(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102625716 A
(43)申请公布日 2012.08.01

(21)申请号 201080041787.6
(22)申请日 2010.07.19
(30)优先权数据
0912584.0 2009.07.20 GB
(85)PCT申请进入国家阶段日
2012.03.20
(86)PCT申请的申请数据
PCT/GB2010/001369 2010.07.19
(87)PCT申请的公布数据
WO2011/010084 EN 2011.01.27
(71)申请人 UCL 商业有限公司
地址 英国,伦敦
(72)发明人 D·塞尔伍德 M·克朗普顿
(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
代理人 赵蓉民 张全信
(51)Int.Cl.
A61K 47/48(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)

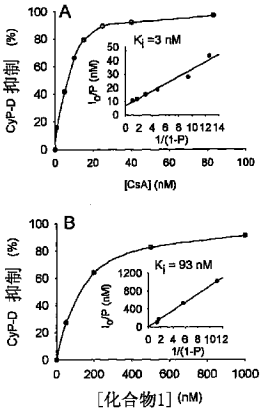
权利要求书 4 页 说明书 46 页 附图 7 页

(54)发明名称

环孢菌素缀合物

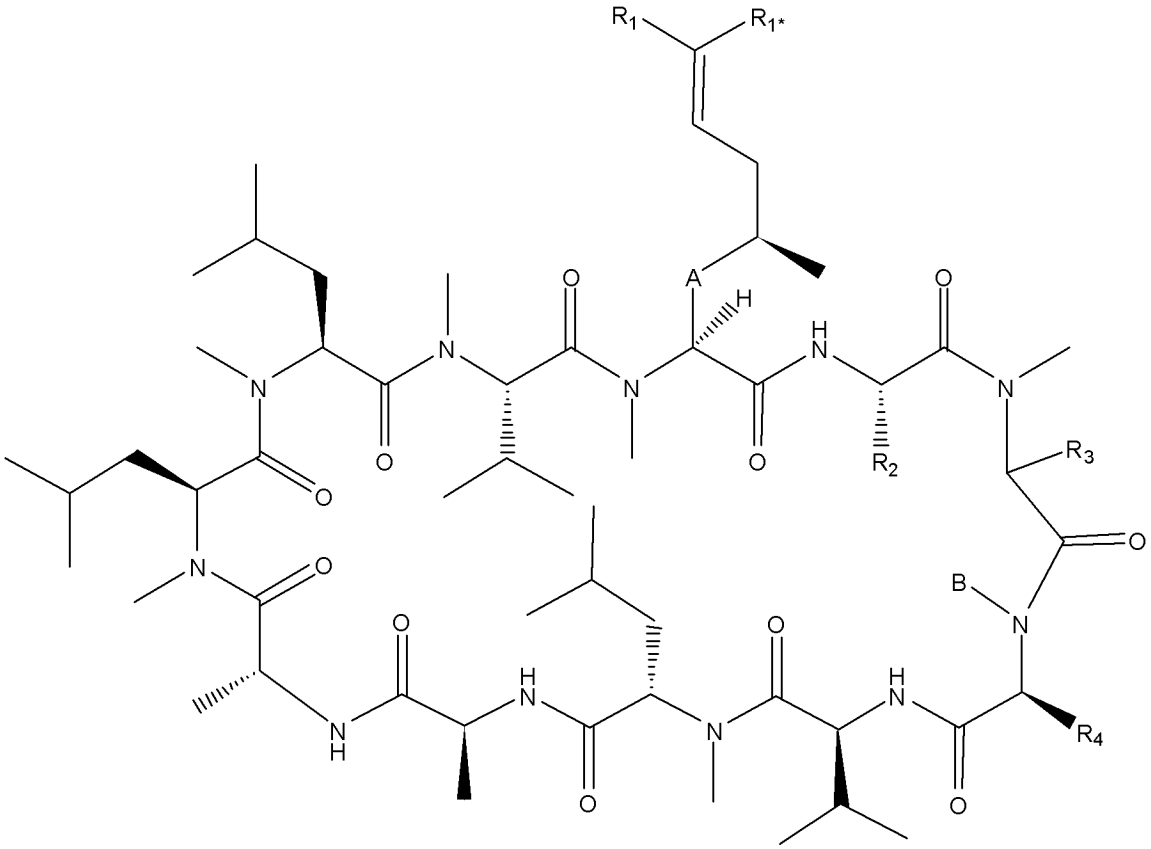
(57)摘要

缀合物,或其药学上可接受的盐,所述缀合物包括与一个或多个线粒体靶向基团连接的式(I)的环孢菌素部分:其中:A表示或,B表示甲基或乙基,R_1和R_{1*}的一个表示氢和另一个表示甲基,R_2表示乙基或异丙基,R_3表示氢或甲基,并且R_4表示 $-CH_2CH(CH_3)CH_3$、$-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$、$-CH(CH_3)CH_3$或$-CH(CH_3)CH_2CH_3$。



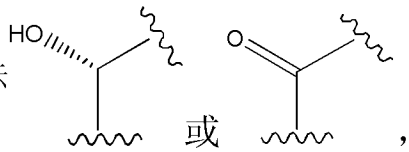
CN 102625716 A

1. 缀合物，或其药学上可接受的盐，所述缀合物包括与一个或多个线粒体靶向基团连接的式 (I) 的环孢菌素部分：



(I)

其中：

A 表示  ，

B 表示甲基或乙基，

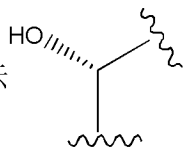
R_1 和 R_{1*} 的一个表示氢并且另一个表示甲基，

R_2 表示乙基或异丙基，

R_3 表示氢或甲基，并且

R_4 表示 $-CH_2CH(CH_3)CH_3$、$-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$、$-CH(CH_3)CH_3$ 或 $-CH(CH_3)CH_2CH_3$。

2. 根据权利要求 1 所述的缀合物或其药学上可接受的盐，其中：

A 表示  ，

R_1 表示甲基和 R_{1*} 表示氢，

B 表示甲基，

R_2 表示乙基，

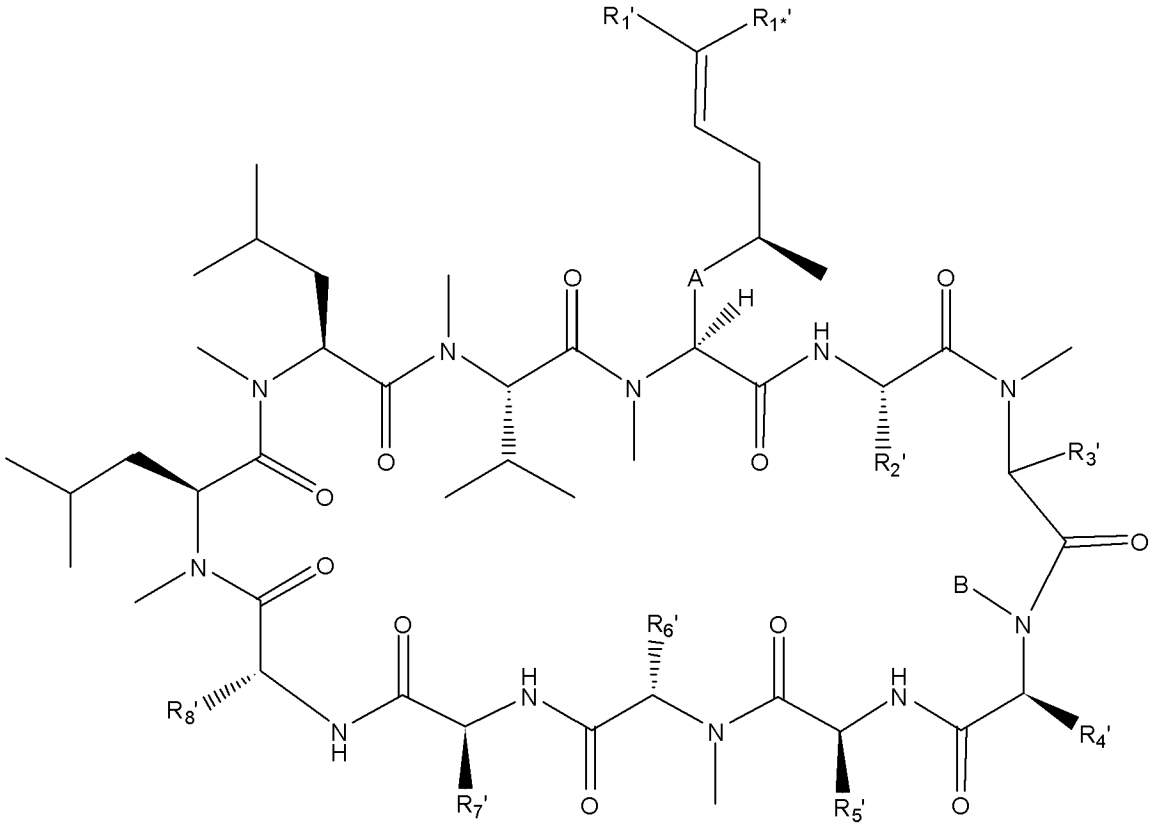
R_3 表示氢，并且

R_4 表示 $-CH_2CH(CH_3)CH_3$。

3. 根据前述权利要求任一项所述的缀合物或其药学上可接受的盐，其中所述线粒体靶向基团是亲脂性阳离子或线粒体靶向肽。

4. 根据权利要求 3 所述的缀合物或其药学上可接受的盐，其中所述亲脂性阳离子是鏻阳离子、𬭸阳离子、铵阳离子、氟吡汀、MKT-077、吡啶鎓神经酰胺、喹啉鎓、脂质体阳离子、山梨醇胍、环状胍或若丹明。

5. 根据前述权利要求任一项所述具有式（I'）的缀合物或其药学上可接受的盐：



(I')

其中：

$-R_1'$ 和 R_{1*}' 的一个表示甲基或 $-L_1-MTG_1$ 并且另一个表示氢，

$-R_2'$ 表示如在权利要求 1 或 2 中所定义的 R_2 或 $-L_2-MTG_2$，

$-R_3'$ 表示如在权利要求 1 或 2 中所定义的 R_3 或 $-L_3-MTG_3$，

$-R_4'$ 表示如在权利要求 1 或 2 中所定义的 R_4 或 $-L_4-MTG_4$，

$-R_5'$ 表示异丙基或 $-L_5-MTG_5$，

$-R_6'$ 表示 $-CH_2CH(CH_3)CH_3$ 或 $-L_6-MTG_6$，

$-R_7'$ 表示甲基或 $-L_7-MTG_7$，

$-R_8'$ 表示甲基或 $-L_8-MTG_8$，并且

-A 和 B 如在权利要求 1 或 2 中所定义的，

$-L_1$ 至 L_8 独立地表示直接键合或为直链 C_1 至 C_{20} 亚烷基的连接体，所述直链 C_1 至 C_{20} 亚烷基被选自卤素原子、羟基、烷氧基、烷基、羟烷基、卤代烷基和卤代烷氧基取代基的一个或多个取代基未取代或取代，其中在所述亚烷基链中的 0 个或 1 个至 10 个碳原子被选自亚芳基、-O-、-S-、-NR'-、-C(O)NR'- 和 -C(O)- 部分的间隔区部分所替代，其中 R' 是氢或 C_1 至 C_6 烷基，所述亚芳基部分被选自卤素原子、羟基、烷基或烷氧基基团的一个、两个或三个取代基未取代或取代，和

$-MTG_1$ 至 MTG_8 的每个独立地表示在权利要求 1、3 和 4 任一项中所定义的线粒体靶向基团 MTG，

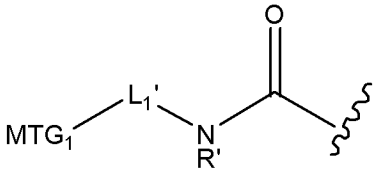
条件是 R_1' 或 R_{1*}' 和 R_2' 至 R_8' 的至少一个且不超过三个表示 -L-MTG。

6. 根据权利要求 5 所述的缀合物，其中 R_1' 表示甲基或 $-L_1-MTG_1$，R_{1*}' 表示氢，R_2' 表示在权利要求 1 或 2 中所定义的 R_2，R_3' 表示在权利要求 1 或 2 中定义的 R_3 或 $-L_3-MTG_3$，R_4' 表示在权利要求 1 或 2 中定义的 R_4，R_5' 表示异丙基，R_6' 表示 $-CH_2CH(CH_3)CH_3$，R_7' 表示甲基，并且 R_8' 表示甲基。

7. 根据权利要求 6 所述的缀合物，其中 R_1' 表示 $-L_1-MTG_1$ 和 R_3' 表示氢。

8. 根据权利要求 6 所述的缀合物，其中 R_1' 表示甲基且 R_3' 表示 $-L_3-MTG_3$。

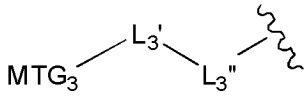
9. 根据权利要求 7 所述的缀合物，其中 $-L_1-MTG_1$ 为式 (VIII) 的化合物：



(VIII)

其中 L_1' 表示直链 C_1 至 C_{19} 亚烷基，其被选自卤素原子、羟基、烷氧基、烷基、羟烷基、卤代烷基和卤代烷氧基取代基的一个或多个取代基未取代或取代，其中在所述亚烷基链中的 1 至 9 个碳原子，优选地 1 至 4 个碳原子被选自亚芳基、-O-、-NR'- 和 -C(O)NR'- 部分的间隔区部分替代，其中 R' 是氢或 C_1 至 C_6 烷基，优选地是氢，并且所述亚芳基部分被选自卤素原子、羟基、烷基或烷氧基基团的一个、两个或三个取代基未取代或取代。

10. 根据权利要求 8 所述的缀合物，其中 $-L_3-MTG_3$ 为式 (IX) 的化合物：



(IX)

其中 L_3" 表示未取代的直链 C_1 至 C_2 亚烷基并且 L_3' 表示 C_1 至 C_{18} 亚烷基，其被选自卤素原子、羟基、烷氧基、烷基、羟烷基、卤代烷基和卤代烷氧基取代基的一个或多个取代基未取代或取代，其中在所述 C_1 至 C_{18} 亚烷基链中的 1 至 10 个碳原子，优选地 1 至 4 个碳原子被选自亚芳基、-O-、-NR'- 和 -C(O)NR'- 部分的间隔区部分替代，其中 R' 是氢或 C_1 至 C_6 烷基，优选地是氢，且亚芳基部分被选自卤素原子、羟基、烷基或烷氧基基团的一个、两个或三个取代基未取代或取代

11. 根据权利要求 7 至 10 任一项所述的缀合物，其中 MTG_1 和 MTG_3 表示三苯基鏻。

12. 根据权利要求 7 至 10 任一项所述的缀合物，其中 MTG_1 和 MTG_3 表示红色碱性染料。

13. 药学组合物，其包括根据权利要求 1 至 12 任一项所述的缀合物和药学上可接受的

赋形剂、稀释剂或载体。

14. 根据权利要求 1 至 12 任一项所述的缀合物，用于治疗人体或动物体。

15. 根据权利要求 1 至 12 任一项所述的缀合物，用于治疗或预防易于通过抑制亲环蛋白 D 改善的疾病或紊乱。

16. 根据权利要求 15 所述的缀合物，其中所述疾病或紊乱是缺血 / 再灌注损伤或神经变性疾病。

17. 根据权利要求 1 至 12 任一项所述的缀合物在制造用于治疗如在权利要求 15 或 16 中所定义的疾病或紊乱的药剂中的应用。

18. 治疗遭受或易感如权利要求 15 或 16 中所定义的疾病或紊乱的患者的方法，该方法包括向所述患者施用根据权利要求 1 至 12 任一项所述的缀合物。

19. 根据权利要求 1 至 12 任一项所述的缀合物作为试验分析试剂的非治疗性应用。

环孢菌素缀合物

[0001] 背景

[0002] 缺血性疾病，尤其心肌梗塞和中风，是世界范围内死亡和残疾的主要原因。缺血发作后，血流尽早恢复对限制组织损伤是必要的。但是，当对缺血细胞恢复血供时，新返回的血液可不利地影响受损的组织。这被称为再灌注损伤，并且缺血发作之后通常造成进一步损伤和细胞死亡。因此，治疗目标是减轻和避免缺血 / 再灌注 (I/R) 损伤。目前对缺血 / 再灌注损伤没有有效的治疗性处理。

[0003] 环孢菌素 A(CsA) 作为免疫抑制药品是公知的。已经提出用于治疗缺血 / 再灌注损伤 (见 N.Engl.J.Med.395 ;5 473 至 481)。但是，研究环孢菌素对于治疗缺血 / 再灌注效力的实验模型和中试试验已经产生高度易变并且仅有轻微的作用。

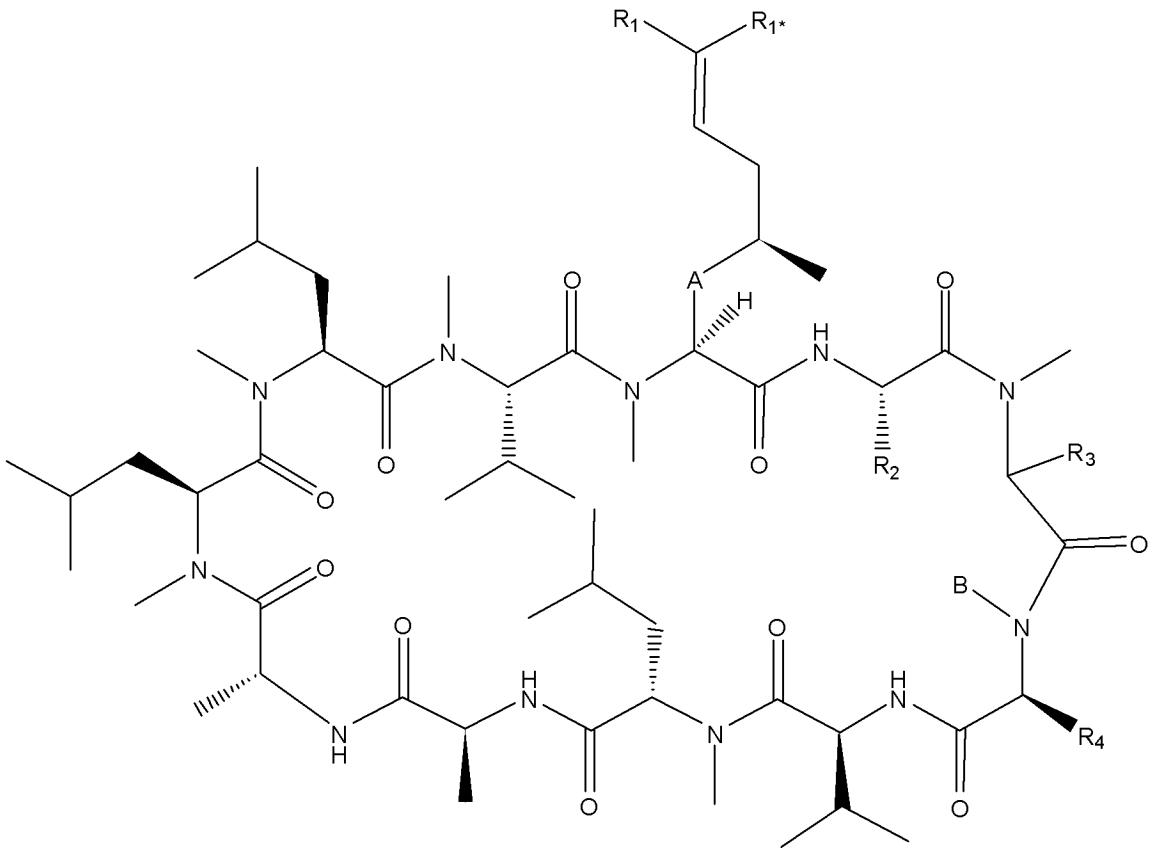
[0004] 本发明发现可通过选择性抑制线粒体亲环蛋白 D(CyP-D) 治疗缺血 / 再灌注损伤。也已经发现同时抑制细胞溶胶亲环蛋白，如亲环蛋白 A(CyP-A)，部分或全部抵消亲环蛋白 D 抑制的有益效果。

[0005] 线粒体亲环蛋白 D(下文“亲环蛋白 D”) 是亲环蛋白家族中的肽基脯氨酸顺反异构酶。也被称为亲环蛋白 F 和肽基脯氨酸异构酶 F。亲环蛋白 D 位于线粒体基质中。设计为在线粒体中积聚的亲环蛋白抑制剂因此对亲环蛋白 D 有一定选择性。

发明内容

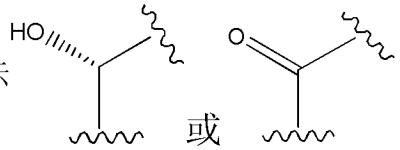
[0006] 本发明因此提供了缀合物或其药学上可接受的盐，所述缀合物包括与一个或多个线粒体靶向基团连接的式 (I) 的环孢菌素部分 ：

[0007]



[0008] (I)

[0009] 其中：

[0010] A 表示  ，

[0011] B 表示甲基或乙基，

[0012] R_1 和 R_{1*} 的一个表示氢并且另一个表示甲基，

[0013] R_2 表示乙基或异丙基，

[0014] R_3 表示氢或甲基，并且

[0015] R_4 表示 $-CH_2CH(CH_3)CH_3$、$-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$、$-CH(CH_3)CH_3$ 或 $-CH(CH_3)CH_2CH_3$。

[0016] 附图描述

[0017] 图 1 是显示通过环孢菌素和本发明的缀合物（化合物 1）抑制分离的亲环蛋白 D 的图表。

[0018] 图 2 是显示化合物 1 和亲环蛋白 A 的复合物不抑制钙依赖磷酸酶的图表。

[0019] 图 3 是显示化合物 1 优先地抑制线粒体内亲环蛋白 D 而不是线粒体外亲环蛋白 A 的一系列图表。

[0020] 图 4 是显示化合物 1 优先地抑制 B50 神经细胞中线粒体内亲环蛋白 D 而不是线粒体外亲环蛋白 A 的一系列图表和图。

[0021] 图 5 显示短暂缺乏葡萄糖和氧之后，在海马神经元中化合物 1 是比环孢菌素更好的细胞保护剂。

[0022] 图 6 是显示通过一系列本发明的缀合物（化合物 1 至 4）对大鼠海马神经元中假

缺血 / 再灌注诱导的坏死细胞保护的图表。

[0023] 图 7 是显示在大鼠心脏细胞中缺乏氧和葡萄糖 4 小时诱导的轻微坏死的图表。

[0024] 图 8 是显示氧和葡萄糖缺乏之后再充氧大鼠心脏细胞诱导心脏细胞的渐进细胞死亡的图表。细胞死亡被化合物 2 抑制。

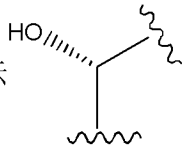
[0025] 图 9 是比较在大鼠心脏细胞中化合物 2 和 3 的细胞保护性能与 CsA 的细胞保护性能的图表。

[0026] 发明详述

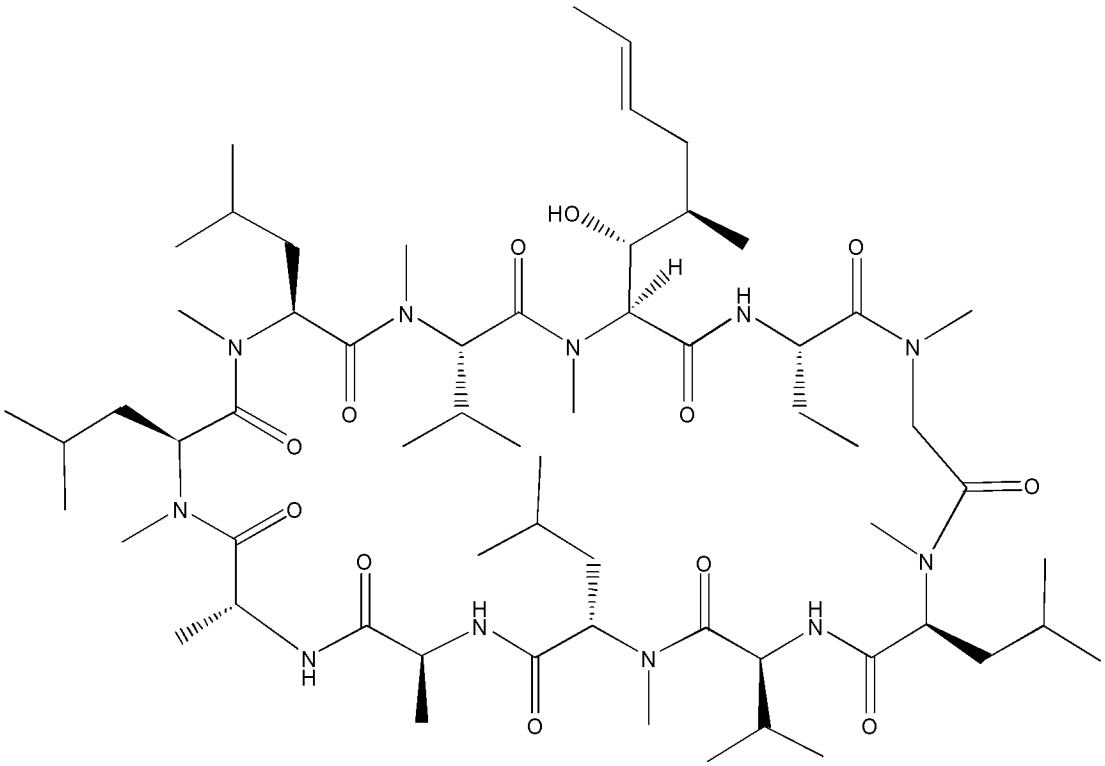
[0027] 一般地，式 (I) 的环孢菌素部分连接一个、两个、三个或四个线粒体靶向基团。优选地，所述环孢菌素部分连接一个或两个线粒体靶向基团，更优选地连接一个线粒体靶向基团。

