



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102083443 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 15

(21) 申请号 200980121482. 3

(22) 申请日 2009. 04. 09

(30) 优先权数据

61/043, 586 2008. 04. 09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 12. 08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/040098 2009. 04. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/126822 EN 2009. 10. 15

(73) 专利权人 北卡罗来纳大学查珀尔希尔分校

地址 美国北卡罗来纳

(72) 发明人 T·M·埃甘

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 王磊 过晓东

(51) Int. Cl.

A61K 31/7028(2006. 01)

A61K 31/7008(2006. 01)

A61P 7/06(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 0170209 A2, 2001. 09. 27, 权利要求 1, 9, 10.

CASIRAGHI ET AL. 427: Toll-Like Receptor-4 (TLR4) Inhibition Reduces Actin Cytoskeletal Re-Arrangement and Gap Formation in Cultured Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells (HMECs) Subjected to Simulated Warm Ischemia-Reperfusion Injury (IRI). 《JOURNAL OF HEART AND LUNG TRANSPLANTATION》. 2008, 第 27 卷 (第 2 期), s214-5.

审查员 张婷

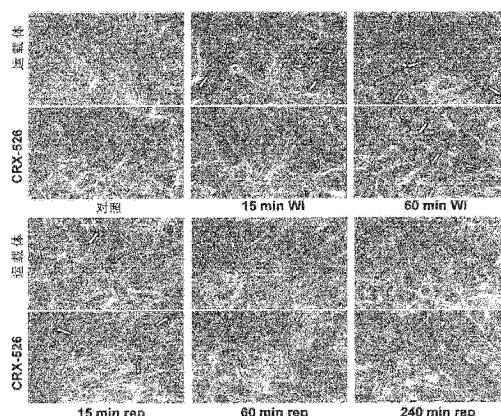
权利要求书2页 说明书17页 附图3页

(54) 发明名称

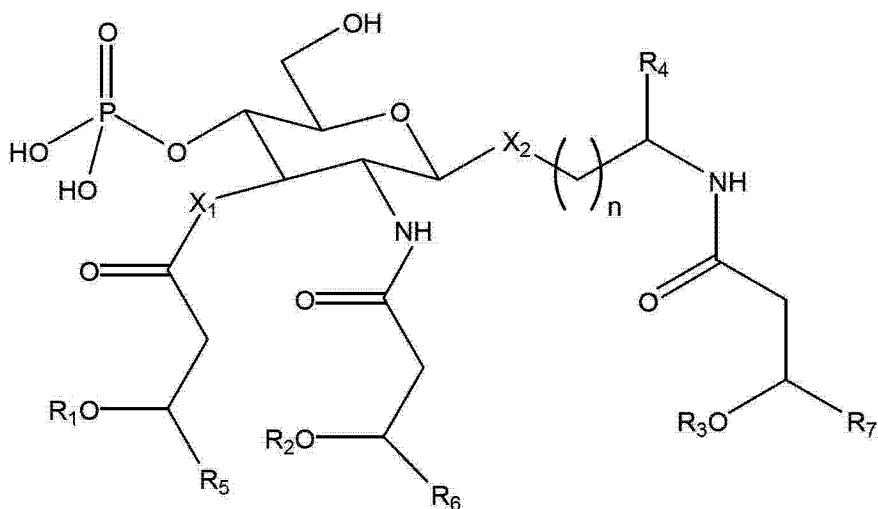
调节肌动蛋白细胞骨架重排和细胞间间隙形成的方法

(57) 摘要

本发明描述了通过使细胞接触氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸酯来预防或降低肌动蛋白细胞骨架重排和细胞间间隙形成的方法。特别地, 本公开的方法可用于预防或降低与缺血性或缺血-再灌注事件相关的肌动蛋白细胞骨架重排和/或细胞间间隙形成, 且可用于预防或缓解与肌动蛋白细胞骨架重排增加相关的疾病或病症。



1. 式 (I) 的化合物在制备用于通过预防或降低在冷缺血期间身体外组织或器官中或者从组织或器官供体移植入的组织或器官中的细胞发生肌动蛋白细胞骨架重排或细胞间间隙形成来预防或降低缺血 - 再灌注损伤的药物组合物中的应用,



其中：

n 为 1；

X_1 为 0；

X_2 为 0；

R_1 、 R_2 和 R_3 独立地为 C_2 - C_7 酰基；

R_4 为 $-(CH_2)_mC(=O)OH$, 其中 m 为 0 至 2 的整数；且

R_5 、 R_6 和 R_7 独立地为 C_{10} - C_{12} 烷基, 或

其药学上可接受的盐。

2. 如权利要求 1 所述的应用, 其中 R_4 为 $-C(=O)OH$ 。

3. 如权利要求 1 所述的应用, 其中所述式 (I) 的化合物为以下化合物, 其中：

R_1 、 R_2 和 R_3 各自为 $-C(=O)(CH_2)_4CH_3$ ；

R_4 为 $-C(=O)OH$ ；且

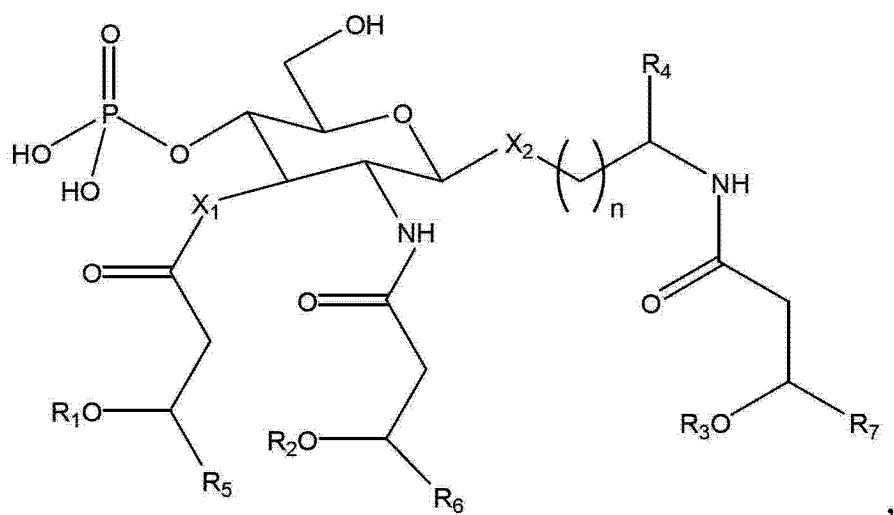
R_5 、 R_6 和 R_7 各自为 $-(CH_2)_{10}CH_3$, 或

其药学上可接受的盐。

4. 如权利要求 1 所述的应用, 其中所述细胞为哺乳动物细胞。

5. 如权利要求 4 所述的应用, 其中所述细胞为内皮细胞。

6. 式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐在制备通过预防或降低肌动蛋白细胞骨架重排或细胞间间隙形成来保持或保存可移植的身体外组织或器官的补加溶液中的用途,



其中：

n 为 1 ；

X_1 为 0 ;

X_2 为 0；

R₁、R₂ 和 R₃ 独立地为 C₂-C₇ 酰基；

R_4 为和 $-(CH_2)_mC(=O)OH$, 其中 m 为 0 至 2 的整数; 且

R₅、R₆ 和 R₇ 独立地为 C₁₀-C₁₂ 烷基。

调节肌动蛋白细胞骨架重排和细胞间间隙形成的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2008 年 4 月 9 日提交的美国专利申请第 61/043,586 号的权益,其公开内容全文援引加入本文。

技术领域

[0003] 本公开的主题涉及用于降低或预防肌动蛋白细胞骨架重排和细胞间间隙形成的方法和组合物。所述方法可用于预防响应缺血性事件或缺血-再灌注损伤而发生的肌动蛋白细胞骨架重排。

[0004] 缩写

[0005] °C = 摄氏度

[0006] AGP = 氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸酯

[0007] ARDS = 成人呼吸窘迫综合症

[0008] ATP = 三磷酸腺苷

[0009] CI = 冷缺血

[0010] CO₂ = 二氧化碳

[0011] HMVEC = 人肺微血管内皮细胞

[0012] hr = 小时

[0013] IRI = 缺血-再灌注损伤

[0014] LDH = 乳酸脱氢酶

[0015] kg = 公斤

[0016] μmol = 微摩尔

[0017] mg = 毫克

[0018] min = 分钟

[0019] O₂ = 氧气

[0020] PBS = 磷酸盐缓冲盐水

[0021] SIRS = 全身炎症反应综合征

[0022] WI = 温缺血

背景技术

[0023] 急性肺损伤是败血症、全身炎性反应和成人呼吸窘迫综合症的特征。与病因学无关,急性肺损伤的后果是非心源性肺水肿和气体交换受损。急性肺损伤引起肺水肿的机理尚不十分清楚。作为在肺移植后立即出现的一种急性肺损伤形式,缺血-再灌注损伤 (IRI) 是引起发病率和死亡率的常见并发症。参见 King 等, Ann. Thorac. Surg., 69, 1681-1685 (2000)。

[0024] 在一段时间的缺血后的再灌注导致涉及先天免疫系统成分的炎性反应,包括补体和凝固级联。实质细胞和骨髓细胞均产生 (elaborate) 自由基、一氧化氮以及促-和抗-炎

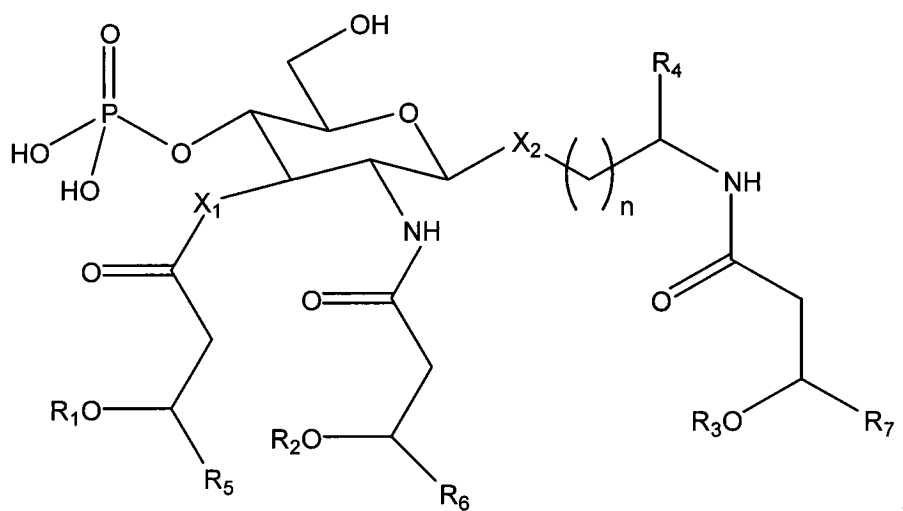
性细胞因子。参见 de Perrot 等, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 167(4), 490-511 (2003) ; de Groot 和 Rauen, *Transplant Proc.*, 39(2), 481-484 (2007) ;和 Mollen 等, *Shock*, 26(5), 430-437 (2006)。

