



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 113544138 B

(45) 授权公告日 2024. 10. 29

(21) 申请号 201980083951.0

(22) 申请日 2019.11.19

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113544138 A

(43) 申请公布日 2021.10.22

(30) 优先权数据
62/781153 2018.12.18 US
62/892939 2019.08.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.06.17

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/062283 2019.11.19

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/131282 EN 2020.06.25

(73) 专利权人 隐形生物治疗公司
地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 G·郑 M·J·巴姆伯格
I·斯穆克斯特

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 李进 初明明

(51) Int.Cl.
C07K 5/10 (2006.01)
C07K 5/117 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 5/11 (2006.01)

(56) 对比文件
W0 2017180535 A1, 2017.10.19
审查员 陈盛峰

权利要求书8页 说明书75页 附图4页

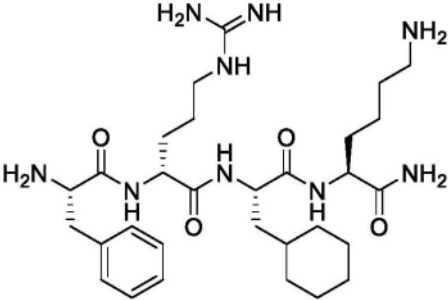
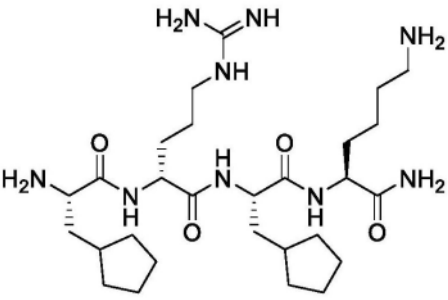
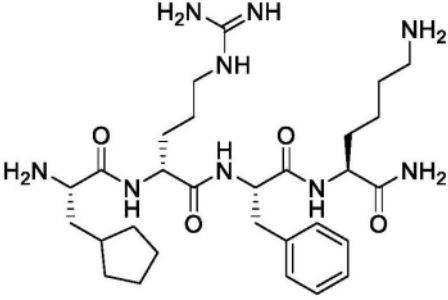
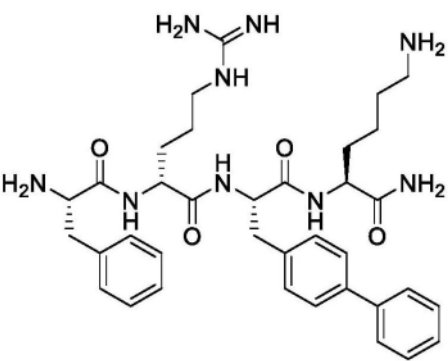
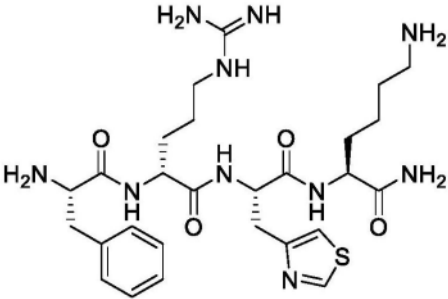
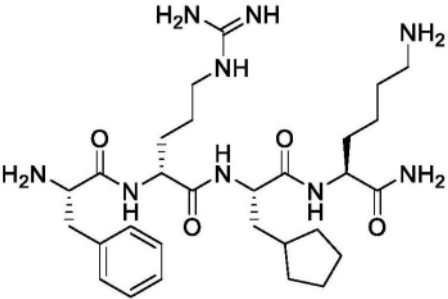
(54) 发明名称

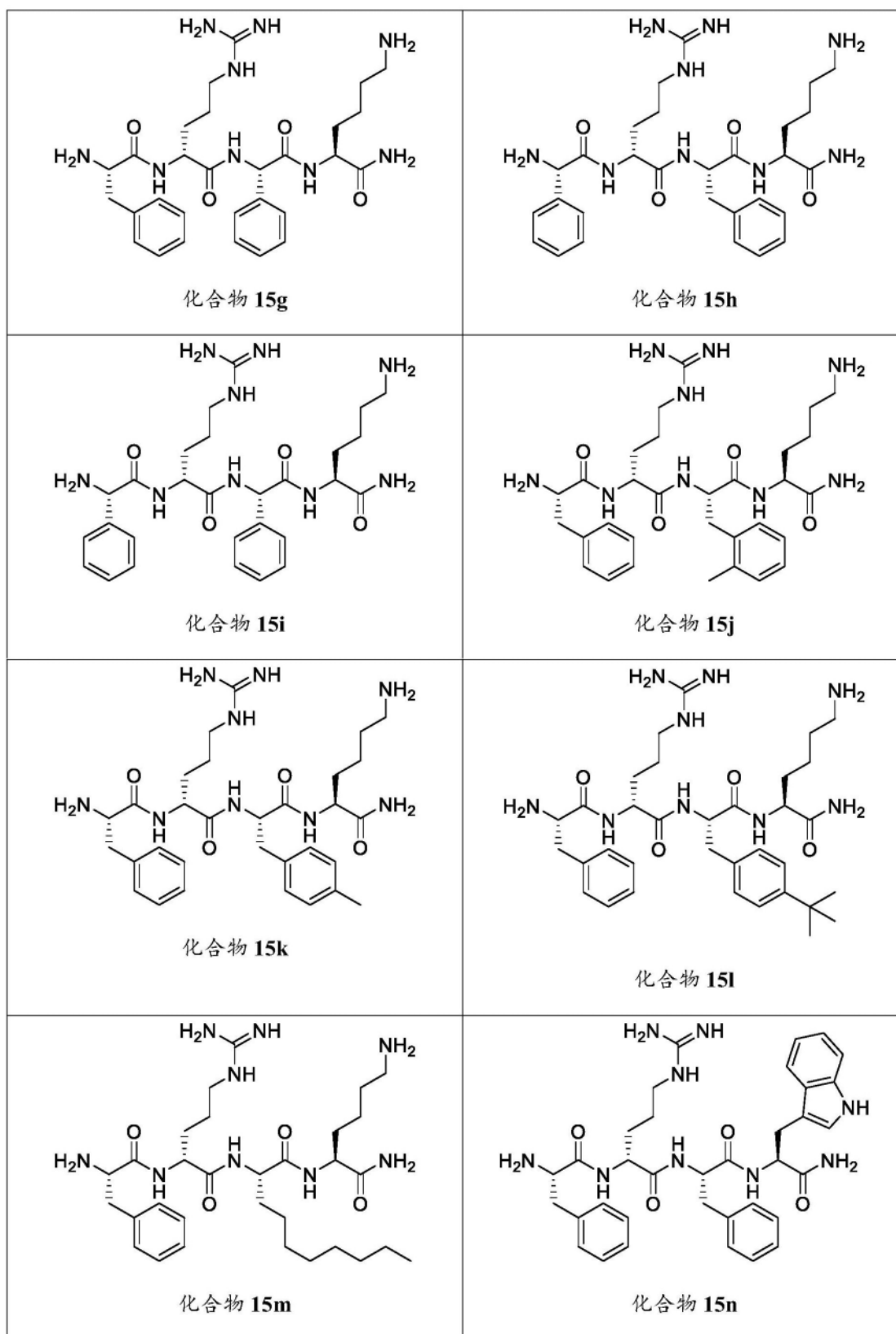
线粒体靶向肽

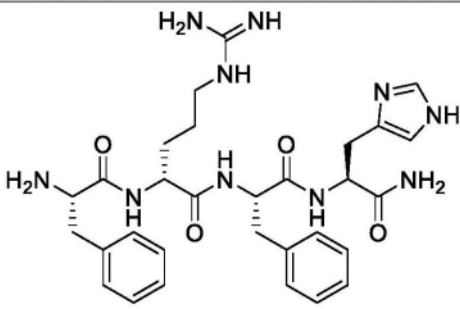
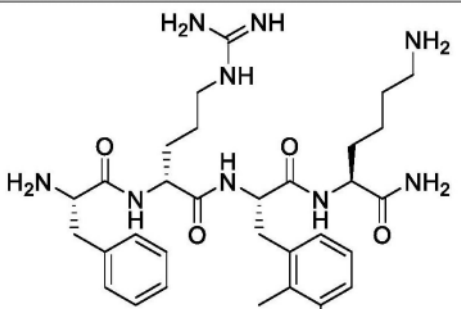
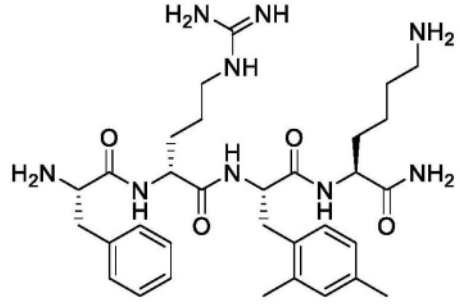
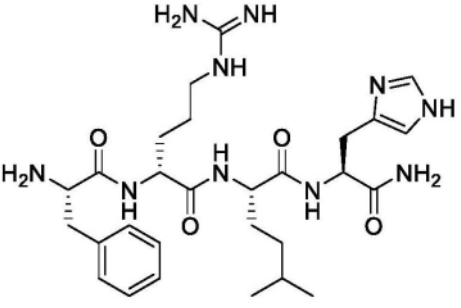
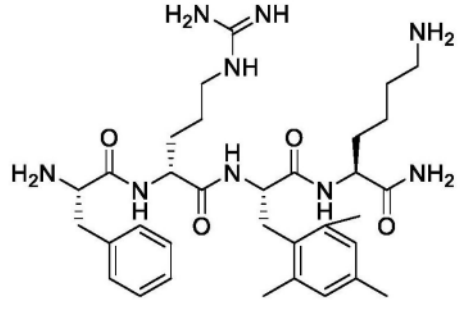
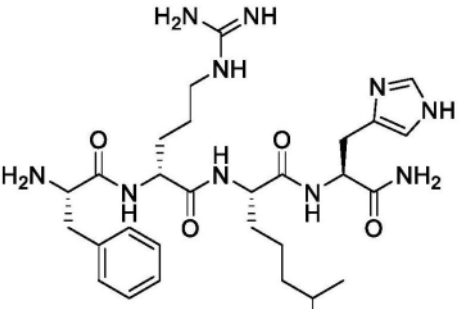
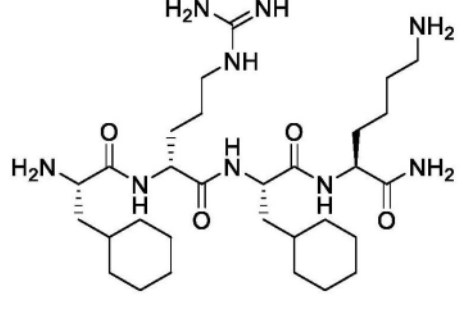
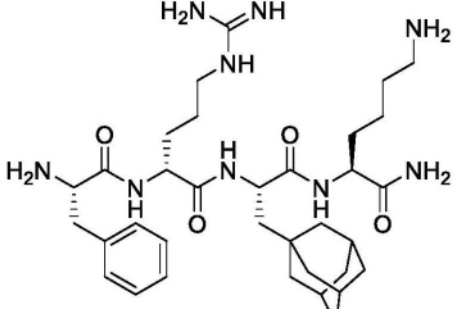
(57) 摘要

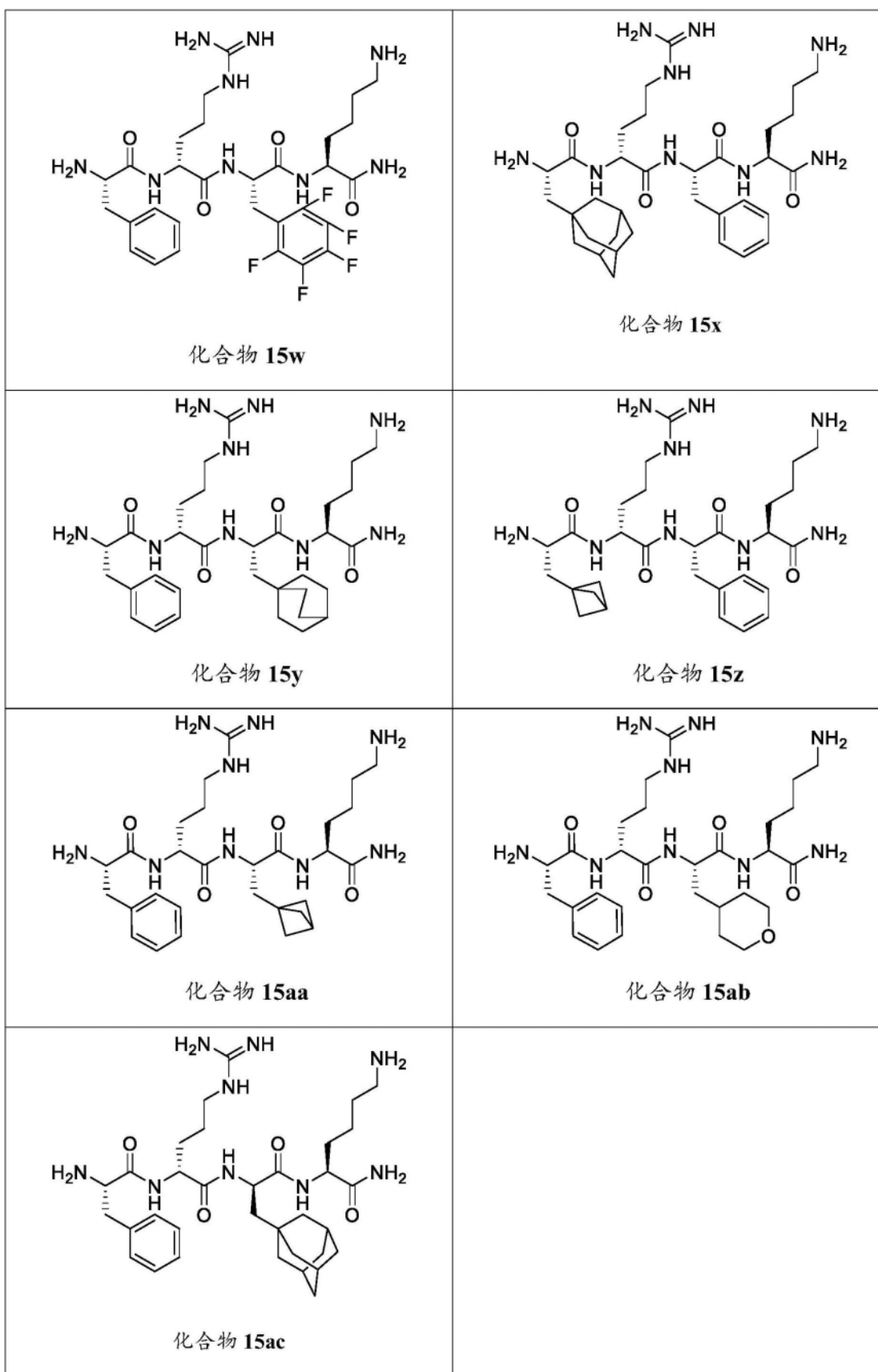
公开了SBT-20的类似物。化合物用于治疗 and 预防缺血-再灌注损伤(例如,心脏缺血-再灌注损伤)或心肌梗塞。

1. 一种化合物,或其药学上可接受的盐,所述化合物选自下表:

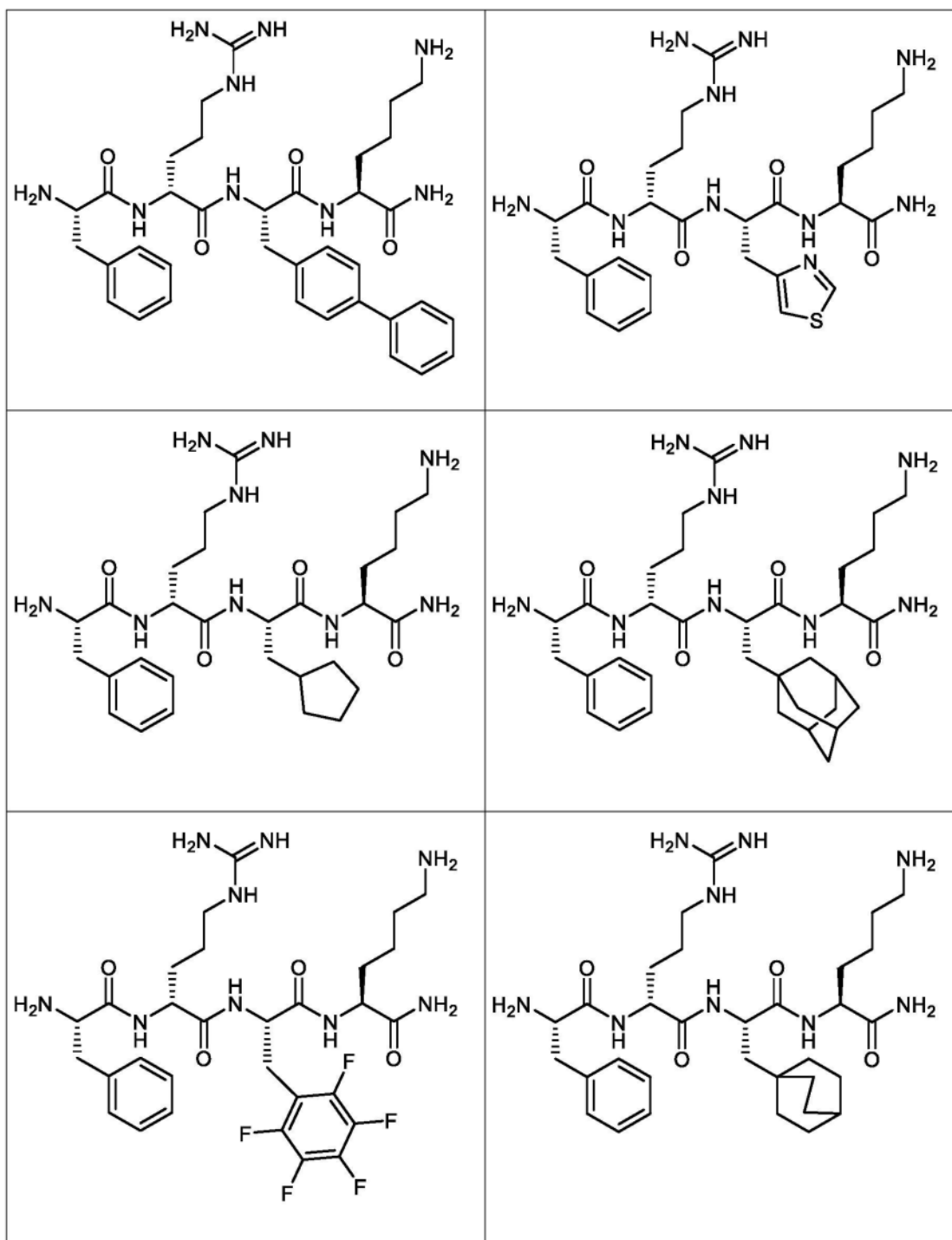
 化合物 15a	 化合物 15b
 化合物 15c	 化合物 15d
 化合物 15e	 化合物 15f

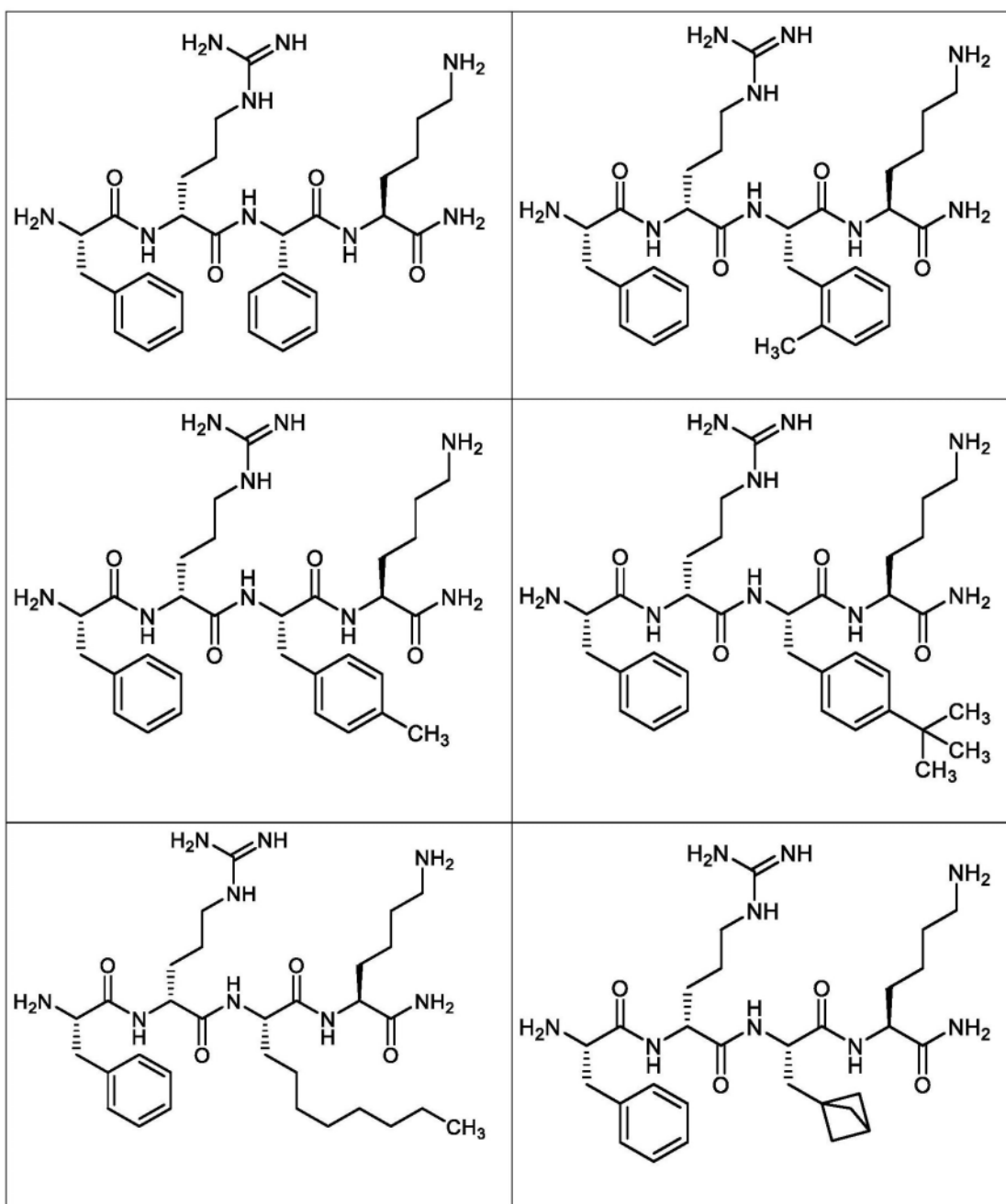


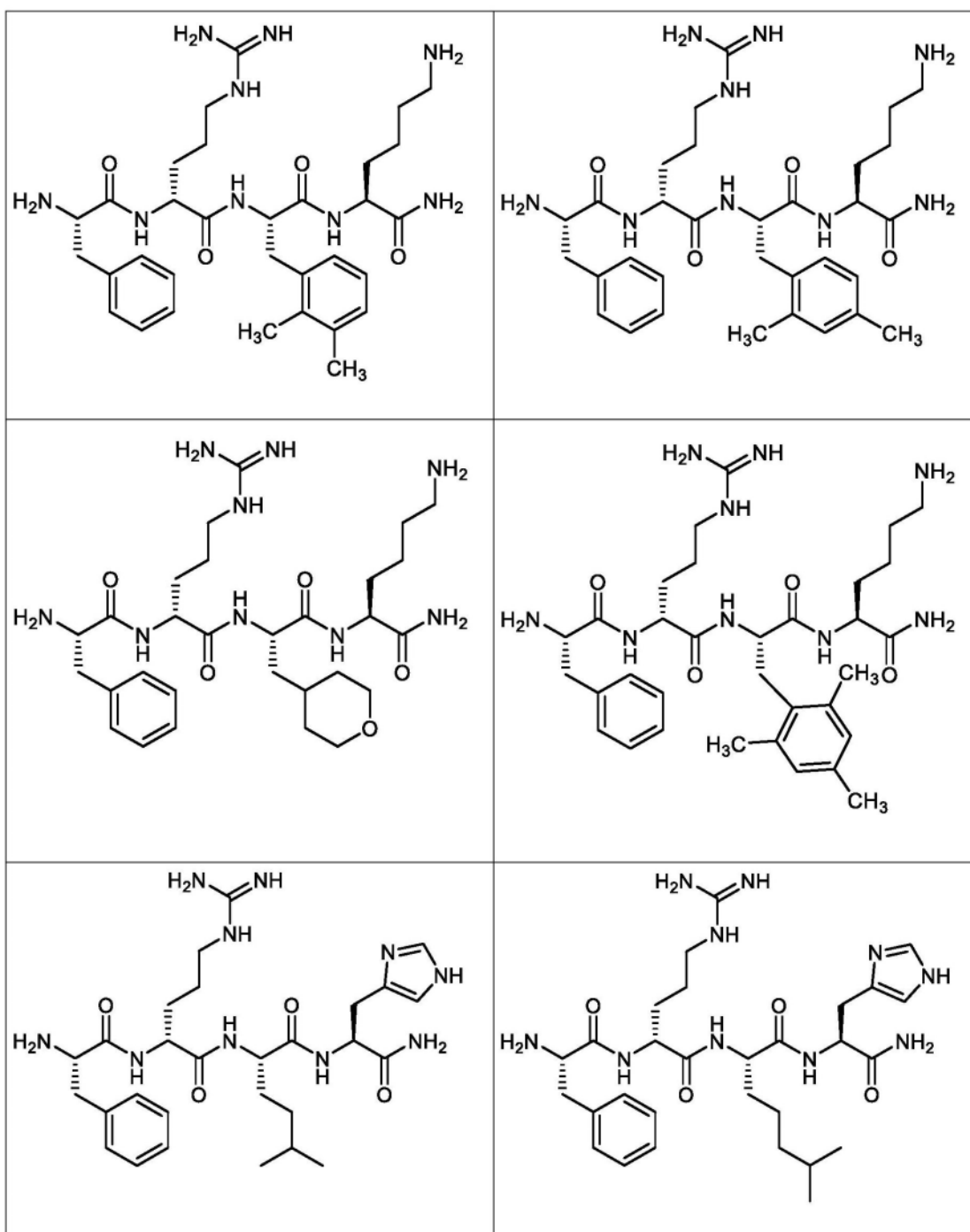
 化合物 15o	 化合物 15p
 化合物 15q	 化合物 15r
 化合物 15s	 化合物 15t
 化合物 15u	 化合物 15v

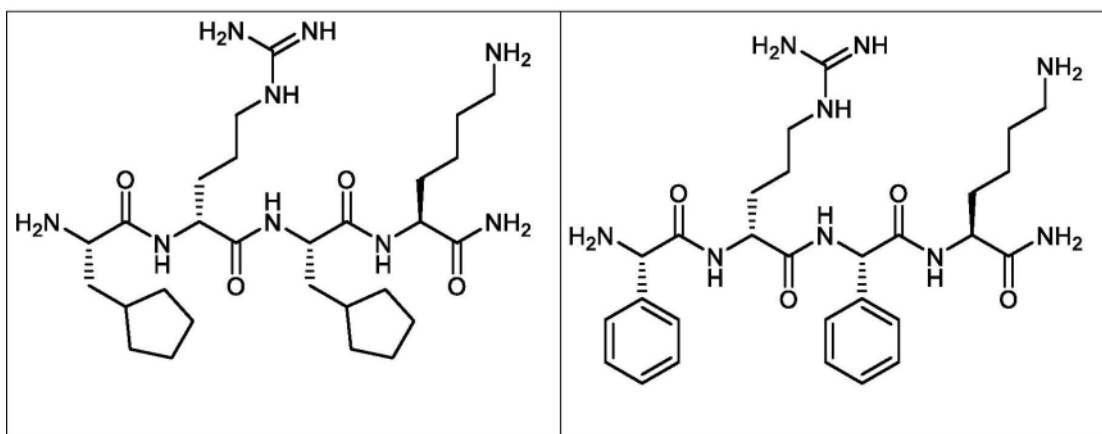


2. 如权利要求1所述的化合物,或其药学上可接受的盐,所述化合物选自下表:

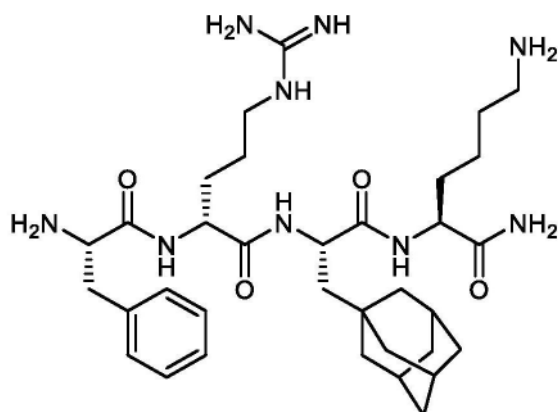




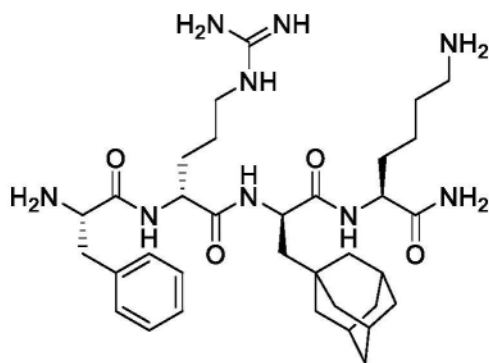




3. 如权利要求2所述的化合物,或其药学上可接受的盐,其中所述化合物是:



4. 如权利要求1所述的化合物,或其药学上可接受的盐,其中所述化合物是:



5. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求1-4中任一项的化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。

6. 权利要求1-4中任一项的化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途,所述药物用于治疗或预防缺血-再灌注损伤。

7. 如权利要求6所述的用途,其中所述缺血-再灌注损伤是心脏缺血-再灌注损伤。

8. 权利要求1-4中任一项的化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途,所述药物用于治疗或预防心肌梗塞。

9. 如权利要求6-8中任一项所述的用途,其中所述药物经口服、局部、全身、静脉内、皮下、腹膜内或肌肉内施用。

线粒体靶向肽

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2018年12月18日提交的美国临时专利申请号62/781,153和2019年8月28日提交的美国临时专利申请号62/892,939的优先权权益。

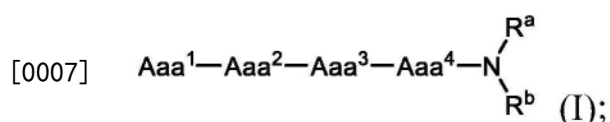
[0003] 发明背景

[0004] SBT-20是具有治疗与线粒体功能障碍相关的疾病的治疗潜力的线粒体靶向肽化合物。由于SBT-20的潜在治疗应用,需要开发具有改善的治疗特征谱(therapeutic profile)的化合物的类似物。

发明内容

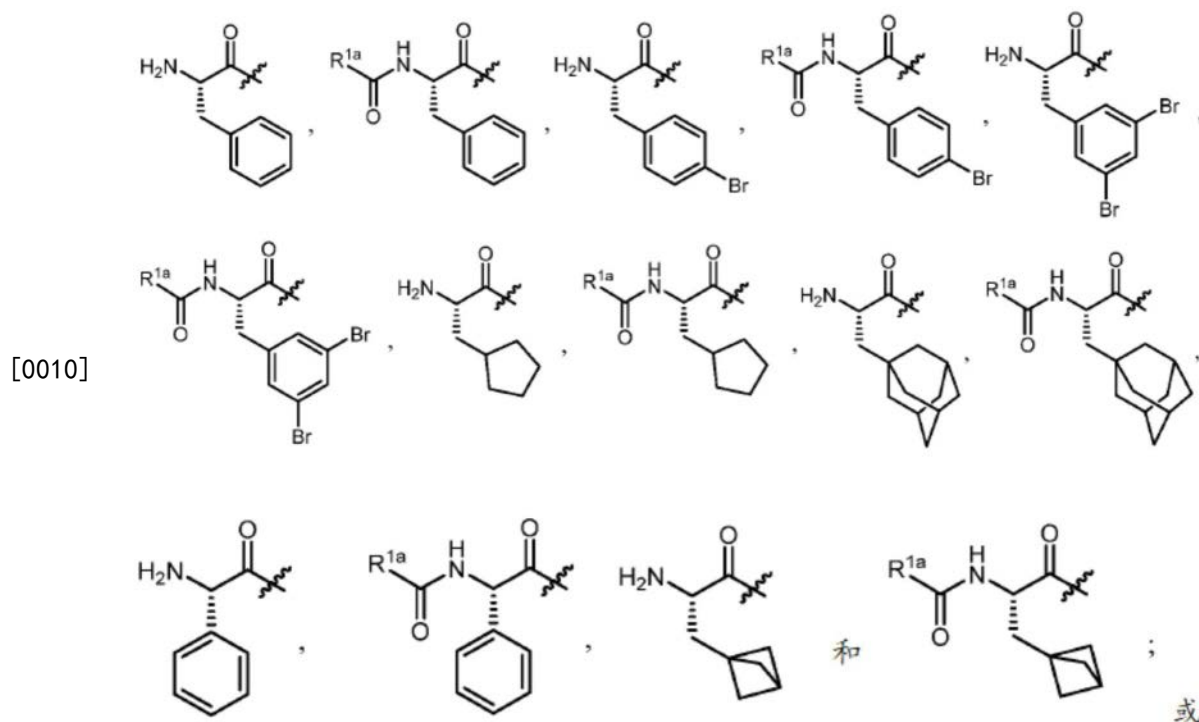
[0005] 本发明的一个方面是SBT-20的类似物。

[0006] 更具体地,本发明提供一种式(I)化合物,或其药学上可接受的盐:



[0008] 其中:

[0009] Aaa¹是选自以下组成的组的氨基酸残基:

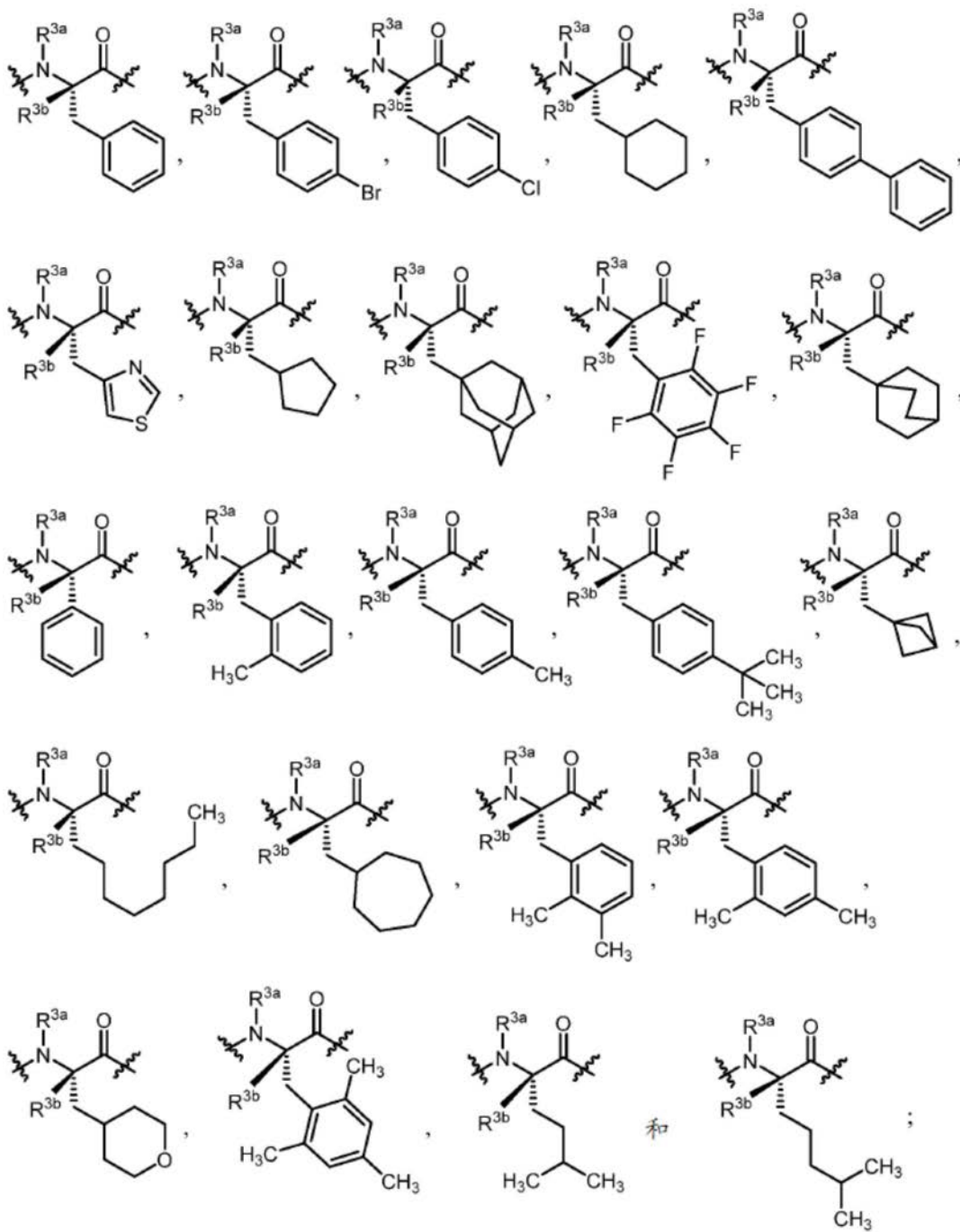


[0011] Aaa¹是 其中R是任选取代的烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、芳烷基或杂芳烷基;且Ra和Rb各自独立地选自H、甲基、乙基、丙基、环丙基、环丁基;或者Ra和Rb

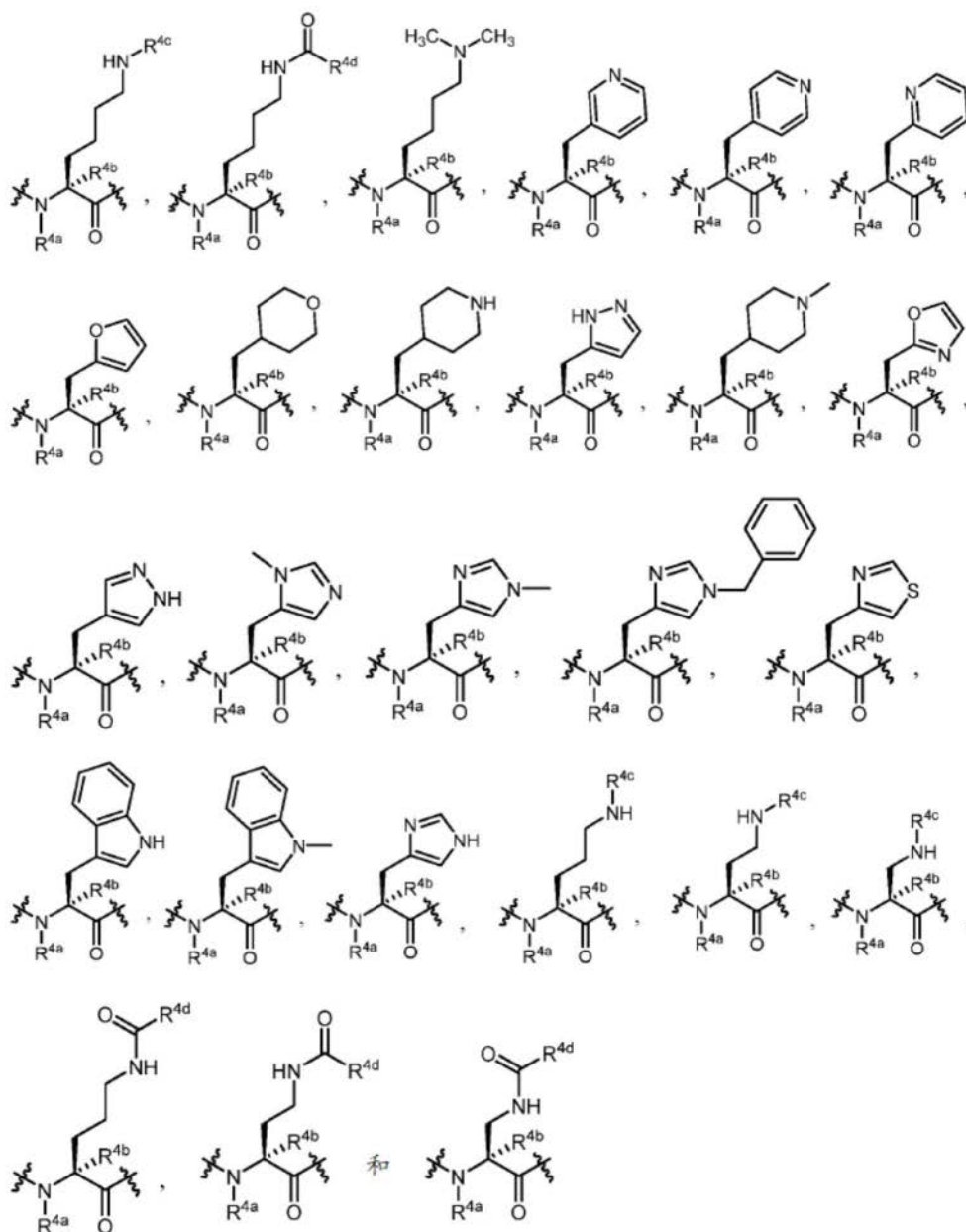
[0012] Aaa²是选自由以下组成的组的氨基酸残基:



