

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 38/08 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880001665.7

[43] 公开日 2009 年 12 月 30 日

[11] 公开号 CN 101616683A

[22] 申请日 2008.1.3

[21] 申请号 200880001665.7

[30] 优先权

[32] 2007.1.4 [33] US [31] 60/878,414

[86] 国际申请 PCT/IB2008/000003 2008.1.3

[87] 国际公布 WO2008/084368 英 2008.7.17

[85] 进入国家阶段日期 2009.7.2

[71] 申请人 德比奥法姆股份有限公司

地址 瑞士洛桑

[72] 发明人 保罗·伯纳迪

格里哥尔·弗格尼奥克斯

拉斐尔·克莱博

[74] 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司

代理人 阎斌斌 韩 龙

权利要求书 1 页 说明书 22 页 附图 5 页

[54] 发明名称

用于治疗 Ullrich 先天性肌营养不良的非免疫抑制性环孢霉素

[57] 摘要

本发明涉及非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物的用途，所述衍生物用于减轻据诊断患有 Ullrich 先天性肌营养不良或 Bethlem 肌病的患者的线粒体功能障碍，并降低肌肉细胞的凋亡率。

1. 式 I 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物在用于减轻 Ullrich 先天性肌营养不良或 Bethlem 肌病患者细胞中线粒体功能障碍和降低凋亡率中的用途。

2. 权利要求 1 的用途, 其中非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物是式 II 的环孢霉素衍生物。

3. 权利要求 1 的用途, 其中非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物是式 III 的非免疫抑制性环孢霉素[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA。

4. 式 I 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物在用于制造意图治疗 Ullrich 先天性肌营养不良无力或 Bethlem 肌病的药物中的用途。

5. 权利要求 4 的用途, 其中非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物是式 II 的环孢霉素衍生物。

6. 权利要求 4 的用途, 其中非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物是式 III 的非免疫抑制性环孢霉素[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA。

7. 治疗 Ullrich 先天性肌营养不良或 Bethlem 肌病患者的方法, 其包含对患者施用有效量的式 I 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物。

8. 权利要求 7 的方法, 其中非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物是式 II 的环孢霉素衍生物。

9. 权利要求 7 的用途, 其中非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物是式 III 的非免疫抑制性环孢霉素[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA。

10. 治疗 Ullrich 先天性肌营养不良或 Bethlem 肌病患者的药物组合物, 其包含有效量的式 I 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物、可药用的载体和, 可选地, 赋形剂和稀释剂。

11. 权利要求 10 的药物组合物, 其中非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物是式 II 的环孢霉素衍生物。

12. 权利要求 10 的药物组合物, 其中非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物是式 III 的非免疫抑制性环孢霉素[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA。

13. 权利要求 10-12 任一项的药物组合物, 其还包含其他活性组分。

用于治疗 Ullrich 先天性肌营养不良的非免疫抑制性环孢霉素

技术领域

本发明涉及非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物的用途,所述衍生物用于减轻据诊断患有 Ullrich 先天性肌营养不良或 Bethlem 肌病的患者的线粒体功能障碍,并降低肌肉细胞的凋亡率。

背景技术

胶原 VI 基因的遗传突变引发两种主要的骨骼肌疾病, Bethlem 肌病(BM, 在线人类孟德尔遗传[OMIM] 158810)和 Ullrich 先天性肌营养不良(UCMD, OMIM 254090)。

BM 是常染色体显形遗传疾病,特征为中轴肌和近端肌的缓慢进行性虚弱无力,并伴随屈曲性手指挛缩(Bethlem and Wijngaarden. Brain 1976; 99: 91-100; Merlini et al. Neuromuscul Disord 1994; 4: 503-11)。表现为家族内部的变异性 and 不同的临床发作时间,从出生前到中年不等。出生前疾病发作的特征为胎动减少;新生儿疾病发作的特征为张力减退或斜颈;幼儿疾病发作的特征为运动里程碑延迟、肌肉无力和挛缩;而成年人疾病发作的特征为近端无力、跟腱和手指挛缩。对于一些 50 岁以上、户外活动需要辅助的患病个体,通常为温和而缓慢的进行性症状(Pepe et al. Biochem Biophys Res Commun 1999; 258: 802-07. De Visser et al.. Muscle Nerve 1992; 15: 591-96)。心功能通常是正常的。

UCMD 是常染色体隐性遗传疾病,特征为先天性肌肉无力,伴有关节挛缩和与其共存的远端关节过度松弛(Ullrich. Z. Ges. Neurol. Psychiatr. 1930; 126 : 171-201. Camacho Vanegas et al.. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 7516-21.)。表现通常是出生时有张力减退、先天性臀部脱臼、跟骨隆起和暂时脊柱后凸畸形。运动里程碑延迟,而且大多数孩子从不能独立行走。通常在上下肢的伸肌表面有毛囊角化过度症,并形成瘢痕瘤和香烟纸样的疤痕。中轴肌严重受累,导致进行性脊柱侧凸,并伴有脊柱僵硬。早期并

且严重的呼吸受累可能在生命的第一个或第二个十年中需要人工通气支持。受 UCMD 影响的研究对象具有正常的智力, 而且 MRI 显示大脑发育正常。带有隐性或新生杂合突变的患者通常有严重而典型的表型, 虽然他们可能偶尔表现出更轻的 Bethlem 类疾病的症状(Pan et al. Am J Hum Genet 2003; 73: 355-69. Baker et al. Hum Mol Genet 2005; 14: 279-93. Demir et al.. Am J Hum Genet 2002; 70: 1446-58.)。在一些具有 UCMD 表型的患者中, 没有发生胶原 VI 基因的突变, 表明即使对于这种疾病, 仍然存在遗传异质性(Pan et al. Am J Hum Genet 2003; 73: 355-69)。

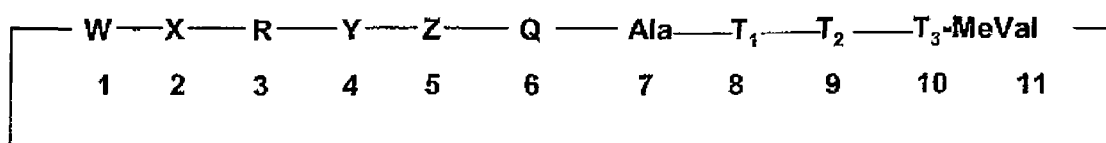
近来, 研究表明因为 Col6a1 靶向失活而缺乏胶原 VI 的小鼠具有由通透性转换孔(PTP)的不合理张开而导致的潜在线粒体缺陷, 其中所述 PTP 是内膜通道, 在几种形式的细胞死亡中起作用, 环孢霉素 A 能使其失敏(Irwin et al. Nat Genet 2003; 35: 267-71. Bernardi et al. FEBS J 2006; 273: 2077-99.)。进一步在体内利用了这一发现, 并在小鼠模型中实现了成功的治疗干预。确定线粒体是否与遗传和临床异质 UCMD 的发病机理有关是主要的挑战, 这是在小鼠模型中确定的疗法用于人类治疗应用的主要障碍。这个挑战现在已经被克服。此外, 本发明的发明人已经能证明 UCMD 患者细胞中存在的潜在线粒体缺陷和由此导致的高凋亡率能够由非免疫抑制性的环孢霉素 A 衍生物如[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 抑制。因此, 本发明提供新方法, 用于抑制 UCMD 患者肌肉细胞的凋亡, 和使用环孢霉素 A 的非免疫抑制性衍生物, 优选[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA, 治疗这些患者中这种疾病的新方法。目前还没有治疗 UCMD 的有效方法。因此, 需要如本文所述的新治疗方法。本发明的发明人还发现了 BM 患者中对环孢霉素 A 敏感的相似的线粒体缺陷。因此, 本文公开的对 UCMD 患者的新治疗方法也适用于 BM 患者的治疗。

发明内容

本发明源自下述发现: UCMD 中的关键问题是骨骼肌肉细胞凋亡率增加。发明人发现凋亡率增加是潜在的线粒体功能障碍的结果, 所述障碍能够通过使细胞接触环孢霉素 A 而修正。重要的是, 非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 在减轻线粒体功能障碍和抑制过度凋亡中同母体化合物一样有效。因此, 本发明涉及使用式 I 的非免疫抑制性环

孢霉素 A(CsA)衍生物, 优选式 II 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物, 和最优选式 III 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物 $[D\text{-MeAla}]^3\text{-}[\text{EtVal}]^4\text{-CsA}$ 减轻 UCMD 患者的线粒体功能障碍和降低 UCMD 患者细胞凋亡率。Novartis AG 的国际专利申请 PCT/EP2004/009804(WO2005/021028)在 3-6 页描述了适用于本发明的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物。美国专利 6,927,208 中公开了 $[D\text{-MeAla}]^3\text{-}[\text{EtVal}]^4\text{-CsA}$ 。

