

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780051510.X

[51] Int. Cl.

*C07C 239/14 (2006.01)*  
*C07C 239/20 (2006.01)*  
*C07C 217/48 (2006.01)*  
*C07C 217/46 (2006.01)*  
*C07C 217/42 (2006.01)*  
*C07C 225/08 (2006.01)*

[43] 公开日 2010年3月24日

[11] 公开号 CN 101679219A

[51] Int. Cl. (续)

*C07C 225/14 (2006.01)*  
*C07C 225/16 (2006.01)*  
*C07D 213/63 (2006.01)*  
*C07D 213/79 (2006.01)*  
*C07D 213/81 (2006.01)*  
*A61K 31/16 (2006.01)*  
*A61K 31/215 (2006.01)*  
*A61K 31/4412 (2006.01)*  
*A61P 11/00 (2006.01)*  
*A61P 27/00 (2006.01)*  
*A61P 13/12 (2006.01)*  
*A61P 25/14 (2006.01)*  
*A61P 25/08 (2006.01)*  
*A61P 25/00 (2006.01)*

*A61P 19/08 (2006.01)*

[22] 申请日 2007.12.19

[21] 申请号 200780051510.X

[30] 优先权

[32] 2006.12.19 [33] US [31] 60/876,012

[86] 国际申请 PCT/CN2007/003691 2007.12.19

[87] 国际公布 WO2008/074227 英 2008.6.26

[85] 进入国家阶段日期 2009.8.19

[71] 申请人 港大科桥有限公司

地址 中国香港数码港

[72] 发明人 杨丹 李祥

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 梁谋 黄可骏

权利要求书7页 说明书40页 附图10页

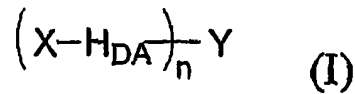
[54] 发明名称

合成离子通道

[57] 摘要

本发明提供能够在脂双层或细胞膜中形成离子通道的自组装化合物以及包含该自组装化合物的形成离子通道的组合物。本发明还提供从一些所述自组装化合物的分子制备离子通道的方法以及使用由一些所述自组装化合物的分子形成的离子通道的方法。本发明进一步提供治疗或预防与包括氯离子通道在内的离子通道功能障碍有关的病症和疾病的方法。

1. 用于在脂双层或细胞膜中形成离子通道的具有式 (I) 的自组装化合物, 或者其盐、溶剂合物、多晶型物或立体异构体:

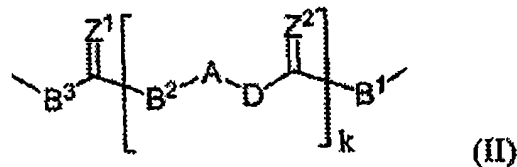


其中, X是未取代或取代的烃基或杂环基;

n是从1到6的整数;

Y是一价、二价、三价、四价、五价或六价连接基团, 该连接基团通过从未取代或取代的烃、碳环或杂环中分别去除1个、2个、3个、4个、5个和6个氢原子形成; 且

$H_{DA}$ 是具有式 (II) 的二价基团:

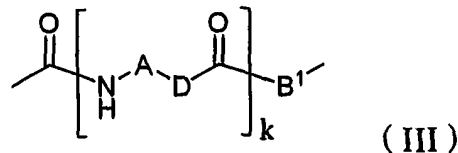


其中 $Z^1$ 和 $Z^2$ 各自独立地是O、S或 $NR^1$ ;

A、 $B^1$ 、 $B^2$ 、 $B^3$ 和D各自独立地是键、O、S、 $NR^2$ 或者取代或未取代的 $C_{1-10}$ 亚烷基; 且

k是从1到20的整数, 其中 $R^1$ 和 $R^2$ 各自独立地是H、酰基、烃基、碳环基或杂环基, 并且 $B^1$ 和 $B^2$ 中至少一个是NH。

2. 权利要求1所述的自组装化合物, 其中式 (I) 中的 $H_{DA}$ 由式 (III) 表示:



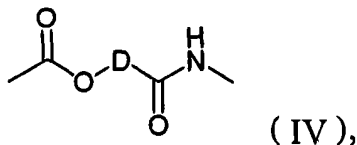
其中, k是从1到20的整数;

A是键、O、S、 $NR^2$ 或者取代或未取代的 $C_{1-10}$ 亚烷基, 其中 $R^2$ 是H、酰基、烃基、碳环基或杂环基;

$B^1$ 是O或NH; 且

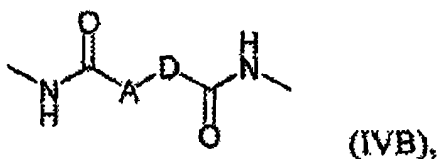
D是 $C_{1-3}$ 亚烷基或者被一个或一个以上的烃基或杂环基取代的 $C_{1-3}$ 亚烷基。

3. 权利要求1所述的自组装化合物，其中式(I)中的 $H_{DA}$ 由式(IV)表示：



其中D是 $C_{1-3}$ 亚烷基或者被一个或一个以上的烃基或杂环基取代的 $C_{1-3}$ 亚烷基。

4. 权利要求1所述的自组装化合物，其中式(I)中的 $H_{DA}$ 由式(IVB)表示：



其中A是键、O、S、 $NR^2$ 或者取代或未取代的 $C_{1-10}$ 亚烷基，其中 $R^2$ 是H、酰基、烃基、碳环基或杂环基；且

D是 $C_{1-3}$ 亚烷基或者被一个或一个以上的烃基或杂环基取代的 $C_{1-3}$ 亚烷基。

5. 权利要求1-4中任一项所述的自组装化合物，其中式(I)中的n是1。

6. 权利要求1-4中任一项所述的自组装化合物，其中式(I)中的n是2或3， $X-H_{DA}$ 单元中的至少两个是相同的。

7. 权利要求1-4中任一项所述的自组装化合物，其中式(I)中的n是2或3， $X-H_{DA}$ 单元中的至少两个是不同的。

8. 权利要求1-7中任一项所述的自组装化合物，其中X是烃基或取代的烃基。

9. 权利要求8所述的自组装化合物，其中X是含有1-14个碳原子的烃基或取代的烃基。

10. 权利要求9所述的自组装化合物，其中X是具有1-14个碳原子的烷基或取代的烷基。

11. 权利要求10所述的自组装化合物，其中X是异丁基。

12. 权利要求1-11中任一项所述的自组装化合物，其中Y是通过从未取代或取代的烷烃、烯烃或炔烃中分别去除2个或3个氢原子而形成的二价或三价连接基团。

13. 权利要求12所述的自组装化合物，其中Y是通过从未取代或取代的C<sub>2-12</sub>烷烃、烯烃或炔烃中分别去除2个或3个氢原子而形成的二价或三价连接基团。

14. 权利要求13所述的自组装化合物，其中Y是未取代或取代的亚丙基或亚丙烯基。

15. 权利要求1-11中任一项所述的自组装化合物，其中Y是通过从未取代或取代的单环、二环或三环芳香性碳环中分别去除2个或3个氢原子而形成的二价或三价连接基团。

16. 权利要求15所述的自组装化合物，其中Y是通过从未取代或取代的苯中分别去除2个或3个氢原子而形成的二价或三价连接基团。

17. 权利要求1-11中任一项所述的自组装化合物，其中Y是通过从未取代或取代的单环、二环或三环杂环中分别去除2个或3个氢原子而形成的二价或三价连接基团。

18. 权利要求17所述的自组装化合物，其中Y是通过从未取代或取代的吡啶中分别去除2个或3个氢原子而形成的二价或三价连接基团。

19. 权利要求1-18中任一项所述的自组装化合物，其中式(I)中H<sub>DA</sub>包含至少一个伯酰胺或仲酰胺基团。

20. 权利要求1-19中任一项所述的自组装化合物，其中D是被至少一个烷基、芳基、取代烷基或取代芳基基团所取代的C<sub>1-3</sub>亚烷基。

21. 权利要求20所述的自组装化合物，其中D是被至少一个异丁基所取代的C<sub>1-3</sub>亚烷基。

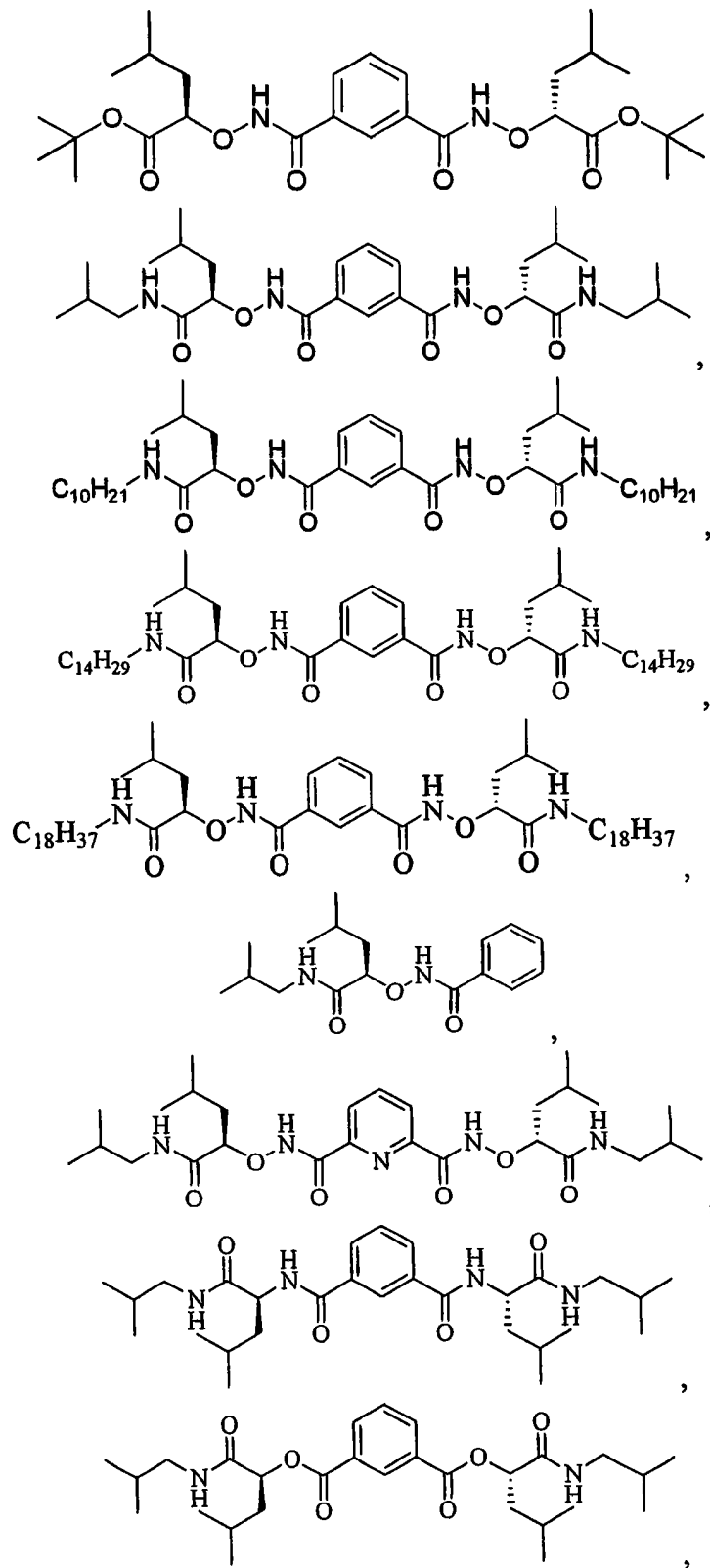
22. 权利要求1-2中任一项所述的自组装化合物，其中A是键；D是亚甲基或取代的亚甲基；且k是1。

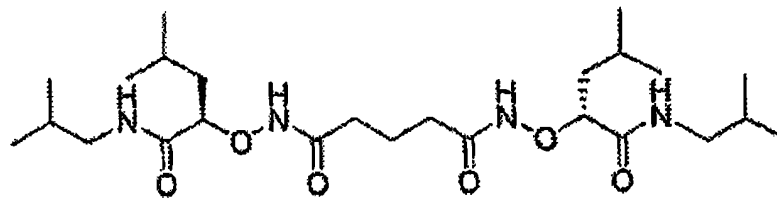
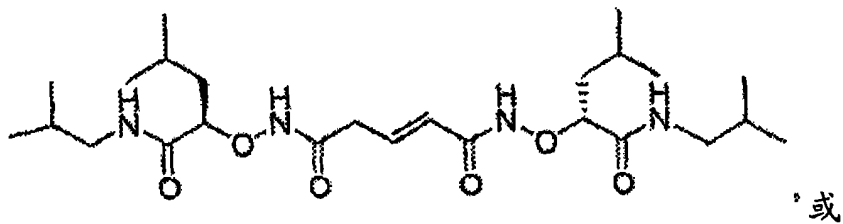
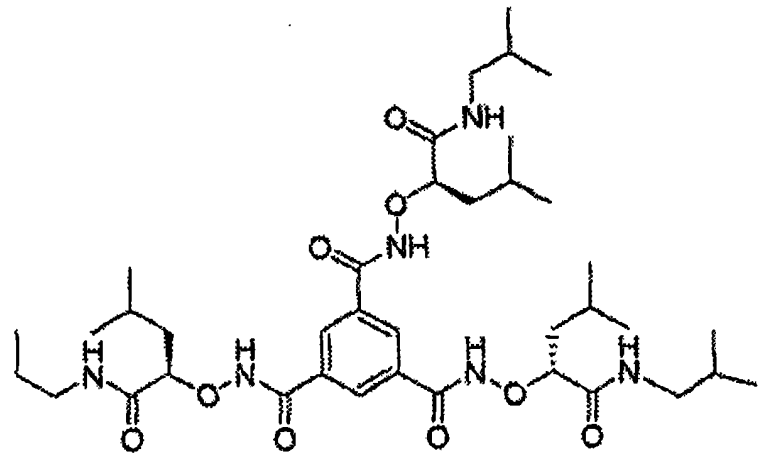
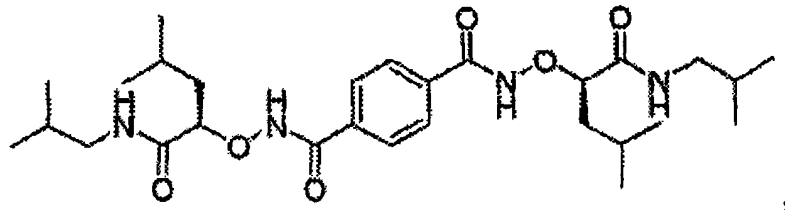
23. 权利要求1-2中任一项所述的自组装化合物，其中A是O；D是亚甲基或取代的亚甲基；且k是1。

24. 权利要求1-2中任一项所述的自组装化合物，其中Y是亚芳基、亚杂芳基、亚烷基或亚烯基；且每个X是具有1-14个碳原子的未取代或取代的烃基。

25. 权利要求1-24中任一项所述的自组装化合物，其中D是被异丁基取代的亚甲基。

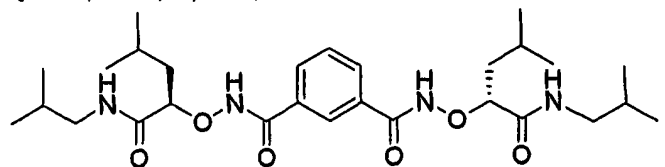
26. 权利要求1所述的自组装化合物，其中所述自组装化合物是：





或者其盐、溶剂合物、多晶型物或立体异构体。

27. 权利要求1或26所述的自组装化合物，其中所述自组装化合物为



或者其盐、溶剂合物、多晶型物或立体异构体。

28. 一种组合物，其包含细胞膜和权利要求1-27中任一项所述的自组装化合物的多个分子。

29. 权利要求28所述的组合物，其中所述细胞膜包含脂双层。

30. 权利要求29所述的组合物，其中所述多个分子自组装形成跨脂双层厚度的阴离子通道。

31. 权利要求30所述的组合物，其中所述阴离子通道为氟离子、氯离子、溴离子、碘离子、硝酸根离子、亚硝酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子、碳酸根离子、碳酸氢根离子、磷酸根离子、磷酸氢根离子、磷酸二氢根离子、或醋酸根离子通道。

32. 权利要求31所述的组合物，其中所述阴离子通道为氯离子通道。

33. 一种在细胞膜中形成合成阴离子通道的方法，所述方法包括将细胞膜和多个权利要求1-27中任一项所述的自组装化合物的分子组合的步骤。

34. 权利要求33所述的方法，其中所述细胞膜包含脂双层。

35. 一种调节离子流通过细胞膜的方法，所述方法包括由多个权利要求1-27中任一项所述的自组装化合物的分子在细胞膜中形成阴离子通道；和建立跨细胞膜的离子梯度或膜电位。

36. 权利要求35所述的方法，其中所述细胞膜包含脂双层。

37. 一种在细胞膜中制造合成离子通道的方法，该方法包括以下步骤：

- (a) 提供多个权利要求1-27中任一项所述的自组装化合物的分子；和
- (b) 在膜的横向上形成分子柱，并且在任意两个相邻的分子柱之间，通过所述分子的自组装在膜的侧向上形成分子间氢键。

38. 权利要求37所述的方法，其中所述细胞膜包含脂双层。

39. 多个权利要求1-27中任一项所述的自组装化合物的分子或其药学可接受的盐、溶剂合物、多晶型物或立体异构体制备用于治疗、管理或预防与氯离子通道功能障碍相关的疾病的药物中的用途。

40. 权利要求39所述的用途，其中所述疾病是囊性纤维化、巴特氏综合征、登特病、遗传性肾结石病、先天性肌强直、贝克综合征、癫痫病、卵黄样黄斑营养不良、惊跳病、少年肌阵挛性癫痫或石骨症。

41. 权利要求39所述的用途，其中所述自组装化合物或其药学可接受的盐、溶剂合物或立体异构体插入到哺乳动物细胞的脂双层中。

42. 权利要求41的用途，其中所述哺乳动物是人。

43. 一种药物组合物，其包含权利要求1-27中任一项所述的自组装化合物或其药学可接受的盐、溶剂合物、多晶型物或立体异构体以及药学可接受的载体。

44. 权利要求43所述的药物组合物，其还包含选自赋形剂、润湿剂、稀释剂、金属硬脂酸盐及其组合的至少一种成分。

45. 权利要求43所述的药物组合物，其为单个的单位剂型。

46. 权利要求43所述的药物组合物，其为适合于插入到哺乳动物细胞的脂双层中的单个的单位剂型。

47. 一种离子通道，其包含多个权利要求1-27中任一项所述的自组装化合物的分子，其中所述离子通道在细胞膜中。

48. 权利要求47所述的离子通道，其中所述离子通道为阴离子通道。

49. 权利要求47-48中任一项所述的离子通道，其中所述细胞膜包含脂双层。

50. 一种治疗、管理或预防与氯离子通道功能障碍相关的疾病的方法，该方法包括给予多个权利要求1-27中任一项所述的自组装化合物的分子或其药学可接受的盐、溶剂合物、多晶型物或立体异构体。

51. 权利要求50所述的方法，其中所述疾病是囊性纤维化、巴特氏综合征、登特病、遗传性肾结石病、先天性肌强直、贝克综合征、癫痫病、卵黄样黄斑营养不良、惊跳病、少年肌阵挛性癫痫或石骨症。

52. 权利要求50所述的方法，其中将所述自组装化合物或其药学可接受的盐、溶剂合物或立体异构体插入到哺乳动物细胞的脂双层中。

53. 权利要求52所述的方法，其中所述哺乳动物是人。



## 合成离子通道

### 技术领域

本发明提供能够在脂双层或细胞膜中形成离子通道的自组装化合物，包含该化合物的形成离子通道的组合物，包含该化合物的药物组合物以及制备和使用该化合物和组合物的方法。本发明还提供在脂双层或细胞膜中形成合成阴离子通道的方法。本发明还提供治疗、预防和/或管理与氯离子通道功能障碍有关的疾病的方法，以及使用本发明公开的自组装化合物介导氯离子流通过脂质体膜或活细胞膜的方法。

### 背景技术

跨细胞膜或脂双层的离子转运是重要的生物学过程。选择性地调节离子流的离子通道参与很多生理过程，包括但不限于神经信号传递、肌肉收缩、心血管功能和免疫应答。天然的离子通道可以是完整的膜蛋白或者更典型的是几个蛋白的组装体，所述蛋白紧密环绕在穿过脂双层的含水孔周围。天然离子通道的两个关键特性是离子选择性和门控性。离子选择性指通道选择性地仅允许特定的离子种类流过其孔，而门控性指通道开放和关闭的机制。阴离子通道通常是生物膜中的蛋白质孔，其允许阴离子沿着其电化学梯度被动扩散。虽然这些通道可以使其他阴离子如碘离子或硝酸根离子通过，但是它们通常被称作氯离子通道，因为氯离子是在生物体中最丰富的阴离子，因此，大部分情况下氯离子是主要的穿过的种类。