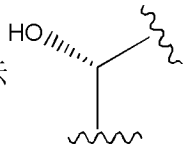
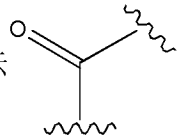
[0028] 当所述环孢菌素部分连接多于一个线粒体靶向基团时，每个线粒体靶向基团可以是相同的或不同的。

[0029] 优选地，在式 (I) 的环孢菌素部分中：

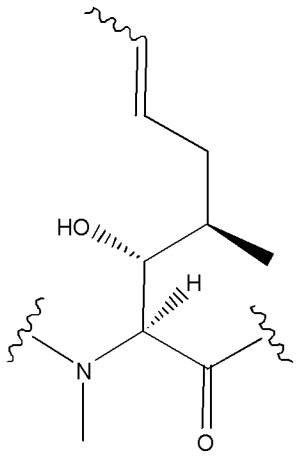
[0030] A 表示  B 表示甲基，R_1 表示甲基，R_{1*} 表示氢，R_2 表示乙基，R_3 表示氢，和 R_4 表示 $-CH_2CH(CH_3)CH_3$。该化合物是环孢菌素 A。它具有下式：

[0031]

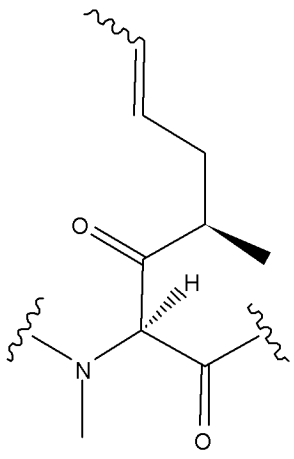


[0032] 式 (I) 的环孢菌素部分的 1 位处的残基取决于 A 的性质包含羟基基团或酮。因此，如果 A 表示  1 位的残基为式 (X) 并且如果 A 表示  1 位的残基为式 (X')。

[0033]



(X)



(X')

[0034] 一般地，线粒体靶向基团或每个线粒体靶向基团共价或非共价地与环孢菌素部分连接。优选地，所有线粒体靶向基团共价连接或所有线粒体靶向基团非共价连接。

[0035] 优选地，至少一个线粒体靶向基团共价连接。更优选地，所有线粒体靶向基团共价连接。

[0036] 线粒体靶向基团或每个线粒体靶向基团可直接或经连接体 (L) 与环孢菌素部分连接。

[0037] 优选地，所有线粒体靶向基团直接与环孢菌素部分连接或所有线粒体靶向基团经连接体与环孢菌素部分连接。

[0038] 优选地，至少一个线粒体靶向基团经连接体与环孢菌素连接。更优选地，所有线粒体靶向基团经连接体与环孢菌素部分连接。

[0039] 连接体 (L) 的性质不是本发明的重要部分。因此，L 可以是能够将所述线粒体靶向基团与所述环孢菌素部分连接的任何部分。这种连接体部分是本领域熟知的。

[0040] 一般地，连接体 (L) 分子量为 50 至 1000，优选地 100 至 500。

[0041] 一般地，连接体 (L) 是直链 C_1 至 C_{20} 亚烷基，其被选自卤素原子、羟基、烷氧基、烷基、羟烷基、卤代烷基和卤代烷氧基取代基的一个或多个取代基未取代或取代，其中亚烷基链中的零个或一个至十个，优选地一个至五个碳原子被选自亚芳基、-O-、-S-、-NR'-、-C(O)NR'- 和 -C(O)- 部分的间隔区部分替代，其中 R' 是氢或 C_1 至 C_6 烷基，优选地是氢，并且亚芳基部分被选自卤素原子、羟基、烷基和烷氧基基团的一个、两个或三个取代基未取代或取代。

[0042] 一般地，所述间隔区部分选自亚芳基、-O-、-S-、-NR'- 和 -C(O)NR'- 部分。优选地，所述间隔区部分包括 0 至 2 个亚芳基、0 至 2 个 -S-、0 至 2 个 -O-、0 至 2 个 -NR'- 和 1 至 2 个 -C(O)NR'- 部分。

[0043] 更优选地，所述间隔区部分包括 0 至 2 个亚芳基、0 至 1 个 -O-、0 至 1 个 -NH- 和 1 至 2 个 -C(O)NH- 部分，例如 (a)1 个亚芳基和 2 个 -C(O)NH- 部分，(b)2 个 -C(O)NH- 和 1 个 -O- 部分，(c)1 个亚芳基、2 个 -C(O)NH- 和 1 个 -O- 部分，或 (d)1 个亚芳基、1 个 -C(O)NH- 和 1 个 -NH- 部分。

[0044] 优选地，所述直链 C_1-C_{20} 亚烷基被一个或多个，优选地 1 个或 2 个卤素原子未取代

或取代。最优选地，所述亚烷基基团是未取代的。

[0045] 优选地，亚芳基间隔区部分用一个、两个或三个卤素原子或羟基基团未取代或取代。当亚芳基间隔区部分携带 2 个或多个取代基时，取代基可以是相同的或不同的。最优选地，亚芳基间隔区部分是未取代的。

[0046] 线粒体靶向基团是能够在细胞线粒体中浓缩缀合物的基团。因此，温育细胞与包括一个或多个线粒体靶向基团的缀合物之后，线粒体中缀合物的浓度比细胞溶胶中缀合物的浓度更高。

[0047] 优选地，施加缀合物至细胞后 15 分钟，线粒体中缀合物的浓度与细胞溶胶中缀合物的浓度的比大于 1.5 ： 1，更优选地大于 2 ： 1，更优选地大于 5 ： 1，最优选地大于 10 ： 1。

[0048] 本发明缀合物中线粒体靶向基团的具体结构不是至关重要的。线粒体靶向基团是熟知的。例如，它们之前已经用于引导抗氧化剂化合物至线粒体。

[0049] 下列文献广泛讨论了适当的线粒体靶向基团的例子 ：

[0050] -Souza 等，Mitochondrion 5(2005)352-358 ；

[0051] -Kang 等，The Journal of Clinical Investigation，119，3，454-464 ；

[0052] -Horton 等，Chemistry and Biology 15，375-382 ；

[0053] -Wang 等，J.Med.Chem.，2007，50(21)，5057-5069 ；

[0054] -Souza 等，Journal of Controlled Release 92(2003)189-197 ；

[0055] -Maiti 等，Angew.Chem.Int.Ed.2007，46，5880-5884 ；

[0056] -Kanai 等，Org.Biomol.Chem.2007，5，307-309 ；

[0057] -Senkal 等，J Pharmacol Exp Ther.317(3)，1188-1199 ；

[0058] -Weiss 等，Proc Natl Acad Sci USA，84，5444-5488 ；

[0059] -Zimmer G，等 .Br J Pharmacol.1998，123(6)，1154-8 ；

[0060] -Modica-Napolitano 等，Cancer Res.1996，56，544-550 ；

[0061] -Murphy 等 (2007)，Ann Rev.Pharm Toxicol.47，629-656 ；和

[0062] -Hoye 等，Accounts of Chemical Research，41，1，87-97。

[0063] 上面所有文献通过参考并入。为了避免怀疑，在这些文章中公开的所有线粒体靶向基团可用在本发明的缀合物中。

[0064] 一般地，线粒体靶向基团是皮尔逊相关系数 (Pearson’s correlation coefficient)(Rr) 大于 0.1，优选地大于 0.2，更优选地大于 0.4，例如 0.5 至 0.6 的那些基团，如通过包括下列步骤的试验所测定的 ：

[0065] (a) 从培养基中移出商业上可得的 HeLa 细胞并用磷酸盐缓冲盐水冲洗细胞 ；

[0066] (b) 将线粒体靶向基团与商业上可得的荧光团缀合 ；

[0067] (c) 在无血清极限必需培养基中，来自步骤 (a) 的细胞在 5μM 获得自步骤 (b) 的缀合物中温育 90 分钟 ；

[0068] (d) 添加能够标记细胞线粒体的试剂 ；和

[0069] (e) 分析细胞的荧光图像以确定皮尔逊相关系数 (Rr)。

[0070] 上面的试验在 Horton 等，Chemistry and Biology 15，375-382 中更详细地描述。

[0071] 一般地，步骤 (a) 中磷酸盐缓冲盐水的 pH 为 pH 7.4。

[0072] 一般地，步骤 (d) 的试剂为 Mitotracker CMXRos，其可从 Invitrogen 商业上获得。一般地，添加浓度为 50nM 的 Mitotracker CMXRo，用于在步骤 (c) 中温育最后 15 分钟。

[0073] 一般地，步骤 (d) 之后，细胞用无血清极限必需培养基冲洗三次并放置在冰上。

[0074] 一般地，用倒置 Zeiss LSM 510 共焦显微镜获取步骤 (e) 中细胞的荧光图像，并用 Colocalizer Pro 软件分析以计算皮尔逊相关系数 (Rr)。

[0075] 特别优选的线粒体靶向基团是能够特异性地在细胞的线粒体基质中浓缩缀合物的基团。因此，优选地，本发明的缀合物的线粒体基质 / 线粒体外积聚比大于 2，更优选地大于 3，更优选地大于 4，如通过包括下列步骤的试验所测定的：

[0076] (1) 在缓冲液中制备分离的线粒体和重组亲环蛋白 A 的第一悬浮液；

[0077] (2) 添加缀合物至 (1) 中获得的悬浮液；

[0078] (3) 添加 Ca^{2+} 到 (2) 中获得的悬浮液至浓度为 50μM；

[0079] (4) 通过 (3) 中获得的悬浮液在 540nm 的吸光度的减少监测通透性转换 (PT) 孔的抑制来监测亲环蛋白 D 的活性；

[0080] (5) 在缓冲液中制备分离的线粒体和重组亲环蛋白 A 的第二悬浮液；

[0081] (6) 添加缀合物至 (5) 中获得的悬浮液；

[0082] (7) 添加 Ca^{2+} 至 (6) 中获得的悬浮液至浓度 50μM，之后立刻沉淀线粒体以提供上清液；

[0083] (8) 通过标准分光光度法监测 (7) 中获得的上层清液中亲环蛋白 A 活性；

[0084] (9) 分别地测定本发明缀合物与重组亲环蛋白 D 和重组亲环蛋白 A 的解离常数 (K_i)；和

[0085] (10) 使用下列式子计算线粒体基质 / 线粒体外积聚比：

[0086]

$$\frac{50}{\text{在产生50\%的PT孔抑制的缀合物浓度下亲环蛋白A抑制(\%)}} \bullet \frac{\text{亲环蛋白D的}K_i}{\text{亲环蛋白A的}K_i}$$

[0087] 优选地，在步骤 (1) 和 (5) 中，通过常规程序从大鼠肝脏分离线粒体，如 Andreeva & Crompton(1994)Eur J Biochem 221,261-268。

[0088] 优选地，步骤 (1) 至 (10) 在 25℃下进行。

[0089] 优选地，在步骤 (3) 和 (7) 中的 Ca^{2+} 作为 $CaCl_2$ 添加，并且以 10μM/ 分钟的速率添加。

[0090] 优选地，在步骤 (7) 中通过离心沉淀线粒体，例如在 Eppendorf 台式离心机中进行一分钟。

[0091] 优选地，在步骤 (8) 中，标准光度分析是 Kofron 等 (1991)Biochemistry30, 6127-6134 中所描述的。

[0092] 优选地，步骤 (1) 和 (5) 中获得的悬浮液是相同的。

[0093] 优选地，所述线粒体靶向基团是亲脂性阳离子或线粒体靶向肽。

[0094] 一般地，亲脂性阳离子是鏻阳离子、𬭸阳离子、铵阳离子、氟吡汀 (flupritine)、

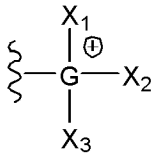
MKT-077、吡啶鎓神经酰胺 (pyridinium ceramide)、喹啉鎓 (quinolium)、脂质体阳离子、山梨醇胍、环状胍、若丹明或吡啶衍生物。

[0095] 优选地，亲脂性阳离子是鏻阳离子、𬭸阳离子、铵阳离子、氟吡汀、MKT-077、吡啶鎓神经酰胺、喹啉鎓、脂质体阳离子、山梨醇胍、环状胍或若丹明。

[0096] 鏻阳离子和若丹明是特别优选的亲脂性阳离子。

[0097] 鏻、𬭸和铵阳离子在 Murphy 等 (2007)，Ann Rev. Pharm Toxicol. 47，629-656 中评述。一般地，鏻、𬭸或铵阳离子是式 (II) 的阳离子：

[0098]



(II)

[0099] 其中 G 表示氮、磷或砷，和 X_1、X_2 和 X_3 独立地表示烷基、芳基、- 亚烷基 - 芳基或杂芳基，其中烷基和亚烷基基团和部分被一个或多个，例如 1、2 或 3 个卤素原子、羟基、烷氧基或卤代烷氧基基团未取代或取代，并且芳基和杂芳基基团和部分被一个、两个或三个卤素原子、羟基、烷氧基或卤代烷氧基基团未取代或取代。

[0100] 优选地，所述烷基和亚烷基基团和部分被一个或多个，优选地 1 或 2 个卤素原子未取代或取代。更优选地，所述烷基和亚烷基基团和部分是未取代的。

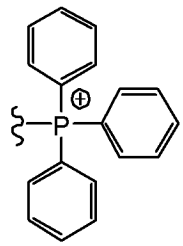
[0101] 优选地，所述芳基和杂芳基基团和部分是未取代的。

[0102] 优选地，G 表示磷原子或氮原子，更优选地表示磷原子。

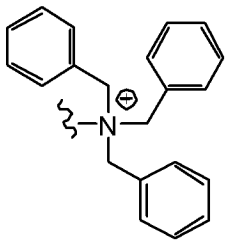
[0103] 优选地，X_1、X_2 和 X_3 的至少一个表示苯基或苄基。更优选地，所有 X_1、X_2 和 X_3 表示苯基或苄基。最优选地，所有 X_1、X_2 和 X_3 表示苯基或所有 X_1，X_2 和 X_3 表示苄基。

[0104] 优选的式 (II) 的阳离子是三苯基鏻 (IIa) 和三苄基铵 (IIb)：

[0105]



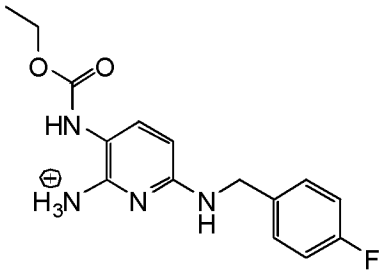
(IIa)

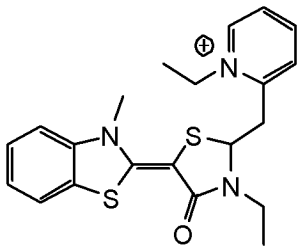


(IIb)

[0106] 氟吡汀和 MKT-077 在：Zimmer G，等 . Br J Pharmacol. 1998，123(6)，1154-8 和 Modica-Napolitano 等，Cancer Res. 1996，56，544-550 中描述。氟吡汀和 MKT-077 具有下列结构。它们可在任何方便的位置连接至本发明的缀合物。

[0107]

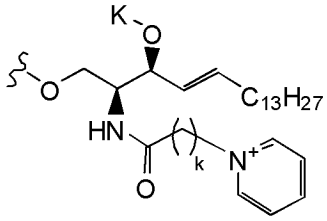




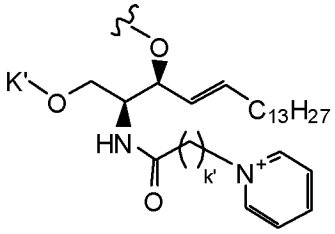
[0108] 氟吡汀 MKT-077

[0109] 吡啶鎓神经酰胺在:Senkal 等,J Pharmacol Exp Ther.317(3),1188-1199 中描述。一般地,吡啶鎓神经酰胺是式 (IIIa) 或 (IIIb) 的化合物:

[0110]



(IIIa)



(IIIb)

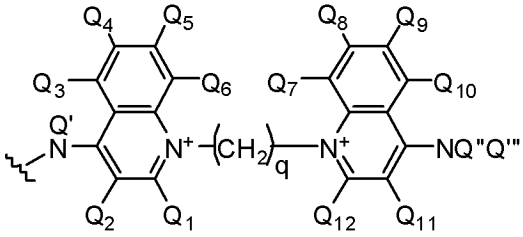
[0111] 其中 K 和 K' 表示氢或保护基,并且 k 和 k' 表示 2 至 10 的整数。

[0112] 所述保护基可以是任何羟基保护基。

[0113] 优选地,K 和 K' 表示氢。优选地,k 和 k' 表示 3 至 6 的整数,例如 4 或 5。更优选地,K 和 K' 表示氢并且 k 和 k' 表示 5。

[0114] 喹啉鎓在:Weiss 等,Proc Natl Acad Sci USA,84,5444-5488 中描述。一般地,喹啉鎓是式 (IV) 的二价阳离子:

[0115]



(IV)

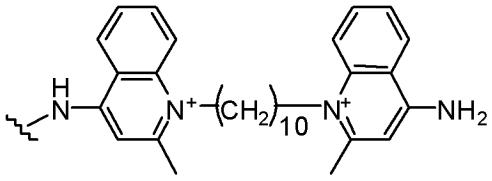
[0116] 其中 Q_1 至 Q_{12} 独立地表示烷基或氢,Q',Q" 和 Q"' 独立地表示烷基或氢和 q 表示 6 至 20 的整数,其中所述烷基基团被一个或多个卤素原子、羟基、烷氧基或卤代烷氧基基团未取代或取代。

[0117] 优选地,所述烷基基团被一个或多个,优选地 1 或 2 个卤素原子、羟基或甲氧基基团未取代或取代。更优选地,所述烷基基团是未取代的。

[0118] 优选地,Q_1 至 Q_{12} 独立地表示甲基或氢。优选地,Q',Q" 和 Q"' 表示氢。优选地,q 表示 8 至 14 的整数。

[0119] 更优选地,Q_1 和 Q_{12} 表示甲基和 Q_2 至 Q_{11} 表示氢。更优选地,q 表示 10。优选地喹铵根 (dequalinium radical):

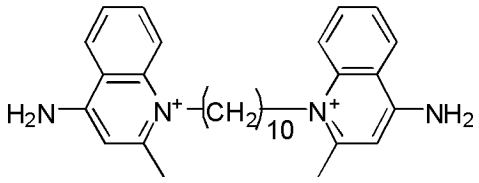
[0120]



[0121] 地喹铵根

[0122] 脂质体阳离子在 :Souza 等,Mitochondrion 5(2005)352-358 中描述。脂质体阳离子是脂质体样阳离子囊泡 (cationic vesicle)。一般地,脂质体阳离子包括多个地喹铵分子 :

[0123]

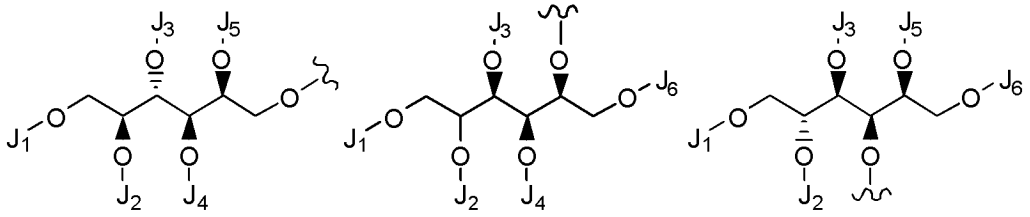


[0124] 地喹铵

[0125] 在该实施方式中,脂质体阳离子一般地非共价与环孢菌素部分连接。

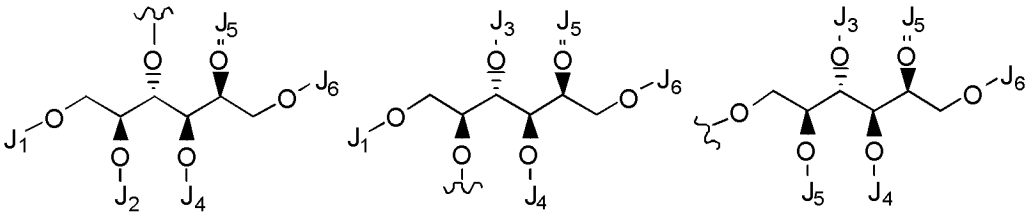
[0126] 山梨醇胍在 :Maiti 等,Angew. Chem. Int. Ed. 2007,46,5880-5884 中描述。一般地,山梨醇胍是式 (Va) 至 (Vf) 的化合物 :

[0127]



(Va) (Vb) (Vc)

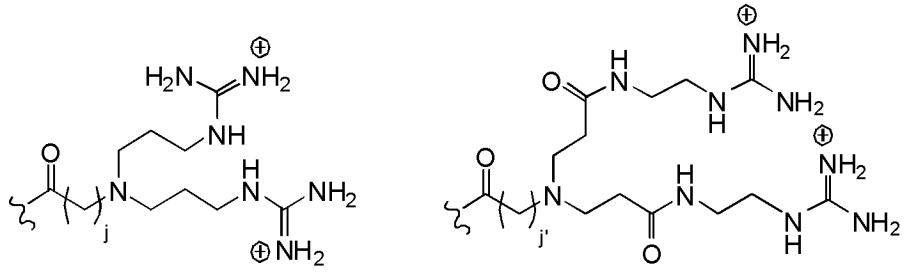
[0128]



(Vd) (Ve) (Vf)

[0129] 其中 J_1 至 J_6 独立地表示氢、保护基、或式 (Vg) 或 (Vh) 的基团 :

[0130]



(Vg) (Vh)

[0131] 其中 j 和 j'表示 2 至 10 的整数，条件是 J_1 至 J_6 的至少一个并且优选地不大于四个表示式 (Vg) 或 (Vh) 的基团。

[0132] 所述保护基可以是任何羟基保护基。

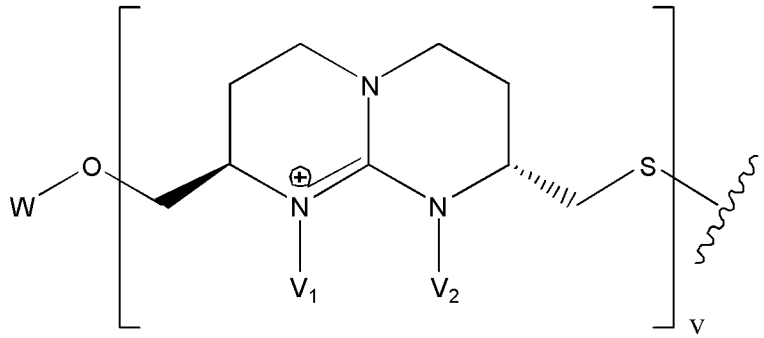
[0133] 优选地，j 和 j' 表示 4 至 8 的整数，例如 5 或 7。

[0134] 在优选的实施方式中，所述山梨醇胍是式 (Va) 的化合物，J_1 表示氢或保护基，J_2 至 J_5 表示式 (Vg) 的基团并且 j 表示 5 或 7。

[0135] 在可选的优选实施方式中，所述山梨醇胍是式 (Va) 的化合物，J_1 表示氢或保护基，J_2 至 J_5 表示式 (Vh) 的基团并且 j 表示 5。

[0136] 环状胍在 :Kang 等，The Journal of Clinical Investigation，119，3，454-464 中描述。一般地，环状胍是式 (VI) 的化合物 :

[0137]



(VI)

[0138] 其中 W 表示氢或保护基，V_1 和 V_2 独立地表示氢或烷基，并且 v 是 1 至 6 的整数，其中所述烷基基团被一个或多个卤素原子、羟基、烷氧基或卤代烷氧基基团未取代或取代。

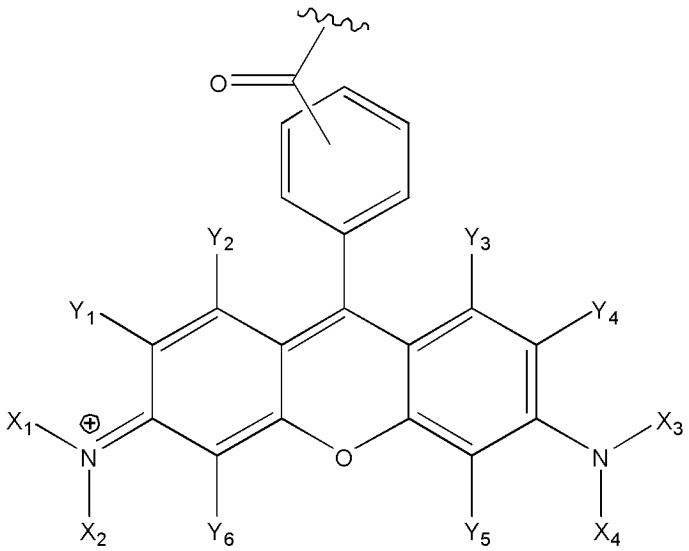
[0139] 优选地，所述烷基基团被一个或多个，优选地 1 或 2 个卤素原子或羟基基团未取代或取代。更优选地，所述烷基基团是未取代的。

[0140] 所述保护基可以是任何羟基保护基。

[0141] 优选地，W 表示氢或叔丁基 - 二甲基 - 甲硅烷基 (TBDMS)。优选地，V_1 和 V_2 表示氢。优选地，v 是 1 至 4 的整数，例如 1 或 2。更优选地，W 表示 TBDMS，V_1 和 V_2 表示氢和 v 是 1。

[0142] 若丹明在 :Hoye 等，Accounts of Chemical Research，41，1，87-97 中描述。一般地，若丹明是式 (VII) 的化合物 :

[0143]



(VII)

