



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110035758 B

(45) 授权公告日 2023.06.16

(21) 申请号 201780053445.8

(22) 申请日 2017.08.30

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110035758 A

(43) 申请公布日 2019.07.19

(30) 优先权数据

16306094.0 2016.08.30 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2019.02.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/071812 2017.08.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02018/041919 EN 2018.03.08

(73) 专利权人 AMA生物制药公司

地址 法国巴黎

(72) 发明人 A.丹钦 A.塞科夫斯卡 P.加尼尔

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理人 何伟

(51) Int.Cl.

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

(56) 对比文件

US 6020139 A, 2000.02.01

CN 105073089 A, 2015.11.18

WO 2016050804 A1, 2016.04.07

Pathak, Chandramani 等. Modulation in

the activity of lactate dehydrogenase and level of c-Myc and c-Fos by modified base queuine in cancer.《CANCER BIOLOGY & THERAPY》.2008, 第7卷(第1期), 85-91.

Manjula VINAYAK等.Queuosine modification of tRNA: its divergent role in cellular machinery.《BIOSCIENCE REPORTS》.2009, 第30卷(第2期), 135-148.

Abou-Sleiman, PM等.Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease.《NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE》.2006, 第7卷(第3期), 207-219.

Modica-Napolitano, JS等.Mitochondrial dysfunction in cancer.《MITOCHONDRION》.2004, 第4卷(第5-6期), 755-762.

de Moura, Michelle Barbi等.Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases and Cancer.《ENVIRONMENTAL AND MOLECULAR MUTAGENESIS》.2010, 第51卷(第5期), 391-405.

Ohtake, A等.Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders: Exome sequencing for disease gene identification.《BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-GENERAL SUBJECTS》.2014, 第1840卷(第4期), 1355-1359. (续)

审查员 尹晴霞

权利要求书1页 说明书17页 附图2页

(54) 发明名称

用于治疗与线粒体功能障碍相关联的疾病的化合物

(57) 摘要

本发明涉及下式(A)的化合物或其药学上可接受的盐或者水合物, 其用于预防或者治疗与线

B
CN 110035758

[接上页]

(56) 对比文件

Reisser,T等.THE NUTRIENT FACTOR QUEUINE PROTECTS HELA-CELLS FROM HYPOXIC STRESS AND IMPROVES METABOLIC ADAPTATION TO OXYGEN AVAILABILITY.《EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY》.1994,第221卷(第3期),979-986.

Reisser,T等.THE NUTRIENT FACTOR QUEUINE PROTECTS HELA-CELLS FROM HYPOXIC

STRESS AND IMPROVES METABOLIC ADAPTATION TO OXYGEN AVAILABILITY.《EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY》.1994,第221卷(第3期),979-986.

Randerath,E等.Specific lack of the hypermodified nucleoside, queuosine, in hepatoma mitochondrial aspartate transfer RNA and its possible biological significance.《Cancer Research》.1984,第44卷(第3期),1167-1171.

1.Q碱或其药学上可接受的盐在制备用于预防或者治疗个体中的与线粒体功能障碍相关联的神经变性疾病的药物中的用途,其中所述与线粒体功能障碍相关联的疾病为帕金森病。

2.根据权利要求1的化合物或其药学上可接受的盐的用途,其以0.01至40mg/kg/d的剂量方案给药。

3.根据权利要求1或2的化合物或其药学上可接受的盐的用途,其为适于通过口服途径、真皮内途径、静脉内途径、肌内途径或者皮下途径给药的形式。

4.根据权利要求1至3中任一项的化合物或其药学上可接受的盐的用途,其与至少一种用于预防或者治疗与线粒体功能障碍相关联的疾病的另外的化合物联合。

用于治疗与线粒体功能障碍相关联的疾病的化合物

技术领域

[0001] 本发明涉及化合物、药物组合物和膳食补充剂,其用于预防或者治疗与线粒体功能障碍相关联的疾病,具体为帕金森病。

背景技术

[0002] 帕金森病(PD)是最常见的运动障碍和继阿尔茨海默病后第二最常见的神经退行性疾病,其特征主要在于黑质致密部中多巴胺能神经元的丧失,导致纹状体中的多巴胺缺乏。随之而来的基底神经节环路的失调导致最突出的运动症状,包括运动迟缓、运动功能减退、僵硬、静止性震颤和姿态不稳。除了典型的运动症状之外,还可能出现各种非运动特征,例如自主神经功能障碍、睡眠障碍、抑郁和认知损伤,表明了更广泛的退行性过程。

[0003] 关于PD的发病机理知之甚少。最常见的散发性PD形式似乎是一种复杂的多因素疾病,其环境因素和遗传易感性的贡献不同,衰老是最重要的危险因素。

[0004] PD的当前治疗旨在通过给予L-DOPA增加多巴胺浓度来纠正多巴胺能神经元丧失的后果。L-DOPA穿过保护性血脑屏障,而多巴胺本身不能,并且一旦L-DOPA进入中枢神经系统,它就被DOPA脱羧酶转化为多巴胺。磷酸吡哆醛(维生素B6)是该反应中所需的辅助因子,并且有时可以与L-DOPA一起施用,其通常采用吡哆醇形式。

[0005] 然而,长期给药L-DOPA治疗帕金森病会引起一些不希望的副作用,例如功能的剂末恶化、开/关振荡、运动时冻结、峰剂量时的运动障碍和多巴胺失调综合征以及耐药性(Thanvi&Lo (2004) Postgrad.Med.J.80:452-458)。

[0006] 因此,帕金森病中的L-DOPA给药需要替代治疗。

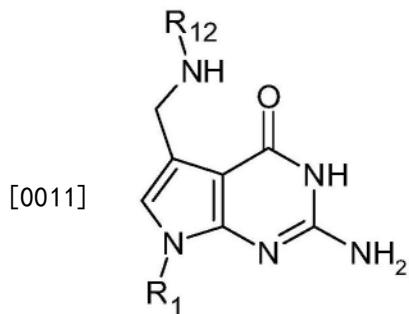
发明内容

[0007] 最近对PD相关基因的功能和功能障碍的研究为与疾病过程相关的生化途径提供了重要的新见解。这些发现已经确定线粒体功能障碍是散发性和家族性PD的共同特征,将线粒体推到PD研究的最前沿(Winklhofer&Haass (2010) Biochimica et Biophysica Acta1802:29-44)。

[0008] 本发明源于本发明人意外的发现,即在涉及线粒体功能障碍的帕金森氏病的体外模型中,Q碱(queuine)具有神经保护作用。

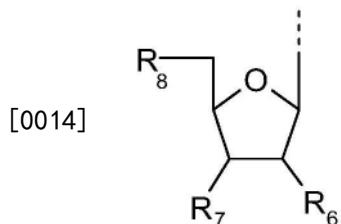
[0009] 因此,本发明涉及Q碱、Q碱前体、Q碱衍生物、Q碱类似物,或者Q碱的立体异构体,或它们药学上可接受的盐或者水合物,用于预防或者治疗与线粒体功能障碍相关联的疾病。

[0010] 本发明还涉及下式(A)的化合物:



(A)

[0012] 其中：

[0013] -R₁表示-H或者下式的核糖基：

[0015] 其中：

[0016] • R₆表示-H; -O-R₉或者-O-CO-R₉,其中R₉为H、具有1至6个碳原子的烷基或者具有3至12个碳原子的芳基；[0017] • R₇表示-H; -O-R₁₀或者-O-CO-R₁₀,其中R₁₀为H、具有1至6个碳原子的烷基或者具有3至12个碳原子的芳基;脱氧核糖核酸基团;或者核糖核酸基团；[0018] • R₈表示-H; -O-R₁₁或者-O-CO-R₁₁,其中R₁₁为H、具有1至20个碳原子的烷基或者具有3至20个碳原子的芳基;磷酸基团;二磷酸基团;三磷酸基团;脱氧核糖核酸基团;或者核糖核酸基团；[0019] -R₁₂表示具有1至20个碳原子的以下基团:饱和的或者不饱和的烷基、环烷基、杂环烷基或者醚基,这些基团任选被至少一个选自以下的基团取代:

[0020] • 具有1至20个碳原子的烷基、

[0021] • 具有3至20个碳原子的芳基或者杂芳基,

[0022] • 具有3至20个碳原子的环烷基或者杂环烷基,

[0023] • 羟基,

[0024] • 具有1至20个碳原子的羰基或者羧基,

[0025] • 环氧化基,

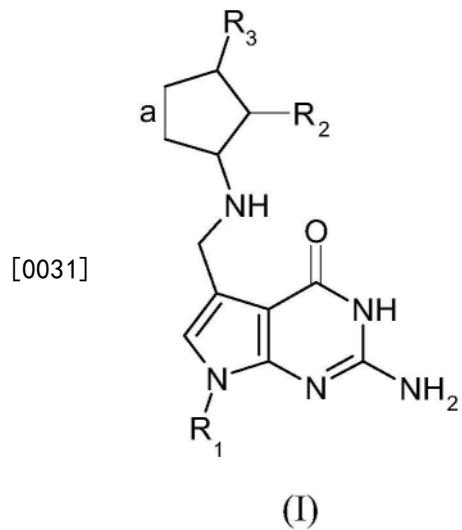
[0026] • -O-R₄基团,其中R₄为H、具有1至6个碳原子的烷基、具有3至12个碳原子的芳基、糖基或者氨基酰基,[0027] • -O-CO-R₅基团,其中R₅为具有1至6个碳原子的烷基、具有3至12个碳原子的芳基或者糖基;

[0028] 或其药学上可接受的盐或者水合物,

[0029] 用于预防或者治疗个体中的与线粒体功能障碍相关联的疾病。

[0030] 本发明还涉及具有下式(I)的式(A)化合物或其药学上可接受的盐或者水合物,其

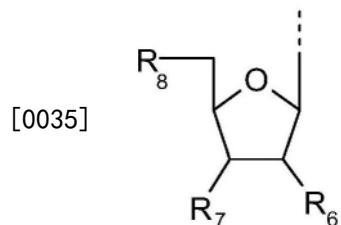
用于预防或者治疗与线粒体功能障碍相关联的疾病：



[0032] 其中：

[0033] -a表示双键或者环氧基，以及

[0034] -R1表示-H或者下式的核糖基：



[0036] 其中：

[0037] • R6表示-H; -0-R9或者-0-CO-R9,其中R9为H、具有1至6个碳原子的烷基或者具有3至12个碳原子的芳基；

[0038] • R7表示-H; -0-R10或者-0-CO-R10,其中R10为H、具有1至6个碳原子的烷基或者具有3至12个碳原子的芳基；脱氧核糖核酸基团；或者核糖核酸基团；

[0039] • R8表示-H; -0-R11或者-0-CO-R11,其中R11为H、具有1至20个碳原子的烷基或者具有3至20个碳原子的芳基；磷酸基团；二磷酸基团；三磷酸基团；脱氧核糖核酸基团；或者核糖核酸基团；

[0040] -R2和R3,其相同或者不同,表示-0-R4,其中R4为H、具有1至6个碳原子的烷基、具有3至12个碳原子的芳基、糖基或者氨基酰基；或者-0-CO-R5,其中R5为具有1至6个碳原子的烷基、具有3至12个碳原子的芳基或者糖基。

[0041] 在本发明的实施方案中,如上所定义使用的式(A)化合物,具体为式(I)化合物,或其药学上可接受的盐或者水合物与至少一种用于预防或者治疗与线粒体功能障碍相关联的疾病的另外的化合物联合。

[0042] 本发明还涉及药物组合物,其包含如上所定义的式(A)化合物,具体为式(I)化合物,或其药学上可接受的盐或者水合物作为活性物质,任选地与至少一种药学上可接受的赋形剂或者媒介物组合,用于预防或者治疗与线粒体功能障碍相关联的疾病。

[0043] 在本发明的实施方案中,如上所定义的药物组合物还包含至少一种用于预防或者

治疗与线粒体功能障碍相关联的疾病的另外的化合物。

[0044] 本发明还涉及药物组合物,其包含如上所定义的式(A)化合物,具体为式(I)化合物,或其药学上可接受的盐或者水合物作为活性物质,还包含至少一种用于预防或者治疗与线粒体功能障碍相关联的疾病的另外的化合物,任选地与至少一种药学上可接受的赋形剂或者媒介物组合。

[0045] 本发明还涉及产品,其包含:

[0046] -如上所定义的式(A)化合物,具体为式(I)化合物,或其药学上可接受的盐或者水合物,

[0047] -至少一种用于预防或者治疗与线粒体功能障碍相关联的疾病的另外的化合物,

[0048] 作为组合制剂,同时地、分开地或者顺序地用于预防或者治疗个体中的与线粒体功能障碍相关联的疾病。

[0049] 本发明还涉及膳食补充剂,其包含如上所定义的式(A)化合物,具体为式(I)化合物,或其药学上可接受的盐或者水合物,用于降低与线粒体功能障碍相关联的疾病的风险。

[0050] 在本发明的实施方案中,如上所定义的膳食补充剂任选地包含另外的化合物,其优选选自维生素、矿物质、脂肪酸、氨基酸和抗氧化剂。

[0051] 本发明还涉及用于预防或者治疗个体中的与线粒体功能障碍相关联的疾病的方法,其包括向个体给药有效量的如上所定义的式(A)化合物,具体为式(I)化合物,或其药学上可接受的盐或者水合物。

[0052] 在本发明的实施方案中,如上所定义的方法还包括给药至少一种用于预防或者治疗与线粒体功能障碍相关联的疾病的化合物。

[0053] 本发明还涉及如上所定义的式(A)化合物,具体为式(I)化合物的用途,其用于制备药物,所述药物预期用于预防或者治疗个体中的与线粒体功能障碍相关联的疾病。

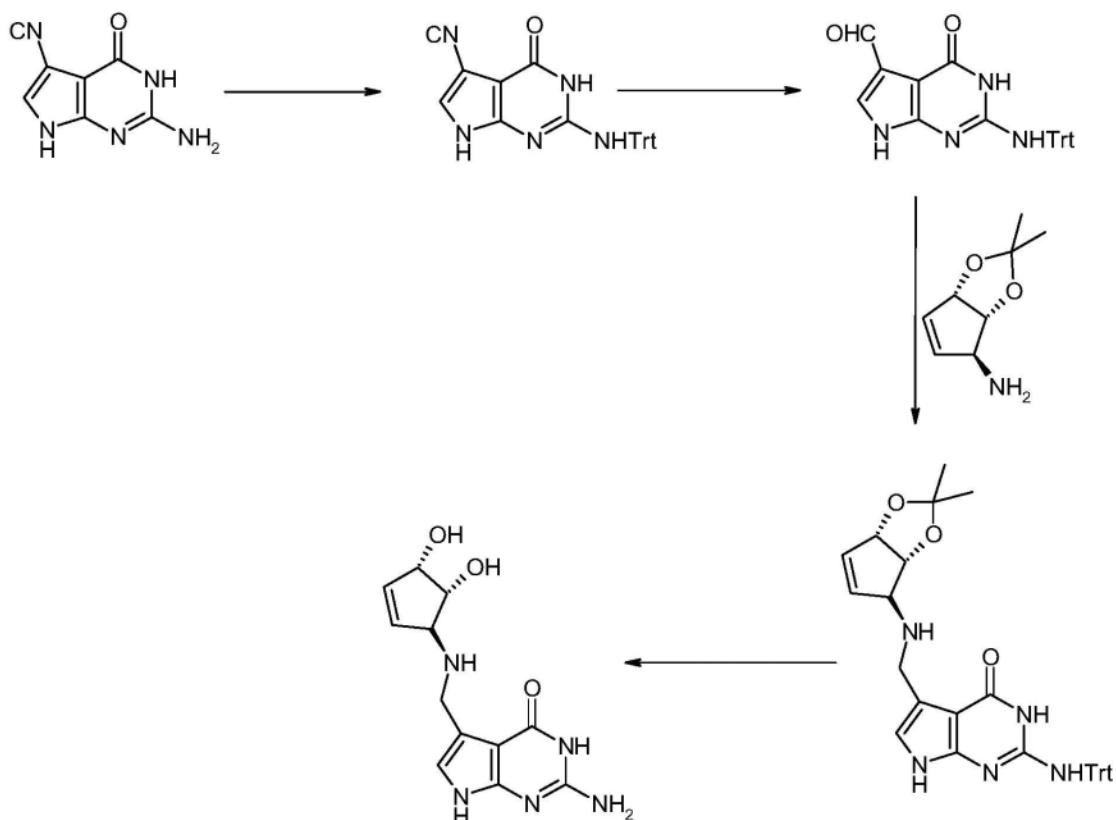
[0054] 在本发明的实施方案中,如上所定义的药物还包含至少一种用于预防或者治疗与线粒体功能障碍相关联的疾病的化合物。