[0025] 对肺 IRI 的更多了解可能与许多类型的急性肺损伤有关,且对肺 IRI 的更多了解除了可能惠及肺移植受体外,还可能惠及大量患者。此类知识也可潜在地用于促进用于移植物的来自心脏停搏尸体供体的肺的挽救,和 / 或有助于子移植物质量肺的补救,参见 Steen 等, Ann Thorac Surg. ,83,2191-2195(2007),以此解决了可移植肺的严重短缺。参见 Egan 等, Ann. Thorac. Surg. ,52,1113-1121(1991) 和 Egan, J. Heart Lung Transplant. , 23(1),3-10(2004)。

发明内容

[0026] 在一些实施方式中,本公开的主题提供了预防或降低细胞中肌动蛋白细胞骨架重排的方法,所述方法包括使所述细胞接触有效量的式(I)的化合物:

[0027]



[0028] 其中：

[0029] n 为 1 至 6 的整数：

[0030] X_1 为 0 或 S:

[0031] X_2 为 0 或 S；

[0032] R_1 、 R_2 和 R_3 独立地为 C_2 - C_{16} 酰基, 其中 R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一个为 C_2 - C_7 酰基;

[0033] R_4 选自由 H、羟基烷基、 $-C(=O)NH_2$ 和 $-(CH_2)_mC(=O)OH$ 组成的组中, 其中 m 为 0 至 2 的整数; 且

[0034] R₅、R₆ 和 R₇ 独立地为 C₁₀-C₁₂ 烷基,或

[0035] 其药学上可接受的盐。

[0036] 在一些实施方式中, n 为 1。在一些实施方式中, X_1 和 X_2 各自为 0。在一些实施方式中, R_4 为 $-C(=O)OH$ 。在一些实施方式中, R_1 、 R_2 和 R_3 各自为 C_2 - C_7 酰基。在一些实施方式中, 式 (I) 的化合物为以下化合物: 其中 n 为 1; X_1 为 0; X_2 为 0; R_1 、 R_2 和 R_3 各自为 $-C(=O)(CH_2)_4CH_3$; R_4 为 $-C(=O)OH$; 且 R_5 、 R_6 和 R_7 各自为 $-(CH_2)_{10}CH_3$, 或其药学上可接受的盐。

[0037] 在一些实施方式中,所述细胞为哺乳动物细胞。在一些实施方式中,所述细胞为内

皮细胞。

[0038] 在一些实施方式中,预防或降低肌动蛋白细胞骨架重排预防或降低了所述细胞与所述细胞周围的一个或多个细胞间的细胞间隙形成。

[0039] 在一些实施方式中,接触所述细胞在缺血性事件或缺血-再灌注相关事件前、在缺血期间或在一段时间的缺血后发生,且预防或降低肌动蛋白细胞骨架重排包括预防或降低与缺血性事件或缺血-再灌注相关事件相关的肌动蛋白细胞骨架重排。

[0040] 在一些实施方式中,本公开的主题提供了预防或降低对象中一个或多个细胞中肌动蛋白细胞骨架重排的方法,所述方法包括对所述对象给药有效量的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐。

[0041] 在一些实施方式中,预防或降低所述对象中一个或多个细胞中肌动蛋白细胞骨架重排预防或缓解了所述对象中与肌动蛋白细胞骨架重排增加有关的疾病或病症,或其症状。在一些实施方式中,所述对象为哺乳动物。

[0042] 本公开主题的一个目的是提供用于预防或降低肌动蛋白细胞骨架重排的方法和组合物。

[0043] 本公开主题的目的如上所述,且通过本公开的主题全部或部分地实现该目的,结合本文以下所述的最佳实施例和附图,随着更深入地描述,其它目的将变得明显。

附图说明

[0044] 图1为鬼笔环肽(phalloidin)染色的人肺微血管内皮细胞(HMVEC)的一系列照片,其显示在不缺氧下模拟温缺血对人肺微血管内皮单层中肌动蛋白细胞骨架重排和间隙形成的影响。HMVEC在具有完整盖片的P30培养皿上生长至汇合,并在1小时的模拟温缺血(WI)前用1 μ g/mL CRX-526或运载体温育。照片显示在WI(对照)前、15或60分钟WI后,和15、60或240分钟模拟再灌注(rep)后CRX-526处理的细胞和运载体处理的细胞。实验一式三份进行。

[0045] 图1B为图1A所示细胞单层中间隙的面积%的图。分析来自三个P30培养皿中每个培养皿的三个单独的区域($n = 9$ 张照片/时间点)。单层中间隙的面积%通过MetaMorph®软件(MDS Analytical Technologies, Inc., Sunnyvale, California, United States of America)定量。运载体处理的细胞数据用阴影柱显示。CRX-526处理的细胞数据用空白柱显示。 $* = p < 0.05$, $\dagger = p < 0.01$, $\ddagger = p < 0.001$ 非配对的t检验。

[0046] 图1C为图1A所示细胞中异常肌动蛋白%的图。因为人肺微血管内皮细胞(HMVEC)的肌动蛋白细胞骨架的高度可变性,将细胞按照在图像中具有“正常”或“异常”肌动蛋白分布来标记($n = 9$ 张照片/时间点),而非尝试对异常性的严重程度进行分级。评价由不知到样品的组同一性或时间的被设盲的观察者来进行。随后,计算群体的比率。运载体处理的细胞数据用阴影柱显示。CRX-526处理的细胞数据用空白柱显示。 $\ddagger = p < 0.001$ 非配对的t检验。

[0047] 图2A为一系列照片,从左到右依次为:在温(37°C)细胞培养基中的人肺微血管内皮细胞(HMVEC)的照片(对照)、在4°C PERFADEX™中4小时冷缺血(CI)后HMVEC的照片(冷PERFADEX™溶液4hr CI)、在4°C含运载体的PERFADEX™(Vitrolife, Kungsbäcka, Sweden)肺的保存液中4小时冷缺血后HMVEC的照片(含运载体的冷PERFADEX™溶液4hr

C1), 和已用 CRX-526 预温育并在含 CRX-526 的 4°C PERFADEX™(Vitrolife, Kungsbacka, Sweden) 中经历冷缺血 4 小时的 HMVEC 的照片 (含 CRX-526 的冷 PERFADEX™ 溶液 4hr C1)。照片代表了从每种条件拍摄的 9 张图像。

[0048] 图 2B 为人肺微血管内皮细胞 (HMVEC) 的单层中间隙的面积%的图, 其中所述人肺微血管内皮细胞在细胞培养基 (培养基) 中、或 PERFADEX™(Vitrolife, Kungsbacka, Sweden) 中用或不用 CRX-526 预处理 1 小时后, 且随后经历 4 小时冷缺血 (4hr C1)、1 小时温缺血 (WI)、或 1 小时温缺血及 15 分钟、1 小时或 4 小时再灌注 (分别为 15min rep、1hr rep 和 4hr rep)。在不含运载体的 PERFADEX™/ 培养基中的 HMVEC 的数据用空白柱显示。在补加有运载体但无化合物的 PERFADEX™/ 培养基中的 HMVEC 的数据用深阴影柱显示。CRX-526 预处理的细胞的数据用浅阴影柱显示。间隙面积%通过 **MetaMorph®** 软件 (MDS Analytical Technologies, Inc., Sunnyvale, California, United States of America) 定量。* = $p < 0.01$ 。

[0049] 具体实施方式

[0050] 本公开的主题将参照以下实施例在下文中更详细地描述, 其中显示了代表性的实施方式。然而, 本公开的主题可以不同形式实施, 且不应限于本文所述的实施方式。然而, 提供这些实施方式以使得本公开全面和完整, 并将发明的范围完全传达给本领域技术人员。

[0051] 除非另有定义, 否则本文所用的全部技术和科技术语都具有与本文所述主题所属领域中的任何普通技术人员通常理解的含义相同的含义。本文提及的全部出版物、专利申请、专利和其它参考文献都全文援引加入本文。

[0052] 在整个说明书和权利要求书中, 所给的化学式或名称将涵盖全部光学和立体异构体, 以及其中存在这种异构体和混合物的外消旋混合物。

[0053] I. 定义

[0054] 虽然认为本领域任一普通技术人员熟知以下术语, 但描述以下定义以有助于解释本公开的主题。

[0055] 按照长期存在的专利法约定, 术语“a”、“an”和“the”用在本申请 (包括权利要求) 中时是指“一个或多个”。因此, 例如“化合物”或“细胞”包括多个此类化合物或细胞等。

[0056] 本文所用的术语“烷基”是指 C_{1-20} , 包括线性 (即“直链”)、支链或环状的, 饱和或至少部分不饱和且在一些情况中完全不饱和的 (即烯基和炔基) 烃链, 包括如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基、辛基、乙烯基、丙烯基、丁烯基、戊烯基、己烯基、辛烯基、丁二烯基、丙炔基、丁炔基、戊炔基、己炔基、庚炔基和丙二烯基。“支链”是指其中低级烷基如甲基、乙基或丙基与线性烷基链相连的烷基。“低级烷基”是指具有 1 至约 6 个碳原子例如 1、2、3、4、5 或 6 个碳原子的烷基 (即 C_{1-7} 烷基)。“高级烷基”是指具有约 8 至约 20 个碳原子例如 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个碳原子的烷基。

[0057] 烷基可选地被一个或多个烷基取代基所取代 (“取代的烷基”), 所述烷基取代基可相同或不同。术语“烷基取代基”包括但不限于烷基、取代的烷基、卤素、芳基氨基、酰基、羟基、芳基氧基、烷氧基、烷基硫基、芳基硫基、芳烷氧基、芳烷基硫基、羧基、烷氧基羰基、氧代和环烷基。可以任选地沿烷基链插入一个或多个氧、硫或取代或未取代的氮原子, 其中氮取代基为氢、低级烷基 (本文中也称为“烷基氨基烷基”) 或芳基。

