



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118475356 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 09

(21) 申请号 202280072208.7

格斯·贝格尼斯

(22) 申请日 2022.09.13

(74) 专利代理机构 北京恒律知识产权代理有限公司 11416

(30) 优先权数据

专利代理师 戴嵩玮

63/243,539 2021.09.13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2024.04.26

A61K 31/70 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 31/7004 (2006.01)

PCT/US2022/076360 2022.09.13

A61K 31/01 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A61K 31/702 (2006.01)

W02023/039600 EN 2023.03.16

(71) 申请人 鲁贝多生命科学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 马尔科·夸尔塔

马克·A·盖洛普

杰弗里·R·贾斯帕 保罗·凯茨

权利要求书3页 说明书101页 附图1页

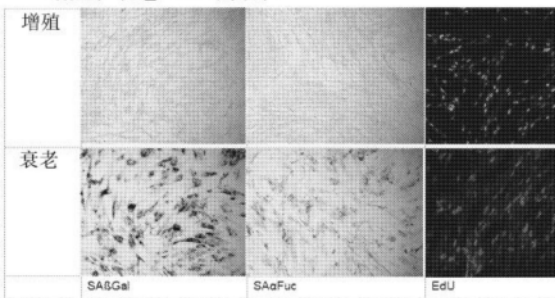
(54) 发明名称

糖衍生物的药物偶联物及其作为衰老细胞裂解剂的用途

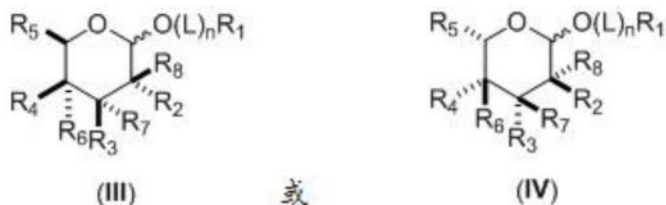
(57) 摘要

本文提供了用于选择性杀死与多种病理和疾病(包括与年龄相关的病理和疾病)相关的衰老细胞的试剂和方法。如本文所公开的,可以通过施用至少一种衰老细胞裂解剂或其药物组合物来治疗或预防与衰老细胞相关的疾病和病症。通过本文所述的制剂和方法治疗或预防的与衰老细胞相关的疾病或病症包括但不限于心血管疾病或病症、与动脉硬化相关的心血管疾病和病症,如动脉粥样硬化、特发性肺纤维化(IPF)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、骨关节炎、炎症性或自身免疫性疾病或病症、肺部疾病或病症、神经性疾病或病症、皮肤疾病或病症、化疗副作用、放疗副作用、转移和代谢性疾病。

增殖和衰老IMR90的表征



1. 一种式 (I) 或式 (I) 的化合物:



或其药学上可使用的盐、水合物和溶剂化物, 其中:

R_1 是 $R_{18}C(O)NH-$, 其中 R_{18} 是异羟肟酸组蛋白去乙酰化酶抑制剂的残基、Hsp90 抑制剂的残基、拓扑异构酶抑制剂的残基、Akt1 抑制剂的残基、DNA 烷基化剂的残基, 蛋白酶体抑制剂的残基或 Bcl2 抑制剂的残基;

L 是接头;

n 是 0 或 1;

R_2 是 $-H$ 、 $-F$ 、 $-OH$ 、 $-OC(O)R_9$ 或 $-OC(O)OR_{10}$;

R_3 是 $-H$ 、 $-F$ 、 $-OH$ 、 $-OC(O)R_{11}$ 或 $-OC(O)OR_{12}$;

R_4 是 $-H$ 、 $-F$ 、 $-OH$ 、 $-OC(O)R_{13}$ 或 $-OC(O)OR_{14}$;

或者, R_3 和 R_4 与其所键合的原子一起形成在缩醛碳原子上被 R_{17} 取代的 5 元环缩醛;

或者, R_3 和 R_4 与其所键合的原子一起形成 5 元环碳酸酯;

R_5 是 $-CH_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-CH_2OC(O)R_{15}$ 或 $-CH_2OC(O)OR_{16}$;

R_6 是 $-H$ 或 $-F$;

R_7 是 $-H$ 或 $-F$;

R_8 是 $-H$ 或 $-F$; 和

R_9 – R_{17} 独立地为烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、取代炔基、芳基、取代芳基、环烷基、取代环烷基、环杂烷基、取代环杂烷基、杂芳基或取代杂芳基;

前提是当 R_5 是 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 或 $-CF_3$ 时, 则 R_2 、 R_3 或 R_4 中有一个是 $-H$ 或 $-F$;

前提是当 R_5 是 $-CH_3$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-CH_2OC(O)R_{15}$ 或 $-CH_2OC(O)OR_{16}$ 时, 则 R_2 、 R_3 或 R_4 中有一个或两个是 $-H$ 或 $-F$; 和

并且前提是仅当 R_4 是 $-F$ 或 $-H$ 时, R_6 是 $-F$; 仅当 R_3 为 $-F$ 或 $-H$ 时, R_7 为 $-F$; 仅当 R_2 为 $-F$ 或 $-H$ 时, R_8 为 $-F$; 仅当 R_6 为 $-F$ 或 $-H$ 时, R_4 为 $-F$; 只有当 R_7 是 $-F$ 或 $-H$ 时, R_3 才是 $-F$; 且仅当 R_8 为 $-F$ 或 $-H$ 时, R_2 为 $-F$ 。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 R_5 是 $-CH_3$, R_2 是 $-H$ 或 $-F$ 。

3. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 R_5 是 $-CH_3$, R_3 是 $-H$ 或 $-F$ 。

4. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 R_5 是 $-CH_3$, R_4 是 $-H$ 或 $-F$ 。

5. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 R_5 是 $-CH_3$, R_2 是 $-F$, R_8 是 $-F$ 。

6. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 R_5 是 $-CH_3$, R_3 是 $-F$, R_7 是 $-F$ 。

7. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 R_5 是 $-CH_3$, R_4 是 $-F$, R_6 是 $-F$ 。

8. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 R_5 为 $-CH_2OH$ 、 $-CH_2OC(O)R_{15}$ 或 $-CH_2OC(O)OR_{16}$, 以及 R_2 为 $-H$ 或 $-F$ 。

9. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 R_5 是 $-CH_2OH$ 、 $-CH_2OC(O)R_{15}$ 或 $-CH_2OC(O)OR_{16}$, 以及 R_3 是 $-H$ 或 $-F$ 。

10. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_5 为 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})R_{15}$ 或 $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{OR}_{16}$,以及 R_4 为 $-\text{H}$ 或 $-\text{F}$ 。

11. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_5 为 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})R_{15}$ 或 $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{OR}_{16}$, R_2 为 $-\text{F}$ 以及 R_8 为 $-\text{F}$ 。

12. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_5 为 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})R_{15}$ 或 $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{OR}_{16}$, R_3 为 $-\text{F}$ 以及 R_7 为 $-\text{F}$ 。

13. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_5 为 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})R_{15}$ 或 $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{OR}_{16}$, R_4 为 $-\text{F}$ 以及 R_6 为 $-\text{F}$ 。

14. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_5 是 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CHF}_2$ 或 $-\text{CF}_3$, R_2 是 $-\text{H}$ 或 $-\text{F}$ 。

15. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_5 是 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CHF}_2$ 或 $-\text{CF}_3$, R_3 是 $-\text{H}$ 或 $-\text{F}$ 。

16. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_5 是 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CHF}_2$ 或 $-\text{CF}_3$, R_4 是 $-\text{H}$ 或 $-\text{F}$ 。

17. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_5 是 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CHF}_2$ 或 $-\text{CF}_3$, R_2 是 $-\text{F}$, R_8 是 $-\text{F}$ 。

18. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_5 是 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CHF}_2$ 或 $-\text{CF}_3$, R_3 是 $-\text{F}$, R_7 是 $-\text{F}$ 。

19. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_5 是 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CHF}_2$ 或 $-\text{CF}_3$, R_4 是 $-\text{F}$, R_6 是 $-\text{F}$ 。

20. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_2 是 $-\text{H}$ 或 $-\text{F}$, R_3 是 $-\text{H}$ 或者 $-\text{F}$ 。

21. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_2 是 $-\text{H}$ 或 $-\text{F}$, R_4 是 $-\text{H}$ 或者 $-\text{F}$ 。

22. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_3 是 $-\text{H}$ 或 $-\text{F}$, R_4 是 $-\text{H}$ 或者 $-\text{F}$ 。

23. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_2 是 $-\text{H}$ 或 $-\text{F}$, R_3 是 $-\text{F}$, R_7 是 $-\text{F}$ 。

24. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_2 是 $-\text{H}$ 或 $-\text{F}$, R_4 是 $-\text{F}$, R_6 是 $-\text{F}$ 。

25. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_3 是 $-\text{H}$ 或 $-\text{F}$, R_4 是 $-\text{F}$, R_6 是 $-\text{F}$ 。

26. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_2 是 $-\text{F}$, R_8 是 $-\text{F}$, R_3 是 $-\text{H}$ 或 $-\text{F}$ 。

27. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_2 是 $-\text{F}$, R_8 是 $-\text{F}$, R_4 是 $-\text{H}$ 或 $-\text{F}$ 。

28. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_3 是 $-\text{F}$, R_7 是 $-\text{F}$, R_4 是 $-\text{H}$ 或 $-\text{F}$ 。

29. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_2 是 $-\text{F}$, R_8 是 $-\text{F}$ 。

30. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_3 是 $-\text{F}$, R_7 是 $-\text{F}$ 。

31. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_4 是 $-\text{F}$, R_6 是 $-\text{F}$ 。

32. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_2 是 $-\text{H}$ 或 $-\text{F}$ 。

33. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_3 是 $-\text{H}$ 或 $-\text{F}$ 。

34. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R_4 是 $-\text{H}$ 或 $-\text{F}$ 。

35. 根据权利要求1-34中任一项所述的化合物,其中 R_9 - R_{17} 独立地为烷基、烯基、炔基、芳基、取代芳基、环烷基、环杂烷基或杂芳基。

36. 根据权利要求1-34中任一项所述的化合物,其中 R_9 - R_{17} 独立地为烷基、烯基、芳基、取代芳基或环杂烷基。

37. 根据权利要求1-34中任一项所述的化合物,其中 R_9 - R_{17} 独立地为 (C_1-C_4) 烷基、 (C_1-C_4) 烯基、苯基、取代苯基或 (C_5-C_7) 环杂烷基。

38. 根据权利要求1-37中任一项所述的化合物,其中所述异头碳是 S 立体异构体。

39. 根据权利要求1-38中任一项所述的化合物,其中 R_1 是 $R_{18}\text{C}(\text{O})\text{NH}-$,其中 R_{17} 是异羟肟酸组蛋白脱乙酰酶抑制剂的残基。

40. 根据权利要求1-38中任一项所述的化合物,其中 R_1 是Hsp90抑制剂的残基。

41. 根据权利要求1-38中任一项所述的化合物,其中 R_1 是拓扑异构酶抑制剂的残基。
42. 根据权利要求1-38中任一项所述的化合物,其中 R_1 是Akt1抑制剂的残基。
43. 根据权利要求1-38中任一项所述的化合物,其中 R_1 是DNA烷基化剂的残基。
44. 根据权利要求1-38中任一项所述的化合物,其中 R_1 是蛋白酶体抑制剂的残基。
45. 根据权利要求1-38中任一项所述的化合物,其中 R_1 是Bcl2抑制剂的残基。
46. 一种药物组合物,其包含权利要求1-38中任一项所述的化合物和药学上可接受的赋形剂。
47. 一种治疗衰老相关疾病或病症的方法,包括给有需要的受试者施用有效治疗量的权利要求1-38中任一项所述的化合物。
48. 一种治疗衰老相关疾病或病症的方法,包括给有需要的受试者施用有效治疗量的权利要求46所述的药物组合物。

糖衍生物的药物偶联物及其作为衰老细胞裂解剂的用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 U.S.C. §119(e) 要求于2021年9月13日提交的申请号为63/243,539 的美国临时专利申请的优先权,该申请的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本文提供了用于选择性杀死与许多病理和疾病(包括与年龄相关的病理和疾病)相关的衰老细胞的衰老细胞裂解剂。如本文所公开的,可以通过施用至少一种衰老细胞裂解剂或其药物组合物来治疗或预防与衰老细胞相关的疾病和病症。通过本文所述方法治疗或预防的与衰老细胞相关的疾病或病症包括但不限于心血管疾病或病症、与动脉硬化相关的心血管疾病和病症,如动脉粥样硬化、特发性肺纤维化(IPF)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、骨关节炎、炎症性或自身免疫性疾病或病症、肺部疾病或病症、神经性疾病或病症、皮肤疾病或病症、化疗副作用、放疗副作用、转移和代谢性疾病。

背景技术

[0004] 衰老是大多数慢性病、残疾和健康状况下降的风险因素。衰老细胞是处于复制停滞的细胞,在衰老个体中积累,并可能部分或显著地导致细胞和组织退化,这是衰老和年龄相关疾病的基础(例如,参见Childs等人,Nat.Rev.Drug Discov.16(2017)718-735)。细胞也可能在暴露于环境、化学或生物损伤后或由于疾病而衰老(例如,参见Demaria等人,Cancer Discovery 7(2017)165-176;Schafer等人,Nat.Comm.8(2017)doi:10.1038/ncomms14532)。

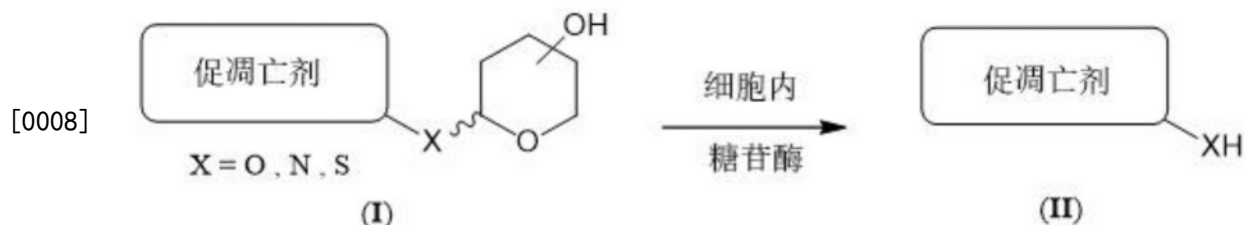
[0005] 本领域先前已经描述了具有多种药理学机制的衰老细胞裂解剂。衰老细胞裂解剂可以是一种或多种Bcl-2抗凋亡蛋白家族成员的特异性抑制剂,其中该抑制剂至少抑制Bcl-xL(例如,Bcl-2/Bcl-xL/Bcl-w抑制剂;选择性的Bcl-xL抑制剂;Bcl-xL/Bcl-w抑制剂(例如,Navitoclax、ABT-737、A1331852、A1155463);参见例如Childs等人,上文;Zhu等,Aging 9(2017)955-965;Yosef等人,Nature Commun.(2016)doi:10.1038);Akt激酶特异性抑制剂(例如MK-2206);受体酪氨酸激酶抑制剂(例如,达沙替尼,参见Zhu等人,Aging Cell 14(2015)654-658);CDK4/6抑制剂(例如,帕博西尼,参见Whittaker等人,Pharmacol.Ther.173(2017)83-105);mTOR抑制剂(例如雷帕霉素,参见Laberge等人,Nat.Cell Biol.17(2015)1049-1061);MDM2抑制剂(例如,Nutlin-3,RG-7112,参见美国专利申请2016/0339019);Hsp90抑制剂(例如,17-DMAG,ganetespib,参见Fuhrmann-Stroissnigg等人,Nat.Comm.8(2017)doi:10.1038/s41467-017-00314-z);黄酮(例如,槲皮素、非瑟酮,参见Zhu等人,Aging Cell 14(2015)654-658;Zhu等人,Aging 9(2017)955-965);或组蛋白脱乙酰酶抑制剂(例如,帕比司他,参见例如Samaraweera等人,Sci.Rep.7(2017)1900.doi:10.1038/s41598-017-01964-1)。

[0006] 一个重大的挑战是鉴定选择性地杀死衰老细胞同时保留非衰老细胞的衰老细胞裂解剂。此外,许多已知的衰老细胞裂解剂最初被开发为细胞毒性抗癌剂,随后被重新用于

“选择性”去除衰老细胞群。因为增殖细胞通常对抗肿瘤剂的细胞毒性或细胞抑制作用更敏感,造血细胞中的剂量限制性毒性是一种经常观察到的副作用,其限制了抗衰老治疗的临床应用(例如,中性粒细胞减少症是一种与抗凋亡Bcl-2家族蛋白抑制剂的使用相关的具有良好特征的毒性,见Levenson等人,Sci.Transl.Med. (2015) 7:279ra40.doi:10.1126/scitranslmed.aaa4642)。脉冲式施用这种衰老细胞裂解剂已被认为是一种机制,其以最大限度地减少非衰老细胞这些分子的接触,并可能限制脱靶效应。因此,需要对杀死衰老细胞具有改善的选择性的衰老细胞裂解剂,其对非衰老细胞具有最小的毒性。

发明内容

[0007] 通过提供无毒的衰老细胞裂解剂前药来满足这些和其它需求,这些衰老细胞裂解剂被优先积聚在衰老细胞内的水解酶激活。在一个方面,水解酶是糖苷酶,并且这些与衰老相关的升高的细胞内糖苷酶活性来将促凋亡剂的无毒前药衍生物(I)转化为有毒的促进凋亡的母体化合物(II),从而导致衰老细胞的特异性杀伤。



[0009] 在一些实施方案中,化合物(II)能够促进非增殖细胞的凋亡。

[0010] 在一个方面,提供了毒性衰老细胞裂解剂的无毒前药,当其在衰老细胞内裂解为活性衰老细胞裂解剂时,特异性地导致衰老细胞死亡。在一些实施方案中,提供了组蛋白乙酰酶抑制剂的前药。在其它实施方案中,提供了Hsp90抑制剂的前药。在其它实施方案中,提供了拓扑异构酶1抑制剂的前药。在其它实施方案中,提供了DNA烷基化剂的前药。在其它实施方案中,提供了Akt1抑制剂的前药。在其它实施方案中,提供蛋白酶体抑制剂的前药。在其它实施方案中,提供了Bcl2抑制剂的前药。还提供了衍生物,包括本文所述前药的盐、溶剂合物、水合物、代谢产物。进一步提供了药物组合物,其包括本文提供的前药和载体。

[0011] 在另一个方面,治疗、预防或改善医学病症症状的方法,例如心血管疾病或病症、与动脉硬化相关的心血管疾病和病症,如动脉粥样硬化、特发性肺纤维化(IPF)、慢性阻塞性肺病(COPD)、骨关节炎、炎症性或自身免疫性疾病或病症、肺部疾病或病症、神经性疾病或病症、皮肤疾病或病症、化疗副作用、放疗副作用、转移和代谢性疾病。在实施所述方法时,将有效治疗量的所述化合物或其药物组合物施用于受试者。

[0012] 在另一个方面,提供了一种治疗与年龄相关的疾病或病症的方法。所述方法包括向受试者施用包含有效治疗量的本文提供的一种或多种衰老细胞裂解剂的组合物。

[0013] 在另一个方面,提供了一种用于延缓受试者衰老的至少一个特征的方法。所述方法包括向受试者施用包含有效治疗量的本文提供的一种或多种衰老细胞裂解剂的组合物。

[0014] 在另一个方面,提供了一种杀死治疗诱导的衰老细胞的方法。所述方法包括向已接受DNA损伤治疗的受试者施用包含有效治疗量的本文提供的一种或多种衰老细胞裂解剂的组合物。

附图说明

[0015] 图1显示了具有代表性的IMR90图像(从L到R:SA- β -Gal, SA- α -Foc, EdU掺入测定[EdU荧光团在FITC通道中可见,用DAPI复染])。

[0016] 图2显示了具有代表性的A549图像掺入测定[EdU荧光团在FITC通道中可见,用DAPI复染]。

具体实施方式

[0017] 定义

[0018] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。如果一个术语存在多个定义,除非另有说明,则以本节中的定义为准。

[0019] 如本文所用,除非另有规定,当与具有数值或数值范围的属性一起使用时,术语“大约”和“近似”表示,在描述特定属性时,该数值或数值范围可能会偏离本领域普通技术人员认为合理的程度。具体地,当在本文中使用术语“大约”和“近似”时,表示数值或数值范围可以变化所述数值或数值的范围的5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%或0.1%。此外,除非上下文另有明确规定,单数形式“一种(a)”和“所述(the)”包括复数形式。因此,例如,所述的“化合物”包括多种此类化合物,所述的“测定”包括提及一种或多种本领域技术人员已知的测定及其等同物。

[0020] 不在两个字母或符号之间的破折号(“-”)用于表示取代基的连接点。例如,-C(O)NH₂通过碳原子连接。在化学基团的前面或末端加一个破折号是为了方便;化学基团可以用或不用一个或多个破折号来描述,而不会失去它们的普通含义。通过结构中的线绘制的波浪线表示基团的附着点。除非在化学或结构上有要求,否则化学基团的书写或命名顺序不会指示或暗示方向性。

[0021] 前缀“C_{u-v}”表示以下基团具有u至v个碳原子。应当理解的是,u至v个碳原子包括u+1至v、u+2至v、u+3至v、u+1至u+3至v、u+1至u+4至v、u+2至u+4至v等,并且包括u和v的所有可能的排列。

[0022] 本文所用的“衰老特征”包括但不限于免疫系统的系统性衰退、肌肉萎缩和肌肉力量下降、皮肤弹性下降、伤口愈合延迟、视网膜萎缩、晶状体透明度降低、听力下降、骨质疏松、少肌症、头发变白、皮肤起皱、视力差、虚弱和认知障碍。

[0023] 本文所用的“与年龄相关的疾病或病症”包括但不限于退行性疾病或功能下降障碍,如阿尔茨海默病、帕金森病、白内障、黄斑退化、青光眼、虚弱、肌肉无力、认知障碍、动脉粥样硬化、急性冠状动脉综合征、心肌梗死、中风、高血压、特发性肺纤维化(IPF)、慢性阻塞性肺病(COPD)、骨关节炎、2型糖尿病、肥胖症、脂肪功能障碍、冠状动脉疾病、脑血管疾病、牙周病、癌症治疗相关残疾(如各种组织的萎缩和纤维化)、脑和心脏损伤,以及治疗相关骨髓增生异常综合征,以及与加速衰老和/或DNA损伤修复和端粒维持缺陷相关的疾病,如早衰综合征(即Hutchinson-Gilford早衰综合征、沃纳综合症、布鲁姆综合症、Rothmund-Thomson综合症、科凯恩综合症、着色性干皮病、毛发低硫营养不良、合并着色性干皮病-科凯恩综合症、限制性皮肤病),共济失调毛细血管扩张症、范科尼贫血、弗里德赖希型共济失调、先天性角化不良、再生障碍性贫血等。

[0024] “烷基”本身或作为另一个取代基的一部分,是指通过从母体烷烃的单个碳原子中去除一个氢原子而获得的饱和或不饱和、支链、直链或环状单价烃基。典型的烷基包括但不限于甲基;乙基;丙基,例如丙1基、丙2基等;丁基如丁1基、丁2基、2-甲基丙-1-基、2-甲酯丙-2-基等;诸如此类。在一些实施方案中,烷基基团包括1至20个碳原子(C_1 - C_{20} 烷基)。在其它实施方案中,烷基基团包括1至10个碳原子(C_1 - C_{10} 烷基)。在其它实施方案中,烷基基团包括1至6个碳原子(C_1 - C_6 烷基)。

[0025] “烯基”本身或作为另一个取代基的一部分,是指具有至少一个碳-碳双键的不饱和和支链、直链或环状烷基,该双键是通过从母体烯烃的单个碳原子中去除一个氢原子而获得的。该基团在双键附近可以是顺式或反式构象。典型的烯基包括但不限于乙烯基;丙烯基,如丙-1-烯-1-基、丙-1-烯-2-基、丙-2-烯-1-基(烯丙基)、丙-2-烯-2-基、环丙-1-烯-1-基;环丙-2-烯-1-基;丁烯基,例如丁-1-烯-1-基、丁-1-烯-2-基、2-甲基-丙-1-烯-1-基、丁-2-烯-1-基、丁-2-烯-2-基、丁-1,3-二烯-1-基、丁-1,3-二烯-2-基、环丁-1-烯-1-基、环丁-1-烯-3-基、环丁-1,3-二烯-1-基等;诸如此类。在一些实施方案中,烯基基团包含1至20个碳原子(C_1 - C_{20} 烯基)。在其它实施方案中,烯基基团包含1至10个碳原子(C_1 - C_{10} 烯基)。在其它实施方案中,烯基基团包含1至6个碳原子(C_1 - C_6 烯基)。

[0026] “炔基”本身或作为另一个取代基的一部分,是指具有至少一个碳-碳三键的不饱和和支链、直链或环状烷基,该键是通过从母体炔烃的单个碳原子中去除一个氢原子而获得的。典型的炔基基团包括但不限于乙炔基;丙炔基,如丙-1-炔-1-基、丙-2-炔-1-基等;丁炔基,例如丁-1-炔-1-基、丁-1-炔-3-基、丁-3-炔-1-基等;诸如此类。在一些实施方案中,炔基基团包含1至20个碳原子(C_1 - C_{20} 炔基)。在其它实施方案中,炔基基团包含1至10个碳原子(C_1 - C_{10} 炔基)。在另一些实施方案中,炔基基团包含1至6个碳原子(C_1 - C_6 炔基)。

[0027] “芳基”本身或作为另一个取代基的一部分,是指如本文所定义的通过从母体芳香环系统的单个碳原子中去除一个氢原子而获得的单价芳香烃基。典型的芳基包括但不限于衍生自苯并蒽、蒽烯、醋菲烯、蒽、薹(azulene)、苯、蒽(chrysene)、晕苯(coronene)、荧蒽、芴、并六苯、己芬(hexaphene)、十六烯基乙酸酯(hexalene)、不对称引达省(as-indacene)、对称引达省(s-indacene)、二氢化茚、茚、萘、并八苯(octacene)、octaphene、octalene、卵苯、戊-2,4-二烯、并五苯、并环戊二烯、戊芬、茛、非那烯(phenalene)、菲、苝(picene)、七曜烯(pleiadene)、苝、吡蒽、玉红省(rubicene)、苯并菲、三萘(trinaphthalene)等。在一些实施方案中,芳基基团包含6至20个碳原子(C_6 - C_{20} 芳基)。在其它实施方案中,芳基基团包含6至15个碳原子(C_6 - C_{15} 芳基)。在其它实施方案中,芳基基团包含6至10个碳原子(C_6 - C_{10} 芳基)。

[0028] “芳烷基”本身或作为另一个取代基的一部分,是指无环烷基,其中与碳原子(通常是末端或 sp^3 碳原子)键合的一个氢原子,被本文定义的芳基取代。典型的芳烷基包括但不限于苄基、2-苯基乙烷-1-基、2-苯基乙烯-1-基、萘甲基、2-萘基乙烷-1-基、2-萘基噻吩-1-基、萘苄基、2-萘酚乙烷-1-基等。在一些实施方案中,芳烷基基团为(C_6 - C_{30})芳烷基,例如,芳烷基基团的烷基部分为(C_1 - C_{10})烷基,芳基部分为(C_6 - C_{20})芳基。在其它实施方案中,芳烷基基团为(C_6 - C_{20})芳烷基,例如,芳烷基基团的烷基部分为(C_1 - C_8)烷基,芳基部分为(C_6 - C_{12})芳基。在另一些实施方案中,芳烷基基团是(C_6 - C_{15})芳烷基,例如,芳烷基基团的烷基部分是(C_1 - C_5)烷基,芳基部分是(C_6 - C_{10})芳基。

[0029] “芳烯基”本身或作为另一个取代基的一部分,是指无环烯基,其中与碳原子键合的一个氢原子被本文定义的芳基取代。在一些实施方案中,芳烯基基团是(C₆-C₃₀)芳基烯,例如,芳烷基基团的烯基部分是(C₁-C₁₀)烯基,芳基部分为(C₆-C₂₀)芳基。在其它实施方案中,芳烯基基团为(C₆-C₂₀)芳基烯,例如,芳烯基基团的烯基部分为(C₁-C₈)烯基,芳基部分为(C₆-C₁₂)芳基。在另一些实施方案中,芳烯基基团为(C₆-C₁₅)芳基烯,例如,芳烯基基团的烯基部分为(C₁-C₅)烯基,芳基部分是(C₆-C₁₀)芳基。

[0030] “芳炔基”本身或作为另一个取代基的一部分,是指无环炔基,其中与碳原子键合的一个氢原子被本文定义的芳基取代。在一些实施方案中,芳炔基基团是(C₆-C₃₀)芳基芳基基,例如,芳炔基基团的炔基部分是(C₁-C₁₀)炔基,芳基部分为(C₆-C₂₀)芳基。在其它实施方案中,芳炔基基团为(C₆-C₂₀)芳炔基,例如,芳炔基基团的炔基部分为(C₁-C₈)炔基,芳基部分为(C₆-C₁₂)芳基。在另一些实施方案中,芳炔基基团是(C₆-C₁₅)芳炔基,例如,芳炔基基团的炔基部分是(C₁-C₅)炔基,芳基部分为(C₆-C₁₀)芳基。

[0031] “碳水化合物衍生物”是指碳水化合物,通式为C_nH_{2n}O_n,附着在一组化合物上。在一些实施方案中,碳水化合物衍生物通常含有五个或六个碳原子。在其它实施方案中,碳水化合物衍生物是单糖(例如,葡萄糖、果糖、半乳糖、核糖)。在其它实施方案中,碳水化合物衍生物包括二糖(例如,乳糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖、壳聚糖、聚二糖等)。在其它实施方案中,碳水化合物衍生物包括低聚糖(例如,低聚果糖、低聚半乳糖、棉子糖、车前糖(plantose)、毛蕊花糖(veracose)等)。在其它实施方案中,碳水化合物衍生物包括多糖(例如,纤维素、直链淀粉、淀粉、几丁质、果胶、半乳糖等)。

[0032] “环烷基”本身或作为另一个取代基的一部分,是指通过从母体环烷烃的单个碳原子中去除一个氢原子而获得的饱和环状单价烃基。典型的环烷基包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基;等;诸如此类。在一些实施方案中,环烷基包含3至20个碳原子(C₁-C₁₅环烷基)。在其它实施方案中,环烷基包含3至10个碳原子(C₁-C₁₀环烷基)。在其它实施方案中,环烷基包含3至8个碳原子(C₁至C₈环烷基)。术语“环状单价烃基”还包括具有单个基团和3至12个碳原子的多环烃环系统。示例性的多环烷基环包括例如降冰片基(norbornyl)、松油基(pinylyl)和金刚烷基。

[0033] “环烯基”本身或作为另一个取代基的一部分,是指通过从母体环烯烃的单个碳原子中去除一个氢原子而获得的不饱和环状单价烃基。典型的环烯基包括但不限于环丙烯、环丁烯、环戊烯;等;诸如此类。在一些实施方案中,环烯基包含3至20个碳原子(C₁-C₂₀环烯基)。在其它实施方案中,环烯基包含3至10个碳原子(C₁-C₁₀环烯基)。在其它实施方案中,环烯基包含3至8个碳原子(C₁-C₈环烯基)。术语“环状单价烃基”还包括具有单个基团和3至12个碳原子的多环烃环系统。

[0034] “环杂烷基”本身或作为另一个取代基的一部分,是指本文定义的环境基,其中一个或多个碳原子(以及任选的任何相关的氢原子)各自独立地被以下“杂烷基”中定义的同或不同的杂原子或杂原子基团取代。在一些实施方案中,环杂烷基包括3至20个碳原子和杂原子(C₁₋₂₀环杂烷基)。在其它实施方案中,环杂烷基包括3-10个碳原子和杂原子(C₁₋₁₀环杂烷基)。在其它实施方案中,环杂烷基包括3至8个碳原子和杂原子(C₁₋₈环杂烷基)。术语“环状单价杂烷基”还包括具有单个基团和3-12个碳原子和至少一个杂原子的多环杂烷基环系统。

[0035] “环杂烯基”本身或作为另一取代基的一部分,是指本文定义的环境基,其中一个或多个碳原子(以及任意的任何相关的氢原子)各自独立地被以下“杂烯基”中定义的环境或不同的杂原子或杂原子基团取代。在一些实施方案中,环杂烯基包含3至20个碳原子和杂原子($_{1-20}$ 环杂链烯基)。在其它实施方案中,环杂烯基包含3-10个碳原子和杂原子($_{1-10}$ 环杂链烯基)。在其它实施方案中,环杂烯基包含3至8个碳和杂原子($_{1-8}$ 环杂链烯基)。术语“环状单价杂烯基”还包括具有单个基团和3-12个碳和至少一个杂原子的多环杂烯基环系统。

[0036] “化合物”是指本文公开的结构式所包含的化合物,并包括本文公开其结构的这些式中的任何特定化合物。化合物可以通过其化学结构和/或化学名称来识别。化学结构决定了化合物的性质。本文所述的化合物可以含有一个或多个手性中心和/或双键,因此可以作为立体异构体存在,例如双键异构体(即几何异构体)、对映体或非对映体。因此,本文所述的化学结构包括结构所述的立体异构体形式(例如几何纯、对映异构体纯或非对映异构体纯)。本文所述的化学结构还包括所述化合物的对映异构和立体异构衍生物。使用本领域技术人员熟知的分离技术或手性合成技术可以将对映异构体和立体异构体混合物分解成它们的组分对映异构体或立体异构体。所述化合物也可以几种互变异构形式存在,包括烯醇形式、酮形式及其混合物。因此,本文描述的化学结构包括所示化合物的所有可能的互变异构体形式。所述化合物还包括同位素标记的化合物,其中一个或多个原子的原子质量不同于自然界中常规发现的原子质量。可掺入本文公开的化合物中的同位素的示例包括但不限于 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{17}O 等。化合物可以未溶剂化形式以及溶剂化形式存在,包括水合形式。通常,化合物可以是水合的或溶剂化的。某些化合物可能以多种结晶或无定形形式存在。一般而言,所有物理形式对于本文所设预想的用途都是等效的,并且旨在落入本公开的范围。此外,应当理解,当举例说明化合物的部分结构时,括号表示部分结构与分子的其余部分的连接点。

[0037] 本文所用的“DNA损伤疗法”包括但不限于g-辐射、烷化剂,如氮芥(例如,苯丁酸氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑)、亚硝脒(链脲佐菌素、卡莫司汀、洛莫司汀)、烷基磺酸盐(例如,白消安)、三嗪类(达卡巴嗪、替莫唑胺)和乙烯亚胺(例如,噻替帕、六甲蜜胺)、铂类药物,例如,顺铂、卡铂、奥沙利铂,抗代谢剂,例如5-氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤、卡培他滨、克拉屈滨、氯法拉滨、阿糖胞苷、氟尿苷、氟达拉滨、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、培美曲塞、喷司他丁、硫鸟嘌呤,蒽环类药物,例如柔红霉素、阿霉素、表柔比星、伊达比星,抗肿瘤抗生素如放线菌素-D、博来霉素、丝裂霉素C、米托蒽醌、拓扑异构酶抑制剂如拓扑异构酶I抑制剂(如拓扑替康、伊立替康)和拓扑异构酶II抑制剂(如依托泊苷、替尼泊苷、米托蒽醌),有丝分裂抑制剂如紫杉烷(如紫杉醇、多西他赛)、埃博霉素(如伊沙匹隆),长春花生物碱(如长春碱、长春新碱、长春瑞滨)和雌莫司汀。

[0038] “卤素”本身或作为另一个取代基的一部分是指基团-F、-Cl、-Br或-I。

[0039] “杂烷基”是指烷基,其中一个或多个碳原子(以及任意的任何相关的氢原子)各自独立地被相同或不同的杂原子或杂原子基团取代。可以取代碳原子的典型杂原子或杂原子基团包括但不限于-O-、-S-、-N-、-Si-、-NH-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)NH-、-S(O)₂NH-等及其组合。杂原子或杂原子基团可以置于烷基、烯基或炔基的任何内部位置。可包含在这些基团中的典型杂原子基团包括但不限于-O-、-S-、-O-O-、-S-S-、-O-S-、-NR⁵⁰¹R⁵⁰²、=N-N=、-N=N-、-N=N-NR⁵⁰³R⁵⁰⁴、-PR⁵⁰⁵-、-P(O)₂-、-POR⁵⁰⁶-、-O-P(O)₂-、-SO-、-SO₂-、-SnR⁵⁰⁷R⁵⁰⁸等,其中

R^{501} 、 R^{502} 、 R^{503} 、 R^{504} 、 R^{505} 、 R^{506} 、 R^{507} 和 R^{508} 独立地为氢、烷基、芳基、取代芳基、杂烷基、杂芳基或取代的杂芳基。在一些实施方案中,杂烷基包括1至20个碳原子和杂原子($_{1-20}$ 杂烷基)。在其它实施方案中,杂烷基包括1-10个碳原子和杂原子($_{1-10}$ 杂烷基)。在另一些实施方案中,杂烷基包括1-6个碳原子和杂原子($_{1-6}$ 杂烷基)。

[0040] “杂烯基”是指其中一个或多个碳原子(以及任选的任何相关的氢原子)各自独立地被相同或不同的杂原子或杂原子基团取代的烯基。可以取代碳原子的典型杂原子或杂原子基团包括但不限于-O-、-S-、-N-、-Si-、-NH-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)NH-、-S(O)₂NH-等及其组合。杂原子或杂原子基团可以置于烷基、烯基或炔基的任何内部位置。可包含在这些基团中的典型杂原子基团包括但不限于-O-、-S-、-O-O-、-S-S-、-O-S-、-NR⁵⁰¹R⁵⁰²、=N-N=、-N=N-、-N=N-NR⁵⁰³R⁴⁰⁴、-PR⁵⁰⁵-、-P(O)₂-、-POR⁵⁰⁶-、-O-P(O)₂-、-SO-、-SO₂-、-SnR⁵⁰⁷R⁵⁰⁸等,其中 R^{501} 、 R^{502} 、 R^{503} 、 R^{504} 、 R^{505} 、 R^{506} 、 R^{507} 和 R^{508} 独立地为氢、烷基、芳基、取代芳基、杂烷基、杂芳基或取代的杂芳基。在一些实施方案中,杂烯基包括1至20个碳原子和杂原子($_{1-20}$ 杂烯基)。在其它实施方案中,杂烯基包括1-10个碳原子和杂原子($_{1-10}$ 杂烯基)。在另一些实施方案中,杂烯基包括1-6个碳原子和杂原子($_{1-6}$ 杂烯基)。

[0041] “杂芳基”本身或作为另一个取代基的一部分,是指如本文所定义的通过从母体杂芳环系统的单个原子中去除一个氢原子而获得的单价杂芳基。典型的杂芳基基团包括但不限于衍生自吡啶、 β -咔啉、色原烷、色原烯、噌啉、呋喃、咪唑、吡唑、吡啶、吡啶啉、中氮茚、异苯并呋喃、异色原烯(isochromene)、异吡啶、异吡啶啉、异喹啉、异噻唑、异恶唑、萘啶、恶二唑、恶唑、呋啶、菲啶、菲咯啉、吩嗪、酞嗪、蝶啶、嘌呤、吡喃、吡嗪、吡唑、哒嗪、吡啶、嘧啶、吡咯、吡咯嗪、喹啉、喹啉、喹啉、喹啉、四唑、噻二唑、噻唑、噻吩、三唑、氧杂蒽等。在一些实施方案中,杂芳基包括5至20个环原子(5-20元杂芳基)。在其它实施方案中,杂芳基包括5至10个环原子(5-10元杂芳基)。示例性杂芳基包括衍生自呋喃、噻吩、吡咯、苯并噻吩、苯并呋喃、苯并咪唑、吡啶、吡唑、喹啉、咪唑、恶唑、异恶唑和吡嗪的杂芳基。

[0042] “杂芳烷基”本身或作为另一个取代基的一部分是指一种无环烷基,其中与碳原子键合的一个氢原子,通常是末端或sp³碳原子,被杂芳基取代。在一些实施方案中,所述杂芳烷基是6-21元杂芳烷基,例如,所述杂芳烷基的烷基部分是(C₁-C₆)烷基,并且所述杂芳基部分是5-15元杂芳基。在其它实施方案中,杂芳基烷基为6-13元杂芳烷基,例如烷基部分为(C₁-C₃)烷基,杂芳基部分为5-10元杂芳基。

[0043] “杂芳基烯基”本身或作为另一个取代基的一部分是指无环烯基,其中一个与碳原子键合的氢原子被杂芳基取代。在一些实施方案中,杂芳基烯基基团是6-21元杂芳烷基,例如,杂芳基烯基的烯基部分是(C₁-C₆)烯基,并且杂芳基部分是5-15元杂芳基。在其它实施方案中,杂芳基烯基是6-13元杂芳基烷基,例如,烯基部分是(C₁-C₃)烷基,杂芳基部分是5-10元杂芳基。

[0044] “杂芳基炔基”本身或作为另一个取代基的一部分是指无环烯基,其中与碳原子键合的一个氢原子被杂芳基取代。在一些实施方案中,杂芳基炔基基团是6-21元杂芳烷基,例如,杂芳基炔基的炔基部分是(C₁-C₆)炔基,并且杂芳基部分是5-15元杂芳基。在其它实施方案中,杂芳基炔基是6-13元杂芳基,例如,炔基部分是(C₁-C₃)烷基,杂芳基部分是5-10元杂芳基。

[0045] “水合物”是指将水以化学计量比例掺入本文所述化合物的晶格中,从而形成加合

物。制备水合物的方法包括但不限于,在含有水蒸气的气氛中储存,包括水的剂型,或常规的药物处理步骤,例如结晶(即,从水或混合的水性溶剂)、冷冻干燥、湿法造粒、水性膜包衣或喷雾干燥。在某些情况下,结晶溶剂化物暴露于水蒸气或无水材料悬浮在水中时也可以形成水合物。水合物也可能以一种以上的形式结晶,导致水合物多态性。参见例如(Guillory,K.,Chapter 5,pp.202205in Polymorphism in Pharmaceutical Solids,(Brittain,H.ed.),Marcel Dekker,Inc.,New York,NY,1999)。上述制备水合物的方法完全在本领域技术人员的范围内,是完全常规的,除本领域典型方法之外,不需要任何实验。水合物可以通过本领域技术人士熟知的方法进行表征和/或分析,例如单晶X射线衍射、X射线粉末衍射、偏光光学显微镜、热显微镜、热重分析、差热分析、差示扫描量热法、红外光谱、拉曼光谱和核磁共振光谱。(Brittain,H.,Chapter 6,pp.205208in Polymorphism in Pharmaceutical Solids,(Brittain,H.ed.),Marcel Dekker,Inc.New York,1999)。此外,许多商业公司通常提供包括水合物的制备和/或表征在内的服务,例如HOLODIAG,Pharmaparc II,Voie de l'Innovation,27100Val de Reuil,France(<http://www.holodiag.com>)。

[0046] “母体芳环体系”是指具有共轭p电子体系的不饱和环或多环系统。具体包括在“母体芳族环系”的定义中的稠环系,其中一个或多个环是芳族的,并且一个或更多个环是饱和或不饱和的,例如茛、茛满、茛、非那烯等。典型的母体芳族环状系包括但不限于,苯并茛、茛烯、醋菲烯、蒽、萹、苯、茛、晕苯、茛蒽、茛、并六苯、己芬、十六烯基乙酸酯、不对称引达省、对称引达省、二氢化茛、茛、茛、并八苯、octaphene、octalene、卵苯、戊-2,4-二烯、并五苯、并环戊二烯、戊芬、茛、非那烯、菲、茛、七曜烯pleiadene、茛、吡蒽、玉红省、苯并菲、三萜等。

[0047] “母体杂芳环体系”是指一个或多个碳原子(以及任选的任何相关氢原子)各自独立地被相同或不同的杂原子取代的母体芳环体系。取代碳原子的典型杂原子包括但不限于N、P、O、S、Si等。具体地包括在“母体杂芳族环系”的定义内的是稠环系,其中一个或多个环是芳族的并且一个或更多个环是饱和或不饱和的,例如苯并二恶烷、苯并呋喃、色原烷、色烯、吲哚、吲哚啉、氧杂蒽等。典型的母体杂芳环系统包括但不限于砷吲哚、吡唑、 β -吡啉、色原烷、色原烯、噌啉、呋喃、咪唑、吡唑、吲哚、吲哚啉、中氮茛、异苯并呋喃、异色原烯(isochromene)、异吲哚、异吲哚啉、异喹啉、异噻唑、异恶唑、萘啶、恶二唑、恶唑、呋啶、菲啶、菲咯啉、吩嗪、酞嗪、蝶啶、嘌呤、吡喃、吡嗪、吡唑、哒嗪、吡啶、嘧啶、吡咯、吡咯嗪、喹啉、喹啉、喹啉、喹啉、四唑、噻二唑、噻唑、噻吩、三唑、氧杂蒽等。

[0048] “药学上可接受的盐”是指具有母体化合物所需药理学活性的化合物的盐。这类盐包括:(1)酸性盐,由无机酸形成,所述无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等;或由有机酸形成,所述有机酸如乙酸、丙酸、己酸、环戊丙酸、乙醇酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、琥珀酸、苹果酸、马来酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、3-(4-羟基苯甲酰基)苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙烷二磺酸、2-羟基乙磺酸、苯磺酸、4-氯苯磺酸、2-萘磺酸、4-甲苯磺酸、樟脑磺酸、4-甲基双环[2.2.2]辛-2-烯-1-羧酸、葡庚糖酸、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、叔丁基乙酸、月桂基硫酸、葡萄糖酸、谷氨酸、羟基萘甲酸、水杨酸、硬脂酸、粘糠酸等;或(2)当母体化合物中存在的酸性质子被金属离子取代时形成的盐,所述金属离子例如碱金属离子、碱土离子或铝离子;或与有机碱配位形成的盐,所述有机如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、N-甲基葡萄糖胺等。

[0049] “预防 (preventing)”或“预防 (prevention)”是指降低患疾病或病症的风险 (即, 使可能接触或易患该疾病但尚未经历或表现出该疾病症状的患者不会出现该疾病的至少一种临床症状)。用于预防或预防疾病或病症的治疗方法被称为“预防”。在一些实施方案中, 本文提供的化合物由于在长时间内较低的长期副作用而提供了优越的预防作用。

[0050] 本文所用的“前药”是指需要在体内转化才能释放活性药物的药物分子的衍生物。前药在转化为母体药物之前通常 (但不一定) 是无药理活性的。

[0051] 本文所用的“前药助剂 (promoiety)”是指一种保护基团的形式, 当用于掩盖药物分子内的官能团时, 该保护基团将药物转化为前药。通常, 前药助剂将在体内通过酶促或非酶促方式裂解的键连接到药物上。

[0052] “保护基团”是指一组原子, 当连接到分子中的反应性官能团上时, 会在化学合成过程中掩盖、减少或阻止官能团的反应性。保护基团的例子可以在Green等人的“Protective Groups in Organic Chemistry”, (Wiley, 2nd ed.1991) 和Harrison等人的“Compendium of Synthetic Organic Methods”, Vols.1-8 (John Wiley and Sons, 1971-1996) 找到。代表性的氨基保护基团包括但不限于甲酰基、乙酰基、三氟乙酰基、苄基、苄氧基羰基 (“CBZ”)、叔丁氧羰基 (“Boc”)、三甲基甲硅烷基 (“TMS”)、2-三甲基甲硅烷基乙磺酰基 (“SES”)、三苯基和取代的三苯基基团、烯丙氧基羰基、9-苄基甲氧基羰基 (“Fmoc”)、硝基蒽基氧羰基 (“Nvoc”) 等。代表性的羟基保护基团包括但不限于其中羟基被酰化或烷基化的那些基团, 例如苄基、三苯甲基醚以及烷基醚、四氢吡喃基醚、三烷基甲硅烷基醚和烯丙基醚。

[0053] 本文所用的“衰老”或“衰老细胞”是指细胞已获得一种或多种衰老标志物以响应某些细胞应激的状态。这种标志物通常可包括永久退出细胞周期、炎症因子的生物活性分泌组的表达、甲基化改变、衰老相关异染色质灶 (SAHF)、氧化应激的表达标志物、DNA损伤的标志物的表达、蛋白质和脂质修饰、衰老的形态学特征、改变的溶酶体/液泡和衰老相关的 β -半乳糖苷酶的表达 (见Lorenzo Galluzzi等人 (编辑), Cell Senescence: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol.965, DOI 10.1007/978-1-62703-239-1_4, ©Springer Science+Business Media, LLC 2013)。

[0054] 本文所用的“衰老细胞裂解剂”是指“选择性地” (优先地或更大程度地) 破坏、杀死、去除或促进选择性破坏衰老细胞的药物。换言之, 与其破坏或杀死非衰老细胞的能力相比, 衰老细胞裂解剂以生物学、临床和/或统计学上显著的方式破坏或杀死衰老细胞。以足以选择性杀死已建立的衰老细胞, 但不足以以临床意义或生物学意义的方式杀死非衰老细胞的量和时间使用衰老细胞裂解剂。在某些实施方案中, 本文所述的衰老细胞裂解剂以诱导 (即启动、刺激、触发、激活、促进) 衰老细胞并导致其死亡的方式改变至少一种信号通路。

[0055] “溶剂化物”是指将溶剂以化学计量比例掺入本文所述化合物的晶格中, 从而形成加合物。制备溶剂化物的方法包括但不限于储存在含有溶剂的气氛中, 包括溶剂的剂型, 或常规的药物处理步骤, 例如结晶 (即, 从溶剂或混合溶剂中结晶) 蒸气扩散等。在某些情况下, 暴露于溶剂或在溶剂中的悬浮时, 也可以由其它结晶溶剂化物或水合物形成溶剂化物。溶剂化物可能以一种以上的形式结晶, 导致溶剂化物多态性。参见例如 (Guillory, K., Chapter 5, pp.205208 in Polymorphism in Pharmaceutical Solids, (Brittain, H.ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1999)。上述制备溶剂化物的方法完全在本领域技术人