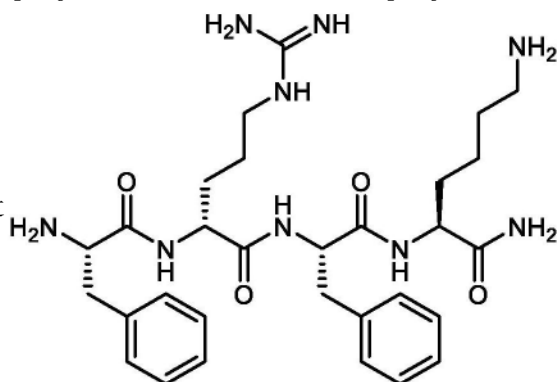
[0015]

[0016] Aaa⁴是选自由以下组成的组的氨基酸残基：

[0017]

[0018] R^{1a} 和 R^{4d} 各自独立地是 (C_1-C_6) 烷基；[0019] R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2e} 、 R^{3a} 、 R^{3b} 、 R^{4a} 、 R^{4b} 、 R^{4c} 各自独立地选自由H和 (C_1-C_6) 烷基组成的组；并且[0020] R^a 、 R^b 、 R^{2c} 和 R^{2d} 各自独立地选自由以下组成的组：H、 (C_1-C_6) 烷基、C(O) ((C_1-C_6) 烷基)、C(O) ((C_1-C_6) 卤代烷基)、C(O)O ((C_1-C_6) 烷基)和C(O)O (芳基 (C_1-C_6) 烷基)；

[0021] 前提是所述式(I)化合物不是



(SBT-20)。

[0022] 本发明的另一方面是一种药物组合物,所述药物组合物包含本发明的化合物和药学上可接受的载体。

[0023] 本发明还提供了治疗或预防缺血-再灌注损伤的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的化合物。

[0024] 本发明还提供了治疗或预防心肌梗塞的方法,所述包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的化合物。

附图说明

[0025] 图1描绘用于本发明中的各种氨基酸残基。

[0026] 图2描绘大鼠透化心脏纤维A/R。参见实施例30。

[0027] 图3描绘白色坏死组织面积占风险面积的% (分析中仅使用白色坏死组织的面积)和梗塞面积(%),平均值±SD。参见实施例31。

[0028] 图4描绘大鼠心肌梗塞(MI)模型中的剂量反应,平均值±SD。参见实施例32。

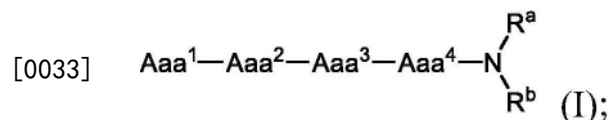
[0029] 图5描绘血浆肌酐,保护%,平均值±SEM。参见实施例33。

[0030] 图6描绘BUN,保护%,平均值±SEM。参见实施例33。

具体实施方式

[0031] SBT-20 (Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂)是具有治疗缺血-再灌注损伤(例如,心脏缺血-再灌注损伤)和心肌梗塞的治疗潜力的线粒体靶向化合物。这种化合物的类似物可具有改善的治疗特征谱,包括改善的代谢性质、选择性或效力。

[0032] 因此,在某些实施方案中,本发明提供一种式(I)化合物,或其药学上可接受的盐:

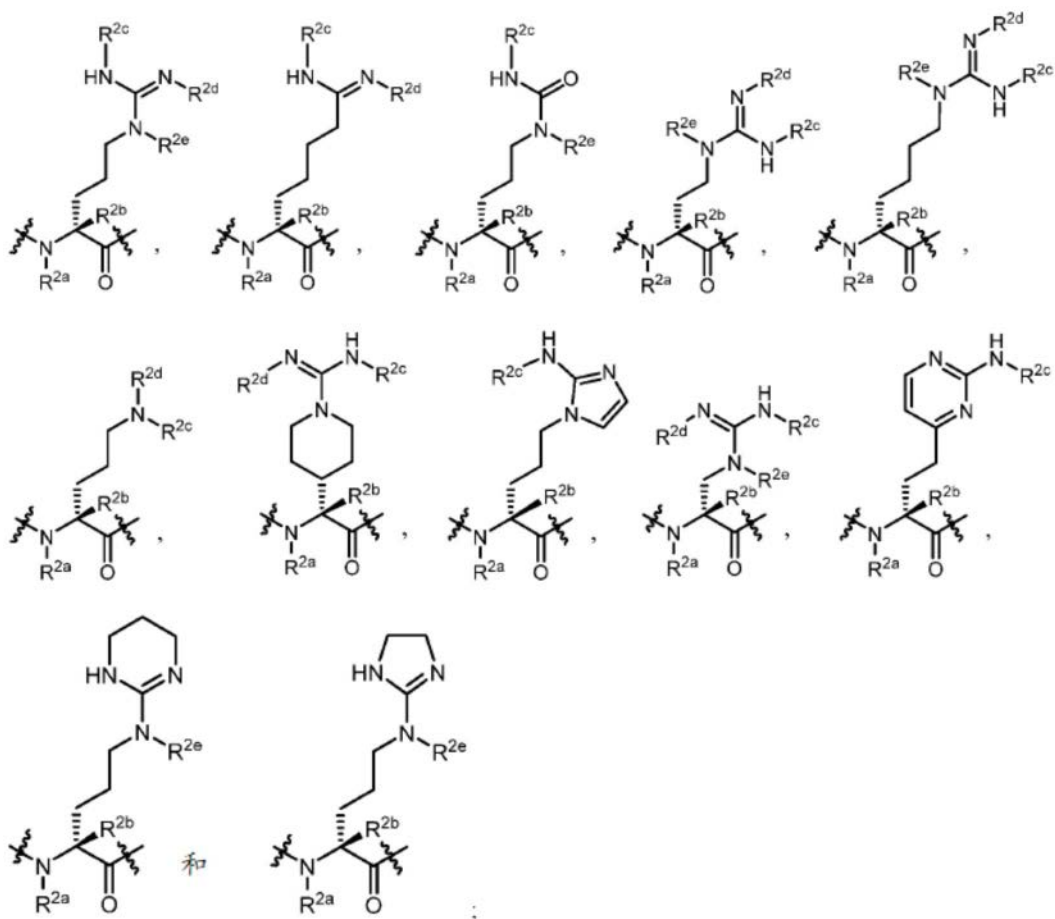


[0034] 其中:

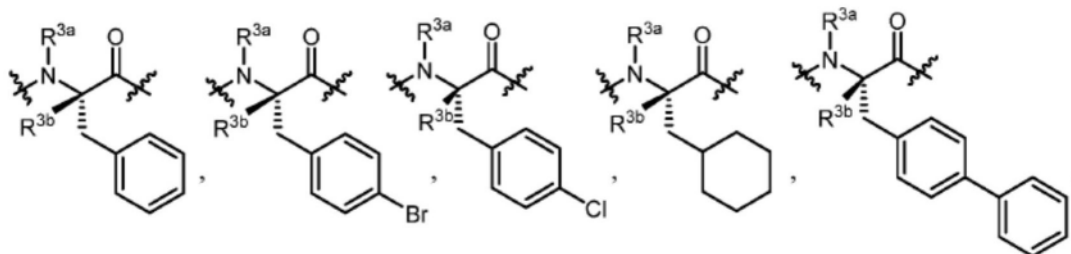
[0035] Aaa¹是选自以下组成的组的氨基酸残基:

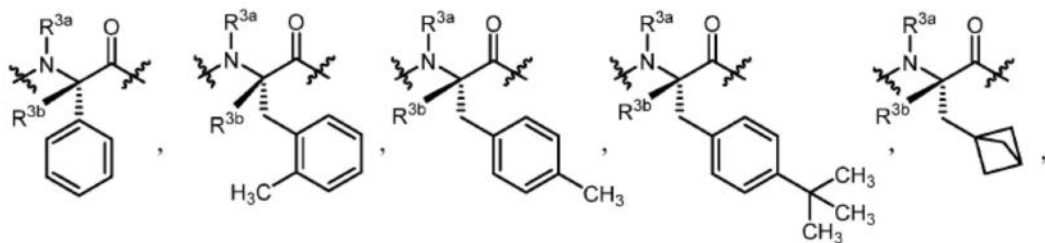
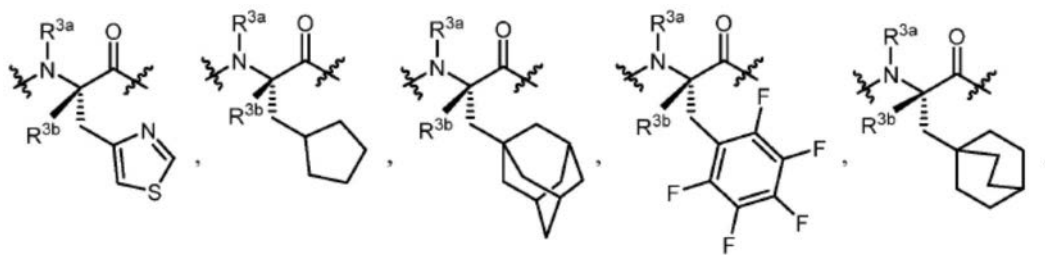


[0039]

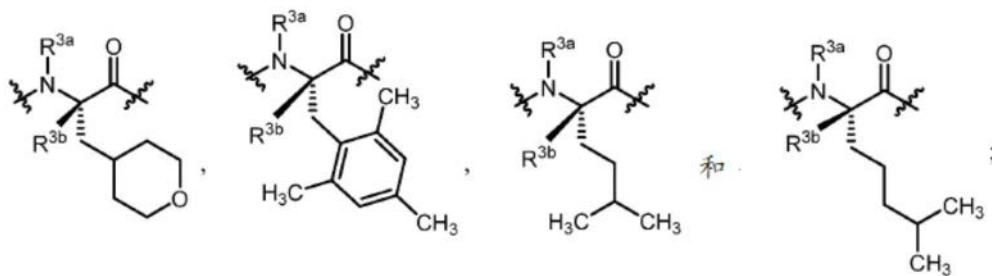
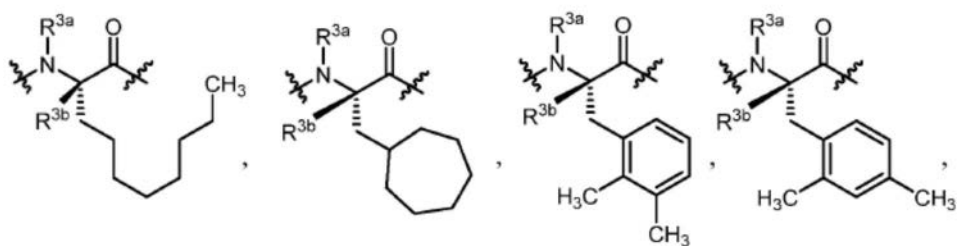
[0040] Aaa³是选自由以下组成的组的氨基酸残基:

[0041]

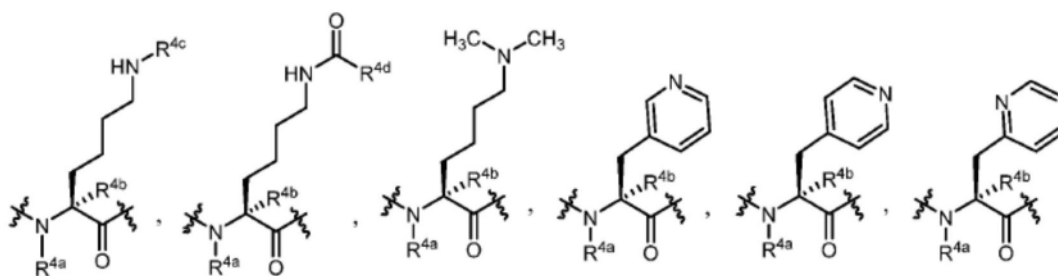


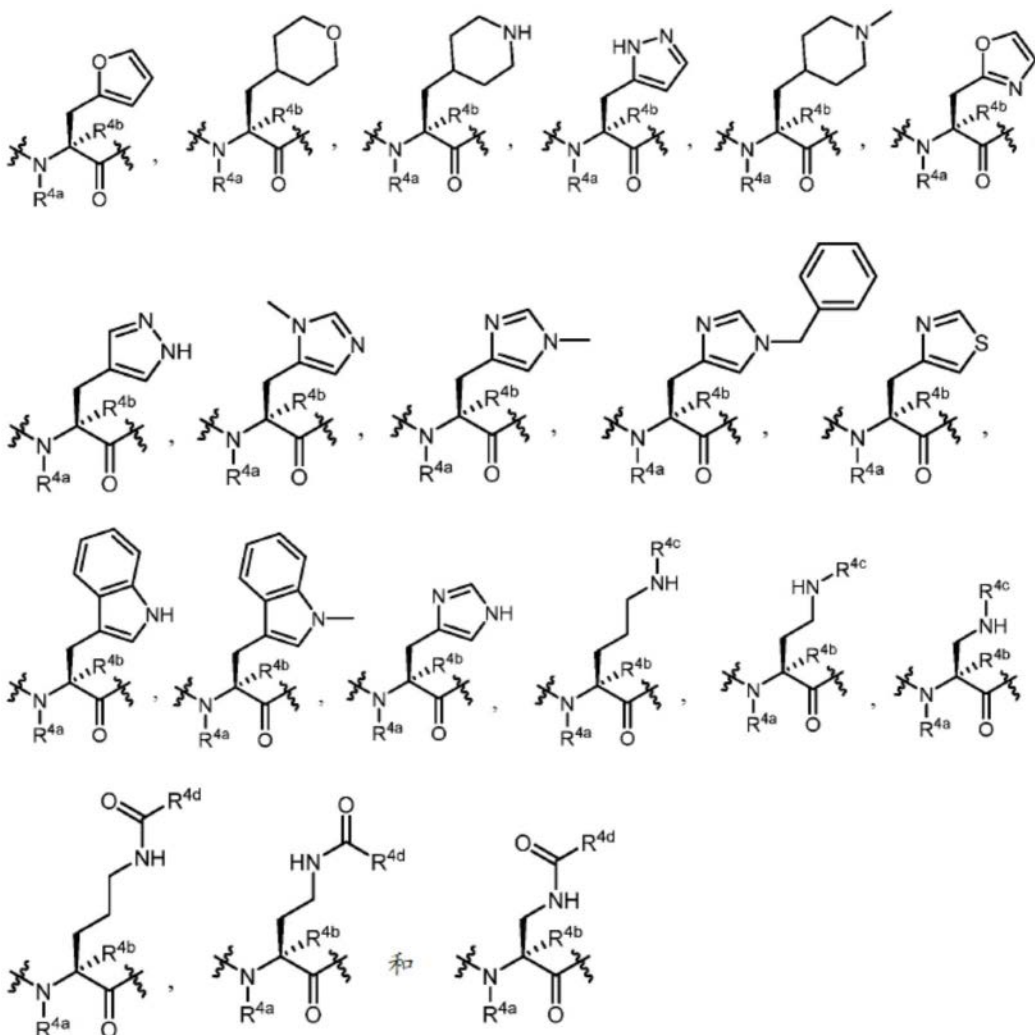


[0042]

[0043] Aaa⁴是选自由以下组成的组的氨基酸残基:

[0044]

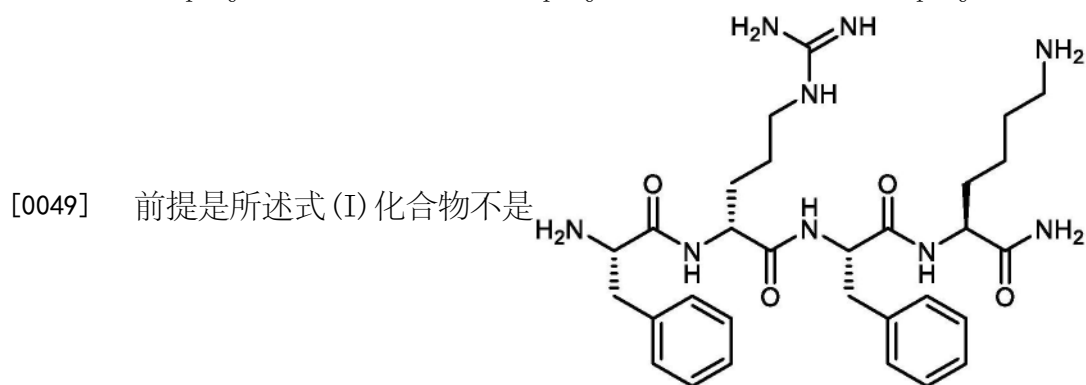




[0046] R^{1a} 和 R^{4d} 各自独立地是 (C_1-C_6) 烷基；

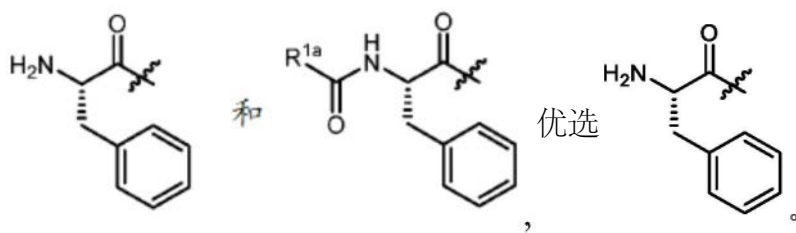
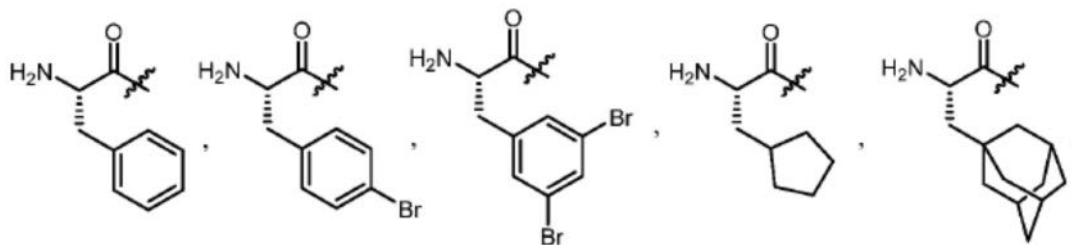
[0047] R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2e} 、 R^{3a} 、 R^{3b} 、 R^{4a} 、 R^{4b} 、 R^{4c} 各自独立地选自由H和 (C_1-C_6) 烷基组成的组；并且

[0048] R^a 、 R^b 、 R^{2c} 和 R^{2d} 各自独立地选自由以下组成的组：H、 (C_1-C_6) 烷基、 $C(=O)$ (C_1-C_6) 烷基、 $C(=O)$ (C_1-C_6) 卤代烷基、 $C(=O)O$ (C_1-C_6) 烷基和 $C(=O)O$ (芳基 (C_1-C_6) 烷基)；并且

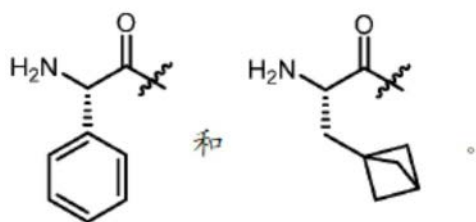


[0050] 在某些实施方案中, Aaa^1 选自由以下组成的组：

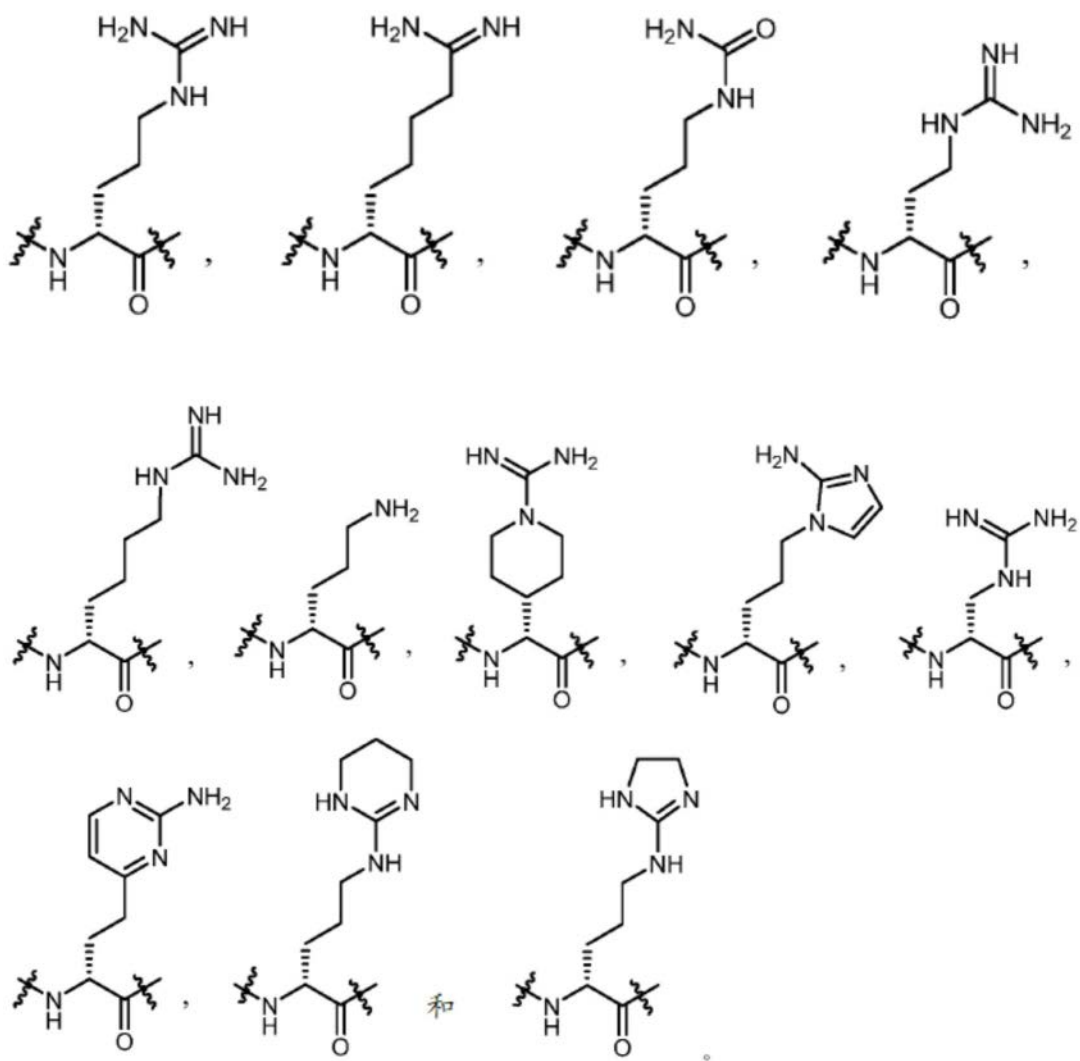
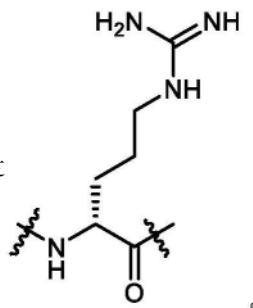
[0051]

[0052] 在其它实施方案中, Aaa¹是选自由以下组成的组的氨基酸残基:

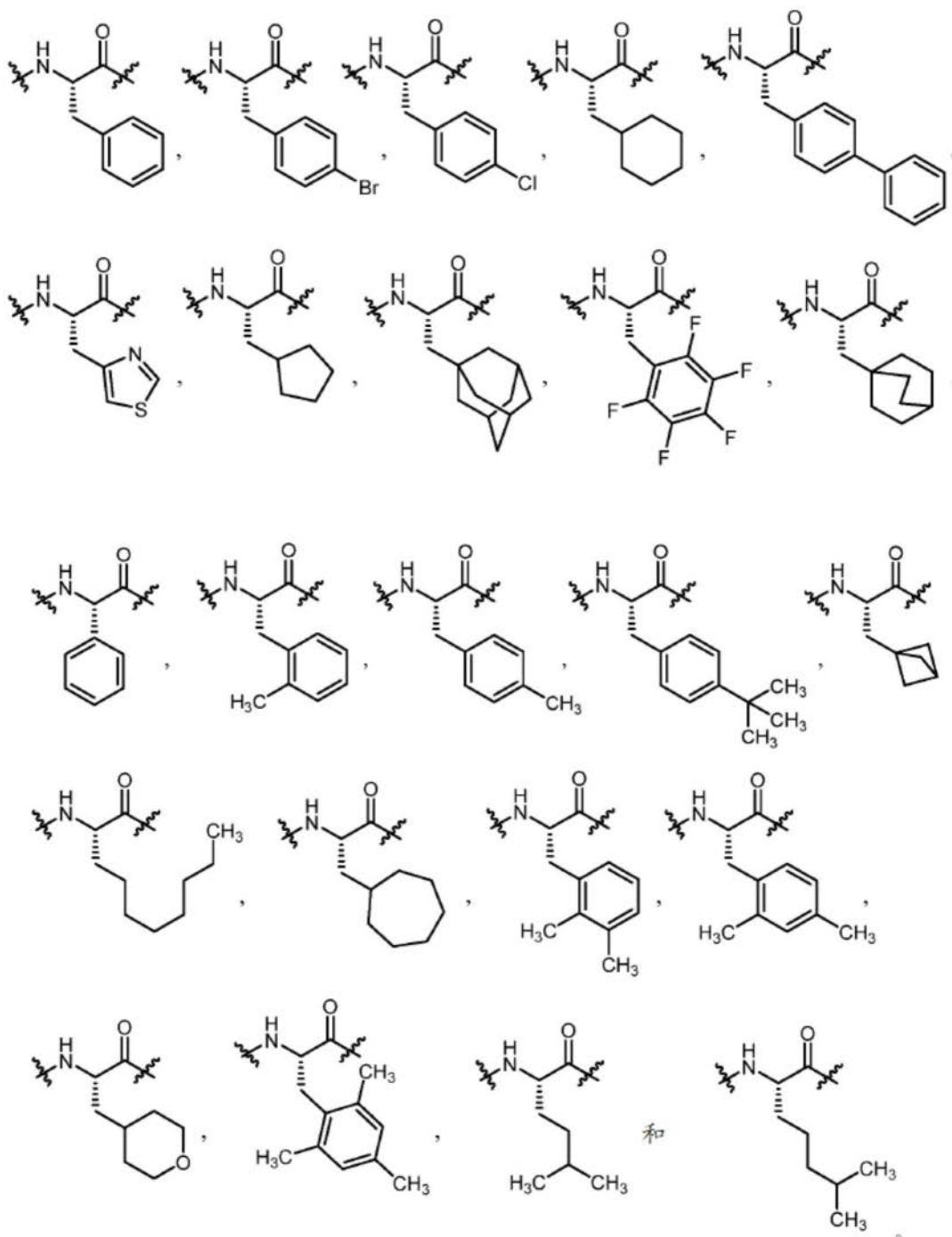
[0053]

[0054] 在某些实施方案中, Aaa²是选自由以下组成的组的氨基酸残基:

[0055]

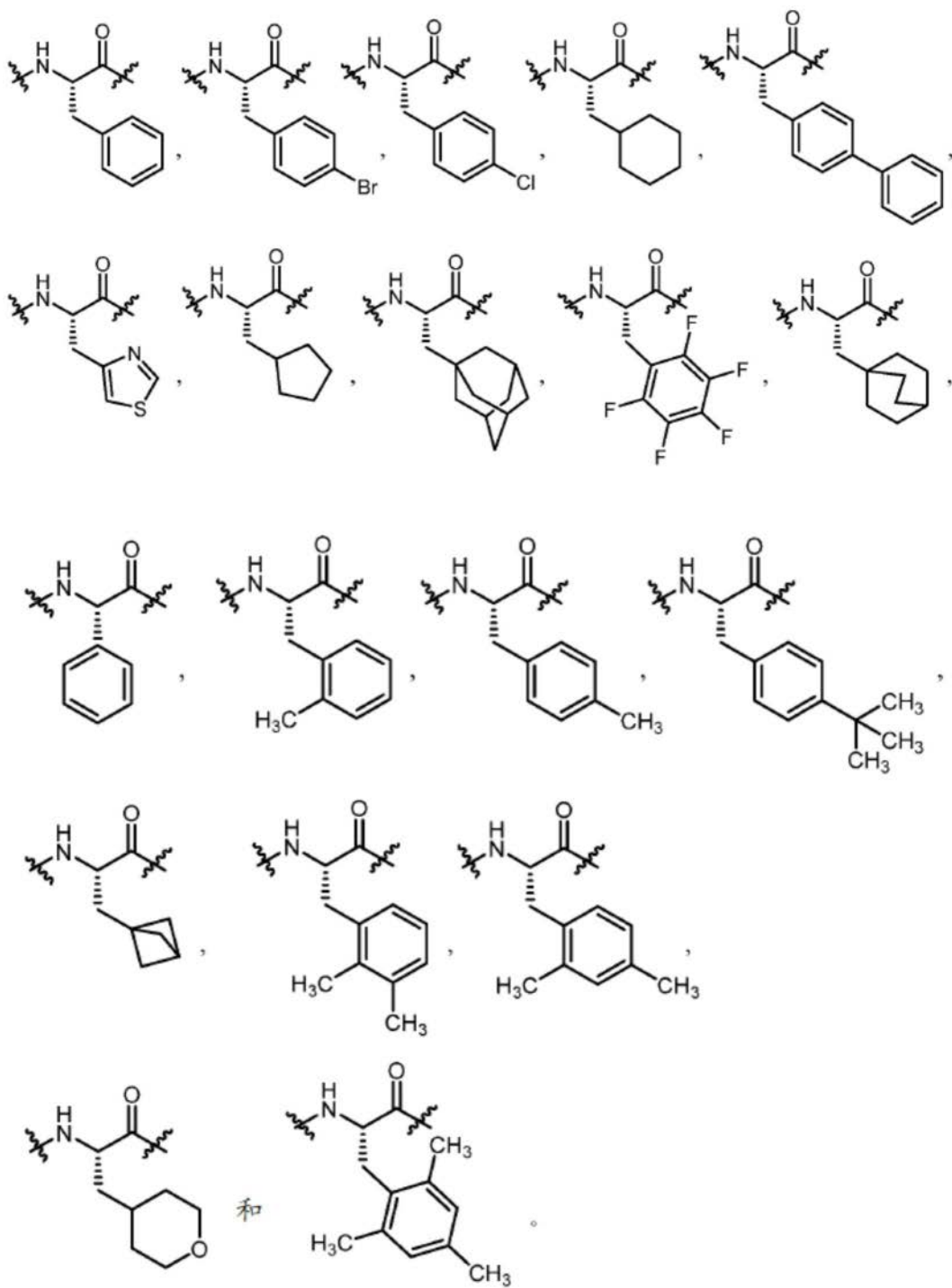
[0056] 在一些优选的实施方案中, Aaa²是[0057] 在某些实施方案中, Aaa³选自由以下组成的组:

[0058]

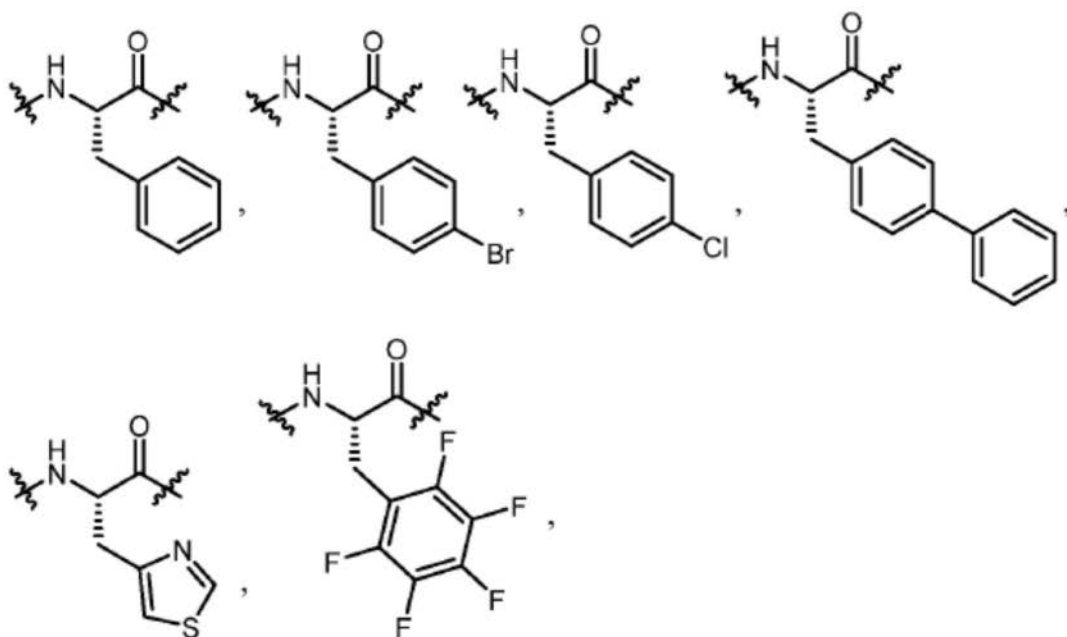


[0059] 在某些实施方案中, Aaa³选自由以下组成的组:

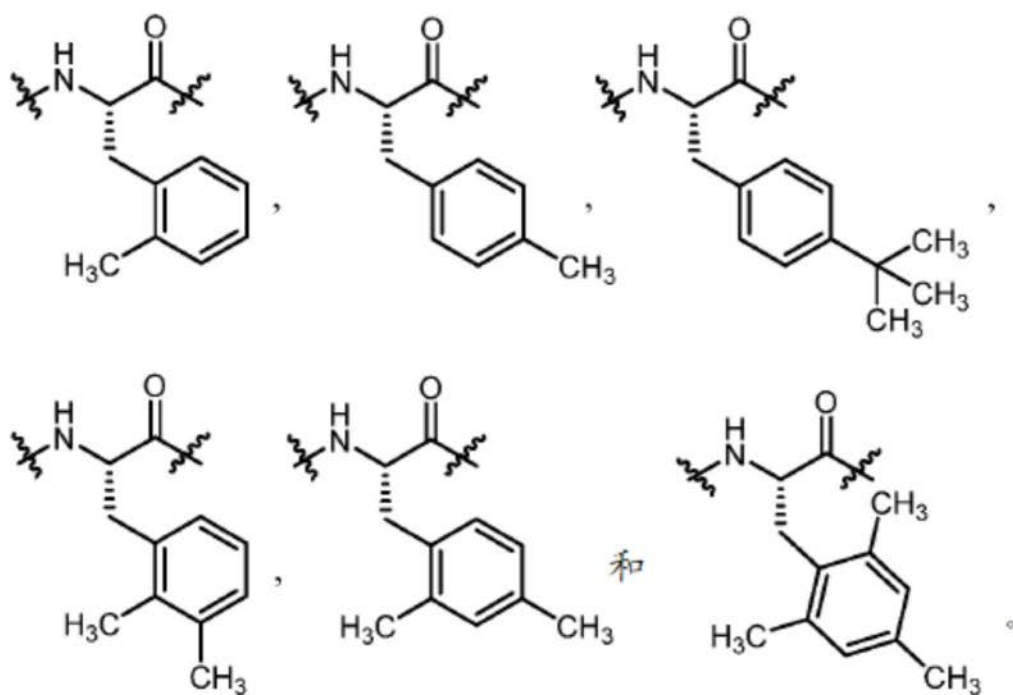
[0060]



[0061] 在某些其它实施方案中, Aaa³选自由以下组成的组:

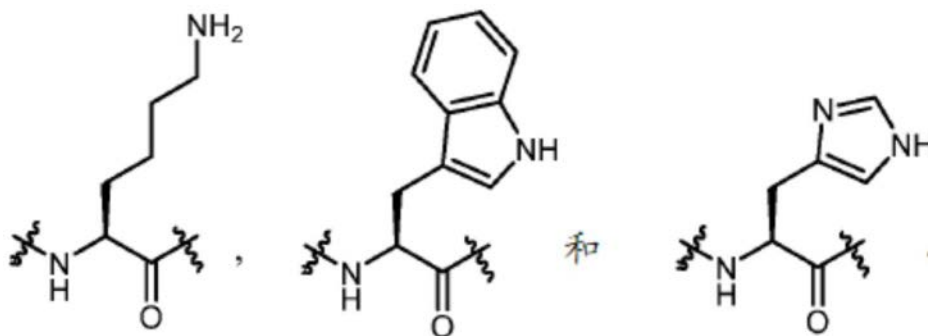


[0062]

[0063] 在某些实施方案中, Aaa⁴选自由以下组成的组:

[0067] 在某些实施方案中, Aaa⁴选自由以下组成的组:

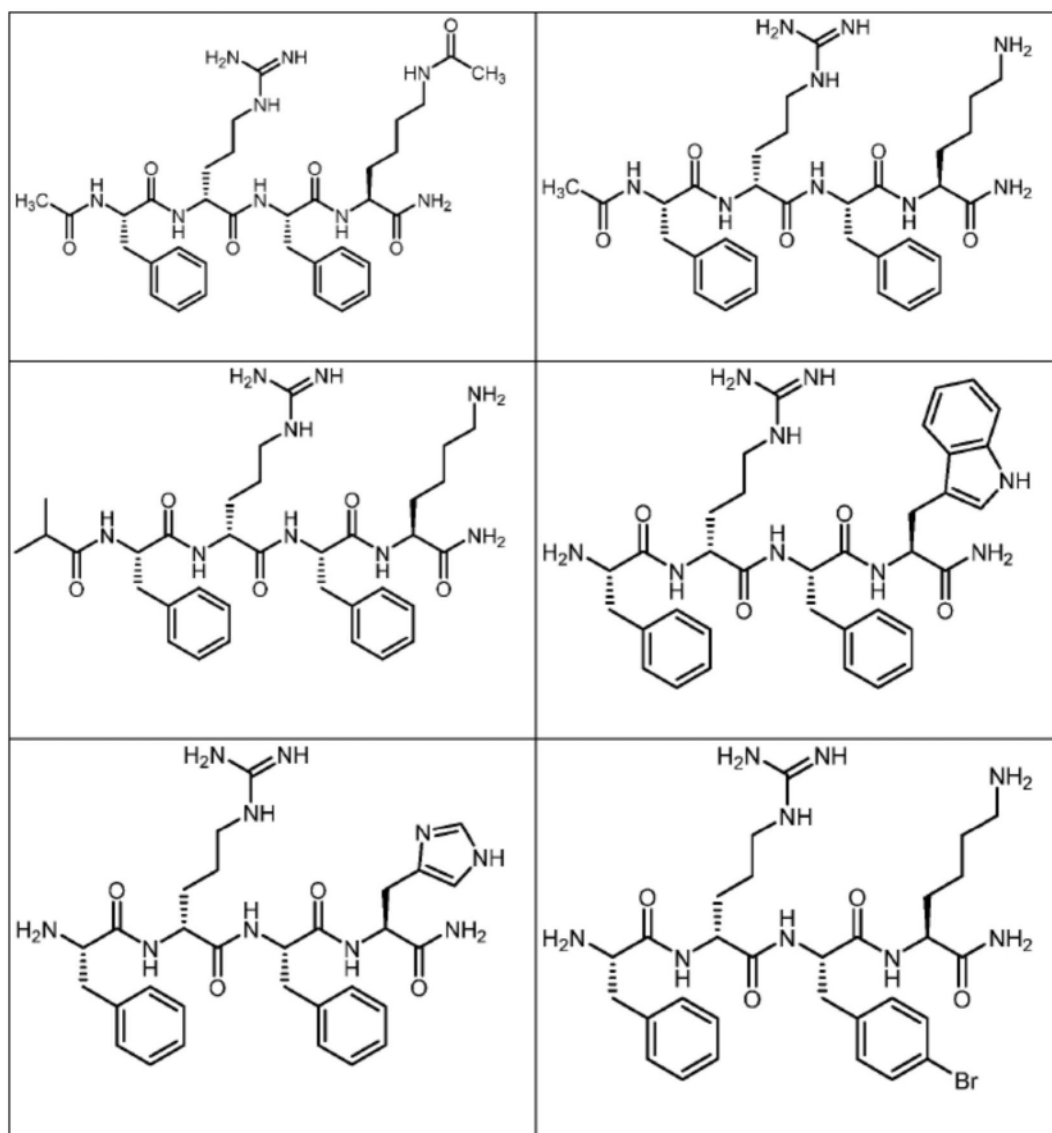
[0068]



