



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103889407 B

(45)授权公告日 2017.03.15

(21)申请号 201280051812.8

A61K 31/275(2006.01)

(22)申请日 2012.10.23

A61P 25/28(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103889407 A

(43)申请公布日 2014.06.25

(30)优先权数据

11382326.4 2011.10.24 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.04.21

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/070945 2012.10.23

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/060668 EN 2013.05.02

(73)专利权人 索姆创新生物技术公司

地址 西班牙巴塞罗那

(72)发明人 马克·桑德拉斯卡萨多

劳尔·因萨博罗纳特

努利亚·雷格博拉诺

努利亚·加瓦尔巴塔拉

(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有

限公司 11270

代理人 武晨燕 张颖玲

(51)Int.Cl.

A61K 31/04(2006.01)

(56)对比文件

CN 1953746 A,2007.04.25,

CN 101198598 A,2008.06.11,

CN 1921856 A,2007.02.28,

Saviana Di Giovanni et al.Entacapone and Tolcapone, Two Catechol O-Methyltransferase Inhibitors, Block Fibril Formation of α -Synuclein and β -Amyloid and Protect against Amyloid-induced Toxicity.《JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》.2010,第285卷(第20期),14941-14954.

Saviana Di Giovanni et al.Entacapone and Tolcapone, Two Catechol O-Methyltransferase Inhibitors, Block Fibril Formation of α -Synuclein and β -Amyloid and Protect against Amyloid-induced Toxicity.《JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》.2010,第285卷(第20期),14941-14954.

审查员 刘鑫

权利要求书3页 说明书16页 附图2页

(54)发明名称

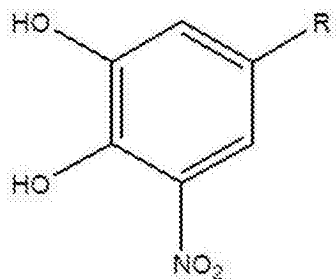
用于甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性的疗法

(57)摘要

提供了一种用于在预防和/或治疗甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性中使用的儿茶酚-O-甲基转移酶(COMT)抑制剂。还提供了一种与另一种COMT抑制剂、一种苯并噁唑衍生物、碘代二氟尼柳、二氟尼柳、白藜芦醇、牛熊去氧胆酸、多西环素或表没食子儿茶素-3-没食子酸酯处于联合治疗的儿茶酚-O-甲基转移酶(COMT)抑制剂,用

于在预防和/或治疗甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性中使用。

1. 一种儿茶酚-O-甲基转移酶 (COMT) 抑制剂用于制备预防和/或治疗甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性的药物的用途, 其中所述COMT抑制剂是一种具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其一种药学上可接受的盐;



(化学式 I)

其中R选自下组, 该组由以下各项组成: $-C(O)-PhCH_3$ 、 $-CH=C(CN)-C(O)-NEt_2$ 和 $-CH=C(C(O)CH_3)_2$ 。

2. 根据权利要求1所述的儿茶酚-O-甲基转移酶 (COMT) 抑制剂的用途, 其中该COMT抑制剂是托卡朋或其一种药学上可接受的盐。

3. 根据权利要求1或2中任一项所述的儿茶酚-O-甲基转移酶 (COMT) 抑制剂的用途, 其中该甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性是家族性淀粉状蛋白多神经病。

4. 根据权利要求1或2中任一项所述的儿茶酚-O-甲基转移酶 (COMT) 抑制剂的用途, 其中该甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性是老年系统性淀粉样变性。

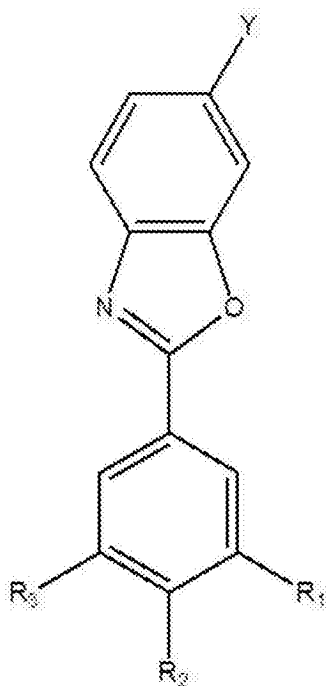
5. 根据权利要求1或2中任一项所述的儿茶酚-O-甲基转移酶 (COMT) 抑制剂的用途, 其中该甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性是柔脑膜淀粉样变性。

