未经 5-125 处理的细胞; # $p < 0.05$ 对 XJB-5-125 预处理的细胞。

[0037] 图 15 显示了氮氧自由基共轭 XJB-5-125 对 γ 射线辐照剂量 / 小鼠胚胎细胞的存活曲线的影响。细胞用 XJB-5-125 (20 μM) 在辐照前预处理 10min 或在辐照后处理 1h, 4h 培养后将其清除。存活比率以相对于对照样本的平板效率进行计算。这些数据通过 SigmaPlot9.0 (SYSTAT 软件) 用多靶单击数学模型进行拟合。数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($n = 3$) 表示。

[0038] 图 16 说明了 GS 共轭氮氧自由基, XJB-5-125, 对 γ 射线剂量 / 32D c1 3 小鼠造血细胞的存活曲线的影响。与 32D c1 3 细胞 (0.797Gy) 相比, 在 XJB-5-125 或 Tempol 中培养的细胞, 其 Do (剂量) (分别为 1.138 or 1.209Gy,) 增加了。在 XJB-5-125 中培养的细胞其存活曲线的肩区比 tempol 中培养的细胞的肩区值 5.82 增大了 18.24n。

[0039] 17A 和 17B 是 GS-氮氧自由基化合物 JP4-039 增加遭受全身辐照 (9.75Gy) 的小鼠的存活率曲线图。

[0040] 图 18 是 GS-氮氧自由基化合物 JP4-039 增加遭受全身辐照 (9.5Gy) 的小鼠的存活率曲线图。

[0041] 图 19 显示 GS-氮氧自由基化合物 JP4-039 对于辐照后 24h 的造血细胞是一种有效的辐射缓解剂。

[0042] 图 20 显示 (GS-氮氧自由基化合物) JP4-039 对于 KM101 人骨髓基质细胞的辐照损伤是一种有效的辐射缓解剂。

[0043] 图 21A 显示出脐带血移植 I. V27 天后, 在所获得的 NOD/SCID 小鼠骨髓中的人类细胞的检测结果, 该结果显示流式细胞仪对于接受辐照, 胫骨上端骨钻孔 (见下文), 和人类脐带血注射之后的人类 CD45+ (浅灰色) 造血细胞在 NOD/SCID 小鼠 BM 中的分析和识别。

[0044] 图 21B 是在骨髓板近端下侧 2mm 的胫骨侧面的一个直径 2mm 的单侧骨皮质伤口用钻头施行外科手术 7 天后胫骨创伤的横截面显微照片。

[0045] 图 22 是一个用于研究体外透皮量 Bronaugh 扩散系统示意图。

[0046] 图 23 是显示 24h 后 XJB-5-125 传递进入小鼠的皮肤的示意图。

[0047] 图 24 显示了从通过小鼠皮肤过滤后所获得的不同比率转录的 GS-氮氧自由基的典型的 EPR 光谱。1- 供体液, 2- 溶液 A 过滤 6h 后的受体液, 3- 溶液 B 过滤 6h 后的受体液, 4- 暴露于溶液 A 24h 后的皮肤。介质, 或皮肤 (组织) 胞液中的 GS-氮氧自由基的 EPR 谱已经录入加有 2mMK₃Fe(CN)₆ 的 28.5% 的乙腈中。

[0048] 图 25 是展现了经过 24hXJB-5-125 穿过小鼠皮肤的累计透皮吸收曲线图。

[0049] 图 26A 及图 26B 分别提供了化合物 JED-E71-37 和 JED-E71-58 的结构。

[0050] 图 27 显示了用于研究确定 XJB-5-131 对类早衰 $Ercc1^{-/-}$ 小鼠出现早衰迹象的年龄的影响的一种治疗模式。XJB-5-131 为 2mg/kg, 由 10 μ g/ μ L 的二甲基亚砜 (DMSO) 与 50 μ L 的葵花籽油的混合并腹腔注射制得。作为对照, 同窝出生的 $Ercc1^{-/-}$ 小鼠只用等量的葵花籽油治疗, 进行双盲双生子研究。

[0051] 图 28 是采用图 27 中所述的方法, 通过与对照样本 (葵花籽油) 相比较显示出 XJB-5-131 (在本图中为“XJB”) 治疗对 $Ercc1^{-/-}$ 小鼠的各种老化迹象出现年龄 (几周内) 的影响的一个简表。在本图中从小鼠 5wks 大开始直到它生命终结, 对小鼠进行的持续治疗是每周三次。XJB 柱中突出显示的细胞说明, 相对于只用介质治疗的同基因对照组小鼠而言, 用 XJB 治疗的小鼠与年龄有关的退行性改变的出现明显推迟。

[0052] 图 29 中的条形图显示出经 XJB-5-131 (在本图中为“XJB”) 治疗的或按照图 27 所述的方法用介质 (葵花籽油) 治疗的 $Ercc1^{-/-}$ 小鼠的椎间盘中的黏多糖 (一种椎间盘维护和灵活性所必须的细胞外基质蛋白) 含量。在本图中小鼠的从其 5wks 大开始直到它生命终结, 对它进行的持续治疗是每周三次。

[0053] 图 30 提供的照片显示出经 XJB-5-131 (80 μ g, 在外用膏剂中乳化) 治疗的或按照图 27 中所述的方法只用膏剂治疗的 $Ercc1^{-/-}$ 小鼠的 (光) 老化效应。本图中小鼠的持续治疗是在紫外线辐照后每天进行, 持续五天。

[0054] 图 31A-B 是经 XJB-5-131 或按照图 27 中所述的方法只用介质 (葵花籽油) 治疗的 (A) 雄性和 (B) 雌性 $Ercc1^{-/-}$ 小鼠的体重与年龄的函数关系的曲线图。XJB-5-131 与其亲代化合物 TEMPO 一样不会导致体重降低。

[0055] 图 32 提供了源自 $Ercc1^{-/-}$ 小鼠的小鼠胚胎成纤维细胞 (“MEF”) 的 SA- β 半乳糖苷酶 (一种细胞衰老标记) 染色显微照片, 其 MEF 细胞在细胞固定和着色前用 XJB-5-131 (本图中称“XJB;”溶于介质 500nM) 或者单纯用介质连续处理 48h。

[0056] 图 33 提供的显微照片显示出源自 $Ercc1^{-/-}$ 小鼠的小鼠胚胎成纤维细胞 (“MEF”) 的 γ H2AX 免疫反应染色 (一种 DNA 双链断裂和细胞衰老的标志物) 显微照片, 其 MEF 细胞在细胞固定和着色前用 XJB-5-131 (本图中称“XJB;”溶于介质 500nM) 或者单纯用介质连续处理 48h。

[0057] 图 34 显示出源自 $Ercc1^{-/-}$ 小鼠的小鼠胚胎成纤维细胞 (“MEF”) 的凋亡, 其 MEF 细胞在细胞固定和着色前用 XJB-5-131 (本图中称“XJB;”溶于介质 500nM) 或者单纯用介质连续处理 48h。

[0058] 图 35 提供的显微照片显示出不同剂量的 JP4-039 对源自 $Ercc1^{-/-}$ 小鼠的小鼠胚胎成纤维细胞 (“MEF”) 的增殖和生长的影响。即使其浓度高达 10 μ M JP4-039 对细胞也没有毒性的。

[0059] 图 36 提供的显微照片显示出不同剂量的 JP4-039 对源自野生型小鼠的小鼠胚胎成纤维细胞 (“MEF”) 的增殖和生长的影响。即使其浓度高达 10 μ M JP4-039 对细胞也没有毒性的。

[0060] 图 37 提供的显微照片显示出源自 $Ercc1^{-/-}$ 小鼠的小鼠胚胎成纤维细胞 (“MEF”) 中 p16 (细胞不可逆衰老的标志物) 的水平, 小鼠胚胎成纤维细胞 (“MEF”) 在细胞固定和

免疫反应着色前用 JP4-039 (本图中“0-39”;溶于介质 10 μ M) 或者单纯用介质处理 48h。

[0061] 图 38 提供的显微照片显示出源自 Ercc1^{-/-}小鼠并生长在氧化应激条件下 (20% 氧) 的小鼠的原代小鼠胚胎成纤维细胞 (“MEF”) 的细胞增殖, 其 MEF 细胞在细胞固定和着色前用 JED-E71-37, JED-E71-58 (溶于介质 1 μ M) 或者单纯用介质持续处理 48h。

[0062] 图 39 提供的显微照片显示出源自 Ercc1^{-/-}小鼠并生长在氧化应激条件下 (20% 氧) 的小鼠胚胎成纤维细胞 (“MEF”) 的 H2AX 免疫反应染色 (一种 DNA 双链的断裂和衰老的标志物), 其 MEF 细胞在细胞固定和着色前用 JED-E71-58 (溶于介质 1 μ M) 或者单纯用介质持续处理 48h。

[0063] 图 40 是氮氧自由基类似物的比较设计示意图。

[0064] 图 41 是氮氧自由基类似物的各种比较设计合成途径示意图。

[0065] 图 42 是 1,1,3,3-四甲基吡咯烷基-2-基氧杂 (TMIO) 的可选择性氮氧自由基部分 (单元) 合成途径示意图。

[0066] 图 43 是一个 1-甲基 2-氮杂金刚烷 N-氧基 (1-Me-AZADO) 的可选择性氮氧自由基部分 (单元) 合成途径示意图。

[0067] 发明详述

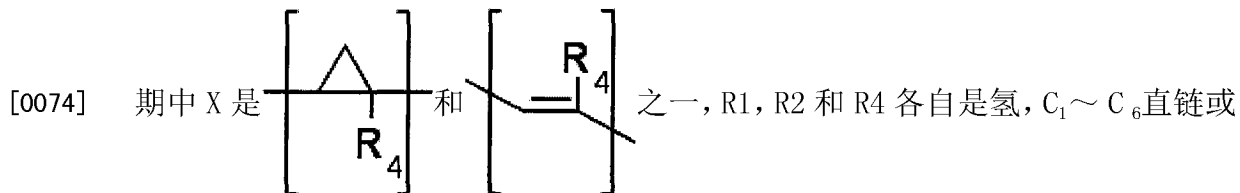
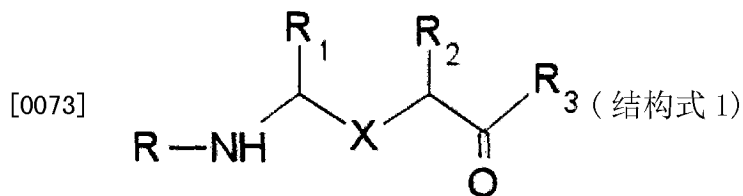
[0068] 本发明所使用的用语“主体”是指动物界的成员,包括但不限于人类。用语“活性氧类物质” (ROS) 包括但不限于,超氧化物阴离子、氢氧根和氢过氧化物自由基。

[0069] 一种抗氧化剂型化合物这里定义为一种降低其它化合物氧化速率或阻止一种物质与氧气或含氧化合物反应的化合物。一种化合物可通过检测其降低分子氧化和 / 或细胞氧化应激后遗症的能力而被确定为抗氧化剂型化合物,例如但不限于,降低脂质过氧化作用和 / 或减少蛋白质或核酸的氧化性损伤能力。在一个实例中,一种抗氧化剂,其至少在一次检测抗氧化活性的测量中具有介于 0.01 和 1000 倍的抗坏血酸的抗氧化活性水平。

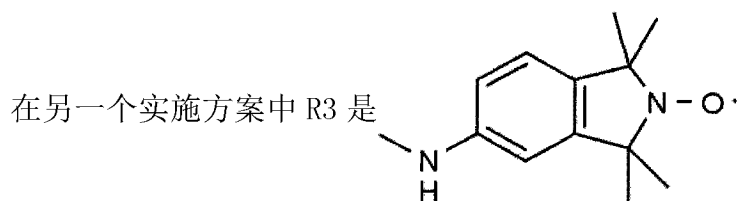
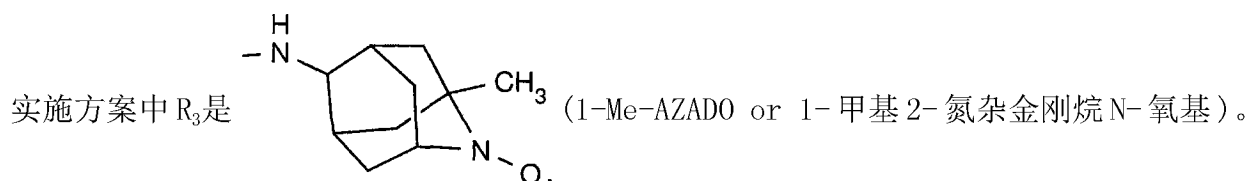
[0070] 本发明提供的化合物和组合物,包括一个目标基团和一个负载物,如含氮氧自由基的基团。负载物可以是任何有用的化合物,如在医疗和化学领域的众所周知的抗氧化剂。负载物可包含一个具有抗微生物活性的因子。例如,目标基团可以与抗菌酶 (如溶菌酶,或抗生素如青霉素) 交联。其他用于将目标基团连接到负载物上的方法在该技术领域众所周知。在一个实施方案中,负载物是一种抗氧化剂,如含氮氧自由基的基团。在另一实施方案中,由线粒体选择性靶向制剂输送的负载物可以包括一氧化氮合酶 (NOS) 活性抑制剂。负载物可以具有从抗氧化,抗辐射,防护,抗细胞凋亡,治疗,改良, NOS 拮抗剂及其制品所构成的基团中选择的特性。在另一实施方案中,负载物可以具有抑制一氧化氮合成酶的酶活性的能力。这将有助于理解,本发明所述的组合物中可能用到各种各样的负载物。负载物的非定性的例子包括: 2-氨基-6-甲基噻嗪,泛醌类似物,泛醌类似物片段成分,没有亲水端基的泛醌类似物片段成分,超氧化物歧化酶模拟化合物,超氧化物歧化酶生物模拟化合物以及 salen- 锰化合物。

[0071] 虽然少量 ROS 的产生是细胞呼吸途径的一种典型的副产品,某些条件下,当 ROS 的量超过天然酶机制无法清除的不断产生的 ROS 的量时,包括疾病或其他病情可能会发生在患者身上。因此,清除细胞线粒体膜内产生的活性氧类物质的化合物,组合物和方法是有用的,并且本发明提供了这些化合物,组合物和方法。这些化合物,组合物和方法具有能够清除过量产生的 ROS,通常超氧化物歧化酶和过氧化氢酶等等不能具备的效用。

[0072] 在一个非限定性的实施方案中,该化合物具有如下结构:

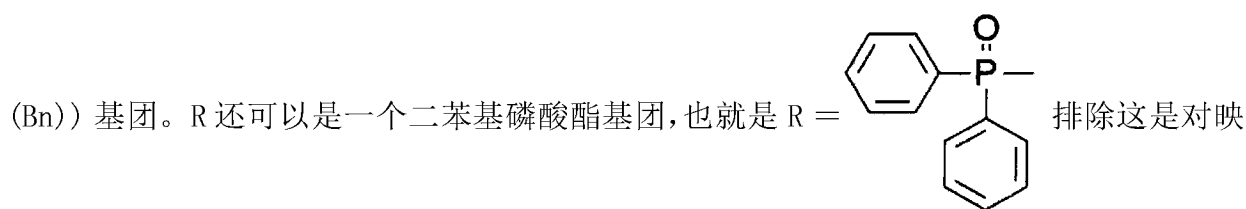


支链烷基,选择性的包括苯基 (C₆H₅) 基团,选择性的是甲基,羟基或氟取代基,包括:甲基、乙基、丙基、2-丙基、丁基、t-丁基、戊基、己基、苄基、羟苄基(如 4-羟苄基)、苯基和羟苯基。R₃是 -NH-R₅、-O-R₅或 -CH₂-R₅,其中 R₅是包含 -N-O•、-N-OH 或 N=O 的基团。在一个



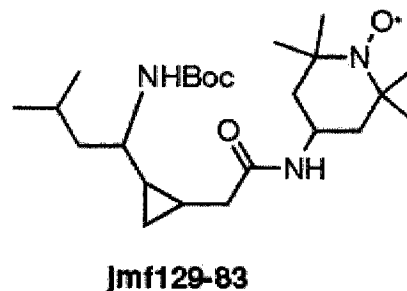
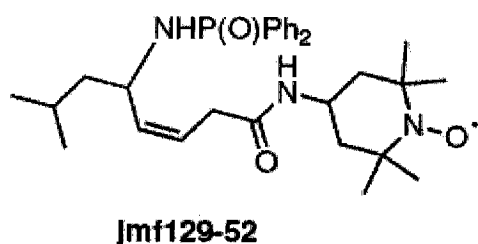
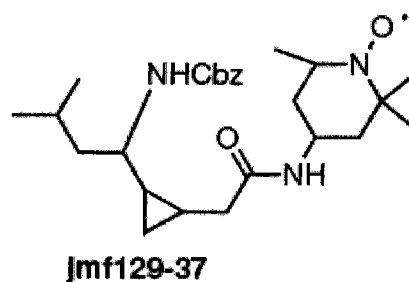
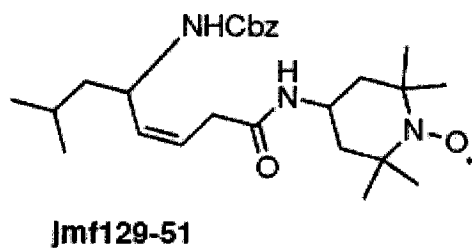
[0075] (TMIO; 1,1,3,3-四甲基异吲哚啉-2-基氧杂)。

[0076] R 是 -C(O)-R₆、-C(O)O-R₆、或 or-P(O)-(R₆)₂,其中 R₆是 C₁~C₆直链或支链烷基,可选择性的包括一个或多个苯基 (-C₆H₅) 基团,并可以选择性是甲基,乙基,羟基或氟取代,包括 Ac(乙酰基, R = -C(O)-CH₃), Boc(R = -C(O)O-t-丁基), Cbz(R = -C(O)O-苄基



体 XJB-5-208,在某些实施方案实施方案中, R₁是 t-丁基, R₂ 和 R₄ 为氢。例如:

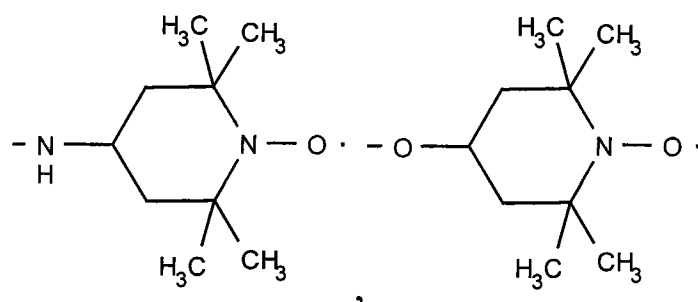
[0077]



[0078] 在本发明中,除非另有说明,例如,本发明所描述的一个结构的所有的化合物和/或结构包括所有可能的立体异构体,单剂或其混合物。

[0079] 如上所述,R5是含有-N-O $\cdot$ 、-N-OH或-N=O的基团(不仅是单独的-N-O $\cdot$ 、-N-OH或-N=O,而是包含如前所述诸基的基团,如TEMPO)。正如本领域普通技术人员所熟知的,氮氧自由基及氮氧自由基衍生物,包括TEMPOL及与TEMPO相关的衍生物是能够抵御生物环境的稳定自由基。因此,本发明提供的线粒体膜内的4-氨基-TEMPO、TEMPOL或其他氮氧自由基“有效载荷”可以用作一种从膜内产生的ROS的有效和高效率的电子清除剂。这方面非限定性的例子包括TEMPO(2,2,6,6-四甲基-4-哌啶1-氧基)和TEMPOL(4-羟基-TEMPO),在它们中间当与本发明所述及的化合物复合,如当R₅是-NH-R₅、-O-R₅时:

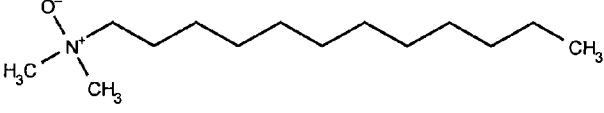
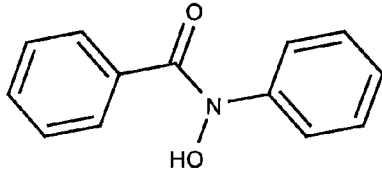
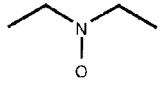
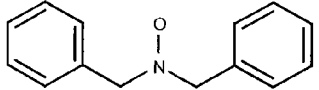
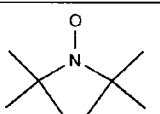
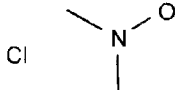
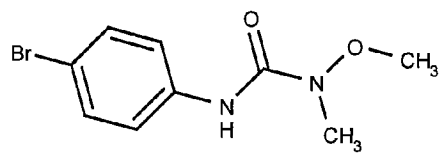
[0080]



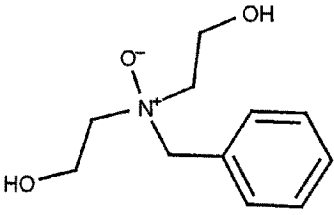
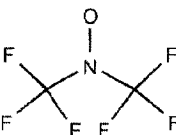
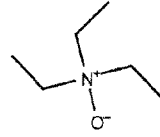
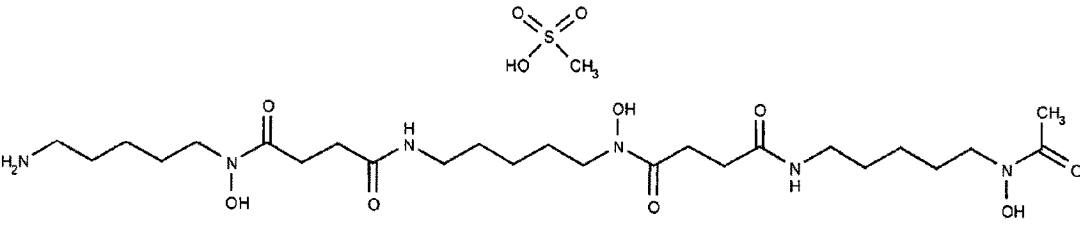
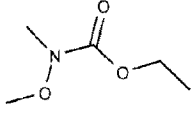
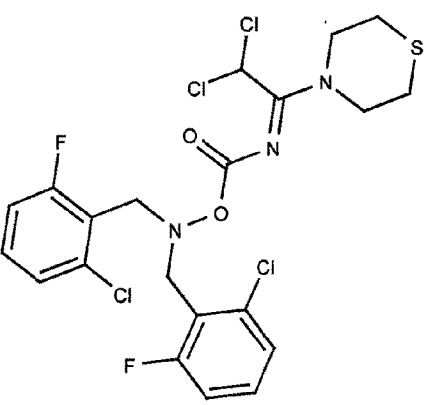
[0081] 其他包含-N-O $\cdot$ 、-N-OH or N=O基团的非限制的例子列于表1及图1(摘自Jiang, J.,等。“优化靶向氮氧自由基的传递、氧化应激的抑制以及抗细胞凋亡活性的结构要求”, J PharmacolExp Therap. 2007, 320(3):1050-60)。本领域普通技术人员采用常用交联剂和/或共轭化学品(如本发明所述的化学品)将这些化合物中的任意一种与其余的化合物进行键合(共价键连接)。表1提供了非限定性摘自超过300中市售确认的含-N-O $\cdot$ 、-N-OH或N=O基团的化合物,这些化合物可在本发明所述的化合物或组合物的制备过程中使用。

[0082] 表1市售含-N-O $\cdot$ 、-N-OH or N=O的基团

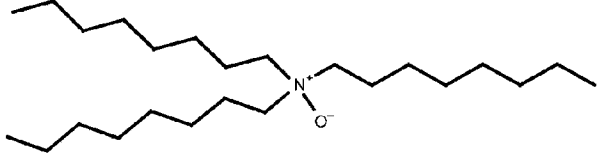
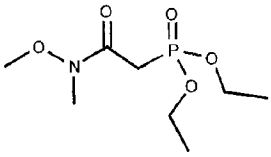
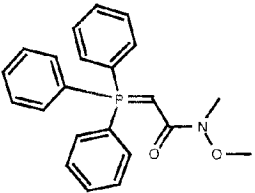
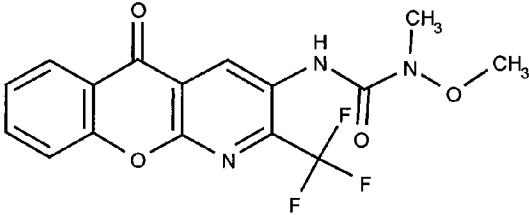
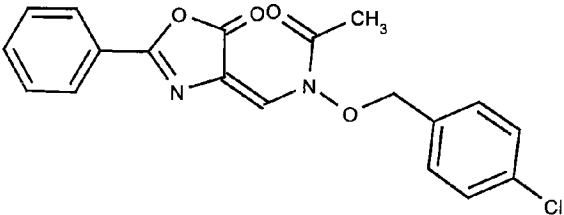
[0083]

结构	名称	CAS No.
	Trimethylamine N-Oxide 三甲胺 N-氧化物	1184-78-7
	N,N-Dimethyldodecylamine N-Oxide 十二烷基二甲基氧化胺	1643-20-5 70592-80-2
	N-Benzoyl-N-Phenylhydroxylamine N-苯甲酰-N-苯基羟胺	304-88-1
	N,N-Diethylhydroxylamine N,N-二乙基羟胺	3710-84-7
	N,N-Dibenzylhydroxylamine N,N'-二苄基乙二胺	14165-27-6 621-07-8
	Di-Tert-Butyl Nitroxide 二叔丁基氧化氮	2406-25-9
	N,N-Dimethylhydroxylamine Hydrochloride N,N-二甲基羟胺盐酸盐	16645-06-0
	Metobromuron 3-对溴苯基-1-甲氧基甲基脲	3060-89-7

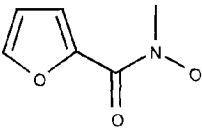
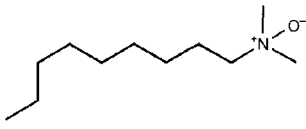
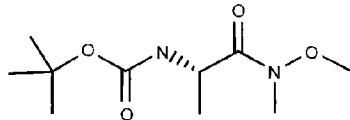
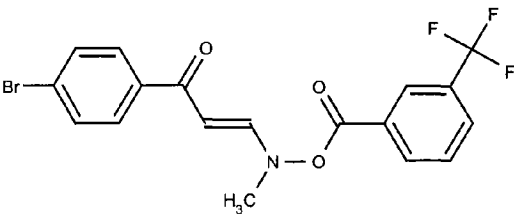
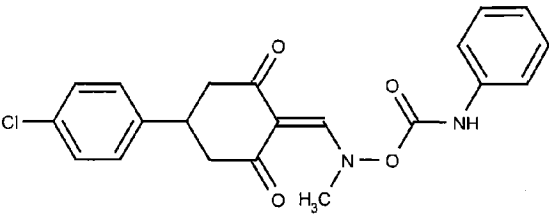
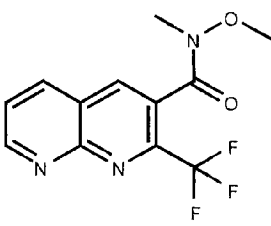
[0084]

	Benzyl-Di-Beta-Hydroxy Ethylamine-N-Oxide 苄基-二-β-羟乙胺-N-氧化物	
	Bis(Trifluoromethyl)Nitroxide 双(三氟甲基)氮氧	2154-71-4
	Triethylamine N-Oxide 三乙胺 N-氧化物	2687-45-8
		
	N-Methoxy-N-Methylcarbamate N-甲氧基-N-甲基氨基甲酸乙酯	6919-62-6
	N,N-Bis(2-Chloro-6-Fluorobenzyl)-N-(((2,2-Dichloro-1-(1,4-Thiazinan-4-yl+)ethylidene)amino)carbonyl)oxy]amine N, N-二(2-氯-6-氟苄基)-N-(((2,2-二氯-1-(1,4-噻嗪烷-4-基+)亚乙基)氨基)羰基)氧]胺	

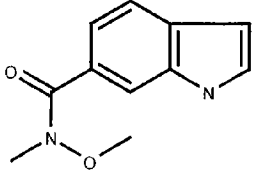
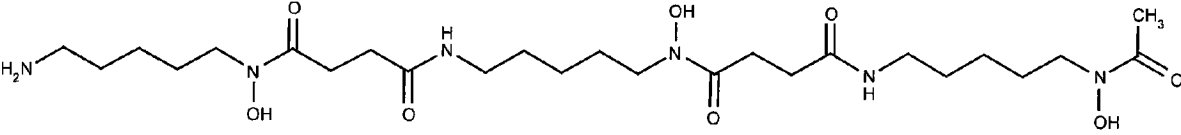
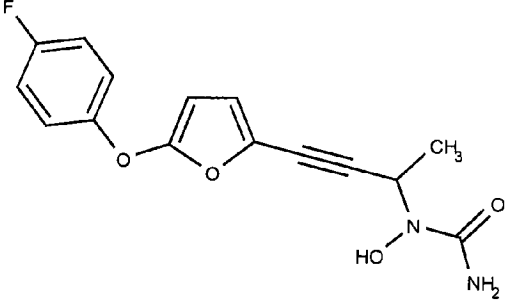
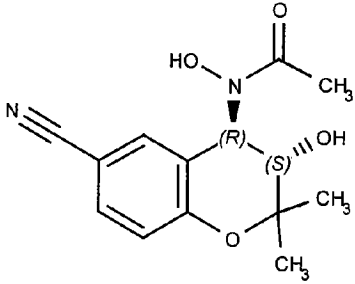
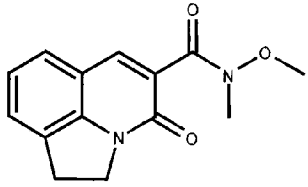
[0085]

	Tri-N-Octylamine N-Oxide 三正辛胺 N-氧化物	13103-04-3
	Diethyl (N-Methoxy-N-Methylcarbamoylmethyl)Phosphonate N-甲氧基-N-甲基羰基甲基)磷酸二乙酯	124931-12-0
	N-Methoxy-N-Methyl-2-(Triphenylphosphorylidene)Acetamide N-甲氧基-N-甲基-2-(三苯基磷)	129986-67-0
	N-Methoxy-N-Methyl-N'-[5-Oxo-2-(Trifluoromethyl)-5h-Chromeno[2,3-B]Pyridin-3-yl]Urea N-甲氧基-N-甲基-N'-[5-羰基-2-(三氟甲基)-5H-吡喃[2,3-B]吡啶+N-3-基]脲	
	N-[(4-Chlorobenzyl)Oxy]-N-([5-Oxo-2-Phenyl-1,3-Oxazol-4(5H)-Yliden]Methyl+)Acetamide N-[(4-氯苄基)氧]-的N-([5-羰基-2-苯基-1,3-恶唑-4(5H)-基苄]甲基+)乙酰胺	

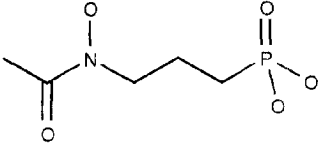
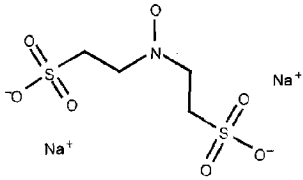
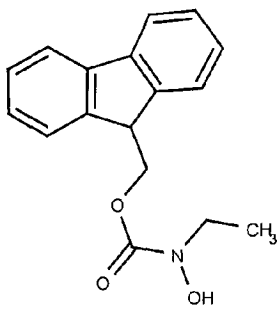
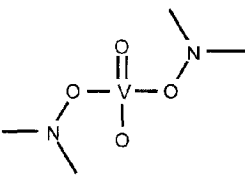
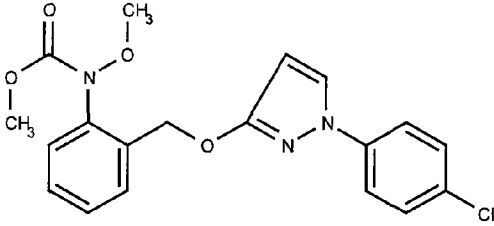
[0086]

	N-Methylfurohydroxamic Acid N-甲基糠酰羟肟酸	109531-96-6
	N,N-Dimethylnonylamine N-Oxide N-氧代-N,N-二甲基-1-辛胺	2536-13-2
	N-(Tert-Butoxycarbonyl)-L-Alanine N'-Methoxy-N'-Methylamide N-(叔丁氧基羰基)-L-丙氨酸 N'-甲氧基-N'-甲基酰胺	87694-49-3
	1-(4-Bromophenyl)-3-(Methyl([3-(Trifluoromethyl)Benzoyl]Oxy)Amino)-2-Prop+ En-1-One 1-(4-溴苯基-3-(甲基([3-(三氟甲基)苯甲酰基]氧)氨基)-2-丙烯基-1-酮	
	2-([[(Anilinocarbonyl)Oxy](Methyl)Amino]Methylene)-5-(4-Chlorophenyl)-1,3+-Cyclohexanedione 2-([[(苯氨基羰基)氧](甲基)氨基]亚甲基)-5-(4-氯苯基)-1,3+-环己二酮	
	N-Methoxy-N-Methyl-2-(Trifluoromethyl)-1,8-Naphthyridine-3-Carboxamide N-甲氧基-N-甲基-2-(三氟甲基)-1,8-萘-3-酰胺	

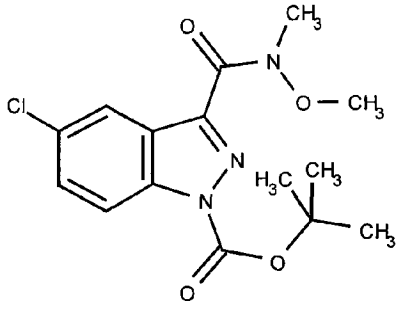
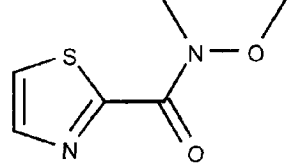
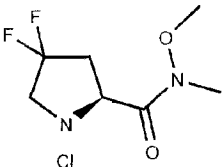
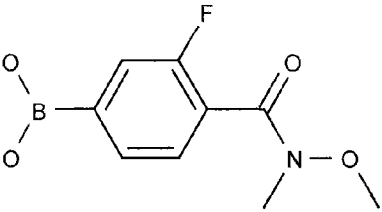
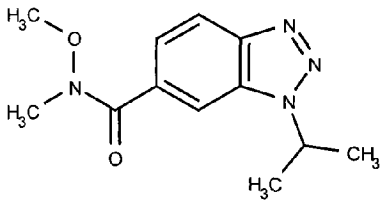
[0087]

	N-Methoxy-N-Methyl-Indole-6-Carboxamide N-甲氧基-N-甲基吲哚-6-酰胺	
 Desferrioxamin		
	AKOS 91254	127408-31-5
	N-[(3s,4r)-6-Cyano-3,4-Dihydro-3-Hydroxy-2,2-Dimethyl-2h-1-Benzopyran-4-Y+ L]-N-Hydroxyacetamide N-[(3s, 4r) -6-氰基- 3,4 -二氢- 3 -羟基- 2,2 -二甲基- 2H-1-苯并吡喃-4-基]-N-羟基乙酰胺	127408-31-5
	N-Methoxy-N-Methyl-1,2-Dihydro-4-Oxo-Pyrrolo[3,2,1-lj]Quinoline-5-Carboxa+ Mide N-甲氧基-N-甲基-1,2-二氢-4-氧代吡咯并[3,2,1-lj]喹啉-5-甲酰胺	

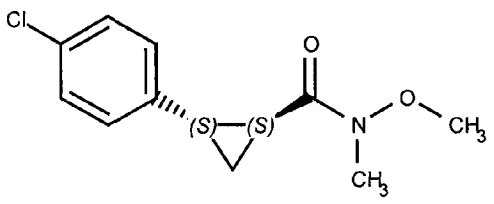
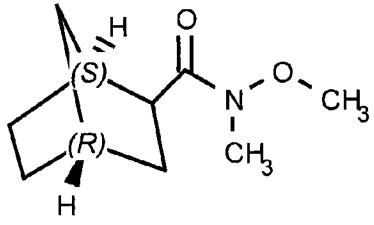
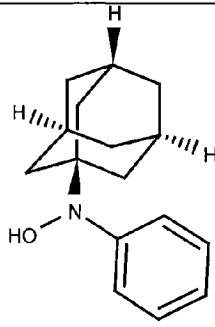
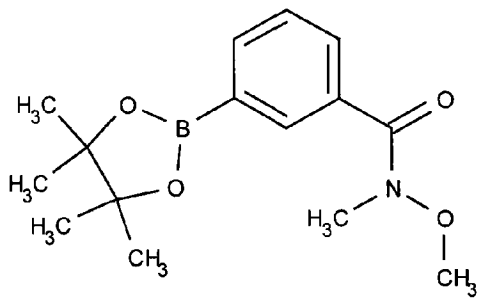
[0088]

	Fr-900098 3-(N-acetyl-N-hydroxyamino) propylphosphonic acid 3-(N-乙酰基-N-羟胺) 丙基磷 酸	66508-32-5
	2,2'-(Hydroxyimino)Bis-Ethane sulfonic Acid Disodium Salt N,N-二乙磺基羟胺二钠盐	133986-51-3
	Fmoc-N-Ethyl-Hydroxylamine 芴甲氧羰基-N-乙基羟胺	
	Bis(N,N-Dimethylhydroxamido))Hydroxooxovanadate 双 (N , N-二羟基氨基) Hydroxooxovanadate	
	Pyraclostrobin N-[2-[[1-(4-氯苯基)吡唑-3-基] 氧甲基]苯基]-N-甲氧基氨基甲 酸甲酯	175013-18-0

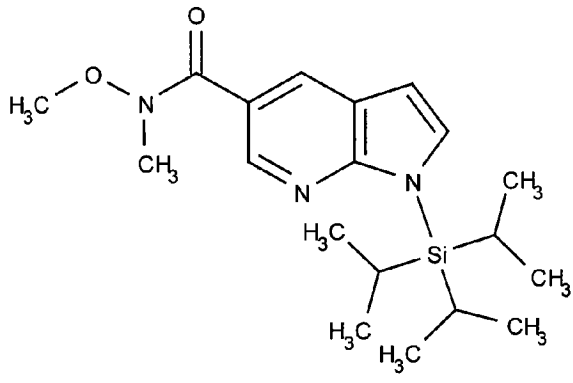
[0089]

	1-Boc-5-Chloro-3-(Methoxy-Methyl-Carbamoyl)Indazole 1-Boc-5-氯-3-(甲氧基甲基甲酰)吲唑	
	N-Methoxy-N-Methyl-Thiazole-2-Carboxamide N-甲氧基-N-甲基噻唑-2-酰胺	
	4,4-Difluoro-N-Methyl-N-Methoxy-L-Prolinamide HCl 4,4 -二氟的 N-甲基-N-甲氧基-L-脯氨酸酰胺盐酸盐	
	3-Fluoro-4-(Methoxy(Methyl)Carbamoyl)Phenylboronic Acid N-甲氧基-N-甲基-4-硼-2-氟苯甲酰胺	913835-59-3
	1-Isopropyl-N-Methoxy-N-Methyl-1H-Benzo[D][1,2,3]Triazole-6-Carboxamide 1-异丙基-N-甲氧基-N-甲基-1H-苯并[D][1,2,3]三唑-6-酰胺	467235-06-9

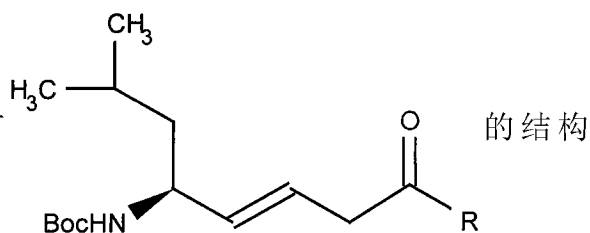
[0090]

	(Trans)-2-(4-Chlorophenyl)-N-Methoxy-N-Methylcyclopropanecarboxamide (反式)-2-(4-氯苯基)的N-甲氧基-N-甲基环丙基甲酰胺	
	Bicyclo[2.2.1]Heptane-2-Carboxylic Acid Methoxy-Methyl-Amide 双环[2.2.1]庚烷二甲酸甲氧基甲基酰胺	
	Akos Bc-0582	
	3-(N,O-Dimethylhydroxylamino carbonyl)Phenylboronic Acid, Pinacol Ester 3-(N,O-二甲基羟基氨基羰基)苯硼酸, 频哪醇酯	

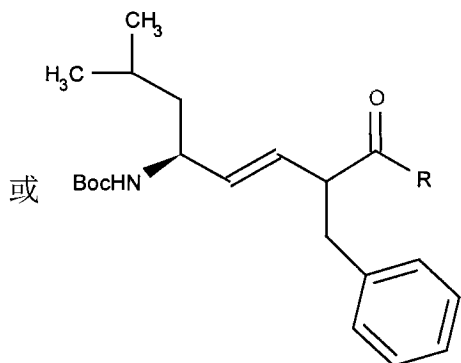
[0091]

	1-Triisopropylsilyl-1h-Pyrrolo[2,3-B]Pyridine-5-Carboxylic Acid Methoxy-Methyl-Amide 1-三异丙基硅烷基-1H-吡咯并[2,3-B]吡啶-5-甲氧基羧酸+甲基酰胺	
---	---	--

[0092] 根据一个实施方案,该化合物具有



或

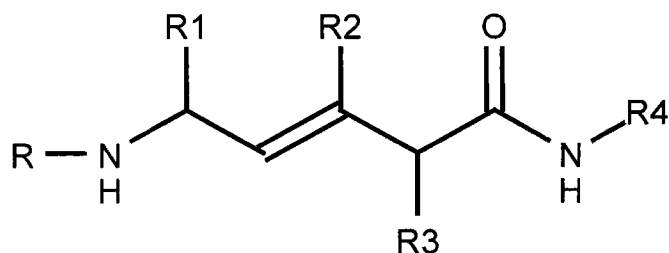


的结构,其中 R 是 -NH-R₁, -O-R₁或 -CH₂-R₁, R₁ 是一种

含 -N-O $\cdot$, -N-OH 或 N=O 的基团。在一个实施方案中 R 是 -NH-R₁,在另一个实施方案中 R 是 -NH-TEMPO。

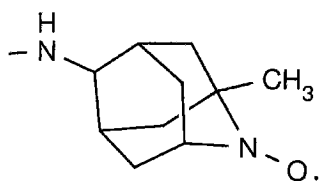
[0093] 根据另一个实施方案,化合物具有结构

[0094]

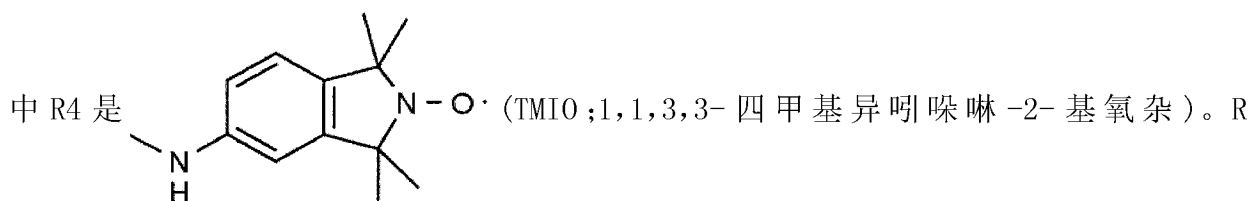


[0095] (结构式 2)

[0096] 其中 R₁、R₂ 和 R₃ 各自是氢、C₁ ~ C₆ 的直链或支链烷基,可选择包括苯基 (C₆H₅) 基团,可选择甲基,羟基或氟取代的,包括 2- 甲基丙基,苄基,甲基,羟基或氟取代苄基,如 4- 羟基苄基。R₄ 是含 -N-O $\cdot$, -N-OH 或 N=O 的基团。在一个实施方案中 R₄ 是

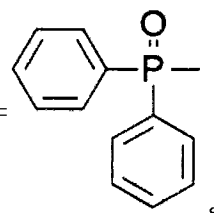


[0097] (1-Me-AZADO 或 1- 甲基 2- 氮杂金刚烷 N- 氧基),在另一个实施方案实施方案



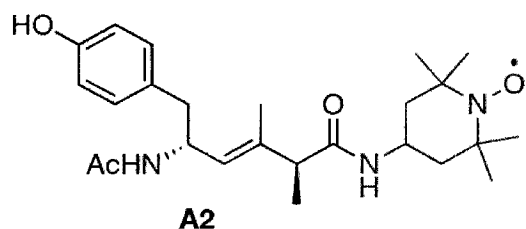
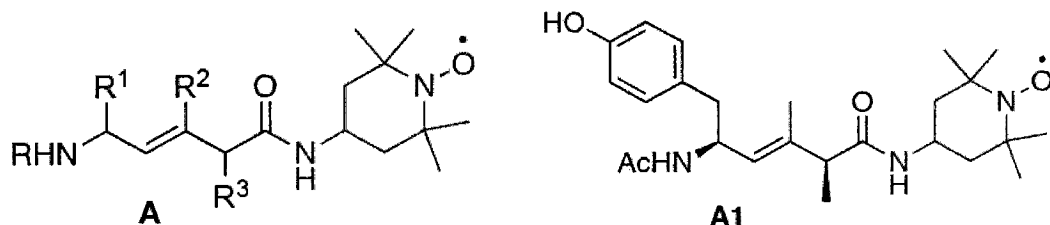
中 R₄ 是 -C(O)-R₅, -C(O)O-R₅,或 -P(O)-(R₅)₂,其中 R₅ 是 C₁ ~ C₆ 的直链或支链烷基,可选择包括一个或多个苯基 (-C₆H₅) 基团,并可以选择是甲基,乙基,羟基或氟取代,包括 Ac, Boc,

和 Cbz 的基团。R 也可以是二苯基磷酸酯基团,也就是 $R =$

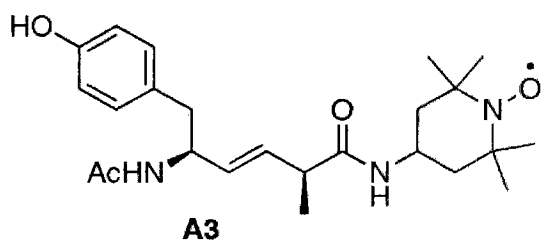


[0098] 在某些具体的实施方案中,其中的 R4 是 TEMPO,这种化合物具有 A、A1、A2 或 A3 (Ac = Acetyl = $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})-$) 的结构之一:

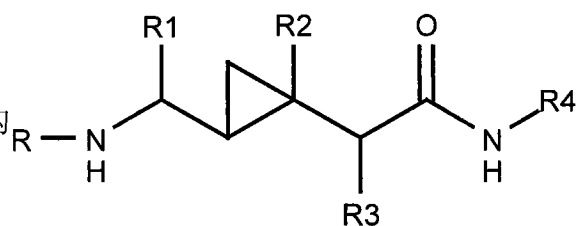
[0099]



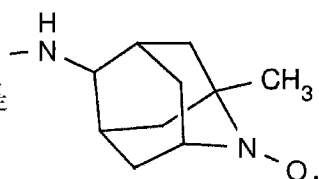
, 和



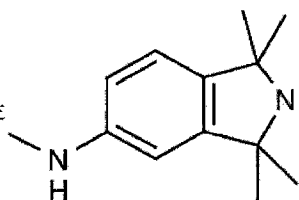
[0100] 根据另一个实施方案,化合物具有结构



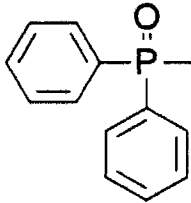
(结构式 3), 其中 R1、R2 和 R3 各自是氢、C1 ~ C6 的直链或支链烷基,可选的是苯基 ($-\text{C}_6\text{H}_5$), 并且可选择是甲基, 乙基, 羟基或氟取代基, 包括 2- 甲基丙基, 苄基, 甲基, 羟基或氟取代苄基, 如 4- 羟苄基。R4 是含 $-\text{N}-\text{O}\cdot$, $-\text{N}-\text{OH}$ 或 $\text{N}=\text{O}$ 的基团。在一个实施方案中, R4

是  (1-Me-AZADO 或 1- 甲基 2- 氮杂金刚烷 N- 氧基)。在另一个实施

方案实施方案中, R4 是

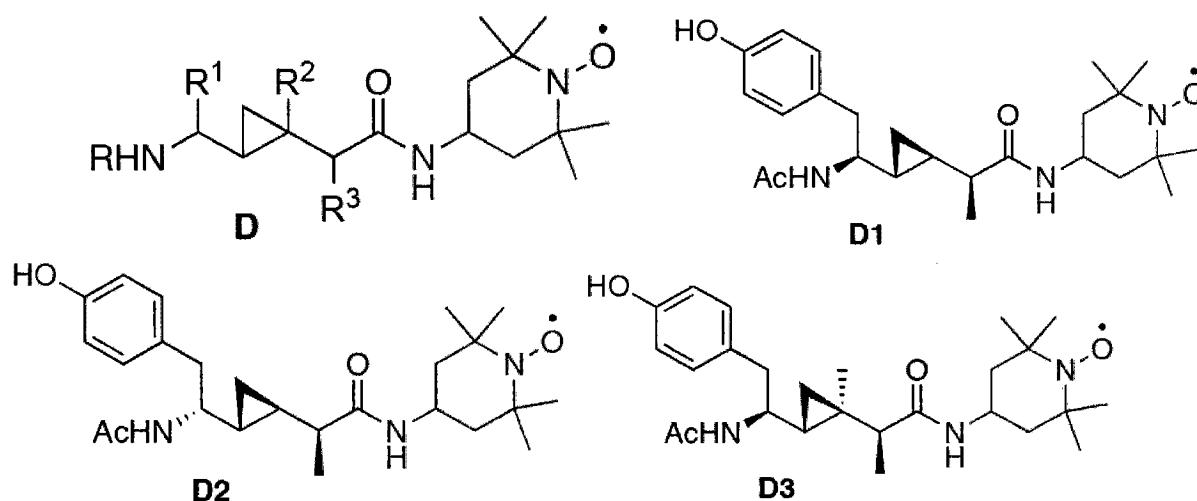


氧杂)。R 是 $-C(O)-R_5$, $-C(O)O-R_5$, 或 $-P(O)-(R_5)_2$, R5 是 C1 ~ C6 的直链或支链烷基, 可选的是含一个或多个苯基 ($-C_6H_5$), 并且可选择的是甲基, 乙基, 羟基或氟取代基, 包括 Ac、