[0144] 其中 X_1、X_2、X_3 和 X_4 独立地表示氢或烷基，并且 Y_1、Y_2、Y_3 和 Y_4 独立地表示氢或烷基，其中所述烷基基团被一个或多个卤素原子、羟基、烷氧基或卤代烷氧基基团未取代或取代。

[0145] 优选地，所述烷基基团被一个或多个，优选地 1 或 2 个卤素原子或羟基基团未取代或取代。更优选地，所述烷基基团是未取代的。

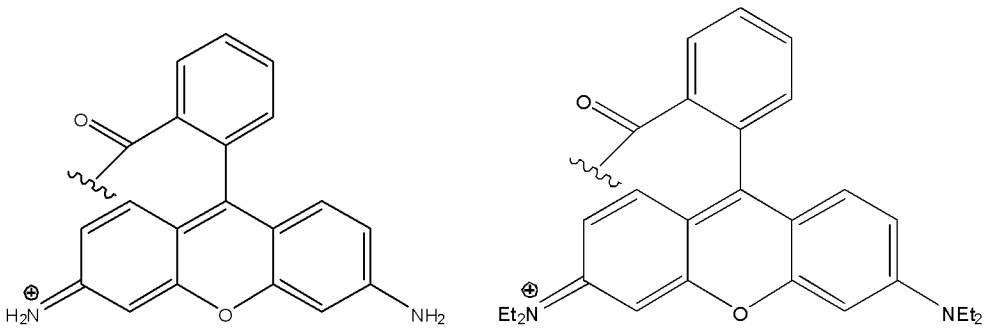
[0146] 优选地，X_1、X_2、X_3 和 X_4 独立地表示氢、甲基或乙基。

[0147] 优选地，Y_1、Y_2、Y_3 和 Y_4 独立地表示氢或甲基。

[0148] 优选地，苯环在 2 或 4 位用羰基部分取代。

[0149] 优选的若丹明包括下列：

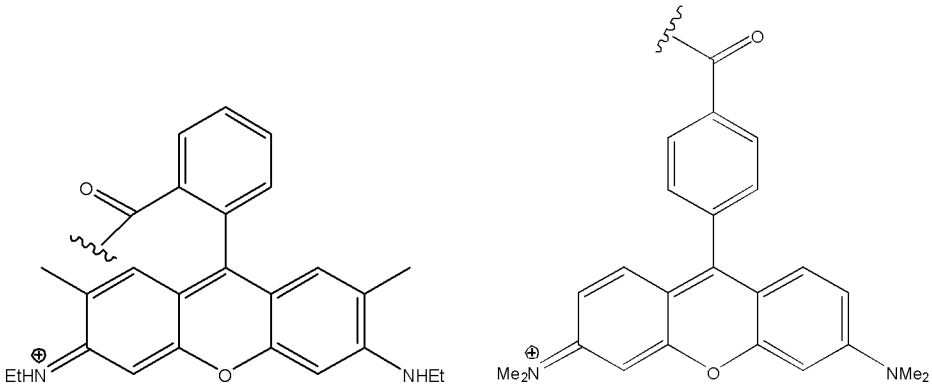
[0150]



若丹明 123 若丹明 B

[0151]

[0152]

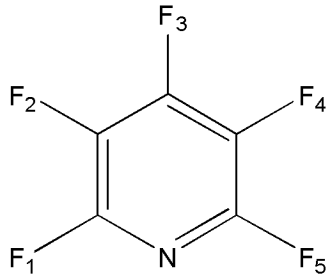


[0153] 若丹明 6G 红色碱性染料

[0154] 红色碱性染料 (rosamine) 是特别优选的。

[0155] 一般地，吡啶衍生物是式 (X) 的化合物：

[0156]

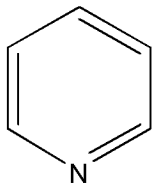


(X)

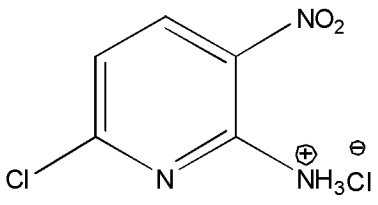
[0157] 其中 F_1 至 F_5 独立地表示氢、卤素原子、$-NO_2$ 或 $-NH_2$。一般地，吡啶衍生物在任何方便的位置连接于环孢菌素部分。例如，吡啶衍生物优选地经吡啶环的氮原子与环孢菌素部分连接。可选地，当 F_1 至 F_5 的一个表示 $-NH_2$ 时，优选地，吡啶衍生物经氮原子胺部分与环孢菌素部分连接。

[0158] 优选地，F_1 至 F_5 的至少两个表示氢。所述 NH_2 部分可任选地为与药学上可接受的阴离子例如卤根阴离子如氯根阴离子相连的叔铵阳离子形式。吡啶衍生物的例子包括式 (Xa) 和 (Xb) 的化合物：

[0159]



(Xa)



(Xb)

[0160] 线粒体靶向肽在：Horton 等，Chemistry and Biology 15,375-382 和 Hoye 等，Accounts of Chemical Research,41,1,87-97 中描述。一般地，线粒体靶向肽包含 4 至 16 个氨基酸。氨基酸是天然的或非天然的氨基酸。一般地，氨基酸选自天然氨基酸和二苯基丙氨酸、环己基丙氨酸、己基丙氨酸、甲基化酪氨酸、二甲基酪氨酸和萘基丙氨酸 (napthylalanine)。所述氨基酸可以是 D- 或 L- 对映异构体。

[0161] 优选的氨基酸是碱性氨基酸和芳族氨基酸。典型的碱性氨基酸是赖氨酸、精氨酸和谷氨酰胺，优选地是赖氨酸和精氨酸。典型的芳族氨基酸是苯丙氨酸、二苯基丙氨酸、环

己基丙氨酸、己基丙氨酸、酪氨酸、甲基化酪氨酸、二甲基酪氨酸和萘基丙氨酸。

[0162] 优选的线粒体靶向肽类是 SS 四肽，其包含交替的芳族氨基酸和碱性氨基酸的结构模体。SS 四肽中优选的芳族残基为二甲基酪氨酸和苯丙氨酸。SS 四肽中优选的碱性残基为精氨酸和赖氨酸。因此，SS 四肽优选地是包含 (a) 二甲基酪氨酸或苯丙氨酸，和 (b) 精氨酸或赖氨酸交替残基的四肽。

[0163] 进一步优选的特定线粒体靶向肽是在 :Horton 等，Chemistry and Biology 15，375-382 和 Hoye 等，Accounts of Chemical Research，41，1，87-97 中公开的那些 :

[0164] 1. F_x-r-F_x-K-F_x-r-F_x-K

[0165] 2. F-r-F-K-F-r-F-K

[0166] 3. F-r-F_x-K-F-r-Fx-K

[0167] 4. F-r-Y-K-F-r-Y-K

[0168] 5. F_x-r-F_x-K

[0169] 6. F-r-F-K

[0170] 7. F-r-F_x-K

[0171] 8. F-r-F_2-K

[0172] 9. F-r-Nap-K

[0173] 10. F-r-Hex-K

[0174] 11. F-r-Y_{Me}-K

[0175] 12. F-r-F_F-K

[0176] 13. F-r-Y-K

[0177] 14. Y-r-Y-K

[0178] 15. Y_{DM}-R-F-K

[0179] 16. R-Y_{DM}-K-F

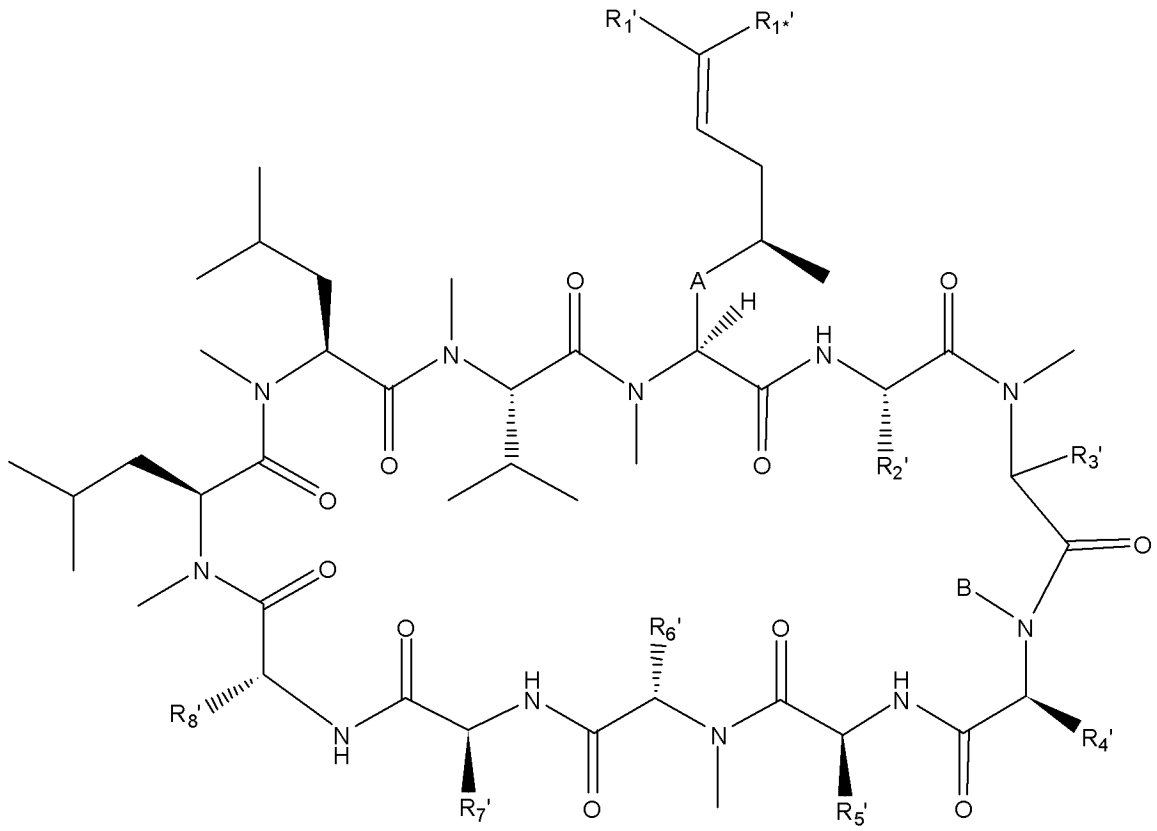
[0180] 17. F-R-F-K

[0181] 上面使用了下列缩写 :F 为苯丙氨酸，F_2 为二苯基丙氨酸，F_x 为环己基丙氨酸，Hex 为己基丙氨酸，K 为 L- 赖氨酸，Nap 为萘基丙氨酸，R 为 L- 精氨酸，r 为 D- 精氨酸，Y 为酪氨酸，Y_{DM} 为二甲基酪氨酸，Y_{Me} 为甲基化酪氨酸和 Q 为谷氨酰胺。

[0182] 一般地，线粒体靶向肽经肽的 C 末端或 N 末端与环孢菌素部分连接。肽的另一端一般地用合适的保护基未保护或保护。合适的保护基是本领域技术人员熟知的。

[0183] 一般地，本发明的缀合物具有式 (I') :

[0184]



[0185]

(I')

[0186] 其中：

[0187] R_1' 和 R_{1*}' 的一个表示甲基或 $-L_1-MTG_1$ 并且另一个表示氢，

[0188] R_2' 表示如上面所定义的 R_2 或 $-L_2-MTG_2$，

[0189] R_3' 表示如上面所定义的 R_3 或 $-L_3-MTG_3$，

[0190] R_4' 表示如上面所定义的 R_4 或 $-L_4-MTG_4$，

[0191] R_5' 表示异丙基或 $-L_5-MTG_5$，

[0192] R_6' 表示 $-CH_2CH(CH_3)CH_3$ 或 $-L_6-MTG_6$，

[0193] R_7' 表示甲基或 $-L_7-MTG_7$，

[0194] R_8' 表示甲基或 $-L_8-MTG_8$，和

[0195] A 和 B 如上面所定义的，

[0196] 其中 L_1 至 L_8 的每一个独立地表示如上面所定义的直接键合或连接体 (L)，并且 MTG_1 至 MTG_8 的每一个独立地表示如上面所定义的线粒体靶向基团，条件是 R_1' 或 R_{1*}' 和 R_2' 至 R_8' 的至少一个且不超过三个表示 -L-MTG。

[0197] 优选地，R_1' 表示甲基或 $-L_1-MTG_1$ 且 R_{1*}' 表示氢。

[0198] 优选地，R_1' 表示甲基或 $-L_1-MTG_1$，R_{1*}' 表示氢，R_2' 表示如上面所定义的 R_2，R_3' 表示如上面所定义的 R_3 或 $-L_3-MTG_3$，R_4' 表示如上面所定义的 R_4，R_5' 表示异丙基，R_6' 表示 $-CH_2CH(CH_3)CH_3$，R_7' 表示甲基，且 R_8' 表示甲基。

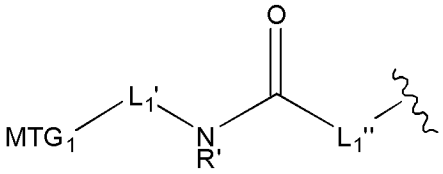
[0199] 在本发明优选的实施方式中，R_1' 表示 $-L_1-MTG_1$，R_{1*}' 表示氢，R_2' 表示如上面所定义的 R_2，R_3' 表示如上面所定义的 R_3，R_4' 表示如上面所定义的 R_4，R_5' 表示异丙基，R_6' 表示 $-CH_2CH(CH_3)CH_3$，R_7' 表示甲基，且 R_8' 表示甲基。

[0200] 在本发明进一步优选的实施方式中，R_1'表示甲基，R_{1*}'表示氢，R_2'表示如上面所定义的 R_2，R_3'表示 $-L_3-MTG_3$，R_4'表示如上面所定义的 R_4，R_5'表示异丙基，R_6'表示 $-CH_2CH(CH_3)CH_3$，R_7'表示甲基，且 R_8'表示甲基。

[0201] 一般地，L_1 至 L_8 独立地表示如上面所定义的连接体 (L)。

[0202] 一般地，L_1-MTG_1 是式 (VIII*) 的化合物：

[0203]

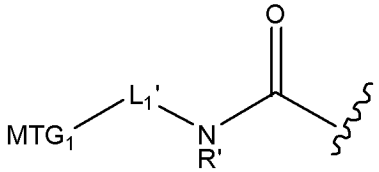


(VIII*)

[0204] 其中 L_1"表示直接键合或亚苯基部分，L_1'表示直链 C_1 至 C_{19} 亚烷基，其被选自卤素原子、羟基、烷氧基、烷基、羟烷基、卤代烷基和卤代烷氧基取代基的一个或多个取代基未取代或取代，其中在所述亚烷基链中的 1 至 9 个碳原子，优选地 1 至 4 个碳原子被选自亚芳基、-O-、-NR'- 和 -C(O)NR'- 部分的间隔区部分替代，其中 R' 是氢或 C_1 至 C_6 烷基，优选地是氢，且亚芳基部分被选自卤素原子、羟基、烷基或烷氧基基团的一个、两个或三个取代基未取代或取代。

[0205] 优选地，L_1-MTG_1 为式 (VIII) 的化合物：

[0206]



(VIII)

[0207] 其中 L_1'表示直链 C_1 至 C_{19} 亚烷基，其被选自卤素原子、羟基、烷氧基、烷基、羟烷基、卤代烷基和卤代烷氧基取代基的一个或多个取代基未取代或取代，其中在所述亚烷基链中的 1 至 9 个碳原子，优选地 1 至 4 个碳原子被选自亚芳基、-O-、-NR'- 和 -C(O)NR'- 部分的间隔区部分替代，其中 R' 是氢或 C_1 至 C_6 烷基，优选地是氢，且亚芳基部分被选自卤素原子、羟基、烷基或烷氧基基团的一个、两个或三个取代基未取代或取代。

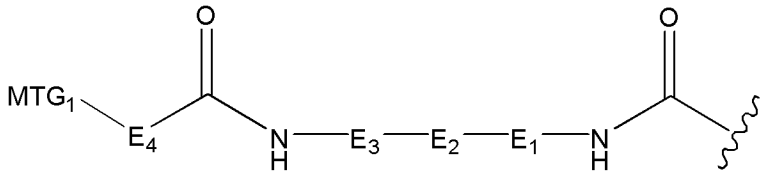
[0208] 优选地，所述直链 C_1 至 C_{19} 亚烷基被一个或多个，优选地 1 个或 2 个卤素原子未取代或取代。最优选地，所述直链 C_1 至 C_{19} 亚烷基是未取代的。

[0209] 优选地，亚芳基间隔区部分用一个、两个或三个卤素原子或羟基基团未取代或取代。当亚芳基间隔区部分携带 2 个或多个取代基时，取代基可以是相同的或不同的。最优选地，亚芳基间隔区部分是未取代的。

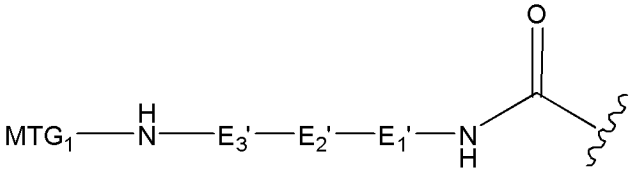
[0210] 优选地，所述间隔区部分包括 0 至 1 个亚芳基、0 至 1 个 -O-、0 至 1 个 -NH- 和 1 至 2 个 -C(O)NH- 部分。

[0211] 更优选地，L_1-MTG_1 是式 (VIIIa) 或 (VIIIb) 的化合物：

[0212]



(VIIIa)



(VIIIb)

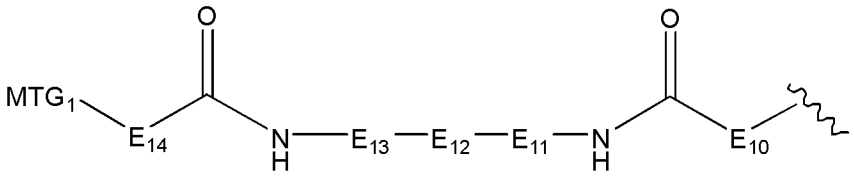
[0213] 其中 E_1 和 E_1' 表示未取代的直链 C_1 至 C_5 亚烷基，E_2 和 E_2' 表示直接键合或 -O-，E_3 和 E_3' 表示未取代的直链 C_1 至 C_5 亚烷基，和 E_4 表示未取代的直链 C_1 至 C_6 亚烷基。

[0214] 优选地，E_1 和 E_1' 表示未取代的 C_2 至 C_4 亚烷基。优选地，E_3 和 E_3' 表示未取代的 C_2 至 C_4 亚烷基。优选地，E_4 表示未取代的 C_2 至 C_6 亚烷基。

[0215] 优选地，当 MTG_1 是鏻阳离子例如三苯基鏻时，L_1-MTG_1 是式 (VIIIa) 的化合物，或当 MTG_1 是若丹明例如红色碱性染料时，L_1-MTG_1 是式 (VIIIb) 的化合物。

[0216] 可选地，L_1-MTG_1 优选地是式 (VIII*a) 的化合物：

[0217]



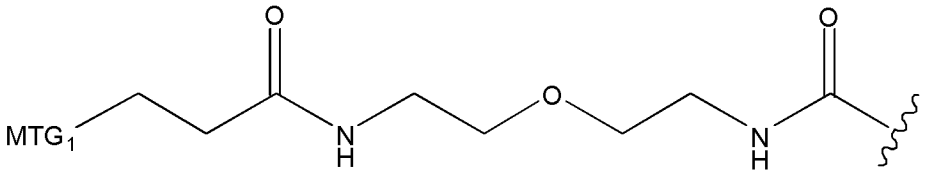
(VIII*a)

[0218] 其中 E_{10} 表示亚苯基部分，E_{11} 表示未取代的 C_1 至 C_4 亚烷基，E_{12} 表示直接键合或 -O-，E_{13} 表示未取代的 C_1 至 C_4 亚烷基，和 E_{14} 表示未取代的 C_1 至 C_6 亚烷基。

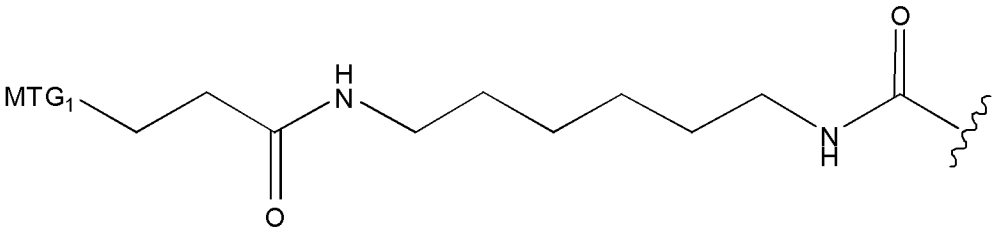
[0219] 优选地，E_{11} 表示未取代的 C_2 至 C_4 亚烷基。优选地，E_{13} 表示未取代的 C_2 至 C_4 亚烷基。优选地，E_{14} 表示未取代的 C_2 至 C_5 亚烷基。

[0220] 式 (VIIIa) 的 L_1-MTG_1 的典型例子为式 (VIIIc) 和 (VIIId) 的结构：

[0221]



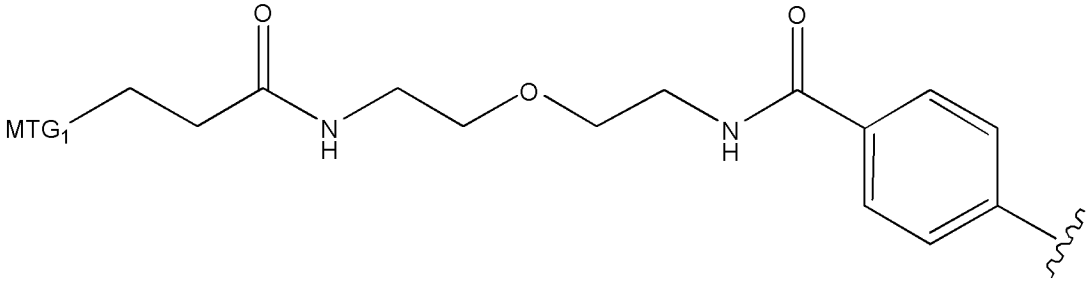
(VIIIc)



(VIIId)

[0222] 式 (VIII*a) 的 L_1-MTG_1 的典型例子为式 (VIIIe) 的结构：

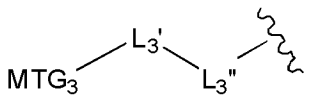
[0223]



(VIIIe)

[0224] 优选地，L_3-MTG_3 为式 (IX) 的化合物：

[0225]



(IX)

[0226] 其中 L_3" 表示未取代的直链 C_1 至 C_2 亚烷基和 L_3' 表示 C_1 至 C_{18} 亚烷基，其被选自卤素原子、羟基、烷氧基、烷基、羟烷基、卤代烷基和卤代烷氧基取代基的一个或多个取代基未取代或取代，其中在所述 C_1 至 C_{18} 亚烷基链中的 1 至 10 个碳原子，优选地 1 至 4 个碳原子被选自亚芳基、-O-、-NR'- 和 -C(O)NR'- 部分的间隔区部分替代，其中 R' 是氢或 C_1 至 C_6 烷基，优选地是氢，且亚芳基部分被选自卤素原子、羟基、烷基或烷氧基基团的一个、两个或三个取代基未取代或取代。

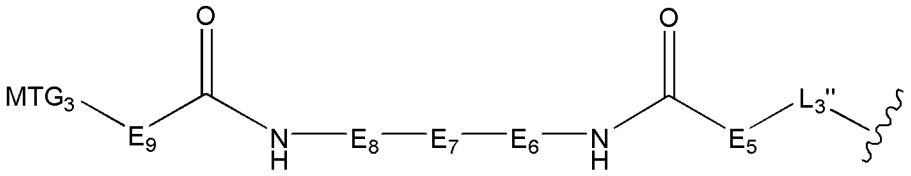
[0227] 优选地，所述直链 C_1 至 C_{18} 亚烷基被一个或多个，优选地 1 个或 2 个卤素原子未取代或取代。最优选地，所述直链 C_1 至 C_{18} 亚烷基是未取代的。

[0228] 优选地，亚芳基间隔区部分用一个、两个或三个卤素原子或羟基基团未取代或取代。当亚芳基间隔区部分携带 2 个或多个取代基时，取代基可以是相同的或不同的。最优选地，亚芳基间隔区部分是未取代的。

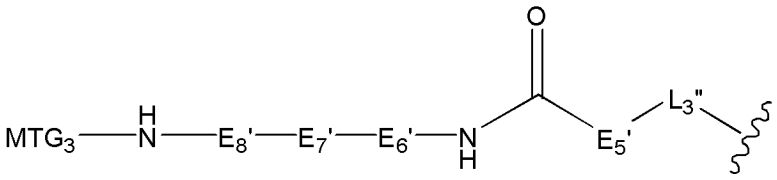
[0229] 优选地，所述间隔区部分包括 0 至 1 个亚芳基、0 至 1 个 -O-、0 至 1 个 -NH- 和 1 至 2 个 -C(O)NH- 部分。

[0230] 优选地，L_3-MTG_3 为式 (IXa) 或 (IXb) 的化合物：

[0231]



(IXa)



(IXb)