6. 根据权利要求1或2中任一项所述的儿茶酚-O-甲基转移酶 (COMT) 抑制剂的用途, 其中该甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性是家族性类淀粉蛋白心肌病。

7. 根据权利要求1或2中任一项所述的儿茶酚-O-甲基转移酶 (COMT) 抑制剂的用途, 其中将该COMT抑制剂作为一种可注射的剂型、作为一种口服剂型或作为一种控释剂型来给予。

8. 一种如在权利要求1中所定义的儿子茶酚-O-甲基转移酶 (COMT) 抑制剂用于制备预防和/或治疗甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性的药物的用途, 该药物与一种选自下组的另外的治疗剂处于联合治疗, 该组由以下各项组成:

如在权利要求1中所定义的另一COMT抑制剂、一种苯并噁唑衍生物、碘代二氟尼柳、二氟尼柳、白藜芦醇、牛熊去氧胆酸、多西环素以及表没食子儿茶素-3-没食子酸酯, 其中该苯并噁唑衍生物是一种具有化学式VI的化合物



化学式 VI

或其一种药学上可接受的盐,其中:

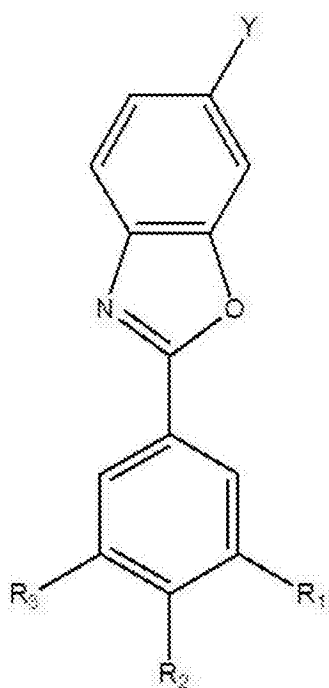
Y选自下组,该组由以下各项组成:COOH和OH;并且

R^1 、 R^2 和 R^3 各自独立地选自下组,该组由以下各项组成:氢、卤素、OH、 $B(OH)_2$ 以及 CF_3 。

9. 根据权利要求8所述的儿茶酚-O-甲基转移酶 (COMT) 抑制剂的用途,其中该苯并噁唑衍生物是氯苯唑酸。

10. 根据权利要求8所述的儿茶酚-O-甲基转移酶 (COMT) 抑制剂的用途,其中将该COMT抑制剂作为一种可注射的剂型、作为一种口服剂型或作为一种控释剂型来给予。

11. 一种如在权利要求1中所定义的儿茶酚-O-甲基转移酶 (COMT) 抑制剂和一种选自下组的另外的治疗剂的组合用于制备预防和/或治疗甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性的药物的用途,该组由以下各项组成:如在权利要求1中所定义的另一COMT抑制剂、一种苯并噁唑衍生物、碘代二氟尼柳、二氟尼柳、白藜芦醇、牛熊去氧胆酸、多西环素以及表没食子儿茶素-3-没食子酸酯,其中该苯并噁唑衍生物是一种具有化学式VI的化合物



(化学式 VI)

或其一种药学上可接受的盐,其中:

Y选自下组,该组由以下各项组成:COOH和OH;

R¹、R²和R³各自独立地选自下组,该组由以下各项组成:氢、卤素、OH、B(OH)₂以及CF₃。

用于甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性的疗法

技术领域

[0001] 本发明与淀粉样蛋白病的领域相关,并且具体地,与用于预防和/或治疗甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性的新化合物相关。

背景技术

[0002] 淀粉样变性是指其中淀粉样蛋白不正常地沉积在器官和/或组织中的多种病症。这些淀粉样蛋白有时以不正常的纤维样形式(被称作淀粉样蛋白原纤维或淀粉样沉着物)存在,该不正常的纤维样形式积累并且渐进地干扰遍及全身的受影响的器官的结构和功能。不同的蛋白质与不同类型的淀粉样蛋白病有关,并且治疗取决于具体的淀粉样蛋白。