式 I



其中

W 是 MeBmt、二氢-MeBmt、8'-羟基-MeBmt 或 O-乙酰基-MeBmt,

X 是 α Abu、Val、Thr、Nva 或 O-甲基苏氨酸(MeOThr),

R 是 Pro、Sar、(D)-MeSer、(D)-MeAla 或 (D)-MeSer(O 乙酰基),

Y 是 MeLeu、硫代 MeLeu、 γ -羟基-MeLeu、Melle、MeVal、MeThr、MeAla、Mealle 或 MeaThr、N-乙基 Val (EtVal)、N-乙基 Ile、N-乙基 Thr、N-乙基 Phe、N-乙基 Tyr 或 N-乙基 Thr(O 乙酰基), 其中 R 是 Sar 时 Y 不能是 MeLeu,

Z 是 Val、Leu、MeVal 或 MeLeu,

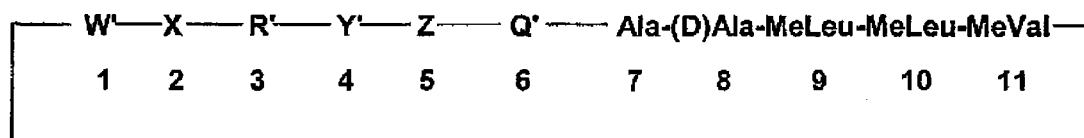
Q 是 MeLeu、 γ -羟基-MeLeu、MeAla 或 Pro,

T_1 是 (D)Ala 或 Lys,

T_2 是 MeLeu 或 γ -羟基-MeLeu, 和

T_3 是 MeLeu 或 MeAla。

式 II



其中

W'是 MeBmt、二氢-MeBmt 或 8'-羟基-MeBmt,

X 是 α Abu、Val、Thr、Nva 或 O-甲基苏氨酸(MeOThr),

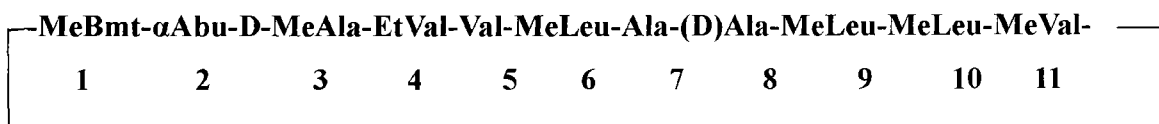
R'是 Sar、(D)-MeSer、(D)-MeAla 或(D)-MeSer(O 乙酰基),

Y'是 MeLeu、 γ -羟基-MeLeu、Melle、MeVal、MeThr、MeAla、Mealle 或 MeaThr; N-乙基 Val (EtVal)、N-乙基 Ile、N-乙基 Thr、N-乙基 Phe、N-乙基 Tyr 或 N-乙基 Thr(O 乙酰基), 其中 R 是 Sar 时 Y 不能是 MeLeu,

Z 是 Val、Leu、MeVal 或 MeLeu,

Q'是 MeLeu、 γ -羟基-MeLeu 或 MeAla。

式 III



其中 MeBmt 是 N-甲基-(4R)-4-丁-2E-烯-1-基-4-甲基-(L)苏氨酸, α Abu 是 L- α -氨基丁酸, D-MeAla 是 N-甲基-D-丙氨酸, EtVal 是 N-乙基-L-缬氨酸, Val 是 L-缬氨酸, MeLeu 是 N-甲基-L-亮氨酸, Ala 是 L-丙氨酸, (D)Ala 是 D-丙氨酸, 和 MeVal 是 N-甲基-L-缬氨酸。

在另一个实施方案中, 本发明涉及式 I 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物, 更优选式 II 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物, 和最优选式 III 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 在产生意欲用于治疗 UCMD 的药物的用途。

在另一个实施方案中, 本发明涉及治疗患者中 UCMD 的方法, 其包含对患者施用有效量的式 I 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物, 更优选式 II 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物和最优选式 III 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA。有效量的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物应理解为当在治疗方案中对 UCMD 患者重复施用时产生目的临床反应, 比如改善、稳定或疾病发展进程的减缓。当口服给药时, 每日给药或每周三次给药的有效量在约 1 mg/kg 至约 100 mg/kg 之间, 优选从约 1 mg/kg 至约 20 mg/kg。通过静脉途径时, 指定的相应剂量可以从约 1 mg/kg 至约 50 mg/kg, 优选从约 1 mg/kg 至约 25 mg/kg。

此外, 本发明涉及用于治疗 UCMD 的药物组合物, 其包含有效量的

式 I 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物,更优选式 II 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物和最优选式 III 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物 $[D-MeAla]^3-[EtVal]^4-CsA$,可药用载体和,可选地,赋形剂和稀释剂。稀释剂通常是水。通常向非肠道用制剂加入的赋形剂包括等渗剂、缓冲液或其他控制 pH 的试剂,和防腐剂。组合物可以包含其他活性组分如抗生素。

本发明进一步涉及式 I 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物,更优选式 II 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物和最优选式 III 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物 $[D-MeAla]^3-[EtVal]^4-CsA$ 在用于减轻 Bethlem 肌病患者的线粒体功能障碍和降低其细胞凋亡率的用途。此外,本发明还涉及治疗患者中 BM 的方法,其包含对患者施用有效量的式 I 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物,更优选式 II 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物和最优选式 III 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物 $[D-MeAla]^3-[EtVal]^4-CsA$ 。此外,本发明还涉及式 I、II 或 III 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物在产生意欲用于治疗 BM 的药物中的用途。最后,本发明涉及用于治疗 BM 的医药组合物,其包含有效量的式 I、II 或 III 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物,可药用的载体和可选地,赋形剂和稀释剂。

附图说明

图 1 在图 A 和 B 中表示从接触寡霉素的 UCMD 患者的肌肉活体组织获得的成肌细胞的线粒体膜电位,在图 C 中表示 UCMD 患者和健康个体中成肌细胞的凋亡率。

图 2 为典型实验,测试 $[D-MeAla]^3-[EtVal]^4-CsA$ 对分离自 *Col6a1*^{-/-} 小鼠的肝脏和肌肉线粒体钙保持能力(CRC)的影响。其中如箭头所示,加入 10 μM Ca^{2+} 的脉冲。最后一次处理的 5 小时后,从安慰组处理的小鼠分离图 A1 和 B1 中检验的线粒体,图 AII 和 BII 中的线粒体来自用 $[D-MeAla]^3-[EtVal]^4-CsA$ 处理的小鼠。线 a-d: 未加入;线 a'-d': 向培养基中加入 $[D-MeAla]^3-[EtVal]^4-CsA$ (0.8 μM)。数据代表 4 次重复实验。

图 3 从用安慰剂或 $[D-MeAla]^3-[EtVal]^4-CsA$ 处理后的 *Col6a1*^{-/-} 小鼠肝脏和肌肉分离线粒体,进行 CRC 测定的结果汇总。实验如图 2 所述进行。CRCmax 指向培养基加入 0.8 μM $[D-MeAla]^3-[EtVal]^4-CsA$ 后观察到的

CRC。图 A：每个点代表一只小鼠。小鼠 24-27 用 $[D-MeAla]^3-[EtVal]^4-CsA$ 处理，小鼠 28-31 用安慰剂处理。

图 4 寡霉素对分离自用安慰剂或 $[D-MeAla]^3-[EtVal]^4-CsA$ 处理后的 *Col6a1*^{-/-} 小鼠 FDB 纤维中线粒体 TMRM 荧光的影响。TMRM 检测如实施例 4（方法）中所述进行。如其中所述，加入 5 μM 寡霉素(Oligo)或 4 μM 羰基氰化物-对-三氟甲氧基苯腙(FCCP)。每条线代表一条纤维的荧光值。图中还显示了加入寡霉素后，相对于随意设定的 90%荧光的阈值，去极化的纤维数目。

图 5 在用 $[D-MeAla]^3-[EtVal]^4-CsA$ 或安慰剂处理的 *Col6a1*^{-/-} 小鼠横膈膜切片中的凋亡发生率。标明了来自用 $[D-MeAla]^3-[EtVal]^4-CsA$ （第 1 组，小鼠 24-27）或安慰剂（第 2 组，小鼠 28-31）处理的每只 *Col6a1*^{-/-} 小鼠的横膈膜切片中每 mm^2 的凋亡核数目。棒表示每只小鼠 20-30 个切片的平均值 $\pm$ SD。未处理（基础）和 CsA（环孢霉素 A）处理动物的数据来自历史样本。

图 6 对用 $[D-MeAla]^3-[EtVal]^4-CsA$ 或安慰剂处理的 *Col6a1*^{-/-} 小鼠横膈膜中发生线粒体改变的纤维的评估。图 A 表示用电镜在来自个体动物的样本中检测到的线粒体发生改变的肌肉纤维的百分比。图 B 表示两个处理组的平均值。棒条表示平均百分比 $\pm$ SD。使用 Mann-Whitney 测试计算显著性。

