



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102858779 B

(45)授权公告日 2016.08.03

(21)申请号 201180019907.7

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

(22)申请日 2011.02.19

代理人 赵蓉民 陆惠中

(30)优先权数据

P.390493 2010.02.19 PL

(51)Int.Cl.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2012.10.19

C07D 487/14(2006.01)

C07D 403/12(2006.01)

C07D 403/06(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/025571 2011.02.19

C07D 403/14(2006.01)

A61K 31/407(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02011/103524 EN 2011.08.25

A61K 31/4025(2006.01)

A61P 37/00(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

A61P 37/08(2006.01)

(73)专利权人 派普塔德姆公司

地址 波兰华沙

专利权人 罗兹大学

审查员 黄清昌

(72)发明人 J·泽布罗奇 M·齐梅基

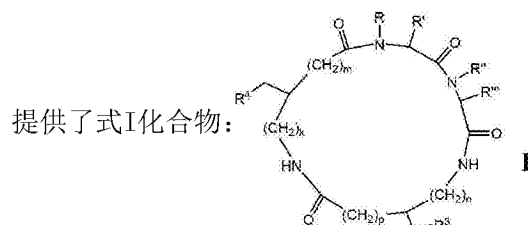
A·卡苏巴 K·卡兹玛瑞克

权利要求书28页 说明书39页 附图8页

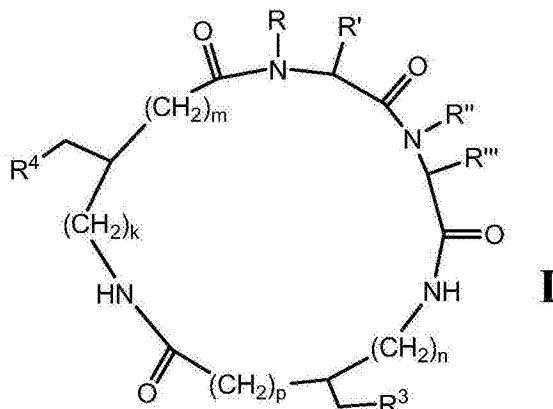
(54)发明名称

环状四肽及其治疗性应用

(57)摘要



1. 具有式I的化合物:



其中

k和n均是0, m和p其中一个是1, 并且m和p中另一个是0;

R和R'各自独立地选自H和C₁₋₃烷基, 或在合在一起时, R和R'是-CR¹R^{1'}-X-CH₂-, 其中CR¹R^{1'}连接于主链氮, R¹和R^{1'}各自独立地选自H和C₁₋₃烷基, X选自-CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH(OH)-, -O-, -S-和-NH-;

R''和R'''各自独立地选自H和C₁₋₃烷基, 或在合在一起时, R''和R'''是-CR²R^{2'}-X'-CH₂-, 其中CR²R^{2'}连接于主链氮, R²和R^{2'}各自独立地选自H和C₁₋₃烷基, X'选自-CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH(OH)-, -O-, -S-和-NH-; 和

R³和R⁴各自独立地选自芳基、取代芳基、杂芳基和取代杂芳基, 其中(a)芳基选自6元碳环芳环; 双环9-或10元碳环芳环系统; 和三环13-或14元碳环芳环系统; (b)杂芳基选自5或6元杂芳环, 其包含1-3个选自O、N或S的杂原子; 双环9或10元杂芳环系统, 其包含1-3个选自O、N或S的杂原子; 和三环13或14元杂芳环系统, 其包含1-3个选自O、N或S的杂原子; (c)当所述芳基或杂芳基被取代时, 各残基中多达三个H原子用下列取代: (i)1-20个碳原子的直链、支链或环状的烷基, (ii)选自氟、氯、溴或碘的卤素, (iii)在上述定义的烷基上具有一个卤素的卤烷基, (iv)羟基, (v)1-6个碳原子的烷氧基, (vi)羧基, (vii)烷氧羰基, 其中烷基如上所定义, (viii)烷基氨基羰基, 其中烷基如上所定义, (ix)氰基, (x)硝基, (xi)氨基, (xii)烷基氨基, 其中烷基如上所定义, (xiii)二烷基氨基, 其中烷基如上所定义, (xiv)巯基, (xv)烷基巯基, 其中烷基如上所定义, (xvi)亚砷, (xvii)砷, (xviii)酰基氨基, (xix)脒基, (xx)苯基, (xxi)苄基, (xxii)如上所定义的杂芳基, (xxiii)苯氧基, (xxiv)苄氧基和 (xxv)杂芳氧基, 其中杂芳基如上所定义;

或其药学上可接受的盐。

2. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R³和R⁴至少其中一个选自苯基、4-羟基苯基、4-叔丁氧基苯基和2-吡啶基。

3. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R³和R⁴其中一个是苯基并且R³和R⁴其中另一个选自苯基、4-羟基苯基、4-叔丁氧基苯基和2-吡啶基。

4. 根据权利要求2所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R³和R⁴其中一个是苯基并且R³和R⁴其中另一个选自苯基、4-羟基苯基、4-叔丁氧基苯基和2-吡啶基。

5. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中m为1。

6. 根据权利要求2所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中m为1。

7. 根据权利要求3所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中m为1。
8. 根据权利要求4所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中m为1。
9. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中p为1。
10. 根据权利要求2所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中p为1。
11. 根据权利要求3所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中p为1。
12. 根据权利要求4所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中p为1。
13. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $-(CH_2)_3-$ 。
14. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R''和R'''合在一起形成 $-(CH_2)_3-$ 。
15. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $-(CH_2)_4-$ 。
16. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R''和R'''合在一起形成 $-(CH_2)_4-$ 。
17. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ 。
18. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R''和R'''合在一起形成 $-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ 。
19. 根据权利要求2所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $-(CH_2)_3-$ 。
20. 根据权利要求2所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R''和R'''合在一起形成 $-(CH_2)_3-$ 。
21. 根据权利要求2所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $-(CH_2)_4-$ 。
22. 根据权利要求2所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R''和R'''合在一起形成 $-(CH_2)_4-$ 。
23. 根据权利要求2所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ 。
24. 根据权利要求2所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R''和R'''合在一起形成 $-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ 。
25. 根据权利要求3所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $-(CH_2)_3-$ 。
26. 根据权利要求3所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R''和R'''合在一起形成 $-(CH_2)_3-$ 。
27. 根据权利要求3所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $-(CH_2)_4-$ 。
28. 根据权利要求3所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R''和R'''合在一起形成 $-(CH_2)_4-$ 。
29. 根据权利要求3所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成-

$\text{CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$ 。

30. 根据权利要求3所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R"和R"'合在一起形成 $\text{CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$ 。

31. 根据权利要求4所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $(\text{CH}_2)_3\text{-}$ 。

32. 根据权利要求4所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R"和R"'合在一起形成 $(\text{CH}_2)_3\text{-}$ 。

33. 根据权利要求4所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $(\text{CH}_2)_4\text{-}$ 。

34. 根据权利要求4所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R"和R"'合在一起形成 $(\text{CH}_2)_4\text{-}$ 。

35. 根据权利要求4所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $\text{CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$ 。

36. 根据权利要求4所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R"和R"'合在一起形成 $\text{CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$ 。

37. 根据权利要求5所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $(\text{CH}_2)_3\text{-}$ 。

38. 根据权利要求5所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R"和R"'合在一起形成 $(\text{CH}_2)_3\text{-}$ 。

39. 根据权利要求5所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $(\text{CH}_2)_4\text{-}$ 。

40. 根据权利要求5所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R"和R"'合在一起形成 $(\text{CH}_2)_4\text{-}$ 。

41. 根据权利要求5所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $\text{CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$ 。

42. 根据权利要求5所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R"和R"'合在一起形成 $\text{CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$ 。

43. 根据权利要求6所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $(\text{CH}_2)_3\text{-}$ 。

44. 根据权利要求6所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R"和R"'合在一起形成 $(\text{CH}_2)_3\text{-}$ 。

45. 根据权利要求6所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $(\text{CH}_2)_4\text{-}$ 。

46. 根据权利要求6所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R"和R"'合在一起形成 $(\text{CH}_2)_4\text{-}$ 。

47. 根据权利要求6所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $\text{CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$ 。

48. 根据权利要求6所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R"和R"'合在一起形成 $\text{CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$ 。

49. 根据权利要求7所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $-(CH_2)_3-$ 。

50. 根据权利要求7所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R''和R'''合在一起形成 $-(CH_2)_3-$ 。

51. 根据权利要求7所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $-(CH_2)_4-$ 。

52. 根据权利要求7所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R''和R'''合在一起形成 $-(CH_2)_4-$ 。

53. 根据权利要求7所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ 。

54. 根据权利要求7所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R''和R'''合在一起形成 $-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ 。

55. 根据权利要求8所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $-(CH_2)_3-$ 。

56. 根据权利要求8所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R''和R'''合在一起形成 $-(CH_2)_3-$ 。

57. 根据权利要求8所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $-(CH_2)_4-$ 。

58. 根据权利要求8所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R''和R'''合在一起形成 $-(CH_2)_4-$ 。

59. 根据权利要求8所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ 。

60. 根据权利要求8所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R''和R'''合在一起形成 $-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ 。

61. 根据权利要求9所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $-(CH_2)_3-$ 。

62. 根据权利要求9所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R''和R'''合在一起形成 $-(CH_2)_3-$ 。

63. 根据权利要求9所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $-(CH_2)_4-$ 。

64. 根据权利要求9所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R''和R'''合在一起形成 $-(CH_2)_4-$ 。

65. 根据权利要求9所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ 。

66. 根据权利要求9所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R''和R'''合在一起形成 $-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ 。

67. 根据权利要求10所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R与R'合在一起形成 $-(CH_2)_3-$ 。

68. 根据权利要求10所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R''和R'''合在一起形

成 $-(\text{CH}_2)_3-$ 。

69. 根据权利要求10所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R与R'合在一起形成 $-(\text{CH}_2)_4-$ 。

70. 根据权利要求10所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R"和R"'合在一起形成 $-(\text{CH}_2)_4-$ 。

71. 根据权利要求10所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R与R'合在一起形成 $\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ 。

72. 根据权利要求10所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R"和R"'合在一起形成 $\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ 。

73. 根据权利要求11所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R与R'合在一起形成 $-(\text{CH}_2)_3-$ 。

74. 根据权利要求11所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R"和R"'合在一起形成 $-(\text{CH}_2)_3-$ 。

75. 根据权利要求11所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R与R'合在一起形成 $-(\text{CH}_2)_4-$ 。

76. 根据权利要求11所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R"和R"'合在一起形成 $-(\text{CH}_2)_4-$ 。

77. 根据权利要求11所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R与R'合在一起形成 $\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ 。

78. 根据权利要求11所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R"和R"'合在一起形成 $\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ 。

79. 根据权利要求12所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R与R'合在一起形成 $-(\text{CH}_2)_3-$ 。

80. 根据权利要求12所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R"和R"'合在一起形成 $-(\text{CH}_2)_3-$ 。

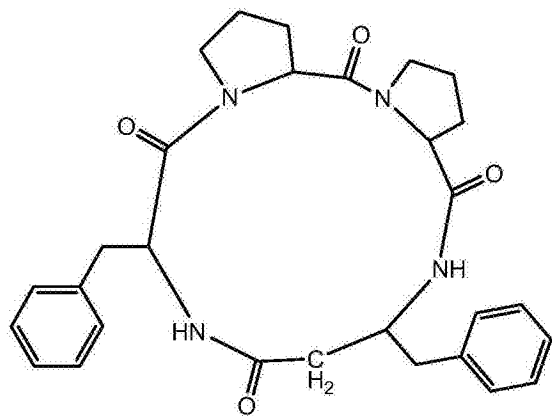
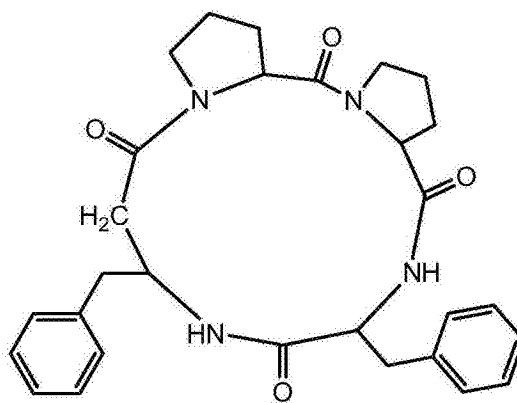
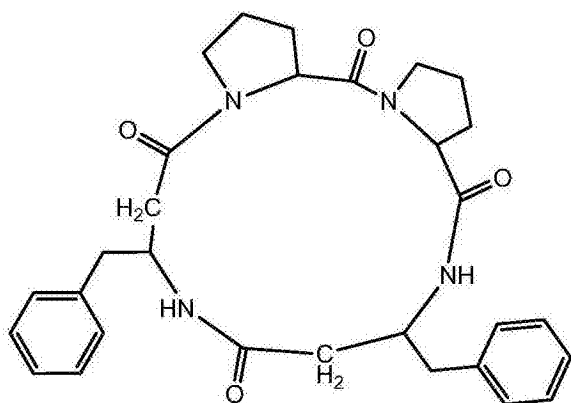
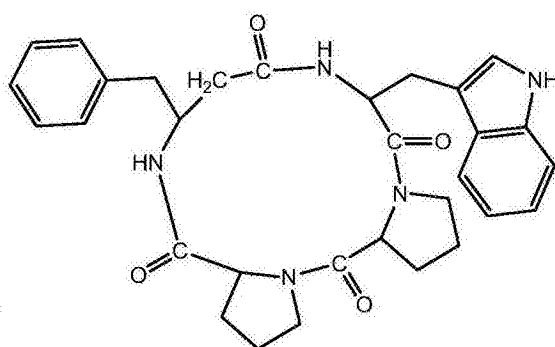
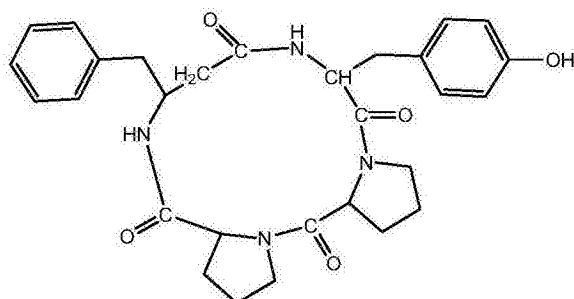
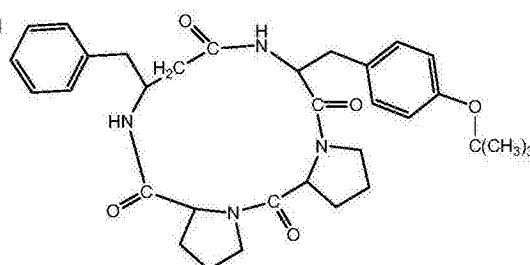
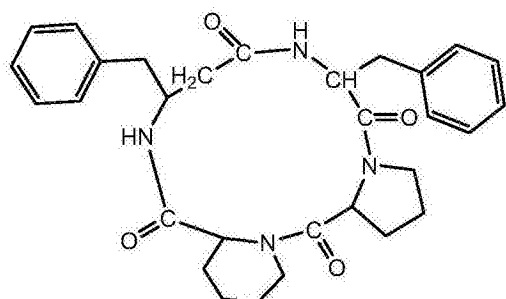
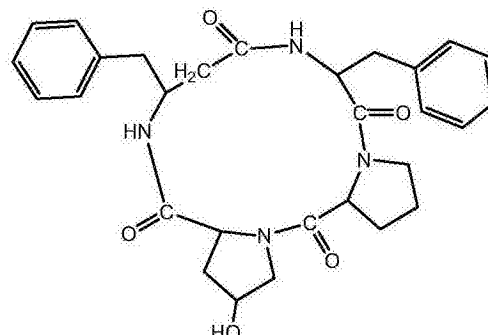
81. 根据权利要求12所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R与R'合在一起形成 $-(\text{CH}_2)_4-$ 。

82. 根据权利要求12所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R"和R"'合在一起形成 $-(\text{CH}_2)_4-$ 。

83. 根据权利要求12所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R与R'合在一起形成 $\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ 。

84. 根据权利要求12所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中R"和R"'合在一起形成 $\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ 。

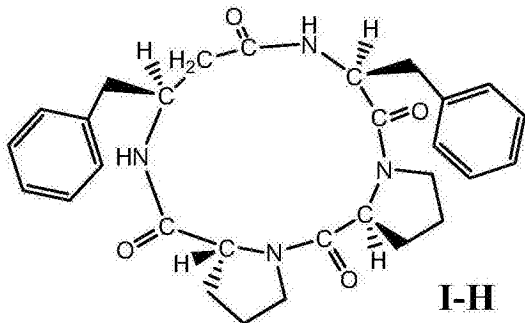
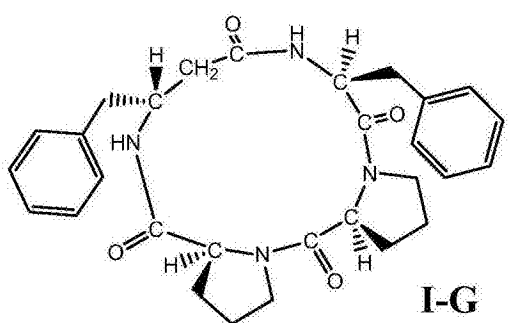
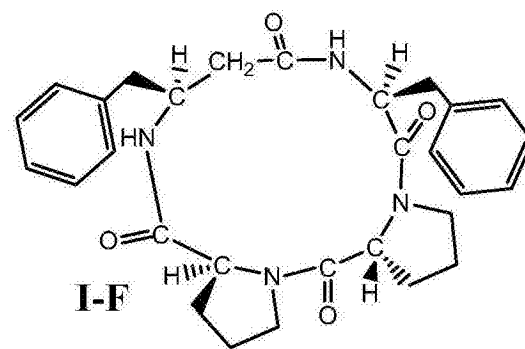
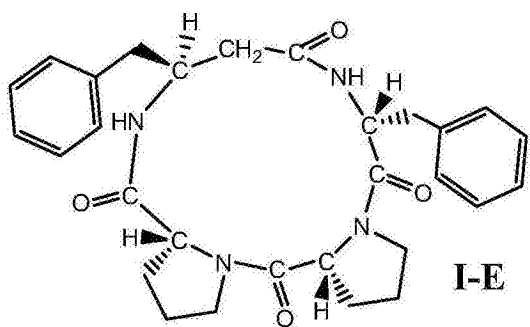
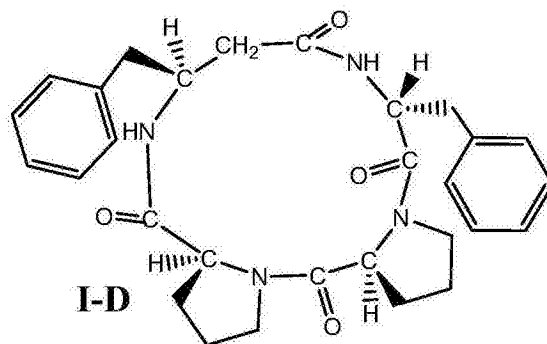
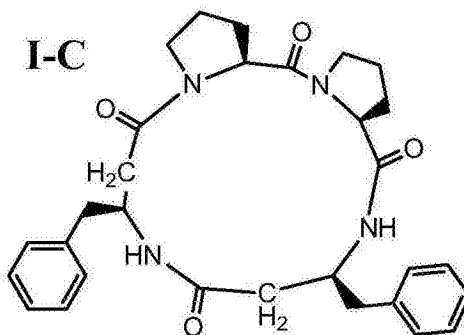
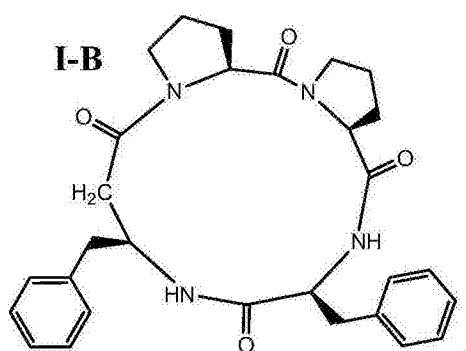
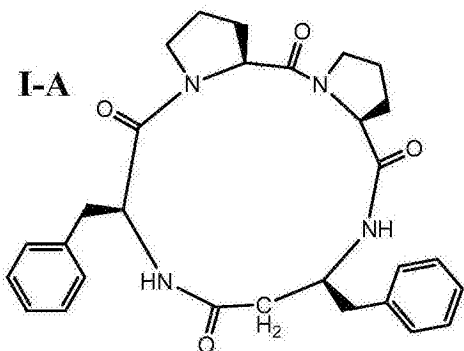
85. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述化合物选自:

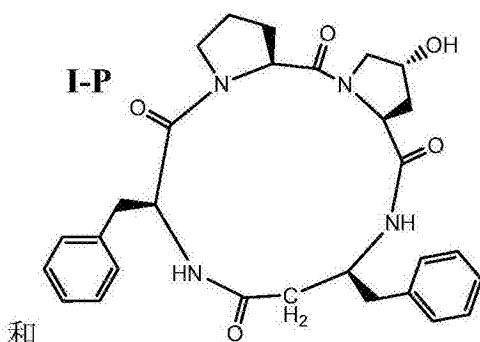
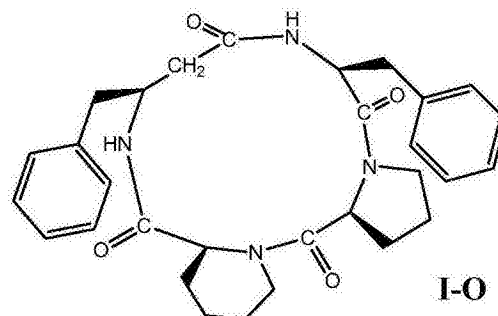
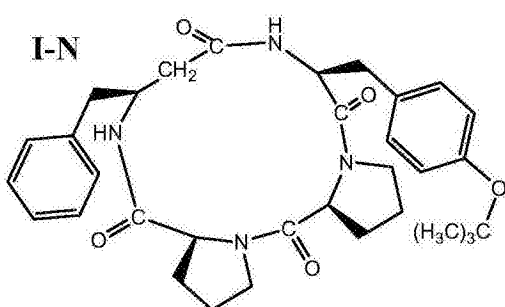
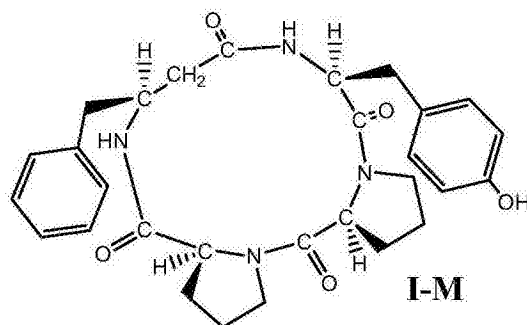
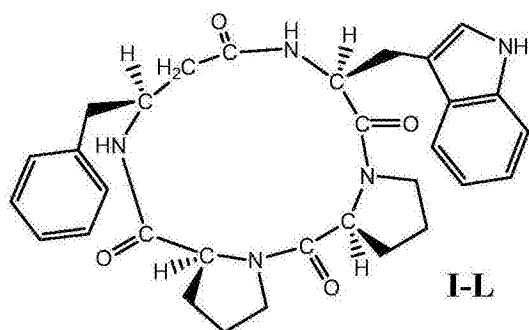
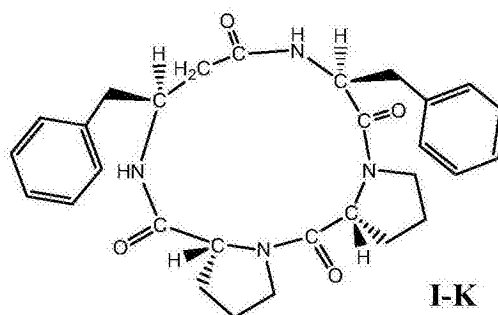
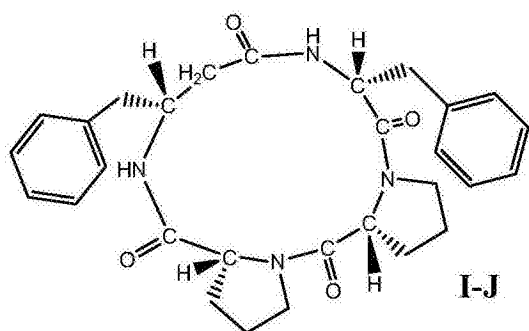
**I-1、****I-2、****I-3、****I-4、****I-5、****I-6、****I-7 和****I-8或其药学上可接**

受的盐。

86. 权利要求85所述的化合物,其具有式I-1,或其药学上可接受的盐。

87. 权利要求85所述的化合物,其具有式I-2,或其药学上可接受的盐。
 88. 权利要求85所述的化合物,其具有式I-3,或其药学上可接受的盐。
 89. 权利要求85所述的化合物,其具有式I-4,或其药学上可接受的盐。
 90. 权利要求85所述的化合物,其具有式I-5,或其药学上可接受的盐。
 91. 权利要求85所述的化合物,其具有式I-6,或其药学上可接受的盐。
 92. 权利要求85所述的化合物,其具有式I-7,或其药学上可接受的盐。
 93. 权利要求85所述的化合物,其具有式I-8,或其药学上可接受的盐。
 94. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,选自:





或其药学上可接受的盐。

和

95. 根据权利要求94所述的化合物,其具有式I-A,或其药学上可接受的盐。
96. 根据权利要求94所述的化合物,其具有式I-B,或其药学上可接受的盐。
97. 根据权利要求94所述的化合物,其具有式I-C,或其药学上可接受的盐。
98. 根据权利要求94所述的化合物,其具有式I-D,或其药学上可接受的盐。
99. 根据权利要求94所述的化合物,其具有式I-E,或其药学上可接受的盐。
100. 根据权利要求94所述的化合物,其具有式I-F,或其药学上可接受的盐。
101. 根据权利要求94所述的化合物,其具有式I-G,或其药学上可接受的盐。
102. 根据权利要求94所述的化合物,其具有式I-H,或其药学上可接受的盐。
103. 根据权利要求94所述的化合物,其具有式I-I,或其药学上可接受的盐。

104. 根据权利要求94所述的化合物,其具有式I-J,或其药学上可接受的盐。
105. 根据权利要求94所述的化合物,其具有式I-K,或其药学上可接受的盐。
106. 根据权利要求94所述的化合物,其具有式I-L,或其药学上可接受的盐。
107. 根据权利要求94所述的化合物,其具有式I-M,或其药学上可接受的盐。
108. 根据权利要求94所述的化合物,其具有式I-N,或其药学上可接受的盐。
109. 根据权利要求94所述的化合物,其具有式I-O,或其药学上可接受的盐。
110. 根据权利要求94所述的化合物,其具有式I-P,或其药学上可接受的盐。
111. 药物组合物,包含根据权利要求1至110中任一项所述的式I化合物或其药学上可接受的盐和其药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。
112. 根据权利要求111所述的药物组合物,其中所述化合物是式I-1化合物或其药学上可接受的盐。
113. 根据权利要求111所述的药物组合物,其中所述化合物是式I-2化合物或其药学上可接受的盐。
114. 根据权利要求111所述的药物组合物,其中所述化合物是式I-3化合物或其药学上可接受的盐。
115. 根据权利要求111所述的药物组合物,其中所述化合物是式I-4化合物或其药学上可接受的盐。
116. 根据权利要求111所述的药物组合物,其中所述化合物是式I-5化合物或其药学上可接受的盐。
117. 根据权利要求111所述的药物组合物,其中所述化合物是式I-6化合物或其药学上可接受的盐。
118. 根据权利要求111所述的药物组合物,其中所述化合物是式I-7化合物或其药学上可接受的盐。
119. 根据权利要求111所述的药物组合物,其中所述化合物是式I-8化合物或其药学上可接受的盐。
120. 根据权利要求111所述的药物组合物,其中所述化合物是式I-A化合物或其药学上可接受的盐。
121. 根据权利要求111所述的药物组合物,其中所述化合物是式I-B化合物或其药学上可接受的盐。
122. 根据权利要求111所述的药物组合物,其中所述化合物是式I-C化合物或其药学上可接受的盐。
123. 根据权利要求111所述的药物组合物,其中所述化合物是式I-D化合物或其药学上可接受的盐。
124. 根据权利要求111所述的药物组合物,其中所述化合物是式I-E化合物或其药学上可接受的盐。
125. 根据权利要求111所述的药物组合物,其中所述化合物是式I-F化合物或其药学上可接受的盐。
126. 根据权利要求111所述的药物组合物,其中所述化合物是式I-G化合物或其药学上可接受的盐。

127. 根据权利要求111所述的药物组合物, 其中所述化合物是式I-H化合物或其药学上可接受的盐。

128. 根据权利要求111所述的药物组合物, 其中所述化合物是式I-I化合物或其药学上可接受的盐。

129. 根据权利要求111所述的药物组合物, 其中所述化合物是式I-J化合物或其药学上可接受的盐。

130. 根据权利要求111所述的药物组合物, 其中所述化合物是式I-K化合物或其药学上可接受的盐。

131. 根据权利要求111所述的药物组合物, 其中所述化合物是式I-L化合物或其药学上可接受的盐。

132. 根据权利要求111所述的药物组合物, 其中所述化合物是式I-M化合物或其药学上可接受的盐。

133. 根据权利要求111所述的药物组合物, 其中所述化合物是式I-N化合物或其药学上可接受的盐。

134. 根据权利要求111所述的药物组合物, 其中所述化合物是式I-O化合物或其药学上可接受的盐。

135. 根据权利要求111所述的药物组合物, 其中所述化合物是式I-P化合物或其药学上可接受的盐。

136. 根据权利要求1至110中任一项所述的式I化合物或其药学上可接受的盐在制备抑制患者免疫应答或治疗或预防患者免疫介导的疾病或病症的药物中的应用。

137. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述免疫介导的疾病或病症选自(a)自身免疫性疾病、炎症进展、移植排斥和过敏反应, (b)银屑病、扁平苔藓及其他丘疹鳞屑性疾病, (c)湿疹和皮炎, (d)皮肤对光的反应, (e)非特异性皮肤刺激和昆虫叮咬, (f)荨麻疹, 和(g)类风湿关节炎、炎性肠道疾病、肠易激综合征、神经退行性疾病、帕金森病和移植物抗宿主反应。

138. 根据权利要求137所述的应用, 其中所述湿疹、银屑病或皮炎选自特应性湿疹、脂溢性皮炎、严重银屑病、特应性皮炎和汗疱, 所述炎性肠道疾病是克罗恩病, 并且所述类风湿关节炎是自身免疫性和感染引起性的。

139. 根据权利要求1至110中任一项所述的式I化合物或其药学上可接受的盐在制备降低药物毒性性状的药物中的应用。

140. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-1化合物或其药学上可接受的盐。

141. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-2化合物或其药学上可接受的盐。

142. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-3化合物或其药学上可接受的盐。

143. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-4化合物或其药学上可接受的盐。

144. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-5化合物或其药学上可接受的

的盐。

145. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-6化合物或其药学上可接受的盐。

146. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-7化合物或其药学上可接受的盐。

147. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-8化合物或其药学上可接受的盐。

148. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-A化合物或其药学上可接受的盐。

149. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-B化合物或其药学上可接受的盐。

150. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-C化合物或其药学上可接受的盐。

151. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-D化合物或其药学上可接受的盐。

152. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-E化合物或其药学上可接受的盐。

153. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-F化合物或其药学上可接受的盐。

154. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-G化合物或其药学上可接受的盐。

155. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-H化合物或其药学上可接受的盐。

156. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-I化合物或其药学上可接受的盐。

157. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-J化合物或其药学上可接受的盐。

158. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-K化合物或其药学上可接受的盐。

159. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-L化合物或其药学上可接受的盐。

160. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-M化合物或其药学上可接受的盐。

161. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-N化合物或其药学上可接受的盐。

162. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-O化合物或其药学上可接受的盐。

163. 根据权利要求136所述的应用, 其中所述化合物是式I-P化合物或其药学上可接受的盐。

164. 试剂盒, 包含根据权利要求1至110中任一项所述的式I化合物或其药学上可接受的盐和说明书, 用于使用化合物(a)抑制患者的免疫应答, (b)治疗或预防患者免疫介导的疾病或病症, 或(c)降低第二药物的毒性性状。

165. 根据权利要求164所述的试剂盒, 其中所述免疫应答选自移植排斥和炎症。

166. 根据权利要求164所述的试剂盒, 其中所述免疫介导的疾病或病症选自自身免疫性疾病、炎症进展、移植排斥和过敏反应。

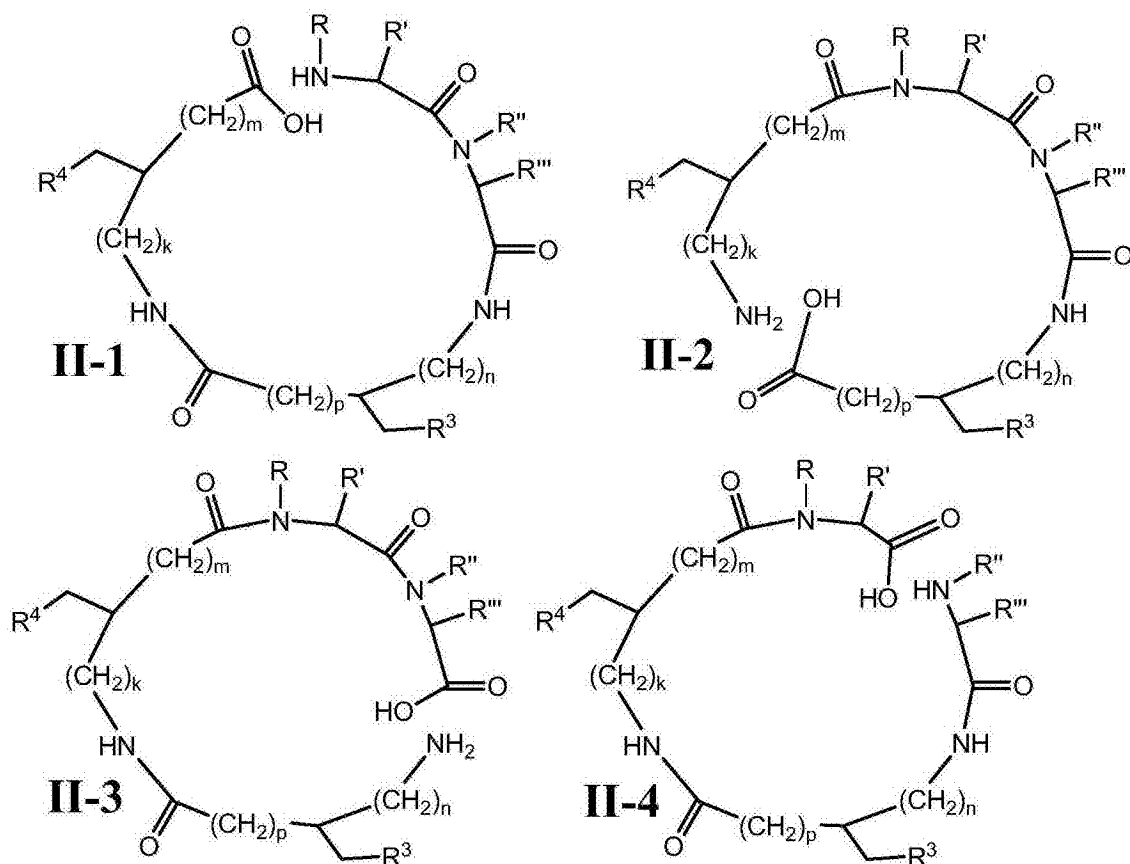
167. 根据权利要求164所述的试剂盒, 其中所述免疫介导的疾病或病症选自银屑病、扁平苔藓及其他丘疹鳞屑性疾病; 湿疹和皮炎; 皮肤对光的反应; 非特异性皮肤刺激和昆虫叮咬; 荨麻疹; 类风湿关节炎; 炎性肠道疾病; 肠易激综合征; 神经退行性疾病; 帕金森病; 和移植植物抗宿主反应。

