



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101413143 B

(45) 授权公告日 2013.09.18

(21) 申请号 200810173890.0

(22) 申请日 2003.12.19

(30) 优先权数据

60/435,079 2002.12.19 US

60/465,435 2003.04.24 US

(62) 分案原申请数据

200380109736.2 2003.12.19

(73) 专利权人 斯克里普斯研究学院

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 J·W·凯利 Y·塞基吉马

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 付磊

(56) 对比文件

Scott A.Peterson, et al..Inhibiting transthyretin conformational changes that lead to amyloid fibril formation.《Proceeding of the National Academy of Science》.1998,第95卷12956-12960.

Per Hammarstrom, et al..Sequence-dependent denaturation energetics: a major determinant in amyloid disease diversity.《Proceeding of the National Academy of Science》.2002,第99卷16427-16432.

审查员 孙谦

(51) Int. Cl.

C40B 30/00(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

A61K 31/603(2006.01)

A61P 9/00(2006.01)

A61P 25/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书60页 附图6页

(54) 发明名称

稳定甲状腺素运载蛋白和抑制甲状腺素运载蛋白错折叠的组合物和方法

(57) 摘要

本发明的名称为稳定甲状腺素运载蛋白和抑制甲状腺素运载蛋白错折叠的组合物和方法。动力学稳定甲状腺素运载蛋白天然状态是防止蛋白错折叠的有效机制。因为甲状腺素运载蛋白错折叠在甲状腺素运载蛋白淀粉样病变中起重要作用,所以抑制所述错折叠可有效地用于治疗 and 预防所述疾病。本发明公开了治疗方法、筛选方法以及具体的甲状腺素运载蛋白稳定化合物。

1. 一种筛选化合物的方法,所述化合物防止或降低甲状腺素运载蛋白四聚体的解离,所述方法包括:

使甲状腺素运载蛋白四聚体与候选化合物接触;和

测定所述候选化合物是否增加与甲状腺素运载蛋白四聚体解离相关的活化能,由此防止或降低甲状腺素运载蛋白四聚体的解离,所述候选化合物选自二氟尼柳类似物、多氯化联苯和苯并噁唑。

2. 权利要求1的方法,所述方法包括测定所述化合物是否通过使甲状腺素运载蛋白四聚体解离过渡态不稳定而防止甲状腺素运载蛋白四聚体的解离。

3. 权利要求1的方法,所述方法包括测定所述化合物是否通过稳定甲状腺素运载蛋白四聚体而防止甲状腺素运载蛋白四聚体的解离。

4. 权利要求1的方法,所述方法还包括检测所述候选化合物抑制纤维形成的能力。

5. 权利要求1-4中任一项的方法,其中所述甲状腺素运载蛋白四聚体包括野生型甲状腺素运载蛋白。

6. 权利要求1-4中任一项的方法,其中所述甲状腺素运载蛋白四聚体包括天然存在的突变甲状腺素运载蛋白。

7. 权利要求6的方法,其中所述甲状腺素运载蛋白四聚体包括与家族性淀粉样多神经病发病病因相关的天然存在的突变甲状腺素运载蛋白。

8. 权利要求6的方法,其中所述甲状腺素运载蛋白四聚体包括与家族性淀粉样心肌病发病病因相关的天然存在突变甲状腺素运载蛋白。

9. 权利要求1-4中任一项的方法,其中所述甲状腺素运载蛋白四聚体包括突变甲状腺素运载蛋白V122I。

10. 权利要求1-4中任一项的方法,其中所述甲状腺素运载蛋白四聚体包括突变甲状腺素运载蛋白V30M。

11. 权利要求1-4中任一项的方法,其中所述甲状腺素运载蛋白四聚体包括突变甲状腺素运载蛋白L55P。

12. 权利要求1-4中任一项的方法,其中所述候选化合物为小分子。

稳定甲状腺素运载蛋白和抑制甲状腺素运载蛋白错折叠的组合物和方法

[0001] 本申请是以下申请的分案申请：申请日 2003 年 12 月 19 日，申请号 200380109736.2 (PCT/US2003/040567)，标题“稳定甲状腺素运载蛋白和抑制甲状腺素运载蛋白错折叠的组合物和方法”。

[0002] 相关申请的相互参考

[0003] 本申请要求 2002 年 12 月 19 日提交的美国临时申请 60/435,079 的优先权，该临时申请的全部内容都通过引用整体结合到本文中。

[0004] 关于联邦资助研究项目的声明

[0005] 本文公开的某些研究所使用的支持资金由 NIH(美国国立卫生研究院)授予的资助号 NIH DK 46335 提供。政府对本发明拥有一定权益。

技术领域

[0006] 本发明一般来说涉及蛋白质错折叠。更具体地说，本发明提供用于稳定甲状腺素运载蛋白、抑制甲状腺素运载蛋白错折叠以及治疗与其相关的淀粉样病变的组合物和方法。

背景技术

[0007] 甲状腺素运载蛋白 (TTR) 是一种存在于血液和脑脊髓液中的 55kDa 同源四聚体蛋白。TTR 的功能是转运 L- 甲状腺素 (T_4) 和全视黄醇结合蛋白 (RBP)。TTR 是超过 20 种非同源性淀粉样蛋白之一，它们可转变为导致人体病变的纤维和其它聚集物。这些疾病似乎不是由蛋白聚集导致的功能缺失引起。相反，聚集似乎通过迄今尚不明的机制引起神经元 / 细胞功能障碍。

[0008] 在变性条件下，限速的野生型 TTR 四聚体解离和快速的单体错折叠可使其错组装成公认为引起老年性系统性淀粉样变性 (SSA) 的淀粉样蛋白。80 多种 TTR 变异体中的一种解离和错折叠就会导致家族性淀粉样多神经病 (FAP) 和家族性淀粉样心肌病 (FAC)。

[0009] TTR 四聚体具有两个 C_2 对称的 T_4 - 结合位点。已知 T_4 的负协同结合稳定 TTR 四聚体，并抑制淀粉样蛋白纤维形成。不幸的是，由于甲状腺结合球蛋白 (TBG) 与 T_4 的亲合性比 TTR 高一个数量级，所以在人血清中与 T_4 结合的 TTR 少于 1%。而且， T_4 的血清浓度 ($0.1 \mu M$) 比 TTR 的血清浓度 ($3.6-7.2 \mu M$) 低。

发明内容

[0010] 本发明至少部分基于以下发现：甲状腺素运载蛋白天然状态的动力学稳定抑制蛋白错折叠。此发现的重要性在于蛋白错折叠在各种疾病进程包括甲状腺素运载蛋白淀粉样病变中起作用。通过抑制甲状腺素运载蛋白错折叠，人们可以干预这种疾病、改善病症和 / 或在某些情况下预防或治愈疾病。

[0011] 甲状腺素运载蛋白天然状态的动力学稳定有效抑制错折叠这一发现可用于开发

潜在高特异性和低毒性的治疗性组合物。因此, 尽管本文公开了能够稳定甲状腺素运载蛋白的示例性联芳基试药, 但人们可以设计选择性稳定所述蛋白的其它试药。例如, 如本文所述, 有可能设计和制备高选择性结合甲状腺素运载蛋白和稳定甲状腺素运载蛋白天然状态的多氯化联苯、二氟尼柳类似物或苯并噁唑。

[0012] 一方面, 本发明特征在于一种防止或降低甲状腺素运载蛋白四聚体解离的化合物的筛选方法。该方法可包括以下步骤: 使甲状腺素运载蛋白四聚体与候选化合物接触; 并测定所述候选化合物是否增加与甲状腺素运载蛋白四聚体解离相关的活化能, 由此防止或降低甲状腺素运载蛋白四聚体解离。所述方法可任选包括检测所述候选化合物抑制纤维形成的附加步骤。

[0013] 在一个实施方案中, 所述方法包括以下步骤: 测定所述化合物是否通过使解离过渡态甲状腺素运载蛋白四聚体不稳定而防止甲状腺素运载蛋白四聚体解离。在另一个实施方案中, 所述方法包括以下步骤: 测定所述化合物是否通过使甲状腺素运载蛋白四聚体比解离过渡态更稳定而防止甲状腺素运载蛋白四聚体解离。

[0014] 这种方法使用的候选化合物任选为小分子。这种小分子可通过四聚体结合稳定甲状腺素运载蛋白天然状态, 由此通过动力学稳定机制在变性和生理条件下减慢解离和淀粉样变性。当所述化合物以 $10.6 \mu\text{M}$ 浓度给予时, 其在人血中任选表现出对 TTR 的结合化学计量超过 0.1。

[0015] 小分子任选其分子量低于 1500, 非协同或正协同结合甲状腺素运载蛋白, 赋予的结合能 $>2.3\text{kcal/mol}$ 。小分子可表现为 K_{d1} 和 $K_{d2} < 100\text{nM}$ (例如 $< 10\text{nM}$) 和 / 或可具有高血浆浓度, 它们对蛋白稳定的贡献都超过 2.0kcal/mol 。所述小分子还可以降低淀粉样病变的产生、降低酸介导或 MeOH 介导的淀粉样蛋白生成的速率和 / 或降低尿素介导的 TTR 解离速率。

[0016] 在某些实施方案中, 所述小分子包括联苯胺、联苯、脲醚、吡啶或其它由两个芳环组成的结构, 其中一个芳环携带亲水基团, 例如酸或酚, 而另一个芳环携带疏水基团, 例如卤素或烷基。

[0017] 在一个实施方案中, 所述候选化合物为联芳化合物, 其中一个环携带亲水取代基而另一个环具有疏水取代基, 或者两个环都携带至少一个亲水取代基。所述亲水基团可以为酚、COOH、苄醇、硼酸或酯、四唑、醛或水合醛, 或者为直接或通过水介导 H-键用作蛋白的 H-键供体或受体的官能团。所述联芳化合物可为两个环都被亲水官能度取代的对称联芳化合物, 所述亲水官能度包括酚、羧化物和醇, 某些情况下为卤素, 以填充 TTR 中的卤素结合袋, 例如具有官能度 3-Cl、4-OH、5-Cl 和 3'-Cl、4'-OH、5'-Cl 的联芳化合物。在一个实施方案中, 所述联芳化合物的至少一个环被以下取代基取代: 2,4-二氟或 3,5-二氟或 2,6-二氟或 3,5-二氯或 3-Cl、4-OH、5-Cl 或 3-F、4-OH、5-F、3-COOH、4-OH 或 3-OH 或 3-COOH 或 4-COOH 或 3-CH₂OH 或 4-CH₂OH。示例性联芳化合物是多氯化联苯, 例如羟化多氯化联苯, 其中至少一个环携带 OH 和 / 或 Cl 取代基, 包括 3-Cl、4-OH、5-Cl 或 2-Cl、3-Cl、4-OH、5-Cl 或 3,4-二氯, 或 2,3,4-三氯或 2,3,4,5-四氯。氯之外的其它卤素也可用于所述候选化合物。所述候选化合物可以为苯并噁唑。

[0018] 在一个实施方案中, 所述候选化合物为二氟尼柳类似物。本文描述了二氟尼柳及各种二氟尼柳类似物的结构。与二氟尼柳相比, 二氟尼柳类似物可任选具有降低或缺失的

NSAID 活性。例如，与二氟尼柳相比，二氟尼柳类似物可具有降低或缺失的环加氧酶抑制剂活性。

[0019] 在一个实施方案中，所述方法包括测定二氟尼柳类似物是否表现 NSAID 活性的附加步骤。例如，所述方法可包括测定二氟尼柳类似物是否具有环加氧酶抑制剂活性的步骤。

[0020] 用于筛选方法的甲状腺素运载蛋白可以是野生型甲状腺素运载蛋白或者突变型甲状腺素运载蛋白，例如与甲状腺素运载蛋白淀粉样病变（例如家族性淀粉样多神经病或家族性淀粉样心肌病）发病病因相关的天然存在突变甲状腺素运载蛋白。示例性天然存在突变甲状腺素运载蛋白包括但不限于 V122I、V30M、L55P（突变体命名描述了相对于野生型在所提及氨基酸位置的取代，参见例如 Saraiva 等（2001）Hum. Mut. 17 :493-503）。

[0021] 本发明还提供在组织或生物体液中稳定甲状腺素运载蛋白并由此抑制错折叠的方法。一般来说，所述方法包括给予组织或生物体液含稳定量的本文所述化合物的组合物，其中所述化合物结合甲状腺素运载蛋白，并通过动力学稳定甲状腺素运载蛋白四聚体的天然状态来防止甲状腺素运载蛋白四聚体解离。

[0022] 因此，在患病组织中稳定甲状腺素运载蛋白的方法改善了错折叠，减轻了相关疾病的症状，并根据疾病的情况可利于治愈疾病。本发明设想在组织和 / 或细胞中抑制甲状腺素运载蛋白错折叠。可通过各种方法，例如实施例中描述的方法，评价错折叠程度以及因此通过本发明方法达到的抑制程度。

[0023] 因此，本发明另一方面包括治疗甲状腺素运载蛋白淀粉样病变的方法，该方法包括给予诊断为具有甲状腺素运载蛋白淀粉样病变的受试者治疗有效量的化合物，所述化合物通过动力学稳定甲状腺素运载蛋白四聚体的天然状态来防止甲状腺素运载蛋白四聚体解离。

[0024] 在一个实施方案中，本发明特征在于一种治疗甲状腺素运载蛋白淀粉样病变方法，该方法包括给予诊断为具有甲状腺素运载蛋白淀粉样病变的受试者治疗有效量的二氟尼柳类似物（例如防止甲状腺素运载蛋白四聚体解离的二氟尼柳类似物），防止甲状腺素运载蛋白四聚体解离。与二氟尼柳相比，二氟尼柳类似物可任选具有降低或缺失的 NSAID 活性（例如环加氧酶抑制剂活性）。

[0025] 在另一个实施方案中，本发明特征在于一种治疗甲状腺素运载蛋白淀粉样病变的方法，该方法包括给予诊断为具有甲状腺素运载蛋白淀粉样病变的受试者治疗有效量的多氯化联苯（例如防止甲状腺素运载蛋白四聚体解离的多氯化联苯），防止甲状腺素运载蛋白四聚体解离。多氯化联苯可以为羟化多氯化联苯。

[0026] 在另一个实施方案中，本发明特征在于一种治疗甲状腺素运载蛋白淀粉样病变的方法，该方法包括给予诊断为具有甲状腺素运载蛋白淀粉样病变的受试者治疗有效量的苯并噁唑（例如防止甲状腺素运载蛋白四聚体解离的苯并噁唑），防止甲状腺素运载蛋白四聚体解离。

[0027] 甲状腺素运载蛋白淀粉样病变可以为例如家族性淀粉样多神经病、家族性淀粉样心肌病或老年性系统性淀粉样变性。

[0028] 本发明方法治疗的受试者可为人类受试者，但要理解的是，本发明的原理表明本发明对所有哺乳动物都有效。在本文中，“哺乳动物”应理解为包括任何需要治疗甲状腺素运载蛋白错折叠相关疾病的哺乳动物物种，特别是农业和驯养的哺乳动物物种。

[0029] 本文描述的化合物（例如联芳化合物，如二氟尼柳类似物、多氯化联苯或苯并噁唑）可配制为药物可接受的，以制备含所述化合物的药物组合物。本文使用的术语“药物可接受的”、“生理耐受的”及其语法变体当指组合物、载体、稀释剂和试药时可互换使用，表示能够给予哺乳动物并且不产生不希望的生理作用的物质。

[0030] 本发明还包括本文描述的任一种化合物或药物组合物在治疗甲状腺素运载蛋白淀粉样病变（例如家族性淀粉样多神经病、家族性淀粉样心肌病或老年性系统性淀粉样变性）中的用途。

[0031] 本发明还包括本文描述的任一种化合物或药物组合物在生产甲状腺素运载蛋白淀粉样病变（例如家族性淀粉样多神经病、家族性淀粉样心肌病或老年性系统性淀粉样变性）治疗药物中的用途。

[0032] 本文描述的化合物和治疗方法相比于目前可用于 TTR 淀粉样病变的治疗选择具有明显优势。TTR 淀粉样病变通常在 10 年内致死，直至最近还被认为不可治愈。因为肝脏通常是促淀粉样变 TTR 的来源，所以在家族性病例中，肝移植是一种用野生型等位基因替换疾病相关等位基因的有效方案。尽管肝移植作为基因治疗的形式是有效的，但它不是不存在问题。移植是复杂的，在于受体和供体都需侵入性手术、移植后长期免疫抑制治疗、供体短缺、高成本、以及大量的 TTR 淀粉样病变受试者由于其病情发展而不是好的候选者。不幸的是，由于野生型 TTR 经常继续堆积，某些家族性受试者的心脏淀粉样变性甚至在肝移植后继续进展。由于通过脉络丛合成，移植也没有减轻中枢神经系统 (CNS) 的 TTR 堆积。移植对最流行的 TTR 疾病老年性系统性淀粉样变性 (SSA) 不是一个可行的方案，由于野生型 TTR 堆积，80 岁以上的人约 25% 患有这种变性。

[0033] 除非另有说明，否则本文使用的所有技术和科学术语都和本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义一致。尽管在本发明的实践或实验中可以使用类似或等同于本文所述的方法和材料，但优选的方法和材料如下所述。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献都通过引用整体结合到本文中。在有冲突时，本申请包括定义有控制权。另外，所述材料、方法和实施例仅是说明性的，而不是限制。

[0034] 由以下的详述和权利要求书显而易见本发明的其它特征和优势。

附图说明

[0035] 图 1 图示甲状腺素运载蛋白的 T4 结合位点。

[0036] 图 2A 和 2B 图示不同抑制剂存在时甲状腺素运载蛋白解折叠的时程。

[0037] 图 3A 和 3B 图示不同抑制剂存在时纤维形成的时程。

[0038] 图 4A 和 4B 图示不同抑制剂存在时纤维形成的时程。

[0039] 图 5 图示所筛选的用于在血浆中结合甲状腺素运载蛋白的多氯化联苯的结构。

[0040] 图 6 图示羟化多氯化联苯的结构，其在血浆中与甲状腺素运载蛋白的结合和其体外淀粉样蛋白纤维化抑制特性合在一起评价。

[0041] 图 7 图示苯并噁唑化合物对甲状腺素运载蛋白纤维形成的抑制。苯并噁唑上的羧基位置沿左侧显示，而 C(2) 苯环沿底部显示。条棒表示纤维形成 (ff) 百分比，即存在苯并噁唑化合物 (7.2 μ M) 时由甲状腺素运载蛋白 (3.6 μ M) 形成纤维的量相比于没有抑制剂时由甲状腺素运载蛋白形成的量（此量定义为 100%）。

[0042] 图 8 图示了在人血浆中孵育后结合甲状腺素运载蛋白的苯并噻唑的化学计量(s)。使用免疫沉淀(采用树脂结合抗体)捕获甲状腺素运载蛋白。从树脂上释放甲状腺素运载蛋白后,由 HPLC 色谱图中其峰下的面积确定甲状腺素运载蛋白和抑制剂的量。s 的最大可能值是 2。沿底部轴线显示了化合物编号。细垂直线表示检测偏差。

[0043] 图 9 图示了没有抑制剂或在 $3.6 \mu\text{M}$ 化合物 20、21 或 27 或 $1.8 \mu\text{M}$ 化合物 20 存在时 6M 尿素中野生型甲状腺素运载蛋白($1.8 \mu\text{M}$)解离的时间(t)函数。

[0044] 图 10 图示结合甲状腺素运载蛋白的化合物 20 的 X-射线共晶体结构。不同亚单位中的相同残基以有撇号和无撇号的残基数区分,成对的卤素结合袋也是如此。

具体实施方式

[0045] 至少某些淀粉样疾病看起来象是由 20 多种非同源蛋白或蛋白片段中任一种的累积引起,最终产生一种纤维状交联- β -折叠四级结构。由正常折叠蛋白如甲状腺素运载蛋白形成淀粉样纤维需要蛋白错折叠,以产生有组装能力的中间体。甲状腺素运载蛋白(TTR)淀粉样变性的过程似乎引起三种不同的淀粉样病变-老年性系统性淀粉样变性(SSA)、家族性淀粉样多神经病(FAP)和家族性淀粉样心肌病(FAC)。SSA 与野生型 TTR 的累积有关,而 FAP 和 FAC 由 80 多种 TTR 变异体中一种的淀粉样变性引起。参见例如 Colon, W. ; Kelly, J. W. *Biochemistry* 1992, 31, 8654-60 ; Kelly, J. W. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1996, 6, 11-7 ; Liu, K. 等 ; *Nat. Struct. Biol.* 2000, 7, 754-7 ; Westermarck, P. 等 ; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990, 87, 2843-5 ; Saraiva, M. J. 等 ; *J. Clin. Invest.* 1985, 76, 2171-7 ; Jacobson, D. R. 等 ; *N. Engl. J. Med.* 1997, 336, 466-73 ; Buxbaum, J. N. ; Tagoe, C. E. *Ann. Rev. Med.* 2000, 51, 543-569 ; 和 Saraiva, M. J. *Hum. Mutat.* 1995, 5, 191-6, 这些文献中的每一个都通过引用整体结合到本文中。

[0046] TTR 是一个 55kDa 的同源四聚体,特征在于 2,2,2 对称性,在二聚体-二聚体界面具有两个等价的漏斗型结合位点,甲状腺激素(T₄)可以在血浆和 CSF 中结合于此。TTR 结合的全视黄醇结合蛋白通常小于 1 当量。TTR 错折叠包括四聚体解离为单体,接着单体内三级结构改变,使得蛋白能够错组装,最终产生淀粉样蛋白。可行的 FAP 治疗使用由肝移植介导的基因治疗,以野生型(WT)蛋白替换血液中的变异 TTR。此方法对 FAC 可能无效,原因是野生型 TTR 持续堆积,同样其对于 SSA 治疗也是无用的,其中野生型 TTR 堆积的过程似乎是病因。肝移植治疗对于大约 10 种在柔脑膜堆积淀粉样纤维导致 CNS 病的 TTR 变异体也无效,因为这些 TTR 由脉络丛合成。因此,迫切需要开发基于通用非侵入型药物的治疗策略。理想的药物是非蛋白、非肽或非核酸型药物。参见例如 Blake, C. C. 等 ; *J. Mol. Biol.* 1978, 121, 339-56 ; Wojtczak, A. 等 ; *Acta Crystallogr., Sect. D* 1996, 758-810 ; Monaco, H. L ; Rizzi, M. ; Coda, A. *Science* 1995, 268, 1039-41 ; Lai, Z. ; Colon, W. ; Kelly, J. W. *Biochemistry* 1996, 35, 6470-82 ; Holmgren, G. 等 ; *Lancet* 1993, 341, 1113-6 ; Suhr, O. B. ; Ericzon, B. G. ; Friman, S. *Liver Transpl.* 2002, 8, 787-94 ; Dubrey, S. W. 等 ; *Transplantation* 1997, 64, 74-80 ; Yazaki, M. 等 ; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 274, 702-6 ; 和 Cornwell, C. G. III 等 ; *Am. J. of Med.* 1983, 75, 618-623, 这些文献中的每一个都通过引用整体结合到本文中。

[0047] 抑制甲状腺素运载蛋白淀粉样纤维形成的二氟尼柳类似物的合成

[0048] 可以通过 T4 介导的四聚体稳定化防止导致淀粉样纤维形成的 TTR 错折叠。某些结构各异的四聚体稳定物家族结合 TTR 的一个或两个 T4 位点,防止淀粉样变性,且没有激素 T4 可能存在的副作用。这些四聚体稳定化合物包括某些非甾族抗炎药物 (NSAID),例如氟芬那酸、双氟芬酸、氟比洛芬和二氟尼柳,它们似乎通过基态结合和稳定化增加与四聚体解离相关的动力学屏障起作用。因为 TTR 在血液中是 T4 的第二载体,所以 TTR 的 T4 结合能力 95% 以上未利用,这使得可以给予靶向这些位点的四聚体稳定化合物。因为二氟尼柳是环加氧酶 -2 抑制剂,所以长期给予可能导致胃肠副作用。因此理想的二氟尼柳类似物应降低或缺失 NSAID 活性,但在血液中对 TTR 具有高亲和性。为此目标的第一步是设计和合成为淀粉样蛋白纤维形成抑制剂的二氟尼柳类似物。参见例如 Miroy, G. J. 等; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1996, 93, 15051-6; Klabunde, T. 等; Nat. Struct. Biol. 2000, 7, 312-21; Baures, P. W.; Peterson, S. A.; Kelly, J. W. Bioorg. Med. Chem. 1998, 6, 1389-401; Petrassi, H. M. 等; J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 2178-2192; Baures, P. W. 等; Bioorg. Med. Chem. 1999, 7, 1339-47; Sacchettini, J. C.; Kelly, J. W. Nat. Rev. Drug Disc. 2002, 1, 267-275; Oza, V. B. 等; J. Med. Chem. 2002, 45, 321-32; Bartalena, L.; Robbins, J. Clin. Lab. Med. 1993, 13, 583-98; Aldred, A. R.; Brack, C. M.; Schreiber, G. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 1995, 111, 1-15; 和 Mao, H. Y. 等; J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 10429-10435, 这些文献中的每一个都通过引用整体结合到本文中。

[0049] TTR 四聚体的亚单位关系到三条正交 C_2 -轴。图 1 图示了 TTR 的 T4 结合位点,表明了抑制剂羧化物参与与 Lys 15 和 15' ϵ -铵盐的静电相互作用的正向结合模式 (forward binding mode)。由四级结构界面产生的两个相同 T4 结合位点与和 C_2 对称晶轴垂直的两个 C_2 轴立体交叉。每个 T4 结合位点都可分为内部和外部结合腔。参见例如 Blake, C. C.; Oatley, S. J. Nature 1977, 268, 115-20, 该文献通过引用整体结合到本文中。内部结合腔包含一对卤素结合袋 (HBP), 命名为 HBP 3 和 3', 由 Leu 17、Ala 108、Val 121 和 Thr 119 的侧链组成。每个亚单位的四个 Ser 117 侧链的会聚限定了最内部区域和两个相同结合位点之间的分界面。Ser 117 羟基可用作氢键供体或受体,以便和所述化合物 (例如淀粉样蛋白形成抑制剂) 上的官能团互补或通过水分子介导与所述化合物的静电作用。外部结合位点由 HBP 1 和 1' 组成,而 HBP 2 和 2' 位于内部和外部结合腔之间的交界面上。Lys 15 和 15' ϵ -铵基限定了外部结合腔的极外区域,使得可以和化合物上的带负电取代基发生静电作用。许多 TTR 四聚体稳定化合物以正向结合模式结合,位于外部结合袋中的亲水苯环上的带负电取代基参与和 Lys 15 ϵ -铵基的静电作用。在正向结合模式中,疏水苯环 (通常由卤素取代) 可占据内部结合袋。但是,也观察到以相反方向 (反向结合模式) 结合的实例。在反向结合模式中,亲水芳环可位于内部腔,使得羧化物与 Ser 117 和 Ser 117' 以氢键键合。在反向结合模式中,卤素取代的疏水环可位于外部腔。

[0050] 二氟尼柳可降低 TTR 酸 - 介导的淀粉样蛋白生成。二氟尼柳的结构 (参见实施例 2) 可用作抑制 TTR 淀粉样蛋白生成的新化合物的设计基础。参见例如 Verbeeck, R. K. 等; Biochem. Pharm. 1980, 29, 571-576; 和 Nuernberg, B.; Koehler, G.; Brune, K. Clin. Pharmacokin. 1991, 20, 81-89。

[0051] 所述化合物可为下式:

[0052]



[0053] 其中 Ar^1 是芳基或杂芳基, Ar^1 任选被以下一种或多种取代: 卤素、 $-\text{R}^1$ 、 $-\text{OR}^1$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^1$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{OR}^1$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{NHR}^1$ 、 $-\text{SR}^1$ 、 $-\text{S}(=\text{O})\text{R}^1$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{R}^1$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^1$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}^1$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NHR}^1$ 、 $-\text{NR}^1\text{R}^2$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{R}^1$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NHR}^1$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{OR}^1$ 或 $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{R}^1$ 。

[0054] Ar^2 是芳基或杂芳基, Ar^2 任选被以下一种或多种取代: 卤素、 $-\text{R}^1$ 、 $-\text{OR}^1$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^1$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{OR}^1$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{NHR}^1$ 、 $-\text{SR}^1$ 、 $-\text{S}(=\text{O})\text{R}^1$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{R}^1$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^1$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}^1$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NHR}^1$ 、 $-\text{NR}^1\text{R}^2$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{R}^1$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NHR}^1$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{OR}^1$ 或 $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{R}^1$ 。

[0055] 每个 R^1 独立地为氢, 或为取代或未取代的烷基、环烷基、杂环烷基、烯基、环烯基、杂环烯基、炔基、芳基或杂芳基。

[0056] 每个 R^2 独立地为氢, 或为取代或未取代的烷基、环烷基、杂环烷基、烯基、环烯基、杂环烯基、炔基、芳基或杂芳基。

[0057] 在某些情况下, Ar^1 可为取代或未取代的苯基。 Ar^2 可独立地为取代或未取代的苯基。 Ar^1 和 Ar^2 可同时为取代或未取代的苯基。 所述取代基可以为氟、氯、羟基、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CO}_2\text{Me}$ 、 $-\text{OMe}$ 、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 或甲酰基。 R^1 可为低级烷基。

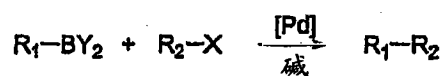
[0058] 所述化合物的使用形式可以为由无机或有机的酸与碱产生的药物可接受盐。 所包括的酸盐如下: 乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐 (digluconate)、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、延胡索酸盐、葡庚糖酸盐 (glucoheptanoate)、甘油磷酸盐、半硫酸盐 (hemisulfate)、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、草酸盐、双羟萘酸盐、果胶酯酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、苦味酸盐、三甲基乙酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐和十一烷酸盐。 碱盐包括铵盐、碱金属盐如钠和钾盐、碱土金属盐如钙和镁盐、有机碱盐如二环己胺盐、N-甲基-D-葡萄糖胺盐, 以及氨基酸盐, 如精氨酸盐、赖氨酸盐, 等等。 此外, 碱性含氮基团可以用以下物质季铵化: 低级烷基卤, 如甲基、乙基、丙基和丁基氯、溴和碘; 硫酸二烷基酯, 如硫酸二甲酯、二乙酯、二丁酯和二戊酯; 长链卤素, 如癸基、十二烷基、十四烷基和十八烷酰氯、溴和碘; 芳烷基卤, 如苄基和苯乙基溴; 等等。 由此获得可溶于或分散于水或油中的产物。

[0059] 所述化合物可稳定 TTR 四聚体, 并抑制 TTR 淀粉样蛋白的形成。 所述化合物可为特征在于微细结构改变的二氟尼柳类似物。 所述化合物可用于评价结构-活性的关系, 因为它们和 TTR 淀粉样蛋白抑制有关。 取代模式和取代基 (包括卤素、羧化物、酰基、烷氧基和羟基) 的数量可以变化。 其它类型化合物的结构-活性数据揭示, 羧化物取代基或类似的阴离子或 H-键基团似乎很重要, 可能参与与 Lys 15 和 15' ϵ -胺基的静电相互作用或与 Ser 117 和 117' 的氢键键合相互作用, 同时卤素取代的疏水环境填补 TTR 的卤素结合袋。 可评价氟和氯取代芳基, 包括 2-氟、4-氟、3,5-二氟、2,4-二氟和 2,6-二氟。 碘取代芳基可能不太理想, 因为它们具有不稳定性 and 潜在的甲状腺素激动剂作用。 在某些类似物中可以没有羧化物 (阴离子) 取代基, 以评价其对纤维抑制和血浆结合选择性的影响。 可以合成含醛或醇官能团的化合物, 以评价不带电氢键受体和供体对结合选择性和淀粉样蛋白纤

维化抑制的影响。醛的偕二醇形式可能是主要结合种类。

[0060] 一般来说,所述化合物可通过本领域已知的方法合成。Suzuki 偶联是制备所述化合物的一种方法:

[0061]



[0062] $BY_2 = B(OH)_2$ 、 $B(OR)_2$ 、9-BBN、 $B(CHCH_3CH(CH_3)_2)_2$

[0063] $X = I$ 、 Br 、 Cl 、 $OSO_2(C_nF_{2n+1})$, $n = 0, 1, 4$

[0064] $R_1 =$ 芳基、烯基、炔基

[0065] $R_2 =$ 芳基、烯基、苄基、烯丙基、烷基

[0066] 例如,联苯化合物可由苯基硼酸和溴苯或碘苯进行 Suzuki 偶联形成。可能需要合适的保护基,以避免在化合物制备过程中形成副产物。例如,可用合适的氨基保护基如三氟乙酰基或叔丁氧羰基保护氨基取代基。其它的保护基和反应条件可见于 T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, (第 3 版, 1999, John Wiley & Sons, New York, N. Y.)。

[0067] 药物组合物

[0068] 本文描述的化合物(例如二氟尼柳类似物、多氯化联苯或苯并噁唑)可配制成药物组合物,可口服、胃肠外、喷雾吸入、局部、直肠、鼻、口腔、阴道给予或通过植入贮库给予。本文使用的术语“胃肠外”包括皮下、静脉内、肌内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、病灶内和颅内注射或灌注技术。

[0069] 所述药物组合物可包括任一种化合物或其药物可接受的衍生物,以及任何药物可接受的载体。本文使用的术语“载体”包括可接受的辅料和赋形剂。可用于本发明药物组合物的药物可接受载体包括但不限于离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白如人血清白蛋白、缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质如鱼精蛋白硫酸盐、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、硅胶、三硅酸镁、聚烯吡酮、纤维素类物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯聚氧化丙烯嵌段共聚物、聚乙二醇和羊毛脂。