具体实施方式

为了评估 UCMD 患者中是否出现凋亡发生率增加和潜在的线粒体功能障碍，相对于健康个体，研究了五名 UCMD 患者。患者 1 和 5 患有已获得基因验证的 UCMD (Demir et al. Mutations in COL6A3 cause severe and mild phenotypes of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1446-58. Giusti et al. Dominant and recessive COL6A1 mutations in Ullrich scleroatonic muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2005; 58: 400-10.)。在患者 2 体内，*COL6A1* 外显子 9 的序列分析表明杂合性中存在 15 个核苷酸缺失（横跨登录号 AJ011932 的核苷酸 35.374-35.388，对应于包括 *COL6A1* 基因外显子 1-20 的基因组克隆；登录号 NM_001848 的核苷酸 921-936，对应于 *COL6A1* 转录子）。在患者 4 体内，*COL6A1* 外显子 9 的序列分析

表明杂合性中存在 G→A 变异（登录号 AJ011932 的核苷酸 35.400；登录号 NM_001848 的核苷酸 850）。未提供患者 3 的基因分析结果，其表现出 UCMD 的典型临床和免疫组织化学特征。

这五名患者代表了 UCMD 的不同严重程度范围：全部为先天发作；三人（患者 2、3 和 5）从来不能站立和行走；一人（患者 4）只能在支撑下站立；一人（患者 1）能够行走。胶原 VI 的减少从轻微（患者 1 和 4），到显著（患者 2 和 3），再到完全缺乏（患者 5）。突变影响了三个个案（患者 2、4 和 5）中的 *COL6A1* 基因和一个个案（患者 1）中的 *COL6A3* 基因，一个个案（患者 3）中则不明确。

在征得患者同意并获得伦理委员会批准之后，得到了来自五名患者和一名健康志愿者的四头肌肌肉活体组织。使用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)方法评估凋亡率。从肌肉活体组织制备七微米厚的冷冻切片，并在 50%丙酮-50%甲醇中固定。使用 Apoptag 原位凋亡检测试剂盒(Chemicon)进行 TUNEL。样品用过氧化物酶-二氨基联苯胺染色，显示 TUNEL-阳性核，并用 Hoechst 33258(Sigma)复染，标记所有核。使用安装有数码相机的 Zeiss Axioplan 显微镜（40 倍放大）在随机选择的视野中确定核的总数和 TUNEL-阳性核的数目。数据以平均值±S.D 的形式表示。用非配对 Student t 检验分析数据，认为 $P<0.01$ 的数值显著。结果显示，与健康供体相比，所有患者样本中凋亡核的频率要高得多，对于患者 1、2 和 3，其数值约增加 10 倍，对于患者 4 和 5，增加超过 200 倍。凋亡增加与所有患者的肌肉活体组织切片中胶原 VI 表达显著下降相对应，如用针对胶原 VI 的选择性抗体染色所证明的。

进行实验测试胶原 VI 缺乏和凋亡之间是否存在因果关系。从两名未患病的对照和患者 1、2、3 和 4 的肌肉活体组织切片，通过酶和机械处理，并在补加 20%胎牛血清、青霉素、链霉素和两性霉素 B(Sigma)的 Dulbecco 修正 Eagle 培养基(DMEM)上涂布，制备成肌细胞培养物。为了测试凋亡，细胞在 50%丙酮-50%甲醇中固定，并处理以用于使用 Dead End 荧光 TUNEL 系统(Promega)进行 TUNEL 分析。通过用 Hoechst 33258 染色，显示所有核。来自所有患者的培养物与健康供体相比，表现出更高的凋亡发生率。在胶原 VI 上涂布或用环孢霉素 A 处理可将患者样品中凋亡发生率

完全正常化。来自患者 2、3 和 4 的肌肉细胞培养物如预期地显示出较低水平的胶原 VI 到几乎没有胶原 VI，如之前在患者 1 和 5 中所示 (Demir et al. 2002. Giusti et al. 2005)。

要评估胶原 VI 和 CsA 的抗凋亡作用是否能上溯至线粒体，研究了活体肌肉细胞培养物中的线粒体功能。如同预期的，向建立自健康供体的培养物中加入寡霉素没有引起线粒体去极化，而加入质子载体羰基氰化物-对-三氟甲氧基苯胺则可立刻引起线粒体去极化。改为向来自所有 UCMD 患者的细胞中加入寡霉素之后产生了线粒体去极化。明显地，用环孢霉素 A 或胞内 Ca^{2+} 螯合剂 BAPTA-M，或在胶原 VI 上涂布细胞，可将寡霉素的响应完全恢复正常，表明 UCMD 的发病机理与 PTP 有关。根据四甲基罗丹明甲酯(TMRM)的积累评估线粒体膜电位。要注意的是，预期在健康的呼吸细胞中加入寡霉素会引起超极化，其中线粒体膜电位通过呼吸链质子泵维持，而且用质子电化学梯度驱动 ATP 合成。因此，由寡霉素在 UCMD 成肌细胞培养物中诱导的线粒体去极化是反常响应，说明膜电位不是由呼吸维持，而是通过线粒体 ATP 合成酶“反向”工作，将质子从基质泵至膜间空间，从而消耗糖酵解的 ATP。

通过电镜研究了建立自健康供体和患者 1、2 和 3 的肌肉细胞培养物。在 UCMD 样品中，患者 1、2 和 3 体内的线粒体面积/周长比例明显增加，分别比健康供体高 62.5、75 和 50% ($p < 0.05$)。这一发现说明在 UCMD 肌肉细胞中，线粒体拉长显著少于正常样本。还观察到，与对照相比 ($< 300 \text{ nm}$)，患者中 4-8% 的线粒体的短轴值增加 ($> 400 \text{ nm}$)。综上所述，这些发现表明在 UCMD 细胞中存在尺度增加的线粒体部分。来自 UCMD 患者的细胞中有较小百分比 (在 4 和 5% 之间，来自健康供体的细胞为 1%) 还显示有肿胀的线粒体，伴有低密度基质，而且缺少嵴。明显地，当 UCMD 细胞在胶原 VI 上涂布时，面积/周长比例和短轴值变得与健康供体相似；而在胶原 VI 上涂布或用环孢霉素 A 处理可将具有肿胀线粒体的细胞的数目降至来自健康供体的培养物中观察到的数值。

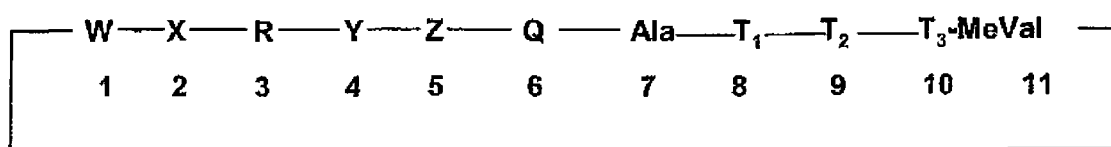
用 FIFO ATP 合成酶抑制剂寡霉素处理培养物可将对照中具有肿胀线粒体的细胞百分比增加至 4%，UCMD 患者中则超过 40%，这一发现表明存在能由寡霉素选择性放大的潜在线粒体功能障碍，如前面胶原 VI 缺陷

小鼠模型所表明的。寡霉素的作用可以通过用环孢霉素 A 处理而阻止,使具有肿胀线粒体的细胞百分比恢复至与所有细胞培养物的基础数值相似。非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物 $[D\text{-MeAla}]^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$ 在防止来自 UCMD 患者的细胞出现寡霉素依赖型线粒体去极化上和环孢霉素 A 一样有效,并将凋亡发生率恢复至来自健康供体的细胞所表现的水平。在实施例 1 中讨论了得出这些发现的实验。

明显的是,可以从具有 UCMD 临床症状的患者的原代培养物中发现线粒体缺陷,无论原代基因缺陷是在 *COL6A1* 还是 *COL6A3* 基因中,而且潜在的线粒体异常并不预测临床症状严重性。这些发现表明,线粒体与所有 UCMD 个案的发病机理有关,而且有其他基因和/或环境因素在个体对肌肉纤维死亡和再生的易感性中起作用。所有线粒体异常和随之而来的凋亡可以通过将 UCMD 细胞涂布在胶原 VI 上或将它们接触环孢霉素 A 而治愈。这些发现证明,从原理来讲,遗传病变下游的发病链可以由合适的药物阻断,至少在早期可以阻断。公知环孢霉素 A 可以引起免疫抑制,这是对患者进行长期治疗的主要障碍。本发明发明人关键的观察结果是,非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物 $[D\text{-MeAla}]^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$ 在减轻 UCMD 细胞中的线粒体障碍和降低凋亡率时,与环孢霉素 A 一样有效。这一发现证明,环孢霉素的免疫抑制活性与其细胞保护作用无关,可以为受胶原 VI 失调影响的患者提供新的药理学治疗。

根据这些发现,本发明涉及式 I 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物,更优选式 I 的非免疫抑制性环孢霉素 A,和最优选式 III 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物 $[D\text{-MeAla}]^3\text{-[EtVal]}^4\text{-CsA}$ 用于减轻 UCMD 患者细胞中线粒体障碍和凋亡率的用途。