员的范围内,是完全常规的,除本领域典型的方法外,不需要任何实验。溶剂化物可以通过本领域技术人士熟知的方法进行表征和/或分析,所述方法例如单晶X射线衍射、X射线粉末衍射、偏振光学显微镜、热显微镜、热重分析、差热分析、差示扫描量热法、IR光谱、拉曼光谱和NMR光谱(Brittain,H.,Chapter 6,pp.205208inPolymorphism in Pharmaceutical Solids,(Brittain,H.ed.),Marcel Dekker,Inc.NewYork,1999)。此外,许多商业公司通常提供包括溶剂化物的制备和/或表征的服务,例如,HOLODIAG、Pharmaparc II、Voie de l'Innovation、27100Val de Reuil、France(<http://www.holodiag.com>)。

[0056] 当用于修饰特定的基团或基团时,“取代的”是指特定基团或基团的一个或多个氢原子各自独立地被相同或不同的取代基取代。可用于取代特定基团或基团中饱和碳原子的取代基包括 R^a 、卤素、 $-O^-$ 、 $=O$ 、 $-OR^b$ 、 $-SR^b$ 、 $-S^-$ 、 $=S$ 、 $-NR^cR^c$ 、 $=NR^b$ 、 $=N-OR^b$ 、trihalomethyl、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-OCN$ 、 $-SCN$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $-N-OR^b$ 、 $-N-NR^cR^c$ 、 $-NR^bS(O)_2R^b$ 、 $=N_2$ 、 $-N_3$ 、 $-S(O)_2R^b$ 、 $-S(O)_2NR^bR^b$ 、 $-S(O)_2O^-$ 、 $-S(O)_2OR^b$ 、 $-OS(O)_2R^b$ 、 $-OS(O)_2O^-$ 、 $-OS(O)_2OR^b$ 、 $-OS(O)_2NR^cNR^c$ 、 $-P(O)(O^-)_2$ 、 $-P(O)(OR^b)(O^-)$ 、 $-P(O)(OR^b)(OR^b)$ 、 $-C(O)R^b$ 、 $-C(O)NR^b-OR^b$ 、 $-C(S)R^b$ 、 $-C(NR^b)R^b$ 、 $-C(O)O^-$ 、 $-C(O)OR^b$ 、 $-C(S)OR^b$ 、 $-C(O)NR^cR^c$ 、 $-C(NR^b)NR^cR^c$ 、 $-OC(O)R^b$ 、 $-OC(S)R^b$ 、 $-OC(O)O^-$ 、 $-OC(O)OR^b$ 、 $-OC(O)NR^cR^c$ 、 $-OC(NCN)NR^cR^c$ 、 $-OC(S)OR^b$ 、 $-NR^bC(O)R^b$ 、 $-NR^bC(S)R^b$ 、 $-NR^bC(O)O^-$ 、 $-NR^bC(O)OR^b$ 、 $-NR^bC(NCN)OR^b$ 、 $-NR^bS(O)_2NR^cR^c$ 、 $-NR^bC(S)OR^b$ 、 $-NR^bC(O)NR^cR^c$ 、 $-NR^bC(S)NR^cR^c$ 、 $-NR^bC(S)NR^bC(O)R^a$ 、 $-NR^bS(O)_2OR^b$ 、 $-NR^bS(O)_2R^b$ 、 $-NR^bC(NCN)NR^cR^c$ 、 $-NR^bC(NR^b)R^b$ and $-NR^bC(NR^b)NR^cR^c$, 其中每个 R^a 独立地为芳基、取代芳基、杂烷基、取代杂烷基、杂芳基或取代的杂芳基;每个 R^b 独立地为氢、烷基、杂烷基、取代的杂烷基、芳烷基、取代芳烷基、杂芳烷基或取代的杂芳烷基;并且每个 R^c 独立地为 R^b ,或者可替换地,两个 R^c 与其氮原子结合形成4-、5-、6-或7-元环杂烷基、取代的环杂烷基或与芳基耦合的环杂烷基,所述芳基可任选地包括1-4个相同或不同的选自O、N和S的附加杂原子。作为具体实例, NR^cR^c 意指包括 $-NH_2$ 、 NH 烷基、 N 吡咯烷基和 N 吗啉基。在其它实施方案中,可用于取代特定基团或基团中的饱和碳原子的取代基包括 R^a 、卤素、 OR^b 、 NR^cR^c 、三卤代甲基、 $-CN$ 、 $-NR^bS(O)_2R^b$ 、 $-C(O)R^b$ 、 $-C(O)NR^b-OR^b$ 、 $-C(O)OR^b$ 、 $-C(O)NR^cR^c$ 、 $-OC(O)R^b$ 、 $-OC(O)OR^b$ 、 $-OS(O)_2NR^cNR^c$ 、 $-OC(O)NR^cR^c$ 和 $-NR^bC(O)OR^b$, 其中每个 R^a 是独立的烷基、芳基、杂芳基,每个 R^b 是独立的氢、 R^a 、异烷基、芳基烷基、杂芳基烷基;并且每个 R^c 独立地为 R^b ,或者可替换地,两个 R^c 与其氮原子结合形成4-、5-、6-或7-元环杂烷基。

[0057] 可用于取代特定基团或基团中的不饱和碳原子的取代基包括 $-R^a$ 、卤素、 $-O^-$ 、 $-OR^b$ 、 $-SR^b$ 、 $-S^-$ 、 $-NR^cR^c$ 、三卤代甲基、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-OCN$ 、 $-SCN$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $-N_3$ 、 $-S(O)_2O^-$ 、 $-S(O)_2OR^b$ 、 $-OS(O)_2R^b$ 、 $-OS(O)_2OR^b$ 、 $-OS(O)_2O^-$ 、 $-P(O)(O^-)_2$ 、 $-P(O)(OR^b)(O^-)$ 、 $-P(O)(OR^b)(OR^b)$ 、 $-C(O)R^b$ 、 $-C(S)R^b$ 、 $-C(NR^b)R^b$ 、 $-C(O)O^-$ 、 $-C(O)OR^b$ 、 $-C(S)OR^b$ 、 $-C(O)NR^cR^c$ 、 $-C(NR^b)NR^cR^c$ 、 $-OC(O)R^b$ 、 $-OC(S)R^b$ 、 $-OC(O)O^-$ 、 $-OC(O)OR^b$ 、 $-OC(S)OR^b$ 、 $-OC(O)NR^cR^c$ 、 $-OS(O)_2NR^cNR^c$ 、 $-NR^bC(O)R^b$ 、 $-NR^bC(S)R^b$ 、 $-NR^bC(O)O^-$ 、 $-NR^bC(O)OR^b$ 、 $-NR^bS(O)_2OR^a$ 、 $-NR^bS(O)_2R^a$ 、 $-NR^bC(S)OR^b$ 、 $-NR^bC(O)NR^cR^c$ 、 $-NR^bC(NR^b)R^b$ 和 $-NR^bC(NR^b)NR^cR^c$ 。其中 R^a 、 R^b 和 R^c 如前所定义。在其它实施方案中,用于取代特定基团或基团中的不饱和碳原子的取代基包括 $-R^a$ 、卤素、 $-OR^b$ 、 $-SR^b$ 、 $-NR^cR^c$ 、三卤代甲基、 $-CN$ 、 $-S(O)_2OR^b$ 、 $-C(O)R^b$ 、 $-C(O)OR^b$ 、 $-C(O)NR^cR^c$ 、 $-OC(O)R^b$ 、 $-OC(O)OR^b$ 、 $-OS(O)_2NR^cNR^c$ 、 $-NR^bC(O)R^b$ 和 $-NR^bC(O)OR^b$, 其中 R^a 、 R^b 和 R^c 如前所定义。

[0058] 可用于取代杂烷基和环杂烷基中的氮原子的取代基包括但不限于 $-R^a$ 、 $-O^-$ 、 $-OR^b$ 、 $-SR^b$ 、 $-S^-$ 、 $-NR^cR^c$ 、三卤代甲基、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $-S(O)_2R^b$ 、 $-S(O)_2O^-$ 、 $-S(O)_2OR^b$ 、 $-OS(O)$

$_2R^b$ 、 $-OS(O)_2O^-$ 、 $-OS(O)_2OR^b$ 、 $-P(O)(O^-)_2$ 、 $-P(O)(OR^b)(O^-)$ 、 $-P(O)(OR^b)(OR^b)$ 、 $-C(O)R^b$ 、 $-C(S)R^b$ 、 $-C(NR^b)R^b$ 、 $-C(O)OR^b$ 、 $-C(S)OR^b$ 、 $-C(O)NR^cR^c$ 、 $-C(NR^b)NR^cR^c$ 、 $-OC(O)R^b$ 、 $-OC(S)R^b$ 、 $-OC(O)OR^b$ 、 $-OC(S)OR^b$ 、 $-NR^bC(O)R^b$ 、 $-NR^bC(S)R^b$ 、 $-NR^bC(O)OR^b$ 、 $-NR^bC(S)OR^b$ 、 $-NR^bC(O)NR^cR^c$ 、 $-NR^bC(NR^b)R^b$ 和 $-NR^bC(NR^b)NR^cR^c$,其中 R^a 、 R^b 和 R^c 如前所定义。在一些实施方案中,可用于取代杂烷基和环杂烷基中的氮原子的取代基包括 R^a 、卤代、 $-OR^b$ 、 $-NR^cR^c$ 、三卤代甲基、 $-CN$ 、 $-S(O)_2OR^b$ 、 $-OS(O)_2R^b$ 、 $-OS(O)_2OR^b$ 、 $-C(O)R^b$ 、 $-C(NR^b)R^b$ 、 $-C(O)OR^b$ 、 $-C(O)NR^cR^c$ 、 $-OC(O)R^b$ 、 $-OC(O)OR^b$ 、 $-OS(O)_2NR^cNR^c$ 、 $-NR^bC(O)R^b$ and $-NR^bC(O)OR^b$,其中 R^a 、 R^b 和 R^c 如前所定义。

[0059] 上述列表中可用于取代其它特定基团或原子的取代基对本领域技术人员来说是显而易见的。

[0060] 用于取代特定基团的取代基可以进一步被取代,通常被选自上述各种基团中的一个或多个相同或不同的基团取代。

[0061] “受试者”、“个体”或“患者”在本文中可互换使用,指脊椎动物,优选哺乳动物。哺乳动物包括但不限于鼠、啮齿动物、猿类、人类、农场动物、运动动物和宠物。

[0062] 在一些实施方案中,任何疾病或病症的“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指改善疾病或病症(即,阻止或减少疾病或其至少一种临床症状的发展)。治疗也可以被认为包括先发制人或预防性施用,以改善、阻止或预防疾病或至少一种临床症状的发展。在另一个特征中,所提供的治疗在多年内产生长期副作用的可能性较低。在其它实施方案中,“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指改善至少一个患者可能无法识别的物理参数。在另一些实施方案中,“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”指的是在物理上(例如,可辨别症状的稳定)、生理上(例如物理参数的稳定)或两者上抑制疾病或病症。在其它实施方案中,“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指延缓疾病或病症的发作。

[0063] “有效治疗量”是指当向患者施用以治疗疾病时,足以治疗该疾病的化合物的量。“有效治疗量”取决于化合物、疾病及其严重程度以及待治疗患者的年龄、体重、吸附、分布、代谢和排泄等。

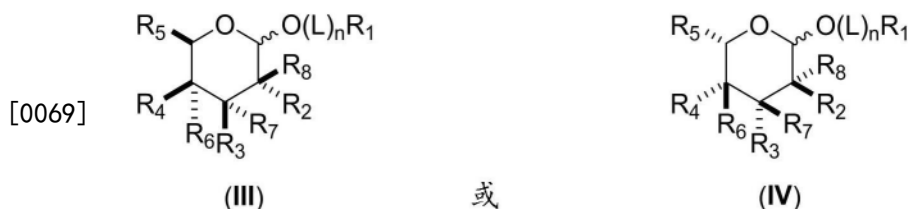
[0064] “溶媒”是指用于向受试者施用化合物的稀释剂、辅料或载体。在一些实施方案中,所述溶媒是药学上可接受的。

[0065] 现在将详细参考化合物和方法的具体实施方案。所公开的实施方案不旨在限制权利要求。相反,权利要求旨在涵盖所有替代方案、修改和等效方案。

[0066] 衰老细胞裂解剂

[0067] 本文提供了衰老细胞裂解剂的无毒前药,其被优先积聚在衰老细胞内的水解酶激活。在一些实施方案中,水解酶是糖苷酶,并且利用衰老相关的升高的细胞内糖苷酶活性将促凋亡剂的无毒前药衍生物转化为毒性的、促凋亡的母体化合物,这导致衰老细胞的特异性杀伤。

[0068] 在一些实施方案中,提供式(III)或式(IV)的化合物或其药学上可获得的盐、水合物和溶剂化物,其中

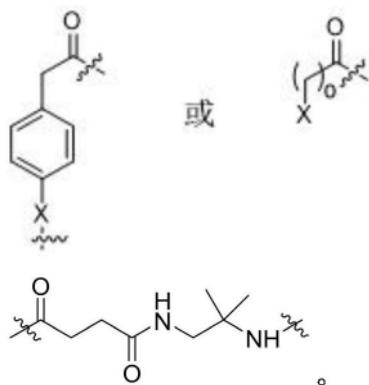


[0070] R_1 为 $R_{18}C(O)NH-$,其中 R_{18} 为组蛋白脱乙酰酶抑制剂的残基、Hsp90抑制剂的残基、拓扑异构酶抑制剂的残基、Akt1抑制剂的残基、DNA烷基化剂的残基、蛋白酶体抑制剂的残基或Bcl2抑制剂的残基;L是接头;n是0或1; R_2 是-H、-F、-OH、-OC(O) R_9 或-OC(O) OR_{10} ; R_3 是-H、-F、-OH、-OC(O) R_{11} 或-OC(O) OR_{12} ; R_4 是-H、-F、-OH、-OC(O) R_{13} 或-OC(O) OR_{14} ;或者, R_3 和 R_4 与其所键合的原子一起形成在缩醛碳原子上被 R_{17} 取代的5元环缩醛;或者, R_3 和 R_4 与其所键合的原子一起形成5元环碳酸酯; R_5 是- CH_3 、- CH_2F 、- CHF_2 、- CF_3 、- CH_2OH 、- $CH_2OC(O)R_{15}$ 或- $CH_2OC(O)OR_{16}$; R_6 是-H或-F; R_7 是-H或-F; R_8 是-H或-F;和 R_9-R_{17} 独立地为烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、取代炔基、芳基、取代芳基、环烷基、取代环烷基、环杂烷基、取代环杂烷基、杂芳基或取代杂芳基;前提是当 R_5 是- CH_2F 、- CHF_2 或- CF_3 时,则 R_2 、 R_3 或 R_4 中有一个是-H或-F;前提是当 R_5 是- CH_3 、- CH_2OH 、- $CH_2OC(O)R_{15}$ 或- $CH_2OC(O)OR_{16}$ 时,则 R_2 、 R_3 或 R_4 中有一个或两个是-H或-F;并且前提是仅当 R_4 是-F或-H时, R_6 是-F;仅当 R_3 为-F或-H时, R_7 为-F;仅当 R_2 为-F或-H时, R_8 为-F;仅当 R_6 为-F或-H时, R_4 为-F;只有当 R_7 是-F或-H时, R_3 才是-F;且仅当 R_8 为-F或-H时, R_2 为-F。

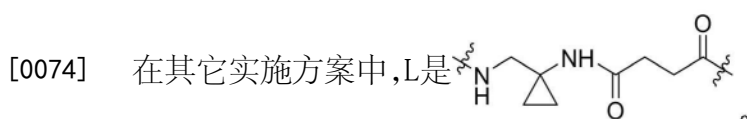
[0071] 在一些实施方案中,仅当 R_4 为-F时, R_6 为-F;仅当 R_3 为-F时, R_7 为-F;仅当 R_2 是-F时, R_8 为-F。

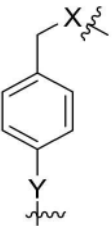
[0072] 如本文所定义的接头L是任选地将糖基连接到 R_1 的部分。接头可以是化学可裂解的接头、光不稳定的接头或酶可裂解的接头(参见,例如,美国专利5,208,020;5,475,092;6,441,163;6,716,821;6,913,748;7,276,497;7,276,499;7,368,565;7,388,026和7,414,073)。接头可以在结构和长度上变化。接头可以是疏水的或亲水的、长的或短的、刚性的、半刚性的或柔性的,等等,唯一的要求是在糖基水解后将接头从衰老细胞裂解剂的残基上裂解以释放游离衰老细胞裂解剂。

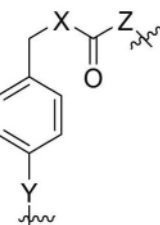
[0073] 接头L包括但不限于以下举例说明的结构。在一些实施方案中,L是



其中X是-O-或-NH-并且-O-是1-20。在其它实施方案中,L是



[0075] 在一些实施方案中, L为  其中X和Y独立地为O、S或NR₂₀, 其中R₂₀为烷基。在其它实施方案中, X和Y独立地为O或NR₂₀。

[0076] 在一些实施方案中, L为  其中X、Y和Z独立地为O、S或NR₂₁, 其中R₂₁为烷基。在其它实施方案中, X、Y和Z独立地为O或NR₂₁。

[0077] 在一些实施方案中, R₅是-CH₃, R₂是-H或-F。在其它实施方案中, R₅是-CH₃并且R₃是-H或者-F。在其他实施方案中, R₅是-CH₃, R₄是-H或-F。在其它实施方案中, R₅是-CH₃, R₂是-F, R₈是-F。在其他实施方案中, R₅是-CH₃, R₃是-F, R₇是-F。在其他实施方案中, R₅是-CH₃, R₄是-F, R₆是-F。

[0078] 在一些实施方案中, R₅是-CH₂OH、-CH₂OC(O)R₁₅或-CH₂OC(O)OR₁₆, R₂是-H或-F。在另一些实施方案中, R₅是-CH₂OH、-CH₂OC(O)R₁₅或-CH₂OC(O)OR₁₆, R₃是-H或-F。在其他实施方案中, R₅为-CH₂OH、-CH₂OC(O)R₁₅或-CH₂OC(O)OR₁₆, R₄为-H或-F。在另一些实施方案中, R₅是-CH₂OH、-CH₂OC(O)R₁₅或-CH₂OC(O)OR₁₆, R₂是-F, R₈是-F。在另一些实施方案中, R₅是-CH₂OH、-CH₂OC(O)R₁₅或-CH₂OC(O)OR₁₆, R₃是-F并且R₇是-F。在另一些实施方案中, R₅是-CH₂OH、-CH₂OC(O)R₁₅或-CH₂OC(O)OR₁₆, R₄是-F, R₆是-F。

[0079] 在一些实施方案中, R₅是-CH₂F、-CHF₂或-CF₃, R₂是-H或-F。在其它实施方案中, R₅是-CH₂F、-CHF₂或-CF₃, R₃是-H和-F。在另一些实施方案中, R₅是-CH₂F、-CHF₂或-CF₃, 并且R₄是-H或者-F。在另一些实施方案中, R₅为-CH₂F、-CHF₂或-CF₃, R₂是-F且R₈是-F。在另一些实施方案中, R₅为-CH₂F、-CHF₂或-CF₃, R₃是-F且R₇是-F。在另一些实施方案中, R₅为-CH₂F、-CHF₂或-CF₃, R₄是-F且R₆是-F。

[0080] 在一些实施方案中, R₂是-H或-F, R₃是-H或-F。在其它实施方案中, R₂是-H或-F, R₄是-H或-F。在其它实施方案中, R₃是-H或-F, R₄是-H或-F。在其它实施方案中, R₂是-H或-F, R₃是-F, R₇是-F。在其它实施方案中, R₂是-H或-F, R₄是-F, R₆是-F。在其它实施方案中, R₃为-H或-F, R₄为-F, R₆为-F。在其它实施方案中, R₂是-F, R₈是-F并且R₃是-H或-F。在其它实施方案中, R₂是-F, R₈是-F并且R₄是-H或-F。

[0081] 在一些实施方案中, R₂是-F, R₈是-F。在其它实施方案中, R₃是-F, R₇是-F。在其它实施方案中, R₄是-F, R₆是-F。

[0082] 在一些实施方案中, R₂是-H或-F。在其它实施方案中, R₃是-H或-F。

[0083] 在另一些实施方案中, R₄是-H或-F。

[0084] 在上述一些实施方案中, R₉-R₁₇独立地为烷基、烯基、炔基、芳基、取代芳基、环烷基、环杂烷基或杂芳基。在其它上述实施方案中, R₉-R₁₇独立地为烷基、烯基、芳基、取代芳基

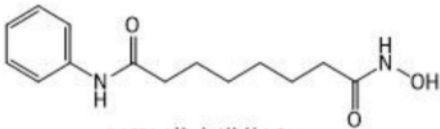
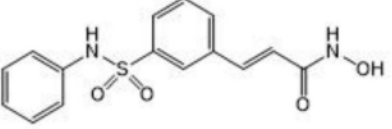
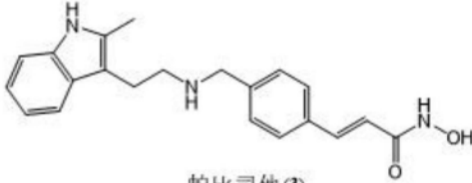
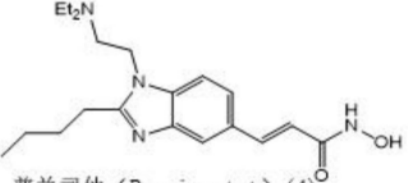
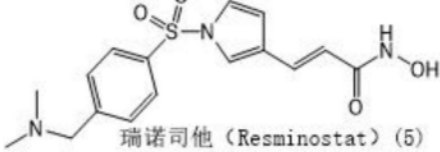
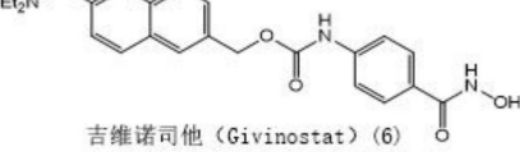
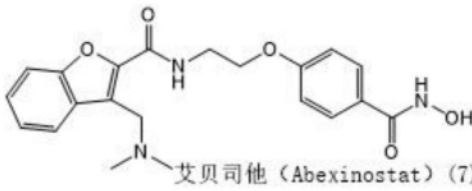
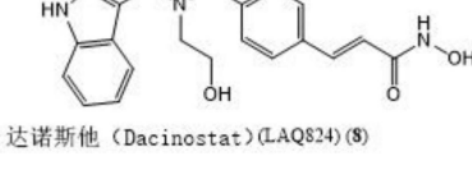
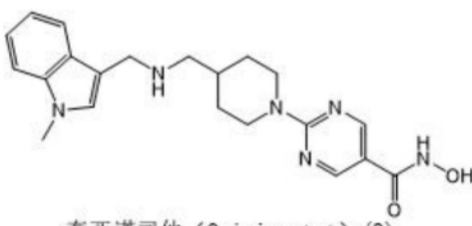
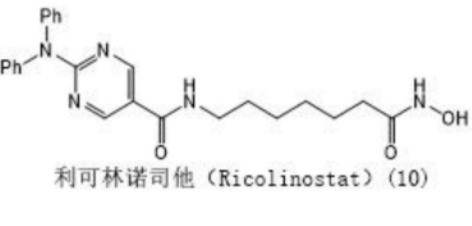
或环杂烷基。在上述实施方案的另一些实施方案中, R_9 - R_{17} 独立地为 (C_1-C_4) 烷基、 (C_1-C_4) 烯基、苯基、取代苯基或 (C_5-C_7) 环杂烷基。

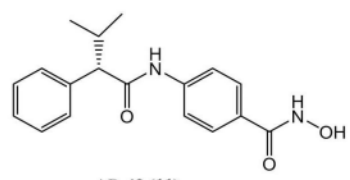
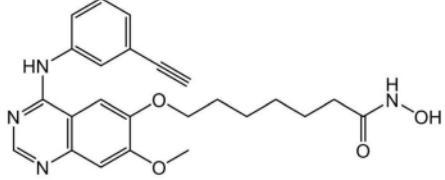
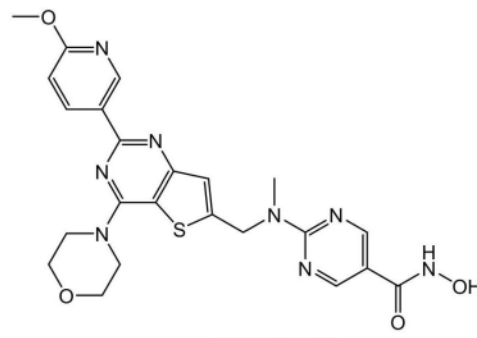
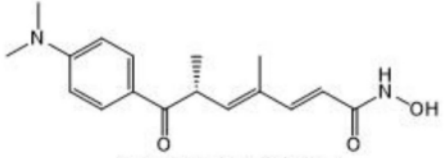
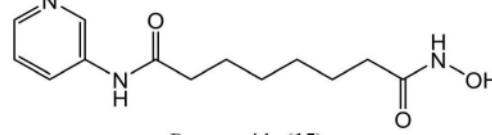
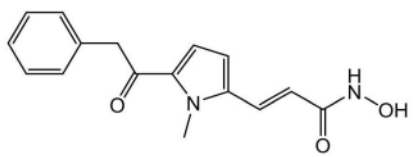
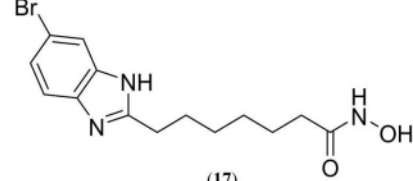
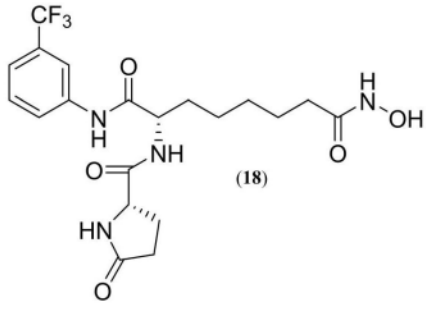
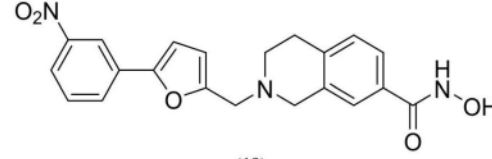
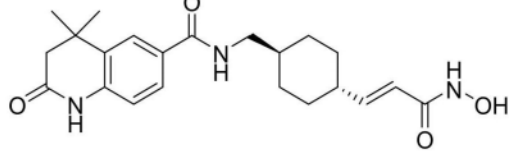
[0085] 在上述一些实施方案中, 异头碳是S立体异构体。在其它上述实施方案中, 异头碳是R立体异构体。

[0086] 在上述一些实施方案中, R_1 是 $R_{18}C(O)NH-$, 其中 R_{18} 是异羟肟酸抑制剂的残基。在上述实施方案中的其它实施方案中, R_{18} 是达诺司他、帕比司他、奎诺司他(quisinostat)或CUDC-907的残基。在上述实施方案的另一些实施方案中, R_1 是HSP抑制剂的残基。在上述实施方案的另一些实施方案中, R_1 是拓扑异构酶抑制剂的残基。在上述实施方案的另一些实施方案中, R_1 是Akt1抑制剂的残基。在上述实施方案的另一些实施方案中, R_1 是DNA烷基化剂的残基。在上述实施方案的另一些实施方案中, R_1 是Bcl2抑制剂的残基。

[0087] 异羟肟酸衍生物HDAC抑制剂包括但不限于伏立诺他(辛二酰苯胺异羟肟酸或SAHA (1))、贝利司他(2)和帕比司他(3)。许多其它异羟肟酸衍生物HDAC抑制剂(例如, 化合物(4)-(13))已被研究用作单一药物或与其它溶瘤化合物联合治疗血液病和实体瘤。除了抑制HDAC I、II和IV类中的各种酶外, 异羟肟酸衍生物已被设计为同时抑制其它治疗靶点, 例如CUDC-101(12)(其有效抑制EGFR和HER-2激酶)和CUDC-907(13)(其另外抑制各种PI3K亚型)。已经公开了许多其它异羟肟酸衍生物HDAC抑制剂, 包括从链霉菌中分离的天然产物曲古抑菌素A(14)和许多合成衍生的化合物, 其示例包括化合物(15)-(21)以及上文Roche和Bertrand中公开的其它化合物; 或美国专利No. 5,369,108、5,932,616、6,087,367和6,511,990中公开的其他羟肟酸。

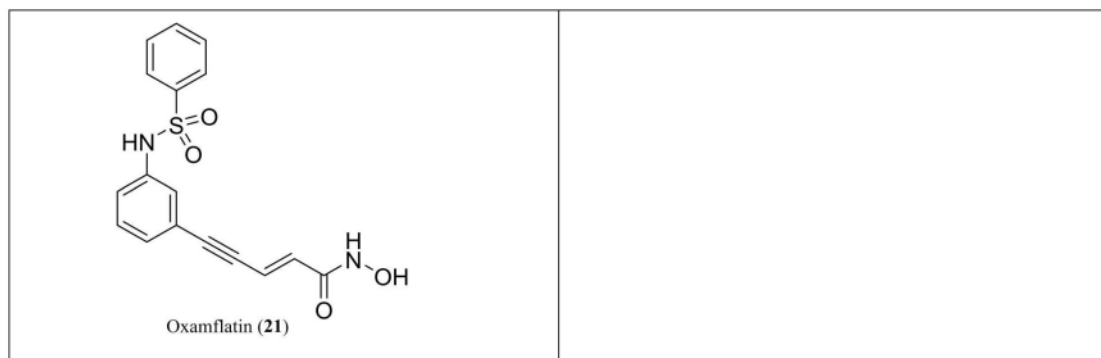
[0088]

 SAHA(伏立诺他)(1)	 贝利司他(Beleodaq)(2)
 帕比司他(3)	 普兰司他(Pracinostat)(4)
 瑞诺司他(Resminostat)(5)	 吉维诺司他(Givinostat)(6)
 艾贝司他(Abexinostat)(7)	 达诺斯他(Dacinostat)(LAQ824)(8)
 奎西诺司他(Quisinostat)(9)	 利可林诺司他(Ricolinostat)(10)

 AR-42 (11)	 CUDC-101 (12)
 CUDC-907 (13)	 曲古抑菌素A(TSA) (14)
 Pyroxamide (15)	 APHA (16)
 (17)	 (18)
 (19)	 (20)

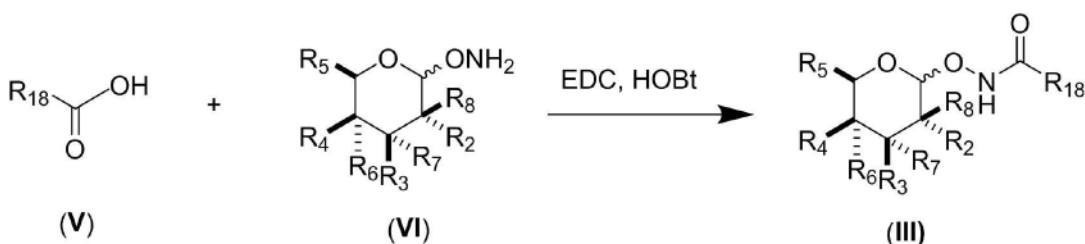
[0089]

[0090]

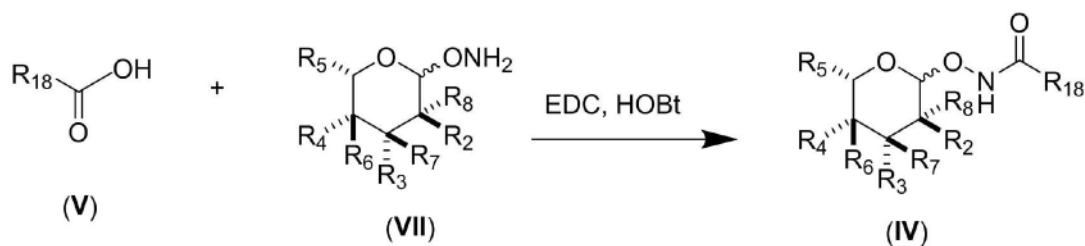


[0091] 泛HDAC抑制剂帕比司他 (3) 的衰老细胞裂解活性先前已有报道 (Samaraweera 等人, 同上), 并且衰老已被证明与整体组蛋白乙酰化减少有关 (Li 等人, *Proteomics* 13 (2013) 2585-2596)。一些报道已经证明了HDAC抑制剂介导的Bcl-xL表达的减少 (例如, 参见Cao 等人, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25 (2001) 562-568; Rada-Iglesias 等人, *Genome Res.* 17 (2007) 708-719; Frys 等人, *Br. J. Haematol.* 169 (2015) 506-519)。不希望受任何理论的束缚, HDAC抑制剂的衰老细胞裂解活性的一个药理学基础可能是通过降低抗凋亡Bcl-xL蛋白水平来介导的。

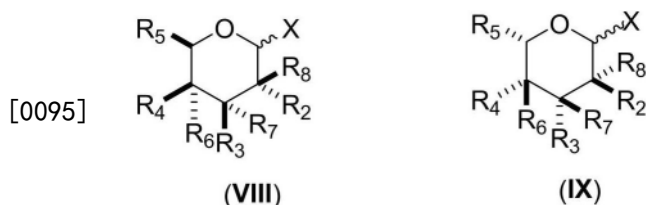
[0092] 式 (III) 或 (IV) 化合物 (其中 R_1 为 $R_{18}C(O)NH-$) 通过在酰基偶联试剂如碳二亚胺 (例如EDC) 的存在下, 或者在作为酰氯或混合酸酐酰化剂的预先活化之后, 将异羟肟酸HDAC抑制剂的羧酸前体 RCO_2H (V) 分别与糖脎化合物 (VI) 和 (VII) 偶联而方便地合成。



[0093]



[0094] 糖烷氧基胺 (VI) 和 (VII) 可以例如分别由卤代化合物 (VIII) 和 (IX) ($X=Cl$ 、 Br 或 F) 分别地通过常规方法制备 (Thomas 等人, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 (2007) 983-986)。

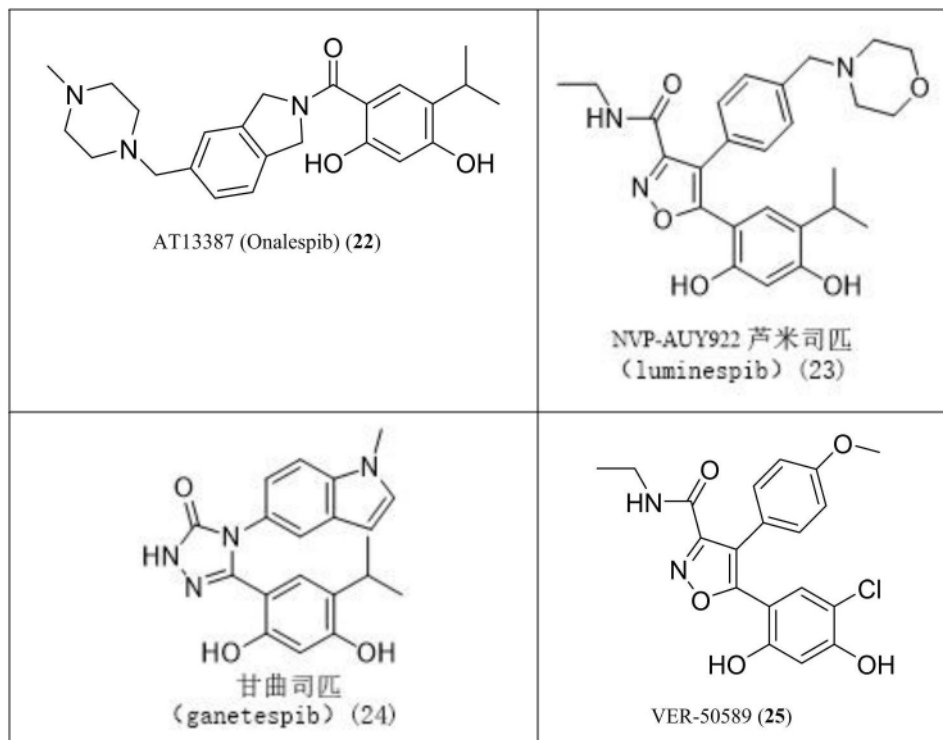


[0096] 异羟肟酸衍生物化合物的HDAC抑制活性通常取决于游离羟肟酸部分的锌螯合活性 (例如, 参见Roche和Bertrand, 同上)。因此, 在式 (III) 或 (IV) 的化合物中, 将异羟肟酸官能团掩蔽为糖苷衍生物确保了这些前药作为HDAC抑制剂是无活性的, 但在衰老细胞的溶酶

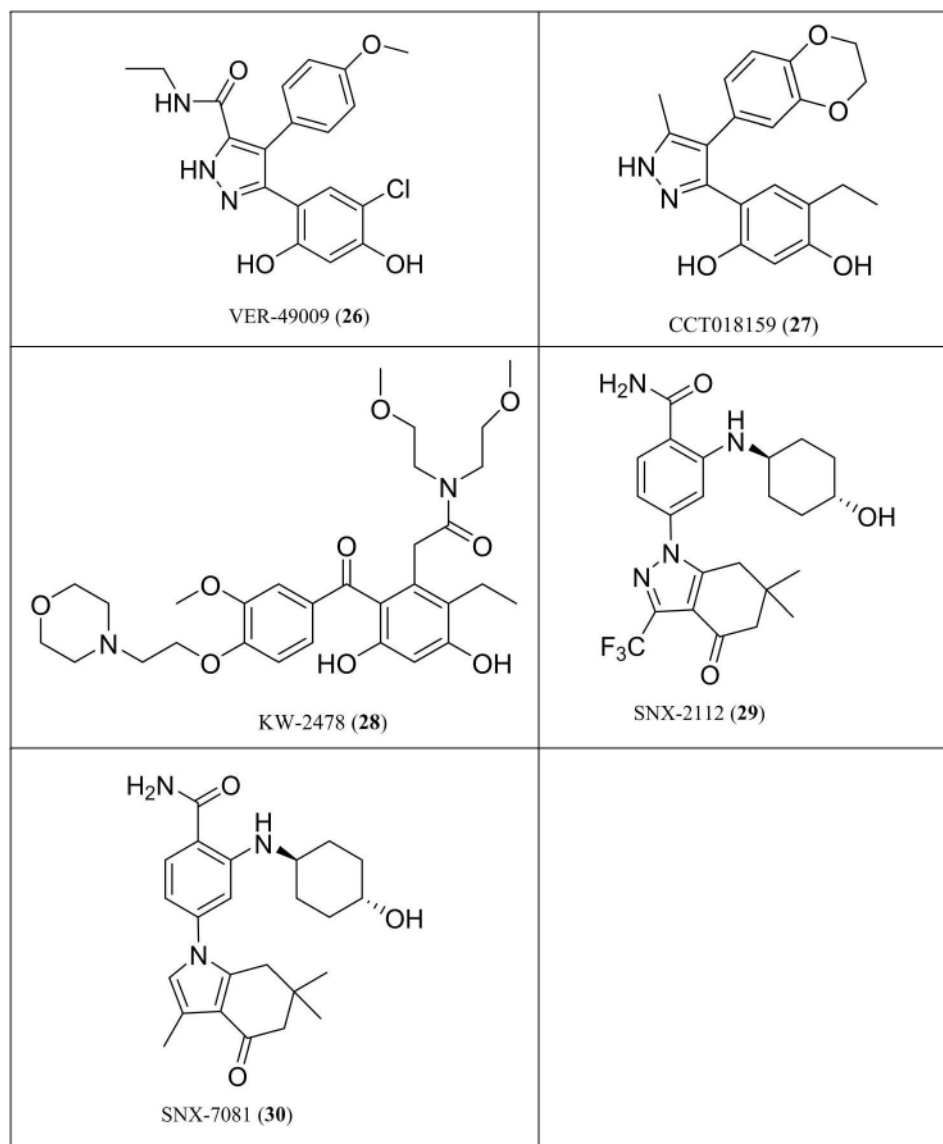
体内水解时会被激活。

[0097] Hsp90抑制剂包括但不限于间苯二酚化合物AT13387 (onalespib, (22))、NYP-AUY922 (芦米司匹 (luminespib), (23))、甘曲司匹 (ganetespib) (24)、VER-50589 (25)、VER-49009 (26)、CCT018159 (27) 和KW-2478 (28), 2-(4-氨基环己醇)-苯甲酰胺衍生物, 例如SNX-2112 (29) 和 (SNX-7081) (30)。本领域技术人员将理解, 由式 (III) 和 (IV) 的化合物举例说明的Hsp90抑制剂的糖偶联物是衰老细胞裂解化合物。

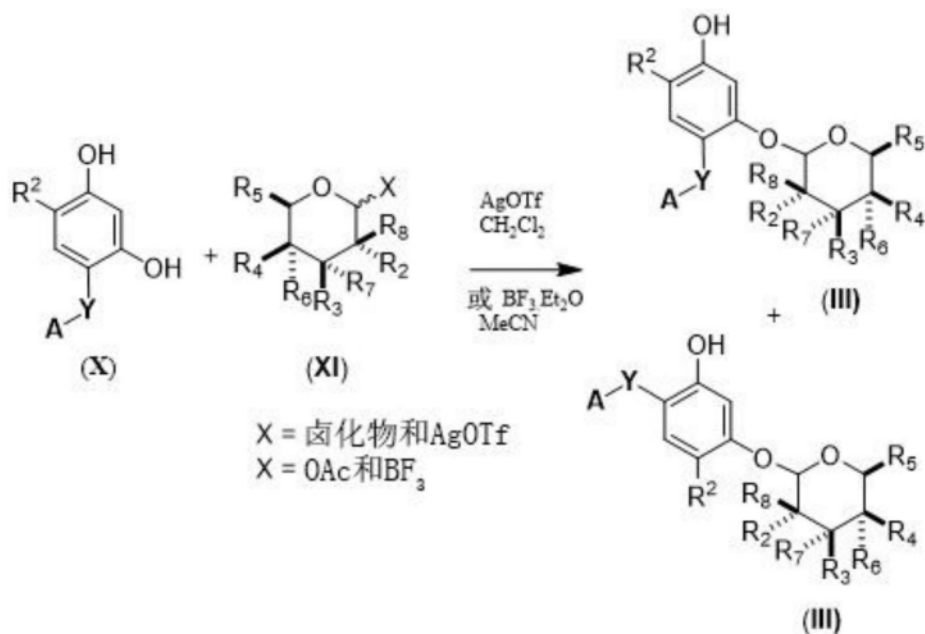
[0098]



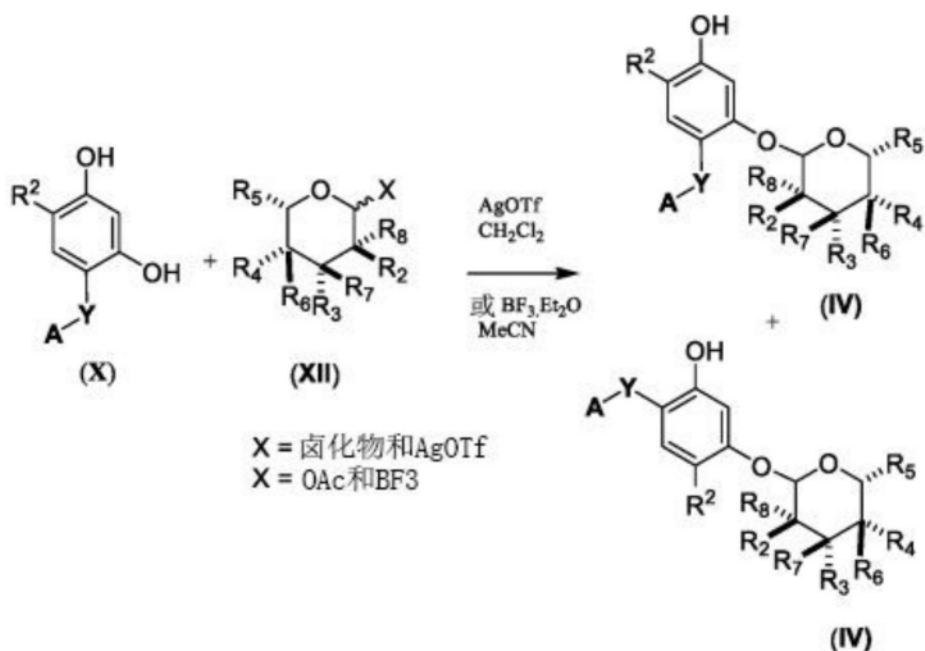
[0099]



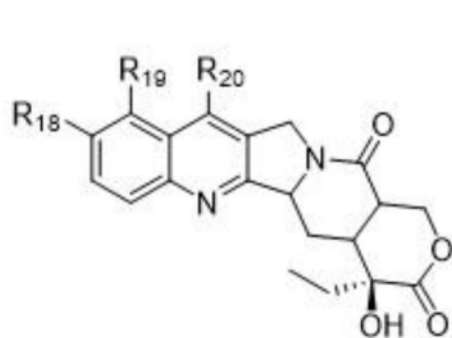
[0100] 式(III)和(IV)的化合物(其中 R_1 为Hsp90抑制剂),可通过式(X)的化合物与受保护的供体部分在经典 BF_3 介导的糖基化或柯尼希斯-克诺尔偶联条件下反应制备(R_2-R_8 不是-OH)(Shie等人,Carbohydrate Res.341(2006)443-456;Brough等人,J.Med.Chem.51(2008)196-218),通过色谱法分离得到的区域异构体。或者,间苯二酚化合物(X)的酚羟基可以首先被选择性保护以允许区域选择性糖基化。



[0101]



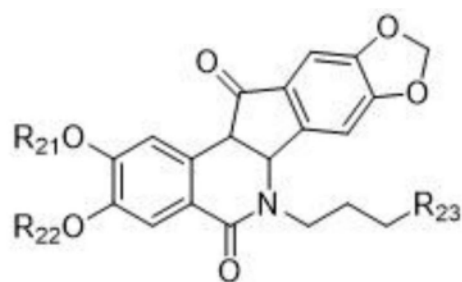
[0102] 拓扑异构酶I (TOP1) 抑制性化合物包括但不限于喜树碱 (31)、SN-38 (32)、拓扑替康 (33) (例如, 参见Jain等人, *Current Genomics* 18 (2017) 75-92; Liu等人, *Med. Res. Rev.* 35 (2015) 753-789), 茚并异喹啉 (以化合物 (34) - (39) 为例 (Cinelli等人, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 10844-10862; Lv等人, *J. Med. Chem.* 59 (2016) 4890-4899)) 和二苯并萘啶酮 (以化合物 (40) - (42) 为例说明, (例如, 参见Sooryakumar等人, *Mol. Cancer Ther.* 10 (2011) 1490-1499))。



$R_{18} = R_{19} = R_{20} = H$, 喜树碱 (31)

$R_{18} = OH$, $R_{19} = H$, $R_{20} = Et$; SN-38 (32)

$R_{18} = OH$, $R_{19} = CH_2NMe_2$, $R_{20} = H$; 拓扑替康 (33)



$R_{21} = R_{22} = Me$, $R_{23} = N$ (Indotecan) (34)

$R_{21} = H$, $R_{22} = Me$, $R_{23} = N$; (35)

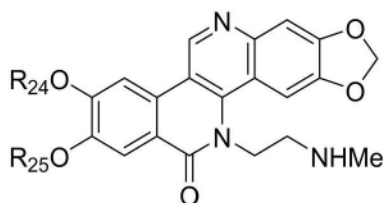
$R_{21} = Me$, $R_{22} = H$, $R_{23} = N$; (36)

$R_{21}, R_{22} = Me$, $R_{23} = N$; Indimitecan (37)

$R_{21} = H$, $R_{22} = Me$, $R_{23} = N$; (38)

$R_{21} = Me$, $R_{22} = H$, $R_{23} = N$; (39)

[0103]



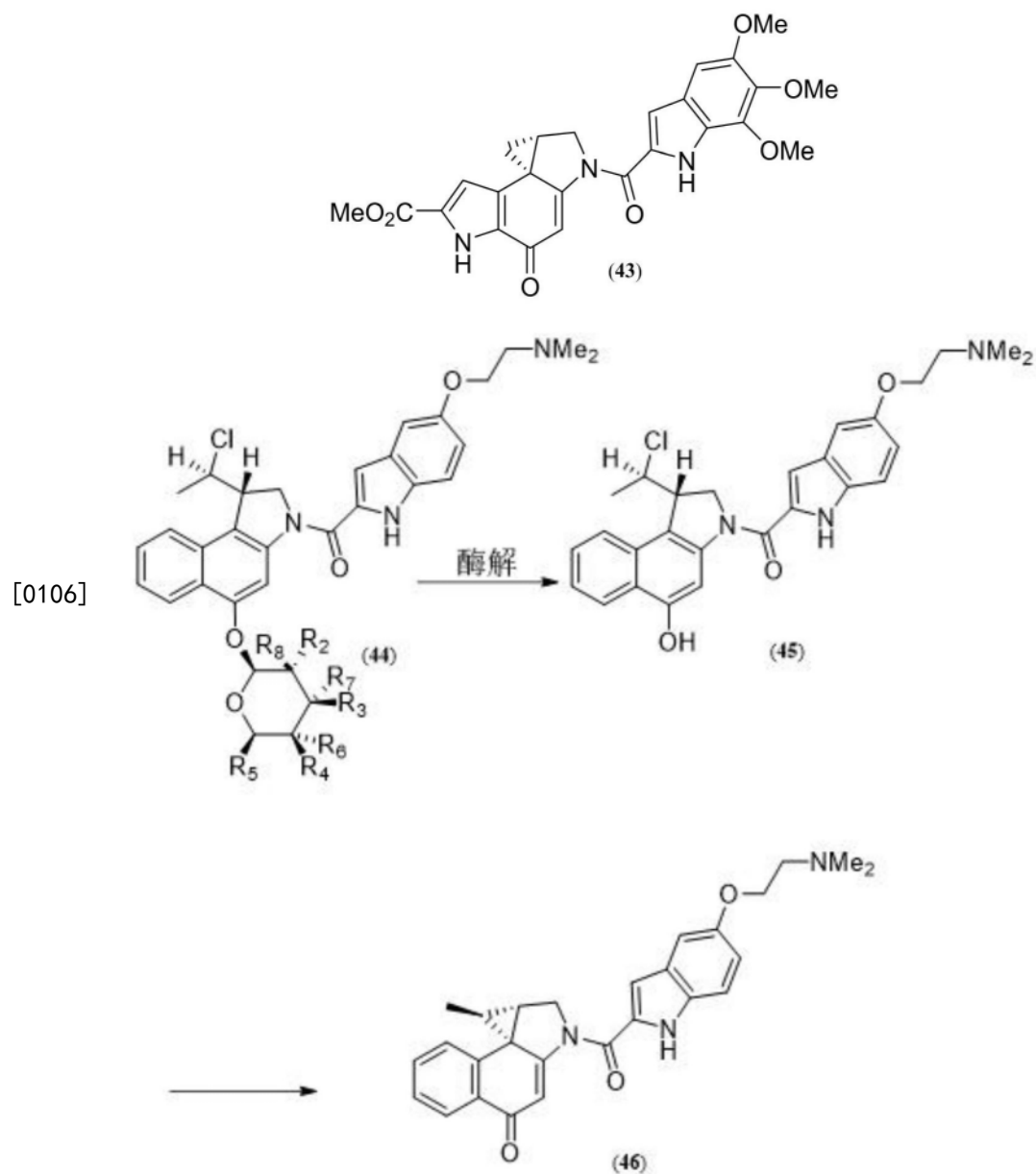
$R_{24} = R_{25} = Me$; Genz-644282 (40)