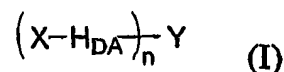
氯离子通道的功能包括但不限于离子动态平衡、细胞体积调控、跨表皮转运和电兴奋性的调控等。因此，氯离子通道功能障碍参与一些与上述功能损害有关的病症和疾病。这些人疾病的一些非限制性例子包括囊性纤维化、巴特氏综合征、登特病、遗传性肾结石病、先天性肌强直、贝克综合征(Becker syndrome)、癫痫病、卵黄样黄斑营养不良、惊跳病、少年肌阵挛性癫痫和石骨症。因而，氯离子通道已成为新药研发的重要靶点。选择性地调节或模拟氯离子通道功能的小分子有可能用于治疗如上所述的人疾病。由于氯离子通道的重要生理学价值，因此期望了解如何调节氯离子通道的功能。

能够模拟天然离子通道功能的合成离子通道可以用作模型来研究天然离子通道的性质。因此,发现新型的合成离子通道可以导致新的化合物或组合物,该新的化合物或组合物用于治疗或预防其中离子转运起重要作用的病症和疾病。这些合成的通道有可能用于控制生物系统中的离子流。虽然很多研究着重于阳离子通道模型,但是对于合成阴离子通道尤其是氯离子通道仅有少量报道。大部分的合成氯离子通道一般具有相对复杂的结构和高分子量,这两点可能限制了它们在药物研发中的应用。因此,仍然需要新型的合成离子通道化合物,该化合物能够用于治疗或预防包括氯离子通道在内的离子通道的功能障碍相关的疾病。

### 发明概述

本发明提供无需外源的帮助就可以自组装以在脂双层或细胞膜中形成离子通道的化合物,包括该化合物的离子通道组合物,以及制备和使用其用于治疗、管理或预防氯离子通道功能障碍相关的疾病的方法。在某些实施方案中,所述化合物可以在内部或外部物理力的帮助下组装形成离子通道,所述内部或外部物理力例如电磁辐射(如X-射线、紫外线、可见光、微波或红外辐射)、电场、磁场、超声波、声波、热或压力等。在某些实施方案中,所述化合物可以在极性化合物例如酸、碱等或非极性化合物例如碳氢化合物等的帮助下组装形成离子通道。另外,本发明还提供具有含所述自组装化合物的合成阴离子通道的生物和合成膜。在某些实施方案中,所述化合物是在脂双层或细胞膜中自组装形成离子通道的自组装化合物。在某些实施方案中,离子通道为阴离子通道。另外,本发明提供合成离子通道的设计方法,包括小分子通过氢键自组装形成合成离子通道的步骤。

一方面,本发明提供由式(I)代表的自组装的化合物:



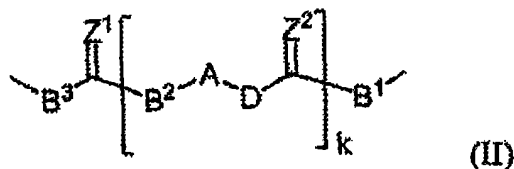
其中, X是未取代或取代的烃基或杂环基;

n是从1到6的整数;

Y是一价、二价、三价、四价、五价或六价的连接基团,该连接基团通过从未取代或取代的烃(例如烷烃、烯烃和炔烃)、碳环(例如脂族碳环如环己烷或芳烃如苯)或杂环(例如杂芳烃如吡啶)中分别去除1个、2个、3个、4个、5个和六个氢原子形成;且

$H_{DA}$ 是二价基团，该二价基团含有至少一个氢键供体和至少一个氢键受体用于通过氢键进行自组装形成至少一个离子通道。

在一些实施方案中，式(I)中的 $H_{DA}$ 是具有式(II)结构的二价基团：

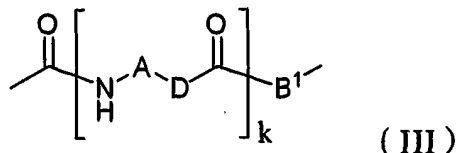


其中 $Z^1$ 和 $Z^2$ 各独立地是O、S或 $NR^1$ ；

A、 $B^1$ 、 $B^2$ 、 $B^3$ 和D各独立地是键、O、S、 $NR^2$ 或者取代或未取代的 $C_{1-10}$ 亚烷基；且

k是从1到20的整数，其中 $R^1$ 和 $R^2$ 各独立地是H、酰基、烃基、碳环基或杂环基，且 $B^1$ 和 $B^2$ 中至少一个是NH。

在其他实施方案中，式(I)中的 $H_{DA}$ 由式(III)表示：



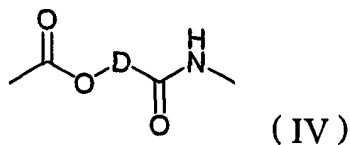
其中k是从1到20的整数；

A是键、O、S、 $NR^2$ 或者取代或未取代的 $C_{1-10}$ 亚烷基，其中 $R^2$ 是H、酰基、烃基、碳环基或杂环基；

$B^1$ 是O或NH；并且

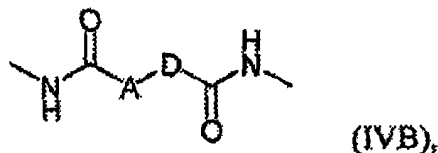
D是 $C_{1-3}$ 亚烷基或者一个或一个以上的烃基或杂环基取代的 $C_{1-3}$ 亚烷基。

在某些实施方案中，式(I)中的 $H_{DA}$ 由式(IV)表示：



其中D是 $C_{1-3}$ 亚烷基或者一个或一个以上的烃基或杂环基取代的 $C_{1-3}$ 亚烷基。

在某些实施方案中，式(I)中的 $H_{DA}$ 由式(IVB)表示：



其中A是键、O、S、NR<sup>2</sup>或者取代或未取代的C<sub>1-10</sub>亚烷基，其中R<sup>2</sup>是H、酰基、烃基、碳环基或杂环基；且

D是C<sub>1-3</sub>亚烷基或者一个或一个以上的烃基或杂环基取代的C<sub>1-3</sub>亚烷基。

在一些实施方案中，本文所公开的自组装化合物的式(I)中的n是1。在其他实施方案中，n是2或3，且X-H<sub>DA</sub>单元中的至少两个是相同的。在另一个实施方案中，n是2或3，且X-H<sub>DA</sub>单元中的至少两个是不同的。

在一些实施方案中，本文所公开的自组装化合物的式(I)中的X是烃基或取代的烃基。在其他实施方案中，X是含有1到14个碳原子的烃基或取代的烃基。在另一个实施方案中，X是含有1到14个碳原子的烷基或取代的烷基。在另一个实施方案中，X是异丁基。

在一些实施方案中，本文所公开的自组装化合物的式(I)中的Y是二价或三价连接基团，该连接基团通过从未取代或取代的烷烃、烯烃或炔烃中分别去除2个或3个氢原子形成。在其他实施方案中，Y是通过从未取代或取代的C<sub>2-12</sub>烷烃、烯烃或炔烃中分别去除2个或3个氢原子形成的二价或三价连接基团。在进一步的实施方案中，Y是未取代或取代的丙烯基或亚丙烯基。

在某些实施方案中，本文所公开的自组装化合物的式(I)中的Y是二价或三价连接基团，该连接基团通过从未取代或取代的单环、二环或三环芳香性碳环中分别去除2个或3个氢原子形成。在其他实施方案中，Y是通过从未取代或取代的芳烃例如苯中分别去除2个或3个氢原子形成的二价或三价连接基团。

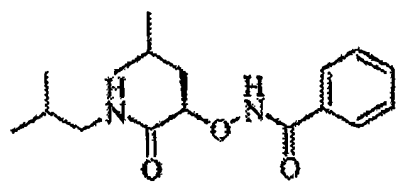
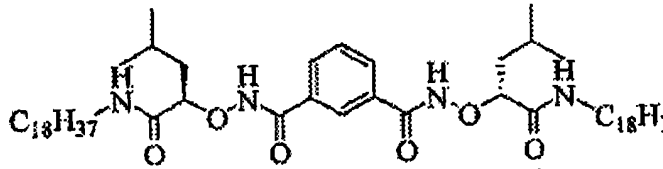
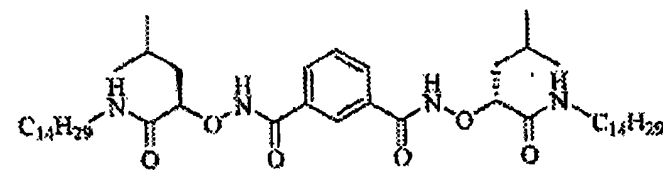
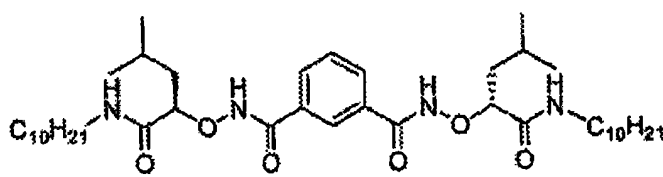
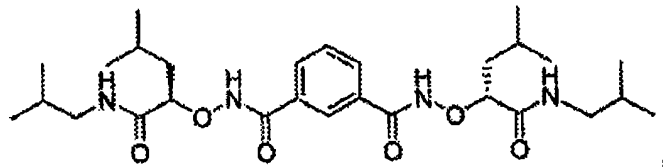
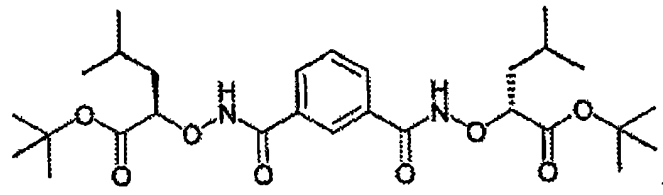
在一些实施方案中，本文所公开的自组装化合物的式(I)中的Y是二价或三价连接基团，该连接基团通过从未取代或取代的单环、二环或三环杂环中分别去除2个或3个氢原子形成。在其他实施方案中，Y是通过从未取代或取代的杂芳烃例如吡啶中分别去除2个或3个氢原子形成的二价或三价连接基团。

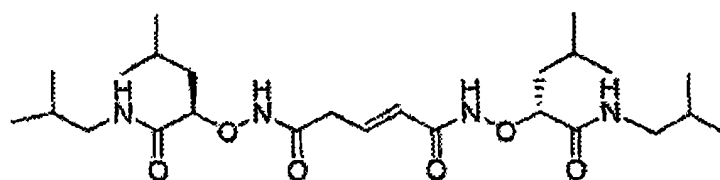
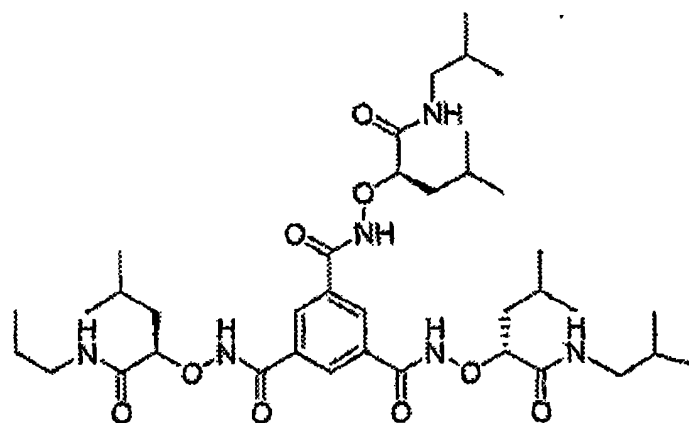
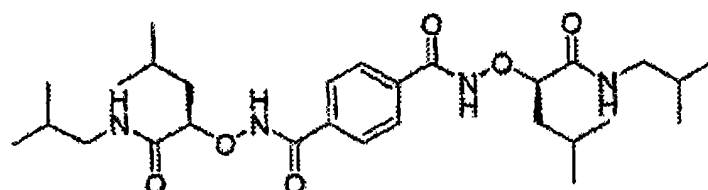
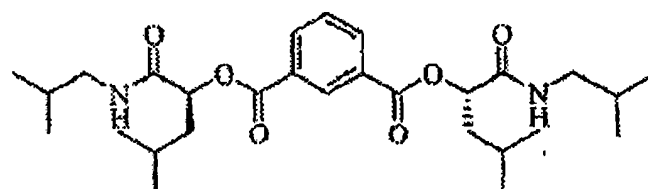
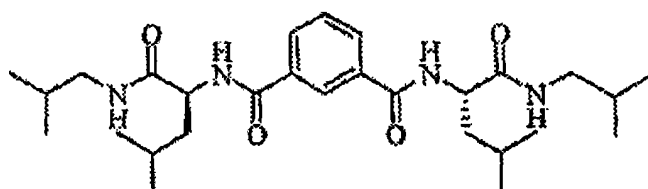
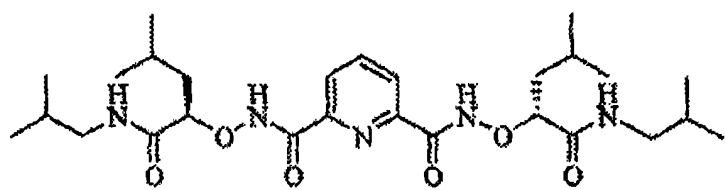
在某些实施方案中，本文所公开的自组装化合物的式(I)中的H<sub>DA</sub>含有至少一个伯酰胺或仲酰胺基团。

在一些实施方案中，式(II)、(III)、(IV)或(IVB)中的D是被至少烷基、芳基、取代烷基或取代芳基基团所取代的C<sub>1-3</sub>亚烷基。在其他实施方案中，D是被至少一个异丁基所取代的C<sub>1-3</sub>亚烷基。在进一步的实施方案中，D是被异丁基取代的亚甲基。

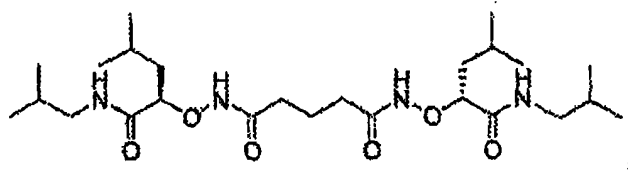
在某些实施方案中，式(II)或(III)中的A是键；D是亚甲基或取代的亚甲基；且k是1。在其他实施方案中，式(II)或(III)中的A是O；D是亚甲基或取代的亚甲基；且k是1。在进一步的实施方案中，Y是亚芳基、亚杂芳基、亚烷基或亚烯基；且各X是具有1到14个碳原子的未取代或取代的烃基。

在一些实施方案中，本文所公开的自组装化合物是：



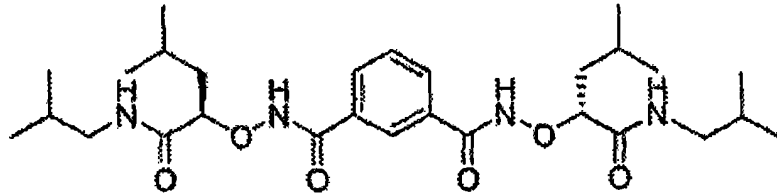


或



或者其盐、溶剂合物、多晶型物或立体异构体。

在进一步的实施方案中，所述自组装化合物是：



或者其盐、溶剂合物、多晶型物或立体异构体。

另一方面，本发明提供一种离子通道组合物，其包含脂双层或细胞膜以及一些本文所公开的自组装化合物的分子，其中所述分子形成跨膜厚度的阴离子通道。在一些实施方案中，所述一些分子自组装形成跨脂双层厚度的阴离子通道。在进一步的实施方案中，所述阴离子通道是氟离子、氯离子、溴离子、碘离子、硝酸根离子、亚硝酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子、碳酸根离子、碳酸氢根离子、磷酸根离子、磷酸氢根离子、磷酸二氢根离子或醋酸根离子通道。在进一步的实施方案中，所述阴离子通道是氯离子通道。

另一方面，本发明提供一种在脂双层或细胞膜中形成合成阴离子通道的方法，所述方法包括将所述膜和一些本文所公开的自组装化合物的分子组合，该分子自组装形成阴离子通道。

另一方面，本发明提供一种调节阴离子流通过脂双层或细胞膜的方法，所述方法包括以下步骤：用一些本文所公开的自组装化合物的分子在所述膜中形成阴离子通道；和之后建立阴离子梯度或膜电位。

另一方面，本发明提供一种在细胞膜中制造合成离子通道的方法，该方法包括以下步骤：提供一些本文公开的自组装化合物的分子；和在膜的横向上形成分子柱，并且在任意两个相邻的分子柱之间通过所述分子的自组装在膜的侧向上形成分子间氢键。在一些实施方案中，本文所公开的细胞膜包含脂双层。

另一方面，本发明提供一种治疗、管理或预防氯离子通道功能障碍相关疾病的方法，该方法包括向需要该治疗、管理或预防的哺乳动物给予治疗或预防有效量的本文公开的自组装化合物或者其药学可接受的盐、溶剂合物或立体异构体。

另一方面，本发明提供一些本文所公开的自组装化合物或其药学可接受的盐、溶剂合物、多晶型物或立体异构体的分子在制备用于治疗、管理或预防与氯离子通道功能障碍相关的疾病的药物中的用途。

在一些实施方案中，所述疾病为囊性纤维化、巴特氏综合征、登特病、遗传性肾结石病、先天性肌强直、贝克综合征、癫痫病、卵黄样黄斑营养不良、惊跳病、少年肌阵挛性癫痫或石骨症。在其他实施方案中，该自组装化合物或其药学可接受的盐、溶剂合物或立体异构体插入到哺乳动物细胞的脂双层中。在进一步的实施方案中，所述哺乳动物为人。

另一方面，本发明提供一种药物组合物，其含有用于治疗、管理或预防氯离子通道功能障碍相关疾病的治疗或预防有效量的本文所公开的自组装化合物或其药学可接受的盐、溶剂合物、多晶型物或立体异构体。在一些实施方案中，所述药物组合物进一步包含载体。在一些实施方案中，所述药物组合物进一步包含选自赋形剂、润湿剂、载体、稀释剂、硬脂酸盐及其组合的至少一种成分。在其他实施方案中，所述药物组合物为单个的单位剂型。在进一步的实施方案中，所述药物组合物为适合于插入哺乳动物细胞的脂双层中的单个的单位剂型。

另一方面，本发明提供一种离子通道，其含有一些本文所公开的自组装化合物的分子，其中所述离子通道在细胞膜中。

在下文中，其他实施方案将部分地清楚，部分地被描述。

## 附图简述

图1示意根据其结构或“设计”的一些合成离子通道的分类。

图2示意跨脂双层的合成离子通道，其中虚线代表氢键，粗实线代表自组装分子，各自组装分子含有至少一个氢键供体（用D表示），以及至少一个氢键受体（用A表示）。

图3示意在图2的合成离子通道中的可能的阴离子转运过程，其中球代表阴离子，虚线代表氢键，粗实线代表自组装分子，各自组装分子含有至少一个氢键供体（用D表示），以及至少一个氢键受体（用A表示）。当阴离子穿过通道的时候，阴离子单个、依次地与沿合成离子通道的各氢键供体形成氢键。

图4a-d示意实施例2中的各种化学表示法。图4a示意实施例2的化学结构。图4b示意以条棍表示的实施例2的晶体结构，其中碳原子、氢原子、氮原子和氧原子分别用灰色、白色、蓝色和红色小棍表示。键长为2.13 Å的两个8元环分子内氢键显示为绿色虚线。图4c和4d分别显示实施例2的固态装配的顶视图和侧



视图。为清楚起见，省略了图4c和4d中的CH氢原子。分子间氢键在图4d中显示为绿色实线，与邻近分子连接一起形成孔结构。

图5显示从大单层囊泡(LUV)由不同浓度的实施例2介导的氯离子释放，其中使用NaCl囊泡外内缓冲液。实验细节在实施例14中描述。

图6显示在氯离子存在但硫酸根离子不存在下实施例2介导的电解质交换。实验细节在实施例14中描述。

图7显示LUV中来自实施例1-9的不同合成离子通道的氯离子转运能力，其中使用NaCl囊泡外内缓冲液。

图8显示单通道记录的结果，阐释实施例2能够通过特征为电压依赖性门控特点的离子通道机制介导氯离子跨脂双层转运。实验细节在实施例15中描述。

图9显示全细胞记录结果，阐释实施例2插入到人细胞膜中后能够增加细胞氯离子电流。实验细节在实施例16中描述。

图10显示在具有氯离子敏感的荧光指示剂SPQ的脂质体中实施例2的氯离子转运活性。

图11显示实施例2的X射线晶体结构。

图12显示LUV中来自实施例2和10-13的不同合成离子通道的氯离子转运能力，其中使用NaCl囊泡外内缓冲液。

## 定义

为了有助于理解本发明公开的主题，下面定义本文所使用的术语、缩写或其他简略表示法。任何未定义的术语、缩写或简略表示法都理解为与提交本申请同时代的本领域技术人员所使用的普通含义。