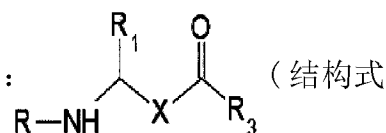
Boc 和 Cbz 基团。R 也可以是二苯基磷酸酯基团, 也就是 R =  在某些具体的

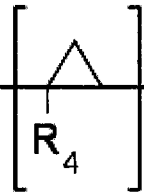
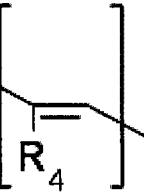
实施方案中, 其中 R4 是 TEMPO, 这种化合物具有 D, D1, D2, 或 D3 (Ac = 乙酰基 = $CH_3C(O)-$) 的结构之一:

[0101]

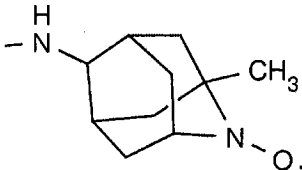


[0102] 在其他非限定性的实施方案中, 这种化合物具有结构:

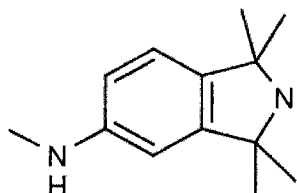


4), 其中 X 是  和  之一, 并且其中 R1 和 R4 各自是氢、C2 ~ C6 的直链

或支链烷基、可选的是苯基 ($-C_6H_5$), 优选的是甲基、羟基或氟取代的基团, 包括甲基, 乙基, 丙基, 2-丙基, 丁基, t-丁基, 戊基, 己基, 苄基, 羟苄基 (如 4-羟苄基) 苯基和羟苯基。R3 是 $-NH-R_5$ 、 $-O-R_5$ 或 $-CH_2-R_5$, 其中 R5 是含 $-N-O\cdot$, $-N-OH$ 或 $N=O$ 的基团。在一个实施方案

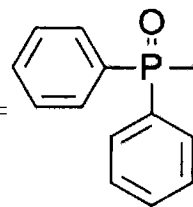
中, R3 是  (1-Me-AZADO 或 1-甲基氮杂金刚烷 N-氧基)。在另一个实

施方案中 R_3 是

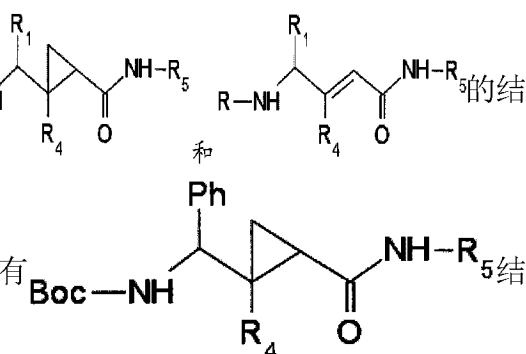


[0103] R 是 $-C(O)-R_6$, $-C(O)O-R_6$, 或 $-P(O)-(R_6)_2$, 其中 R_6 是 $C_1 \sim C_6$ 的直链或支链烷基, 可选包含一个或多个苯基 ($-C_6H_5$) 的基团, 上述基团可选被甲基, 乙基, 羟基或氟取代的基团, 包括 AC(乙酰基 $R = -C(O)-CH_3$), Boc ($R = -C(O)O-t$ -丁基), Cbz ($R = -C(O)$

O -benzyl (Bn)). R 也可以是二苯基磷酸酯基团, 也就是 $R =$



[0104] 在一个非限制性的实例中, 该化合物具有



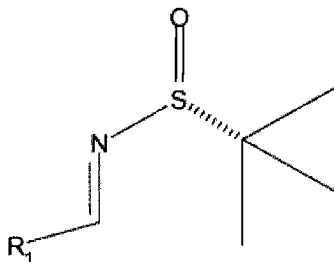
构之一。在又一个非限制性的实施方案中, 该化合物具有

构, 其中 R_4 是氢或甲基。

[0105] 上述化合物, 如结构式 1 所示, 可以通过任何适用的方法合成。化合物 JP4-039 通过例 8 的方法合成。在一个实施方案中, 本发明提供了制备结构式 1 的化合物的方法。合成该化合物采用如下步骤:

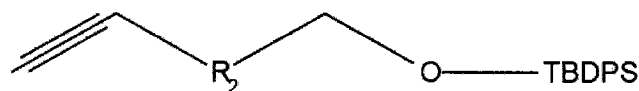
[0106] A、用一种含 $R_1-C(O)-$ 结构的醛与 (R)-2-甲基丙烷基-2-亚磺酰胺反应生成一种亚胺。如

[0107]



[0108] 在 $R_1-C(O)-$ 中, 例如但不限于此, R_1 是 $C_1 \sim C_6$ 的直链或支链烷基, 可选择的是苯基 ($-C_6H_5$), 并且可选择的是甲基、羟基或氟取代的基团, 包括甲基, 乙基, 丙基, 2-丙基, 丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 苄基, 羟苄基 (如 4-羟苄基)、苯基和羟苯基。

[0109] B、用端炔-1-醇 ($HCC-R_2-CH_2-OH$) 与叔丁基二苯基硅烷盐反应生成一种炔, 如

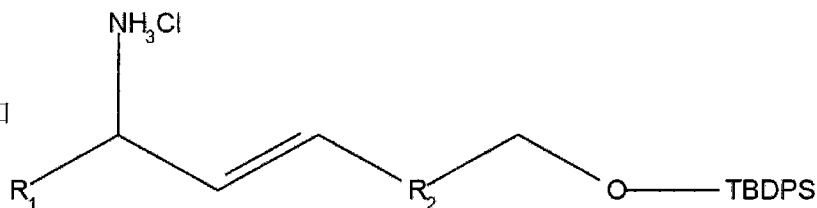


[0110] 在 $HCC-R_2-CH_2-OH$ 中, 举例但不限于本例, R_2 可不出现或者 R_2 是直链或支链的亚烃

基,包括包括甲基、乙基、丙基炔烃。

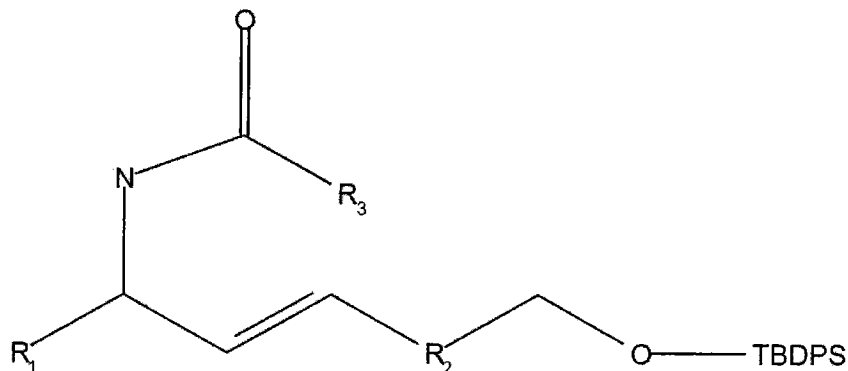
[0111] C、用上述炔化合物与亚胺化合物在有机铂催化剂存在条件下反应(利用铂氢化

反应)生成一种烯。如



[0112] D1、将该烯烃酰化生产氨基甲酸酯,如

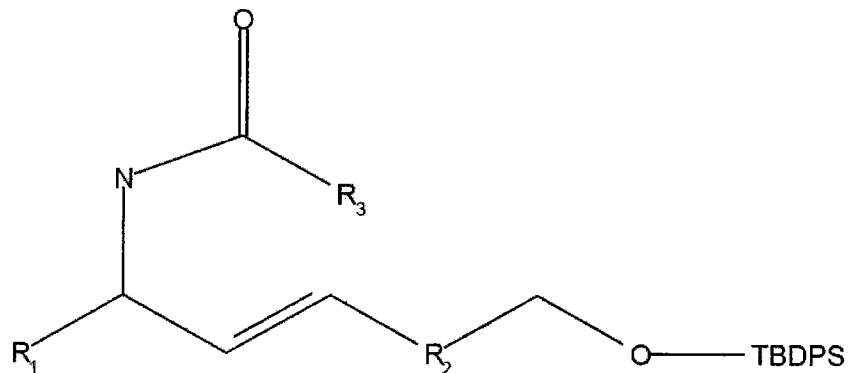
[0113]



[0114] 其中,例如但不限于本例, R_3 是 $C_1 \sim C_6$ 的直链或支链烷基,可选包含苯基(C_6H_5)的基团,上述诸基团可选甲基,羟基或氟取代的基团,包括:甲基、乙基、丙基、2-丙基、丁基、叔丁基、戊基、己基、苄基、羟苄基(如4-羟苄基)苯基和羟苯基;

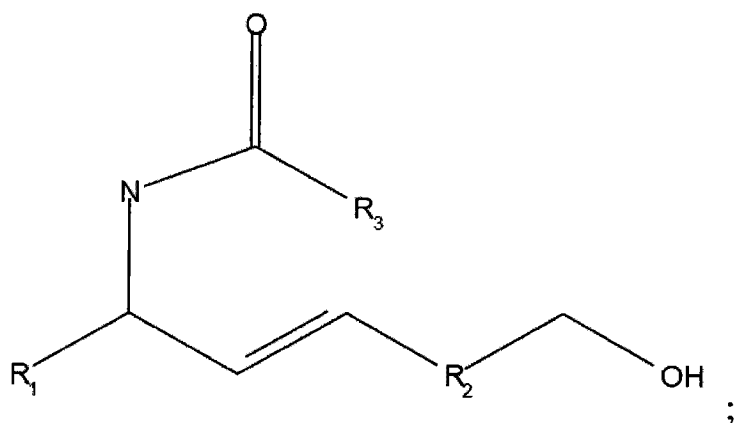
[0115] D2、或者,将丙烯基环丙烷化然后将该烯烃进行丙烯酸酯化生成一种氨基丙烯酸酯,如

[0116]



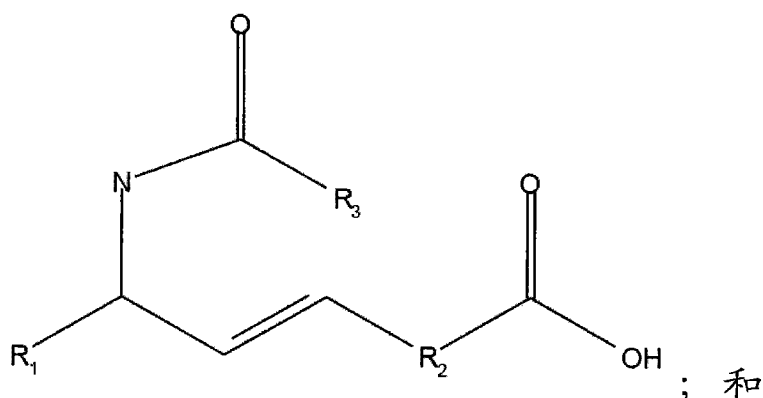
[0117] 其中,例如但不限于本例, R_3 是 $C_1 \sim C_6$ 的直链或支链的烷基,可选基团是苯基(C_6H_5),上述诸基团可选被甲基、羟基或氟取代的基团,包括甲基、乙基、丙基、2-丙基、丁基、叔丁基、戊基、己基、苄基、羟基(如4-羟苄基)苯基和羟苯基;

[0118] E、从氨基甲酸酯中除去叔丁基二苯基甲硅烷基基团生成一种醇,如



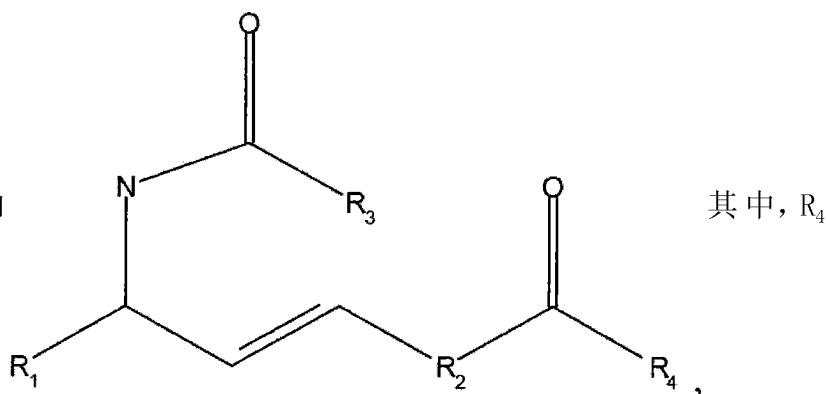
[0119] F、将醇氧化生成一种羧酸,如

[0120]



[0121] G、将羧酸和由羟基或氨基构成的含氮氧自由基的化合物进行反应通过缩合反

应生成抗氧化剂化合物,如



是 -NH-R₄ 或 -O-R₄, 并且, 如上文所述, R₄ 是一种含有 -N-O•、-N-OH 或 N=O 基团。

[0122] 在另一个非限定性的实施方案中, 提供了一种含有 R1-R2-R3 结构的化合物, 其中 R1 和 R3 是具有 -R4-R5 结构的基团, R4 是是一种线粒体靶向基团, R5 是 -NH-R6, -O-R6 或 -CH2-R6, 其中 R6 是一种含 -N-O•, -N-OH 或 N=O 的基团, 如 TEMPO。R1 和 R2 可以相同或者不同。同样, R4 和 R5 对于每一个 R1 和 R3 也可以是相同或者不同的。在一个非限定性的实施方案中, R2 是一种具有对称性的链接剂。图 26A 和图 26B 中描绘了两种该化合物的例子。在一个实施方案中, R1 和 R2 具有上文中结构式 1、2 或 3 及上文定义的所有基团包括 A、A1、A2、A3、D、D1、D2 和 D3 的结构, 代表化合物为 JED-E71-58, 见图 26B。在另一个实施方案中, R1 和 R2 各自是短杆菌肽衍生物, 如化合物 JED-E71-37, 见图 26A。对本发明提供的短杆菌肽衍生物的例子, 如 XJB-5-131 和 XJB-5-125 (见图 2), 美国专利 NO. 20070161573

和 20070161544 以及 Jiang, J, 等。在结构和功能方面有进一步详细的描述。(优化靶向氮氧自由基的传递、氧化应激的抑制以及抗细胞凋亡活性的结构要求, J Pharmacol Exp Therap. 2007, 320 (3) :1050-60, 还见于, Hoyer, AT 等., 靶向线粒体, Acc Chem Res. 2008, 41 (1) :87-97, 还见于, Wipf, P, 等., 线粒体靶向选择性电子清除剂:半短杆菌肽--TEMPO 衍生物的合成和生物学分析, (2005) J Am Chem Soc. 2005, 127 :12460-12461)。XJB 化合物可以连接成二聚体, 例如但不限于本例, 与 BocHN 基团 (例如, 像在 XJB-5-131 中) 中的氮反应, 或者与一种胺, 如果存在, 例如, 如果一个或多个该化合物的氨基没有酰化生成一种酰胺 (如 NHBoc 或 NHCbx)。

[0123] 在 Jiang, J, 等人 (J Pharmacol Exp Therap. 2007, 320 (3) :1050-60), 采用 ActD 致小鼠胚胎细胞凋亡模型, 作者筛选了氮氧自由基库, 以研究其抗氧化 / 抗凋亡特性、化学组成和三维 (3D) 结构之间的构效关系。高疏水性和有效的线粒体融合被认为是必要的, 但是对氮氧自由基衍生物的高抗细胞凋亡 / 抗氧化剂活性是不充分的。通过设计构象预组织化的肽基氮氧自由基衍生物以及从实验 (圆二色性和 NMR) 和理论 (分子动力学) 上表征其 3D 结构, 他们证实 β -转角 / β -折叠二级结构的存在对所要求活性所必需的。脂膜模型的 Monte Carlo 模拟证实半-GS 类似物内 D-Phe-Pro 反转的保护能确保氮氧自由基组分在线粒体膜表面的具体定位并使其保护作用最大化。如本发明所述, 探究氮氧自由基-肽以及-肽电子等排体衍生物之间的构效关系对于开发以新机理为基础的有宜于治疗的有效药物是有帮助的。

[0124] 靶向基团 R4 可以是源自作用于细菌细胞壁的抗生素分子的膜活性肽片段。此类抗生素的例子包括:杆菌肽, 短杆菌肽, 缬氨霉素, 恩镰孢菌素, 丙甲菌素, 白僵菌素, serratomolide, 蕈孢霉酯, 短杆菌酪肽, 多黏菌素, 摩那菌素, 和海鞘胎。源自抗生素的膜活性肽片段可包括完整的抗生素多肽、或其中具有膜, 最好是线粒体靶向能力的某些部分, 这是容易确定的, 例如, 采用放射性标记肽的细胞分隔实验。有用的短杆菌肽衍生膜活性肽片段是 Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn 和 D-Phe-Pro-Val-Orn-Leu 半短杆菌肽片段。由于短杆菌肽是环状的, 可以推测任何半短杆菌肽 5-mer 都可用作膜活性肽片段, 包括 Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn、D-Phe-Pro-Val-Orn-Leu、Pro-Val-Orn-Leu-D-Phe、Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro 和 Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val (源自短杆菌肽 S)。任何较长大或较小的短杆菌肽片段, 甚至包含重复短杆菌肽序列 (例如 Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro) 的较大片段预计对膜靶向性是有用的, 并能容易地测试这种活性。在一个实施方案中, 短杆菌肽-S 衍生肽包含一个 β -转角, 这似乎赋予肽对线粒体的高亲和性。短杆菌肽的衍生物, 或其他抗生素片段, 包括电子等排体 (分子或离子具有相同数目的原子基相同数目的价电子, 因此, 它们可以表现出类似的药代动力学和药效学性质), 如 (E)-烯炔电子等排体 (见关于示范合成方法的美国专利 No. 20070161573 和 20070161544)。正如短杆菌肽, 杆菌肽、其他短杆菌肽, 缬氨霉素, 恩镰孢菌素, 丙甲菌素, 白僵菌素, serratomolide, 蕈孢霉酯, 短杆菌酪肽, 多黏菌素, 摩那菌素, 和海鞘胎的结构 (氨基酸序列) 是众所周知的, 并且这些片段可以容易地制备, 对于本领域的普通技术人员, 它们的膜靶向性能力能容易确认。

[0125] 烯炔电子等排体如短杆菌肽 S 的 (E)-烯炔电子等排体 (即半短杆菌肽) 被用作靶向序列的一部分。见图 3 关于 (E)-烯炔电子等排体的合成路线及关于相应化学结构的文

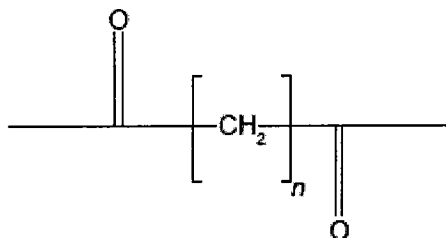
献 2。首先,炔烃(图 3,化合物 1)用 Cp_2ZrHCl 进行锆氢化,然后是 Me_2Zn 的转移金属化和 N-Boc- 异戊醛亚胺的加成反应。然后所得化合物(未显示)与四丁基氟化铵(“TBAF”)和乙醚的溶液作用,收率为 74%。然后将所得的化合物用醋酸酐、三乙胺(TEA)和 4- N,N -(二甲氨基)吡啶(“DMAP”)处理,用色谱分离获得非对映烯酰胺混合物,收率为 94%。最后使产品与 K_2CO_3 在甲醇中作用获得(E)-烯炔,标识为化合物 2。然后,将图 3 中标识为化合物 2 的(E)-烯炔经多步氧化生成化合物 3(图 3)一个(E)-烯炔电子等排体的例子。

[0126] 然后,用 γ -乙基-3-(3-二甲氨基亚胺盐酸盐)(EDC)作为偶联剂,将图 3 的化合物 3 与肽 $\text{H-Pro-Val-Orn(Cbz)-OMe}$ 共轭。这种肽是对细胞线粒体具有亲和性的靶向序列的一个适宜的例子。由此获得的产品在图 3 中显示为化合物 4a。化合物 4a 皂化后与 4-氨基-TEMPO(4-AT)偶联获得共轭产物,在图 3 中显示为化合物 5a,其中 Leu-DPhe 肽键被一个(E)-烯炔取代。

[0127] 在一个可选择实施方案中,图 3 中化合物 5b 是通过皂化和肽 4b($\text{Boc-Leu-DPhe-Pro-Val-Orn(Cbz)-OMe}$)与 4-AT 偶联制备。类似地,图 3 中化合物 5c 由标识为化合物 3 的(E)-烯炔电子等排体与 4-AT 偶联制备。这些肽和肽类似物是另外一些适宜的对细胞线粒体具有亲和性的靶向序列的例子。

[0128] 在另一实施方案中,肽电子等排体可以用作化合物。这些适宜的肽电子等排体是三元取代的(E)-烯炔肽电子等排体、和环丙烷肽电子等排体,以及所有的用于合成二元取代和三元取代的(E)-烯炔和环丙烷肽电子等排体的含有氢-或有机金属的内和端炔的亚胺加成产物。见 Wipf 等:用于合成三元取代(E)-烯炔和环丙烷肽电子等排体的内炔-亚胺加成反应, *Adv Synth Catal.* 2005, 347:1605-1613. 据发现这些肽模拟化合物可以起到 β -翻转促进剂的作用。见 Wipf 等:(E)-烯炔和环丙烷肽电子等排体的加合方法, *Org Lett.* 2005, 7(1):103-106.

[0129] 连接剂 R2,可以是任何有用的连接剂,根据其活性基团选择,例如:羧基,烷氧基,氨基,巯基,酰胺等。通常情况下,除了其活性基团外,剩余部分没有反应活性(如饱和烷基或苯基),不会在与整个化合物的活性有关的负面作用(功能丧失)方面对空间的或任何其他物理或化学属性,如极性、亲水/疏水性产生干扰。在一个实施方案中,除了活性基团,该连接剂包含线性的或支化的饱和 $\text{C}_4 \sim \text{C}_{20}$ 烷基。在一个实施方案中,连接剂 R2 具有结构 [0130]



[0131] 其中 $n = 4 \sim 18$, 包含期间所有的整数,在一个实施方案中 $n = 8 \sim 12$, 在另一个实施方案中, $n = 10$ 。

[0132] 一个有机合成领域的技术人员利用任何可获得的化学品通过 R1 和 R3 交联就能合成这些化合物。在一个实施方案中,利用连接剂的端羧基与 R1 和 R3(或者反过来)上的氨基脱水(缩合反应),使 R1 和 R3 通过胺(肽键)连接形成 R2。在一个实施方案中, R1 和 R3 相同或者不同,并且根据所含的基团进行选择: XJB-5-131, XJB-5-125, XJB-7-75,

XJB-2-70, XJB-2-300, XJB-5-208, XJB-5-197, XJB-5-194, . JP4-039 和 JP4-049, 见图 26A 和 26B 的连接方式。

[0133] 在一个治疗的实施方案中, 提供了一种在主体 (例如, 一名需要自由基清除治疗的患者) 中清除自由基的方法, 包括向主体提供一定数量的一种或多种本发明描述的并含有一个自由基清除基团, 如有效清除自由基的含氮氧自由基的基团。如上所述, 许多疾病、病例或伤患可以通过提供自由基清除化合物得到改善、治疗或预防。正如在本发明中所阐述的。

[0134] 在任何情况下, 本发明所用的用于预防、缓解或治疗由于辐照引起的损伤的主体的任何药剂都以能有效的预防、缓解或治疗这种损伤的剂量提供, 亦即, 一种有效预防或减少辐照引起的损伤的持续时间和 / 或严重程度剂量和给药方案。根据一个非限制性实施方案, 从 0.1 或 1mg/kg ~ 100mg/kg 的有效剂量范围, 包括该范围内任何增量和范围, 包括 1mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg, 25mg/kg, 50mg/kg, and 75mg/kg。然而, 对于本发明所描述的每一种化合物, 有效剂量或剂量范围预计会因任何原因而使本发明所述及其他化合物而各不相同。包括化合物的分子量、生物利用度、具体活性等等。例如, 并不限于本例, XJB-5-131 作为抗氧化剂的情况下, 其剂量范围可以大约在 0.1 和 20mg/kg 之间, 或大约在 0.3 和 10mg/kg 之间, 或大约在 2 和 8mg/kg 之间, 或大约 2mg/kg。在 JP4-039、JED-E71-37 或 JED-E71-58 作为抗氧剂的情况下, 使用剂量可能大约在 0.01 和 50mg/kg 之间、或大约在 0.1 和 20mg/kg 之间, 或大约在 0.3 和 10mg/kg 之间, 或大约在 2 和 8mg/kg、或大约是 2mg/kg。对主体的最小有效剂量和最大耐受剂量之间的治疗窗可由本领域的技术人员根据经验地确定, 终点可以通过体内或体外试验确定, 如本发明描述的和 / 或获得这类关于辐射防护药剂的信息的方法在制药和治疗领域是可接受的。对于所提供的药品, 本发明所述的不同的药剂浓度预计可达到类似的结果, 例如, 不限于本例, 在预测的辐射剂量之前给药一次, 如放射治疗或诊断遭受致电离辐射之前、遭受辐射过程中、或在辐照后任何有效的给药方案。可以连续性给药, 如静脉注射, 每天一次或多次, 每隔 2、3、4、5 或更多天、周、月一次等包括治疗时间段之间的增量。一个制药和医疗领域普通的技术人员将会明白预防、缓解或治疗由于暴露于辐射导致的伤患而确定适宜的给药方案的问题关键是简单设计的选择和优化。

[0135] 本发明所描述的化合物对预防、缓解 (降低严重程度) 和 / 或治疗辐射导致的损伤也是有用的。本发明中所述“辐射”一词, 是指导致自由基, 即本发明所述的活性氧类物质 (ROS) 产生的辐射类型。例如, 但不限于本例, 由于辐射的直接作用造成自由基的产生作为对辐射的生理反应和 / 或作为由辐射造成的一系列损害 / 损伤。在一个实施方案中, 辐射是致电离辐射, 致电离辐射包括能从原子或分子中分离 (电离) 至少一个电子的高能粒子或波。致电离辐射的例子有高能 β 粒子, 中子和 α 粒子。光波 (光子) 使原子或分子电离的能力随其各不相同的电磁波谱而变化。X-射线和 γ 射线几乎使任何分子或原子电离; 远紫外光可使大量原子和分子电离, 而近紫外和可见光则仅使很少分子电离。微波和无线电波一般被认为是非致电离辐射, 尽管损伤由例如微波造成, 仍可导致自由基产生, 成为损伤和 / 或损伤导致的生理反应的部分因素。

[0136] 通常化合物一般以能预防、缓解或治疗主体由于暴露于辐射而遭受的影响的一定剂量及按照给药方案供药。化合物可以任何能有效治疗、缓解或预防由辐射引起的伤害的

方式给药。输药路线的非限制性例子包括：局部的，如，皮肤、吸入、灌肠、眼、耳和鼻腔给药；肠内的，如，口服、胃饲管和直肠给药；及肠胃外的，如静脉、动脉内、肌肉注射、心内、皮下、骨内、皮内、膜内、腹腔内、透皮吸收，离子导入，转化粘液质、硬膜外和玻璃体。口服、静脉注射、肌肉注射和透皮方法在很多情况下是首选。

[0137] 化合物可能会被复合或以其他方式制造成适于使用的组合物，如药物剂型或制剂中该化合物是一种活性成分。组合物可包括药学上可接受的载体或赋形剂。赋形剂是一种用作一种活性成分的药物载体惰性物质。尽管是惰性的，赋形剂也可以促进和帮助提高药物产品的输药能力或活性成分的生物利用度。有用的赋形剂的非限制性例子包括：抗附着剂、粘合剂、流变改性剂、涂料、崩解剂、乳化剂、油、缓冲剂、盐、酸、碱、填料、稀释剂、溶剂、香料、着色剂，助流剂、润滑剂、防腐剂、抗氧化剂、吸附剂、维生素、甜味剂等，作为制药/药物复合领域可提供的辅料。

[0138] 常用剂型包括：静脉注射、肌肉注射、或腹腔内的方案，口服片剂或液体，外用药膏或乳膏及透皮贴（如贴片）。在一个实施方案中，化合物是无菌溶液，包含活性成分（药物或化合物）、溶剂比如水，生理盐水，乳酸林格氏液，或磷酸盐缓冲液（PBS）。附加的辅料，如聚乙二醇，乳化剂、盐和缓冲剂、也可以包括在溶液中。

[0139] 在一个实施方案中，剂型是透皮贴或贴片。透皮贴的一般结构在制药领域是公知的，一个典型的贴片包括但不限于，一个用于存储并为为主体提供药物的可输送药物的贮药器，一个在近侧（指向主体皮肤）附有贮药器的封闭的基底，以及通常附着于基底近侧、贮药器周围的用于将贴片完全贴在患者皮肤上的黏胶。贮药器通常是由无纺布（如纱布）或凝胶基质形成，如公知的聚乙烯吡咯烷酮（PVP）或聚醋酸乙烯酯（PVA）。贮药器通常包括吸附在贮药器基质上或基质内的活性成分和皮肤渗透促进剂。渗透促进剂的选择通常取决于实验研究。如下文实施方案 12 中所示，某些有用的渗透促进剂的配方包括但不限于：DMSO；95%丙二醇+5%亚油酸；和 50% EtOH+40% H₂O+5%丙二醇+5% Brij30。

具体实施方式

[0140] 示例 1-7 摘自美国专利 NO. 11/565779，列于此处提供利用短杆菌肽 S- 衍生线粒体靶向基团的某些线粒体靶向自由基清除化合物的有用的合成方法和效果的非限制性的说明。

[0141] 示例 1

[0142] 材料。除非另有说明，所有化学品购自 Sigma-Aldrich 公司 (St Louis, MO)。肝素，盐酸氯胺酮以及戊巴比妥钠购自雅培实验室 (North Chicago, IL)。达氏修正依氏培养基 (“DMEM”) 购自 Bio Whittaker (Walkersville, MD)。胎牛血清 (FBS 的；< 0.05 EU/ml (内毒素单位)) 购自 Hyclone (Logan, UT)。无热原无菌生理盐水购自 Baxter (Deerfield, IL)。

[0143] 一般地。所有水分敏感性反应都在 N₂ 保护条件下采用隔膜式注射器保护套技术进行，并且所有玻璃器皿使用前都需要在烘箱中 150°C 干燥 2h。反应在 -78°C 进行采用 CO₂- 丙酮浴实现。THF (四氢呋喃) 是用钠 / 二苯甲酮羰基回流蒸出；CH₂Cl₂ (DCM)、甲苯和 Et₃N (三乙胺) 是在 CaH₂ 存在条件下经蒸馏处理而得。Me₂Zn 购自 Aldrich 公司。

[0144] 反应通过薄层色谱 (“TLC”) 分析法 (EM Science 预涂硅胶 60F254 薄层层析板，涂层厚度 250 μm) 进行监测，其可视化是通过一个 254nm 的紫外光灯，并通过 Vaughn' s 试

剂 (4.8g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.2g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶于 10ml H_2SO_4 /90ml 水溶液) 染色实现。闪式硅胶柱层析法用于纯化反应混合物粗品。

[0145] 熔点测定使用 Laboratory Devices Mel-Temp II。红外光谱分析使用 Nicolet Avatar 360FT-IR 光谱仪。质谱数据以 Waters Autospec 双聚焦质谱仪 (“EI”) 或 Waters Q-ToF 质谱仪 (“ESI”) 获得。LC-MS 数据通过 Agilent 1100 仪, 并采用 Waters Xterra MS CH 3.5 μm RP 柱 (4.6x100mm) 获得。

[0146] 合成示例 I, 按照文献描述的步骤制备无色油 (图 3, 化合物 1), 见 Edmonds, M. K. 等。基于沙奎那韦 (Saquinavir) 和奈非那韦 (Nelfinavir) 的生物活性构象的限制型反式肽电子等排体的设计与合成, J Org Chem. 66 :3747(2001); 还见 Wipf, P. 等, Org Lett. 7 :103(2005); 还可见 Xiao, J. 等, 缩氨酸模拟化合物的静电与空间位阻效应: 带有 (E)-烯炔肽电子等排体的短杆菌肽 S 类似物的合成和二级结构的分析, J Am Chem Soc. 127 :5742(2005)。

[0147] 将 2.20g (5.52mmol) 化合物 1 (图 3) 溶于 20.0mL 干 CH_2Cl_2 形成的溶液在室温条件下用 1.85g (7.17mmol) 的 Cp_2ZrHCl 处理。反应混合物在室温下搅拌 5min, 减压脱除 CH_2Cl_2 , 并加入 20.0mL 甲苯。由此产生的黄色溶液冷却至 -78°C , 并用 2.76mL (5.52mmol) 的 Me_2Zn (溶于甲苯形成 2.0M 溶液) 处理 30min。该溶液在 -78°C 下搅拌 30min, 在 5min 内回温至 0°C , 其中一部分用 2.05g (11.1mmol) 的 N-Boc-异戊醛亚胺处理, 见 Edmonds, M. K. 等, J Org Chem. 66 :3747(2001); 还见于 Wipf, P. 等, J Org Lett. 7 :103(2005)。还于见 Xiao 等人, J Am Chem Soc. 127 :5742(2005)。

[0148] 由此产生的混合物在 0°C 条件下搅拌 2h, 用饱和 NH_4Cl 溶液终止反应, 并用 EtOAc (乙酸乙酯) 稀释, 通过硅藻土薄滤垫过滤, 并用 EtOAc 萃取。将有机层干燥 (MgSO_4), 真空浓缩, 用 SiO_2 色谱纯化 (20 : 1, 正己烷 /EtOAc), 制得 3.13g (97%) 无色油性 1 : 1 的对映体混合物。

[0149] 将 4.19g (7.15mmol) 上述过程制得的产物溶于 100mL 干四氢呋喃 (“THF”) 中形成的溶液在 0°C 条件下用 9.30mL (9.30mmol) 的氟化四丁铵 (溶于 THF 形成 1.0M 的 TBAF 溶液) 处理。该反应混合物在室温下搅拌 20h, 用 EtOAc 稀释, 并用盐水洗涤。将有机层干燥 (MgSO_4), 真空浓缩, 用 SiO_2 色谱纯化 (4 : 1, 正己烷 /EtOAc), 制得 1.89g (76%) 淡黄色泡沫状非对映异构体混合物。

[0150] 将 1.86g (5.23mmol) 上述过程制得的产物溶于干 40.0mL CH_2Cl_2 形成的溶液在 0°C 条件下用 1.46mL (10.5mmol) 三乙胺 (“TEA”)、2.02mL (21.4mmol) Ac_2O 和 63.9mg (0.523mmol) 4-N, N^1 -(二甲氨基)吡啶 (“DMAP”) 处理。该反应混合物在 0°C 条件下搅拌 15min, 在室温下搅拌 3h, 用 EtOAc 稀释, 并用盐水洗涤。将有机层干燥 (MgSO_4), 真空浓缩, 用 SiO_2 色谱纯化 (20 : 1, 正己烷 /EtOAc), 制得 1.97g (94%) 的乙酸 (2S)-苄基-(5R)-t-丁氧羰基氨基-7-甲基辛-(3E)-烯基酯 (807mg, 38.7%), 乙酸 (2S)-苄基-(5S)-t-丁氧羰基氨基-7-甲基辛-(3E)-烯基酯 (826mg, 39.6%), 以及上述产物的混合物 (337mg, 16.2%)。

[0151] 将 350mg (0.899mmol) 乙酸 (2S)-苄基-(5S)-t-丁氧羰基氨基-7-甲基辛-(3E)-烯基酯溶于 8.00mL MeOH 形成的溶液在 0°C 条件下用 62.0mg (0.449mmol) K_2CO_3 处理。该反应混合物在 0°C 条件下搅拌 1h, 再在室温下在继续搅拌 4h, 用 EtOAc 稀释, 用水

洗涤。将有机层干燥 (MgSO_4), 真空浓缩, 用 SiO_2 色谱纯化 (4 : 1, 正己烷 /EtOAc), 获得 312mg (定量的) 无色油状的化合物 2 (图 3)。

[0152] 将 23.0mg (66.2 μmol) 化合物 2 (图 3) 溶于 2.00mL 干 CH_2Cl_2 形成的溶液在 0℃ 条件下用 42.1mg (99.3 μmol) 戴斯-马丁氧化剂 (Dess-Martin Periodinane) 处理。反应混合物在 0℃ 条件下搅拌 1h, 再在室温下在继续搅拌 4h, 用饱和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液 (溶于饱和 NaHCO_3 溶液形成) 终止反应, 在室温下搅拌 30min, 用 CH_2Cl_2 萃取。将有机层干燥 (MgSO_4), 真空浓缩, 随后将制得无色泡沫状产物溶于 3.00mL THF, 并在 0℃ 条件下用 300 μL (600 μmol) 2-甲基-2-丁烯 (溶于 THF 形成的 2.0M 溶液) 处理, 然后再用另一 18.0mg (199 μmol) NaClO_2 和 18.2mg (132 μmol) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (溶于 3.00mL 水形成的溶液) 处理。该反应混合物在 0℃ 条件下搅拌 1h, 再在室温下在继续搅拌 3h, 用 EtOAc 萃取, 用水洗涤。将有机层干燥 (MgSO_4), 真空浓缩, 制得无色泡沫状的化合物 3 粗品 (图 3) 无需纯化直接用于下一步反应。

[0153] 将化合物 3 的粗品 (图 3) (66.2 μmol) 溶于 3.00mL CHCl_3 所形成的溶液在 0℃ 条件下用 10.7mg (79.2 μmol) 的 1-羟基苯并三氮唑 (“HOBt”) 和 14.0mg (73.0 μmol) 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐 (“EDC”) 处理, 再用由 62.9mg (132 μmol) H-Pro-Val-Orn (Cbz)-OMc 溶于 1.00mL CHCl_3 和 0.8mg (6.6 μmol) DMAP 形成的一种溶液处理, 见 Edmonds, M. K. 等, J Org Chem. 66 : 3747 (2001); 还见于 Wipf, P. 等, J Org Lett. 7 : 103 (2005); 还见于 Xiao, J. 等, J Am Chem Soc. 127 : 5742 (2005)。反应混合物在室温下搅拌 2 天, 用 CHCl_3 稀释, 并用水洗涤。将有机层干燥 (MgSO_4), 真空浓缩, 用 SiO_2 色谱纯化 (2 : 1 正己烷 /EtOAc 到 20 : 1 CHCl_3 /MeOH), 制得 51.3mg (94%) 无色泡沫状的化合物 4a (图 3)。

[0154] 将 53.7mg (65.5 μmol) 的化合物 4a (图 3) 溶于 2.00mL MeOH 形成的溶液在 0℃ 条件下用 655 μL (655 μmol) 的 1N NaOH 处理。反应混合物在室温下搅拌 6h, 并用 655 μL (655 μmol) 的 1N HCl 处理。该溶液用 CHCl_3 萃取, 将有机层干燥 (Na_2SO_4), 真空浓缩, 制得无色泡沫状的粗酸。该酸溶于 5.00mL CHCl_3 中, 并在室温下用 10.6mg (78.4 μmol) 的 HOBt, 15.1mg (78.8 μmol) 的 EDC, 20.2mg (118 μmol) 4-氨基-TEMPO 和 8.0mg (65.5 μmol) 的 DMAP 处理。该反应混合物在室温下搅拌 36h, 用 CHCl_3 稀释, 并用水洗涤。将有机层干燥 (Na_2SO_4), 真空浓缩, 用 SiO_2 色谱纯化 (1 : 1 正己烷 /EtOAc 到 20 : 1 CHCl_3 /MeOH), 制得 62.0mg (99%) 无色固体化合物 5a (图 3)。获得以下特征分析数据: LC-MS 法 (液相色谱-质谱联用) (Rt 8.81min, 10min 内线性梯度 70%~95% CH_3CN (水), 0.4mg/min; m/z = 959.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 981.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$) 以及 HRMS (ESI) (高分辨率质谱仪) m/z 对于 $\text{C}_{53}\text{H}_{80}\text{N}_7\text{O}_9\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$) 的计算值为 981.5915, 实测值为 981.5956。

[0155] 将 60.0mg (71.7 μmol) 化合物 4b (图 3), 见 Tamaki, M. 等人, Bull Chem Soc Jpn., 66 : 3113 (1993), 溶于 2.15mL 的 MeOH 形成的溶液在室温下用处理 717 μL (717 μmol) 的 1N NaOH 处理。该反应混合物在室温下搅拌 5h, 再在 0℃ 条件下用 717 μL (717 μmol) 的 1N HCl 处理。该溶液用 CHCl_3 萃取, 将有机层干燥 (Na_2SO_4), 真空浓缩, 制得无色泡沫状的粗酸。该酸溶于 6.04mL CHCl_3 , 在室温下用 11.6mg (85.8 μmol) 的 HOBt, 16.5mg (85.1 μmol) 的 EDC, 18.5mg (108 μmol) 4-氨基-TEMPO 和 8.8mg (72.0 μmol) 的 DMAP 的处理。该反应混合物在室温下搅拌 20h, 用 CHCl_3 稀释, 并用水洗涤。将有机层干燥 (Na_2SO_4), 真空浓缩, 用 SiO_2 色谱纯化 (从 2 : 1 正己烷 /EtOAc 到 20 : 1 CHCl_3 /MeOH), 制得 69.6mg (99%) 的黄色固体

化合物 5b (图 3)。获得以下特征分析数据:LC-MS 法(液相色谱-质谱联用)(Rt 7.02min, 10min 内线性梯度 70%~95% CH₃CN(水), 0.4mg/min; m/z = 976.5[M+H], 998.4[M+Na]⁺) 以及 HRMS(ESI) m/z 对于 C₅₂H₇₉N₈O₁₀Na(M+Na) 计算值为 998.5817, 实测值为 998.5774。

[0156] 将化合物 3 粗品 (40.3 μmol) (图 3) 溶于 3.00mL CH₂Cl₂ 形成的溶液, 在 0°C 条件下用 10.4mg (60.7 μmol) 的 4-氨基-TEMPO, 7.7mg (40.2 μmol) 的 EDC, 和 5.4mg (44.2 μmol) 的 DMAP 处理。该反应混合物在室温下搅拌 20h, 用 CHCl₃ 稀释, 并用水洗涤。将有机层干燥 (Na₂SO₄), 真空浓缩, 用 SiO₂ 色谱纯化 (4:1~1:1, 正己烷/EtOAc), 制得 18.8mg (91%) 的微黄色固体化合物 5c (图 3)。获得以下特征分析数据:LC-MS 法 (Rt 7.01min, 10min 内线性梯度 70%~95% CH₃CN(水), 0.4mg/min; m/z = 537.3[M+Na]⁺) 以及 HRMS(ESI) m/z 对于 C₃₀H₄₈N₃O₄Na(M+Na) 计算值为 537.3543, 实测值为 537.3509。

[0157] 细胞内超氧自由基的测定。氧化依赖性荧光染料, 二氢乙锭 (“DHE”, 分子探针) 被用于检测细胞内产生的超氧自由基。DHE 具有细胞渗透性, 并在超氧化物存在条件下被氧化成可以插入 DNA 的荧光性溴乙非锭。乙锭荧光的荧光性采用配备了 488-nm 氩离子激光器, 并装有 Cell Quest 软件的 FACscan (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ) 流式细胞仪测量。10000 个细胞的平均荧光强度是采用 585-nm 的带通滤波器 (FL-2channel) 获得的。

[0158] 细胞内 ATP 水平的测定。细胞用 10 μm 化合物 5a (图 3) 按照指示时间周期 (2, 4, 6, 12 和 14h) 培养。在培养结束时, 收集细胞, 细胞内 ATP 的含量采用生物发光体细胞检测试剂盒 (Sigma, St. Louis, MA) 测定。作为阳性对照, 细胞用 2mM 2-脱氧-葡萄糖 (一种竞争性抑制细胞摄取和利用葡萄糖的葡萄糖类似物) 培养 12 和 14h。

[0159] 细胞。Caco-2BBE 人类肠上皮样上皮细胞源自美国模式培养物集存库 (Manassas, VA)。细胞一般保存在 37°C, 空气中含有 8% CO₂ 的潮湿的大气条件下。该培养基为含 10% FBS (胎牛血清) 的 DMEM, 非必需氨基酸补充 (Sigma-Aldrich 公司目录 #M7145), 丙酮酸钠 (2mM), 链霉素 (0.1mg/ml), 青霉素 G (100U/ml) 和人类转铁蛋白 (0.01mg/ml)。培养基每周更换 3 次。

[0160] 获得血管通路的外科治疗。所有使用大鼠的研究方法都遵循了美国国家卫生研究院实验动物的使用准则和制度, 并且获得了匹兹堡大学动物照顾与使用委员会认证。雄性无特殊病原体 (SPF 级) SD 大鼠 (Charles River Laboratories, Wilmington, MA), 重量 150~250g, 饲养在一个有 12h 昼/夜周期性温度控制的环境里。大鼠都可以自由进食和饮水。实验过程中, 大鼠通过肌肉注射 g 他命盐酸 (30mg/kg) 和腹腔灌注戊巴比妥钠 (35mg/kg) 来进行麻醉。实验过程中动物保持仰卧位。利多卡因 (0.5% 溶液 0.5ml) 注入皮下, 为外科手术切开部位提供局部麻醉。为了确保气道, 进行气管切开术, 将聚乙烯管 (PE (聚乙烯) 240; Becton Dickinson, Sparks, MD) 插入气管。使动物能够自主呼吸。

[0161] 右侧股动脉插管用聚乙烯管材 (PE10)。这个导管连接到压力传感器以保证实验过程中的平均动脉压 (MAP) 的瞬时测量。对于采用定压控制式失血性休克 (HS) 模型的实验, 右侧颈静脉被暴露, 远端结扎, 并插入聚乙烯管 (PE10) 以便采血。对于采用定容控制式失血性休克 (HS) 模型的实验, 采用颈静脉导管灌注复苏溶液并且右股静脉插入一个硅导管 (慢性-蛋白酶, Norfolk Medical, Skokie, IL), 被用于采血。

[0162] 所有动物均在 30min 内完成装备。肝素 (500U/kg) 是在股静脉装备完成后立刻注入。动物被放置在一个热毯上以维持其体温在 37°C。在上述不同的装备完成安装后检验。

[0163] 肠黏膜通透性检测。实验前 24h 动物被允许饮水,但不允许进食,以减少肠道内容物的体积。将大鼠如上所述进行装备。实施中间线剖腹手术并取出十二指肠空肠交接处到回盲瓣之间的这段小肠。在近端小肠的系膜小肠对象部部位做一个小切口并注射盐溶液 (1.5ml)。采用丝线 4-0 对肠的切口进行近端和远端结扎 (Look, Reading, PA)。

[0164] 小肠在对口方向沿其长度被轻轻压缩进入结肠以取出肠内容物。从回盲瓣开始 5cm,回肠被分为六个毗连的水密段。每一段为 3cm 长,是通过压缩周界丝线 4-0 进行近端和远端结扎。小心操作确保为小肠供血的血管不受损伤并且每一段灌注良好。

[0165] 从每只大鼠随机选取两个小肠段分别灌注 0.3ml 的介质,用作“无治疗”对照样本。为了灌注肠段,做一小切口,并用聚四氟乙烯导管灌注溶液 (Abbocath 16Ga, Abbot Laboratories)。

[0166] 剩余其他四个肠段分别灌注 4-羟基-2,2,6,6-四甲基吡啶-N-氧基 (TEMPOL) 或者任意一种短杆菌肽 S 系化合物的溶液。TEMPOL 在生理盐水中所形成的四种不同的最终浓度经检测为:0.1,1,5 和 20mM。该半短杆菌肽系化合物溶解于二甲基亚砜 (DMSO) 和生理盐水混合物 (1 : 99v/v) 中,以 0.1,1,10 或 100 μ M 的最终浓度灌注。

[0167] 肠段灌注生理盐水或实验化合物后,肠道被放回腹膜腔,腹部切口暂时使用 Backhaus 手术钳封口。

[0168] 经过 5min 的稳定期,通过抽取颈静脉血液导致失血性休克。MAP 保持在 30 ± 3 mm Hg2h。将所抽取的血液重新输入以将 MAP 维持在需要的范围内。

[0169] 休克 2h 后,动物采用心脏内氯化钾推注实施安乐死。回肠迅速从回盲瓣与肠近端之间切除。各肠段的顶端被丢弃。为了检测半胱天冬酶 3 和 7 (caspases) 的活性和磷脂过氧化反应,大出血后立刻从肠段采集粘膜样本,保藏于 -80°C 。为了进行渗透性测量,每个肠段转变成外翻肠囊,如前文 Wattanasirichaigoon 等人所述,见 Wattanasirichaigoon, S, 等。肠系膜缺血再灌注或失血性休克对大鼠肠黏膜通透性和 ATP 含量的影响, Shock. 12 : 127-133 (1999)。

