

[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 200810166669.2

[51] Int. Cl.

A61K 31/343 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

[43] 公开日 2009年4月15日

[11] 公开号 CN 101406468A

[22] 申请日 2008.10.13

[21] 申请号 200810166669.2

[30] 优先权

[32] 2007.10.12 [33] CN [31] 200710046992.1

[71] 申请人 中国科学院上海有机化学研究所

地址 200032 上海市徐汇区枫林路354号

[72] 发明人 张立红 于佳 潘鹤龄 马大为
袁钧瑛

[74] 专利代理机构 上海天翔知识产权代理有限公司

代理人 王裕

权利要求书3页 说明书22页 附图1页

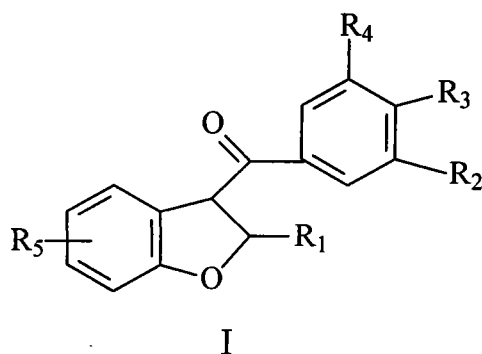
[54] 发明名称

苯比呋喃化合物的用途及含其的药物组合物

[57] 摘要

本发明涉及药物领域，具体地涉及苯比呋喃衍生物的应用及含其的药物组合物。本发明公开了一类结构通式(I)的苯比呋喃化合物及其药学上可接受的盐或前药在制备治疗错误折叠蛋白聚集所导致的疾病的药物中的用途。本方面所公开的化合物可以明显地促进自吞噬、减少细胞中错配蛋白聚集，并显示出更低的细胞毒性，甚至优于雷帕霉素和另一种已知的自吞噬诱导剂他莫西酚。本方面所公开的化合物可以在一些错配蛋白所导致的疾病如多聚谷氨酸聚集所导致的神经退行性疾病治疗中发挥作用，能开发成为治疗相关疾病的治疗药物。

1. 一类下列结构通式 (I) 的苯比呋喃化合物及其药学上可接受的盐或前药在制备治疗错误折叠蛋白聚集所导致的疾病的药物中的用途,



其中, R_1 选自烷基、链烯基、杂烷基、烷氧烷基、烯氧基、炔氧基、氨基、烷基氨基或氨基烷基中之一;

R_2 选自烷基、链烯基、杂烷基、烷氧烷基、烯氧基、烷氧基氨基烷基、烷基氨基羰基、磺酰基、烷基磺酰基、烷基亚磺酰基、氨基磺酰基、酰基或酰胺基中之一;

R_3 和 R_4 独立选自 H、硝基、氨基、烷基或卤素中之一;

R_5 选自烷氧烷基、烯氧基、炔氧基、氨基、烷基氨基、氨基烷基、烷基氨基羰基、磺酰基、烷基磺酰基、烷基亚磺酰基、氨基磺酰基、酰基或 $-NHSO_2R_6$ 中之一;

R_6 选自 H、氨基、烷基、链烯基、卤代烷基、卤代烯基、杂烷基、烷氧烷基、烯氧基、炔氧基、氨基、烷基氨基、氨基烷基、烷基氨基羰基、磺酰基、烷基磺酰基、烷基亚磺酰基、氨基磺酰基、酰基、芳基烷基, 环烷基芳基、杂芳基或杂环基中之一;

在以上基团中, 各自可不被取代或被一个或多个取代基取代, 这些取代基包括: 卤素、=O、=S、-CN、-NO₂、-CF₃、-OCF₃、烷基、链烯基、链炔基、卤代烷基、卤代烯基、卤代炔基、羟基、羟烷基、烷氧基、烷氧烷基、烯氧基、炔氧基、氨基、烷基氨基、磺酰基、烷基磺酰基、氨基磺酰基、烷氧基烷基、-COOH、-SH 和酰基。

2. 根据权利要求 1 所述的用途, 其特征在于 R_1 选自 C₁-C₁₀ 烷基。

3. 根据权利要求 1 所述的用途, 其特征在于 R_1 为 C₄ 烷基。

4. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于 R_2 为烷氧基氨基烷基。

5. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于所述烷氧基氨基烷基为二乙氧基乙氧基。

6. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于 R_3 和 R_4 独立选自H或I原子。

7. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于 R_5 选自H或 $-NHSO_2R_6$, R_6 选自H、氨基、烷基中之一。

8. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于所述结构通式(I)的苯比呋喃化合物为胺碘酮、去乙基胺碘酮或决奈达隆。

9. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于所述错误折叠蛋白聚集所导致的疾病为肌病或神经系统退行性疾病。

10. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于所述错误折叠蛋白聚集所导致的疾病为阿尔茨海默病、帕金森症、肌萎缩侧索硬化症、亨廷顿舞蹈病、脊髓小脑性共济失调以及眼、咽型肌营养不良、传染性蛋白质病、致死性家族失眠症、 α -型抗胰蛋白酶缺乏症、齿状核红核苍白球路易斯核萎缩症、额颞叶失智症、进行性上眼神经核麻痹症、x连锁脊延髓肌萎缩症、神经元核内包涵体病中之一。

11. 一种药物组合物,其特征在于它含有

(a) 作为主要活性成分的0.01-99.9wt%的如式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐;

(b) 选自下组的一种或多种辅助活性成分:雷帕霉素、长春新碱、他莫西芬、白藜芦醇、紫杉醇、替莫唑胺、三苯氧胺、三氧化二砷、丁氯倍他松、卡巴西平、丙戊酸钠、N-羟基-N'-苯基辛二酰胺(SAHA)、喜树碱、替尼泊苷、秋水仙碱、高三尖杉酯碱、依托泊苷、丙卡巴肼、门冬酰胺酶、顺铂、卡铂、米托蒽醌、环磷酰胺、盐酸氮芥、洛莫司汀、司莫司汀、塞替派、白消安、氮甲、苯丁酸氮芥、氟尿嘧啶、喃氟啶、优氟啶、卡莫氟、巯嘌呤、甲氨蝶呤、阿糖胞苷、环胞苷、巯鸟嘌呤、六甲蜜胺、羟基脲、丝裂霉素、阿霉素、表柔比星、博莱霉素、培莱霉素、阿伐司汀、赫赛汀、格列卫、吉西他滨、托泊替康、多西他赛、亮丙瑞林;和

(c) 药学上可接受的载体。

12. 如权利要求11所述的组合物,其特征在于所述的(b)辅助活性成分的含量是0.0001-20wt%。

13. 如权利要求 11 所述的组合物,其特征在於所述的药物组合物的剂型选自下组:注射剂、注射用无菌粉末、片剂、胶囊、酞剂、散剂、颗粒剂、糖浆剂、溶液剂、酞剂、气雾剂、粉雾剂、栓剂。

14. 一种具有自吞噬诱导功能、能治疗错误折叠蛋白聚集所致疾病的药物的筛选方法,包括下列步骤:

(1) 将生物活性的化合物进行稳定表达 LC3—GFP 的细胞株,以二甲基亚砷溶剂为空白对照,已知的自吞噬诱导剂雷帕霉素作为阳性对照,高通量分析化合物作用导致的细胞数目以 LC3—GFP 荧光变化情况,去除明显减少细胞数目或并不明显增加 LC3—GFP 的化合物;

(2) 将(1)剩余的明显增加 LC3—GFP 的化合物处理稳定表达 FYVE—RFP 的细胞株,以二甲基亚砷溶剂为阴性对照,已知的自吞噬诱导剂雷帕霉素作为阳性对照,高通量分析化合物作用导致的 FYVE—RFP 荧光变化情况,去除 FYVE 显著减少的化合物;

(3) 雷帕霉素作为阳性对照,将(2)剩余的明显增加 LC3—GFP 且基本不减少 FYVE—RFP 的化合物作为候选的自吞噬诱导剂,通过 LC3 II /LC3 I 比例分析、长寿命蛋白降解以及 polyQ 降解实验进一步确证,上述 3 项指标都较二甲基亚砷显著增强的化合物即为具有自吞噬诱的治疗错误折叠蛋白聚集所致疾病的药物。