[0070] 所述药物组合物可为无菌可注射的制剂形式,例如无菌可注射的水性或油性悬浮液。此悬浮液可按照本领域已知的技术,使用合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂配制。所述无菌可注射制剂也可以为在无毒胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液,例如在 1,3-丁二醇中的溶液。可用的可接受赋形剂和溶剂是水、Ringer 溶液和等渗氯化钠溶液。另外,无菌不挥发油通常可用作溶剂或悬浮介质。为此,可使用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。脂肪酸,例如油酸及其甘油酯衍生物,可用于制备注射剂,也可以使用天然的药物可接受的油,例如橄榄油或蓖麻油,尤其是其聚氧乙烯化形式。这些油性溶液或悬浮液可以包含长链醇稀释剂或分散剂。

[0071] 所述药物组合物可以以任何口服可接受的剂型经口给药,所述剂型包括但不限于胶囊、片剂、水性悬浮液或溶液。当以片剂口服使用时,通常使用的载体包括乳糖和玉米淀粉。通常也可以添加润滑剂,如硬脂酸镁。以胶囊形式经口给药时,可用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当需要以水性悬浮液口服使用时,将活性成分与乳化剂和悬浮剂组合。

如有需要,还可以添加某些甜味剂、矫味剂或着色剂。

[0072] 或者,所述药物组合物可以以栓剂形式直肠给药。可通过将药物与合适的非刺激性赋形剂混合进行制备,所述赋形剂于室温为固体,但于直肠温度为液体,因此将在直肠融化释放药物。此类物质包括可可油、蜂蜡和聚乙二醇。

[0073] 所述药物组合物还可以局部给药,尤其是在治疗靶位包括局部施药易于到达的部位或器官时,包括眼睛、皮肤或下肠道的疾病。对于这些部位或器官的每一种,都容易制备合适的局部制剂。

[0074] 可以直肠栓剂形式(参见上文)或合适的灌肠剂进行下肠道局部用药。还可以使用局部给药的经皮贴剂。

[0075] 对于局部用药,所述药物组合物可配制成包含悬浮或溶解在一种或多种载体中的活性组分的合适软膏。用于化合物局部给药的载体包括但不限于矿物油、液体石蜡、白凡士林、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。或者,所述药物组合物可配制成合适的洗剂或乳剂,其包含悬浮或溶解在一种或多种药物可接受载体中的活性组分。合适的载体包括但不限于矿物油、山梨醇酐单硬脂酸酯、聚山梨醇酯 60、十六烷基酯蜡、鲸蜡醇、2-辛基十二烷醇、苜醇和水。

[0076] 对于眼部用药,所述药物组合物可配制为在等渗、pH 调节的无菌盐水中的微粉化悬浮液,或者优选为在等渗、pH 调节的无菌盐水中的溶液,有或者没有防腐剂如苯扎氯铵。或者,对于眼部用药,所述药物组合物可配制为软膏形式,例如凡士林。

[0077] 所述药物组合物还可以通过使用喷雾器、干粉吸入器或定量吸入器以鼻气溶胶或吸入剂给药。所述组合物按照本领域众所周知的药剂技术制备,可制备为盐水溶液,使用苜醇或其它合适的防腐剂、增强生物利用度的吸收促进剂、氟代烃和/或其它常规的增溶剂或分散剂。

[0078] 可与载体物质组合以生产单剂型的活性成分的量根据治疗对象和具体的给药方式有所变化。但是,应当理解的是,任何特定受试者的具体剂量和治疗方案取决于各种因素,包括使用的具体化合物的活性、年龄、体重、身体健康情况、性别、饮食情况、给药时间、排泄速率、药物组合和主治医师的判断以及要治疗的特定疾病的严重性。如果有的话,活性成分的量还取决于与所述活性成分共同给予的治疗或预防的药物。

[0079] 药物组合物的有效量为对治疗受试者产生治疗效果需要的量,其取决于多种因素,例如抑制剂性质、受试者大小、治疗目标、要治疗的病理特征、使用的具体药物组合物以及主治医师的判断。相关文献参见 Freireich 等, Cancer Chemother. Rep. 1966, 50, 219 和 Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardley, New York, 1970, 537。可用的活性成分的剂量水平为每天约 0.001- 约 100mg/kg 体重、每天约 0.1- 约 10mg/kg 体重。

[0080] 以下为实践本发明的实施例。不能以任何方式将它们理解为限制本发明的范围。

[0081] 实施例

[0082] 实施例 1: 通过改变蛋白错折叠能量学预防甲状腺素运载蛋白淀粉样病变

[0083] 许多的人类疾病,包括淀粉样变性病,都与蛋白错折叠有关。恶化[例如 Val30 → Met30 (V30M) 和 Leu55 → Pro55 (L55P)] 或改善 [Thr119 → Met119 (T119M)] 甲状腺素运载蛋白 (TTR) 淀粉样病变的 80 种家族突变提供了有价值的机理理解。迄今为止,所有疾病相关突变的特征都是使 TTR 四聚体不稳定,许多突变影响了限速性四聚体解离的速

度,快速率促进淀粉样变性,慢速率延缓淀粉样变性。我们利用 T119M 预防 V30M 化合物杂合子所引起疾病的机制,开发急剧减缓初始错折叠事件(四聚体解离)的小分子 TTR 淀粉样蛋白抑制剂,初始错折叠事件是部分单体变性所需要的,使其能错组装成淀粉样蛋白或其它聚集物。

[0084] 分离杂种四聚体,以更好地理解反式抑制机制。增加 T119M 亚单位相对于 V30M[或 L55P] 的化学计量将最大的酸介导纤维形成转移到较低的 pH,降低了生理可到达 pH(>4.0) 时淀粉样蛋白的总产量,并减慢了酸诱导(pH 4.4)和甲醇介导的淀粉样变性的速率。已经发现了某些小分子 TTR 淀粉样蛋白纤维化抑制剂,本文研究了其亚类,包括美国食品药品监督管理局(FDA)批准的两种药物(抑制剂 8 和 10)(Sacchettini 等, *Nature Rev. Drug Discovery* 1,267(2002))。小分子抑制剂结合对野生型(WT)TTR 纤维形成的产量和速率的影响类似于加入 T119M 亚单位的影响。但是,没有在所有抑制剂中都观察到最适于纤维形成的 pH 降低。这些抑制剂的作用是结合至 TTR 四聚体中的两个相同的甲状腺素(T4)位点,而不是单体。

[0085] 通过将缓慢的四级结构变化与解折叠过渡态联系在一起,检测四聚体解离速率,解折叠过渡态的速率是解离速率的 5×10^5 倍(Hammarström 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99,16427(2002))。变性检测解离是不可逆的,因为所使用尿素的浓度(>6.0M)不支持重折叠。增加 T119M 亚单位相对于 V30M[或 L55P] 的化学计量揭示, TTR(1.8 μ M) 四聚体解离速率(限速淀粉样变性)在三种不同变性环境(酸性 pH、甲醇水溶液或尿素)中急剧下降,解释了疾病预防的起源。

[0086] 在抑制剂 6-10(1.8 和 3.6 μ M) 存在时,野生型 TTR 四聚体(1.8 μ M) 解离速率的检测结果显示,对所有 TTR 抑制剂复合物都是剂量依赖性减慢。四聚体初始解离速率与结合两种抑制剂($T \cdot I_2$)的四聚体的摩尔分数粗略成反比。在抑制剂 6、7 和 9(1.8 μ M) 存在时,单指数振幅(amplitude of single exponential)主要与未配位四聚体解离相关(较小程度上与 $T \cdot I$ 相关),暗示 $T \cdot I_2$ 在 6M 尿素中防止四聚体解离。相反,抑制剂 8 和 10 时形成的 $T \cdot I$ 和 $T \cdot I_2$ 在尿素中基本不能保护四聚体免于解离,说明仅结合还不足。在 6、7 和 9(3.6 μ M) 中观察到的有效抑制的起因是结合能稳定 $T \cdot I_2$ 复合物超过 2.3kcal/mol 的自由能($\Delta G1 = RT \ln([T \cdot I]/[T]) = RT \ln([I]/Kd1)$ 和 $\Delta G2 = RT \ln([T \cdot I_2]/[T]) = RT \ln\{([I]^2/(Kd1 \cdot Kd2))\}$ 。 $T \cdot I_2$ 相比于 T 稳定 2.7kcal/mol 将使 TTR 四聚体解离速率降低两个数量级。抑制剂 8 和 10(3.6 μ M) 的强负协同结合表明,结合第二个位点($T \cdot I_2$, μ M 解离常数)相比于结合第一个位点($T \cdot I$)不会进一步稳定 TTR。抑制剂 6、7 和 9 的 nM 解离常数(Kd1 和 Kd2) 确保,基态稳定(>2.3kcal/mol)基本上足以增加 TTR 四聚体解离的活化障碍,前提是所述抑制剂不结合并同样稳定解离过渡态。 $T \cdot I_2$ 和 $T \cdot I$ 复合物的抑制剂解离速率也可以在抑制剂 6、7 和 9 的效力中起作用。通过抗体树脂固定化抑制剂饱和的 TTR,使水性缓冲液以 5.0ml/分钟经过,以评价 6-10 的有效解离速率。最好的抑制剂是具有最低表观解离速率的抑制剂。

[0087] 尽管淀粉样变性速率(酸性条件)与四聚体解离速率(在尿素中)在抑制剂存在时一般来说关联很好,但不需要是这种情况。淀粉样变性需要解离后浓度依赖性错组装。因此,一般来说小分子预防纤维形成比预防四聚体解离更有效,尤其是在抑制剂可以将单体淀粉样蛋白中间体浓度保持得较低时(<3.6 μ M),此时纤维形成完全无效。有时,在尿素中

检测到的四聚体解离速率不能精确预测酸性条件下抑制剂效力的排列次序。例如, FDA 批准的药物二氟尼柳 (8) 是比四聚体解离抑制剂好得多的淀粉样蛋白抑制剂。关于此观察结果的一个可能解释是 K_{d1} 和 / 或 K_{d2} 在酸中比尿素中低 (18)。另外, 猜测有些抑制剂在变性条件下比其在生理条件下测定的结合常数要好得多。例如, 化合物 9 在防止四聚体解离 (尿素) 和纤维形成 (酸) 方面比抑制剂 7 更有效或等效, 尽管抑制剂 9 的 K_{d1} 和 K_{d2} 值分别是 7 的 10 倍和 83 倍 (在生理条件下检测)。因此, 重要的是在各种变性条件下而不是仅在生理条件下判断错折叠抑制剂的效力。

[0088] 通过稳定四聚体基态的程度高于稳定过渡态的程度 (此时是使用小分子抑制剂的情况) 和 / 或使解离过渡态不稳定, 使四聚体包含 T119M 反式抑制剂亚单位而不是由疾病相关亚单位组成可以降低四聚体解离速率。为区别这些可能性, 我们对比了野生型和 T119M 同源四聚体的重构动力学。T119M 单体重折叠快速且在野生型 TTR 单体折叠速率的误差范围之内。但是, T119M 折叠单体的再组装比尿素稀释启动的野生型 TTR 单体四聚化慢两个数量级。再组装过程是双相的, 这可由组装途径中存在可观测的中间体 (可能是二聚体) 得到解释。在相反方向, T119M 四聚体以野生型 TTR 四聚体解离速率的 1/37 解离。这些动力学作用无法影响三级结构稳定性和 / 或四聚体稳定性的差异。野生型和 T119M 单体 (使用基因工程单体 TTR 构建物 (M-TTR)) 热力学稳定性的直接比较揭示, 解折叠的自由能变化 ΔG 仅为 0.4kcal/mol, 远低于分别解释解离和组装速率差异所需的 2.1 和 2.7kcal/mol。T119M 和野生型 TTR 的热力循环分析表明, T119M 通过以约 3.1kcal/mol 使解离过渡态不稳定防止四聚体解离, 而不是通过四聚体稳定化。按照此分析结果, 与野生型相比, 实际上 T119M 四聚体不稳定 0.9kcal/mol, 这进一步支持了动力学稳定机制。野生型和 T119M 四聚体解离之间的自由能差异不能通过尿素介导的解折叠检测, 这是因为 T119M 在尿素中变性需要特别长的诱导周期 (数周), 在此期间 TTR 被修饰。对比氯化胍 (GdmCl) 和硫氰酸胍 (GdmSCN) 变性曲线表明, 野生型 TTR 比 T119M 更能抵抗 GdmCl 变性, 而在 GdmSCN 中则相反。这些变性中点的差异可能是由于有差别的阴离子稳定化, 提示这些蛋白的真实热力学稳定性非常相似, 尽管在这些离液剂中进行定量分析是不可能的。

[0089] T119M 反式抑制主要由解离过渡态不稳定介导, 与 T-119M 在二聚体 - 二聚体交界面的定位一致。将解离过渡态能增加至 3.1kcal/mol 能有效防止四聚体解离, 这是因为活化障碍变得不可逾越 (解离半衰期 $t_{1/2}$ 由约 42 小时增加至 1500 小时以上)。小分子结合同样以剂量依赖方式增加与四聚体解离相关的活化障碍, 尽管其通过四聚体稳定化 (相对于过渡态稳定化) 介导。小分子解离常数 K_{d1} 和 K_{d2} 尽可能低且抑制剂浓度尽可能高时, 稳定程度最大。我们实验中基态稳定使用的浓度与血浆中观测到的众多口服利用药物的浓度相当。

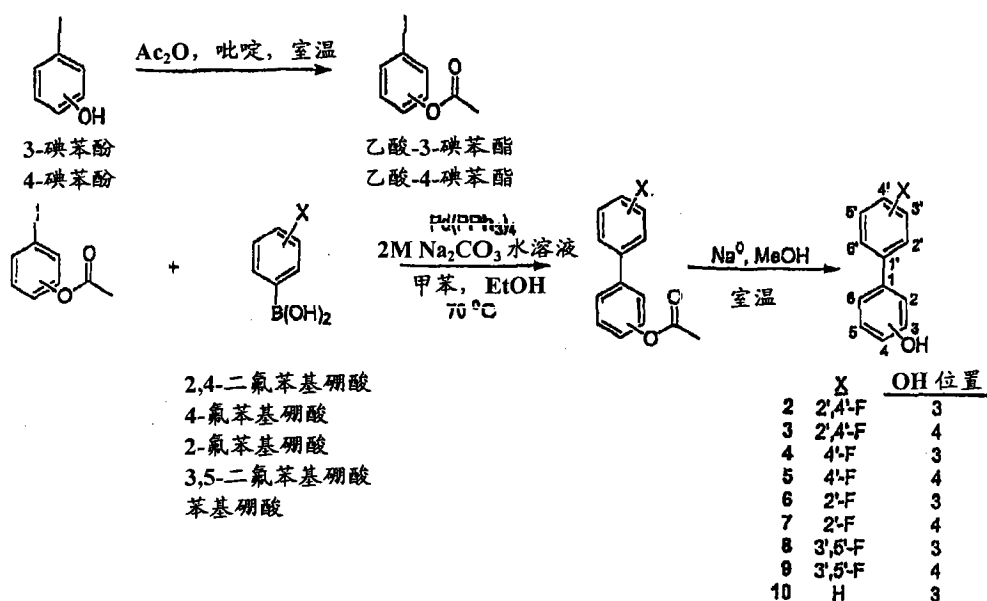
[0090] 小分子结合和反式抑制增加了与 TTR 纤维形成的限速步骤四聚体解离相关的活化能。确立此类推的重要性在于已知反式抑制防止 V30M 化合物杂合子引起的疾病。考虑到小分子错折叠寡聚物为神经毒剂这个新证据, 天然状态的动力学稳定是特别吸引人的策略。现在应当考虑找寻小分子结合剂或开发调节其它容易错折叠的病理相关蛋白的能量地形面 (energy landscape) 的反式抑制方法。

[0091] 实施例 2: 二氟尼柳类似物稳定甲状腺素运载蛋白天然状态并是甲状腺素运载蛋白淀粉样蛋白纤维形成的抑制剂

[0092] 二氟尼柳 (1) 可减少甲状腺素运载蛋白 (TTR) 淀粉样变性。例如, 在某些条件 (例如 $3.6 \mu\text{M}$ TTR、 $3.6 \mu\text{M}$ 二氟尼柳、pH 4.4、72 小时、 37°C) 下, 二氟尼柳将 TTR 淀粉样变性减少 63%。在这些条件下, 加倍二氟尼柳浓度 (至 $7.2 \mu\text{M}$) 将 TTR 淀粉样变性减少 97%。二氟尼柳是迄今报道的较好的淀粉样蛋白纤维化抑制剂之一, 口服给予的二氟尼柳具有高度的生物利用度, 250mg 每日两次的剂量产生 $100 \mu\text{M}$ 以上的稳定血浆浓度。因为二氟尼柳为环加氧酶-2 抑制剂, 所以长期给予可能导致胃肠道副作用。二氟尼柳类似物降低或缺失 NSAID 活性, 但在血浆中对 TTR 具有高亲和性, 因此是理想选择。故二氟尼柳的结构可用作抑制 TTR 淀粉样变性的新化合物的设计基础。参见例如 Verbeeck, R. K. 等; Biochem. Pharm. 1980, 29, 571-576; 和 Nuemberg, B.; Koehler, G.; Brune, K. Clin. Pharmacokin. 1991, 20, 81-89。

[0093] 使用芳基卤与芳基硼酸间 Pd 介导的 Suzuki 偶联合成二氟尼柳类似物。可通过以下方法合成类似物 2-10: 用乙酸酐和吡啶乙酰化 3- 或 4- 碘苯酚, 接着与合适的氟苯基硼酸在标准 Suzuki 偶联反应条件下如流程 1 所示进行 Suzuki 偶联。用 Na^0 和 MeOH (Zemplén 条件) 除去酯获得苯酚 2-10。参见例如 Miyaura, N.; Yanagi, T.; Suzuki, A. Synth. Commun. 1981, 11, 513-519; Sharp, M. J.; Snieckus, V. Tetrahedron Lett. 1985, 26, 5997-6000; Sharp, M. J.; Cheng, W.; Snieckus, V. Tetrahedron Lett. 1987, 28, 5093-5096; Pozsgay, V.; Nanasi, P.; Neszmelyi, A. Carbohydr. Res. 1981, 90, 215-231; Jendralla, H.; Chen, L.-J. Synthesis 1990, 827-833; 和 Kelm, J.; Strauss, K. Spectrochim. Acta, Part A 1981, 37, 689-692, 这些文献的每一个都通过引用整体结合到本文中。

[0094]

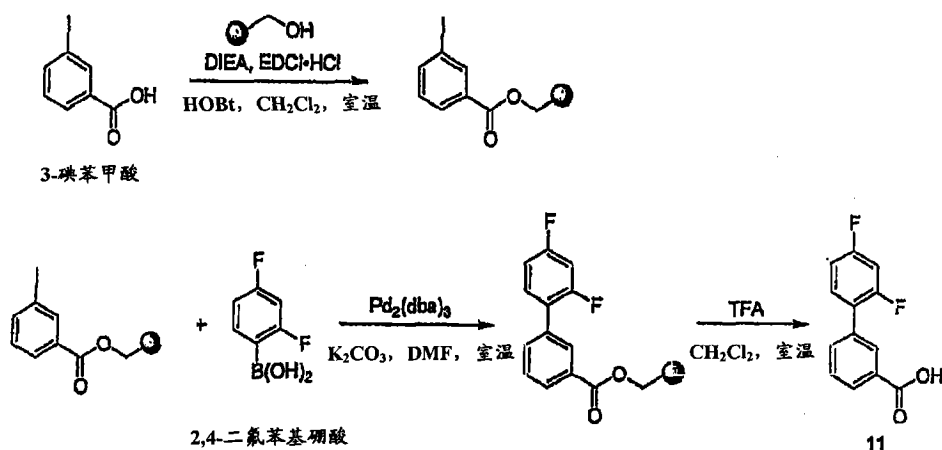


[0095]

流程 1

[0096] 使用如流程 2 所示的固相合成法合成二氟尼柳类似物 11。将 3- 碘苯甲酸经酯键偶联至 Wang 树脂, 产生树脂结合的碘代苯, 然后将其偶联至 2,4- 二氟苯基硼酸, 用 1:1 的 TFA: CH_2Cl_2 混合物将其与树脂切开。参见例如 Guiles, J. W.; Johnson, S. G.; Murray, W. V. J. Org. Chem. 1996, 61, 5169-5171, 该文献通过引用整体结合到本文中。

[0097]

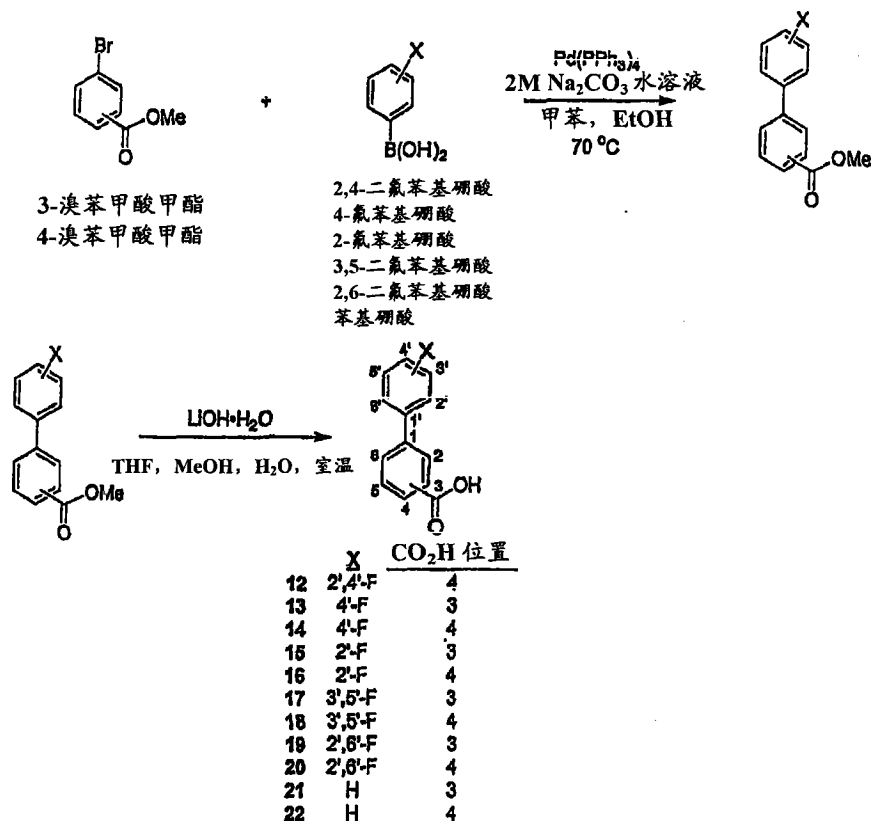


[0098]

流程 2

[0099] 使用标准的 Suzuki 偶联条件 (参见上文), 如流程 3 所示, 将 3-溴苯甲酸甲酯或 4-溴苯甲酸甲酯 (都有市售) 与合适的氟苯基硼酸偶联, 组装成含羧化物的底物 12-22。然后用 $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 皂化酯, 产生对应的羧酸。参见例如 Bumagin, N. A.; Bykov, V. V. *Tetrahedron* 1997, 53, 14437-14450; Ananthakrishnanadar, P.; Kannan, N. J. *Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1982, 1305-1308; Homis, F.; Nozaki, K.; Hiyama, T. *Tetrahedron Lett.* 2000, 41, 5869-5872; 和 Hajduk, P. J. 等; *J. Med. Chem.* 1997, 40, 3144-3150, 这些文献的每一个都通过引用整体结合到本文中。

[0100]



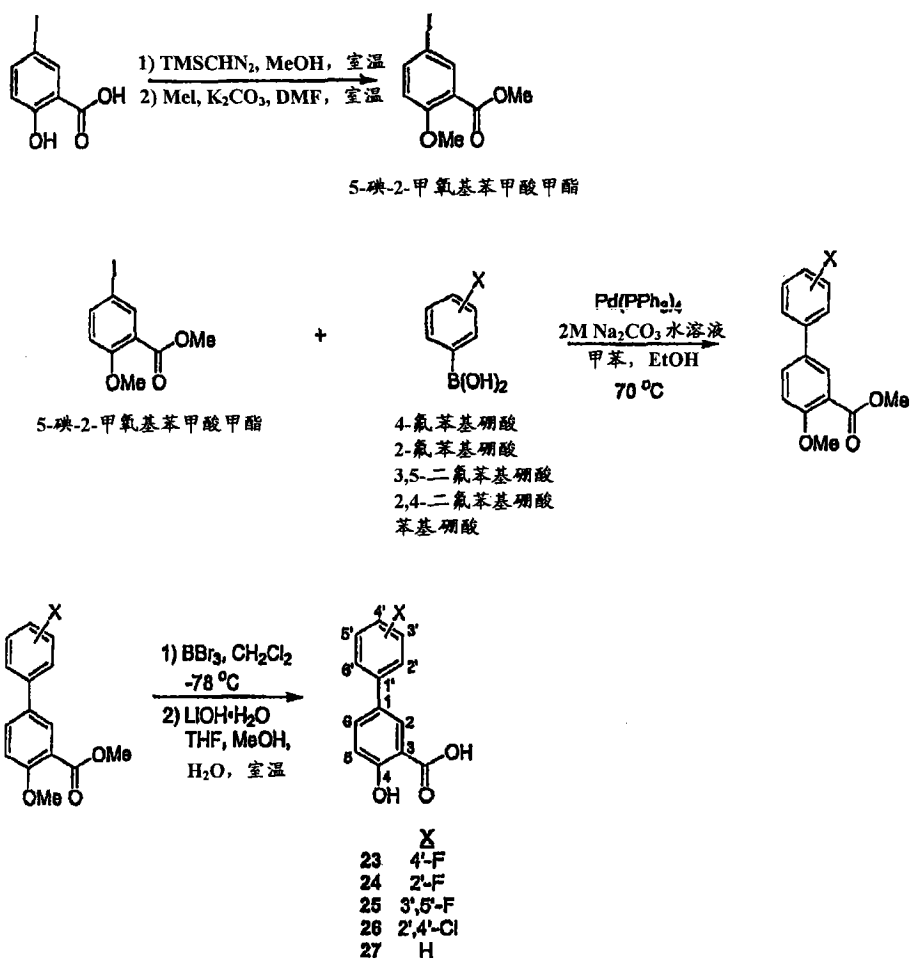
[0101]

流程 3

[0102] 使用 $\text{TMS}-\text{CH}_2\text{N}_2$ 酯化 5-碘代水杨酸, 使用 MeI 将苯酚转变为甲酯。如流程 4 所示, 将保护的水杨酸与各种氟苯基硼酸偶联, 随后通过 $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 皂化和 BBr_3 脱甲基化去保护, 获得水杨酸衍生物 23-27。参见例如 Nicolaou, K. C. 等; *Chem. Eur. J.* 1999, 5, 2602-2621;

和 Chu-Moyer, M. Y. 等; J. Med. Chem. 2002, 45, 511-528。

[0103]

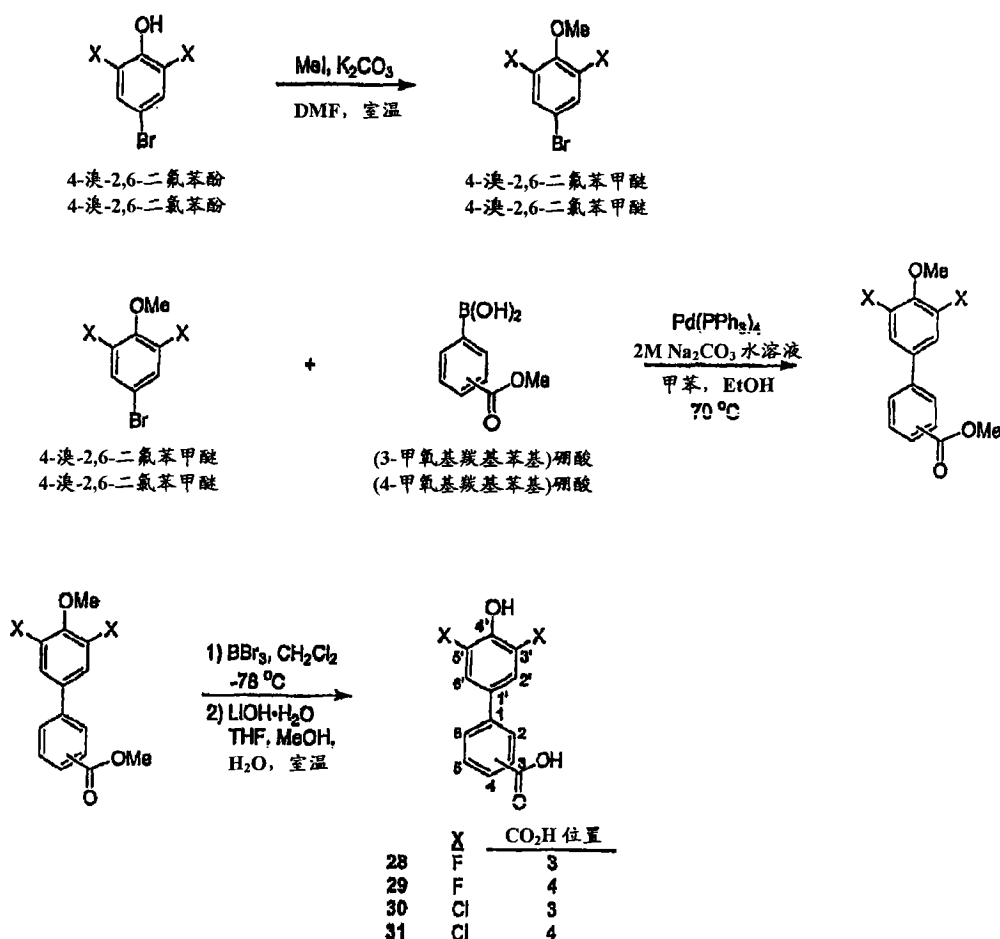


[0104]

流程 4

[0105] 首先通过将市售溴苯酚保护为甲酯 (MeI 和 K_2CO_3), 合成含 3' 5' -二卤代 -4' -羟基的类似物 28-31。与 (甲氧基羰基苯基) 硼酸进行 Suzuki 偶联形成全保护联苯底物。如流程 5 所示, BBr_3 介导的甲酯剪切和 $LiOH \cdot H_2O$ 皂化产生全官能化二氟尼柳类似物 28-31。

[0106]

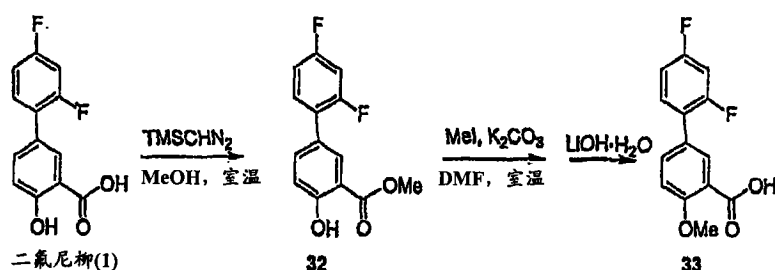


[0107]

流程 5

[0108] 通过用 TMS- 重氮甲烷酯化羧酸产生 32, 接着任选用 MeI 和 K₂CO₃ 醚化, 并用 LiOH · H₂O 进行酯水解, 获得 33, 合成二氟尼柳的甲醚和甲酯类似物。参见流程 6。

[0109]

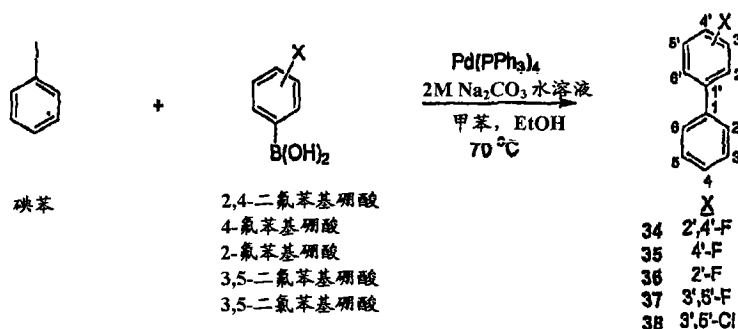


[0110]

流程 6

[0111] 如流程 7 所示, 将碘苯和一系列含卤素的硼酸进行 Suzuki 偶联, 组装成一系列卤化联苯 34-38。参见例如 Patrick, T. B. ; Willaredt, R. P. DeGonia, D. J. J. Org. Chem. 1985, 50, 2232-2235 ; Kuchar, M. 等 ; Collection of Czechoslovak Chemical Communications 1988, 53, 1862-1872 ; Allen, K. J. ; Bolton, R. ; Williams, G. H. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2 1983, 691-695 ; Nakada, M. 等 ; Bull. Chem. Soc. Jpn. 1989, 62, 3122-3126 ; 和 Weingarten, H. J. Org. Chem. 1961, 26, 730-733, 这些文献的每一个都通过引用整体结合到本文中。

[0112]