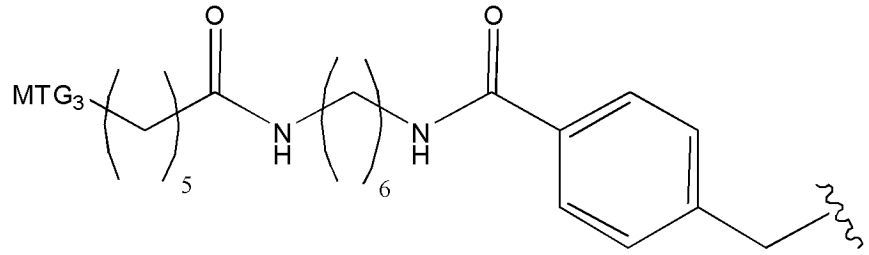
[0232] 其中 E_5 和 E_5' 表示直接键合或未取代的亚芳基，E_6 和 E_6' 表示未取代的 C_1 至 C_4 亚烷基，E_7 和 E_7' 表示直接键合或 -O-，E_8 和 E_8' 表示未取代的 C_1 至 C_4 亚烷基且 E_9 表示未取代的 C_1 至 C_6 亚烷基。

[0233] 优选地，E_5 和 E_5' 表示未取代的亚芳基，更优选地未取代的亚苯基。优选地，E_7 和 E_7' 表示未取代的 C_2 至 C_4 亚烷基。优选地，E_8 和 E_8' 表示未取代的 C_2 至 C_4 亚烷基。优选地，E_9 表示未取代的 C_2 至 C_5 亚烷基。

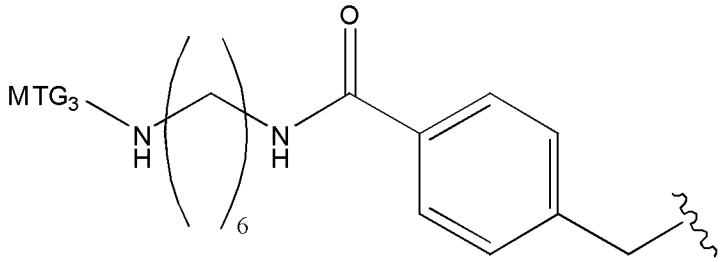
[0234] 优选地，当 MTG_3 是鏻阳离子例如三苯基鏻时，L_3-MTG_3 是式 (IXa) 的化合物，或当 MTG_3 是若丹明例如红色碱性染料时，L_3-MTG_3 是式 (IXb) 的化合物。

[0235] 式 (IXa) 的 L_3-MTG_3 的典型例子为式 (IXc)、(IXe) 和 (IXf) 的结构。式 (IXb) 的 L_3-MTG_3 的典型例子为式 (IXd) 的结构。

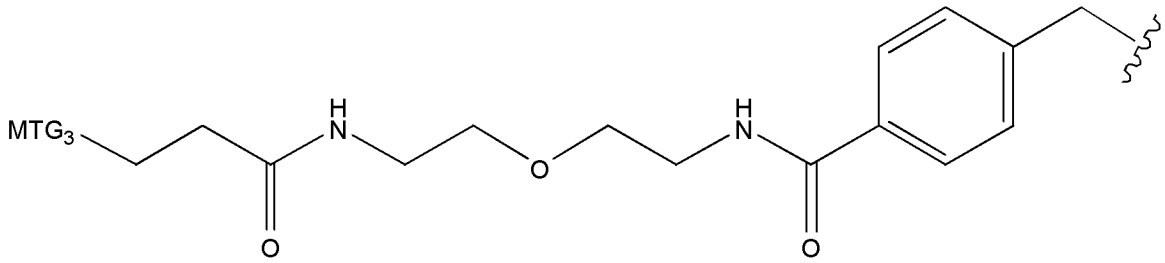
[0236]



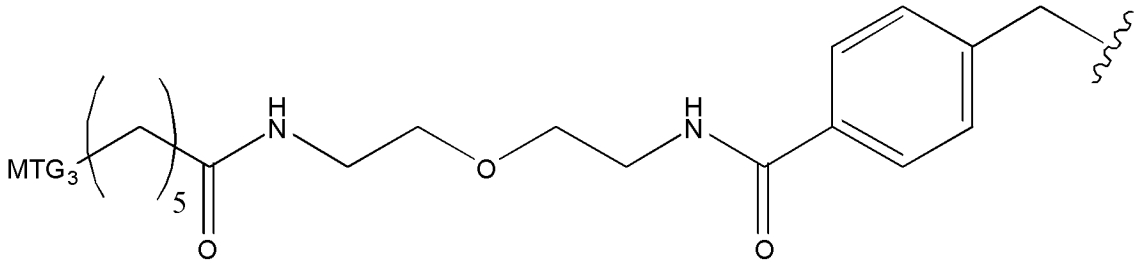
(IXc)



(IXd)



(IXe)



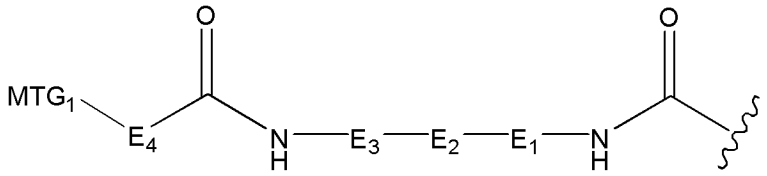
(IXf)

[0237] 在本发明特别优选的实施方式中：

[0238] R_1’表示 $-L_1-MTG_1$，R_{1*}’表示氢，R_2’表示如上面所定义的 R_2，R_3’表示如上面所定义的 R_3，R_4’表示如上面所定义的 R_4，R_5’表示异丙基，R_6’表示 $-CH_2CH(CH_3)CH_3$，R_7’表示甲基，且 R_8’表示甲基，并且

[0239] L_1-MTG_1 是式 (VIIIa) 的化合物：

[0240]

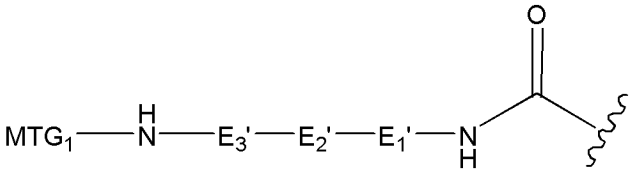


(VIIIa)

[0241] 其中 E_1 至 E_4 如上面所定义的且 MTG_1 表示三苯基鏻,或

[0242] L_1-MTG_1 是式 (VIIIb) 的化合物 :

[0243]



(VIIIb)

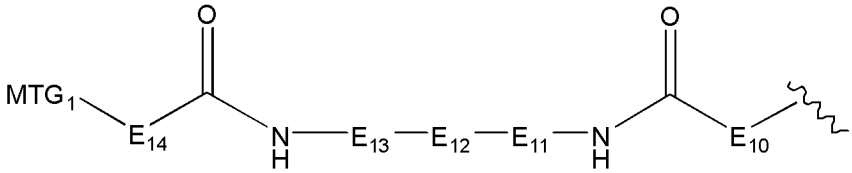
[0244] 其中 E_1' 至 E_3' 如上面所定义的且 MTG_1 表示红色碱性染料。

[0245] 在本发明另一种特别优选的实施方式中 :

[0246] R_1' 表示 -L_1-MTG_1,R_{1*}' 表示氢,R_2' 表示如上面所定义的 R_2,R_3' 表示如上面所定义的 R_3,R_4' 表示如上面所定义的 R_4,R_5' 表示异丙基,R_6' 表示 -$CH_2CH(CH_3)CH_3$,R_7' 表示甲基,且 R_8' 表示甲基,并且

[0247] L_1-MTG_1 是式 (VIII*a) 的化合物 :

[0248]



(VIII*a)

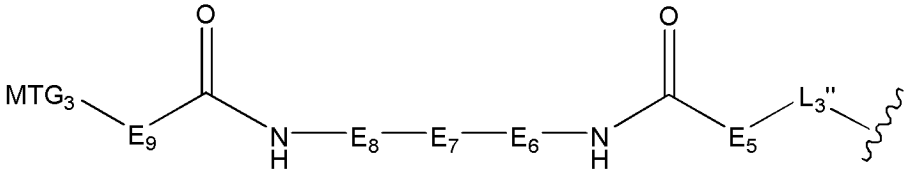
[0249] 其中 E_{10} 至 E_{14} 如上面所定义的且 MTG_1 表示三苯基鏻。

[0250] 在本发明又一种特别优选的实施方式中 :

[0251] R_1' 表示甲基,R_{1*}' 表示氢,R_2' 表示如上面所定义的 R_2,R_3' 表示 -L_3-MTG_3,R_4' 表示如上面所定义的 R_4,R_5' 表示异丙基,R_6' 表示 -$CH_2CH(CH_3)CH_3$,R_7' 表示甲基,且 R_8' 表示甲基,并且

[0252] L_3-MTG_3 是式 (IXa) 的化合物 :

[0253]

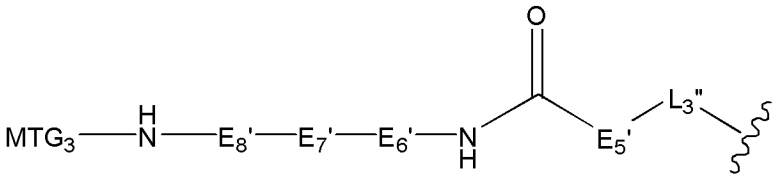


(IXa)

[0254] 其中 L_3" 和 E_5 至 E_9 如上面所定义的且 MTG_3 表示三苯基鏻或

[0255] L_3-MTG_3 是式 (IXb) 的化合物：

[0256]

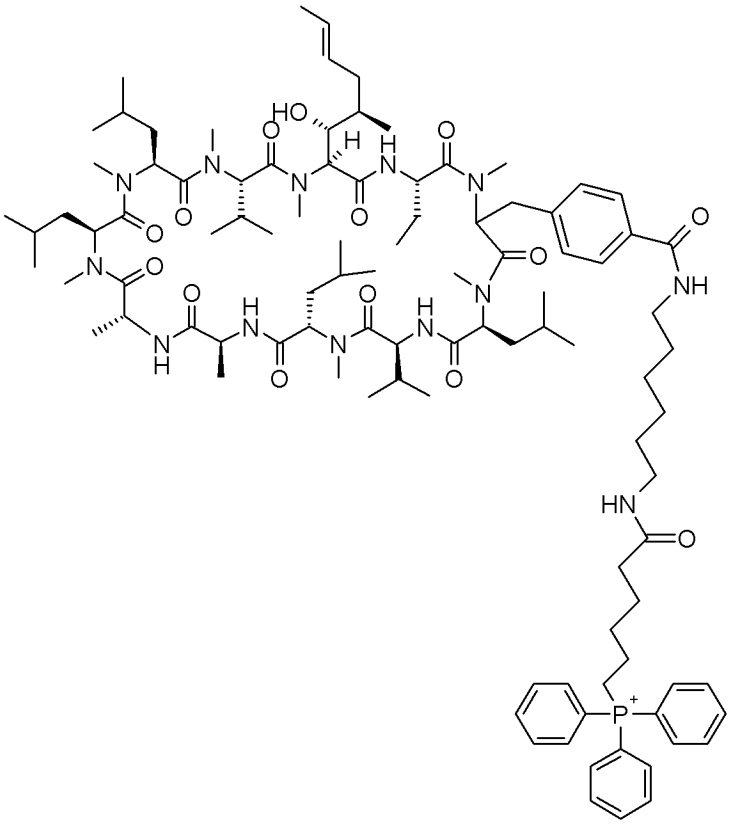


(IXb)

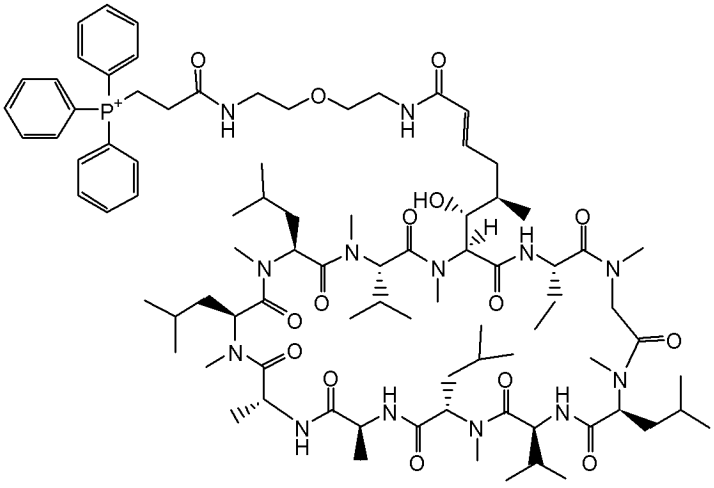
[0257] 其中 L_3”和 E_5’至 E_8’如上面所定义的且 MTG_3 表示红色碱性染料。

[0258] 特别优选的本发明的缀合物为式 (I’a)、(I’b)、(I’c)、(I’d)、(I’e)、(I’f) 和 (I’g) 的化合物和其药学上可接受的盐：

[0259]

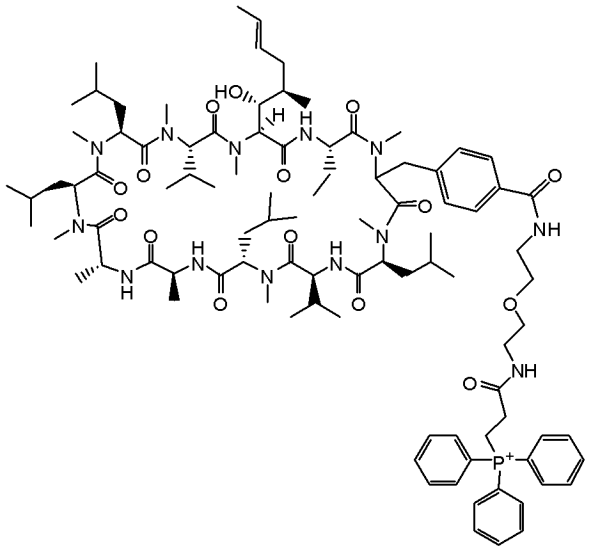


(I'a)

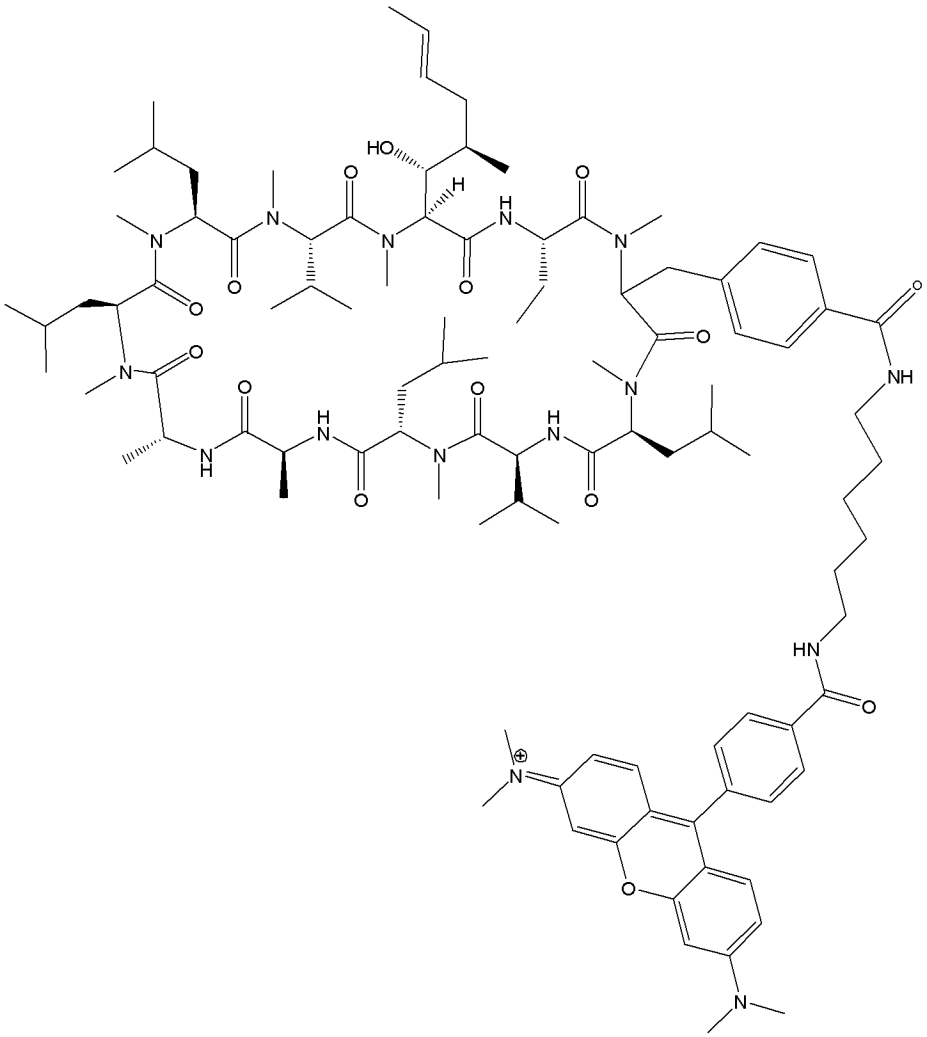


(I'b)

[0260]

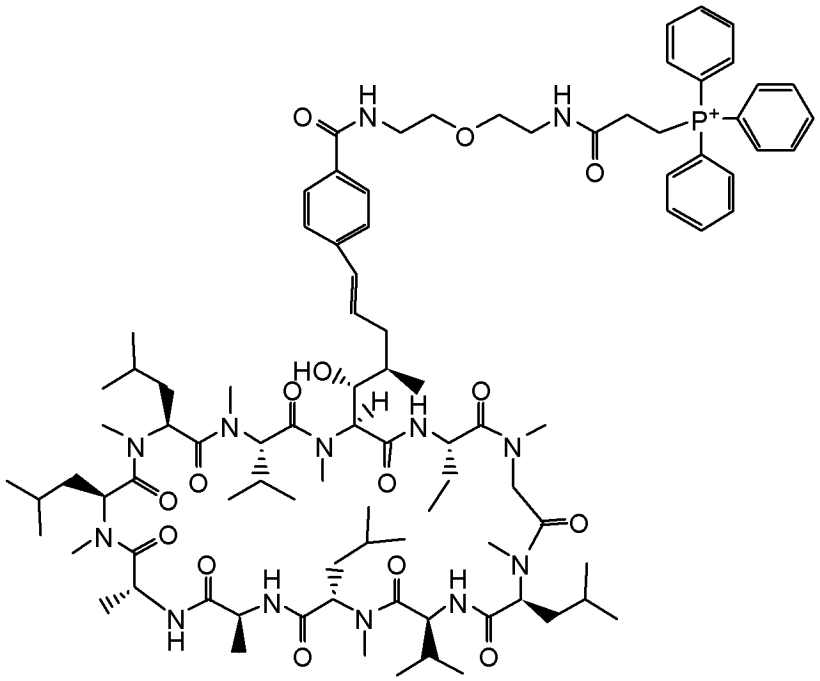


(I'c)

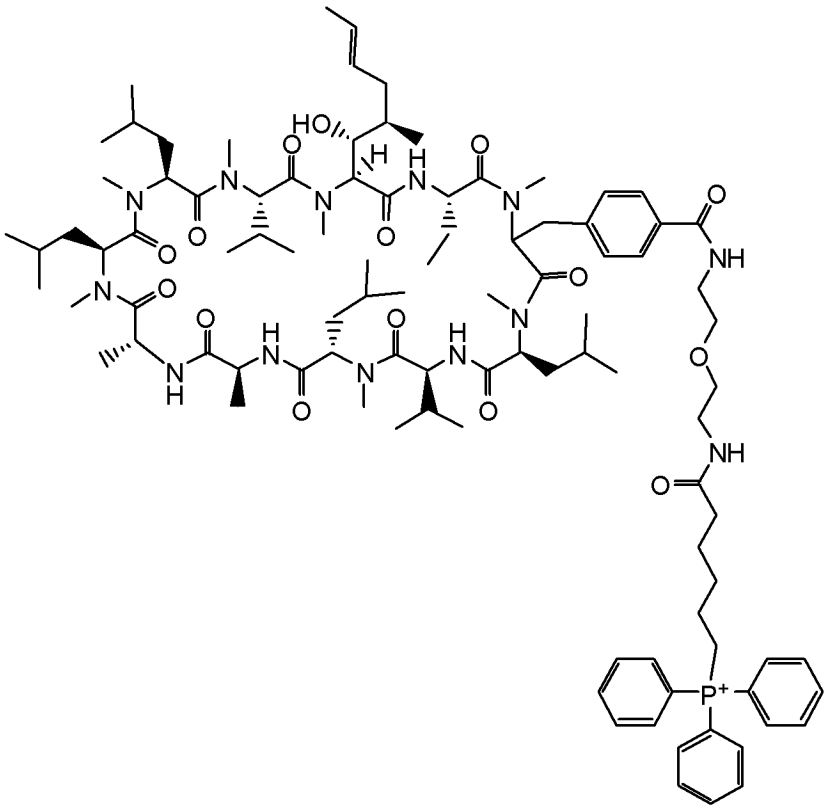


(I'd)

[0261]

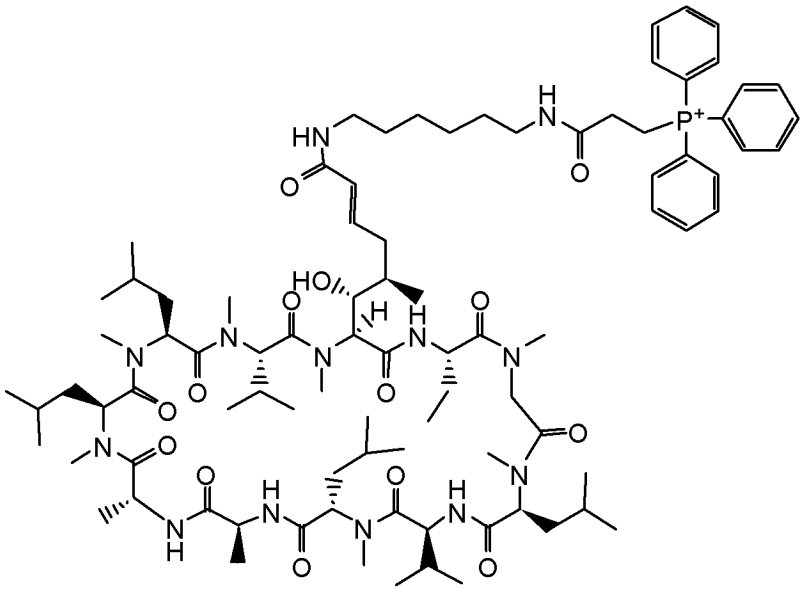


(I'e)



(I'f)

[0262]



(I'g)

[0263] 如本文所使用,"烷基"基团或部分一般地为 C_{1-20} 烷基,优选地 C_{1-12} 烷基,更优选地 C_{1-6} 烷基和最优选地 C_{1-3} 烷基。特别优选的烷基基团和部分包括,例如,甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基和己基。

[0264] 如本文所使用的,亚烷基基团是二价的所述烷基基团。

[0265] 如本文所使用的,烷氧基基团是与氧原子连接的所述烷基基团。烷氧基基团一般地为 C_{1-20} 烷氧基基团,优选地 C_{1-12} 烷氧基基团,更优选地 C_{1-6} 烷氧基基团和最优选地 C_{1-3} 烷氧基基团。特别优选的烷氧基基团包括,例如,甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、异丁氧基、叔丁氧基、戊氧基和己氧基。

[0266] 如本文所使用的,卤素一般地为氯、氟、溴或碘并优选地为氯、溴或氟。

[0267] 卤代烷基或卤代烷氧基基团一般地为被一个或多个所述卤素原子取代的所述烷基或烷氧基基团。一般地,它被 1、2 或 3 个所述卤素原子取代。优选的卤代烷基和卤代烷氧基基团包括全卤代烷基和全卤代烷氧基基团如 $-CX_3$ 和 $-OCX_3$,其中 X 是所述卤素原子,例如氯和氟。特别优选的卤代烷基基团为 $-CF_3$ 和 $-CCl_3$。特别优选的卤代烷氧基基团为 $-OCF_3$ 和 $-OCCl_3$。

[0268] 羟烷基基团一般地为被一个或多个羟基基团,优选地 1、2 或 3 个羟基基团,更优选地 1 个羟基基团取代的所述烷基基团。

[0269] 如本文所使用的,术语"芳基"是 C_{6-10} 单芳族或聚芳族系统,其中所述聚芳族系统可以是稠合的或非稠合的。芳基基团的例子为苯基和萘基。苯基是优选的。

[0270] 如本文所使用的,亚芳基基团是二价的所述芳基基团。亚苯基是优选的。所述亚苯基基团可以在 1,2 或 1,3 或 1,4 位是二价的。1,4 亚苯基是优选的。

[0271] 如本文所使用,术语"杂芳基"是 5- 至 6- 元环系统,其包含选自 O、S 和 N 的至少一个杂原子,优选地 1 或 2 个杂原子。杂芳基基团的例子是吡啶基 (pyridyl)、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、呋喃基、噁二唑基、噁唑基、咪唑基、噻唑基、噻二唑基、噻吩基、吡咯基、吡啶基 (pyridinyl)、三唑基、四唑基、和吡唑基基团。

[0272] 术语"- 亚烷基 - 芳基"指与所述芳基基团连接的所述亚烷基基团。典型的 - 亚烷

基 - 芳基基团是苄基。

[0273] 如本文所使用，术语保护基指保护官能团如醇、胺或羧酸的任何部分。羟基保护基优选地为三烷基甲硅烷基，如三甲基 - 甲硅烷基 (TMS) 或叔丁基 - 二甲基 - 甲硅烷基 (TBDMS)、四氢吡喃基 (THP)、苄基 (Bn)、甲基 (Me)、乙酰基 (Ac) 或苯甲酰基 (Bz)。胺保护基优选地为苯甲氧甲酰基 (Cbz) 或苄基 (Bn)。羧酸优选地保护为酯，如甲酯、苄基酯、叔丁基酯或甲硅烷基酯。

