



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114302881 B

(45) 授权公告日 2025.03.25

(21) 申请号 202080057706.5
 (22) 申请日 2020.08.14
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 114302881 A
 (43) 申请公布日 2022.04.08
 (30) 优先权数据
 19192107.1 2019.08.16 EP
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2022.02.15
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/EP2020/072911 2020.08.14
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02021/032643 EN 2021.02.25
 (73) 专利权人 沃尔克·亚当斯
 地址 德国莱比锡
 专利权人 西格弗里德·拉贝特
 (72) 发明人 沃尔克·亚当斯
 西格弗里德·拉贝特
 (74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
 11247
 专利代理师 杨春刚 黄革生

A61K 31/352 (2006.01)
 A61K 31/381 (2006.01)
 A61K 31/4433 (2006.01)
 A61P 21/00 (2006.01)
 A61P 21/04 (2006.01)
 A61P 33/00 (2006.01)
 A61P 9/04 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01)
 A61P 31/18 (2006.01)
 A61P 11/00 (2006.01)
 A61P 13/12 (2006.01)
 A61P 3/10 (2006.01)
 A61P 17/02 (2006.01)
 A61P 9/00 (2006.01)
 A61P 9/12 (2006.01)
 A61P 39/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 112274183 A, 2021.01.29

秦娇,等.无过渡金属催化的 α -溴代茚酮自由基裂解反应合成(2-氰基苯基)乙酸-2,2,6,6-四甲基哌啶酯.有机化学. .2023,第43卷(第06期),2171-2177. (续)

审查员 夏伯姍

(51) Int. Cl.
 C07D 405/12 (2006.01)
 C07D 407/12 (2006.01)
 C07D 409/12 (2006.01)
 C07D 311/16 (2006.01)

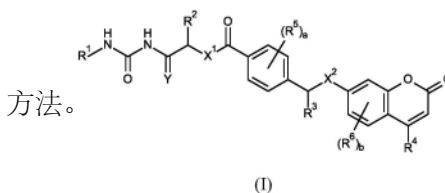
权利要求书4页 说明书47页
 序列表2页 附图35页

(54) 发明名称
 适用于治疗和预防肌肉萎缩和其他状况的化合物

(57) 摘要

本发明涉及通式I化合物及其药学上可接受的盐;其中变量如权利要求和说明书中所定义的。本发明还涉及用于治疗或预防肌肉萎缩状况、骨骼肌或心脏肌肉萎缩、特别是与肌肉环指1 (MuRF1) 表达增加相关的肌病,以及其他状况;涉

及用作药物的式I化合物;涉及包含至少一种式I化合物的药物组合物,以及用于治疗所述状况的



CN 114302881 B

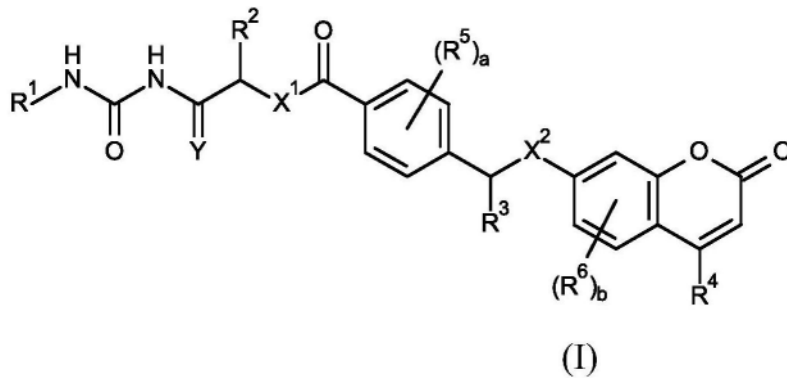
[接上页]

(56) 对比文件

Fernando Ribeiro, 等. Small-Molecule
Inhibition of MuRF1 Prevents Early

Disease-Induced Diaphragmatic Dysfunction
and Atrophy. *Int J Mol Sci* . .2023, 第24卷
(第04期), 3637.

1. 通式I化合物



其中

R^1 是氢或基团 $-CH_2R^{1a}$,其中 R^{1a} 选自氢和含有作为环成员的选自N、O和S的1个杂原子的未取代的5至6元单环杂芳环;

R^2 选自氢和甲基;

R^3 是氢;

R^4 是甲基;

X^1 是NH或O;

X^2 是O;

Y表示氧原子或两个氢原子;

a是0;且

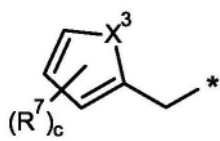
b是0;

及其药学上可接受的盐。

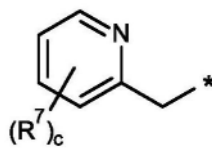
2. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R^1 是基团 $-CH_2R^{1a}$,其中 R^{1a} 是含有作为环成员的选自N、O和S的1个杂原子的未取代5至6元单环杂芳环;

及其药学上可接受的盐。

3. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R^1 选自基团 CH_2-I' 或 CH_2-II'



(CH₂-I')



(CH₂-II')

其中*表示与脲氮原子的连接点;

X^3 是O或S;且

c是0;

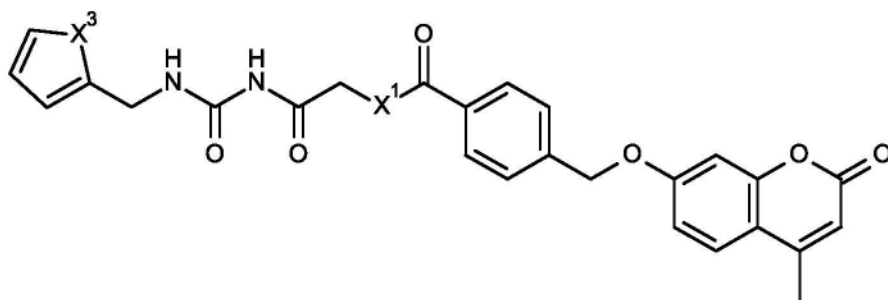
及其药学上可接受的盐。

4. 根据权利要求3所述的化合物,其中

R^2 是氢;

及其药学上可接受的盐。

5. 根据权利要求1-4中任何一项所定义的式I化合物,其相应于式I-A,



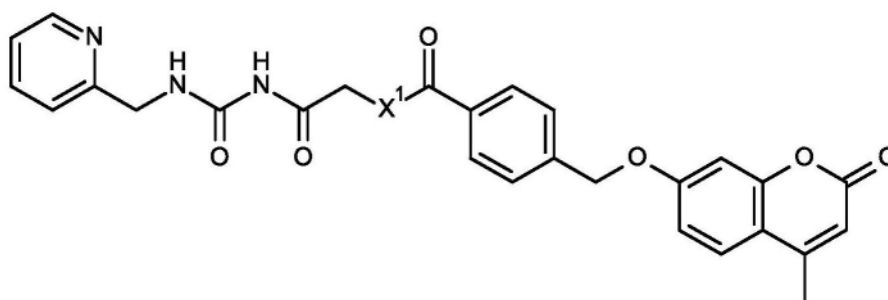
(I-A)

其中

X³是O或S;

及其药学上可接受的盐,

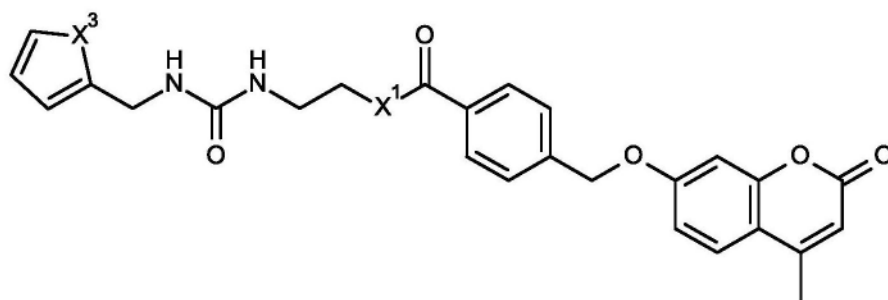
或者相应于式I-B,



(I-B)

及其药学上可接受的盐,

或者相应于式I-C,



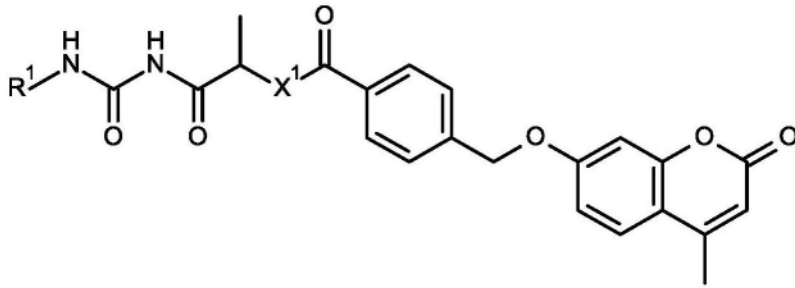
(I-C)

其中

X³是O或S;

及其药学上可接受的盐,

或者相应于式I-D,



(I-D)

其中

R¹是氢或甲基；

及其药学上可接受的盐。

6. 化合物4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸[2-(2-咪喃基甲基氨基甲酰基氨基)-2-氧代-乙基]酯,及其药学上可接受的盐。

7. 化合物4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]-N-[2-(2-噻吩基甲基氨基甲酰基氨基)乙基]苯甲酰胺,及其药学上可接受的盐。

8. 化合物4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸[2-氧代-2-(2-吡啶基甲基氨基甲酰基氨基)乙基]酯,及其药学上可接受的盐。

9. 根据权利要求1定义的式I化合物,其选自N-[2-(2-咪喃基甲基氨基甲酰基氨基)-2-氧代-乙基]-4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酰胺、4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]-苯甲酸[2-氧代-2-(2-噻吩基甲基氨基甲酰基氨基)乙基]酯和4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]-N-[2-氧代-2-(2-噻吩基甲基氨基甲酰基氨基)乙基]-苯甲酰胺,及其药学上可接受的盐。

10. 根据权利要求1定义的式I化合物,其选自4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸(1-甲基-2-氧代-2-脲基-乙基)酯和4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸[1-甲基-2-(甲基氨基甲酰基氨基)-2-氧代-乙基]酯,及其药学上可接受的盐。

11. 药物组合物,其包含至少一种权利要求1-10中任何一项所定义的通式I化合物或其至少一种药学上可接受的盐,以及至少一种药学上可接受的载体。

12. 权利要求1-10中任何一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗或预防肌肉萎缩状况的药物中的用途。

13. 权利要求1-10中任何一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗或预防由下述疾病或状况之一引起的骨骼或心脏肌肉萎缩的药物中的用途:充血性心力衰竭、慢性心力衰竭、癌症、用肌毒性和/或心脏毒性物质的癌症治疗、先天性肌病、AIDS、慢性阻塞性肺病、慢性肾脏疾病、肾衰竭、糖尿病、严重烧伤、衰老期间肌肉减少症、血液供应减少、暂时或长期固定、长期机械通气、去神经支配、长期失重和营养不良。

14. 权利要求1-10中任何一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗或预防与肌肉环指1表达增加相关的状况的药物中的用途。

15. 权利要求14所述的用途,其中肌肉环指1表达增加相关的状况是与肌肉环指1表达增加有关的肌病。

16. 权利要求15所述的用途,其中所述肌病选自危重病肌病、线状体肌病、炎症性肌病、

糖尿病引起的肌病、肺动脉高压引起的肌病、慢性心力衰竭引起的肌病、肾衰竭引起的肌病和肿瘤恶病质引起的肌病。

17. 权利要求1-10中任何一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗或预防与收缩或舒张功能障碍相关的心脏疾病的药物中的用途。

18. 权利要求1-10中任何一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗或预防糖尿病的药物中的用途。

19. 权利要求1-10中任何一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途,其中所述药物用于治疗或预防

-由射血分数降低的心力衰竭、射血分数保持的心力衰竭、高血压或肿瘤恶病质引起或与之相关的骨骼肌或心肌萎缩;

-阿霉素引起的肌肉萎缩和/或心脏毒性;

-衰老引起的肌肉减少症和/或心肌病;

-慢性肾病引起的肌肉萎缩;

-机械通气或充血性心力衰竭导致的膈肌无力;

-先天性肌病;

-糖尿病引起的肌肉萎缩;和/或

-糖尿病。

20. 权利要求19所述的用途,其中先天性肌病是同源肌肉萎缩。

适用于治疗和预防肌肉萎缩和其他状况的化合物

[0001] 发明背景

[0002] 本发明涉及新的取代的4-[2-氧代-色烯-7-基]杂甲基]苯甲酸化合物,特别是如本文所述的通式I化合物。所述化合物具有重要的治疗性质,并且适于治疗和预防肌肉萎缩状况(muscle wasting conditions),以及治疗或预防肌病,尤其是与肌肉环指1(Muscle RING Finger 1(MuRF1))表达增加相关的肌病。

[0003] 肌肉萎缩和肌无力是在各种临床状况包括心因性恶病质、心肌梗死、高血压、癌症、用某些药物的癌症治疗、糖尿病、肾脏疾病和肾衰竭、遗传性肌肉萎缩和严重感染下观察到的一种衰弱性并发症,但也可以是在与特定疾病无关的一些身体状况例如固定(immobilization)、长期机械通气、长期失重或年老下观察到的一种衰弱性并发症。肌肉萎缩的特征是肌肉量的减少,这发生在四肢和呼吸肌。肌肉萎缩通常会导致症状和预后恶化,并延长恢复期。

[0004] 肌肉萎缩的潜在机制尚不完全清楚。众所周知,肌肉萎缩包括所谓的Atrogins的激活,Atrogins通过自噬体和泛素-蛋白酶体系统(UPS)促进肌肉蛋白的降解。

[0005] 不幸的是,只有少数可靠的已知策略例如运动训练阻止上述临床状况引起的肌肉蛋白损失。所述已知的策略通常旨在下调或灭活Atrogins的表达和/或抑制其泛素化活性。

[0006] 例如,W02015/010107 A1描述小分子通过抑制炎症细胞因子诱导(IL-6诱导)的信号转导子和转录激活子3(Stat 3)的酪氨酸磷酸化,减少肌肉无力和/或肌肉萎缩和/或恶病质的用途。Stat 3磷酸化的抑制阻止肌生长抑制素(myostatin)表达的增加,已知肌生长抑制素通过上调特异性Atrogins的表达来阻止肌肉生长。

[0007] 阻止肌肉蛋白损失的另一个有希望的策略是抑制肌肉环指1(MuRF1)的功能。MuRF1是一种肌肉-特异性泛素E3连接酶,认为其是将多泛素化肌肉蛋白转移到泛素蛋白酶体系统进行降解的关键步骤。在许多临床情况下,它的表达与肌肉萎缩密切相关,而它的基因失活赋予对肌肉萎缩状况的部分抵抗力。过去15年的大量研究表明:许多肌肉相关疾病,即肌病例如危重病肌病(critical illness myopathy)、线状体肌病(nemaline myopathy)、慢性炎症性肌病、糖尿病或肺动脉高压致的肌病(其导致肌无力),可能与MuRF1表达上调有关。

[0008] Hooijman等人,Am.J.Respir.Crit.Care.Med.,2015,191(10),1126-1138描述MuRF1表达与膈膜肌纤维力损失和肌肉蛋白降解之间的联系,这通常是在接受机械通气的危重病患者(危重病肌病)中观察到的。他们观察到,在接受机械通气的MuRF1-KO小鼠中所述肌纤维力损失减弱,从而揭示了危重病肌病与MuRF1表达之间的联系。

[0009] Li和Granzier,Hum.Mol.Genet.,2015年9月15日,24(18),5219-5233描述一种线状体肌病的小鼠模型,其中富含糖酵解纤维的肌肉上调包括MuRF-1的蛋白质水解通路,并经历营养不良,导致横截面积(CSA)变小,从而加剧其力量不足。因此,预测MuRF1抑制可保护线状体肌病中的肌纤维CSA和肌纤维力,特别是富含糖酵解纤维的肌肉类型,例如股四头肌。

[0010] Adams等人,J.Mol.Biol.,2008,384,48-59描述在C57B16小鼠中腹腔注射肿瘤坏

死因子- α (TNF- α) 可将比目鱼肌在150Hz下的力量形成降低25%。在MuRF-1敲除的动物中, TNF- α 诱导的肌力损失减弱。因此, 预测MuRF1抑制对TNF- α 水平升高的慢性炎症状态是有用的。

[0011] De Man等人, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 2011年5月15日, 183(10), 1411-1418 描述肺动脉高压 (PH) 大鼠膈肌纤维CSA明显小于对照组。与大鼠数据一致, 对PH患者的研究显示, 与对照个体相比, CSA显著降低, 并且膈肌纤维的收缩能力受损。他们进一步发现, 隔膜纤维CSA的减少与E3-连接酶MAFbx和MuRF-1的表达增加有关。

[0012] 迄今为止, 针对抑制MuRF1功能的治疗方法数量有限。

[0013] 例如, Castillero等人, *Metabolism*, 2013, 62, 1495-1502描述Atrogin-1和MuRF1的腺病毒敲除, 其可以防止培养的L6肌管的地塞米松诱导的萎缩。

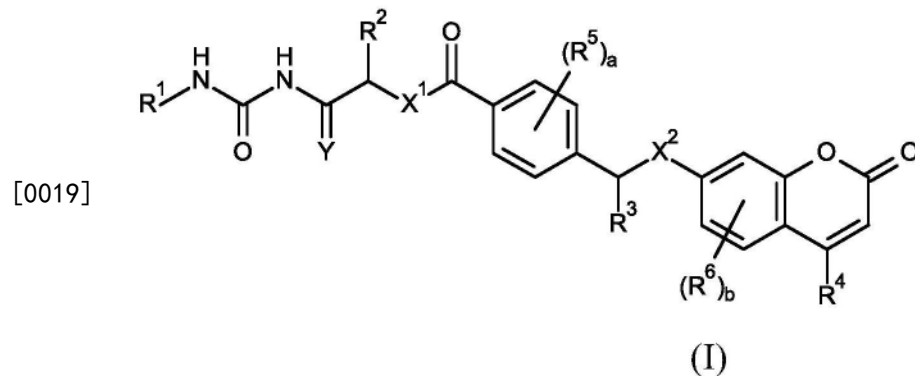
[0014] Eddins等人, *Cell Biochem. Biophys.*, 2011, 60, 113-118描述肌肉特异性小分子对MuRF1泛素化的靶向抑制, 其可显著减少细胞萎缩模型中的肌肉萎缩。

[0015] 尽管所述治疗研究表明: 小分子抑制MuRF1功能可以防止肌管萎缩, 但这种方法尚未转化至体内环境, 例如在临床相关的动物模型中。因此, 在本领域中, 仍然存在实际未满足的需求, 即提供用于治疗 and/或预防肌肉萎缩状况的化合物和方法。

[0016] 发明简述

[0017] 本发明的目的是提供进一步的小分子, 其适合用于治疗 and/或预防肌肉萎缩状况或可通过改善肌肉状况来减轻的状况。

[0018] 所述目的和其他目的通过下述通式I化合物及其药学上可接受的盐实现:



[0020] 其中

[0021] R^1 是氢或基团- CH_2R^{1a} , 其中 R^{1a} 选自氢、 C_1 - C_3 -烷基、苯基, 其中苯基是未取代的或者可携带独立选自卤素、氰基、 C_1 - C_3 -烷基、 C_1 - C_3 -卤代烷基和 C_1 - C_3 -烷氧基的1、2或3个基团; 以及含有作为环成员的独立选自N、 NR^c 、O和S的1~4个杂原子或杂基的5-至10-元杂芳环, 其中5-至10-元杂芳环是未取代的或可携带1、2或3个 R^7 基团;

[0022] R^2 是氢、甲基或氟化的甲基;

[0023] R^3 是氢、甲基或氟化的甲基;

[0024] R^4 是氢或 C_1 - C_4 -烷基;

[0025] R^5 各自独立选自卤素、氰基、 C_1 - C_3 -烷基、 C_1 - C_3 -氯代烷基、 C_1 - C_3 -烷氧基和 C_1 - C_3 -卤代烷氧基;

[0026] R^6 各自独立选自卤素、氰基、 C_1 - C_3 -烷基、 C_1 - C_3 -氯代烷基、 C_1 - C_3 -烷氧基和 C_1 - C_3 -卤代烷氧基;

[0027] R^7 各自独立选自卤素、氰基、 C_1-C_3 -烷基、 C_1-C_3 -氯代烷基、 C_1-C_3 -烷氧基和 C_1-C_3 -卤代烷氧基；

[0028] X^1 是 NR^a 或O；

[0029] X^2 是 NR^b 、O或S；

[0030] Y表示氧原子(从而 $C=Y$ 是 $C=O$)或两个氢原子(从而 $C=Y$ 是 CH_2)；

[0031] R^a 、 R^b 、 R^c 各自独立选自氢和 C_1-C_4 -烷基；

[0032] a是0、1、2、3或4；且

[0033] b是0、1、2或3。

[0034] 因此,本发明涉及通式I化合物和通式I化合物的药学上可接受的盐。

[0035] 鉴于化合物I的药理学性质,本发明还涉及用作药物的通式I化合物或其药学上可接受的盐。

[0036] 在细胞试验和临床相关动物模型中发现,新化合物能够减轻肌肉萎缩和收缩功能障碍。

[0037] 因此,本发明涉及用于治疗或预防肌肉萎缩状况的通式I化合物或通式I化合物的药学上可接受的盐。

[0038] 本发明特别涉及通式I化合物或通式I化合物的药学上可接受的盐,其用于治疗或预防由下列疾病或状况之一引起的骨骼肌或心肌萎缩:充血性心力衰竭、慢性心力衰竭、癌症、用肌毒物质的癌症治疗、先天性肌病、AIDS、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、慢性肾脏疾病、肾衰竭、糖尿病、严重烧伤、衰老期间肌肉减少、血液供应减少、暂时或长期固定、长期机械通气、去神经支配、长期失重和营养不良。

[0039] 此外,本发明化合物通过抑制MuRF1的泛素E3连接酶活性和MuRF1与靶肌肉蛋白例如titin的结合,是MuRF1功能的有效抑制剂。因此,本发明进一步涉及通式I化合物或通式I化合物的药学上可接受的盐,其用于治疗或预防与肌肉环指1(MuRF1)表达增加相关的状况,特别是与MuRF1表达增加相关的肌病。

[0040] 还发现:通式I化合物对与收缩或舒张功能障碍相关的心脏状况具有有益作用,这与它们对肌肉状况的作用没有直接关系。因此,本发明还涉及通式I化合物或其药学上可接受的盐,其用于治疗或预防与收缩或舒张功能障碍相关的心脏状况。

[0041] 还发现通式I化合物对糖尿病的有益作用。因此,本发明还涉及通式I化合物或其药学上可接受的盐,其用于治疗或预防糖尿病,尤其是II型糖尿病。

[0042] 本发明还涉及一种药物,其包含至少一种本文所述的式I化合物或至少一种式I化合物的药学上可接受的盐。

[0043] 本发明还涉及一种药物组合物,其包含选自如本文所述的通式I化合物的化合物,或至少一种其药学上可接受的盐和至少一种药学上可接受的载体。

[0044] 本发明还涉及选自本文定义的通式I化合物的化合物或其药学上可接受的盐用于制备治疗或预防肌肉萎缩状况的药物的用途;或者用于制备治疗或预防上述状况或病患的药物。

[0045] 本发明还涉及治疗或预防上述状况或病患之一的方法,所述方法包括向需要其的个体施用选自本文定义的通式I化合物的化合物或其药学上可接受的盐的步骤。

[0046] 发明详述

[0047] 术语“式I化合物”和“化合物I”用作同义词。

[0048] 术语“药学上可接受的盐”指阳离子或阴离子盐化合物,其中反离子来自药学上可接受的无毒碱类或酸类,包括无机或有机碱类和无机或有机酸类。应该理解:如本文所用,对式I化合物的提及意指还包括药学上可接受的盐。

[0049] 如果式I化合物为碱性,则盐可由药学上可接受的无毒酸(包括无机酸和有机酸)制备。所述药学上可接受的酸加成盐包括但不限于乙酸、三氟乙酸、苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、柠檬酸、乙磺酸、富马酸、葡萄糖酸、谷氨酸、氢溴酸、盐酸、羟乙磺酸、乳酸、马来酸、苹果酸、扁桃酸、甲磺酸、粘酸、硝酸、帕莫酸、泛酸、磷酸、琥珀酸、硫酸、酒石酸、对甲苯磺酸等。特别优选的是柠檬酸、氢溴酸、盐酸、马来酸、磷酸、硫酸、富马酸和酒石酸。

[0050] 如果式I化合物是酸性的,则可从药学上可接受的无毒碱包括无机碱和有机碱制备盐。药学上可接受的碱盐包括衍生自碱的无毒盐,包括金属阳离子例如碱或碱土金属阳离子,以及胺。合适的金属阳离子的示例包括锂、钠、钾、镁、钙、锌和铝。适当的胺的示例包括精氨酸、N,N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙胺、二乙醇胺、二环己胺、乙二胺、甘氨酸、赖氨酸、N-甲基葡萄糖胺、乙醇胺、2-氨基-2-羟甲基-丙烷-1,3-二醇和普鲁卡因。优选的药学上可接受的碱盐是锂、钠、钾、镁、钙、锌、铝和二乙醇胺。

[0051] 有关有用的酸加成盐和碱盐的讨论,请参见例如S.M. Berge等人,“Pharmaceutical Salts,”66J.Pharm.ScL 1-19(1977)。

[0052] 术语“C₁-C₄-烷基”指甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基或叔丁基。优选地,C₁-C₄-烷基选自甲基、乙基、正丙基、异丙基,尤其选自甲基和乙基。

[0053] 术语“C₁-C₃-烷基”指甲基、乙基、正丙基或异丙基。优选地,C₁-C₃-烷基选自甲基和乙基,特别是选自甲基。

[0054] 术语“卤素”指氟、氯、溴和碘。优选地,卤素是氟和氯,特别是氟。

[0055] 术语“氟化的甲基”指氟甲基、二氟甲基、三氟甲基,优选指三氟甲基。

[0056] 术语“氟化的甲氧基”指氟甲氧基、二氟甲氧基、三氟甲氧基,优选指三氟甲氧基。

[0057] 术语“C₁-C₃-烷氧基”指甲氧基、乙氧基、正丙氧基和异丙氧基。优选地,C₁-C₃-烷氧基选自甲氧基和乙氧基,特别是选自甲氧基。

[0058] 术语“C₁-C₃-卤代烷基”指上文定义的C₁-C₃-烷基基团,其中C₁-C₃-烷基基团的至少一个氢原子例如1、2、3、4、5或6个氢原子已被卤素原子替代,优选被氯原子或氟原子,特别是氟原子替代。C₁-C₃-卤代烷基的示例包括氯甲基、二氯甲基、三氯甲基、2-氯乙基、2,2-二氯乙基、2,2,2-三氯乙基、氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、2-氟乙基、2,2-二氟乙基、2,2,2-三氟乙基、1-氟乙基、1,1-二氟乙基、1,1,2,2-四氟乙基、五氟乙基等。特别是,“C₁-C₃-卤代烷基”选自上文定义的氟化的甲基,并还选自三氯甲基、2,2,2-三氯乙基和2,2,2-三氟乙基,尤其是选自三氟甲基。

[0059] 术语“C₁-C₃-卤代烷氧基”指上文定义的C₁-C₃-烷氧基基团,其中C₁-C₃-烷氧基基团的至少一个氢原子例如1、2、3、4、5或6个氢原子已被卤素原子替代,优选氯原子或氟原子,特别是氟原子替代。C₁-C₃-卤代烷氧基的示例包括氯甲氧基、二氯甲氧基、三氯甲氧基、2-氯乙氧基、2,2-二氯乙氧基、2,2,2-三氯乙氧基、氟甲氧基、二氟甲氧基、三氟甲氧基、2-氟乙氧基、2,2-二氟乙氧基、2,2,2-三氟乙氧基、1-氟乙氧基、1,1-二氟乙氧基、1,1,2,2-四氟乙氧基、五氟乙氧基等。特别是,“C₁-C₃-卤代烷氧基”选自上文定义的氟化的甲氧基,并也选自

三氯甲氧基、2,2,2-三氯乙氧基和2,2,2-三氟乙氧基,尤其是选自三氟甲氧基。

[0060] 术语“5-至10-元杂芳环”指5-至6-元单环芳环或稠合的8-至10-元双环芳环,其中单环或双环芳环包含1~4个独立地选自N、NR^c、O和S的杂原子或杂基,其中R^c选自氢和C₁-C₄-烷基。所述5-至6-元单环芳环的示例包括噻吩基、呋喃基、吡咯基、咪唑基、咪唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、1,2,3-三唑基、1,2,4-三唑基、噁二唑基、噻二唑基、吡啶基、嘧啶基、哒嗪基、吡嗪基、1,2,4-三嗪基、1,3,6-三嗪基等。所述8-至10-元双环芳环的示例包括喹啉基、异喹啉基、咪唑并吡啶基、喹唑啉基、喹喔啉基、蝶啶基、噌啉基、酞嗪基、萘啶基、吲哚基、异吲哚基、氮杂吲哚基、吲嗪基、吲唑基、嘌呤基、吡咯并吡啶基、呋喃并吡啶基、苯并呋喃基、异苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、苯并异噁唑基、苯并噻唑基、苯并异噻唑基、苯并噁二唑基、苯并噻二唑基等。

[0061] 就其预期用途而言,式I中的变量R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、X¹、X²、Y、R^a、R^b、R^c、a和b具体具有下述含义,其中各自考虑,以及与至少一个其他或所有的式I化合物的特定实施方案组合考虑时,所述变量表示:

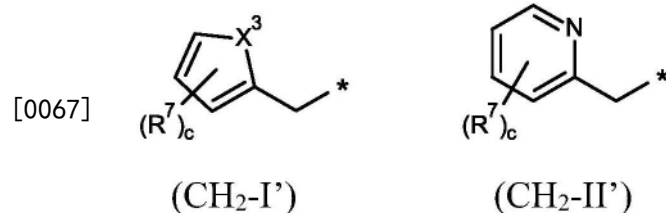
[0062] R¹优选是氢或基团-CH₂R^{1a},其中R^{1a}选自氢、甲基、苯基,以及含有作为环成员的独立选自N、NR^c、O和S的1~4个杂原子或杂基的5-至10-元杂芳环,其中5-至10-元杂芳环是未取代的或可携带1、2或3个R⁷基团,其中R^c和R⁷具有上述通用含义之一,或者特别具有下述优选含义之一。

[0063] 更优选地,R¹选自氢和基团-CH₂R^{1a},其中R^{1a}选自氢、甲基以及含有作为环成员的独立选自N、O和S的1~3个杂原子特别是1个杂原子的5-至6-元单环杂芳环,其中5-至6-元单环杂芳环是未取代的或携带1个R⁷基团,其中R⁷选自卤素、C₁-C₃-烷基和C₁-C₂-烷氧基。

[0064] 特别是,R¹选自氢和基团-CH₂R^{1a},其中R^{1a}选自氢和含有作为环成员的独立选自N、O和S的1~3个杂原子特别是1个杂原子的未取代5-至6-元单环杂芳环。

[0065] 更特别是,R¹是基团-CH₂R^{1a},其中R^{1a}是含有作为环成员的独立选自N、O和S的1~3个杂原子的未取代5-至6-元单环杂芳环。尤其是,R¹是基团-CH₂R^{1a},其中R^{1a}是含有作为环成员的选自N、O和S的1个杂原子的未取代5-至6-元单环杂芳环。非常尤其是,R¹是基团-CH₂R^{1a},其中R^{1a}是呋喃基、噻吩基或吡啶基。

[0066] 在另一个更优选的实施方案中,R¹选自氢、甲基和基团CH₂-I' 或CH₂-II'



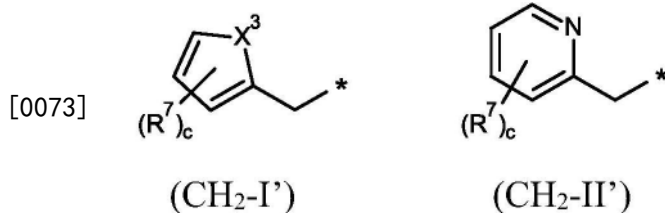
[0068] 其中*表示与脲氮原子的连接点,并且其中

[0069] X³是NR^c、O或S;

[0070] c是0、1、2或3;且

[0071] R⁷如文中所定义。

[0072] 具体地,R¹选自CH₂-I' 和CH₂-II'



[0074] 其中*表示与脲氮原子的连接点,并且其中R⁷、X³和c如文中所定义。

[0075] R²优选是氢或甲基。特别是R²是氢。

[0076] R³优选是氢或甲基。特别是R³是氢。

[0077] R⁴优选是甲基或乙基。特别是,R⁴是甲基。

[0078] 优选地,R⁵各自独立选自卤素、C₁-C₃-烷基、C₁-C₂-卤代烷基和C₁-C₂-烷氧基氟。更优选地,R⁵各自独立选自卤素、C₁-C₃-烷基和C₁-C₂-烷氧基。甚至更优选地,R⁵各自独立选自氟、甲基和三氟甲基。特别是,R⁵各自独立选自氟和甲基。

[0079] 优选地,R⁶各自独立选自卤素、C₁-C₃-烷基、C₁-C₂-卤代烷基和C₁-C₂-烷氧基氟。更优选地,R⁶各自独立选自卤素、C₁-C₃-烷基和C₁-C₂-烷氧基。甚至更优选地,R⁶各自独立选自氟、甲基和三氟甲基。特别是,R⁶各自独立选自氟和甲基。

[0080] X¹是NR^a或O。优选地,X¹是NH或O。

[0081] 优选地,X²是O或S。特别是,X²是O。

[0082] 在一优选实施方案中,Y是氧原子。在另一优选实施方案中,Y表示两个氢原子。

[0083] 优选地,R^a、R^b、R^c各自独立选自氢和C₁-C₃-烷基。更优选地,R^a、R^b、R^c各自独立选自氢和甲基。特别是,R^a、R^b、R^c是氢。

[0084] 优选地,a是0、1、2或3。更优选地,a是0、1或2。特别是,a是0。

[0085] 优选地,b是0、1或2。更优选地,b是0或1。特别是,b是0。

[0086] 在式CH₂-I' 基团中,变量X³、c和R⁷ (如果存在),单独考虑以及与至少一个其他或所有变量组合考虑时,特别是具有下述含义:

[0087] 优选地,R⁷各自独立选自卤素、C₁-C₃-烷基、C₁-C₂-卤代烷基和C₁-C₂-烷氧基。更优选地,R⁷各自独立选自卤素、C₁-C₃-烷基和C₁-C₂-卤代烷基。甚至更优选地,R⁷各自独立选自氟、甲基和三氟甲基。特别是,R⁷各自独立选自氟和甲基。

[0088] 优选地,X³是O或S。特别是,X³是O。在另一具体实施方案中,X³是S。

[0089] 优选地,c是0、1或2。更优选地,c是0或1。特别是,c是0。

[0090] 在式CH₂-II' 基团中,变量c和R⁷ (如果存在),单独考虑以及与至少一个其他或所有变量组合考虑时,特别是具有下述含义:

[0091] 优选地,R⁷各自独立选自卤素、C₁-C₃-烷基、C₁-C₂-卤代烷基和C₁-C₂-烷氧基。更优选地,R⁷各自独立选自卤素、C₁-C₃-烷基和C₁-C₂-卤代烷基。甚至更优选地,R⁷各自独立选自氟、甲基和三氟甲基。特别是,R⁷各自独立选自氟和甲基。

[0092] 优选地,c是0、1或2。更优选地,c是0或1。特别是,c是0。

[0093] 本发明的优选实施方案涉及通式I化合物,其中,

[0094] R¹是氢或基团-CH₂R^{1a},其中R^{1a}是氢或含有作为环成员的独立选自N、O和S的1~3个杂原子特别是1个杂原子的未取代5-至6-元单环杂芳环;

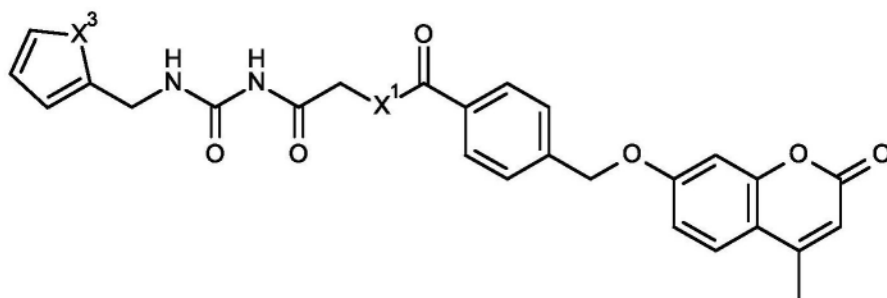
[0095] R²是氢或甲基;

- [0096] R³是氢或甲基;
- [0097] R⁴是C₁-C₂-烷基;
- [0098] R⁵各自独立选自卤素、C₁-C₃-烷基、C₁-C₂-卤代烷基和C₁-C₂-烷氧基;
- [0099] R⁶各自独立选自卤素、C₁-C₃-烷基、C₁-C₂-卤代烷基和C₁-C₂-烷氧基;
- [0100] R⁷各自独立选自卤素、C₁-C₃-烷基、C₁-C₂-卤代烷基和C₁-C₂-烷氧基;
- [0101] X¹是NR^a或O;
- [0102] X²是O或S;
- [0103] Y表示氧原子或两个氢原子;
- [0104] R^a选自氢和C₁-C₃-烷基;
- [0105] a是0、1、2或3;且
- [0106] b是0、1或2;
- [0107] 及其药学上可接受的盐。
- [0108] 本发明的更优选实施方案涉及通式I化合物,其中,
- [0109] R¹是氢或基团-CH₂R^{1a},其中R^{1a}是氢或含有作为环成员的选自N、O和S的1个杂原子未取代5-至6-元单环杂芳环;
- [0110] R²是氢或甲基;
- [0111] R³是氢;
- [0112] R⁴是甲基;
- [0113] X¹是NH或O;
- [0114] X²是O;
- [0115] Y表示氧原子或两个氢原子;
- [0116] a是0;且
- [0117] b是0;
- [0118] 及其药学上可接受的盐。
- [0119] 本发明的一具体实施方案涉及通式I化合物,其中,
- [0120] R¹是基团-CH₂R^{1a},其中R^{1a}是含有作为环成员的选自N、O和S的1个杂原子的未取代5-至6-元单环杂芳环;
- [0121] R²是氢;
- [0122] R³是氢;
- [0123] R⁴是甲基;
- [0124] X¹是NH或O;
- [0125] X²是O;
- [0126] Y表示氧原子或两个氢原子;
- [0127] a是0;且
- [0128] b是0;
- [0129] 及其药学上可接受的盐。
- [0130] 本发明的另一优选实施方案涉及通式I化合物,其中,
- [0131] R¹是氢、甲基或基团CH₂-I' 或CH₂-II' ,
- [0132] R²选自氢和甲基;