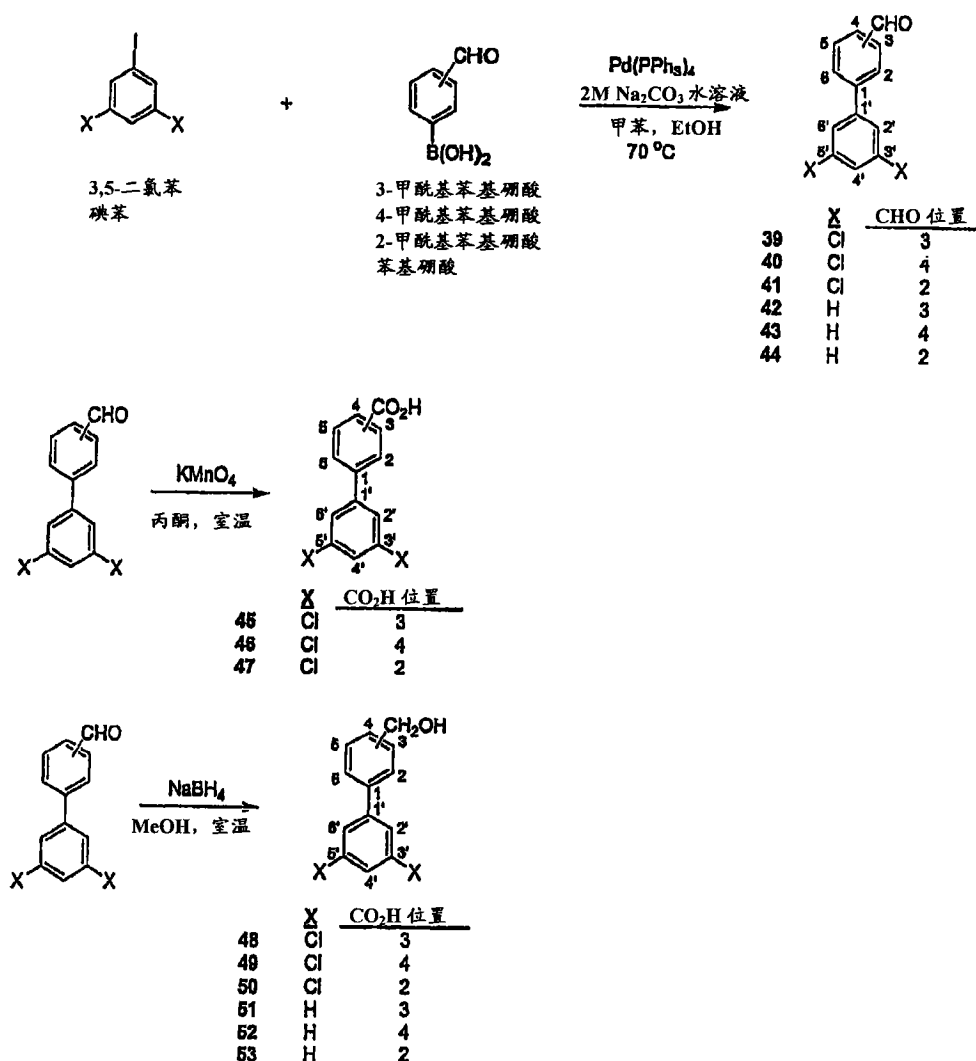


[0113]

流程 7

[0114] 如流程 8 所示,使用 3,5- 二氯碘苯和 2-、3- 或 4- 甲酰基苯基硼酸组装氯化联芳醛。类似地制备没有卤素取代的醛 42-44。醛 39-41 用 KMnO_4 的丙酮 / 水溶液氧化,产生流程 8 对应的羧酸 45-47,或者,用 NaBH_4 的 MeOH 溶液还原,产生流程 8 对应的苄醇 48-50。用 NaBH_4 和 MeOH 还原非氯化醛 42-44,产生联苯苄醇 51-53。参见例如 Song, X. P. ;He, H. T. ;Siahaan, T. J. *Org. Lett.* 2002,4,549-552 ; 和 Nicolaou, K. C. 等 ;*J. Am. Chem. Soc.* 2001,123,9313-9323 ;Hashizume, H. 等 ;*Chem. Pharm. Bull.* 1994,42,512-520 ;Indolese, A. F. *Tetrahedron Lett.* 1997,38,3513-3516 ;Pridgen, L. N. ;Snyder, L. ;Prol, J. J. *Org. Chem.* 1989,54,1523-1526 ;Huang, C. G. ;Beveridge, K. A. ;Wan, P. J. *Am. Chem. Soc.* 1991,113,7676-7684 ;Wendebom, S. 等 ;*Synlett.* 1998,6,671-675 ;Stevens, C. V. ;Peristeropoulou, M. ;De Kimpe, N. *Tetrahedron* 2001,57,7865-7870 ;Tanaka, K. ;Kishigami, S. ;Toda, F. *J. Org. Chem.* 1990,55,2981-2983 ; 和 Clive, D. L. J. ;Kang, S. Z. *J. Org. Chem.* 2001,66,6083-6091,这些文献的每一个都通过引用整体结合到本文中。

[0115]

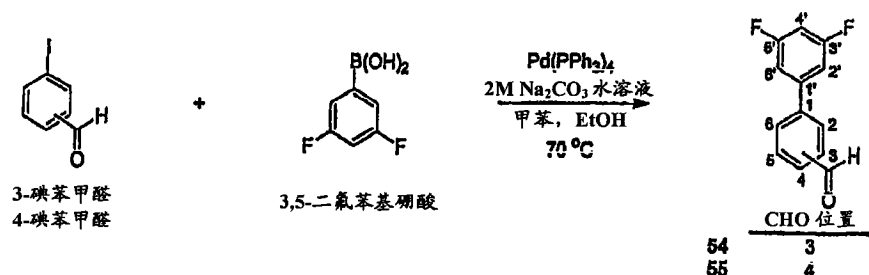


[0116]

流程 8

[0117] 如流程 9 所示, 将 3,5-二氟苯基硼酸与 2-或 3-碘苯甲醛进行 Suzuki 偶联, 合成 3',5'-二氟甲酰-官能化联苯 54 和 55。通过类似的方法和前述的方法合成所有其它抑制剂。化合物 10、21、35、36 和 43 有市售。

[0118]



[0119]

流程 9

[0120] 试剂和溶剂购自 Aldrich、Lancaster、Acros、Combi-Blocks、Matrix 和 Pfaltz-Bauer。THF 和 CH_2Cl_2 经 Al_2O_3 干燥。其它的溶剂和试剂得自市场供应商, 除非另有声明, 否则都没有进一步纯化就使用。在硅胶 60 F_{254} 预涂板上进行分析性薄层层析 (TLC), 用购自 EM Science 的荧光指示剂监测反应。通过 UV 照射、磷钼酸处理后加热或钼酸高铈铵处理后加热使 TLC 板显色。使用 EM Science 的硅胶 60 (230-400 目) 进行快速层析。通过

HPLC 测定对本文所得结论必不可少的新化合物纯度。用 Waters 600 泵 / 控制器、Waters 996 光电二极管阵列检测器和 Waters NovaPak 硅胶柱进行正相 HPLC。使用的溶剂系统是己烷和乙酸乙酯,梯度在 30 分钟内由 50:50 己烷:乙酸乙酯至 0:100 己烷:乙酸乙酯。用 Waters 600 泵 / 控制器、Waters 2847 双波长检测器和 Vydac 蛋白和肽 C18 柱进行反相 HPLC。溶剂系统 A 为含 0.5% 三氟乙酸的 95:5 水:乙腈,而溶剂系统 B 为含 0.5% 三氟乙酸的 5:95 水:乙腈。梯度在 20 分钟内由 100:0A:B 至 0:100 A:B,再以 100% B 保持 10 分钟。用 AVIV Instruments 的 202SF 型光谱仪进行圆二色性光谱学检测。用 Varian FT NMR 光谱仪以 400 MHz 质子频率记录 NMR 光谱。除非另有说明,否则质子化学位移参照内部化学位移标准品 CHCl_3 (7.26ppm) 以 ppm 报告。偶合常数以赫兹 (Hz) 报道。除非另有说明,否则碳化学位移参照内部化学位移标准品 CDCl_3 (77.23ppm) 以 ppm 报告。所有的质谱都在 Scripps 研究所质谱中心或伊利诺伊大学质谱实验室获得。

[0121] 按照流程 1 制备化合物 2-10。将合适的乙酸-碘苯酯 (1.0 当量) 溶解在足量甲苯中,得到浓度为 0.05M 的溶液,向其中加入苯基硼酸 (1.1 当量) 溶解在 EtOH 获得的 0.6M 硼酸溶液。加入 2 M Na_2CO_3 水溶液,使乙酸-碘苯酯的终反应浓度为 0.03M,接着加入 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (4.0mol%)。将反应液在氩气中加热回流 20 小时,一结束就冷却至室温,用 CH_2Cl_2 提取 (2×),用盐水洗涤 (1×),经 MgSO_4 干燥并真空浓缩。残余物经快速层析 (10:1 己烷:乙酸乙酯) 纯化,获得乙酰化联苯。

[0122] 向乙酰化联苯的 MeOH 溶液中加入催化量的 Na^0 ,以使终反应物浓度为 0.3M。使反应物在氩气中于室温搅拌 12 小时,此后加入 Dowex 50W-X8 阳离子交换树脂,以中和反应混合物。过滤树脂,将滤过液真空浓缩并快速层析 (3:1 己烷:乙酸乙酯),获得为白色固体的羟基联苯产物,收率为 22-75%。

[0123] 2',4'-二氟联苯-3-醇 (2)。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400MHz) δ 9.63 (br s, 1H), 7.54 (td, 1H, $J = 8.9, 6.7\text{Hz}$), 7.34 (ddd, 1H, $J = 11.1, 9.2, 2.6\text{Hz}$), 7.27 (m, 1H), 7.17 (tdd, 1H, $J = 8.3, 2.6, 1.2\text{Hz}$), 6.92 (m, 2H), 6.81 (ddd, 1H, $J = 8.1, 2.5, 1.0\text{Hz}$)。 ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100MHz) δ 162.8, 160.3, 157.4, 135.4, 131.8, 129.7, 119.4, 115.6, 114.9, 111.9, 104.4。 $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}$ (M-H) 的 HRESIMS 理论值为 205.0466,实测值为 205.0465。正相 HPLC 保留时间:10.5 分钟。反向 HPLC 保留时间:1.3 分钟。>99% 纯。

[0124] 2',4'-二氟联苯-4-醇 (3)。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400MHz) δ 7.49 (td, 1H, $J = 9.4, 8.6\text{Hz}$), 7.34 (AA' XX', 2H, $J_{\text{AA}'} = J_{\text{XX}'} = 2.5\text{Hz}$, $J_{\text{XA}} = 8.7\text{Hz}$, $J_{\text{X}'\text{A}'} = 8.5\text{Hz}$, $J_{\text{X}'\text{A}} = 0.3\text{Hz}$, $J_{\text{XA}'} = 0.3\text{Hz}$, $\nu_{\text{A}} = \nu_{\text{A}'} = 2934.1\text{Hz}$, $\nu_{\text{X}} = \nu_{\text{X}'} = 2746.2\text{Hz}$), 7.28 (ddd, 2H, $J = 11.3, 9.4, 2.6\text{Hz}$), 7.13 (dddd, 1H, $J = 8.3, 7.5, 2.8, 1.0\text{Hz}$), 6.87 (AA' XX', 2H, 同上)。 ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100MHz) δ 162.3, 160.0, 157.2, 131.4, 129.9, 124.8, 115.4, 111.8, 104.3。 $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}$ (M-H) 的 HRESIMS 理论值为 205.0464,实测值为 205.0465。正相 HPLC 保留时间:11.2 分钟。反向 HPLC 保留时间:12.6 分钟。>98% 纯。

[0125] 3',5'-二氟联苯-3-醇 (8)。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400MHz) δ 9.65 (br s, 1H), 7.34 (m, 2H), 7.28 (t, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$), 7.19 (tt, 1H, $J = 9.1, 2.2\text{Hz}$), 7.13 (ddd, 1H, $J = 7.8, 1.8, 1.0\text{Hz}$), 7.08 (t, 1H, $J = 2.1\text{Hz}$), 6.86 (ddd, 1H, $J = 8.0, 2.4, 1.0\text{Hz}$)。 ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100MHz) δ 162.9, 158.0, 144.1, 139.1, 130.1, 117.6, 115.7, 109.7, 102.6。 $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}$ (M-H) 的 HRESIMS 理论值为 205.0465,实测值为 205.0468。正相 HPLC 保留时间:11.4 分钟。反

向 HPLC 保留时间 :12.9 分钟。>99% 纯。

[0126] 3',5'-二氟联苯-4-醇 (9)。¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ 7.44(AA' XX', 2H, J_{AA'} = J_{XX'} = 3.0Hz, J_{XA} = 8.0Hz, J_{X'A'} = 8.5Hz, J_{X'A} = 0.7Hz, J_{XA'} = 0.5Hz, v_A = v_{A'} = 2973.8Hz, v_X = v_{X'} = 2766.0Hz), 7.05(dtd, 2H, J = 6.6, 2.4, 0.7Hz), 6.92(AA' XX', 2H, 同上), 6.74(tt, 1H, J = 8.9, 2.4Hz), 5.11(s, 1H)。¹³C NMR(CDCl₃, 100MHz) δ 164.7, 156.1, 144.2, 131.8, 128.6, 116.1, 109.6, 102.1。C₁₃H₈Cl₂O₂(M-H) 的 HRESIMS 理论值为 205.0465, 实测值为 205.0465。正相 HPLC 保留时间 :10.8 分钟。反向 HPLC 保留时间 :12.9 分钟。>99% 纯。

[0127] 2',4'-二氟联苯-3-甲酸 (11)。按照流程 2 制备化合物 11。将 3-碘苯甲酸 (200mg, 0.81mmol)、DIEA (140 μL, 0.81mmol)、EDCI·HCl 和 HOBT 加入到在 CH₂Cl₂ (10mL) 中溶胀的 Wang 树脂溶液 (265mg, 0.67mmol, 2.53mmol/g) 中。在肽振荡器上于室温剧烈振荡 22 小时后, 去除溶剂, 用 DMF (3×10mL) 和 CH₂Cl₂ (3×10mL) 洗涤树脂, 并经真空彻底干燥。

[0128] 将 2,4-二氟苯基硼酸 (112mg, 0.71mmol)、K₂CO₃ (98mg, 0.71mmol) 和 Pd₂(dba)₃ (4mg, 0.01mmol) 加入到在 DMF (2mL) 中溶胀的官能化 Wang 树脂 (140mg, 0.35mmol) 溶液中。于室温搅拌后, 过滤反应物, 用 DMF (3×)、H₂O (3×)、CH₂Cl₂ (3×) 和 MeOH (3×) 洗涤树脂, 并经真空彻底干燥。

[0129] 将 TFA:CH₂Cl₂ (3mL 1:1) 溶液加入到官能化树脂 (140mg, 0.35mmol) 中, 在肽振荡器上于室温剧烈振荡 13 小时。完成后, 过滤反应物, 用 CH₂Cl₂ (3×) 洗涤树脂, 滤过液真空浓缩, 通过快速层析 (2:1 己烷:乙酸乙酯, 0.5% 乙酸) 纯化, 获得为白色固体的 11 (81mg, 100%)。¹H NMR(DMSO-d₆, 400MHz) δ 13.19(br s, 1H), 8.07(q, 1H, J = 1.7Hz), 7.99(dt, 1H, J = 7.9, 1.6Hz), 7.78(dq, 1H, J = 7.8, 1.3Hz), 7.64(m, 2H), 7.40(ddd, 1H, J = 11.1, 8.8, 2.5Hz), 7.22(tdd, 1H, J = 8.4, 2.8, 1.0Hz)。¹³CNMR(DMSO-d₆, 100MHz) δ 167.0, 160.7, 160.4, 134.5, 133.0, 132.0, 131.3, 129.4, 129.1, 128.7, 123.9, 112.2, 104.6。C₁₃H₈F₂O₂(M-H) 的 HRESIMS 理论值为 233.0414, 实测值为 233.0426。正相 HPLC 保留时间 :13.7 分钟。反向 HPLC 保留时间 :12.5 分钟。>99% 纯。

[0130] 按照流程 3 制备化合物 12-22。将合适的溴苯甲酸甲酯 (1.0 当量) 溶解于足量甲苯中, 获得浓度为 0.1M 的溶液, 向其中加入苯基硼酸 (2.0 当量) 溶解于 EtOH 中获得的 1.0M 硼酸溶液。加入 2M Na₂CO₃ 水溶液, 使溴苯甲酸酯的终反应浓度为 0.06M, 接着加入 Pd(PPh₃)₄ (10.0mol%)。将反应物在氩气中于 70℃ 下搅拌 25 小时, 一结束就冷却至室温, 用 CH₂Cl₂ (2×) 提取, 用盐水 (1×) 洗涤, 经 MgSO₄ 干燥, 并真空浓缩。残余物通过快速层析 (10:1 己烷:乙酸乙酯) 纯化, 得到甲酯。

[0131] 向 0.06M 浓度的甲酯 (1.0 当量) 的 THF:MeOH:H₂O (1:1:1) 溶液中加入 LiOH·H₂O (3.0 当量)。反应物于室温搅拌 4 小时, 一结束就用 30% HCl 酸化, 用乙酸乙酯 (3×5mL) 提取, 经 MgSO₄ 干燥, 并真空浓缩。残余物通过快速层析 (CH₂Cl₂, 1% MeOH, 0.2% 乙酸) 纯化, 得到为白色固体的联苯羧酸, 收率为 6-93%。

[0132] 2',4'-二氟联苯-4-甲酸 (12)。¹H NMR(DMSO-d₆, 400MHz) δ 13.09(br s, 1H), 8.04(AA' XX', 2H, J_{AA'} = J_{XX'} = 2.0Hz, J_{XA} = J_{X'A'} = 8.0Hz, J_{X'A} = J_{XA'} = 0.7Hz, v_A = v_{A'} = 3213.3Hz, v_X = v_{X'} = 3056.2Hz), 7.65(AA' XX', 2H, 同上), 7.63(m, 1H), 7.38(ddd, 1H, J = 11.2, 9.0, 2.8Hz), 7.21(td, 1H, J = 8.4, 2.2Hz)。¹³C NMR(DMSO-d₆, 100MHz) δ 167.1,

160.8, 158.0, 138.6, 132.1, 130.1, 129.6, 129.0, 123.9, 112.2, 104.7。C₁₃H₈F₂O₂(M-H) 的 HRESIMS 理论值为 233.0414, 实测值为 233.0407。正相 HPLC 保留时间:13.3 分钟。反向 HPLC 保留时间:12.6 分钟。>99% 纯。

[0133] 2'-氟联苯-3-甲酸 (15)。¹H NMR(CD₃OD, 400MHz) δ 8.18(q, 1H, J = 1.4Hz), 8.03(dt, 1H, J = 7.8, 1.3Hz), 7.76(dq, 1H, J = 7.7, 1.5Hz), 7.55(t, 1H, J = 7.8Hz), 7.48(td, 1H, J = 7.8, 1.7Hz), 7.38(dddd, 1H, J = 8.3, 7.5, 5.1, 1.8Hz), 7.26(td, 1H, J = 7.6, 1.3Hz), 7.20(ddd, 1H, J = 11.0, 8.2, 1.2Hz)。¹³C NMR(CD₃OD, 100MHz) δ 169.7, 161.2, 137.5, 134.6, 132.4, 132.0, 131.3, 130.1, 129.9, 129.5, 126.0, 117.2。C₁₃H₉FO₂(M-H) 的 HRESIMS 理论值为 215.0508, 实测值为 215.0498。正相 HPLC 保留时间:10.6 分钟。反向 HPLC 保留时间:12.1 分钟。>99% 纯。

[0134] 2'-氟联苯-4-甲酸 (16)。¹H NMR(DMSO-d₆, 400MHz) δ 13.10(br s, 1H), 8.05(AA' XX', 2H, J_{AA'} = J_{XX'} = 1.7Hz, J_{XA} = J_{X' A'} = 8.5Hz, J_{X' A} = J_{XA'} = 0.3Hz, ν_A = ν_{A'} = 3217.9Hz, ν_X = ν_{X'} = 3070.0Hz), 7.67(AA' XX', 2H, 同上), 7.58(td, 1H, J = 8.0, 1.8Hz), 7.34(m, 1H)。¹³C NMR(DMSO-d₆, 100MHz) δ 167.1, 159.1, 139.4, 130.8, 130.3, 130.2, 129.6, 129.0, 127.3, 125.1, 116.2。C₁₃H₉FO₂(M-H) 的 HRESIMS 理论值为 215.0508, 实测值为 215.0515。正相 HPLC 保留时间:12.3 分钟。反向 HPLC 保留时间:12.2 分钟。>99% 纯。

[0135] 3', 5'-二氟联苯-3-甲酸 (17)。¹H NMR(丙酮-d₆, 400MHz) δ 8.30(td, 1H, J = 2, 0.5Hz), 8.10(dtd, 1H, J = 7.6, 1.1, 0.5Hz), 7.97(ddd, 1H, J = 7.8, 2.0, 1.1Hz), 7.64(td, 1H, J = 7.8, 0.6Hz), 7.39(m, 2H), 7.06(tt, 1H, J = 9.3, 2.4Hz)。¹³C NMR(丙酮-d₆, 100MHz) δ 167.4, 165.6, 163.2, 144.6, 139.8, 132.5, 132.4, 130.6, 130.3, 128.9, 111.0, 103.7。C₁₃H₈F₂O₂(M-H) 的 HRESIMS 理论值为 233.0414, 实测值为 233.0425。正相 HPLC 保留时间:13.5 分钟。反向 HPLC 保留时间:12.7 分钟。>99% 纯。

[0136] 3', 5'-二氟联苯-4-甲酸 (18)。¹H NMR(DMSO-d₆, 400MHz) δ 13.15(br s, 1H), 8.02(d, 2H, J = 8.2Hz), 7.85(d, 2H, J = 8.5Hz), 7.49(m, 2H), 7.26(tt, 1H, J = 9.4, 2.4Hz)。¹³C NMR(DMSO-d₆, 100MHz) δ 166.4, 164.1, 161.7, 142.6, 141.6, 130.9, 130.0, 127.1, 110.2, 103.5。C₁₃H₈F₂O₂(M-H) 的 HRESIMS 理论值为 233.0414, 实测值为 233.0423。正相 HPLC 保留时间:13.0 分钟。反向 HPLC 保留时间:12.8 分钟。>99% 纯。

[0137] 2', 6'-二氟联苯-3-甲酸 (19)。¹H NMR(DMSO-d₆, 400MHz) δ 8.03(dt, 1H, J = 7.8, 1.6Hz), 8.00(m, 1H), 7.72(dt, 1H, J = 7.8, 1.4Hz), 7.64(t, 1H, J = 7.7Hz), 7.53(m, 1H), 7.26(t, 2H, J = 8.3Hz)。¹³C NMR(DMSO-d₆, 100MHz) δ 167.7, 158.7, 135.0, 132.2, 131.4, 131.1, 129.9, 129.5, 129.5, 112.8, 110.9。C₁₃H₈F₂O₂(M-H) 的理论值为 233.0414, 实测值为 233.0410。正相 HPLC 保留时间:12.1 分钟。反向 HPLC 保留时间:12.1 分钟。>97% 纯。

[0138] 2', 6'-二氟联苯-4-甲酸 (20)。¹H NMR(DMSO-d₆, 400MHz) δ 8.06(AA' XX', 2H, J_{AA'} = J_{XX'} = 2.0Hz, J_{XA} = J_{X' A'} = 8.0Hz, J_{X' A} = J_{XA'} = 0.7Hz, ν_A = ν_{A'} = 3243.6Hz, ν_X = ν_{X'} = 3018.6Hz), 7.60(AA' XX', 2H, 同上), 7.54(m, 1H), 7.27(t, 2H, J = 8.3Hz)。¹³C NMR(DMSO-d₆, 100MHz) δ 171.0, 164.0, 134.1, 125.7, 122.0, 121.9, 121.1, 103.4。C₁₃H₈F₂O₂(M-H) 的 HRESIMS 理论值为 233.0414, 实测值为 233.0425。正相 HPLC 保留时间:

14.5 分钟。反向 HPLC 保留时间:12.1 分钟。>99% 纯。

[0139] 联苯-4-甲酸 (22)。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz) δ 13.07(br s, 1H), 8.03(AA' XX', 2H, $J_{AA'} = J_{XX'} = 1.8\text{Hz}$, $J_{XA} = J_{X'A'} = 8.3\text{Hz}$, $J_{X'A} = J_{XA'} = 0.3\text{Hz}$, $\nu_A = \nu_{A'} = 3210.7\text{Hz}$, $\nu_X = \nu_{X'} = 3122.0\text{Hz}$), 7.81(AA' XX', 2H, 同上), 7.75(m, 2H), 7.51(tt, 2H, $J = 7.2, 1.1\text{Hz}$), 7.43(tt, 1H, $J = 7.4, 1.2\text{Hz}$)。 ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 100MHz) δ 167.2, 144.2, 139.0, 130.0, 129.8, 129.1, 128.3, 127.0, 126.8。 $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_2$ (M $^+$) 的 HREIMS 理论值为 198.0683, 实测值为 198.0683。正相 HPLC 保留时间:13.8 分钟。反向 HPLC 保留时间:12.2 分钟。>99% 纯。

[0140] 5-碘-2-甲氧基苯甲酸甲酯。将 TMS-重氮甲烷 (19.25mL, 38.50mmol, 2M 己烷溶液) 加入到 5-碘水杨酸 (5.08g, 19.24mmol) 的 MeOH(20mL) 溶液中, 于室温搅拌 11 小时。一结束就真空浓缩反应物, 残余物不用进一步纯化就进行下一步。

[0141] 将甲基碘 (2.40mL, 38.48mmol) 和 K_2CO_3 (10.60g, 76.96mmol) 加入到 5-碘-2-甲氧基苯甲酸 (5.37g, 19.24mmol) 的 DMF(20mL) 溶液中, 在氩气中于室温搅拌 24 小时。一结束就加入乙酸乙酯, 用 1% HCl (2 $\times$ 20mL)、盐水 (1 $\times$) 洗涤反应物, 经 MgSO_4 干燥并真空浓缩。残余物通过快速层析 (3:1 己烷: 乙酸乙酯) 纯化, 获得为白色固体的 5-碘-2-甲氧基苯甲酸甲酯 (4.93g, 88%)。参见例如 Corey, E. J.; Myers, A. G. J. Am. Chem. Soc. 1985, 107, 5574-5576, 该文献通过引用整体结合到本文中。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz) δ 7.90(d, 1H, $J = 2.4\text{Hz}$), 7.80(dd, 1H, $J = 8.8, 2.4\text{Hz}$), 6.96(d, 1H, $J = 9.0\text{Hz}$), 3.81(s, 3H), 3.79(s, 3H)。 ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 100MHz) δ 164.7, 158.0, 141.6, 138.5, 122.2, 115.2, 82.1, 55.9, 52.0。 $\text{C}_9\text{H}_9\text{IO}_3$ (M $^+$) 的 HREIMS 理论值为 291.9608, 实测值为 291.9596。

[0142] 按照流程 4 制备化合物 23-27。将 5-碘-2-甲氧基苯甲酸甲酯 (1.0 当量) 溶解于足量甲苯中, 获得浓度为 0.08M 的溶液, 向其中加入苯基硼酸 (2.0 当量) 溶解于 EtOH 中获得的 0.8M 硼酸溶液。加入 $2\text{MNa}_2\text{CO}_3$ 水溶液, 使甲氧基苯甲酸酯的终反应浓度为 0.06M, 接着加入 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (10.0mol%)。将反应物在氩气中于 60 $^\circ\text{C}$ 下搅拌 15 小时, 一结束就冷却至室温, 用 CH_2Cl_2 (2 $\times$) 提取, 用盐水 (1 $\times$) 洗涤, 经 MgSO_4 干燥, 并真空浓缩。残余物通过快速层析 (3:1 己烷: 乙酸乙酯) 纯化, 得到甲基化水杨酸酯。

[0143] 将 BBr_3 (2.0 当量, 1M 的 CH_2Cl_2 溶液) 加入到甲基化水杨酸酯 (1.0 当量) 溶于足量 CH_2Cl_2 所获得的 0.06M 浓度溶液中。反应物在氩气中于室温搅拌 4 小时, 一结束就用 H_2O (10mL) 猝灭, 用 CH_2Cl_2 (2 $\times$) 提取, 用盐水 (1 $\times$) 洗涤, 经 MgSO_4 干燥, 并真空浓缩。残余物不用进一步纯化就进行下一步。

[0144] 向 0.06M 浓度的甲酯 (1.0 当量) 的 THF:MeOH: H_2O (1:1:1) 溶液中加入 $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (3.0 当量)。反应物于室温搅拌 4 小时, 一结束就用 30% HCl 酸化, 用乙酸乙酯 (3 $\times$ 5mL) 提取, 经 MgSO_4 干燥, 并真空浓缩。残余物通过快速层析 (CH_2Cl_2 , 1% MeOH, 0.2% 乙酸) 纯化, 得到为白色固体的联苯水杨酸, 收率为 12-42%。

[0145] 4'-氟-4-羟基联苯-3-甲酸 (23)。 ^1H NMR(CD_3OD , 400MHz) δ 8.01(d, 1H, $J = 2.5\text{Hz}$), 7.65(dd, 1H, $J = 8.7, 2.5\text{Hz}$), 7.51(m, 2H), 7.11(tt, 2H, $J = 10.0, 3.0\text{Hz}$), 6.97(d, 1H, $J = 8.7\text{Hz}$)。 ^{13}C NMR(CD_3OD , 100MHz) δ 173.5, 165.0, 162.7, 137.7, 135.1, 132.6, 129.6, 129.3, 118.9, 116.7, 116.6, 114.2。 $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{FO}_3$ (M-H) 的 HRESIMS 理论值为 231.0459, 实测值为 231.0457。正相 HPLC 保留时间:14.2 分钟。反向 HPLC 保留时间:12.8 分钟。>99% 纯。

[0146] 2'-氟-4-羟基联苯-3-甲酸 (24)。 ^1H NMR(CD_3OD , 400MHz) δ 7.98(dd, 1H, $J = 2.2, 1.4\text{Hz}$), 7.59(ddd, 1H, $J = 8.7, 2.4, 1.7\text{Hz}$), 7.36(td, 1H, $J = 7.8, 1.7\text{Hz}$), 7.26(dddd, 1H, $J = 9.9, 7.4, 4.9, 1.7\text{Hz}$), 7.16(td, 1H, $J = 7.5, 1.2\text{Hz}$), 7.10(ddd, 1H, $J = 11.1, 8.2, 1.3\text{Hz}$), 6.95(d, 1H, $J = 8.5\text{Hz}$)。 ^{13}C NMR(CD_3OD , 100MHz) δ 173.5, 162.9, 162.4, 137.2, 131.8, 130.2, 130.1, 129.1, 128.1, 125.8, 118.5, 117.1, 114.0。 $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{FO}_3$ (M-H) 的 HRESIMS 理论值为 231.0457, 实测值为 231.0446。正相 HPLC 保留时间: 13.8 分钟。反向 HPLC 保留时间: 12.7 分钟。 >99% 纯。

[0147] 3', 5'-二氟-4-羟基联苯-3-甲酸 (25)。 ^1H NMR(CD_3OD , 400MHz) δ 8.07(d, 1H, $J = 2.5\text{Hz}$), 7.73(dd, 1H, $J = 8.5, 2.7\text{Hz}$), 7.15(m, 2H), 7.01(d, 1H, $J = 8.9\text{Hz}$), 6.86(tt, 1H, $J = 9.0, 2.5\text{Hz}$)。 ^{13}C NMR(CD_3OD , 100MHz) δ 173.3, 166.3, 163.8, 145.1, 135.2, 131.0, 129.8, 119.2, 114.4, 110.4, 103.0。 $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_3$ (M-H) 的 HRESIMS 理论值为 249.0363, 实测值为 249.0356。正相 HPLC 保留时间: 14.5 分钟。反向 HPLC 保留时间: 13.3 分钟。 >99% 纯。

[0148] 2', 4'-二氯-4-羟基联苯-3-甲酸 (26)。 ^1H NMR(CD_3OD , 400MHz) δ 7.83(d, 1H, $J = 2.2\text{Hz}$), 7.70(d, 1H, $J = 2.0\text{Hz}$), 7.58(dd, 1H, $J = 8.6, 2.4\text{Hz}$), 7.48(ABX, 1H, $J_{\text{AB}} = 8.4\text{Hz}$, $J_{\text{AX}} = 2.2\text{Hz}$, $J_{\text{BX}} = 0.0\text{Hz}$, $\nu_{\text{A}} = 2989.4\text{Hz}$, $\nu_{\text{B}} = 2973.0\text{Hz}$), 7.44(ABX, 1H, 同上), 7.06(d, 1H, $J = 8.7\text{Hz}$)。 ^{13}C NMR(CD_3OD , 100MHz) δ 171.6, 160.8, 137.5, 136.4, 132.8, 132.6, 132.4, 130.8, 129.2, 128.5, 127.7, 117.2, 112.9。 $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_3$ (M-H) 的 HRESIMS 理论值为 280.9772, 实测值为 280.9782。正相 HPLC 保留时间: 13.1 分钟。反向 HPLC 保留时间: 14.4 分钟。 >99% 纯。

[0149] 4-羟基联苯-3-甲酸 (27)。 ^1H NMR(CD_3OD , 400MHz) δ 8.08(d, 1H, $J = 2.4\text{Hz}$), 7.73(dd, 1H, $J = 8.7, 2.3\text{Hz}$), 7.54(m, 2H), 7.41(tt, 2H, $J = 7.3, 1.8\text{Hz}$), 7.29(tt, 1H, $J = 7.8, 1.7\text{Hz}$), 7.38(dddd, 1H, $J = 8.8, 6.4\text{Hz}$), 7.05(d, 1H, $J = 8.7\text{Hz}$), 6.93(m, 1H), 6.90(ddd, 1H, $J = 7.3, 1.9\text{Hz}$), 7.00(d, 1H, $J = 8.5\text{Hz}$)。 ^{13}C NMR(CD_3OD , 100MHz) δ 161.5, 140.1, 134.0, 132.4, 128.7, 128.3, 126.9, 126.3, 117.5, 112.9。 $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_3$ (M-H) 的 HRESIMS 理论值为 213.0552, 实测值为 213.0545。正相 HPLC 保留时间: 12.9 分钟。反向 HPLC 保留时间: 12.6 分钟。 >99% 纯。

[0150] 4-溴-2,6-二氟苯甲醚。将甲基碘 (580 μL , 10.06mmol) 和 K_2CO_3 (2.80g, 20.12mmol) 加入到 4-溴-2,6-二氟苯酚 (1.05g, 5.03mmol) 的 DMF (10mL) 溶液中, 在氩气中于室温搅拌 24 小时。一结束就加入乙酸乙酯, 用 1% HCl (2 $\times$ 20mL)、盐水 (1 $\times$) 洗涤反应物, 经 MgSO_4 干燥并真空浓缩。残余物通过快速层析 (己烷) 纯化, 获得为白色固体的 4-溴-2,6-二氟苯甲醚 (747mg, 67%)。参见例如 Chambers, R. D. 等; J. Fluorine Chem. 2000, 102, 169-174, 该文献通过引用整体结合到本文中。 ^1H NMR(CDCl_3 , 400MHz) δ 7.06(m, 2H), 3.97(q, 3H, $J = 1.1\text{Hz}$)。 ^{13}C NMR(CDCl_3 , 100MHz) δ 155.8, 136.3, 116.2, 113.8, 61.9。 $\text{C}_7\text{H}_5\text{F}_2\text{OBr}$ (M+) 的 LREIMS 实测值为 223.0。