式 I



其中

W 是 MeBmt、二氢-MeBmt、8'-羟基-MeBmt 或 O-乙酰基-MeBmt,

X 是 α Abu、Val、Thr、Nva 或 O-甲基苏氨酸(MeOThr),
 R 是 Pro、Sar、(D)-MeSer、(D)-MeAla 或(D)-MeSer(O 乙酰基),
 Y 是 MeLeu、硫代 MeLeu、 γ -羟基-MeLeu、MeIle、MeVal、MeThr、
 MeAla、Mealle 或 MeaThr; N-乙基 Val (EtVal)、N-乙基 Ile、N-乙基 Thr、
 N-乙基 Phe、N-乙基 Tyr 或 N-乙基 Thr(O 乙酰基), 其中 R 为 Sar 时 Y 不
 能为 MeLeu,

Z 是 Val、Leu、MeVal 或 MeLeu,

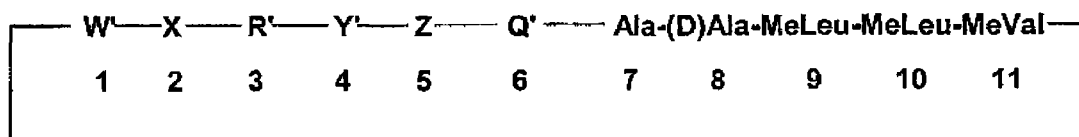
Q 是 MeLeu、 γ -羟基-MeLeu、MeAla 或 Pro,

T₁ 是(D)Ala 或 Lys,

T₂ 是 MeLeu 或 γ -羟基-MeLeu, 和

T₃ 是 MeLeu 或 MeAla。

式 II



其中

W' 是 MeBmt、二氢-MeBmt 或 8'-羟基-MeBmt,

X 是 α Abu、Val、Thr、Nva 或 O-甲基苏氨酸(MeOThr),

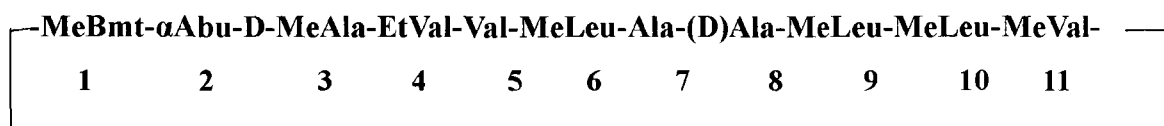
R' 是 Sar、(D)-MeSer、(D)-MeAla 或(D)-MeSer(O 乙酰基),

Y' 是 MeLeu、 γ -羟基-MeLeu、Melle、MeVal、MeThr、MeAla、Mealle
 或 MeaThr; N-乙基 Val (EtVal)、N-乙基 Ile、N-乙基 Thr、N-乙基 Phe、N-
 乙基 Tyr 或 N-乙基 Thr(O 乙酰基), 其中 R 为 Sar 时 Y 不能为 MeLeu,

Z 是 Val、Leu、MeVal 或 MeLeu,

Q' 是 MeLeu、 γ -羟基-MeLeu 或 MeAla。

式 III



其中 MeBmt 是 N-甲基-(4R)-4-丁-2E-烯-1-基-4-甲基-(L)苏氨酸, α Abu

是 L- α -氨基丁酸, D-MeAla 是 N-甲基-D-丙氨酸, EtVal 是 N-乙基-L-缬氨酸, Val 是 L-缬氨酸, MeLeu 是 N-甲基-L-亮氨酸, Ala 是 L-丙氨酸, (D)Ala 是 D-丙氨酸, 而 MeVal 是 N-甲基-L-缬氨酸。

可以使用非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物体外抑制由 UCMD 患者活体组织切片制备的肌肉细胞的凋亡。抑制凋亡的发现可以作为说明用非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物治疗患者有效减轻了疾病严重程度的指标。

本发明还涉及式 I 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物, 更优选式 II 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物, 和最优选式 III 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物 [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 用于治疗 UCMD 患者的用途。活性化合物, 例如非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物, 可以通过便利的途径给药。可以肠道外给药, 例如以注射溶液或混悬液的形式, 或者以可注射沉降制剂的形式给药。优选地, 通过饮用的溶液或混悬液、片剂或胶囊的形式口服给药。实施例中描述了包含非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物 [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 的口服给药的药物组合物。如实施例所证明的, 这些药物组合物通常包含优选的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物和一种或更多可药用的载体物质。合适的药用载体在例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1990) 中描述, 所述文献为本领域标准的参考文本。有时将这些组合物浓缩, 并在给药前需要与合适的稀释剂例如水混合。肠道外给药的药物组合物通常还包括一种或更多赋形剂。可选的赋形剂包括等渗剂、缓冲液或其他控制 pH 的试剂, 和防腐剂。可以为保持组合物和获得优选的 pH 范围(约 6.5-7.5) 和渗透浓度(约 300 mosm/L) 而加入这些赋形剂。

用于口服的环孢霉素制剂的其他实例可以在美国专利 5,525,590 和 5,639,724 和美国专利申请 2003/0104992 中找到。通过口服进入, 非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物每天给药的或每周三次给药的指定剂量可以从约 1 mg/kg 至约 100 mg/kg, 优选从约 1 mg/kg 至约 20 mg/kg。通过静脉途径, 相应的指定剂量可以从约 1 mg/kg 至约 50 mg/kg, 优选从约 1 mg/kg 至约 25 mg/kg。有效量的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物应理解为在治疗期间对 UCMD 患者反复给药时, 产生目的临床反应, 比如改善、稳定或疾病发展进程减缓。这些临床反应可以通过, 例如定量等长肌力(QIS)测试进行

评价。QIS 可以在压力传感和记录设备的辅助下，客观评价肌肉力量。可替换地，凋亡率的正常化可以通过本领域技术人员已知的生物化学和免疫组织化学方法在肌肉活体组织切片中进行评价。最后，可以使用肌电图，其显示肌肉图而不是神经图，其可以量化。

进行初始的 I 期临床研究，评价[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 口服剂量的安全性，并确定药物的药物动力学性质和安全性。研究显示，水中微乳液 50 至 1600 mg 的剂量可以很好地耐受。观察到有轻微而短暂的副作用，包括恶心、呕吐、腹痛和轻微头痛。这些副作用不是剂量相关型的。

在为测试本发明包含式 I、II 或 III 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物药物组合物效果而确定试验剂量时，临床医生会考虑很多因素。其中最主要的是非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物的毒性和半衰期。其他因素包括患者的体形大小、患者的年龄、患者的概况（包括机械通气、疾病的临床阶段、症状的严重程度）、患者体内是否有其他药物等。治疗过程需要将本发明的药物组合物反复给药。通常，每天约按足够的剂量给药一次。因为疾病的遗传性质，治疗可能需要持续很长时间，可能是患者的一生。

目前已知还没有 UCMD 的有效药理学治疗。通过接种疫苗支持患者对抗流行性感冒和肺炎球菌感染，并用抗生素激进地治疗任何感染。因此，除了非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物，本发明的药物组合物可以包含一种或更多其他活性组分，比如，例如，一种或更多的抗生素。环孢霉素 A 衍生物和这些其他活性组分可以作为相同药物组合物的一部分一起给药，或者可以作为为获得所有活性组分的益处而设计的适当剂量方案的一部分而单独给药。适当剂量方案、每次给药的剂量和每种活性组分剂量之间的具体间隔将取决于使用的活性剂的具体组合、要治疗的患者的条件和前面部分中讨论的其他因素。这些其他活性组分通常将以与已知作为单独的治疗剂而有效的量的相同量给药。公众可以获得已经获得 FDA 批准的对人用药的这些活性剂的 FDA 批准剂量。

本发明还涉及式 I 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物，更优选式 II 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物，和最优式 III 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 用于减轻 BM 患者细胞中线粒体功能障碍和降低凋亡率的用途。此外，本发明还涉及患者中 BM 的治疗方法，

其包含对患者施用有效量的式 I 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物, 更优选式 II 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物, 和最优选式 III 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA。此外, 本发明还涉及式 I、II 或 III 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物在用于生产治疗 BM 的药物中的用途。最后, 本发明涉及治疗 BM 的药物组合物, 其包含有效量的式 I、II 或 III 的非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物, 可药用的载体和, 可选地, 赋形剂和稀释剂。

本文引用的所有专利、专利申请和出版物应该视为通过引用全部并入本文。

本发明进一步由下述实施例详细阐述。实施例为向本领域技术人员说明而提供, 并不意欲将发明范畴限定于权利要求所述内容。因此, 本发明不应该理解为受所提供实施例的限定, 而应该理解为包括因为本文提供教导而显而易见的任何和全部变化。

实施例

实施例 1: 环孢霉素 A 和非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物 [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 对来自 UCMD 患者的成肌细胞培养物的线粒体 TMRM 荧光 (线粒体膜电位的度量) 和凋亡发生率的影响。