$R_{24} = H$, $R_{25} = Me$ (41)

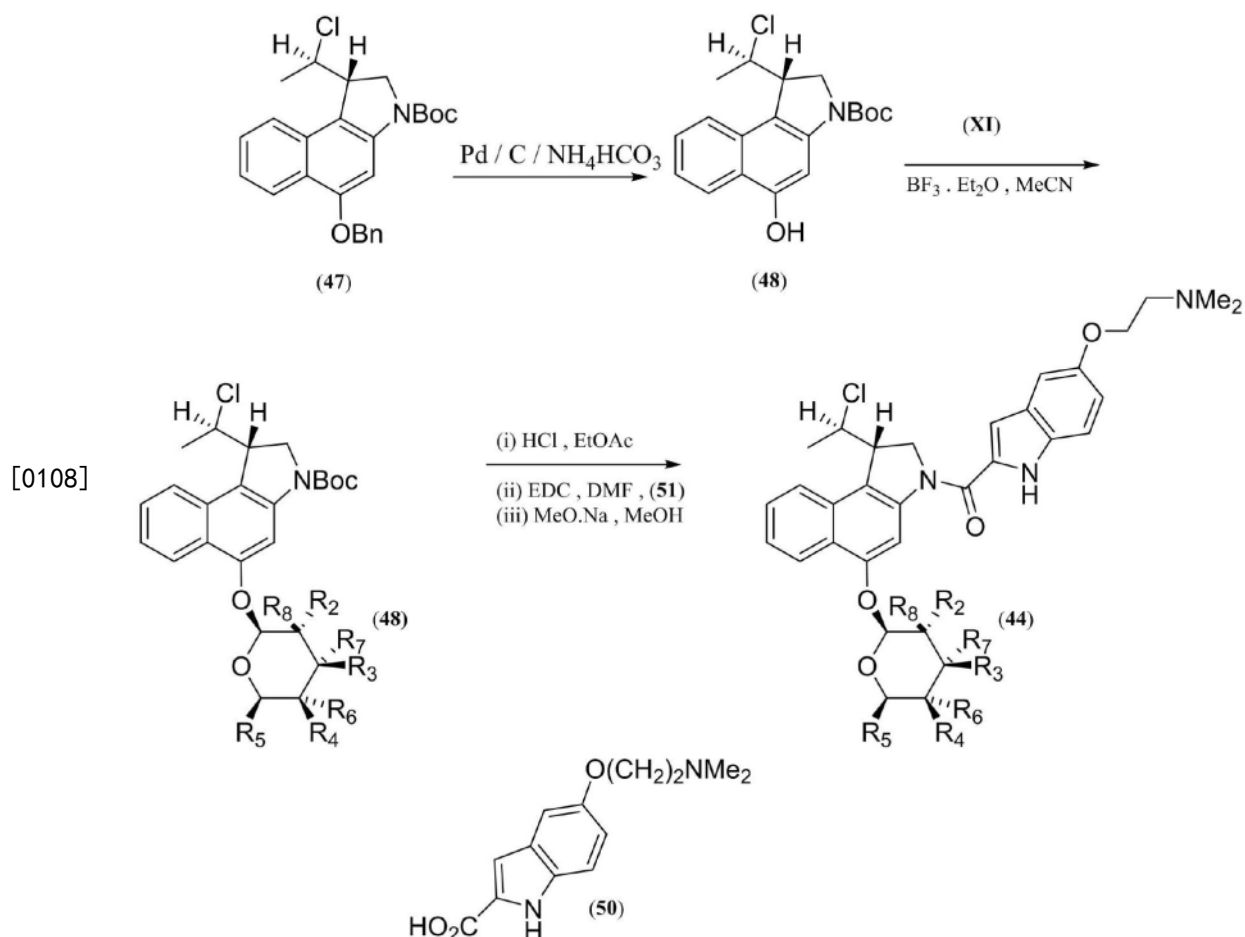
$R_{24} = Me$, $R_{25} = H$ (42)

[0104] 式 (III) 和式 (IV) 的化合物 (其中 R_1 是拓扑异构酶 I (TOP1) 抑制剂), 可通过本文先前公开的方法制备。

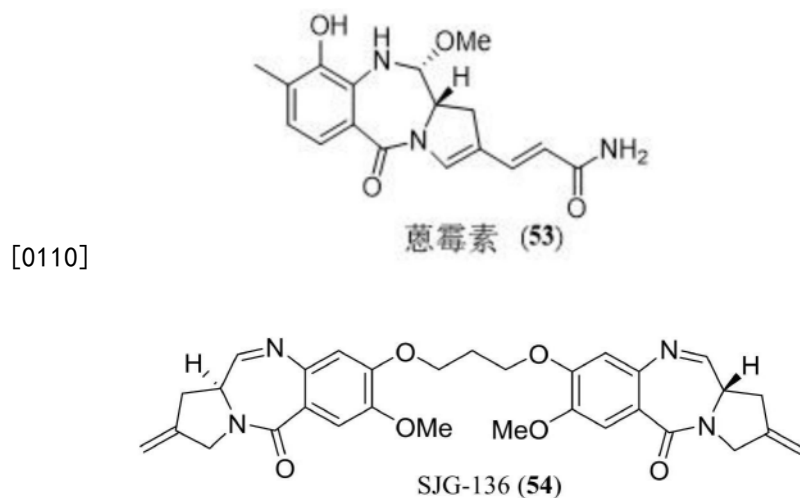
[0105] DNA 烷基化剂包括化合物, 例如衍生自多卡霉素 SA (43) 的 DNA 反应性螺环丙基环己二烯酮 (46)。式 (III) 的化合物 (44) (例如, 参见 Tietze 等人, Angew. Chem. Int. Ed. 45 (2006) 6574-6577; Tietze 等人, J. Med. Chem. 52 (2009) 537-543) 的细胞毒性可能比水解的 seco 产物 (45) 小得多, 水解的 seco-产物在原位进行所谓的 Winstein 环化以提供 DNA 反应性螺环丙基环己二烯酮 (46) (本领域技术人员将理解, 也可以使用式 (IV) 的化合物代替式 (III) 的化合物)。



[0107] 式(III)化合物,化合物(44)由化合物(47)合成(根据Tietze等人(同上)的方法制备):

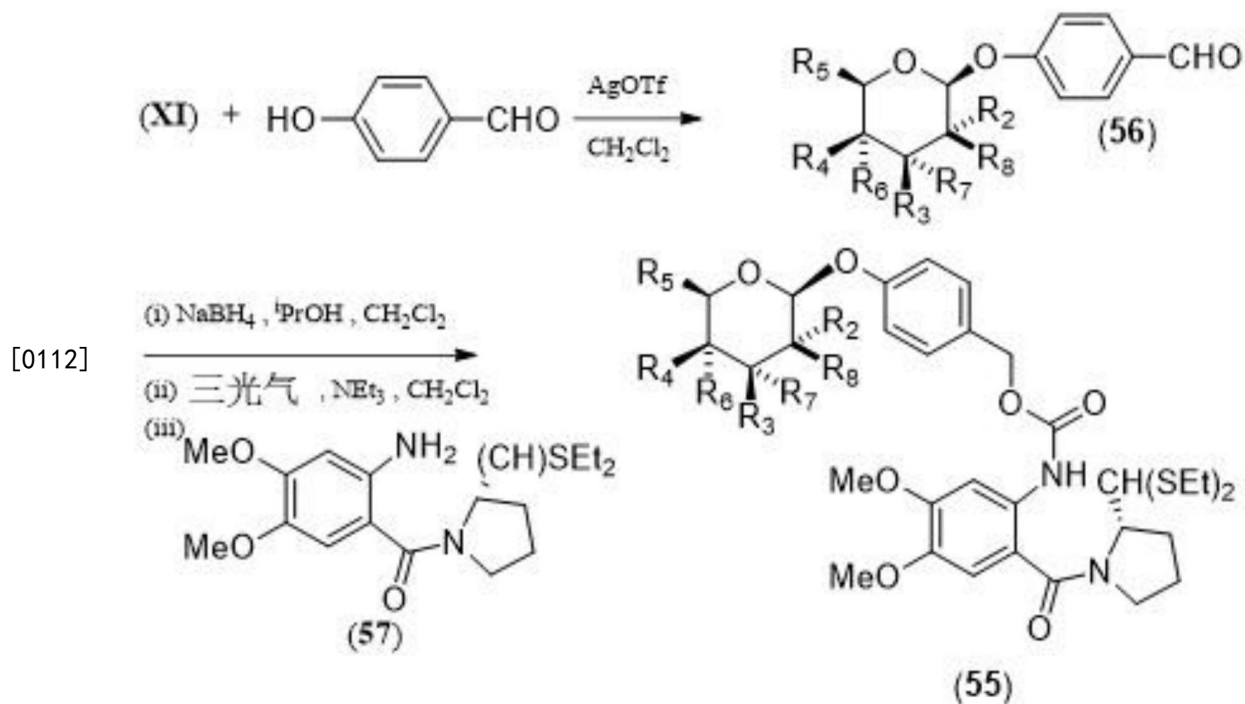


[0109] 其它DNA烷基化剂包括,例如,作为衰老细胞裂解剂的细胞毒性吡咯并[2,1-c][1,4]苯二氮卓类(PBD)的偶联物。PBD是一种抗肿瘤抗生素,其包括天然产物蒽霉素(53),其通过其N10-C11亚胺官能团共价结合到DNA小凹槽中的鸟嘌呤残基的外环NH₂基团而发挥细胞毒性作用(例如,参见Antonow和Thurston, Chem. Rev. 111 (2011) 2815-2864; Mantaj等人, Angew. Chem. Int. Ed. 56 (2017) 462-488)。PBD单体显示出显著的细胞毒性,并且通过接头连接两个PBD单体会产生能够链间DNA交联的PBD二聚体。SJG-136(54)是一种具有高细胞毒性的二聚体,其已被用于构建具有临床实用性的抗体-药物偶联物。



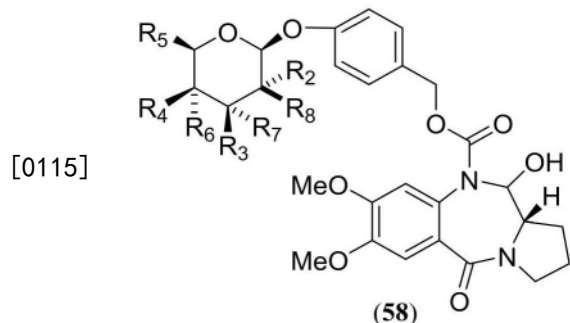
[0111] 式(III)化合物,化合物(55)由化合物(56)合成(根据Kamal等人, ChemMedChem3

(2008) 794-802的方法制备)：



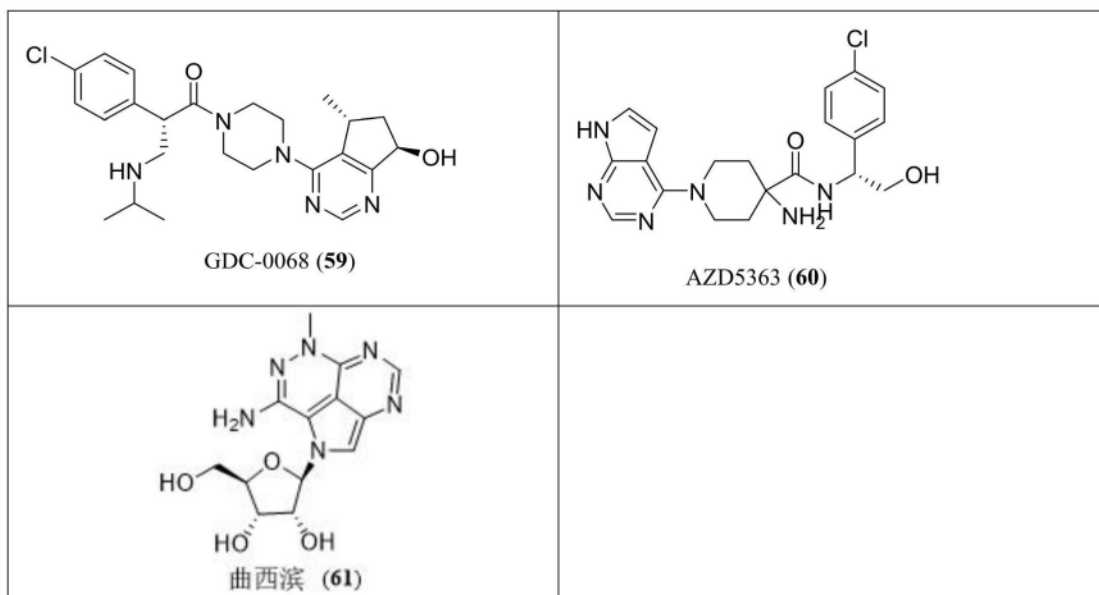
[0113] 本领域技术人员将理解,也可以使用式 (XII) 化合物代替式 (XI) 化合物来提供式 (IV) 化合物。

[0114] 化合物 (58) 是式 (III) 的化合物,可以使用类似的方法制备。本领域技术人员将理解,式 (IV) 的化合物可以以类似的方式制备。



[0116] Akt抑制剂包括但不限于,ipatasertib(或GDC-0068) (59)、AZD5363(60)和曲西滨(triciribine) (61))。

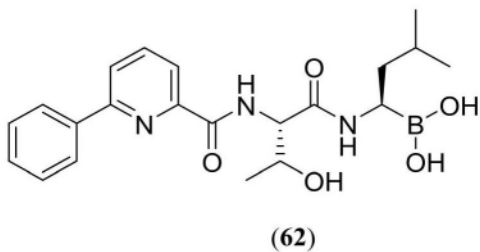
[0117]



[0118] 其中R1为Akt抑制剂的式(III)和式(IV)化合物可通过本文先前公开的方法制备。

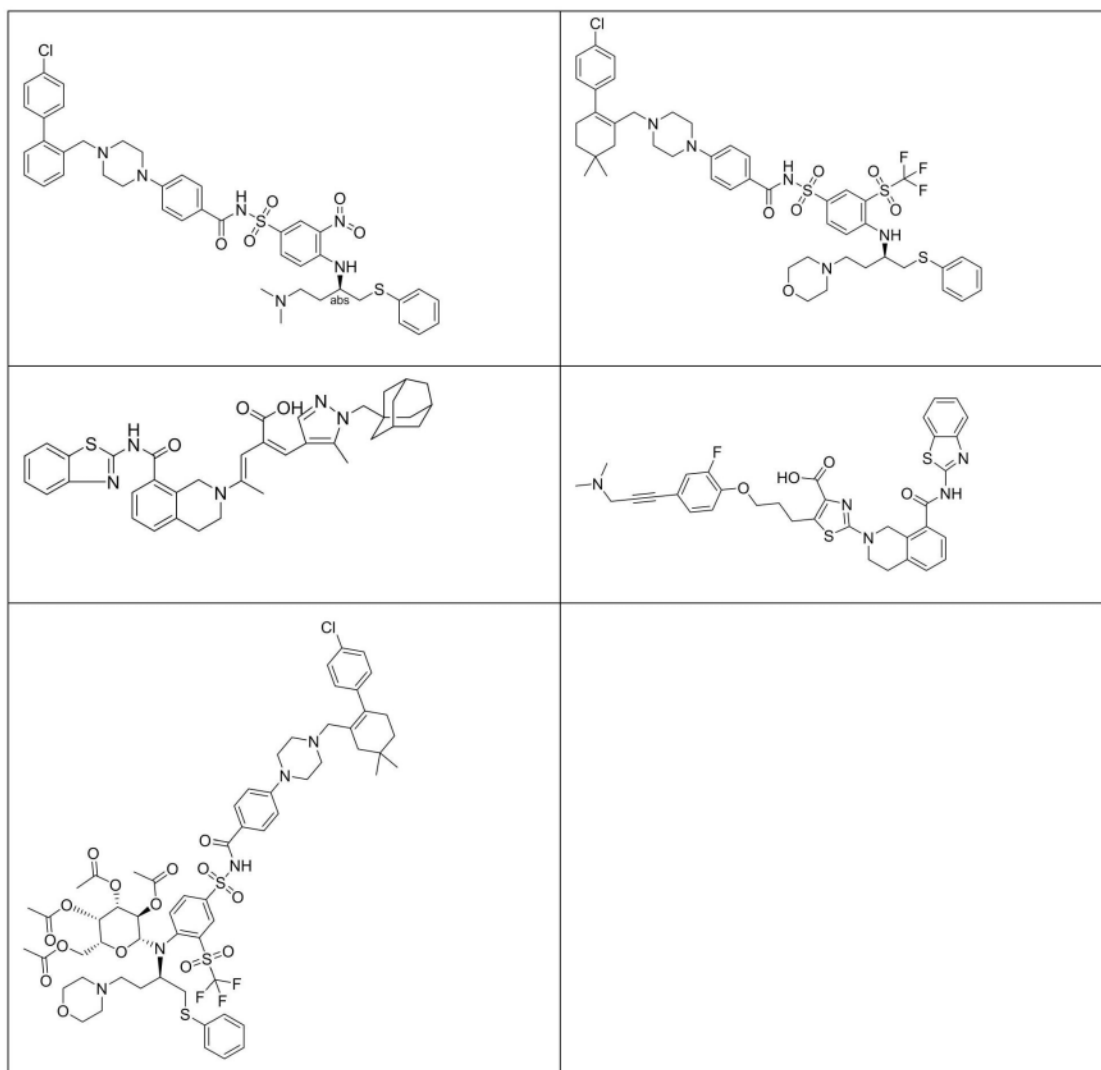
[0119] 蛋白酶体抑制剂包括但不限于德兰佐米(delanzomib) (62)。

[0120]



[0121] Bcl2抑制剂包括但不限于以下所示的化合物：

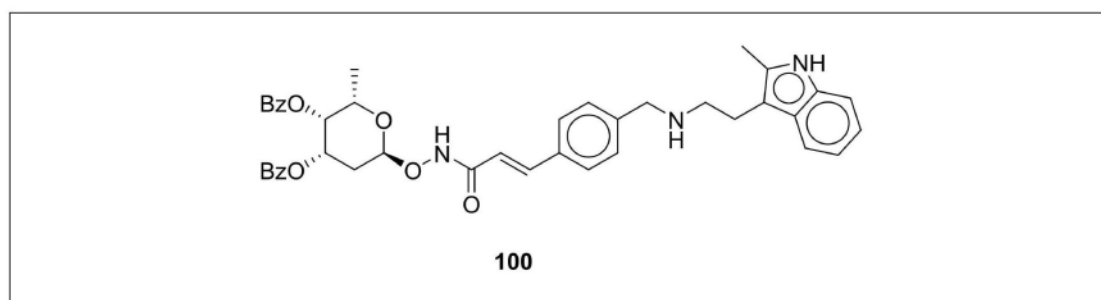
[0122]

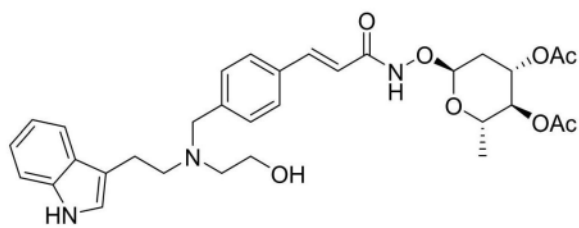


[0123] 衰老细胞裂解化合物包括下面表1中所示的那些化合物

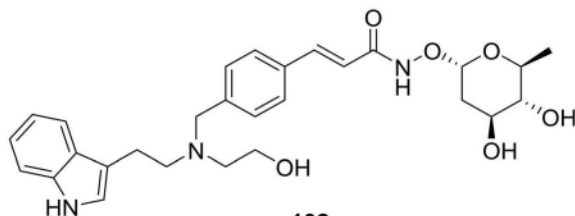
[0124] 表1

[0125]



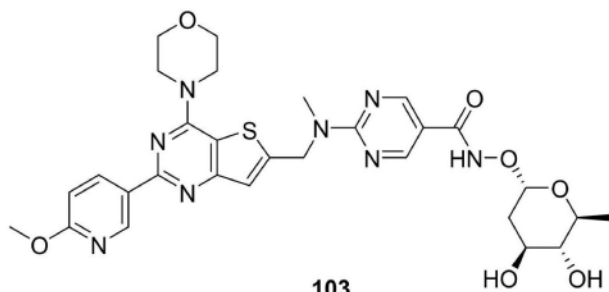


101

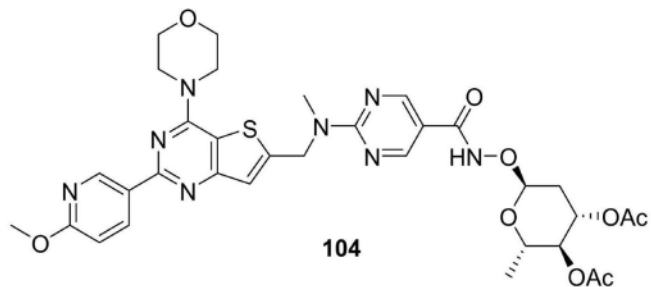


102

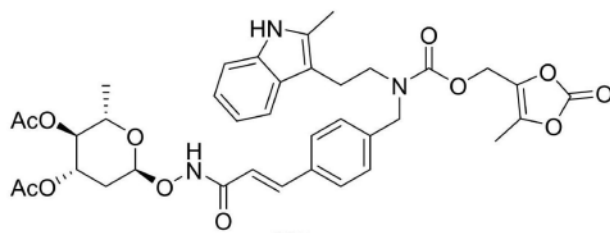
[0126]



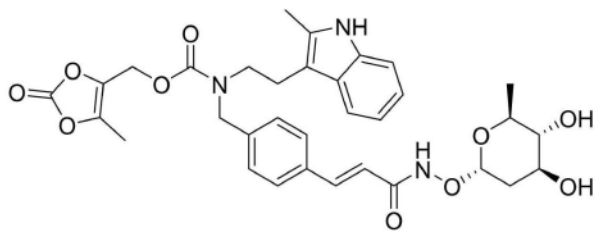
103



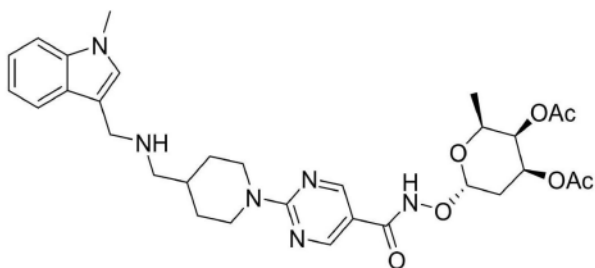
104



105

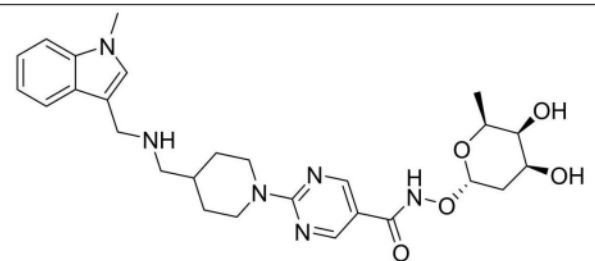


106

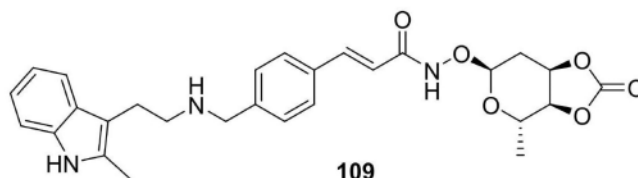


107

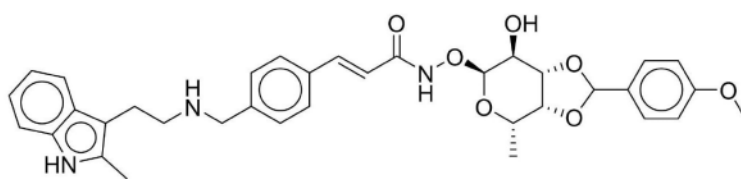
[0127]



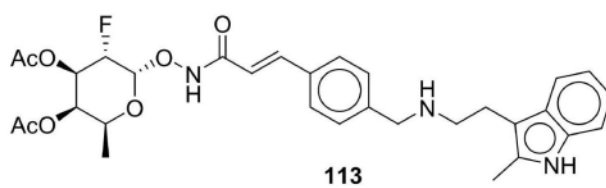
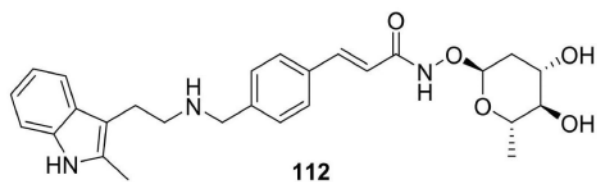
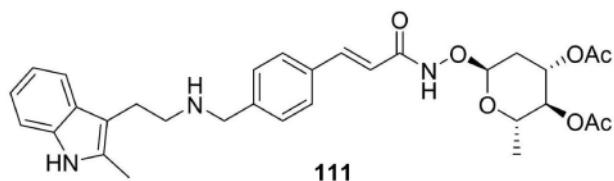
108



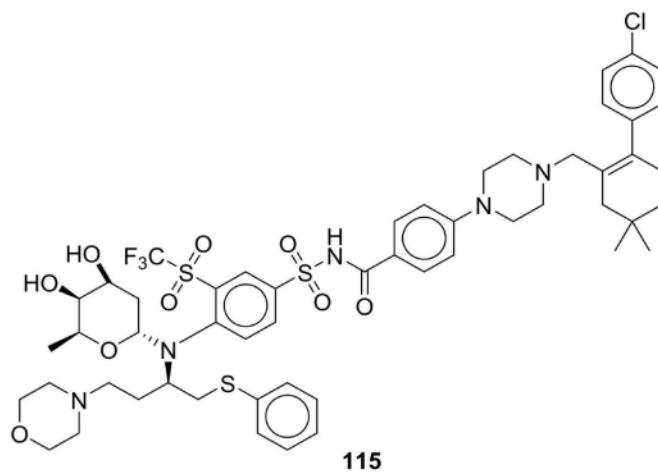
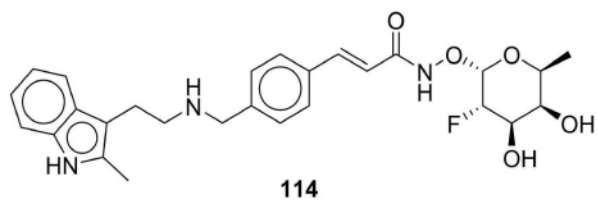
109

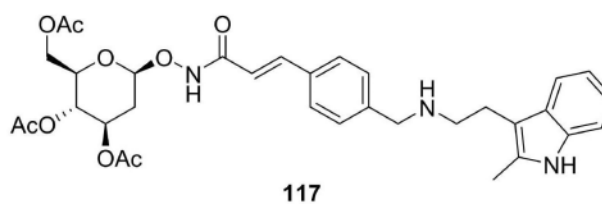
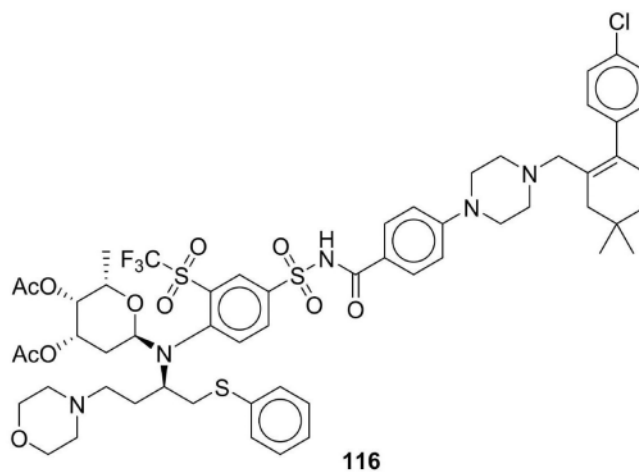


110

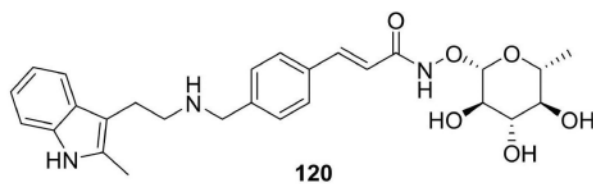
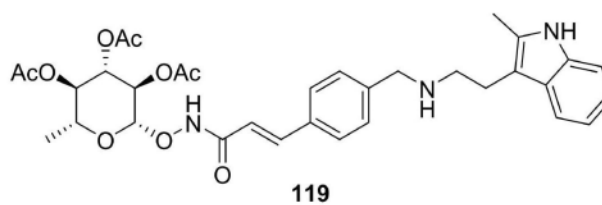
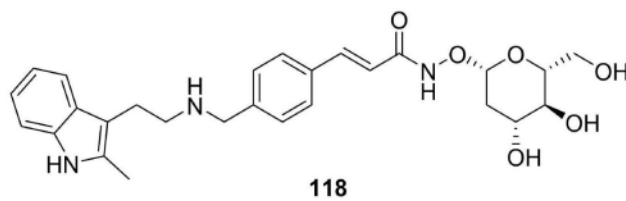


[0128]

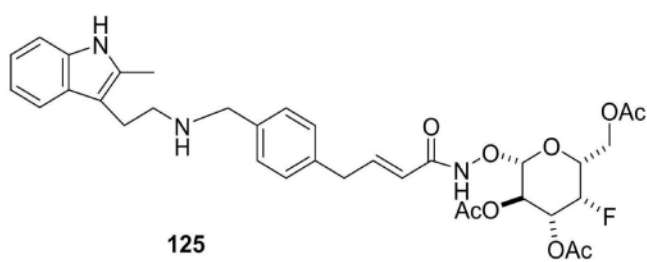
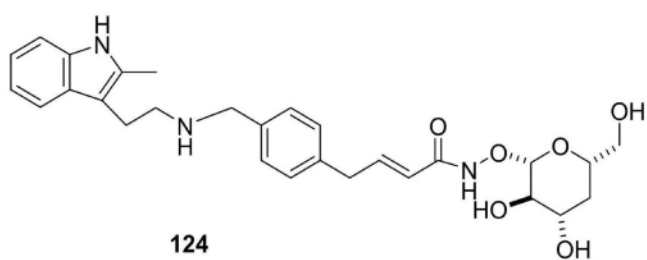
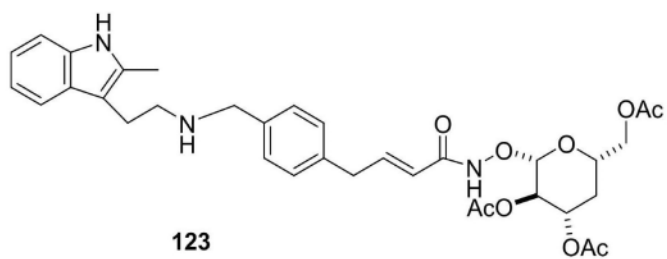
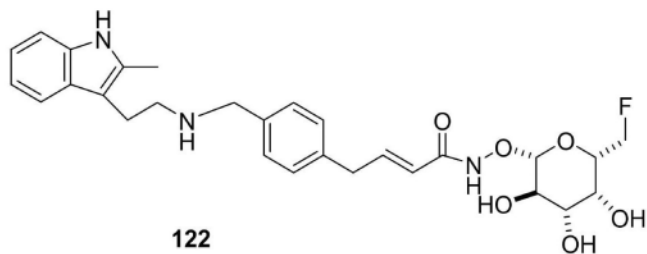
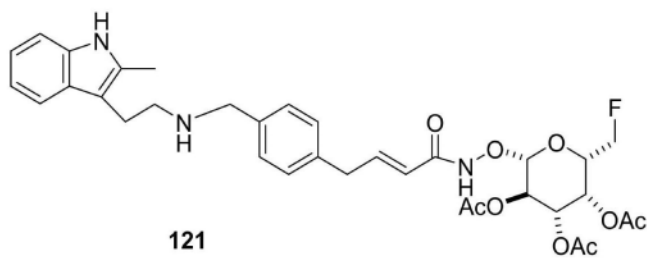




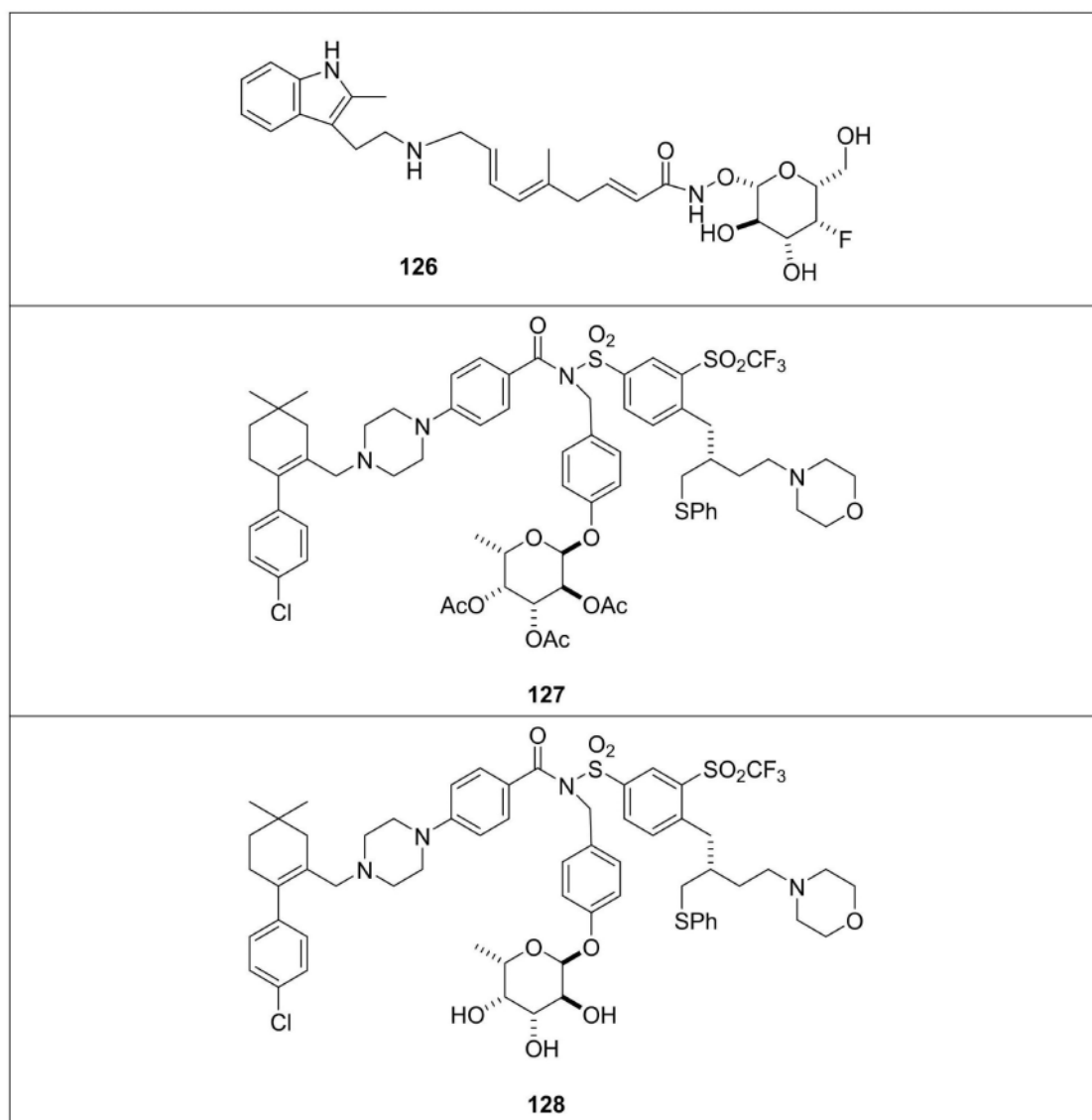
[0129]



[0130]



[0131]



[0132] 衰老细胞裂解化合物可通过下文方案1-7中所示的方法制备。制备衰老细胞裂解化合物的其它步骤在本领域技术人员的范围内。

[0133] 衰老细胞裂解剂的表征和鉴定方法

[0134] 可以使用本文或本领域所述的一种或多种基于细胞的测定法和一种或多种本领域技术人员熟悉的动物模型来确定衰老细胞裂解剂的表征。衰老细胞裂解剂可以选择性地杀死一种或多种类型的衰老细胞(例如,衰老前脂肪细胞、衰老内皮细胞、衰老成纤维细胞、衰老神经元、衰老上皮细胞、衰老间充质细胞、衰老平滑肌细胞、衰老巨噬细胞或衰老软骨细胞)。在某些实施方案中,衰老细胞裂解剂能够选择性地杀死至少衰老的成纤维细胞。

[0135] 可以使用本文或本领域所述的一种或多种基于细胞的测定法和一种或多种动物模型来将试剂表征为衰老细胞裂解剂。本领域技术人员将容易理解,通过将测试试剂的活性与适当的阴性对照(例如仅载体或稀释剂和/或本领域已知的不杀伤衰老细胞的组合物或化合物)和适当的阳性对照进行比较来完成。用于表征衰老细胞裂解剂的基于体外细胞的测定还包括用于确定试剂对非衰老细胞(例如静止细胞或增殖细胞)的影响的对照。与一个或多个阴性对照相比,衰老细胞裂解剂减少(即,降低)多个衰老细胞的存活百分比(即,以某种方式降低动物或基于细胞的测定中存活的衰老细胞的量)。特定体外测定的条件包

括温度、缓冲液(包括盐、阳离子、介质)和其它组分,这些组分保持了测定中使用的测试试剂和试剂的完整性,是本领域技术人员所熟悉的和/或可以通过常规实验容易地确定。

[0136] 用于测定的衰老细胞的来源可以是原代细胞培养物或培养物适应性细胞系,包括但不限于可能含有染色体整合或附加体重组核酸序列的遗传工程细胞系、永生化或可永生化细胞系、体细胞杂交细胞系、已分化或可分化细胞系、转化细胞系等。在一些实施方案中,衰老细胞是从具有衰老细胞相关疾病或病症的宿主或受试者获得的生物样品中分离的。在其它实施方案中,非衰老细胞可以从受试者获得,或者可以是培养适应系,并且衰老是通过本文所述的方法和本领域中所述的方法诱导的,例如通过暴露于辐射或化疗剂(例如,阿霉素)诱导。生物样品可以是,例如,血液样品、活检样品、体液(例如,肺灌洗物、腹水、粘膜冲洗物、滑液等)、骨髓、淋巴结、组织外植体、器官培养物或从受试者获得的任何其它组织或细胞制剂。生物样品可以是形态完整性或物理状态已被破坏的组织或细胞制剂,例如,通过解剖、解离、溶解、分馏、均质化、生物化学或化学提取、粉碎、冷冻干燥、超声处理或任何其它用于处理来源于受试者或生物源的样品的手段。受试者可能是人类或非人类动物。

[0137] 本文所述和本领域所述的转基因动物模型可用于测定衰老细胞的杀伤或去除(参见,例如Baker等人,上文;Nature, 479 (2011) 232-236;国际申请No. WO/2012/177927;国际申请No. WO 2013/090645)。示例性转基因动物模型包含转基因,所述转基因包括允许作为阳性对照的衰老细胞(例如p16INK4a阳性衰老细胞)的受控清除的核酸。转基因动物中衰老细胞的存在和水平可以通过测定动物衰老细胞中表达的一种或多种可检测标志物的水平来确定。转基因核苷酸序列包括可检测标记,例如,一种或多种红色荧光蛋白;绿色荧光蛋白;和一种或多种检测衰老细胞清除的荧光素酶。

[0138] 本文或本领域所述的动物模型包括本领域公认的用于确定衰老细胞裂解剂治疗或预防(即降低发生的可能性)特定衰老相关疾病或病症的有效性的模型,如动脉粥样硬化模型、骨关节炎模型、COPD模型、IPF模型等。如本文所述,肺病小鼠模型,如博来霉素肺纤维化模型和慢性吸烟模型适用于COPD等疾病,并可由本领域技术人员常规实践。国际申请No. WO 2013/090645和WO 2014/205244描述了用于确定衰老细胞裂解剂治疗和/或预防(即降低发生的可能性)化疗和放疗副作用模型或治疗或预防(即降低发生的可能性)转移有效性的动物模型。用于确定治疗眼病,特别是年龄相关性黄斑变性的药物有效性的动物模型也为本领域中常规使用(参见,例如, Pennesi等人, Mol. Aspects Med. 33 (2012) 487-509; Zeiss等, Vet. Pathol. 47 (2010) 396-413; Chavala等人, J. Clin. Invest. 123 (2013) 4170-4181)。

[0139] 作为非限制性示例,如本文所述,已经开发了骨关节炎动物模型。骨关节炎可以在动物中诱导,例如,通过外科手术不完全或完全切断前交叉韧带,诱发关节损伤,例如,在膝关节中。骨关节炎动物模型可用于评估衰老细胞裂解剂治疗或预防(即,降低发生的可能性)骨关节炎的有效性,并导致蛋白多糖侵蚀的减少,诱导(即,刺激、增强)胶原(如2型胶原)的产生,以及减轻进行ACL手术的动物的疼痛。可以对关节中组织和细胞的完整性和组成进行免疫组织学检查。还可以使用本文所述的方法和技术,例如如上所述的用于确定炎症分子(例如IL-6)水平的测定和用于确定衰老标志物水平的测定来实施免疫化学和/或分子生物学技术,这些方法和技术可以由本领域技术人员常规实践。

[0140] 通过另一个非限制性示例,如本文所述,已经开发出动脉粥样硬化动物模型。动脉

粥样硬化可以在动物中诱导,例如,通过给动物喂食高脂肪饮食或通过使用高度易患动脉粥样硬化的转基因动物诱导。动物模型可用于确定衰老细胞裂解剂在减少动脉粥样硬化斑块的量或抑制动脉粥样硬化斑块的形成、减少动脉粥样硬化斑块的脂质含量(即,减少、降低斑块中的脂质量)以及导致斑块的纤维帽厚度增加或增强方面的有效性。苏丹染色可用于检测动脉粥样硬化血管中的脂质水平。免疫组织学、免疫化学和分子生物学测定(例如,用于测定炎症分子(例如IL-6)的水平,以及用于测定如上所述的衰老标志物的水平)都可以根据本文所述的方法进行,这些方法在本领域中是常规实践的。

[0141] 在另一个非限制性示例中,如本文所述,已经描述了用博来霉素处理动物的小鼠模型(参见,例如,Peng等人,PLoS One 8(4)(2013)e59348.doi:10.1371/journal.pone.0059348;Mouratis et al.,Curr.Opin.Pulm.Med.17(2011)355-361),用于确定治疗IPF的药物的有效性。在肺病动物模型(例如,博来霉素动物模型、烟雾暴露动物模型等)中,可以进行呼吸测量以确定弹性、顺应性、静态顺应性和外周毛细血管氧饱和度(SpO_2)。免疫组织学、免疫化学和分子生物学测定(例如,用于测定炎症分子(例如IL-6)的水平,以及用于测定如上所述的衰老标志物的水平)都可以根据本文所述的方法进行,这些方法在本领域中是常规实践的。

[0142] 如本文所述,可以使用本领域技术人员熟悉的一个或多个统计分析来确定衰老细胞裂解剂在动物模型中选择性杀死衰老细胞的有效性。例如,可以使用诸如双向方差分析(ANOVA)的统计分析来确定用药物处理的动物组与未用药物处理动物组(即阴性对照组,其可以包括仅载体和/或非衰老细胞裂解剂)之间的差异的统计显著性。诸如SPSS、MINITAB、Statistika、Graphpad、GLIM、Genstat和BMDP的统计软件包可轻易获得,并且是动物模型领域的技术人员常规使用的。

[0143] 本领域技术人员将容易理解,通过将测试试剂的活性与适当的阴性对照(例如,仅载体和/或本领域已知的不杀死衰老细胞的组合物、试剂或化合物)和适当的阳性对照进行比较,可以实现对衰老细胞裂解剂的表征和确定衰老细胞裂解剂的杀伤水平。用于表征药物的基于体外细胞的测定还包括用于确定药物对非衰老细胞(例如静止细胞或增殖细胞)的作用的对照。与一种或多种阴性对照相比,有用的衰老细胞裂解剂降低(即,降低)衰老细胞的存活百分比(即,以某种方式降低动物或基于细胞的测定中存活的衰老细胞的量)。因此,与杀死非衰老细胞(本文中可称为相对于非衰老细胞选择性杀死衰老细胞)相比,衰老细胞裂解剂选择性地杀死衰老细胞。

[0144] 在某些实施方案中(在体外测定中或在体内(在人或非人动物中)),所述至少一种衰老细胞裂解剂杀死至少20%的衰老细胞,并且杀死不超过5%的非衰老细胞。在其它实施方案中(在体外测定中或在体内(在人或非人动物中)),所述至少一种衰老细胞裂解剂杀死至少约25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%或65%的衰老细胞,并且杀死不超过约5%或10%的非衰老细胞。在另一些实施方案中(在体外测定中或在体内(在人或非人动物中)),所述至少一种衰老细胞裂解剂杀死至少约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%或65%的衰老细胞,并且杀死不超过约5%、10%或15%的非衰老细胞。在其它实施方案中(在体外测定中或在体内(在人或非人动物中)),所述至少一种衰老细胞裂解剂杀死至少约40%、45%、50%、55%、60%或65%的衰老细胞,并且杀死不超过约5%、10%、15%、20%或25%的非衰老细胞。在另一些实施方案中(在体外测定中或在体内(在人或非人动物中)),

所述至少一种衰老细胞裂解剂杀死至少约50%、55%、60%或65%的衰老细胞,并且杀死不超过约5%、10%、15%、20%、25%或30%的非衰老细胞。换言之,衰老细胞裂解剂对衰老细胞的选择性杀伤是对非衰老细胞的至少5-25、10-50、10-100或100-1000倍。

[0145] 关于本文所述用于治疗衰老相关疾病或病症的方法的具体实施方案,所述被杀死的衰老细胞百分比可指在包括有助于疾病或病症发作、进展和/或恶化的衰老细胞的组织或器官中被杀死的老化细胞百分比。作为非限制性示例,脑组织、眼睛的组织和部位、肺组织、心脏组织、动脉、关节、皮肤和肌肉可以包括衰老细胞,如上所述,衰老细胞可以通过本文所述的衰老细胞裂解剂以百分比减少,从而提供治疗效果。此外,从受影响的组织或器官选择性地去除至少20%或至少25%的衰老细胞可以具有临床显著的治疗效果。

[0146] 关于本文所述方法的具体实施方案,例如,通过施用衰老细胞裂解剂(即,参考上述体内方法)来治疗与动脉硬化相关的心血管疾病或病症,例如动脉粥样硬化,被杀死的衰老细胞百分比可以是指在含有斑块的受影响动脉中被杀死的衰老细胞相对于在动脉斑块中被杀死的非衰老细胞的百分比。在某些实施方案中,在如本文所述的用于治疗心血管疾病(例如动脉粥样硬化)的方法中,所述至少一种衰老细胞裂解剂杀死动脉中至少20%的衰老细胞和不超过5%的非衰老细胞。在其它实施方案中,衰老细胞裂解剂选择性地杀死动脉硬化动脉中至少25%的衰老细胞。

[0147] 在一些实施方案中,关于本文所述的通过施用衰老细胞裂解剂治疗骨关节炎的方法,被杀死的衰老细胞百分比可以指在骨关节炎关节中被杀死的衰老细胞与在骨关节炎关节中被杀死的非衰老细胞的百分比。在某些实施方案中,在本文所述的治疗骨关节炎的方法中,所述至少一种衰老细胞裂解剂杀死骨关节炎关节中至少20%的衰老细胞和不超过5%的非衰老细胞。在其它实施方案中,衰老细胞裂解剂选择性地杀死骨关节炎关节中至少25%的衰老细胞。

[0148] 在一些实施方案中,关于本文所述的通过施用至少一种衰老细胞裂解剂来治疗衰老相关肺部疾病或病症(例如,COPD、IPF)的方法,被杀死的衰老细胞百分比可以是指在受影响的肺组织中被杀死的衰老细胞与在受影响肺组织中杀死的非衰老细胞的百分比。在某些实施方案中,在本文所述的用于治疗衰老相关肺部疾病和病症的方法中,衰老细胞裂解剂杀死受影响的肺组织中的至少20%的衰老细胞和不超过5%的非衰老细胞。在其它实施方案中,衰老细胞裂解剂选择性地杀死受影响的肺组织中至少25%的衰老细胞。