168. 根据权利要求167所述的试剂盒, 其中所述炎性肠道疾病是克罗恩病。

169. 根据权利要求167所述的试剂盒, 其中所述湿疹、银屑病或皮炎选自特应性湿疹、脂溢性皮炎、严重银屑病、特应性皮炎和汗疱, 所述类风湿关节炎是自身免疫性和感染引起性的。

170. 根据权利要求164所述的试剂盒, 其中所述说明书指示联合化学治疗药物给予所述式I化合物。

171. 制备权利要求1限定的式I化合物的方法, 包括环化具有式II-1、II-2、II-3或II-4的化合物:



形成相应的式I化合物, 其中R、R'、R''、R'''、R³、R⁴、k、m、n和p如权利要求1所定义。

172. 根据权利要求171所述的方法, 其进一步包括合成所述式II-1、II-2、II-3或II-4

化合物。

173. 根据权利要求172所述的方法, 其中通过固相合成来合成所述式II-1、II-2、II-3或II-4化合物。

174. 化合物, 选自权利要求171限定的式II-1、II-2、II-3和II-4。

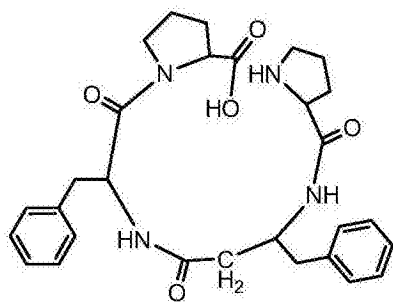
175. 根据权利要求174所述的化合物, 其是式II-1化合物。

176. 根据权利要求174所述的化合物, 其是式II-2化合物。

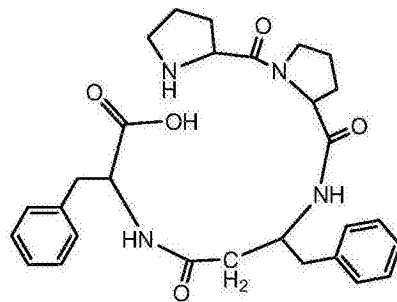
177. 根据权利要求174所述的化合物, 其是式II-3化合物。

178. 根据权利要求174所述的化合物, 其是式II-4化合物。

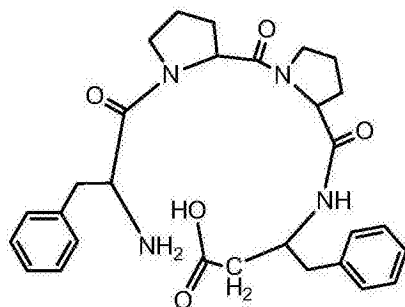
179. 根据权利要求174所述的化合物, 其选自



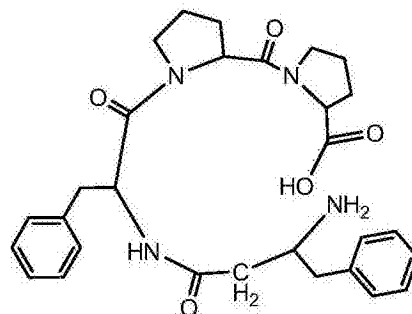
II-4-a、



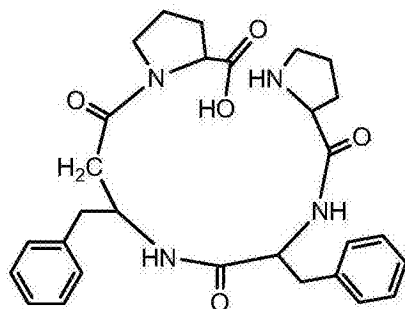
II-1-a、



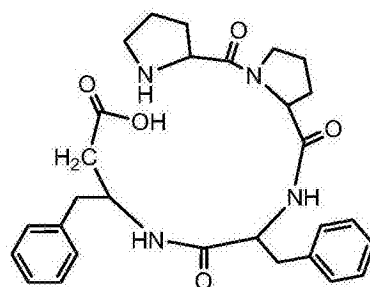
II-2-a、



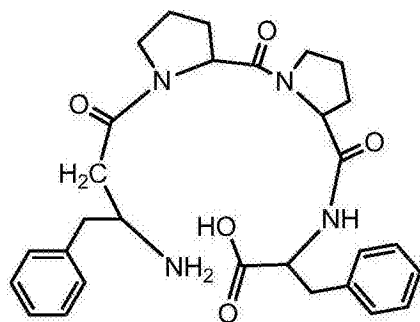
II-3-a、



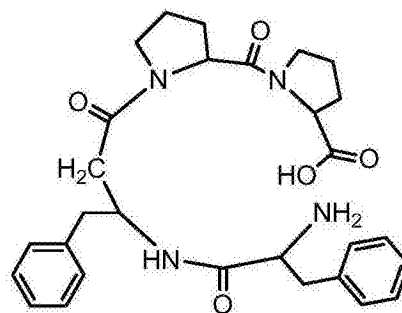
II-4-b、



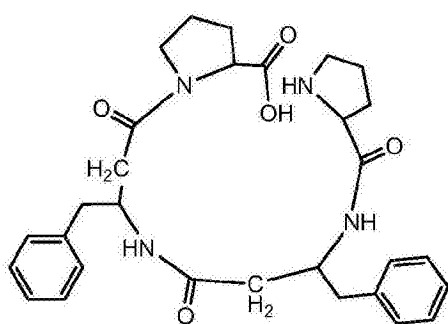
II-1-b、



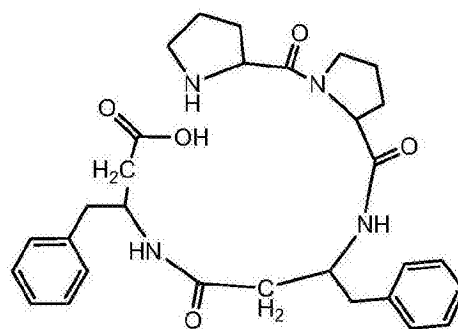
II-2-b、



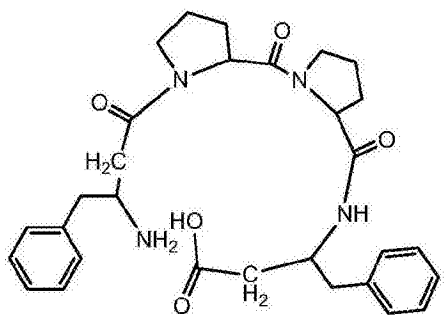
II-3-b、



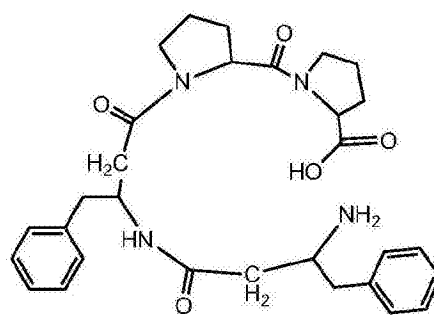
II-4-c、



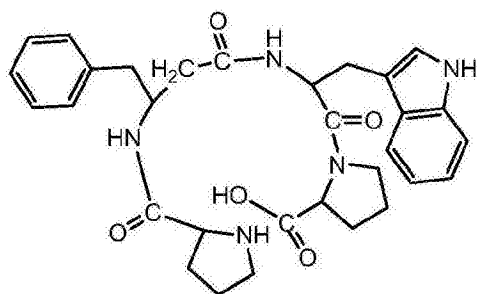
II-1-c、



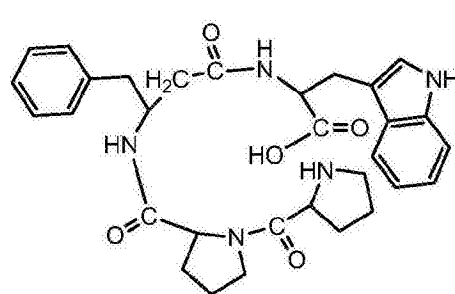
II-2-c、



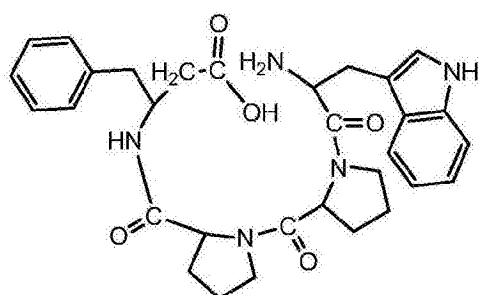
II-3-c、



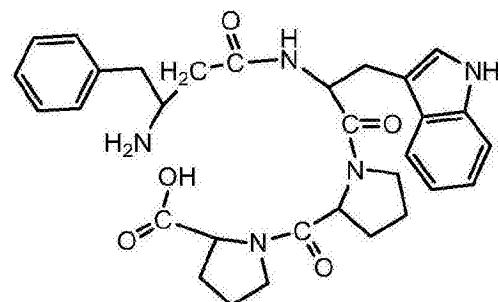
II-4-d、



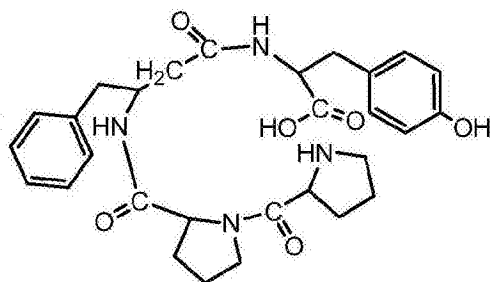
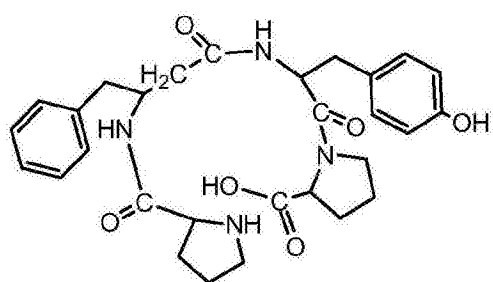
II-1-d、



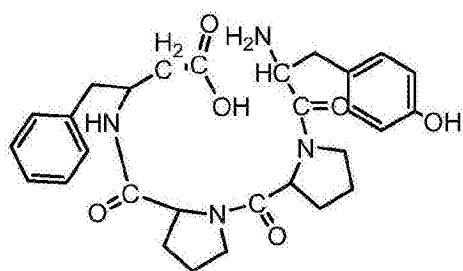
II-2-d、



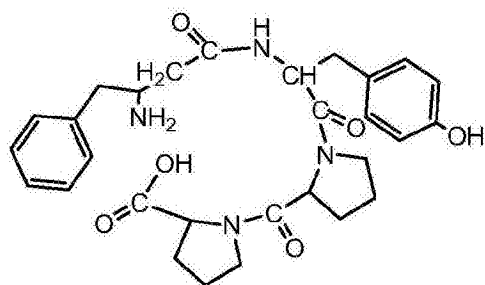
II-3-d、



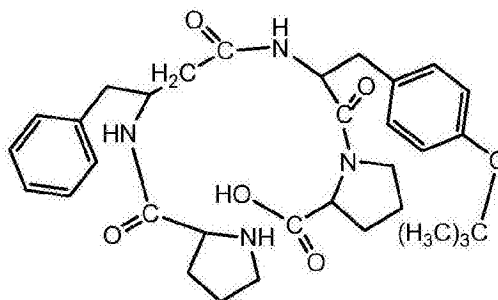
II-4-e、



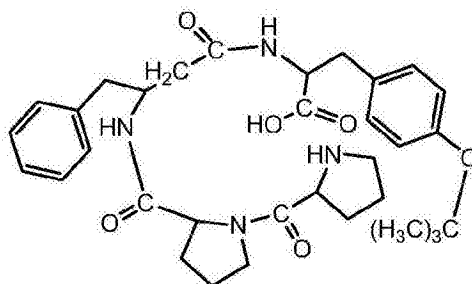
II-1-e、



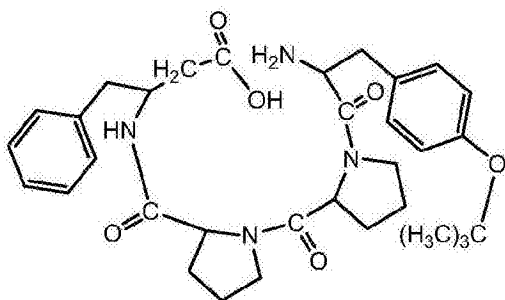
II-2-e、



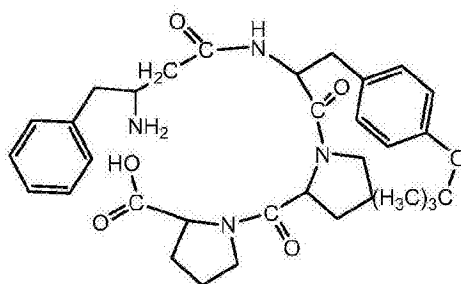
II-3-e、



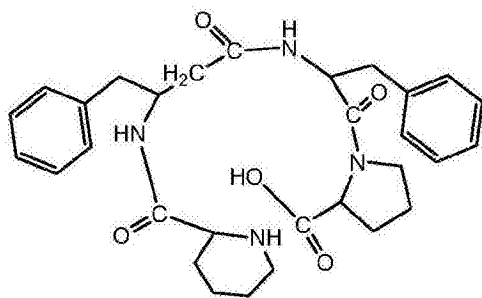
II-4-f、



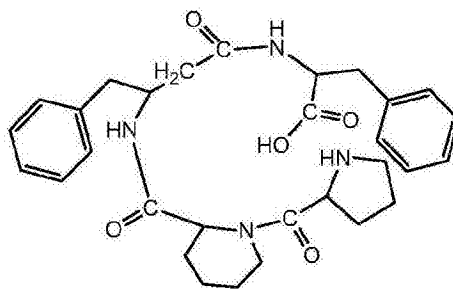
II-1-f、



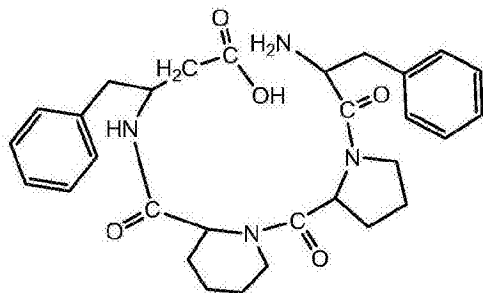
II-2-f、



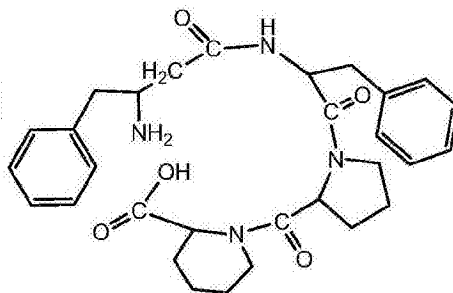
II-3-f、

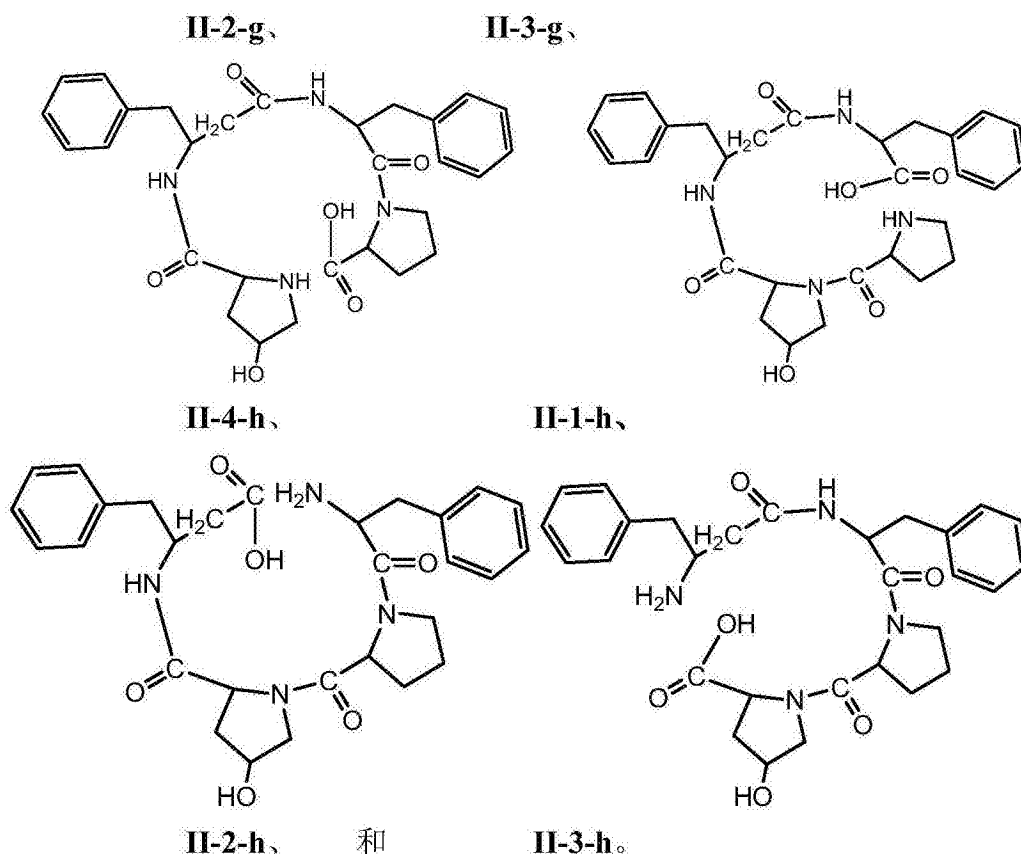


II-4-g、



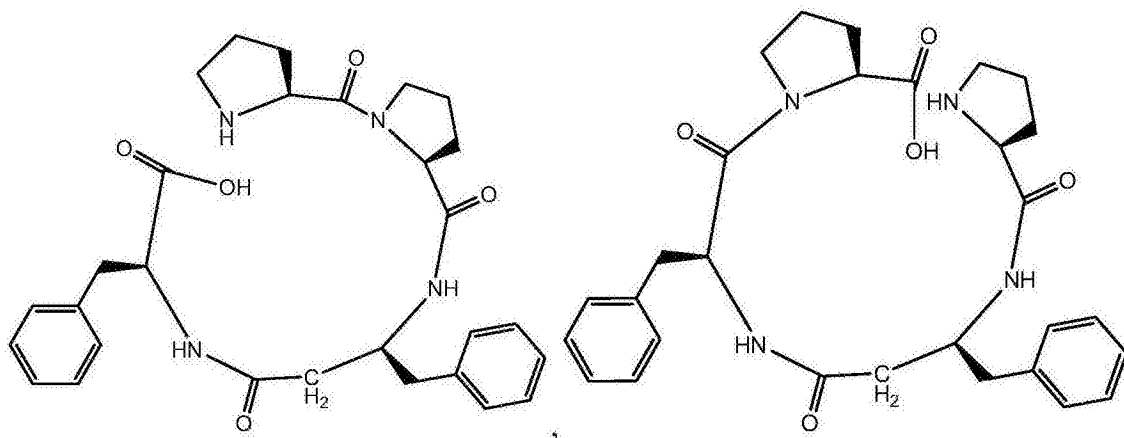
II-1-g、





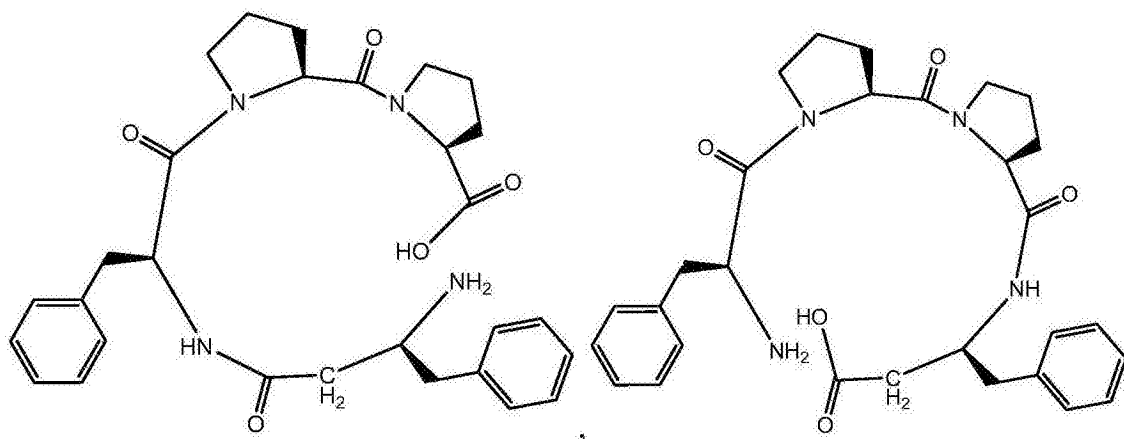
180. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-1-a。
181. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-2-a。
182. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-3-a。
183. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-4-a。
184. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-1-b。
185. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-2-b。
186. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-3-b。
187. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-4-b。
188. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-1-c。
189. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-2-c。
190. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-3-c。
191. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-4-c。
192. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-1-d。
193. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-2-d。
194. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-3-d。
195. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-4-d。
196. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-1-e。
197. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-2-e。
198. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-3-e。
199. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-4-e。
200. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-1-f。

201. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-2-f。
202. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-3-f。
203. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-4-f。
204. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-1-g。
205. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-2-g。
206. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-3-g。
207. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-4-g。
208. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-1-h。
209. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-2-h。
210. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-3-h。
211. 根据权利要求179所述的化合物,其具有式II-4-h。
212. 根据权利要求174所述的化合物,其选自



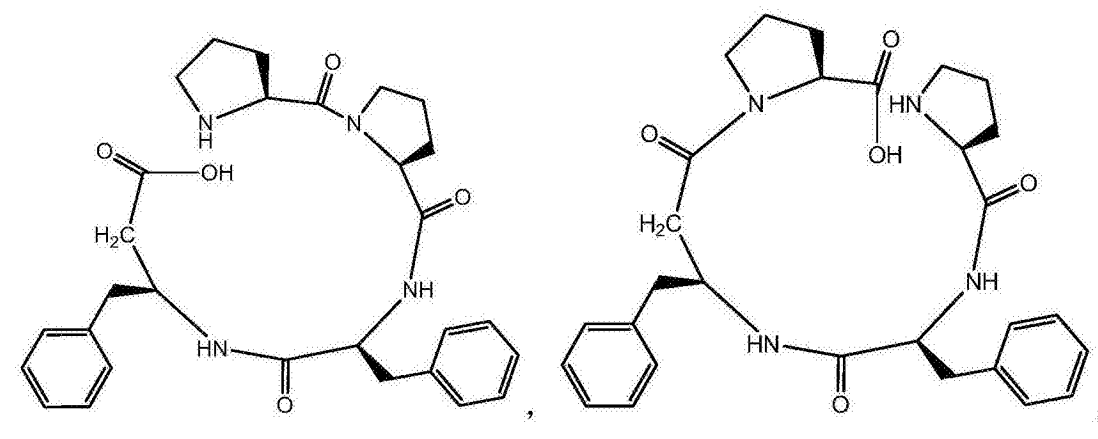
II-A-1

II-A-2



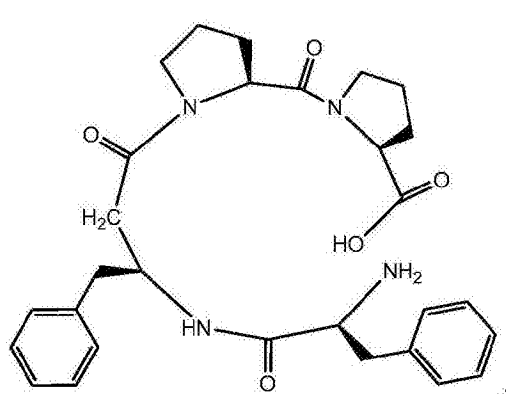
II-A-3

II-A-4

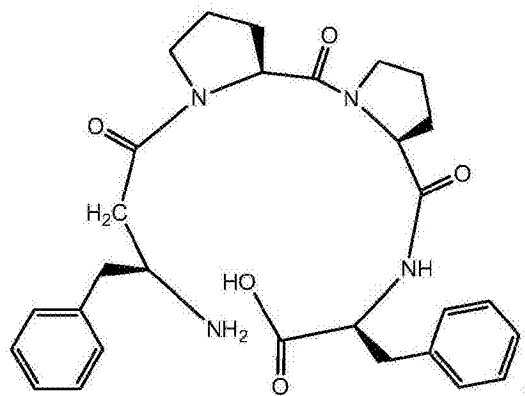


II-B-1

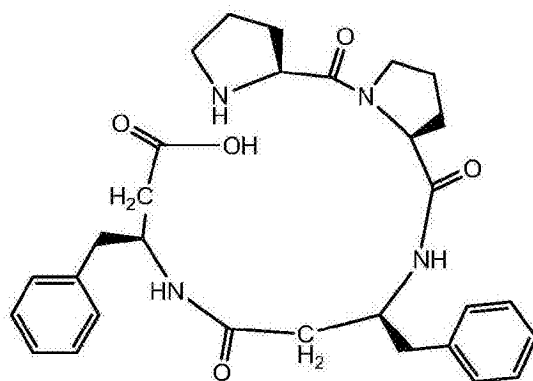
II-B-2



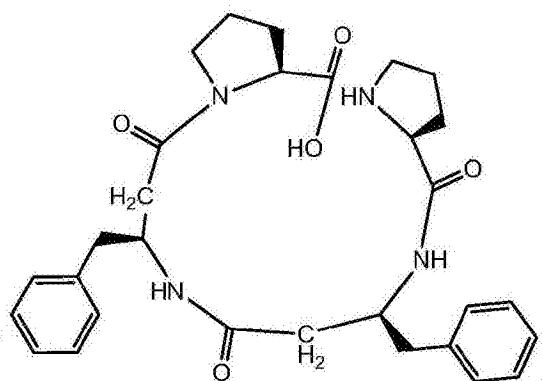
II-B-3



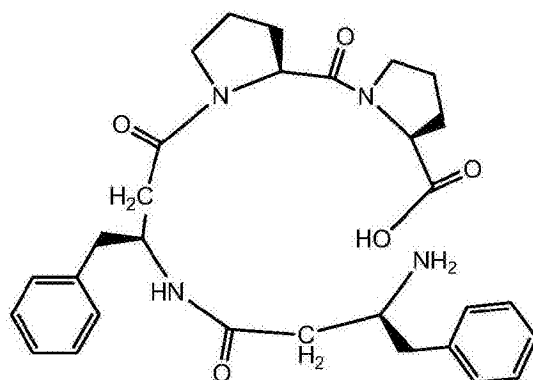
II-B-4



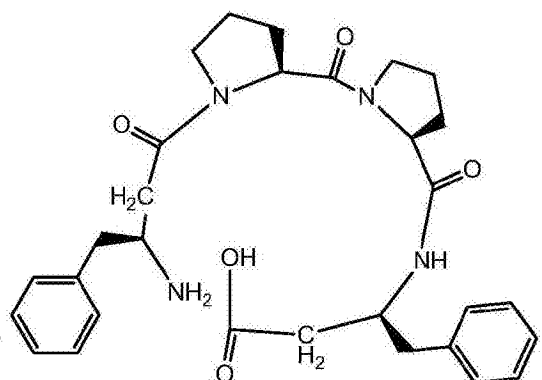
II-C-1



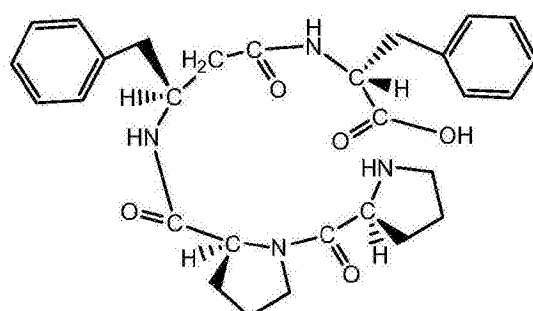
II-C-2



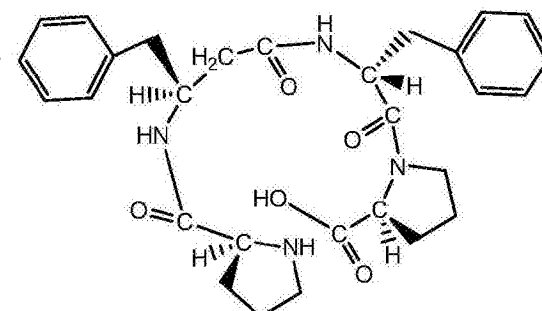
II-C-3



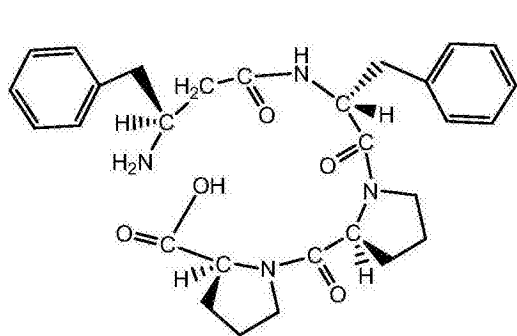
II-C-4



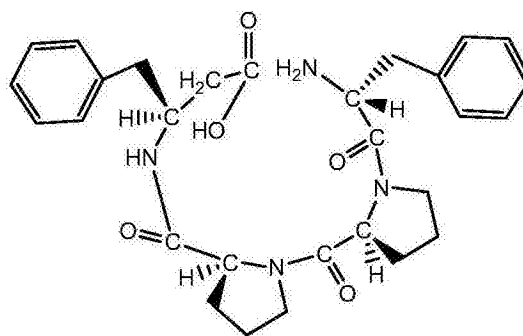
II-D-1



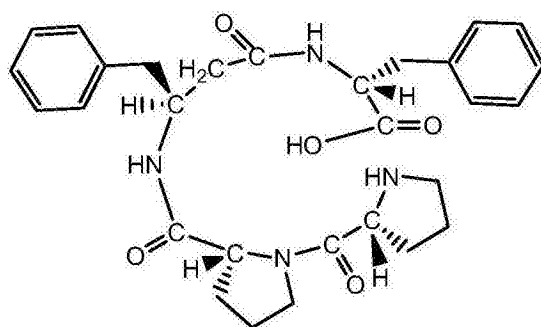
II-D-2



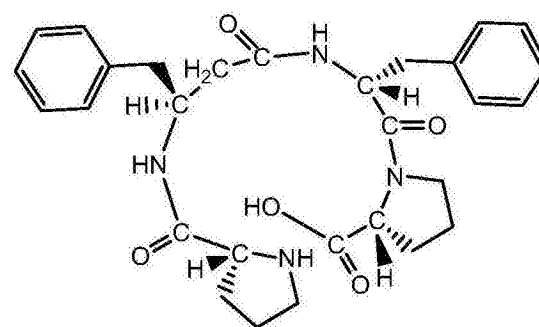
II-D-3



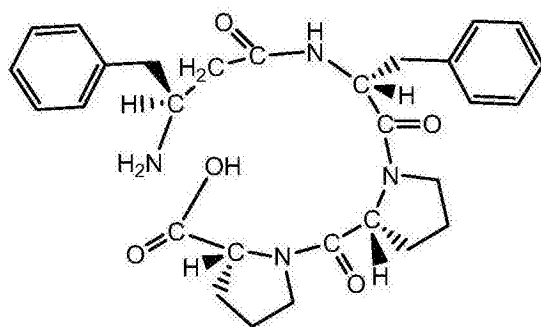
II-D-4



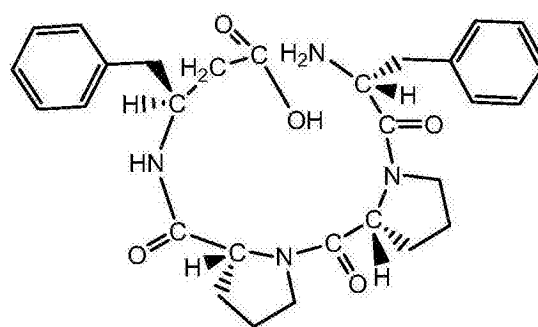
II-E-1



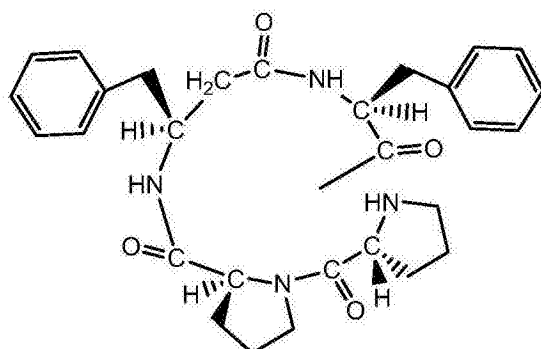
II-E-2



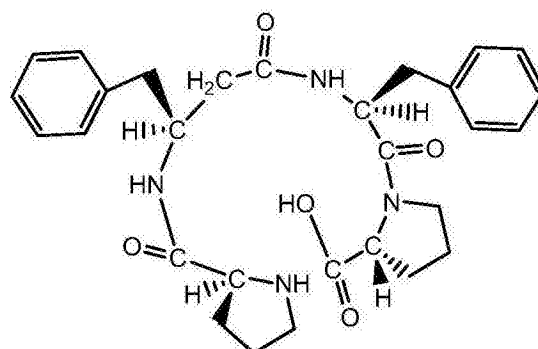
II-E-3



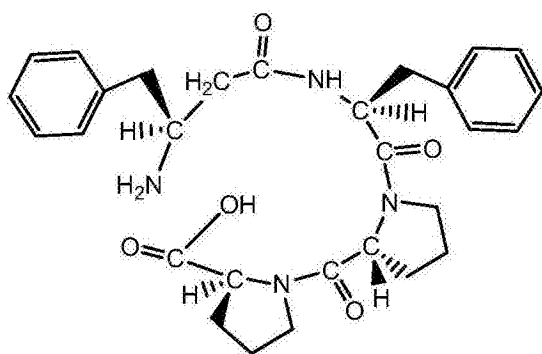
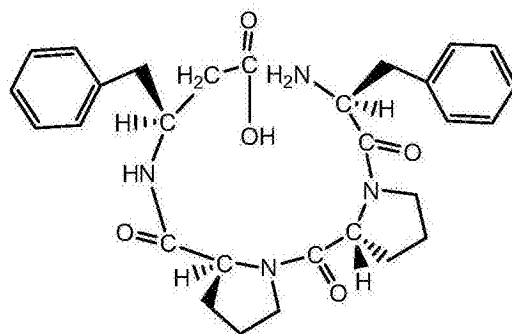
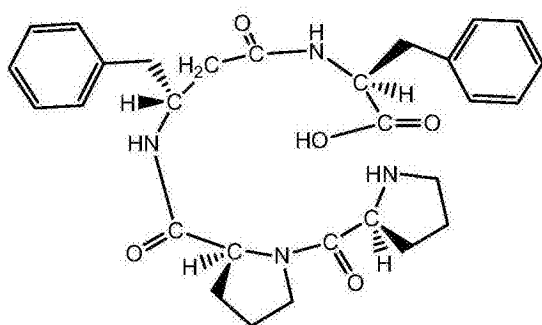
II-E-4