“pS”指兆分之一西门子(picoSiemens)。

“mM”指毫摩尔。

“uM”指M=微摩尔。

“nM”指纳摩尔。

“阴离子”指带负电的离子。

“阳离子”指带正电的离子。

“双层膜”或“脂双层”指双分子厚度组装体，其形成围绕真核细胞的通透性屏障，并在细胞内的隔室、脂质体和其他细胞器官中发挥类似的作用。该膜含有很多两性脂质分子但是在细胞内它主要由磷脂构成。

“细胞”指原核细胞、酵母细胞、真核细胞、植物细胞、人细胞、动物细胞，在一个实施方案中为哺乳动物细胞。

“膜”指薄的半通透屏障，其分开可能具有相同或不同组分的两个液相。

“细胞膜”指覆盖有蛋白质的选择性通透的脂双层。细胞膜包括细胞的外层。

“通道”或“离子通道”指对膜不渗透化合物的水化扩散通道，通常由在细胞膜内的孔形成，允许中性或离子物质从膜的一侧转移到另一侧。

“超分子组装体”指明确确定(well-defined)的复合物，由分子通过非共价键，如范德华力或氢键，连接在一起形成。超分子组装体可以包括两个或更多的分子。超分子组装体可以是任意形式或形状，如球形、圆柱形、碟形或片状，可以是实心的或中空的。在一些实施方案中，超分子组装体是中空的圆柱形。在其他实施方案中，超分子组装体是有孔的通道。超分子组装体的直径可以从纳米级到微米级。

“自组装”指分子不经外源指导或管理的组装。一般有两种类型的自组装，分子内自组装和分子间自组装。分子内自组装分子通常是复合多聚体，具有从无规则卷曲的构象组装成明确确定稳定的结构。分子间自组装是指分子形成超分子组装体的能力。

“自组装化合物”或“自组装分子”指能够通过分子间自组装过程形成超分子组装体的化合物或分子。

“氢键供体”指具有至少一个氢原子的基团，该氢原子与强电负性的杂原子包括氧、氮和硫相连。

“氢键受体”指强电负性的杂原子，包括氧、氮、硫、氟、氯和溴。

“脂质体”指人工囊，通常为球形，由一个（单层）或多个（多层）磷脂双层膜组成，该磷脂双层膜包围含水核心并以很好方式模拟生物膜。术语脂质体有时与“囊泡”互换使用。

“单层”指由单层组成的磷脂脂质体的双层膜。

“多层”指由结构与洋葱类似的一个以上的同心层组成的磷脂脂质体的双层膜。

“选择性”指可以测量出的对某一物质相对于另一物质的偏好，包括阳离子相对于阴离子、阴离子相对于阳离子、一种阳离子相对于另一种阳离子，或一种阴离子相对于另一种阴离子。

“转运”指离子或其他物质跨膜的运动。

“氨基”指伯胺、仲胺或叔胺，其可以任选地是烷基、取代的烷基或杂原子取代的。尤其包括的是为杂环成员的仲胺或叔胺氮原子。还特别包括的是，例如，由酰基基团取代的仲胺或叔胺基团。

“烷基”指完全饱和的无环一价基团，含有碳和氢并且可以是支链或直链。烷基基团的例子包括甲基、乙基、正丁基、叔丁基、正庚基和异丙基。除非特殊说明，本发明所描述的烷基基团优选为低级烷基，主链含有一到十个碳原子，最多20个碳原子，例如甲基、乙基、正丁基、异丁基、叔丁基、异戊基、正戊基。

“烯基”指一价或二价的不饱和，优选单不饱和的基团，含有碳和氢并且可以是环形、支链或直链。除非特殊说明，本发明所描述的烯基基团优选为低级烷基，主链含有2到8个碳原子，最多20个碳原子，例如乙烯基、丙烯基、异丙烯基、丁烯基、异丁烯基、己烯基等。

“炔基”指低级烷基，主链含有2到8个碳原子，最多20个碳原子。它们可以含有直链或支链，例如乙炔基、丙炔基、异丙炔基、丁炔基、异丁炔基、己炔基等。

“芳烃”指芳基或杂芳基。

“芳基”指任选取代的碳环芳香基团，尤其是单环或双环基团，在环部分中含有6到12个碳原子，如苯基、联苯基、取代苯基、取代联苯基或取代萘基。苯基和取代苯基是更优先的芳基。

“卤素 (halogen)”或“卤 (halo)”指氟、氯、溴和碘。

“杂原子”指除了碳和氢之外的原子。

“杂环”或“杂环基”指任选取代的、完全饱和或不饱和、单环或双环、芳香或非芳香基团，在至少一个环中具有至少一个杂原子，优选在各环中5或6个原子。芳香杂环基（即杂芳基）基团优选在环中具有1或2个氧原子，1或2个硫原子，和/或1到4个氮原子，并且可以通过碳或杂原子连接到分子中的其余部分上。杂芳基的非限制性例子包括咪喃基、噻吩基、噻唑基、吡啶基、噁唑基、吡咯基、吲哚基、喹啉基或异喹啉基等。取代基团的非限制性例子包括下列一个或多个基团：烃基、取代烃基、酮基、羟基、保护羟基、酰基、酰氧基、烷氧基、链烯氧基、炔氧基、芳氧基、卤素、酰氨基、氨基、硝基、氰基、硫醇、缩酮、缩醛、酯和醚。

“烃”或“烃基”指有机化合物或基团，其只由碳元素和氢元素组成。烃基包括烷基、烯基、炔基和芳基基团。烃基还包括被其他脂族、环状或芳基烃基团取代的烷基、烯基、炔基和芳基基团，例如烷芳基、烯芳基和炔芳基。在一些实施方案中，“烃”或“烃基”含有1到20个碳原子。

“亚烃基”指二价基团，该二价基团通过从烃中去除两个氢原子形成，自由价不形成双键，例如1,3-间苯、丙烷-1,3-二基和亚甲基。

本文用于描述化合物或化学基团的“取代的”指该化合物或化学基团中至少一个氢原子被第二个化学基团替换。所述第二个化学基团可以是任意期望的取代基，只要不对化合物的期望活性产生负面影响。取代基的例子包括例示的化合物以及本文公开的实施方案，以及卤素；烷基；杂烷基；烯基；炔基；芳基；杂芳基；羟基；烷氧基；氨基；硝基；硫醇；硫醚；亚胺；氰基；酰氨基；膦酸酯(phosphonato)；膦；羧基；硫代羰基；磺酰基；氨磺酰；酮；醛；酯；氧代；卤代烷基（例如，三氟甲基）；碳环环烷基，其可以是单环或融合或非融合的多环（例如环丙基、环丁基、环戊基或环己基）或杂环烷基，其可以是单环或融合或非融合的多环（例如吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基或噻嗪基）；碳环或杂环、单环或融合或非融合多环芳基（例如苯基、萘基、吡咯基、吲哚基、呋喃基、噻吩基、咪唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、三唑基、四唑基、吡唑基、吡啶基、喹啉基、异喹啉基、吡啶基、吡嗪基、哒嗪基、嘧啶基、苯并咪唑基、苯并噻吩基或苯并呋喃基）；氨基（伯、仲或叔）；*o*-低级烷基；*o*-芳基、芳基；芳基-低级烷基； $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ ； $-\text{CONH}_2$ ； $-\text{OCH}_2\text{CONH}_2$ ； $-\text{NH}_2$ ； $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ； $-\text{OCHF}_2$ ； $-\text{CF}_3$ ； $-\text{OCF}_3$ ； $-\text{NH}(\text{烷基})$ ； $-\text{N}(\text{烷基})_2$ ； $-\text{NH}(\text{芳基})$ ； $-\text{N}(\text{烷基})(\text{芳基})$ ； $-\text{N}(\text{芳基})_2$ ； $-\text{CHO}$ ； $-\text{CO}(\text{烷基})$ ； $-\text{CO}(\text{芳基})$ ； $-\text{CO}_2(\text{烷基})$ ；和 $-\text{CO}_2(\text{芳基})$ ；并且这些基团还可以任选被融合环结构或桥例如 $-\text{OCH}_2\text{O}-$ 取代。这些取代基可以任选被选自这些基团的取代基进一步取代。所有本发明公开的化学基团都可以被取代，除非特别说明。例如，本发明描述的“取代”的烷基、烯基、炔基、芳基、烃基或杂环基团可以是被烃基基团、被取代的烃基基团、杂原子或杂环所取代的基团。进一步来说，取代基可以包括其中碳原子被杂原子取代的基团，所述杂原子例如氮、氧、硅、磷、硼、硫或卤素原子。这些取代基可以包括卤素、杂环、烷氧基、链烯氧基、炔氧基、芳氧基、羟基、保护羟基、酮基、酰基、酰氧基、硝基、氨基、酰氨基、氰基、硫醇、缩酮、缩醛、酯和醚。

“药学可接受的盐”包括但不限于，可以在本发明的化合物中存在的酸性或碱性基团的盐。本质上为碱性的本发明的化合物能够与各种无机和有机酸形成多种盐。用于和所述碱性化合物一起制备药学可接受的盐的酸是形成含有药学可接受的阴离子的盐的那些酸，所述阴离子包括但不限于醋酸根、苯磺酸根、苯甲酸根、碳酸氢根、酒石酸根、溴离子、乙二胺四乙酸钙、右旋樟脑磺酸根、碳酸根、氯离子、溴离子、碘离子、柠檬酸根、二氢氯化物、乙二胺四乙酸根、乙二磺酸、丙酸酯十二烷硫酸根(estolate)、乙磺酸根(esylate)、富马酸根、葡庚糖酸根、葡糖酸根、谷氨酸根、对羟乙酰氨基苯膦酸根(glycollylarsanilate)、己基间苯二酚酸根(hexylresorcinate)、哈胺、羟萘酸根、羟乙基磺酸根、乳酸根、

乳糖酸根、苹果酸根、马来酸根、扁桃酸根、甲磺酸根、甲基硫酸根、muscate、茶磺酸根、硝酸根、泛酸根、磷酸根/二磷酸根、多聚半乳糖醛酸根、水杨酸根、硬脂酸根、琥珀酸根、硫酸根、丹宁酸根、酒石酸根、茶氯酸根、三乙基碘和双羟萘酸根。包含氨基基团的本发明的化合物，除了与上述酸以外，也能够与各种氨基酸形成药学可接受的盐。本质上为酸性的本发明的化合物能够与各种药学可接受的阳离子形成碱盐。这些盐的非限制性的例子包括碱金属或碱土金属盐，尤其是钙、镁、钠、锂、锌、钾和铁盐。

“立体异构体”包括所有对映异构体/立体异构体纯的或富含对映异构体/立体异构体的本发明公开的化合物。

“立体异构体纯的”或“对映异构体纯的”指化合物含有一种立体异构体，基本上不含其对应的立体异构体或对映异构体。例如，当化合物含有80%、90%或95%或更多的一种立体异构体和20%、10%或5%或更少的另一种对应的立体异构体时，即认为其为“立体异构体纯的”或“对映异构体纯的”。在一些情况下，本发明的化合物相对于某手性中心为大约80% ee (对映体过量)或更多对映体过量，优选等于或超过90% ee (对映体过量)，更优选相对于某手性中心95% ee时，即认为该化合物是具有旋光性或立体异构体纯的/对映异构体纯的(即基本上为R型或基本上为S型)。

“富含立体异构体的”或“富含对映体异构体的”含有外消旋混合物，以及其他本发明的化合物的立体异构体的混合物(例如R/S=30/70、35/65、40/60、45/55、55/45、60/40、65/35和70/30)。

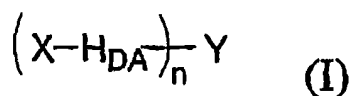
“水合物”指本发明的化合物或其盐，其进一步包含通过分子间非共价力结合的化学当量或非化学当量的水。

“溶剂合物”指本发明的化合物与一种或几种溶剂分子缔合形成的溶剂合物。术语“溶剂合物”包括水合物(如一水合物、二水合物、三水合物、四水合物等)。

“多晶型物”指本发明的化合物或复合物的固态晶形。同一种化合物的不同多晶型物可以表现不同的物理、化学和/或光谱学特性。

## **发明详述**

本发明提供自组装化合物，其能够在脂双层或细胞膜中形成离子通道，由式(I)表示：

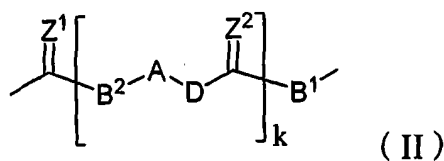


其中, X是未取代或取代的烃基或杂环基;

n是从1到6的整数;

Y是一价、二价、三价、四价、五价或六价连接基团, 该连接基团通过从未取代或取代的烃、碳环或杂环中分别去除1个、2个、3个、4个、5个和6个氢原子形成。

$H_{DA}$ 是二价基团, 具有式(II):



其中 $Z^1$ 和 $Z^2$ 各自独立地是O、S或 $NR^1$ ;

A、 $B^1$ 、 $B^2$ 、 $B^3$ 和D各自独立地是键、O、S、 $NR^2$ 或者取代或未取代的 $C_{1-10}$ 亚烷基; 且

k是从1到20的整数, 其中 $R^1$ 和 $R^2$ 各自独立地是H、酰基、烃基、碳环基或杂环基, 且 $B^1$ 和 $B^2$ 中至少一个是NH。

在一些实施方案中,  $H_{DA}$ 是取代的亚烃基, 含有至少一个氢键供体和至少一个氢键受体。在进一步的实施方案中, 氢键供体包含直接连接到氧、氮或硫上的氢原子。在进一步的实施方案中, 氢键受体是氧原子、氮原子、硫原子、氟原子、氯原子或溴原子。在特定的实施方案中, 式(I)中的 $H_{DA}$ 含有至少一个伯酰胺或仲酰胺基团。

在某些实施方案中, 式(I)中的n是1。在其他实施方案中, 式(I)中的n是2, 且两个 $X-H_{DA}$ 单元是相同或不同的。

在一些实施方案中, X是烃基基团, 如烷基、芳基或芳烷基, 含有最多18个碳原子, 被含有氧、氮或硫的基团任选取代。在其他实施方案中, X是杂环基团, 被含有氧、氮或硫的基团任选取代。在一个实施方案中,  $H_{DA}$ 含有二酰胺并且X是异丁基基团( $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 通过氮原子连接到 $H_{DA}$ , 形成末端异丁基酰胺。在其他实施方案中, 式(I)中的X是烃基或取代的烃基。在特定实施方案中, 式(I)中的X是含有1到14个碳原子的烃基或取代的烃基。在进一步的实施方案中, 式(I)中的X是含有1到14个碳原子的烷基或取代的烷基。在进一步的实施方案中, 式(I)中的X是异丁基。

在某些实施方案中，式(I)中的Y是二价或三价连接基团，该连接基团通过从未取代或取代的烷烃、烯烃或炔烃中分别去除2个或3个氢原子形成。在其他实施方案中，Y是通过从未取代或取代的C<sub>2-12</sub>烷烃、烯烃或炔烃中分别去除2个或3个氢原子形成的二价或三价连接基团。在进一步的实施方案中，Y是未取代或取代的丙烯基或亚丙烯基。

在一些实施方案中，式(I)中的Y是二价或三价连接基团，该连接基团通过从未取代或取代的单环、二环或三环芳香性碳环中分别去除2个或3个氢原子形成。在进一步的实施方案中，所述芳香性碳环是未取代或取代苯。在进一步的实施方案中，Y是通过从未取代的苯中分别去除2个或3个氢原子形成的二价或三价连接基团。

在一些实施方案中，式(I)中的Y是二价或三价连接基团，该连接基团通过从未取代或取代的单环、二环或三环杂环中分别去除2个或3个氢原子形成。在进一步的实施方案中，所述杂环是未取代或取代的吡啶。在进一步的实施方案中，Y是亚吡啶基。

在特定的实施方案中，式(I)中的Y是亚芳基或亚杂芳基，并且各H<sub>DA</sub>与Y的环原子连接。在一些实施方案中，式(I)中的Y是单环、二环或者三环亚芳基。在特定的实施方案中，式(I)中的Y是亚芳基或亚杂芳基，仅具有一个5元、6元或7元环；并且各H<sub>DA</sub>与Y的环原子连接。在某些实施方案中，式(I)中的Y是亚苯基、亚吡啶基、取代的亚苯基或取代的亚吡啶基。

在进一步的实施方案中，Y是亚芳基或亚杂芳基；各H<sub>DA</sub>与Y的环原子连接；并且各X是未取代或取代的烃基，具有1-14个碳原子。

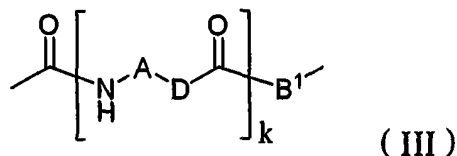
在特定的实施方案中，H<sub>DA</sub>可以选自于多种既含氢键供体又含氢键受体的有机单元。例如，H<sub>DA</sub>可以是取代的烃基或杂环基。不被任何理论所束缚，看起来化合物自组装形成离子通道的驱动力由很多明确的分子间氢键相互作用所提供，该氢键相互作用在低电解质常数的脂双层介质中更喜欢。在特定的实施方案中，H<sub>DA</sub>可以是取代的烃基，具有低级烷基醚、酯、硫酯、酰胺、羟基、硫醇、氨基、偶氨基或卤取代基或其他氢键供体和氢键受体。例如，在一个实施方案中，H<sub>DA</sub>含有两个酰胺键，如氨甲酰键。在另一个实施方案中，H<sub>DA</sub>是肽。

在其他实施方案中，在Y把相同或不同的X-H<sub>AD</sub>单元连接到一起时，化合物的形成离子通道的自组装效率可以被增强，从而允许更可能形成三维的分子间氢键网络。在这些实施方案中，Y单元在特定的实施方案中是刚性的足以把X-H<sub>AD</sub>单元固定在特定的方向上，在这些方向上所述化合物可以更有效地自组装。符合这些设计考虑的Y单元可以从多种有机单元中选择。一般来说，这些

单元是碳环或杂环。非环状的Y单元也在考虑范围之内。例如，Y可以是含有碳原子并任选含有氮、氧或硫环原子的5元或6元环，其中X-H<sub>DA</sub>单元共价地与环原子连接。在一个实施方案中，Y是亚苯环。

本发明提供的化合物可以由领域技术人员利用已知技术以及本文公开的一般合成方法经有机合成得到。化合物的设计、合成和表征在实施例中详细描述。例如，在一个实施方案中，H<sub>DA</sub>是肽，因此可以使用标准的肽偶联方法通过酰胺键与X和Y单元分别相连接。

在其他实施方案中，式(I)中的H<sub>DA</sub>由式(III)表示：



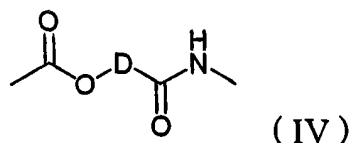
其中k是1或2；

A是键、O、S、NR<sup>2</sup>或者取代或未取代的C<sub>1-10</sub>亚烷基，其中R<sup>2</sup>是H、酰基、烃基、碳环基或杂环基；

B<sup>1</sup>是O或NH；并且

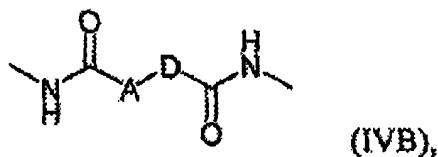
D是C<sub>1-3</sub>亚烷基或者一个或一个以上的烃基或杂环基取代的C<sub>1-3</sub>亚烷基。

在某些实施方案中，式(I)中的H<sub>DA</sub>由式(IV)表示：



其中D是C<sub>1-3</sub>亚烷基或者一个或一个以上的烃基或杂环基取代的C<sub>1-3</sub>亚烷基。

在其他实施方案中，式(I)中的H<sub>DA</sub>由式(IVB)表示：



A是键、O、S、NR<sup>2</sup>或者取代或未取代的C<sub>1-10</sub>亚烷基，其中R<sup>2</sup>是H、酰基、烃基、碳环基或杂环基；且

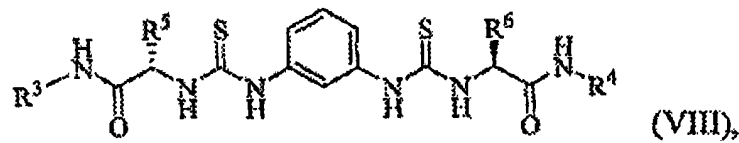
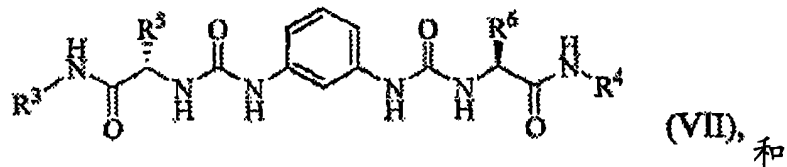
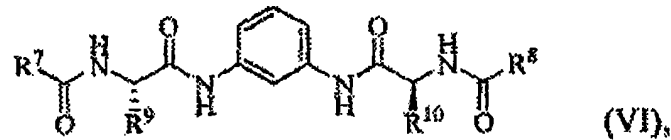
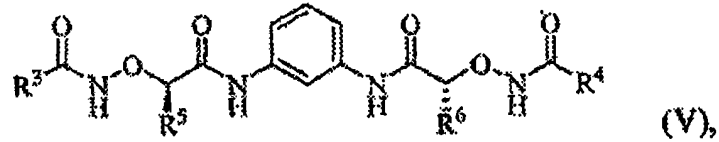
D是C<sub>1-3</sub>亚烷基或者一个或一个以上的烃基或杂环基取代的C<sub>1-3</sub>亚烷基。