- [0133] R³选自氢和甲基；
- [0134] R⁴是C₁-C₂-烷基；
- [0135] R⁵各自独立选自卤素、C₁-C₃-烷基、C₁-C₂-卤代烷基和C₁-C₂-烷氧基；
- [0136] R⁶各自独立选自卤素、C₁-C₃-烷基、C₁-C₂-卤代烷基和C₁-C₂-烷氧基；
- [0137] R⁷各自独立选自卤素、C₁-C₃-烷基、C₁-C₂-卤代烷基和C₁-C₂-烷氧基；
- [0138] X¹是NR^a或O；
- [0139] X²是O或S；
- [0140] X³是O或S；
- [0141] Y表示氧原子或两个氢原子；
- [0142] R^a选自氢和C₁-C₃-烷基；
- [0143] a是0、1、2或3；
- [0144] b是0、1或2；且
- [0145] c是0、1或2；
- [0146] 及其药学上可接受的盐。
- [0147] 本发明的另一更优选实施方案涉及通式I化合物，其中，
- [0148] R¹是氢、甲基或者基团CH₂-I' 或CH₂-II'，
- [0149] R²是氢或甲基；
- [0150] R³是氢；
- [0151] R⁴是甲基；
- [0152] R⁵各自独立选自卤素、C₁-C₃-烷基和C₁-C₂-烷氧基；
- [0153] R⁶各自独立选自卤素、C₁-C₃-烷基和C₁-C₂-烷氧基；
- [0154] R⁷各自独立选自卤素、C₁-C₃-烷基和C₁-C₂-烷氧基；
- [0155] X¹是NH或O；
- [0156] X²是O；
- [0157] X³是O或S；
- [0158] Y表示氧原子或两个氢原子；
- [0159] a是0、1或2；
- [0160] b是0或1；且
- [0161] c是0或1；
- [0162] 及其药学上可接受的盐。
- [0163] 本发明的甚至更优选实施方案涉及通式I化合物，其中，
- [0164] R¹是氢、甲基或基团CH₂-I' 或CH₂-II'，
- [0165] R²是氢或甲基；
- [0166] R³是氢；
- [0167] R⁴是甲基；
- [0168] R⁵各自独立选自卤素、C₁-C₃-烷基和C₁-C₂-烷氧基；
- [0169] R⁶各自独立选自卤素、C₁-C₃-烷基和C₁-C₂-烷氧基；
- [0170] R⁷各自独立选自卤素、C₁-C₃-烷基和C₁-C₂-烷氧基；
- [0171] X¹是NH或O；

- [0172] X^2 是0;
- [0173] X^3 是0或S;
- [0174] Y表示氧原子或两个氢原子;
- [0175] a是0;
- [0176] b是0;且
- [0177] c是0;
- [0178] 及其药学上可接受的盐。
- [0179] 本发明的另一具体实施方案涉及通式I化合物,其中,
- [0180] R^1 是基团 CH_2-I' 或 CH_2-II' ,
- [0181] R^2 是氢;
- [0182] R^3 是氢;
- [0183] R^4 是甲基;
- [0184] X^1 是NH或0;
- [0185] X^2 是0;
- [0186] X^3 是0或S;
- [0187] Y表示氧原子或两个氢原子;
- [0188] a是0;
- [0189] b是0;且
- [0190] c是0;
- [0191] 及其药学上可接受的盐。
- [0192] 另一组优选实施方案涉及通式I化合物,其中,基团 CH_2-I' ,
- [0193] X^3 是0或S;
- [0194] R^7 各自独立选自卤素、 C_1-C_3 -烷基、 C_1-C_2 -卤代烷基和 C_1-C_2 -烷氧基;且
- [0195] c是0、1或2。
- [0196] 另一组优选的实施方案涉及通式I化合物,其中,基团 CH_2-II' ,
- [0197] R^7 各自独立选自卤素、 C_1-C_3 -烷基、 C_1-C_2 -卤代烷基和 C_1-C_2 -烷氧基;且
- [0198] c是0、1或2。
- [0199] 一组甚至更优选的实施方案涉及通式I化合物,其中,基团 CH_2-I' ,
- [0200] X^3 是0或S;
- [0201] R^7 各自独立选自氟、甲基或三氟甲基;且
- [0202] c是0或1。
- [0203] 一组甚至更优选的实施方案涉及通式I化合物,其中,基团 CH_2-II' ,
- [0204] R^7 各自独立选自氟、甲基或三氟甲基;且
- [0205] c是0或1。
- [0206] 本发明特别优选的实施方案涉及式I化合物,其相应于式I-A,

[0207]



(I-A)

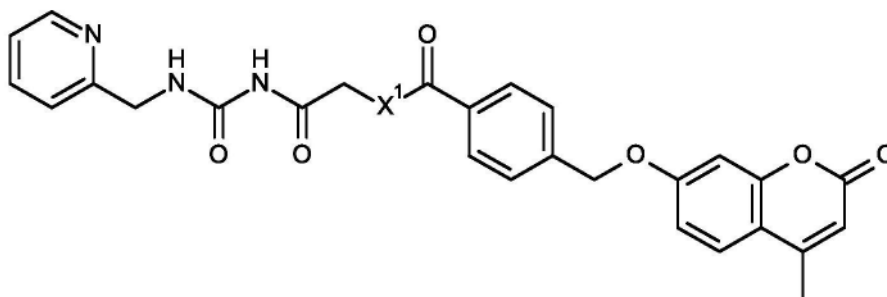
[0208] 其中

[0209] X^1 是NH或O;且[0210] X^3 是O或S;

[0211] 及其药学上可接受的盐。

[0212] 本发明另一特别优选的实施方案涉及式I化合物,其相应于式I-B,

[0213]



(I-B)

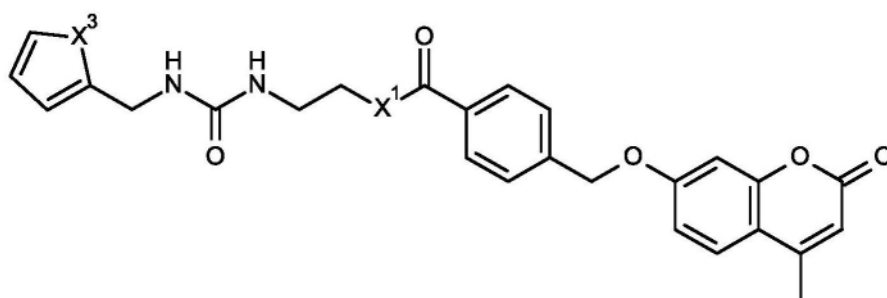
[0214] 其中

[0215] X^1 是NH或O;

[0216] 及其药学上可接受的盐,

[0217] 本发明另一特别优选的实施方案涉及式I化合物,其相应于式I-C,

[0218]



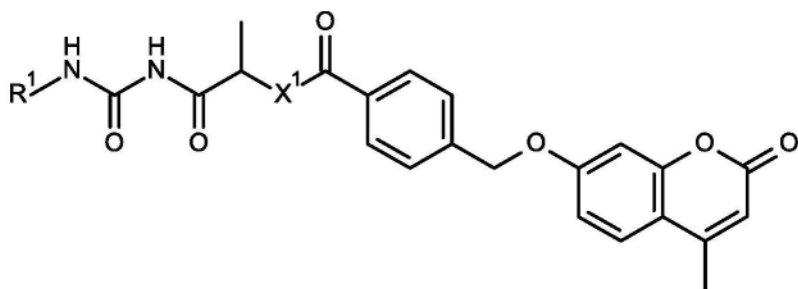
(I-C)

[0219] 其中

[0220] X^1 是NH或O;且[0221] X^3 是O或S;

[0222] 及其药学上可接受的盐。

[0223] 本发明的另一特别优选的实施方案涉及式I化合物,其相应于式I-D,



[0224]

(I-D)

[0225] 其中

[0226] R^1 选自氢或甲基;且[0227] X^1 是NH或O;

[0228] 及其药学上可接受的盐。

[0229] 一尤其优选的式I化合物是4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸[2-(2-咪喃基甲基氨基甲酰基-氨基)-2-氧代-乙基]酯(即化合物I,其中 R^1 是基团- CH_2R^{1a} ,其中 R^{1a} 是咪喃-2-基, R^2 是H, R^3 是H, R^4 是甲基, X^1 是O, X^2 是O, Y 是O, a 是0和 b 是0),及其药学上可接受的盐。该化合物在下文中也称为MyoMed-946。

[0230] 另一尤其优选的式I化合物是N-[2-(2-咪喃基甲基氨基甲酰基氨基)-2-氧代-乙基]-4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酰胺(即化合物I,其中 R^1 是基团- CH_2R^{1a} ,其中 R^{1a} 是咪喃-2-基, R^2 是H, R^3 是H, R^4 是甲基, X^1 是NH, X^2 是O, Y 是O, a 是0和 b 是0),及其药学上可接受的盐。

[0231] 另一尤其优选的式I化合物是4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]-苯甲酸[2-氧代-2-(2-噻吩基甲基氨基甲酰基氨基)乙基]酯(即化合物I,其中 R^1 是基团- CH_2R^{1a} ,其中 R^{1a} 是噻吩-2-基, R^2 是H, R^3 是H, R^4 是甲基, X^1 是O, X^2 是O, Y 是O, a 是0和 b 是0),及其药学上可接受的盐。

[0232] 另一尤其优选的式I化合物是4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]-N-[2-氧代-2-(2-噻吩基甲基氨基甲酰基氨基)乙基]-苯甲酰胺(即化合物I,其中 R^1 是基团- CH_2R^{1a} ,其中 R^{1a} 是噻吩-2-基, R^2 是H, R^3 是H, R^4 是甲基, X^1 是NH, X^2 是O, Y 是O, a 是0和 b 是0),及其药学上可接受的盐。

[0233] 另一尤其优选的式I化合物是4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基-甲基]苯甲酸[2-氧代-2-(2-吡啶基甲基氨基甲酰基氨基)乙基]酯(即化合物I,其中 R^1 是基团- CH_2R^{1a} ,其中 R^{1a} 是吡啶-2-基, R^2 是H, R^3 是H, R^4 是甲基, X^1 是O, X^2 是O, Y 是O, a 是0和 b 是0),及其药学上可接受的盐。该化合物在下文中也称为MyoMed-203。

[0234] 另一尤其优选的式I化合物是4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]-N-[2-(2-噻吩基甲基氨基甲酰基氨基)乙基]苯甲酰胺(即化合物I,其中 R^1 是基团- CH_2R^{1a} ,其中 R^{1a} 是噻吩-2-基, R^2 是H, R^3 是H, R^4 是甲基, X^1 是NH, X^2 是O, Y 表示两个氢原子(即 $C=Y$ 是 CH_2), a 是0和 b 是0),及其药学上可接受的盐。该化合物在下文中也称为MyoMed-205。

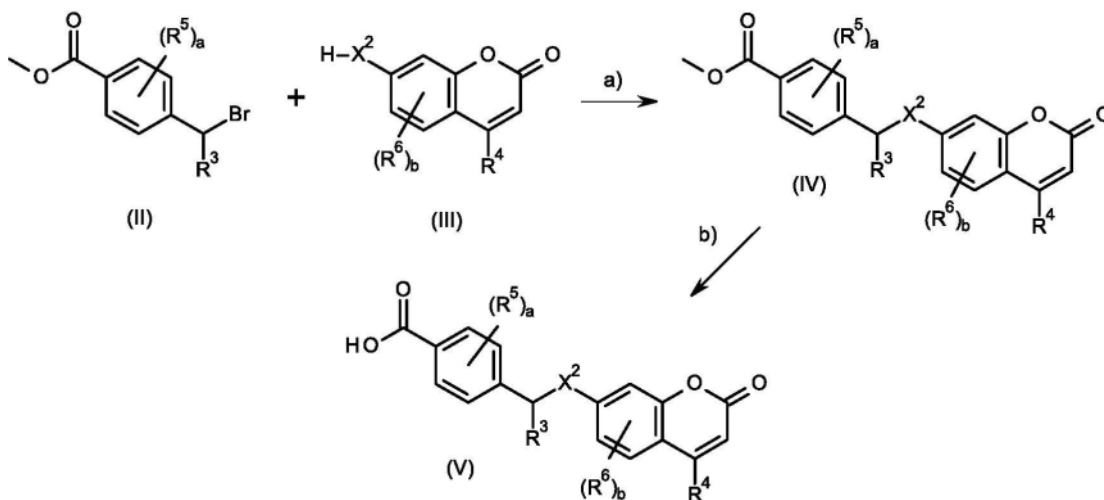
[0235] 另一尤其优选的式I化合物是4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸(1-甲基-2-氧代-2-脲基-乙基)酯(即化合物I,其中 R^1 是H, R^2 是甲基, R^3 是H, R^4 是甲基, X^1 是O, X^2 是O, Y 是O, a 是0和 b 是0),及其药学上可接受的盐。该化合物在下文中也称为MyoMed-

946-5。

[0236] 另一尤其优选的式I化合物是4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]-苯甲酸[1-甲基-2-(甲基氨基甲酰基-氨基)-2-氧代-乙基]酯(即化合物I,其中 R^1 是基团- CH_2R^{1a} ,其中 R^{1a} 是H, R^2 是甲基, R^3 是H, R^4 是甲基, X^1 是O, X^2 是O, Y 是O, a 是0和 b 是0),及其药学上可接受的盐。该化合物在下文中也称为MyoMed-946-8。

[0237] 根据本发明的化合物I可以通过类似于文献的已知方法来制备。本发明化合物的一个重要方法是通过4-溴烷基-取代的苯甲酸甲基酯化合物II与色烯-2-酮化合物III反应生成2-氧代色烯-取代的苯甲酸甲基酯化合物IV,该化合物IV水解为中间体苯甲酸化合物V来提供,如流程图1中所示。

[0238] 流程图1:



[0239]

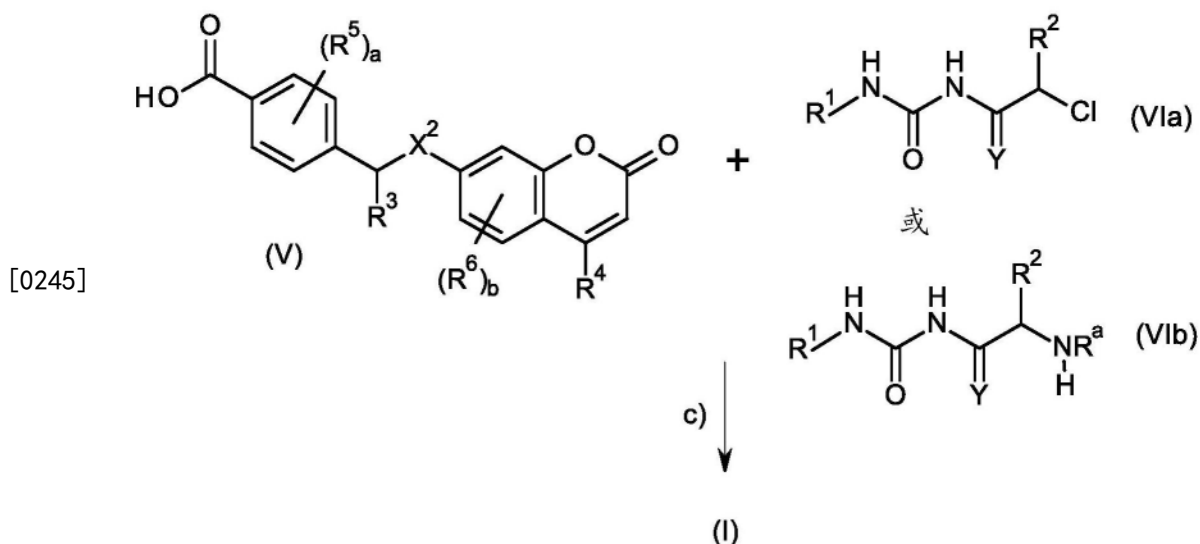
[0240] 在流程图1中,变量 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 X^2 、 a 和 b 具有上述含义。

[0241] 在流程图1的步骤a)中,式(II)的溴化物在适合亲核取代反应的条件下与化合物III的OH、SH或 HNR^b 基团($H-X^2$ -基团)反应。技术人员熟悉此类亲核取代反应所需的反应条件。通常,该反应在碱存在下进行。适当的碱可以是无机碱或有机碱。适当的无机碱的示例包括碱金属碳酸盐,例如 Li_2CO_3 、 Na_2CO_3 、 K_2CO_3 或 Cs_2CO_3 ,碱金属氢氧化物例如LiOH、NaOH或KOH或者磷酸盐例如 Li_3PO_4 、 Na_3PO_4 、 K_3PO_4 或 Cs_3PO_4 。适当的有机碱的示例是例如叔胺诸如三甲胺、三乙胺、三丙胺、乙基二异丙胺(DIPEA)等,碱性N-杂环化合物例如吗啉、吡啶、二甲基吡啶、DABCO、DBU或DBN,或者烷醇盐化合物例如甲醇盐、乙醇盐、丙醇盐、异丙醇盐、丁醇盐或叔丁醇盐如其钠或钾盐。

[0242] 在强碱例如碱金属氢氧化物诸如LiOH、NaOH或KOH存在下,在流程图1的步骤b)中,皂化由此获得的式(IV)甲酯化合物,以得到式(V)的苯甲酸化合物。

[0243] 然后,中间体苯甲酸化合物V进一步与脲化合物VIa或VIb反应,以生成本发明的化合物I,如流程图2中所示。

[0244] 流程图2:



[0246] 在流程图2中,变量 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 X^2 、 Y 、 R^a 、 a 和 b 具有上述含义。

[0247] 在流程图2的步骤c)中,式(V)苯甲酸中间体与含氯基团的式(VIa)脲化合物或含N(H) R^a 基团的式(VIb)脲化合物反应,生成式I的相应酯或酰胺化合物。在流程图2的步骤c)中,在适合亲核取代反应条件下,进行式(V)苯甲酸中间体与含有氯基团的式(VIa)脲化合物的反应。本领域技术人员熟悉此类反应所需的反应条件。通常,该反应在上述碱存在下进行,以中和反应期间形成的酸。如果需要,可以通过向亲核取代反应中添加合适的溴化物盐或者特别是碘化物盐,进一步原位活化化合物(VIa)。适当的溴化物盐或碘化物盐是例如碱金属溴化物或碘化物,以及四烷基溴化铵或四烷基碘化铵。示例包括溴化钠、碘化钠、溴化钾、碘化钾、四丁基溴化铵和四丁基碘化铵。

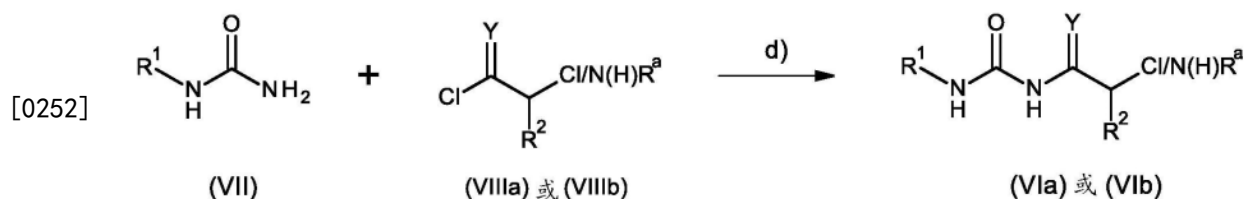
[0248] 在适合酰胺键形成的条件下,进行流程图2的步骤c)中式(V)苯甲酸中间体与含有N(H) R^a 基团的式(VIb)脲化合物的反应。本领域技术人员熟悉此类反应所需的反应条件。通常,酰胺键的形成在偶联剂存在下进行。适当的偶联剂(活化剂)是众所周知的,并且例如选自碳二亚胺类,诸如EDCI(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺;也简称为EDC)、DCC(二环己基碳二亚胺)和DIC(二异丙基碳二亚胺);苯并三唑衍生物,例如HOAt(1-羟基-7-氮杂苯并三唑)、HOBt(1-羟基苯并三唑)、HATU(0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)- N,N,N',N' -四甲基脲六氟磷酸盐)、HBTU((0-苯并三唑-1-基)- N,N,N',N' -四甲基脲六氟磷酸盐)和HCTU(1H-苯并三唑鎓-1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-5-氯四氟硼酸盐);**磷**衍生的活化剂例如BOP((苯并三唑-1-基氧基)-三(二甲基氨基)**磷**六氟磷酸盐)、Py-BOP((苯并三唑-1-基氧基)-三吡咯烷基**磷**六氟磷酸盐)和Py-BrOP(溴代三吡咯烷基**磷**六氟磷酸盐)等,诸如COMU((1-氰基-2-乙氧基-2-氧代亚乙基氨基氧基)二甲基氨基吗啉代-碳正离子六氟磷酸盐)。上述活化剂也可相互组合使用。通常,相对于未过量使用的反应物,将活化剂至少以等摩尔量使用。苯并三唑和**磷**偶联剂通常在碱性介质中使用。或者,可首先将式(V)的羧酸中间体转化为所谓的活性酯,其在形式意义上通过羧酸与形成活性酯的醇(例如对硝基苯酚、 N -羟基苯并三唑(HOBt)、 N -羟基琥珀酰亚胺或OPfp(五氟苯酚))反应获得。然后,在存在或不存在偶联剂的情况下,活性酯与胺3反应。

[0249] 式(II)和式(III)化合物既可以购买,也可以利用本领域技术人员熟知的方法合

成。

[0250] 式(VIa)和式(VIb)化合物可以购买或者例如根据流程图3所述的方法合成。

[0251] 流程图3:

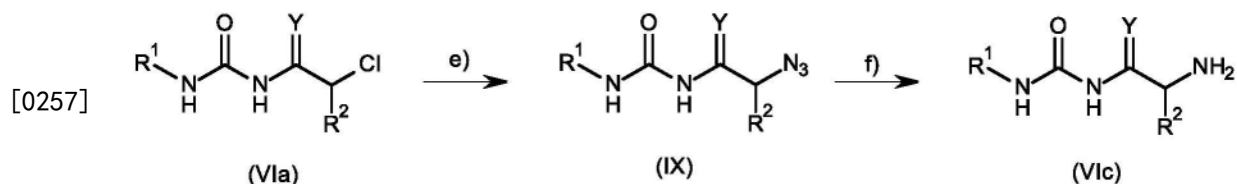


[0253] 在流程图3中,变量 R^1 、 R^2 和 R^a 具有上述含义,在流程图3的步骤d)中,在Y代表氧原子的情况下,脲化合物(VII)在亲核酰化条件下与酰氯(VIIIa)或(VIIIb)反应。本领域技术人员熟知适于酰化反应的反应条件。如果Y代表两个氢原子,则在适合亲核取代反应的条件下进行。本领域技术人员熟悉此类反应所需的反应条件。如果需要,可以如上所述进一步原位活化化合物(VIIIa)。通常,步骤d)在上文定义的碱例如叔胺存在下进行,以淬灭反应期间形成的盐酸盐或其他酸。

[0254] 在某些特定情况下,可能需要使用适当的保护基团,以避免与其他反应基团发生副反应,所述反应基团可存在于化合物(VII)、(VIIIa)或(VIIIb)中,并可能参与或干扰反应。在这些情况下,可能需要额外的脱保护步骤,以在酰胺键形成后除去这些保护基团。本领域技术人员熟知适当的保护基团以及利用所述适当的保护基团保护和脱保护不同取代基的方法;例如可参见T.Greene和P.Wuts,《有机合成中的保护基团》(第三版)(Protective Groups in Organic Synthesis(3rd ed.)),John Wiley&Sons,NY(1999)。

[0255] 此外,化合物(VIc)可由化合物(VIa)制备,例如根据流程图4中所述的步骤制备。

[0256] 流程图4:



[0258] 在流程图4中,变量 R^1 、 R^2 和Y具有上述含义。在流程图4的步骤e)中,在叠氮化物源例如磷酰基叠氮化物、叠氮酸或叠氮化钠、叠氮化物存在下或者通过用 PPh_3 或其他磷试剂的Staudinger反应(如Zwierzak A.,在磷、硫和硅及相关元素(Phosphorus,Sulfur,and Silicon and the Related Elements)(1993),75:1-4,51-54中所述),将脲化合物(VIa)转移至叠氮化合物(IX)。通常,步骤e)在上文定义的碱例如叔胺存在下进行,以淬灭反应期间形成的盐酸盐。

[0259] 在流程图4的步骤f)中,将化合物(IX)的叠氮化物基团在氢化催化剂存在下用氢还原,或与氢化物反应,以得到胺化合物(VIc)。本领域技术人员熟知适合于这类反应的反应条件。

[0260] 如果未另外说明,上述反应通常在有机溶剂中进行,包括非质子有机溶剂例如取代酰胺、内酰胺和脲,例如二甲基甲酰胺、二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、四甲基脲;环醚,例如二噁烷、四氢呋喃;卤代烃类,例如二氯甲烷及其混合物,以及其与 C_1 - C_6 -烷醇和/或水的混合物。

[0261] 根据所用化合物的反应性,上述反应通常在室温和所用溶剂的沸腾温度之间的温度进行。

[0262] 将反应混合物用常规方式后处理,例如与水混合,分离相,并在适当情况下通过色谱法纯化粗产物。如果中间产物和终产物作为固体获得,也可通过重结晶或消化进行纯化。

[0263] 常规实验,包括反应条件的适当操作、试剂和合成途径序列,保护可能与反应条件不相容的任何化学官能团,以及制备方法反应序列中适当点的脱保护属于常规技术。

[0264] 已如上所述,在细胞试验和临床相关动物模型中,发现通式I化合物能够减轻肌肉萎缩和收缩功能障碍。

[0265] 因此,本发明涉及上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防肌肉萎缩状况。

[0266] 文中所用的与肌肉萎缩状况和肌病相关的术语“治疗”指的是对与状况和/或疾病相关的症状即肌肉萎缩或肌肉衰弱的治疗。

[0267] 文中所用的与肌肉萎缩状况和肌病相关的术语“预防”指与疾病和/或状况相关的预防性治疗,即预防或减少肌肉萎缩或肌肉衰弱风险的治疗。

[0268] 本文使用的术语“肌肉萎缩”必须理解为指肌肉纤维的大小(横截面积减少)和数量减少,可见的肌肉质量减少,其在科学和医学文献中也称为肌肉萎缩。

[0269] 本文所用的术语“肌病”指肌肉纤维功能不正常的肌肉疾病。这会导致肌肉无力。本文所用的术语“肌病”特别指与肌肉环指1(MuRF1)表达增加相关的肌病。然而,认为本发明化合物的作用不限于该途径。

[0270] 认为肌肉萎缩是由肌肉蛋白合成和肌肉蛋白降解之间平衡的变化引起的。特别是,据认为在萎缩期间,肌肉蛋白降解途径例如肌肉蛋白的泛素化被激活。

[0271] 肌肉萎缩通常见于恶病质患者,例如心脏疾病引起的恶病质,即心因性恶病质。此外,肌肉萎缩特别会影响骨骼肌,导致骨骼肌退化,即骨骼肌萎缩。然而,肌肉萎缩也会影响心肌。

[0272] 因此,本发明的优选实施方案涉及上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防心因性恶病质、骨骼肌萎缩或心肌萎缩。

[0273] 例如,心肌梗塞患者会出现心因性恶病质、心肌和骨骼肌萎缩,这通常会导致其症状和预后恶化,并可显著延长其恢复期。

[0274] 因此,本发明的特定实施方案涉及上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防心因性恶病质、骨骼肌萎缩或心肌萎缩,其中心因性恶病质和心脏或骨骼肌萎缩由心肌梗塞引起。

[0275] 已知有大量与疾病相关的状况,但也有许多与疾病无关的身体状况,其会导致心肌或骨骼肌萎缩和/或恶病质。

[0276] 可导致心肌或骨骼肌萎缩和/或恶病质的疾病相关状况是例如充血性心力衰竭、慢性心力衰竭、心肌梗塞、癌症、先天性肌病、AIDS、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、多发性硬化、家族性淀粉样多神经病(familial amyloid polyneuropathy)、血液供应减少、激素缺乏、慢性肾病、肾功能衰竭、糖尿病、传染病、慢性胰腺炎和自身免疫性疾病。

[0277] 可导致骨骼肌萎缩和/或恶病质且与疾病无关的身体状况是例如严重烧伤、去神经支配、暂时或长期固定、长期机械通气、衰老期间肌肉减少、长期失重、营养不良和药物成瘾。

[0278] 某些用于癌症治疗的化疗药物显示出心脏和肌肉毒性。例如,阿霉素是一种用于各种癌症治疗的有效化疗药物,它的使用与早期和慢性心脏毒性和肌肉毒性有关(K.M.Cho等人,Oncotarget,2017,8(45),79441-79452;D.S.Hydock等人,体内阿霉素治疗对大鼠骨骼肌功能影响的表征(Characterization of the Effect of In Vivo Doxorubicin Treatment on Skeletal Muscle Function in the Rat),International Journal of Cancer Research and Treatment,2011,2028,2023-2028;T.A.Nissinen等人,Sci.Rep.,2016,6,32695;M.S.Willis等人,Circulation:Heart Failure,2019,12(3),1-12)。在啮齿类动物中,单次注射阿霉素能够减少心脏和骨骼肌的重量,随后出现明显的功能损害。

[0279] 本发明的优选实施方案涉及上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防由下述疾病或状况之一引起的骨骼肌或心肌萎缩:充血性心力衰竭、慢性心力衰竭、癌症、用肌毒物质的癌症治疗、先天性肌病、AIDS、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、慢性肾病、肾衰竭、糖尿病、严重烧伤、衰老期间的肌肉减少、血液供应减少、临时或长期固定、长期机械通气、去神经支配、长期失重和营养不良。

[0280] 本发明还涉及糖尿病尤其是II型糖尿病的治疗或预防。在不希望受到理论约束的情况下,我们认为对糖尿病的积极作用是基于MuRF1抑制,从而增强肌肉的胰岛素敏感性。S.Hirner等人,在J.Mol.Biol.,2008,379,666-677中显示,可将MuRF1和胰岛素理解为拮抗剂方式地功能相关,即MuRF1消耗糖原储存并抑制糖酵解,而胰岛素上调糖酵解和糖原储存。因此,抑制MuRF1可以降低胰岛素需求,并构成治疗糖尿病的策略。

[0281] 本发明特别涉及:

[0282] -上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防充血性心力衰竭引起的骨骼肌或心肌萎缩。

[0283] -上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防慢性心力衰竭引起的骨骼肌或心肌萎缩。

[0284] -上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防癌症引起的骨骼肌或心肌萎缩。

[0285] -上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防用肌毒和/或心脏毒物质例如阿霉素治疗癌症引起的骨骼肌或心肌萎缩。

[0286] -上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防由先天性肌病引起的骨骼肌或心肌萎缩。

[0287] -上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防AIDS引起的骨骼肌或心肌萎缩。

[0288] -上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防由慢性阻塞性肺疾病(COPD)引起的骨骼肌或心肌萎缩。

[0289] -上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防慢性肾病引起的骨骼肌或心肌萎缩。

[0290] -上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防肾衰竭引起的骨骼肌或心肌萎缩。

[0291] -上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防糖尿病引起的骨骼肌或心肌萎缩。

[0292] -上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防严重烧伤引起的骨骼肌或心肌萎缩。

[0293] -上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防衰老期间骨骼肌减少引起的骨骼肌或心肌萎缩。

- [0294] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防血液供应减少引起的骨骼肌或心肌萎缩。
- [0295] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防因暂时或长期固定而导致的骨骼肌或心肌萎缩。
- [0296] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防长期机械通气导致的骨骼肌或心肌萎缩。
- [0297] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防去神经支配导致的骨骼肌或心肌萎缩。
- [0298] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防长期失重引起的骨骼肌或心肌萎缩。
- [0299] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防营养不良引起的骨骼肌或心肌萎缩。
- [0300] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防糖尿病。
- [0301] 本发明还特别涉及:
- [0302] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防心因性恶病质。
- [0303] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防肿瘤恶病质。
- [0304] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗心肌梗塞。
- [0305] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗慢性心力衰竭。
- [0306] - 上文定义的通式I化合物,其用于从机械通气中恢复。
- [0307] 本发明尤其涉及:
- [0308] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防射血分数降低的心力衰竭(HF-rEF)引起或与之相关的骨骼肌或心肌萎缩。
- [0309] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防因射血分数保持的心力衰竭(HF-pEF)引起或与之相关的骨骼肌或心肌萎缩。
- [0310] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防由高血压引起或与之相关的骨骼肌或心肌萎缩。
- [0311] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防由肿瘤恶病质引起或与之相关的骨骼肌或心肌萎缩。
- [0312] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防由阿霉素引起的肌肉萎缩和/或心脏毒性。
- [0313] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防因衰老引起的肌肉减少症和/或心肌病。
- [0314] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防慢性肾脏疾病引起的肌肉萎缩。
- [0315] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防因机械通气或充血性心力衰竭导致的膈肌无力。
- [0316] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防先天性肌病,特别是先天性肌肉萎缩。
- [0317] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防糖尿病引起的肌肉萎缩。
- [0318] - 上文定义的通式I化合物,其用于治疗或预防糖尿病,特别是II型糖尿病。

[0319] 由于它们能够通过抑制MuRF1的泛素E3连接酶活性,以及通过抑制MuRF1与靶肌肉蛋白例如titin的结合,来下调MuRF1的功能,式I化合物及其药学上可接受的盐也适用于治疗或预防与肌肉环指1(MuRF1)表达增加相关的状况;并特别是与肌蛋白合成失调和肌蛋白降解(其导致肌肉萎缩和肌病)相关的肌病,典型地与肌肉环指1(MuRF1)表达增加相关的肌病。

[0320] 因此,本发明进一步涉及上文定义的式I化合物,其用于治疗或预防与肌肉环指1(MuRF1)表达增加相关的状况。

[0321] 特别是,本发明进一步涉及上文定义的式I化合物,其用于治疗或预防与肌肉环指1(MuRF1)表达增加相关的肌病。

[0322] 与MuRF1表达增加相关的肌病例如选自危重病肌病、线状体肌病、炎症性肌病、糖尿病引起的肌病、肺动脉高压引起的肌病、慢性心力衰竭特别是射血分数降低的心力衰竭(HFrEF)和射血分数保持的心力衰竭(HFpEF)亚型期间发生的肌病,肾衰引起的肌病和肿瘤恶病质引起的肌病。

[0323] 例如,de Man等人,Am.J.Respir.Crit.Care Med.,2011年5月15日,183(10),1411-1418中描述MuRF1表达增加与肺动脉高压引起的肌病之间的联系。

[0324] 例如,du Bois等人,Circ.Res.,2015年8月14日,117(5),424-436中描述MuRF1表达增加与血管紧张素II促进的慢性心力衰竭和/或肾衰竭肌病之间的联系。

[0325] 还有,Bowen等人,Eur.J.Heart.Fail.,2015年3月,17(3),263-272描述MuRF1表达增加与舒张性心力衰竭(HFpEF)期间发生的肌病之间的关系。

[0326] 已报道慢性肾衰竭患者中MuRF1的上调,并且这与肌肉萎缩密切相关(J.Aniort等人,J.Cachexia Sarcopenia Muscle,2019,10(2),323-337;S.H.Lecker等人,J.Am.Soc.Nephrol.,2011,22(5),821-824)。因此,预计下调MuRF1的化合物可在慢性肾衰竭期间保护骨骼肌。肾脏损伤和肌肉萎缩的概念在利用急性庆大霉素诱导的肾损伤动物模型中也得到了进一步验证(J.Aniort等人,Int.J.Biochem.Cell Biol.,2016,79,505-516)。

[0327] MuRF1在骨骼肌老化过程中上调(O.Rom等人,Free Radic.Biol.Med.2016,98,218-230)。这与线粒体功能障碍有关,认为其会导致肌肉减少症(肌原纤维丢失)和心肌病(H.W.Liu等人,Biogerontology.2020,21(3),367-380)。从线粒体功能障碍中获救使心肌病小鼠模型获救(Y.A.Chiao等人,eLife,2020,9,55513)。因此,预测改善线粒体功能和下调MuRF1的化合物可预防与年龄相关的肌肉减少症和心肌病。

[0328] 机械通气(H.W.van Hees等人,Am.J.Physiol.Lung Cell Mol.Physiol.,2008,294(6),L1260-8)或充血性心力衰竭(P.E.Hoojiman等人,Am.J.Respir.Crit.Care Med.,2015,191(10),1126-1138)对膈肌的压力会激活泛素和蛋白酶系统,包括MuRF1(van Hees,见上述引文;Hoojiman,见上述引文)。这不仅仅是一个相关发现,这一发现被以下发现所支持:硼替佐米对蛋白酶体系的抑制(van Hees,见上述引文),或利用敲除模型去除MuRF1(Hoojiman,见上述引文)可以保护膈肌免于变弱(Hoojiman,见上述引文)。因此,预测本文所述的化合物可保护充血性心力衰竭和危重病患者的膈肌收缩力(van Hees,见上述引文;Hoojiman,见上述引文)。

[0329] 遗传性肌肉萎缩与肌肉组织显著损失和肌力损失有关。MuRF1的上调在机制上与

此有关(J. Shin等人, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2013, 45 (10), 2266-2279)。作为所述线状体肌病一个具体示例值得一提, 其中在糖酵解活跃的肌纤维中, MuRF1在纤维水平上的上调与那些变得最萎缩的纤维和组织密切相关(F. Li等人, *Hum. Mol. Genet.*, 2015, 24 (18), 5219-5233)。

[0330] 已表明包括糖尿病在内的许多类型的代谢应激状态能激活MuRF1表达(S. H. Lecker等人, *FASEB J.* 2004, 18 (1), 39-51)。在糖尿病的动物模型(即streptozotocin诱导的小鼠糖尿病)中, 已表明其能激活Foxo-MuRF1信号轴, 而这进而又与肌肉萎缩密切相关(B. T. O'Neill等人, *Diabetes*, 2019, 68 (3), 556-570)。

[0331] 严重肥胖伴随着影响骨骼蛋白合成和降解的循环因子(例如胰岛素和氨基酸)的变化(C. S. Katsanos等人, *Obesity*, 2011, 19, 469-475)。胰岛素抵抗通过激活泛素-蛋白酶体途径加速肌肉蛋白降解(X. Wang, *Endocrinology*, 147 (9), 4160-4168)。先前的研究表明, 高达30%的体重减轻可能是由于肥胖患者利用不同的节食方式减少肌肉量(D. L. Ballor等人, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 1994, 18, 35-40)。

