

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98812314.2

[51] Int. Cl.

C07F 9/54 (2006.01)

C07F 9/655 (2006.01)

C07F 9/572 (2006.01)

A61K 31/66 (2006.01)

A61K 31/665 (2006.01)

A61K 31/675 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 5 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 1318434C

[22] 申请日 1998.11.25 [21] 申请号 98812314.2

[30] 优先权

[32] 1997.11.25 [33] NZ [31] 329255

[86] 国际申请 PCT/NZ1998/000173 1998.11.25

[87] 国际公布 WO1999/026954 英 1999.6.3

[85] 进入国家阶段日期 2000.6.16

[73] 专利权人 安迪珀蒂恩生物工艺学有限公司

地址 新西兰奥克兰

[72] 发明人 M·P·墨菲 R·A·J·史密斯

[56] 参考文献

US3532667A 1970.10.6

审查员 田丁丁

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所

代理人 杜京英

权利要求书 5 页 说明书 16 页 附图 10 页

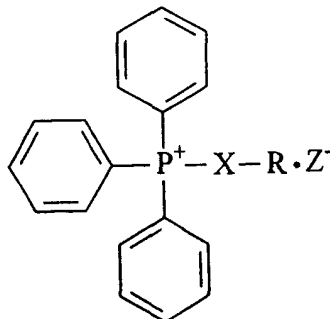
[54] 发明名称

线粒体靶向的抗氧化剂

[57] 摘要

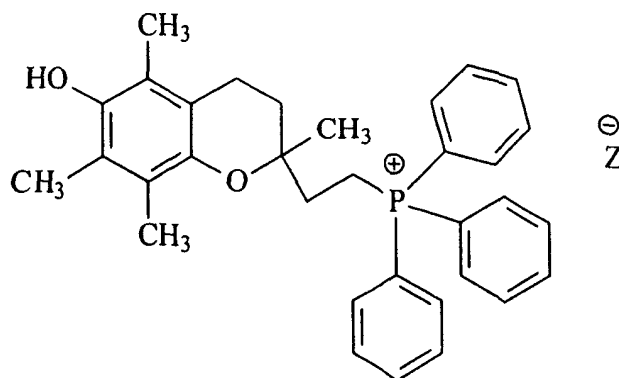
本发明提供了线粒体靶向的抗氧化剂化合物。本发明的化合物含有与抗氧化剂部分共价偶联的亲脂性阳离子。在优选的实施方案中，亲脂性阳离子是三苯基𬰷阳离子，所述化合物是式  $P(Ph_3)^+XRZ^-$  的化合物，其中 X 是连接基团，Z 是阴离子，R 是抗氧化剂部分。本发明还提供含有所述线粒体靶向的抗氧化剂化合物的药物组合物，以及对可以从减少氧化性应激反应中受益的患者进行治疗或预防的方法，该方法包括施用本发明化合物的步骤。

1. 线粒体靶向的抗氧化剂化合物，其中所述化合物具有如下结构式：



其中 X 是 (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>，n 是 1-6 的整数，Z 是可药用阴离子，以及 R 是抗氧化剂部分，所述抗氧化剂部分选自维生素 E、维生素 E 衍生物、链终止抗氧化剂，包括丁基化的羟基苯甲醚、丁基化的羟基甲苯、醇醌、游离基清除剂，包括衍生化的富勒烯、和自旋捕获剂，包括 5,5-二甲基吡咯啉-N-氧化物、叔丁基亚硝基苯、亚硝基苯、α-苯基-叔丁基硝酮的衍生物。

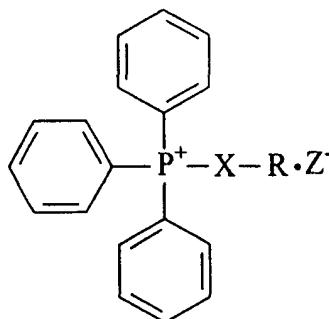
2. 权利要求 1 的化合物，其中 X 是亚乙基、亚丙基或亚丁基。
3. 权利要求 2 的化合物，其中 X 是亚乙基。
4. 根据权利要求 1-3 任一项的化合物，其中所述抗氧化剂部分能够通过线粒体膜被转运并且能够在完整细胞的线粒体内积聚。
5. 权利要求 1 的化合物，其中所述化合物具有如下结构式：



其中 Z 是可药用阴离子。

6. 权利要求 5 的化合物，其中 Z 是 Br。

7. 一种适于对可从减少氧化性应激反应中受益的患者进行治疗的药物组合物，所述组合物包含有效量的线粒体靶向的抗氧化剂和一种或多种可药用载体，其中所述线粒体靶向的抗氧化剂化合物具有如下结构式：

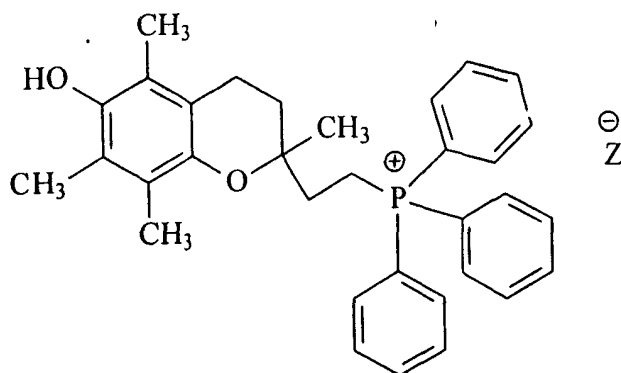


其中 X 是  $(CH_2)_n$ ，n 是 1-6 的整数，Z 是可药用阴离子，以及 R 是抗氧化剂部分，所述抗氧化剂部分选自维生素 E、维生素 E 衍生物、链终止抗氧化剂，包括丁基化的羟基苯甲醚、丁基化的羟基甲苯、醇醚、游离基清除剂，包括衍生化的富勒烯、和自旋捕获剂，包括 5,5-二甲基吡咯啉-N-氧化物、叔丁基亚硝基苯、亚硝基苯、 $\alpha$ -苯基-叔丁基硝酮的衍生物。

8. 权利要求 7 的药物组合物，其中 X 是亚乙基、亚丙基或亚丁基。

9. 权利要求 8 的药物组合物，其中 X 是亚乙基。

10. 权利要求 7 的药物组合物，其中所述线粒体靶向的抗氧化剂化合物具有如下结构式：



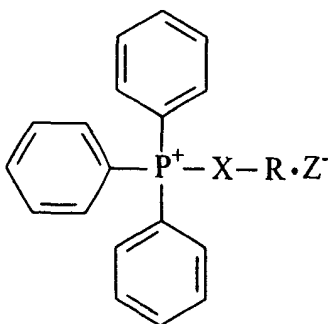
其中 Z 是可药用阴离子。

11. 权利要求 10 的药物组合物，其中 Z 是 Br。

12. 权利要求 7-11 任一项的药物组合物，其中所述患者患或者倾向于患帕金森氏症、早老性痴呆、亨廷顿氏舞蹈病、弗里德希氏共济失调、炎症、中风和/或心脏病发作和/或器官移植和/或手术过程中的局部缺血-再灌注组织损伤。

13. 权利要求 1-7 任一项所定义的线粒体靶向的抗氧化剂在制备用于治疗氧化性应激反应引起的疾病的药物中的应用。

14. 线粒体靶向的抗氧化剂化合物和一种或多种可药用载体或稀释剂在制备用于治疗或预防与氧化性应激反应有关的病症的药物中的应用，其中所述线粒体靶向的抗氧化剂化合物具有如下结构式：

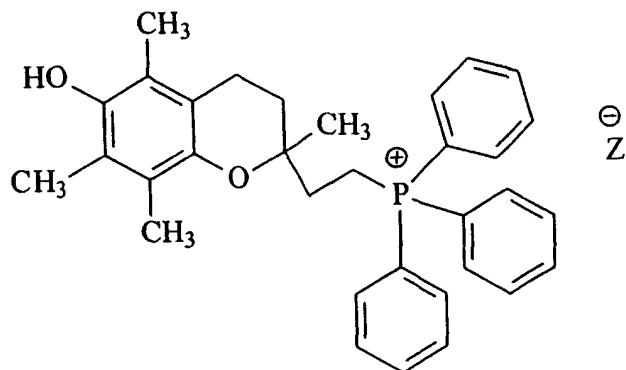


其中 X 是  $(\text{CH}_2)_n$ ,  $n$  是 1-6 的整数, Z 是可药用阴离子, 以及 R 是抗氧剂部分, 所述抗氧剂部分选自维生素 E、维生素 E 衍生物、链终止抗氧剂, 包括丁基化的羟基苯甲醚、丁基化的羟基甲苯、醇醌、游离基清除剂, 包括衍生化的富勒烯、和自旋捕获剂, 包括 5, 5-二甲基吡咯啉-N-氧化物、叔丁基亚硝基苯、亚硝基苯、 $\alpha$ -苯基-叔丁基硝酮的衍生物。