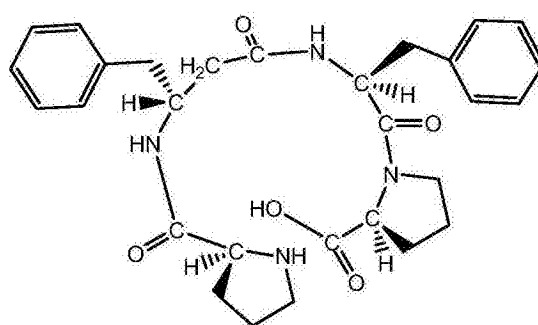
II-F-1



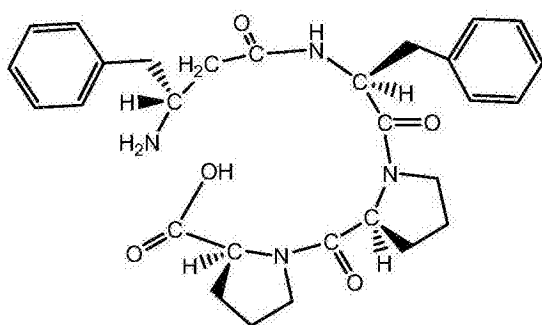
II-F-2

**II-F-3****II-F-4**

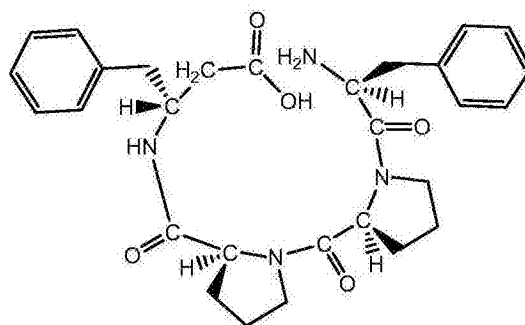
II-G-1



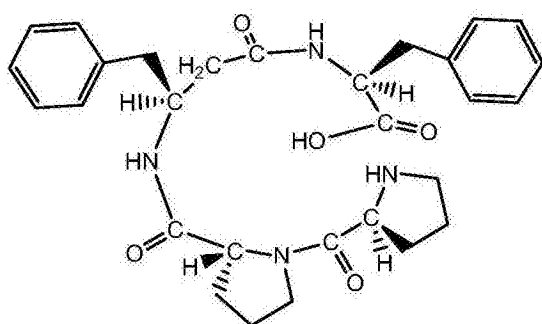
II-G-2



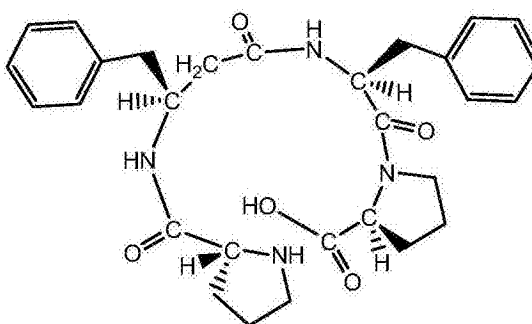
II-G-3



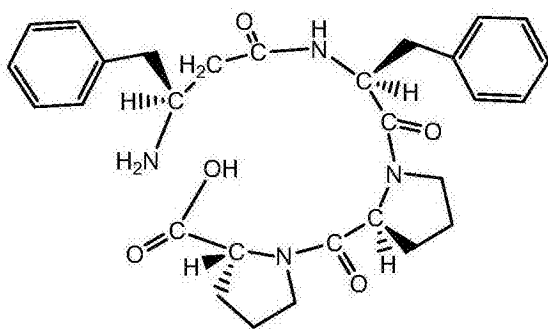
II-G-4



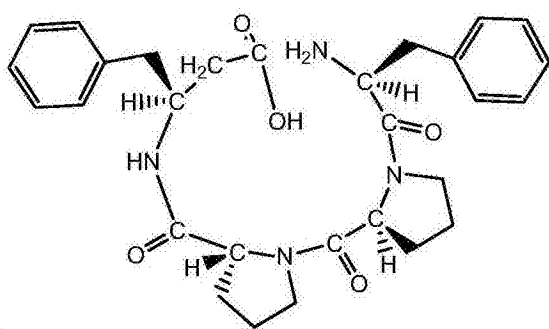
II-H-1



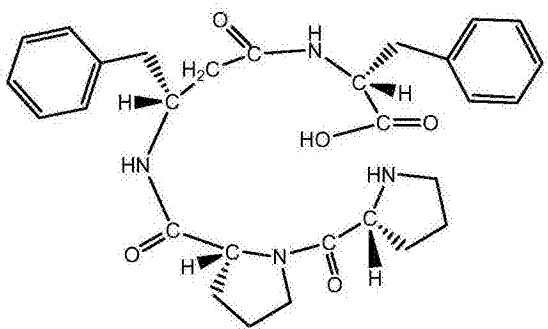
II-H-2



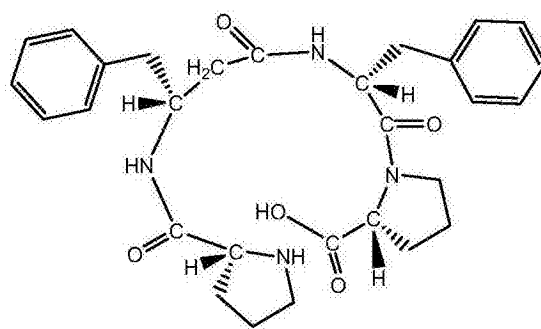
II-H-3



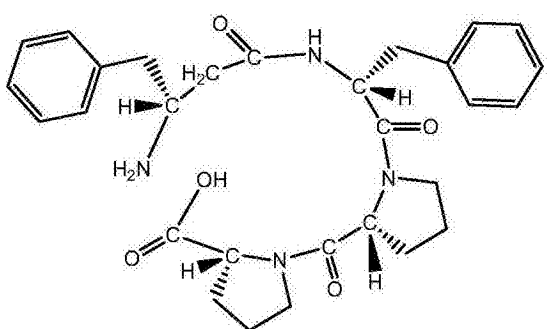
II-H-4



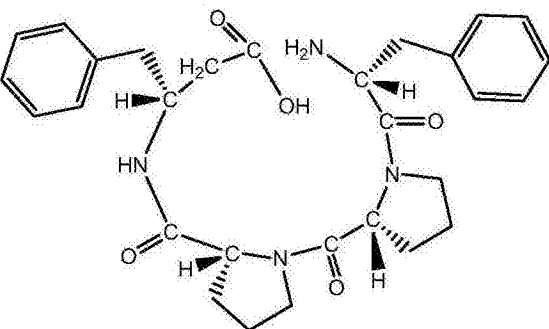
II-J-1



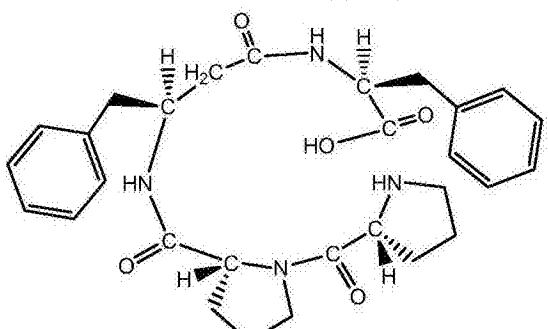
II-J-2



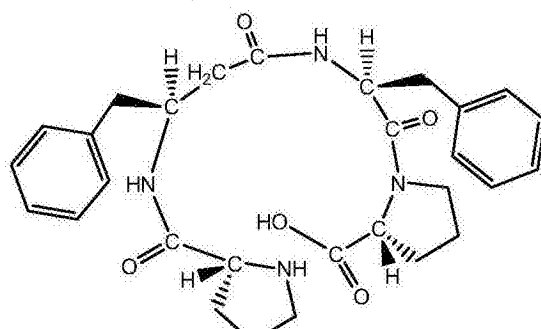
II-J-3



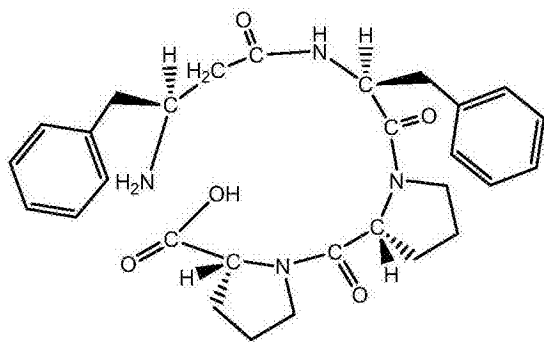
II-J-4



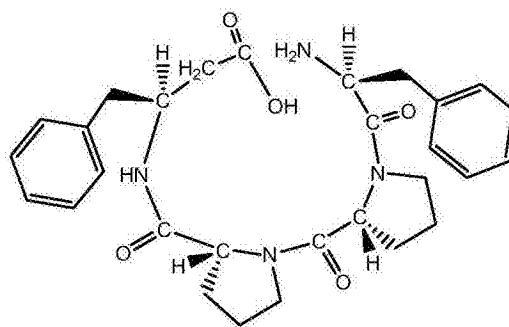
II-K-1



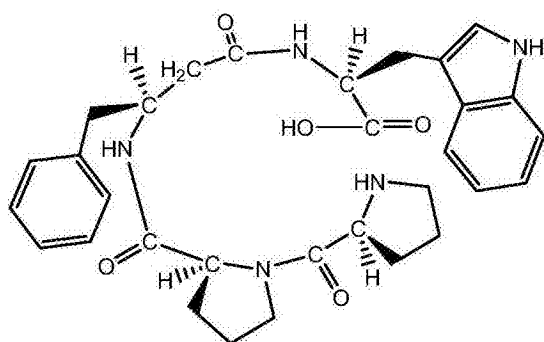
II-K-2



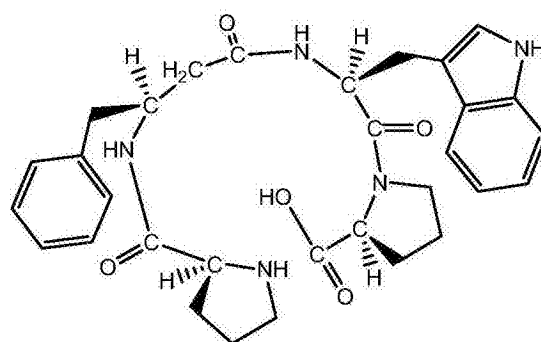
II-K-3



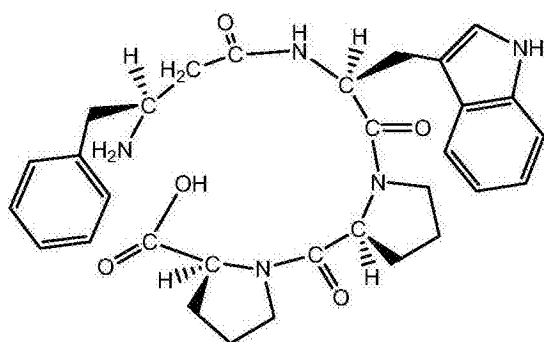
II-K-4



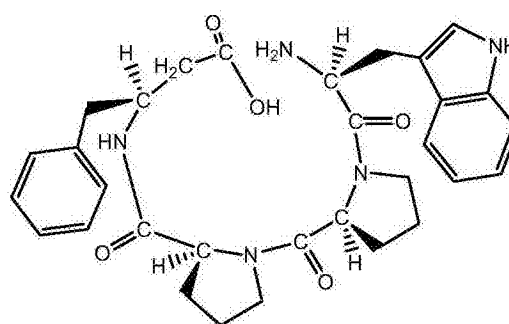
II-L-1



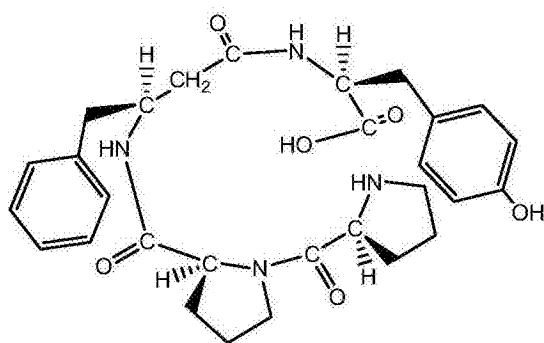
II-L-2



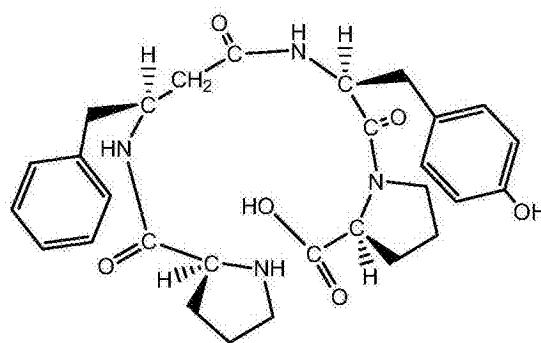
II-L-3



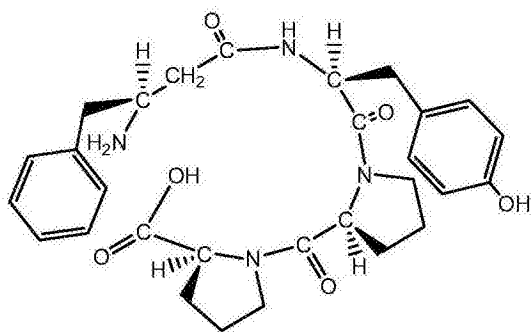
II-L-4



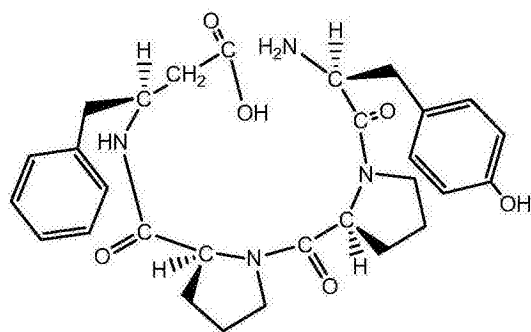
II-M-1



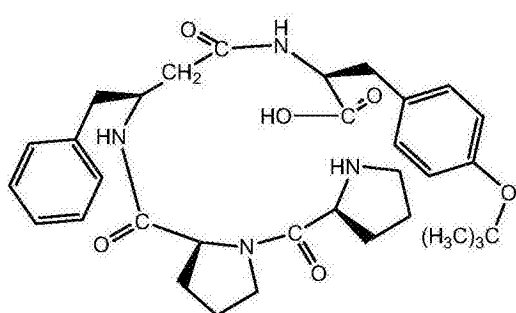
II-M-2



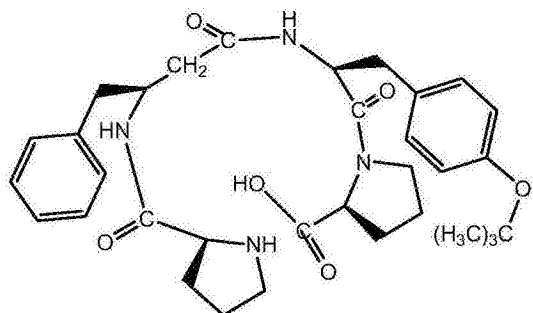
II-M-3



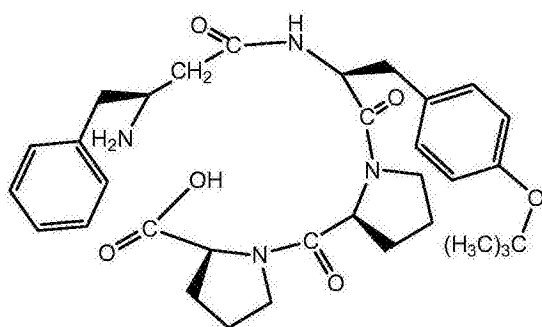
II-M-4



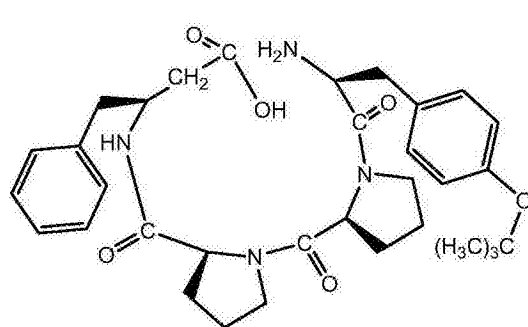
II-N-1



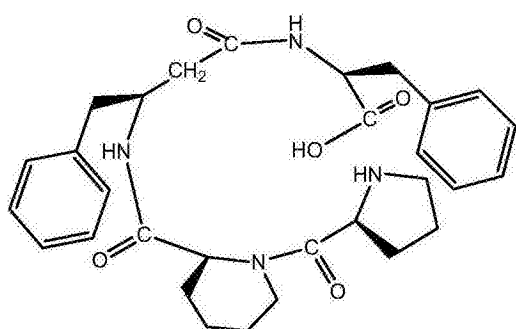
II-N-2



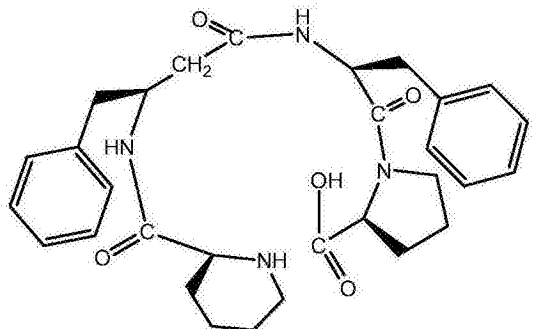
II-N-3



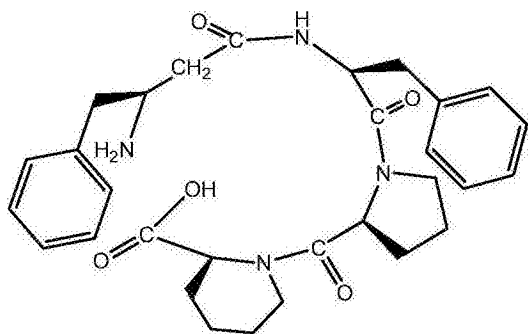
II-N-4



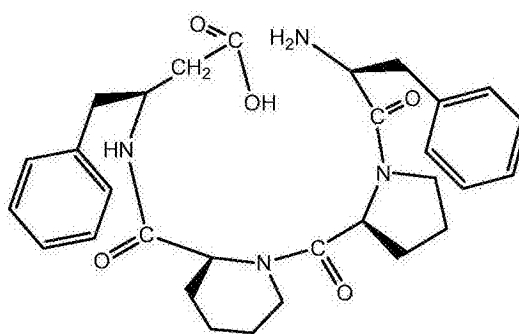
II-O-1



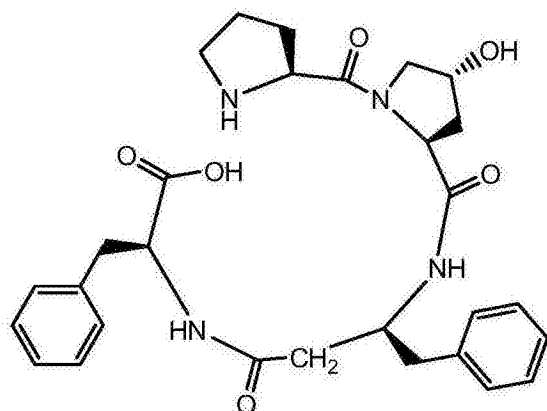
II-O-2



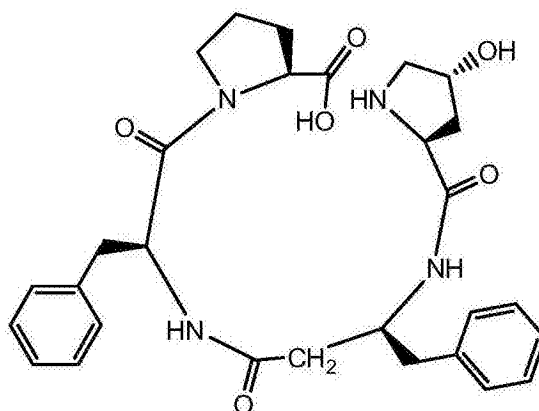
II-O-3



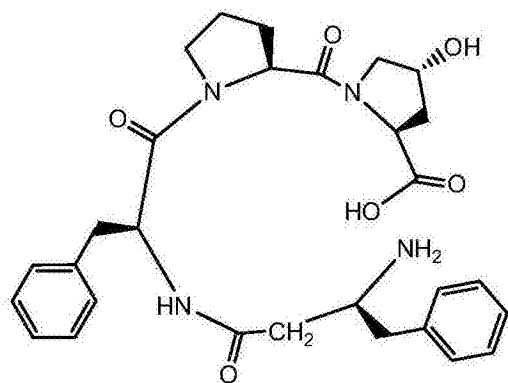
II-O-4



II-P-1

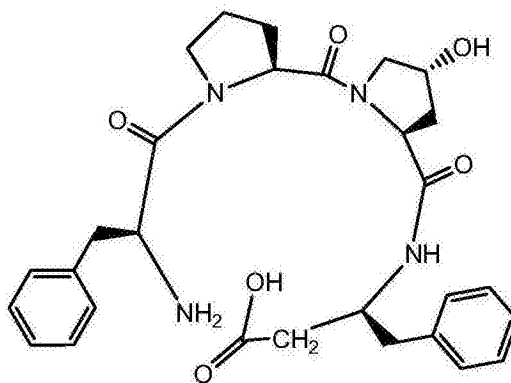


II-P-2



II-P-3

和



II-P-4

213. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-A-1。

214. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-A-2。

215. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-A-3。

216. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-A-4。

217. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-B-1。

218. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-B-2。

219. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-B-3。

220. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-B-4。

221. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-C-1。

222. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-C-2。

- 223. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-C-3。
- 224. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-C-4。
- 225. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-D-1。
- 226. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-D-2。
- 227. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-D-3。
- 228. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-D-4。
- 229. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-E-1。
- 230. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-E-2。
- 231. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-E-3。
- 232. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-E-4。
- 233. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-F-1。
- 234. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-F-2。
- 235. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-F-3。
- 236. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-F-4。
- 237. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-G-1。
- 238. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-G-2。
- 239. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-G-3。
- 240. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-G-4。
- 241. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-H-1。
- 242. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-H-2。
- 243. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-H-3。
- 244. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-H-4。
- 245. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-J-1。
- 246. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-J-2。
- 247. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-J-3。
- 248. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-J-4。
- 249. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-K-1。
- 250. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-K-2。
- 251. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-K-3。
- 252. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-K-4。
- 253. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-L-1。
- 254. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-L-2。
- 255. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-L-3。
- 256. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-L-4。
- 257. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-M-1。
- 258. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-M-2。
- 259. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-M-3。
- 260. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-M-4。
- 261. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-N-1。

- 262. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-N-2。
- 263. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-N-3。
- 264. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-N-4。
- 265. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-O-1。
- 266. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-O-2。
- 267. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-O-3。
- 268. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-O-4。
- 269. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-P-1。
- 270. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-P-2。
- 271. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-P-3。
- 272. 根据权利要求212所述的化合物,其具有式II-P-4。

环状四肽及其治疗性应用

[0001] 背景

[0002] 免疫抑制药物常用于移植和治疗自身免疫性疾病。这些药物的生产成本高昂,并且这些药物中最常用的一一即环孢霉素A、他克莫司(tacrolimus)和雷帕霉素,显示不利的副作用。探索无副作用的新型免疫抑制药物,特别是天然肽免疫调节剂及其类似物类别中的免疫抑制药物,是药物化学的严正挑战。

[0003] 环肽A(Cyclolinopeptide A,CLA)——疏水性极强的环状九肽,在1959被首次分离于亚麻种子。CLA具有强免疫抑制性,其效力相当于环孢霉素A(CsA)。CLA的作用机制显示类似于CsA,即,CLA与导致神经钙蛋白失活的亲环蛋白A形成复合物,尽管亲和力要低得多(Gaymes et al.,Febs Lett,1997,418,224-227)。CLA抑制体液和细胞免疫应答以及移植物抗宿主反应;延长同种异体皮肤移植物的存活;缓和大鼠的佐剂后(post-adjuvant)多关节炎和新西兰黑色小鼠的溶血性贫血;并且,类似于CsA,抑制IL1和IL-2生成。不幸地,CLA的高疏水性是该化合物在治疗中潜在应用的阻碍。

[0004] 肽链的连续位置包含丙氨酸残基的线性CLA类似物被发现具有免疫抑制性(Wieczorek et al.,Arch Immunol Ther Exp,1992,40,213-216)。还发现,线性CLA类似物的活性随肽链自N端缩短而逐渐减少,同时显示C端四肽和三肽的活性增加(Siemion et al.,Arch Immunol Ther Exp,1994,42,459-465)。单个亲水性苏氨酸残基引入CLA分子没有造成在水中的溶解性提高。但是,溶解性提高通过在一个或两个苯丙氨酸残基的苯环的对位引入磺酸基而得以实现,而不损失生物学活性(Siemion et al.,Arch Immunol Ther Exp,1992,40,257-261;Cebrat et al.,J Peptide Res.,1997,49,415-420)。此外,观察到较长线性肽链含有四肽(Pro-Pro-Phe-Phe)或三肽(Pro-Phe-Phe)片段对免疫抑制活性具有重要意义(Wieczorek et al.,Arch Immunol Ther Exp,1993,41,291-296;Cebrat et al.,Pol.JChem,1997,71,1401)。

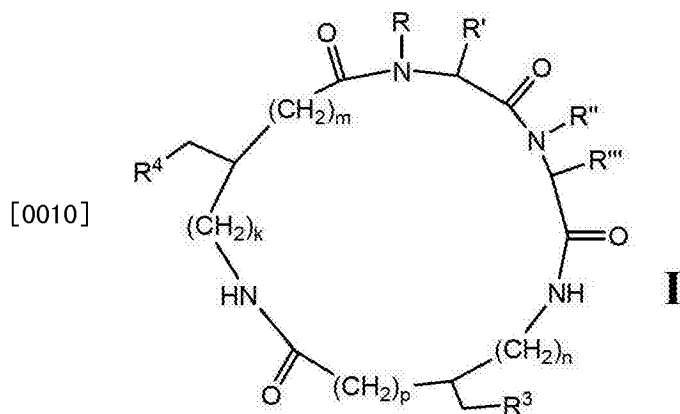
[0005] 脯氨酸残基之间的顺式-肽键被1,5-双取代四唑环取代(顺式构型中酰胺键的良好模拟)的一系列类似物显示出免疫抑制活性相当于CsA。(Karczmarek et al.,Biopolymers,2002,63,343-357)。

[0006] 5和/或8位的亮氨酸残基被其羟甲基类似物取代的合成CLA类似物显示出在水中的溶解性相对于CLA增加四倍,但也显示出生物学活性相对于天然CLA降低25%(Zubrzak et al.,Biopolymers(Peptide Science),2005,80,347-356)。

[0007] 通过用 β^2 -异脯氨酸和 β^3 -高脯氨酸取代CLA脯氨酸残基得到一系列九种CLA类似物。相对于CsA,这些CLA类似物在细胞免疫应答中显示出强抑制性。这些类似物多数实际上无细胞毒性(Katarzyńska et al.,J Pept Sci,2009,14,1283-1294)。

[0008] 发明概述

[0009] 根据本发明的实施方式提供了具有式I的化合物:



[0011] 其中

[0012] k 、 m 、 n 和 p 各自独立地为0、1或2；

[0013] R 和 R' 各自独立地选自H和 C_{1-3} 烷基,或在合在一起时, R 和 R' 是 $-CR^1R^{1'}-X-CH_2-$,其中 $CR^1R^{1'}$ 连接于主链氮, R^1 和 $R^{1'}$ 各自独立地选自H和 C_{1-3} 烷基, X 选自 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 和 $-NH-$ ；

[0014] R'' 和 R''' 各自独立地选自H和 C_{1-3} 烷基,或在合在一起时, R'' 和 R''' 是 $-CR^2R^{2'}-X'-CH_2-$,其中 $CR^2R^{2'}$ 连接于主链氮, R^2 和 $R^{2'}$ 各自独立地选自H和 C_{1-3} 烷基, X' 选自 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 和 $-NH-$ ；和

[0015] R^3 和 R^4 各自独立地选自芳基、取代芳基、杂芳基和取代杂芳基；

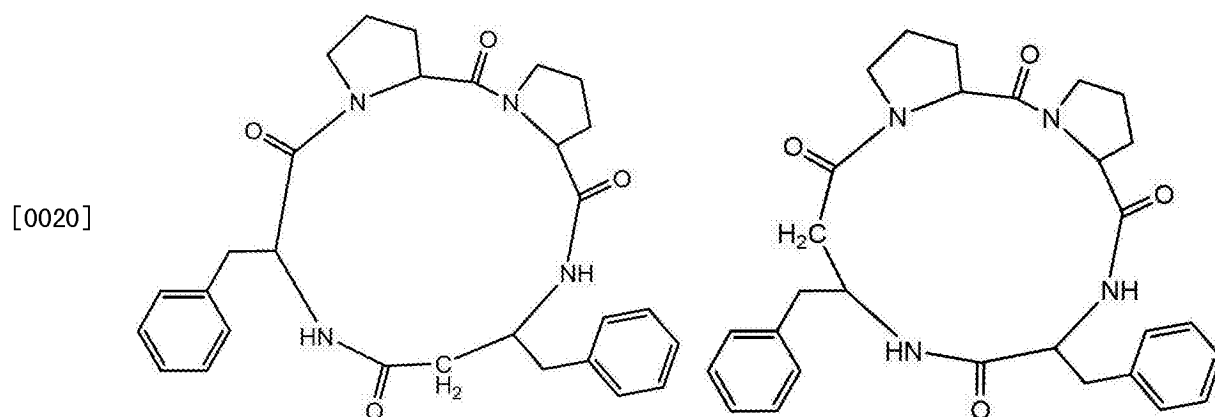
[0016] 或其药学上可接受的盐。

[0017] 在一些实施方式中, R^3 和 R^4 至少其中一个是苯基。在一些实施方式中, R^3 和 R^4 至少其中一个是4-羟基苯基。在一些实施方式中, R^3 和 R^4 至少其中一个是4-叔丁氧基苯基。在一些实施方式中, R^3 和 R^4 至少其中一个是2-吡啶基。在一些实施方式中, R^3 和 R^4 均是苯基。在一些实施方式中, R^3 和 R^4 其中一个是苯基,并且 R^3 和 R^4 其中另一个是4-羟基苯基。在一些实施方式中, R^3 和 R^4 其中一个是苯基,并且 R^3 和 R^4 其中另一个是4-叔丁氧基苯基。在一些实施方式中, R^3 和 R^4 其中一个是苯基,并且 R^3 和 R^4 其中另一个是2-吡啶基。在一些实施方式中, $-CH_2-R^3$ 所连接的碳具有绝对(R)-立体化学。在一些实施方式中, $-CH_2-R^3$ 所连接的碳具有绝对(S)-立体化学。在一些实施方式中, $-CH_2-R^4$ 所连接的碳具有绝对(R)-立体化学。在一些实施方式中, $-CH_2-R^4$ 所连接的碳具有绝对(S)-立体化学。在一些实施方式中, k 、 m 、 n 和 p 其中一个为1,并且 k 、 m 、 n 和 p 其余为0。在一些实施方式中, k 、 m 、 n 和 p 其中两个为1,并且 k 、 m 、 n 和 p 其余为0。在一些实施方式中, k 和 m 至少其中一个不为0。在一些实施方式中, n 和 p 至少其中一个不为0。在一些实施方式中, k 和 m 至少其中一个不为0,并且 n 和 p 至少其中一个不为0。在一些实施方式中, k 和 n 均为0。在一些实施方式中, k 和 n 均为0, m 和 p 其中一个为0,并且 m 和 p 中另一个为1。在一些实施方式中, k 和 n 均为0,并且 m 和 p 均为1。在一些实施方式中,全部四个氨基酸为L-氨基酸。在一些实施方式中,其中三个氨基酸为L-氨基酸,并且其中一个氨基酸为D-氨基酸。在一些实施方式中,其中两个氨基酸为L-氨基酸,并且其中两个氨基酸为D-氨基酸。在一些实施方式中,其中一个氨基酸为L-氨基酸,并且其中三个氨基酸为D-氨基酸。在一些实施方式中,全部四个氨基酸为D-氨基酸。

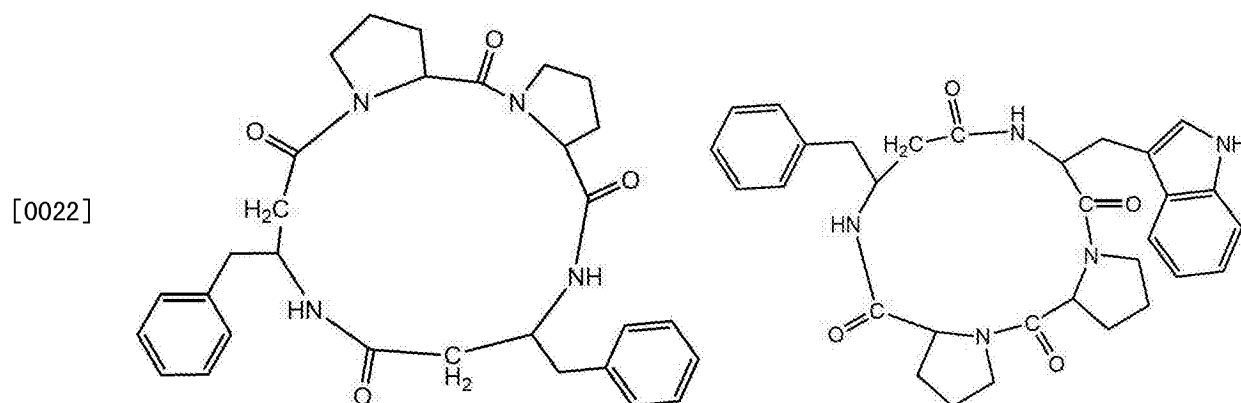
[0018] 在一些实施方式中, R 与 R' 合在一起形成 $-(CH_2)_3-$,即, R 与 R' 合在一起形成 $-CR^1R^{1'}-X-CH_2-$,其中 R^1 和 $R^{1'}$ 均是H,并且 X 是 CH_2 。在一些实施方式中, R'' 和 R''' 合在一起形成-

$(\text{CH}_2)_3$ -, 即, R'' 和 R''' 合在一起形成 $-\text{CR}^2\text{R}^{2'}-\text{X}'-\text{CH}_2-$, 其中 R^2 和 $\text{R}^{2'}$ 均是 H, 并且 X' 是 CH_2 。在一些实施方式中, R 与 R' 合在一起形成 $-(\text{CH}_2)_4-$, 即, R 与 R' 合在一起形成 $-\text{CR}^1\text{R}^{1'}-\text{X}-\text{CH}_2-$, 其中 R^1 和 $\text{R}^{1'}$ 均是 H, 并且 X 是 $(\text{CH}_2)_2$ 。在一些实施方式中, R'' 和 R''' 合在一起形成 $-(\text{CH}_2)_4-$, 即, R'' 和 R''' 合在一起形成 $-\text{CR}^2\text{R}^{2'}-\text{X}-\text{CH}_2-$, 其中 R^2 和 $\text{R}^{2'}$ 均是 H, 并且 X 是 $(\text{CH}_2)_2$ 。在一些实施方式中, R 与 R' 合在一起形成 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$, 即, R 与 R' 合在一起形成 $-\text{CR}^1\text{R}^{1'}-\text{X}-\text{CH}_2-$, 其中 R^1 和 $\text{R}^{1'}$ 均是 H, 并且 X 是 $\text{CH}(\text{OH})$ 。在一些实施方式中, R'' 和 R''' 合在一起形成 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$, 即, R'' 和 R''' 合在一起形成 $-\text{CR}^2\text{R}^{2'}-\text{X}'-\text{CH}_2-$, 其中 R^2 和 $\text{R}^{2'}$ 均是 H, 并且 X' 是 $\text{CH}(\text{OH})$ 。在 R 与 R' 合在一起的一些实施方式中, R' 所连接的碳具有绝对(S)-立体化学。在 R 与 R' 合在一起的一些实施方式中, R' 所连接的碳具有绝对(R)-立体化学。在 R'' 和 R''' 合在一起的一些实施方式中, R'' 所连接的碳具有绝对(S)-立体化学。在 R'' 和 R''' 合在一起的一些实施方式中, R''' 所连接的碳具有绝对(R)-立体化学。