[0332] 因此, 本发明的优选实施方案涉及上文定义的式I化合物, 其用于治疗或预防危重病肌病、线状体肌病、炎症性肌病、糖尿病引起的肌病、肺动脉高压引起的肌病、慢性心力衰竭(特别是HFrEF和HFpEF亚型)引起的肌病、肾衰竭引起的肌病、肿瘤恶病质引起的肌病、机械通气或充血性心力衰竭对膈肌造成的压力导致的膈肌无力、先天性肌病特别是先天性肌肉萎缩; 年龄相关性肌肉减少症和心肌病。

[0333] 本发明特别涉及:

[0334] - 上文定义的式I化合物, 其用于治疗或预防危重病肌病。

[0335] - 上文定义的式I化合物, 其用于治疗或预防线状体肌病。

[0336] - 上文定义的式I化合物, 其用于治疗或预防炎性肌病。

[0337] - 上文定义的式I化合物, 其用于治疗或预防糖尿病引起的肌病。

[0338] - 上文定义的式I化合物, 其用于治疗或预防肺动脉高压引起的肌病。

[0339] - 上文定义的式I化合物, 其用于治疗或预防慢性心力衰竭特别是HFrEF和HFpEF亚型引起的肌病。

[0340] - 上文定义的式I化合物, 其用于治疗或预防肾衰竭引起的肌病。

[0341] - 上文定义的式I化合物, 其用于治疗或预防肿瘤恶病质引起的肌病。

[0342] - 上文定义的式I化合物, 其用于治疗或预防因机械通气或充血性心力衰竭对膈肌造成压力而导致的膈肌无力。

[0343] - 上文定义的式I化合物, 其用于治疗或预防先天性肌病, 特别是先天性肌肉萎缩。

[0344] - 上文定义的式I化合物, 其用于治疗或预防与年龄相关的肌肉减少症。

[0345] - 上文定义的式I化合物, 其用于治疗或预防年龄相关性心肌病。

[0346] - 上文定义的式I化合物, 其用于治疗或预防糖尿病。

[0347] 并且, 还发现: 独立于它们对肌肉状况的作用, 化合物I及其盐对与收缩或舒张功能障碍相关的心脏状况具有有益作用。因此, 本发明还涉及化合物I及其盐, 其用于治疗或预防与收缩或舒张功能障碍相关的心脏状况。

[0348] 本发明还涉及一种药物组合物(即药物), 其包含至少一种选自上文定义的通式I化合物的化合物, 或至少一种其药学上可接受的盐和至少一种药学上可接受的载体。

[0349] 根据药物形式和所需的施用方式,选择所述药学上可接受的载体。

[0350] 本发明的化合物可用于生产用于肠胃外(例如肌肉内、腹腔内、静脉内、ICV、脑内注射或输液、皮下注射或植入)、口服、舌下、气管内、鼻内、局部、经皮、阴道或直肠施用的药物组合物,并以与常规药物载体混合的单位剂量形式施用于动物或人类,用于预防或治疗上述状况或疾病。

[0351] 在药物组合物中,本发明的至少一种化合物可以单独或与其他活性化合物一起配制成包含常规载体的适当剂量单位制剂,其通常是无毒的和/或药学上可接受的。载体可以是固体、半固体或液体材料,其作为活性化合物的溶媒、载体或介质。适当的载体列在专业医学专著中。此外,所述制剂可包含药学上可接受的载体或常规辅助物质,例如助流剂;润湿剂;乳化剂和助悬剂;防腐剂;抗氧化剂;抗刺激剂;螯合剂;包衣助剂;乳液稳定剂;膜形成剂;凝胶形成剂;气味掩蔽剂;矫味剂;树脂;水胶体;溶剂;增溶剂;中和剂;扩散加速剂(diffusion accelerators);色素;季铵化合物;再脂化剂和富脂化剂;软膏剂、霜剂或油剂的原材料;硅酮衍生物;展开助剂;稳定剂;杀菌剂;栓剂基质;片剂助剂,例如粘合剂、填充剂、助流剂、崩解剂或包衣;喷射剂;干燥剂;乳浊剂;增稠剂;蜡;增塑剂和白色矿物油。制剂这方面是基于专业知识,例如Fiedler,H.P.,Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete[制药、化妆品及相关领域辅助物质百科全书(Encyclopedia of auxiliary substances for pharmacy, cosmetics and related fields)],第四版,Aulendorf:ECV-Editio-Kantor-Verlag,1996年中所述。

[0352] 适当的单位剂量形式包括口服施用形式,例如用于口服摄入的片剂、明胶胶囊剂、粉剂、颗粒剂和溶液剂或混悬剂;舌下、经颊、气管内或鼻腔施用形式,气雾剂、植入物;皮下、肌肉或静脉注射形式;以及直肠施用形式。

[0353] 本发明的化合物可用于乳膏、软膏或洗剂中,用于局部施用。

[0354] 如果以片剂形式制备固体组合物,则将主要成分与药学上可接受的载体例如明胶、淀粉、乳糖、硬脂酸镁、滑石、二氧化硅等混合。

[0355] 可将片剂包被蔗糖、纤维素衍生物或其他合适的物质,或者以其他方式处理,以显示延长或延迟的活性,并连续释放预定量的基本活性成分。

[0356] 通过将活性成分与填充剂混合并将所得混合物装入软或硬明胶胶囊中,得到明胶胶囊形式的制剂。

[0357] 糖浆或酞剂形式的制剂或以滴剂形式施用的制剂可包含活性成分和甜味剂(优选无热量)、作为防腐剂的尼泊金甲酯或尼泊金丙酯、矫味剂和适当的着色剂。

[0358] 水分散性粉末剂或颗粒剂可包含与分散剂、润湿剂或助悬剂例如聚乙烯吡咯烷酮,以及甜味剂或矫味剂混合的活性成分。

[0359] 直肠施用通过使用栓剂来实现,栓剂由在直肠温度下熔化的粘合剂例如可可脂或聚乙二醇类制成。

[0360] 肠胃外施用通过使用水性混悬剂、等渗盐溶液剂或者无菌和注射溶液剂来实现,所述剂型包括药理学上合适的分散剂和/或润湿剂,例如丙二醇或聚乙二醇。

[0361] 也可将活性成分配制成微囊或脂质体/中心体,如果合适的话,可以用一种或多种载体或添加剂。

[0362] 除了通式I化合物及其药学上可接受的盐,本发明的组合物可包含可能有益于治

疗上述损伤或疾病的其他活性成分。

[0363] 因此,本发明进一步涉及其中同时存在多种活性成分的药物组合物,其中至少一种为本发明化合物。

[0364] 当生产药物组合物时,将根据本发明的化合物任选地用一种或多种药学上可接受的载体混合或稀释。

[0365] 本发明还涉及选自上文定义的通式I化合物的化合物或其药学上可接受的盐,其用于制备治疗或预防上文定义的状况的药物,所述状况例如上文所定义的肌肉萎缩状况或者上文定义的与肌肉环指1 (MuRF1) 表达增加相关的状况特别是肌病或者与收缩或舒张功能障碍相关的心脏疾病、或糖尿病。

[0366] 对于所述药物的制备,参考与上述药物组合物相关的陈述。

[0367] 本发明还涉及用于治疗或预防上述状况的方法,所述状况例如上文定义的肌肉萎缩状况或状况,特别是肌病,其与肌肉环指1 (MuRF1) 表达增加相关,或与收缩或舒张功能障碍相关的心脏状况,或糖尿病,所述方法包括向需要其的个体施用治疗有效量的选自通式I化合物或其药学上可接受的盐的化合物的步骤。

[0368] 同样,本发明涉及保护或增强在应激状态例如长期机械通气、手术、慢性心力衰竭或原发性肌病下的膈肌收缩力的方法,所述方法包括向需要其的个体施用治疗有效量的选自通式I化合物或其药学上可接受的盐的化合物的步骤。

[0369] 本发明特别涉及:

[0370] -一种治疗或预防由充血性心力衰竭引起的骨骼肌或心肌萎缩和/或膈肌无力的方法;

[0371] -一种治疗或预防由慢性心力衰竭引起的骨骼肌或心肌萎缩的方法;

[0372] -一种治疗或预防由癌症引起的骨骼肌或心肌萎缩的方法;

[0373] -一种治疗或预防因使用肌毒和/或心脏毒物质例如阿霉素治疗癌症而导致的骨骼肌或心肌萎缩的方法;

[0374] -一种治疗或预防由先天性肌病引起的骨骼肌或心肌萎缩的方法;

[0375] -一种治疗或预防由AIDS引起的骨骼肌或心肌萎缩的方法;

[0376] -一种治疗或预防由慢性阻塞性肺病 (COPD) 引起的骨骼肌或心肌萎缩的方法;

[0377] -一种治疗或预防由慢性肾病引起的骨骼肌或心肌萎缩的方法;

[0378] -一种治疗或预防由肾衰引起的骨骼肌或心肌萎缩的方法;

[0379] -一种治疗或预防由糖尿病引起的骨骼肌或心肌萎缩的方法;

[0380] -一种治疗或预防由严重烧伤引起的骨骼肌或心肌萎缩的方法;

[0381] -一种治疗或预防因衰老期间肌肉减少而导致骨骼肌或心肌萎缩的方法;

[0382] -一种治疗或预防因血液供应减少而导致骨骼肌或心肌萎缩的方法;

[0383] -一种治疗或预防由暂时或长期固定引起的骨骼肌或心肌萎缩的方法;

[0384] -一种治疗或预防长期机械通气引起的骨骼肌或心肌萎缩和/或膈肌无力的方法;

[0385] -一种治疗或预防去神经支配导致的骨骼肌或心肌萎缩的方法;

[0386] -一种治疗或预防长期失重引起的骨骼肌或心肌萎缩的方法;

[0387] -一种治疗或预防由营养不良引起的骨骼肌或心肌萎缩的方法;

[0388] -一种治疗或预防糖尿病的方法;

- [0389] -一种治疗或预防与收缩或舒张功能障碍相关的心脏状况的方法；
- [0390] 所述方法包括向需要其的个体施用治疗有效量的选自通式I化合物或其药学上可接受的盐的化合物的步骤。
- [0391] 本发明还特别涉及：
- [0392] -一种治疗或预防危重病肌病包括在重症监护期间保护膈肌的收缩性和功能的方法；
- [0393] -一种治疗或预防线状体肌病的方法；
- [0394] -一种治疗或预防炎性肌病的方法；
- [0395] -一种治疗或预防糖尿病引起的肌病的方法；
- [0396] -一种治疗或预防肺动脉高压引起的肌病的方法；
- [0397] -一种治疗或预防慢性心力衰竭尤其是HF_rEF和HF_pEF亚型引起的肌病的方法；
- [0398] -一种治疗或预防肾衰引起的肌病的方法；
- [0399] -一种治疗或预防肿瘤恶病质引起的肌病的方法；
- [0400] 所述方法包括向需要其的个体施用治疗有效量的选自通式I化合物或其药学上可接受的盐的化合物的步骤。
- [0401] 本发明尤其涉及：
- [0402] -一种治疗或预防由射血分数降低的心力衰竭(HF-rEF)引起或与之相关的骨骼肌或心肌萎缩的方法。
- [0403] -一种治疗或预防由射血分数保持的心力衰竭(HF-pEF)引起或与之相关的骨骼肌或心肌萎缩的方法。
- [0404] -一种治疗或预防由高血压引起或与之相关的骨骼肌或心肌萎缩的方法。
- [0405] -一种治疗或预防由肿瘤恶病质引起或与之相关的骨骼肌或心肌萎缩的方法。
- [0406] -一种治疗或预防由阿霉素引起的肌肉萎缩和/或心脏毒性的方法。
- [0407] -一种治疗或预防因衰老引起的肌肉减少症和/或心肌病的方法。
- [0408] -一种治疗或预防由慢性肾病引起的肌肉萎缩的方法。
- [0409] -一种治疗或预防因机械通气或充血性心力衰竭引起的膈肌无力的方法。
- [0410] -一种治疗或预防先天性肌病特别是同源的肌肉萎缩的方法。
- [0411] -一种治疗或预防糖尿病引起的肌肉萎缩的方法。
- [0412] -一种治疗或预防糖尿病的方法。
- [0413] -一种治疗或预防与收缩或舒张功能障碍相关的心脏状况的方法。
- [0414] 本文所使用的术语“需要其的个体”是指患有的一种或多种上述状况或疾病的个体，或者是指可能患上一种或多种上述状况或疾病的个体。优选地，术语“需要其的个体”是指哺乳动物，特别是人类、生产动物或家养动物。具体而言，术语“需要其的个体”是指人。
- [0415] 本文所用的术语“有效量”和“治疗有效量”意指将引起研究人员、兽医、医生或其他临床人员寻求的组织、系统、动物或人的生物或医学反应的受试化合物的量。应认识到，本领域技术人员可通过用有效量的本发明化合物治疗目前患有所述病患的患者或预防性治疗患有所述病患的患者来影响肌肉萎缩状况和/或肌病。
- [0416] 本文结合上述方法所用的术语“治疗”是指所有过程，其中可能存在延缓、中断、阻止、控制或停止本文所述的肌肉萎缩状况和/或肌病的恶化，但这并不一定意味着所述状况

或病患的所有症状完全消除,预防性治疗上述状况,特别是对易患所述状况或病患的患者。

[0417] 本文所用的术语“组合物”旨在包括含有规定量的规定成分的产品,以及直接或间接由规定量的规定成分组合而得到的任何产品。该术语与药物组合物有关,旨在涵盖包含活性成分和构成载体的惰性成分的产品,以及直接或间接由任何两种或两种以上所述成分的组合、络合或聚集,或由一种或多种所述成分的离解,或由一种或多种所述成分的其他类型的反应或相互作用产生的任何产品。因此,本发明的药物组合物包含通过混合本发明化合物和药学上可接受的载体制备的任何组合物。

[0418] “药学上可接受的”意指载体、稀释剂或赋形剂必须与制剂的其他成分相容,且不会对受试者有害。

[0419] 术语“化合物的施用”和/或“施用化合物”应理解为向需要治疗的个体提供本发明化合物或本发明化合物的前药。

[0420] 在治疗和/或预防与MuRF1表达增加相关的上述肌肉萎缩状况和肌病时,适当的剂量水平通常为每天大约2~500mg/kg需要其的个体的体重,可将其单剂量或多剂量施用。优选地,剂量水平应是每天大约5mg/kg至大约250mg/kg。

[0421] 对于口服施用,优选将组合物以含有10~5000毫克活性成分,特别是含有50.0毫克、100.0毫克、200.0毫克、500.0毫克、1000.0毫克、2000.0毫克、3000.0毫克、4000.0毫克和5000.0毫克活性成分的片剂形式提供,用于针对需要其的个体对症调整剂量。

[0422] 所述给药方案可以调整,以提供最佳的治疗反应。然而,应该理解,任何特定患者的特定剂量水平和给药频次可有所不同,并取决于多种因素,包括所用特定化合物的活性、该化合物的代谢稳定性和作用时间、年龄、体重、一般健康、性别、饮食、施用方式和时间、排泄率、药物组合、特殊情况的严重程度以及正在接受治疗的宿主。

[0423] 本发明化合物可通过常规施用途径进行施用,包括肠胃外施用(例如肌肉内、腹腔内、静脉内、ICV、脑池内注射或输液、皮下注射或植入)、口服施用、吸入喷雾施用、鼻腔施用、阴道施用、直肠施用、舌下施用或局部施用途径。

[0424] 根据本发明的化合物进一步与其他物质联合用于治疗 and/或预防上述疾病和状况的方法中。

[0425] 本发明化合物可与一种或多种其他药物联合用于治疗 and/或预防上述疾病和状况,其中式I化合物或其他药物可具有效用,其中联合用药比单独用药更安全或更有效。所述其他药物可与式I化合物以通常所用的量,同时或依次通过一种途径施用。当式I化合物与一种或多种其他药物同时施用时,含有所述其他药物和式I化合物的单位剂型的药物组合物是优选的。然而,组合疗法也可以包括其中式I化合物和一种或多种其他药物以不同的交叠方案施用的疗法。还可以设想,当与一种或多种其他活性成分联合使用时,可将本发明化合物和其他活性成分以比单独使用时的剂量更低的量使用。上述组合包括本发明化合物不仅与一种其他活性化合物的组合,而且还包括与两种或两种以上其他活性化合物的组合。

[0426] 本发明化合物与第二种活性成分的重量比可以改变,并且取决于每种成分的有效剂量。一般情况下,每种药物都会使用有效剂量。因此,例如,当本发明化合物与另一种活性剂组合时,本发明化合物与该另一种活性剂的重量比通常在大约1000:1至大约1:1000,优选大约200:1至大约1:200。本发明化合物和其他活性成分的组合通常也在上述范围内,但

在每种情况下,应使用有效剂量的每种活性成分。在所述组合中,本发明化合物和其他活性物质可单独或联合施用。此外,一种活性物质的施用可以在其它活性剂施用之前、同时或之后进行。

[0427] 下述实施例和附图旨在进一步说明本发明。

[0428] 缩写:

[0429]	ALPHA	放大发光接近均匀分析;
[0430]	DSF	差示扫描荧光测定法;
[0431]	GST	谷胱甘肽-S-转移酶;
[0432]	UBE1	重组人His6泛素激活酶;
[0433]	DMSO	二甲基亚砷;
[0434]	CDI	1,1'-羰基二咪唑;
[0435]	DMEM	Dulbecco改良Eagle培养基;
[0436]	Sham	生理盐水-处理的;
[0437]	DEX	地塞米松;
[0438]	PBS	磷酸盐缓冲盐水;
[0439]	MCT	野百合碱;
[0440]	TA	胫前肌;
[0441]	TL	胫骨长度;
[0442]	EDL	趾长伸肌;
[0443]	CSA	横截面积;
[0444]	LAD	左前dexterior冠状动脉结扎术;
[0445]	MI	心肌梗塞;
[0446]	WB	蛋白质印迹;
[0447]	BW	体重;
[0448]	CHF	慢性心力衰竭;
[0449]	LV	左心室;
[0450]	LVEDD	左室舒张末期直径;
[0451]	LVEF	左室射血分数;
[0452]	LVESD	左室收缩末期直径;
[0453]	LVFS	左室(射血)分数缩短;
[0454]	MRPS-5	线粒体核糖体蛋白5;
[0455]	Nox 2	NADPH氧化酶2;
[0456]	CS	柠檬酸合酶;
[0457]	SDH	琥珀酸脱氢酶;
[0458]	TOM-20	线粒体外膜转位酶20;
[0459]	GAPDH	甘油醛3-磷酸脱氢酶;
[0460]	AU	任意单位;
[0461]	HPRT	次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶;
[0462]	FRET	荧光共振能量转移;

- [0463] MAFbx 肌肉萎缩F-盒；
 [0464] CARP 心脏阿霉素反应蛋白；
 [0465] GAPDH 3-磷酸甘油醛脱氢酶；
 [0466] eIF2B-delta 翻译起始因子eIF-2B亚单位 δ ；
 [0467] AS3MT 亚砷酸盐甲基转移酶；
 [0468] ATPAF1 ATP合酶线粒体F1复合体组装因子2；
 [0469] GHDC 含GH3结构域的蛋白；
 [0470] BAX 凋亡调节因子BAX。

[0471] 附图：

[0472] 图1：在浓度增加的化合物MyoMed-946、MyoMed-946-5、MyoMed-946-8存在下基于培养的成肌细胞中乳酸脱氢酶 (LDH) 活性释放的细胞毒性试验结果。

[0473] 图2：在浓度增加的化合物MyoMed-946、MyoMed-946-5、MyoMed-946-8存在下基于培养的肌细胞中乳酸脱氢酶 (LDH) 活性释放的细胞毒性试验结果。

[0474] 图3~7：假处理组 (sham) (n=20) 和用野百合碱处理的喂食正常食物 (MCT;n=27) 或用野百合碱处理的喂食MyoMed-946化合物 (MCT+MyoMed-946;n=27) 的小鼠的身体特征。数据证实MCT处理引起独立于施用的饮食的心脏恶病质,如体重增加受损 (图3), 肺淤血增加 (图4) 和心脏重量相对于体重 (BW) 增加 (图5), 以及右心室 (RV) 肥大 (图6) 减弱,后者由代表性的H&E染色的心脏内侧横截面可视化 (图7)。 $*P<0.01$ vs.假处理组。

[0475] 图8~12：在不存在或存在MuRF1抑制剂MyoMed-946的情况下, MCT处理的小鼠的趾长伸肌 (EDL) (图8)、比目鱼肌 (图9)、胫前肌 (TA) (图10) 的骨骼肌湿重 (相对于胫骨长度TL标准化)。此外,还提供TA肌的纤维横截面积 (CSA) (图11),后者由代表性的H&E染色可视化 (图12)。 $*P<0.05$ vs.假处理组; $^{\$}P<0.01$ vs.假处理组和MCT+MyoMed-946。

[0476] 图13~18：假处理组 (n=10) 和野百合碱处理小鼠的身体特征,所述野百合碱处理小鼠喂食正常食物 (MCT;n=10) 或MuRF1抑制剂MyoMed-946 (MCT+MyoMed-946;n=10)、MyoMed-203 (MCT+MyoMed-203;n=10) 和MyoMed-205 (MCT+MyoMed-205;n=10)。数据以平均值 \pm 平均值的准差表示。图13: $***p<0.001$ vs.开始;图14: $***p<0.001$ vs.假处理 $**p<0.01$ vs.假处理;图15: $***p<0.001$, $**p<0.01$ vs.假处理, $^{\$}\$p<0.01$, $^{\$}p<0.05$ vs.MCT;图16-18: $*P<0.01$ vs.假处理。数据证实MCT处理引起独立于施用的食物的心因性恶病质,如体重增加受损 (图13), 肺淤血增加 (图14) 和心脏重量相对于体重 (BW) 增加 (图15) 所示,并且MuRF1抑制剂MyoMed-946、MyoMed-203和MyoMed-205可减轻右心室 (RV) 肥大 (图16-18)。

[0477] 图19和20：在不存在 (假处理) 或存在MuRF1抑制剂MyoMed-946、MyoMed-203和MyoMed-205的情况下, MCT-处理小鼠的趾长伸肌 (EDL) (图19) 和胫前肌 (TA) (图20) 的骨骼肌湿重 (相对于胫骨长度TL标准化)。

[0478] 图21：在不存在 (假处理) 或存在MuRF1抑制剂MyoMed-946、MyoMed-203和MyoMed-205的情况下, MCT-处理小鼠的膈肌最大力。

[0479] 图22和23：在不存在 (假处理) 或存在MuRF1抑制剂MyoMed-946、MyoMed-203和MyoMed-205的情况下, MCT-处理小鼠的MuRF1 (图22) 和连续蛋白 (telethonin) (图23) 在胫前肌组织中的表达。

[0480] 图24-27：心肌梗塞 (MI) 后射血分数降低的 (HFrEF) 慢性心力衰竭 (CHF) 小鼠膈肌

肌纤维束的等长收缩(图24)和等张收缩(图25)期间评价的膈肌功能,由此测定膈肌最大力(图26)和膈肌峰值功率(图27)。数据表示为平均值±平均值的标准误差。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. CHF, § $P < 0.05$ 和§§ $P < 0.01$ vs. CHF+MyoMed-946。

[0481] 图28~30:等长收缩(图28)和等张收缩期间评估的体外骨骼肌收缩功能,从而测定缩短速度(图29)和功率(图30)。与假处理组相比,MCT处理的小鼠显示在缩短速度和功率方面的损伤约为20%。所述损伤在喂食MyoMed-946化合物的MCT小鼠中基本上得到阻止。* $P < 0.05$ vs 假处理组; § $P < 0.01$ vs 假处理组和MCT+MyoMed-946。

[0482] 图31:接受常规食物的B16F10细胞接种小鼠(肿瘤),以及喂食MyoMed-946(肿瘤+MyoMed-946)和MyoMed-205(肿瘤+MyoMed-205)的B16F10细胞接种小鼠的胫前肌(TA)肌肉湿重。

[0483] 图32:接种后第9天、第16天和第23天,B16F10细胞接种小鼠(黑色素瘤细胞模型)的金属丝悬挂试验。与对照组(假处理)小鼠相比,肿瘤生长导致肌肉功能显著降低(肿瘤组)。所述肌肉功能的降低在喂食化合物MyoMed-946(肿瘤+MyoMed-946)和MyoMed-205(肿瘤+MyoMed-205)的小鼠中减弱。

[0484] 图33~35:western blot分析测定的假处理小鼠、MCT小鼠和MCT+MyoMed-946小鼠的eIF2B亚单位- δ (图33)和BAX(图34)的表达水平,代表性blots(图35)。* $P < 0.05$ vs 假处理组; § $P < 0.01$ vs. MCT。

[0485] 图36~38:假处理、MCT和MCT+MyoMed-946小鼠的MuRF1(图36)、MAFBx(图37)和CARP(图38)的蛋白表达水平和代表性western blots。MCT处理导致MuRF1和CARP的表达增加,但在喂食MyoMed-946化合物的小鼠中所述表达减弱。未检测到MAFBx水平的变化。* $P < 0.05$ vs 假处理组和MCT MyoMed-946。

[0486] 图39:假处理小鼠、CHF小鼠和CHF+MyoMed-946小鼠的在膈肌组织中的MRPS-5蛋白表达水平和代表性western blots。数据表示为平均值±平均值的标准误差。

[0487] 图40~42:假处理小鼠、CHF小鼠和CHF+MyoMed-946小鼠的膈肌组织中MuRF1(图40)、MuRF2(图41)和连续蛋白(图42)的蛋白表达水平和代表性western blots。CHF导致MuRF1和MuRF2表达增加,并且连续蛋白表达减少,但所述作用在喂食MyoMed-946化合物的小鼠中减弱。数据表示为平均值±平均值的标准误差。

[0488] 图43~46:在喂食常规食物(肿瘤)或者喂食化合物MyoMed-946(肿瘤+MyoMed-946)或MyoMed-205(肿瘤+MyoMed-205)的B16F10细胞接种小鼠的肌肉组织中,通过western blots(WB)分析(图43)测定的MuRF1、Nox 2(图44)和LC3 I/II(图46)蛋白表达水平以及活性氧标记物硝基酪氨酸的水平(图45)。与对照组(假处理)小鼠相比,肿瘤生长导致肿瘤组中MuRF1和Nox 2的蛋白表达水平以及硝基酪氨酸水平显著增加,并导致LC3 I/II表达水平显著降低。所述变化在喂食化合物MyoMed-946(肿瘤+MyoMed-946)或MyoMed-205(肿瘤+MyoMed-205)的小鼠中减弱。数据表示为平均值±平均值的标准误差。

[0489] 图47~49:假处理小鼠、慢性心力衰竭(CHF)小鼠和CHF+MyoMed-946小鼠的膈肌组织样本中柠檬酸合成酶(图47)、琥珀酸脱氢酶(图48)和线粒体复合物I(图49)的酶活性。数据显示,与假处理组相比,CHF的柠檬酸合成酶、琥珀酸脱氢酶和线粒体复合物I的活性显著下调,但在喂食化合物MyoMed-946的小鼠中所述下调减弱。数据表示为平均值±平均值的标准误差。

[0490] 图50和51:假处理小鼠、慢性心力衰竭(CHF)小鼠和CHF+MyoMed-946小鼠的膈肌组织样本中,线粒体外膜的线粒体孔蛋白的蛋白表达水平(图50)和TOM-20(图51)。数据显示,与假处理组相比,CHF的孔蛋白和TOM-20表达显著下调,但在喂食化合物MyoMed-946的小鼠中所述下调减弱。数据表示为平均值±平均值的标准误差。

[0491] 图52和53:在假处理小鼠、喂食常规食物的B16F10细胞接种小鼠(肿瘤)或者喂食化合物MyoMed-946(肿瘤+MyoMed-946)或MyoMed-205(肿瘤+MyoMed-205)的B16F10细胞接种小鼠的肌肉组织样本中,柠檬酸合酶(图52)和线粒体复合物I(图53)的酶活性。数据显示,与假处理组相比,肿瘤组的柠檬酸合酶和线粒体复合物I活性显著下调,但在喂食化合物MyoMed-946或MyoMed-205的小鼠中所述下调减弱。数据表示为平均值±平均值的标准误差。

[0492] 图54:用地塞米松(DEX; $10\mu\text{mol/L}$)孵育24小时后,肌管mRNA水平的MuRF1表达。显示的是未处理细胞(DEX),以及用 $0.1\mu\text{mol/L}$ 和 $10\mu\text{mol/L}$ 化合物MyoMed-946预处理2小时的细胞的倍数变化。预处理的细胞显示MuRF1 mRNA水平降低。 $*P<0.05\text{vs. CON.}^{\S}P<0.05\text{vs. DEX.}$

[0493] 图55:示差扫描荧光分析法(DSF)融化曲线,就350nm处的荧光信号与330nm处的荧光信号的比值与热梯度作图,对于PBS缓冲液中的MuRF1中心片段(实线),PBS缓冲液+1% DMSO中的MuRF1中心片段(虚线),以及对于PBS缓冲液+1%的化合物MyoMed-946的DMSO的10mM储备液中的MuRF1中心片段(MyoMed-946的最终浓度: $100\mu\text{M}$)(点线)。

[0494] 图56:HFpEF大鼠模型实验研究设计示意图。

[0495] 图57:HFpEF大鼠模型实验的心肌功能超声心动图和有创血流动力学测量结果。

[0496] 图58:HFpEF大鼠模型实验的骨骼肌质量和功能测量结果。

[0497] 图59:阿霉素诱导的肌肉萎缩和心脏毒性小鼠模型的恶病质和身体应激结果。

[0498] 图60:阿霉素诱导的肌肉萎缩和心脏毒性小鼠模型的超声心动图结果。

[0499] 图61:2型糖尿病肥胖小鼠在饮食诱导的体重减轻期间的金属丝悬挂试验。MyoMed-205治疗可减轻肌肉功能的损失。

[0500] 图62:与DIO对照组小鼠相比,MyoMed-203治疗的DIO小鼠禁食6小时后的血糖水平。

[0501] 图63和64:与DIO对照组小鼠相比,MyoMed-203治疗的DIO小鼠在试验第14天和第28天的口服葡萄糖耐量试验结果。

[0502] 图65:与DIO对照组小鼠相比,MyoMed-203治疗的DIO小鼠的胰岛素耐受试验结果。

[0503] I. 化合物I的合成

[0504] 1. 分析

[0505] 如果没有另外说明,在400MHz NMR仪器(Bruker AVANCE III)上,将化合物通过在 d_6 -二甲基亚砜(DMSO- d_6)中经 ^1H NMR和最后 ^{13}C NMR进行表征。

[0506] 核磁共振谱特性(NMR)是指以百万分之一(ppm)表示的化学位移(δ)。 ^1H NMR谱中位移的相对面积相应于分子中一种特定功能类型的氢原子数。就多重性而言,将位移的性质表示为单重态(s)、宽单重态(s.br.)、双峰(d)、宽双峰(d.br.)、三重峰(t)、宽三重峰(t.br.)、四重峰(q)、五重峰(quint.)和多重峰(m)。

[0507] 将化合物进一步通过HPLC-MS和/或UPLC-MS以C18-材料上的快速梯度(电喷雾电离(ESI)模式)来表征。如果没有另外说明,ESI MS-数据以正模式记录。MS数据是指质子化

化合物 $(M+H)^+$, 以质荷比 (m/z) 表示, 其中 z 为 1。

[0508] HPLC-MS说明:

[0509] HPLC-MS仪器: 装配DAD\ELSD的安捷伦1100Series LC/MSD系统和安捷伦LC\MSD VL(G1956A), SL(G1956B) 质谱仪或者装配DAD\ELSD的安捷伦1200Series LC/MSD系统和安捷伦LC\MSD SL(G6130A), SL(G6140A) 质谱仪。所有的LC/MS数据都是通过正/负模式转换获得的。

[0510] 采集方法: 柱子: Zorbax SB-C18 1.8 μ m 4.6x15mm Rapid Resolution cartridge (PN 821975-932)。流动相 A: 乙腈+0.1% 甲酸; B: 含0.1% 甲酸的水。流速: 3ml/min; 进样体积: 1 μ l。

[0511] 溶剂梯度:

[0512] 0-0.01分钟100%B;

[0513] 0.01-1.5分钟100%至0%B, 线性梯度;

[0514] 1.5-1.8分钟0%B;

[0515] 1.8-1.81分钟0%至100%B。

[0516] 电离模式: 大气压化学电离 (APCI);

[0517] 扫描范围: m/z 80-1000。

[0518] UPLC-MS说明:

[0519] UPLC-MS仪器: 装配单四极杆的Agilent Infinity 1290, 电喷雾电离质谱仪;

[0520] 采集方法: 柱子: Acquity UPLC BEH C18; 1.7 μ m; 2.1x50mm; T=40 $^{\circ}$ C。流动相: A: 水+0.1% 三氟乙酸; B: MeCN+0.1% 三氟乙酸。流速: 1ml/min; 进样体积: 3 μ l; 运行时间 3min。

[0521] 溶剂梯度 (3分钟梯度):

[0522] 0-2.3分钟5%-100%B, 线性梯度;

[0523] 2.3-2.5分钟100%B;

[0524] 2.5-2.6分钟100-5%B, 线性梯度;

[0525] 2.6-3.0分钟100%B。

[0526] 如果没有另外说明, ESI MS-数据以正模式记录。MS-数据是指质子化化合物 $(M+H)^+$, 以质荷比 (m/z) 表示, 其中 z 为 1。

[0527] 2. 合成

[0528] 2.1 制备型HPLC-纯化

[0529] 利用HPLC (H_2O -MeOH或 H_2O - CH_3CN ; 安捷伦1260Infinity systems), 其装配有DAD的和质谱-检测器, 使用Waters SunFire C18 OBD制备柱 (100 \AA , 5 μ m, 19mm X 100mm, 装配SunFire C18 Prep Guard Cartridge, 100 \AA , 10 μ m, 19mm X 10mm), 完成制备型HPLC-纯化。将原料化合物溶解在0.7mL DMSO中。流速: 30mL/min。通过分析型LCMS检测所得级分的纯度。记录每个级分的光谱, 因为它是在色谱后以溶液形式直接获得的。溶剂在80 $^{\circ}$ C的 N_2 流中蒸发。将个体级分基于色谱后LCMS分析合并。将固体级分溶于0.5mL MeOH/ CH_3CN 中, 并转移到预先称重带标记的小瓶中。获得的溶液在80 $^{\circ}$ C的 N_2 流中再次蒸发。干燥后, 将产物最终用LC-MS和 1H -NMR表征。

[0530] 2.2 中间体

[0531] 2.2.1 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]乙酸

[0532] 将80.6g (0.458mol) 7-羟基-4-甲基香豆素、110.1g 4-(溴甲基)苯甲酸甲酯(0.480mol)和无水 K_2CO_3 (95g, 0.686mol) 在无水丙酮(800mL)中的混合物加热回流3小时。然后,将混合物冷却,过滤,并真空浓缩滤液。将残留物溶解在DMSO (450mL)中,并加入氢氧化钾水溶液(200mL, 20% KOH)。将所得混合物在环境温度下搅拌72h。水解完成后,加入1L水,将溶液用10%盐酸酸化至pH=1-2。将形成的沉淀物过滤并真空干燥,得到纯产物。4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]乙酸的产率是75% (106g)。

[0533] HPLC-MS (正模式) :m/z 311 (M+H)⁺; 保留时间:1.11min.

[0534] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆, ppm) : δ = 13.01 (br s, 1H), 8.0-7.97 (m, 2H), 7.71 (d, J = 7.0Hz, 1H), 7.60-7.58 (m, 2H), 7.09-7.05 (m, 2H), 6.23 (s, 1H), 5.34 (s, 2H), 2.40 (s, 3H) .

[0535] 2.2.2 2-氨基-N-(2-咪喃基甲基氨基甲酰基)乙酰胺

[0536] 将1.46g (6.74mmol) 2-氯-N-(2-咪喃基甲基-氨基甲酰基)乙酰胺和叠氮化钠90mg (NaN_3 , 2eq.) 在15ml乙醇中的混合物于70°C搅拌过夜。冷却至室温后,除去固体物,并将获得的滤液真空浓缩(1/3体积)。将残留物在EtOAc和水之间分配。将有机层用盐水洗涤, Na_2SO_4 干燥,并真空蒸发。将残余物溶解于MeOH中,并向其中加入Pd/C。将混合物脱气,并在氢气气氛下于RT搅拌过夜。除去催化剂,并将滤液蒸发,并真空干燥,以得到粗胺,不需进一步纯化,将其用于下一步中。(X=0 0.8g 60%; X=0 0.7g 62% (历经2步))。

[0537] 2.2.3 2-氨基-N-(2-噻吩基甲基氨基甲酰基)乙酰胺

[0538] 除了将1.26g (5.41mmol) 2-氯-N-(2-噻吩基甲基氨基甲酰基)-乙酰胺用作原料代替2-氯-N-(2-咪喃基甲基-氨基甲酰基)乙酰胺,类似于实施例2.2.2,制备2-氨基-N-(2-噻吩基甲基氨基甲酰基)乙酰胺。不需进一步纯化,将由此得到的粗2-氨基-N-(2-噻吩基甲基-氨基甲酰基)乙酰胺用于下一步。产率:0.7g 62% (历经2步)。

[0539] 2.3化合物I

[0540] 实施例1

[0541] 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸[2-(2-咪喃基甲基氨基甲酰基氨基)-2-氧代-乙基]酯(MyoMed-946)的合成

[0542] 将310mg (1.0mmol) 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]-乙酸、228mg (1.05mmol) 2-氯-N-(2-咪喃基甲基氨基甲酰基)乙酰胺、75mg (0.5mmol) NaI和DIPEA 155mg (1.2mmol)的混合物溶于6mL DMSO中。将得到的浆液在室温下搅拌72h,以完成反应;通过LC-MS控制转化。然后,将反应混合物倒入50mL水中,过滤所得沉淀物,随后用另外一部分水、异丙醇和己烷洗涤。将固体产品真空干燥。4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基-甲基]苯甲酸[2-(2-咪喃基甲基氨基甲酰基氨基)-2-氧代-乙基]酯(MyoMed-946)的产率是61% (289mg)。

[0543] 在室温下储存几个月后,4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸[2-(2-咪喃基甲基氨基甲酰基氨基)-2-氧代-乙基]酯(MyoMed-946)没有任何衰变迹象(通过NMR和LC-MS确证的)。

[0544] HPLC-MS (正模式) :m/z 491/492 (M+H)⁺; 保留时间:1.436min.