[0058] 因此,本文所用的术语“取代的烷基”包括如本文所定义的烷基,其中所述烷基的一个或多个原子或官能团被另一个原子或官能团代替,所述另一个原子或官能团包括例如烷基、取代的烷基、卤素、芳基、取代的芳基、烷氧基、羟基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、硫酸根和巯基。

[0059] 术语“烯基”是指包括一个或多个碳碳双键的烷基。

[0060] 本文所用的术语“芳基”是指以下芳香取代基:其可为单个芳环,或多个芳环,所述多个芳环稠合在一起,共价连接,或连接至共同的基团例如但不限于亚甲基或亚乙基部分。共同的连接基团也可作为羰基如在二苯甲酮中,或氧如在二苯基醚中,或氮如在二苯基胺中。术语“芳基”特别地涵盖杂环芳族化合物。芳环尤其可包括苯基、萘基、联苯基、二苯基醚、二苯基胺和二苯甲酮。在特定实施方式中,术语“芳基”是指包括约 5 至约 10 个碳原子如 5、6、7、8、9 或 10 个碳原子,且包括 5 和 6 元烃和杂环芳环的环状芳族化合物。

[0061] 芳基基团可任选地被一个或多个芳基取代基(“取代的芳基”)取代,所述芳基取代基可以相同或不同,其中“芳基取代基”包括烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、羟基、烷氧基、芳氧基、芳烷氧基、羧基、酰基、卤素、硝基、烷氧基羰基、芳氧基羰基、芳烷氧基羰基、酰氧基、酰基氨基、芳酰基氨基、氨基甲酰基、烷基氨基甲酰基、二烷基氨基甲酰基、芳硫基、烷基硫基、亚烃基(alkylene)和 $-NR'R''$, 其中 R' 和 R'' 可各自独立地为氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基和芳烷基。

[0062] 因此,本文所用的术语“取代的芳基”包括如本文所定义的芳基基团,其中所述芳基基团的一个或多个原子或官能团被另一个原子或官能团代替,所述另一个原子或官能团包括例如烷基、取代的烷基、卤素、芳基、取代的芳基、烷氧基、羟基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、硫酸根和巯基。

[0063] 芳基的具体实例包括但不限于环戊二烯基、苯基、呋喃、噻吩、吡咯、吡喃、吡啶、咪唑、苯并咪唑、异噻唑、异噁唑、吡唑、吡嗪、三嗪、嘧啶、喹啉、异喹啉、吲哚、呋唑等。

[0064] “亚烃基”是指具有 1 至约 20 个碳原子例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个碳原子的直链或支链的二价脂族烃基。亚烃基可为直链的、支链的或环状的。亚烃基也可任选地为不饱和的,和/或被一个或多个“烷基取代基”取代。可任选地沿亚烃基基团插入一个或多个氧、硫或取代或未取代的氮原子(本文中也称为“烷基氨基烷基”),其中氮取代基为前述的烷基。亚烃基的实例包括亚甲基($-\text{CH}_2-$);亚乙基($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$);亚丙基($-(\text{CH}_2)_3-$);环亚己基($-\text{C}_6\text{H}_{10}-$); $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$; $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$; $-(\text{CH}_2)_q-\text{N}(\text{R})-(\text{CH}_2)_r-$, 其中 q 和 r 各自独立地为从 0 至约 20 的整数,如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20,且 R 为氢或低级烷基;亚甲二氧基($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$);和亚乙基二氧基($-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-$)。亚烃基基团可具有约 2 至约 3 个碳原子且可进一步具有 6-20 个碳。

[0065] “羟基”(“Hydroxy”和“hydroxyl”)是指基团 $-\text{OH}$ 。

[0066] 术语“羟基烷基”是指末端为羟基的烷基。在一些实施方式中,羟基烷基具有结构 $-(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ 。

[0067] 术语“羧酸”是指基团 $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ 。术语“羧酸根”是指当羧酸基团的 H 被去除时所形成的阴离子。因此,“羧酸根”是指基团 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}^-$ 。羧酸根可与阳离子基团形成盐(即羧酸盐)。术语“亚烃基羧酸根”和“亚烃基羧酸”是指通过将羧酸或羧酸根基团与亚

烃基上的开放连接点连接而形成的单价基团（如基团 $-(CH_2)_n C(=O)OH$ 和 $-(CH_2)_n C(=O)O^-$ ）。

[0068] 本文所用的术语“酰基”是指基团 $-C(=O)R$ ，其中 R 为前述定义的烷基或芳基。在一些实施方式中，酰基的 R 为 C_1-C_{16} 烷基。在一些实施方式中，酰基部分的烷基基团为直链烷基或烯基。在一些实施方式中，酰基的 R 为 C_1-C_{16} 直链烷基。

[0069] 术语“磷酸根”是指基团 $-P(=O)(OH)_2$ 。术语“磷酸根”也包括通过从磷酸根基团 (phosphate group) 去除一个或多个氢原子而形成的阴离子物质。

[0070] 术语“硫醇 (thiol)”是指具有结构 $-S-R$ 的基团，其中 R 为烷基、酰基或芳基。术语“硫醇”也可指具有结构 $H-S-R$ 的化合物，其中 R 为烷基、酰基或芳基。

[0071] 术语“氨基”是指具有结构 $-NR_1R_2$ 的基团，其中 R_1 和 R_2 独立地选自基团 H、烷基、酰基和芳基。

[0072] 术语“氨基甲酰基”是指基团 $-C(=O)NH_2$ 。

[0073] 术语“单糖”是指式 $(CH_2O)_{n+m}$ 的碳水化合物单体单元，所述式 $(CH_2O)_{n+m}$ 基于具有化学结构 $H(CHOH)_n C(=O)(CHOH)_m H$ 的化合物的开链形式，其中 $n+m$ 之和为 2 和 8 之间的整数。因此，单体单元可包括丙糖、丁糖、戊糖、己糖、庚糖、壬糖和其混合物。单糖可为环化的化学结构。因此，在一些实施方式中，化合物将包括半缩醛或半缩酮。在一些实施方式中，术语“单糖”是指环化的单体单元，所述环化的单体单元基于具有化学结构 $H(CHOH)_n C(=O)(CHOH)_m H$ 的化合物，其中 $n+m$ 为 4 或 5。因此，单糖包括但不限于己醛糖、戊醛糖、己酮糖和戊酮糖如阿拉伯糖、来苏糖、核糖、木糖、核酮糖、木酮糖、阿洛糖、阿卓糖、半乳糖、葡萄糖、古洛糖、艾杜糖、甘露糖、塔罗糖、果糖、阿洛酮糖、山梨糖和塔格糖。

[0074] 术语“单糖类似物”是指其中单糖的一个或多个羟基被另一个化学基团例如但不限于磷酸根、胺、硫醇或烷基代替的单糖。

[0075] 术语“氨基糖”是指其中单糖的一个或多个羟基被胺代替的单糖类似物。示例性的氨基糖为葡糖胺（即 2-脱氧-2-氨基- α -D-吡喃葡萄糖）。

[0076] 本文所用的与化合物相关的术语“片段”是指小于最初命名的化合物的整体的结构是最初命名的化合物的结构的任何一部分的化合物。因此，片段小于最初化合物，但通常保留最初化合物的一些或全部生物学活性。

[0077] “药学上可接受的”是指在合理的医学判断的范围内适合于接触人类和动物的组织，而无过量的毒性、刺激、变态反应或其它问题或并发症，与合理的益处 / 风险比相匹配的那些化合物、物质、组合物和 / 或剂型。因此，在一些实施方式中，对于在人类中使用，本公开的化合物、物质、组合物和 / 或剂型是药学上可接受的。

[0078] 通常，术语“降低”是指通过例如将病症或疾病的症状或作用降低或缓解至一定程度来治疗在先存在的病症或疾病的方法。

[0079] “预防”是指在一定程度上防止潜在的预期病症、疾病、紊乱或损伤或其症状发生的方法。“预防”可指降低了预期病症或损伤的影响，使得预期病症或损伤的影响比在缺少预防性举动的情况下将出现的影响在程度上更低或持续时间更短的方法，以及完全防止出现所述影响的方法。因此，“预防”是指医学和兽医治疗的预防性方法。

[0080] “缺血”是指至生物组织或器官的血流不足，这导致器官或组织无法满足代谢的要求。对缺血性器官或组织的再灌注（血流的恢复）可导致产生过量的活性氧簇 (ROS) 和活

性氮簇 (RNS), 因此引起导致一系列事件的氧化应激, 所述事件例如有线粒体氧化磷酸化变化、ATP 损耗 (其也在缺血期间发生且由缺血引起)、细胞内钙增加, 以及蛋白激酶、磷酸酶、蛋白酶、脂肪酶和核酸酶的活化, 其导致细胞功能 / 完整性的丧失。

[0081] 缺血再灌注损伤 (IRI) 是指血循环在遭受缺血的有机体组织 (如当器官被手术切除且再连接时, 如在移植物或自体移植物中) 中重启后发生的损伤。以额外的实例且不限的方式, 此类损伤也在当血循环在因器官移植而停止后重启时发生; 在心肌梗死后通过经皮冠状动脉腔内成形术 (PTCA)、支架或旁路治疗冠状动脉后发生; 和向中风患者给药溶血栓药后发生。另一个实例为当流至心脏的血液因心脏外科手术被临时停止时 (通常通过事先给药心麻痹溶液)。另一个实例为当止血带在肢体上膨胀时, 为了在不流血区域的手术, 整形外科医生中断流至肢体的血液。此类损伤可发生在许多组织中, 如肾、肝、肺、胰腺、骨骼肌、平滑肌软组织、皮肤和肠道, 以及心脏和脑。因此, IRI 可包括但不限于脑、视网膜、肝、肾、胰腺、脊髓、肠系膜、肢体、肠、大脑、心肌、中枢神经系统、皮肤或肺缺血再灌注损伤, 或其组合。特别地, 缺血再灌注损伤是器官移植中的严重问题, 这通常是因为采取的器官从供体的身体中移出, 与血源分离, 且因此在较长时期内失去营养物, 且通常失去氧。

[0082] “水肿”是指组织或器官中间质液增加。在肺中, “水肿”也可指肺泡液增加。在一些实施方式中, 水肿与涉及内皮细胞渗透性增加的病症相关。

[0083] “内皮细胞渗透性增加”是指器官或组织中血管对血液中的流体和 / 或蛋白质的渗透性的增加, 其导致水肿, 这可发生在许多临床情况中, 所述临床情况包括但不限于成人呼吸窘迫综合征 (ARDS)、全身炎症反应综合征 (SIRS) 和多种细菌导致的感染发生。