[0003] 甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性是一组特异性地与甲状腺素运载蛋白不正常的错折叠、聚集(原纤维形成)以及随后的沉积相关的淀粉样蛋白病的一般名称。甲状腺素运载蛋白(TTR)蛋白质是甲状腺激素甲状腺素和视黄醇的血清和脑脊液载体。位于人类染色体18q12.1-11.2上的TTR基因的突变有时导致TTR蛋白的不稳定,这导致不正常的聚集和甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样蛋白病。已知超过80种类淀粉蛋白形成的TTR的变体,其中最常见的是被称作TTR V30M。

[0004] 家族性淀粉状蛋白多神经病(FAP)(也被称作甲状腺素运载蛋白相关的遗传性淀粉样变性、甲状腺素运载蛋白淀粉样变性或科利诺安德拉德氏病(Corino de Andrade's disease)是一种常染色体显性神经退行性疾病。通常在20岁与40岁之间自身显现,其特征是疼痛、感觉异常、肌无力以及自主神经机能异常。在其晚期状态,累及肾脏和心脏。FAP特征是TTR蛋白的类淀粉蛋白变体的全身性沉积(尤其是在周围神经系统中),这导致进行性的感觉和运动多神经病。到目前为止,这种疾病是全世界最常见类型的遗传性淀粉样变性。

[0005] 其他类型的甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性是由类淀粉蛋白TTR在心脏中沉积导致的家族性类淀粉蛋白心肌病和老年系统性淀粉样变性,以及在柔脑膜血管壁、在软膜蛛网膜并且还在软膜下的空间沉积中发现TTR的淀粉样沉积物的柔脑膜淀粉样变性。后一种病症与显现为痴呆、共济失调、以及痉挛状态的中枢神经系统损伤的临床状况相关。

[0006] 然而,到目前为止,仍没有阻断类淀粉蛋白沉积或加速其清除的治疗,淀粉样蛋白病的治疗的目的在于支持衰竭器官的功能。由于TTR蛋白主要在肝脏中产生,所以肝移植通常被用作甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性(特别是FAP)的治疗。用制造正常的甲状腺素运载蛋白蛋白质的肝脏替换包含突变的TTR基因的肝脏的目的在于阻止另外的类淀粉蛋白的形成并且可以稳定该疾病。已经为患有FAP的患者进行了肝移植,其中在许多病例中是非常成功的。然而,肝移植不总是一个可供使用的选择,并且此外,随着经验增加,越来越清楚的是用于FAP的肝移植应该在已经对神经或心脏造成太多损害之前进行。悲哀地是,后者可以在不引起任何症状的情况下出现。

[0007] 极少的化合物已经被描述为发挥对抗原纤维形成以及随后的TTR的沉积的抑制活性。在这些中间,碘代二氟尼柳(iododiflunisal)已经被Gales(盖尔斯)等人报道为有效力

的体外类淀粉蛋白抑制剂(盖尔斯L,Macedo-Ribeiro(马塞-里贝罗)S,Arsequell(阿斯奎丽)G,Valencia(瓦伦西亚)G,Saraiva(萨莱瓦)MJ,Damas(达马斯)AM.“Human transthyretin in complex with iododiflunisal:structural features associated with a potent amyloid inhibitor(与碘代二氟尼柳处于络合物形式的人甲状腺素运载蛋白:与有效力的类淀粉蛋白抑制剂相关的结构特征”,Biochem J(生物化学杂志),2005,第388卷,第615-621页)。此外,专利申请WO 2005/113523披露了用于稳定TTR淀粉样蛋白,从而阻止TTR类淀粉蛋白原纤维的形成的苯并噁唑化合物。声称这些化合物可用于治疗甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样蛋白病。

[0008] 特别地,一种被称作氯苯唑酸((2-(3,5-二氯苯基)-1,3-苯并噁唑-6-羧酸)的苯并噁唑衍生物已经被描述为抑制TTR的不正常聚集和原纤维形成,并且正经历用于FAP的治疗的临床试验。尽管是一种有前途的远景,但是氯苯唑酸仍处于主要的官方药品注册办事处的评估之下。因此,氯苯唑酸的临床相关性仍需阐明。