[0545] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆, ppm) : δ = 10.50 (br. s, 1H, NH), 7.85 (br. s, 1H, NH), 7.55 (d, J=8.0Hz, 2H, CH+CH), 7.22 (d, J=8.4Hz, 1H, CH), 7.15 (d, J=8.0Hz, 2H, CH+CH), 7.09

(s, 1H, CH), 6.60 (m, 2H, CH+CH), 5.90 (m, 1H, CH), 5.78 (d, J=1.4Hz, 1H, CH), 5.74 (s, 1H, CH), 4.87 (s, 2H, OCH₂), 4.44 (s, 2H, OCH₂), 3.88 (d, J=5.2Hz, 2H, NCH₂), 1.91 (s, 3H, CH₃).

[0546] MyoMed-946进一步分析表征

[0547] 利用1D和2D NMR和UPLC-MS,进一步评价化合物的纯度和鉴定,如下所示:

[0548] 对于NMR分析,将2mg MyoMed-946溶于1ml含有微量CCl₄的d₆-二甲基亚砷中。记录¹H-和¹³C-谱,以及用于¹H-NMR峰分配的COSY和HSQC2D-NMR谱。

[0549] ¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆+CCl₄): δ=10.68 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.05 (d, J=7.37Hz, 2H), 7.53-7.45 (m, 4H), 7.14-6.91 (m, 2H), 6.40 (s, 1H), 6.30-6.16 (m, 2H), 5.37 (s, 2H), 4.94 (s, 2H), 4.44-4.23 (m, 2H), 2.41 (s, 3H).

[0550] ¹³C NMR (126MHz, DMSO-d₆+CCl₄): δ=169.0, 165.1, 161.0, 160.0, 154.6, 153.3, 152.5, 151.8, 142.3 (2C), 129.6 (2C), 128.5, 127.6 (2C), 126.6, 113.5, 112.6, 111.4, 110.4, 107.0, 101.8, 69.1, 62.7, 36.0, 18.1.

[0551] 对于UPLC-MS分析,将少量MyoMed-946溶于乙腈 (MeCN) 中,并将3μl该溶液进样至C18 UPLC柱 (Acquity UPLC BEH C18; 1.7μm; 2.1x50mm) 中。UPLC-MS系统和分析方法如上所述。

[0552] UPLC-MS (正模式): m/z=491.1 (M+H)⁺; 保留时间: 1.7min。

[0553] 实施例2:

[0554] 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸(1-甲基-2-氧代-2-脲基-乙基)酯(MyoMed-946-5)的合成

[0555] 除了用N-氨基甲酰基-2-氯-丙酰胺代替2-氯-N-(2-呋喃基甲基-氨基甲酰基)乙酰胺,类似于实施例1,完成合成。

[0556] HPLC-MS (正模式): m/z 439 (M+H)⁺; 保留时间1.388min。

[0557] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆, ppm): δ=10.63 (br. s, 1H), 8.05-7.98 (m, 3H), 7.72-7.68 (m, 1H), 7.68-7.59 (m, 2H), 7.05-7.01 (m, 2H), 6.23 (s, 1H), 5.35 (s, 2H), 5.22-5.14 (m, 1H), 2.70 (d, 3H), 2.39 (s, 3H), 1.50 (d, 3H).

[0558] 实施例3:

[0559] 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸[1-甲基-2-(甲基氨基甲酰基氨基)-2-氧代-乙基]酯(MyoMed-946-8)的合成

[0560] 除了用2-氯-N-(甲基氨基甲酰基)丙酰胺代替2-氯-N-(2-呋喃基甲基-氨基甲酰基)乙酰胺,类似于实施例1,完成合成。

[0561] HPLC-MS (正模式): m/z 425 (M+H)⁺; 保留时间1.327min。

[0562] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆, ppm): δ=10.51 (br. s, 1H), 8.06-7.97 (m, 2H), 7.73-7.67 (m, 1H), 7.67-7.59 (m, 2H), 7.54 (br, s, 1H), 7.33 (br, s, 1H), 7.09-7.02 (m, 2H), 6.22 (s, 1H), 5.35 (s, 2H), 5.22-5.14 (m, 1H), 2.39 (s, 3H), 1.51 (d, 3H).

[0563] 实施例4:

[0564] N-[2-(2-呋喃基甲基氨基甲酰基氨基)-2-氧代-乙基]-4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酰胺的合成

[0565] 向实施例2.2.2中得到的2-氨基-N-(2-呋喃基甲基氨基甲酰基)乙酰胺(0.6mmol)、558mg(1.8mmol)4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]-乙酸、1-羟基-7-

氮杂苯并三唑109mg (HOAt, 0.8mmol) 的2mL DMF的冷却溶液中, 滴加EDC 124mg (0.8mmol), 并将混合物在室温下搅拌过夜。收集形成的沉淀物, 用甲醇冲洗, 然后用水冲洗, 再次用甲醇冲洗, 并干燥, 得到110mg标题化合物。产量: 37%。

[0566] ^1H NMR (400MHz, DMSO- D_6 , ppm) : δ = 10.53 (s, 1H), 8.82 (t, J = 5.7Hz, 1H), 8.51 (br. s, 1H), 7.89 (d, J = 8.0Hz, 2H), 7.70 (d, J = 8.6Hz, 1H), 7.56 (m, 3H), 7.06 (m, 2H), 6.37 (s, 1H), 6.24 (d, J = 2.5Hz, 1H), 6.21 (s, 1H), 3.50 (s, 2H), 4.35 (d, J = 5.7Hz, 2H), 3.99 (d, J = 5.0Hz, 2H), 2.38 (s, 3H) .

[0567] 实施例5:

[0568] 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸[2-氧代-2-(2-噻吩基甲基氨基甲酰基氨基)乙基]酯的合成

[0569] 将310mg (1.0mmol) 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]-乙酸、250mg (1.05mmol) 2-氯-N-(2-噻吩基甲基氨基甲酰基)乙酰胺、75mg (0.5mmol) NaI和155mg (1.2mmol) DIPEA的混合物溶于6mL DMSO中。将得到的浆液在室温下搅拌72h, 以完成反应; 通过LC-MS谱监控转化。然后, 将反应混合物倒入50mL水中, 将形成的沉淀物过滤, 随后用另外一部分水、异丙醇和己烷依次洗涤。将产物在真空条件下干燥。4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸[2-氧代-2-(2-噻吩基甲基氨基甲酰基-氨基)乙基]酯的产率61% (310mg)。

[0570] HPLC-MS (正模式) : m/z 507/508 (M+H)⁺; 保留时间1.399min。

[0571] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6 , ppm) : δ = 10.67 (br s, 1H), 8.47 (br s, 1H), 8.03 (d, J = 8.0, 2H), 7.71 (d, J = 8.0, 1H), 7.64 (d, J = 8.0, 2H), 7.39 (d, J = 4.0, 1H), 7.08-6.95 (m, 4H), 6.22 (s, 1H), 5.35 (s, 2H), 4.92 (s, 2H), 4.52 (d, J = 4.6, 2H), 2.39 (s, 3H) .

[0572] 实施例6:

[0573] 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]-N-[2-氧代-2-(2-噻吩基甲基-氨基甲酰基氨基)乙基]苯甲酰胺

[0574] 类似于与实施例3, 制备标题化合物。得到90mg标题化合物。产率: 30%。

[0575] ^1H NMR (400MHz, DMSO- D_6 , ppm) : δ = 10.52 (s, 1H), 8.82 (t, J = 5.7Hz, 1H), 8.63 (br. s, 1H), 7.89 (d, J = 8.0Hz, 2H), 7.68 (d, J = 8.7Hz, 1H), 7.55 (d, J = 8.0Hz, 2H), 7.39 (d, J = 4.2Hz, 1H), 7.07 (m, 2H), 6.98 (s, 1H), 6.95 (m, 1H), 6.21 (s, 1H), 5.31 (s, 2H), 4.23 (d, J = 5.2Hz, 2H), 4.00 (d, J = 5.7Hz, 2H), 2.39 (s, 3H) .

[0576] 实施例7

[0577] 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸[2-氧代-2-(2-吡啶基甲基氨基甲酰基氨基)乙基]酯 (MyoMed-203) 的合成

[0578] 2-氯-N-(2-吡啶基甲基氨基甲酰基)乙酰胺的制备:

[0579] 向冷却至-10°C、搅拌的2-吡啶基甲胺 (7.84g, 72.5mmol) 的无水二氯甲烷 (100mL) 溶液中, 加入氯乙酰异氰酸酯 (8.66g, 72.5mmol), 并将反应混合物在r. t. 下搅拌2h。将沉淀的固体经过滤收集, 用二氯甲烷 (2×30ml) 洗涤, 并干燥, 得到12.0g (52.7mmol, 产率: 73%) 2-氯-N-(2-吡啶基甲基氨基甲酰基)乙酰胺。

[0580] ^1H NMR (500MHz, 氯仿-d) : δ = 9.45 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.67 (t, J = 7.1Hz, 1H), 7.28 (d, J = 8.0Hz, 1H), 7.24-7.18 (m, 1H), 4.65 (d, J = 5.2Hz, 2H), 4.13 (s, 2H) .

[0581] HPLC-MS (负模式) m/z 226 (M-H)⁺; 保留时间0.565min。

[0582] 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸的制备:

[0583] 向7-羟基-4-甲基-色烯-2-酮(80.6g, 458mmol)的丙酮(1000mL)溶液中,加入K₂CO₃(94.9g, 687mmol)和4-(溴甲基)苯甲酸甲酯(110g, 480mmol),并将反应混合物回流3h。然后,将其冷却至r.t.,并过滤。将滤液减压蒸发,并将残余物与水(1000mL)混合。将不溶性固体经过滤收集,用水、2-丙醇和己烷洗涤,干燥并溶解在DMSO(500mL)中。将20% KOH水溶液(150mL)加入到得到的4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸甲酯的溶液中,并将混合物在r.t.下搅拌过夜。反应完成后,将其倒入水(3000mL)中,并用10%盐酸酸化至pH 1-2。搅拌30min后,将沉淀的固体经过滤收集,用水、2-丙醇和己烷洗涤,并干燥,得到106g(342mmol, 产率75%) 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸。

[0584] 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸甲酯:

[0585] ¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆): δ = 7.98 (d, J = 8.1Hz, 2H), 7.68 (d, J = 8.5Hz, 1H), 7.60 (d, J = 8.1Hz, 2H), 7.12-6.96 (m, 2H), 6.20 (s, 1H), 5.32 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.38 (s, 3H) .

[0586] 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸:

[0587] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ = 12.99 (br s, 1H), 7.96 (d, J = 7.2Hz, 2H), 7.67 (d, J = 8.4Hz, 1H), 7.57 (d, J = 7.2Hz, 2H), 7.11-6.99 (m, 2H), 6.20 (s, 1H), 5.31 (s, 2H), 2.37 (s, 3H) .

[0588] HPLC-MS (正模式) m/z 311 (M+H)⁺; 保留时间1.242min。

[0589] 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸[2-氧代-2-(2-吡啶基甲基氨基甲酰基氨基)乙基]酯的制备

[0590] 将4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸(9.28g, 29.9mmol)、2-氯-N-(2-吡啶基甲基氨基甲酰基)乙酰胺(7.49g, 32.9mmol)、DIPEA(4.64g, 35.9mmol)和NaI(0.900g, 6.00mmol)的DMSO(100mL)混合物在r.t.下搅拌过夜,然后倒入冷水(500mL)中。将沉淀的固体经过滤收集,用水、2-丙醇和己烷洗涤,并干燥,得到13.8g(27.5mmol, 产率: 92%) 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸[2-氧代-2-(2-吡啶基甲基氨基甲酰基-氨基)乙基]酯(MyoMed-203)。

[0591] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ = 10.65 (br s, 1H), 8.69 (br s, 1H), 8.47 (d, J = 4.6Hz, 1H), 8.01 (d, J = 8.1Hz, 2H), 7.73 (t, J = 8.4Hz, 1H), 7.67 (d, J = 8.7Hz, 1H), 7.61 (d, J = 8.1Hz, 2H), 7.28 (d, J = 7.7Hz, 1H), 7.26-7.20 (m, 1H), 7.08-6.97 (m, 2H), 6.19 (s, 1H), 5.33 (s, 2H), 4.91 (s, 2H), 4.46 (d, J = 5.3Hz, 2H), 2.36 (s, 3H) .

[0592] HPLC-MS (负模式) m/z 502 (M-H)⁺; 保留时间1.176min。

[0593] 实施例8

[0594] 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]-N-[2-(2-噻吩基甲基-氨基甲酰基氨基)乙基]苯甲酰胺(MyoMed-205)的合成

[0595] N-[2-(2-噻吩基甲基氨基甲酰基氨基)乙基]氨基甲酸叔丁酯的制备:

[0596] 向CDI(42.8g, 264mmol)的无水乙腈(400mL)混悬液中,加入2-噻吩基甲胺(14.9g, 132mmol),并将反应混合物在超声浴中于r.t.下保持1h。然后,加水(2.5mL),并将混合物在超声浴中再保持30min。溶液脱气后,加入N-boc-乙二胺(21.1g, 132mmol),并将反应在50°C下搅拌2h。然后,将混合物冷却至r.t.,并减压蒸发。将残余物用水(100mL)研磨,过滤,并干

燥,得到35.2g (118mmol, 89%) N-[2-(2-噻吩基甲基氨基甲酰基氨基)-乙基]氨基甲酸叔丁酯。

[0597] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ = 7.35 (d, J = 5.8Hz, 1H), 6.97-6.88 (m, 2H), 6.83-6.72 (m, 1H), 6.55-6.38 (m, 1H), 6.07-5.93 (m, 1H), 4.34 (d, J = 5.9Hz, 2H), 3.11-3.00 (m, 2H), 2.99-2.88 (m, 2H), 1.37 (s, 9H) .

[0598] HPLC-MS (正模式) m/z 300 (M+H) $^+$; 保留时间1.156min。

[0599] 2-(2-噻吩基甲基氨基甲酰基氨基)乙基氯化铵的制备:

[0600] 向N-[2-(2-噻吩基甲基氨基甲酰基氨基)-乙基]氨基甲酸叔丁酯 (19.5g, 65.1mmol) 的无水二氯甲烷 (200mL) 溶液中, 加入10% 二氧六环/HCl (50mL), 并将反应物在 r. t. 下搅拌2h。将沉淀的固体物经过滤收集, 并真空干燥, 得到14.3g (60.6mmol, 95%) 2-(2-噻吩基甲基氨基甲酰基氨基)乙基氯化铵。

[0601] ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6): δ = 8.08 (br s, 3H), 7.35 (s, 1H), 6.93 (s, 2H), 6.78 (br s, 1H), 6.51 (br s, 1H), 4.38-4.29 (m, 2H), 3.31-3.19 (m, 2H), 2.88-2.74 (m, 2H) .

[0602] HPLC-MS (正模式) m/z 200 (M+H) $^+$; 保留时间0.428min。

[0603] 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸的制备:

[0604] 向7-羟基-4-甲基-色烯-2-酮 (80.6g, 458mmol) 的丙酮 (1000mL) 溶液中, 加入 K_2CO_3 (94.9g, 687mmol) 和4-(溴甲基)苯甲酸甲酯 (110g, 480mmol), 并将反应混合物回流3h。然后, 将其冷却至 r. t., 并过滤。减压蒸发滤液, 并将残留物与水 (1000mL) 混合。将不溶性固体经过滤收集, 用水、2-丙醇和己烷洗涤, 干燥并溶解在DMSO (500mL) 中。将20% KOH水溶液 (150mL) 加入到得到的4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸甲酯的溶液中, 并将混合物在 r. t. 下搅拌过夜。反应完成后, 将其倒入水 (3000mL) 中, 并用10% 盐酸酸化至pH 1-2。搅拌30min后, 将沉淀的固体经过滤收集, 用水、2-丙醇和己烷洗涤, 并干燥, 得到106g (342mmol, 产率75%) 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸。

[0605] 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸甲酯:

[0606] ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6): δ = 7.98 (d, J = 8.1Hz, 2H), 7.68 (d, J = 8.5Hz, 1H), 7.60 (d, J = 8.1Hz, 2H), 7.12-6.96 (m, 2H), 6.20 (s, 1H), 5.32 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.38 (s, 3H) .

[0607] 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸:

[0608] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ = 12.99 (br s, 1H), 7.96 (d, J = 7.2Hz, 2H), 7.67 (d, J = 8.4Hz, 1H), 7.57 (d, J = 7.2Hz, 2H), 7.11-6.99 (m, 2H), 6.20 (s, 1H), 5.31 (s, 2H), 2.37 (s, 3H) .

[0609] HPLC-MS (正模式) m/z 311 (M+H) $^+$; 保留时间1.242min。

[0610] 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]-N-[2-(2-噻吩基-甲基氨基甲酰基氨基)乙基]苯甲酰胺的制备:

[0611] 向4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]苯甲酸 (12.6g, 40.6mmol) 的DMA (150mL) 溶液中, 加入CDI (7.26g, 44.8mmol), 并将混合物在 r. t. 下搅拌30min。然后, 加入2-(2-噻吩基甲基氨基甲酰基氨基)-乙基氯化铵 (10.1g, 42.7mmol) 和三乙胺 (4.90g, 48.4mmol), 并将反应物在50°C下搅拌16h。将混合物冷却至 r. t., 加入水 (600mL)。将沉淀的固体经过滤收集, 用水、2-丙醇和己烷洗涤, 并干燥, 得到13.3g (27.1mmol, 67%) 4-[(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧基甲基]-N-[2-(2-噻吩基-甲基氨基甲酰基氨基)乙基]苯甲酰胺

(MyoMed-205)。

[0612] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ =8.61-8.47 (m, 1H), 7.86 (d, J=7.9Hz, 2H), 7.70 (d, J=8.7Hz, 1H), 7.55 (d, J=7.9Hz, 2H), 7.38-7.27 (m, 1H), 7.12-7.02 (m, 2H), 6.51 (t, J=6.0Hz, 1H), 6.22 (s, 1H), 6.17-6.06 (m, 1H), 5.30 (s, 2H), 4.36 (d, J=5.9Hz, 2H), 3.32-3.17 (m, 4H), 2.39 (s, 3H)。

[0613] HPLC-MS (正模式) m/z 492 (M+H)⁺; 保留时间1.249min。

[0614] II. 生化分析

[0615] 1. MuRF1-肌联蛋白 (titin) 相互作用测定:

[0616] 利用ALPHA筛选, 进行小分子筛选, 来鉴定抑制MuRF1和肌联蛋白相互作用的化合物。所述筛选是基于识别MuRF1 B-box-卷曲结构域与肌联蛋白A169相互作用的MuRF1和肌联蛋白相互作用的研究 (参见例如Mrosek等人, Biochemistry 2008, 47, 10722-10730)。W02009/077618中描述所述ALPHA筛选试验的范例。

[0617] 方法:

[0618] 这些相互作用的片段以GST和生物素融合蛋白的形式表达, 从而可以分别用谷胱甘肽受体和抗生物素蛋白供体珠来监测复合物的形成, 如W02009/077618中所述。对280, 000种化合物 (内部library, EMBL化学核心设施) 的研究识别总共40种分子, 其MuRF1-肌联蛋白相互作用的 K_i 值为5-25 $\mu\text{mol/L}$ 。

[0619] 2. 抑制MuRF1 E3连接酶活性的测定:

[0620] 然后, 通过混合75nmol/L UBE1 (Boston Biochem)、1 $\mu\text{mol/L}$ UbcH5c (Boston Biochem)、100 $\mu\text{mol/L}$ 泛素、4mmol/L ATP、100nmol/L肌联蛋白A168-170与20-100 $\mu\text{mol/L}$ 相应化合物, 评价化合物对MuRF1 E3连接酶活性 (针对肌联蛋白或针对MuRF1本身 (自身泛素化)) 的影响。加入220nmol/L MuRF1启动反应, 然后在37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应1h, 用MuRF1和肌联蛋白特异性抗体进行SDS PAGE和Western blot分析。所有的反应也包括5% DMSO。基于泛素化模式, 测试MyoMed-946、MyoMed-946-5和MyoMed-946-8, 并确定它们能显著抑制MuRF1 E3连接酶活性。

[0621] 3. 在不存在和存在化合物MyoMed-946的情况下, MuRF1中央片段的差示扫描荧光测定法 (DSF):

[0622] 用差示扫描荧光测定法 (DSF), 体外测定化合物MyoMed-946对MuRF1蛋白稳定性的影响。

[0623] 方法:

[0624] 将“MuRF1中央片段”如前所述表达 (Mrosek M等, FASEB J, 2007, 21, 1383-1392), 并以75 μM 终浓度用于DSF实验。将化合物MyoMed-946的10mM DMSO储备液用作为DSF测定缓冲液的PBS稀释至100 μM , 形成1% DMSO的最终浓度。在室温下预孵育1小时后, 将蛋白质水溶液吸入毛细管中, 并置于Prometheus NT.48nanoDSF装置 (NanoTemper Technologies, 慕尼黑, 德国) 中。分别在330nm和350nm处, 检测蛋白在热梯度去折叠后LED激光激发后发生的内在色氨酸或酪氨酸荧光的变化。分别在350nm和330nm处, 监测热梯度内在蛋白荧光的变化。用热蛋白去折叠时荧光波长比为350/330nm的一阶导数来计算单个和多个过渡态的过渡中点 (T_m)。

[0625] 结果:

[0626] 从图55可以看出,在PBS中,MuRF1中央片段的 T_m 为65.2°C(实线),并且通过加入1%DMSO,仅可忽略不计地变为65.8°C(虚线)。相反,通过加入化合物MyoMed-946,可观察到对MuRF1热去折叠的强作用(点线)。化合物MyoMed-946使MuRF1不稳定,如显著降低的52.5°C主 T_m 所示。

[0627] III. 生物学研究

[0628] 1. 细胞培养实验

[0629] 将小鼠C2C12成肌细胞(CRL-1772,ATCC)培养于补充10%胎牛血清(FCS; Gibco® Invitrogen, Carlsbad, CA)的DMEM(Lonza; 巴塞尔,瑞士)中。为了诱导分化为肌管,将亚融合培养物转换至含有2%马血清(Sigma-Aldrich; Seelze, 德国)的DMEM中。随后,将肌管用增加的化合物浓度(0.1~10 μ mol/L,溶解于DMSO中)预处理或用等体积的DMSO预处理2h,然后用10 μ mol/L地塞米松(DEX; Sigma-Aldrich; Seelze, 德国)处理24小时。然后,通过图像分析软件(Analysis 3.0, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, 德国)评估肌管直径。为了测定所选化合物的细胞毒性,将成肌细胞或肌管用增加的浓度孵育24h。随后,如Bellocci等人,Anal Biochem, 2008, 374, 48-55中所述,定量细胞培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)活性的浓度,作为细胞破坏的一种测量方法。从图1和图2可以看出,化合物MyoMed-946在成肌细胞和肌管(肌细胞)中显示低毒性。

[0630] 2. 动物实验

[0631] 2.1 肺动脉高压小鼠模型:

[0632] 2.1.1 用MuRF1抑制剂MyoMed-946的测试系列1:

[0633] 动物实验得到Regierungspräsidium Karlsruhe (35-9185.81/G-141/13)和Regierungspräsidium Leipzig (TVV 40/16)的批准。本研究包括三组小鼠,包括:1)生理盐水处理的(假处理组, n=20); 2) 喂养正常食物的野百合碱(MCT)处理的(MCT; n=27); 和3) 喂养MuRF1抑制剂食物的MCT处理的(MCT+化合物; n=27)。简言之,将C57BL/6小鼠(8周龄)每周皮下注射MCT(600mg/kg)或匹配体积的生理盐水,持续6周,如Ahn等人,PLoS One, 2013, 8: e62702中所述,已知MCT由于肺动脉高压和随后的RV功能障碍而非厌食症诱导心性恶病质的一段时间。小鼠暴露于相同的条件下,12:12h的光/暗循环,自由提供食物和水。在MCT注射前1周,MCT+化合物组开始接受抑制剂食物,而假处理组和MCT组则给予相同的食物,但未添加所选化合物。每周记录每只小鼠的体重。腹腔注射施用芬太尼(0.05mg/kg)、美托咪定(0.5mg/kg)、咪达唑仑(5mg/kg)和氯胺酮(100mg/kg)而深度麻醉后处死小鼠。处死时,将心脏和肺剖割、清洁、吸干并称重,用4%PBS-缓冲的福尔马林固定心脏。也将左胫前肌(TA)、比目鱼肌、趾长伸肌(EDL)和肋膈切片剖割、称重,并用4%PBS缓冲的福尔马林固定,而将剩余的肌肉部分立即冷冻在液态N₂中,用于分子分析。

[0634] 对于组织学评价,将石蜡包埋的TA肌肉切片(3 μ m)用H&E染色,然后通过成像软件(Analysis 3.0, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, 德国)评价纤维横截面积(CSA)。此外,将心脏的内侧横截面(3 μ m)装于玻片上,随后用H&E染色,以评估RV壁厚。

[0635] 从图3至图5可以看出,MCT和MCT+MyoMed-946喂养的小鼠的体重增加、肺重量和心脏重量几乎相同,这表明两组的疾病进展独立于化合物喂食。重要的是,从图6和图7可以看出,MuRF1抑制剂MyoMed-946减缓右心室肥大的进展。此外,从图8~12可以看出,MCT处理的

小鼠显示骨骼肌量进行性损失,然而MCT+化合物喂养的小鼠没有遵循所述趋势,并受到保护--在TA肌肉中可看到最明显的效果。

[0636] 2.1.2采用MuRF1抑制剂MyoMed-946、MyoMed-203和MyoMed-205的测试系列2:

[0637] 类似于测试系列1,完成测试系列2。简言之,本研究包括三组小鼠:1)生理盐水处理的小鼠(假处理组,n=10);2)喂养正常食物的野百合碱(MCT)处理的小鼠(MCT;n=10);和3)喂养MuRF1抑制剂食物的MCT处理的小鼠(MCT+化合物;对于各化合物,n=10)。将8周龄C57BL/6小鼠每周皮下注射MCT(600mg/kg)或匹配体积的生理盐水,持续8周。在MCT注射前1周,MCT+化合物组开始接受抑制剂食物,而假处理组和MCT组则给予相同的食物,但未添加所选化合物。食物中的化合物浓度为0.1重量%,致使每只小鼠每天摄入约3mg的化合物。每周记录每只小鼠的体重。治疗8周后处死小鼠。处死时,按测试系列1所述,完成检查和组织分析。

[0638] 从图13至图15可以看出,MCT和MCT+化合物喂养的小鼠的体重增加、肺重量和心脏重量是相似的,这表明两组的疾病进展独立于化合物喂养。还在本测试系列中,从图16~18可以看出,MuRF1抑制剂MyoMed-946、MyoMed-203和MyoMed-205减缓右心室肥大的进展。此外,从图19~21可以看出,尽管MCT处理的小鼠显示骨骼肌量进行性损失,但MCT+化合物喂养的小鼠没有遵循所述趋势,并受到保护--从化合物MyoMed-203可看到最明显的效果。此外,在MCT+化合物喂养的小鼠中,TA肌肉组织的MuRF1-表达水平明显降低,其中化合物MyoMed-205的下降最为明显,如图22所示。在MCT+化合物喂养的小鼠中,连续蛋白(telothonin)(一种MuRF1靶蛋白)的表达水平基本上是标准化的,如图23所示。

[0639] 2.2心肌梗死LAD小鼠模型:

[0640] 如下所述,通过结扎左前冠状动脉(left anterior dexterio coronary artery,LAD),建立患射血分数降低(HFrEF)的心衰的心肌梗塞小鼠模型,以诱发急性心肌梗塞(MI),随后发展为慢性(收缩性)心力衰竭(CHF)。

[0641] LAD结扎操作:

[0642] 遵循本领域既定和众所周知的方法,在Leipzig Heart Center,为12周龄的C57/BL6小鼠完成小动物手术(参见例如Bowen等人,J Appl Physiol,2015,118,11-19;Mangner等人,J Cachexia Sarcopenia Muscle,2015,6,381-390)。简言之,将LAD组小鼠腹腔注射MMF、美托咪啶(0.5mg/kg体重)、咪达唑仑(5.0mg/kg体重)、芬太尼(0.05mg/kg体重)麻醉。将昏迷小鼠固定在手术台上。将胸部腹侧部分剃毛、清洗和消毒。然后,利用动物呼吸器(TSE GmbH,Siemensstr.21,61352Bad Homburg;product:http://tinateb.com/wp-content/uploads/2016/06/TSE_Respirator-Compact_20080724_HR.pdf),对昏迷小鼠进行气管插管并用正常室内空气通气。对于LAD手术,在剑突上方约1厘米,且左胸骨旁大约1cm处,通过切开此处皮肤而打开胸腔。在没有进一步损伤的情况下,将下方的胸大肌移到侧壁,以接触胸壁。将两条肋骨之间的肋间肌向一侧移动而不折断肋骨。通过在心包上方插入手术牵开器而扩大由此创建的胸腔内通路。用两个解剖钳将心包切开。如果胸腺存在于手术视野,则用手术拭子将胸腺推向一侧,以进入主动脉根部。用钩将心脏小心地移出心包,并用手术拭子将左心房放到一边。然后,将LAD用5.0Prolene缝线结扎(Ethicon,参见<http://www.ethicon.com/healthcare-professionals/products/wound-closure/non-absorbable-sutures/prolene-polypropylene>)。靠近主动脉根部进行结扎,并收紧缝线,

直至发现冠状动脉前壁苍白。结扎后,用4.0Prolene缝线依次缝合胸壁和皮肤(公司:Ethicon)。

[0643] 作为对照,进行假手术(或称为“假处理”(sham)。对于假手术对照组,除了5.0prolene缝线在LAD周围松弛而不收紧外,后续的操作与上述操作完全相同。

[0644] 手术以拔管结束,静脉注射阿替美唑(Atipamezol)(2.5mg/kg体重)和氟马西尼(0.5mg/kg体重)对抗麻醉。将小鼠放在一个温暖的伙伴上直到醒来,然后被转移回动物笼子。专家完成上述整个过程的时间约为30min。

[0645] LAD结扎一周后,完成M型超声心动图,以确定MI,即评估左心室舒张末期(LVEDD)和收缩期(LVESD)直径,以允许计算左心室(LV)缩短分数(LVFS=[LVEDD-LVESD]/LVEDD)×100)。随后,只将大梗死(左室射血分数(LVEF)<20%)的小鼠随机分为两组,即一组接受正常食物(CHF,n=11),而第二组接受补充化合物(0.1%化合物MyoMed-946,CHF+MyoMed-946,n=12)的食物。假手术(sham)动物仅接受正常食物(n=15)。9周后,再次完成超声心动图检查。

[0646] 表1:干预10周后的动物特征

	假手术 (n=15)	CHF (n=11)	CHF + MyoMed-946 (n=12)
<i>身体</i>			
体重(g)	22.6 ± 0.5	22.4 ± 0.6	23.8 ± 0.4
心重与体重之比 (g/mg)	5.03 ± 0.11	7.87 ± 0.55***	7.52 ± 0.57***
肺重(湿重/干重)	4.16 ± 0.07	4.48 ± 0.06*	4.47 ± 0.10*
<i>组织学</i>			
LV 梗死大小(%)	—	30.5 ± 4.6	27.1 ± 2.9
<i>超声心动图</i>			
LVEDD (mm)	3.8 ± 0.1	6.2 ± 0.2***	5.9 ± 0.2***

	假手术 (n=15)	CHF (n=11)	CHF + MyoMed-946 (n=12)
LVEDD (mm)	2.6 ± 0.1	5.8 ± 0.3***	5.3 ± 0.2***
LVEF (%)	59.6 ± 2.7	16.1 ± 2.9***	21.1 ± 2.5***
LVFS (%)	31.8 ± 1.9	7.5 ± 1.4***	9.9 ± 1.2***

[0649] *P<0.05vs.假手术;***P<0.001vs.假手术。

[0650] 将动物处死,以收集组织,特别是膈肌组织,用于功能和分子鉴定。所有的实验和操作都得到了当地动物研究委员会、莱比锡大学和Landesbehörde Sachsen (TVV 36/15)的批准。

[0651] 2.3收缩功能:

[0652] 为了提供直接的功能评估,如下测量骨骼肌纤维束即来自MCT小鼠和CHF小鼠膈肌的纤维束的收缩性。如Bowen等人,FASEB J,2017,31所述,从膈肌分离出纤维束,从而利用长度控制的杠杆系统(301B,Aurora Scientific Inc.,Aurora,加拿大)评价体外收缩功能。简言之,将肌肉束垂直装载于充满缓冲液的器官浴槽($\sim 22^{\circ}\text{C}$)中,设定为最佳长度,并且15min后,通过1-300Hz(600mA;500ms的训练持续时间;0.25ms的脉宽)的力-频率方案进行刺激。然后,肌肉经历力-速度方案,据此在150Hz刺激300ms后,允许肌肉在外部载荷下缩短(最大强直力的80~10%;每次间隔1min)。在长度第一次改变后10ms,并在瞬态线性截面上(DMA软件,Aurora Scientific)确定缩短速度。通过将肌肉量(g)除以 L_0 (cm)和估算肌肉密度(1.06)的乘积,将力(N)相对于肌肉横截面积(CSA; cm^2)标准化,这允许计算以 N/cm^2 为单位的比力(specific force)。将缩短速度相对于最佳肌肉长度(L_0/s)标准化,而将每个负荷的功率计算为缩短速度和比力的乘积(W/cm^2)。

[0653] 从图24~27可以看出,来自慢性心力衰竭小鼠(CHF小鼠)的膈肌肌纤维束在电刺激过程中产生的力量较小(图24),并且也降低了最大力量(图25和26)和峰值功率(图27)。因此,与假手术动物相比,对照食物组CHF小鼠在第10周时出现膈肌肌病。用化合物MyoMed-946喂养可保护小鼠避免所述梗死后的膈肌无力。与未处理组的CHF小鼠相比,用化合物MyoMed-946喂养的小鼠,可显著降低慢性心力衰竭导致的膈肌功能和膈肌最大力量的损失。这表明在心肌梗死诱导的射血分数降低的心衰(HFrEF)之后,用化合物MyoMed-946选择性抑制MuRF1,对膈肌功能有有益作用。

[0654] 同样,从图28~30可以看出,当将MCT小鼠喂食化合物MyoMed-946(MCT+MyoMed-946)时,在患MCT诱导的肺动脉高压的小鼠中,也基本上预防膈肌的收缩功能障碍(就缩短速度和功率而言)。

[0655] 因此,总起来说,上述结果表明,在慢性心力衰竭和心源性恶病质中,化合物MyoMed-946对MuRF1的选择性抑制对骨骼肌的数量(即量)和质量(即收缩功能)产生有益作用。

[0656] 2.4肿瘤小鼠模型:

[0657] 将8周龄雌性C57BL/6N小鼠接种B16F10黑色素瘤细胞(9×10^5 细胞)或生理盐水(假处理组, $n=10$)。在肿瘤接种后的前3天内,B16F10小鼠和假处理小鼠都接受常规食物。然后,将B16F10小鼠随机分为三组,其中第一组接受MyoMed-946食物(肿瘤+MyoMed-946, $n=10$),第二组接受MyoMed-205食物(肿瘤+MyoMed-205, $n=10$),而第三组接受相同的食物,但未添加所选化合物(肿瘤, $n=10$)。食物中的化合物浓度为0.1重量%,致使每只小鼠每天摄入约3mg化合物。此外,假处理组用相同的食物喂养,但未添加所选化合物。在肿瘤接种后第9、16和23天,对每只小鼠进行金属丝悬挂试验(肌肉功能)。为此,采用标准的金属丝悬挂结构,金属丝(长度:40cm,直径:2.5mm)高度高于地面70cm。在金属丝中央下方,放置一个装有锯末的大盒子。为了测试,将小鼠用两肢悬挂在金属丝上,并记录悬挂时间。每只动物试三次,每次最多180秒。三次尝试后,计算最大保持冲动力(悬挂时间 \times 体重)。

[0658] 接种肿瘤25天后,处死小鼠。处死时,如上所述,完成检查和组织分析。

[0659] 从图31可以看出,与肿瘤小鼠相比,在肿瘤+MyoMed-946小鼠和肿瘤+MyoMed-205小鼠中,肿瘤引起的骨骼肌萎缩(基于TA肌肉重量)至少有一定程度减弱。所述作用在金属

丝悬挂试验(图32)中更为明显,其中与正常饮食的肿瘤小鼠相比,给予化合物MyoMed-946和MyoMed-205(肿瘤+MyoMed-946小鼠和肿瘤+MyoMed-205小鼠)显著减轻肌肉功能的损失。

[0660] 2.5射血分数保持的心力衰竭(HFpEF)的心肌和骨骼肌改变-大鼠模型

[0661] 研究设计的示意图如图56所示。对于本试验,用ZSF1大鼠。20周龄后,ZSF1大鼠失去舒张顺应性,导致舒张末期容积增加,从而模拟人HFpEF(也称为舒张性心力衰竭)。

[0662] 将雌性ZSF1瘦鼠(对照组,n=25)和ZSF1肥胖鼠(n=40)纳入研究。在20周龄时,通过超声心动图/有创血流动力学测量确证HFpEF的发展,并收集了一组动物的组织材料(对照组n=10;ZSF1肥胖n=10)。其余对照组大鼠(对照组,n=15)再静置12周,而将其余ZSF1肥胖动物(n=30)随机分为下述组:(1)接受正常食物的大鼠(HFpEF组,n=15)或接受添加化合物MyoMed-205的食物的大鼠(0.1%MyoMed-205,Hfpef+MyoMed-205,n=15)。将大鼠暴露于相同的条件下,12h的光/暗周期,自由提供食物和水。随机分组后12周,完成超声心动图和侵入性血流动力学测量,以阐明舒张功能障碍的程度。随后处死大鼠(深麻醉时开胸),并收集骨骼肌和心肌组织,用于功能和分子分析(福尔马林固定和液氮速冻)。所有的实验和操作都得到当地动物研究委员会、德累斯顿工业大学和Landesbehörde Sachsen (TVV 42/2018)的批准。

[0663] 超声心动图

[0664] 如前所述,将大鼠用异氟醚(1.5-2%)麻醉,并用Vevo 3100系统和21-MHz换能器(Visual Sonic,Fujifilm)完成经胸超声心动图检查,以评估心脏功能(T.S.Bowen等人,Eur.J.Heart Fail.,2015,17,263-272)。对于收缩功能,在乳头肌水平,测量胸骨旁长轴和短轴的B和M模式。利用脉冲波式多普勒(用于测量二尖瓣速度的早期(E)波和心房(A)波)和组织多普勒(用于测量心肌速度(E'和A')),在左心室室间隔壁的基底间隔段水平,在心尖4-腔视图中评估舒张功能。利用Vevo LAB 2.1.0软件,获得功能参数(即LV射血分数(LVEF)和每搏量(SV)),以及[E/E']和[E/A]的比值)。