[0170] 简言之,根据上文所述 Wattanasirichaigoon 的方法,肠囊在冰冷的改良 Krebs-Henseleit 重碳酸盐缓冲液 (“KHBB”) (pH 值 7.4) 中制作。肠段的一端用丝线 4-0 结扎;然后肠段外翻到一个细塑料棒上。所产生的肠囊装在与一个含 1.5ml KHBB 的 3ml 的塑料注射器相连接的聚四氟乙烯导管 (Abbocath 16GA, Abbot Laboratories) 上。肠囊悬浮在含有 KHBB 和异硫氰酸荧光素标记葡聚糖 (平均相对分子质量 4kDa ;FD4 ;0.1mg/ml) 的烧杯中。维持该溶液在 37°C ,以混合气体 (O_2 95% / CO_2 5%) 鼓泡充氧。30min 后,收集肠囊内的液体。样品在 2000g 离心 5min 澄清。

[0171] 烧杯和每段肠囊内溶液中的 FD4 的荧光度,都用荧光分光光度计 (LS-50, Perkin-Elmer, Palo Alto, CA) 在激发波长 492nm 和发射波长 515nm 处检测。如前面所述,黏膜通透性表示为利用肠囊长度归一化处理的清除率,其单位为 $\text{nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^2$,见 Yang, R 等。丙酮酸乙酯调节遭受失血性休克的小鼠的炎症基因表达, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 283 :G212-G22 (2002)。

[0172] 特定实验条件 (即单一浓度的特定试验化合物) 的结果表示为根据下列公式计算的相对渗透率变化:相对渗透率变化 (%) = $(C_{\text{HS exp}} - C_{\text{normal}}) / (C_{\text{HS cont}} - C_{\text{normal}}) \times 100$,其中 C_{HS} 是测得的灌注了实验化合物的肠段的 FD4 的清除率, C_{normal} 是测得的取自没有遭受失血

性休克的 3 例正常动物的 6 个肠段的 FD4 的清除率,而 $C_{HS \text{ cont}}$ 是测得的取自用来检测 $C_{HS \text{ exp}}$ 的同一动物的灌注了介质的两个肠段的平均 FD4 的清除率。Caco-2 单层膜通透性的测量。Caco-2_{BBe} 细胞以 5×10^4 细胞/孔的细胞密度涂布在 12 孔双室培养槽 (Transwell, Costar, Corning, NY) 的透滤器上 (孔径 $0.4 \mu\text{m}$)。经过 21 ~ 24 天,通过测量从顶端到基底侧的 FD4 的清除率来测定细胞旁路通透性。

[0173] 简单地说,基底外侧的介质被换成了对照介质或含有甲萘醌 (终浓度 $50 \mu\text{M}$) 的介质。含 FD4 (25mg/ml) 的介质适用于顶端槽。在某些情况下,该短杆菌肽 S 系化合物之一, XJB-5-131, 也以 $0.1, 1, 10$ 或 $100 \mu\text{M}$ 的最终浓度被添加到顶部。经过 6h 的培养,通过两个舱室为介质供气。单层膜通透性表示为清除率 ($\text{pL} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^2$), 见 Han, X 等。炎症细胞因子引起肠上皮细胞中的紧密连接蛋白的 NO 依赖性和非依赖性变化的表达和定位, Shock. 19 : 229-237 (2003)。

[0174] 半胱天冬酶 3 和 7 的活性测定。半胱天冬酶 3 和 7 的活性测定采用市售的检测试剂盒,半胱天冬酶 GloTM 3/7 检测试剂盒 (Promega, Madison, WI)。简单地说, $50 \mu\text{L}$ 大鼠肠粘膜胞液 (20 罐蛋白) 与 $50 \mu\text{L}$ 半胱天冬酶 -GloTM μL 试剂混合,并在室温下培养 1h。在培养期结束时,每个样品的发光测定采用平板读数化学发光仪 (ML1000, Dynatech Laboratories, Horsham, PA)。半胱天冬酶 3 和 7 的活性分别表示为发光强度 (每 mg 蛋白任意单位)。蛋白质浓度采用 BioRad 法测定 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA)。

[0175] 磷脂过氧化反应的测定。肠道黏膜样本均质化。脂类采用 Folch 法从胞液中萃取,见 M. Lees 和 G. H. Sloan-Stanley, 从动物组织中分离及纯化总脂的简单方法, J. BIOL. CHEM. 226 :497-509 (1957), 以及如前所述通过 2D HPTLC (高效薄层色谱法) 解决,见 Kagan, V. E. 等,氧化应激在细胞凋亡中的作用:磷脂酰丝氨酸的氧化和外翻是清除遭受 Fas 介导的细胞凋亡的巨噬细胞所需要的, J Immunol. 169 :487-489 (2002)。磷脂的斑点从 HPTLC 板上刮去和磷脂从 SiO_2 萃取。脂质磷采用微量测定法测定,见 Bottcher, C. J. F. 等。一种快速、敏感的亚微量磷测定, AnalChim Acta. 24 :203-204 (1961)。

[0176] 氧化磷脂采用溶于含有 1mM CaCl_2 、 0.5mM EDTA 和 0.5mM 十二烷基硫酸钠 (SDS) 的 25mM 磷酸盐缓冲液 (pH 8.0, 室温, 30min) 的胰腺磷脂酶 A2 ($2\text{U}/\mu\text{L}$) 水解。所生成的脂肪酸氢过氧化物是利用荧光 HPLC 通过测定在 Amplex Red (在 4°C 40min) (8) 存在条件下在其微过氧化物酶 11 催化的还原反应过程中按化学剂量比生成的试卤灵 (9-羟基-3-异吩恶唑酮) 来测定的。荧光高效液相色谱法 (Eclipse XDB-C18 柱, $5 \mu\text{m}$, $150 \times 4.6\text{mm}$, 流动相由 25mM 磷酸二钠缓冲液 (pH7.0) / 甲醇 (60 : 40v/v 组成); 激发波长 560nm , 发射波长 590nm) 在配有荧光检测器 (RF-10Ax1) 和自动进样器 (SIL-10AD) 的 Shimadzu LC-100ATHPLC 系统进行。

[0177] 遭受定容控制式失血性休克的大鼠的存活。继术前准备和一个获得基线读数的 5min 的稳定期之后,大鼠遭受失血性休克。出血分两个阶段进行。

[0178] 初期,在 20min 内按照 21ml/kg 的量抽取血液。紧接着,又在 40min 内按照 12.5ml/kg 的量抽取血液。因此,出血发生总时间为 60min,总失血量为 33.5ml/kg 或约为总血容量的 55%。大鼠随机分配输入 XJB-5-131 ($2 \mu\text{mol/kg}$) 或其介质,一种 33 : 67 (v/v) DMSO 和生理盐水的混合物。XJB-5-131 溶液或单纯的介质在出血的最后 20min 期间被安排连续输入。输液总量为 2.8ml/kg ,它是使用注射泵 (KD100, KD Scientific, New Hope, PA) 静脉注

射。大鼠被观察 6 个 h, 或直至到死亡 (被定义为停止呼吸 > 1min)。在 6h 的观察期结束时, 仍然活着的动物用过量的氯化钾安乐死。

[0179] 使用市售应变片传感器, 放大器和监测器 (S90603a, SpaceLabs, Redmond, WA) 连续记录血压。血液样本 (0.5ml) 在失血开始时 (基准值), 在失血 (性休克) 终止时, 于复苏 (复活) 结束时从颈静脉收集。血红蛋白浓度 [Hb], 乳酸和血糖浓度采用自动分析仪测定 (Model ABL 725, Radiometer Copenhagen, Westlake, OH)。

[0180] 数据显示和统计。所有的变量都以平均值 + 标准误差平均值 (SEM) 的形式表示。统计显著性组间差异用恰当的 ANOVA (方差分析) 和 LSD (最小明显差异) 试验, 或较恰当的用 Kruskal-Wallis 和 Mann-Whitney 法测试。存活数据采用对数秩实验进行分析。其显著性检验表明 P 值小于 0.05。

[0181] 实施例 2

[0182] TEMPO 选择性传送到线粒体可能导致有益于治疗的活性氧类物质的减少; 因此, 对 4-氨基-TEMPO (“4-AT”) 轭合物的使用研究进行了探讨。为了选择性靶线粒体, 定位序列使用膜活性抗生素短杆菌肽 (“GS”), 以及相应的烯炔电子等排体, 图 2 和 3 所示。因此, 使用短杆菌肽 S 肽酰片段和烯炔电子等排体作为 “锚” 的 TEMPO “有效载荷” 可以导入线粒体。

[0183] 半短杆菌肽的 Leu-^DPhe-Pro-Val-Orn 片段用作定位序列。烯炔-电子等排体, 如短杆菌肽 (即半短杆菌肽) 的 (E)-烯炔电子等排体被用作定位序列的一部分。图 3 是 (E)-烯炔电子等排体和具有相应的化学结构的化合物 3 的合成途径。随后, 图 3 中的 (E) 如化合物 2 所描述的 (E)-烯炔被多步氧化产生化合物 3 的 (E)-烯炔电子等排体示例中所描述的化合物。

[0184] 然后, 图 3 中化合物 3 所描述的化合物是通过用作偶联剂的 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (“EDC”) 与三肽 H-Pro-Val-Orn (Cbz)-OMe 耦合。该三肽是一个合适具有细胞线粒体亲和力的定位序列的例子。最终产品如图 3 中化合物 4a 所示。化合物 4a 皂化后再通过与 4-氨基-TEMPO 耦合产生如图 3 中的化合物 5a 所示的轭合物, 其中 Leu-^DPhe 肽键已被替换为一 (E)-烯炔。

[0185] 在一个可选实施方案中, 通过肽 4b (Boc-Leu-^DPhe-Pro-Val-Orn (Cbz)-OMe) 与 (E)-烯炔电子等排体偶联得到的轭合物 5b 和 5c 如图 3 中被标识为化合物 3 到 4-AT 的化合物。肽是另外一个合适的具有细胞线粒体亲和力的定位序列的例子。

[0186] 电子顺磁共振 (“EPR”) 光谱是用来监测小鼠胚胎细胞 (“MEC”) 中的如图 3 所示的化合物 5a 和 5b 的细胞传递。

[0187] 下列条件用于小鼠胚胎细胞中氮氧自由基短杆菌肽 S-肽基轭合物的结合和还原的 EPR 分析过程。浓度为 1000 万小鼠胚胎细胞 /mL 的小鼠胚胎细胞分别用 10 μM 的 4-AT 和化合物 5a 培养。回收的全部细胞, 线粒体和胞液中的氮氧自由基悬浮于分别含有或不含有 2 μM K₃Fe(CN)₆ 的磷酸盐缓冲液 (“PBS”) 中。简言之, 图 4A 显示出含有 K₃Fe(CN)₆ 的在小鼠胚胎细胞中占不同比率的化合物 5a 的 EPR 谱图。此外, 图 4B 显示了总氮氧自由基的检测值。

[0188] 用 10 μM 的化合物 5a (图 3) 培养的 MECs 以及从这些细胞中分离的线粒体中氮氧自由基的具有明显的特征的三组信号被检测。胞液的存在并没有引发氮氧自由基的 EPR 信

号;通过轭合物 5b(图 3)可以观察到类似的结果(数据未显示)。

[0189] 当添加一种单电子氧化剂,铁氰化物(图 4B)时 EPR 信号强度的数值明显增大,这表明用化合物 5a(图 3)培养 MECs 可导致化合物 5a 的融合和单电子还原。(注:用化合物 5b 培养的 MECs 的 EPR 结果没有显示在图 4 中,但是 5b 的 EPR 结果与 5a 相似)。然而,与 5a 和 5b 相比,4-氨基-TEMPO(4-AT)的 EPR 结果并没有明显的振幅变化表明 4-AT 并不能有效地渗透细胞或线粒体。

[0190] 5a,5b(图 3),和 4-AT 抑制细胞内超氧化物的能力通过荧光流式细胞仪监测二氢乙锭(“DHE”)氧化成荧光溴乙非锭被检验。对于 5a,5b 和 4-AT 抑制放线菌素 D(“ActD”)引起的细胞凋亡的能力也进行了试验。MECs 用 10 μ M 的 4-AT,5a,或 5b 预处理,然后用浓度为 100ng/mL 的 ActD 培养。结果发现,5a 及 5b 可完全抑制 MECs 内近 2 倍的细胞内超氧化物的产生(见图 6A)。4-AT 对于 MECs 内的超氧化物的产生并没有影响。

[0191] 凋亡细胞反应使用三种生物标记物记录:(1)细胞表面的磷脂酰丝氨酸(“PS”)外翻(使用 FITC 标记 -pS- 结合蛋白,膜联蛋白 V 通过流式细胞仪进行,见图 6B 及 6E), (2)通过 Z-DEVD-AMC 底物降解活化半胱天冬酶-3(见图 6C),以及(3)利用流式细胞仪通过碘化丙啶染色 DNA 进行 DNA 破碎(见图 6D)。

[0192] 磷脂酰丝氨酸(“PS”)是一种主要分布于质膜内小叶上的酸性磷脂;细胞表面 PS 外翻是细胞凋亡特征。PS 外翻利用膜联蛋白 V 检验试剂盒通过流式细胞仪分析。细胞在培养结束时通过胰蛋白酶作用采集,然后用膜联蛋白 V-FITC 和碘化丙啶(“PS”)染色。一万个细胞事件通过一个 FACScan 流式细胞仪采集。膜联蛋白 V-阳性和 PI-阴性细胞被认为是细胞凋亡。

[0193] caspase-3,一种只在细胞凋亡执行阶段被激活的半胱氨酸蛋白酶的活化,用 EnzChek caspase-3 检测试剂盒检验。

[0194] 而且,细胞凋亡过程中钙和镁依赖性核酸酶被激活致 DNA 降解。这些 DNA 片段被洗提,用碘化丙啶染色,并流式细胞仪分析。一个 DNA 含量减少的细胞群被认为是凋亡细胞的一部分。

[0195] 在相对较低的浓度(10 μ M)条件下观察化合物 5a 及 5b 的抗细胞凋亡作用。化合物 5a 和 5b(图 3)减少了膜联蛋白 V 阳性细胞数量,如图 6B 所示,抑制 caspase-3 的活化,如图 6C 所示,并阻止 DNA 分裂,如图所示 6D 所示。浓度大于 10 μ M 时,5a 及 5b 抑制性下降,或者表现出细胞毒性(图 6E 所示)。相比之下,4-AT 没有保护作用。

[0196] 相比较而言,没有一个完整的靶向性组分的化合物 5c 在低浓度条件下对于保护 MECs 抑制 ActD 致细胞凋亡无效(图 6B 和 6C)。因此,半短杆菌肽基定位序列是诸如含有 TEMPO 的那些氮氧自由基轭合物的抗凋亡活性所必须的。

[0197] 最后,化合物 5a 和 5b 的还原反应也会导致线粒体氧化磷酸化作用的抑制,所以对于用这些化合物处理的 MECs 的 ATP 含量进行了试验。正如本领域技术普通人员所熟知的,ATP 是生物有机体中的主要能量来源;ATP 水平下降将会严重影响正常细胞的功能。将含有或不含有 5a 或 2-脱氧葡萄糖(“2-DG”)的 MECs 中的 ATP 水平用作阳性对照(见图 6F)。在抗细胞凋亡作用最大的浓度条件下($\sim$ 10 μ M,图 6E),氮氧自由基轭合物没有引起细胞内 ATP 水平的明显改变。因此,合成 GS-肽基轭合物迁移进入细胞和线粒体,在那里他们被还原但不影响线粒体产生 ATP 的能力。

[0198] 实施例 3

[0199] 在体内试验中,大鼠回肠被分成了在一定程度上类似于香肠的一系列良好血管供应的组分。每个回肠段管腔内都灌注了 3 μ L 小剂量的实验溶液。两节回肠段单纯灌注介质(即一种至少含有一定浓度的 TEMPO 衍生物的溶液)。这两段都用作内部对照,以解释休克严重程度或黏膜对休克反应的个体差异。

[0200] 使用这种检测系统,对八化合物进行了评价,如图 5 所示:TEMPOL(图 5A),一个二肽 TEMPO 类似物(图 5B-XJB-5-208),3 个半短杆菌肽-TEMPO 衍生物(图 5C XJB-5-125、5E XJB-5-131 和 5G XJB-5-197),3 个没有 TEMPO 组分的半短杆菌肽化合物(图 5D-XJB-5-127, 5F-XJB-5-133,和 5H-XJB-5-194)。

[0201] 大鼠失血性休克导致肠黏膜屏障功能明显紊乱-换句话说,在休克状态下肠段黏膜通透性明显高于正常大鼠的肠段通透性(分别为 52.3 ± 0.5 对 $6.9 \pm 0.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^2$; $p < 0.01$),见 Tuominen, E. K. J., 磷脂细胞色素 c 的相互作用:脂质锚地延伸的证据, J. BIO L. CHEM., 277:8822-8826 (2002);还见于 Wipf, P. 等,线粒体靶向选择性电子清除剂:半短杆菌肽-TEMPO 衍生物的合成和生物学分析, J. AM. CHEM. SOC. 127:12460-12461。因此,小鼠遭受 2h 休克(平均动脉压("MAP") = $30 \pm 3 \text{ mm Hg}$),切取肠段,并对荧光异硫氰酸盐-葡聚糖("FD4")的黏膜渗透性进行离体检测。图 5 的数据表示为相对于同时检测的休克过程中输入生理盐水的对照肠段的渗透率变化的百分比。

[0202] 因此,腔内 TEMPOL 被用作一种肠道粘膜保护检验的“阳性对照”。肠腔内的 TEMPOL 浓度 $> 1 \text{ mM}$ 改善了失血性休克致回肠黏膜的过高通透性(图 5A)。两种 TEMPO 衍生物,即 XJB-5-208(图 5B) 和 XJB-5-131(图 5C),也明显改善了失血性休克致回肠黏膜的通过高透性。XJB-5-208(图 5B) 和 XJB-5-131 最低有效浓度(图 5E)为 $1 \mu \text{M}$;也就是说,这两种化合物药效均大于 TEMPOL ~ 1000 倍以上。载有 TEMPO 的有效成分的另外两种化合物, XJB-5-125(图 5C) 和 XJB-5-197(图 5G) 不能提供出血致肠屏障功能障碍防护。XJB-5-133(图 5F) 具有与 XJB-5-131(图 5E) 相同的(半短杆菌肽基)线粒体靶向组分,但没有 TEMPO 的有效成分。因此,值得注意的是, XJB-5-133(图 5F) 不能提供保护抑制回肠黏膜过高通透性的增长。

[0203] 还有其他两个半短杆菌肽系的化合物, XJB-5-127(图 5D) 和 XJB-5-194(图 5H),也因缺乏 TEMPO 的有效成分而无效。对这些化合物进行筛选, XJB-5-131(图 5E) 似乎是最有效的,减少失血性休克致黏膜通透性约为对照值的 60%。

[0204] 基于图 5A-5H 反映的结果,TEMPO 的有效成分,和“锚定”半短杆菌肽片段都是化合物 XJB-5-131 具备清除电子的有效活性所必须的。因此,有人发现, XJB-5-131 可改善线粒体磷脂在遭受失血性休克的大鼠的肠道粘膜中过氧化反应(即 ROS 活性)。

[0205] 在随后的一系列的体内实验中,对于腔内 XJB-5-131 对出血致肠黏膜磷脂过氧化反应的影响进行了研究。离体大鼠回肠段被分为一系列在一定程度上类似于香肠的良好血管供应的组分,并且每段回肠管腔都灌注含有介质或 $10 \mu \text{m}$ 的 XJB-5-131 溶液(此前已被表明是活性最大的半短杆菌肽-TEMPO 衍生物)相同体积的实验溶液。在一个优选的实施方案中,每段回肠腔内都灌注 0.3mL 的实验溶液。

[0206] 经过两个小时的 HS 后,取出灌注了介质和 XJB-5-131 的取自肠囊的回肠黏膜样本,并与正常 MECs 的回肠黏膜比较。所有样品都用 caspase 3 或 caspase 7 的活性以及卵

磷脂（“PC”）、磷脂酰乙醇胺（“PE”）、磷脂酰丝氨酸（“PS”）和心磷脂（“CL”）的过氧化反应进行检测，总结在图 7 中。

[0207] 在图 7A-7D 可以看出，用 XJB-5-131 处理明显改善出血致 CL（唯在线粒体中检测发现的磷脂）过氧化反应。然而，用 XJB-5-131 处理只对 PE 过氧化反应有较小影响，而对 PC 和 PS 过氧化反应没有影响。基于在这些趋势，失血性休克与大量氧化应激相关，即使在不复苏的情况下。并且，这一数据还证实，XJB-5-131 是一种有效的 ROS 清除剂，因为它主要位于线粒体内并能抑制 CL 过氧化反应。

[0208] 相对于检测到的正常动物样本活性，用介质处理的取自失血性大鼠的黏膜样本中的 caspases 3 和 7 的活性明显增加（图 8）。然而，当回肠段用 XJB-5-131 溶液替代介质灌注，失血性休克后 caspase 3 和 7 的活性水平明显下降。因此，失血性休克是与肠道粘膜细胞的促凋亡途径的活化相关的。此外，该数据证实，继 XJB-5-131 处理线粒体之后这个过程明显改善。

[0209] 实施例 4

[0210] 在另一系列实验中，对肠上皮样细胞（Caco-2_{BBE}）单层膜，进行了生理和病理生理研究，以确定肠屏障功能。正如与 ROS 暴露有关的优先例所述，当细胞用 ROS，过氧化氢，或甲萘醌（一种促使超氧化物阴离子自由基的形成的氧化还原循环奎宁）培养时，Caco-2BBE 膜通透性增加，见 Baker, R. D. 等。Caco-2 细胞的分化，活性氧代谢物对肠屏障功能的影响，DIGESTIVE DIS. SCI. 40 :510-518(1995)；还见于 Banan, A. 等，蛋白激酶 C 的 delta- 异构体的活化是微管细胞骨架和肠上皮细胞透性障氧化-还原分解所必须的。J. PHARMACOL. EXP. THER. 303 :17-28(2002)。

[0211] 由于有关 XJB-5-131 及其对于出血致体内粘膜细胞内 CL 过氧化反应的改良的结果（见上述第 1 和第 2 实施例），对于一个采用 XJB-5-131 的可能性处理进行观察，以确定甲萘醌致上皮细胞过高通透性是否能进行体外改善。与之前的体内观察一致，Caco-2BBE 单层膜别在有或没有甲萘醌存在的条件下培养。6h 后，用甲萘醌培养 Caco-2BBE 单层膜引起了从顶端到基底侧的 FD4 清除率明显增加（图 9）。以 10 μ M 的 XJB-5-131 处理可以提供保护明显抑制甲萘醌致过高通透性。

[0212] 实施例 5

[0213] 正如上文在体内和体外研究反映，XJB-5-131 对于若干生化和生理读数有明显有益的影响。因此，XJB-5-131 全身给药研究关于是否会延长遭受由于大量失血而又没有进行规范的血液和晶体溶液复苏的情况下的深度失血性休克的患者的存活率。对于上述研究，大鼠被用作试验患者。

[0214] 这项研究一共使用了十六只大鼠进行测试。大鼠在出血试验过程的最后 20min 用 2.8ml/kg 的介质或相同容量的 XJB-5-131 溶液治疗。输入 XJB-5-131 总剂量为 2 μ mol/kg。以下是及与之前所述的研究过程一致的深度失血性休克之后，十三只大鼠的存活时间至少为 60min，接收了所灌注的全部剂量的 XJB-5-131 溶液或介质（一种 33 : 67(v/v) 的 DMSO 和生理盐水混合物）。如表 2 所示，在基线阶段和治疗之前以及短暂治疗之后，两组的血糖，乳酸和血红蛋白浓度相似。在组间无统计学意义上的明显差异。

[0215] 表 2

[0216]

参数	化合物	基线	第一阶段失血结束	第二阶段失血结束
血糖浓度 (mg/dL)	介质	143 ± 5	255 ± 30	219 ± 26
	XJB-5-131	134 ± 4	228 ± 24	201 ± 38
血乳酸浓度 (mEq/L)	Vehicle	1.8 ± 0.4	606 ± 0.8	5.9 ± 1.3
	XJB-5-131	1.8 ± 0.2	5.7 ± 0.8	5.6 ± 1.2
血红蛋白浓度 (g/dL)	介质	12.7 ± 0.5	11.1 ± 0.3	9.4 ± 0.2
	XJB-5-131	12.7 ± 0.3	10.7 ± 0.3	9.4 ± 0.3

[0217] 治疗开始后不久,两组的平均动脉压 (“MAP”) 都略有上升 (参见图 10A)。在两组平均动脉压 (“MAP”) 在出血实验过程的第一阶段迅速下降,并在第二阶段开始几乎保持恒定在 40mmHg。用介质治疗 (对照组) 的七个动物中有六个出血试验过程结束一个小时内死亡,所有动物均在 125min 内 (图 10B) 死亡。采用静脉注射 XJB-5-131 治疗的大鼠存活时间明显大于用介质治疗的大鼠。在失血实验过程结束后,六大鼠中有 3 只存活时间超过 3h,一只大鼠在出血观察期结束后整整存活了 6h (图 10B)。

[0218] 因此,对 XJB-5-131 的研究分析表明,患者接触该化合物可以延长其由于外伤或其他灾难 (如腹主动脉瘤破裂) 失去大量的血后的生存时间。

[0219] 在发生不可逆休克前,通过扩展治疗窗口,由 XJB-5-131 参与治疗可以“赢得”足够的时间使更多的严重受伤的患者可以转移到权威的治疗地点,包括出血控制和用血液制品及非血质液体复苏都可以提供。使用一种失血性休克的啮齿目动物模型的结果还开创了 XJB-5-131 类的药物可能会对与明显的组织低灌注,如中风,心肌梗死相关的其他病况有益。

[0220] 所得结果也证实了线粒体靶向性 ROS 清除剂是一种合理的治疗策略的一般性概念。虽然以前的研究表明,采用 TEMPOL 治疗有益于啮齿目动物 HS 的情况,但是需要该化合物的剂量较大 (30mg/kg 丸 +30mg/kg 每小时)。相反,用 XJB-5-131 治疗以约低于上述剂量 300 倍的剂量就有明显的效果。XJB-5-131 比 TEMPOL 具有更大的药效大概反映了 XJB-5-131 主要作用于线粒体膜的倾向,本发明的一个关键实施方案。如上所述,两个半短杆菌肽-4-氨基-TEMPO 衍生物 (即 XJB-5-208 和 XJB-5-131,见图 2) 在用该化合物溶液培养后,集中作用于饲养小鼠的胚胎细胞的线粒体。

[0221] 并且,XJB-5-131 的使用明显延长了遭受大量失血大鼠存活时间,即使动物没有用血液或其他非血质液体复苏,它们仍然处于深度低血压状态。

[0222] 鉴于上述情况,合成半短杆菌肽基-TEMPO 钽合物渗透到细胞膜,及线粒体膜,并在那里起到 ROS(例如包括但不限于,超氧化物阴离子自由基)的自由基清除剂的作用。然后钽合物在线粒体内通过包括细胞呼吸途径并由此耦合去耦合的活性氧类物质的电子传递蛋白还原。这些钽合物的优点,正如上文中讨论的,具备抗凋亡能力,特别是对于诸如化合物 5a 和 5b 而言。

[0223] 通过有效地降低活性氧类物质的量,患者的状况,包括疾病或其他医疗状况,都可能会改善,在某些情况下,存活时间可能如示例 IV 研究所描述的被延长。这种状况的列子,包括疾病和其他医疗状况,包括(但不限于)以下的医疗状况,包括疾病和病症:心肌缺血和再灌注(如血管成形术后,以及用于不稳定心绞痛或心肌梗死支架置入术),实质器官(肺肝、肾、胰、肠、心脏)移植,出血性休克,感染性休克,中风,致电离辐射造成的组织损伤,肺损伤,急性呼吸窘迫综合征(ARDS),坏死性胰腺炎以及坏死性小肠结肠炎。

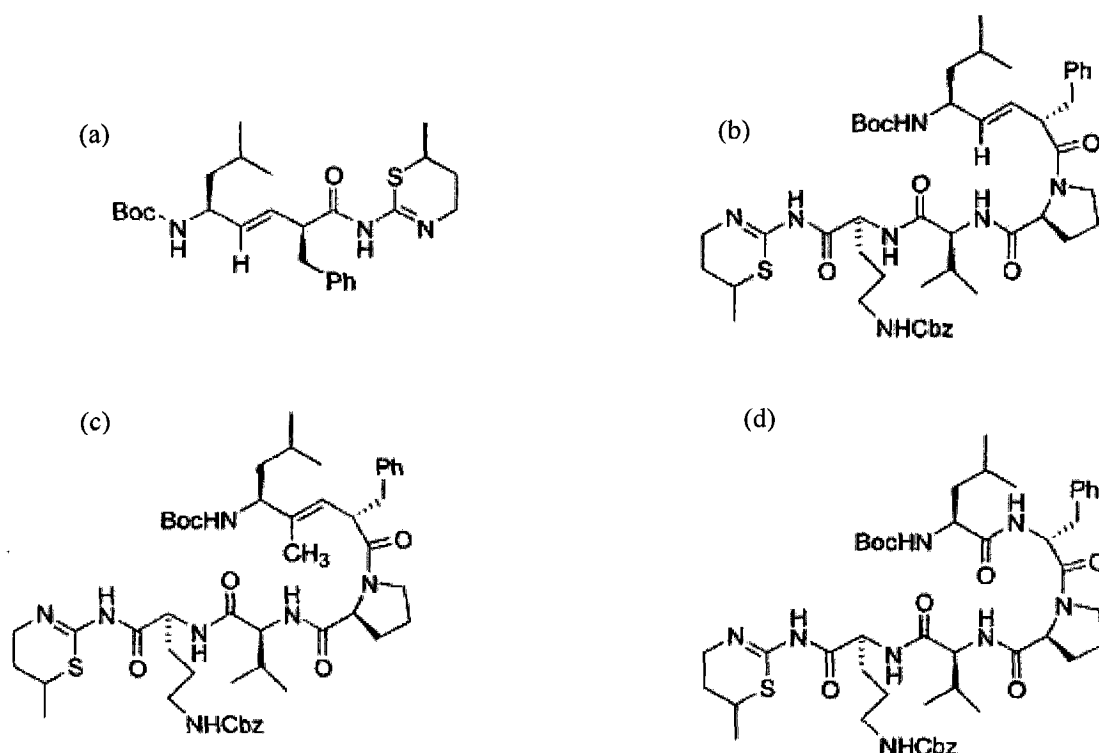
[0224] 实施例 6

[0225] 在又一实施方案中,证实线粒体靶向基团的可交换性负载物,一种清除线粒体膜内自由基的组合物包括自由基清除剂或 NOS 抑制剂和对线粒体膜具有高亲和力的一种膜活性肽片段。膜活性肽片段最好是从含有抗氧化,抗辐射,防护性,抗细胞凋亡,益于治疗的,改良的, NOS 拮抗剂及其制品的基团中选择。在一个相关的实施方案中,对于具有抗生素特性的化合物,一般优选采用其作用方式包括细菌壁标靶的化合物。

[0226] 在另一实施方案中,膜活性化合物是优选的选自含有杆菌肽,短杆菌肽,缬氨霉素,恩镰孢菌素,丙甲菌素,白僵菌素, serratomolide, 蕈孢霉酯,短杆菌酪肽,多黏菌素,摩那霉素和海鞘肽的基团。

[0227] 在一个相关的实施方案中, NOS 拮抗剂选自含有 XJB-5-234(a), XJB-5-133(b), XJB-5-241(c), and XJB-5-127(d) 的基团,其中包括 AMT NOS 拮抗剂负载物:

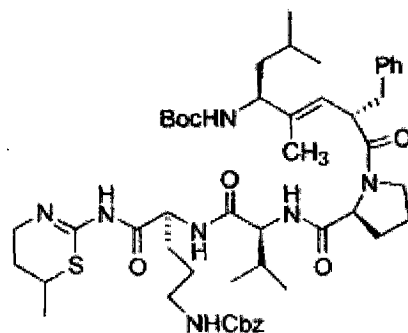
[0228]



[0229] 实施例 7

[0230] 下面的实施例提供了可用于本发明所述的用作 NOS 拮抗剂的附加负载物的合成途径。

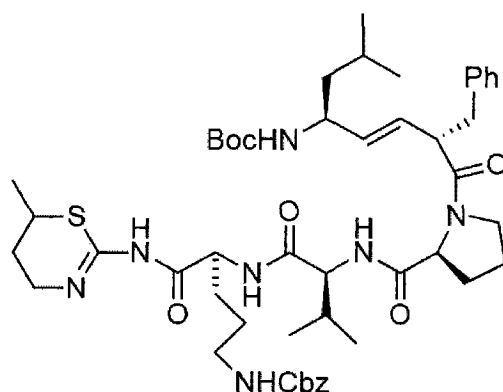
[0231]



[0232] 化合物 (1) 是 Boc-Leu-Ψ[(E)-C(CH₃)=CH]-^DPhe-Pro-Val-Orn(Cbz)-AMT (XJB-5-241), 按照以下方法制备。将 11.0mg (13.2 μmol) 的 Boc-Leu-Ψ[(E)-C(CH₃)=CH]-^DPhe-Pro-Val-Orn(Cbz)-OMe (2-48) 溶于 400 μL 的 MeOH 形成的溶液在 0 °C 条件下, 用 132 μL (132 μmol) 的 1N NaOH 处理。该反应混合物在室温下搅拌 8h, 并用 132 μL (132 μmol) 的 1N HCl 处理。该溶液用 CHCl₃ 萃取, 将有机层干燥 (Na₂SO₄), 真空浓缩, 制得无色的粗酸。该酸溶解于 2.00mL 的 CHCl₃, 并在室温下用 2.1mg (16 μmol) 的 HOBt, 3.0mg (16 μmol) 的 EDC, 3.3mg (20 μmol) 的 2-氨基-5,6-二氢-6-甲基-4-氢-1,3-噻嗪·HCl 和 3.5mg (27 μmol) 的 DMAP 处理。该反应混合物在室温下搅拌 48h, 用 CHCl₃ 稀释, 并用水洗涤。将有机层干燥 (Na₂SO₄), 真空浓缩, 用 SiO₂ 色谱纯化 (先 1 : 1, 正己烷 / EtOAc 然后 20 : 1, CHCl₃ / MeOH), 制得 11mg (89%) 的无色粉末状 XJB-5-241。获得以下特征分析数据: LC-MS 法 (液相色谱-质谱联用) (Rt 8.37min, 10min 内线性梯度 70% ~ 95% CH₃CN (水), 0.4mL/min; m/z = 932.4 [M+H]⁺, 954.3 [M+Na]⁺) 以及 HRMS (ESI) (高分辨率质谱

仪) m/z 对于 $C_{49}H_{72}N_7O_8S(M+H)$ 计算值为 932.5320, 实测值为 932.5318。

[0233]

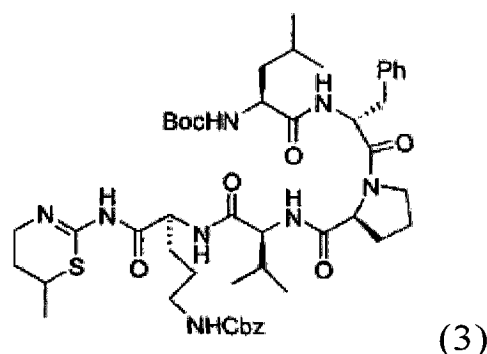


XJB-5-133

(2)

[0234] 化合物 (2) 是 Boc-Leu- $\Psi[(E)-CH=CH]^D$ Phe-Pro-Val-Orn(Cbz)-AMT(XJB-5-133), 并按照以下方法制备。20.0mg (24.3 μ mol) 的 2-85(XJB-5-194) 溶于 800 μ L 的 MeOH 形成的溶液, 在 0℃ 条件下用 243 μ L (243 μ mol) 的 1N NaOH 处理。该反应混合物在室温下搅拌 6h, 并 243 μ L (243 μ mol) 的 1N HCl 处理。该溶液用 $CHCl_3$ 萃取, 将有机层干燥 (Na_2SO_4), 真空浓缩, 制得无色的粗酸。该酸溶解于 1.00mL 的 $CHCl_3$, 在室温下用 3.9mg (29 μ mol) 的 HOBt, 5.6mg (29 μ mol) 的 EDC, 6.1mg (37 μ mol) 的 2-氨基-5,6-二氢-6-甲基-4-氢-1,3-噻嗪·HCl 和 7.4mg (61 μ mol) 的 DMAP 处理。该反应混合物在室温下搅拌 20h, 用 $CHCl_3$ 稀释, 并用水洗涤。将有机层干燥 (Na_2SO_4), 真空浓缩, 然后用 SiO_2 色谱纯化 (先 1:1, 正己烷/EtOAc, 然后 20:1, $CHCl_3$ /MeOH) 和再用 C_{18} 反相 HPLC 制备色谱纯化 (20min 内 80% 到 100% $CH_3CN(H_2O)$, 5.0mL/min), 制得 12.9mg (58%) 的无色粉末状的 XJB-5-133。获得以下特征分析数据: LC-MS 法 (R_t 7.89min, 10min 内线性梯度 70%~95% $CH_3CN(水)$, 0.4mL/min; $m/z = 918.3[M+H]^+$, 940.3[M+Na] $^+$) 以及 HRMS (ESI) m/z 对于 $C_{49}H_{72}N_7O_8S(M+H)$ 计算值为 918.5163, 实测值为 918.5185。

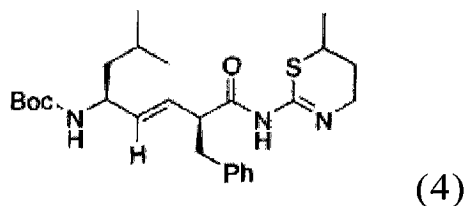
[0235]



[0236] 化合物 (3) 是 Boc-Leu- Ψ^D Phe-Pro-Val-Orn(Cbz)-AMT(XJB-5-127), 按照以下方法制备。24.0mg (28.7 μ mol) 的 Boc-Leu- Ψ^D Phe-Pro-Val-Orn(Cbz)-OMe 溶于 800 μ L 的 MeOH 形成的溶液在室温条件下, 用 287 μ L (287 μ mol) 的 1N NaOH 处理。该反应混合物在室温下搅拌 5h, 并于 0℃ 条件下用 287 μ L (287 μ mol) 的 1N HCl 处理。溶液用 $CHCl_3$ 萃取, 将有机层

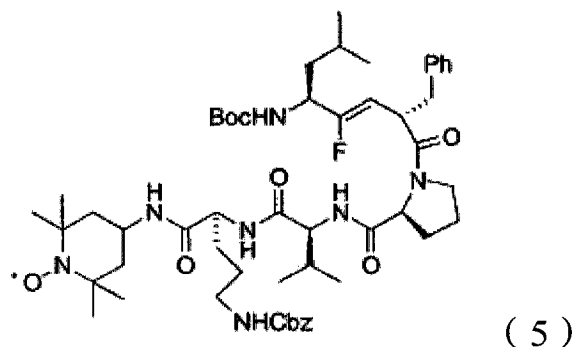
干燥 (Na_2SO_4), 真空浓缩, 制得无色泡沫状的粗酸。该粗酸溶解于 2.00mL 的 CHCl_3 , 在室温下用 4.6mg ($34 \mu\text{mol}$) 的 HOBt, 6.6mg ($34 \mu\text{mol}$) 的 EDC, 5.7mg ($34 \mu\text{mol}$) 的 2-氨基-5,6-二氢-6-甲基-4-氢-1,3-噻嗪·HCl 和 8.8mg ($72.0 \mu\text{mol}$) 的 DMAP 处理。反应混合物在室温下搅拌 24h, 用 CHCl_3 稀释, 并用水洗涤。将有机层干燥 (Na_2SO_4), 真空浓缩, 用 SiO_2 色谱纯化 (先 2 : 1, 正己烷 / EtOAc, 然后 20 : 1 CHCl_3 / MeOH), 制得 17.0mg (63%) 的无色粉末状 XJB-5-127。获得以下特征分析数据: LC-MS 法 (R_t 6.32min, 10min 内线性梯度 70% ~ 95% CH_3CN (水), 0.4mL/min; $m/z = 935.3[\text{M}+\text{H}]^+$, $957.3[\text{M}+\text{Na}]^+$) 以及 HRMS (ESI) m/z 对于 $\text{C}_{49}\text{H}_{71}\text{N}_8\text{O}_9\text{S}$ (M+H) 计算值为 935.5065, 实测值为 935.5044。

[0237]



[0238] 化合物 (4) 是 Boc-Leu- Ψ [(E)-CH = CH] $^{\text{D}}$ Phe-AMT (XJB-5-234)。Boc-Leu- Ψ [(E)-CH = CH] $^{\text{D}}$ Phe-OH (2-84) 粗品 ($30.5 \mu\text{mol}$) 溶于 2.00mL 的 CH_2Cl_2 形成的溶液, 在 0℃ 条件下用 6.1mg ($37 \mu\text{mol}$) 的 2-氨基-5,6-二氢-6-甲基-4-氢-1,3-噻嗪·HCl, 7.0mg ($37 \mu\text{mol}$) 的 EDC, 4.9mg ($37 \mu\text{mol}$) 的 HOBt, and 9.3mg ($76 \mu\text{mol}$) 的 DMAP 处理。该反应混合物在室温下彻夜搅拌, 真空浓缩, 用 SiO_2 制备色谱纯化 (2 : 1, CH_2Cl_2 / EtOAc), 制得 9.1mg (63%) 的无色泡沫状 XJB-5-234。获得以下特征分析数据: LC-MS 法 (R_t 8.42min, 10min 内线性梯度 70% ~ 95% CH_3CN (水), 0.4mL/min; $m/z = 474.5[\text{M}+\text{H}]^+$) 和 HRMS (ESI) m/z 对于 $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ (M+H) 计算值为 474.2790, 实测值为 474.2781。

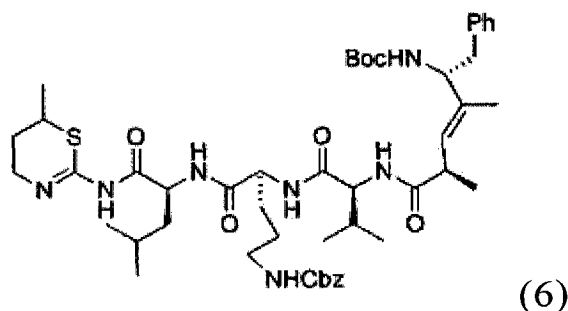
[0239]



[0240] 化合物 (5) 是 Boc-Leu- Ψ [(Z)-CF = CH] $^{\text{D}}$ Phe-Pro-Val-Orn (Cbz)-TEMPO (XJB-7-53)。3.4mg ($4.1 \mu\text{mol}$) 的 Boc-Leu- Ψ [(Z)-CF = CH] $^{\text{D}}$ Phe-Pro-Val-Orn (Cbz)-OMe (XJB-5-66) 溶于 400 μL 的 MeOH 形成的溶液, 在 0℃ 条件下用 41 μL ($41 \mu\text{mol}$) 的 1N NaOH 处理。反应混合物在室温下搅拌 12h, 并用 41 μL ($41 \mu\text{mol}$) 的 1N HCl 处理。该溶液用 CHCl_3 萃取, 将有机层干燥 (Na_2SO_4), 真空浓缩, 制得无色的粗酸。该酸溶于 400 μL 的 CHCl_3 , 在室温下用 0.7mg ($5 \mu\text{mol}$) 的 HOBt, 0.9mg ($5 \mu\text{mol}$) 的 EDC, 0.5mg ($4 \mu\text{mol}$) 的 4-氨基-TEMPO 和 1.1mg ($6 \mu\text{mol}$) 的 DMAP 处理。该反应混合物在室温下搅拌 12h, 用 CHCl_3 稀释, 并用水洗涤。将有机层干燥 (Na_2SO_4), 真空浓缩, 用 SiO_2 色谱纯化 (先 1 : 1, 正己烷 / EtOAc 然后 20 : 1, CHCl_3 / MeOH), 制得 3.6mg (91%) 无色粉末状的 XJB-7-53。获得以下特征分析数据: LC-MS 法

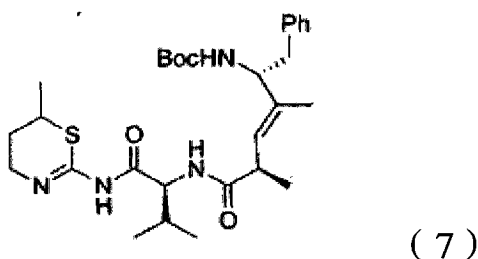
(Rt 8.45min, 10min 内线性梯度 70%~95% CH₃CN(水), 0.4mL/min; m/z = 977.5[M+H]⁺, 999.5[M+Na]⁺) 和 HRMS(ESI)m/z 对于 C₅₃H₇₉FN₇O₉Na(M+Na) 计算值为 999.5821。

[0241]



[0242] 化合物(6)是 Boc-^DPhe-Ψ[(E)-C(CH₃)=CH]-Ala-Val-Orn(Cbz)-Leu-AMT(XJB-7-42), 按照以下方法制备。4.5mg(5.6 μmol) 的 Boc-^DPhe-Ψ[(E)-C(CH₃)=CH]-Ala-Val-Orn(Cbz)-Leu-OMe(2-119) 溶于 0.35mL 的 MeOH 形成的溶液, 在 0℃ 条件下用 56 μL(56 μmol) 的 1N NaOH 处理。该反应混合物在室温下搅拌 12h, 并用 56 μL(56 μmol) 的 1N HCl 处理。该溶液用 CHCl₃ 萃取, 将有机层干燥 (Na₂SO₄), 真空浓缩, 制得无色的粗酸。该酸溶于 0.80mL 的 CHCl₃, 在室温下用 0.9mg(6.7 μmol) 的 HOBt, 1.3mg(6.7 μmol) 的 EDC, 1.4mg(8.4 μmol) 的 2-氨基-5,6-二氢-6-甲基-4-氢-1,3-噻嗪·HCl 和 1.7mg(14 μmol) 的 DMAP 处理。该反应混合物在室温下搅拌 36h, 真空浓缩, 用 SiO₂ 色谱纯化 (20 : 1, CHCl₃/MeOH), 制得 5.0mg(99%) 的无色泡沫状的 XJB-7-42。获得以下特征分析数据: LC-MS 法 (Rt6.61min, 10min 内线性梯度 70%~95% CH₃CN(水), 0.4mL/min; m/z = 907.3[M+H]⁺, 929.4[M+Na]⁺) 以及 HRMS(ESI)m/z 对于 C₄₈H₇₂N₇O₈S(M+H) 计算值为 906.5163, 实测值为 906.5190。

[0243]



[0244] 化合物(7)是 Boc-^DPhe-Ψ[(E)-C(CH₃)=CH]-Ala-Val-AMT(XJB-7-43)。14.3 μmol Boc-^DPhe-Ψ[(E)-C(CH₃)=CH]-Ala-Val-OMe(2-111) 粗品溶于 1.00mL 的 CHCl₃ 形成的溶液, 在 0℃ 条件下用 2.3mg(17 μmol) 的 HOBt, 3.3mg(17 μmol) 的 EDC, 3.6mg(22 μmol) 的 2-氨基-5,6-二氢-6-甲基-4-氢-1,3-噻嗪·HCl 和 4.4mg(36 μmol) 的 DMAP 处理。反应混合物在室温下搅拌 36h, 真空浓缩, 用 SiO₂ 色谱纯化 (20 : 1, CHCl₃/MeOH), 制得 7.5mg(96%) 的无色泡沫状 XJB-7-43。获得以下特征分析数据: LC-MS 法 (Rt5.41min, 10min 内线性梯度 70%~95% CH₃CN(水), 0.4mL/min; m/z = 545.3[M+H]⁺, 567.3[M+Na]⁺) 以及 HRMS(ESI)m/z 对于 C₂₉H₄₄N₄O₄S(M+Na) 计算值为 567.2981, 实测值为 567.2971。

[0245] 首选的自由基清除剂中有一种从包括类泛醌, 类泛醌片段组分, 无亲水性端基的类泛醌片段组分, 超氧化物歧化酶模拟化合物, 一种超氧化物歧化酶生物模拟化合物或 salen-锰化合物材料组成的基团中选择材料。

[0246] 为本领域技术人员所熟知的是, 致电离辐射激活线粒体氮氧自由基合酶

(“mtNOS”), 导致呼吸链抑制, 产生过量超氧自由基, 过氧亚硝基阴离子 (peroxynitrite, ONOO⁻) 产物以及亚硝基化损伤。致电离辐射造成的伤害被认为是被缓解了 [见 Kanai, A. J 等. Am J Physiol. 383 :F1304-F1312(2002) ;以及 Kanai, A. J 等人, Am J Physiol. 286 : H13-H21 (2004)]。这个实施方案的组合物的特点是抑制 mtNOS, 从而可以阻止过量超氧自由基, 过氧化亚硝酸盐和亚硝基化损伤的发生。

[0247] 采用全身性给药防止二次辐照损伤可能导致不想要的副作用。一种限制或防止这些不良的副作用的办法是使用肽载体法对线粒体靶向给药。

[0248] 在一个实施方案中, 一个强效 NOS 抑制剂, 2- 氨基 -6- 甲基 - 噻嗪 (“AMT”) 的非精氨酸类似物, 被选定为负载物。膀胱上皮细胞辐射会引起超氧化物和一氧化氮 (“NO”) 产物增加, 分别将 AMT 或 4- 氨基 -TEMPO 灌注入小鼠膀胱, 以确定 NO 抑制或清除自由基是否更具辐射防护性。