苯比呋喃化合物的用途及含其的药物组合物

技术领域

本发明涉及药物领域，具体地涉及苯比呋喃化合物的用途及含其的药物组合物。

技术背景

自吞噬是一类溶酶体依赖的细胞内蛋白或损伤器官降解过程。(Klionsky, D. J. & Emr, S. D. *Science*, 2000, 290, 1717-21.) 在这一过程当中，双膜的自吞噬体包被需要降解的细胞内容物之后，与溶酶体融合行使降解功能，实现氨基酸的再循环。这一降解/再循环系统在进化上高度保守，在发育、生长、衰老、疾病、死亡等过程中至关重要。自吞噬-溶酶体途径与泛素-蛋白酶体途径一起成为真核细胞中的两种主要降解系统，但与蛋白酶体途径分工不同，自吞噬主要降解长寿命蛋白，蛋白聚集体以及细胞器等。因此，除了参与一些重要的生理过程，自吞噬在一些由于特定组织中错误折叠蛋白聚集等因素所导致的疾病例如阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森症 (Parkinson's disease)、肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis)、亨廷顿舞蹈病 (Huntington's disease, HD) 以及脊髓小脑性共济失调的一些类型 (spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, 7, 17) 以及传染性蛋白质病 (Prion diseases)、致死性家族失眠症 (fatal familial insomnia)、 α -I 型抗胰蛋白酶缺乏症 (alpha-1 antitrypsin deficiency)、齿状核红核苍白球路易斯科萎缩症 (dentatorubral-pallidolusian atrophy)、额颞叶失智症 (frontal temporal dementia)、进行性上眼神经核麻痹症 (progressive supranuclear palsy)、X 连锁脊延髓肌萎缩症 (spinobulbar muscular atrophy)、神经元核内包涵体病 (Neuronal intranuclear hyaline inclusion disease) 等的治疗中显得很有意义，通过化合物 (如雷帕霉素, rapamycin) 诱导自吞噬降解 HD 相关蛋白聚集体被证实是一种行之有效的方法 (Berger Z, Ravikumar B, Menzies FM et al *Hum Mol Genet*. 2006, 15: 433-42)。基于自吞噬在生理和病理过程中的重要作用，

目前这一领域已日益成为生物学研究热点。(Lum, J. J., DeBerardinis, R. J. & Thompson, C. B. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, 6, 439-48.)。

在正常条件下,自吞噬在细胞中仅维持低微的本底水平,而在饥饿或其它压力条件之下,自吞噬水平迅速上调。酵母基因分析业已确定了17个自吞噬相关基因(简称ATG基因)(Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A. et al. *Dev Cell* 2003, 5, 539-45.)。这17个基因编码的蛋白可以分为4类,包括参与调节自吞噬上游信号(如mTOR)的几种丝/苏氨酸激酶(Atg1, Atg13, Atg17),参与调节自吞噬起始过程中脂/激酶信号复合物的蛋白(Atg6, Atg14, Vps34, and Vps15),参与自噬体形成的2类新型泛素样结合系统(Atg8以及Atg12系统),以及帮助自吞噬体形成过程中结合于自吞噬体之上的ATG分子从成熟的自吞噬体上进行解离的蛋白(Atg2, Atg9, Atg18)。绝大多数酵母ATG基因在高等真核生物细胞中具有同源体(Mizushima, N. & Klionsky, D. J. *Annu Rev Nutr* 2007, 27, 19-40.)。例如,在哺乳动物细胞中,雷帕霉素靶蛋白mTOR激酶介导非饥饿等条件下自吞噬抑制通路(Lum, J. J., DeBerardinis, R. J. & Thompson, C. B. *Nat Rev Mol Cell*, 2005, 6, 439-48)。相反,酵母vps34蛋白在哺乳动物细胞中的同源体C3 PI3激酶则为自吞噬启动所必需,雷帕霉素因而也成为自吞噬研究和相关应用过程中最常用的诱导剂。

雷帕霉素(Rapamycin, RAPA, RPM),又名Sirolimus,是新型大环内酯的抗排斥药物,是目前世界上最新的强效免疫抑制剂,临床上用于器官移植的抗排斥反应和自身免疫性疾病的治疗。在大量的临床试验中发现其副作用有剂量依赖性,并且为可逆的,治疗剂量的RAPA尚未发现有明显的肾毒性,无齿龈增生。主要毒副作用包括:头痛,恶心,头晕,鼻出血,关节疼痛。实验室检查异常包括:血小板减少,白细胞减少,血色素降低,高甘油三酯血症,高胆固醇血症,高血糖,肝酶升高(SGOT, SGPT),乳酸脱氢酶升高,低钾,低镁血症等。

发明内容

本发明的目的之一是提供一类苯比呋喃衍生物在制备治疗错误折叠蛋白聚集所导致的疾病的药物中用途。

本发明的目的之二是提供一种临床适用的、能用于治疗错误折叠蛋白聚集

所导致的疾病的药物制剂。

本发明的目的之三是提供一种具有自吞噬诱导功能、能治疗错误折叠蛋白聚集所致疾病的药物的筛选方法。

本发明的目的之四是提供一种治疗错误折叠蛋白聚集所导致的疾病的治疗方法。

基于自吞噬作用机制，同时寻找更多的真正诱导自吞噬发生的小分子化合物，发明人以 LC3-GFP 在自吞噬发生时定位于自吞噬体膜这一特性为基础，建立了一种基于图像的高通量筛选自吞噬诱导剂的新方法 (Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., et al *EMBOJ*, 2000, 19, 5720-8.)。灵长类细胞中 LC3 蛋白乃是酵母 ATG8 的同源体，被认为是自吞噬体的特征性蛋白标记。通过与绿色荧光蛋白 (GFP) 融合表达，可以通过荧光显微镜方便地观察到自吞噬体的情况。在正常培养的细胞中，LC3-GFP 的荧光亮点数量以及荧光强度处于很低的本底水平，而在一些自吞噬诱导条件，例如饥饿或加入自吞噬诱导剂等，以上参数则迅速而显著地升高 (Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., et al *Mol Biol Cell*, 2004, 15, 1101-11.)。这为大规模地筛选可能地自吞噬提供了基础。然而，LC3-GFP 增加并能不完全等同于自吞噬降解活性的增加，它还有可能源于细胞损伤甚至溶酶体功能遭到破坏导致的自吞噬体过程停滞 (抑制) 等因素。同时，虽然本发明人筛选的 480 种化合物 (ICCB known bioactive library, BIOMOL) 已经证实有清楚的生物活性，但绝大多数化合物都不会只有单一作用靶点，其本身已知的活性只可能为筛选提供参考，但并不能对以上所述的多种诱导 LC3-GFP 增加的情况加以区分。

多种细胞内、外的诱导因素包括饥饿、营养因子去除、细菌感染、细胞器损伤以及蛋白错配等均可能诱导自吞噬发生。目前只对饥饿诱导的自吞噬机制研究相对清楚。但同时许多细胞内信号分子例如 AMPK, mTOR, C3PI3K, MAPK 也被证实参与自吞噬调节 (12)

此外，Ca²⁺、Ca²⁺ 调节的蛋白酶 (calpains et al, *Autophagy*, 2007, 3, 235-7) 以及 calmodulin (Hoyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., et al *Mol Cell*, 2007, 25, 193-205.) 亦可能参与自吞噬调节。由于化合物可能影响多个蛋白靶点，筛选到的增加 LC3-GFP 的化合物即便不是由于溶酶体功能破坏导致的自吞噬抑制，也需排除细胞死亡带来的影响，从而寻找到通过影响已知甚至未知的自吞噬调控蛋白诱导自吞噬的化合物。

III 型磷脂酰肌醇 - 3 - 磷酸激酶 (class III phosphoinositide 3-kinases (PI-3-kinases), PI3K) 催化磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol PI) 磷酸化生成磷脂酰肌醇 - 3 - 磷酸 (Phosphatidylinositol-3-phosphate, PtdIns(3)P, PI(3)P), 后者在细胞内吞以及自吞噬体膜运输过程中至关重要 (Simonsen, A., Wurmser, A. E., Emr, S. D. et al *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13, 485-92.)。同时 Vps34/beclin1 (分别为哺乳动物细胞中酵母 III 型 PI3K 同源体 Vps34 与 ATG6 同源体 beclin1) 形成的复合物参与自吞噬起始信号调节 (Nobukuni, T., Kozma, S. C. & Thomas, G., *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19, 135-41)。因此, 在自吞噬发生过程中, PI(3)P 水平至少不应当降低太多。

FYVE domain 由约 70 个氨基酸残基组成, 形成一个锌指蛋白结构, 与 PtdIns(3)P 特异结合, 通常 PtdIns(3)P 募集含有 FYVE domain 蛋白结合于细胞器膜, 参与蛋白运输等过程。因此, 荧光标记的 FYVE domain 常被用于检测细胞内 PI(3)P 水平及定位 (Stenmark, H., Aasland, R. & Driscoll, P. C. *FEBS Lett*, 2002, 513, 77-84)。我们亦利用稳定表达 FYVE-RFP 融合蛋白的细胞株观察化合物对 FYVE domain 的影响, 从中间接反映化合物对自吞噬的影响, 去除掉 FYVE 显著减少的化合物。