[0151] 4-溴-2,6-二氯苯甲醚。将甲基碘 (467 μL , 8.12mmol) 和 K_2CO_3 (2.24g, 16.24mmol) 加入到 4-溴-2,6-二氯苯酚 (982mg, 4.06mmol) 的 DMF (10mL) 溶液中, 在氩气中于室温搅拌 40 分钟。一结束就加入乙酸乙酯, 用 1% HCl (2 $\times$ 20mL)、盐水 (1 $\times$) 洗涤反应物, 经 MgSO_4 干燥并真空浓缩。残余物通过快速层析 (己烷) 纯化, 获得为白色固体的 4-溴-2,6-二氯苯甲醚 (768mg, 74%)。参见例如 Li, J. 等; J. Med. Chem. 1996, 39,

1846-1856, 该文献通过引用整体结合到本文中。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz) δ 7.75(s, 2H), 3.81(s, 3H)。 ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 100MHz) δ 151.3, 131.5, 129.6, 116.5, 60.6。 $\text{C}_7\text{H}_5\text{BrCl}_2\text{O}$ (M $^{+}$) 的 HREIMS 理论值为 253.8905, 实测值为 253.8901。

[0152] 按照流程 5 制备化合物 28-31。将合适的卤代苯甲醚(1.0 当量)溶解于足量甲苯中, 获得浓度为 0.25M 的溶液, 向其中加入苯基硼酸(2.0 当量)溶解于 EtOH 中获得的 1.5M 硼酸溶液。加入 2M Na_2CO_3 水溶液, 使卤代苯甲醚的终反应浓度为 0.08M, 接着加入 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (10.0mol%)。将反应物于 65℃ 下搅拌 17 小时, 一结束就冷却至室温, 用 CH_2Cl_2 (2 $\times$) 提取, 用盐水(1 $\times$) 洗涤, 经 MgSO_4 干燥, 并真空浓缩。残余物通过快速层析(20:1 己烷: 乙酸乙酯) 纯化, 获得为白色固体的甲基化联苯。

[0153] 将 BBr_3 (2.0 当量, 1M 的 CH_2Cl_2 溶液) 加入到甲基化联苯(1.0 当量) 溶于足量 CH_2Cl_2 所获得的 0.20M 浓度溶液中。反应物在氩气中于室温搅拌 3 小时, 一结束就用 H_2O (10mL) 猝灭, 用 CH_2Cl_2 (2 $\times$) 提取, 用盐水(1 $\times$) 洗涤, 经 MgSO_4 干燥, 并真空浓缩。残余物不用进一步纯化就进行下一步。

[0154] 向 0.04M 浓度的甲酯(1.0 当量) 的 THF:MeOH: H_2O (1:1:1) 溶液中加入 $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (3.0 当量)。反应物于室温搅拌 5 小时, 一结束就用 30% HCl 酸化, 用乙酸乙酯(3 $\times$ 5mL) 提取, 经 MgSO_4 干燥, 并真空浓缩。残余物通过快速层析(CH_2Cl_2 , 1% MeOH, 0.2% 乙酸) 纯化, 得到为白色固体的联苯产物, 收率为 14-39%。

[0155] 3', 5'-二氟-4'-羟基联苯-3-甲酸(28)。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz) δ 10.60(br s, 1H), 8.14(t, 1H, $J = 1.7\text{Hz}$), 7.91(dt, 1H, $J = 7.7, 1.1\text{Hz}$), 7.88(ddd, 1H, $J = 8.0, 2.0, 1.1\text{Hz}$), 7.55(t, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$), 7.41(m, 2H)。 ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 100MHz) δ 167.3, 154.0, 151.5, 138.4, 133.6, 131.6, 130.8, 129.9, 129.4, 128.4, 127.1, 110.3。 $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_3$ (M-H) 的 HRESIMS 理论值为 249.0363, 实测值为 249.0358。正相 HPLC 保留时间: 18.3 分钟。反向 HPLC 保留时间: 10.5 分钟。>98% 纯。

[0156] 3', 5'-二氟-4'-羟基联苯-4-甲酸(29)。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz) δ 7.98(AA' XX', 2H, $J_{\text{AA}'} = J_{\text{XX}'} = 1.7\text{Hz}$, $J_{\text{XA}} = J_{\text{X}'\text{A}'} = 8.2\text{Hz}$, $J_{\text{X}'\text{A}} = J_{\text{XA}'} = 0.5\text{Hz}$, $\nu_{\text{A}} = \nu_{\text{A}'} = 3189.9\text{Hz}$, $\nu_{\text{X}} = \nu_{\text{X}'} = 3122.0\text{Hz}$), 7.81(AA' XX', 2H, 同上), 7.51(m, 2H)。 ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 100MHz) δ 167.7, 154.5, 142.5, 136.0, 130.5, 130.5, 130.4, 126.9, 111.0。 $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_3$ (M-H) 的 HRESIMS 理论值为 249.0363, 实测值为 249.0375。正相 HPLC 保留时间: 18.9 分钟。反向 HPLC 保留时间: 10.2 分钟。>99% 纯。

[0157] 3', 5'-二氯-4'-羟基联苯-3-甲酸(30)。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz) δ 8.13(t, 1H, $J = 1.6\text{Hz}$), 7.91(m, 2H), 7.70(s, 2H), 7.56(t, 1H, $J = 7.8\text{Hz}$)。 ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 100MHz) δ 167.2, 149.0, 137.9, 132.2, 131.6, 130.8, 129.3, 128.4, 127.1, 126.8, 122.9, 123.0。 $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_3$ (M-H) 的 HRESIMS 理论值为 280.9772, 实测值为 280.9767。正相 HPLC 保留时间: 16.2 分钟。反向 HPLC 保留时间: 11.6 分钟。>99% 纯。

[0158] 3', 5'-二氯-4'-羟基联苯-4-甲酸(31)。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz) δ 7.98(AA' XX', 2H, $J_{\text{AA}'} = J_{\text{XX}'} = 1.7\text{Hz}$, $J_{\text{XA}} = J_{\text{X}'\text{A}'} = 8.1\text{Hz}$, $J_{\text{X}'\text{A}} = J_{\text{XA}'} = 0.5\text{Hz}$, $\nu_{\text{A}} = \nu_{\text{A}'} = 3189.9\text{Hz}$, $\nu_{\text{X}} = \nu_{\text{X}'} = 3110.0\text{Hz}$), 7.81(AA' XX', 2H, 同上), 7.78(s, 2H)。 ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 100MHz) δ 167.2, 141.8, 141.7, 134.7, 129.9, 129.7, 126.9, 126.4, 123.0。 $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_3$ (M-H) 的 HRESIMS 理论值为 280.9772, 实测值为 280.9785。正相 HPLC 保留时间:

15.9 分钟。反向 HPLC 保留时间:11.4 分钟。>97% 纯。

[0159] 2',4'-二氟-4-羟基联苯-3-甲酸甲酯 (32)。按照流程 6 制备化合物 32 和 33。将 TMS-重氮甲烷 (5.87mL, 11.75mmol, 2M 己烷溶液) 加入到二氟尼柳 (1.03g, 4.11mmol) 的 MeOH (10mL) 溶液中, 于室温搅拌 5 小时。一结束就真空浓缩反应物, 残余物经快速层析 (10:1 己烷:乙酸乙酯) 纯化, 获得为白色固体的 32 (774mg, 71%)。¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 7.97 (dd, 1H, J = 2.2, 1.3Hz), 7.59 (dt, 1H, J = 8.8, 2.1Hz), 7.36 (dq, 1H, J = 7.7, 1.5Hz), 7.48 (td, 1H, J = 7.8, 1.7Hz), 7.38 (dddd, 1H, J = 8.8, 6.4Hz), 7.05 (d, 1H, J = 8.7Hz), 6.93 (m, 1H), 6.90 (ddd, 1H, J = 10.6, 8.9, 2.5Hz), 3.96 (s, 3H)。¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz) δ 170.6, 163.6, 161.3, 158.5, 136.4, 131.2, 130.3, 126.2, 124.2, 118.0, 112.6, 111.8, 104.6, 52.6, 124.2。C₁₄H₁₀F₂O₃ (M+) 的 HRFABMS 理论值为 264.0596, 实测值为 264.0598。正相 HPLC 保留时间:6.9 分钟。反向 HPLC 保留时间:14.7 分钟。>99% 纯。

[0160] 2',4'-二氟-4-甲氧基联苯-3-甲酸 (33)。将甲基碘 (350 μL, 1.16mmol) 和 K₂CO₃ (320mg, 2.32mmol) 加入到 32 (152mg, 0.58mmol) 的 DMF (4mL) 溶液中, 在氩气中于室温搅拌 14 小时。一结束就加入乙酸乙酯, 用 1% HCl (2×20mL)、盐水 (1×) 洗涤反应物, 经 MgSO₄ 干燥并真空浓缩, 不用进一步纯化就可以进行下一步。

[0161] 向全甲基化二氟尼柳 (140mg, 0.50mmol) 的 MeOH:THF:H₂O (1:1:1) 溶液中加入 LiOH·H₂O (60mg, 1.43mmol), 于室温搅拌 4 小时。一结束就用 30% HCl 酸化反应物, 用乙酸乙酯 (3×5mL) 提取, 经 MgSO₄ 干燥, 并真空浓缩。残余物通过快速层析 (2:1 乙酸乙酯:己烷, 1% 乙酸) 纯化, 得到为白色固体的 33 (122mg, 93%)。¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 10.77 (br s, 1H), 8.31 (dd, 1H, J = 2.5, 0.9Hz), 7.75 (dt, 1H, J = 8.6, 2.1Hz), 7.41 (dt, 1H, J = 8.9, 6.6Hz), 7.15 (d, 1H, J = 8.8Hz), 6.94 (m, 1H), 4.13 (s, 3H)。¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz) δ 177.7, 161.4, 158.2, 135.7, 133.9, 131.4, 129.0, 123.5, 118.1, 112.2, 112.0, 104.6, 56.9。C₁₄H₁₀F₂O₃ (M-H) 的 HRESIMS 理论值为 263.0520, 实测值为 263.0514。正相 HPLC 保留时间:21.6 分钟。反向 HPLC 保留时间:11.9 分钟。>99% 纯。

[0162] 按照流程 7 制备化合物 34-38。按照流程 8 制备化合物 39-44。将芳基碘 (1.0 当量) 溶解于足量甲苯中, 获得浓度为 0.07M 的溶液, 向其中加入合适的甲酰基苯基硼酸溶解于足量 EtOH 所获得的 0.4M 浓度硼酸溶液。加入 2M Na₂CO₃ 水溶液, 使芳基碘的终反应浓度为 0.04M, 接着加入 Pd(PPh₃)₄ (3.0mol%)。将反应物在氩气中加热回流 18 小时, 一结束就冷却至室温, 用 CH₂Cl₂ (2×) 提取, 用盐水 (1×) 洗涤, 经 MgSO₄ 干燥, 并真空浓缩。残余物通过快速层析 (40:1 己烷:乙酸乙酯) 纯化, 获得为白色固体的联苯醛, 收率为 40-91%。

[0163] 3',5'-二氯-3-甲酰基联苯 (39)。¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 10.09 (s, 1H), 8.04 (t, 1H, J = 1.8Hz), 7.91 (dt, 1H, J = 7.6, 1.3Hz), 7.80 (ddd, 1H, J = 7.8, 2.0, 1.3Hz), 7.64 (t, 1H, J = 7.8Hz), 7.49 (d, 2H, J = 1.8Hz), 7.38 (t, 1H, J = 1.9Hz)。¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz) δ 192.0, 142.8, 139.7, 137.2, 135.8, 133.0, 130.1, 130.0, 128.1, 128.0, 125.9。C₁₃H₈Cl₂O (M+H) 的 HRFABMS 理论值为 251.0027, 实测值为 251.0027。正相 HPLC 保留时间:8.0 分钟。反向 HPLC 保留时间:15.2 分钟。>99% 纯。

[0164] 3',5'-二氯-4-甲酰基联苯 (40)。¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 7.99 (AA' XX', 2H, J_{AA'} = J_{XX'} = 2.1Hz, J_{XA} = J_{X'A'} = 8.5Hz, J_{X'A} = J_{XA'} = 0.7Hz, ν_A = ν_{A'} = 3193.7Hz, ν_X = ν_{X'} = 3077.8Hz), 7.70 (AA' XX', 2H, 同上), 7.47 (t, 1H, J = 1.9Hz), 7.39 (d, 2H, J =

1.9Hz)。¹³C NMR(CDCl₃, 100MHz) δ 191.8, 144.4, 142.9, 136.2, 135.8, 130.6, 128.5, 127.9, 126.1。C₁₃H₈Cl₂O(M-H) 的 HREIMS 理论值为 248.9873, 实测值为 248.9874。正相 HPLC 保留时间:7.9 分钟。反向 HPLC 保留时间:15.2 分钟。>99% 纯。

[0165] 3', 5' - 二氯-2- 甲酰基联苯 (41)。¹H NMR(CDCl₃, 400MHz) δ 9.98(s, 1H), 8.03(dd, 1H, J = 7.8, 1.3Hz), 7.66(td, 1H, J = 7.6, 1.5Hz), 7.55(tt, 1H, J = 7.6, 1.0Hz), 7.44(t, 1H, J = 1.9Hz), 7.39(dd, 1H, J = 7.7, 1.0Hz), 7.27(d, 2H, J = 1.9Hz)。¹³C NMR(CDCl₃, 100MHz) δ 191.4, 142.9, 141.0, 135.3, 134.0, 133.7, 130.7, 129.0, 128.5, 128.4, 128.4。C₁₃H₈Cl₂O(M+H) 的 HRFABMS 理论值为 251.0030, 实测值为 251.0029。正相 HPLC 保留时间:7.0 分钟。反向 HPLC 保留时间:14.9 分钟。>99% 纯。

[0166] 按照流程 8 制备化合物 45-47。将联苯醛 (1.0 当量) 溶解于足量甲苯中, 获得浓度为 0.07M 的溶液, 向其中加入 KMnO₄ (2.0 当量) 溶于足量水所获得的 0.2M 浓度高锰酸钾溶液。将反应物于室温搅拌 16 小时, 一结束就真空浓缩, 将获得的残余物再溶解于 10:1CH₂Cl₂:MeOH 中, 通过玻璃棉塞过滤。粗产物通过快速层析 (10:1CH₂Cl₂:MeOH) 纯化, 获得为白色固体的羧酸 (58mg, 100%), 收率为 82-100%。

[0167] 2', 4' - 二氯联苯-3- 甲酸 (45)。¹H NMR(DMSO-d₆, 400MHz) δ 8.22(br s, 1H), 8.00(br s, 1H), 7.94(d, 1H, J = 7.5Hz), 7.76(s, 2H), 7.63(s, 1H), 7.60(br s, 1H)。¹³C NMR(DMSO-d₆, 100MHz) δ 168.0, 143.7, 138.1, 135.4, 131.6, 129.9, 127.9, 126.2。C₁₃H₈Cl₂O₂(M-H) 的 HRESIMS 理论值为 264.9823, 实测值为 264.9810。正相 HPLC 保留时间:12.3 分钟。反向 HPLC 保留时间:14.2 分钟。>99% 纯。

[0168] 2', 4' - 二氯联苯-4- 甲酸 (46)。¹H NMR(CD₃OD, 400MHz) δ 8.11(brs, 2H), 7.72(m, 2H), 7.64(d, 2H, J = 1.9Hz), 7.46(t, 1H, J = 1.7Hz)。¹³C NMR(DMSO-d₆, 100MHz) δ 170.3, 140.6, 135.2, 127.2, 126.4, 119.3, 118.6, 117.4。C₁₃H₈Cl₂O₂(M-H) 的 HRESIMS 理论值为 264.9830, 实测值为 264.9823。正相 HPLC 保留时间:12.5 分钟。反向 HPLC 保留时间:14.4 分钟。>99% 纯。

[0169] 2', 4' - 二氯联苯-2- 甲酸 (47)。¹H NMR(DMSO-d₆, 400MHz) δ 7.75(br s, 1H), 7.56(s, 2H), 7.48(m, 2H), 7.36(m, 2H)。¹³C NMR(DMSO-d₆, 100MHz) δ 170.1, 152.5, 145.2, 133.3, 130.0, 129.6, 128.0, 127.2, 126.3。C₁₃H₈Cl₂O₂(M-H) 的 HRESIMS 理论值为 264.9823, 实测值为 264.9834。正相 HPLC 保留时间:11.4 分钟。反向 HPLC 保留时间:13.6 分钟。>99% 纯。

[0170] 按照流程 8 制备化合物 48-53。将联苯醛 (1.0 当量) 溶解于足量 MeOH 中, 获得浓度为 0.1M 的溶液, 向其中加入 NaBH₄ (2.0 当量) 溶于足量 MeOH 所获得的 0.3M 浓度硼氢化物溶液。于 0℃ 搅拌反应物, 缓慢升温至室温, 搅拌 16 小时后, 真空浓缩, 通过快速层析 (3:1 己烷:乙酸乙酯) 纯化, 获得为白色固体的联苯醇, 收率为 94-100%。

[0171] 3', 5' - 二氯联苯-3- 基- 甲醇 (48)。¹H NMR(CDCl₃, 400MHz) δ 7.54(m, 1H), 7.46(d, 2H, J = 1.8Hz), 7.45(m, 2H), 7.39(m, 1H), 7.34(t, 1H, J = 1.9Hz), 4.77(s, 2H), 1.90(br s, 1H)。¹³C NMR(CDCl₃, 100MHz) δ 144.1, 141.9, 139.0, 135.5, 129.5, 127.4, 127.1, 126.5, 125.8, 125.7, 65.3。C₁₃H₁₀Cl₂O(M+) 的 HREIMS 理论值为 252.0103, 实测值为 252.0109。正相 HPLC 保留时间:13.9 分钟。反向 HPLC 保留时间:14.0 分钟。>99% 纯。

[0172] 3', 5' - 二氯联苯-4- 基- 甲醇 (49)。¹H NMR(CDCl₃, 400MHz) δ 7.53(AA' XX' ,

2H, $J_{AA'} = 1.9\text{Hz}$, $J_{XX'} = 3.1\text{Hz}$, $J_{XA} = 8.7\text{Hz}$, $J_{X'A'} = 6.4\text{Hz}$, $J_{X'A} = J_{XA'} = 0.5\text{Hz}$, $\nu_A = \nu_{A'} = 3009.8\text{Hz}$, $\nu_X = \nu_{X'} = 2977.8\text{Hz}$), 7.45(AA' XX', 2H, 同上), 7.45(d, 2H, $J = 1.9\text{Hz}$), 7.33(t, 1H, $J = 1.9\text{Hz}$), 4.75(br d, 2H, $J = 4.8\text{Hz}$), 1.81(br t, 1H, $J = 5.2\text{Hz}$)。 ^{13}C NMR(CDCl_3 , 100MHz) δ 144.0, 141.4, 138.0, 135.5, 127.8, 127.4, 127.4, 125.8, 65.1。 $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{O}(\text{M}^+)$ 的 HREIMS 理论值为 251.0110, 实测值为 252.0109。正相 HPLC 保留时间: 15.4 分钟。反向 HPLC 保留时间: 14.0 分钟。>97% 纯。

[0173] 3', 5'-二氯联苯-2-基-甲醇 (50)。 ^1H NMR(CDCl_3 , 400MHz) δ 7.55(dd, 1H, $J = 7.5, 1.3\text{Hz}$), 7.43(td, 2H, $J = 7.5, 1.4\text{Hz}$), 7.38(m, 2H), 7.29(d, 2H, $J = 1.9\text{Hz}$), 7.24(dd, 1H, $J = 7.4, 1.4\text{Hz}$), 4.58(s, 2H), 1.79(s, 1H)。 ^{13}C NMR(CDCl_3 , 100MHz) δ 143.7, 138.9, 137.9, 134.9, 130.0, 129.0, 128.9, 128.2, 127.9, 127.6, 63.0。 $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{O}(\text{M}^+)$ 的 HREIMS 理论值为 252.0110, 实测值为 252.0109。正相 HPLC 保留时间: 11.5 分钟。反向 HPLC 保留时间: 14.0 分钟。>99% 纯。

[0174] 按照流程 9 制备化合物 54 和 55。将合适的碘苯甲醛 (1.0 当量) 溶解于足量甲苯中, 获得浓度为 0.07M 的溶液, 向其中加入 3,5-二氟苯基硼酸 (2.0 当量) 溶解于足量 EtOH 所获得的 1.0M 浓度硼酸溶液。加入 2M Na_2CO_3 水溶液, 使碘苯甲醛的终反应浓度为 0.04M, 接着加入 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (4.0mol%)。将反应物在于 60℃ 搅拌 17 小时, 一结束就冷却至室温, 用 CH_2Cl_2 (2×) 提取, 用盐水 (1×) 洗涤, 经 MgSO_4 干燥, 并真空浓缩。残余物通过快速层析 (10:1 己烷: 乙酸乙酯) 纯化, 获得为白色固体的联苯醛, 收率为 78-80%。

[0175] 3', 5'-二氟-3-甲酰基联苯 (54)。 ^1H NMR(CDCl_3 , 400MHz) δ 10.06(s, 1H), 8.02(t, 1H, $J = 1.4\text{Hz}$), 7.88(dt, 1H, $J = 7.8, 1.4\text{Hz}$), 7.78(ddd, 2H, $J = 7.8, 2.0, 1.2\text{Hz}$), 7.61(t, 2H, $J = 7.7$), 7.10(m, 2H), 6.80(tt, 1H, $J = 8.8, 2.3\text{Hz}$)。 ^{13}C NMR(CDCl_3 , 100MHz) δ 192.0, 164.8, 162.3, 143.0, 139.8, 137.1, 132.9, 129.9, 127.9, 110.4, 103.5。 $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}(\text{M}+\text{H})$ 的 HRFABMS 理论值为 219.0620, 实测值为 219.0621。正相 HPLC 保留时间: 8.9 分钟。反向 HPLC 保留时间: 13.7 分钟。>99% 纯。

[0176] 3', 5'-二氟-4-甲酰基联苯 (55)。 ^1H NMR(CDCl_3 , 400MHz) δ 9.98(s, 1H), 8.02(dd, 1H, $J = 7.8, 1.5\text{Hz}$), 7.65(td, 1H, $J = 7.3, 1.4\text{Hz}$), 7.54(t, 1H, $J = 7.8\text{Hz}$), 7.40(dd, 1H, $J = 7.6, 1.2\text{Hz}$), 6.90(m, 3H)。 ^{13}C NMR(CDCl_3 , 100MHz) δ 191.5, 164.1, 161.6, 143.4, 141.3, 134.0, 133.7, 130.6, 129.0, 128.3, 113.3, 103.8。 $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}(\text{M}+\text{H})$ 的 HRFABMS 理论值为 219.0620, 实测值为 219.0621。正相 HPLC 保留时间: 7.0 分钟。反向 HPLC 保留时间: 13.4 分钟。>99% 纯。

[0177] 可以使用多种体外实验评价所述化合物稳定甲状腺素运载蛋白四聚体或防止纤维形成的能力。所述实验可包括纤维形成测定、血浆选择性测定、甲状腺素运载蛋白: 化合物复合物三维结构测定 (例如通过 X-射线晶体学)、甲状腺素运载蛋白四聚体解离或纤维形成的动力学, 以及通过例如离心或热量测定法测定甲状腺素运载蛋白: 化合物相互作用的化学计量和能量学。以下给出了代表性体外测定的详述。

[0178] 每种化合物都进行滞止纤维形成测定。化合物经 P_2O_5 干燥过夜, 并用 DMSO 溶解至 7.2mM 终浓度, 获得一级原液 (10× 原液)。用 DMSO 将一级原液稀释 5 倍, 至终浓度为 1.44mM, 获得二级原液 (2× 原液)。在抑制剂 (1.44mM) 存在时如下检测 TTR (3.6 μM) 的酸介导淀粉样蛋白变性: 向一次性 UV 比色皿中加入 495 μL 的 0.4mg/mL 野生型 TTR 蛋白

的 10mM 磷酸钠、100mM KCl 和 1mM EDTA 溶液 (pH7.6), 以及 5 μ L 的 1.44mM 抑制剂 DMSO 溶液的二级原液 (2 $\times$ 原液)。涡旋混合物, 并温育 30 分钟 (25 $^{\circ}$ C), 此时用 500 μ L 的 200mM 乙酸、100mM KCl 和 1mM EDTA 溶液 (pH4.2) 将 pH 降低至 4.4。涡旋最终的 1mL 溶液, 在不搅拌的情况下于 37 $^{\circ}$ C 温育 72 小时。72 小时后, 涡旋比色皿以悬浮存在的任何纤维, 使用 UV- 可见分光光度计于 350 和 400nm 检测悬浮液的浊度。观测的每个 TTR 加抑制剂样品的浊度比上以同样方式制备的无抑制剂样品的浊度, 乘以 100, 得到纤维形成的百分率。使用 1 $\times$ 二级原液如上进行使用等摩尔抑制剂和 TTR 浓度 (3.6 μ M) 的纤维形成测定。用 DMSO 将 7.2mM 10 $\times$ 一级原液稀释 10 倍至终浓度为 0.72mM, 制备 1 $\times$ 原液, 将其用于如上所述的纤维形成测定。所有测定都平行进行三次, 使用野生型 TTR 测定全部化合物。通过测定无野生型 TTR 时溶液的浊度, 发现所有化合物在整个实验过程中都是可溶的, 确保了浊度由 TTR 淀粉样蛋白形成所产生。

[0179] 通过抗体捕获/HPLC法评价潜在抑制剂在血浆中结合 TTR 的化学计量。在评价时, 将 1.0mL 人血浆和 7.5 μ L 抑制剂的 1.44mM DMSO 溶液装入 1.5mL Eppendorf 管中。溶液于 37 $^{\circ}$ C 温育并温和震荡 24 小时。将猝灭琼脂糖的 1:1 凝胶:TSA (Tris 盐水) 浆 (125 μ L) 加入溶液中, 于 4 $^{\circ}$ C 温和震荡 1 小时。将溶液离心 (16,000 $\times$ g), 将上清液分为 400 μ L 两等份, 然后将其加入不同的 200 μ L 抗-TTR 抗体缀合琼脂糖的 1:1 凝胶:TSA 浆样品中。溶液于 4 $^{\circ}$ C 温和震荡 20 分钟, 离心 (16,000 $\times$ g), 去除上清液。用 1mL TSA/0.05% 皂苷于 4 $^{\circ}$ C 洗涤凝胶 (3 $\times$, 各 10 分钟), 接着用 1mL TSA 于 4 $^{\circ}$ C 洗涤凝胶 (2 $\times$, 各 10 分钟)。样品离心 (16,000 $\times$ g), 去除最终的洗涤液, 加入 155 μ L 的 100mM 三乙胺 (pH11.5), 将 TTR 和结合的抑制剂由抗体上洗脱下来。于 4 $^{\circ}$ C 温和震荡 30 分钟后, 离心 (16,000 $\times$ g) 洗脱的样品, 取出 145 μ L 含 TTR 和抑制剂的上清液。然后通过先前描述的反相 HPLC 分析上清液。参见例如 Purkey, H. E.; Dorrell, M. I.; Kelly, J. W. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2001, 98, 5566-71, 该文献通过引用整体结合到本文中。

[0180] 以悬滴法用 2M 硫酸铵平衡 7mg/mL 蛋白溶液 (其 100mM KCl、1mM EDTA、10mM 磷酸钠, pH7.0, 0.35-0.50M 硫酸铵的溶液), 由蛋白溶液获得野生型 TTR 晶体。用 10 倍摩尔的过量配体浸泡晶体 3 周以上, 制备 TTR-配体复合物。联合使用 CCD-PXL-L600 检测器 (Bruker instruments) 和 RU200 旋转式阳极 X-射线发生器收集 20 或 26 浸泡晶体的数据。使用 14-BM-C, BIOCARs, Advance Photon Source 的单色高能源 Quantum-4 检测器收集 1 或 18 浸泡晶体的数据。将晶体置于冷冻保护剂 Paratone 油中并冷却, 以进行衍射实验 (20 和 26 为 120K, 1 和 18 为 100K)。TTR-配体复合物晶体结构和脱辅基晶体 (apo crystal) 为同晶型, 晶胞大小接近 $a=43$ Å, $b=85$ Å 和 $c=66$ Å; 空间群为 $P2_12_12$, 不对称单位含两个单体。使用 DENZO 和 SCALEPACK 简化 1 和 18 的数据集。参见 Otwinowski, Z.; Minor, W. Macromolecular Crystallography, A 部, 载于 Methods in Enzymology; Carter, C. W., Sweet, R. M. 主编, Academic Press: 1997; 276 卷, 307-326 页, 该文献通过引用整体结合到本文中。使用 SAINT 和 PROSCALE (Bruker AXS, Inc.) 简化 20 和 26 的数据集。

[0181] 在利用 EPMR 进行分子置换检索的过程中, 使用蛋白质数据库的 TTR 蛋白原子坐标 (登录号 1BMZ) 作为原型。通过 CNS 的分子力学和能量最小化方案精修 EPMR 的最佳解决方案。获得的差值 Fourier 图揭示, TTR 四聚体的每个结合袋中都有配体结合 (18、20 和 26 的两个构象, 以及 1 的四个构象)。使用这些图谱, 可以清楚定位配体在密度图中的

位置,将其纳入晶体学精修。几轮模拟退火以及随后的位置和温度因子精修后,定位了差值 Fourier 图中水分子的位置。使用根据振动 / 扭曲偏差去除法计算的无偏差加权电子密度图,进行最后一轮图形拟合。所有的配体结合构象都与没有抑制剂时定相的无偏差退火省略图以及振动 / 扭曲无偏差加权图十分一致。利用 Refmac 约束精修法进行最后一轮精修。因为在最终图中没有可解释的电子密度,所以 9 个 N- 端残基和 3 个 C- 端残基没有包括在最终模型中。晶体学分析的总结示于表 2。参见例如 Kissinger, C. R. ;Gehlhaar, D. K. ;Fogel, D. B. *Acta Crystallogr., Sect. D* 1999,55,484-491 ;Brunger, A. T. 等 ; *Acta Crystallogr., Sect. D* 1998,54,905-921 ;Kantardjieff, K. 等 ;*ActaCrystallogr., Sect. D* 2002,58,735-743 ;Bailey, S. *Acta Crystallogr., Sect. D*1994,50,760-763 ;和 Murshudov, G. N. ;Vagin, A. A. ;Dodson, E. J. *Acta Crystallogr., Sect. D* 1997,53, 240-255,这些文献的每一个都通过引用整体结合到本文中。

[0182] 通过相连的尿素中单体解折叠评价 TTR 四聚体解离动力学。远紫外 CD 分光法未检测到缓慢的四聚体解离,但其与如前所述的远紫外 CD 易于检测的快速解折叠步骤(快 500,000 倍)相连。通过向已加入 127.4 μ L 磷酸缓冲液的 69 μ L 野生型 TTR(2.90mg/mL, 10mM 磷酸钠,100mM KCl,1mM EDTA, pH 7.0) 中加入 3.6 μ L 1mM 的目标抑制剂溶液(乙醇溶液),评价随抑制剂(3.6 μ M) 变化的 TTR 四聚体(3.6 μ M) 解离动力学。因为抑制剂浓度(7.2 μ M) 两倍于 TTR 浓度(3.6 μ M),所以将 7.2 μ L 1mM 目标抑制剂溶液(乙醇溶液)加入至已加入 123.8 μ L 磷酸缓冲液的 69 μ L 野生型 TTR(2.90mg/mL, 10mM 磷酸钠,100mM KCl, 1mM EDTA, pH 7.0) 中。将 100 μ L 的目标蛋白-抑制剂溶液加入到 600 μ L 10.3M 尿素和 300 μ L 磷酸缓冲溶液中,产生的最终尿素浓度为 6.5M。涡旋溶液,以如下间隔收集圆二色性光谱:0、5、8、23、46、71、95、118、144 和 168 小时。制备含 7.2 μ L 乙醇而不是抑制剂的对照样品进行对比,并以上文确定的时间点收集光谱。扫描每 0.5nm、平均时间 10 秒收集 220 和 213nm 之间的 CD 光谱。每个波长扫描一次。对 220 和 213nm 之间的振幅值取平均值,以测定整个实验中 β - 折叠的损失程度。

[0183] 通过浊度监测 pH 4.4 时酸介导的纤维形成速率。化合物经 P_2O_5 过夜干燥,并用 DMSO 溶解至终浓度 7.2mM,获得一级原液(10 $\times$ 原液)。用 DMSO 将一级原液稀释 5 倍,至终浓度为 1.44mM,制备二级原液(2 $\times$ 原液)。使用 7.2 μ M 浓度抑制剂和 3.6 μ M TTR(四聚体),如下进行纤维形成测定:向一次性 UV 比色皿中加入 495 μ L 的 0.4mg/mL 野生型 TTR 蛋白的 10mM 磷酸钠、100mM KCl 和 1mM EDTA 溶液(pH 7.6),以及 5 μ L 的 1.44mM 二级抑制剂原液(2 $\times$ 原液)。涡旋混合物,并温育 30 分钟(25 $^{\circ}$ C)。30 分钟后,用 500 μ L 的 200mM 乙酸、100mM KCl、1mM EDTA(pH 4.2) 将 pH 降至 4.4。涡旋最终的 1mL 溶液,并于 37 $^{\circ}$ C 不搅拌温育。涡旋溶液,检测 350 和 400nm 的浊度。酸化后以如下间隔收集 UV 光谱:0、4、8、24、48、72、96、120、144、168 和 192 小时。制备含 5 μ L DMSO 的对照样品进行对比,并以上述时间点收集光谱。每种抑制剂溶液都制备成 10 个的组,以防止读数前存在比色皿干扰。获得 UV 吸光度后,废弃对应于该时间点的比色皿。使用 1 $\times$ 二级抑制剂原液如上所述进行使用等摩尔(3.6 μ M) 浓度 TTR 和抑制剂的纤维形成测定,所述 1 $\times$ 二级抑制剂原液制备方法如下:用 DMSO 将 7.2mM 10 $\times$ 一级原液稀释 10 倍至终浓度为 0.72mM,将其用于上述纤维形成测定。结果发现所有化合物在整个实验过程中都是可溶的,确保了浊度由 TTR 淀粉样蛋白形成所产生。