[0249] 非共轭和共轭 NOS 拮抗剂 (AMT, 100 μ M) 或非共轭和共轭氮氧自由基衍生物 (4- 氨基 -TEMPO, 100 μ M) 在 37°C 条件用于培养 32D c13 造血细胞两小时。

[0250]



[0251] 4-NH₂-TEMPO AMT

[0252] 培养完成后, 细胞破碎, 线粒体分离用于质谱分析, 将从线粒体分离的化合物表示为 Na⁺ 加合物。由此产生的光谱 (未显示) 表明, 借助所连接 GS- 源性定位序列, 4- 氨基 -TEMPO 只会渗透穿过线粒体膜。进一步光谱数据 (未显示) 表明, 大量非共轭 AMT 不进入线粒体膜。因此, 靶向性肽成功的将 NOS 拮抗剂和氮氧自由基导入线粒体。

[0253] 进行进一步的生理研究, 以确定肽定位 AMT 和 4- 氨基 -TEMPO 对辐照后的膀胱上皮细胞内的 NO 和过氧亚硝基盐的生成的影响。辐照后这些细胞被置于一个 8 孔玻板式培养槽内培养 3 天, 然后用微传感器测量 24h。

[0254] 辐照后未经处理的细胞和用非共轭 4- 氨基 -TEMPO (100 μ M) 或非共轭 AMT (10 μ M), 辣椒素处理的细胞, 会引起 NO 的生成以及在相当数量的超氧化亚硝酸盐的生成。细胞用高剂量共轭 4- 氨基 -TEMPO (100 μ M) 处理, 过氧化亚硝酸盐的生成量会降低大约 4 倍。未被辐照的细胞或用共轭 AMT (10 μ M) 处理细胞, 其 NO 致过氧化亚硝酸盐的生成几乎完全被抑制。这说明, 肽轭合物与膜非透性 4- 氨基 -TEMPO 或 AMT 耦合或以共价键连接, 并可促进 4- 氨基 -TEMPO 穿过线粒体膜。此外, 这一数据表明, 肽轭合物对 AMT 的 NOS 抑制活性或 4- 氨基 -TEMPO 的自由基清除活性并无干扰, 并且 AMT 是一中更有效的辐射防护剂 [Kanai, A. J. 等. 利用肽基轭合物的线粒体靶向辐射防护剂, ORGANIC AND BIOMOLECULAR CHEMISTRY (印刷中)]。

[0255] 质谱定量研究, 用于比较几个 AMT 肽轭合物, 特别是 XJB-5-234, XJB-5-33, XJB-5-241, 和 XJB-5-127 的线粒体膜渗透效果。fmole/10 μ M (数微升, 蛋白质含量以 fmole 计算) 线粒体蛋白比率提供了一种集中于标靶部位的轭合物的相对量。表 3 显示, 最有效轭合物 XJB-5-241。

[0256] 表 3

[0257]

化合物	fmole/10 M 线粒体蛋白
XJB-5-234	1.45
XJB-5-133	89.8
XJB-5-241	103.3
XJB-5-127	50.8

[0258] 在三元取代 (E)-烯基部分嵌入 XJB-5-241 比双取代 (E)-烯基 XJB-5-133 或 GS 肽基片段 XJB-5-127 具有更强的构象影响, 见 Wipf, P. 等, 甲基-和 (三氟甲基) 烯烃肽电子等排体: 合成及对其作为 β -转角促进剂和肽类似化合物的潜力的评价。J. ORG. CHEM. 63: 6088-6089 (1998); 以及 Wipf, P. 等, 用于三取代 (E)-烯烃和环丙烷肽电子等排体合成的内缺的亚胺加成反应。ADV. SYNTH. CAT. 347: 1605-1613 (2005)。这些数据表明, 一个确定的二级结构和适当的构象改变对于完成可减少亚硝基化和氧化作用的化合物渗透通过线粒体很重要。

[0259] 一个非水解烯烃等排体的存在起到代替不稳定肽键的作用, 并能明显延长作用机制。较具刚性的 (E)-烯烃 ($\Psi[(E)-C(R)=CH]$) 呈现出有用的, 构象改变的结构模拟化合物, 并用于替代许多酶抑制剂的水解不稳定氨基键。这一方法的主要目标是肽键精确的几何模拟; 但是, (E)-烯烃也可以调节的理化特性, 溶解性, 和亲油性, 氢供体和受体的数量, 等, 具有母结构, 因此, 与单肽相比普遍具有不同的代谢命运。

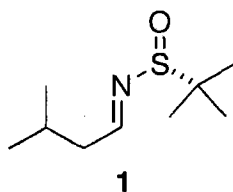
[0260] 本发明所采用靶向传输法极为有利, 因为有些二乙基溴乙酰胺 NOS (nNOS) 拮抗剂和大多数抗氧化剂, 包括氮氧自由基衍生物, 细胞渗透性差, 如果不使用轭合物, 所需要有效治疗浓度大于 100 μ M。

[0261] 根据本发明的这个实施方案所述方法, 其特征在于传递一种组合物到线粒体, 包括将所需的负载物传递到所述的线粒体, 例如, 该负载物可以是 (a) 一种自由基清除剂 (利用一种可能具有对线粒体膜有高亲和力的 β -转角基元的膜活性肽基片段) 或 (b) 键合了膜活性肽基片段的一氧化氮合酶拮抗剂

[0262] 实施例 8 JP4-039 的合成 (见图 11)

[0263] 根据如下步骤合成 JP4-039。

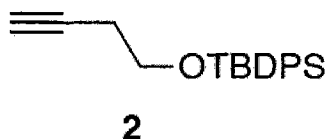
[0264]



[0265] (R,E)-2-甲基-N-(3-甲基亚丁胺)丙烷-2-磺酰亚胺 (1) (Staas, D. D.; Savage, K. L.; Homnick, C. F.; Tsou, N.; Ball, R. G. J. Org. Chem., 2002, 67, 8276)-向由异戊醛 (3-甲基丁醛, 5.41mL, 48.5mmol) 溶于 CH_2Cl_2 (250mL) 形成的溶液中加入 (R)-2-甲基丙烷-2-磺酰亚胺 (5.00g, 40.4mmol), $MgSO_4$ (5.0eq, 24.3g, 202mmol) and PPTS (10mol %,

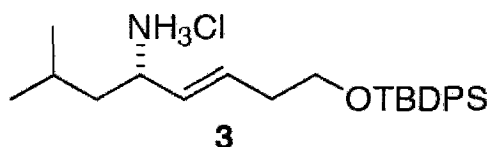
1.05g, 4.04mmol) 并将所生成的悬浮液在室温 (室温约为 25℃) 下搅拌 24h。将反应产物用硅藻土滤片过滤, 所得粗残余物用 SiO₂ 色谱纯化 (3 : 7, EtOAc : 正己烷), 制得 6.75g (88%) 无色的油状物。¹H NMR δ 8.07 (t, 1H, J = 5.2Hz), 2.47-2.38 (m, 2H), 2.18-1.90 (m, 1H), 1.21 (s, 9H), 1.00 (d, 6H, J = 6.7Hz)。可选择性的, 在接下来的反应中, 用 SiO₂ 滤片过滤获得粗亚胺会获得同样好的效果。

[0266]



[0267] (丁基-3-炔氧基)(t-丁基)二苯基硅烷 (2) (Nicolaou, K. C. 等. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 4460) - 向由 3-炔-1-醇 (5.00g, 71.3mmol) 溶于 CH₂Cl₂ (400mL) 形成的溶液中加入咪唑和 (5.40g, 78.5mmol) 和 TBDPSCl (t-丁基) 氯代二苯基硅烷 (22.0g, 78.5mmol), 将该反应物在室温下搅拌 22h。将反应物用 SiO₂ 滤片过滤, 将 SiO₂ 用 CH₂Cl₂ 洗涤, 然后将得到的无色溶液浓缩得到 21.4g (97%) 粗炔烃, 不需要进一步纯化即可使用。

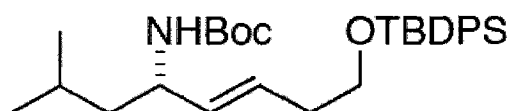
[0268]



[0269] (S, E)-8-(t-叔丁基二苯基硅氧基)-2-甲基辛基-5-烯-4-胺盐酸盐 (3) - 向由 (2) (15.9g, 51.5mmol) 溶于 CH₂Cl₂ (300mL) 形成的溶液中加入盐酸锆 (15.1g, 58.4mmol, 分成 3 部分加入), 并将所生成的悬浮液在室温下搅拌 10min。将所制得的黄色溶液冷却到 0℃, 加入 Me₃Al (溶于正己烷形成 2.0M 的溶液, 27.5mL, 54.9mmol), 搅拌 5min, 然后加入由亚胺 (1) (6.50g, 34.3mmol) 溶于 CH₂Cl₂ (50mL) 形成的一种溶液, 将所制得的橙色溶液再搅拌 4h, 搅拌过程中使溶液回温到室温。用 MeOH 终止反应, 并用 H₂O 和 CH₂Cl₂ 稀释。向溶液中加入 HCl (1M) 破乳 (也可以使用 Rochelle's 盐延长搅拌的方法)。将有机层分离, 水层用 CH₂Cl₂ (2x) 洗涤。将分离出的有机层合并, 用盐水洗涤, 用 MgSO₄ 干燥, 用硅藻土滤片过滤并浓缩。因为油状物粗品被金属盐污染, 将油状物溶于 Et₂O (乙醚, Et = 乙基), 静置 2h, 然后经硅藻土滤片过滤并浓缩。将粗残余物用 ¹H NMR 分析显示只有一种非对应异构体 (> 95 : 5dr)。

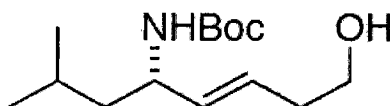
[0270] 向由粗残余物溶于 Et₂O (800mL) 形成的溶液中加入 HCl (溶于二氧杂环乙烷形成 4.0M 溶液, 17.2mL, 68.7mmol), 将反应物搅拌 30min, 在搅拌过程中有白色沉淀物生成。将沉淀物过滤, 用干 Et₂O 洗涤, 干燥后得到 11.0g (74% 经过 2 步) 无色固体 (3)。mp (熔点) : 151 ~ 154℃ ; [α]_D -2.9 (c 1.0, CH₂Cl₂) ; ¹H NMR δ 8.42 (bs, 3H), 7.70-7.55 (m, 4H), 7.48-7.30 (m, 6H), 5.90 (dt, 1H, J = 14.9, 7.5Hz), 5.52 (dd, 1H, J = 15.4, 8.4Hz), 3.69 (appt, 3H, J = 6.5Hz), 2.45-2.20 (m, 2H), 1.80-1.50 (m, 3H), 1.03 (s, 9H), 0.95-0.84 (m, 6H) ; ¹³C NMR δ 135.5, 134.5, 133.7, 129.5, 127.6, 127.3, 63.0, 52.9, 42.1, 35.6, 26.7, 24.4, 22.9, 21.5, 19.1 ; EIMS m/z 395 ([M-HCl]⁺, 40), 338 (86), 198 (100) ; HRMS (EI) m/z 对于 C₂₅H₃₇NOSi (M-HCl) 的计算值为 395.2644, 实测值为 395.2640。

[0271]

**4**

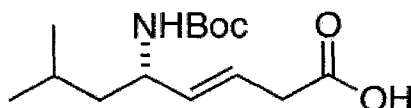
[0272] (S,E)-*t*-丁基 8-(*t*-叔丁基二苯基硅氧基)-2-甲基辛基-5-烯-4-基氨基甲酸酯 (4) 一向由 (3) (10.5g, 24.3mmol) 溶于 CH_2Cl_2 (400mL) 形成的溶液中加入 Et_3N (三乙胺) (3.0eq, 10.3mL, 72.9mmol) 和 Boc_2O (1.05eq, 5.74g, 25.5mmol), 并将所生成的悬浮液在室温下搅拌 14h。用饱和 NH_4Cl 溶液终止反应, 将有机层分离, 干燥 (用 MgSO_4), 过滤和浓缩。所得粗残余物无需进一步纯化用于下一步反应。

[0273]

**5**

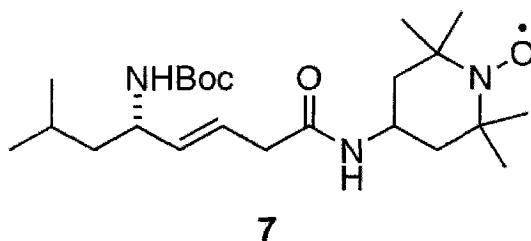
[0274] (S,E)-*t*-丁基 8-羟基-2-甲基辛基-5-烯-4-基氨基甲酸酯 (5) 一向在 0°C 条件下由粗残余物 (4) (12.0g, 24.3mmol) 溶于 THF (200mL) 形成的溶液中加入 TBAF (1.0M in THF, 1.25eq, 30.4mL, 30.4mmol), 并将反应物回温到室温搅拌 2h。用饱和 NH_4Cl 溶液终止反应, 所得有机层用盐水洗涤、干燥 (用 MgSO_4)、过滤并浓缩。所得粗残余物用 SiO_2 色谱纯化 (3 : 7, EtOAc : 正己烷), 得到 5.51g (88%, 2步) 无色油状物。 $[\alpha]_D^{25} -12.7$ (c1.0, CH_2Cl_2); ^1H NMR δ 5.56 (dt, 1H, $J = 15.3, 6.9\text{Hz}$), 5.41 (dd, 1H, $J = 15.4, 6.4\text{Hz}$), 4.41 (bs, 1H), 4.06 (bm, 1H), 3.65 (appbq, 2H, $J = 5.7\text{Hz}$), 2.29 (q, 2H, $J = 6.3\text{Hz}$), 1.76 (bs, 1H), 1.68 (m, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.33 (m, 2H), 0.92 (m, 6H); ^{13}C NMR δ 155.4, 134.3, 126.9, 79.2, 61.5, 50.9, 44.5, 35.6, 28.3, 24.6, 22.5; EIMS m/z 257 ($[\text{M}]^+$, 10), 227 (55), 171 (65); HRMS (EI) m/z 对 $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{NO}_3$ 计算值为 257.1991, 实测值为 257.1994.

[0275]

**6**

[0276] (S,E)-5-(*t*-丁氧羰基氨基)-7-甲基辛基-3-十八碳烯酸 (6) 一向在 0°C 条件下由 (5) (1.00g, 3.89mmol) 溶于丙酮形成的溶液中加入 (40mL) 新制备的琼斯试剂 (Jones Reagent) (2.5M, 3.89mL, 9.71mmol), 并且将反应物在 0°C 条件下搅拌 1h。将所生成的黑色溶液用 Et_2O (3x50mL) 萃取, 将有机层分别用水 (2x75mL)、盐水 (1x50mL) 洗涤, 干燥 (用 Na_2SO_4), 过滤并浓缩得到 990mg (94%粗品) 黄色油状羧酸 (6), 其无需进一步纯化即可使用。

[0277]



[0278] TEMP0-4-基-(S, E)-5-(*t*-丁氧羰基氨基)-7-甲基辛基-3-烯己酰胺 (7)-在 0℃ 条件下由 (6) (678mg, 2.50mmol, 粗品) 溶于 CH₂Cl₂ (35mL) 形成的溶液中加入 4-氨基 tempo (1.5eq, 662mg, 3.75mmol), EDCI (1.2eq, 575mg, 3.00mmol), DMAP (1.1eq, 339mg, 2.75mmol) 和 HOBt-水合物 (1.1eq, 377mg, 2.75mmol), 并将所得橙色溶液在室温下搅拌 14h。反应产物用 CH₂Cl₂ 稀释, 用饱和 NH₄Cl 溶液洗涤, 并将有机层干燥 (Na₂SO₄), 过滤并浓缩。所得粗残余物用 SiO₂ 色谱纯化 (1 : 1 到 2 : 1, EtOAc/ 正己烷), 得到 857mg (76%, 经过 2 步) 桃红色固体。mp 61℃ (软化点 : 51℃); $[\alpha]_D^{23} + 35.6$ (c 0.5, DCM); ESIMS m/z 365 (40), 391 (50), 447 ([M+Na]⁺, 100), 257 (20); HRMS (ESI) m/z 对于 C₂₃H₄₂N₃O₄Na 的计算值为 447.3073, 实测值为 447.3109。

[0279] 该化合物, 结构式见上文结构式 4, 可以用如图 11B 所示的过程合成。简言之, 合成可以按如下步骤完成: 向含 (1) 的 CH₂Cl₂ 溶液中加入盐酸锆之后再加入 Me₂Zn, 然后加入 N-磷酸二苯基-1-苯基亚甲胺 (亚胺) 溶液。将反应混合物回流、过滤、洗涤并干燥得到 (2)。用 TBAF 处理 (2) 除去 TBDPS 的保护基团, 从而导致 (3) 的生成。将端醇脱水得到烯烃 (4), 将 (4) 进一步进行臭氧分解得到酯 (5)。与上文所述的用于 JP4-039 的合成的类似方法利用 Boc 保护基团也可用于酰化氨基, 以及端羧酸与 4-氨基 TEMP0 反应生成 (6)。

[0280] 实施例 9-一种线粒体靶向氮氧自由基 / 半短杆菌肽 S 衍合物保护小鼠胚胎细胞防止 γ 射线 (见, Jiang, J, 等., Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., Vol. 70, No. 3, pp. 816-825, 2008)

[0281] 氮氧自由基的融合与分布的 EPR 分析。为了比较融合效率, 用 10 μM 氮氧自由基培养小鼠胚胎干细胞 (1×10⁷/mL) 10min。用 2mM K₃Fe(CN)₆ 培养 5min 再与乙腈 (1 : 1v/v) 混合后, 培养基、细胞悬液或线粒体悬液中氮氧自由基的 ESR 谱在如下条件用 EOL-RE1X 电子顺磁共振光谱仪记录: 中心场 3350G; 扫描范围 25G; 场调制 0.79G, 微波功率 20mW; 时间常数 0.1s; 扫描时间 4min。融合效率用 (E_{initial}-E_{medium})/E_{initial}×100% 计算。根据制造商的说明书用线粒体提取试剂盒 (Pierce, Rockford, IL) 分离线粒体。融合到线粒体中的氮氧自由基数量归一化到细胞色素 c 氧化酶 IV 亚型的含量。

[0282] 超氧化物的生成。用氧化依赖性荧光染料 DHE 评估细胞内超氧自由基的生成。DHE 是胞渗透性的, 并且在超氧化物的存在时被氧化成能够嵌入 DNA 的荧光溴乙非啶。简而言之, 在培养结束后用 5 μM DHE 处理细胞 30min。让后用胰蛋白酶消化收集细胞并在 PBS 中重悬。用附带 CellQuest 软件的 FACScan 流式细胞仪测定溴乙非啶荧光性, 用 585/42nm 带通滤波器从 10000 个细胞获得平均荧光强度。

[0283] CL 氧化。用与荧光底物 Amplex Red 在 MP-11 催化反应中所生成产品的荧光 HPLC 确定发光氢过氧化物。在含 1mM CaCl₂、0.5mM EDTA 和 0.5mM SDS (pH 8.0 在室温下 30min) 的磷酸缓冲溶液用胰磷脂酶 A₂ (2U/ml) 将氧化磷脂水解。之后加入 Amplex Red 和 MP-11, 将试样在 4℃ 培养 40min。用配有荧光检测器 (RF-10Ax1, Ex/Em = 560/590nm) 和自动进样

器 (SIL-10AD vp) 的岛津 LC-100AT 高效液相色谱系统 (Shimadzu LC-100AT vp HPLC) 分析由高效液相色谱 (HPLC) (Eclipse XDB-C18 柱, $5\ \mu\text{m}$, $150\times 4.6\text{mm}$) 分离得到的产品, 流动相为 NaH_2PO_4 (25mM, pH 7.0) / 甲醇 (60 : 40v/v)。

[0284] 磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻。磷脂酰丝氨酸外翻用流式细胞计分析, 使用膜联蛋白 -V 套件。简言之, 获得的细胞在去流式细胞计分析之前在黑暗中用膜联蛋白 -V 型 FITC 和 PI 染色 5min。用附带 CellQuest 软件的 FACScan 流式细胞计收集一万个事件。

[0285] 小鼠胚胎干细胞的 γ 射线照射剂量存活曲线。用 2ml 培养基将细胞接种与 35mm 的 Petri 培养皿中, 每只培养皿的细胞密度在 100 ~ 1000 之间。细胞在 γ 射线照射之前 (10min) 或照射之后 (1h) 用 GS 氮氧自由基 (XJB-5-125) 处理。照射 4h 后将 XJB-5-125 从培养基中除去。经过 9 天的培养期后, 在 80% 的甲醇中用 0.25% 的结晶紫和 10% 的福尔马林 (35% v/v) 对集落进行固定并染色 30min。经计数有 ≥ 50 个细胞是存活细胞。存活分数是以该样本的平板效率相对于对照样本进行计算的。

[0286] 图 12 表明, 融合到细胞和线粒体中氮氧共轭 XJB-5-125 比其未共轭的亲代非共轭 4-氨基-TEMPO 在小鼠胚胎肝细胞中的融合更有效。(A) 表明他们在小鼠细胞和胚胎细胞线粒体中的融合效率。(B) 显示了从线粒体中回收的氮氧自由基有代表性的 EPR 谱。

[0287] 图 13 显示了氮氧共轭 XJB-5-125 保护小鼠胚胎细胞抑制 γ 辐照诱导产生超氧化物和磷脂过氧化作用。(A) 超氧化物的生成。将细胞暴露在 10Gy 的 γ 射线辐照下。在辐照前 10min 或辐照后 1h 加入 XJB-5-125 ($20\ \mu\text{M}$), 经过 5h 培养后除去。在指定的时间点将细胞与 $5\ \mu\text{M}$ DHE 培养 30min。用附带 CellQuest 软件的 FACScan 流式细胞计分析溴乙非锭荧光。使用 585nm 带通滤波器从 10000 各细胞获得平均荧光强度。(B) 心磷脂的氧化。心磷脂氢过氧化物采用荧光高效液相色谱为基础的 AmplexRed 法测定。所列数据是平均值 $\pm$ 标准偏差 ($n = 3$)。* $p < 0.01$ 对应未被辐射的细胞; * $p < 0.01$ (0.05) 对应在同样条件下未经过 XJB-5-125 处理的辐照后细胞。Insert 是一典型的来自细胞的磷脂的 2D-HPTLC 剖面。

[0288] 图 14 显示, 氮氧自由基共轭 XJB-5-125 保护细胞抑制 γ 辐照诱导的细胞凋亡。(A) 阻止 γ 辐照诱导的小鼠胚胎肝细胞胞质中细胞色素 c 的积累。(B) 细胞色素 c 与肌动蛋白的密度比。使用 Labworks 图像采集和分析软件 (UVP, Upland, CA), 由密度得到半定量的带宽。细胞色素 c 释放的水平以表示为细胞色素 C 与肌动蛋白的平均密度比。(C) 剂量 (5, 10 和 $20\ \mu\text{M}$) 取决于 XJB-5-125 (预处理) 对 γ 射线辐照 (10Gy) 诱导的磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻的辐射防护作用。经过 48h 辐照后培养, 在去流式细胞计分析之前收集细胞并用膜联蛋白 -V-FITC 和碘化丙啶试剂染色。(D) 时间 (2, 3, 4, 5, and 6h) 取决于 XJB-5-125 ($20\ \mu\text{M}$) 对 γ 射线 (10Gy) 辐照诱导的小鼠胚胎肝细胞中磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻 (后辐照 48h) 的辐射防护作用。(E) XJB-5-125 对 γ 射线 (10Gy) 引起的人支气管上皮细胞系 BEAS-2B 细胞中的磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻的影响。细胞用 XJB-5-125 (5 或 $10\ \mu\text{M}$) 在辐照前 (10min) 或辐照后 (1h) 进行处理。在后照 72h 后分析磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻。所列数据是平均值 $\pm$ 标准偏差 ($n = 3$) *(&) $p < 0.01$ (0.05) 对应没有经 XJB-5-125 处理的辐照后细胞, # $p < 0.05$ 对应经过用 XJB-5-125 预处理的细胞。

[0289] 图 15 显示了氮氧自由基共轭 XJB-5-125 对 γ 辐照剂量与小鼠胚胎肝细胞存活曲线的影响。细胞在辐照 10min 前或辐照 1h 后用 XJB-5-125 ($20\ \mu\text{M}$) 处理, 经 4h 培养后

除去。存活分数以相对于对照样本的平板效率计算。该数据通过 SigmaPlot 9.0 (Systat Software) 用多靶单点模型拟合, 所列数据是平均值 + 标准偏差 ($n = 3$)。

[0290] 图 16 说明了 GS 共轭氮氧自由基, XJB-5-125, 对 γ 射线剂量 / 32D c1 3 小鼠造血细胞的存活曲线的影响。与 32D c1 3 细胞 (0.797Gy) 相比, 在 XJB-5-125 或 Tempol 中培养的细胞, 其 D_0 (剂量) (分别为 1.138 或 1.209Gy,) 增加了。在 XJB-5-125 中培养的细胞其存活曲线的肩区比 tempol 中培养的细胞的肩区值 5.82 增大了 18.24n。

[0291] 实施例 10 JP4-039 辐射防护性能试验

[0292] 图 17A 和 17B 是显示 GS- 氮氧自由基化合物 JP4-039 提高小鼠暴露在 9.75Gy 下全身照射存活率的曲线图。在图 17A 中, 小鼠按每公斤体重接受 10mg 的如图 5 所示每种化学品腹腔注射。根据公开的方法, 24h 后全身接受辐照 9.75Gy。接下来按照 IACUC 准则, 考察小鼠的存活率。与辐射照后对照样本 ($P = .0008$) 相比, 接受 JP4-039 的小鼠的存活率明显提高。在图 17B 中, 小鼠在 9.75Gy 辐照前 10min (正方形符号) 或者在 9.75Gy 辐照后 4h (三角形符号) 接受 JP4-039 腹腔注射。

[0293] 图 18 是显示出 GS- 氮氧自由基化合物 JP4-039 提高全身暴露在 9.75Gy 辐照下的小鼠存活率的曲线图。由 15 只小鼠构成的样本组按照每千克体重 10mg 剂量的每一种指定的 GS- 氮氧自由基化合物或载体 (聚氧乙烯氢化蓖麻油与乙醇按 1 : 1 比例混合, 然后用蒸馏水稀释至 10 倍) 接受腹腔注射。小鼠在全身辐照前 24h 接受 10mg 每千克剂量的腹腔注射。对比组只接受辐照。统计显示接受 GS- 氮氧自由基化合物 ($P = .0005$) 的小鼠, 其存活率有明显的提高。

[0294] 图 19 显示, 造血细胞经过辐照 24h 后供给 GS- 氮氧自由基 JP4-039, 表明 P4-039 是有效的辐射缓解剂。辐照存活曲线由 32D c1 3 小鼠造血祖细胞系的细胞获得, 细胞辐照前在 $10 \mu M$ JP4-039 中培养 1h 或辐照后接种在含有 $10 \mu M$ JP4-030 的甲基纤维素中。细胞接受 0 ~ 8Gy 的辐射, 接种在含有培养基的 0.8% 的甲基纤维素中, 在 $37^\circ C$ 培养 7 天。对大于 50 个细胞的集落计数, 采用二次线性方程和多靶单点模型进行数据分析与只有 32Dc1 3 细胞本身时 $n = 1.29 \pm 0.13$ (p 分别为 0.0109 或 0.0022) 相比, 培养在 JP4-039 中的细胞具有更好的抗辐射性, 显示其存活曲线具有增大的肩峰, 分别为 $n = 5.25 \pm 0.84$ (如果在辐照前加入药物) 或者 $n = 4.55 \pm 0.47$ (如果在辐照后加入药物)。

[0295] 图 20 显示, JP4-039 是一种有效的 KM101 人骨髓基质细胞辐射损伤缓解剂。在辐照前 1h 或辐照后 24h 将 KM101 细胞置于单纯的培养基中或者 JP4-039 ($10 \mu M$) 中培养。这些细胞接受辐照的剂量范围在 0 ~ 6Gy, 并接种于 4 孔平板。7 天后这些细胞用结晶紫染色并对集落大于 50 个细胞进行计数。辐照前或辐照后培养在 JP4-039 中的细胞显示更具有抗辐射性, 与 KM101 细胞在 $n = 1.1 \pm 0.1$ 处 ($p = 0.0309$ 或 0.0386, 分别地) 相比, 分别在 $n = 2.3 \pm 0.2$ 或 $n = 2.2 \pm 0.2$ 处出现增大的肩峰。对于不同的剂量条件没有明显的变化。

[0296] 实施例 11 NOD/SCID 小鼠模型优化 JP4-039 的临床试验

[0297] 我们有大量关于用 NOD/SCID 鼠试验 JP4-039 用于人骨髓基质干细胞和造血干细胞从导致造血综合征的全身辐射恢复效果的初步数据。图 21A 显示了脐血移植 I.V27 天后收集的 NOD/SCID 鼠骨髓中的人类细胞监测结果, 显示出继辐照、近端胫骨钻孔 (见下文) 和人脐血注射后的 NOD/SCID 鼠骨髓中的人类 CD45+ 造血干细胞 (浅灰色) 的流式细胞仪

分析和鉴定。

[0298] 6 只 NOD/SCID 鼠在接受 350cGy 辐射后,注入 1×10^7 人脐血 (CB) 单核细胞 (MNC)。经 CB MNC 初次注射 5 个月后,6 只小鼠的右腿接受 10Gy 辐射。辐照 24h 后在胫骨钻孔 (见图 21B),钻头尺寸为直径 1mm (Dremel Corp.)。钻孔 24h 后对 6 只小鼠中的 3 只注入 1×10^7 CB MNC。对照小鼠 (3 只) 不接受 CB 注射。CB 注入 27 天后,收集骨头进行组织化学分析,并用用 PE 标记的抗 -CD45 抗体 (BD Biosciences) 对 BM 中的人类 CD45+ 细胞 (浅灰色) 进行流式细胞仪分析。分析在一台 BD LSR II flow 流式细胞仪 (BD Biosciences) 上进行。当与对照鼠 (小鼠 4) 进行比较时,所有接受人类 CB MNC 的小鼠 (编号 1-3) 中都可以检测到人类 CD45+ 细胞。

[0299] 在没有经过高剂量辐射的腿部和经过介于百分之 0.028 ~ 0.892 高辐照的腿部内,人类 CD45+ 细胞的百分数介于百分之 0.045 ~ 3.288 范围内。对这些小鼠,大剂量辐照和非大剂量辐照的腿部之间没有差别。虽然数据表明有一种趋势 (在高剂量辐照的腿部人 CD45+ 细胞百分数较低),但是将全身非大剂量辐照与 1000cGy 的大剂量腿部辐照相比没有明显的差异。第 7 天的骨照片见图 21B。

[0300] 图 21B 是通过用 2mm 直径的单一皮质骨钻头手术 7 天后胫骨创面横截面的显微照片,伤口在近端骨骺板下胫骨 2 毫米侧面。在伤口自发修复的中间阶段,鲁棒松质骨填充髓内腔以及皮质窗口。正如在本应用中所推荐的,这个时间点对于评估由辐射导致的骨髓基质细胞成骨抑制和用 JP4-039 恢复是最佳的。箭头指示伤口边缘。(甲苯胺蓝染色, x35) (58)

[0301] 实施例 12 GS- 氮氧自由基化合物的局部和经皮吸收。

[0302] 计划用实用的皮肤贴片输送 JP4-039 或其他在此需输送的化合物。这块皮肤贴片可以提供给一个在辐照之前、之间或之后的主体,包括 24h 或以上被辐照的主体。在初步研究中,我们试图表征在小鼠皮肤局部使用的典型 GS- 氮氧自由基 XJB-5-125 的吸收和渗透。基于其抑制 ROS 的产生、抑制细胞凋亡和抑制线粒体脂质氧化损伤过度表达的能力,选择 XJB-5-125 为一种潜在的局部用药。XJB-5-125 包含了其中的 (Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn) 片段并已被证明可减弱 ActD 诱导的剂量依赖性 (2.5-20 μ M) 的 PS 外翻。它也可以抑制细胞色素 c 从线粒体释放,抑制心磷脂过氧化反应。一种化学品的物理性质对其渗入并通过皮肤的能力是至关重要的。两个重要的因素是分配系数 $\log(\text{辛醛} / \text{水})$ (K_o/w) 和分子量。对 XJB-5-125, $\log K_o/w = 4.5$, 分子量是 956, 这种亲脂性“规则”是基于一种化合物从亲脂性角质层分出和进入更多亲水性表皮和真皮的需求。XJB-5-125 的 $\log K_o/w$ 和分子量 MW 与酮康唑 ($\log K_o/w = 4.34$, MW = 532)、克霉唑 ($\log K_o/w = 6.27$, MW = 902) 以及吡哆美辛 ($\log K_o/w = 4.23$, MW = 358) 类似。暗示了用类似于那些用于高效输送这些药剂的配方的输送可行性。就像 JP4-039, XJB-5-125 是一个辐射缓解药剂以及防护药剂 (见图 15)。

[0303] 将皮肤小贴片 (2cm^2) 被放置于一 Bronaugh 式流通扩散细胞系统 (PermeGear, Riegelsville, PA) (图 22)。然后将其放置在两片惰性聚合物 Kel-F 之间并夹住以防泄漏。使表皮侧面朝上并暴露于供体溶液 (试验溶液), 真皮一侧与受体流体接触。暴露表面积是 0.79cm^2 (直径 1cm 的圆形腔室)。该皮肤在流通室内形成一个水密封, 因此, 只有 XJB-5-125 穿透该皮肤时, 在真皮一侧接受流体 (PBS+25% 乙醇) 将含有 XJB-5-125。受体

腔用这种缓冲剂灌注,然后用特富龙管导入馏分收集器。使用 PBS+25%乙醇是因为它对疏水化合物是高效的沉降剂,并能比其他手提溶液产生更好的体内外相关性。通过放置在金属块中的腔室内用循环水浴加热,将皮肤保持在 32℃。在导入试验化合物之前将皮肤恒温 60min。将 75 μ L XJB-5-125 放置在皮肤上,并允许留在实验过程中。将排出物收集 24h。(图 23-25)。

[0304] 为了评估 XJB-5-125 在小鼠皮肤的渗透,用动物剪(#40 刀片)将 C57/BL6 小鼠剃光。接着用 Nair(脱毛剂)简单处理,出去剩余的毛。脱毛后立即清洗皮肤以防进一步刺激。在研究之前皮肤允许恢复 24h。这将减少毛的干扰,并在皮肤渗透性研究之前让时间治愈小擦伤。

[0305] 在研究完成后,从扩散室中取出皮肤。使用布鲁克曼胶带(3M 公司,明尼阿波利斯,明尼苏达州)通过顺序胶带剥离(15 次)除去角质层,角质层含有大多数局部使用的化合物,但从治疗角度看是不相关的。将其余的皮肤(可自行生长发育的表皮和真皮)和透皮污水用 ESR 进行针对 XJB-5-125 的检测。

[0306] 250℃下,将小鼠皮肤在 400 μ L、50mM、pH 7.4 的 PBS 中均质化。在从 Alpha Wire Corp. (Elizabeth, NJ, USA) 获得的透气性 Teflon 管(内径 0.8mm,壁厚 0.013mm)中用日本电子 JES-RE1X 谱仪进行电子顺磁共振(EPR)检测,Teflon 管用(约 8cm 长)70 μ L 含有 28.5%乙腈和 2mM $K_3Fe(CN)_6$ 的样品填充,对折后放入开口的 EPR 石英管(内径 3.0mm)。(图 24)

[0307] 在中心场 334.7mT;功率 20mW;场调制 0.079mT;扫描宽度 5mT;接收器增益 400and 4000;时间常数,0.1s 条件下记录 EPR 谱。用 EPRware 软件(Scientific Software Services, Bloomington, IL, USA) 收集谱图。

[0308] 这些初步的实验表明,XJB-5-125 能充分渗透穿过完整的皮肤。此外,24h 后的总透皮吸收和出现在可自行生长的皮肤中 XJB-5-125 水平可使用本发明所述的技术成功地测量。使用 3 个不同的供体溶液考察了配方对局部输药的影响(图 25)。供体 A = 1mM XJB-5-125 在 DMSO 中,供体 B = 1mM XJB-5-125 在 95%丙二醇+5%亚油酸中,供体 C = 1mM XJB-5-125 在 50%EtOH+40%HSO+5%丙二醇+5%Brij30 中。一共 75nmole 放置在每一块皮肤的上面以开始试验(75ul of 100mM)。XJB-5-125 输送进入皮肤 24h 后,有 0.07% -0.46% 留在皮肤中。其较高的输送效率在其他局部输送产品的范围内。

[0309] 鉴于观察到,在 2.5 ~ 20 μ M 浓度范围并假设组织密度为 1g/cm³时,XJB-5-125 在细胞内是具有活性的,基于这些数据的大量分析表明,XJB-5-125 的局部输送方法通过增强全身血液水平来保护骨髓是可行的。

[0310] 此外,通常认为总透皮吸收与供体浓度线性相关,该事实意味着提高供体的浓度将大幅度提高局部输送。这些初步的研究表明 XJB-5-125 的传输达到治疗水平的可行性,并且表明,较小的 JP4-039 分子,以及本发明所述的其他化合物,作用作传输治疗造血综合症的辐射缓解剂的皮肤贴。

[0311] 实施例 13(推荐)

[0312] 下述方法可以用来选择和优化最好的 GS- 氮氧自由基 JP4-039(辐射损伤缓解药剂),JP4-039 能增强骨髓基质细胞及更新人类基质细胞系进入 NOD/S CID 小鼠的受辐射肢体的种植效率。MnSOD- 过度表达细胞是阳性对照样本。

[0313] A. KM101-MnSOD/ds-red(control KM101-ds-red) 克隆细胞系实验。12NOD/SCID 小鼠组接受 300cGy 全身辐射（低剂量腿）及左后腿（高剂量腿）接受 1000cGy 的高剂量辐射,然后在 24h 后对每一个细胞系静脉注射 1×10^5 或 1×10^6 个细胞（组 1 和组 2）。第三组小鼠在辐射 24h 之前接受 MnSOD-PL 静脉注射,然后注射 KM101-MnSOD/ds-red 细胞。第四组在辐射 24h 之前进行 MnSOD-PL 静脉注射,然后注射对照 KM101/ds-red 细胞。该实验可以重复两次。在细胞移植第 1、3、7、14 天后小鼠后腿取出骨髓,对总细胞的百分数和形成细胞集落（细胞是呈阳性的人类源细胞）的可收回数打分。得分可以通过 ds-red 阳性,然后通过在外体利用基质细胞形成的集落进行。我们可以记录总分,然后是人源基质细胞的百分数。

[0314] B. 通过线粒体靶向辐射防护药剂/缓解药剂 JP4-039 (GS-氮氧自由基) 的给药改善人骨髓基质干细胞系 KM101 种植实验。这个试验,对所有的组,基本上可以按照上述 (A) 的方法进行,但对辐照后接受 JP4-039 (24h) 的亚组（细胞系注射后同一天,或一个亚组腹腔接受 JP4-039 (细胞移植后每天或每周)）。细胞可以高剂量到低剂量辐照的在第 7 天、14 天、21 天,从辐照后的股骨取出,并在体外培养以使人干细胞集落形成祖细胞 (CFU-F)。进入高剂量和低剂量辐照四肢的人类细胞可通过 ds-red 的细胞分选定量。对每一个试验可进行 2 次。

[0315] C. 如上述 (A) 的实验,但替换为从一个 45 岁的供体细胞取代新鲜人类骨髓 Stro 1+ 基质细胞。

[0316] D. 如上述 (B) 的实验,替换为 Stro 1+ 人类骨髓基质细。

[0317] 统计考虑 - 在 (A) 中,我们提出在 4 个不同的时间点对 4 个组样本进行对比: 有没有 MnSOD、KM101 细胞注射量,根据 DsRed-KM101 细胞的数目注入是 10^5 或 10^6 KM101 cells。在 (B) 中,我们提出针对 (A) 中相同端点,采用不同的剂量和试验化合物使用方案,在 3 个不同的时间点对 10 组样本对比。除了使用人基质细胞代替 KM101 细胞外, (C) 和 (D) 分别与 (A) 和 (B) 相同。该试验中所有的对比条件分别对高剂量受辐射腿和低剂量受辐射腿独立地进行。方差分析和杜克检验可用于这些分析。样本大小可以由两个样本 t 检验两两比较进行估计。由于缺少初步数据,样本大小的估计是基于预期的群组之间的差异即根据标准差 σ 进行检测。在每个时间点,每组 6 只小鼠可以牺牲。用这样的样本大小,使用具有显著性水平 0.05 的使用双面两样本 t 检验。将有 82% 功效来检测群体之间 1.8σ 的差异。

[0318] 作为次要端点, (人类) 成纤维细胞集落形成单位 CFU-F 的数量也能用与主要端点相同的方法进行群组之间的比较。

[0319] 预计 MnSOD 在 KM101-MnSOD/ds-red 细胞中的超表达将会导致在 NOD/SCID 小鼠受高低两种剂量辐射的肢体中较高的种植效率。我们预计在 KM101 克隆系细胞系输液之前对造血微环境进行 MnSOD-PL 治疗,将进一步提高 KM101-MnSOD/ds-red 和 KM101-ds-red 细胞系的植入。我们预计种植效率的最高百分数将在辐照前接受 MnSOD-PL 和注射 KM101-MnSOD/ds-red 细胞的小鼠中被检测到。

[0320] 我们预计,细胞移植后 JP4-039 每天给药将有助于通过降低因骨髓微环境的辐照而导致的自由基的产生,提高所有基质细胞系的植入稳定性。

[0321] 也许使用一个对于 JP4-039 惰性的对照化合物, (JP4-039 没有氮氧活性组分)。

基于这些实验结果,可以导出骨髓基质干细胞种植的最佳条件,而这些条件可能会在下述实验中使用。

[0322] 实施例 14(推荐)

[0323] 挑选和优化 GS- 氮氧自由基 JP4-039 治疗,以提高人类 CD34+ 脐带血多向造血干细胞祖细胞移植进入已经植入了人类骨髓基质干细胞且遭受辐照后的 NOD/SCID 小鼠的四肢。

[0324] 1. TBI 处理 C57BL/6J 小鼠实验和小鼠骨髓筛查。(初步系统试验)

[0325] 2. 实验中采用最佳移植法将人类 KM101 细胞植入遭受辐照后的 NOD/SCID 小鼠(预先将 MnSOD-PL(锰超氧化物歧化酶质粒, manganese superoxide dismutase plasmid liposome)输入接受辐照前的这些小鼠,然后注射 KM101-MnSOD/ds-red,每日补充 JP4-039)。小鼠静脉注射 1×10^5 或 1×10^6 的来自人类脐带血库的 CD34+LIN- 细胞。对照细胞可以每次注射 10^5 或 10^6 CD34+LIN+(分化型祖)细胞。每组 12 只小鼠。

[0326] 这些实验可以按照两个方案进行。

[0327] a. 脐血细胞与 KM101-MnSOD/ds-red 细胞同样的时间注入。

[0328] b. 脐血细胞在从示例 13 的移植试验中回收 KM101-MnSOD/ds-red 细胞的最佳时间注入。这应该是在基质细胞注入后的第 7 天或第 14 天。

[0329] 在这些实验中,小鼠可以在继脐血干细胞移植之后的两个月的一连串时间点内进行观察和试验。人类外周血造血干细胞的百分率可以以每周的外周血液样本记录,而形成 CFU-GEMM 集落细胞的数量可以在死去的小鼠的移植骨骼中测出。

[0330] 在脐血移植后的第 7 天、14、21、28 或 60 天,子组的小鼠可能被牺牲,并且可以从高剂量和低剂量辐照后的股骨采取所有细胞,并对人类多向造血祖细胞 s-CFU-GEMM 进行检测。检测可以用两种方法进行:

[0331] a. 采用人类单克隆抗体规则为人类 CD34+ 细胞打分。

[0332] b. 集落在人类 CFU-GEMM 培养基上形成,然后按照完整小鼠子集对人类集落进行二次打分,人类细胞集落形成于 7 天 14 天进行体外检测。

[0333] 体外实验可平行进行如下:

[0334] KM101-MnSOD-PL 的平台期基质细胞可在体外辐照到 100, 200, 500, 1000cGy, 然后 CD34+LIN- 人类脐血细胞中与基质细胞在体外进行共培养。对照组可以包括未辐照的 KM101-MnSOD/ds-red, 辐照的 KM101-ds-red 细胞, 未辐照的 KM101-ds-red。

[0335] 我们可以每周记录这些培养过程中的人类鹅卵石群岛(干细胞集落), 标出累计鹅卵石岛的形成, 以每周获取的细胞表示的累积产生的非贴壁细胞, 检测每周获得的细胞以评价 CFU-GEMM 形成。这些研究可能会进行了两-三周。在体外共培养研究只能部分重复体内造血微环境, 因此两个星期应该是检测贴壁 KM101 细胞层内的 MnSOD-PL 表达是否会增加脐血干细胞移植的最有效的的时间。

[0336] 3. 以如上述 (1) 所述的 JP4-039 脐血移植的补充方案进行实验, 以通过去除辐照骨髓基质干细胞环境中的 ROS 产物来提高人类脐带血干细胞的归巢, 稳定平静, 和繁育能力。

[0337] 在体外实验中每天向共培养的培养基补充药物 JP4-039。将辐照后的 KM101 单克隆细胞系与脐血干细胞进行共培养实验, 可以通过每天添加 JP4-039, 或活性类 JP4-039

实施。对照实验可以包括添加推测可能会随着时间推移产生越来越少的 CFU-GEMM 的 CD34+LIN+ 分化型脐带血细胞。基质细胞培养可按照上述方法进行辐照,补充脐带血细胞,及培养记录。

[0338] 12 只小鼠的实验组,可以得到上述针对人类 CFU-GEMM 细胞植入的最佳治疗方法,然后子组可以按以下方式处理:

[0339] a. JP4-039 每周两次

[0340] b. JP4-039 每天一次

[0341] c. 非活性 JP4-039 类似物,每天一次

[0342] 4. 上文所述实验 (1) 用新鲜的人类 Stro 1+ 骨髓细胞取代 KM101 单克隆细胞系。

[0343] 5. 上文所述实验 (2) 用人类 Stro 1+ 骨髓细胞取代 KM101 单克隆细胞系。

[0344] 统计学考虑 - 在 (1) 中,我们用 MnSOD-KM101 和 / 或 $10^5/10^6$ CD34+ 细胞,在 7 组间比较 5 个不同的时间点的 CD45+ 细胞数量。在 (2) 中,针对 (1) 中同一端点,我们可以比较 7 组间 5 个不同时间点,使用 KM101, CD34+ 细胞, KM101 以及 CD34+ 细胞,实验化合物单次或双次给药,或实验化合物无活性类似物单次或双次给药。除了我们可以利用人类 Stro 1+ 骨髓细胞替代 KM101 细胞外,任务 (3) 及 (4) 分别与例 13 的 (A) 和 (B) 相同。这项任务中对于接受高或低剂量辐照的腿可以进行所有的比较。采用 Tukey 实验的方差分析可用于这些分析。类似于例 13 样本大小的考虑,我们每一个时间点每组将使用 6 只小鼠。作为次要端点,对 CFU-GEMM 数也可以作为主要端点以同样的方法在组间进行比较。

[0345] 可能的结果 - 基于实施例 13 的结果,我们预期脐血干细胞和人骨髓基质干细胞在体外归巢可以在基质细胞移植前通过 MnSOD-PL 处置小微环境进行优化,而且 MnSOD-PL 过度表达 KM101 细胞将在辐照微环境中显示出更好的稳定性。我们预计 JP4-039 的治疗将进一步提高造血细胞的存活率,增加 CFU-GEMM 的数量。

[0346] 实施例 15 (推荐)

[0347] 这些实验通过 JP4-039 将利用人类基质细胞进行骨生成用作骨髓损伤的有效缓解手段。JP4-039 可被实验用于通过源自格根包尔氏细胞的人类基质细胞产生的人类胶原蛋白修复在 NOD/SCID 小鼠的胫骨近端的人为骨折,通过抗氧化剂 JP4-039 的治疗能够增强骨折愈合度。

[0348] A. 用 KM101-MnSOD/ds-red 移植的小鼠与 KM101 细胞相比较实验。小鼠可能如上所述在两个胫骨近端钻孔,然后辐照全身剂量 300cGy,一后肢的剂量 1000cGy,然后在 24h 后每个细胞系注射 1×10^5 骨髓基质细胞。小鼠可以观察 21 天,在连续七天时间点胫骨移植并测定骨骼愈合过程中人类胶原蛋白的相对含量。

[0349] B. 在重复上述实验 (A) 中的实验中,每周或每天补充注射 JP4-039 (每组 12 只小鼠)。

[0350] C. 在辐照前 24h 小鼠接受 MnSOD-PL 的静脉注射,然后注射 KM101-MnSOD/ds-red 或 KM101。

[0351] D. 根据上述 (C) 所述方法,在细胞系注入之前将顺序打乱注射 MnSOD-PL。

[0352] E. 根据 (A-D) 所述实验,用新鲜 Stro 1+ 间质细胞取代 KM101 单克隆细胞。

[0353] 统计考虑 - 在 (A) 中,我们针对人类胶原蛋白百分比,在 3 个不同时间点对 17 组进行比较,使用 KM101 细胞, MnSOD, 实验性化合物单次或双次给药, 脓毒症 MnSOD, 或者是其