[0009] 尽管在该领域中已经做出了相当大的努力,但是到目前为止还没有用于FAP的治疗的有效的药理学疗法。所以,提供用于FAP以及其他甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性的治疗的替代性化合物是令人希望的。

发明内容

[0010] 诸位发明人已经出人意料地发现儿茶酚-O-甲基转移酶(COMT)抑制剂可用于预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性。

[0011] 如在下面的实例中所示,COMT抑制剂托卡朋具有针对TTR类淀粉蛋白形成的高的抑制活性。托卡朋的良好抑制活性由其低IC₅₀值和高百分数的淀粉样变性减少(RA%)值揭示。

[0012] 因此,本发明的一个第一方面涉及一种用于在预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性中使用的COMT抑制剂。可以用COMT抑制剂用于制备预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性的药物的用途的形式来重新阐述这一方面。

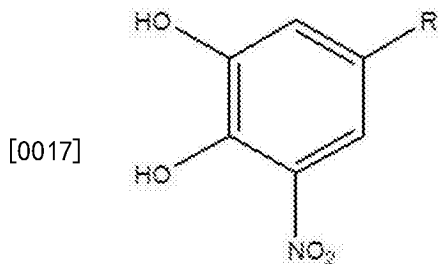
[0013] 一种用于预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性的方法也形成本发明的一部分,该方法包括向一位对其有需要的受试者给予一种COMT抑制剂。在一个具体实施例中,对预防和/或治疗有需要的受试者是一种哺乳动物,包括人。在一个另外的优选实施例中,该哺乳动物是人。

[0014] 与到目前为止作为FAP治疗的最先进的药理学化合物的氯苯唑酸相比,托卡朋具有四倍低的体外IC₅₀,这意味着抑制50%的TTR原纤维形成所需的托卡朋的浓度比氯苯唑酸低得多(参见下面的实例)。此外,下面的实例说明托卡朋以比氯苯唑酸更大程度地结合TTR并且阻止TTR-诱导的细胞毒性。根据这些结果,托卡朋比参比氯苯唑酸化合物更有效地减少TTR原纤维形成。除了阻止TTR原纤维形成以外,诸位发明人已经发现托卡朋展示出对现存TTR原纤维的重要的破坏活性。下面呈现的这些结果说明托卡朋的TTR原纤维破坏活性比氯苯唑酸要高。

[0015] COMT抑制剂作为抑制儿茶酚-O-甲基转移酶的作用的化合物在现有技术中是为人熟知的,儿茶酚-O-甲基转移酶是在降解神经递质中涉及的一种酶(Mannisto(曼妮斯托)和Kaakkola(卡口拉),Pharm.Rev.(药学评论),1999,第51卷,第593-628页)。可以通过本领域

已知的方法确定COMT抑制剂活性,例如披露于Zürcher(许理和)等人(Biomedical Chromatography (生物医学色谱法),1996,第10卷,第32-36页)中的方法。COMT抑制剂连同多巴胺能试剂(例如L-DOPA)在用于治疗帕金森氏病的药理学领域中是为人熟知的。

[0016] 已经描述了若干COMT抑制剂。托卡朋、恩他卡朋、以及硝替卡朋属于所谓的“第二代COMT抑制剂”,已经证明它们是有效力的、具有高度选择性、并且具有口服活性的COMT抑制剂。硝基儿茶酚是这些分子中的关键结构(Pharm.Rev.(药学评论),1999,第51卷,第593-628页,同上)。因此,在一个实施例中,用于在预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性中使用的COMT抑制剂是一种硝基儿茶酚化合物。在一个具体实施例中,该硝基儿茶酚化合物具有以下化学式I