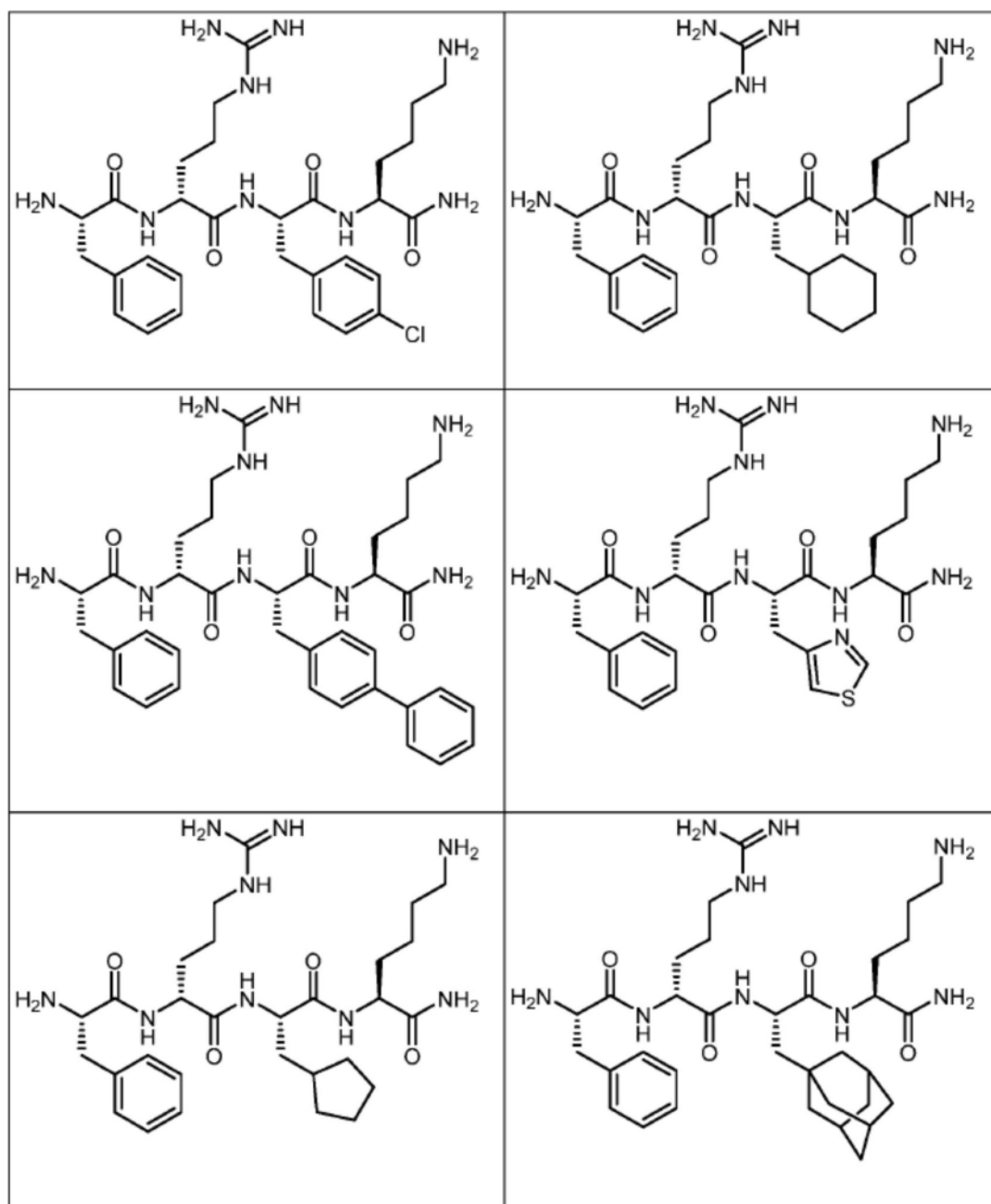
[0069] 在某些实施方案中, R^a和R^b各自独立地是H或甲基, 优选H。

[0070] 在一些实施方案中, 所述式(I)化合物选自以下表:

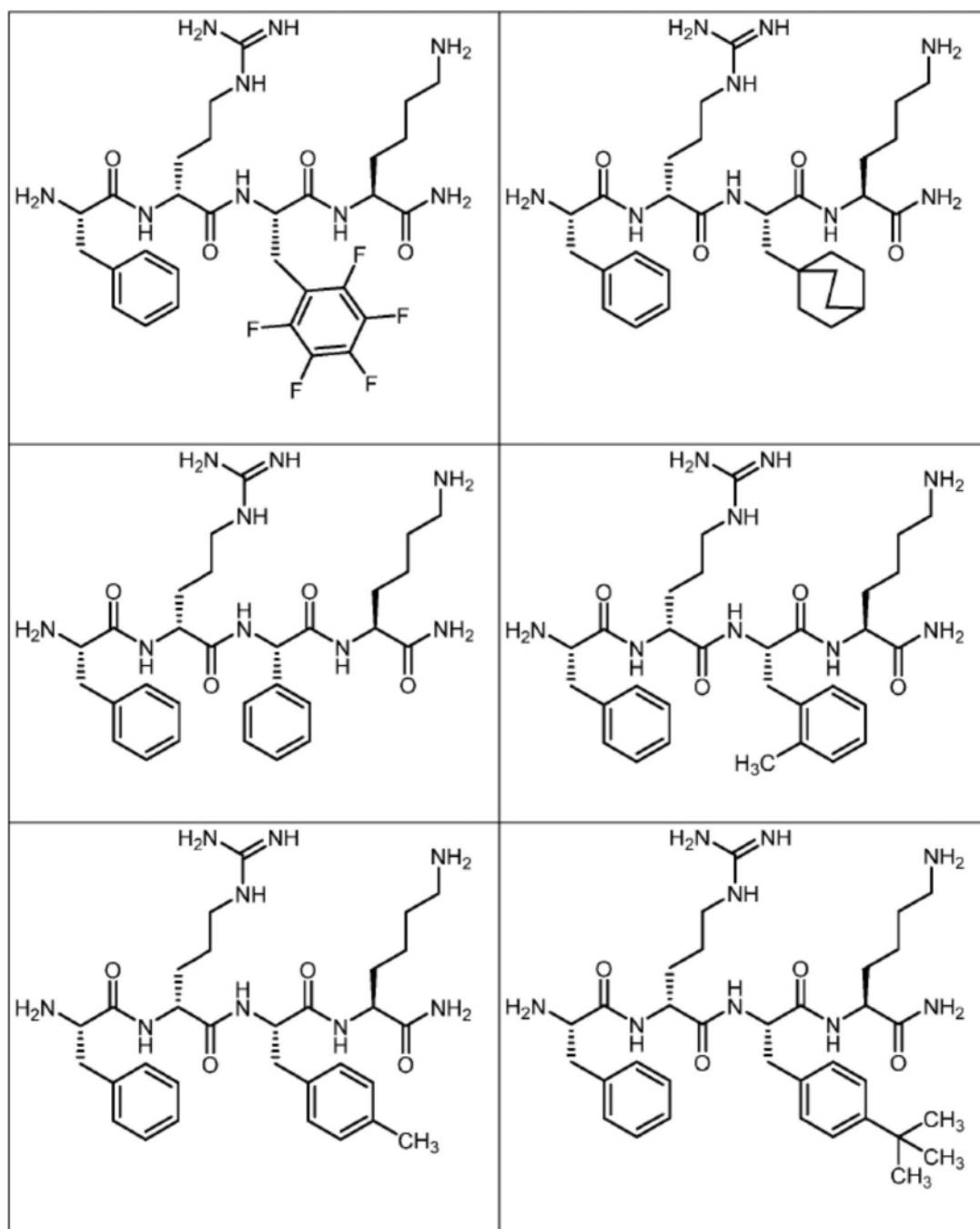
[0071]



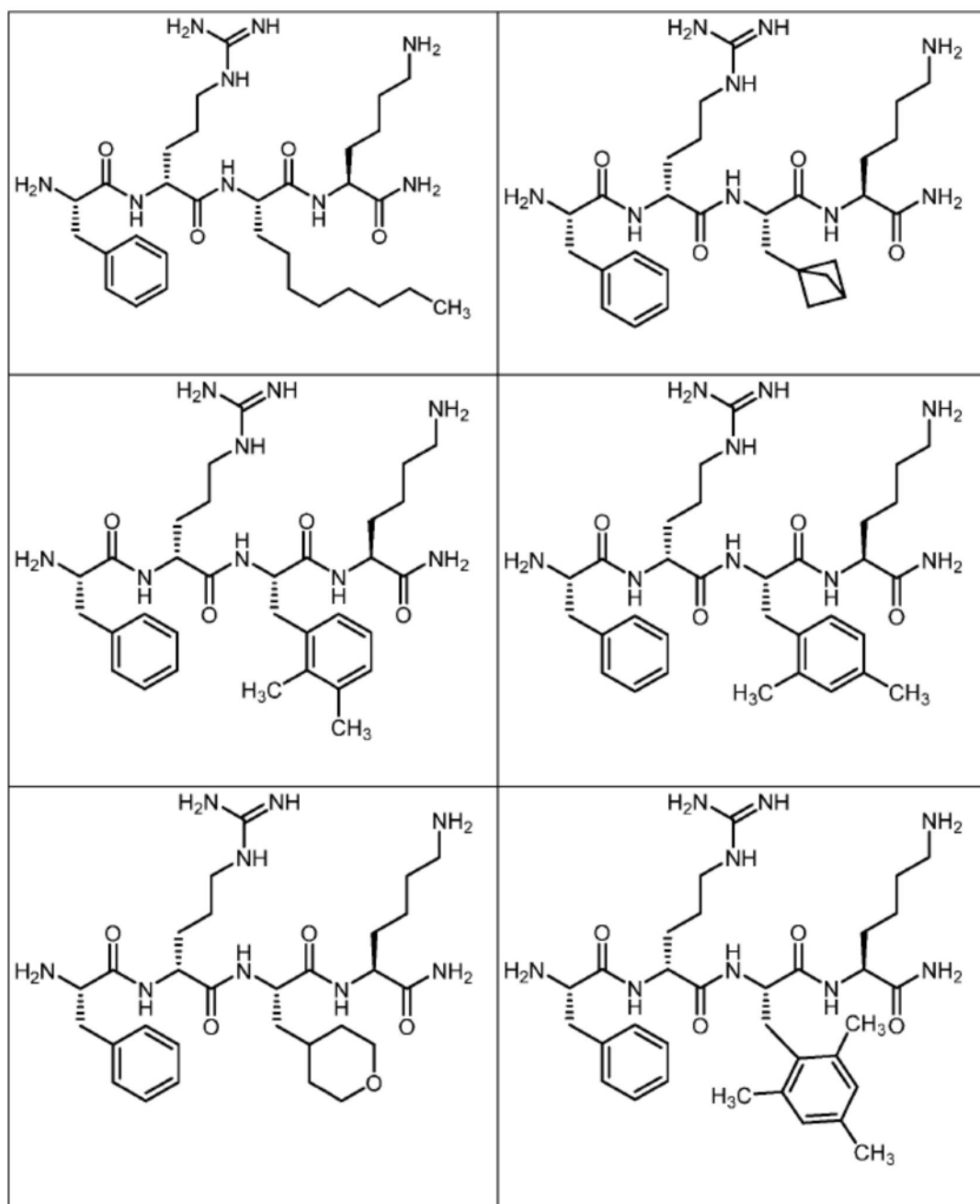
[0072]



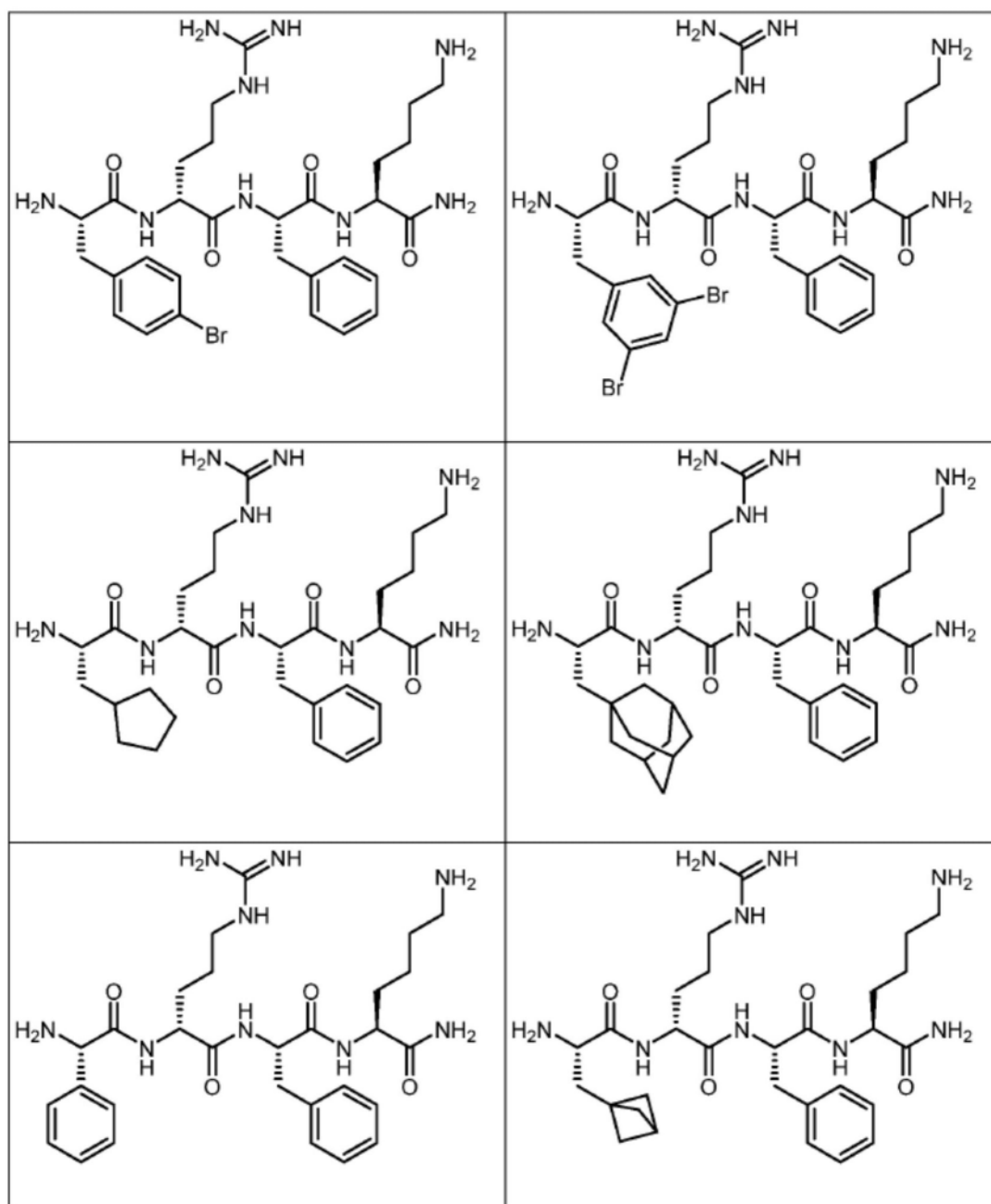
[0073]



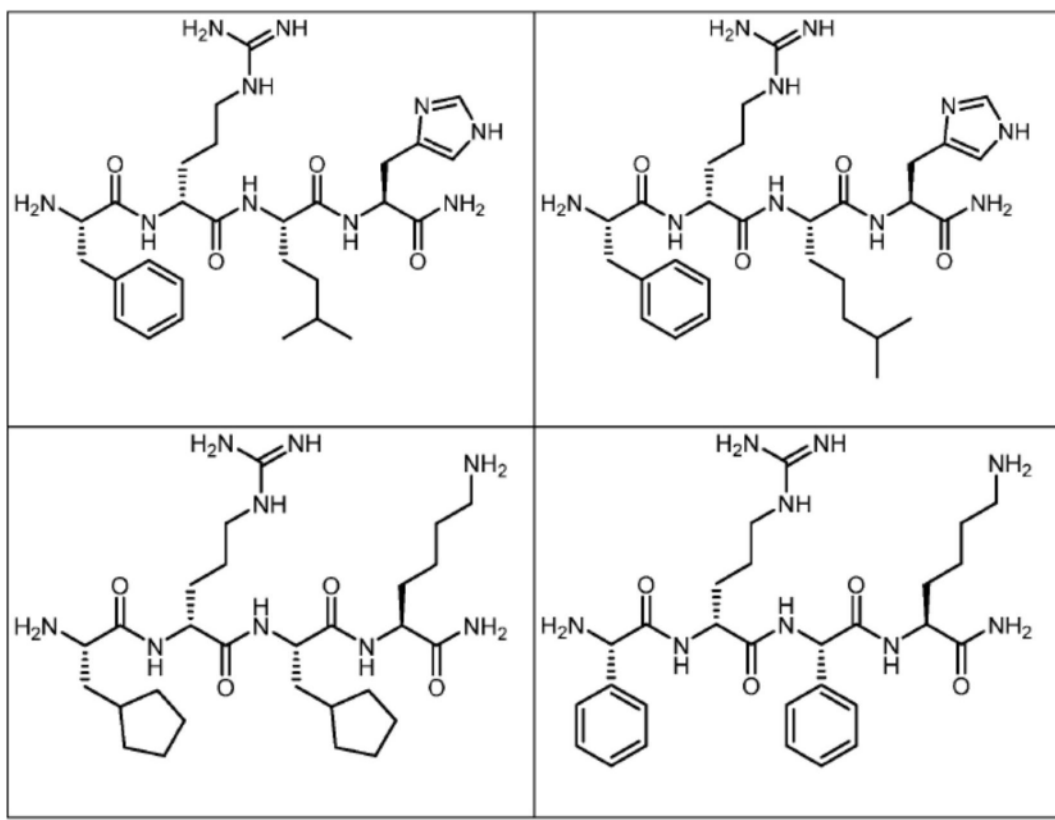
[0074]



[0075]



[0076]



[0077] 肽合成

[0078] 本发明的肽化合物可使用肽合成方法(如常规液相肽合成或固相肽合成)或通过借助于自动化肽合成仪的肽合成来制备(Kelley等人,Genetics Engineering Principles and Methods,Setlow,J.K.编辑,Plenum Press NY.(1990)第12卷,第1至19页;Stewart等人,Solid-Phase Peptide Synthesis(1989)W.H.;Houghten,Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1985)82:p.5132)。可通过常规方法,例如色谱法(如凝胶过滤色谱法、离子交换柱色谱法、亲和色谱法、反相柱色谱法和HPLC)、硫酸铵分级分离、超滤和免疫吸附来收集或纯化由此产生的肽。

[0079] 在固相肽合成中,通常从氨基酸链的羧基侧(C末端)至氨基侧(N末端)合成肽。在某些实施方案中,通常经由酯或酰胺键以及任选地经由连接基团,通过氨基酸的羧基将氨基保护的氨基酸共价结合至固体载体材料。可使用偶联试剂使氨基脱保护并与第二氨基保护的氨基酸的羧基反应(即“偶联”),从而产生与固体载体结合的二肽。可重复这些步骤(即脱保护、偶联)以形成所需的肽链。一旦所需的肽链完成,所述肽就可从固体载体裂解。

[0080] 在某些实施方案中,在氨基酸残基的氨基上使用的保护基团包括9-苄基甲基氧基羰基(Fmoc)和叔丁氧基羰基(Boc)。用碱从氨基末端除去Fmoc基团,而用酸除去Boc基团。在替代实施方案中,氨基保护基团可以是甲酰基;丙烯酰基(Acr);苯甲酰基(Bz);乙酰基(Ac);三氟乙酰基;芳烷氧基羰基类型的取代的或未取代的基团,如苄氧基羰基(Z)、对氯苄氧基羰基、对溴苄氧基羰基、对硝基苄氧基羰基、对甲氧基苄氧基羰基、二苯甲基氧基羰基、2(对联苯基)异丙氧基羰基、2-(3,5-二甲氧基苯基)异丙氧基羰基、对苯基偶氮苄氧基羰基、三苯基磷酰基乙基氧基羰基或9-苄基甲基氧基羰基(Fmoc);烷氧基羰基类型的取代的或未取代的基团,如叔丁氧基羰基(BOC)、叔戊基氧基羰基、二异丙基甲基氧基羰基、异丙氧

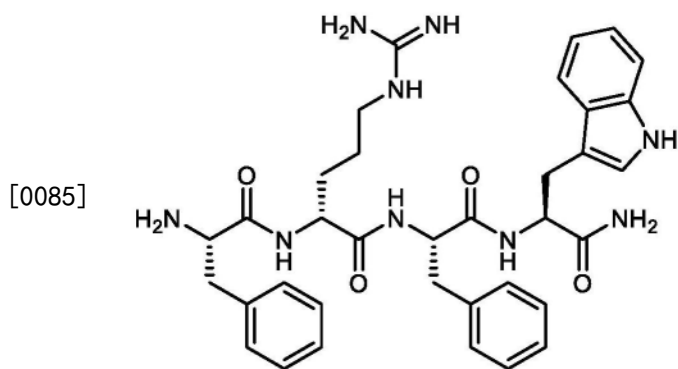
基羰基、乙氧基羰基、烯丙氧基羰基、2-甲基磺酰基乙基氧基羰基或2,2,2-三氯乙基氧基羰基;环烷氧基羰基类型的基团,如环戊基氧基羰基、环己基氧基羰基、金刚烷基氧基羰基或异冰片基氧基羰基;以及含杂原子的基团,如苯磺酰基、对甲苯磺酰基、均三甲苯磺酰基、甲氧基三甲基苯基磺酰基、2-硝基苯磺酰基、2-硝基苯亚磺酰基、4-硝基苯磺酰基或4-硝基苯亚磺酰基。

[0081] 许多氨基酸在侧链中携带反应性官能团。在某些实施方案中,保护此类官能团以防止官能团与进入的氨基酸反应。与这些官能团一起使用的保护基团必须对肽合成的条件稳定,但是可在从固体载体裂解肽之前、之后或同时除去。

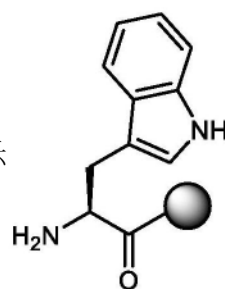
[0082] 在某些实施方案中,用于固相肽合成方法中的固体载体材料是凝胶型载体,如聚苯乙烯、聚丙烯酰胺或聚乙二醇。或者,可将诸如多孔玻璃、纤维素纤维或聚苯乙烯的材料在其表面上官能化以提供用于肽合成的固体载体。

[0083] 可用于本文所述的固相肽合成中的偶联试剂通常是碳二亚胺试剂。碳二亚胺试剂的实例包括但不限于N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)、N-环己基-N'-异丙基碳二亚胺(CIC)、N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)、N-叔丁基-N'-甲基碳二亚胺(BMC)、N-叔丁基-N'-乙基碳二亚胺(BEC)、双[[4-(2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烯基)]-甲基]碳二亚胺(BDDC)和N,N-二环戊基碳二亚胺。DCC是优选的偶联试剂。

[0084] 在某些实施方案中,根据方案1中描绘的固相合成,以线性顺序方式合成本发明的化合物,例如下图所示的化合物:



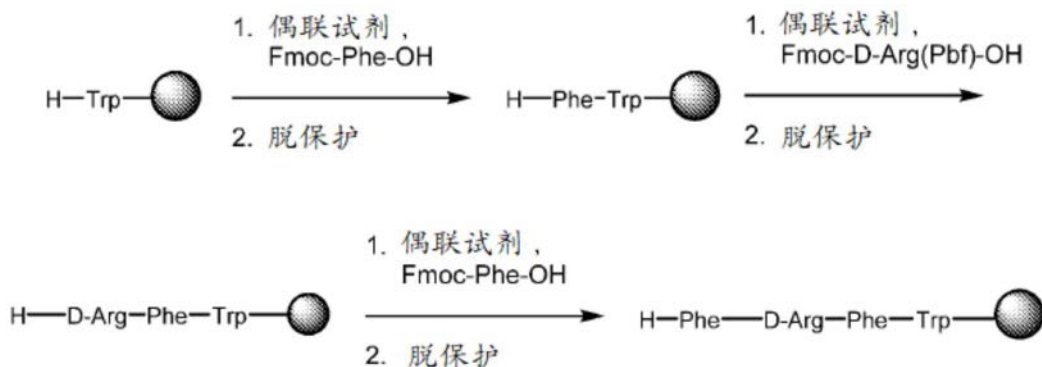
[0086] 作为参考,在以下方案中, H-Trp- 表示



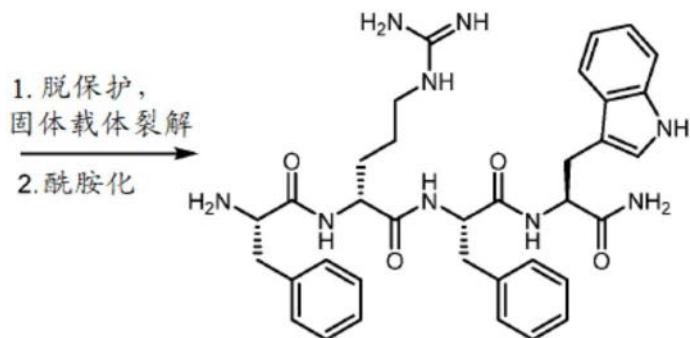
其中  表示固体

载体和任意的连接基团。

[0087] 方案1

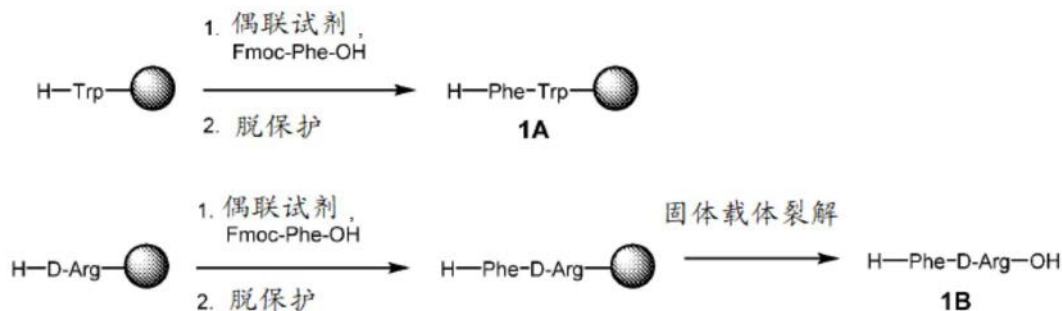


[0088]

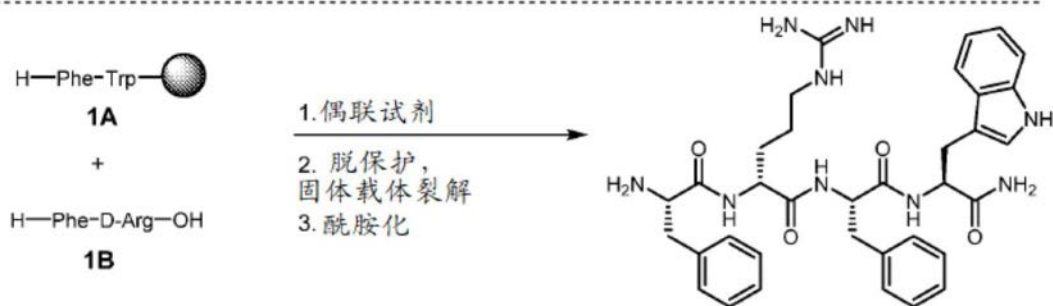


[0089] 或者,本发明的化合物可例如根据方案2以汇集方式合成:

[0090] 方案2

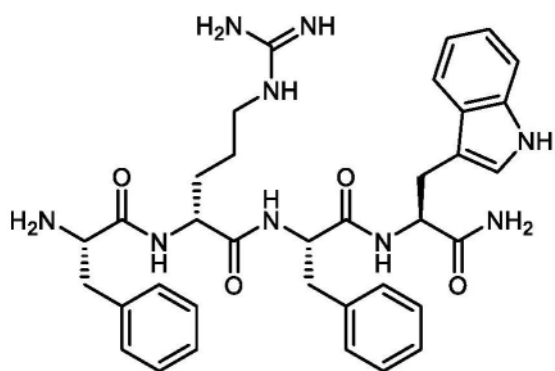


[0091]

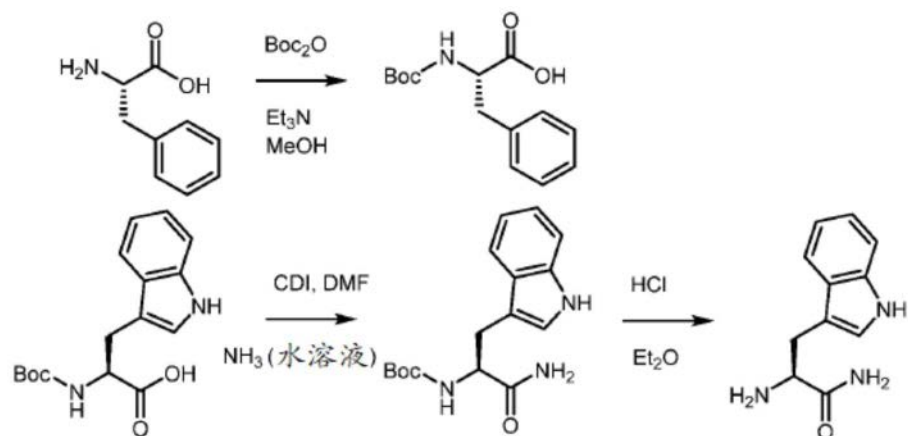


[0092] 本发明的化合物也可根据常规液相肽合成途径来合成。例如,下图所示的化合物可在汇集液相合成中合成,如方案3所描绘。

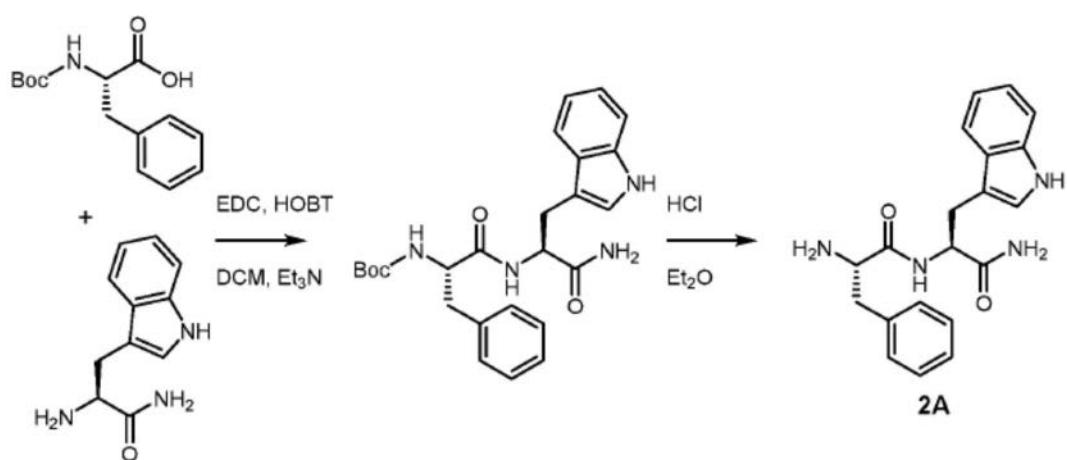
[0093]



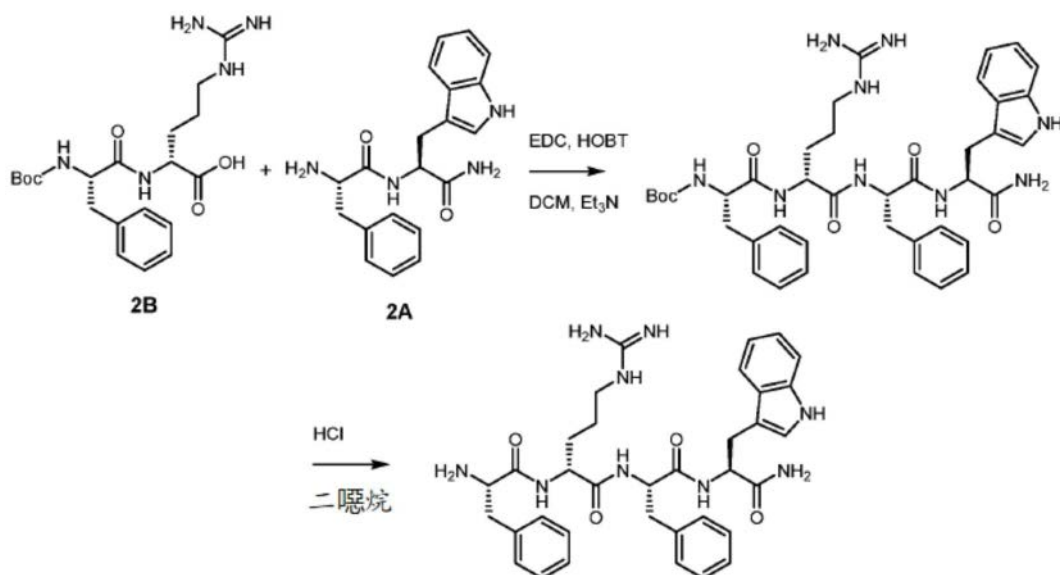
[0094] 方案3



[0095]

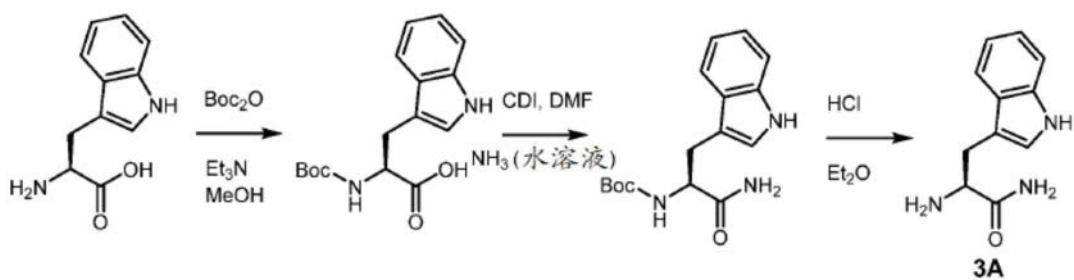


[0096]

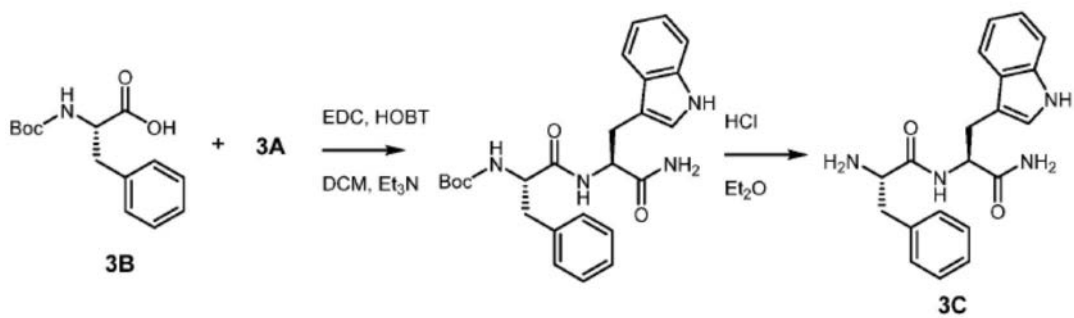


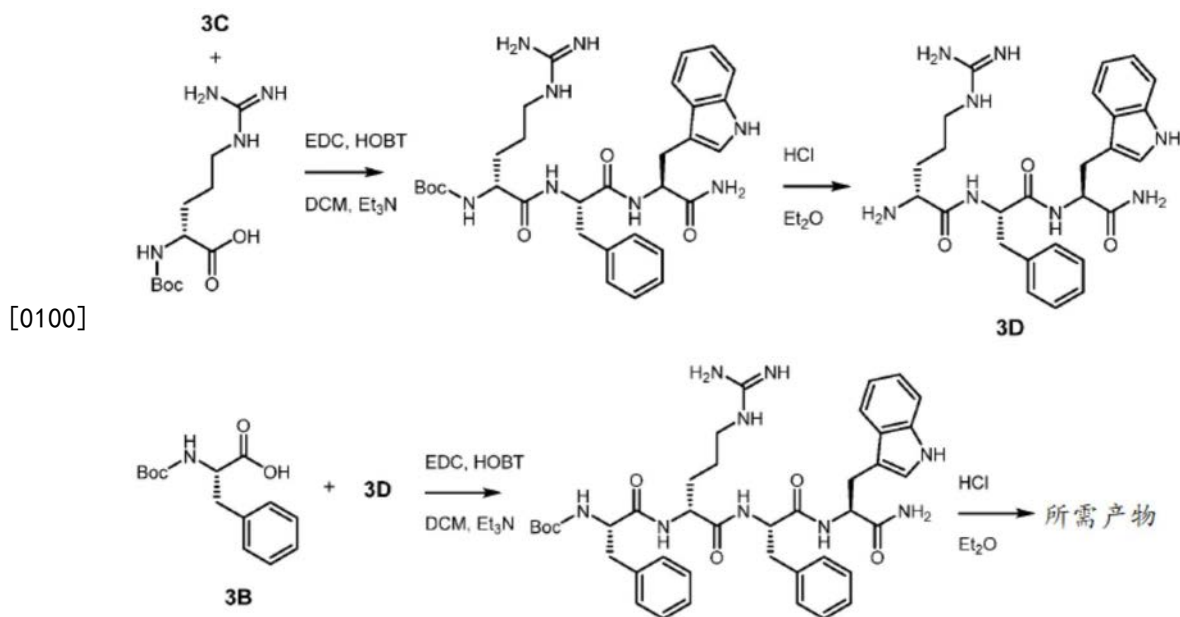
[0097] 在另一个示例性实施方案中,本发明的化合物通过方案4中描绘的线性顺序液相合成来制备。

[0098] 方案4



[0099]





盐,包括药学上可接受的盐。

[0109] 冠词“一个/种(a/an)”在本文中用来指代冠词的语法对象中的一个或多个(即,“至少一个”)。通过举例,“一个元件”意指一个元件或多个元件。

[0110] 如本文所用,术语“烷基”是本领域的术语,并且是指饱和脂族基团,包括直链烷基、支链烷基、环烷基(脂环族)基团、烷基取代的环烷基和环烷基取代的烷基。在某些实施方案中,直链或支链烷基在其主链中具有约30个或更少碳原子(例如,对于直链 C_1 - C_{30} ,对于支链 C_3 - C_{30}),以及可替代地约20个或更少、10个或更少(即, C_1 - C_{10})或6个或更少(即, C_1 - C_6)。烷基的代表性实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基和正己基。