[0665] 有创血流动力学测量:

[0666] 作为终末步骤,完成有创血流动力学压力测量。用麻醉(氯胺酮、甲苯噻嗪)但自主呼吸的大鼠,将右颈动脉用大鼠PV导管(SPR-838,ADInstruments Limited)插管,将插管轻柔地置于左心室中部。对于左室舒张,测量LV舒张末期和收缩末期压、最大压力上升率(dP/dtmax)、最大压力下降率(dP/dtmin)和时间常数(τ),随后将导管撤至主动脉,并测量相压和平均动脉压。测量升主动脉的平均动脉压。将数据记录在LabChart 8软件(ADInstruments)中。

[0667] 骨骼肌功能

[0668] 分割右侧EDL和左侧比目鱼肌,并将其垂直安装于钩和力传感器之间的Krebs-Henseleit缓冲液中,连续记录输出并将其数字化(1205A:分离的肌肉系统-大鼠(Isolated Muscle System-Rat),Aurora Scientific Inc.,安大略省,加拿大)。利用铂电极,通过大功率双极刺激器(701C;Aurora Scientific Inc.,安大略省,加拿大)的超最大电流(700mA,500ms训练期,0.25ms脉宽)刺激肌肉,来评估体外肌肉功能(700mA,500ms训练持续时间,0.25ms脉宽)。将肌束设置为与产生的最大抽搐力相等的最佳长度(L₀),然后将浴温提高到25°C,随后进行15分钟的热平衡。然后,在1Hz、15Hz、30Hz、50Hz、80Hz和120Hz的频率下,完成力-频率方案,有1分钟的休息期间隔。5分钟休息期之后,然后,肌肉经历5分钟(每2

秒,40Hz)的疲劳方案。将疲劳方案期间产生的力相对于产生的初始力标准化,以提供疲劳性能的相对评估。

[0669] 结果:

[0670] 20周时的动物特征(随机时间点)

[0671] 为了验证HFpEF的进展,在将动物随机分为不同的处理组之前,对10只ZSF1-消瘦和10只ZSF1-肥胖动物进行超声心动图、有创血流动力学测量和骨骼肌功能测量分析。ZSF1-肥胖动物表现出体重增加(肥胖的迹象),并且心肌肥厚的体征(当相对于胫骨长度标准化时,心脏重量增加)是明显的。关于舒张功能的标志,ZSF1-肥胖动物的E/ε比值和左室舒张末压(LVEDP)显著升高。尽管舒张功能紊乱,左室射血分数(LVEF)是正常的(>60%),并且甚至比消瘦对照组稍高。对于平均动脉血压(MABP),在ZSF1-肥胖动物中发现显著升高。所述MABP的增加是动物高渗状态的标志,这一特征在HFpEF患者中是众所周知的。关于外周骨骼肌,ZSF1-肥胖动物出现肌肉萎缩和骨骼肌功能障碍。总之,20周龄动物出现符合HFpEF的诊断的特征。

[0672] MyoMed-205治疗对HFpEF心脏参数的影响

[0673] 为了评估MyoMed-205对心肌功能的影响,进行超声心动图和有创血流动力学测量。如图57所示,当与对照组ZSF1-消瘦动物相比时,未治疗的HFpEF动物的左室射血分数(LVEF)(图57A)显著降低。用MyoMed-205治疗12周后,所述降低明显减弱。关于舒张功能参数E/ε比值(图57B)和LVEDP(图57C),用MyoMed-205治疗减弱未治疗的ZSF1-肥胖动物中发现的增长。对于MABP,发现MyoMed-205无治疗效果(图57D)。综上所述,所述结果表明,MyoMed-205治疗显著改善收缩和舒张功能,并且所述作用不是通过调节血压介导的。

[0674] MyoMed-205治疗对骨骼肌质量和功能的影响

[0675] 在随机分为不同治疗组的时间点,ZSF1-肥胖动物的骨骼量和骨骼肌功能已经受损。本试验检测MyoMed-205是否能够调节骨骼肌的量和功能。结果可见于图58。胫前肌(TA)的肌肉重量分析(图58A)显示HFpEF未治疗动物的肌肉湿重显著下降。MyoMed-205减轻所述肌肉萎缩。就EDL(图58C)和比目鱼肌(图58B)而言,HFpEF的发展对肌肉湿重没有影响。然而,在EDL肌肉中,用MyoMed-205治疗致使肌肉重量的少量但显著增加(图58C)。

[0676] 对肌肉萎缩的进展,除了测量肌肉重量外,肌肉功能评价也是非常重要的。如图58D所示,当与ZSF1-消瘦对照组相比时,未治疗的ZSF1-肥胖动物出现骨骼肌功能障碍。当测量绝对比肌力时,所述肌力的下降在比目鱼肌中是明显的(图58D)。用MyoMed-205治疗HFpEF动物12周可减轻功能损失。

[0677] 结论:

[0678] 结果表明,在HFpEF中,MyoMed-205减轻心肌舒张功能障碍的发展,并减轻骨骼肌萎缩和骨骼肌功能障碍。

[0679] 2.6阿霉素诱导的肌肉萎缩与心脏毒性

[0680] 阿霉素(DOX)是一种有效的化疗药物,用于各种癌症治疗。然而,它的使用与早期和慢性心脏毒性和肌毒性有关。在啮齿类动物中,单次注射阿霉素能减少心脏和骨骼肌的量,随后出现明显的功能损害。

[0681] 在用阿霉素处理的小鼠模型中,评价富含MyoMed-205食物的效果。将C57b1/6小鼠在动物饲养所中适应3天,然后随机分为4组,如下:1.对照组(安慰剂食物+腹腔注射0.9%

生理盐水); 2. MyoMed-205 (MyoMed-205-食物, 添加1g/kg MyoMed-205的食物; +0.9%生理盐水注射); 3. DOX (安慰剂食物+DOX注射); 4. DOX+MyoMed-205 (MyoMed-205食物+DOX注射)。在第一次DOX注射前, 将动物预先喂食MyoMed-205食物或安慰剂7天。DOX治疗总剂量为25mg/kg, 分别在第10天、12天、16天、25天和28天注射5次。在一天中的同一时间, 每天测量动物的体重和食物摄入量, 以评估食物消耗和体重增加。在第19天和第42天通过超声心动图评价心脏功能。如图59所示, 在第43天, MyoMed-205喂养能够显著减少恶病质消耗和身体应激的特征: MyoMed-205-喂食的小鼠有较高的瘦体重 (图59A), 保留更多的体脂 (图59B), 并且间质水肿游离液体减少约2倍 (图59C)。*指 $p < 0.05$ vs. 对照; \$指 $p < 0.05$ vs. MyoMed-205; §指 $p < 0.05$ vs. DOX+MyoMed-205 (Tukey post-test)。

[0682] 在第15天和25mg/Kg累积DOX剂量后, 超声心动图显示心脏毒性和衰竭, 可以从图60看出, 即分别是心脏重量减少 (胫骨长度校正的) (图60C), 射血分数降低 (由长轴分布图计算的) (图60A), 以及减少的分数降低 (由短轴分布图计算的) (图60B)。直到第43天, MyoMed-205治疗才阻止所述情况。总之, 在DOX化疗期间, MyoMed-205的施用有助于保护心脏。*指 $p < 0.05$ vs. 对照; \$指 $p < 0.05$ vs. MyoMed-205; §指 $p < 0.05$ vs. DOX+MyoMed-205 (Tukey post-test)。

[0683] 2.7 2型糖尿病肥胖小鼠在饮食诱导减肥期间的肌肉功能 (DIO小鼠模型: 伴胰岛素抵抗和肥胖的糖尿病)

[0684] 用糖尿病小鼠模型测试化合物喂养的效果, 该模型在糖尿病恶化过程中也发展为肌病。在DIO小鼠中, 用高果糖高脂肪饮食 (HFD) 诱导糖尿病4个月。体重增加22.2%。小鼠出现增加的空腹血糖和胰岛素抵抗。对照组动物接受正常啮齿动物饮食 (常规饮食)。然后, 在30天测试期间, 诱导体重减轻。第一阶段, 将动物喂正常的啮齿动物饮食16天。然后, 第二阶段, 动物接受低热量饮食14天。终点时, 体重平均下降12.4%。第一阶段开始后两天, 饮食中添加MyoMed-205 (1g化合物/1kg食物)。第一阶段开始, 然后在测试期间的第3天、7天、14天、21天和28天, 用金属丝悬吊试验比较化合物喂养小鼠和对照小鼠的肌力。

[0685] 试验设计: 将ICR-DIO雄性小鼠随机分组, 每组8~10只动物。包括三个对照组: 无肥胖的小鼠对照组 (对照组; 常规饮食 (RD); $n=10$); 肥胖小鼠, 在整个研究期间喂高果糖高脂饮食 (DIO HFD; $n=8$); 以及开始体重减轻的肥胖小鼠 (DIO对照; $n=8$)。

[0686] 金属丝悬吊试验: 对于金属丝悬吊试验 (WHT), 采用标准金属丝悬吊结构 (长度: 40cm, 直径: 2.5mm), 高于地面70cm的高度。在金属丝中央下方, 放置一个装有锯末的大盒子。对于测试, 将小鼠用两肢挂在金属丝上, 并记录小鼠在脱落前能够抓住金属丝的时间。每只动物进行三次尝试, 最多180秒。三次尝试后, 计算最大保持冲量 (悬挂时间 \times 体重)。

[0687] 结果:

组	金属丝悬挂试验中观察到的对肌肉力量的影响(WHT)
对照(RD)	对 WHT 无作用, 对照组
DIO 对照	与第 1 组相比, WHT 表现下降
DIO HFD	与第 1 组和第 2 组相比, WHT 表现下降
MyoMed-205-治疗的 DIO	与第 2 组和第 3 组相比, 第 4 周 WHT 肌肉力量显著改善

[0689] 图61是与DIO对照小鼠相比,MyoMed-205-治疗的DIO小鼠WHT结果的示意图。可以看出,到第4周(28天)时,与DIO对照小鼠相比,MyoMed-205显著提高肌肉力量。与DIO HFD小鼠相比,肌肉力量也显著改善,并且在第4周时,与对照组(RD)小鼠没有显著差异(图61中未显示)。

[0690] 2.8 2型糖尿病肥胖小鼠在饮食诱导体重减轻期间的葡萄糖和胰岛素调节(DIO小鼠模型:糖尿病伴胰岛素抵抗和肥胖)

[0691] 类似于实施例2.7,在DIO小鼠中用高果糖高脂肪饮食(HFD)诱导糖尿病4个月。小鼠形成增加的空腹血糖和胰岛素抵抗。对照组动物接受正常啮齿动物饮食(常规饮食)。然后,在30天的测试期间诱导体重减轻。第一阶段,将动物喂食正常啮齿动物饮食16天。然后,在第二阶段,动物接受低热量饮食14天。第一阶段开始后两天,饮食中添加MyoMed-203(1g化合物/1kg食物)。

[0692] 试验设计:将ICR-DIO雄性小鼠随机分组,每组8~10只动物。包括三个对照组:无肥胖的小鼠对照组(对照组;常规饮食(RD);n=10);肥胖小鼠,在整个研究期间喂高果糖高脂饮食(DIO HFD;n=8);以及开始体重减轻的肥胖小鼠(DIO对照;n=8)。

[0693] 血糖水平测定:

[0694] 在禁食6-小时后,进行血糖水平测定。将On Call Plus血糖仪(Acon Laboratories, Inc., USA)和特殊试纸(REF G133-111)用于测定血糖水平。通过切开尾尖,从尾静脉取血。每次检测用5~6 μ l血液。

[0695] 在整个治疗期间,MyoMed-203-治疗的动物的血糖水平显著低于DIO对照组,在研究的第2天和第21天,空腹血糖值显著变化。图62显示MyoMed-203-治疗的DIO小鼠与DIO对照小鼠的比较。

[0696] 葡萄糖耐量试验

[0697] 对于口服葡萄糖耐量试验(OGTT),禁食6小时后,用10ml/kg的剂量体积,以2g/kg的剂量葡萄糖口服处理小鼠。在处理前、葡萄糖施用后15分钟、30分钟、60分钟和120分钟,进行葡萄糖测定。用下述公式计算描述每只小鼠在试验过程中血糖输出率的AUC:

$$[0698] \quad S = \int_a^b f(x) dx$$

[0699] 根据OGTT数据,减肥和治疗14天后,MyoMed-203在肥胖小鼠中显示有轻微的降血

糖作用。与DIO对照组相比,该组动物在OGTT试验30分钟时的血糖水平趋向于是更低的。同样的情况也适用于描述葡萄糖消除的计算的AUCs。在研究的第28天,类似的趋势继续存在:与所有对照组相比,观察到MyoMed-203治疗组在120分钟时血糖水平显著降低;葡萄糖消除曲线下的计算面积也趋向于是更低的。图63和图64分别显示第14天和第28天MyoMed-203-治疗的DIO小鼠和DIO对照小鼠的OGTT数据。

[0700] 胰岛素作用耐受试验

[0701] 对于胰岛素耐受试验 (ITT), 禁食6小时后,以5ml/kg体积,以0.75IU/g体重或0.60IU/g体重的剂量,将小鼠腹腔注射重组人胰岛素溶液(礼来,法国;REF C620001K)。在治疗前、胰岛素施用后15min、30min、60min和120min,进行葡萄糖测量。血糖输出率的结果用曲线下面积(AUC)表示。

[0702] 与所有对照组相比,注射胰岛素后120分钟,观察到MyoMed-203-处理的小鼠的血糖水平显著降低。图65显示MyoMed-203-处理的DIO小鼠和DIO对照小鼠的ITT结果。

[0703] 3. 组织分析

[0704] 3.1 蛋白质组学和蛋白印迹分析:

[0705] 3.1.1 MCT小鼠:

[0706] 蛋白质组学分析:

[0707] 将来自假处理 (sham)、MCT和MCT+化合物小鼠 (每组n=3) 的冰冻膈肌样品的蛋白质在液态N₂下粉碎。然后,在Bad Nauheim的DZHK Core Facility完成质谱分析,如Konzer等人,Methods in molecular biology,2013,1005,39-52中所述。测定MCT/假处理和MCT+化合物/MCT的相对比值,只认为hits是差异表达的,通过蛋白质印记 (Western blot) 进一步研究是高度显著的 (P<0.01)。

[0708] Western blot分析:

[0709] Western blot分析包括将冷冻的TA肌肉样品在RIPA缓冲液 (50mmol/L Tris, 150mmol/L氯化钠,1mmol/L EDTA,1%NP-40,0.25%脱氧胆酸钠,0.1%SDS,1%Triton X-100;pH 7.4) 或包含蛋白酶抑制剂mix (抑制剂mix M,Serva,海德堡,德国) 的松弛缓冲液 (90mmol/L HEPES,126mmol/L氯化钾,1mmol/L MgCl,50mmol/L EGTA,8mmol/L ATP,10mmol/L磷酸肌酸;pH 7.4) 中匀化,超声,并以16,000x g离心5min。测定上清液的蛋白质浓度 (BCA测定法,Pierce,Bonn,德国),用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离试样 (5~20μg)。将蛋白质转移到聚偏氟乙烯膜 (PVDF) 上,并与下述初级抗体在4℃下温孵过夜:MAFbx (1/2000,Eurogentec,Seraing,比利时)、MuRF1 (1/1000,Myomedix Ltd.,Neckargemünd,德国)、CARP (1/500,Myomedix Ltd.,Neckargemünd,德国)、BAX (1/1000;Abcam,剑桥,UK) 和 eIF2B-delta (1/200;Santa Cruz Biotechnology,圣克鲁斯,USA)。随后,将膜与辣根过氧化物酶缀合的二级抗体一起孵育,并通过酶化学发光 (Super Signal West Pico,赛默飞-世尔Scientific Inc.,波恩,德国) 观察到特异性条带,并利用1D扫描软件包 (Scanalytics Inc.,Rockville,USA) 对密度进行量化。然后,将印迹标准化为加载对照GAPDH (1/30000;HyTest Ltd,Turku,芬兰)。所有数据均以相对于假处理组的倍数变化表示。

[0710] 发现5种蛋白质的表达水平对所述化合物有特异性反应,如比较MCT和MCT+MyoMed-946蛋白质组所示。表2总结所述蛋白的表达水平。

[0711] 表2

基因	功能	组	P-值	蛋白质比率(log ₂)	-log ₁₀ P 值
eIF2B4	蛋白质合成	MCT/假处理	0.005	-0.46	2.29
		MCT+MyoMed-946/MCT	0.005	0.32	2.28
AS3MT	甲基化	MCT/假处理	0.008	0.16	2.09
		MCT+MyoMed-946/MCT	0.009	-0.31	2.05
ATPAF1	氧化磷酸化	MCT/假处理	0.006	0.27	2.26
		MCT+MyoMed-946/MCT	0.001	-0.68	3.69
GHDC	未知的	MCT/假处理	0.005	0.54	2.32
		MCT+MyoMed-946/MCT	0.005	-0.39	2.33
BAX	凋亡	MCT/假处理	0.005	0.97	2.28
		MCT+MyoMed-946/MCT	0.006	-0.73	2.25

[0713] 这包括eIF2B(δ 亚单位)的上调和BAX的下调,随后通过蛋白质印迹证实,可见于图33~35。eIF2B途径是已知的蛋白质合成的翻译调节器。先前将eIF2B确定为MuRF1相互作用因子,表明在MCT应激下MuRF1-介导翻译起始因子eIF2B的耗竭,但是所述化合物缓解该情况。此外,所述化合物还调节促凋亡调节器BAX,与假处理组相比,该蛋白在MCT小鼠中上调,但在MCT+MyoMed-946组中正常。在慢性心力衰竭的人患者中,骨骼肌中凋亡增加,并与萎缩程度密切相关(参见例如Adams等人, *J Am Coll Cardiol*, 1999, 33, 959-965和Vescovo等人, *Heart*, 2000, 84, 431-437)。事实上,以前已经注意到, BAX在心因性恶病质中升高,并与MuRF1表达增加有关(参见例如Dalla Libera等人, *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286, C138-144和Rezk等人, *PLoS One*, 2012, 7, e30276)。

[0714] 从图36~38可以进一步看出,蛋白质组学分析证实,在MCT小鼠中, MuRF1蛋白表达的增加是由化合物MyoMed-946阻止的,而对MAFBx(另一个关键的atrogen E3连接酶)没有观察到影响。这表明该化合物的潜在机制似乎是MuRF1特异性的,这在体外初步研究的基础上是可以预期的。也已知MuRF1与许多底物相互作用,其中一个为CARP(肌肉锚蛋白重复蛋白(MARP)家族成员),这是一种声称的具有转录功能的以核-和肌节(肌联蛋白)-为基础的蛋白(参见例如Miller等人, *J Mol Biol*, 2003, 333, 951-964)。已知CARP在应激相关条件下上调,并与收缩功能障碍和肌肉萎缩有关(参见例如Laure等人, *The FEBS journal*, 2009, 276, 669-684和Moulik等人, *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54, 325-333)。与上述证据一致,在MCT-应激小鼠中观察到CARP的表达增加,而在MyoMed-946喂养的小鼠中所述作用得到消除,表明该化合物可通过抑制MuRF1而减弱CARP的表达,这进而有助于肌肉质量和功能的维持。

[0715] 3.1.2 CHF小鼠:

[0716] 为了分析患CHF的MyoMed-946-处理的小鼠中观察到的生理变化和益处的分子机制,对假处理组、CHF和CHF+MyoMed-946-处理小鼠的膈肌组织完成比较定量蛋白质组学分析和蛋白质印迹分析。

[0717] 蛋白质组学分析:

[0718] 在DZHK Core Facility, Bad Nauheim, 德国完成基于质谱的蛋白质组学分析。获得的MS原始数据由MaxQuant (1.6.0.1) 利用Andromeda搜索引擎和Uniprot小鼠数据库(截至2017年4月20日)处理。在错误发现率为1% (肽和蛋白质水平)时,确定>2600蛋白质组。所用的还原二甲基化方案(参见Boersema等人, Nat Protoc, 2009, 4, 484-494)产生CHF+MyoMed-946、CHF、CHF和假处理条件下蛋白质间的配对相对比较定量(比率),利用标准统计检验对其显著性差异进行统计查询。确定几种蛋白质在统计学上是不同的(例如TNNT3、Timm9、Ccdc5、Adil、Ptges3和Ndufa3)。应用多重假设检验(Benjamini-Hochberg; 校正 $P < 0.05$)比较有无化合物喂养的CHF小鼠,仅Mrps5(线粒体核糖体蛋白5)仍然是显著上调的蛋白质($P=0.02$;图4A),Mrps5是一种在线粒体核糖体中负责蛋白质的起始和延伸的线粒体-胞质穿梭蛋白,并如下所述,通过Western blot分析进一步研究。

[0719] 从图39可以看出,纳入CHF研究的所有动物膈肌的Western blot分析显示与假处理对照组相比,CHF组Mrps5的表达显著降低。其可被化合物MyoMed-946喂养逆转。数据表示为平均值±该平均值的标准误差。

[0720] Western blot分析:

[0721] 对于western blot分析,将冰冻膈肌在含有蛋白酶抑制剂mix(抑制剂Mix M, Serva, 海德堡, 德国)的松弛缓冲液(90mmol/L HEPES, 126mmol/L氯化钾, 36mmol/L氯化钠, 1mmol/L氯化镁, 50mmol/L EGTA, 8mmol/L ATP和10mmol/L磷酸肌酸, pH 7.4)中匀化,并超声。测定上清液的蛋白质浓度(二辛可宁酸(bicinchoninic acid)测定, Pierce, Bonn, 德国),用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离试样(5-20 μ g)。将蛋白质转移到聚偏氟乙烯膜上,并利用下述初级抗体在4 $^{\circ}$ C孵育过夜:孔蛋白和连续蛋白(都是1/1000, Abcam, 剑桥, UK)、MRPS-5(1/500, Thermo Fisher, Rockford, IL, USA)、MuRF1和MuRF2(都是1/1000; Myomedix市售的, Neckargemünd, 德国)和Tom20(1:200, Santa Cruz Biotechnologies, 海德堡, 德国)。随后,将膜与辣根过氧化物酶缀合的二级抗体一起孵育,通过酶化学发光(Super Signal West Pico, Thermo Fisher Scientific Inc., Bonn, 德国)观察特异性条带,并利用一维扫描软件包(Scanalytics Inc., Rockville, MD, USA)对光密度法进行定量。将测量值相对于负荷对照GAPDH(1/30 000; HyTest Ltd, Turku, 芬兰)或 α -微管蛋白(1:1000, Santa Cruz Biotechnologies)标准化。所有数据均以相对于假处理组的倍数变化表示。

[0722] 从图40~42可以看出,在CHF组中,MuRF1和MuRF2的表达显著上调,而用化合物MyoMed-946处理防止所述上调(图40和41)。定量连续蛋白(一种MuRF1靶蛋白)的表达,观察到CHF组有降低表达的趋势($P=0.08$),这在化合物MyoMed-946-处理组中并不明显(图42)。

[0723] 3.1.3 B16F10小鼠(肿瘤小鼠):

[0724] 如上所述,对于MCT和CHF小鼠,测定B16F10小鼠肌肉组织中MuRF1、Nox 2和LC3 I/II的蛋白表达。此外,测定活性氧标记物硝基酪氨酸的水平。

[0725] 从图43~46可以看出,在肿瘤组中,MuRF1表达显著上调,并且用化合物MyoMed-

946和MyoMed-205处理防止所述上调(图43)。此外,已知的内源性活性氧种类(ROS)Nox 2的表达,以及硝基酪氨酸的组织水平在肿瘤小鼠组也显著上调,而在肿瘤+MyoMed-946和肿瘤+MyoMed-205小鼠组中,所述种类在肌肉组织中的量显著减少(图44和45)。另一方面,参与自吞噬作用的关键蛋白LC3I/II的表达水平在肿瘤组下调,这在肿瘤+MyoMed-946和肿瘤+MyoMed-205组中没有观察到(图46)。

[0726] 3.2酶活性测定:

[0727] 3.2.1 CHF小鼠:

[0728] 由于蛋白质组学分析数据表明线粒体稳态受损,测定了CHF小鼠膈肌组织中关键线粒体酶的酶活性。

[0729] 将膈肌组织在松弛缓冲液中匀化,并将试样用于测定酶活性。如先前所详述,用分光光度法测定乳酸脱氢酶(EC 1.1.1.27)、丙酮酸激酶(EC 2.7.1.40)、琥珀酸脱氢酶(SDH, EC 1.3.5.1)、柠檬酸合成酶(CS, EC 2.3.3.1)、 β -羟酰基-COA脱氢酶(EC 1.1.1.35)和线粒体复合物I的酶活性(Mukherjee等人, *J Biol Chem*, 1976, 251, 2155-2160; Vanderlinde等人, *Ann Clin Lab Sci*, 1985, 15, 13-31; Dzeja等人, *Mol Cell Biochem*, 1999, 201, 33-40; Takashi等人, *Biochim Biophys Acta*, 1979, 574, 258-267; Schwarzer等人, *J Physiol*, 2014, 592, 3767-3782)。将酶活性数据均以相对于假处理组的倍数变化表示。

[0730] 从图47~51可以看出,当与假处理组相比时,CHF动物膈肌中线粒体酶包括柠檬酸合酶(图47)、琥珀酸脱氢酶(图48)和线粒体复合物I(图49)的酶活性分别显著降低21%、28%和27%。未发现肌酸激酶的差异。如通过线粒体孔蛋白表达(图50)和TOM-20(图51)的蛋白表达评估,CHF小鼠膈肌组织的线粒体量也显著减少。与对线粒体功能的作用一致,用化合物MyoMed-946处理可部分改善柠檬酸合酶、琥珀酸脱氢酶和线粒体复合物I酶活性(图47~49),并产生接近正常的孔蛋白,以及适度的但统计学显著的TOM-20表达改善(图50和51)。

[0731] 相反,当评价糖酵解和脂肪酸代谢的细胞质酶(糖酵解:丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶;脂肪酸代谢: β -羟酰基-COA脱氢酶)时,未检测到三组间的差异。

[0732] 3.2.2 B16F10小鼠(肿瘤小鼠):

[0733] 如前对CHF小鼠所述,测定B16F10接种小鼠肌肉组织中柠檬酸合成酶和线粒体复合物I的酶活性。

[0734] 从图52和53可以看出,当与假处理组相比时,线粒体酶柠檬酸合酶(图52)和线粒体复合物I(图53)的酶活性在肿瘤组的肌肉组织中显著降低。用化合物MyoMed-946和MyoMed-205处理可部分或完全恢复B16F10接种小鼠肌肉组织中的柠檬酸合成酶和线粒体复合物I的酶活性(图52和53)。

[0735] 4.C2C12肌管细胞培养,逆转录PCR

[0736] 将C2C12肌管在有或无化合物MyoMed-946的条件下在10 μ mol/L终浓度孵育20分钟。在温孵期后,从C2C12细胞中分离总RNA,并利用随机六聚体和Sensiscript逆转录酶(Qiagen, Hilden, 德国)逆转录至cDNA。将一份cDNA用于定量RT-PCR,采用Light Cycler system(罗氏诊断公司,曼海姆,德国)。将特定基因的表达相对于次黄嘌呤-磷酸核糖-转移酶(hypoxanthin-phosphoribosyl-transferase, HPRT)-mRNA的表达标准化。对于MuRF-1表达定量,利用荧光共振能量转移(FRET)技术,使用下述引物(TIB MolBiol, 柏林, 德国)和条

件: HPRT: 5'-CTCATggACTgATTATggACAaggAC-3'(SEQ IN NO:1)和5'-gCAggTCAgCAAAGAACTTATAgCC-3'(SEQ ID NO:2), 60℃退火; MuRF-1: 5'-gATgTgCAAaggAACACgAA-3'(SEQ ID NO:3)、5'-CCTTCACCTggTggCTATTC-3'(SEQ ID NO:4)、LC640-gCACAaggAgCAAgTAggCACCTCAC-PH(SEQ ID NO:5)、5'-gCCTggTgAgCCCCAAACACCT-FL(SEQ ID NO:6), 58℃退火。LC640代表LC Red 640, 一种荧光染料。FL代表荧光素。PH代表磷酸基团(阻断游离的3'-羟基, 阻止经聚合酶的不需要的延伸)。

[0737] 从图54可以看出, 化合物MyoMed-946防止MCT小鼠中MuRF1蛋白表达的增加。

[0738] 5. 统计学分析:

[0739] 将数据表示为均值±SEM。将单向方差分析(ANOVA), 随后Bonferroni post hoc, 用于比较组, 而将双向重复测量ANOVA, 随后Bonferroni post hoc用于评价收缩功能(GraphPad Prism)。P<0.05认可显著性。

序列表

	<110> 沃尔克·亚当斯 西格弗里德·拉贝特	
	<120> 适用于治疗和预防肌肉萎缩和其他状况的化合物	
	<130> M/60137-PCT	
	<160> 6	
	<170> PatentIn 版本3.5	
	<210> 1	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR 引物	
[0001]	<400> 1 ctcatggact gattatggac aggac	25
	<210> 2	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR 引物	
	<400> 2 gcaggtcagc aaagaactta tagcc	25
	<210> 3	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR 引物	

	<400> 3 gatgtgcaag gaacacgaa	19
	<210> 4 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> PCR 引物	
	<400> 4 ccttcacctg gtggctattc	20
[0002]	<210> 5 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> PCR 引物	
	<400> 5 gcacaaggag caagtaggca cctcac	26
	<210> 6 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> PCR 引物	
	<400> 6 gcctggtgag ccccaaacac ct	22