中的一些组合。(B)与(A)相同,除去用人类 Stro 1+ 骨髓细胞代替 KM101 细胞。这项任务中所有可以进行的比较,分别为高,低剂量辐照的腿。其次采用 Tukey 实验的方差分析可用于这些分析。类似于例 13 样本大小的考虑,我们将利用每一个时间点每组使用 6 只小鼠。

[0354] 可能的结果-我们希望 KM101-MnSOD/ds-red 将展示改善体内成骨能力。我们预计,辐照前 24h 对小鼠 MnSOD-PL 给药将进一步加强归巢和 KM101-MnSOD/ds-red 成骨细胞的分化。

[0355] 初步数据显示利用 MnSOD 过度表达获得的骨髓基质细胞系辐照存活曲线和存活率的提高。其他初步数据预计将显示每个 Stro 1+ 感染 MnSOD-PL 和 KM101-MnSOD/ds-red 以及 KM101-DS-RED 的细胞是有能力在体外和 NOD/SCID 小鼠体内的钻孔内分化成格根鲍尔氏细胞(成骨基质试验进展)。用 JP4-039 但是不用上文所述的 JP4-039 非活性类似物治疗的 KM101-MnSOD/ds-red 和 KM101-DS-RED 的辐射存活曲线。我们预计有三个状况:1) MnSOD-PL 给药的微环境,2) 取自人类的骨髓基质细胞系内的 MnSOD 的过度表达,以及 3) 补充 JP4-039 抗氧化剂疗法会导致最大的人类起源胶原蛋白生成细胞的成骨分化。作进一步的对照实验,我们可以判断是否人类起源的造血干细胞骨是髓基质干细胞的最佳功能所需要的。KM101-MnSOD/ds-red 基质细胞移植给 NOD/SCID 小鼠可以通过注射人类脐血 CD34+LIN-,或 CD34+LIN+ 给药,或 24h 后,观察这些细胞是否产生最佳集落形成。其他对照组可以只是 CD34+LIN-,CD34+LIN+ 造血细胞。另外的对照组可能包括来单独自脐带血或全部脐带血对照组的 TRO1+ 脐血基质细胞祖细胞对照。

[0356] 实施例 16

[0357] 为了评估 XJB-5-131 抑制病变和/或老化的迹象的功效,该化合物是在 18-21 周期间给药于早衰样 ERCC1^{/Δ}小鼠,剂量为 2mg/kg 葵花籽油载体(促进溶解度)腹腔给药,每周三次(图 32)。以葵花籽油按同样的时间表给药的双生 ERCC1^{/Δ}小鼠作为对照。监测治疗组和对照组小鼠的体重及症状,每周两次。

[0358] 图 33 提供了一个汇总表显示出从治疗直至死亡的 5 周的生命过程中,与对照组(葵花籽油)比较,用 XJB-5-131 的治疗效果(在本图中表示为“XJB”)。这些数字表明了与用 XJB-5-131 或只用介质(n=5 只小鼠/每组)治疗的小鼠的与年龄有关的症状发作的平均年龄。细胞以黄色突出显示表明,通过 XJB-5-131 治疗其症状发生有明显推迟。除大多数迹象改善的测量外,XJB-5-131 治疗的小鼠的整体老化评分也明显改善。值得注意的是,对神经退行性疾病的所有迹象,包括肌张力障碍,颤抖,共济失调,消瘦和尿失禁对于治疗后的动物而言都被推迟,所提供的强有力的证据表明,XJB-5-131 可以抑制氧化应激致神经元的退行性改变。

[0359] 为了评估 XJB-5-131 抑制椎间盘退化(一种颈椎退行性病变的指数)的能力,对治疗和对照小鼠椎间盘内的黏多糖水平进行测量,其结果如图 34 所示。与对照组相比,治疗后的小鼠椎间盘中含有大约百分之三十多的黏多糖,表明其对椎间盘退变的抑制作用。

[0360] 为了测量 XJB-5-131 对光老化,Ercc 1^{/cond}的影响;K14-Cre 小鼠,只有其皮肤缺少 ERCC1,被剃光毛并脱毛处置,然后用 UV-B 辐照导致灼伤(500J/m²,中等红斑值)。随后,小鼠用 XJB-5-131(80g)乳液治疗每天一次,治疗五天。结果如图 35 所示,表明相对于对照组(仅用乳液治疗),治疗组小鼠的皮肤显得更加光滑,健康。

[0361] 在宏观层面,XJB-5-131 给药似乎动物耐受性良好,结果表明他们并没有因为治疗

而体重减轻。经过治疗, 未经治疗以及对照组动物体重随时间变化图示如图 36A-B 所示。为了评估 XJB-5-131 在细胞水平的影响, 采用取自 Ercc 1^{-/-} 小鼠胚胎的小鼠胚胎成纤维细胞 (“MEF”) 进行了大量实验。如图 37 所示, 这种 MEF 培养物在环境氧气 (氧化应激) 条件下制备和生长, 然后或者未经治疗的 (只用介质), 或用浓度为 500nM XJB-5-131 (溶于介质) 治疗, 然后用 SA- β 半乳糖苷酶染色法 (一种细胞衰老的标志) 实验。经过治疗的细胞的染色量明显较少。此外, 还发现 XJB-5-131 的治疗可以减少 DNA 中 H2AX 焦点的数量 (图 38) (细胞衰老以及 DNA 双链断裂的第二标记), 虽然它并不能减少细胞凋亡数量 (图 39)。

[0362] 实施例 17-JP4-039 的防护作用

[0363] 为了评估 JP4-039 的治疗潜力, 为了安全和保护活性进行了试验。图 35 和 36 显示测试结果可用来评估是否 JP4-039 的不同浓度会对分别取自 Ercc 1^{-/-} 或野生型小鼠胚胎 MEF 细胞培养 48h 后产生毒性作用。即使在最高浓度测试 (10 μ M), 在这两种培养系统没有观察到毒性的迹象, 相对于未经治疗的对照细胞 (只用介质治疗) 细胞的增殖增强。

[0364] 为了试验 JP4-039 保护活性, 初级 MEFs 细胞培养物是通过 ERCC1^{-/-} 小鼠胚胎制备并在会造成这些对活性氧类物质高度敏感的细胞氧化应激的 20% 氧气 (环境空气) 中生长。然后这些细胞既可以用 1 μ M XJB-5-131, JP4-039, JED-E71-37 或 JED-E71-58 治疗, 也可以不治疗 (只用介质), 48h 后用免疫荧光染色测定 p16 表达水平 (一种不可逆细胞衰老的标志)。如图 37 所示, 用 JP4-039 治疗的 MEF 细胞的 p16 表达水平明显低于未经治疗的细胞中的水平, 而 XJB-5-131, JED-E71-37 and JED-E71-58 据观察在此浓度不那么有效。

[0365] 实施例 18 抗氧化剂在细胞培养物中的防护作用

[0366] 为了评估 JED-E71-37 and JED-E71-58 的保护活性, 原代 MEFs 细胞培养物是通过 ERCC1^{-/-} 小鼠胚胎制备并在氧化应激条件下 (20% 氧气, 环境空气) 中生长。然后这些细胞或者不治疗或者用 1 μ M 的 JED-E71-37 or JED-E71-58 治疗 48h。在图 38 中可以看出, 这两个化合物尽管在氧化应激条件下仍能改善细胞的增殖。

[0367] 接下来, 是这两种药物以及 XJB-5-131 和 JP4-039 的能力, 每种药物的浓度为 1 μ M, 试验其在如前面的段落所述的细胞培养制备, 和氧化应激条件下防止氧化导致的 DNA 双链断裂的能力。治疗以及不治疗的细胞, 经过 48h 的治疗后, 用 γ -H2AX 免疫组织染色 (一种 DNA 双链断裂以及细胞衰老的标志)。JED-E71-58 的结果显示在图 39, 呈现出 γ -H2AX 的明显减少。JP4-039 也有效, 但据观察 XJB-5-131 和 JED-E71-37 在此浓度无效。

[0368] 实施例 19-氮氧自由基类似物的替代设计

[0369] 为进一步考察 GS- 氮氧自由基化合物 JP4-039 高活性的结构要求, 我们设计了几种氮氧自由基类似物。图 40 显示了氮氧自由基类似物的替代设计的示意图。该设计可以包含以下实验的一个或两个: 改善目标基团以优化类药特性和 / 或考察含有可替代氮氧自由基的基团以改善其氧化剂效力 (例如, 没有限制地, 见 Reid, D. A. 等, 水溶性异吲哚啉氮氧自由基和超氮氧盐酸羟胺 UV-VIS 探针的合成, Chem Comm. 1998, 17:1907-8; Iwabuchi, Y. J., 乙醇氧化过程中氧代氨离子的合成应用的研究和开发。J. Synth. Org. Chem. Jpn. 2008, 66(11):1076-84)。靶向基团的改性可以包括用 Boc 取代替保护基团, 如 Ac(-C(O)CH₃), Cbz(-C(O)O-Bn, 其中 Bn 是一种苄基) 或二烷基磷酸盐。二烷基磷酸盐包括 -P(O)-Ph₂, 其中 Ph 是苯基。其它改性还包括以电子等排取代靶向基团 (例如环丙烷基)

内的链(烯)烃基团。含氮氧自由基的基团包括 TEMPO 和 TEMPOL, 以及替代氮氧自由基组分, 如 TMI0(1, 1, 3, 3- 四甲基异吲哚啉-2- 基氧杂) 或 1-Me-AZADO(1- 甲基 2- 氮杂金刚烷 N- 氧基)。这些替代氮氧自由基组分合成途径如下。

[0370] 图 41 显示出一个可用于制备各种替代设计的氮氧自由基类似物的合成方法, 包括 JP4-039, 根据结构式 2 的化合物, 根据结构式 3 的化合物, 和其他类似物。对 JP4-039 专有合成技术如上文示例 8 所述。JP4-039 及其类似物是采用之前由我们实验室开发的 (Wipf P. & Pierce J. G. 免疫刺激剂半乳糖基神经酰胺 (KRN7000) 的 -C 型糖苷类似物的有效合成, Org. Lett. 2006, 8(15) :3375-8) 一个烯丙基胺的不对称高效合成法制备。图 41 中的一个关键步骤包括用钼法制备非对映烯丙基胺 (7)。该方法包括用 Cp_2ZrHCl 将炔 (5) 钼氢化, Me_3Al 转移金属转移化, 并通过加合反应制得 N-tBu- 亚磺酰基胺 (3)。采用 $\text{Zn}(\text{CH}_2\text{I})_2$ 将链烯烃 (8b) Smith 环丙烷化是图 41 中的另一个关键步骤。在这后一步, 环丙烷环周围的立体结构在反应后测定。

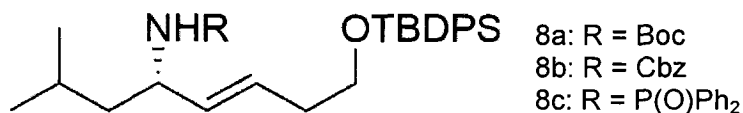
[0371] 化合物 (10a, JP4-039), (10b), (10c), (14a), 和 (14b) 的合成 (图 41 所示) 是根据以下步骤完成的。

[0372] (R, E)-2- 甲基 -N-(3- 甲基亚丁基) 丙烷-2- 亚磺酰胺 (3)。标题所述化合物的合成, 在示例 8 中已被描述 (化合物 1)。

[0373] (丁烯-3- 丙烯基氧基)(t- 丁基) 二苯基硅烷 (5)。标题所述化合物的合成, 在示例 8 中已被描述 (化合物 2)。

[0374] (S,E)-8-(t- 丁基二苯基硅氧基)-2- 甲基辛基-5- 烯-4- 胺盐酸盐 (7)。标题所述化合物的合成, 在示例 8 中已被描述 (化合物 3)。

[0375]



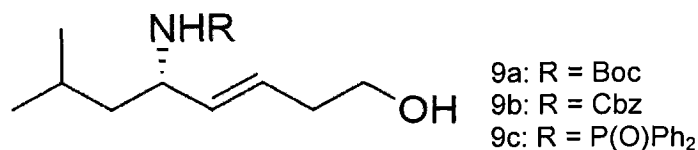
[0376] (S,E)-叔-丁基 8-(t- 丁基二苯基硅氧基)-2- 甲基辛基-5- 烯-4- 叔丁氧羰基氨基 (8a)。标题所述化合物的合成, 在示例 8 中已被描述 (化合物 4)。

[0377] (S, E)-苄基 8-(t- 丁基二苯基硅氧基)-2- 甲基辛基-5- 烯-4- 叔丁氧羰基氨基 (8b)。向胺 7 (1.50g, 3.79mmol) 溶于干 THF (15mL) 形成的混合物中加入 Et_3N (1.65mL, 11.75mmol), 然后加入在 0℃ 条件下加入氯甲酸苄基酯 (CbzCl , 0.59mL, 4.17mmol) 溶于干 THF (4mL) 中形成一种溶液。所生成的白色悬浮液回温到室温并搅拌 5h, 然后用 DCM 和水稀释。水相用 DCM (2x) 萃取, 合并的有机层用 10% 的 HCl 和饱和 NaHCO_3 洗涤, 干燥 (用 MgSO_4), 过滤, 真空浓缩。用闪式柱色谱 (二氧化硅, 8 : 2, 正己烷 / EtOAc) 纯化, 制得 1.45g (72%) 黄色的油状标题所述化合物。¹H NMR (300MHz, CDCl_3) 7.75-7.65 (m, 4H), 7.50-7.28 (m, 11H), 5.70-5.55 (m, 1H), 5.40 (dd, 1H, $J = 15.4, 6.2\text{Hz}$), 5.11 (s, 2H), 4.58 (m, 1H), 4.21 (m, 1H), 3.71 (t, 2H, $J = 6.6\text{Hz}$), 2.30 (q, 2H, $J = 6.6\text{Hz}$), 1.67 (m, 1H), 1.40-1.22 (m, 2H), 1.07 (s, 9H), 0.92 (m, 6H); HRMS (ESI) m/z 对于 $\text{C}_{33}\text{H}_{43}\text{NO}_3\text{SiNa}$ 的计算值为 552.2910, 实测值 552.2930。

[0378] (S, E)-N-(8(t- 丁基二苯基硅氧基)-2- 甲基辛基-5- 烯-4- 基)-p, p- 二苯基磷酸酰胺 (8c)。向胺 7 (400mg, 1.01mmol) 溶于 DCM (7mL) 形成的溶液中加入 Et_3N (0.44mL, 3.13mmol), 然后加入 0℃ 条件下二苯基次膦酰氯 (Ph_2POCl , 0.22mL, 1.11mmol) 溶于 DCM (3mL) 中形成一种溶液。在 0℃ 条件下搅拌 15min, 该反应混合物被回温到室温并搅拌

4h,然后用 DCM 和 10% HCl 稀释。水相用 DCM 萃取,合并的有机层用饱和 NaHCO_3 洗涤,干燥 (MgSO_4),过滤并真空浓缩制得 720mg 淡黄色固化油状标题所述化合物,该化合物无需纯化用于下一步反应。

[0379]

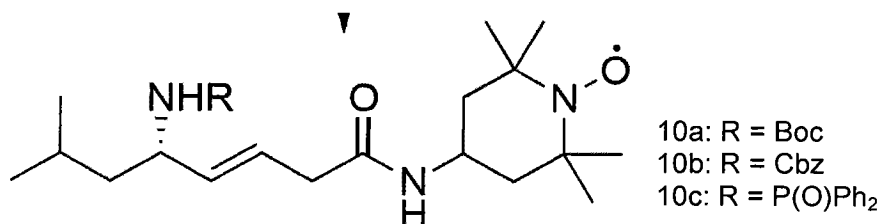


[0380] (S,E)-叔丁基 8-羟基-2-甲基辛基-5-乙基-4-基氨基甲酸盐 (9a)。标题中所述的化合物的合成,在示例 8 中已被描述(化合物 5)。

[0381] (S,E)-苄基 8-羟基-2-甲基辛基-5-烯-4-基氨基甲酸盐 (9b)。向在 0℃ 条件下 TBDPS 保护的醇 8b (584mg, 1.10mmol, 粗品) 溶于 THF (9mL) 形成的溶液中加入 TBAF (1.0M/THF, 1.38mL, 1.38mmol), 该反应混合物在氩气保护下搅拌 3.5h 的同时被回温到室温,再用饱和 NH_4Cl 溶液终止反应,并用 EtOAc 稀释。将水相分离并用 EtOAc 萃取。合并的有机层用盐水洗涤,干燥 (MgSO_4),过滤,真空浓缩。闪式柱色谱(二氧化硅, 5 : 5, 正己烷/EtOAc)制得 194mg (60%, 2 步) 无色的油状标题所述化合物。[α_D^{23}]-6.4 (c 1.0, DCM); ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) 7.20-7.40 (m, 5H), 5.65-5.49 (m, 1H), 5.44 (dd, 1H, $J = 15.3, 6.6\text{Hz}$), 5.09 (s, 2H), 4.67 (bs, 1H), 4.16 (m, 1H), 3.63 (bs, 2H), 2.28 (q, 2H, $J = 6.0\text{Hz}$), 1.82 (bs, 1H), 1.65 (m, 1H), 1.40-1.25 (m, 2H), 0.80-1.00 (m, 6H); HRMS (ESI) m/z 对 $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{NO}_3\text{Na}$ 计算值为 314.1732, 实测值 314.1739。

[0382] (S,E)-N-(8-羟基-2-甲基辛基-5-烯-4-基)-p,p'-二苯基次膦酰胺 (9c)。向在 0℃ 条件下 TBDPS 保护的醇 8c (700mg, 0.983mmol, 粗品) 溶于 THF (8mL) 形成的溶液中加入 TBAF (1.0M/THF, 1.23mL, 1.23mmol), 该反应混合物在氩气保护下搅拌的同时被回温到室温。4h 后由于反应没有结束, 0℃ 条件下加入 0.75eq 的 TBAF 溶液 (0.75mL) 终止反应。反应混合物在室温条件下再被搅拌 3h, 然后用饱和 NH_4Cl 溶液终止反应,并用 EtOAc 稀释。将水相分离并用 EtOAc 萃取。合并的有机层用盐水洗涤,干燥 (MgSO_4),过滤,真空浓缩。闪式柱色谱纯化(二氧化硅, 5 : 5, 95 : 5, EtOAc/MeOH)制得 272mg (77%, 2 步) 白色固体状标题所述化合物。mp 124.0-124.2℃; [α_D^{23}]-12.1 (c 1.0, DCM); ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) 8.00-7.83 (m, 4H), 7.58-7.35 (m, 6H), 5.52 (dd, 1H, $J = 15.3, 9.0\text{Hz}$), 5.24 (m, 1H), 4.58 (bs, 1H), 3.78-3.47 (m, 3H), 2.80 (appdd, 1H, $J = 9.2, 3.8\text{Hz}$), 2.16 (m, 2H), 1.68 (bs, 1H), 1.55-1.43 (m, 1H), 1.43-1.31 (m, 1H), 0.87 (dd, 6H, $J = 8.6, 6.4\text{Hz}$); HRMS (ESI) m/z 对 $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{NO}_2\text{PNa}$ 的计算值为 380.1755, 实测值为 380.1725。

[0383]



[0384] TEMPO-4-基-(S,E)-5-(t-丁氧羰基氨基)-7-甲基辛基-3-烯己酰胺 (10a, JP4-039)。标题中所述的化合物的合成,在示例 8 中已被描述(化合物 7)。

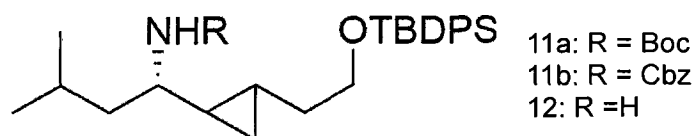
[0385] TEMPO-4-基-(S,E)-5-(苄氧羰基氨基)-7-甲基辛基-3-烯己酰胺(10b)。向在 0℃条件下醇 9b(158mg, 0.543mmol) 溶于丙酮(5mL) 形成的溶液中缓慢加入新制备好的琼斯试剂溶液(2.5M, 0.54mL, 1.358mmol)。所制得的黑色悬浮液在 0℃条件下搅拌 1h, 然后用 EtOAc 和水稀释。将水相分离并用 Et₂O(2x) 萃取。合并的有机层用水(2x) 和盐水(1x) 萃取, 干燥(MgSO₄), 过滤, 真空浓缩制得 166mg(定量) 淡黄色油状标题所述化合物, 该化合物无需进一步纯化用于下一步反应。

[0386] 在 0℃条件下, 将该酸(160mg, 0.524mmol, 粗品) 加入 DCM(7mL) 中形成一种溶液, 再继续加入由 4-氨基-TEMPO(139mg, 0.786mmol) 溶于 DCM(0.5mL)、DMAP(71mg, 0.576mmol)、HOBT·H₂O(78mg, 0.576mmol) 和 EDCI(123mg, 0.629mmol) 形成的一种溶液。所制得的橙色溶液在室温条件下在氩气保护中搅拌 15h, 再用饱和 NH₄Cl 洗涤。将水相分离并用 DCM 萃取一次。合并的有机层干燥(Na₂SO₄), 过滤, 真空浓缩。闪式柱色谱纯化(先 SiO₂ 5 : 5, 再正己烷/EtOAc 3 : 7) 制得 171mg(71%) 桃红色泡沫状标题所述化合物。mp 60.5℃(软化点: 44℃); $[\alpha]_D^{23} +26.5$ (c 0.5, DCM); EIMS m/z 458([M]⁺, 37), 281(19), 154(28), 124(47), 91(100), 84(41); HRMS(EI) m/z 对于 C₂₆H₄₀N₃O₄ 的计算值为 458.3019, 实测值为 458.3035。

[0387] TEMPO-4-基-(S,E)-5-(二苯基磷酰胺)-7-甲基辛基-3-烯己酰胺(10c)。向在 0℃条件下由醇 9c(166.5mg, 0.466mmol) 溶于丙酮(5mL) 形成的溶液中缓慢加入新制备的琼斯试剂溶液(2.5M, 0.47mL, 1.165mmol)。所制得的黑色悬浮液在 0℃条件下搅拌 2h, 然后用 EtOAc 和水稀释。将水相分离并用 Et₂O(2x) 萃取。合并的有机层用水(2x) 和盐水(1x) 萃取, 干燥(MgSO₄), 过滤, 真空浓缩制得 114mg(66%)(定量) 白色泡沫状粗酸, 该酸无需进一步纯化用于下一步反应。

[0388] 在 0℃条件下, 将该酸(110mg, 0.296mmol, 粗品) 加入 DCM(3.5mL) 中形成一种溶液, 再继续加入由 4-氨基-TEMPO(78.4mg, 0.444mmol) 溶于 DCM(0.5mL), DMAP(40.2mg, 0.326mmol), HOBT·H₂O(44.0mg, 0.326mmol) 和 EDCI(69.5mg, 0.355mmol) 形成的溶液。所制得的橙色溶液在室温条件下在氩气保护中搅拌 13h, 再用饱和 NH₄Cl 洗涤。将水相分离并用 DCM 萃取一次。将合并的有机层干燥(用 Na₂SO₄), 过滤, 真空浓缩。闪式柱色谱(SiO₂, EtOAc 97 : 3, EtOAc/MeOH) 制得 91.2mg(59%) 橙色油状在真空条件下缓慢固化的标题所述化合物。mp 168.0-168.8℃(软化点: ~75℃); $[\alpha]_D^{23} -14.1$ (c 0.5, DCM); EIMS m/z 525([M+H]⁺, 10), 371(27), 218(28), 201(74), 124(100), 91(35), 84(26); HRMS(EI) m/z 对于 C₃₀H₄₃N₃O₃P 的计算值为 524.3042, 实测值为 524.3040。

[0389]



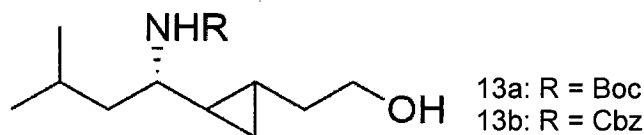
[0390] 苄基(1S)-1-(2-(2-(t-丁基二苯基硅氧基)乙基)环丙基)-3-甲基丁基氨基甲酸盐(11b)。向由 ZnEt₂(110mg, 0.844mmol) 溶于 DCM(2mL) 形成的溶液中加入 DME(蒸馏所得, 0.088mL, 844mmol)。该反应混合物在室温条件下在氮气保护中搅拌 10min, 然后冷却到 -20℃, 再在 4min 内滴加 CH₂I₂(0.137mL, 1.687mmol)。搅拌 10min, 将一种链烯 8b(149mg, 0.281mmol) 溶于 DCM(1mL) 形成的溶液在 5min 内滴加完全。搅拌的同时使反应混合物回

温到室温。10h 后,该反应混合物用饱和 NH_4Cl 溶液终止反应,再用 DCM 和水稀释,将水相分离并用 EtOAc 萃取。将合并的有机层干燥 (Na_2SO_4),过滤,真空浓缩。用闪式柱色谱纯化 (SiO_2 , 正己烷 / Et_2O , 9 : 1) 制得 785mg (68%) 无色油状标题所述化合物。 ^1H NMR 分析显示只有一种非对映异构体 ($> 95 : 5\text{dr}$)。 $[\alpha]_{\text{D}}^{23} -26.8$ (c 1.0, DCM); ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) 7.73–7.66 (m, 4H), 7.48–7.28 (m, 11H), 5.13–4.96 (m, 2H), 4.62 (appbd, 1H, $J = 8.4\text{Hz}$), 3.72 (appbt, 2H, $J = 6.4\text{Hz}$), 3.21 (m, 1H), 1.80–1.63 (m, 1H), 1.60–1.25 (m, 4H), 1.08 (s, 9H), 0.92 (appd, 6H, $J = 6.3\text{Hz}$), 0.79 (m, 1H), 0.51 (m, 1H), 0.40 (m, 1H), 0.30 (m, 1H); HRMS (ESI) m/z 对于 $\text{C}_{34}\text{H}_{45}\text{NO}_3\text{SiNa}$ 的计算值为 566.3066, 实测值为 566.3103。

[0391] (1S)-1-(2-(2-(*t*-丁基二苯基硅氧基)乙基)环丙基)-3-甲基丁-1-胺 (12)。一只装有 Cbz-保护胺 11b (460mg, 0.846mmol) 溶于 5 : 1 MeOH/EtOAc 混合物 mixture (12mL) 形成的溶液的烧瓶,氩气吹扫并充满 3 次,然后加入 10% 的 pd/C (50mg)。该烧瓶用氢气吹扫并充满 3 次,所产生的黑色悬浮液在室温条件下 H_2 (1atm) 中搅拌。3h 后由于反应没有完全,补加 10% 的 pd/C (30mg),在 H_2 中继续搅拌 5h。然后该反应混合物通过一个硅藻土滤片过滤,硅藻土用 MeOH 和 AcOEt 洗涤,所得溶液在真空中浓缩制得 317mg (92%) 的淡黄色油状标题所述化合物粗品,该化合物无需进一步纯化用于下一步实验。

[0392] *t*-丁基 (1S)-1-(2-(2-(*t*-丁基二苯基硅氧基)乙基)环丙基)-3-甲基丁基氨基甲酸盐 (第 11a)。在 0℃ 条件下,向由胺 12 (309mg, 0.755mmol) 溶于 DCM (12mL) 形成的溶液中加入 Et_3N (0.21mL, 0.153mmol),然后再加入 Boc2O (183mg, 0.830mmol)。该反应混合物在室温及氮气保护下搅拌 28h。用饱和 NH_4Cl 溶液终止反应,水相用 DCM 萃取。将合并的橙色有机层干燥 (Na_2SO_4),过滤,真空浓缩得到 471mg 的无色油状标题所述化合物粗品,该化合物不用进一步纯化用于下一步反应。

[0393]

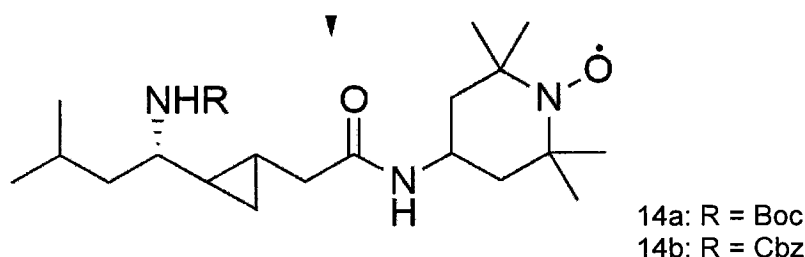


[0394] *t*-丁基 (1S)-1-(2-(2-羟乙基)环丙基)-3-甲基丁基氨基甲酸盐 (13a)。向在 0℃ 条件下由粗 TBDPS 保护的醇 11a (464mg, 0.742mmol) 溶于干 THF 形成的溶液中加入 (6mL) TBAF (1.0M/THF, 0.93mL, 0.927mmol),在氮气保护下搅拌的同时,将反应混合物回温到室温。经过 5h 后由于 TLC 显示没有完全反应,因此加入 0.75eq. TBAF (0.56mL)。9h 后,该反应混合物用饱和 NH_4Cl 水溶液终止反应,并用 EtOAc 稀释。将水相分离并用 EtOAc 萃取,将合并的有机层用盐水洗涤,干燥 (Na_2SO_4)、过滤,真空浓缩,用闪式柱色谱纯化 (SiO_2 , 5 : 5, 正己烷 /EtOAc) 制得 177mg (88%) 无色油状标题所述化合物 (高真空度条件下,固化后得到白色粉末)。mp 49.8–50.2℃; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} -30.8$ (c 1.0, DCM); ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) 4.50 (appbd, 1H, $J = 4.5\text{Hz}$), 3.66 (bs, 2H), 2.94 (m, 1H), 2.36 (bs, 1H), 1.82 (bs, 1H), 1.71 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.39 (t, 2H, $J = 7.2\text{Hz}$), 1.01 (bs, 2H), 0.90 (dd, 6H, $J = 10.2, 6.6\text{Hz}$), 0.50 (m, 1H), 0.43–0.27 (m, 2H); HRMS (ESI) m/z 对于 $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{NO}_3\text{Na}$ 的计算值为 294.2045, 实测值为 294.2064。

[0395] 苄基 (1S)-1-(2-(2-羟乙基)环丙基)-3-甲基丁基氨基甲酸盐 (13b)。向在 0℃ 条件下 TBDPS 保护的醇 11b (320mg, 0.588mmol) 溶于干 THF (5mL) 形成的溶液

入 TBAF (1.0M/THF, 0.74mL, 0.735mmol), 该反应物混合物在氩气保护下搅拌 7h 的同时, 回温到室温, 然后用饱和 NH_4Cl 水溶液终止反应, 并用 EtOAc 稀释。将水相分离并用萃取 EtOAc, 将合并的有机层用盐水洗涤, 干燥 (Na_2SO_4)、过滤并在真空下浓缩。用闪式柱色谱纯化 (SiO_2 , 5 : 5, 正己烷 /EtOAc) 制得 166mg (92%) 无色油状标题所述化合物。 [^1H NMR (300MHz, CDCl_3) 7.42-7.28 (m, 5H), 5.10 (m, 2H), 4.76 (appbd, 1H, $J = 5.7\text{Hz}$), 3.63 (bs, 2H), 3.04 (m, 1H), 2.12-1.98 (bs, 1H), 1.83-1.62 (m, 2H), 1.42 (t, 2H, $J = 7.0\text{Hz}$), 1.16-0.95 (m, 2H), 0.90 (appt, 6H, $J = 7.0\text{Hz}$), 0.53 (sept, 1H, $J = 4.3\text{Hz}$), 0.42 (dt, 1H, $J = 8.4, 4.5\text{Hz}$), 0.34 (dt, 1H, $J = 8.4, 5.0\text{Hz}$); HRMS (ESI) m/z 对于 $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_3\text{Na}$ 的计算值为 328.1889, 实测值为 328.1860。

[0396]



[0397] TEMPO-4-基-2-(2-((S)-1-(*t*-丁氧羰基氨基)-3-甲基丁基)环丙基)乙酰胺 (14a)。向在 0℃ 条件下醇 13a (130mg, 0.477mmol) 溶于丙酮 (5mL) 形成的一种溶液中缓慢地加入 Jones 试剂 (2.5M, 0.48mL, 1.194mmol) 溶液。将所得黑色悬浮液在 0℃ 条件下搅拌 1h, 然后用 Et_2O 和水稀释, 将水相分离并用 Et_2O (2x) 萃取。将合并的有机层用水 (2x) 和盐水 (1x) 洗涤, 干燥 (Na_2SO_4), 过滤并在真空下浓缩得到 133mg (97%) 无色油状标题所述化合物粗品, 该化合物不需进一步纯化用于下一步反应。

[0398] 在 0℃ 条件下, 将该酸 (127.6mg, 0.447mmol, 粗品) 加入干 DCM (5.5mL) 形成一种溶液, 继续加入一种由 4-氨基-TEMPO (118.4mg, 0.671mmol) 溶于干 DCM (0.5mL)、DMAP (60.7mg, 0.492mmol)、HOBt · H_2O (66.4mg, 0.492mmol) 及 EDCI (105.0mg, 0.536mmol) 形成的溶液。将所制得的橙色溶液在室温及氩气保护下搅拌 15h, 然后用饱和 NH_4Cl 溶液洗涤。将水相分离并用 DCM 萃取一次, 并将合并的有机层干燥 (Na_2SO_4), 过滤并在真空下浓缩。用闪式柱色谱纯化 (SiO_2 , 5 : 5 ~ 3 : 7, 正己烷 /EtOAc) 制得 150.0mg (76%) 桃红色泡沫状标题所述化合物。mp 139.5℃; [^1H NMR] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) 15.7 (c 0.5, DCM); EIMS m/z 438 ($[\text{M}]^+$, 6), 252 (57), 140 (67), 124 (80), 91 (48), 84 (59), 57 (100); HRMS (EI) m/z 对于 $\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_4$ 的计算值为 438.3332, 实测值为 438.3352。

[0399] TEMPO-4-基-2-(2-((S)-1-(苄氧羰基氨基)-3-甲基丁基)环丙基)乙酰胺 (14b)。向在 0℃ 条件下由醇 13b (110.5mg, 0.362mmol) 溶于丙酮形成的一种溶液中缓慢地加入 Jones 试剂 (110.5mg, 0.362mmol) 溶液。将所得黑色悬浮液在 0℃ 条件下搅拌 1h, 然后用 Et_2O 和水稀释。将水相分离并用 Et_2O (2x) 萃取。将合并的有机层用水 (2x) 和盐水 (1x) 洗涤, 干燥 (Na_2SO_4), 过滤并在真空内浓缩得到 133.5mg (98%) 无色油状标题所述化合物粗品。该化合物用于下一步反应不需进一步纯化。

[0400] 在 0℃ 条件下, 将该酸 (110mg, 0.344mmol, 粗品) 加入干燥 DCM (4.5mL) 形成一种溶液, 再继续加入由 4-氨基-TEMPO (118.4mg, 0.671mmol) 溶于干 DCM (0.5mL)、DMAP (46.7mg, 0.379mmol)、HOBt · H_2O (51.2mg, 0.379mmol) 及 EDCI (80.8mg, 0.413mmol) 形成的一种溶

液。将所得橙色溶液在室温和氩气保护下搅拌 18h,然后用饱和 NH_4Cl 溶液洗涤。将水相分离并用 DCM 萃取一次,并将合并的有机层干燥 (Na_2SO_4),过滤并在真空下浓缩。用闪式柱色谱纯化 (SiO_2 , 5 : 5 ~ 3 : 7, 正己烷 / EtOAc) 制得 150.0mg (76%) 桃红色泡沫状标题所述化合物。mp 51.8°C (软化点: 44°C); $[\alpha]_D^{23}$ -15.3 (c 0.5, DCM); EIMS m/z 472 ($[\text{M}]^+$, 42), 415 (58), 322 (43), 168 (47), 140 (46), 124 (75), 91 (100), 84 (53); HRMS (EI) m/z 对于 $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_4$ 的计算值为 472.3175, 实测值为 472.3165。

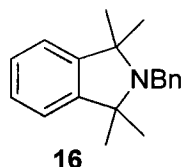
[0401] 实施例 20 替代氮氧自由基组分的合成

[0402] 替代氮氧自由基组分的合成见原理图,其中图 42 显示了 5-氨基-1,1,3,3-四甲基异吲哚啉-2-基氧杂 (5-氨基-TMIO) 的合成方法,图 43 显示了 6-氨基-1-甲基-2-氮杂金刚烷 N-氧基 (6-氨基-1-Me-AZADO) 合成方法。

[0403] 图 42 所示的化合物 5-氨基-1,1,3,3-四甲基异吲哚啉-2-基氧杂 (5-氨基-TMIO) 和 (20) 按照如下步骤制备。

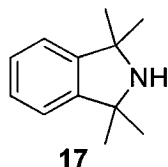
[0404] Reid, D. A. 等人之前曾描述过 5-氨基-TMIO 的合成。(水溶性异吲哚啉氮氧自由基和一种用于防辐射的 pronitroxide hydroxylamine hydrochloride UV-VIS 探针的合成。Chem Comm. 1998, 17, 1907-8), 参考文献引自该处。

[0405]



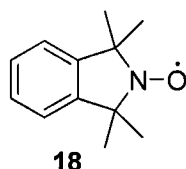
[0406] 2-苄基-1,1,3,3-四甲基异吲哚啉 (16)。(第一步: Org. Synth. 1998, 9, 649; 第二步: Griffiths, P. G. 等。自由基清除剂 1,1,3,3-四甲基异吲哚啉-2-基氧杂的合成。Aust. J. Chem. 1983, 36, 397-401)。向一个烘干的 250ml 三口圆底烧瓶中冲入液氮,然后加入镁 (3.84g, 156.5mmol), 上部用干 Et_2O (9mL) 覆盖。在 50min 内边搅拌边用滴液漏斗将由 MeI (9.45mL, 150.2mmol) 溶于干 Et_2O (80mL) 形成的溶液一种溶液滴入。之后将所得到的反应混合物再搅拌 30min, 然后采用缓慢蒸出溶剂的方法进行浓缩直至内部温度达到 80°C。所得残液冷却到 60°C, 在维持该温度的有效搅拌速度下, 用滴液漏斗滴加一种由 N-苄基邻苯二甲酰亚胺 (6.00g, 25.04mmol) 溶于干甲苯 (76mL) 所形成的溶液。当滴加完成后, 将溶剂从混合物中缓慢蒸出直至温度达到 108 ~ 110°C。将该反应混合物在 110°C 回流 4h, 然后再用溶剂蒸馏的方法浓缩一次。然后冷却并用正己烷稀释 (变成紫色)。将所的浆状物用硅藻土过滤并用正己烷洗涤。合并的黄色滤液在空气中静置一夜后变为暗紫红色。然后将其在真空下浓缩。将所得紫色残余物用正己烷 (~ 1L) 通过以碱性氧化铝短柱洗脱, 得到 2.585g (39%) 无色油状标题所述化合物 (凝固后得到白色固体)。mp 61.0-61.4°C. ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) 7.48 (appd, 2H, $J = 7.2\text{Hz}$), 7.34-7.19 (m, 5H), 7.18-7.11 (m, 2H), 4.00 (s, 2H), 1.31 (s, 12H); HRMS (EI) m/z 对于 $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}$ 的计算值为 265.1830, 实测值为 265.1824。

[0407]



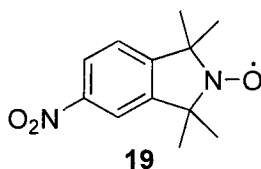
[0408] 1,1,3,3-四甲基异吲哚啉(17)。(Griffiths, P.G. 等。自由基清除剂 1,1,3,3-四甲基异吲哚啉-2-基氧杂的合成. Aust. J. Chem. 1983, 36, 397-401; Chan, K. S. 等。氮氧自由基与载有 β 氢的烷基金属卟啉的反应: 用金属中心自由基激活脂肪族 C-C 键。J. Organomet. Chem. 2008, 693, 399-407)。在 Parr 烧瓶中, 将保护状态下的苄胺 16 (1.864g, 7.02mmol) 溶于 AcOH (34mL), 加入 10% Pd/C (169.5mg)。(将该反应物分成 3 批。) 将该烧瓶放入以高压反应器内。将反应器通入 H_2 置换 5 次, 最后用氢气升压至 4bar (60psi)。在室温下搅拌 3h 后, 将反应混合物通过硅藻土过滤, 并在真空下除去溶剂。将所得残余物溶解于水 (5mL) 中, 用 2.5N NaOH (pH 11.5) 溶液中和, 并用 Et_2O (3x50mL) 萃取。将合并的有机层干燥 (Na_2SO_4), 过滤并在真空下浓缩得到 1.165g (95%) 淡黄色晶体状粗标题所述化合物。mp 36.0-36.5°C。 1H NMR (300MHz, $CDCl_3$) 7.30-7.23 (m, 2H), 7.18-7.11 (m, 2H), 1.86 (bs, 1H), 1.48 (s, 12H)。

[0409]



[0410] 1,1,3,3-四甲基异吲哚啉-2-基氧杂(18)。(Griffiths, P.G. 等。自由基清除剂 1,1,3,3-四甲基异吲哚啉-2-基氧杂的合成. Aust. J. Chem. 1983, 36, 397-401; Chan, K. S. 等。氮氧自由基与载有 β 氢的烷基金属卟啉的反应: 用金属中心自由基激活脂肪族 C-C 键。J. Organomet. Chem. 2008, 693, 399-407)。将胺 17 (1.46g, 8.33mmol) 加入一种按 14 : 1 混合的 MeOH/MeCN (16.6mL) 的混合物, 形成一种溶液, 继续加入 $NaHCO_3$ (560mg, 6.67mmol)、 $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ (83.3mg, 0.25mmol) 和 30% H_2O_2 (3.12mL, 27.50mmol) 的水溶液。将所得悬浮液在室温下搅拌。18h 后, 向所制得的嫩黄色悬浮物中加入 30% 的 H_2O_2 (3.00mL, 26.44mmol) 水溶液。将该反应物搅拌 2 天, 然后用水稀释并用正己烷 (2x) 萃取。将合并的有机层用 1M H_2SO_4 和盐水洗涤、干燥 (Na_2SO_4)、过滤并在真空下浓缩得到 1.55g (98% 粗品) 黄色晶体粉末状标题所述化合物。mp 122-125°C (软化点: 108°C); HRMS (EI) m/z 对于 $C_{12}H_{17}NO$ 的计算值为 191.1310, 实测值为 191.1306。

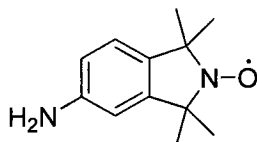
[0411]



[0412] 5-硝基-1,1,3,3-四甲基异吲哚啉-2-基氧杂(19)。(Bolton, R. 等。四甲基异吲哚啉-2-基氧杂自由基的 EPR 和 NMR 研究。J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 1993, 2049-52)。在冰-水浴中将浓 H_2SO_4 (13.5mL) 滴加到 18 (1.345g, 7.07mmol) 中, 形成一中暗红色溶液, 然后将其加热到 60°C 恒温 15min, 接着冷却到 0°C。滴加浓 HNO_3 (0.90mL, 19.09mmol)。反

应结束后,将所得橙黄色溶液加热到 100℃并恒温 10min,颜色变为橙红色。冷却到室温后,将经过冰冷冷却的 2.5N NaOH(30mL)小心地滴加到反应混合物进行中和。将水相用 Et₂O 萃取至无色,将合并的有机层进行干燥 (Na₂SO₄),过滤并在真空下浓缩得到 1.64g(98%) 橙黄色粉末状标题所述化合物,该化合物用于下一步反应不需进一步纯化。

[0413]

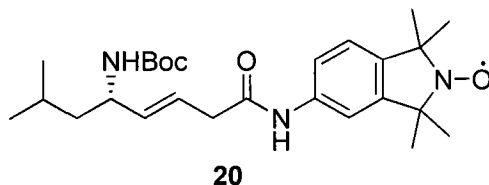


5-amino-TMIO

[0414] 5-氨基-1,1,3,3-四甲基异吲哚啉-2-基氧杂(5-氨基-TMIO)。(第一步:Reid, D.A. 等. The synthesis of water soluble isoindoline nitroxides and a pronitroxide hydroxylamine hydrochloride UV-VIS probe for free radicals. Chem Comm. 1998, 17, 1907-8; Giroud, A. M. 和 Rassat, A. Nitroxides LXXX: synthèses de mono et biradicaux nitroxydes dérivés de l'isoindoline. Bull. Soc. Chim. Fr. 1979, II, 48-55; 第二步: Keana, J. F. W. 和 Lee, T. D. Versatile synthesis of doxyl spin labels bypassing the usual ketone precursors. J. Am. Chem. Soc. 1975, 97, 1273-4)。将含有一种由 19(1.50g, 6.38mmol, 粗品)溶于 MeOH(75mL)所形成的溶液的烧瓶用氩气置换,然后加入 10% Pd/C(150mg)。接着将烧瓶用 H₂置换 3 次。在 H₂(1atm)气氛中将所得黑色悬浮液在室温下搅拌 4h。然后将反应混合物用硅藻土过滤,再将硅藻土用 MeOH 洗涤,得到的溶液在真空下浓缩得到 1.38g 黄色固体状标题所述化合物,该化合物用于下一步反应不需进一步纯化。¹H NMR(300MHz, CD₃OD) 6.89(d, 1H, J = 8.1Hz), 6.25(dd, 1H, J = 8.1, 2.1Hz), 6.54(d, 1H, J = 2.1Hz), 3.35(s, 2H), 1.34(appd, 12H, J = 5.7Hz)。

[0415] 向由该羟胺粗品(1.38g, 6.38mmol)溶于 MeOH(75mL)所形成的溶液中加入 Cu(OAc)₂·H₂O(26mg, 0.128mmol)。在空气中将该反应混合物在室温搅拌 1.5h,颜色变为深褐色。然后在真空下除去溶剂,用 CHCl₃回收残余物,用少量 MeOH 溶解不溶物,并用水洗涤。水相用 CHCl₃萃取两次,将合并的有机层用盐水洗涤、干燥(Na₂SO₄)、过滤并在真空下浓缩。用闪式柱色谱纯化(SiO₂, 6:4~5:5, 正己烷/EtOAc)制得 1.126g(86%)黄色粉末状标题所述化合物。mp 192-194℃(软化点:189℃);HRMS(EI)m/z 对于 C₁₂H₁₇N₂O 的计算值为 205.1341,实测值为 205.1336。

[0416]



20

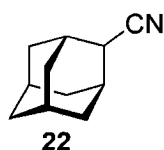
[0417] TMIO-5-基-(S,E)-5-(t-丁氧羰基氨基)-7-甲基辛基-3-烯己酰胺(20)。向在 0℃条件下由醇 9a(187mg, 0.728mmol, 根据前述实施例制备)溶于丙酮(7mL)所形成的溶液中缓慢加入 Jones 试剂溶液(2.5M, 0.73mL, 1.821mmol)。将所得黑色悬浮物在 0℃条件下搅拌 1h,然后用 Et₂O 和水稀释。将水相分离并用 Et₂O(2x)萃取。合并的有机层用水(2x)和盐水(1x)洗涤,干燥(Na₂SO₄),过滤并在真空下浓缩得 190mg(96%)浅黄色油状标题所

述化合物,该化合物用于下一步反应不需进一步纯化。

[0418] 在 0℃ 条件下,将该酸 (187.4mg,0.691mmol,粗品) 加入干 DCM(8mL) 形成一种溶液,再继续加入 5-氨基-TMI0(212.6mg,1.036mmol),DMAP(93.7mg,0.760mmol),HOBt·H₂O(102.6mg,0.760mmol) 和 EDCI(162.1mg,0.829mmol)。将所得黄色溶液在室温及氩气保护下搅拌 16h,然后用饱和 NH₄Cl 溶液洗涤。将水相分离并用 DCM 萃取一次,将合并的有机层用 1N HCl 溶液洗涤两次和再用饱和 NaHCO₃溶液洗涤一次,干燥 (Na₂SO₄),过滤并在真空下浓缩。用闪式柱色谱纯化 (SiO₂,6 : 4,正己烷/EtOAc) 制得 221.0mg(70%) 橙灰色泡沫状标题所述化合物。mp 78-79℃ (软化点:70℃);[α]_D²²+72.2(c 0.5,DCM);ESIMS m/z 481([M+Na]⁺,50),939([2M+Na]⁺,100)。

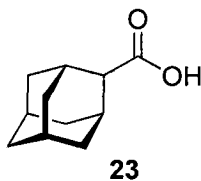
[0419] 图 43 所示化合物 6-氨基-1-甲基-2-氮杂金刚烷 N-氧基 (6-氨基-1-Me-AZADO) 和 (30) 按照如下步骤制备。

[0420]