[0111] 如本文所用,“芳基”(有时称为“Ar”)是指单环或多环(例如,双环或三环) $4n+2$ 芳族环系统(例如,具有在环阵列中共享的6、10、或14个 π 电子)的基团,在所述芳族环系统中具有6-14个环碳原子和零个杂原子(“ C_6 - C_{14} 芳基”)。在一些实施方案中,芳基具有6个环碳原子(“ C_6 芳基”;例如,苯基)。在一些实施方案中,芳基具有10个环碳原子(“ C_{10} 芳基”;例如,萘基,如1-萘基和2-萘基)。在一些实施方案中,芳基具有14个环碳原子(“ C_{14} 芳基”;例如,蒽基)。芳基可被描述为例如 C_6 - C_{10} 元芳基,其中术语“元”是指所述部分内的非氢环原子。芳基包括苯基、萘基、茛基和四氢萘基。芳基的每个实例可以是独立地任选取代的,即,未取代的(“未取代的芳基”)或被一个或多个取代基,例如,例如1至5个取代基、1至4个取代基、1至3个取代基、1至2个取代基或仅1个取代基取代的(“取代的芳基”)。芳族环可在一个或多个环位置被一个或多个取代基取代,所述取代基如卤素、叠氮化物、烷基、芳烷基、烯基、炔基、环烷基、羟基、烷氧基、氨基、硝基、巯基、亚氨基、酰胺基、膦酸酯根、亚膦酸根、羰基、羧基、甲硅烷基、醚、烷硫基、磺酰基、磺酰胺基、酮、醛、酯、杂环基、芳族或杂芳族部分、氟烷基(如三氟甲基)、氰基或类似取代基。例如,在某些实施方案中,芳基可以是未取代的 C_5 - C_{12} 芳基,并且在某些实施方案中,芳基可以是取代的 C_5 - C_{10} 芳基。

[0112] 如本文所用,术语“杂芳基”是指包含1、2、3或4个杂原子的芳族杂环的基团,所述杂原子彼此独立地选自氮、硫和氧。如本文所用,术语“杂芳基”是指可被取代或未被取代的基团。杂芳基可稠合至一个或两个环,如环烷基、芳基或第二杂芳基环。杂芳基与分子的连接点可在杂芳基、环烷基、杂环烷基或芳基环上,并且杂芳基可通过碳或杂原子连接。杂芳基的实例包括咪唑基、呋喃基、吡咯基、噻吩基、噻唑基、异噻唑基、异噻唑基、噻二唑基、噻二唑基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基、喹啉基、异喹啉基、吲唑基、苯并噻唑基、苯并异噻唑基、苯并呋喃基、苯并噻唑基、吲嗪基、咪唑并吡啶基、吡唑基、三唑基、噻唑基、四唑基、苯并咪唑基、苯并异噻唑基、苯并噻二唑基、苯并噻二唑基、吲哚基、四氢吲哚基、氮杂吲哚基、咪唑并吡啶基、喹啉基、嘌呤基、吡咯并[2,3]嘧啶基、吡唑并[3,4]嘧啶基或苯并(b)噻吩基,其各自可任选地被取代。芳族杂环可在一个或多个环位置被一个或多个取代基取代,所述取代基如卤素、叠氮化物、烷基、芳烷基、烯基、炔基、环烷基、羟基、烷氧基、氨基、硝基、巯基、亚氨基、酰胺基、膦酸酯根、亚膦酸根、羰基、羧基、甲硅烷基、醚、烷硫基、磺酰基、磺酰胺基、酮、醛、酯、杂环基、芳族或杂芳族部分、氟烷基(如三氟甲基)、氰基或类似取代基。

[0113] 如本文所用的术语“杂环基”是指非芳族环系统的基团,包括但不限于单环、双环和三环,其可以是完全饱和的或者其可含有一个或多个不饱和单元(为避免疑问,不饱和度不产生芳族环系统)并且具有3至12个原子,包括至少一个杂原子,如氮、氧或硫。为了举例

说明的目的,不应解释为限制此术语的范围,以下是杂环基环的实例:氮丙啶基、吡丙啶基(aziriny1)、环氧乙烷基、硫杂环丙烷基、硫杂环丙烯基(thiireny1)、二环氧乙烷基、二吡丙啶基、氮杂环丁二烯基(azety1)、氧杂环丁烷基、氧杂环丁二烯基(oxety1)、硫杂环丁烷基、硫杂环丁二烯基(thiety1)、二氮杂环丁烷基、二氧杂环丁烷基、二氧杂环丁烯基、二硫杂环丁烷基、二硫杂环丁二烯基、呋喃基、二氧戊环基、吡咯基、噁唑基、噻唑基、咪唑基、噁二唑基、噻二唑基、三唑基、三嗪基、异噻唑基、异噁唑基、苯硫基、吡唑基、四唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、四嗪基、喹啉基、异喹啉基、喹喔啉基、喹唑啉基、吡啶并吡嗪基、苯并噁唑基、苯并苯硫基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并噁二唑基、苯并噻二唑基、吡啶基、苯并三唑基、萘啶基、氮杂卓、氮杂环丁烷基、吗啉基、氧代哌啶基、氧代吡咯烷基、哌嗪基、哌啶基、吡咯烷基、quiniclidiny1、硫代吗啉基、四氢吡喃基和四氢呋喃基。更一般地,术语“杂环(heterocyclic ring)”或“杂环(heterocycle)”是指至少两种不同元素的原子的环,其中一者是碳。进行另外的参考:Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology,Oxford University Press,Oxford,1997,以证明术语“杂环”是有机化学领域中公认的术语。

[0114] 如本文所用,术语“芳基烷基”或“芳烷基”是指经由亚烷基接头连接至(C_1 - C_{12})烷基的芳基或杂芳基(“杂芳烷基”)的基团。如本文所用,术语“芳基烷基”是指可被取代或未被取代的基团。术语“芳基烷基”还意图指那些化合物,其中芳基烷基的烷基链中的一个或多个亚甲基可被诸如O、N、P、Si和S的杂原子置换,并且其中氮、磷和硫原子可任选地被氧化并且氮杂原子可任选地被附接的烷基和/或芳基季铵化。芳烷基包括例如苄基。

[0115] 如本文所用,“环烷基”是指具有3至12个环碳原子的非芳族环状烃基的基团(“ C_3 - C_{12} 环烷基”)。在一些实施方案中,环烷基具有3至10个环碳原子(“ C_3 - C_{10} 环烷基”)。在一些实施方案中,环烷基具有3至8个环碳原子(“ C_3 - C_8 环烷基”)。在一些实施方案中,环烷基具有3至6个环碳原子(“ C_3 - C_6 环烷基”)。在一些实施方案中,环烷基具有5至7个环碳原子(“ C_5 - C_7 环烷基”)。环烷基可被描述为例如a C_4 - C_7 元环烷基,其中术语“元”是指所述部分内的非氢环原子。示例性 C_3 - C_6 环烷基包括,但不限于环丙基(C_3)、环丙烯基(C_3)、环丁基(C_4)、环丁烯基(C_4)、环戊基(C_5)、环戊烯基(C_5)、环己基(C_6)、环己烯基(C_6)、环己二烯基(C_6)等。示例性 C_3 - C_7 环烷基包括但不限于上述 C_3 - C_5 环烷基以及环庚基(C_6)、环庚烯基(C_7)、环庚二烯基(C_7)和环庚三烯基(C_7)、双环[2.1.1]己烷基(C_6)、双环[3.1.1]庚烷基(C_7)等。示例性 C_3 - C_{10} 环烷基包括,但不限于上述 C_3 - C_7 环烷基以及环壬基(C_9)、环壬烯基(C_9)、环癸基(C_{10})、环癸烯基(C_{10})、八氢-1H-茚基(C_9)、十氢萘基(C_{10})、螺[4.5]癸烷基(C_{10})等。如前述实例所阐明的,在某些实施方案中,环烷基是单环的(“单环环烷基”)抑或含有稠合、桥联或螺环系统(如双环系统(“双环环烷基”)),并且可以是饱和的或者可以是部分不饱和的。双环环烷基的非限制性实例包括1-乙基双环[1.1.1]戊烷、1-乙基双环[2.2.2]辛烷和(3r,5r,7r)-1-乙基金刚烷。“环烷基”也包括环系统,其中环烷基环(如上文所定义)与一个或多个芳基稠合,其中连接点在环烷基环上,并且在此类情况下,碳的数目继续指代环烷基环系统中的碳的数目。环烷基的每个实例可以是独立地任选取代的,即,未取代的(“未取代的环烷基”)或被一个或多个取代基取代的(“取代的环烷基”)。

[0116] 本发明还提供了本发明化合物的盐。

[0117] 如本文所用的术语“药学上可接受的盐”包括源自无机酸或有机酸的盐,所述无机

酸或有机酸包括例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、高氯酸、磷酸、甲酸、乙酸、乳酸、马来酸、富马酸、琥珀酸、酒石酸、乙醇酸、水杨酸、柠檬酸、甲磺酸、苯磺酸、苯甲酸、丙二酸、三氟乙酸、三氯乙酸、萘-2-磺酸以及其它酸。药学上可接受的盐形式可包括其中包含所述盐的分子的比例不为1:1的形式。例如,盐可包含碱的每个分子多于一个无机或有机酸分子,如化合物的每个分子两个盐酸分子。作为另一个实例,盐可包含碱的每个分子少于一个无机或有机酸分子,如酒石酸的每个分子化合物的两个分子。

[0118] 如本文所用的术语“载体”和“药学上可接受的载体”是指与化合物一起施用或配制用于施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。此类药学上可接受的载体的非限制性实例包括液体,如水、盐水和油;和固体,如阿拉伯胶、明胶、淀粉糊、滑石、角蛋白、胶体二氧化硅、尿素等。此外,可使用助剂、稳定剂、增稠剂、润滑剂和着色剂。合适的药物载体的其它实例描述于E.W.Martin的Remington's Pharmaceutical Sciences中,所述文献以引用的方式整体并入本文。

[0119] 如本文所用,“抑制(inhibit)”或“抑制(inhibiting)”意指与对照相比降低客观上可测量的量或程度。在一个实施方案中,抑制或抑制意指与对照相比降低至少统计学上显著的量。在一个实施方案中,抑制或抑制意指与对照相比降低至少5%。在各个单独实施方案中,抑制或抑制意指与对照相比降低至少10%、15%、20%、25%、30%、33%、40%、50%、60%、67%、70%、75%、80%、90%、95%或99%。

[0120] 如本文所用,术语“治疗(treating)”和“治疗(treat)”是指进行干预以使得(a)预防疾患或疾病在可能有发展所述疾患或疾病的风险或易患所述疾患或疾病、但尚未被诊断为患有所述疾患或疾病的受试者中发生; (b) 抑制疾患或疾病,例如减缓或阻止其发展或进展;或(c)减轻或改善疾患或疾病,例如引起所述疾患或疾病消退。在一个实施方案中,术语“治疗(treating)”和“治疗(treat)”是指进行干预以使得(a)抑制疾患或疾病,例如减缓或阻止其发展;或(b)减轻或改善疾患或疾病,例如引起所述疾患或疾病消退。

[0121] 如本文所用,“受试者”是指活动物。在各个实施方案中,受试者是哺乳动物。在各个实施方案中,受试者是非人类哺乳动物,包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔、绵羊、山羊、猫、狗、猪、马、牛或非人类灵长类动物。在某些实施方案中,受试者是人。

[0122] 如本文所用,“施用”具有其通常的含义,并且涵盖通过任何合适的施用途径施用,所述施用途径包括但不限于静脉内、肌肉内、腹膜内、皮下、直接注射、粘膜、吸入、口服和局部。

[0123] 如本文所用,短语“有效量”是指足以实现所需生物作用的任何量。“治疗有效量”是足以实现所需的治疗效果,例如治疗缺血-再灌注损伤的量。

[0124] 本发明的化合物及其盐可与其它治疗剂组合。本发明的化合物和其它治疗剂可同时或顺序施用。当同时施用其它治疗剂时,它们可在相同或分开的制剂中施用,但它们基本上同时施用。当其它治疗剂和本发明化合物的施用在时间上分开时,所述其它治疗剂与彼此并与本发明化合物顺序施用。施用这些化合物之间的时间分隔可能是几分钟,或者它可更长。

[0125] 药物组合物、施用途径和给药

[0126] 在某些实施方案中,本发明涉及药物组合物,所述药物组合物包含本发明的化合物和药学上可接受的载体。在某些实施方案中,所述药物组合物包含多种本发明的化合物

和药学上可接受的载体。

[0127] 在某些实施方案中,本发明的药物组合物还包含除本发明化合物以外的至少一种另外的药物活性剂。所述至少一种另外的药物活性剂可以是用于治疗缺血-再灌注损伤的剂。

[0128] 本发明的药物组合物可通过将一种或多种本发明的化合物与药学上可接受的载体和任选的一种或多种另外的药物活性剂组合来制备。

[0129] 如上所述,“有效量”是指足以实现所需生物作用的任何量。结合本文提供的教义,通过在各种活性化合物和权重因子如效力、相对生物利用度、患者体重、不良副作用的严重程度和施用模式之中选择,可计划有效的预防或治疗方案,所述方案不会引起实质性不想要的毒性并且对于治疗特定受试者是有效的。用于任何特定应用的有效量可取决于诸如所治疗的疾病或病状、所施用的特定本发明化合物、受试者的大小或疾病或病状的严重程度的因素而变化。本领域的普通技术人员可凭经验确定本发明的具体化合物和/或其它治疗剂的有效量而无需过度实验。可使用最大剂量,即根据一些医学判断的最高安全剂量。可考虑每天多个剂量以实现化合物的适当全身水平。适当的全身水平可通过例如测量患者的峰值或持续血浆药物水平来确定。“剂量”和“用量”在本文中可互换使用。

[0130] 在某些实施方案中,化合物的静脉内施用通常可以是0.1mg/kg/天至20mg/kg/天。在一个实施方案中,化合物的静脉内施用通常可以是0.1mg/kg/天至2mg/kg/天。在一个实施方案中,化合物的静脉内施用通常可以是0.5mg/kg/天至5mg/kg/天。在一个实施方案中,化合物的静脉内施用通常可以是1mg/kg/天至20mg/kg/天。在一个实施方案中,化合物的静脉内施用通常可以是1mg/kg/天至10mg/kg/天。

[0131] 一般来说,对于人受试者,化合物的每日口服剂量将是每天约0.01毫克/kg至每天1000毫克/kg。预期每天一次或多次施用的在0.5至50毫克/kg范围内的口服剂量将产生治疗结果。取决于施用模式,可适当地调整剂量以实现所需的局部或全身性药物水平。例如,预期静脉内施用将是每天一个数量级至几个数量级的较低剂量。如果受试者的反应在此类剂量下不足,则可采用甚至更高的剂量(或通过不同的更局部的递送途径的有效更高剂量)至患者耐受允许的程度。预期每天多个剂量以实现化合物的适当全身水平。

[0132] 对于本文所述的任何化合物,治疗有效量可初始地从动物模型确定。治疗有效剂量也可根据已经在人进行了测试的化合物和已知表现出类似药理学活性的化合物(例如其它相关活性剂)的人数据确定。对于胃肠外施用,可能需要更高的剂量。所施加的剂量可基于所施用化合物的相对生物利用度和效力进行调整。基于上述方法和本领域中众所周知的其它方法调整剂量以实现最大功效完全在普通技术人员的能力范围内。

[0133] 本发明的制剂可以药学上可接受的溶液施用,所述溶液可常规地含有药学上可接受浓度的盐、缓冲剂、防腐剂、相容性载体、佐剂以及任选的其它治疗成分。

[0134] 为了用于治疗,可通过将化合物递送至所需表面的任何模式将有效量的化合物施用至受试者。施用药物组合物可通过本领域的技术人员已知的任何方式来完成。施途径包括但不限于静脉内、肌肉内、腹膜内、膀胱内(膀胱)、口服、皮下、直接注射(例如,注射到肿瘤或脓肿中)、粘膜(例如眼部局部)、吸入和局部。

[0135] 对于静脉内和其它肠胃外施途径,本发明的化合物可被配制成冻干制剂、脂质体嵌入或包封的活性化合物的冻干制剂、水性悬浮液中的脂质复合物或盐复合物。冻干制

剂通常在施用前不久在合适的水溶液中,例如在无菌水或盐水中重构。

[0136] 对于口服施用,可通过使一种或多种活性化合物与本领域熟知的药学上可接受的载体组合而容易地配制化合物。此类载体使得本发明的化合物能够被配制成用于由待治疗的患者口服摄取的片剂、丸剂、糖衣剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、悬浮液等。用于口服使用的药物制剂可通过以下方式获得:添加固体赋形剂,任选地研磨所得混合物,并且(如果需要)在添加合适的助剂之后,加工颗粒的混合物以获得片剂或糖衣丸核心。合适的赋形剂具体地是填充剂如糖类,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨糖醇;纤维素制剂,例如像玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉、土豆淀粉、明胶、黄芪胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧基甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要,可添加崩解剂,如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐,如海藻酸钠。任选地,口服制剂还可配制在盐水或缓冲液(例如用于中和和内部酸性条件的EDTA)中,或者可在没有任何载体的情况下施用。

[0137] 还特别考虑了一种或多种上述组分的口服剂型。一种或多种组分可被化学改性,以使得衍生物的口服递送是有效的。一般来说,所考虑的化学改性是至少一个部分与组分分子本身的连接,其中所述部分允许(a)抑制酸水解;和(b)从胃或肠摄取到血流中。还需要一种或多种组分的整体稳定性的增加以及体内循环时间的增加。此类部分的实例包括:聚乙二醇、乙二醇与丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮以及聚脯氨酸。Abuchowski和Davis,“Soluble Polymer-Enzyme Adducts”,In:Enzymes as Drugs,Hocenberg and Roberts,编辑,Wiley-Interscience,New York,N.Y.,第367-383页(1981);Newmark等人,J Appl Biochem 4:185-9(1982)。其它可使用的聚合物是聚-1,3-二氧戊环和聚-1,3,6-三氧杂环辛烷(tioxocane)。如上所述,对于药物用途,聚乙二醇部分是合适的。

[0138] 对于组分(或衍生物),释放的位置可以是胃、小肠(十二指肠、空肠或回肠)或大肠。本领域的技术人员具有可用的制剂,所述制剂将不会溶解在胃中,但将物质释放在十二指肠或肠中的其它地方中。优选地,通过保护本发明的化合物(或衍生物)或通过将生物活性物质释放到胃环境以外(如肠中),释放将避免胃环境的有害作用。

[0139] 为了确保完全的胃阻力,不可渗透至少pH 5.0的包衣是必不可少的。用作肠溶衣的更常见的惰性成分的实例是乙酸偏苯三酸纤维素(CAT)、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素(HPMCP)、HPMCP 50、HPMCP55、聚乙酸邻苯二甲酸乙烯酯(PVAP)、Eudragit L30D、Aquateric、邻苯二甲酸乙酸纤维素(CAP)、Eudragit L、Eudragit S以及虫胶。这些包衣可用作混合膜。

[0140] 片剂上也可使用包衣或包衣的混合物,所述片剂不意图用于提供针对胃的保护。这可包括糖衣或使片剂易于吞咽的包衣。胶囊可由用于递送干燥治疗剂(例如粉末)的硬壳(如明胶)组成;对于液体形式,可使用软明胶壳。扁囊剂的壳材料可以是厚淀粉或其它可食用纸。对于丸剂、锭剂、模制片剂或片剂研磨剂,可使用湿润成团技术。

[0141] 治疗剂可作为呈粒度约1mm的颗粒或小丸形式的精细多微粒包含在制剂中。用于胶囊施用的材料的制剂也可作为粉末、略微压制的栓剂或甚至作为片剂。治疗剂可通过压制来制备。

[0142] 着色剂和调味剂都可包括在内。例如,可配制本发明的化合物(或衍生物)(如通过脂质体或微球封装),且然后进一步包含在可食用产品如含有着色剂和调味剂的冷冻饮料

中。

[0143] 可用惰性材料稀释或增加治疗剂的体积。这些稀释剂可包括碳水化合物,特别是甘露糖醇、 α -乳糖、无水乳糖、纤维素、蔗糖、改性的葡聚糖以及淀粉。某些无机盐也可用作填充剂,包括三磷酸钙、碳酸镁和氯化钠。一些可商购的稀释剂是Fast-Flo、Emdex、STA-Rx 1500、Emcompress以及Avicell。

[0144] 崩解剂可包含在治疗剂制剂中成为固体剂型。用作崩解剂的材料包括但不限于淀粉,包括基于淀粉的商业崩解剂Explotab。淀粉羟乙酸钠、安伯来特、羧甲基纤维素钠、超支链淀粉、海藻酸钠、明胶、橙皮、酸性羧甲基纤维素、天然海绵以及膨润土都可使用。另一种形式的崩解剂是不溶性阳离子交换树脂。粉状树胶可用作崩解剂和粘合剂,并且这些可包括粉状树胶如琼脂、刺梧桐胶或黄芪胶。海藻酸及其钠盐也用作崩解剂。

[0145] 可使用粘合剂来将治疗剂保持在一起以形成硬片剂并且包括来自天然产物如阿拉伯胶、黄芪胶、淀粉以及明胶的材料。其它包括甲基纤维素(MC)、乙基纤维素(EC)和羧甲基纤维素(CMC)。聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和羟丙基甲基纤维素(HPMC)两者均可用于醇溶液中以使治疗剂颗粒化。

[0146] 抗摩擦剂可包含于治疗剂的配方中以防止配制过程中的粘连。润滑剂可用作治疗剂与模壁之间的层,并且这些可包括但不限于:硬脂酸(包括其镁盐和钙盐)、聚四氟乙烯(PTFE)、液体石蜡、植物油以及蜡。也可使用可溶性润滑剂,如月桂基硫酸钠、月桂基硫酸镁、各种分子量的聚乙二醇、Carbowax 4000和6000。

[0147] 可添加助流剂,所述助流剂可在配制过程中改进药物的流动性质并在压制过程中帮助重排。助流剂可包括淀粉、滑石、热解二氧化硅以及水合硅铝酸盐。

[0148] 为了帮助治疗剂溶解到水性环境中,可添加表面活性剂作为润湿剂。表面活性剂可包括阴离子洗涤剂,如月桂基硫酸钠、磺基丁二酸钠二辛酯和磺酸钠二辛酯。可使用阳离子洗涤剂,并且可包括苯扎氯铵和苄索氯铵。可作为表面活性剂包含在制剂中的潜在非离子型洗涤剂包括聚桂醇400、聚氧乙烯40硬脂酸酯、聚氧乙烯氢化蓖麻油10、50和60、单硬脂酸甘油酯、聚山梨酯40、60、65和80、蔗糖脂肪酸酯、甲基纤维素以及羧甲基纤维素。这些表面活性剂可单独或作为不同比例的混合物存在于本发明化合物或衍生物的制剂中。

[0149] 可口服使用的药物制剂包括由明胶制成的推入配合型胶囊(push-fit capsule)以及由明胶和增塑剂(如甘油或山梨糖醇)制成的软密封型胶囊。推入配合型胶囊可含有与填充剂(如乳糖)、粘合剂(如淀粉)和/或润滑剂(如滑石或硬脂酸镁)以及任选的稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中,活性化合物可溶解或悬浮于合适的液体,如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇中。此外,可添加稳定剂。为口服施用配制的微球也可使用。此类微球在本领域中已被良好地定义。用于口服施用的所有制剂都应处于适用于这种施用的剂量。

[0150] 对于经颊施用,组合物可采用以常规方式配制的片剂或锭剂的形式。

[0151] 对于局部施用,化合物可被配制为本领域中熟知的溶液、凝胶、软膏、乳膏、悬浮液等。全身制剂包括被设计用于通过注射(例如皮下、静脉内、肌肉内、鞘内或腹膜内注射)施用的制剂,以及被设计用于经皮、经粘膜口服或肺部施用的那些制剂。

[0152] 对于吸入施用,根据本发明使用的化合物可使用适合的推进剂(例如,二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适的气体)从加压包装或喷雾器以气溶胶喷雾剂呈现形式方便地递送。在加压气雾剂的情况下,可以通过提供阀门以便递送计量

的量来确定剂量单位。可配制含有化合物与适合的粉末基质(如乳糖或淀粉)的粉末混合物的用于在吸入器或吹入器中使用的(例如)明胶的胶囊和药筒。

[0153] 本文也考虑了本文公开的化合物(或其盐)的肺部递送。化合物在吸入时被递送至哺乳动物的肺并穿过肺上皮层至血流。其它吸入分子的报告包括Adjei等人, Pharm Res 7: 565-569 (1990); Adjei等人, Int J Pharmaceutics 63:135-144 (1990) (醋酸亮丙瑞林); Braquet等人, J Cardiovasc Pharmacol 13 (增刊5):143-146 (1989) (内皮素-1); Hubbard等人, Annal Int Med 3:206-212 (1989) (α 1-抗胰蛋白酶); Smith等人, 1989, J Clin Invest 84:1145-1146 (α 1-蛋白酶); Oswein等人, 1990, "Aerosolization of Proteins", Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, March, (重组人生长激素); Debs等人, 1988, J Immunol 140:3482-3488 (干扰素 γ 和肿瘤坏死因子 α) 以及Platz等人, 美国专利号5,284,656 (粒细胞集落刺激因子; 以引用的方式并入)。出于全身作用用于药物的肺部递送的方法和组合物描述于Wong等人的1995年9月19日发布的美国专利号5,451,569 (以引用的方式并入) 中。

[0154] 考虑用于本发明的实践中的是被设计用于肺部递送治疗产品的广泛范围的机械装置, 包括但不限于雾化器、计量剂量吸入器以及粉末吸入器, 这些全部是本领域的技术人员所熟悉的。

[0155] 适用于本发明实践的可商购装置的一些具体实例是由Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Mo. 制造的Ultravent雾化器; 由Marquest Medical Products, Englewood, Colo. 制造的Acorn II雾化器; 由Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolina 制造的Ventolin计量剂量吸入器; 以及由Fisons Corp., Bedford, Mass. 制造的Spinhaler粉末吸入器。

[0156] 所有此类装置都需要使用适用于分配本发明化合物的制剂。通常, 每种制剂对于所用装置的类型具有特异性, 并且除了适用于治疗的常用稀释剂、佐剂和/或载体之外, 还可涉及使用适当的推进剂材料。此外, 考虑使用脂质体、微胶囊或微球、包合复合物或其它类型的载体。取决于化学改性的类型或所用装置的类型, 本发明的化学改性的化合物也可以不同的制剂制备。

[0157] 适用于与喷雾器(喷射型或超声波型)一起使用的制剂通常将包含以每mL溶液约0.1至25mg本发明的生物活性化合物的浓度溶于水中的本发明化合物(或衍生物)。所述制剂还可包含缓冲剂和简单糖(例如, 用于抑制剂稳定化和调控渗透压)。喷雾器制剂也可含有表面活性剂以降低或防止由溶液在形成气雾剂时的雾化引起的表面诱导的本发明化合物的聚集。

[0158] 与计量剂量吸入器装置一起使用的制剂通常将包含含有借助于表面活性剂悬浮在推进剂中的本发明化合物(或衍生物)的细碎粉末。推进剂可以是用于此目的的任何常规材料, 如氯氟烃、氢氯氟烃、氢氟烃或烃, 包括三氯氟甲烷、二氯二氟甲烷、二氯四氟乙醇以及1,1,1,2-四氟乙烷或其组合。合适的表面活性剂包括脱水山梨糖醇三油酸酯和大豆卵磷脂。油酸也用作表面活性剂。

[0159] 用于从粉末吸入器装置分配的制剂将包含含有本发明化合物(或衍生物)的细碎干燥粉末, 并且还可包含促进粉末从所述装置分散的量(例如制剂的50重量%-90重量%)的增积剂, 如乳糖、山梨糖醇、蔗糖或甘露糖醇。本发明化合物(或衍生物)应有利地以平均

粒度小于10微米(μm)、最优选0.5至5 μm 的微粒形式制备,以最有效地递送至肺深部。

[0160] 还考虑本发明的药物组合物的经鼻递送。经鼻递送允许本发明的药物组合物在将治疗产品施用于鼻后直接进入血流,而无需将产品沉积在肺中。用于经鼻递送的制剂包括具有葡聚糖或环糊精的制剂。

[0161] 对于经鼻施用,有用的装置是附有计量剂量喷雾器的小硬瓶。在一个实施方案中,通过将本发明溶液的药物组合物抽吸到限定体积的腔室中来递送计量剂量,所述腔室具有尺寸设定为在腔室中的液体被压缩时通过形成喷雾而使气雾剂制剂雾化的孔。所述腔室被压缩以施用本发明的药物组合物。在具体实施方案中,所述腔室是活塞布置。此类设备是可商购的。

[0162] 或者,使用具有孔或开口的塑料挤压瓶,所述孔或开口的尺寸设定为在使用挤压时通过形成喷雾而使气雾剂制剂雾化。开口通常位于瓶的顶部中,并且所述顶部通常是锥形的以部分配合在鼻道中以有效施用气雾剂制剂。优选地,鼻吸入器将提供计量量的气雾剂制剂,以用于施用测量剂量的药物。

[0163] 当需要全身递送化合物时,所述化合物可配制用于通过注射(例如通过快速浓注或连续输注)进行胃肠外施用。注射用制剂可以单位剂量呈现,例如在安瓿中或在多剂量容器中,并加有防腐剂。组合物可采用诸如油性或水性媒介物中的悬浮液、溶液或乳液的形式,且可含有诸如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂的配制剂。

[0164] 用于肠胃外施用的药物制剂包括呈水溶性形式的活性化合物的水溶液。此外,活性化合物的悬浮液可被制备为适当的油性注射悬浮液。合适的亲脂性溶剂或媒介物包括脂肪油(如芝麻油)或合成脂肪酸酯(如油酸乙酯或甘油三酸酯)或脂质体。水性注射悬浮液可含有增加悬浮液粘度的物质,如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。任选地,悬浮液也可包含合适的稳定剂或增加化合物的溶解度以允许制备高浓度溶液的试剂。

[0165] 或者,活性化合物可呈在使用前用合适媒介物(例如无菌无热原水)复原的粉末形式。

[0166] 化合物还可被配制为直肠或阴道组合物,如(例如)含有常规栓剂基质(如可可脂或其它甘油酯)的栓剂或保留灌肠剂。

[0167] 除以上所述的制剂以外,化合物还可被配制为储库制剂。此类长效制剂可用合适的聚合或疏水性材料(例如,配制为在可接受的油中的乳液)或离子交换树脂配制,或配制为微溶性衍生物,例如配制为微溶性盐。

[0168] 药物组合物还可包含合适的固体或凝胶相载体或赋形剂。此类载体或赋形剂的实例包括但不限于碳酸钙、磷酸钙、各种糖、淀粉、纤维素衍生物、明胶和聚合物如聚乙二醇。

[0169] 合适的液体或固体药物制剂形式是例如用于吸入的水性或盐水溶液,微囊化、螺旋化、涂覆到微观金颗粒上,包含于脂质体中,雾化去污剂,用于植入皮肤中的球丸或干燥到尖锐物体上以划入皮肤中。药物组合物还包括颗粒、粉末、片剂、包衣片剂、(微)胶囊、栓剂、糖浆、乳液、混悬液、乳膏、滴剂或延长释放活性化合物的制剂,在所述制剂中赋形剂和添加剂和/或诸如崩解剂、粘合剂、包衣剂、溶胀剂、润滑剂、调味剂、甜味剂或增溶剂的助剂通常如上所述使用。药物组合物适用于多种药物递送系统中。对于药物递送方法的简评,参见Langer R, Science 249:1527-33(1990)。

[0170] 本发明的化合物和任选的其它治疗剂可本身(净)或以药学上可接受的盐的形式

施用。当在药物中使用时,盐应该是药学上可接受的,但是非药学上可接受的盐可常规地用于制备其药学上可接受的盐。此类盐包括但不限于由以下酸制备的那些盐:盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、对甲苯磺酸、酒石酸、柠檬酸、甲磺酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸、萘-2-磺酸以及苯磺酸。而且,此类盐可被制备成碱金属盐或碱土金属盐,如羧酸基团的钠盐、钾盐或钙盐。

[0171] 合适的缓冲剂包括:乙酸和盐(1-2% w/v);柠檬酸和盐(1-3% w/v);硼酸和盐(0.5-2.5% w/v);以及磷酸和盐(0.8-2% w/v)。合适的防腐剂包括苯扎氯铵(0.003-0.03% w/v);氯丁醇(0.3-0.9% w/v);对羟基苯甲酸酯(0.01-0.25% w/v)和硫柳汞(0.004-0.02% w/v)。

[0172] 本发明的药物组合物含有有效量的如本文所述的化合物和任选地包含在药学上可接受的载体中的治疗剂。术语“药学上可接受的载体”是指适于向人或其它脊椎动物施用的一种或多种相容的固体或液体填充剂、稀释剂或包封物质。术语“载体”表示天然的或合成的有机或无机成分,活性成分与所述载体组合以促进应用。药物组合物的组分还能够与本发明的化合物以及与彼此以这样一种方式共混:所述方式使得不存在会实质性地减损所需药物效率的相互作用。

[0173] 治疗剂(具体地包括但不限于本发明的化合物)可以颗粒形式提供。如本文所用的颗粒是指可全部或部分由本发明化合物或本文所述的其它治疗剂组成的纳米颗粒或微颗粒(或在一些情况下较大颗粒)。颗粒可包含被包衣(包括但不限于肠溶包衣)包围的核心中的治疗剂。治疗剂也可分散在整个颗粒中。治疗剂也可被吸附到颗粒中。颗粒可具有任何级数的释放动力学,包括零级释放、一级释放、二级释放、延迟释放、持续释放、立即释放及其任何组合等。除治疗剂外,颗粒还可包含药学和药物领域中常规使用的那些材料中的任一种,包括但不限于可侵蚀的、不可侵蚀的、可生物降解的或不可生物降解的材料或其组合。颗粒可以是含有处于溶液或半固体状态的本发明化合物的微胶囊。颗粒可具有实际上任何形状。

[0174] 生物不可降解和生物可降解的聚合物材料均可用于制造用于递送治疗剂的颗粒。此类聚合物可以是天然的或合成的聚合物。基于期望释放的时间段来选择聚合物。特别感兴趣的生物粘附聚合物包括Sawhney H S等人(1993)Macromolecules 26:581-7中描述的生物可侵蚀性水凝胶,其教义并入本文。这些包括聚透明质酸、酪蛋白、明胶、明胶蛋白、聚酸酐、聚丙烯酸、海藻酸盐、壳聚糖、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸异丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸异癸酯)、聚(甲基丙烯酸月桂酯)、聚(甲基丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)以及聚(丙烯酸十八烷基酯)。

[0175] 一种或多种治疗剂可包含在控制释放系统中。术语“控制释放”意图指任何含药物的制剂,其中控制从制剂中释放药物的方式和概况。这是指立即释放和非立即释放制剂,其中非立即释放制剂包括但不限于持续释放制剂和延迟释放制剂。术语“持续释放”(也称为“延长释放”)以其常规意义用于指在延长的时间段内提供药物的逐渐释放并且优选地(但不一定)在延长的时间段内产生药物的基本上恒定的血液水平的药物制剂。术语“延迟释放”以其常规意义用于指药物制剂,其中在施用制剂与从其释放药物之间存在时间延迟。“延迟释放”可能或可能不涉及在延长的时间段内逐渐释放药物,并且因此可能或可能不是

“持续释放”。

[0176] 长期持续释放植入物的使用可能特别适用于慢性病状的治疗。如本文所用,“长期”释放是指植入物被构建且布置成递送治疗水平的活性成分持续至少7天,并且优选30-60天。长期持续释放植入物是本领域的普通技术人员所熟知的并且包括上述释放系统中的一些。

[0177] 相关领域的普通技术人员将理解,根据本文所包含的本发明的描述,鉴于本领域普通技术人员已知的信息,对本文所述的组合物和方法的其它合适的修改和改编是显而易见的,并且可在不脱离本发明或其任何实施方案的范围的情况下进行。现已详细描述本发明,通过参考以下实施例将更明确地了解本发明,所述实施例是仅出于说明目的包括于此且不意图限制本发明。

[0178] 使用方法

[0179] 本发明提供了用于治疗或预防缺血-再灌注损伤或心肌梗塞或与心肌梗塞相关的损伤的肽化合物。

[0180] 因此,在某些实施方案中,本发明涉及治疗或预防缺血-再灌注损伤的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本文所述的式(I)化合物或其药学上可接受的化合物。在某些此类实施方案中,缺血-再灌注损伤是心脏缺血-再灌注损伤。在一些实施方案中,化合物经口服、局部、全身、静脉内、皮下、腹膜内或肌内施用。

[0181] 在其它实施方案中,本发明提供了用于治疗或预防心肌梗塞的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的式(I)化合物,或其药学上可接受的盐。此类方法可通过预防梗塞的起始或进展来防止再灌注时对心脏的损伤。在一些实施方案中,化合物经口服、局部、全身、静脉内、皮下、腹膜内或肌内施用。

[0182] 缺血是组织或器官的血液供应降低或减少,并且具有许多不同的原因。缺血可以是局部的,例如由血栓或栓子引起;或者可以是更总体的,例如由于低灌注压力。缺血事件可导致低氧(氧气减少)和/或缺氧(不存在氧)。

[0183] 哺乳动物的组织或器官中的缺血是由氧剥夺(低氧)和/或葡萄糖(例如底物)剥夺引起的多方面的病理学状况。组织或器官的细胞中的氧和/或葡萄糖剥夺导致能量产生能力的降低或完全丧失,并且因此导致跨细胞膜的活性离子转运的功能丧失。氧和/或葡萄糖剥夺还导致其它细胞膜的病理变化,包括线粒体膜的通透性转变。此外,其它分子,如通常在线粒体内分隔的凋亡蛋白,可能渗漏到细胞质中并且导致凋亡细胞死亡。深度缺血可导致坏死细胞死亡。

[0184] 特定组织或器官的缺血或低氧可由组织或器官的血液供应丧失或严重减少引起。血液供应的丧失或严重减少可能是由于例如血栓栓塞性中风、冠状动脉粥样硬化或周围血管疾病。受缺血或低氧影响的组织通常是肌肉,如心肌、骨骼肌或平滑肌。

[0185] 受缺血或低氧影响的器官可以是遭受缺血或低氧的任何器官。举例来说,但不以限制的方式,心肌缺血或低氧通常是由动脉粥样硬化或血栓形成堵塞引起的,其导致通过心脏动脉和毛细血管供血向心脏组织的氧气递送减少或丢失。这种心脏缺血或低氧可引起受影响的心肌疼痛和坏死,并且最终可能导致心力衰竭。

[0186] 再灌注是血液流动减少或阻塞的任何器官或组织的血流恢复。例如,血流可恢复至受缺血影响的任何器官或组织。血流的恢复(再灌注)可通过本领域技术人员已知的任何

方法进行。例如,缺血性心脏组织的再灌注可源于血管成形术、冠状动脉旁路搭桥术或溶栓药物的使用。

[0187] 缺血-再灌注损伤是在一段时间的缺血后血液供应返回受影响区域时引起的细胞或组织损伤。缺血期间氧气和营养物质的缺乏造成循环恢复导致组织受损的疾患。作为举例但不以限制的方式,心肌再灌注损伤的形式包括再灌注引起的心律不齐、心肌顿抑、表现为冠脉血流缓慢的微血管阻塞和致命的心肌再灌注损伤(即再灌注诱导的在指数缺血事件结束时存活的心肌细胞死亡)。研究表明,致命的心肌再灌注损伤占最终心肌梗塞面积的约50%。

[0188] 在某些实施方案中,肽经口服、静脉内或肠胃外施用。

[0189] 在某些实施方案中,受试者是人。

[0190] 本发明的肽化合物或其药学上可接受的盐(如乙酸盐、酒石酸盐或三氟乙酸盐)可以足以治愈或至少部分地阻止疾病的症状(包括疾病发展过程中的其并发症和中间病理表型)的量施用至疑似患有或已经患有缺血性损伤的受试者。可通过本领域已知的诊断或预后测定中的任一种或组合来鉴定患有缺血性损伤的受试者。作为举例,但不以限制的方式,在一些实施方案中,缺血性损伤与心脏缺血、脑缺血、肾缺血、脑缺血、肠缺血、肝缺血或心肌梗塞有关。

[0191] 作为举例,但不以限制的方式,心脏缺血的典型症状包括但不限于心绞痛(例如,胸痛和胸闷)、呼吸急促、心悸、虚弱、头晕、恶心、出汗、快速心跳和疲劳。

[0192] 在一些实施方案中,用本文公开的至少一种肽治疗被诊断患有心脏缺血的受试者可改善或消除心脏缺血的一种或多种以下症状:心绞痛(例如胸痛和胸闷)、呼吸急促、心悸、虚弱、头晕、恶心、出汗、快速心跳和疲劳。