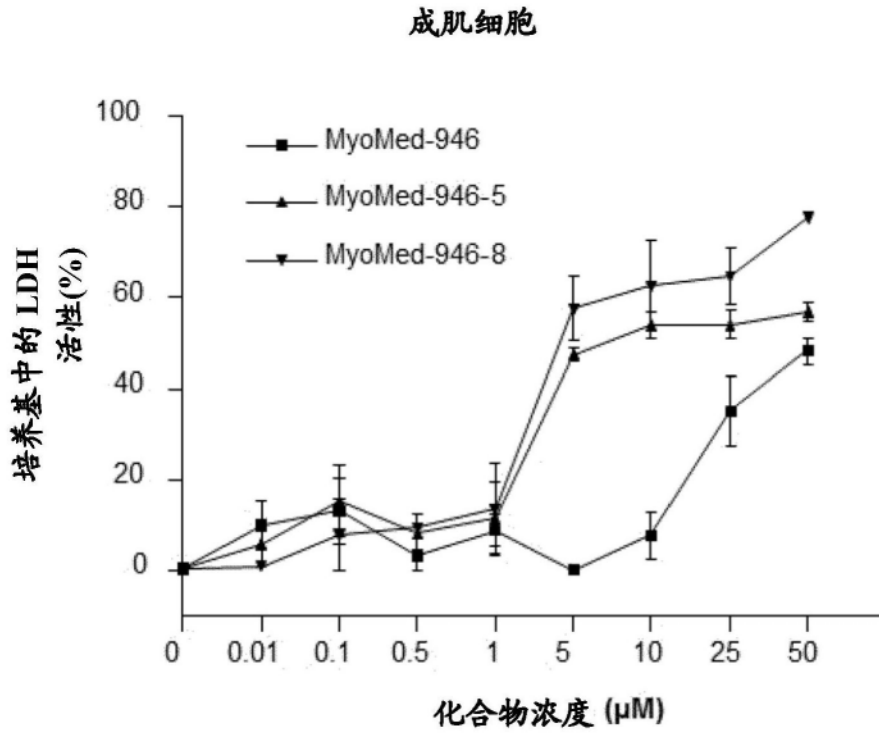


图1

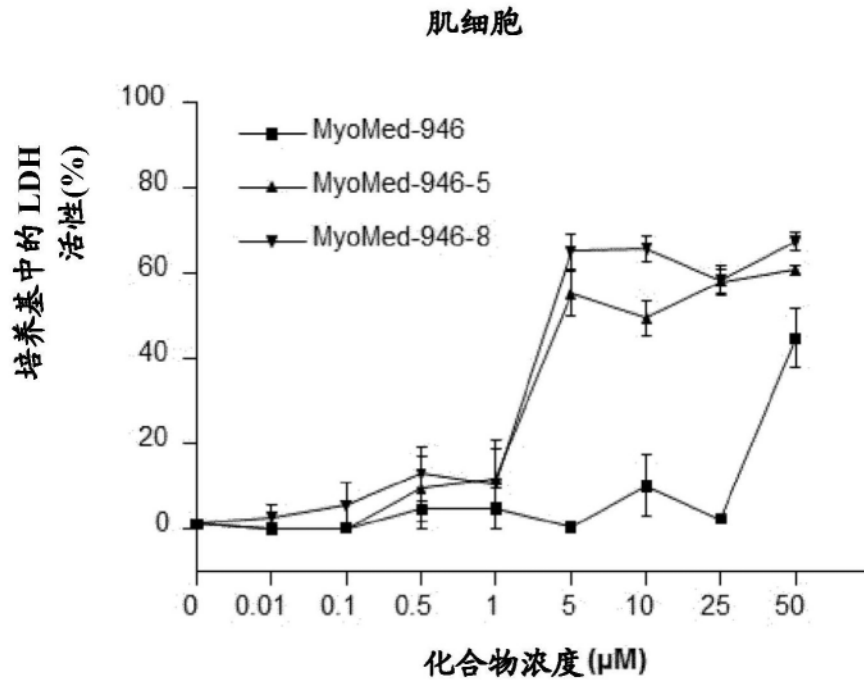


图2

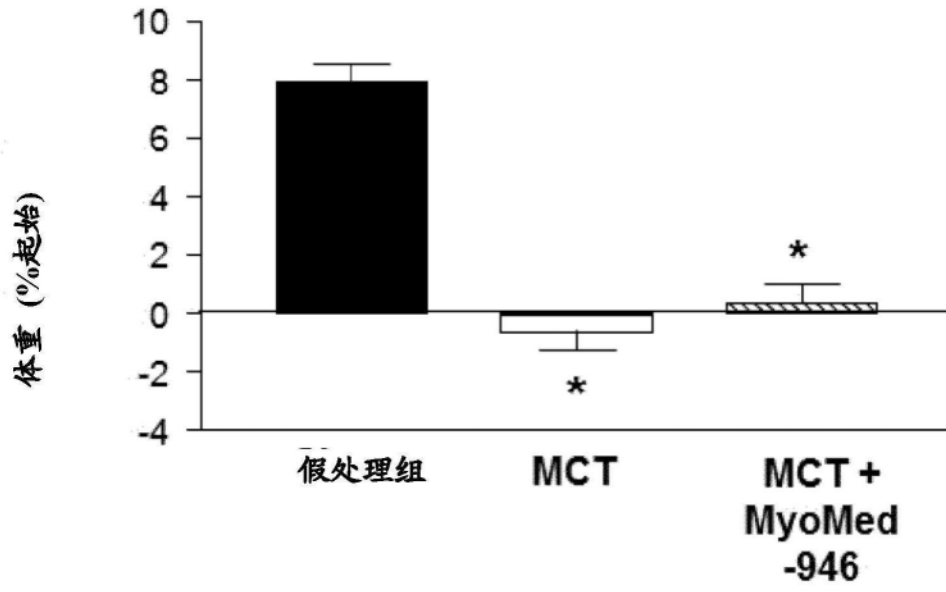


图3

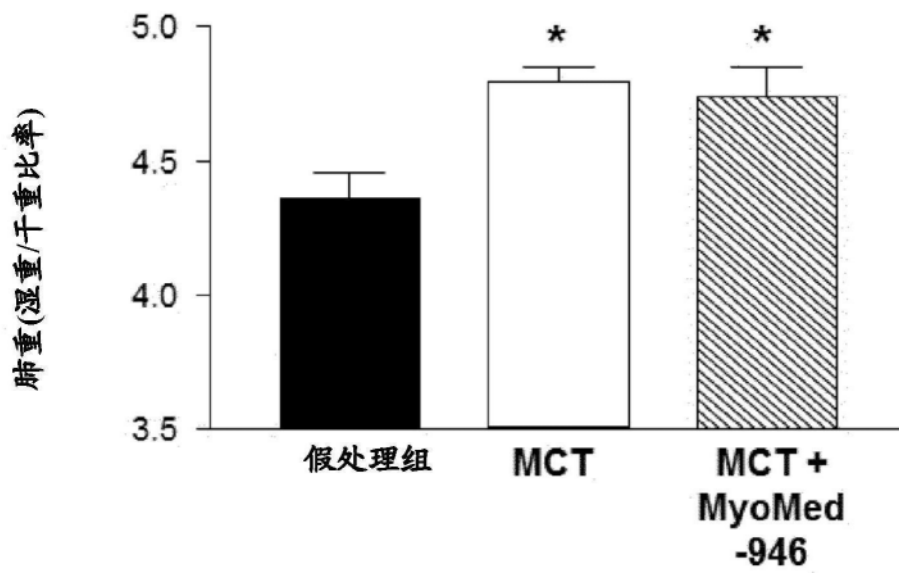


图4

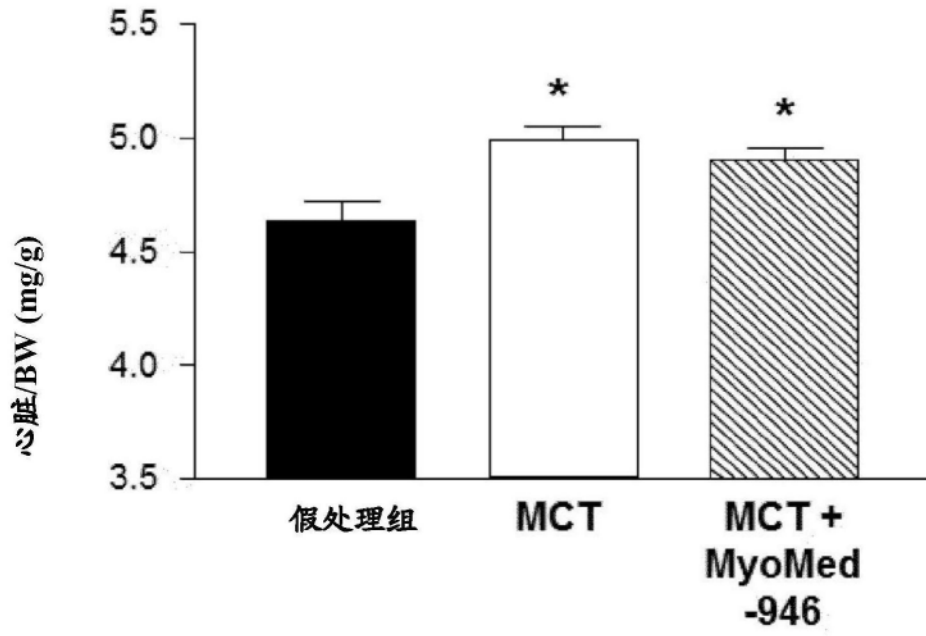


图5

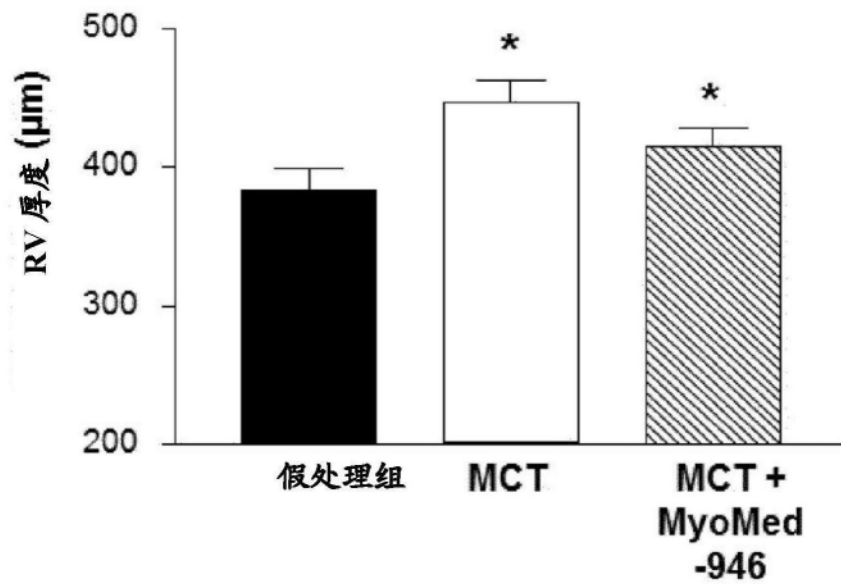


图6

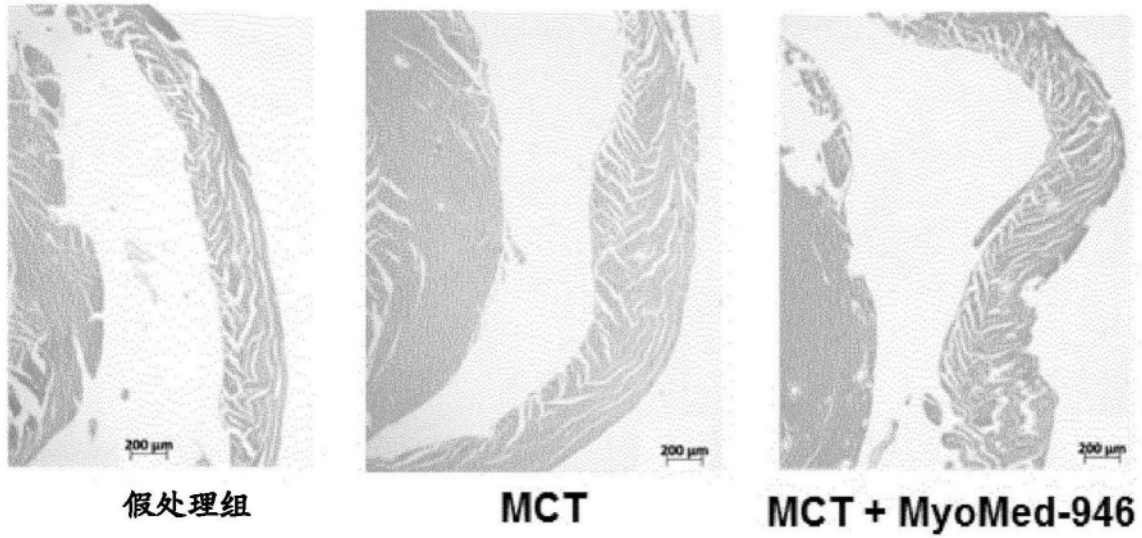


图7

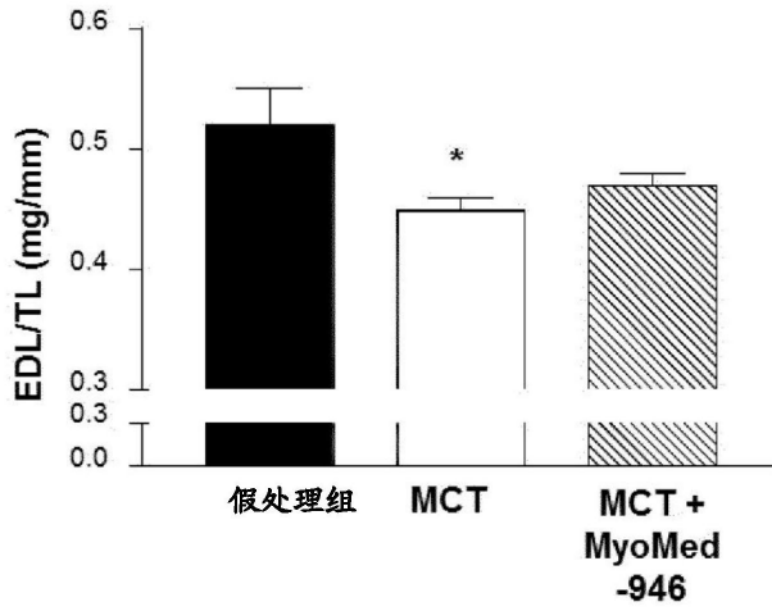


图8

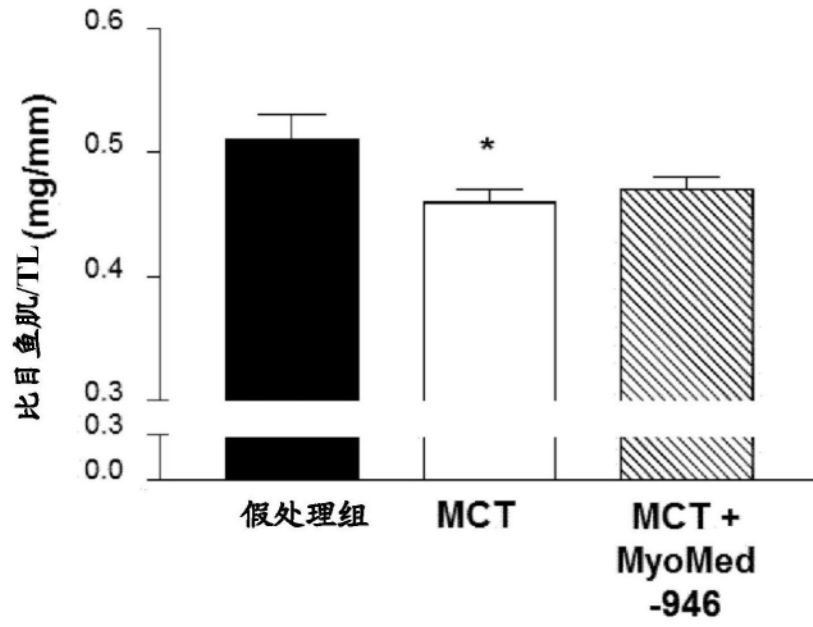


图9

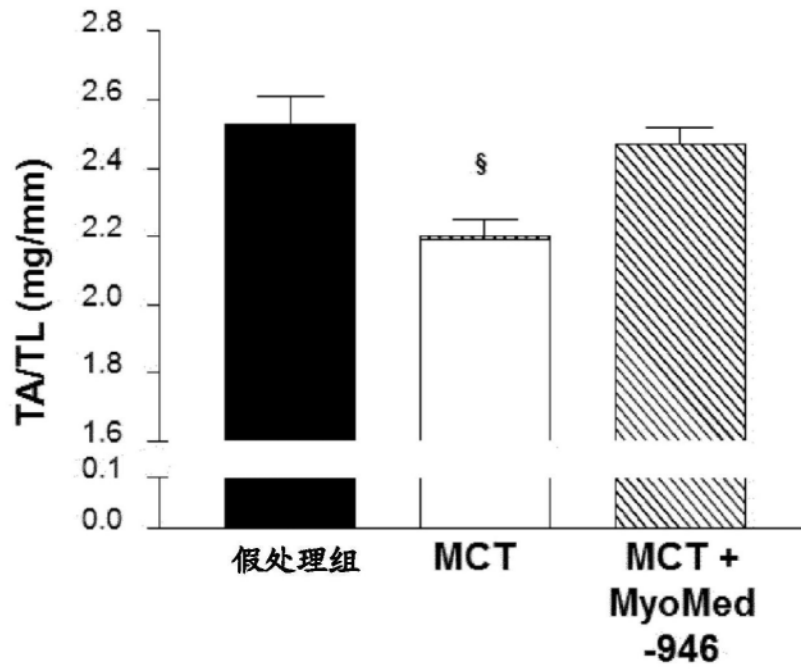


图10

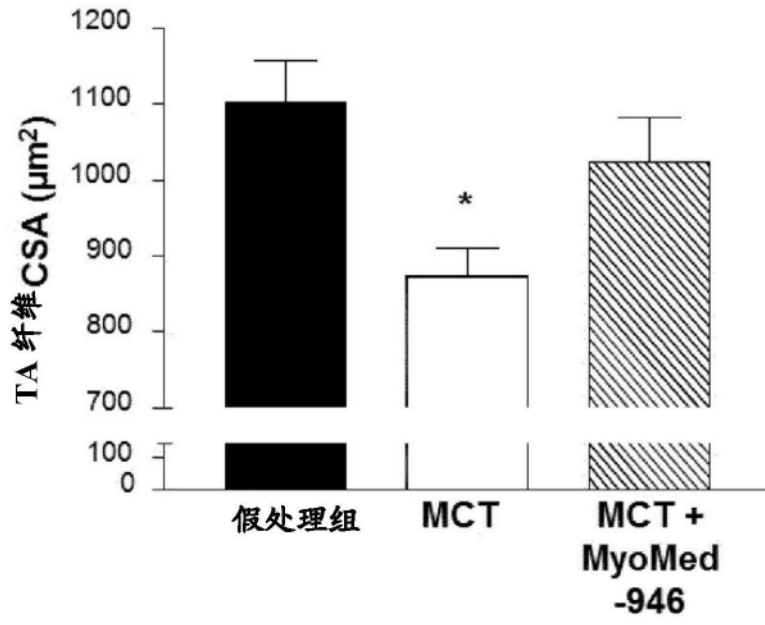


图11

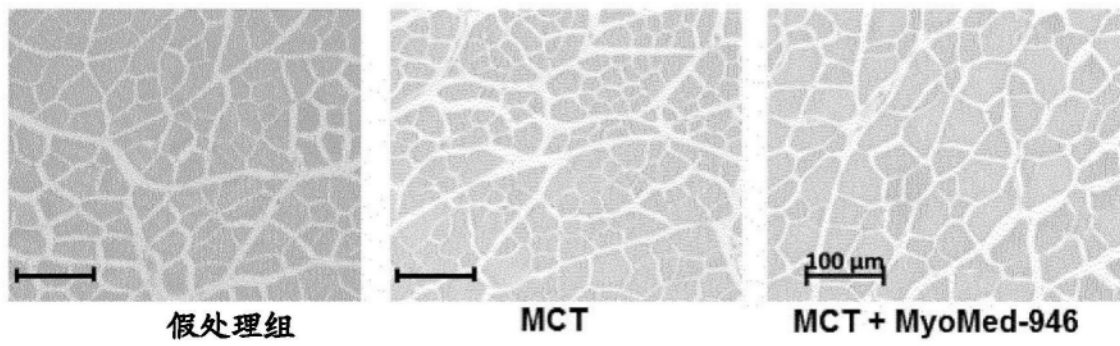


图12

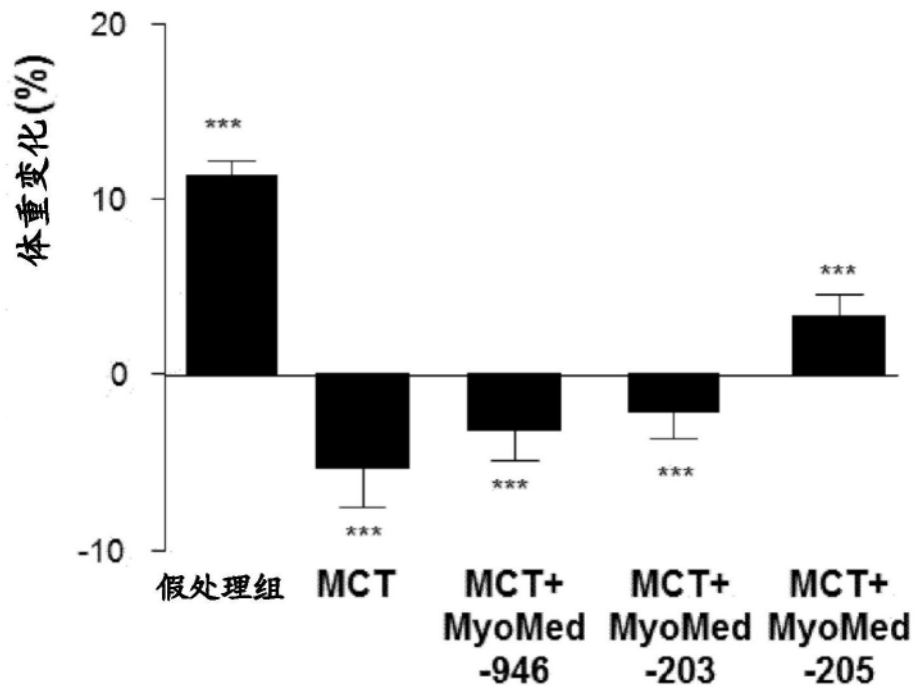


图13

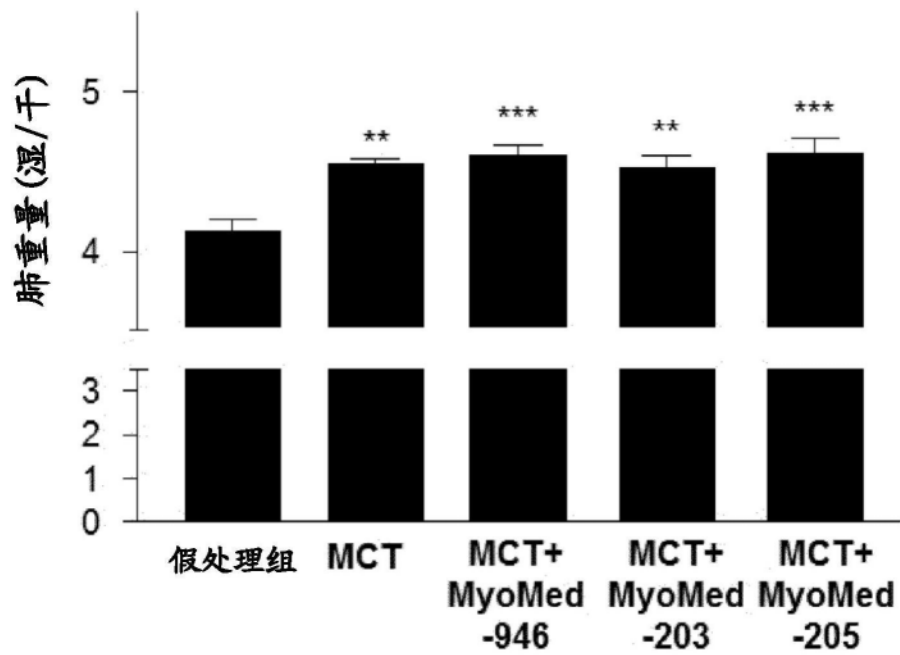


图14

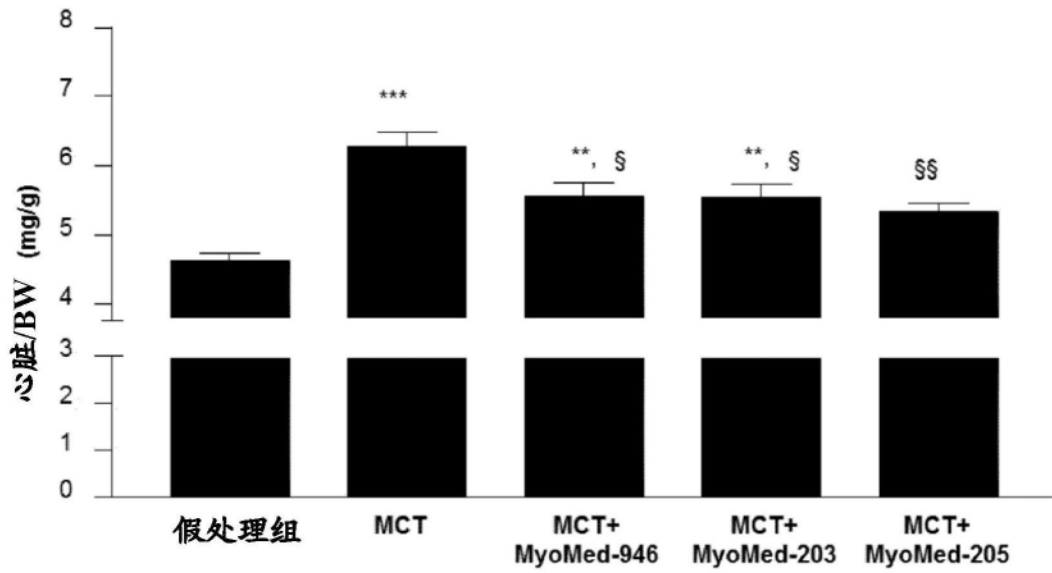


图15

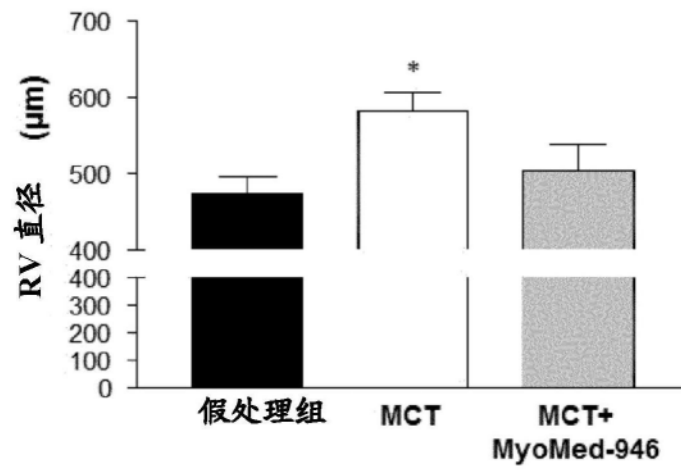


图16

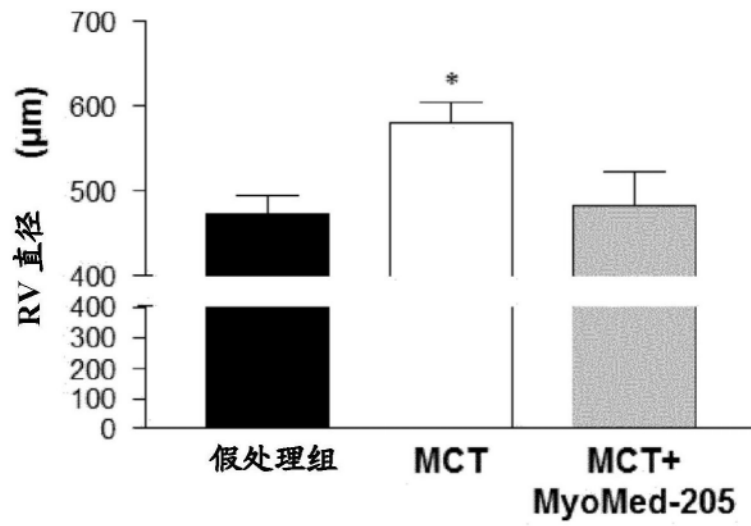


图17

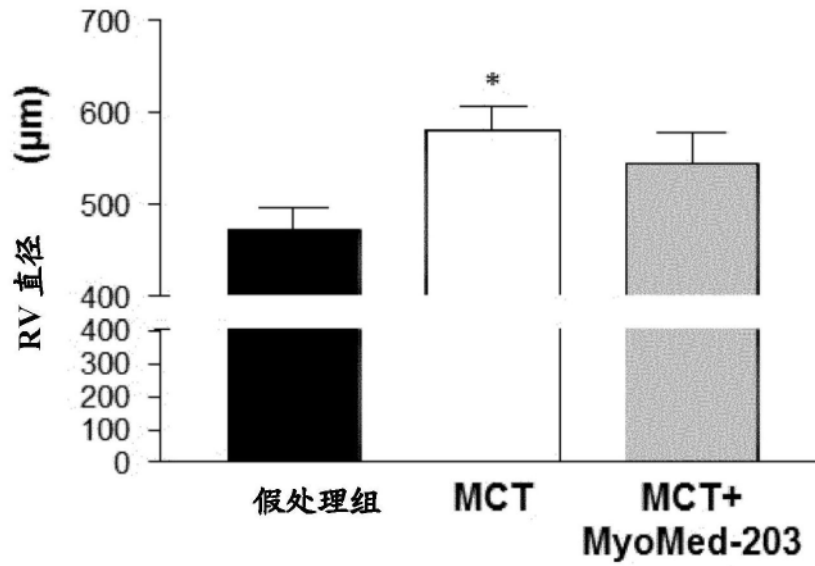


图18

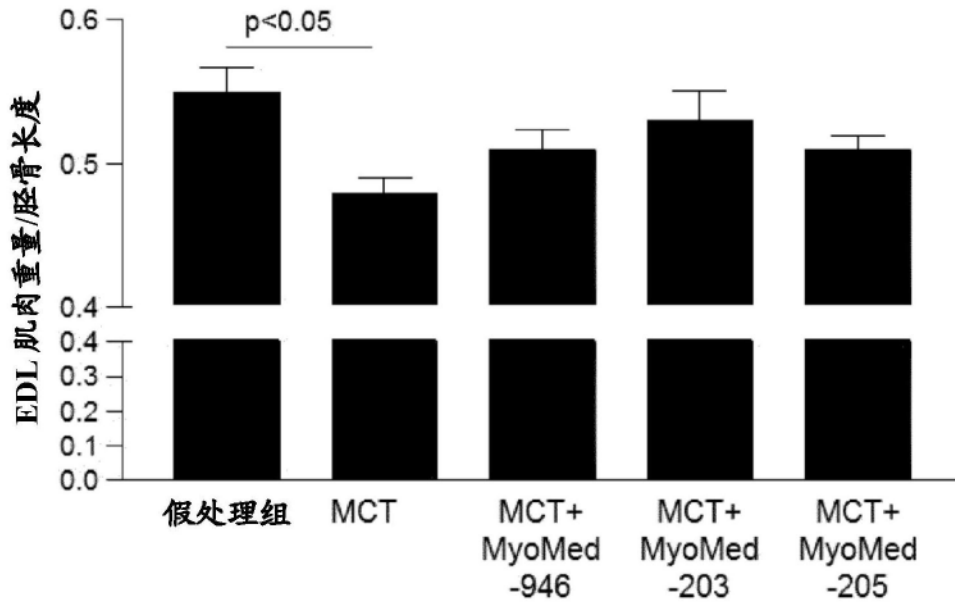


图19

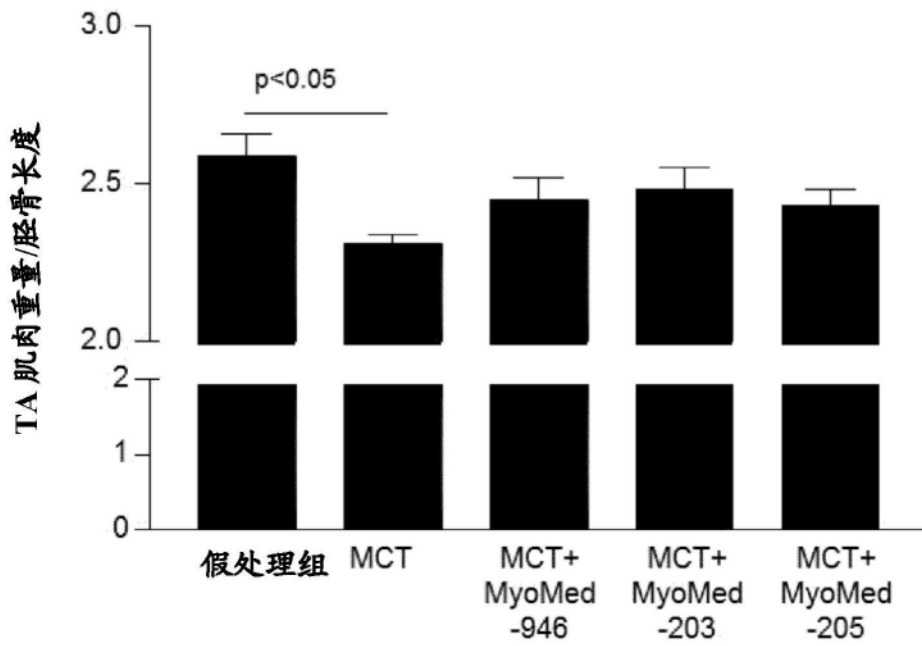


图20

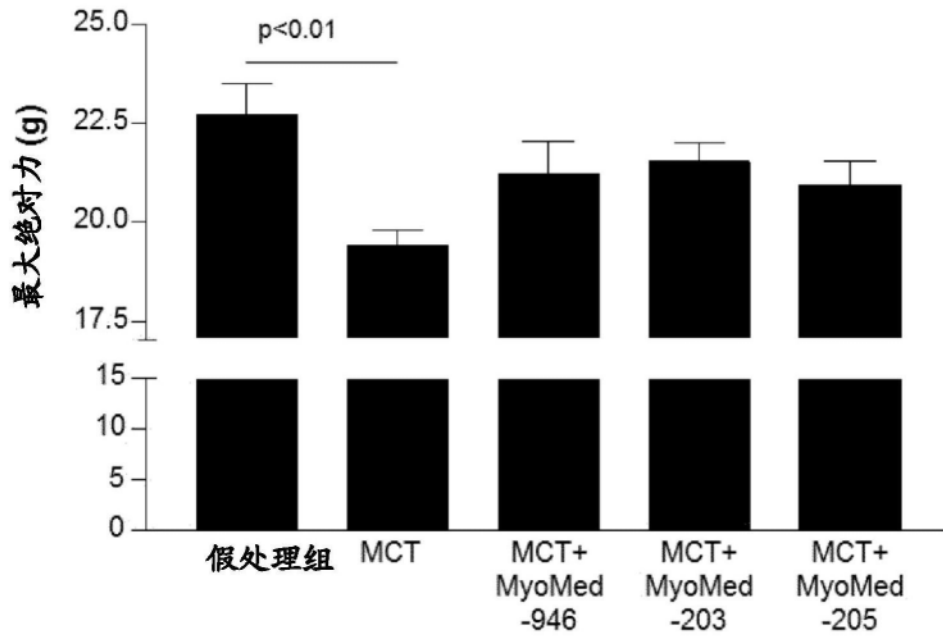


图21

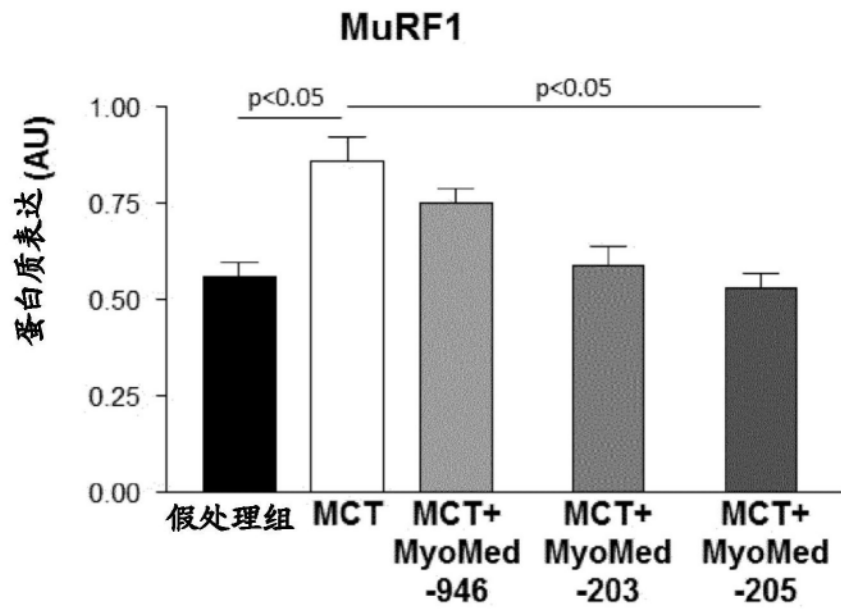


图22