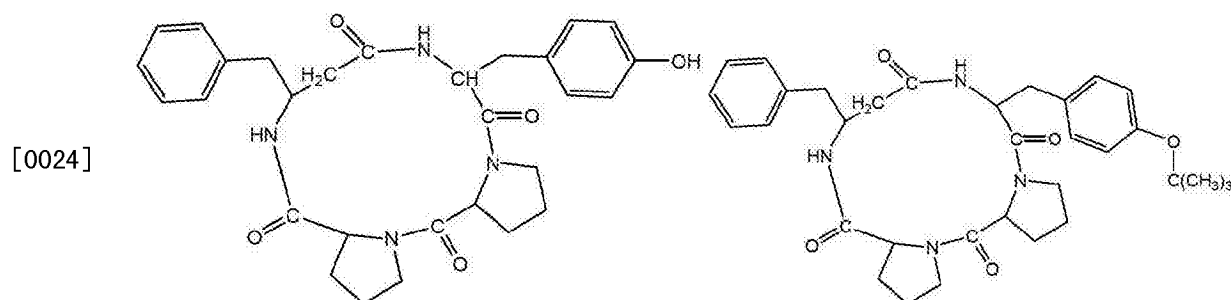
[0019] 在一些实施方式中, 化合物选自:



[0021] I-1(环状(-Pro-Pro- β^3 hoPhe-Phe-)), I-2(环状(-Pro-Pro-Phe- β^3 hoPhe-)),



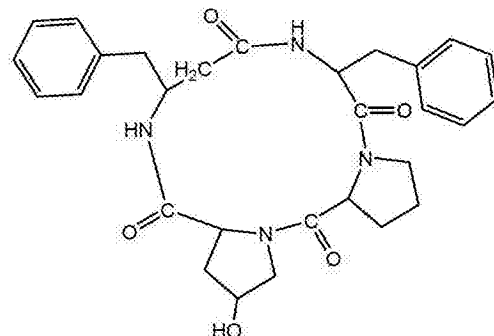
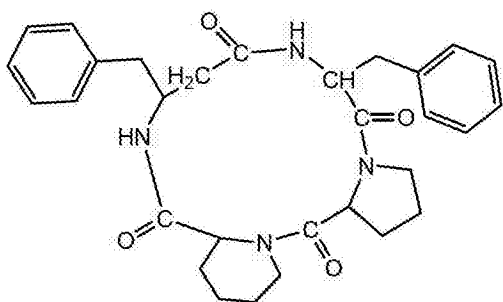
[0023] I-3(环状(-Pro-Pro- β^3 hoPhe- β^3 hoPhe-)), I-4(环状(-Pro-Pro- β^3 hoPhe-Trp-)),



[0025] I-5(环状(-Pro-Pro- β^3 hoPhe-Tyr-)), I-6(环状(-Pro-Pro- β^3 hoPhe-Tyr(t-

Bu)-))、

[0026]

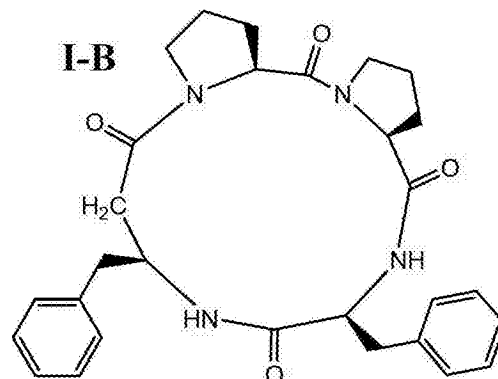
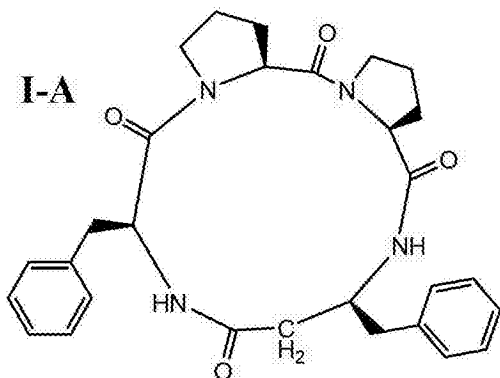


[0027] I-7(环状(-Pro-Pip-β³hoPhe-Phe-))和I-8(环状(Pro-Hyp-β³hoPhe-Phe-))。

[0028] 在一些实施方式中,化合物是式I-1化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-2化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-3化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-4化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-5化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-6化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-7化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-8化合物。

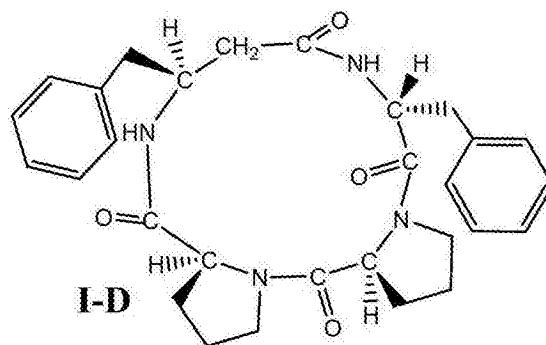
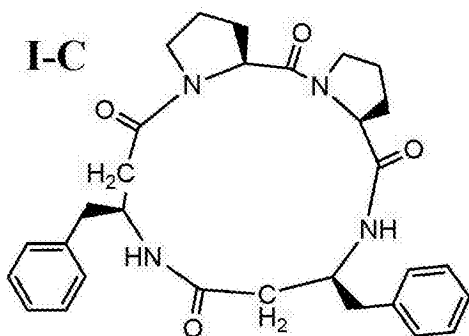
[0029] 在一些实施方式中,化合物选自:

[0030]



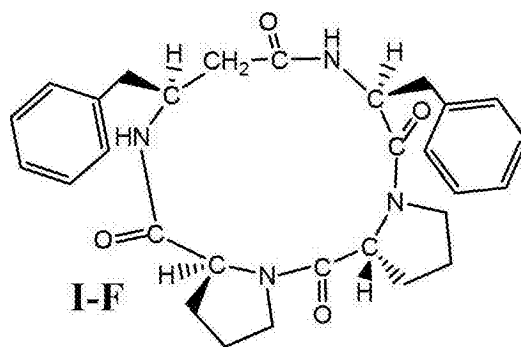
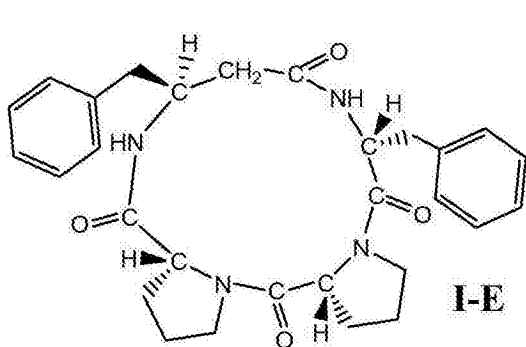
[0031] ((环状(-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-β³hoPhe-(L)-Phe-))、(环状(-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-β³hoPhe-))、

[0032]



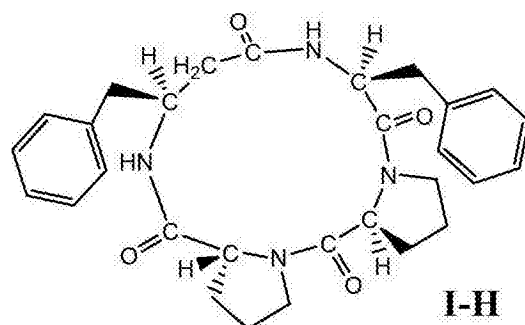
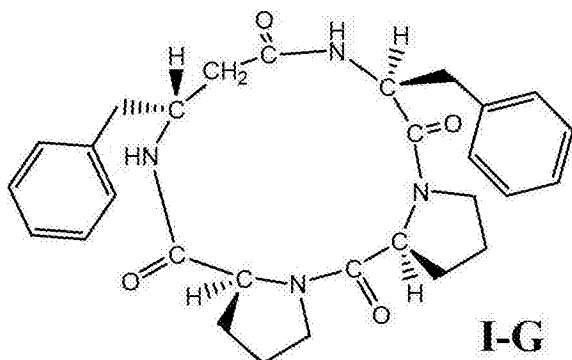
[0033] (环状(-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-β³hoPhe-(L)-β³hoPhe-))、(环状(-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-β³hoPhe-(D)-Phe-))、

[0034]



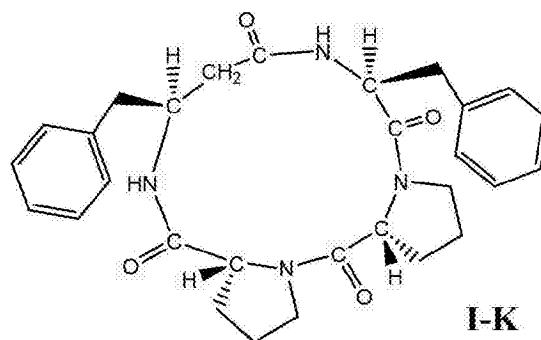
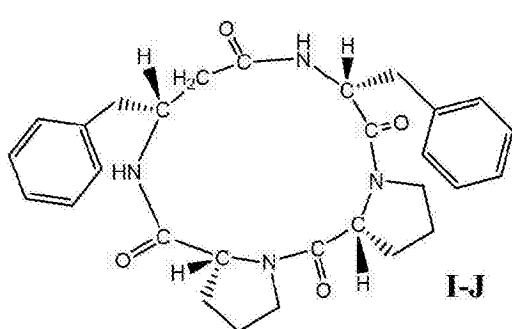
[0035] (环状(-(D)-Pro-(D)-Pro-(L)- β^3 HoPhe-(D)-Phe-)), (环状(-(D)-Pro-(L)-Pro-(L)- β^3 HoPhe-(L)-Phe-)),

[0036]



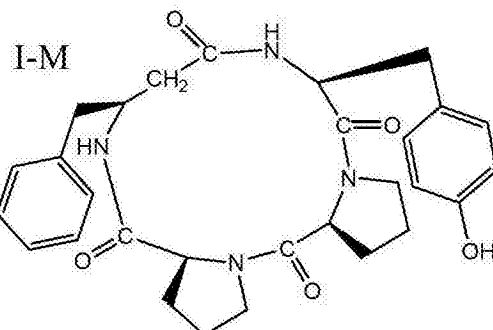
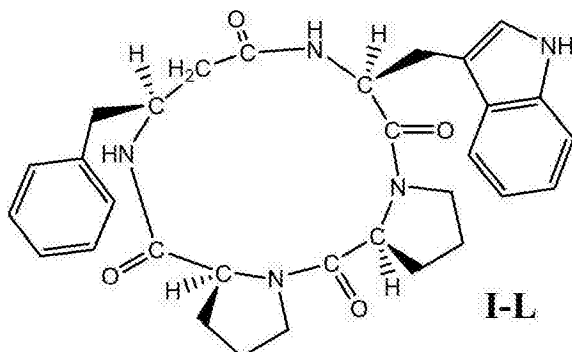
[0037] (环状(-(L)-Pro-(L)-Pro-(D)- β^3 HoPhe-(L)-Phe-)), (环状(-(L)-Pro-(D)-Pro-(L)- β^3 HoPhe-(L)-Phe-)),

[0038]



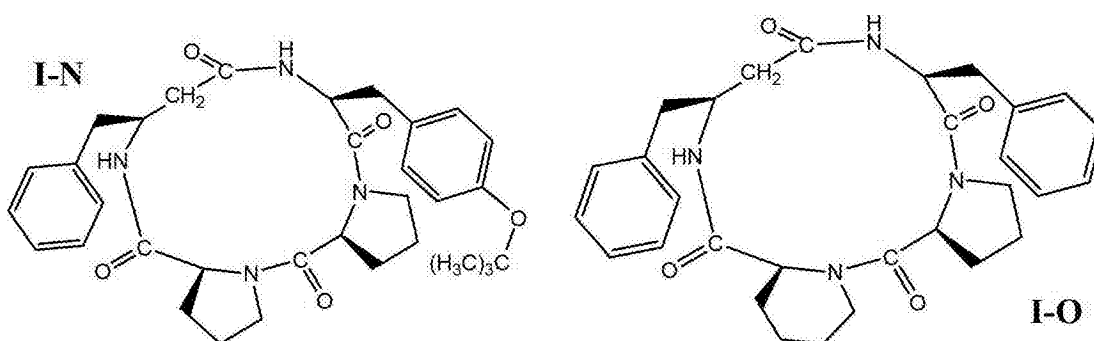
[0039] (环状(-(D)-Pro-(D)-Pro-(D)- β^3 HoPhe-(D)-Phe-)), (环状(-(D)-Pro-(D)-Pro-(L)- β^3 HoPhe-(L)-Phe-)),

[0040]



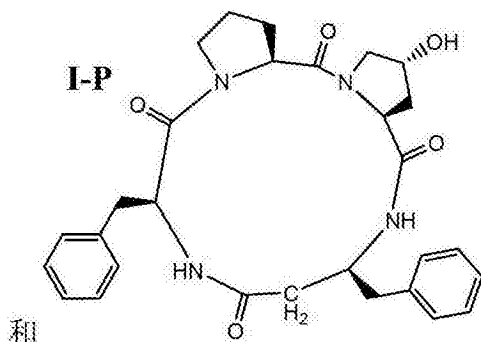
[0041] (环状(-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)- β^3 HoPhe-(L)-Trp-)), (c(-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)- β^3 HoPhe-(L)-Tyr-)),

[0042]



[0043] (环状[-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)- β^3 HoPhe-(L)-Tyr(tBu)-])、(环状(-(L)-Pro-(L)-Pip-(L)- β^3 HoPhe-(L)-Phe-))

[0044]



和

[0045] (环状(-(L)-Pro-(L)-t-Hyp-(L)- β^3 HoPhe-(L)-Phe-))。

[0046] 在一些实施方式中,化合物是式I-A化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-B化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-C化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-D化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-E化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-F化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-G化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-H化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-I化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-J化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-K化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-L化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-M化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-N化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-O化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-P化合物。

[0047] 在一些实施方式中,式I化合物中的一个或多个氨基处于受保护形式。

[0048] 根据本发明的实施方式还提供了包含式I化合物及其药学上可接收的载体、赋形剂或稀释剂的药物组合物。在一些实施方式中,化合物是式I-1化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-2化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-3化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-4化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-5化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-6化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-7化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-8化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-A化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-B化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-C化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-D化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-E化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-F化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-G化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-H化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-I化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-J化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-K化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-L化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-M化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-N化合物。在

一些实施方式中,化合物是式I-0化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-P化合物。

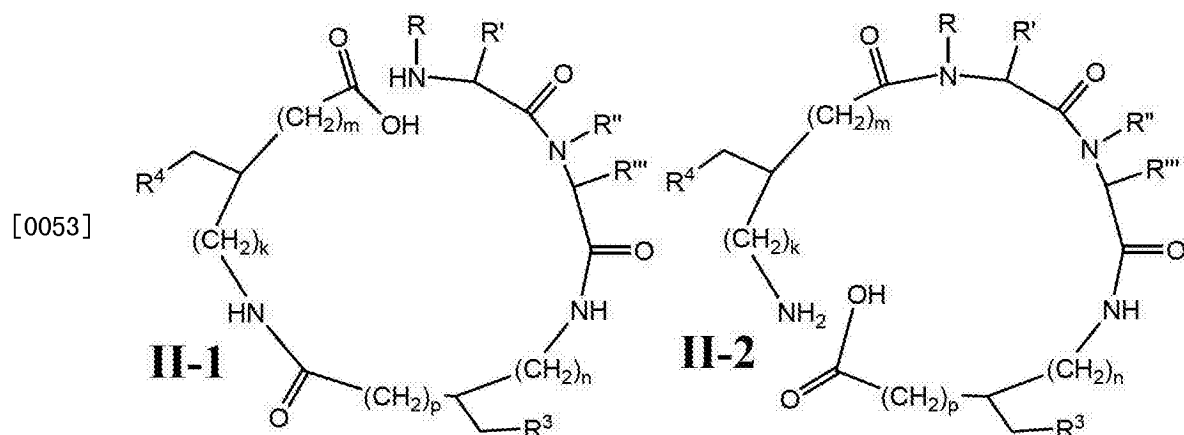
[0049] 根据本发明的实施方式还提供了抑制患者免疫应答的方法,包括给予对其有需要的患者有效量的式I化合物。在一些实施方式中,被抑制的免疫应答是炎症。在一些实施方式中,被抑制的免疫应答是移植排斥。在一些实施方式中,化合物是式I-1化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-2化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-3化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-4化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-5化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-6化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-7化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-8化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-A化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-B化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-C化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-D化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-E化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-F化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-G化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-H化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-I化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-J化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-K化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-L化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-M化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-N化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-O化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-P化合物。

[0050] 根据本发明的实施方式还提供了治疗或预防患者免疫介导的疾病或病症的方法,包括给予对其有需要的患者有效量的式I化合物。根据本发明的实施方式还提供了降低第二药物毒性性状的方法,包括联合第二药物给予式I化合物。在一些实施方式中,免疫介导的疾病或病症选自自身免疫性疾病、炎症进展、移植排斥和过敏反应。在一些实施方式中,免疫介导的疾病或病症选自银屑病、扁平苔藓及其他丘疹鳞屑性疾病。在一些实施方式中,免疫介导的疾病或病症选自湿疹和皮炎。在一些实施方式中,湿疹或皮炎选自湿疹、特应性湿疹、脂溢性皮炎和汗疱。在一些实施方式中,免疫介导的疾病或病症是皮肤对阳光的反应。在一些实施方式中,免疫介导的疾病或病症选自非特异性皮肤刺激和昆虫叮咬。在一些实施方式中,免疫介导的疾病或病症是荨麻疹。在一些实施方式中,免疫介导的疾病或病症选自原发性皮肤肿瘤(例如,黑素瘤);类风湿关节炎(自身免疫性和感染引起性);克罗恩病;炎性肠道疾病;肠易激综合征;神经退行性疾病(例如,多发性硬化症);帕金森病;移植抗宿主反应;严重银屑病;和特应性皮炎。在一些实施方式中,联合化学治疗药物给予式I化合物,从而减少化学治疗药物的毒性作用。在一些实施方式中,化合物是式I-1化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-2化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-3化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-4化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-5化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-6化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-7化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-8化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-A化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-B化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-C化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-D化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-E化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-F化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-G化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-H化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-I化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-J化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-K化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-L化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-M化合物。在一些实施方式中,化合物

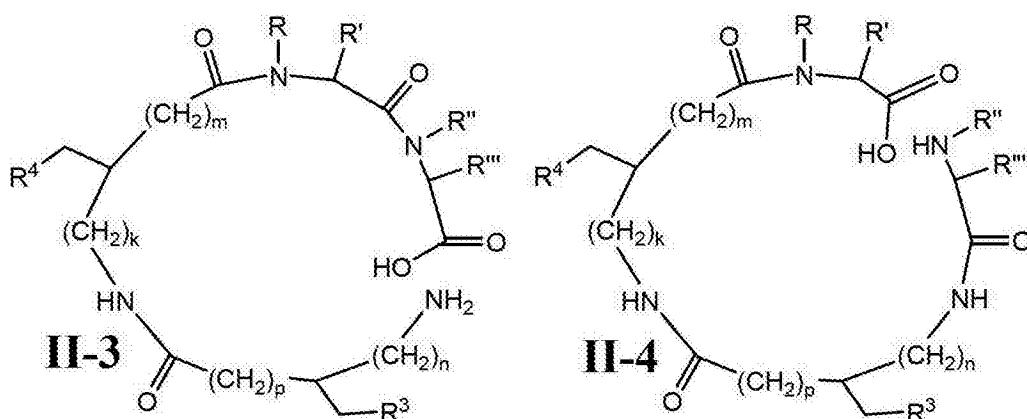
是式I-N化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-O化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-P化合物。

[0051] 根据本发明的实施方式还提供了试剂盒,包括式I化合物和用化合物(a)抑制患者的免疫应答、(b)治疗或预防患者免疫介导的疾病或病症或(c)降低第二药物毒性性状的说明书。在一些实施方式中,免疫应答是炎症。在一些实施方式中,免疫应答是移植排斥。在一些实施方式中,免疫介导的疾病或病症选自自身免疫性疾病、炎症进展、移植排斥、过敏反应。在一些实施方式中,免疫介导的疾病或病症选自银屑病、扁平苔藓及其他丘疹鳞屑性疾病。在一些实施方式中,免疫介导的疾病或病症选自湿疹和皮炎。在一些实施方式中,湿疹或皮炎选自湿疹、特应性湿疹、脂溢性皮炎和汗疱。在一些实施方式中,免疫介导的疾病或病症是皮肤对阳光的反应。在一些实施方式中,免疫介导的疾病或病症选自非特异性皮肤刺激和昆虫叮咬。在一些实施方式中,免疫介导的疾病或病症是荨麻疹。在一些实施方式中,免疫介导的疾病或病症选自原发性皮肤肿瘤(例如,黑素瘤);类风湿关节炎(自身免疫性和感染引起性);克罗恩病;炎症肠道疾病;肠易激综合征;神经退行性疾病(例如,多发性硬化症);帕金森病;移植物抗宿主反应;严重银屑病;和特应性皮炎。在一些实施方式中,说明书指示联合化学治疗药物给予式I化合物,从而减少化学治疗药物的毒性作用。在一些实施方式中,化合物是式I-1化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-2化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-3化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-4化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-5化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-6化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-7化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-8化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-A化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-B化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-C化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-D化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-E化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-F化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-G化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-H化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-I化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-J化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-K化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-L化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-M化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-N化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-O化合物。在一些实施方式中,化合物是式I-P化合物。

[0052] 根据本发明的实施方式还提供了制备式I化合物的方法,包括环化具有式II-1、II-2、II-3或II-4的化合物,其中R、R'、R''、R'''、R³、R⁴、k、m、n和p如式I中限定(在下文中被统称为式II化合物):



[0054]

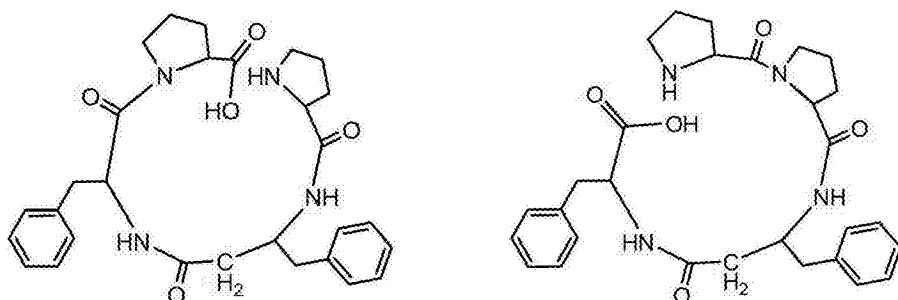


[0055] 形成相应的式I化合物。在一些实施方式中,该方法进一步包括合成式II-1、II-2、II-3或II-4化合物。在一些实施方式中,式II-1、II-2、II-3或II-4化合物通过固相合成而形成。

[0056] 根据本发明的实施方式,还提供了式II-1、II-2、II-3和II-4化合物本身以及这些化合物的受保护形式(例如,其中一个或多个氨基、如N-端氨基或侧链氨基、被例如叔丁氧基羰基保护)和在连接于固相树脂时的受保护或未受保护的形式的这些化合物。在下文中,除非另外指明或在给定的情况下不合逻辑,在述及式II化合物或其亚属或亚种时,这种引述旨在包括如下形式的这种化合物:其中(a)(i)至少部分地受保护或(a)(ii)完全不受保护或脱保护;(b)(i)(1)直接或(2)通过连接体结合于树脂;或(b)(ii)不结合于树脂;或情况(a)和(b)的组合。此外,如本文所述,以简便为目的,游离、非受保护的线性肽显示为中性分子,即在N-端具有 H_2N -并在C-端具有 $-COOH$;但要理解的是,这些部分以及任何可离子化的侧链部分(例如,侧链的羧酸或胺部分)的实际电荷将取决于周围的pH,并且不一定如所显示的。

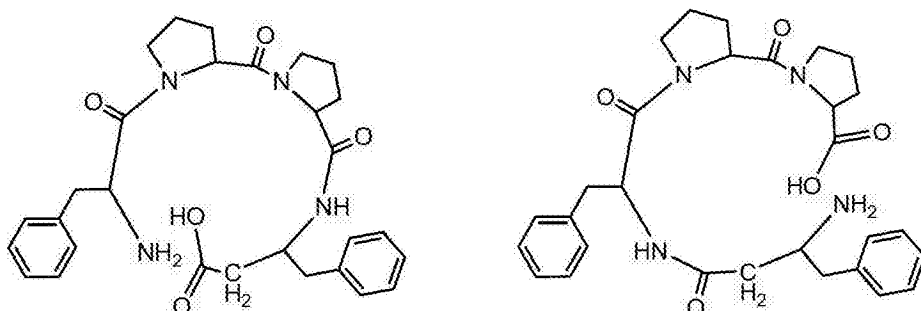
[0057] 在一些实施方式中,式II化合物选自:

[0058]



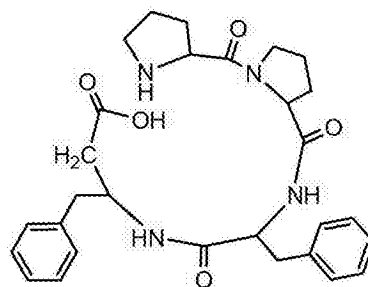
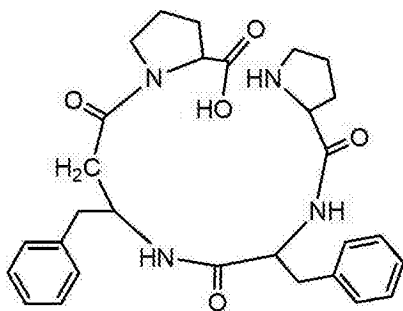
[0059] II-4-a(H-Pro- β^3 hoPhe-Phe-Pro-OH)、II-1-a(H-Pro-Pro- β^3 hoPhe-Phe-OH),

[0060]

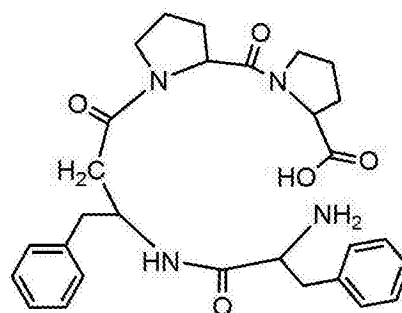
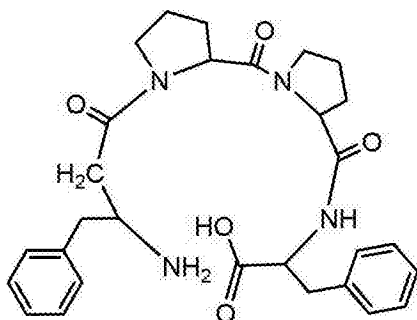


[0061] II-2-a(H_2N -Phe-Pro-Pro- β^3 hoPhe-OH)、II-3-a(H_2N - β^3 hoPhe-Phe-Pro-Pro-OH)、

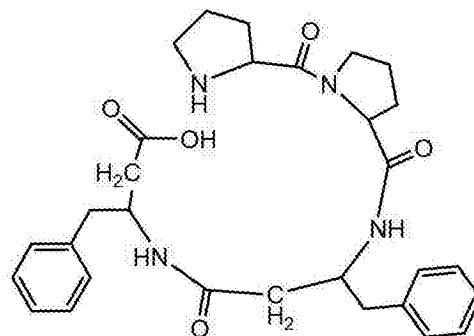
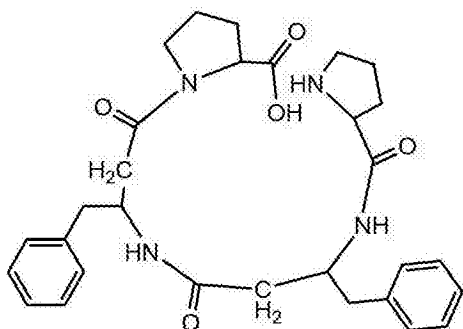
[0062]

[0063] II-4-b(H-Pro-Pro-Phe-β³hoPhe-OH)、II-1-b(H-Pro-Pro-Phe-β³hoPhe-OH)、

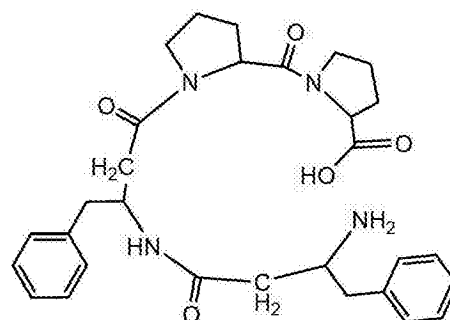
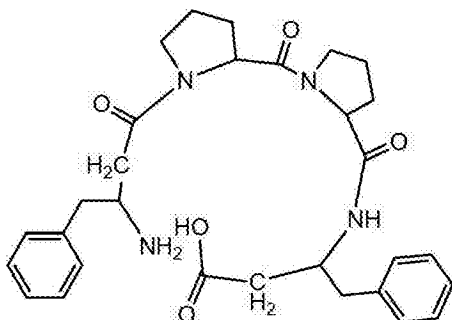
[0064]

[0065] II-2-b(H₂N-β³hoPhe-Pro-Pro-Phe-OH)、II-3-b(H₂N-Phe-β³hoPhe-Pro-Pro-OH)、

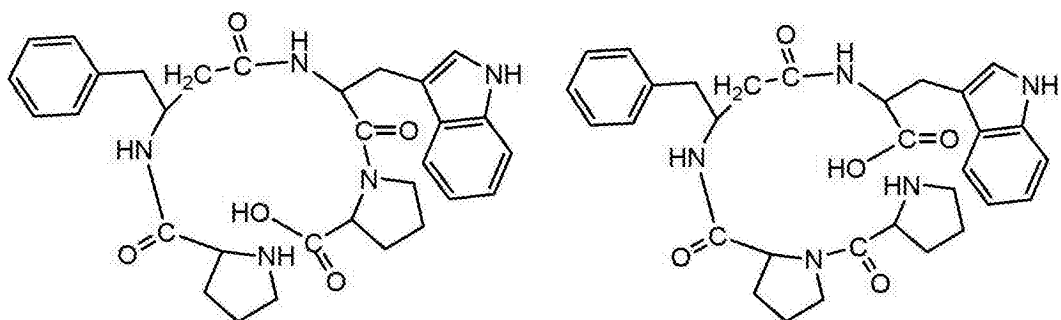
[0066]

[0067] II-4-c(H-Pro-β³hoPhe-β³hoPhe-Pro-OH)、II-1-c(H-Pro-Pro-β³hoPhe-β³hoPhe-OH)、

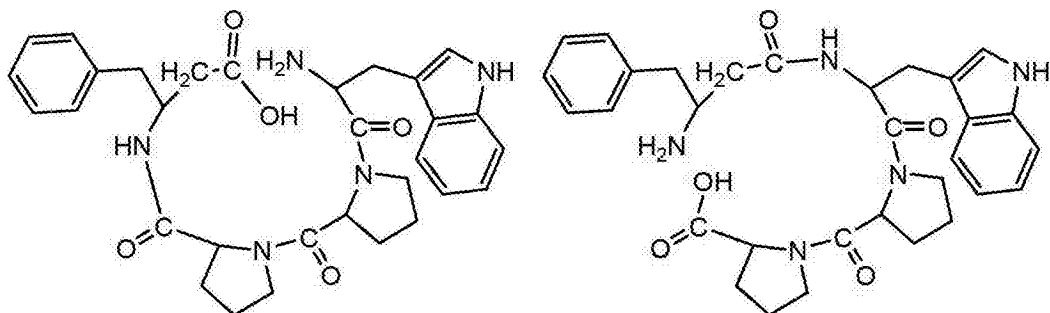
[0068]

[0069] II-2-c(H₂N-β³hoPhe-Pro-Pro-β³hoPhe-OH)、II-3-c(H₂N-β³hoPhe-β³hoPhe-Pro-Pro-OH)、

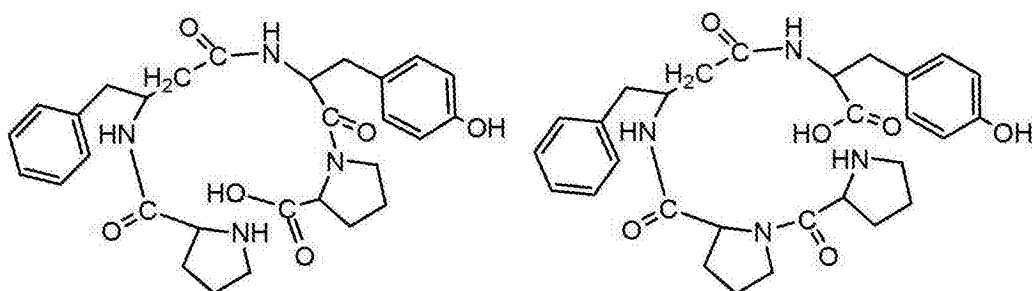
[0070]

[0071] II-4-d(H-Pro-Pro-β³hoPhe-Trp-OH)、II-1-d(H-Pro-Pro-β³hoPhe-Trp-OH)、

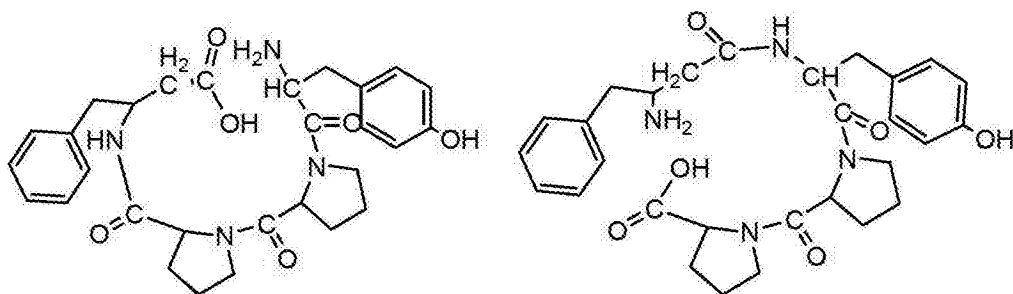
[0072]

[0073] II-2-d(H-Pro-Pro-β³hoPhe-Trp-OH)、II-3-d(H₂N-β³hoPhe-Trp-Pro-Pro-OH)、

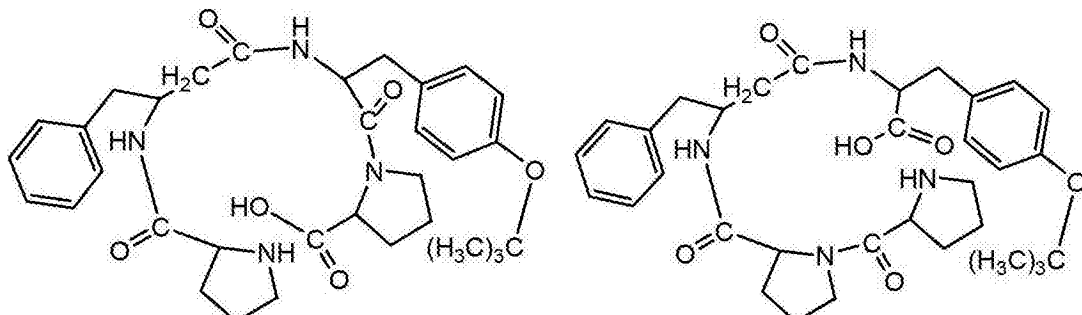
[0074]