图 1 的 A 和 B 表明, 来自 UCMD 患者 1(A)和 4(B)的成肌细胞中线粒体膜电位是时间的函数。根据四甲基罗丹明甲酯(TMRM)的积累测定线粒体膜电位。将成肌细胞接种于 24 mm 圆形盖玻片上, 并在补加 20% FCS 的 DMEM 中生长两天。因此, 载入电位滴定探针的线粒体和细胞的范围受质膜多药物抗性泵的活性影响, 所述泵受环孢霉素 A 抑制。因此用环孢霉素 A 治疗可能引起线粒体荧光增加, 其会被错误理解为线粒体膜电位的增加。为了避免这样的假象并将载入条件标准化, 在 1.6 μ M 环孢霉素 H 存在的情况下进行实验, 环孢霉素 H 可以抑制多药物抗性泵, 但不影响 PTP。对于线粒体膜电位的测定, 将细胞漂洗一次, 然后在补加 1.6 μ M 环孢霉素 H 并载入 10 nM TMRM 的无血清 DMEM 中培育 30 分钟。在每次实验末期, 通过加入 4 μ M 质子载体羰基氰化物-对-三氟甲氧基苯腈(FCCP)而使线粒体完全去极化。用安装有用于落射照明的氙光源(75W)和 12 比特

数字致冷 CCD 照相机(Micromax, Princeton Instruments)的 Olympus IX71/IX51 倒置显微镜获得细胞荧光图像。对于荧光检测,使用 568 $\pm$ 25 nm 带通激发和 585 nm 长通发射过滤器设置。使用 40 X、1.3 NA 的油浸物镜(Nikon),用 100 毫秒的曝光时间收集图像。使用 Cell R 软件(Olympus)收集并分析数据。将几个(10-30)线粒体组成的簇确定为目的区域,将不包含细胞的视野作为背景。每 2 分钟获得连续的数字图像,记录并保存平均荧光强度,用于后面的分析。在图 A 和 B 所示的实验中,如讨论的将玻片上的细胞载入 TMRM,在箭头指示的位置,在不进行进一步处理(空心符号)或用 1.6 μ M 环孢霉素 A(实心方块)或 1.6 μ M [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA(实心三角)处理 30 分钟后,加入 6 μ M 寡霉素(寡)和 4 μ M FCCP。图 1 的 C: 在不进行进一步处理(基础)或用 1.6 μ M 环孢霉素 A 或 1.6 μ M [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 处理培育 2 小时后,将来自患者 1(P1)和 4(P4)的成肌细胞在塑料碟上培育,并计数存在的 TUNEL-阳性核。数据为至少四次独立实验的 $\pm$ S.D 的平均值。(*),与基础条件相比, $P<0.01$ 。如前所述评价凋亡情况。

图 1 中报告的结果证明,在防止来自 UCMD 患者的细胞中产生寡霉素依赖型线粒体去极化和将凋亡发生率恢复至来自健康供体的细胞所显示的水平中,非免疫抑制性环孢霉素 A 衍生物[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 与环孢霉素 A 一样有效。

实施例 2: [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 的合成

(翻译自 Jean Francois Guichou 题为“De nouveaux analogues de Cyclosporin A comme agent anti-VIH-1”的博士论文, Faculte des Sciences, University of Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland (2001))。

实例 A:

H-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(Oac)-Abu-Sar-OMe 的合成:

向环孢霉素 A(CsA)(8.3 毫摩尔; 10 g)的 100 ml 乙酸酐溶液加入 4-二甲基氨基吡啶(DMAP) (41.5 毫摩尔; 5.8 g)。室温搅拌溶液 18 小时。然后用 600 ml 乙酸乙酯稀释反应混合物,并用水洗涤两次,用碳酸氢钠饱和水溶液洗涤四次。将有机相通过无水 Na₂SO₄ 干燥,过滤,减压蒸发溶剂。

获得的黄色残余物在硅凝胶上进行色谱分析（洗脱剂：98:2 的二氯甲烷/甲醇）并在醚中重结晶。回收得到 9.5 g MeBmt(OAc)-CsA，其为白色粉末，得率为 92%。

向 MeBmt(OAc)-Cs(7.5 毫摩尔；9.4 g)的 60 ml 二氯甲烷溶液加入三甲基氧鎢四氟硼酸（22.5 毫摩尔；3.3 g）。室温放置 16 小时后，加入 35 ml 0.26 M 甲醇钠的甲醇溶液。1 小时后，加入 35 ml 甲醇和 35 ml 2 N 硫酸，将反应混合物再搅拌 15 分钟，用饱和 KHCO_3 (28 ml)中和至 pH 6.0，并用乙酸乙酯萃取两次。用饱和 NaCl 洗涤两次有机相，通过无水 Na_2SO_4 干燥并过滤。然后，减压蒸发溶剂。残余物在硅凝胶上进行色谱分析（洗脱剂：5:1 乙酸乙酯 / 甲醇）。得到 7.3 g H-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe（得率：76%）。

HPLC t_r =268.23 mn(98%)

ES/MS: m/z : 1277.5 $[\text{M}+\text{H}^+]$, 639.2 $[\text{M}+2\text{H}^+]$

实例 B:

H-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe 的合成:

向

H-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe(4.6 毫摩尔；7 g)的 48 ml 四氢呋喃溶液中加入 DMAP（2.3 毫摩尔；334 mg）和异硫氰酸苯酯（6.9 毫摩尔；0.75 ml）。2 小时后，将溶剂蒸发，并将粗产物在硅凝胶上进行色谱分析（洗脱剂：9:1 叔丁基甲醚(MTBE)/乙酸乙酯(1)；9:1 MTBE/甲醇(2)）。得到 5.8 g Ph-NH-C(S)-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe（90%得率）。

向后者化合物(4 毫摩尔；5.6 g)的 290 ml 二氯甲烷溶液中加入 13.8 ml 三氟乙酸。反应 1 小时后，使用 KHCO_3 中和，并用 500 ml 二氯甲烷稀释。用饱和 NaCl 洗涤两次有机相，通过无水 Na_2SO_4 干燥并过滤。然后，减压蒸发溶剂。残余物在硅凝胶上进行色谱分析（洗脱剂：9:1 MTBE/乙酸乙酯(1)；3:1 MTBE/甲醇(2)）。得到 2.8 g H-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-

MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe (61%得率)。

HPLC t_r =25.80 mn (99%)

ES/MS: m/z : 1050.5 $[M+H^+]$, 547.7 $[M+2H^+]$

实例 C:

Boc-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-NMe-CH₂-CH₂-OH 的合成:

在惰性气氛下, 向 H-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe (0.87 毫摩尔; 1.00 g)、DIPEA (2.78 毫摩尔; 0.48 ml) 和 Boc-D-MeAla-EtVal-OH (0.96 毫摩尔; 0.32 g) 的 15 ml 二氯甲烷溶液中加入氟-N,N,N'-四甲基甲脒六氟磷酸酯(TFFH) (0.96 毫摩尔; 0.25 g)。15 分钟后, 将二氯甲烷蒸发, 并将残余物溶于乙酸乙酯。用饱和 NaHCO₃ 溶液、10%的柠檬酸溶液和饱和 NaCl 溶液先后洗涤有机相, 然后通过无水 Na₂SO₄ 干燥并浓缩。在硅凝胶上的色谱(洗脱剂: 98:2 乙酸乙酯/甲醇)纯化得到 1.14 g(90%)

Boc-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe。

将后面的产物 (0.64 毫摩尔; 0.93 g) 溶于 45 ml 无水甲醇, 并历时 3 小时 30 分钟, 每隔 15 分钟加入少量硼氢化钠(25.5 毫摩尔; 0.96 g)。4 小时时, 将反应化合物冷却至 0°C, 通过加入 10%柠檬酸而水解并浓缩。将残余物溶于乙酸乙酯。用 10%柠檬酸溶液和饱和 NaCl 溶液洗涤有机相, 通过无水 Na₂SO₄ 干燥并浓缩。在硅凝胶上进行色谱(洗脱剂: 95:5 乙酸乙酯/甲醇)纯化后, 得到 0.63 g(81%)

Boc-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-NMe-CH₂-CH₂-OH。

ES/MS: m/z : 1434.9 $[M+H^+]$, 717.9 $[M+2H^+]$

实例 D:

H-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-Abu-OH 的合成:

向 Boc-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-NMe-CH₂-CH₂-OH (0.425 毫摩尔; 610 mg) 的 42.5 ml 甲醇溶液加入甲磺酸 (3.18 毫摩尔; 2.060 ml), 将混合物加热至 50°C

并保持该温度。通过 HPLC 和质谱监控反应进程。80 小时后，将混合物冷却至 0°C，并通过加入 1 M NaHCO₃ 而水解。除去甲醇，并将残余物溶于乙酸乙酯。先用 1 M NaHCO₃ 溶液，然后用饱和 NaCl 溶液洗涤有机相，通过无水 Na₂SO₄ 干燥并浓缩。产物(557 mg)，