15. 权利要求 14 的应用, 其中 X 是亚乙基、亚丙基或亚丁基。

16. 权利要求 15 的应用, 其中 X 是亚乙基。

17. 权利要求 14 的应用, 其中所述线粒体靶向的抗氧剂化合物具有如下结构式:



其中 Z 是可药用阴离子。

18. 权利要求 17 的应用，其中 Z 是 Br。

19. 权利要求 13-18 的应用，其中所述病症为帕金森氏症、老年性痴呆、亨廷顿氏舞蹈病、弗里德希氏共济失调、炎症、中风和/或心脏病发作和/或器官移植和/或手术过程中的局部缺血-再灌注组织损伤。

## 线粒体靶向的抗氧剂

### 技术领域

本发明涉及带有亲脂性阳离子基团的抗氧剂以及这些抗氧剂作为药物等的用途。

### 发明背景

氧化性应激反应可引起多种与衰老有关的人类变性疾病，例如帕金森氏症、老年性痴呆以及亨廷顿氏舞蹈病和弗里德希氏共济失调，并可引起伴随衰老而逐渐增加的非特异性损伤。它还可以引起炎症以及中风、心脏病发作和器官移植和手术过程中的局部缺血-再灌注组织损伤。为了预防由氧化性应激反应引起的损伤，已开发了大量抗氧剂疗法。但是，其中的大部分疗法不能定向于细胞内，因此不能达到最佳效果。

线粒体是负责能量代谢的细胞内的细胞器。因此，线粒体的缺陷是损伤性的，特别是对于高能量需求的神经和肌肉组织。线粒体还是可在大部分细胞内引起氧化性应激反应的自由基和活泼氧物质的主要来源。因此，申请人确信，将抗氧剂选择性地传送到线粒体将比使用非靶向的抗氧剂更为有效。因此，本发明的目的是提供可靶向于线粒体的抗氧剂。

亲脂性阳离子因其带有正电荷而可以在线粒体基质中积聚 (Rottenberg, (1979) 酶学方法 (Methods Enzymol), 55, 547-560; Chen, (1988) 细胞生物学年鉴 (Annu Rev Cell Biol) 4, 155-181)。所述离子积聚的条件是它们具有足够的亲脂性以屏蔽正电荷或使其分散在很大的表面积上，此外还应当没有主动流出途径并且阳离子不能代谢或者对细胞直接产生毒性。

因此，本发明的目的是提供一种方法，该方法可以利用线粒体浓

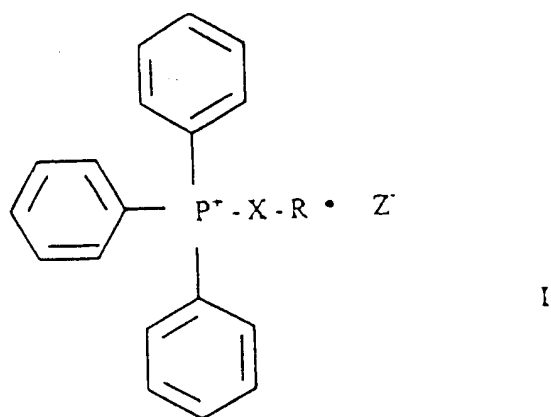
缩特定亲脂性阳离子的能力来摄入所连接的抗氧化剂，从而使抗氧化剂靶向于可引起氧化性应激反应的自由基和活泼氧物质的主要来源。

### 发明概述

广义地讲，本发明提供线粒体靶向的抗氧化剂，其含有与抗氧化剂部分共价偶联的亲脂性阳离子。

适宜的亲脂性阳离子是三苯基磷阳离子。

另一方面，本发明提供下式的线粒体靶向的抗氧化剂：



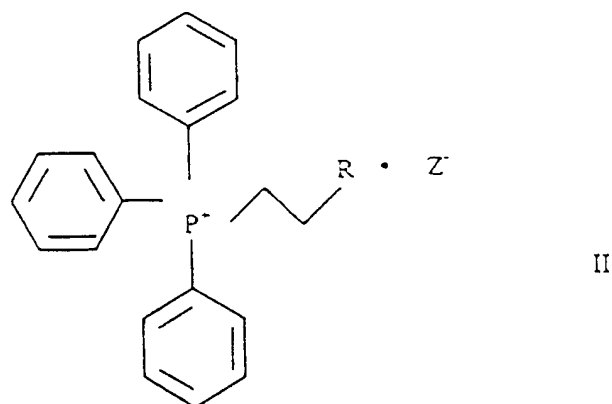
其中 Z 是阴离子，X 是连接基团，R 是抗氧化剂部分。

优选 X 是  $(CH_2)_n$ ，其中 n 是 1-6 的整数。

更优选 X 是亚乙基、亚丙基或亚丁基。

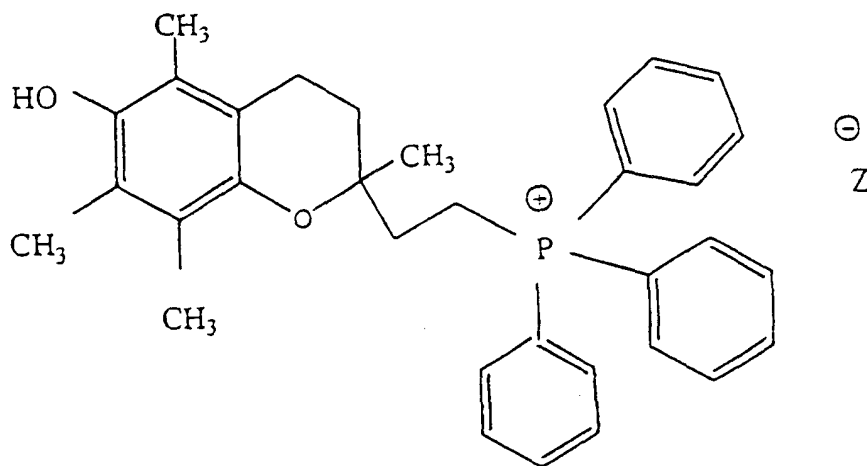
优选 Z 是可药用阴离子。

首选本发明的线粒体靶向的抗氧化剂具有如下结构式



优选 R 选自能够通过线粒体膜被转运并且能够在完整细胞的线粒体内积聚的抗氧化剂。

在一个特别优选的实施方案中，本发明的线粒体靶向的抗氧剂具有如下结构式



优选 Z 是 Br。

另一方面，本发明提供适于对可从减少氧化性应激反应中受益的患者进行治疗的药物组合物，所述组合物含有有效量本发明的线粒体靶向的抗氧剂和一种或多种可药用载体或稀释剂。

又一方面，本发明提供在细胞中减少氧化性应激反应的方法，该方法包括向所述细胞施用以上定义的线粒体靶向的抗氧剂的步骤。

再一方面，本发明提供对可从减少氧化性应激反应中受益的患者进行治疗或预防的方法，该方法包括向所述患者施用以上定义的线粒体靶向的抗氧剂的步骤。

尽管有以上的宽范围定义，但本发明不仅限于此，并且本发明也不仅限于以下说明书中所提供的实施例所构成的实施方案。

#### 附图描述

可以参照附图更好地理解本发明，其中：

图 1 是显示分离出的线粒体对化合物 1 (本发明的线粒体靶向的抗氧剂) 的摄取的图；

图 2 是显示分离出的线粒体对化合物 1 积聚的图；

图 3 是显示化合物 1 的摄取与三苯基磷阳离子 (TPMP) 的摄取相比

较的图;

图 4 是显示化合物 1 保护线粒体防止氧化损伤的图;

图 5 比较了化合物 1 和维生素 E 并显示了解偶联剂和其它亲脂性阳离子的影响;

图 6 是显示化合物 1 保护线粒体的功能防止氧化损伤的图;

图 7 显示了化合物 1 对线粒体功能的影响;

图 8 是显示细胞对化合物 1 的摄取的图;

图 9 是显示细胞对化合物 1 的能力增加(energisation)-敏感性摄取的图;