[0084] II. 总则

[0085] 内皮细胞骨架, 特别是肌动蛋白应力纤维, 在肺血管渗透性调节中起作用。参见 Dudek 和 Garcia, J. Appl. Physiol., 91(4), 1487-1500 (2001)。也已假定细胞骨架可起到细胞内交流系统或信号支架 (signaling scaffold) 的作用。参见 Ingber, FASEB J., 20(7), 811-827, (2006)。本公开的主题涉及以下观点: 即氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸酯 CRX-526 降低模拟缺血后的细胞骨架重排。

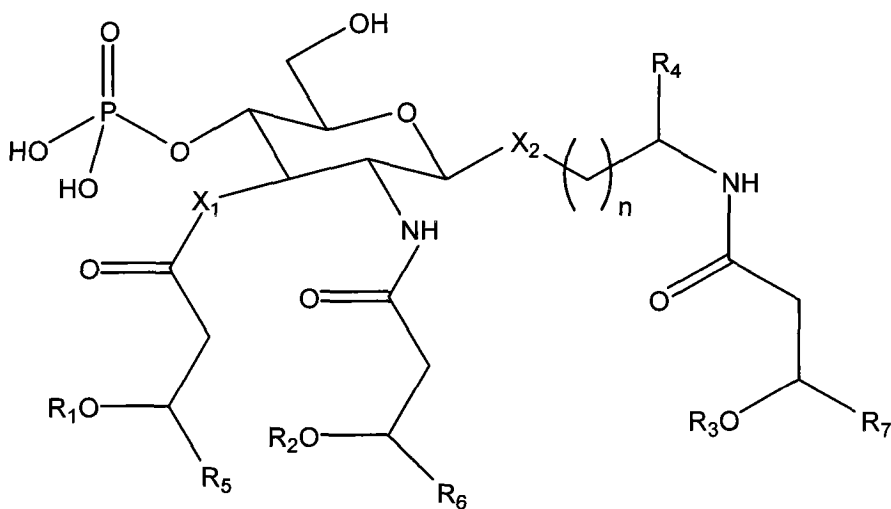
[0086] III. 脂质 A 模拟物

[0087] 在一些实施方式中, 本公开的主题涉及包括单糖或单糖类似物的脂质 A 模拟物化合物的应用。在一些实施方式中, 单糖类似物为氨基糖。在一些实施方式中, 氨基糖为葡萄糖胺。在一些实施方式中, 本公开的主题涉及氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸酯 (AGP) 或其药学上可接受的盐的应用。

[0088] III. A. 式 (I) 的化合物

[0089] 通常, AGP 为合成的 (即化学合成的) 脂质 A 模拟物, 且可具有式 (I) 的结构:

[0090]



[0091] 其中：

[0092] n 为 1 至 6 的整数；

[0093] X_1 为 0 或 S；

[0094] X_0 为 0 或 S；

[0095] R_1 、 R_2 和 R_3 独立地为 C_2 - C_{16} 酰基；

[0096] R_4 选自由 H、羟基烷基、 $-C(=O)NH_2$ 和 $-(CH_2)_mC(=O)OH$ 组成的组中, 其中 m 为 0 至 2 的整数; 且

[0097] R₅、R₆ 和 R₇ 独立地为 C₁₀-C₁₂ 烷基,或

[0098] 其药学上可接受的盐。

[0099] 通常,用于本公开主题中的 AGP 包括至少一条小于 8 个碳的仲酰基链(即 R_1 、 R_2 或 R_3)。因此,在一些实施方式中, R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一个为 $-C(=O)R_8$,其中 R_8 为 C_1 - C_6 烷基(即 R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一个为 C_2 - C_7 酰基)。在一些实施方式中, R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少两个为 C_2 - C_7 酰基。在一个实施方式中, R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一个为 $-C(=O)R_8$,其中 R_8 为 C_5 烷基。在一些实施方式中, R_5 、 R_6 和 R_7 各自为 C_{10} - C_{12} 直链的、全饱和的烷基。

[0100] 在一些实施方式中,化合物为 CRX-526,即式 (I) 的化合物,其中 n 为 1;X₁ 和 X₂ 各自为 O;R₁、R₂ 和 R₃ 各自为 -C(=O)(CH₂)₄CH₃;R₄ 为 -C(=O)OH;且 R₅、R₆ 和 R₇ 各自为 -(CH₂)₁₀CH₃,或其药学上可接受的盐。

[0101] 之前已描述了各种 AGP 的合成和活性。参见如 Cluff 等, *Infection and Immunity*, 73(5), 3044-3052 (2005) ; Stöver 等, *J. Biol. Chem.* , 279(6), 4440-4449 (2004) ; 和其中引用的参考文献。还参见 Johnson 等的美国专利第 6, 113, 918 号。

[0102] 式(I)的化合物具有不对称碳原子,且因此其可以以对映体或非对映体的形式存在。基于它们的物理化学差异,非对映体混合物可通过公知方法如通过色谱和/或分步结晶被分离为它们的单独的非对映体。可通过以下方法分离对映体:通过与适当的光学活性化合物(如醇)反应将对映体混合物转化为非对映体混合物,分离非对映体,并将单独的非对映体转化(如水解)为对应的纯对映体。全部这类异构体,包括非对映体、对映体和其混合物都被认为是本公开主题的一部分。

[0103] III. B. 药学上可接受的盐

[0104] 与本公开主题的化合物（如式（I）的化合物）相关的本文所用的表述“药学上可

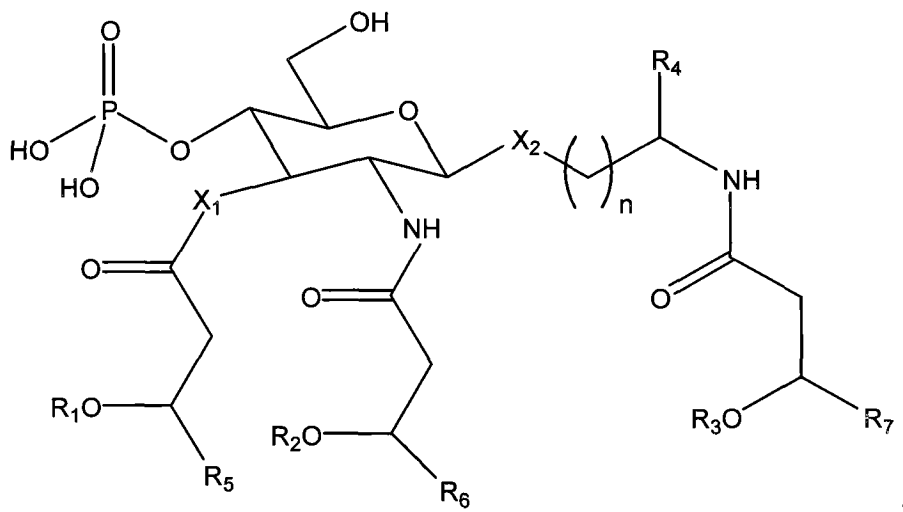
接受的盐”包括药学上可接受的阳离子盐。表述“药学上可接受的阳离子盐”意图定义这些盐但不仅限于以下盐：如碱金属盐（如钠和钾）、碱土金属盐（如钙和镁）、铝盐、铵盐和与有机胺的如苄星（N,N'-二苄基乙二胺）、胆碱、乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、乙二胺、甲葡胺（N-甲基葡糖胺）、苄乙苄胺（N-苄基苄乙基胺）、乙醇胺、二乙胺、哌嗪、三乙醇胺（2-氨基-2-羟基甲基-1,3-丙二醇）和普鲁卡因的盐。在一些实施方式中，本文所用的术语“药学上可接受的盐”是指在人中药学上可接受的盐。

[0105] 式(I)的化合物的药学上可接受的盐可容易地通过将游离酸形式的所述化合物与通常一当量或更多当量的适合的碱在助溶剂中反应来制备。助溶剂可包括但不限于二乙醚、二甘醇二甲醚和丙酮。碱可以包括但不限于氢氧化钠、甲醇钠、乙醇钠、氢化钠、甲醇钾、氢氧化镁、氢氧化钙、苜星、胆碱、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪和三乙醇胺。通过浓缩至干燥或通过加入助溶剂来分离盐。在许多情况中,盐可通过将酸的溶液与不同的阳离子盐溶液(如乙基己酸钠或钾、油酸镁)混合并使用上述助溶剂来制备,所需的阳离子盐从其中沉淀出,或可通过浓缩与其分离。

[0106] IV. 预防或降低细胞中肌动蛋白细胞骨架重排的方法

[0107] 在一些实施方式中,本公开的主题涉及预防或降低肌动蛋白细胞骨架重排的方法。在一些实施方式中,本公开的主题提供了预防或降低细胞中肌动蛋白细胞骨架重排的方法,所述方法包括使所述细胞接触有效量的式(I)的化合物:

[0108]



[0109] 其中：

[0110] n 为 1 至 6 的整数；

[0111] X_1 为 0 或 S;

[0112] X_0 为 0 或 S;

[0113] R_1 、 R_2 和 R_3 独立地为 C_2 - C_{16} 酰基；

[0114] R_4 选自自由 H、羟基烷基、 $-C(=O)NH_2$ 和 $-(CH_2)_mC(=O)OH$ 组成的组中, 其中 m 为 0 至 2 的整数; 且

[0115] R_5 、 R_6 和 R_7 独立地为 C_{10} - C_{12} 烷基, 或

[0116] 其药学上可接受的盐。

[0117] 在一些实施方式中, R_1 、 R_2 和 R_3 的至少一个为 $-C(=O)R_8$, 其中 R_8 为 C_5 直链的、全

饱和的烷基。在一些实施方式中, R_5 、 R_6 和 R_7 各自为 C_{10} - C_{12} 直链的、全饱和的烷基。

[0118] 在一些实施方式中, n 为 1。在一些实施方式中, X_1 和 X_2 各自为 0。在一些实施方式中, R_4 为 $-C(=O)OH$ 。在一些实施方式中, R_1 、 R_2 和 R_3 各自为 C_2 - C_7 酰基。

[0119] 在一些实施方式中, 化合物为 CRX-526, 即式 (I) 的化合物, 其中 n 为 1; X_1 和 X_2 各自为 0; R_1 、 R_2 和 R_3 各自为 $-C(=O)(CH_2)_4CH_3$; R_4 为 $-C(=O)OH$; 且 R_5 、 R_6 和 R_7 各自为 $-(CH_2)_{10}CH_3$, 或其药学上可接受的盐。