自吞噬过程的实质是蛋白质降解过程, 它主要介导细胞器以及细胞内长寿命蛋白的降解 (Mizushima, N. & Klionsky, D. J. *Annu Rev Nutr*, 2007, 27, 19-40.)。因此, 检测化合物是否促进细胞内长寿命蛋白降解是说明化合物诱导自吞噬的一个重要佐证。另外, 错误折叠的蛋白大量聚集是多种神经退行性疾病的一个显著特点, 例如, 亨廷顿舞蹈病的发病机理即由于含有大量多聚谷氨酸 (polyglutamine, polyQ) 的蛋白聚集于神经细胞当中无法清理所致。自吞噬在此被认为是 polyQ 清除机制 (Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M. N. *Cell*, 2006, 124, 471-84)。例如, 自吞噬诱导剂雷帕霉素就常用作清除 polyQ 聚集体的化合物。所以, polyQ 清除与降解实验同样也是自吞噬发生的重要佐证。基于此, 我们建立了从检测 LC3 - GFP 荧光变化、检测 FYVE - RFP 荧光变化到检测长寿命蛋白总量或 polyQ 降解的一系列方法筛选诱导自吞噬的小分子化合物。

本发明采用了简便的化合物高通量筛选途径, 包括: 定量分析细胞中荧光标记的 LC3 变化 - 定量分析细胞中荧光标记的 FYVE 变化, 获得自吞噬诱导剂

候选化合物，再进行长寿命蛋白降解、polyQ 降解等，最终确定新的自吞噬诱导剂和具有自吞噬机制的分子工具或错误折叠蛋白聚集因素所导致的疾病等自吞噬相关疾病的治疗的药物。

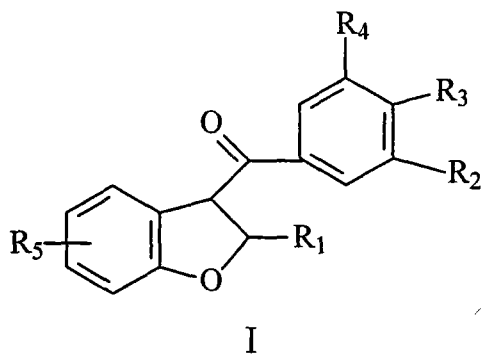
具体筛选步骤分 3 步进行：

1、对 480 种已知生物活性的化合物（ICCB known bioactive library, BIOMOL）处理稳定表达 LC3-GFP 的细胞株，以二甲基亚砜（DMSO）溶剂为空白对照，已知的自吞噬诱导剂雷帕霉素作为阳性对照，高通量分析化合物作用导致的细胞数目以 LC3-GFP 荧光变化情况，去除明显减少细胞数目或并不明显增加 LC3-GFP 的化合物。

2、将剩余的明显增加 LC3-GFP 的化合物处理稳定表达 FYVE-RFP 的细胞株，以 DMSO 溶剂为阴性对照，已知的自吞噬诱导剂雷帕霉素作为阳性对照，高通量分析化合物作用导致的 FYVE-RFP 荧光变化情况，去除 FYVE 显著减少的化合物。

3、将剩余的明显增加 LC3-GFP 且基本不减少 FYVE-RFP 的化合物作为候选的自吞噬诱导剂，通过 LC3 II/LC3 I 比例分析、长寿命蛋白降解以及 polyQ 降解实验进一步确证，上述 3 项指标都较 DMSO 显著增强的化合物即为筛选出的新的错误折叠蛋白聚集因素所导致的疾病等自吞噬相关疾病的治疗的药物，雷帕霉素在此依然作为阳性对照。

本发明公开了一类下列结构通式（I）的苯比呋喃类化合物及其药学上可接受的盐或前药在制备治疗错误折叠蛋白聚集所导致的疾病的药物中用途，



其中，R₁选自烷基、链烯基、杂烷基、烷氧烷基、烯氧基、炔氧基、氨基、烷基氨基或氨基烷基中之一；

R₂选自烷基、链烯基、杂烷基、烷氧烷基、烯氧基、烷氧基氨基烷基、烷基氨基羰基、磺酰基、烷基磺酰基、烷基亚磺酰基、氨基磺酰基、酰基或酰胺基中之一；

R_3 和 R_4 独立选自 H、硝基、氨基、烷基或卤素中之一；

R_5 选自烷氧烷基、烯氧基、炔氧基、氨基、烷基氨基、氨基烷基、烷基氨基羰基、磺酰基、烷基磺酰基、烷基亚磺酰基、氨基磺酰基、酰基或 $-NHSO_2R_6$ 中之一；

R_6 选自 H、氨基、烷基、链烯基、卤代烷基、卤代烯基、杂烷基、烷氧烷基、烯氧基、炔氧基、氨基、烷基氨基、氨基烷基、烷基氨基羰基、磺酰基、烷基磺酰基、烷基亚磺酰基、氨基磺酰基、酰基、芳基烷基，环烷基芳基、杂芳基或杂环基中之一；

在以上基团中，各自可不被取代或被一个或多个取代基取代，这些取代基包括：卤素、 $=O$ 、 $=S$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-CF_3$ 、 $-OCF_3$ 、烷基、链烯基、链炔基、卤代烷基、卤代烯基、卤代炔基、羟基、羟烷基、烷氧基、烷氧烷基、烯氧基、炔氧基、氨基、烷基氨基、磺酰基、烷基磺酰基、氨基磺酰基、烷氧基烷基、 $-COOH$ 、 $-SH$ 和酰基；

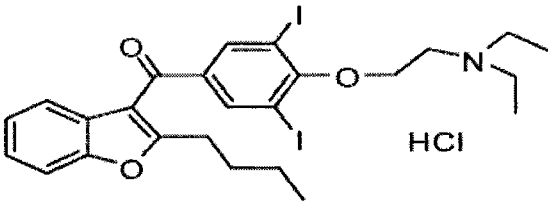
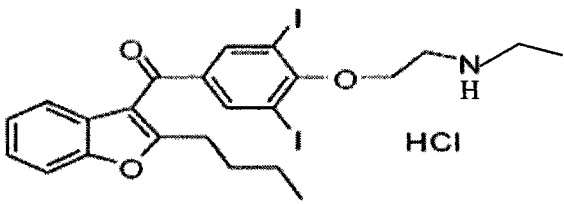
在某些具体实施方案中， R_1 选自 C_1 - C_{10} 烷基，优选为 C_4 烷基；

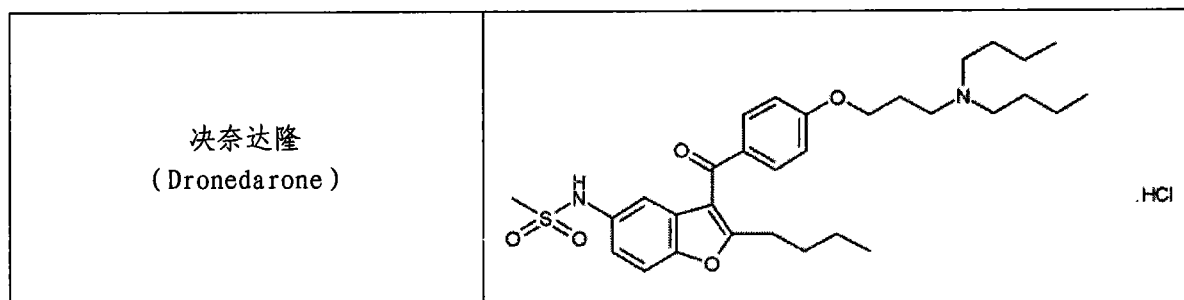
在某些具体实施方案中， R_2 为烷氧基氨基烷基，优选为二乙氨基乙氧基；

在某些具体实施方案中， R_3 和 R_4 独立选自 H 或 I 原子；

在某些具体实施方案中， R_5 选自 H 或 $-NHSO_2R_6$ ； R_6 选自 H、氨基或烷基；

在一些具体实施方案中，结构通式 (I) 的苯比呋喃化合物为胺碘酮 (Amiodarone)、去乙基胺碘酮或决奈达隆 (Dronedarone)。

化合物	结构式
胺碘酮 (Amiodarone)	
去乙基胺碘酮 (desethylamiodarone)	



本发明所述错误折叠蛋白聚集所导致的疾病为，包括但不限于阿尔茨海默病、帕金森症、肌萎缩侧索硬化症、亨廷顿舞蹈病、脊髓小脑性共济失调以及眼、咽型肌营养不良、传染性蛋白质病、致死性家族失眠症、 α -型抗胰蛋白酶缺乏症、齿状核红核苍白球路易斯核萎缩症、额颞叶失智症、进行性上眼神经核麻痹症、x 连锁脊延髓肌萎缩症、神经元核内包涵体病。