具体实施方式

[0055] 式(A)化合物

[0056] 如上所定义的式(A)化合物,具体为式(I)化合物,可由本领域技术人员容易地化学合成,如以下文献中所具体描述:Barnett&Grubb (2000), Tetrahedron 56:9221-9225, Oxenford et al. (2004) Tetrahedron Letters 45:9053-9055, Brooks et al. (2010) Tetrahedron Letters 51:4163-4165, Gerber et al. (2012) Org. Biomol. Chem. 10:8660-8668, the thesis by Allen Brook entitled "Synthesis of Tritium Labeled Queuine, PreQ₁ and Related Azide Probes Toward Examining the Prevalence of Queuine" (2012, University of Michigan), Akimoto et al. (1986) J. Med. Chem., 29:1749-1753, Kelly et al. (2016) Nucleic Acids Research, 1-11, and international application WO2016/050806,所有文献通过引用并入本文中。

[0057] 简单地说,例如,PreQ₁可根据以下反应方案合成:



[0059] 此外,如上所定义的式(A)化合物,具体为式(I)化合物可从天然来源如微生物(具体为细菌)或者从植物(具体地为用 α -变形菌如根瘤菌(Rhizobium)、中生根瘤菌(Mesorhizobium)和中华根瘤菌(Sinorhizobium genii)的细菌结瘤的植物)提取并任选地纯化得到的。

[0060] 例如,Q苷可得自tRNAs,具体为tRNA^{Asn}、tRNA^{Asp}、tRNA^{His}和tRNA^{Tyr},其如下制备:

[0061] 在酸性条件下制备总RNA

[0062] 将枯草芽孢杆菌(subtilis)菌株(或其他相关细菌)在含有适当补充物的ED液体培养基中于37℃和恒定通气下生长。将新鲜的过夜培养物接种在15ml ED培养基中至600nm的光密度(OD600)为0.1。细胞在37℃生长至OD600为1,并在-80℃在70mM Hepes pH 7.5中在等体积的60%甲醇中冷却。所有后续步骤在冷的条件下进行,所制备的粗RNA的溶液用焦碳酸二乙酯处理并灭菌。将细胞在4℃沉淀,在水中洗涤并重悬于0.5ml 10%葡萄糖、11mM Tris、10mM EDTA中。将悬浮液转移到装有酸洗过的0.1g玻璃珠(sigma-Aldrich,G4649)的管中。将管置于含有50g干冰的FastPrep®-24设备(MP Biomedicals)的CoolPrep Adapter中。使用以下参数在三个循环后破坏细胞:在45秒期间每秒6米。每个循环后,将悬浮液在冰上保持1分钟。在10,000rpm离心2分钟后,将上清液转移到新鲜的微量离心管(eppendorf tube)中。加入0.3M的乙酸钠(pH5.2),在酸性条件下分离总RNA。加入一体积的pH4.5的酸性苯酚:氯仿(具有异戊醇)(125:24:1)(Amresco,AM9720)。通过涡旋10s混合样品,并在65℃水浴中温育3分钟。通过在14,000rpm旋转5分钟分离各相,然后用相同的热酸苯酚方法将水相再萃取一次。将水相转移到新管中并用一体积的冷酸苯酚补充。在14,000rpm离心5分钟后,将RNA在-80℃用2.5体积的无水乙醇析出1小时。将RNA在4℃以14,000rpm沉淀15分钟并用70%乙醇洗涤。将RNA沉淀物溶于10mM Tris、1mM EDTA(pH 7.5)中。

[0063] 富集tRNA

[0064] 然后将总RNA制备物与一体积的8M的氯化锂(pH 4.5)和乙酸钠(pH 5.2)以0.01mM终浓度混合。将该RNA溶液在-80℃温育2小时。在4℃以14,000rpm离心15分钟后,tRNA保留在上清液中。为了去除盐污染物,通过加入0.3M乙酸钠(pH 5.2)和2.5体积的无水乙醇,在-80℃使tRNA析出1小时。然后,通过在4℃以14,000rpm离心15分钟沉淀tRNA,并用70%乙醇洗涤。将tRNA沉淀溶于10mM Tris,1mM EDTA(pH 7.5)中。

[0065] 本发明的Q碱的立体异构体可为任何类型。优选地,Q碱的立体异构体为对映体-Q碱(ent-queoine)。

[0066] 本发明的药学上可接受的盐或者水合物可为任何类型。然而,优选地,本发明的药学上可接受的盐为盐酸盐。

[0067] 优选地,本发明的糖基选自甘露糖基、半乳糖基或者谷氨酰基。

[0068] 优选地,氨基酰基选自丙氨酸(ala,A)、精氨酸(arg,R)、天冬酰胺(asn,N)、天冬氨酸(asp,D)、半胱氨酸(cys,C)、谷氨酰胺(gln,Q)、谷氨酸(glu,E)、甘氨酸(gly,G)、组氨酸(his,H)、异亮氨酸(ile,I)、亮氨酸(leu,L)、赖氨酸(lys,K)、甲硫氨酸(met,M)、苯基丙氨酸(phe,F)、脯氨酸(pro,P)、丝氨酸(ser,S)、苏氨酸(thr,T)、色氨酸(trp,W)、酪氨酸(tyr,Y)和缬氨酸(val,V)。

[0069] 优选地,本发明的式(A),具体为式(I)的取代基可连接在一起。

[0070] 在如上所定义的式(A)化合物的一个优选实施方案中:

[0071] -R₁为H,以及

[0072] -R₁₂表示具有1至20个碳原子的以下基团:饱和的或者不饱和的烷基、环烷基、杂环烷基或者醚基,这些基团任选被至少一个选自以下的基团取代:

[0073] • 具有1至20个碳原子的烷基,

[0074] • 具有3至20个碳原子的芳基或者杂芳基,

[0075] • 具有3至20个碳原子的环烷基或者杂环烷基,

[0076] • 羟基,

[0077] • 具有1至20个碳原子的羰基或者羧基,

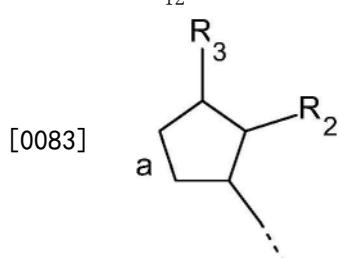
[0078] • 环氧基,

[0079] • -O-R₄基团,其中R₄为H、具有1至6个碳原子的烷基、具有3至12个碳原子的芳基、糖基或者氨基酰基,

[0080] • -O-CO-R₅基团,其中R₅为具有1至6个碳原子的烷基、具有3至12个碳原子的芳基或者糖基。

[0081] 在如上所定义的式(A)化合物的另一优选实施方案中:

[0082] -R₁₂表示下式的基团:



[0084] 其中：

[0085] • a表示双键或者环氧基,以及

[0086] • R₂和R₃,其相同或者不同,表示-O-R₄,其中R₄为H、具有1至6个碳原子的烷基、具有3至12个碳原子的芳基、糖基或者氨基酰基;或者-O-CO-R₅,其中R₅为具有1至6个碳原子的烷基、具有3至12个碳原子的芳基或者糖基。

