

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020年7月23日 (23.07.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/147624 A1

(51) 国际专利分类号:

A01N 1/02 (2006.01) *A61K 38/13* (2006.01)
C07K 7/64 (2006.01) *A61K 38/12* (2006.01)
C07K 7/56 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/070852

(22) 国际申请日: 2020年1月8日 (08.01.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910050741.3 2019年1月20日 (20.01.2019) CN

(71) 申请人: 睿诺医疗科技(上海)有限公司 (FARSIGHT MEDICAL TECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区新金桥路1088号联创国际大厦A栋2101室, Shanghai 201206 (CN)。

(72) 发明人: 麦靖邦 (MAK, Ching Pong); 中国上海市浦东新区新金桥路1088号联创国际大厦A栋2101室, Shanghai 201206 (CN)。 曾力 (ZENG, Li); 中国上海市浦东新区新金桥路1088号联创国际大厦A栋2101室, Shanghai 201206 (CN)。 郁胜强 (YU, Shengqiang); 中国上海市浦东新区新金桥路1088号联创国际大厦A栋2101室, Shanghai 201206 (CN)。 溥·迈克 (PEEL, Michael Robert); 英国剑桥郡巴布拉汉姆巴布拉汉姆大道赛普瑞里斯公司, Cambridgeshire CB22 3AT

(GB)。 费·汉斯 (FLIRI, Hans Georg); 英国剑桥郡巴布拉汉姆巴布拉汉姆大道赛普瑞里斯公司, Cambridgeshire CB22 3AT (GB)。

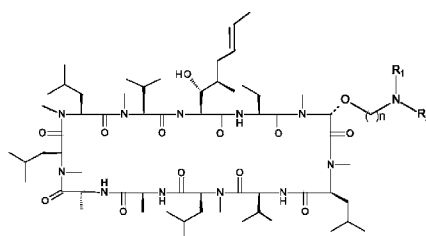
(74) 代理人: 上海市金茂律师事务所 (JIN MAO LAW FIRM); 中国上海市黄浦区延安东路222号外滩中心40层上海市金茂律师事务所谢瑞强, Shanghai 200002 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(54) Title: CYCLOSPORIN ANALOG AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 环孢菌素类似物及其用途



(1)

(57) Abstract: The present invention provides a cyclosporin analog and use thereof, and in particular relates to a compound and use thereof as a mitochondrial protective agent for storing a donated organ. The compound is a compound of formula 1 or a salt thereof, wherein n is 2-5, and R₁ and R₂ are independently selected from H or C₁-C₄ alkyl, wherein R₁ and R₂ can be linked together to form a C₃-C₅ heteroalkyl ring.

(57) 摘要: 本发明提供环孢菌素类似物及其用途, 具体涉及化合物及其用作用于保存捐赠器官的线粒体保护剂的用途, 其中化合物是式1的化合物或其盐, 其中, n为2-5, 并且R₁和R₂独立选自H或C₁-C₄烷基, 其中R₁和R₂可以连接在一起以形成C₃-C₅杂烷基环。

[见续页]

WO 2020/147624 A1

根据细则4.17的声明:

- 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

环孢菌素类似物及其用途

技术领域

本发明涉及环孢菌素类似物和它们在器官供体中作为线粒体保护剂的用途。本发明的化合物可以用于在移植前对从受试者上移除或切除的器官或其他身体部分的保存（防腐，preservation）。本发明特别但不排他地涉及式 1（Formula 1）的环孢菌素类似物在器官供体中作为线粒体保护剂的用途。更具体地，本发明涉及化合物 1（Compound 1）在肾脏供体中作为线粒体保护剂的用途。

背景技术

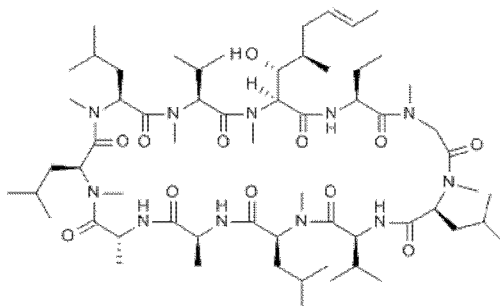
急性炎症被公认为参与各种细胞的（中性粒细胞，巨噬细胞）和细胞外（补体、组胺）因子之间的复杂相互作用，这些因子作用以响应于 PAMP（病原体激活的分子模式，pathogen-activated molecular patterns）和 DAMP（损伤激活的分子模式，damage-activated molecular patterns）信号以消除源头性损害（the originating insult）。已证实亲环素 A（cyclophilin A）作为趋化因子以促进支持炎症应答的白细胞迁移，并且已经示出在急性炎症的动物模型中阻断亲环素 A 是有益的。最近，已经描述了一种伴随着细胞死亡和组织坏死的炎症的严重形式。现有大量证据支持在线粒体膜孔处的开放（术语称为线粒体膜通透性转换孔（MPTP））对于这种坏死性炎症的发作和维持至关重要。对该 MPTP 开放的关键调节子是亲环素 D（CypD），而 CypD 的抑制剂在预防与坏死性炎症相关的组织损伤方面已经表现出良好的活性。MPTP 的开放，以及随后的坏死性细胞死亡的启动，是由作为多种因素的结果的升高的细胞内钙水平所引发的，多种因素包括氧化应激、缺氧、胆盐毒素等。值得注意的是，发现 CypD 的基因消融（genetic ablation）或药理抑制（pharmacological inhibition）对心肌组织的缺血-再灌注损伤所引起的组织降解是保护性的，这提示 CypD 抑制是更普遍的用于缺血-再灌注损伤的可行的药物靶点。

肾缺血是由动脉闭塞、休克和肾移植引起的，并且肾缺血可以导致肾细胞死亡和肾功能衰竭。与缺血相关的另一组织损伤源发生于器官移植的过程中。在移除供体器官后，作为血流损失的结果，组织不可避免地遭受氧气匮乏，而在血流重新开始后随之发生对缺血组织的损伤。能够在切除和再灌注过程中防止组织损伤的化合物会提高所移植的器官的生存能力。待用作组织保护剂的化合物的优选特性（preferred profile）包括：有效抑制

CypD; 预防缺血性应激后的 MPTP 开放; 和以足够高以保护组织的浓度被配制以用于静脉内施用和用于添加至在器官运输过程中通常使用的保存溶液的充分的溶解度。

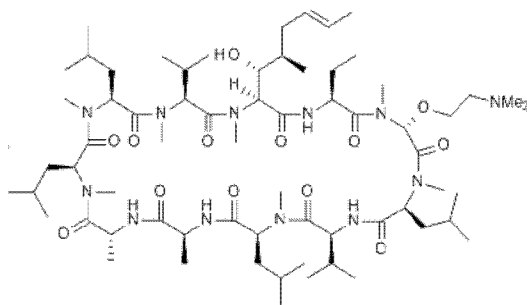
在使用亲环素 D 敲除小鼠进行的研究以及使用亲环素抑制剂的药理学策略中, 已经明确证明, 线粒体膜通透性转换孔——线粒体内膜中的非特异性通道——是多种损害引起的细胞死亡中的基本事件。此外, 抑制亲环素 D 可以防止 mPTP 的开放, 其对线粒体功能起保护作用并保存细胞生存能力。可以诱导 MPTP 的对细胞的毒性损害包括: 缺血、活性氧物质 (ROS)、胆盐、 α -突触核蛋白的寡聚体和升高的细胞内钙水平。从供体移除后的捐赠器官可以经历坏死性炎症, 导致组织损伤和在置入受体时受损的功能。本文描述的化合物预防捐赠器官在移除后同时存储该器官等待植入受体期间的降解。

环孢菌素 A (Cyclosporin A) 是一种以其免疫抑制特性而众所周知的化合物, 但也描述了其他生物学特性。环孢菌素 A 具有如下化学结构:



环孢菌素 A (CsA)

也已制备了环孢菌素 A 的生物活性衍生物。例如, US 6,583,265、EP 0 484 281 和 EP 0 194 972 描述了具有包括免疫抑制、抗寄生虫和抗病毒特性在内的多种特性的环孢菌素衍生物。US 6,583,265 描述了在环孢菌素大环的第 3 位具有修饰的环孢菌素衍生物。特别是, US 6,583,265 公开了**化合物 1**:



化合物 1 (Compound 1)

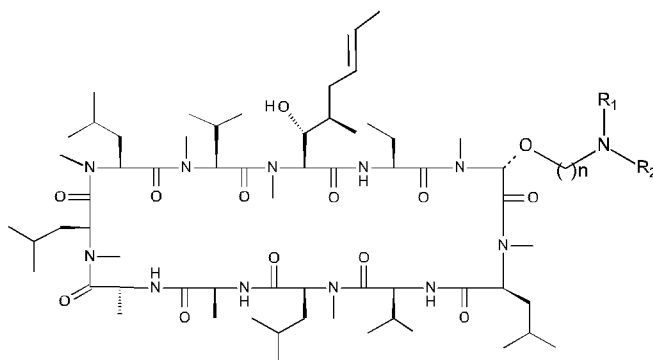
该化合物是专利 US 6,583,265 中的实例 27, 该专利包括数百种在环周围的不同位置具有修饰的已命名化合物。然而, 没有对于该化合物或相关类似物的生物测试数据或具体用

途。当申请人试图采用在 US 6,583,265 中公开的用于制备化合物 27 的路线来合成所述化合物时，方法是无效的。已经进行了多次尝试以重复 US 6,583,265 中的方法，但并没有非常成功。在不受理论束缚的情况下，据信二甲基氨基基团（为碱性的）偏好与酸催化剂反应。由此防止酸催化剂对离去基团的脱离进行活化，抑制了反应的进行。因此，对于先前是否已合成实例 27 存在一些疑问，并且因此也怀疑现有技术是否实际上充分公开了化合物 1 的制备。

发明内容

申请人已经确定，可以将作为线粒体保护剂的化合物给予至器官供体以改善器官在植入前的保存。这些化合物通过亲环素 D 抑制发挥作用。可以如本文所描述使用任何已知的亲环素 D 抑制剂。合适的抑制剂包括：环孢菌素或环缩酚肽类似物（cyclic depsipeptide analogues）如在包括例如 US 6,583,265、EP 0 484 281、EP 0 194 972、WO2010/076329 和 WO2014/053834 在内的公开中所报道的那些。

申请人已经合成了先前在上述现有技术出版物中所提出的化合物，并且惊讶地发现这些化合物的小子集是特别好的亲环素 D 抑制剂。因此，下述化合物可以用于治疗得益于抑制亲环素 D 活性的病症，并且可以施用至器官供体以辅助离体器官保存。根据本发明的一个方面，提供了一种化合物，其用作对移植前从供体移除的身体部分或器官的保存中的线粒体保护剂。移除的身体部分可以是肢体、手、脚、手指或脚趾。器官可以是肾脏。供体可以是活体供体。



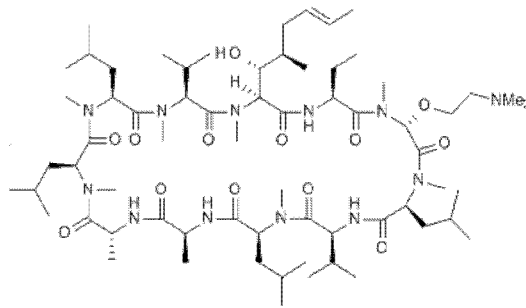
式 1

或其盐，

其中 n 为 2-5，并且

R_1 和 R_2 独立地选自 H 或 C_1 - C_4 烷基，其中 R_1 和 R_2 可以连接在一起以形成 C_3 - C_5 杂烷基环（heteroalkyl ring）。

在一种优选的实施方式中，化合物是：



化合物 1

式 1 的化合物可以用于治疗与已切除的身体部分和器官的重附着 (re-attachment) 相关的缺血-再灌注损伤 (ischaemia-reperfusion injury)。本申请提供的数据 (图 1 和图 2 中图示的) 显示化合物 1 显著优于确认的对比例环孢菌素 A 和其他密切相关的类似物, 包括在式 1 的范围内的那些。实际上, 在进行的挑战性测试中, 从器官除去血液持续三十分钟, 化合物 1 给出了令人惊讶的良好结果, 事实上示出在对受影响器官的预期损伤方面的几乎完全逆转。