另一方面，本发明还公开了一种药物组合物，其特征在于它含有

(a) 作为主要活性成分的 0.01-99.9wt% 的如式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐；

(b) 选自下组的一种或多种辅助活性成分：雷帕霉素、长春新碱、他莫西芬、白藜芦醇、紫杉醇、替莫唑胺、三苯氧胺、三氧化二砷、丁氯倍他松、卡巴西平、丙戊酸钠、N-羟基-N'-苯基辛二酰胺 (SAHA)、喜树碱、替尼泊昔、秋水仙碱、高三尖杉酯碱、依托泊昔、丙卡巴肼、门冬酰胺酶、顺铂、卡铂、米托蒽醌、环磷酰胺、盐酸氮芥、洛莫司汀、司莫司汀、塞替派、白消安、氮甲、苯丁酸氮芥、氟尿嘧啶、喃氟啶、优氟啶、卡莫氟、巯嘌呤、甲氨蝶呤、阿糖胞苷、环胞苷、巯鸟嘌呤、六甲蜜胺、羟基脲、丝裂霉素、阿霉素、表柔比星、博莱霉素、培莱霉素、阿伐司汀、赫赛汀、格列卫、吉西他滨、托泊替康、多西他赛、亮丙瑞林；和

(c) 药学上可接受的载体。

在某些具体实施方案中，所述辅助活性成分的含量是 0.0001-20wt%。

另一方面，本发明还提供了具有自吞噬诱导功能、能治疗错误折叠蛋白聚集所致疾病的药物的筛选方法，包括下列步骤：

(1) 将生物活性的化合物进行稳定表达 LC3-GFP 的细胞株，以二甲基亚砜溶剂为空白对照，已知的自吞噬诱导剂雷帕霉素作为阳性对照，高通量分析化合物作用导致的细胞数目以 LC3-GFP 荧光变化情况，去除明显减少细胞数目或并不明显增加 LC3-GFP 的化合物；

(2) 将(1)剩余的明显增加 LC3—GFP 的化合物处理稳定表达 FYVE—RFP 的细胞株, 以二甲基亚砜溶剂为阴性对照, 已知的自吞噬诱导剂雷帕霉素作为阳性对照, 高通量分析化合物作用导致的 FYVE—RFP 荧光变化情况, 去除 FYVE 显著减少的化合物;

(3) 雷帕霉素作为阳性对照, 将(2)剩余的明显增加 LC3—GFP 且基本不减少 FYVE—RFP 的化合物作为候选的自吞噬诱导剂, 通过 LC3 II /LC3 I 比例分析、长寿命蛋白降解以及 polyQ 降解实验进一步确证, 上述 3 项指标都较二甲基亚砜显著增强的化合物即为具有自吞噬诱的治疗错误折叠蛋白聚集所致疾病的药物。

另一方面, 本发明提供使用有效量的通式(I)所表示的化合物或含有通式(I)所表示的化合物的药物组合物单独或者与其它药物联合使用进行治疗由治疗错误折叠蛋白聚集所导致、关联或伴随的病症的方法。

本方面所公开的化合物可以明显地促进自吞噬、减少细胞中错配蛋白聚集, 并显示出更低的细胞毒性, 甚至优于雷帕霉素和另一种已知的自吞噬诱导剂他莫西酚。本方面所公开的化合物可以在一些错配蛋白所导致的疾病如多聚谷氨酸聚集所导致的神经退行性疾病治疗中发挥作用, 能开发成为治疗相关疾病的治疗药物。

附图说明

图 1 八种化合物增加内源性 LC3 II 比率

图 2 八种化合物增加 polyQ 降解。

具体实施方式

本发明所使用的术语“不被取代”是指无取代基或仅被氢取代。

本发明所使用的部分术语定义如下:

“卤素”是指氟、氯、溴和碘。

“烷基”当作一基团或一基团的部分时是指直链或者带有支链的脂肪烃基团。优先选择烷基为 C₁-C₁₄ 的烷基; 更优先选择为: C₁-C₁₀ 烷基; 最优先选择为 C₁-C₆, 除非另有指明。直链或和带有支链的 C₁-C₆ 烷基的实例包括, 但不限于: 甲基、乙基、正丙基、2-丙基、正丁基、异丁基、特丁基、己基等。

“烷基氨基”包括单烷基氨基和二烷基氨基两种，除非另有指明。“单烷基氨基”是指：(烷基-NH)-的基团；“二烷基氨基”是指：((烷基)₂N)-的基团。其中，烷基见本文有关定义。该烷基基团优先选择 C₁-C₆的烷基基团。实例包括，但不限于：N-甲胺基、N-乙胺基、N-异丙胺基、N,N-(二乙基)胺基等。

“氨基烷基”是指：(氨基-烷基)-的基团。其中，烷基见本文有关定义。实例包括，但不限于：氨基乙基、1-氨基丙基、1-氨基丙基等。

“芳基氨基”包括单-芳基氨基和二-芳基氨基两种，除非另有说明。单-芳基氨基是指：(芳基-)NH-的基团；二-芳基氨基是指式 (芳基)₂N-的基团；芳基的定义见本文相关部分。

“酰基”包括 (烷基-CO)-的基团和 (芳基-CO)-的基团，除非另有说明。其中烷基或芳基均见本文中的有关定义。酰基的实例包括，但不限于：乙酰基、丙酰基、异丁酰基、苯甲酰基等。

“酰胺基”包括 (烷基-CONH)-的基团和 (芳基-CONH)-的基团，除非另有说明。其中，烷基或芳基均见本文中的有关定义。酰胺基的实例包括，但不限于：乙酰胺基、丙酰胺基、丁酰胺基、异丁酰胺基、苯甲酰胺基等。

“烯基”作为一基团或一基团的一部分时是指至少含有一个碳-碳双键的脂肪烃基团，可为直链也可以带有支链。优先选择具有 C₂-C₁₄的烯基。C₂-C₁₂则更好；最为优先选择的是 C₂-C₆的烯基。该基团可在其主链中含有多个双键且其构象可各自为 E 或 Z。烯基基团的例子包括，但不限于：乙烯基、丙烯基等。

“烷氧基”是指 (烷基-O)-的基团。其中，烷基见本文有关定义。C₁-C₆的烷氧基为优先选择。其实例包括，但不限于：甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基等。

“烯氧基”是指 (烯基-O)-的基团。其中，的烯基见本文有关定义。C₁-C₆的烯氧基为优先选择。

“炔氧基”是指 (炔基-O)-的基团。其中，的炔基见本文有关定义。C₁-C₆的炔氧基为优先选择。

“烷氧羰基”是指 (烷基-O-C(O))-的基团。其中，烷基见本文有关定义。优先选择的烷基基团为 C₁-C₆烷基。其实例包括，但不限于：甲氧羰基、乙氧羰基等。

“烷基亚磺酰基”是指 (烷基-S(O))-的基团。其中，的烷基见本文有关定义。优先选择的烷基为 C₁-C₆烷基基团。烷基亚磺酰基基团包括，但不限于：甲基

亚磺酰基、乙基亚磺酰基等。

“烷基磺酰基”是指(烷基-S(O)₂-O)-的基团。其中,的烷基见本文有关定义。该优先选择的烷基为 C₁-C₆烷基基团。其实例包括,但不限于:甲磺酰基、乙磺酰基等。

“烷基氨基芳基”是指烷基氨基-芳基基团。其中,烷基氨基见本文有关定义。

“环烷基”是指饱和或部分饱和的单环、稠环或螺环之碳环。以 3-9 个碳原子组成的环为优先选择。实例包括,但不限于:环丙基、环丁基、环戊基、环己基等。

“环烷基烷基”是指环烷基-烷基基团。其中,环烷基和烷基部分见本文有关定义。单环烷基烷基基团包括,但不限于:环丙基甲基,环戊基甲基,环己基甲基、环庚基甲基等。

“杂环烷基”是指至少含有一个选自 N, S, O 的杂原子的环烷基。优选含有 1-3 个杂原子。优选的环为 3-14 员环,更优先选择的环为 4-7 员环。杂环烷基包括,但不限于:吡咯烷基、二氢吡咯基、四氢吡咯基、二氢吡唑基、哌啶基、吗啉四氢呋喃基、四氢硫代呋喃基、四氢吡喃基等。

“杂环烯基”是指至少含有一个双键的杂环烷基。杂环烷基见本文有关定义。

“杂环烷基烷基”是指:(杂环烷基-烷基)-的基团。其中,杂环烷基和烷基部分见本文有关定义。杂环烷基烷基基团包括,但不限于:(2-四氢呋喃基)甲基、(2-四氢硫代呋喃基)甲基等。