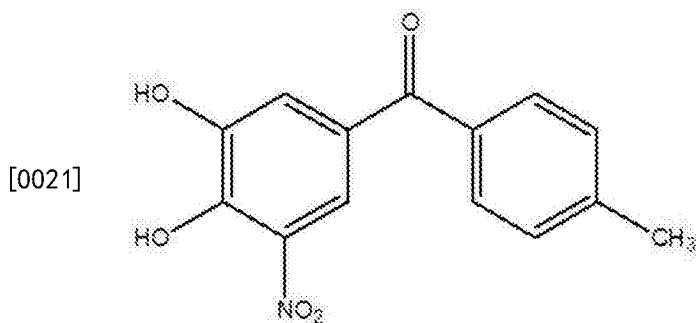


(化学式 I)

[0018] 或其药学上可接受的盐,其中R= $-\text{C}(\text{O})-\text{PhCH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{C}(\text{CN})-\text{C}(\text{O})-\text{NEt}_2$ 或 $-\text{CH}=\text{C}(\text{C}(\text{O})\text{CH}_3)_2$ 。

[0019] 在本发明的第一方面的另一个实施例中,该COMT抑制剂是托卡朋、恩他卡朋或硝替卡朋、或其药学上可接受的盐。

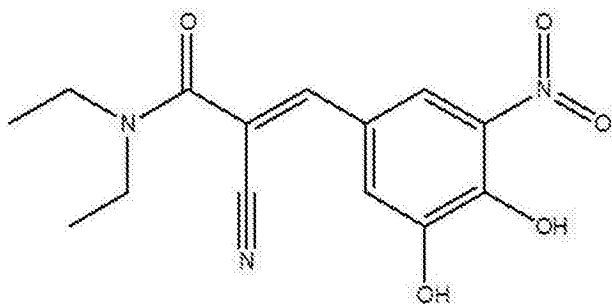
[0020] 在一个具体实施例中,该COMT抑制剂是托卡朋、或其药学上可接受的盐。托卡朋(化学式II)是一种黄色的、无臭的、非吸湿的、结晶化合物,相对分子量为273.25。其实验式是 $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_5$ 。托卡朋的化学名称是3,4-二羟基-4'-甲基-5-硝基二苯甲酮并且其CAS参考号是134308-13-7。



(化学式 II)

[0022] 在本发明的第一方面的另一个实施例中,该COMT抑制剂是恩他卡朋、或其药学上可接受的盐。恩他卡朋(化学式III)是一种黄色的结晶化合物,分子量为305.29。其实验式是 $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_5$ 。恩他卡朋的化学名称是(2E)-2-氰基-3-(3,4-二羟基-5-硝基苯基)-N,N-二甲基-2-丙烯酰胺并且其CAS参考号是130929-57-6。

[0023]



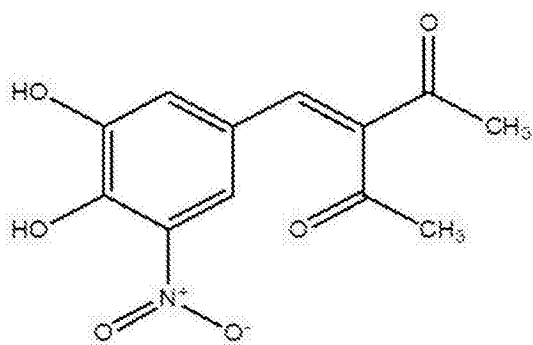
(化学式 III)

[0024] 由于这些化合物自从1998年起已经被美国食品与药品管理局 (FDA) 和欧洲药品管理局 (EMA) 批准为用于治疗帕金森病的医学用途的药物, 因此已经在若干临床试验种研究了托卡朋和恩他卡朋的生物利用度和安全性曲线。像这样, 这些化合物具有用于人类使用的可接受的安全性曲线以及良好的生物利用度。其安全性曲线连同其对抗TTR原纤维形成的高抑制活性使得COMT抑制剂成为用于预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性的有前途的药物。

[0025] 此外, 由于已经使这些化合物经受用于治疗人类疾病的临床试验, 因此当与新化学实体的传统研发相比时, 临床概念验证实现起来是不太危险的 (并且更快)。在这个意义上, 强调需要在人类和动物中进行相当少的实验是重要的, 这随后意味着更低的研究成本并且更重要的是, 人类和动物遭受更少的痛苦。