[0274] 如本文所使用的，药学上可接受的盐是具有药学上可接受的酸或碱的盐。药学上可接受的酸包括无机酸如盐酸、硫酸、磷酸、焦磷酸、氢溴酸或硝酸和有机酸如柠檬酸、反丁烯二酸、顺丁烯二酸、苹果酸、抗坏血酸、琥珀酸、酒石酸、苯甲酸、乙酸、甲基磺酸、乙基磺酸、苯磺酸或对甲苯磺酸。药学上可接受的碱包括碱金属（例如钠或钾）和碱土金属（例如钙或镁）氢氧化物和有机碱如烷基胺、芳烷基胺或杂环胺。

[0275] 本发明也包括溶剂化物形式的本发明缀合物的应用。在权利要求中使用的术语包括这些形式。

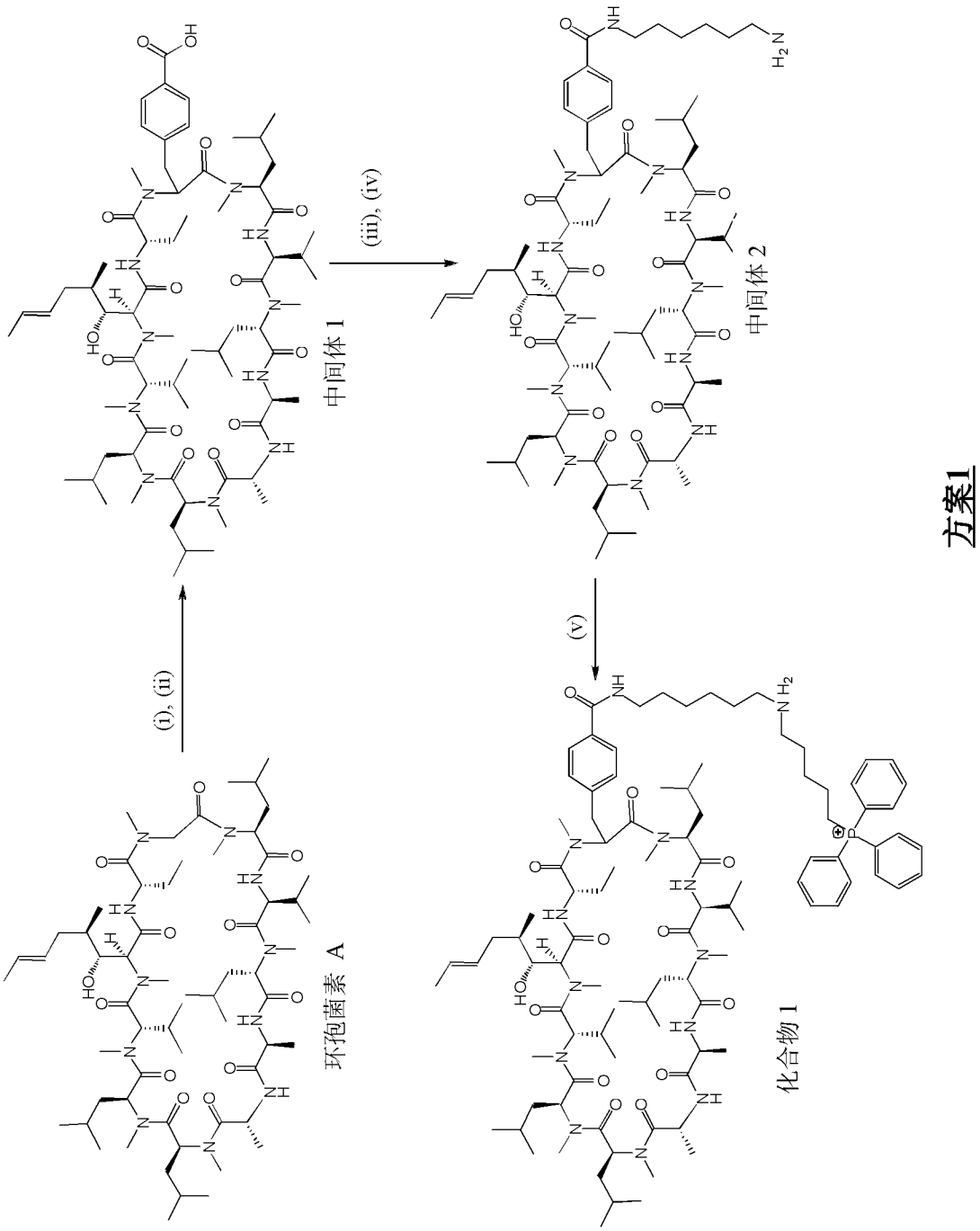
[0276] 本发明此外涉及各种晶形、多晶型和含水（无水）形式的本发明的缀合物。在药学工业中已经很好地确定，通过稍微改变从在合成制备这种化合物中使用的溶剂纯化和分离的方法，可以分离任何这种形式的化合物。

[0277] 本发明进一步包括前体药物形式的本发明的化合物。这种前体药物一般是本发明的化合物，其中一个或多个合适的基团已经被修饰，以便在施用至人或哺乳动物对象后，该修饰可被逆转。这种逆转通常通过在对象中天然存在的酶进行，但是可能将第二试剂与这种前体药物一起施用，以便在体内完成该逆转。这种修饰的例子包括酯，其中逆转可通过酯酶等进行。其他这种系统对于本领域技术人员是熟知的。

[0278] 本发明的缀合物可通过本领域已知的标准方法制备。式 (I) 的化合物是商业上可得的已知的化合物。式 (I) 的化合物可接着使用本领域已知的标准技术与线粒体靶向基团连接。

[0279] 例如，本发明的特定缀合物（化合物 1）可如在方案 1 中所示方便地制备。该途径开始于商业上可得的环孢菌素 A 并通过多个步骤经由中间体 1 和 2 进行。每个步骤合适的试剂为 :(i) 二异丙基酰胺锂、氯化三甲基甲硅烷基、4- 溴苯甲基甲酸酯，ii)LiOH、甲醇，iii) 芴甲氧羰基 - 二氨基己烷、PyBOP，iv) 哌啶、DMF，v) 溴化 5-（羧基戊基）三苯基鏻、PyBOP。

[0280]



方案1

[0281] 本发明的缀合物可用于治疗或预防易于通过抑制亲环蛋白 D 改善的疾病或紊乱——尤其在人体中。因此，本发明的缀合物可优选地用于改善已经遭受缺血 / 再灌注损伤、正在遭受缺血 / 再灌注损伤或处于遭受缺血 / 再灌注损伤风险下的患者的病症。尤其地，本发明的化合物可用于治疗脑或心肌缺血 / 再灌注损伤。神经变性疾病，如阿尔茨海默病和多发性硬化症也可通过抑制亲环蛋白 D 治疗。

[0282] 因此，本发明进一步提供了本发明的缀合物用于治疗人体或动物体。

[0283] 本发明进一步提供了本发明的缀合物用于治疗或预防易于通过抑制亲环蛋白 D 改善的疾病或紊乱。

[0284] 本发明进一步提供了本发明的缀合物在制造用于治疗易于通过抑制亲环蛋白 D 改善的疾病或紊乱的药剂中的应用。

[0285] 本发明进一步提供了治疗遭受或易感易于通过抑制亲环蛋白 D 改善的疾病或紊乱的患者的方法，该方法包括向所述患者施用本发明的缀合物。

[0286] 优选地，所述易于通过抑制亲环蛋白 D 改善的疾病或紊乱是缺血 / 再灌注损伤或神经变性疾病。神经变性疾病的例子包括阿尔茨海默病和多发性硬化症。但是，最优选地，所述易于通过抑制亲环蛋白 D 改善的疾病或紊乱是缺血 / 再灌注损伤。

[0287] 本发明的缀合物可以各种方式施用至人体，如口服、直肠、阴道、肠胃外、肌肉内、腹膜内、动脉内、鞘内、支气管内、皮下、真皮内、静脉内、鼻、含服 (buccal) 或舌下施用途径。具体的施用模式和给药方案可通过主治医师选择，这考虑包括患者的年龄、体重和病症在内的许多因素。

[0288] 包含本发明的缀合物作为有效成分的药学组合物通常根据使用的具体施用模式用合适的药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂配制。例如，肠胃外制剂通常是可注射流体，其使用药学上和生理上可接受的流体如生理盐水、平衡盐溶液或类似物作为载体。另一方面，口服制剂可以是固体的例如片剂或胶囊，或液态溶液或悬浮液。

[0289] 因此，本发明也提供包括本发明的缀合物和药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体的药学组合物。

[0290] 组合物可以以单位剂型，即以包含单位剂量、或多个单位剂量或单位剂量亚单位的离散部分的形式配制。

[0291] 给予患者的本发明的缀合物的量取决于被讨论的具体缀合物的活性。进一步因素包括被治疗的病症、治疗患者的特性和治疗病症的严重性。施用缀合物的时机应当由医务人员确定，这取决于应用是预防缺血 / 再灌注损伤还是治疗缺血 / 再灌注损伤。如熟练的医师可理解的，与任何药品一样，缀合物在非常高剂量下是有毒的。例如，可以以 0.01 至 30mg/kg 体重的剂量施用，如 0.1 至 10mg/kg 体重，更优选地 0.1 至 5mg/kg 体重。

[0292] 本发明的缀合物可单独给予或与可用于治疗易于通过抑制亲环蛋白 D 改善的疾病或紊乱如缺血 / 再灌注损伤或神经变性疾病的一种或多种额外活性剂联合给予。两种或多种活性剂一般地同时、分别或顺序施用。该活性剂一般地作为联合制剂施用。

[0293] 本发明的缀合物也可用作试剂。例如，它们可用于需要选择性抑制亲环蛋白 D 的非治疗性实验程序。本发明的缀合物因此可用作实验室试剂用于评估细胞过程如细胞死亡中亲环蛋白 D 的参与。目前没有这类试剂可获得。一般地，所述非治疗性实验程序是试验。因此，本发明也提供了本发明的缀合物作为试验分析试剂的非治疗性应用。

[0294] 下列实施例阐述了本发明。

实施例

[0295] 材料和方法

[0296] 制备重组亲环蛋白 D(CyP-D) 和亲环蛋白 A(CyP-A)

[0297] 如之前在 Li 等，Biochem. J. 383，101-109 中所描述的，制备并纯化重组大鼠 CyP-D。对于 CyP-A，大鼠中的编码序列被 PCR 扩增添加 BamH1 和 EcoR1 限制位点，并在大肠杆菌 DH5α 细胞中的 pGEX-4T-1 的相同位点之间克隆。转化的细胞在 21℃下生长 5 小时。提取 GST/CyP-A 融合蛋白，在 GSH 琼脂糖上纯化，并接着用凝血酶切割以释放 CyP-A。CyP-A 在阳离子交换 (Mono-S) 和凝胶过滤 (Superdex-75) 柱上纯化以在 SDS-PAGE 上给出

单条带。

[0298] 环孢菌素和环孢菌素缀合物与亲环蛋白和钙依赖磷酸酶的相互作用

[0299] 亲环蛋白/环孢菌素和亲环蛋白/环孢菌素缀合物相互作用的解离常数测定为抑制常数，K_i。在15℃下、100mM NaCl/20mM Hepes(pH7.5)中，使用N-琥珀酰-丙氨酰-丙氨酰-脯氨酰-4-硝基苯胺(nitroanilide)作为测试肽，如在McGuinness等(1990)Eur. J.Biochem.194,671-679中所描述，进行PPIase试验。该肽包含顺式和反式Ala-Pro异构体的混合物，其中只有反式构象异构体被胰凝乳蛋白酶在C末端酰胺键处水解释放发色团。存在的反式异构体在混合时间内被切割；进一步的切割需要顺式-反式异构化，对其进行测量。亲环蛋白与环孢菌素预温育5分钟，然后添加胰凝乳蛋白酶和60μM肽（包含约35μM顺式肽）以启动反应。

[0300] 环孢菌素通过在活性部位与底物竞争进行抑制。因此，通过用于紧密结合(tight binding)、竞争性抑制剂的亨德森方程分析动力学数据，其可写为：

[0301]

$$\frac{I_o}{P}=\frac{1}{(1-P)}\cdot K_i\cdot(1+\frac{S}{K_M})+E_o$$

[0302] 其中E_o和I_o分别是酶和抑制剂（环孢菌素）的总浓度，K_i是酶/抑制剂解离常数，K_M是米氏常数，并且S是底物浓度。P是抑制分数(fractional inhibition)，等于{1-(v_i/v_o)}，其中v_i和v_o分别是存在抑制剂和不存在抑制剂情况下的反应速率。

[0303] 使用的顺式肽的K_M值比在试验中的其浓度（＜35μM）大很多。因为K_M＞＞S，所以方程可简化为：

[0304] $$\frac{I_o}{P}=\frac{1}{(1-P)}\cdot K_i+E_o$$ 方程1

[0305] 并且I_o/P对1/(1-P)的图是线性的，斜率＝K_i。

[0306] 亲环蛋白/环孢菌素和亲环蛋白/环孢菌素缀合物复合物与钙依赖磷酸酶的相互作用从抑制钙依赖磷酸酶的磷酸酶活性进行评估，如通过从RII磷酸肽释放无机磷酸盐所测定的(Biomol International UK,Exeter,UK)。

[0307] 利用分离线粒体的实验

[0308] 如之前所描述从大鼠肝脏中分离线粒体(Crompton等，Eur J.Biochem 178,489-501)。通过线粒体的相关膨胀监测PT孔打开，如通过减少在540nm处吸光度所测量的。将线粒体(2mg蛋白）悬浮在3ml的120mM KCl/2mM KH_2PO_4/3mM琥珀酸盐/10mM Hepes(pH 7.2)/1μM鱼藤酮/5μM EGTA/重组CyP-A(1μg)和测试环孢菌素中，并且在25℃、持续搅拌下保持。5分钟后，将$CaCl_2$缓慢灌注(10μM/分钟）达到终浓度50μM。在平行温育中，添加Ca^{2+}之后立刻沉淀线粒体并且测定上清液的CyP-A活性。

[0309] 神经元培养和试验

[0310] 来自大鼠神经细胞系的B50细胞和稳定地过量表达CyP-D的克隆在盖玻片上、在包含10％胎牛血清的DMEM(Dulbecco极限必需培养基）中培养。通过在25℃下、在包含50nM TMRE的基础培养基(140mMNaCl/4mM KCl/24mM Hepes(pH 7.4)/1mM $MgSO_4$/1mM $CaCl_2$/1mM KH_2PO_4/11mM葡萄糖）中温育细胞，测量荧光四甲基若丹明乙基酯(TMRE)的吸收。

[0311] 用奥林巴斯 IX-70 荧光显微镜——X60 油目镜、Micromax 1401ECCD 照相机和 Metamorph 软件 (Universal imaging)——获得荧光图像 (530nm/ ＞ 595nm)。对于硝普盐治疗，细胞在包含 100μM 硝普酸钠的基础培养基中温育 40 分钟并接着返回到 DMEM 培养基。5 小时后，提取细胞并且分析提取物的胱天蛋白酶 -3 活性，这使用胱天蛋白酶 -3/-7 选择性底物 (Ac-DEVD-AFC) 的荧光 7- 氨基 -4- 三氟甲基香豆素 (AFC) 衍生物进行，如在 Capano 等，Biochem J. (2002)363，29-36 中所描述的。

[0312] 为了反义阻抑 CyP-A，将细胞与 1μM 硫代磷硫 ODN5’-CATGGCTTCCACAATGCT 温育 48 小时，如在 Capano 等，Biochem J. (2002)363，29-36 中所描述的。

[0313] 从 2-4 天龄 Sprague Dawley 大鼠准备海马神经元作为与神经胶质细胞的混合培养物。解剖的海马在包含 0.1％ w/v 的胰蛋白酶的汉克斯平衡盐溶液 (HBSS) 中、在 37℃下温育 5 分钟，随后在 HBSS 中冲洗两次。海马接着在包含 1mg/ml BSA、5％胎牛血清和 8mM $MgCl_2$ 的 HBSS 中解离。

[0314] 沉淀解离的细胞，悬浮在补充有 0.5mM 谷氨酰胺、2％ B27 增补剂 (Gibco) 和 5％胎牛血清的 Neurobasal A 培养基 (NBA) 中，接种在盖玻片上，并在 95％空气 /5％ CO_2 下、相同培养基加抗有丝分裂混合物 (5- 氟 -2’- 脱氧尿苷，尿苷，1-β-D- 阿拉伯呋喃糖基胞嘧啶，各自 1μM) 中温育。3 天后引入不含抗有丝分裂物的培养基 (medium minus antimitotics)。

[0315] 对于氧和葡萄糖缺乏 (OGD)，具有海马神经元的盖玻片被固定以形成安装在显微镜载物台上小的、带盖室的底部。该小室包含用于连续充气的入口和出口、用于改变温育培养基的输入管和输出管，和保持温度在 36℃的加热元件。在该实验小室中通过省略葡萄糖并用 N_2 替换空气施加假 - 缺血性病症。

[0316] 在 95％ N_2/5％ CO_2 中，将细胞与 (预充气的)145mM NaCl/26mM$NaHCO_3$/5mM KCl/1.8mM $CaCl_2$/0.8mM $MgCl_2$/4μM 乙锭 (ethidium) 同型二聚体 /2μM Hoechst 33342 和如所指出的环孢菌素温育。30 分钟之后充气转换为 95％空气 /5％ CO_2 并且培养基用包含 4μM 乙锭同型二聚体的 NBA 培养基替换。在亮视场照明下鉴定海马神经元并接着根据 Hoechst 荧光使之与各自细胞核相关联 (就在神经胶质细胞核的焦平面的上方)。

[0317] 通过活细胞不可渗透但进入死细胞的荧光乙锭同型二聚体，根据细胞核染色量化坏死。对于用谷氨酰胺处理，培养物在 95％空气 /5％ CO_2 下、在包含环孢菌素 (如所指示) 的 150mM NaCl/5mM KCl/25mM $NaHCO_3$/2.3mM $CaCl_2$/6mM 葡萄糖 /5mM Hepes(Lockes 培养基) 中温育。10 分钟后，添加 1mM 谷氨酰胺。进一步周期 (如所指示) 之后，细胞返回包含 Hoechst 33342 和乙锭同型二聚体的 NBA 培养基，并且 15 分钟后量化坏死。

[0318] 使用单向 ANOVA 检验、用 Dunnett 后检验进行统计学分析。

[0319] 心脏细胞培养和试验

[0320] 从 14 天龄 Sprague-Dawley 大鼠制备心室肌细胞并接种在盖玻片上，如在 Doyle 等，Biochem J. (1999)341，127-132 中所描述的。在 CO_2/ 空气 (1 ： 19)37℃下，包含 20 单位 /ml 青霉素、2μg/ml 维生素 B_{12} 和 10％ (w/v) 胎牛血清的 M199 培养基 (Sigma) 中培养细胞。

[0321] 通过短暂氧和葡萄糖缺乏，之后补充葡萄糖的常氧 (glucose-replete normoxia) 模拟缺血 / 再灌注。对于氧和葡萄糖缺乏，具有心肌细胞的盖玻片在不含 O_2 的 N_2 中、在

145mM NaCl/4mM KCl/24mM Hepes(pH7.4)/1.8mM $CaCl_2$/1mM $MgCl_2$/1mM KH_2PO_4/4μM 乙锭同型二聚体 /2μM Hoechst 33342 和所指示的环孢菌素中温育。4 小时后,添加 10mM 葡萄糖和 50μM 叔丁基氢过氧化物并且通过转换空气充气对细胞再充氧。通过乙锭同型二聚体染色细胞核测定坏死。结果以平均值 ±SEM(n = 4) 给出。

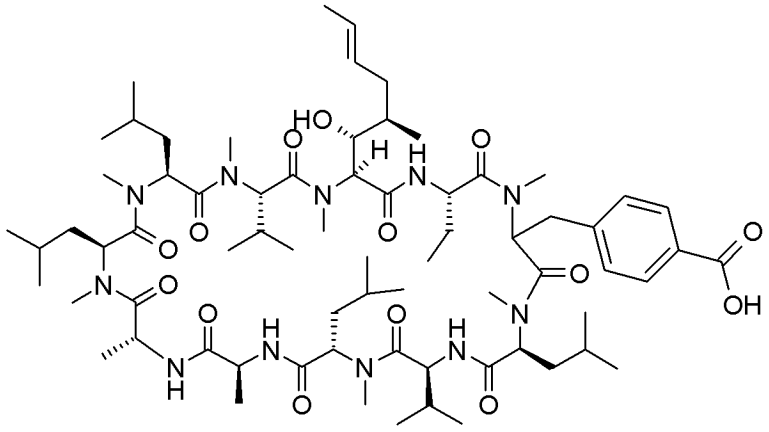
[0322] 合成化合物 1

[0323] 根据上面方案 1,经中间体 2 和 3 制备化合物 1。

[0324] 中间体 1

[0325] 4-(((5S,8S,11S,14S,17R,20S,23S,26S,29S,32S)-32- 乙 基 -29-((1R,2R,E)-1- 羟基 -2- 甲基己 -4- 烯基)-5,11,20,23- 四异丁基 -8,26- 二异丙基 -1,4,10,14,17,19,22,25,28- 壬甲基 -3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33- 十一氧代 -1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31- 十一氮杂环三十三烷 -2- 基) 甲基) 苯甲酸

[0326]



[0327] 在氮气、0℃下,向干燥 THF(25ml) 中的环孢菌素 A(1.00g,0.83mmol) 的搅拌溶液中逐滴添加新鲜 LDA(4.6mmol,2.3ml,2M 在 THF 中)。向所得深棕色悬浮液逐滴添加氯化三甲基硅烷 (0.83mmol,0.1ml) 产生澄清棕色溶液。0℃下搅拌混合物 10 分钟。接着逐滴添加进一步 LDA(7.1mmol,3.5ml,2M,在 THF 中) 并在 0℃下搅拌反应 30 分钟。

[0328] 逐滴添加干燥 THF(10ml) 中的 4- 溴甲基苯甲酸酯 (1.3g,5.8mmol) 溶液产生浅黄色溶液,其被进一步搅拌 1 小时。用饱和含水氯化铵 (10ml),然后 2M 盐酸淬灭反应,并接着用 CH_2Cl_2(20ml) 稀释。分开的水层用 CH_2Cl_2(2×20ml) 萃取。组合的有机相用 2M HCl(aq)(2×20ml)、饱和的 NH_4Cl(aq)(2×20ml) 和盐水 (2×20ml) 冲洗,接着 ($MgSO_4$(s)) 干燥。

[0329] 真空移除挥发物留下深褐色油状残留物。通过快速层析用在 CH_2Cl_2 中的 6% MeOH 洗脱进行的纯化产生黄色固体残留物 (0.930g),其为未反应的环孢菌素和烷基化酯产物 : 甲 基 4-(((5S,8S,11S,14S,17R,20S,23S,26S,29S,32S)-32- 乙 基 -29-((1R,2R,E)-1- 羟基 -2- 甲基己 -4- 烯基)-5,11,20,23- 四异丁基 -8,26- 二异丙基 -1,4,10,14,17,19,22,25,28- 壬甲基 -3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33- 十一氧代 -1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31- 十一氮杂环三十三烷 -2- 基) 甲基) 苯甲酸酯的混合物。

[0330] 这不需要进一步的纯化在接下来的反应中使用。

[0331] 在 0℃下向 THF ： MeOH(1 ： 1,20ml) 中的黄色固体残留物 (0.93g) 的搅拌溶液中逐滴添加在水 (10ml) 中的 LiOH•H_2O(500mg) 溶液。使反应逐渐温热至室温 18 小时。接着添加 CH_2Cl_2(20ml)。所得溶液用 2MHCl(aq)(pH = 3) 酸化。分开的水层用 CH_2Cl_2(3×30ml)

萃取。结合的有机萃取物用饱和的 2M HCl(aq)(2×30ml) 和盐水 (2×30ml) 冲洗并接着 ($MgSO_4$(s)) 干燥。

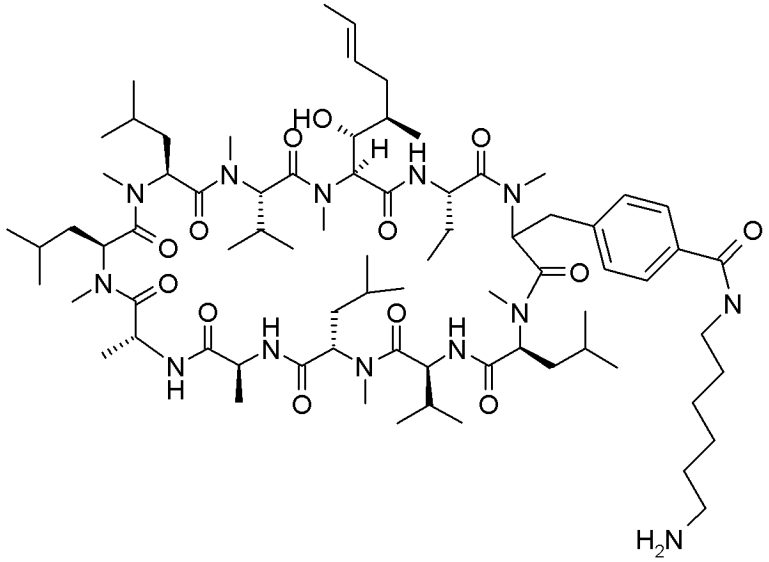
[0332] 真空移除挥发物留下固体残留物,作为酸 (中间体 1) 和未反应的环孢菌素 A 的混合物。通过快速柱 (flash column) 层析经胺柱用 MeOH ： CH_2Cl_2 ： NH_3(aq)(1 ： 8 ： 1) 混合物洗脱从环孢菌素 A 分离酸产生作为盐的酸。搅拌在 CH_2Cl_2(20ml) 和 2M HCl(aq)(20ml) 中的盐 10 分钟后,通过 CH_2Cl_2(3×20ml) 萃取,浓缩,并通过快速柱层析纯化产生为黄色固体的中间体 1(0.300g,0.24mmol,27％)。