化合物 1 表现出作为亲环素 D 的抑制剂的显著效力。如表 1 中可见的, 化合物 1 (条目 4) 表现出针对亲环素 D 的 24 nM 的 EC_{50} 。用 H 取代 N 原子上的一个甲基 (条目 1 仅为 NHMe 或 NMe₂) 降低效力约 100 倍, 具有 > 2000nM 的 EC_{50} 。因此, 化合物 1 是亲环素 D 和线粒体通透性转换 (MPT) 的令人惊讶的强抑制剂。

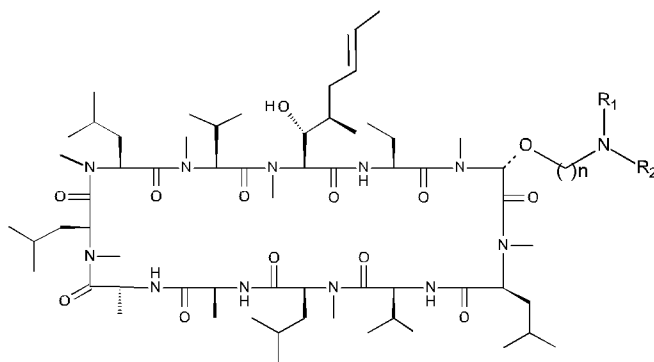
在如上所述的化合物、方法或用途的一种实施方式中, 化合物的剂量为 0.1 至 10mg/kg。在如上所述的化合物、方法或用途的一种实施方式中, 化合物的剂量为 1 至 3mg/kg。在这些剂量范围内, 本发明的化合物是特别有效的。

可以通过向式 1 的化合物或化合物 1 加入酸来产生本发明的盐。所产生的酸加成盐包括用以下各项形成的那些: 乙酸、2,2-二氯乙酸、柠檬酸、乳酸、扁桃酸、乙醇酸、己二酸、海藻酸、芳基磺酸 (例如, 苯磺酸、萘-2-磺酸、萘-1,5-二磺酸和对甲苯磺酸)、抗坏血酸 (例如 L-抗坏血酸)、L-天冬氨酸、苯甲酸、4-乙酰氨基苯甲酸、丁酸、(+)-樟脑酸、樟脑磺酸、(+)-(1S)-樟脑-10-磺酸、癸酸、己酸、辛酸、肉桂酸、柠檬酸、环拉酸、十二烷基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙磺酸、2-羟乙基磺酸、甲酸、富马酸、粘酸、龙胆酸、葡庚糖酸、葡萄糖酸 (例如, D-葡萄糖酸)、葡萄糖醛酸 (例如, D-葡萄糖醛酸)、谷氨酸 (例如, L-谷氨酸)、 α -酮戊二酸、乙醇酸、马尿酸、氢溴酸、盐酸、氢碘酸、羟乙基磺酸、乳酸 (例如, (+)-L-乳酸和(±)-DL-乳酸)、乳糖

酸、马来酸、苹果酸（例如，(-)-L-苹果酸）、(±)-DL-扁桃酸、偏磷酸、甲磺酸、1-羟基-2-萘甲酸、烟碱酸、硝酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、帕莫酸、磷酸、丙酸、L-焦谷氨酸、水杨酸、4-氨基水杨酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸、硫酸、单宁酸、酒石酸（例如，(+)-L-酒石酸）、硫氰酸、十一烯酸和戊酸。特别地，酸加成盐包括衍生自以下各项的那些：无机酸如盐酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸、硝酸和硫酸；有机酸如酒石酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、富马酸、苯甲酸、乙醇酸、葡萄糖酸、琥珀酸、芳基磺酸。

本发明的化合物可以与一种或多种其他活性物质一起施用。

根据本发明的一个方面，提供了一种线粒体保护剂化合物，用于在器官移植到新的个体或重附着身体部分之前，对从受试者移除或切除的身体部分或器官的保存中使用，其中化合物是式 1 的化合物：



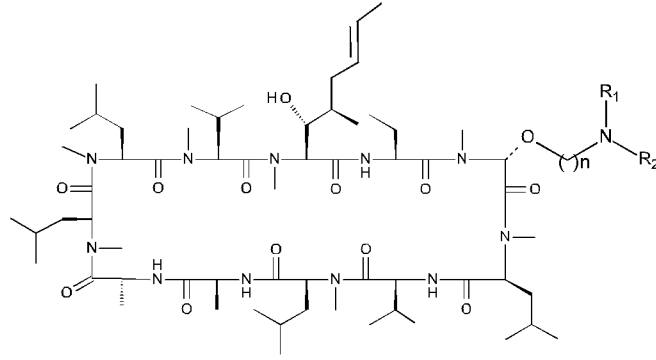
式 1

或其盐，

其中 n 为 2-5，并且

R_1 和 R_2 独立地选自 H 或 C_1 - C_4 烷基，其中， R_1 和 R_2 可以连接在一起以形成 C_3 - C_5 杂烷基环。

根据本发明的一个方面，提供了一种用于在器官移植或重附着之前对从受试者移除或切除的器官进行保存的方法，包括将器官暴露于式 1 的线粒体保护剂化合物：



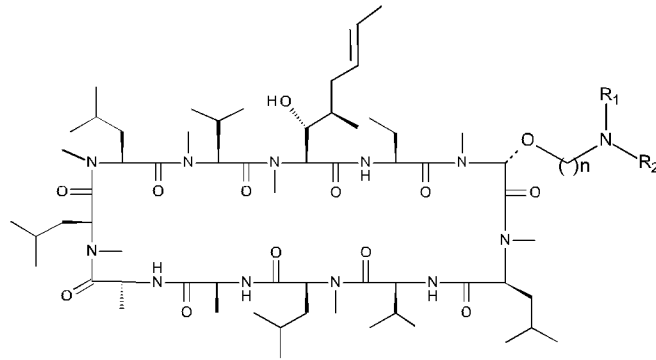
式 1

或其盐，

其中 n 为 2-5，并且

R₁ 和 R₂ 独立地选自 H 或 C₁-C₄ 烷基，其中，R₁ 和 R₂ 可以连接在一起以形成 C₃-C₅ 杂烷基环。

根据本发明的一个方面，提供了线粒体保护剂化合物用于制备药物的用途，所述药物用于在移植或重附着之前，对从受试者移除或切除的身体部分或器官进行保存，其中，化合物是式 1 的化合物：



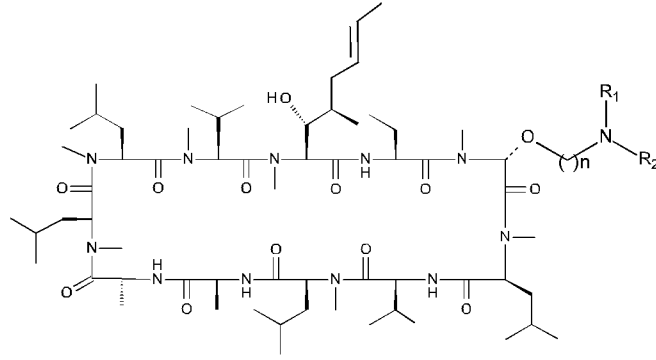
式 1

或其盐，

其中 n 为 2-5，并且

R₁ 和 R₂ 独立地选自 H 或 C₁-C₄ 烷基，其中，R₁ 和 R₂ 可以连接在一起以形成 C₃-C₅ 杂烷基环。

根据本发明的一个方面，提供线粒体保护剂化合物用于在移植或重附着之前对从受试者移除或切除的身体部分或器官进行保存的用途，其中，化合物是式 1 的化合物：



式 1

或其盐，

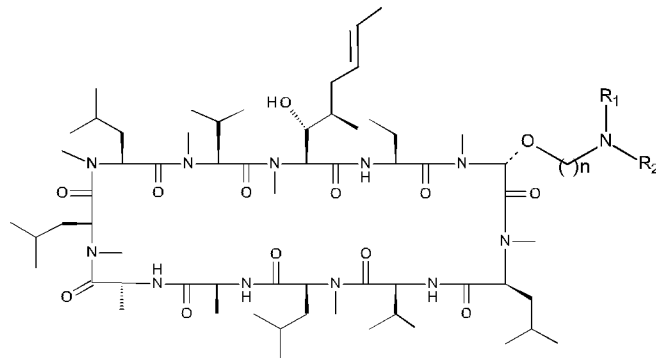
其中 n 为 2-5，并且

R_1 和 R_2 独立地选自 H 或 C_1 - C_4 烷基，其中， R_1 和 R_2 可以连接在一起形成 C_3 - C_5 杂烷基环。

在一种实施方式中，化合物可以用作器官供体中的线粒体保护剂，其中，化合物可以在从所述供体移除所述器官之前被施用至器官供体以保护该器官。

在进一步的实施方式中，线粒体保护剂化合物是亲环素抑制剂。

在一种实施方式中，化合物可以用作器官供体中的线粒体保护剂，其中，化合物在从所述供体移除所述器官之前被施用至器官供体以保护所述器官，其中，化合物是式 1 的化合物：



式 1

或其盐，

其中 n 为 2-5，并且

R_1 和 R_2 独立地选自 H 或 C_1 - C_4 烷基，其中， R_1 和 R_2 可以连接在一起形成 C_3 - C_5 杂烷基环。

在一种实施方式中，式 1 的化合物可以用作器官供体中的线粒体保护剂，其中，器官是肾脏。

在一种实施方式中，式 1 的化合物可以被用于保存肾脏。

根据本发明的另一方面，提供一种保存器官供体中的器官的方法，包括在从所述供体移除所述器官之前将线粒体保护剂化合物施用至所述供体。

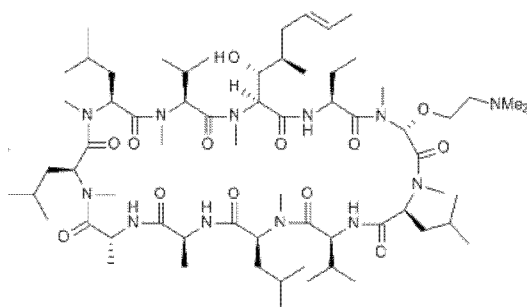
在一种实施方式中，提供一种保存肾脏供体中的肾脏的方法，包括在从所述供体移除所述肾脏之前将线粒体保护剂化合物施用至所述供体。

在一种实施方式中，提供一种保存肾脏供体中的肾脏的方法，包括在从所述供体移除所述肾脏之前将线粒体保护剂化合物施用至所述供体，其中，化合物是式 1 的化合物。

在一种实施方式中，在器官移植之前将式 1 的化合物施用至活体供体。

在一种优选的实施方式中，在肾脏移植之前将式 1 的化合物施用至活体肾脏供体。

在一种实施方式中，提供一种保存肾脏供体中的肾脏的方法，包括在从所述供体移除所述肾脏之前将线粒体保护剂化合物施用至所述供体，其中，化合物是化合物 1：



化合物 1

在一种实施方式中，化合物可用作器官供体中的线粒体保护剂，其中，化合物在从所述供体移除所述器官之前被施用至器官供体以保护所述器官，其中，化合物是化合物 1。

在一种优选的实施方式中，化合物 1 可以用于保存肾脏。

在一种实施方式中，提供一种保存肾脏供体中的肾脏的方法，包括在从所述供体移除所述肾脏之前将线粒体保护剂化合物施用至所述供体，其中，化合物是化合物 1。在一种优选的实施方式中，在肾脏移植之前将化合物 1 施用至活体肾脏供体。

根据本发明的一个方面，提供线粒体保护剂化合物用于制备药物的用途，所述药物用于保存肾脏。在一种实施方式中，提供线粒体保护剂化合物用于制备药物的用途，所述药物用于保存肾脏，其中，化合物是式 1 的化合物。在一种实施方式中，提供线粒体

保护剂化合物用于制备药物的用途，所述药物用于保存肾脏，其中，化合物是化合物 1。

根据本发明的一个方面，提供一种保存肾脏的方法，包括用化合物 1 处理供体。在一种优选的实施方式中，器官或肾脏供体是活体供体。

当组织的区域的血液供应被切断时发生缺血性损伤。缺血性损伤的发生率很高：心肌梗死、中风和其他血栓性事件，并且仅在美国这些事件每年影响超过 130 万个体。此外，在血管被交叉夹住的手术期间以及在用于移植的器官中也会发生缺血性损伤。组织在缺氧条件中能够存活的时间长度不同，但最终缺血的组织变为坏死的组织。