H-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-O-CH₂-CH₂-NHMe，用于下一步骤而无需纯化。

将产物 (0.42 毫摩尔; 557 mg) 溶解于 20 ml 甲醇中，并在惰性气氛下与甲醇钠 (1.26 毫摩尔) 的 1.26 ml 甲醇溶液合并。室温 18 小时后，将反应化合物冷却至 0°C，并滴加氢氧化钠 (4.2 毫摩尔; 168 mg) 的 5 ml 水溶液。室温 21 小时后，再次将反应物冷却至 0°C，并用 1 M KHSO₄ 中和。去除甲醇，并将残余物溶解于乙酸乙酯中。用半饱和 NaCl 溶液洗涤有机相，通过无水 Na₂SO₄ 干燥并浓缩。产物(335 mg; 64%)，

H-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-Abu-OH 在下一步骤中使用且无需纯化。

HPLC tr=26.27 mn (86%)

ES/MS: m/z: 1235.5 [M+H⁺], 618.2 [M+2H⁺]

实例 E: [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 的合成:

在惰性气氛下，向(7-氮杂苯丙三唑-1-酰氧基)三吡咯烷基磷六氟磷酸盐 (PyAOP, 0.486 毫摩尔; 254 mg) 的 3.2 升二氯甲烷溶液中滴加入 H-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-Abu-OH (0.162 毫摩尔; 200 mg) 和 sym 可力丁 (1.78 毫摩尔; 0.24 ml) 的 50 ml 二氯甲烷溶液。72 小时后，通过加入 10% Na₂CO₃ 溶液将反应混合物水解。将二氯甲烷蒸发，并将残余物溶于乙酸乙酯。用 0.1 N HCl 溶液和 NaCl 饱和溶液先后洗涤有机相，通过无水 Na₂SO₄ 干燥并浓缩。在硅胶上纯化粗产物，得到 110 mg(59%)[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA。

HPLC tr=30.54 mn (100%)

ES/MS: m/z: 1217.6 [M+H⁺], 609.3 [M+2H⁺]

实施例 3: [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 的口服制剂
量以重量百分比(w%w)表示。

实例 A:

[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 10

糖原质(Glycofurol) 75	35.95
中链三甘油酯(Miglycol) 812	18
聚氧乙烯醚(40)氢化蓖麻油	35.95
α -生育酚	0.1

实例 B:

[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	10
四甘醇	2
Captex 800	2
Nikkol HCO-40	85.9
丁基羟基甲苯 (BHT)	0.1

实例 C:

[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	10
糖原质 75	39.95
中链三甘油酯 812	14
聚氧乙烯醚(40)氢化蓖麻油	36
丁基羟基苯甲醚 (BHA)	0.05-0.1

实例 D:

[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	10
四甘醇	10
辛酸/癸酸三甘油酯	5
聚氧乙烯醚(40)氢化蓖麻油	74.9
α -生育酚	0.1

实例 E:

[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	10
乙醇	9
丙二醇	8
聚氧乙烯醚(40)氢化蓖麻油	41
甘油单亚油酸酯	32

对于制剂 A-D 中每种组分及制备方法参见英国专利申请 2,222,770。

实施例 4: 胶原 VI 敲除小鼠中 [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 的治疗效果
对一组四只胶原 VI 敲除小鼠 (*Col6a1*^{-/-}; 5-6 个月大; 性别平衡) 每天腹腔给药两次, 共 5 天, 给药剂量为 5 mg/kg [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA。对照组的四只动物用安慰制剂进行相似的治疗。在宰杀动物后, 收集每个动物的血液样品, 然后分离肝脏, 并从后腿分离肌肉, 处理制备线粒体, 用于钙保持能力(CRC)检测。同时, 分离横膈肌和屈趾短肌, 处理用于组织病理学和原位线粒体功能评价(线粒体跨膜电位)。所有体内实验都由合适的机构批准, 并根据机构的指导进行。

方法

线粒体的制备和 CRC 检测

如 Fontaine et al. 1998. J. Biol. Chem. 273: 25734-25740 和 Fontaine and Bernardi. 1999. J. Bioenerg. Biomembr. 31: 335-345 所述, 通过差速离心从肝脏和肌肉匀浆制备线粒体。在 Ca^{2+} 指示剂 Calcium Green-5N (Molecular Probes; 激发: 505 nm; 发射: 535 nm) 存在的情况下, 使用安装有磁力搅拌子和控温装置的荧光分光光度计评估线粒体制备物的 CRC。培养基包含 0.25 M 蔗糖、10 mM Tris-MOPS、5 mM 谷氨酸、2.5 mM 苹果酸、1 (肝脏) 或 10 (肌肉) mM Pi-Tris、20 μM Calcium Green-5N(pH 7.4)。

骨骼肌纤维的分离与培养和 TMRM 检测

如 Irwin et al. 2003. Nat. Genet. 35: 267-271 所述分离 FDB 纤维。将完整的肌纤维涂布在包被层粘蛋白($3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)的盖玻片上, 并在包含 10% 胎牛血清的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基中培养。就本实验而言, 将 FDB 纤维置于 1 ml Tyrode 缓冲液中, 并如 Irwin 等所述载入 20 nM TMRM(Molecular Probes)。使用 Olympus IX71/IX51 倒置显微镜获得线粒体 TMRM 荧光的图像。

TUNEL 检测

在 4% 多聚甲醛中固定和石蜡包埋后, 制备肌肉横膈的 7 μm 切片。使用 ApopTag 原位凋亡检测试剂盒(Intergen)进行 TUNEL。用过氧化物酶/二

氨基联苯胺将样品染色,检测 TUNEL 阳性的核,并用 Hoechst 33258(Sigma)复染,如 Irwin 等所述标记出所有核。使用安装有 Leica DC 500 照相机的 Zeiss Axioplan 显微镜,确定随机选择的纤维中核的总数和 TUNEL 阳性核的数目。

结果

[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 对通透性转换孔(PTP)的离体影响

在监控线粒体外 Ca^{2+} 的 Calcium Green-5N 存在的情况下,培育分离自用 [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 或安慰剂处理的 *Col6a1*^{-/-} 小鼠的肝脏和后腿肌肉的能化线粒体。然后施加 Ca^{2+} 脉冲系列,每次脉冲加至到达引起 PTP 打开的阈值浓度为止。这种操作可以对 PTP 增敏剂和脱敏剂的作用进行详细分析(Fontaine et al. 1998.)。结果显示,在用 [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 处理的小鼠肝脏和肌肉线粒体中,均出现了 PTP 对 Ca^{2+} 和 Pi 脱敏现象,显示 PTP 开放所需的 Ca^{2+} 阈值增加(图 2)。这种作用对于肌肉线粒体特别显著,CRC 接近直接向培养基加入 [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 可实现的最大水平。参见图 BII, d 线与 d'线。从对四只 [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 处理(小鼠 24-27)和四只安慰剂处理小鼠(小鼠 28-31)的线粒体的分析得出的结果概要示于图 3 中。

[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 对 FDB 纤维中线粒体跨膜电位的作用

通过四甲基罗丹明甲酯(TMRM)的线粒体荧光变化评估线粒体跨膜电位,TMRM 是一种荧光探针,可以在极化线粒体中积累,当跨膜电位降低时会释放出去。曾经表明,线粒体 F1F0-ATP 合成酶的抑制剂寡霉素可以显示 *Col6a1*^{-/-} 肌肉纤维中的线粒体功能障碍。向分离自安慰剂处理 *Col6a1*^{-/-} 小鼠的纤维加入寡霉素,大多数纤维中的 TMRM 荧光产生了预期的降低(图 4A)。体内用 [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 处理使观察到线粒体去极化的纤维数目显著降低(图 4B)。表 1 分别总结了用安慰剂或 [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 处理的每只个体小鼠的结果。

表 1: 加入寡霉素后的去极化纤维

组	小鼠 #	加入寡霉素后去极化的纤维数目	纤维总数
2 (安慰剂)	28	3	6
	29	6	8
	30	4	8
	31	5	9
1 ([D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA)	24	4	12
	25	2	8
	26	4	10
	27	0	10

[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 对横膈凋亡的作用

将来自 [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA (#24-27) 或安慰剂 (#28-31) 处理的 *Col6a1*^{-/-} 每只小鼠的横膈制成切片。通过 TUNEL 检测检查每只动物的二十至三十个切片。与用安慰剂处理的小鼠相比，来自用 [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 处理的小鼠的横膈纤维表现出凋亡核显著减少 (图 5)。用 [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 进行体内处理与 CsA 一样有效。