[0149] 在某些实施方案中,提供了用于鉴定(即筛选)试剂的方法,所述试剂是用于治疗或预防(即降低发生的可能性)衰老相关疾病或病症的有用的衰老细胞裂解剂。在一些实施方案中,鉴定用于治疗此类疾病和病症的衰老细胞裂解剂的方法包括诱导细胞衰老以提供建立的衰老细胞。本文和本领域描述了诱导细胞衰老的方法,包括例如暴露于辐射(例如,10Gy通常是足够的)或化疗剂(例如,阿霉素或其它蒽环类药物)。在暴露于药物后,将细胞在适当的条件下培养适当的时间(例如,适合于给定细胞类型或细胞系的培养基、温度、CO₂/O₂水平),以允许建立衰老。如本文所讨论的,细胞的衰老可以通过确定任何数量的特征来确定,例如形态的变化(例如通过显微镜观察);产生例如衰老相关半乳糖苷酶(SA- β -gal)、p16INK4a、p21或任何一种或多种SASP因子(例如IL-6、MMP3)。然后将衰老细胞的样品与候选试剂接触(即,与细胞和试剂混合、组合或以某种方式允许细胞和试剂相互作用)。本领域技术人员将理解,该测定将包括适当的对照,阴性和阳性,无论是过去的还是同时进行

的。例如,将与衰老细胞相似地培养但未暴露于衰老诱导剂的对照非衰老细胞样品与候选剂接触。确定衰老细胞的存活水平,并将其与非衰老细胞的生存水平进行比较。当衰老细胞的存活水平低于非衰老细胞的存活水平时,鉴定出一种衰老细胞裂解剂。

[0150] 在一些实施方案中,上述鉴定衰老细胞裂解剂的方法可进一步包括鉴定衰老细胞裂解剂是否可用于治疗骨关节炎的步骤。该方法可以进一步包括使所鉴定的衰老细胞裂解剂与能够产生胶原的细胞接触;以及测定细胞产生的胶原水平。在一些实施方案中,细胞是软骨细胞,胶原是2型胶原。该方法可进一步包括向关节中有关节炎病变的非人动物施用候选衰老细胞裂解剂,并测定以下一项或多项(a)关节中衰老细胞的水平;(b)动物的身体功能;(c)一种或多种炎症标志物的水平;(d)关节组织学;和(e)产生的2型胶原的水平,从而确定所述衰老细胞裂解剂的治疗功效,其中与未用所述衰老细胞裂解剂处理的动物相比,在所述处理的动物中观察到以下一种或多种:(i)所述经处理的动物的关节中的衰老细胞水平的降低;(ii)所述经处理的动物的身体功能的改善;(iii)所述经处理的动物中一种或多种炎症标志物的水平降低;(iv)所述经处理的动物的关节中的组织学正常性增加;和(v)在所述经处理的动物中产生的2型胶原水平的增加。如本文和本领域所述,动物的身体功能可以通过确定腿对诱导的或自然的骨关节炎病症的敏感性的技术来确定,例如,通过动物在受影响的肢体上承受重量的耐受性或动物远离不愉快刺激(如热或冷)的能力。可以使用本领域技术人员熟悉的一个或多个统计分析来确定如本文所述的在动物模型中杀死衰老细胞的药物的有效性。如本文所述和本领域常规实践的统计分析可以应用于分析数据。

[0151] 在其它实施方案中,上述鉴定衰老细胞裂解剂的方法可进一步包括鉴定衰老细胞裂解剂是否可用于治疗由动脉硬化引起或与动脉硬化相关的心血管疾病的步骤。因此,该方法可进一步包括在非人动物或动物模型中施用衰老细胞裂解剂候选试剂,以确定试剂减少斑块量、抑制动脉粥样硬化动脉中斑块形成、减少动脉粥样硬化斑块的脂质含量(即,减少、减少斑块中的脂质量)和/或导致斑块的纤维帽厚度增加或增强的有效性。苏丹染色可用于检测动脉粥样硬化血管中的脂质水平。如上所述,免疫组织学、用于确定炎症分子(例如IL-6)水平的测定和/或用于确定衰老标志物水平的测定都可以根据本文所述的方法和本领域常规实践进行。

[0152] 在一个特定的实施方案中,本文所述的用于鉴定衰老细胞裂解剂的方法可进一步包括向患有动脉粥样硬化斑块的非人动物施用候选衰老细胞裂解剂,并测定以下一项或多项(a)动脉中衰老细胞的水平;(b)动物的身体功能;(c)一种或多种炎症标志物的水平;(d)受影响血管(例如动脉)的组织学;从而确定所述衰老细胞裂解剂的治疗功效,其中与未用所述衰老细胞裂解剂处理的动物相比,在所述处理的动物中观察到以下一种或多种:(i)所述经处理的动物的动脉中衰老细胞水平的降低;(ii)所述经处理的动物的身体功能的改善;(iii)所述经处理的动物中一种或多种炎症标志物的水平降低;(iv)所述经处理的动物的动脉中的组织学正常性增加。如本文和本领域所述,动物的身体功能可以通过测定身体活动来确定。如本文所述和本领域常规实践的统计分析可以应用于分析数据。

[0153] 在一些实施方案中,本文所述的用于鉴定衰老细胞裂解剂的方法可包括向非人动物肺病模型(如博来霉素模型或烟雾暴露动物模型)施用候选衰老细胞裂解剂,并测定以下一项或多项(a)肺中衰老细胞的水平;(b)动物的肺功能;(c)一种或多种炎症标志物的水平;(d)肺组织的组织学,从而确定衰老细胞裂解剂的治疗功效,其中与未用衰老细胞裂解

剂处理的动物相比,在所述处理的动物中观察到以下一种或多种:(i)所述经处理的动物的肺和肺组织中衰老细胞水平的降低;(ii)所述经处理的动物的肺功能的改善;(iii)所述经处理的动物中一种或多种炎症标志物的水平降低;和(iv)所述经处理的动物的肺组织的组织学正常性增加。可以进行呼吸测定以测定弹性、顺应性、静态顺应性和外周毛细血管血氧饱和度(SpO_2)。肺功能可以通过确定多种测定中的任何一种来评估,所述测定例如呼气储备容量(ERV)、用力肺活量(FVC)、用力呼气容量(FEV)(例如,1秒内的FEV,FEV1)、FEV1/FEV比率、用力呼气流量25%至75%和最大自主通气量(MVV)、峰值呼气流量(PEF)、缓慢肺活量(SVC)。总肺容积包括总肺活量(TLC)、肺活量(VC)、残余容量(RV)和功能性残余容量(FRC)。可以使用一氧化碳的扩散容量(DLCO)来测定肺泡毛细血管膜上的气体交换。也可以测定外周毛细管氧饱和度($SpO_{2,sub}$)。如本文所述和本领域常规实践的统计分析可以应用于分析数据。

[0154] 衰老相关疾病的治疗和预防方法

[0155] 本文提供了用于治疗与细胞衰老相关、有联系或由细胞衰老引起的病况、疾病或病症的方法,包括有需要的受试者的与年龄相关的疾病和病症。衰老相关疾病或病症在本文中也可称为衰老细胞相关疾病或病症。与衰老相关的疾病和病症包括,例如,心血管疾病和病症、炎症性疾病和病症、自身免疫性疾病和病症、肺部疾病和病症、眼病和病症、代谢性疾病和病症、神经疾病和病症(例如,神经退行性疾病和障碍);衰老引起的与年龄相关的疾病和病症;皮肤病况;年龄相关疾病;皮肤病和病症;以及与移植相关的疾病和病症。衰老的一个显著特征是在分子、细胞、组织和生物体水平上逐渐丧失功能或退化。与年龄相关的变性会导致公认的病理,如少肌症、动脉粥样硬化和心力衰竭、骨质疏松症、肺功能不全、肾功能衰竭、神经退行性变(包括黄斑变性、阿尔茨海默病和帕金森病)等。尽管不同的哺乳动物物种对特定年龄相关病理的易感性各不相同,但总的来说,年龄相关病理通常在物种特异性寿命的中点开始(例如,人类50-60岁)以近似指数的动力学上升(见,例如Campisi, Annu.Rev.Physiol.75(2013)685-705;Naylor et al.,Clin.Pharmacol.Ther.93(2013)105-116)。

[0156] 可通过根据本文所述方法施用本文所述的任何一种衰老细胞裂解剂来治疗的衰老相关病况、病症或疾病的示例包括认知疾病(例如,轻度认知障碍(MCI)、阿尔茨海默病和其它痴呆;亨廷顿舞蹈症);心血管疾病(例如动脉粥样硬化、心脏舒张功能障碍、主动脉瘤、心绞痛、心律失常、心肌病、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病、心肌梗死、心内膜炎、高血压、颈动脉疾病、外周血管疾病、心脏抗应激、心脏纤维化);代谢性疾病和疾病(如肥胖、糖尿病、代谢综合征);运动功能疾病和疾病(例如帕金森病、运动神经元功能障碍(MND));亨廷顿舞蹈症);脑血管病;肺气肿;骨关节炎;良性前列腺肥大;肺部疾病(例如,特发性肺纤维化、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺气肿、阻塞性细支气管炎、哮喘);炎症性/自身免疫性疾病和病症(例如骨关节炎、湿疹、银屑病、骨质疏松症、粘膜炎、移植相关疾病和病症);眼科疾病或病症(如年龄相关性黄斑变性、白内障、青光眼、视力丧失、老花眼);糖尿病溃疡;转移;化疗副作用、放疗副作用;与衰老相关的疾病和病症(例如驼背、肾功能不全、虚弱、脱发、听力损失、肌肉疲劳、皮肤病况、少肌症和椎间盘突出)和其它由衰老引起的与年龄相关的疾病(例如,由辐射、化疗、吸烟、高脂/高糖饮食和环境因素引起的疾病/病症);伤口愈合;皮肤痣;纤维化疾病和病症(例如,囊性纤维化、肾纤维化、肝纤维化、肺纤维化、口腔黏膜下纤维

化、心脏纤维化和胰腺纤维化)。在某些实施方案中,可以排除上述或本文所述的任何一种或多种疾病或病症。

[0157] 在一些实施方案中,提供了用于治疗衰老相关疾病或病症的方法,其通过施用衰老细胞裂解剂来杀死患有该疾病或病症受试者中与该疾病或病症相关的衰老细胞(即,已建立的衰老细胞),其中所述疾病或病症是骨关节炎;特发性肺纤维化;慢性阻塞性肺病;或动脉粥样硬化。

[0158] 心血管疾病和病症

[0159] 在其它实施方案中,通过本文所述方法治疗的衰老相关疾病或病症是心血管疾病。心血管疾病可以是心绞痛、心律失常、动脉粥样硬化、心肌病、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病(CAD)、颈动脉疾病、心内膜炎、心脏病发作(冠状动脉血栓形成、心肌梗死[MI])、高血压/过度紧张、主动脉瘤、脑动脉瘤、心脏纤维化、心脏舒张功能障碍、高胆固醇血症/高脂血症、二尖瓣脱垂、外周血管疾病(例如,外周动脉疾病(PAD))、心脏应激抵抗和中风中的任意一种或多种。

[0160] 在某些实施方案中,提供了用于治疗与动脉硬化(即动脉的硬化)相关或由动脉硬化引起的衰老相关心血管疾病的方法。心血管疾病可以是动脉粥样硬化(例如,冠状动脉疾病(CAD)和颈动脉疾病)中的任意一种或多种;心绞痛、充血性心力衰竭和外周血管疾病(例如,外周动脉疾病(PAD))。用于治疗与动脉硬化相关或由动脉硬化引起的心血管疾病的方法可以降低发生高血压/过度紧张、心绞痛、中风和心脏病发作(即,冠状动脉血栓形成、心肌梗死(MI))的可能性。在某些实施方案中,提供了用于稳定受试者的血管(例如动脉)中的动脉粥样硬化斑块的方法,从而降低血栓事件(例如中风或心肌梗死)发生的可能性或延迟血栓事件的发生。在某些实施方案中,这些方法包括施用衰老细胞裂解剂,降低(即,引起降低)受试者血管(例如,动脉)中动脉粥样硬化斑块的脂质含量和/或增加纤维帽厚度(即,导致纤维帽的增加、增强或促进增厚)。

[0161] 动脉粥样硬化的特征是斑块状内膜斑块(动脉粥样硬化瘤)侵犯中动脉和大动脉的管腔;斑块含有脂质、炎症细胞、平滑肌细胞和结缔组织。动脉粥样硬化会影响大中型动脉,包括冠状动脉、颈动脉和脑动脉、主动脉及其分支以及四肢的主要动脉。在一些实施方案中,提供了通过施用衰老细胞裂解剂来抑制动脉粥样硬化斑块的形成(或减少、减弱动脉粥样硬化斑块的形成、引起动脉粥样硬化斑块的减少)的方法。在其它实施方案中,提供了用于减少(降低、减弱)斑块的量(即水平)的方法。血管(例如动脉)中斑块数量的减少可以通过例如斑块表面积的降低,或者通过血管(例如,动脉)的闭塞程度或程度(例如百分比)的降低来确定,其可以通过血管造影术或心血管领域中使用的其它可视化方法来确定。本文还提供了用于增加存在于受试者的一个或多个血管(例如,一个或更多动脉)中的动脉粥样硬化斑块的稳定性(或改善、促进、增强稳定性)的方法,所述方法包括给受试者施用本文所述的任何一种衰老细胞裂解剂。

[0162] 可以使用本领域已知的心血管疾病标准诊断方法来鉴定患有心血管疾病的受试者。通常,动脉粥样硬化和其它心血管疾病的诊断是基于患者的症状(例如胸痛或压力(心绞痛)、手臂或腿部麻木或无力、说话困难或口齿不清、面部肌肉下垂、腿痛、高血压、肾衰竭和/或勃起功能障碍)、病史和/或身体检查。诊断可以通过血管造影术、超声检查或其它影像学检查来确认。有患心血管疾病风险的受试者包括那些具有任何一种或多种易感因素的

人,如心血管疾病家族史,以及那些具有其它风险因素(即易感因素)的人,例如高血压、血脂异常、高胆固醇、糖尿病、肥胖和吸烟、久坐不动的生活方式和高血压。在某些实施方案中,作为衰老细胞相关疾病/病症的心血管疾病是动脉粥样硬化。

[0163] 医学和临床领域的技术人员可以很容易地确定一种或多种衰老细胞裂解剂治疗或预防(即,减少或降低发展或发生)心血管疾病(如动脉粥样硬化)的有效性。诊断方法的一种或任意组合,包括身体检查、临床症状的评估和监测,以及本文所述和本领域实践的分析测试和方法(例如,血管造影、心电图、压力测试、非压力测试)的执行,可以用于监测受试者的健康状态。可以使用本领域已知的技术,例如将已经接受治疗的患有心血管疾病或有心血管疾病风险的患者的症状与没有接受这种治疗或安慰剂治疗的患者的那些症状进行比较,来分析衰老细胞裂解剂或包含其的药物组合物的治疗效果。

[0164] 炎症性和自身免疫性疾病和病症

[0165] 在某些实施方案中,衰老相关疾病或病症是炎症性疾病或病症,例如通过非限制性示例的方式,骨关节炎,其可根据本文所述的方法治疗或预防(即,降低发生的可能性),所述方法包括施用衰老细胞裂解剂。可以通过施用衰老细胞裂解剂如本文所述的抑制剂和拮抗剂来治疗的其它炎症性或自身免疫性疾病或病症包括骨质疏松症、银屑病、口腔粘膜炎症、类风湿性关节炎、炎症性肠病、湿疹、驼背、椎间盘突出和肺部疾病、COPD和特发性肺纤维化。

[0166] 骨关节炎退行性关节病的特征是高机械应力部位的软骨纤维化、骨硬化以及滑膜和关节囊增厚。纤维性颤动是一种局部表面紊乱,涉及软骨表层的分裂。早期分裂与软骨表面相切,遵循主要胶原束的轴线。软骨内的胶原蛋白变得紊乱,蛋白多糖从软骨表面流失。在关节中缺乏蛋白多糖的保护和润滑作用的情况下,胶原纤维容易降解,随后发生机械破坏。患骨关节炎的易发风险因素包括年龄增长、肥胖、既往关节损伤、关节过度使用、大腿肌肉无力和遗传。骨关节炎的症状包括不活动或过度使用后关节疼痛或僵硬,尤其是髌、膝盖和下背部;休息后的僵硬,运动后消失;以及活动后或接近一天结束时更严重的疼痛。骨关节炎也可能影响颈部、小指关节、拇指根部、脚踝和大脚趾。慢性炎症被认为是导致骨关节炎的主要年龄因素。与衰老相结合,关节过度使用和肥胖似乎会促进骨关节炎。

[0167] 通过选择性杀死衰老细胞,衰老细胞裂解剂可以防止(即降低发生的可能性)、减少或抑制关节中蛋白多糖层的丢失或侵蚀、减少受影响关节的炎症、并促进(即刺激、增强、诱导)胶原(如2型胶原)的产生。衰老细胞的去除导致关节中产生的炎性细胞因子(如IL-6)的量(即水平)减少,炎症减少。本文提供了用于治疗骨关节炎、选择性杀死受试者骨关节炎关节中的衰老细胞和/或通过施用至少一种衰老细胞裂解剂(其可与至少一种药学上可接受的赋形剂组合以形成药物组合物)诱导受试者关节中胶原(如2型胶原)产生的方法。衰老细胞裂解剂也可用于降低(抑制、减少)降解关节中胶原的金属蛋白酶13(MMP-13)的产生,并用于恢复蛋白多糖层或抑制蛋白多糖的损失和/或降解。由此,用衰老细胞裂解剂治疗还可预防(即,降低发生的可能性)、抑制或减少侵蚀,或减缓(即,减少速率)骨侵蚀。如本文中详细描述,在某些实施方案中,将衰老细胞裂解剂直接施用到骨关节炎关节(例如,通过关节内、局部、透皮、皮内或皮下递送)。用衰老细胞裂解剂处理也可以恢复、改善或抑制关节强度的恶化。此外,包括施用衰老细胞裂解剂的方法可以减少关节疼痛,因此可用于骨关节炎关节的疼痛控制。

[0168] 一种或多种衰老细胞裂解剂用于治疗或预防受试者骨关节炎以及监测接受一种或多种衰老细胞裂解剂的受试者的有效性可以由医学和临床领域的技术人员容易地确定。一种或任意组合的诊断方法,包括身体检查(如确定受影响关节的压痛、肿胀或发红)、临床症状(如疼痛、僵硬、活动性)的评估和监测,以及本文所述和本领域实践的分析测试和方法的执行(如,确定炎症细胞因子或趋化因子的水平;X射线图像,以确定关节中骨骼之间的空间变窄所示的软骨损失;磁共振成像(MRI),提供骨骼和软组织(包括软骨)的详细图像),可用于监测受试者的健康状态。一种或多种衰老细胞裂解剂的治疗效果可以通过比较接受治疗的患有炎症性疾病或病症(如骨关节炎)或有炎症性疾病或病症风险的患者与没有接受这种治疗或已经接受安慰剂治疗的患者的症状来分析。

[0169] 在某些实施方案中,衰老细胞裂解剂可用于治疗和/或预防(即,降低或降低发生的可能性)类风湿性关节炎(RA)。先天性和适应性免疫反应的失调是类风湿性关节炎(RA)的特征,RA是一种自身免疫性疾病,其发病率随着年龄的增长而增加。类风湿性关节炎是一种慢性炎症性疾病,通常影响手和脚的小关节。骨关节炎至少部分是由关节磨损引起的,而类风湿性关节炎会影响关节内壁,导致疼痛肿胀,从而导致骨侵蚀和关节畸形。RA有时也会影响身体的其它器官,如皮肤、眼睛、肺和血管。RA可发生在任何年龄的受试者;然而,RA通常在40岁后开始发展。这种疾病在女性中更为常见。在本文所述方法的某些实施方案中,RA被排除。

[0170] 慢性炎症也可能导致其它与年龄相关或与衰老相关的疾病和病症,如驼背和骨质疏松。驼背是一种严重脊柱弯曲现象,并且它经常与正常和过早衰老一起出现(参见,例如,Katzman等人,J.Orthop.Sports Phys.Ther.40(2010)352-360)。与年龄相关的驼背通常发生在骨质疏松症使脊柱骨骼弱化到破裂和压缩的程度之后。有几种类型的驼背是针对婴儿或青少年的。严重的驼背会影响肺部、神经和其它组织和器官,导致疼痛和其它问题。驼背与细胞衰老有关。可以在本领域使用的临床前动物模型中确定衰老细胞裂解剂治疗驼背的能力的特征。例如,TTD小鼠发展为驼背(参见,例如,de Boer等人,Science 296(2002)1276-1279);可使用的其它小鼠包括BubR1H/H小鼠,其也已知会发生驼背(参见,例如Baker等人,Nature 479(2011)232-236)。随着时间的推移,可视觉测量驼背的形成。通过检测一种或多种衰老细胞相关标志物的存在,例如通过SA- β -Gal染色,可以确定通过用衰老细胞裂解剂处理而降低的衰老细胞水平。

[0171] 骨质疏松症是一种进行性骨病,其特征是骨量和密度降低,这可能导致骨折风险增加,可以通过施用本文所述的衰老细胞裂解剂来治疗或预防。骨密度(BMD)降低,骨微结构恶化,骨中蛋白质的数量和种类发生改变。骨质疏松症通常通过骨密度测试进行诊断和监测。绝经后妇女或雌激素减少的妇女风险最大。虽然75岁以上的男性和女性都有风险,但女性患骨质疏松症的可能性是男性的两倍。通过检测一种或多种衰老细胞相关标志物的存在,例如通过SA- β -Gal染色,可以确定通过用衰老细胞裂解剂处理而降低的衰老细胞水平。

[0172] 在其它实施方案中,可以用本文所述的衰老细胞裂解剂治疗或预防(即,降低发生的可能性)的炎症性/自身免疫性疾病包括肠易激综合征(IBS)和炎症性肠病,如溃疡性结肠炎和克罗恩病。炎症性肠病(IBD)涉及整个或部分消化道的慢性炎症。除了IBD引起的危及生命的并发症外,这种疾病还可能令人痛苦和衰弱。溃疡性结肠炎是一种在部分消化道引起长期炎症炎症性肠病。症状通常会随着时间的推移而发展,而不是突然出现。溃疡性结

肠炎通常只影响大肠(结肠)和直肠的最内层。克罗恩病是一种炎症性肠病,会在消化道内壁的任何地方引起炎症,并经常深入受影响的组织。这会导致腹痛、严重腹泻和营养不良。克罗恩病引起的炎症可能涉及消化道的不同区域。根据本领域常规实践的方法和诊断测试(包括血液测试、结肠镜检查、柔性乙状结肠镜、钡灌肠、CT扫描、MRI、内窥镜和小肠成像)来进行疾病的诊断和监测。

[0173] 可以通过使用衰老细胞裂解剂治疗或预防(即降低发生的可能性)的其它炎症性或自身免疫性疾病包括湿疹、银屑病、骨质疏松症和肺部疾病(例如,慢性阻塞性肺病(COPD)、特发性肺纤维化(IPF)、哮喘)、炎症性肠病,和粘膜炎(包括口腔粘膜炎,在某些情况下由辐射引起)。器官的某些纤维化或纤维化状况,如肾纤维化、肝纤维化、胰腺纤维化、心脏纤维化、皮肤伤口愈合和口腔黏膜下纤维化,可以用本文所述的衰老细胞裂解剂治疗。

[0174] 在某些实施方案中,衰老细胞相关疾病是皮肤的炎症性疾病,通过非限制性实例举例如,银屑病和湿疹,其可以根据本文所述的方法进行治疗或预防(即,降低发生的可能性),所述方法包括施用衰老细胞裂解剂。银屑病的特征是皮肤表皮层异常过度快速生长。银屑病的诊断通常基于皮肤的外观。银屑病的典型皮肤特征是鳞状红色斑块、丘疹或可能疼痛和瘙痒的皮肤斑块。在银屑病中,观察到各种促炎细胞因子(如SASP的关键成分IL-6)的皮肤和全身过度表达。湿疹是一种皮肤炎症,其特征是发红、皮肤肿胀、瘙痒和干燥、结痂、剥落、起泡、破裂、渗出或出血。衰老细胞裂解剂用于治疗银屑病和湿疹以及监测接受这种衰老细胞裂解剂的受试者的有效性可以由医学或临床领域的技术人员容易地确定。一种或任意组合的诊断方法,包括身体检查(如皮肤外观)、临床症状(如瘙痒、肿胀和疼痛)监测的评估,以及本文所述和本领域实践的分析测试和方法的实施(即,确定促炎细胞因子的水平)。

[0175] 可以用本文所述的衰老细胞裂解剂治疗或预防的其它免疫疾病或病症(即,降低发生的可能性)包括由宿主对器官移植(例如,肾、骨髓、肝、肺或心脏移植)的免疫反应引起的病症,如移植器官的排斥反应。本文所述的衰老细胞裂解剂也可用于治疗或降低移植物对抗宿主疾病发生的可能性。

[0176] 肺部疾病和病症

[0177] 在一些实施方案中,提供了通过施用本文所述的衰老细胞裂解剂在患有衰老相关疾病或病症的受试者中杀死与所述疾病或病症相关的衰老细胞(即已建立的衰老细胞)来治疗或预防(即降低发生的可能性)衰老相关疾病或病症的方法,所述疾病或病症是肺病或病症。衰老相关的肺部疾病和病症包括,例如,特发性肺纤维化(IPF)、慢性阻塞性肺病(COPD)、哮喘、囊性纤维化、支气管扩张和肺气肿。

[0178] 慢性阻塞性肺病是一种由肺组织破裂(肺气肿)和小气道功能障碍(阻塞性细支气管炎)导致的持续不良气流定义的肺部疾病。COPD的主要症状包括呼吸急促、喘息、胸闷、慢性咳嗽和痰液过多。来自香烟烟雾激活的中性粒细胞和巨噬细胞的弹性蛋白酶分解肺泡结构的细胞外基质,导致空气空间增大和呼吸能力丧失(参见例如Shapiro等人,Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.32(2005)367-372)。慢性阻塞性肺病最常见的病因是烟草烟雾(包括香烟烟雾、雪茄烟雾、二手烟、烟斗烟雾)、职业暴露(如暴露于灰尘、烟雾或烟气)和污染,发生时间超过几十年,因此将衰老视为患慢性阻塞性肺疾病的风险因素。

[0179] 引起肺损伤的过程包括,例如,烟草烟雾中高浓度自由基产生的氧化应激;由于对

气道中刺激物的炎症反应而引起的细胞因子释放;以及烟草烟雾和自由基对抗蛋白酶的损害,使蛋白酶损伤肺部。遗传易感性也会导致这种疾病。在约1%的COPD患者中,这种疾病是由一种遗传性疾病引起的,这种疾病会导致肝脏中 α -1-抗胰蛋白酶的产生水平较低。这种酶通常会分泌到血液中,以帮助保护肺部。

[0180] 肺纤维化是一种慢性进行性肺部疾病,其特征是肺部硬化和瘢痕形成,可能导致呼吸衰竭、癌症和心力衰竭。纤维化与上皮的修复有关。成纤维细胞被激活,细胞外基质蛋白的产生增加,转分化为可收缩的肌成纤维细胞有助于伤口收缩。临时基质堵塞受伤的上皮,并为上皮细胞迁移提供支架,涉及上皮-间充质转化(EMT)。与上皮损伤相关的失血会诱导血小板活化、生长因子的产生和急性炎症反应。正常情况下,上皮屏障愈合,炎症反应消退。然而,在纤维化疾病中,成纤维细胞的反应仍在继续,导致伤口愈合无法解决。成纤维细胞灶的形成是该疾病的一个特征,反映了正在进行的纤维形成的位置。顾名思义,IPF的病因尚不清楚。观察到IPF的发病率随着年龄的增长而增加,并且IPF患者的肺组织富含SA,这表明细胞衰老与IPF有关SA- β -Gal-阳性细胞并且含有升高水平的衰老标志物p21(参见,例如,Minagawa等人,Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol.300(2011)L391-L401;也参见例如Naylor等人,上文)。短端粒是IPF和细胞衰老共同的风险因素(参见例如Alder等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 105(2008)13051-13056)。不希望被理论束缚,细胞衰老对IPF的贡献由衰老细胞的SASP成分如IL-6、IL-8和IL-1的报告提出,促进成纤维细胞向肌成纤维细胞的分化和上皮-间充质转化,导致肺泡和间质空间的细胞外基质的广泛重塑(参见,例如,Minagawa等人,上文)。

[0181] 有患肺纤维化风险的受试者包括暴露于环境或职业污染物的受试者,如石棉肺和硅肺;抽烟的人;患有一些典型的结缔组织疾病,如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮和硬皮病的人;患有其它涉及结缔组织的疾病,如结节病和韦格纳肉芽肿病;传染病;服用某些药物(如胺碘酮、博来霉素、白消安、甲氨蝶呤和呋喃妥因)的人;接受胸部放射治疗的患者;以及那些家庭成员患有肺纤维化的患者。

[0182] COPD的症状可能包括以下任何一种:呼吸急促,尤其是在体育活动期间;喘息;胸闷;由于肺部粘液过多,早上第一件事就是清嗓子;慢性咳嗽,产生透明、白色、黄色或绿色的痰;嘴唇或指甲床发青(发绀);频繁的呼吸道感染;精力不足;意外的体重减轻(在疾病后期观察到)。COPD受试者也可能出现急性加重,在此期间症状恶化并持续数天或更长时间。肺纤维化的症状是本领域已知的,包括呼吸急促,特别是在运动期间;干咳;快速、浅呼吸;体重逐渐意外减轻;疲劳;关节和肌肉疼痛;以及杵状指(手指或脚趾尖端的加宽和变圆)。

[0183] 可以使用本领域常规实践的标准诊断方法来鉴定患有COPD或肺纤维化的受试者。可以使用通常用于诊断的方法来监测对患有或有患肺病风险的受试对象施用的一种或多种衰老细胞裂解剂的效果。通常,可以进行以下一项或多项检查或测试:身体检查、患者病史、患者家族病史、胸部X光检查、肺功能测试(如肺活量测定法)、血液测试(如动脉血气分析)、支气管肺泡灌洗、肺活检、CT扫描和运动测试。

[0184] 可以通过使用衰老细胞裂解剂治疗的其它肺部疾病或病症包括,例如,肺气肿、哮喘、支气管扩张和囊性纤维化(参见,例如,Fischer等人,Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.304(6)(2013)L394-400)。烟草烟雾(包括香烟烟雾、雪茄烟雾、二手烟、烟斗烟雾)、职业暴露(如暴露于灰尘、烟雾或烟气)、感染和/或诱导细胞衰老从而导致炎症的污染

物也可能加剧这些疾病。肺气肿有时被认为是COPD的一个亚组。

[0185] 支气管扩张是由于气道受损,导致气道变宽、松弛和结疤。支气管扩张通常是由损伤气道壁或抑制气道清除粘液的疾病引起的。这种情况的例子包括囊性纤维化和原发性纤毛运动障碍(PCD)。当肺部只有一部分受到影响时,这种疾病可能是由阻塞引起的,而不是由医疗原因。

[0186] 本文所述用于治疗或预防(即,降低衰老相关肺部疾病或病症的可能性或发生)的方法也可用于治疗正在衰老且肺功能丧失(或退化)(即,与年轻受试者相比,肺功能下降或受损)和/或肺组织退化的受试者。呼吸系统随着年龄的增长而发生各种解剖学、生理学和免疫学变化。结构变化包括胸壁和胸椎畸形,这些畸形会损害整个呼吸系统的顺应性,导致呼吸努力增加。呼吸系统会随着年龄的增长而发生结构、生理和免疫方面的变化。与年轻人相比,老年人的支气管肺泡灌洗液中中性粒细胞比例增加,巨噬细胞比例降低。下呼吸道持续的低度炎症可导致蛋白水解和氧化剂介导的肺基质损伤,导致肺泡单位损失和肺泡膜上的气体交换受损。下呼吸道的持续炎症可能使老年人对有毒环境暴露的易感性增加,并加速肺功能下降。(例如,参见Sharma等人,Clinical Interventions in Aging 1(2006)253-260)。氧化应激在衰老过程中加剧炎症(参见,例如Brod,Inflamm.Res.49(2000)561-570;Hendel等人,Cell Death and Differentiation 17(2010)596-606)。衰老过程中氧化还原平衡的改变和氧化应激的增加促使细胞因子、趋化因子和粘附分子以及酶的表达(参见,例如,Chung等人,Ageing Res.Rev.8(2009)18-30)。巨噬细胞、T细胞和肥大细胞的组成性激活和募集促进蛋白酶的释放,导致细胞外基质降解、细胞死亡、重塑和其它可在慢性炎症期间引起组织和器官损伤的事件(参见,例如,Demedts等人,Respir.Res.7(2006)53-63)。通过向衰老的受试者(包括无症状的中年人)施用衰老细胞裂解剂,可以通过杀死和清除呼吸道中的衰老细胞来减缓或抑制肺功能的下降。

[0187] 衰老细胞裂解剂的有效性可以由医学和临床领域的技术人员容易地确定。诊断方法(包括例如本文所述的身体检查、临床症状的评估和监测,以及进行分析测试和方法)的一种或任意组合,可以用于监测受试者的健康状况。可以使用本领域已知的技术,例如将已经接受治疗的患有肺病或有患肺病风险的患者的症状与没有接受这种治疗或安慰剂治疗的患者的那些症状进行比较,来分析衰老细胞裂解剂或包含该药物的药物组合物的治疗效果。此外,可以实施评估肺的机械功能的方法和技术,例如,测量肺容量、弹性和气道超敏反应的技术。为了确定肺功能并在整个治疗过程中监测肺功能,可以获得多种测量中的任何一种:呼气储备容量(ERV)、用力肺活量(FVC)、用力呼气容量(FEV)(例如,1秒内的FEV,FEV1)、FEV1/FEV比率、用力呼气流量25%至75%和最大自主通气(MVV)、呼气峰值流量(PEF)、缓慢肺活量(SVC)。总肺容积包括总肺活量(TLC)、肺活量(VC)、残余容量(RV)和功能性残余容量(FRC)。可以使用一氧化碳的扩散容量(DLCO)来测定肺泡毛细血管膜上的气体交换。也可以测定外周毛细血管氧饱和度(SpO_2);正常的氧气水平通常在95%和100%之间。血氧饱和度低于90%表明受试者有低氧血症。低于80%的数值被认为是至关重要的,需要进行干预以维持大脑和心脏功能,避免心脏或呼吸停止。

[0188] 神经系统疾病和病症

[0189] 可通过施用本文所述的衰老细胞裂解剂治疗的衰老相关疾病或病症包括神经系统疾病或病症。这种与衰老相关的疾病和病症包括帕金森氏症、阿尔茨海默氏症(和其它痴

呆症)、运动神经元功能障碍(MND)、轻度认知障碍(MCI)、亨廷顿舞蹈症以及眼睛疾病和病症,如年龄相关性黄斑变性。与年龄增长相关的其它眼部疾病包括青光眼、视力下降、老花眼和白内障。

[0190] 帕金森病(PD)是第二常见的神经退行性疾病。这是一种大脑致残性疾病,其特征是运动迟缓(运动迟缓)、颤抖、僵硬,后期失去平衡。其中许多症状是由于大脑中某些神经的丧失,从而导致多巴胺的缺乏。这种疾病的特征是神经退行性变,如黑质致密部约50%至70%的多巴胺能神经元丧失,纹状体多巴胺严重丧失和/或存在主要由 α -突触核蛋白和泛素组成的细胞质内包涵体(路易氏体)。帕金森病还具有运动缺陷,如震颤、僵硬、运动迟缓和/或姿势不稳定。有患帕金森氏症风险的受试者包括那些有帕金森氏症家族史的受试者,以及那些接触过杀虫剂(如鱼藤酮或百草枯)、除草剂(如橙剂)或重金属的受试者。产生多巴胺的神经元的衰老被认为通过活性氧的产生而导致观察到PD中的细胞死亡(参见,例如, Cohen等人, J. Neural Transm. Suppl. 19(1983) 89-103);因此,本文所述的方法和衰老细胞裂解剂可用于治疗和预防帕金森病。

[0191] 检测、监测或量化与帕金森氏症相关的神经退行性缺陷和/或运动缺陷的方法是本领域已知的,所述方法例如组织学研究、生物化学研究和行为评估(参见,例如,美国申请公开号2012/0005765)。帕金森氏症的症状是本领域已知的,包括但不限于难以开始或完成自主运动、急动、僵硬运动、肌肉萎缩、颤抖(震颤)和心率变化,但包括正常反射、运动迟缓和姿势不稳定。人们越来越认识到,被诊断为帕金森氏症的人除了身体症状外,还可能存在认知障碍,包括轻度认知障碍。

[0192] 阿尔茨海默病(AD)是一种神经退行性疾病,表现为缓慢进行的精神退化,伴有记忆障碍、定向障碍和意识模糊,导致严重痴呆。年龄是发展为AD的单一最大易感风险因素,AD是老年人痴呆的主要原因(例如,参见Hebert等人, Arch. Neural. 60(2003) 1119-1122)。早期临床症状与轻度认知障碍明显相似(见下文)。随着疾病的发展,会出现判断力受损、意识模糊、行为改变、定向障碍以及行走和吞咽困难。

[0193] 阿尔茨海默病的特征是组织学标本中存在神经原纤维缠结和淀粉样蛋白(老年)斑块。这种疾病主要涉及大脑的边缘和皮层区域。包含淀粉样前体蛋白(APP)的淀粉样蛋白A β 片段的嗜银斑块的散布在整个大脑皮层和海马体中。神经原纤维缠结主要存在于Meynert的新皮层、海马体和基底核的锥体神经元中。观察到其它变化,如海马锥体细胞的颗粒细胞变性,皮层和海马的神经元丢失和胶质增生。有患阿尔茨海默氏症风险的受试者包括老年人、有阿尔茨海默氏症家族史的受试者、有遗传风险基因(如ApoE4)或确定性基因突变(如APP、PS1或PS2)的受试者,以及有头部创伤或心脏/血管疾病史(如高血压、心脏病、中风、糖尿病、高胆固醇等)的受试者。

[0194] 本领域已知许多行为和组织病理学测定,用于评估阿尔茨海默病表型、表征治疗剂和评估治疗。组织学分析通常在死后进行。A β 水平的组织学分析可以使用硫黄素-S、刚果红或抗-A β 染色(例如4G8、10D5或6E10抗体),以显示切片脑组织上的A β 沉积(参见例如 Holcomb等人, Nat. Med. 4(1998) 97-100; Borchelt等人, Neuron 19(1997) 939-945; Dickson等人, Am. J. Path. 132(1998) 86-101)。还描述了是转基因小鼠中的A β 沉积可视化的体内方法。BSB((反式,反式)-1-溴-2,5-双-(3-羟基羰基-4-羟基)苯乙烯基苯)和PET示踪剂11C标记的匹兹堡化合物-B(PIB)结合A β 斑块(参见,例如 Skovronsky等人,

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97 (2000) 7609-7614;Klunk等人,Ann.Neurol.55 (2004) 306-319)。¹⁹F-含淀粉样刚果红型化合物FSB((E,E)-1-氟-2,5-双-(3-羟基羰基-4-羟基)苯乙烯基苯)允许通过MRI观察A β 斑块(参见例如Higuchi等人,Nature Neurosci.8 (2005) 527-533)。放射性标记的、腐胺修饰的淀粉样蛋白 β 肽标记阿尔茨海默病小鼠模型中的体内淀粉样蛋白沉积物(参见,例如,Wengenack等人,Nat.Biotechnol.18 (2000) 868-872)。

[0195] 星形胶质细胞分泌的胶质纤维酸性蛋白(GFAP)增加是神经退行性变过程中星形胶质细胞活化和胶质增生的标志。A β 斑块与GFAP阳性活化的星形胶质细胞相关,并且可以通过GFAP染色进行观察(参见,例如,Nagele等人,Neurobiol.Aging 25 (2004) 663-674;Mandybur等人,Neurology 40 (1990) 635-639;Liang等人,J.Biol.Chem.285 (2010) 27737-27744)。神经原纤维缠结可以通过使用硫黄素-S荧光显微镜和Gallyas银染的免疫组织化学鉴定(参见,例如,Gotz等人,J.Biol.Chem.276 (2001) 529-534;美国专利号6,664,443)。利用电子显微镜的轴突染色和轴突运输研究可用于观察神经元变性(参见,例如,Ishihara等人,Neuron 24 (1999) 751-762)。

[0196] 可以使用本领域已知的阿尔茨海默病标准诊断方法来鉴定患有阿尔茨海默病的受试者。一般来说,阿尔茨海默病的诊断是基于症状(例如,记忆功能的进行性下降、对正常活动的逐渐退缩和沮丧、冷漠、激动或易怒、攻击性、焦虑、睡眠障碍、烦躁不安、异常运动行为、去抑制、社交退缩、食欲下降、幻觉、痴呆)、病史,神经心理学测试、患者的神经和/或身体检查。还可以测试脑脊液中与阿尔茨海默病相关的各种蛋白质,包括tau、淀粉样蛋白 β 肽和AD7C-NTP。基因检测也可用于早发性家族性阿尔茨海默病(eFAD),一种常染色体显性遗传疾病。临床基因检测可用于AD症状患者或早发性疾病患者的高危家庭成员。在美国,根据《临床实验室改进修正案》(Clinical Laboratory Improvement Amendments),PS2和APP的突变可以在临床或联邦批准的实验室进行测试。PS1突变的商业测试也可用(Elan Pharmaceuticals)。

[0197] 医学和临床领域的技术人员可以容易地确定本文所述的一种或多种衰老细胞裂解剂的有效性以及对接受一种或多种衰老细胞裂解剂的受试者的监测。诊断方法(包括例如本文所述的身体检查、临床症状的评估和监测,以及进行分析测试和方法)的一种或任意组合,可以用于监测受试者的健康状况。可以使用本领域已知的技术来分析施用一种或多种衰老细胞裂解剂的效果,所述技术例如将已经接受治疗的患有阿尔茨海默病或有阿尔茨海默病风险的患者的症状与没有接受这种治疗或安慰剂治疗的患者的症候进行比较。

[0198] 轻度认知障碍(MCI)是一种脑功能综合征,涉及认知障碍的发生和演变,超出了基于个人年龄和教育程度的预期,但其严重程度不足以干扰个人的日常活动。MCI是认知衰老的一个方面,被认为是正常衰老和痴呆之间的过渡状态,它可能转化为痴呆(参见Pepeu,Dialogues in Clinical Neuroscience 6 (2004) 369-377)。主要影响记忆的MCI被称为“失忆性MCI”。患有失忆性MCI的人可能会开始忘记他或她以前很容易回忆起来的重要信息,比如最近的事件。失忆性MCI常被视为阿尔茨海默病的前驱期。影响记忆以外的思维技能的MCI被称为“非失忆性MCI”。这种类型的MCI影响思维技能,如做出正确决策的能力、判断完成复杂任务所需的时间或步骤顺序的能力,或视觉感知能力。患有非失忆性MCI的个体被认为更有可能转变为其它类型的痴呆(例如,路易体痴呆)。

[0199] 医学领域的人越来越认识到,被诊断为帕金森病的人除了身体症状外,还可能患

有MCI。最近的研究表明,20-30%的帕金森病患者患有MCI,他们的MCI往往是非失忆性的。患有MCI的帕金森病患者有时会发展为完全痴呆症(帕金森病伴痴呆症)。

[0200] 检测、监测、量化或评估与MCI相关的神经病理学缺陷的方法是本领域已知的,包括星形胶质细胞形态分析、乙酰胆碱的释放、用于评估神经退行性变的银染和用于检测 β -淀粉样蛋白沉积的PiB PET成像(参见,例如,美国申请公开号2012/0071468;Pepeu,(2004),同上)。检测、监测、量化或评估与MCI相关的行为缺陷的方法也是本领域已知的,包括八臂径向迷宫范式、与样本不匹配任务、水迷宫中的异中心位置确定任务、Morris迷宫测试、视觉空间任务、延迟反应空间记忆任务和嗅觉新颖性测试。

[0201] 运动神经元功能障碍(MND)是一组破坏运动神经元(控制说话、行走、呼吸和吞咽等基本自主肌肉活动的细胞)的进行性神经系统疾病。其是根据退化是否影响上部运动神经元、下部运动神经元或两者兼而有之来分类的。MND的示例包括但不限于肌萎缩侧索硬化症(ALS),也称为Lou Gehrig病、进行性延髓麻痹、假性延髓性麻痹、原发性侧索硬化、进行性肌萎缩、下运动神经元疾病和脊髓性肌萎缩(SMA)(例如,SMA1也称为Werdnig-Hoffmann病,SMA2,SMA3也称为库格尔贝格-韦兰德病和肯尼迪氏症)、脊髓灰质炎后综合征和遗传性痉挛性截瘫。在成年人中,最常见的MND是肌萎缩侧索硬化症(ALS),其影响上下运动神经元。其会影响手臂、腿部或面部肌肉。原发性侧索硬化症是一种上运动神经元疾病,而进行性肌萎缩只影响脊髓中的下运动神经元。在进行性延髓麻痹中,脑干最低的运动神经元受到的影响最大,导致口齿不清、咀嚼和吞咽困难。手臂和腿部几乎总是有轻微的异常迹象。MND患者表现出帕金森病的表型(例如,有震颤、僵硬、运动迟缓和/或姿势不稳定)。用于检测、监测或量化与帕金森氏症(例如MND)相关的运动和/或其它缺陷的方法是本领域已知的(参见例如美国申请公开No.2012/0005765)。

[0202] 检测、监测、量化或评估与MND相关的运动缺陷和组织病理学缺陷的方法是本领域已知的,包括组织病理学、生物化学和电生理学研究以及运动活动分析(参见,例如,Rich等人,J.Neurophysiol.88(2002)3293-3304;Appel等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88(1991)647-651)。在组织病理学上,MND的特征是运动神经元的死亡、含有SOD1和泛素的耐去污剂聚集体的进行性积聚以及退化运动神经元中异常的神经丝积聚。此外,在病变组织中经常检测到反应性星形胶质细胞和小胶质细胞。MND患者表现出一种或多种运动缺陷,包括肌肉无力和萎缩、无法控制的抽搐、痉挛、缓慢和费力的运动以及过度活跃的肌腱反射。

[0203] 眼科疾病和病症

[0204] 在某些实施方案中,衰老相关疾病或病症是眼部疾病、病症或病况,例如,老花眼、黄斑变性或白内障。在其它某些实施方案中,与衰老相关的疾病或病症是青光眼。黄斑变性是一种神经退行性疾病,会导致视网膜中央部分的感光细胞丧失(称为黄斑)。黄斑变性一般分为两种类型:干型和湿型。干型比湿型更常见,约90%的年龄相关性黄斑变性(ARMD或AMD)患者被诊断为干型。湿型疾病通常会导致更严重的视力损失。虽然年龄相关性黄斑变性的确切原因尚不清楚,但衰老的视网膜色素上皮(RPE)细胞的数量随着年龄的增长而增加。年龄和某些遗传因素以及环境因素是发展ARMD的风险因素(参见,例如,Lyengar等人,Am.J.Hum.Genet.74(2004)20-39;Kenealy等人,Mol.Vis.10(2004)57-61;Gorin等人,Mol.Vis.5(1999)29)。环境易感因素包括 ω -3脂肪酸的摄入(参见,例如,Christen等人,Arch.Ophthalmol.129(2011)921-929);雌激素暴露(参见,例如,Feshanich等人,

Arch.Ophthalmol.126 (4) (2008) 519-524);以及增加的维生素D的血清水平(参见,例如 Millen等人,Arch.Ophthalmol.129 (4) (2011) 481-89)。遗传易感性风险因素包括干性AMD患者眼睛中Dicer1(参与微小RNA成熟的酶)水平降低,以及微小RNA减少导致细胞衰老。

[0205] 干型ARMD与RPE层萎缩有关,会导致感光细胞的损失。干型ARMD可能是由于黄斑组织的老化和变薄以及黄斑中色素的沉积引起的。衰老似乎抑制RPE的复制和迁移,导致干型AMD患者黄斑中的RPE永久性耗竭(参见,例如,Iriyama等人,J.Biol.Chem.283 (2008) 11947-11953)。在湿型ARMD中,视网膜下会生长出新的血管,并渗透血液和液体。这种异常渗透的脉络膜新生血管导致视网膜细胞死亡,在中央视觉中产生盲点。不同形式的黄斑变性也可能发生在年轻患者身上。与年龄无关的病因可能与遗传、糖尿病、营养不足、头部损伤、感染或其它因素有关。

[0206] 患者或眼科医生在常规眼科检查中注意到的视力下降可能是黄斑变性的第一个指标。黄斑布鲁赫膜下渗出物或“核膜”的形成通常是黄斑变性可能发展的第一个物理迹象。症状包括感知到的直线扭曲,在某些情况下,视觉中心看起来比场景的其它部分更扭曲;在视觉中心出现一个黑暗、模糊的区域或“白色区域”;和/或颜色感知改变或减少。患有黄斑变性的受试者的诊断和监测可以由眼科领域的技术人员根据本领域公认的定期眼部检查程序和受试者症状的报告来完成。

[0207] 老花眼是一种与年龄相关的疾病,随着年龄的增长,正常眼睛的调节速度和幅度降低,眼睛对近距离物体的聚焦能力逐渐减弱。晶状体的弹性损失和睫状肌的收缩性损失已被假定为其原因(参见例如Heys等人,Mol.Vis.10 (2004) 956-963;Petrash, Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.54 (2013) ORSF54-ORSF59)。晶状体前囊和晶状体后囊的机械性能的与年龄相关的变化表明晶状体后囊的机械强度随着年龄的增长而显著降低(参见,例如,Krag等人,Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.44 (2003) 691-696;Krag等人, Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.38 (1997) 357-363)。

[0208] 囊的层压结构也发生变化,并且可能至少部分由组织成分的变化引起(参见,例如,Krag等人,1997,同上,以及其中引用的参考文献)。晶状体囊的主要结构成分是基底膜IV型胶原,其被组织成三维分子网络(参见,例如Cummings等人,Connect.Tissue Res.55 (2014) 8-12;Veis等人,Coll.Relat.Res.1 (1981) 269-286)。IV型胶原由六种同源胶原组成 α 链($\alpha 1-6$),其结合成异三聚胶原IV原聚体,每个原聚体包含以下的特异性链组合: $\alpha 112$ 、 $\alpha 345$,或 $\alpha 556$ (参见例如Khoshnoodi等人,Microsc.Res.Tech.71 (2008) 357-370)。原聚体与Gly-X-Y的三重肽序列具有三螺旋胶原结构域的结构相似性(Timpl等人, Eur.J.Biochem.95 (1979) 255-263),终止于称为非胶原1(NC1)结构域的球状C末端区域。N-末端由称为7S结构域的螺旋结构域组成(参见,例如,Risteli等人,Eur.J.Biochem.108 (1980) 239-250),其也参与原聚体-原聚体的相互作用。