[0075] II-4-e(H-Pro-β³hoPhe-Tyr-Pro-OH)、II-1-e(H-Pro-Pro-β³hoPhe-Tyr-OH)、

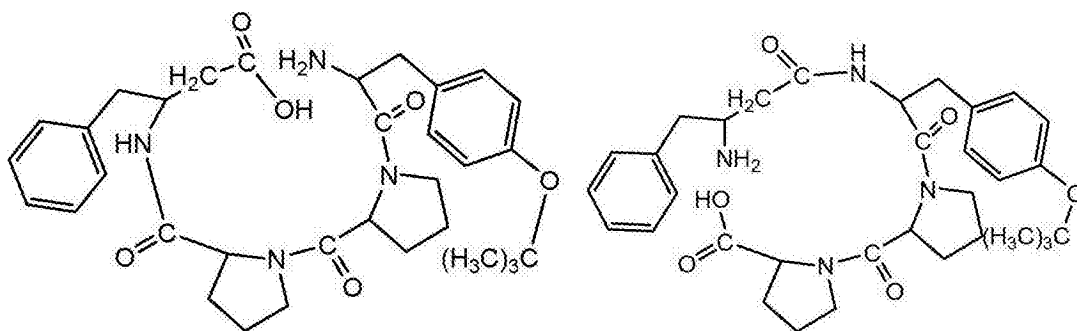
[0076]

[0077] II-2-e(H₂N-Tyr-Pro-Pro-β³hoPhe-OH)、II-3-e(H₂N-β³hoPhe-Tyr-Pro-Pro-OH)、

[0078]

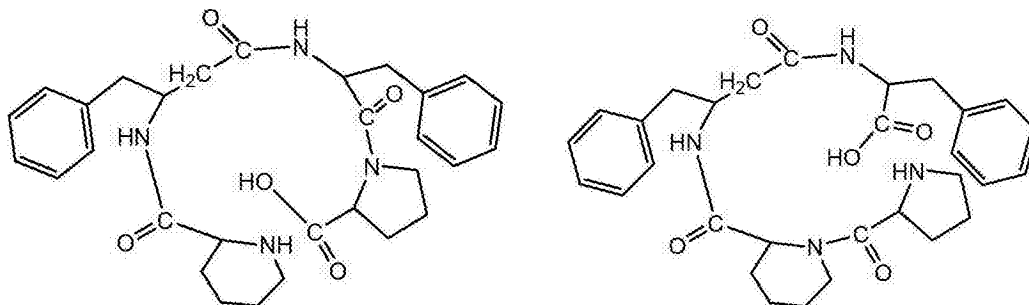
[0079] II-4-f(H-Pro-β³hoPhe-Tyr(t-Bu)-Pro-OH)、II-1-f(H-Pro-Pro-β³hoPhe-Tyr(t-Bu)-OH)、

[0080]



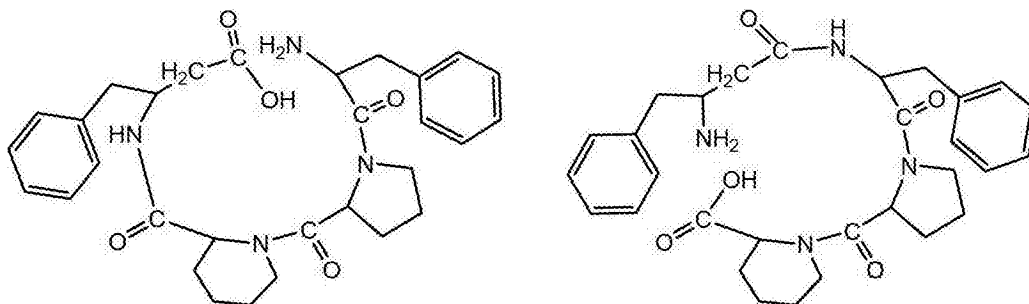
[0081] II-2-f(H₂N-Tyr(t-Bu)-Pro-Pro-β³hoPhe-OH)、II-3-f(H₂N-β³hoPhe-Tyr(t-Bu)-Pro-Pro-OH)、

[0082]



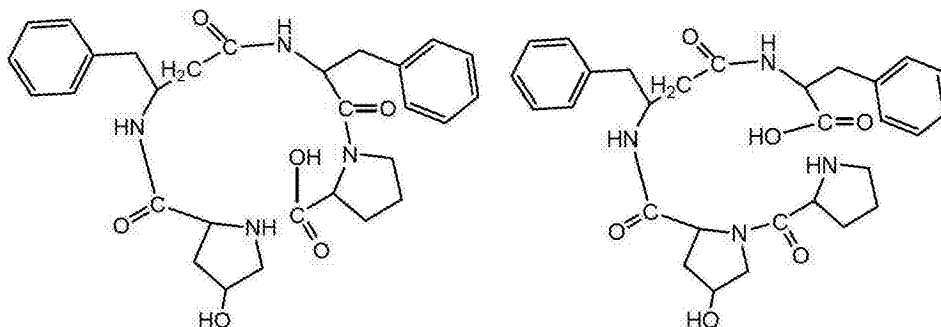
[0083] II-4-g(H-Pip-β³hoPhe-Phe-Pro-OH)、II-1-g(H-Pro-Pip-β³hoPhe-Phe-OH)、

[0084]



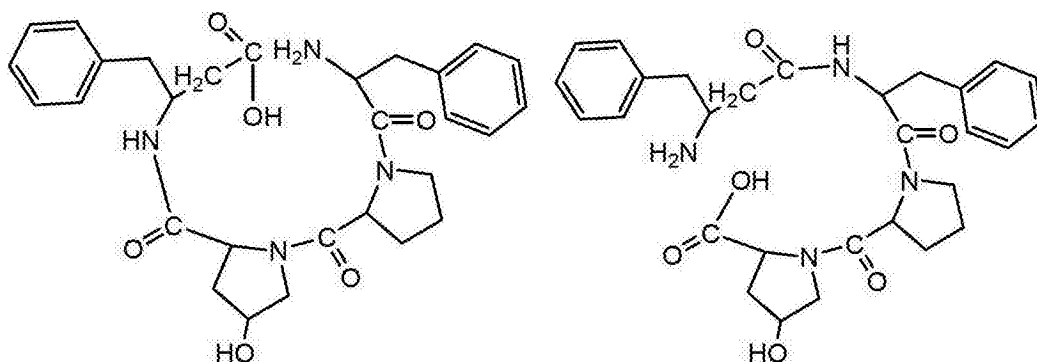
[0085] II-2-g(H₂N-Phe-Pro-Pip-β³hoPhe-OH)、II-3-g(H₂N-β³hoPhe-Phe-Pro-Pip-OH)、

[0086]



[0087] II-4-h(H-Hyp-β³hoPhe-Phe-Pro-OH)、II-1-h(H-Pro-Hyp-β³hoPhe-Phe-OH)、

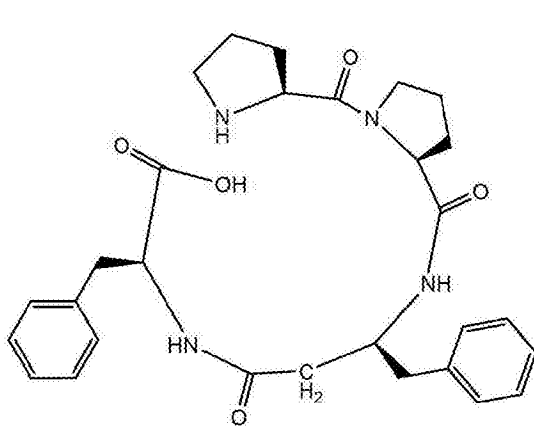
[0088]



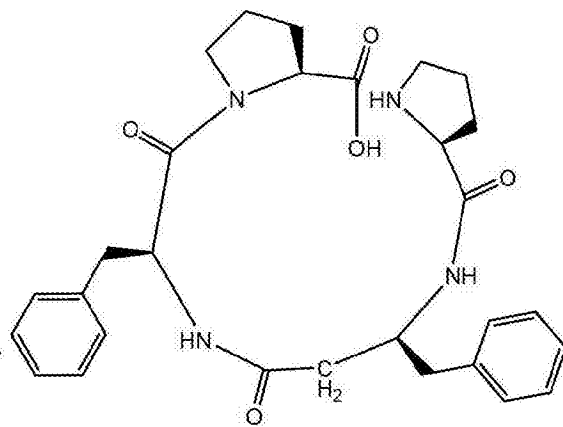
[0089] II-2-h(H₂N-Phe-Pro-Hyp-β³hoPhe-OH)和II-3-h(H₂N-β³hoPhe-Phe-Pro-Hyp-OH)。

[0090] 在一些实施方式中,化合物是式II-4-a化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-1-a化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-2-a化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-3-a化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-4-b化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-1-b化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-2-b化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-3-b化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-4-c化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-1-c化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-2-c化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-3-c化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-4-d化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-1-d化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-2-d化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-3-d化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-4-e化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-1-e化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-2-e化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-3-e化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-4-f化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-1-f化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-2-f化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-3-f化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-4-g化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-1-g化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-2-g化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-3-g化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-4-h化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-1-h化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-2-h化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-3-h化合物。

[0091] 在一些实施方式中,式II化合物选自:

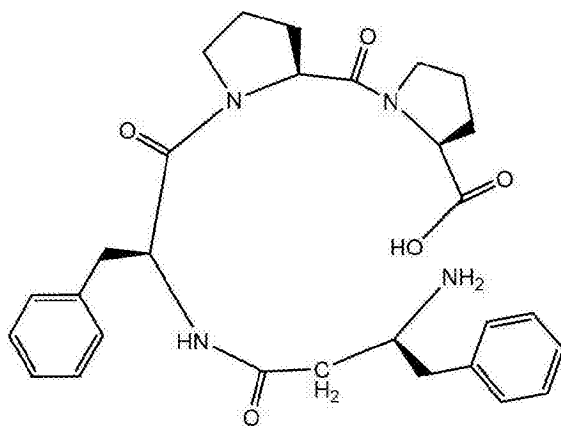


II-A-1

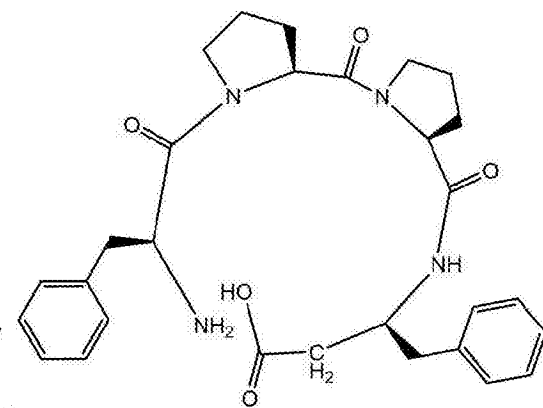


II-A-2

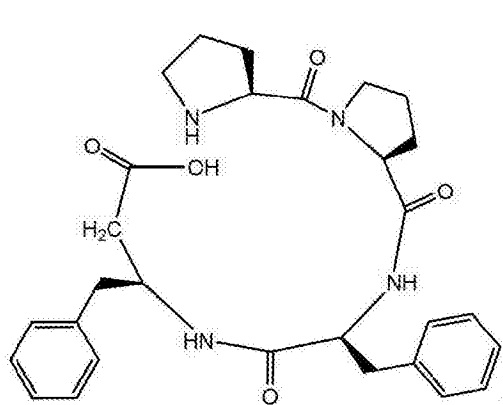
[0092]



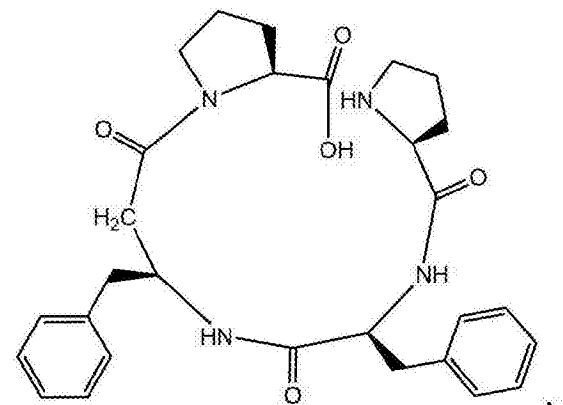
II-A-3



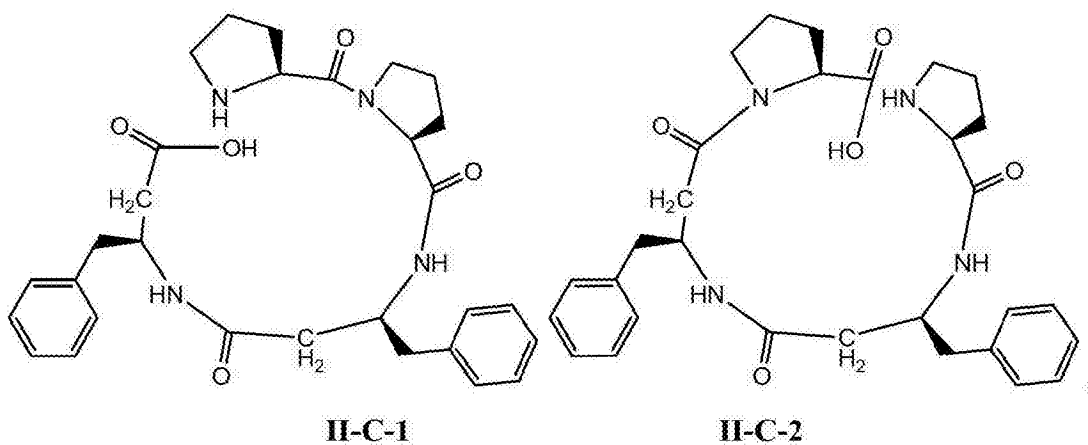
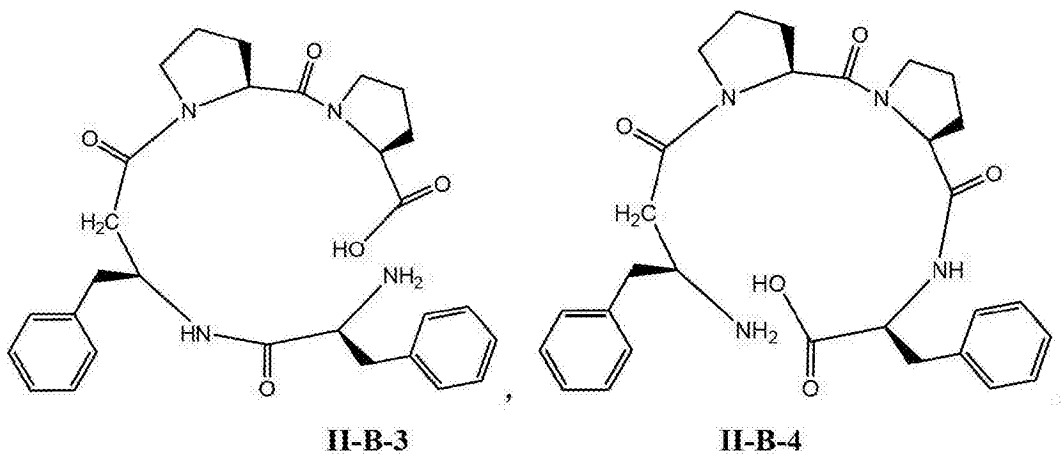
II-A-4



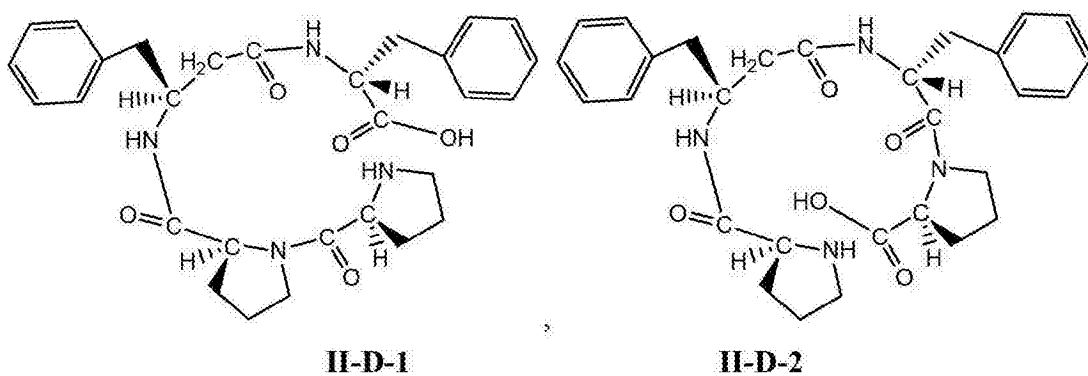
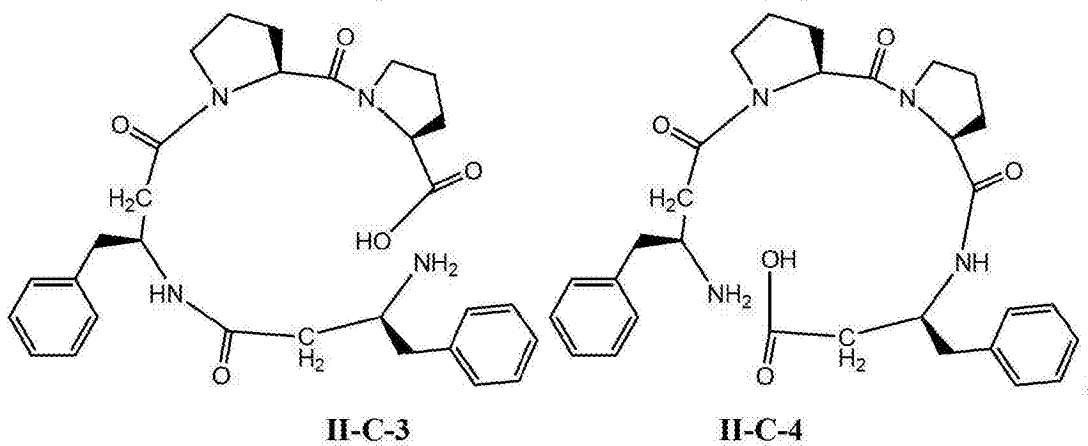
II-B-1

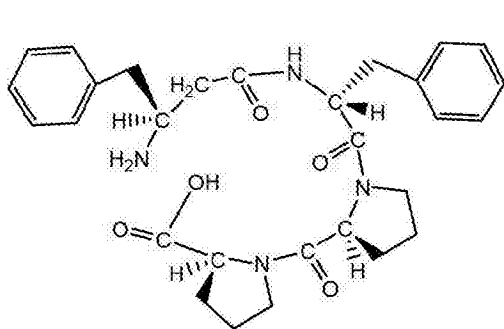


II-B-2

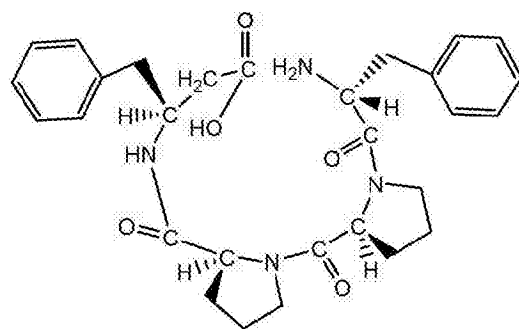


[0093]

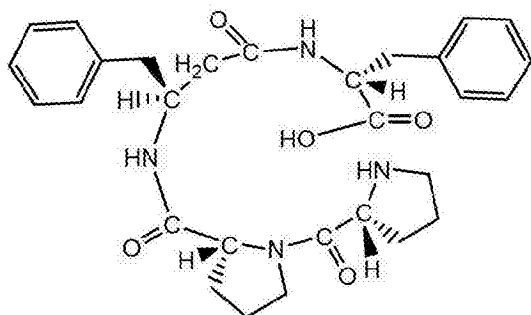




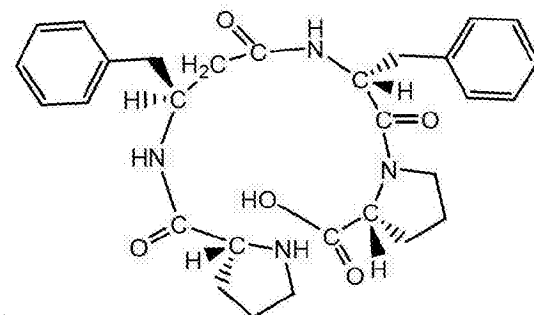
II-D-3



II-D-4

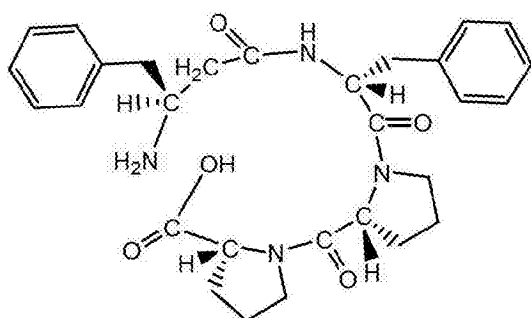


II-E-1

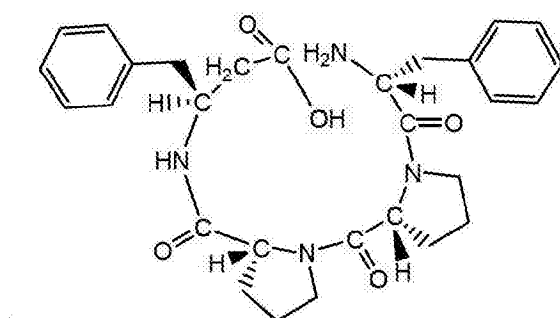


II-E-2

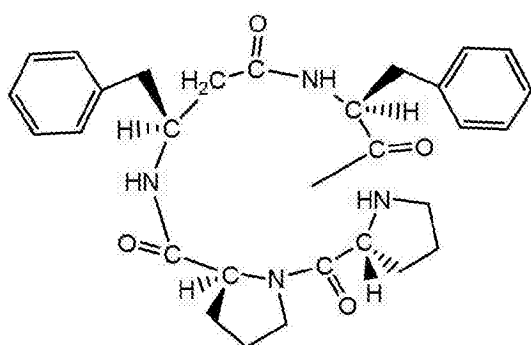
[0094]



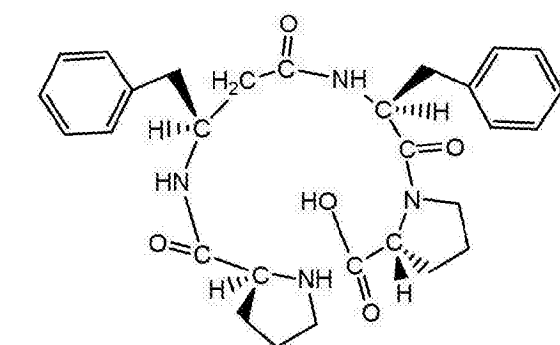
II-E-3



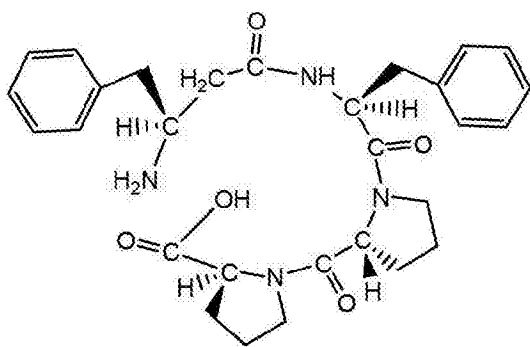
II-E-4



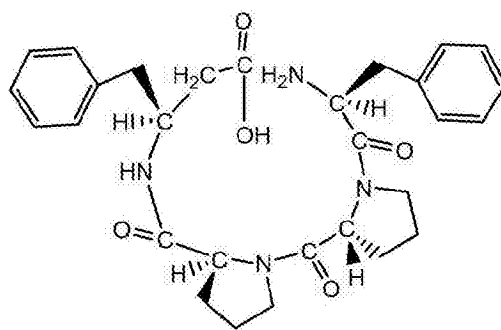
II-F-1



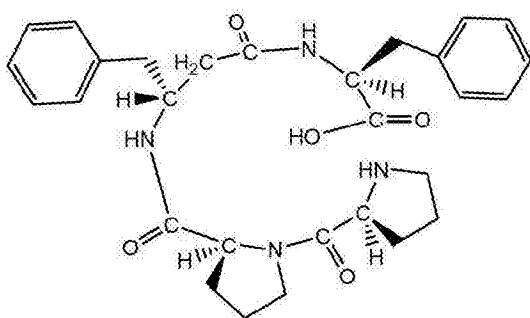
II-F-2



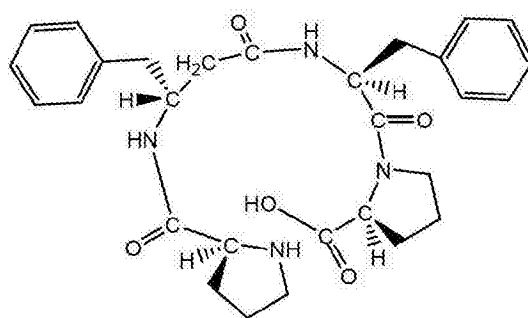
II-F-3



II-F-4

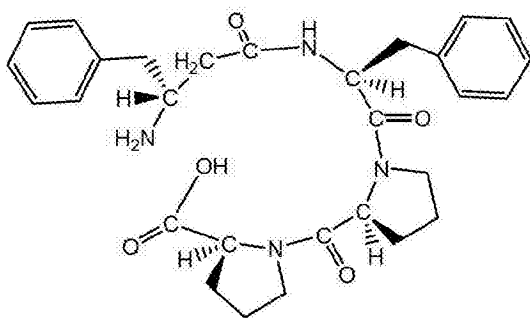


II-G-1

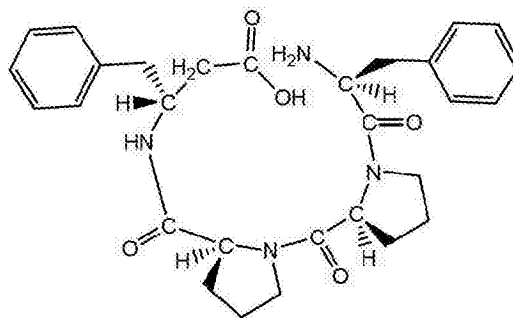


II-G-2

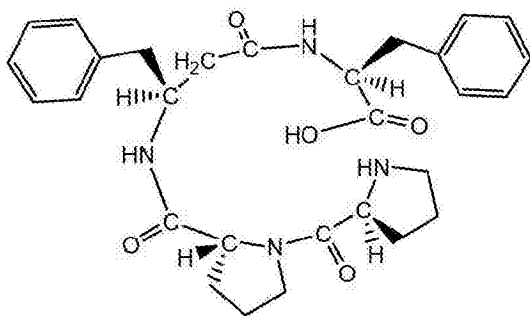
[0095]



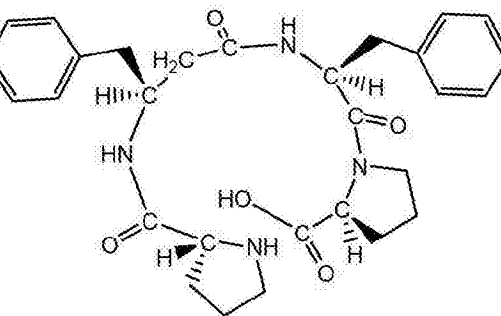
II-G-3



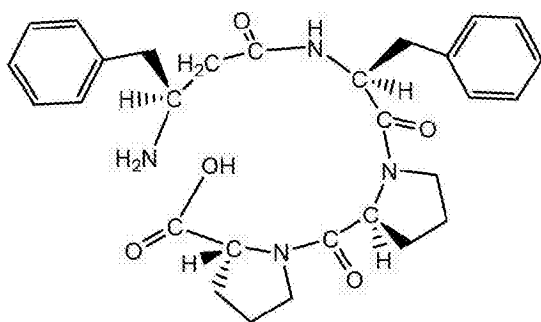
II-G-4



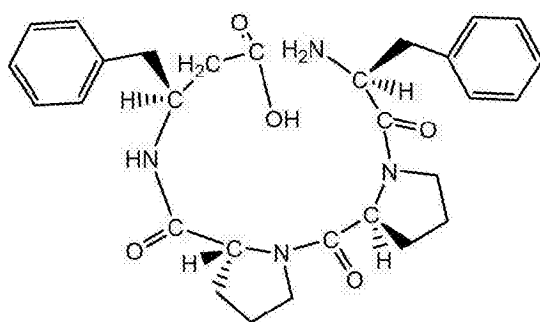
II-H-1



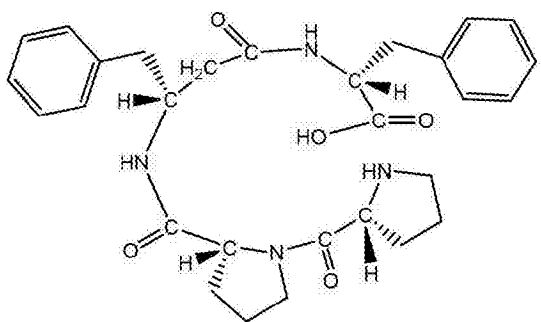
II-H-1



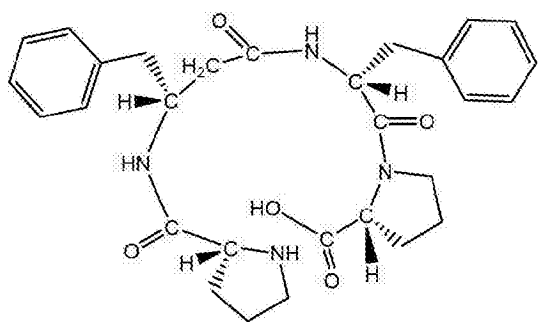
II-H-3



II-H-4

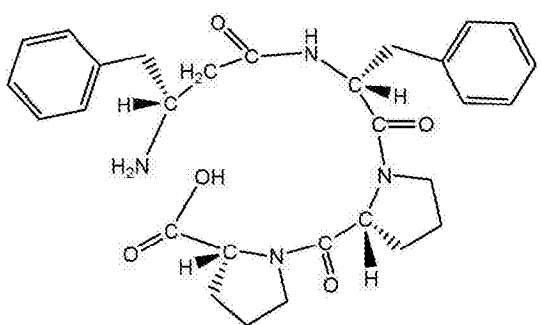


II-J-1

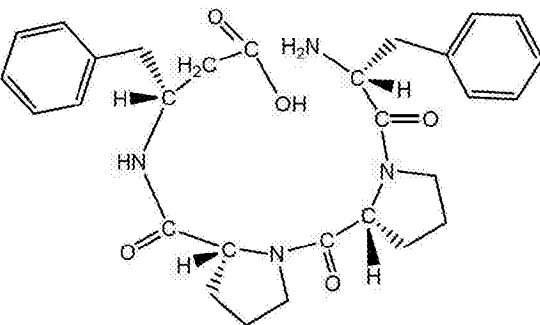


II-J-2

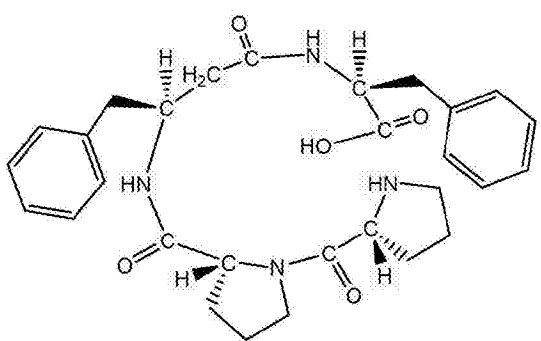
[0096]



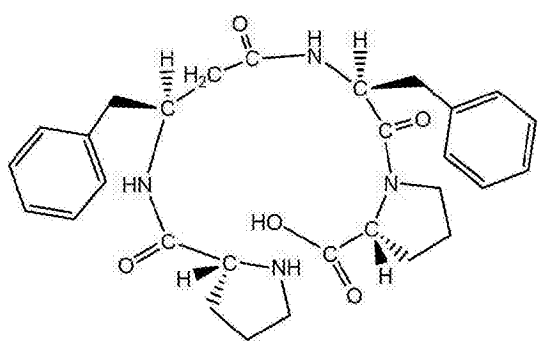
II-J-3



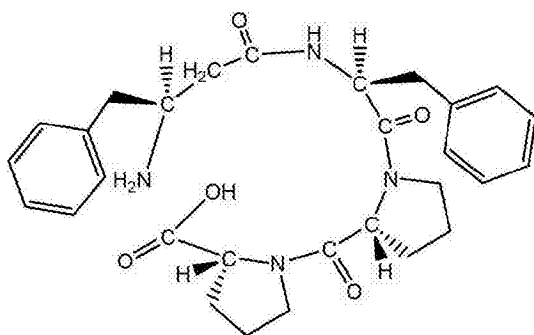
II-J-4



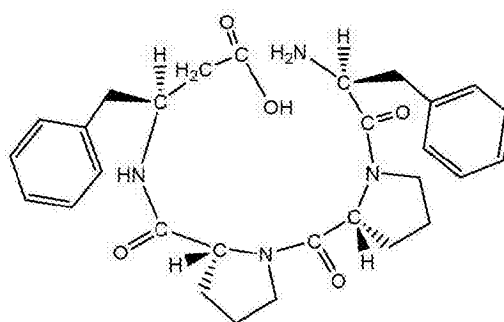
II-K-1



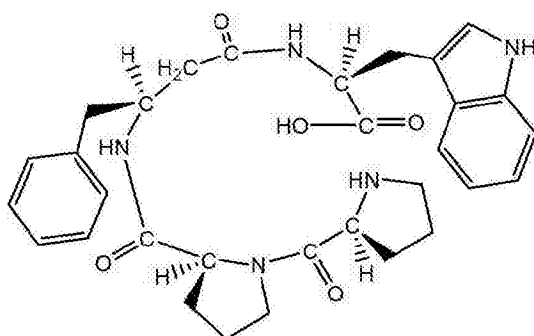
II-K-2



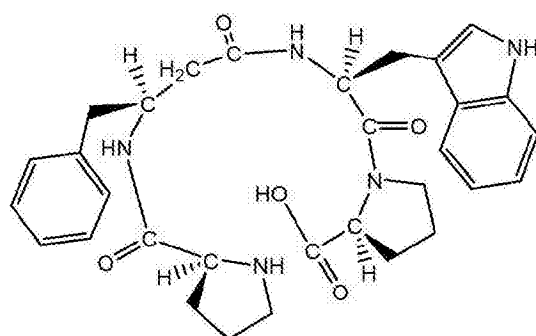
II-K-3



II-K-4

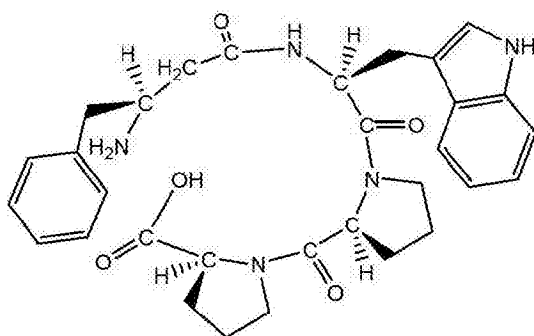


II-L-1

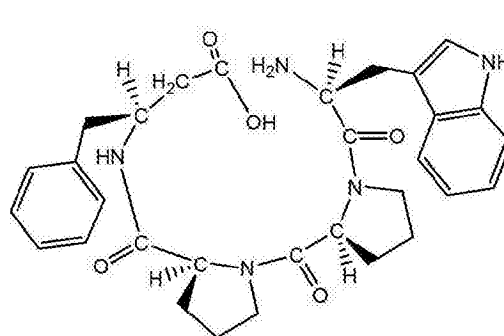


II-L-2

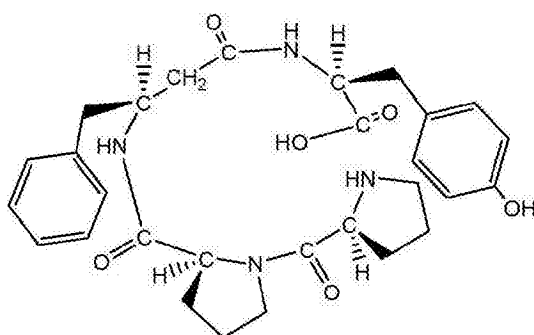
[0097]