图 10 是显示化合物 1 对细胞活力影响的图。

## 发明详述

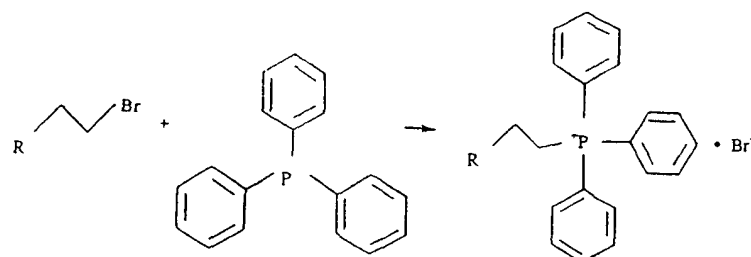
如上所述,本发明涉及线粒体靶向的化合物,主要目的是治疗和/或预防以减少氧化性应激反应。

线粒体在其内膜上的基础膜电位高达 180mV(内侧为负极)。由于该电位,膜渗透性的亲脂性阳离子在线粒体基质内积聚了数百倍。

申请人现已发现,通过将亲脂性阳离子(优选亲脂性三苯基磷阳离子)与抗氧化剂共价偶联,该化合物可传送到完整细胞内的线粒体基质。抗氧化剂于是靶向于细胞内自由基和活泼氧物质的主要生产位点,而不是随机的分散。

理论上,所有的亲脂性阳离子和所有的抗氧化剂均可用于形成本发明的化合物。但优选所述亲脂性阳离子是本文所例举的三苯基磷阳离子,所述亲脂性阳离子与抗氧化剂部分通过 1-6 个碳原子的直链亚烷基链连接;更优选通过亚乙基、亚丙基或亚丁基连接。根据本发明,其它可与抗氧化剂共价偶联的亲脂性阳离子包括三苺基铵或磷阳离子。

所述优选的抗氧化剂化合物很容易通过例如如下的反应制备:



通用的合成方案是将卤代的前体、优选溴代或碘代的前体 (RBr 或 RI) 在适宜的溶剂中与 2-3 当量的三苯膦一起在氩气氛下加热数天。然后以溴化物或碘化物盐的形式分离出磷化合物。为了分离化合物，蒸除溶剂，然后将产物用乙醚反复研制，直至得到米色的固体。然后将其溶于氯仿并用乙醚沉淀除去过量的三苯膦。重复该过程，直至该固体不再溶于氯仿。然后将产物用二氯甲烷/乙醚重结晶数次。

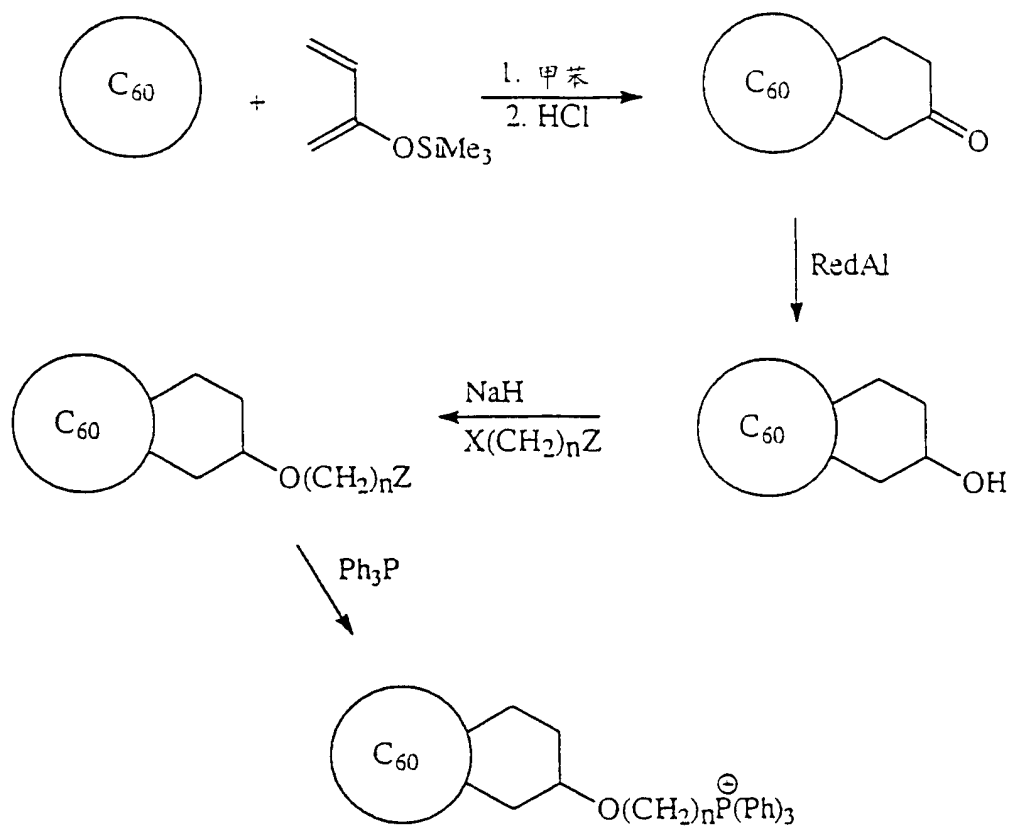
还应当理解，如需要，所制备的抗氧化剂化合物的阴离子 (当采用该合成方法时为卤素) 很容易与其它的药物阴离子或可药用阴离子通过离子交换、色谱或其它本领域已知的技术进行互换。

同一通用方法可用于生产多种带有不同的与三苯基磷 (或其它亲脂性阳离子) 盐相连接的抗氧化剂部分 R 的线粒体靶向化合物。其中包括维生素 E 衍生物系列，其中，连接维生素 E 功能基和三苯基磷盐的桥键的长度不同。可用作 R 的其它抗氧化剂包括链终止抗氧化剂，例如丁基化的羟基苯甲醚、丁基化的羟基甲苯、醇醌和一般的游离基清除剂如衍生化的富勒烯 (fullerenes)。此外，还可以合成可与自由基反应生成稳定自由基的自旋捕获剂。其中包括 5,5-二甲基吡咯啉-N-氧化物、叔丁基亚硝基苯、亚硝基苯、 $\alpha$ -苯基-叔丁基硝酮以及相关的化合物的衍生物。

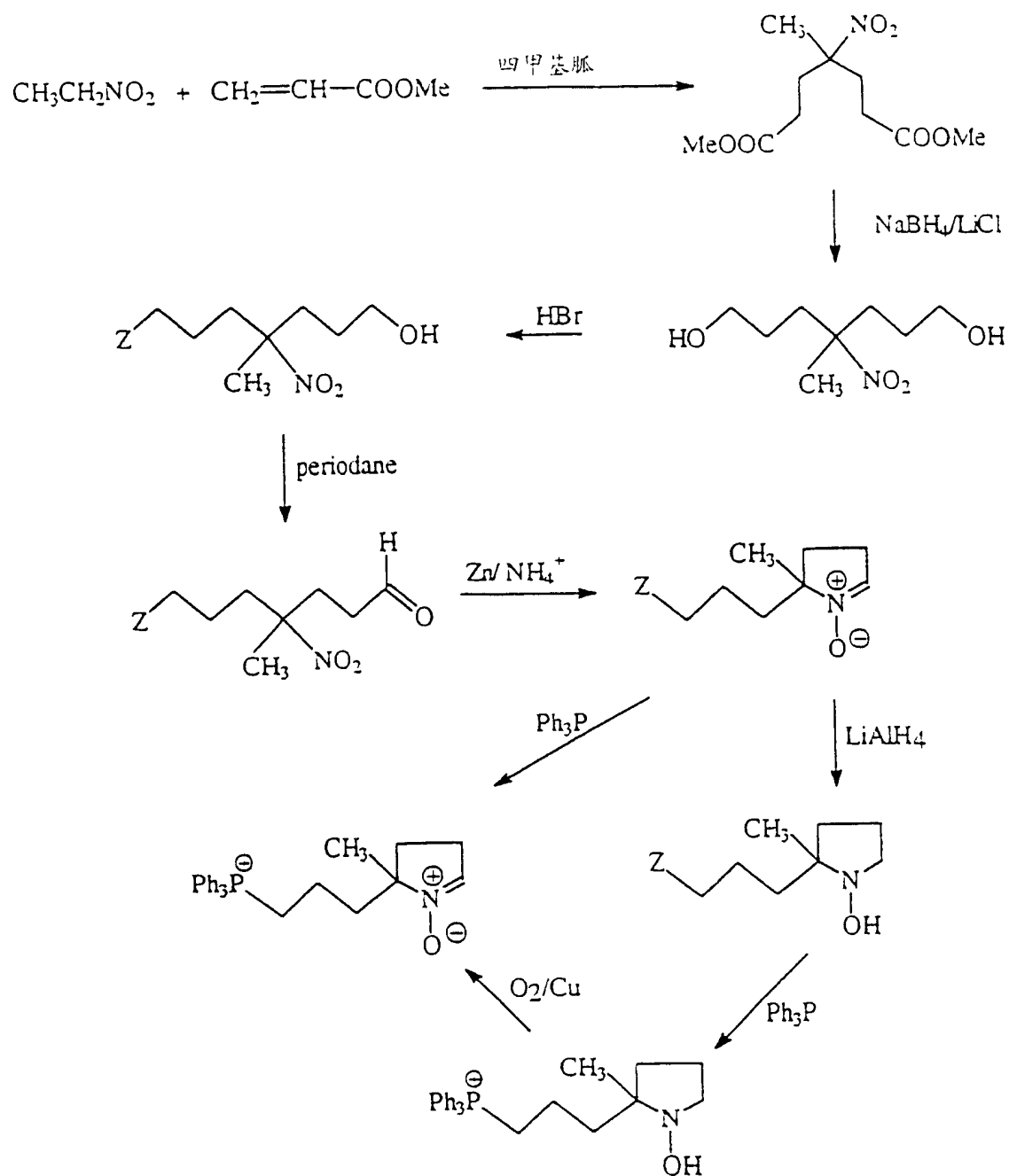
在制得本发明的抗氧化剂化合物后，可将其以任何药学上适宜的形式 (可选择性地含有可药用载体或添加剂) 向需要进行治疗和/或预防的患者给药。给药后，该化合物将靶向于细胞内的线粒体。