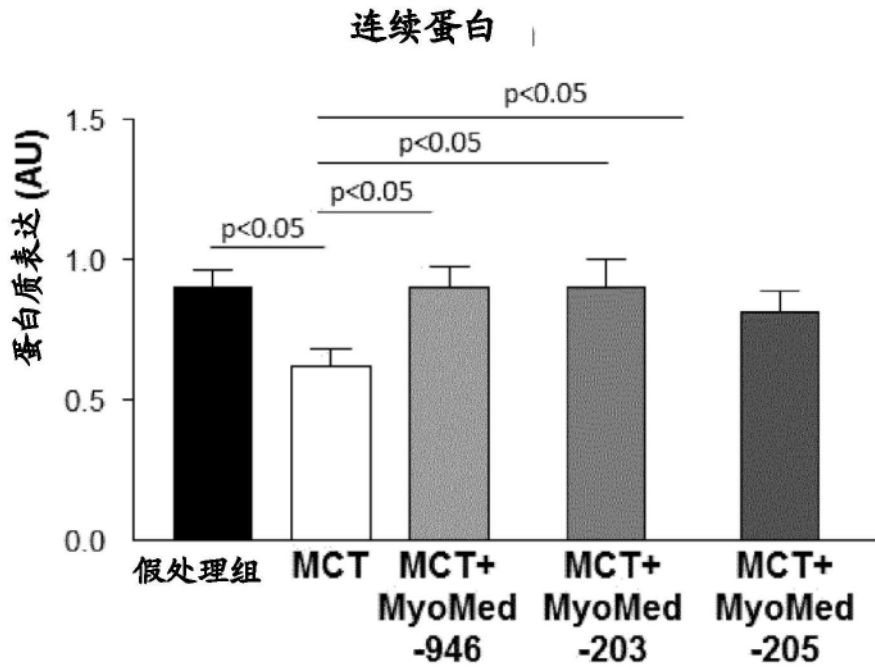


图23

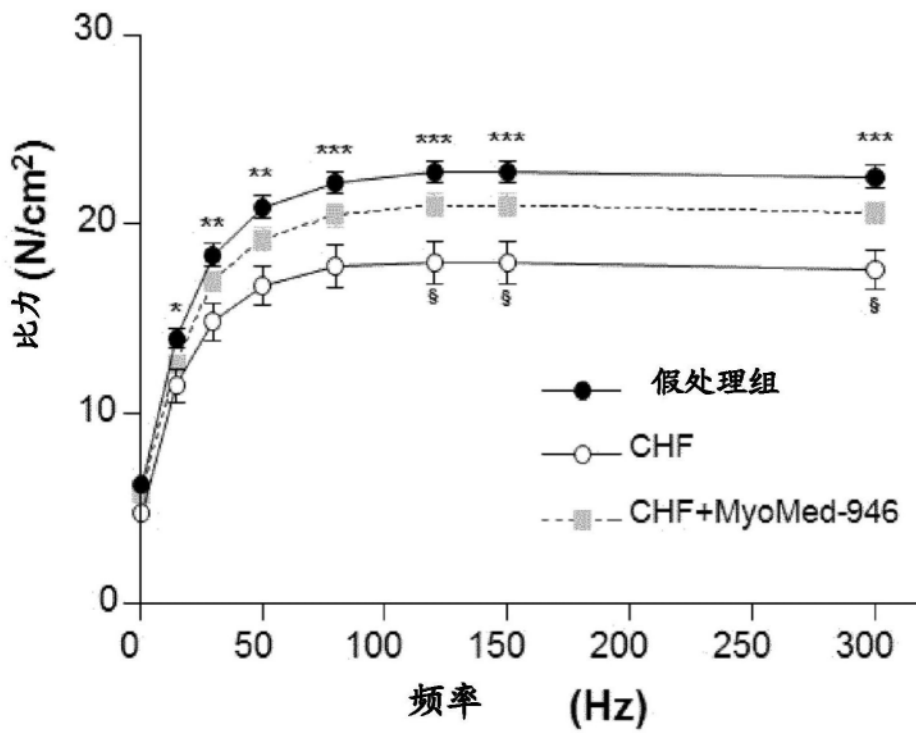


图24

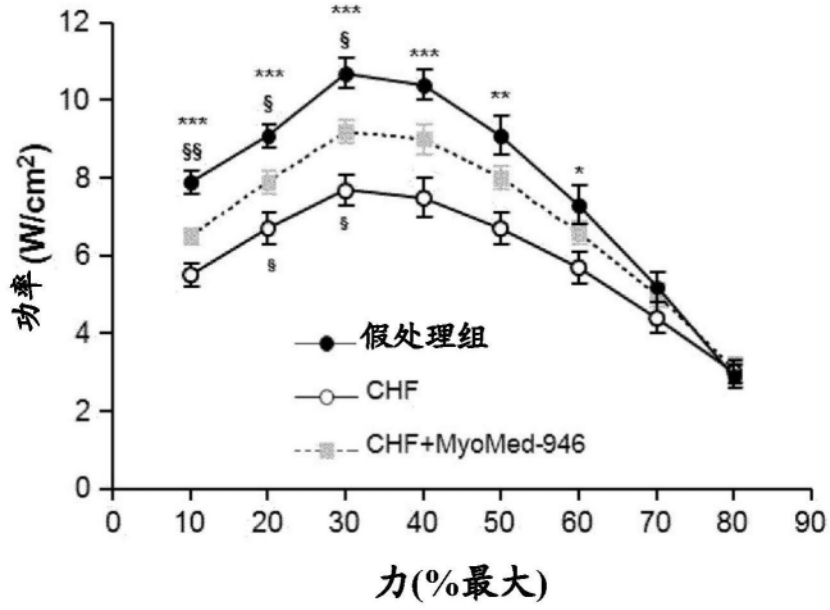


图25

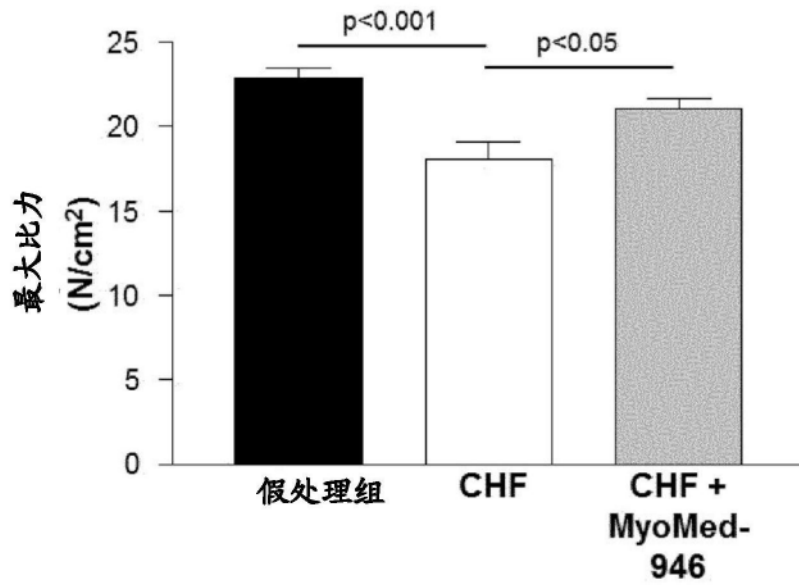


图26

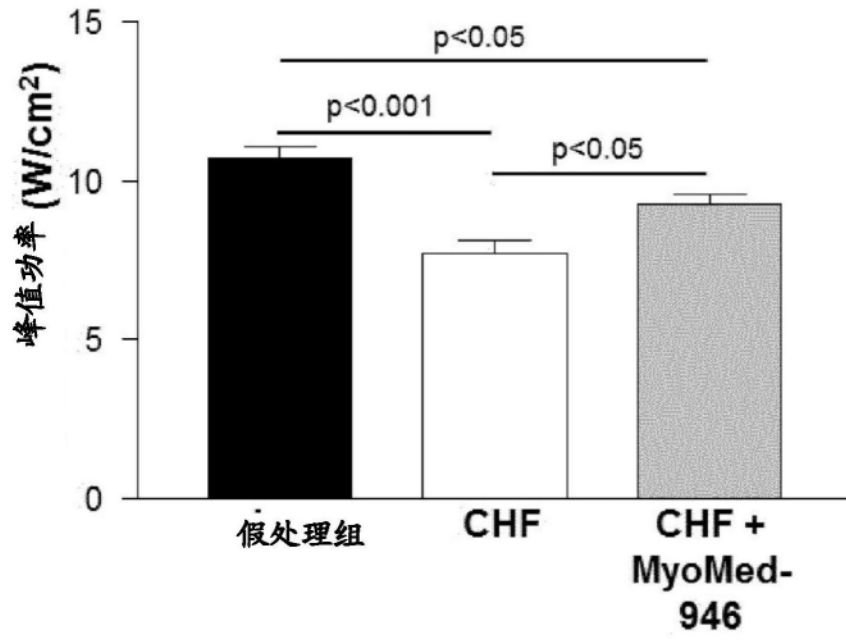


图27

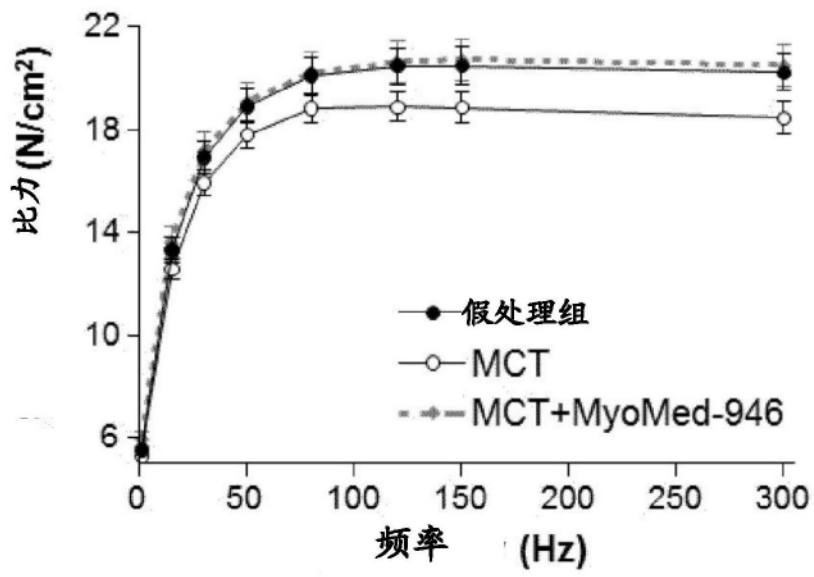


图28

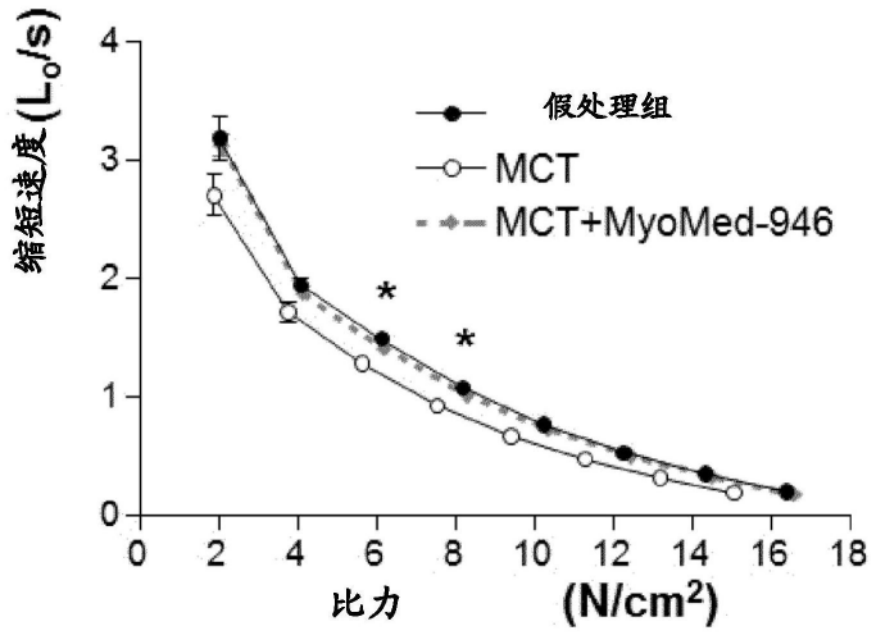


图29

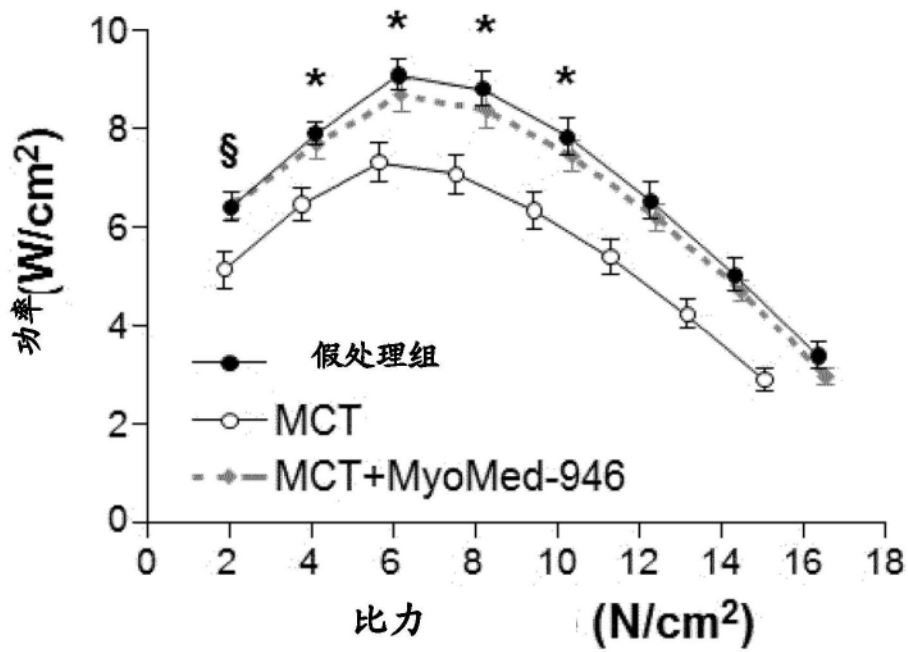


图30

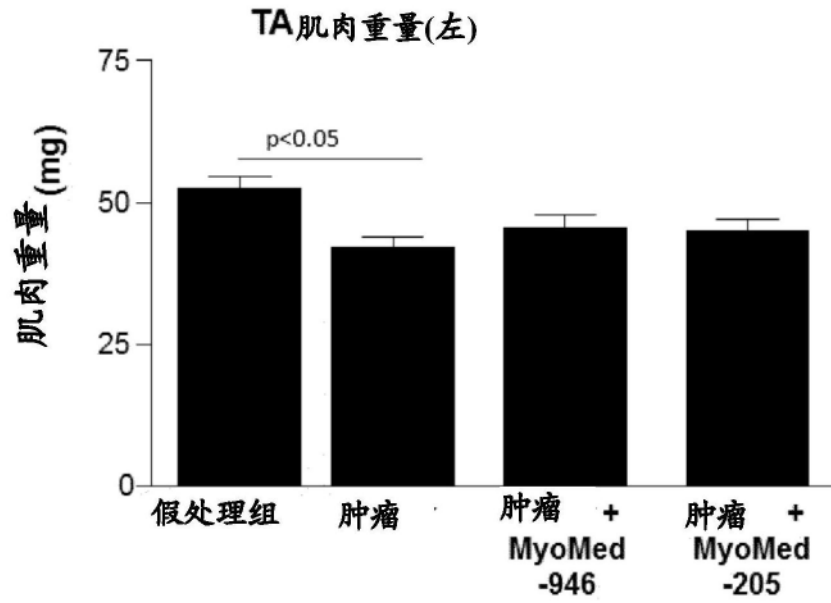


图31

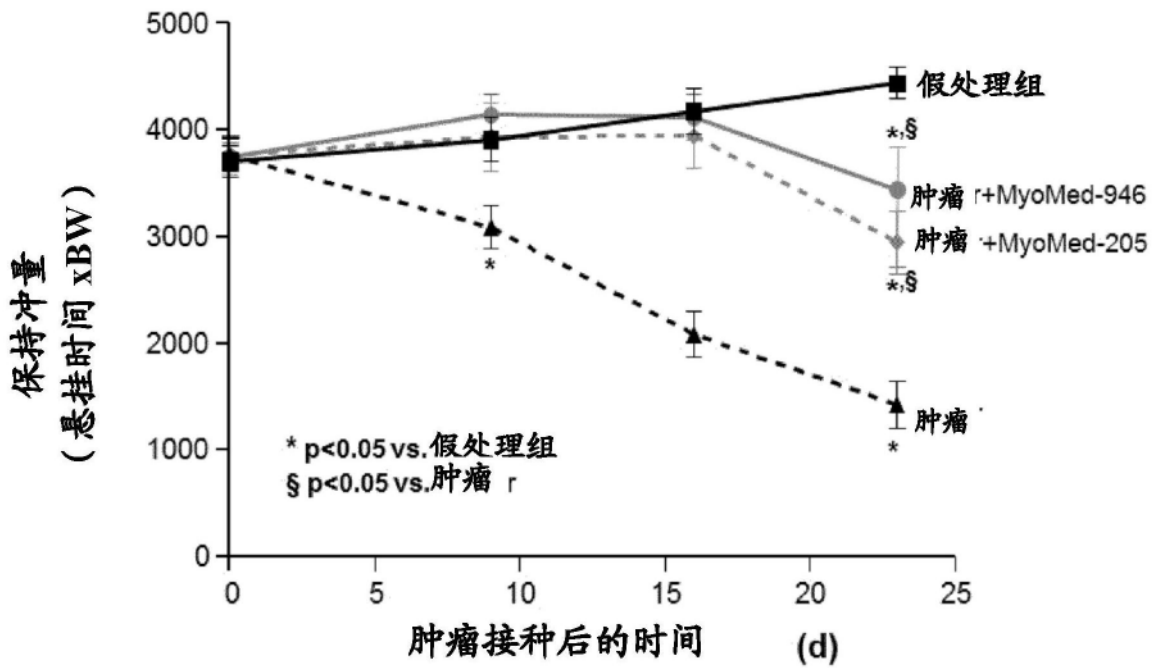


图32

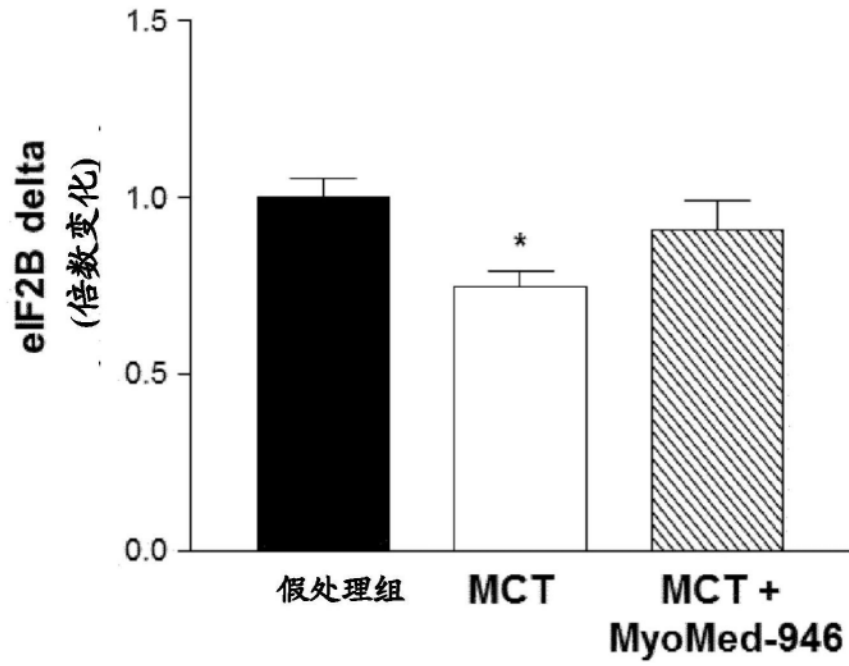


图33

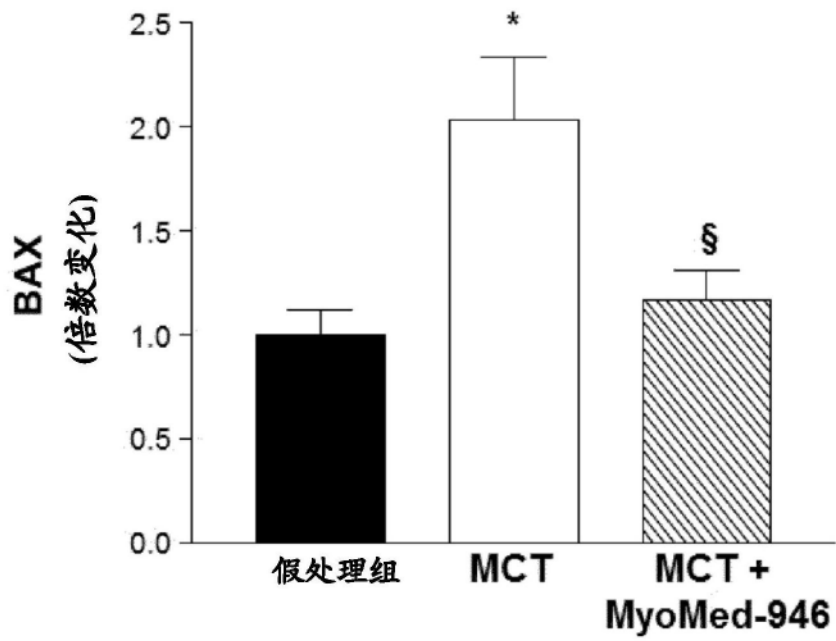


图34

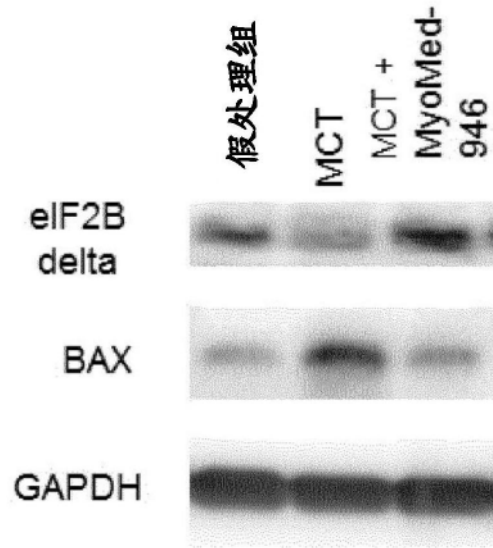


图35

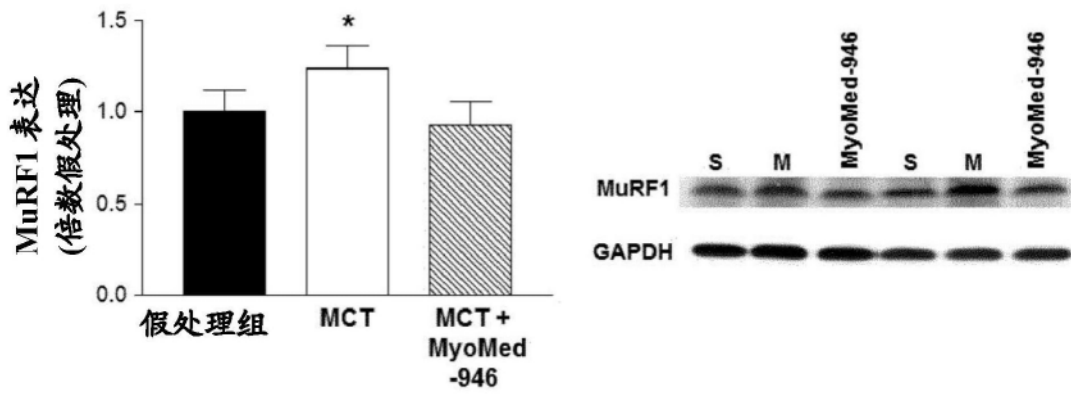


图36

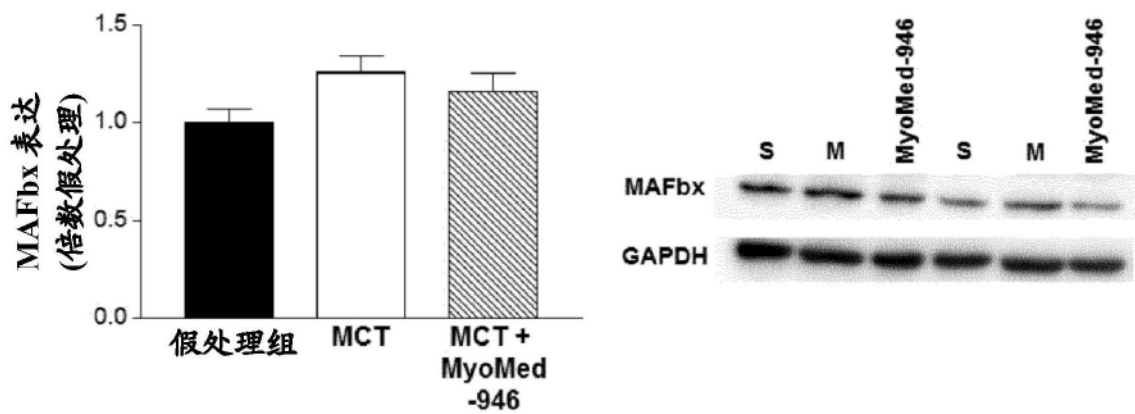


图37

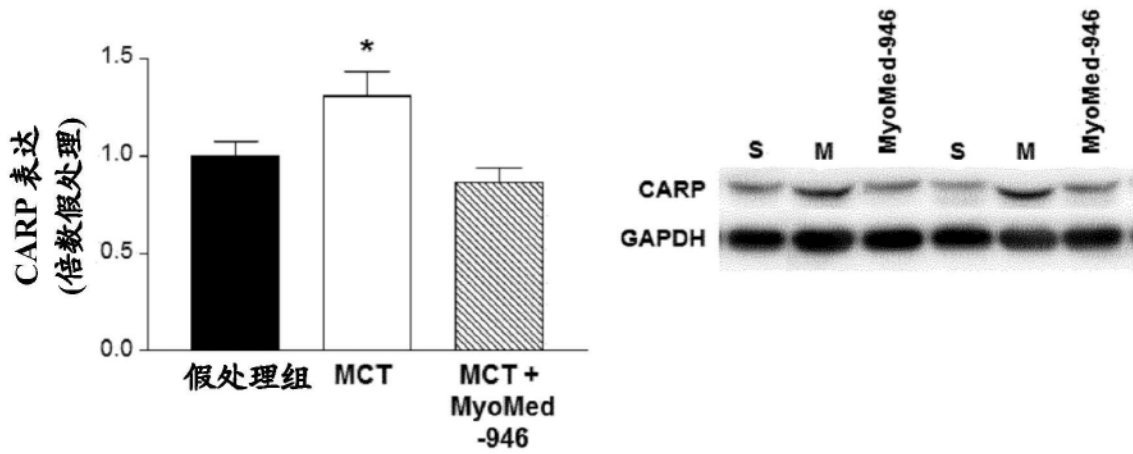


图38

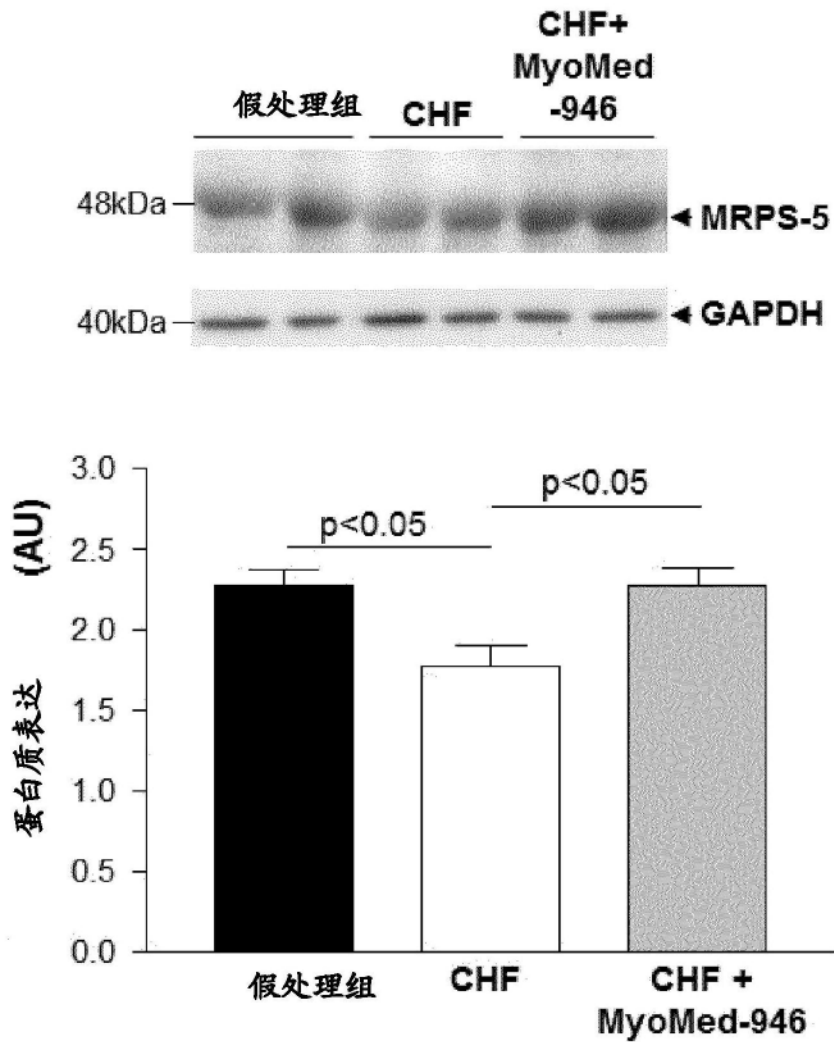


图39

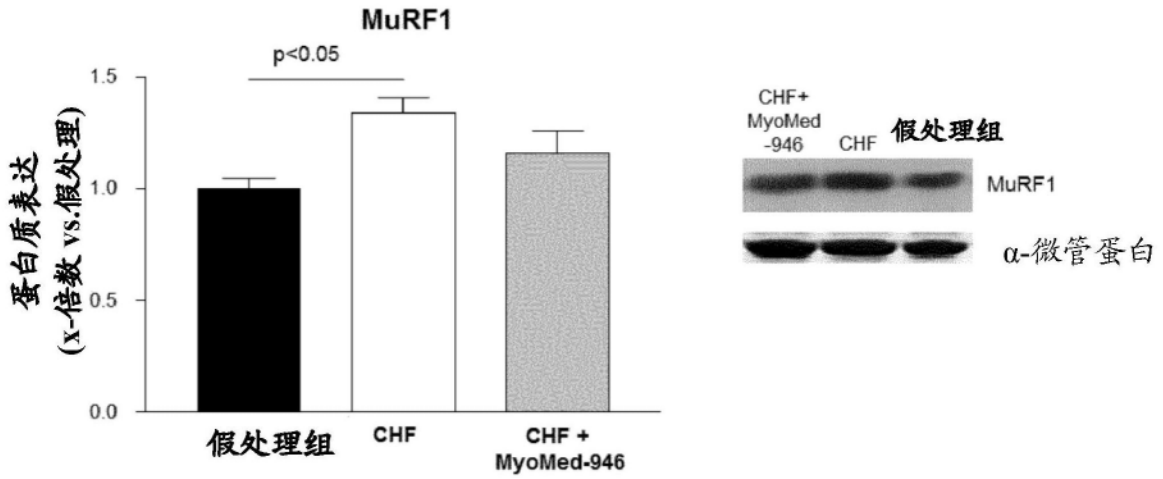


图40

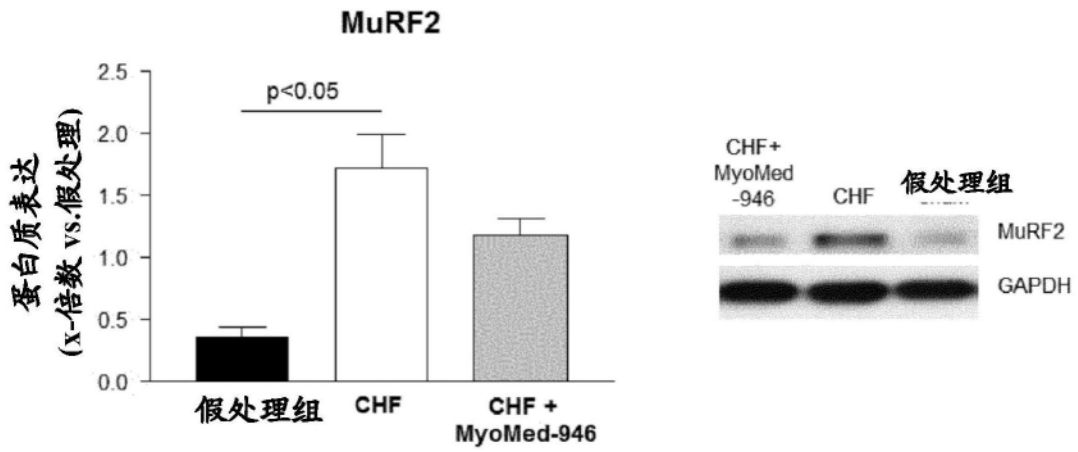


图41

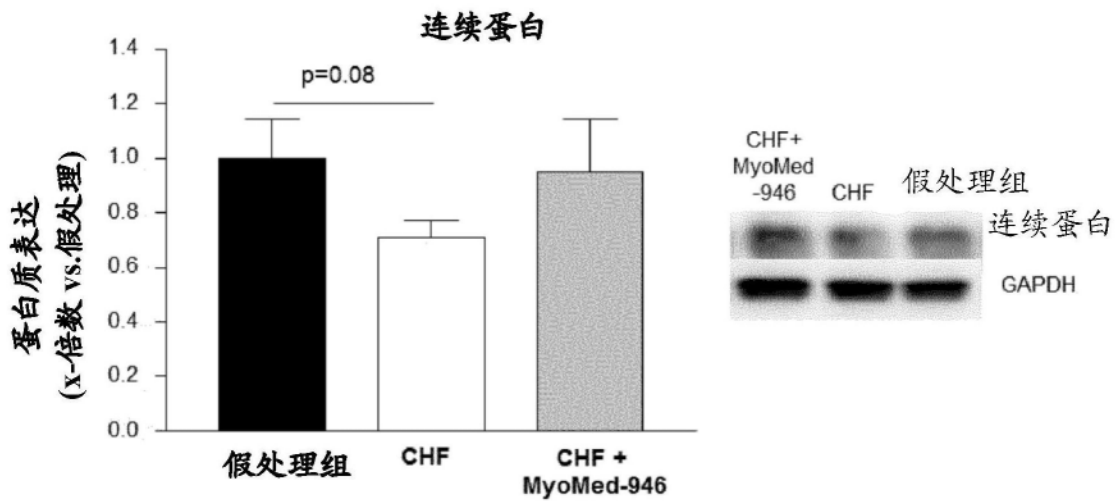


图42

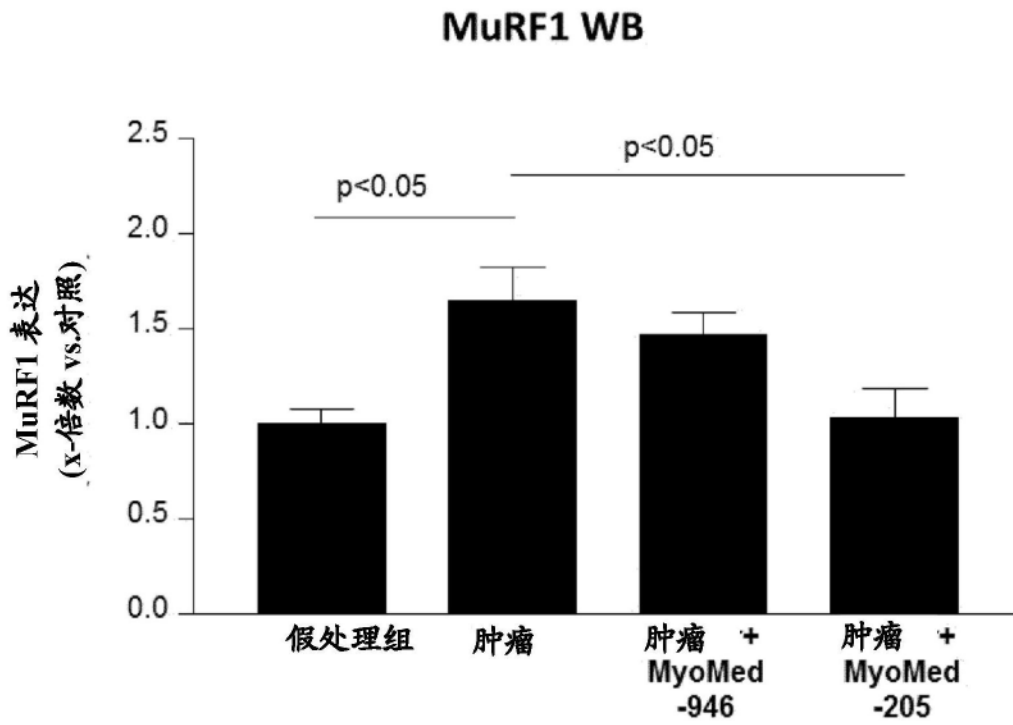


图43

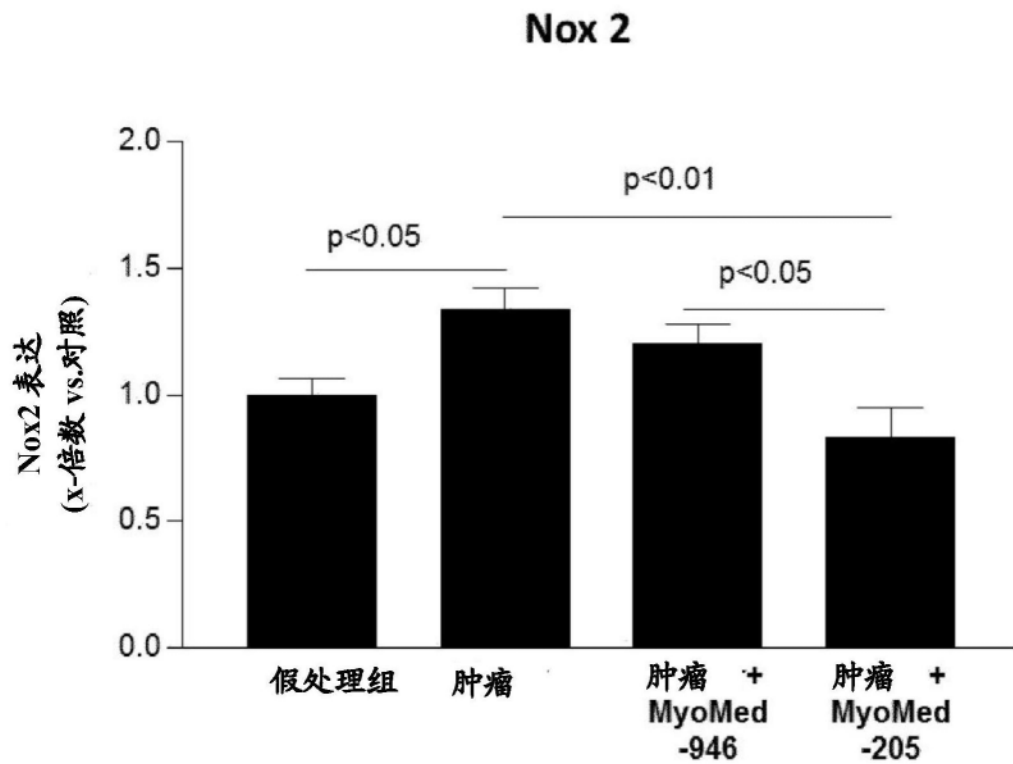


图44