再灌注（复氧）损伤是在缺血或缺少氧气（缺氧(anoxia)，低氧(hypoxia)）一段时间后，当血液供应返回组织时所引起的组织损伤。在不受理论束缚的情况下，据信在缺血期间缺少来自血液的氧和营养物创造了一种条件，其中循环的恢复导致炎症和氧化损伤。

在器官移植中，从供体的血液供应移除器官到将器官重新连接至供体受体的血液供应之间存在一段时间。在此期间，存在潜在的缺血-再灌注损伤。在一些案例中，器官可能需要远距离运输至手术地点，增加了器官损伤的可能性。

在涉及断肢的事故中，从血液供应中切断身体部分直至将身体部分重新连接至血液供应之间存在一段时间。在此期间，存在潜在的缺血-再灌注损伤。在一些案例中，身体部分和患者可能需要长距离运输至手术地点，增加了重附着之前、期间和之后损伤的可能性。

提供本发明用于施用本发明的线粒体保护剂化合物以防止此类对身体部分和器官的损伤。特别是在从供体的血液供应移除身体部分或器官到重新连接至供体受体的血液供应之间的一段时间中，或者是在切断的身体部分的案例中到重附着之间的一段时间中。本领域技术人员会知晓在移除身体部分或器官之前将本发明的化合物施用至个体的方式，或者施用至从个体移除的身体部分或器官的方式，个体是器官供体或事故受害者。例如，可以在移除身体部分或器官之前将本发明的化合物静脉内施用至供体或事故受害者，或者可以将本发明的化合物添加至（或包含于）放置器官的液体中；和/或将本发明的化合物添加至（或包含于）在器官/身体部分中再循环或再循环通过器官/身体部分的液体中。

在如上所述的化合物、方法或用途的一种实施方式中，在从个体移除器官之后并在移植或重附着之前，将本发明的化合物施用至器官。可替代地，或另外地，在移除供体器官之前，将本发明的化合物施用至供体受试者。例如，本发明的化合物可以全身施用。

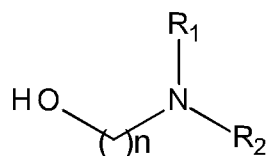
证实，相对于本领域已知的相似类似物（条目 1 至 3 和 5 至 7），化合物 1（条目 4）的出乎意料地高的亲环素 D 抑制和 MPT。还观察到相对于其他三种密切相关的化合物（条目 1、5 和 7）在 MPT 方面的 100 倍改善，以及观察到相对于次最佳表现的类似物（条目 3）的超过 25 倍改善。化合物 1 也显示出优异的亲环素 D 抑制，具有相对于测试的所有其他类似物的至少 50 倍改善。

在如上所述的化合物、方法或用途的一种实施方式中，器官可以是肾脏、胰腺、肝脏、心脏、肺脏或肠。在切断的身体部分的情况下，身体部分可以是四肢、手、脚、手指或脚趾。

在如上所述的化合物、方法或用途的一种实施方式中，化合物的剂量是 0.1 至 10 mg/kg；并且可选地是 1 至 3 mg/kg。在其中器官或身体部分浸浴（bathed）在含有本发明的化合物的液体中或该液体被再循环的情况下，可以根据需要提高或降低化合物的浓度。

在如上所述的化合物、方法或用途的一个实施方式中，将化合物配制在克列莫佛（聚氧乙烯蓖麻油，Cremophor）/生理盐水/DMSO（二甲基亚砜）中。

根据本发明的一个方面，提供一种制备式 1 的化合物的方法，方法包括产物形成反应，反应包括三氟甲基磺酸铜（copper triflate）和式 2 的氨基醇：



式 2

其中，n 为 2-5，并且

R₁ 和 R₂ 独立地选自 H 或 C₁-C₄ 烷基，其中，R₁ 和 R₂ 可以连接在一起形成 C₃-C₅ 杂烷基环。

令人惊奇地，已经发现，通过上述方法可以很容易地获得本发明的化合物。例如，本申请人进行了多次重复 US 6,583,265 中所公开的方法的失败尝试，并最终放弃了 US 6,583,265 中的不可行的方法。

在一种实施方式中，反应包括干燥剂和/或在基本无水的条件下进行。可选地，干燥剂是分子筛。可选地，分子筛是 3A 分子筛。在一种实施方式中，氨基醇是 N,N-二甲基氨基乙醇。该氨基醇给出化合物 1。在一种实施方式中，氨基醇与含有不稳定基团的环

孢菌素前体化合物反应，其中，不稳定基团在反应中脱离。可选地，不稳定基团通过-S-键与前体化合物键合。进一步可选地，不稳定基团是硫代吡啶基基团(thiopyridyl group)或巯基苯并噻唑-2-基硫代(mercaptobenzothiazole-2-ylthio)基团。

附图说明

图 1 示出通过测量血清肌酸酐浓度，化合物 1 和对比化合物 CsA 对大鼠中诱导的急性肾损伤的抑制和/或保护作用。

图 2 示出通过测量血尿素氮(BUN)浓度，化合物 1 和对比化合物 CsA 对大鼠中诱导的急性肾损伤的抑制和/或保护作用。

图 3 示出化合物 1 对 LPS 诱导的急性肾损伤的抑制和/或保护作用。

图 4 示出化合物 1 对肾功能的影响。用化合物 1 治疗的动物的较低的肌酸酐水平和血尿素氮水平与降低的对肾脏的损伤水平相一致。

图 5 至图 7 示出展示移除后离体肾脏保存的数据。4 个肾脏用于对照，在肾脏灌注之前没有保护剂化合物 i.v. (静脉注射) 剂量；5 个肾脏在肾脏灌注之前 1 小时接受 5 mg/kg C4066 (化合物 1) i.v. 剂量。数据显示的是所研究的肾脏在移除后 0、6、24 和 48 小时的时间的平均评分。HE 评分标准：根据炎症程度从轻度到重度，接着是半定量评分，对于非常小的或无病变的阴性为“-” 0；轻度的或小的为“+” 1；中度或中等大的为“+” 2；严重的或大的为“++” 3；非常严重或大的为“+++” 4。图 5 示出炎症评分，图 6 示出肾囊的扩张，而图 7 示出肾管扩张。

附图中文字说明：

图 1: Creatinine: 肌酸酐。

图 3: LPS induced acute kidney injury: LPS 诱导的急性肾损伤。

图 4: Control: 对照; Compound: 化合物; Creatinine: 肌酸酐。

图 5: Inflammation score: 炎症评分。

图 6: Dilatation of renal capsule: 肾囊扩张。

图 7: Renal tubular dilatation: 肾管扩张。

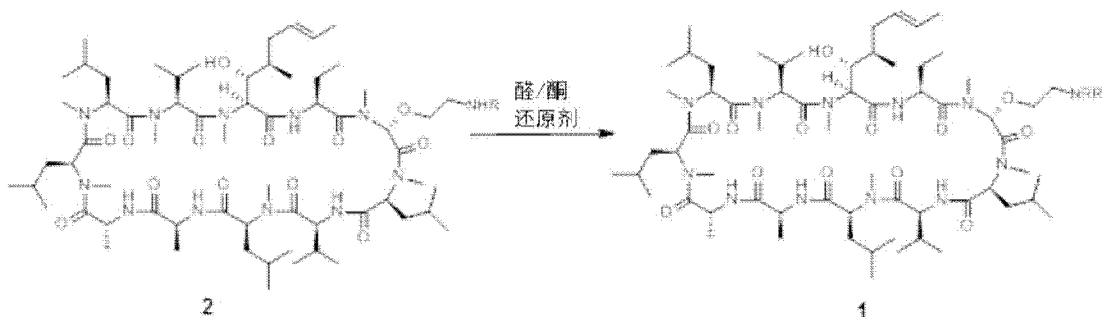
具体实施方式

现在通过以下实施例来阐述本发明。

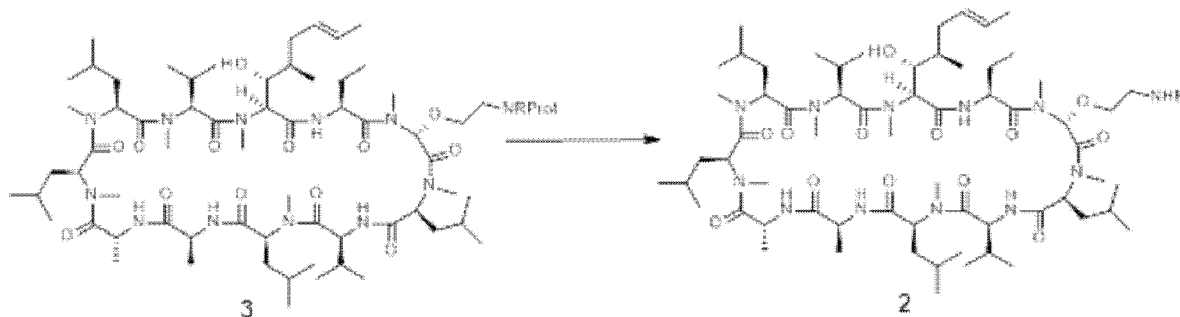
实验方法和实验结果

本领域的技术人员会认识到可以以多种方式制备式 1 的化合物。以下路线仅是可以用于合成化合物 1 的方式的一个示例。尽管如此，US 6,583,265 中用于制备化合物 1 的路线是无效的。已进行多次尝试来重复 US 6,583,265 中的方法，然而不是非常成功。在不受理论束缚的情况下，据信二甲基氨基基团（为碱性的）偏好与酸催化剂反应。由此防止酸催化剂对离去基团的脱离进行活化，抑制了反应的进行。

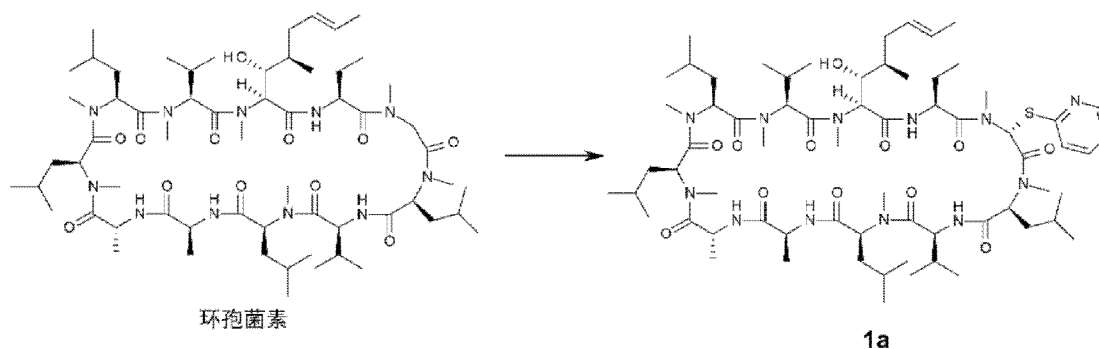
可以通过多种途径方便地制备通式 1 的化合物。在一个实例（方案 1）中，化合物 2（其中 R 是低级烷基）与羰基化合物和还原剂的反应可以进行还原胺化反应过程以给出所需化合物。优选地，羰基化合物是低级烷基醛或酮并且还原剂是金属硼氢化物。更优选地，醛是甲醛、乙醛或丙醛并且酮是丙酮或 2-丁酮等。优选地，还原剂是三乙酰氧基硼氢化钠或氰基硼氢化钠。



胺化合物 2 可以方便地制备自适当保护的乙醇胺化合物如化合物 3，其中，R 是氢或低级烷基，通过用已知的用于除去保护基团的条件处理所述化合物并产生游离胺化合物。在分子中其他官能团存在的情况下可以被除去的合适的保护基团包括：叔丁氧基羰基（BOC）、9-芴基甲氧基羰基（Fmoc）等。优选地，保护基团是叔丁氧基羰基（BOC）并且用于除去 BOC 基团的条件包括用酸处理，酸例如是三氟乙酸。