[0120] 本公开方法的细胞可为任何适合的细胞。适合的细胞包括但不限于成骨细胞、破骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、内皮细胞、上皮细胞、间充质细胞、造血细胞、感觉细胞、内分泌和外分泌腺细胞、神经胶质细胞、神经元细胞、少突胶质细胞、血细胞、肠细胞、脑细胞、心脏细胞、肺细胞、肝细胞、肾细胞、肌肉细胞和胰腺细胞。在一些实施方式中, 细胞为真核细胞。在一些实施方式中, 细胞为哺乳动物细胞。在一些实施方式中, 细胞为人细胞。

[0121] 在一些实施方式中, 所述细胞为内皮细胞。在一些实施方式中, 本公开的主题涉及内皮细胞渗透性的调节。因此, 在一些实施方式中, 本公开的主题提供了调节内皮细胞渗透性的方法, 其中所述方法包括使内皮细胞接触式 (I) 的化合物。细胞渗透性的调节可导致所接触细胞周围的间质液 (和 / 或肺泡液) 维持正常水平, 或导致间质液 (和 / 或肺泡液) 水平降低。在一些实施方式中, 细胞渗透性的调节预防可能会由疾病或事件 (如感染或缺血再灌注损伤) 导致的间质液或肺泡液的增加。

[0122] 在一些实施方式中, 预防或降低肌动蛋白细胞骨架重排的方法预防或降低细胞和所述细胞周围的一个或多个其它细胞之间的细胞间的间隙形成。

[0123] 肌动蛋白细胞骨架重排可与水肿 (包括肺水肿或其它器官中的水肿) 有关。水肿可与炎症、感染、外伤 (如外科手术)、毒素吸入、循环障碍或暴露于高海拔有关。在一些实施方式中, 预防或降低肌动蛋白细胞骨架重排包括预防或降低与特征为内皮细胞渗透性增加的病症相关的肌动蛋白细胞骨架重排。在一些实施方式中, 待预防或降低的水肿与缺血 - 再灌注例如器官移植期间的、肺部栓子清除术 (从肺动脉去除凝固的血) 期间的或肺部血栓动脉内膜切除术 (从肺部脉管系统手术去除组织化凝块和纤维蛋白) 期间的缺血 - 再灌注有关。

[0124] 在一些实施方式中, 在模拟的或预计的缺血性或缺血 - 再灌注事件 (如移除用于器官移植、组织移植的组织, 心脏停搏, 应用止血带等) 前, 使细胞接触有效量的式 (I) 的化合物, 以预防或降低缺血或随后的再灌注期间的肌动蛋白细胞骨架重排。在一些实施方式中, 可在缺血期间使细胞接触式 (I) 的化合物。在一些实施方式中, 可在一段时间的缺血后 (如再灌注期间) 使细胞接触式 (I) 的化合物。

[0125] 在一些实施方式中, 缺血 - 再灌注事件与心肌梗死或中风有关。在一些实施方式中, 缺血 - 再灌注事件与心脏手术期间的心脏停搏 (即当有意停止心脏活动时) 有关, 或与由整形手术导致的骨骼肌缺血 (即当对肢体使用止血带以减少手术区域的血液时) 有关。

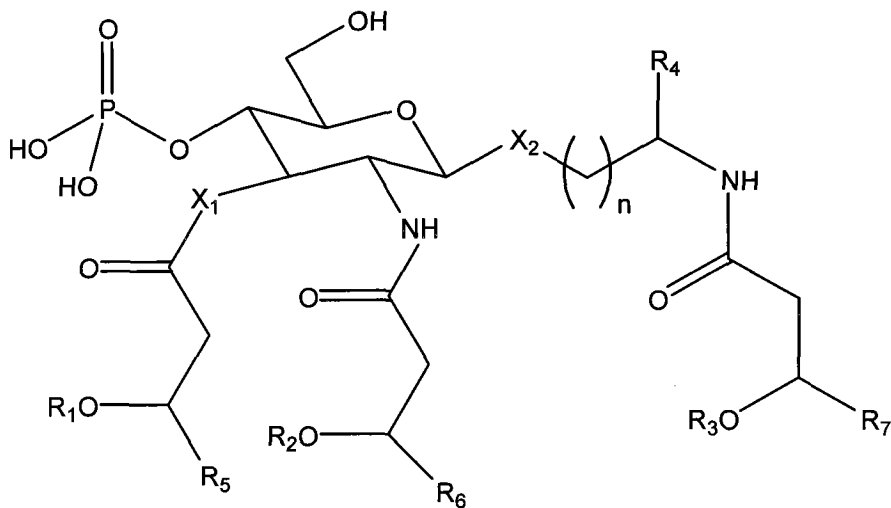
[0126] 在一些实施方式中, 本公开的主题涉及体外或离体方法, 其中细胞不在活的生物体中。例如, 细胞可存在于细胞培养中, 或在离体组织或器官中。在一些实施方式中, 此类体外或离体方法可用于确定化合物对预防或降低肌动蛋白细胞骨架重排的相对能力, 或用于确定在特定细胞类型中特定化合物的剂量。在一些实施方式中, 离体方法可用于治疗存

在于待用于移植的组织或器官中的细胞。

[0127] V. 预防或降低对象中肌动蛋白细胞骨架重排的方法

[0128] 在一些实施方式中,细胞存在于活的生物体中。因此,在一些实施方式中,本公开的主题提供了预防或降低对象中一个或多个细胞中肌动蛋白细胞骨架重排的方法,所述方法包括向所述对象给药有效量的式(I)的化合物:

[0129]



[0130] 其中：

[0131] n 为 1 至 6 的整数；

[0132] X_1 为 0 或 S；

[0133] X_9 为 0 或 S；

[0134] R_1 、 R_2 和 R_3 独立地为 C_2 - C_{16} 酰基；

[0135] R_4 选自由 H、羟基烷基、 $-C(=O)NH_2$ 和 $-(CH_2)_mC(=O)OH$ 组成的组中, 其中 m 为 0 至 2 的整数; 且

[0136] R₅、R₆ 和 R₇ 独立地为 C₁₀-C₁₂ 烷基,或

[0137] 其药理学上可接受的盐。

[0138] 在一些实施方式中, R_1 、 R_2 和 R_3 的至少一个为 $-C(=O)R_8$, 其中 R_8 为 C_5 直链的、全饱和的烷基。在一些实施方式中, R_5 、 R_6 和 R_7 各自为 C_{10} - C_{12} 直链的、全饱和的烷基。

[0139] 在一些实施方式中, n 为 1。在一些实施方式中, X_1 和 X_2 各自为 0。在一些实施方式中, R_4 为 $-C(=O)OH$ 。在一些实施方式中, R_1 、 R_2 和 R_3 各自为 C_2-C_7 酰基。

[0140] 在一些实施方式中,化合物为 CRX-526,即式 (I) 的化合物,其中 n 为 1;X₁ 和 X₂ 各自为 O;R₁、R₂ 和 R₃ 各自为 -C(=O)(CH₂)₄CH₃;R₄ 为 -C(=O)OH;且 R₅、R₆ 和 R₇ 各自为 -(CH₂)₁₀CH₃,或其药学上可接受的盐。

[0141] 在一些实施方式中, 预防或降低对象中一个或多个细胞中肌动蛋白细胞骨架重排预防或缓解了所述对象中与肌动蛋白细胞骨架重排增加有关的疾病或病症, 或其症状。所述疾病或病症可为特征为水肿的任何疾病或病症。在一些实施方式中, 水肿与内皮细胞渗透性增加有关。例如, 疾病或病症为 ARDS 或 SIRS。

[0142] 在一些实施方式中,疾病或病症与 IRI 有关。因此,疾病或病症可与 IRI 相关,所述 IRI 与组织或器官移植(包括异种移植或自体移植)、心脏停搏、心肌梗死、中风、非急需

整形外科手术、涉及肝血流阻断法 (Pringlemaneuver) 的肝外科手术,或其中血流局限于组织的其它外科手术有关。在一些实施方式中,病症可与涉及肺移植物的 IRI 有关。

[0143] 式 (I) 的化合物的给药可通过任何适合的途径 (如口服、静脉、非消化道、经气道等)。接触可在缺血性事件前、在缺血期间或在一段时间的缺血后 (如再灌注期间) 进行。

[0144] 在一些实施方式中,对象为哺乳动物。在一些实施方式中,对象为人。在一些实施方式中,所述一个或多个细胞存在于器官或组织中,所述器官或组织选自包括但不限于肾或其部分、肝或其部分、心脏或其部分、视网膜、胰腺或其部分、肠或其部分、脑组织、骨骼肌,或肺或其部分的组中。

[0145] VI. 药物组合物

[0146] 本文所用的术语“活性化合物”是指可以抑制细胞骨架重排和 / 或细胞间间隙形成的任何化合物。特别地,所述术语是指式 (I) 的化合物和它们的盐。可通过任何适合的方法使活性化合物接触细胞或将其给药至对象。本文所用的术语“有效量”是指能够抑制或预防本文所述的各种病理病症和后遗症的一种或多种活性化合物的量。术语“抑制”(“inhibit”或“inhibiting”)是指阻止、预防、治疗、缓解、改善、停止、抑制、降低、减慢或逆转病理病症的进展,或降低病理病症的严重性,所述病理病症为例如 (但不限于) 具有与细胞骨架重排增加相关的疾病或病症的风险的对象中与组织损伤 (如肺组织损伤) 相关或由组织损伤导致的病症。因此,任选地,本公开的给药活性化合物的方法包括医学治疗性给药 (急性) 和 / 或预防性给药 (预防)。

[0147] 当然,所给药的活性化合物的量和时机可取决于所治疗的对象、病痛的严重程度、给药的方式和处方医师的判断。因此,由于对象之间的不同,以下所给剂量是指导原则,且医师可确定化合物的剂量,以实现医师认为 适合于对象的治疗。考虑到所需治疗的程度,医师可平衡各种因素,如对象的年龄、先前已有疾病的存在,以及其它疾病的存在。如下文所详述,可制备用于口服、静脉或气雾剂给药的药物制剂。