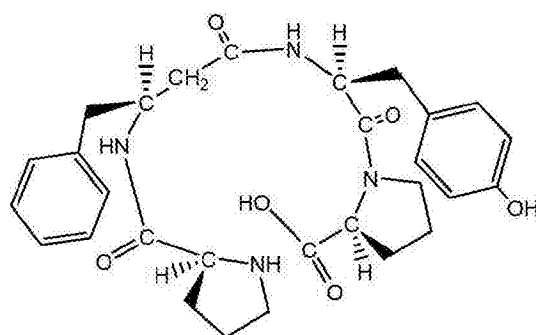
II-L-3



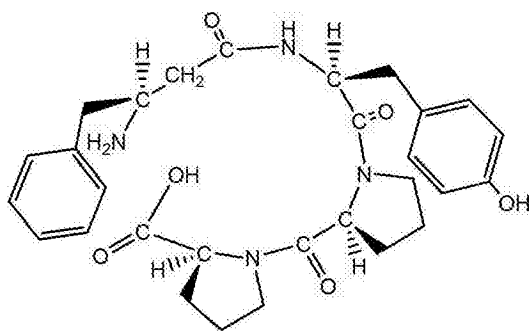
II-L-4



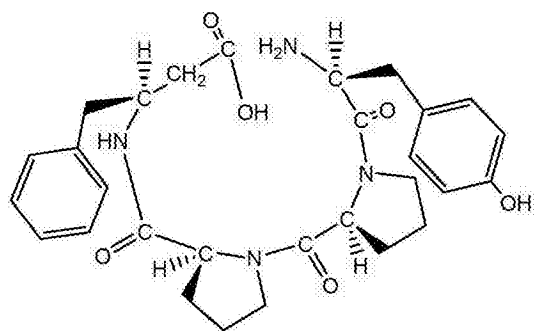
II-M-1



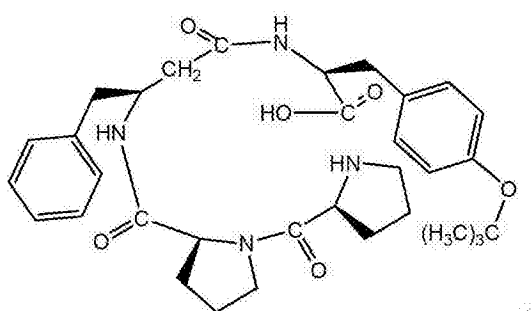
II-M-2



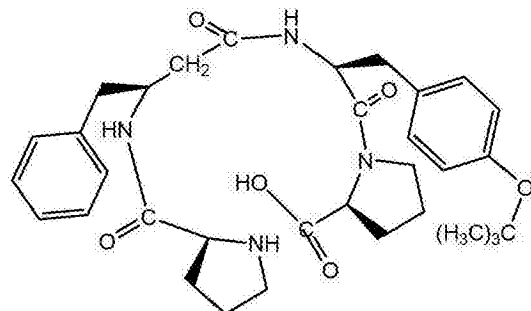
II-M-3



II-M-4

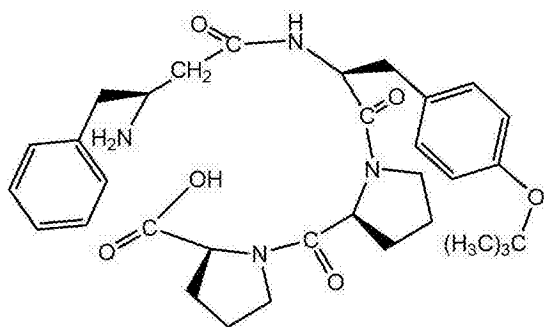


II-N-1

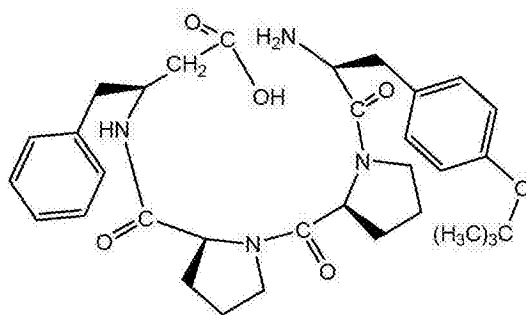


II-N-2

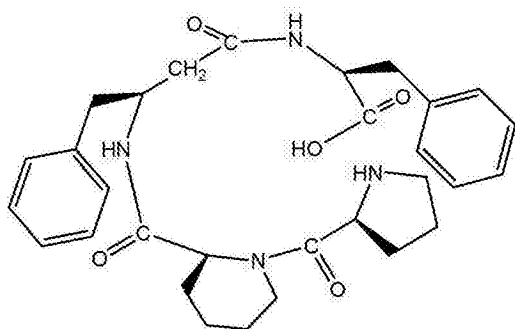
[0098]



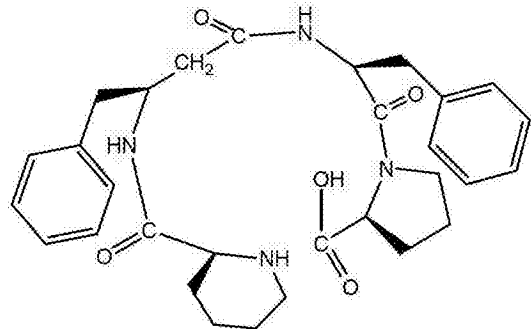
II-N-3



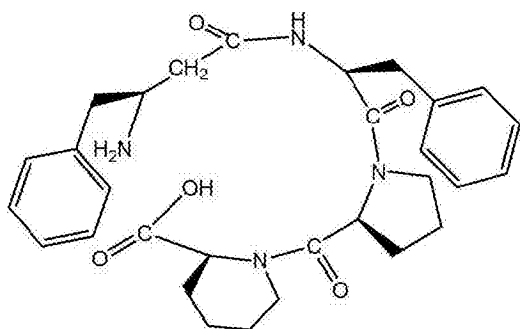
II-N-4



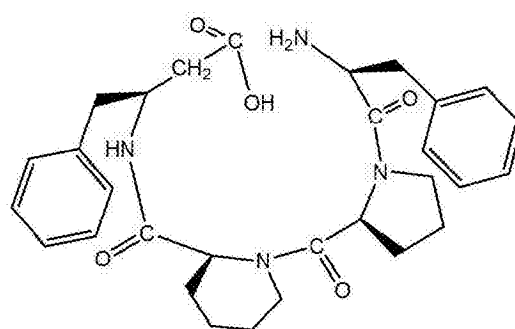
II-O-1



II-O-2

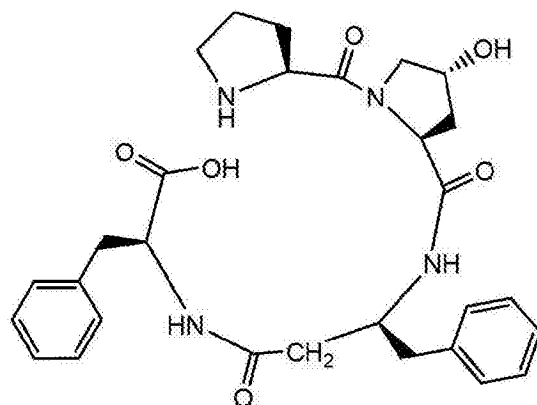


II-O-3

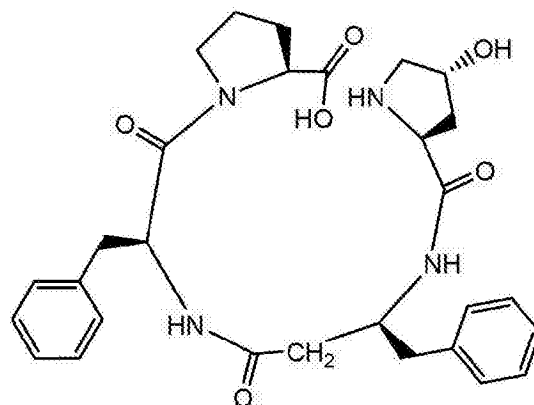


II-O-4

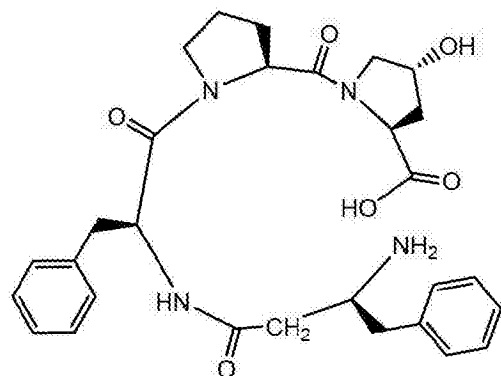
[0099]



II-P-1

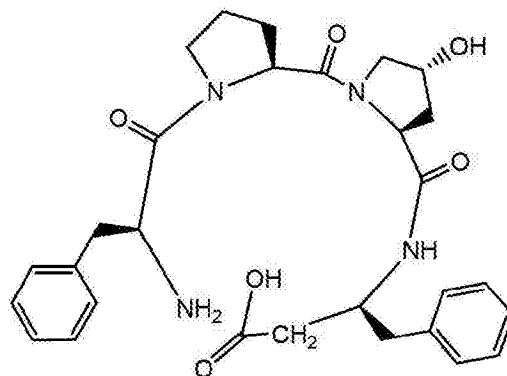


II-P-2



II-P-3

和



II-P-4

[0100] 在一些实施方式中,化合物是式II-A-1化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-A-2化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-A-3化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-A-4化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-B-1化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-B-2化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-B-3化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-B-4化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-C-1化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-C-2化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-C-3化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-C-4化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-D-1化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-D-2化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-D-3化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-D-4化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-E-1化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-E-2化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-E-3化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-E-4化合物。在一些实施方式中,化合物是式

II-F-1化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-F-2化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-F-3化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-F-4化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-G-1化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-G-2化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-G-3化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-G-4化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-H-1化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-H-2化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-H-3化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-H-4化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-J-1化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-J-2化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-J-3化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-J-4化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-K-1化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-K-2化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-K-3化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-K-4化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-L-1化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-L-2化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-L-3化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-L-4化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-M-1化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-M-2化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-M-3化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-M-4化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-N-1化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-N-2化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-N-3化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-N-4化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-O-1化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-O-2化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-O-3化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-O-4化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-P-1化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-P-2化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-P-3化合物。在一些实施方式中,化合物是式II-P-4化合物。

[0101] 详细描述

[0102] 已发现式I化合物显示免疫抑制和/或抗炎活性,同时显示毒性小于一些已知的化合物。因此,式I化合物可用作免疫抑制和/或抗炎剂。如本文所用,术语“免疫介导的”是指机体免疫系统反应过度 and/或侵袭机体的疾病或病症。

[0103] 贯穿本说明书,术语和替换形式保持其定义。

[0104] “烷基”意为包括线性、支链或环状饱和烃结构及其组合。低级烷基指具有1至6个碳原子的烷基。低级烷基实例包括甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基和叔丁基及类似物。优选的烷基是C₂₀或以下的烷基。环烷基是烷基的子集,包括具有3至8个碳原子的环烷基。环烷基实例包括环-丙基、环-丁基、环-戊基、降冰片基及类似物。

[0105] C₁至C₂₀烃包括烷基、环烷基、多环烷基、烯基、炔基、芳基及其组合。实例包括苄基、苯乙基、环己基甲基、樟脑酰基和萘乙基。术语“碳环”意为包括完全由碳组成的环系统,但具有任何氧化态。因此(C₃-C₁₀)碳环指诸如环丙烷、苯和环己烯的系统;(C₈-C₁₂)碳多环指诸如降冰片烯、十氢萘、茛满和萘的系统。

[0106] 烷氧基(alkoxy或alkoxyl)指具有直链、支链、环状构型及其组合的1至8个碳原子的基团,其通过氧原子连接于母体结构。实例包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、环丙氧基、环己氧基及类似物。低级烷氧基指包含1至4个碳的基团。

[0107] 氧杂烷基指其中一个或多个碳已被氧取代的烷基残基。实例包括甲氧基丙氧基、3,6,9-三氧癸基及类似物。

[0108] 酰基指具有直链、支链、环状构型、饱和、不饱和和芳香族及其组合的1至8个碳原子的基团,其通过羰基官能度连接于母体结构。酰基残基的一个或多个碳可被氮、氧或硫取代,只要与母体的连接点保持在羰基。实例包括乙酰基、苯甲酰基、丙酰基、异丁酰基、叔丁氧基羰基、苄氧基羰基及类似物。低级酰基指包含1至4个碳的基团。

[0109] 芳基意为6元芳环;双环9-或10元芳环系统;或三环13-或14元芳环系统。芳香族6-至14元碳环包括,例如,苯、萘、茚满、四氢萘和茚。

[0110] 杂芳基意为5或6元杂芳环,其包含1-3个选自O、N或S的杂原子;双环9或10元杂芳环系统,其包含1-3个选自O、N或S的杂原子;或三环13或14元杂芳环系统,其包含1-3个选自O、N或S的杂原子。5至10元芳香族杂环包括,例如,咪唑、吡啶、吡咯、噻吩、苯并吡喃酮、噻唑、呋喃、苯并咪唑、喹啉、异喹啉、喹唑啉、嘧啶、吡嗪、四唑和吡唑。

[0111] 芳基烷基指其中芳基残基通过烷基连接于母体结构的取代基。实例是苄基、苯乙基及类似物。杂芳基烷基指其中杂芳基残基通过烷基连接于母体结构的取代基。实例包括,例如,吡啶基甲基、嘧啶基乙基及类似物。

[0112] 杂环意为环烷基或芳基残基,其中1至3个碳被杂原子取代,该杂原子选自N、O和S。氮和硫杂原子可任选地被氧化,并且氮杂原子可任选地季铵化。杂环实例包括吡咯烷、吡唑、吡咯、吡啶、咪唑、噻吩、四氢吡啶、四氢异噻吩、苯并呋喃、苯并二噁烷、苯并二噁唑(在作为取代基出现时常被称为亚甲基二氧基苯基)、四唑、吗啉、噻唑、吡啶、哒嗪、嘧啶、噻吩、呋喃、噻唑、噻唑啉、异噻唑、二噁烷、四氢呋喃及类似物。要注意的是,杂芳基是杂环的子集,其中杂环是芳香族的。杂环基残基实例另外包括哌嗪基、2-氧哌嗪基、2-氧哌啶基、2-氧-吡咯烷基、2-氧吡咯烷基、吡咯烷基、吡啶基、咪唑基、咪唑啉基、咪唑烷基、吡嗪基、噻唑烷基、异噻唑烷基、噻唑烷基、异噻唑基、奎宁环基、异噻唑烷基、苯并咪唑基、噻二唑基、苯并吡喃基、苯并噻唑基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、噻吩基、苯并噻吩基、硫代吗啉基、硫代吗啉基亚砷、硫代吗啉基砷、噻二唑基、三唑基和四氢噻吩基。

[0113] 取代烷基、芳基、环烷基、杂环基等指烷基、芳基、环烷基或杂环基,其中各残基中多达三个H原子被烷基、卤素、卤烷基、羟基、低级烷氧基、羧基、烷氧羰基(carboalkoxy)(也被称为烷氧基羰基)、羧酰胺基(carboxamido)(也被称为烷基氨基羰基)、氰基、羰基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、巯基、硫代烷基、亚砷、砷、酰基氨基、脒基、苯基、苄基、杂芳基、苯氧基、苄氧基或杂芳氧基取代。

[0114] 术语“卤素”意为氟、氯、溴或碘。

[0115] 下列缩写词和术语贯穿全文具有指定的含义:

[0116] Boc =叔丁氧基羰基

[0117] c- =环

[0118] DCM =二氯甲烷=甲叉二氯=CH₂Cl₂

[0119] DIEA =N,N-二异丙基乙胺

[0120] DIPEA =二异丙基乙胺

[0121] DMF =N,N-二甲基甲酰胺

[0122] Fmoc =9-苄基甲氧基羰基

[0123] HATU =O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基六氟磷酸脒

[0124] HBTU =O-(苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基六氟磷酸脒

[0125]	HOAc	=乙酸
[0126]	HOAt	=1-羟基-7-氮杂苯并三唑
[0127]	HOBt	=1-羟基苯并三唑
[0128]	Hyp	=4-羟基脯氨酸
[0129]	Me	=甲基
[0130]	Pip	=哌可酸
[0131]	Phe	=苯丙氨酸
[0132]	Pro	=脯氨酸
[0133]	PyBOP	=O-(苯并三唑-1-基)-三吡咯烷六氟磷酸磷
[0134]	rt	=室温
[0135]	TBTU	=O-(苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基四氟硼酸脒
[0136]	TFA	=三氟乙酸
[0137]	t-Hyp	=反式-4-羟基脯氨酸
[0138]	Trp	=色氨酸
[0139]	Tyr	=酪氨酸
[0140]	Tyr(tBu)	=(O-叔丁基)酪氨酸

[0141] 此外,有机化学师(即,本领域普通技术人员)所用缩写词的全面列表呈现在 Journal of Organic Chemistry 的每卷第一期。列表一般以名为“标准缩写词列表”的表格呈现,在此将其引入作为参考。此外,关于非天然存在的氨基酸——其中另外的亚甲基基团存在于主链,本文用表述“ β^3 -Ho-”(或“ $\beta 3$ -高(homo)-”)指代在主链中侧链负载碳原子与端氮原子之间具有另外的亚甲基(-CH₂-)的氨基酸;本文用表述“ β^2 -Ho-”(或“ $\beta 2$ -高-”)指代在主链中侧链负载碳原子与端碳原子之间具有另外的亚甲基的氨基酸。

[0142] 本发明的实施方式包括盐形式的式I化合物,特别是酸加成盐。适当的盐包括与有机酸和无机酸形成的盐。这种酸加成盐通常是药学上可接受的,尽管非药学上可接受的盐可于在述化合物的制备和纯化中具有应用性。因此,优选的盐包括由盐酸、氢溴酸、硫酸、柠檬酸、酒石酸、磷酸、乳酸、丙酮酸、乙酸、琥珀酸、草酸、富马酸、马来酸、草酰乙酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、苯磺酸和羟乙磺酸形成的盐。式I化合物的盐可通过使游离碱形式的适当化合物与适当酸反应而制成。

[0143] 根据本发明的实施方式所述的式I化合物是环状四肽。这些肽的合成可通过环化相应的线性肽实现,该线性肽本身利用本领域已知的方法合成;参见,例如,Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149(1964);Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:5132(1985); Kelley&Winkler in Genetic Engineering Principles and Methods, Setlow, J. K, ed., Plenum Press, N.Y., vol. 12, pp 1-19(1990); Stewart&Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. (1984); Mergler et al. (1988) Tetrahedron Letters 29:4005-4008; Mergler et al. (1988) Tetrahedron Letters 29:4009-4012; Kamber et al. (编辑), Peptides, Chemistry and Biology, ESCOM, Leiden (1992) pp. 525-526; Riniker et al. (1993) Tetrahedron Letters 49:9307-9320; Lloyd-Williams et al. (1993) Tetrahedron Letters 49:11065-11133; Andersson et al. (2000) Biopolymers 55:227-250; Bray, Nature Reviews 2:587-593(2003), 美国专利号4,105,

603、3,972,859、3,842,067、3,862,925、6,015,881、6,197,927和7,439,222。这种合成可通过液相或固相合成或通过二者组合实现,如本领域已知。

[0144] 液相合成方法(常被称为溶液相方法)在均相中实施全部反应。相继的氨基酸在溶液中连接,直到理想的肽材料形成。在合成过程中,相继的中间肽通过沉淀和/或洗涤而得到纯化。

[0145] 在固相肽合成(SPPS)中,第一氨基酸或肽基团被连接于不溶性支持物,如树脂。相继的氨基酸或肽基团被添加至第一氨基酸或肽基团,直到目标肽材料形成。因此,固相合成的产物是连接于不溶性支持物的肽。然后从树脂切割通过SPPS技术合成的肽,并分离切割的肽。

[0146] 更具体地,固相合成起始于假定肽的羧基端——通过将受保护氨基酸连接于惰性固体支持物。惰性固体支持物可以是能够充当初始氨基酸C端的固定物(anchor)的任何大分子。一般,大分子支持物是交联的聚合树脂(例如,聚酰胺或聚苯乙烯树脂),如上文Stewart&Young第2和4页的图1-1和1-2所示。在一些情况下,C端氨基酸连接于聚苯乙烯树脂,以形成苄酯。选择大分子支持物,以使肽固定连接在用于在肽合成中使受阻氨基酸的 α -氨基脱保护的条件下稳定。如果采用碱不稳定的 α -保护基团,则需要在肽与固体支持物之间应用酸不稳定的连接。例如,酸不稳定的醚树脂有效用于碱不稳定的Fmoc-氨基酸肽合成,如上文Stewart&Young第16页所述。可选地,可应用对酸解差异性不稳定的肽固定连接和 α -保护基团。例如,氨甲基树脂如苄基乙酰氨甲基(Pam)树脂协同Boc-氨基酸肽合成运行良好,如上文Stewart&Young第11-12页所述。Guiller et al., Chem Rev. 2000, 100, 2091-2157, 评述了固相有机合成和组合化学——包括肽合成——的连接体和切割策略。

[0147] 在初始氨基酸连接于惰性固体支持物后,用例如甲叉二氯中的三氟乙酸(TFA)移除初始氨基酸的 α -氨基保护基团,并且该三氟乙酸在例如三乙胺(TEA)中中和。在使初始氨基酸的 α -氨基脱保护后,添加合成中的下一个 α -氨基和侧链受保护氨基酸。然后通过缩合以理想的顺序相继连接其余 α -氨基和——如必要——侧链受保护氨基酸,从而得到连接于固体支持物的中间化合物。可选地,一些氨基酸可彼此连接,以形成理想肽的片段,然后添加肽片段至增长的固相肽链。

[0148] 两氨基酸之间或氨基酸与肽之间或肽与肽之间的缩合反应可根据如下常用缩合方法进行:如axide法、混合酸酐法、DCC(N,N'-二环己基碳二亚胺)或DIC(N,N'-二异丙基碳二亚胺)法、活性酯法、对硝基苯酯方法、BOP(苯并三唑-1-基-氧-三[二甲基氨基]六氟磷酸盐)法、N-羟基琥珀酸亚氨基酯法等、以及Woodward试剂K法。

[0149] 在肽化学合成中常用适当的保护基团保护氨基酸的任何活性侧链基团。最终,这些保护基团在理想的多肽链相继组装后被去除。同样常用的是在氨基酸或肽片段的C端羧基与正在增长的固相多肽链的游离N端氨基发生反应时保护氨基酸或肽片段上的 α -氨基,然后选择性去除 α -氨基保护基团以使下一个氨基酸或肽片段添加到固相多肽链。因此,在多肽合成中常见的是生成包含在肽链中以理想的顺序定位的各个氨基酸残基的中间化合物,其中各残基仍携带侧链保护基团。在从固相去除后,这些保护基团可基本上同时被去除,以生成理想的多肽产物。

[0150] α -和 ω -氨基侧链可用例如下列基团保护:苄氧基羰基(缩写Z)、异烟氧基羰基(iNoc)、邻氯苄氧基羰基[Z(2Cl)或2-Cl-Z]、对硝基苄氧基羰基[Z(NO₂)]、对甲氧基苄氧基

羰基[Z(OMe)]、叔丁氧基-羰基(Boc)、叔戊氧基羰基(Aoc)、异冰片基氧羰基、金刚烷氧基-羰基(Adoc)、2-(4-联苯基)-2-丙氧基羰基(Bpoc)、9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)、甲基磺酰基乙氧基羰基(Msc)、三氟乙酰基、邻苯二甲酰基(Phf)、甲酰基(For)、2-硝基-苯基亚磺酰基(Nps)、二苯基硫磷基(Ppt)和二甲基硫磷基(Mpt)及类似基团。侧链保护基团的另外实例包括乙酰基(Ac)、苯甲酰基(Bz)、叔丁基(t-Bu)、三苯基甲基(三苯甲基, Trt)、四氢吡喃基、苄基(Bzl)、2,6-二氯苄基、硝基、对甲苯磺酰基(Tos)、氯苄基(Xan)、苄基、甲基、乙基和叔丁酯、以及芳香族或脂肪族尿烷型保护基团、光不稳定的基团如硝基苄基氧羰基(Nvoc)、和氟化物不稳定的基团如三甲基甲硅烷基乙氧基羰基(TEOC)。

[0151] 氨基端保护基团(在本文中也称为N端保护基团)的实例包括:(1)酰基型保护基团,如甲酰基、丙烯酰基(Acr)、苯甲酰基(Bz)和乙酰基(Ac);(2)芳香族尿烷型保护基团,如苄氧基-羰基(Z)和取代Z,如对氯苄氧基羰基、对硝基苄氧基羰基、对溴苄氧基羰基、对甲氧基苄氧基羰基;(3)脂肪族尿烷保护基团,如叔丁氧基羰基(BOC)、二异丙基甲氧基羰基、异丙氧基羰基、乙氧基羰基、烯丙氧基羰基;(4)环烷基尿烷型保护基团,如9-苄基-甲氧基羰基(Fmoc)、环戊氧基羰基、金刚烷氧基羰基和环己氧基羰基;和(5)硫尿烷型保护基团,如苯基硫-羰基。优选的保护基团包括9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)、2-(4-联苯基)-丙基(2)氧羰基(Bpoc)、2-苄基丙基(2)-氧羰基(Poc)和叔丁氧基羰基(Boc)。

[0152] 羧基官能团的保护基团由如下示例:苄酯(Obzl)、环己基酯(CHx)、4-硝基苄酯(ONb)、叔丁酯(Obut)、4-吡啶基甲酯(OPic)及类似物。通常理想的是,具有官能团的特定氨基酸如精氨酸、半胱氨酸和丝氨酸而非氨基和羧基被适当的保护基团保护。例如,精氨酸的胍基基团可用如下保护:硝基、对甲苯磺酰基、苄氧基羰基、金刚烷氧基羰基、对甲氧基苄磺酰基、4-甲氧基-2,6-二甲基苯磺酰基(Nds)、1,3,5-三甲基苯基磺酰基(Mts)及类似物。半胱氨酸的硫醇基团可用对甲氧基苄基、三苯甲基、及类似物保护。

[0153] 虽然式I化合物可以以原始化学剂被给予,但优选使其表现为药物组合物。根据进一步方面,根据本发明的实施方式提供了药物组合物,其包含式I化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物连同一种或多种其药学载体和任选地一种或多种其他治疗性成分。载体(一种或多种)必须是“可接受的”,其意义为与制剂其他成分相容并且对其接受者无害。

[0154] 制剂包括适于口服、胃肠外(包括皮下、皮内、肌内、静脉内和关节内)、直肠和局部(包括真皮、颊部、舌下和眼内)给予的制剂。最适当的途径可取决于接受者的情况和疾病。制剂可方便地以单位剂型呈现,并且可通过药学领域公知的任何方法制备。制备这种制剂的方法包括步骤:使式I化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物(“活性成分”)与构成一种或多种附加成分的载体结合。通常,制剂通过如下制备:使活性成分均匀地并且紧密地结合液态载体或细碎的固体载体或二者,然后——如必要——将产物塑形为理想的制剂。

[0155] 适于口服给予的根据本发明的实施方式所述的制剂可表现为离散的单位,如胶囊、扁囊剂或片剂,其均包含预定量的活性成分;作为粉末或颗粒;作为溶液或悬浮液,在含水液体或非含水液体中;或作为水包油乳液或油包水乳液。活性成分还可表现为丸剂、药糖剂或糊剂。

[0156] 片剂可任选地与一种或多种附加成分通过压缩或模塑制成。压缩片剂可通过在适当的机器中压缩活性成分制备,该活性成分处于自由流动的形式,如粉末或颗粒,任选地与粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂、润滑剂、表面活性剂或分散剂混合。模塑片剂可通过在适当的

机器中模塑用惰性液体稀释剂湿化的粉末状化合物的混合物而制成。片剂可任选地被涂布或刻痕,并可被配制以提供其中活性成分持续、延长或受控的释放。

[0157] 胃肠外给予的制剂包括含水和非含水无菌注射液,其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抗菌剂和使制剂与目标接受者的血液等渗的溶质。胃肠外给予的制剂还包括含水和非含水无菌悬浮液,其可包括悬浮剂和增稠剂。制剂可表现为多剂量容器例如密封安瓿和小瓶中的单位剂量,并可在冻干(冷冻干燥)条件下储存,仅需在使用前刻添加无菌液体载体,例如盐水、磷酸盐缓冲液(PBS)或类似物。即时注射液和悬浮液可由前文描述类型的无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0158] 直肠给予的制剂可与常用载体如可可脂或聚乙二醇一起表现为栓剂。

[0159] 口中局部给予的制剂——例如颊部或舌下,包括在调味基料如蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶中包含活性成分的锭剂和如在明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶的基料中包含活性成分的锭剂。

[0160] 优选的单位剂量制剂是包含如下文所述有效剂量或其适当分数的活性成分的那些。

[0161] 应当理解的是,除以上具体描述的成分外,根据本发明实施方式所述的制剂可包含其他与在述制剂类型有关的本领域常规剂,例如适于口服给予的制剂可包含调味剂。

[0162] 如述,根据本发明的实施方式,根据本发明的实施方式所述的化合物可用于治疗或预防某些疾病或病症。如本文所用的术语“预防”指预先给予药物以阻止或减缓侵袭。(本用途权利要求方法涉及的)医药领域的普通技术人员理解,术语“预防”不是绝对的术语。在医药领域中,其被理解为指代预防性给予药物,以基本上减少病症的可能性或严重性,而这正是申请人的权利要求所意指的意义。阅读者注意Physician's Desk Reference——本领域的标准文本,其中术语“预防”出现了上百次。医药领域技术人员不会将该术语解释为绝对的意义。类似地,在描述根据本发明的实施方式所述的化合物可用于抑制免疫应答时,“抑制”将被理解为包括降低应答程度,而不一定绝对地阻断应答。

[0163] 基于检查可能发现,当前没有从本申请的权利要求中排除的化合物对于发明人而言是不可被授予专利权的。在这种情况下,申请人权利要求中种和属的排除将被认为是专利实施的假象,而不反映发明人的观点或其发明的描述。本发明在组合物方面是全部式I和II化合物——除公共权属范围的化合物外。

[0164] 本发明的实施方式将参考附图而得到更好的理解,其中:

[0165] 图1显示得自实施例2所述实验的耳厚度的抗原特异性增加;

[0166] 图2显示实施例2所述实验中观察到的腮腺淋巴结中的细胞总数;

[0167] 图3显示实施例2所述的腮腺淋巴结中的活细胞和死细胞含量;

[0168] 图4显示实施例2所述的实验所登记的引流淋巴结中的细胞类型的数量和参与;

[0169] 图5显示如实施例3所述式IA化合物对人血单核细胞的毒性;

[0170] 图6显示如实施例4所述腹膜内给予式IA化合物对于小鼠对绵羊红细胞的体液免疫应答的影响;

[0171] 图7显示如实施例5所述腹膜内给予式IA化合物对于对卵清蛋白细胞免疫应答的影响;

[0172] 图8A和8B显示根据本发明实施方式所述的肽在体外对PMBC存活的影响;

[0173] 图9A和9B显示根据本发明实施方式所述的肽在体外对PHA诱导的PBMC增殖的影响；

[0174] 图10A和10B显示如实施例7所述几种化合物对响应抗原挑战的耳厚度变化的影响；

[0175] 图11显示如实施例7所述伊凡斯蓝测试中毛细血管的渗透性；

[0176] 图12显示如实施例7所述引流淋巴结中的细胞总数；

[0177] 图13显示如实施例7所述化合物对循环白细胞数的影响；

[0178] 图14显示如实施例7所述不同情况下存在的白细胞类型；和

[0179] 图15提供如实施例7所述小鼠耳廓细胞数量和组成的形态测量数据。

[0180] 实施例1.合成环状四肽

[0181] 根据本发明实施方式所述的环状四肽可通过利用已知的肽合成方法合成,如溶液相或固相方法。通常,合成包括两个连续步骤:(1)合成线性四肽;和(2)环化以生成环状四肽。线性四肽可以以受保护形式制备,然后在环化前脱保护。

[0182] 为进行示例,根据下列方案进行在固体支持物(连接于Wang型树脂的Fmoc-L-苯丙氨酸,或者连接于2-氯三苯甲基树脂的L-β-3-高苯丙氨酸或L-脯氨酸)上合成线性四肽:

[0183] 1.使树脂在二甲基甲酰胺(DMF)(0.25mmol,10ml/g树脂)中膨胀15min。

[0184] 2.用20%哌啶的DMF溶液去除Fmoc基团(2×20min)。

[0185] 3.用DMF洗涤树脂(3×2min)。

[0186] 4.用甲醇(MeOH)洗涤树脂(3×2min)

[0187] 5.用二氯甲烷(DCM)洗涤树脂(3×2min)

[0188] 6.通过与溶于无水DMF(4ml/mmol)的Fmoc-受保护氨基酸(4eq)、HBTU或TBTU(4eq)和DIPEA(4eq)的混合物一起振动20小时,酰化树脂上的氨基酸或肽氨基。

[0189] 7.用DCM洗涤树脂(3×2min)。

[0190] 8.用MeOH洗涤树脂(3×2min)。

[0191] 9.用DCM洗涤树脂(3×2min)。

[0192] 10.利用Kaiser测试(用于除脯氨酸外的所有氨基酸)评估氨基是否被酰化。

[0193] 如果Kaiser测试的结果是阴性,则用DMF洗涤树脂(1×2min.),并从方案第2点开始新的结合循环。如果Kaiser测试的结果是阳性,用第一轮结合所用的一半量的试剂重复酰化。在脯氨酸酰化的情况下,Kaiser测试的灵敏性不足以确定酰化程度,因此在脯氨酸的情况下,用半量试剂重复连接程序。在重复酰化的情况下,进行如下洗涤:

[0194] 7A.用DCM洗涤(3×2min)

[0195] 8A.用MeOH洗涤(3×2min)

[0196] 9A.用DCM洗涤(3×2min)

[0197] 在最后一次连接后,按照方案第3-5点洗涤树脂。如第2点所述从肽去除Fmoc基团,再如第3-5点用DMF、MeOH和DCM洗涤树脂。在将肽脱离聚合支持物前,在室温、减压下于干燥器中KOH小球上使树脂干燥过夜。

[0198] 用三氟乙酸/水/三异丙基硅烷的95:2.5:2.5(v/v/v;10ml/1g肽基树脂)混合物使肽脱离干燥的Wang型树脂。在室温、减压下部分蒸发得到的溶液,并用10体积的醚使肽沉淀。在被滤出后,将粗肽溶于0.05M含水HCl,并蒸发至干燥。将残余物溶于水,并冷冻干燥。

[0199] 通过用乙酸/二氯甲烷/三氟乙醇(v/v/v;10ml/1g肽基树脂)的1:3:1混合物处理使肽脱离2-Cl-三苯甲基树脂。将生成的裂解液和收集的洗涤液过滤,在环境温度和减压下蒸发至干燥,将残余物溶于最小体积的DCM,用20体积的己烷稀释,和再蒸发(两次)。将粗分离的肽溶于水,并冷冻干燥。