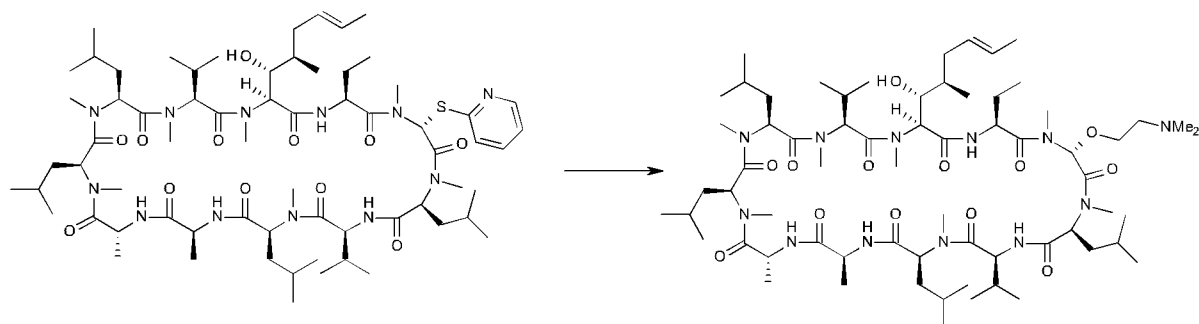
第一步：制备[2'-(2-硫代吡啶基)-Sar]³-环孢菌素 A



[2'-(2-硫代吡啶基)-Sar]³-环孢菌素 A (1a)

向干燥的 1L 烧瓶中加入环孢菌素 A (20 g, 16.6 mmol)、无水氯化锂 (21.1 g, 499 mmol) 和无水 THF (500 mL)，然后用氩气吹扫烧瓶并将混合物冷却至 -45°C。在另一个烧瓶中，将二异丙胺 (13.5g, 133 mmol) 溶解在无水 THF (120 mL) 中并冷却至 -78°C。向此烧瓶中加入正丁基锂 (53.2 mL 的 2.5 M 溶液, 133 mmol)，并将所得溶液在 -78°C 下搅拌 20 分钟。使用套管，将二异丙基氨基锂的溶液转移到环孢菌素的溶液中，并将所得到的混合物在 -45°C 下搅拌 90 分钟。逐滴加入 2-吡啶基二硫化物 (11g, 49.9mmol) 的无水 THF 溶液 (20mL)，并允许所得到的混合物温暖至室温过夜。通过小心地加入饱和 NaCl 溶液 (200mL) 淬灭反应，并分离所得到的有机层。用乙酸乙酯 (3×100mL) 萃取水层，并用 3N NaOH (2×100mL)、饱和 NH₄Cl (100mL) 和饱和 NaCl (100mL) 洗涤合并的有机级分 (fraction)，然后用无水 Na₂SO₄ 干燥并蒸发。通过硅胶色谱法分离标题化合物，为固体，7.18g。¹H NMR (400 MHz, 氯仿-d) δ 8.45 (ddd, *J*=0.88, 1.73, 4.90 Hz, 1H), 7.98 (d, *J*=9.66 Hz, 1H), 7.65-7.73 (m, 1H), 7.59 (dt, *J*=1.85, 7.71 Hz, 1H), 7.51 (ddd, *J*=0.76, 1.68, 6.44 Hz, 0H), 7.45 (d, *J*=8.54 Hz, 1H), 7.35 (ddd, *J*=1.73, 6.97, 8.77 Hz, 0H), 7.25 (s, 0H), 7.17 (d, *J*=7.96 Hz, 1H), 7.09-7.15 (m, 2H), 6.72 (dt, *J*=1.17, 6.71 Hz, 0H), 5.70 (dd, *J*=4.29, 10.88 Hz, 1H), 5.50 (d, *J*=6.39 Hz, 1H), 5.32-5.38 (m, 1H), 5.28 (dd, *J*=3.88, 11.74 Hz, 1H), 5.13 (d, *J*=10.88 Hz, 1H), 4.97-5.11 (m, 2H), 4.84 (dq, *J*=7.03, 7.24 Hz, 1H), 4.69 (t, *J*=9.15 Hz, 1H), 4.54 (quin, *J*=7.31 Hz, 1H), 4.13 (q, *J*=7.16 Hz, 0H), 3.81 (dt, *J*=1.00, 5.75 Hz, 1H), 3.59-3.72 (m, 1H), 3.50 (s, 2H), 3.38 (s, 2H), 3.26 (s, 2H), 3.13 (s, 5H), 2.70 (d, *J*=1.07 Hz, 5H), 2.34-2.54 (m, 1H), 1.92-2.23 (m, 4H), 1.55-1.85 (m, 11H), 1.19-1.54 (m, 11H), 1.12 (d, *J*=6.54 Hz, 2H), 0.78-1.07 (m, 30H), 0.73 (d, 3H)。

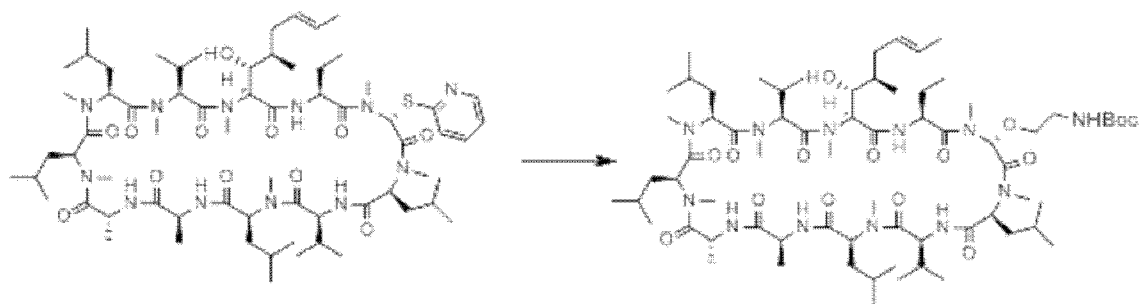
第二步：制备[2'-(2-二甲基氨基乙氧基)-Sar]³-环孢菌素 A (化合物 1)



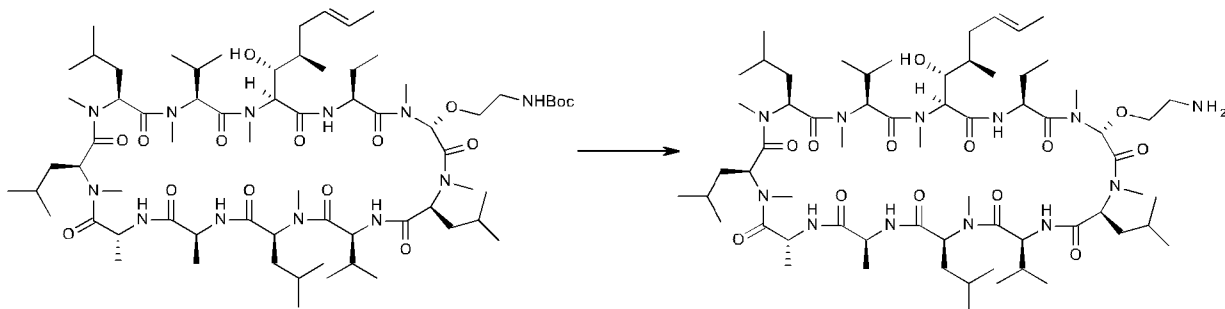
[2'-(2-二甲基氨基乙氧基)-Sar]³-环孢菌素 A (1)

将三氟甲基磺酸铜(0.291g, 0.8mmol)和3埃分子筛加入烧瓶中,加入无水 THF(3mL)并用氩气吹扫烧瓶。在另一个烧瓶中,将[2'-(2-硫代吡啶基)-Sar]³-环孢菌素 A (1a) (0.293g, 0.223mmol)、二甲基氨基乙醇(0.086g, 0.96mmol)和3A分子筛在无水 THF (2mL)中的混合物搅拌 30 分钟,然后加入至三氟甲基磺酸铜溶液中。允许反应在室温下搅拌过夜。加入 NaHCO₃ 的饱和溶液(10mL)并且将混合物通过硅藻土(celite)过滤。将硅藻土用乙酸乙酯(3×25mL)洗涤并加入滤液。分离有机层;将水层用 EtOAc (2×25mL)萃取,并将合并的有机层经无水 Na₂SO₄干燥和蒸发。在硅胶上纯化粗提物,提供标题化合物,86.4mg。¹H NMR (400 MHz, 氯仿-d) δ 7.92 (d, *J*=9.61 Hz, 1H), 7.75 (d, *J*=7.32 Hz, 1H), 7.22 (d, *J*=8.15 Hz), 7.15 (d, *J*=7.86 Hz), 6.01 (s, 1H), 5.70 (dd, *J*=4.22, 10.86 Hz, 1H), 5.46 (d, *J*=6.10 Hz, 1H), 5.35 (q, *J*=4.77 Hz, 1H), 5.27 (dd, *J*=4.15, 11.42 Hz, 1H), 5.14 (d, *J*=10.83 Hz, 1H), 5.05-5.11 (m, 1H), 4.94-5.04 (m, 1H), 4.77-4.90 (m, 1H), 4.73 (s), 4.66 (t, *J*=8.83 Hz, 1H), 4.46-4.57 (m, 1H), 3.71-3.81 (m, 1H), 3.58-3.67 (m, *J*=5.15, 5.64, 5.64, 5.83 Hz, 1H), 3.53-3.58 (m, 1H), 3.51 (s, 2H), 3.24 (s, 2H), 3.20 (s, 2H), 3.13 (d, *J*=2.10 Hz, 3H), 2.71 (d, *J*=6.54 Hz, 3H), 2.49-2.67 (m, 2H), 2.33-2.46 (m, 1H), 2.27 (s, 4H), 1.88-2.20 (m, 4H), 1.74 (d, *J*=0.29 Hz, 6H), 1.57-1.68 (m, 5H), 1.38-1.52 (m, 2H), 1.35 (d, *J*=7.27 Hz, 3H), 1.26 (d, *J*=2.88 Hz, 4H), 0.77-1.12 (m, 30H), 0.70 (d, 2H)。

例如,本领域技术人员会理解:可以通过使用不同的氨基醇试剂来制备化合物 1 的类似物。例如,醇和胺基团之间的碳原子数可以增加或减少(连接基团的实例包括:亚甲基、乙烯(ethylene)、丙烯(propylene)、丁烯(butylene)、戊搭烯(pentalene),并且可以包括它们的支链形式,如异丙烯(iso-propylene)、仲丁烯(sec-butylene)、叔丁烯(tert-butylene)、2-甲基丁烯(2-methylbutylene)、2,2-二甲基丙烯(2,2-dimethylpropylene))。可替代地,或另外地,也可以改变氨基醇上的 N-氨基取代基以给出化合物 1 的其他类似物(N-氨基取代基的实例包括:甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、丁基)。

制备[2'-(2-N-Boc-氨基乙氧基)-Sar]³-环孢菌素 A

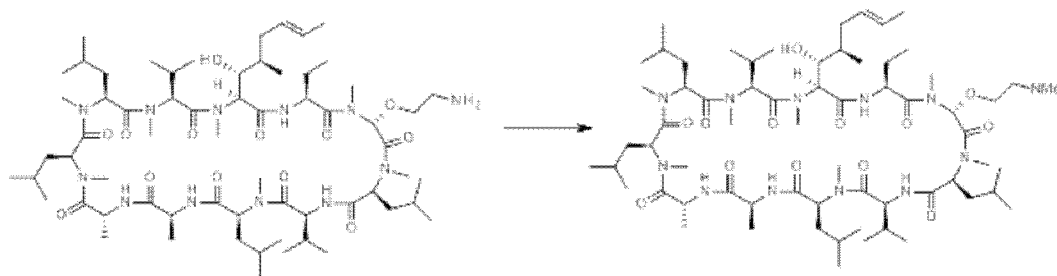
将三氟甲基磺酸铜 (4.95g, 13.7mmol) 和 3A 分子筛悬浮在无水 THF (50mL) 中并在氩气下搅拌 30 分钟。将[2'-(2-硫代吡啶基)-Sar]³-环孢菌素 A (1a) (5.0g, 3.82mmol) 和 N-Boc-乙醇胺 (2.64g, 16.4mmol) 的无水 THF 溶液 (10mL) 用 3A 分子筛干燥 30 分钟, 然后加入三氟甲基磺酸铜悬浮液中。将得到的混合物在室温下搅拌过夜。加入饱和 NaHCO₃ (2×50mL) 并将混合物通过硅藻土过滤。用 EtOAc (4×100mL) 洗涤硅藻土并分离有机层。用 EtOAc (2×50mL) 萃取水相, 用饱和 NaCl (50mL) 洗涤合并的有机级分, 用无水 Na₂SO₄ 干燥并蒸发。在二氧化硅上纯化粗产物以产生标题化合物, 4.18g。¹H NMR (400 MHz, 氯仿-d) δ ppm 0.72 (ddd, 2 H) 0.91 (m, 31 H) 1.32 (m, 8 H) 1.48 (dddd, J=3.95, 3.07, 2.23, 0.95 Hz, 2 H) 1.69 (m, 10 H) 2.10 (m, 4 H) 2.39 (m, 1 H) 2.70 (m, 4 H) 2.95 (m, 2 H) 3.12 (d, J=7.42 Hz, 4 H) 3.17 (d, J=9.37 Hz, 1 H) 3.20 (s, 2 H) 3.25 (s, 2 H) 3.29 (m, J=6.69, 3.02, 1.45, 0.76, 0.63 Hz, 1 H) 3.41 (m, 1 H) 3.51 (s, 2 H) 3.61 (m, 1 H) 3.75 (dddd, J=7.73, 1.54, 1.02, 0.73 Hz, 1 H) 4.13 (q, J=7.11 Hz, 1 H) 4.50 (m, 1 H) 4.65 (dd, J=18.06, 0.44 Hz, 1 H) 4.98 (m, 4 H) 5.30 (m, 2 H) 5.47 (m, 1 H) 5.70 (m, 1 H) 5.93 (d, J=0.34 Hz) 7.21 (m, 1 H) 7.71 (m) 8.03 (m)。