超微结构评估

将来自用 [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA (#24-27) 或安慰剂 (#28-31) 处理的 *Col6a1*^{-/-} 小鼠的横膈肌样品在牙科蜡支撑物上轻轻拉长，以防止在固定过程中收缩。为了固定，将样品在包含 2.5% 戊二醛的 0.1 M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中 4°C 培育 3 小时，在 0.15 M 磷酸盐缓冲液中过夜洗涤，在 1% 四氧化钬的巴比妥溶液中后固定，脱水并包埋在 Epon 812 环氧树脂中。用乙酸铀酰和柠檬酸铅将超薄切片染色，并在以 100 千伏工作的 Philips EM 400 透射式电子显微镜下观察。为了计学分析，研究了来自每个样品组织的三个不同块中的 300 条肌肉纤维 (图 6)。与对照小鼠 (#28-31) 相比，[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 处理小鼠 (#24-27) 中发生改变的显示有肿胀或电密内含物的线粒体的纤维数目显著降低。

对用包含 [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 的制剂或安慰剂制剂口服治疗的 *Col6a1*^{-/-} 小鼠进行了类似的实验。观察到来自 [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 治疗

动物的肌肉线粒体中 CRC 明显增加,说明环孢霉素引起了 PTP 去极化。此外,横膈肌切片上的 TUNEL 检测说明用[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 进行体内治疗可引起凋亡产生率显著降低。

实施例 5: [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA 对 UCMD 和 BM 患者的初步临床试验

有五名患者参加,其中四名 UCMD 患者,一名 BM 患者。患者分别在 COL6A1、COL6A2 或 COL6A3 基因发生变异。设计试验,测试用 CsA 治疗是否对于减轻线粒体功能障碍有效,这通过寡霉素引起肌肉纤维中线粒体去极化进行评估。根据 TMRM 荧光的变化检测去极化。用每日 5 mg/kg CsA 的口服剂量治疗患者,持续三十天。在治疗前和治疗后立即取肌肉活体组织,并处理用于 TMRM 检测。五名患者的平均结果表明,在治疗前,寡霉素诱导 90%肌肉细胞极化,但治疗后仅有 37%。因此,通过用寡霉素诱导的极化进行检测,用 CsA 进行短期治疗能够基本减轻线粒体功能障碍。