[0148] 其应用处于本文所述实施方式的范围内的任何具体活性化合物的治疗有效剂量在不同化合物之间和不同对象之间略有不同,且可取决于对象的病症和递送的途径。作为一般性建议,约 0.1 至约 50mg/kg 的剂量可具有疗效,其中全部重量都基于活性化合物的重量计算,包括使用盐的情况。对较高水平下毒性的担忧会使得将静脉剂量限制至较低水平,如高至约 10mg/kg,其中全部重量都基于活性成分的重量计算,包括使用盐的情况。对于口服给药,可使用约 10mg/kg 至约 50mg/kg 的剂量。通常,对于肌肉注射,可使用约 0.5mg/kg 至 5mg/kg 的剂量。在一些实施方式中,对静脉或口服给药,剂量可为约 $1 \mu\text{mol/kg}$ 至约 $50 \mu\text{mol/kg}$,或任选地,在约 $22 \mu\text{mol/kg}$ 和约 $33 \mu\text{mol/kg}$ 之间的化合物。

[0149] 本文所述的体外和体内试验提供了可以比较化合物活性的方法。这些比较的结果可用于确定哺乳动物包括人中用于引起对肌动蛋白细胞骨架重排的保护的剂量水平。此类试验提供了对式 I 的化合物和其它化合物的活性的比较。这些比较的结果可用于确定这些剂量水平。

[0150] 根据本公开的方法,本文所述的药物活性化合物可以固体或液体形式口服给药,或可以溶液剂、混悬剂或乳剂形式肌肉、静脉或经气道 (如通过吸入) 给药。在一些实施方式中,化合物和盐也可以脂质体混悬剂形式吸入、经静脉或经肌肉给药。当通过吸入给药时,活性化合物或盐可为多个固体颗粒或液滴的形式,所述固体颗粒或液滴的粒径为约 0.5

至约 5 μm , 任选地为约 1 至约 2 μm 。

[0151] 药物制剂可包括在任何药学上可接受的载体中的本文所述的活性化合物或其药学上可接受的盐。如果需要溶液剂, 对于水溶性化合物或盐, 水是特别好的载体。对于水溶性化合物或盐, 有机运载体例如甘油、丙二醇、聚乙二醇或其混合物是适合的。在后者的情况中, 有机运载体可包括大量的水。在任何情况中, 溶液剂都可随后以本领域技术人员熟知的适合方式灭菌, 且通常通过 0.22 μm 过滤器过滤来灭菌。在灭菌后, 可将溶液剂分装入适当的容器例如去热源的 (depyrogenated) 玻璃瓶中。分装任选地通过无菌方法完成。任选地, 可随后将灭菌的塞子置于瓶上, 并将瓶的内含物冻干。

[0152] 除了活性化合物或它们的盐 (如式 (I) 的化合物) 之外, 药物制剂可包括其它添加剂例如 pH 调节添加剂。特别地, 有用的 pH 调节剂包括酸如盐酸、碱或缓冲剂例如乳酸钠、乙酸钠、磷酸钠、柠檬酸钠、硼酸钠或葡萄糖酸钠。此外, 制剂可包括抗菌防腐剂。有用的抗菌防腐剂包括尼泊金甲酯、尼泊金丙酯和苯甲醇。当将制剂置于为多剂给药而设计的瓶中时, 通常使用抗菌防腐剂。本文所述的药物制剂可使用本领域公知的技术冻干。

[0153] 对于口服给药, 药物组合物可采用溶液剂、混悬剂、片剂、丸剂、胶囊剂、散剂等形式。将包含各种赋形剂如柠檬酸钠、碳酸钙和磷酸钙的片剂连同各种崩解剂如淀粉 (如马铃薯或木薯淀粉) 和某些复合硅酸盐, 以及粘结剂如聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖、明胶和阿拉伯胶一起使用。此外, 润滑剂如硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠和滑石通常对压片十分有用。也将类似类型的固体组合物作为软和硬填充的明胶胶囊剂中的填充剂使用。在这方面, 材料也包括乳糖 (lactose 或 milk sugar), 以及高分子量聚乙二醇。当需要口服给药含水混悬剂和 / 或酞剂时, 本公开主题的化合物可与各种甜味剂、调味剂、着色剂、乳化剂和 / 或助悬剂, 以及稀释剂如水、乙醇、丙二醇、甘油和它们的各种类似的组合进行组合。

[0154] 在本文所述主题的另一个实施方式中, 提供了在密封容器中的单位剂量形式的可注射的、稳定的、无菌的制剂, 所述制剂包含本文所述的活性化合物或其盐。化合物或盐以冻干产物形式提供, 所述冻干产物能够使用适合的药学上可接受的载体复溶, 以形成适合于将冻干产物注射入对象中的液体制剂。当化合物或盐基本上不溶于水时, 可以足够的量使用生理学上可接受的足量乳化剂, 以在含水载体中乳化化合物或盐。特别有用的乳化剂包括磷脂酰胆碱和卵磷脂。

[0155] 本文提供的其它实施方式包括本文所公开活性化合物的脂质体制剂。用于形成脂质体混悬剂的技术为本领域所熟知。当化合物为水溶性盐时, 使用常规脂质体技术, 其也可将所述化合物加入脂质泡囊中。在此情况中, 由于活性化合物的水溶性, 活性化合物可主要存在于亲水中心或脂质体的核内。所用脂质层可为任何常规组合物, 且可包含胆固醇或可不含胆固醇。当目标活性化合物为水不溶性时, 再次使用常规脂质体形成技术, 盐可主要存在于形成脂质体结构的疏水脂质双层内。在任何情况中, 可例如通过使用标准超声处理和均质化技术将所制得的脂质体的尺寸降低。可将包括本文公开的活性化合物的脂质体制剂冻干以制备冻干产物, 所述冻干产物可使用药学上可接受的载体如水复溶, 以产生脂质体混悬剂。

[0156] 还提供了适于作为气雾剂通过吸入来给药的药物制剂。这些制剂包括本文所述的所需化合物或其盐的溶液剂或混悬剂, 或化合物或盐的多种固体颗粒。可将所需制剂置于小舱室中并雾化。雾化可通过压缩的空气或通过超声波能量完成, 以形成含化合物或盐的

多个液滴或固体颗粒。液滴或固体颗粒应具有在约 0.5 至约 10 μm 范围内的粒径,且任选地具有约 0.5 至约 5 μm 的粒径。固体颗粒可通过以本领域已知的任何适当方式如通过微粉化加工固体化合物或其盐来获得。任选地,固体颗粒或液滴的大小可为约 1 至约 2 μm 。在此方面,可获得商业的雾化器以实现此目的。化合物可按美国专利第 5,628,984(其公开全文援引加入本文)所述的方式经由可吸入颗粒的气雾剂混悬剂给药。

[0157] 当适合以气雾剂形式给药的药物制剂为液体形式时,制剂可包括在包含水的载体中的水溶性活性化合物。可存在表面活性剂,其充分降低了制剂的表面张力,导致当进行雾化时,形成在所需大小范围内的液滴。

[0158] 正如所述,提供了水溶性和水不溶性活性化合物。本文所用的术语“水溶性”意在定义可以约 50mg/mL 或更高的量溶于水的任何组合物。此外,如本文所用,术语“水不溶性”意在定义在水中的溶解度小于约 20mg/mL 的任何组合物。在一些实施方式中,需要水溶性化合物或盐,而在其它实施方式中,同样地,需要水不溶性化合物或盐。

[0159] 在一种给药模式中,本公开主题的化合物可在即将进行有缺血风险的手术前(如在手术如心脏手术或移植手术前 24 小时内)、手术期间和/或手术后(如在手术后 24 小时内)给药。在另一种给药模式中,活性化合物在手术前以初始负荷剂量(如快速注射或输液)给药,随后在手术前、手术期间和手术后进行恒定输液。活性化合物也可以长期的每日模式给药。

[0160] 制备含一定量活性成分的各种药物组合物的方法是已知的,或可以由本领域技术人员根据本公开而确定。对于制备药物组合物的方法的实例,参见 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 16th Edition (1980)。根据本公开主题的药物组合物可包括如 0.0001% -95% 的一种或多种活性化合物。在任何情况中,待给药的组合物或制剂可包含大量的一种或多种活性化合物,所述活性化合物的量可有效治疗待治疗对象的疾病/病症。

[0161] 在一些实施方式中,本公开主题的方法可用于预防或降低身体外组织或器官中和/或从组织或器官供体移植入移植受体的组织或器官中的肌动蛋白细胞骨架重排和/或细胞间间隙形成。身体外组织或器官为不在个体内的组织或器官(也称为离体)。对于组织和器官移植,在获取、同时运送并随后移植入受体期间,移出的供体组织和器官也易受到再灌注损伤。本公开的方法可通过例如补加用于保持或保存可移植的组织或器官的溶液来增加可移植的组织或器官的生存力。例如,方法和组合物在运输期间可用于浸洗可移植的组织或器官,或在移植前、移植期间或移植后可接触可移植的组织或器官。在一些实施方式中,当所述组织或器官存在于供体中时,本公开主题的制剂可接触组织或器官。

[0162] 本公开主题溶液可用在灌注装置(如离体灌注回路)中。本文所用的灌注装置为用于将包括化合物或组合物的溶液灌注入特定器官或体循环的任何机械装置。此类装置可包括一个或多个储蓄器。装置可包括从储蓄器引出且可插入器官、静脉或动脉的管、导管或插管。装置可为具有电泵和用于控制溶液递送温度、速率或体积的装置的机电装置。在某些实施方式中,对于特定临床情况、器官重量或器官大小(如心肺转流术对(vs.)肾移植对肝移植),装置为可程序化的,以使得一种或多种溶液以适当的温度、速率或体积被递送。

[0163] VII. 对象

[0164] 在一些实施方式中, 尽管应理解本文所述的方法对意图包括在术语“对象”之内的全部脊椎动物物种均有效, 但希望本公开主题中所治疗的对象为人。特别地, 本文所述的方法可用于治疗和 / 或预防温血脊椎动物的细胞中的肌动蛋白细胞骨架重排。因此, 所述方法可用于治疗哺乳动物和鸟类。在一些实施方式中, 本公开方法的对象为器官移植受体。

[0165] 更具体地, 本文提供了对于哺乳动物例如人的治疗, 以及对于因濒危而对人重要的那些哺乳动物 (如西伯利亚虎)、对人有经济重要性的那些哺乳动物 (饲养在农场中用于人类消费的动物) 和 / 或对人具有社会重要性的那些哺乳动物 (作为宠物饲养或在动物园中的动物) 例如除人外的肉食动物 (如猫和狗)、猪 (猪、肉猪和野猪)、反刍动物 (如牛、公牛、绵羊、长颈鹿、鹿、山羊、野牛和骆驼) 和马的治疗。本文还提供了对于鸟类的治疗, 包括对于濒危的、饲养在动物园中的或作为宠物饲养的那些鸟类, 以及禽类, 且更具体地为驯养的禽类, 即家禽如火鸡、鸡、鸭、鹅、珍珠鸡等的治疗, 因为它们也对人有经济重要性。因此, 本文所述方法的实施方式包括对于家畜的治疗, 所述家畜包括但不限于驯养的猪 (猪和肉猪)、反刍动物、马、家禽等。