硝基酪氨酸

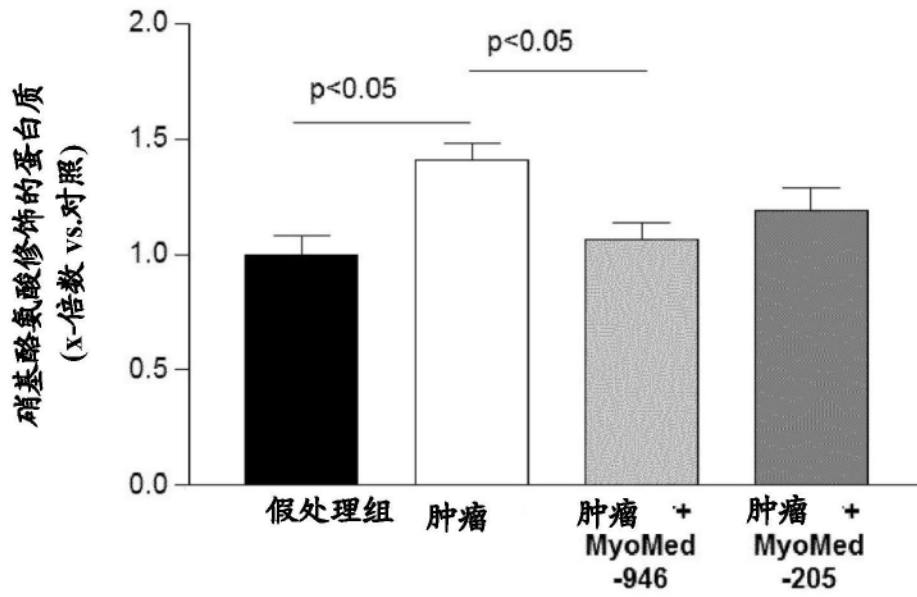


图45

LC3 I/II

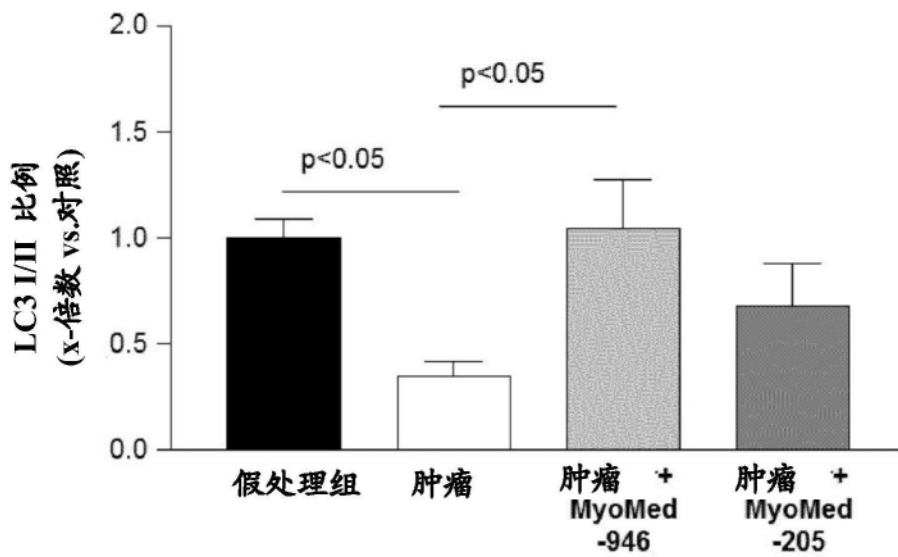


图46

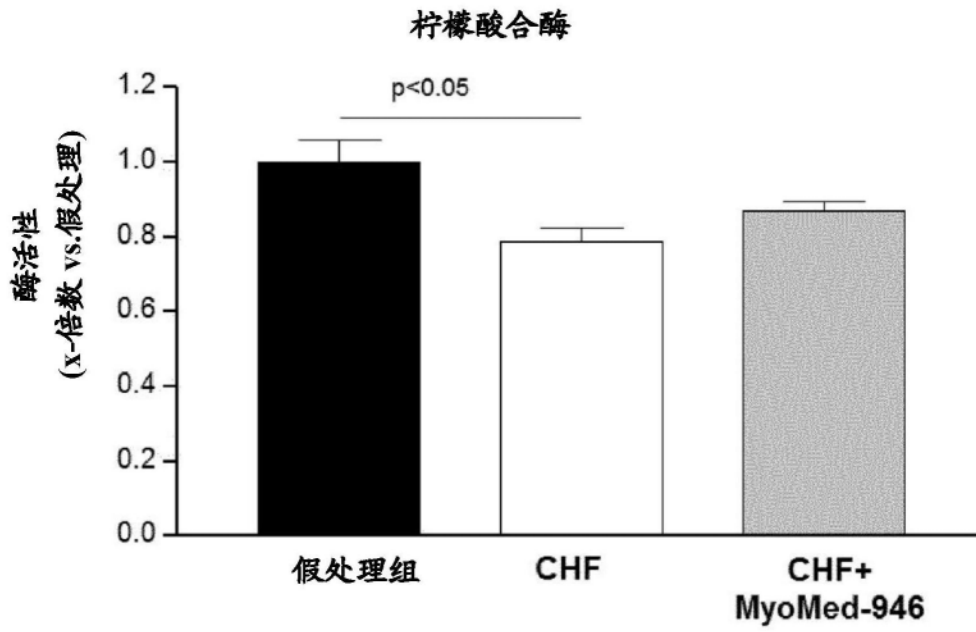


图47

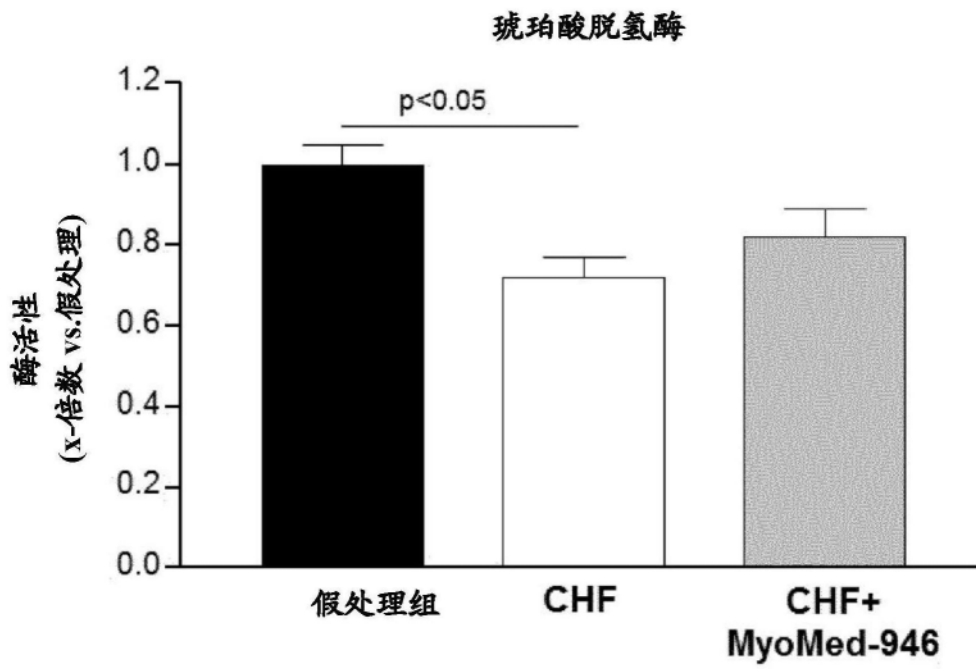


图48

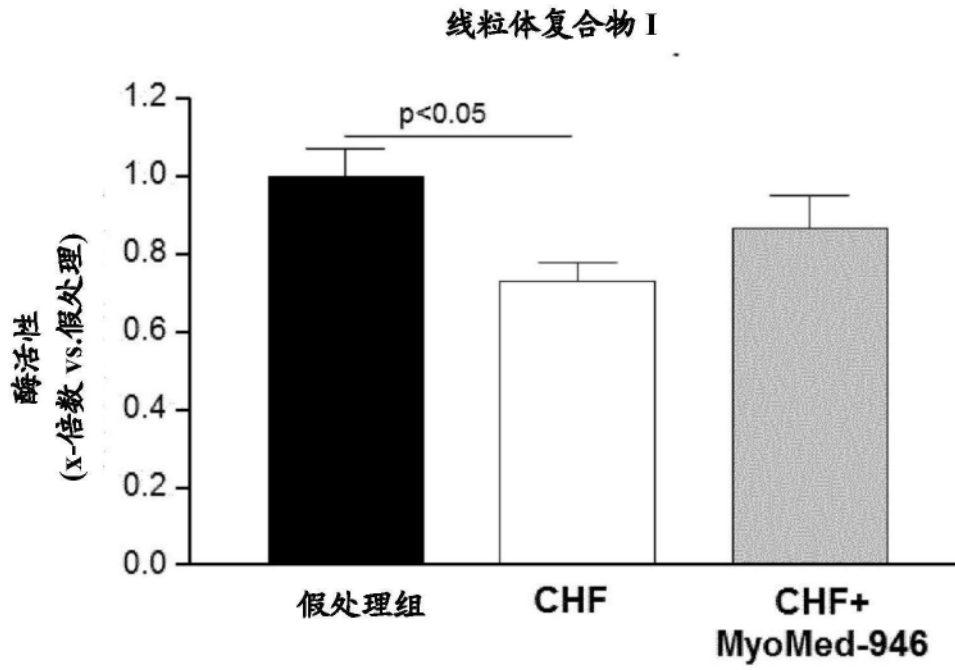


图49

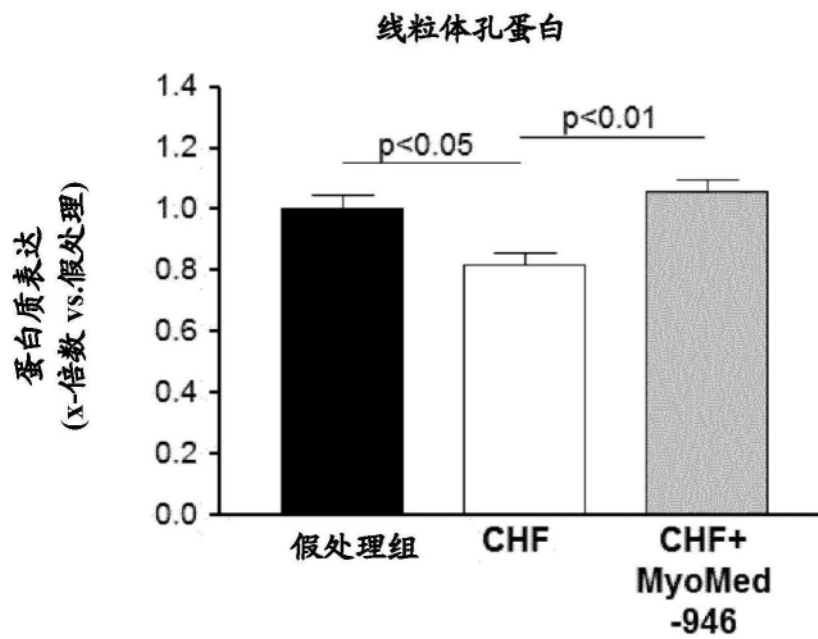


图50

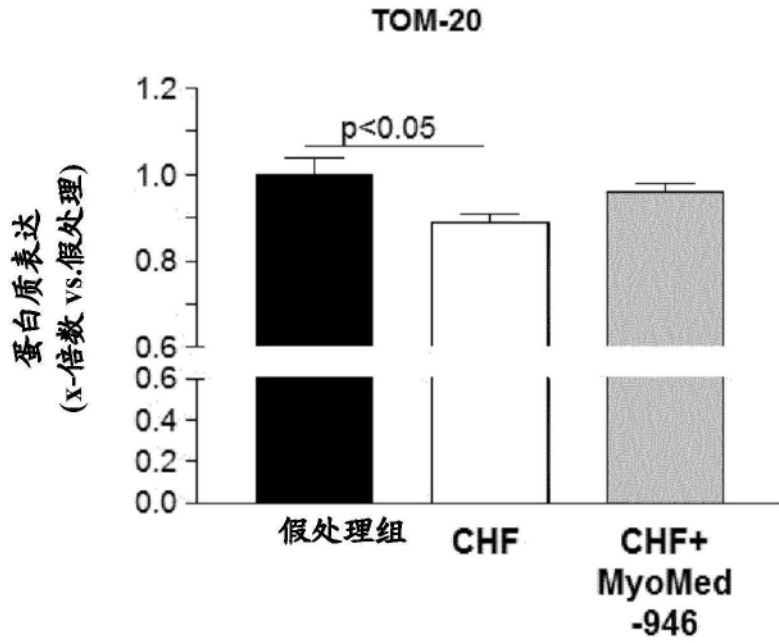


图51

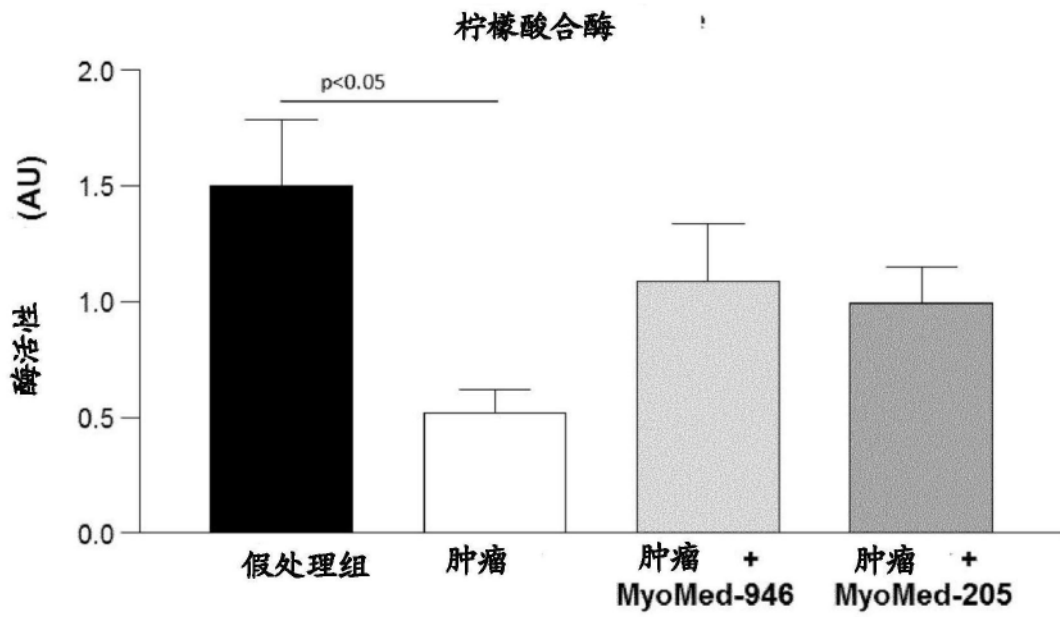


图52

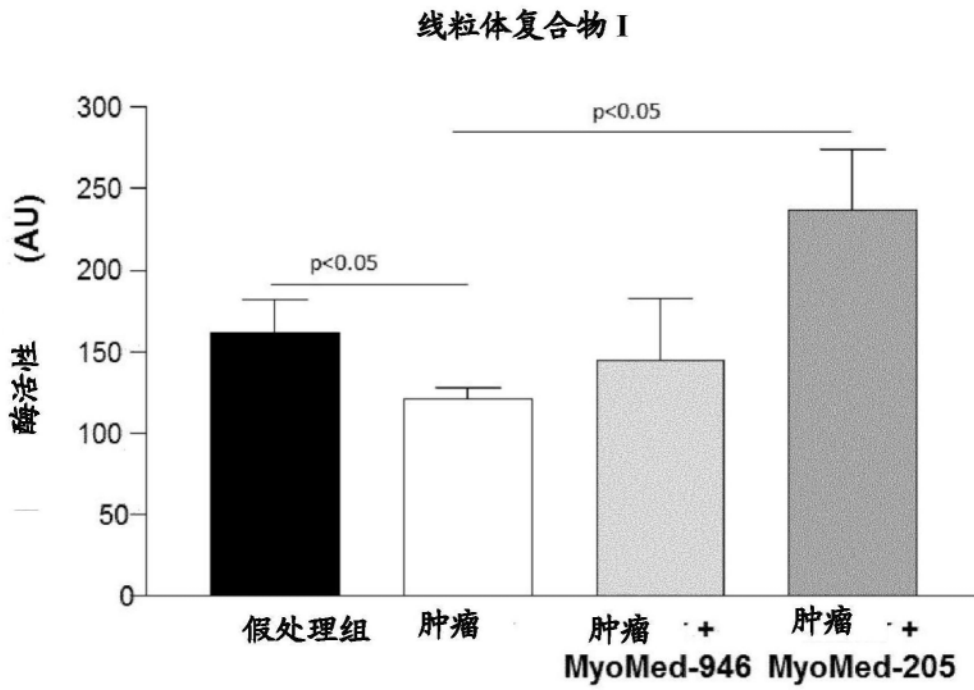


图53

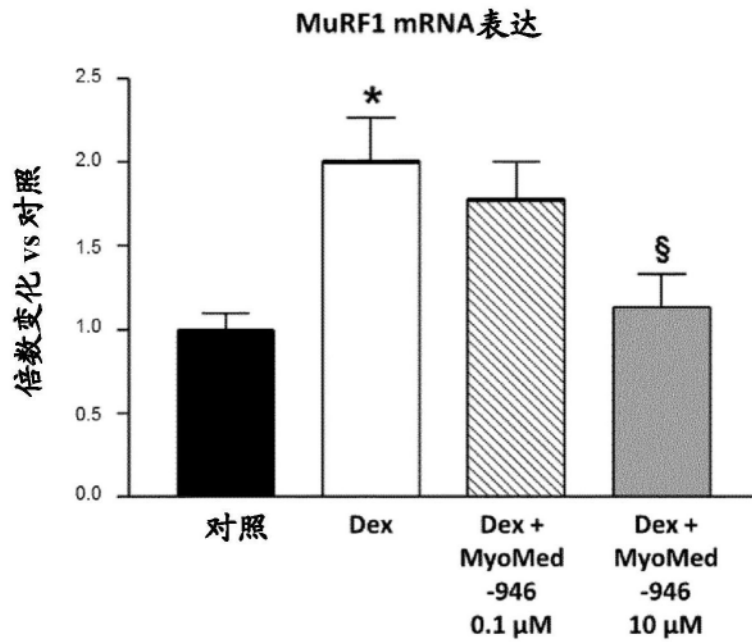


图54

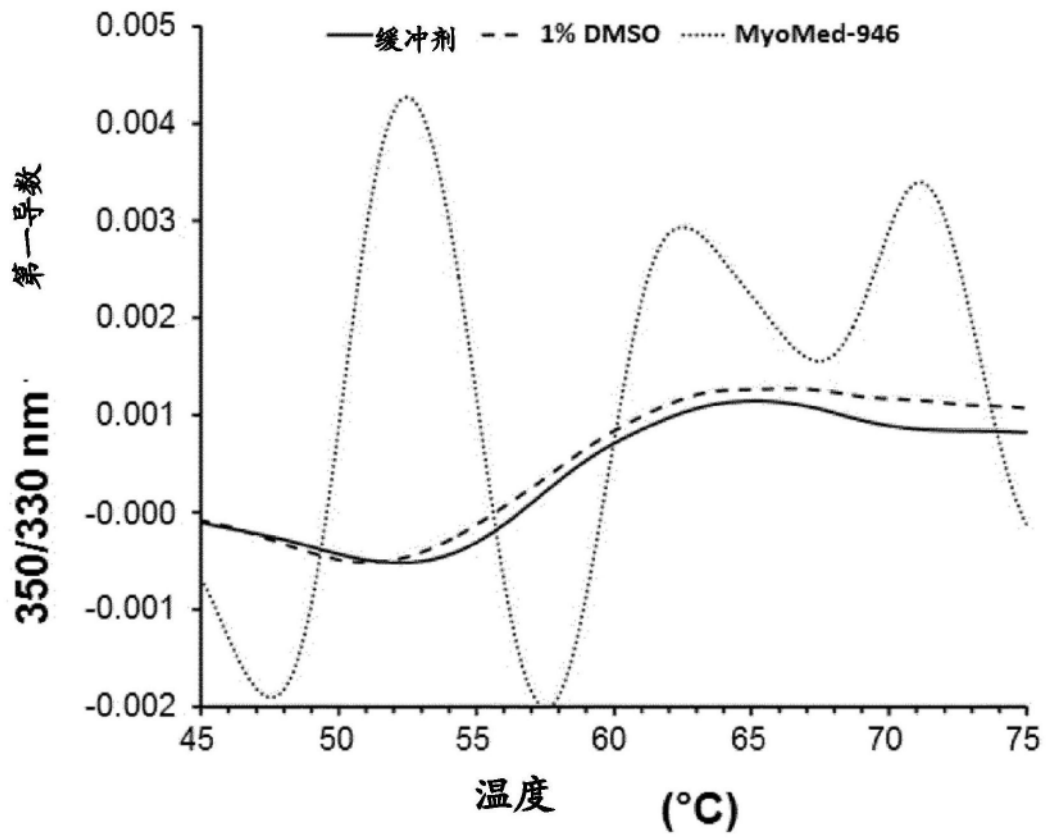


图55

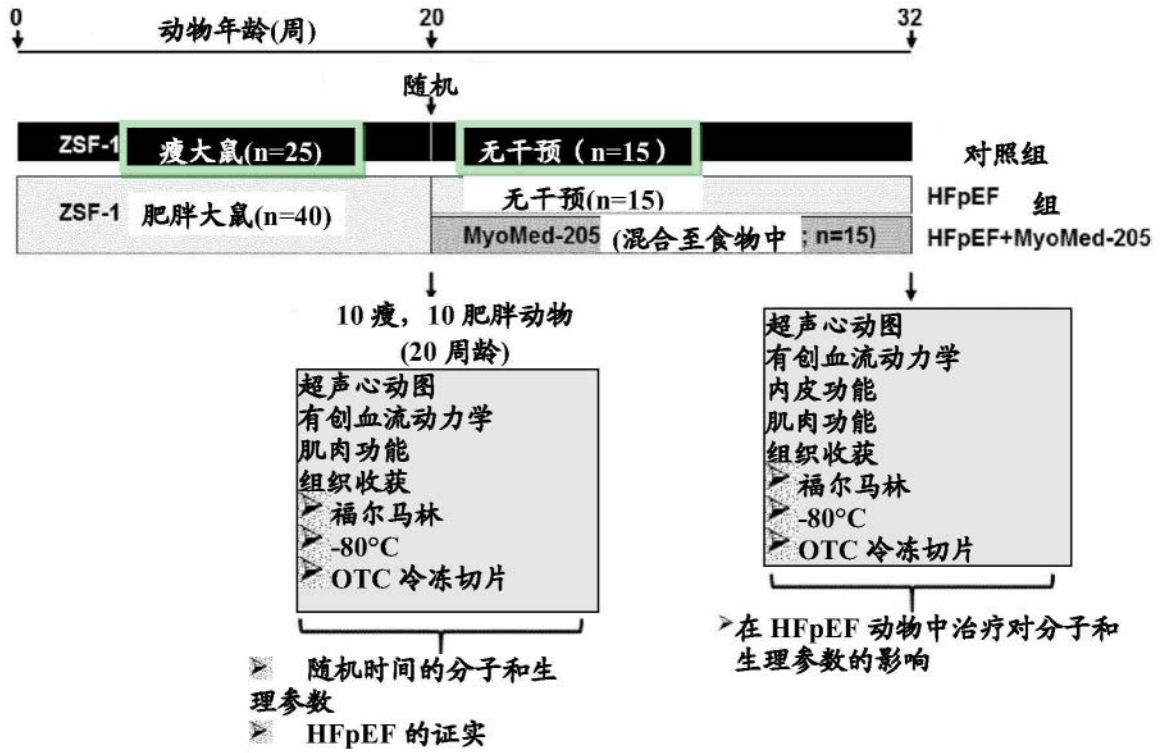


图56

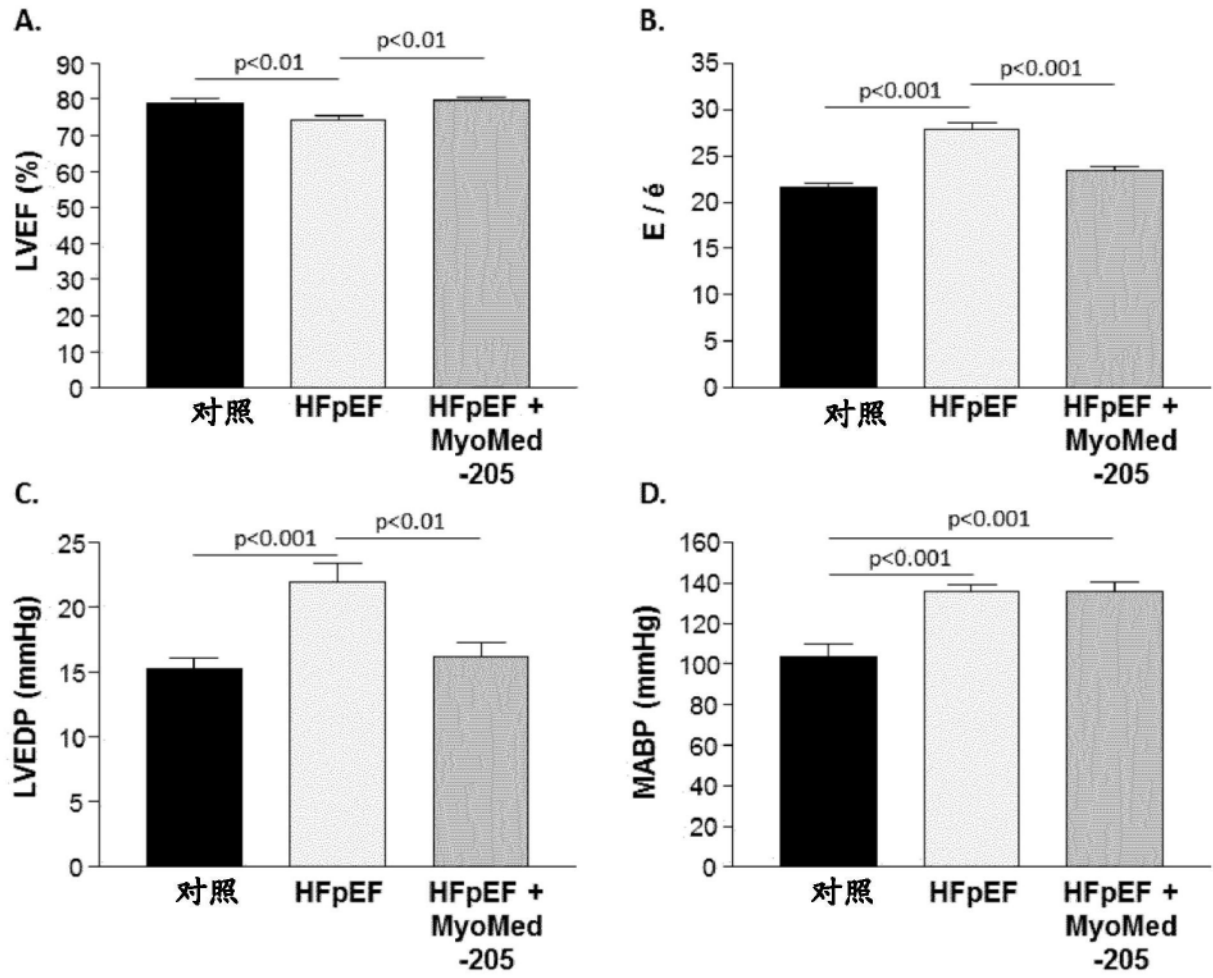


图57

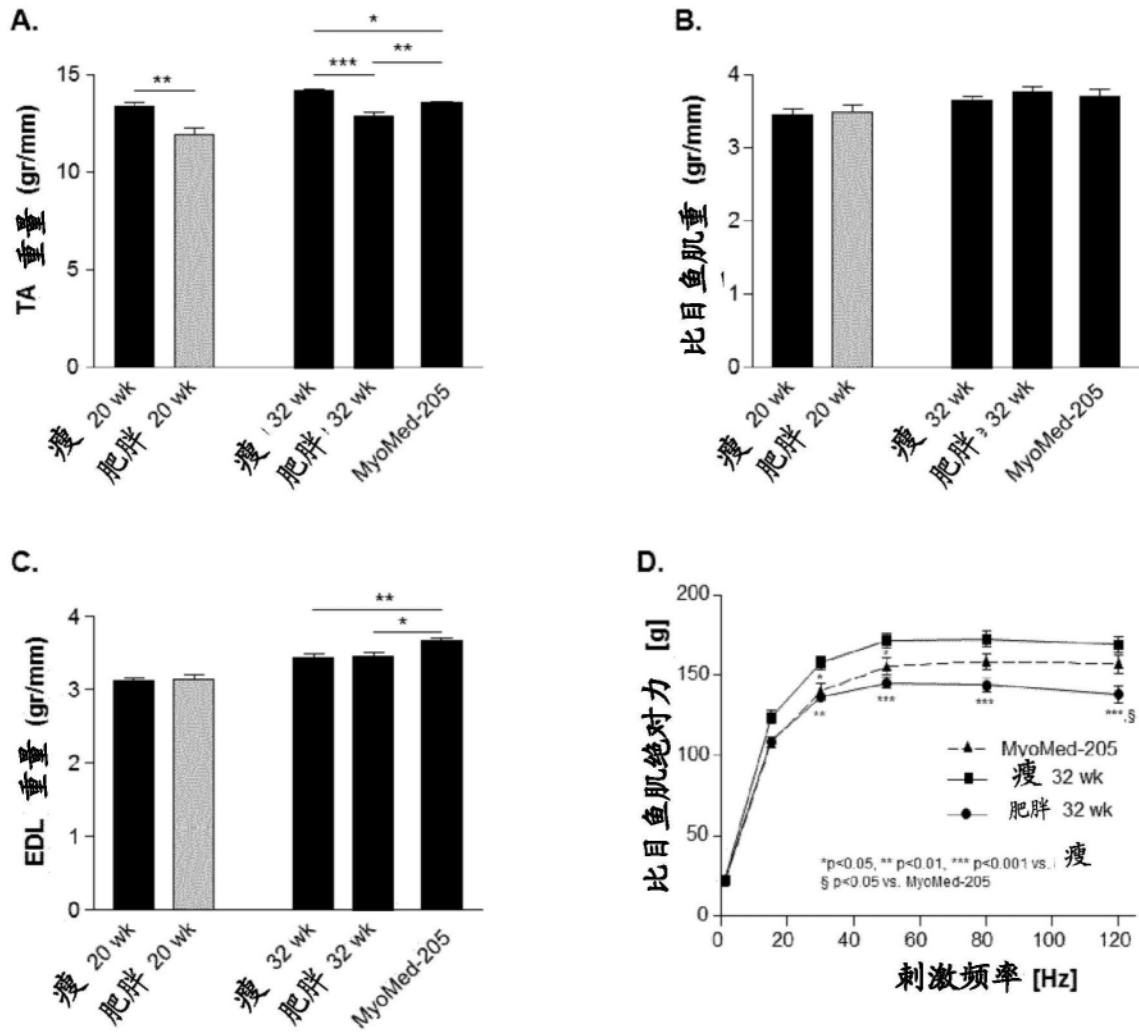


图58

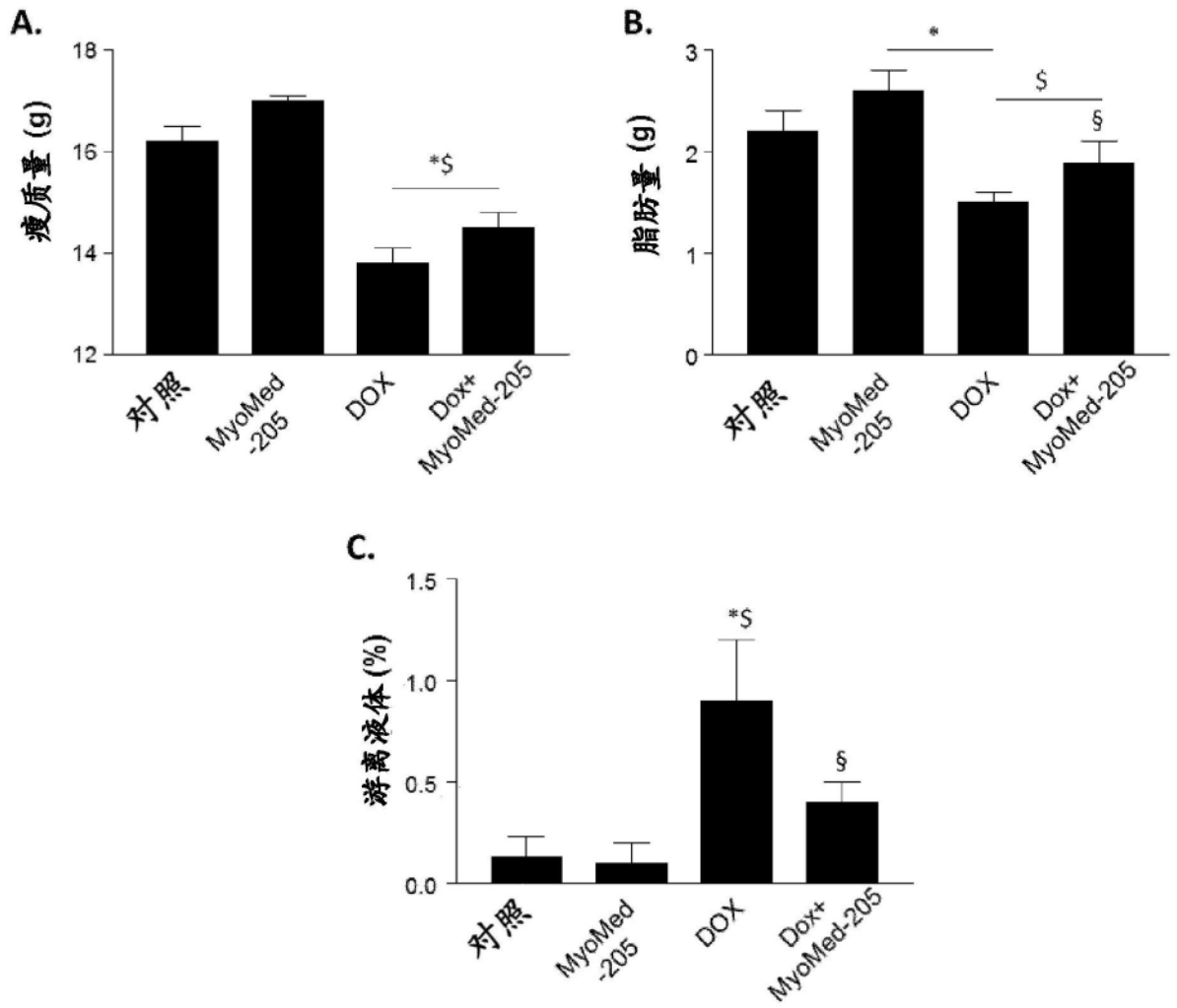


图59

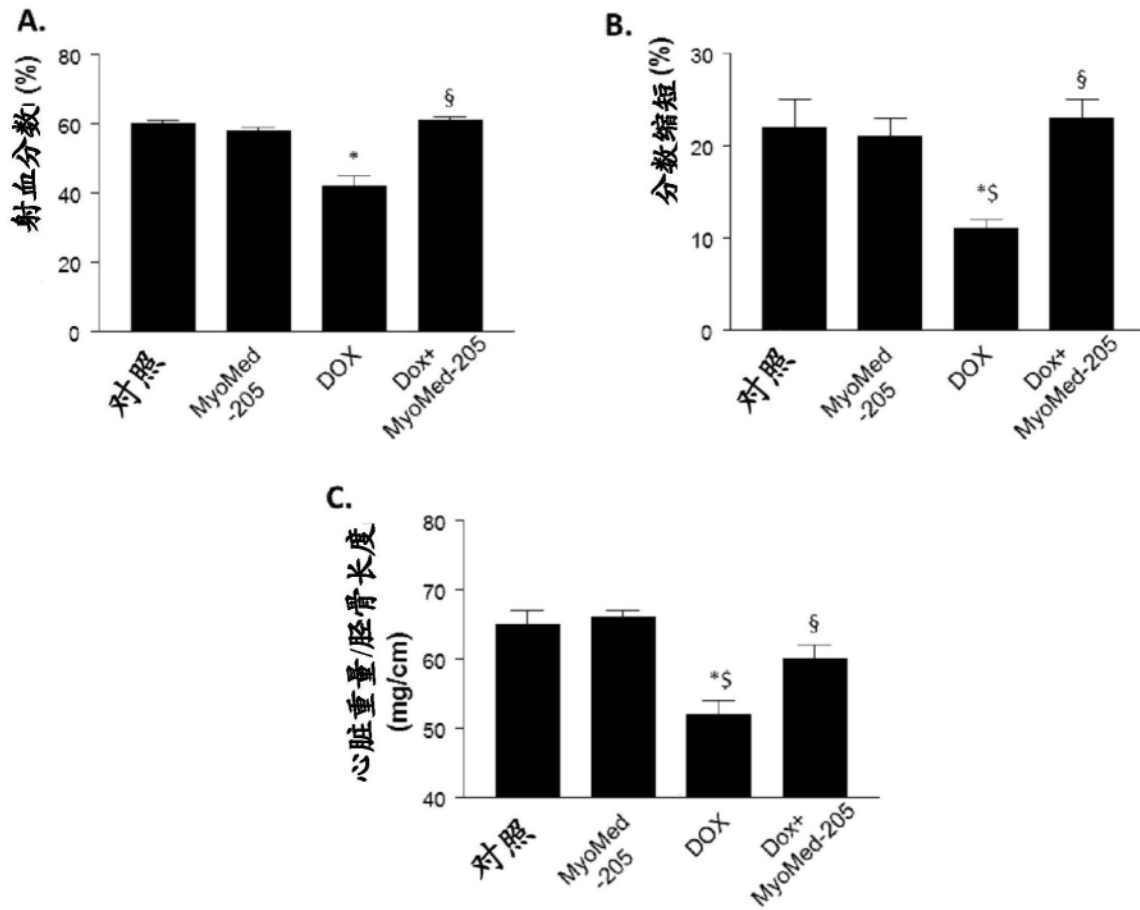


图60

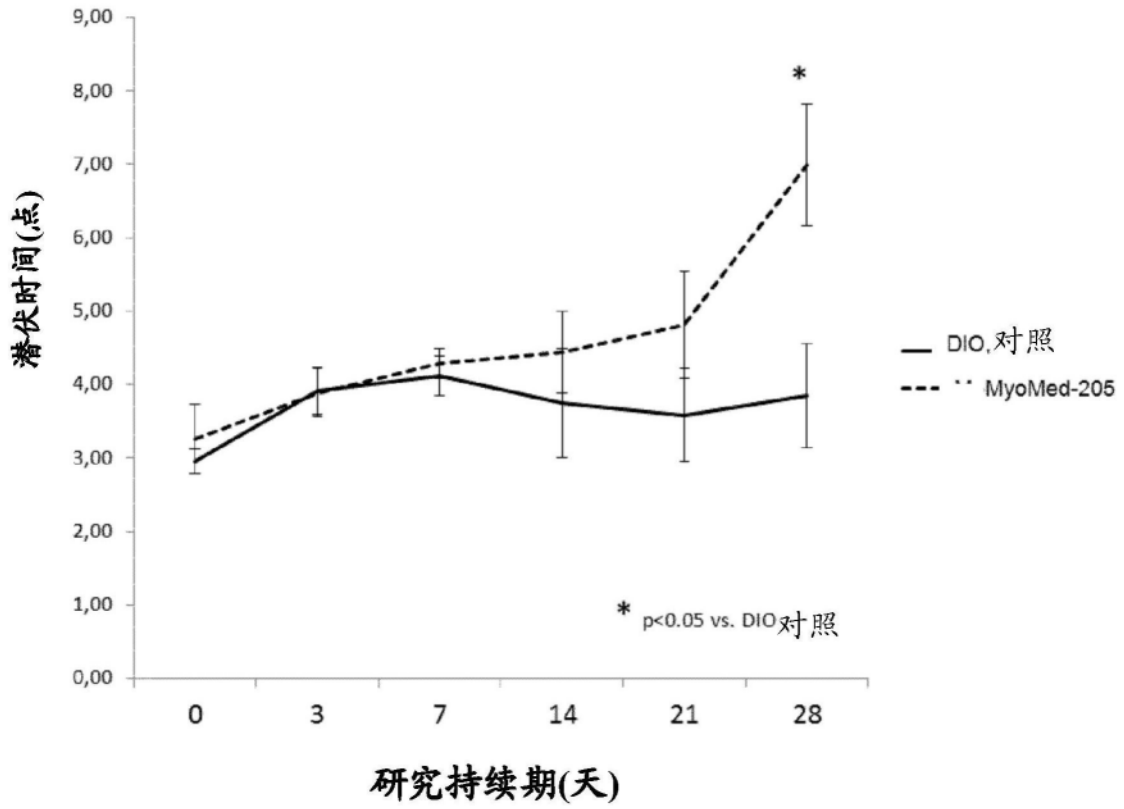


图61

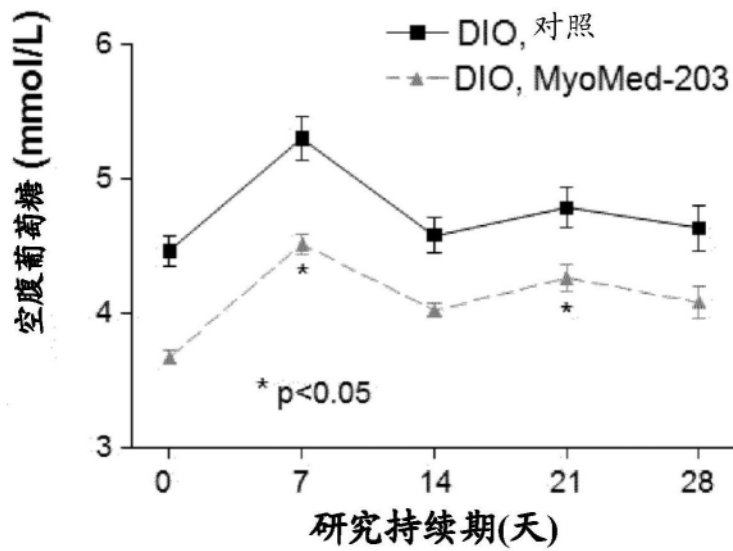


图62

OGTT, 处理 14 天

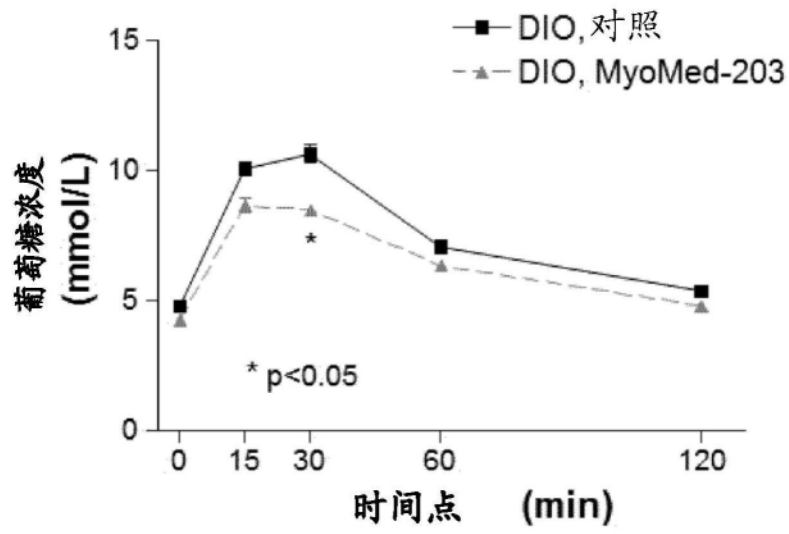


图63

OGTT, 处理 28 天

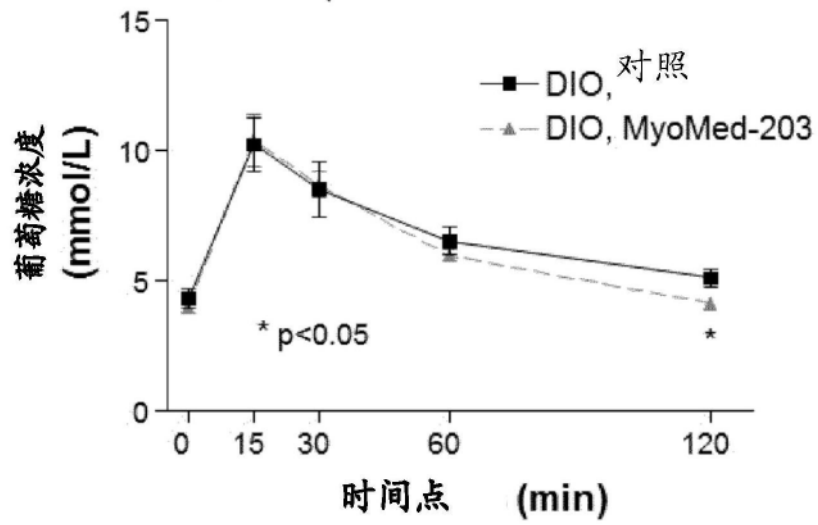


图64

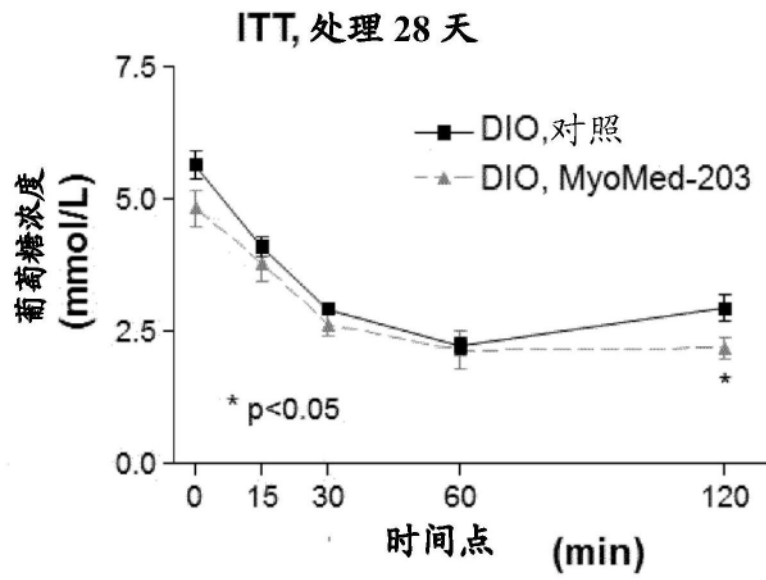


图65