



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120136844 A

(43) 申请公布日 2025. 06. 13

(21) 申请号 202510314712.9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2019.08.29

C07D 401/14 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 31/45 (2006.01)

62/724281 2018.08.29 US

A61P 9/10 (2006.01)

62/825358 2019.03.28 US

C07D 401/08 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201980071611.6 2019.08.29

(71) 申请人 贝勒医学院

地址 美国德克萨斯州

(72) 发明人 B·W·奥马利 D·M·罗纳德

Y·宋

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 张华

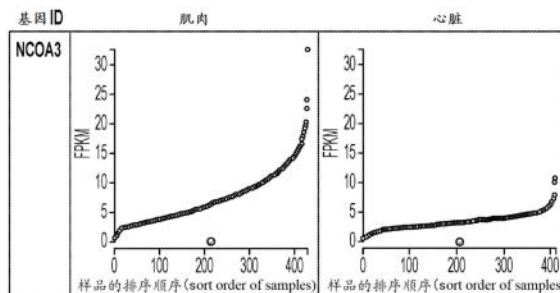
权利要求书2页 说明书39页 附图32页

(54) 发明名称

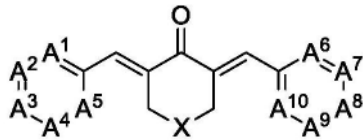
类固醇受体共激活剂-3的小分子刺激剂以及它们用作心脏保护剂和/或血管再生剂的方法

(57) 摘要

本发明涉及类固醇受体共激活剂-3的小分子刺激剂以及它们用作心脏保护剂和/或血管再生剂的方法。提供了类固醇受体共激活剂-3 (SRC-3) 的小分子刺激剂以及它们用作心脏保护剂的方法。小分子刺激剂可用于促进心肌梗塞后的心脏保护和修复以及血管再生。所述化合物也可用于预防心脏肥厚和胶原沉积以及改善心肌梗塞后的功能。



1. 一种下式的化合物:



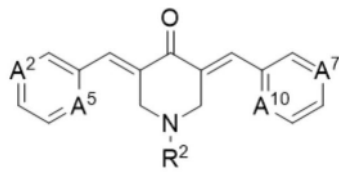
或其药学上可接受的盐或前药,其中:

A^1 、 A^2 、 A^3 、 A^4 、 A^5 、 A^6 、 A^7 、 A^8 、 A^9 和 A^{10} 各自独立地选自 CR^1 和N,其中每个 R^1 是氢或烷氧基;且X是 NR^2 或 CR^3R^4 ,其中 R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立地选自由氢、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基和取代或未取代的环烷基组成的组,其中 R^2 不是环己基;

其中 A^3 、 A^4 、 A^5 、 A^8 、 A^9 和 A^{10} 为 CR^1 ,其中每个 R^1 是氢。

2. 如权利要求1所述的化合物,其中 R^2 选自环丙基、环丁基、环戊基、环庚基和环辛基。

3. 一种下式的化合物:



或其药学上可接受的盐或前药,其中:

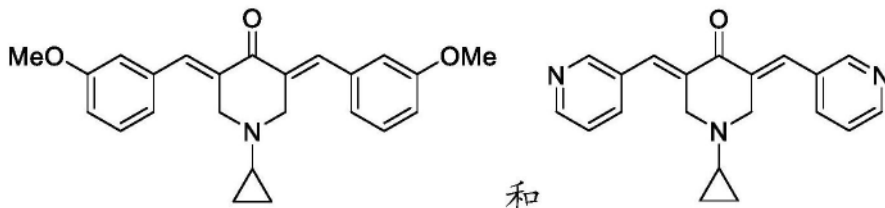
■ A^2 和 A^7 各自独立地选自 CR^1 ,其中每个 R^1 为卤素、烷氧基、氰基、三氟甲基或者取代或未取代的 C_{1-6} 烷基;

■ A^5 和 A^{10} 各自独立地选自 $CR^{1'}$,其中 $R^{1'}$ 为氢、氰基或者取代或未取代的 C_{1-6} 烷基;和

■ R^2 为取代或未取代的环烷基或者取代或未取代的杂环烷基,其中 R^2 不是环己基。

4. 如权利要求3所述的化合物,其中 R^2 选自环丙基、环丁基、环戊基、环庚基和环辛基。

5. 一种选自由以下组成的组的化合物:



6. 根据权利要求1至5中任一项所述的化合物在制备用于治疗受试者的缺血性损伤的药物中的用途。

7. 根据权利要求6所述的用途,其中所述缺血性损伤包括心肌梗塞或中风。

8. 根据权利要求6所述的用途,其进一步包括选择已罹患缺血性损伤的受试者,其中所述缺血性损伤包括心肌梗塞或中风。

9. 根据权利要求1至5中任一项的化合物在制备用于减小已罹患心肌梗塞的受试者的心肌梗塞尺寸的药物中的用途。

10. 根据权利要求9所述的用途,其中所述心肌梗塞尺寸与未治疗的已罹患心肌梗塞的受试者的心肌梗塞尺寸相比减小至少5%。

11. 根据权利要求9所述的用途,其中所述心肌梗塞尺寸与未治疗的已罹患心肌梗塞的受试者的心肌梗塞尺寸相比减小至少15%。

12. 根据权利要求1至5中任一项所述的化合物在制备用于在已罹患心肌梗塞或中风的受试者中预防或减轻心肌细胞损失、改善心脏血管灌注以及/或者改善中枢神经系统血管灌注的药物中的用途。

13. 根据权利要求1至5中任一项所述的化合物在制备用于改善受试者的心血管功能和/或中枢神经系统血管功能的药物中的用途。

14. 根据权利要求13所述的用途,其中受试者已罹患缺血性损伤。

15. 根据权利要求14所述的用途,其中所述缺血性损伤是心肌梗塞或中风。

16. 根据权利要求13所述的用途,其中所述受试者是老年受试者。

17. 根据权利要求1至5中任一项所述的化合物制备用于促进受试者伤口愈合的药物中的用途。

18. 根据权利要求1至5中任一项所述的化合物在制备用于治疗或预防受试者的肥厚型心肌病变的药物中的用途,其。

19. 根据权利要求18所述的用途,其中所述受试者已罹患缺血性损伤。

20. 根据权利要求19所述的用途,其中所述缺血性损伤是心肌梗塞或中风。

类固醇受体共激活剂-3的小分子刺激剂以及它们用作心脏保护剂和/或血管再生剂的方法

[0001] 本申请是专利申请号为201980071611.6、申请日为2019年8月29日、发明名称为“类固醇受体共激活剂-3的小分子刺激剂以及它们用作心脏保护剂和/或血管再生剂的方法”的发明申请的分案申请。

[0002] 优先权申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2018年8月29日提交的第62/724,281号美国临时申请和2019年3月28日提交的第62/825,358号美国临时申请的优先权,所述美国临时申请以全文引用的方式并入本文。

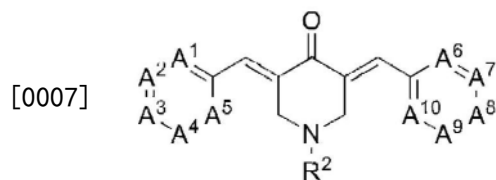
背景技术

[0004] 心肌梗塞(MI)诱导的心力衰竭的决定因素是与心肌细胞的损失、炎症、纤维化和心脏射血分数的严重降低相关的心脏组织的进行性重塑。改善心脏功能的一种有前景的治疗途径是通过直接保护功能性心肌来预防原位心脏组织的有害重塑。梗塞后维持心脏功能的主要障碍包括组织破坏以及成人心脏的有限和受限的再生潜力,这对于旨在促进组织重编程和修复的疗法构成了障碍。

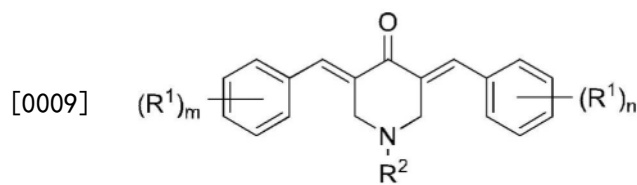
发明内容

[0005] 本文描述了类固醇受体共激活剂-3 (SRC-3) 的小分子刺激剂以及它们用作心脏保护剂和/或血管再生剂的方法。本文所达的化合物可用于促进心肌梗塞后的心脏保护和修复以及血管再生。所述方法包括对受试者施用如本文所述的化合物。

[0006] 小分子SRC-3刺激剂包括下式的化合物:

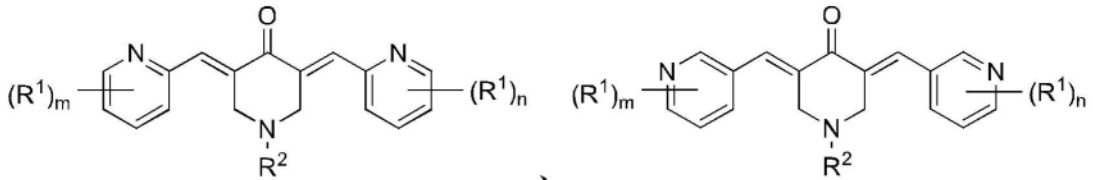


[0008] 及其药学上可接受的盐或前药。在这些化合物中, A^1 、 A^2 、 A^3 、 A^4 、 A^5 、 A^6 、 A^7 、 A^8 、 A^9 和 A^{10} 各自独立地选自 CR^1 和N, 其中每个 R^1 是氢、卤素、烷氧基、氰基、三氟甲基或取代或未取代的 C_{1-6} 烷基; 且 R^2 是取代或未取代的环烷基或取代或未取代的杂环烷基。任选地, 所述化合物具有下式:

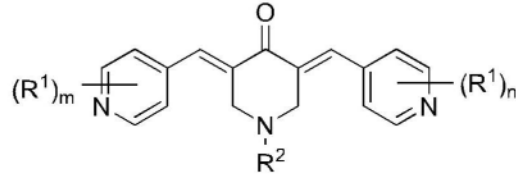


[0010] 其中m和n各自独立地为1、2、3、4或5。

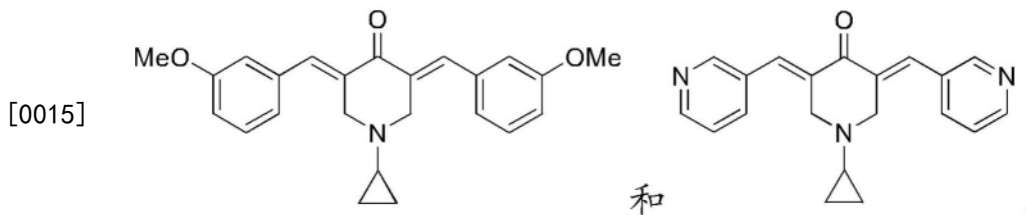
[0011] 任选地, 所述化合物具有下式:



[0012]

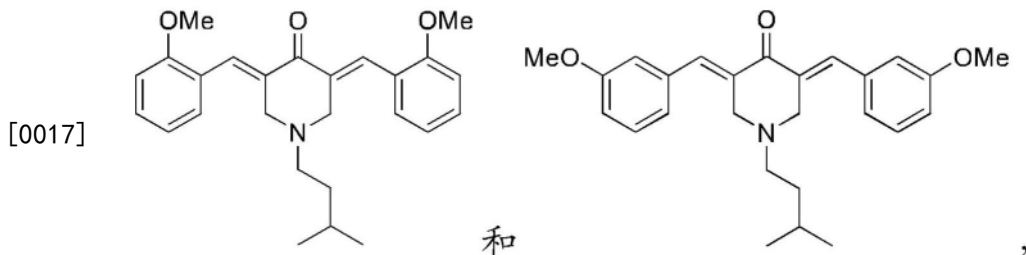


[0013] 其中m和n各自独立地为1、2、3或4。

[0014] 在本文所述的化合物中, R²任选地选自由环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基组成的组。任选地, 所述化合物选自由以下组成的组:

[0015]

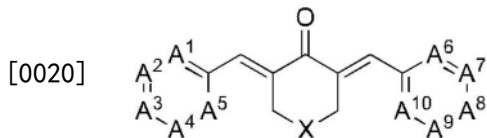
[0016] 任选地, 所述化合物选自由以下组成的组:



[0017]

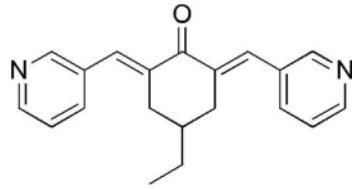
[0018] 或其药学上可接受的盐或前药。

[0019] 本文还描述了治疗受试者的缺血性损伤(例如, 心肌梗塞或中风)的方法, 其包括对所述受试者施用有效量的下式的化合物:

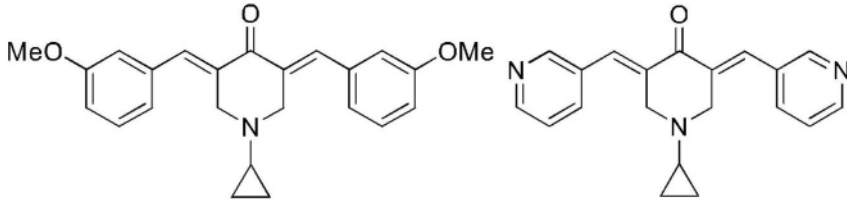


[0020]

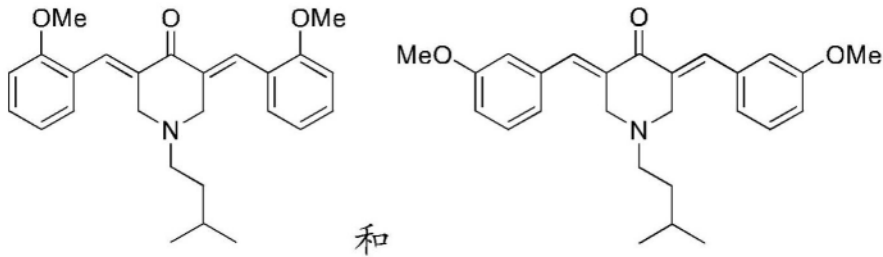
[0021] 或其药学上可接受的盐或前药。在用于这种方法中的化合物中, A¹、A²、A³、A⁴、A⁵、A⁶、A⁷、A⁸、A⁹和A¹⁰各自独立地选自CR¹和N, 其中每个R¹是氢、卤素、烷氧基、氰基、三氟甲基或取代或未取代的C₁₋₆烷基; 且X是NR²、CR³R⁴或O, 其中R²、R³和R⁴各自独立地选自由氢、取代或未取代的C₁₋₆烷基、取代或未取代的环烷基和取代或未取代的杂环烷基组成的组。任选地, 所述化合物选自由以下组成的组:



[0022]



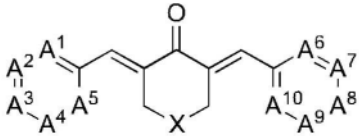
[0023]



[0024] 任选地,所述方法可进一步包括选择已罹患心肌梗塞或已罹患中风或中枢神经系统的其它血管损伤的受试者。

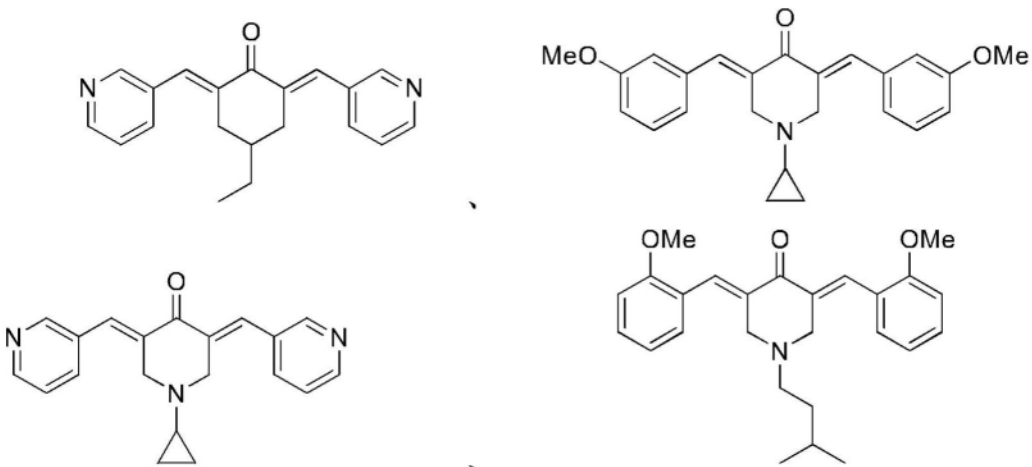
[0025] 本文进一步描述了减小已罹患心肌梗塞的受试者的心肌梗塞尺寸的方法。所述方法可包括对所述受试者施用有效量的下式的化合物:

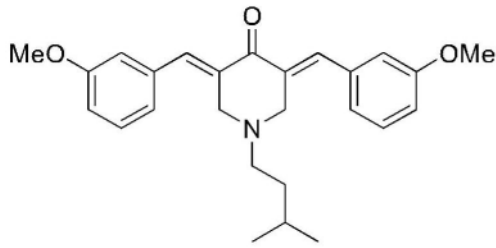
[0026]



[0027] 或其药学上可接受的盐或前药。在用于本文所述的方法中的化合物中, A^1 、 A^2 、 A^3 、 A^4 、 A^5 、 A^6 、 A^7 、 A^8 、 A^9 和 A^{10} 各自独立地选自 CR^1 和N,其中每个 R^1 是氢、卤素、烷氧基、氰基、三氟甲基或取代或未取代的 C_{1-6} 烷基;且X是 NR^2 、 CR^3R^4 或O,其中 R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立地选自由氢、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、取代或未取代的环烷基和取代或未取代的杂环烷基组成的组。任选地,所述化合物选自由以下组成的组:

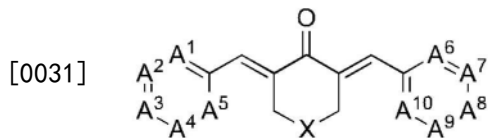
[0028]



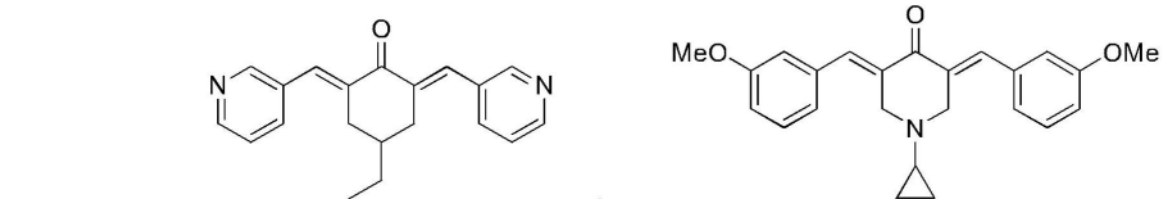


[0029] 任选地,与已罹患心肌梗塞的未治疗的受试者的心肌梗塞尺寸相比,心肌梗塞尺寸减小至少5% (例如,减小至少15%)。

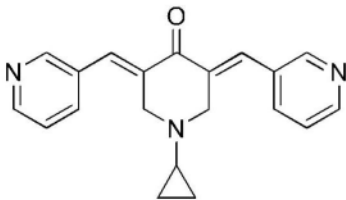
[0030] 本文还描述了在已罹患心肌梗塞或中风的受试者中预防或减轻心肌细胞损失、改善心脏血管灌注以及/或者改善中枢神经系统血管灌注的方法,其包括对所述受试者施用有效量的下式的化合物:



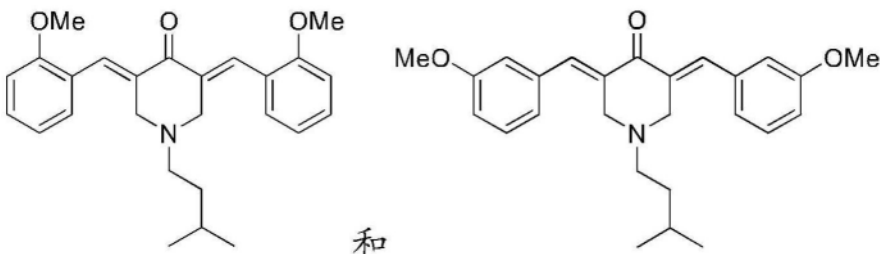
[0032] 或其药学上可接受的盐或前药。在用于这种方法中的化合物中, A^1 、 A^2 、 A^3 、 A^4 、 A^5 、 A^6 、 A^7 、 A^8 、 A^9 和 A^{10} 各自独立地选自 CR^1 和 N ,其中每个 R^1 是氢、卤素、烷氧基、氰基、三氟甲基或取代或未取代的 C_{1-6} 烷基;且 X 是 NR^2 、 CR^3R^4 或 O ,其中 R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立地选自由氢、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、取代或未取代的环烷基和取代或未取代的杂环烷基组成的组。任选地,所述化合物选自由以下组成的组:



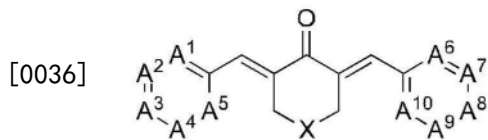
[0033]



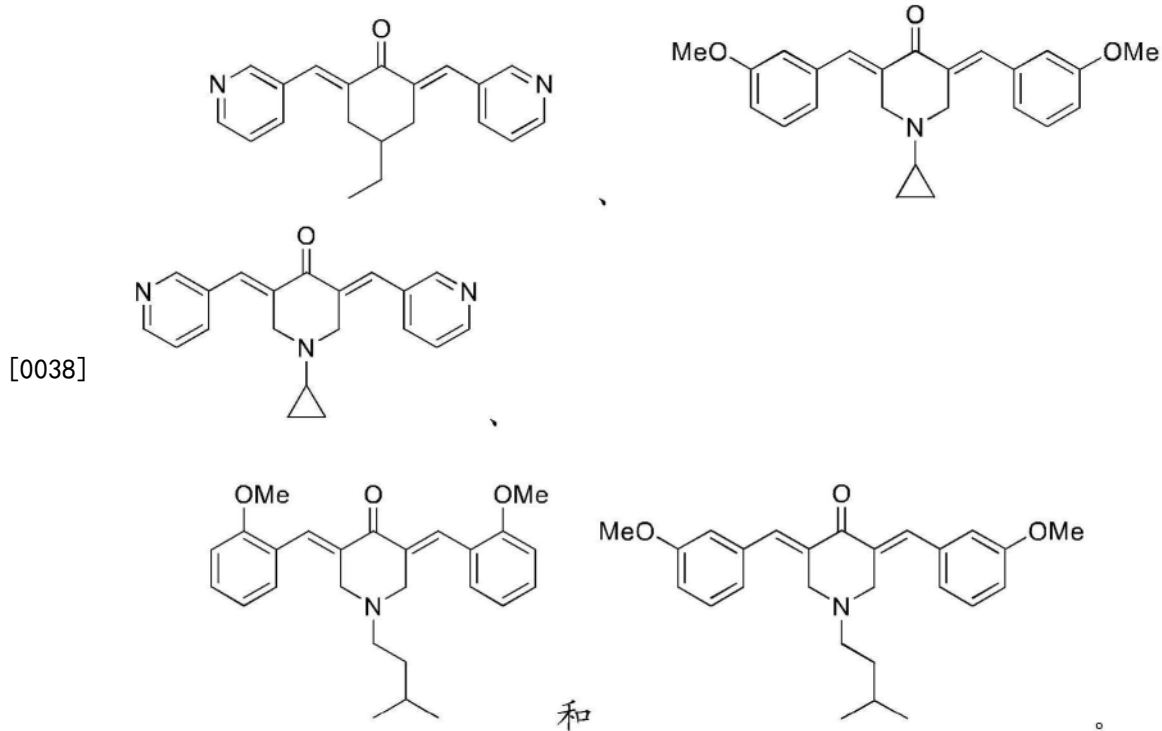
[0034]



[0035] 本文还描述了改善受试者的心血管功能和/或中枢神经系统血管功能的方法,其包括对所述受试者施用有效量的下式的化合物:

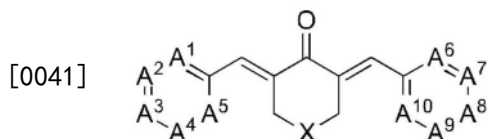


[0037] 或其药学上可接受的盐或前药。在用于这种方法中的化合物中, A^1 、 A^2 、 A^3 、 A^4 、 A^5 、 A^6 、 A^7 、 A^8 、 A^9 和 A^{10} 各自独立地选自 CR^1 和N, 其中每个 R^1 是氢、卤素、烷氧基、氰基、三氟甲基或取代或未取代的 C_{1-6} 烷基; 且X是 NR^2 、 CR^3R^4 或O, 其中 R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立地选自由氢、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、取代或未取代的环烷基和取代或未取代的杂环烷基组成的组。任选地, 所述化合物选自由以下组成的组:

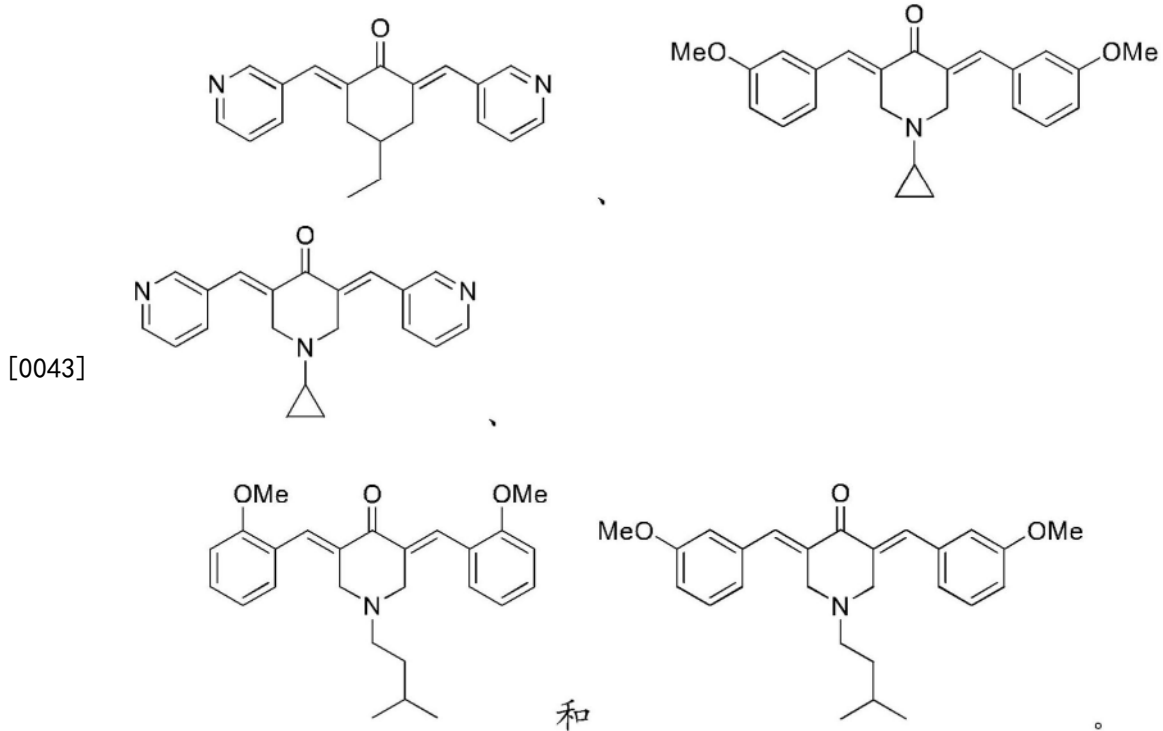


[0039] 任选地, 所述受试者已罹患缺血性损伤(例如, 心肌梗塞或中风)。任选地, 所述受试者是老年受试者。

[0040] 本文还描述了促进受试者伤口愈合的方法, 其包括对所述受试者施用有效量的下式的化合物:

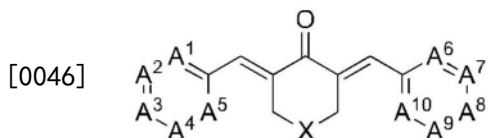


[0042] 或其药学上可接受的盐或前药。在用于这种方法中的化合物中, A^1 、 A^2 、 A^3 、 A^4 、 A^5 、 A^6 、 A^7 、 A^8 、 A^9 和 A^{10} 各自独立地选自 CR^1 和N, 其中每个 R^1 是氢、卤素、烷氧基、氰基、三氟甲基或取代或未取代的 C_{1-6} 烷基; 且X是 NR^2 、 CR^3R^4 或O, 其中 R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立地选自由氢、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、取代或未取代的环烷基和取代或未取代的杂环烷基组成的组。任选地, 所述化合物选自由以下组成的组:

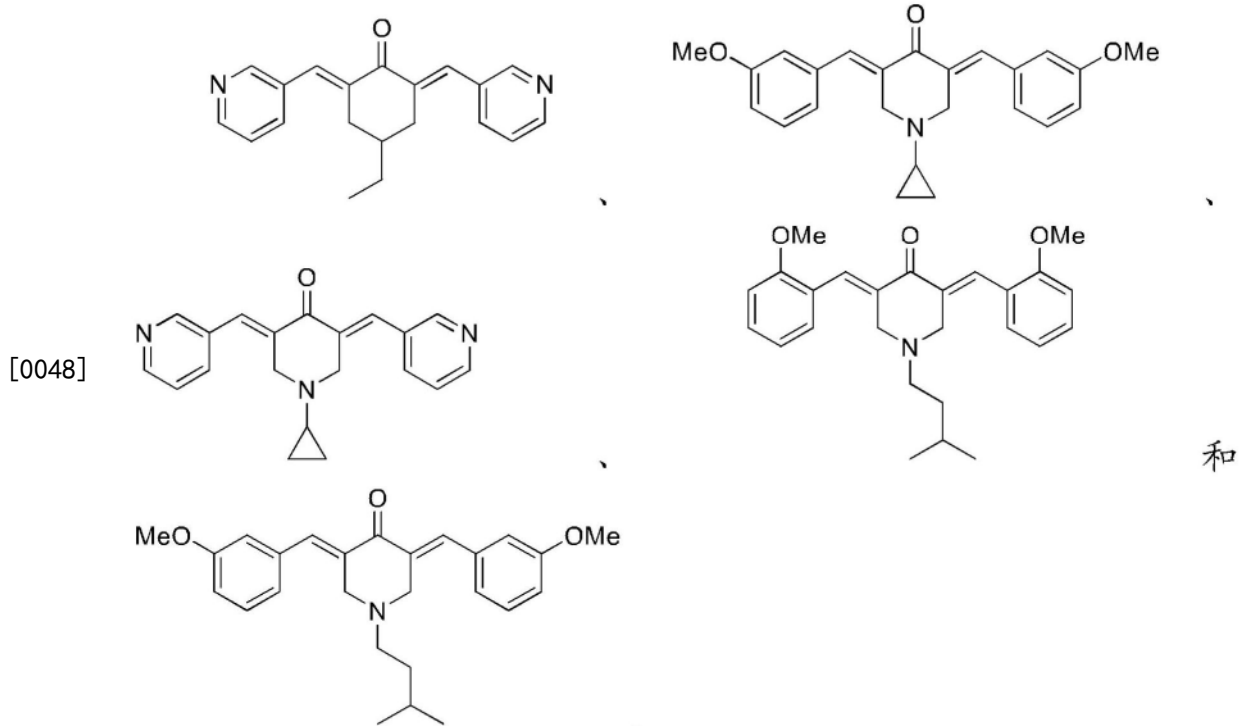


[0044] 任选地,所述受试者已罹患缺血性损伤(例如,心肌梗塞或中风)。任选地,所述受试者是老年受试者。

[0045] 本文进一步描述了治疗或预防受试者中的肥厚型心肌病变的方法,其包括对所述受试者施用有效量的下式的化合物:



[0047] 或其药学上可接受的盐或前药。在用于这种方法中的化合物中, A^1 、 A^2 、 A^3 、 A^4 、 A^5 、 A^6 、 A^7 、 A^8 、 A^9 和 A^{10} 各自独立地选自 CR^1 和N,其中每个 R^1 是氢、卤素、烷氧基、氰基、三氟甲基或取代或未取代的 C_{1-6} 烷基;且X是 NR^2 、 CR^3R^4 或O,其中 R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立地选自由氢、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、取代或未取代的环烷基和取代或未取代的杂环烷基组成的组。任选地,所述化合物选自由以下组成的组:



[0049] 任选地,所述受试者已罹患缺血性损伤(例如,心肌梗塞或中风)。

[0050] 在下面的附图和描述中阐述了一个或多个实施方案的细节。根据描述和附图以及根据权利要求书,其它特征、目的和优点将是明显的。

附图说明

[0051] 图1含有示出NCOA3在正常心脏(左图)和肌肉组织(右图)中的表达的图表。

[0052] 图2是来自收获前注射了腺-SRC3的小鼠的心脏的图像。

[0053] 图3A描述心肌梗塞(MI)之后的药物处理和超声心动图测量结果的实验时间线。图3B是示出心肌梗塞之后小鼠的心脏重量和胫骨长度比(HW/TL)的图表。图3C是示出心肌梗塞之后MCB-613处理在小鼠中的效果的图表。图3D含有心肌梗塞之后收获并染色以显现胶原纤维的小鼠心脏的图像。

[0054] 图4是示出心肌梗塞之后化合物10-1处理在小鼠中的效果的图表。

[0055] 图5A是描述成年小鼠心脏中的非肌细胞的全面单细胞转录谱分析的图。图5B是示出心肌梗塞之后经MCB-613处理的的心脏中存在的不同细胞类型的图表。5C是具有内皮标记的三个细胞簇的Venn分析。

[0056] 图6A是示出心肌梗塞之后小鼠心脏中长链脂肪酸的代谢组学的热图。图6B是示出心肌梗塞之后小鼠心脏中甲基戊二酰肉碱的代谢组学的热图。

[0057] 图7上图显示MCB-613选择性地刺激SRC的固有转录活性。图7中图显示化合物10-1选择性地刺激SRC的固有转录活性。图7下图显示化合物10-2选择性地刺激SRC的固有转录活性。

[0058] 图8含有心肌梗塞之后以及用化合物10-1处理之后心脏的乳头肌水平截面的图片。

[0059] 图9含有示出在用生理盐水处理的小鼠(“生理盐水”)、用MCB-613处理的小鼠

(“MCB-613”)和非梗塞野生型小鼠(“WT”)中进行的渐进式最大运动测试的结果的图表。上图示出二氧化碳呼出量,且下图示出氧气消耗量。

[0060] 图10A-10E显示MCB-613在MI后三天刺激鸡卵和小鼠心脏中的血管生成。对于图10A,用DMSO或MCB-613处理心脏成纤维细胞24小时。然后分离出总蛋白,并针对SRC-1、-2和-3进行免疫印迹测定。Hsp90用作上样对照。对于图10B,用GAL4DNA结合位点-荧光素酶报告子(pG5-luc)和GAL4-DNA结合结构域-全长SRC-1、-2或-3融合物(pBIND-SRC)或对照pBIND表达载体转染心脏成纤维细胞。转染后,用DMSO或MCB-613处理细胞24小时。分离总蛋白并测量荧光素酶活性。通过将荧光素酶活性相对于总蛋白浓度归一化($n=3$)(* $P<0.05$)来计算相对光单位(RLU)。对于图10C,用DMSO或MCB-613处理心脏成纤维细胞24小时,然后在没有药物的情况下用内皮生长培养基再调理24小时。然后将经调理的细胞铺于基质胶中以允许管形成过夜,然后将管用钙黄绿素AM染料染色并成像。对于图10D,用DMSO或MCB-613处理鸡卵,并在第一天和第三天测量血管面积。将小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)用二甲亚砜(DMSO)或MCB-613处理24小时,然后置于鸡卵中的膜上。在第一天和第三天测量血管面积。数据表示为每种条件下相对于对照的增加百分比。每种条件下使用六个卵* $P<0.05$ 。对于图10E,在MI后两小时用MCB-613或对照处理小鼠。将心脏固定,并针对内皮细胞特异性CD31进行免疫染色。图10E示出来自三只对照小鼠和三只用MCB-613处理的小鼠的梗塞边界区的代表性图像。图10E还含有显示每个边界区的两个视野的组织单位面积的定量CD31免疫染色密度的条形图* $P<0.05$ 。

[0061] 图11A-11G显示MCB-613改善心肌梗塞后的心脏功能。图11A是实验程序的示意图。在左前降支冠状动脉永久结扎后两小时以及在另外六天以及在8周和16周如所指示的那样用MCB-613或对照处理小鼠。对于图11B,在指示的时间通过超声心动图测量射血分数,并在24小时和12周收获心脏。* $P<0.05$ 。对于图11C,将心脏重量与MI后12周的胫骨长度进行比较。图11D示出轴向(短轴)、冠状(长轴)和矢状切面的小鼠心脏中心切片的代表性图像,该图像示出了在MI后两周在对照(无MI)、MI与MI加MCB-613之间的形态学和 ^{18}F -FDG摄取的差异。箭头指示梗塞区。对于无MI对照, $n=6$;对于MI加媒介物对照, $n=6$;对于MI加MCB-613, $n=4$ 。对于图11E,将在12周时经MCB-613处理的(心脏($n=2$;梗塞尺寸44%和31%))以及经MCB-613处理的(心脏($n=4$;梗塞尺寸22%、3%、20%和14%))固定,并用天狼猩红染色。图11E还含有示出在每颗心脏的边界区的纤维化百分比定量的条形图。比例尺:2000 μm 和20 μm 。图11F显示在MI后72小时边界区的代表性电子显微照片。My=肌原纤维。Mi=线粒体。比例尺=1 μm 。图11G显示在MI后24小时来自对照和经MCB-613处理的(心脏的代表性TUNEL染色。每组 $n=4$ 颗心脏。比例尺:2000 μm 和20 μm 。

[0062] 图12含有示出在用生理盐水处理的非梗塞野生型小鼠(“WT 盐水”)、用MCB-613处理的非梗塞野生型小鼠(“WT MCB-613”)、MI后用生理盐水处理的小鼠(“MI 生理盐水”)以及MI后用MCB-613处理的小鼠(“MI MCB-613”)中进行的渐进式最大运动测试的结果的图形。左图示出氧气消耗量,且右图示出二氧化碳呼出量。

[0063] 图13A-13F示出MI后12周心肌细胞的RNA转录谱分析和间质细胞的单细胞分析,其揭示了MCB-613保护性反应与氧化磷酸化改善、炎症减少和免疫细胞减少相关。图13A是在MI后12周从经对照处理的小鼠和经MCB-613处理的小鼠中获得用于总RNA测序的心肌细胞和用于单细胞RNA-seq分析的非心肌细胞的分离程序的示意图。 $n=2$ 颗心脏/组。图13B是通

过RNA-seq识别的并且在MI后10周时与用生理盐水处理的两只小鼠相比在用MCB-613处理的两只小鼠的心肌细胞中差异表达的基因的热图分析。图13C是与经对照处理的心脏在经MCB-613处理的心脏的心肌细胞中上调和下调的基因的基因集富集分析。图13D描述通过无监督聚类识别的细胞群。每个点表示单个细胞。图13E是指示出用于特异性地识别每个簇的已确立的细胞类型标志物的热图。图13F显示在MI后24小时来自经对照处理的心脏和经MCB-613处理的心脏的代表性TUNEL染色。每组n=4颗心脏。比例尺:2000 μ m和20 μ m。

[0064] 图14A是成纤维细胞簇基因表达的Venn分析。图14B是内皮细胞簇基因表达的Venn分析。图14C是巨噬细胞基因表达的Venn分析。图14D是与经对照处理的心脏相比在经MCB-613处理的心脏的粒细胞中上调和下调的基因的基因集富集分析。

[0065] 图15A-15D显示在MI后12周MCB-613调节持续的免疫和内皮细胞反应。图15A示出与经MCB-613处理的小鼠相比在对照小鼠的非肌细胞中上调和下调的基因数目。图15B含有不包括心肌细胞在内的心脏细胞类型之间的细胞间通讯的受体-配体分析。线条指示两种细胞类型之间的通讯。配体-受体配对的方向性始于节点,终止于同源受体,如图例中所示。线条的厚度反映配体-受体配对数目。环代表自分泌信号传导电路。图15C是粒细胞、成纤维细胞簇和巨噬细胞C4之间的配体-受体配对的热图。图15D是示出分别来自经对照处理的心脏和经MCB-613处理的心脏的277个和310个粒细胞的前50个上调和下调药物反应基因的热图。

[0066] 图16A-16C显示MCB-613早在MI后24小时就减少B淋巴细胞和单核细胞,并上调粒细胞基因和溶菌酶。图16A示出在MI后24小时通过荧光激活细胞分选(FACS)免疫表型分析对来自经对照处理的小鼠和经MCB-613处理的小鼠的心脏免疫细胞的定量。图16B示出在MI和MCB613处理后24小时从骨髓中分离的粒细胞和嗜中性粒细胞中的mRNA表达。从骨髓的嗜中性粒细胞富集级分和嗜中性粒细胞耗乏级分中分离出总RNA并将其转化为cDNA。通过qPCR测量S100a9、T1r7和Lcn2的基因表达变化,并将18s RNA表达用作对照。每组N=6*P<0.05。图16C示出MI后24小时来自经对照处理的心脏和经MCB-613处理的心脏的代表性LYZ染色。图16C的上图示出从心内膜到心外膜的低放大率,且下图示出心内膜下区域的高放大率。箭头指示LYZ+细胞。图16C中的条形图示出LYZ+细胞的LV密度定量。n=3颗心脏/组,>10mm²成像/心脏,MI手术后24小时*P<0.039。

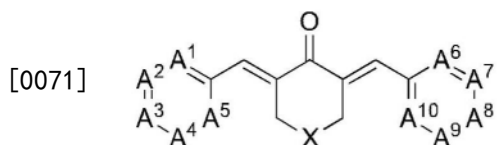
[0067] 图17含有在CD-1小鼠中获得的MCB-613、化合物1和化合物2的药代动力学数据的图示。

具体实施方式

[0068] 本文描述了类固醇受体共激活剂(SRC)蛋白的刺激剂以及它们的使用方法。类固醇受体共激活剂是核受体共激活剂的p160家族的成员,并且包括SRC-1、SRC-2(TIF2/GRIP1)和SRC-3(AIB1/RAC3/ACTR/pCIP)。本文所述的小分子是SRC-3的刺激剂,并且可用作心脏保护剂和/或血管再生剂。特别地,所述化合物可用于促进心肌梗塞或中风后的心脏保护和修复以及血管再生。所述化合物也可用于预防心脏肥厚和胶原沉积以及改善心脏梗塞后的功能。已证明所述化合物可增加血管生成,增加心脏和中枢神经系统中的血管灌注,并促进心脏 β 氧化。本文所述的化合物的施用还显著降低与扩张型心肌病变相关的代谢物甲基戊二酰肉碱的存在。

[0069] I. 化合物

[0070] 本文所述的一类SRC刺激剂由式I:



[0072] 及其药学上可接受的盐或前药表示。

[0073] 在式I中, A^1 、 A^2 、 A^3 、 A^4 、 A^5 、 A^6 、 A^7 、 A^8 、 A^9 和 A^{10} 各自独立地选自 CR^1 和N。式I中存在的每个 R^1 基团独立地选自氢、卤素、烷氧基、氰基、三氟甲基和取代或未取代的 C_{1-6} 烷基。

[0074] 另外,在式I中,X是 NR^2 、 CR^3R^4 或O,其中 R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立地选自自由氢、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、取代或未取代的环烷基和取代或未取代的杂环烷基组成的组。

[0075] 如本文所用,术语烷基、烯基和炔基包括直链和支链单价取代基。实例包括甲基、乙基、异丁基、3-丁炔基等。可用于本文所述的化合物和方法的这些基团的范围包括 C_1 - C_{20} 烷基、 C_2 - C_{20} 烯基和 C_2 - C_{20} 炔基。可用于本文所述的化合物和方法的这些基团的另外的范围包括 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_{12} 烯基、 C_2 - C_{12} 炔基、 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烯基和 C_2 - C_4 炔基。

[0076] 杂烷基、杂烯基和杂炔基被类似地定义为烷基、烯基和炔基,但可在主链内含有O、S或N杂原子或其组合。可用于本文所述的化合物和方法的这些基团的范围包括 C_1 - C_{20} 杂烷基、 C_2 - C_{20} 杂烯基和 C_2 - C_{20} 杂炔基。可用于本文所述的化合物和方法的这些基团的另外的范围包括 C_1 - C_{12} 杂烷基、 C_2 - C_{12} 杂烯基、 C_2 - C_{12} 杂炔基、 C_1 - C_6 杂烷基、 C_2 - C_6 杂烯基、 C_2 - C_6 杂炔基、 C_1 - C_4 杂烷基、 C_2 - C_4 杂烯基和 C_2 - C_4 杂炔基。

[0077] 术语环烷基、环烯基和环炔基包括具有单个环状环或多个稠环的环状烷基。实例包括环己基、环戊基乙基和金刚烷基。可用于本文所述的化合物和方法的这些基团的范围包括 C_3 - C_{20} 环烷基、 C_3 - C_{20} 环烯基和 C_3 - C_{20} 环炔基。可用于本文所述的化合物和方法的这些基团的另外的范围包括 C_5 - C_{12} 环烷基、 C_5 - C_{12} 环烯基、 C_5 - C_{12} 环炔基、 C_5 - C_6 环烷基、 C_5 - C_6 环烯基和 C_5 - C_6 环炔基。

[0078] 术语杂环烷基、杂环烯基和杂环炔基被类似地定义为环烷基、环烯基和环炔基,但可在环状主链内含有O、S或N杂原子或其组合。可用于本文所述的化合物和方法的这些基团的范围包括 C_3 - C_{20} 杂环烷基、 C_3 - C_{20} 杂环烯基和 C_3 - C_{20} 杂环炔基。可用于本文所述的化合物和方法的这些基团的另外的范围包括 C_5 - C_{12} 杂环烷基、 C_5 - C_{12} 杂环烯基、 C_5 - C_{12} 杂环炔基、 C_5 - C_6 杂环烷基、 C_5 - C_6 杂环烯基和 C_5 - C_6 杂环炔基。

[0079] 芳基分子包括例如并入了一个或多个通常具有通过离域电子连接的六个碳原子的平面组的环状烃,所述离域电子编号相同,就如同它们由交替的单和双共价键组成一样。芳基分子的实例为苯。杂芳基分子包括诸如O、N或S的原子沿着该杂芳基分子的主要环状链的取代。当引入杂原子时,一组五个原子,例如四个碳和杂原子,可产生芳族体系。杂芳基分子的实例包括呋喃、吡咯、噻吩、咪唑、噁唑、吡啶和吡嗪。芳基和杂芳基分子还可包括另外的稠环,例如苯并呋喃、吲哚、苯并噻吩、萘、蒽和喹啉。除非另有说明外,否则芳基和杂芳基分子可连接在环上的任何位置。

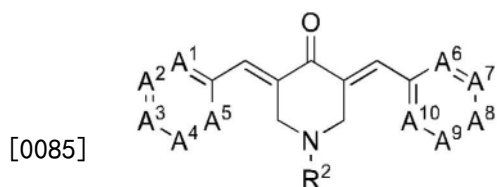
[0080] 如本文所用的术语烷氧基是通过单个末端醚键结合的烷基。同样,如本文所用的术语芳氧基是通过单个末端醚键结合的芳基。

[0081] 如本文所用的术语羟基由式-OH表示。

[0082] 如本文所用的术语胺或氨基由式-NZ¹Z²表示,其中Z¹和Z²可各自为如本文所述的取代基团,如上述的氢、烷基、卤代烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、环烷基、环烯基、杂环烷基或杂环烯基。

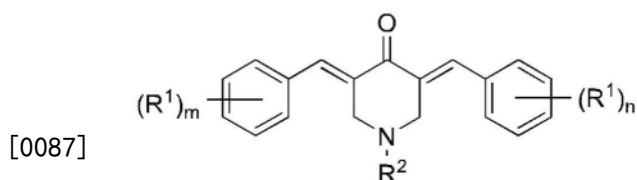
[0083] 本文所用的烷氧基、芳氧基、氨基、烷基、烯基、炔基、芳基、杂烷基、杂烯基、杂炔基、杂芳基、环烷基或杂环烷基分子可以是取代或未取代的。如本文所用,术语“取代的”包括将烷氧基、芳氧基、氨基、烷基、烯基、炔基、芳基、杂烷基、杂烯基、杂炔基、杂芳基、环烷基或杂环烷基添加到连接于该烷氧基、芳氧基、氨基、烷基、烯基、炔基、芳基、杂烷基、杂烯基、杂炔基、杂芳基、环烷基或杂环烷基的主链的位置,例如氢被这些分子中的一者置换。取代基团的实例包括但不限于羟基、卤素(例如,F、Br、Cl或I)和羧基。相反,如本文所用,术语“未取代的”表示烷氧基、芳氧基、氨基、烷基、烯基、炔基、芳基、杂烷基、杂烯基、杂炔基、杂芳基、环烷基或杂环烷基具有满配的氢(即与其饱和水平相称的氢)而没有取代,例如直链癸烷(- (CH₂)₉-CH₃)。

[0084] 在一些实例中,式I由结构I-A表示:



结构 I-A

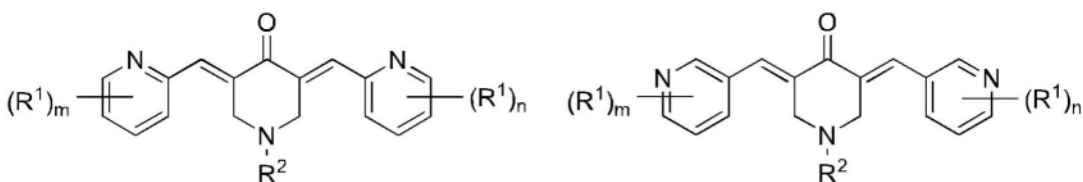
[0086] 在结构I-A中,A¹、A²、A³、A⁴、A⁵、A⁶、A⁷、A⁸、A⁹、A¹⁰和R²如上面针对式I所定义。在结构I-A的一些实例中,A¹、A²、A³、A⁴、A⁵、A⁶、A⁷、A⁸、A⁹和A¹⁰中的每一者是CR¹,其中每个R¹独立地选自如上面针对式I所定义的基团。例如,结构I-A的化合物可由结构I-A1表示:



结构 I-A1

[0088] 在结构I-A1中,m和n各自独立地为1、2、3、4或5。换言之,该分子的苯环可包括一至五个R¹基团。R¹基团中的每一者可独立地选自如上面针对式I所定义的基团。

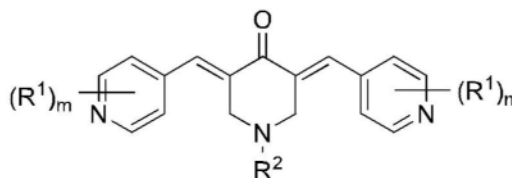
[0089] 在结构I-A的一些实例中,A¹、A²、A³、A⁴、A⁵、A⁶、A⁷、A⁸、A⁹和A¹⁰中的一者或多者可以是N。例如,结构I-A的化合物可由结构I-A2、结构I-A3或结构I-A4表示:



结构 I-A2

结构 I-A3

[0090]

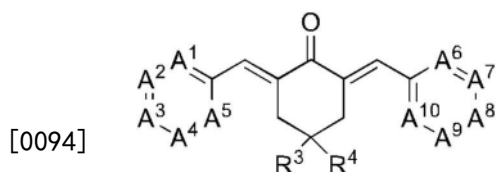


结构 I-A4

[0091] 在结构I-A2、结构I-A3和结构I-A4中,m和n各自独立地为1、2、3或4。换言之,该分子的苯环可包括一至四个R¹基团。R¹基团中的每一者可独立地选自如上面针对式I所定义的基团。

[0092] 任选地,在结构I-A1、结构I-A2、结构I-A3和/或结构I-A4中,R²是取代或未取代的环烷基或取代或未取代的杂环烷基。在一些实例中,R²选自由环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基组成的组。

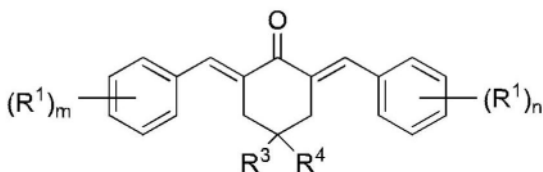
[0093] 在一些实例中,式I由结构I-B表示:



[0094]

结构 I-B

[0095] 在结构I-B中,A¹、A²、A³、A⁴、A⁵、A⁶、A⁷、A⁸、A⁹、A¹⁰、R³和R⁴如上面针对式I所定义。在结构I-B的一些实例中,A¹、A²、A³、A⁴、A⁵、A⁶、A⁷、A⁸、A⁹和A¹⁰中的每一者是CR¹,其中每个R¹独立地选自如上面针对式I所定义的基团。例如,结构I-B的化合物可由结构I-B1表示:

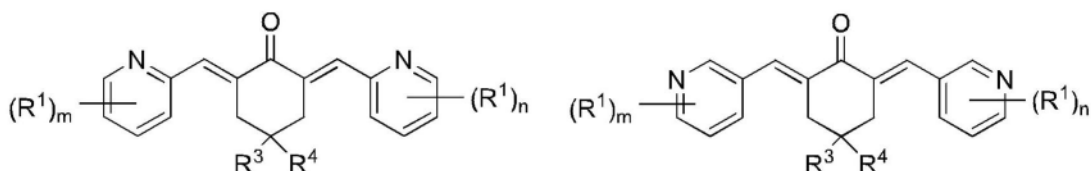


[0096]

结构 I-B1

[0097] 在结构I-B1中,m和n各自独立地为1、2、3、4或5。换言之,该分子的苯环可各自独立地包括一至五个R¹基团。R¹基团中的每一者可独立地选自如上面针对式I所定义的基团。

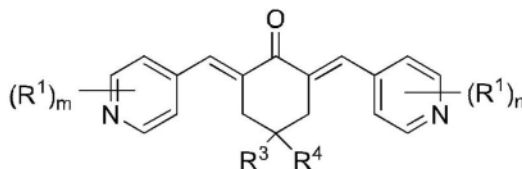
[0098] 在结构I-B的一些实例中,A¹、A²、A³、A⁴、A⁵、A⁶、A⁷、A⁸、A⁹和A¹⁰中的一者或多者可以是N。例如,结构I-B的化合物可由结构I-B2、结构I-B3或结构I-B4表示:



结构 I-B2

结构 I-B3

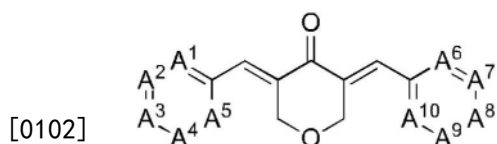
[0099]



结构 I-B4

[0100] 在结构I-B2、结构I-B3和结构I-B4中,m和n各自独立地为1、2、3或4。换言之,该分子的苯环可各自独立地包括一至四个R¹基团。R¹基团中的每一者可独立地选自如上面针对式I所定义的基团。

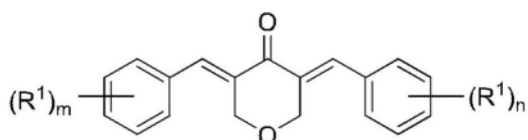
[0101] 在一些实例中,式I由结构I-C表示:



[0102]

结构 I-C

[0103] 在结构I-C中,A¹、A²、A³、A⁴、A⁵、A⁶、A⁷、A⁸、A⁹和A¹⁰如上面针对式I所定义。在结构I-C的一些实例中,A¹、A²、A³、A⁴、A⁵、A⁶、A⁷、A⁸、A⁹和A¹⁰中的每一者是CR¹,其中每个R¹独立地选自如上面针对式I所定义的基团。例如,结构I-C的化合物可由结构I-C1表示:

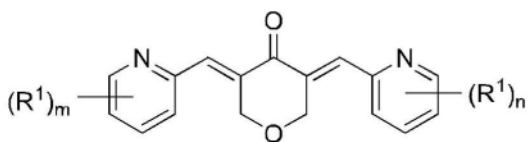


[0104]

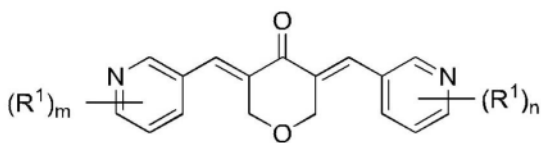
结构 I-C1

[0105] 在结构I-C1中,m和n各自独立地为1、2、3或4。换言之,该分子的苯环可各自独立地包括一至四个R¹基团。R¹基团中的每一者可独立地选自如上面针对式I所定义的基团。

[0106] 在结构I-C的一些实例中,A¹、A²、A³、A⁴、A⁵、A⁶、A⁷、A⁸、A⁹和A¹⁰中的一者或多者可以是N。例如,结构I-C的化合物可由结构I-C2、结构I-C3或结构I-C4表示:



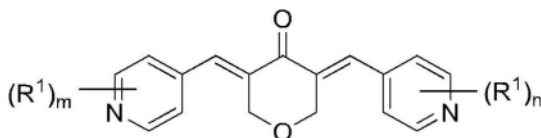
[0107]



结构 I-C2

结构 I-C3

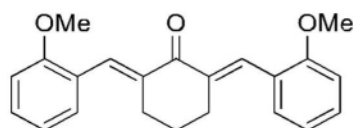
[0108]



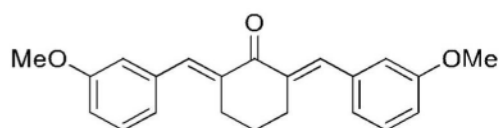
结构 I-C4

[0109] 在结构I-C2、结构I-C3和结构I-C4中,m和n各自独立地为1、2、3或4。换言之,该分子的苯环可各自独立地包括一至四个R¹基团。R¹基团中的每一者可独立地选自如上面针对式I所定义的基团。

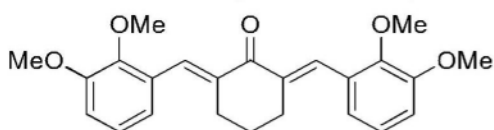
[0110] 式I的实例包括以下化合物:



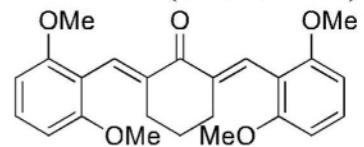
SYC-929 (化合物 1-1)



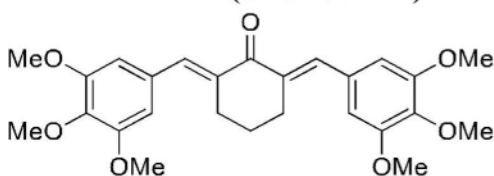
SYC-930 (化合物 1-2)



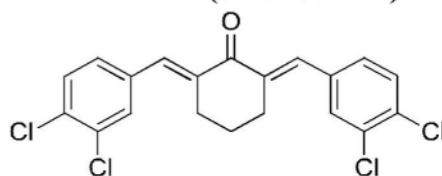
SYC-931 (化合物 1-3)



SYC-932 (化合物 1-4)

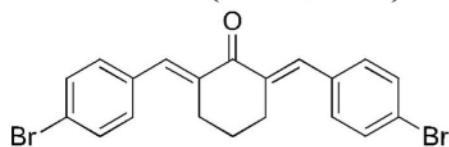


SYC-933 (化合物 1-5)

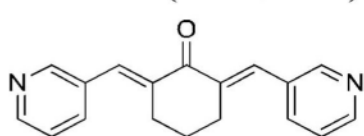


SYC-934 (化合物 1-6)

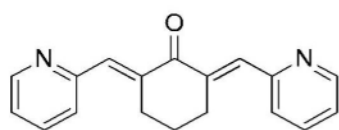
[0111]



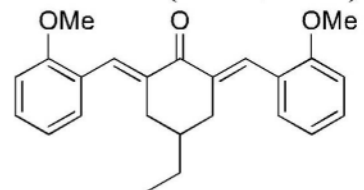
SYC-935 (化合物 1-7)



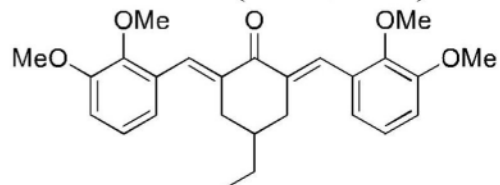
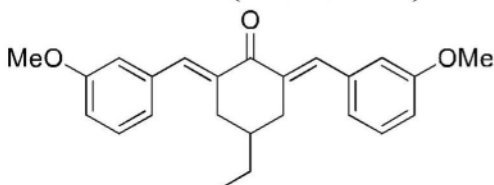
SYC-907 (化合物 1-8)



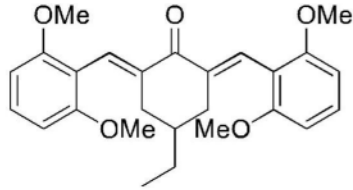
SYC-936 (化合物 1-9)



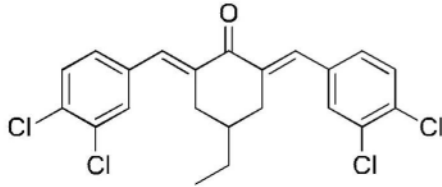
SYC-937 (化合物 2-1)