实施例

[0166] 以下实施例提供了示例性的实施方式。根据本公开和本领域技术人员的一般水平, 本领域技术人员可理解以下实施例仅是示例性的, 且在不背离本公开主题的范围的情况下可进行各种变化、修改和改变。

[0167] 实施例 1

[0168] 普通方法

[0169] 温肺 IRI 的细胞培养模型

[0170] 开发 IRI 的体外正常体温 (37°C) 的模型, 采用 100% 氧气中营养物消耗来模拟缺血, 通过向在密封的 **PLEXIGLAS®** 容器中的细胞培养皿提供新制培养基来模拟再灌注。将在 37°C 下、5% CO₂ 的湿润培养箱中的保持在 **CLONETICS®** EGM-2MV **BULLETKITS®** (Cambrex Bio Science, Walkersville, Maryland, United States of America) 的人肺微血管内皮细胞 (HMVEC) (Cambrex Bio Science, Walkersville, Maryland, United States of America) 以 2000 细胞 /cm² 接种在涂布有胶原的 30mm 直径玻璃底培养皿的盖片上 (Mattek Corp., Ashland, Massachusetts, United States of America), 并生长至 100% 汇合。将在 37°C 下容纳培养皿的密封 **PLEXIGLAS®** 容器用 95% O₂/5% CO₂ 换气 (ventilate)。为了模仿温缺血 (WI), 将细胞培养基突然用 2mL 营养物耗尽的, 不含致热原的临床级林格式乳酸盐替换。在 WI 前 1 小时, 将培养皿用 1 μg/mL CRX-526 (GlaxoSmithKline, Duluth, Minnesota, United States of America) 或运载体 (2% 甘油) 预处理。无论何时更换培养基, 均加入 CRX-526 或运载体。在 1 小时模拟 WI 后, 将林格氏乳酸盐用 EGM2-MV 不含致热原的培养基替换以模拟再灌注, 对舱室用处于屋内空气中的 5% CO₂ 换气。在 WI 和再灌注期间, 将培养皿一式三份移出, 且立即固定于 4% 低聚甲醛中, 用于鬼笔环肽染色。将具有抑制剂或运载体的保持在 37°C 下, 湿润的 5% CO₂ 培养箱中的 EGM2-MV 培养基中的细胞作为对照。细胞培养基与实验培养皿中的培养基同时更换。使用具有由 PicoRecorded 软件 (Pico Technology, St. Neots, United Kingdom) 记录数据输出的电压表, 穿过密封口插入的探针连续记录 **PLEXIGLAS®** 箱中代表性培养皿中的

温度和 pH。

[0171] 鬼笔环肽染色和图像分析

[0172] 在室温下将 HMVEC 在 4% 低聚甲醛中固定 10 分钟,并用 PBS 洗涤 3 次。将细胞用含 1% BSA 和 0.05% 吐温-20 的 **ALEXAFLO®** 568 鬼笔环肽 (Invitrogen, Carlsbad, California, United States of America) 在 PBS 中的 1/100 稀释液温育 1 小时。将对 F-肌动蛋白染色的盖片立即用 Leica DMIRB 倒置荧光/DIC 显微镜 (Leica Microsystems, Inc., Bannockburn, Illinois, United States of America) 在 20 倍和 40 倍放大下检验,以评价细胞形状和 F-肌动蛋白细胞骨架的变化。对于每个培养皿,对培养皿中心附近的邻近区域用 Kodak (Rochester, New York, United States of America) 数码相机在 40 倍下以相同曝光时间拍摄 3 张照片。被设盲的观察者将每个细胞的肌动蛋白应力纤维图评价为正常或异常。间隙面积的定量分析使用 **METAMORPH®** 软件 (MDS Analytical Technologies, Inc., Sunnyvale, California, United States of America) 进行。

[0173] 细胞培养实验的生存力确定

[0174] 在一式三份进行的单个实验中,在 P35 培养皿上生长至汇合的 HMVEC 经历模拟的 IRI。在相同时间点时,按照制造商的说明书,使用 CytoTox96 非放射性细胞毒性试验 (Promega, Madison, Wisconsin, United States of America) 分析细胞和细胞培养基或林格氏乳酸盐的乳酸脱氢酶 (LDH) 活性。除了实验模型外,也在 0 时间和 24 小时取对照样品来评价细胞生存力。细胞培养基和林格氏乳酸盐用作背景对照,以将获自其它样品的吸光值标准化。用培养基 LDH 活性除以总 LDH 活性 (细胞小球 + 培养基) 来计算细胞毒性。在每个时间点,生存力为逆 (inverse),且表示为生存力的百分数。

[0175] 统计学分析

[0176] 全部数据以平均值 $\pm$ SEM 报告。使用 **STATISTICA®** (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, United States of America), 通过具有 Tukey 事后比较检验的 ANOVA 或通过配对或非配对 t 检验对组进行比较。

[0177] 实施例 2

[0178] 通过 CRX-526 预防的内皮单层中的模拟的温缺血相关的肌动蛋白细胞骨架重排和间隙形成

[0179] 使用缺血的体外模型来研究细胞骨架重排的抑制,关注肺微血管内皮细胞。虽然改变的肺上皮流体清除也可促使肺水肿,但在先的缺血相关的研究表明在 1 小时缺血后大鼠肺的过滤系数和 W/D 显著增加,其促使内皮障碍 (参见 Jones 等, J. Appl. Physiol. 83, 247-252 (1997))。参见 Matthay 等, Proc. Am. Thorac. Soc., 2(3), 206-213 (2005)。其它在先研究已在 IRI 的细胞培养模型中采用缺氧-再氧合。参见 Powell 和 Jackson, Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., 285(1), L189-198 (2003); 和 Zhang, 等, J. Biol. Chem., 278(2), 1248-1258 (2003)。然而,心搏停止后,在 37°C 下原位保持 1 小时的大鼠肺中已观察到肺酸中毒至 pH 6.8,无显著缺氧。参见 Koukoulis 等, J. Heart Lung Transplant, 24(12), 2218-2225 (2005)。因此,似乎缺氧不是肺缺血的普遍特征,特别是在用 100% 氧气充气的肺中。因此,虽然营养物损耗和酸中毒的发展在体内会更逐步地进行,但仍认为本公开的体外模型准确地反应出体内事件。

[0180] 如实施例 1 所述,将在具有完整盖片的 P30 培养皿上生长至汇合的 HMVEC 用 1 μ g/

mL CRX-526 或运载体温育,用 95% O₂/5% CO₂ 换气。将培养基用温的 (37°C) 林格氏乳酸盐替换并用 100% O₂ 换气以模拟温缺血。1 小时后,将林格氏乳酸盐用温细胞培养基替换,并将舱室用 95% 屋内空气 /5% CO₂ 换气以模拟再灌注。在模拟的温缺血期间,细胞中肌动蛋白应力纤维消失或变得更边缘化 (参见图 1A 中的阴影箭头),这与内皮单层中间隙形成有关 (参见图 1A 中的白色箭头)。模拟再灌注 4 小时后 (240 min rep) 和模拟再灌注 24 小时后 (未显示),单层为汇合的,且肌动蛋白细胞骨架图与对照相似。

[0181] 在 CRX-526 存在下,在缺血期间单层间隙的面积显著降低,且在模拟再灌注后,单层重新更迅速地汇合。参见图 1B。单层中具有改变的肌动蛋白细胞骨架的细胞的百分数通过 CRX-526 而降低。如图 1C 所示,在新制的对照培养皿中,约 40% 的细胞具有一定程度的肌动蛋白细胞骨架的边缘定向。与暴露于运载体的单层相比,在 CRX-526 存在下,在 60 分钟 WI 和随后 15 分钟模拟再灌注 (rep) 后,肌动蛋白的边缘定向显著降低。在全部时间点,在对照和治疗组中通过 LDH 试验定量的细胞存活力相同。

[0182] 将培养基替换为林格氏乳酸盐导致 pH 从 7.2 骤降至 6.5,这在替换培养基时会相反。为了研究是否内皮细胞单层中的间隙形成仅是因为 pH 改变,进行以下实验:其中通过用 10% CO₂ (pH 6.8) 对小室换气,或当用 100% O₂ 换气时通过加入 HCl 将培养基的 pH 降低至 6.5,或当用 5% CO₂ 换气时通过加入 HCl 将培养基的 pH 降低至 5.6,从而将细胞培养基的 pH 持续改变 1 小时。在 1 小时后,将改变的培养基用正常培养基替换以突然恢复 pH。当仅改变 pH 时,单层的完整性无明显变化。

[0183] 实施例 3

[0184] 模拟的冷 IRI

[0185] 如以上实施例 2 所述,考虑到 CRX-526 对受到模拟温 IRI 的 HMVEC 中肌动蛋白细胞骨架重排和间隙形成的显著影响,也在冷 IRI 的模拟模型中研究了 CRX-526 的作用。图 2A 显示了用冷 PERFADEx™ (Vitrolife, Kungsbäcka, Sweden) (世界上最常用的肺保存液) 替换温细胞培养基对 HMVEC 的影响。细胞培养皿经过约 1 小时达到 4°C 的温度,因此,在图 2A 中,在 4 小时冷“缺血”(CI) 后细胞的照片表示在用冷 PERFADEx™ (Vitrolife, Kungsbäcka, Sweden) 替换温培养基后 5 小时的细胞的外观。虽然全部培养皿中肌动蛋白细胞骨架错乱,但在 CRX-526 处理的细胞中间隙不明显得多。参见图 2B。