[0193] 作为举例,但不以限制的方式,肾缺血的典型症状包括但不限于尿毒症(即,血液高水平的蛋白质副产物,例如尿素)、由肺部流体突然积聚引起的呼吸困难的急性发作(用力呼吸或呼吸困难)、高血压、肾脏附近感到疼痛、虚弱、高血压、恶心、腿痛史、反映腿部血液循环不良的大步前进以及可在颈部(例如,颈动脉杂音)、腹部(其可能反映肾动脉变窄)和腹股沟(股动脉杂音)中检测到的由动脉内血液湍流引起的杂音(用听诊器听见的声音或杂音)。

[0194] 在一些实施方案中,用本文公开的至少一种肽治疗被诊断患有肾缺血的受试者可改善或消除肾缺血的一种或多种以下症状:尿毒症(即,血液高水平的蛋白质副产物,例如尿素)、由肺部流体突然积聚引起的呼吸困难的急性发作(用力呼吸或呼吸困难)、高血压、肾脏附近感到疼痛、虚弱、高血压、恶心、腿痛史、反映腿部血液循环不良的大步前进以及可在颈部(例如,颈动脉杂音)、腹部(其可能反映肾动脉变窄)和腹股沟(股动脉杂音)中检测到的由动脉内血液湍流引起的杂音(用听诊器听见的声音或杂音)。

[0195] 作为举例,但不以限制的方式,脑(或脑)缺血的典型症状包括但不限于一只眼睛失明、一只手臂或一条腿无力、身体整个一侧的虚弱、头晕、眩晕、复视、身体两侧无力、说话困难、口齿不清以及协调感缺失。

[0196] 在一些实施方案中,用本文公开的至少一种肽治疗被诊断患有脑(或脑)缺血的受试者可改善或消除脑(或脑)缺血的一种或多种以下症状:一只眼睛失明、一只手臂或一条腿无力、身体整个一侧的虚弱、头晕、眩晕、复视、身体两侧无力、说话困难、口齿不清以及协

调感缺失。

[0197] 在另一方面,本发明涉及治疗缺血再灌注损伤和/或与针对缺血再灌注损伤的现有疗法相关的副作用的方法。在治疗应用中,将包含至少一种本发明化合物或其药学上可接受的盐(如乙酸盐、酒石酸盐或三氟乙酸盐)的组合物或药物以足以治愈或至少部分地阻止疾病的症状(包括疾病发展过程中的其并发症和中间病理表型)的量施用至疑似患有或已经患有缺血再灌注损伤的受试者。可通过本领域已知的诊断或预后测定中的任一种或组合来鉴定患有缺血-再灌注损伤的受试者。在一些实施方案中,缺血-再灌注损伤与心脏缺血、脑缺血、肾缺血、脑缺血、肠缺血和肝缺血有关。在一些实施方案中,本文公开的肽化合物用于治疗心脏缺血-再灌注损伤。

[0198] 在一些实施方案中,本文公开的肽化合物用于治疗受试者的心肌梗塞,以预防再灌注时对心脏的损伤。在一些实施方案中,本发明涉及冠状动脉血运重建的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的本发明的肽化合物或其药学上可接受的盐,并对所述受试者进行冠状动脉旁路搭桥术(CABG)。

[0199] 在一些实施方案中,用本文公开的肽化合物治疗心肌梗塞可减小梗塞面积、增加LVDP并增加最大收缩和舒张率($\pm dP/dt$)。

[0200] 预防方法

[0201] 在一些实施方案中,本发明提供了用于预防有患缺血损伤风险的受试者中的缺血性损伤或缺血性损伤的症状或延迟其发作的方法。在一些实施方案中,本技术提供了用于预防或减轻有患缺血损伤风险的受试者中的缺血性损伤的症状的方法。

[0202] 在一些实施方案中,本发明提供了用于预防有患缺血-再灌注损伤风险的受试者中的缺血-再灌注损伤或缺血-再灌注损伤的症状或延迟其发作的方法。在一些实施方案中,本发明提供了用于预防或减轻有患缺血-再灌注损伤风险的受试者中的缺血再灌注损伤的症状的方法。

[0203] 在一些实施方案中,缺血性损伤、缺血-再灌注损伤或缺血性或缺血-再灌注损伤的症状与心脏缺血、脑缺血、肾缺血、脑缺血、肠缺血和肝缺血有关。在一些实施方案中,缺血性损伤是心肌梗塞。

[0204] 在一些实施方案中,本文公开的肽化合物用于治疗或预防心脏缺血-再灌注损伤。在一些实施方案中,本文公开的肽化合物用于预防心脏缺血-再灌注损伤。

[0205] 可通过例如本领域已知的诊断或预后测定中的任一种或组合来鉴定处于缺血性损伤或缺血-再灌注损伤风险的受试者。在预防性应用中,将本发明化合物或其药学上可接受的盐(如乙酸盐、酒石酸盐或三氟乙酸盐)的药物组合物或药物以足以消除疾病、降低疾病风险或延迟疾病发作(包括在疾病发展过程中出现的疾病的生物化学、组织学和/或行为症状、其并发症以及中间病理表型)或减轻疾病发展过程中出现的症状和/或并发症和中间病理表型的量施用于易患缺血性损伤或缺血再灌注损伤或有患缺血性损伤或缺血再灌注损伤的受试者。预防性肽的施用可在疾病或病症的特征性症状的表现之前发生,以使得疾病或病症得以预防,延迟其进展,或者疾病或病症的症状或副作用的严重程度降低。

[0206] 作为举例,在一些实施方案中,如果受试者患有冠状动脉疾病(动脉粥样硬化)、血凝块或冠状动脉痉挛,则所述受试者可能处于心脏缺血的风险。

[0207] 作为举例,但不以限制的方式,在一些实施方案中,如果受试者患有肾损伤(例如,

急性肾损伤)和/或由于肾脏被剥夺正常血液流动持续延长时间段的手术(例如,心脏搭桥手术)引起的损伤或并发症,则所述受试者可处于肾缺血的危险中。

[0208] 作为举例,但不以限制的方式,在一些实施方案中,如果受试者患有镰状细胞性贫血、受压迫的血管、室性心动过速、动脉中斑块积聚、血栓、由于心脏病发作、有过中风或先天性心脏缺陷所致的极低血压,则所述受试者可能处于脑缺血的风险。

[0209] 对于治疗性和/或预防性应用,将包含至少一种本文所述的肽化合物或其药学上可接受的盐(如乙酸盐、酒石酸盐或三氟乙酸盐)的组合物施用于有需要的受试者。在一些实施方案中,肽组合物每天施用1、2、3、4或5次。在一些实施方案中,每天施用肽组合物超过五次。另外或可替代地,在一些实施方案中,肽组合物每天、每隔一天、每三天、每四天、每五天或每六天施用。在一些实施方案中,肽组合物每周一次、每两周一次、每三周一次或每月一次施用。在一些实施方案中,施用肽组合物持续一周、两周、三周、四周或五周的时间段。在一些实施方案中,肽施用六周或更长时间。在一些实施方案中,肽施用十二周或更长时间。在一些实施方案中,肽施用少于一年的时间段。在一些实施方案中,肽施用超过一年的时间段。在一些实施方案中,用本文公开的至少一种肽治疗将预防心脏缺血的一种或多种以下症状或延迟其发作:心绞痛(例如胸痛和胸闷)、呼吸急促、心悸、虚弱、头晕、恶心、出汗、快速心跳和疲劳。

[0210] 在一些实施方案中,用本文公开的至少一种肽治疗将预防肾缺血的一种或多种以下症状或延迟其发作:尿毒症(即,血液高水平的蛋白质副产物,例如尿素)、由肺部流体突然积聚引起的呼吸困难的急性发作(用力呼吸或呼吸困难)、高血压、肾脏附近感到疼痛、虚弱、高血压、恶心、腿痛史、反映腿部血液循环不良的大步前进以及可在颈部(例如,颈动脉杂音)、腹部(其可能反映肾动脉变窄)和腹股沟(股动脉杂音)中检测到的由动脉内血液湍流引起的杂音(用听诊器听见的声音或杂音)。

[0211] 在一些实施方案中,用本文公开的至少一种肽治疗将预防脑(或脑)缺血的一种或多种以下症状或延迟其发作:一只眼睛失明、一只手臂或一条腿无力、身体整个一侧的虚弱、头晕、眩晕、复视、身体两侧无力、说话困难、口齿不清以及协调感缺失。

[0212] 评估代谢稳定性的方法

[0213] 在某些实施方案中,以下方法可用于评估本发明化合物的代谢稳定性。

[0214] 先前在以下参考文献中描述了某些体外肝脏代谢研究:Obach, R S, Drug Metab Disp, 1999, 27:1350; Houston, J B等人, Drug Metab Rev, 1997, 29:891; Houston, J B, Biochem Pharmacol, 1994, 47:1469; Iwatsubo, T等人, Pharmacol Ther, 1997, 73:147; 以及 Lave, T, 等人, Pharm Res, 1997, 14:152。

[0215] 微粒体测定:人肝微粒体(20mg/mL)可从Xenotech, LLC (Lenexa, Kans.) 获得。可从Sigma-Aldrich购买还原型 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)、氯化镁($MgCl_2$)和二甲基亚砜(DMSO)。

[0216] 代谢稳定性的确定:在DMSO中制备测试化合物的7.5mM储备溶液。将7.5mM储备溶液在乙腈(ACN)中稀释至12.5-50 μ M。将20mg/mL人肝微粒体在含有3mM $MgCl_2$ 的0.1M磷酸钾缓冲液(pH 7.4)中稀释至0.625mg/mL。将稀释的微粒体一式三份添加至96孔深孔聚丙烯板的孔中。将12.5-50 μ M测试化合物的10 μ L等分试样添加至微粒体中,并将混合物预热10分钟。通过添加预热的NADPH溶液来引发反应。最终反应体积是0.5mL,并且含有0.1M磷酸钾缓

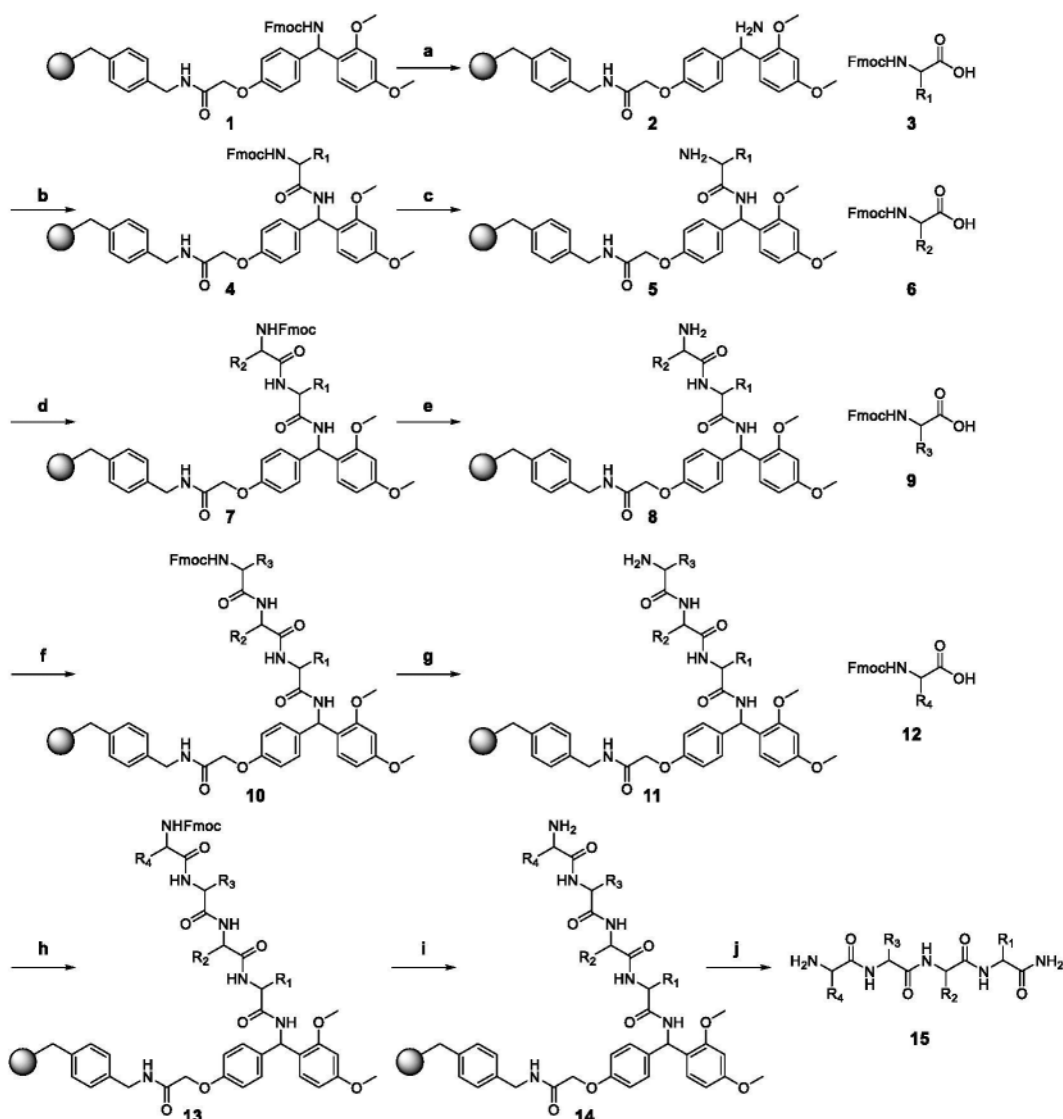
冲液 (pH 7.4) 和 3mM MgCl_2 中的 0.5mg/mL 人肝微粒体、0.25-1.0 μM 测试化合物和 2mM NADPH。将反应混合物在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育,并在 0、5、10、20 和 30 分钟时取出 50 μL 等分试样,并添加至含有 50 μL 冰冷 ACN 和内部标准品的浅孔 96 孔板中以终止反应。将板在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存 20 分钟,之后将 100 μL 的水添加至板的孔中,然后离心以使沉淀的蛋白质沉降。将上清液转移至另一个 96 孔板中,并使用 Applied Bio-systems API 4000 质谱仪通过 LC-MS/MS 分析剩余母体的量。测试一式三份进行。

[0217] 数据分析:测试化合物的体外半衰期 ($t_{1/2}$ s) 是根据母体剩余 % (ln) 对比孵育时间的线性回归的斜率计算的:体外 $t_{1/2} = 0.693/k$, 其中 $k = -[\text{母体剩余 \% (ln) 对比孵育时间的线性回归的斜率}]$

[0218] 实施例

[0219] 用于肽合成的一般程序

[0220] 方案 1:



[0222] 由 GL Biochem(Shanghai) Ltd 进行的合成。

[0223] 步骤 a. 树脂制备

[0224] 称量 10g 的 Rink AM 树脂 (负载量 0.6mmol/g), 将树脂倒入反应柱中, 并用 DCM 使其

溶胀30分钟。

[0225] 步骤b.脱保护

[0226] 用20%哌啶/DMF将Fmoc脱保护,混合10分钟,然后用DMF洗涤。重复此步骤。

[0227] 步骤c.偶联

[0228] 1) 将12mmol Fmoc-Lys (Boc) -OH、12mmol HOBT、12mmol HBTU和12mmol DIEA添加到树脂中,以用于在室温下偶联40分钟。

[0229] 2) 洗涤:在偶联完成后,用DMF洗涤树脂1-2次。

[0230] 步骤b-e (d-h) .增加肽链的长度

[0231] 通过重复步骤2-4,直到所有氨基酸都顺序偶联至链上。

[0232] 步骤i.使肽脱保护

[0233] 在最后一个氨基酸已偶联至链上之后,然后用MeOH洗涤树脂3次。将树脂干燥。

[0234] 步骤j.裂解

[0235] 称重干燥的树脂,将其放入管中,添加适量的裂解溶液(例如95%TFA),并在40度下孵育3.5小时。过滤反应溶液,然后通过将溶液添加到乙醚中来使溶液沉淀。

[0236] 将溶液离心两次,持续2分钟(4000/s)。

[0237] 步骤k.干燥

[0238] 将肽样品风干几分钟,然后将所述肽样品冻干。

[0239] 最终产物HPLC纯化程序

[0240] 仪器:HPLC

[0241] 波长:220nm

[0242] 流速:30ml/min

[0243] 柱:3cm DAC (C18)

[0244] 流动相A:ACN+TFA0.1%,B:超纯水+TFA0.1%

梯度: 时间 (分钟) A B

0 18% 82%

[0245]

25 28% 72%

40 40% 60%

[0246] 1) 预分析

[0247] 将适量的样品放入0.5ml管中,使用超纯水使其溶解。使用0.45um膜过滤所述样品,然后使用快速梯度HPLC(10%-100%)分析所述样品

[0248] 2) 样品制备

[0249] 将300MG样品添加到20ML烧杯中,然后添加15ml H₂O和5ml ACN。对样品进行超声处理直至样品完全溶解,然后使用0.45um膜过滤溶液

[0250] 3) HPLC纯化

[0251] 使用上述梯度的HPLC纯化样品,在0-40分钟收集级分。

[0252] 使用分析型HPLC分析所收集的级分以检查纯度

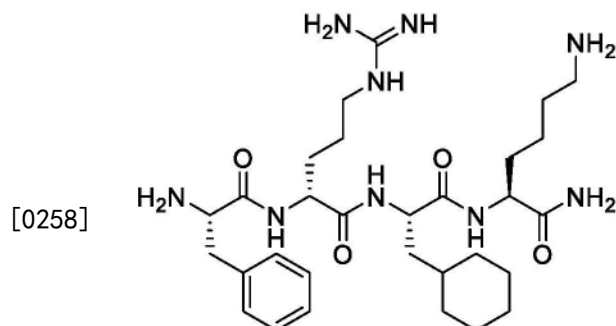
[0253] 4) 干燥和冻干

[0254] 使用旋转蒸发器干燥所收集的级分,然后将其冻干两天。

[0255] 5) 储存

[0256] 称重并检查干燥的样品,然后将其储存在管中。低于10℃,避光。

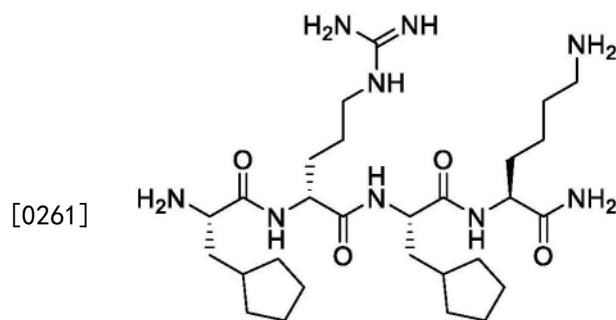
[0257] 实施例1: (S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-环己基丙酰胺基)己酰胺 (Phe-D-Arg-Cha-Lys-NH₂, 15a) 的合成



化合物 15a

[0259] 化合物15a是根据方案1,通过使用第一氨基酸L-Fmoc-(N6-Boc)-Lys(3a)、第二氨基酸L-Fmoc-Cha(6a)、第三氨基酸D-Fmoc-Arg(9a)和第四氨基酸L-Fmoc-Phe(12a),得到所需产物15a来制备(HPLC,98.1%):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆), δ=8.66(m,1H),8.40(m,1H),8.26(m,3H),7.94(m,1H),7.86(m,4H),7.40(m,1H),7.34(m,5H),7.08(m,1H),4.38(m,2H),4.14(m,2H),3.02(m,4H),2.75(m,2H),1.00-1.70(m,21H),1.07(m,2H)。MS(M+1):602.44。

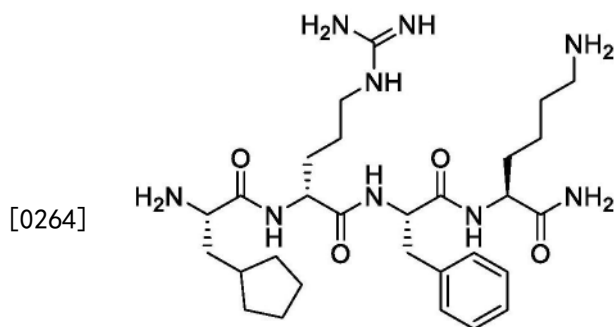
[0260] 实施例2: (S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-环戊基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-环戊基丙酰胺基)己酰胺((β-环戊基)-Ala-D-Arg-(β-环戊基)-Ala-Lys-NH₂, 15b) 的合成



化合物 15b

[0262] 化合物15b是根据方案1,通过使用第一氨基酸L-Fmoc-(N6-Boc)-Lys(3a)、第二氨基酸L-Fmoc-(β-环戊基)-Ala(6b)、第三氨基酸D-Fmoc-Arg(9a)和第四氨基酸L-Fmoc-(β-环戊基)-Ala(6b)以得到所需产物15b来制备(HPLC,98.1%):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆), δ=8.86(m,1H),8.40(m,1H),8.19(m,3H),7.91(m,2H),7.86(m,3H),7.44(m,1H),7.10(m,1H),4.46(m,1H),4.28(m,1H),4.15(m,1H),3.70(m,1H),3.10(m,2H),2.75(m,2H),1.20-1.80(m,28H),1.10(m,4H)。MS(M+1):580.45。

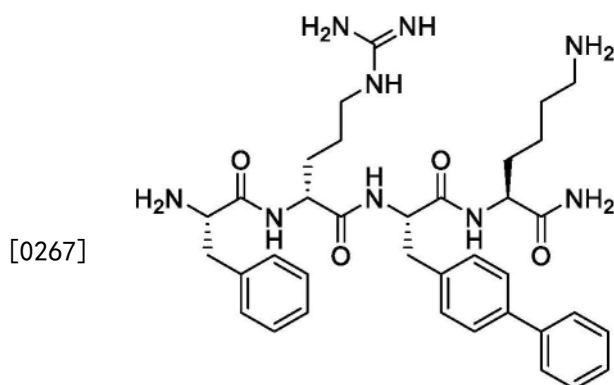
[0263] 实施例3: (S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-环戊基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-苯基丙酰胺基)己酰胺((β-环戊基)-Ala-D-Arg-Phe-Lys-NH₂, 15c) 的合成



化合物 15c

[0265] 化合物15c是根据方案1,通过使用第一氨基酸L-Fmoc-(N6-Boc)-Lys(3a)、第二氨基酸L-Fmoc-Phe(12a)、第三氨基酸D-Fmoc-Arg(9a)和第四氨基酸L-Fmoc-(β -环戊基)-Ala(6b)以得到所需产物15b来制备(HPLC,99.6%): ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6), δ =8.74(m,1H),8.48(m,1H),8.16(m,4H),7.86(m,3H),7.72(m,1H),7.43(m,1H),7.29(m,5H),7.24(m,1H),4.60(m,1H),4.38(m,1H),4.20(m,1H),3.80(m,1H),3.10(m,1H),2.90(m,2H),2.75(m,3H),1.70(m,6H),1.50(m,7H),1.30(m,4H),1.10(m,4H)。MS(M+1):588.45。

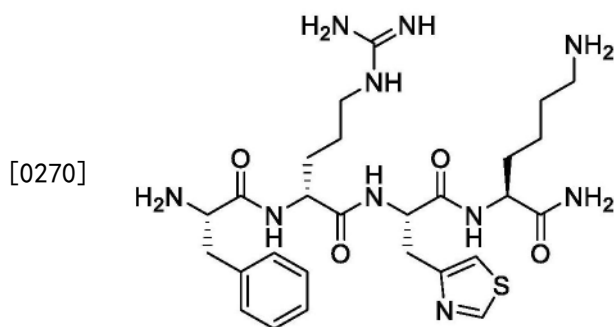
[0266] 实施例4:(S)-2-((S)-3-([1,1'-联苯基]-4-基)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)丙酰胺基)-6-氨基己酰胺(Phe-D-Arg-(4)-Bip-Lys-NH₂,15d)的合成



化合物 15d

[0268] 化合物15d是根据方案1,通过使用第一氨基酸L-Fmoc-(N6-Boc)-Lys(3a)、第二氨基酸L-Fmoc-(4)-Bip(6c)、第三氨基酸D-Fmoc-Arg(9a)和第四氨基酸L-Fmoc-Phe(12a)以得到所需产物15d来制备(HPLC,99.5%): ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6), δ =8.65(m,1H),8.45(m,1H),8.20(m,4H),7.80(m,3H),7.60(m,5H),7.45(m,4H),7.30(m,5H),7.15(m,1H),4.60(m,1H),4.32(m,1H),4.15(m,2H),2.60-3.40(m,8H),1.00-1.80(m,7H),0.90(m,3H)。MS(M+1):672.42。

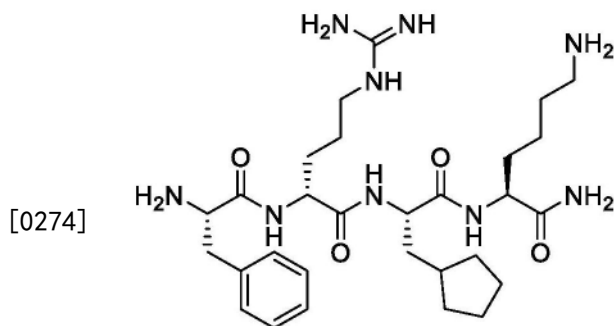
[0269] 实施例5:(S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-(噻唑-4-基)丙酰胺基)己酰胺(Phe-D-Arg-(β -噻唑-4-基)-Ala-Lys-NH₂,15e)的合成



[0271] 化合物 **15e**

[0272] 化合物15e是根据方案1,通过使用第一氨基酸L-Fmoc-(N6-Boc)-Lys(3a)、第二氨基酸L-Fmoc-(β-噻唑-4-基)-Ala(6d)、第三氨基酸D-Fmoc-Arg(9a)和第四氨基酸L-Fmoc-Phe(12a)以得到所需产物15e来制备(HPLC,99.5%):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆),δ=8.99(s,1H),8.63(m,1H),8.43(m,1H),8.20(m,3H),8.10(m,1H),7.78(m,3H),7.60(m,1H),7.50(s,1H),7.30(m,6H),7.10(m,1H),4.70(m,1H),4.32(m,1H),4.12(m,2H),3.22(m,1H),3.00(m,5H),2.75(m,2H),1.70(m,1H),1.50(m,3H),1.20(m,4H),0.90(m,2H)。MS(M+1):603.52。

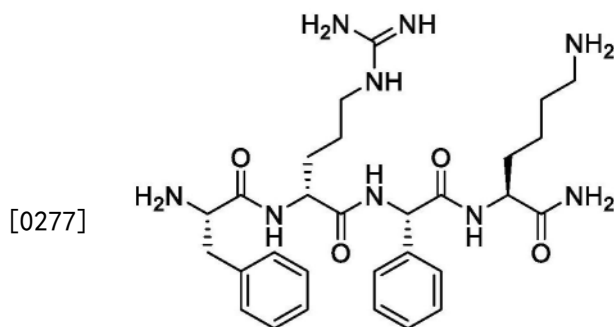
[0273] 实施例6:(S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-环戊基丙酰胺基)己酰胺(Phe-D-Arg-Cpa-Lys-NH₂,15f)的合成



化合物 **15f**

[0275] 化合物15f是根据方案1,通过使用第一氨基酸L-Fmoc-(N6-Boc)-Lys(3a)、第二氨基酸L-Fmoc-(β-环戊基)-Ala(6b)、第三氨基酸D-Fmoc-Arg(9a)和第四氨基酸L-Fmoc-Phe(12a)以得到所需产物15f来制备(HPLC,99.7%):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆+D₂O),δ=8.40(m,1H),7.93(m,1H),7.35(m,5H),4.10(m,4H),3.00(m,2H),2.90(m,2H),2.75(m,2H),1.20-1.70(m,17H),1.00(m,4H)。MS(M+1):588.56。

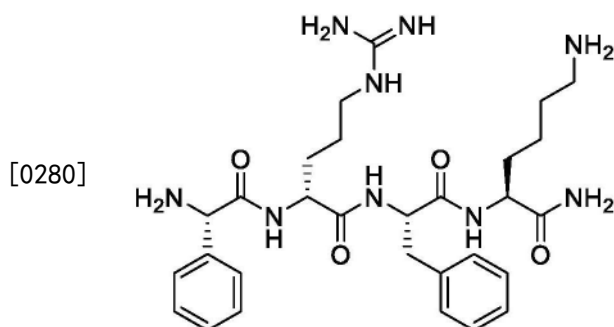
[0276] 实施例7:(S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-2-苯基乙酰胺基)己酰胺(Phe-D-Arg-(α-苯基)-Gly-Lys-NH₂,15g)的合成



化合物 15g

[0278] 化合物15g是根据方案1,通过使用第一氨基酸L-Fmoc-(N6-Boc)-Lys(3a)、第二氨基酸L-Fmoc-(α -苯基)-Gly(6e)、第三氨基酸D-Fmoc-Arg(9a)和第四氨基酸L-Fmoc-Phe(12a)以得到所需产物15g来制备(HPLC,98.6%): ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6), δ =8.82(m,1H),8.65(m,1H),8.42(m,1H),8.20(m,3H),7.25(m,3H),7.12(m,1H),7.45(m,3H),7.30(m,10H),5.55(m,1H),4.50(m,1H),4.15(m,3H),3.00(m,4H),2.70(m,2H),1.00-1.70(m,10H)。MS(M+1):582.40。

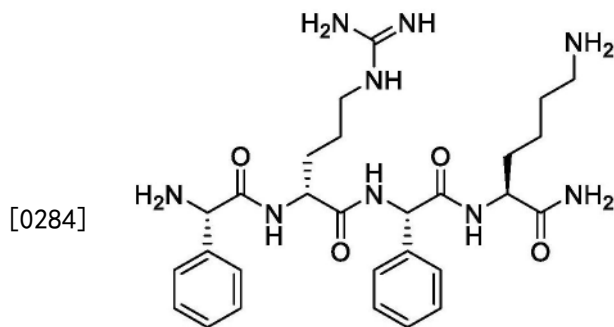
[0279] 实施例8:(S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-2-苯基乙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-苯基丙酰胺基)己酰胺((α -苯基)-Gly-D-Arg-Phe-Lys-NH₂,15h)的合成



化合物 15h

[0282] 化合物15h是根据方案1,通过使用第一氨基酸L-Fmoc-(N6-Boc)-Lys(3a)、第二氨基酸L-Fmoc-Phe(12a)、第三氨基酸D-Fmoc-Arg(9a)和第四氨基酸L-Fmoc-(α -苯基)-Gly(6e)以得到所需产物15h来制备(HPLC,98.5%): ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6), δ =8.70(m,4H),8.50(m,1H),8.25(m,1H),7.80(m,3H),7.40(m,7H),7.20(m,7H),5.00(m,1H),4.60(m,1H),4.35(m,1H),4.15(m,1H),3.20(m,2H),2.70(m,4H),1.60(m,4H),1.25(m,3H),1.08(m,2H),0.75(m,1H)。MS(M+1):582.45。

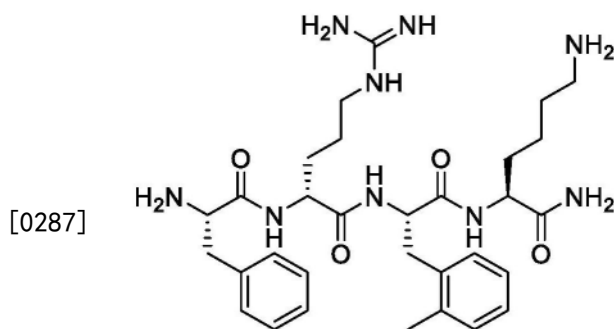
[0283] 实施例9:(S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-2-苯基乙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-2-苯基乙酰胺基)己酰胺((α -苯基)-Gly-D-Arg-(α -苯基)-Gly-Lys-NH₂,15i)的合成



化合物 15i

[0285] 化合物15i是根据方案1,通过使用第一氨基酸L-Fmoc-(N6-Boc)-Lys(3a)、第二氨基酸L-Fmoc-(α -苯基)-Gly(6e)、第三氨基酸D-Fmoc-Arg(9a)和第四氨基酸L-Fmoc-(α -苯基)-Gly(6e)以得到所需产物15i来制备(HPLC,98.1%): ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6), δ =8.85(m,2H),8.22(m,3H),8.45(m,1H),7.85(m,3H),7.65(m,1H),7.55(m,3H),7.45(m,5H),7.30(m,5H),5.58(m,1H),5.06(m,1H),4.58(m,1H),4.18(m,1H),2.90(m,2H),2.75(m,2H),1.60(m,5H),1.30(m,5H),1.10(m,2H)。MS(M+1):568.45。

[0286] 实施例10:(S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-(邻甲苯基)丙酰胺基)己酰胺(Phe-D-Arg-(2-甲基)-Phe-Lys-NH₂,15j)的合成

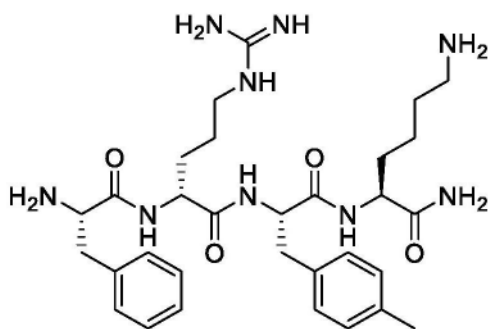


化合物 15j

[0288] 化合物15j是根据方案1,通过使用第一氨基酸L-Fmoc-(N6-Boc)-Lys(3a)、第二氨基酸L-Fmoc-(2-甲基)-Phe(6f)、第三氨基酸D-Fmoc-Arg(9a)和第四氨基酸L-Fmoc-Phe(12a)以得到所需产物15j来制备(HPLC,99.0%): ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6), δ =8.59(m,1H),8.52(m,1H),8.22(m,2H),8.03(m,1H),7.84(m,3H),7.60(m,1H),7.38(m,3H),7.25(m,3H),7.20(m,2H),7.08(m,5H),4.62(m,1H),4.32(m,1H),4.15(m,2H),3.10(m,1H),2.98(m,2H),2.80(m,5H),2.32(s,3H),1.68(m,1H),1.55(m,3H),1.38(m,3H),1.10(m,1H),0.88(m,2H)。MS(M+1):610.45。

[0289] 实施例11:(S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-(对甲苯基)丙酰胺基)己酰胺(Phe-D-Arg-(4-甲基)-Phe-Lys-NH₂,15k)的合成

[0290]



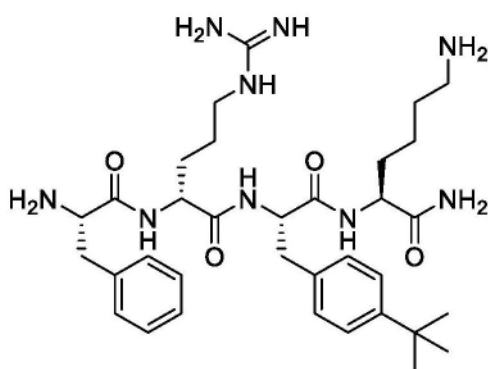
[0291]

化合物 15k

[0292] 化合物15k是根据方案1,通过使用第一氨基酸L-Fmoc-(N6-Boc)-Lys(3a)、第二氨基酸L-Fmoc-(4-甲基)-Phe(6g)、第三氨基酸D-Fmoc-Arg(9a)和第四氨基酸L-Fmoc-Phe(12a)以得到所需产物15k来制备(HPLC,98.7%):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆), δ =8.55(m,1H),8.42(m,1H),8.21(m,3H),8.14(m,1H),7.83(m,3H),7.58(m,1H),7.25(m,6H),7.15(m,5H),4.56(m,1H),4.20(m,1H),4.16(m,2H),3.00(m,3H),2.78(m,4H),2.24(s,3H),1.65(m,1H),1.55(m,3H),1.20(m,4H),0.85(m,2H)。MS(M+1):610.45。

[0293] 实施例12:(S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-(4-(叔丁基)苯基)丙酰胺基)己酰胺(Phe-D-Arg-(4-叔丁基)-Phe-Lys-NH₂,15l)的合成

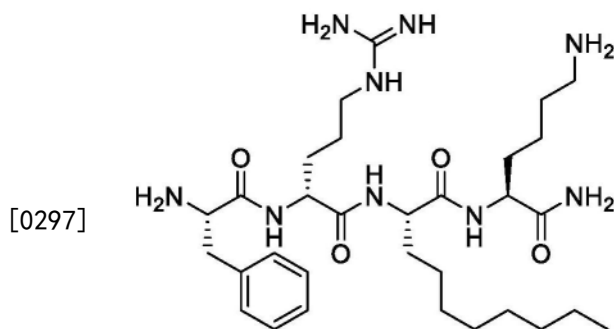
[0294]



化合物 15l

[0295] 化合物15l是根据方案1,通过使用第一氨基酸L-Fmoc-(N6-Boc)-Lys(3a)、第二氨基酸L-Fmoc-(4-叔丁基)-Phe(6h)、第三氨基酸D-Fmoc-Arg(9a)和第四氨基酸L-Fmoc-Phe(12a)以得到所需产物15l来制备(HPLC,98.9%):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆+D₂O), δ =7.25(m,5H),7.12(m,4H),4.45(m,1H),4.12(m,1H),3.95(m,2H),3.05(m,2H),2.90(m,1H),2.70(m,5H),1.60(m,4H),1.35(m,2H),1.16(s,9H),0.95(m,2H),0.70(m,2H)。MS(M+1):652.68。

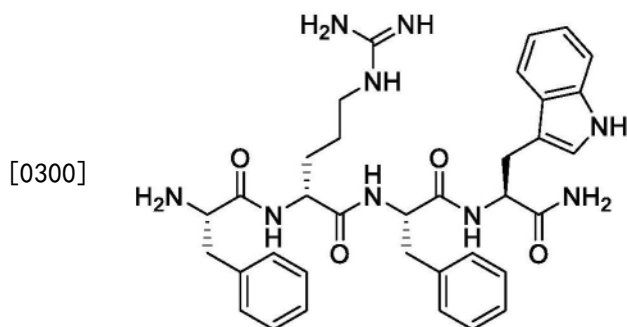
[0296] 实施例13:(S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-N-((S)-1,6-二氨基-1-氧代己烷-2-基)癸酰胺(Phe-D-Arg-(β -正庚基)-Ala-Lys-NH₂,15m)的合成



化合物 15m

[0298] 化合物15m是根据方案1,通过使用第一氨基酸L-Fmoc-(N6-Boc)-Lys(3a)、第二氨基酸L-Fmoc-(β-正庚基)-Phe(6i)、第三氨基酸D-Fmoc-Arg(9a)和第四氨基酸L-Fmoc-Phe(12a)以得到所需产物15m来制备(HPLC,99.2%):¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆),δ=8.66(m,1H),8.37(m,4H),7.95(m,1H),7.85(m,3H),7.28(m,1H),7.30(m,6H),7.05(m,1H),4.38(m,1H),4.25(m,1H),4.15(m,2H),3.00(m,4H),2.75(m,2H),1.65(m,2H),1.50(m,4H),1.25(m,18H),0.85(m,3H)。MS(M+1):618.67。

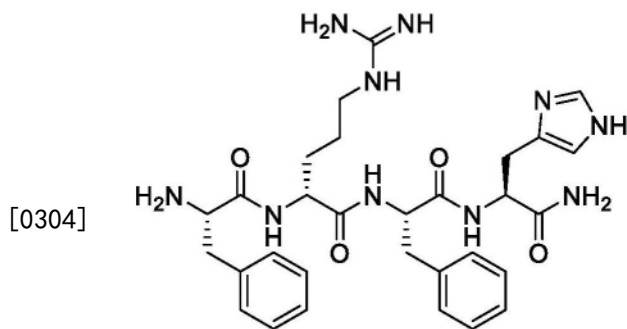
[0299] 实施例14:(R)-N-((S)-1-(((S)-1-氨基-3-(1H-吡啶-3-基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基)-1-氧代-3-苯基丙烷-2-基)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺(Phe-D-Arg-Phe-Trp-NH₂,15n)的合成



化合物 15n

[0302] 化合物15n是根据方案1,通过使用第一氨基酸L-Fmoc-Trp(3b)、第二氨基酸L-Fmoc-Phe(12a)、第三氨基酸D-Fmoc-Arg(9a)和第四氨基酸L-Fmoc-Phe(12a)以得到所需产物15n来制备(HPLC,98.7%):¹H NMR(400MHz,CD₃OD),δ=8.66(m,1H),7.70(m,1H),7.22(m,14H),4.78(m,1H),4.56(m,1H),4.15(m,1H),4.08(m,1H),3.73(m,1H),3.20(m,5H),2.92(m,2H),2.60(m,1H),1.40(m,2H),1.08(m,1H),0.88(m,1H)。MS(M+1):654.61。