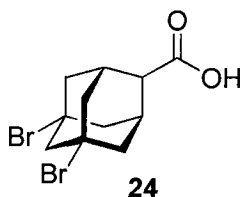
[0421] 2-金刚烷甲腈 (三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-2-腈,22)。(Oldenziel, O. H. 等。2-金刚烷甲腈.Org. Synth. 1977,57,8;Rohde, J. J. 等。强效和选择性 2-氨基-N-(金刚烷-2-基)乙酰胺 11-羟化类固醇脱氢酶 1 抑制剂的研究和代谢稳定性.J. Med. Chem. 2007, 50,149-64)。将 2-金刚烷酮 (三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸-2-酮,21) (21.0g,137mmol)、p-甲苯磺酰甲基异脒 (TosMIC,35.5g,178mmol) 和 EtOH(14mL,233mmol) 溶于 1,2-乙二醇二甲醚 (DME,470mL) 形成的溶液将在 3-5℃ 通过分次加入固体 t-BuOK(39.2g,342mmol) 进行处理,同时维持内部温度在 10℃ 以下。添加完毕后,将所得浆状反应混合物在室温搅拌 30min 后在 35 ~ 40℃ 再搅拌 30min。将该非均相反应混合物过滤,所得固体用 DME 洗涤。滤液在真空下浓缩,然后转移到一短 Al₂O₃柱中 (活化,中性, Brockmann I,150mesh, 7cm 厚 x15cm 高),用 5 : 1 的正己烷/DCM(~ 1.5L) 混合液洗出。将所得溶液在真空下浓缩制得 19.0g(86%) 白色粉末状标题所述化合物。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) 2.91(s,1H), 2.23-2.08(m,4H), 2.00-1.80(m,4H), 1.80-1.66(m,6H)。

[0422]



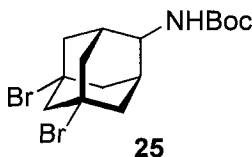
[0423] 2-金刚烷羧酸 (23)。(Rohde, J. J. 等。强效和选择性 2-氨基-N-(金刚烷-2-基)乙酰胺 11-羟化类固醇脱氢酶 1 抑制剂的研究和代谢稳定性. J. Med. Chem. 2007, 50, 149-64)。将腈 22(18.9g,117mmol) 溶于 AcOH 溶液 (56mL) 和 48% HBr(224mL) 所形成的混合物在 120℃ 下搅拌一夜。在反应混合物冷却到 4℃,静置 4h,然后过滤。固体用水洗涤并在真空下用硅胶干燥一夜获得 20.6g(98%) 白色晶体状标题所述化合物。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) 12.09(s,1H), 2.55-2.47(m,1H), 2.20(bs,2H), 1.87-1.64(m,10H), 1.60-1.50(m,2H)。

[0424]



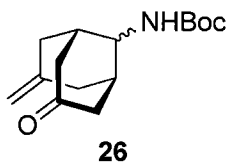
[0425] 5,7-二溴-2-金刚烷羧酸 (24)。(根据 Rohde, J. J. 等人方法改进。强效和选择性 2-氨基-N-(金刚烷-2-基)乙酰胺 11-羟化类固醇脱氢酶 1 抑制剂的研究和代谢稳定性。J. Med. Chem. 2007, 50, 149-64)。将 AlBr_3 (18.9g, 69.6mmol), BBr_3 (2.40g, 9.49mmol) 和 Br_2 (40mL) 形成的混合溶液在 0°C 条件下强力搅拌, 并分次加入酸 23 (5.70g, 31.6mmol) 进行处理。在酸加入结束时, 将反应混合物在 70°C 搅拌 48h, 然后在冰浴中冷却, 并小心的用亚硫酸氢钠饱和溶液终止反应。在室温下持续搅拌一夜后。将所得灰褐色悬浮液过滤, 所得固体用水洗涤, 并在 60°C 条件下, 真空干燥一夜, 获得 10.95g (定量) 米色粉末状标题所述化合物。 ^1H NMR (300MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 12.56 (bs, 0.3H), 2.85 (appd, 2H, $J = 12.9\text{Hz}$), 2.75-2.55 (m, 2H), 2.50-2.35 (m, 2H), 2.35-2.10 (m, 7H)。

[0426]



[0427] (5,7-二溴-金刚烷-2-基)-氨基甲酸 t-丁酯 (25)。将酸 24 (2.00g, 5.92mmol) 加入干丙酮 (30mL) 形成一种悬浮液, 再继续依次用 Et_3N (1.0mL, 7.10mmol) 和叠氮磷酸二苯酯 (DPPA, 1.6mL, 7.10mmol) 处理。将所得混合物在 85°C 搅拌 15h。在 0°C 条件下, 通过滴液漏斗向盛有由 t-BuOK (1.35g, 11.8mmol) 溶于干 THF (80mL) 形成的一种溶液的分离瓶中分次滴加异氰酸酯溶液。所得反应混合物在 30min 内回温到室温, 然后用水终止反应。在真空下除去 THF, 将所得物质用 EtOAc 稀释。将有机层分别用 1N HCl, NaHCO_3 饱和溶液和盐水洗涤, 然后干燥 (Na_2SO_4), 过滤并在真空下浓缩。用闪式柱色谱纯化 (SiO_2 , 95 : 5 ~ 8 : 2, 正己烷/EtOAc) 得到 1.20g (50%, 2步) 白色粉末状标题所述化合物。 ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) 4.68 (bs, 1H), 3.76 (bs, 1H), 2.87 (s, 2H), 2.47-2.13 (m, 10H), 1.46 (s, 9H)。

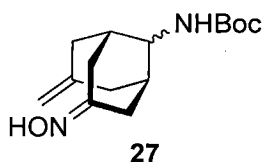
[0428]



[0429] (7-亚甲基-二环[3.3.1]壬-3-酮-9-基)-氨基甲酸 t-丁酯 (26)。(第一步: Rohde, J. J. 等。强效和选择性 2-氨基-N-(金刚烷-2-基)乙酰胺 11-羟化类固醇脱氢酶 1 抑制剂的研究和代谢稳定性。J. Med. Chem. 2007, 50, 149-64)。将一种由 25 (125mg, 0.305mmol) 溶于氧杂环乙烷形成的溶液, 用 2N NaOH (0.70mL, 1.37mmol) 处理, 并在 180°C 用微波 (μw , Biotage) 照射 15min。在真空条件下除去氧杂环乙烷。将残余物溶于 DCM, 用水洗涤, 干燥 (Na_2SO_4), 过滤并在真空下浓缩得到 82.5mg 黄色油状 9-氨基-7-亚甲基-二环[3.3.1]壬-3-酮粗品, 用于下一步反应不需进一步纯化。

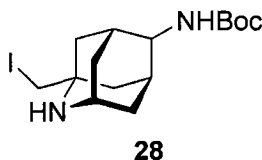
[0430] 在 0℃条件下,向由这种粗胺溶于干 DCM(5mL) 形成的一种溶液加入 Et₃N(0.13mL, 0.913mmol), 然后加入 Boc₂O(73.8mg, 0.335mmol)。反应混合物在室温及 N₂保护下搅拌 14h。用饱和 NH₄Cl 水溶液终止反应,并将水相用 DCM 萃取两次。将合并的有机层干燥 (Na₂SO₄), 过滤并在真空下浓缩。用闪式柱色谱纯化 (SiO₂, 7 : 3, 正己烷 /EtOAc) 制得 48.0mg (59%, 2 步) 白色粉末状标题所述化合物。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) 4.93(bs, 0.25H), 4.84(s, 2H), 4.81(bs, 0.75H), 4.12(bs, 0.25H), 3.91(appbd, 0.75H, J = 3.6Hz), 2.64-2.37(m, 6H), 2.37-2.23(m, 3.25H), 2.17(appbd, 0.75H, J = 13.8Hz), 1.48and 1.46(2s, 9H)。

[0431]



[0432] (7-亚甲基-二环[3.3.1]壬-3-酮肟-9-基)-氨基甲酸 t-丁酯 (27)。向由酮 26(137mg, 0.515mmol) 溶于干吡啶 (1mL) 形成的一种溶液中加入 NH₂OH·HCl(109mg, 1.54mmol)。将反应混合物在室温及氩气保护下搅拌 23h。将溶剂在真空下除去,用 EtOAc 稀释残余物,然后加入水。将各层分离并将水相用 EtOAc 萃取。合并的有机层用 5% CuSO₄ 水溶液 (3x) 和盐水 (1x) 洗涤,干燥 (Na₂SO₄), 过滤并在真空下干燥。用闪式柱色谱纯化 (SiO₂, 4 : 6, 正己烷 /EtOAc) 制得 133mg (92%) 无色胶状标题所述化合物。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) 7.02(bs, 0.6H), 4.90(bs, 0.25H), 4.80(d, 1H, J = 2.1Hz), 4.76(bs, 0.75H), 4.69(d, 1H, J = 2.1Hz), 3.87(bs, 1H), 3.26(d, 0.25H, J = 16.8Hz), 3.11(d, 0.75H, J = 16.8Hz), 2.55-2.48(m, 4H), 2.48-2.20(m, 4H), 2.16(appd, 0.25H, J = 17.1Hz), 2.04(dd, 0.75H, J = 17.1, 5.4Hz), 1.47(s, 9H)。

[0433]

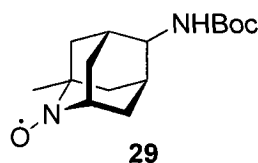


[0434] (1-碘甲基-2-氮杂金刚烷-6-基)-氨基甲酸 t-丁酯 (28)。在 0℃和氩气保护下,向由肟 27 和 MoO₃(94mg, 0.649mmol) 溶于干 MeOH(4.6mL) 形成的混合物中分次加入 NaBH₄(179mg, 4.64mmol)。反应混合物在 0℃搅拌,分别在 2.5h 和 5.5h 分次加入 2 倍量的 NaBH₄(179mg, 4.64mmol)。经过 7h 后加入丙酮使暗褐色的反应混合物终止反应,然后用硅藻土过滤,用丙酮洗涤硅藻土。将滤液在真空下浓缩。所得残余物用水稀释并用 EtOAc 萃取两次。合并的有机层用盐水洗涤,干燥 (K₂CO₃), 过滤并在真空下浓缩制得 136mg 黄色油状粗胺,其用于下一步反应不需进一步纯化。

[0435] 在 0℃及氩气保护下,向由该粗胺溶于干乙腈 (MeCN, 2.3mL) 形成的悬浮液中加入 I₂(117mg, 0.462mmol)。反应混合物搅拌 4h 的同时回温到室温,然后用饱和 NaHCO₃水溶液和饱和 Na₂S₂O₃水溶液终止反应。将所得混合物用 DCM/CHCl₃萃取两次,将有机层干燥 (K₂CO₃), 过滤并在真空下浓缩。用闪式柱色谱纯化 (SiO₂, 95 : 5 to 9 : 1, DCM/MeOH) 制得 76.5mg (42%) 褐色油状标题所述化合物。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) 4.83(bs, 1H), 3.77(bs, 1H), 3.30(bs, 1H), 3.24(apps, 2H), 2.14(appbs, 2H), 1.94(appbd, 2H, J = 13.5Hz),

1.75 (m, 6H), 1.46 (s, 9H)。

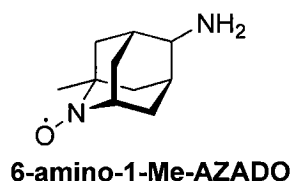
[0436]



[0437] (1-甲基-2-氮杂金刚烷-N-氧基-6-基)-氨基甲酸 t-丁酯 (29)。胺 28 脱氧化可以通过用一种还原剂 (如 LiAlH_4 或 NaBH_4)，可能在催化剂 (如 InCl_3) 存在下及在极性非质子溶剂如 THF 或 MeCN 中处理 28 实现。

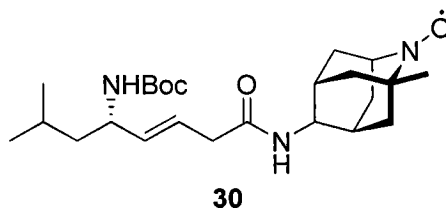
[0438] 在 MeOH 和 H_2O 的混合溶剂中，在催化剂量的 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 存在条件下，用 H_2O_2 处理所得到的胺，可将所述的胺氧化得到相应的氮氧自由基 29。

[0439]



[0440] 6-氨基-1-甲基-2-氮杂金刚烷-N-氧基 (6-氨基-1-Me-AZADO)。在 DCM 中用三氟乙酸 (TFA) 处理保护状态下的胺 29 可将 Boc 保护的基团去除，从而得到游离态的胺 6-氨基-1-Me-AZADO。

[0441]



[0442] (1-Me-AZADO-6-基)-(S, E)-5-(t-丁氧羰基氨基)-7-甲基辛基-3-烯己酰胺 (30)。通过 Jones 氧化 (S, E)-t-丁基 8-羟基-2-甲基辛基-5-烯-4-基氨基甲酸酯 (9a) 可得到上述相应的酸。化合物 (9a) 根据前述实施例制备。

[0443] 在 CH_2Cl_2 (DCM) 中，按照上文描述的条件，通过偶联剂 EDCI、DMAP、和 HOBt-hydrate，使所述的酸与 6-氨基-1-Me-AZADO 耦合得到酰胺化合物 (30)。

[0444] 鉴于说明之目的，本发明特有的实施方案在上文中已经描述，本发明许多细节的变化，如所附本发明权利要求所定义的，对本领域的技术人员来说无需脱离本发明即可认识到，这是显而易见的。

[0445] 在本发明指定的不同范围的数值的使用，除非另有明确说明，都表述为近似值，犹如在指定的最小值和最大值二者都冠以单词“大约”来陈述。在这种方式下，陈述范围内的数值在其之上或之下有略微变化也能大体上获得相同的结果。同时，除非另有明确说明，这些公开的范围是作为一个连续范围，包括每一个最小值和最大值之间的数值。

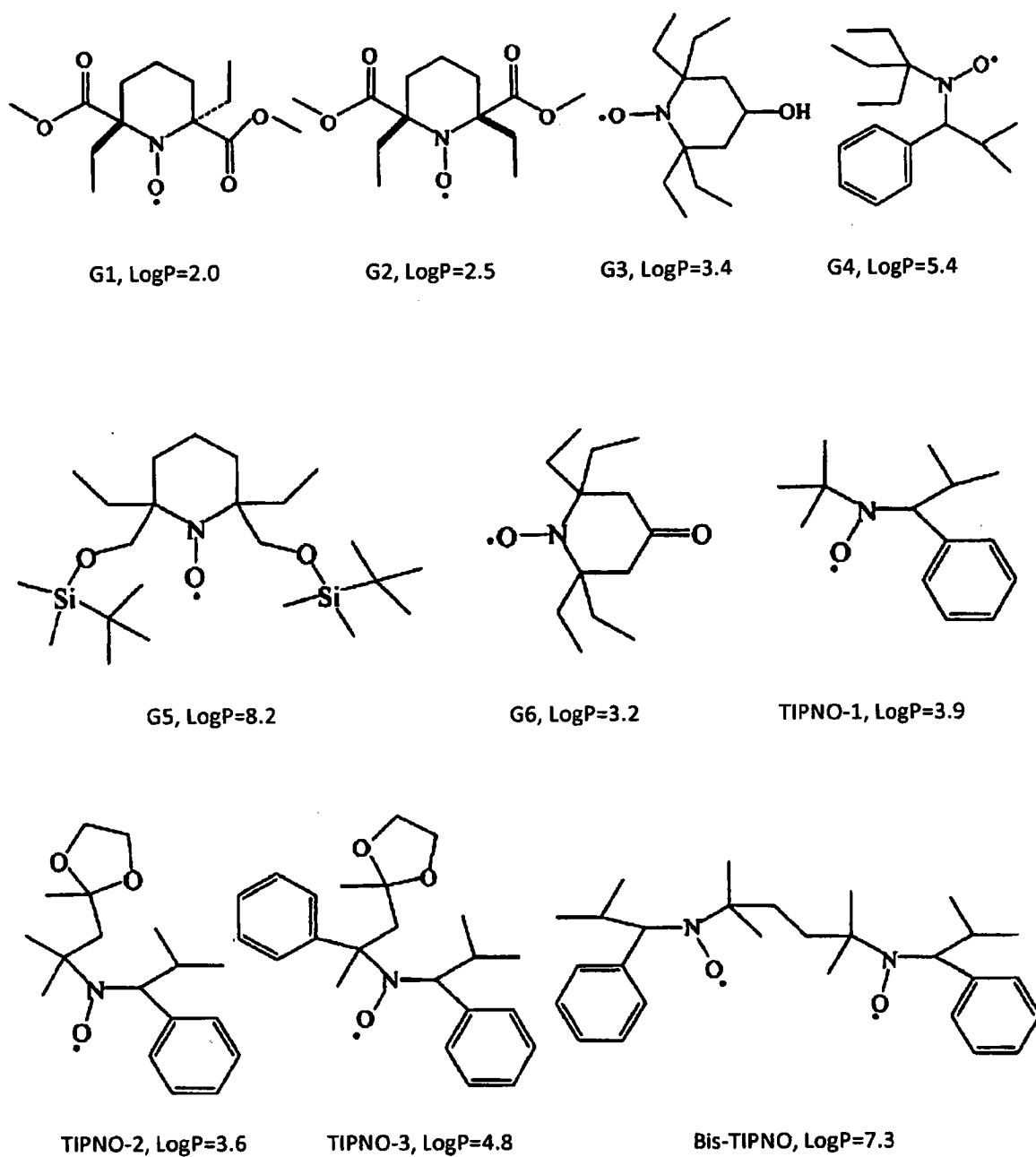
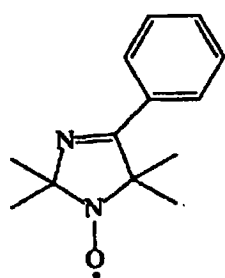
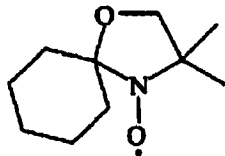