制备[2'-(2-氨基乙氧基)-Sar]³-环孢菌素 A

将[2'-(2-N-Boc-氨基乙氧基)-Sar]³-环孢菌素 A (3) (3.0g, 2.2mmol) 在无水 CH₂Cl₂ 中

的溶液 (30mL) 冷却至 0°C, 并且逐滴加入三氟乙酸 (6.54mL, 10.03g, 88mmol), 并将混合物搅拌 30 分钟。蒸发除去溶剂并且在二氧化硅上纯化粗产物以给出标题化合物, 1.99g。

制备[2'-(2-二甲基氨基乙氧基)-Sar]³-环孢菌素 A (2)



将[2'-(2-氨基乙氧基)-Sar]³-环孢菌素 A (0.273 g, 0.216 mmol) 溶解于 CH₂Cl₂ (5 mL), 并加入甲醛(37%水溶液, 0.048mL, 0.69mmol), 然后加入 NaB(OAc)₃H (0.138g, 0.649mmol), 允许反应在约室温下搅拌 18 小时。将反应混合物过滤通过硅胶小垫, 其用 90:9:1 的 CH₂Cl₂:MeOH:浓 NH₄OH (5×100mL) 洗涤。蒸发溶剂, 并且通过硅胶色谱法分离产物已提供标题化合物, 0.214g。

亲环素抑制结合测定

使用改编自 Quesniaux 等人 (*Eur. J Immunol.*, 1987, 17:1359-1365) 所描述的方法的竞争性 ELISA 测定本文所公开的化合物的亲环素抑制结合活性。与 D-Lys⁸-环孢菌素 A (D-Lys⁸-Cs) 结合的经活化的琥珀酰基间隔子的酯通过第 8 位的 D-赖氨酸残基连接至牛血清白蛋白 (BSA)。将 BSA 溶解于 0.1 M 硼酸盐缓冲液, pH 9.0 中 (4mg 在 1.4ml 中)。在剧烈搅拌下, 将溶解在二甲基甲酰胺 (0.6ml) 中的百倍摩尔过量的 D-Lys⁸-Cs 逐滴加入 BSA 中。在温和搅拌的条件下, 在室温下进行连接反应 2 至 3 小时, 并将所得结合物 (conjugate) 对磷酸盐缓冲的盐水 (PBS, pH 7.4) 进行充分透析。在用丙酮沉淀结合蛋白的等分试样后, 没有共价结合的 D-Lys⁸-Cs 保留在丙酮溶液中, 然后计算环孢菌素共价结合的程度。

用 D-Lys⁸-Cs-BSA 结合物涂覆微量滴定板 (在 4°C 下, 2 μg/ml 在 PBS 中, 持续 24 小时)。用 Tween®/PBS 和仅 PBS 洗涤滴定板。为了阻断非特异性结合, 向孔中加入 2% BSA/PBS (pH 7.4) 并允许在 37°C 下孵育 2 小时。在单独的微量滴定板中, 制备待测试化合物在乙醇中的五倍稀释系列。对于用人重组亲环素进行的测定, 起始浓度为 0.1mg/mL。将 198μL 的 0.1μg/mL 的亲环素溶液加入微量滴定板中, 紧接着加入 2μL 已稀释的环孢菌素 A (用作参比化合物) 或本发明的化合物。允许涂覆的 BSA-Cs 结合物、游离环孢菌素 A 和亲环素之间的反应在 4°C 下平衡过夜。用稀释于含有 1% BSA 的 PBS 中的抗亲环素兔血清检测亲环素,

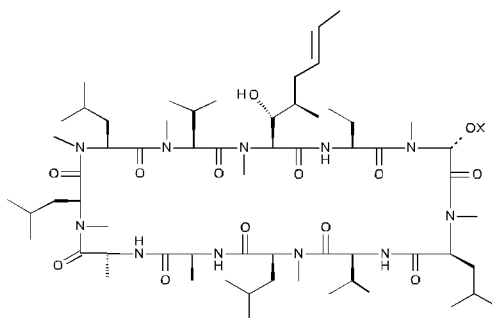
并在 4°C 下孵育过夜。如上所描述的那样洗涤滴定板。然后由稀释于 1% BSA-PBS 中的结合至碱性磷酸酶的山羊抗兔 IgG 检测结合的兔抗体，并允许在 37°C 下孵育 2 小时。如上所描述的那样洗涤滴定板。在 37°C 下用 4-硝基苯基磷酸盐 (1g/l 在二乙醇胺缓冲液中, pH 9.8) 孵育 1 至 2 小时后, 使用分光光度计在 405nm 处分光光度法测量酶促反应。结果表示为 EC₅₀, 其是实现 50% 抑制所需的本发明的化合物的浓度。化合物 1 具有对亲环素 A、亲环素 B 和亲环素 D 的小于 100nM 的 EC₅₀ 值。

PPI 酶 (PPIase) 抑制

基本上如 Janowski 等人以“未结合测定”{Jankowski *et al. Anal. Biochem.* (1997), 252:299-307} 所描述的那样, 使用 Agilent 8453 分光光度计进行测定。在精密玻璃比色杯中将由 35mM HEPES pH 7.8 和 50μM DTT 组成的测定缓冲液冷却至 10°C (伴随搅拌), 并且从 100%DMSO 原液加入抑制剂。获得空白光谱, 然后加入纯化 His 标记的重组人亲环素酶 (f/c 2nM) 和四肽底物 (已溶解于 0.5M LiCl 的三氟乙醇 (Bachem, f/c 60μM) 溶液中的 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-对硝基苯胺), 并在 5 分钟内测量 330 nM 处吸光度的变化。将吸光度数据进行一阶速率方程拟合以获得速率常数 (由于混合最前 10 至 15 秒被排除)。从酶促速率减去背景速率计算催化速率。从速率常数对抑制剂浓度绘图获得抑制剂的 K_i。

线粒体通透性转换

线粒体通透性转换 (MPT) 是通过测量由 Ca²⁺ 诱导的线粒体的肿胀来确定的。程序改编自 Blattner *et al.*, 2001, *Analytical Biochem*, 295:220 所描述的方法。从大鼠肝脏制备线粒体, 大鼠肝脏已经用磷酸盐缓冲的盐水 (PBS) 灌注以除去血液, 采用标准方法, 其利用基于蔗糖的缓冲液中的温和匀化以及随后的差速离心以首先除去细胞碎片并然后沉淀线粒体。由 150 微摩尔 Ca²⁺ (添加自浓缩的 CaCl₂ 溶液) 诱导肿胀, 并通过测量 535-540nm 处的散射来进行监测。在诱导肿胀前 5 分钟加入代表性化合物。通过比较具有和不具有本文公开的化合物的肿胀来确定 EC₅₀。化合物 1 以小于 0.2μM 的 EC₅₀ 抑制线粒体肿胀。



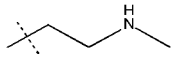
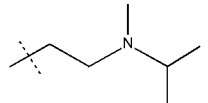
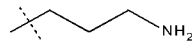
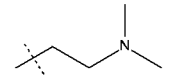
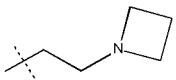
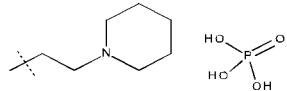
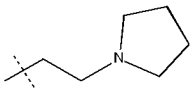
条目	X	CypA EC ₅₀ (nM)	CypD EC ₅₀ (nM)	MPT (μM)
1		61	2170	10
2		202	3550	7.6
3		14	ND	2.69
4 化合物 1		60	24	0.1
5		66	ND	10
6		118	2500	7.5
7		12	1200	10

表 1— 亲环素 A 抑制、亲环素 D 抑制和线粒体通透性转换 (MPT) 的测量结果

表 1 所示的结果表明, 相对于相似的类似物 (条目 1 至 3 和 5 至 7), 化合物 1 (条目 4) 具有出乎意料地高的亲环素 D 抑制和 MPT。相对于三种其他化合物 (条目 1、5 和 7) 观察到在 MPT 方面的 100 倍改善, 并且, 相对于次最佳表现的类似物 (条目 3) 观察到超过 25 倍改善。化合物 1 也显示出具有优异的亲环素 D 抑制, 相对于测试的所有其他类似物具有至少 50 倍改善。

化合物 1 在器官损伤动物模型中的保护作用

由肾缺血-再灌注损伤诱导的急性肾损伤

通过将化合物 1 和环孢菌素 A 与克列莫佛/生理盐水/DMSO 混合, 制备了这些化合物的制剂。

将斯普拉-道来 (Sprague-Dawley) 大鼠分成 6 组: 第 (i) 组为假手术组, 给予克列莫佛/生理盐水/DMSO, 无活性成分; 第 (ii) 组为对照组, 给予克列莫佛/生理盐水/DMSO, 无活性成分; 第 (iii) 组给予化合物 1 (3mg/kg); 第 (iv) 组给予 CsA (3mg/kg; 第 (v) 组给予化合物 1 (10mg/kg); 第 (vi) 组给予 CsA (10mg/kg)。

除第 (i) 组外, 即“假手术组”外, 在大鼠中通过双侧肾动脉结扎 30 分钟然后释放结扎诱导肾缺血-再灌注诱导的急性肾损伤 (AKI)。

对照组和治疗组中的动物给予腹膜内注射三次 (结扎前 1 小时, 结扎后 4 小时和 8 小时)。在结扎/释放过程后 24 小时从动物取血并分析血清肌酸酐和血尿素氮 (BUN) 浓度, 作为肾损伤的测量。

如下示出这些实验的结果, 并在图 1 和图 2 中图形显示。

	肌酸酐 (umol/L)	血尿素氮 (mmol/L)
第 (i) 组	25	5
第 (ii) 组	195	38
第 (iii) 组	60	14
第 (iv) 组	115	22
第 (v) 组	250	40
第 (vi) 组	290	42

表 2 - 第 (i) 组至第 (vi) 组的血清肌酸酐和 BUN 浓度的测量结果

结果讨论

在图 1 中, 血清肌酸酐的浓度是肾损伤的指标。“假手术组”中的大鼠无诱导的 AKI。“对照组”代表大鼠具有诱导的 AKI, 但没有治疗。因此, 可以看出诱导的 AKI 导致血清肌酸酐从 25 μ mol/ml (第 i 组) 至 195 μ mol/ml 组 (第 ii 组) 的增加了的水平。

与第 ii 组相比, 用 3mg/kg CsA 治疗具有诱导的 AKI 的大鼠 (第 iv 组) 使得肌酸酐水平从 195 μ mol/ml 下降至 115 μ mol/ml。因此理解的是 CsA 作用以预防缺血-再灌注损伤。

令人惊讶的是, 当用 3mg/kg 的化合物 1 治疗具有诱导的 AKI 的大鼠时 (第 iii 组), 给出了在肌酸酐水平方面的非常显著的降低, 从 195 μ mol/ml 下降至 60 μ mol/ml (与第 ii 组相比), 这接近于在“假手术组” (第 i 组), 即, 没有诱导的 AKI 的大鼠中观察到的肌酸酐水平。当化合物 1 和 CsA 的剂量从 3mg/ml (第 iii 组和第 iv 组) 增加至 10mg/ml (第 v 组和第 vi 组) 时, 似乎 CsA 和化合物 1 的益处被降低, 但化合物 1 表现仍好于 CsA。