[0026] 在本发明的第一方面的另一个实施例中, 该COMT抑制剂是硝替卡朋、或其药学上可接受的盐。硝替卡朋 (化学式IV) 是一种分子量为265.21的化合物。其实验式是 $C_{12}H_{11}NO_6$, 化学名称是3-[(3,4-二羟基-5-硝基苯基)亚甲基]-2,4-戊二酮, 并且CAS参考号是116313-94-1。

[0027]



(化学式 IV)

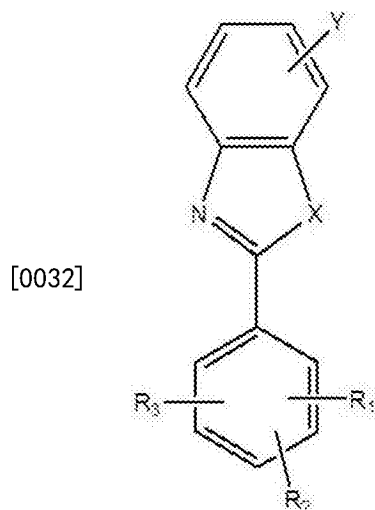
[0028] 在本发明的一个优选实施例中, 该TTR-相关的淀粉样变性是FAP。在另一个实施例中, 该TTR-相关的淀粉样变性是老年系统性淀粉样变性。在另一个实施例中, 该TTR-相关的淀粉样变性是家族性类淀粉蛋白心肌病。在又一个实施例中, 该TTR-相关的淀粉样变性是柔脑膜淀粉样变性。

[0029] COMT抑制剂 (例如上面定义的那些) 可以单独或与其他治疗剂组合使用, 用于预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性。因此, 在一个第二方面中, 本发明涉及一种COMT抑制剂和一种另外的治疗剂的组合, 用于预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性。可以用一种COMT抑制剂和一种另外的治疗剂的组合, 用于预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性的形式来重新阐述这一实施例。此外, 一种用于预防和/或治疗甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性

的方法也形成本发明的一部分,该方法包括向一位对其有需要的受试者给予一种COMT抑制剂和一种另外的治疗剂的组合。用于在本发明的第二方面中使用的另外的治疗剂的非限制性实例是另一种COMT抑制剂、苯并噁唑衍生物、碘代二氟尼柳、二氟尼柳、白藜芦醇、牛熊去氧胆酸、多西环素 (doxocycline) 以及表没食子儿茶素-3-没食子酸酯 (EGCG)。优选地,该COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐。熟练人士将理解地是,上面提及的另外的治疗剂的药学上可接受的盐也可以在本发明的第二方面的组合中使用。

[0030] 在本发明的第二方面的一个实施例中,提供了一种COMT抑制剂和一种另外的选自下组的治疗剂的组合,该组由以下各项组成:另一种COMT抑制剂、苯并噁唑衍生物、以及碘代二氟尼柳,用于在预防和/或治疗甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性中使用。优选地,该COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐。

[0031] 苯并噁唑衍生物在国际专利申请WO 2005113523中被披露为稳定TTR的天然状态,由此抑制蛋白错折叠的化合物。在本发明的第二方面的一个实施例中,这些苯并噁唑衍生物是具有化学式V的化合物:



(化学式 V)

[0033] 或其一种药学上可接受的盐,其中:

[0034] Y是COOR、四唑基、CONHOR、B(OH)₂或OR;

[0035] X是O;并且

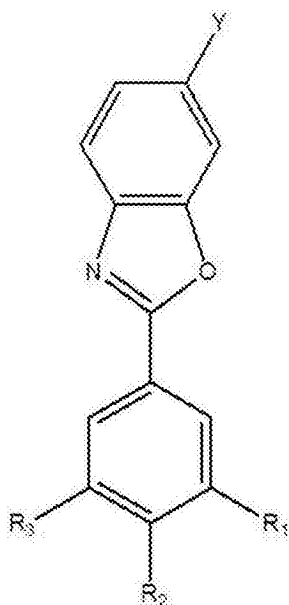
[0036] R¹、R²和R³各自独立地选自氢、卤素、OR、B(OH)₂或CF₃,并且