“杂烷基”是指直链或含有支链烷基的基团,并且在主链中,至少含有一个或多个选自 S, O 和 N 的杂原子。优先选择含有 2-14 个原子链。杂烷基包括,但不限于:醚类、硫醚类、烷基酯类,第二或第三烷基胺类、烷基亚磺酸类等。

“芳基”作为一基团或一基团的部分是指:(1)芳香性的单环或稠环;优先选择具有 5-12 个碳原子的芳香性碳环(环原子均为碳的环状构造)。芳基的实例包括,但不限于:苯基,萘基;(2)可以连接部分饱和的碳环,例如:苯基和 C₅₋₇环烷基或 C₅₋₇环烯基基团系互相稠合而形成一环状结构。实例包括,但不限于:四氢萘基,茛基或氢茛基等。芳基基团可被一个或多个取代基取代。

“芳基烯基”是指:(芳基-烯基)-的基团。其中,的芳基和烯基见本文有关定义。示例性的芳基烯基基团包括,但不限于:苯基丙烯基等。

“芳烷基”是指：(芳基-烷基)-的基团。其中，芳基和烷基部分见本文有关定义。示例性的芳烷基基团包括，但不限于：苯甲基，苯乙基、1-萘甲基等。

“环烯基”是指非芳香性单环或多环环系。其至少含有一个碳-碳双键且每环优选具有5-10个碳原子。示例性的单环状环烯基环包括，但不限于：环戊烯，环己烯或环庚烯。环烯基集团可被一个或多个取代基取代。

“杂芳基”是指单环性或稠合的多环芳香杂环。优先选择含有一个或多个选自N, O或/和S的杂原子的5-7员芳香环。典型的杂芳基取代基包括实例，但不限于：呋喃基，噻吩基，吡咯，吡唑，三唑，噻唑，吡啶，嘧啶，吡嗪，咪唑，苯并咪唑等。

“杂芳烷基”是指：(杂芳基-烷基)-的基团。其中，杂芳基和烷基部分见本文有关定义。示例性的杂芳烷基基团包括，但不限于：2-呋喃甲基、3-呋喃甲基、2-吡啶甲基等。

本发明包括通式(I)所表示的化合物及其可能的各种异构型式。包括：非镜像异构体、镜像异构体、互变异构体和“E”或“Z”构型异构体的几何异构体等。任何具有一定基础的化学工作者均可以分离出上述光学纯或者立体异构纯的化合物。

本发明包括通式(I)所表示的化合物及其可能的消旋体或/和镜像异构物/或/和非镜像异构物的混合物。

术语“药学上可接受的盐”是指上述化合物能保持原有生物活性并且适合于医药用途的某些盐类。通式(I)所表示的化合物的药学上可接受的盐有两种形成形式：一是与酸形成的盐；另一是与碱或者碱金属形成的盐。与通式(I)所表示的化合物形成药学上可接受的盐的酸包括无机酸和有机酸。合适的无机酸包括：盐酸，硫酸和磷酸。合适的有机酸可选自脂肪族、环脂肪族、芳香性、杂环羧酸和磺酸类有机酸；其实例包括但不限于：甲酸、乙酸、丙酸、琥珀酸、甘醇酸、葡萄糖酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、甘氨酸、精氨酸、柠檬酸、反丁烯二酸、烷基磺酸、芳基磺酸等。与通式(I)所表示的化合物形成药学上可接受的盐的碱金属包括：锂、钠、钾、镁、钙、铝、锌等；与通式(I)所表示的化合物形成药学上可接受的盐的碱包括：胆碱、二乙醇胺、吗啉等。

“前药”是一种通式(I)所表示的衍生物，借助于在体内代谢的方式将其于活体内转化(例如：藉由水解，还原或氧化)成通式(I)所表示的化合物。例如，

可以将通式(I)所表示的、含有羟基基团的化合物与酸反应制备成相应的酯。相应的酯即为前药,可以再活体内水解母体药物。适合来制备“前药”的酸包括但不限于:乙酸、柠檬酸、乳酸、酒石酸、丙二酸、草酸、水杨酸、琥珀酸、反丁烯二酸、顺丁烯二酸、亚甲基-双- β -羟基萘酸、龙胆酸、羟乙基磺酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸等。

通式(I)所表示的化合物的制备可参见胺碘酮(Amiodarone)、去乙基胺碘酮或奈达隆(Dronedarone)的制备方法和步骤(如奈达隆的合成流线参见EP 0471609、FR 2665444、JP 1992316554、US 5223510;胺碘酮的合成流线参见CHARLIER R, DELTOUR G, TONDEUR R, BINON F, Arch Int Pharmacodyn Ther. 1962 Sep 1;139:255-64),可以广泛应用于类似物的合成,只需要变换起始原材料即可。

通式(I)所表示的化合物亦可用以治疗涉及、关于或由错误折叠蛋白聚集因素所导致的疾病。已有许多病症已知涉及或至少一部分藉由自吞噬所调节,其中已知自吞噬诱导剂对于减轻或减缓疾病发作扮演某种角色,或者该等征状已知或已显示可藉由自吞噬诱导剂抑制剂予以减轻。预期可藉由本发明的化合物加以治疗的此型病症包括但不限于下列:阿尔茨海默病、帕金森症、肌萎缩侧索硬化症、亨廷顿舞蹈病、脊髓小脑性共济失调以及眼、咽型肌营养不良、传染性蛋白质病、致死性家族失眠症、 α -型抗胰蛋白酶缺乏症、齿状核红核苍白球路易斯核萎缩症、额颞叶失智症、进行性上眼神经核麻痹症、x连锁脊延髓肌萎缩症、神经元核内包涵体病。

通常,当本发明通式(I)所表示的化合物用于上述用途时,它们可与一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂混合制成不同给药途径的药物剂型,如注射剂、注射用无菌粉末、片剂、胶囊、酞剂、散剂、颗粒剂、糖浆剂、溶液剂、酞剂、气雾剂、粉雾剂、栓剂等。

上述剂型中可经口服给药的剂型为:片剂、胶囊、散剂、颗粒剂、糖浆剂、溶液剂、酞剂。固态载体包括:淀粉、乳糖、磷酸氢钙、微晶纤维素、蔗糖、白陶土、微粉硅胶、滑石粉、低取代羟丙基纤维素、羧甲基淀粉钠、聚乙烯吡咯烷酮。而液态载体包括:无菌水、乙醇、聚乙二醇、非离子型表面活性剂和食用油(如玉米油、花生油和芝麻油)。在制备药物组合物的过程中通常使用的佐剂包括:调味剂、着色剂、防腐剂(如羟苯烷基丁酯、苯甲酸钠、山梨酸)和抗氧化剂(如维生素E、维生素C、焦亚硫酸钠和二丁基羟基甲苯)。

上述剂型中可用于注射途径给药的剂型包括：注射剂、注射用无菌粉末，它们是将药物与一种或多种药学上可接受的赋形剂混合制成以供注射给药的形式。溶剂包括：无菌水、乙醇、甘油、丙二醇、聚乙二醇。此外，还需加入抑菌剂（如苯甲醇、羟苯丁酯、硫柳汞）、等渗调节剂（如氯化钠、葡萄糖）、助悬剂（如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素）、增溶剂（吐温-80、卵磷脂）、抗氧化剂（如维生素 E、维生素 C、焦亚硫酸钠）和填充剂（如乳糖、甘露醇）。

上述剂型中可经胃肠道外途径给药的有：气雾剂、粉雾剂、栓剂。粉雾剂中适合的载体实例包括：乳糖、葡聚糖、阿拉伯胶、甘露、葡萄糖和十二烷基硫酸钠。气雾剂中适合的溶剂为无菌水、乙醇、植物油、油酸。适合的抛射剂为三氯一氟甲烷、二氯二氟甲烷、丙烷、异丁烷、二氧化碳、氮气。栓剂的制备可将药物与一种适合的无刺激性赋形剂混合而成，赋形剂包括：可可脂、聚乙二醇-4000、聚乙二醇-6000、羟苯乙酯、甘油。

所用的活性成分的有效剂量可随给药模式和待治疗疾病的严重程度而变化。然而，通常当本发明通式(I)所表示的化合物每天以约 0.05-200mg/kg 动物体重的剂量给予时，能得到令人满意的效果，较佳地每天以 2-4 次分开的剂量给予，或以缓释形式给药。适用于内服的剂量形式，包含与固态或液态药学上可接受的载体混合的约 0.5-200mg 的通式(I)所表示的化合物。可调节此治疗方案以达到最佳治疗效果。例如，可根据治疗状况的需要，每天若干次分开给药，或将剂量按比例减少。通常，成人口服临床剂量的范围为 0.5-200mg/日，优选为 1-100mg/日。