[0186] 应理解,在不背离本公开主题的范围的情况下,可改变本公开主题的各个细节。此外,先前的描述仅出于说明的目的,而非出于限制的目的。

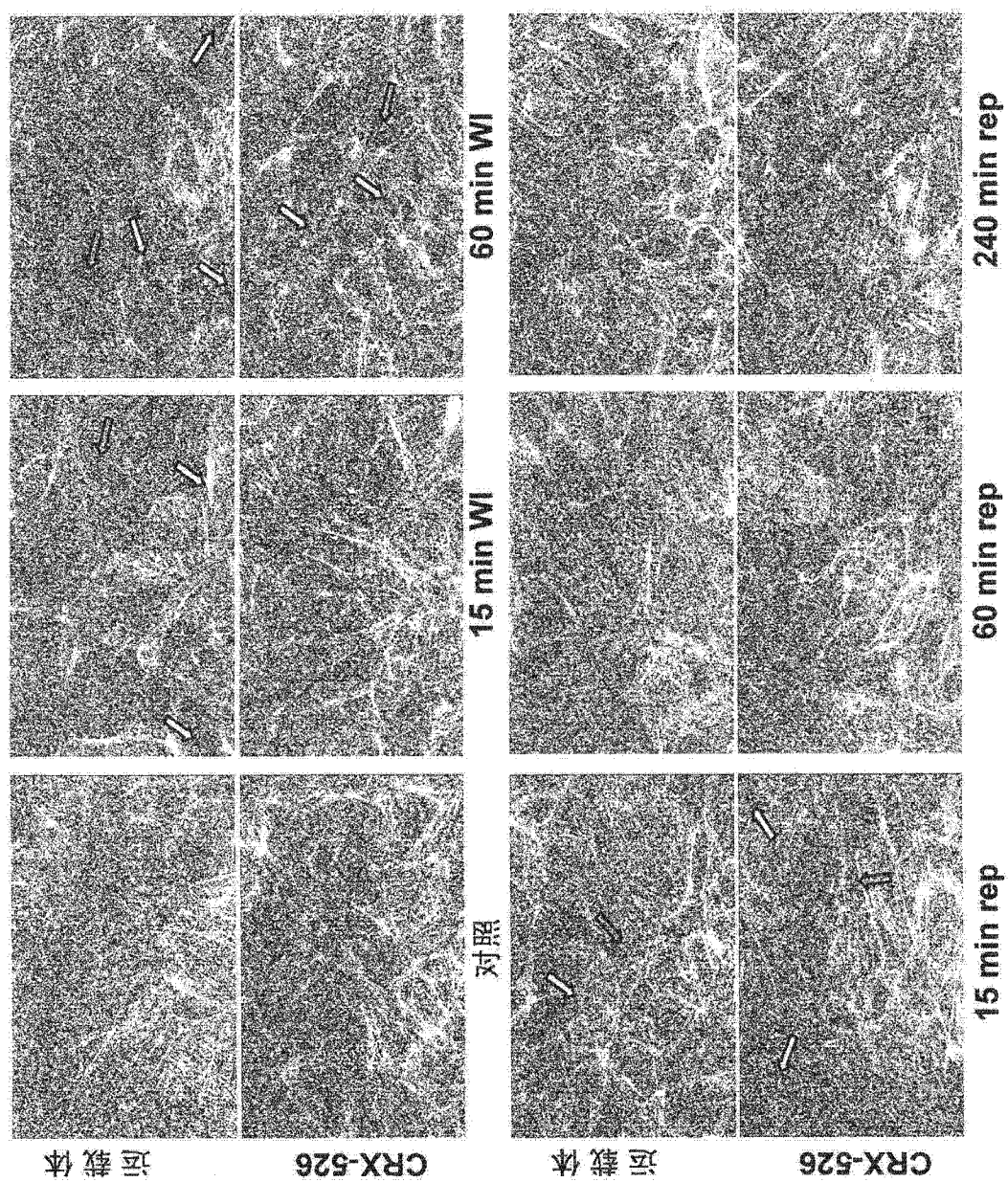


图 1A

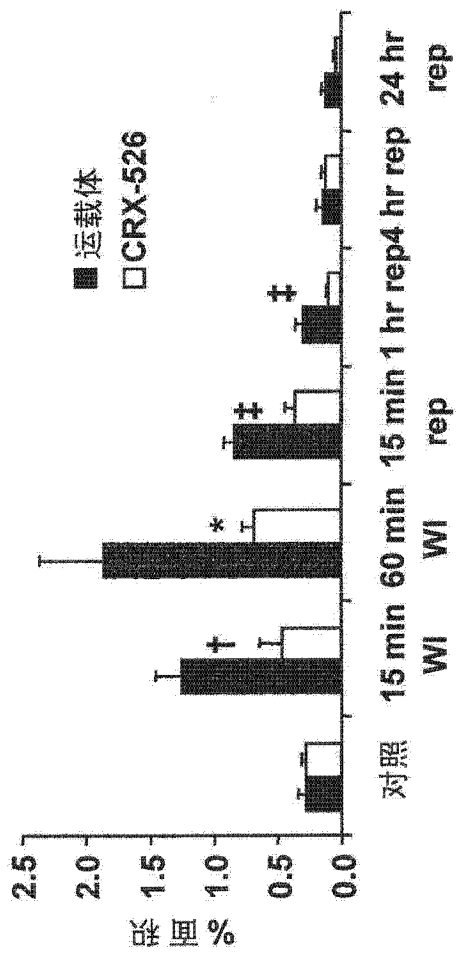


图 1B

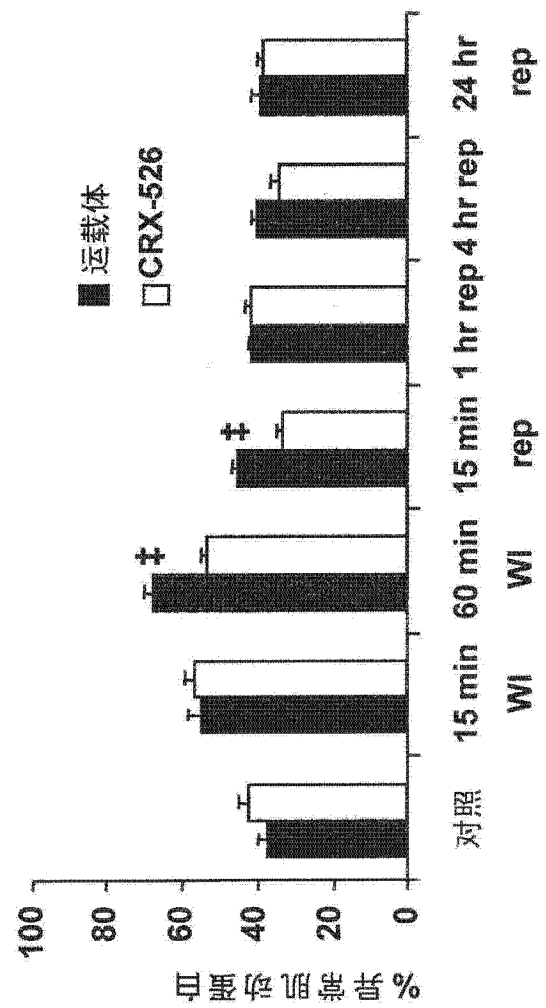


图 1C

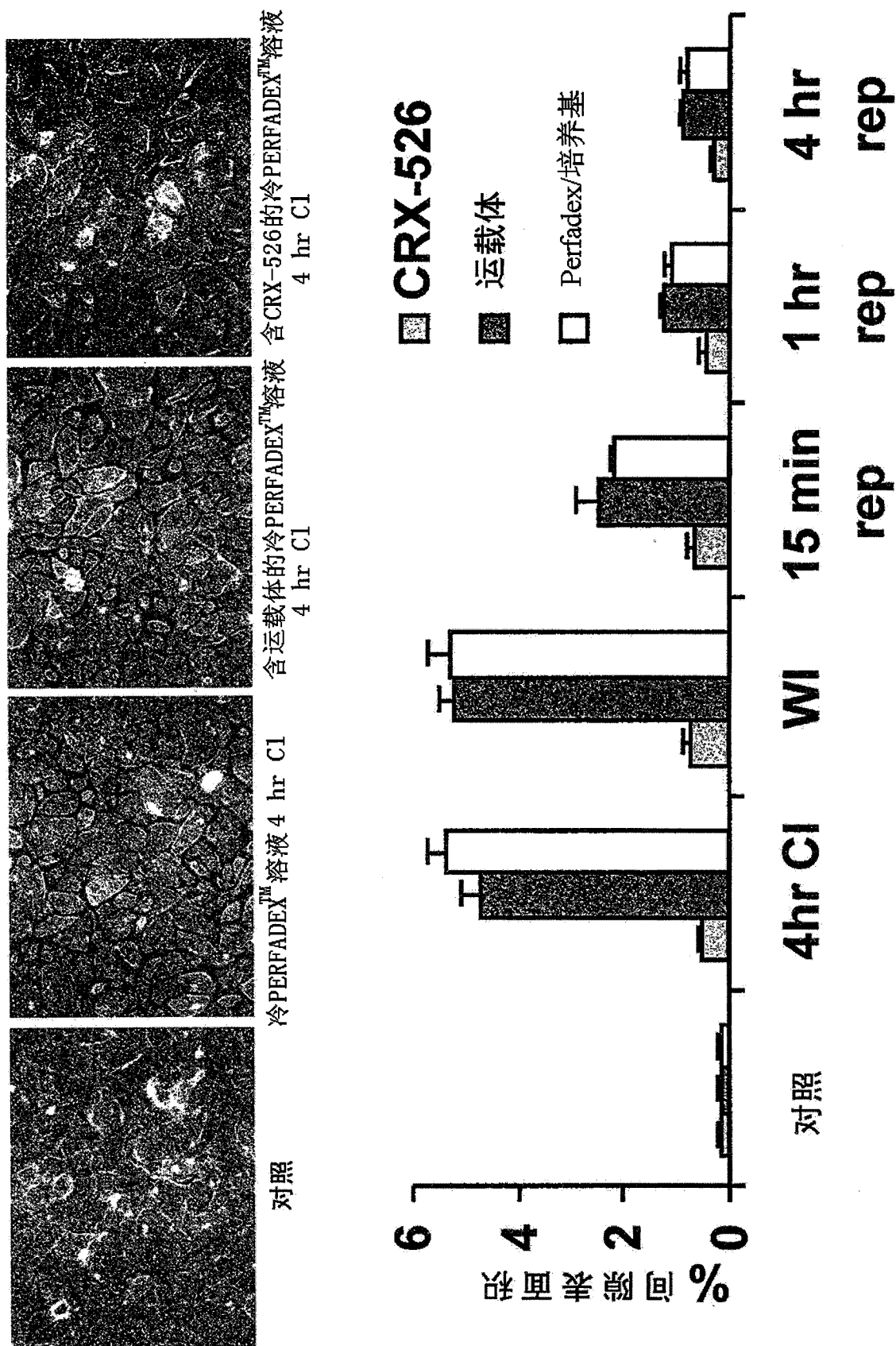


图 2A

图 2B