[0209] 研究表明,IV型胶原影响细胞功能,这是从上皮层下基底膜的位置推断出来的,数据支持IV型胶原在组织稳定中的作用(例如,见Cummings等人,上文)。在白内障手术后的随后几年中,约20-40%的患者会出现后囊混浊(PCO)并发症(参见,例如Awasthi等人, Arch.Ophthalmol.127 (2009) 555-562)。多囊卵巢综合征是由晶状体后囊残留上皮细胞的增殖和活性引起的,其反应类似于伤口愈合。生长因子,如成纤维细胞生长因子、转化生长因子- β 、表皮生长因子、肝细胞生长因子、胰岛素样生长因子和白细胞介素IL-1和IL-6也可

以促进上皮细胞迁移(参见例如Awasthi等人,同上;Raj等人,同上)。如本文所述,衰老细胞产生这些因子和细胞因子有助于SASP。相反,体外研究显示IV型胶原促进晶状体上皮细胞的粘附(参见,例如,Olivero等人,Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.34(1993)2825-2834)。胶原IV、纤连蛋白和层粘连蛋白与人工晶状体的粘附抑制细胞迁移并可降低PCO的风险(参见例如Raj等人,Int.J.Biomed.Sci.3(2007)237-250)。

[0210] 在不受任何特定理论约束的情况下,本文所述的衰老细胞裂解剂选择性杀死衰老细胞可能会减缓或阻碍(延迟、抑制、延缓)IV型胶原网络的解体。去除衰老细胞并由此消除SASP的炎症作用可能会减少或抑制上皮细胞迁移,也可能延迟(抑制)老花眼的发作,或降低或减缓病情的严重程度(如减缓从轻度到中度或从中度到重度的进展)。本文所述的衰老细胞裂解剂也可用于白内障手术后降低PCO发生的可能性。

[0211] 虽然尚未从人类研究中获得细胞衰老与白内障发展有关的直接证据,但BubR1亚型小鼠在生命早期双侧发展为后囊下白内障,这表明衰老可能起到一定作用(例如,参见Baker等人,Nat.Cell Biol.10(2008)825-836)。白内障是晶状体混浊,导致视力模糊,如果不及时治疗,可能导致失明。白内障手术是有效的,而且是常规手术。施用本文所述的一种或多种衰老细胞裂解剂可降低白内障发生的可能性,或可减缓或抑制白内障的进展。白内障的存在和严重程度可以通过使用眼科领域技术人员常规进行的方法的眼部检查来监测。

[0212] 在某些实施方案中,本文所述的至少一种衰老细胞裂解剂可用于有患老花眼、白内障或黄斑变性风险的受试者。当人类受试者至少40岁时,可以开始用衰老细胞裂解剂进行治疗,以延缓或抑制白内障、老花眼和黄斑变性的发作或发展。因为几乎所有人都会患上老花眼,所以在某些实施方案中,在人类受试者达到40岁之后,可以以本文所述的方式将衰老细胞裂解剂施用于该受试者,以延缓或抑制老花眼的发作或发展。

[0213] 在某些实施方案中,与衰老相关的疾病或病症是青光眼。青光眼是一个宽泛的术语,用于描述一组导致视野丧失的疾病,通常没有任何其它常见症状。缺乏症状往往会导致青光眼的诊断延迟到疾病的晚期。即使青光眼患者没有失明,他们的视力也通常严重受损。正常情况下,透明液体会流入和流出眼睛的前部,即前房。在患有开角/广角青光眼的患者中,这种液体排出得太慢,导致眼内压力增加。如果不及时治疗,这种高压会损害视神经,并可能导致完全失明。外周视力的丧失是由视网膜神经节细胞的死亡引起的。神经节细胞是连接眼睛和大脑的一种特殊类型的投射神经元。当流体流出所需的细胞网络进行SA- β -Gal染色时,在青光眼患者中观察到衰老增加四倍(参见,例如Liton等人,Exp.Gerontol.40(2005)745-748)。

[0214] 为了监测治疗对抑制青光眼进展的影响,标准自动视野检查(视野检查)是最广泛使用的技术。此外,已经开发了几种用于进展检测的算法(参见,例如,Wesselink等人,Arch.Ophthalmol.127(3)(2009)270-274,以及其中的参考文献)。其它方法包括角镜检查(检查小梁网和液体从眼睛排出的角度);成像技术,例如扫描激光断层扫描(例如HRT3)、激光偏振测量(例如GDX)和眼部相干断层扫描;检眼镜检查;以及确定中央角膜厚度的厚度计测量。

[0215] 代谢性疾病或病症

[0216] 可通过施用衰老细胞裂解剂治疗的衰老相关疾病或病症包括代谢性疾病或病症。这种与衰老细胞相关的疾病和病症包括糖尿病、代谢综合征、糖尿病溃疡和肥胖症。

[0217] 糖尿病的特征是由胰岛素产生、胰岛素作用或两者兼有的缺陷引起的高血糖。在所有确诊的成人糖尿病病例中,绝大多数(90%至95%)是2型糖尿病,其特征是胰腺逐渐失去胰岛素分泌。糖尿病是美国成年人中肾功能衰竭、非创伤性下肢截肢以及的新失明病例等的主要原因。糖尿病是心脏病和中风的主要原因,也是美国第七大死亡原因(例如,见Centers for Disease Control and Prevention, National diabetes fact sheet: national estimates and general information on diabetes and pre-diabetes in the United States, 2011("Diabetes fact sheet"))。本文所述的衰老细胞裂解剂可用于治疗2型糖尿病,特别是与年龄、饮食和肥胖相关的2型糖尿病。

[0218] 衰老细胞参与代谢疾病,如肥胖和2型糖尿病,已被认为是对损伤或代谢功能障碍的反应(参见,例如,Tchkonia等人, Aging Cell 9(2010)667-684)。肥胖小鼠的脂肪组织显示衰老标志物SA- β -Gal、p53和p21的诱导作用(参见例如Tchkonia等人,同上;Minamino等人, Nat. Med. 15(2009)1082-1087)。在相同的脂肪组织中观察到,促炎细胞因子如肿瘤坏死因子- α 和Ccl2/MCP1的伴随上调(参见,例如,Minamino等人,上文)。肥胖中衰老细胞的诱导可能具有临床意义,因为促炎SASP成分也被认为有助于2型糖尿病(参见,例如,Tchkonia等人,上文)。在小鼠和人类中,衰老标志物和SASP成分的类似上调模式与糖尿病相关(参见,例如,Minamino等人,上文)。因此,本文所述的包括施用衰老细胞裂解剂的方法可用于治疗或预防2型糖尿病以及肥胖和代谢综合征。在不希望受理论约束的情况下,衰老的前脂肪细胞与衰老细胞裂解剂接触从而杀死衰老的前脂肪细胞可以为患有糖尿病、肥胖症或代谢综合征中的任何一种的人提供临床和健康益处。

[0219] 患有2型糖尿病的受试者可以使用本领域已知的2型糖尿病标准诊断方法进行鉴定。通常,2型糖尿病的诊断是基于患者的症状(例如,口渴和尿频增加、饥饿增加、体重减轻、疲劳、视力模糊、溃疡愈合缓慢或频繁感染和/或皮肤变黑区域)、病史和/或身体检查。有患2型糖尿病风险的受试者包括那些有2型糖尿病家族史的受试者和那些有其它风险因素的受试者,所述风险因素如超重、脂肪分布、不活动、种族、年龄、糖尿病前期和/或妊娠期糖尿病。

[0220] 衰老细胞裂解剂的有效性可以由医学和临床领域的技术人员容易地确定。诊断方法(包括例如本文所述的身体检查、临床症状的评估和监测,以及进行分析测试和方法)的一种或任意组合,可以用于监测受试者的健康状况。正在接受本文所述的用于治疗或预防糖尿病的一种或多种衰老细胞裂解剂的受试者可以通过例如测定葡萄糖和胰岛素耐受性、能量消耗、身体成分、脂肪组织、骨骼肌和肝脏炎症和/或脂毒性(通过体内成像测定肌肉和肝脏脂质,通过组织学测定肌肉、肝脏、骨髓和胰腺 β 细胞脂质积累和炎症)。2型糖尿病的其他特征或表型是已知的,并且可以如本文所述以及通过使用本领域已知和常规实践的其它方法和技术来进行测定。

[0221] 肥胖和肥胖相关疾病是指体重明显大于身高和身材理想值的受试者的情况。体重指数(BMI)是一种用于确定超重的测量工具,根据受试者的身高和体重计算得出。当一个人的BMI为25-29时,该人被视为超重;当一个人的BMI为30-39时,该人被视为肥胖,当该人的BMI >40 时,该个人被视为严重肥胖。因此,术语肥胖和肥胖相关是指身体质量指数值大于30、大于35或大于40的人类受试者。BMI没有涵盖的一类肥胖在本领域被称为“腹部肥胖”,其涉及受试者腹部周围发现的额外脂肪,这是健康的一个重要因素,甚至与BMI无关。腹部

肥胖最简单、最常用的衡量标准是腰围。通常,女性的腹部肥胖定义为腰围35英寸或更高,男性的腹部肥胖则定义为腰围40英寸或更大。更复杂的确定肥胖的方法需要专门的设备,如磁共振成像或双能X射线吸收仪。

[0222] 与糖尿病和衰老相关的病症或病症是糖尿病溃疡(即糖尿病伤口)。溃疡是皮肤的一种破坏,可能会延伸到皮下组织,甚至肌肉或骨骼。这些病变尤其发生在下肢。患有糖尿病静脉溃疡的患者在慢性伤口部位表现出细胞衰老的增加(参见,例如Stanley等人, J.Vas.Surg.33(2001)1206-1211)。在慢性伤口的部位也观察到慢性炎症,例如糖尿病溃疡(参见例如Goren等人, Am.J.Pathol.168(2006)65-77),这表明衰老细胞的促炎细胞因子表型在病理中起作用。

[0223] 患有2型糖尿病或有患2型糖尿病风险的受试者可能患有代谢综合征。人类代谢综合征通常与肥胖有关,其特征是心血管疾病、肝脂肪变性、高脂血症、糖尿病和胰岛素抵抗中的一种或多种。患有代谢综合征的受试者可能表现出一系列代谢紊乱或异常,可能包括例如高血压、2型糖尿病、高脂血症、血脂异常(例如高甘油三酯血症、高胆固醇血症)、胰岛素抵抗、肝脂肪变性(脂肪性肝炎)、高血压、动脉粥样硬化和其它代谢紊乱中的一种或多种。

[0224] 肾功能障碍

[0225] 肾脏病理,如肾小球疾病,发生于老年人,可通过施用本文所述的衰老细胞裂解化合物进行治疗。肾小球肾炎的特征是肾脏炎症和两种蛋白质IL1 α 和IL1 β 的表达(参见,例如Niemir等人, Kidney Int.52(1997)393-403)。IL1 α 和IL1 β 被认为是SASP的主要调节因子(参见,例如, Coppe等人, PLoS.Biol.6(2008)2853-2868)。肾小球疾病与衰老细胞的存在增加有关,特别是在纤维化肾脏中(参见例如Sis等人, Kidney Int.71(2007)218-226)。

[0226] 皮肤病或病症

[0227] 可通过施用本文所述的衰老细胞裂解剂治疗的衰老相关疾病或病症包括皮肤病或病症。这种与衰老细胞相关的疾病和病症包括银屑病和湿疹,它们也是炎症性疾病,并且在上文中进行了更详细的讨论。与衰老相关的其它皮肤病和病症包括皱纹(衰老引起的皱纹);瘙痒症(与糖尿病和衰老有关);感觉障碍(与糖尿病和多发性硬化症相关的化疗副作用);银屑病(如前所述)和其它丘疹样鳞状疾病,例如红皮病、扁平苔藓和苔藓样皮肤病;特应性皮炎(湿疹的一种形式,与炎症相关);湿疹样皮疹(常见于老年患者,与某些药物的副作用有关)。其它与衰老相关的皮肤病和病症包括嗜酸性皮肤病(与某些类型的血液系统癌症有关);反应性中性粒细胞性皮肤病(与炎症性肠综合征等潜在疾病相关);天疱疮(一种自身免疫性疾病,其中形成抗桥粒蛋白的自身抗体);类天疱疮和其它免疫性大疱性皮肤病(自身免疫性皮肤病起泡);皮肤纤维组织细胞增生,与衰老有关;以及在老年人群中更常见的皮肤淋巴瘤。根据本文所述方法可治疗的另一种皮肤病包括皮肤狼疮,其是红斑狼疮的症状。迟发性狼疮可能与T细胞和B细胞以及与衰老相关的细胞因子(免疫衰老)功能下降(即降低)有关。

[0228] 转移

[0229] 在一些实施方案中,提供了用于治疗或预防(即,降低发生或发展的可能性)衰老细胞相关疾病(或病症或病况)的方法,所述疾病是转移。本文所述的衰老细胞裂解剂也可根据本文所述方法用于治疗或预防(即,降低发生的可能性)从体内一个器官或组织转移

(即,癌症或肿瘤细胞的扩散和扩散)到另一器官或组织。

[0230] 衰老细胞相关疾病或病症包括转移,患有癌症的受试者可受益于施用本文所述的用于抑制转移的衰老细胞裂解剂。当根据本文所述的方法施用于患有癌症的受试者时,这种衰老细胞裂解剂可以抑制肿瘤增殖。癌症的转移发生在癌症细胞(即肿瘤细胞)扩散超过起源解剖部位并最初定植到受试者全身其它区域时。肿瘤增殖可以通过肿瘤大小来确定,肿瘤大小可以通过本领域技术人员熟悉的各种方式来测定,例如通过PET扫描、MRI、CAT扫描、活检。治疗剂对肿瘤增殖的作用也可以通过检查肿瘤细胞的分化来评估。

[0231] 如本文和本领域所用,术语癌症或肿瘤是临床描述性术语,其包括通常以表现出异常细胞增殖的细胞为特征的疾病。癌症一词通常用于描述恶性肿瘤或由肿瘤引起的疾病状态。或者,异常生长在本领域中可以称为肿瘤。术语肿瘤,例如指组织,通常指任何异常的组织生长,其特征为至少部分地以过度和异常的细胞增殖。肿瘤可能是转移性的,并且能够扩散到其起源解剖部位之外,并能够在受试者全身的其它区域进行初始定植。癌症可包括实体瘤或可包括“液体”肿瘤(例如白血病和其它血癌)。

[0232] 癌症疗法(如辐射和某些化疗药物)可诱导细胞衰老。衰老细胞的存在增加了炎症分子的分泌,促进了肿瘤的发展,这可能包括促进肿瘤生长和增加肿瘤大小、促进转移和改变分化。当衰老细胞被破坏时,肿瘤发展被显著抑制,导致肿瘤体积小并且几乎没有或根本没有观察到转移生长(参见例如国际公开No. WO 2013/090645)。

[0233] 在一些实施方案中,提供了通过施用本文所述的衰老细胞裂解剂来预防(即降低发生的可能性)、抑制或延缓患有癌症的受试者的转移的方法。在其它实施方案中,在不超过7天或14天的治疗窗(即,疗程)内的一天或多天施用衰老细胞裂解剂。在其它实施方案中,疗程不超过2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20,或不长于21天。在另一些实施方案中,治疗疗程是一天。在另一些实施方案中,在不超过7天或14天的治疗窗口内,在两天或更多天内施用衰老细胞裂解剂。

[0234] 由于癌症疗法,例如放射和某些化学疗法药物(例如,阿霉素、紫杉醇、吉西他滨、泊马度胺、来那度胺),可诱导细胞衰老,因此本文所述的衰老细胞裂解剂可在化学疗法或放射疗法后施用,以杀死(或促进杀死)这些衰老细胞。如本文所讨论和本领域所理解的,如衰老相关分泌表型(SASP)的存在所示,衰老的建立发生数天;因此,当衰老已经建立时,就开始施用衰老细胞裂解剂以杀死衰老细胞,从而降低发生的可能性或降低转移的程度。如本文所讨论的,以下用于施用衰老细胞裂解剂的治疗过程可用于本文所述的用于治疗或预防(即,降低发生的可能性或降低严重程度)化疗或放疗副作用的方法中。

[0235] 在某些实施方案中,当化疗或放疗在治疗周期中施用时,治疗周期为至少一天(即化疗或放疗),然后是至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14(或约2周)、15、16、17、18、19、20、21(或约3周)天或约4周(约1个月)的非治疗期(即非化疗或放疗期),在非治疗时间间隔(时间段)期间的一天或多天施用衰老细胞裂解剂,该一天或多天开始于非治疗时间区间的第二天或之后。举例来说,如果n是停止治疗的天数,则在停止治疗的时间间隔的至少一天且不超过n-1天施用衰老细胞裂解剂。在一些实施方案中,当在治疗(即化疗或放疗)后至少一周不治疗的治疗周期中施用化疗或放疗时,在所述非治疗时间间隔期间的一天或多天施用所述衰老细胞裂解剂,所述一天或多天开始于所述非治疗时间间隔的第二天或之后并且结束于所述治疗时间间隔的最后一天或之前。

[0236] 化疗 (chemotherapy) 可以称为化学疗法 (chemotherapy)、化学疗法的 (chemotherapeutic) 或化疗 (chemotherapeutic) 药物。许多化疗药物都是被称为小有机分子的化合物。化疗是一个术语,也用于描述用于治疗特定癌症的化疗药物组合。如本领域技术人员所理解的,化疗也可以指两种或多种协同施用的化疗分子的组合,其可以被称为组合化疗。许多化疗药物用于肿瘤学领域,包括但不限于烷化剂;抗代谢物;蒽环类抗生素、植物生物碱;和拓扑异构酶抑制剂。

[0237] 可能转移的癌症可能是实体瘤,也可能是液体瘤(例如,血癌,例如白血病)。在本领域中,液体肿瘤的癌症分类为发生在血液、骨髓和淋巴结中的癌症,并且通常包括白血病(骨髓和淋巴细胞)、淋巴瘤(例如霍奇金淋巴瘤)和黑色素瘤(包括多发性骨髓瘤)。白血病包括例如急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓细胞白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性粒细胞白血病(CML)和毛细胞白血病。在人类中更频繁发生的实体瘤癌症包括,例如,前列腺癌、睾丸癌、乳腺癌、脑癌、胰腺癌、结肠癌、甲状腺癌、胃癌、肺癌、卵巢癌、卡波西肉瘤、皮肤癌(包括鳞状细胞皮肤癌)、肾癌、头颈癌、喉癌、在鼻子、嘴、喉咙等潮湿粘膜内膜上形成的鳞状癌、膀胱癌、骨肉瘤(骨癌)、宫颈癌、子宫内膜癌、食道癌、肝癌、癌症和肾癌。在某些特定实施方案中,通过本文所述的方法治疗或预防的衰老细胞相关疾病或病症(即,发生或发展的可能性降低)是黑色素瘤细胞、前列腺癌细胞、睾丸癌细胞、乳腺癌细胞、脑癌细胞、胰腺癌细胞、结肠癌细胞、甲状腺癌细胞、胃癌细胞、肺癌细胞、卵巢癌细胞、卡波西肉瘤细胞、皮肤癌细胞、肾癌细胞、头或颈癌细胞、喉癌细胞、鳞状癌细胞、膀胱癌细胞、骨肉瘤细胞、宫颈癌细胞、子宫内膜癌细胞、食管癌细胞、肝癌细胞或肾癌细胞的转移。

[0238] 本文所述的方法也可用于抑制、延缓或减缓医学领域所述任何一种类型肿瘤的转移性癌症的进展。癌症(肿瘤)的类型包括:肾上腺皮质癌、儿童肾上腺皮质癌、艾滋病相关癌症、肛门癌、阑尾癌、基底细胞癌、儿童基底细胞癌、膀胱癌、儿童膀胱癌、骨癌、脑肿瘤、儿童星形细胞瘤、儿童脑干神经胶质瘤、儿童中枢神经系统非典型畸胎瘤/横纹肌样瘤、儿童中枢神经系统胚胎瘤、儿童中枢神经系统生殖细胞肿瘤、儿童颅咽管瘤脑肿瘤、儿童室管膜瘤脑肿瘤、乳腺癌、儿童支气管肿瘤、类癌瘤、儿童类癌瘤、胃肠道类癌瘤、未知原发性癌、儿童未知原发性癌、儿童心脏肿瘤、宫颈癌、儿童宫颈癌、儿童脊索瘤、慢性骨髓增生性疾病、结肠癌、结直肠癌、儿童结直肠癌、肝外胆管癌、导管原位癌(DCIS)、子宫内膜癌、食管癌、儿童食管癌、儿童感觉神经母细胞瘤、眼癌、骨恶性纤维组织细胞瘤、胆囊癌、胃癌、儿童胃癌、胃肠道间质瘤(GIST)、儿童胃肠道间质瘤(GIST)、儿童颅外生殖细胞瘤、性腺外生殖细胞瘤、妊娠滋养细胞瘤、神经胶质瘤、头颈癌、儿童头颈癌、肝细胞癌、下咽癌、肾癌、肾细胞癌、肾母细胞瘤、儿童肾肿瘤、朗格汉斯细胞组织细胞增多症、喉癌、儿童喉癌、白血病、急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓细胞白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓细胞白血病(CML)、毛细胞白血病、唇癌、肝癌(原发性)、儿童肝癌(原发性)、小叶原位癌(LCIS)、肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、淋巴瘤、艾滋病相关淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤(CNS)、黑色素瘤、儿童黑色素瘤、眼内(眼)黑色素瘤、默克尔细胞癌、恶性间皮瘤、儿童恶性间皮瘤、转移性鳞状颈症伴隐匿性原发癌、涉及NUT基因的中线束癌、口腔癌、儿童多发性内分泌瘤综合征、蕈样肉芽肿、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常肿瘤、骨髓增生性肿瘤、多发性骨髓瘤、鼻腔癌、鼻咽癌、儿童鼻咽癌、成神经细胞瘤、口腔癌、儿童口腔癌、口咽癌症、卵巢癌、儿童卵巢癌、

上皮性卵巢癌、低恶性潜能肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、儿童胰腺癌、胰腺神经内分泌肿瘤(胰岛细胞瘤)、儿童乳头状瘤病、副神经节瘤、副鼻窦癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、浆细胞瘤、儿童胸膜肺母细胞瘤、前列腺癌、直肠癌、肾盂移行细胞癌、视网膜母细胞瘤、唾液腺癌、儿童唾液腺癌、尤文氏肉瘤家族肿瘤、卡波西肉瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、儿童横纹肌肉瘤、软组织肉瘤、子宫肉瘤、赛扎里综合征、儿童皮肤癌、非黑色素瘤皮肤癌、小肠癌、鳞状细胞癌、儿童鳞状细胞癌、睾丸癌、儿童睾丸癌、喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、儿童胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、儿童甲状腺癌、输尿管移行细胞癌、尿道癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌和Waldenstrom巨球蛋白血症。

[0239] 化疗和放疗的副作用

[0240] 在其它实施方案中,衰老细胞相关病症或病症是化疗副作用或放疗副作用。诱导非癌细胞衰老的化学治疗剂的示例包括蒽环类药物(如阿霉素、柔红霉素);紫杉醇类(例如紫杉醇);吉西他滨;泊马度胺;和来那度胺。如本文所述施用的一种或多种衰老细胞裂解剂可用于治疗和/或预防(即,降低化疗副作用或放疗副作用的可能性或发生)。衰老细胞的去除或破坏可以改善化疗或放疗的急性毒性,包括包含能量失衡的急性毒性。急性毒副作用包括但不限于胃肠道毒性(如恶心、呕吐、便秘、厌食、腹泻)、周围神经病变、疲劳、不适、体力活动不足、血液学毒性(如贫血)、肝毒性、秃头症(脱发)、疼痛、感染、粘膜炎、液体滞留、皮肤毒性(如皮疹、皮炎、色素沉着过度、荨麻疹、光敏性、指甲变化)、口腔(如口腔粘膜炎)、牙龈或喉咙问题,或化疗或放疗引起的任何毒副作用。例如,由放疗或化疗引起的毒性副作用可以通过本文所述的方法来改善。因此,在某些实施方案中,本文提供了用于在接受治疗的受试者中改善(减少、抑制或预防(即,降低发生的可能性)化疗或放疗或两者的急性毒性或降低毒副作用(即,有害副作用)的严重性的方法,其中所述方法包括给所述受试者施用选择性杀死、去除、或破坏或促进选择性破坏衰老细胞的药物。施用本文所述的用于治疗或降低化疗或放疗副作用发生的可能性或降低其严重性的衰老细胞裂解剂可以通过与上述用于治疗/预防转移的治疗过程相同的治疗过程来实现。如用于治疗或预防(即,降低发生转移的可能性)转移所描述的,在非化疗或非放疗时间间隔期间或在化疗或放疗治疗方案完成之后施用衰老细胞裂解剂。

[0241] 在更具体的实施方案中,急性毒性是包括能量失衡的急性毒性,并且可以包括体重减轻、内分泌变化(例如,激素失衡、激素信号传导的变化)和身体组成的变化中的一种或多种。在某些实施方案中,包括能量失衡的急性毒性与受试者身体活动能力的降低或降低有关,如在未接受药物治疗的受试者中观察到的能量消耗的降低或减少所示。作为非限制性示例,包括能量失衡的这种急性毒性效应包括低体力活动。在其它实施例中,能量失衡包括疲劳或不适。

[0242] 在一些实施方案中,通过本文所述的衰老细胞裂解剂治疗或预防的化疗副作用(即,降低发生的可能性)是心脏毒性。患有正在用蒽环类药物(如阿霉素、柔红霉素)治疗的癌症的受试者可以用本文所述的一种或多种减少、改善或降低蒽环类的心脏毒性的衰老细胞裂解剂治疗。正如医学领域所熟知的,由于蒽环类药物的心脏毒性,即使癌症对药物有反应,受试者可以接受的最大终生剂量也是有限的。施用一种或多种衰老细胞裂解剂可以降低心脏毒性,从而可以向受试者施用额外量的蒽环类药物,从而改善与癌症疾病相关的预后。在一些实施方案中,心脏毒性由蒽环类药物如阿霉素的施用引起。阿霉素是一种蒽环类

拓扑异构酶抑制剂,被批准用于治疗基于铂的治疗失败后患有卵巢癌症的患者;原发性全身化疗失败或对治疗不耐受后的卡波西肉瘤的患者;或先前未接受硼替佐米或先前接受过至少一种治疗的多发性骨髓瘤联合硼替佐米治疗的患者。如果患者一生的总剂量超过 $550\text{mg}/\text{m}^2$,阿霉素可能会导致心肌损伤,从而导致充血性心力衰竭。如果患者同时接受纵隔照射或其它心脏毒性药物,则可能在更低剂量下发生心脏毒性。

[0243] 在其它实施方案中,本文所述的衰老细胞裂解剂可用于本文所提供的方法中,以改善慢性或长期副作用。慢性毒性副作用通常是由长期多次暴露于或施用化疗或放疗引起的。某些毒性作用在治疗后很长时间就会出现(也称为晚期毒性作用),是由治疗对器官或系统的损伤引起的。在儿童时期接受癌症治疗的患者中已经观察到器官功能障碍(例如,神经、肺、心血管和内分泌功能障碍)(参见例如Hudson等人,JAMA 30992013) 2371-2381)。在不希望受任何特定理论约束的情况下,通过破坏衰老细胞,特别是通过化疗或放疗诱导衰老的正常细胞,可以降低慢性副作用发生的可能性,或者可以降低或减少慢性副作用的严重性,或者可以延迟慢性副作用开始的时间。在接受化疗或放射治疗的受试者中发生的慢性和/或晚期毒性副作用包括非限制性示例,心肌病、充血性心脏病、炎症、更年期早期、骨质疏松、不孕、认知功能受损、周围神经病变、继发性癌症、白内障和其它视力问题、听力损失、慢性疲劳、肺活量减少和肺病。

[0244] 此外,通过施用衰老细胞裂解剂杀死或去除癌症受试者的衰老细胞,与未施用衰老细胞裂解剂相比,可以以临床或统计学显著的方式增强对化疗或放疗的敏感性。换言之,当对用相应的化疗或放疗治疗的受试者施用衰老细胞裂解剂时,可以抑制化疗或放疗耐药性的发展。

[0245] 与年龄相关的疾病和病症

[0246] 本文所述的衰老细胞裂解剂选择性地杀死衰老细胞。因此,在衰老过程中靶向衰老细胞可能是一种预防策略。因此,对受试者施用本文所述的衰老细胞裂解剂可以预防老年受试者的合并症并延迟死亡率。此外,选择性杀死衰老细胞可以增强免疫系统,延长健康寿命,提高受试者的生活质量。

[0247] 衰老细胞裂解剂也可用于治疗或预防(即降低发生的可能性)作为自然衰老过程的一部分发生的或当受试者暴露于衰老诱导剂或因素(如辐射、化疗、吸烟、高脂肪/高糖饮食、其它环境因素)时发生的与年龄相关的疾病或病症。与年龄相关的病症或疾病或对年龄敏感的特征可能与衰老诱导的刺激有关。本文所述的治疗方法的功效可以通过减少与衰老诱导刺激相关的与年龄相关的病症或年龄敏感特征的症状数量、降低一种或多种症状的严重程度、或延缓与衰老诱导的刺激相关的年龄相关的病症或年龄敏感特性的进展来表现。在其它实施方案中,预防与衰老诱导刺激相关的与年龄相关的病症或年龄敏感特征是指预防(即,降低发生的可能性)或延迟与衰老诱导刺激相关联的年龄相关的病症或年龄敏感特征的发生,或一种或多种与衰老诱导的刺激相关的年龄相关病症或年龄敏感性特征的复发。与年龄相关的疾病或病症包括,例如,肾功能障碍、驼背、椎间盘突出、虚弱、脱发、听力损失、视力损失(失明或视力受损)、肌肉疲劳、皮肤状况、皮肤癌、糖尿病、代谢综合征和少肌症。视力丧失是指以前有视力的受试者出现视力损失。已经开发了各种量表来描述基于视敏度的视力和视力损失的程度。与年龄相关的疾病和病症还包括皮肤病,例如但不限于治疗以下病症中的一种或多种:皱纹,包括浅表细皱纹;色素沉着;疤痕;瘢痕疙瘩;皮炎;银

屑病;湿疹(包括脂溢性湿疹);酒渣鼻;白癜风;寻常型鱼鳞病;皮炎;和光化性角化病。虚弱被定义为一种临床上可识别的虚弱性增加的状态,这种状态是由衰老相关的多个生理系统的储备和功能下降引起的,这会损害受试者应对日常或急性应激源的能力。虚弱的特征可能是受损的能量学特征,如低握力、低能量、行走速度减慢、体力活动少和/或无意的体重减轻。研究表明,当观察到上述五种特征中的三种时,患者诊断为虚弱(参见,例如,Fried等人,J.Gerontol.A Biol.Sci.Med,Sci.56(3)(2001)M146-M156;Xue,Clin.Geriatr.Med.27(1)(2001)1-15)。在某些实施方案中,衰老以及与衰老相关的疾病和病症可以通过施用衰老细胞裂解剂来治疗或预防(即,降低发生的可能性)。衰老细胞裂解剂可以抑制成体干细胞的衰老,或抑制已经衰老的成体干细胞的积累、杀死或促进其去除。防止干细胞衰老以维持组织再生能力的重要性在例如Park等人,J.Clin.Invest.113(2004)175-179;和Sousa-Victor,Nature 506(2014)316-321有所讨论。

[0248] 测定衰老的方法是本领域已知的。例如,可通过以下方式测定骨老化:偶发非椎骨骨折、偶发髋关节骨折、偶发总骨折、偶发脊椎骨折、偶发重复骨折、骨折后功能恢复、腰椎和髋关节的骨密度降低、膝关节屈曲率、NSAID的使用、关节疼痛和骨关节炎的数量。也可以通过功能下降、跌倒率、反应时间和握力、上肢和下肢肌肉质量下降以及10米步态速度来测定肌肉的衰老。此外,可以通过收缩压和舒张压变化、高血压事件、重大心血管事件如心肌梗死、中风、充血性心脏病和心血管死亡率来测定心血管系统中的衰老。此外,可以通过认知能力下降、意外抑郁和意外痴呆来测定大脑中的衰老。此外,可以通过感染率、上呼吸道感染率、流感样疾病率、导致住院的偶发严重感染、偶发癌症、植入物感染率和胃肠道感染率来测定免疫系统中的衰老。衰老的其它指征可能包括但不限于口腔健康状况下降、牙齿脱落、胃肠道症状发生率、空腹血糖和/或胰岛素水平变化、身体成分、肾功能下降、生活质量、日常生活活动相关的意外残疾以及入住疗养院。测定皮肤老化的方法是本领域已知的,并且可以包括经表皮水分损失(TEWL)、皮肤水合作用、皮肤弹性、鱼尾纹的面积比分析、敏感性、光泽、粗糙度、斑点、松弛度、肤色均匀性、柔软度和起伏度(深度变化)。

[0249] 与未接受治疗的受试者的预期生存期相比,施用本文所述的衰老细胞裂解剂可以延长的生存期。需要治疗的受试者包括那些已经患有该疾病或病症的受试者,以及那些容易患有或有患上该疾病或病症风险的人,和那些需要对该疾病、病况或病症进行预防性治疗的人。受试者可能具有发展疾病或病症的遗传倾向,该疾病或病症将受益于衰老细胞的清除,或者受试者可能具有一定的年龄,其中接受衰老细胞裂解剂将提供延迟疾病发展或降低疾病(包括与年龄相关的疾病或病症)的严重性的临床益处。

[0250] 在其它实施方案中,提供了一种用于治疗衰老相关疾病或病症的方法,该方法还包括鉴定将受益于本文所述的衰老细胞裂解剂治疗的受试者(即表型;个体化治疗)。该方法包括首先检测受试者中衰老细胞的水平,例如在受试者的特定器官或组织中。生物样品可以从受试者获得,所述样品例如,血液样品、血清或血浆样品、活检样品、体液(例如,肺灌洗物、腹水、粘膜冲洗物、滑液、玻璃状体液、脊髓液)、骨髓、淋巴结、组织外植体、器官培养物或来自受试者的任何其它组织或细胞制剂。衰老细胞的水平可以根据本文所述的任何体外测定或技术来测定。例如,衰老细胞可以通过形态学检测(例如通过显微镜观察);衰老相关标志物的产生,如产生例如衰老相关半乳糖苷酶(SA- β -gal)、p16INK4a、p21、PAI-1或任何一种或多种SASP因子(例如IL-6、MMP3)。生物样品的衰老细胞和非衰老细胞也可用于体

外细胞测定,其中细胞暴露于本文所述的任意一种衰老细胞裂解剂,以测定衰老细胞裂解剂杀死受试者的衰老细胞而对非衰老细胞没有不良毒性的能力。此外,这些方法可用于在用衰老细胞裂解剂处理之前、期间和之后监测受试者中衰老细胞的水平。在某些实施方案中,可以检测衰老细胞的存在(例如,通过测定mRNA的衰老细胞标志物表达水平),并且可以相应地调整治疗过程和/或非治疗间隔。

[0251] 联合疗法

[0252] 本文公开的衰老细胞裂解剂和组合物也可与一种或多种其它活性成分组合使用。在某些实施方案中,所述化合物可以与另一种治疗剂组合或顺序施用。此类其它治疗药物包括已知用于治疗、预防或改善本文所述的一种或多种症状或病症的那些治疗药物。

[0253] 应当理解,本文提供的化合物和药物组合物与一种或多种上述治疗剂以及任选的一种或多种其它药理学活性物质的任何合适组合被认为在本公开的范围。在一些实施方案中,本文提供的化合物和药物组合物在一种或多种额外活性成分之前或之后施用。

[0254] 药物组合物和施用方法

[0255] 本文还提供了药物组合物,其包含本文所述的衰老细胞裂解剂和至少一种药学上可接受的赋形剂,其也可称为药学上合适的赋形剂或载体(即,不干扰活性成分活性的无毒材料)。药物组合物可以是无菌水溶液或非水溶液、悬浮液或乳液(例如,微乳液)。本文所述的赋形剂是示例,且并非限制性的。有效量或有效治疗量是指以单剂量或一系列剂量的一部分形式施用于受试者的一种或多种衰老细胞裂解剂的量,其有效地产生所需的治疗效果。

[0256] 当向受试者施用两种或多种衰老细胞裂解剂以治疗本文所述的疾病或病症时,每种衰老细胞裂解剂可配制成单独的药物组合物。可以制备包括每种单独的药物组合物的药物制剂(为了方便,其可以被称为,例如,分别包括第一和第二衰老细胞裂解剂的第一药物组合物和第二药物组合物)。制剂中的每种药物组合物可以在相同的时间(即同时)通过相同的施用途径施用,或者可以在不同的时间通过相同或不同的施用途径施用。可替换地,两种或多种衰老细胞裂解剂可以一起配制成单一的药物组合物。

[0257] 在其它实施方案中,可将至少一种衰老细胞裂解剂和至少一种mTOR、NF- κ B或PI3K途径抑制剂的组合施用于有需要的受试者。当在本文所述的选择性杀死衰老细胞的方法中同时使用至少一种衰老细胞裂解剂和mTOR、NF- κ B或PI3K途径中的一种或多种的抑制剂时,可以将每种药物可以配制成相同的药物组合物或配制成单独的药物组合物。可以制备包含每种单独的药物组合物的药物制剂,为了方便起见,所述药物组合物可以称为例如分别包含一种或多种mTOR、NF- κ B或PI3K途径的解酶剂和抑制剂的第一药物组合物和第二药物组合物。制剂中的每种药物组合物可以在同一时间通过同一施用途径施用,或者可以在不同时间通过相同或不同的施用途径施用。

[0258] 施用于受试者的衰老细胞裂解剂(或其一种或多种代谢产物)的药代动力学可通过测定生物流体中衰老细胞裂解剂的水平来监测,例如,通过测定受试者血液、血液部分(如血清)和/或尿液和/或其它生物样品或生物组织中衰老细胞裂解剂的水平。本领域实践的和本文所述的检测试剂的任何方法都可以用于在治疗过程中测定衰老细胞裂解剂的水平。

[0259] 本文所述的用于治疗衰老细胞相关疾病或病症的衰老细胞裂解剂的剂量可能取

决于受试者的病情,即疾病的阶段、由疾病引起的症状的严重程度、总体健康状况以及年龄、性别和体重,以及医学领域的技术人员显而易见的其它因素。药物组合物可以以医学领域技术人员确定的适合于待治疗疾病的方式施用。除了本文和上文所述的与使用衰老细胞裂解剂治疗衰老相关疾病或病症有关的因素外,还可以通过诸如患者的状况、患者疾病的类型和严重程度、活性成分的特定形式、以及施用方法等因素来确定或调节。药物的最佳剂量通常可以使用实验模型和/或临床试验来确定。最佳剂量可能取决于受试者的质量、体重或血容量。通常优选使用足以提供有效治疗的最小剂量。本文所述衰老细胞裂解剂的临床前和临床研究的设计和执行(包括用于预防性益处的施用)完全在相关领域技术人员的技能范围内。当施用两种或多种衰老细胞裂解剂以治疗衰老相关疾病或病症时,每种衰老细胞裂解剂的最佳剂量(例如小于任一药物单独作为单一药物治疗施用时的最佳剂量)可能不同。在某些实施方案中,两种衰老细胞裂解剂组合起协同作用或相加作用,并且任一药物的使用量可以小于单独施用时的使用量。可以每天施用的衰老细胞裂解剂的量可以是例如,约0.01mg/kg至100mg/kg(例如,约0.1mg/kg至1mg/kg、约1mg/kg至10mg/kg、约10mg/kg至50mg/kg、约50mg/kg至100mg/kg体重)。在其它实施方案中,每天可施用的衰老细胞裂解剂的量为约0.01mg/kg至1000mg/kg、约100mg/kg至500mg/kg或约500mg/kg至1000mg/kg体重。需要治疗的衰老相关疾病或病症的最佳剂量(每天或每个疗程)可能不同,并且也可能因施用途径和治疗方案而异。

[0260] 通过使用本领域常规实践的技术,可以以适用于递送方法的方式配制包含衰老细胞裂解剂的药物组合物。该组合物可以是固体(如片剂、胶囊)、半固体(如凝胶)、液体或气体(气雾剂)的形式。在其它特定的实施方案中,衰老细胞裂解剂(或包含其的药物组合物)以推注的形式施用。在某些实施方案中,当通过输注递送衰老细胞裂解剂时,根据医学领域技术人员常规进行的技术,将衰老细胞裂解剂递送至包括衰老细胞的器官或组织,以经由血管杀死衰老细胞。

[0261] 药学上可接受的赋形剂在药学领域是众所周知的,并在例如Rowe等人, *Handbook of Pharmaceutical Excipients: A Comprehensive Guide to Uses, Properties, and Safety*, 5th Ed., 2006和Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (Gennaro, 21st Ed. Mack Pub. Co., Easton, Pa. (2005))中进行了描述。示例性药学上可接受的赋形剂包括生理pH下的无菌盐水和磷酸盐缓冲盐水。药物组合物中可提供防腐剂、稳定剂、染料、缓冲剂等。此外,还可以使用抗氧化剂和悬浮剂。通常,根据施用方式以及活性成分的化学组成来选择赋形剂的类型。或者,本文所述的组合物可以配制成冻干物。本文所述的组合物可以使用一种或多种合适的赋形剂溶液冻干或以其它方式配制成冻干产品,用于在施用溶解和/或稀释组合物的制剂。在其它实施方案中,可以使用本领域已知和实践的技术将药物包封在脂质体内。药物组合物可以配制用于本文所述的和领域中任何适当的施用方式。

[0262] 药物组合物可通过本领域技术人员已知的几种途径中的任何一种递送给有需要的受试者。作为非限制性示例,该组合物可通过口服、静脉内、腹膜内、输注(例如推注)、皮下、肠内、直肠、鼻内、吸入、口腔、舌下、肌内、经皮、皮内、局部、眼内、阴道、直肠或颅内注射,或其任何组合。在某些实施方案中,如上所述,通过静脉内、腹膜内、直接进入目标组织或器官或皮下途径施用剂量。在某些实施方案中,递送方法包括药物涂覆的或渗透的支架,所用药物是衰老细胞裂解剂。本文更详细地描述了适用于这种递送方法的制剂。

[0263] 在某些实施方案中,将衰老细胞裂解剂(其可与至少一种药学上可接受的赋形剂组合以形成药物组合物)直接施用至包含有助于疾病或病症表现的衰老细胞的靶组织或器官。在治疗骨关节炎的具体实施方案中,将所述至少一种衰老细胞裂解剂直接施用到有需要的受试者的骨关节炎关节(即,关节内)。在其它具体实施方案中,可以通过局部、透皮、皮内或皮下途径将衰老细胞裂解剂施用到关节。在其它某些实施方案中,本文提供了通过直接施用于动脉中来治疗与动脉硬化相关的心血管疾病或病症(例如动脉粥样硬化)的方法。在其它实施方案中,用于治疗衰老相关肺部疾病或病症的衰老细胞裂解剂(其可与至少一种药学上可接受的赋形剂组合以形成药物组合物)可通过例如吸入、鼻内、插管或鞘内施用,以将衰老细胞裂解剂更直接地提供给受影响的肺组织。作为另一个非限制性示例,可以通过注射(例如,眼内或玻璃体内)或通过眼睑下方结膜施用乳膏、软膏、凝胶或滴眼液,将衰老细胞裂解剂(或包含衰老细胞裂解剂的药物组合物)直接递送至眼睛。在更具体的实施方案中,衰老细胞裂解剂或包含衰老细胞裂解剂的药物组合物可以配制为定时释放(也称为持续释放、控制释放)组合物,或者可以以推注的形式施用。

[0264] 药物组合物(例如,用于口服施用或注射、输注、皮下施用、肌肉施用、腹膜内施用或其它方法)可以是液体形式。液体药物组合物可以包括例如以下一种或多种:无菌稀释剂,例如水、盐水溶液,优选生理盐水、林格溶液、等渗氯化钠、可以用作溶剂或悬浮介质的固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它溶剂;抗菌剂;抗氧化剂;螯合剂;用于调节张力的缓冲剂和试剂,如氯化钠或葡萄糖。肠胃外组合物可以封装在玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。优选使用生理盐水,并且可注射的药物组合物优选是无菌的。在其它实施方案中,为了治疗眼科病症或疾病,液体药物组合物可以以滴眼液的形式施用于眼睛。液体药物组合物可以口服递送。

[0265] 对于口服制剂,本文所述的至少一种衰老细胞裂解剂可以单独使用或与适当的添加剂组合使用,以制备片剂、散剂、颗粒剂或胶囊,如果需要,还可以与稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂、着色剂和调味剂一起使用。所述化合物可以与缓冲剂和/或肠溶包衣一起配制,以保护所述化合物免受胃环境的低pH的影响。包括在药物组合物中的衰老细胞裂解剂可以与调味剂一起配制用于口服递送,例如以液体、固体或半固体制剂和/或肠溶包衣的形式。

[0266] 包含本文所述的任何一种衰老细胞裂解剂的药物组合物可配制为持续或缓慢释放(也称为定时释放或控制释放)。这种组合物通常可以使用众所周知的技术制备,并通过例如口服、直肠、皮内或皮下植入,或通过期望的靶位点植入来施用。缓释制剂可以包含分散在载体基质中和/或包含在由速率控制膜包围的储存器中的化合物。用于此类制剂中的赋形剂是生物兼容的,也可以是可生物降解的;优选的,所述制剂提供相对恒定水平的活性成分释放。缓释制剂中所含活性剂的量取决于植入部位、释放速率和预期持续时间,以及待治疗或预防的病况、疾病或病症的性质。

[0267] 在某些实施方案中,包含衰老细胞裂解剂的药物组合物被配制用于透皮、皮内或局部施用。所述组合物可以使用注射器、绷带、透皮贴剂、插入物或类似注射器的施用器施用,如粉末/滑石粉或其它固体、液体、喷雾、气雾剂、软膏、泡沫、乳膏、凝胶、糊剂。优选是控释制剂或缓释制剂的形式,局部施用或直接注射到与待治疗区域相邻或在待治疗区域内的皮肤中(皮内或皮下)。活性组合物也可以通过离子电渗疗法递送。防腐剂可以用来防止真菌和其它微生物的生长。合适的防腐剂包括但不限于苯甲酸、对羟基苯甲酸丁酯、对羟基苯

甲酸乙酯、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠、丙酸钠、苯扎氯铵、苄索氯铵、苯甲醇、十六烷基氯化吡啶、氯丁醇、苯酚、苯乙醇、硫柳汞及其组合。

[0268] 包含衰老细胞裂解剂的药物组合物可配制为局部应用的乳液。乳液包含一种液体,该液体分布在第二种液体的主体上。乳液可以是水包油乳液或油包水乳液。油相和水相中的任一个或两者可以含有一种或多种表面活性剂、乳化剂、乳液稳定剂、缓冲剂和其它赋形剂。油相可以含有其它药学上认可的油性赋形剂。合适的表面活性剂包括但不限于阴离子表面活性剂、非离子表面活性剂、阳离子表面活性剂和两性表面活性剂。用于局部施用的组合物还可以包括至少一种合适的悬浮剂、抗氧化剂、螯合剂、润肤剂或保湿剂。

[0269] 例如,软膏和乳膏可以用水性或油性基质配制,并添加合适的增稠剂和/或胶凝剂。洗剂可以用水性或油性基质配制,并且通常还含有一种或多种乳化剂、稳定剂、分散剂、悬浮剂、增稠剂或着色剂。液体喷雾可以在加压包装中输送,例如,通过特殊形状的封闭件。水包油乳液也可用于组合物、贴剂、绷带和制品中。这些系统是半固体乳液、微乳液或泡沫乳液体系。

[0270] 可通过添加本领域可用的缓释添加剂(如聚合物结构、基质)来实现控制或缓释透皮或局部制剂。例如,可通过使用热熔挤出制品(如生物粘附性热熔挤出膜)来施用组合物。该制剂可以包括交联的聚羧酸聚合物制剂。交联剂可以提供足够的粘附性的量存在,以允许系统在足够的时间内保持附着于靶上皮或内皮细胞表面,从而允许化合物的期望释放。

[0271] 插入物、透皮贴剂、绷带或制品可以包括聚合物的混合物或涂层,其在长时间内以恒定速率释放活性剂。在一些实施方案中,制品、透皮贴剂或插入物包含水溶性成孔剂,例如聚乙二醇(PEG),其可与水不溶性聚合物混合以增加插入物的耐久性并延长活性成分的释放。

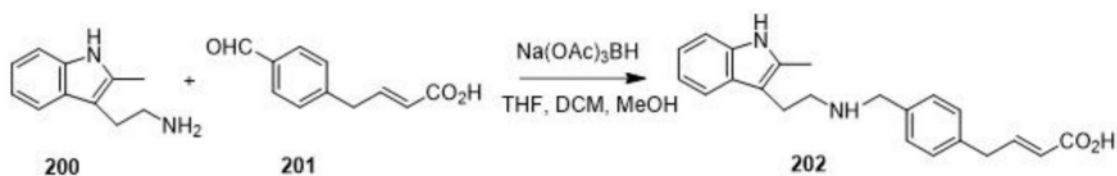
[0272] 聚合物制剂也可用于提供受控或持续释放。可以使用本领域中描述的生物粘附聚合物。例如,可将缓释凝胶和化合物掺入聚合物基质中,例如疏水性聚合物基质。聚合物基质的示例包括微粒。微粒可以是微球,并且芯可以是与聚合物壳不同的材料。或者,聚合物可以浇铸成薄片或薄膜,通过研磨或其它标准技术生产的粉末,或凝胶如水凝胶。聚合物也可以是涂层或绷带、支架、导管、血管移植物或其它装置的一部分的形式,以便于衰老细胞裂解剂的递送。基质可以通过溶剂蒸发、喷雾干燥、溶剂提取和本领域技术人员已知的其它方法形成。

[0273] 提供了具有单位剂量的本文所述的一种或多种制剂的试剂盒,所述单位剂量通常为口服或注射剂量。这种试剂盒可以包括含有单位剂量的容器、描述药物在治疗衰老细胞相关疾病中的用途和伴随的益处的信息包装插页,以及任选地用于递送组合物的器具或装置。