以下列出了用于制备本发明的其它特异性线粒体靶向的抗氧化剂化合物的合成方案，即，(1) 线粒体靶向的足球烯；(2) 线粒体靶向的自旋捕获化合物和 (3) 线粒体靶向的自旋捕获化合物的其它合成路线。

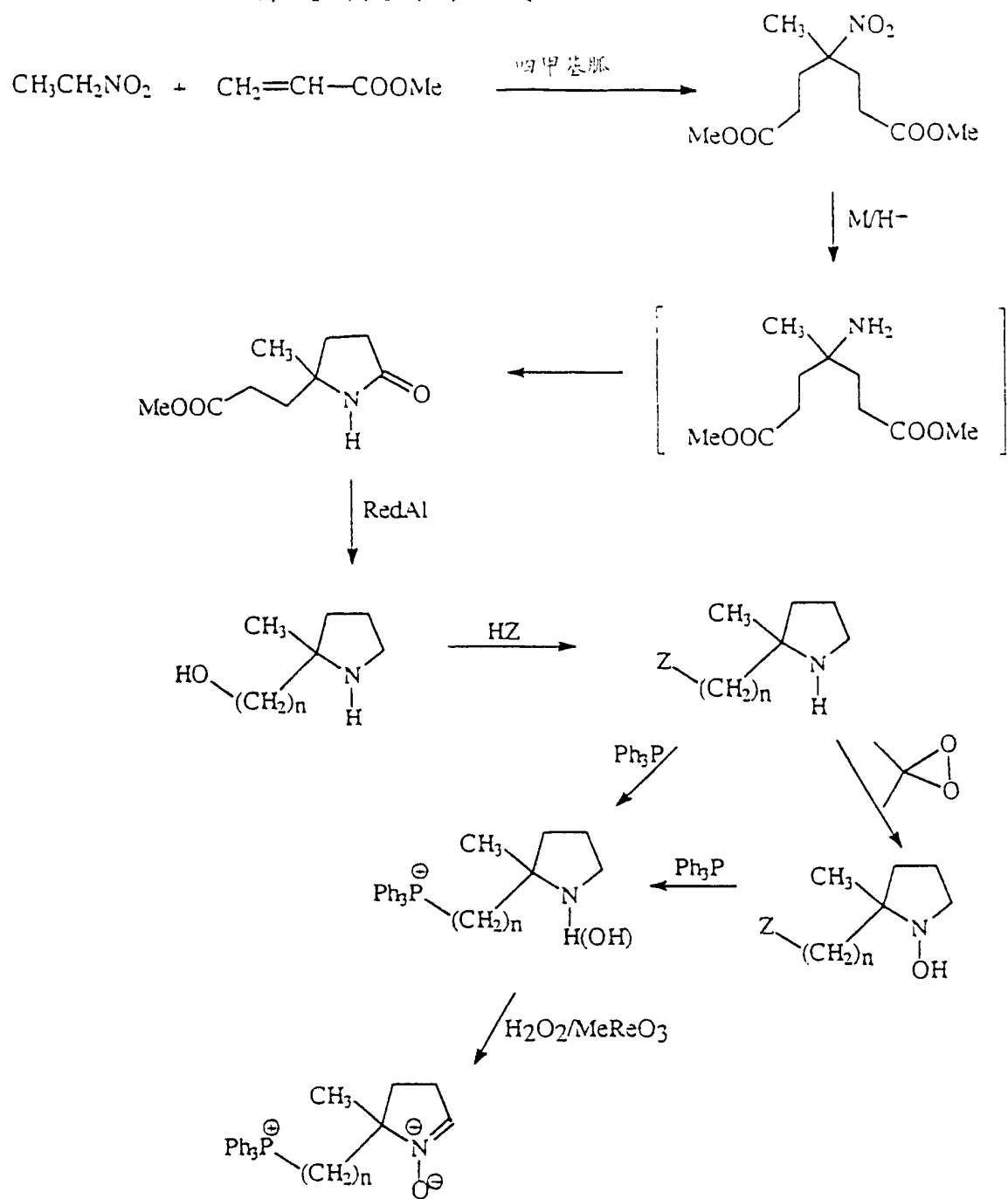
# 足球烯(Buckminsterfullerene)的合成



## 自旋捕获剂的合成 I



## 自旋捕获剂的合成 II

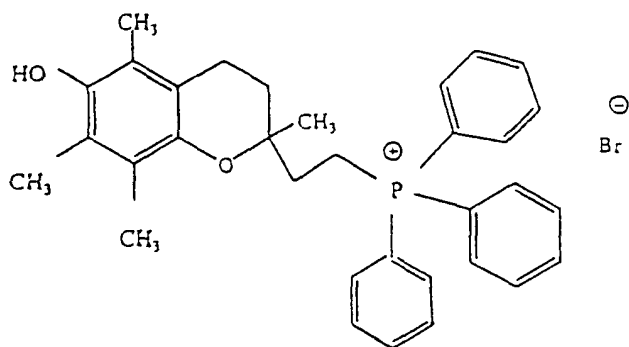


现在将通过以下非限定性实验部分对本发明进行更详细的描述。

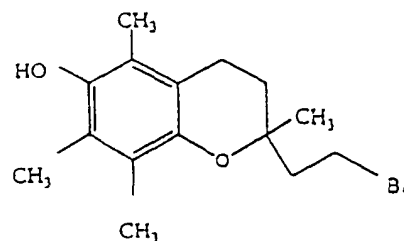
## 实验

### 1. 线粒体靶向的维生素 E 衍生物 (化合物 1) 的合成

线粒体靶向的维生素 E (化合物 1) 的合成方案如下。溴代的前体 (化合物 2) 2-(2-溴乙基)-3,4-二氢-6-羟基-2,5,7,8-四甲基-2H-1-苯并吡喃通过将相应的醇按照 Grisar 等人 (1995) (药物化学杂志 (J. Med. Chem.) 38, 2880-2886) 的描述溴化进行合成。所述醇通过将相应的羧酸按照 Cohen 等人 (1979) (美国化学会志 (J. Amer. Chem. Soc.) 101, 6710-6717) 的描述还原进行合成。羧酸衍生物按照 Cohen 等人 (1982) (合成通讯 (Syn. Commun) 12, 57-65) 的描述由 2,6-二羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃合成, 而后者按照 Scott 等人 (1974) (美国油脂化学家学会志 (J. Amer. Oil. Chem. Soc., 101, 6710-6716) 的描述进行合成。