在图 2 中，血尿素氮（BUN）浓度是肾损伤的指标。图 2 与图 1 中所见的趋势相同。即，3mg/kg 的 CsA 获得 BUN 水平的下降（第 iv 组与第 ii 组相比），而 3mg/kg 的化合物 1 显示在 BUN 水平方面非常显著的降低（第 iii 组与第 ii 组相比），获得接近于在“假手术组”（第 i 组）中所见的 BUN 水平。将化合物 1 和 CsA 的浓度从 3mg/kg（第 iii 组和第 v 组）增加至 10mg/kg（第 v 组和第 vi 组）证明是较不有效的。该结果支持在图 1 中所见的结果。

由脂多糖（LPS）挑战诱导的急性肾损伤

在小鼠（C57）中，通过腹膜内注射 LPS（15mg/kg）诱导了 LPS 诱导的急性肾损伤（AKI）。将 20 只小鼠随机分为两组。对照组中的动物接受媒介物（克列莫佛/生理盐水/DMSO）而治疗组接受化合物 1（3mg/kg，在克列莫佛/生理盐水/DMSO 中），各自通过腹膜内给予。用媒介物或化合物 1 给予动物三次（LPS 注射前 1h 以及 LPS 注射后 4h 和 8h），在 LPS 注射后 12h 从动物取血。通过提高的存活率（图 3）和通过评价肾功能的标志物（图 4）来确定化合物的活性。

	存活率	肌酸酐 ($\mu\text{mol/L}$)	血尿素氮 (mmol/L)
对照	40%	37	52
化合物 1	100%	26	38

结果讨论

图 3 中，在动物存活率方面呈现了化合物 1 的保护作用。在 3 mpk 的剂量水平下，化合物 1 施用获得该组中所有动物的存活，与此相比，在没有接受化合物 1 的对照组中，10 只动物中仅 4 只存活。

图 4 示出在该实验中化合物 1 对肾功能的影响。用化合物 1 治疗的动物的较低的肌酸酐水平和血尿素氮水平更低与对肾脏的损伤的降低的水平相一致。

通过施用至器官供体在移植期间的器官保护

以猪肾脏例证了化合物 1 对经受移植条件的器官的保护作用。在所进行的实验中，在肾脏切除术前 1h，经静脉递送，将 5 mg/kg 的单剂量的化合物 1 施用至猪。切除肾脏，用标准高渗柠檬酸腺嘌呤（HCA）保存液灌注，然后在低温（0°C-4°C）下保存在 HCA 溶液中。在切除程序后的几个时间点，通过组织学评估和炎症标志物的测量来监测器官用于记录损伤：

- 零点
- 6h

- 24h
- 48h。

数据示于图 5 至图 7 中。

使用根据炎症程度的评分标准在苏木精和依红（HE）染色后进行组织学评估。采用“0 至 4”的半定量的评分系统，其中，非常小的或无病变的分配为“0”；轻度的或小的分配为“1”；中度的分配为“2”；严重的分配为“3”；非常严重的分配为“4”。

用总共 9 个猪肾脏进行实验，其中，将 4 个肾脏用作对照，没有保护剂化合物，而 5 个肾脏在肾脏切除之前 1 小时接受 5 mg/kg 化合物 1 的 i.v. 剂量。数据显示所研究的肾脏在移除后的各时间的平均值。

图 5 示出平均炎症评分的结果；

图 6 示出对肾囊扩张的影响；并且

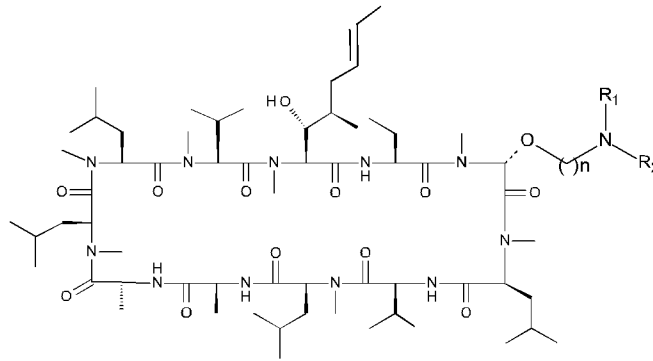
图 7 示出对肾小管扩张的影响。

结果讨论

综上所述，发现化合物 1 在治疗或预防缺血-再灌注损伤方面，特别是在较低浓度水平下是惊人有效的。在移除器官（用于随后植入受体）之前将该化合物施用至器官供体同样是特别有效的。图 5 至图 7 示出，通过在器官移除之前将化合物施用至供体，可以离体保存该器官。

权利要求书

1. 线粒体保护剂化合物用于保存器官的用途，其中，在从所述供体移除所述器官之前将所述化合物施用至器官供体以保护所述器官。
2. 根据权利要求 1 所述的用途，其中，所述化合物是亲环素 D 抑制剂。
3. 根据权利要求 2 所述的用途，其中，所述化合物是式 1 的化合物或其盐：

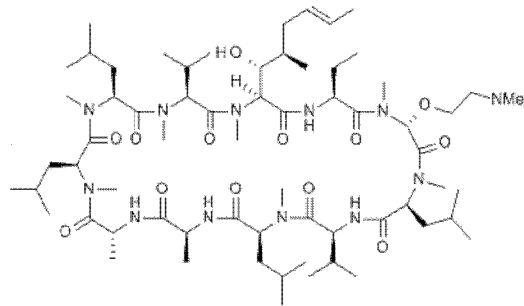


式 1

其中 n 为 2 至 5，并且

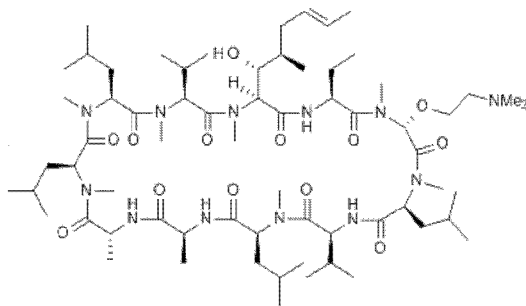
R_1 和 R_2 独立地选自 H 或 C_1 - C_4 烷基，其中， R_1 和 R_2 可以连接在一起以形成 C_3 - C_5 杂烷基环。

4. 根据权利要求 3 所述的化合物，其中，所述化合物是化合物 1 或其盐：



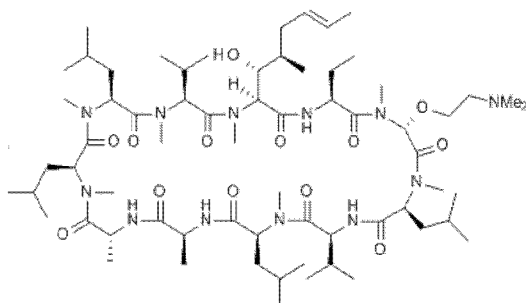
化合物 1。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的用途，其中，所述器官是肾脏。
6. 一种保存来自肾脏供体的肾脏的方法，包括在从所述供体移除所述肾脏前将化合物施用至所述供体，其中，所述化合物是化合物 1 或其盐：



化合物 1。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的方法或用途, 其中, 所述供体是活体供体。
8. 线粒体保护剂化合物在制备用于施用至活供体以保存肾脏的药物的用途, 其中, 所述化合物是化合物 1 或其盐:



化合物 1。

9. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的方法或用途, 其中, 所述化合物的剂量为 0.1 至 10mg/kg。
10. 根据权利要求 9 所述的方法或用途, 其中, 所述化合物的剂量为 1 至 3mg/kg。

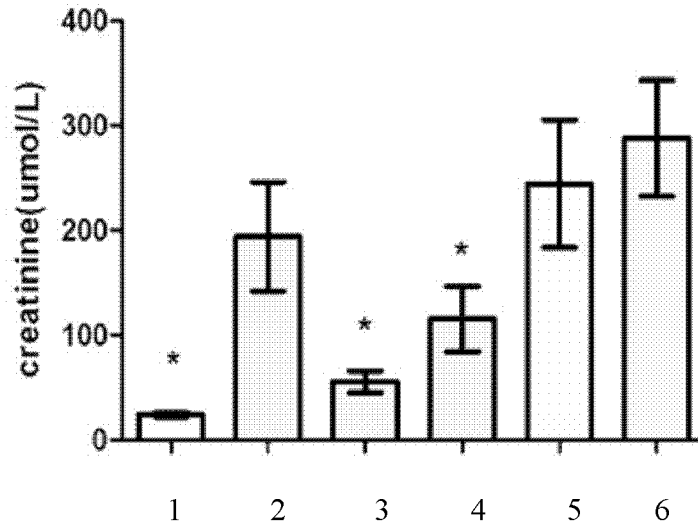


图 1

组

第 1 栏-假手术组

第 2 栏-对照组

第 3 栏-化合物 1 (3 mg/kg) (组 iii)

第 4 栏-CsA (3 mg/kg) (组 iv)

第 5 栏-化合物 1 (10 mg/kg) (组 v)

第 6 栏-CsA (10 mg/kg) (组 vi)

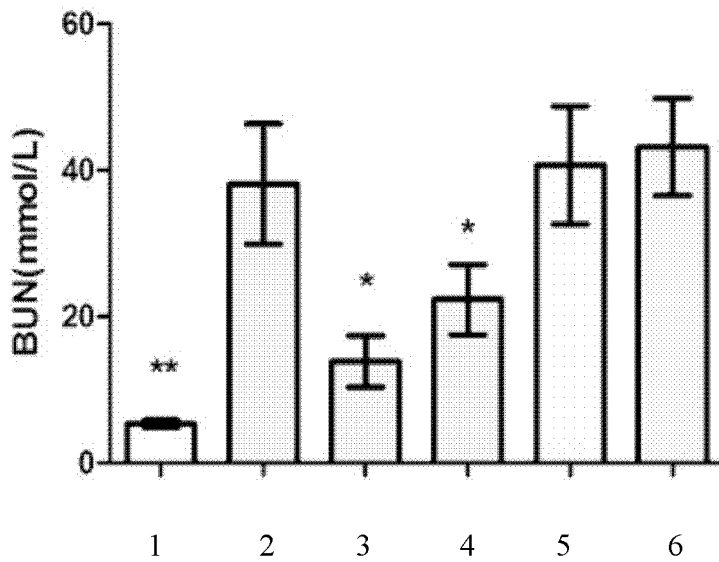


图 2

组

第 1 栏-假手术组

第 2 栏-对照组

第 3 栏-化合物 1 (3 mg/kg) (组 iii)

第 4 栏-CsA (3 mg/kg) (组 iv)

第 5 栏-化合物 1 (10 mg/kg) (组 v)

第 6 栏 - CsA (10 mg/kg) (组 vi)