在特定的实施方案中，式(III)或(IV)中的D是C<sub>1-3</sub>亚烷基，其被至少一个烷基、芳基、取代烷基或取代芳基所取代。在进一步的实施方案中，式(III)或(IV)中的D是C<sub>1-3</sub>亚烷基，其被至少一个异丁基所取代。在进一步的实施方



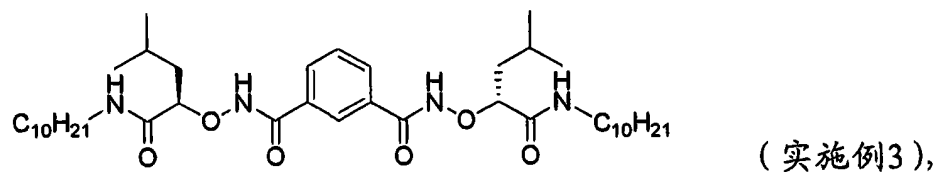
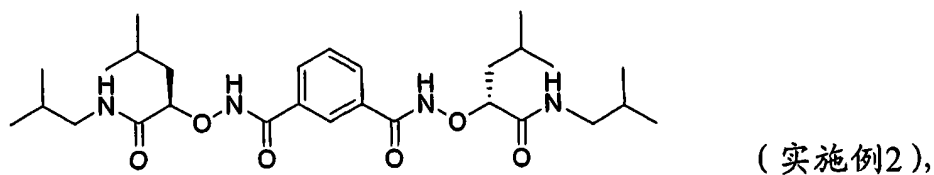
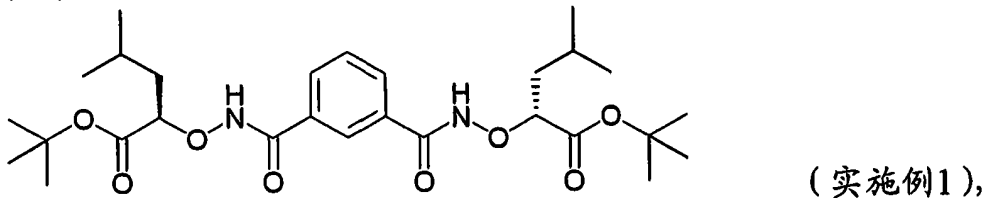
案中，式(III)中的A是键；D是亚甲基或取代的亚甲基；且k是1。在进一步的实施方案中，式(III)中的A是O；D是亚甲基或取代的亚甲基；且k是1。

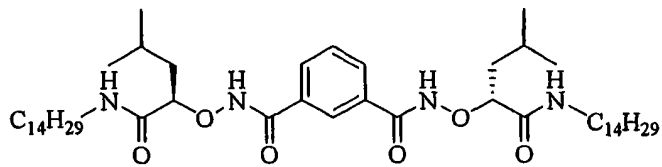
在一些实施方案中，所述自组装化合物具有下式之一：



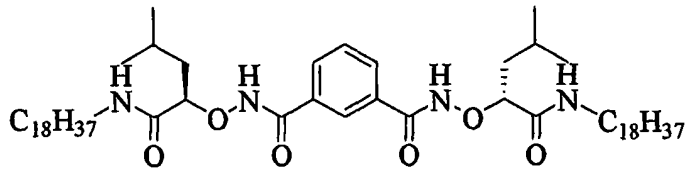
其中各  $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  和  $R^6$  是 H、酰基、烃基、碳环基或杂环基。

在特定实施方案中，所述自组装化合物是下列化合物中的一种：

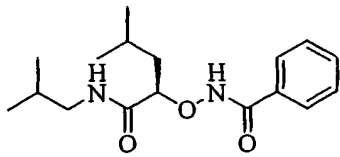




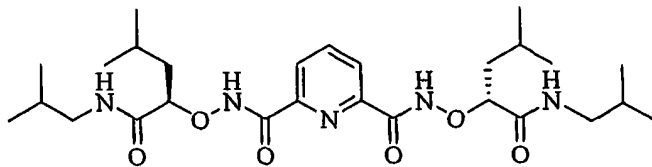
(实施例4),



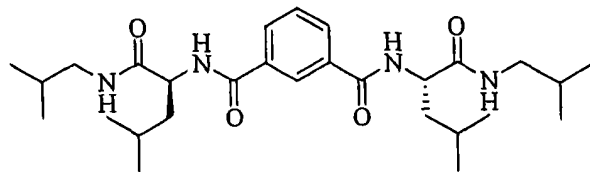
(实施例5)



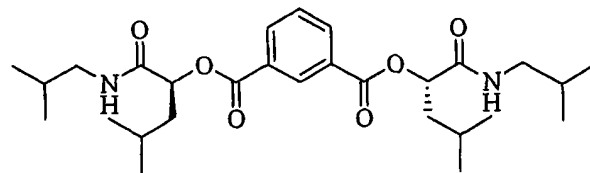
(实施例6),



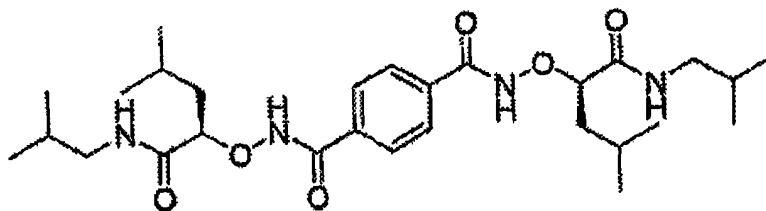
(实施例7),



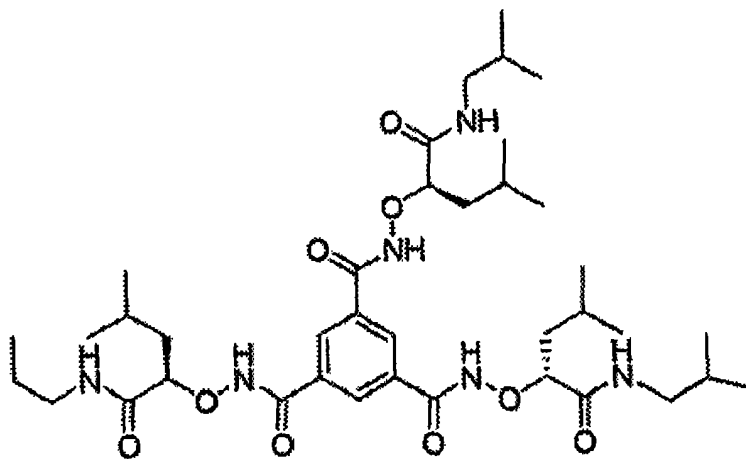
(实施例8),



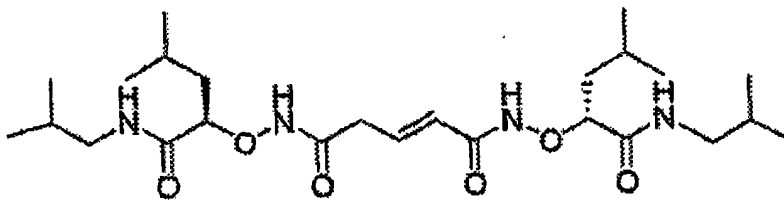
(实施例9),



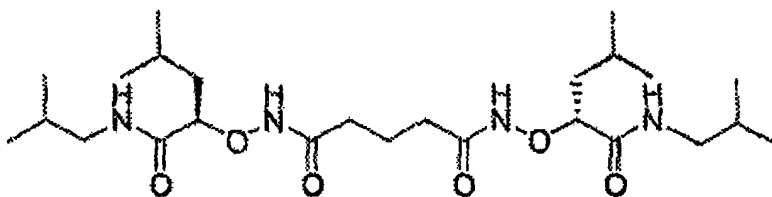
(实施例10),



(实施例11),



(实施例12), 或



(实施例13)。

或者是盐、溶剂合物、多晶型物或立体异构体。

合成离子通道可以通过跨细胞膜构建孔样结构而制备。合成离子通道可以根据其结构或“设计”进行分类。关于图1, 合成离子通道最简单的设计包含长度大约25-40 Å的大分子, 其具有单分子的孔样结构。其他制备超分子组装离子通道的设计策略包括自组装线性桶板样单体成为“桶-桶板”孔样结构; 以及堆叠大环、箍样单体成为“桶-箍”孔样结构。一些较小的大分子可以自组装成为复杂的“桶-玫瑰花结”(barrel-rosette)孔样结构, 其可以想象为带有片段化桶板的“桶-桶板”孔样结构, 或者是带有片段化箍的“桶-箍”孔样结构。

迄今为止, 所有的合成离子通道都设计为孔样结构, 离子通过其跨膜转运。本发明提供一种新的自组装化合物的设计策略, 所述化合物的分子可以自组装成离子通道。在一些实施方案中, 所设计的分子能够通过非共价相互作用自组装, 在脂质膜的横向上形成分子柱。在一个实施方案中, 两个平行的分子柱之间, 脂质膜的侧向上有分子间氢键, 如图2所示。当阴离子或阳离子到达膜时, 这些分子间氢键可以被识别。当离子转运通过如图3所示的脂质膜的疏水区域

时，最初分子间氢键的供体或受体会分别提供连续的结合位点用于稳定阴离子或阳离子。在一个实施方案中，所设计的自组装化合物显示固态的自组装结构，如图4b-d所示，其具有可用作氯离子通道的通道。

不受任何理论限制，虽然详细的机制还不清楚，但是本发明所公开的自组装化合物能够插入到脂双层中并在其中自组装成为离子通道。认为这些化合物通过明确的分子间氢键相互作用进行组装，该相互作用适合低电解质常数的脂双层介质。这种氢键结合引起的具有相对亲脂表面的化合物的组装，使得化合物能够稳定的整合并且在非极性的脂双层环境中进行自组装，可以穿透脂双层的疏水区域形成离子通道。

具有生理学活性的阴离子如氯离子，参与很多生理过程。在自然条件下，氯离子的跨细胞膜转运由中性阴离子结合蛋白介导（阴离子通道）。本发明所公开的自组装化合物可以插入生理的和合成的细胞膜的脂双层中，并发挥合成离子通道的功能。例如，实施例2中所公开的化合物能够用于制备这种合成离子通道。实施例2能够插入脂质体的脂双层中并自组装形成54pS（兆分之一西门子）氯离子通道，该氯离子通道显示出氯离子选择性和电压依赖性门控。实施例2的化合物还能够人在人胚胎肾细胞（HEK293）的细胞膜中有效地形成氯离子通道，从而在50 nM（纳摩尔）的显著低浓度下就明显地增加了细胞氯离子电流。实施例2的化合物的离子通道行为表明本发明公开的合成离子通道结构能够提供选择性的膜渗透，在很多方面都与在天然蛋白通道中所观察到的相当。

本发明公开的自组装化合物可以调节目标阴离子的浓度，允许对生理系统或相关模型的行为进行研究。或者，阴离子浓度可以通过在治疗性系统中应用自组装化合物进行改变或调节，增加或降低阴离子浓度，以对抗或改善疾病或不良病症。相应地，本发明公开的自组装化合物可以用于调节阴离子包括但不限于卤素离子(halide)如氯离子和溴离子或其他阴离子如硝酸根离子和碳酸氢根离子流入或流出哺乳动物细胞或其他膜系统，如线粒体、内体、溶酶体、分泌性囊泡、内质网、细胞核、高尔基体、细胞内转运泡、MHC加工囊泡、破骨细胞再生的皱褶膜囊泡以及其他具有脂双层膜的系统。

在生物和合成系统中，细胞膜的组成成分根据其在生物系统中的位置及其在合成系统中所要发挥的功能不同而不同。因此，本发明提供在膜中合成离子通道的形成，不考虑该膜是否为天然还是合成来源。在特定的实施方案中，本发明公开的自组装化合物能够通过氢键在生理或非生理系统中进行自组装，并在脂双层或细胞膜中形成阴离子通道。

本发明还提供一种利用本发明提供的化合物和组合物来治疗、预防或改善与细胞氯离子通道失衡有关的疾病或病症的方法。非限制性的这些疾病和病症的例子包括囊性纤维化、巴特氏综合征、登特病、遗传性肾结石病、先天性肌强直、贝克综合征、癫痫病、卵黄样黄斑营养不良、惊跳病、少年肌阵挛性癫痫和石骨症。在一些实施方案中，本发明公开的自组装化合物以适当的量和方式插入哺乳动物细胞膜脂双层中，所述适当的量和方式由特定化合物、患者特征和相关疾病的特征来确定。

在特定实施方案中，所述化合物及组合物可以体内施用于组织，如肺、气管、皮肤、肌肉、脑、肝脏、心脏、脾脏、骨髓、胸腺、膀胱、淋巴、血液、胰脏、胃、肾脏、卵巢、睾丸、直肠、周围或中枢神经系统、眼睛、淋巴器官、软骨和内皮。在特定实施方案中，目标细胞是肌肉细胞（如骨骼肌细胞、心肌细胞和平滑肌细胞）、神经细胞、造血干细胞、神经元细胞、表皮细胞或气道细胞。在其他实施方案中，目标细胞是气管或肺细胞。在进一步的实施方案中，目标细胞是呼吸系统上皮细胞。

表明增加肺表面膜的氯离子通透性减少囊性纤维化突变相关的病理状况。因此，施用本发明的形成氯离子通道的化合物可以增加肺尖上皮细胞氯离子通透性，从而补偿囊性纤维化突变。

囊性纤维化（CF）是高加索人种中最常见的致命性遗传疾病之一。囊性纤维化跨膜传导调节蛋白（CFTR）是氯离子通道，位于上皮细胞的顶膜上，其活性由磷酸化和细胞内核苷酸调节。在气道上皮细胞中，囊性纤维化跨膜传导调节蛋白是主要的氯离子转运通道，调节活性离子转运介导的液体运输。在囊性纤维化中，编码囊性纤维化跨膜传导调节蛋白的基因突变导致跨上皮氯离子转运和液体运输缺陷，结果损害气道粘膜的清理并降低盐敏感的防御素的杀菌活力。已提出，这些缺陷与囊性纤维化患者的肺复发性感染和继发性破坏有关。

在治疗囊性纤维化方面，一些治疗性方法在同时进行研发。这些包括：（1）使用改善杀菌活性和衬气道的粘膜液体的粘度的试剂；（2）使用激活另外的氯离子通道以补偿囊性纤维化跨膜传导调节蛋白氯离子通道缺陷的试剂；（3）蛋白和基因增强治疗；以及（4）使用弥补与囊性纤维化跨膜传导调节蛋白最常见的突变形式相关的细胞内转运缺陷或者抑制过早停止突变的药物。因此，合成阴离子通道的开发在研究细胞阴离子失衡和调节这些病症方面具有非常重要的应用。

本发明公开的自组装化合物能够作为用于治疗和预防目的的药物。尤其是，该自组装化合物可以用于治疗性处理的方法中，该方法包括将该化合物引

入离子转运相关的目标细胞的脂双层中。因此，该化合物可以用于制备治疗或预防目的的药物，用于人体或动物体的治疗。

药物可以直接体内给予，例如，通过注射到肌肉，通过气雾剂方式进入肺等。也可能通过离体的途径，其包括收集来自患者的细胞（骨髓干细胞、外周血淋巴细胞、肌细胞、神经细胞、神经元细胞、上皮细胞等），将化合物给予细胞，然后再将细胞给予患者。

本发明提供的自组装化合物可以通过肌肉、气管内、鼻内、脑内、胸膜内、肿瘤内、心脏内、胃内、腹腔内、表皮、静脉内或动脉内途径，通过注射器或其他类似的方法、适合气道或粘膜治疗的系统如吸入、滴注或气雾法给药。其他给药途径包括施用乳膏、口服或任意其他本领域技术人员已知并适用于本发明提供的化合物和组合物的方法。

给药可以通过很多不同途径实现。一个途径是组合物的口服给药，如丸剂、胶囊或混悬剂。这些组合物可以根据本领域已知的任何方法制备，也可以包括多种非活性成分中的任何。这种组合物中的适合使用的赋形剂包括惰性稀释剂（可以是固体材料、液体溶液和/或油），如碳酸钙、碳酸钾或碳酸钠、乳糖、磷酸钙、磷酸钾、磷酸钠、水、生油(arachis oil)、花生油、液体石蜡或橄榄油；成粒剂和崩解剂，例如玉米淀粉、明胶或阿拉伯树胶和/或润滑剂，如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉等。其他非活性成分可以存在，但不是必需的，包括一种或多种助悬剂（如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍树胶和阿拉伯胶）、增稠剂（如蜂蜡，石蜡或十六醇）、分散剂或保湿剂、防腐剂（如抗氧化剂如抗坏血酸）、着色剂、甜味剂和/或调味剂。

药用组合物可以用保护活性成分免于从体内快速清除的载体制备，该载体例如延时释放制剂或包衣。这些载体包括控释制剂，例如，但不限于，微囊体给药系统和生物降解、生物相容性聚合物，如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙烯醇酸、聚原酸酯、聚乳酸、聚乙二醇、聚乙二醇醚以及其他本领域技术人员已知的那些。

在其他实施方案中，本发明提供方法，其中所述化合物作为加压气雾剂或雾化制剂通过吸入直接给药到患者肺。该制剂可以含有用于肺内和/或经鼻内吸入给药的多种已知气雾剂抛射剂中的任何。另外，可以含有水，可以有也可以没有助溶剂、表面活性剂、稳定剂（如抗氧化剂、螯合剂、惰性气体和缓冲液）。对于从多剂量容器给予的组合物，通常加入抗微生物剂。这些组合物还可以经过过滤和灭菌，并可冻干以增强稳定性和改善溶解性。

药物组合物可以以一定的量和频率给药，只要该量和频率有效地抑制或缓解疾病或病症如囊性纤维化的症状和/或有效地延缓疾病进程。准确的剂量和治疗持续时间可以经验性确定，使用已知的检测方案或通过现有技术中已知的模式系统对组合物进行测试并从中进行推测。根据疾病严重程度的不同改变剂量。可以配制和给予药物组合物以实现治疗有用的效果同时将不期望的副作用最小化。很明显的是，对于任何特定的受试者，特定的给药方案可以根据个体的需要随时间进行调整。

如上面所述，可以将药物组合物给予哺乳动物以刺激氯离子转运，或者治疗、管理或预防囊性纤维化、巴特氏综合征、登特病、遗传性肾结石病、先天性肌强直、贝克综合征、癫痫病、卵黄样黄斑营养不良、惊跳病、少年肌阵挛性癫痫或石骨症等。受益于本发明提供的自组装化合物的给予的患者是患有囊性纤维化、巴特氏综合征、登特病、遗传性肾结石病、先天性肌强直、贝克综合征、癫痫病、卵黄样黄斑营养不良、惊跳病、少年肌阵挛性癫痫或石骨症的那些患者。这些患者可以根据本领域技术人员已知的标准确定，所述标准包括汗液测试中存在异常的高盐浓度、存在高鼻电位或存在囊性纤维化相关的突变。激活氯离子转运还可对其他在气道内显示异常的高粘液积累的疾病如哮喘和慢性支气管炎有益。类似地，便秘可以受益于本发明提供的氯离子转运的激活。

本发明还提供通过静脉内、口服、滴注、吸入、局部、腹腔内、皮下或肌肉内途径给予所述药物组合物的方法。所述药物组合物可以以胶囊剂、散剂、片剂、液体、溶液和气雾剂溶液给予。本发明还提供治疗哺乳动物中引起阴离子跨细胞膜转运缺陷的疾病或其他病症的方法。