化合物 1



化合物 2

为了合成化合物 1, 将 1g 化合物 2 加入到 8ml 含有 2.5 摩尔当量三苯磷的丁酮中, 然后在密封的 Kimax 管中在氩气氛及 100℃ 下加热 7-8 天。室温下真空蒸除溶剂, 将黄色的油用乙醚研制, 直至形成米色的固体。将其溶于氯仿并用乙醚析出沉淀。重复该过程直至固体不溶于氯仿, 然后将其用二氯甲烷/乙醚重结晶数次, 真空干燥得到白色吸湿性粉末。

### 线粒体对化合物 1 的摄取

为了证实该靶向是有效的, 将维生素 E 化合物 1 用分离的线粒体和分离的细胞进行试验。为此, 用 [ $^3\text{H}$ ]-三苯膦合成 [ $^3\text{H}$ ]-化合物 1 并通过闪烁计数定量线粒体对化合物 1 的积聚作用(图 1)(Burns 等, 1995, 生物化学和生物物理学文献(Arch Biochem Biophys) 332, 60-68; Burns 和 Murphy, 1997, 生物化学和生物物理学文献 339, 33-39)。为此, 将大鼠的肝脏线粒体在已知可产生大约 180mV 线粒体膜电位的条件下温育(Burns 等, 1995; Burns 和 Murphy, 1997)。在该条件下, 化合物 1 可以被迅速(<10s)摄取到线粒体内, 积聚比例为大约 6000。通过加入解偶联剂 FCCP(羧基氟化物-对-三氟甲氧基苯基脒)可以阻断化合物 1 在线粒体内的积聚, 所述解偶联剂可以阻止线粒体膜电位的建立(图 1 和 2)(Burns 等, 1995)。因此, 化合物 1 可以在线粒体膜电位的驱动下迅速而且选择性地积聚在线粒体内, 并且该积聚导致线粒体内化合物的浓度比外部介质高数千倍。当化合物 1 在线粒体内积聚后, 通过加入解偶联剂 FCCP 消除线粒体膜电位可以使该积聚迅速(<10s)逆转。因此, 线粒体特异性的积聚作用仅仅是由线粒体膜电位引起的, 并非是由特异性结合或共价相互作用引起的。

线粒体对化合物 1 的特异性积聚作用还可以在完整细胞内发生。这可以按照 Burns 和 Murphy, 1997 的描述测定, 并且该积聚作用可以通过消除线粒体和血浆膜电位而阻止。此外, 含有有缺陷线粒体(无线粒体膜电位)的细胞不能积聚化合物 1。因此, 化合物 1 在细胞内的积聚是由线粒体膜电位驱动的。

在一系列化合物 1 的浓度下, 积聚比例相似, 并且摄取到线粒体内的化合物 1 的量相对于线粒体内的浓度为 4-8mM(图 2)。该摄取完全是由膜电位引起的, 并且在一系列的膜电位范围内与简单的三苯基膦阳离子 TPMP 的摄取相似(图 3)。通过在相同膜电位下比较 TPMP 和化合物 1 的摄取, 我们推论出在线粒体内约 84%的化合物 1 是与膜结合的(与之相比, 疏水性较弱的化合物 TPMP 为约 60%)。

以下给出详细的实验方法和结果。

图 1 显示了能化的大鼠肝脏线粒体对 10 $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]化合物 1 的摄取(实

线和实心符号)。虚线和空心的符号显示了在第 3 分钟时加入 333nM FCCP 的影响。在一开始便与 FCCP 一起温育和在第 3 分钟时加入 FCCP 所引起的摄取结果相同(数据未示出)。肝脏线粒体从雌性 Wistar 大鼠通过匀浆化然后在含有 250mM 蔗糖、10mM Tris-HCl (pH 7.4) 和 1mM EGTA 的培养液中差速离心制得, 蛋白质浓度通过缩二脲试验用 BSA 作为标准物进行测定。为了测定 [ $^3\text{H}$ ] 化合物 1 的摄取, 将线粒体 (2mg 蛋白/ml) 于 25℃ 下悬浮在补充有尼日利亚菌素 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、10mM 琥珀酸盐、鱼藤酮 1.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$  和 60nCi/ml [ $^3\text{H}$ ] 化合物 1 和 10 $\mu\text{M}$  化合物 1 的 0.5-1ml 110mM KCl, 40mM Hepes-KOH, pH 7.2, 0.1mM EDTA 中。温育后, 通过离心使线粒体沉积, 然后通过闪烁计数定量上清液和沉积物中的 [ $^3\text{H}$ ] 化合物 1。

图 2 显示了将能化的大鼠肝脏线粒体与不同浓度的化合物 1 一起温育 3 分钟后得到的线粒体聚集比  $[(\text{化合物 1}/\text{mg 蛋白})/(\text{化合物 1}/\mu\text{l})]$  (实心条块) 和 333nM FCCP 对该聚集比的影响 (空心条形)。虚线和空心圈显示线粒体对化合物 1 的摄取 (对 FCCP-不敏感性结合进行了校正)。为了测定 [ $^3\text{H}$ ] 化合物 1 的聚集比, 将线粒体 (2mg 蛋白/ml) 于 25℃ 下悬浮在补充有尼日利亚菌素 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、10mM 琥珀酸盐、鱼藤酮 1.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$  和 6-60nCi/ml [ $^3\text{H}$ ] 化合物 1 和 1-50 $\mu\text{M}$  化合物 1 的 0.5-1ml 110mM KCl, 40mM Hepes-KOH, pH 7.2, 0.1mM EDTA 中。温育后, 通过离心使线粒体沉积, 然后通过闪烁计数定量上清液和沉积物中的 [ $^3\text{H}$ ] 化合物 1。

图 3 显示了在一系列线粒体膜电位的范围内, 化合物 1 的摄取与 TPMP 的摄取比较。将能化的大鼠肝脏线粒体与 10 $\mu\text{M}$  化合物 1 和 1 $\mu\text{M}$  TPMP 一起保温 3 分钟, 用 0-8 mM 的丙二酸盐或 333nM FCCP 建立不同的膜电位。测定与 60nCi/ml [ $^3\text{H}$ ] 化合物 1 或 50nCi/ml [ $^3\text{H}$ ] TPMP 平行温育的聚集比, 用化合物 1 的聚集比相对于在相同膜电位下的 TPMP 的聚集比作图 (斜率 = 2.472, y 截距 = 319,  $r = 0.97$ )。将线粒体 (2mg 蛋白/ml) 于 25℃ 下悬浮在补充有尼日利亚菌素 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、10mM 琥珀酸盐、鱼藤酮 1.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 0.5-1ml 110mM KCl, 40mM Hepes-KOH, pH

7.2, 0.1mM EDTA 中。

### 3. 化合物 1 的抗氧化剂效果

本发明的化合物还可以非常有效地对抗氧化性应激反应。为了证明这一点, 将化合物 1 用大鼠大脑匀浆进行了进一步的测试。将大鼠大脑匀浆在含或不含各种浓度的试验化合物(化合物 1; 天然维生素 E( $\alpha$ -生育酚)、溴化溴丁基三苯基磷、Trolox(一种水溶性维生素 E)和化合物 2, 即 2-(2-溴乙基)-3, 4-二氢-2, 5, 7, 8-四甲基-2H-1-苯并吡喃-6-醇、化合物 1 的前体(“Brom Vit E”))的条件下温育并用 TBARS 试验定量在温育过程中发生的氧化损伤(Stocks 等, 1974, (Clin. Sci. Mol. Med.) 47, 215-222)。由此测定出抑制氧化损伤 50%所需的化合物浓度。在该系统中, 210nM 化合物 1 可以抑制氧化损伤达 50%, 而天然维生素 E 的相应值为 36nM。含有三苯基磷部分但不含抗氧化剂维生素 E 部分的溴化溴丁基三苯基磷的相应值为 47 $\mu$ M。这些数据表明, 化合物 1 是有效的抗氧化剂, 其数量级与维生素 E 的相当。与溴化溴丁基三苯基磷的比较表明抗氧化能力是由维生素 E 部分而不是磷盐引起的。以下将进一步详细描述实验方法和结果。