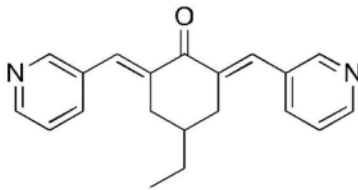
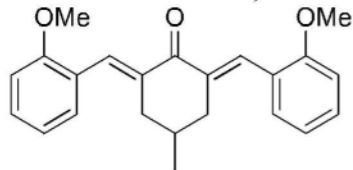
SYC-938 (化合物 2-2)



SYC-940 (化合物 2-4)

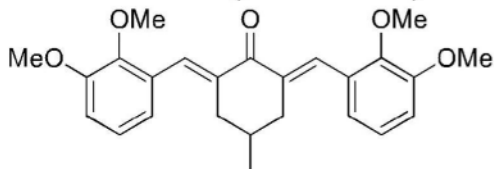


SYC-942 (化合物 2-6)

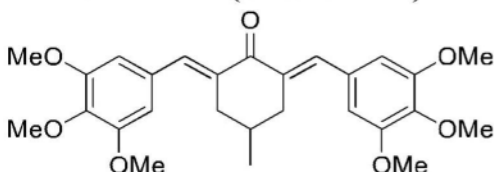
SYC-944 (化合物 2-8)(或
MCB-613)

[0112]

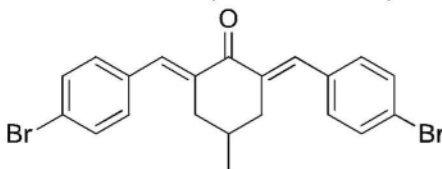
SYC-945 (化合物 3-1)



SYC-947 (化合物 3-3)

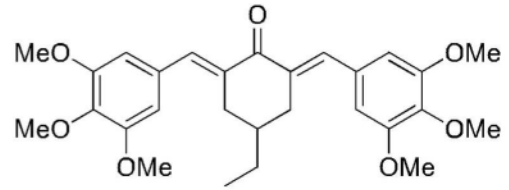


SYC-949 (化合物 3-5)

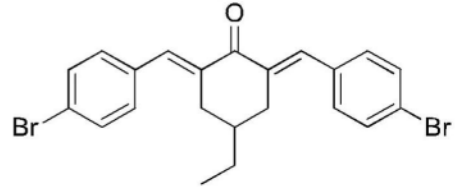


SYC-951 (化合物 3-7)

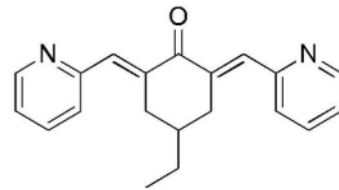
SYC-939 (化合物 2-3)



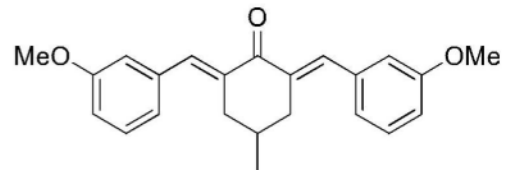
SYC-941 (化合物 2-5)



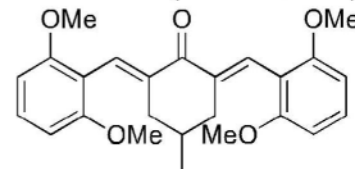
SYC-943 (化合物 2-7)



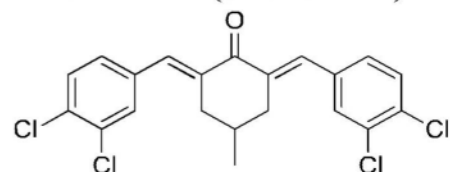
SYC-908 (化合物 2-9)



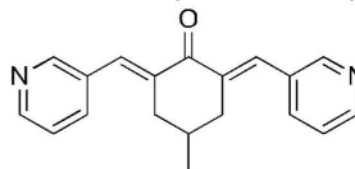
SYC-946 (化合物 3-2)



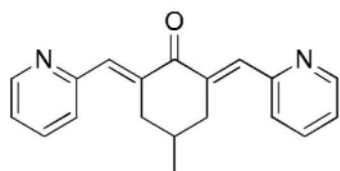
SYC-948 (化合物 3-4)



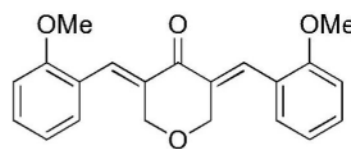
SYC-950 (化合物 3-6)



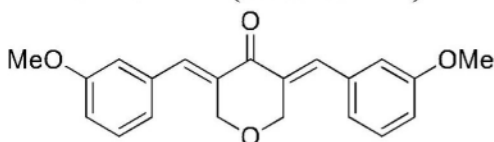
SYC-909 (化合物 3-8)



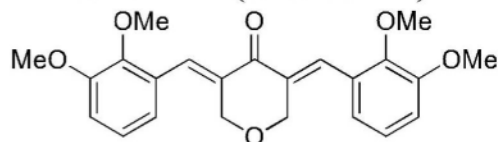
SYC-952 (化合物 3-9)



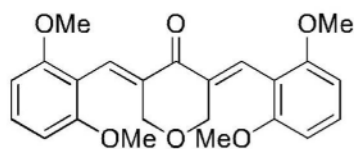
SYC-849 (化合物 4-1)



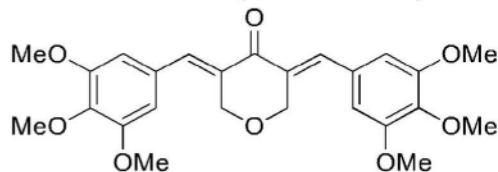
SYC-850 (化合物 4-2)



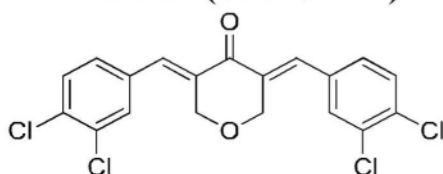
SYC-953 (化合物 4-3)



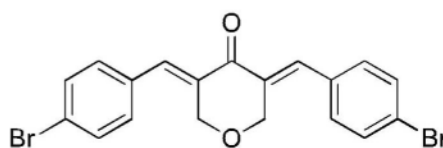
SYC-954 (化合物 4-4)



SYC-910 (化合物 4-5)

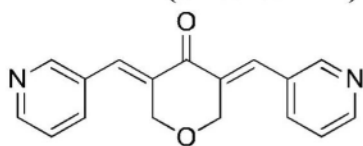


SYC-955 (化合物 4-6)

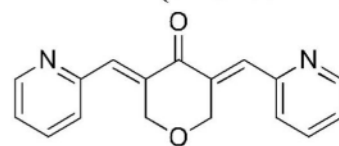


SYC-956 (化合物 4-7)

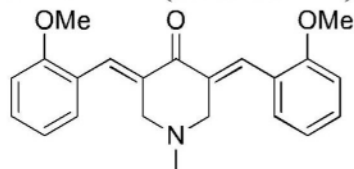
[0113]



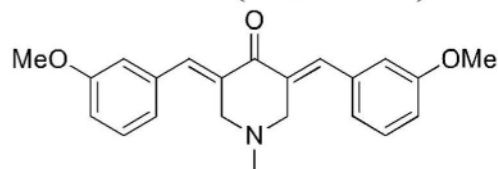
SYC-851 (化合物 4-8)



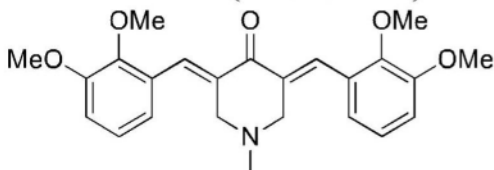
SYC-957 (化合物 4-9)



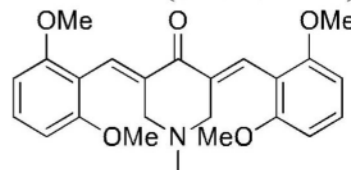
SYC-852 (化合物 5-1)



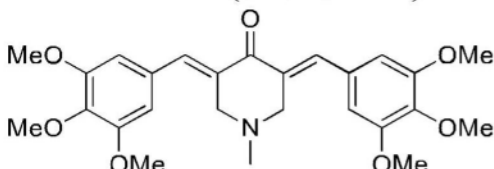
SYC-958 (化合物 5-2)



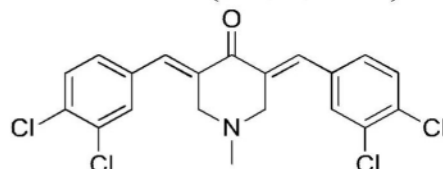
SYC-911 (化合物 5-3)



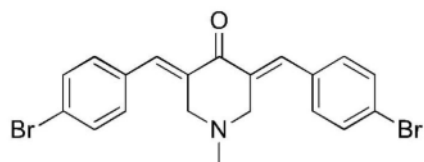
SYC-853 (化合物 5-4)



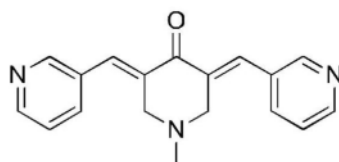
SYC-912 (化合物 5-5)



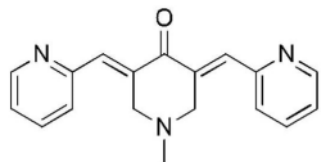
SYC-959 (化合物 5-6)



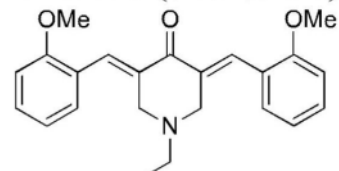
SYC-960 (化合物 5-7)



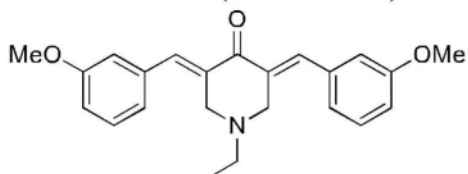
SYC-928 (化合物 5-8)



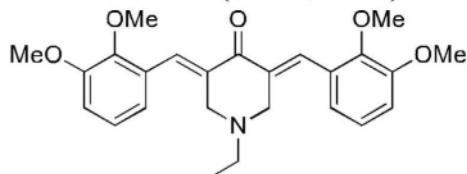
SYC-913 (化合物 5-9)



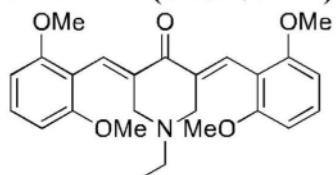
SYC-961 (化合物 6-1)



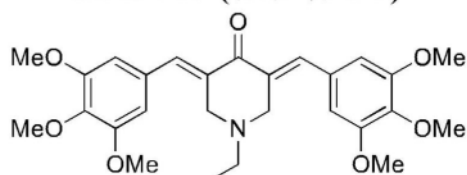
SYC-962 (化合物 6-2)



SYC-963 (化合物 6-3)

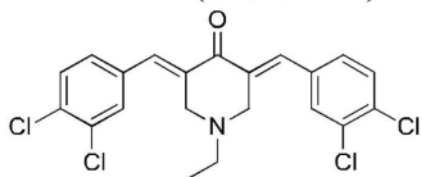


SYC-964 (化合物 6-4)

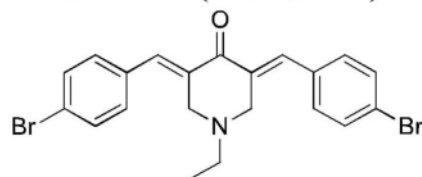


SYC-914 (化合物 6-5)

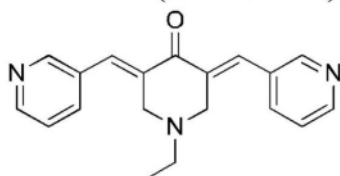
[0114]



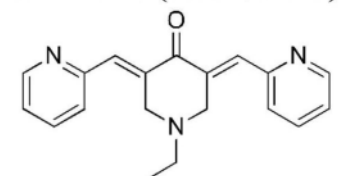
SYC-965 (化合物 6-6)



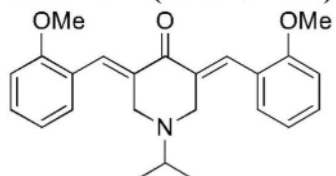
SYC-966 (化合物 6-7)



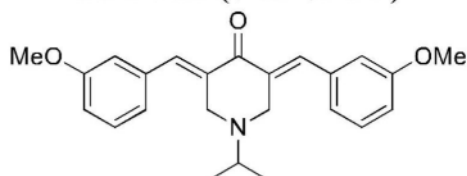
SYC-854 (化合物 6-8)



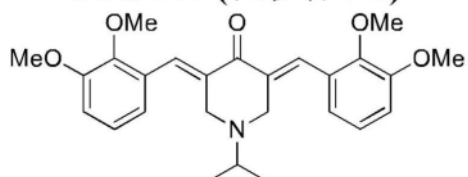
SYC-915 (化合物 6-9)



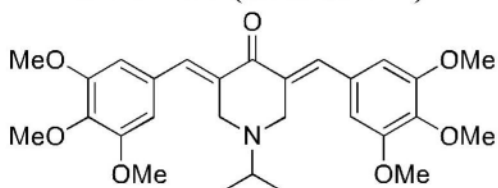
SYC-967 (化合物 7-1)



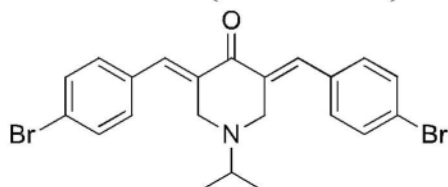
SYC-968 (化合物 7-2)



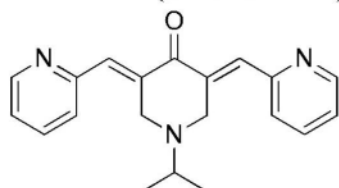
SYC-920 (化合物 7-3)



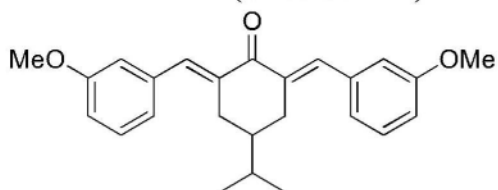
SYC-921 (化合物 7-5)



SYC-971 (化合物 7-7)

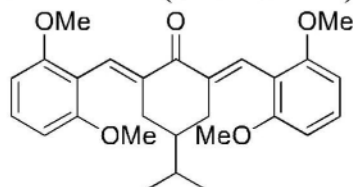


SYC-916 (化合物 7-9)

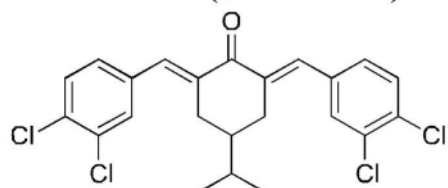


[0115]

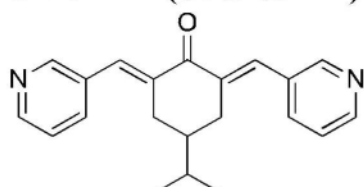
SYC-856 (化合物 8-2)



SYC-974 (化合物 8-4)

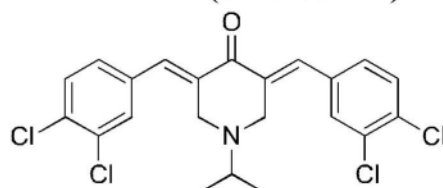


SYC-975 (化合物 8-6)

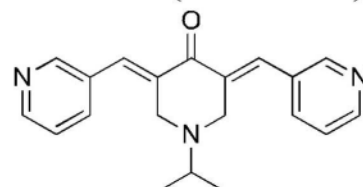


SYC-977 (化合物 8-8)

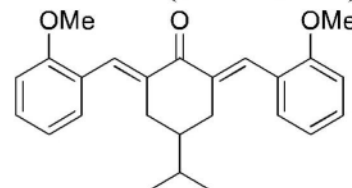
SYC-969 (化合物 7-4)



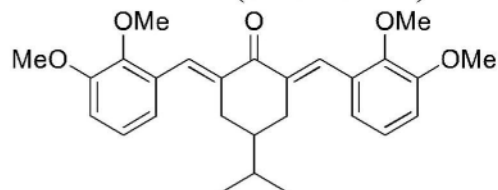
SYC-970 (化合物 7-6)



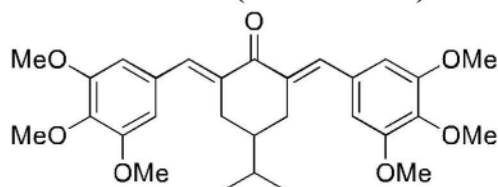
SYC-855 (化合物 7-8)



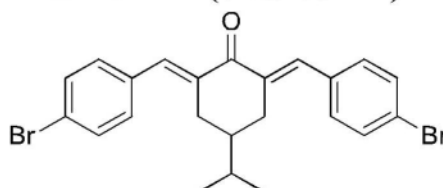
SYC-972 (化合物 8-1)



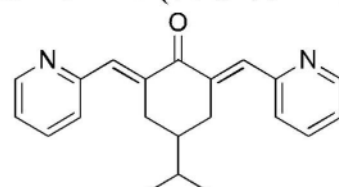
SYC-973 (化合物 8-3)



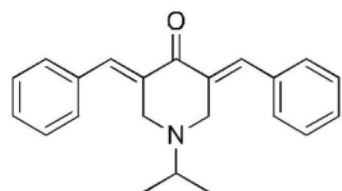
SYC-857 (化合物 8-5)



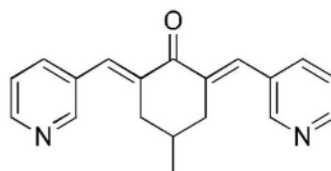
SYC-976 (化合物 8-7)



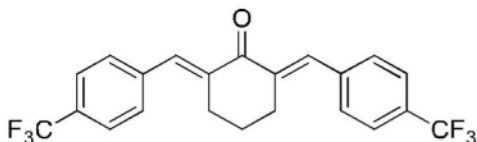
SYC-919 (化合物 8-9)



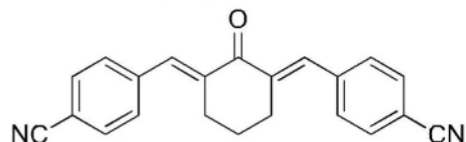
化合物 S2



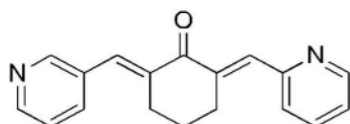
化合物 S3



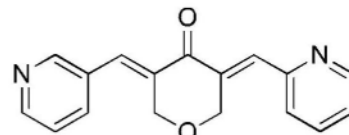
化合物 S15



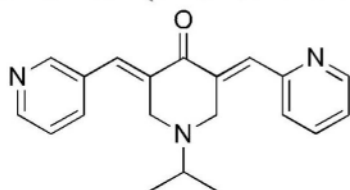
化合物 S18



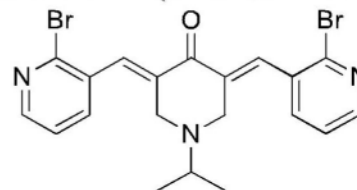
SYC-923 (化合物 1-8-2)



SYC-925 (化合物 4-8-2)

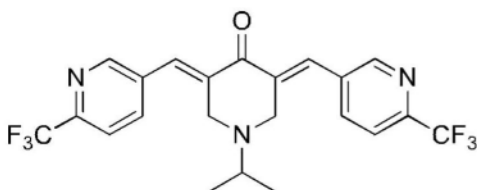


SYC-927 (化合物 7-8-2)

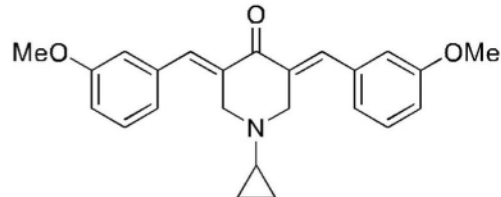


SYC-917 (化合物 7-18)

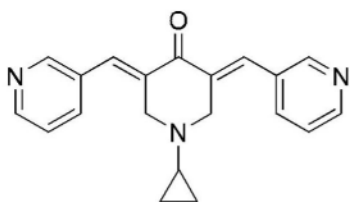
[0116]



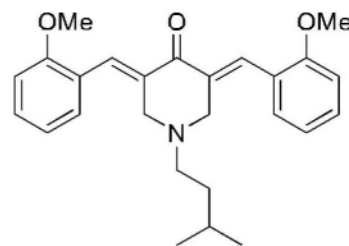
SYC-918 (化合物 7-19)



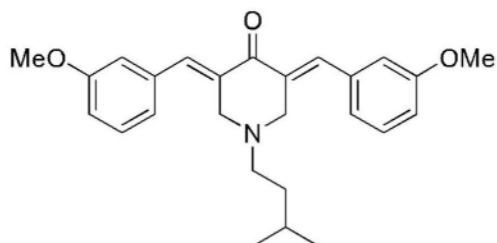
化合物 9-2



化合物 9-8



化合物 10-1



化合物 10-2

[0117] 在一些实施方案中,所述化合物是SYC-944(化合物2-8)(在本文中也被称为MCB-613)。在一些实施方案中,所述化合物不是SYC-944(化合物2-8)(在本文中也被称为MCB-

613)。在一些实施方案中,所述化合物是化合物9-2、化合物9-8、化合物10-1或化合物10-2。

[0118] II. 制备所述化合物的方法

[0119] 可按多种方式制备本文所述的化合物。可采用各种合成方法合成所述化合物。这些方法中的至少一些是合成有机化学领域中已知的。可由容易获得的起始物质来制备本文所述的化合物。最佳反应条件可随所用的特定反应物或溶剂而变化,但此类条件可由本领域技术人员通过常规的优化程序来确定。

[0120] 式I上的变化包括如针对每种化合物所描述的各种成分的添加、减少或移动。类似地,当分子中存在一个或多个手性中心时,所有可能的手性变体都包括在内。另外,化合物合成可涉及各种化学基团的保护和脱保护。保护和脱保护的使用以及适当保护基的选择可由本领域技术人员确定。保护基团的化学可见于例如Wuts, Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, 第5版, Wiley&Sons, 2014, 该文献以全文引用的方式并入本文。

[0121] 可在溶剂中进行产生本文所述的化合物的反应,所述溶剂可由有机合成领域的技术人员选择。在反应进行的条件(即,温度和压力)下,溶剂可基本上不与起始物质(反应物)、中间体或产物反应。反应可在一种溶剂或多于一种溶剂的混合物中进行。可根据本领域中已知的任意合适的方法监测产物或中间体形成。例如,产物形成可通过光谱手段如核磁共振光谱法(例如,¹H-NMR或¹³C-NMR)、红外光谱法、分光光度法(例如,UV-可见光)或质谱法或通过色谱法如高效液相色谱法(HPLC)或薄层色谱法来监测。

[0122] 合成如本文所述的化合物的示例性方法提供在下面的实施例1和以引用的方式并入本文的WO 2016/109470号国际专利申请公布中。

[0123] III. 药物制剂

[0124] 本文所述的化合物或其衍生物可以药物组合物的形式提供。根据预期的施用方式,药物组合物可呈固体、半固体或液体剂型(例如片剂、栓剂、丸剂、胶囊、粉末、液体或悬浮液)的形式,优选呈适合于单次施用精确剂量的单位剂型。所述组合物将包含治疗有效量的本文所述的化合物或其衍生物与药学上可接受的载体的组合,且此外还可包含其它医药剂(medicinal agent)、药剂、载体或稀释剂。所谓药学上可接受的意指不是在生物学上或在其他方面不合需要的物质,其可与选定的化合物一起施用给个体,而不会引起不可接受的生物学效应或者不会以有害的方式与包含它的药物组合物的其它组分相互作用。

[0125] 如本文所用,术语载体涵盖任何赋形剂、稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶剂、脂质、稳定剂或本领域中熟知的用于药物制剂的其它物质。用于在组合物中使用的载体的选择将取决于组合物预期的施用途径。药学上可接受的载体和含有这些物质的制剂的制备描述于例如Remington's Pharmaceutical Sciences, 第21版, University of the Sciences in Philadelphia, Lippincott, Williams&Wilkins, Philadelphia Pa, 2005中。生理上可接受的载体的实例包括缓冲液,如磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液和具有其它有机酸的缓冲液;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖及其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖醇,如甘露糖醇或山梨糖醇;成盐抗衡离子,如钠;和/或非离子表面活性剂,如TWEEN® (ICI, Inc.; Bridgewater, New Jersey)、聚乙二醇(PEG)和PLURONICS™ (BASF; Florham Park, NJ)。

[0126] 含有本文所述的化合物或其衍生物的适合于肠胃外注射的组合物可包含生理学上可接受的无菌水性或非水性溶液、分散体、悬浮液或乳液,以及用于复原成无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。合适的水性和非水性载体、稀释剂、溶剂或媒介物的实例包括水、乙醇、多元醇(丙二醇、聚乙二醇、甘油等)、其合适的混合物、植物油(如橄榄油)和可注射的有机酯如油酸乙酯。适当的流动性可例如通过使用包衣剂(如卵磷脂)、在分散体的情况下通过维持所需的粒度,以及通过使用表面活性剂来维持。

[0127] 这些组合物还可含有佐剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分配剂。可通过各种抗菌剂和抗真菌剂如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等来促进对微生物作用的预防。还可以包括等渗剂,例如糖、氯化钠等。可通过使用延迟吸收的剂,例如单硬脂酸铝和明胶来实现可注射药物形式的延长吸收。

[0128] 用于口服施用本文所述的化合物或其衍生物的固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、粉末和颗粒剂。在此类固体剂型中,本文所述的化合物或其衍生物与以下混合:至少一种惰性常用赋形剂(或载体),如柠檬酸钠或磷酸二钙,或(a)填充剂或增量剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和硅酸,(b)粘结剂,例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶,(c)保湿剂,例如甘油,(d)崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、马铃薯淀粉或木薯淀粉、藻酸,某些复合硅酸盐和碳酸钠,(e)溶液缓凝剂,例如石蜡,(f)吸收加速剂,例如季铵化合物,(g)润湿剂,例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯,(h)吸附剂,例如高岭土和膨润土,和(i)润滑剂,例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠或其混合物。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,剂型也可包含缓冲剂。

[0129] 相似类型的固体组合物也可在使用诸如乳糖或奶糖以及高分子量聚乙二醇等赋形剂的软和硬填充明胶胶囊中用作填充剂。

[0130] 固体剂型,如片剂、糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒剂可被制备成具有包衣和壳,如肠溶包衣及本领域中已知的其它包衣。它们可含有遮光剂,并且也可具有使它们在肠道的某一部分中以延迟的方式释放一种或多种活性化合物的组成。可使用的包埋组合物的实例为聚合物和蜡。活性化合物也可以是微囊封形式,如果合适,其可具有一种或多种上述赋形剂。

[0131] 用于口服施用本文所述的化合物或其衍生物的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。除了活性化合物之外,液体剂型可含有本领域中常用的惰性稀释剂,如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苜醇、苯甲酸苜酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(特别是棉籽油、花生油、玉米胚芽油、橄榄油、蓖麻油、芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯,或这些物质的混合物等。

[0132] 除了这类惰性稀释剂之外,所述组合物还可包含另外的剂,如润湿剂、乳化剂、悬浮剂、甜味剂、调味剂或芳香剂。

[0133] 除了活性化合物之外,悬浮液还可含有另外的剂,例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄蓍胶,或这些物质的混合物等。

[0134] 用于直肠施用的本文所述的化合物或其衍生物的组合物任选地为栓剂,所述栓剂可通过将所述化合物与合适的非刺激性赋形剂或载体混合来制备,所述赋形剂或载体如可

可脂、聚乙二醇或栓剂蜡,它们在常温下是固体,但在体温下是液体,因此在直肠或阴道腔中融化,并释放活性组分。

[0135] 用于局部施用本文所述的化合物或其衍生物的剂型包括膏剂、粉末、喷雾剂和吸入剂。本文所述的化合物或其衍生物在无菌条件下与生理上可接受的载体和可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。眼用制剂、膏剂、粉末和溶液也涵盖在组合物的范围内。

[0136] 组合物可包含一种或多种本文所述的化合物和药学上可接受的载体。如本文所用,术语药学上可接受的盐是指本文所述的化合物或其衍生物的那些盐,所述盐在合理的医学判断范围内适用于与受试者的组织接触使用,而没有不适当的毒性、刺激性、过敏反应等,与合理的益处/风险比相称,并且对其预期用途有效;以及在可能的情况下本文所述的化合物的两性离子形式。术语盐是指本文所述的化合物的相对无毒的无机和有机酸加成盐。这些盐可在化合物的分离和纯化期间原位制备,或者通过将纯化的游离碱形式的化合物与合适的有机或无机酸单独反应并分离如此形成的盐来制备。代表性的盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、硝酸盐、乙酸盐、草酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、硼酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲苯磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘酸盐(naphthylate)、甲磺酸盐、葡庚糖酸盐、乳糖醛酸盐、甲烷磺酸盐和月桂基磺酸盐等。这些可包括基于碱金属和碱土金属(如钠、锂、钾、钙、镁等)的阳离子,以及无毒的铵、季铵和胺阳离子,包括但不限于铵、四甲铵、四乙铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等。(参见S.M. Barge等人, J. Pharm. Sci. (1977) 66, 1, 该文献至少对于其中教导的组合物内容以全文引用的方式并入本文。)

[0137] 本文所述的化合物和组合物或其药学上可接受的盐的施用可采用治疗有效量的本文所述的化合物和组合物或如本文所述的其药学上可接受的盐进行,持续有效治疗病症的时间段。本文所述的化合物和组合物或如本文所述的其药学上可接受的盐的有效量可由本领域普通技术人员确定,并且包括用于哺乳动物的每天约0.5至约200mg/kg体重的活性化合物的示例性剂量,其可以单剂量或以单独的分剂量的形式施用,例如每天1至4次。替代地,剂量的量可以是每天约0.5至约150mg/kg体重的活性化合物、每天约0.5至100mg/kg体重的活性化合物、每天约0.5至约75mg/kg体重的活性化合物、每天约0.5至约50mg/kg体重的活性化合物、每天约0.01至约50mg/kg体重的活性化合物、每天约0.05至约25mg/kg体重的活性化合物、每天约0.1至约25mg/kg体重的活性化合物、每天约0.5至约25mg/kg体重的活性化合物、每天约1至约20mg/kg体重的活性化合物、每天约1至约10mg/kg体重的活性化合物、每天约20mg/kg体重的活性化合物、每天约10mg/kg体重的活性化合物、每天约5mg/kg体重的活性化合物、每天约2.5mg/kg体重的活性化合物、每天约1.0mg/kg体重的活性化合物,或每天约0.5mg/kg体重的活性化合物,或其中可导出的任何范围。任选地,剂量的量为每天约0.01mg/kg至约10mg/kg体重的活性化合物。任选地,剂量的量为约0.01mg/kg至约5mg/kg。任选地,剂量的量为约0.01mg/kg至约2.5mg/kg。