本发明另外的特点和优点将被阐明，部分地从说明书描述变得清楚，或者通过实践本发明被了解。

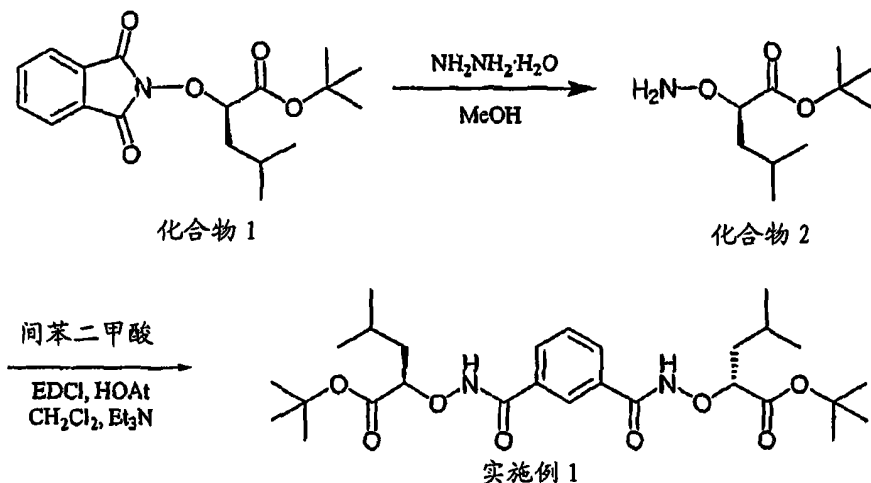
本发明所提供的组合物的剂量是变化的，其取决于例如化合物半衰期、化合物潜在的副作用或其产品的降解、给药途径、患者状况等因素。这些因素能够由本领域技术人员加以确定。基于每天的确切的剂量水平应由医生确定以达到最优化的治疗反应。

### 实施例

下列实施例1-12是对制备和使用通式(I)代表的化合物的方法的详细描述。其他本发明公开内容范围内的化合物可以通过对本领域技术人员而言清楚的

方法采用合适的起始材料进行制备。这些实施例仅做例示的目的被提供，并不限制本发明的范围。

### 实施例1的制备



### 路线A

根据上面的路线A制备实施例1。起始材料D-2-苯二甲酰亚氨基-4-甲基戊酸叔丁酯 (D-*tert*-butyl 2-phthalimidoxy-4-methylpentanoate, 化合物1) 的合成根据文献Yang *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2001, 66, 7303-7312所述。化合物1为白色结晶固体, 通过以下数据表征: m.p. 92–93 °C;  $[\alpha]_D^{20} +77.0^\circ$  (*c* 1.01, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.85–7.81 (m, 2H), 7.78–7.74 (m, 2H), 4.74 (dd, *J* = 8.5, 5.4 Hz, 1H), 2.05–1.91 (m, 2H), 1.72–1.63 (m, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.07 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.00 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169.13, 163.21, 134.50, 128.87, 123.53, 84.74, 83.39, 39.89, 27.82, 24.47, 22.90, 21.96; IR (CHCl<sub>3</sub>) 3032, 1793, 1738 cm<sup>-1</sup>; LRMS (EI, 70 eV) *m/z* 333 (M<sup>+</sup>, 1), 278 (6), 232 (17), 164 (15), 148 (100); HRMS (EI), 用于C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub> (M<sup>+</sup>): 计算值333.1576, 测量值333.1573。

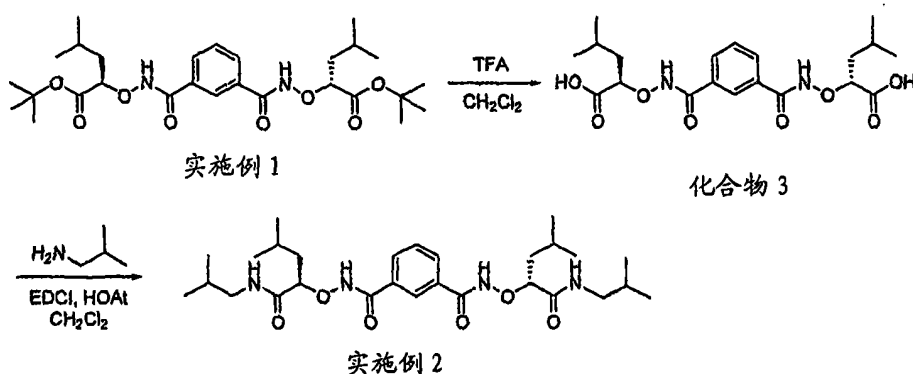
向化合物1 (2.00g, 6.0 mmol) 在CH<sub>3</sub>OH (20 mL) 中的溶液中加入NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (900 mg, 18.0 mmol)。1小时后看到白色沉淀产生。在室温下搅拌大约2.5小时后, 反应混合物进行真空浓缩。将残余物溶于CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中, 用5% NaHCO<sub>3</sub>洗两次, 然后用盐水洗。有机层用无水硫酸钠进行干燥, 然后浓缩, 得到游离胺 (化合物2) 和邻苯二甲酰肼的混合物, 为无色油状物。此混合物不进行进一步的纯化即立刻用于下面的肽偶联反应。

**肽偶联反应:** 在氮气氛下向含有无水化合物2的烧瓶中加入新鲜蒸馏的CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80 mL), 然后加入1-羟基-7-叠氮苯并三唑 (HOAt, 2.11 g, 15.6 mmol)、



间苯二甲酸 (498mg, 3.0mmol)、三乙胺(0.83 mL, 6.0 mmol), 最后加入1-乙基-3-(3-二甲氨基-丙基)碳二亚胺(EDCI, 5.35 g, 18.0 mmol)。搅拌过夜, 用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>稀释反应混合物。有机层用5% NaHCO<sub>3</sub>和盐水洗, 然后用无水硫酸镁干燥, 浓缩。粗油状物用闪蒸柱色谱纯化, 得到1.32 g (82%收率)的实施例1, 为白色固体。实施例1通过以下数据表征: m.p. 57–59 °C;  $[\alpha]_D^{20} + 78.1^\circ$  (c 0.50, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.86 (br, 2H), 8.14 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.90 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 2H), 7.48 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.53 (dd, *J* = 9.0, 4.2 Hz, 2H), 2.01–1.92 (m, 2H), 1.77–1.68 (m, 2H), 1.60–1.51 (m, 2H), 1.46 (s, 18H), 1.02 (d, *J* = 6.5 Hz, 12H), 0.96 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.80, 164.58, 132.18, 130.41, 128.91, 125.58, 82.37, 82.17, 39.86, 27.97, 24.60, 23.18, 23.01, 21.79; IR (CHCl<sub>3</sub>) 3403, 3019, 1730, 1688 cm<sup>-1</sup>; LRMS (EI, 20 eV) *m/z* 536 (M<sup>+</sup>); HRMS (EI, 20 eV), 用于C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (M<sup>+</sup>): 计算值536.3098, 测量值536.3078。

### 实施例2的制备

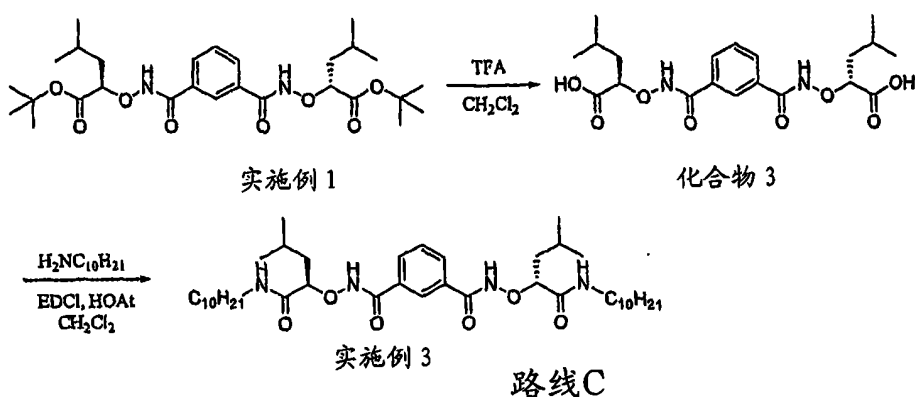


根据上面的路线B制备实施例2。在室温下, 用注射器向实施例1 (537 mg, 1.0 mmol)在CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL)中的溶液中小心加入等体积的CF<sub>3</sub>COOH (5 mL)。在室温下搅拌大约3小时后, 反应混合物进行真空浓缩。残余物与甲苯进行两次共沸, 得到游离酸化合物3, 为白色固体, 该白色固体直接用于肽偶联。

在氮气氛下向含有无水化合物3的烧瓶中加入新鲜蒸馏的CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL), 然后加入HOAt (354 mg, 2.6 mmol)、异丁胺 (0.21mL, 2.1mmol), 最后加入EDCI (891 mg, 3.0 mmol)。搅拌过夜, 用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>稀释反应混合物。有机层用5% NaHCO<sub>3</sub>和盐水洗, 然后用无水硫酸镁干燥, 浓缩。粗油状物用闪蒸柱色谱纯化, 得到492 mg (92%收率)实施例2, 为白色固体。实施例2通过以下数据表征: m.p. 176–178 °C;  $[\alpha]_D^{20} + 67.3^\circ$  (c 0.50, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.43

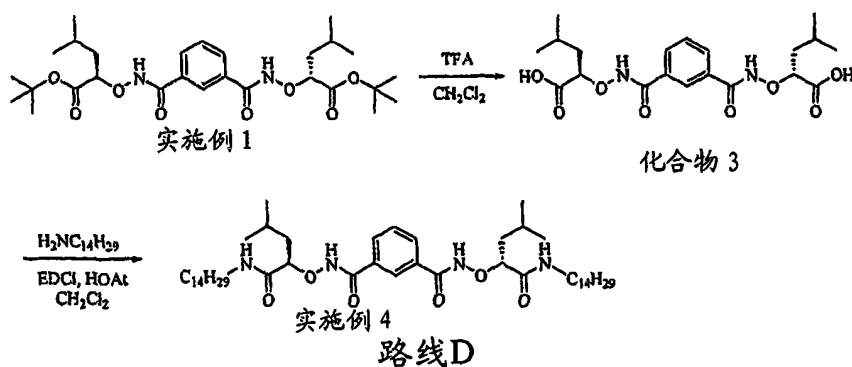
(s, 2H), 8.12 (s, 1H), 8.07 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 8.04 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.57 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 4.40 (dd,  $J = 9.5, 3.4$  Hz, 2H), 3.05–3.01 (m, 2H), 2.91–2.88 (m, 2H), 1.86–1.62 (m, 8H), 0.92 (d,  $J = 6.6$  Hz, 12H), 0.84 (d,  $J = 6.7$  Hz, 6H), 0.78 (d,  $J = 6.7$  Hz, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.89, 166.14, 131.97, 131.30, 129.69, 124.93, 85.60, 46.69, 41.15, 28.29, 24.85, 23.18, 21.81, 20.04, 19.99; IR ( $\text{CHCl}_3$ ) 3332, 3185, 1663  $\text{cm}^{-1}$ ; LRMS (EI, 20 eV)  $m/z$  534 ( $\text{M}^+$ ); HRMS (EI, 20 eV), 用于  $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_6$  ( $\text{M}^+$ ): 计算值534.3417, 测量值534.3435.

### 实施例3的制备



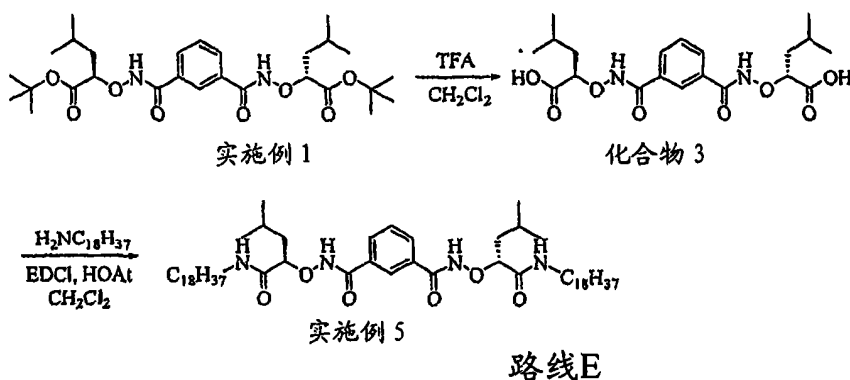
实施例3的制备根据上面的路线C进行, 与制备实施例2的路线B类似, 除了把异丁胺替换为癸胺。实施例3分离为无色油状物。实施例3通过以下数据表征:  $[\alpha]_D^{20} +34.5^\circ$  ( $c$  1.00,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  11.32 (s, 2H), 8.28 (br, 2H), 8.19 (s, 1H), 8.05 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 7.52 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 4.38 (br, 2H), 3.13–3.02 (m, 4H), 1.82 (m, 2H), 1.65–1.55 (m, 4H), 1.42 (br, 4H), 1.35–1.25 (m, 28H), 0.89–0.85 (m, 18H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.30, 165.91, 132.05, 131.29, 129.37, 124.98, 85.31, 41.17, 39.47, 31.89, 29.55, 29.53, 29.30, 29.12, 26.91, 24.73, 23.18, 22.67, 21.79, 14.10; IR ( $\text{CHCl}_3$ ) 3446, 1662  $\text{cm}^{-1}$ ; LRMS (FAB)  $m/z$  704 ( $\text{M}^+, 1$ ); HRMS (FAB), 用于  $\text{C}_{40}\text{H}_{71}\text{N}_4\text{O}_6$  ( $\text{M}^+, 1$ ): 计算值703.5374, 测量值703.5354.

### 实施例4的制备



实施例4的制备根据上面的路线D进行，与制备实施例2的路线B类似，除了把异丁胺替换为十四胺。实施例4分离为黄色油状物。实施例4通过以下数据表征： $[\alpha]_D^{20} +52.2^\circ$  ( $c$  1.00,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.97 (s, 2H), 8.15 (br, 3H), 8.05 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.53 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 4.36 (dd,  $J = 9.1, 3.7$  Hz, 2H), 3.16-3.06 (m, 4H), 1.80 (m, 2H), 1.65-1.55 (m, 4H), 1.43 (br, 4H), 1.25-1.17 (m, 44H), 0.89-0.85 (m, 18H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.96, 165.92, 132.00, 131.26, 129.43, 124.93, 85.38, 41.07, 39.39, 31.89, 29.67, 29.64, 29.59, 29.53, 29.33, 29.27, 29.14, 26.89, 24.72, 23.12, 22.66, 21.77, 14.08; IR ( $\text{CHCl}_3$ ) 3441, 3342, 1662  $\text{cm}^{-1}$ ; LRMS (FAB)  $m/z$  816 ( $\text{M}^+$ , 1); HRMS (FAB), 用于  $\text{C}_{48}\text{H}_{87}\text{N}_4\text{O}_6$  ( $\text{M}^+$ , 1): 计算值815.6626, 测量值815.6610。

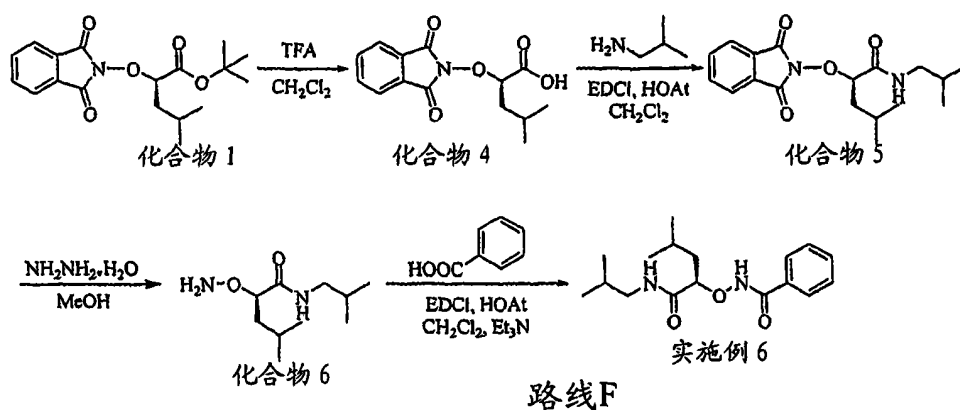
#### 实施例5的制备



实施例5的制备根据上面的路线E进行，与制备实施例2的路线B类似，除了把异丁胺替换为十八胺。实施例5分离为白色固体。实施例5通过以下数据表征： $m.p.$  88-90  $^\circ\text{C}$ ;  $[\alpha]_D^{20} +43.9^\circ$  ( $c$  1.00,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  11.11 (s, 2H), 8.18 (br, 3H), 8.05 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 7.55 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 4.36 (dd,  $J = 8.8, 3.4$  Hz, 2H), 3.15-3.05 (m, 4H), 1.80 (m, 2H), 1.65-1.54 (m, 4H), 1.41 (br, 4H),

1.30–1.16 (m, 60H), 0.89–0.84 (m, 18H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.03, 165.89, 131.98, 129.37, 124.98, 85.31, 41.06, 39.39, 31.89, 29.69, 29.60, 29.53, 29.33, 29.28, 29.12, 26.88, 24.68, 23.12, 22.56, 21.74, 14.08; IR ( $\text{CHCl}_3$ ) 3444, 3345, 1662  $\text{cm}^{-1}$ ; LRMS (FAB)  $m/z$  928 ( $\text{M}^+$ ); HRMS (MALDI), 用于  $\text{C}_{56}\text{H}_{102}\text{N}_4\text{O}_6$  ( $\text{M}^+ + \text{Na}$ ): 计算值927.4323, 测量值949.7678。

### 实施例6的制备



实施例6的制备根据上面的路线F。在室温下，用注射器向化合物1 (1.00 g, 3.0 mmol) 在  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) 中的溶液中小心加入等体积的  $\text{CF}_3\text{COOH}$  (10 mL)。在室温下搅拌大约3小时后，反应混合物进行真空浓缩。残余物与甲苯进行两次共沸，得到化合物4，为白色固体，该白色固体直接用于下一步。

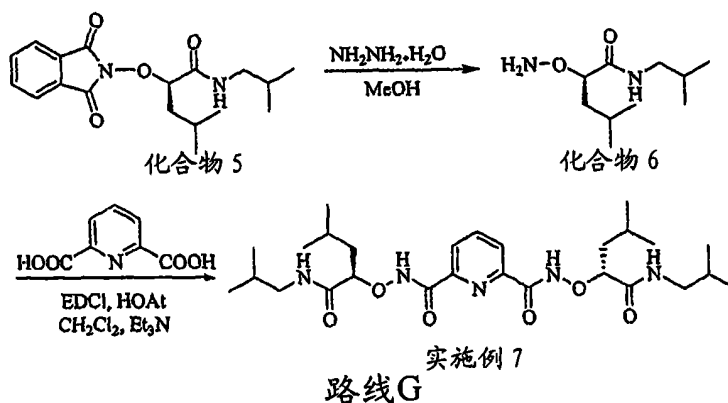
在氮气气氛下向含有无水化合物4的烧瓶中加入新鲜蒸馏的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (80 mL)，然后加入 HOAt (530 mg, 3.9 mmol)、异丁胺 (0.32 mL, 3.15 mmol)，最后加入 EDCI (1.34 g, 4.5 mmol)。搅拌过夜后，用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  稀释反应混合物。有机层用 5% 的  $\text{NaHCO}_3$  和盐水洗涤，然后用无水硫酸镁干燥，浓缩得到化合物5 (0.99 g, 99%)，为白色固体，直接用于下一步反应，无需进行进一步的纯化。

向化合物5在  $\text{CH}_3\text{OH}$  (10 mL) 溶液中加入  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (450 mg, 9.0 mmol)。1小时后看到白色沉淀产生。在室温下搅拌大约2.5小时后，反应混合物进行真空浓缩。将残余物溶于  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中，用 5%  $\text{NaHCO}_3$  洗两次，然后用盐水洗。有机层用无水硫酸钠进行干燥，然后浓缩，得到化合物6和邻苯二甲酰肼的混合物，为无色油状物。此混合物不进行进一步的纯化即立刻用于下一步反应。

在氮气气氛下向含有无水化合物6的烧瓶中加入新鲜蒸馏的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL)，然后加入 HOAt (530 mg, 3.9 mmol)、苯甲酸 (366 mg, 3.0 mmol)、三乙胺 (0.41 mL, 3.0 mmol)，最后加入 EDCI (1.34 g, 4.5 mmol)。搅拌过夜后，用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  稀

释反应混合物。有机层用5% NaHCO<sub>3</sub>和盐水洗，然后用无水硫酸镁干燥，浓缩。粗油状物用闪蒸柱色谱纯化，得到实施例6 (832 mg, 86%)，为白色固体。实施例6通过以下数据表征： m.p. 130-132 °C;  $[\alpha]_D^{20} +31.7^\circ$  (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.98 (br, 1H), 8.21 (br, 1H), 7.75 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.52 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.52 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 4.40 (dd, *J* = 9.4, 3.8 Hz, 1H), 3.13-2.97 (m, 2H), 1.85-1.61 (m, 4H), 0.92-0.85 (m, 12H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.94, 167.74, 132.41, 131.01, 128.65, 127.27, 85.40, 46.61, 40.97, 28.32, 24.71, 23.19, 21.62, 20.06, 19.88; IR (CHCl<sub>3</sub>) 3345, 1659 cm<sup>-1</sup>; LRMS (EI, 20 eV) *m/z* 307 (M<sup>+</sup>, 1); HRMS (EI, 20 eV), 用于C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (M<sup>+</sup>): 计算值306.1943, 测量值306.1923。