在大鼠大脑匀浆中测定抑制脂质过氧化的  $IC_{50}$  值, 该值为在 2-3 个大脑制备物上测定值的平均值 $\pm$ SEM 或范围。辛-1-醇/PBS 分配系数为 3 次彼此独立的测定值的平均值 $\pm$ SEM。N.D. 未测定。分配系数通过如下方法来测定: 将 200 $\mu$ M 化合物在 2ml 用水饱和的辛-1-醇中的溶液与 2ml 辛醇饱和的 PBS 在室温下混合 1 小时, 然后通过短时间的离心将两层分离并利用 PBS 或辛醇制备的标准曲线通过分光光度法测定各层的浓度。为了测定抗氧化剂效果, 将 4 个大鼠大脑在 15ml 40mM 磷酸钾(pH 7.4)、140mM NaCl 中于 4 $^{\circ}$ C 下进行匀浆, 沉积颗粒状物质(1000g x g, 4 $^{\circ}$ C 15 分钟), 洗涤一次并将合并的上清液冷冻保存。将等份液迅速解冻并将 5mg 蛋白质悬浮在 800 $\mu$ l 含有抗氧化剂或乙醇载体的 PBS 中并于 37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟。向保温液中加入 200 $\mu$ l 浓高氯酸和 200 $\mu$ l 1% 硫代巴比土酸, 于 100 $^{\circ}$ C 加热 15 分钟然后冷却并离心分离(10000 x g,

2 分钟), 于 532nm 处定量硫代巴比土酸活泼物质(TBARS)。所得结果示于下面的表 1 中。

表 1. 化合物 1 及相关化合物的分配系数和抗氧化剂效果

| 化合物         | 抑制脂质过氧化的 IC <sub>50</sub> (nM) | 辛醇: PBS 分配系数 |
|-------------|--------------------------------|--------------|
| 化合物 1       | 210±58                         | 7.37±1.56    |
| Bromo Vit E | 45±26                          | 33.1±4.4     |
| α-生育酚       | 36±22                          | 27.4±1.0     |
| Trolox      | 18500±5900                     | N. D.        |
| BrBTP       | 47000±13000                    | 3.82±0.22    |

当将线粒体接触氧化性应激反应时, 化合物 1 可以保护线粒体防止氧化损伤, 这可以通过脂质过氧化和蛋白羧基形成进行测定(图 4)。通过将线粒体与解偶联剂 FCCP 温育以阻止化合物 1 的摄取可以阻止该氧化剂保护作用, 并且亲脂性阳离子本身不会保护线粒体(图 5)。最重要的是, 化合物 1 的摄取对线粒体功能的保护作用(通过产生膜电位的能力进行确定)比维生素 E 本身更为有效(图 6)。这表明化合物 1 在线粒体内的积聚可以选择性地保护线粒体的功能防止氧化性损伤。此外我们还证实, 化合物 1 在产生保护作用的浓度下不会损伤线粒体。

下一步是测定化合物 1 是否可以被完整细胞积聚。化合物 1 可被完整的 143B 细胞迅速积聚, 积聚量大于从 143 细胞衍生的 p° 细胞。这是非常重要的, 因为 p° 细胞缺乏线粒体 DNA 从而其线粒体膜电位远远低于 143B 细胞, 但其它方面, 包括血浆膜电位、细胞体积和蛋白含量完全相同(图 8); 这表明细胞内的化合物 1 大部分是在线粒体内。通过阻断血浆和线粒体膜电位可以抑制化合物摄取到细胞内的比例(图 9)。该能化敏感性的摄取对应于化合物 1 在线粒体内的浓度为约 2-4mM, 该浓度足以保护线粒体防止氧化性损伤。这样的化合物 1 的浓度对细胞是无毒的(图 10)。

以下将进一步详细描述实验方法和结果。

图 4 显示了化合物 1 对防止线粒体氧化性损伤的保护作用。将线

粒体与铁/抗坏血酸盐一起保温使其接触氧化性应激反应, 然后通过测定 TBARS(实心条块)和蛋白的羧基(空心条块)来评估化合物 1 对氧化性损伤的影响。将大鼠肝脏线粒体(10mg 蛋白)于 25℃下在振摇水浴中于 2ml 含有 100mM KCl, 10mM Tris, pH 7.7 并且补充有鱼藤酮(1.33μg/ml), 10mM 琥珀酸盐、500μM 抗坏血酸盐和其它添加剂的培养液中保温。预保温 5 分钟后, 加入 100μM FeSO<sub>4</sub>并在 45~55 分钟后取出两份样品分析 TBARS 或蛋白的羧基。

图 5 显示了化合物 1 和维生素 E 的比较结果以及解偶联剂和其它亲脂性阳离子的影响。使能化的大鼠肝脏线粒体接触叔丁基过氧化氢并测定化合物 1(实心条块)、α-生育酚(空心条块)、化合物 1+333nM FCCP(点画条块)或简单的亲脂性阳离子溴丁基三苯基磷(交叉孔的条块)对 TBARS 形成的影响。将大鼠肝脏线粒体(4mg 蛋白)在 2ml 含有 120mM KCl、10mM Hepes-HCl pH 7.2, 1mM EGTA 的培养液中在 37℃下于振摇水浴中与各种添加剂一起保温 5 分钟, 然后加入叔丁基过氧化氢(5mM), 将线粒体继续保温 45 分钟然后测定 TBARS。

图 6 显示了化合物 1 是如何保护线粒体的功能防止氧化性损伤的。将能化的大鼠肝脏线粒体与铁/抗坏血酸一起在不含添加剂(点画条块)、含 5μM 化合物 1(实心条块)、5μM α-生育酚(空心条块)或 5μM TPMP(交叉孔的条块)的条件下保温, 然后分离线粒体并测定相对于不含铁/抗坏血酸的对照保温液由呼吸底物所产生的膜电位。将大鼠肝脏线粒体于 25℃下在 2ml 含有 100mM KCl、10mM Tris、pH 7.7 并且补充有鱼藤酮(1.33μg/ml)、10mM 琥珀酸盐、500μM 抗坏血酸和其它添加剂的培养液中于振摇水浴中保温。预保温 5 分钟后, 加入 100μM FeSO<sub>4</sub>, 30 分钟后, 将保温液用 6ml 冰冷的 STE 250mM 蔗糖、10mM Tris-HCl(pH 7.4)和 1mM EGTA 稀释, 离心(5000 x g 5 分钟), 然后将沉积物重新悬浮在 200μl STE 中并将 20μl(=1mg 蛋白)悬浮在含有 1μM TPMP 和 50nCi/ml [<sup>3</sup>H]TPMP 以及 10mM 谷氨酸盐和苹果酸盐、10mM 琥珀酸盐和鱼藤酮或 5mM 抗坏血酸/100μM TMPD + 鱼藤酮和 myxothiazol(2μg/ml)的 1ml 110mM KCl、40mM HEPES、0.1mM EDTA pH

7.2 中, 于 25℃ 保温 3 分钟, 然后离心, 按照以上描述测定膜电位并与未接触氧化性应激反应的保温液进行比较。

图 7 显示了化合物 1 对膜电位(实心的条块)以及偶联的(空心的条块)、磷酸化的(点画的条块)和解偶联的线粒体(交叉孔的条块)呼吸速率的影响, 用不存在化合物 1 时的数值的百分数表示。各种浓度的化合物 1 对分离的线粒体膜电位的影响通过将大鼠肝脏线粒体(2mg 蛋白/ml)在 0.5ml 含有 1 $\mu$ M TPMP 和 50n Ci/ml [ $^3$ H] TPMP 的上述培养基中温育 3 分钟从 [ $^3$ H] TPMP 的分布来测定。温育后, 通过离心使线粒体沉积, 然后通过闪烁计数定量上清液和沉积物中的 [ $^3$ H] TPMP 并计算膜电位, 假定体积为 0.5 $\mu$ l/mg 蛋白并且 60% 的线粒体内 TPMP 是膜结合的。为了测定化合物 1 对偶联的、磷酸化的和解偶联的呼吸速率的影响, 将线粒体(2mg 蛋白/ml)在 3ml Clark 氧电极中悬浮在 120mM KCl、10mM Hepes-HCl pH7.2、1mM EGTA, 10mM K Pi 中, 然后向电极中依次加入呼吸底物、ADP(200 $\mu$ M)和 FCCP(333nM)并测定呼吸速率。

图 8 显示了细胞对化合物 1 的摄取。将 10<sup>6</sup> 143B 细胞(实心的符号)或  $\rho^0$  细胞(空心的符号)与 1 $\mu$ M [ $^3$ H] 化合物 1 一起温育并测定化合物 1 的积聚比例。将人骨肉瘤 143B 细胞以及衍生的缺乏线粒体 DNA 的  $\rho^0$  细胞系在补充有尿苷和丙酮酸盐的 DMEM/10% FCS(胎牛血清)中、在 5% CO<sub>2</sub>/95% 空气的氛围下于 37℃ 培养, 生长至融合然后收集细胞, 用胰蛋白酶处理进行实验。为了测定 [ $^3$ H] 化合物 1 的积聚, 将细胞(10<sup>6</sup>) 在 1ml HEPES-缓冲的 DMEM 中温育。温育结束时, 离心使细胞沉积, 制备用于闪烁计数的细胞沉积物和上清液并计算积聚比例[(化合物 1/mg 蛋白)/(化合物 1/ $\mu$ l)]。