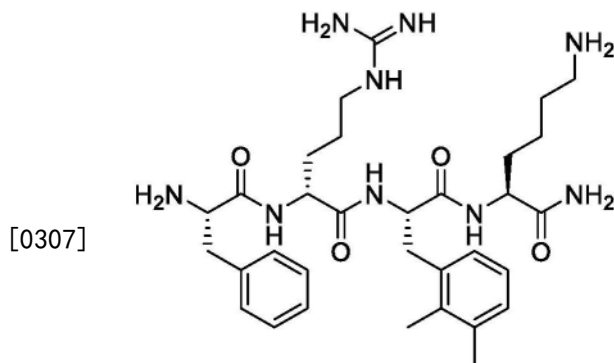
[0303] 实施例15:(R)-N-((S)-1-(((S)-1-氨基-3-(1H-咪唑-4-基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基)-1-氧代-3-苯基丙烷-2-基)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺(Phe-D-Arg-Phe-His-NH₂,15o)的合成



化合物 15o

[0305] 化合物15o是根据方案1,通过使用第一氨基酸L-Fmoc-His (3c)、第二氨基酸L-Fmoc-Phe (12a)、第三氨基酸D-Fmoc-Arg (9a) 和第四氨基酸L-Fmoc-Phe (12a) 以得到所需产物15o来制备 (HPLC, 98.6%) : ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) , $\delta=8.88(\text{s}, 1\text{H})$, $7.50(\text{s}, 1\text{H})$, $7.30(\text{m}, 10\text{H})$, $4.76(\text{m}, 1\text{H})$, $4.59(\text{m}, 1\text{H})$, $4.22(\text{m}, 1\text{H})$, $4.16(\text{m}, 1\text{H})$, $3.35(\text{m}, 1\text{H})$, $3.20(\text{m}, 4\text{H})$, $3.00(\text{m}, 2\text{H})$, $2.90(\text{m}, 1\text{H})$, $1.40(\text{m}, 2\text{H})$, $1.06(\text{m}, 2\text{H})$ 。MS (M+1) : 605.47。

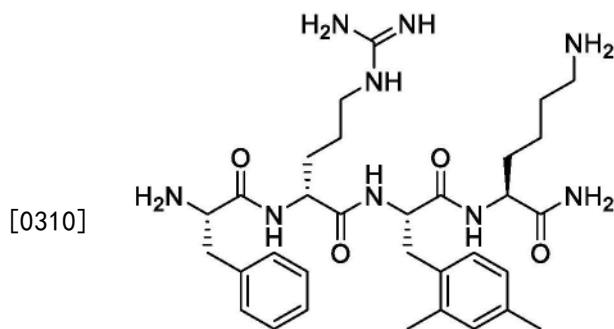
[0306] 实施例16: (S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-(2,3-二甲基苯基)丙酰胺基)己酰胺 (Phe-D-Arg-(2,3-二甲基)-Phe-Lys- NH_2 , 15p) 的合成



化合物 15p

[0308] 化合物15p是根据方案1,通过使用第一氨基酸L-Fmoc-Lys (3a)、第二氨基酸L-Fmoc-(2,3-二甲基)-Phe (6j)、第三氨基酸D-Fmoc-Arg (9a) 和第四氨基酸L-Fmoc-Phe (12a) 以得到所需产物15p来制备 (HPLC, 99.1%) : ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) , $\delta=7.32(\text{m}, 5\text{H})$, $7.02(\text{m}, 3\text{H})$, $4.62(\text{m}, 1\text{H})$, $4.43(\text{m}, 1\text{H})$, $4.12(\text{m}, 2\text{H})$, $3.45(\text{m}, 1\text{H})$, $3.12(\text{m}, 2\text{H})$, $2.96(\text{m}, 3\text{H})$, $2.90(\text{m}, 2\text{H})$, $2.30(\text{s}, 3\text{H})$, $2.28(\text{s}, 3\text{H})$, $1.65-1.90(\text{m}, 4\text{H})$, $1.50(\text{m}, 2\text{H})$, $1.35(\text{m}, 2\text{H})$, $1.16(\text{m}, 1\text{H})$, $0.96(\text{m}, 1\text{H})$ 。MS (M+1) : 624.31。

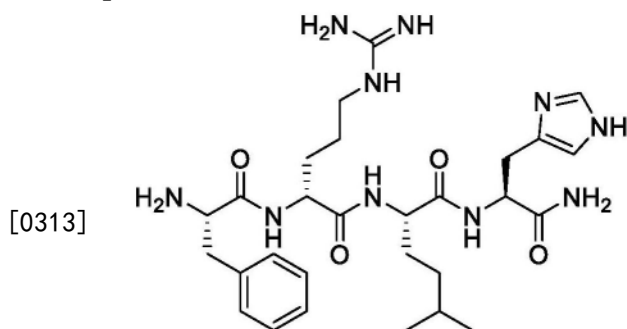
[0309] 实施例17: (S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-(2,4-二甲基苯基)丙酰胺基)己酰胺 (Phe-D-Arg-(2,4-二甲基)-Phe-Lys- NH_2 , 15q) 的合成



化合物 15q

[0311] 化合物15q是根据方案1,通过使用第一氨基酸L-Fmoc-Lys (3a)、第二氨基酸L-Fmoc-(2,4-二甲基)-Phe (6k)、第三氨基酸D-Fmoc-Arg (9a) 和第四氨基酸L-Fmoc-Phe (12a) 以得到所需产物15q来制备 (HPLC, 99.4%) : ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) , $\delta=7.32$ (m, 5H) , 7.06 (m, 1H) , 6.98 (s, 1H) , 6.92 (m, 1H) , 4.61 (m, 1H) , 4.41 (m, 1H) , 4.13 (m, 2H) , 3.32 (m, 1H) , 3.14 (m, 2H) , 2.98 (m, 3H) , 2.88 (m, 2H) , 2.34 (s, 3H) , 2.27 (s, 3H) , 1.60-1.90 (m, 4H) , 1.55 (m, 2H) , 1.35 (m, 2H) , 1.10 (m, 2H) 。MS (M+1) : 624.45。

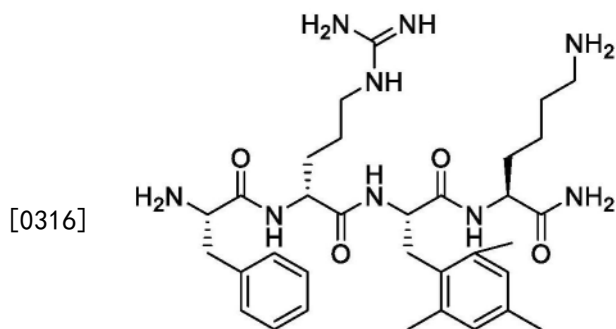
[0312] 实施例18: (S)-N-((S)-1-氨基-3-(1H-咪唑-4-基)-1-氧代丙烷-2-基)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-5-甲基己酰胺 (Phe-D-Arg-homoLeu-His-NH₂, 15r) 的合成



化合物 15r

[0314] 化合物15r是根据方案1,通过使用第一氨基酸L-Fmoc-His (3c)、第二氨基酸L-Fmoc-homoLeu (6l)、第三氨基酸D-Fmoc-Arg (9a) 和第四氨基酸L-Fmoc-Phe (12a) 以得到所需产物15r来制备 (HPLC, 98.6%) : ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) , $\delta=8.86$ (s, 1H) , 7.33 (m, 6H) , 4.65 (m, 1H) , 4.20 (m, 3H) , 3.30 (m, 1H) , 3.15 (m, 5H) , 1.80 (m, 1H) , 1.70 (m, 1H) , 1.60 (m, 3H) , 1.35 (m, 2H) , 1.20 (m, 2H) , 0.90 (d, J=6.8Hz, 6H) 。MS (M+1) : 585.45。

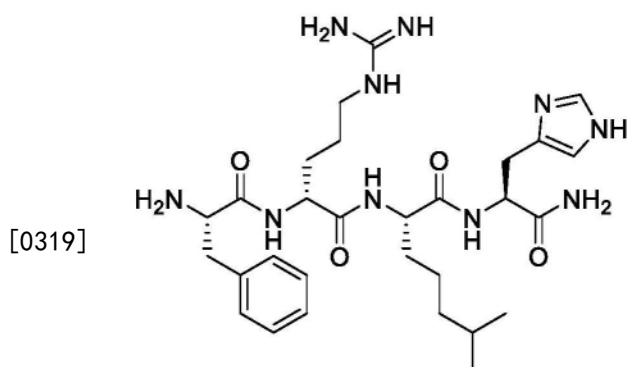
[0315] 实施例19: (S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-均三甲苯丙酰胺基)己酰胺 (Phe-D-Arg-(2,4,6-三甲基)-Phe-Lys-NH₂, 15s) 的合成



化合物 15s

[0317] 化合物15s是根据方案1,通过使用第一氨基酸L-Fmoc-Lys (3a)、第二氨基酸L-Fmoc-(2,4,6-三甲基)-Phe (6m)、第三氨基酸D-Fmoc-Arg (9a)和第四氨基酸L-Fmoc-Phe (12a)以得到所需产物15s来制备 (HPLC, 98.6%) : ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) , $\delta=7.32$ (m, 5H) , 6.82 (s, 2H) , 4.66 (m, 1H) , 4.32 (m, 1H) , 4.18 (m, 2H) , 3.28 (m, 1H) , 3.15 (m, 2H) , 3.00 (m, 5H) , 2.24 (s, 6H) , 2.22 (s, 3H) , 1.88 (m, 1H) , 1.72 (m, 2H) , 1.50 (m, 5H) , 1.12 (m, 2H) 。MS (M+1) : 638.61。

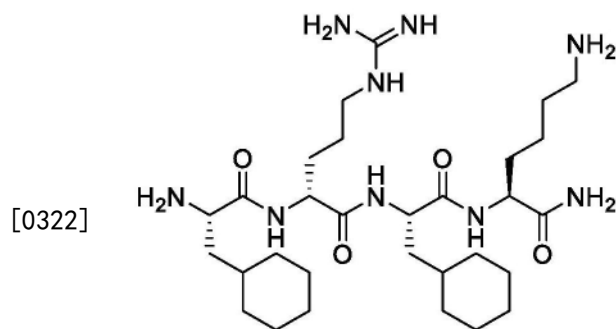
[0318] 实施例20: (S)-N-((S)-1-氨基-3-(1H-咪唑-4-基)-1-氧代丙烷-2-基)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-6-甲基庚酰胺 (Phe-D-Arg-(2,4,6-三甲基)-Phe-Lys-NH₂, 15t) 的合成



化合物 15t

[0320] 化合物15t是根据方案1,通过使用第一氨基酸L-Fmoc-His (3c)、第二氨基酸L-Fmoc-(β -(3-甲基丁烷-1-基))-Ala (6n)、第三氨基酸D-Fmoc-Arg (9a)和第四氨基酸L-Fmoc-Phe (12a)以得到所需产物15t来制备 (HPLC, 99.5%) : ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) , $\delta=8.85$ (d, $J=1.2\text{Hz}$, 1H) , 7.33 (m, 6H) , 4.73 (m, 1H) , 4.23 (m, 3H) , 3.28 (m, 1H) , 3.12 (m, 5H) , 1.75 (m, 2H) , 1.65 (m, 4H) , 1.35 (m, 3H) , 1.20 (m, 2H) , 0.89 (m, 6H) 。MS (M+1) : 599.90。

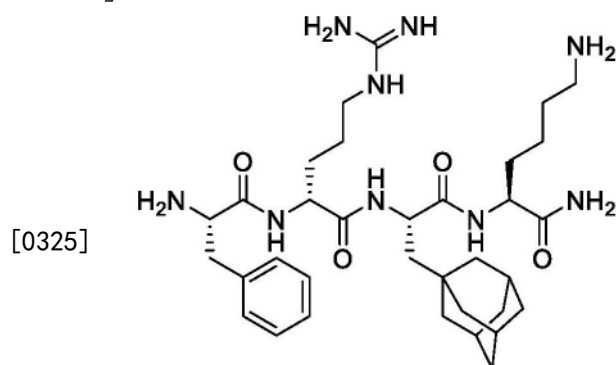
[0321] 实施例21: (S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-环己基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-环己基丙酰胺基)己酰胺 (Cha-D-Arg-Cha-Lys-NH₂, 15u) 的合成



化合物 15u

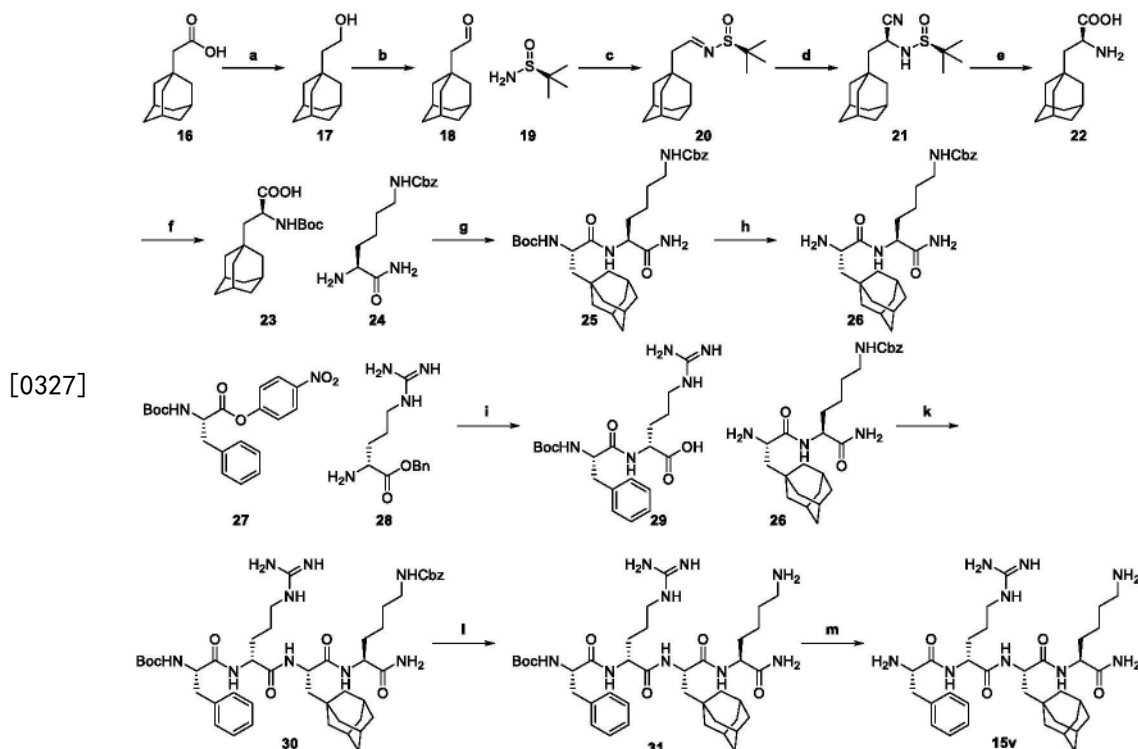
[0323] 化合物15u是根据方案1,通过使用第一氨基酸L-Fmoc-Lys (3a)、第二氨基酸L-Fmoc-Cha (6a)、第三氨基酸D-Fmoc-Arg (9a) 和第四氨基酸L-Fmoc-Cha (6a) 以得到所需产物15u来制备 (HPLC, 98.1%) : ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) , $\delta=4.38$ (m, 3H) , 4.04 (m, 1H) , 3.27 (m, 2H) , 2.96 (m, 2H) , $1.10-1.90$ (m, 32H) , 1.00 (m, 4H) 。MS (M+1) : 608.60。

[0324] 实施例22: (2S)-2-((2S)-3-(金刚烷-1-基)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)丙酰胺基)-6-氨基己酰胺 (Phe-D-Arg-(β -金刚烷基-1-基)-Ala-Lys- NH_2 , 15v) 的合成



化合物 15v

[0326] 方案2:



[0327] 步骤a: 2-(金刚烷-1-基)乙-1-醇(17)的合成

[0328] 在配备有搅拌器、温度计的5L容积的三颈烧瓶中, 装入1-金刚烷基乙酸(16, 300g, 1.53mol)、四氢呋喃(3L), 并用搅拌器搅拌并冷却至5℃。将硼烷/THF复合物(1M THF溶液, 2.6L)置于滴液漏斗中, 将其逐滴添加到上述溶液中。在逐滴添加完成后, 将混合物搅拌过夜, 同时保持在10℃。将反应混合物缓慢倒入3L冰水中, 并将混合物搅拌30分钟。之后, 将其用乙酸乙酯(2L)萃取3次, 用饱和NaHCO₃水溶液(2L)和盐水(2L)洗涤乙酸乙酯层。在用无水硫酸镁干燥乙酸乙酯层后, 在真空中蒸发溶剂得到粗产物, 将所述粗产物重新溶解在2L水/甲醇(10/90, v/v)中, 然后浓缩以提供呈白色固体的化合物17(270g, 97%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ4.19-4.17 (t, J=4.0Hz, 1H), 3.47-3.42 (m, 2H), 1.91-1.88 (m, 3H), 1.68-1.61 (m, 6H), 1.48-1.47 (m, 6H), 1.26-1.22 (m, 2H) ppm。

[0329] 1) 步骤b: 2-(金刚烷-1-基)乙醛(18)的合成

[0330] 取出烤箱干燥的三颈烧瓶, 并用DCM(2L)和DMSO(316g, 4.04mol)填充。冷却至-78℃后, 逐滴添加草酰氯(270g, 2.10mol), 并且在添加后, 将混合物在-78℃下搅拌15分钟。随后, 将1-金刚烷基乙醇(17, 270g, 1.50mol)于DCM(2L)中的溶液逐滴添加至反应混合物中。在-78℃下搅拌1小时后, 逐滴添加Et₃N(818g, 8.09mol), 并且再搅拌30分钟后, 将反应混合物温热至室温。添加冷NH₄Cl溶液(2L)和冷水(2L), 并将反应混合物搅拌15分钟。将有机层用盐水洗涤, 经Na₂SO₄干燥, 过滤并浓缩, 得到呈浅黄色油的所需产物18(265g, 粗)。所述产物无需进一步纯化即可立即用于下一步骤。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ9.79-9.78 (t, J=4.0Hz, 1H), 2.11-2.10 (d, J=4.0Hz, 2H), 1.95-1.92 (m, 3H), 1.70-1.59 (m, 12H) ppm。

[0331] 2) 步骤c: (S)-N-((E)-2-(金刚烷-1-基)亚乙基)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺(20)的合成

[0332] 在室温下在氮气氛围下将四乙氧基钛(700g, 3.06mol)添加到1-金刚烷基乙醛(18, 265g, 1.49mol)和(S)-叔丁基亚磺酰胺(19, 223g, 1.84mol)于THF(4L)中的搅拌溶液中。将

混合物在15℃下搅拌12小时。TLC和HPLC指示反应完成。然后添加乙酸乙酯(4L)和水(4L)。将反应混合物通过硅藻土过滤,并用乙酸乙酯(2L)萃取水层。浓缩有机层,并通过硅胶柱色谱法(PE/EtOAc=10/1)纯化,得到呈白色固体的产物20(350g,83%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃):δ8.09-8.05(t, J=6.0Hz, 1H), 2.23-2.21(m, 2H), 1.94-1.88(m, 3H), 1.66-1.54(m, 12H), 1.14(s, 9H) ppm。

[0334] 3) 步骤d: (S)-N-((S)-2-(金刚烷-1-基)-1-氰基乙基)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺(21)的合成

[0335] 向化合物20(350g, 1.24mol)和CsF(246g, 1.62mol)于THF(4L)中的混合物中添加TMSCN(148g, 1.49mol)。将反应混合物在25℃下搅拌12小时。TLC和HPLC指示反应完成。冷却至-5℃,并通过添加饱和NaHCO₃溶液(2L)淬灭。将水层用乙酸乙酯(2L)萃取。将有机相用水和盐水洗涤。将合并的有机层用Na₂SO₄干燥,并在减压下浓缩。将所得残余物溶解于DCM(200mL)中且添加PE(2L)。将混合物在室温下搅拌1小时。将析出的沉淀物过滤。将滤饼用PE(500mL)洗涤,干燥,得到呈白色固体的所需产物6(150g)。将滤液浓缩,并通过硅胶柱色谱法(PE/EtOAc=2/1)纯化,得到黄色油状物(80g),将其溶解于DCM(80mL)中,然后添加PE(800mL)。将混合物在室温下搅拌1小时。将析出的沉淀物过滤。将滤饼用PE(300mL)洗涤,干燥,得到呈白色固体的所需产物21(62g)。总计212g,产率:55%, %ee>99%。 $[\alpha]_D^{21}=34.61$ (c=1, CHCl₃)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃):δ4.25-4.19(m, 1H), 3.61-3.59(m, 1H), 2.06-1.98(m, 3H), 1.75-1.61(m, 14H), 1.27(s, 9H) ppm。

[0336] 4) 步骤e: (S)-3-(金刚烷-1-基)-2-氨基丙酸(22)的合成

[0337] 将化合物21(50g, 0.163mol)溶解于6N HCl(5L)中并加热至回流,并搅拌过夜(并行进行三批,总计150g化合物21)。将反应混合物在冰上冷却,从而导致产物沉淀。通过过滤收集沉淀物,用冰冷的6N HCl洗涤并干燥,得到呈白色固体的所需产物22(108g,产率:85%)。¹H NMR(400MHz, CD₃OD):δ4.02-3.99(t, J=6.0Hz, 1H), 2.05-1.98(m, 3H), 1.90-1.85(m, 1H), 1.81-1.59(m, 12H), 1.53-1.47(m, 1H) ppm。

[0338] 5) 步骤f: (S)-3-(金刚烷-1-基)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酸(23)的合成

[0339] 在0℃下向金刚烷基-丙氨酸(22, 108g, 0.415mol)于H₂O(500mL)中的溶液添加K₂CO₃(115g, 0.831mol)。在10分钟后,逐滴添加二噁烷(1L)中的Boc₂O(181g, 0.831mol)。搅拌5小时后,LC-MS分析表明起始材料的完全消耗。将反应混合物用H₂O(2L)稀释,并使用0.5N HCl酸化至pH=4。通过过滤收集沉淀物,得到产物(80g, HPLC纯度>98%, ee>98%)。将滤液用EtOAc(2x 1L)萃取。将合并的有机层用盐水(1L)洗涤,经Na₂SO₄干燥并浓缩,得到粗残余物(45g),将其溶解于氯仿(125mL)中,并添加PE(1.25L)。通过过滤收集所产生的沉淀,用PE洗涤并干燥,得到呈白色固体的23(22g, HPLC纯度>98%, ee>98%)。总计102g,产率:76%。¹H NMR(400MHz, CDCl₃):δ5.37-5.35(M, 0.17H), 4.77-4.55(M, 0.74H), 4.36-4.33(M, 0.78H), 4.18-4.16(M, 0.19H), 1.91-1.88(m, 3H), 1.71-1.55(m, 13H), 1.44(s, 9H), 1.34-1.28(m, 1H) ppm。

[0340] 6) 步骤g: (S)-3-(金刚烷-1-基)-2-氨基丙酸(25)的合成

[0341] 向23(0.260g, 0.804mmol)和24(0.231g, 0.731mmol)于5mL干燥DCM中的混合物添加EDCI·HCl(0.210g, 1.096mmol),然后添加HOBt·H₂O(0.123g, 0.804mmol)。在10-15分钟后添加NMM(0.133g, 1.316mmol)并将混合物在环境温度下搅拌过夜。在减压下除去挥发物,

并将残余物用5%柠檬酸水溶液洗涤。通过快速反相色谱法纯化获得的白色固体,得到呈白色固体的25(0.320g)。¹H NMR(400MHz,甲醇-d₄) δ7.34(d, J=4.3Hz, 4H), 7.29(td, J=8.2, 4.0Hz, 1H), 5.06(s, 2H), 4.33(dd, J=8.7, 5.0Hz, 1H), 4.13(dd, J=9.2, 3.0Hz, 1H), 3.11(t, J=6.9Hz, 2H), 1.94(s, 3H), 1.86-1.33(m, 29H)。

[0342] 7) 步骤h: ((5S)-5-((2S)-3-(金刚烷-1-基)-2-((叔丁氧羰基羰基)氨基)丙酰胺基)-6-氨基-6-氧代己基)氨基甲酸苄酯(26)的合成

[0343] 向25(0.300g, 0.513mmol)于DCM(5mL)中的冷却溶液添加TFA(2mL)。然后除去冰/水浴并将混合物在环境温度下搅拌2小时。在减压下除去挥发物,并将残余物用甲苯浓缩(2x)。通过快速反相色谱法纯化得到0.200g的呈白色固体的26。¹H NMR(400MHz, 甲醇-d₄) δ7.34(d, J=4.5Hz, 4H), 7.32-7.27(m, 1H), 5.07(s, 2H), 4.40(dd, J=8.0, 6.0Hz, 1H), 3.95(dd, J=7.6, 5.4Hz, 1H), 3.12(t, J=6.9Hz, 2H), 1.97(s, 3H), 1.84(dd, J=14.4, 7.7Hz, 2H), 1.72(q, J=12.0Hz, 8H), 1.59(d, J=2.7Hz, 6H), 1.53(q, J=7.1Hz, 2H), 1.44(dd, J=14.4, 5.4Hz, 2H)。

[0344] 8) 步骤i: (叔丁氧基羰基)-L-苯丙氨酰基-D-精氨酸(29)的合成

[0345] 在室温下,向Boc-Phe-ONp(27, 20.5g, 52.94mmol)于DMF(300mL)中的溶液添加D-Arg-OH·HCl(28, 9.30g, 44.1mmol)。将反应混合物搅拌过夜。然后将反应混合物倒入冰冷的水中,并滤出沉淀物(硝基苯酚)。在减压下除去溶剂。将黄色固体用DCM洗涤直至颜色消失。在干燥后,得到16.0g(产率-79%)的29。HPLC纯度-98%。¹H NMR(400MHz, 甲醇-d₄) δ7.31-7.19(m, 5H), 4.30-4.20(m, 2H), 3.20-3.10(m, 3H), 2.80(dd, J=9.0, 5.1Hz, 1H), 1.87-1.81(m, 1H), 1.73-1.64(m, 1H), 1.53-1.45(m, 2H), 1.35(s, 9H)。

[0346] 9) 步骤j: ((9S, 12S, 15R, 18S)-12-(金刚烷-1-基甲基)-9-氨基甲酰基-15-(3-胍基丙基)-3, 11, 14, 17-四氧代-1, 19-二苯基-2-氧杂-4, 10, 13, 16-四氮杂十九烷-18-基)氨基甲酸叔丁酯(30)的合成

[0347] 向26(0.200g, 0.384mmol)和Boc-Phe-D-Arg-OH(29, 0.211g, 0.461mmol)于5mL干燥DCM中的混合物添加EDCI·HCl(0.132g, 0.691mmol),然后一次性添加HOBt·H₂O(0.071g, 0.461mmol)。在10-15分钟后添加NMM(0.070g, 0.691mmol)并将混合物在环境温度下搅拌过夜。之后,在减压下除去挥发物。将残余物通过快速反相色谱法纯化,得到呈白色粉末的30(0.320g)。

[0348] 10) 步骤k: ((2S)-1-(((2R)-1-(((2S)-3-(金刚烷-1-基)-1-(((S)-1, 6-二氨基-1-氧代己烷-2-基)氨基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基)-5-胍基-1-氧代戊烷-2-基)氨基)-1-氧代-3-苯基丙烷-2-基)氨基甲酸叔丁酯(31)的合成

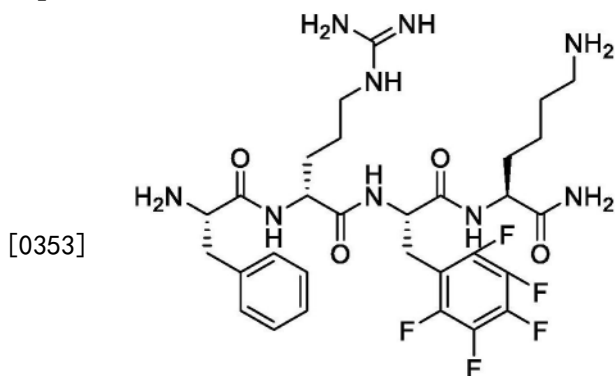
[0349] 向30(0.245g, 0.265mmol)于DCM(5mL)中的冷却溶液添加TFA(2mL)。然后除去冰/水浴并将混合物在环境温度下搅拌2小时。在减压下除去挥发物,并将残余物用甲苯浓缩(2x)。通过快速反相色谱法和制备型HPLC纯化得到0.125g呈白色固体的31。

[0350] 11) 步骤l: (2S)-2-((2S)-3-(金刚烷-1-基)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)丙酰胺基)-6-氨基己酰胺(15v)的合成

[0351] 向含有31(0.100g, 0.098mmol)和Pd/C 10%w/w(0.016g, 0.015mmol)的烧瓶添加MeOH(10mL)。用H₂冲洗烧瓶,并将混合物在室温下搅拌2小时。之后,将混合物过滤并在减压下除去挥发物。将残余物通过制备型HPLC纯化。得到呈白色粉末的15v(48mg)。(HPLC纯度在

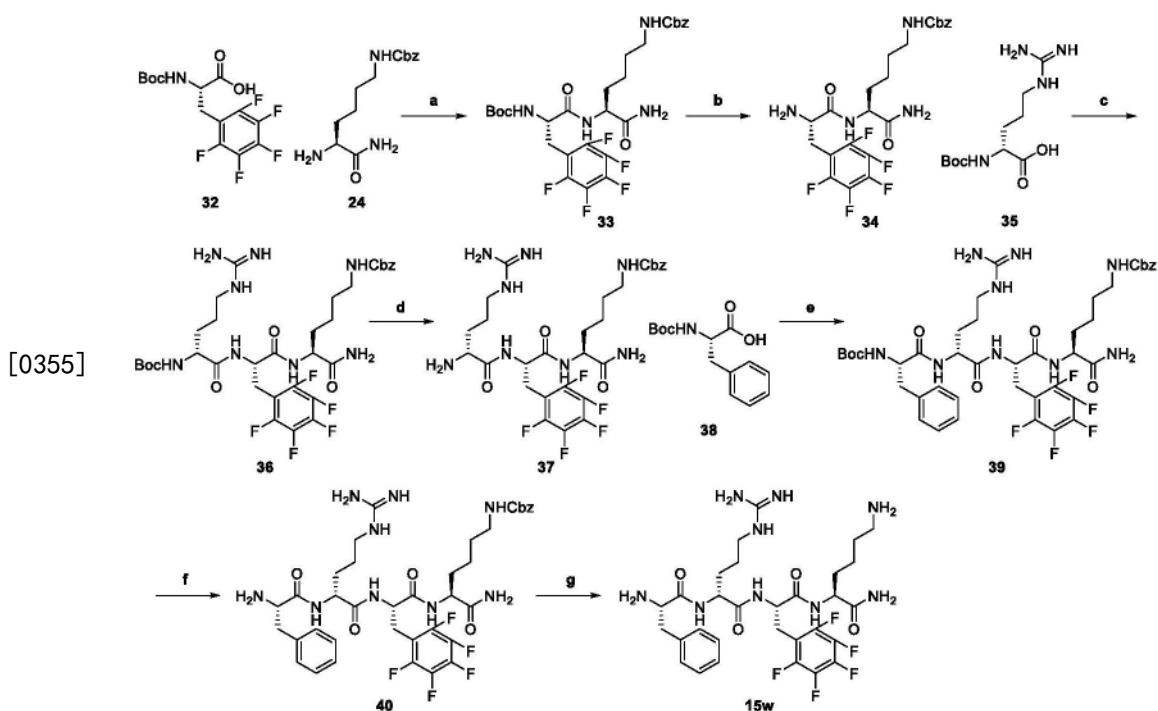
210nm是98.7%)。¹H NMR (400MHz, 甲醇-d₄) δ7.34-7.20 (m, 5H), 4.35 (d, J=14.5Hz, 2H), 4.14 (dd, J=8.3, 6.2Hz, 1H), 3.86 (t, J=7.5Hz, 1H), 3.10 (td, J=7.1, 2.1Hz, 2H), 3.06-2.97 (m, 2H), 2.93 (td, J=8.0, 2.9Hz, 2H), 1.94 (s, 3H), 1.91-1.79 (m, 2H), 1.78-1.56 (m, 13H), 1.55-1.47 (d, J=9.5Hz, 5H), 1.45-1.29 (m, 4H)。MS:EI-MS:m/z 654.5[M+1]。

[0352] 实施例23: (S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-(全氟苯基)丙酰胺基)己酰胺 (Phe-D-Arg-(2,3,4,5,6-五氟)-Phe-Lys-NH₂, 15w) 的合成



化合物 15w

[0354] 方案3:



[0356] 1) 步骤a: ((S)-6-氨基-5-((S)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(全氟苯基)丙酰胺基)-6-氧代己基)氨基甲酸苄酯 (33) 的合成

[0357] 向Phe(5F)-OH (32, 400mg, 1.12mmol) 和Lys(Cbz)-NH₂ (24, 445mg, 1.16mmol) 于DMF (15mL) 中的混合物添加HOBT·H₂O (208mg, 1.36mmol)、EDC·HCl (260mg, 1.36mmol) 和DIPEA (472μl, 3.39mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。然后除去DMF, 并通过快速色谱法 (0%-5% 于DCM中的MeOH) 纯化粗产物, 得到呈白色固体的33 (410mg, 59%)。

[0358] 2) 步骤b: ((S)-6-氨基-5-((S)-2-氨基-3-(全氟苯基)丙酰胺基)-6-氧代己基)氨基甲酸苄酯(34)的合成

[0359] 向33(410mg, 0.666mmol)于DCM(10mL)中的冷却(0℃)溶液中添加TFA(2mL)。在5分钟后,除去冰浴,并且在环境温度下搅拌混合物2小时。在减压下除去挥发物,并将残余物用甲苯浓缩两次。获得呈白色固体的34(460mg),其无需进一步纯化即可使用。

[0360] 3) 步骤c: ((6R,9S,12S)-12-氨基甲酰基-6-(3-胍基丙基)-2,2-二甲基-4,7,10-三氧代-9-((全氟苯基)甲基)-3-氧杂-5,8,11-三氮杂十六烷-16-基)氨基甲酸苄酯(36)的合成

[0361] 向34(200mg, 0.318mmol)和Boc-D-Arg-OH(35,83mg, 0.325mmol)于DMF(15mL)中的混合物添加HOBt·H₂O(58.4mg, 0.382mmol)、EDC·HCl(121mg, 0.336mmol)和DIPEA(187μl, 1.59mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。然后除去DMF,并通过快速色谱法(0%-10%于DCM中的MeOH)纯化粗产物,得到呈白色固体的36(180mg, 72%)。

[0362] 4) 步骤d: ((S)-6-氨基-5-((S)-2-((R)-2-氨基-5-胍基戊酰胺基)-3-(全氟苯基)丙酰胺基)-6-氧代己基)氨基甲酸苄酯(37)的合成

[0363] 向36(175mg, 0.222mmol)于DCM(5mL)中的冷却(0℃)溶液中添加TFA(1mL)。在5分钟后,除去冰浴,并且在环境温度下搅拌混合物2小时。在减压下除去挥发物,并将残余物用甲苯浓缩两次。获得呈白色固体的37(210mg),其无需进一步纯化即可使用。

[0364] 5) 步骤e: ((6S,9R,12S,15S)-6-苄基-15-氨基甲酰基-9-(3-胍基丙基)-2,2-二甲基-4,7,10,13-四氧代-12-((全氟苯基)甲基)-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十九烷-19-基)氨基甲酸苄酯(39)的合成

[0365] 向37(210mg, 0.229mmol)和Boc-Phe-OH(38,62mg, 0.230mmol)于DMF(15mL)中的混合物添加HOBt·H₂O(42.0mg, 0.382mmol)、EDC·HCl(88mg, 0.458mmol)和DIPEA(160μl, 1.45mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。然后除去DMF,并通过快速色谱法(0%-15%于DCM中的MeOH)纯化粗产物,得到呈白色固体的39(220mg)。

[0366] 6) 步骤f: ((S)-6-氨基-5-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-(全氟苯基)丙酰胺基)-6-氧代己基)氨基甲酸苄酯(40)的合成

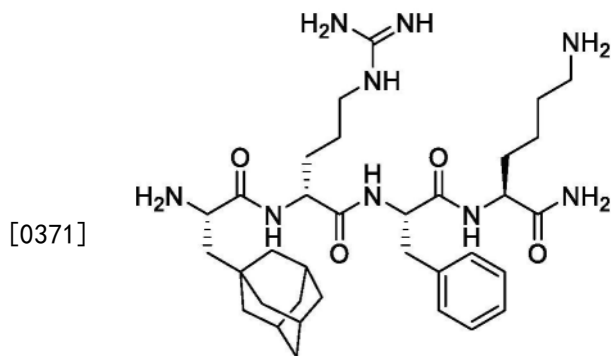
[0367] 向39(215mg, 0.189mmol)于DCM(5mL)中的冷却(0℃)溶液中添加TFA(1.0mL)。在5分钟后,除去冰浴,并且在环境温度下搅拌混合物2小时。在减压下除去挥发物,并将残余物用甲苯浓缩两次。获得呈淡黄色油状物的40(220mg),其无需进一步纯化即可使用。

[0368] 7) 步骤g: (S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-(全氟苯基)丙酰胺基)己酰胺(15w)的合成

[0369] 在室温下向40(210mg, 0.200mmol)于MeOH(7mL) Pd/C(10%w/w, 15mg)中的溶液鼓入氢气3小时。然后将反应混合物通过硅藻土垫过滤,并用MeOH(10mL)洗涤。通过蒸发除去溶剂。得到150mg白色固体。通过HPLC进行纯化。分离出呈白色固体的15w(49mg, 杂质<5%)。¹H NMR(400MHz, 甲醇-d₄) δ7.38-7.24(m, 5H), 4.55(dd, J=8.9, 6.4Hz, 1H), 4.38(dd, J=8.6, 5.5Hz, 1H), 4.13-4.05(m, 2H), 3.34(dd, J=14.0, 6.1Hz, 1H), 3.15-3.00(m, 5H), 2.95-2.89(m, 2H), 1.89-1.34(m, 8H), 1.28-1.12(m, 2H)。MS:EI-MS;m/z 686.6[M+1]。

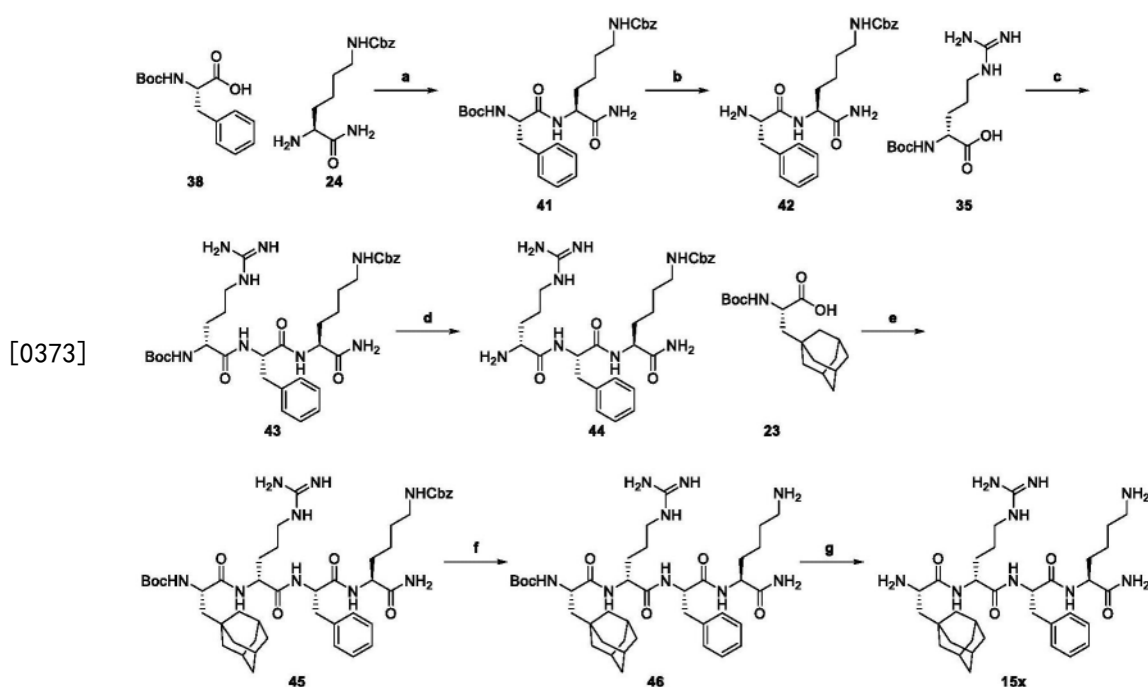
[0370] 实施例24: (2S)-2-((2S)-2-((2R)-2-((2S)-3-(金刚烷-1-基)-2-氨基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-苯基丙酰胺基)-6-氨基己酰胺((β-金刚烷-1-基)-Ala-D-Arg-