[0037] 其中R是氢、C₁-C₆烷基、C₁-C₆烯基、C₁-C₆炔基、C₁-C₆环烷基、C₁-C₆杂环基、苯基、二甲苯基、萘基、噻吩基、吡啶基或吡啶基。

[0038] 在本发明的第二方面的一个具体实施例中,该COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐并且另外的治疗剂是如上所定义的具有化学式V的苯并噁唑衍生物或其药学上可接受的盐。

[0039] 在本发明的第二方面的另一个实施例中,该苯并噁唑衍生物是一种具有化学式VI的化合物

[0040]



(化学式 VI)

[0041] 或其一种药学上可接受的盐,其中:

[0042] Y是COOH、或OH;并且

[0043] R^1 、 R^2 和 R^3 各自独立地选自氢、卤素、OH、 $B(OH)_2$ 或 CF_3 。

[0044] 在一个具体实施例中,该COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐并且另外的治疗剂是如上所定义的具有化学式VI的苯并噁唑衍生物或其药学上可接受的盐。

[0045] 在另一个实施例中,该苯并噁唑衍生物是氯苯唑酸。在一个具体实施例中,该COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐并且另外的治疗剂是氯苯唑酸。在另一个具体实施例中,该COMT抑制剂是托卡朋或其药学上可接受的盐并且另外的治疗剂是氯苯唑酸。

[0046] 在本发明的第二方面的另一个实施例中,另外的治疗剂是碘代二氟尼柳。在一个具体实施例中,该COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐并且另外的治疗剂是碘代二氟尼柳。在另一个具体实施例中,该COMT抑制剂是托卡朋或其药学上可接受的盐并且另外的治疗剂是碘代二氟尼柳。

[0047] 在另一个具体实施例中,该COMT抑制剂与另一种COMT抑制剂组合。优选地,这些COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐。例如,本发明提供了一种托卡朋和恩他卡朋的组合,用于预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性。

[0048] 在本发明的第二方面的一个另外的实施例中,提供了一种COMT抑制剂和一种另外的选自下组的治疗剂的组合,该组由以下各项组成:二氟尼柳、白藜芦醇、牛熊去氧胆酸、多西环素以及EGCG,用于在预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性中使用。EGCG是绿茶中的主要的并且是最有意义的多酚。在本发明的意义上,EGCG可以被用作分离的化合物或形成植物提取物(特别是茶叶提取物)的一部分。优选地,该COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐。更优选地,该COMT抑制剂是托卡朋或其药学上可接受的盐。一个具体实施例提供了托卡朋或其药学上可接受的盐和

EGCG的组合,用于在预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性中使用。

[0049] 如将对本领域的普通技术人员而言显而易见的,本发明的组合不仅在这些有效成分在单一组合物中使用是有效的,并且当这些有效成分在两个不同的组合物中使用也是有效的,这两个不同的组合物同时给予或在一定的时间段后顺序地或分开地给予。此外,本领域的普通技术人员将理解的是,可以将该COMT抑制剂开处方以与其他有效成分在联合治疗中一起使用,以便预防和/或治疗甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性,并且反之亦然。

[0050] 因此,本发明的一个第三方面提供了一种与一种另外的治疗剂处于联合治疗的COMT抑制剂,用于在预防和/或治疗甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性中使用。可以用与一种另外的治疗剂处于联合治疗的COMT抑制剂用于制备预防和/或治疗甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性的药物的用途的形式来重新阐述这一实施例。一种用于预防和/或治疗甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性的方法也形成本发明的一部分,该方法包括向一位对其有需要的受试者给予一种与一种另外的治疗剂组合的COMT抑制剂。

[0051] 用于在本发明的第三方面中使用的另外的治疗剂的非限制性实例是另一种COMT抑制剂、苯并噁唑衍生物、碘代二氟尼柳、二氟尼柳、白藜芦醇、牛熊去氧胆酸、多西环素以及EGCG。优选地,该COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐。熟练人士将理解的是,上面提及的另外的治疗剂的药学上可接受的盐也可以在本发明的第三方面的联合治疗中使用。