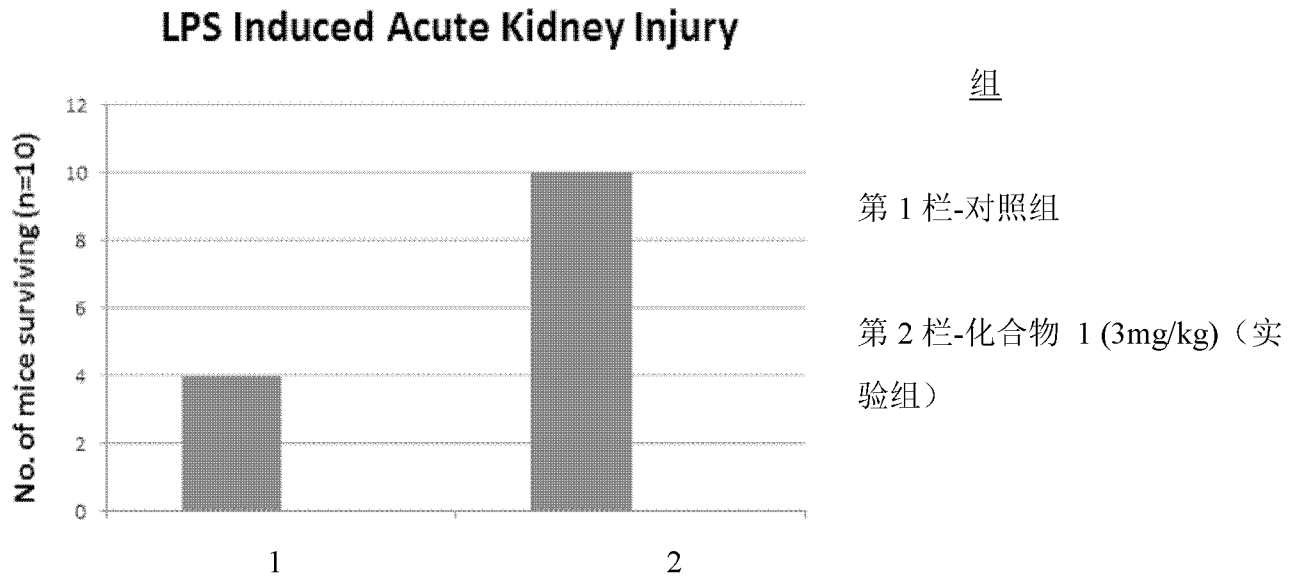


图 3

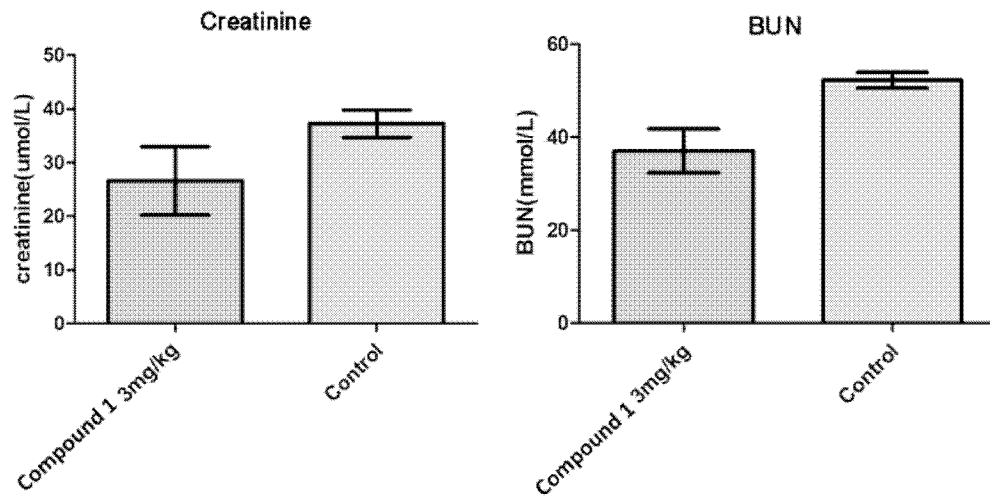


图 4

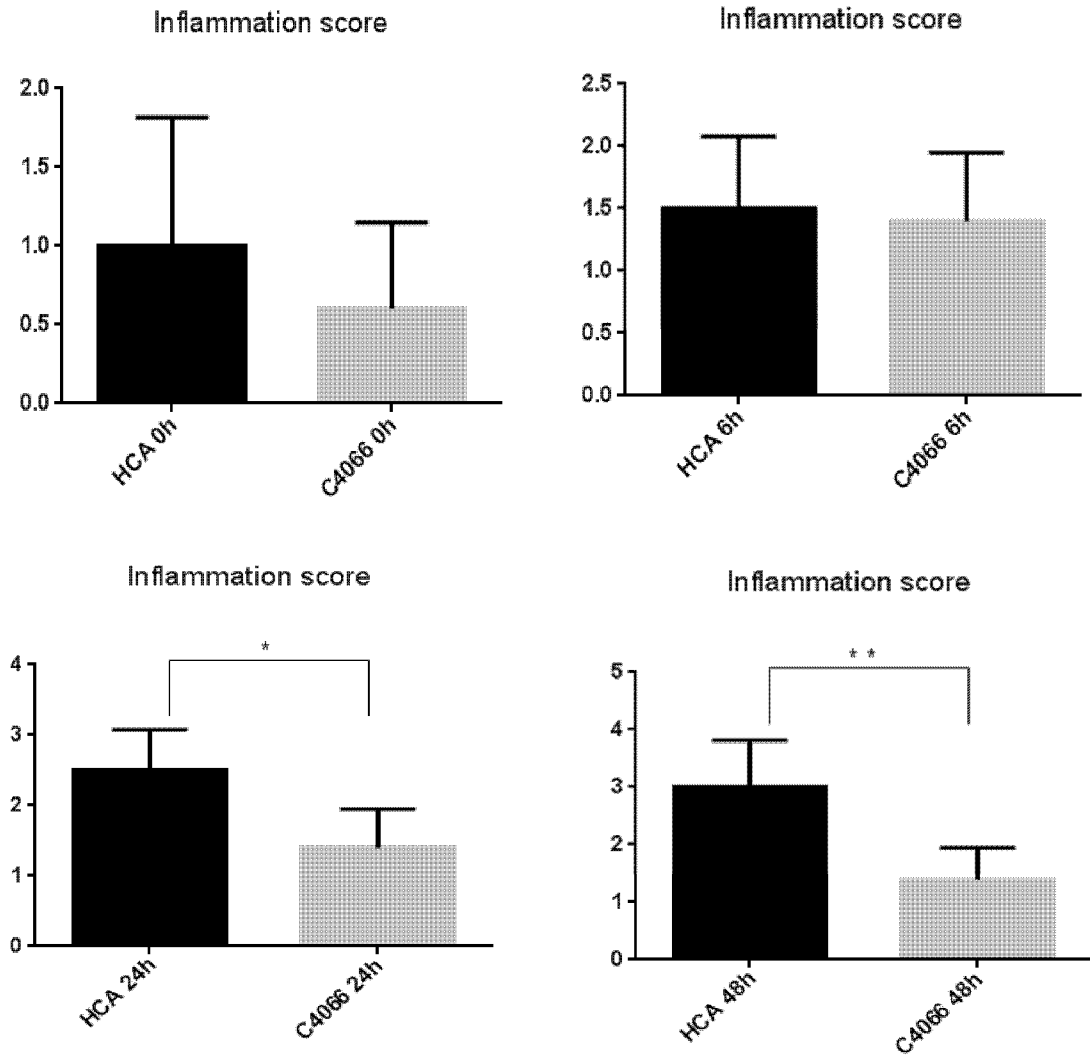


图 5

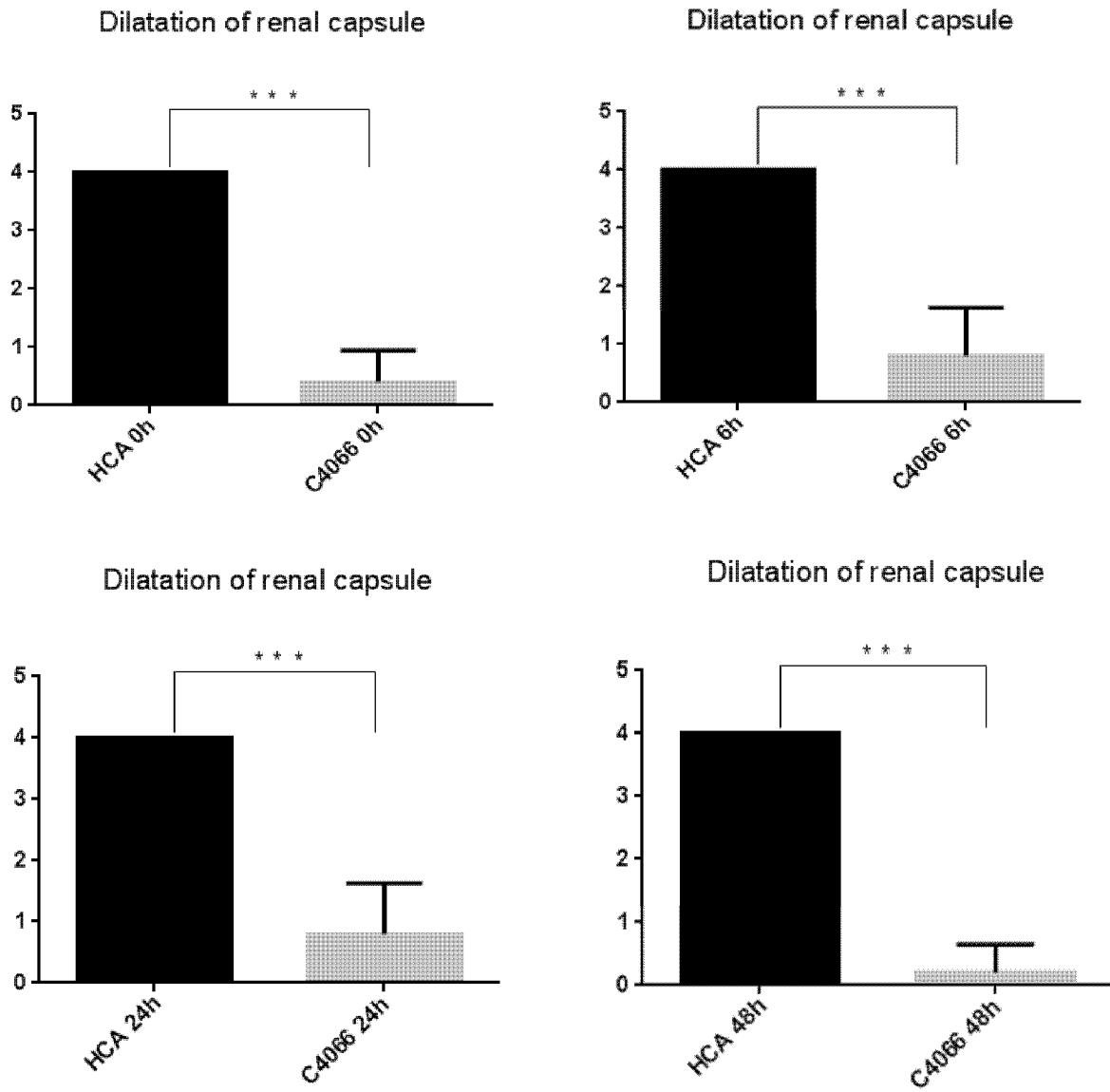


图 6

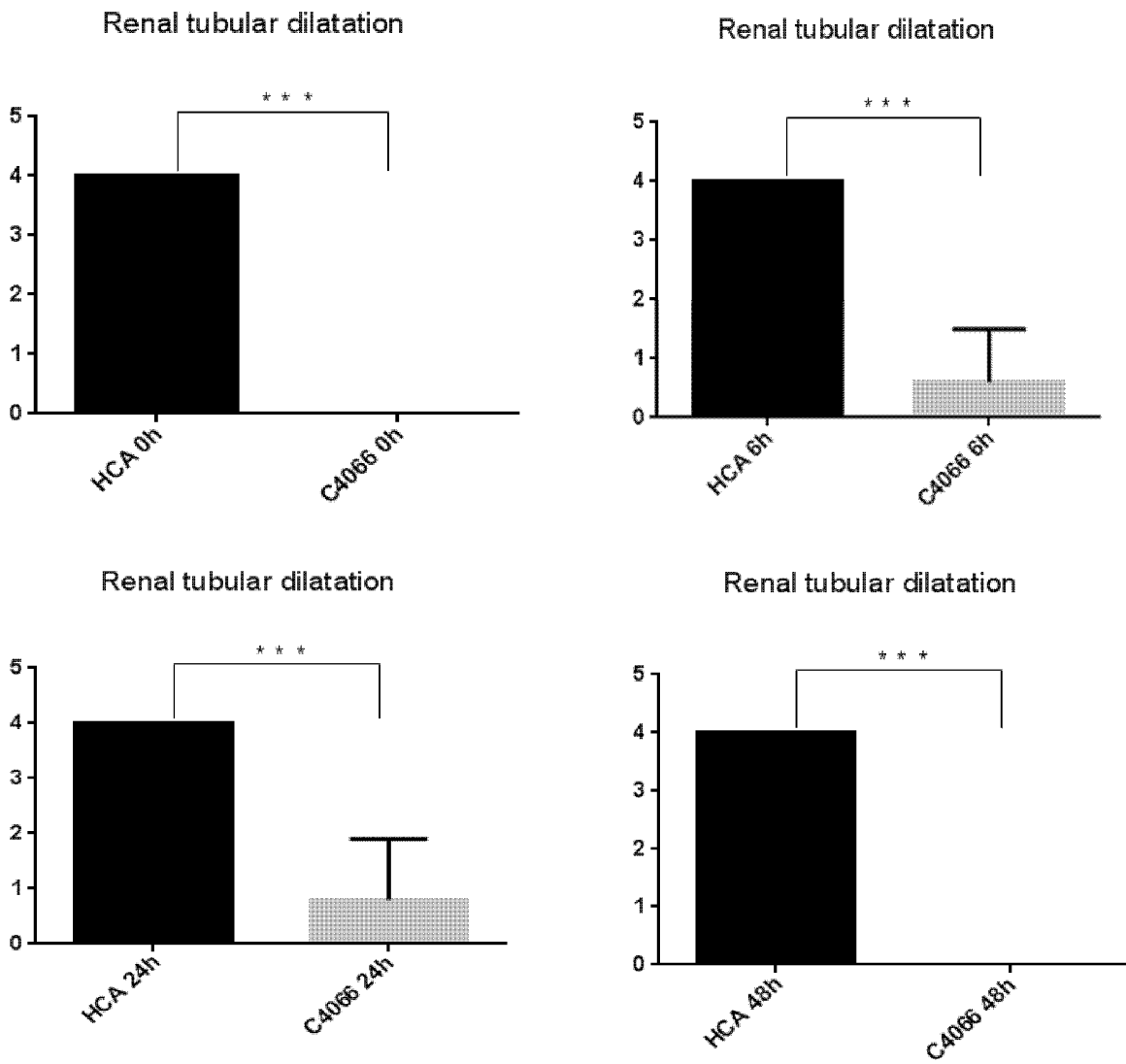


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/070852

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A01N 1/02(2006.01)i; C07K 7/64(2006.01)i; C07K 7/56(2006.01)i; A61K 38/13(2006.01)i; A61K 38/12(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01N; C07K; A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; VEN; CNKI; USTXT; WOTXT; EPTXT; ISL_Web of Science; STN: 环孢霉素, 环霉素, 环孢多肽, CsA, 亲环素, 亲环蛋白, 线粒体, 供体, 预处理, 施用, 注射, 口服, 移植, 器官, 组织, 肾, 保存, cyclosporin+, CypD, mitochondria, Donor??. donator??. precondit+, Preprocess+, pretreat+, transport+, transplant+, kidney, preserv+, organ, CAS号: 252731-57-0, CAS number: 252731-57-0		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO 2019016572 A1 (CYPRALIS LTD.) 24 January 2019 (2019-01-24) description, page 3, line 16 to page 5, line 30 and page 8, line 10 to page 10 line 28, and claims 1-14	1-10
X	SINGH D. et al. "Cyclosporine Protects Against Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Kidneys" <i>Toxicology</i> , Vol. 207, No. 3, 22 December 2004 (2004-12-22), ISSN: 0300-483X, page 339, the abstract, and page 340, left column, paragraph 5 to page 341, left column, paragraph 2	1, 2, 5, 7, 9, 10
Y	SINGH D. et al. "Cyclosporine Protects Against Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Kidneys" <i>Toxicology</i> , Vol. 207, No. 3, 22 December 2004 (2004-12-22), ISSN: 0300-483X, page 339, the abstract, and page 340, left column, paragraph 5 to page 341, left column, paragraph 2	3, 4, 6, 8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 March 2020		Date of mailing of the international search report 03 April 2020
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	唐建等 (TANG, Jian et al.). "供体应用钙调磷酸酶抑制剂预处理减少大鼠肾移植缺血再灌注损伤及机制 (Using Calcineurin Inhibitor in Donor Preconditioning Reduce Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Renal Transplantation and the Mechanisms)" <i>中国医药导报 (China Medical Herald)</i> , No. 25, 30 September 2012 (2012-09-30), ISSN: 1673-7210, page 8, the abstract, and page 8, right column, paragraph 2 to page 9, left column, paragraph 3 and page 10, left column, paragraph 1	1, 2, 5, 7, 9
Y	唐建等 (TANG, Jian et al.). "供体应用钙调磷酸酶抑制剂预处理减少大鼠肾移植缺血再灌注损伤及机制 (Using Calcineurin Inhibitor in Donor Preconditioning Reduce Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Renal Transplantation and the Mechanisms)" <i>中国医药导报 (China Medical Herald)</i> , No. 25, 30 September 2012 (2012-09-30), ISSN: 1673-7210, page 8, the abstract, and page 8, right column, paragraph 2 to page 9, left column, paragraph 3 and page 10, left column, paragraph 1	3, 4, 6, 8
Y	CN 1305493 A (C-CHEM AG.) 25 July 2001 (2001-07-25) description, page 7, paragraph 2 and page 12, line 23,	3, 4, 6, 8
Y	CN 106902347 A (WATERSTONE PHARMACEUTICALS (WUHAN) CO., LTD.) 30 June 2017 (2017-06-30) claim 6	3, 4, 6, 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/070852

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
WO	2019016572	A1	24 January 2019	None			
CN	1305493	A	25 July 2001	AU	4899399	A	05 January 2000
				CZ	20004610	A3	16 May 2001
				EP	1086124	B1	19 November 2003
				CA	2334730	C	29 September 2009
				WO	9965933	A1	23 December 1999
				DE	69912952	D1	24 December 2003
				CN	1205220	C	08 June 2005
				MX	2000012218	A1	01 May 2002
				KR	20010052766	A	25 June 2001
				JP	4477777	B2	09 June 2010
				EP	1086124	A1	28 March 2001
				NO	20006282	A	12 February 2001
				BR	9911160	A	03 April 2001
				HU	0102833	A2	28 January 2002
				US	6583265	B1	24 June 2003
				JP	2002518406	A	25 June 2002
				AU	760168	B2	08 May 2003
				ES	2212583	T3	16 July 2004
CN	106902347	A	30 June 2017	None			