[0087] 在如上所定义的式(A)化合物的另一优选实施方案中：

[0088] -R₁为H,以及

[0089] -R₁₂表示具有1至20个碳原子的饱和的或者不饱和的烷基,其任选地被至少一个羟基取代。

[0090] 在如上所定义的式(A)化合物,具体为式(I)化合物的另一优选实施方案中：

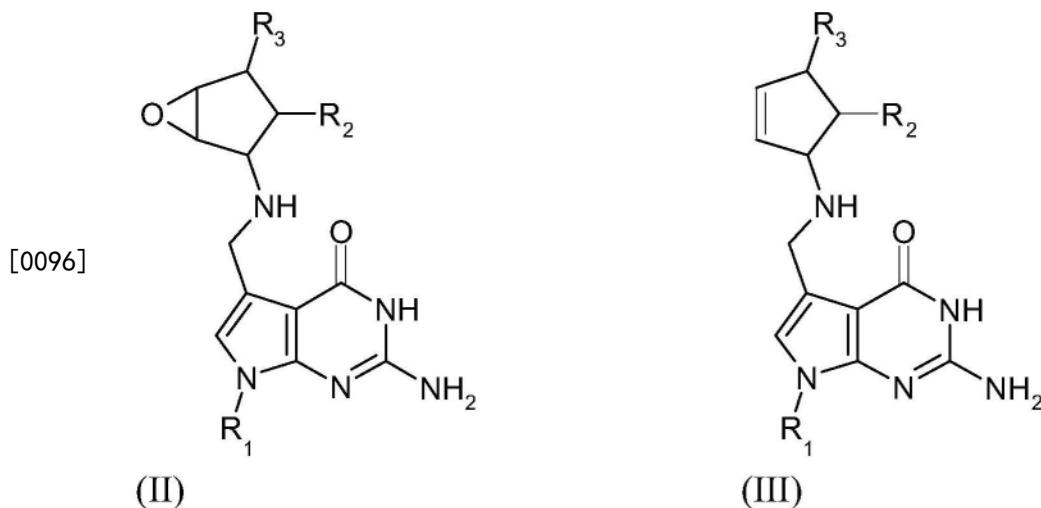
[0091] -R₂和R₃,其相同或者不同,表示-OH、-O-甘露糖基、-O-半乳糖基或者-O-谷氨酰基;

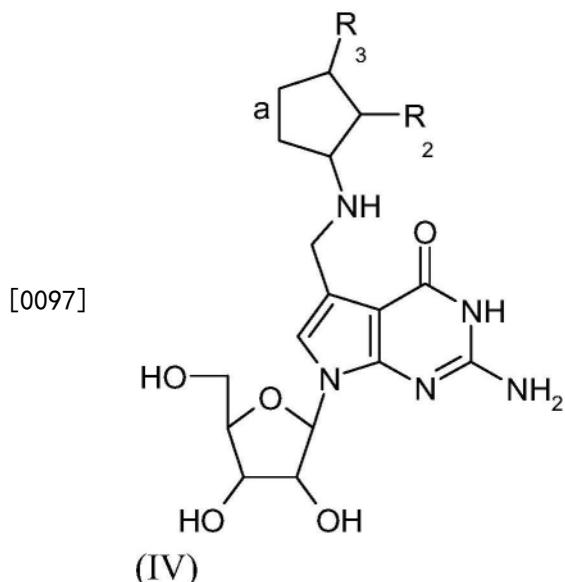
[0092] -R₆表示-OH;

[0093] -R₇和R₈,其相同或者不同,表示-OH或者核糖核酸基团。

[0094] 优选地,当R₇和R₈均表示核糖核酸基团时,本发明的式(A)化合物,具体为式(I)化合物作为tRNA的核糖核苷包含在转移RNA(tRNA)中。更优选地,本发明的式(A)化合物,具体为式(I)化合物为tRNA的反密码子的核糖核苷,最优选地,反密码子的第一核苷,即,反密码子的5'核苷或者反密码子的摆动位置(wobble position)中的核苷。本发明优选的tRNA选自tRNA^{Asn}、tRNA^{Asp}、tRNA^{His}和tRNA^{Tyr}。

[0095] 优选地,如上所定义的式(A)化合物,具体为式(I)化合物由下式(II)、(III)或者(IV)表示:

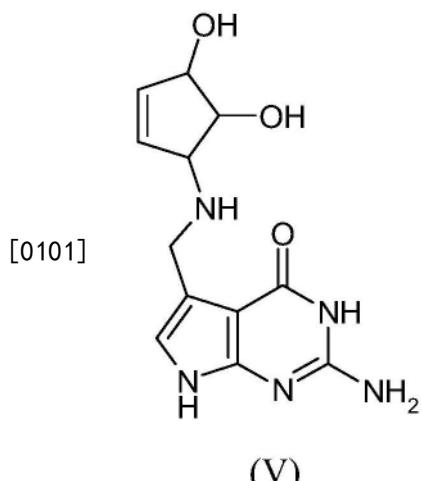




[0098] 优选地,当本发明的式(A)化合物,具体为式(I)-(III)化合物包含在tRNA^{Asp}中时,R₃为OH和R₂为O-甘露糖。

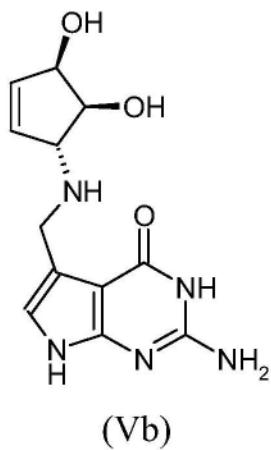
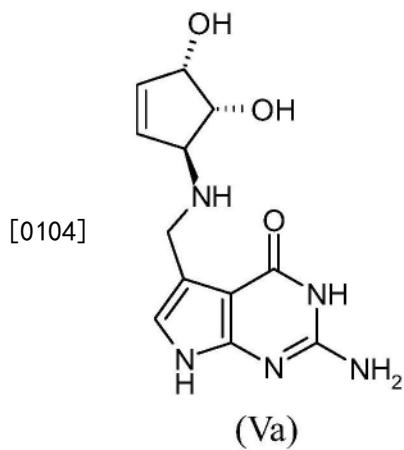
[0099] 还优选地,当本发明的式(A)化合物,具体为式(I)-(III)化合物包含在tRNA^{Tyr}中时,R₃为OH和R₂为O-半乳糖。

[0100] 优选地,本发明的式(A)化合物,具体为式(I)化合物由下式(V)表示:



[0102] 本领域技术人员清楚的是,本发明化合物的所有立体化学构型均旨在由本文所示的结构式涵盖。具体地,如本文所预期的,当未指定键的立体构型时,键可以表示向上的键,向下的键和两者的混合物中的任一种,具体为两者的1/1混合物。

[0103] 因此,本发明的式(A)化合物,具体为式(I)化合物还涉及式(V)化合物的光学活性形式,例如由下式(Va)和(Vb)表示的对映异构体:

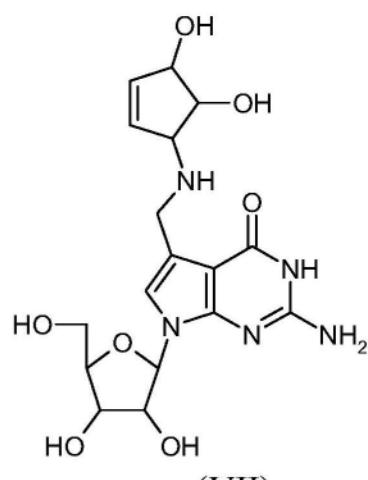
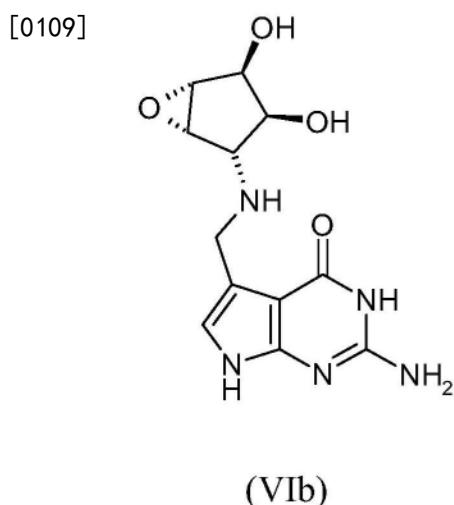
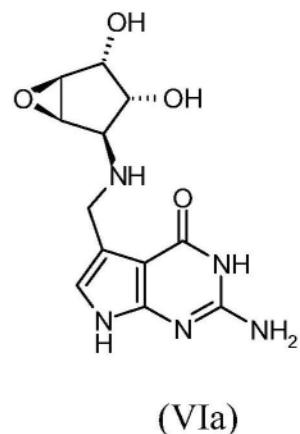
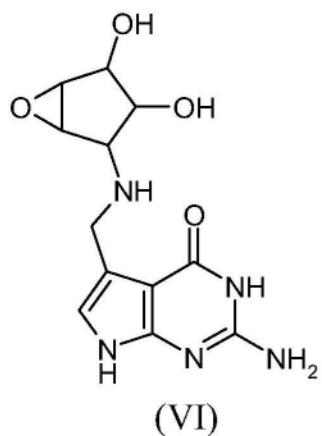