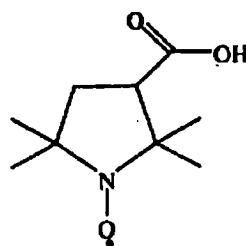
图 1-1



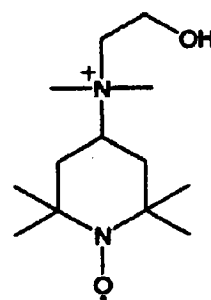
Nitronyl nitroxide,
LogP=1.7



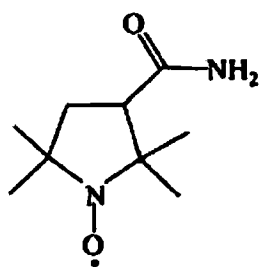
Doxyl radical, LogP=2.6



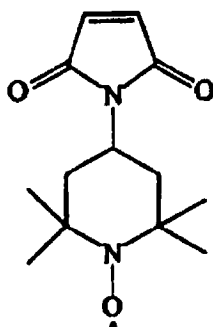
3-carboxyl-
PROXYL,
LogP=1.4



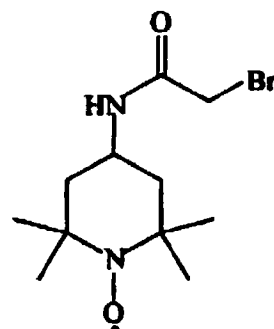
TEMPO choline,
LogP=2.5



3-Carbamoyl-PROXYL,
LogP=0.9



4-Maleimido-TEMPO,
LogP=2.9



4-(2-Bromoacetamido)-
TEMPO, LogP=1.9

图 1-2

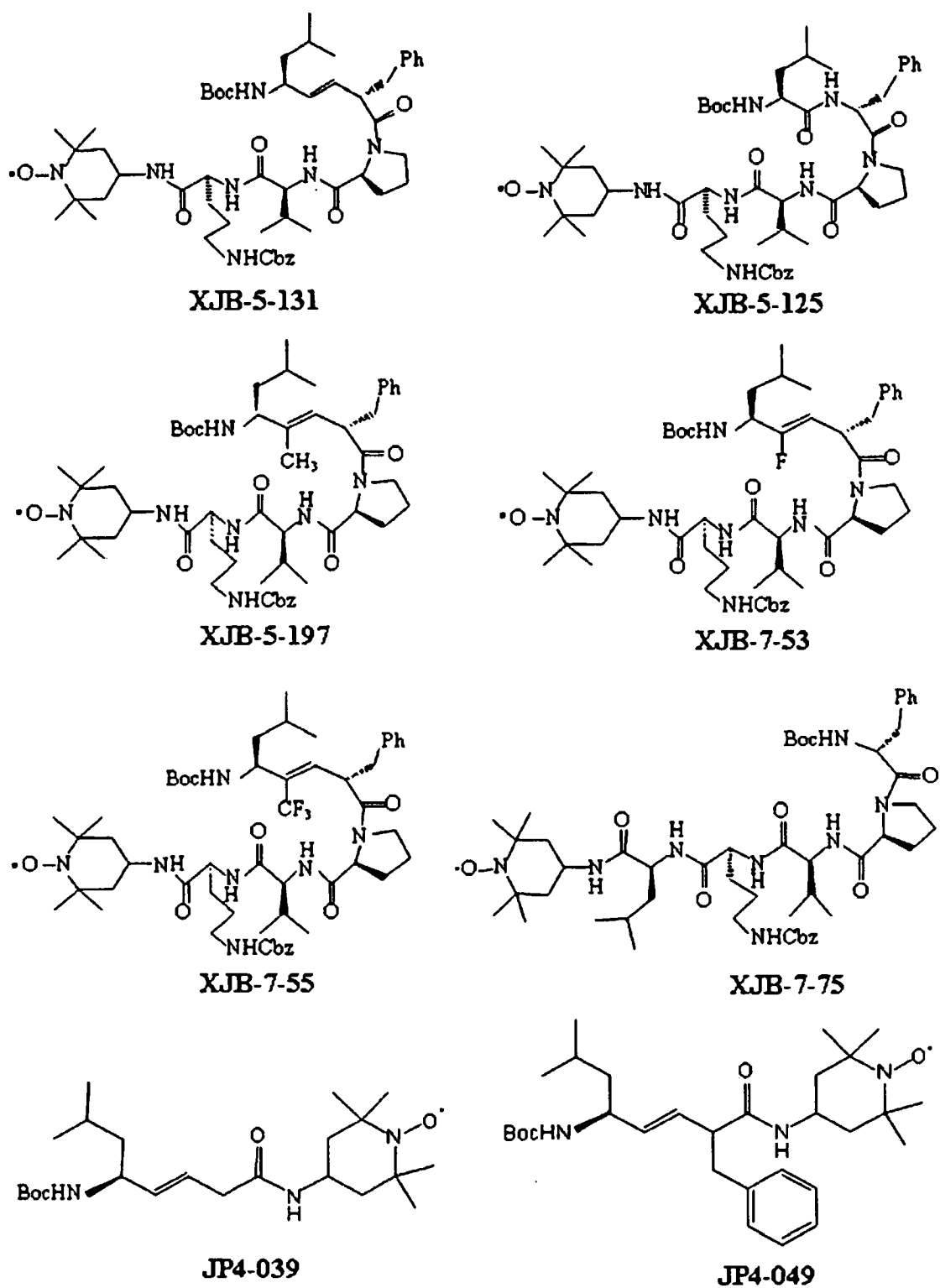


图 2-1

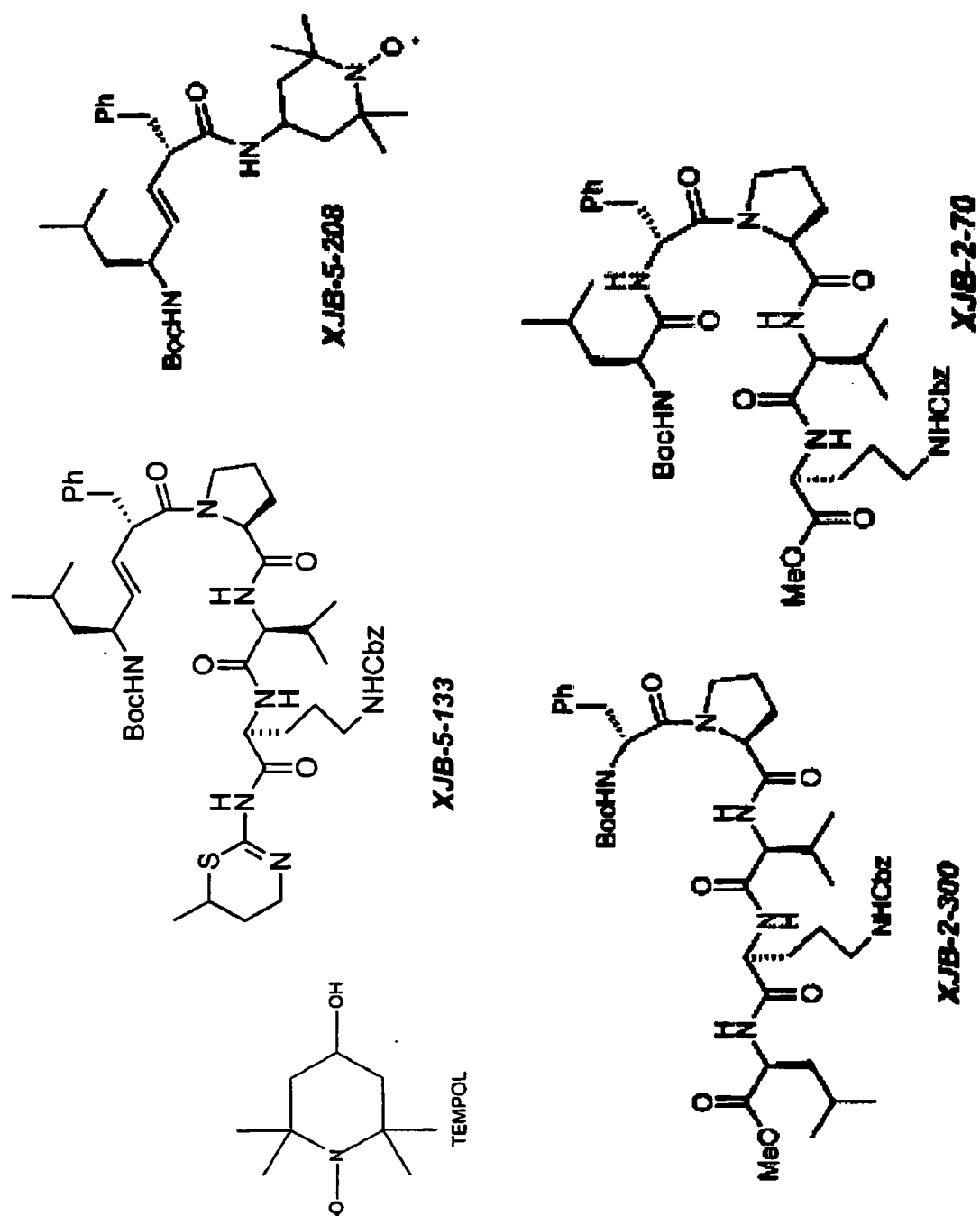


图 2-2

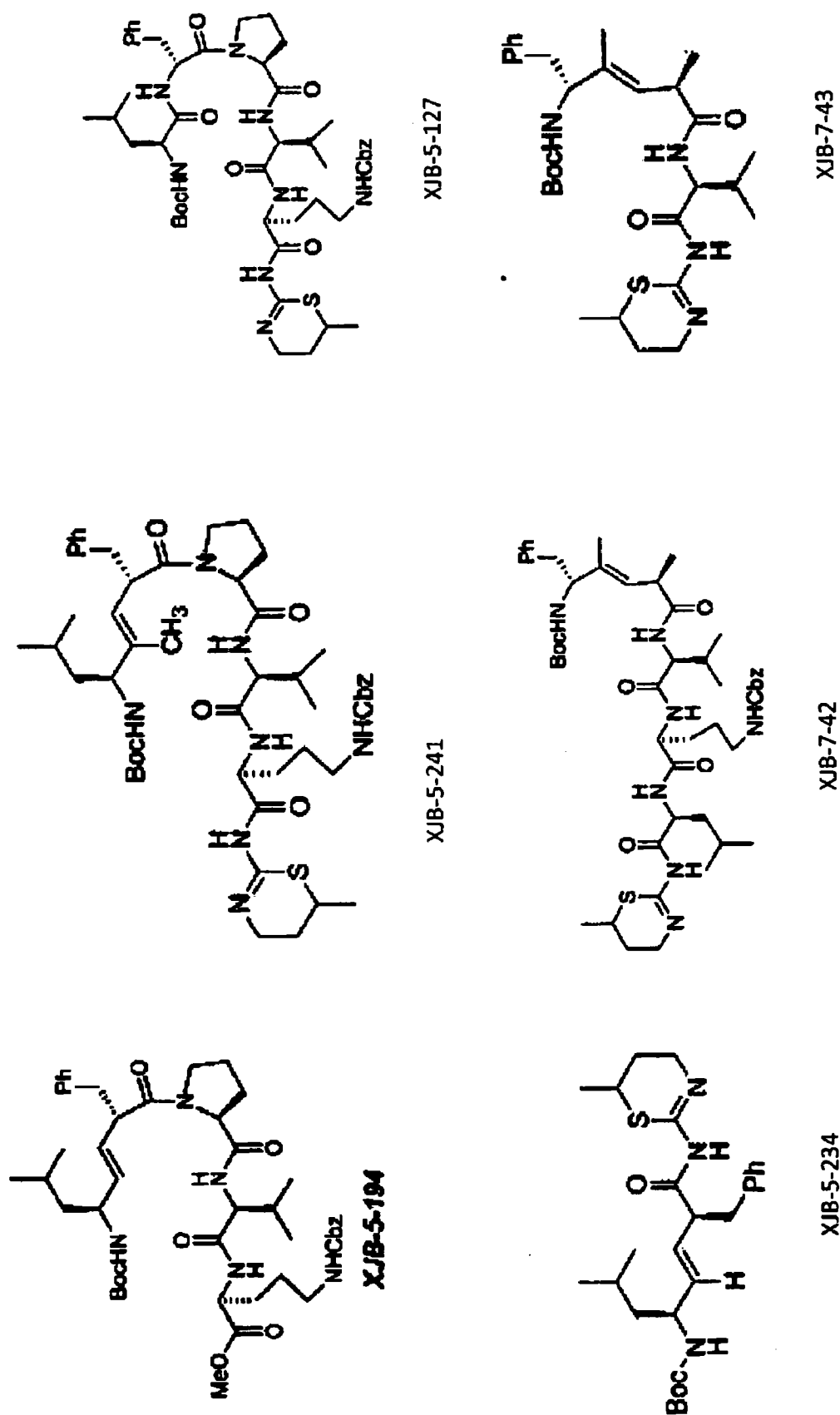


图 2-3

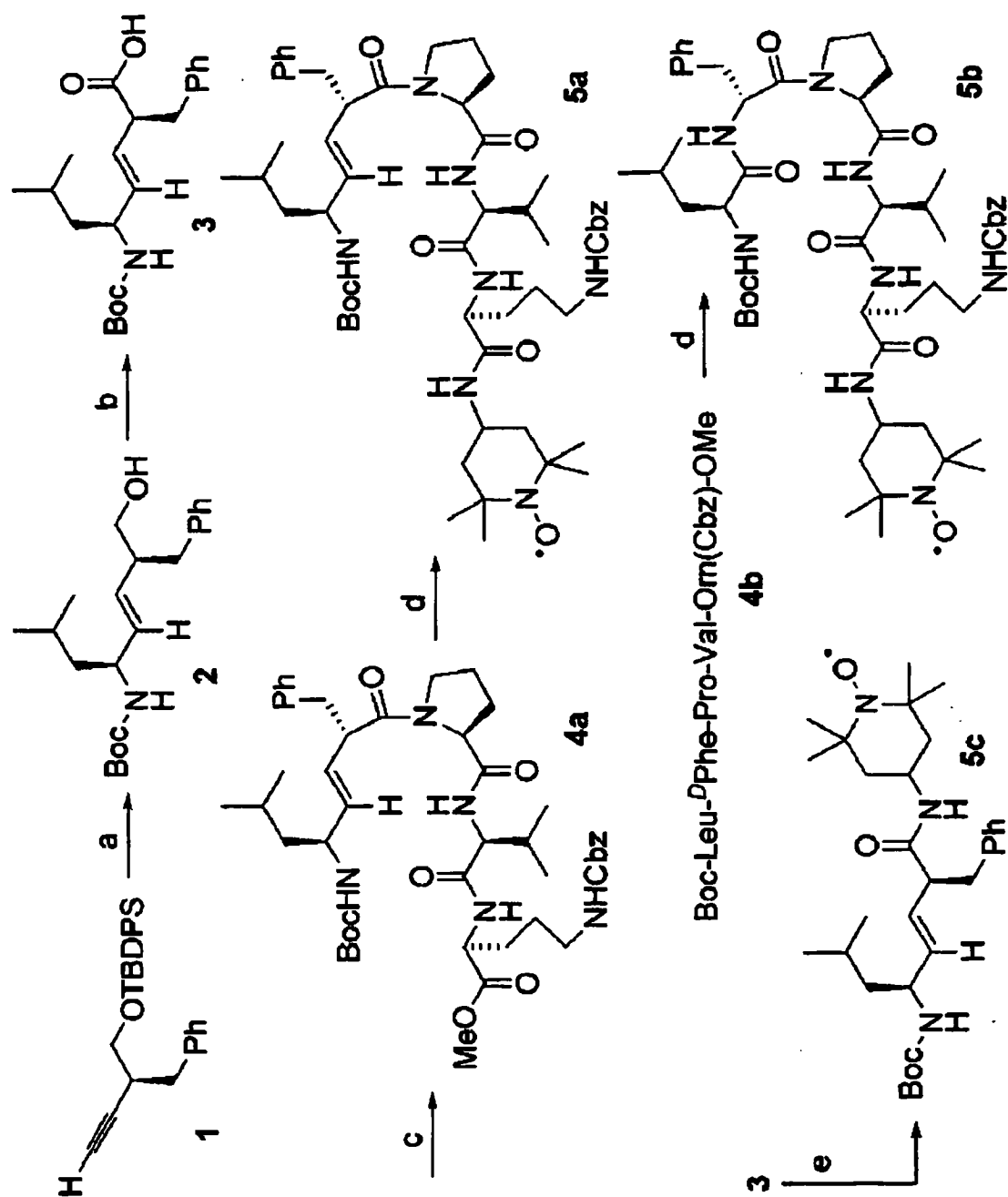


图 3

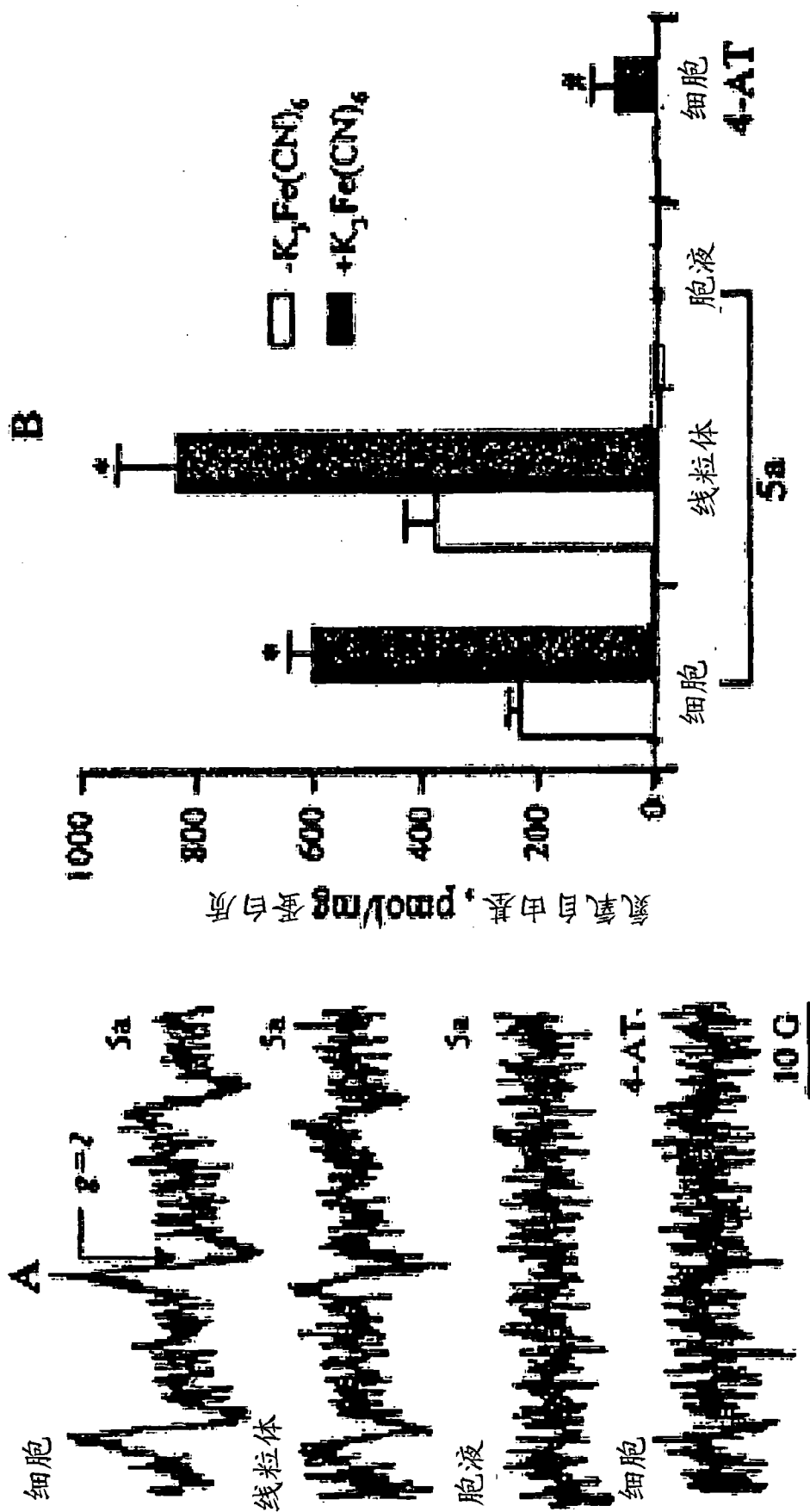


图 4

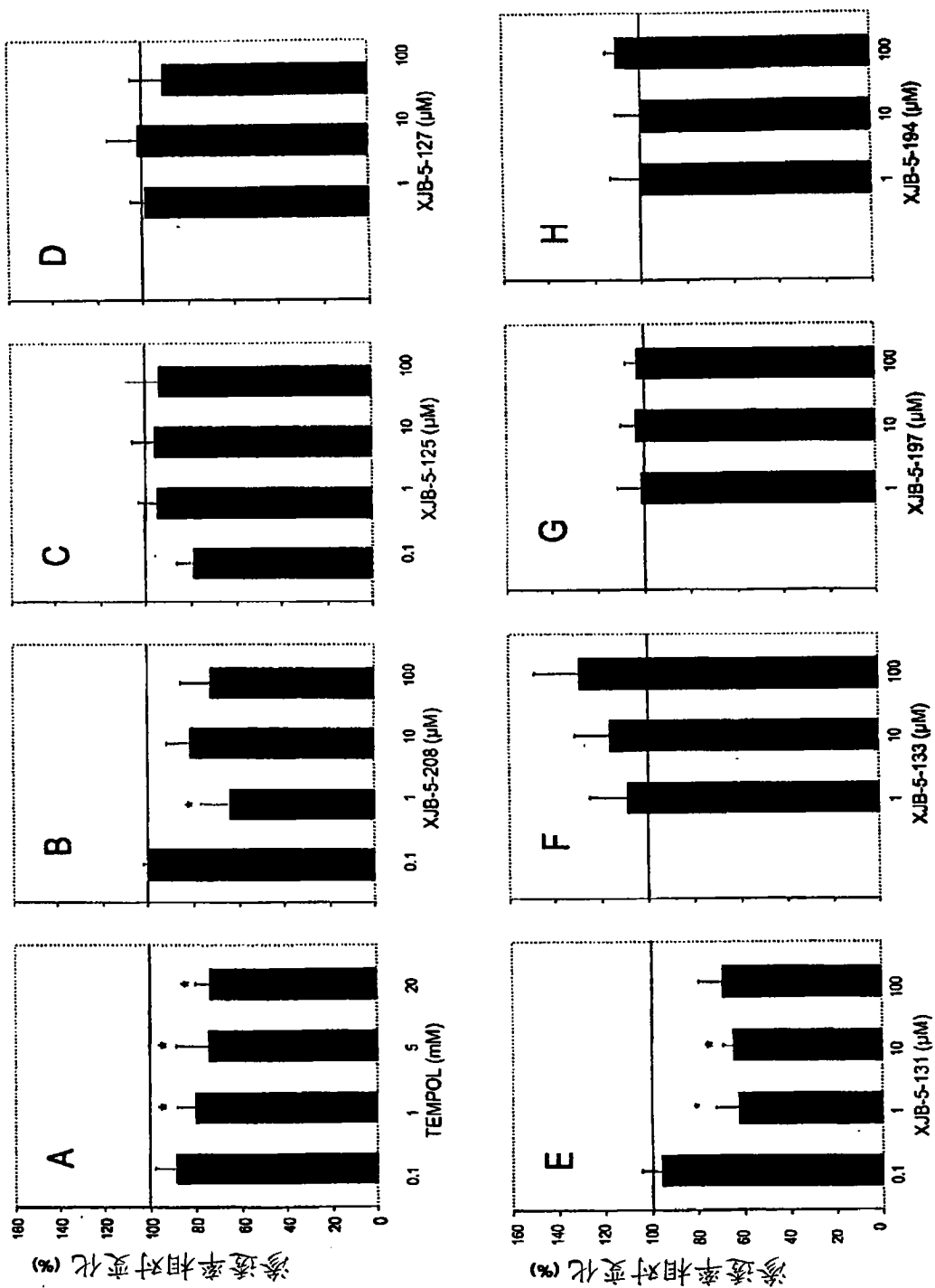


图 5

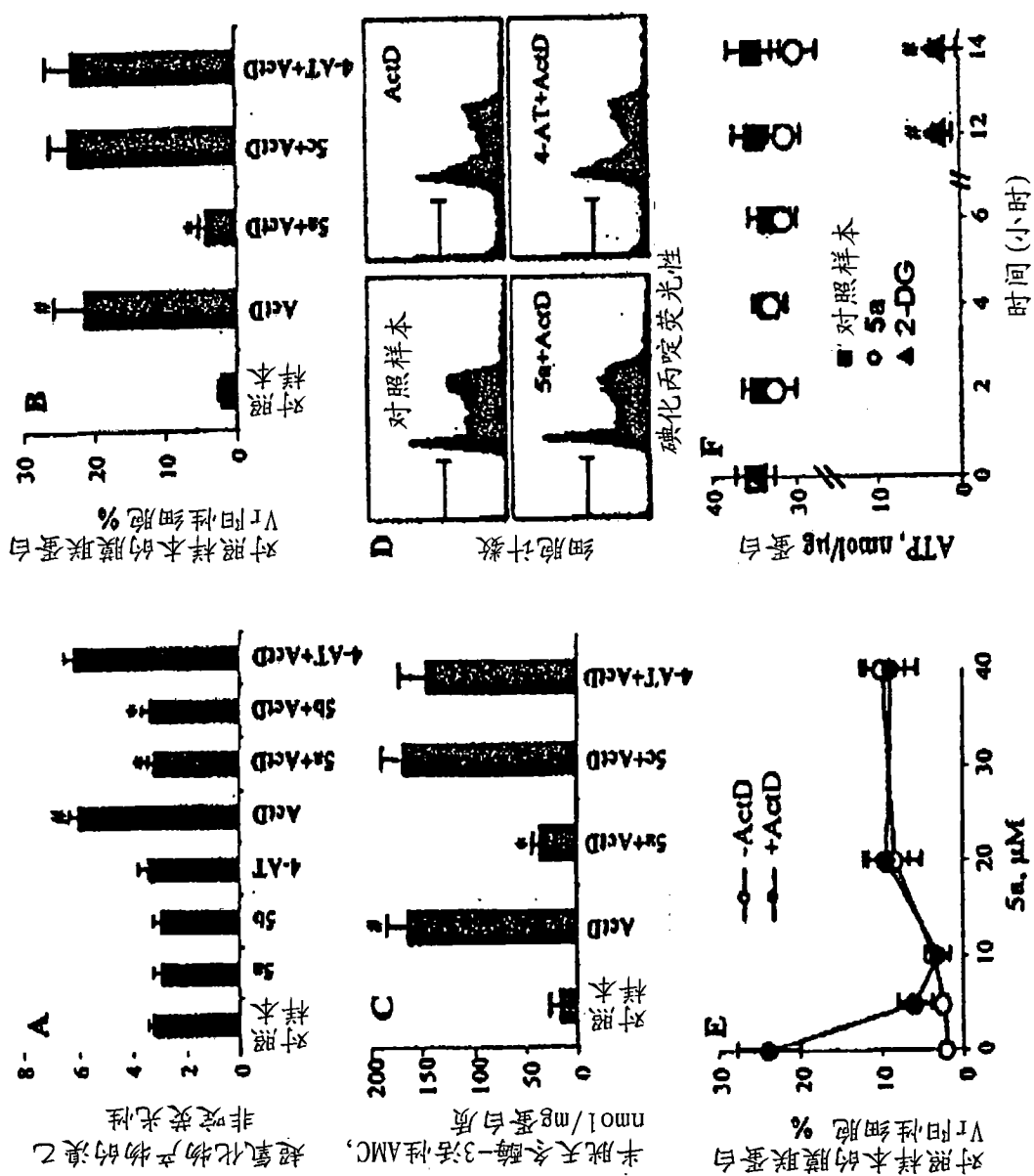


图 6

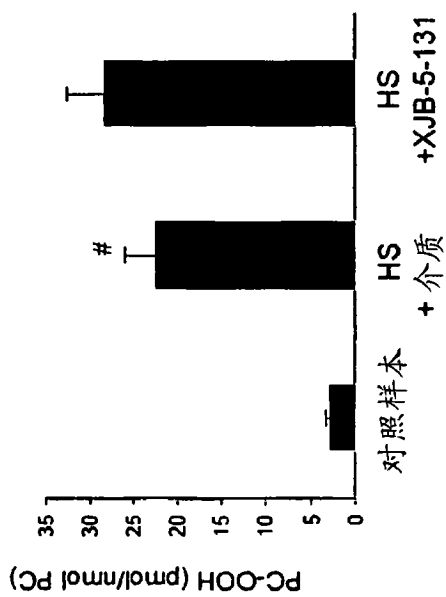


图 7A

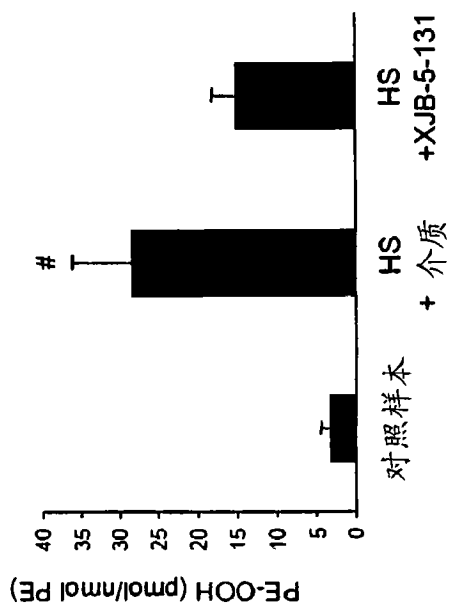


图 7B

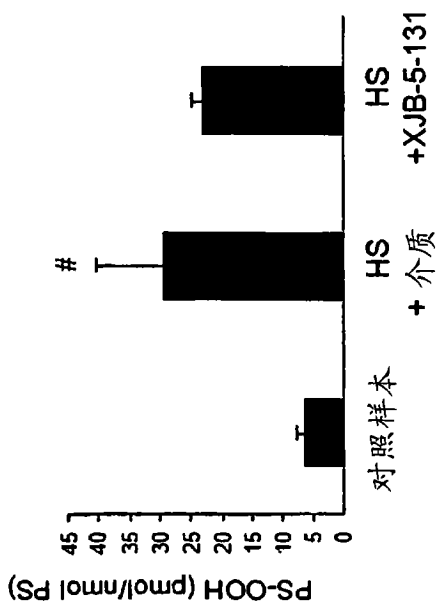


图 7C

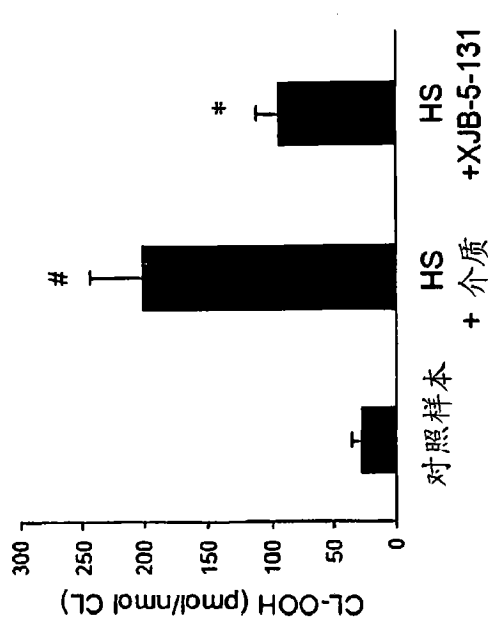


图 7D

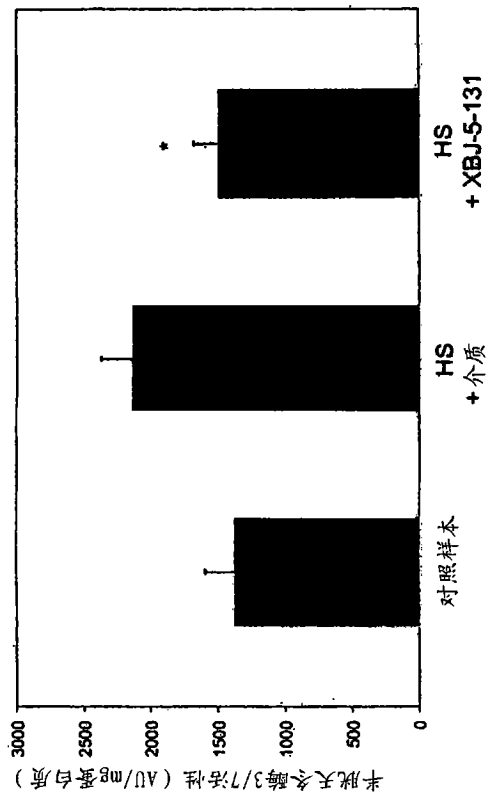


图 8

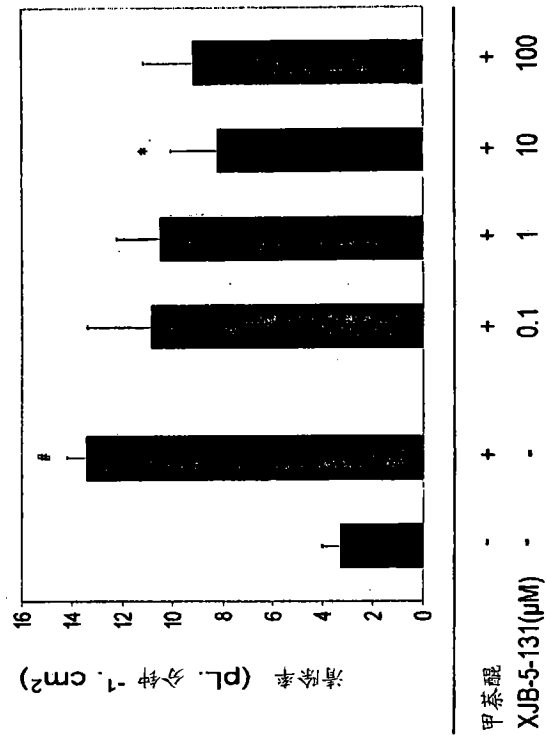


图 9

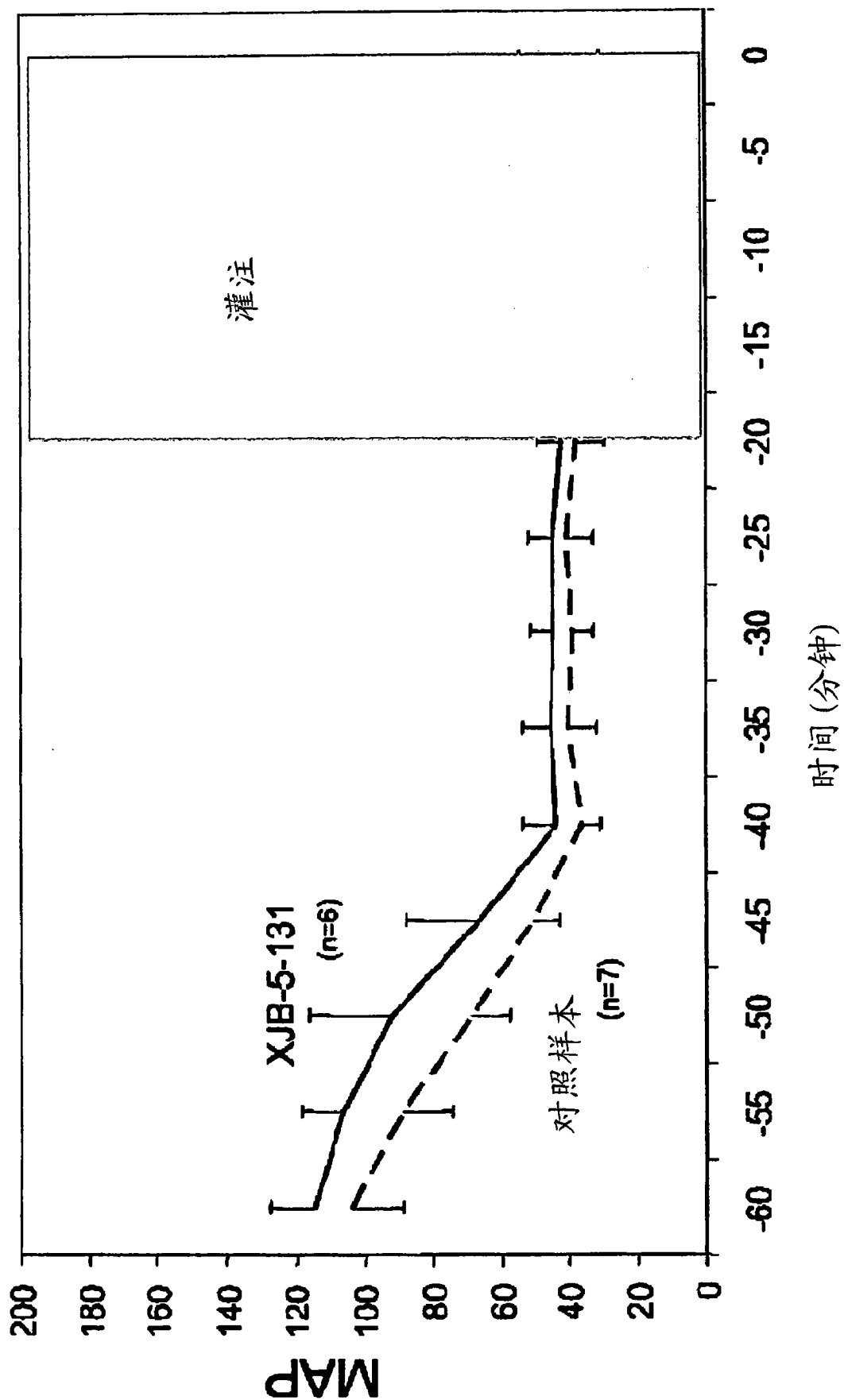


图 10A

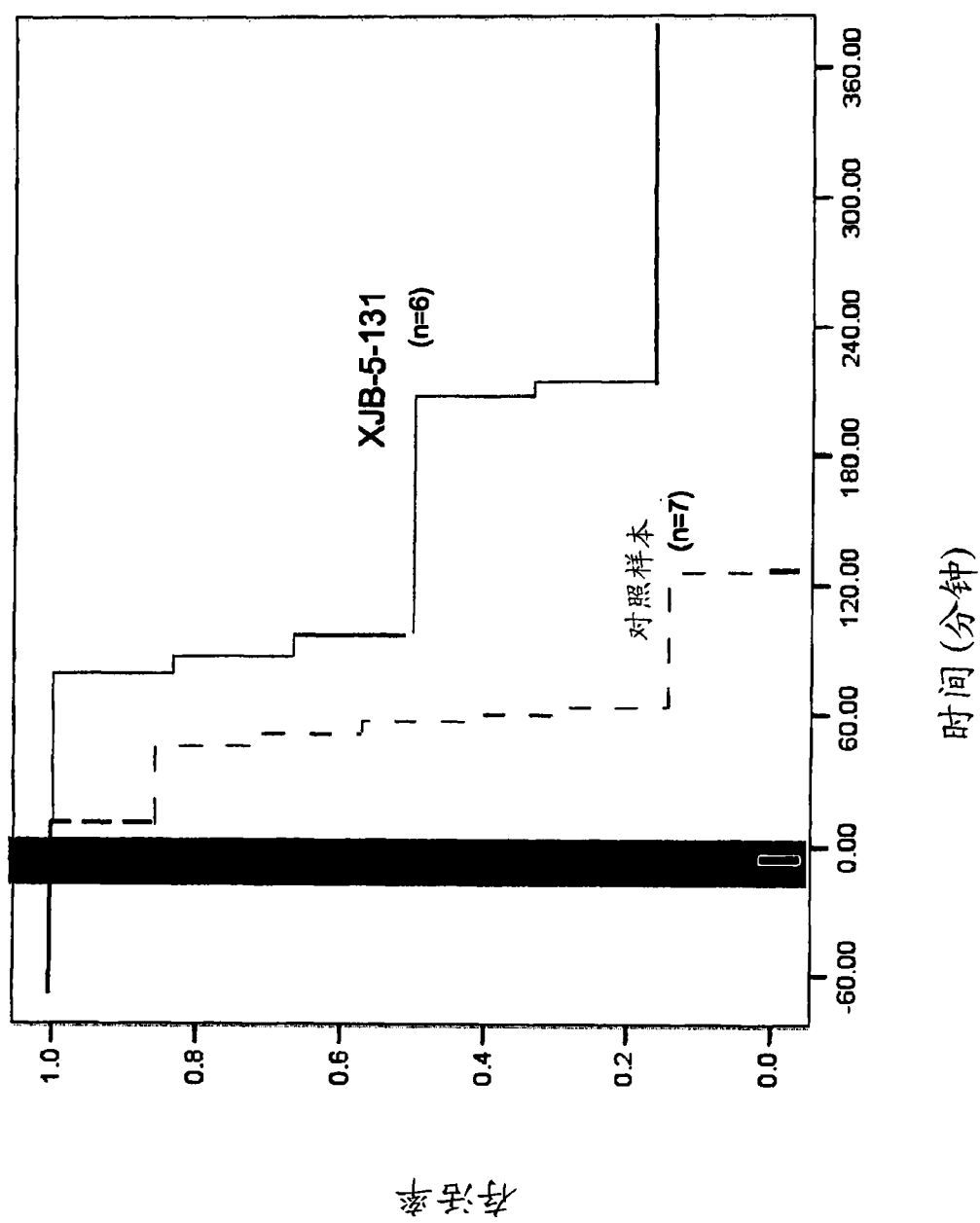


图 10B

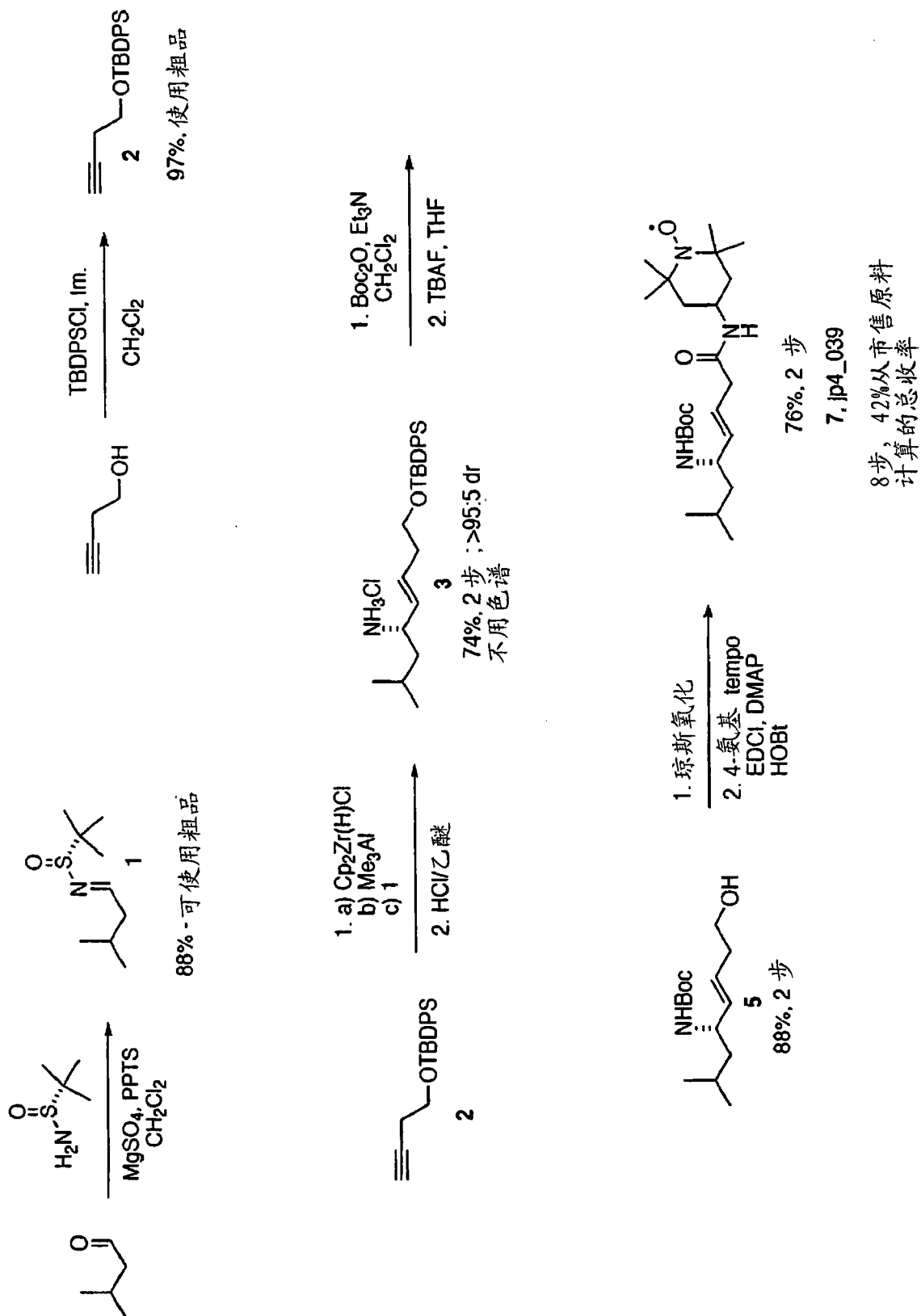


图 11A

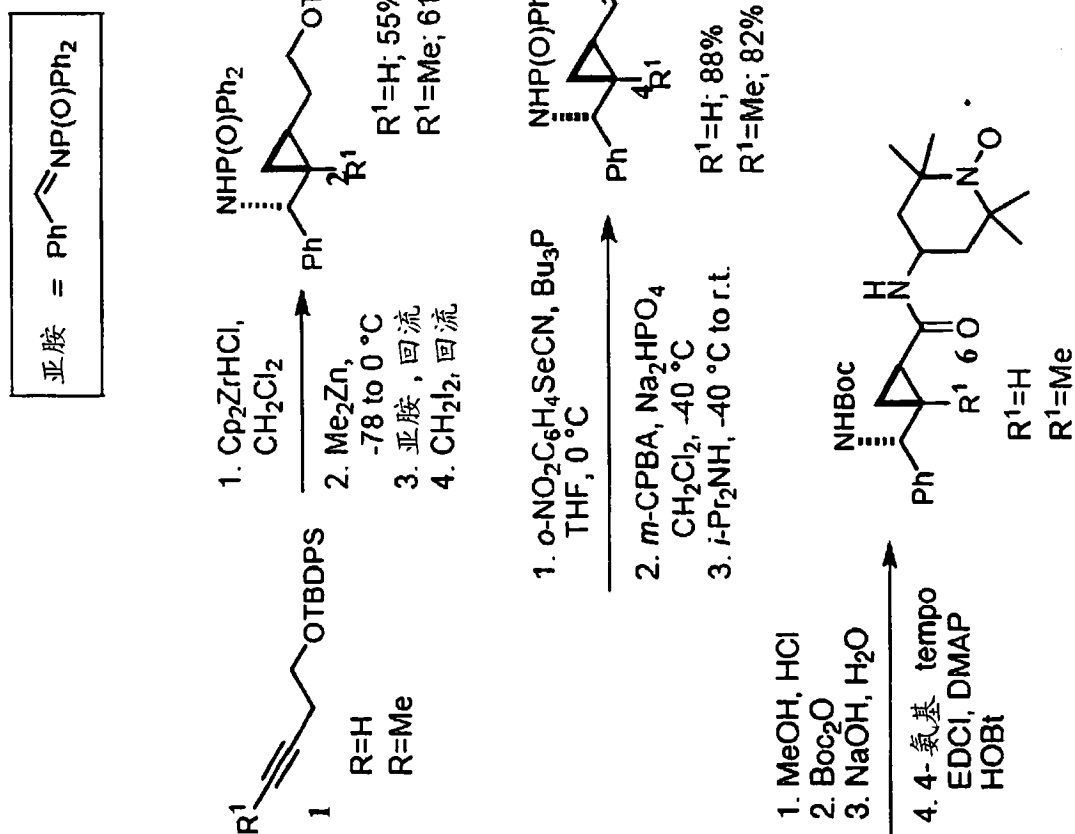


图 11B

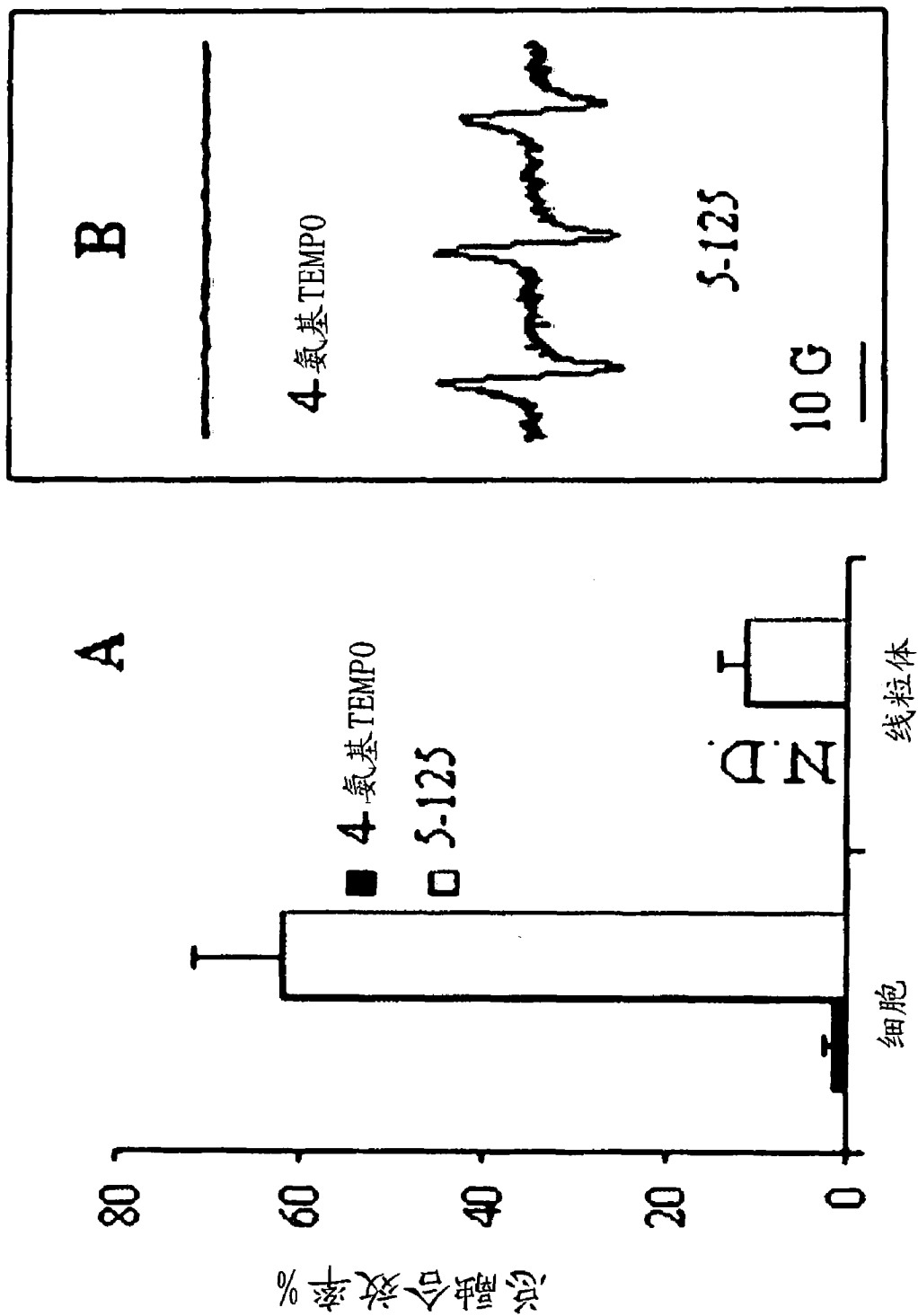


图 12

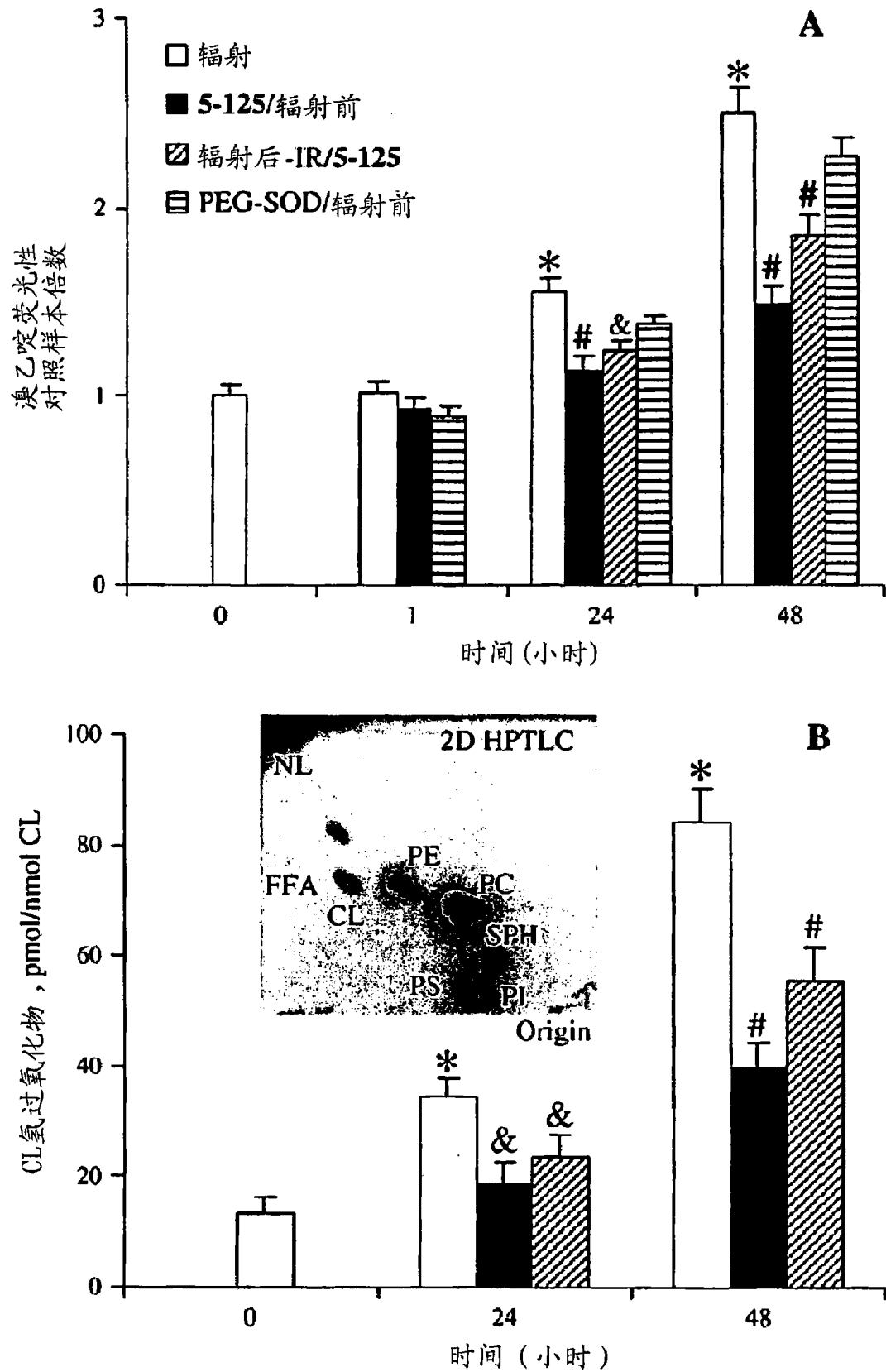


图 13

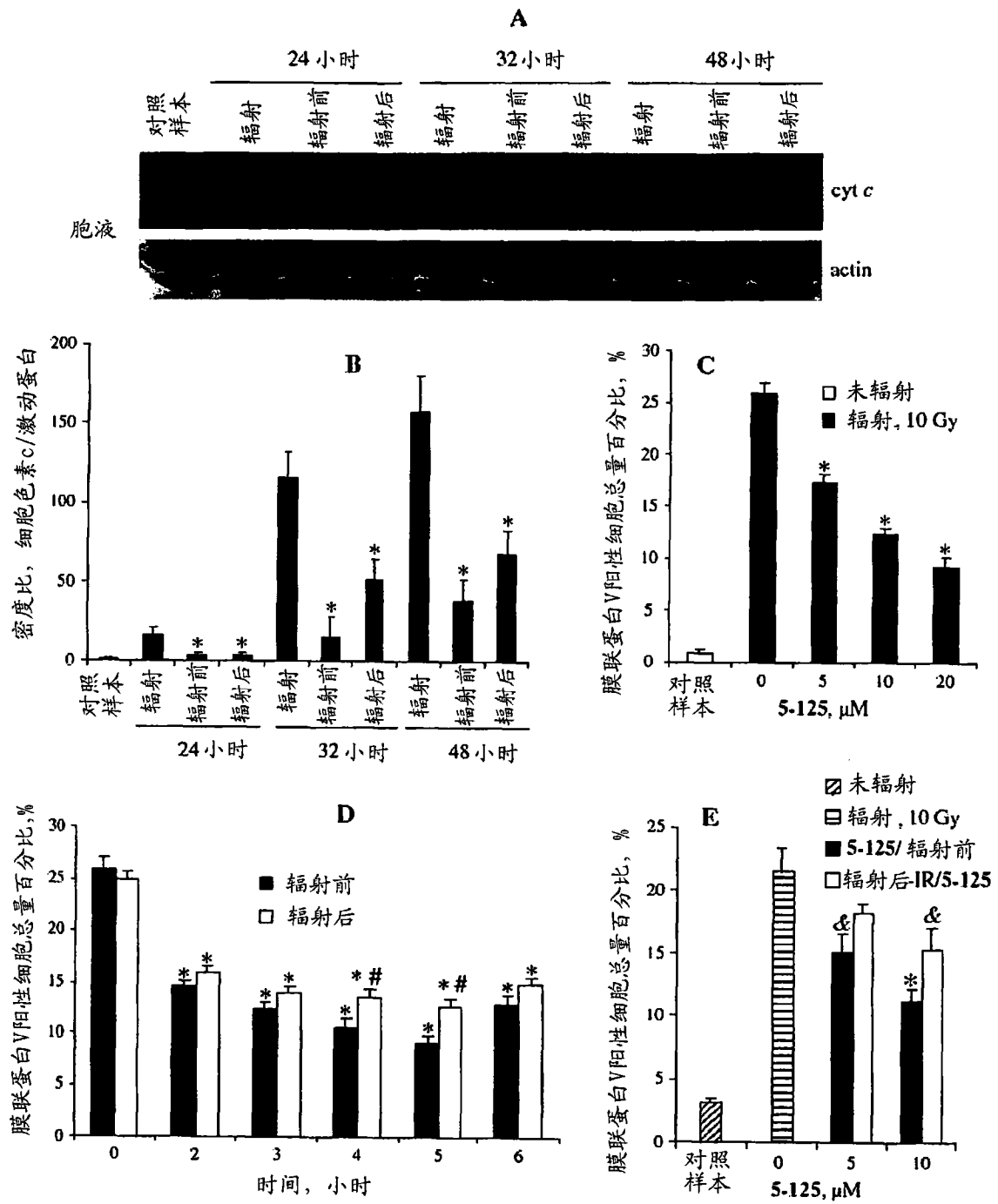


图 14

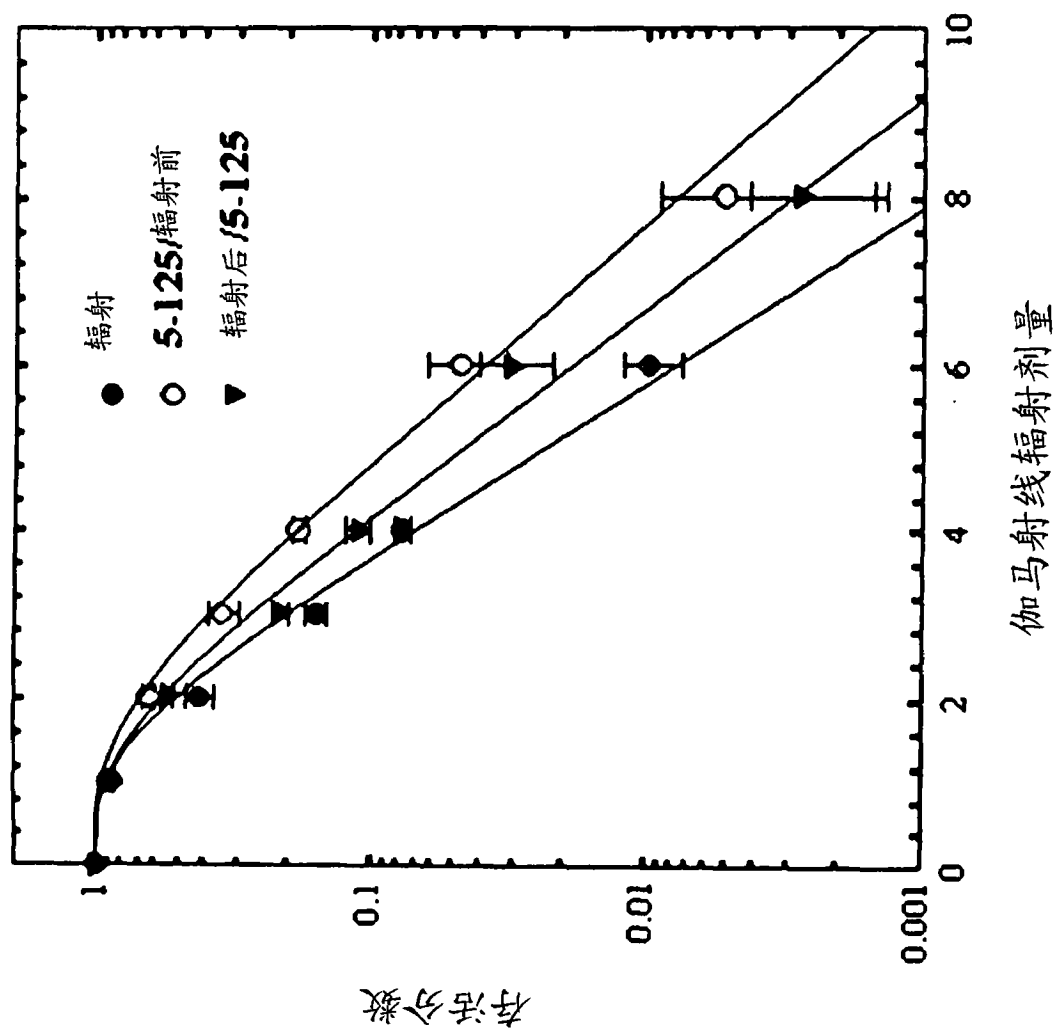


图 15

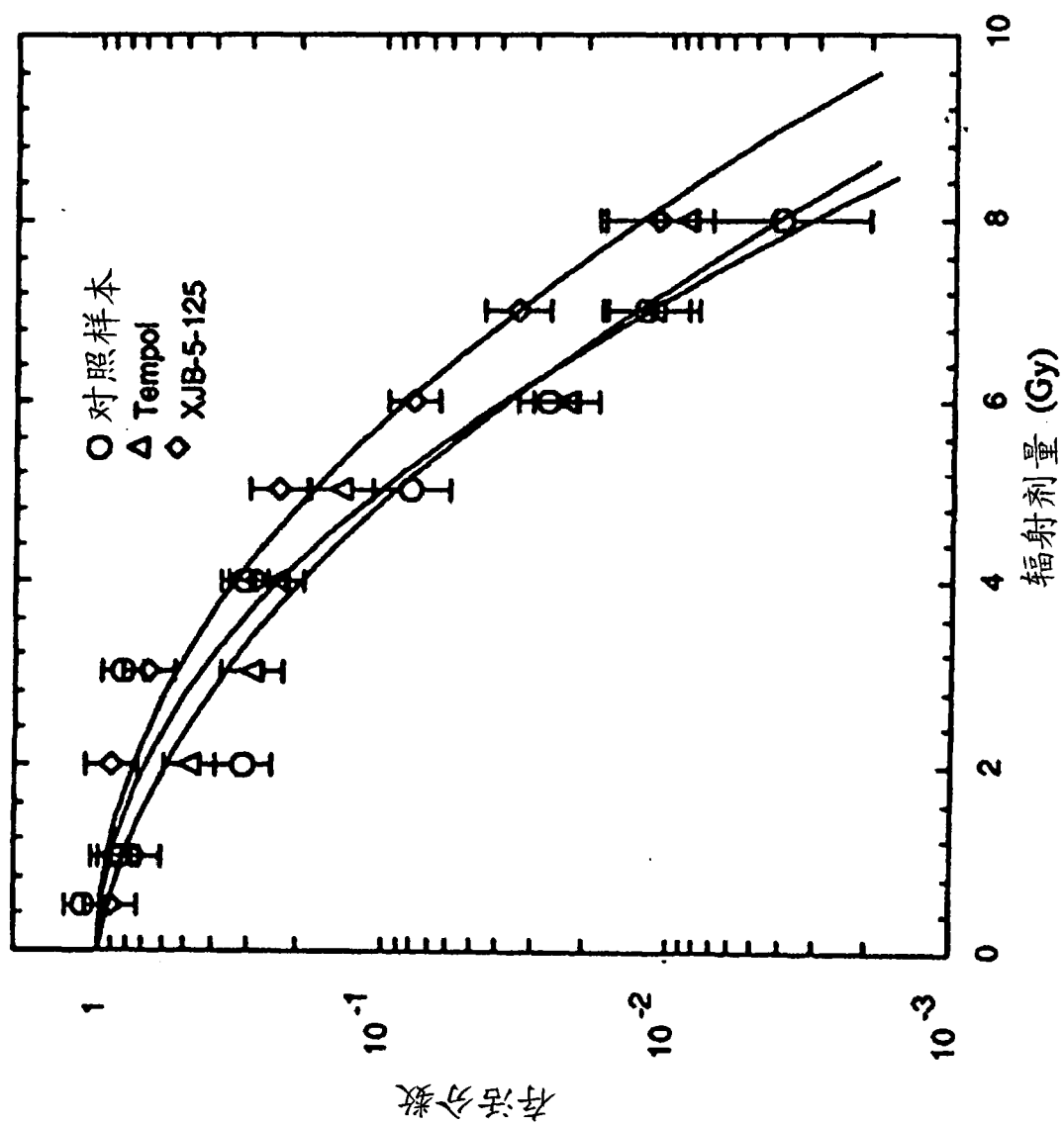


图 16

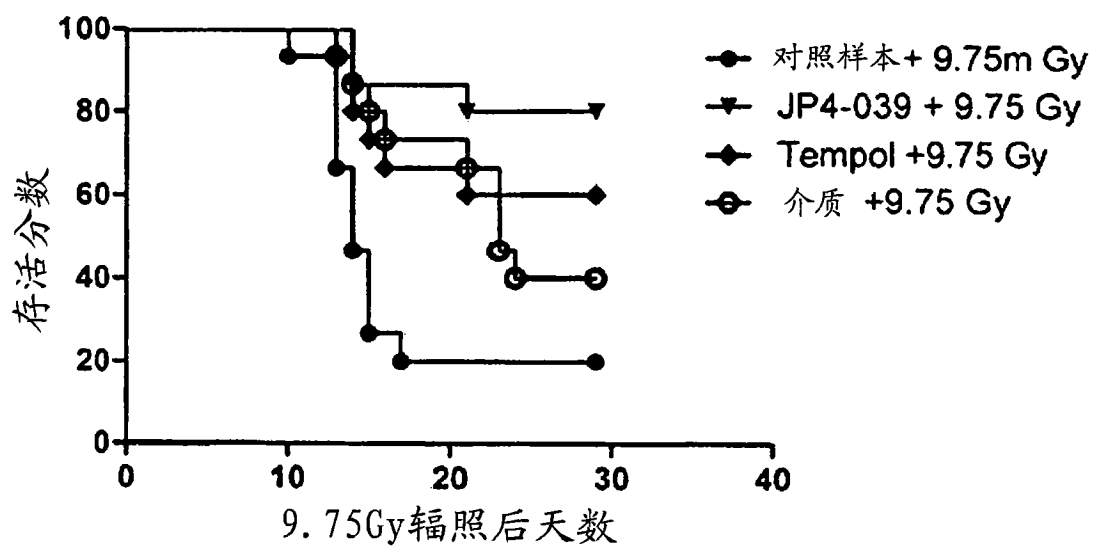