### 实施例7的制备

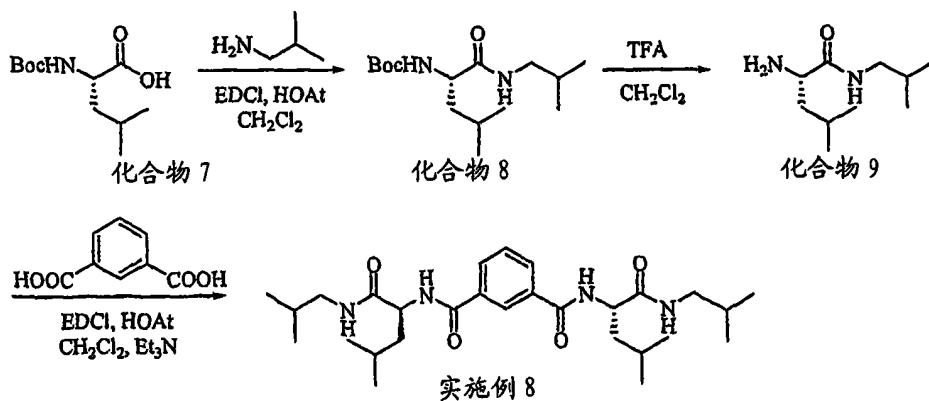


实施例7的制备根据上面的路线G进行。向化合物5 (332 mg, 1 mmol) 在CH<sub>3</sub>OH (10 mL)中的溶液中加入NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (150 mg, 3.0 mmol)。1小时后，看到白色沉淀产生。在室温下搅拌大约2.5小时后，反应混合物进行真空浓缩。残余物溶于CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中，用5% NaHCO<sub>3</sub>洗两次，然后用盐水洗。有机层用无水硫酸钠进行干燥，然后浓缩，得到化合物6和邻苯二甲酰肼的混合物，为无色油状物。此混合物不进行进一步的纯化即立刻用于下一步反应。

在氮气氛围下，向含有无水化合物6的烧瓶中加入新鲜蒸馏的CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL)，然后加入HOAt (177 mg, 1.3 mmol)、吡啶-2,6-二羧酸 (366 mg, 0.5 mmol)、三乙胺 (0.14 ml, 1.0 mmol)，最后加入EDCI (447 mg, 1.5 mmol)。搅拌过夜后，用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>稀释反应混合物。有机层用5% NaHCO<sub>3</sub>和盐水洗，然后用无水硫酸镁干燥，浓缩。粗油状物用闪蒸柱色谱纯化，得到实施例7 (214 mg, 80%)，为白色固体。实施例7通过以下数据表征： m.p. 175-177 °C;  $[\alpha]_D^{20} +117.2^\circ$  (c 0.50, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 11.97 (s, 2H), 8.31 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 8.20 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 8.10 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.41 (dd, *J* = 8.6, 4.2 Hz, 2H), 3.05-2.98 (m,

4H), 1.81-1.60 (m, 8H), 0.90-0.78 (m, 24H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.73, 162.30, 147.51, 139.20, 125.59, 85.30, 46.68, 41.12, 28.16, 24.65, 23.03, 21.97, 19.99, 19.95; IR ( $\text{CHCl}_3$ ) 3321, 1673  $\text{cm}^{-1}$ ; LRMS (EI, 20 eV)  $m/z$  535 ( $\text{M}^+$ ); HRMS (EI, 20 eV), 用于  $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_6$  ( $\text{M}^+$ ): 计算值 535.3370, 测量值 535.3371.

### 实施例8的制备



### 路线H

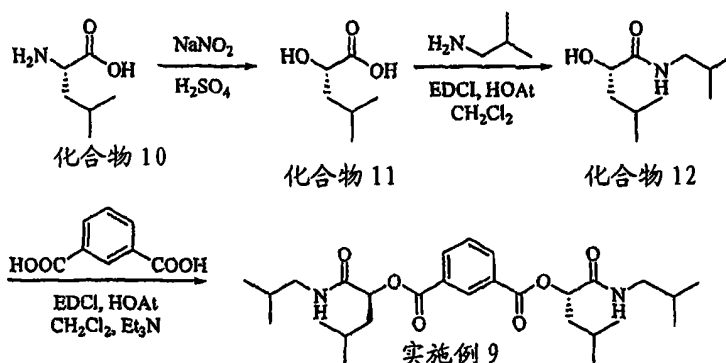
实施例8的制备根据上面的路线H进行。在氮气氛下把N-叔丁氧羰基-L-亮氨酸(化合物7)溶于新鲜蒸馏的 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL)中, 然后加入HOAt (530 mg, 3.9 mmol)、异丁胺 (0.32 ml, 3.15 mmol), 最后加入EDCI (1.34 g, 4.5 mmol)。搅拌过夜后, 用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 稀释反应混合物。有机层用5%的 $\text{NaHCO}_3$ 和盐水洗涤, 然后用无水硫酸镁干燥, 浓缩得到化合物8 (851 mg, 99%), 为白色固体, 直接用于下一步反应, 无需进行进一步的纯化。

在室温下, 用注射器向化合物8在 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL)中溶液中小心加入等体积的 $\text{CF}_3\text{COOH}$  (5 mL)。在室温下搅拌大约3小时后, 反应混合物进行真空浓缩。残余物溶于 $\text{CHCl}_3$ 中, 用 $\text{K}_2\text{CO}_3$ 溶液 (pH=2)和盐水洗涤, 然后用无水硫酸钠干燥, 浓缩得到游离胺化合物9, 为白色固体, 直接用于下一步反应。

在氮气氛下向含无水化合物9的烧瓶中加入新鲜蒸馏的 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL), 然后加入HOAt (530 mg, 3.9 mmol)、间苯二甲酸 (249 mg, 1.5 mmol)、三乙胺 (0.41 ml, 3.0 mmol), 最后加入EDCI (1.34 g, 4.5 mmol)。搅拌过夜后, 用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 稀释反应混合物。有机层用5%  $\text{NaHCO}_3$ 和盐水洗, 然后用无水硫酸镁干燥, 浓缩。粗油状物用闪蒸柱色谱纯化, 得到实施例8 (617 mg, 82%), 为白色固体。实施例8通过以下数据表征: m.p. 240-242  $^\circ\text{C}$ ;  $[\alpha]_D^{20}$  32.1 $^\circ$  (c 1.00,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.20 (s, 1H), 7.92 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.48 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.09 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 6.35 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 4.65 (m, 2H), 3.15-3.10 (m,

2H), 3.05–3.00 (m, 2H), 1.81–1.69 (m, 8H), 0.97 (d,  $J = 6.7$  Hz, 12H), 0.90 (d,  $J = 6.7$  Hz, 12H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.01, 166.53, 134.19, 130.47, 128.98, 125.53, 52.48, 46.94, 41.27, 28.45, 24.93, 22.86, 22.31, 20.08, 20.06; IR ( $\text{CHCl}_3$ ) 3400, 1653  $\text{cm}^{-1}$ ; LRMS (EI, 20 eV)  $m/z$  503 ( $\text{M}^+$ ); HRMS (EI, 20 eV), 用于  $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_4$  ( $\text{M}^+$ ): 计算值502.3519, 测量值502.3486.

### 实施例9的制备



### 路线I

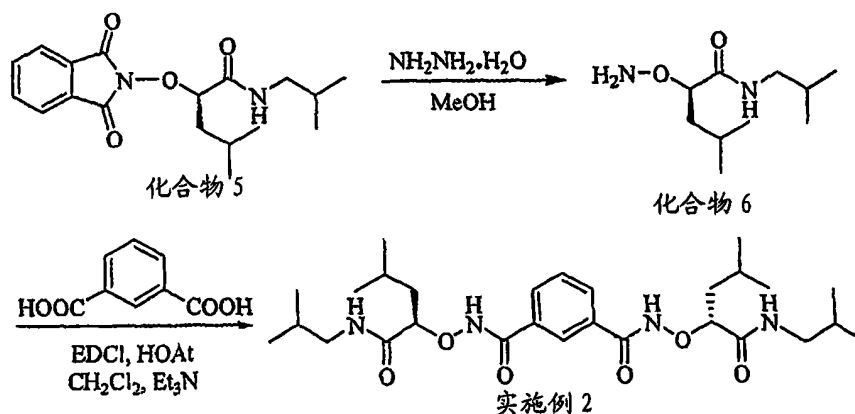
实施例9的制备根据上面的路线I进行。向在含有L-亮氨酸(化合物10)(787 mg, 6.0 mmol)的100 mL圆底烧瓶中的水(22 mL)中, 小心地加入浓硫酸(0.48 mL)。将 $\text{NaNO}_2$ (1.24 g, 18 mmol)在水(40 mL)中的溶液通过滴液漏斗逐滴加入, 速率控制为使反应混合物温度不超过 $5^\circ\text{C}$ 。在 $0^\circ\text{C}$ 下搅拌1小时后, 将反应混合物缓慢升温至室温, 然后继续搅拌1小时。产物用乙酸乙酯萃取, 有机层用盐水洗涤, 然后用无水硫酸镁干燥。使有机溶剂挥发干净, 然后得到粘稠的淡黄色油状物, 化合物11, 直接用于下一步反应。

在氮气氛围下向含有无水化合物11的烧瓶中加入新鲜蒸馏的 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (50 mL), 然后加入HOAt(1.06 g, 7.8 mmol)、异丁胺(0.63 mL, 6.3 mmol), 最后加入EDCI(2.68 g, 9.0 mmol)。搅拌过夜后, 用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 稀释反应混合物。有机层用5%的 $\text{NaHCO}_3$ 和盐水洗涤, 然后用无水硫酸镁干燥, 浓缩得到化合物12, 为白色固体, 直接用于下一步反应, 无需进行进一步的纯化。

在氮气氛围下向含有无水化合物12的烧瓶中加入新鲜蒸馏的 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (50 mL), 然后加入HOAt(1.06 g, 7.8 mmol)、间苯二甲酸(500 mg, 3 mmol)、三乙胺(0.82 mL, 6.0 mmol), 最后加入EDCI(2.68 g, 9.0 mmol)。搅拌过夜后, 用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 稀释反应混合物。有机层用5%  $\text{NaHCO}_3$ 和盐水洗涤, 然后用无水硫酸镁干燥, 浓缩。粗油状物用闪蒸柱色谱纯化, 得到实施例9(1.02 g, 68%), 为白色固体。

实施例9通过以下数据表征: m.p. 137-139 °C;  $[\alpha]_D^{20} +22.6^\circ$  ( $c$  1.00,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.74 (t,  $J = 1.6$  Hz, 1H), 8.32 (dd,  $J = 7.8, 1.7$  Hz, 2H), 7.63 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 6.06 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 5.43 (dd,  $J = 9.4, 3.9$  Hz, 2H), 3.11 (t,  $J = 6.6$  Hz, 4H), 1.96–1.75 (m, 8H) 1.00–0.97 (m, 12H), 0.90–0.87 (m, 12H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169.78, 164.66, 134.48, 130.85, 130.08, 129.20, 74.03, 46.50, 40.78, 28.45, 24.73, 23.13, 21.81, 19.94; IR ( $\text{CHCl}_3$ ) 3450, 1729, 1679  $\text{cm}^{-1}$ ; LRMS (EI, 20 eV)  $m/z$  504 ( $\text{M}^+$ ); HRMS (EI, 20 eV), 用于  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_6$  ( $\text{M}^+$ ): 计算值504.3199, 测量值504.3199。

### 实施例2的替代制备方法

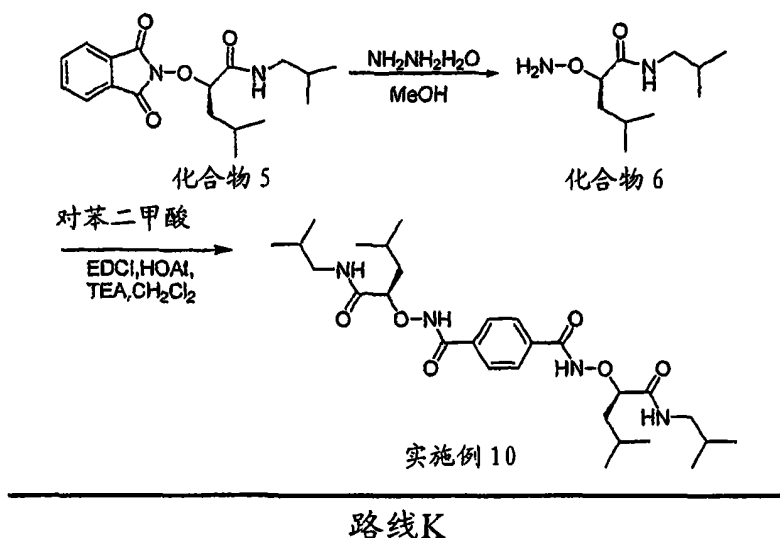


### 路线J

实施例2的制备根据上面的路线J进行, 与实施例7的路线G类似, 除了把吡啶-2,6-二羧酸替换为间苯二甲酸。分离实施例2为白色固体, 通过以下数据表征: m.p. 176-178 °C;  $[\alpha]_D^{20}$  ( $\text{deg cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ dm}^{-1}$ )  $+67.3^\circ$  ( $c = 0.01 \text{ g cm}^{-3}$  在  $\text{CHCl}_3$  中);  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.43 ppm (s, 2H), 8.12 (s, 1H), 8.07 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 8.04 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.57 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 4.40 (dd,  $J = 9.5, 3.4$  Hz, 2H), 3.05–3.01 (m, 2H), 2.91–2.88 (m, 2H), 1.86–1.62 (m, 8H), 0.92 (d,  $J = 6.6$  Hz, 12H), 0.84 (d,  $J = 6.7$  Hz, 6H), 0.78 (d,  $J = 6.7$  Hz, 6H);  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.89, 166.14, 131.97, 131.30, 129.69, 124.93, 85.60, 46.69, 41.15, 28.29, 24.85, 23.18, 21.81, 20.04, 19.99; IR ( $\text{CHCl}_3$ ) 3,332  $\text{cm}^{-1}$ , 3,185, 1,663 ( $\text{C}=\text{O}$ )  $\text{cm}^{-1}$ ; LRMS (EI, 20 eV)  $m/z$  534 ( $\text{M}^+$ ); HRMS (EI, 20 eV) ( $m/z$ ): [ $\text{M}^+$ ]  $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_6$ , 计算值 534.3417; 测量值 534.3435。

### 实施例10的制备

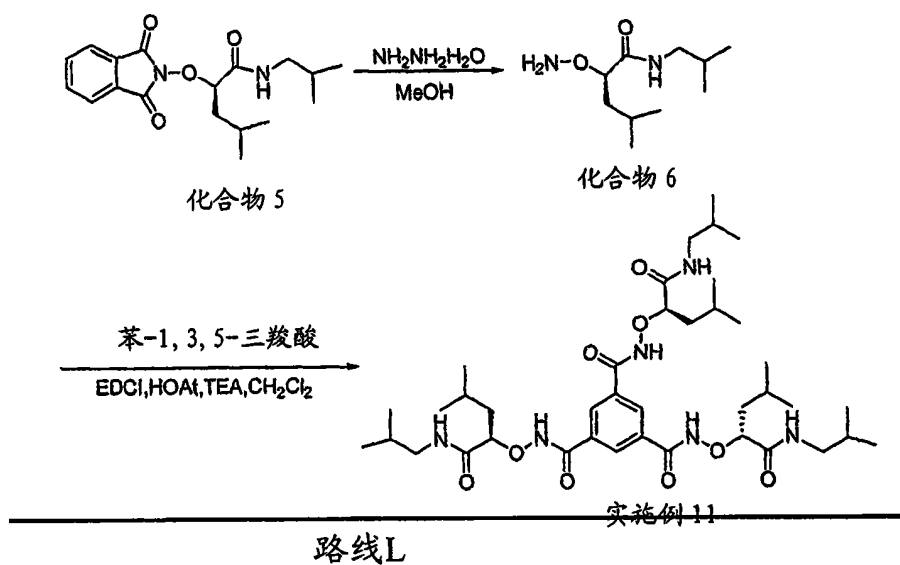




实施例 10 的制备根据上面的路线 K 进行。向化合物 5 (332 mg, 1 mmol) 在  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) 中的溶液中加入  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (150 mg, 3.0 mmol)。1 小时后看到白色沉淀产生。在室温下搅拌大约 2.5 小时后，将反应混合物进行真空浓缩。将残余物溶于  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中，用 5%  $\text{NaHCO}_3$  洗涤两次，然后用盐水洗。有机层用无水硫酸钠进行干燥，然后浓缩，得到化合物 6 和邻苯二甲酰肼的混合物，为无色油状物。该混合物不进行进一步的纯化即立刻用于下一步反应。

在氮气气氛下向含有无水化合物 6 的烧瓶中加入新鲜蒸馏的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL)，然后加入 HOAt (1-羟基-7-叠氮苯并三唑，CAS 号 39968-33-7, 177 mg, 1.3 mmol)、对苯二甲酸 (83 mg, 0.5 mmol)、三乙胺 (0.41 mL, 1.0 mmol)，最后加入 EDCI (447 mg, 1.5 mmol)。搅拌过夜后，用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  稀释反应混合物。有机层用 5%  $\text{NaHCO}_3$  和盐水洗涤，然后用无水硫酸镁干燥，浓缩。粗油状物用闪蒸柱色谱纯化，得到实施例 10 (107 mg, 40%)，为白色固体。实施例 10 通过以下数据表征： $^1\text{H}$ NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  12.03 (s, 2H), 8.24 (s, 2H), 7.82 (s, 4H), 4.38 (dd,  $J=8.5, 4.5$  Hz, 2H), 2.96-2.90 (m, 4H), 1.83-1.50 (m, 8H), 0.98 (d,  $J=6.5$  Hz, 6H) 0.93 (d,  $J=6.5$  Hz, 6H), 0.81 (d,  $J=6.6$  Hz, 6H), 0.79 (d,  $J=6.6$  Hz, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  170.93, 164.99, 135.00, 127.79, 84.01, 46.25, 28.42, 24.66, 23.47, 22.47, 20.40, 20.16; LRMS (ESI)  $m/z$  557 ( $\text{M}^+ + \text{Na}$ );

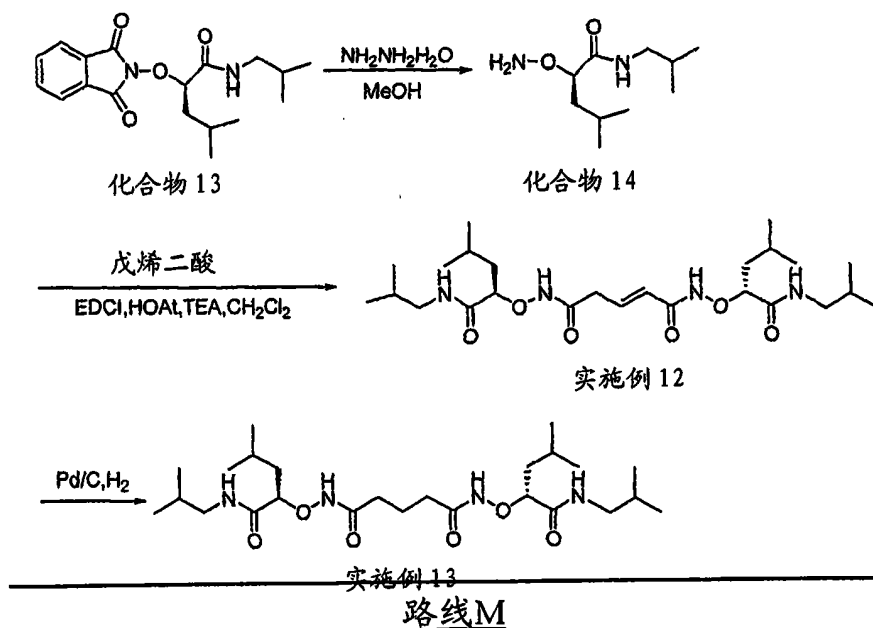
#### 实施例11的制备



实施例11的制备根据上面的路线L进行。向化合物5 (332 mg, 1 mmol)在CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL)中的溶液中加入NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (150 mg, 3.0 mmol)。1小时后看到白色沉淀产生。在室温下搅拌大约2.5小时后,将反应混合物进行真空浓缩。将残余物溶于CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中,用5% NaHCO<sub>3</sub>洗涤两次,然后用盐水洗。有机层用无水硫酸钠进行干燥,然后浓缩,得到化合物6和邻苯二甲酰肼的混合物,为无色油状物。该混合物不进行进一步的纯化即立刻用于下一步反应。