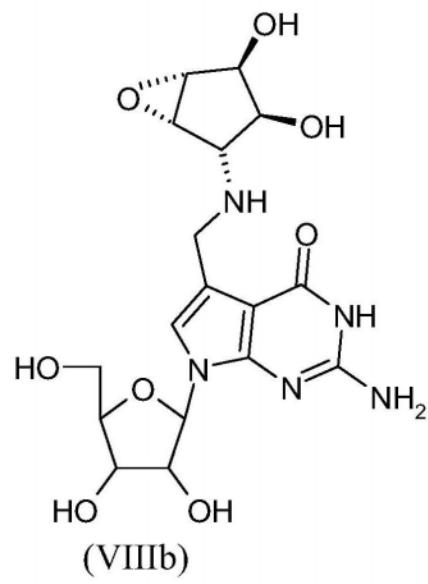
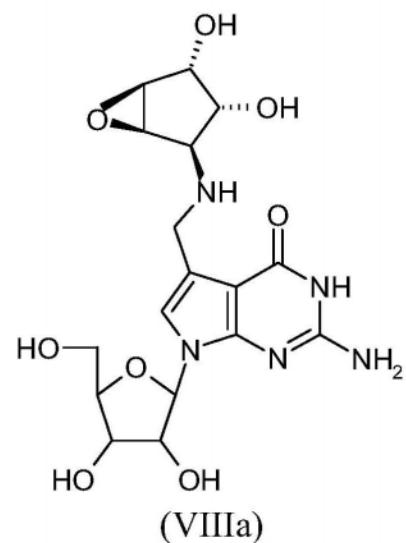
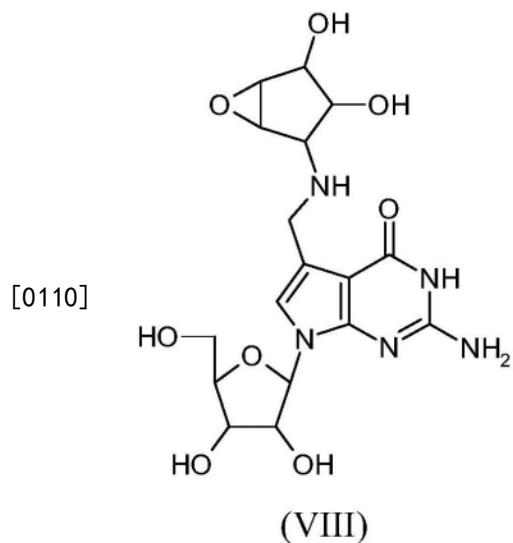
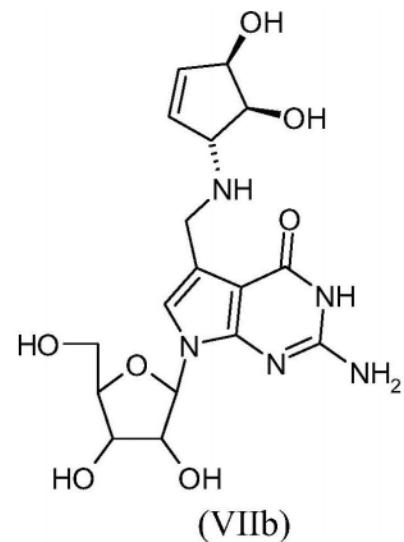
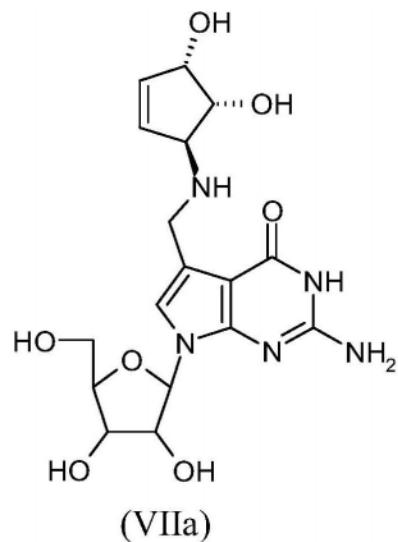
[0105] 或者它们的混合物,具体为其外消旋混合物。

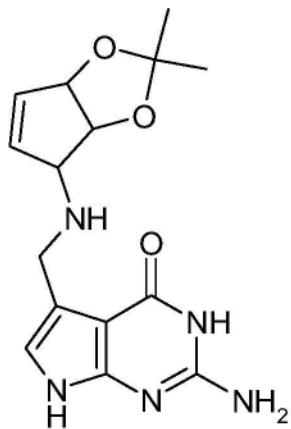
[0106] 式(Va)化合物为Q碱。Q碱也被称为7-(3,4-反式-4,5-顺式-二羟基-1-环戊烯-3-基氨基甲基)-7-脱氮鸟嘌呤。

[0107] 式(Vb)化合物为对映体-Q碱。

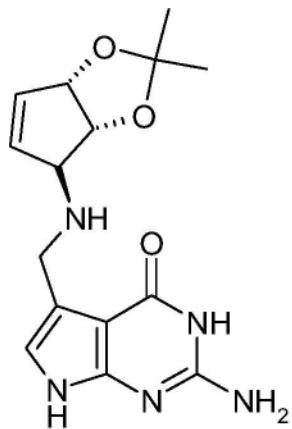
[0108] 优选地,本发明的式(A)化合物,具体为式(I)化合物由下式(VI)、(VIa)、(VIb)、(VII)、(VIIa)、(VIIb)、(VIII)、(VIIIa)、(VIIIb)、(IX)、(X)、(Xa)或者(Xb)表示:





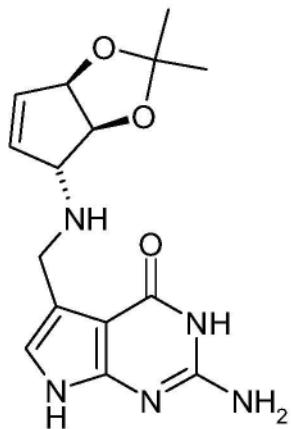


(X)



(Xa)

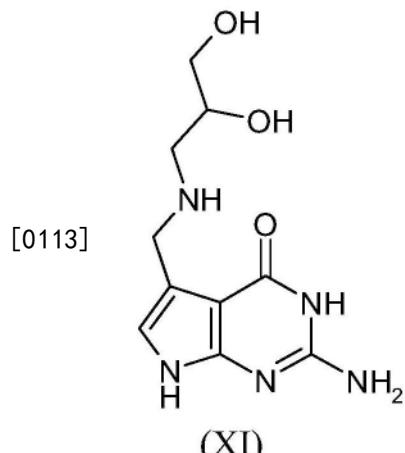
[0111]



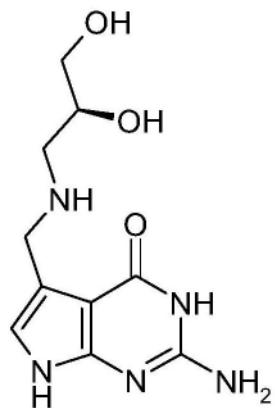
(Xb)

。

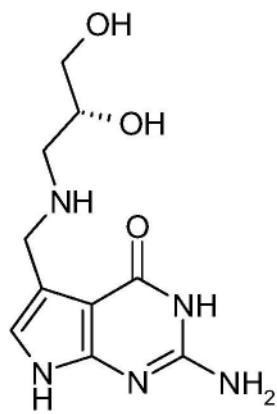
[0112] 还优选地，本发明的式(A)化合物由下式(XI)、(XIa)、(XIb)、(XII)、(XIII)、(XIV)、(XV)、(XVI)或者(XVII)表示：



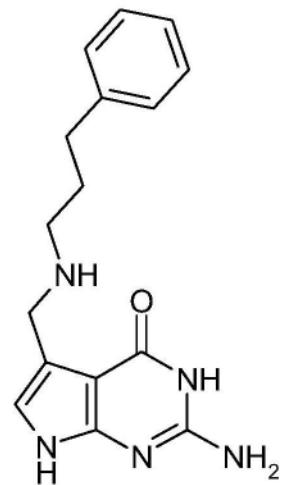
(XI)