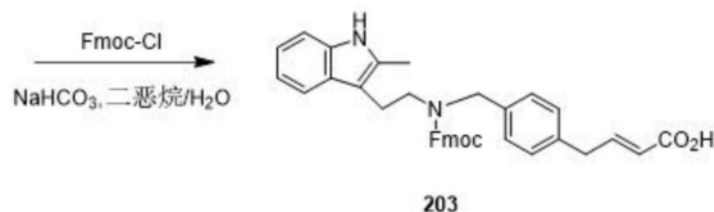
[0274] 出于所有目的,所有参考文献和专利文件全部并入本文。

[0275] 以下实施例仅用于说明目的,并不旨在限制本发明的范围。

[0276] 实施例



[0277]

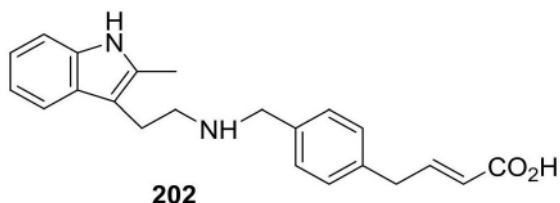


方案1

[0278] 方案1说明了关键中间体203的制备。

[0279] (E)-3-(4-(((2-(2-甲基-1H-吡咯-3-基)乙基)氨基)甲基)苯基)丙烯酸 (202)

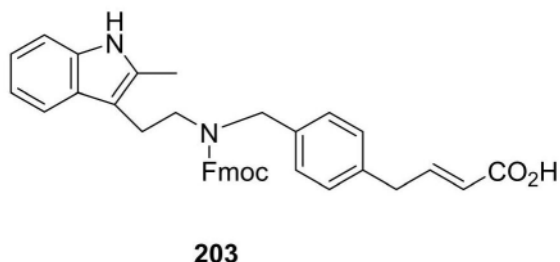
[0280]



[0281] 向2-甲基吡咯-3-乙胺 (200) (15.0g, 86.1mmol) 和4-甲酰基肉桂酸 (201) (15.2g, 86.1mmol) 在THF:DCM:MeOH(200mL:200mL:25mL) 中的混合物中加入乙酸 (1.0mL)。然后, 在环境温度下逐份加入三乙酰氧基硼氢化钠 (43.8g, 206.6mmol)。将反应混合物在环境温度下搅拌过夜, 并通过烧结玻璃漏斗过滤。用乙酸乙酯 (300mL)、水 (300mL) 和饱和碳酸氢钠溶液 (150mL) 洗涤沉淀物, 随后在高真空下干燥, 得到所需产物 (E)-3-(4-(((2-(2-甲基-1H-吡咯-3-基)乙基)氨基)甲基)苯基)丙烯酸 (202) (26g, 70% 产率)。LC/MS (方法A): RT=2.41 分钟; $m/z=334.41$, 实测值=335.4 $[m^+H]$ 。

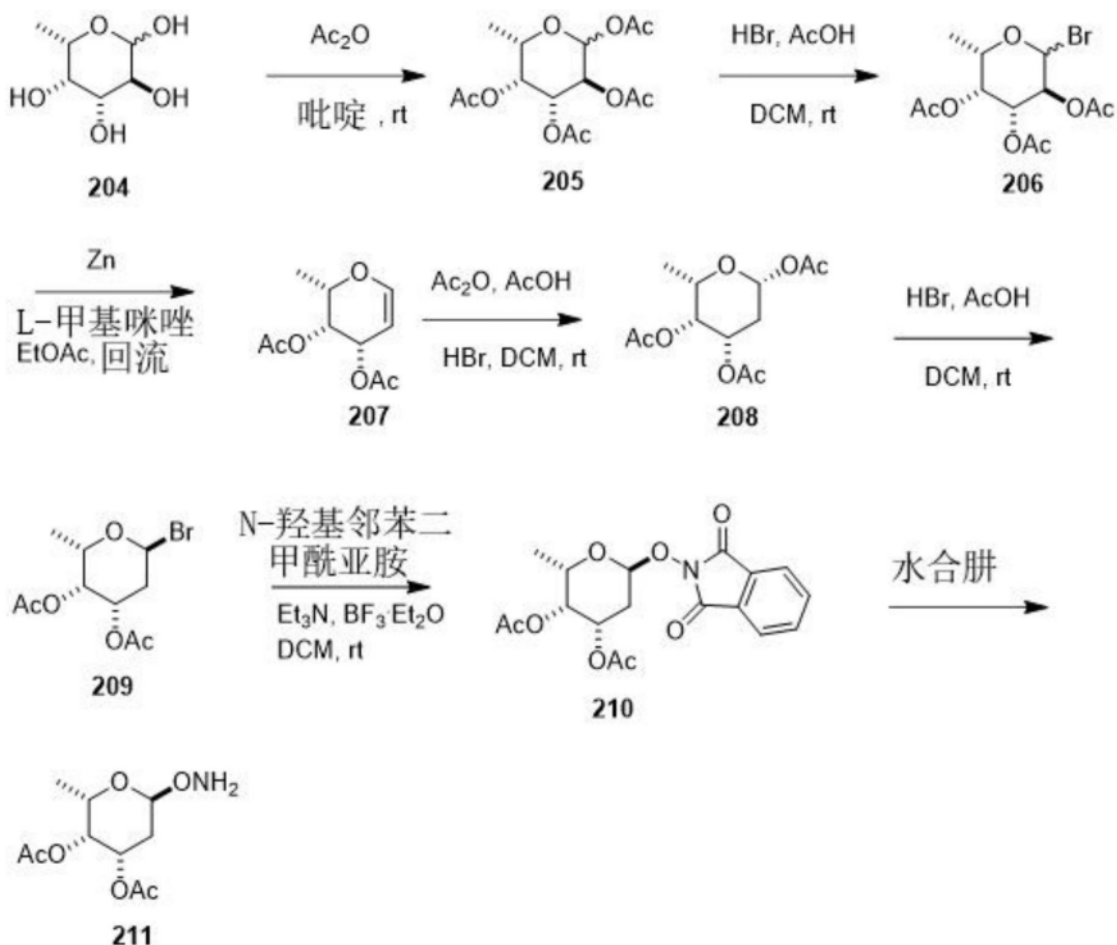
[0282] (E)-3-(4-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)(2-(2-甲基-1H-吡咯-3-基)乙基)氨基)甲基)苯基)丙烯酸 (203)

[0283]



[0284] (E)-3-(4-(((2-(2-甲基-1H-吡咯-3-基)乙基)氨基)甲基)苯基)丙烯酸 (202) (260mg, 0.77mmol, 1.0eq) 和碳酸氢钠 (245mg, 2.92mmol, 3.8eq) 悬浮在二恶烷-水 (3:1) (5.1mL, 0.15M) 中。在0℃下分批加入芴甲氧羰基氯化物 (230mg, 0.89mmol, 1.15eq)。将反应混合物加热至室温。LCMS的分析显示了所需的产品。加入稀释的HCl, 直到pH为pH~2。水溶液用乙酸乙酯萃取两次, 合并的有机层用盐水洗涤, 用硫酸钠干燥并浓缩, 得到橙色固体。

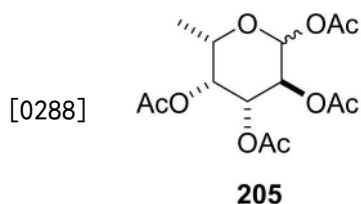
将粗产物进行正相纯化(用10-100%乙酸乙酯在己烷中洗脱。将产物馏分合并并浓缩至干燥,得到灰白色固体的(E)-3-(4-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)(2-(2-甲基-1H-吡啶-3-基)乙基)氨基)甲基)苯基)丙烯酸(203)。(240mg,56%产率)。LC/MS(方法A):RT=3.91分钟; $m/z=556.6$,实测值=557.6 $[m^+H]$ 。总时间=6分钟。



方案2

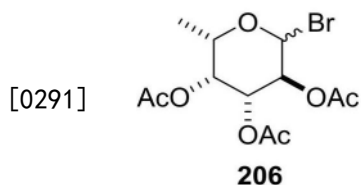
[0286] 方案2说明了关键中间体211的制备。

[0287] 1,2,3,4-四-O-乙酰基-L-岩藻糖(205)



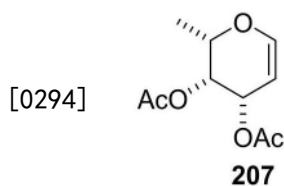
[0289] L-岩藻糖(204)(50g,0.3mol)溶于乙酸酐(400mL,4.23mol)和吡啶(800mL,9.9mol)的溶液中。将反应混合物在室温下搅拌过夜,减压浓缩,残留物用EtOAc(2000mL)稀释,用水(1000mL)、10%柠檬酸水溶液(3×700mL)、水(1000mL)和盐水(1000mL)洗涤,用无水硫酸钠干燥,在减压条件下进行过滤和浓缩。将残余物与甲苯(200mL)共沸,并在高真空下干燥,得到粗产物1,2,3,4-四-O-乙酰基-L-岩藻糖(205)(100g,产量),该粗产物用于下一步骤,无需进行任何进一步纯化。

[0290] (2S,3R,4R,5S)-4,5-双(乙酰氧基)-6-溴-2-甲基氧基-3-基乙酸酯(206)



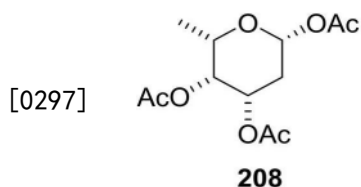
[0292] 1,2,3,4-四-O-乙酰基-L-岩藻糖 (205) (101g, 0.3mol) 溶于无水二氯甲烷 (500mL) 中, 并冷却至 0℃。然后, 加入 HBr (33% 在 AcOH 中, 135mL), 并使反应混合物在搅拌下加热至室温 2 小时。将反应混合物倒入冰/水混合物中, 分离有机层。水相用 CH₂Cl₂ (200mL) 萃取。有机层用饱和碳酸氢钠 (100mL)、盐水 (150mL) 洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 并在减压下浓缩, 得到 (2S, 3R, 4R, 5S)-4,5-双(乙酰氧基)-6-溴-2-甲基氧基-3-基乙酸酯 (206) (115g, 产量), 为黄色油状物。该粗材料用于下一步骤, 无需进行纯化。

[0293] (2S, 3R, 4S)-4-(乙酰氧基)-2-甲基-3,4-二氢-2H-吡喃-3-基乙酸酯 (207)



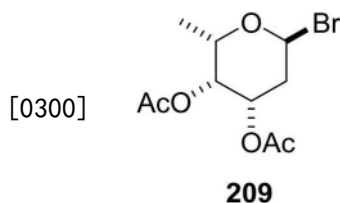
[0295] 在 40 分钟内向回流的 Zn (111g, 1.7mol) 和 1-甲基-咪唑 (25mL, 0.31mol) 的无水乙酸乙酯 (1200mL) 的搅拌溶液中逐滴加入 (2S, 3R, 4R, 5S)-4,5-双(乙酰氧基)-6-溴-2-甲基氧基-3-基乙酸酯 (206) (100g, 0.28mol) 的无水乙酸乙酯 (200mL) 溶液。将反应混合物回流加热 3 小时, 直到 TLC 分析显示反应完成。将反应混合物冷却至室温并再搅拌 30 分钟, 然后通过硅藻土垫过滤。减压浓缩得到粗产物, 该粗产物通过硅胶快速色谱法 (0-10% EtOAc 溶于己烷中) 纯化, 得到所需产物 (2S, 3R, 4S)-4-(乙酰氧基)-2-甲基-3,4-二氢-2H-吡喃-3-基乙酸酯 (207) (38g, 63% 产率)。

[0296] (2S, 3R, 4S)-4,6-双(乙酰氧基)-2-甲氧基-3-基乙酸酯 (208)



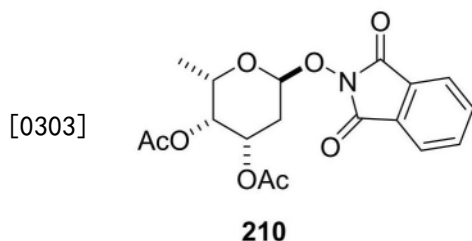
[0298] 向 (2S, 3R, 4S)-4-(乙酰氧基)-2-甲基-3,4-二氢-2H-吡喃-3-基乙酸酯 (207) (75g, 0.35mol) 的无水二氯甲烷 (500mL) 冷溶液 (冰浴/水浴) 中加入乙酸 (190mL, 3.3mol) 和乙酸酐 (290mL, 3mol)。将反应混合物搅拌 15 分钟, 并加入 33% HBr 在 AcOH (19mL) 中的溶液。将反应混合物再搅拌 30 分钟, 此时溶液变成浅黄色。TLC 分析显示原料完全消耗 (低点, 25% EtOAc/己烷)。加入冰/水混合物以终止反应。用水 (2 × 1L) 彻底洗涤有机层, 然后用冷饱和碳酸氢钠水溶液 (1L)、水 (1L) 和盐水 (1L)。有机层用无水硫酸钠干燥并真空浓缩, 得到粗产物, 该粗产物通过硅胶快速色谱法 (0-20% EtOAc 溶于己烷中) 纯化, 得到所需产物 (2S, 3R, 4S)-4,6-双(乙酰氧基)-2-甲氧基-3-基乙酸酯 (208), 为白色固体 (83g, 86.2% 产率)。

[0299] (2S, 3R, 4S, 6S)-4-(乙酰氧基)-6-溴-2-甲基氧基-3-基乙酸酯 (209)



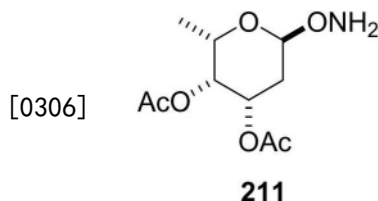
[0301] 在0℃下,向(2S,3R,4S)-4,6-双(乙酰氧基)-2-甲氧基-3-基乙酸酯(208)(82g, 0.3mol)的无水二氯甲烷(700mL)溶液中加入33% HBr的AcOH(80mL)溶液。将反应混合物搅拌15分钟,然后加入冰冷的水(300mL)以终止反应。水相用二氯甲烷(3×700mL)萃取,合并的有机层用盐水(2×500mL)洗涤,用无水硫酸钠干燥并真空浓缩,得到(2S,3R,4S,6S)-4-(乙酰氧基)-6-溴-2-甲氧基-3-基乙酸酯(209)为粘性油。在没有任何进一步纯化的情况下,将粗物质尽快推进到下一步骤。

[0302] (2S,3R,4S,6S)-4-(乙酰氧基)-6-[(1,3-二氧化-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)氧基]-2-甲氧基-3-乙酸酯(210)



[0304] 向粗(2S,3R,4S,6S)-4-(乙酰氧基)-6-溴-2-甲氧基-3-基乙酸酯(209)和N-羟基邻苯二甲酰亚胺(54g, 0.33mol)在无水二氯甲烷(600mL)中的溶液中加入三乙胺(55mL, 0.33mol),然后在0℃下加入BF₃·OEt₂(92mL, 0.75mol)。将反应混合物升至室温并搅拌1h,直到其变成绿灰色。加入冷饱和碳酸氢钠水溶液(500mL)并分离有机层。随后用二氯甲烷(3×500mL)提取水溶液,将合并的有机层用无水硫酸钠干燥并在减压下浓缩以获得粗物质。硅胶快速色谱法(10%-60% EtOAc在己烷中)提供(2S,3R,4S,6S)-4-(乙酰氧基)-6-[(1,3-二氧化-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)氧基]-2-甲氧基-3-乙酸酯(210),其为白色泡沫状固体(75g,两步产率66%)。LC/MS(方法B):RT=4.32分钟;m/z=377.1,实测值=378.2[m⁺H]⁺。总时间=12分钟。¹H NMR(500MHz,三氯甲烷-d)¹H NMR(500MHz,三氯甲烷-d) δ 7.85(ddd, J=5.5, 3.3, 0.6Hz, 2H), 7.76(ddd, J=5.9, 2.9, 0.8Hz, 2H), 5.62-5.52(m, 1H), 5.43(ddd, J=12.5, 5.3, 3.0Hz, 1H), 5.38-5.23(m, 1H), 4.97(td, J=6.7, 6.7, 5.6Hz, 1H), 2.35-2.18(m, 2H), 2.17(s, 3H), 2.03(d, J=0.6Hz, 3H), 1.14(dd, J=6.5, 0.6Hz, 3H)。

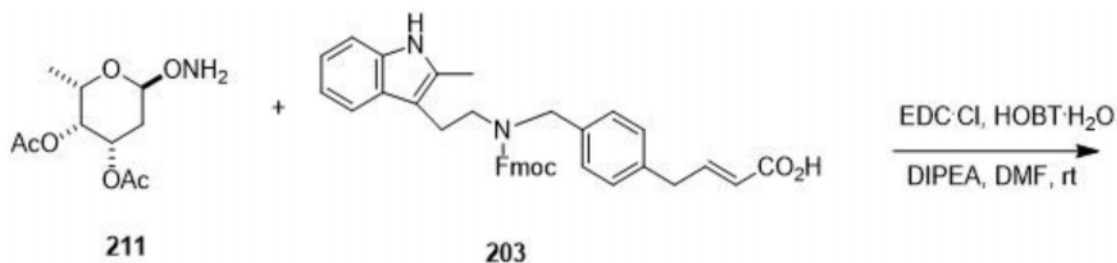
[0305] (2S,3R,4S,6S)-4-(乙酰氧基)-6-(氨基氧基)-2-甲氧基-3-基乙酸酯(211)



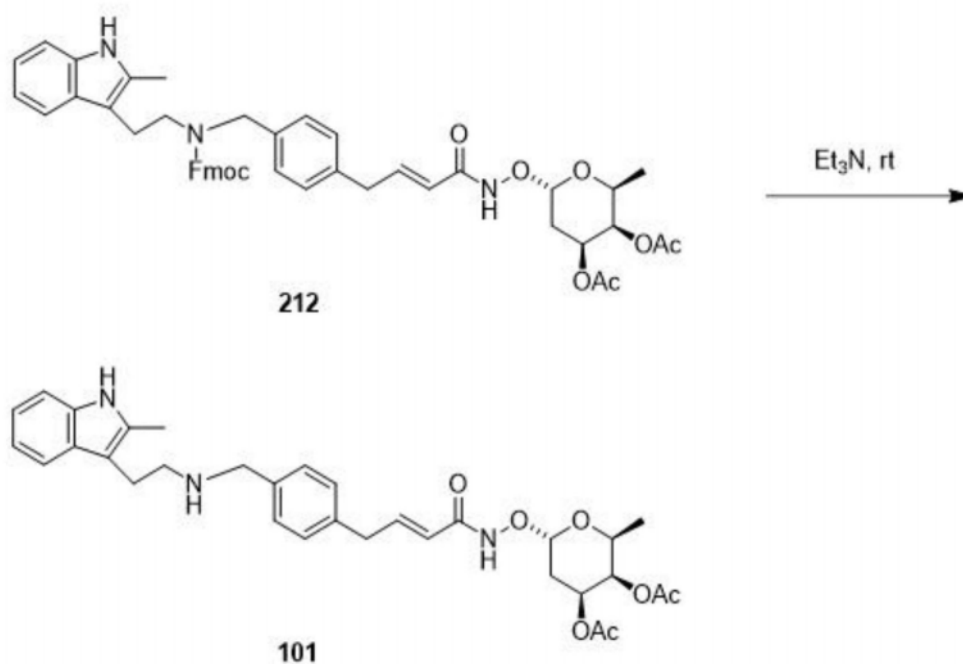
[0307] 将(2S,3R,4S,6S)-4-(乙酰氧基)-6-[(1,3-二氧化-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)氧基]-2-甲氧基-3-乙酸酯(210)(25g, 0.066mol)的甲醇(500mL)溶液在冰浴/水浴下冷却至0℃。缓慢加入水合肼(5.5mL, 0.066mol),并在0℃下将所得反应混合物再搅拌30分钟。过

滤沉淀物并用二氯甲烷 (500mL) 稀释滤液, 用冰冷的碳酸氢钠水溶液 ($2 \times 350\text{mL}$)、水 (350mL) 和盐水 (350mL) 洗涤。有机层用无水硫酸钠干燥并在减压下浓缩, 得到粗 (2S, 3R, 4S, 6S) - 4- (乙酰氧基) - 6- (氨基氧基) - 2- 甲氧基 - 3- 基乙酸酯 (211) (12g, 78% 产率), 为灰白色泡沫状固体。LC/MS (方法A): RT=1.22 分钟; $m/z=247.2$, 实测值=248.3 $[m^+H]^+$ 。

[0308] 总时间=6分钟。



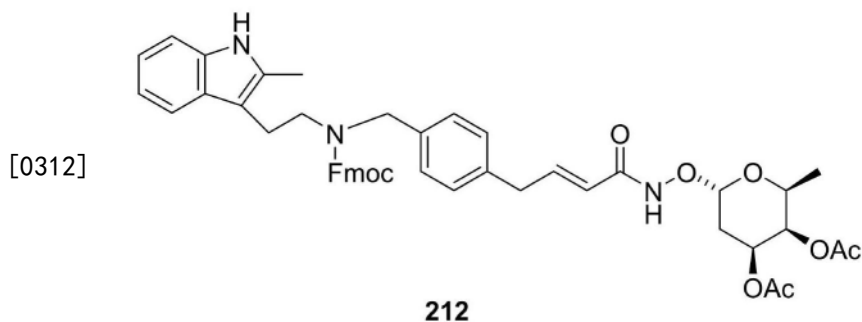
[0309]



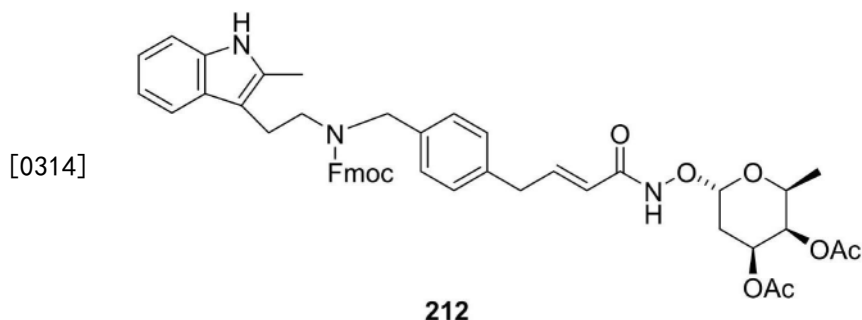
方案3

[0310] 方案3说明了化合物101的制备。

[0311] (2S, 3R, 4S, 6S) - 3- (乙酰氧基) - 6- {[(2E) - 3- [4- ({[(9H- 芴- 9- 基甲氧基) 羰基] [2- (2- 甲基- 1H- 吡啶- 3- 基) 乙基] 氨基) 甲基] 苯基] 丙- 2- 烯酰胺] 氧基} - 2- 甲氧基- 4- 基乙酸酯 (212) 的制备

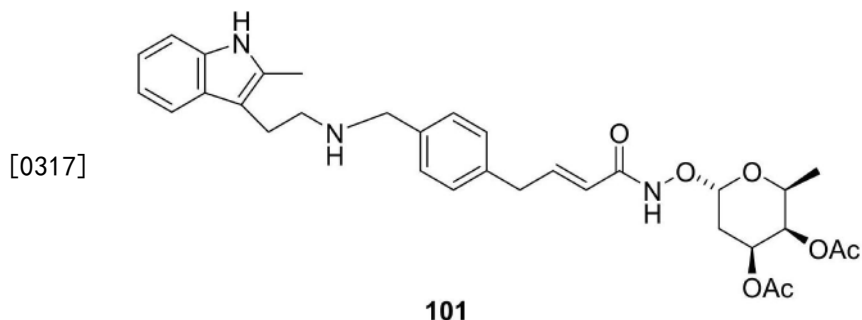


[0313] 将(E)-3-(4-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)(2-(2-甲基-1H-吡啶-3-基)乙基)氨基)甲基)苯基)丙烯酸(203)(710mg,1.27mmol,1.0eq)溶于DMF(7mL)中。加入EDCI(277mg,1.77mmol)和HOBt(240mg,1.77mmol),将所得混合物在室温下搅拌10分钟,然后加入(2S,3R,4S,6S)-4-(乙酰氧基)-6-(氨基氧基)-2-甲氧基-3-基乙酸酯(211)(437mg,



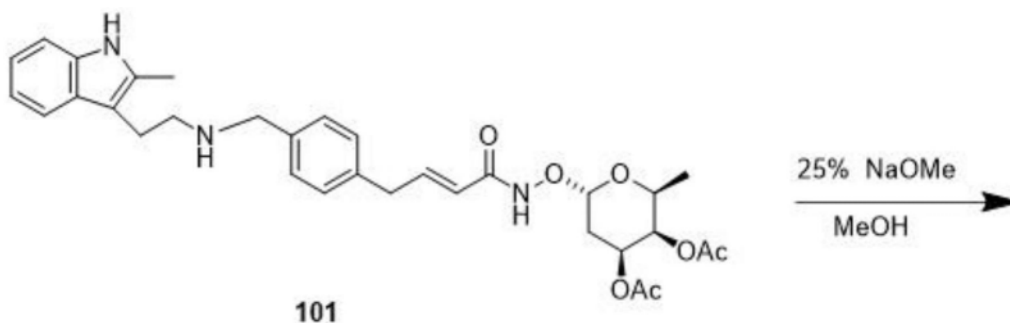
[0315] 1.4mmol) 在二氯甲烷 (1.0mL) 和DIPEA (0.29mL) 中的溶液。2小时后,通过加入饱和氯化铵 (5mL) 淬灭反应混合物,并用EtOAc (2×50mL) 萃取。用盐水 (25mL) 洗涤合并的有机层,用无水硫酸钠干燥并浓缩,得到粗产物。在快速硅胶柱上纯化 (10-70%EtOAc在己烷中),提供 (2S,3R,4S,6S) -3-(乙酰氧基)-6-{[(2E)-3-[4-({[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基][2-(2-甲基-1H-吡啶-3-基)乙基]氨基}甲基)苯基]丙-2-烯酰胺]氧基}-2-甲氧基-4-基乙酸酯 (212) (540mg,产率54%)。LC/MS (方法B):RT=6.19分钟;m/z=785.3,实测值=786.7 [m⁺H]。总时间=12分钟。

[0316] 实施例1: (2S,3R,4S,6S) -3-(乙酰氧基)-2-甲基-6-{{(2E)-3-[4-({[2-(2-甲基-1H-吡啶-3-基)乙基]氨基)甲基]苯基}丙基-2-烯酰胺]氧基}氧-4-基乙酸酯, (101)

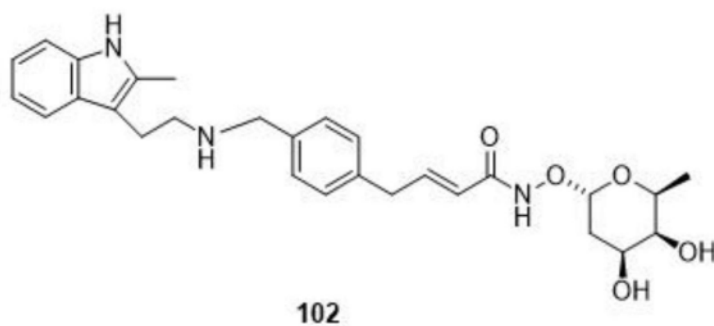


[0318] 向 (2S,3R,4S,6S)-3-(乙酰氧基)-6-[[(2E)-3-[4-([(9H-芴-9-基甲氧基) 羰基] [2-(2-甲基-1H-吡啶-3-基) 乙基] 氨基) 甲基) 苯基] 丙-2-烯酰胺] 氧基]-2-甲氧基-4-基乙酸酯 (212) (700mg, 0.89mmol, 1.0eq) 在 DMF (3.0mL) 中的溶液中加入三乙胺 (3.0mL)。在室温下搅拌反应混合物, 直到 LCMS 指示起始材料的完全消耗。加入饱和冷碳酸氢钠溶液 (20mL), 用乙酸乙酯 (3×30mL) 萃取反应混合物。在减压下浓缩合并的有机层以得到粗产物, 该粗产

物通过使用碳酸氢铵缓冲液的反相HPLC纯化以获得 (2S,3R,4S,6S) -3-(乙酰氧基)-2-甲基-6-[[(2E)-3-[4-({[2-(2-甲基-1H-吡咯-3-基)乙基]氨基}甲基)苯基]丙基-2-烯酰胺]氧基}氧-4-基乙酸酯 (101)。LC/MS (方法C): RT=1.98分钟; m/z=563.2, 实测值=564.4[m⁺H]⁺。总时间=6分钟。



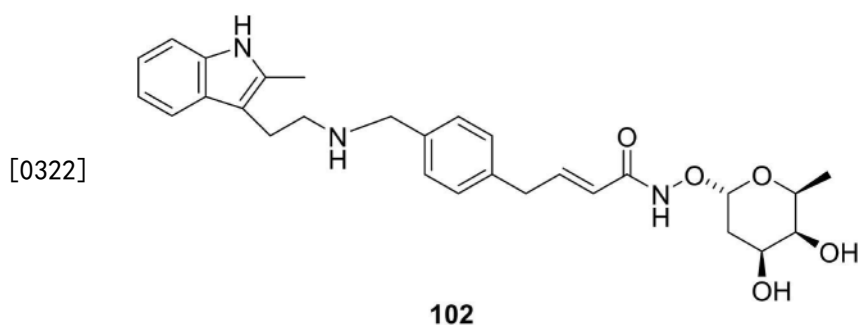
[0319]



方案4

[0320] 方案4说明了化合物102的制备。

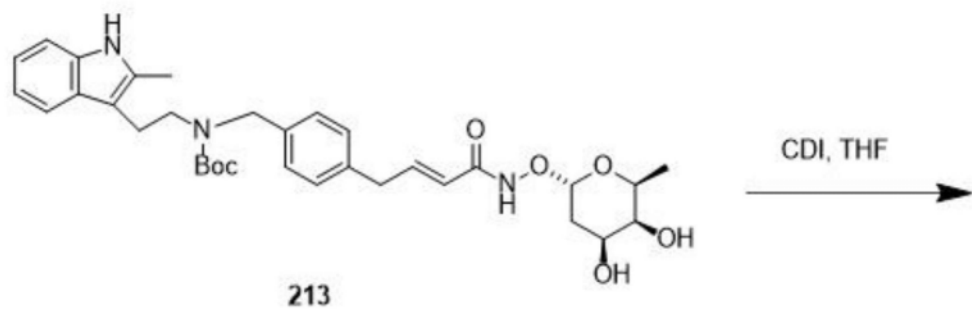
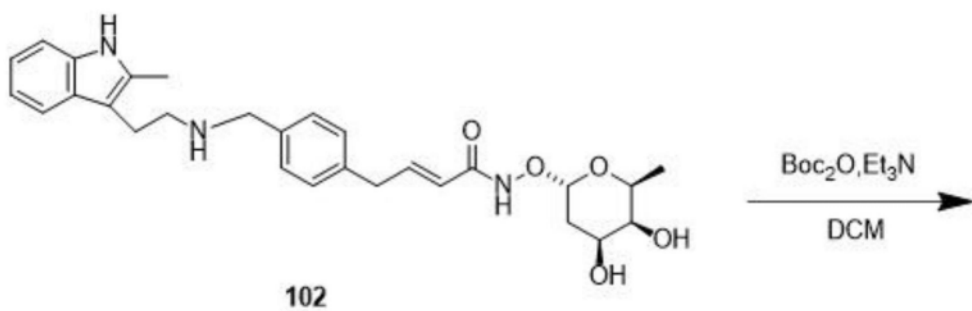
[0321] 实施例2: (2E)-N-[[(2S,4S,5S,6S) -4,5-二羟基-6-甲基氧基-2-基]氧基]-3-[4-({[2-(2-甲基-1H-吡咯-3-基)乙基]氨基}甲基)苯基]丙-2-烯酰胺 (102)



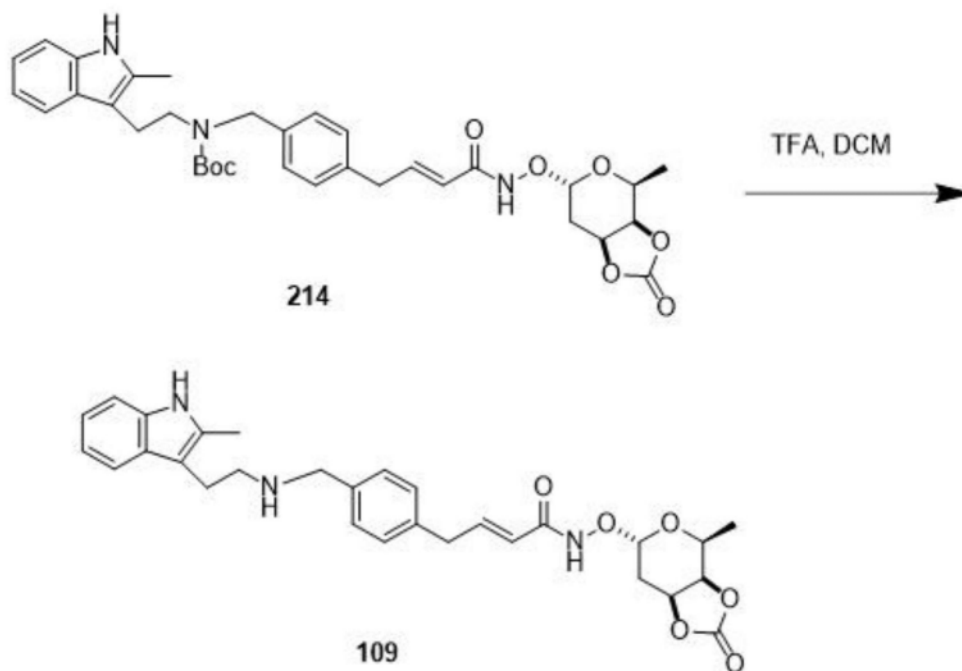
[0322]

[0323] 在冰浴/水浴中,向 (2S,3R,4S,6S) -3-(乙酰氧基)-2-甲基-6-[[(2E)-3-[4-({[2-(2-甲基-1H-吡咯-3-基)乙基]氨基}甲基)苯基]丙基-2-烯酰胺]氧基}氧-4-基乙酸酯 (101) (230mg, 0.4mmol, 1.0eq) 的甲醇 (4.0mL) 溶液中加入25% 甲醇钠的甲醇 (0.06mL, 0.28mmol) 溶液。将反应混合物逐渐升至室温并搅拌直至LCMS指示完成。将反应混合物在冰浴/水浴中冷却,并通过加入1N盐酸水溶液 (0.1mL) 淬灭,直到pH达到约7。在减压下浓缩反应混合物,并使用碳酸氢铵缓冲液通过反相HPLC纯化粗物质以获得所需产物 (2E)-N-[[(2S,4S,5S,6S) -4,5-二羟基-6-甲基氧基-2-基]氧基]-3-[4-({[2-(2-甲基-1H-吡咯-3-

基)乙基]氨基}甲基)苯基]丙-2-烯酰胺(102)(70mg,36%产率)。LC/MS(方法C):RT=1.44分钟;m/z=479.2,实测值=480.1[m⁺H]⁺。总时间=6分钟。¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) δ11.10(d,J=62.0Hz,1H),10.64(s,1H),7.53-7.40(m,3H),7.34(dd,J=8.0,2.7Hz,3H),7.19(d,J=7.9Hz,1H),6.97-6.91(m,1H),6.90-6.84(m,1H),6.44(d,J=15.9Hz,1H),5.01(d,J=3.8Hz,1H),4.64(d,J=6.0Hz,1H),4.37(d,J=4.7Hz,1H),4.04(d,J=7.0Hz,1H),3.73(s,2H),3.42(d,J=8.0Hz,1H),2.77(t,J=7.4,7.4Hz,2H),2.66(t,J=7.4,7.4Hz,2H),2.29(s,3H),1.83(td,J=12.7,12.5,4.0Hz,1H),1.76-1.64(m,1H),1.11(d,J=6.5Hz,3H)。



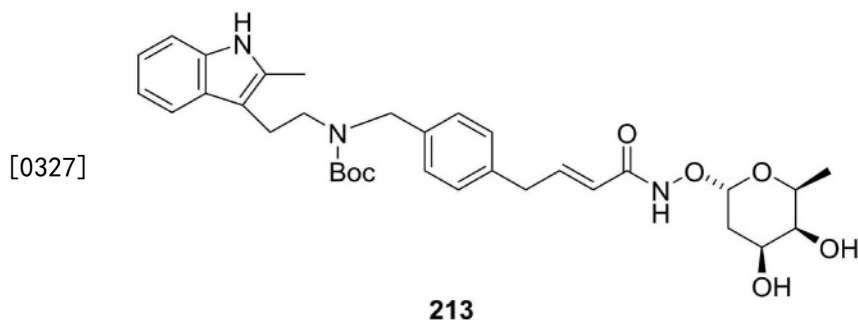
[0324]



方案5

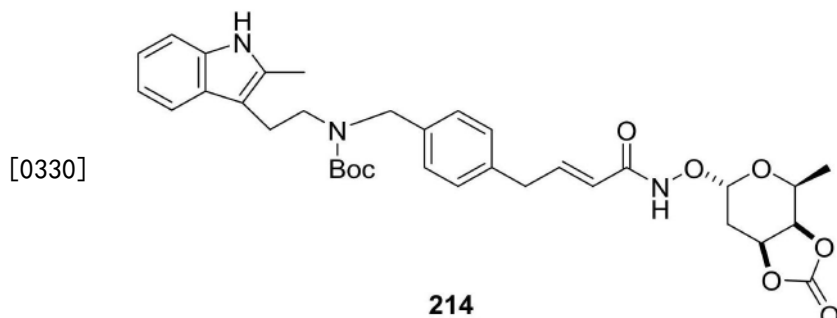
[0325] 方案5说明了化合物109的制备。

[0326] 叔丁基N-({4-[(1E)-2-({[(4S,5S,6S)-4,5-二羟基-6-甲基氧-2-基]氧基}氨基甲酰基)乙基-1-烯-1-基]苯基}甲基)-N-[2-(2-甲基-1H-吡咯-3-基)乙基]氨基甲酸酯(213)



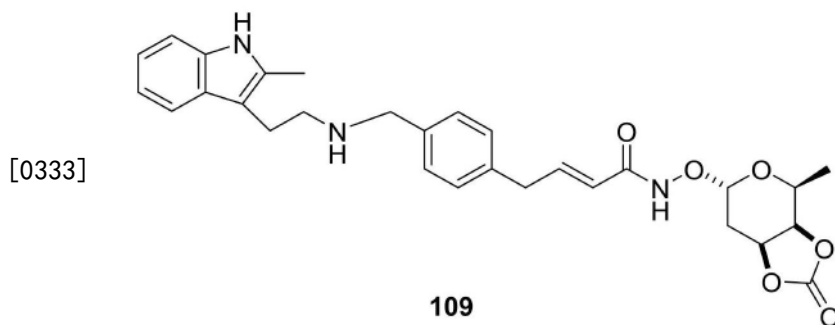
[0328] 向(2S,3R,4S,6S)-3-(乙酰氧基)-2-甲基-6-{[(2E)-3-[4-({[2-(2-甲基-1H-吡啶-3-基)乙基]氨基)甲基]苯基]丙基-2-烯酰胺]氧基}氧-4-基乙酸酯(101)(100mg, 0.208mmol)的DCM(2mL)溶液中加入(Boc)₂O(64mg, 0.292mmol)和三乙胺(0.072mL, 0.416mmol)。将反应混合物在40℃下搅拌3小时,并在减压下除去溶剂,得到粗叔丁基N-({4-[(1E)-2-({[(4S,5S,6S)-4,5-二羟基-6-甲基氧-2-基]氧基}氨基甲酰基)乙基-1-烯-1-基]苯基}甲基)-N-[2-(2-甲基-1H-吡啶-3-基)乙基]氨基甲酸酯(213),其在下一步骤中使用,无需任何进一步纯化。LC/MS(方法A):RT=2.81分钟;m/z=579.6,实测值=580.5[m⁺H]。总时间=6分钟。

[0329] 叔丁基N-({4-[(1E)-2-({[(3aR,4S,7aS)-4-甲基-2-氧代-六氢-[1,3]二氧杂环[4,5-c]吡喃-6-基]氧基}氨基甲酰基)乙基-1-烯-1-基]苯基}甲基)-N-[2-(2-甲基-1H-吡啶-3-基)乙基]氨基甲酸酯(214)

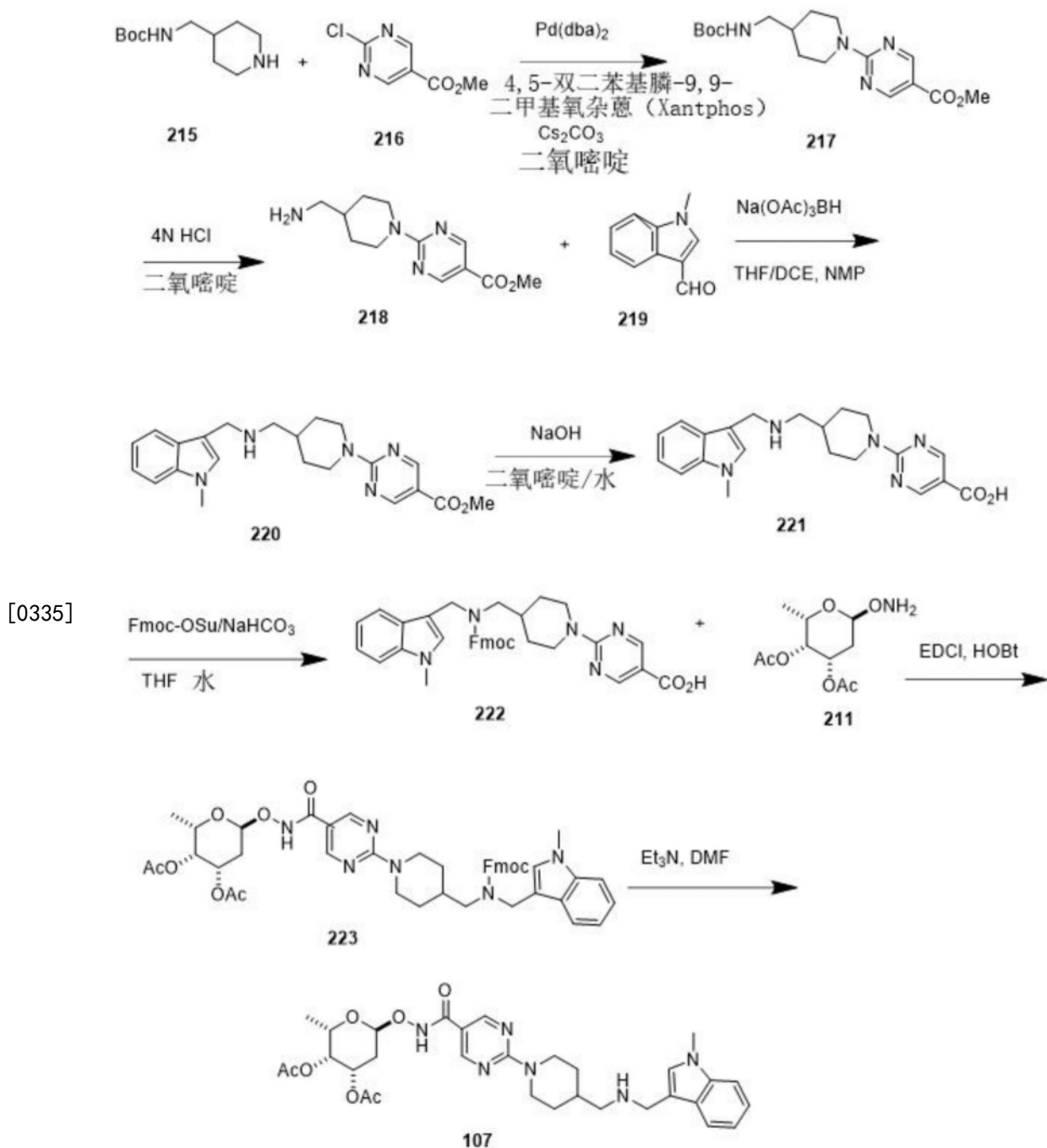


[0331] 向叔丁基N-({4-[(1E)-2-({[(4S,5S,6S)-4,5-二羟基-6-甲基氧-2-基]氧基}氨基甲酰基)乙基-1-烯-1-基]苯基}甲基)-N-[2-(2-甲基-1H-吡啶-3-基)乙基]氨基甲酸酯(213)(来自先前步骤的粗品, 0.208mmol)在THF(2mL)中的溶液中加入CDI(50mg, 0.308mmol)将反应混合物在55℃下搅拌18小时,并在减压下浓缩,得到粗的叔丁基N-({4-[(1E)-2-({[(3aR,4S,7aS)-4-甲基-2-氧代-六氢-[1,3]二氧杂环[4,5-c]吡喃-6-基]氧基}氨基甲酰基)乙基-1-烯-1-基]苯基}甲基)-N-[2-(2-甲基-1H-吡啶-3-基)乙基]氨基甲酸酯(214),其用于下一步,而不进行任何纯化。LC/MS(方法A):RT=3.2min;m/z=605.7,实测值=606.7[m⁺H]⁺。总时间=6分钟。

[0332] 实施例3: (2E)-N-{[(3aR,4S,7aS)-4-甲基-2-氧代-六氢-[1,3]二氧并[4,5-c]吡喃-6-基]氧基}-3-[4-({[2-(2-甲基-1H-吡啶-3-基)乙基]氨基)甲基]苯基]丙-2-烯酰胺(109)

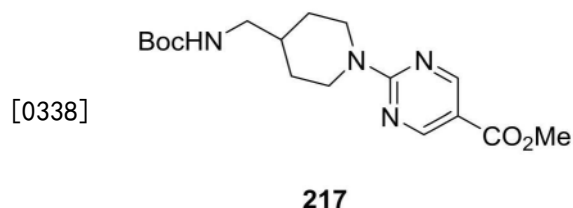


[0334] 将先前步骤中获得的粗叔丁基N-({4-[(1E)-2-({[(3aR,4S,7aS)-4-甲基-2-氧代-六氢-[1,3]二氧杂环[4,5-c]吡喃-6-基]氧基}氨基甲酰基)乙基-1-烯-1-基]苯基}甲基)-N-[2-(2-甲基-1H-吡啶-3-基)乙基]氨基甲酸酯(214)(0.208mmol)溶于DCM(2mL)中的20%TFA中。将反应混合物在50℃下加热1小时,并在减压下浓缩。通过反相HPLC纯化粗残留物,得到白色固体形式的(2E)-N-{{[(3aR,4S,7aS)-4-甲基-2-氧代-六氢-[1,3]二氧并[4,5-c]吡喃-6-基]氧基}-3-[4-({[2-(2-甲基-1H-吡啶-3-基)乙基]氨基}甲基)苯基]丙-2-烯酰胺(109)(12.5mg,三步产率12%)。LC/MS(方法C):RT=2.1Min;m/z=505.2,实测值=506.2[m⁺H]⁺。总时间=6分钟。¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) δ10.63(s,1H),7.48(t,J=14.8,14.8Hz,3H),7.36-7.31(m,3H),7.19(d,J=7.9Hz,1H),6.96-6.90(m,1H),6.87(t,J=7.0,7.0Hz,1H),6.44(d,J=16.0Hz,1H),5.13(d,J=8.5Hz,1H),5.04(t,J=7.0,7.0Hz,1H),4.74(dd,J=8.7,1.8Hz,1H),4.18(d,J=6.1Hz,1H),3.72(s,2H),2.77(t,J=7.4,7.4Hz,2H),2.66(t,J=7.4,7.4Hz,2H),2.28(s,3H),1.91(d,J=17.4Hz,1H),1.16(d,J=6.6Hz,3H)。



[0336] 方案6说明了化合物107的制备。

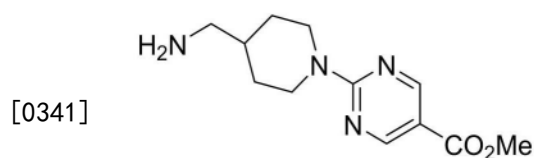
[0337] 2-[4-(叔丁氧基羰基氨基甲基)-哌啶-1-基]-嘧啶-5-羧酸甲酯 (217)



[0339] 用碳酸铯 (18g, 57mmol) 和 Pd (dba) 2-丙酮 (1.56g, 1.7mmol) 处理中的叔丁基(哌啶-4-基甲基)氨基甲酸酯 (215) (5g, 23mmol, 1.0eq) 和 2-氯嘧啶-5-羧酸甲酯 (216) (4.8g,

28mmol) 的二恶烷 (90mL) 溶液。用氮气 (3×) 吹打该溶液, 并一次性加入 Xantphos (1.99g, 3.45mmol)。悬浮液在几分钟内从暗红色变为黄绿色。然后将反应混合物在 70°C 下加热 30 分钟, 此时 LCMS 分析显示存在所需产物。将混合物冷却至室温, 通过硅藻土垫过滤, 并用二氯甲烷 (3×40mL) 洗涤。除去溶剂, 残留物进行正相纯化, 用己烷-乙酸乙酯 (40-100%) 洗脱。收集、合并并浓缩产物馏分, 得到 2-[4-(叔丁氧基羰基氨基甲基)-哌啶-1-基]-嘧啶-5-羧酸甲酯 (217) (5g, 产率 61%), 为灰白色固体。LC/MS (方法 A): RT=3.23 分钟; m/z=350.4, 实测值=351.6 [m⁺H]⁺。总时间=6 分钟。

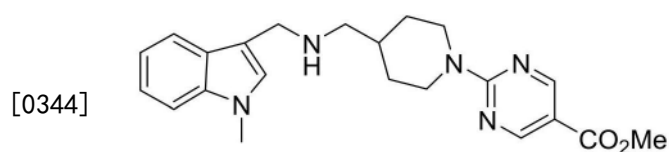
[0340] 2-(4-氨基甲基-哌啶-1-基)-嘧啶-5-羧酸甲酯盐酸盐 (218)