[0333] FAB+ve ;计算 m/z $C_{70}H_{117}N_{11}O_{14}$(M+Na)1358.86787,发现 (M+Na)1358.86447。

[0334] 中间体 2

[0335] N-(6- 氨 基 己 基)-4-(((5S,8S,11S,14S,17R,20S,23S,26S,29S,32S)-32- 乙基 -29-((1R,2R, E)-1- 羟基 -2- 甲基己 -4- 烯基)-5,11,20,23- 四异丁基 -8,26- 二异丙基 -1,4,10,14,17,19,22,25,28- 壬甲基 -3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33- 十一氧代 -1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31- 十一氮杂环三十三烷 -2- 基) 甲基) 苯甲酰胺。

[0336]



[0337] 在氮气、室温下,向干燥 THF(3.0ml) 中的中间体 1(109mg,0.08mmol) 的搅拌溶液添加 N- 芴甲氧羰基 -1,6- 二氨基己烷氢溴酸盐 (68.5mg,0.16mmol)、PyBOP(84.5mg,0.16mmol) 和三乙胺 (0.25mmol,0.4ml),并且搅拌所得混合物 24 小时。接着添加 CH_2Cl_2(5ml) 随后添加饱和含水氯化铵 (5ml)。用 CH_2Cl_2(2×3ml) 萃取混合物, ($MgSO_4$(s)) 干燥。

[0338] 真空移除挥发物留下棕色油状残留物。通过层析纯化产生芴甲氧羰基 - 保护的衍生物 (100mg) :(9H- 芴 -9- 基) 甲基 6-(4-(((5S,8S,11S,14S,17R,20S,23S,26S,29S,32S)-32- 乙基 -29-((1R,2R,E)-1- 羟基 -2- 甲基己 -4- 烯基)-5,11,20,23- 四异丁基 -8,26- 二异丙基 -1,4,10,14,17,19,22,25,28- 壬甲基 -3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33- 十一氧代 -1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31- 十一氮杂环三十三烷 -2- 基) 甲基) 苯甲酰氨基) 己基氨基甲酸酯,其为黄色固体。

[0339] 这不需进一步纯化而使用。

[0340] 在氩气下、DMF(4ml)20％哌啶中搅拌芴甲氧羰基 - 保护的衍生物 (100mg) 的溶液

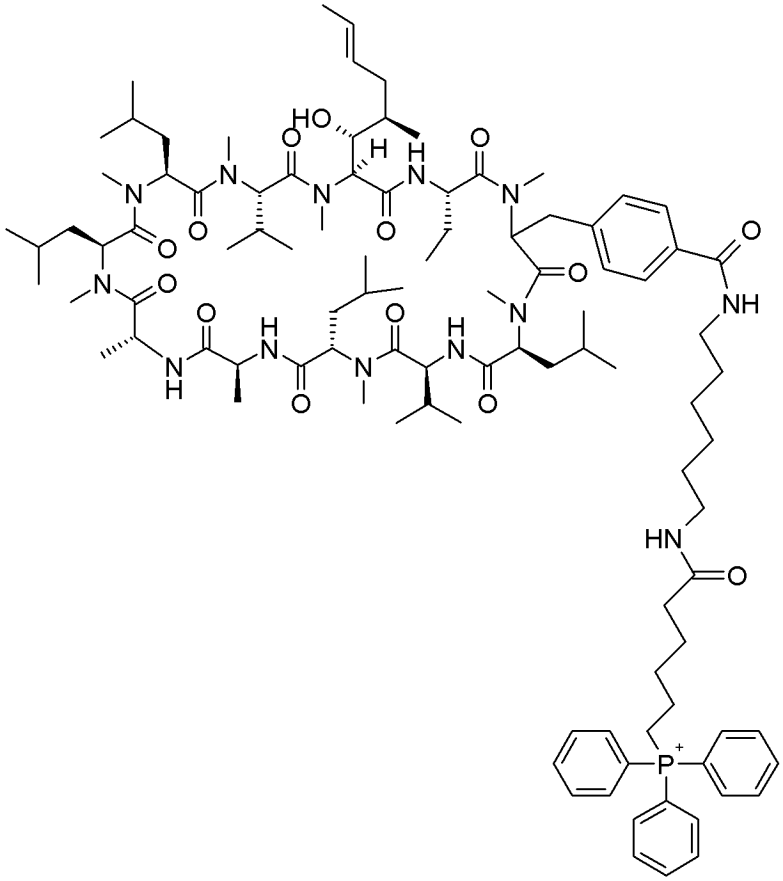
24 小时。真空移除挥发物留下黄色油状物。在硅胶上通过快速柱层析，用 DCM 中的 6％ MeOH 接着 MeOH ： DCM ： NH_3(aq)(1 ： 8 ： 1) 洗脱，以提供标题化合物中间体 2(70mg，0.05mmol，85％)，其为黄色固体。

[0341] MSES+ve ；m/z $C_{76}H_{131}N_{13}O_{13}$(M+1)1435.00，(M+2)718，发现的：(M+1)1435.53，(M+2)718.76

[0342] 化合物 1

[0343] (6-(6-(4-(((5S,8S,11S,14S,17R,20S,23S,26S,29S,32S)-32- 乙基 -29-((1R,2R,E)-1- 羟基 -2- 甲基己 -4- 烯基)-5,11,20,23- 四异丁基 -8,26- 二异丙基 -1,4,10,14,17,19,22,25,28- 壬甲基 -3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33- 十一氧代 -1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31- 十一氮杂环三十三烷 -2- 基) 甲基) 苯甲酰氨基) 己基氨基)-6- 氧代己基) 三苯基鏻

[0344]



[0345] 在氩气、室温下，向干燥 THF(3ml) 中的胺中间体 2(65mg，0.05mmol) 的搅拌溶液添加一部分 PyBOP(35.5mg，0.07mmol)，溴化 5-(羧基戊基) 三苯基鏻 (32mg，0.07mmol) 和三乙胺 (0.15mmol，0.05ml) 并且在室温下搅拌所得混合物 24 小时。

[0346] 真空移除挥发物留下黄色油状物。在硅胶上通过快速柱层析用 DCM 中的 6％ MeOH 接着 MeOH ： DCM ： NH_3(aq)(1 ： 8 ： 1) 洗脱，以提供标题化合物实施例 1(55mg，0.03mmol，70％)，其为白色固体。

[0347] ES+ ；计算 m/z $C_{100}H_{155}N_{13}O_{14}P$+(M+1)1793.8199，发现：(M+1)1794.8270，(M+2)898。

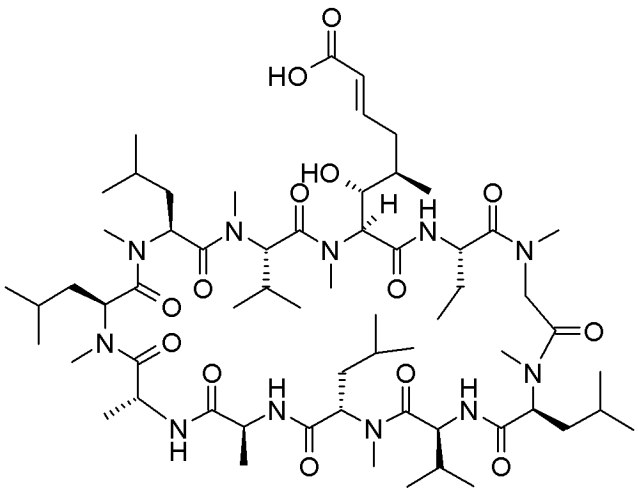
[0348] 合成化合物 2

[0349] 经中间体 3、4 和 5 制备化合物 2。

[0350] 中间体 3

[0351] (5R,6R, E)-6-((2S,5S,11S,14S,17S,20S,23R,26S,29S,32S)-5- 乙 基 -11,17,26,29- 四异丁基 -14,32- 二异丙基 -1,7,10,16,20,23,25,28,31- 壬甲基 -3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33- 十一氧代 -1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31- 十一氮杂环三十三烷 -2- 基)-6- 羟基 -5- 甲基己 -2- 烯酸

[0352]



[0353] 在回流、氩气下,将二氯甲烷 (8ml) 中环孢菌素 A(3.70g,3.10mmol)、丙烯酸叔丁酯 (6.36g,49.6mmol,7.2ml) 和 Hoveyda-Grubbs 2nd 产生催化剂 (155mg,0.25,8%) 的溶液搅拌 48 小时。反应混合物过滤通过 C 盐并且真空下移除挥发物留下棕色油状残留物。通过快速柱层析用 CH_2Cl_2 中的 6% MeOH 洗脱进行纯化产生浅黄固体 (4.00g),其为叔丁基酯衍生物和未反应的环孢菌素的混合物。固体残留物接收在三氟乙酸和二氯甲烷 (10ml,1 ∶ 1) 的混合物中并且在室温下搅拌混合物 2 小时。

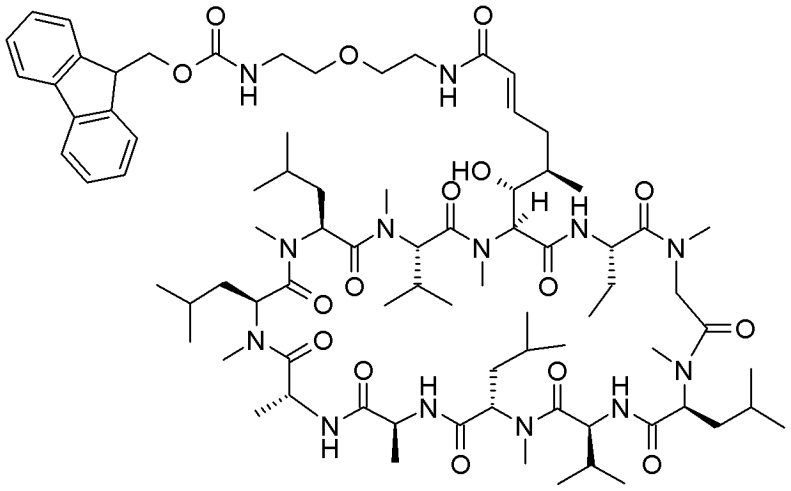
[0354] 真空除去挥发物。通过闪蒸油状残留物经过预填充胺柱,用在 DCM 中的 6% MeOH 随后 MeOH ∶ NH_3(aq) ∶ CH_2Cl_2(1 ∶ 8 ∶ 1) 洗脱,将酸与环孢菌素分离。该酸洗脱为阴离子。阴离子酸化并通过在硅胶上快速柱层析,用 DCM 中的 6% MeOH 洗脱,进一步纯化,经过两个步骤提供中间体 3(1.20g,0.93mmol,30%)。

[0355] FAB+ve ;计算 m/z $C_{62}H_{109}N_{11}O_{14}$(M+Na+H)1255,发现 :(M+Na+H)1255。

[0356] 中间体 4

[0357] (9H- 芴 -9- 基) 甲基 2-(2-((5R,6R, E)-6-((2S,5S,11S,14S,17S,20S,23R,26S,29S,32S)-5- 乙基 -11,17,26,29- 四异丁基 -14,32- 二异丙基 -1,7,10,16,20,23,25,28,31- 壬甲基 -3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33- 十一氧代 -1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31- 十一氮杂环三十三烷 -2- 基)-6- 羟基 -5- 甲基己 -2- 烯酰胺) 乙氧基) 乙基氨基甲酸酯

[0358]



[0359] 在氩气、室温下，向干燥 THF(10ml) 中的中间体 3(560mg,0.46mmol) 的溶液逐滴添加盐酸 2-[2-(芴甲氧羰基 - 氨基) 羟乙基氨基](335mg,0.92mmol)，HATU(350mg,0.92mmol) 和三乙胺 (1.50mmol,0.21ml)。混合物在室温下搅拌 24 小时。接着真空下除去挥发物。

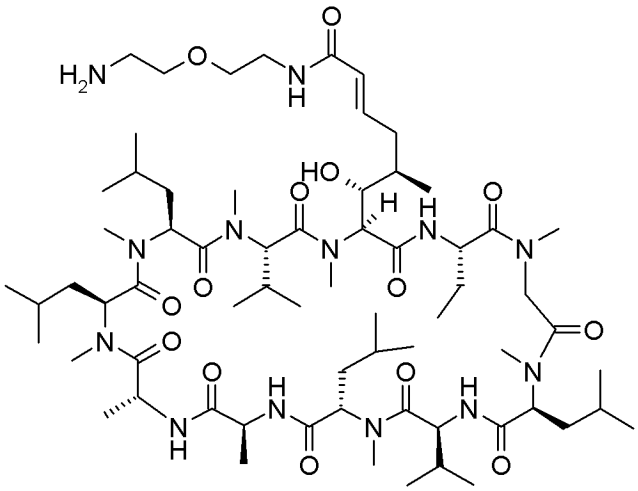
[0360] 剩余油状残留物通过快速柱层析纯化用二氯甲烷中的 6％ MeOH 洗脱以提供标题化合物中间体 4(638.00g,0.42mmol,90％)，其为白色固体。

[0361] TOF MS ES+ ；计算 m/z $C_{81}H_{129}N_{13}O_{16}$(M+Na)1562.9578，发现 ：(M+Na)1562.9580。

[0362] 中间体 5

[0363] (5R,6R, E)-N-(2-(2- 氨基乙氧基) 乙基)-6-((2S,5S,11S,14S,17S,20S,23R,26S,29S,32S)-5- 乙基 -11,17,26,29- 四异丁基 -14,32- 二异丙基 -1,7,10,16,20,23,25,28,31- 壬甲基 -3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33- 十一氧代 -1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31- 十一氮杂环三十三烷 -2- 基)-6- 羟基 -5- 甲基己 -2- 烯酰胺。

[0364]



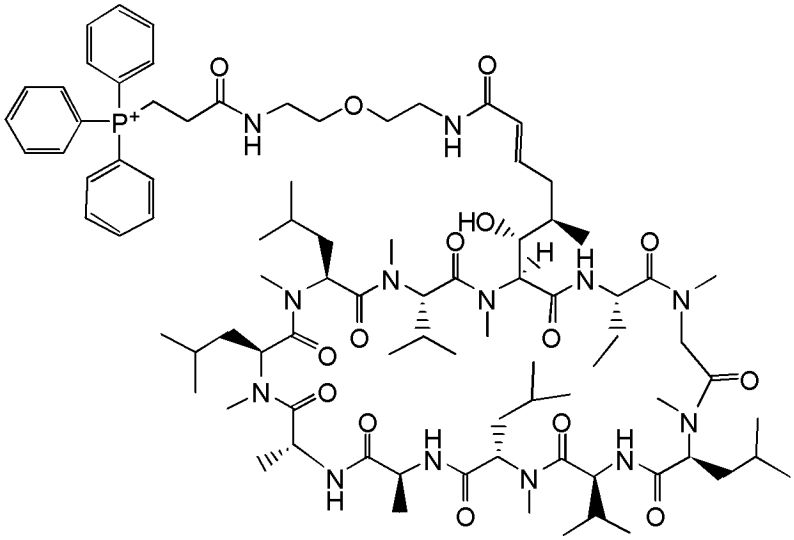
[0365] 在室温下，搅拌在 DMF(5ml) 中的 20％哌啶混合物中的中间体 4(500mg,0.33mmol) 的溶液 3 小时。真空去除挥发物留下黄色油状残留物，其通过快速柱层析，用在二氯甲烷中 6％的 MeOH 接着 MeOH ： NH_3(aq) ： CH_2Cl_2(1 ： 8 ： 1) 洗脱进行纯化以提供标题化合物中间体 5(382mg,0.29mmol,90％)，其为白色固体。

[0366] FAB+ve ；计算 m/z $C_{66}H_{119}N_{13}O_{14}$(M+Na)1340.88967，发现 ：(M+Na)1340.89380。

[0367] 化合物 2

[0368] (16R,17R,E)-17-((2S,5S,11S,14S,17S,20S,23R,26S,29S,32S)-5- 乙 基 -11,17,26,29- 四异丁基 -14,32- 二异丙基 -1,7,10,16,20,23,25,28,31- 壬甲基 -3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33- 十一氧代 -1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31- 十一氮杂环三十三烷 -2- 基)-17- 羟基 -16- 甲基 -4,12- 二氧代 -1,1,1- 三苯基 -8- 噁 -5,11- 二氮杂 -1- 磷 杂十七碳 -13- 烯

[0369]



[0370] 在氩气、室温下,向在 THF(5ml) 中的中间体 5(288mg,0.22mmol) 的溶液添加溴化 (2- 羧乙基) 三苯基 (182mg,0.44mmol),HATU(166mg,0.44mmol) 和三乙胺 (0.70mmol,0.1ml)。在室温下搅拌反应混合物 24 小时。

[0371] 真空去除挥发物留下黄色油状残留物,其通过快速柱层析,用在二氯甲烷中的 6% MeOH 随后 MeOH ： NH_3(aq) ： CH_2Cl_2(1 ： 8 ： 1) 洗脱进行纯化,以提供标题化合物化合物 2。

[0372] TOF MS ES+ ;计算 m/z $C_{87}H_{137}N_{13}O_{15}P$+(M+1)1635.0095,发现 :(M+1)1636.0115。

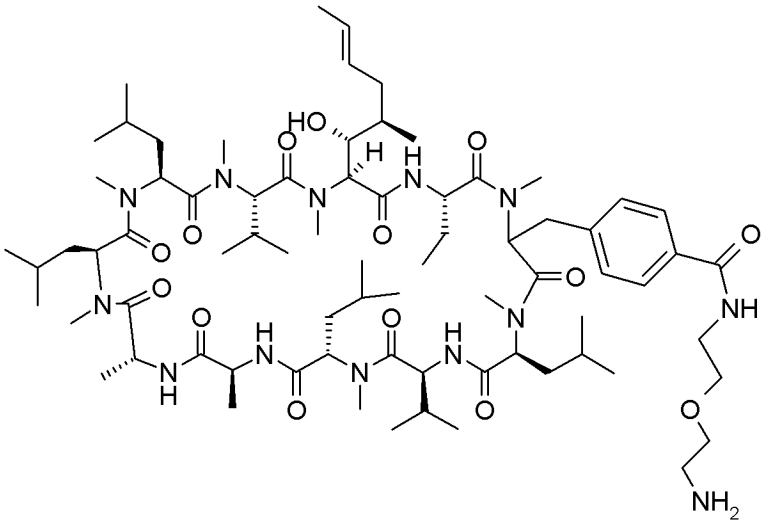
[0373] 合成化合物 3

[0374] 经中间体 6 从中间体 1 制备化合物 3。

[0375] 中间体 6

[0376] N-(2-(2- 氨 基 乙 氧 基) 乙 基)-4-(((5S,8S,11S,14S,17R,20S,23S,26S,29S,32S)-32- 乙基 -29-((1R,2R,E)-1- 羟基 -2- 甲基己 -4- 烯基)-5,11,20,23- 四异丁基 -8,26- 二 异 丙 基 -1,4,10,14,17,19,22,25,28- 壬 甲 基 -3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33- 十一氧代 -1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31- 十一氮杂环三十三烷 -2- 基) 甲基) 苯甲酰胺

[0377]



[0378] 在氮气、室温下，向干燥 THF(6.0ml) 中的中间体 1(100mg,0.07mmol) 的搅拌溶液，添加盐酸 2-[2-(芴甲氧羰基 - 氨基) 羟乙基氨基 (70.0mg,0.12mmol)、HATU(70.0mg,0.12mmol) 和三乙胺 (0.36mmol,0.1ml)，并且所得混合物搅拌 24 小时。接着添加 CH_2Cl_2(5ml) 随后添加饱和含水氯化铵 (5ml)。用 CH_2Cl_2(2×3ml) 萃取，用 ($MgSO_4$(s)) 干燥。

[0379] 真空去除挥发物留下棕色油状残留物。通过层析纯化产生芴甲氧羰基 - 保护的衍生物 (100mg,0.61mmol,82％)：(9H- 芴 -9- 基) 甲基 2-(2-(4-(((5S,8S,11S,14S,17R,20S,23S,26S,29S,32S)-32- 乙基 -29-((1R,2R,E)-1- 羟基 -2- 甲基己 -4- 烯基)-5,11,20,23- 四异丁基 -8,26- 二异丙基 -1,4,10,14,17,19,22,25,28- 壬甲基 -3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33- 十一氧代 -1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31- 十一氮杂环三十三烷 -2- 基) 甲基) 苯甲酰氨基) 乙氧基) 乙基氨基甲酸酯，其为白色固体。

[0380] 这不需进一步纯化而使用。

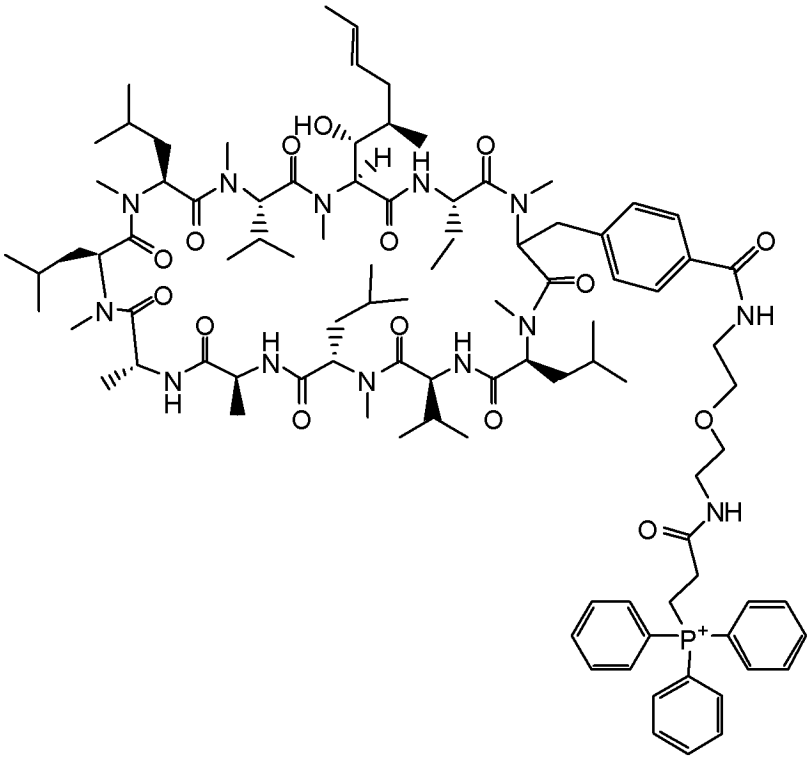
[0381] 在氩气下，在 DMF(4ml) 的 20％哌啶中，搅拌芴甲氧羰基保护的衍生物 (90mg) 的溶液 24 小时。真空去除挥发物留下黄色油状物。该油状物通过在硅胶上快速柱层析，用 DCM 中的 6％ MeOH 随后 MeOH ： DCM ： NH_3(aq)(1 ： 8 ： 1) 洗脱进行纯化，以提供标题化合物中间体 6：(55mg,0.04mmol,80％)，其为黄色固体。

[0382] MSES+ve，m/z 1424.47(M+1)，712.24(M+2)

[0383] 化合物 3

[0384] 12-(4-(((5S,8S,11S,14S,17R,20S,23S,26S,29S,32S)-32- 乙基 -29-((1R,2R,E)-1- 羟基 -2- 甲基己 -4- 烯基)-5,11,20,23- 四异丁基 -8,26- 二异丙基 -1,4,10,14,17,19,22,25,28- 壬甲基 -3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33- 十一氧代 -1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31- 十一氮杂环三十三烷 -2- 基) 甲基) 苯基)-4,12- 二氧代 -1,1,1- 三苯基 -8- 噁 -5,11- 二氮杂 -1- 磷鎓杂十二烷

[0385]



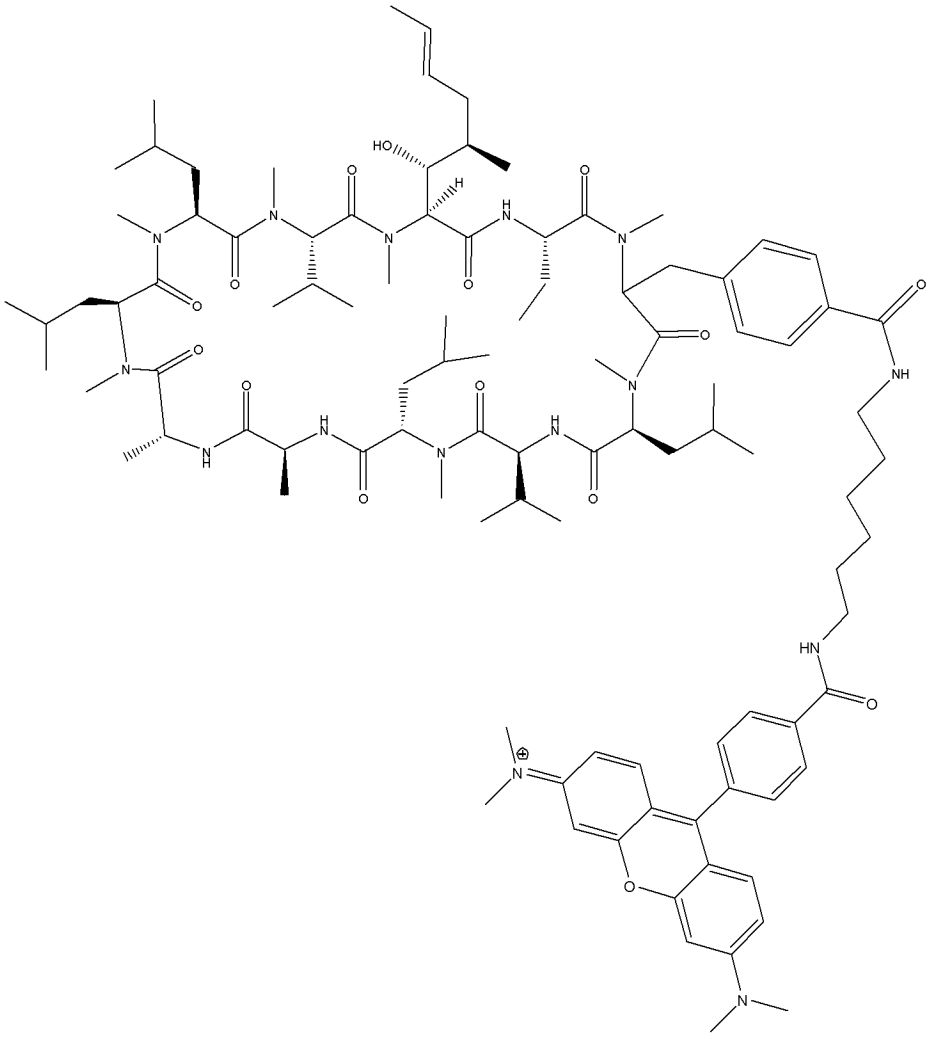
[0386] 在氩气、室温下，向 THF(1ml) 中的中间体 6(50mg,0.035mmol) 的溶液添加溴化 (2- 羧乙基) 三苯基鏻 (30mg,0.07mmol)、HATU(30mg,0.07mmol) 和三乙胺 (0.70mmol, 0.1ml)。在室温下，搅拌反应混合物 24 小时。真空去除挥发物留下黄色油状物。该油状物通过在硅胶上快速柱层析，用 DCM 中的 6％ MeOH 随后 MeOH ： DCM ： NH_3(aq)(1 ： 8 ： 1) 洗脱进行纯化，以提供化合物 3(40mg,0.029mmol,82％)，其为白色固体。