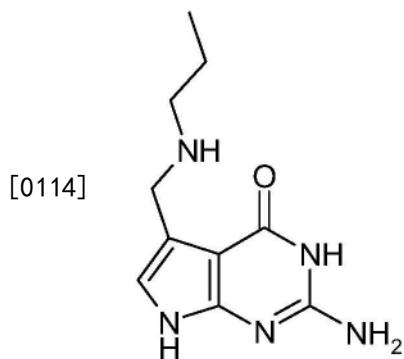
(XIa)



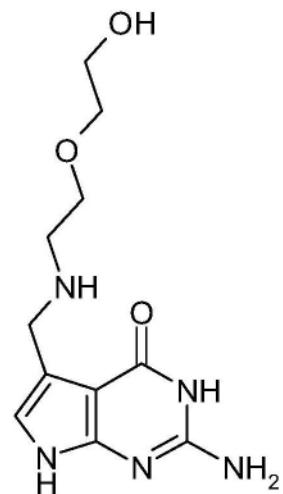
(XIb)



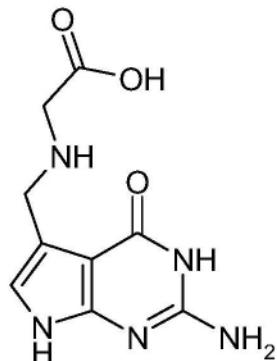
(XII)



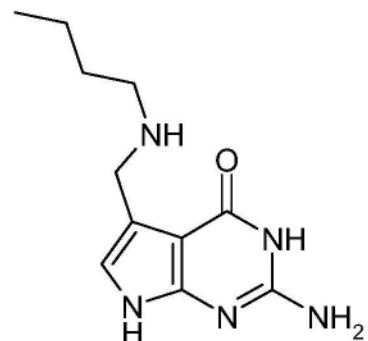
(XIII)



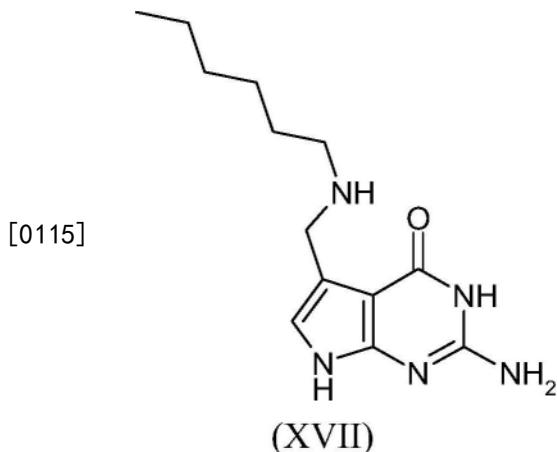
(XIV)



(XV)



(XVI)



[0116] 式(VIa)化合物为环氧Q碱,也被称为7-[(3,4-环氧-2,5-二羟基环戊-1-基)氨基]甲基)-7-脱氮鸟嘌呤。

[0117] 式(VIIa)化合物为Q昔(queuosine),也被称为2-氨基-5-([(1S,4S,5R)-4,5-二羟基环戊-2-烯-1-基]氨基)甲基)-7-(β -D-呋喃核糖基)-1,7-二氢-4H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-酮。

[0118] 式(VIIIa)化合物为环氧Q昔,也被称为7-[(3,4-环氧-2,5-二羟基环戊-1-基)氨基]甲基)-7-脱氮鸟昔。

[0119] 式(XI)化合物为N-((2-氨基-4-氧代-4,7-二氢-3H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲基)-2,3-二羟基丙-1-胺。

[0120] 式(XII)化合物为N-((2-氨基-4-氧代-4,7-二氢-3H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲基)-3-苯基丙-1-胺。

[0121] 化合物(XIII)为N-((2-氨基-4-氧代-4,7-二氢-3H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲基)-丙-1-胺。

[0122] 化合物(XVI)为N-((2-氨基-4-氧代-4,7-二氢-3H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲基)-丁-1-胺。

[0123] 化合物(XVII)为N-((2-氨基-4-氧代-4,7-二氢-3H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)甲基)-己-1-胺。

[0124] 优选地,本发明的式(A)化合物,具体为式(I)化合物选自甘露糖基-Q碱、半乳糖基-Q碱、谷氨酰基-Q碱、半乳糖基-Q昔、甘露糖基-Q昔、谷氨酰基-Q昔、Q碱-tRNA,和环氧Q碱-tRNA。

[0125] 还优选地,本发明的式(A)化合物,具体为式(I)化合物选自Q碱-tRNA^{Asp}、Q碱-tRNA^{Tyr}、环氧Q碱-tRNA^{Asp}、环氧Q碱-tRNA^{Tyr}、Q碱-tRNA^{Asn}、Q碱-tRNA^{His}、环氧Q碱-tRNA^{Asn}、环氧Q碱-tRNA^{His}、甘露糖基-Q碱-tRNA^{Asp}、半乳糖基-Q碱-tRNA^{Tyr}、甘露糖基-环氧Q碱-tRNA^{Asp},和半乳糖基-环氧Q碱-tRNA^{Tyr}。

[0126] 还最优选地,本发明的式(A)化合物,具体为式(I)化合物选自Q碱、对映体-Q碱、Q昔、环氧Q碱、环氧Q昔、甘露糖基-Q碱、半乳糖基-Q碱、谷氨酰基-Q碱、半乳糖基-Q昔、甘露糖基-Q昔、谷氨酰基-Q昔、Q碱-tRNA、环氧Q碱-tRNA、式(XI)、(XIa)和(XIb)的化合物。

[0127] 与线粒体功能障碍相关联的疾病

[0128] 如本文所预期的,表述“与线粒体功能障碍相关的疾病”包括与线粒体功能障碍、

紊乱或疾病相关或由其引起的疾病。

[0129] 优选地,本发明的与线粒体功能障碍相关联的疾病为与线粒体功能障碍相关联的神经元疾病,更优选地,与线粒体功能障碍相关联的中枢神经系统疾病和最优选地,与线粒体功能障碍相关联的神经变性疾病。

[0130] 优选地,本发明的与线粒体功能障碍相关联的疾病为帕金森病。

[0131] 帕金森病是本领域技术人员所熟知的,并且特别是在ICD-10版本:2016的G20、G21和G22部分中定义。

[0132] 如本发明所预期的,本发明的帕金森病特别包括:

[0133] -原发性(特发性)帕金森症,

[0134] -继发性帕金森症(获得性),

[0135] -非典型帕金森症,和

[0136] -导致帕金森症的家族性神经退行性疾病。

[0137] 本发明的帕金森病还包括散发性(sporadic)和家族性帕金森病。

[0138] 本发明的帕金森病尤其还包括I期、II期、III期、IV期和V期帕金森病。

[0139] 个体

[0140] 如本文所预期的,本发明的个体优选是人。

[0141] 优选地,本发明的个体超过30、40、50、60、70或者80岁。

[0142] 还优选地,本发明的个体小于80、70、60、50,或者40岁。

[0143] 还优选地,本发明的个体是患有I、II、III、IV或者V期帕金森病的个体。

[0144] 还优选地,本发明的个体未患帕金森氏病或没有帕金森病症状但存在患帕金森病的风险。更优选地,本发明的个体未患帕金森氏病或没有帕金森病症状但个体的至少一个亲属患有帕金森病。

[0145] 另外的化合物

[0146] 用于预防或治疗与线粒体功能障碍相关的疾病的其他化合物可以是本领域技术人员已知的任何类型。优选地,本发明的另外的化合物选自维生素、矿物质、脂肪酸、氨基酸、抗氧化剂和其衍生物或者前体。

[0147] 优选地,维生素选自吡哆醇、磷酸吡哆醛(维生素B₆)、核黄素、硫胺素、维生素E、维生素K3、维生素C、烟酸、CoQ10和β-胡萝卜素。

[0148] 优选地,矿物质选自钙、镁、硒和磷。

[0149] 优选地,氨基酸为L-DOPA(左旋多巴)。

[0150] 优选地,脂肪酸选自左旋-肉碱和乙酰基-L-肉碱。

[0151] 给药

[0152] 如本文所预期的,“组合”或“联合”是指如上定义的式(A)化合物,具体为式(I)化合物与另一种化合物或产品同时施用,或者一起施用(即在相同的给药部位),或分开施用或在不同的时间施用,条件是如上定义的式(A)化合物,具体为式(I)化合物对个体发挥作用的时间段和另外的药剂或产品对个体发挥其药理作用的时间段至少部分地相交。