[0200] 在冷冻干燥的肽在真空下于干燥器KOH和P₂O₅上干燥后,其准备用于环化。

[0201] 在一般的合成中——在上述方案后,以连接于Wang树脂的Fmoc-Phe(278mg, 0.2mmol, 0.72mmol/g)开始,和在相继连接Fmoc-L-β³-homoPhe-OH、Fmoc-Pro-OH和再次连接Fmoc-Pro-OH后——冷冻干燥后的产量为91mg(82%)粗线性肽,纯度为94%(HPLC)。

[0202] 在DCM溶液(肽浓度2×10⁻⁴毫摩/升)中通过PyBOP/HOAt/2,4,6-三甲基吡啶(3:3:5)环化粗肽,随之线性前体消失,该线性前体通过在分析型反相(RP)HPLC柱上注入反应液样本而示踪。在环化结束时,在减压下将溶液蒸发至干燥,并将残余物在乙酸乙酯(每1毫摩肽1000ml溶剂)和0.5N HCl的水(每1毫摩肽100ml溶液)之间分割。连续用0.5N HCl的水(2×)、水(1×)、1M NaHCO₃(3×)和水(1×)洗涤有机相。在减压下去除有机溶剂,并将残余固体溶于二氯甲烷和冻干。利用溶剂B(0.038%TFA在82%乙腈/水中)在溶剂A(0.05%TFA在水中)中的洗脱梯度,在制备型Vydac C₁₈或Kromasil C₈反相柱(250mm/22mm,100Å,10μm)上纯化粗产物。

[0203] 作为环化反应的实例,在2,4,6-三甲基吡啶(67.5μL,0.5mmol)存在下用PyBOP(157mg,0.3mmol)和HOAt(40mg,0.3mmol)处理H-Pro-Pro-β³-hPhe-Phe-OH x HCl(55.7mg, 0.1mmol)的500ml DCM溶液,在处理(work-up)和纯化后生成13.5mg(27%)的环状四肽,通过HPLC确定纯度为99%。

[0204] 在这种方式下,合成式I-A至I-P的化合物。下表1提供式I-A至I-P化合物的一些数据。

[0205] 表1

[0206]

编号	MS (MH ⁺) /MW 计算值	HPLC (Vydac C ₁₈ 250×4.6 mm, 5μm, 300A, 1mL/min, 45-75% B, 15 min。 A:0.05% TFA/水, B:0.038%TFA/82%乙腈/水)	
		t _R (min)	纯度 (% , λ 214nm)
I-A	503.45/502.6	4.79	99.35
I-B	503.47/502.6	5.96	99.00
I-C	517.49/516.6	5.26	99.00
I-D	503.25/502.6	5.10	98.12
I-E	503.20/502.6	5.83	97.15
I-F	503.25/502.6	6.70	99.08
I-G	503.25/502.6	5.87	98.71
I-H	503.26/502.6	6.23	98.79
I-J	503.30/502.6	4.80	100.0
I-K	503.27/502.6	4.65	97.44
I-L	542.1/541.6	4.72	99.47
I-M	519.3/518.6	5.81	100.0
I-N	575.3/574.7	7.25	98.43
I-O	517.3/516.6	6.52	97.05
I-P	MS+Na ⁺ =541.47, MS+K ⁺ =557.44/ 518.25	9.15 (C-8 Kromasil 柱, 梯度 40-80 % B, 15 min)	99.00

[0207] 实施例2. 肽以0.1%膏在BALB/c小鼠对矽唑酮的接触敏感性模型中的治疗效力

[0208] 本实验的目的是验证化合物I-A在普遍接受的动物模型中的治疗作用及其毒性。在下述实验中, 式I-A化合物用作治疗性制剂, 其形式为0.1%wt/wt膏——基于常用的药物载体, 即由50%凡士林和50%羊毛脂组成的膏。研究了制剂相对于广泛用于治疗皮肤疾病的参考制剂如他克莫司(Protopic[®])和吡美莫司(pimecrolimus)(Elidel[®])在减少小鼠对矽唑酮接触敏感性的效应期中的有效性。

[0209] 材料和方法

[0210] 小鼠: 研究采用BALB/c雌性小鼠, 8-10周龄, 由实验室医药研究所(Institute of Laboratory Medicine), Łódź, 波兰递送。小鼠被喂养以商用颗粒食物和水, 自由摄取。当地伦理委员会批准本研究。

[0211] 试剂: 油包水乳剂和膏剂由Nepentes递送。环状四肽(化合物I-A)如上所述合成。Protopic[®](他克莫司)购自Astellas, 爱尔兰; Elidel[®](吡美莫司)购自Novartis; Hydrocortisonum[®](氢化可的松)购自Aflofarm Farmacja Polska, 波兰。DMSO得自Fluka; 矽唑酮、丙酮、伊凡斯蓝、吉姆萨、May-Grünwald和福尔马林来自Sigma。

[0212] 对矽唑酮的接触敏感性: 测试按照Noonan et al. (Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 1978, 56, 523-532)进行, 并有一些改动。小鼠腹部(2×2cm区域)剃毛, 并在

24h后将100 μ l 0.5%噻唑酮的丙酮施用于剃毛区域。5天后通过在耳两侧施用50 μ l 1%噻唑酮的丙酮引起接触敏感性反应。48h后用弹簧卡钳测量耳肿胀。结果显示为耳厚度的抗原特异性增加(即,测量厚度减去小鼠本底(BG)耳厚度)。

[0213] 施用化合物:在显示的实验中,在用第二剂噻唑酮引起反应后24h和26h,于耳两侧(每只耳总体积50 μ l)以0.1%膏剂局部施用式I-A化合物。以类似方式施用参考化合物,其形式为可商业获得的制剂。

[0214] 确定淋巴结细胞数:将浅表腮腺、下颌和附属下颌淋巴结分离,通过压向不锈钢筛进入磷酸盐缓冲溶液(PBS)同质化,洗涤两次和再悬浮于包含0.2%台盼蓝的PBS。利用光学显微镜和Bürker血细胞计数器确定总细胞数和失活细胞数。仅以引发剂量的抗原治疗的小鼠充当本底对照。

[0215] 确定循环白细胞数和血像:小鼠经历卤烷麻醉和自后眼窝丛(retro-orbital plexus)放血,然后颈脱位。通过在Türk's溶液中稀释血液和在血细胞计数器中计数细胞来确定血液白细胞数。在显微镜玻璃上制备血液涂片,干燥,并用吉姆萨和May-Grünwald试剂染色。随后通过组织学方法评价涂片。显示每1mm³的循环白细胞数,血液细胞组成显示为给定细胞类型的百分比。仅以引发剂量的抗原治疗小鼠充当本底对照。

[0216] 组织学分析:将耳廓固定于4%福尔马林溶液48h,洗涤24h,在醇系列中脱水,和包埋在石蜡中。将石蜡块在Micron HM310切片机中切片成6 μ m切片。用苏木精和曙红和用甲苯胺蓝将该切片染色。在Nikon Eclipse 801光学显微镜下进行组织学分析。在包含耳廓横截面的组织学玻片上,对血管周围和皮下结缔组织的中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和肥大细胞进行形态测量学评估。以400 $\times$ 放大倍率在0.07mm²的区域计数细胞。形态测量学分析借助于图像软件NIS-Elements(Nikon)进行。每一个考察组,对中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和肥大细胞进行25个列举。

[0217] 统计学:结果显示为平均值 $\pm$ 标准误差(SE)。Brown-Forsyth测试用于确定组间方差的一致性。当方差一致时,应用方差分析(单向ANOVA),然后与Tukey测试事后比较,以评估组间差异的显著性。非参数数据用Kruskal-Wallis方差分析评价,如文中所述。确定 $p < 0.05$ 的显著性。统计学分析用Windows的STATISTICA7进行。统计学分析适用于本说明书中显示的所有数据。

[0218] 结果:

[0219] 图1包括的数据显示式I-A化合物(图1和后图中标记为“4B8M”)和参考制剂在对噻唑酮充分产生接触敏感性反应的小鼠中的治疗效力。如所述方法局部施用制剂。图1仅显示耳厚度的抗原特异性增加(作为减去本底值的结果,该本底值在仅给予引发剂量抗原的非致敏小鼠中测得)。化合物I-A导致约80%耳肿胀抑制;Protopic[®]和Elidel[®]分别导致约30%和50%抑制。

[0220] 耳中的炎症进展强度应与引流淋巴结的细胞数相关联。因此,炎症抑制应与引流淋巴结中细胞数减少相关。图2显示式I-A化合物和Elidel[®]均使引流淋巴结中的淋巴细胞数减少至非致敏小鼠中记载的水平。但是,在用Protopic[®]治疗的小鼠中,淋巴结细胞数类似于未治疗小鼠。

[0221] 图3显示引流淋巴结中活细胞和死细胞的比例,以百分比表示。相对于对照——非治疗小鼠,式I-A化合物显示忽略不计的毒性作用。Elidel[®]引起较高毒性作用,并且

Protopic[®]对淋巴结细胞具有剧毒性。

[0222] 关于制剂治疗效力的补充信息可源自发炎耳廓中细胞数和组成的组织学分析。图4显示局部炎症进展涉及的基本细胞类型的数量和参与。在图4中,Mast=肥大细胞,L=淋巴细胞,MO=巨噬细胞,Ne=中性粒细胞。未治疗小鼠(K+)的耳廓的特征在于中性粒细胞的高渗透。施用式I-A化合物几乎完全逆转在对照小鼠(中性粒细胞数标准化,并且巨噬细胞含量有所增加)中观察到的改变。Protopic[®]依次导致各细胞类型的比例有所变化,并且总细胞渗透不减少。Elidel[®]导致总细胞数中等减少。

[0223] 实施例3. 化合物I-A相对于环肽对人血单核细胞的毒性

[0224] 关于评价式I-A化合物的毒性,选择人外周单核血液细胞(PBMC)。该部分由约80%淋巴细胞和20%单核细胞组成。作为参考化合物,选择环肽(CLA),因为式I-A化合物共有CLA的部分序列。CLA显示与环孢霉素A相当的免疫抑制性,但具有较少毒性。

[0225] 材料和方法

[0226] 细胞毒性测试:将单一供体的静脉血采集到肝素化的注射器中,用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释两次,并施加于Lymphoprep[®](Polfa,Kutno,波兰)(密度为1.077g/ml)。在1200×g下离心20min后,收集相间的(interphase)单核细胞,并用PBS洗涤3次。将细胞再悬浮于标准培养基,该标准培养基由RPMI-1640介质、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、2-巯基乙醇、链霉素和青霉素各100μg/ml和10%胎牛血清组成。将细胞分布于96孔平底培养板,密度为2×10⁵/100μl。使化合物(式I-A和CLA)首先溶于DMSO(5mg/500μl),随后溶于培养基。用培养基适当稀释的DMSO用作对照。在细胞培养箱中24h培育后,通过比色法(Hansen et al., J Immunol Methods, 1989, 119, 203-210)确定细胞活力。

[0227] 结果显示在图5中,显示为四孔(细胞培养物)平均光密度值±SE。在图5中可见,式I-A化合物(列为“4B8M”)浓度范围10至100μg/ml内不显示可感知的毒性。另一方面,CLA,在40μg/ml下显示统计学上显著的细胞毒性效应。

[0228] 实施例4. 肽对体内SRBC体液免疫应答的影响

[0229] CBA雌性小鼠,8-12周龄,由实验室医药研究所,Łódź,波兰递送。小鼠自由摄取水和颗粒食物。当地伦理委员会批准本研究。绵羊红细胞(SRBC)由弗罗茨瓦夫生命与环境科学大学(Wroclaw University of Life and Environmental Sciences),波兰递送,并保持在RPMI-1640介质中。

[0230] 体内主要的SRBC体液免疫应答:腹膜内用0.2ml 5%SRBC悬浮液(0.5ml SRBC小球再悬浮于10ml体积的0.9%NaCl)使小鼠具有免疫性。在4天后,利用在琼脂凝胶中的局部溶血分析(按照Mishell et al., J Exp Med, 1967, 126, 423-442)确定脾中的抗体形成细胞(AFC)数。结果在图6中显示为5小鼠平均值±标准误差,并表示为每10⁶个活脾细胞的AFC数。

[0231] 如上所述用SRBC使小鼠具有免疫性,并在2h后给予10或100μg式I-A化合物。环孢霉素A(CsA)充当参考药物。4天后测量SRBC抗体形成细胞数。如图6所示,式IA化合物在两种剂量下均比CsA更具抑制性。

[0232] 实施例5. 肽对体内卵清蛋白细胞免疫应答的影响

[0233] 雄性CBA小鼠,8-12周龄,由实验室医药研究所,Łódź,波兰递送。小鼠自由摄取水和颗粒食物。卵清蛋白来自Sigma,佐剂来自Difco。

[0234] 迟发型超敏性(DTH)测试:在尾基中皮下用5 μ g在Freund完全佐剂中乳化的卵清蛋白(OVA)使小鼠致敏。4天后,在后足垫中用50 μ g在Freund不完全佐剂中的OVA挑战小鼠。再24小时后,用卡钳测量足垫厚度。对照(本底应答小鼠)不被致敏,但接受挑战剂量的OVA。在致敏剂量的抗原前2h和后24h,给予小鼠两个100 μ g腹膜内剂量的式I-A化合物和参考化合物。结果在图7中显示为以DTH单位(1DTH单位=10⁻²cm)表示的在5小鼠中测量的抗原特异性增加的足垫厚度的平均值 $\pm$ 标准误差,显示免疫后2h和24h以两剂量给予的式I-A化合物抑制OVA延迟型超敏性反应。该抑制作用强于CLA和CsA。

[0235] 实施例6

[0236] 通过1-100 μ g/ml浓度范围的全血细胞培养物来体外测试环状四肽其对植物血凝素A(PHA)引起的人外周血液单核细胞(PBMC)增殖和脂多糖(LPS)引起的肿瘤坏死因子 α (TNF- α)生成的影响。化合物还被测试1-100 μ g/ml浓度范围下对人PBMC的细胞毒性。

[0237] 材料和方法:

[0238] 试剂:RPMI-1640介质(Cibi/Life Technologies,UK)、胎牛血清(FCS,Gibco)、DMSO、植物血凝素A(PHA)、大肠杆菌(E.coli)菌株0111:B4的脂多糖(LPS)(Sigma)、93-[4,5-二甲基噻唑-2-基]-2,5-二苯基四唑溴化物(MTT)、SDS和DMF(Sigma)。培养基由RPMI-1640、10%FCS添加物、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、2-巯基乙醇和抗生素(链霉素和青霉素)组成。环状四肽最初溶于DMSO(5mg/ml),溶于培养基至理想的浓度。

[0239] 分离PBMC:从单一供体(男,62岁)将静脉血取入肝素化的注射器,并用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释两次。通过在Ficoll-uropoline梯度(密度1.077g/ml)(Lymphoprep;PAA Laboratories)下于4 $^{\circ}$ C下以800 $\times$ g离心20min,分离PBMC。然后将由淋巴细胞(20%)和单核细胞(80%)组成的相间细胞用Hanks介质洗涤三次,并再悬浮于培养基中,密度为2 $\times$ 10⁶个细胞/ml。

[0240] PBMC对PHA的增殖性应答:将分离的PBMC以100 μ l等份(2 $\times$ 10⁵个细胞/孔)分布于96孔平底板中。在5 μ g/ml的浓度下应用PHA。在1、10和100 μ g/ml的浓度下测试化合物。DMSO的适当稀释液充当对照。在细胞培养箱中四天温育后,通过比色MTT法(Hansen et al., J. Immunol. Methods, 1989, pp. 203-210)确定细胞的增殖性应答。数据显示为四孔平均OD值 $\pm$ 标准误差(SE)。培养物“对照(-)”不包含分裂素(PHA)。培养物“对照(PHA)”包含PHA,但不含环状四肽。

[0241] 毒性测试:将以2 $\times$ 10⁵/100 μ l/孔的密度再悬浮于培养基中的PBMC在细胞培养箱中培养24h,并且环状四肽的浓度为1、10和100 μ g/ml浓度。通过MTT比色法(Hansen et al., J. Immunol. Methods, 1989, pp. 203-210)确定细胞存活。数据显示为四孔平均OD值 $\pm$ 标准误差(SE)。培养物“对照(-)”在培养基中仅包含细胞。确定TNF- α 活性(按照Espevik et al., J. Immunol. Methods, 95(1986):99-103):将人全血用RPMI-1640介质稀释10倍,并以1ml等份分布于24孔培养板。将LPS以1 μ g/ml浓度加入培养物。在1、10和100 μ g/ml的浓度下应用本研究肽。过夜温育后,收集上清液,并将其在-20 $^{\circ}$ C下冷冻,直到细胞因子测定。利用生物分析确定TNF- α 活性。简要地,以2 $\times$ 10⁴个细胞/孔的浓度一式四份接种WEHI 164.13细胞(ATCC CRL 1751)。在放线菌素D(1 μ g/ml)存在下,将所分析的上清液增加的稀释液与目标细胞混合。20h温育后,将MTT加入孔,并将培养物再温育4h。下一步,添加裂解缓冲液(20% SDS和50%DMF,pH 4.7),并在24h后在Dynatech 5000分光光度计中测量550nm下的光密度,

参考波长为630nm。分析的检测限值为约2.5pg/ml。1单位TNF- α 活性被定义为发生50%细胞死亡的上清液稀释的倒数。标记为“对照(-)”的培养物不包含LPS。标记为“对照(LPS)”的培养物包含LPS,不包含本研究化合物。不应用统计学分析,因为数据来自单一培养物(孔)。

[0242] 细胞生长和死亡的比色MTT分析:分析按照Hansen et al., J.Immunol.Methods, 1989, 119pp. 203-210进行。简要地,在细胞温育结束时每孔添加25 μ l MTT(5mg/ml)原溶液,并将板在细胞培养箱中温育3h。然后,添加100 μ l提取缓冲液(20%SDS和50%DMF, pH 4.7)。再过夜温育后,在550nm下测量光密度(Dynatech 5000)。

[0243] 在适用时,结果显示为平均值 $\pm$ 标准误差(SE)。利用Brown-Forsyth测试确定组间方差的一致性。当方差一致时,采用方差分析(单向ANOVA),然后与Tukey测试事后比较,以评估组间差异的显著性。确定 $P < 0.05$ 的显著性。利用Windows的STATISTICA 6.1进行统计学分析。

[0244] 结果

[0245] 化合物对PBMC存活的影响:肽对24h培养物中PBMC存活的影响显示在图8A和8B中。包括肽4B8M(化合物I-A)作为参考化合物。DMSO的适当稀释液加入对照培养物。结果显示化合物在本研究浓度范围内无毒性迹象。在图中, P01=化合物I-D, P02=化合物I-E, P03=化合物I-F, P04=化合物I-G, P05=化合物I-H, P06=化合物I-J, P07=化合物I-K, P08=化合物I-L, P10a=化合物I-M, P10b=化合物I-N, 和P11=化合物I-O。

[0246] 图8A和8B显示测试肽对PBMC存活的影响。图8A:统计学(所有与DMSO在适当稀释的比较):100 μ g/ml:4B8M NS($P=0.9999$);P01NS($P=1.0000$);P02NS($P=1.0000$);P03NS($P=1.0000$);P04NS($P=0.9047$);P05NS($P=1.0000$);P06NS($P=0.9999$);P07NS($P=1.0000$);10 μ g/ml:4B8M NS($P=1.0000$);P01NS($P=1.0000$);P02NS($P=1.0000$);P03NS($P=1.0000$);P04NS($P=0.9999$);P05NS($P=1.0000$);P06NS($P=1.0000$);P07NS($P=1.0000$);1 μ g/ml:4B8MNS($P=1.0000$);P01NS($P=1.0000$);P02NS($P=1.0000$);P03NS($P=1.0000$);P04NS($P=1.0000$);P05NS($P=1.0000$);P06NS($P=0.8253$);P07NS($P=1.0000$)(ANOVA)。图8B:统计学(所有与DMSO在适当稀释的比较):100 μ g/ml:4B8MNS($P=0.0669$);P08NS($P=0.9957$);P10b NS($P=1.0000$);10 μ g/ml:4B8MNS($P=0.9999$);P08NS($P=1.0000$);P10b NS($P=1.0000$);1 μ g/ml:4B8M NS($P=0.3176$);P08NS($P=0.9999$);P10b NS($P=1.0000$)(ANOVA)。

[0247] 肽对PHA引起的PBMC增殖的影响:肽对PBMC增殖性应答的影响显示在图9A和9B中。包括肽4B8M作为参考化合物。加入DMSO的适当稀释液为对照培养物。

[0248] 图9A:肽对PHA引起的PBMC增殖的影响:统计学(所有与DMSO在适当稀释的比较):1 μ g/ml:4B8M NS($P=0.9995$);P01NS($P=1.0000$);P02NS($P=1.0000$);P03NS($P=1.0000$);P04NS($P=0.9047$);P05NS($P=0.5198$);P06NS($P=1.0000$);P07NS($P=0.1445$);10 μ g/ml:4B8M NS($P=1.0000$);P01NS($P=0.9999$);P02NS($P=1.0000$);P03NS($P=0.9930$);P04NS($P=0.4297$);P05NS($P=1.0000$);P06NS($P=1.0000$);P07NS($P=0.8647$);100 μ g/ml:4B8M NS($P=1.0000$);P01NS($P=1.0000$);P02NS($P=0.9982$);P03P=0.0001;P04NS($P=0.9970$);P05NS($P=0.2037$);P06NS($P=0.1257$);P07NS($P=1.0000$)(ANOVA)。

[0249] 图9B:肽对PHA引起的PBMC增殖的影响:统计学(所有与DMSO在适当稀释的比较):1 μ g/ml:4B8M NS($P=0.9919$);P08NS($P=0.9999$);P10b NS($P=1.0000$);10 μ g/ml:4B8M NS($P=1.0000$);P08NS($P=1.0000$);P10b NS($P=0.2763$);100 μ g/ml:4B8M NS($P=0.4941$);P08NS($P=$

1.0000); P10b NS(P=0.9933)(ANOVA)。

[0250] 肽对全血细胞培养物中LPS引起的TNF- α 生成的影响:肽对全血细胞培养物中LPS引起的TNF- α 生成的影响显示在表2A和2B。包括肽4B8M作为参考化合物。加入DMSO的适当稀释液为对照培养物。

[0251] 表2A.

[0252] 肽对LPS引起的TNF- α 生成的影响

	化合物	化合物 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	TNF- α (pg/ml)	相对于 DMSO 的 抑制%
[0253]	对照(-)	-	92	-
	对照 (LPS)	-	6668	-
	仅 DMSO	1	8167	-
		10	8006	-
		100	196	-
	4B8M	1	7364	9.8
		10	7176	10.4
	(化合物 I-A)	100	178	9.2
	P01 (化合物 I-D)	1	7016	14.1
		10	5757	28.1
		100	141	28.1
P02 (化合物 I-E)	1	6614	19.0	
	10	6346	20.7	
	100	176	10.2	
P03 (化合物 I-F)	1	6052	25.9	
	10	5222	34.8	
	100	76	61.2	
[0254] P04 (化合物 I-G)	1	5463	33.1	
	10	5302	33.8	
	100	58	70.4	
P05 (化合物 I-H)	1	7123	12.8	
	10	7203	10.0	
	100	110	43.9	
P06 (化合物 I-J)	1	8033	1.6	
	10	7658	4.4	
	100	203	0.0	
P07 (化合物 I-L)	1	6453	21.0	
	10	7284	9.0	
	100	163	16.8	

[0255] 表2B.

[0256] 肽对LPS引起的TNF α 生成的影响

化合物	化合物 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	TNF α (pg/ml)	相对于 DMSO 的 抑制%
对照(-)	-	223	-
对照 (LPS)	-	4260	-
仅 DMSO	1	4550	-
	10	4351	-
	100	854	-
[0257] 4B8M (化合物 I-A)	1	4097	10.0
	10	4416	-
	100	979	-
P08 (化合物 I-M)	1	4039	11.2
	10	3363	22.7
	100	269	68.5
P10b (化合物 I-O)	1	3792	16.7
	10	3739	14.0
	100	282	67.0

[0258] 实施例7. 化合物I-A对甲苯二异氰酸酯引起的小鼠耳部炎症的抑制效应

[0259] 化合物I-A对甲苯二异氰酸酯(TDI)引起的BALB/c小鼠耳部炎症的抑制效力。可商业获得的Protopic®(他克莫司)和Elidel®(吡美莫司)充当参考药物。

[0260] 材料和方法

[0261] 小鼠: BALB/c雌性小鼠, 8-10周龄, 由实验室医药研究所, Łódź, 波兰递送。小鼠被喂养以商用颗粒食物和水, 自由摄取。当地伦理委员会批准本研究。

[0262] 试剂。化合物I-A如上所述合成; Protopic®(他克莫司)来自Astellas, 爱尔兰Elidel®(吡美莫司)来自Novartis; DMSO来自Fluka; TDI、丙酮、伊凡斯蓝、台盼蓝、吉姆萨、May-Grünwald、苏木精、曙红、甲苯胺蓝和福尔马林来自Sigma。

[0263] 对TDI的免疫应答。测试按照Yamamoto, Eur. J. Pharmacol., 2006, 550, 166-172进行, 略有改动。将小鼠在腹部(2×2cm区域)剃毛, 并在24h后施用100 μl 3%丙酮中的TDI连续3天。14天后, 通过在耳两侧施用50 μl 0.3%TDI引起反应。该程序每3天重复5次。每次用TDI刺激后5h和24h, 用弹簧卡钳(Mitutoyo)测量耳厚度。

[0264] 施用化合物。每次用TDI刺激后1小时, 在耳两侧局部施用0.1%膏剂形式的化合物I-A(每耳总体积100 μl -50 μl)。参考药物以类似方式施用。

[0265] 确定淋巴结细胞数。将浅表腮腺、下颌和附属下颌淋巴结分离, 通过压向不锈钢筛进入PBS同质化, 用PBS洗涤2次, 和再悬浮于包含0.2%台盼蓝的PBS中。利用光学显微镜和Bürker血细胞计数器计数总细胞数和失活细胞数。

[0266] 确定循环白细胞数和血像。使小鼠经受卤烷麻醉和自后眼窝丛放血, 然后颈脱位。通过在Türk溶液中稀释血液和在血细胞计数器中计数细胞来确定血液白细胞数。在显微镜玻璃上制备血液涂片, 干燥, 并用吉姆萨和May-Grünwald试剂染色。随后利用组织学方法评价涂片。显示每1 μl 的细胞数, 血液细胞组成显示为给定细胞类型的百分比。

[0267] 伊凡斯蓝测试。静脉内给予小鼠0.2ml 0.9%NaCl中的1mg伊凡斯蓝。30min后, 处死

小鼠,并将耳部切除,称重和浸入37℃的50μl 1M KOH 18h。用450μl 0.2M磷酸和丙酮(5:13的比)从耳部提取染料。在3,000rpm下将样本离心15min。在630nm下测量上清液的光密度(OD)。基于标准曲线确定伊凡斯蓝的量(μg/ml)。结果显示为每100mg湿组织的伊凡斯蓝量。仅以引发剂量的抗原治疗小鼠充当本底对照。

[0268] 组织学分析。将耳廓固定在4%福尔马林溶液中48h,洗涤24h,在醇系列中脱水,并包埋在石蜡中。将石蜡块在Micron HM310切片机中切片成6μm切片。用苏木精和曙红和用甲苯胺蓝将该切片染色。利用Nikon Eclipse 801光学显微镜进行组织学分析。在包含耳廓横截面的组织学玻片上,对血管周围和皮下结缔组织的中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和肥大细胞进行形态测量学评估。以400×放大倍率在0.07mm²的区域计数细胞。形态测量学分析利用图像软件NIS-Elements(Nikon)进行。每一个考察制剂,对中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和肥大细胞进行25个列举。

[0269] 统计学。图10A和10B的结果显示为平均值±标准误差(SE)。用Brown-Forsyth测试确定组间方差的一致性。当方差一致时,采用方差分析(单向ANOVA),然后与Tukey测试进行事后比较,以评估组间差异的显著性。非参数数据用Kruskal-Wallis方差分析进行评价,如文中所述。确定P<0.05的显著性。统计学分析利用Windows的STATISTICA 7进行。

[0270] 结果

[0271] 化合物对耳厚度的影响。对TDI的体液免疫应答如方法中所述引起。在每次用抗原刺激后1小时,用四肽(式I-A,在图10A和10B中标记为4B8M)和参考化合物局部治疗小鼠。治疗结果显示在图10A和10B中,显示在图中所示测试当天给予后5h(图10A)和24h(图10B)的耳厚度测量结果。对照TDI应答在每次抗原刺激后逐渐增加(5h测量结果显示最佳)。结果显示化合物在减少耳部膨胀中的差异效力。

[0272] 图10A:第14天:对照对4B8M P=0.0005;对照对Protopic[®]P=0.0002;对照对Elidel[®]P=0.0152;4B8M对Protopic[®]NS;4B8M对Elidel[®]NS;第17天:对照对4B8M P=0.0001;对照对Protopic[®]P=0.0001;对照对Elidel[®]P=0.0377;4B8M对Protopic[®]NS;4B8M对Elidel[®]P=0.0002;第20天:对照对4B8M P=0.0001;对照对Protopic[®]P=0.0001;对照对Elidel[®]NS;4B8M对Protopic[®]NS;4B8M对Elidel[®]P=0.0001;第23天:对照对4B8M P=0.0001;对照对Protopic[®]P=0.0001;对照对Elidel[®]NS;4B8M对Protopic[®]NS;4B8M对Elidel[®]P=0.0001;第27天:对照对4B8M P=0.0001;对照对Protopic[®]P=0.0001;对照对Elidel[®]P=0.0001;4B8M对Protopic[®]NS;4B8M对Elidel[®]P=0.0001(ANOVA)。图10B:第14天:对照对4B8M P=0.0001;对照对Protopic[®]P=0.0001;对照对Elidel[®]P=0.0004;4B8M对Protopic[®]NS;4B8M对Elidel[®]NS;第17天:对照对4B8M P=0.0001;对照对Protopic[®]P=0.0023;对照对Elidel[®]P=0.0004;4B8M对Protopic[®]NS;4B8M对Elidel[®]NS;第20天:对照对4B8M P=0.0006;对照对Protopic[®]P=0.0003;对照对Elidel[®]P=0.0156;4B8M对Protopic[®]NS;4B8M对Elidel[®]NS;第23天:对照对4B8M P=0.0001;对照对Protopic[®]P=0.0001;对照对Elidel[®]P=0.0039;4B8M对Protopic[®]NS;4B8M对Elidel[®]P=0.0027;第27天:对照对4B8M P=0.0001;对照对Protopic[®]P=0.0001;对照对Elidel[®]P=0.0023;4B8M对Protopic[®]NS;4B8M对Elidel[®]P=0.0016(ANOVA)。

[0273] 化合物对皮肤血管渗透性的影响:毛细血管渗透性显示在图11中,显示在伊凡斯

蓝测试中的毛细血管渗透性。如上所述程序在第五次用TDI刺激后24h(第28天)进行。如图11所示,血管渗透率与化合物对各小鼠组耳厚度的影响密切相关。统计学:BG对对照 $P=0.0248$;对照对4B8M(I-A) $P=0.030$;对照对Protopic[®]NS;对照对Elidel[®]NS;4B8M(I-A)对Protopic[®]NS;4B8M(I-A)对Elidel[®]NS(ANOVA)。

[0274] 化合物对引流淋巴结中细胞数的影响:图12显示引流淋巴结中的细胞总数。如图12所示,化合物I-A治疗小鼠导致淋巴结细胞数几乎减少至本底水平(非致敏小鼠)。统计学:BG对对照 $P=0.0001$;对照对4B8M(I-A) $P=0.0001$;对照对Protopic[®]NS;对照对Elidel[®]NS;4B8M(I-A)对Protopic[®] $P=0.0183$;4B8M(I-A)对Elidel[®] $P=0.0001$ (ANOVA of Kruskal-Wallis)。

[0275] 化合物对循环白细胞数的影响。图13显示化合物对循环白细胞数的影响;施用本研究制剂使循环白细胞数降至在对照——未致敏小鼠——中观察到的水平。统计学:BG对对照 $P=0.0001$;对照对4B8M(I-A) $P=0.0001$;对照对Protopic[®] $P=0.0001$;对照对Elidel[®] $P=0.0001$;4B8M(I-A)对Protopic[®]NS;4B8M(I-A)对Elidel[®]NS(ANOVA)。

[0276] 化合物对血液细胞组成的影响:对TDI的充分反应的对照小鼠的血液组成的特征在于中性粒细胞量和嗜酸性粒细胞量相对于对照——本底小鼠——增加(图14,显示各情况下白细胞类型的细目分类)。在施用4B8M(I-A)(中性粒细胞和嗜酸性粒细胞量减少)时,但不在给予Protopic[®]或Elidel[®]后,标准化血像。统计学:带(b):BG对对照NS;对照对4B8M(I-A)NS;对照对Protopic[®] $P=0.0500$;对照对Elidel[®] $P=0.0500$;4B8M(I-A)对Protopic[®]NS;4B8M(I-A)对Elidel[®]NS(ANOVA of Kruskal-Wallis);段(S):BG对对照 $P=0.0131$;对照对4B8M(I-A)NS;对照对Protopic[®]NS;对照对Elidel[®]NS;4B8M(I-A)对Protopic[®] $P=0.0163$;4B8M(I-A)对Elidel[®]NS(ANOVA of Kruskal-Wallis);嗜酸性粒细胞(E):BG对对照 $P=0.0001$;对照对4B8M(I-A) $P=0.0001$;对照对Protopic[®]NS;对照对Elidel[®]NS;4B8M(I-A)对Protopic[®]NS;4B8M(I-A)对Elidel[®] $P=0.0146$ (ANOVA of Kruskal-Wallis);淋巴细胞(L):BG对对照 $P=0.0001$;对照对4B8M(I-A) $P=0.0043$;对照对Protopic[®]NS;对照对Elidel[®]NS;4B8M(I-A)对Protopic[®] $P=0.0345$;4B8M(I-A)对Elidel[®]NS(ANOVA of Kruskal-Wallis)。

[0277] 化合物对耳廓细胞组成的影响:图15提供关于耳廓细胞数量和组成的形态测量数据。本研究小鼠组之间不同的耳廓内细胞类型组成显示在图15中。对照非致敏小鼠中主要存在的细胞类型是肥大细胞和中性粒细胞(分别为每个分析区10和5个细胞)。在未用治疗剂治疗的致敏对照小鼠中,肥大细胞数量增加两倍,中性粒细胞增加几乎5倍(分别为20和23个细胞)。Protopic[®]和化合物I-A有效使细胞数减少至14和14.8。统计学:Ne(中性粒细胞):BG对对照 $P=0.0001$;对照对4B8M(I-A) $P=0.0151$;对照对Protopic[®] $P=0.0001$;对照对Elidel[®]NS;4B8M(I-A)对Protopic[®]NS;4B8M(I-A)对Elidel[®] $P=0.0003$ (ANOVA of Kruskal-Wallis);MØ(巨噬细胞):BG对对照 $P=0.0144$;对照对4B8M(I-A)NS;对照对Protopic[®]NS;对照对Elidel[®] $P=0.0255$;4B8M(I-A)对Protopic[®]NS;4B8M(I-A)对Elidel[®] $P=0.0031$ (ANOVA of Kruskal-Wallis);L(淋巴细胞):BG对对照NS;对照对4B8M(I-A)NS;对照对Protopic[®]NS;对照对Elidel[®] $P=0.0023$;4B8M(I-A)对Protopic[®]NS;4B8M(I-A)对Elidel[®] $P=0.0001$ (ANOVA of Kruskal-Wallis);Mast(肥大细胞):BG对对照 $P=0.0001$;对照对4B8M(I-A)NS;对照对Protopic[®] $P=$

0.0001;对照对Elidel[®]NS;4B8M(I-A)对Protopic[®]NS;4B8M(I-A)对Elidel[®]P=0.0001(ANOVA of Kruskal-Wallis)。