[0138] 本领域技术人员将理解的是,用于任何特定受试者的具体剂量水平和给药频率是可以变化的,并且将取决于多种因素,包括所用具体化合物的活性;该化合物的代谢稳定性和作用时长;受试者的种类、年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;施用模式和时间;排泄速率;药物组合;以及特定病状的严重程度。

[0139] 待在制剂中使用的精确剂量也将取决于施用途径和疾病或病症的严重性,并且应

根据执业医生的判断和每一受试者的情况来决定。可从由体外或动物模型测试系统获得的剂量-反应曲线外推有效剂量。进一步地,根据施用途径,本领域技术人员将知道如何确定产生受试者的细胞、组织和/或器官中的所需水平的反应的血浆浓度的剂量。

[0140] IV. 使用方法

[0141] 本文提供了治疗受试者的心肌梗塞或其它缺血性损伤(例如,中风)的方法。所述方法包括对受试者施用有效量的一种或多种本文所述的化合物或组合物或其药学上可接受的盐或前药。有效量当用于描述方法中的化合物量时是指实现所需药理学效应或其它生物学效应的化合物的量。

[0142] 还涵盖这样的方法,其包括对受试者施用一定量的一种或多种本文所述的化合物,使得在受试者的靶细胞处达到对应于体外施用的浓度的体内浓度。

[0143] 本文进一步描述了减小已罹患心肌梗塞的受试者的心肌梗塞尺寸的方法。所述方法包括对受试者施用有效量的一种或多种如本文所述的化合物或组合物。所述心肌梗塞尺寸与未治疗的已罹患心肌梗塞的受试者(例如,已罹患心肌梗塞且未对心肌梗塞施用任何治疗的受试者或者已罹患心肌梗塞且已施用不同于如本文所述的化合物或组合物的治疗剂的受试者)的心肌梗塞尺寸相比可减小至少5%。任选地,所述心肌梗塞尺寸与未治疗的已罹患心肌梗塞的受试者的心肌梗塞尺寸相比可减小至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。本文所述的化合物和组合物也可用于预防或减轻已罹患心肌梗塞的受试者的心肌细胞损失。预防或减轻已罹患心肌梗塞的受试者的心肌细胞损失的方法包括对受试者施用有效量的一种或多种如本文所述的化合物或组合物。

[0144] 本文进一步描述了在受试者中改善心血管功能、改善心脏血管灌注、改善中枢神经系统血管功能、改善中枢神经系统血管灌注、促进伤口愈合以及/或者预防或治疗肥厚型心肌病变的方法。所述方法包括对受试者施用有效量的一种或多种如本文所述的化合物或组合物。任选地,受试者已罹患缺血性损伤,如心肌梗塞或中风。任选地,受试者是老年个体,肥胖个体,糖尿病个体,罹患代谢综合征的个体,暴露于烟的个体(例如,吸烟者和长期暴露于二手烟的个体),血压、血液胆固醇或甘油三酯水平升高的个体,或罹患自身免疫病状的个体。

[0145] 在受试者中治疗心肌梗塞、减小心肌梗塞尺寸、预防或减轻心肌细胞损失、改善心血管功能、改善心脏血管灌注、改善中枢神经系统血管功能、改善中枢神经系统血管灌注、促进伤口愈合,以及/或者预防或治疗肥厚型心肌病变的方法可进一步包括对受试者施用一种或多种另外的剂。可按包括伴随施用、同时施用或依次施用在内的任意顺序施用所述一种或多种另外的剂和本文所述的化合物或其药学上可接受的盐或前药。依次施用可以是以最多相隔数天的时间间隔顺序施用。所述方法还可包括对所述一种或多种另外的剂和/或本文所述的化合物或其药学上可接受的盐或前药多于一次地施用。可通过相同或不同的途径且并行或依次地施用所述一种或多种另外的剂和本文所述的化合物或其药学上可接受的盐或前药。

[0146] 另外的治疗剂包括但不限于抗血小板剂、他汀类药物、 β 阻滞剂和肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)阻滞剂(例如,血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂和血管紧张素受体阻

滞剂(ARB))。可用作如本文所述的另外的治疗剂的抗血小板剂的说明性非限制实例包括糖蛋白(GP) IIb/IIIa受体拮抗剂(例如,阿昔单抗、依替巴肽和替罗非班)、双嘧达莫、环氧合酶抑制剂(例如,乙酰水杨酸、布洛芬、吲哚美辛和磺吡酮)、二磷酸腺苷(ADP)受体拮抗剂(例如,氯吡格雷和噻氯匹定)以及磷酸二酯酶抑制剂(例如,西洛他唑)。

[0147] 可用作如本文所述的另外的治疗剂的他汀类药物的说明性非限制实例包括阿托伐他汀、西立伐他汀、普伐他汀、洛伐他汀、美伐他汀、辛伐他汀、罗苏伐他汀、氟伐他汀和匹伐他汀。

[0148] 可用作如本文所述的另外的治疗剂的 β 阻滞剂的说明性实例包括但不限于醋丁洛尔、阿替洛尔、倍他洛尔、富马酸比索洛尔、卡替洛尔、卡维地洛、艾司洛尔、拉贝洛尔、美托洛尔、纳多洛尔、奈必洛尔、喷布洛尔、吲哚洛尔、普萘洛尔、索他洛尔和噻吗洛尔。

[0149] 可用作如本文所述的另外的治疗剂的肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)阻滞剂(例如,血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂和血管紧张素受体阻滞剂(ARB))的说明性实例包括但不限于阿利吉仑、依那吉仑、瑞米吉仑、苯那普利、苯那普利拉、卡托普利、依那普利、赖诺普利、培哚普利、喹那普利、雷米普利、群多普利、福辛普利、莫昔普利、培哚普利、氯沙坦、缬沙坦、厄贝沙坦、坎地沙坦、替米沙坦、他索沙坦、依普沙坦、螺内酯和依普利酮。

[0150] 任何前述治疗剂均可与本文所述的组合物以任意组合使用。组合可以伴随施用(例如,作为混合物施用)、分开但同时施用(例如,经由分开的静脉导管进入同一受试者),或者依序施用(例如,首先给予其中一种化合物或剂,接着给予第二种)。因此,术语组合用于指两种或更多种剂的伴随、同时或依序施用。

[0151] 任选地,如本文所述的化合物或治疗剂可与外科手术(例如,冠状动脉旁路手术)、血管成形术、支架植入术或另一种植入程序组合施用。

[0152] 如本文所述的方法和化合物可用于防治性和治疗性治疗。对于防治性用途,在心肌梗塞发作之前(例如,在心肌梗塞的征象明显前)、在心肌梗塞早期发作期间(例如,在出现心肌梗塞的最初征象和症状后),或者在心肌梗塞发生之后对受试者施用治疗有效量的如本文所述的化合物和组合物或其药学上可接受的盐。防治性施用可在表现出心肌梗塞症状之前进行数天至数年。治疗性治疗涉及在心肌梗塞发生后对受试者施用治疗有效量的如本文所述的化合物和组合物或其药学上可接受的盐。

[0153] 本文用于防治性和治疗性治疗的方法任选地包括选择已罹患缺血性损伤(如心肌梗塞或中风)或者处于罹患所述缺血性损伤(如心肌梗塞或中风)的高风险中的受试者(例如,肥胖个体、老年个体或先前已罹患缺血性损伤如心肌梗塞或中风的个体)。技术人员可利用例如包括例如疾病或病状的个人或家族史、临床测试(例如,基因测试)等在内的多种预后和诊断方法进行这样的确定。任选地,本文的方法可用于预防已罹患心肌梗塞的受试者罹患后发的心肌梗塞。

[0154] 本文所述的化合物和组合物或其药学上可接受的盐可用于在人(包括但不限于儿科和老年群体)和动物(例如,兽医应用)中治疗心肌梗塞、减小心肌梗塞尺寸、预防或减轻心肌细胞损失、改善心血管功能、促进伤口愈合和/或预防或治疗肥厚型心肌病变。

[0155] V. 试剂盒

[0156] 本文还提供了用于在受试者中治疗心肌梗塞、减小心肌梗塞尺寸、预防或减轻心肌细胞损失、改善心血管功能、促进伤口愈合,以及/或者预防或治疗肥厚型心肌病变的试

剂盒。试剂盒可包括本文所述的任何化合物或组合物。例如,试剂盒可包括一种或多种式I的化合物。试剂盒可进一步包括一种或多种另外的剂,如抗血小板剂、他汀类药物、 β 阻滞剂、肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)阻滞剂(例如,血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂和血管紧张素受体阻滞剂(ARB))以及这些的组合。

[0157] 试剂盒可包括本文所述的任何化合物或组合物的口服制剂。试剂盒可包括本文所述的任何化合物或组合物的静脉内或腹膜内制剂。试剂盒可另外包括试剂盒的使用指南(例如,治疗受试者的说明书)、容器、用于施用所述化合物或组合物的装置(例如,注射器),以及/或者载体。

[0158] 如本文所用,术语治疗(treatment/treat/treating)是指减轻疾病或病状的一种或多种症状的方法。因此在所公开的方法中,治疗可指疾病或病状的一种或多种症状的严重程度减轻5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。例如,如果受试者的疾病的一种或多种症状或征象(例如,心肌梗塞的尺寸)与对照相比减轻5%,则认为治疗疾病的方法是治疗。如本文所用,对照是指未治疗的病状(例如,未治疗的已罹患心肌梗塞的受试者的心肌梗塞尺寸)。因此,减轻可以是与原生水平或对照水平相比,5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或者介于5%与100%之间的任何百分比的减轻。要理解的是,治疗不一定是治愈或完全消除疾病、病状,或者疾病或病状的症状。

[0159] 如本文所用,术语疾病或病症的预防(prevent/preventing/prevention)是指例如在受试者开始显示出疾病或病症的一种或多种症状之前或几乎同时发生的行为,例如施用组合物或治疗剂,其抑制或延迟疾病或病症的一种或多种症状的发作或严重程度。

[0160] 如本文所用,对减少、减轻或抑制的提及包括与对照水平相比的5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大的变化。这类术语可包括但不一定包括完全消除。

[0161] 如本文所用,受试者意指哺乳动物和非哺乳动物两者。哺乳动物包括例如人;非人灵长类动物,例如猿和猴;牛;马;绵羊;大鼠;小鼠;猪;和山羊。非哺乳动物包括例如鱼和鸟。

[0162] 在整个本申请中,引用了各种出版物。这些出版物的公开内容特此以全文引用的方式并入本申请。

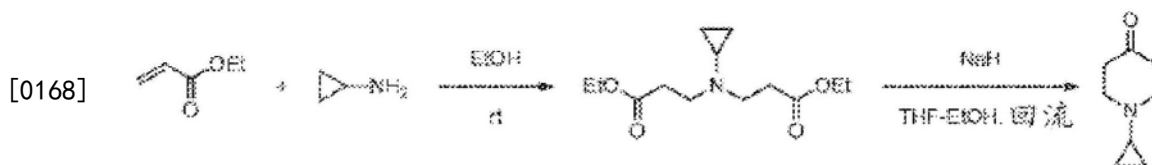
[0163] 下面的实施例旨在进一步说明本文所述的方法和组合物的某些方面,并不旨在限制权利要求书的范围。

[0164] 实施例

[0165] 实施例1:化合物的合成

[0166] 用于合成的所有化学物质均购自Alfa Aesar(Ward Hill,MA)或Aldrich(Milwaukee,WI)。在Varian(Palo Alto,CA)400-MR波谱仪上通过 ^1H NMR表征化合物特性。通过具有Zorbax C18(或C8)柱(4.6x250mm)的Shimadzu Prominence HPLC,通过在254nm下的UV监测确定所合成的化合物的纯度。发现所报告的化合物纯度>95%。

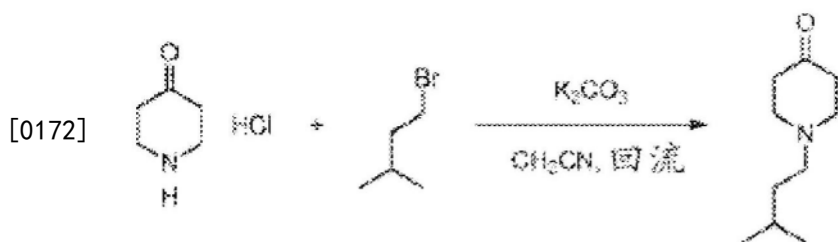
[0167] 1-环丙基哌啶-4-酮的合成:



[0169] 将环丙胺 (6.9mL, 100mmol) 和丙烯酸乙酯 (22.3mL, 210mmol, 2.1当量) 溶解在无水乙醇 (50mL) 中。将混合物在室温 (rt) 下搅拌4天。真空移除挥发物, 得到粗油状物, 将其通过柱色谱法 (硅胶, 从10:1至1:1的正己烷与乙酸乙酯) 纯化, 得到3,3'-(环丙基氮烷二基)二丙酸二乙酯, 为无色液体 (15.68g, 61%)。

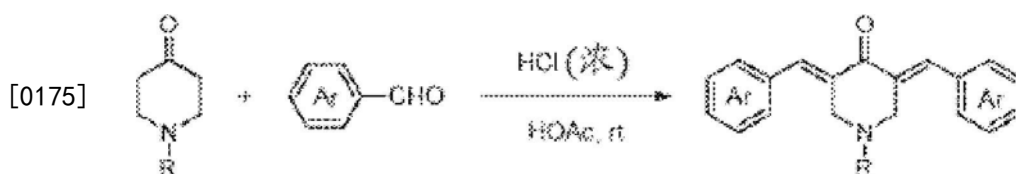
[0170] 将氢化钠 (60%的在油中的分散体, 3.0g, 75mmol, 1.5当量) 和四氢呋喃 (THF, 30mL) 置于烘干的烧瓶中, 向其中滴加3,3'-(环丙基氮烷二基)二丙酸二乙酯 (12.8g, 50mmol) 在THF (20mL) 中的溶液。然后添加无水乙醇 (2.9mL, 50mmol, 1.0当量), 并将所得混合物在回流下搅拌24小时。用饱和氯化铵 (50mL) 淬灭反应。将混合物用乙醚 (3×100mL) 萃取, 并将合并的有机层用水和盐水洗涤, 经Na₂SO₄干燥。真空移除挥发物, 得到粗油状物, 将其通过柱色谱法 (硅胶, 从10:1至2:1的正己烷与乙酸乙酯) 纯化, 得到1-环丙基哌啶-4-酮, 为无色液体 (4.52g, 65%收率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): 62.92 (t, J=6.2Hz, 4H), 2.42 (t, J=6.2Hz, 4H), 1.80-1.70 (m, 1H), 和0.55-0.47 (m, 4H)。

[0171] 1-异戊基哌啶-4-酮的合成:



[0173] 将哌啶-4-酮盐酸盐 (13.56g, 100mmol)、1-溴-3-甲基丁烷 (14.4mL, 120mmol, 1.2当量) 和碳酸钾 (27.6g, 200mmol, 2.0当量) 溶解在乙腈/水 (50/50mL) 混合溶剂中。将混合物在回流下搅拌12小时。将混合物冷却到室温, 用乙醚 (3×100mL) 萃取, 将合并的有机层用水和盐水洗涤, 并经Na₂SO₄干燥。真空移除挥发物, 得到粗油状物, 将其通过柱色谱法 (硅胶, 从10:1至2:1的正己烷与乙酸乙酯) 纯化, 得到1-异戊基哌啶-4-酮, 为无色液体 (10.32g, 61%收率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): 82.71 (t, J=5.9Hz, 4H), 2.43 (t, J=5.9Hz, 6H), 1.61 (七重峰, J=6.6Hz, 1H), 1.40 (td, J=7.6, 6.6Hz, 2H), 和0.90 (d, J=6.6Hz, 6H)。

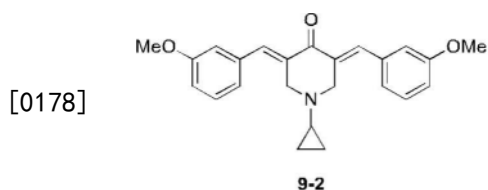
[0174] 合成 α, β -不饱和酮的一般方法:



[0176] 将N-保护的哌啶-4-酮 (5mmol) 和醛 (11mmol, 2.2当量) 溶解在乙酸 (10mL) 中, 向其中添加浓盐酸 (3mL)。将混合物在室温下搅拌12小时。用饱和碳酸氢钠小心地淬灭反应。将混合物用乙酸乙酯 (3×30mL) 萃取, 将合并的有机层用水和盐水洗涤, 并经Na₂SO₄干燥。真空移除挥发物, 得到粗油状物, 将其通过柱色谱法 (硅胶, 从5:1至1:1的正己烷与乙酸乙酯), 得到 α, β -不饱和酮 (60-76%收率)。根据一般方法制备本文所述的化合物, 包括化合物9-2、

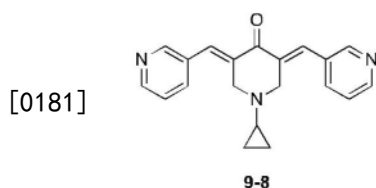
9-8、10-1和10-2。下面提供这些化合物中每一者的表征。

[0177] (3E,5E)-1-环丙基-3,5-双(3-甲氧基亚苄基)哌啶-4-酮(9-2)。



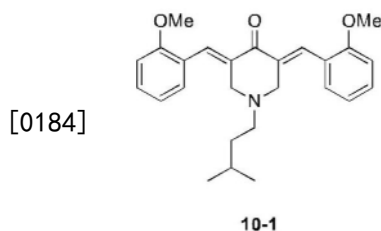
[0179] 黄色粉末。¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ7.75(s,2H),7.36(t,J=8.0Hz,2H),7.03(d,J=8.0Hz,2H),6.96(s,2H),6.93(d,J=8.0Hz,2H),3.99(s,4H),3.85(s,6H),1.96-1.91(m,1H),0.51-0.47(m,2H)和0.41-0.38(m,2H);¹³C NMR(100MHz,CDCl₃):187.6,159.7,136.7,136.4,133.8,129.7,123.0,116.1,114.7,54.0,51.3,38.1和6.9;MS(ESI)[M+H]⁺376.5。

[0180] (3E,5E)-1-环丙基-3,5-双(吡啶-3-基亚甲基)哌啶-4-酮(9-8)。



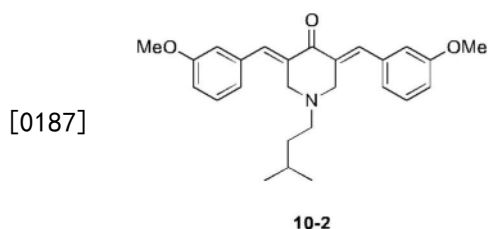
[0182] 橙色粉末。¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ8.67(s,2H),8.59(d,J=4.8Hz,2H),7.73(s,2H),7.70(d,J=8.0Hz,2H),7.37(dd,J=8.0,4.8Hz,2H),3.99(s,4H),1.99-1.94(m,1H),0.58-0.51(m,2H)和0.47-0.42(m,2H);¹³C NMR(100MHz,CDCl₃):187.2,151.2,149.9,137.3,135.8,132.4,131.1,123.6,55.8,40.1和6.9;MS(ESI)[M+H]⁺318.5。

[0183] (3E5E)-1-异戊基-3,5-双(2-甲氧基亚苄基)哌啶-4-酮(10-1)。



[0185] 化合物10-1是以盐酸盐(黄色粉末)形式制备的。¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ13.19(br,1H),8.36(s,2H),7.45(t,J=7.3Hz,2H),7.10(d,J=6.6Hz,2H),7.03(t,J=7.3Hz,2H),6.97(d,J=8.3Hz,2H),4.49(d,J=15.6Hz,2H),4.28(d,J=15.6Hz,2H),3.88(s,6H),2.87-2.82(m,2H),1.43(七重峰,J=6.6Hz,1H),1.30(td,J=7.6,6.6Hz,2H)和0.70(d,J=6.6Hz,6H);¹³C NMR(100MHz,CDCl₃):182.2,158.2,141.4,132.5,130.5,124.1,122.2,120.9,111.3,55.7,50.8,49.6,32.8,26.0和22.1;MS(ESI)[M+H]⁺406.5。

[0186] (3E,5E)-1-异戊基-3,5-双(3-甲氧基亚苄基)哌啶-4-酮(10-2)。



[0188] 化合物10-2是以盐酸盐(黄色粉末)的形式制备的。¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ13.46

(br, 1H), 8.17 (s, 2H), 7.40 (t, J=8.0Hz, 2H), 7.01 (dd, J=8.0, 2.3Hz, 2H), 6.89 (d, J=8.0Hz, 2H), 6.86 (d, J=2.3Hz, 2H), 4.59 (d, J=15.6Hz, 2H), 4.48 (d, J=15.6Hz, 2H), 3.84 (s, 6H), 2.89-2.84 (m, 2H), 1.46 (七重峰, J=6.6Hz, 1H), 1.37 (td, J=7.6, 6.6Hz, 2H) 和 0.72 (d, J=6.6Hz, 6H); ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): 181.8, 160.0, 144.8, 134.3, 130.4, 123.9, 122.2, 116.3, 116.1, 55.5, 50.5, 50.2, 32.7, 26.0 和 22.1; MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 406.5。

[0189] 实施例2: 心肌梗塞后的心脏保护促进和修复

[0190] 本文的数据显示在心肌梗塞之后施用本文所述的化合物能促进心脏保护和修复。除了其它功能外, 代表性化合物还预防梗塞尺寸增大、心脏肥厚和胶原沉积。所述化合物显著改善了心肌梗塞后的功能。所述化合物还增加血管生成, 促进心脏 β -氧化, 并显著降低与扩张型心肌病变相关的代谢物甲基戊二酰肉碱的水平。

[0191] 方法

[0192] 所有动物研究和方案均得到贝勒医学院 (Baylor College of Medicine) 的 Institutional Animal Care and Use Committee 批准, 并严格按照美国国家卫生研究院实验动物的护理和使用指南 (National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) 进行。成年 (8-10 周龄) ICR (CD1) 小鼠用于所有研究。

[0193] 成年小鼠心力衰竭模型。为了在 8-10 周龄小鼠中诱导心肌梗塞 (MI), 永久结扎左前降支 (LAD) 动脉。简言之, 用 2% 异氟烷麻醉小鼠, 然后给小鼠插管。通过穿过第四或第五肋间隙进行开胸暴露心脏, 并在 LAD 动脉周围绑上 8-0 尼龙缝线。将 10ul 滴度为 9×10^9 pfu/ml 的腺病毒 SRC-3 (Ad-SRC-3) 或腺病毒 GFP (Ad-GFP) 注射到左心室降支冠状动脉附近的前游离壁中。为了评估细胞周期进入, 在实验的 9 天持续时间中, 将类似物 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU; 0.2g/L, Santa Cruz, SC-284628A) 添加到饮用水中。使用 Click-iT EdU 试剂盒 (Invitrogen, C10339) 测量细胞增殖。手术后 2 小时以 20mg/kg 腹膜内施用 MCB-613 的初始剂量。随后在另外 6 天给予相同剂量的注射, 然后在 9 周和 16 周给予重复剂量持续 3 天。在指定的时间点收获小鼠用于分析。

[0194] 超声心动图。通过超声心动图 (VisualSonics, Vevo 2100, 40Mhz-550S 探针) 确定心脏功能。在横向 B 模式中乳头肌对准之后, 在 M 模式图像上测量心脏功能。

[0195] 组织学分析。将整个心脏用 10% 福尔马林固定, 包埋在石蜡中, 并以 7- μm 间隔切片。每个载玻片具有开始于顶点, 在缝合结扎部位终止的 3 或 10 个切片 (大约 30-50 个载玻片)。将乳头水平 (papillary level) 切片 (载玻片 20-30) 用天狼猩红染色以识别纤维化区域。采用基于长度的途径确定梗塞尺寸。

[0196] 免疫染色分析。在 FFPE (经福尔马林固定且石蜡包埋的切片) 上进行免疫组织化学和免疫荧光染色实验。采用 DeadEndT^M 荧光测定 TUNEL 系统制造商方案 (DeadEndT^M Fluorometric TUNEL System manufacturer's protocol) (Promega, GS3250) 进行 TUNEL 染色以检测凋亡细胞。

[0197] 用于单细胞转录谱分析的心脏细胞的分离。在颈脱位前将小鼠置于麻醉的手术平面之下。取出心脏, 并通过含 1mg/mL 胶原酶的无钙 pH 7.4 Tyrodes 溶液 (130mM NaCl、74.55mM KCl、0.5mM MgCl₂、0.33mM NaH₂PO₄、0.25mM HEPES、22mM 葡萄糖) 的 15 分钟 Langendorff 逆行灌注分离细胞。然后将心脏从仪器中取出, 并在含有 15mg/mL 牛血清白蛋白 (BSA) 的相同 Tyrodes 缓冲液中细细地切碎, 之后再用玻璃移液管研磨。然后通过 300RPM

差速离心3分钟来使心肌细胞沉淀。然后将含有细胞的非心肌细胞群的上清液通过70微米过滤器过滤,并在750G下进行沉淀,然后重悬于1.1mL含2%胎牛血清(FBS)的磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)中。取出0.1mL作为“无染色对照”用于荧光激活细胞分选(FACS)。将另外的1mL与4ug/mL钙黄绿素蓝和10microM DyeCycle Ruby一起温育,并在37°C下温育10分钟。然后将细胞在600G下旋转离心,并重悬于含有Sytox Green(30nM)的0.5mL 2%FBS/PBS中。然后使用FACS Aria ii细胞分选仪将细胞针对:Sytox Green-、Calcein+、DyeCycle Ruby+分选到含0.4%FBS的PBS中。然后对细胞进行沉淀,并将细胞重悬于100uL含0.4%FBS的PBS中,对细胞进行计数,然后使细胞流过10x基因组学铬系统以进行单细胞转录谱分析。

[0198] 代谢组学谱分析。MI后24小时分离来自4只对照和4只经MCB-613处理的小鼠的心脏,用10mM KCl灌注,在液氮中速冻,并保存在-80°C下。分析10mg组织的脂肪酸和肉碱,并相对于3个正常肝对照样品作归一化。用内标L-色氨酸对脂肪酸进行归一化,并且用内标L-玉米素对肉碱进行归一化。

[0199] RER、VO₂和VCO₂测量。采用渐进式最大运动测试通过间接量热法来测量呼吸交换比(RER)、氧气消耗量(VO₂)和二氧化碳呼出量(VCO₂),直到小鼠筋疲力尽。

[0200] .结果

[0201] SRC-3激活具有低毒性。核受体共激活剂3(NCOA3)在成人心脏中以低水平表达,表明SRC-3的激活将几乎没有副作用。此外,MCB-613具有低的体外和体内毒性谱。确定正常人心脏中的NCOA3表达,并将其与从来自大约1,000个尸检供体的GTEx数据库中分析的肌肉组织进行比较。图1含有示出NCOA3在正常人心脏(左图)和肌肉组织(右图)中的表达的图表。y轴示出每百万个映射读段(FPKM)的每kb基因长度的片段,且数据点代表样品。数据按NCOA3的表达水平进行分类。

[0202] SRC-3表达诱导心脏中非心肌细胞的增殖。将腺病毒来源的SRC-3(Adeno-SRC3)注射到野生型成年小鼠心脏的左心室游离壁中。给小鼠喂食经5-乙炔基-2'-脱氧尿苷处理的水(Edu水)作为细胞增殖标志物。九天后收获心脏,并用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(Dapi)染色以识别细胞核、PCM1心肌细胞标志物、细胞表面标志物麦胚凝集素(WGA)和细胞增殖标志物Edu。图2是心脏的图像,并且显示SRC-3表达诱导野生型成年小鼠心脏中非心肌细胞的增殖。

[0203] 本文所述的化合物防范心肌梗塞后心脏功能的早期和进行性丧失。在心肌梗塞后用本文所述的代表性化合物处理小鼠。图3A显示心肌梗塞后药物处理和超声心动图测量的实验时间线。结扎后两小时以及在另外六天每隔24小时施用MCB-613或生理盐水。在8周和16周,每周给予三次重复注射。如图3B中所示,在10周测量心脏重量和胫骨长度。给六只小鼠施用盐水,并且给七只小鼠施用MCB-613。 $P < 0.03$ 。通过超声心动图确定左心室射血分数(在12周之前 $n = 14$;在19周时 $n = 3$) (图3C)。用重复测量值通过ANOVA分析数据,并表示为平均值 \pm SEM。 $P < 0.001$ 。图3D含有心肌梗塞后收获并染色以显现胶原纤维的小鼠心脏的图像。具体地,图3D示出心肌梗塞后10周4倍放大的乳头肌水平截面的天狼猩红染色,和相应的20倍放大的梗塞边界区水平截面的天狼猩红染色。梗塞尺寸以%长度表示。数据表明,与施用生理盐水的对照小鼠相比,经MCB-613处理的小鼠的梗塞尺寸减小。在心肌梗塞后通过超声心动图确定用化合物10-1处理的小鼠的左心室射血分数(参见图4)。图8示出在心肌梗塞后6周乳头肌水平截面的天狼猩红染色。梗塞尺寸以%长度表示。数据表明,与施用生理

盐水的对照小鼠相比,经化合物10-1处理的小鼠梗塞尺寸减小。

[0204] MCB-613诱导心肌梗塞后心脏中主要和次要非心肌细胞类型的变化。对成年小鼠心脏中的非肌细胞进行全面单细胞转录谱分析。在心肌梗塞后10周对心脏中的非心肌细胞进行单细胞测序。通过tSNE分析产生细胞簇,并通过基因表达标记进行鉴定。参见图5A,该图描绘了成年小鼠心脏中的非肌细胞的全面单细胞转录谱分析。图5B示出心肌梗塞后在经MCB-613处理的心脏中存在的不同细胞类型。图5C是具有内皮标记的三个细胞簇的Venn分析,该分析表明MCB-613在心肌梗塞后10周刺激心脏中的两种不同内皮细胞群的内皮细胞生长。

[0205] MCB-613增加心脏保护性肉碱代谢物。图6A是示出心肌梗塞后24小时小鼠心脏中长链脂肪酸的代谢组学的热图。图6B是示出心肌梗塞后小鼠心脏中甲基戊二酰肉碱的代谢组学的热图(全组FDR=1)。热图显示,MCB-613增加心脏保护性肉碱代谢物,增加长链脂肪酸的 β -氧化,并且减少甲基戊二酰肉碱。