[0153] 优选地,本发明的式(A)化合物,具体为式(I)化合物或其药学上可接受的盐或者水合物用于给药或者以下面的剂量方案给药:0.01至40mg/kg/d,更优选为0.01至10mg/kg,甚至更优选为0.01至1mg/kg/d,和最优选为0.01至0.1mg/kg/d。

[0154] 优选地,本发明的式(A)化合物,具体为式(I)化合物或其药学上可接受的盐或者水合物是适于给药的形式或通过口服途径、真皮内途径、静脉内途径、肌内途径或皮下途径给药。优选地,本发明的式(A)化合物,具体为式(I)化合物,或包含它的药物组合物、药物、产品或膳食补充剂是适于给药的形式或通过皮下植入物形式给药。

[0155] 优选地,本发明的式(A)化合物,具体为式(I)化合物,或包含它的药物组合物、药物、产品或膳食补充剂是粉剂、袋装剂(sachet)、片剂、明胶剂、胶囊剂或液体或凝胶溶液剂的形式。

[0156] 还优选地,本发明的药物组合物、药物、产品或膳食补充剂包含式(A)化合物,特别是式(I)化合物,具体为Q碱、对映体-Q碱、Q昔,或者式(XI)、(XIa)或者(XIb)的化合物,单位剂量为至少0.15mg、1mg、10mg、50mg、100mg、500mg或者1000mg。

[0157] 优选地,本发明的药物组合物、药物、产品或膳食补充剂包含来自微生物和/或植物的提取物,特别是纯化的提取物,其包含本发明的式(A)的化合物,特别是式(I)的化合物,具体为Q碱、对映体-Q碱、Q昔,或者式(XI)、(XIa),或者(XIb)的化合物,具体地,单位剂量为至少0.15mg、1mg、10mg、50mg、100mg、500mg或者1000mg。

附图说明

[0158] 图1

[0159] 图1显示以%表示的原代多巴胺能神经元培养物的存活率,其中包括不含6-OHDA的对照(灰色条,对照)、具有单独的6-OHDA(黑色条)、具有6-OHDA+在6-OHDA中毒前一天添加的Q碱(带点条形图),和具有6-OHDA+BDNF.*表示相对于6-OHDA,p<0.05。

[0160] 图2

[0161] 图2表示以%表示的原代多巴胺能神经元培养物的存活率,其中包括不含6-OHDA的对照(灰色条,对照)、具有单独的6-OHDA(黑色条)、具有6-OHDA+在6-OHDA中毒前6天添加的Q碱(带小点条形图),和具有6-OHDA+BDNF(带大点条形图)。*表示相对于6-OHDA,p<0.05。

[0162] 实施例

[0163] 6-羟基多巴胺(6-OHDA)是一种选择性儿茶酚胺能神经毒素,其不仅可以作为一种能够引发帕金森病样特征(stigmata)的药物(Sauer和Ortel (1994) Neuroscience 59:401-15; Cass et al. (2002) Brain Res. 938:29-37),而且可能对应于天然多巴胺能分解代谢物,其在受帕金森氏病影响的大脑中积累并且似乎对该病理学有很大贡献(Ellenberg et al. (1995), “Etiology of Parkinson's Disease”, eds Ellenberg, Koller, Langston (Marcel Dekker, New York), pp 153-201; Jellinger et al. (1995) J. Neural. Transm. 46: 297-314)。

[0164] 因此,6-OHDA诱导的大鼠多巴胺能神经毒性被广泛用作PD研究的模型(Simola et al. (2007) Neurotox. Res. 11:151-167; Mercanti (2012) Methods Mol. Biol. 846:355-364; De Jesus-Cortes et al. (2015) npj Parkinson's Disease 1:15010)。此外,6-OHDA已被证明可以损害该帕金森病大鼠模型中的线粒体功能,这实现了对明显的线粒体功能障碍的检测,作为潜在神经保护策略的临床前评估的合适替代指标(Kupsch et al. (2014) J. Neural. Transm. 121:1245-1257)。

[0165] 在这方面,体外6-OHDA诱导的多巴胺能神经元的神经变性也提供了帕金森病的有

用模型,特别是关于线粒体功能的恢复(Wei et al. (2015) *Translational Neurodegeneration*4:11)。

[0166] 因此,本研究调查了Q碱对因暴露于6-OHDA而损伤的大鼠原代中脑培养物的影响。已经提出脑源性神经营养因子(BDNF)在体外减少6-OHDA诱导的神经变性并用作阳性对照。

[0167] 1.材料和方法

[0168] 1.1.化合物

[0169] 6-OHDA得自Sigma(编号:H116)。

[0170] Q碱根据Brooks等人(2010) *Tetrahedron Letters*51:4163-4165和Allen Brooks的标题为“*Synthesis of Tritium Labeled Queuine, PreQ1 and Related Azide Probes Toward Examining the Prevalence of Queuine*”的论文(2012,密歇根大学)合成。

[0171] BDNF得自PanBiotech(编号:CB-1115002)。

[0172] 在以下实验中,将6-OHDA、Q碱和BDNF悬浮在下文定义的培养基中。

[0173] 1.2.多巴胺能神经元的大鼠原代培养物

[0174] 如Schinelli et al. (1988) *J.Neurochem.*50:1900-1907所述培养大鼠多巴胺能神经元。

[0175] 简而言之,将妊娠15天的妊娠雌性大鼠(Wistar大鼠;Janvier)通过颈脱位杀死并且将胚胎从子宫中移除。取出胚胎的中脑并置于含有2%青霉素-链霉素(PS;PanBiotech)和1%牛血清白蛋白(BSA;PanBiotech)的冰冷Leibovitz培养基(L15;PanBiotech)中。只有中脑曲的腹侧部分用于细胞制备,因为这是发育中的脑中富含多巴胺能神经元的区域。中脑通过胰蛋白酶消化在37°C解离20分钟(胰蛋白酶EDTA 1X;PanBiotech)。通过加入含有II级DNase I(0.1mg/mL;Roche Diagnostic)和10%胎牛血清(FCS;Invitrogen)的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM;PanBiotech)终止反应。通过10ml移液管将细胞机械解离3次。然后将解离的细胞在4°C在L15培养基中的BSA(3.5%)层上以180×g离心10分钟。弃去上清液,将沉淀的细胞重新悬浮在培养基中,所述培养基由补充有B27(2%;Invitrogen,编号:17504)、L-谷氨酰胺(2mM;PanBiotech,编号:P04-80100)和2%PS、10ng/mL BDNF(PanBiotech,编号:CB-1115002)和1ng/mL GDNF(PanBiotech,编号:CB-1116001)的Neurobasal(Invitrogen,编号:21103,Batch:1725098)组成。使用台盼蓝排除试验在Neubauer细胞计数器中计数活细胞。然后将细胞以40 000个细胞/孔的密度接种在预先涂有聚-D-赖氨酸(Greiner)的96孔板中,并在37°C在潮湿空气(95%)/CO₂(5%)气氛中培养。每2天使用新鲜培养基更换一半培养基。在这些条件下,培养5天后,星形胶质细胞存在于培养物中并释放生长因子,从而允许神经元分化。5%至6%的神经元细胞群是多巴胺能神经元。

[0176] 1.3.评估大鼠多巴胺能神经元的神经保护作用

[0177] 根据以下方案,针对6日龄培养物评估Q碱的神经保护作用:

[0178] -添加对照培养基(培养基);

[0179] -加入6-OHDA(20μM,48H)+培养基;

[0180] -加入6-OHDA(20μM,48H)+BDNF(50ng/ml);

[0181] -加入6-OHDA(20μM,48H)+Q碱(0,03μM至30μM的7种浓度),其在6-OHDA中毒之前、期间或之后的三个不同时间添加:

- [0182] o在6-OHDA中毒前6天,化合物将保持在培养基中直至中毒;
- [0183] o在6-OHDA中毒前1天
- [0184] o在中毒后1天
- [0185] 平行测试没有6-OHDA(无中毒)的相同条件以评估Q碱对多巴胺能神经元存活的影响。
- [0186] 每种条件在96孔培养板的6个孔中复制。
- [0187] 1.4. 终点评估:确定多巴胺能神经元的总数
- [0188] 在孵育时间结束时,将细胞在室温通过4%多聚甲醛溶液固定20分钟。然后使细胞透化,并在室温用含有0.1%皂昔(Sigma)和1%胎牛血清(FCS)的磷酸盐缓冲盐水(PBS; PanBiotech)溶液封闭非特异性位点15分钟。最后,将细胞与在含有1%FCS和0.1%皂昔的PBS中的单克隆抗酪氨酸羟化酶(TH)小鼠抗体(Sigma)在室温孵育2小时。抗-TH抗体靶向多巴胺能神经元。
- [0189] 用含有1%FCS、0.1%皂昔的PBS中的Alexa Fluor 488标记的山羊抗小鼠IgG(分子探针)在室温显示抗体1小时。细胞核在相同溶液中用荧光标记物(Hoechst溶液,SIGMA)染色。
- [0190] 对于每个条件,使用InCell AnalyzerTM 2000(GE Healthcare)以20x放大率拍摄每个孔,每孔拍摄20张图片。还采集每个培养孔的图像。
- [0191] 使用Developer软件(GE healthcare)进行TH阳性神经元的细胞体分析。每个实验条件总共提供6个数据。所有值均表示为平均值±s.e.平均值。对于统计学分析,进行ANOVA,然后进行Dunnett检验。
- [0192] 2. 结果
- [0193] 初步结果表明,Q碱对6-OHDA诱导的神经毒性具有神经保护作用。
- [0194] 因此,根据图1和图2,以20μM施加6-OHDA 48小时诱导TH阳性神经元的大量且显著的减少。在6-OHDA中毒前1天和6天施用BDNF(50ng/mL)显示出对6-OHDA损伤的保护作用(*, p<0.05, 图1中对照的80.80%, 和*, p<0.05, 图2中对照的83.44%)。这些结果验证了该研究。
- [0195] 此外,图1显示当在6-OHDA中毒前1天(24小时)加入时,1μM的Q碱对6-OHDA具有显著的保护作用(*, p<0.05, 对照的81.33%)。此外,图2显示,当在6-OHDA中毒前6天加入时,0.3μM的Q碱对6-OHDA中毒具有显著的保护作用(*, p<0.05, 对照的80.47%)。

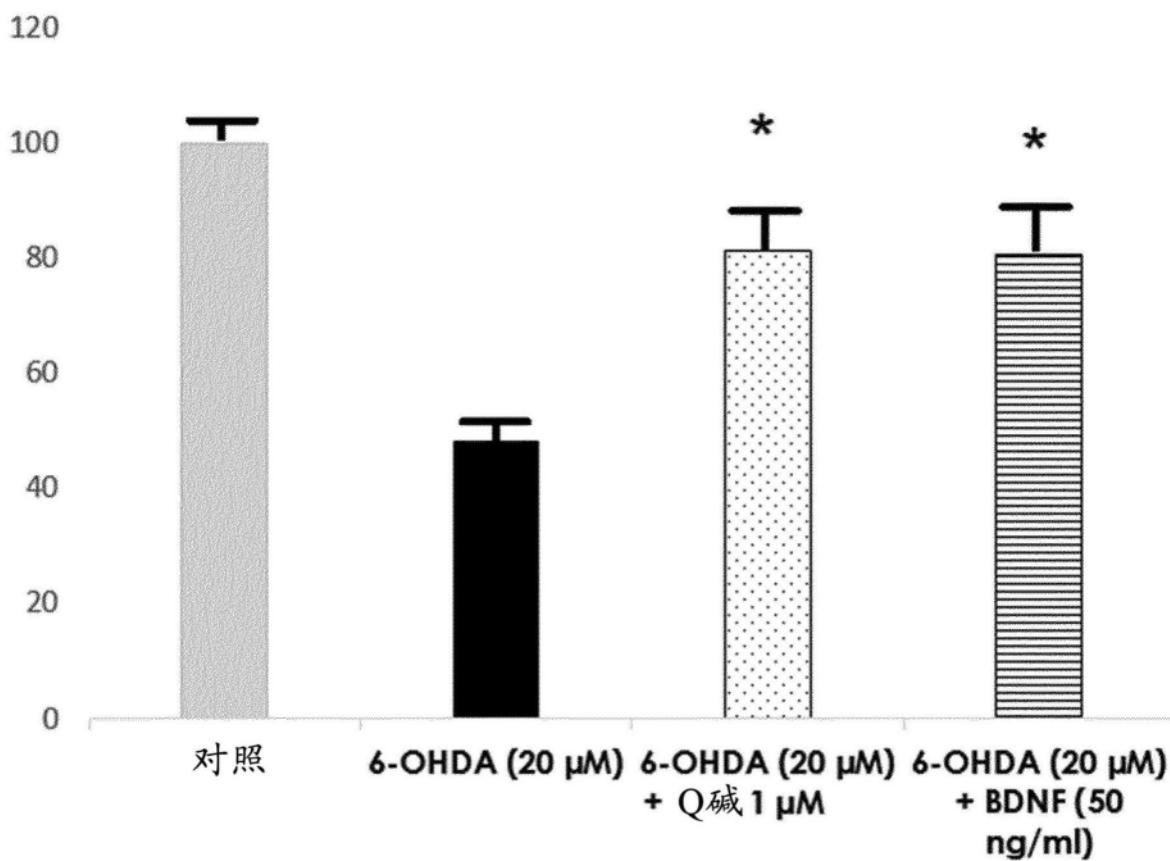


图1

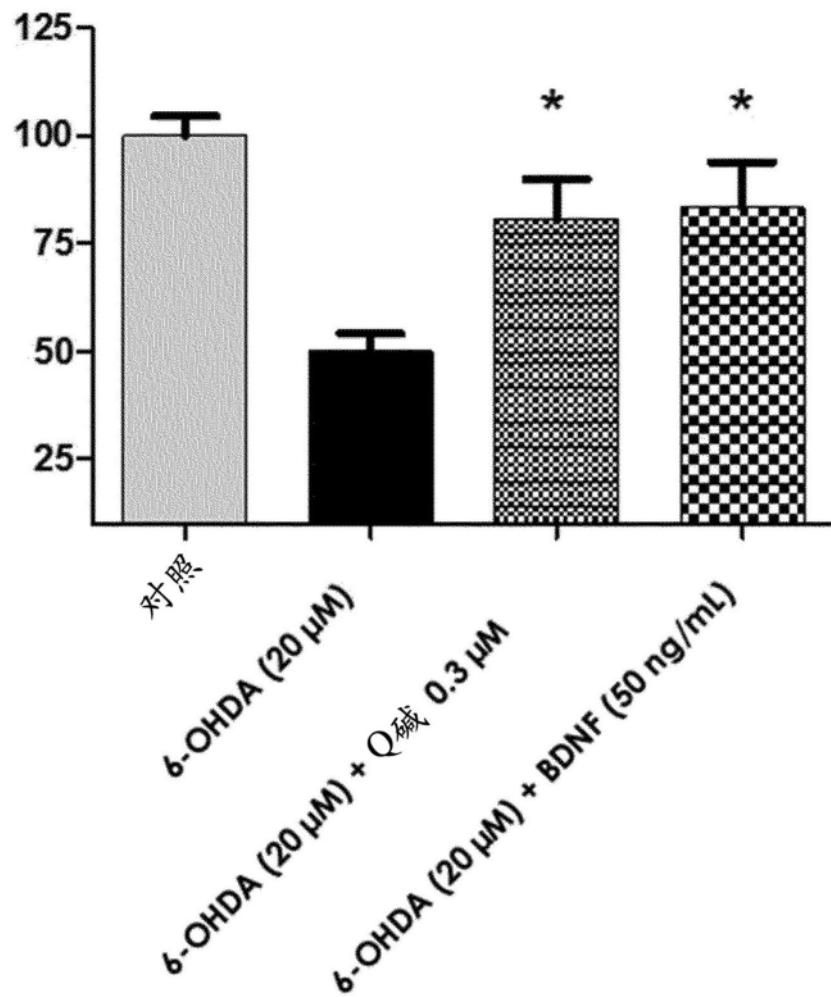


图2