[0387] MSES+ve ;m/z $C_{95}H_{145}N_{13}O_{15}P+$ 1424.47，发现 :1424.47。

[0388] 化合物 4

[0389] 经过与上面描述的那些类似的数个步骤，从中间体 2 制备下面描述的化合物 4。

[0390]

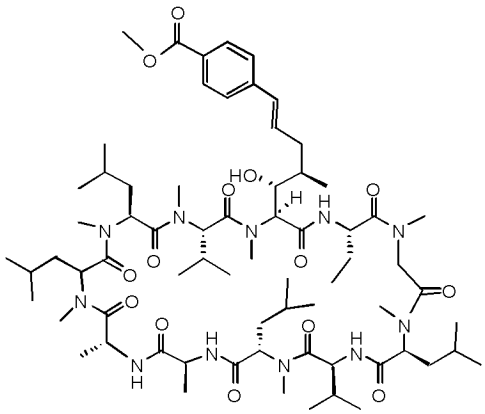


[0391] 合成化合物 5

[0392] 经中间体 7、8 和 9 制备化合物 5。

[0393] 中间体 7

[0394]



[0395] 在回流 (60℃)、氮气下,搅拌二氯甲烷 (4ml) 中环孢菌素 A(1.00g,0.832mmol)、甲基 -4- 乙烯基苯甲酸酯 (270mg,1.665mmol) 和 Hoveyda-Grubbs 2nd 产生催化剂 (20mg,0.032,4%) 的溶液 48 小时。反应混合物的 TLC 分析 (丙酮 : 环己胺,1 : 1) 显示产物的存在 (R_f 0.63) 和完全消耗环孢菌素 A 原材料 (R_f 0.65)。LCMS 分析也确认产物的存在。

[0396] 将反应混合物预吸收在硅胶上并通过快速柱层析 (乙酸乙酯 : 环己烷,1 : 1,至

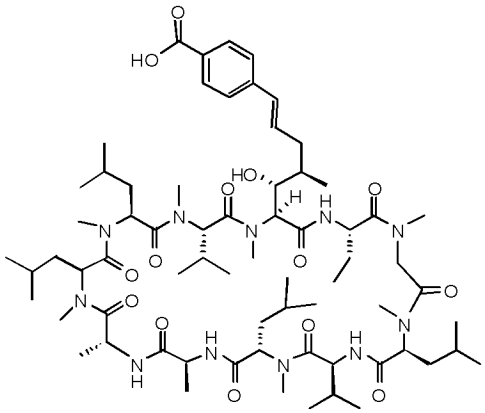
乙酸乙酯至乙酸乙酯：甲醇，10％）纯化，并且真空去除溶剂产生灰色固体。该灰色固体接着通过将它穿过SPE-硫醇柱（洗脱液：甲醇）除去Grubbs-Hoveida催化剂而进一步纯化。

[0397] 真空除去溶剂以产生中间体7，其为白色结晶固体（950mg，86.4％）。

[0398] HRMS(TOF MS ES$^+$)：发现1344.8726[M+Na]$^+$ $C_{69}H_{115}N_{11}O_{14}Na$ 需要1344.8523；计算的同位素分布：1344.8523(100％)，1345.8553(82.9％)，1346.8584(32.5％)，1347.8612(11.4％)；发现的同位素分布：1344.8726(100％)，1345.8918(89.2％)，1346.9116(35.7％)，1347.9224(7.1％)；ν_{max}（薄膜，KBr）：3466，3418，3318(m-s，不平，CON-Hs，OH)，2961，2935，2873(m，烷基C-H)，1720(m，共轭C＝OOMe)，1627(s宽，不平，C＝Os，酰胺I)，1520(m宽，不平，C＝Os，酰胺II)cm^{-1}；δ_H($CDCl_3$，500MHz)：7.92(1H，d，J 10.5Hz，NH)，7.90(2H，d，$J_{ArCH,ArCH}$ 8.4Hz，2×ArHs)，7.64(1H，d，J 7.6Hz，NH)，7.47(1H，d，J 8.2Hz，NH)，7.32(2H，d，$J_{ArCH,ArCH}$ 8.4Hz，2×ArHs)，7.06(1H，d，J 7.9Hz，NH)，6.34-6.24(2H，m，H^A & H^B)，3.17(3H，s，OMe甲酯)，2.65-2.60(1H，m，完全隐藏在其他峰下，H^{C2})，1.88-1.79(1H，m，部分隐藏，H^{C1})；δ_C($CDCl_3$，125MHz)：173.84(C＝O)，173.81(C＝O)，173.74(C＝O)，173.50(C＝O)，171.54(C＝O)，171.31(C＝O)，171.17(C＝O)，170.50(C＝O)，170.44(2×C＝O)，170.26(C＝O)，170.18(C＝O)，167.1(C＝OOMe)，142.4(Cq-C^A)，132.9(C^A)，130.6(C^B)，129.9，125.9(4Cs，4×ArCs)，128.2(Cq-COOMe)，52.0(OMe甲酯)，36.8(CC)。

[0399] 中间体8

[0400]

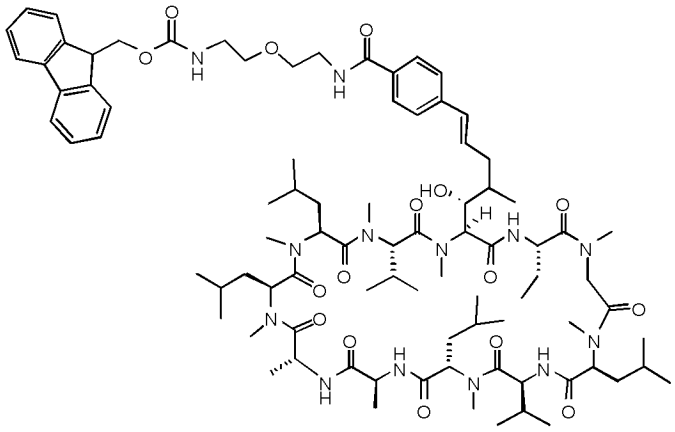


[0401] 在丙酮(4mL)和氢氧化钠水溶液(2M，2mL)中搅拌中间体7(260mg，0.196mMol)。19小时后，形成白色沉淀，并且T.l.c.分析（丙酮：环己烷，1：1）显示存在一种产物(R_f 0.17)和一些残留原材料/杂质(R_f0.31)。从反应混合物中除去丙酮，并且用乙酸乙酯冲洗留下的水层。水层用盐酸水溶液(1M)酸化，并且再次用乙酸乙酯冲洗。收集的乙酸乙酯层被干燥（硫酸镁），过滤并真空浓缩产生白色/淡棕色吸湿性固体，其接着在乙腈中稀释并再次过滤（洗脱液乙腈）。滤液最终真空浓缩产生中间体8(220mg，86％)，其为白色/淡棕色吸湿性固体。

[0402] ν_{max}（薄膜，KBr）：3418，3315(m，不平，CON-Hs，OH)，2961，2936，2873(m，烷基C-H)，1714(m，共轭C＝OOH)，1627(s宽，不平，C＝Os，酰胺I)，1520(m宽，不平，C＝Os，酰胺II)cm^{-1}

[0403] 中间体9

[0404]

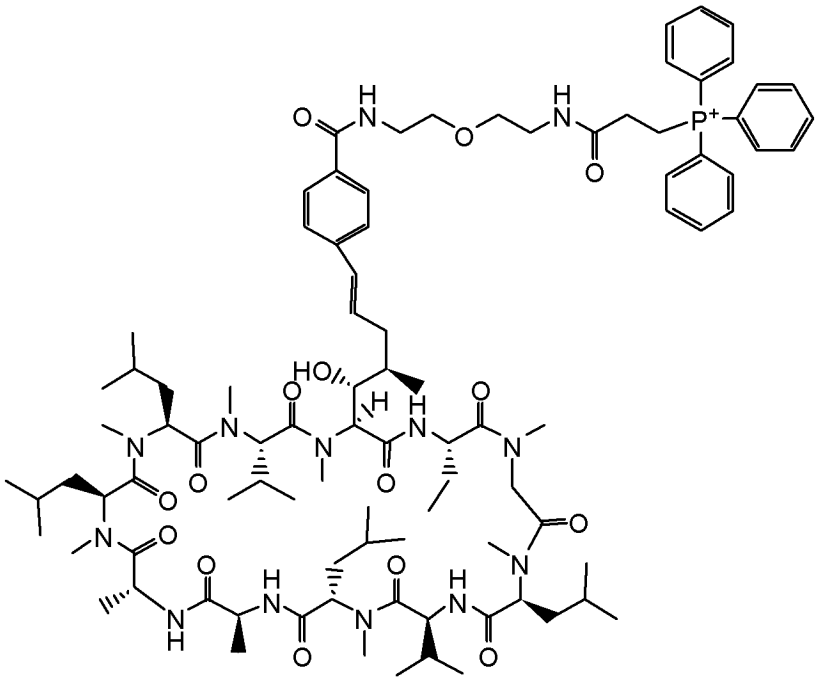


[0405] 将 HATU 偶联试剂 (230mg,0.6037mMol) 添加至已经在氮气氛围、室温下搅拌 5 分钟的中间体 8(395mg,0.3018mMol)、氯仿 (10mL) 和三乙胺 (168μL) 的溶液中。另外 5 分钟之后,将盐酸 2-[2-(芴甲氧羰基-氨基)乙氧基乙胺 (257mg,0.7083mMol) 添加至搅拌的反应混合物并继续反应 22.5 小时。LCMS 分析揭示反应混合物中产物的存在。反应混合物真空下浓缩并接着在乙酸乙酯中稀释并用盐酸水溶液 (1M) 冲洗。收集的有机层通过硫酸镁干燥,过滤并真空浓缩产生残留物,其通过快速柱层析 (氯仿至氯仿:甲醇,3%) 纯化,产生中间体 9(406mg,83%),其为白色吸湿性固体。

[0406] 化合物 5

[0407] 使用与上述那些类似的技术从中间体 9 制备化合物 5。

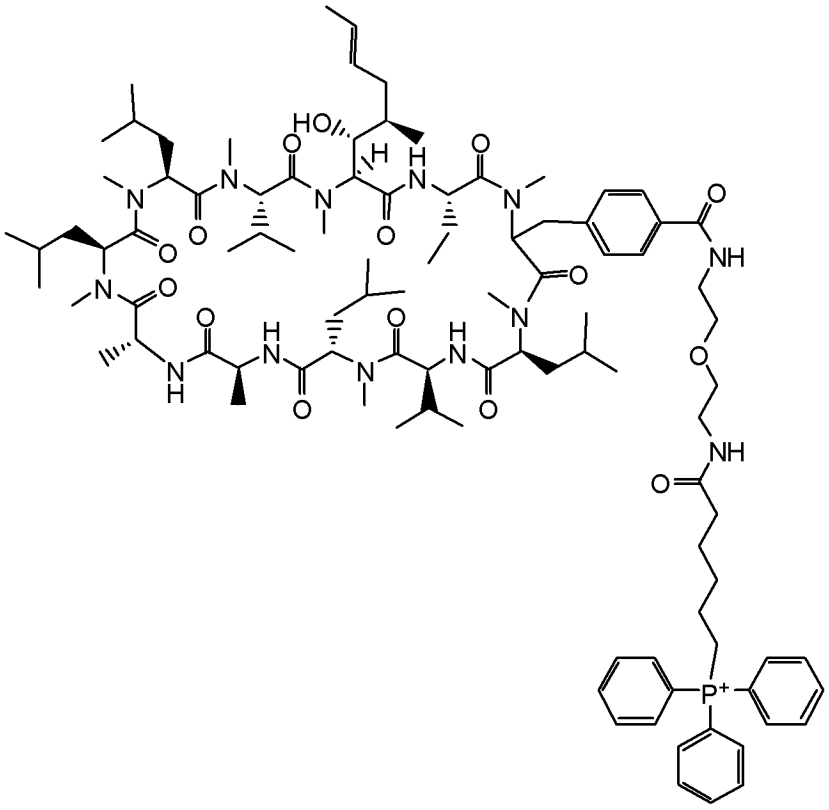
[0408]



[0409] 化合物 6

[0410] 经过与上述那些类似的数个步骤制备下面描述的化合物 6。

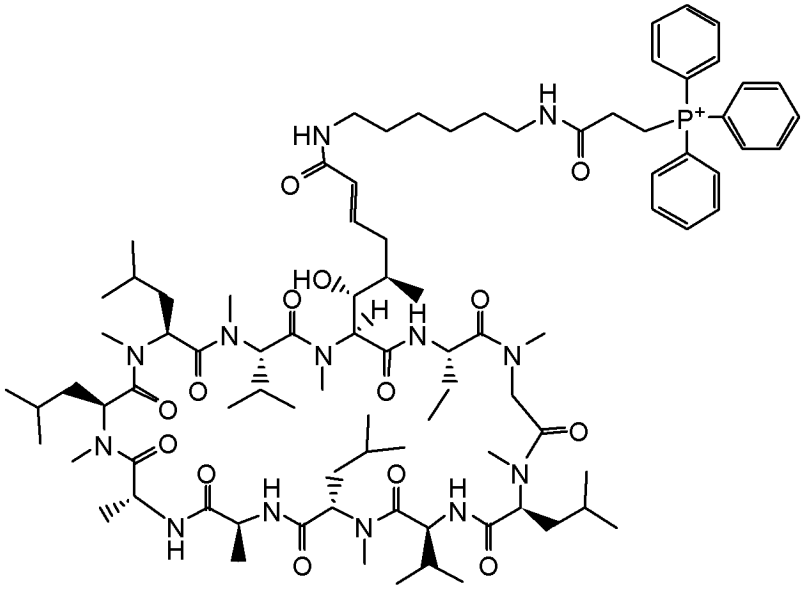
[0411]



[0412] 化合物 7

[0413] 经过与上述那些类似的数个步骤制备下面描述的化合物 7。

[0414]



[0415] 分析化合物 1 的性质

[0416] 实施例 1- 化合物 1 与亲环蛋白和钙依赖磷酸酶的相互作用

[0417] 亲环蛋白是肽基脯氨酸顺反异构酶；该活性被环孢菌素抑制。从抑制肽基脯氨酸顺反异构酶 (PPIase) 的活性方面，研究化合物 1 和 CsA 与亲环蛋白 D(CyP-D) 和亲环蛋白 A(CyP-A) 的相互作用。大约 7nM(总)CsA 产生 50％的 CyP-D 抑制 (见图 1A)。但是，这低估了真实的 CsA 结合亲合力——因为试验包含类似浓度的 CyP-D(8nM)。因此，使用用于紧密结合抑制剂的亨德森方程 (见上方) 对抑制进行分析，其对于 CsA 和 CyP-D 产生了 3nM

的抑制（解离）常数（插图 1A）。

[0418] 对化合物 1（图 1B）和中间体 1 和 2 的类似分析显示增加添加至位置 3 愈加削弱结合，以致化合物 1 与 CyP-D 的结合亲合力比 CsA 低约 30 倍。CsA 和化合物 1 与 CyP-A 的结合亲合力和它们与 CyP-D 的结合亲合力类似。这些图显示在下面表 1 中。

[0419] 表 1

[0420]

化合物	对 CyP-D 的 K_i(nM)	对 CyP-A 的 K_i(nM)
环孢菌素 A	3	4
化合物 1	93	113

[0421] 除了抑制亲环蛋白以外，CsA 还与 CyP-A 形成复合物，其又抑制 Ca^{2+}/ 钙调蛋白依赖的 Ser/Threo 蛋白磷酸酶钙依赖磷酸酶，从而明显扩大它的作用范围。因此，确定 3 位修饰如何影响复合物抑制钙依赖磷酸酶的能力是重要的。

[0422] 为了能够比较，选择测试温育中 CsA(1μM) 和化合物 1(4μM) 的浓度以建立相同浓度的 CsA/CyP-A 和化合物 1/CyP-A 复合物，即 720nM 复合物与 740nM 总 CyP-A（使用 CyP-A 与 CsA 和化合物 1 的 K_i 值计算）。

[0423] 图 2 显示，虽然 CyP-A 单独产生小的（20％）钙依赖磷酸酶活化，但是 CsA/CyP-A 复合物（720nM）抑制约 70％。与之相比，化合物 1/CyP-A 复合物（720nM）不产生抑制。缀合至 CsA 环的 3 位显示防止形成亲环蛋白 / 环孢菌素 / 钙依赖磷酸酶的三元复合物，已知该三元复合物需要钙依赖磷酸酶与环 3-7 位的相互作用。

[0424] 实施例 2- 评估在混合的体外体系中化合物 1 的 CyP-D 选择性

[0425] 使用包括分离的线粒体和外部添加的重组 CyP-A 的测试系统，研究化合物 1 是否选择线粒体内 CyP-D 和 PT 孔，而非线粒体外亲环蛋白。为了评估在线粒体中的 CyP-D 活性，监测在线粒体中通透性转换（PT）孔的形成。PT 孔形成由 CyP-D 控制，因此 CyP-D 抑制防止 PT 孔形成。通过添加高 [Ca^{2+}] 诱导 PT 孔打开，并通过所得线粒体膨胀进行监测——由于内膜变得自由通透（渗透）低分子量溶质。通过在 540nm 处吸光度的降低监测膨胀（图 3A 和 3B）。

[0426] 因为 Ca^{2+} 流入线粒体是电泳的，内膜电势，$\Delta\varphi_M$，在快速 Ca^{2+} 吸收期间散失（并当吸收完成时随后恢复）。因为散失$\Delta\varphi_M$将损害线粒体中带正电化合物 1 的积聚，所以 Ca^{2+} 被缓慢注入测试温育以限制 Ca^{2+} 吸收速率并从而避免膜去极化（这使用四苯基鏻电极和 CsA 阻止 PT 孔打开进行确认）。

[0427] CsA 和化合物 1 抑制孔打开，如在图 3A 和 3B 中所显示的，指示抑制 CyP-D。评估抑制程度（根据在虚线标记的时间得到的吸光度降低），指示约 0.1μM CsA 和 0.4μM 化合物 1 产生 50％的孔打开抑制（闭合符号；图 3C 和 3D）。

[0428] 添加 Ca^{2+} 后立即取出样品，线粒体沉积，并测定上清液中的 CyP-A 活性（开放符号）。

[0429] 从这些图中，可看到 CsA 抑制线粒体外 CyP-A，浓度曲线与 PT 的浓度曲线类似（图 3C）；这是被预料到的，因为 CyP-D 和 CyP-A 对 CsA 具有类似的结合亲合力，并且是不带电

的，CsA 应当在内膜两侧平衡至相同的游离浓度。

[0430] 相比之下，化合物 1 抑制 PT 孔形成比它抑制 CyP-A 更显著（图 3D），即使它以相似的亲合力结合 CyP-A 和 CyP-D（表 1）。这指示相对于外部培养基（包含 CyP-A），化合物 1 积聚在线粒体基质中（CyP-D 位于其中）。

[0431] 从这些数据，可计算由于线粒体靶向的有效线粒体基质 / 线粒体外积聚比。线粒体基质 / 线粒体外积聚比等于：

[0432]

$$\frac{50}{\text{在产生50\%的PT孔抑制的[缀合物]下Cyp-A抑制(\%)}} \bullet \frac{\text{CyP D的}K_i}{\text{CyP A的}K_i}$$

[0433] 这为化合物 1 产生 4.8 的值和为未修饰的 CsA 产生 0.6 的值。

[0434] 图 4 的数据显示，不像 CsA，化合物 1 优先地抑制线粒体内 CyP-D 而不是线粒体外 CyP-A。

[0435] 实施例 3- 评估在完整细胞中化合物 1 的 CyP-D 选择性

[0436] 使用大鼠 B50 神经母细胞瘤细胞和其中过量表达 CyP-D 约 10- 倍的克隆 {CyP-D(+) 细胞}，研究在完整细胞中化合物 1 对 CyP-D 的选择性。CyP-D(+) 细胞保持相对低的$\Delta\varphi_M$，指示瞬时 PT 孔打开。因为$\Delta\varphi_M$降低由于过多的 CyP-D 造成，$\Delta\varphi_M$回复至野生型值提供了 CyP-D 抑制的明确测量。

[0437] 从吸收四甲基若丹明乙酸乙酯 (TMRE)——根据电势大小由线粒体积聚的荧光亲脂性阳离子——监测$\Delta\varphi_M$。

[0438] 图 4A 显示在这些细胞线粒体中积聚的 TMRE 的典型图像。CyP-D(+) 克隆的线粒体比野生型细胞积聚显著少的 TMRE，但是该差异被 CsA 去除，CsA 促进通过 CyP-D(+) 细胞的吸收。获得 CyP-D(+) 细胞的 TMRE 吸收的最大恢复约 0.8μM CsA（图 4C）和 2.4μM 化合物 1（图 4D）。相同的浓度不影响野生型细胞的 TMRE 吸收（图 4B）。可得出结论约 0.8μM CsA 和 2.4μM 化合物 1 足够至抑制 B50 细胞中的 CyP-D。

[0439] 为了研究化合物 1 是否选择性抑制 CyP-D，即没有可觉察到地抑制 CyP-A，需要 CyP-A 活性标记。B50 细胞中被硝普盐诱导的胱天蛋白酶活化被 CsA 和被 CyP-A 的反义 (AS) 阻抑所减小，这指示在该模型中 CyP-A 参与胱天蛋白酶活化。该系统提供了 CyP-A 活性的测量。

[0440] 反义处理降低 CyP-A 表达＞ 85％，并且反义处理和 CsA 二者减少硝普盐诱导的胱天蛋白酶 -3 的活化（图 4E）。但是，不像 CsA，2.5μM 的化合物 1 对胱天蛋白酶活化没有明显的影响。因此，化合物 1 显示在完整细胞中对线粒体 CyP-D 的选择性超过细胞溶胶 CyP-A。

[0441] 这些数据指示，不像 CsA，化合物 1 被来自细胞溶胶的线粒体积聚。

[0442] 实施例 4- 海马神经元中的缺血 / 再灌注

[0443] 通过在氧和葡萄糖缺乏 (OGD) 下温育海马神经元 30 分钟，其后恢复葡萄糖和 O_2 而模拟缺血 / 再灌注 (I/R)。为了指示为线粒体电子传递的损失充分移除 O_2 需要的 OGD 时间段，从预加载细胞的线粒体的 TMRE 损失随后作为$\Delta\varphi_M$散失的指标。

[0444] 约 5 分钟 OGD 后，TMRE 损失指示此时呼吸抑制。在每个试验的开始，一组海马神经元与下面的神经胶质细胞区分并且相同的神经元在其后以一定间隔成像。神经元细胞（而不是神经胶质细胞）对 OGD 诱导坏死的易感性随着培养天数增加，并且在培养 24-28 天后获得数据。

[0445] OGD 之后，约 60％的神经元在 90 分钟内坏死（图 5A），但是在存在化合物 1 情况下，死亡率大约减半。用＞ 0.8μM 化合物 1，产生最大保护（图 5B）。

[0446] CsA 是较差保护性（图 5B）。用 0.1μM CsA 1 存在相对较小的保护，但是在高 CsA 浓度下这被反转，指示在线粒体外存在使该保护失效 (override) 的第二 CsA 靶。因此，使用与线粒体靶向基团缀合的环孢菌素限制 CsA 对线粒体的作用，改善了它对由于 OGD 期间带来的细胞坏死的保护能力，指示 CyP-D 和 PT 是该形式损伤的主要贡献因素。

[0447] 分析化合物 2 至 4 的性质

[0448] 实施例 5- 与亲环蛋白 D 的相互作用

[0449] 如在实施例 1 中所描述测定化合物 2 至 4 与亲环蛋白 D 的结合亲合力。结果（连同 CsA 和化合物 1 的结果一起）显示在下面表 2 中。

[0450] 表 2

[0451]

化合物	CyP-D 的 K_i(nM)
CsA	3
化合物 1	93
化合物 2	30
化合物 3	6
化合物 4	120

[0452] 实施例 6- 线粒体基质 / 线粒体外积聚比

[0453] 如在实施例 2 中所描述测定化合物 2 至 4 的线粒体基质 / 外部线粒体积聚比。结果（连同 CsA 和化合物 1 的结果一起）显示在下面表 2 中。