[0206] 本文所述的化合物刺激SRC固有转录活性。将用Gal4反应性荧光素酶报告子(pG5-luc)和编码与Gal4的DNA结合结构域融合的SRC-1、SRC-2或SRC-3的构建体(pBIND-SRC-1、pBIND-SRC-2或pBIND-SRC-3)转染的HeLa细胞暴露于用如本文所述的包括MCB-613、化合物10-1和化合物10-2的化合物进行的处理中。图7上图显示MCB-613选择性地刺激SRC的固有转录活性。图7中图显示化合物10-1选择性地刺激SRC的固有转录活性。图7下图显示化合物10-2选择性地刺激SRC的固有转录活性。

[0207] 化合物10-1改善心肌梗塞后的心血管适应性。图9含有显示在用生理盐水处理的小鼠(“生理盐水”;n=3)、用MCB-613处理的小鼠(“MCB-613”;n=3)和非梗塞野生型小鼠(“WT”;n=2)中进行的渐进式最大运动测试的结果的图表。上图示出二氧化碳呼出量(VCO_2),而下图示出氧气消耗量(VO_2)。如图9中通过代表性化合物10-1所示,本文所述的化合物改善心肌梗塞后的心血管和外周血管适应性。

[0208] 总结

[0209] 如本文提供的数据所示,本文所述的化合物在体内刺激血管生成,并改善受损心肌的功能。因此,本文所述的化合物是优异的治疗剂,其可用于修复和预防慢性伤口、促进血管生成、恢复血管疾病中的血流量以及通过预防代谢重塑来抑制易损心肌的有害结构重塑。所述化合物可用于冠状动脉功能不全后的心脏修复。

[0210] 实施例3:使用类固醇受体共激活剂刺激剂促进心肌梗死后的心脏保护和修复

[0211] 具有心肌细胞损失、炎症、纤维化和心脏射血分数降低的心脏组织的进行性重塑是心肌梗塞(MI)诱导的心力衰竭的标志。MI后的关键治疗目标是保护心肌、使梗塞尺寸最小化、预防进展为心力衰竭以及支持功能恢复。本文的数据显示,本文所述的类固醇受体共激活剂的小分子刺激剂在MI之后促进新的血管生长并改善心脏功能。如通过代表性化合物所示,施用小分子受体共激活剂刺激剂能降低梗塞尺寸、细胞凋亡、心脏肥厚、胶原沉积,并激活心肌细胞能量通路。单细胞转录谱分析鉴定出与心脏功能改善相关的不同间质细胞类型和转录反应。本文所述的化合物代表了用于预防MI后心脏功能的早期和进行性丧失的新颖治疗选择。

[0212] 方法

[0213] 动物。所有动物研究和方案得到贝勒医学院的Institutional Animal Care and

Use Committee批准,并严格按照美国国家卫生研究院实验动物的护理和使用指南进行。成年(8-10周龄)ICR(CD1)小鼠用于所有研究。

[0214] 针对小分子刺激剂处理的血管生成测定。五至七日龄的保证无特定病原体(SPF)的受精鸡卵(自来亨鸡)用于进入绒膜尿囊膜(CAM)。使用在施加药物之前获得的图像测量CAM上的总血管面积。将浓度为 $0.6\mu\text{M}$ 的MCB-613($100\mu\text{L}$)局部施加到CAM的表面上。每天施加药物之后,每天监测CAM上的血管面积。在整个实验过程中维持媒介物对照。处理持续四天,在其结束时采用图像阈值化方法(ImageJ)来定量CAM上的总血管面积。比较对照和经处理的卵的血管面积增长百分比。每种条件下 $n=6$ 个卵。将此实验重复三次。

[0215] 用经药物处理的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)进行的血管生成测定。五至七日龄的保证SPF的受精鸡卵(自来亨鸡)用于进入绒膜尿囊膜(CAM)。用 $0.6\mu\text{M}$ MCB-613处理小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)24小时。处理后,将两百万个MEF悬浮于 $60\mu\text{L}$ 含有镁和钙的PBS和 $40\mu\text{L}$ 的Matrigel(2M/卵)(Coming Inc.;Coming,NY)中。然后通过用移液管吹吸将MEF充分混合,并转移至CAM的表面。每天监测CAM上的血管面积。在整个实验过程中维持媒介物对照。允许MEF在CAM表面上生长四天,在其结束时采用图像阈值化方法(ImageJ)来定量CAM上的总血管面积。然后比较对照和经处理的卵(MEF处理相比未处理)的血管面积增长百分比。每种条件下 $n=6$ 个卵。

[0216] 报告基因测定。将心脏成纤维细胞铺在六孔板中,并使用Lipofectamine 3000(Invitrogen;Carlsbad,CA),用GAL4反应性荧光素酶报告基因(pG5-luc)以及用于GAL4DNA结合结构域(GAL4-DBD)全长SRC-1、SRC-2或SRC-3融合构建体(pBIND-SRC-1、pBIND-SRC-2或pBIND-SRC-3)或pBIND对照的表达载体进行转染。转染后二十四(24)小时,将细胞用 $6\mu\text{M}$ MCB-613或二甲亚砜(DMSO)处理并温育过夜。将处理后的细胞裂解,并使用Promega荧光素酶测定系统(Promega Life Sciences;Madison,WI)分离总蛋白。采用Bradford测定法(Bio-Rad Laboratories;Hercules,CA)测量蛋白质浓度。测量相对光单位,并将其相对于总蛋白质浓度作归一化。

[0217] 成年小鼠的心力衰竭模型。为了在八至十周龄小鼠中诱导MI,永久结扎左前降支(LAD)动脉。简言之,用2%异氟烷麻醉小鼠,然后给小鼠插管。通过穿过第四或第五肋间隙进行开胸暴露心脏,并在LAD周围绑上8-0尼龙缝线。手术后两小时以 $20\text{mg}/\text{kg}$ 腹膜内施用MCB-613的初始剂量。随后在一天的同一时间并以相同的剂量再给予注射六天,然后在9周和16周给予重复剂量持续三天。在指定的时间点收获小鼠用于分析。

[0218] 超声心动图。通过超声心动图(VisualSonics, Vevo 2100, 40Mhz-550S探针)确定心脏功能。在横向B模式中与乳头肌对准之后,在M模式图像上测量心脏功能。图11A中心脏功能的动物编号是第0天对照(17);MCB-613(15),第1天对照(10);MCB-613(12),第14天媒介物(19);对照(19),第56天对照(12);MCB-613(15),第70天对照(8);MCB-613(10),第80天对照(8);MCB-613(11),第133天对照(3);和MCB-613(3)。

[0219] 组织学分析。将整个心脏用10%福尔马林固定,包埋在石蜡中,并以 $7\mu\text{m}$ 间隔切片。每个载玻片具有开始于顶点,在缝合结扎部位终止的三(3)至十(10)个切片(大约30-50个载玻片)。将乳头水平(papillary level)切片(载玻片20-30)用天狼猩红染色以识别纤维化区域。采用基于长度的途径确定梗塞尺寸。使用DeadEnd™荧光测定TUNEL系统(Promega, GS3250)进行TUNEL染色以检测凋亡细胞。

[0220] 电子显微镜检查。将动物处死,快速取出心脏,并直接置于冷的初级固定液(含有2%多聚甲醛+2.5%戊二醛+2mM CaCl_2 的0.1M甲次磷酸盐缓冲液,pH 7.4)中,在那里将它们按截面切片,然后在冷的初级固定液中存放四天。固定后,将组织用含0.1%鞣酸的0.1M甲次磷酸盐缓冲液染色,冲洗并用钨酸染色一小时,此后将组织在 dH_2O 中冲洗,并在乙酸铀酰水溶液中复染。再次在 dH_2O 中冲洗组织,然后在系列的梯度的乙醇(50%、70%、80%、90%、95%和100%)中脱水。经四天时间通过用逐渐增加的塑料树脂对乙醇的稀释液来缓慢地浸润组织,直至达到100%塑料。在更换了三次的100%塑料中渗透一整天后,将组织包埋在新制的Spurr低粘度树脂中,并在60°C下聚合过夜。使用Leica UC7超微切片机,用Diatome Ultra 45金刚石刀切出55-65nm的超薄切片。将切片收集在150六目铜网格栅上,并在Hitachi H7500透射电子显微镜上观察。使用AMT XR-16数码相机和AMT Image Capture, v602.600.51软件拍摄图像。

[0221] 心脏细胞的分离。在颈脱位前将小鼠置于麻醉的手术平面之下。取出心脏,并通过含1mg/mL胶原酶的无钙pH 7.4Tyrodes溶液(130mM NaCl、74.55mM KCl、0.5mM MgCl₂、0.33mM NaH_2PO_4 、0.25mM HEPES、22mM葡萄糖)的15分钟Langendorff逆行灌注分离细胞。然后将心脏从仪器中取出,并在含有15mg/mL BSA的相同Tyrodes缓冲液中细细地切碎,之后再玻璃移液管研磨。然后通过300RPM差速离心3分钟来使心肌细胞沉淀。然后将含有细胞的非心肌细胞群的上清液通过70微米过滤器过滤,并在750g下进行沉淀,然后重悬于1.1mL含有2%胎牛血清(FBS)的磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)中。然后,取出0.1mL混合物作为“无染色对照”用于荧光激活细胞分选(FACS)。将另外的1mL混合物与4 μg /mL钙黄绿素蓝和10 μM DyeCycle Ruby一起温育,并在37°C下温育10分钟。然后将细胞在600g下旋转离心,并将其重悬于含有Sytox Green(30nM)的0.5mL2%FBS/PBS中。然后使用FACS Aria ii细胞分选仪将细胞针对:Sytox Green⁻、Calcein⁺、DyeCycle Ruby⁺分选到含0.4%FBS的PBS中。然后对细胞进行沉淀,并将其重悬于100 μL 含0.4%FBS的PBS中,对细胞进行计数并使其通过10x基因组学铬系统(10x Genomics Chromium system)。

[0222] 单细胞RNA测序。将原始fastq文件导入到Cell Ranger 2.1.1(10X Genomics)中,以便进行STAR比对、数据过滤、条形码计数和UMI计数。为了识别细胞簇和差异表达的基因,用在R(3.4.3版)中实现的3.0.0版Seurat套件分析Cell Ranger结果。作为质量控制措施,将表达了<200或>5,000个独特基因的细胞或者映射到线粒体的读数>25%的细胞去除。将过滤后的数据在每个样品内进行归一化和缩放,并且野生型和经处理的样品均用Seurat的比对程序进行比对以用于综合分析。使用内置在Seurat中的Wilcoxon秩和检验识别跨越细胞类型或处理差异表达的基因。利用python中开发的自定义代码进行基因本体分析,该代码利用超几何分布来识别富集的通路(P值<0.05)。

[0223] 为了研究处理对梗塞心脏中的细胞间通讯的影响,获得人中的精选和推定的配体-受体对。对于每种细胞类型,通过应用P值<0.05以及 $\log_2\text{FC}>0.25$ 或 <-0.25 的过滤器来获得药物处理的标记。通过连接细胞类型A和B来建立细胞间通讯,其中配体在细胞类型A中差异表达,而受体在细胞类型B中差异表达。使用igraph R软件包绘制网络图。

[0224] 总RNA-Seq分析。使用trimGalore软件修整测序读数。接下来,使用HISAT针对人基因组构建UCSC mm10映射读数,并使用StringTie针对Gencode基因模型进行定量。使用R统计系统将基因表达(FPKM)分位数归一化。使用参数t检验确定肿瘤与正常样品之间差异表

达的基因, p 值 <0.05 ,且倍数变化为1.25。使用GSEA软件包进行通路富集分析;调整后的 q 值达到了显著性($q<0.25$)。使用python下的Matplotlib、NumPy和SciPy文库生成热图。

[0225] RNA分离和qPCR。使用Qiagen RNA分离试剂盒从细胞中分离总RNA。用VILO主混合试剂制备cDNA。使用具有针对Tlr7、Lcn2和18s的引物的Taqman试剂盒进行qPCR分析。

[0226] 粒细胞分离。从用对照或MCB-613处理24小时的小鼠的后腿中分离出骨髓细胞。取出后腿并置于冰冷的外加2%FBS的Hanks平衡盐溶液(HBSS)(不含Ca/Mg)中。切开骨的两端,并使用26G针用冰冷的含2%FBS的HBSS冲洗骨髓。用18G针打碎团块,并将其通过70 μ m过滤器过滤,并在4 $^{\circ}$ C下以400g离心10分钟。将沉淀悬浮于RBC裂解缓冲液(BD Biosciences Pharmigen;San Diego,CA)中,并在室温下温育两分钟。添加HBSS缓冲液(8mL),并在4 $^{\circ}$ C下以400g旋转离心10分钟。通过台盼蓝排除法计数活细胞,并使用来自Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach,德国)的小鼠嗜中性粒细胞分离试剂盒分离出骨髓粒细胞。

[0227] 流式细胞术和心脏免疫表型分析。将在MI后或假手术后24小时从经对照和MCB-613处理的小鼠中分离的心脏和脾在消化缓冲液:500 μ L DNA酶I(10mg/ml)、500 μ L胶原酶II(50mg/ml)中消化到4ml(对于大约12个脾@1x是足够的)RPMI 1640中。将细胞置于GentleMacs解离器上,在“IMPC_step2”上运行两次,并在25 $^{\circ}$ C下温育15分钟。重复“IMPC_step2”程序,并将样品在25 $^{\circ}$ C下再温育15分钟,接着进行另一轮“IMPC_step2”程序。然后,将400 μ L的4 $^{\circ}$ C终止缓冲液(1x PBS,0.1M EDTA)添加到每个样品中,并以~100g离心一秒钟,以在管的底部收集液体。通过筛网过滤帽将样品过滤到50mL锥形管中。然后将管用1mL FAC缓冲液洗涤,然后也使缓冲液通过过滤器。心脏制备物更粘稠,将其用20mL冷的过滤的生理盐水洗涤。将样品以500g离心6分钟。弃去上清液,将沉淀悬浮于1mL4 $^{\circ}$ CFACS缓冲液中。在红细胞(RBC)裂解和封闭之后,将单细胞悬液用免疫细胞板染色,并使用LSR II流式细胞仪定量。然后,对脾对照计数500,000个活事件,并记录和分析整个管的心脏细胞。

[0228] Western印迹。使用研钵和研杵装置将冷冻的整个心脏粉碎。将大约20mg粉状组织添加到300 μ L放射免疫沉淀测定(RIPA)缓冲液中,并使用组织匀浆器进行匀浆。然后将样品在4 $^{\circ}$ C旋转器平台上温育一小时,接着以12,000g离心10分钟以清除碎屑。收集上清液,并在-80 $^{\circ}$ C下储存以备将来使用。使用二喹啉甲酸测定(BCA)试剂系统确定蛋白质浓度。对于细胞裂解物,使用含10%甘油的NETN缓冲液裂解细胞并分离总蛋白。所有裂解缓冲液均补充有蛋白酶和磷酸酶抑制剂。将组织裂解物蛋白(30-50 μ g)或细胞裂解物蛋白(50-70 μ g)上样到4-15%梯度凝胶(Bio-Rad)上,并转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。使用针对SRC-1、SRC-2、SRC-3、肌动蛋白和Hsp90的抗体进行免疫印迹测定。以1:2,500的稀释度使用HRP缀合抗兔和抗小鼠二级抗体。Pierce ECL用于化学发光检测。

[0229] 管形成测定。用DMSO或6 μ M MCB-613处理心脏成纤维细胞。处理后二十四小时,通过用PBS冲洗细胞两次来洗去药物。然后将细胞用内皮细胞生长培养基调理24小时。调理后,将细胞铺在生长因子减少的基质胶(10mg/ml)上,以允许过夜形成管。第二天,将管用钙黄绿素AM染色,并使用Cytation成像系统成像。

[0230] 免疫染色。将心脏用心脏麻痹20mM KCL-PBS灌注,然后用10%中性缓冲福尔马林灌注,之后进行滴注固定,然后加工成石蜡中。然后切割切片(7微米),并置于载玻片上。通过首先移除石蜡,然后再水化切片来进行免疫荧光。此后,进行抗原修复(抗原解蔽溶液,基于Tris,Vector Labs目录号H-3301;Vector Labs,Burlingame,CA)。将切片用0.1%

tween20-PBS透化,用含10%驴血清的1% tween20-PBS封闭,并随后与封闭溶液中的一级抗体(1:200兔抗溶菌酶,abcam目录号AB108508;Abcam, Cambridge, 英国)、接着与二级抗体(1:200驴抗兔, Alexa 647, Thermo Fisher Scientific目录号31573; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)、然后与罗丹明缀合的WGA(1:250 Vector Labs目录号RL-1022)和DAPI(1:500 Thermo Fisher Scientific目录号62248)一起温育。在Zeiss LSM780共焦显微镜上拍摄图像。从跨越左前降支冠状动脉闭塞手术下方的左心室的整个心肌的随机图像中手动计数LYZ+细胞。 $n=3$ 颗心脏/组, $>10\text{mm}^2$ 成像/心脏, MI手术后24小时。

[0231] RER、 VO_2 和 VCO_2 测量。采用渐进式最大运动测试通过间接量热法来测量RER、 VO_2 和 VCO_2 ,直到小鼠达到精疲力尽。

[0232] 结果

[0233] MCB-613刺激血管生成。研究了MCB-613对血管生成和基质反应的影响,特别是在成体心脏成纤维细胞中对血管生成和基质反应的影响。SRC-1、2和3蛋白在分离自10周龄小鼠的成体心脏成纤维细胞中表达(图10A)。用GAL4DNA结合结构域-SRC-1、2和3融合蛋白的表达载体和GAL4反应性荧光素酶报告基因转染心脏成纤维细胞,以测量MCB-613处理后的SRC激活(图10B)。响应于MCB-613, SRC-3活性被诱导的程度大于SRC-1和SRC-2,表明MCB-613优先刺激心脏成纤维细胞中的SRC-3活性。在功能上, MCB-613在体外刺激成体心脏成纤维细胞中的管形成(图10C)。为了研究MCB-613在体内对血管生成的刺激,进行鸡卵血管生成测定(图10D)。MCB-613对鸡卵的直接施用刺激了体内血管生成。另外,用MCB-613预刺激的小鼠胚胎成纤维细胞的引入有可能以细胞非自主方式促进了稳健的血管生成。不受理论的束缚,这些发现表明MCB-613的血管生成刺激可通过多种机制发生。

[0234] 为了确定MCB-613是否改善缺血诱导的心肌损伤后的恢复,在由左前降支冠状动脉的永久性手术结扎诱导的心肌损伤之后两小时对小鼠施用MCB-613或媒介物对照。在MI后三天,在梗塞边界区观察到血管生成增加,表明MCB-613促进损伤组织中的血管生成,并恢复血管疾病环境中的血流量(图10E)。

[0235] MCB-613预防MI后心脏功能的丧失。小鼠左前颈动脉的手术结扎是测试心血管治疗干预的常用临床前MI模型。为了探索SRC刺激对早期和晚期梗塞后心脏功能和重塑的作用,用MCB-613或媒介物对照处理接受MI的小鼠。在MI手术后两小时以及在另外6天每隔24小时通过腹膜内注射给予小鼠20mg/kg MCB-613或对照媒介物(图11A)。在手术之前、手术后24小时以及2、8、12和19周通过超声心动图测量MI后心脏功能的早期和进行性丧失。在MI后24小时,经对照处理的动物中的射血分数降低至平均30%。相比之下,在MI后两小时用MCB-613处理的小鼠的平均射血分数为43%,表明MCB-613预防了早期射血分数的降低,并对易损心肌提供了早期保护(图11B)。经对照处理的小鼠中的射血分数在24小时后进一步降低,并且在MI后19周最低,这表明心脏功能随时间推移进行性丧失。相比之下,在施用MCB-613之后,从MI后24小时直到MI后19周的射血分数维持在40%以上,表明MCB-613的早期心肌保护作用能预防心脏功能的进行性丧失。在8周和16周给予三天重复注射没有改变射血分数,表明MCB-613在稍后的时间点对心脏功能没有进一步的影响。MI后的长达19周的心脏功能维持表明短期的早期干预可有效地预防MI后的充血性心力衰竭。心脏重量分析显示, MCB-613在MI后12周减弱了MI诱导的心脏肥厚补偿反应(图11C),表明保护心脏功能与预防心力衰竭的另一关键特征相关。然后采用心脏正电子发射断层扫描(PET)成像对心肌

生存力进行空间评估。梗塞区中¹⁸F-FDG摄取的改善表明,MCB-613在MI后2周保护健康心肌(图11D)。将心脏组织切片用天狼猩红染色,以评估梗塞尺寸和纤维化程度(图11E)。与来自经MCB-613处理的小鼠的心脏(3%、14%、20%和22%)相比,MI后12周测量的梗塞尺寸在经对照处理的心脏(31%和44%)中更大。此外,心肌细胞更小并且与梗塞边界区中纤维化较少相关,这证明了MCB-613能预防进行性心力衰竭的两个另外的关键分子特征(图11E)。心脏代谢功能障碍是心力衰竭的常见特征。SRC协调包括骨骼肌和心肌在内的组织中的不同代谢需求。执行采用运动的间接量热法以确定与作为对照的无MI的年龄匹配小鼠相比,MCB-613对MI后三周的能量消耗的影响(图12)。在MI后三周,经MCB-613处理的动物中VCO₂和VO₂升高,表明MCB-613可改善MI后小鼠运动期间的能量利用。因此,心脏功能改善与能量消耗改善相关。MI后72小时心脏的电子显微照片显示,MCB-613可预防肌原纤维结构混乱和异常线粒体嵴架构,表明MCB-613可保护心肌和线粒体免受MI诱导的损伤(图11F)。支持早期心肌保护的是,MCB-613可预防MI后24小时的细胞凋亡(图11G)。这些发现表明,MCB-613具有直接保护功能性心肌并预防心脏组织的有害重塑的作用。

[0236] MCB-613预防心肌细胞损伤反应。为了深入了解与心肌重塑减轻和心脏功能改善相关的心肌细胞和非心肌细胞特异性MCB-613转录功能,在MI后12周对从经对照处理和MCB-613处理的小鼠中纯化的心脏细胞进行转录组谱分析(图13A)。心肌细胞的差异基因表达分析表明,122个上调基因和107个下调基因与MI后12周心脏功能改善相关(图13B)。差异表达基因的基因集富集分析显示,代表氧化磷酸化和脂肪形成以及细胞凋亡和炎症反应的抑制的基因本体论类别(gene ontology categories)表现出很强的富集(图13C),这为MCB-613除了预防与心肌细胞损伤相关的信号传导之外还改善心脏能量利用提供了进一步的支持。

[0237] MCB-613减少炎症巨噬细胞。在MI后12周进行单细胞转录组谱分析,以识别与经MCB-613处理的小鼠中的心脏功能改善相关的细胞类型和细胞类型特异性信号传导反应。在Langendorff灌注之后,由整个心脏制备非心肌细胞的有代谢活性的能存活的单细胞悬液(图13A)。执行最小限度的程序操作,以预防细胞类型的损失并使对转录活性的影响最小化。使用10x平台通过Seurat分析来分析通过RNA质量控制的两只经生理盐水处理的小鼠的21,894个细胞和两只经MCB-613处理的小鼠的21,474个细胞的转录谱。基于细胞表达模式、无监督聚类和采用Seurat软件分析的降维分析识别了十五个不同的细胞簇(图13D)。簇大小在从101至6,085个细胞的范围内。基于已知的小鼠心脏细胞类型标志物确认细胞群(图13E)。巨噬细胞占分析的总细胞的42%,是MI后12周的主要非心肌细胞细胞群,这与正常成年小鼠心脏不同,后者中非心肌细胞仅由10%的造血源性细胞组成。细胞数量的最大变化的评估表明,在来自经MCB-613处理的小鼠的心脏中,巨噬细胞簇1和B淋巴细胞数量减少,而心外膜细胞、NK/T淋巴细胞、成纤维细胞和内皮细胞(包括含淋巴细胞)的细胞数量增加(图13F)。心脏巨噬细胞、成纤维细胞和内皮细胞群显示出转录异质性,并且分别由四个、三个和两个子簇组成。对心脏成纤维细胞中的独特基因标记的评估揭示了存在表达Postn的损伤反应性成纤维细胞群(成纤维细胞簇2),并且支持最近报道的重塑心脏中的“稳态成纤维细胞”的是,簇3中的成纤维细胞独特地表达Comp(图14A)。在成纤维细胞簇1中独特富集的基因表明存在参与促进血管生成(Bmp4、Ecm1、Cc111、Pgf)和细胞外基质组织(Ecm2和Pdgfra)的分泌功能的成纤维细胞亚群。内皮细胞转录标记指示存在3个亚群。与内皮簇1相

比,内皮簇2和淋巴管内皮细胞分别表现出218和308个独特基因的转录激活增加,表明了MI后12周的心脏维持中发挥着不同的作用(图14B)。淋巴管内皮簇由淋巴管内皮基因Prox1和Lyve1的独特表达界定。除了增加的细胞数量之外,促血管生成调控子Hif1a和Lrg1以及淋巴管生成调控子Cc1121a的并行表达也表明MCB-613在MI后12周刺激淋巴管生成。由早期心脏基因Mk12、Tek和Hand2的独特表达界定的内皮簇2中的基因表达标记指示转录回复至更原始的细胞状态,这可能是由损伤应激反应所致。不受理论的束缚,最大的内皮簇(即内皮簇1)代表以少量独特基因和不存在任何相关G0期或信号传导通路为特征的内源性稳态内皮细胞。四个巨噬细胞亚簇的转录标记是明显可分离的(图14C)。巨噬细胞簇1是巨噬细胞的亚群,并且由炎症基因标记的表达来界定,所述炎症基因标记包括与这些基因在解决心肌炎症中的作用相容的Cc18、Cc124和Ly96。簇2代表Ccr2+单核细胞来源的巨噬细胞群,其响应于损伤表达已知为来源于骨髓的短寿浸润性巨噬细胞的炎症基因Cxc11、Ccr2、Ccr5和Tlr2。相比之下,簇3中的巨噬细胞独特地表达110个细胞周期增殖基因,表明存在增殖性Ccr2-巨噬细胞小群,已知其是通过在组织修复和肌生成中起作用的局部增殖来维持的。根据参与吞噬激活的基因(包括Cd209和Coro1a)的表达识别出簇4中的巨噬细胞,表明MI后12周存在吞噬性巨噬细胞的小群。意外的是,与改善的心脏功能维持相关的细胞群数量的相当小的变化表明,MCB-613心脏保护有可能反而是细胞功能变化的结果。

[0238] MCB-613促进有益的旁分泌信号传导。为了确定MI后12周与MCB-613介导的心脏功能改善相关的间质细胞类型功能反应,比较来自经对照处理的小鼠和经MCB-613处理的小鼠的非心肌细胞中的转录组谱(图15A)。细胞群转录反应的大差异表明MCB-613选择性细胞反应有助于心脏功能改善。由淋巴管细胞群和免疫细胞群组成的较小细胞群经历了最大的药物诱导的转录组变化。为了识别有助于心脏功能改善的潜在间质细胞信号传导相互作用,计算与来自经MCB-613处理的小鼠的心脏相比对照心脏中的每种细胞的配体与受体之间的相互作用数目(图15B)。最高频率的相互作用发生在来自每个成纤维细胞群、一种巨噬细胞亚型与向粒细胞受体传播的内皮/SMC群的配体之间。这种间质细胞向粒细胞的信号传导的模式暗示了在MI后12周的MCB-613心脏保护反应中粒细胞功能的广泛旁分泌调控。配体-受体配对表明了组织构架和抗炎性信号传导通路(包括MMP9-LRP1、HSP90B1-TLR7和SERPINE1-TAUR)的协调调控(图15C)。支持这一点的是,对粒细胞中上调和下调基因标记的基因集富集分析表明,MCB-613抑制炎症粒细胞功能(图14D)。与对照相比,来自经MCB-613处理的小鼠的心脏粒细胞中最高上调和下调的基因显示,参与先天防御的颗粒的表达增加,且参与炎症信号传导的细胞因子、酶和趋化因子减少(图15D)。这些发现表明,对MCB-613的心肌反应的特征在于持续的旁分泌抗炎性信号传导模式(landscape),其是心脏功能改善的基础。

[0239] 由于在损伤之时施用MCB-613导致在24小时的立即反应(图11B和图11E),因此测量在MI后24小时MCB-613对免疫细胞的影响。MI后24小时通过FACS分析从整个心脏中分离的单个细胞的免疫表型,以定量免疫细胞的组成。与在MI后12周观察到的类似,与对照相比,在来自经MCB-613处理的小鼠的心脏中B细胞显著减少、单核细胞具有减少的趋势,而粒细胞的分数没有变化(图16A)。然后测量到MI后12周由于旁分泌信号传导的存在而导致的急性粒细胞对MCB-613的转录反应和粒细胞中的稳健转录反应。粒细胞是在急性缺血性损伤后第一个到达心肌的先天免疫细胞,并且是由急性心脏病发作触发的炎症反应的程度和

对心肌导致的损伤的关键介体。由于难以从小鼠心脏中分离出足够量未受损的粒细胞,因此为了研究粒细胞反应,分离出骨髓粒细胞,其反映MI后24小时的心肌粒细胞反应。与粒细胞耗乏的骨髓相比,粒细胞中粒细胞标志物S100A9的mRNA表达升高指示粒细胞的成功分离(图16B)。Tlr7和Lcn2在来自用MCB-613处理的小鼠的粒细胞中的表达的增加支持单细胞转录组分析,并且揭示粒细胞功能的调节可能有助于对MCB-613的急性心肌反应。为了控制在不存在MI的情况下由于手术程序引起组织创伤而导致MCB-613调控骨髓粒细胞中的Tlr7或Lcn2的可能性,在假手术之后24小时从小鼠中分离出粒细胞,并施用对照媒介物或MCB-613。没有观察到细胞数量或基因表达的变化,表明粒细胞基因表达变化是MCB-613介导的心肌损伤反应的结果。MCB-613在粒细胞中诱导强转录组反应,这表明嗜中性粒细胞颗粒可调节化合物的MI后炎性效应。支持这一点的是,在MI后24小时,与对照动物相比,LYZ1颗粒表达在经MCB-613处理的小鼠的心肌中显著增加(图16C)。