图 17A

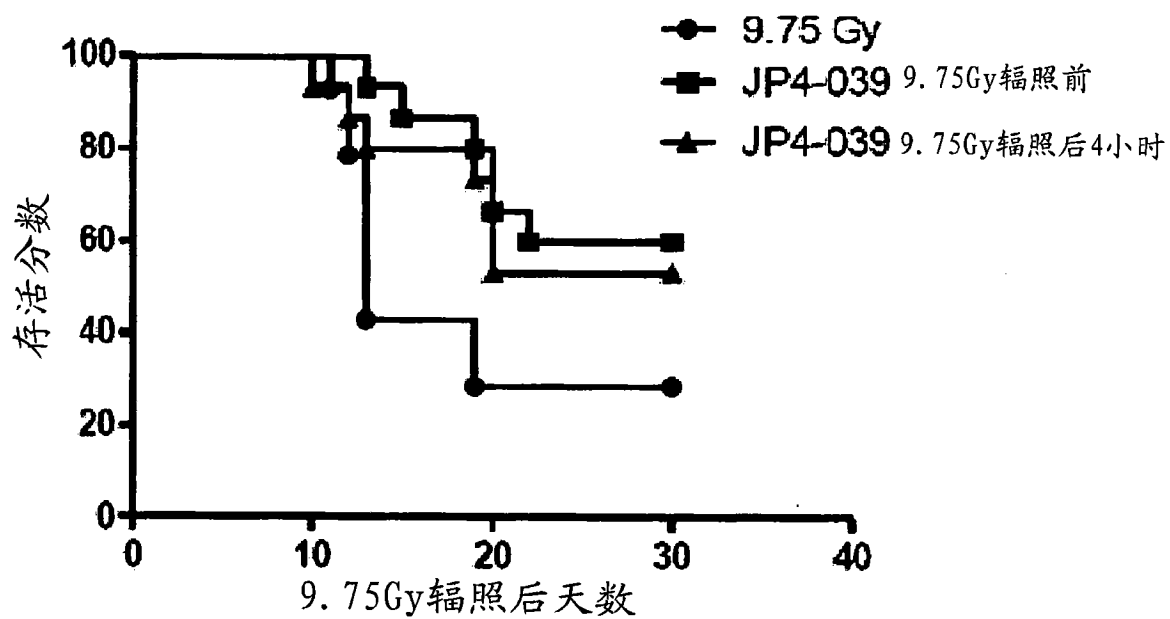


图 17B

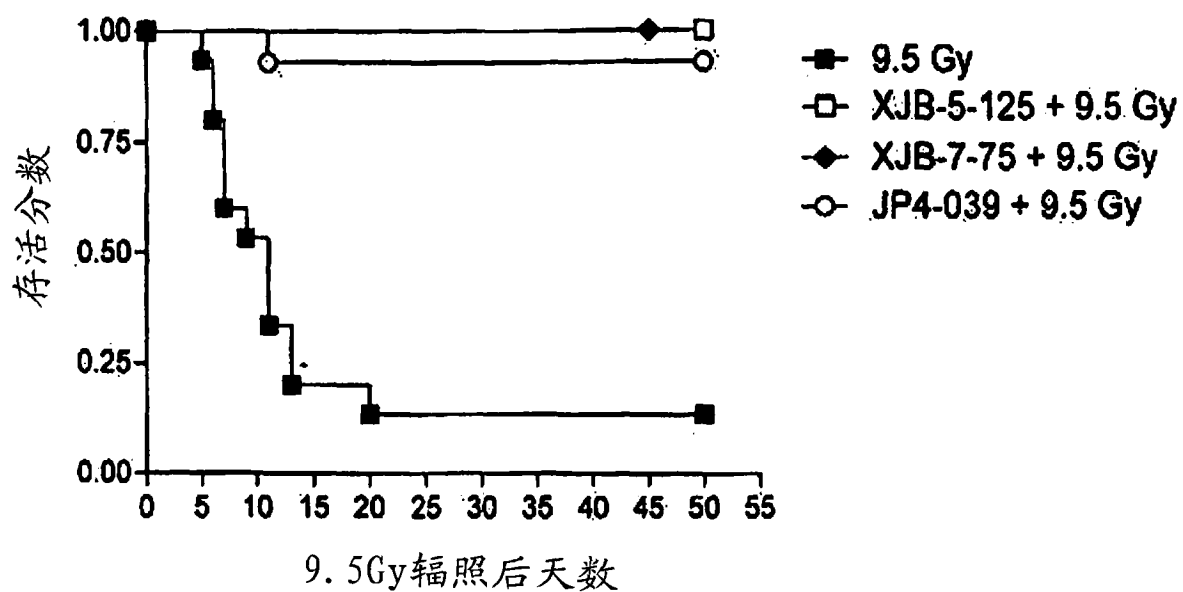


图 18

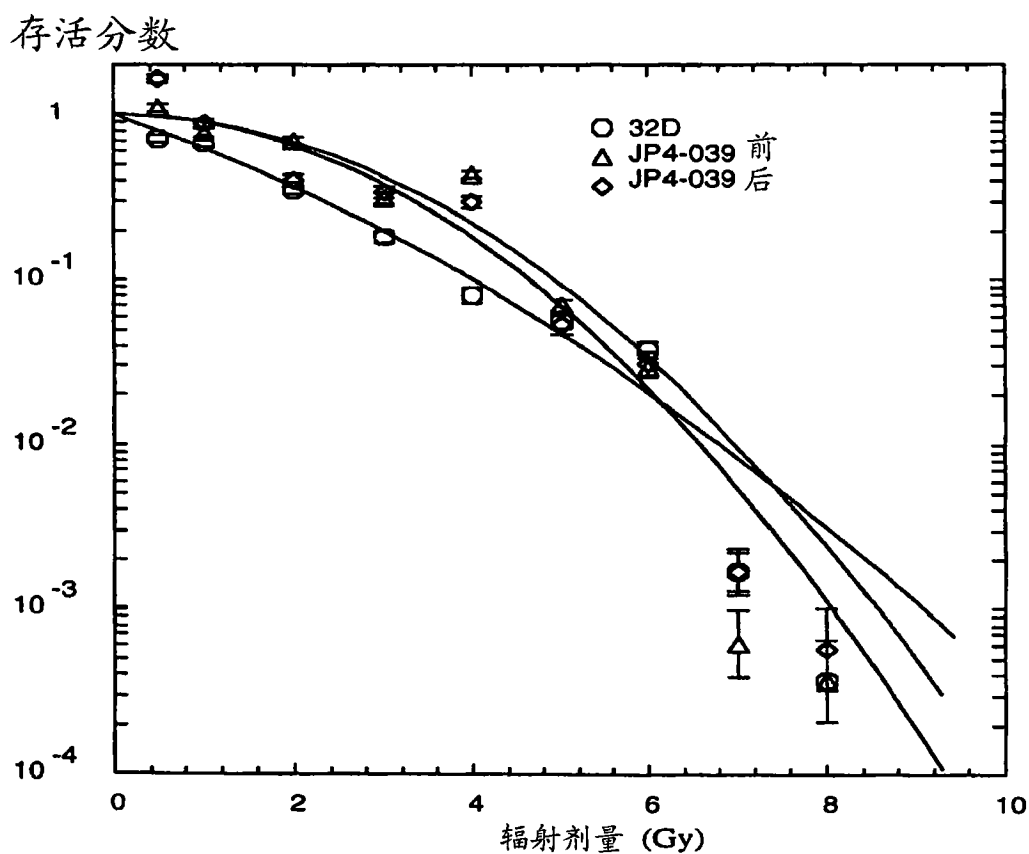


图 19

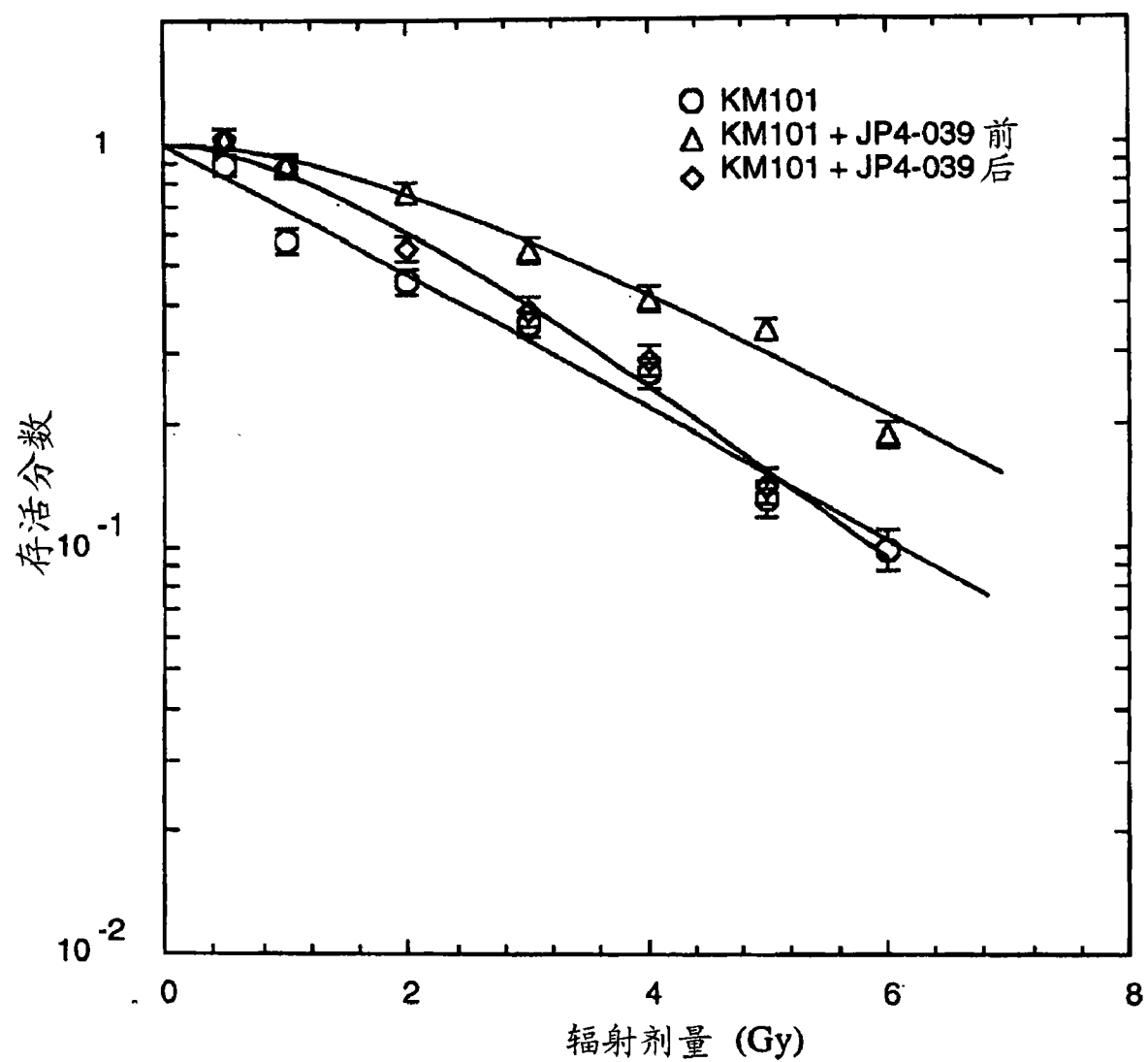


图 20

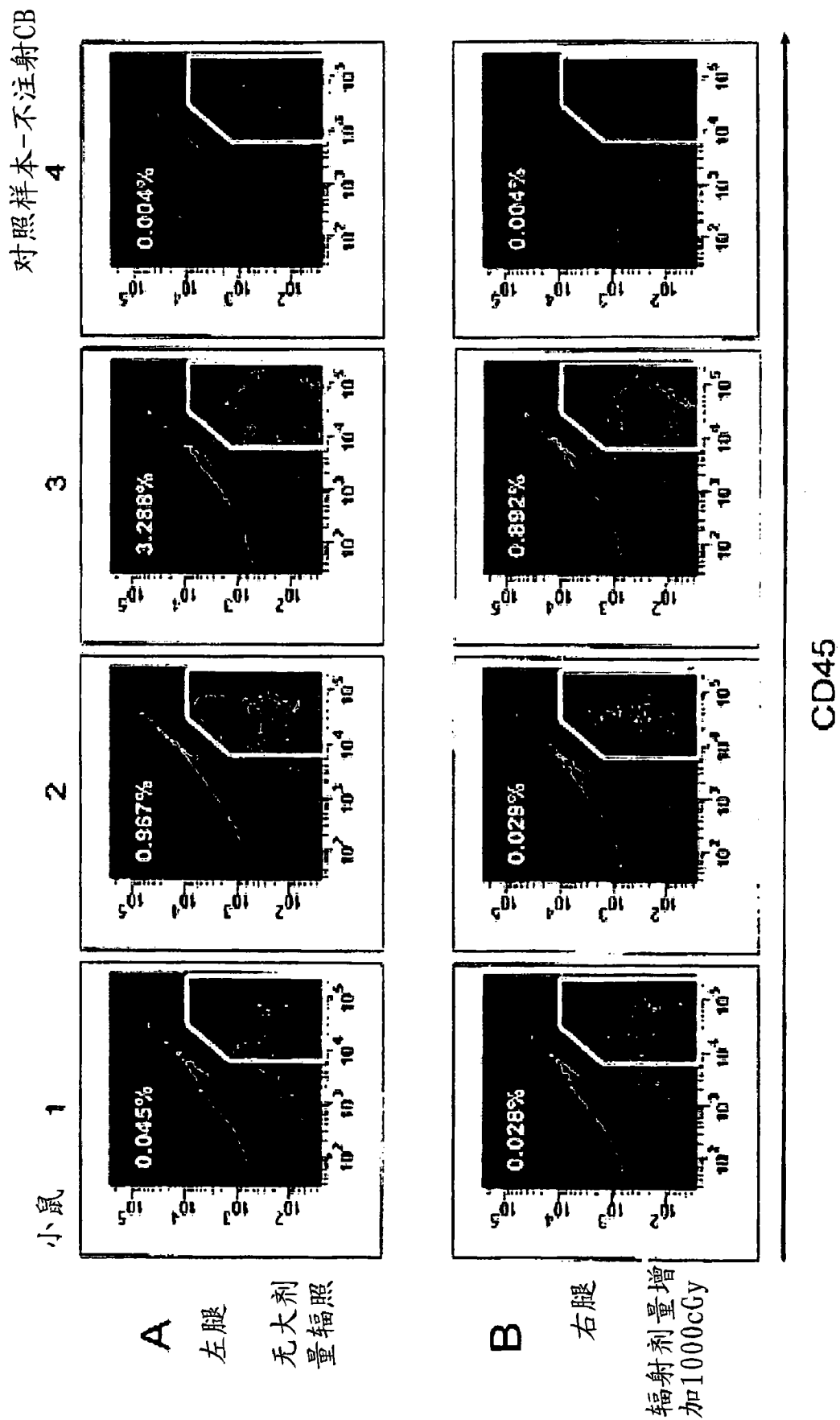


图 21A



图 21B

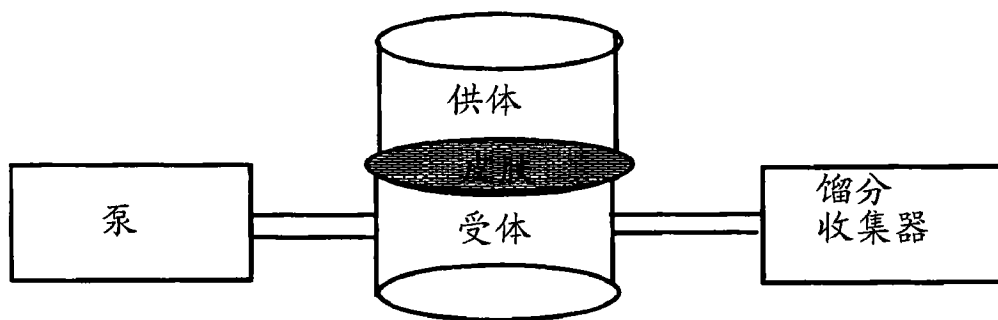


图 22

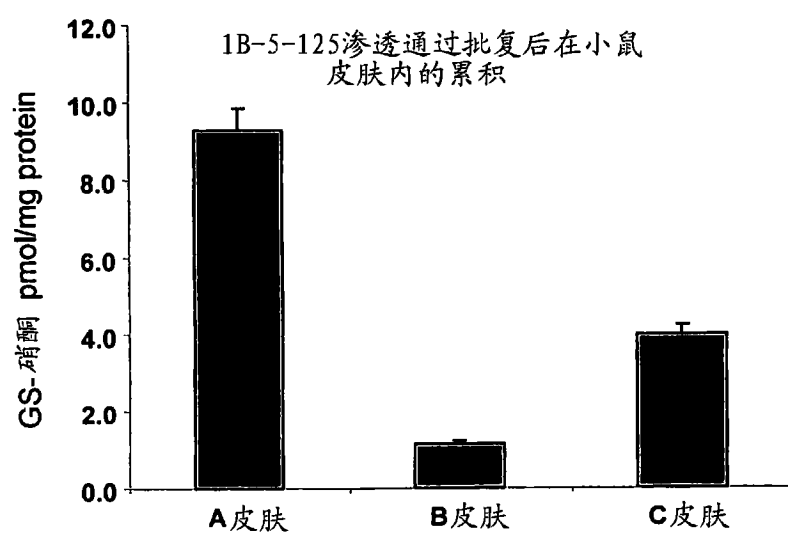


图 23

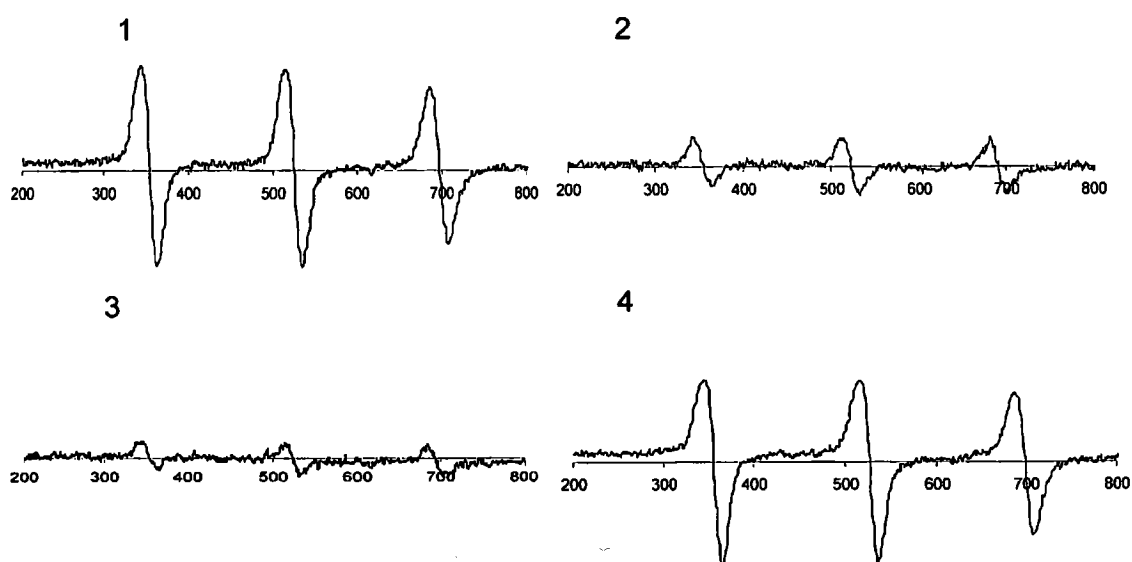


图 24

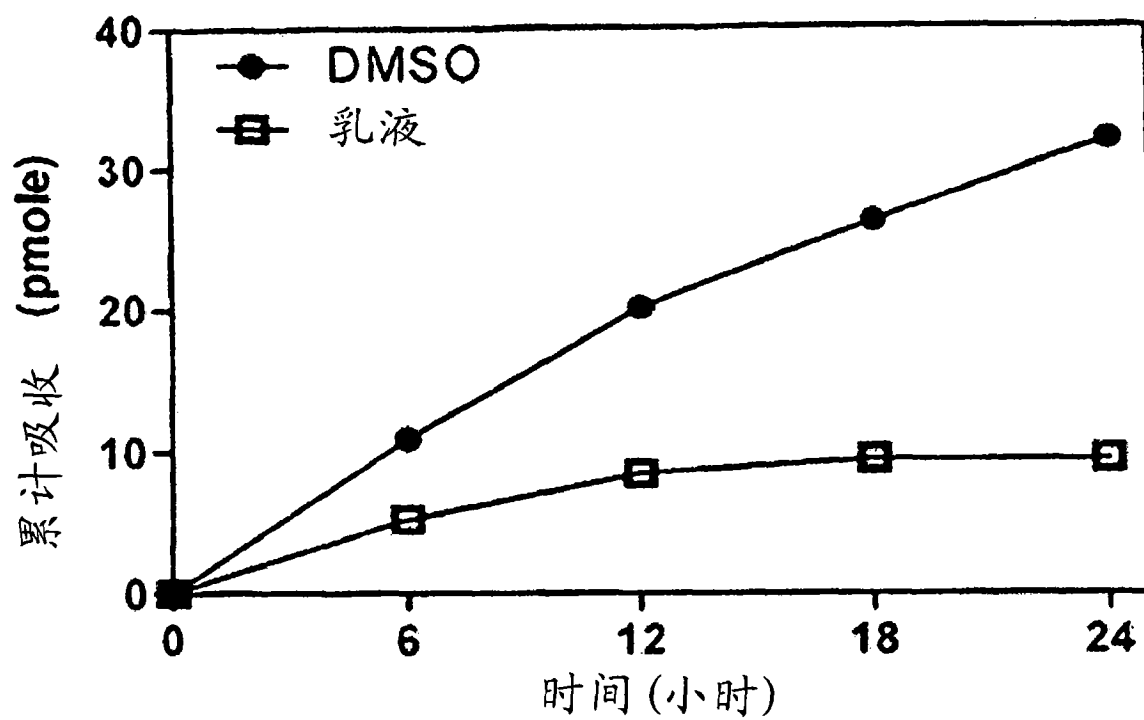


图 25

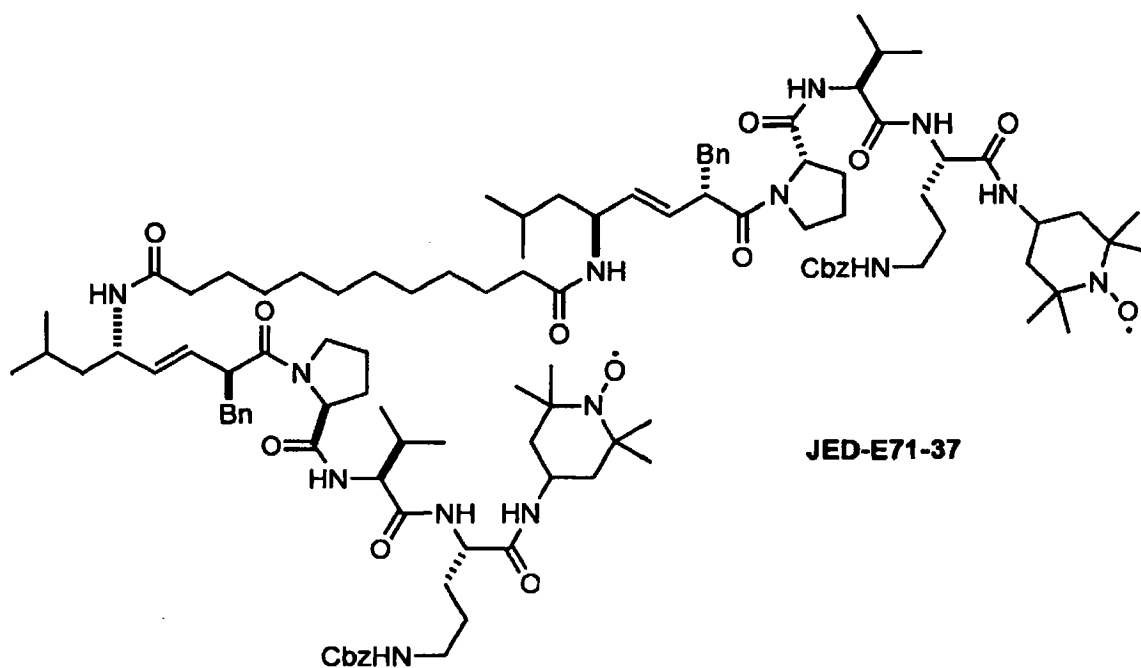


图 26A

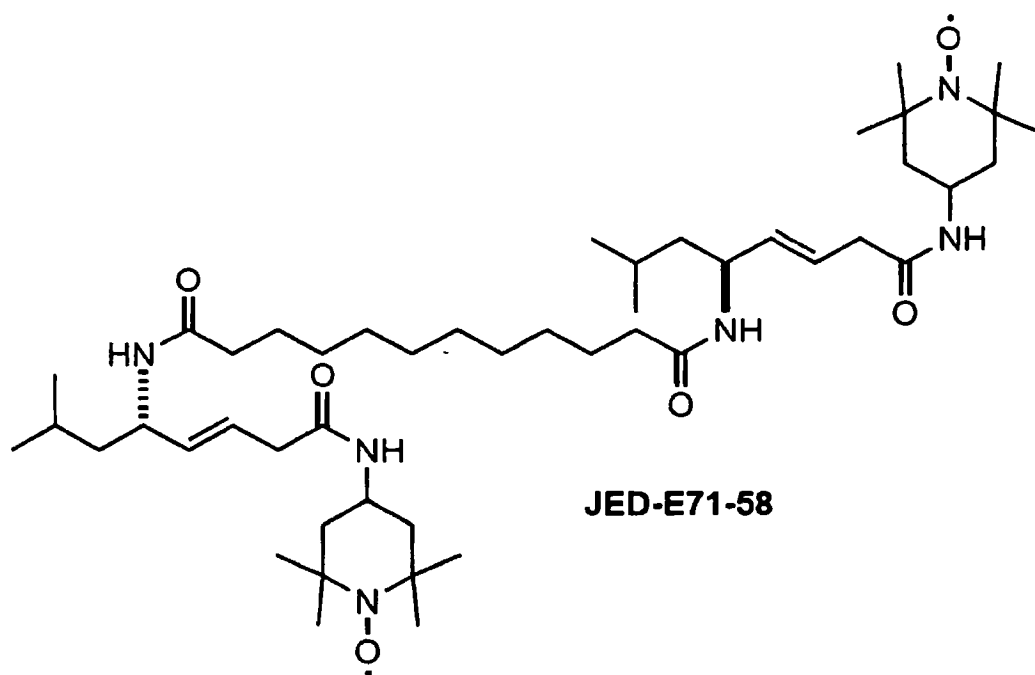


图 26B

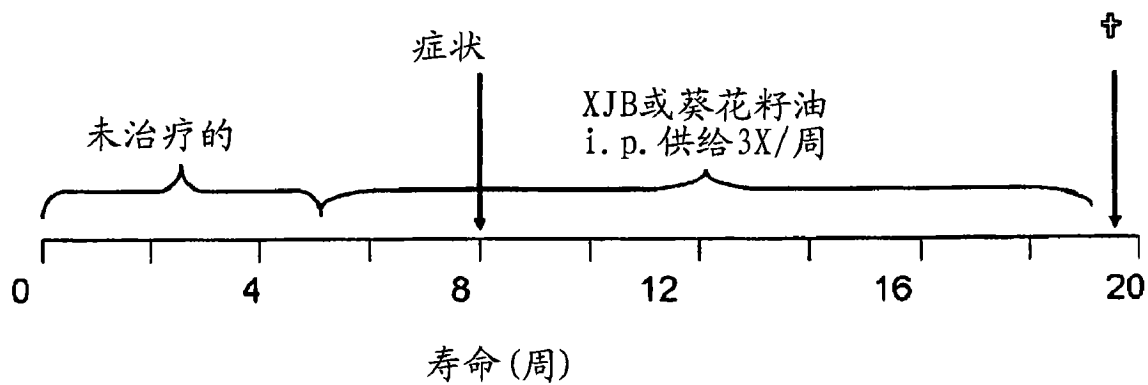


图 27

	XJB	n	油	n
张力障碍	8.7	5	6.8	3
发抖	9.8	5	8.5	3
驼背	12.6	5	10.8	3
共济失调	17.1	5	13.2	3
废物	16.5	5	14.2	3
眼睛	22.0	1	14.3	2
阴茎异常勃起	17.0	1	17.6	2
活性降低	22.4	3	17.0	3
失禁		3	12.4	2
老化评分 (症状出现延迟)	90%	5	10%	3
$p \leq 0.05$				

图 28

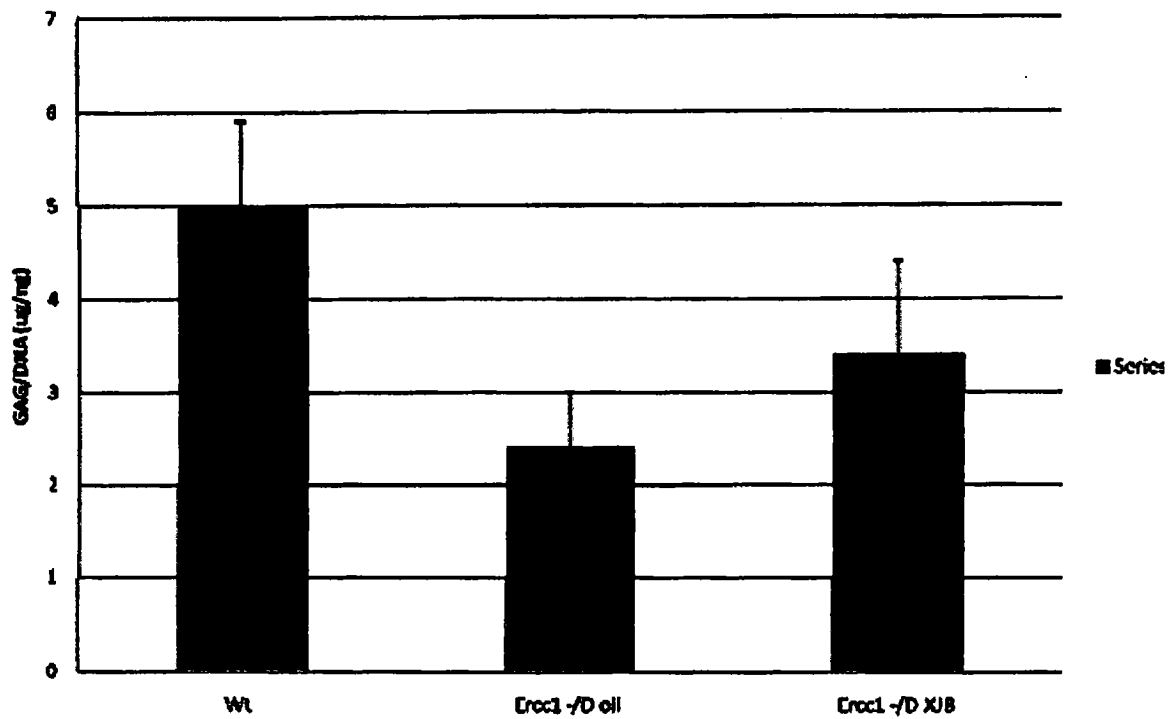


图 29

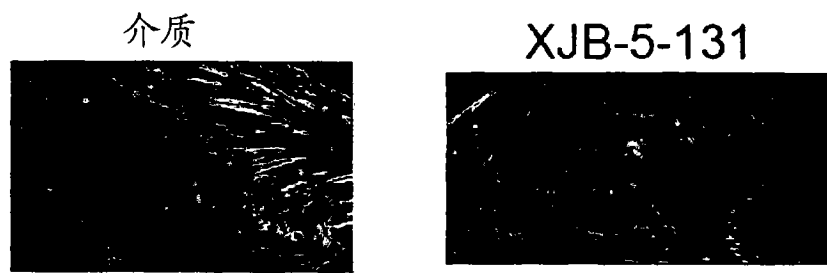


图 30

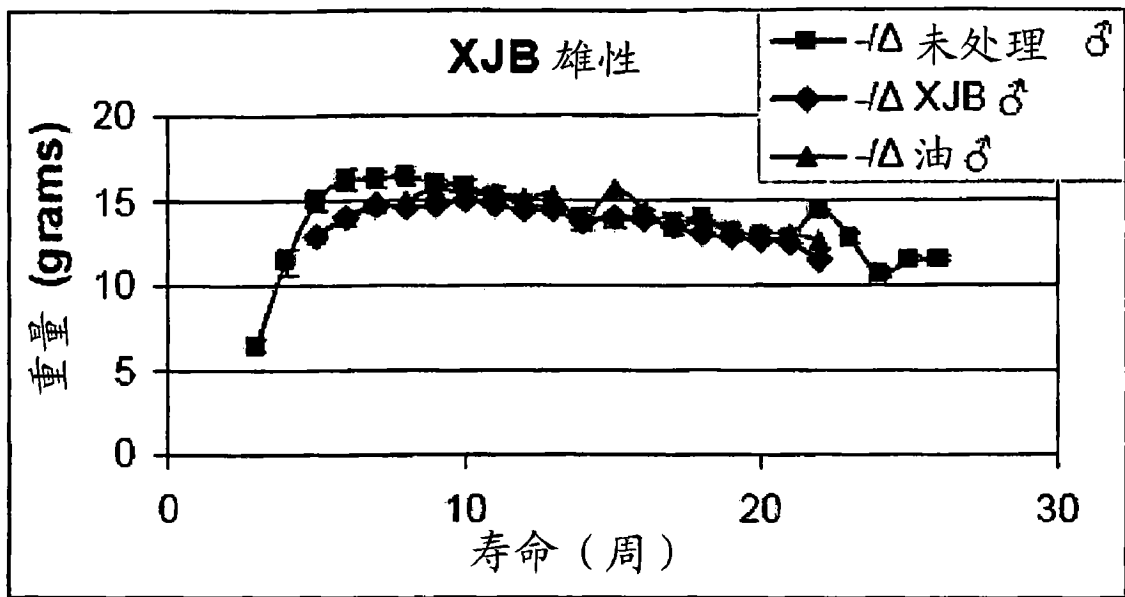


图 31A

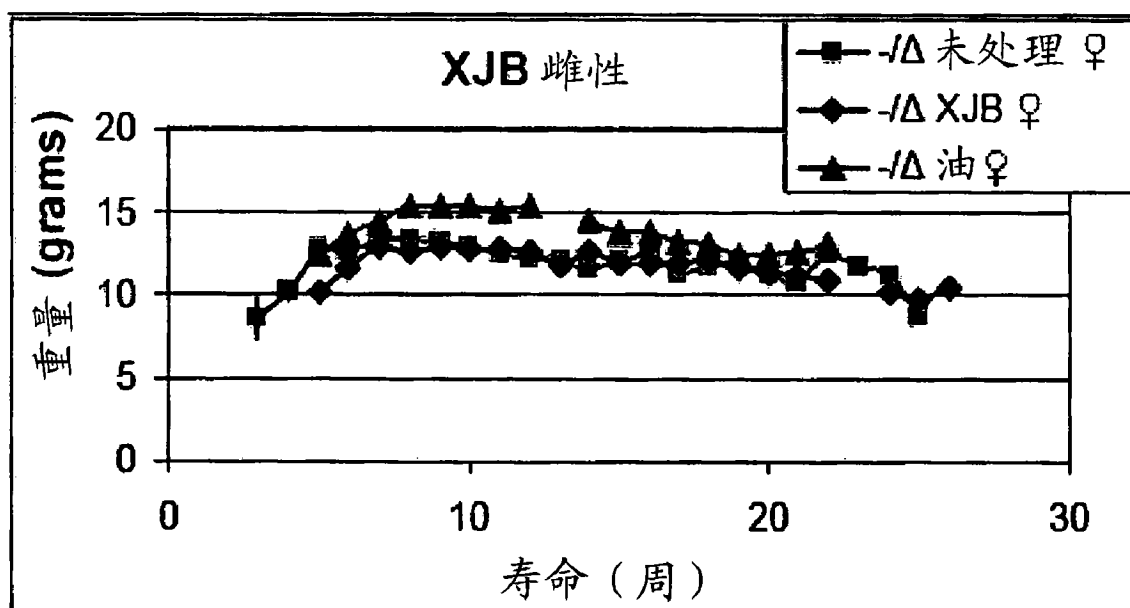


图 31B

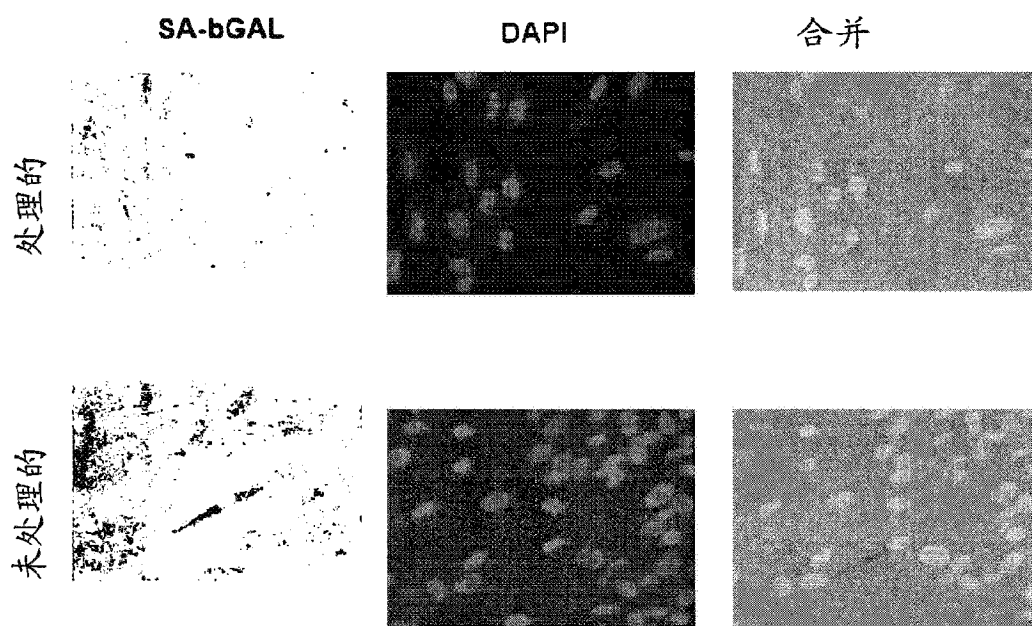


图 32

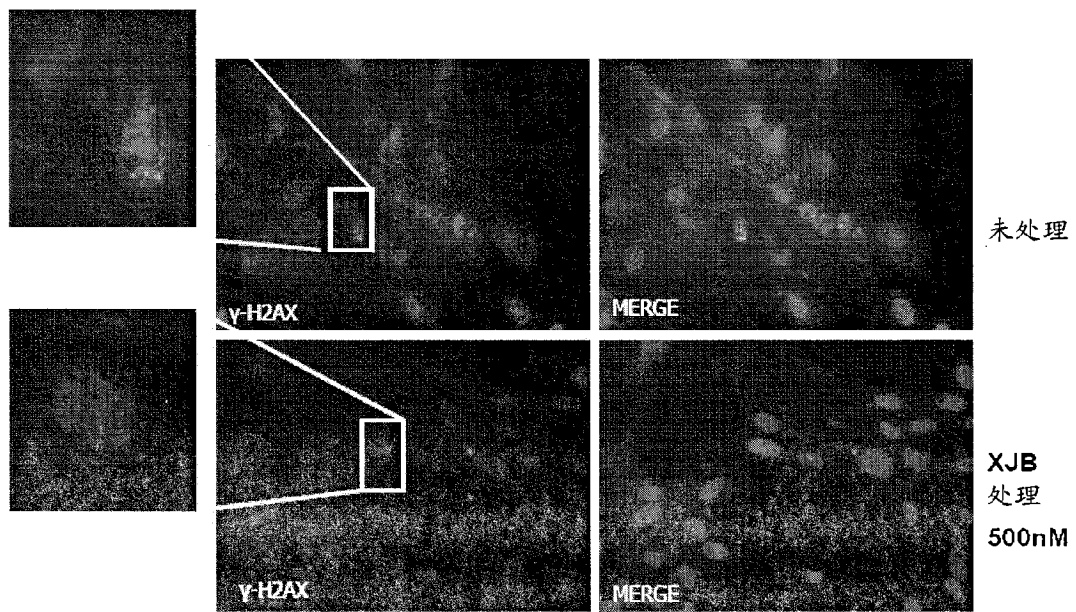


图 33

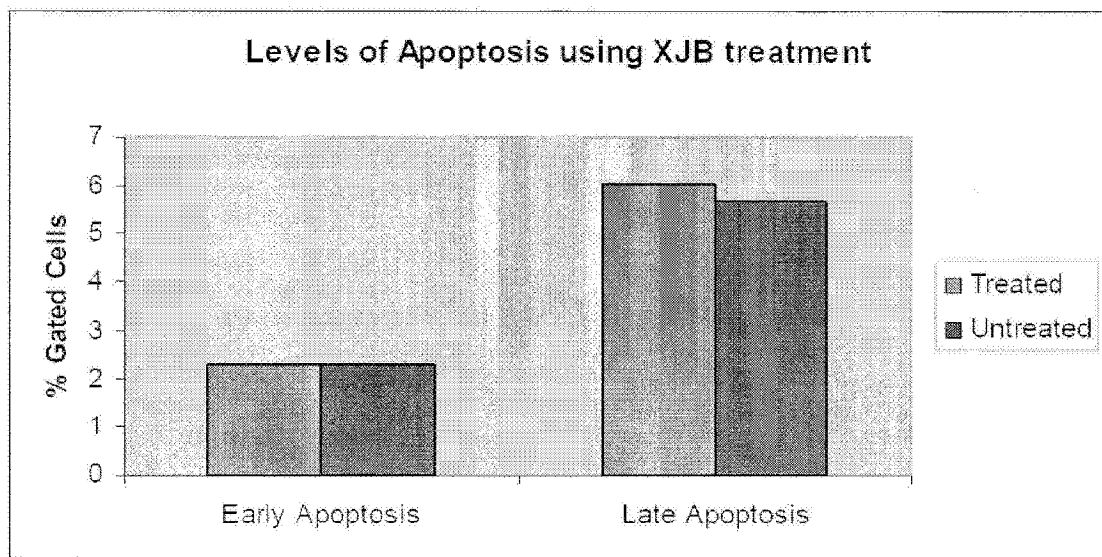


图 34

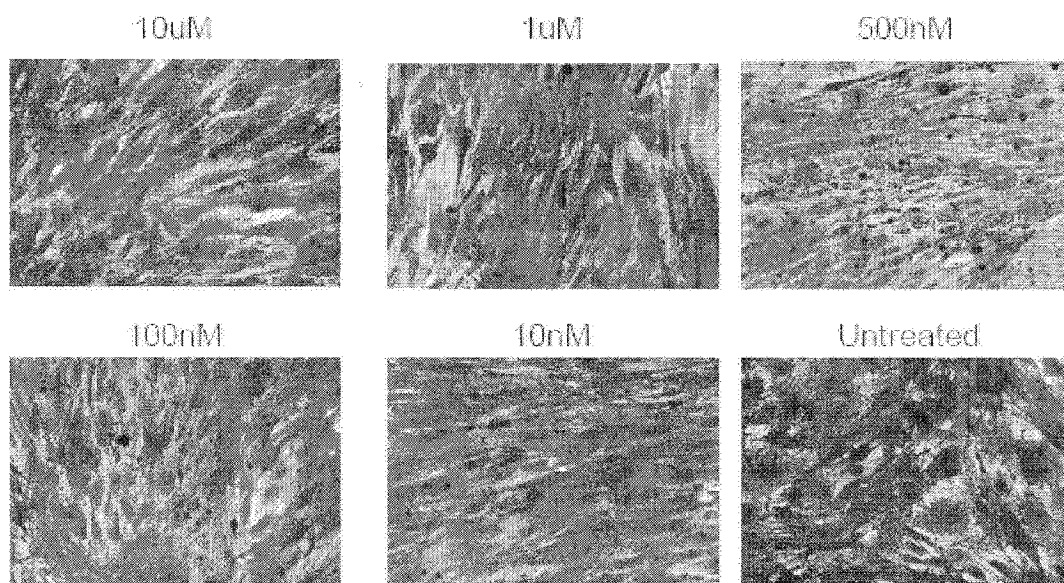


图 35

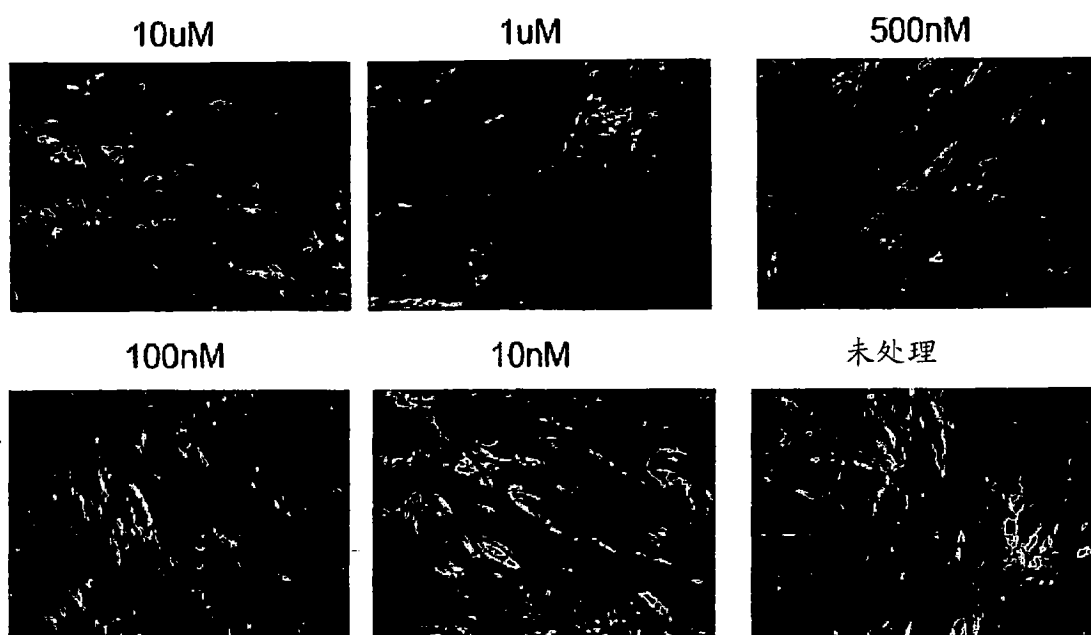


图 36

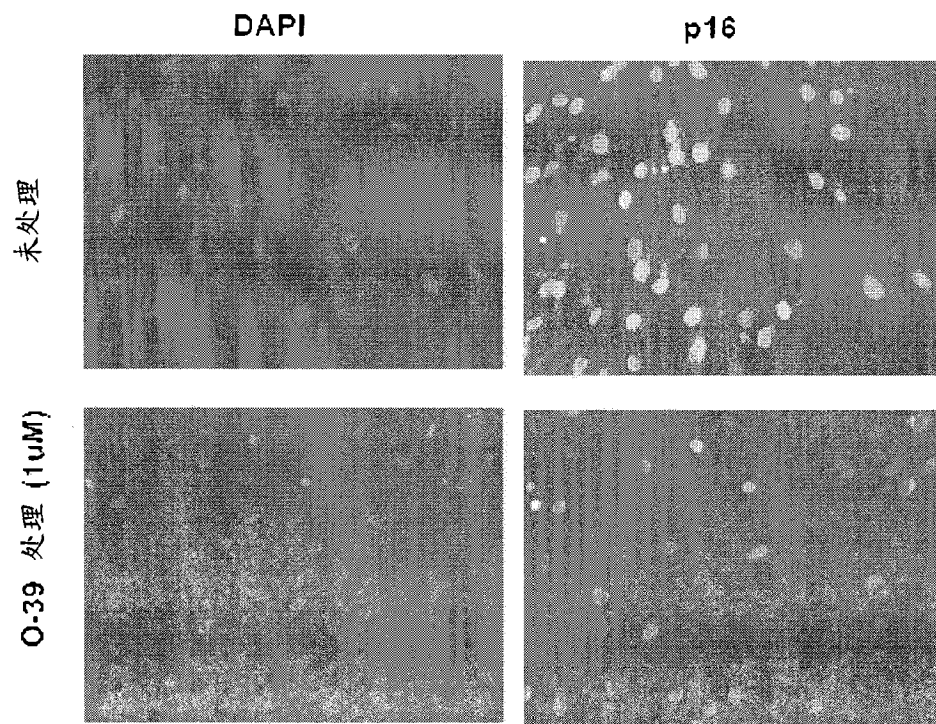


图 37

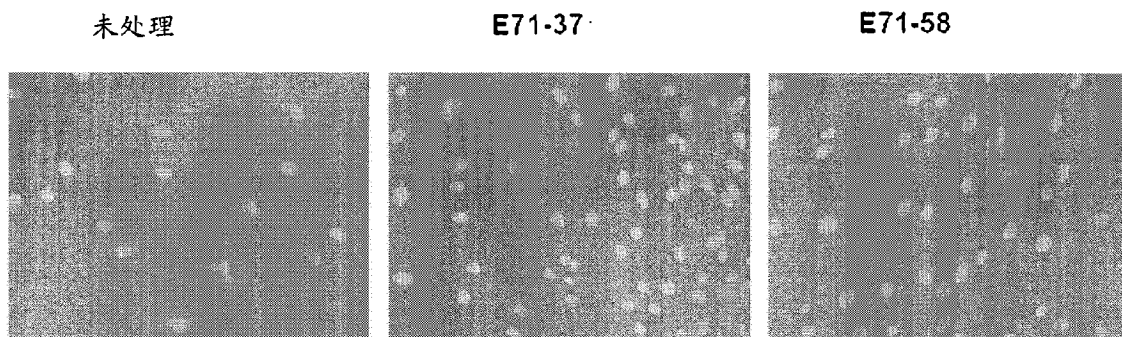


图 38

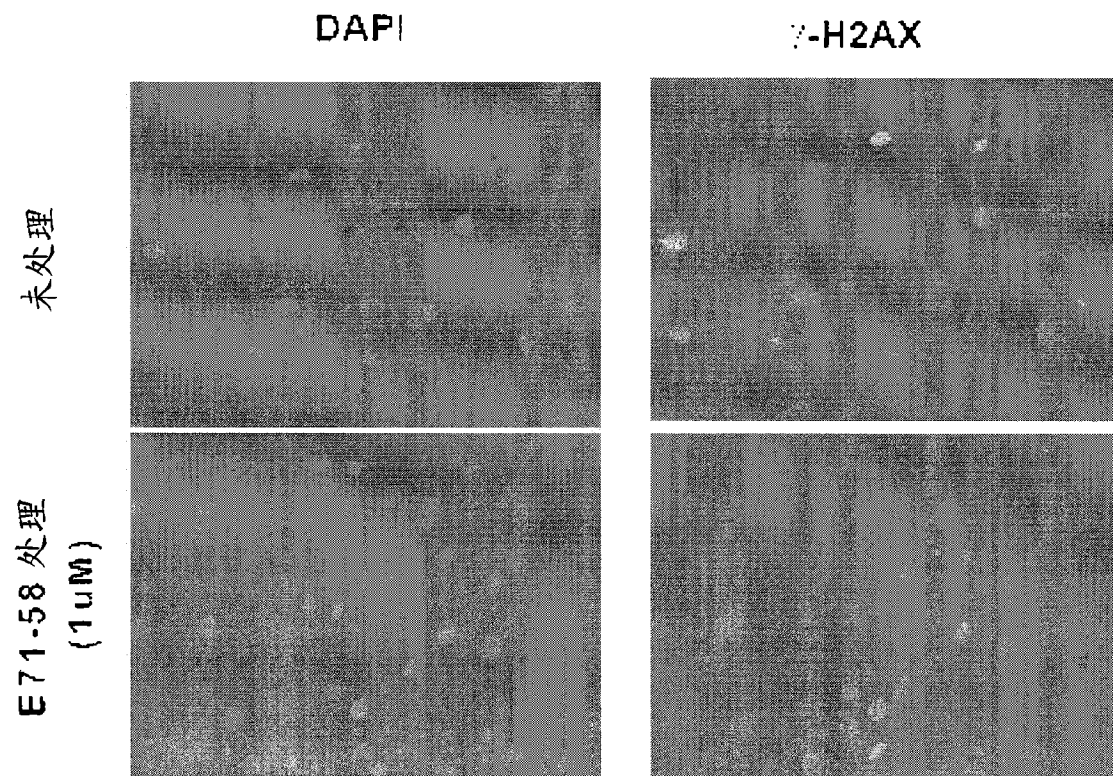


图 39

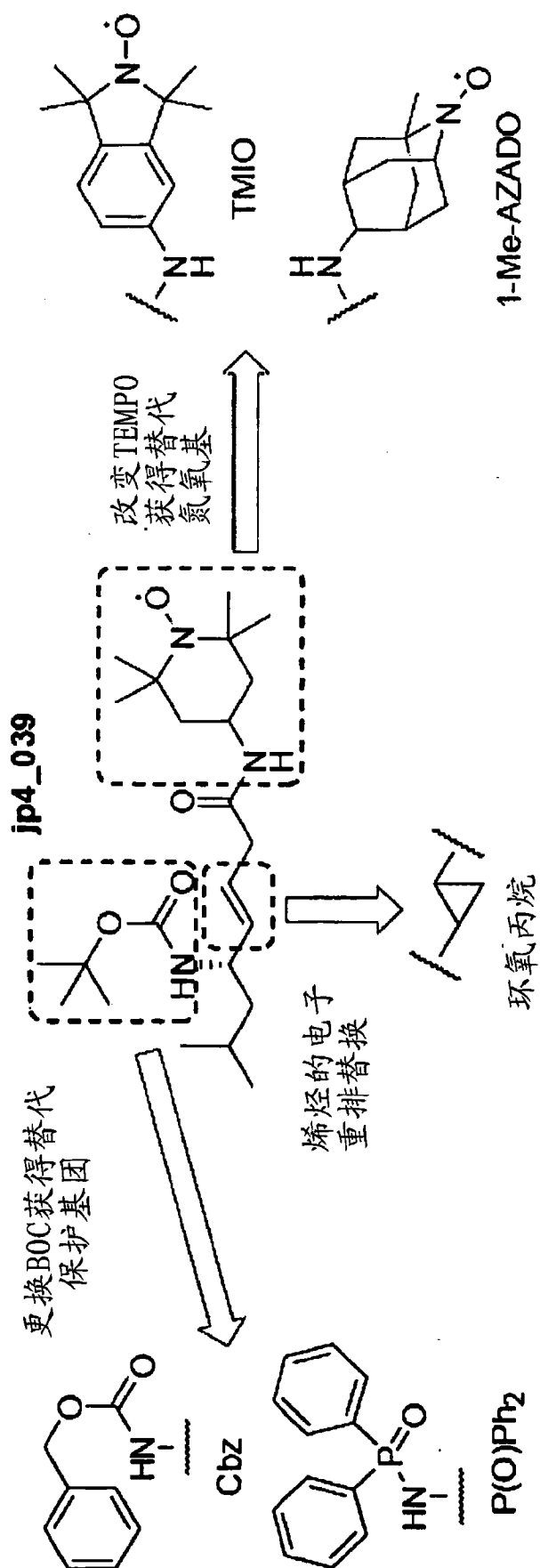


图 40

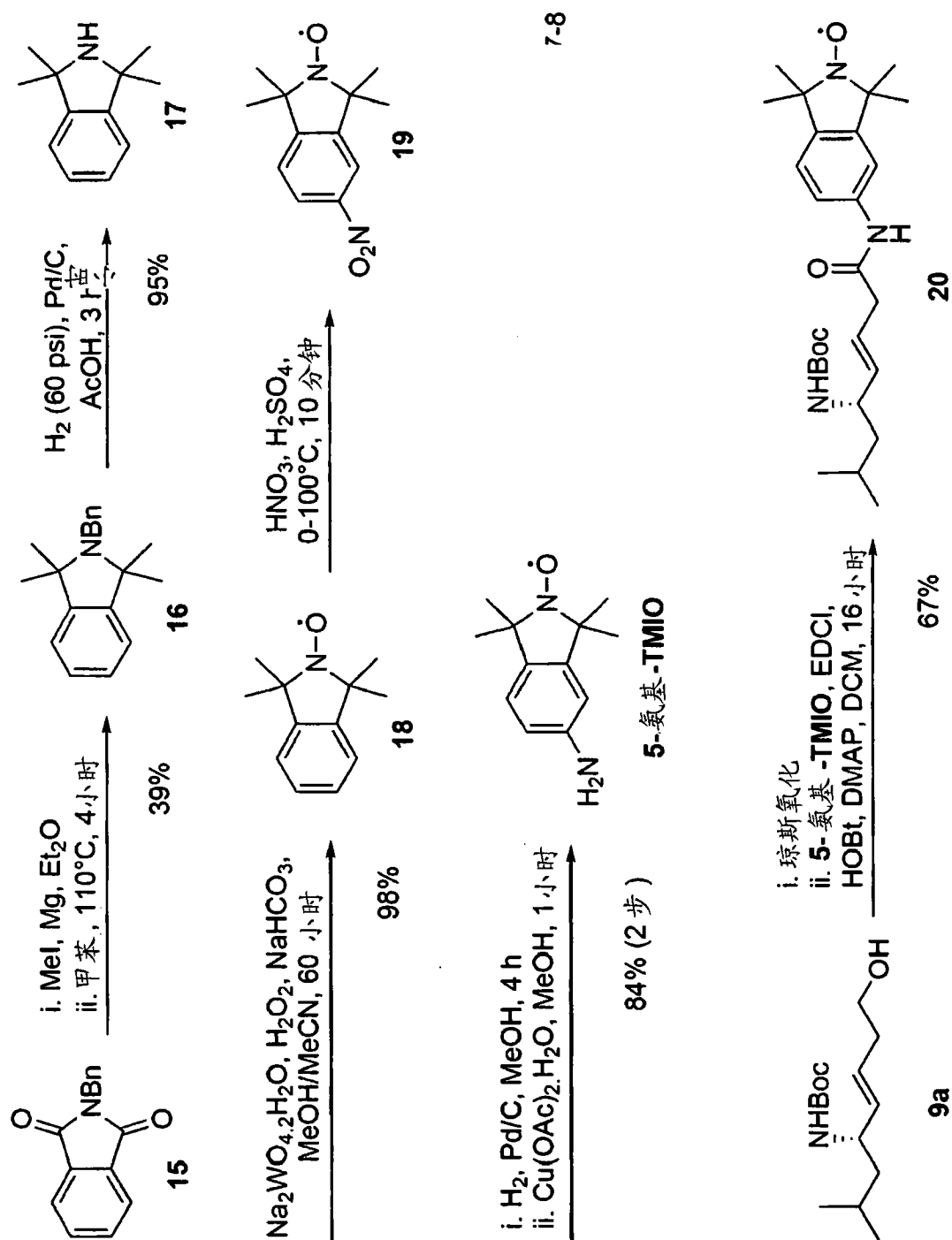


图 42

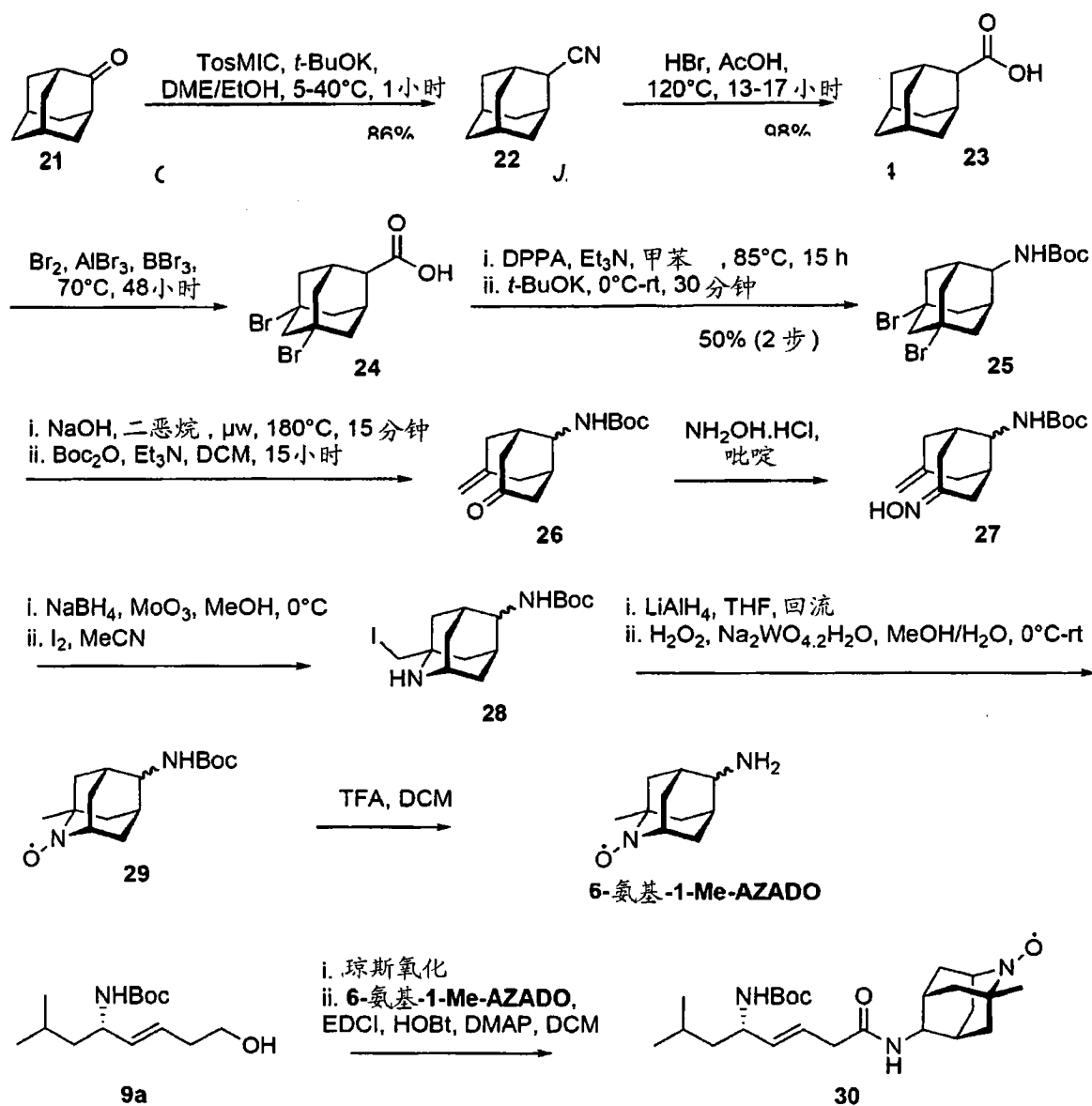


图 43