下面结合具体实施例，来进一步阐述本发明。这些实施例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照制造厂商所建议的条件。

实施例 1 化合物增加 LC3 - GFP 的表达和聚集

试验方法：

微管相关蛋白轻链 3 (LC3) 是酵母自吞噬蛋白 ATG8 (Aut7/Apg8) 的哺乳动物蛋白同源体，定位于前自噬泡和自噬泡膜表面，为广泛采用的自吞噬体膜标记 (Mizushima N. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 2491 - 2502)。本发明通过高内涵显微镜分析统计绿色荧光 (GFP) 标记的自噬体标记 LC3 在化合物作用前后的荧光强度以及分布等变化情况

具体方法: 在 H4 细胞中转入融合蛋白 LC3 - GFP, 构建并筛选获得 H4 - LC3 细胞株作为筛选平台对 480 种已知生物活性的化合物 (ICCB known bioactive library, BIOMOL) 进行高内涵筛选, 具体方法: 将化合物用 DMSO 稀释溶解配制不同浓度, 每浓度重复 3 次; 将 H4 - LC3 细胞按照合适密度种植于 96 孔板, 用化合物处理 24 小时。设置以下实验组: 空白对照 (DMSO 处理)、阳性对照 (诱导剂雷帕霉素处理)、实验组 (化合物处理) 等。如果化合物影响 LC3 的表达及分布, 则可通过图像以及荧光点大小、强弱等数值准确体现。该实验被重复 3 次, 选取在 3 次实验中 LC3 - GFP 荧光强度大于空白对照组 50% 以上的 72 种化合物加以分析, 根据统计的细胞数结果去除细胞死亡超过 30% (与对照组比较) 的化合物, 剩余的化合物作为候选分子进一步研究。

试验结果:

对 480 种化合物进行筛选后确认 47 种化合物 (用*标注) 显著增加 LC3 - GFP 且并不导致明显的细胞死亡, 可以用来继续筛选可能的自吞噬抑制剂。结果见表 1:

表 1: 增加 LC3 - GFP 强度且基本没有细胞毒性的化合物

化合物	中文名	浓度 (μM)	相对细胞数 (%)	LC3 - GFP 相对荧光强度 (%)
Rapamycin	雷帕霉素	0.2	88.62 \pm 1.47	285.38 \pm 9.15
Tamoxifen	他莫西酚	4.4	91.20 \pm 15.79	585.87 \pm 23.60
Grayanotoxin III*	木藜芦素-III	6.0	129.36 \pm 12.25	210.65 \pm 18.76
Loperamide*	派洛丁胺	4.9	126.76 \pm 6.52	666.50 \pm 29.17
Amiodarone*	胺碘酮	3.7	138.50 \pm 1.88	327.25 \pm 43.47
Bay	K-8644*	7.0	134.45 \pm 31.56	181.32 \pm 24.39
Niguldipine*	尼古地平	3.9	132.78 \pm 18.11	777.92 \pm 93.57
Pimozide*	匹莫齐特	5.4	127.14 \pm 5.73	447.75 \pm 27.40
Clozapine*	氯氮平	7.7	139.18 \pm 7.07	350.13 \pm 4.27
Monensin*	莫能星	3.6	92.38 \pm 20.28	639.29 \pm 131.46
Nigericin*	尼日利亚菌素	3.4	106.90 \pm 20.30	747.88 \pm 59.06

Wiskostatin*		5.9	96.96 ± 20.37	2401.38 ± 69.13
E6 Berbamine*	小檗胺	3.3	131.16 ± 51.61	2447.47 ± 118.04
Paxilline*		5.7	119.79 ± 14.88	205.83 ± 23.64
2,5-Ditertbutylhydroquinone*	2,5-二叔丁基对苯二酚	11.3	118.42 ± 15.99	326.89 ± 28.36
Cyclopiazonic acid*	环匹阿尼酸	7.4	112.62 ± 3.20	186.44 ± 24.02
Flunarizine*	氟桂利嗪	5.2	104.67 ± 23.55	203.66 ± 5.56
AM 92016*		5.2	135.28 ± 14.74	222.83 ± 4.66
FPL-64176*		7.2	132.45 ± 18.98	200.83 ± 6.35
Verapamil*	维拉帕米	5.2	132.44 ± 14.80	238.60 ± 7.49
Bepriidil*	苜普地尔	6.2	111.92 ± 36.16	168.39 ± 10.81
Nicardipine*	尼卡地平	4.8	131.58 ± 2.77	229.64 ± 11.37
Penitrem A*	青霉震颤素	3.9	93.08 ± 14.17	166.85 ± 12.90
Propafenone*	普罗帕酮	6.6	99.88 ± 10.80	385.97 ± 11.98
Quinine*	奎宁	6.9	115.16 ± 3.83	165.01 ± 12.20
SDZ-201106*		5.4	94.70 ± 8.45	329.96 ± 42.81
Fluspirilene*	氟司必林	5.3	143.30 ± 17.53	1593.16 ± 23.32
Trifluoperazine*	三氟拉嗪	8.3	105.72 ± 12.84	1010.35 ± 109.78
TMB-8*		5.8	145.22 ± 28.06	229.50 ± 8.36
Cyclosporin A*	环孢素A	2.1	159.64 ± 24.07	178.79 ± 12.89
Cypermethrin*	氯氰菊酯	6.0	97.45 ± 28.70	208.14 ± 50.53
NapSul-Ile-Trp-CHO*		5.1	124.74 ± 15.35	199.27 ± 27.78
CA-074-Me*		6.3	132.20 ± 1.87	272.48 ± 13.64
E-64-d*		7.3	119.19 ± 21.97	244.88 ± 42.95
Ac-Leu-Leu-Nle-CHO*		6.5	96.31 ± 6.90	495.29 ± 25.66
Calpeptin*		6.9	128.87 ± 13.59	232.89 ± 14.22
Geldanamycin*	格尔德霉素	4.5	81.41 ± 1.67	546.80 ± 22.61
Chelerythrine*	白屈菜赤碱	6.5	110.26 ± 10.99	213.88 ± 27.31

BADGE*		7.3	132.48 ± 3.64	182.11 ± 14.16
GW-9662*		9.0	105.38 ± 6.48	166.91 ± 16.53
Castanospermine*	栗树精胺	13.2	157.35 ± 11.87	171.20 ± 10.92
Dipyridamole*	双嘧达莫	5.0	158.96 ± 20.49	213.63 ± 8.98
CAPE*		8.8	146.20 ± 21.95	150.18 ± 24.10
GM6001*		6.4	143.94 ± 11.51	196.42 ± 24.22
H9*		7.71	96.70 ± 4.54	156.16 ± 13.15
K252A*		0.5	101.89 ± 3.64	215.29 ± 17.56
Indirubin*	靛玉红	9.5	101.26 ± 13.87	172.28 ± 37.92
24(S)-Hydroxycholesterol*	24(S)-羟基胆固醇	6.2	108.20 ± 15.82	648.90 ± 135.44
Cyclopamine*	环巴胺	6.1	110.76 ± 20.93	1564.12 ± 149.37
SB 202190		7.6	91.14 ± 27.00	169.71 ± 31.55
ML9		6.9	82.33 ± 14.75	447.81 ± 36.14
Cytochalasin D	细胞松弛素D	4.9	71.84 ± 23.37	378.77 ± 59.48
Bafilomycin A1	巴佛洛霉素A1	0.4	71.96 ± 7.74	4027.54 ± 133.76
Tanshinone IIA	丹参酮IIA	8.5	79.77 ± 21.67	273.72 ± 21.09
Aphidicolin	蚜肠霉素	7.4	73.06 ± 11.61	350.13 ± 4.27
17-Allylamino-geldanamycin	17-丙烯胺格尔德霉素	4.3	66.89 ± 1.23	385.49 ± 35.56
Ikarugamycin	斑鸠霉素	5.2	50.16 ± 5.27	172.85 ± 35.93
Latrunculin B		6.3	27.55 ± 3.99	723.64 ± 78.60
Trichostatin-A	曲古菌素A	5.2	40.15 ± 5.26	1649.69 ± 174.70
Thapsigargin	毒胡萝卜素	3.8	63.77 ± 8.62	187.15 ± 2.47
A-23187		4.8	49.30 ± 3.18	150.83 ± 14.52
SKF-96365		6.2	42.96 ± 4.32	285.59 ± 17.28
Ro		4.5	50.58 ± 12.18	240.67 ± 33.17
GF-109203X31-8220		6.1	47.77 ± 2.96	211.81 ± 18.29
Cytochalasin B	细胞松弛素B	5.2	30.58 ± 18.88	286.43 ± 20.43