[0240] 实施例4: MCB-613、化合物10-1和化合物10-2的药代动力学(PK)研究

[0241] 在CD-1小鼠中测试MCB-613、化合物10-1和化合物10-2的药代动力学。将这三种化合物中的每一者溶解在DMSO(20mg/mL)中,以1:9比率与30%羟丙基- β -环糊精混合,并通过管饲法腹膜内(ip)或口服(po)施用给CD-1小鼠。在施用化合物后,在九个时间点,即在5分钟、0.25小时、0.5小时、1小时、2小时、4小时、8小时、12小时和24小时通过尾静脉收集血液样品(每种化合物3只小鼠)。从这些血液样品中分离出血浆,并通过HPLC-MS/MS确定化合物血浆浓度。如在Zhang等人,Computer Methods and Programs in Biomedicine,99:306-314(2010)中所述的那样,使用PKSolver程序(用于分析药代动力学和药效动力学数据分析的附加程序)计算药代动力学参数。结果汇总于表1和2中,并且包括半衰期($t_{1/2}$)、终末期半衰期(终末期 $t_{1/2}$)、施用化合物后达到最大浓度的时间(t_{max})、观察到的化合物的最大浓度(C_{max})、直到最后可测量浓度的曲线下面积(AUC_{0-t})、到无限时间的曲线下面积(AUC_{0-inf})和化合物的清除率(Cl)。

[0242] 表1含有来自上述研究的药代动力学数据,在该研究中MCB-613、化合物10-1和化合物10-2是腹膜内施用给CD-1小鼠的。

[0243] 表1

[0244]

	MCB-613	10-1	10-2
$t_{1/2}$ (h)	0.86	0.64	0.25
终末期 $t_{1/2}$ (h)	6.5	18.1	15.9
t_{max} (h)	0.08	0.25	0.08
C_{max} (ng/mL)	49.2	356.7	463.3
AUC_{0-t} (ng/mL*h)	122.2	622.6	333.8
AUC_{0-inf} (ng/mL*h)	129.6	851.1	481.5
Cl (mg)/(ng/mL)/h	6.4	0.97	1.7

[0245] 表2含有来自上述研究的药代动力学数据,在该研究中MCB-613、化合物10-1和化合物10-2是通过口服施用给CD-1小鼠的。

[0246] 表2

[0247]

	MCB-613	10-1	10-2
$t_{1/2}$ (h)	0.94	1.2	0.78

终末期 $t_{1/2}$ (h)	16.1	10.2	27.1
t_{max} (h)	0.25	0.5	0.25
C_{max} (ng/mL)	5.6	53.2	181.9
AUC_{0-t} (ng/mL*h)	15.7	98.4	131.1
AUC_{0-inf} (ng/mL*h)	24.3	112.6	134.6
Cl (mg) / (ng/mL) /h	34	7.3	6.1

[0248] 药代动力学数据也示于图17中。图17中的图表示出随时间的推移测得的平均血浆浓度。上排图表示来自上述研究的药代动力学数据,在该研究中MCB-613(左上曲线)、化合物10-1(中上曲线)和化合物10-2(右上曲线)是腹膜内施用给CD-1小鼠的。下排图表示来自上述研究的药代动力学数据,在该研究中MCB-613(左下曲线)、化合物10-1(中下曲线)和化合物10-2(右下曲线)是口服施用给CD-1小鼠的。

[0249] 所附权利要求书的化合物和方法在范围上不受本文描述的具体化合物和方法的限制,本文描述的具体化合物和方法旨在举例说明权利要求书的几个方面,并且在功能上等价的任何化合物和方法都在本公开的范围之内。除了本文所示出和描述的那些之外的化合物和方法的各种修改旨在落入所附权利要求书的范围之内。进一步地,虽然仅具体描述了这些化合物和方法中的某些代表性化合物、方法和方面,但其它化合物和方法旨在落入所附权利要求书的范围之内。因此,本文可以明确提到步骤、要素、组分或成分的组合;然而,步骤、要素、组分和成分的所有其它组合即使没有被明确地陈述也是包括在内的。

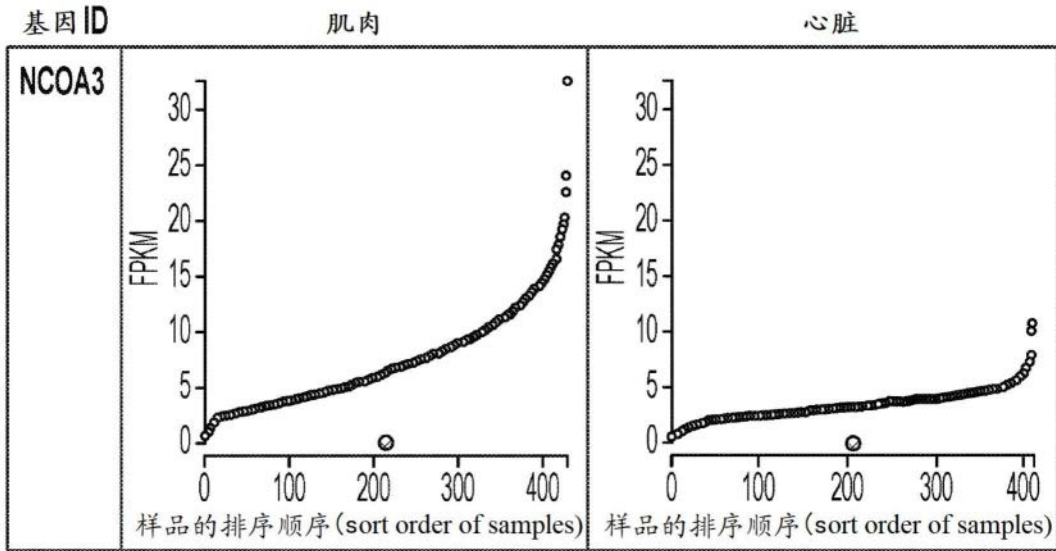


图1

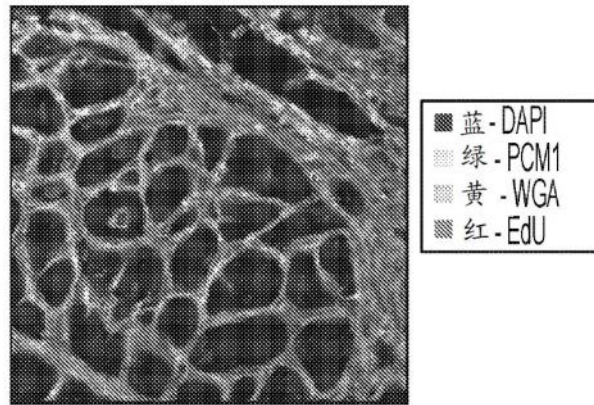


图2

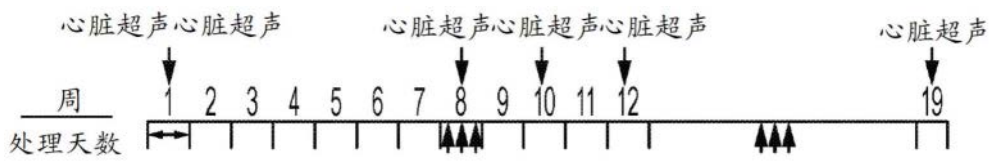


图3A

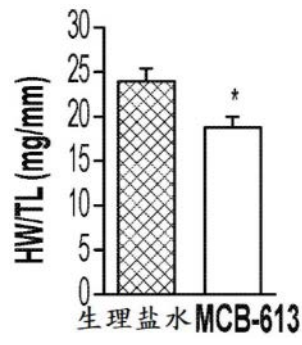


图3B

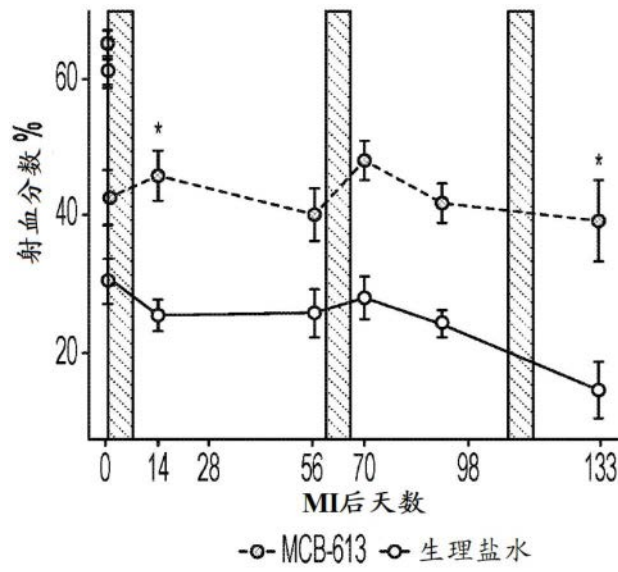


图3C

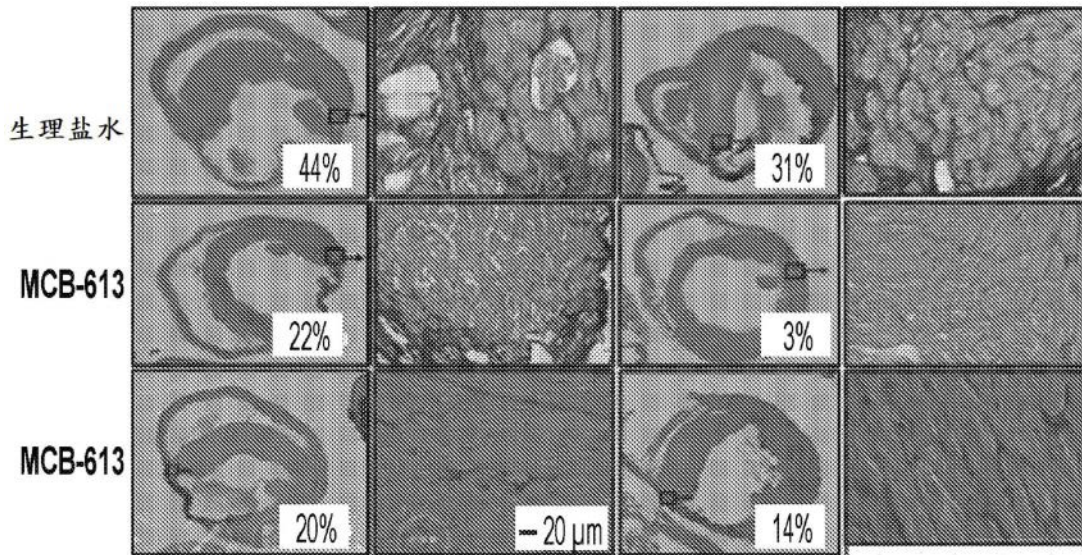
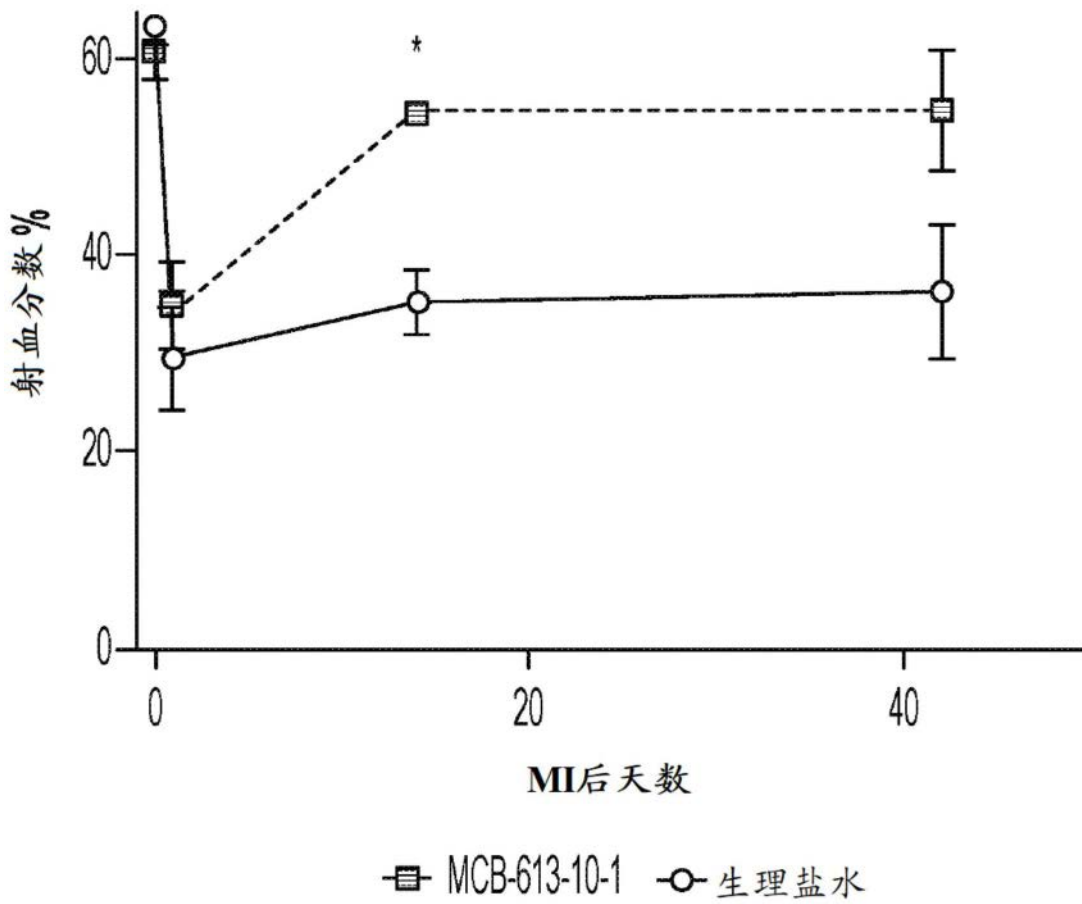