Phe-Lys-NH₂, 15x) 的合成



化合物 15x

[0372] 方案4:



[0374] 1) 步骤a: ((S)-6-氨基-5-((S)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-苯基丙酰胺基)-6-氧代己基)氨基甲酸苄酯(41)的合成

[0375] 向38(0.844g, 3.483mmol)和24(1.0g, 3.166mmol)于25mL干燥DCM中的混合物添加EDCI·HCl(0.944g, 4.749mmol), 然后添加HOBt·H₂O(0.533g, 3.483mmol)。在10-15分钟后添加NMM(0.576g, 5.699mmol)并将混合物在环境温度下搅拌过夜。然后在减压下除去挥发物, 并将残余物用5%柠檬酸水溶液洗涤。通过快速反相色谱法纯化所获得的白色固体, 得到呈白色固体的41(1.100g)。¹H NMR(400MHz, 甲醇-d₄) δ7.33-7.19(m, 10H), 5.05(s, 2H), 4.30(dd, J=9.0, 5.7Hz, 2H), 3.10(q, J=5.8, 4.6Hz, 3H), 2.85(dd, J=13.7, 9.1Hz, 1H), 1.87-1.78(m, 1H), 1.69-1.60(m, 1H), 1.55-1.46(m, 2H), 1.37(s, 11H)。

[0376] 2) 步骤b: ((S)-6-氨基-5-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-6-氧代己基)氨基甲酸苄酯(42)的合成

[0377] 将41(0.325g, 0.617mmol)溶解于DCM(5mL)中。将溶液冷却至0℃-5℃, 并添加Et₂O(1.54mL)中的2M HCl。然后除去冷却并将混合物在室温下搅拌过夜。在减压下除去挥发物,

并将残余物用Et₂O (3x) 浓缩。将沉淀物在环境温度在大气压下干燥。得到呈浅灰色固体的42 (0.257g)。¹H NMR (400MHz, 甲醇-d₄) δ 7.39-7.27 (m, 9H), 5.06 (s, 2H), 4.36 (dd, J=8.5, 5.4Hz, 1H), 4.14 (dd, J=8.5, 5.7Hz, 1H), 3.29 (dd, J=14.4, 5.6Hz, 1H), 3.11 (t, J=6.9Hz, 2H), 3.03 (dd, J=14.3, 8.5Hz, 1H), 1.87-1.78 (m, 1H), 1.74-1.65 (m, 1H), 1.52 (h, J=7.7, 7.3Hz, 2H), 1.46-1.34 (m, 2H)。

[0378] 3) 步骤c: ((6R, 9S, 12S) -9-苄基-12-氨基甲酰基-6-(3-胍基丙基)-2,2-二甲基-4,7,10-三氧代-3-氧杂-5,8,11-三氮杂十六烷-16-基) 氨基甲酸苄酯 (43) 的合成

[0379] 向42 (0.220g, 0.475mmol) 和Boc-D-Arg (35, 0.163g, 0.523mmol) 于10mL干燥DCM中的混合物添加EDCI·HCl (0.137g, 0.713mmol), 然后添加HOBt·H₂O (0.080g, 0.523mmol)。在10-15分钟后添加NMM (0.106g, 1.045mmol) 并将混合物在环境温度下搅拌过夜。在减压下除去挥发物。将残余物通过快速反相色谱法纯化, 得到呈白色固体的43 (0.170g)。¹H NMR (400MHz, 甲醇-d₄) δ 7.34-7.20 (m, 10H), 5.06 (s, 2H), 4.63 (dd, J=10.0, 4.6Hz, 1H), 4.29 (dd, J=9.8, 4.6Hz, 1H), 3.92 (t, J=7.0Hz, 1H), 3.29 (dd, J=10.8, 4.5Hz, 1H), 3.12 (t, J=6.4Hz, 2H), 3.03-2.99 (m, 2H), 2.90 (dd, J=13.9, 10.3Hz, 1H), 1.94-1.85 (m, 1H), 1.81-1.70 (m, 1H), 1.60-1.47 (m, 7H), 1.41 (s, 9H), 1.23-1.14 (m, 1H)。

[0380] 4) 步骤d: ((S) -6-氨基-5-((S) -2-((R) -2-氨基-5-胍基戊酰胺基)-3-苯基丙酰胺基)-6-氧代己基) 氨基甲酸苄酯 (44) 的合成

[0381] 向43 (0.170g, 0.236mmol) 于DCM (5mL) 中的冷却溶液添加TFA (2mL)。然后除去冰/水浴并将混合物在环境温度下搅拌2小时。在减压下除去挥发物, 并将残余物用甲苯浓缩 (2x)。通过反相快速色谱法纯化, 得到0.140g的呈白色固体的44。¹H NMR (400MHz, 甲醇-d₄) δ 7.34-7.21 (m, 10H), 5.06 (s, 2H), 4.75 (dd, J=10.8, 4.9Hz, 1H), 4.35 (dd, J=9.3, 5.0Hz, 1H), 3.85 (t, J=6.4Hz, 1H), 3.30-3.25 (m, 1H), 3.16-3.10 (m, 2H), 2.97 (t, J=7.0Hz, 2H), 2.88 (dd, J=13.9, 11.0Hz, 1H), 1.88-1.79 (m, 1H), 1.74-1.58 (m, 3H), 1.57-1.36 (m, 4H), 1.25-1.14 (m, 2H)。

[0382] 5) 步骤e: ((6S, 9R, 12S, 15S) -6-(金刚烷-1-基甲基)-12-苄基-15-氨基甲酰基-9-(3-胍基丙基)-2,2-二甲基-4,7,10,13-四氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十九烷-19-基) 氨基甲酸苄酯 (45) 的合成

[0383] 向44 (0.140g, 0.213mmol) 和23 (0.090g, 0.277mmol) 于5mL干燥DCM中的混合物添加EDCI·HCl (0.073g, 0.383mmol), 然后添加HOBt·H₂O (0.039g, 0.256mmol)。在10-15分钟后添加NMM (0.039g, 0.383mmol) 并将混合物在环境温度下搅拌过夜。然后在减压下除去挥发物, 并将残余物45用反相快速柱彻底冲洗, 并且无需进一步纯化即可用于下一步骤。

[0384] 6) 步骤f: ((2S) -3-(金刚烷-1-基)-1-(((R) -1-(((S) -1-(((S) -1,6-二氨基-1-氧代己烷-2-基) 氨基)-1-氧代-3-苯基丙烷-2-基) 氨基)-5-胍基-1-氧代戊烷-2-基) 氨基)-1-氧代丙烷-2-基) 氨基甲酸叔丁酯 (46) 的合成

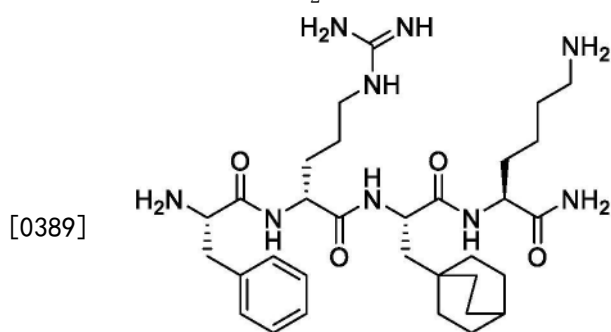
[0385] 向45 (0.105g, 0.114mmol) 于DCM (5mL) 中的冷却溶液添加TFA (2mL)。然后除去冰/水浴并将混合物在环境温度下搅拌2小时。在减压下除去挥发物, 并将残余物用甲苯浓缩 (2x)。通过反相快速色谱法和制备型HPLC纯化得到0.065g呈白色固体的46。¹H NMR (400MHz, 甲醇-d₄) δ 7.31-7.18 (m, 10H), 5.04 (s, 2H), 4.65 (dd, J=11.2, 4.0Hz, 1H), 4.38 (dd, J=8.9, 5.5Hz, 1H), 4.08 (t, J=7.2Hz, 1H), 3.96-3.89 (m, 1H), 3.39 (dd, J=14.1,

3.7Hz, 1H), 3.18-3.08 (m, 2H), 3.01-2.93 (m, 2H), 2.78 (dd, J=14.0, 11.5Hz, 1H), 1.92 (s, 3H), 1.86-1.78 (m, 3H), 1.73-1.62 (m, 6H), 1.56-1.34 (m, 12H), 1.34-1.20 (m, 2H), 1.03-0.91 (m, 1H)。

[0386] 7) 步骤g: (2S)-2-((2S)-2-((2R)-2-((2S)-3-(金刚烷-1-基)-2-氨基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-苯基丙酰胺基)-6-氨基己酰胺 (15x) 的合成

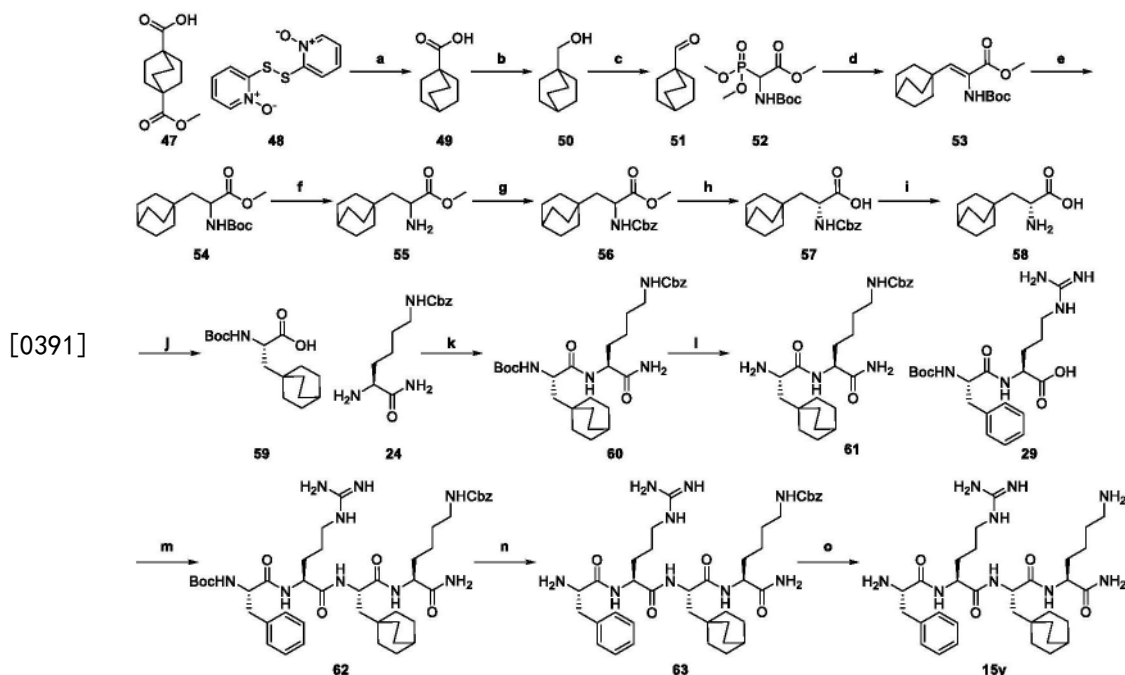
[0387] 向含有46(0.064g, 0.065mmol)和Pd/C 10%w/w(0.010g, 0.010mmol)的烧瓶添加MeOH(5mL)。用H₂冲洗烧瓶,并将混合物在室温下搅拌2小时。然后将混合物过滤并在减压下除去挥发物。将残余物在制备型HPLC上纯化,得到52mg呈白色固体的15x(HPLC纯度在210nm是95.4%)。¹H NMR(400MHz, 甲醇-d₄) δ7.31-7.20 (m, 5H), 4.66 (dd, J=11.3, 4.3Hz, 1H), 4.43 (dd, J=8.9, 5.5Hz, 1H), 4.15 (t, J=7.4Hz, 1H), 3.95 (dd, J=8.6, 4.6Hz, 1H), 3.39 (dd, J=14.1, 4.2Hz, 1H), 3.05-2.95 (m, 4H), 2.86 (dd, J=14.1, 11.3Hz, 1H), 1.95 (s, 3H), 1.90-1.80 (m, 3H), 1.76-1.64 (m, 8H), 1.59-1.43 (m, 10H), 1.37-1.29 (m, 2H), 1.13-1.02 (m, 1H)。MS:EI-MS:m/z 654.8[M+1]。

[0388] 实施例25: (S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-(双环[2.2.2]辛-1-基)丙酰胺基)己酰胺 (Phe-D-Arg-(β-双环[2.2.2]辛烷-1-基)-Ala-Lys-NH₂, 15y) 的合成



化合物 15y

[0390] 方案5:



[0392] 1) 步骤a: 双环[2.2.2]辛烷-1-甲酸(49)的合成

[0393] 向烧瓶中装入47(35g, 165mmol)、48(50.0g, 198mmol)和DCM(1.5L)。将烧瓶用箔遮盖以减少环境光。将所得悬浮液冷却至0°C,并逐滴用三丁基磷(51mL, 206mmol)处理。除去冰浴,并继续搅拌2小时。将反应物冷却至0°C,并用2-甲基丙烷-2-硫醇(165mL, 1.46mol)处理。用300W钨灯照射反应物1.25小时。通过添加350g次氯酸钙于水(2.0L)中的悬浮液来淬灭反应。将混合物用乙醚稀释并在0°C下搅拌5分钟,然后在室温下搅拌20分钟。添加硅藻土以帮助分离各层,并将所得混合物过滤。将洗脱液倒入分液漏斗中,并分离各层。将有机物用盐水洗涤,经Na₂SO₄干燥,并浓缩。将所得残余物用75g氢氧化钾于1.0L甲醇/水(1:1)中的溶液处理。将所得混合物在室温下搅拌过夜。将反应物浓缩以除去大部分甲醇,并用EtOAc(500mL x 2)萃取以除去副产物。通过添加浓HCl使水相呈酸性,在其上形成白色沉淀物。通过过滤收集沉淀物,得到49(21g, 83%)。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆), δ=1.60(m, 13H)。

[0394] 2) 步骤b: 双环[2.2.2]辛烷-1-基甲醇(50)的合成

[0395] 在0°C下向49(21g, 136mmol)于THF(300mL)中的溶液分批添加LAH(7.7g, 198mmol)。添加完成时,将反应混合物加热至回流3小时,冷却至室温,并且再冷却至0°C,通过5%NaOH(5mL)和10mL水淬灭,添加Na₂SO₄(50g),通过硅藻土过滤,并将滤液真空浓缩,得到粗产物,通过柱色谱法(SiO₂, 100-200, 用PE/EtOAc=30:1洗脱)纯化,得到呈白色固体的所需产物(50, 10.5g, 54%)。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆), δ=4.27(br, 1H), 2.97(m, 2H), 1.49(m, 7H), 1.17(m, 6H)。

[0396] 3) 步骤c: 双环[2.2.2]辛烷-1-甲醛(51)的合成

[0397] 将35mL无水二氯甲烷中的草酰氯(1.8g, 13mmol)冷却至-70°C;添加30mL DCM中的DMSO(2.3g, 30mmol)。将混合物在所述温度下搅拌30分钟,然后逐滴添加20mL DCM和1mL DMSO中的50(1.8g, 13mmol)。在3小时内,将混合物加热至-30°C。添加Et₃N(5.1g, 52mmol);使温度在1小时内升至0°C。将反应物用60mL水淬灭。将有机层分离,用水洗涤,用活性炭处理,并经Na₂SO₄干燥。在减压下除去溶剂,得到呈无色油状物的所需产物(51, 10.0g, 粗)。¹H NMR

(300MHz, DMSO- d_6), δ =9.36(s, 1H), 1.61(s, 1H), 1.52(m, 12H)。

[0398] 4) 步骤d: (Z)-3-(双环[2.2.2]辛烷-1-基)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)丙烯酸甲酯(53)的合成

[0399] 向51(10g, 72.5mmol)和52(32.3g, 108mmol)于CH₂Cl₂(50mL)中的溶液添加1,1,3,3-四甲基胍(12.4g, 108mmol), 当添加完成时, 将反应混合物在室温下搅拌24小时, 将所得混合物通过50mL水淬灭, 通过DCM 50mL稀释, 分离有机层, 用盐水洗涤, 经Na₂SO₄干燥, 过滤并通过(SiO₂, 100-200m, 通过己烷/EtOAc, 10:1洗脱), 得到呈白色固体的53(12g, 55%)。¹H NMR(300MHz, DMSO- d_6), δ =8.16(m, 1H), 6.19(m, 1H), 3.61(m, 3H), 1.20-1.60(m, 22H)。

[0400] 5) 步骤e: 3-(双环[2.2.2]辛烷-1-基)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酸甲酯(54)的合成

[0401] 在6atm下将53(12g, 39mmol)和Pd(OAc)₂(1.2g)于MeOH(100mL)中的溶液用H₂气体吹扫三次, 然后在室温下搅拌过夜。通过硅藻土过滤, 并将滤液在真空中浓缩, 得到呈白色固体的所需产物(54, 9.7g, 81%)。

[0402] 6) 步骤f: 2-氨基-3-(双环[2.2.2]辛烷-1-基)丙酸甲酯(55)的合成

[0403] 在室温下将54(9.7g, 31.2mmol)于4N HCl/二噁烷(100mL)中的溶液搅拌2小时, 将反应混合物在真空中浓缩, 得到呈白色固体的所需产物(55, 7.7g, 粗)。

[0404] 7) 步骤g: 2-(((苄氧基)羰基)氨基)-3-(双环[2.2.2]辛烷-1-基)丙酸甲酯(56)的合成

[0405] 在0℃下, 向化合物55(7.7g, 31mmol)于水(100mL)和EtOAc(100mL)中的溶液缓慢添加K₂CO₃(8.5g, 62mmol), 然后在将温度控制在0℃至5℃的情况下逐滴添加CbzCl(4.9mL, 34.1mmol), 当完成添加时, 将反应混合物在0℃搅拌1小时, LCMS显示没有剩余起始材料, 分离有机层, 通过盐水洗涤, 经Na₂SO₄干燥, 过滤并通过硅胶柱色谱法(SiO₂, 100-200m, 通过PE/EtOAc=3:1洗脱)纯化得到呈白色固体的所需产物(56, 6.5g, 61%)。¹H NMR(300MHz, CDCl₃), δ =7.35(m, 5H), 5.15(m, 2H), 4.90(m, 1H), 4.45(m, 1H), 1.20-1.70(m, 15H)。MS: (M+H)⁺: 346.2。

[0406] 8) 步骤h: (S)-2-(((苄氧基)羰基)氨基)-3-(双环[2.2.2]辛烷-1-基)丙酸(57)的合成

[0407] 向化合物56(6.5g, 18.8mmol)于MeOH(25mL)和THF(25mL)中的溶液添加2N NaOH(25mL), 然后将混合物在室温下搅拌2小时, 在真空中浓缩以除去大部分MeOH和THF, 冷却至0℃, 通过2N HCl中和至pH=3至4, 通过EtOAc(50mL x 2)萃取, 通过盐水洗涤, 经Na₂SO₄干燥, 过滤并且在真空中浓缩以除去溶剂, 在搅拌下将50mL的PE/Et₂O(5:1)添加到残余物中, 形成白色固体, 将其过滤并通过PE/Et₂O(10mL, 5:1)洗涤, 在真空中干燥, 得到呈白色固体的所需产物(5.8g, 94%), 手性HPLC分离得到57a和57b。

[0408] 57a: ¹H NMR(300MHz, DMSO- d_6), δ =7.55(m, 1H), 7.40(m, 5H), 5.15(s, 2H), 4.04(m, 1H), 1.20-1.50(m, 15H)。

[0409] 57b: ¹H NMR(300MHz, DMSO- d_6), δ =7.52(m, 1H), 7.35(m, 5H), 5.04(s, 2H), 4.00(m, 1H), 1.20-1.50(m, 15H)。

[0410] 9) 步骤i: (S)-2-氨基-3-(双环[2.2.2]辛烷-1-基)丙酸(58)的合成与方案4中所述相同的程序得到58。

[0411] 10) 步骤j: (S)-3-(双环[2.2.2]辛烷-1-基)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酸的合成(59)

[0412] 在0℃下,向58(200mg,0.856mmol)于H₂O(5mL)中的悬浮液添加Na₂CO₃(190mg,1.80mmol),然后添加3mL二噁烷中的Boc₂O(373mg,1.71mmol)。然后添加额外的水和二噁烷(反应混合物的总体积为20mL),并用Na₂CO₃水溶液使pH增加直到pH=9。将反应混合物在室温下搅拌过夜,然后用10% HCl酸化直到pH 3,并用EtOAc(3x)萃取。将有机相分离,用饱和NaCl和水洗涤,经无水Na₂SO₄硫酸镁干燥,过滤并蒸发。将粗产物59与甲苯一起蒸发,并且不经进一步纯化即用于下一步骤。

[0413] 11) 步骤k: ((S)-1-(((S)-1-氨基-6-((苄氧基)羰基)氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基)-3-(双环[2.2.2]辛烷-1-基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基甲酸叔丁酯(60)的合成

[0414] 在0℃下向粗产物(59,254mg,0.856mmol)、N_ε-Cbz-L-赖氨酸盐酸盐(24,270mg,0.856mmol)、HOBt一水合物(262mg,1.71mmol)、EDC盐酸盐(328mg,1.71mmol)于DMF(5mL)中的混合物添加NMM(0.47mL,4.28mmol)。在5分钟后,除去冰浴,并将反应混合物在室温下搅拌过夜,然后蒸发并通过快速柱色谱法(洗脱液H₂O(0.1% AcOH)/MeOH)纯化。分离出300mg(63%)的60。¹H NMR(400MHz,甲醇-d₄) δ7.35-7.29(m,5H),5.06(s,2H),4.33-4.30(m,1H),4.09-4.05(m,1H),3.12-3.08(m,2H),1.83-1.31(多重峰,26H)。

[0415] 12) 步骤l: ((S)-6-氨基-5-((S)-2-氨基-3-(双环[2.2.2]辛烷-1-基)丙酰胺基)-6-氧代己基)氨基甲酸苄酯(61)的合成

[0416] 在0℃下向60(198mg,0.354mmol)于DCM(8mL)中的溶液添加TFA(3mL)。在5分钟后,除去冰浴,并将反应混合物在环境温度下搅拌30分钟。将挥发物蒸发,然后将粗61与甲苯一起蒸发,并且不经纯化即用于下一步骤。

[0417] 13) 步骤m: ((6S,9S,12S,15S)-6-苄基-12-(双环[2.2.2]辛烷-1-基甲基)-15-氨基甲酰基-9-(3-胍基丙基)-2,2-二甲基-4,7,10,13-四氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十九烷-19-基)氨基甲酸苄酯(62)的合成

[0418] 在0℃下向61(203mg,0.354mmol)、29(149mg,0.354mmol)、HOBt一水合物(81mg,0.531mmol)、EDC盐酸盐(102mg,0.531mmol)于DMF(2mL)中的混合物添加NMM(0.12mL,1.06mmol)。在5分钟后,除去冰浴,并将反应混合物在室温下搅拌1天,然后蒸发并通过快速柱色谱法(洗脱液H₂O(0.1% AcOH)/MeOH)纯化。分离130mg的粗产物62,并用于下一步骤。

[0419] 14) 步骤n: ((S)-6-氨基-5-((S)-2-((S)-2-((S)-2-氨基-3-苄基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-(双环[2.2.2]辛烷-1-基)丙酰胺基)-6-氧代己基)氨基甲酸苄酯(63)的合成

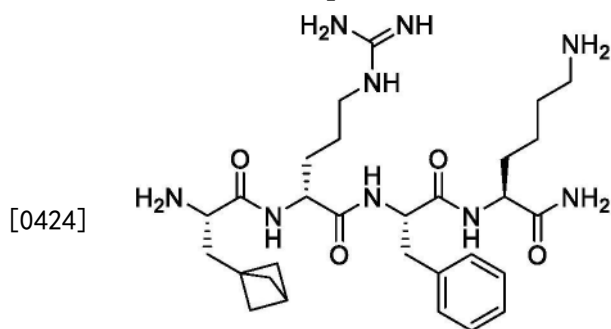
[0420] 在0℃下向粗产物(62,130mg,0.151mmol)于DCM(3mL)中的溶液添加TFA(1.5mL)。在5分钟后,除去冰浴,并将反应混合物在环境温度下搅拌30分钟。将挥发物蒸发,然后将粗产物通过制备型HPLC纯化。分离出50mg的63。¹H NMR(400MHz,甲醇-d₄) δ7.39-7.27(m,10H),5.07(s,2H),4.33-4.30(m,1H),4.39-4.32(m,2H),4.19-4.12(m,2H),3.22-3.07(m,6H),1.84-1.29(多重峰,25H)。

[0421] 15) 步骤o: (S)-6-氨基-2-((S)-2-((S)-2-((S)-2-氨基-3-苄基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-(双环[2.2.2]辛烷-1-基)丙酰胺基)己酰胺(15y)的合成

[0422] 向63(50mg,0.066mmol)于MeOH(3mL)中的溶液添加催化量的10% Pd/C。将反应混

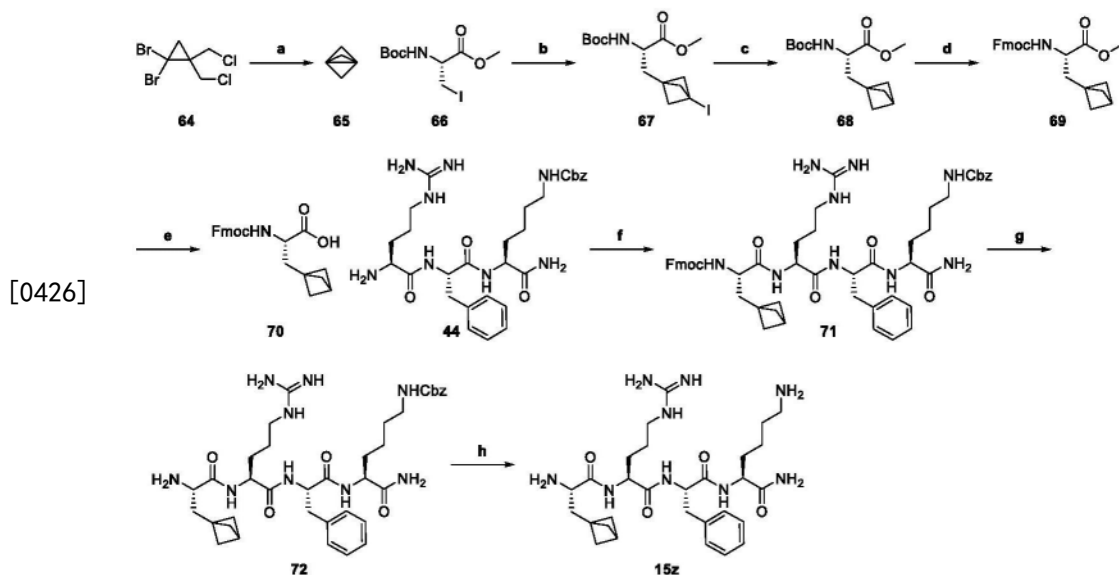
合物抽真空并用氢气(x 8, 气球)回填,然后在室温下搅拌过夜。将粗产物通过45 μ m过滤器过滤,蒸发并通过制备型HPLC纯化。结果,分离出15mg呈白色固体的15y。¹H NMR (400MHz, 甲醇-d₄) δ 8.73 (br d, J=7.6Hz, 1H), 7.76 (br d, J=8.8Hz, 1H), 7.42-7.30 (m, 5H), 4.45-4.33 (多重峰, 2H), 4.24-4.16 (多重峰, 2H), 3.19-3.13 (多重峰, 4H), 2.99-2.94 (m, 2H), 1.93-1.19 (多重峰, 21H)。MS:EI-MS:m/z 628.7[M+1]。

[0423] 实施例26: (S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-(双环[1.1.1]戊烷-1-基)丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-苯基丙酰胺基)己酰胺((β -双环[1.1.1]戊烷-1-基)-Ala-D-Arg-Phe-Lys-NH₂, 15z)的合成



化合物 15z

[0425] 方案6:



[0427] 1) 步骤a: 三环[1.1.1.0^{1,3}]戊烷(65)的合成

[0428] 将64(258g, 863.2mmol)于戊烷(250.0mL)中的溶液冷却至-78 $^{\circ}$ C。将甲基锂(1.6M于乙醚中, 2270.0mmol)缓慢加入至混合物中,同时保持温度低于-60 $^{\circ}$ C。在添加完成后,将溶液温热至0 $^{\circ}$ C并搅拌2小时,在此期间产生白色沉淀。2小时后,在0 $^{\circ}$ C下蒸馏至用液体N₂冷却至-196 $^{\circ}$ C的接收烧瓶中。涉及戊烷和乙醚的粗产物不经进一步纯化即用于下一步骤。

[0429] 2) 步骤b: (S)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-碘代双环[1.1.1]戊烷-1-基)丙酸甲酯(67)的合成

[0430] 将66(107.5g, 326.8mmol)溶解于来自上一步骤的65的溶液中。用氩气冲洗。将此

溶液置于Hg灯(500W)周围,并在室温下搅拌10小时。完成后,将混合物用NaHSO₃溶液洗涤并测试过氧化物,经Na₂SO₄干燥,滤出并在30℃下在真空中浓缩。将残余物用PE洗涤并过滤。收集固体,并将残余物通过色谱柱纯化,得到呈灰白色固体的化合物67(80g,2步,20%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ7.29(br,1H),3.95(m,1H),3.60(s,3H),2.19(m,6H),1.87(m,2H),1.38(s,9H)。

[0431] 3) 步骤c: (S)-3-(双环[1.1.1]戊烷-1-基)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酸甲酯(68)的合成

[0432] 将化合物67(70g,177.0mmol)悬浮在水(150mL)中,并添加TTMSS(15g,359.0mmol)。将不均匀混合物搅拌10分钟,然后添加2-巯基乙醇(1.39g,17.8mmol),然后添加AIBN(725mg,4.37mmol)。将混合物搅拌10分钟,然后加热至80℃。并且加热期间反应混合物变为无色澄清溶液。将反应混合物用EA(150mL*3)萃取,将合并的有机层用盐水(150mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤,浓缩并通过柱色谱法(SiO₂,200-300m,通过PE/EtOAc=100/1至10/1洗脱)纯化,得到所需产物68(32g,58%)。¹H NMR(300MHz,CDCl₃) δ4.94(br,1H),4.31(m,1H),3.74(s,3H),2.46(s,1H),1.97(m,1H),1.80(m,1H),1.74(s,6H),1.46(s,9H)。

[0433] 4) 步骤d: (S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(双环[1.1.1]戊烷-1-基)丙酸甲酯(69)的合成

[0434] 将化合物68(17.0g,63.4mmol)溶解于4N HCl-二噁烷(100mL)中并搅拌1小时,然后将混合物浓缩至干。添加水(80mL)和二噁烷(80mL),然后添加NaHCO₃水溶液(5.3g,60.1mmol)和FmocCl(19.6g,75.8mmol)。然后将混合物在室温下搅拌3小时。完成后,在减压下除去溶剂,并将残余物通过柱色谱法(SiO₂,200-300m,通过PE/EtOAc=10/1至1/1洗脱)纯化,得到所需产物69(15.0g,61%)。¹H NMR(300MHz,CDCl₃) δ7.78(m,2H),7.61(m,2H),7.42(m,2H),7.31(m,2H),5.21(m,1H),4.40(m,3H),4.27(m,1H),3.76(s,3H),2.47(s,1H),2.04(m,1H),1.85(m,1H),1.73(s,6H)。

[0435] 5) 步骤e: (S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(双环[1.1.1]戊烷-1-基)丙酸(70)的合成

[0436] 将化合物69(15.0g)溶解于10N HCl水溶液(100mL)和二噁烷(100mL)中,然后将反应物温热至50℃并搅拌24小时。完成后,除去溶剂,并将残余物通过柱色谱法(SiO₂,200-300m,通过PE/EtOAc=10/1至DCM/MeOH=50/1,0.1% AcOH洗脱)纯化,得到粗产物70(11.0g),通过用PE/EtOAc(150mL,v/v=50/1)打浆而进一步纯化,得到呈灰白色固体的纯度产物(70,9.5g,66%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ7.89(m,2H),7.72(m,1H),7.54(m,1H),7.41(m,2H),7.32(m,2H),4.36(m,1H),4.24(m,2H),3.93(m,1H),2.40(s,1H),1.78(m,2H),1.62(m,6H)。

[0437] 6) 步骤f: ((9S,12S,15S,18S)-12-苄基-19-(双环[1.1.1]戊烷-1-基)-9-氨基甲酰基-15-(3-胍基丙基)-3,11,14,17-四氧代-1-苯基-2-氧杂-4,10,13,16-四氮杂十九烷-18-基)氨基甲酸(9H-芴-9-基)甲酯(71)的合成

[0438] 在室温下向70(226mg,0.6mmol)、44(330mg,0.5mmol)、HOBt一水合物(138mg,0.9mmol)、EDC盐酸盐(288mg,1.5mmol)于DMF(20mL)中的混合物逐滴添加NMM(222mL,2mmol)。将反应混合物搅拌过夜,然后在减压下除去溶剂,并将粗产物通过快速反相色谱法(洗脱液H₂O(0.2% AcOH)/MeOH,10%至85%甲醇)纯化。结果分离出190mg呈乙酸盐的71。¹H

NMR (400MHz, 甲醇- d_4) δ 7.78 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 7.63 (m, 2H), 7.38 (m, 2H), 7.31-7.17 (m, 2H), 7.65-7.61 (m, 2H), 7.39-7.36 (m, 2H), 7.30-7.18 (7H, m), 4.58-4.48 (m, 2H), 4.36-4.32 (m, 1H), 4.28-4.24 (m, 1H), 4.22-4.17 (m, 2H), 4.05-4.01 (m, 1H), 3.25-3.20 (m, 1H), 3.5-2.97 (m, 4H), 2.91-2.85 (m, 1H), 2.03 (s, 9H), 1.90-1.86 (m, 2H), 1.76-1.65 (m, 10H)。

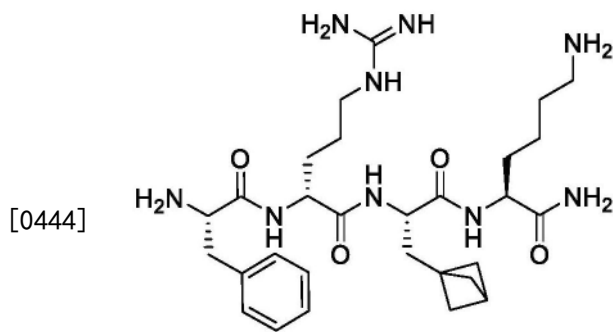
[0439] 7) 步骤g: ((S)-6-氨基-5-((S)-2-((S)-2-((S)-2-氨基-3-(双环[1.1.1]戊烷-1-基)丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-苯基丙酰胺基)-6-氧代己基)氨基甲酸苄酯(72)的合成

[0440] 用20%哌啶/DMF (3mL) 的混合物处理71 (190mg)。将反应混合物在室温下搅拌1小时, 然后蒸发有机溶剂, 并将粗产物通过快速反相色谱法(洗脱液 H_2O (0.2% AcOH) /MeOH, 5%至70%甲醇)纯化。结果, 分离出110mg呈二乙酸盐的72。 ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4) δ 7.32-7.20 (m, 5H), 4.66-4.62 (m, 1H), 4.36-4.32 (m, 1H), 4.13-4.10 (m, 1H), 3.49-3.45 (m, 1H), 3.40-3.32 (m, 1H), 3.07-2.97 (m, 4H), 2.88-2.81 (m, 1H), 1.93 (s, 9H), 1.89-1.77 (m, 2H), 1.72-1.68 (m, 1H), 1.61-1.50 (m, 3H), 1.35-1.26 (m, 1H), 1.13-1.04 (m, 1H)。

[0441] 8) 步骤h: (S)-6-氨基-2-((S)-2-((S)-2-((S)-2-氨基-3-(双环[1.1.1]戊烷-1-基)丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-苯基丙酰胺基)己酰胺(15z)的合成

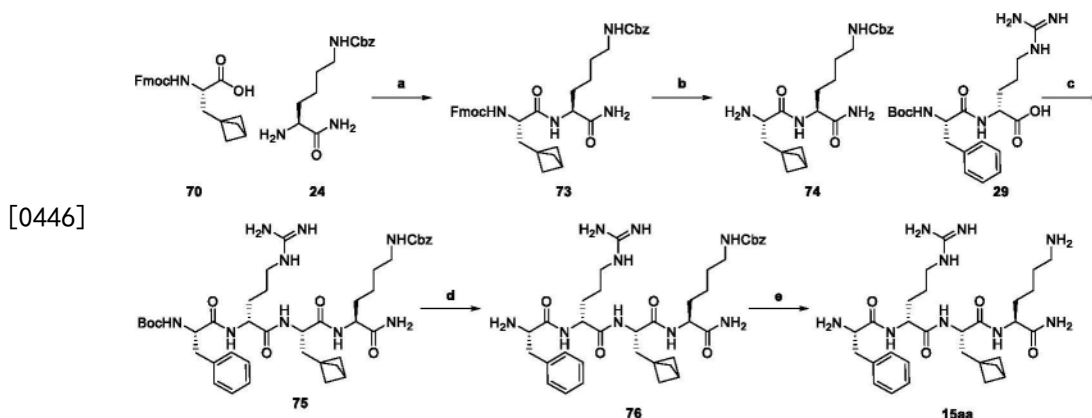
[0442] 在0℃下向72 (110mg) 于DCM (6mL) 中的溶液添加TFA (2mL)。在5分钟后, 除去冰浴, 并将反应混合物在环境温度下搅拌3小时。蒸发挥发物, 并通过制备型HPLC纯化粗产物得到纯的15z。 ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4) δ 7.38-7.15 (m, 5H), 4.66 (dd, $J=11.3, 4.2$ Hz, 1H), 4.45 (dd, $J=8.7, 5.7$ Hz, 1H), 4.14 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 3.85 (t, $J=6.7$ Hz, 1H), 3.40 (dd, $J=14.1, 4.2$ Hz, 1H), 3.07-2.89 (m, 4H), 2.84 (dd, $J=14.2, 11.4$ Hz, 1H), 2.47 (s, 1H), 2.13-1.63 (m, 12H), 1.62-1.39 (m, 4H), 1.36-1.20 (m, 1H), 1.02 (m, 1H)。MS: EI-MS: m/z 586.4 [M+1]。

[0443] 实施例27: (S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-(双环[1.1.1]戊烷-1-基)丙酰胺基)己酰胺 (Phe-D-Arg-(β -双环[1.1.1]戊烷-1-基)-Ala-Lys-NH₂, 15aa) 的合成



化合物 15aa

[0445] 方案7:



[0447] 1) 步骤a: ((S)-1-(((S)-1-氨基-6-((苄氧基)羰基)氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基)-3-(双环[1.1.1]戊烷-1-基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基甲酸(9H-芴-9-基)甲酯(73)的合成

[0448] 向70(0.377g, 1mmol)、24盐酸盐(0.316g, 1mmol)、EDC HCl(0.384g, 2mmol)、HOBt(0.153g, 1mmol)于DMF(5mL)中的混合物添加DIPEA(565μl, 3.26mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。然后添加EtOAc和水。将合并的有机萃取物经Na₂SO₄干燥并浓缩。将粗产物通过快速色谱法纯化,得到呈白色固体的73(0.490g, 76%)。