218

[0342] 2-[4-(叔丁氧基羰基氨基甲基)-哌啶-1-基]-嘧啶-5-羧酸甲酯 (217) (2.8g, 8mmol) 溶于 THF (30mL) 中。加入 4N HCl/二恶烷 (10mL), 将溶液在 70°C 下加热 2 小时, 在此期间沉淀固体。过滤沉淀物, 用醚/己烷 (3×) 洗涤, 并在高真空下干燥, 得到白色固体的 2-(4-氨基甲基-哌啶-1-基)-嘧啶-5-羧酸甲酯盐酸盐 (218) (2.3g, 定量)。LC/MS (方法 A): RT=1.89 分钟; m/z=250.3, 实测值=251.4 [m⁺H]⁺。总时间=6 分钟。

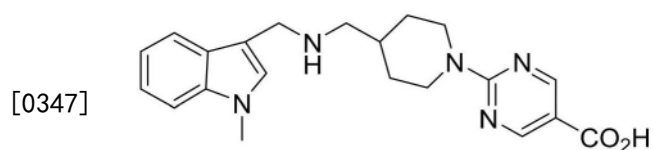
[0343] 2-(4-(((1-甲基-1H-吡咯-3-基)甲基)氨基)甲基)哌啶-1-基)嘧啶-5-羧酸甲酯 (220)



220

[0345] 向 2-(4-氨基甲基-哌啶-1-基)-嘧啶-5-羧酸甲酯盐酸盐 (218) (2.3g, 8mmol) 和三乙胺 (4mL, 28mmol, 3.5eq) 的 THF:DCE (1:1) 5% 甲醇 (30mL) 中一次性加入 1-甲基-1H-吡咯-3-甲醛 (219) (1.2g, 7.6mmol)。加入三乙酰氧基硼氢化钠 (9.8g, 48mmol), 然后加入乙酸 (0.5mL)。然后, 加入 NMP (1.1mL), 将混合物在室温下搅拌 2 天, 直到 LCMS 分析显示形成所需产物。加入水, 用碳酸氢钠将 pH 调节至 7, 过滤白色固体并用水 (10mL) 和乙酸乙酯 (20mL) 洗涤。在高真空下干燥产物, 得到白色固体 2-(4-(((1-甲基-1H-吡咯-3-基)甲基)氨基)甲基)哌啶-1-基)嘧啶-5-羧酸甲酯 (220) (3g, 产率 95%)。在下一步骤中使用该材料而无需进一步纯化。LC/MS (方法 A): RT=2.3 分钟; m/z=393.4, 实测值=394.5 [m⁺H]⁺。总时间=6 分钟。

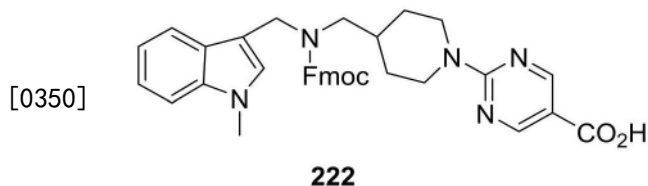
[0346] 2-(4-(((1-甲基-1H-吡咯-3-基)甲基)氨基)甲基)哌啶-1-基)嘧啶-5-羧酸 (221)



221

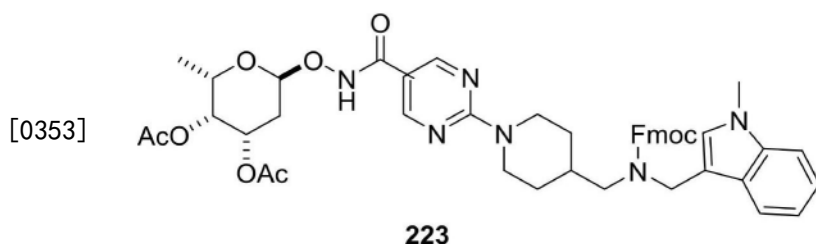
[0348] 将2-(4-(((1-甲基-1H-吡啶-3-基)甲基)氨基)甲基)哌啶-1-基)嘧啶-5-羧酸甲酯(220)(3.3g,8.4mmol)和氢氧化钠(2.76mg,69mmol)粗品悬浮在二恶烷/水(3:1)(30.0mL)中。将溶液在70℃下加热2小时,直到LCMS分析显示完全反应。去除二恶烷,并将混合物酸化至pH~5。沉淀物用水洗涤,然后用己烷洗涤。将灰色固体在高真空下干燥,得到纯2-(4-(((1-甲基-1H-吡啶-3-基)甲基)氨基)甲基)哌啶-1-基)嘧啶-5-羧酸(221)(2.1g,产率66%)。LC/MS(方法A):RT=2.41分钟;m/z=379.4,实测值=380.6[m⁺H]。总时间=6分钟。

[0349] 2-(4-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)((1-甲基-1H-吡啶-3-基)甲基)氨基)甲基)哌啶-1-基)嘧啶-5-羧酸(222)



[0351] 2-(4-(((1-甲基-1H-吡啶-3-基)甲基)氨基)甲基)哌啶-1-基)嘧啶-5-羧酸(221)(1.3g,3.43mmol)和碳酸氢钠(720mg,8.5mmol)悬浮在THF:水(3:1)(20mL)中。在1小时内分批加入Fmoc-OSu(1.21g,3.63mmol),然后加入N-甲基-2-吡咯烷酮(1.2mL)。搅拌反应直至LCMS分析显示反应完成,真空浓缩并用水(10mL)稀释。加入固体碳酸氢钠调节至pH~8,并用乙酸乙酯(2×25mL)萃取水溶液。合并的有机层被丢弃。用1NHC1将水层酸化至pH~2,并用乙酸乙酯(3×30mL)萃取。将合并的有机层用盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥,并在减压下浓缩,得到白色泡沫状的所需产物2-(4-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)((1-甲基-1H-吡啶-3-基)甲基)氨基)甲基)哌啶-1-基)嘧啶-5-羧酸(222)(1.55g,产率76%)。LC/MS(方法A):RT=3.96min;m/z=601.7,实测值=602.3[m⁺H]。总时间=6分钟。

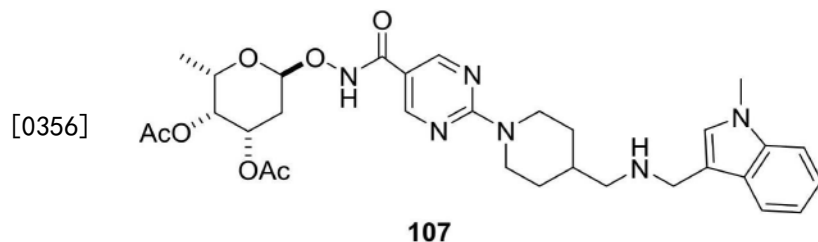
[0352] (2S,3R,4S,6S)-3-(乙酰氧基)-6-[(2-[4-((9H-芴-9-基甲氧基)羰基)[(1-甲基-1H-吡啶-3-基)甲基]氨基)甲基)哌啶-1-基)嘧啶-5-基]甲酰胺基)氧基]-2-甲氧基-4-基乙酸酯(223)



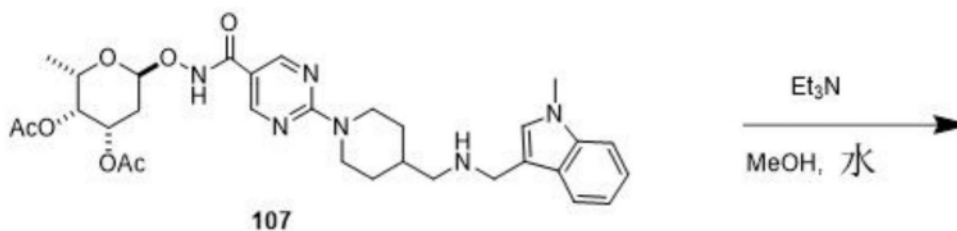
[0354] 向2-(4-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)((1-甲基-1H-吡啶-3-基)甲基)氨基)甲基)哌啶-1-基)嘧啶-5-羧酸(222)(250mg,0.41mmol)的DMF(1.3mL)溶液中加入EDCI(109mg,0.57mmol)和HOBT(87mg,0.41mmol)。将所得混合物在室温下搅拌15分钟。加入(2S,3R,4S,6S)-4-(乙酰氧基)-6-(氨基氧基)-2-甲氧基-3-乙酸酯化合物(211)(100mg,0.404mmol)在DCM/DMF(1:1;0.4mL)和DIPEA(0.1mL)中的溶液,并搅拌反应混合物2小时。通过加入氯化铵饱和水溶液(5mL)使反应终止,并用乙酸乙酯(2×15mL)萃取。合并的有机层用10%碳酸氢钠水溶液(10mL)和盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥并真空浓缩,得到粗产物,该粗产物通过硅胶快速色谱法(含30-70%乙酸乙酯的己烷)纯化,得到(2S,3R,4S,6S)-3-(乙

酰氧基)-6-[(2-[4-((9H-芴-9-基甲氧基)羰基)[(1-甲基-1H-吡啶-3-基)甲基]氨基]甲基)哌啶-1-基]嘧啶-5-基]甲酰胺基)氧基]-2-甲氧基-4-基乙酸酯(223)(200mg, 58%产率), 为黄色泡沫。LC/MS(方法B): RT=7.06分钟; m/z=830.4, 实测值=831.1[m⁺H]⁺。总时间=12分钟。

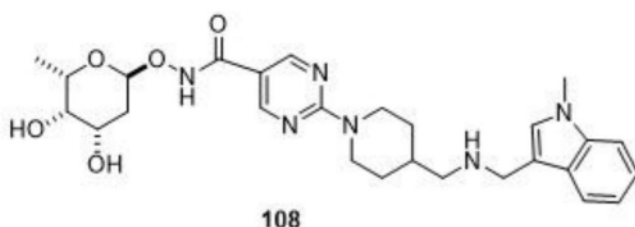
[0355] 实施例4: (2S, 3R, 4S, 6S)-3-(乙酰氧基)-2-甲基-6-[(2-[4-((1-甲基-1H-吡啶-3-基)甲基]氨基)甲基)哌啶-1-基]嘧啶-5-基]甲酰胺基)氧基]氧杂-4-基乙酸酯(107)



[0357] (2S, 3R, 4S, 6S)-3-(乙酰氧基)-2-甲基-6-[(2-[4-((9H-芴-9-基甲氧基)羰基)[(1-甲基-1H-吡啶-3-基)甲基]氨基]甲基)哌啶-1-基]嘧啶-5-基]甲酰胺基)氧基]-2-甲氧基-4-基乙酸酯(223)(200mg, 0.24mmol)溶于DMF(2.0mL)中。一份加入三乙胺(2.0mL), 将所得反应混合物在室温下搅拌过夜。然后, 加入饱和碳酸氢钠水溶液(10mL), 并用乙酸乙酯(3×20mL)萃取反应混合物。合并的有机层用盐水洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 并在减压下浓缩, 得到粗产物(120mg)。使用碳酸氢铵缓冲液通过反相HPLC纯化40mg部分的该粗物质, 得到(2S, 3R, 4S, 6S)-3-(乙酰氧基)-2-甲基-6-[(2-[4-((1-甲基-1H-吡啶-3-基)甲基]氨基)甲基)哌啶-1-基]嘧啶-5-基]甲酰胺基)氧基]氧杂-4-基乙酸酯(107)(19mg, 39%产率)。LC/MS(方法C): RT=2.31分钟; m/z=608.3, 实测值=609.4[m⁺H]⁺。总时间=6分钟。¹H NMR(500MHz, DMSO-d₆) δ8.62(s, 2H), 7.59(dt, J=7.9, 1.0, 1.0Hz, 1H), 7.35(dd, J=8.2, 0.9Hz, 1H), 7.17(s, 1H), 7.11(ddd, J=8.3, 7.1, 1.3Hz, 1H), 6.98(ddd, J=7.9, 7.0, 1.1Hz, 1H), 5.21(t, J=2.7, 2.7Hz, 1H), 5.14(ddd, J=11.0, 6.8, 3.0Hz, 1H), 5.11-5.07(m, 1H), 4.68(d, J=13.2Hz, 2H), 4.46(q, J=6.2, 6.2, 6.2Hz, 1H), 3.81(s, 2H), 3.72(s, 3H), 2.91(td, J=13.1, 12.8, 2.7Hz, 2H), 2.44(d, J=6.5Hz, 2H), 2.10(s, 3H), 1.99-1.94(m, 2H), 1.93(s, 3H), 1.81-1.70(m, 3H), 1.09-1.02(m, 2H), 1.01(d, J=6.5Hz, 3H)。



[0358]

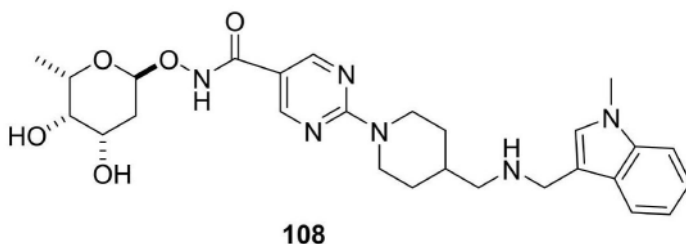


方案7

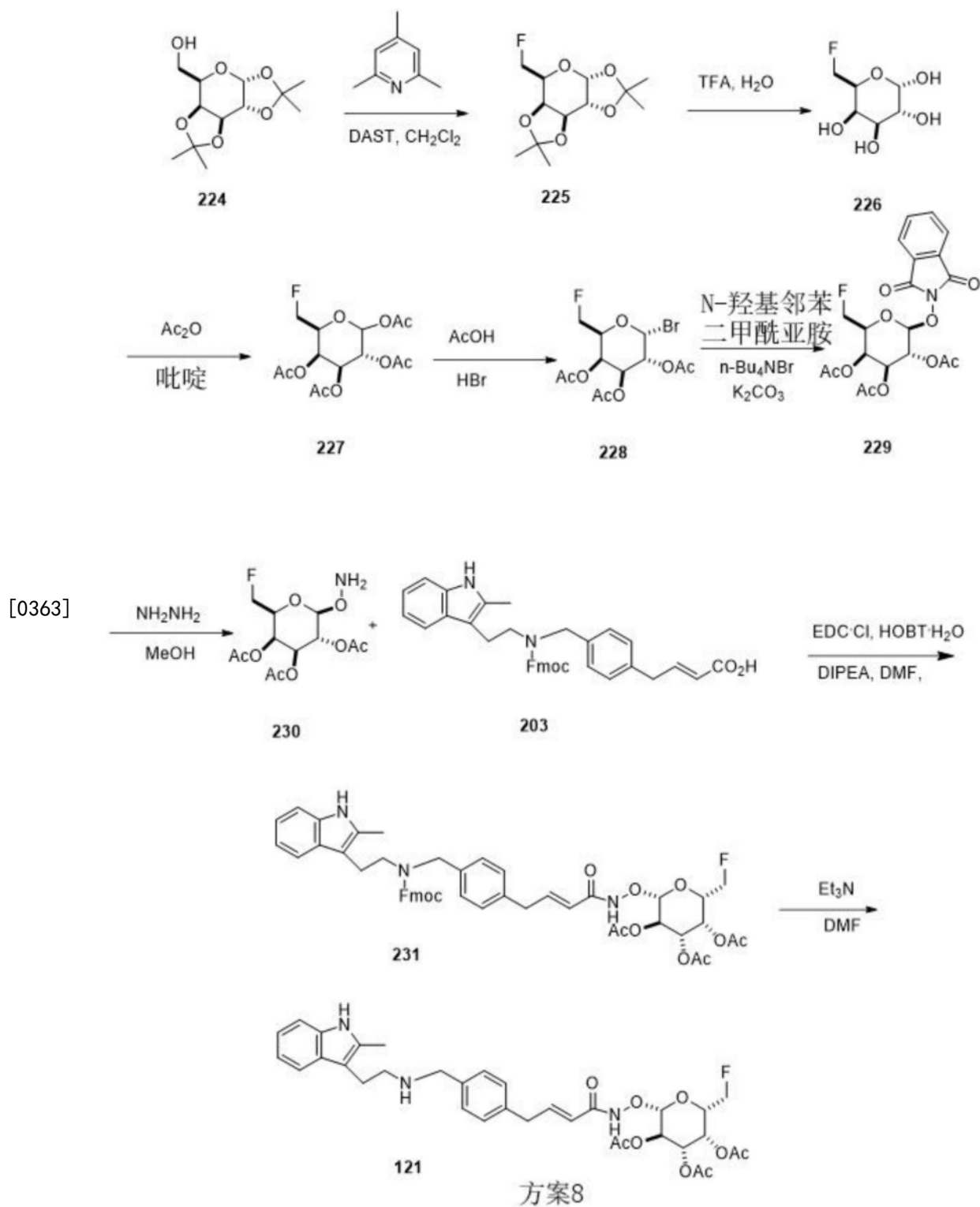
[0359] 方案7说明了化合物108的制备。

[0360] 实施例5:N-[[(2S,4S,5S,6S) -4,5-二羟基-6-甲基氧杂环己烷-2-基]氧基]-2-[4-({[(1-甲基-1H-吡啶-3-基)甲基]氨基}甲基)哌啶-1-基]嘧啶-5-甲酰胺 (108)

[0361]

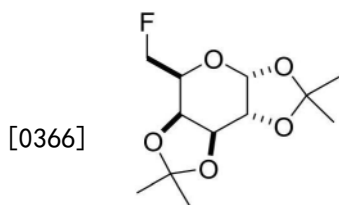


[0362] (2S,3R,4S,6S) -3-(乙酰氧基)-2-甲基-6-[(2-[4-({[(1-甲基-1H-吡啶-3-基)甲基]氨基}甲基)哌啶-1-基]嘧啶-5-基]甲酰胺基]氧基]氧杂-4-基乙酸酯 (107) (80mg, 0.131mmol) 悬浮于甲醇:水 (2:1; 2.0mL) 中。加入三乙胺 (0.4mL), 将所得混合物在55℃下加热6小时。真空浓缩反应混合物, 随后使用碳酸氢铵缓冲液通过反相HPLC纯化, 得到N-[[(2S,4S,5S,6S) -4,5-二羟基-6-甲基氧杂环己烷-2-基]氧基]-2-[4-({[(1-甲基-1H-吡啶-3-基)甲基]氨基}甲基)哌啶-1-基]嘧啶-5-甲酰胺 (108) (60.5mg, 88% 产率)。LC/MS (方法C): RT=1.82分钟; m/z=524.3, 实测值=525.7 [m⁺H]。总时间=6分钟。¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 8.62 (s, 2H), 7.59 (dt, J=7.9, 1.1, 1.1Hz, 1H), 7.35 (dd, J=8.3, 1.0Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.11 (ddd, J=8.2, 7.0, 1.3Hz, 1H), 6.98 (ddd, J=8.1, 7.0, 1.1Hz, 1H), 5.05 (d, J=3.5Hz, 1H), 4.68 (dt, J=12.3, 3.0, 3.0Hz, 2H), 4.64 (d, J=6.3Hz, 1H), 4.35 (d, J=4.6 Hz, 1H), 4.11 (d, J=6.6 Hz, 1H), 3.81 (s, 2H), 3.79-3.74 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.42 (t, J=3.9, 3.9 Hz, 1H), 2.92 (td, J=13.1, 12.9, 2.7 Hz, 2H), 2.44 (d, J=6.5 Hz, 2H), 1.88-1.66 (m, 5H), 1.08 (d, J=6.6 Hz, 3H), 1.02 (ddd, J=15.6, 8.4, 3.6 Hz, 2H)。



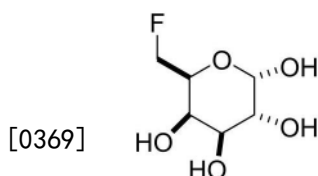
[0364] 方案8说明了化合物121的制备。

[0365] (1S,2R,6R,8S,9R)-8-(氟甲基)-4,4,11,11-四甲基-3,5,7,10,12-五氧杂环[7.3.0.0.02,6]十二烷(225)

**225**

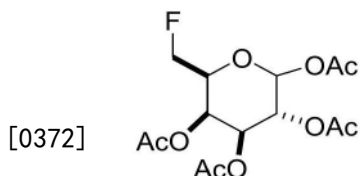
[0367] 向1,2:3,4-Di-O-异亚丙基- α -D-吡喃半乳糖(224)(1.7mL,7.68mmol,1.00eq)的二氯甲烷(20mL)溶液中加入2,4,6-三甲基吡啶(2.4mL,18.4mmol,2.40eq)。将混合物冷却至0°C,并用(二乙基胺)三氟化硫(1.2mL,9.22mmol,1.20eq)使反应混合物在室温下在氮气下搅拌,并通过TLC(乙酸乙酯:环己烷1:1)进行监测。18小时后,用二氯甲烷稀释反应混合物,用饱和碳酸氢钠、盐水(25mL)洗涤,过滤干燥(Na_2SO_4)并蒸发挥发物。残留物通过硅胶快速色谱法(用乙酸乙酯:环己烷(0-20%)洗脱)纯化,得到无色糖浆状的目标化合物(225)(913mg,45%)。 ^1H NMR(300MHz, CDCl_3): δ 5.55(d,J=4.9Hz,1H),4.69-4.58(m,2H),4.48(dq,J=6.1,8.9Hz,1H),4.35(ddd,J=2.5,2.5,2.5Hz,1H),4.27(dd,J=2.0,8.0Hz,1H),4.13-4.03(m,1H),1.55(s,3H),1.45(s,3H),1.34(s,6H)。

[0368] (3R,4S,5R,6S)-6-(氟甲基)四氢吡喃-2,3,4,5-四醇(226)

**226**

[0370] (1S,2R,6R,8S,9R)-8-(氟甲基)-4,4,11,11-四甲基-3,5,7,10,12-五氧杂环[7.3.0.0^{2,6}.0^{4,11}.0^{8,9}]十二烷(225)(913mg,3.48mmol,1.00eq)用三氟乙酸(8.0mL,0.104mol,30.0eq)和水(0.92mL)的混合物处理。反应混合物在室温下搅拌,并通过TLC(乙酸乙酯:环己烷1:1)进行监测。0.5h后,用甲苯稀释反应物并在减压下浓缩,得到粗目标化合物(226)(1.0g)浅米色浆液,直接进入下一个合成步骤。

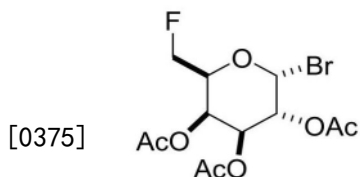
[0371] [(2S,3R,4S,5R)-4,5,6-三乙酰氧基-2-(氟甲基)四氢吡喃-3-基]乙酸酯(227)

**227**

[0373] (3R,4S,5R,6S)-6-(氟甲基)四氢吡喃-2,3,4,5-四醇(634mg,3.48mmol,1.00eq)(226)溶于干燥吡啶(10mL)中,冷却至0°C,并用乙酸酐(3.3mL,34.8mmol,10.0eq)处理。反应混合物在室温下在氮气下搅拌,并通过TLC(1:4乙酸乙酯:二氯甲烷)监测。5小时后,用甲苯(3 $\times$)稀释反应物,并在减压下浓缩以除去任何过量的试剂。通过快速色谱法纯化油状残留物(12g柱状物用乙酸乙酯:二氯甲烷(1:9)洗脱),得到无色油状的目标化合物(227)

(960mg, 79%) (异头混合物)。

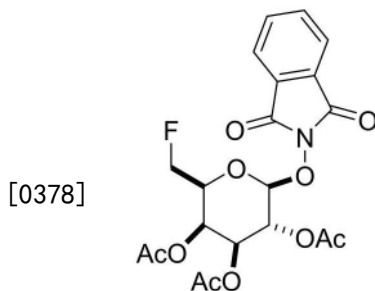
[0374] [(2S, 3R, 4S, 5R, 6R) -4, 5--二乙酰氧基-6-溴-2-(氟甲基)四氢吡喃-3-基]乙酸酯 (228)



228

[0376] 在避光的反应容器中,用溴化氢在乙酸(33%) (1.4mL) 中缓慢处理[(2S, 3R, 4S, 5R) -4, 5, 6-三乙酰氧基-2-(氟甲基)四氢吡喃-3-基]乙酸酯(227) (300mg, 0.856mmol, 1.00eq) 在0℃、氮气气氛下的干二氯甲烷(7mL) 中的溶液。使反应升温至室温并通过TLC进行监测。1小时后,将反应混合物缓慢倒入碳酸氢钠(2.10g) 的冰水(15mL) 溶液中,并搅拌15分钟。使有机层通过相分离柱并浓缩,得到白色固体的目标化合物(229) (300mg, 94%)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) : d 6.72 (d, J=4.2Hz, 1H) , 5.58 (d, J=3.5Hz, 1H) , 5.42 (dd, J=3.2, 10.9Hz, 1H) , 5.08 (dd, J=4.6, 10.6Hz, 1H) , 4.58-4.49 (m, 2H) , 4.39-4.35 (m, 1H) , 2.15 (s, 3H) , 2.12 (s, 3H) , 2.02 (s, 3H) 。

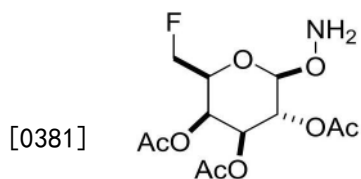
[0377] [(2S, 3R, 4S, 5R, 6S) -4, 5-二乙酰氧基-6-(1, 3-二氧代异吲哚-2-基) 氧基-2-(氟甲基)四氢吡喃-3-基]乙酸酯 (229)



229

[0379] 将N-羟基邻苯二甲酰亚胺(114mg, 0.700mmol, 1.00eq)、四丁基溴化铵(113mg, 0.350mmol, 0.500eq) 在二氯甲烷(0.8mL) 中的红色悬浮液添加到碳酸钾(106mg, 0.770mmol, 1.10eq) 的水(0.8mL) 溶液和[(2S, 3R, 4S, 5R, 6R) -4, 5--二乙酰氧基-6-溴-2-(氟甲基)四氢吡喃-3-基]乙酸酯(228) (260mg, 0.700mmol, 1.00eq) 在二氯甲烷(0.8mL) 中的溶液中。将反应混合物在室温下搅拌24小时,并通过LCMS进行监测。然后将反应混合物在二氯甲烷和饱和碳酸氢钠水溶液之间分配。分离有机层,干燥(Na₂SO₄) ,过滤并蒸发挥发物,得到通过快速色谱法纯化的粗产物(用环己烷:乙酸乙酯(2-60%) 洗脱),得到不纯固体(85mg) ,其通过将其溶解在二氯甲烷中并通过过滤分离杂质而进一步纯化。浓缩滤液,得到目标化合物(229) (65mg, 18%) ,为含灰固体。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) d 7.88-7.83 (m, 2H) , 7.81-7.75 (m, 2H) , 5.53-5.46 (m, 2H) , 5.14 (dd, J=3.7, 9.9Hz, 1H) , 5.03 (d, J=8.8Hz, 1H) , 4.66-4.36 (m, 2H) , 4.04-3.95 (m, 1H) , 2.23 (s, 3H) , 2.20 (s, 3H) , 2.03 (s, 3H) . LC/MS: Rt=1.53min; m/z=476 [M+Na]⁺。

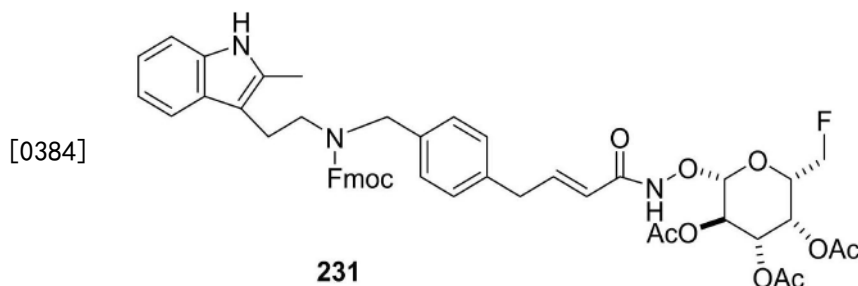
[0380] [(2S,3R,4S,5R,6S)-4,5-二乙酰氧基-6-氨基氧基-2-(氟甲基)四氢吡喃-3-基]乙酸酯(230)



230

[0382] 在0℃下,向[(2S,3R,4S,5R,6S)-4,5-二乙酰氧基-6-(1,3-二氧代异吲哚-2-基)氧基-2-(氟甲基)四氢吡喃-3-基]乙酸酯(229)(280mg,0.618mmol,1.00eq)的甲醇(4mL)悬浮液中缓慢加入一水合肼(98%,0.031mL,0.618mmol,1.00eq)。将反应混合物在0℃下搅拌30分钟,并通过TLC(1:1乙酸乙酯:环己烷)进行监测。通过过滤去除固体并丢弃。滤液用二氯甲烷稀释,用冰冷的碳酸氢钠水溶液、水和盐水洗涤,干燥(Na_2SO_4),过滤并蒸发挥发物,得到固体(169mg),其通过快速色谱法纯化(12g柱用环己烷:乙酸乙酯(5-80%)洗脱),得到白色固体的目标化合物(230)(158mg,79%)。 ^1H NMR:(300MHz, CDCl_3):5.84(s,2H),5.46(d, $J=3.2\text{Hz}$,1H),5.27(dd, $J=8.3,10.4\text{Hz}$,1H),5.06(dd, $J=3.4,10.4\text{Hz}$,1H),4.72(d, $J=8.5\text{Hz}$,1H),4.64-4.34(m,2H),4.06-3.96(m,1H),2.17(s,3H),2.09(s,3H),2.00(s,3H)。

[0383] [(2S,3R,4S,5R,6S)-4,5-二乙酰氧基-6-[[(E)-3-[4-[[9H-氟-9-甲氧基羰基-2-(2-甲基-1H-吡啶-3-基)乙基]氨基]甲基]苯基]丙-2-烯基]氨基]氧基-2-(氟甲基)四氢吡喃-3-基]乙酸酯(231)



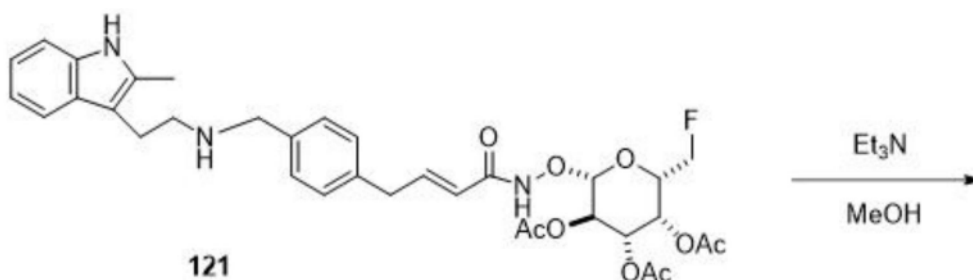
[0385] 向(E)-3-(4-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)(2-(2-甲基-1H-吡啶-3-基)乙基)氨基)甲基)苯基)丙烯酸(189mg,0.340mmol,1.00eq)(203)在N,N-二甲基甲酰胺(6.0mL)中的溶液中一次性加入1-羟基苯并三唑水合物(69mg,0.453mmol,1.33eq)和N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(87mg,0.453mmol,1.33eq)。15分钟后,将混合物冷却至0℃,并缓慢加入[(2S,3R,4S,5R,6S)-4,5-二乙酰氧基-6-氨基氧基-2-(氟甲基)四氢吡喃-3-基]乙酸酯(110mg,0.340mmol,1.00eq)(230)在含有N,N-二异丙基乙胺(0.079mL,0.453mmol,1.33eq)的N,N-甲基甲酰胺(1mL)中的溶液。将所得混合物升至室温并进一步搅拌18小时。将反应混合物冷却至0℃,并通过缓慢加入冷饱和 NH_4Cl 水溶液淬灭,以得到浅黄色沉淀物,通过过滤收集该沉淀物并用水冲洗。将收集的固体溶解在乙酸乙酯中,用水、饱和碳酸氢钠水溶液和盐水洗涤。将有机层干燥(Na_2SO_4),过滤并蒸发挥发物,得到粗产物(254mg),其通过快速色谱法纯化(用环己烷:乙酸乙酯(0-70%)洗脱的12g硅胶柱),得到黄色固体的目标化合物(231)(182mg,62%)。LC/MS: $R_t=1.92$ 分钟; $m/z=862[\text{m}^+\text{H}]^+$ 。

[0386] 实施例6: [(2S,3R,4S,5R,6S)-4,5-二乙酰氧基-2-(氟甲基)-6-[[(E)-3-[4-[[2-

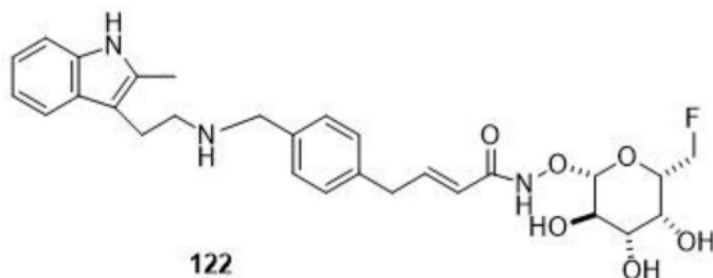
[0387]

121

84



[0389]

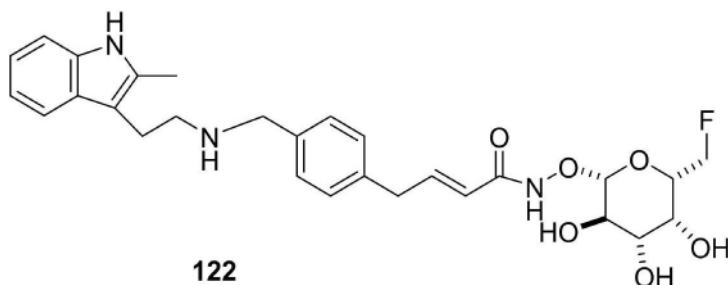


方案8

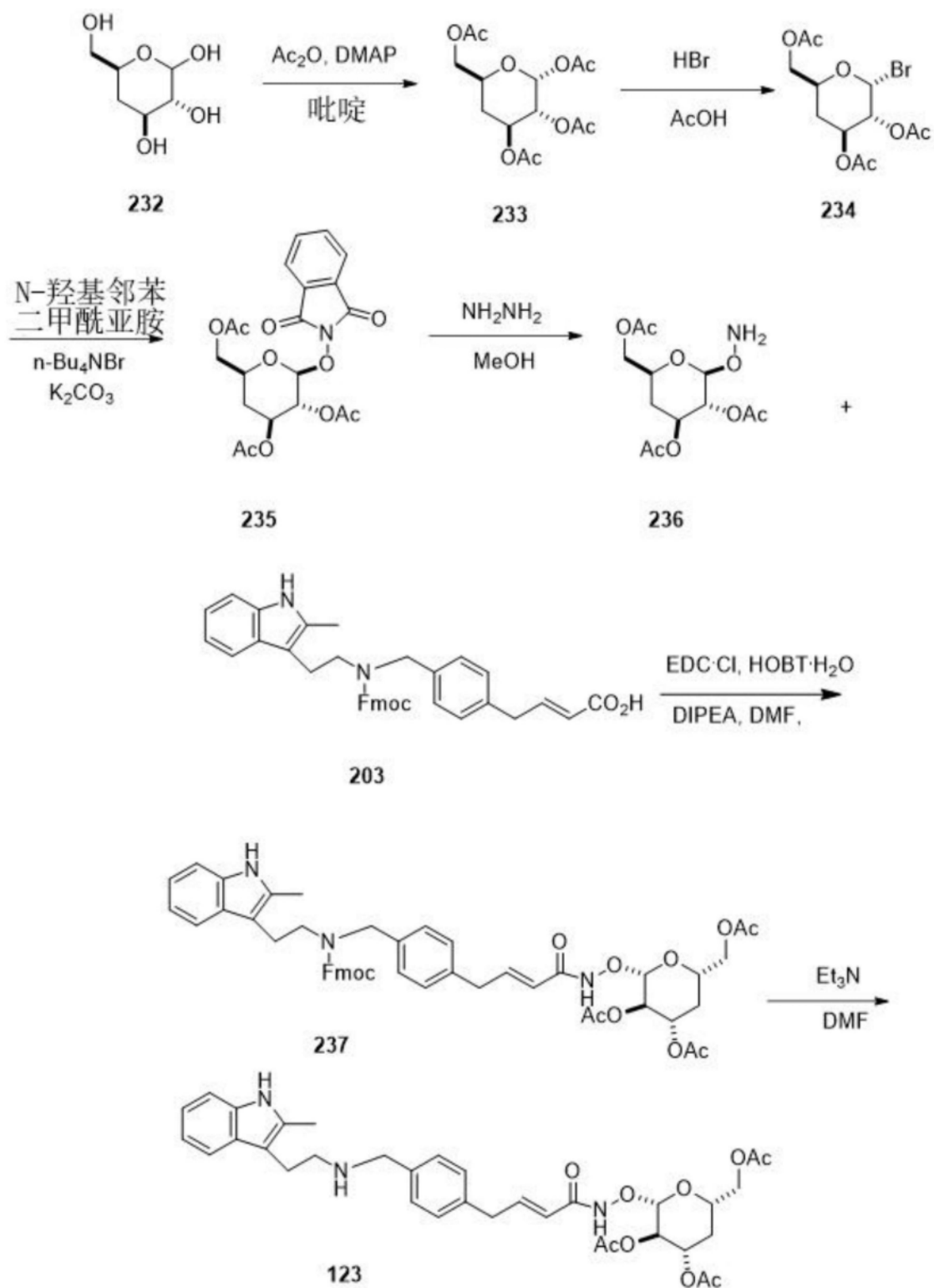
[0390] 方案8说明了化合物122的制备。

[0391] 实施例7: (E)-N-[(2S,3R,4S,5R,6S)-6-(氟甲基)-3,4,5-三羟基-四氢吡喃-2-基]氧基-3-[4-[[2-(2-甲基-1H-吡啶-3-基)乙基氨基]甲基]苯基]丙-2-烯酰胺 (122)

[0392]

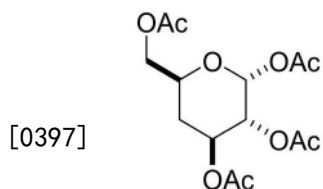


[0393] 向[(2S,3R,4S,5R,6S)-4,5-二乙酰氧基-2-(氟甲基)-6-[[(E)-3-[4-[[2-(2-甲基-1H-吡啶-3-基)乙基氨基]甲基]苯基]丙-2-烯基]氨基]氧基-四氢吡喃-3-基]乙酸酯 (121) (90%, 75mg, 0.106mmol, 1.00eq) 的甲醇 (2.50mL) 溶液中加入水 (0.35mL) 和三乙胺 (0.37mL, 2.65mmol, 25.1eq)。将反应混合物在室温下搅拌24小时。将粗产物浓缩至干燥,溶于CH₃CN:水1:1中,冷冻干燥过夜,得到灰白色固体的目标化合物 (122) (57mg, 99%)。¹H NMR (400MHz, MeOD): δ 7.60-7.49 (m, 3H), 7.38 (d, J=7.8Hz, 1H), 7.29 (d, J=8.0Hz, 2H), 7.24-7.21 (m, 1H), 7.00 (ddd, J=1.0, 7.1, 8.1Hz, 1H), 6.92 (ddd, J=1.0, 7.0, 7.8 Hz, 1H), 6.49 (d, J=15.3 Hz, 1H), 4.68-4.65 (m, 1H), 4.60 (d, J=8.3 Hz, 1H), 4.57-4.53 (m, 1H), 3.92-3.85 (m, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.69 (dd, J=7.9, 9.7 Hz, 1H), 3.58 (dd, J=3.4, 9.7 Hz, 1H), 2.98-2.92 (m, 2H), 2.89-2.85 (m, 2H), 2.34 (s, 3H)。¹⁹F NMR (400 MHz, MeOD) 231.52 ppm。LC/MS: Rt=2.61 min; m/z=514[M+H]⁺。



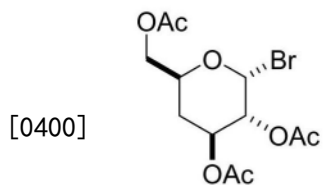
[0395] 方案9说明了化合物123的制备。

[0396] (2R,3R,4S,6S)-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2,3,4-三乙酸三酯 (233)

**233**

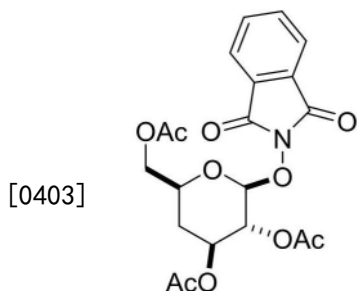
[0398] 在0℃下,在10分钟的时间内,向(3R,4S,6S)-6-(羟甲基)四氢吡喃-2,3,4-三醇(232)(500mg,3.05mmol,1.00eq)和4-(二甲氨基)吡啶(37mg,0.305mmol,0.100eq)的吡啶(10mL)溶液中加入乙酸酐(4.3mL,45.7mmol,15.0eq),将反应混合物在0℃下搅拌2.5小时。将反应混合物浓缩至最小体积,剩余的吡啶与甲苯共蒸发。将油性残留物重新溶解在甲苯中,并用1M HCl、水和盐水洗涤。将有机相干燥(Na_2SO_4),过滤并浓缩,得到目标化合物(233)(993mg,98%)。 ^1H NMR(300MHz, CDCl_3): δ 5.69-5.65(m,1H),5.09-4.99(m,2H),4.19-4.15(m,2H),3.96-3.87(m,1H),2.23-2.16(m,1H),2.12(s,3H),2.10(s,3H),2.06(s,6H),1.73-1.59(m,1H)。

[0399] (2R,3R,4S,6S)-6-(乙酰氧基甲基)-2-溴四氢-2H-吡喃-3,4-二基二乙酸酯(234)

**234**

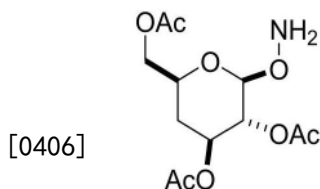
[0401] 向避光的反应容器中加入(2R,3R,4S,6S)-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2,3,4-三乙酸三酯(233)(200mg,0.602mmol,1.00eq.)和二氯甲烷(5mL)。将烧瓶维持在0℃,并在氮气气氛下缓慢加入溴化氢的乙酸溶液(33%)(0.6mL)。将反应混合物在室温下搅拌,并通过TLC进行监测。3小时后,TLC(1:1环己烷:乙酸乙酯)显示预期产物 R_f 为0.60。将粗反应混合物逐份加入含有碳酸氢钠(1.1g)和冰水(8mL)的混合物的烧杯中,并剧烈混合(放出气体)5分钟。分离有机相,并用二氯甲烷(30mL)进一步萃取水相。将合并的有机相干燥(Na_2SO_4),过滤并蒸发挥发物,得到无色油状的目标化合物(234)(200mg,94%)。 ^1H NMR(300MHz, CDCl_3): δ 6.66(d, $J=3.9\text{Hz}$,1H),4.79(dd, $J=3.9,9.9\text{Hz}$,1H),4.43-4.34(m,1H),4.18(d, $J=4.6\text{Hz}$,2H),2.34-2.25(m,1H),2.13(s,3H),2.12(s,3H),2.07(s,3H),1.71(ddd, $J=12.0,12.0,12.0\text{Hz}$,1H)。

[0402] [(2S,4S,5R,6S)-4,5-二乙酰氧基-6-(1,3-二氧代异吲哚-2-基)氧基-四氢吡喃-2-基]乙酸甲酯(235)

**235**

[0404] 向N-羟基邻苯二甲酰亚胺(93mg, 0.570mmol, 0.950eq)和四丁基溴化铵(97mg, 0.300mmol, 0.500eq)的二氯甲烷(0.6mL)溶液中加入碳酸钾(91mg, 0.660mmol, 1.10eq)在水(1.2mL)中的溶液, 然后加入(2R, 3R, 4S, 6S)-6-(乙酰氧基甲基)-2-溴四氢-2H-吡喃-3, 4-二基二乙酸酯(234)在二氯甲烷(1.0mL)中溶液。将反应混合物在黑暗中搅拌24小时, 并通过LCMS进行监测。然后反应混合物在二氯甲烷和饱和碳酸氢钠水溶液之间分配。分离有机层, 并用更多的二氯甲烷萃取水相。使用相分离柱分离合并的有机提取物, 蒸发挥发物得到浅棕色油状物(322mg), 其通过硅胶色谱法(12g柱用环己烷:乙酸乙酯(2-50%)洗脱)纯化, 得到白色泡沫的目标化合物(235)(172mg, 66%)。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ 7.88-7.83(m, 2H), 7.81-7.74(m, 2H), 5.21(dd, J=7.7, 9.1Hz, 1H), 5.13-5.03(m, 1H), 5.01(d, J=7.9Hz, 1H), 4.28(dd, J=5.9, 11.6Hz, 1H), 4.13(d, J=5.1Hz, 1H), 3.85-3.76(m, 1H), 2.25-2.17(m, 1H), 2.21(s, 3H), 2.07(s, 3H), 2.04(s, 3H), 1.76(ddd, J=12.2, 12.2, 12.2Hz, 1H)。LC/MS: Rt=1.49min; m/z=458[M+Na]⁺。

[0405] [(2S, 4S, 5R, 6S)-4, 5-二乙酰氧基-6-(1, 3-二氧代异吲哚-2-基)氧基-四氢吡喃-2-基]乙酸甲酯(236)

**236**

[0407] 向[(2S, 4S, 5R, 6S)-4, 5-二乙酰氧基-6-(1, 3-二氧代异吲哚-2-基)氧基-四氢吡喃-2-基]乙酸甲酯(235)(270mg, 0.620mmol, 1.00eq)甲醇(2mL)悬浮液中加入一水合肼(98%, 0.031mL, 0.620mol, 1.00eq)。将反应混合物在0℃下搅拌, 并通过TLC进行监测。35分钟后, 过滤所得固体, 用冷甲醇洗涤并弃去。滤液用二氯甲烷稀释, 用饱和碳酸氢钠水溶液、水和盐水洗涤。将有机层干燥(Na₂SO₄), 过滤并蒸发挥发物, 得到粗产物。通过快速色谱法纯化(用环己烷:乙酸乙酯(10-70%)洗脱12g硅胶柱), 得到白色固体的目标化合物(236)(180mg, 95%)。¹H NMR(300MHz, CDCl₃): δ, 5.76-5.74(m, 2H), 5.04-4.95(m, 2H), 4.62(d, J=8.8Hz, 1H), 4.20-4.16(m, 2H), 3.85-3.76(m, 1H), 2.18-2.11(m, 1H), 2.10(s, 3H), 2.08(s, 3H), 2.03(s, 3H), 1.66-1.57(m, 1H)。

[0408] [(2S, 4S, 5R, 6S)-4, 5-二乙酰氧基-6-[(E)-3-[4-[[9H-芴-9-基甲氧基羰基]-2-

[0409]

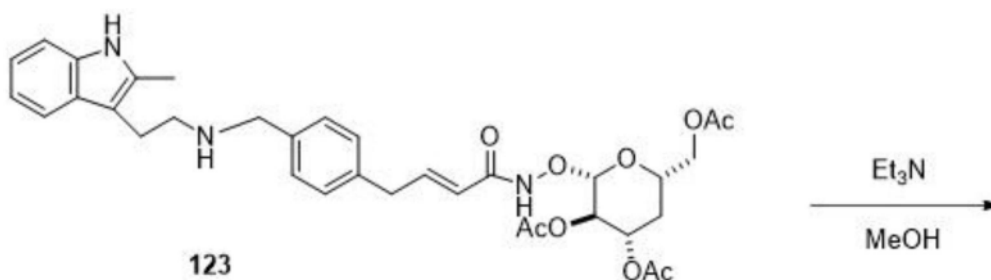
237

[0412]

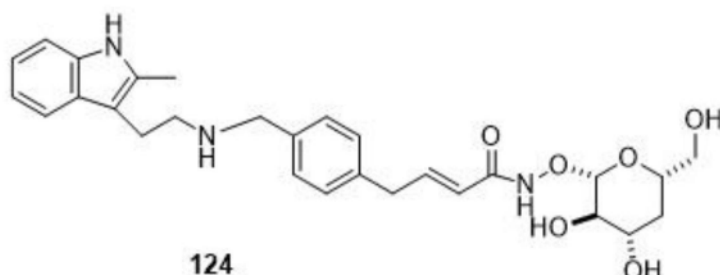
123

89

2.35-2.34(m,3H), 2.17-2.00(m,10H), 1.63(ddd, J=12.1, 12.1, 12.1Hz, 1H). LC/MS: Rt=3.34min; m/z=622.2[M+H]⁺.