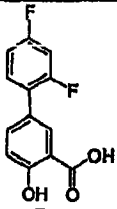
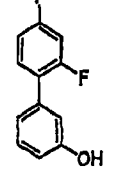
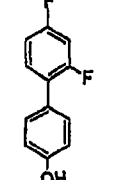
[0184] 分析存在抑制剂的情况下 pH4.4 时的 TTR 四级结构。在 $3.6\ \mu\text{M}$ 或 $7.2\ \mu\text{M}$ 抑制剂存在时,在滞止纤维形成测定条件下,将蛋白 ($3.6\ \mu\text{M}$) 温育 72 小时,评价 18 和 20 稳定 TTR 的机制。72 小时后,离心 ($14,000\times g$) 样品,从测定中形成的任何固体去除上清液。用 BeckmanXL-I 分析型超速离心机进行平衡和速度超速离心分析。如前述进行数据的获取和分析。参见例如 Lashuel, H. A. ;Lai, Z. ;Kelly, J. W. *Biochemistry* 1998, 37, 17851-64 ;和 Lashuel, H. A. 等 ;*Biochemistry*1999, 38, 13560-73, 这些文献的每一个都通过引用整体结合到本文中。

[0185] 使用 Microcal instrument (Microcal Inc., Northampton, MD), 通过等温滴定量热法, 测定为 18 和 20 与野生型 TTR 结合的特征的解离常数。制备抑制剂溶液 ($300\ \mu\text{M}$ 或 $500\ \mu\text{M}$ 的 25mM tris 缓冲液, 100mM KCl, 1mM EDTA, 12% EtOH, pH 8.0), 并滴定入含野生型 TTR ($15\ \mu\text{M}$ 或 $25\ \mu\text{M}$ 的 25mM tris 缓冲液, 100mM KCl, 1mM EDTA, 12% EtOH, pH 8.0) 的 ITC 池中。首先注射 $2.5\ \mu\text{L}$, 接着以每次 $5.0\ \mu\text{L}$ 注射 50 次 (25°C)。扣除本底后对温谱图积分, 获得结合等温线, 其与具有负协同性的两个连续结合位点模型拟合得最好。使用 Microcal 提供的 ORIGIN 2.9 版的 ITC 数据分析模块, 利用具有四个可调节参数 (即 K_1 、 ΔH_1 、 K_2 、 ΔH_2) 的非线性最小二乘法拟合数据。

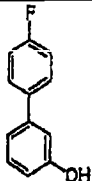
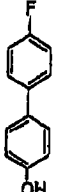
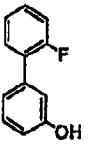
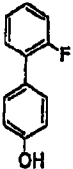
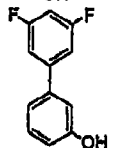
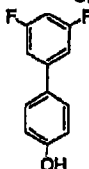
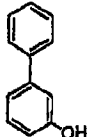
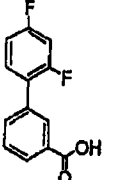
[0186] 使用浊度测定评价为 TTR 淀粉样蛋白纤维化抑制剂的所述化合物。通过酸化用抑制剂预温育 (25°C , 30 分钟) 的 TTR, 使用加入后将 pH 跳至最终值 4.4 的缓冲液, 开始野生型 TTR 淀粉样变性。每种混合物温育 72 小时 (37°C) 后, 使用 UV- 可见分光光度计检测 350 和 400nm 的浊度。将无抑制剂时的野生型 TTR 淀粉样变性指定为 100% 纤维形成, 所有的淀粉样蛋白纤维形成数据都对此值归一化。因此, 5% 纤维形成相当于 72 小时后化合物抑制野生型 TTR 纤维形成达 95%。首先对 $3.6\ \mu\text{M}$ 浓度 TTR 四聚体评价 $7.2\ \mu\text{M}$ 浓度的每种潜在抑制剂。以等于 TTR 浓度 ($3.6\ \mu\text{M}$) 的浓度再评价使纤维形成低于 15% 的化合物, 以选择高效抑制剂。在这些条件下纤维形成低于 40% 表征为极好抑制剂, 而 40-70% 抑制表示为适中化合物。纤维形成数据示于表 1。

[0187] 表 1 : 化合物对纤维形成的作用

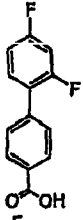
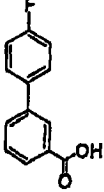
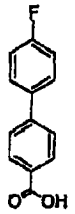
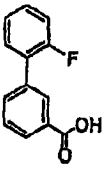
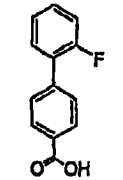
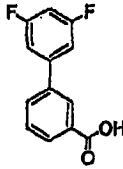
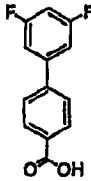
[0188]

化合物编号	结构	%纤维形成 (3.6 μ M 抑制剂)	%纤维形成 (7.2 μ M 抑制剂)	血浆选择性 (等量结合)
二氟尼柳 (1)		37.0	3.4	0.13 $\pm$ 0.02
2			31.5	
3			32.4	

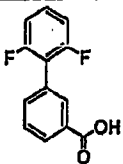
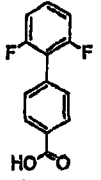
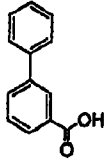
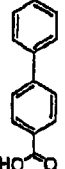
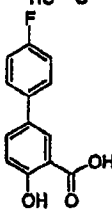
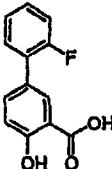
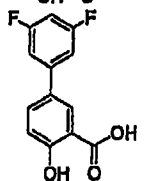
[0189]

化合物编号	结构	%纤维形成 (3.6 μ M 抑制剂)	%纤维形成 (7.2 μ M 抑制剂)	血浆选择性 (等量结合)
4			46.3	
5			53.1	
6			19.5	
7			19.6	
8		40.9	10.2	0.18 $\pm$ 0.05
9			16.4	
10			61.2	
11		39.4	9.1	未检测到

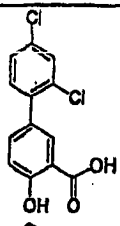
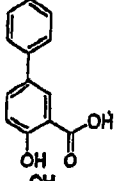
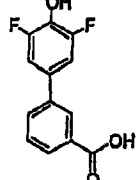
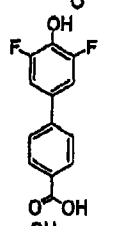
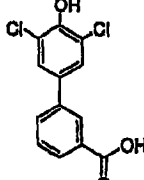
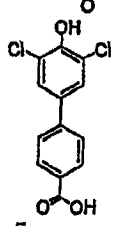
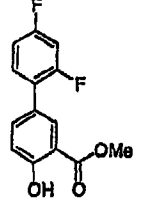
[0190]

化合物编号	结构	%纤维形成 (3.6 μ M 抑制剂)	%纤维形成 (7.2 μ M 抑制剂)	血浆选择性 (等量结合)
12		32.6	2.6	0.20 $\pm$ 0.05
13			15.7	
14			13.3	
15		39.4	9.8	未观测到
16		32.4	4.8	0.08 $\pm$ 0.00
17		35.7	5.6	0.23 $\pm$ 0.00
18		35.7	3.7	1.27 $\pm$ 0.12

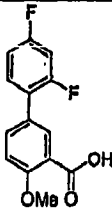
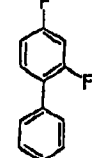
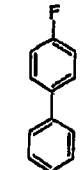
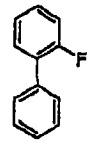
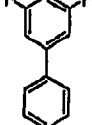
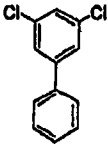
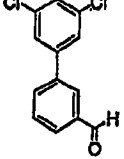
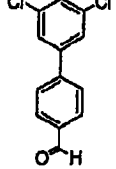
[0191]

化合物编号	结构	%纤维形成 (3.6 μ M 抑制剂)	%纤维形成 (7.2 μ M 抑制剂)	血浆选择性 (等量结合)
19		35.1	6.7	0.29 $\pm$ 0.12
20		28.5	4.5	0.50 $\pm$ 0.05
21			30.8	
22		51.5	14.3	0.08 $\pm$ 0.01
23		38.7	2.6	0.09 $\pm$ 0.00
24		38.7	2.5	0.07 $\pm$ 0.02
25		35.5	1.0	未观测到

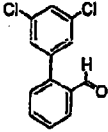
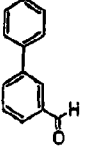
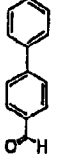
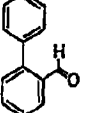
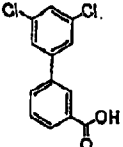
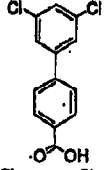
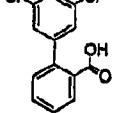
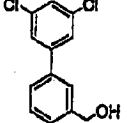
[0192]

化合物编号	结构	%纤维形成 (3.6 μ M 抑制剂)	%纤维形成 (7.2 μ M 抑制剂)	血浆选择性 (等量结合)
26		29.9	3.6	0.27 ± 0.02
27		47.4	15.4	未观测到
28		38.5	3.5	未观测到
29		31.7	3.4	0.07 ± 0.02
30		25.5	4.4	0.12 ± 0.02
31		25.8	3.8	0.26 ± 0.04
32			69.9	

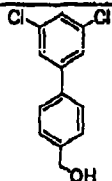
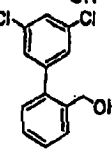
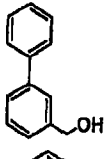
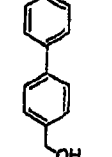
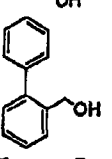
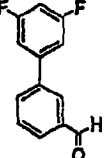
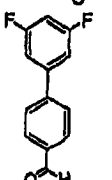
[0193]

化合物编号	结构	%纤维形成 (3.6 μ M 抑制剂)	%纤维形成 (7.2 μ M 抑制剂)	血浆选择性 (等量结合)
33			38.5	
34			100.0	
35			100.0	
36			99.4	
37			100.0	
38			52.2	
39		30.6	4.4	1.30 $\pm$ 0.15
40			25.4	

[0194]

化合物编号	结构	%纤维形成 (3.6 μ M 抑制剂)	%纤维形成 (7.2 μ M 抑制剂)	血浆选择性 (等量结合)
41		34.5	7.1	1.96 $\pm$ 0.11
42			35.4	
43			93.5	
44			72.5	
45		32.7	3.0	0.80 $\pm$ 0.08
46		41.2	4.9	1.56 $\pm$ 0.01
47			45.4	
48		30.0	3.3	0.89 $\pm$ 0.09

[0195]

化合物编号	结构	%纤维形成 (3.6 μ M 抑制剂)	%纤维形成 (7.2 μ M 抑制剂)	血浆选择性 (等量结合)
49		38.9	5.9	0.54 $\pm$ 0.10
50		33.6	7.7	未观测到
51			85.5	
52			100.0	
53			81.0	
54			64.3	
55			69.6	

[0196] 根据化合物 2-55 的抑制剂效力数据,似乎与二卤代官能化疏水环直接连接的羧基取代亲水环足以获得极佳的活性(表 1)。酚取代基代替羧基(2-10)变成活性低得多的抑制剂,远次于母体化合物 1。在疏水环的邻位或间位具有卤素的抑制剂优于没有卤素或具有单一对位卤素的化合物。这提示对位卤素不以与间位和邻位卤代联芳化合物相同的方式填补 HBP。完全去除所有卤素得到的抑制剂极差,估计是没有立体互补来填充卤素结合袋(例如化合物 10、21-22、27、42-44 和 51-53)。在测试条件下,最好的酚化合物(8)劣于在亲水环上同时具有酚和羧基官能团的 1。以单羧基稳定的联芳化合物(例如 11-22)可能是极佳的淀粉样蛋白纤维化抑制剂,例如化合物 11、12、15-20。这些化合物与二氟尼柳竞争抑制,那些仅含有对位卤素的化合物(例如化合物 13 和 14)是例外。间位或对位取代的芳基羧酸可能足以赋予极佳的抑制特性,提示 1 的羟基取代基不是良好抑制剂活性所必须的。另外,对位羧基定位似乎产生更好的抑制剂,表明对位羧基能更好地利用与 Lys 15 和

15' 的 ϵ -氨基之间的静电作用（正向结合模式），如 20 的情况，或者能更好地利用与 Ser 117 和 117' 羟基的氢键键合作用（反向结合模式），如 18 的情况。疏水环由卤素在对位以外的位置取代且亲水环具有间位和（特别是）对位羧基的联芳化合物是高效的 TTR 淀粉样蛋白纤维形成抑制剂。

[0197] 向含羧基取代基的环加入羟基取代基（水杨酸取代，例如 23-27）也可以获得类似于二氟尼柳的高活性抑制剂。对于具有水杨酸核的联芳化合物，卤素的确切位置似乎不是和之前的情况一样至关重要，提示此环对结合能的贡献不成比例。对位羟基可能参与和 Lys 15 和 15' 的 ϵ -氨基（正向结合模式）或 Ser 117 和 117' 羟基（反向结合模式）的氢键键合。氯取代 1 中的氟（26）可获得活性相等或更好的抑制剂，而完全去除卤素（27）可获得适中的抑制剂。应当指出的是，27 在体外仅略优于对位羧酸 22，而它们两个都优于在间位具有羧基的无卤素抑制剂 21 和含羟基类似物 10。

[0198] 在含卤素环上包含 3', 5' - 二卤代 -4' - 羟基取代基和在对位或间位具有羧基（28-31）可获得类似于二氟尼柳的高抑制剂活性。包含 4-羟基取代基更精确地模拟 TTR 的天然配体甲状腺素。这些抑制剂还可以更精确地模拟甲状腺素激素活性，因此可以作为甲状腺激动剂或拮抗剂，该作用是不需要的。

[0199] 将羧基保护为甲酯或将羟基保护为甲醚（32 和 33）得到的抑制剂劣于 1。结合电荷损失和空间体积增大或许可以解释这些观测结果。去除所有的亲水取代基（例如 34-38）得到的抑制剂极差。仅含间位氯取代基的联芳化合物（例如 38）是适中的抑制剂，提示与含氟联芳化合物（37）相比，氯增强卤素结合袋中的接触。

[0200] 合成几种含氯抑制剂，评价其 TTR 纤维化抑制活性。当此类抑制剂成员在间位或对位含有羧基（例如 45 和 46）时，它们可具有高活性，而具有邻位羧基的成员（例如 47）可能是较差的抑制剂。此观察结果提示邻位羧基可能离 Lys 15 和 15' ϵ -氨基太远，以至于不能产生良好的静电作用（正向结合模式），或者离 Ser 117 和 117' 羟基太远，以至于不能进行氢键键合作用（反向结合模式）。苄醇 48-50 令人惊奇地证实为极佳的纤维形成抑制剂。一个环上的间位二氯取代似乎由邻位、间位或对位的苄醇官能团补偿，潜在的原因是氢键键合或水介导的氢键键合。一系列 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 基团由醛官能团取代的醛类似物（39-41）显示出良好的抑制性，对位醛 41 是例外，这可能是由于醛水合为偕二醇的作用。醛、苄醇和羧酸可能经不同机制结合在所述袋。但是，在没有结构信息时，不能排除相似的结合模式。醛也有可能通过半缩醛共价结合 Ser 117(117') 或通过亚胺键共价结合 Lys 15(15')。在醛化合物情况下由氟取代氯（54 和 55）获得的抑制剂相当差（39 和 41）。如前所述，完全去除卤素获得的抑制剂活性较差（42 和 44），只有间位醛 43 具有适中活性是个例外。此适中活性可能源自高度的水合作用。令人惊奇的是，3', 5' - 二氟 - 间位醛（54）劣于没有卤素的醛（42）。

[0201] 对于以和 TTR (3.6 μM) 相等的浓度保持 TTR 纤维形成低于 50% 的抑制剂，进一步评价其选择结合 TTR 超过血浆中所有其它蛋白的能力。血液中的二氟尼柳在单剂 500mg 后 20 小时可超过 30 μM ，或者在相同剂量后 4 小时可超过 300 μM 。尽管此高水平的持续血浆浓度提示极佳的生物利用度，但选择性更强的抑制剂将容许更低的剂量和潜在更少的副作用；因此，将此抑制剂的亚类以 10.8 μM 终浓度（人血浆中的平均 TTR 浓度大约为 5 μM ）与人血浆温育。然后使用树脂结合抗体捕获 TTR，用 TSA(tris 盐水)/0.05% 皂苷溶液洗涤固

定化的 TTR 三次,接着用 TSA 洗涤两次。用 100mM 三乙胺 (pH 11.5) 将 TTR- 抑制剂复合物由树脂上释放下来,通过反向 HPLC 分析测定存在的抑制剂对 TTR 的化学计量。每个 TTR 四聚体最大可结合 2 当量抑制剂。表 1 总结了洗涤后的血浆结合化学计量,结果显示下限源自与洗涤相关的损失。

[0202] 含氯联苯化合物在人血浆中可选择性结合 TTR(平均化学计量为 0.8,理论最大化学计量为 2.0,参见表 1)。观测到的所有测试抑制剂的平均化学计量为 0.4。在含氟抑制剂中,18 和 20 分别表现出非常好和可接受的 TTR 结合选择性,优于相似条件下 1 所显示的 0.13 化学计量。表 1 报告的化学计量值可代表下限,原因是 TTR 螯合在多克隆抗体树脂上时抑制剂的洗涤相关损失。39 和 41 的 TTR 结合选择性结果应当慎重考虑,因为如上所述这些化合物可能共价连接至 TTR。

[0203] 这些抑制剂在体外表现出极佳的 TTR 淀粉样蛋白纤维抑制数据,还表现出较差的血浆选择性,它们可能优先结合白蛋白中的药物结合位点和 / 或血浆中存在的其它蛋白中的相似位点。这样的抑制剂未必能够在类似于血浆或 CSF 的复杂环境中防止 TTR 错折叠和淀粉样变性。

[0204] 通过用 10 倍摩尔过量抑制剂浸泡 TTR 晶体三周以上,获得结合 TTR 的 1 及其三种类似物 26、18 和 20 的高分辨率 X 射线共晶体结构。表 2 概述了晶体学统计数据。

[0205] 表 2 :晶体学统计数据

[0206]

数据收集	TTR•1	TTR•18	TTR•20	TTR•26
分辨率(Å)	35.58-1.85	42.18-1.54	64.5-1.7	51.30-1.7
单反射数量(No of unique reflection)	20,478	33,741	25,634	25,486
完整度 (%) (整体 / 外 壳)	98.4/99.0	95.0/98.0	98.0/99.0	99.0/98.0
R _{sym} (整体/外壳)	0.09/0.31	0.03/0.32	0.08/0.39	0.07/0.40
精修				
分辨率(Å)	35.58-1.85	42.18-1.54	64.5-1.7	51.30-1.7
R-因子/R-free (%)	21.2/23.6	22.2/24.5	22.5/24.0	21.5/24.2
Rmsd 键长(Å)	0.03	0.06	0.02	0.02
Rmsd 键角(°)	2.3	2.7	1.9	1.9

[0207] 二氟尼柳 (1) 以正向和反向两种方式结合 TTR。在 TTR 的每个激素结合位点中都发现二氟尼柳的四个不同结合构象具有大致相同的占有率—正向和反向结合方式各自都具有两种对称等价结合方式。二氟尼柳的联苯体系变得远离激素结合袋的中心,并占据两个不同位置,在 TTR 的激素结合袋形成电子密度的“V”型锥体。这种结合模式同时增强了抑制剂和由 Leu 17、Ala 108、Leu 110、Thr 119 和 Val 121 形成的 TTR 疏水袋之间的疏水

作用和范德华作用。羧基和内部结合袋中的 Thr 119 侧链氧以及 Ala 108 主链氧之间的氢键作用增进了二氟尼柳的反向结合模式。令人惊奇的是, Ser 117 既没有参与多个构象, 也没有与抑制剂形成任何静电作用。在反向结合模式中, 二氟尼柳的一个氟取代基在 Thr 119 侧链氧的氢键键合距离之内 (3.3 Å)。在外部结合袋中, Lys 15' 侧链原子的电子密度仅在低 Σ 水平可见, 表明其可能在一个以上的构象中。Lys 15 残基的最可能构象被建模在正向结合模式中二氟尼柳羧基的氢键键合距离内。

[0208] 化合物 20 以正向结合模式结合 TTR, 羧基取代的亲水环朝向外部结合袋, 以和 Lys 15 和 15' 产生静电作用。氟化芳环位于内部结合袋中, 其中卤素位于 HBP 2 和 2'。令人感兴趣的是, 对两个结合位点的严格检查表明联苯环方向存在显著差异。苯环平面之间的夹角由一个结合部位的 32.6 度变至另一个结合部位的 63.8 度。该观测结果可能是 20 和 TTR 负协同结合的结果。

[0209] 化合物 18 以反向模式结合 TTR, 羧基取代的亲水芳环朝向内部结合袋, 在 Ser 117 和 Ser 117' 的氢键键合距离之内。芳环相互之间旋转 34 度, 以利用和 Leu 17、Ala 108、Val 121 和 Thr 119 的疏水作用。氟位于卤素结合袋 1 和 1' 中。预期反向结合模式不是如此, 而是羧基位于外部结合袋中, 以利用与 Lys 15 和 15' 的静电作用, 氟螯合至卤素结合袋 2 和 2' 中。但是, 反向结合模式并不是完全出乎意料, 先前观测到双氯芬酸 (联芳胺) 和几个双氯芬酸类似物就是如此。

[0210] 二氟尼柳中氯代替氟导致 26 与 TTR 结合的显著差异。化合物 26 以反向结合模式结合 TTR, 羧基取代的芳环朝向内部结合袋, 而氯螯合至卤素结合袋 2 和 2' 中。同 18 和 20 一样, 化合物 26 也占据激素结合袋的中心。TTR 原体的残基 Ala 108、Lys 15、Leu 17、Leu 110、Lys 17 和 Thr 119 与抑制剂形成范德华作用和疏水作用。在内部结合袋中, Ser 117 的侧链以两种构象存在, 以和 26 的羧基取代基以及其它单体的 Ser 117 作用。26 的同一个羧基氧也与 Ser 117 的主链氧形成氢键。26 的另一个羧基氧与 Ala 108 的主链氧形成氢键。与二氟尼柳相反, Thr 119 残基背向抑制剂, 对结合袋的疏水性而不是与抑制剂的氢键键合起作用。

[0211] 为进一步探究这些抑制剂的作用机制, 评价其稳定 TTR 抗随时间变化的尿素诱导解离的能力。将四聚体解离速率与不可逆地、快速、易于监测、使用单体能再折叠浓度以上尿素浓度的单体解折叠相关联。在 6.5M 尿素中以远紫外 -CD 探测解折叠监测的解离, 结果表明酸介导淀粉样变性的所有优秀抑制剂都以剂量依赖方式减慢四聚体解离速率 (图 2A 和 2B)。某些抑制剂, 包括 20、46 和 48, 显示出对淀粉样变性的限速步骤 TTR 四聚体解离的巨大作用。参见例如 Hammarstrom, P. 等; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002, 25, 16427-32, 该文献通过引用整体结合到本文中。

[0212] 因为猜想这些化合物抑制 TTR 纤维形成的模式是通过基态稳定化剂量依赖性地调整四聚体解离屏障, 所以最好的抑制剂应当将四聚体解离减慢得最多。以最终 pH4.4 时的浊度监测 192 小时内纤维形成的速率。参见图 3A、3B、4A 和 4B。在低 pH 能够稳定四聚体 TTR 的抑制剂防止四聚体解离、错折叠和错组装成淀粉样蛋白。最好的淀粉样蛋白纤维形成抑制剂将四聚体解离减慢得最多 (图 2A 和 2B)。但是, 关联不完全, 因为某些抑制剂在尿素中比在酸性条件下结合得更好, 反之亦然。

[0213] 为确保抑制剂稳定四聚体形式的 TTR (3.6 μ M), 用平衡和速度分析性超速离心研

究探测 TTR 的四级结构。测定与 18 和 20 ($3.6 \mu\text{M}$ 或 $7.2 \mu\text{M}$) 于 pH 4.4 温育 72 小时后的蛋白四级结构。在平衡 AUC 以及速度研究中, $3.6 \mu\text{M}$ 和 $7.2 \mu\text{M}$ 抑制剂浓度时四聚体都是主导形式。

[0214] 使用等温滴定量热法 (ITC) 测定 18 和 20 与 TTR 在 pH 8.0 (25°C) 时的结合常数。二氟尼柳和两种类似物负协同性结合 TTR, 这是许多其它配体表现出的特征。对于二氟尼柳和 20, 第一个部位的结合比第二个部位的结合强 15 倍。联芳化合物 18 的 K_{d1} 大约比 K_{d2} 低 120 倍 (表 3)。表 3 概述了通过 ITC 测定的 1、18 和 20 与野生型 TTR 结合的第一和第二解离常数。1 的结合常数先前已报道, 本文提供其是为了进行对比。参见实施例 1。

[0215] 表 3: 化合物结合野生型 TTR 的解离常数

[0216]

抑制剂	K_{d1}	K_{d2}
1	75 nm	1100 nm
18	9 nm	1100 nm
20	80 nm	1300 nm

[0218] 四聚体野生型 TTR 解离的 $t_{1/2}$ 为 42 小时, 解折叠快 500,000 倍。因此, 通过与在 6.5M 尿素中的不可逆解折叠相关联, 可探测其解离速率。因为四聚体解离是淀粉样蛋白变性的限速步骤, 所以如果推测的通过选择性结合天然状态而使动力学稳定的作用机制是正确的, 那么所有表现出极佳的体外活性和血浆中的结合化学计量超过 0.50 的抑制剂都应当减慢四聚体解离 (参见图 2A 和 2B)。

[0219] 在 168 小时时程内, 在 6.5M 尿素中, 检测随抑制剂浓度变化的 TTR 四聚体解离速率。选择的抑制剂, 具体地说是 18、20、39、41、45、46、48 和 49, 如振幅变化反映的, 证实在 160 小时内四聚体解离程度相比于无抑制剂的 TTR 全面下降。如时程斜率下降反映的, 抑制剂存在时四聚体解离速率也急剧减慢。抑制剂 20、45、46 和 48 较好, 推测是由于其在尿素中的高结合性而与 $\text{TTR} \cdot \text{I}$ 和 $\text{TTR} \cdot \text{I}_2$ 非常缓慢地解离。基本上对于 20、45、46 和 48 来说, 由于 $\text{TTR} \cdot \text{I}$ 和 $\text{TTR} \cdot \text{I}_2$ 这些复合物的 K_d 低, 所以形成 $\text{TTR} \cdot \text{I}$ 和 $\text{TTR} \cdot \text{I}_2$ 可显著稳定天然状态, 并增加四聚体解离的动力学屏障。即使 16 和 18 结合 TTR, 似乎其亲和性也不足以影响动力学稳定。可能有意义的是, $3.6 \mu\text{M}$ 抑制剂浓度 ($3.6 \mu\text{M}$ 蛋白) 时尿素中抑制剂效力的排列顺序是 $20 \approx 45 > 46 \approx 48$, 这与 $7.2 \mu\text{M}$ 抑制剂浓度不同 ($20 \approx 46 > 45 \approx 48$)。这可能反映出尿素中 K_{d2} 值的差异。

[0220] 天然状态的动力学稳定是一种有吸引力的治疗策略, 因为有新证据表明错折叠的寡聚物无论开启还是关闭淀粉样蛋白途径都具有神经毒性。用抑制剂实现动力学稳定可为 SSA、FAP 和 FAC 提供非侵入性治疗。

[0221] 给定抑制剂存在时尿素中的四聚体解离速率未必总能预测出抑制剂在低 pH 时防止淀粉样变性的能力。因为迄今还不清楚人体中的淀粉样蛋白怎样和在哪里形成, 所以在各种变性环境中发挥功能的 TTR 四聚体稳定剂比较理想。在酸性条件下探测随抑制剂浓度变化的 TTR 纤维形成速率 (图 3A、3B、4A 和 4B)。抑制剂 20、45 和 48 在此环境中预期也表现良好。抑制剂 46 作为四聚体抑制剂在尿素中比在酸中更好, 而 1 在酸中比在尿素中好得多。与在给定环境中形成 $\text{TTR} \cdot \text{I}$ 和 $\text{TTR} \cdot \text{I}_2$ 复合物相关的稳定自由能决定了基态稳定程

度和四聚体解离活化自由能的相关增加程度。这些数据提示抑制剂在低 pH 减慢 TTR 淀粉样变性远比它们在 6.5M 尿素中减慢 TTR 四聚体解离有效。这可能是因为淀粉样变性需要在解离后浓度依赖性再组装。更有效的抑制剂可将 TTR 单体淀粉样变性中间体的浓度保持在足够低的水平,以使纤维形成基本无效。正如在抑制剂存在时 TTR 的尿素变性中观察到的一样,低 pH 时抑制剂效力的等级排序明显在 3.6 μ M 抑制剂(图 3A 和 3B)和 7.2 μ M 抑制剂(图 4A 和 4B)浓度中不同。此观测结果可能反映出低 pH 时各种抑制剂 K_{d2} 值的差异。最引人注目的实例是二氟尼柳——由于其 K_{d2} 较高,所以 3.6 μ M 时它是最有效的纤维形成抑制剂之一,但 7.2 μ M 时其是最低效的抑制剂之一。

[0222] 二氟尼柳类似物代表着一类有前途的治疗 TTR 淀粉样变性的化合物。尽管某些双氯芬酸类似物是非常好的纤维形成抑制剂,但二氟尼柳类似物提供了另外一类高效 TTR 四聚体稳定剂。某些双氯芬酸类似物有能力抑制两种 TTR 突变体 -Val30Met 和 Leu55Pro 的解离和错折叠导致的纤维形成。X-射线共晶体结构表明双氯芬酸类似物主要以反向结合模式结合,但是,二氟尼柳类似物结构轻微变化就可以容许正向或反向结合。另外,二氟尼柳能够以正向或反向结合方式结合,两种方式的占有率几乎相等。获得的双氯芬酸解离常数(K_{d1} 为 60nM, K_{d2} 为 1200nM)与获得的二氟尼柳和 20 的解离常数相当,而 18 根据其 K_{d1} 值证实其第一结合要牢固接近 10 倍。另外,两种抑制剂类型都表现出负协同结合。更值得注意的是,某些二氟尼柳类似物对人血浆中 TTR 的选择性很高,具有降低毒性和副作用的潜力。参见 Oza, V. B. 等; J. Med. Chem. 2002, 45, 321-32。

[0223] 合成的 28 种化合物基本可抑制 TTR 淀粉样变性。其中几种显示在人血浆中的结合化学计量超过 0.50 当量。较好抑制剂的氯化物和氟化芳基结构都已在已知药物中发现,因此,有充分理由相信可将这些化合物或其类似物开发成不表现出 1 的 NSAID 活性的药物。氟化化合物 18 和 20 可在 6.5M 尿素中结合并稳定四聚体 TTR,急剧减慢错折叠和淀粉样变性的第一步 TTR 四聚体解离。这些化合物以及其它化合物还急剧减慢酸介导的 TTR 淀粉样变性。在测试的化合物中,18、20、39、41、45、46、48 和 49 在尿素和酸性条件下将 TTR 四聚体稳定得最好。这些联芳化合物似乎通过基态稳定化增加与淀粉样蛋白形成的限速步骤四聚体解离相关的活化障碍。

[0224] 实施例 3:口服给予的二氟尼柳稳定甲状腺素运载蛋白抗变性

[0225] 甲状腺素运载蛋白(TTR)是转运甲状腺素和全视黄醇结合蛋白的同源四聚体蛋白质。在变性条件下,限速性四聚体解离和快速的单体错折叠能够将其错组装成引起老年性系统性淀粉样变性、家族性淀粉样多神经病和家族性淀粉样心肌病的淀粉样蛋白。已知二氟尼柳结合 TTR 中两个未被占据的甲状腺素结合位点中的至少一个,以此稳定 TTR 四聚体,也增加了体外解离活化障碍。研究了使用二氟尼柳治疗 TTR 淀粉样变性的可行性。

[0226] 方法

[0227] 在给出知情同意后招收 30 个健康志愿者(25 个男性,5 个女性)。受试者年龄由 23-53 岁(平均年龄 37.6 ± 8.8),平均体重 78.0 ± 12.1 kg。每个受试者用二氟尼柳(**Dolobid®**)以 125、250 或 500mg 每天两次(每 12 小时)的剂量治疗 7 天(共 13 剂)。在治疗前 1 天和第 8 天、以及摄入二氟尼柳后第 4 和 12 小时采血。该研究设计方案得到 Scripps 临床受试者委员会、Scripps 绿色医院、Scripps 研究所和 Scripps 综合临床研究中心的批准。

[0228] 检测血清二氟尼柳水平。将 100 μ L 血清加入 900 μ L 乙腈中沉淀蛋白质。离心后, 将 100 μ L 上清液加入到 900 μ L 的 100mM 三乙胺水溶液 (pH11.5) 中。过滤后, 将 100 μ L 的各样品注入 Keystone 3 厘米 C18 反相柱, 该柱在 10 分钟内使用 40–100% 梯度的溶液 B (溶液 A : 94.8% 水 / 5% 乙腈 / 0.2% 三氟乙酸 ; 溶液 B : 94.8% 乙腈 / 5% 水 / 0.2% 三氟乙酸), 由 Waters 600E 多元溶剂传送系统操控。用 Waters 486 可调吸光度检测器于 280nm 完成检测, 积分峰, 根据标准曲线获得二氟尼柳浓度。