图3D



MI后天数

▣ MCB-613-10-1 ○ 生理盐水

图4

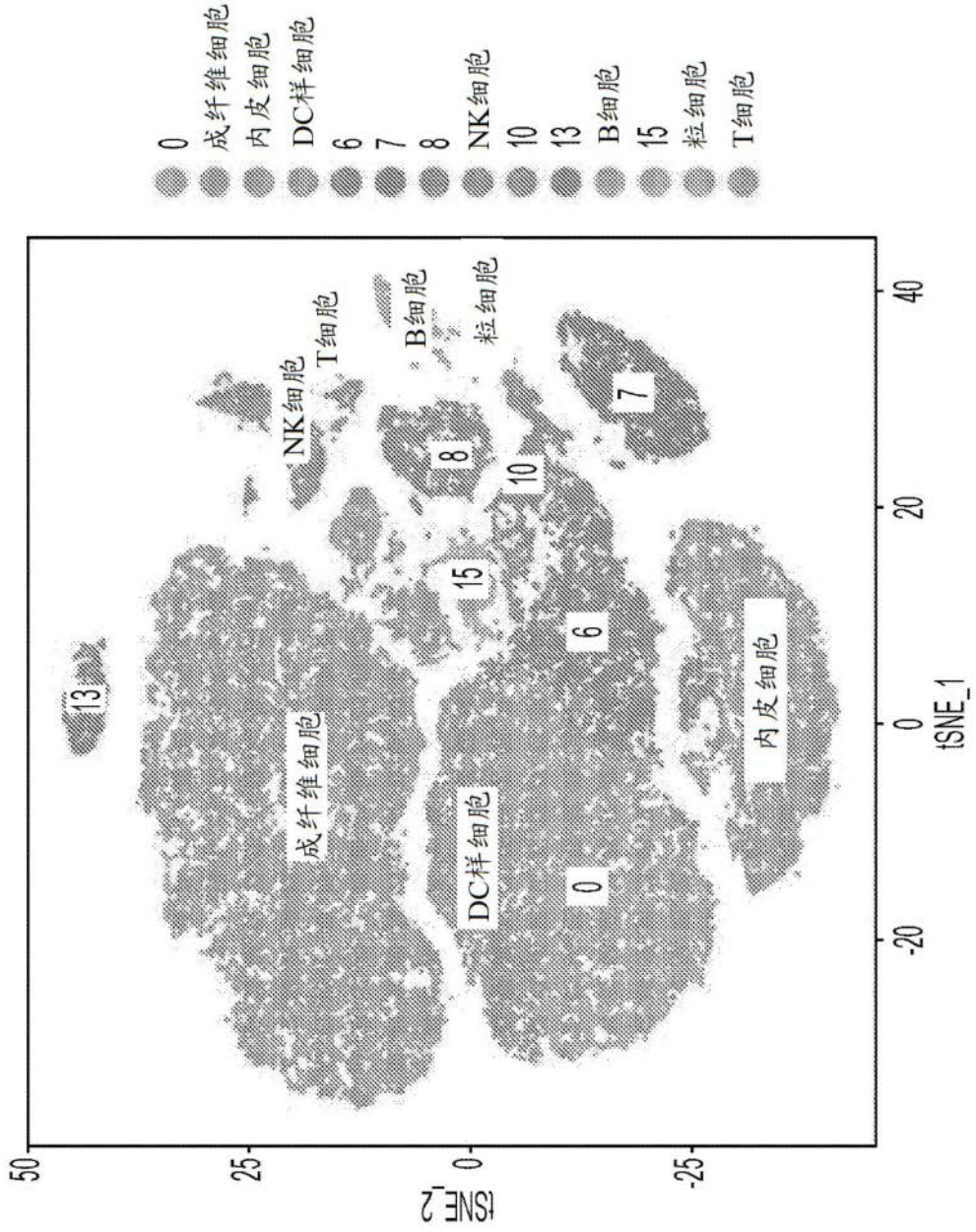


图5A

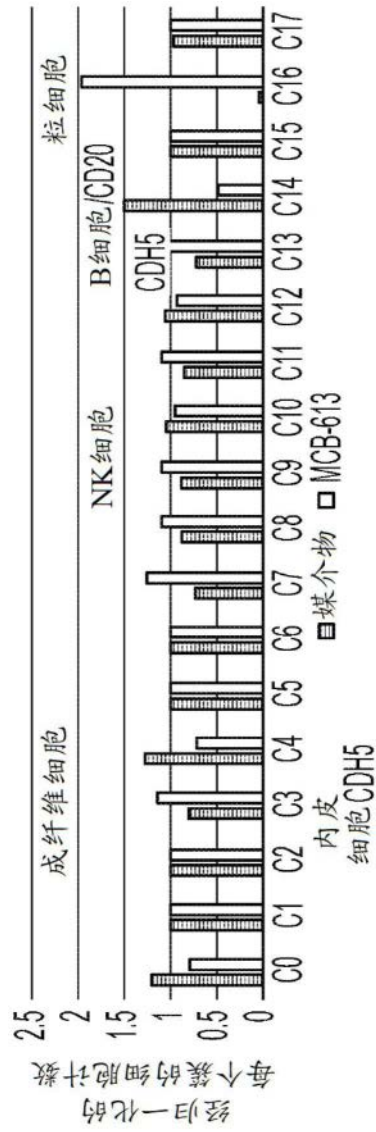


图5B

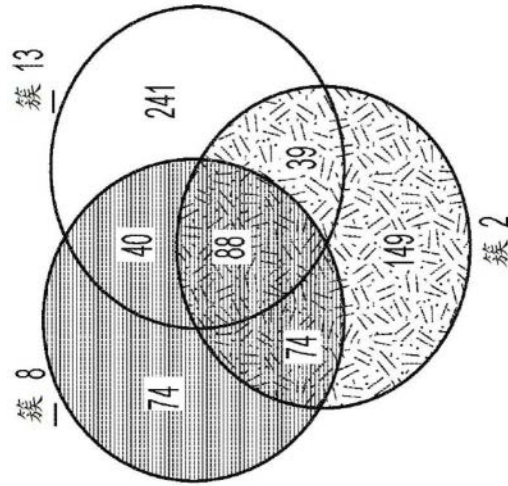


图5C

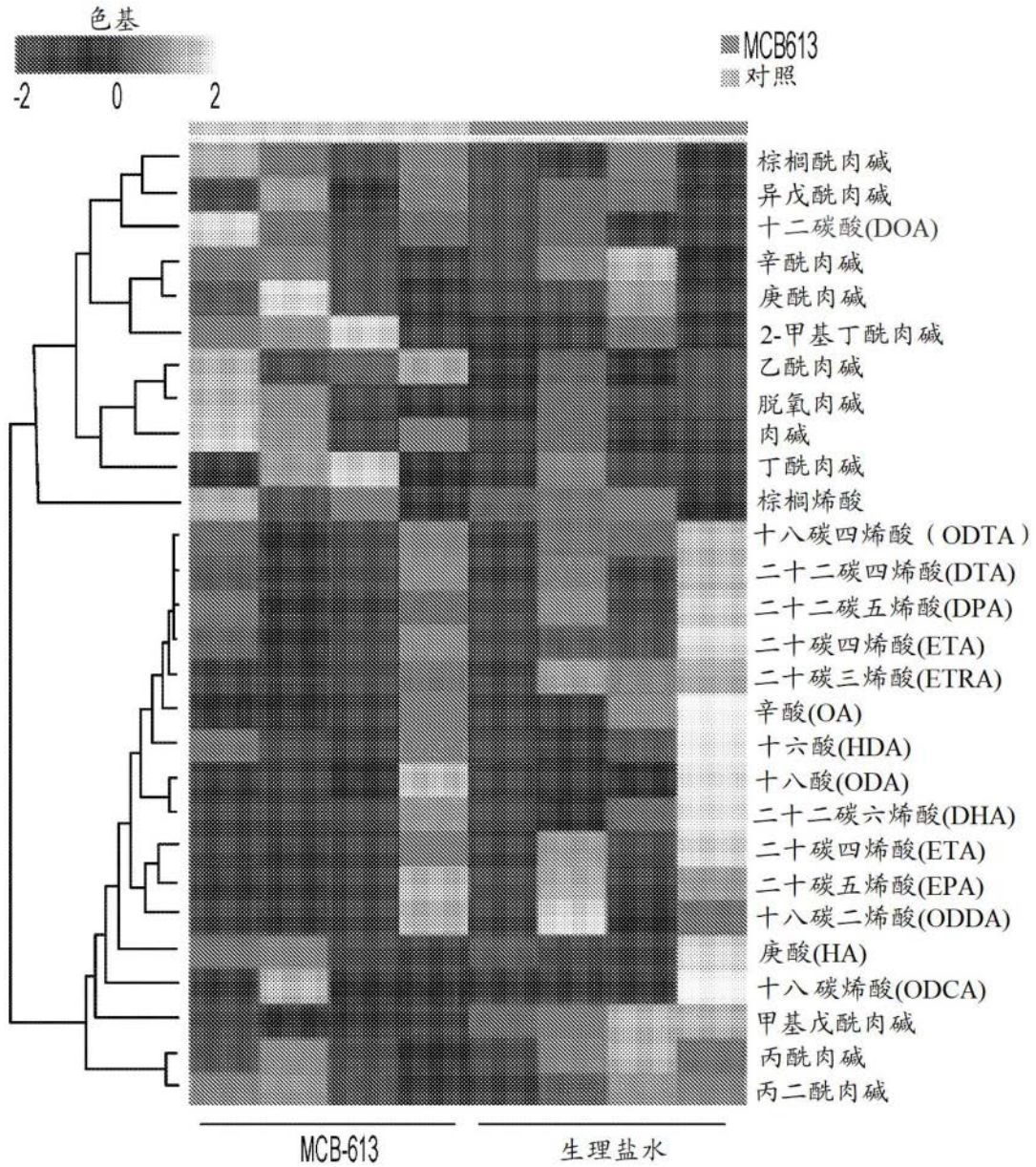


图6A

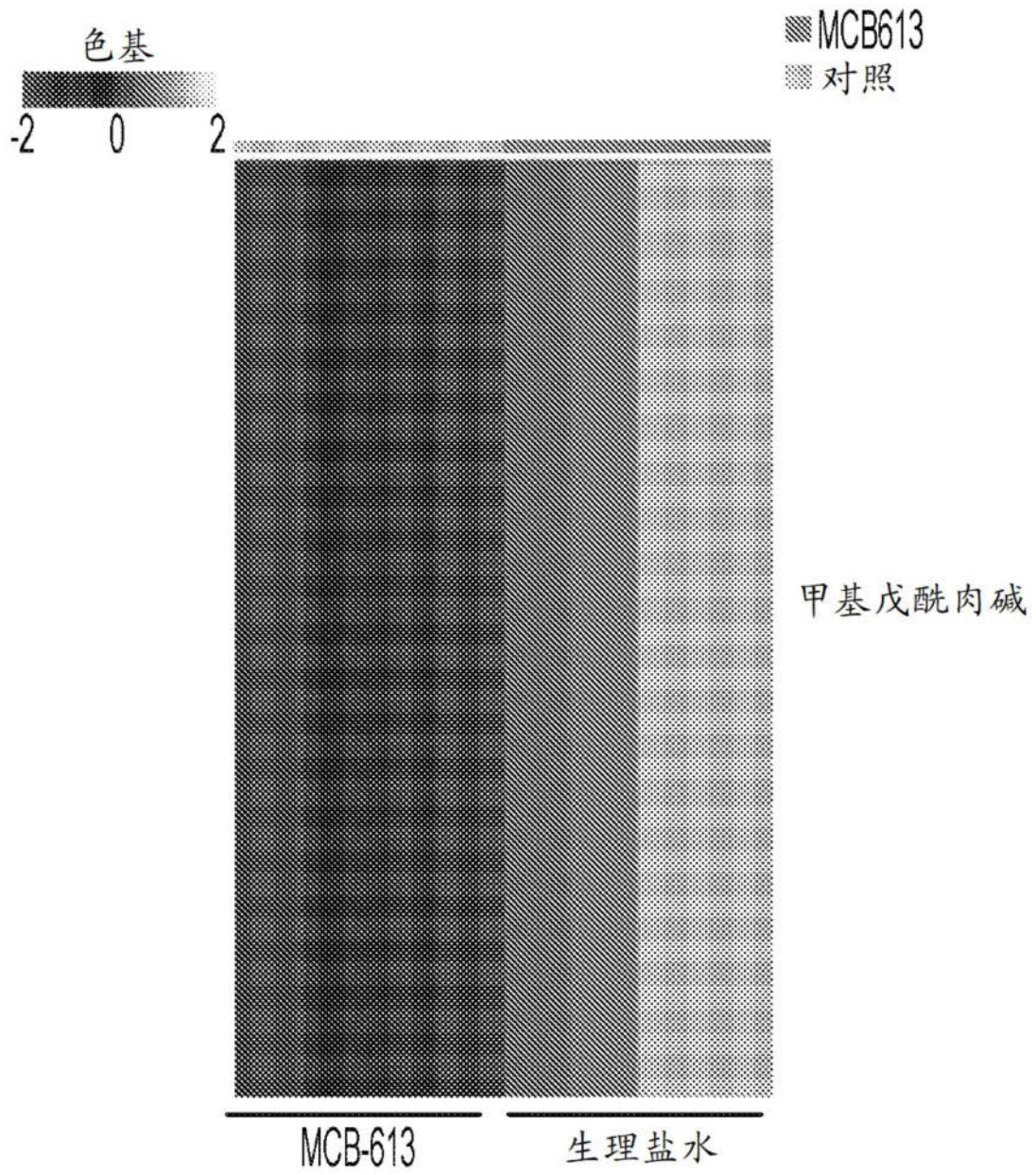


图6B

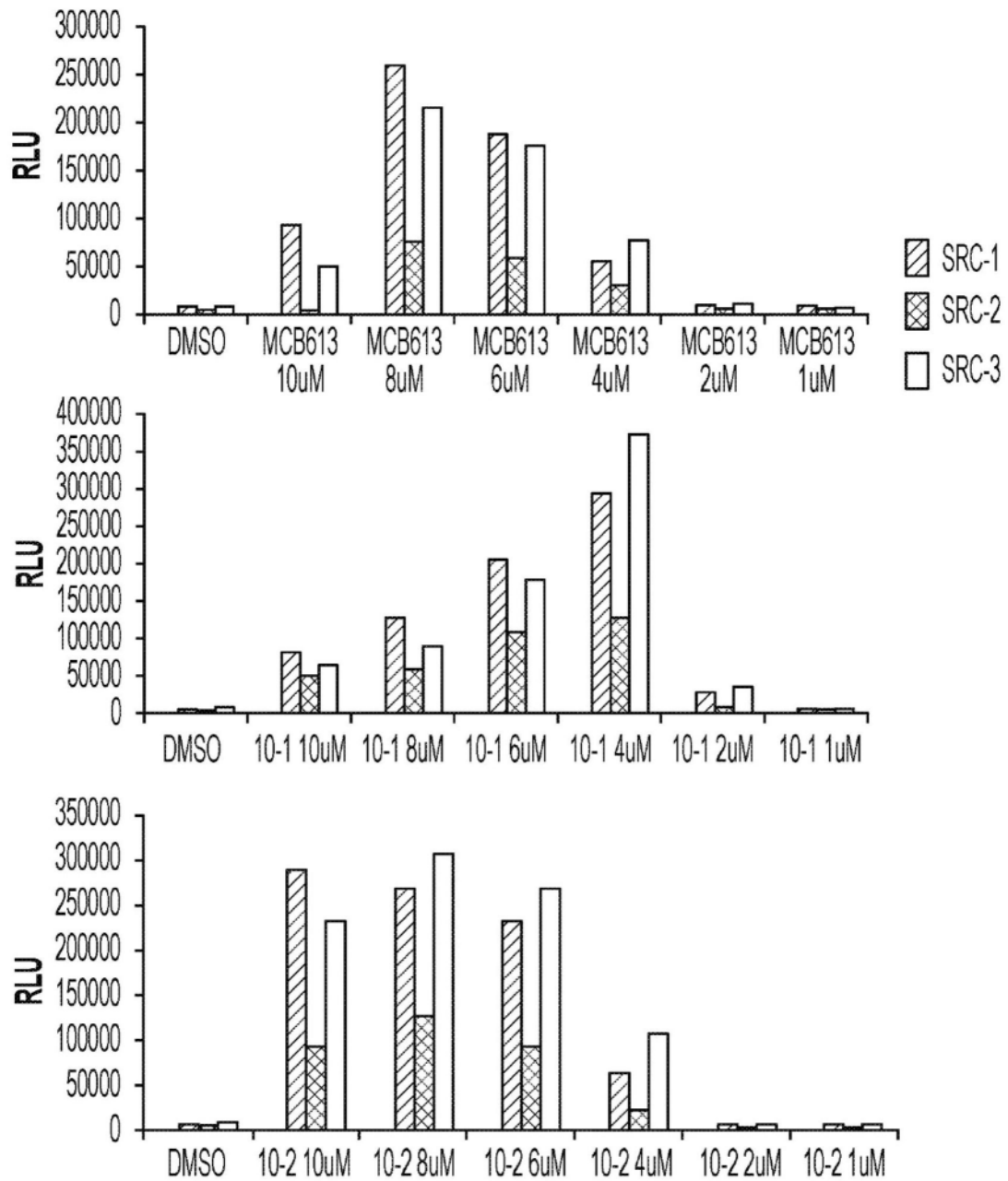


图7

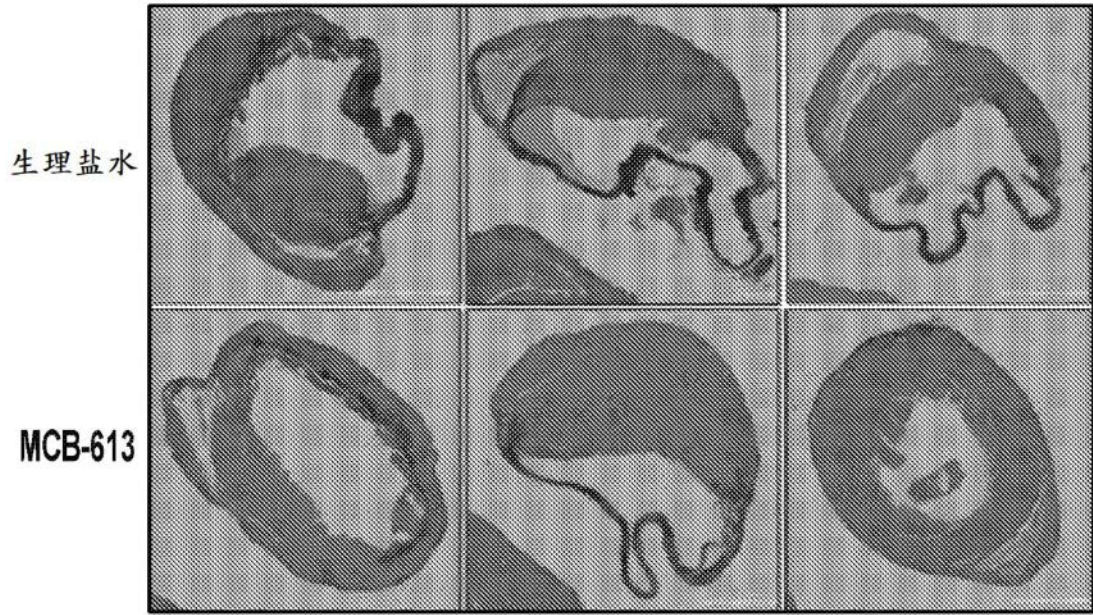


图8

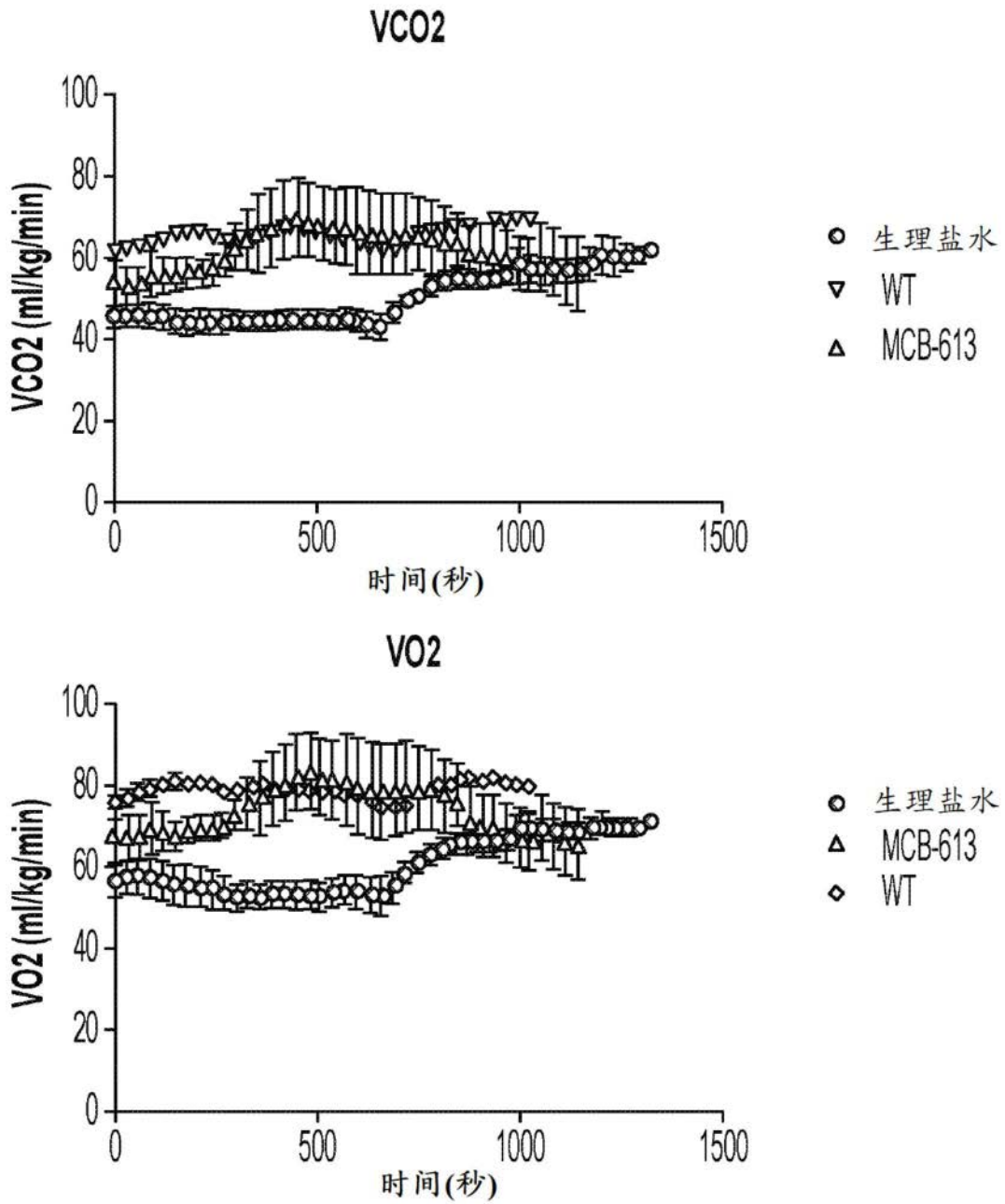


图9

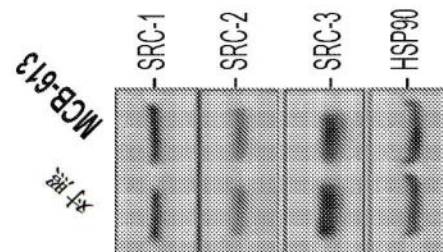


图10A

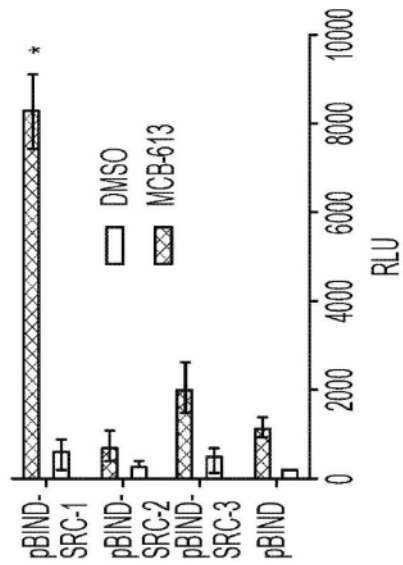


图10B

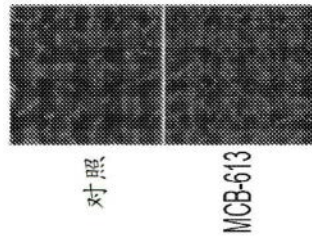


图10C

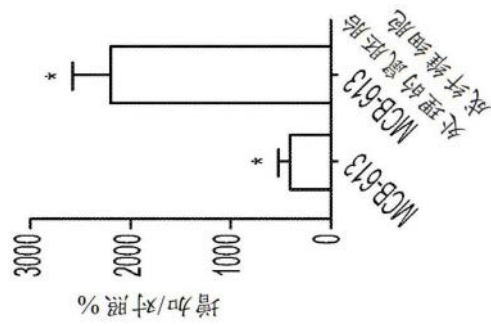


图10D

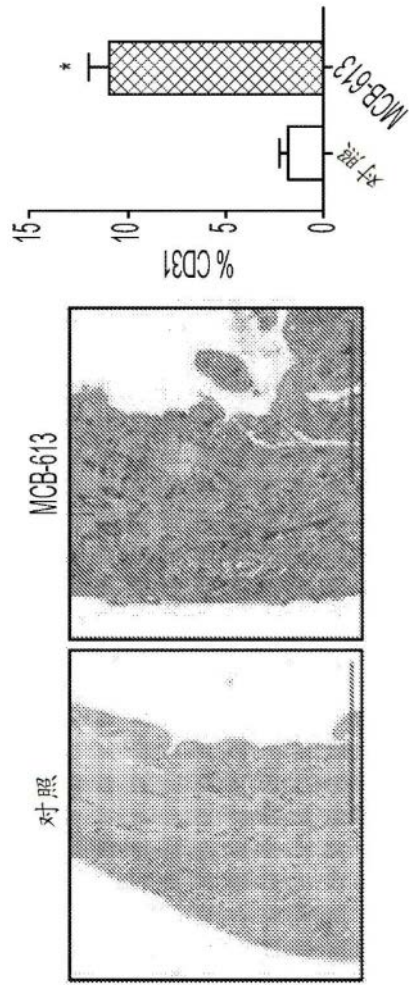


图10E

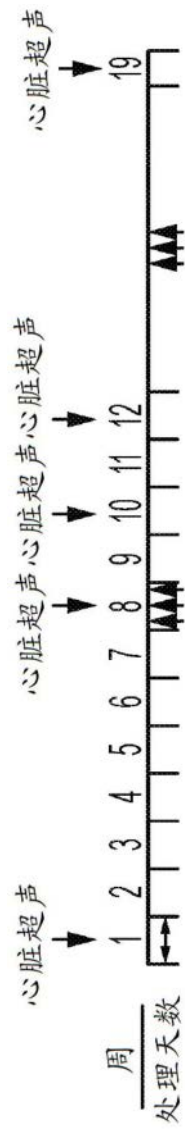


图11A

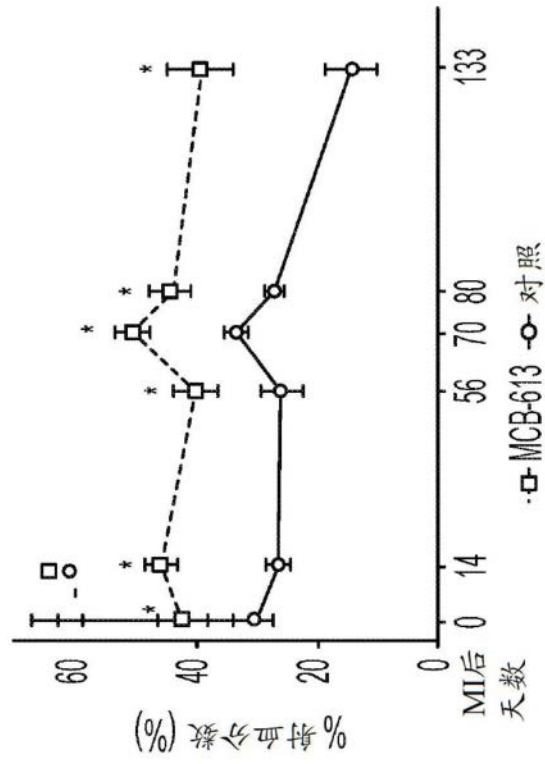


图11B

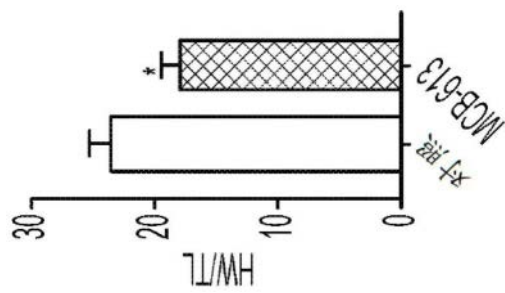


图11C

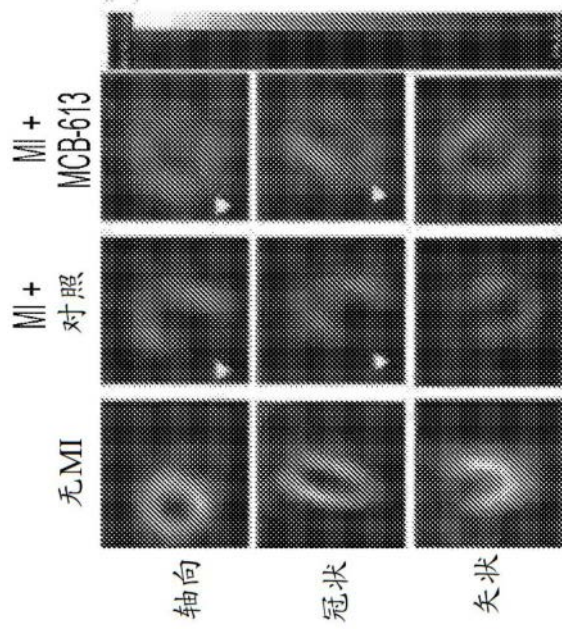


图11D

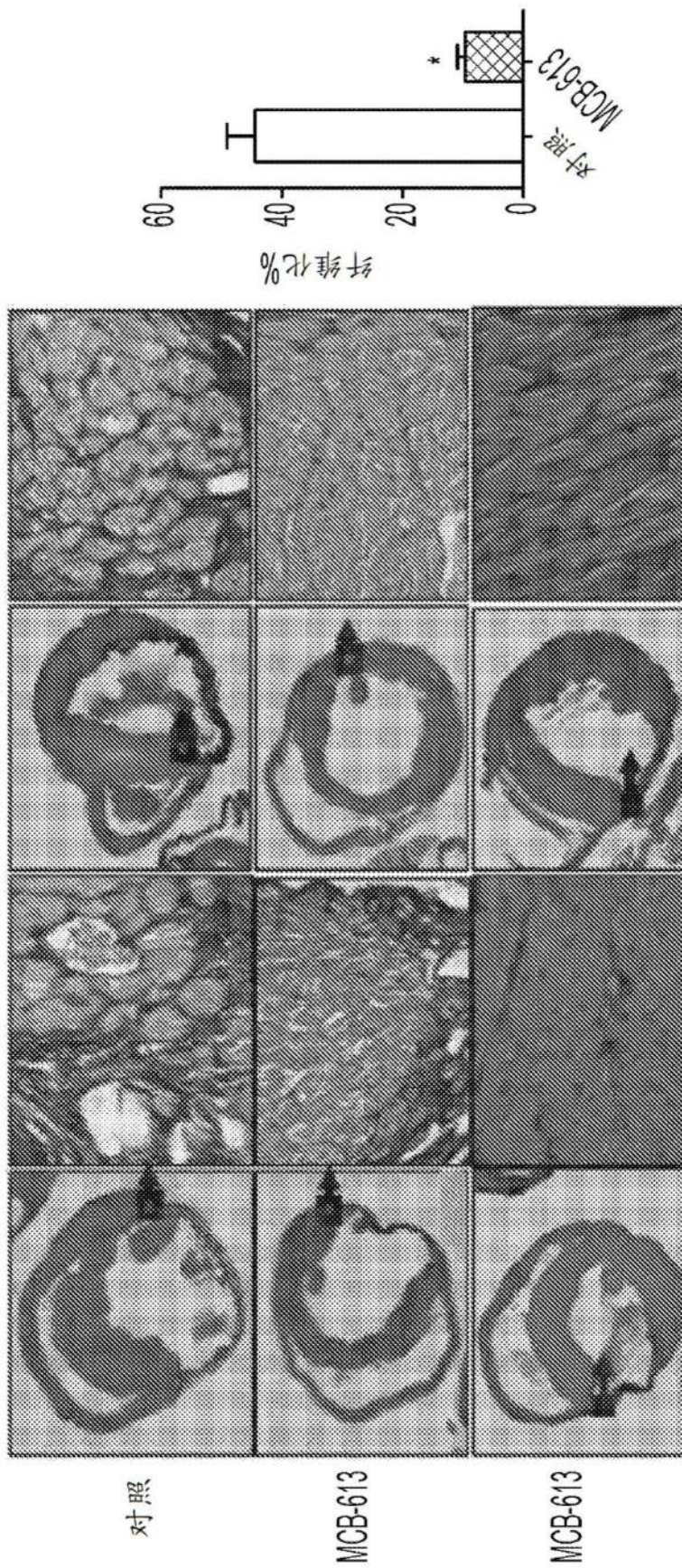


图11E

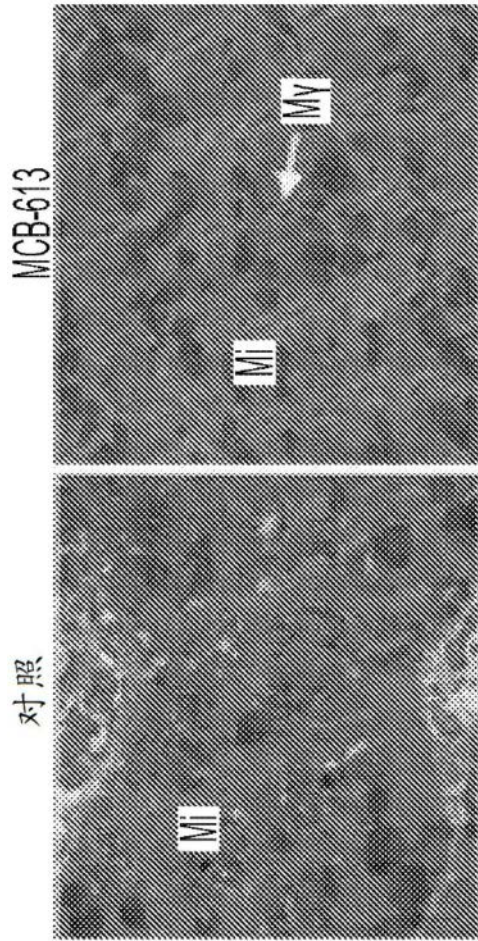


图11F