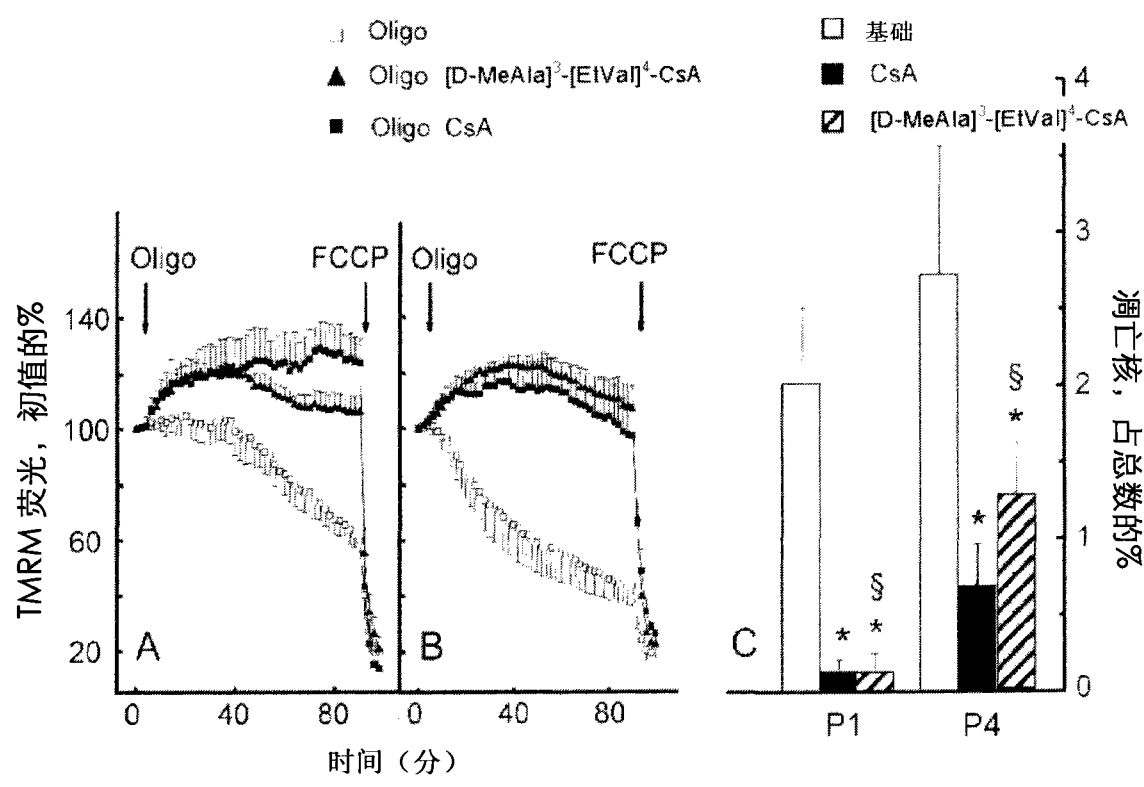


图 1

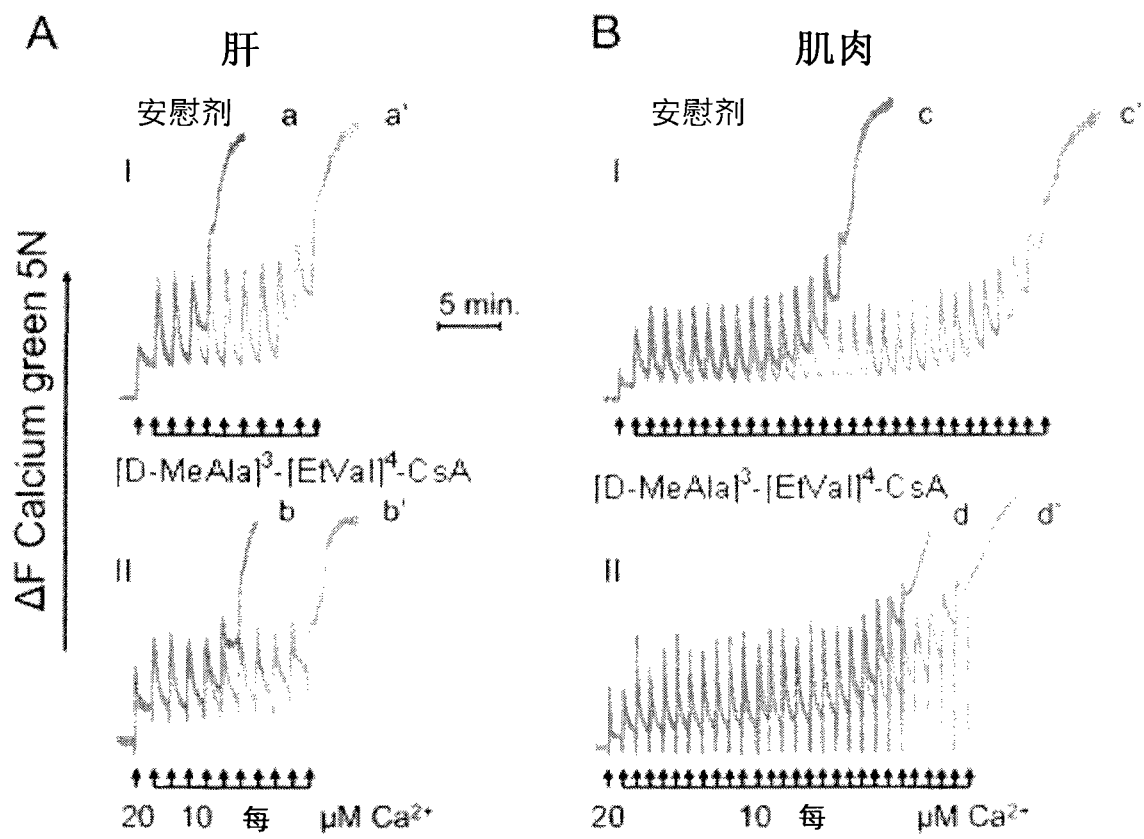


图 2

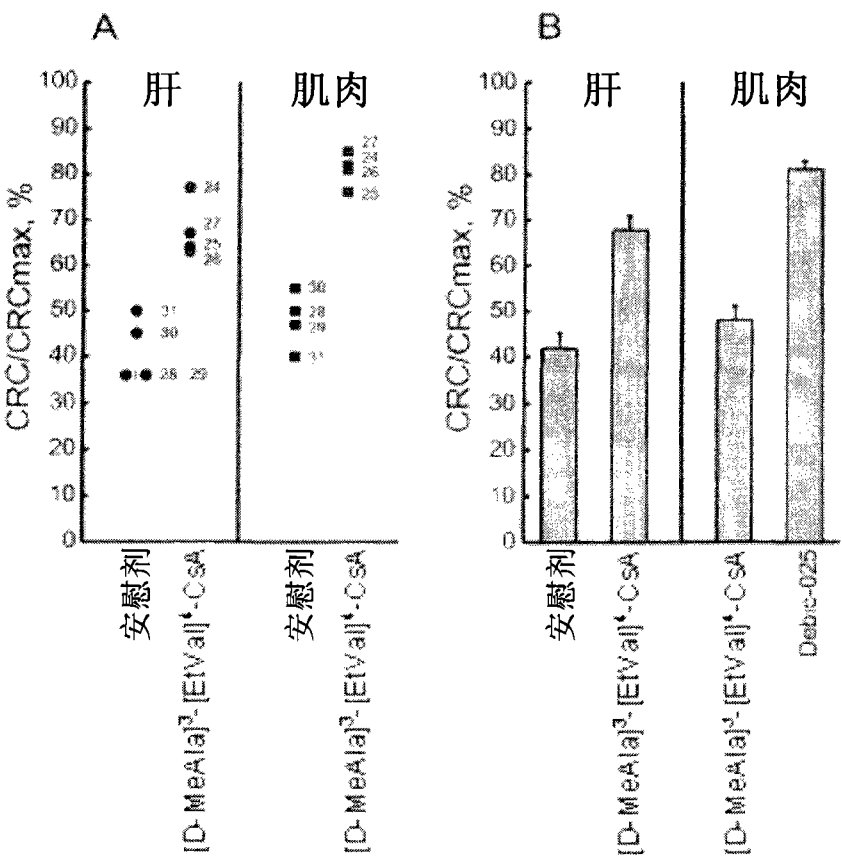


图 3

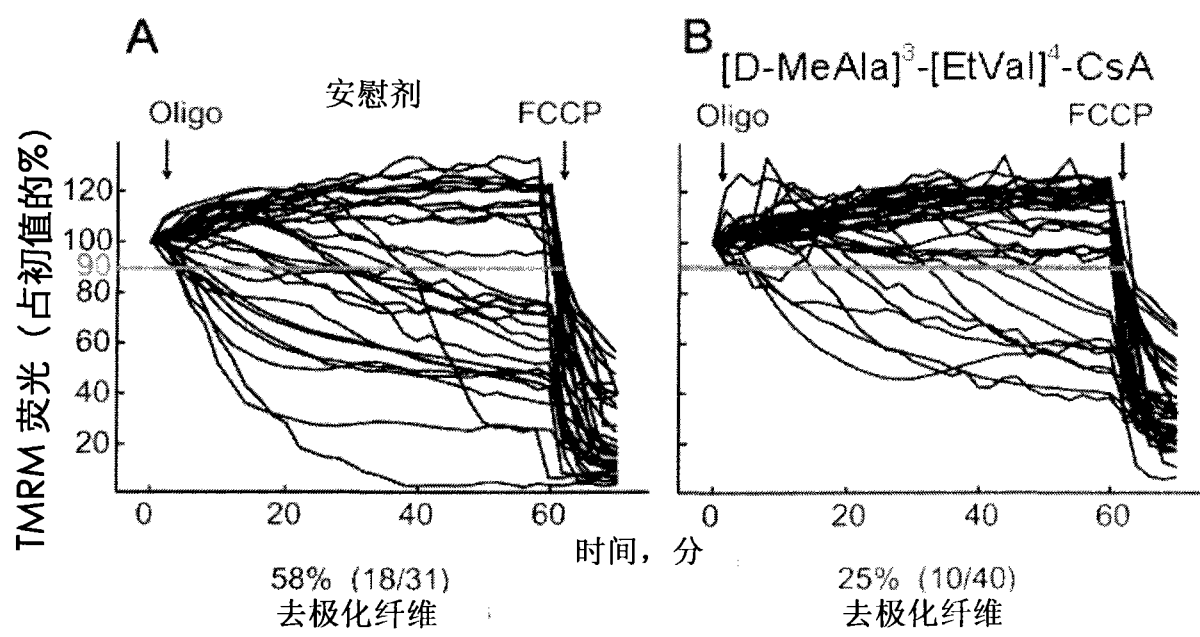


图 4

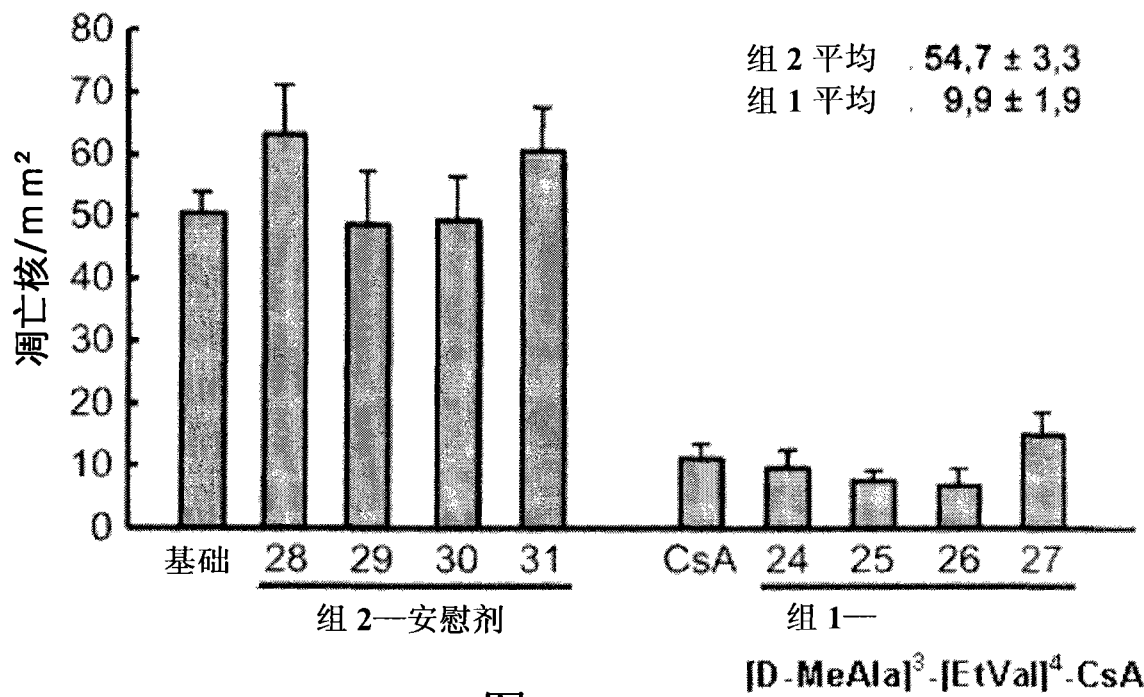


图 5

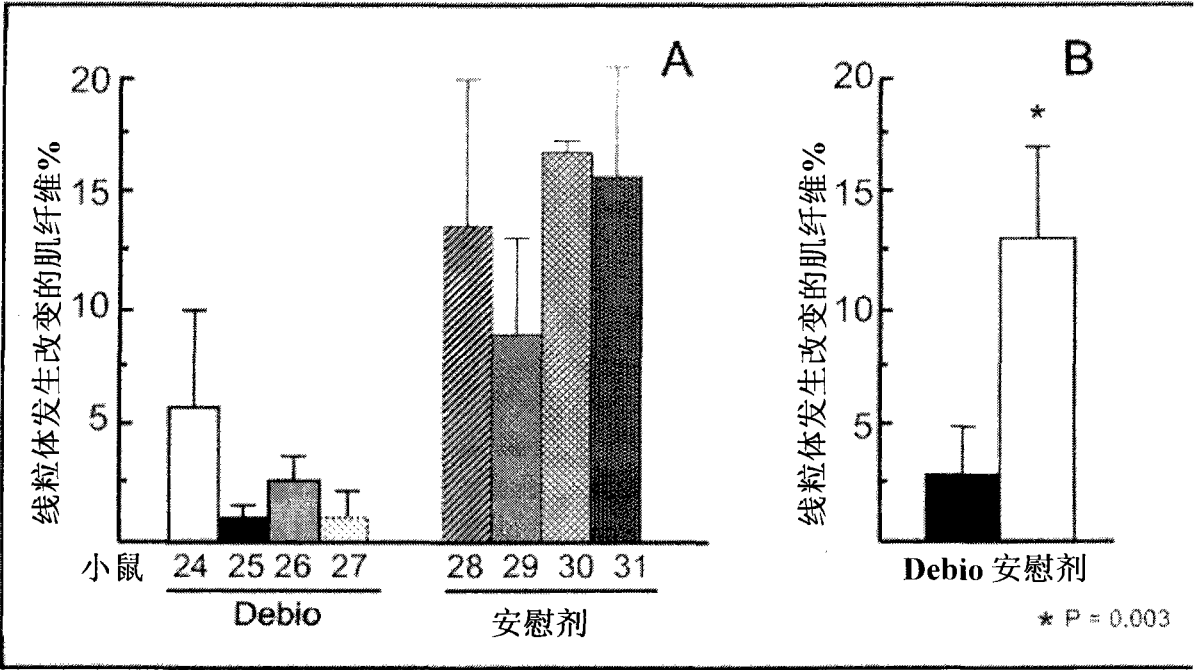


图 6