在氮气氛下向含有无水化合物6的烧瓶中加入新鲜蒸馏的CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL),然后加入HOAt (1-羟基-7-叠氮苯并三唑, 177 mg, 1.3 mmol)、苯-1,2,3三羧酸 (105 mg, 0.5 mmol)、三乙胺 (0.41 ml, 1.0 mmol),最后加入EDCI (二氯乙烷, 447 mg, 1.5 mmol)。搅拌过夜后,用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>稀释反应混合物。有机层用5% NaHCO<sub>3</sub>和盐水洗涤,然后用无水硫酸镁干燥,浓缩。粗油状物用闪蒸柱色谱纯化,得到实施例11 (171mg, 45%),为白色固体。实施例11通过以下数据表征:  
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.14 (s, 3H), 8.26 (s, 3H), 8.22 (s, 3H), 4.38 (dd, J= 8.4, 4.0 Hz, 3H), 3.00-2.89 (m, 6H), 1.85-1.51 (m, 12H), 0.98 (d, J= 6.5 Hz, 9H), 0.93 (d, J= 6.6 Hz, 9H), 0.81 (d, J= 7.0 Hz, 9H), 0.79 (d, J= 8.0 Hz, 9H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 170.97, 164.43, 132.80, 129.45, 84.19, 46.25, 28.43, 24.69, 23.48, 22.42, 20.40; LRMS (ESI) *m/z* 762 (M<sup>+</sup>);

实施例12和13的制备



实施例12和13的制备根据上面的路线M进行。向化合物5 (332 mg, 1 mmol) 在CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL)中的溶液中加入NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (150 mg, 3.0 mmol)。1小时后看到白色沉淀产生。在室温下搅拌大约2.5小时后，将反应混合物进行真空浓缩。将残余物溶于CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中，用5% NaHCO<sub>3</sub>洗涤两次，然后用盐水洗。有机层用无水硫酸钠进行干燥，然后浓缩，得到化合物6和邻苯二甲酰肼的混合物，为无色油状物。该混合物不进行进一步的纯化即立刻用于下一步反应。

在氮气气氛下向含有无水化合物6的烧瓶中加入新鲜蒸馏的CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL)，然后加入HOAt (1-羟基-7-叠氮苯并三唑，177 mg, 1.3 mmol)、戊烯二酸 (65 mg, 0.5 mmol)、三乙胺 (0.41 ml, 1.0 mmol)，最后加入EDCI (二氯乙烷，447 mg, 1.5 mmol)。搅拌过夜后，用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>稀释反应混合物。有机层用5% NaHCO<sub>3</sub>和盐水洗涤，然后用无水硫酸镁干燥，浓缩。粗油状物用闪蒸柱色谱纯化，得到实施例12 (40mg, 16%)，为白色固体。实施例12通过以下数据表征：<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.60 (br, 1H), 10.49 (br, 1H), 8.07 (br, 1H), 7.88 (br, 1H), 6.88 (dt, J= 15.4, 6.9 Hz, 1H), 5.89 (d, J= 15 Hz, 1H), 4.28 (d, J= 5.2 Hz, 2H), 3.11-2.97(m, 6H), 1.84-1.60(m, 8H), 0.95-0.87(m, 24H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.97, 167.92, 137.25, 123.45, 85.31, 85.22, 46.70, 46.66, 40.98, 28.34, 24.71, 23.16, 21.71, 20.07; LRMS (ESI) *m/z* 521 (M<sup>+</sup> + Na)。

将实施例12 (40 mg, 0.08 mmol)溶解在1 mL MeOH中，将4 mg 10% Pd/C加入混合物中，然后将混合物在室温和气球压力下用H<sub>2</sub>搅拌过夜。反应混合物经硅藻土过滤，并浓缩，得到实施例13 (40 mg, quant)。实施例13通过以下数据表

征:  $^1\text{H}$ NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.69 (br, 2H), 4.35 (dd,  $J$ = 8.6, 3.8 Hz, 2H), 3.29-3.24 (m, 2H), 2.87-2.85 (m, 2H), 2.18-2.16 (m, 2H), 1.88-1.63 (m, 12H), 1.00-0.92 (m, 24H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.72, 170.30, 86.21, 46.59, 40.77, 30.58, 28.44, 24.75, 23.04, 21.80, 20.71, 20.05; LRMS (ESI)  $m/z$  523 ( $\text{M}^+$  + Na).

#### 实施例14 恒pH荧光转运分析

本实施例例示实施例2的化合物当并入脂质体中介导氯离子释放。基于脂质体的恒pH荧光分析是用于鉴定生理学相关的离子载体的常规使用的分析方法, 该离子载体在下列文献中公开: (a) Deng, G., Dewa, T. and Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 8975; (b) Schlesinger, P. H., Ferdani, R., Liu, J., Pajewska, J., Pajewski, R., Saito, M., Shabany, H. and Gokel, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 1848; (c) Sidorov, V., Kotch, F. W., Abdrakhmanova, G., Mizani, R., Fettingner, J. C. and Davis, J. T. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 2267; (d) Sidorov, V., Kotch, F. W., Kuebler, J. L., Lam, Y.-F. and Davis, J. T. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 2840; 以及(e) Baumeister, B., Sakai, N. and Matile, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2000, 39, 1955, 所有上述文献都作为参考引入本文。例如, 在此分析中, 加入控制量的碱和可能的离子载体到脂质体的悬浮液中, 该悬浮液中含有pH值敏感的染料、8-羟基芘-1,3,6-三磺酸 (HPTS, 吡喃)。得到的跨双层膜的pH梯度使水合氢离子流出和氢氧根离子流入, 产生电位。此电位可以通过阴离子流出和阳离子流入而抵消(可能 $\text{H}^+/\text{M}^+$ 或 $\text{OH}^-/\text{A}^-$ 反向转运, 以及 $\text{H}^+/\text{A}^-$ 或 $\text{M}^+/\text{OH}^-$ 同向转运机制)。如果目标化合物介导这种离子转运, 水合氢离子的流出或氢氧根离子的流入继续改变囊泡内的pH值和报告染料的荧光。

实施例2介导的氯离子的释放用直径为100nm的大单层囊泡(LUV)确定, 如Sidorov, V., Kotch, F. W., Abdrakhmanova, G., Mizani, R., Fettingner, J. C. and Davis, J. T. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 2267中所报道。图5显示施用实施例2导致快速的浓度依赖性的囊泡外内电解质的交换。重要的是, 实施例2介导的电解质的交换具有高度的阴离子选择性。其在氯离子存在下但不是硫酸根离子存在下介导电质交换(参见图6)。与图6所示的结果相反, 在使用NaCl外内囊泡缓冲液时, 在用硫酸钠对称性地负载的LUV中没有检测到转运活性。该阴离子依赖性活性强有力地证明, 实施例2介导氯离子的跨双层转运。图7显示除了实施例2之外, 实施例1和实施例3-9也有效率地介导氯离子跨含氯离子的脂质体的脂双层的转运。图12显示除了实施例2外, 实施例10-13也有效率地介导氯离子跨含氯离子的脂质体的脂双层的转运。

### 实施例15

实施例15显示实施例2的化合物当分配入脂双层中时可以作为电压依赖性的氯离子选择性的通道发挥作用。使用膜片钳技术进行的单通道记录是用于鉴定离子通道形成的最关键的测试，其与其他离子转运机制如离子载体不同，定量膜通道的离子转运效率。结合入脂双层中的实施例2的通道形成活性利用膜片钳技术，在大型脂质体上进行检测。当槽液中施用实施例2时，在对称的0.2 M N-甲基-葡糖胺盐酸盐 (NMDG-Cl) 溶液中记录特征性的单通道电流，基础传导为54pS (图8)，表明实施例2可以有效地分配入脂质体的脂双层中，从而形成离子通道。

离子通道的两个关键特征本质上是离子选择性合门控性，离子选择性即通道仅允许特定的离子种类流过其孔道，而门控性指通道开放和关闭的机制。由实施例2形成的离子通道具有阴离子选择性和电压门控性。当把槽液中的NMDG-Cl换成氯化钾(KCl)时，没有检测到电导性或逆转电位的变化，提示这些通道对K离子是不通透的。在电压生理相关的范围内增加脂双层的电压，离子通道的开放概率( $P_o$ )和频率明显增强，提示其具有电压依赖性门控特性(图8)。

### 实施例16

实施例16显示实施例2的化合物分配入到人细胞膜中并明显的增加细胞氯离子电流。使用全细胞膜片钳技术来检测由实施例2在人胚胎肾细胞(HEK293)中诱导产生的离子电流的电生理特性。HEK293细胞株最初来自于美国典型培养物保藏中心，在DMEM中培养，DMEM中补充有10% FBS和100 IU/ml青霉素G和0.1 mg/ml链霉素。细胞在37°C, 5% CO<sub>2</sub>加湿培养箱中培养。使用EPC9膜片钳放大器(HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, 德国)在电压-膜片钳模式下，由Pulse/PulseFit 8.7(HEKA)软件控制，记录全细胞氯离子电流。膜片钳电极(电阻, 35 MΩ)内部充满溶液，该电极内液含有CsCl 140、MgCl<sub>2</sub> 1、HEPES 10、EGTA 5、Na<sub>2</sub>ATP 5(单位mmol/L, 用CsOH调pH 7.2)。槽液含有NaCl 140、CsCl 5、CaCl<sub>2</sub> 1、MgCl<sub>2</sub> 1、HEPES 10(单位mmol/L, 用CsOH调pH 7.2)。待电阻达到千兆欧姆时，用脉冲负压破膜。电极和膜电容自动补偿。串联电阻一般可以补偿70%。细胞保持在0mV，以20mV的增量施加-80到+80 mV的电压阶跃800 ms。所有的宏观电流都在50kHz取样，在5kHz过滤，数据用PulseFit(HEKA)软件分

析。对于相同的细胞在暴露到含有50 nM浓度的实施例2的槽液前后，检测Cl<sup>-</sup>离子电流的变化。所有的实验都在室温（22-25℃）下进行。

在50nM的低浓度下，实施例2引起全细胞电流的明显增加（图9），表明实施例2可以有效地介导跨HEK 293细胞的细胞膜的氯离子转运。另外，引发的电流在细胞阴离子转运抑制剂例如4,4'-二异硫氰酸根合均二苯乙烯-2,2'-二磺酸盐(DIDS)存在下也没有减小。该性质排除了实施例2可能通过激活HEK 293细胞中的天然氯离子通道来增加全细胞电流，表明实施例2形成的合成氯离子通道的确引起观察到的电流变化。

### 实施例17

图17显示实施例2的化合物的氯离子转运活性，采用氯离子敏感的荧光指示剂SPQ在脂质体中进行试验。

**脂质体的制备** 卵黄L- $\alpha$ -磷脂酰胆碱卵磷脂（EYPC，91mg，120  $\mu$ mol）溶于CHCl<sub>3</sub>/MeOH混合物中，溶液在减压下蒸发，得到的薄膜在高真空的条件下干燥3小时。脂膜在1.2mL的溶液A（200 mM NaNO<sub>3</sub>，0.5 mM SPQ）中水合2小时。在水合过程中，悬浮液进行5个循环的冻融过程（液氮，室温下的水）。大多层脂质体悬浮液（1mL）在室温下进行高压挤压（通过0.1 $\mu$ m聚碳酸酯膜进行>21次挤压，得到大单层脂质体囊泡（LUV），平均直径100 nm）。通过分子排阻色谱（固定相：Sephadex G-50，流动相：溶液B 20 mM NaNO<sub>3</sub>）将LUV悬浮液与囊泡外染料分离，然后用溶液B稀释制备成储液，脂质体浓度为10 mM（假定100%的脂质都掺入脂质体中）。

**荧光分析：**一般来说，100  $\mu$ L负载SPQ的囊泡（储液）用1.9 mL溶液C（200 mM NaCl）进行悬浮，并加入荧光孔中。激发波长360 nm，观察到SPQ在430 nm处的发射光。在第100秒时，通过进样孔加入20  $\mu$ L 0.5 mM的实施例2的THF溶液。结果如图10所示。

### 实施例18

实施例18显示实施例2的X射线晶体分析。实施例2的X射线晶体结构显示在图11中。其他的X射线晶体数据和数据收集方法显示在下面。

**数据收集：**使用固定在玻璃纤维上的直径为0.4 x 0.35 x 0.1 mm的晶体用于数据收集，在-20℃下进行，采用MAR衍射计，300 mm图像板检测器，使用石墨单色化的Mo-K $\alpha$ 辐射（ $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ）。数据收集采用2°振动步幅 $\phi$ ，15分钟暴露时间，扫描距离为120 mm。收集100幅图像。

晶体数据:  $[C_{28}H_{46}N_4O_6]$ ; 分子量 = 534.69, 斜方晶,  $C222_1$ ,  $a = 7.725(2) \text{ \AA}$ ,  $b = 18.967(4) \text{ \AA}$ ,  $c = 21.145(4) \text{ \AA}$ ,  $V = 3098.2(11) \text{ \AA}^3$ ,  $Z = 4$ ,  $D_c = 1.146 \text{ g cm}^{-3}$ ,  $\mu(\text{Mo-K}\alpha) = 0.081 \text{ mm}^{-1}$ ,  $F(000) = 1160$ ,  $T = 253 \text{ K}$ .

表1 实施例2的晶体数据和结构解析

经验式	$C_{28}H_{46}N_4O_6$	
分子量	534.69	
温度	253(2) K	
波长	0.71073 $\text{ \AA}$	
晶体系统:	斜方晶	
空间基团	$C222_1$	
单位孔径	$a = 7.725(2) \text{ \AA}$	$= 90^\circ$ .
	$b = 18.967(4) \text{ \AA}$	$= 90^\circ$ .
	$c = 21.145(4) \text{ \AA}$	$= 90^\circ$ .
体积	$3098.2(11) \text{ \AA}^3$	
Z	4	
密度 (计算值)	$1.146 \text{ Mg/m}^3$	
吸收系数	$0.081 \text{ mm}^{-1}$	
F(000)	1160	
晶体尺寸:	$0.4 \times 0.35 \times 0.1 \text{ mm}^3$	
数据收集的 $\theta$ 范围	1.93至25.35°.	
指标范围	$-7 \leq h \leq 7, -21 \leq k \leq 21, -24 \leq l \leq 24$	
收集的反射	7174	
自由反射	2039 [R(int) = 0.0498]	
$\theta$ 完整性 = 25.35°	75.2 %	
吸收校正	无	
解析方法	F <sup>2</sup> 全矩阵最小二乘	
数据/限制/参数	2039 / 2 / 185	
F <sup>2</sup> 适合度	0.969	
最终R指数 [I > 2 $\sigma$ (I)]	R1 = 0.0497, wR2 = 0.1217	
R表征 (所有数据)	R1 = 0.0707, wR2 = 0.1310	
绝对结构参数	1(2)	
最大折射峰和孔	0.365和-0.284 e. $\text{ \AA}^{-3}$	

如上面所显示，本发明的实施方案提供了各种自组装化合物，该化合物可用于制备离子通道组合物和含有其的膜。虽然本发明的公开内容就有限数量的实施方案进行描述，但是一种实施方案的特定特征不归于本发明的其他实施方案。没有任何一个单独的实施方案代表本发明的所有方面。在一些实施方案中，所述组合物或方法可以包括多个本文没有提到的化合物或步骤。在其他实施方案中，所述组合物或方法不包括或基本上不含本文没有提及的任何化合物或步骤。所描述的实施方案的变体和修饰也存在。例如，本文公开的离子通道组合不需要仅包括自组装化合物。它还可以包括通常适合于离子通道组合物的任意形式的化合物。要注意，本文所描述的制备和使用本发明所公开的离子通道组合物的方法参考多个步骤被描述。这些步骤可以以任意顺序实施。一个或多个步骤可以被省略或被组合，但是仍然获得基本相同的结果。所附的权利要求书无意覆盖落入本发明的范围内的所有此类的变体和修改。

本说明书提到的所有的出版物和专利申请都引入本文作为参考，其参考程度如同每一篇单个的出版物或专利申请被特别地且单个地指出引入本文作为参考一样。应当理解，本发明的公开内容通过例示和实施例的方式进行了详细描述，以使得本领域其他技术人员了解本发明、其原理及其实际应用。另外，本发明所提供的特定实施方案无意欲穷举或限制本发明的公开内容，通过前述的实施例和详细描述，多种替换、修饰和变体对于本领域技术人员而言是显而易见的。因此，本发明的公开内容无意欲涵盖落入下面权利要求的精神和范围内的所有此类替代、修饰和变体。虽然上面一些实施例和描述包括一些关于本发明的化合物、组合物和方法可以发挥功能的方式的结论，但是本发明的发明人无意欲被这些结论和功能所限制，仅是根据目前的现有理解作为可能的解释对它们进行描述。