[0229] 分析二氟尼柳结合人血清中 TTR 的化学计量。将 Sepharose 的 1:1 凝胶 / 10mM Tris • HCl, pH 8.0 / 140mM NaCl / 0.025% NaN₃ (TSA) 浆 (62.5 μ L) 加入到 500 μ L 血清中, 并于 4℃ 温育 1 小时。离心后, 将 400 μ L 上清液加入到 200 μ L 抗 TTR 抗体缀合的 Sepharose 的 1:1 凝胶 / TSA 浆中, 于 4℃ 缓慢摇动 20 分钟。离心后, 于 4℃ 用 1mL TSA / 0.05% 皂苷 (Fisher Scientific) 洗涤凝胶 (两次, 各 10 分钟), 再用 1mL TSA 洗涤 (一次, 10 分钟)。然后加入 155 μ L 的 100mM 三乙胺水溶液 (pH 11.5), 以将 TTR 和结合的二氟尼柳从抗体上洗脱下来。于 4℃ 温和摇动 30 分钟后, 离心样品, 取出 145 μ L 上清液。分离出 135 μ L 注射样品, 并如先前所述进行分析 (Purkey 等, Proc Natl Acad Sci USA 2001 ; 98 : 5566–71)。

[0230] 评价血清 TTR 四聚体对尿素变性的稳定性。10 μ L 血清样品在 90 μ L 含各种浓度尿素的 50mM 磷酸缓冲液 (pH7.0 ; 100mM KCl, 1mM EDTA, 1mM DTT) 中温育 (25℃)。用折射率检查尿素浓度, 以确认按据重量制备的浓度。通过加入 10 μ L 戊二醛 (25%) 实现蛋白的戊二醛交联。交联反应进行 4 分钟, 然后加入 10 μ L NaBH₄ (7% 的 0.1M NaOH 溶液) 猝灭。将样品与 120 μ L SDS 还原性凝胶上样混合物 (SDS 终浓度 = 2.5%) 混合, 并煮沸 5 分钟。使用 12% SDS-PAGE 分离样品, 使用抗 -TTR 抗血清通过免疫印迹分析凝胶 (Purkey 等, 同上)。

[0231] 评价血清 TTR 四聚体对酸变性的稳定性。10 μ L 血清样品与 90 μ L 的 100mM 酸性缓冲液温育 (37℃)。当最终 pH 要求 $\leq$ 3.8 时使用柠檬酸缓冲液 ; 评价时的 pH 范围为 4.2–5.4 时使用乙酸缓冲液。交联后, 如上所述通过 SDS-PAGE 和免疫印迹分析样品。

[0232] 用含 TTR 和氨苄青霉素抗性基因的 pmmH α 质粒转化 BL21/DE3 Epicurian gold 大肠杆菌 (Stratagene), 以该菌株表达重组野生型 TTR 和变异体。如前所述 (Lashuel 等, Biochemistry 1999 ; 38 : 13560–73) 进行表达和纯化。

[0233] 用圆二色性光谱法检测 TTR 四聚体的解离速率。使用重组 TTR (3.6 μ M) 样品的 6.5M 尿素溶液进行四聚体解离速率的评价, 6.5M 尿素浓度是位于三级结构变化的过渡后区间中的浓度 (Hammarström 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002 ; 99 : 16427–32)。通过与快速的三级结构变化相关联, 检测随时间变化的 TTR 远紫外 CD 光谱 (210–220nm), 由此评测缓慢的四聚体解离速率。

[0234] 如下进行纤维形成测定。用 100mM 酸性缓冲液以 1:1 稀释重组 TTR 原液 (7.2 μ M)。当最终 pH 要求 $\leq$ 3.8 时使用柠檬酸缓冲液 ; 评价时的 pH 范围为 4.2–6.0 时使用乙酸缓冲液, pH6.5 时评价淀粉样变性使用磷酸缓冲液。样品在酸化后不搅拌于 37℃ 温育 72 小时。通过于 400nm 检测浊度探测纤维形成的程度。

[0235] 如下检测纤维形成动力学。将重组 TTR 溶液 (7.2 μ M) 与等体积的 100mM 乙酸缓冲液混合, 获得的最终 pH 为 4.4。样品于 37℃ 温育, 监测 168 小时时程内的 400nm 浊度。每个时间点准备单独的样品。

[0236] 通过将二氟尼柳加入到温育 3 小时 (37℃) 的 TTR 溶液中,然后使蛋白经受尿素变性或 pH 介导的淀粉样蛋白变性,以此评价二氟尼柳对尿素介导的四聚体解离和 pH 介导的纤维形成的作用。

[0237] 结果

[0238] 通过 HPLC 检测摄入第 13 剂后 4 和 12 小时的平均血清二氟尼柳浓度,125mg 每天两次的组别为 20.1 ± 7.1 和 $6.9 \pm 3.0 \mu\text{M}$,250mg 每天两次的组别为 233.5 ± 76.0 和 $145.8 \pm 38.9 \mu\text{M}$,而 500mg 每天两次的组别为 517.0 ± 79.5 和 $421.9 \pm 78.1 \mu\text{M}$ 。99% 以上的二氟尼柳是蛋白结合的。250mg 每天两次和 500mg 每天两次的组别观测到的这些浓度比血清中的 TTR 浓度高很多 ($3.6\text{--}7.2 \mu\text{M}$),如果与竞争性蛋白(如对小分子具有多个结合位点的 TBG ($0.3\text{--}0.5 \mu\text{M}$) 和 / 或白蛋白 ($580\text{--}725 \mu\text{M}$)) 的结合不是高亲和性的,则产生的二氟尼柳化学计量接近最大值 2。

[0239] 为观察最大动力学稳定,二氟尼柳优选以至少 1、理想值 2 的化学计量在血液中结合四聚体 TTR。为确定每个受试者二氟尼柳化学计量的下限,我们如前所述(Purkey 等,同上)用含有结合至固相树脂的多克隆抗体的血清中免疫沉淀甲状腺素运载蛋白。洗涤固定化 TTR 3 次,以消除非特异性结合,由树脂解离 TTR-二氟尼柳复合物,采用标准曲线以 HPLC 测定二氟尼柳化学计量。在摄取后 4 和 12 小时在血清中二氟尼柳结合 TTR 的化学计量在 125mg 每天两次的组别为 0.45 ± 0.11 和 0.31 ± 0.12 ,250mg 每天两次的组别为 1.12 ± 0.08 和 0.95 ± 0.13 ,而 500mg 每天两次的组别为 1.51 ± 0.09 和 1.48 ± 0.08 。二氟尼柳化学计量随其血清浓度(最高约 $300 \mu\text{M}$) 增加。这比预期的 $300 \mu\text{M}$ 血清浓度时的最大化学计量 1.5 低,原因是方法局限(洗涤相关的损失)和 / 或二氟尼柳与其它血浆蛋白结合,因此我们用重组 TTR 进行二氟尼柳结合化学计量研究。洗涤相关损失解释了最大结合化学计量 1.5 主要源自低亲和性位点的解离。二氟尼柳负协同结合 TTR,因此低亲和性位点的解离明显更快。根据由等温滴定量热法测定的解离常数 (K_{d1} , 75nm; K_{d2} , $1.1 \mu\text{M}$) 计算缓冲液中预期的结合化学计量。将计算的和实验测定的化学计量共同绘图,后者由免疫沉淀(3 次洗涤)和 HPLC 分析产生,图形使人们估测到 250mg 每天两次组别的真实化学计量为 1.75-1.91,提示可以使用该剂量。

[0240] 对比受试者中 (0.8-1) 与重组 TTR(1.5) 的二氟尼柳 ($100 \mu\text{M}$) 结合化学计量,结果揭示明显结合 TTR 以外的血清蛋白,这提供了开发更选择性结合 TTR 的二氟尼柳类似物的动机。所有组别给予二氟尼柳后, TTR 的血清水平都增加,总 T_4 和 RBP 的血清水平下降。这些发现提示二氟尼柳影响 TTR 代谢。在研究中或研究后没有观察到明显的副作用。但是, 500mg 每天两次组别的白蛋白血清水平显著下降, BUN 和肌酸酐水平略微增加。在 250mg 每天两次的组别中,白蛋白的血清水平中度下降, BUN 水平略微增加。

[0241] 开发一种新方法来说明口服给予的二氟尼柳稳定血清 TTR 抗变性压力,包括淀粉样蛋白变性。该方法可用作替代指标以鉴别应当预防 TTR 错折叠疾病的化合物。通过加入尿素 (0-9M) 或加入酸 (pH3.8-5.4) 使受试者全血清经受变性。因为 TTR 必须解离才能变性,所以可使用四级结构变化来监测解折叠程度 (Hammarström 等, 同上)。血清经受变性压力后加入戊二醛交联血清中的所有蛋白,以确定何种 TTR 组分正常折叠(四聚体或二聚体)和变性(单体)。全血清 SDS-PAGE 将交联的 TTR 四聚体和二聚体(这些表示折叠的 TTR) 和单体分离开。免疫印迹能定量比较折叠 TTR 的量。多克隆抗体几乎不结合解折

叠的 TTR 单体以及折叠的 TTR, 因此其对比较有和没有二氟尼柳时四聚体和二聚体条带的强度最有用。还可以通过该方法评价二氟尼柳抑制 TTR 变性的时间相关性。在二氟尼柳存在时几乎不能看出该过程的时间相关性, 这强有力地支持了二氟尼柳稳定基态使四聚体解离屏障无法逾越的动力学稳定机制 (参见实施例 1)。预计这些变性时程中的二氟尼柳效力 (250mg 每天两次) 比检测的化学计量 (0.8-1.2) 更好, 这提供了进一步的证据证明免疫沉淀法低估了实际的结合化学计量, 尤其当其超过 1 时。

[0242] 已知人体中二氟尼柳结合化学计量的范围和在试管中模拟这些化学计量所需的二氟尼柳浓度, 这使得可以进行相关的体外生物物理学研究, 以探测 TTR • 二氟尼柳和 TTR • 二氟尼柳₂ 复合物防止解离和淀粉样变性的机制。经研究, 尿素介导 (6.5M) 的解离速率和酸介导 (pH4.4) 的淀粉样蛋白纤维形成速率随二氟尼柳浓度 (5、10、20 和 60 μ M) 变化, 表现为剂量依赖性减慢。因为四聚体解离是淀粉样蛋白纤维形成的限速步骤, 因而推断尿素中的四聚体解离速率应当可以预示由酸化介导的淀粉样蛋白纤维形成的程度。二氟尼柳抑制淀粉样变性比抑制尿素介导的解离更佳, 因为淀粉样变性也需要浓度依赖性再组装。与二氟尼柳结合 TTR 相关的 K_{d1} 和 K_{d2} 在酸中也有可能比在尿素中低。

[0243] 80 多种 TTR 突变体通过变性能量地形面的序列依赖性改变使个体倾向于遗传性淀粉样变性。其中, V122I 淀粉样蛋白沉积导致 3-4% 的非洲裔美国人患家族性淀粉样心肌病 (FAC), 而 V30M 是家族性淀粉样多神经病 (FAP) 的主要突变。二氟尼柳以剂量依赖方式同时抑制 V122I 和 V30M 淀粉样变性的发生, 证明该方法具通用性。

[0244] 高度需要开发一种通用的、非侵入性的、改善 TTR 淀粉样变性的治疗策略。本文概述的结果表明, 口服给予二氟尼柳可通过结合和稳定非促淀粉样变性天然状态减慢四聚体解离。根据最近的错折叠寡聚物而不是淀粉样蛋白纤维化引起神经变性的报告, 天然状态稳定是特别吸引人的策略。二氟尼柳 (250-500mg 每天两次) 对类风湿性关节炎和骨关节炎的临床应用证明了其长期使用的低毒性。TTR 血清半衰期为 12-15 小时, 因此每天两次给药似乎对已知的二氟尼柳半衰期 8-10 小时最佳。二氟尼柳对抗 SSA、FAC 和 FAP 应当有效, 因为其同时结合野生型和变异体 TTR, 达到动力学稳定, 类似于使 TTR 四聚体包含反式抑制亚单位而不是由疾病相关亚单位组成所使用的、已知改善人类疾病的机制。二氟尼柳由于其不能通过血脑屏障而可能对 CNS 淀粉样变性无效, 尽管二氟尼柳类似物 (例如本文描述的类似物) 可能具有这种能力。

[0245] 实施例 4: 羟化多氯化联苯选择性结合血液中的甲状腺素运载蛋白并抑制淀粉样变性

[0246] 已知氯化联苯 (PCB) 是持久的环境污染物, 据报道对啮齿类动物有毒, 并可能对人体有毒。这些化合物在环境中的长期存在是由于其缓慢降解和高亲油性, 随着它们在食物链中上移而在生物体内累积和浓缩。羟化 PCB (OH-PCB) 是 P450 单加氧酶氧化 PCB 形成的代谢物。难以发现单种 PCB 化合物对人毒性的权威性数据, 因为事实上市售 PCB 一般是含许多不同异构体以及痕量已知毒素 (例如氯化二苯并呋喃) 的混合物。但是, 已经用实验动物证实了几种纯化 PCB 的毒性。除了 OH-PCB 的雌激素样作用之外, 骨质疏松、免疫毒性、神经毒性和甲状腺激素水平低也与这些化合物的给予有关。

[0247] 众多研究证实 PCB 和 OH-PCB 体外结合甲状腺素运载蛋白 (TTR)。已经表明, TTR 在人血液中是蛋白靶, 有助于 OH-PCB 在接触个体中的存留。尽管众多的报告提示 TTR 在体

内为 PCB 结合蛋白,但没有确切证据表明 PCB 在血浆中结合甲状腺素运载蛋白。我们开发的免疫沉淀法可用于评估生物体液中分子与 TTR 结合化学计量的下限。本文评价 PCB 和 OH-PCB 与人血浆 TTR 的 TTR 结合化学计量。

[0248] 需要限速四聚体解离、单体错折叠和错组装的血浆 TTR 分泌后淀粉样变性导致老年性系统性淀粉样变性、家族性淀粉样心肌病和家族性淀粉样多神经病。本文证实几种 OH-PCB 选择性结合人血浆中的 TTR,并通过导致天然状态部分或全部动力学稳定的四聚体稳定化抑制淀粉样蛋白纤维形成。用 X-射线晶体学鉴定了 4 种 $\text{TTR} \cdot (\text{OH-PCB})_2$ 复合物,以更好地理解结合的分子基础,并提供最佳 TTR 淀粉样变性抑制剂的设计基础。

[0249] PCB 和 OH-PCB 对人血浆中甲状腺素运载蛋白的结合选择性

[0250] 评价 8 种 PCB(化合物 1-8,图 5) 和 14 种 OH-PCB(化合物 9-22,图 6) 的结合选择性,据报道这 8 种 PCB 从 TTR 上替换甲状腺激素, IC_{50} 低于 50nM,而这 14 种 OH-PCB 据报道是在小鼠或大鼠中结合 TTR 或降低甲状腺素水平的已知 PCB 代谢物。使用共价连接至琼脂糖树脂的多克隆 TTR 抗体,将其与用 PCB 或 OH-PCB (10.8 μM) 预处理的人血浆混合,以此确定血浆中 PCB 与 TTR 结合化学计量的下限。洗涤后,通过反相 HPLC 评价 PCB 或 OH-PCB 与 TTR ($\approx 5 \mu\text{M}$) 的结合化学计量。

[0251] TTR 四聚体中的两个相同甲状腺激素结合位点最多可结合两个 PCB。除了 PCB1 和 3 之外,剩余的非羟化 PCB 显示出相对较低的血浆 TTR 结合选择性(表 4)。相反,OH-PCB 显示出良好至极好的血浆 TTR 结合选择性(表 5)。某些羟化 PCB(例如 16 和 22)的结合化学计量接近 2。全血中 OH-PCB 的结合选择性非常类似于血浆中观测到的结果,因此红细胞膜没有明显隔离所研究的 OH-PCB。

[0252] 表 4:人血浆中 PCB 与 TTR 的结合化学计量

[0253]

化合物	结合当量
3	1.50 ± 0.42
1	0.62 ± 0.12
6	0.19 ± 0.11
2	0.18 ± 0.03
5	0.06 ± 0.04
4	0.05 ± 0.04
7	未结合
8	未结合

[0254] 表 5:人血浆中羟化 PCB 与 TTR 的结合化学计量

[0255]

化合物	结合当量(血浆)	结合当量(血液)
16	1.86 ± 0.14	未检测
22	1.67 ± 0.40	1.69
17	1.63 ± 0.05	未检测
19	1.48 ± 0.16	1.55
21	1.40 ± 0.22	1.33
18	1.36 ± 0.21	未检测
12	1.23 ± 0.24	1.47
11	1.12 ± 0.22	1.20
20	1.02 ± 0.09	0.86
10	0.96 ± 0.09	0.93

13	0.84 ± 0.24	0.86
9	0.83 ± 0.19	0.57
14	0.81 ± 0.29	0.73
15	0.70 ± 0.17	0.56

[0256] 抗体捕获 TTR • PCB 复合物可能由于 5 次洗涤步骤中 PCB 与 TTR 的解离而低估了 PCB 的结合化学计量。PCB 和 OH-PCB ($10.8 \mu\text{M}$) 与重组 TTR ($3.6 \mu\text{M}$) 温育, 以评价每次洗涤步骤后小分子结合固定化 TTR 的化学计量。5 次洗涤后 PCB 2 和 OH-PCB 18 降低化学计量达 10–17%, 而 PCB 4 降低达 45%。洗涤相关损失定量使人们可以估测血浆中 PCB 和 OH-PCB 的真实结合化学计量。此外, OH-PCB 结合重组 TTR 的最终化学计量和血浆中结合 TTR 的量之间的良好关联表明, OH-PCB 18 之类的化合物在血浆中是高度选择性的 TTR 结合剂。相反, PCB 2 和 4 在缓冲液中比在血浆中具有更高的 TTR 结合化学计量, 这强有力地表明它们在血浆中结合竞争蛋白以及 TTR。

[0257] 羟化 PCB 抑制 TTR 淀粉样蛋白纤维化

[0258] 评价 OH-PCB 和 PCB 3 体外抑制 TTR 纤维形成的能力, 因为这些化合物在血液中具有有良好的 TTR 结合选择性。由肝脏分泌入血液中的 TTR 似乎是全身 TTR 淀粉样蛋白的来源。尽管还不清楚人体中的淀粉样蛋白在哪里或如何形成, 但酸是细胞中的典型变性剂, 其将几乎所有的淀粉样变性肽和蛋白有效转变为淀粉样蛋白和 / 或相关的聚集物。因此, 以浊度监测酸介导 (pH 4.4) 的纤维形成, 用此来监测 PCB 作为抑制剂的有效性。羟化 PCB 和 PCB 3 是高度有效的 TTR 纤维化抑制剂。在抑制剂浓度等于野生型 TTR 浓度 ($3.6 \mu\text{M}$) 时, 在 72 小时诱导期后只观察到正常量 12–50% 的纤维形成。此活性等于迄今为止发现的最佳纤维化抑制剂 (例如氟芬那酸 (Flu), 将其作为阳性对照纳入) 所表现的活性。

[0259] OH-PCB18 与 TTR 的结合

[0260] 先前的质谱实验提示, OH-PCB 18 对 TTR 的两个 C_2 相关的甲状腺激素结合位点具有正协同结合性。当将亚化学计量 (<1:1) 的 18 加入至 TTR 中时, 质谱中观察到的主要组分是脱辅基 -TTR 和 TTR • 18₂ 复合物, 这与正协同结合性一致。18 的 TTR 结合特性与负协同结合的众多其它 TTR 淀粉样蛋白纤维形成抑制剂所具有的特性相反。在生理条件下进行的等温滴定量热法研究揭示, OH-PCB 18 与野生型 TTR 的结合与解离常数为相等 K_d ($3.2 \pm 1.8 \text{nM}$) 的模型拟合得最好。该结果与正协同结合没有冲突, 因为基于热量释放不充分的缘故人们不能获得足够低的 TTR 浓度来探测正协同性。尝试将收集的数据与正或负协同结合模型进行拟合, 结果拟合得很差。

[0261] OH-PCB12、16、17 和 18 的共晶体结构

[0262] 通过用 10 倍过量的抑制剂浸泡 TTR 晶体 4 周, 获得结合野生型 TTR 的 OH-PCB 12、16、17 和 18 晶体。然后解析每种复合物的 X-射线结构。晶体学不对称单位中的 TTR 二聚体形成两个配体结合袋的一半。因为两个结合位点由同一个二重对称轴两等分, 所以通常观察到所述抑制剂的两种对称等同结合模式。每个 TTR 结合位点可以再分为内部和外部腔。这些腔包含三个所谓的卤素结合袋 (HBP), 因为它们由甲状腺素两个芳环上的碘占据。HBP 3 和 3' 处于内部结合腔的中心, HBP 2 和 2' 确定了内部和外部结合腔之间的边界, 而 HBP 1 和 1' 位于外部结合腔的外周附近。共晶体结构揭示, 连接 OH-PCB 两个芳环的 C-C 键几乎位于二重对称轴中心, 呈现单一结合构象的表象。两个苯环之间的二面角为: 12 是 59° , 16 和 17 都是 37° , 而 18 是 44° 。所有的 OH-PCB 都在内部和外部结合袋中占据相似的位

置。联芳环体系的范德华补偿促进了某些内部亚单位的相互作用,该作用涉及组成每个结合位点的一个亚单位中的残基 X、Y 和 Z 以及另一个亚单位中的残基 n'、m' 和 o'。苯环上的某些取代基位于轴外,可在所观测到的电子密度图中的多个位置建模。

[0263] OH-PCB 18 结合 TTR

[0264] TTR • 18₂ 复合物的 1.8 Å X 射线结构证实,该抑制剂对 TTR 结合位点具有极好的立体互配。分子力学 (Insight II, Accelrys) 表明,18 的未结合构象接近于其结合结构。精修结构明确了有助于 18 的高亲和性结合的直接和水介导的静电作用。3-Cl、4-OH、5-Cl 等价取代芳环的其中一个占据内部结合袋,其氯取代基凸出到 HBP 3 和 3' 中。如由无偏差电子密度图识别出的, Ser 117 和 Thr 119 的侧链通过围绕其 C α -C β 键旋转而采用互变构象 (alternative conformation)。如根据电子密度分布识别出的, Ser 117 的侧链采用全部三种旋转体构象。令人感兴趣的是,两个水分子位于二重轴上邻近 Ser 117 残基之间,占有率为 50%,这有利于连接 Ser 117 残基、邻近水分子和 18 的苯酚官能团的氢键网络。根据结构检查还不清楚为什么 18 以非协同或正协同特性结合。其它等价取代环以其卤素凸出到 HBP 1 和 1' 中而占据外部 TTR 结合袋。

[0265] 结合 TTR 的化合物 16

[0266] 16 的 3-Cl、4-OH、5-Cl 三取代基苯酚环朝向 TTR 内部结合袋,产生与上述 TTR • 18₂ 结构中该环作用相同的与 TTR 的静电和疏水作用。3,4- 二氯芳环占据外部结合袋,卤素根据所设想的对称等价结合模式投向 HBP-1 或 1'。16 的电子密度与 OH-PCB 18 一样是对称的,因此根据电子密度图不可能明确地定位对位 OH 和对位 Cl。无偏差电子密度图与 Ser 117 的三个旋转体构象一致,在 Ser 117 残基之间含有两个水分子,类似于 TTR • 18₂ 结构。

[0267] 结合 TTR 的 OH-PCB17

[0268] 抑制剂 17 以其朝向内部结合袋的 3-Cl、4-OH、5-Cl 取代芳环结合,使用的相互作用与上述 TTR • 16₂ 和 TTR • 18₂ 结构中该环所用的相同。2,3,4- 三氯化环利用与 HBP-1、HBP-1'、HBP-2、HBP-2' 的相互作用以两种对称等价结合模式占据外部结合袋。Ser 117 和两个保守水分子的多种构象也表征了 TTR • 17₂ 结构。由无偏差电子密度图可清楚看出 Thr 119 侧链的构象改变。

[0269] 结合 TTR 的化合物 12

[0270] 联芳化合物 12 的 3-Cl、4-OH 取代芳环位于外部结合袋,其两个氯与 HBP-1 和 1' 相互作用。与苯酚位于内部结合袋中的 TTR • 16₂ 和 TTR • 17₂ 结构相反。羟基 (可能为离子化形式) 在 Lys 15 侧链的氢键键合距离之内。四氯化环位于内部结合袋中,其中卤素朝向 HBP 2 和 2' 以及 3 和 3'。Ser 117 和 Thr 119 侧链采用的构象与脱辅基-TTR 结构中发现的构象相同,与 16、17 和 18 的情况不同。

[0271] 在本文先前报告的取代 T4 的 IC₅₀ 低于 50nM 的 8 种 PCB 中,只有 1 和 3 以可接受的化学计量在人血浆中结合 TTR。相反,先前报告的结合 TTR 的全部 14 种 OH-PCB 在血浆中都表现出对 TTR 的显著结合选择性。这与 OH-PCB 主要在血浆中观测到并似乎选择性保留在血浆中的观察结果一致,与在 PCB 通常累积在脂质和其它组织中相反。OH-PCB 还选择性结合全血中的 TTR,这与它们不能分配入脂膜的观点一致。

[0272] 使用重组野生型 TTR 评价洗涤步骤中由抗体 • TTR • PCB 复合物上洗去的 PCB (或 OH-PCB) 的量。洗涤相关的 PCB 解离是分子特异性的。某些化合物在洗涤后具有高结合化

学计量,这与显著的初始结合和低洗涤相关损失一致,暗示解离速率慢。具有低结合化学计量的化合物属于至少两个类别:高初始结合化学计量以及显著的洗涤相关损失,或低初始结合化学计量及不显著的洗涤相关损失,后种情况适用于与 TTR 高亲和性结合但与另一种血浆蛋白以更高亲和性结合的化合物。PCB 2 和 4 都与重组 TTR 表现出低洗涤后结合化学计量。PCB 4 由于洗涤损失 45%,而 PCB 2 仅具有很低的初始结合化学计量以及最小的洗涤相关损失(10%)。洗涤后的选择性值反映出血浆中 PCB 初始结合量的下限。类似于具有高洗涤后结合化学计量特征的 PCB 18 的化合物,一定具有高结合亲和性和选择性,与观测到的低解离速率一致。

[0273] 除了对血浆 TTR 具有高结合选择性之外,OH-PCB 和 PCB 3 还在体外表现出极佳的 TTR 纤维形成抑制性。在等摩尔抑制剂和 TTR 浓度(3.6 μ M)时抑制剂 14、15 和 18 的效力是迄今观测到的最高效力之一。这有可能有助于其高结合亲和性(也与其低解离速率一致)及其不常见的非协同或正协同 TTR 结合特性。最好的抑制剂 OH-PCB 18 具有 nM K_d ,表明以 $>3\text{kcal/mol}$ 稳定天然状态的 TTR。基态稳定显著提高了四聚体解离屏障(TTR 淀粉样变性的限速步骤),以至于四聚体不能以生物相关时标解离。四聚体解离在 6M 尿素中急剧减慢和在 pH4.4 时缓慢淀粉样变性,这证实了由 18 与基态结合介导的天然非淀粉样变性状态的动力学稳定。据信 OH-PCB 18(3.6 μ M) 是另人印象深刻的淀粉样蛋白抑制剂,因为它是极佳的四聚体 TTR 动力学稳定剂,即因为 TTR $\cdot$ 18 和 TTR $\cdot$ 18₂ 不能形成淀粉样蛋白,所以其在 pH4.4 时防止 2/3 的 3.6 μ M TTR 样品淀粉样变性,TTR 残余物(1.18 μ M) 由于其低浓度而无法形成淀粉样蛋白。最好的 OH-PCB 抑制剂的解离速率也可能比预期低,因为 OH-PCB 周围的 TTR 结构退火,但对此还没有和需要的一样仔细评价。这些化合物至少提供了特殊抑制剂的合成指引,或者依其毒性情况证明其自身可用作抑制剂。

[0274] TTR 结合 OH-PCB 12、16、17 和 18 的结构信息揭示,这些联苯化合物一般沿着晶体学二重对称轴结合。两个环之间的二面角在约 40–60° 的范围内,使两个相邻亚单位上的卤素结合袋(HBP) 能同时占据,导致四聚体四级结构界面稳定化。羟化 PCB 18 具有最佳的 TTR 结构互配性,因为其氯能够同时结合 HBP 1 和 1' 以及 3 和 3'。16 和 17 的情况不是这样,它们需要考虑两种对称等价结合模式,以便将氯延伸入 HBP 1、1'、3 和 3'。

[0275] 苯酚环朝向内部结合袋似乎起重要作用,因为其能在其与邻近的 TTR 亚单位之间形成水介导的氢键网络,推测这可以进一步稳定 TTR 的天然四级结构。氢键网络涉及 Ser-117、抑制剂的苯酚基团和两个保守水分子的三种交叉构象,产生内部连接两个亚单位、形成 PCB 结合位点的静电网络。在全部三种结构中,Thr 119 还占据多个旋转体构象。相反,该静电作用网络在 12₂ $\cdot$ TTR 复合物中不存在,在该复合物中羟基取代苯环朝向外部结合袋,其中 Ser 117 和 Thr 119 采用脱辅基侧链构象。

[0276] OH-PCB 的毒性在文献中未完全证实。在各种体外和动物研究中,OH-PCB 似乎是轻微雌激素作用或抗雌激素作用。已经阐明了其它的毒性机制,还报告在接触这些化合物时动物甲状腺激素水平降低。OH-PCB 结合 TTR 降低 T4 水平以及 T4 水平降低反映小分子 TTR 结合的观点难以得到直接支持。因为大约一半的 T4 由白蛋白运载,所以取代白蛋白结合位点的 T4 似乎更可能是接触 PCB 个体 T4 水平降低的原因。甲状腺结合球蛋白对甲状腺素的亲和性最高,是人体中的主要载体,但其在许多低等动物中不存在,包括研究这些化合物的多种毒理学性质的大鼠和小鼠。因此,在这些物种中,更有可能是结合 TTR 的化合物对 T4

的整体结合和转运有影响。显示 PCB 与 TBG 结合的数据表明它们基本没有相互作用,只有一个或两个微弱结合的化合物是例外。因此,OH-PCB 对人甲状腺素水平的影响应当是最小的,除非它们结合白蛋白。还报告了这些化合物可能干扰甲状腺激素活化或增加 T4 硫酸化速率,因此使 T4 失活。OH-PCB 还可以结合其它甲状腺激素靶,包括甲状腺激素受体,如果有 T4 类似结构的话这似乎是有可能的。

[0277] 很明显,关于羟化 PCB 毒性,尤其是在人体中的毒性,基本没有得到证实。预期对啮齿类动物的毒性更严重,因为 TTR 主要起甲状腺激素转运体的作用。清楚的是,羟化 PCB 作为甲状腺素运载蛋白纤维形成抑制剂具有极佳活性,提示此类化合物有潜力用于抑制淀粉样蛋白纤维形成。

[0278] 材料和方法

[0279] 甲状腺素运载蛋白抗体纯化和与琼脂糖的缀合

[0280] 生产、纯化抗体,并将其偶联至琼脂糖。树脂储存为 1:1 TSA 浆 (10mM Tris、pH 8.0/140mM NaCl/0.025% NaN₃) 中。另外,通过用 200mM Tris、pH8.0 代替抗体与树脂偶联制备猝灭琼脂糖。

[0281] 人血浆制备

[0282] 按照 Scripps 综合临床研究中心的标准取血程序从健康志愿者采集全血,并转移至 50mL 圆锥管中。用配有甩平转子的 Sorvall RT7 台式离心机于 25℃ 对该管以 3000 RPM (1730×g) 离心 10 分钟。取出血浆上清液,再以 3000 RPM 离心 10 分钟,去除残余的细胞。加入叠氮化钠,获得 0.05% 溶液。将血浆储存在 4℃,直至使用。

[0283] 免疫沉淀甲状腺素运载蛋白和结合的 PCB

[0284] 在评测时,将 1.5mL 人血浆和 7.5 μL PCB 的 2.16mM DMSO 溶液注入 2mL eppendorf 管。将该溶液于 37℃ 温育 24 小时。将猝灭琼脂糖的 1:1 树脂 /TSA 浆 (187 μL) 加入到溶液中,并于 4℃ 温和震荡 1 小时。离心溶液 (16,000×g),将上清液分为各 400 μL 的 3 等份。向其中各加入 200 μL 抗甲状腺素运载蛋白抗体缀合的琼脂糖的 1:1 树脂 /TSA 浆,并于 4℃ 缓慢震荡 20 分钟。离心样品 (16,000×g),去除上清液。用 1mL TSA/0.05% 皂苷 (Acros) 于 4℃ 洗涤树脂 (3×10 分钟),再用 1mL TSA 于 4℃ 洗涤 (2×10 分钟)。离心样品 (16,000×g),去除最终的洗涤液,加入 155 μL 100mM 甲状腺素运载蛋白 (pH11.5),从抗体上洗脱 TTR 和结合的小分子。于 4℃ 温和震荡 30 分钟,离心样品 (16,000×g),取出 145 μL 含 TTR 和抑制剂的上清液。

[0285] HPLC 分析和甲状腺素运载蛋白与结合 PCB 的定量

[0286] 将 TTR 抗体珠的上清液洗脱样品 (145 μL) 加至 Waters 71P 自动取样器。在 8 分钟内使用 40–100% B 梯度 (A:94.8% H₂O/5% 乙腈 /0.2% TFA; B:94.8% 乙腈 /5% H₂O/0.2% TFA),采用 Waters 600E 多元溶剂传递系统控制,经 Keystone 3 厘米 C18 反相柱分离 135 μL 注入的各个样品。在 280nm 用 Waters 486 可调吸光度检测器进行检测,对峰积分,得到 TTR 和小分子二者的面积。为了测定各种组分的量,将已知量的四聚体 TTR 或 PCB 注入 HPLC。对峰积分,使用 Kaleidagraph (Synergy Software) 对数据进行线性回归,得到校准曲线。使用校准曲线测定血浆样品中存在的各种组分的摩尔数。计算小分子对蛋白的比率,获得小分子在血浆中结合 TTR 的化学计量。