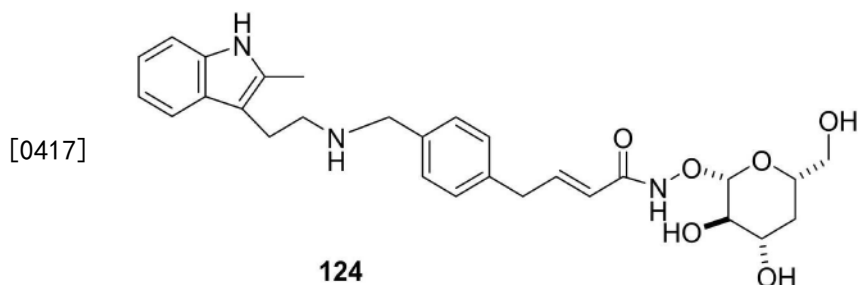
[0414]



方案10

[0415] 方案10说明了化合物124的制备。

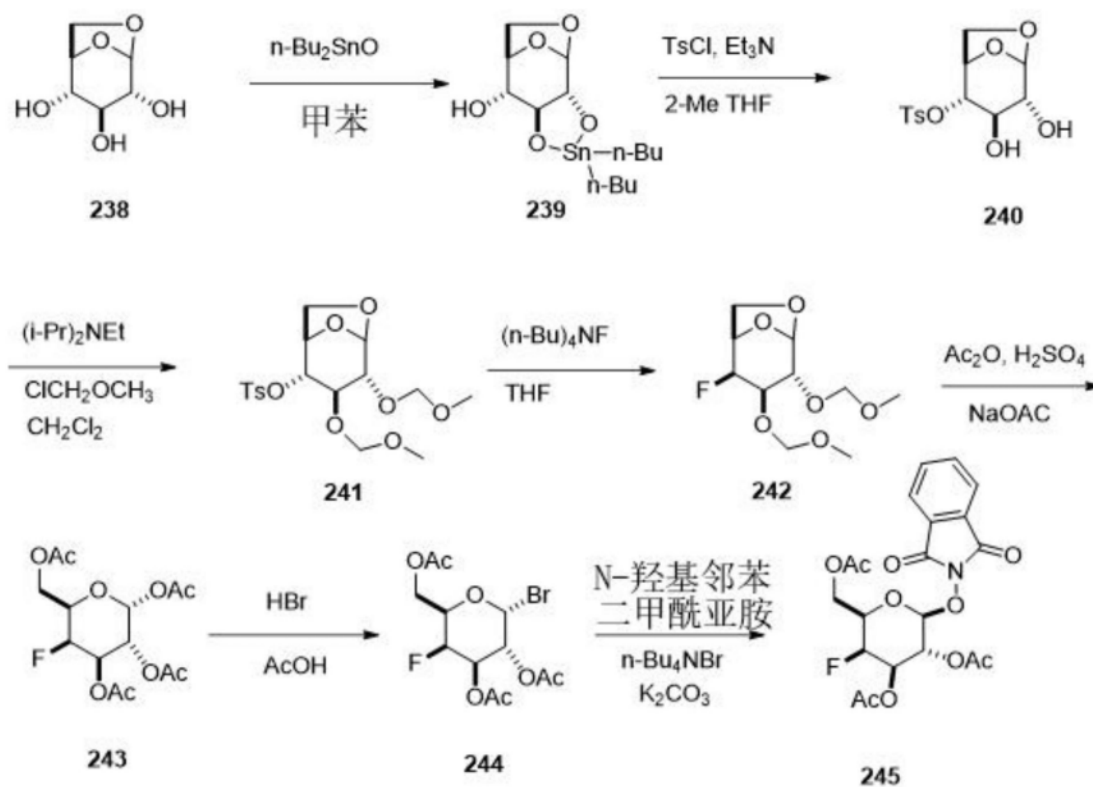
[0416] 实施例9: (E)-N-[(2S,3R,4S,6S)-3,4-二羟基-6-(羟甲基)四氢吡喃-2-基]氧基-3-[4-[[2-(2-甲基-1H-吡咯-3-基)乙基氨基]甲基]苯基]丙-2-烯酰胺



[0417]

[0418] 向[(2S,4S,5R,6S)-4,5-二乙酰氧基-6-[[[(E)-3-[4-[[2-(2-甲基-1H-吡咯-3-基)乙基氨基]甲基]苯基]丙-2-烯基]氨基]氧基-四氢吡喃-2-基]乙酸甲酯(110mg, 0.177mmol, 1.00eq)的甲醇(4.40mL)(123)溶液中加入水(0.60mL)和三乙胺(0.62mL, 4.42mmol, 25.0eq)。使反应混合物在室温下搅拌24小时。LCMS显示起始材料和中间体。使反应混合物在室温下搅拌48小时。加入更多的三乙胺(148uL)和水(148uL),并将混合物再搅拌6小时。在减压下浓缩反应混合物,并通过快速色谱法纯化粗产物(12g, 15微米柱,用二氯甲烷:MeOH(1-20%)洗脱),得到标题(124)化合物(49mg, 53%),为白色固体。¹H NMR(400MHz, DMSO): δ 10.68(s, 1H), 7.56-7.50(m, 3H), 7.36(d, J=7.9Hz, 3H), 7.20(d, J=7.9Hz, 1H), 6.97-6.86(m, 2H), 6.48(d, J=16.0Hz, 1H), 5.05-4.99(m, 1H), 4.72(s, 1H), 4.50(d, J=7.9 Hz, 1H), 3.75-3.73(m, 2H), 3.57-3.43(m, 3H), 3.43-3.39(m, 1H), 3.03-2.98(m, 1H), 2.78(t, J=7.3 Hz, 2H), 2.67(t, J=7.4 Hz, 2H), 2.30(s, 3H), 1.81(dd, J=

4.3, 12.1 Hz, 1H), 1.18 (ddd, $J=12.0, 12.0, 12.0$ Hz, 1H). LC/MS: RT=2.47 min; $m/z=496.2$ $[M+H]^+$.

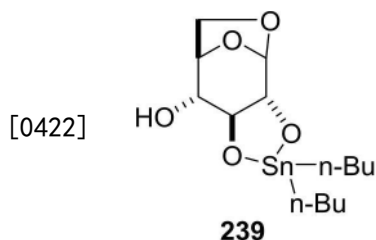


方案11

[0420] 方案11说明了化合物125的制备。

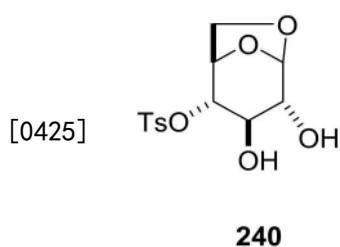
[0421] (1R,2R,6S,7R,8R) -4,4-二丁基-3,5,10,11-四氧基-4-锡杂环[6.2.1.0^{2,6}.1^{4,5}]十一

烷-7-醇 (239)



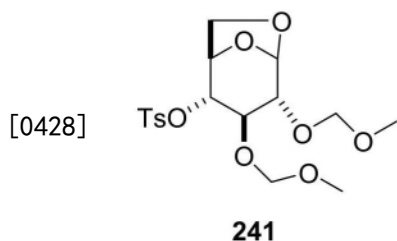
[0423] 将1,6-脱水-β-D-葡萄糖 (238) (5.00g, 30.8mmol, 1.00eq) 和氧化二丁基锡 (IV) (7.68g, 30.8mmol, 1.00eq) 在甲苯 (150mL) 中的混合物在配备有共沸去除水的设备中回流 12 小时 (见 Grindley 等人, Carbohydrate Res. 1988, 172, 311)。将冷却的混合物在减压下蒸发, 得到白色半固体的粗锡烯衍生物 (239), 其在未经纯化的情况下使用。

[0424] 1,6-脱水-4-O-对甲苯磺酰基-β-D-吡喃葡萄糖 (240)



[0426] 向 (1R, 2R, 6S, 7R, 8R) -4,4-二丁基-3,5,10,11-四氧基-4-锡杂环[6.2.1.0^{2,6}.0^{3,11}]十一烷-7-醇 (239) (12.54g, 31.9mmol, 1.00eq) 的四氢呋喃 (300mL) 溶液中加入三乙胺 (4.9mL, 35.1mmol, 1.10eq) 和粉末状 4A 分子筛 (3g)。加入对甲苯磺酰氯 (6.69g, 35.1mmol, 1.10eq), 将混合物剧烈搅拌 2 天, 然后通过硅藻土过滤。蒸发滤液, 并用二氯甲烷 (150mL) 稀释残留物。将有机溶液用水 (2×50mL) 洗涤, 干燥 (硫酸钠) 并蒸发。使用 7:3 二氯甲烷:2-甲基四氢呋喃作为洗脱剂, 在硅胶上通过柱色谱法纯化粗物质。首先洗脱的组分为 1,6-脱水-2,4-二-O-对甲苯磺酰基-β-D-吡喃葡萄糖, 易于分离。第二种成分为目标产物 (240) (~8g 无色油), 其难以分离的另一个区域异构体 1,6-脱水-2,4-二-O-对甲苯磺酰基-β-D-吡喃葡萄糖污染。将混合物从丙酮、乙醚和石油醚的混合物中重结晶 (b.p. 30-60°C), 得到白色针状的所需产物 (240)。第二次重结晶得到作为单一区域异构体的纯产物 (2.2g, 22%)。¹HNMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.83 (d, J=8.3Hz, 2H), 7.38 (d, J=8.1Hz, 2H), 5.48 (s, 1H), 4.65 (d, J=5.4Hz, 1H), 4.42 (s, 1H), 4.13 (d, J=8.1Hz, 1H), 3.79-3.71 (m, 2H), 3.49 (dd, J=0.9, 11.3Hz, 1H), 2.50 (d, J=7.5Hz, 1H), 2.47 (s, 3H), 2.32 (d, J=11.4Hz, 1H)。

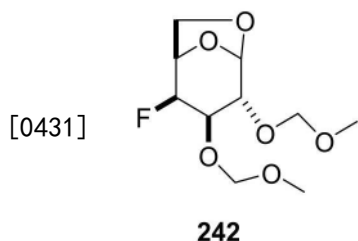
[0427] 1,6-酸酐-2,3-双(O-甲氧基甲基)-4-O-(4-甲苯磺酰基)-β-D-吡喃葡萄糖 (241)



[0429] 向搅拌的[(1R, 2S, 3R, 4R, 5R) -3,4-二羟基-6,8-二氧杂双环[3.2.1]辛-2-基]-4-甲基苯基硫酸盐 (240) (2.20g, 6.95mmol, 1.00eq) 的二氯甲烷 (50mL) 溶液中加入 N,N-二异丙基丙基乙胺 (13mL, 76.5mmol, 11.0eq) 和氯甲基甲醚 (5.3mL, 69.5mmol, 10.0eq)。将混

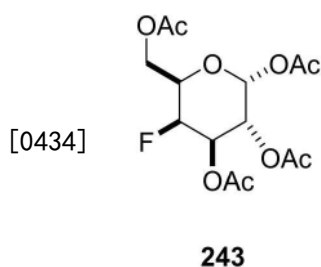
合物在40℃下搅拌4小时,得到棕色溶液。将溶液冷却,然后用水(50mL)淬灭。用二氯甲烷(2×50mL)萃取混合物,合并的有机相用盐水(100mL)洗涤。将有机溶液用硫酸钠干燥,过滤,并在减压下浓缩。粗残留物通过快速柱色谱法(硅胶40g,乙酸乙酯/己烷,(5-50%))纯化,得到[(1R,2R,3R,4R,5R)-3,4-双(甲氧基甲氧基)-6,8-二氧杂环[3.2.1]辛-2-基]4-甲基苯磺酸酯(241)(2.10g,5.19mmol,75%),为无色油状物。 $R_f=0.5$ (二氧化硅、乙酸乙酯/环己烷1:1)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 7.84(d, $J=8.3\text{Hz}$, 2H), 7.36(d, $J=8.1\text{Hz}$, 2H), 5.46(s, 1H), 4.68-4.63(m, 2H), 4.59(s, 2H), 4.58-4.53(m, 1H), 4.44(s, 1H), 4.04(d, $J=7.7\text{Hz}$, 1H), 3.86-3.84(m, 1H), 3.71(dd, $J=6.0, 7.5\text{Hz}$, 1H), 3.52-3.50(m, 1H), 3.37(s, 3H), 3.32(s, 3H), 2.45(s, 3H)。

[0430] 1,6-无水-4-脱氧-4-氟-2,3-双(0-甲氧基甲基)- β -D-吡喃半乳糖(242)



[0432] [(1R,2R,3R,4R,5R)-3,4-双(甲氧基甲氧基)-6,8-二氧杂环[3.2.1]辛-2-基]4-甲基苯磺酸酯(241)(2.10g,5.19mmol,1.00eq)在四丁基氟化铵(1M于THF中,55mL,10eq)中回流搅拌5天。将黑色混合物冷却并蒸发。残留物用水(100mL)稀释,混合物用乙酸乙酯(3×50mL)萃取。用盐水(100mL)洗涤合并的有机相,用硫酸钠干燥,过滤,并在减压下浓缩。通过快速柱色谱法(硅胶,乙酸乙酯/环己烷,0-30%)纯化粗物质,得到(1R,2S,3R,4R,5R)-2-氟-3,4-双(甲氧基甲氧基)-6,8-二氧杂环[3.2.1]辛烷(242),为浅黄色油状物(470mg,25%产率,70%纯度)。这种含有所需氟产物和未知其它产物的不可分离的混合物用于下一步,而无需进一步纯化。 $R_f=0.51$ (二氧化硅,乙酸乙酯/环己烷2:3)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3)与作为主要成分的产物(242)一致(约70%纯度)。

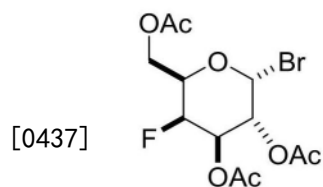
[0433] 1,2,3,6-四-O-乙酰基-4-脱氧-4-氟- α/β -D-吡喃半乳糖(243)



[0435] 在0℃下,向含有化合物(1R,2S,3R,4R,5R)-2-氟-3,4-双(甲氧基甲氧基)-6,8-二氧杂环[3.2.1]辛烷(242)(470mg,1.86mmol,1.00eq)(70%纯)的混合物在乙酸酐(5.3mL,55.9mmol,30.0eq)中的搅拌溶液中滴加硫酸(0.99mL,18.6mmol,10.0eq)。将混合物在室温下搅拌72小时。然后将混合物冷却至0℃,加入乙酸钠(3.06g,37.3mmol,20.0eq),再搅拌20分钟,然后用水(20mL)淬灭。用二氯甲烷(3×15mL)提取混合物。将合并的有机相依次用水(3×30mL)和盐水(30mL)洗涤,用硫酸钠干燥,过滤,并在减压下浓缩。粗残留物通过快速柱色谱法(硅胶,12g,15 μm ,环己烷中的乙酸乙酯,1-40%)纯化,得到产物[(2R,3S,4R,5R)-4,5,6-三乙酰氧基-3-氟-四氢吡喃-2-基]乙酸甲酯(243)(360mg,0.925mmol,50%)的异头混

合物 ($\alpha/\beta=4:1$), 为无色油状物 (360mg、90% 纯度, 约50% 产率)。Rf=0.4 (二氧化硅, AcOEt/己烷, 1:1)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 6.39 (d, $J=3.5\text{Hz}$, 1H), 5.43-5.39 (m, 1H), 5.32-5.21 (m, 1H), 4.97 (dd, $J=2.7, 50.2\text{Hz}$, 1H), 4.32-4.16 (m, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.03 (s, 3H)。

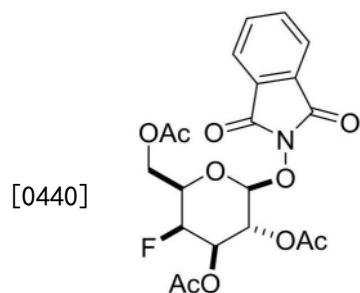
[0436] [(2R,3S,4R,5R)-4,5-二乙酰氧基-6-溴-3-氟-四氢吡喃-2-基]乙酸甲酯 (244)



244

[0438] 在0℃下, 向搅拌的[(2R,3S,4R,5R)-4,5,6-三乙酰氧基-3-氟-四氢吡喃-2-基]乙酸甲酯 (243) (360mg, 1.03mmol, 1.00eq) 的二氯甲烷 (6.00mL) 溶液中加入6M 溴化氢 (4.0mL, 24.0mmol, 23.4eq), 其为AcOH溶液的33wt%。将混合物在室温下搅拌1小时, 然后在0℃下用饱和碳酸氢钠水溶液 (20mL) 淬灭。使二氯甲烷层通过疏水性玻璃料并且不蒸发。TLC (50:50 乙酸乙酯: 环己烷) 显示极性较低的斑点, 并且大多数SM已经反应。将粗溴化物 (244) 作为二氯甲烷溶液用于下一步骤, 而无需进一步纯化。

[0439] [(2R,3S,4R,5R,6S)-4,5-二乙酰氧基-6-(1,3-二氧代异吲哚-2-基)氧基-3-氟-四氢吡喃-2-基]乙酸甲酯 (245)

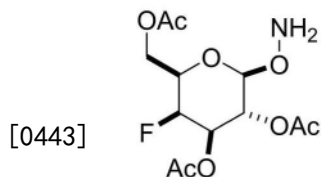


245

[0441] 向N-羟基邻苯二甲酰亚胺 (224mg, 1.37mmol, 0.950eq)、溴化四丁基铵 (233mg, 0.721mmol, 0.500eq)、二氯甲烷 (2.0mL) 和碳酸钾 (219mg, 1.59mmol, 1.10eq) 的水溶液 (3.9mL) 中加入[(2R,3S,4R,5R)-4,5-二乙酰氧基-6-溴-3-氟-四氢吡喃-2-基]乙酸甲酯 (244) (535mg, 1.44mmol, 1.00eq) 的二氯甲烷溶液 (2.0mL)。将溶液在室温下搅拌, 并通过LCMS进行监测。24小时后, 将反应混合物在二氯甲烷和饱和碳酸氢钠水溶液之间分配。分离有机层, 并用更多的二氯甲烷提取水层。将合并的有机提取物干燥 (MgSO_4), 过滤并蒸挥发物, 得到粗产物, 该粗产物通过快速色谱法纯化 (用环己烷: 乙酸乙酯 (2-40%)) 洗脱20g 硅胶柱, 得到目标化合物 (245) (443mg, 68%)。 ^1H NMR (300MHz, CDCl_3): δ 7.91-7.77 (m, 4H), 5.55 (dd, $J=8.6, 9.8\text{Hz}$, 1H), 5.14-4.80 (m, 3H), 4.45 (dd, $J=6.0, 11.3\text{Hz}$, 1H), 4.28 (dd, $J=7.3, 11.2\text{Hz}$, 1H), 3.92-3.78 (m, 1H), 2.24 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.06 (s, 3H)。LC/MS; Rt=1.58min; $m/z=476[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。

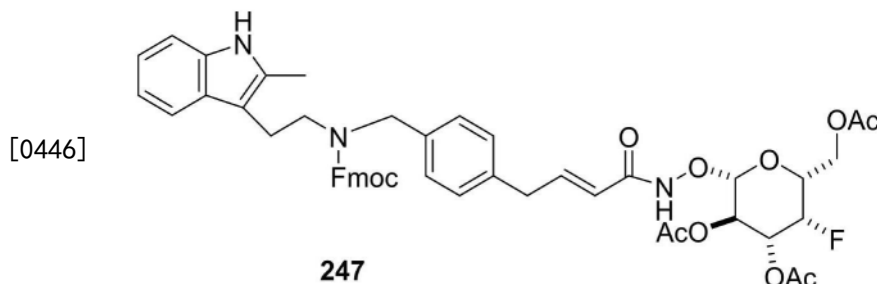
[0442] [(2R,3S,4R,5R,6S)-4,5-二乙酰氧基-6-氨基氧基-3-氟-四氢吡喃-2-基]乙酸甲

酯 (246)

**246**

[0444] 在0℃下,向[(2R,3S,4R,5R,6S)-4,5-二乙酰氧基-6-氨基氧基-3-氟-四氢吡喃-2-基]乙酸甲酯(246)(440mg,0.971mmol,1.00eq)的甲醇(6.00mL)悬浮液中缓慢加入一水合肼(0.047mL,0.971mmol,1.00eq)。反应混合物在0℃下搅拌45分钟,并通过TLC(1:1乙酸乙酯:环己烷)和LCMS进行监测。通过过滤将固体分离,干燥并放置在一边。用二氯甲烷稀释滤液,并用冷的饱和碳酸氢钠水溶液和水洗涤。使有机层通过相分离柱并浓缩以得到原油。均通过快速色谱法(用环己烷:乙酸乙酯(10-80%))洗脱12g硅胶柱)纯化不纯固体和原油,得到白色固体的目标化合物(247)(230mg,73%)。¹H NMR(300MHz,CDCl₃):δ,5.82(s,2H),5.39(t,J=8.7Hz,1H),5.07-4.78(m,2H),4.71(d,J=8.2Hz,1H),4.43-4.25(m,2H),3.87(ddd,J=6.7,6.7,26.3Hz,1H),2.14(s,3H),2.12(s,3H),2.10(s,3H)。

[0445] [(2R,3S,4R,5R,6S)-4,5-二乙酰氧基-6-[[(E)-3-[4-[[9H-芴-9-基甲氧基羰基]-2-(2-甲基-1H-吡啶-3-基)乙基]氨基]甲基]苯基]丙-2-烯基]氨基]氧基-3-氟-四氢吡喃-2-基]乙酸甲酯(247)



[0447] 在室温下向(E)-3-(4-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)(2-(2-甲基-1H-吡啶-3-基)乙基)氨基)甲基)苯基]丙烯酸(203)(250mg,0.449mmol,1.00eq)的N,N-二甲基甲酰胺(4.0mL)溶液中加入1-羟基苯并三唑水合物(91mg,0.597mmol,1.33eq)和N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(114mg,0.597mmol,1.33eq)。搅拌10分钟后,将溶液冷却至0℃,并缓慢加入[(2R,3S,4R,5R,6S)-4,5-二乙酰氧基-6-氨基氧基-3-氟-四氢吡喃-2-基]乙酸甲酯(246)(145mg,0.449mmol,1.00eq)在含有N,N-二异丙基乙胺(0.10mL,0.597mmol,1.33eq)的N,N-甲基甲酰胺(2.0mL)中的溶液。将所得溶液在室温下搅拌过夜。将反应混合物浓缩至最小体积,冷却至0℃,并通过缓慢加入饱和NH₄Cl水溶液(15mL)淬灭。通过过滤收集得到的黄色沉淀物并用水洗涤。将固体重新溶解在乙酸乙酯中,用水、碳酸氢钠水溶液(sat)和盐水洗涤。分离有机层,干燥(Na₂SO₄),过滤并蒸发挥发物,得到粗产物(443mg),其通过快速色谱法纯化(12g硅胶柱,用环己烷:乙酸乙酯(5-50%))洗脱,得到白色固体的目标化合物(247)(236mg,61%)。LC/MS:Rt=1.97分钟;m/z=862[m⁺H]⁺。

[0448] 实施例10: [(2S,3R,4S,5R,6S)-4,5-二乙酰氧基-2-(氟甲基)-6-[[(E)-3-[4-[[2-(2-甲基-1H-吡啶-3-基)乙基氨基]甲基]苯基]丙-2-烯基]氨基]氧基-四氢吡喃-3-

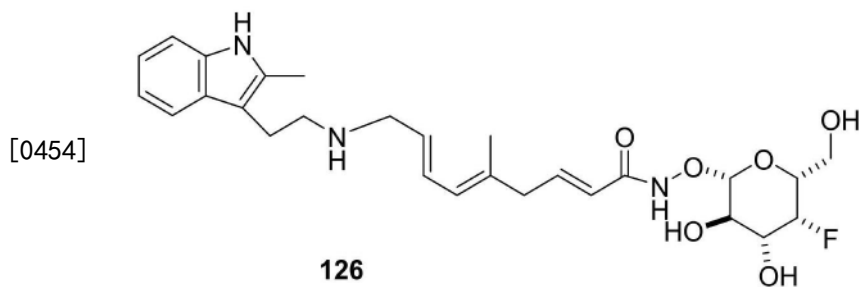
[0449]

125

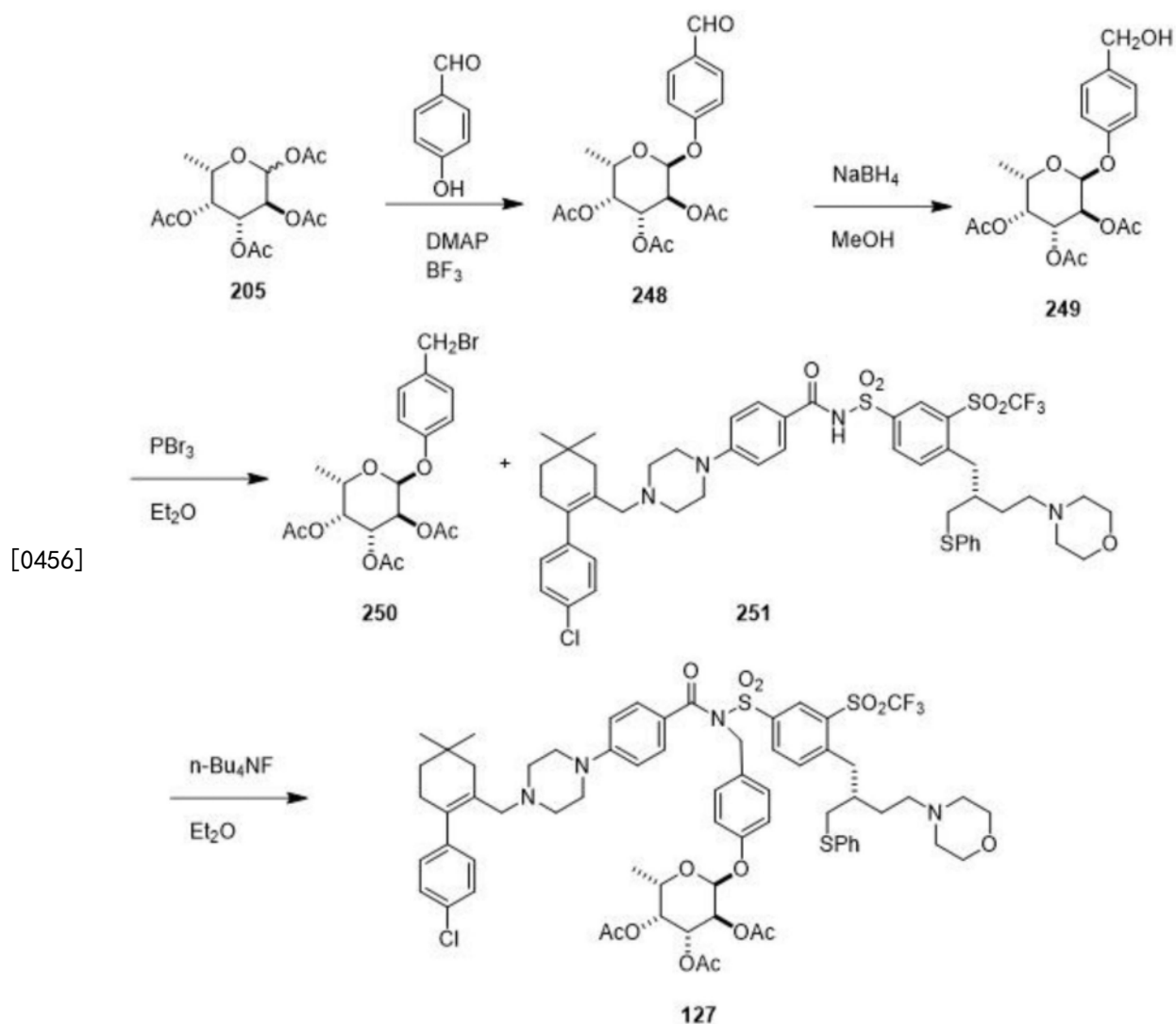
[0451]

126

96



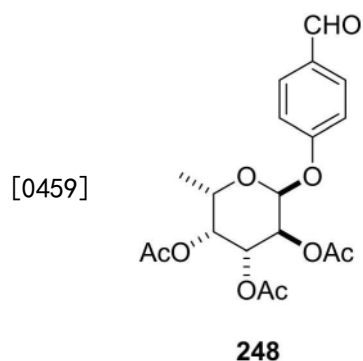
[0455] 向[(2S,3R,4S,5R,6S)-4,5-二乙酰氧基-2-(氟甲基)-6-[[*(E)*-3-[4-[[2-(2-甲基-1*H*-吡啶-3-基)乙基氨基]甲基]苯基]丙-2-烯酰基]氨基]氧基-四氢吡喃-3-基]乙酸酯(125)(58mg,0.0907mmol,1.00eq)的甲醇(2.50mL)溶液中加入水(0.35mL)和三乙胺(0.32mL,2.27mmol,25.1eq)。使反应混合物在室温下搅拌,并通过LCMS进行监测。48小时后,将粗反应混合物浓缩至干燥,并通过快速色谱法(12g硅胶柱,15微米,用二氯甲烷:MeOH(1-20%)洗脱)纯化,以获得白色固体的目标化合物(126)(18mg,38%)。1*H* NMR(400MHz,DMSO): δ 10.65(s,1*H*),7.57-7.48(m,3*H*),7.38-7.34(m,3*H*),7.20(d,*J*=7.9Hz,1*H*),6.98-6.86(m,2*H*),6.48(d,*J*=16.2Hz,1*H*),5.38-5.38(m,1*H*),4.95-4.88(m,1*H*),4.72-4.51(m,2*H*),3.76-3.53(m,6*H*),3.43(t,*J*=8.9Hz,1*H*),3.33(m,2*H*,水信号下),2.79(t,*J*=7.3Hz,2*H*),2.67(t,*J*=7.3Hz,2*H*),2.31-2.29(m,3*H*),1.25-1.22(m,1*H*)。LC/MS:*R*_t=2.52min;*m/z*=514[M+*H*]⁺。



方案13

[0457] 方案13说明了化合物127的制备。

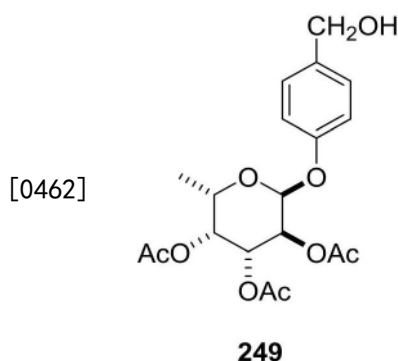
[0458] [(2S,3R,4R,5S,6S)-4,5-二乙酰氧基-6-(4-甲酰基苯氧基)-2-甲基-四氢吡喃-3-基]乙酸酯(248)



[0460] 将1,2,3,4-四-O-乙酰基-L-岩藻糖(205)(3.00g,9.03mmol,1.00eq)和4-羟基苯甲醛(2.20g,18.1mmol,2.00eq)的混合物在氩气下悬浮于1,2-二氯乙烷(40ml)中,并加入4-(二甲基氨基)吡啶(4.41g,36.1mmol,4.00eq),搅拌混合物15分钟以确保溶解。将溶液在

氩气下的冰水中冷却。滴加三氟化硼乙醚 (14mL, 0.112mol, 12.4eq), 得到浅棕色溶液。将所得溶液在63°C (外部) 下加热3小时, 直到TLC (甲苯中20%乙酸乙酯) 显示产物。将棕色溶液冷却并通过缓慢加入饱和碳酸氢钠水溶液进行中和, 直到泡腾停止。用二氯甲烷提取产物。二氯甲烷提取物用1N NaOH洗涤以除去未反应的苯酚, 用盐水洗涤, 干燥 (PTFE) 并浓缩。粗产物通过硅胶色谱法 (40g, 50 μ m) 纯化, 用0-20%乙酸乙酯在甲苯中洗脱, 首先洗脱所需产物 (248) (1.30g, 2.64mmol, 29%), 为黄色油状物, 静置半结晶。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.93 (s, 1H), 7.86 (d, J=9.0Hz, 2H), 7.21-7.17 (m, 2H), 5.86 (d, J=3.7Hz, 1H), 5.58 (dd, J=3.3, 11.0Hz, 1H), 5.37 (dd, J=0.8, 3.3Hz, 1H), 5.31 (dd, J=3.5, 11.0Hz, 1H), 4.22 (q, J=6.5Hz, 1H), 2.20 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.13 (d, J=6.5Hz, 3H)。

[0461] [(2S, 3R, 4R, 5S, 6S) -4, 5-二乙酰氧基-6-[4-(羟甲基) 苯氧基]-2-甲基-四氢吡喃-3-基]乙酸酯 (249)



[0463] 将[(2S, 3R, 4R, 5S, 6S) -4, 5-二乙酰氧基-6-(4-甲酰基苯氧基)-2-甲基-四氢吡喃-3-基]乙酸酯 (248) (80%, 1.30g, 2.64mmol, 1.00eq) 在二氯甲烷 (2.00mL) 和甲醇 (18.00mL) 中的溶液在冰水中冷却。加入硼氢化钠 (100mg, 2.64mmol, 1.00eq), 并将溶液搅拌30分钟; 黄色消失了。TLC (乙酸乙酯: 环己烷1:1) 显示起始物质消失, 同时出现极性更强的斑点。通过加入1M氯化氢 (2.6mL, 2.64mmol, 1.00eq) 使混合物淬灭。蒸发溶剂, 将粗物质分散在水和二氯甲烷之间。有机提取物用盐水洗涤, 干燥 (PTFE) 并蒸发, 得到真空干燥的白色泡沫状产物。使用0-50%乙酸乙酯在环己烷中在二氧化硅上纯化粗材料, 得到白色泡沫状产物 (249) (880mg, 2.22mmol, 84%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.32 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.05 (d, J=8.7Hz, 2H), 5.74 (d, J=3.7Hz, 1H), 5.58 (dd, J=3.4, 10.9Hz, 1H), 5.36 (d, J=3.1Hz, 1H), 5.28 (dd, J=3.6, 10.9Hz, 1H), 4.64 (d, J=5.8Hz, 2H), 4.27 (q, J=6.6Hz, 1H), 2.20 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.60 (t, J=5.9Hz, 1H), 1.12 (d, J=6.5Hz, 3H)。

[0464] [(2S, 3R, 4R, 5S, 6S) -4, 5-二乙酰氧基-6-[4-(溴甲基) 苯氧基]-2-甲基-四氢吡喃-3-基]乙酸酯 (250)

[0465]

250

[0466] 将[(2S,3R,4R,5S,6S)-4,5-二乙酰氧基-6-[4-(羟甲基)苯氧基]-2-甲基-四氢吡喃-3-基]乙酸酯(249)(200mg,0.505mmol,1.00eq)在干乙醚(14mL)中的溶液冷却至0℃,并加入三溴化磷(0.024mL,0.252mmol,0.500eq)。将溶液在0℃下搅拌,并通过TLC(乙酸乙酯:环己烷1:1)进行监测。45分钟后,用饱和碳酸氢钠水溶液终止反应。将产物提取到乙醚中,干燥(Na_2SO_4),过滤,蒸发溶剂,得到白色固体的目标化合物(250)(185mg,80%)。 ^1H NMR(300MHz, CDCl_3) δ 7.35(td,J=2.5,9.5Hz,2H),7.04(td,J=2.5,9.6Hz,2H),5.76(d,J=3.6Hz,1H),5.59(dd,J=3.4,10.9Hz,1H),5.38(dd,J=1.2,3.5Hz,1H),5.29(dd,J=3.7,10.8Hz,1H),4.50(s,2H),4.26(q,J=6.4Hz,1H),2.21(s,3H),2.07(s,3H),2.04(s,3H),1.14(d,J=6.5Hz,3H)。

[0467] 实施例12: [(2S,3R,4R,5S,6S)-4,5-二乙酰氧基-6-[4-[[[4-[4-[2-(4-氯苯基)-5,5-二甲基-环己基-1-基]甲基]哌嗪-1-基]苯甲酰基]-[4-[3-吗啉-1-(苯基磺酰基甲基)丙基]氨基]-3-(三氟甲基磺酰基)苯基]磺酰基氨基]甲基]苯氧基]-2-甲基-四氢吡喃-3-基]乙酸酯(127)

[0468]

127

[0469] 将氢氧化钾(36mg, 0.637mmol, 1.80eq)加入4-[4-[2-(4-氯苯基)-5,5-二甲基-环己烯-1-基]甲基]哌嗪-1-基]-N-[4-[3-吗啉-1-(苯基磺酰基甲基)丙基]氨基]-3-(三氟甲基磺酰基)苯基]磺酰基-苯甲酰胺(251)(345mg, 0.354mmol, 1.00eq)、[(2S, 3R, 4R, 5S, 6S)-4,5-二乙酰氧基-6-[4-(溴甲基)苯氧基]-2-甲基-四氢吡喃-3-基]乙酸酯(250)(183mg, 0.398mmol)和溴化四丁基铵(23mg, 0.0708mmol, 0.200eq)在干燥甲苯(14mL)中的搅拌混合物中。将混合物在氮气下于80℃搅拌过夜,并通过LCMS和TLC(二氯甲烷:甲醇9.5:0.5)进行监测。48小时后,将反应混合物冷却至室温,并通过蒸发除去甲苯。残留物在水和乙酸乙酯之间分配。使有机层通过相分离柱,蒸发挥发物,得到粗产物(450mg)。通过快速色

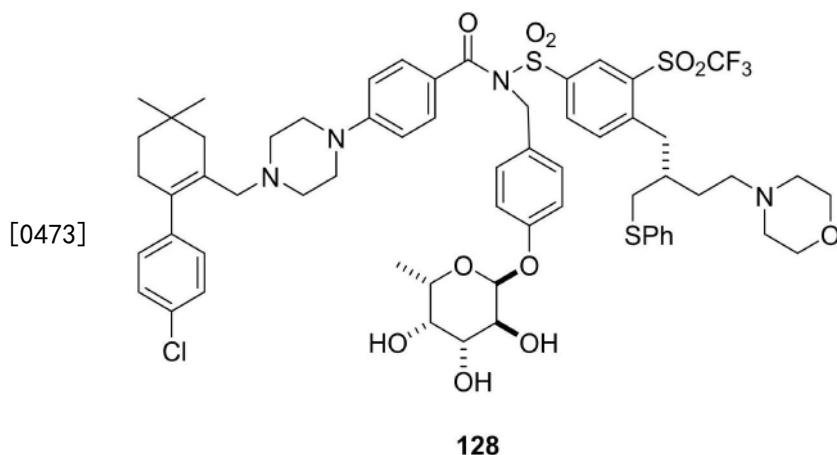
127

CC1(C)C(C2=CC=C(C=C2)C(Cl)=CC=C2)C3=CC=CC=C3CN4CCN(CC4)CN5C(=O)C(=O)N(S(=O)(=O)C6=CC=C(C=C6)S(=O)(=O)C(F)(F)F)C7=CC=C(C=C7)OC8=CC=CC=C8O[C@H]9[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]9O[C@H]10C(=O)N(S(=O)(=O)C11=CC=C(C=C11)S(=O)(=O)C(F)(F)F)C12=CC=CC=C12C13CCN(CC13)CC14=CC=CC=C14S14

128

101

酰胺



[0474] 在0℃下,向[(2S,3R,4R,5S,6S)-4,5-二乙酰氧基-6-[4-[[[4-[4-[2-(4-氯苯基)-5,5-二甲基-环己基-1-基]甲基]哌嗪-1-基]苯甲酰基]-4-[3-吗啉-1-(苯基磺酰基)甲基]氨基]-3-(三氟甲基磺酰基)苯基]磺酰基氨基]甲基]苯氧基]-2-甲基-四氢吡喃-3-基]乙酸酯(127)(40mg,0.0296mmol,1.00eq)的甲醇(1.6mL)悬浮液中加入水(228uL)和三乙胺(25uL,0.177mmol,6.00eq)。通过TLC 1:1环己烷:[3:1EA:IMS]监测反应,并在室温下搅拌过夜,得到悬浮在溶液中的固体。浓缩反应物以除去大部分挥发物,并将残余物干燥装载到HMN色谱仪中,通过快速色谱法(用环己烷:[3:1EA:IMS](5-100%))洗脱12g,15微米硅胶柱)纯化,得到白色固体的未反应原材料(10mg)和白色固体的目标化合物(11.6mg)(128)。¹H NMR(400MHz,DMSO) d 7.97(d,J=2.3Hz,1H),7.79(dd,J=2.1,9.4Hz,1H),7.43(d,J=8.9Hz,2H),7.39-7.26(m,6H),7.23-7.18(m,1H),7.12-7.05(m,3H),7.01(d,J=9.9Hz,1H),6.97(d,J=8.7Hz,2H),6.90-6.83(m,4H),5.29(d,J=2.8Hz,1H),4.84(s,2H),4.77(d,J=5.9Hz,1H),4.64(d,J=5.4Hz,1H),4.55(d,J=4.5Hz,1H),4.17-4.08(m,1H),3.83(q,J=6.5Hz,1H),3.76-3.67(m,2H),3.56-3.43(m,5H),3.41-3.32(m,2H),3.27-3.20(m,4H),2.75-2.71(m,2H),2.34-2.19(m,10H),2.17-2.12(m,2H),2.01-1.87(m,3H),1.78-1.70(m,1H),1.43(t,J=6.4Hz,2H),1.02(d,J=6.6Hz,3H),0.97(s,6H)。LC/MS:Rt=1.41min;m/z=614[M+H]⁺/2。

[0475] LCMS方法:

[0476] 方法A:Chromolith,C-18,50×4.6mm;1.5mL/min流速、ELSD和254nm UV检测;流动相A:0.1%TFA水溶液;流动相B:0.1%TFA乙腈溶液;5至100%的流动相B在6分钟内;环境温度。

[0477] 方法B:Chromolith,C-18,50×4.6mm;1.5mL/min流速、ELSD和254nm UV检测;流动相A:0.1%TFA水溶液;流动相B:0.1%TFA乙腈溶液;5至100%的流动相B在12分钟内;环境温度。

[0478] 方法C:Water Cortex,C18,3.0mm×50mm,2.7um柱,3uL注射液,1.2mL/min流速,220和254nmUV检测,5%ACN(0.1%TFA)至100%水(0.1%TFA)4分钟,在100%(ACN,0.1%TFA)停留0.5分钟,然后在1.5分钟内平衡至5%(ACN,0.1%TFA)。

[0479] 细胞水解测定

[0480] T47D乳腺癌细胞在含有10%热灭活胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养。用含

有化脓性链球菌Cas9和靶向目的基因的sgRNA的慢病毒构建体感染细胞系。通过抗生素处理选择受感染的细胞。为了评估化合物的细胞水解,将细胞接种到96孔板中。第二天,将30 μ M的化合物加入到细胞中。在基线时记录相对荧光(激发330nm/发射450nm),并使用Molecular Devices SpectraMax M5酶标仪每24小时监测一次,持续2-4天。从含有细胞的孔产生的相对荧光中减去在每个时间点无细胞的培养基中的每种化合物得平均相对荧光。产品的梯度

[0481] CRISPR工程癌细胞系活力测定的实验程序

[0482] 在含有10%热灭活胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养T47D和HCC1954乳腺癌细胞。用含有化脓性链球菌Cas9和靶向目的基因的sgRNA的慢病毒构建体感染细胞系。通过抗生素处理选择受感染的细胞。为了评估对化合物处理的细胞活力,将细胞接种到96孔板中。第二天,将覆盖10个浓度的化合物的系列稀释液加入细胞中。将细胞处理三天。通过线粒体脱氢酶活性(XTT测定,Cayman Chemical)测定细胞活力。为了生成剂量-反应曲线,将数据拟合到四参数Hill函数,并在Y=0.5活力下确定绝对IC₅₀。

[0483] 细胞毒性分析

[0484] 增殖细胞和衰老细胞在T175烧瓶中,在以下规定的条件下维持,在达到~90%融合度时传代。在用于细胞毒性测定之前,在相位显微镜下目视检查细胞的污染和健康状况;如果发现污染或明显的细胞碎片,则不使用细胞。将健康细胞以5000或10000个细胞/孔的浓度(分别用于增殖和衰老条件)接种到96孔板的中间60孔中。每个板中的外部36个孔包含DPBS,以防止内部孔的干燥和对光谱读数的边缘影响。在将细胞接种到96孔板中之后,在添加药物之前给予它们24小时的附着时间。药物分三次加入,共10种不同浓度的药物,跨度约为4个Log₁₀单位。将平板与药物孵育72小时,此时抽吸含药物的培养基并用XTT培养基代替。XTT试剂在通过NAD(P)H依赖性代谢反应还原时发生吸光度偏移,并且所产生的偏移可用于量化药物处理后剩余细胞的存活率。一旦达到合适的动态范围(通常为0.7-1.4吸光度单位),则对每种试验物质进行吸光度读数。然后对所得数据进行背景校正和对数化,以产生浓度响应曲线。

[0485] A549衰老诱导方案

[0486] 将野生型A549细胞解冻到补充有10%热灭活胎牛血清和1%青霉素-链霉素抗生素混合物的DMEM培养基(高葡萄糖,4mM L-谷氨酰胺,无丙酮酸钠)中。细胞在37°C、5%CO₂和常压氧气下培养。对于衰老诱导,仅使用传代20或更低时的A549。在吸取培养基并用含有25 μ M吉西他滨的新鲜培养基替换之前,细胞生长至60-70%的融合度。在没有刷新培养基的情况下培养细胞72小时。处理后,抽吸含药物培养基,用1 $\times$ DPBS轻轻洗涤细胞,并将新鲜的无药物培养基加入烧瓶中,此时使细胞再静置72小时。在该静置期之后,通过形态学、SA- β -gal和EdU掺入来评估衰老诱导活性。注:吉西他滨诱导衰老偶尔会导致A549细胞自发重新进入细胞周期。因此,细胞应在诱导后14天内用于各种测定,以避免非衰老群体的生长。在细胞毒性测定中,将第20代或或更低的增殖细胞作为对照。代表性的A549图像EdU掺入测定[EdU荧光团在FITC通道中可见,用DAPI复染]如图2所示。

[0487] IMR90衰老诱导方案

[0488] 将IMR90原代肺成纤维细胞解冻到补充有10%热灭活胎牛血清和1%青霉素-链霉素抗生素混合物的DMEM培养基(高葡萄糖,4mM L-谷氨酰胺,无丙酮酸钠)中。细胞在37°C和

5%CO₂的低氧(5%O₂)条件下培养。对于衰老诱导,仅使用约50倍或更少群体倍数的IMR90,以避免复制性衰老造成的任何混淆效应。在吸取培养基并用含有300nM阿霉素的新鲜培养基替换之前,细胞生长至60-70%的融合度。将细胞在含药物的培养基中培养48小时,然后抽吸三分之一的培养基并用无药物的培养液替换。然后将细胞再培养24小时,然后抽吸所有培养基,用1×DPBS轻轻洗涤,用无药物培养基更换,并将细胞放回培养箱静置72小时。在这个静置期之后,通过形态学、SA-β-gal和EdU掺入来评估衰老诱导活性。在诱导后21天内将细胞用于接下来的测定。代表性IMR90图像(从L到R:SA-β-Gal,SA-α-Foc,EdU掺入测定[EdU荧光团在FITC通道中可见,用DAPI复染])如图1所示。

[0489] 下表2报告了通过T47/D sgNTC、T47D/sbFUCA1、T47D/sbGLB sgGALC、IMR90 SEN0、A549 SEN测定的选定化合物的生物活性。

[0490] 表2

[0491]

化合物 #	T47/D sgNTC	T47D/ sgFUCA1	T47D/sgGLB sgGALC	IMR90 SEN	A549 SEN
105	5.31E-8	2.86E-6			
106	1.01E10-06	2.92E-05			
107	9.40E-09	1.01E-06			
108	9.42E-07	8.72E-06			
109	3.30E-07	1.36E-06		1.35E-05	2.27E-06
110	6.77E-08	1.46E-06		4.86E-06	4.90E-08
111	2.53E-08	1.11E-06		3.78E-06	2.43E-07
112	8.22E-07	1.64E-05			
113	3.22E-05			3.33E-05	
114	6.98E-07			1.99E-06	7.62E-07
121	1.42E-06		7.04E-06		1.05E-05
122	>3.00E-05		>3.00E-05		
123	2.76E-08		1.48E-06		1,16E-05
124	9.86E-06		>3.00E-05		6.70E-05
125					>3.00E-05

[0492]

126					>3.00E-05
127					>3.00E-05

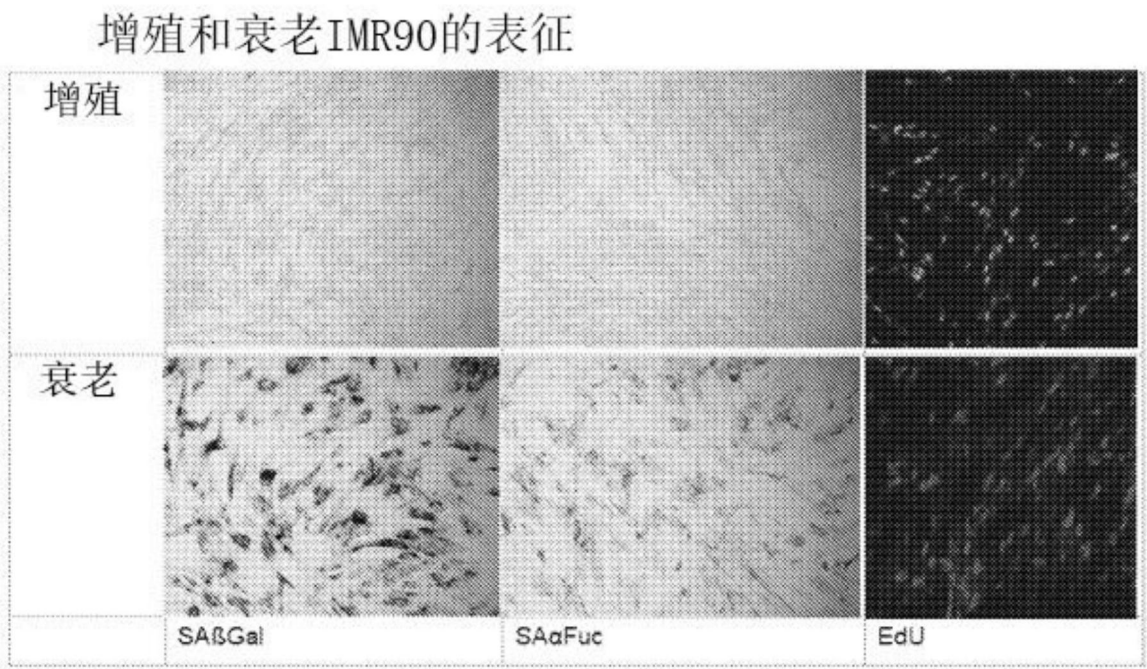


图1

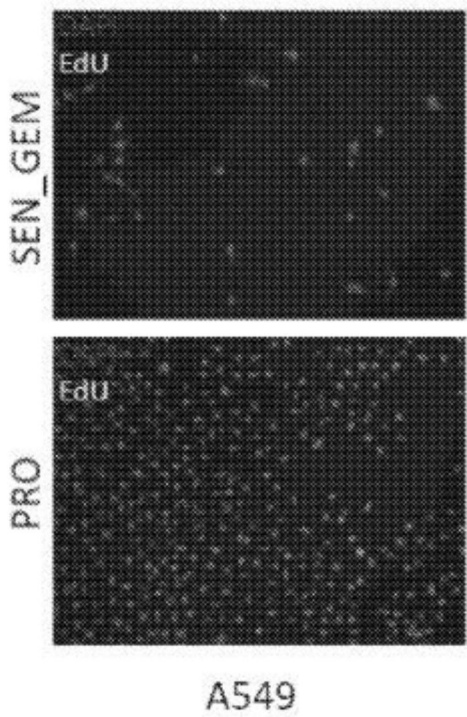


图2