图 9 显示了 10<sup>6</sup> 143B 细胞在 1 小时的温育时间内摄取的化合物 1 的量(对抑制剂不敏感性结合进行校正)。将人骨肉瘤 143B 细胞与 1-50 $\mu$ M 的化合物 1 一起在补充有 6-60nCi/ml [ $^3$ H] 化合物 1 的 1ml HEPES-缓冲的 DMEM 中进行温育。为了测定能化依赖型的摄取, 用 12.5 $\mu$ M 寡霉素、20 $\mu$ M FCCP、10 $\mu$ M myxathiazol、100nM 缬氨霉素和 1mM 哇巴因进行平行温育。温育结束时, 通过离心使细胞沉积, 然后进行闪烁计

数并测定能化敏感性摄取。

图 10 显示了化合物 1 对细胞活力的影响。将融合 143B 细胞与各种浓度的化合物 1 一起在 24 孔组织培养盘中温育 24 小时，然后通过乳酸脱氢酶释放测定细胞活力。

### 工业实用性

本发明的化合物可用于人类患者的选择性抗氧剂疗法，以预防线粒体损伤。该化合物可以阻止与特定疾病有关的提高的线粒体氧化性应激反应，例如帕金森氏病或与线粒体 DNA 突变有关的疾病。

它们还可用于和神经变性疾病的细胞移植疗法结合，以增加移植细胞的存活率。

此外，这些化合物可用作预防剂在移植过程中保护器官，或缓解手术过程中出现的局部缺血-再灌注损伤。本发明的化合物还可用于降低中风和心脏病发作后的细胞损伤，或对易于发生大脑局部缺血的早产婴儿进行预防性给药。相对于现有的抗氧剂疗法，本发明方法的主要优点在于，它们可以使抗氧剂选择性地在线粒体内积聚，而线粒体是细胞中受氧化应激反应最大的部分。这将大大增加抗氧剂疗法的效力。所涉及的亲脂性阳离子已在试验中用作潜在的抗癌药物，并且已证实对所有动物均相对无毒，因此这些靶向的抗氧剂不可能具有有害的副作用。