[0287] 甲状腺素运载蛋白淀粉样蛋白纤维形成测定

[0288] 以 720 μM 浓度将化合物溶解在 DMSO 中。将 5 μL 待评测化合物溶液加入 0.5 mL 7.2 μM TTR 的 10 mM 磷酸盐 (pH 7.6)、100 mM KCl、1 mM EDTA 缓冲溶液中,使化合物与 TTR 温育 30 分钟。加入 495 μL 的 0.2 mM 乙酸盐 (pH 4.2)、100 mM KCl、1 mM EDTA,获得的最终蛋白和抑制剂浓度各为 3.6 μM , pH 4.4。然后将混合物于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 72 小时,此后涡旋试管 3 秒,检测 400 nm 的光密度。将无抑制剂 TTR 的光密度定义为 100% 纤维形成,通过对每个光密度归一化,测定纤维形成程度。还测试了没有 TTR 时各个化合物的对照溶液,在 400 nm 没有明显吸收。

[0289] PCB 18 和 TTR 的等温滴定量热

[0290] 使用 Microcal MCS 等温滴定量热仪 (Microcal, Northampton, MA), 将 25 μM 化合物 18 的溶液 (10 mM 磷酸盐 pH 7.6、100 mM KCl、1 mM EDTA、8% DMSO 溶液) 滴定入 1.2 μM TTR 的相同缓冲溶液中。最初注入 2 μL , 接着于 25 $^{\circ}\text{C}$ 注入 10 μL 共 25 次。对等温线积分,扣除本底获得结合等温线,使用 ORIGIN 5.0 (Microcal) 的 ITC 数据分析包其与两个相同结合位点的模型拟合得最好。

[0291] 结晶和 X-射线数据收集

[0292] 在悬滴实验中,由对 2 M 硫酸铵平衡的 5 mg/ml 蛋白溶液 (100 mM KCl、100 mM 磷酸盐 pH 7.4、1 mM 硫酸铵) 获得重组 TTR 晶体。将晶体用 10 倍摩尔过量的配体浸泡 2 周,以确保两个结合位点都完全饱和,由此制备 TTR·配体复合物。使用 1:1 的丙酮:水溶液作为浸泡剂。联合使用 DIP2030b 成像板系统 (MAC Science, Yokohama, Japan) 和 RU200 旋转阳极 X-射线发生器进行数据收集。将晶体置于冷冻保护剂 Paratone 油中,冷却至 120 K 进行衍射实验。所有 TTR·配体复合物的晶体都和脱辅基晶型是同晶型,晶胞大小为 **a=43 Å**、**b=86 Å** 和 **c=65 Å**。它们属于空间群 $P2_12_12$, 在不对称单位中包含一半的同源四聚体。用 DENZO 和 SCALEPACK 简化数据。

[0293] 结构测定和精修

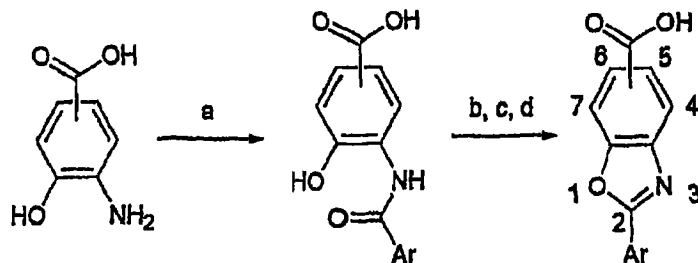
[0294] 使用蛋白质数据库的 TTR 蛋白原子坐标 (登录号 1BMZ) 作为初始模型,使用程序 CNS 通过分子动力学和能量最小化精修天然 TTR 和 TTR-配体复合物。对用 PCB 浸泡或同时共结晶的 TTR 晶体收集衍射数据,由此计算图谱。对于 TTR 与 PCB 的复合物,获得的图揭示了配体在 TTR 四聚体的两个结合袋中的大概位置,峰高在 5–9 r. m. s 以上。为进一步提高小分子电子密度和去除模型偏差,对模型实施数轮扭曲/振动方案,这在图中导致了显著改善,尤其是在抑制剂周围。随后使用这些图进行模型拟合,确定了配体分子在密度图中的位置。在全部三种情况中,由程序 InsightII (Accelrys) 计算的抑制剂最小能量构象与图谱非常一致。因为二重晶体对称轴在结合通道旁,所以必须应用统计无序模型,为四聚体 TTR 两个结合位点的每一个产生两种配体结合模式。根据无偏差电子密度图置入水分子。因为在最终图谱中没有可解释的电子密度,所以 9 个 N-末端残基和 3 个 C-末端残基没有包括在最终模型中。

[0295] 实施例 5:甲状腺素运载蛋白淀粉样蛋白纤维化抑制剂苯并噻唑

[0296] 甲状腺素运载蛋白的两个甲状腺素结合位点由其四级结构界面产生。小分子结合这些位点可以稳定四聚体,潜在地提供了用小分子药物治疗 TTR 淀粉样蛋白病变的方法。已经发现了许多化合物家族,其结合将四聚体基态稳定至与小分子解离常数 K_{d1} 和 K_{d2} 成比例的程度。这也有效增加了解离活性屏障,并通过动力学稳定化抑制淀粉样变性。这

样的抑制剂通常由两个芳环组成,一个环具有卤素取代基,另一个环具有亲水取代基。在 C(4)-C(7) 被羧酸取代并在 C(2) 被卤化苯环取代的苯并噻唑似乎也匹配 TTR 甲状腺素结合位点。因此,如流程 1 所示,通过对 N- 酰基氨基-羟基苯甲酸脱氢环化,制备这些化合物的小型库。

[0297]



[0298] 流程 1: 苯并噻唑的通用合成方法

[0299] 试剂: (a) ArCOCl , THF, 吡啶 (Ar = 苯基、3,5-二氟苯基、2,6-二氟苯基、3,5-二氯苯基、2,6-二氯苯基、2-(三氟甲基)苯基和 3-(三氟甲基)苯基); (b) $\text{TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$, 回流二甲苯; (c) TMSCHN_2 、苯、MeOH; (d) LiOH、THF、MeOH、 H_2O (4 步的收率为 8-27%)。

[0300] 使用一系列严格性增加的分析评价苯并噻唑。将野生型 TTR ($3.6 \mu\text{M}$) 与测试化合物 ($7.2 \mu\text{M}$) 温育 30 分钟 (pH7、 37°C)。因为至少一个分子的测试化合物必须结合 TTR 四聚体的每个分子才能够使其稳定,所以测试化合物的浓度 $7.2 \mu\text{M}$ 仅仅是最小有效浓度的两倍。然后将 pH 调节至纤维化的最佳 pH 值 4.4。在测试化合物存在的情况下,通过 400nm 的浊度测定 72 小时后形成的淀粉样蛋白量 (37°C),并表示为 % 纤维形成 (ff), 100% 是只有 TTR 时所形成的量。在所测试的 28 种化合物中, 11 种将纤维形成降低至可忽略不计的水平 (ff<10%; 图 7)。

[0301] 然后评价 11 种最有活性化合物在血液中相对于所有其它蛋白选择性结合 TTR 的能力。将人血浆 (TTR 浓度 3.6 - $5.4 \mu\text{M}$) 与测试化合物 ($10.8 \mu\text{M}$) 于 37°C 温育 24 小时。使用结合多克隆 TTR 抗体的琼脂糖免疫沉淀 TTR 和结合的任何抑制剂。以高 pH 由树脂上释放有或没有抑制剂结合的 TTR, 通过 HPLC 分析确定抑制剂: TTR 的化学计量 (图 8)。在 5- 或 6- 位具有羧酸和在 2 位具有 2,6-二氯苯基 (13、20) 或 2-三氟甲基苯基 (11、18) 取代基的苯并噻唑具有最高结合化学计量。特别是 20 具有极好的抑制剂活性和结合选择性。因此, 进一步特征鉴定其作用机制。

[0302] 为证实 20 通过强结合四聚体抑制 TTR 纤维形成, 用野生型 TTR 进行等温滴定量热法 (ITC) 和沉降速度实验。ITC 显示在生理条件下 2 当量 20 结合的平均解离常数为 $K_{d1} = K_{d2} = 55 (\pm 10) \text{nm}$ 。这与许多其它高效 TTR 淀粉样变性抑制剂的解离常数相当。至于沉降速度实验, 在最佳纤维化条件下 (72 小时、pH 4.4、 37°C) 将 TTR ($3.6 \mu\text{M}$) 与 20 ($3.6 \mu\text{M}$ 、 $7.2 \mu\text{M}$ 、 $36 \mu\text{M}$) 温育。四聚体 (55kDa) 是 7.2 或 $36 \mu\text{M}$ 20 的溶液中唯一可检测到的组分。 $3.6 \mu\text{M}$ 20 形成某些大聚集物, 但保留在溶液中的 TTR 是四聚体。

[0303] 包含 T119M 亚单位和小分子结合都通过升高四聚体解离的活化屏障防止 TTR 淀粉样蛋白纤维化。通过检测抑制剂在严重变性压力 6M 尿素中减慢四聚体解离的效力, 最严格地测试其在升高四聚体解离活化屏障方面的能力。因此, 对比有和没有 20、21 或 27 的情况下 6M 尿素中 TTR 四聚体解离的速率 (图 9)。在 6M 尿素中 168 小时后 TTR ($1.8 \mu\text{M}$) 完全变性。相反, $3.6 \mu\text{M}$ 20 至少在 168 小时内防止四聚体解离 ($>3 \times$ 血浆中的 TTR 半衰期)。

等摩尔量 20 时 168 小时内仅有 27% 的 TTR 变性。化合物 27 (3.6 μ M) 即使在纤维形成测定中有活性也基本不能防止四聚体解离 (168 小时后 90% 解折叠)。化合物 21 根本不能阻止 TTR 解离。这些结果显示抑制剂结合 TTR 是必须的, 但不足以在强变性条件下动力学稳定 TTR 四聚体; 解离常数较低 (或解离速率较低) 也很重要。此外, 20 的官能团形态显然对稳定 TTR 四聚体最理想; 将羧酸由 C(6) 移至 C(7) (如 27) 或去除氯 (如 21) 严重降低其活性。

[0304] 由其与 TTR 的共晶体结构可明显看出 20 中取代基的作用 (图 10)。化合物 20 将其两个氯原子朝向卤素结合袋 2 和 2' 附近 (如此称呼是因为甲状腺素结合 TTR 时它们由碘占据)。苯环上的 2,6 取代模式迫使苯并噁唑和苯环不在一个平面, 最好将羧酸定位于苯并噁唑上, 以氢键键合 Lys 15/15' 的 ϵ -NH₃⁺ 基团。20 的芳环和 Leu 17、Leu 110、Ser 117 和 Val 121 侧链之间的疏水相互作用额外贡献了结合能。

[0305] 方法

[0306] 以下详述苯并噁唑合成和产物鉴定 (¹H- 和 ¹³C-NMR 以及高分辨率质谱) 的通用方法。

[0307] 分析性超速离心

[0308] 使用沉降速度分析性超速离心观测 20 存在时 TTR 的四级结构。将样品与 3.6、7.2 或 36 μ M 的 20 温育 72 小时。以温控型 Beckman XL-I 分析性超速离心机 (配有 An60Ti 转子和光电扫描器) 收集数据。使用注射器将 400–420 μ L 样品上样至配有 12mm Epon 中心杯和蓝宝石窗的双区池中。以连续方式于 25°C、3000 和 5000rpm 的转子转速收集数据, 使用平均每点 1 次扫描的 0.005cm 步长。于 280nm 进行检测。使用 Philo (Philo, 2000; Stafford, 1992) 开发的程序 DCDT+ 对数据进行时间导数分析。分析显示溶液中组分的分布以 *s* 值范围表示。然后将该分布拟合不同的模型, 以便确定系统中组分的沉降和扩散系数。以先前报道的方法 (Petrassi 等, 2000) 测定每种组分的分子量。测定的 TTR *s* 值显示, 在 7.2 和 36 μ M 的 20 存在时 TTR 保持为四聚体, 而 3.6 μ M 时尽管形成了一些聚集物, 但保留在溶液中的 TTR 仍为四聚体。

[0309] 结晶和 X-射线数据收集

[0310] 在悬滴实验中, 由对 2M 硫酸铵平衡的 12mg/ml 蛋白溶液 (100mM KCl、1mM EDTA、10mM 磷酸钠、pH 7.0、0.35M 硫酸铵) 获得野生型 TTR 晶体。将晶体用 10 倍摩尔过量的配体浸泡 3 周, 以确保两个结合位点都完全饱和, 由此制备 TTR-20 复合物。用 14-BM-C, BIOCARs, Advanced Photon Source (Argonne National Laboratory) 的单色高能源 Quantum-4 检测器衍射配体浸泡晶体达 1.55 Å。将晶体浸泡在 Paratone 油中, 骤冷至 100K 进行衍射实验。TTR-20 复合物的晶体和脱辅基晶型同晶型, 晶胞大小为 *a*=43.1 Å, *b*=84.7 Å 和 *c*=64.7 Å, 空间群为 P2₁2₁2, 在不对称单位中包含两个 TTR 亚单位。用 HKL2000 程序组 (Otwinowski, 1997) 的 DENZO 和 SCALEPACK 简化数据。

[0311] 构测定和精修

[0312] 使用蛋白质数据库的 TTR 蛋白原子坐标 (登录号 1BMZ) 作为初始模型进行分子置换检索。使用 CNS 的分子动力学和能量最小化方案对 TTR-20 复合物结构进行精修。获得的差值 Fourier 图揭示配体在 TTR 四聚体的两个结合袋都结合。使用这些图谱, 可以明确地定位配体在密度图中的位置, 将其纳入晶体学精修。由程序 Insight II (Accelrys Inc.)

计算的抑制剂最小能量构象用作晶体学精修的初始模型。因为二重晶体对称轴在结合通道旁,所以必须应用统计无序模型,为每个 TTR 结合袋生成两种配体结合模式。经过数轮模拟退火和随后的位置和温度因子精修后,定位水分子在差值 Fourier 图中的位置。使用由振荡 n' 扭曲偏差去除方案计算的无偏差加权电子密度图进行最后一轮图形拟合。配体的对称相关结合构象与没有抑制剂时定相的无偏差退火省略图以及振荡 n' 扭曲无偏差加权图非常一致。因为在最终图中没有可解释的电子密度,所以 9 个 N- 末端残基和 3 个 C- 末端残基没有包括在最终模型中。表 6 提供了晶体学分析的概述。

[0313] 表 6 :X- 射线晶体结构的统计结果

[0314]

完整度(%)(整体/外壳)	86/90
R_{sym} (整体/外壳)	0.05/0.33
精修统计(Å)	
分辨率(Å)	33.02-1.55
R-因子/R-free (%)	21.1/24.3
Rmsd 键长(Å)	0.03
Rmsd 键角(°)	2.5
其它统计结果	
晶体大小(mm)	0.3×0.2×0.15
晶体体系	斜方晶
晶胞大小(a, b, c) (Å)	43.1, 84.7, 64.7
晶胞体积(Å ³)	236123
最大分辨率(Å)	1.54
扫描模式	Phi
检测温度	100 K
独立反射数	30705
结构解析方法	EMPR 的分子置换(Kissinger, 1999)
精修对象	F_{obs}
精修目标	最大可能
精修使用的程序	CNS-Solve (Brunger 1998)
数据库	蛋白质数据库

[0315] 苯并噁唑合成 - 通用方法

[0316] 除非另有说明,否则所有的反应都使用 FirstMate 有机合成仪 (Argonaut Technologies) 在干氩气氛下于烘干的玻璃器皿中进行。所有的溶剂 (水性) 和试剂都购自 Aldrich, 使用时不用进一步纯化。用 Bruker DRX-500 光谱仪于 500MHz 或用 Bruker DRX-600 光谱仪于 600MHz 检测 ^1H NMR 谱, 并参照内标 $\text{CHD}_2\text{-S(0)-CD}_3$ (2.49ppm)。用 Bruker DRX-500 于 125MHz 或用 Bruker DRX-600 仪器于 150MHz 检测 ^{13}C 谱, 并参照 $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (39.5ppm)。在玻璃衬底的薄层分析平板 (Kieselgel 60 F_{254} , 0.25mm, EM Science 第 5715-7 号) 上进行薄层色谱分析。使用 UV 吸收或 10% 磷钼酸乙醇溶液完成显色。在离心薄层色谱 (Harrison Research, 7924T 型, 2mm 平板) 或制备型硅胶平板 (Kieselgel 60 F_{254} , 1mm, EM Science 第 13895-7 号) 上进行色谱。

[0317] 苯并噁唑合成的一般步骤

[0318] 用吡啶 (500 μL , 0.6mmol) 和所需酰氯 (0.2mmol) 依次处理氨基羟基苯甲酸 (0.2mmol) 的 THF (3mL) 混合物。于室温搅拌反应混合物 10 小时, 回流 1 小时, 真空浓缩, 不用纯化就用于下一步。

[0319] 向粗反应混合物的二甲苯溶液 (5mL) 中加入对甲苯磺酸一水合物 (380.4mg, 2.0mmol), 获得的混合物回流搅拌过夜。12 小时后, 冷却反应物至室温, 用 NaOH (2mL, 1N) 猝灭反应, 分离各相。用 HCl (1N) 酸化水层至 pH 2, 用 EtOAc (4 $\times$ 3mL) 提取。合并的有机层经 MgSO_4 干燥, 过滤并真空浓缩。将得到的残余物溶解在 MeOH: 苯 (2mL; 1:4) 混合物中, 用 TMS- CHN_2 (200 μL 的 2.0M 己烷溶液, 0.4mmol) 于 25 $^\circ\text{C}$ 处理, 以 TLC 监测反应进程 (通常于 0.5 小时后完成)。真空浓缩反应混合物, 残余物进行色谱 (10-25% EtOH/ 己烷梯度), 获得所需的苯并噁唑甲酯。

[0320] 将苯并噁唑甲酯溶解在 THF:MeOH:H₂O (3:1:1, 0.07M) 中, 用 LiOH $\cdot\text{H}_2\text{O}$ (4 当量) 处理。于室温搅拌反应物, 用 TLC 监测。一结束就用 1N HCl 将混合物酸化至 pH 2, 用 EtOH (4 $\times$) 提取。合并的有机层经 MgSO_4 干燥, 过滤并浓缩。残余物经制备型薄层色谱 (4.9% MeOH、95% CH_2Cl_2 、0.1% HOAc) 纯化, 获得为白色固体的产物。

[0321] 4-羧基-2-(3,5-二氟苯基)-苯并噁唑 (1)。按照一般步骤由 3-羟基邻氨基苯甲酸制备, 得到为白色固体的 1 (7.0mg, 13%)。1 的数据: ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 13.70-12.50 (br. s, 1H, CO_2H), 8.04 (AMX, 1H, $J = 8.1\text{Hz}$, Ar), 7.94 (AMX, 1H, $J = 7.3\text{Hz}$, Ar), 7.84 (br. d, 2H, $J = 5.6\text{Hz}$, Ar), 7.62-7.58 (m, 1H, Ar), 7.56 (AMX, 1H, $J = 7.3, 8.1\text{Hz}$, Ar); ^{13}C NMR (125MHz, DMSO- d_6) δ 165.8, 162.7 (d, $J = 248\text{Hz}$), 162.6 (d, $J = 248\text{Hz}$), 161.1, 151.0, 140.3, 129.3, 127.0, 125.8, 123.6, 115.2, 110.8 (d, $J = 28\text{Hz}$), 107.8 (t, $J = 26\text{Hz}$); $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 的 HRMS (MALDI-FTMS) 理论值 276.0467, 实测值 276.0463。

[0322] 4-羧基-2-(2,6-二氟苯基)-苯并噁唑 (2)。按照一般步骤由 3-羟基邻氨基苯甲酸制备, 得到为白色固体的 2 (8.2mg, 15%)。2 的数据: ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 13.00 (br. s, 1H, CO_2H), 8.06 (AMX, 1H, $J = 8.1\text{Hz}$, Ar), 7.94 (AMX, 1H, $J = 7.6\text{Hz}$, Ar), 7.80-7.74 (m, 1H, Ar), 7.57 (AMX, 1H, $J = 7.6, 8.1\text{Hz}$, Ar), 7.40-7.38 (m, 2H, Ar); ^{13}C NMR (125MHz, DMSO- d_6) δ 166.1, 160.4 (d, $J = 256\text{Hz}$), 160.3 (d, $J = 256\text{Hz}$), 154.9, 150.6, 139.6, 134.7 (t, $J = 10\text{Hz}$), 126.8, 125.8, 114.8, 112.8 (d, $J = 22\text{Hz}$), 105.2 (t, $J = 16\text{Hz}$); $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 的 HRMS (MALDI-FTMS) 理论值为 276.0467, 实测值为 276.0461。

[0323] 4-羧基-2-[(3-三氟甲基)苯基]-苯并噁唑 (3)。按照一般步骤由 3-羟基邻氨

基苯甲酸制备,得到为白色固体的 3(9.5mg,15%)。3 的数据: ^1H NMR(500MHz, DMSO- d_6) δ 13.70-12.80(br. s, 1H, CO_2H), 8.50(ABX, 1H, $J = 7.8\text{Hz}$, Ar), 8.43(s, 1H, Ar), 8.06(AMX, 1H, $J = 8.1\text{Hz}$, Ar), 8.03(ABX, 1H, $J = 8.1\text{Hz}$, Ar), 7.94(AMX, 1H, $J = 7.8\text{Hz}$, Ar), 7.88(ABX, 1H, $J = 7.8\text{Hz}$, Ar), 7.54(AMX, 1H, $J = 8.1\text{Hz}$, Ar); ^{13}C NMR(125MHz, DMSO- d_6) δ 165.8, 161.9, 151.0, 140.6, 131.4, 130.8, 130.0(q, $J = 33\text{Hz}$), 128.7(d, $J = 4\text{Hz}$), 127.2, 127.0, 125.5, 123.8, 123.7(q, $J = 273\text{Hz}$), 123.2, 115.2; $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS(MALDI-FTMS) 理论值为 308.0529, 实测值为 308.0535。

[0324] 4-羧基-2-[(2-三氟甲基)苯基]-苯并噁唑(4)。按照一般步骤由 3-羟基邻氨基苯甲酸制备,得到为白色固体的 4(15.2mg,25%)。4 的数据: ^1H NMR(600MHz, DMSO- d_6) δ 13.15(br. s, 1H, CO_2H), 8.18(d, 1H, $J = 7.6\text{Hz}$, Ar), 8.06(AMX, 1H, $J = 0.9, 8.2\text{Hz}$, Ar), 8.02(d, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$, Ar), 7.96(AMX, 1H, $J = 0.9, 7.9\text{Hz}$, Ar), 7.94-7.87(m, 2H, Ar), 7.58(AMX, 1H, $J = 8.2\text{Hz}$, Ar); ^{13}C NMR(150MHz, DMSO- d_6) δ 165.8, 161.6, 151.2, 140.0, 133.0, 132.6, 132.3, 127.6(q, $J = 32\text{Hz}$), 127.2(q, $J = 6\text{Hz}$), 127.0, 125.6, 124.9, 123.5, 123.4(q, $J = 273\text{Hz}$), 115.2; $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS(MALDI-FTMS) 理论值为 308.0529, 实测值为 308.0531。

[0325] 4-羧基-2-(3,5-二氯苯基)-苯并噁唑(5)。按照一般步骤由 3-羟基邻氨基苯甲酸制备,得到为白色固体的 5(8.0mg,13%)。5 的数据: ^1H NMR(600MHz, DMSO- d_6) δ 13.60-12.60(br. s, 1H, CO_2H), 8.16(A₂M, 2H, $J = 2.0\text{Hz}$, Ar), 8.05(AMX, 1H, $J = 0.9, 8.2\text{Hz}$, Ar), 7.96(A₂M, 1H, $J = 2.0\text{Hz}$, Ar), 7.94(AMX, 1H, $J = 0.9, 7.6\text{Hz}$, Ar), 7.56(AMX, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$, Ar); ^{13}C NMR(150MHz, DMSO- d_6) δ 165.8, 160.8, 151.0, 140.4, 135.2, 131.5, 129.4, 127.0, 126.3, 125.9, 125.8, 123.6, 115.2; $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS(MALDI-FTMS) 理论值为 307.9876, 实测值为 307.9876。

[0326] 4-羧基-2-(2,6-二氯苯基)-苯并噁唑(6)。按照一般步骤由 3-羟基邻氨基苯甲酸制备,得到为白色固体的 6(5.2mg,8%)。6 的数据: ^1H NMR(600MHz, DMSO- d_6) δ 13.80-12.50(br. s, 1H, CO_2H), 8.07(AMX, 1H, $J = 8.2\text{Hz}$, Ar), 7.95(AMX, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$, Ar), 7.77-7.71(m, 3H, Ar), 7.59(AMX, 1H, $J = 7.9, 8.2\text{Hz}$, Ar); ^{13}C NMR(150MHz, DMSO- d_6) δ 165.8, 158.2, 150.8, 139.3, 134.8, 134.0, 128.7, 126.8, 126.7, 125.9, 122.4; $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS(MALDI-FTMS) 理论值为 307.9876, 实测值为 307.9880。

[0327] 4-羧基-2-苯基-苯并噁唑(7)。按照一般步骤由 3-羟基邻氨基苯甲酸制备,得到为白色固体的 7(10.2mg,21%)。7 的数据: ^1H NMR(600MHz, DMSO- d_6) δ 13.50-12.60(br. s, 1H, CO_2H), 8.24-8.22(m, 2H, Ar), 8.03(AMX, 1H, $J = 0.9, 8.2\text{Hz}$, Ar), 7.91(AMX, 1H, $J = 0.9, 7.9\text{Hz}$, Ar), 7.68-7.61(m, 3H, Ar), 7.51(AMX, 1H, $J = 7.9, 8.2\text{Hz}$, Ar); ^{13}C NMR(150MHz, DMSO- d_6) δ 166.0, 163.4, 151.0, 140.8, 132.4, 129.4, 127.6, 126.7, 126.1, 125.0, 123.0, 115.0; $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS(MALDI-FTMS) 理论值为 240.0655, 实测值为 240.0656。

[0328] 5-羧基-2-(3,5-二氟苯基)-苯并噁唑(8)。按照一般步骤由 3-氨基-4-羟基苯甲酸制备,得到为白色固体的 8(10.2mg,19%)。8 的数据: ^1H NMR(600MHz, DMSO- d_6) δ 13.60-12.80(br. s, 1H, CO_2H), 8.32(ABM, 1H, $J = 1.5\text{Hz}$, Ar), 8.07(ABM, 1H, $J = 1.5, 8.5\text{Hz}$, Ar), 7.90(ABM, 1H, $J = 8.5\text{Hz}$, Ar), 7.86-7.85(m, 2H, Ar), 7.60(tt, 1H, $J = 2.4, 9.2\text{Hz}$, Ar); ^{13}C NMR(150MHz, DMSO- d_6) δ 166.8, 162.8(d, $J = 248\text{Hz}$), 162.7(d, $J = 248\text{Hz}$),

161.5, 153.0, 141.2, 129.1 (t, $J = 11\text{Hz}$), 128.2, 127.7, 121.4, 111.2, 110.8 (d, $J = 23\text{Hz}$), 110.7 (d, $J = 22\text{Hz}$), 107.8 (t, $J = 26\text{Hz}$); $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_2\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS (MALDI-FTMS) 理论值为 276.0467, 实测值为 276.0469。

[0329] 5-羧基-2-(2,6-二氟苯基)-苯并噁唑 (9)。按照一般步骤由 3-氨基-4-羟基苯甲酸制备, 得到为白色固体的 9 (6.8mg, 12%)。9 的数据: $^1\text{H NMR}$ (600MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.50-12.80 (br. s, 1H, CO_2H), 8.39 (ABM, 1H, $J = 0.7, 1.6\text{Hz}$, Ar), 8.10 (ABM, 1H, $J = 1.6, 8.7\text{Hz}$, Ar), 7.95 (ABM, 1H, $J = 0.7, 8.7\text{Hz}$, Ar), 7.77 (m, 1H, Ar), 7.40 (t, 2H, $J = 8.8\text{Hz}$, Ar); $^{13}\text{C NMR}$ (150MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 166.8, 160.4 (d, $J = 257\text{Hz}$), 160.3 (d, $J = 257\text{Hz}$), 155.4, 152.6, 140.8, 134.8 (t, $J = 11\text{Hz}$), 128.2, 127.7, 121.6, 113.0 (d, $J = 22\text{Hz}$), 112.9 (d, $J = 22\text{Hz}$), 111.2, 104.9; $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_2\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS (MALDI-FTMS) 理论值为 276.0467, 实测值为 276.0467。

[0330] 5-羧基-2-[(3-三氟甲基)苯基]-苯并噁唑 (10)。按照一般步骤由 3-氨基-4-羟基苯甲酸制备, 得到为白色固体的 10 (6.7mg, 11%)。10 的数据: $^1\text{H NMR}$ (500MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.30-12.80 (br. s, 1H, CO_2H), 8.51 (ABX, 1H, $J = 7.8\text{Hz}$, Ar), 8.45 (s, 1H, Ar), 8.35 (ABM, 1H, $J = 1.7\text{Hz}$, Ar), 8.08 (ABM, 1H, $J = 1.7, 8.6\text{Hz}$, Ar), 8.04 (ABX, 1H, $J = 7.8\text{Hz}$, Ar), 7.93 (ABM, 1H, $J = 8.6\text{Hz}$, Ar), 7.89 (ABX, 1H, $J = 7.8\text{Hz}$, Ar); $^{13}\text{C NMR}$ (125MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 166.8, 162.2, 153.1, 141.4, 131.4, 130.9, 130.1 (q, $J = 33\text{Hz}$), 128.8, 128.2, 127.5, 127.1, 123.8 (q, $J = 4\text{Hz}$), 123.7 (q, $J = 273\text{Hz}$), 121.3, 111.2; $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS (MALDI-FTMS) 理论值为 308.0529, 实测值为 308.0530。

[0331] 5-羧基-2-[(2-三氟甲基)苯基]-苯并噁唑 (11)。按照一般步骤由 3-氨基-4-羟基苯甲酸制备, 得到为白色固体的 11 (10.3mg, 17%)。11 的数据: $^1\text{H NMR}$ (600MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.19 (br. s, 1H, CO_2H), 8.38 (m, 1H, Ar), 8.19 (d, 1H, $J = 7.6\text{Hz}$, Ar), 8.09 (dd, 1H, $J = 1.8, 8.5\text{Hz}$, Ar), 8.03 (d, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$, Ar), 7.94-7.88 (m, 3H, Ar); $^{13}\text{C NMR}$ (150MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 166.8, 161.6, 153.2, 141.1, 133.1, 132.5, 132.4, 128.2, 127.6, 127.5 (q, $J = 32\text{Hz}$), 127.2 (q, $J = 6\text{Hz}$), 124.7, 123.4 (q, $J = 274\text{Hz}$), 121.6, 111.2; $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS (MALDI-FTMS) 理论值为 308.0529, 实测值为 308.0531。

[0332] 5-羧基-2-(3,5-二氯苯基)-苯并噁唑 (12)。按照一般步骤由 3-氨基-4-羟基苯甲酸制备, 得到为白色固体的 12 (7.3mg, 12%)。12 的数据: $^1\text{H NMR}$ (600MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.14 (br. s, 1H, CO_2H), 8.33 (AMX, 1H, $J = 0.6, 1.8\text{Hz}$, Ar), 8.16 (AM, 2H, $J = 1.8\text{Hz}$, Ar), 8.08 (AMX, 1H, $J = 1.8, 8.5\text{Hz}$, Ar), 7.95 (AM, 1H, $J = 1.8\text{Hz}$, Ar), 7.91 (AMX, 1H, $J = 0.6, 8.5\text{Hz}$, Ar); $^{13}\text{C NMR}$ (150MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 166.7, 161.1, 153.0, 141.3, 135.2, 131.6, 129.2, 128.2, 127.7, 125.9, 121.4, 111.3; $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS (MALDI-FTMS) 理论值为 307.9876, 实测值为 307.9879。

[0333] 5-羧基-2-(2,6-二氯苯基)-苯并噁唑 (13)。按照一般步骤由 3-氨基-4-羟基苯甲酸制备, 得到为白色固体的 13 (10.8mg, 18%)。13 的数据: $^1\text{H NMR}$ (600MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.08 (br. s, 1H, CO_2H), 8.43 (AMX, 1H, $J = 0.6, 1.8\text{Hz}$, Ar), 8.13 (AMX, 1H, $J = 1.8, 8.5\text{Hz}$, Ar), 7.98 (AMX, 1H, $J = 0.6, 8.5\text{Hz}$, Ar), 7.77-7.72 (m, 3H, Ar); $^{13}\text{C NMR}$ (150MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 166.7, 158.6, 152.8, 140.4, 134.8, 134.2, 128.8, 128.4, 127.8, 126.2, 121.8, 111.5; $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS (MALDI-FTMS) 理论值为 307.9876, 实测值为 307.9879。

[0334] 5-羧基-2-苯基-苯并噁唑(14)。按照一般步骤由3-氨基-4-羟基苯甲酸制备,得到为白色固体的14(11.5mg,24%)。14的数据: ^1H NMR(600MHz, DMSO- d_6) δ 13.12(br. s, 1H, CO_2H), 8.30(ABX, 1H, $J = 1.8\text{Hz}$, Ar), 8.20(dt, 2H, $J = 1.5, 6.7\text{Hz}$, Ar), 8.03(ABX, 1H, $J = 1.8, 8.5\text{Hz}$, Ar), 7.87(ABX, 1H, $J = 8.5\text{Hz}$, Ar), 7.67-7.60(m, 3H, Ar); ^{13}C NMR(150MHz, DMSO- d_6) δ 166.9, 163.6, 153.0, 141.6, 132.4, 129.4, 127.9, 127.5, 127.0, 126.0, 121.0, 111.0; $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS(MALDI-FTMS) 理论值为 240.0655, 实测值为 240.0656。