[0278] 实施例8-化合物I-B和I-C的体外测试

[0279] 方法

[0280] 脾细胞对伴刀豆球蛋白A(ConA)的增殖性应答:将脾压向塑料筛,进入0.83%NH₄Cl溶液以溶解红细胞(在室温下5min温育)。然后将细胞用Hanks介质洗涤两次,通过玻璃棉柱,以去除碎片,再悬浮于培养基中,在下文中被称为“培养基”,由补充10%胎牛血清、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、2-巯基乙醇、链霉素和青霉素(100μg/ml)的RPMI-1640组成。然后将细胞分布于96孔平底组织培养板(Nunc)中,密度为 2×10^5 个细胞/100μl/孔。添加Con A(2.5μg/ml)以引起细胞增殖。将化合物以1-100μg/ml的剂量加入培养物。三天温育后,利用比色MTT法(Hansen MB, J Immunol Methods, 1989, 119, 203-210)测定细胞增殖。结果显示为四份测定(孔)在550nm下的平均光密度(OD)±SE。

[0281] 对绵羊红细胞(SRBC)的体外第二体液免疫应答:腹膜内用0.2ml 5%(v/v)SRBC悬浮液使小鼠致敏。四天后,分离这些小鼠的脾,并通过在PBS溶液中同质化制备单细胞悬浮液。通过离心在PBS中洗涤细胞后,将细胞再悬浮于培养基中,密度为 5×10^6 个细胞/ml。随后将细胞以1ml等份分布于24孔培养板,并向各孔添加0.05ml 0.005%SRBC作为抗原。在四天温育时间开始时,将化合物加入培养物,其浓度范围为1-100μg/ml。利用根据Mishell et al., J Exp Med, 1967, 126, 423-442所述的在琼脂凝胶中局部溶血的方法,测定培养物中的抗体形成细胞(AFC)的数量。

[0282] 毒性测试:将密度为 2×10^5 个细胞/100μl/孔、再悬浮于培养基中的脾细胞在细胞培养箱中与化合物(1-100μg/ml)一起培养24h。通过MTT比色法确定细胞存活。结果显示为4孔在550nm下的平均光密度(OD)。将各化合物浓度的细胞活力与相应于各化合物浓度的适当DMSO对照组(100%存活)进行比较。

[0283] 结果

[0284] 在50-100μg/ml浓度下,化合物I-C显示对伴刀豆球蛋白A引起的小鼠脾细胞增殖的强抑制效应。在100μg/ml下,该化合物显示对脾细胞的70%毒性。在10μg/ml和100μg/ml下,化合物I-C在对小鼠脾细胞培养物中的SRBC体外体液免疫应答模型中,分别显示33%和80%抑制。在对卵清蛋白的迟发型超敏性模型中,化合物I-C在100μg剂量下显示26.9%抑制,与之相比化合物I-A显示72.7%抑制。

[0285] 在100μg/ml浓度下,化合物I-B显示对伴刀豆球蛋白A引起的脾细胞增殖的弱抗增殖性效应;较低浓度下未观察到这种效应。化合物I-B在该浓度下具有30%毒性。

[0286] 虽然以示例为目的已对前述发明进行一些具体描述,但对于本领域技术人员显而易见的是,可做出改变和改动而不脱离本文所述发明的范围。

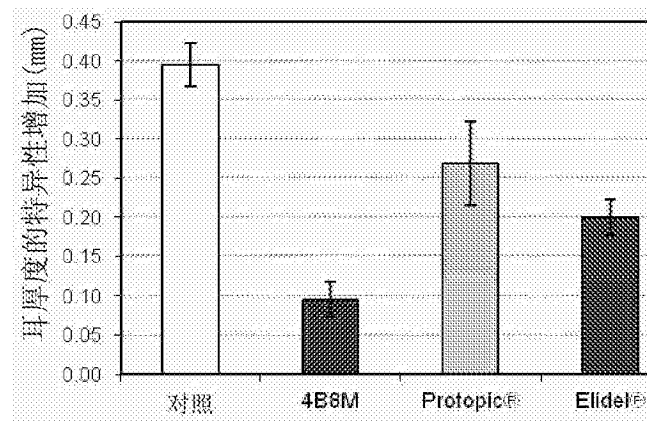


图1

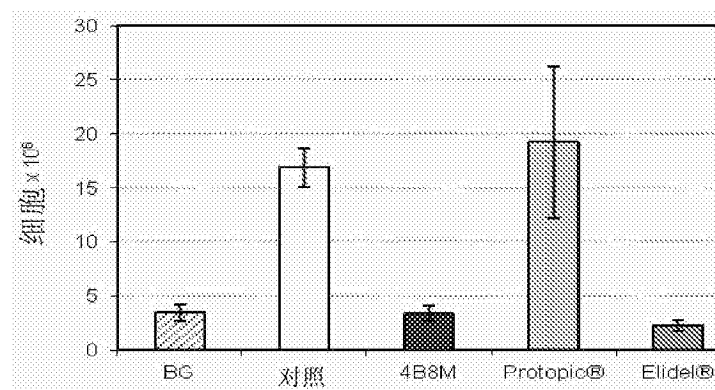


图2

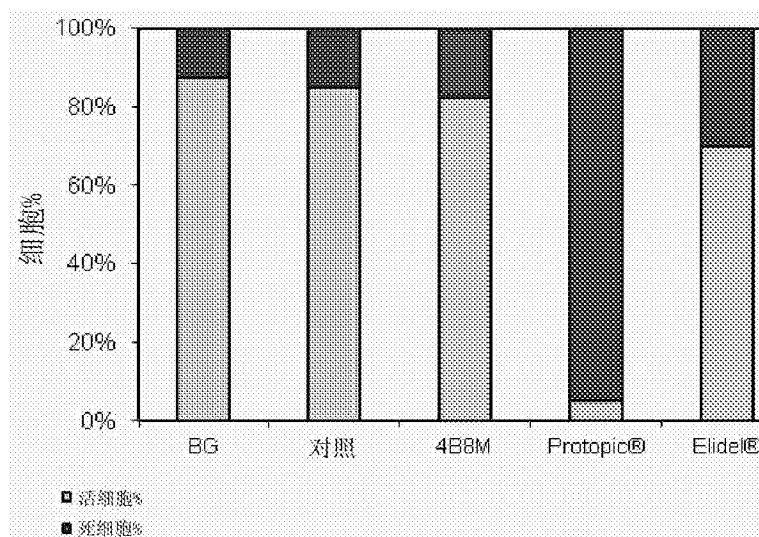


图3

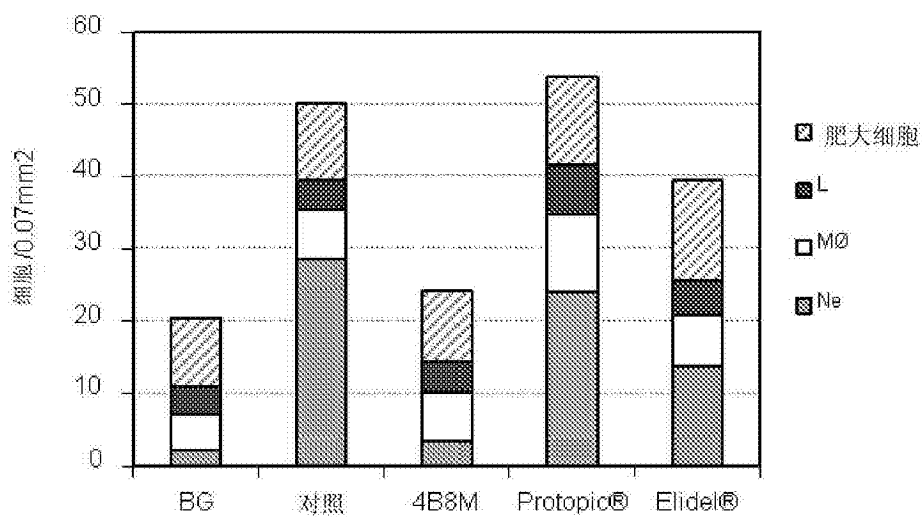


图4

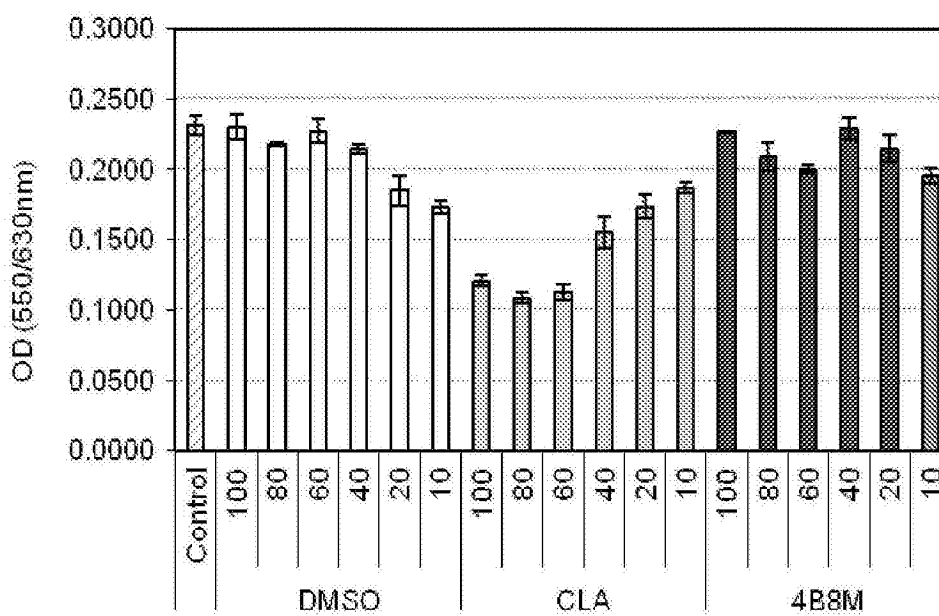


图5

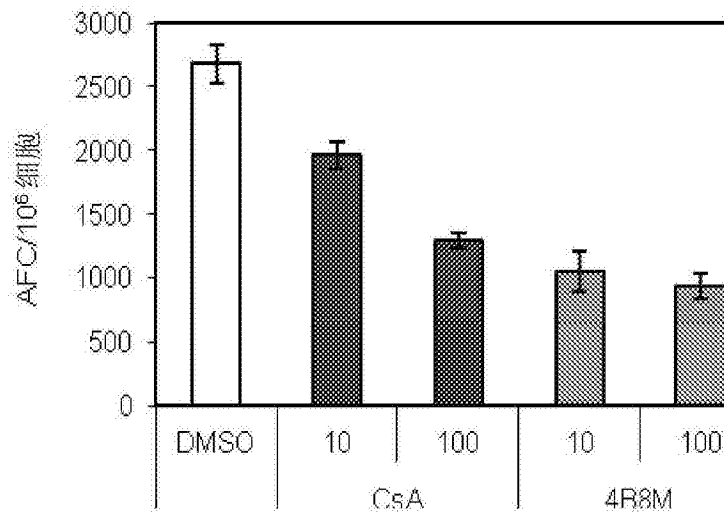


图6

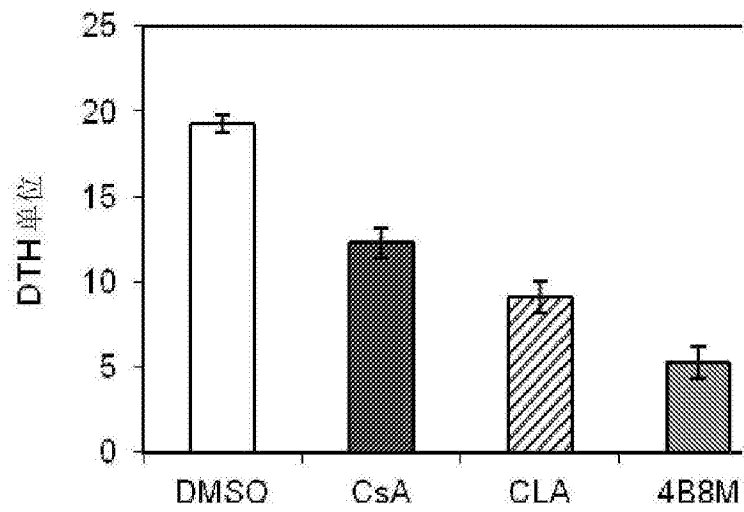


图7

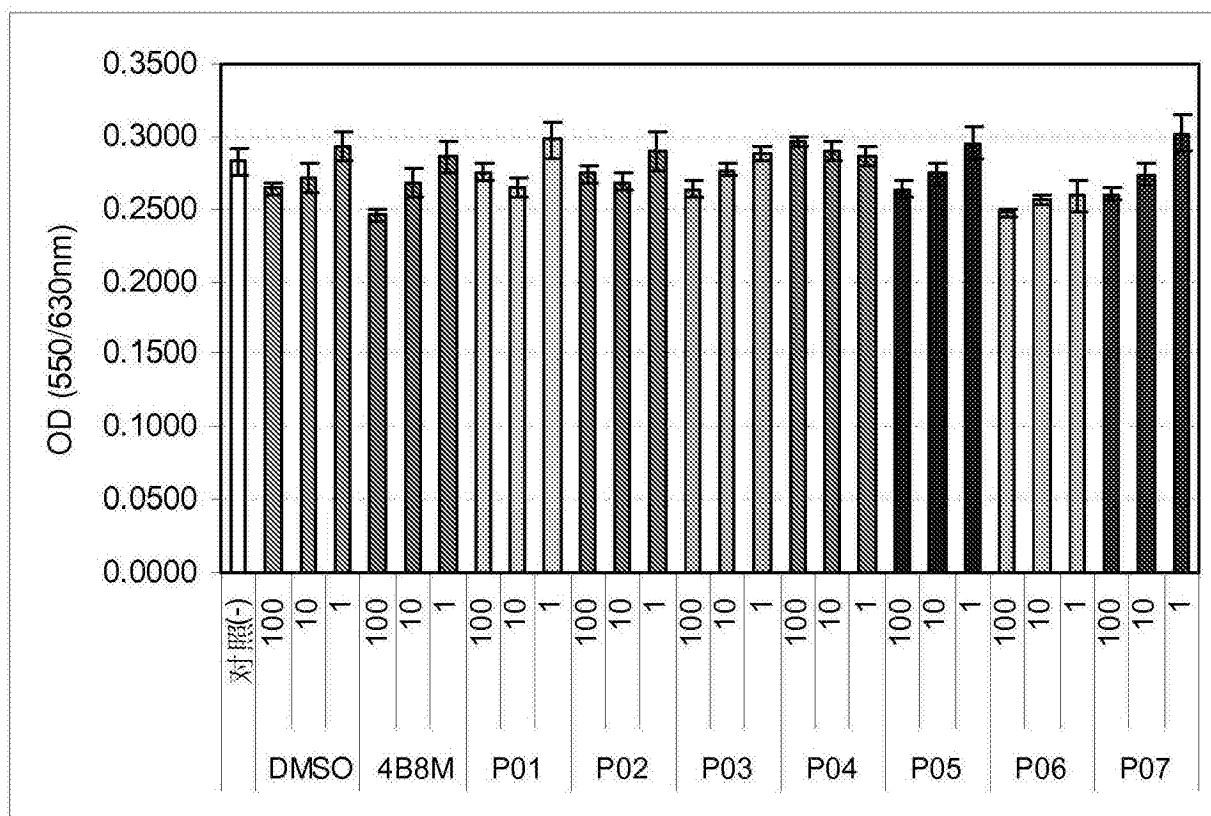


图8A

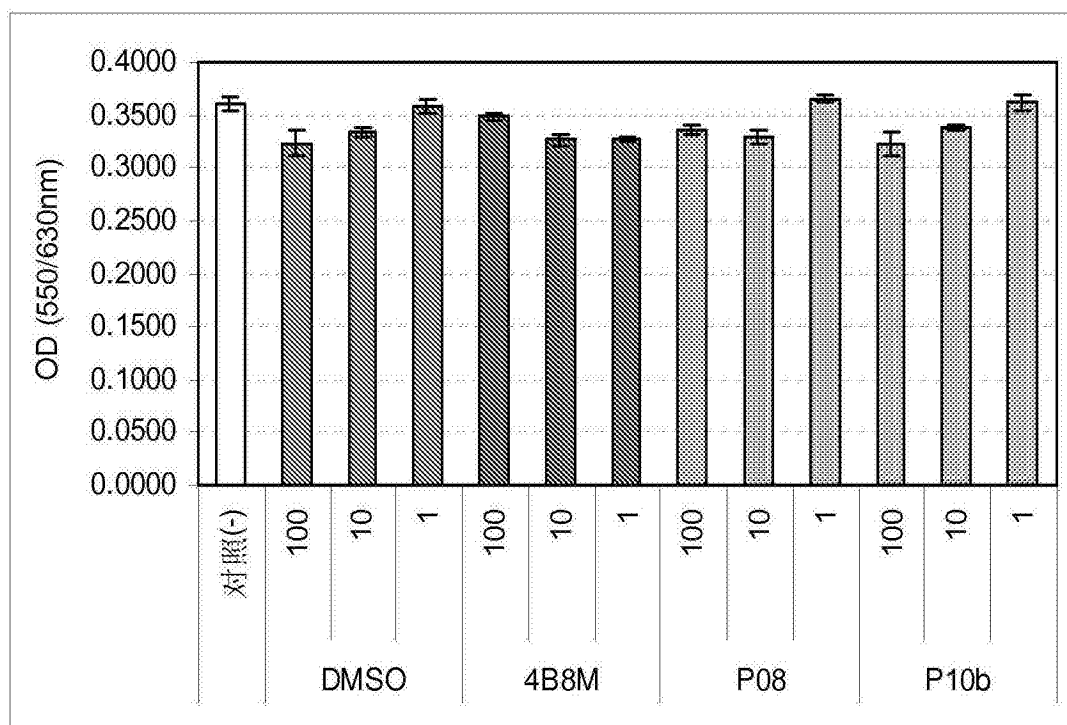


图8B

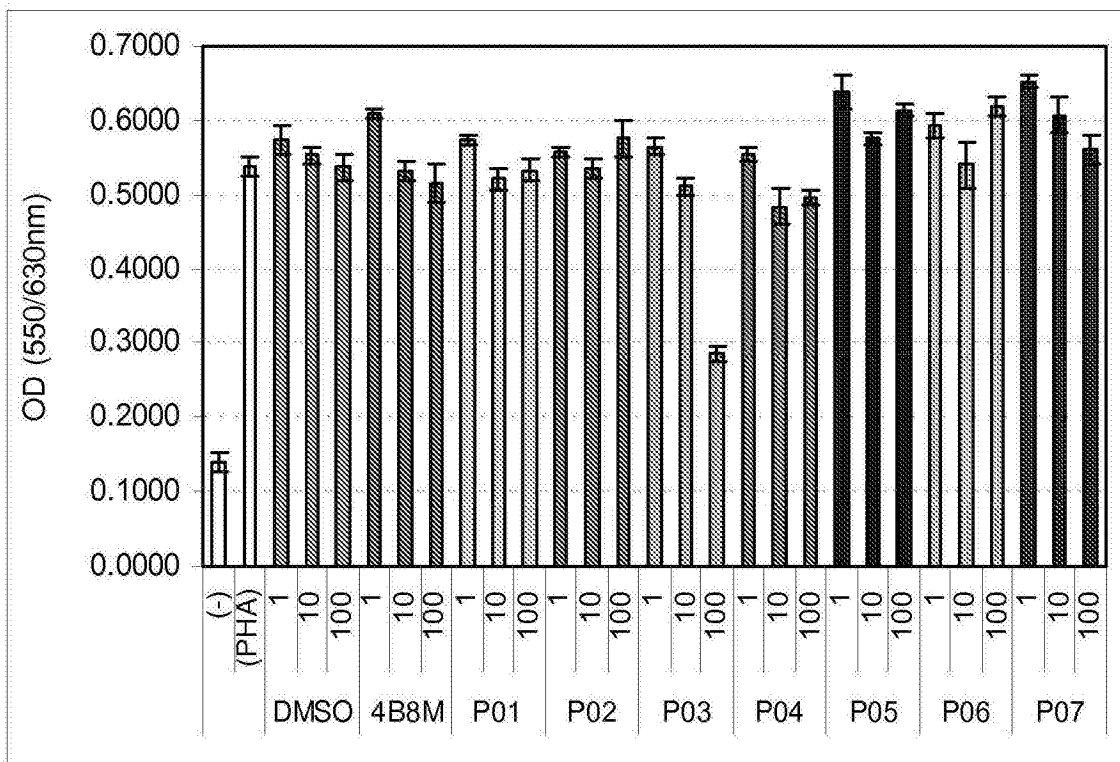


图9A

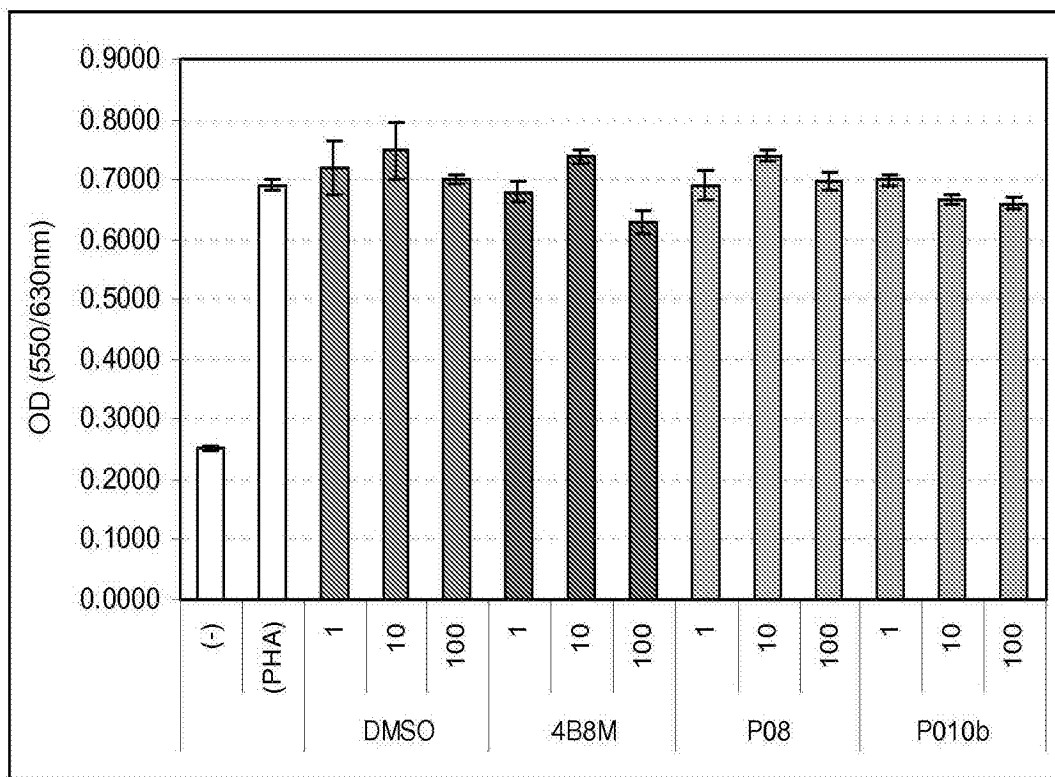


图9B

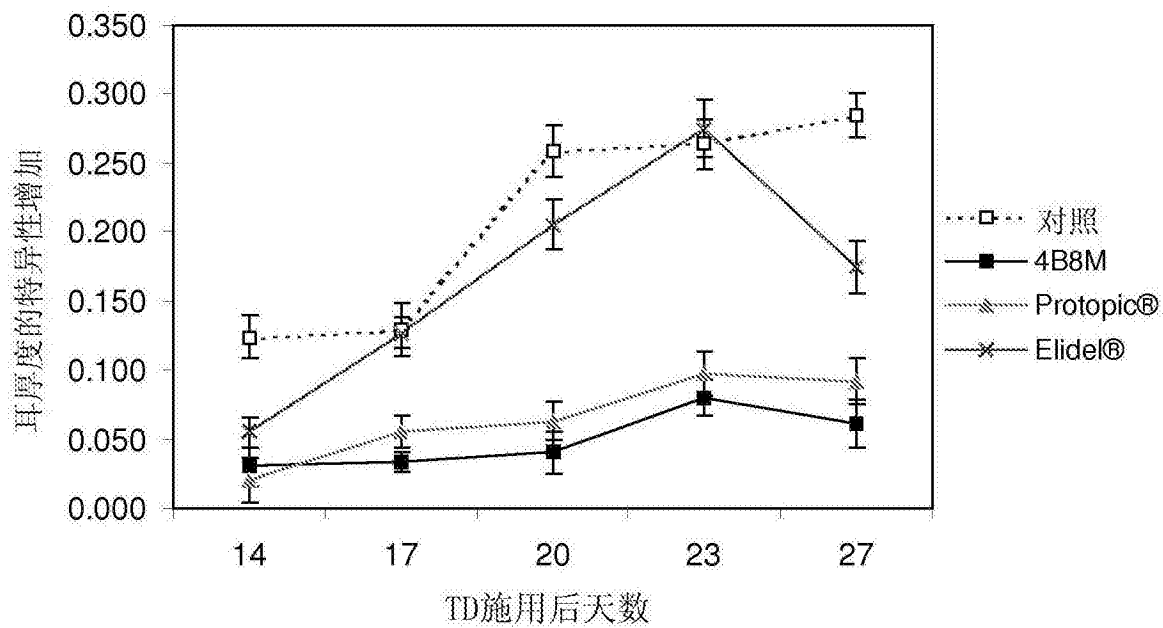


图10A

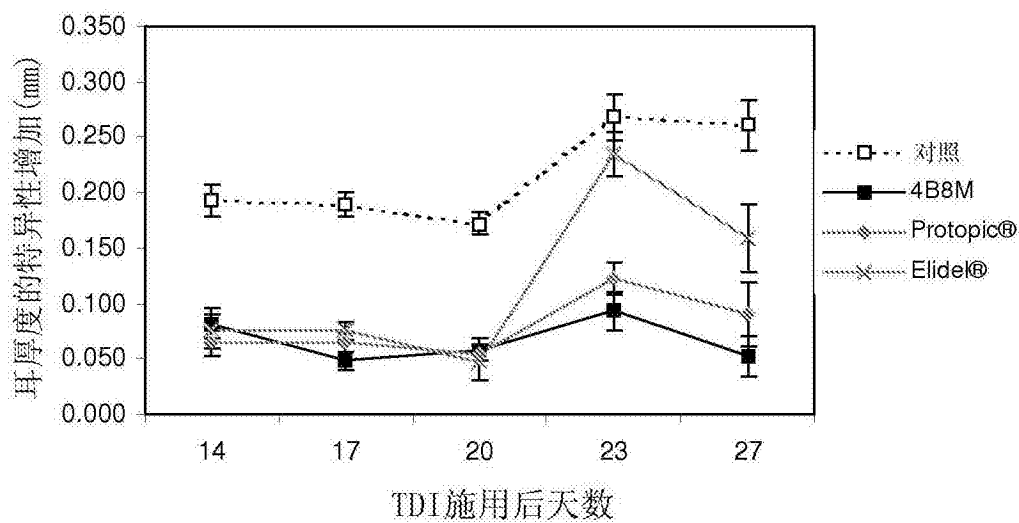


图10B

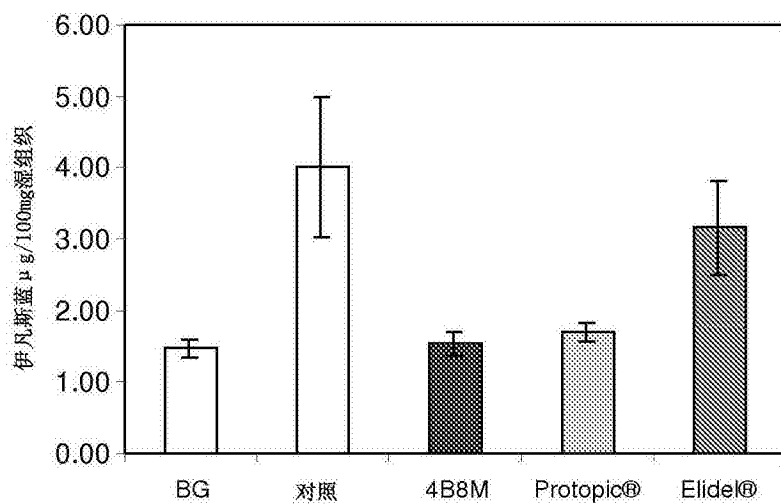


图11

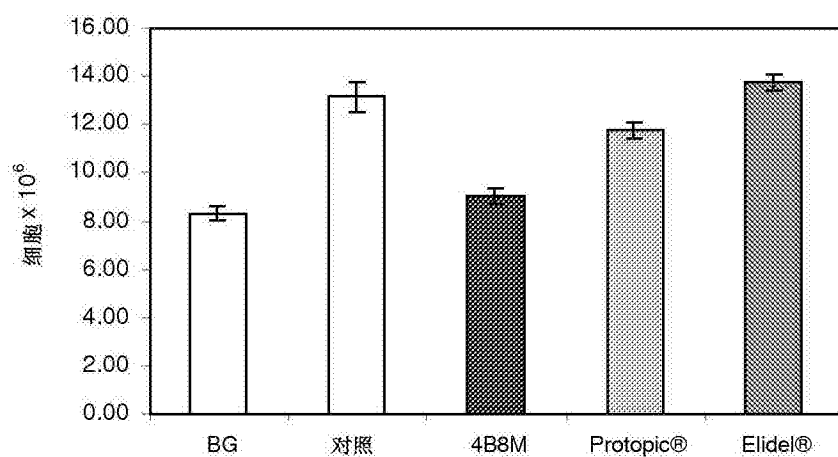


图12

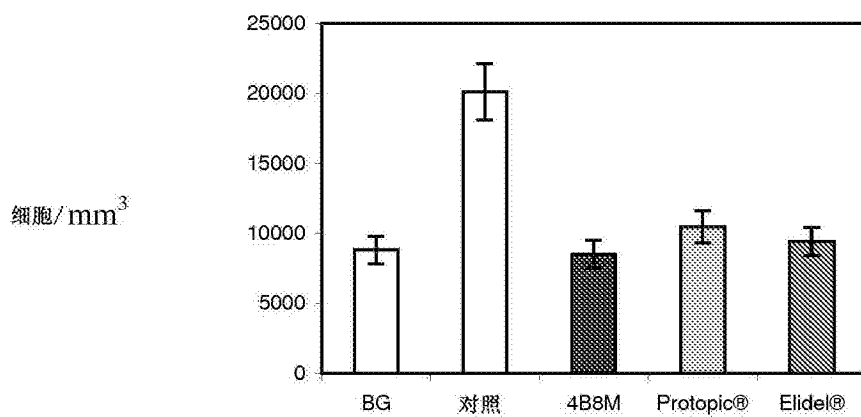


图13

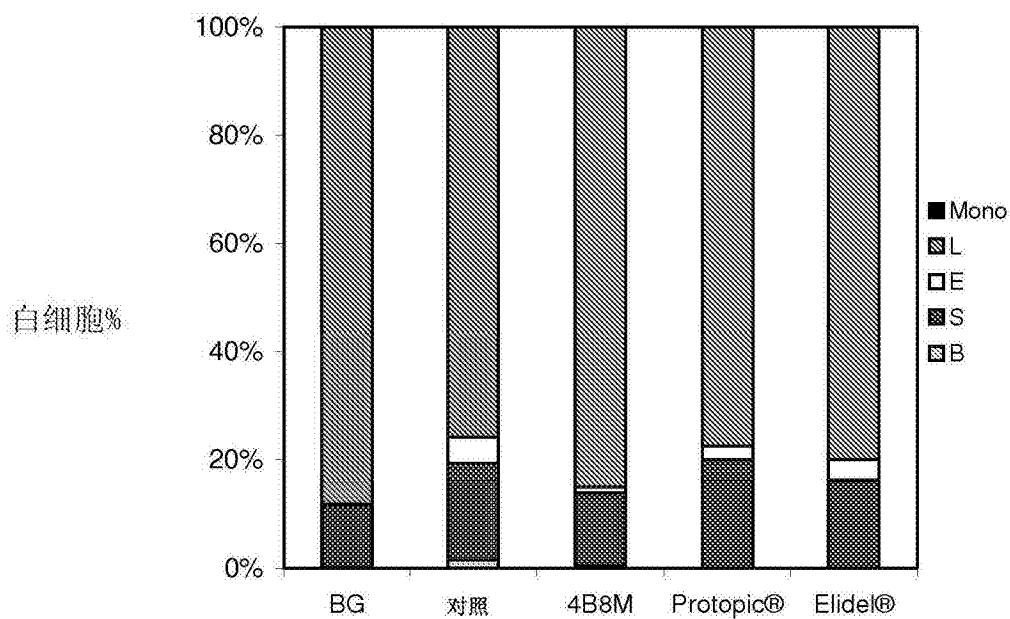


图14

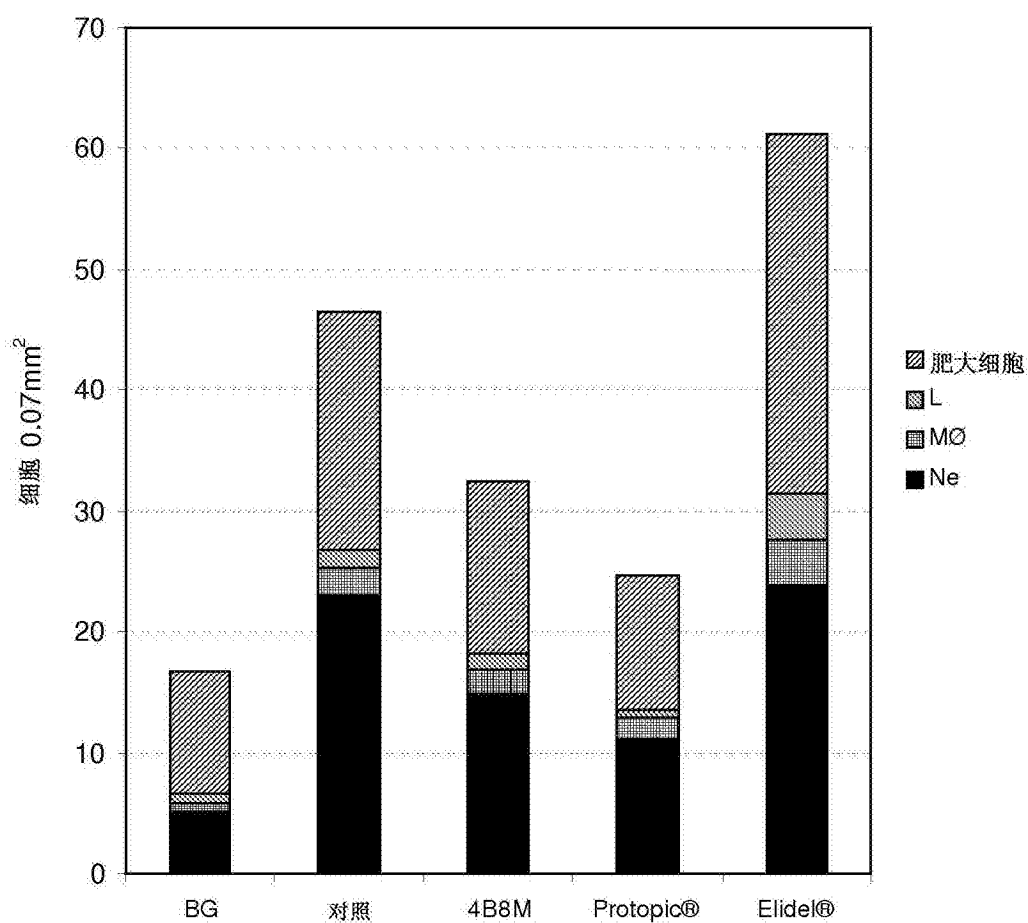


图15