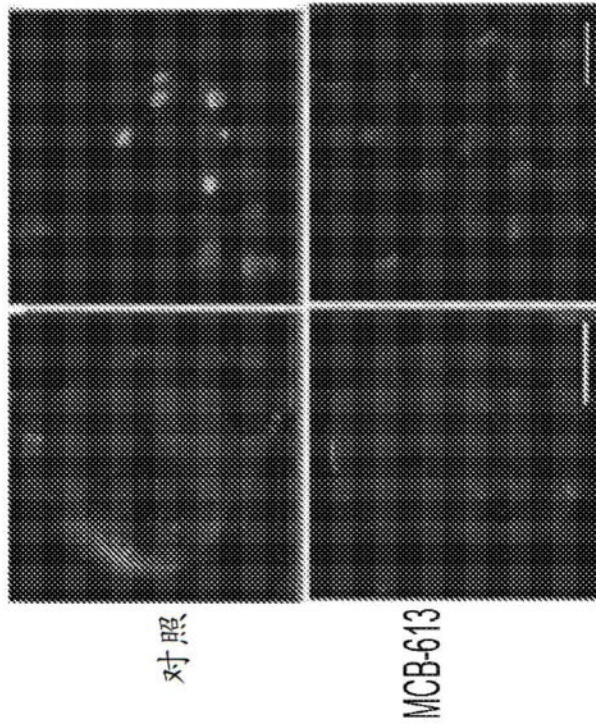


图11G

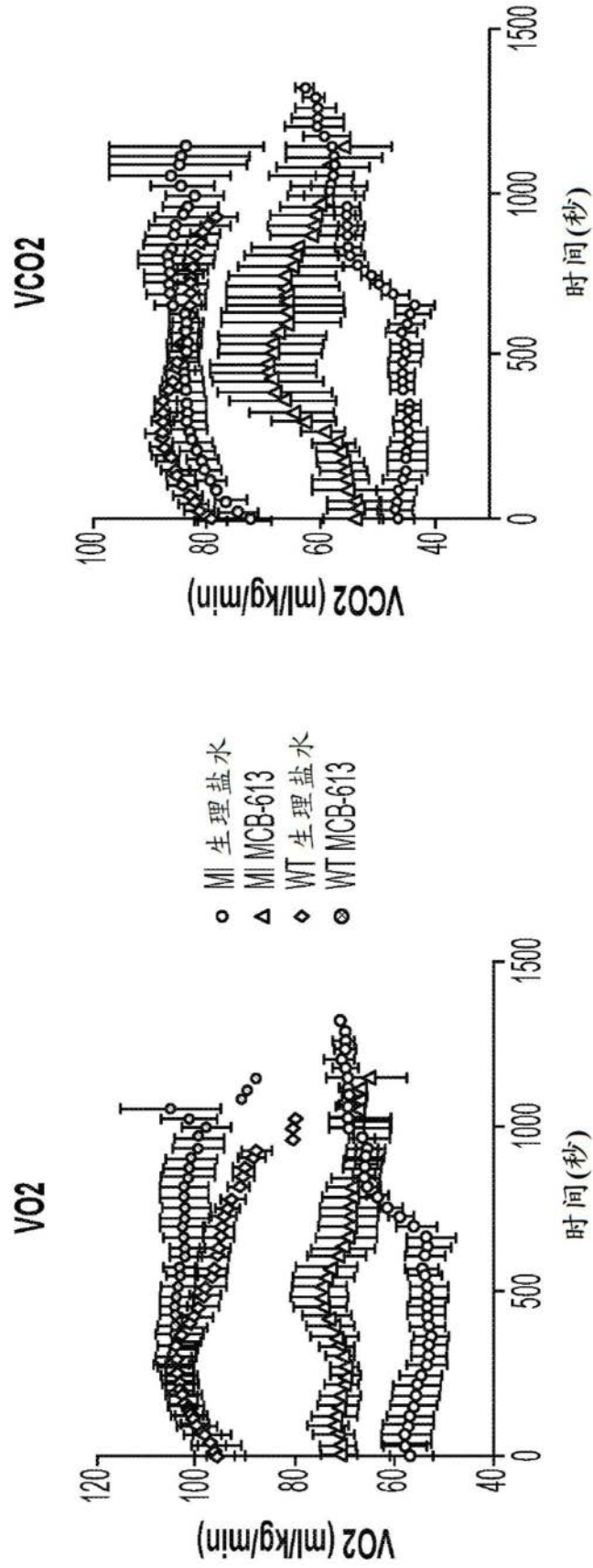


图12

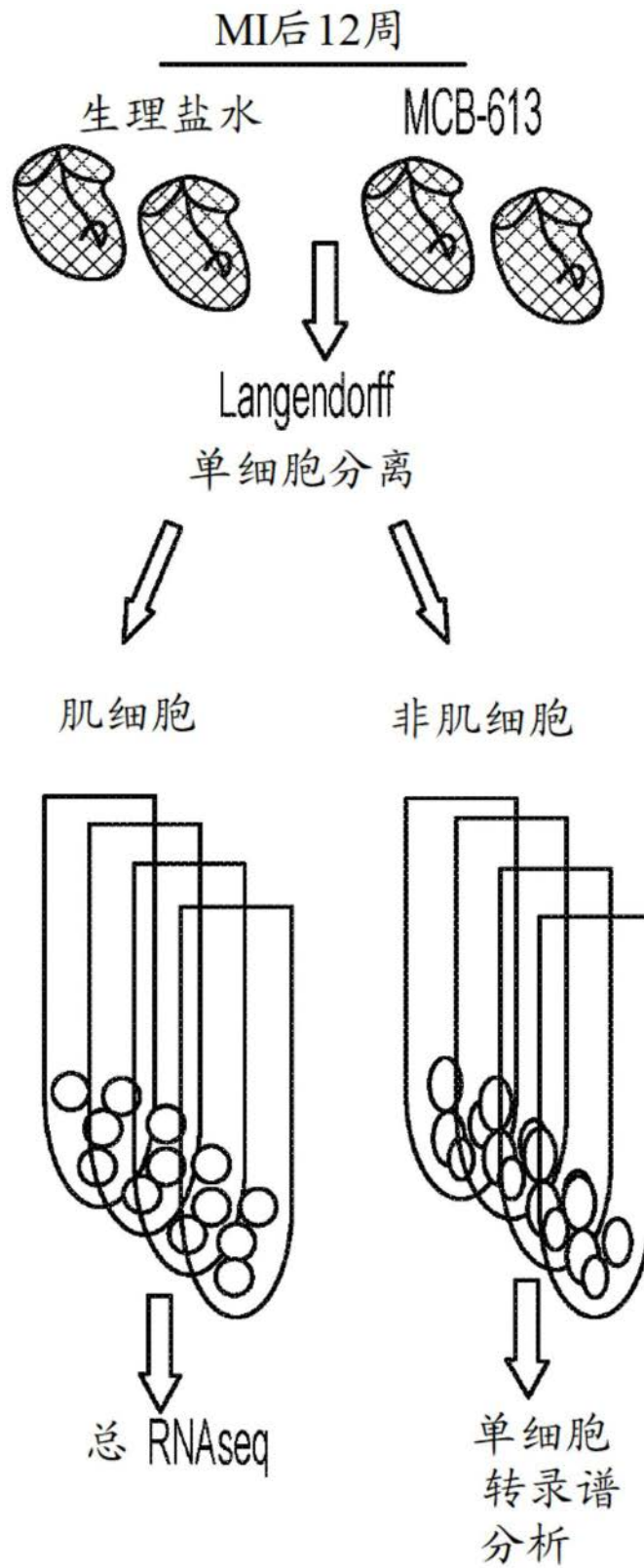


图13A

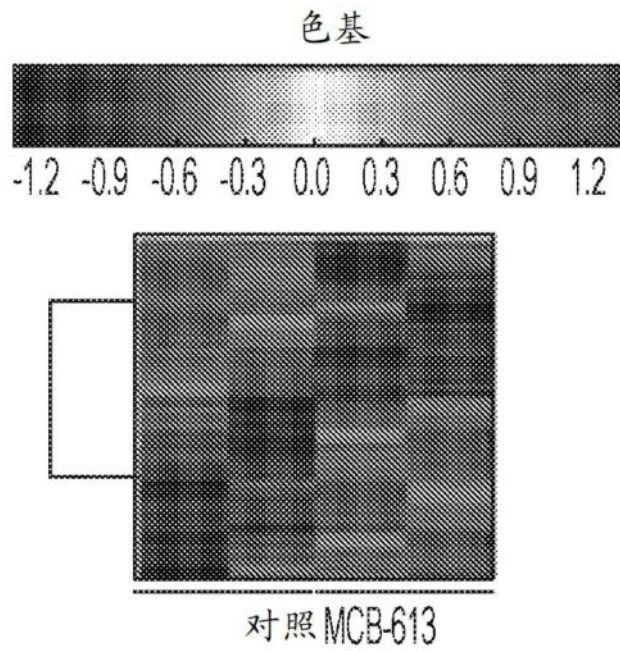


图13B

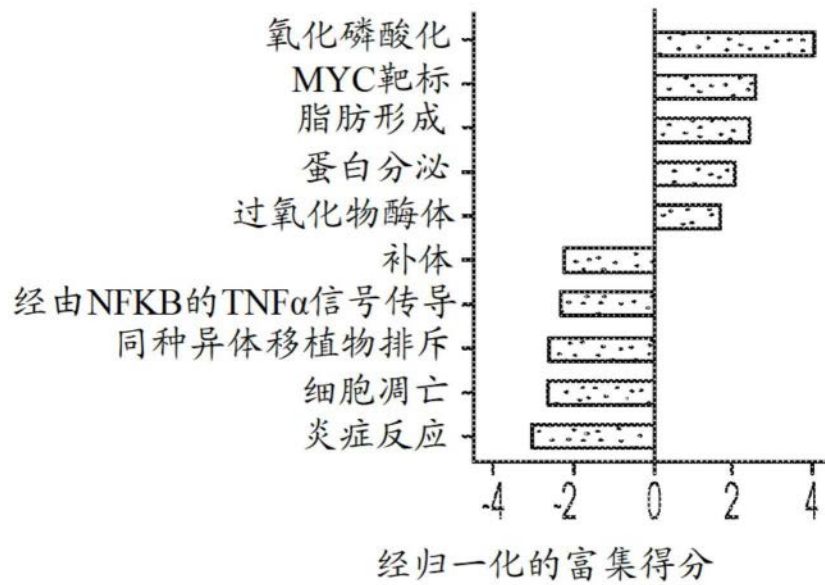


图13C

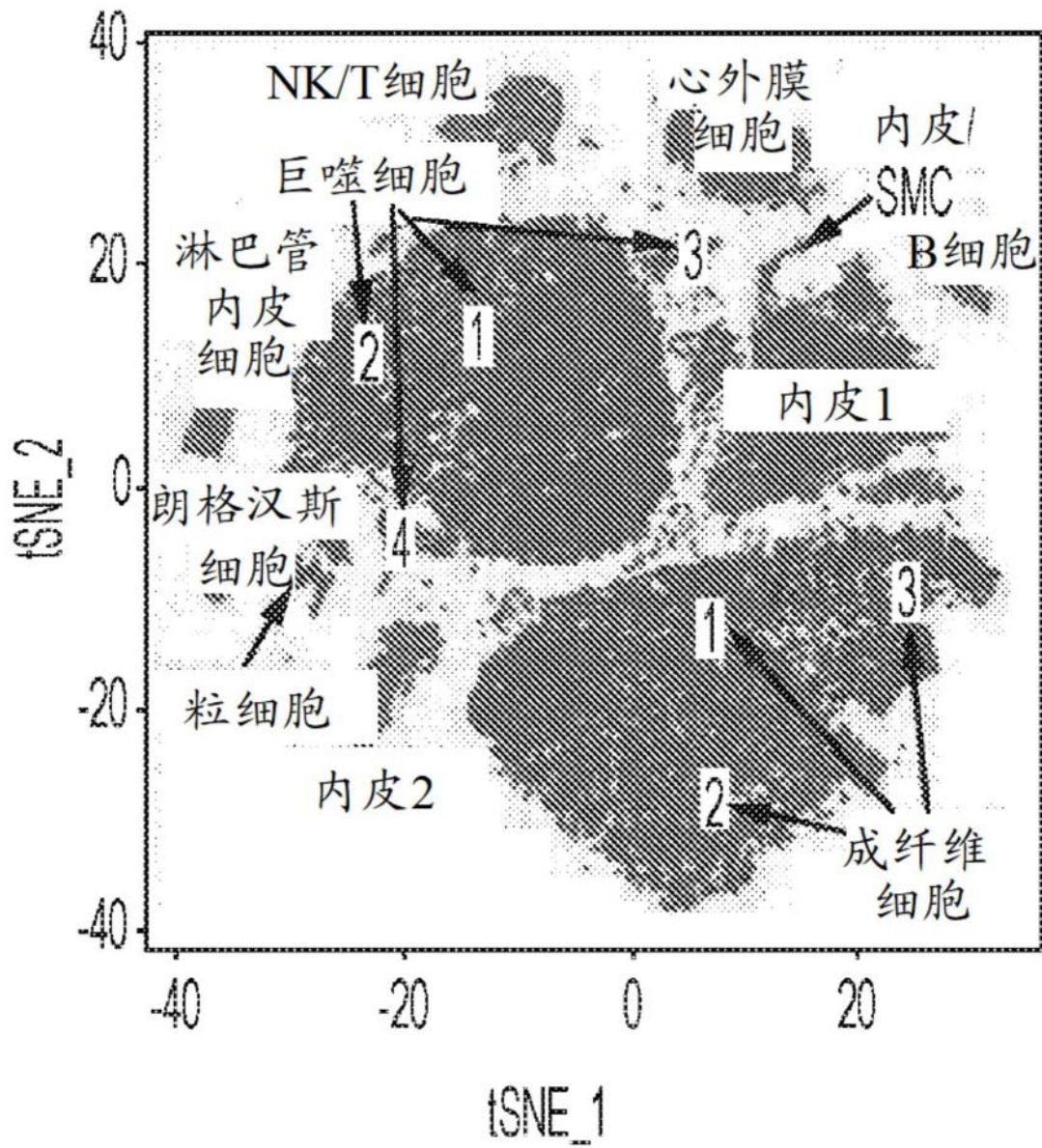


图13D

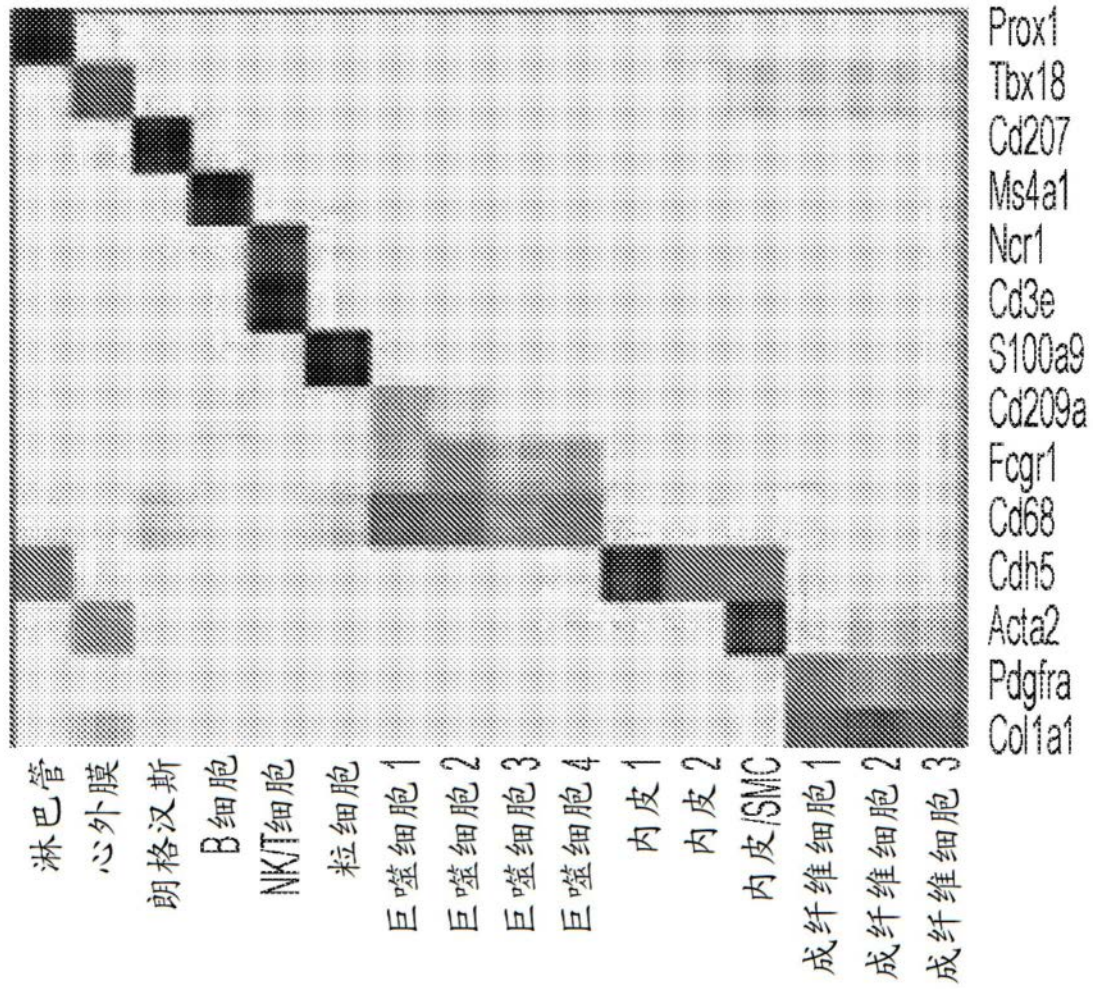


图13E

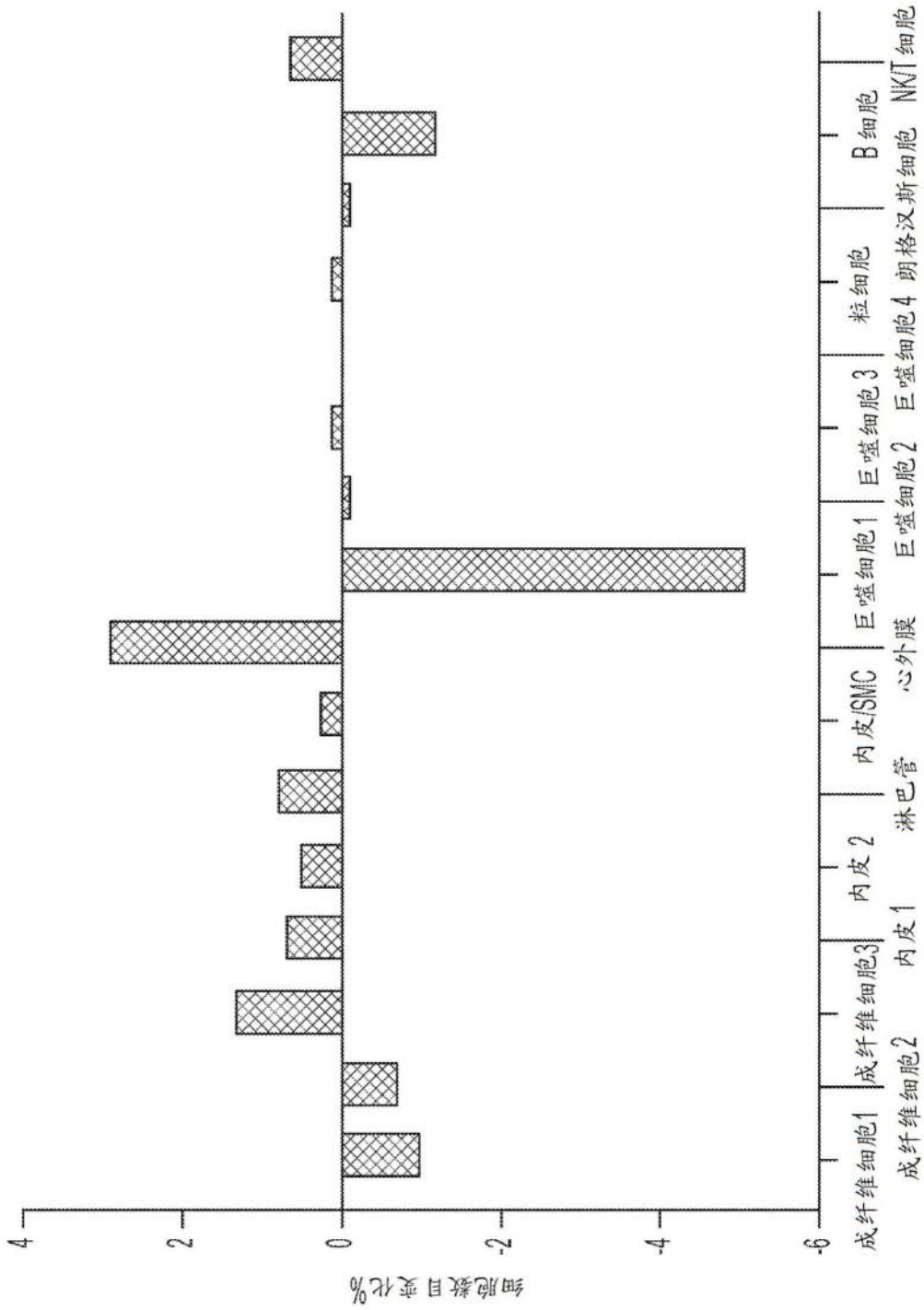


图13F

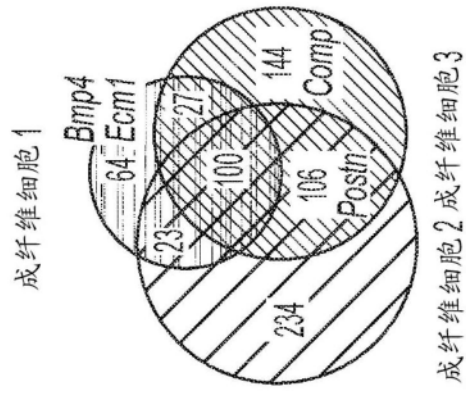


图14A

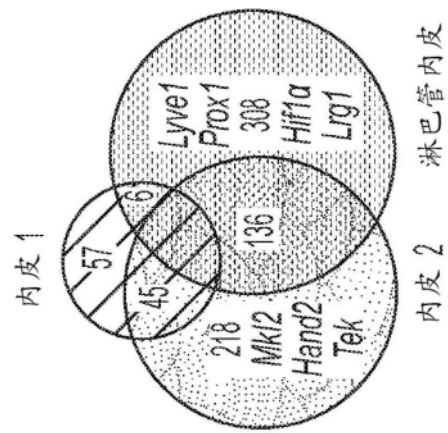


图14B

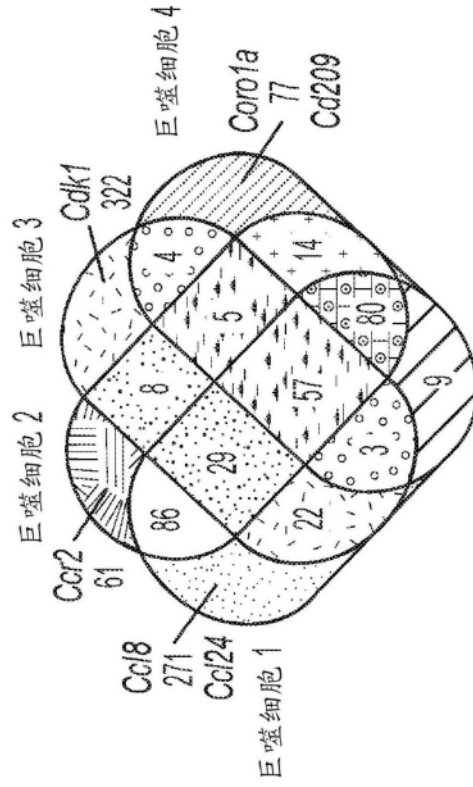


图14C

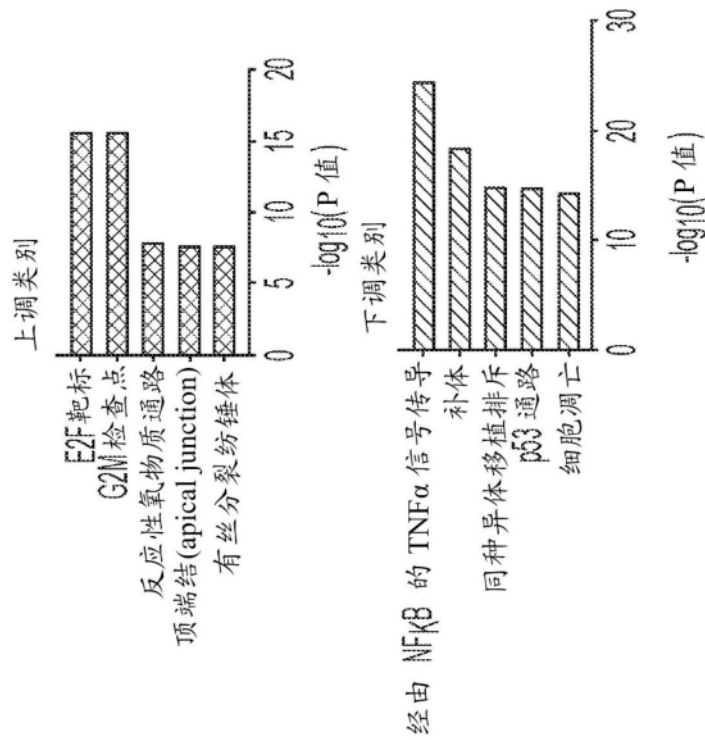


图14D

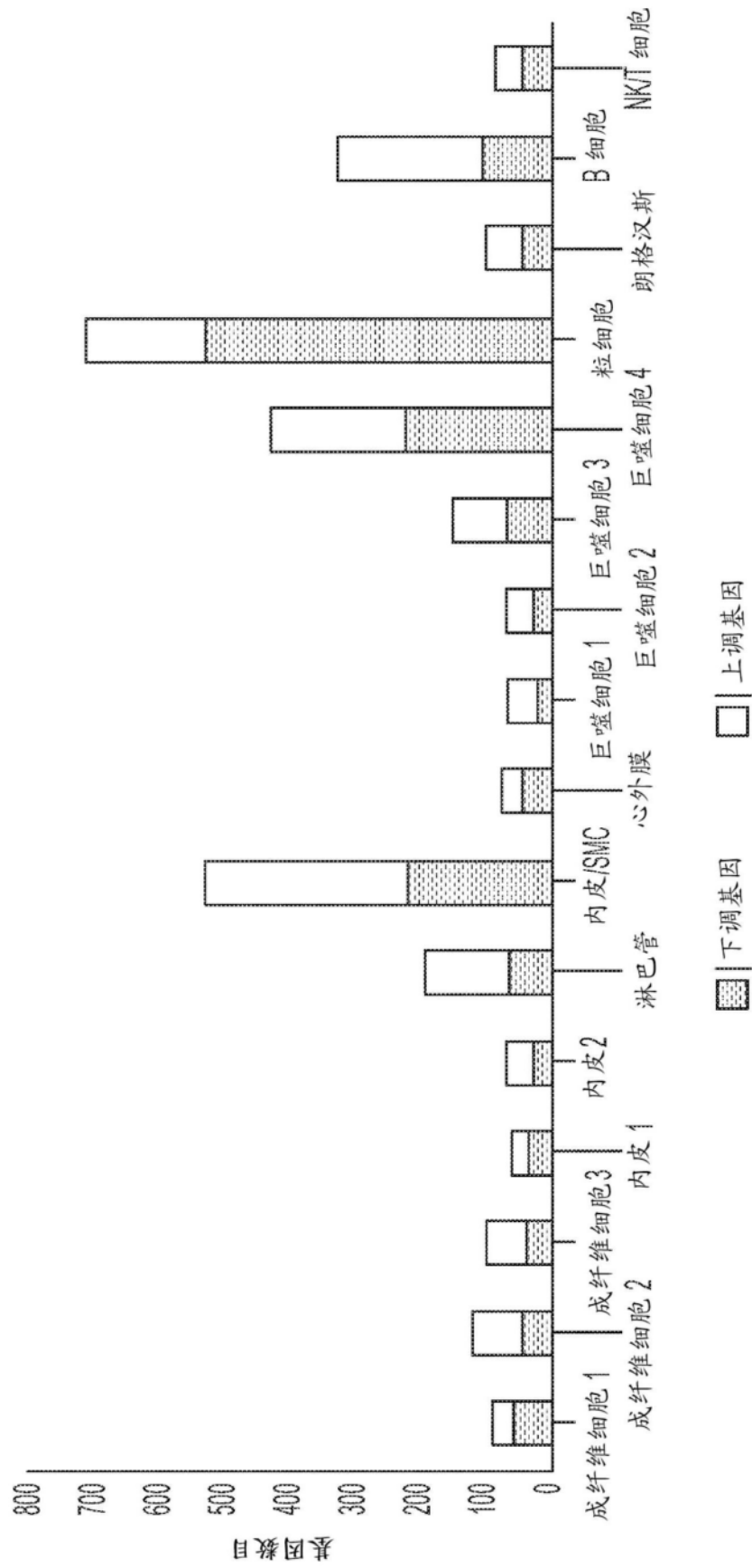


图15A

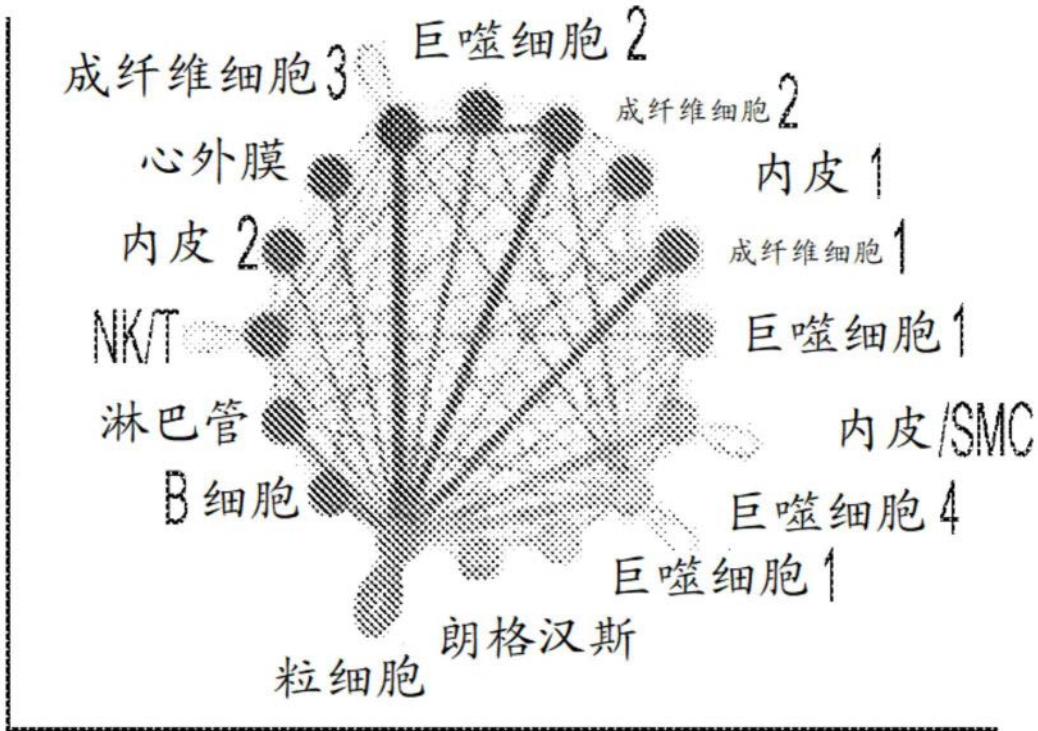


图15B

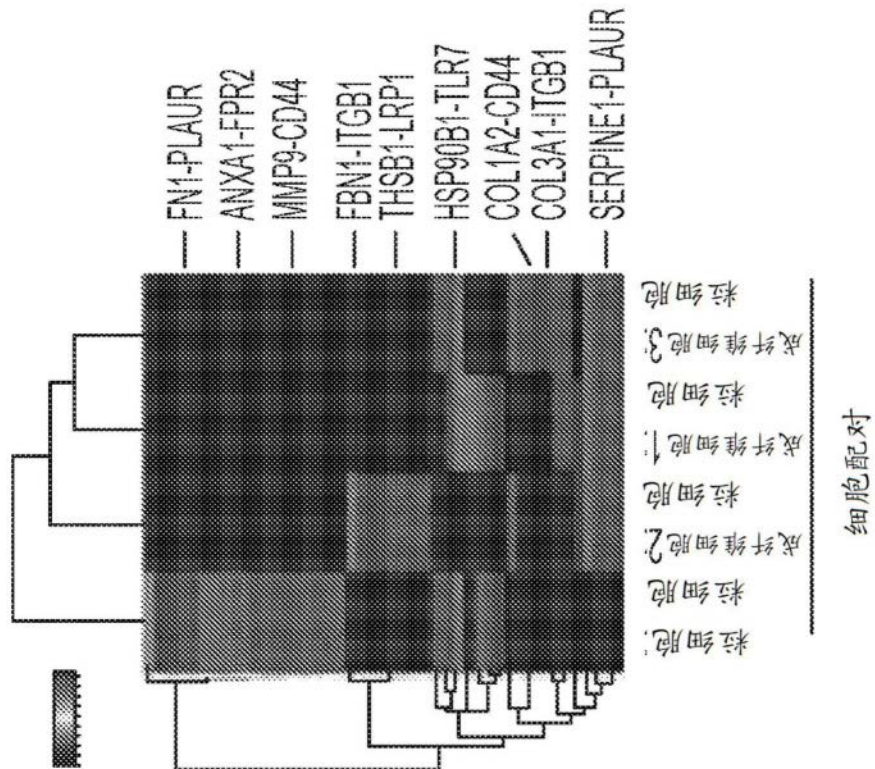


图15C

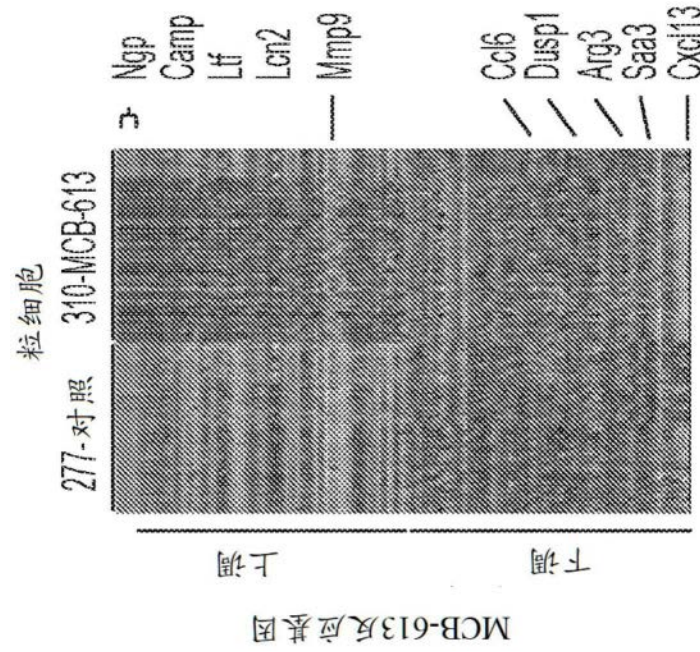


图15D

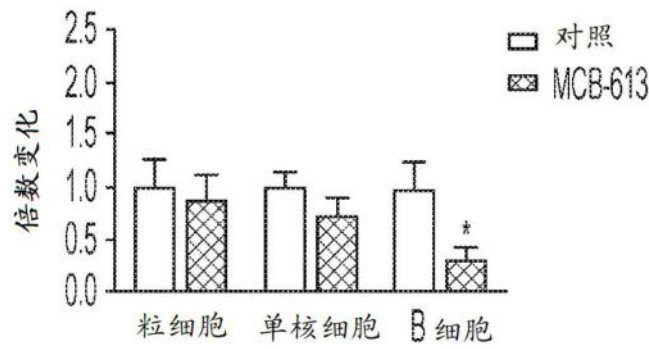


图16A

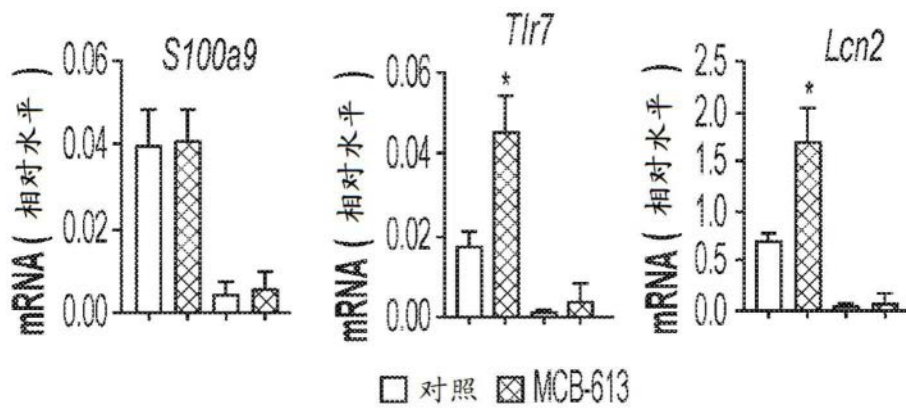


图16B

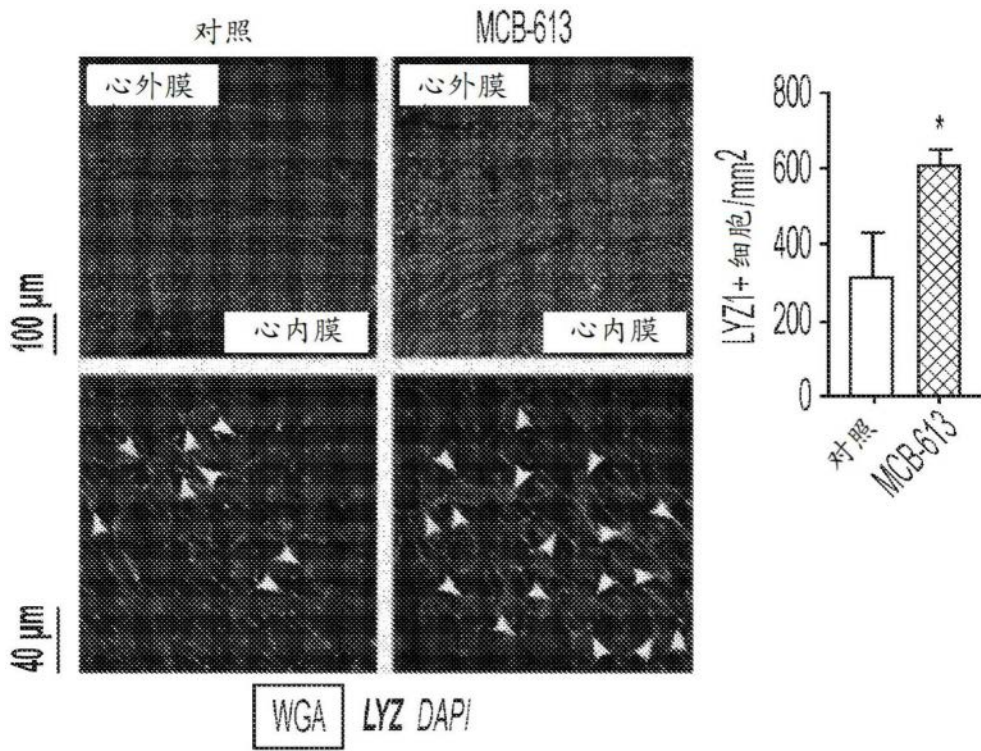


图16C

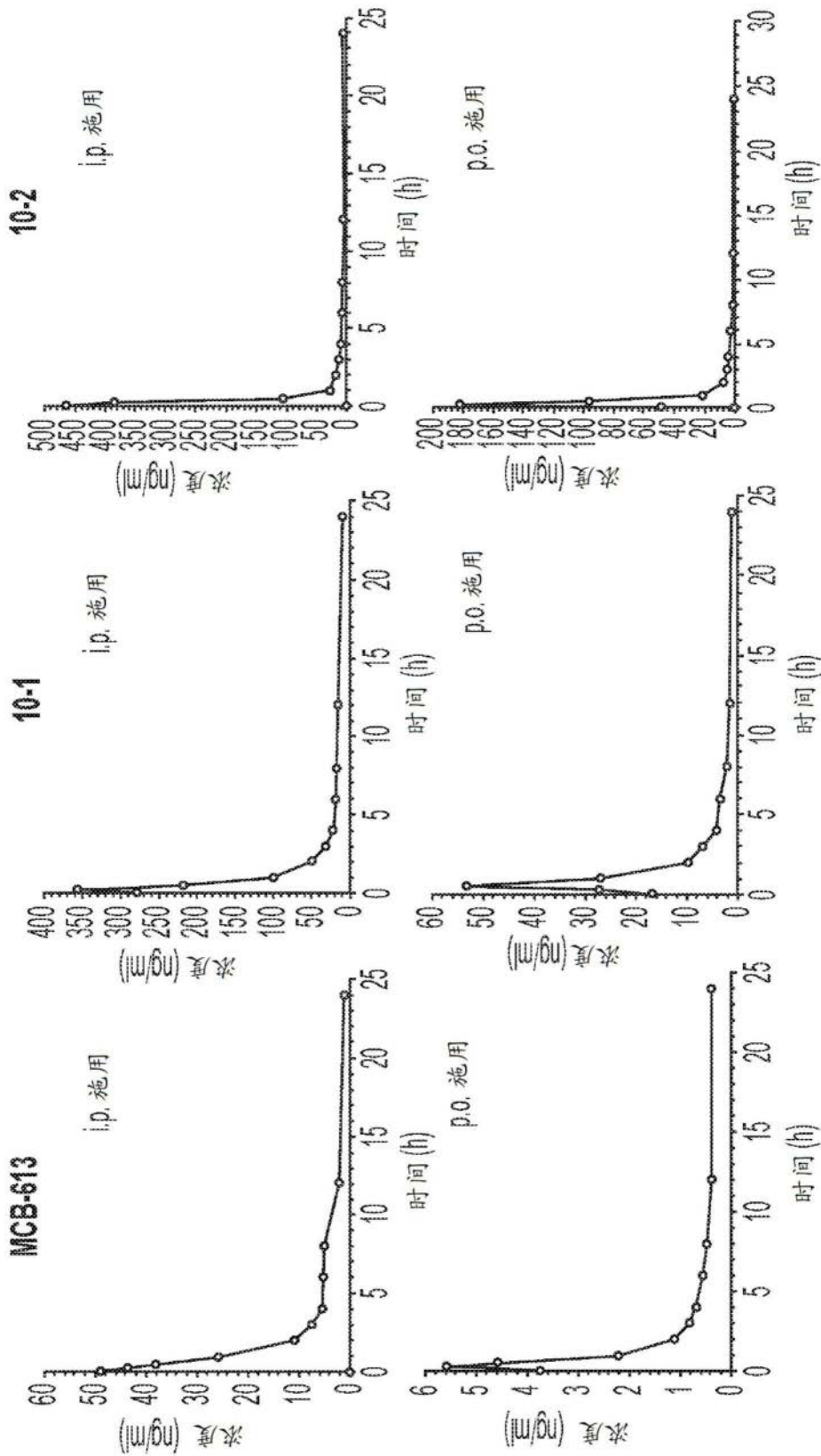


图17