本领域技术人员可以理解，以上描述仅仅是举例性的，可以采用不同的亲脂性阳离子/抗氧剂组合物而不超出本发明的范围。

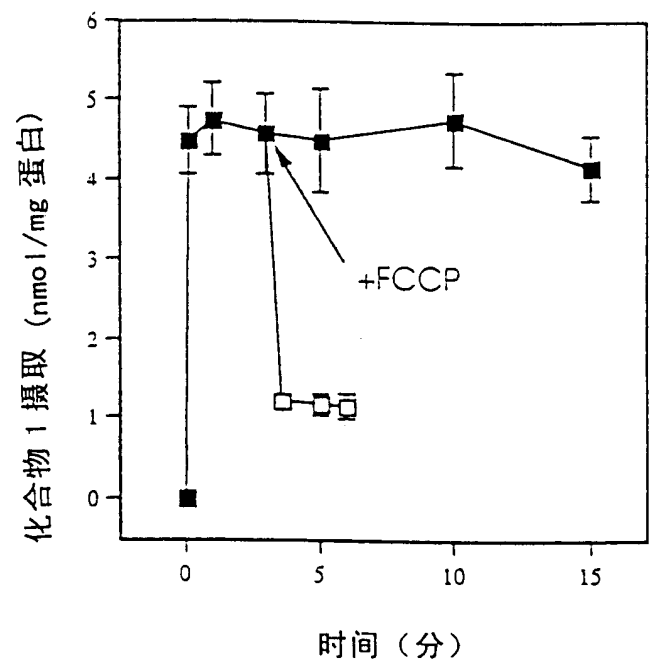


图 1

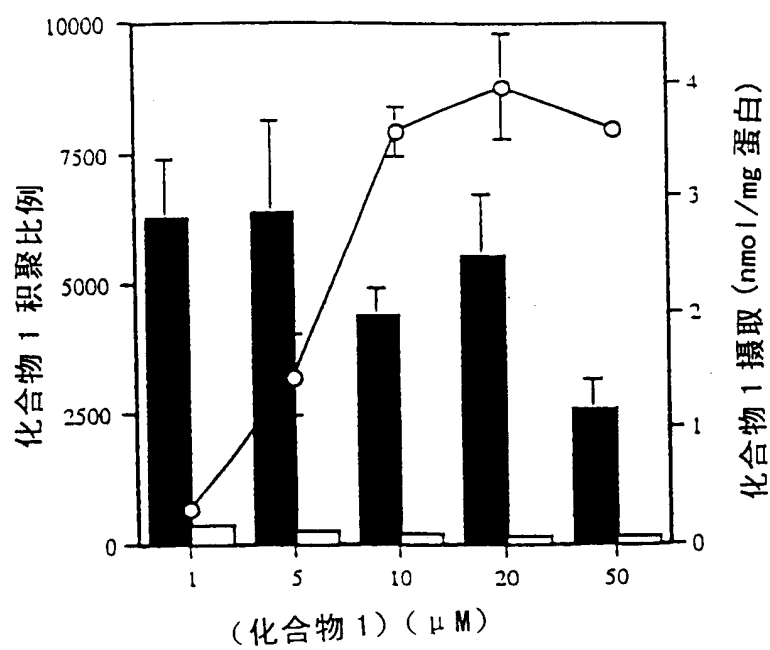


图 2

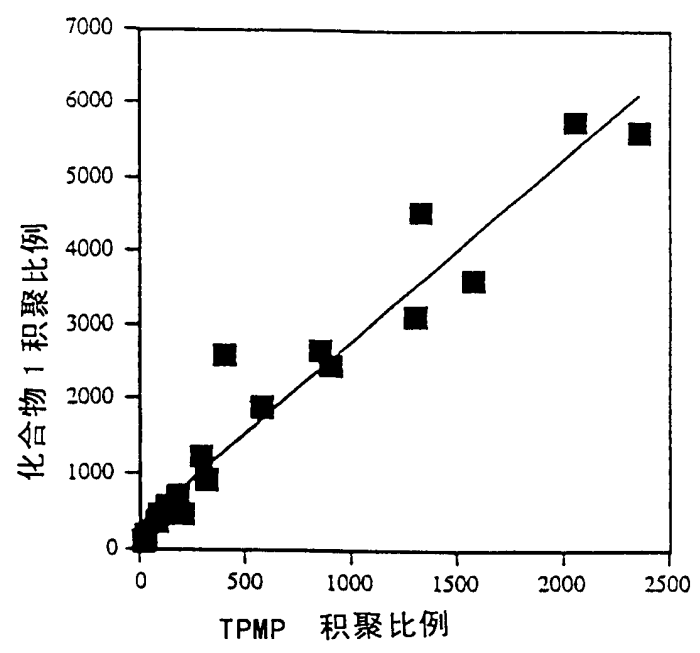


图 3

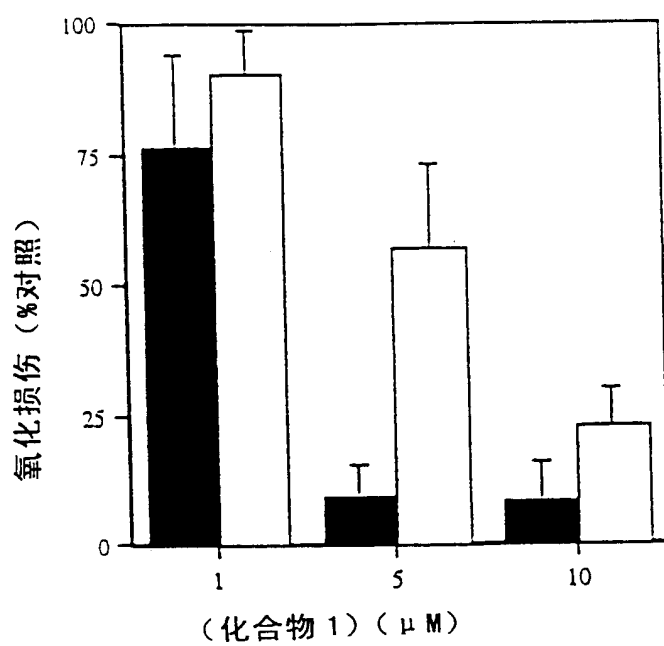


图 4

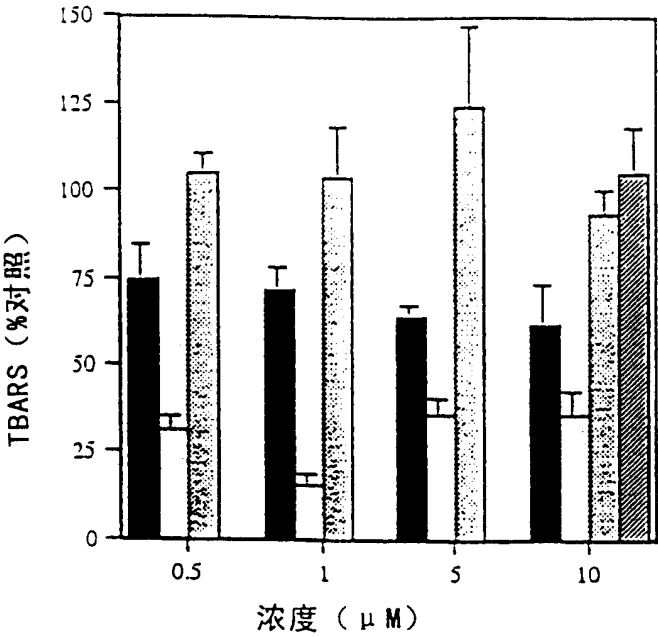


图 5

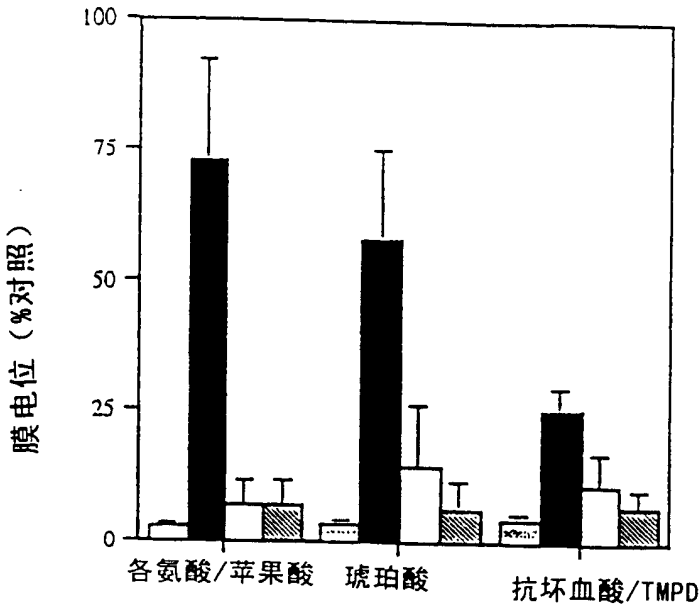


图 6

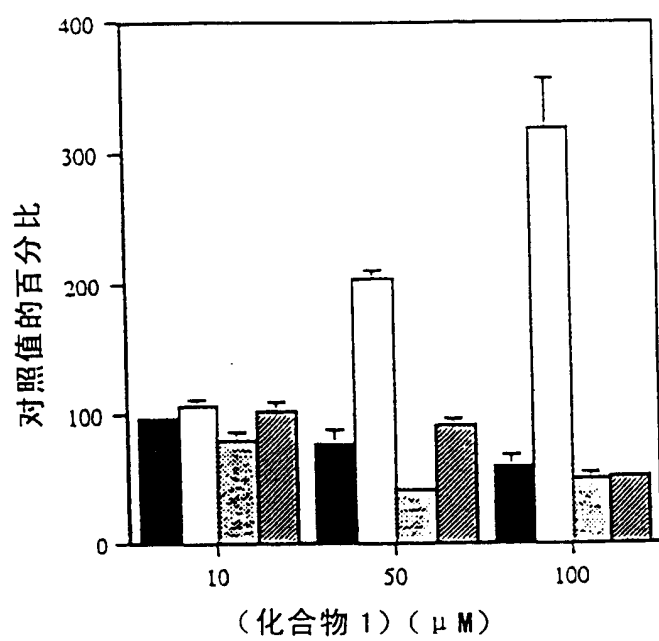


图 7

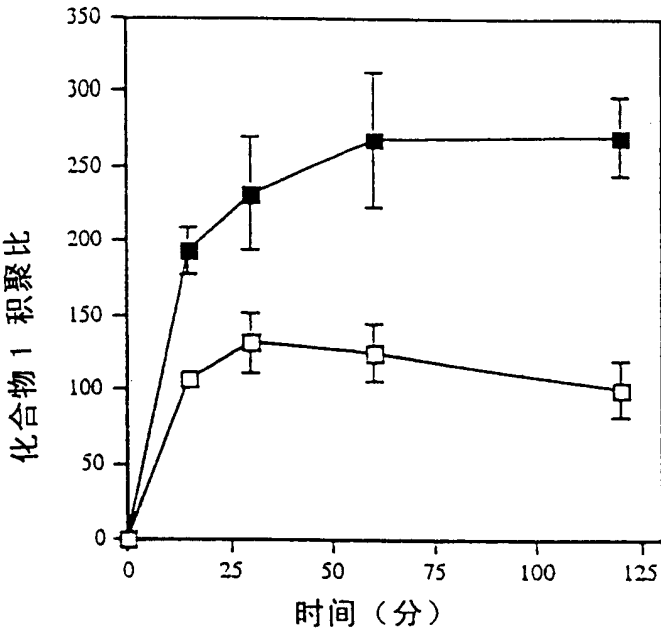


图 8

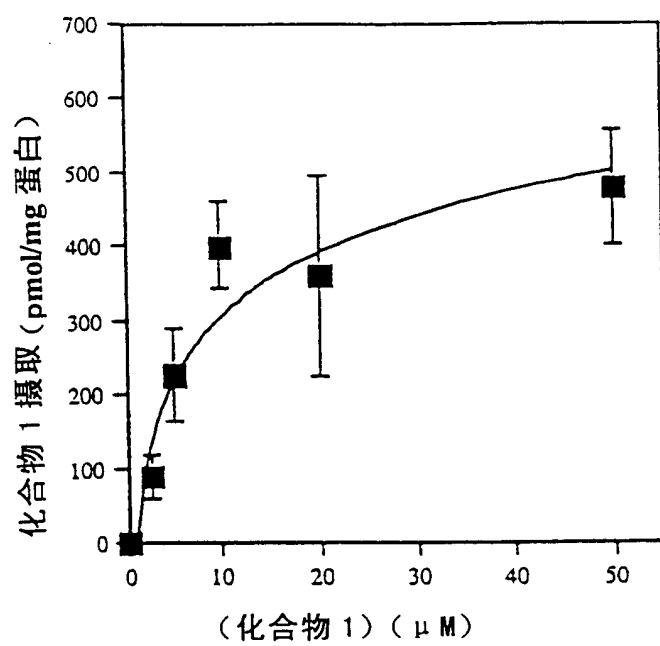


图 9

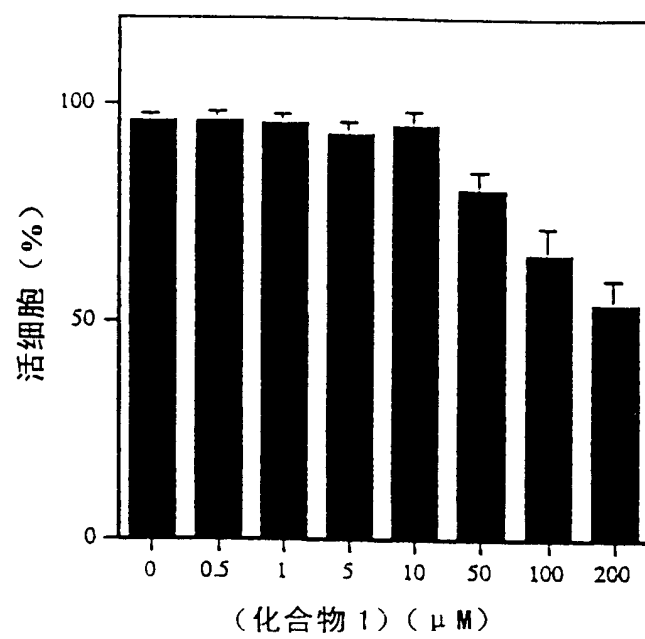


图 10