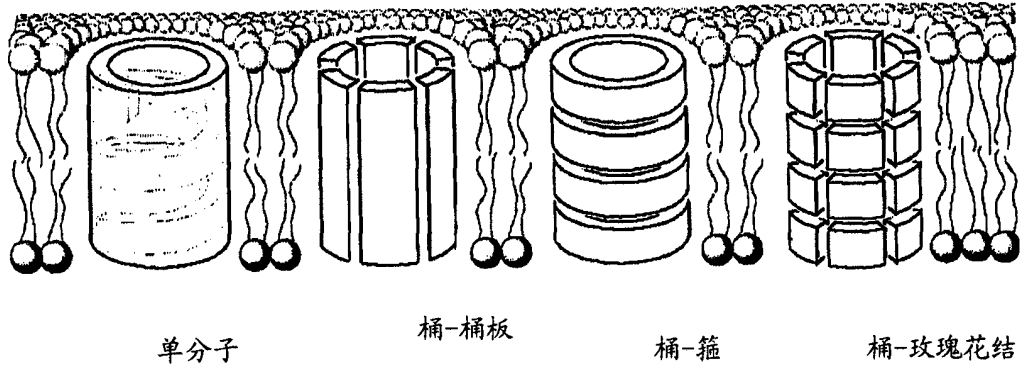


图 1

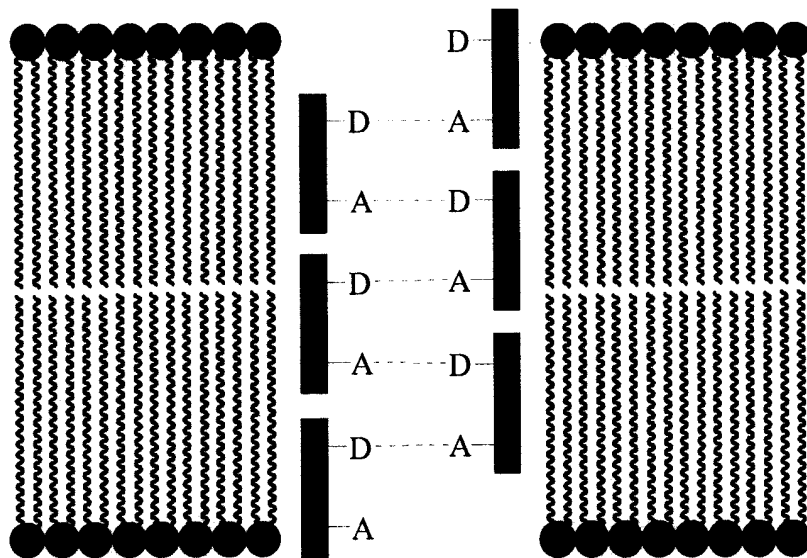


图 2

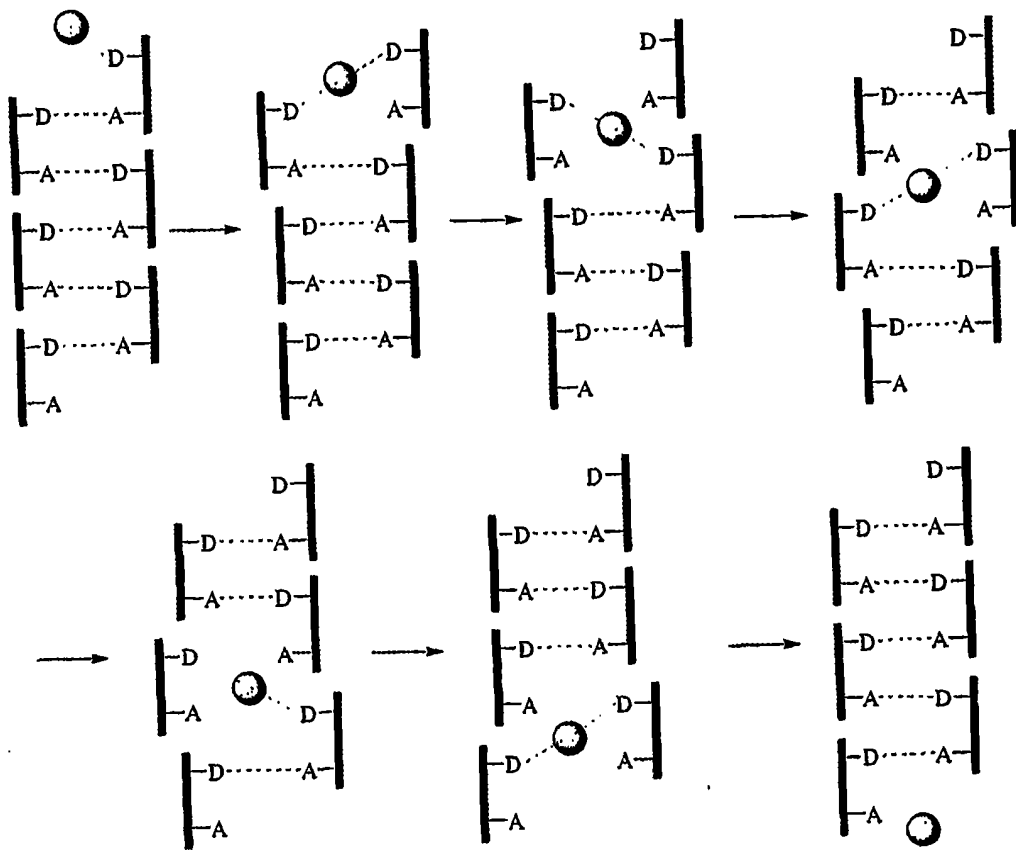


图3

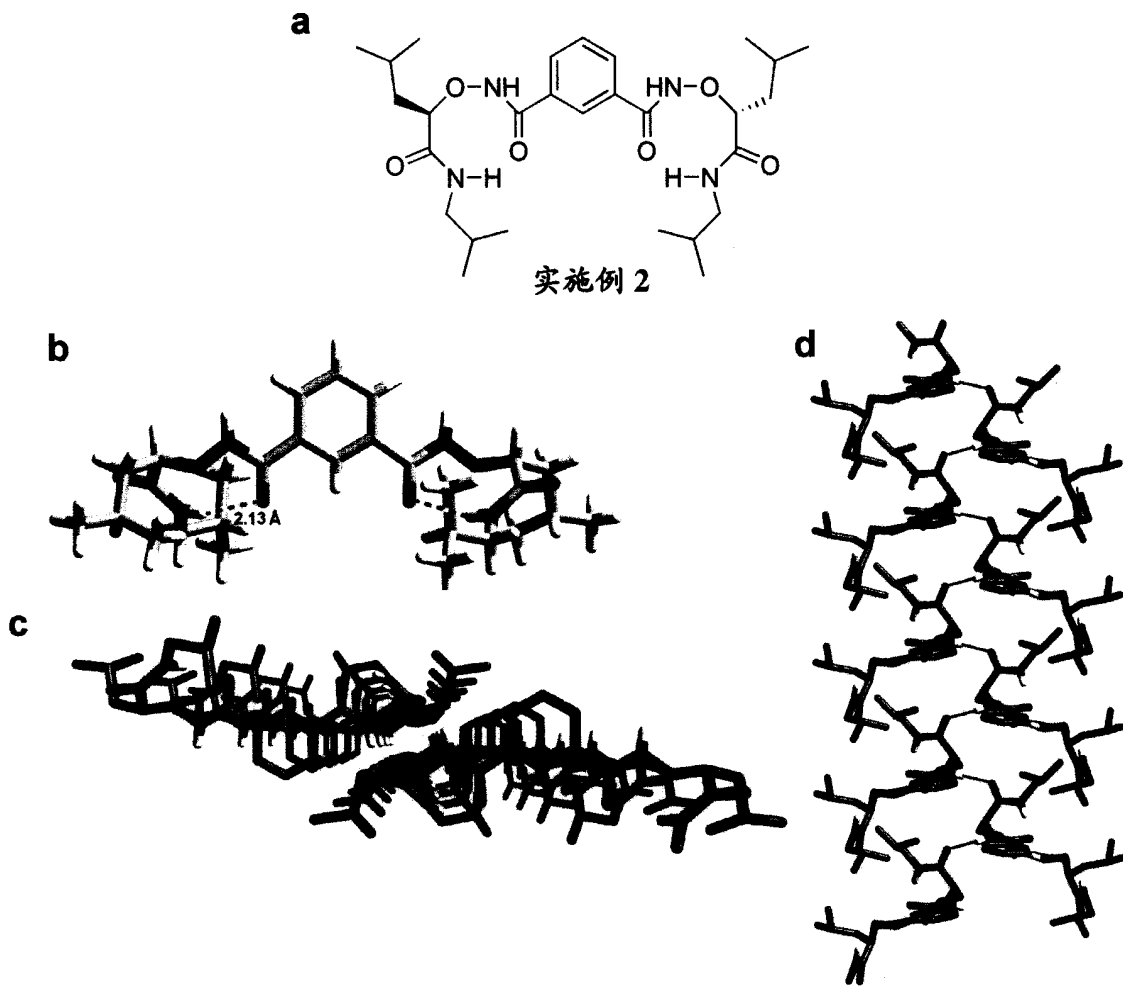


图 4

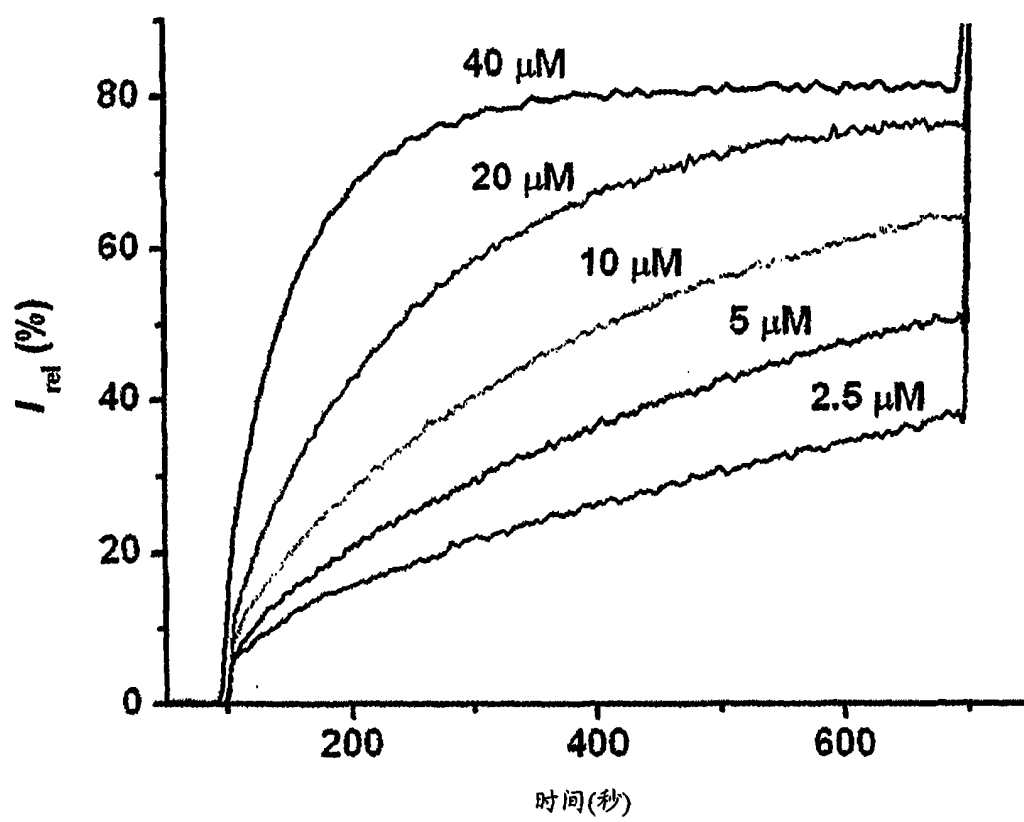


图5

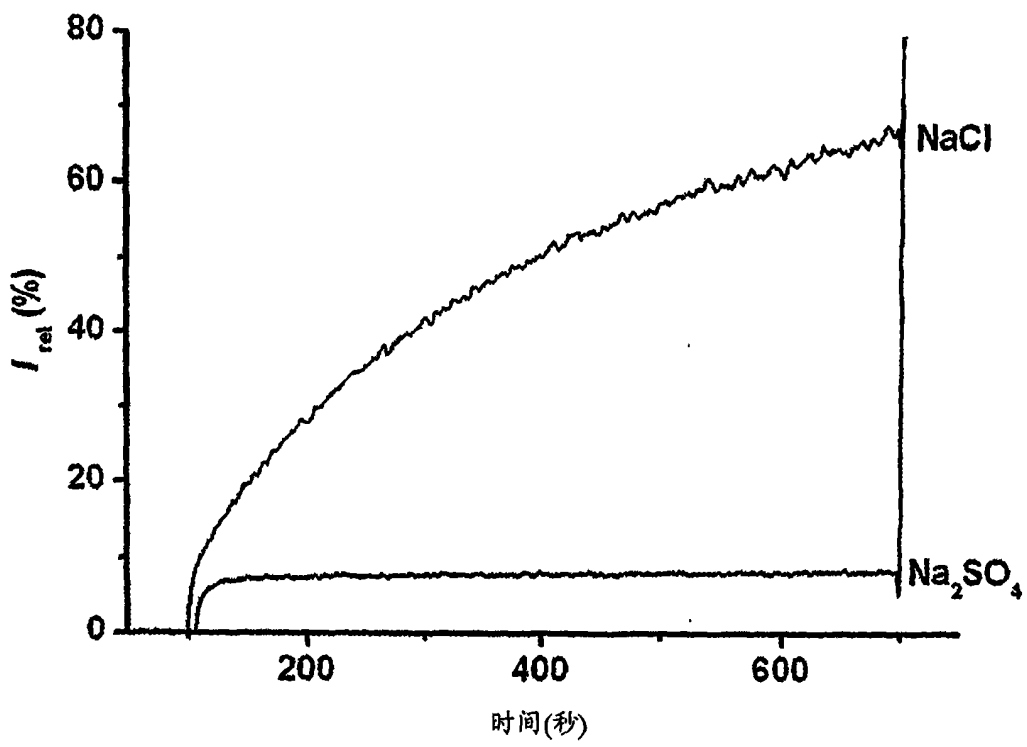


图 6

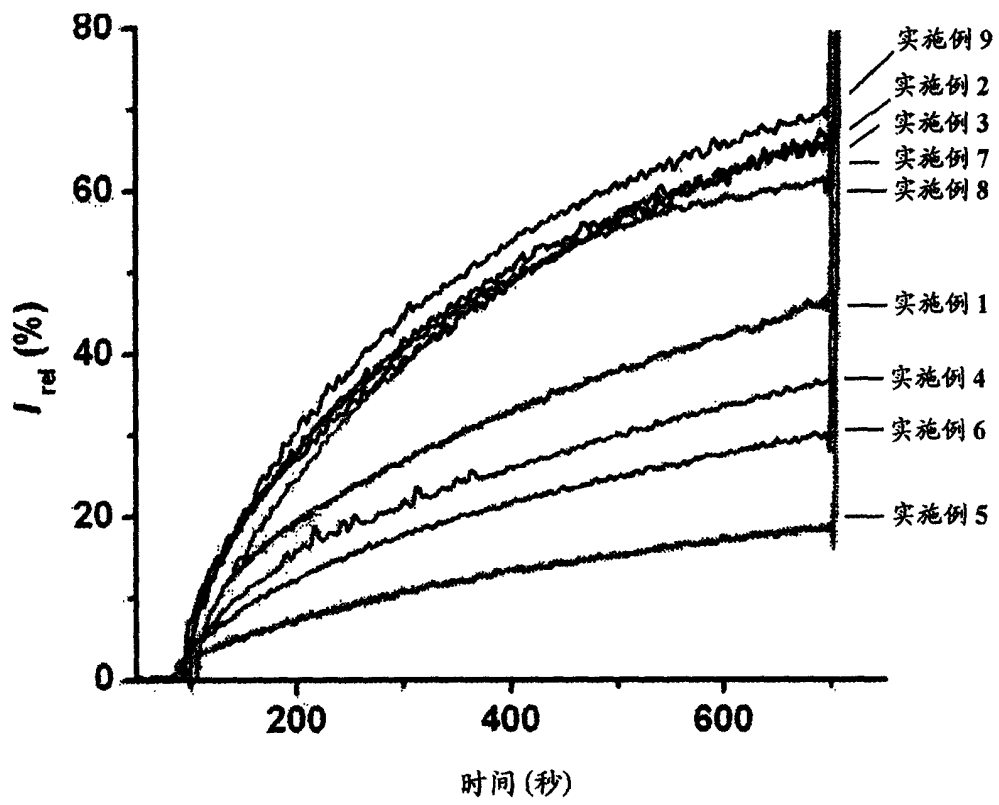


图 7

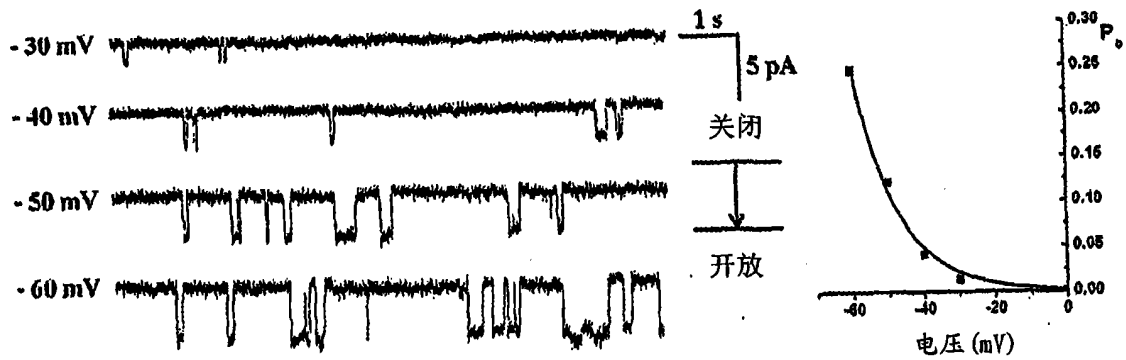


图 8

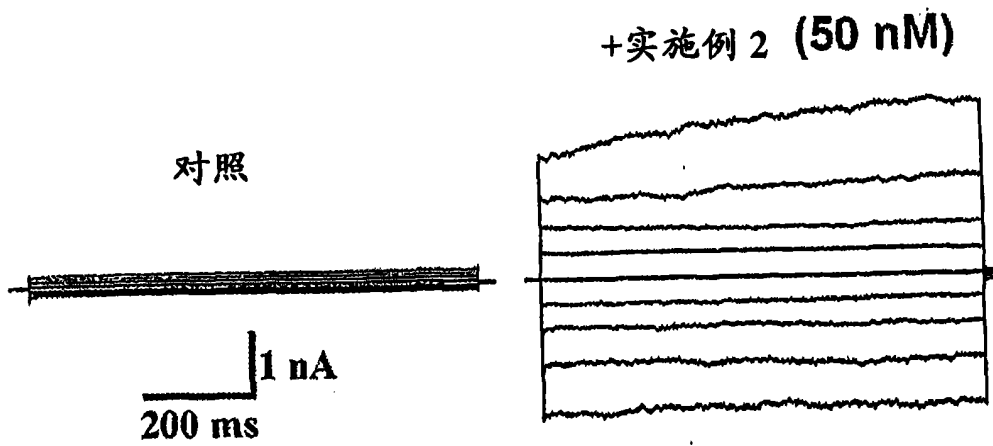


图 9

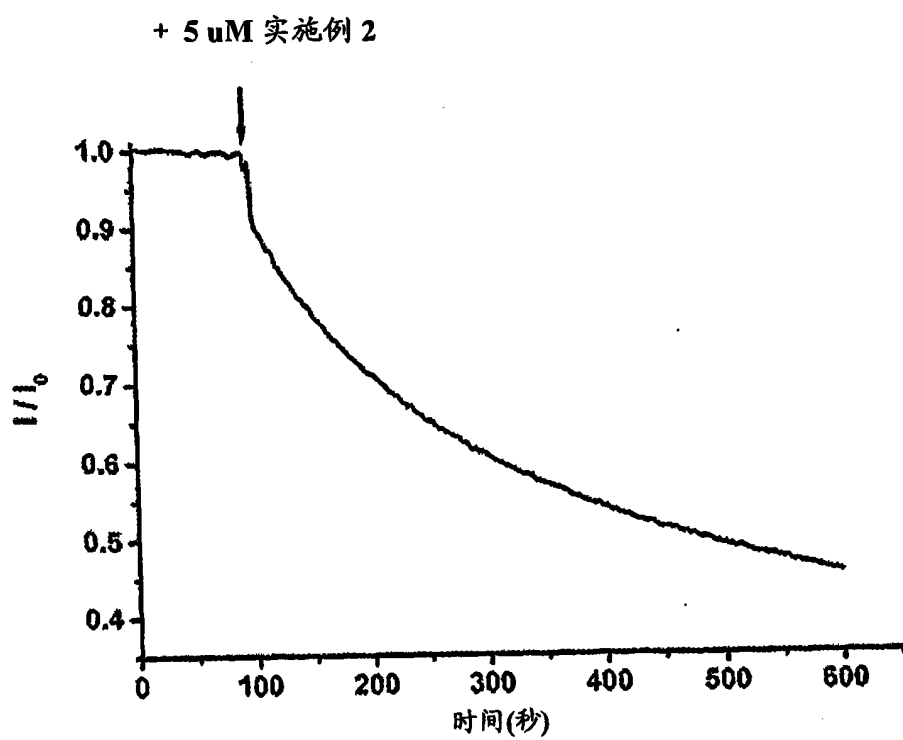


图10



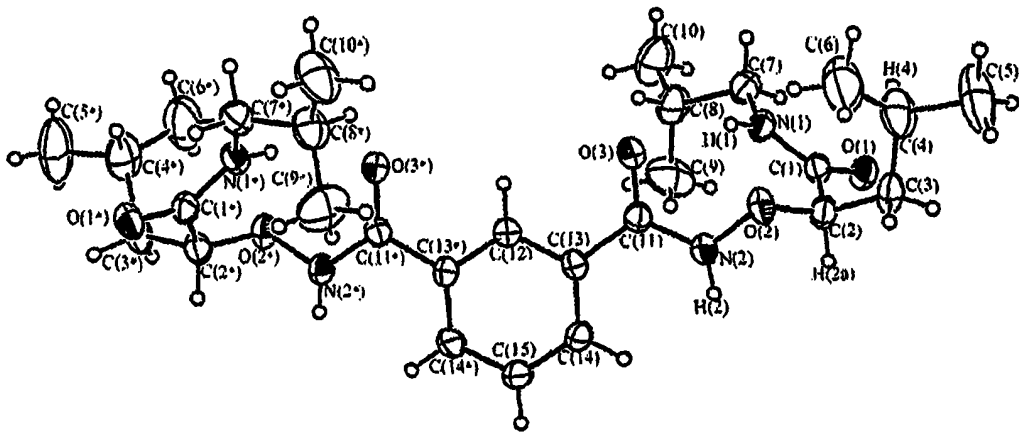


图 11

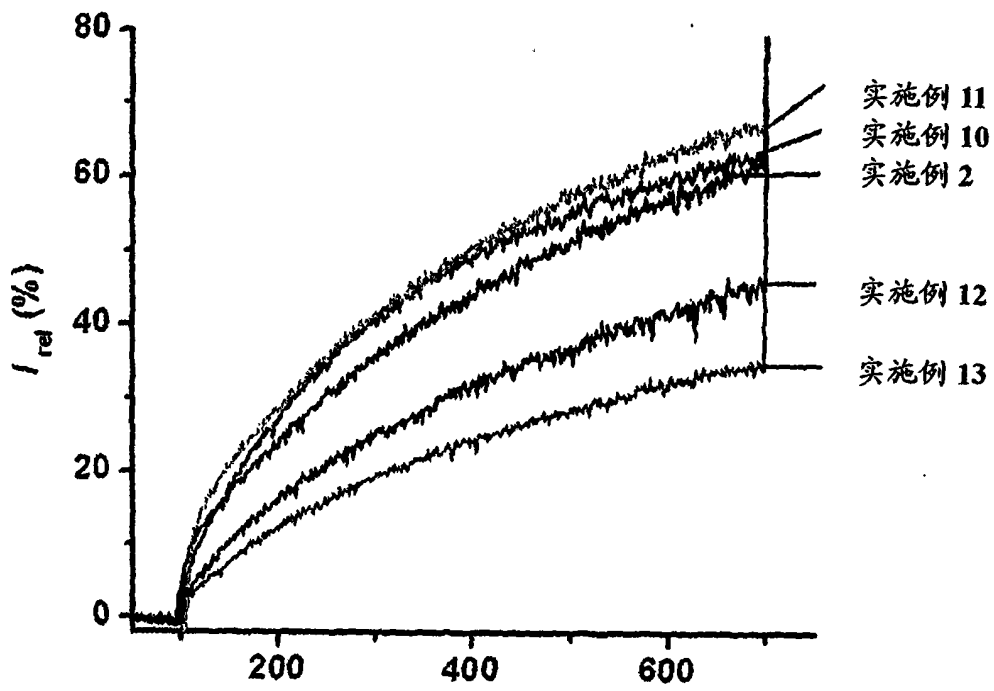


图 12