Cantharidin	斑蝥素	12.7	24.47 ± 2.33	463.81 ± 22.89
Etoposide	依托泊苷	4.3	48.17 ± 4.58	335.90 ± 53.85
ICRF-193		8.9	45.03 ± 5.04	483.18 ± 27.44
Furoxan		13.4	33.47 ± 4.82	214.71 ± 51.52
Curcumin	姜黄素	6.8	59.32 ± 23.06	249.22 ± 7.06
OBAA		5.8	35.84 ± 23.94	155.80 ± 23.68
Z-Leu3-VS		4.5	38.56 ± 5.36	176.02 ± 12.29

实施例 2 化合物增加或不影响细胞内 PI (3) P 水平

试验方法:

III 型 PI3K vps34 是一种多功能蛋白,一方面,它催化 PI 磷酸化生成 PI (3) P, 细胞内吞以及自吞噬体膜运输过程中至关重要(14)。同时 Vps34/beclin1 形成的复合物参与自吞噬起始信号调节(15)。因此,在自吞噬发生过程中, PtdIns(3)P 水平至少不应当降低太多。而 FYVE domain 是一种由 70 个氨基酸残基的、含锌指蛋白结构的蛋白结构域,可以特异结合 PI(3)P (16), 通常 PI(3)P 募集含有 FYVE domain 蛋白结合于细胞器膜,参与蛋白运输等过程。因此,荧光标记的 FYVE domains 可以用于检测细胞内 PI(3)P 水平及定位。

我们在 H4 细胞中转入融合蛋白 FYVE-RFP, 构建并筛选获得 H4 - FYVE 细胞株作为筛选平台对化合物进行高内涵筛选,从中间接反映化合物对自吞噬的影响,去除掉 FYVE 显著减少的化合物。本发明通过高内涵显微镜分析统计红色荧光(RFP)标记的 PI(3)P 募集蛋白 marker FYVE domain 在化合物作用前后的荧光强度以及分布等变化情况。

具体方法: 将化合物用 DMSO 稀释溶解配制不同浓度,每浓度重复 3 次; 将 H4 - FYVE 细胞按照合适密度种植于 96 孔板,用化合物分别处理 2、4、8 小时。设置以下实验组:

空白对照(DMSO 处理)、阳性对照(诱导剂雷帕霉素处理)、阴性对照(PI3K 抑制剂 LY-294002 处理)、实验组(化合物处理)等。如果化合物影响 FYVE 的表达及分布,则可通过图像以及荧光点大小、强弱等数值准确体现。该实验被重复 3 次,去除显著减少 FYVE 的化合物,选取在 3 次实验中 RFP - FYVE

荧光强度均较对空白对照组没有显著减少的各种化合物进行进一步分析。

试验结果:

对 47 种化合物进行筛选后确认 26 种化合物并不明显减少 FYVE-RFP (包括以上 8 种化合物), 可以用来继续筛选可能的自吞噬抑制剂, 见表 2:

表 2: 化合物不减少 FYVE-RFP 表达和聚集

化合物	FYVE-RFP相对荧光强度 (%)		
	2h	4h	8h
Rapamycin	164.93±10.96	131.41±26.64	152.35±4.55
Nigericin	148.43±5.17	145.40±8.39	140.54±18.21
Wiskostatin	267.90±6.16	240.08±4.26	131.93±11.05
Fluspirilene	224.98±16.90	142.15±5.77	108.53±6.07
Niguldipine	147.18±25.39	148.26±3.67	125.53±2.84
Trifluoperazine	136.58±15.74	111.52±13.45	94.28±2.87
Nicardipine	132.05±19.93	112.51±10.09	104.77±31.63
Penitrem A	121.40±12.66	87.41±5.90	72.71±5.57
Tamoxifen	77.66±4.43	71.55±0.73	85.37±7.59
Loperamide	115.39±5.20	123.62±1.37	95.70±12.84
Amiodarone	92.50±5.51	89.23±3.47	83.45±3.64
Pimozide	94.42±4.71	103.96±9.06	73.64±12.18
Clozapine	64.04±2.94	74.79±13.43	78.38±1.35
Cyclopamine	108.75±12.44	75.21±1.18	96.38±5.12
Paxilline	100.56±0.58	52.37±1.65	56.82±4.44
FPL-64176	99.43±9.62	78.17±1.90	87.62±2.42
Verapamil	83.96±20.67	70.15±13.00	71.28±11.29
Propafenone	114.69±8.90	78.75±18.93	62.87±3.38
Bay K-8644	110.18±25.18	57.79±3.76	79.70±7.28
Quinine	70.35±10.23	78.03±6.33	60.70±6.59
SDZ-201106	65.87±4.72	59.79±2.38	72.40±20.27

TMB-8	89.59±4.79	74.72±13.74	78.64±10.26
Cyclosporin A	73.62±5.70	71.69±27.87	55.82±4.16
NapSul-Ile-Trp-CHO	89.37±3.52	64.10±11.47	62.34±8.21
CA-074-Me	65.94±12.73	79.82±4.66	86.43±4.15
Ac-Leu-Leu-Nle-CHO	72.86±10.18	84.85±2.83	88.42±6.29
CAPE	86.89±20.98	71.17±18.70	69.14±4.32
H9	102.35±12.94	79.63±1.52	83.01±6.62
K252A	76.86±6.51	65.58±9.36	70.33±5.89
AM92016	68.06±1.20	71.97±15.67	66.35±17.66

实施例 3 八种化合物增加长寿命蛋白降解

试验方法

自吞噬过程的实质是蛋白质降解过程，它主要介导细胞器以及细胞内内长寿命蛋白的降解 (5)。因此，检测化合物是否促进细胞内长寿命蛋白降解是说明化合物诱导自吞噬的一个重要佐证。

具体方法：将化合物用 DMSO 稀释溶解配制不同浓度，每浓度重复 3 次；将 H4 细胞按照合适密度种植于 96 孔板，用化合物分别处理其、2、4、24 小时。设置以下实验组：

空白对照 (DMSO 处理)、阳性对照 (诱导剂雷帕霉素处理)、实验组 (化合物处理)。于实验前 1 天将细胞按照合适密度种植于 12 孔板中在正常条件下 (DMEM + 10% 胎牛血清) 进行培养，实验前换不含 L-亮氨酸的完全培养液培养 1h 以去除细胞内内源性 L-亮氨酸。接着用含 [3H] L-亮氨酸的完全培养液孵育细胞 24h，使细胞摄入同位素标记的亮氨酸进行蛋白合成，24h 之后换用完全培养液孵育细胞 24h 降解短寿命蛋白。待短寿命蛋白降解之后换用加入化合物的完全培养液孵育细胞，分别于 0、1、2、4、24h 检测培养液中放射性强度，24h 收集细胞检测细胞中同位素强度，计算化合物作用后不同时间相对于空白对照组长寿命蛋白降解率，通过 t 检验挑选出增加长寿命蛋白降解的化合物。

实验结果：找到八种可以增加长寿命蛋白降解 (促进自吞噬) 的化合物，见表 3:

表 3 化合物促进长寿命蛋白降解

化合物	长寿命蛋白相对降解率 (%)			
	1h	2h	4h	24h
雷帕霉素	159.89 ± 11.46	171.67 ± 10.41	149.89 ± 24.83	165.87 ± 4.08
洛哌丁胺	78.70 ± 13.17	122.10 ± 6.48	125.21 ± 4.29	139.19 ± 18.77
氟司必林	93.82 ± 3.25	143.17 ± 4.26	144.79 ± 9.02	145.50 ± 2.98
三氟拉嗪	76.62 ± 2.32	105.60 ± 5.01	109.00 ± 5.22	124.78 ± 2.05
匹莫齐特	129.13 ± 11.46	155.80 ± 9.22	152.01 ± 9.63	162.47 ± 3.50
尼卡地平	84.62 ± 4.48	126.59 ± 3.83	122.60 ± 7.70	121.03 ± 13.43
青霉震颤素	92.88 ± 2.83	126.09 ± 0.47	132.13 ± 10.01	141.83 ± 1.25
尼古地平	71.65 ± 2.68	107.42 ± 2.72	105.68 ± 2.74	117.85 ± 1.98
胺碘酮	101.32 ± 5.95	122.42 ± 9.71	110.75 ± 3.68	116.73 ± 5.54

实施例 4 八种化合物增加细胞内源性自吞噬体标记 LC3 II 比率

试验方法:

在化合物筛选平台中使用的自吞噬体标记 LC3 在胞浆中经过以上加工过程, 通常细胞中新合成的 LC3 经过加工, 成为胞浆可溶性 LC3 I, 分子量为 18Kd。自吞噬发生时, 后者经泛素样加工修饰过程, 与自噬泡膜表面的磷脂酰乙醇胺 (PE) 结合, 称为 LC3 II, 定位于自吞噬体膜, 表观分子量为 16KD (Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al EMBO J. 2000; 19, 5720-8)。LC3-II 含量的多少在某种程度上反映了细胞的自噬活性, 因此通过免疫印记的方法检测细胞中 LC3-II 的含量能够进一步反映化合物对自吞噬的影响。具体方法: 将 H4-LC 细胞按照合适密度种植于 6 孔板, 用化合物处理 4h 后收集细胞, 裂解后收获胞浆中蛋白质进行电泳分离后转膜, 用抗体进行免疫印记染色, 细胞骨架蛋白 actin 作为内参照。设置以下实验组: 空白对照 (DMSO 处理)、阳性对照 (诱导剂雷帕霉素处理)、实验组 (化合物作用)。

实验结果:

8 种化合物能够诱导 LC3II/LC3I 比率增加。如附图 1 所示。图 1 中: D: DMSO; R: 雷帕霉素; 3: 胺碘酮; 4: 尼古地平; 5: 三氟拉嗪; 6: 洛哌丁胺; 7: 青霉震颤素; 8: 匹莫齐特; 9: 氟司必林; 10: 尼卡地平。

实施例 5 八种化合物促进多聚谷氨酸降解

试验方法:

错误折叠的蛋白大量聚集是多种神经退行性疾病的一个显著特点,例如,亨廷顿舞蹈病的发病机理即由于含有大量多聚谷氨酸 (polyglutamine, polyQ) 的蛋白聚集于神经细胞当中无法清理所致。自吞噬在此被认为是 polyQ 清除机制 (20)。例如,自吞噬诱导剂 mTOR 常用作清除 polyQ 聚集体的化合物。所以, polyQ 清除与降解实验同样是自吞噬发生的重要佐证。

具体方法: 将筛选到的 8 种化合物用 DMSO 溶解, 并逐级稀释于完全培养液中。将 H4 细胞按照合适密度种植于 12 孔板, 用脂质体包裹重组质粒 GFP-polyQ-HA 转染细胞, 4 小时后换用上述添加不同浓度化合物的完全培养液继续培养, 24 小时后拍照并收集细胞, 裂解后收获胞浆中蛋白质, 用点样器点样至 PVDF 膜, 用抗 HA 抗体进行免疫印记染色, 细胞骨架蛋白 actin 作为内参照。设置以下实验组: 空白对照 (DMSO 处理)、阳性对照 (诱导剂雷帕霉素处理)、实验组 (化合物处理)。

实验结果:

八种化合物可以有效诱导 polyQ 降解并呈较好的剂量依赖关系, 能制备并成为更好的由错误折叠蛋白聚集因素所导致的疾病等自吞噬相关疾病的治疗药物。见附图 2。图 2 中: 从左至右: 第一列: 上: DMSO; 下: 雷帕霉素处理样品。2-9 列分别为氟司必林、匹莫齐特、三氟拉嗪、胺碘酮、哌洛丁胺、尼卡地平、尼古地平、以及青霉震颤素处理的样品, 从上至下为不同稀释比例的样品, 依次为用筛选浓度, 数值见附图 1, 以及按照 1:2.5、1:5 以及 1:10 稀释度稀释的化合物处理的样品。

实施例 6

胺碘酮颗粒剂

处方:

胺碘酮	10g
PVP K30	10g
交联 PVP	15g
乳糖	1000g
蔗糖	1000g

柠檬黄	1g
硬脂酸	20g

工艺：将胺碘酮过 80 目筛，与乳糖、蔗糖混匀，加含柠檬黄的 PVP K30 浆制成软材，用 14 目筛制粒后，置 70℃ ~ 80℃ 干燥后于 12 目筛整粒，加入交联 PVP 和硬脂酸混匀后，装 1000 袋即可。

奈达隆片

处方：奈达隆	1000g
乳糖	1500g
淀粉	500g
10% 淀粉浆	200g
干淀粉	20g
硬脂酸镁	15g

制成 1000 片

工艺：将奈达隆过 80 目筛，与淀粉乳糖混匀，加淀粉浆制成软材，用 14 目筛制粒后，置 70℃ ~ 80℃ 干燥后于 12 目筛整粒，加入干淀粉及硬脂酸镁混匀后，压片，即得。

胺碘酮缓释片

处方：胺碘酮	1000g
枸橼酸	10g
HPMC (K4M)	160g
乳糖	180g
硬脂酸镁	2mg

制成 1000 片

工艺：将胺碘酮与 HPMC 乳糖混匀，枸橼酸溶于乙醇中作润湿剂制成软材，制粒，干燥，整粒，加硬脂酸镁混匀，压片即得。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

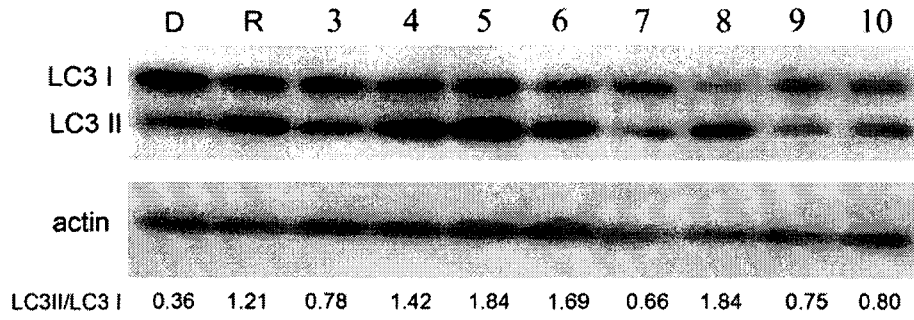


图 1

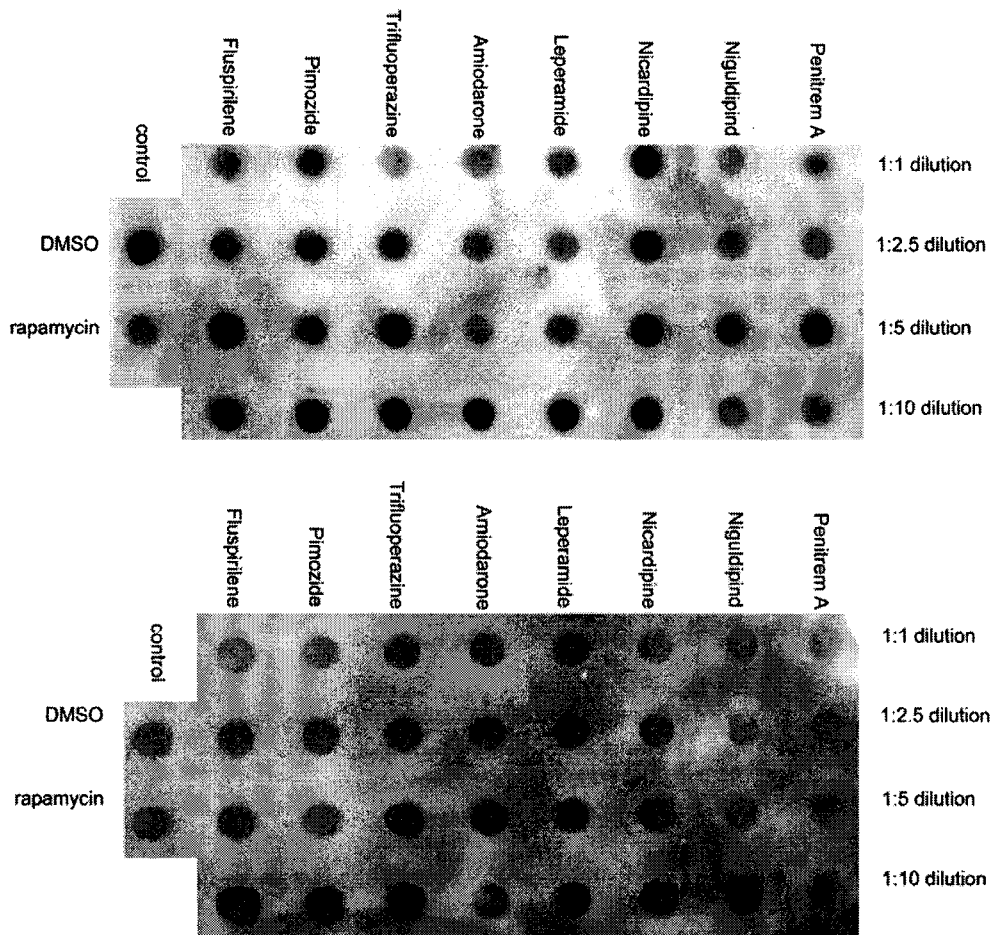


图 2