[0335] 6-羧基-2-(3,5-二氟苯基)-苯并噁唑(15)。按照一般步骤由4-氨基-3-羟基苯甲酸制备,得到为白色固体的15(10.3mg,19%)。15的数据: ^1H NMR(600MHz, DMSO- d_6) δ 13.22(br. s, 1H, CO_2H), 8.20(ABM, 1H, $J = 1.5\text{Hz}$, Ar), 7.98(ABM, 1H, $J = 1.5, 8.2\text{Hz}$, Ar), 7.86(ABM, 1H, $J = 8.2\text{Hz}$, Ar), 7.79-7.78(m, 2H, Ar), 7.57(tt, 1H, $J = 2.4, 9.4\text{Hz}$, Ar); ^{13}C NMR(150MHz, DMSO- d_6) δ 166.7, 162.7(d, $J = 248\text{Hz}$), 162.6(d, $J = 248\text{Hz}$), 162.4, 150.0, 144.7, 129.0(t, $J = 11\text{Hz}$), 128.7, 126.5, 120.0, 112.1, 110.9(d, $J = 23\text{Hz}$), 110.8(d, $J = 22\text{Hz}$), 108.0(t, $J = 26\text{Hz}$); $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_2\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS(MALDI-FTMS) 理论值为 276.0467, 实测值为 276.0468。

[0336] 6-羧基-2-(2,6-二氟苯基)-苯并噁唑(16)。按照一般步骤由4-氨基-3-羟基苯甲酸制备,得到为白色固体的16(8.5mg,15%)。16的数据: ^1H NMR(600MHz, DMSO- d_6) δ 13.25(br. s, 1H, CO_2H), 8.30(ABM, 1H, $J = 0.6, 1.5\text{Hz}$, Ar), 8.04(ABM, 1H, $J = 1.5, 8.2\text{Hz}$, Ar), 7.96(ABM, 1H, $J = 0.6, 8.2\text{Hz}$, Ar), 7.76(m, 1H, Ar), 7.39(t, 2H, $J = 8.8\text{Hz}$, Ar); ^{13}C NMR(150MHz, DMSO- d_6) δ 166.7, 160.4(d, $J = 257\text{Hz}$), 160.3(d, $J = 257\text{Hz}$), 156.6, 149.7, 144.2, 134.9(t, $J = 11\text{Hz}$), 128.8, 126.4, 120.1, 113.1, 112.9, 112.2(d, $J = 5\text{Hz}$), 105.0(t, $J = 16\text{Hz}$); $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_2\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS(MALDI-FTMS) 理论值为 276.0467, 实测值为 276.0466。

[0337] 6-羧基-2-[(3-三氟甲基)苯基]-苯并噁唑(17)。按照一般步骤由4-氨基-3-羟基苯甲酸制备,得到为白色固体的17(7.4mg,12%)。17的数据: ^1H NMR(600MHz, DMSO- d_6) δ 13.20(br. s, 1H, CO_2H), 8.48(ABX, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$, Ar), 8.41(s, 1H, Ar), 8.28(ABM, 1H, $J = 1.5\text{Hz}$, Ar), 8.03(ABX, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$, Ar), 8.02(ABM, 1H, $J = 1.5, 8.2\text{Hz}$, Ar), 7.90(ABM, 1H, $J = 8.2\text{Hz}$, Ar), 7.86(ABX, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$, Ar); ^{13}C NMR(150MHz, DMSO- d_6) δ 168.0, 164.6, 151.4, 146.2, 132.8, 132.2, 131.4(q, $J = 32\text{Hz}$), 130.2, 129.8, 128.4, 127.8, 125.2, 125.0(q, $J = 272\text{Hz}$), 121.2, 113.6; $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS(MALDI-FTMS) 理论值为 308.0529, 实测值为 308.0530。 $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS(MALDI-FTMS) 理论值为 308.0529, 实测值为 308.0531。

[0338] 6-羧基-2-[(2-三氟甲基)苯基]-苯并噁唑(18)。按照一般步骤由4-氨基-3-羟基苯甲酸制备,得到为白色固体的18(6.6mg,11%)。18的数据: ^1H NMR(600MHz, DMSO- d_6) δ 13.22(br. s, 1H, CO_2H), 8.30(ABX, 1H, $J = 0.6, 1.5\text{Hz}$, Ar), 8.20(d, 1H, $J = 7.3\text{Hz}$, Ar), 8.06(ABX, 1H, $J = 1.5, 8.2\text{Hz}$, Ar), 8.04(d, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$, Ar), 7.98(ABX, 1H, $J = 0.6, 8.2\text{Hz}$, Ar), 7.94(t, 1H, $J = 7.3\text{Hz}$, Ar), 7.90(t, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$, Ar); ^{13}C NMR(150MHz, DMSO- d_6) δ 168.0, 164.0, 151.6, 145.9, 133.8, 130.0, 129.0(q, $J = 32\text{Hz}$), 128.6(q, $J = 6$), 127.7, 126.0, 124.7(q, $J = 273\text{Hz}$), 121.6, 113.6; $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS(MALDI-FTMS) 理论值为 308.0529, 实测值为 308.0530。

[0339] 6-羧基-2-(3,5-二氯苯基)-苯并噁唑 (19)。按照一般步骤由 4-氨基-3-羟基苯甲酸制备,得到为白色固体的 19 (6.0mg, 10%)。19 的数据: ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 13.20 (br. s, 1H, CO_2H), 8.17 (ABX, 1H, $J = 0.6, 1.5\text{Hz}$, Ar), 8.00 (AB, 1H, $J = 2.0\text{Hz}$, Ar), 7.96 (ABX, 1H, $J = 1.5, 8.5\text{Hz}$, Ar), 7.83 (AB, 1H, $J = 2.0\text{Hz}$, Ar), 7.82 (ABX, 1H, $J = 0.6, 8.5\text{Hz}$, Ar); ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 166.6, 161.9, 150.0, 144.6, 135.1, 131.6, 129.0, 128.7, 126.4, 125.8, 119.9, 112.1; $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS (MALDI-FTMS) 理论值为 307.9876, 实测值为 307.9879。

[0340] 6-羧基-2-(2,6-二氯苯基)-苯并噁唑 (20)。按照一般步骤由 4-氨基-3-羟基苯甲酸制备,得到为白色固体的 20 (12.7mg, 21%)。20 的数据: ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 13.27 (br. s, 1H, CO_2H), 8.38 (ABX, 1H, $J = 0.5, 1.5\text{Hz}$, Ar), 8.09 (ABX, 1H, $J = 1.5, 8.3\text{Hz}$, Ar), 8.02 (ABX, 1H, $J = 8.3, 0.5\text{Hz}$, Ar), 7.78-7.71 (m, 3H, Ar); ^{13}C NMR (125MHz, DMSO- d_6) δ 166.6, 159.8, 150.0, 143.8, 134.8, 134.2, 129.1, 128.8, 126.4, 126.3, 120.4, 112.6; $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS (MALDI-FTMS) 理论值为 307.9876, 实测值为 307.9877。

[0341] 6-羧基-2-苯基-苯并噁唑 (21)。按照一般步骤由 4-氨基-3-羟基苯甲酸制备,得到为白色固体的 21 (7.0mg, 15%)。21 的数据: ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 13.16 (br. s, 1H, CO_2H), 8.27 (d, 1H, $J = 0.9\text{Hz}$, Ar), 8.25-8.22 (m, 2H, Ar), 8.01 (dd, 1H, $J = 1.5, 8.5\text{Hz}$, Ar), 7.89 (d, 1H, $J = 8.5\text{Hz}$, Ar), 7.69-7.62 (m, 3H, Ar); ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 166.8, 164.7, 150.0, 145.2, 132.6, 129.4, 128.0, 127.6, 126.3, 126.0, 119.6, 112.0; $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS (MALDI-FTMS) 理论值为 240.0655, 实测值为 240.0655。

[0342] 7-羧基-2-(3,5-二氟苯基)-苯并噁唑 (22)。按照一般步骤由 3-氨基水杨酸制备,得到为白色固体的 22 (8.8mg, 16%)。22 的数据: ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 13.55 (br. s, CO_2H), 8.10 (AMX, 1H, $J = 1.2, 7.9\text{Hz}$, Ar), 7.97 (AMX, 1H, $J = 1.2, 7.9\text{Hz}$, Ar), 7.80-7.79 (m, 2H, Ar), 7.63 (tt, 1H, $J = 2.4, 9.2\text{Hz}$, Ar), 7.55 (AMX, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$, Ar); ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 164.5, 162.8 (d, $J = 248\text{Hz}$), 162.6 (d, $J = 248\text{Hz}$), 160.9, 149.2, 142.6, 129.2, 128.0, 125.2, 124.9, 116.1, 110.6 (d, $J = 28\text{Hz}$), 107.7 (q, $J = 25\text{Hz}$); $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_2\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS (MALDI-FTMS) 理论值为 276.0467, 实测值为 276.0469。

[0343] 7-羧基-2-(2,6-二氟苯基)-苯并噁唑 (23)。按照一般步骤由 3-氨基水杨酸制备,得到为白色固体的 23 (7.3mg, 13%)。23 的数据: ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 13.48 (br. s, 1H, CO_2H), 8.16 (ABX, 1H, $J = 1.2, 8.2\text{Hz}$, Ar), 8.00 (ABX, H, $J = 1.2, 7.6\text{Hz}$, Ar), 7.78 (m, 1H, Ar), 7.57 (ABX, 1H, $J = 7.6, 8.2\text{Hz}$, Ar), 7.40 (t, 2H, $J = 8.5\text{Hz}$, Ar); ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 164.5, 160.4 (d, $J = 256\text{Hz}$), 160.3 (d, $J = 257\text{Hz}$), 154.9, 148.9, 142.1, 134.8 (t, $J = 10\text{Hz}$), 128.0, 125.1, 125.0, 116.0, 113.0 (d, $J = 22\text{Hz}$), 112.9 (q, $J = 21\text{Hz}$), 105.1 (t, $J = 17\text{Hz}$); $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_2\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS (MALDI-FTMS) 理论值为 276.0467, 实测值为 276.0467。

[0344] 7-羧基-2-[(3-三氟甲基)苯基]-苯并噁唑 (24)。按照一般步骤由 3-氨基水杨酸制备,得到为白色固体的 24 (7.9mg, 13%)。24 的数据: ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 13.51 (br. s, CO_2H), 8.48 (ABX, 1H, $J = 8.2\text{Hz}$, Ar), 8.40 (s, 1H, Ar), 8.10 (AMX, 1H, $J = 1.2, 7.9\text{Hz}$, Ar), 8.05 (ABX, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$, Ar), 7.96 (AMX, 1H, $J = 1.2, 7.6\text{Hz}$, Ar), 7.94 (ABX, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$, Ar), 7.54 (AMX, 1H, $J = 7.9, 7.6\text{Hz}$, Ar); ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 164.6,

161.7, 149.3, 142.7, 131.3, 131.0, 130.0 (q, $J = 32\text{Hz}$), 128.6 (d, $J = 3\text{Hz}$), 127.7, 127.2, 125.0, 124.8, 123.7 (q, $J = 272\text{Hz}$), 123.5, 116.0; $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS (MALDI-FTMS) 理论值为 308.0529, 实测值为 308.0532。

[0345] 7-羧基-2-[(2-三氟甲基)苯基]-苯并噁唑 (25)。按照一般步骤由 3-氨基水杨酸制备, 得到为白色固体的 25 (13.8mg, 22%)。25 的数据: ^1H NMR (600MHz, DMSO-d_6) δ 13.46 (br. s, 1H, CO_2H), 8.18 (d, 1H, $J = 76\text{Hz}$, Ar), 8.14 (AMX, 1H, $J = 1.2, 7.9\text{Hz}$, Ar), 8.03 (d, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$, Ar), 7.98 (AMX, 1H, $J = 1.2, 7.6\text{Hz}$, Ar), 7.94 (t, 1H, $J = 7.3\text{Hz}$, Ar), 7.89 (t, 1H, $J = 7.6\text{Hz}$, Ar), 7.56 (AMX, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$, Ar); ^{13}C NMR (150MHz, DMSO-d_6) δ 164.6, 161.1, 149.3, 142.4, 133.0, 132.4, 132.2, 127.8, 127.6, 127.2 (q, $J = 6\text{Hz}$), 125.0, 124.9, 123.4 (q, $J = 273\text{Hz}$), 116.2; $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS (MALDI-FTMS) 理论值为 308.0529, 实测值为 308.0534。

[0346] 7-羧基-2-(3,5-二氯苯基)-苯并噁唑 (26)。按照一般步骤由 3-氨基水杨酸制备, 得到为白色固体的 26 (7.0mg, 11%)。26 的数据: ^1H NMR (600MHz, DMSO-d_6) δ 14.00-12.80 (br. s, CO_2H), 8.10-8.08 (m, 3H, Ar), 7.98-7.96 (m, 2H, Ar), 7.55 (t, 1H, $J = 7.8\text{Hz}$, Ar); ^{13}C NMR (150MHz, DMSO-d_6) δ 164.5, 160.5, 149.2, 142.6, 135.2, 131.5, 129.4, 128.0, 125.6, 125.2, 124.8, 116.2; $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS (MALDI-FTMS) 理论值为 307.9876, 实测值为 307.9874。

[0347] 7-羧基-2-(2,6-二氯苯基)-苯并噁唑 (27)。按照一般步骤由 3-氨基水杨酸制备, 得到为白色固体的 27 (10.3mg, 17%)。27 的数据: ^1H NMR (600MHz, DMSO-d_6) δ 13.90-13.10 (br. s, CO_2H), 8.16 (AMX, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$, Ar), 8.02 (AMX, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$, Ar), 7.78-7.72 (m, 3H, Ar), 7.60 (AMX, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$, Ar); ^{13}C NMR (150MHz, DMSO-d_6) δ 164.4, 158.3, 149.1, 141.7, 134.9, 134.2, 128.8, 128.2, 126.5, 125.3, 125.2, 116.2; $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS (MALDI-FTMS) 理论值为 307.9876, 实测值为 307.9875。

[0348] 7-羧基-2-苯基-苯并噁唑 (28)。按照一般步骤由 3-氨基水杨酸制备, 得到为白色固体的 28 (13.1mg, 27%)。28 的数据: ^1H NMR (600MHz, DMSO-d_6) δ 13.48 (br. s, 1H, CO_2H), 8.20-8.19 (m, 2H, Ar), 8.05 (AMX, 1H, $J = 1.2, 7.9\text{Hz}$, Ar), 7.92 (AMX, 1H, $J = 1.2, 7.6\text{Hz}$, Ar), 7.66-7.62 (m, 3H, Ar), 7.50 (AMX, 1H, $J = 7.9\text{Hz}$, Ar); ^{13}C NMR (150MHz, DMSO-d_6) δ 164.8, 163.1, 149.2, 142.9, 132.2, 129.4, 127.4, 127.2, 126.0, 124.7, 124.4, 115.8; $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_3(\text{MH}^+)$ 的 HRMS (MALDI-FTMS) 理论值为 240.0655, 实测值为 240.0656。

[0349] 其它实施方案

[0350] 应当理解的是, 尽管已经连同其详细说明阐述了本发明, 但前文的描述仅具说明作用, 不限制本发明的范围。本发明的其它方面、优势和修改都在下文提出的权利要求书的范围内。

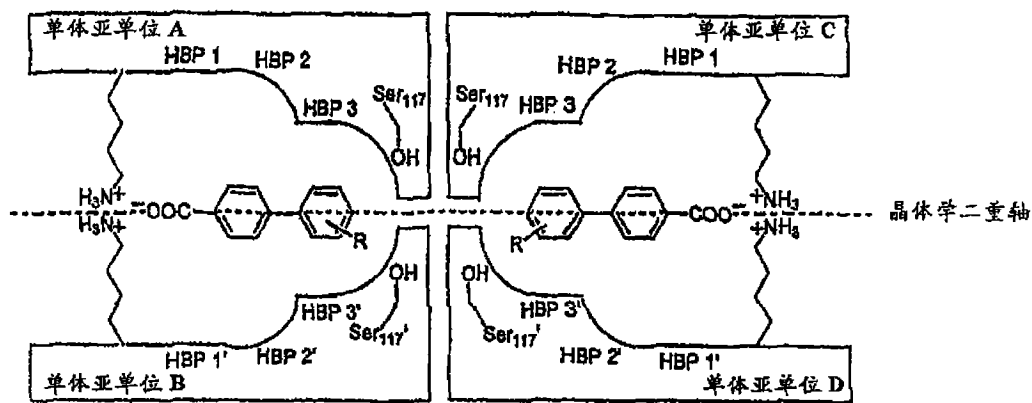


图 1

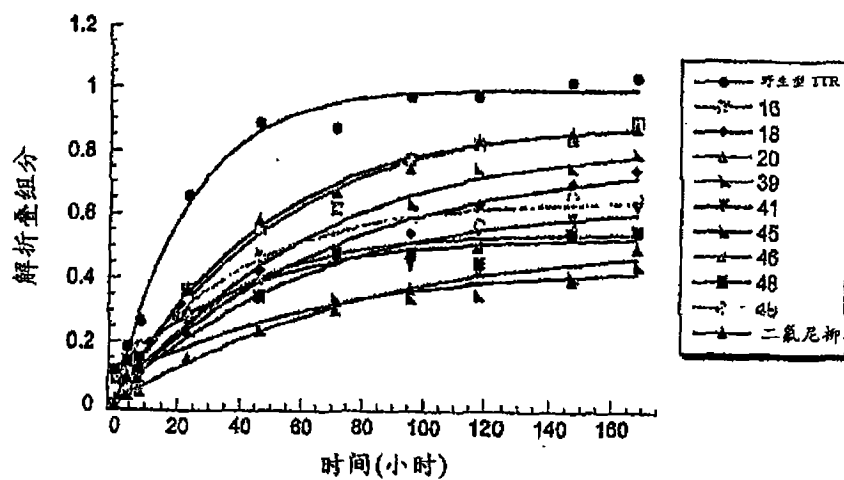


图 2A

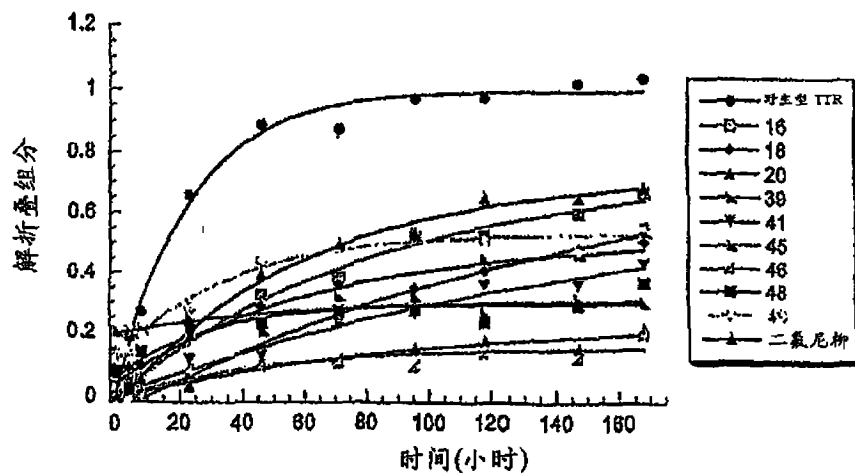


图 2B

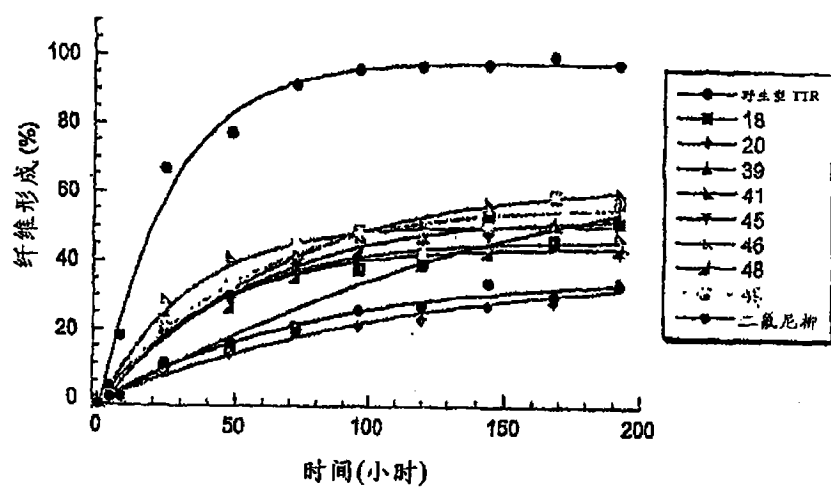


图 3A

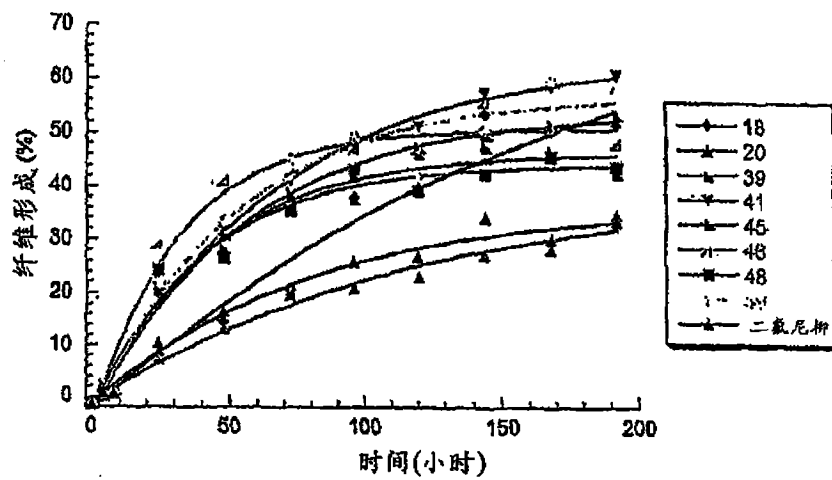


图 3B

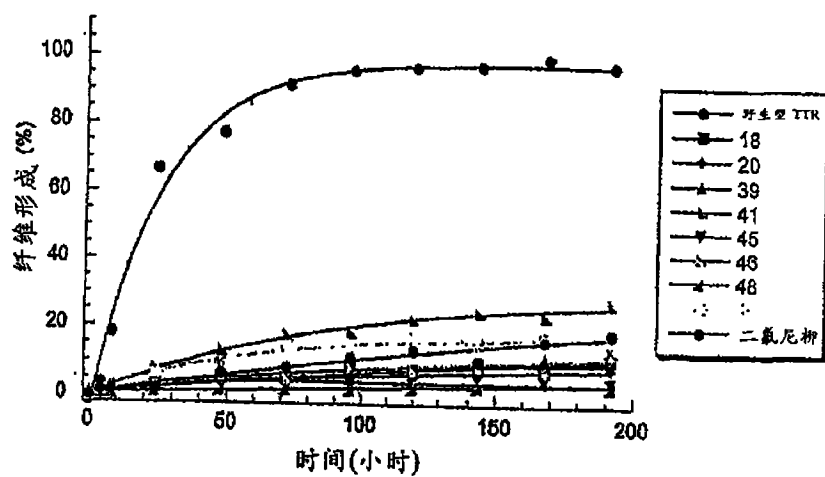


图 4A

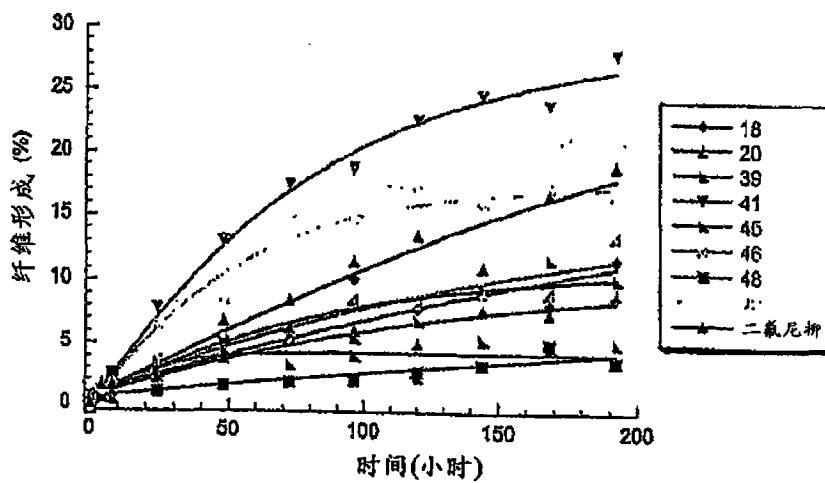


图 4B

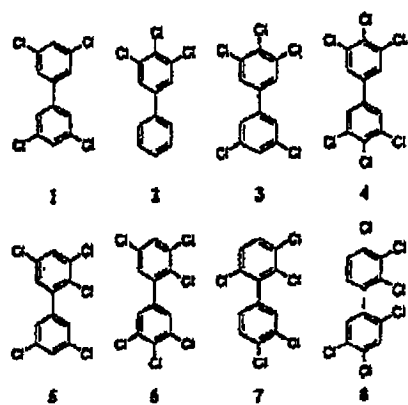


图 5

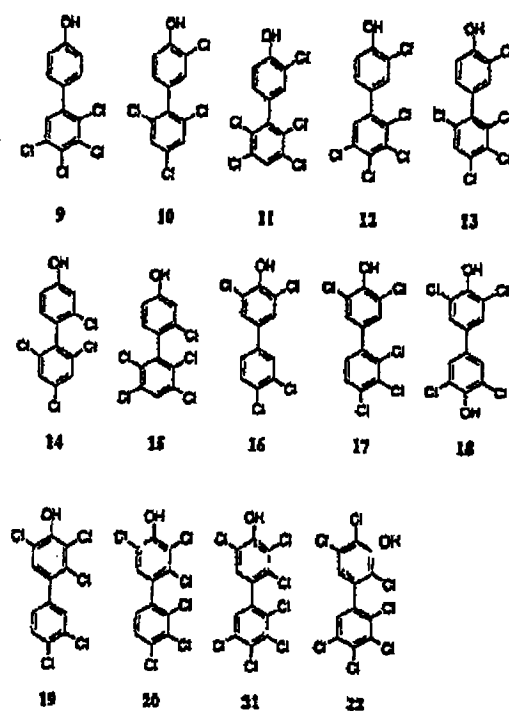


图 6

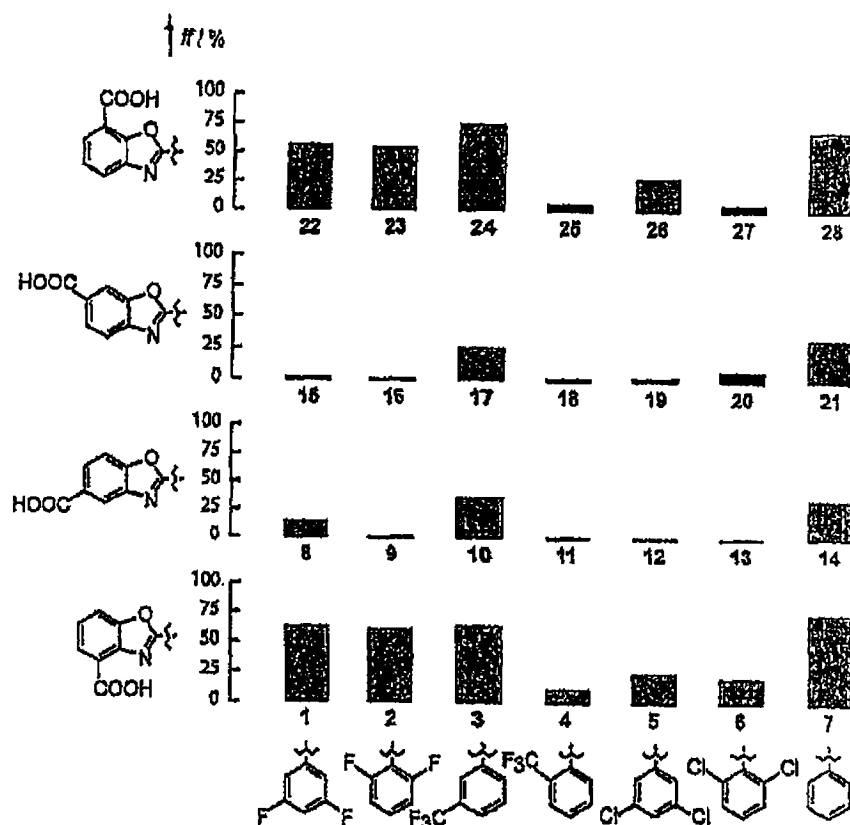


图 7

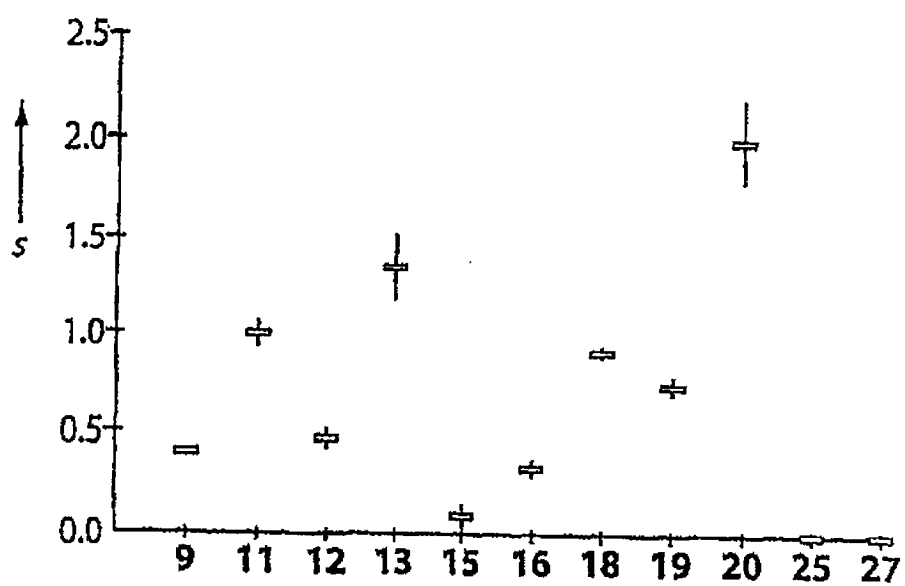


图 8

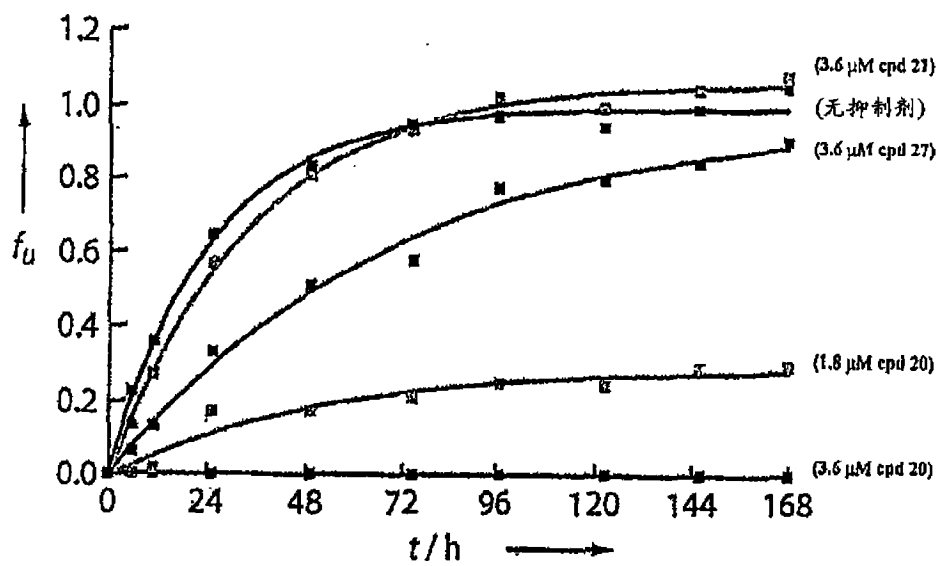


图 9

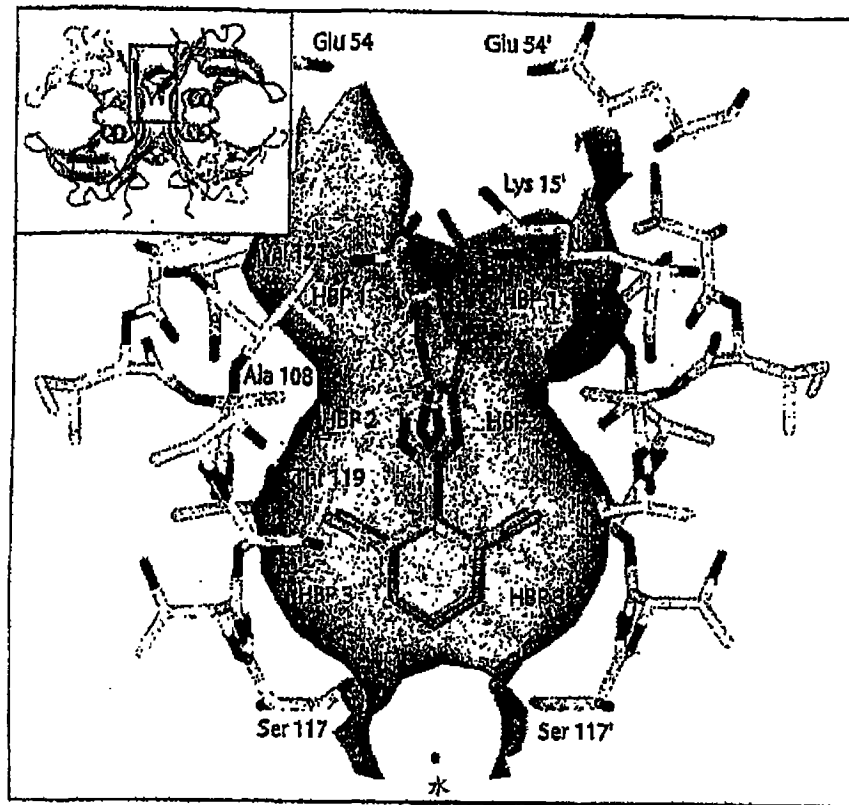


图 10