<p>A. 主题的分类</p> <p>A01N 1/02(2006.01)i; C07K 7/64(2006.01)i; C07K 7/56(2006.01)i; A61K 38/13(2006.01)i; A61K 38/12(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A01N; C07K; A61K</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS;VEN;CNKI;USTXT;WOTXT;EPTXT;ISI Web of Science;STN; 环孢霉素, 环霉素, 环孢多肽, CsA, 亲环素, 亲环蛋白, 线粒体, 供体, 预处理, 施用, 注射, 口服, 移植, 器官, 组织, 肾, 保存, cyclosporin+, CypD, mitochondria, Donor??, donator??, preconditionit+, Preprocess+, pretreat+, transport+, transplant+, kidney, preserv+, organ, CAS号: 252731-57-0</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>WO 2019016572 A1 (CYPRALIS LTD) 2019年 1月 24日 (2019 - 01 - 24) 说明书第3页第16行-第5页第30行, 第8页第10行-第10页第28行, 权利要求1-14</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>SINGH D. 等. "Cyclosporine Protects Against Ischemia/Reperfusion Injury In Rat Kidneys" Toxicology, 第207卷, 第3期, 2004年 12月 22日 (2004 - 12 - 22), ISSN: 0300-483X, 第339页摘要, 第340页左栏第5段-第341页左栏第2段</td> <td>1、2、5、7、9、10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>SINGH D. 等. "Cyclosporine Protects Against Ischemia/Reperfusion Injury In Rat Kidneys" Toxicology, 第207卷, 第3期, 2004年 12月 22日 (2004 - 12 - 22), ISSN: 0300-483X, 第339页摘要, 第340页左栏第5段-第341页左栏第2段</td> <td>3、4、6、8</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>唐建 等. "供体应用钙调磷酸酶抑制剂预处理减少大鼠肾移植缺血再灌注损伤及机制" 中国医药导报, 第25期, 2012年 9月 30日 (2012 - 09 - 30), ISSN: 1673-7210, 第8页摘要, 第8页右栏第2段-第9页左栏第3段, 第10页左栏第1段</td> <td>1、2、5、7、9</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	WO 2019016572 A1 (CYPRALIS LTD) 2019年 1月 24日 (2019 - 01 - 24) 说明书第3页第16行-第5页第30行, 第8页第10行-第10页第28行, 权利要求1-14	1-10	X	SINGH D. 等. "Cyclosporine Protects Against Ischemia/Reperfusion Injury In Rat Kidneys" Toxicology, 第207卷, 第3期, 2004年 12月 22日 (2004 - 12 - 22), ISSN: 0300-483X, 第339页摘要, 第340页左栏第5段-第341页左栏第2段	1、2、5、7、9、10	Y	SINGH D. 等. "Cyclosporine Protects Against Ischemia/Reperfusion Injury In Rat Kidneys" Toxicology, 第207卷, 第3期, 2004年 12月 22日 (2004 - 12 - 22), ISSN: 0300-483X, 第339页摘要, 第340页左栏第5段-第341页左栏第2段	3、4、6、8	X	唐建 等. "供体应用钙调磷酸酶抑制剂预处理减少大鼠肾移植缺血再灌注损伤及机制" 中国医药导报, 第25期, 2012年 9月 30日 (2012 - 09 - 30), ISSN: 1673-7210, 第8页摘要, 第8页右栏第2段-第9页左栏第3段, 第10页左栏第1段	1、2、5、7、9
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
PX	WO 2019016572 A1 (CYPRALIS LTD) 2019年 1月 24日 (2019 - 01 - 24) 说明书第3页第16行-第5页第30行, 第8页第10行-第10页第28行, 权利要求1-14	1-10															
X	SINGH D. 等. "Cyclosporine Protects Against Ischemia/Reperfusion Injury In Rat Kidneys" Toxicology, 第207卷, 第3期, 2004年 12月 22日 (2004 - 12 - 22), ISSN: 0300-483X, 第339页摘要, 第340页左栏第5段-第341页左栏第2段	1、2、5、7、9、10															
Y	SINGH D. 等. "Cyclosporine Protects Against Ischemia/Reperfusion Injury In Rat Kidneys" Toxicology, 第207卷, 第3期, 2004年 12月 22日 (2004 - 12 - 22), ISSN: 0300-483X, 第339页摘要, 第340页左栏第5段-第341页左栏第2段	3、4、6、8															
X	唐建 等. "供体应用钙调磷酸酶抑制剂预处理减少大鼠肾移植缺血再灌注损伤及机制" 中国医药导报, 第25期, 2012年 9月 30日 (2012 - 09 - 30), ISSN: 1673-7210, 第8页摘要, 第8页右栏第2段-第9页左栏第3段, 第10页左栏第1段	1、2、5、7、9															
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2020年 3月 3日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2020年 4月 3日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>曹猛猛</p> <p>电话号码 (86-512)88996864</p>															

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	唐建 等. “供体应用钙调磷酸酶抑制剂预处理减少大鼠肾移植缺血再灌注损伤及机制” 中国医药导报, 第25期, 2012年 9月 30日 (2012 - 09 - 30), ISSN: 1673-7210, 第8页摘要, 第8页右栏第2段-第9页左栏第3段, 第10页左栏第1段	3、4、6、8
Y	CN 1305493 A (斯一凯穆公司) 2001年 7月 25日 (2001 - 07 - 25) 说明书第7页第2段和第12页第23行	3、4、6、8
Y	CN 106902347 A (美华世通生物医药科技武汉有限公司) 2017年 6月 30日 (2017 - 06 - 30) 权利要求6	3、4、6、8

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/070852

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
WO	2019016572	A1	2019年 1月 24日	无	
CN	1305493	A	2001年 7月 25日	AU	4899399 A 2000年 1月 5日
				CZ	20004610 A3 2001年 5月 16日
				EP	1086124 B1 2003年 11月 19日
				CA	2334730 C 2009年 9月 29日
				WO	9965933 A1 1999年 12月 23日
				DE	69912952 D1 2003年 12月 24日
				CN	1205220 C 2005年 6月 8日
				MX	2000012218 A1 2002年 5月 1日
				KR	20010052766 A 2001年 6月 25日
				JP	4477777 B2 2010年 6月 9日
				EP	1086124 A1 2001年 3月 28日
				NO	20006282 A 2001年 2月 12日
				BR	9911160 A 2001年 4月 3日
				HU	0102833 A2 2002年 1月 28日
				US	6583265 B1 2003年 6月 24日
				JP	2002518406 A 2002年 6月 25日
				AU	760168 B2 2003年 5月 8日
				ES	2212583 T3 2004年 7月 16日
CN	106902347	A	2017年 6月 30日	无	