[0449] 2) 步骤b: ((S)-6-氨基-5-((S)-2-氨基-3-(双环[1.1.1]戊烷-1-基)丙酰胺基)-6-氧代己基)氨基甲酸苄酯(74)的合成

[0450] 将0.49g的73溶解于DMF和哌啶混合物(4:1, 3mL)中。将所得混合物在环境温度下搅拌1小时。然后在减压下除去溶剂,并将粗产物通过硅胶快速色谱法(二氯甲烷/甲醇)纯化,得到0.21g呈游离碱的74。

[0451] 3) 步骤c: ((9S, 12S, 15R, 18S)-12-(双环[1.1.1]戊烷-1-基甲基)-9-氨基甲酰基-15-(3-胍基丙基)-3, 11, 14, 17-四氧代-1, 19-二苯基-2-氧杂-4, 10, 13, 16-四氮杂十九烷-18-基)氨基甲酸叔丁酯(75)的合成

[0452] 在0℃下向74(0.2g, 0.48mmol)、Boc-Phe-(D-)Arg-OH盐酸盐(29, 0.229g, 0.5mmol)、HOBt一水合物(77mg, 0.5mmol)、EDC盐酸盐(0.192g, 1mmol)于DMF(5mL)中的混合物添加NMM(0.12mL, 1.06mmol)。在5分钟后,除去冰浴,并将反应混合物在室温下搅拌1天,然后蒸发并通过快速柱色谱法(洗脱液H₂O(0.1% AcOH)/MeOH)纯化。分离出0.11g的粗产物75,并用于下一步骤。

[0453] 4) 步骤d: ((S)-6-氨基-5-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-(双环[1.1.1]戊烷-1-基)丙酰胺基)-6-氧代己基)氨基甲酸苄酯(76)的合成

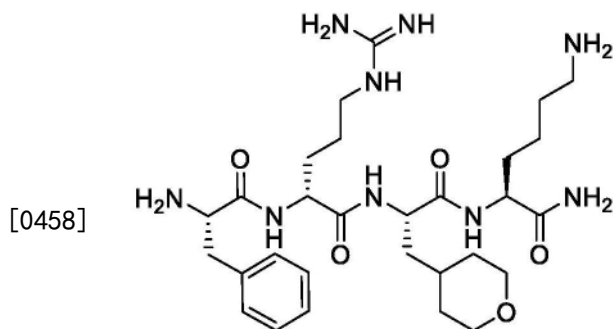
[0454] 在0℃下向粗产物(75, 110mg)于DCM(3mL)中的溶液添加TFA(1.5mL)。在5分钟后,除去冰浴,并将反应混合物在环境温度下搅拌30分钟。将挥发物蒸发,然后将粗产物通过制备型HPLC纯化。分离出59mg的76。

[0455] 5) 步骤e: (S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-(双环[1.1.1]戊烷-1-基)丙酰胺基)己酰胺(15aa)的合成

[0456] 向59mg的76于MeOH(20mL)中的溶液添加16mg的Pd/C 10% w/w。用H₂冲洗烧瓶,并将混合物在室温下搅拌2小时。然后滤出沉淀物,并添加0.2mL的TFA。蒸发混合物,并与甲醇

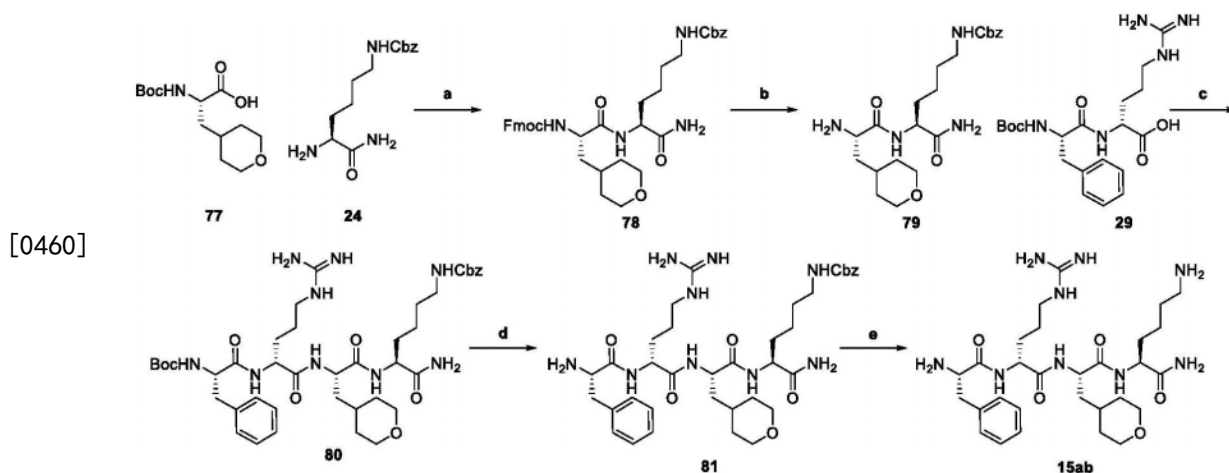
一起再蒸发三次,得到33mg呈泡沫的15aa。¹H NMR(400MHz,甲醇-d₄) δ8.62(br d, J=7.6Hz, 1H), 7.85(br d, J=8.4Hz, 1H), 7.43-7.31(m, 5H), 4.43-4.40(m, 1H), 4.29-4.17(多重峰, 2H), 3.20-3.13(m, 4H), 2.95-2.75(m, 2H), 2.48(m, 1H), 2.09(dd, J=3.2, 14.8Hz, 1H), 1.94-1.18(多重峰, 18H)。MS:EI-MS:m/z 586.5[M+1]。

[0457] 实施例28: (S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-(四氢-2H-吡喃-4-基)丙酰胺基)己酰胺 (Phe-D-Arg-(β-四氢-2H-吡喃-4-基)-Ala-Lys-NH₂, 15ab) 的合成



化合物 15ab

[0459] 方案8:



[0461] 1) 步骤a: ((S)-1-(((S)-1-氨基-6-(((苄氧基)羰基)氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基)-1-氧代-3-(四氢-2H-吡喃-4-基)丙-2-基)氨基甲酸(9H-苄-9-基)甲酯(79)的合成

[0462] 向氨基-3-(四氢-2H-吡喃-4-基)丙酸(78, 205mg, 0.716mmol)和24(300mg, 0.788mmol)于DMF(7mL)中的混合物添加DIPE(565μL, 3.26mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。然后添加EtOAc和水。将合并的有机萃取物经Na₂SO₄干燥并浓缩。将粗产物通过快速色谱法(2%于DCM中的EtOH)纯化,得到呈白色固体的79(380mg, 98%)。¹H NMR(400MHz, 甲醇-d₄) δ7.35-7.27(m, 5H), 5.06(s, 2H), 4.31(dd, J=9.0, 4.8Hz, 1H), 4.09(dd, J=9.0, 4.2Hz, 1H), 3.89(pent, J=5.2Hz, 2H), 3.36(q, J=12.1Hz, 2H), 3.11(t, J=6.7Hz, 2H), 1.87-1.74(m, 1H), 1.72-1.45(m, 8H), 1.44(s, 9H), 1.43-1.18(m, 4H)。

[0463] 2) 步骤b: ((S)-6-氨基-5-((S)-2-氨基-3-(四氢-2H-吡喃-4-基)丙酰胺基)-6-氧代己基)氨基甲酸苄酯(80)的合成

[0464] 向79(380mg, 0.711mmol)于DCM(7mL)中的冷却(0℃)溶液中添加TFA(2.0mL)。在5分钟后,除去冰浴,并且在环境温度下搅拌混合物2小时。在减压下除去挥发物。得到395mg(产率-90%)的80。淡黄色固体无需进一步纯化即使用。¹H NMR(400MHz, 甲醇-d₄) δ7.36-7.28(m, 5H), 5.06(s, 2H), 4.39(dd, J=8.7, 5.4Hz, 1H), 3.96-3.90(m, 3H), 3.47-3.40(m, 2H), 3.12(t, J=6.8Hz, 2H), 1.87-1.79(m, 2H), 1.78-1.62(m, 5H), 1.56-1.29(m, 6H)。

[0465] 3) 步骤c: ((9S, 12S, 15R, 18S)-9-氨基甲酰基-15-(3-胍基丙基)-3, 11, 14, 17-四氧代-1, 19-二苯基-12-((四氢-2H-吡喃-4-基)甲基)-2-氧杂-4, 10, 13, 16-四氮杂十九烷-18-基)氨基甲酸叔丁酯(81)的合成

[0466] 向80(390mg, 0.711mmol)和30(340mg, 0.743mmol)于DMF(15mL)中的混合物添加HOBT·H₂O(130mg, 0.853mmol)、EDC·HCl(409mg, 2.13mmol)和NMM(3900μl, 3.55mmol)。在室温下搅拌反应混合物。48小时后,除去DMF。将粗产物通过反相快速色谱法(20%-65%于H₂O中的MeOH)纯化,得到呈白色固体的81(274mg, 纯度-85%)。通过HPLC进行另外的纯化。分离出呈白色固体的81(178mg)。¹H NMR(400MHz, 甲醇-d₄) δ7.40-7.26(m, 10H), 5.06(s, 2H), 4.54(dd, J=9.6, 6.0Hz, 1H), 4.40-4.26(m, 3H), 3.95-3.84(m, 3H), 3.45-3.32(m, 2H), 3.21-3.00(m, 3H), 3.11(t, J=6.8Hz, 2H), 1.86-1.58(m, 12H), 1.56-1.20(m, 5H), 1.38(s, 9H)。

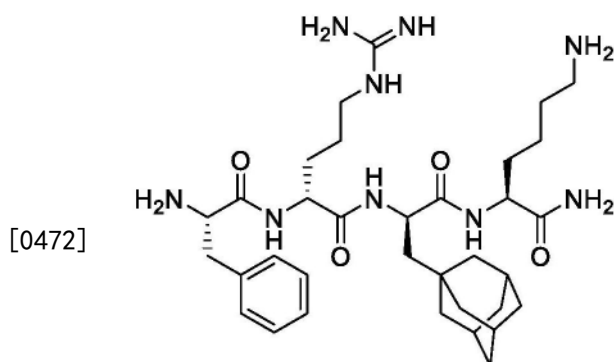
[0467] 4) 步骤d: ((S)-6-氨基-5-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-(四氢-2H-吡喃-4-基)丙酰胺基)-6-氧代己基)氨基甲酸苄酯(82)的合成

[0468] 向81(175mg)于DCM(5mL)中的冷却(0℃)溶液中添加TFA(0.5mL)。在减压下除去挥发物。得到200mg的L10S-076-6。淡黄色油状物82无需进一步纯化即使用。¹H NMR(400MHz, 甲醇-d₄) δ7.40-7.26(m, 10H), 5.06(s, 2H), 4.54(dd, J=9.3, 5.9Hz, 1H), 4.38(dd, J=8.8, 5.3Hz, 1H), 4.31(dd, J=9.0, 5.1Hz, 1H), 4.23-4.12(m, 1H), 3.95-3.86(m, 3H), 3.34-3.32(m, 2H), 3.23-3.06(m, 3H), 3.11(t, J=6.9Hz, 2H), 1.88-1.23(m, 17H)。

[0469] 5) 步骤e: (S)-6-氨基-2-((S)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)-3-(四氢-2H-吡喃-4-基)丙酰胺基)己酰胺(15ab)的合成

[0470] 在室温下用氢气吹扫82(200mg, 0.235mmol)于MeOH(10mL)Pd/C(10%w/w, 15mg)中的溶液3小时。然后将反应混合物通过硅藻土垫过滤,并用MeOH(10mL)洗涤。通过蒸发除去溶剂。得到119mg白色固体。通过HPLC进行纯化。分离出呈白色固体的15ab(9mg, 杂质<5%)。¹H NMR(400MHz, 甲醇-d₄) δ7.39-7.26(m, 5H), 4.42-4.32(m, 2H), 4.39(t, J=7.4Hz, 1H), 4.14(t, J=7.8Hz, 1H), 3.94-3.89(m, 2H), 3.42-3.32(m, 2H), 3.20-3.08(m, 4H), 2.94-2.91(m, 2H), 3.11(t, J=6.9Hz, 2H), 1.87-1.25(m, 17H)。MS:EI-MS;m/z 604.5[M+1]。

[0471] 实施例29: (2S)-2-((2R)-3-(金刚烷-1-基)-2-((R)-2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基)-5-胍基戊酰胺基)丙酰胺基)-6-氨基己酰胺(Phe-D-Arg-D-(β-金刚烷-1-基)-Ala-Lys-NH₂, 15ac)的合成



化合物 15ac

[0473] 化合物15ac (63mg) 根据方案2分离为白色粉末。¹H NMR (400MHz, 甲醇-d₄) δ7.42-7.26 (m, 5H), 4.45 (ddd, J=7.5, 5.1, 2.7Hz, 2H), 4.36 (dd, J=8.7, 5.2Hz, 1H), 4.26 (dd, J=8.8, 5.1Hz, 1H), 3.37-3.33 (m, 1H), 3.25 (t, J=6.9Hz, 2H), 3.00 (dd, J=14.3, 8.9Hz, 1H), 2.94 (t, J=7.5Hz, 2H), 2.02-1.39 (多重峰, 27H)。MS:EI-MS;m/z654.6[M+1]。

[0474] 实施例30:大鼠透化心脏纤维A/R研究

[0475] 线粒体功能性体外缺氧-复氧(A/R)模型

[0476] 1) 透化心脏纤维的制备

[0477] 如先前所述(具有一些修改),从常氧心脏制备透化心脏纤维(Kuka J,Vilskersts R,Cirule H,Makrecka M,Pugovics O,Kalvinsh I,Dambrova M,Liepinsh E.The cardioprotective effect of mildronate is diminished after co-treatment with L-carnitine.J Cardiovasc Pharmacol Ther.2012Jun;17(2):215-22.doi:10.1177/1074248411419502)。使用50μg/mL皂苷和0.5mg/mL胶原酶在4℃下在1mL缓冲液A(20mM咪唑、0.5mM二硫苏糖醇、20mM牛磺酸、7.1mM MgCl₂、50mM MES、5mM ATP、15mM磷酸肌酸、2.6mM CaK₂EGTA、7.4mM K₂EGTA,在0℃下pH 7.0)透化纤维束。孵育15分钟后,将纤维在补充有化合物(例如100nM)或媒介物的2mL缓冲液B(20mM咪唑、0.5mM二硫苏糖醇、20mM牛磺酸、1.6mM MgCl₂、100mM MES、3mM KH₂PO₄、2.9mM CaK₂EGTA、7mM K₂EGTA,在37℃下pH 7.1)中洗涤15分钟。

[0478] 2) 同时用H₂O₂通量检测进行的呼吸测量

[0479] 用于呼吸测量的介质:MiR05-110mM蔗糖,60mM K-乳糖酸盐,0.5mM EGTA,3mM MgCl₂,20mM牛磺酸,10mM KH₂PO₄,20mM HEPES,在30℃下pH 7.1,以及基本不含脂肪酸的0.1%BSA。

[0480] 方案

[0481] 为诱导缺氧,通过添加底物琥珀酸盐(10mM)及鱼藤酮(0.5μM)和ADP(5mM)刺激样品的最大呼吸速率,并准备在呼吸腔中消耗所有O₂(10-20分钟内),从而进入缺氧状态(Makrecka M,Svalbe B,Volska K,Sevastjanovs E,Liepins J,Grinberga S,Pugovics O,Liepinsh E,Dambrova M.Mildronate,the inhibitor of L-carnitine transport, induces brain mitochondrial uncoupling and protects against anoxia-reoxygenation.Eur J Pharmacol.2014年1月15日;723:55-61.doi:10.1016/j.ejphar.2013.12.006.)。在缺氧30分钟后,通过打开腔室将O₂重新引入腔室以实现复氧。

腔室中的 O_2 浓度达到初始浓度后,关闭腔室并监测 O_2 通量10分钟。

[0482] H_2O_2 通量 (ROS通量) 使用 H_2O_2 敏感型探针Ampliflu™ Red (AmR) 在O2k-荧光计中通过呼吸计量法同时测量 (Makrecka-Kuka M, Krumschnabel G, Gnaiger E. High-Resolution Respirometry for Simultaneous Measurement of Oxygen and Hydrogen Peroxide Fluxes in Permeabilized Cells, Tissue Homogenate and Isolated Mitochondria. *Biomolecules*. 2015年1月29日; 5 (3): 1319-38. doi:10.3390/biom5031319)。将10 μ M AmR、1U/mL辣根过氧化物酶 (HRP) 和5U/mL超氧化物歧化酶 (SOD) 添加至腔室。通过HRP催化的AmR与 H_2O_2 之间的反应产物是荧光性的, 类似于试卤灵。使用以0.1 μ M的步距重复添加的 H_2O_2 进行校准。可添加额外的AmR, 以确保复氧后的 H_2O_2 通量测量。

[0483] 在基线时 (在添加透化纤维之前) 添加测试化合物或媒介物。

[0484] 研究概述:

[0485] • 透化心肌纤维CII OXPHOS状态+30分钟。缺氧+10分钟。在 H_2O_2 敏感性探针Ampliflu™ Red存在下复氧。

[0486] • 参数:CII OXPHOS (常氧, 复氧后), H_2O_2 (ROS) 通量 (常氧, 复氧后), H_2O_2/O_2 比率 (常氧, 复氧后)。

[0487] • 每组并行测试CTRL (媒介物)+3-4种100nM浓度的SBT化合物 (n=5-6)。可对并行测试的化合物的数量以及化合物的浓度进行调整, 并将其记录在研究文件和最终报告中。

[0488] 方案可根据实验结果和与赞助者的讨论进行修改。对方案的任何更改都将记录在研究文件和方案修订中。

[0489] 参见图2。

[0490] 实施例31: Langendorff研究

[0491] 缺血-再灌注损伤-Langendorff心脏制备方案 (拉脱维亚有机合成研究所)

[0492] 根据如先前所述 (具有一些修改) 的Langendorff技术进行梗塞研究 (Kuka J, Vilskersts R, Cirule H, Makrecka M, Pugovics O, Kalvinsh I, et al. The cardioprotective effect of mildronate is diminished after co-treatment with L-carnitine. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2012; 17: 215-222)。用戊巴比妥钠 (60mg/kg) 麻醉大鼠, 并腹膜内施用肝素。对于梗塞研究, 在60mmHg的恒定灌注压力下向心脏灌注补充有10mM葡萄糖的含氧 (95% O_2 -5% CO_2) Krebs-Henseleit (KH) 缓冲溶液 (118mmol/L NaCl、4.7mmol/L KCl、1.24mmol/L $CaCl_2$ 、1.64mmol/L $MgCl_2$ 、24.88mmol/L $NaHCO_3$ 、1.18mmol/L KH_2PO_4 和 0.05mmol/L EDTA; pH 7.3-7.5; 36.8-37.0°C)。将连接至生理压力传感器 (ADInstruments) 的充满水-乙醇混合物 (1:1) 的气球插入左心室, 并且舒张末期基线压力设定为5-10mmHg。使用来自ADInstruments的PowerLab 8/35系统连续记录心率 (HR)、流量、左心室形成的压力 (LVDP)、收缩力 (+dp/dt)。将分离的大鼠心脏适应20分钟, 并且随后将冠状动脉左前降支 (LAD) 闭塞30分钟, 然后再灌注120分钟。在进行分离心脏灌注的整个过程中, 将使用添加或不添加目标化合物 (媒介物或1 μ M浓度) 的KH灌注溶液。可通过冠状动脉流量减少约40%确认闭塞。如先前所述确定梗塞大小 (Kuka J, Vilskersts R, Cirule H, Makrecka M, Pugovics O, Kalvinsh I, Dambrova M, Liepinsh E. The cardioprotective effect of mildronate is diminished after co-treatment with L-carnitine. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2012年1月; 17 (2): 215-22. doi:10.1177/

1074248411419502.;Liepinsh E,Kuka J,Dambrova M.Troubleshooting digital macro photography for image acquisition and the analysis of biological samples.J Pharmacol Toxicol Methods.2013年3月-4月;67(2):98-106.doi:10.1016/j.vascn.2012.11.001.)。简言之,在再灌注结束时,将LAD重新闭塞,并向心脏灌注溶解于KH缓冲液中的0.1%亚甲蓝。然后,将心脏从顶端到底部横向切成2mm厚的6片切片(如果是较小的心脏则为5片),并在磷酸盐缓冲液(pH 7.4,37℃)中的1%氯化三苯基-四氮唑中孵育10分钟,以将活组织染色为红色并且坏死组织染色为白色。使用Image-Pro Plus v6.3软件执行横截面图像的平面分析,以确定风险面积(AR)和坏死面积(AN),各自以横截面切片面积的百分比表示。然后根据以下公式将获得的值用于计算作为风险面积百分比的梗塞面积(IS):

[0493] $IS(\%) = AN/AR \times 100\%$ 。

[0494] 坏死面积是通过合并白色坏死组织和粉红色组织的面积来确定的。

[0495] 研究概述

[0496] • 20分钟适应+30分钟缺血(LAD连接)+120分钟再灌注。媒介物或化合物1μM

[0497] • 可调整测试物品浓度。任何更改都将记录在研究文件和最终报告中。

[0498] • 终点:HR,流量,LVDP,±dP/dt,梗塞面积-坏死面积

[0499] • CTRL(媒介物)+每组测试最多4种测试化合物(每种处理n=8)

[0500] 可根据实验结果和与赞助者的讨论来修改方案和待测化合物的数量。对方案的任何更改都将记录在研究文件和方案修订中。

[0501] 参见图3。

[0502] 实施例32:大鼠心肌梗塞模型

[0503] 大鼠心肌梗塞模型(MI)由IPST Therapeutique Inc,Sherbrooke,Quebec,Canada进行的。研究负责人根据动物的体重,根据处理组之间的均匀分布将动物随机分组,目的是在手术的每一天(如果可能)安排来自每个处理组的动物。

[0504] 1) 媒介物组:组的大小:n=8。施用途径:皮下;

[0505] 2) 测试物品组:组的大小:n=8。施用途径:皮下;处理:缺血前30分钟0.01、0.1、0.5和2mg/kg剂量。

[0506] 实验程序

[0507] 研究设计

[0508] 1) 在手术当天,将使用2%至2.5%的异氟烷USP(Abbot Laboratories,Montreal Canada)于氧气中的混合物麻醉大鼠,并放置在加热垫上以保持体温。

[0509] 2) 用设定为约10mL/kg体重、频率为65-70冲程/分钟的正压啮齿动物呼吸器将动物插管并立即通气。

[0510] 3) 将通过左前肋间隙进行胸廓切开术以暴露心脏。

[0511] 4) 5-0丝质缝合线将放置在左前降支(LAD)动脉周围,左心房下方2-3mm。

[0512] 5) 根据颜色变化,将对缝合线进行短暂缝合以验证心肌缺血的大小和位置,然后将其绑扎在一起以产生较大的前外侧心肌梗塞(约45%)。

[0513] 6) LAD闭塞后30分钟,将缝合线去除以允许肌肉再灌注。

[0514] 7) 胸廓切开术将以4-0缝合线进行闭合,并将进行美洛昔康(1mg/kg)皮下注射以

进行术后疼痛管理。

[0515] 8)再灌注后24小时,将动物再次麻醉(异氟醚2%)。

[0516] 9)心脏将被切除并安装到Langendorff装置中。在 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下加热的含氧Tyrode溶液将以大约70mmHg的压力和约10mL/min的流速以逆行方式灌注心脏。

[0517] 10)然后,将向心脏灌注伊文思蓝染料以评估心肌梗塞的大小。伊文思蓝染色后,将心脏从Langendorff装置中取出并浸入冷乙醇(-50°C)中。心脏将被切成大约2mm的横向切片。扫描切片以评估风险面积(AAR),然后在含1%TTC的磷酸盐缓冲液中在 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下孵育30分钟,然后在 $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下转移于4%福尔马林溶液中24小时。切片将被重新扫描以测量梗塞面积。风险面积>60%的动物将被排除在研究范围之外。

[0518] 计算

[0519] 梗塞面积(%) = (梗塞面积/风险面积)*100

[0520] 计算机系统

[0521] 运行Microsoft Windows8、XP Professional或Microsoft Windows Vista Business的联网个人计算机将用于数据采集。分析软件将是安装在运行Microsoft Windows8、XP Professional或Vista的联网个人计算机上的Microsoft Office Excel 2007。

[0522] 报告

[0523] 进展/状态报告

[0524] 在整个研究过程中,定期进展报告将提交给赞助者的联系人。这些报告的频率将在与赞助者的联系人协商后确定。

[0525] 研究报告

[0526] 在研究的实验阶段完成后的一周内,Excel电子表格中的未经审核的原始数据以及包含研究设计、研究的定量/定性结果以及单独数据图表的未经审核的报告草稿将提交给赞助者。最终报告将在收到赞助者评论后的1周内提供。

[0527] 参见图4。

[0528] 实施例33:肾缺血研究

[0529] 大鼠急性肾损伤(AKI)模型是由IPST Therapeutique Inc, Sherbrooke, Quebec, Canada进行的。研究负责人根据动物的体重,根据处理组之间的均匀分布将动物随机分组,目的是在手术的每一天安排来自每个组的动物。大鼠将自由获得食物和水。

[0530] 1)假手术组:组的大小:n=2。施用途径:不适用;

[0531] 2)媒介物组:组的大小:n=8。施用途径:皮下;

[0532] 3)测试物品组:组的大小:n=8。施用途径:皮下;处理剂量:2X 2mg/kg,缺血前30分钟和再灌注前5分钟。

[0533] 实验程序

[0534] 缺血-再灌注的诱导

[0535] 1.将使用氧气中的2%异氟烷USP(Abbot Laboratories, Montreal Canada)麻醉大鼠,并放置在加热垫上以保持体温。在整个手术过程中将监测ECG和血氧饱和度。体温将通过插入腹部的探针温度计进行监测,所述温度计非常靠近肾脏。

[0536] 2.从颈静脉抽取1mL血液。将血液收集到肝素锂管中,并以3000rpm离心10分钟以

获得血浆。将血浆分成200 μ L等分试样,并储存在-20℃直至使用生物标志物。

[0537] 3.腹部将用聚维酮碘消毒并进行剖腹手术。

[0538] 4.将暴露肾脏,并在两个肾脏的肾动脉周围放置临时缝合线。通过在缺血开始后的几分钟内肾脏颜色会从红色逐渐变为深紫色而从视觉上确认肾脏缺血。缺血期间,将使用加热灯和浸泡在温热(37℃)盐水中的无菌纱布将肾脏保持湿润和温热。温度将通过插入腹部的探针温度计进行监测,所述温度计非常靠近肾脏。

[0539] 5.闭塞30分钟后,将缝合线移除。

[0540] 6.将腹部伤口用4-0丝质缝合线闭合,然后将动物放回笼中。

[0541] 7.再灌注后二十四(24)小时,大鼠将被再次麻醉。如在缺血之前一样进行第二次抽血。

[0542] 8.假手术将在与媒介物相同的条件下进行,除了肾脏将不会经受缺血性条件。

[0543] 生物标志物的检测

[0544] 将在缺血前和缺血后24小时取得血浆样品的200 μ L等分试样,将其送至CHUS的临床实验室(Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, Quebec, Canada)以检测血浆肌酐水平(p.Cr)和血尿素氮(BUN)。

[0545] 计算机系统

[0546] 以下是在进行这项研究的过程中使用的经过验证的计算机系统。

[0547] 分析软件将是安装在运行Microsoft Windows 8、XP Professional或Vista的联网个人计算机上的Microsoft Office Excel 2007。

[0548] 数据分析

[0549] 值呈现为平均值 $\pm$ SEM(平均值的标准误差)。在Microsoft Excel 2007中对所有实验数据重复进行未配对的Student t检验。当 $p \leq 0.05$ 时,差异被认为是显著的。

[0550] 将媒介物组与假手术组进行比较,同时将测试物品与媒介物组进行比较。

[0551] 使用以下公式计算I/R后的血浆肌酐(媒介物的平均值%):

[0552]
$$\frac{((\text{缺血后24小时的血浆肌酐}) - (\text{缺血前的血浆肌酐})) - \text{假手术组中的平均} \Delta \text{血浆肌酐}}{\text{媒介物组中的平均} \Delta \text{血浆肌酐}} \times 100$$

[0553] 媒介物组中的平均 Δ 血浆肌酐

[0554] 其中:

[0555] 假手术组中的平均 Δ 肌酐=假手术组中的平均(缺血后24小时的血浆肌酐-缺血前的血浆肌酐)

[0556] 媒介物组中的平均 Δ 肌酐=媒介物组中的平均((缺血后24小时的血浆肌酐-缺血前的血浆肌酐)-假手术组中的平均 Δ 肌酐)

[0557] 使用以下公式计算I/R后的BUN(媒介物的平均值%):

[0558]
$$\frac{((\text{缺血后24小时的BUN}) - (\text{缺血前的BUN})) - \text{假手术组中的平均} \Delta \text{BUN}}{\text{媒介物组中的平均} \Delta \text{BUN}} \times 100$$

[0559] 媒介物组中的平均 Δ BUN

[0560] 其中:

[0561] 假手术组中的平均 Δ BUN=假手术组中的平均(缺血后24小时的BUN-缺血前的BUN)

[0562] 媒介物组中的平均 Δ BUN=媒介物组中的平均((缺血后24小时的BUN-缺血前的

BUN) -假手术组中的平均 Δ BUN)

[0563] 使用以下公式计算保护%：

[0564] 保护% (血浆肌酐) = $100\% - I/R$ 后的 Δ 血浆肌酐 (媒介物的平均值%)

[0565] 保护% (BUN) = $100\% - I/R$ 后的 Δ BUN (媒介物的平均值%)

[0566] 参见图5和6。

[0567] 等效方案

[0568] 为了清楚地理解,已经通过说明和实施例的方式对本发明进行了详细描述,对于本领域的普通技术人员显而易见的是,可通过在广泛且等效的条件范围内修改或改变制剂和其它参数来执行本发明,而不影响本发明或其任何具体实施方案的范围,并且可此类修改或改变意图包括在所附权利要求的范围之内。

[0569] 以引用的方式并入

[0570] 以上描述中提到的所有美国专利以及美国和PCT公布的专利申请都以引用的方式整体并入本文。

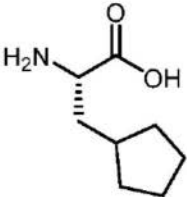
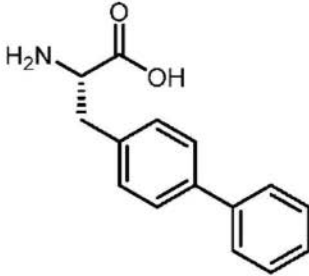
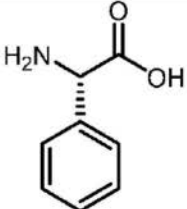
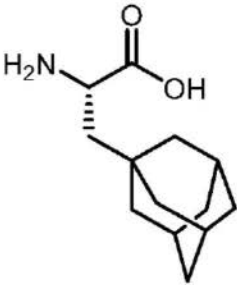
<u>CAS号</u>	<u>供应商(目录号)或文献引用</u>	<u>结构</u>
96539-87-6	Aldrich (38473)	
155760-02-4	QM Bio (8253011)	
2935-35-5	Alfa Aesar (30314)	
95975-81-8	Do, 等人Helvetica,1979, 第62卷,第4期,956-964。	

图1

大鼠透化心脏纤维A/R

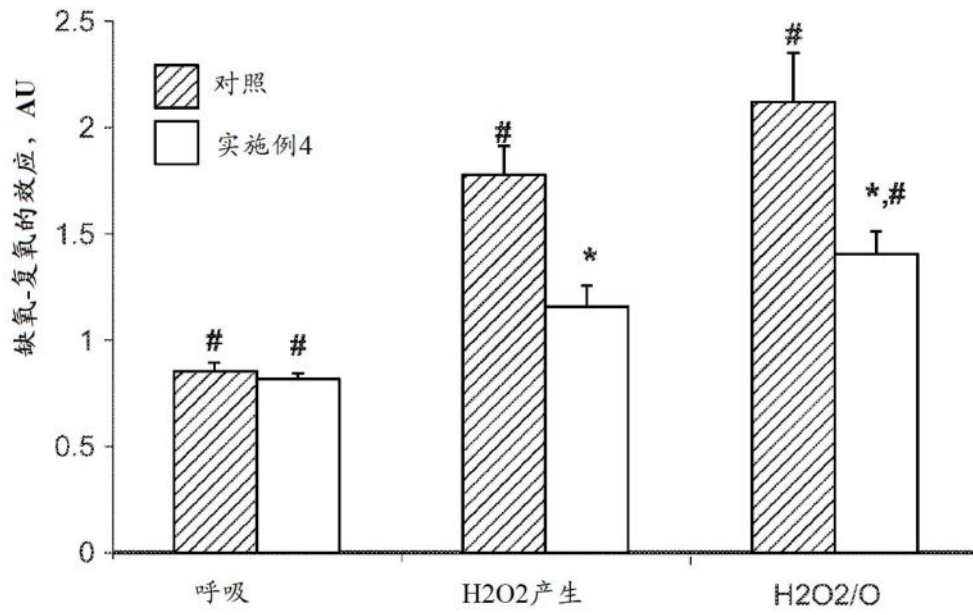


图2

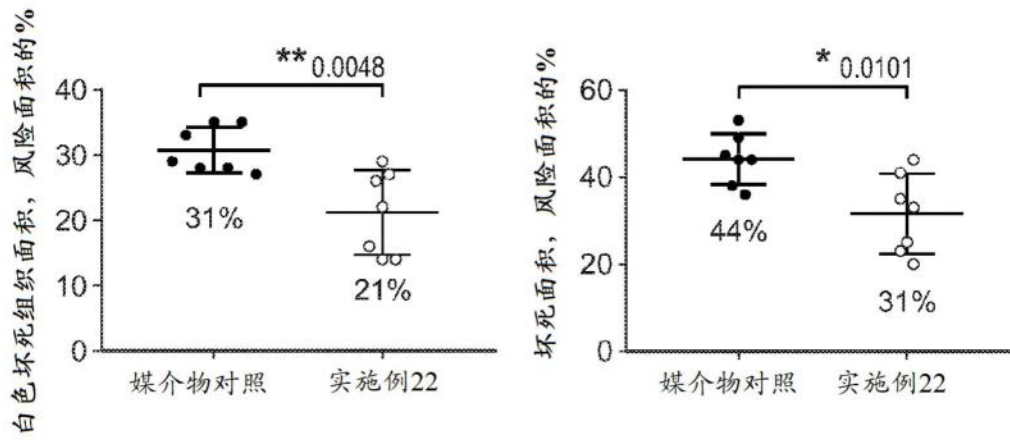


图3

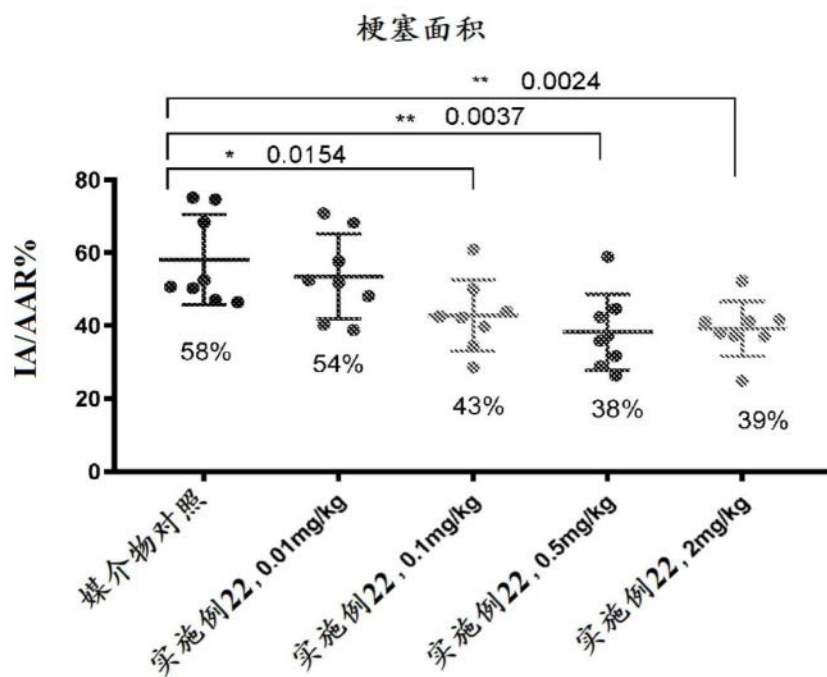


图4

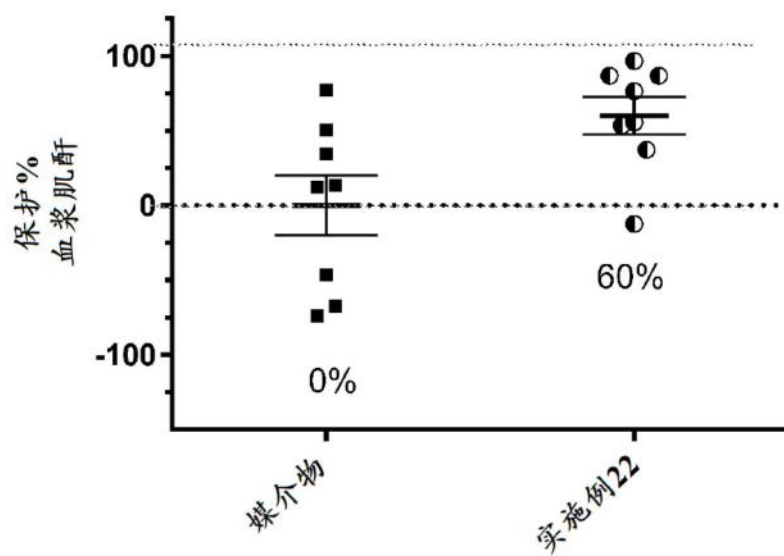


图5

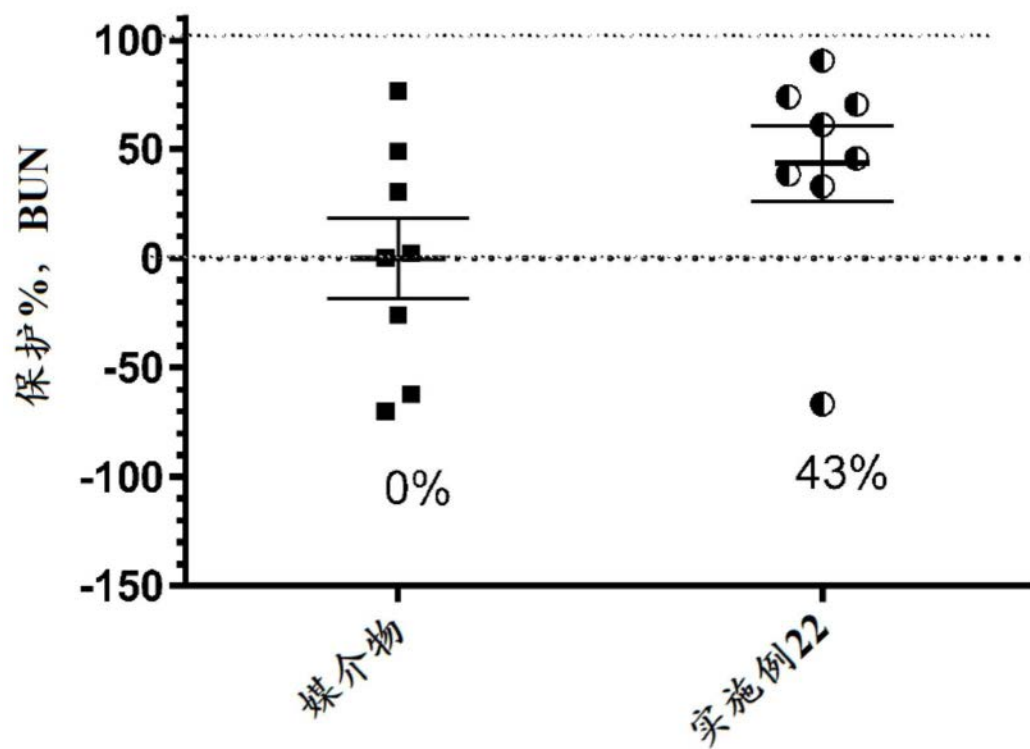


图6