[0454] 表 2

[0455]

化合物	积聚比
CsA	0.6
化合物 1	4.8
化合物 2	＞ 10
化合物 3	＞ 10

化合物 4	4.2

[0456] 实施例 7- 海马神经元中缺血 / 再灌注

[0457] 使用实施例 4 描述的方法测定 CsA 和化合物 1 至 4 对缺血 / 再灌注诱导的大鼠海马神经元坏死的最大细胞保护（％）。结果描绘在图 6 中。

[0458] 图 6 中的数据显示包含不同的线粒体靶向基团并与环孢菌素环具有不同连接体和不同连接点的本发明缀合物显示对 CsA 改进的细胞保护。

[0459] 分析化合物 2 和 3 在心脏细胞中的细胞保护性质

[0460] 实施例 8- 化合物 2 在心脏细胞中的细胞保护性质

[0461] 通过在氧和葡萄糖缺乏 (OGD) 下温育心脏细胞 4 小时，之后恢复氧和葡萄糖模拟心脏的缺血 / 再灌注。如在图 7 中所显示，有或没有化合物 2，OGD 诱导轻微坏死。

[0462] 但是，在葡萄糖存在情况下的随后再充氧诱导渐进的细胞死亡，如在下面图 8 中所显示的。在 5 小时的再充氧期间，约 50％的心肌细胞坏死。再充氧期间的坏死被化合物 2 抑制，尤其在再充氧的前 3 个小时期间。

[0463] 实施例 9- 比较化合物 2、化合物 3 和 CsA 在心脏细胞中的细胞保护性质

[0464] 使用实施例 8 中所描述的方法，测定 CsA、化合物 2 和化合物 3 对心脏细胞中缺血 / 再灌注损伤的细胞保护。再充氧 3 小时后测定坏死。结果描绘在下面图 9 中。

[0465] 图 9 中的数据显示化合物 2 和化合物 3 二者在 15nM 浓度下产生完全保护。化合物 3 在 3nM 下也类似有效。与之相比，通过 CsA 的最大保护仅为 42％，并且是在 50nM 的浓度下获得的。因此，化合物 2 和 3 产生比 CsA 更好的细胞保护，并且在比 CsA 低得多的浓度下有效。线粒体靶向明显改善了心脏细胞中的细胞保护，如被化合物 2 和 3 所例证的，所述化合物 2 和 3 对环孢菌素环具有不同的连接体和不同的连接点。

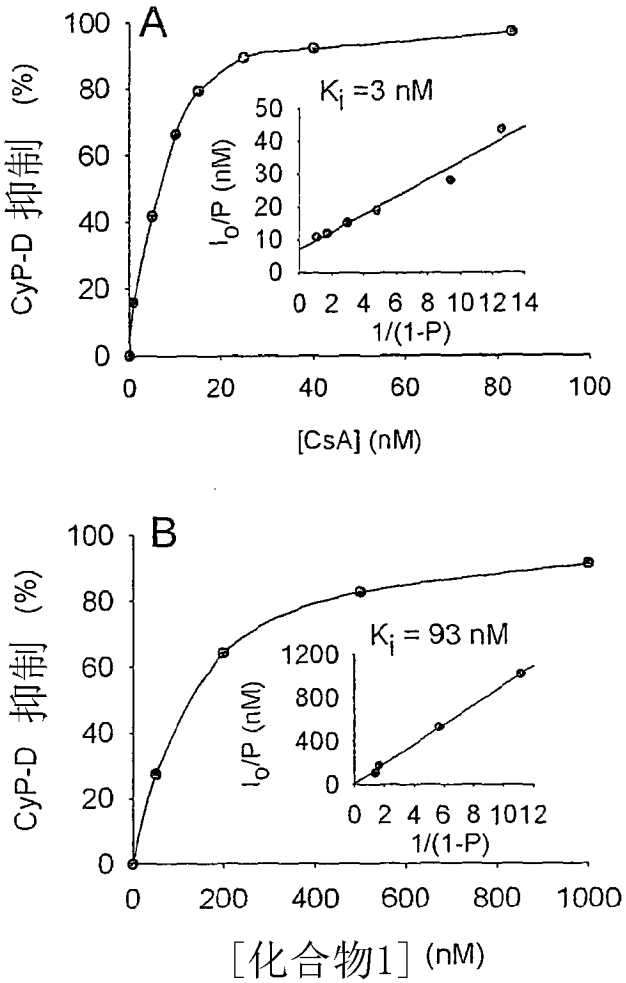
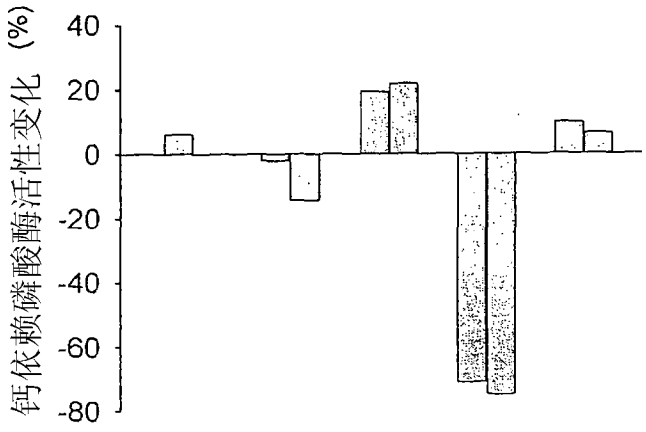


图 1



CyP-A (nM)	0	0	740	740	740
CsA (μM)	1	0	0	1	0
化合物1 (μM)	0	4	0	0	4

图 2

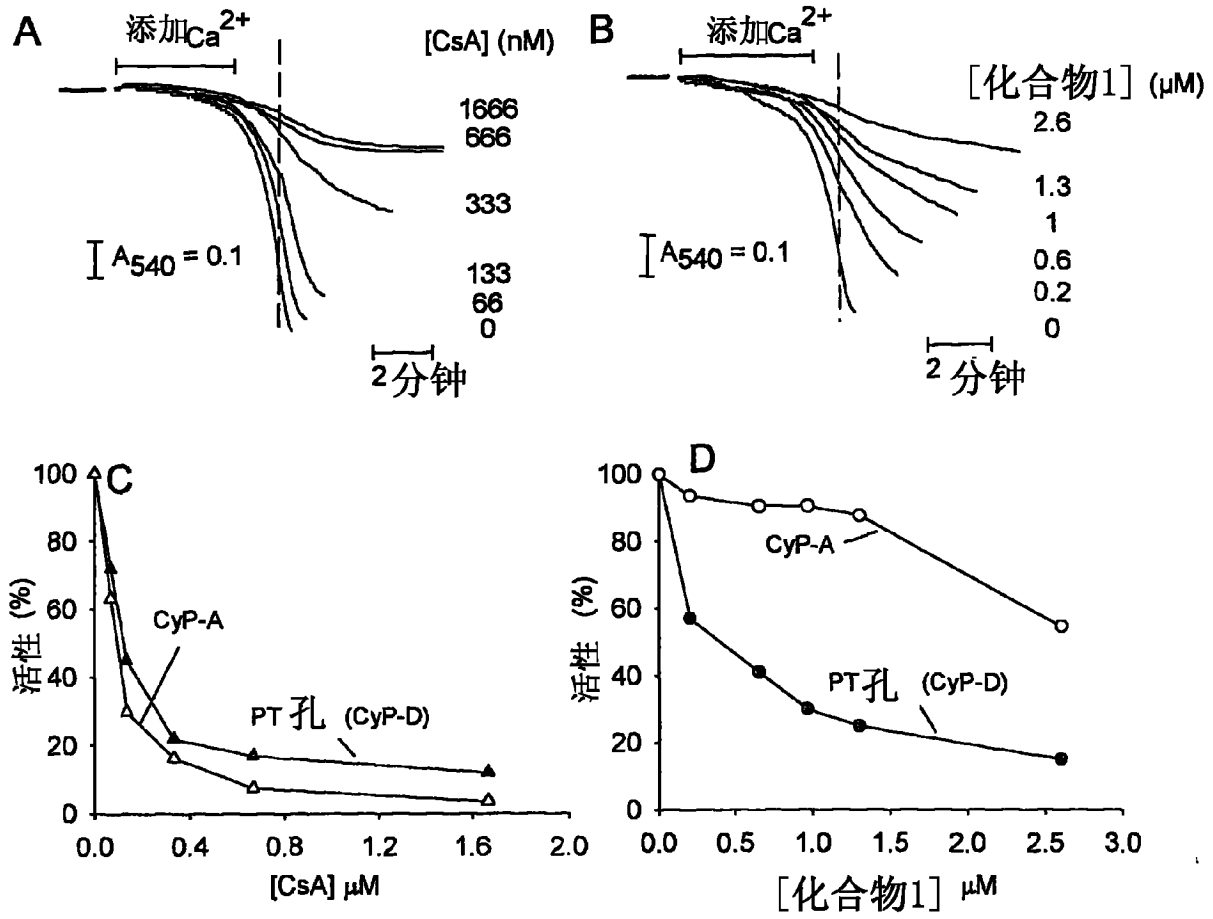

A
添加Ca2+
[CsA] (nM)
1666
666
333
133
66
0
A540 = 0.1
2分钟
B
添加Ca2+
[化合物1] (μM)
2.6
1.3
1
0.6
0.2
0
A540 = 0.1
2 分钟
C
活性 (%)
CyP-A
PT 孔 (CyP-D)
[CsA] μM
D
活性 (%)
CyP-A
PT孔 (CyP-D)
[化合物1] μM

图 3

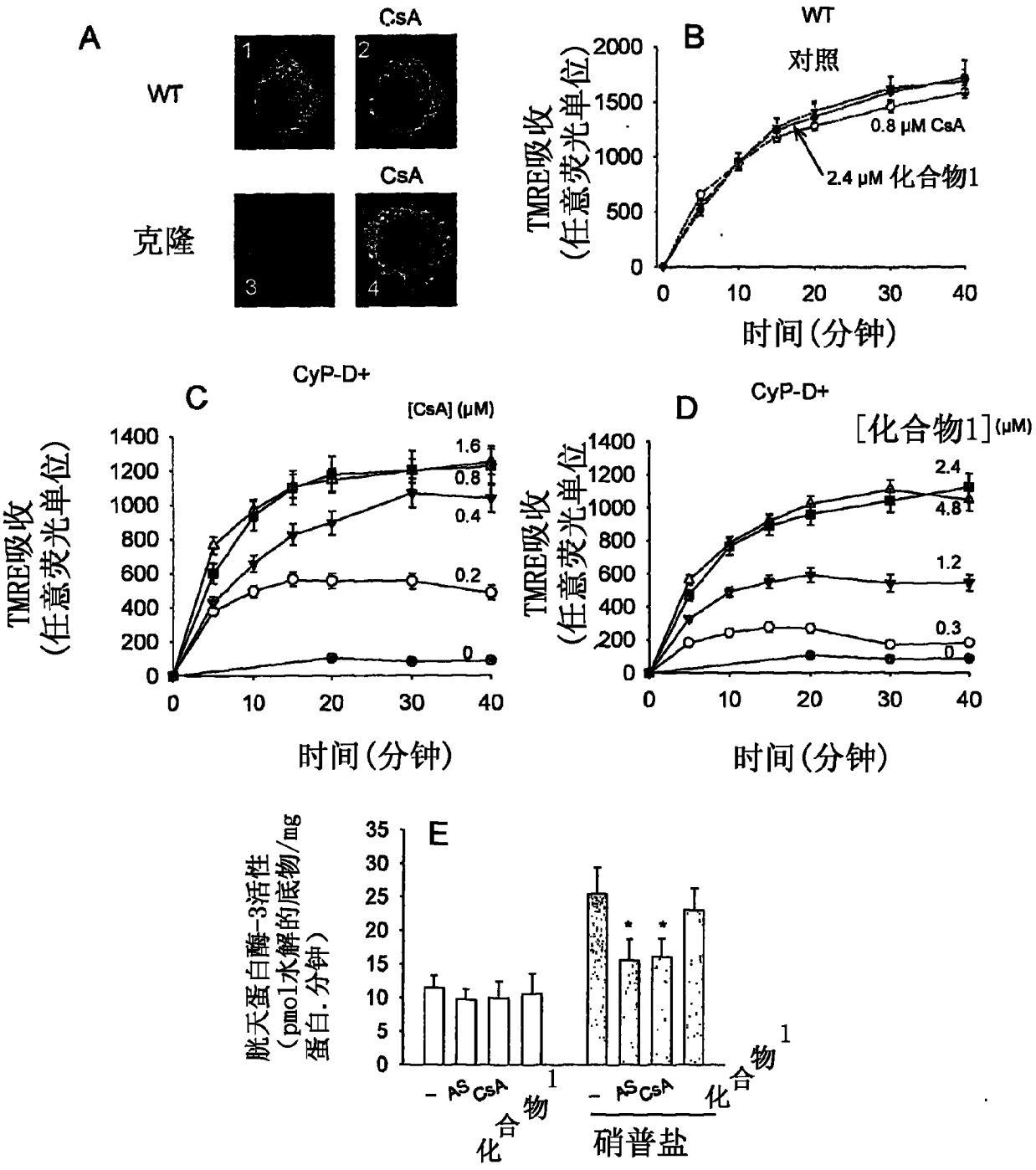

A
CsA
WT
克隆
1
2
3
4
B
WT
对照
0.8 μM CsA
2.4 μM 化合物1
TMRE吸收
(任意荧光单位)
时间(分钟)
C
CyP-D+
[CsA] (μM)
1.6
0.8
0.4
0.2
0
D
CyP-D+
[化合物1](μM)
2.4
4.8
1.2
0.3
0
E
脱天蛋白酶-3活性
(pmol水解的底物/mg
蛋白.分钟)
- AS
CsA
化合物1
硝普盐

图 4

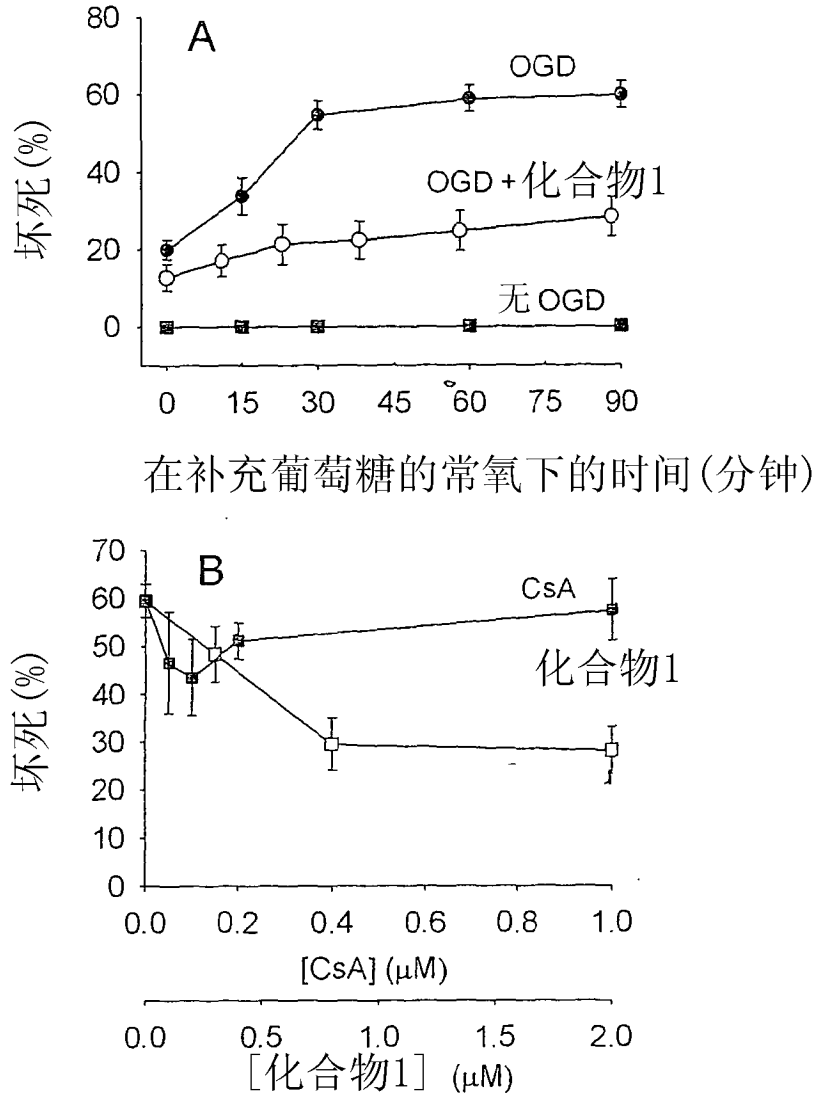

A
OGD
OGD + 化合物1
无 OGD
坏死 (%)
80
60
40
20
0
0 15 30 45 60 75 90
在补充葡萄糖的常氧下的时间(分钟)
B
CsA
化合物1
坏死 (%)
70
60
50
40
30
20
10
0
0.0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0
[CsA] (μM)
0.0 0.5 1.0 1.5 2.0
[化合物1] (μM)

图 5

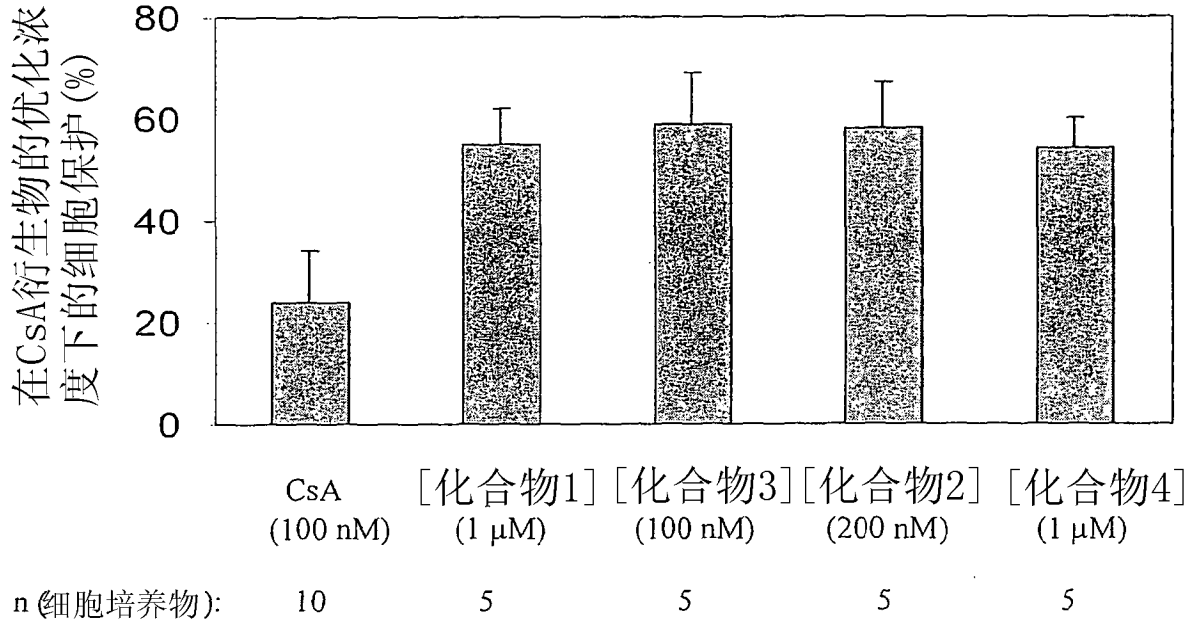

在CsA衍生物的优化浓度下的细胞保护(%)
80
60
40
20
0
CsA (100 nM)
[化合物1] (1 μM)
[化合物3] (100 nM)
[化合物2] (200 nM)
[化合物4] (1 μM)
n (细胞培养物): 10 5 5 5 5

图 6

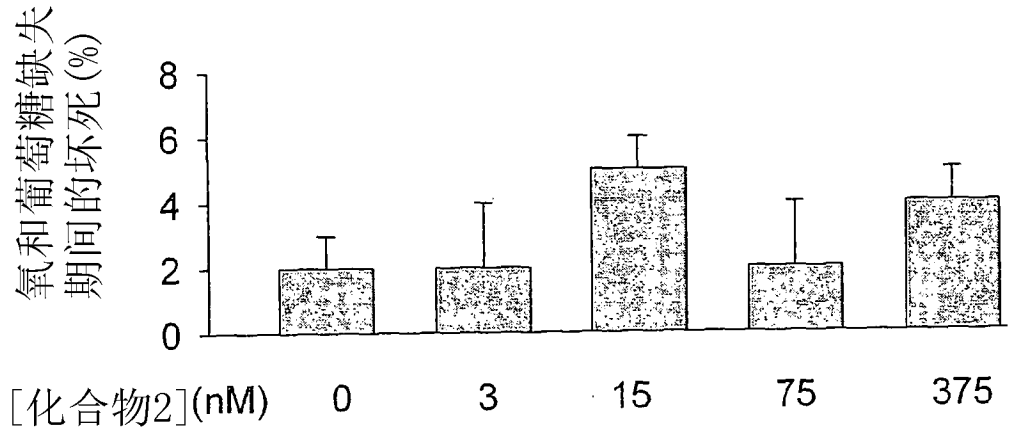

氧和葡萄糖缺失期间的坏死(%)
8
6
4
2
0
[化合物2](nM) 0 3 15 75 375

图 7

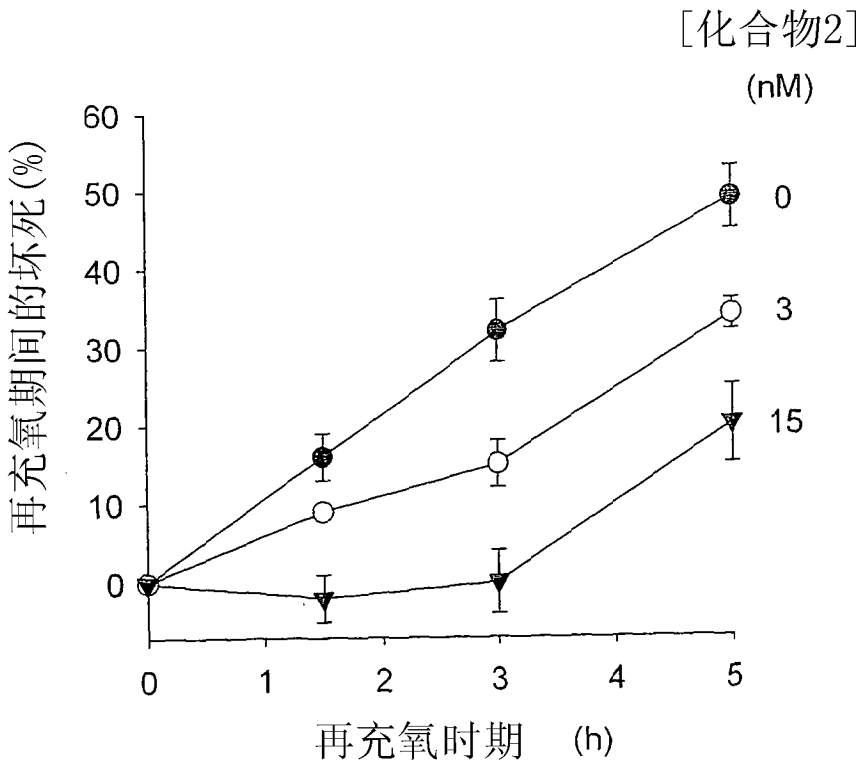


图 8

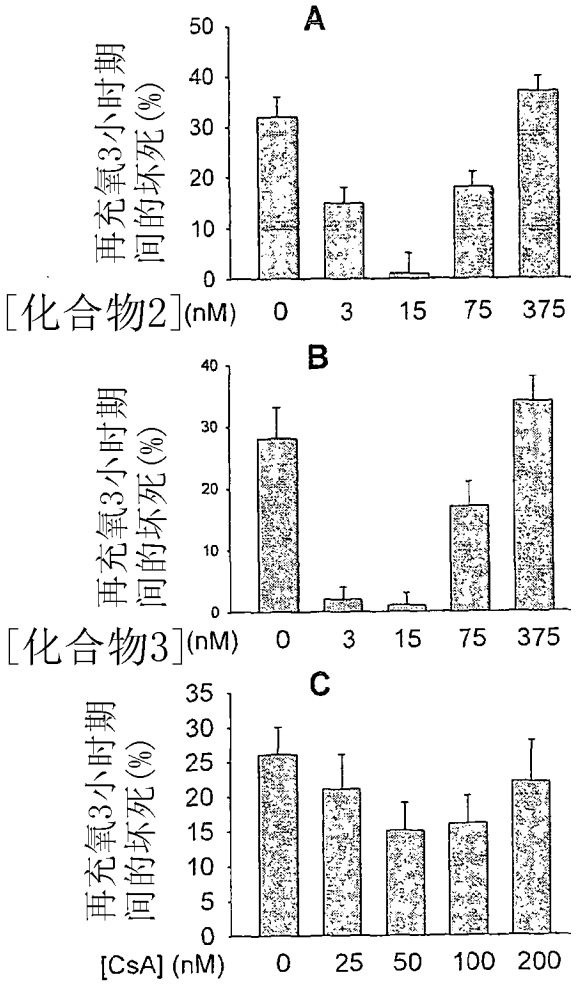

A
再充氧3小时期间的坏死(%)
50
40
30
20
10
0
[化合物2](nM) 0 3 15 75 375
B
再充氧3小时期间的坏死(%)
40
30
20
10
0
[化合物3](nM) 0 3 15 75 375
C
再充氧3小时期间的坏死(%)
35
30
25
20
15
10
5
0
[CsA] (nM) 0 25 50 100 200

图 9