[0052] 在本发明的第三方面的一个实施例中,提供了一种与一种另外的选自下组的治疗剂处于联合治疗的COMT抑制剂,用于在预防和/或治疗甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性中使用,该组由以下各项组成:另一种COMT抑制剂、苯并噁唑衍生物、以及碘代二氟尼柳。优选地,该COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐。

[0053] 在本发明的第三方面的一个具体实施例中,另外的治疗剂是另一种COMT抑制剂。优选地,这些COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐。例如,本发明提供了与恩他卡朋组合的用于预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性的托卡朋。在另一个具体实施例中,另外的治疗剂是一种苯并噁唑衍生物。优选地,所述苯并噁唑衍生物是一种如本发明的第二方面所定义的具有化学式V或VI的化合物或其药用盐。例如,本发明提供了一种与氯苯唑酸组合的用于预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性的COMT抑制剂。优选地,该COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐。更优选地,该COMT抑制剂是托卡朋或其药学上可接受的盐。因此,本发明提供了与氯苯唑酸组合的用于预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性的托卡朋。在又一个实施例中,另外的治疗剂是碘代二氟尼柳。在又一个实施例中,另外的治疗剂是碘代二氟尼柳并且该COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐。因此,本发明提供了与碘代二氟尼柳组合的用于预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性的托卡朋或其药学上可接受的盐。

[0054] 在本发明的第三方面的一个另外的实施例中,提供了一种与一种选自下组的另外的治疗剂处于联合治疗的COMT抑制剂,该组由以下各项组成:二氟尼柳、白藜芦醇、牛熊去

氧胆酸、多西环素以及EGCG,用于在预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性中使用。优选地,该COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐。更优选地,该COMT抑制剂是托卡朋或其药学上可接受的盐。在一个具体实施例中,本发明提供了与EGCG处于联合治疗的托卡朋或其药学上可接受的盐,用于在预防和/或治疗甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性中使用。

[0055] 本发明的一个第四方面提供了一种与一种COMT抑制剂处于联合治疗的选自下组的治疗剂,该组由以下各项组成:苯并噁唑衍生物、碘代二氟尼柳、二氟尼柳、白藜芦醇、牛熊去氧胆酸、多西环素以及EGCG,用于在预防和/或治疗甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性中使用。优选地,该COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐。熟练人士将理解的是,上面提及的治疗剂的药学上可接受的盐也可以在本发明的第四方面的联合治疗中使用。

[0056] 在本发明的第四方面的一个实施例中,提供了一种与一种COMT抑制剂处于联合治疗的选自下组的治疗剂,该组由以下各项组成:苯并噁唑衍生物和碘代二氟尼柳,用于在预防和/或治疗甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性中使用。优选地,该COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐。

[0057] 在本发明的第四方面的一个具体实施例中,该治疗剂是一种苯并噁唑衍生物。优选地,所述苯并噁唑衍生物是一种如本发明的第二方面所定义的具有化学式V或VI的化合物或其药用盐。例如,本发明提供了与一种COMT抑制剂组合的用于预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性的氯苯唑酸。优选地,该COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐。更优选地,该COMT抑制剂是托卡朋或其药学上可接受的盐。因此,本发明提供了与托卡朋或其药学上可接受的盐组合的用于预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性的氯苯唑酸。在又一个实施例中,该治疗剂是碘代二氟尼柳。在又一个实施例中,另外的治疗剂是碘代二氟尼柳并且该COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐。本发明提供了与托卡朋或其药学上可接受的盐组合的用于预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性的碘代二氟尼柳。

[0058] 在本发明的第四方面的一个另外的实施例中,提供了一种与一种COMT抑制剂处于联合治疗的选自下组的治疗剂,该组由以下各项组成:二氟尼柳、白藜芦醇、牛熊去氧胆酸、多西环素以及EGCG,用于在预防和/或治疗甲状腺素运载蛋白相关的淀粉样变性中使用。优选地,该COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐。更优选地,该COMT抑制剂是托卡朋或其药学上可接受的盐。一个具体实施例提供了与托卡朋或其药学上可接受的盐处于联合治疗的用于预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性的EGCG。

[0059] 额外地,该COMT抑制剂可以在肝移植之前和/或之后在患有TTR-相关的淀粉样变性的患者中用作辅佐治疗。优选地,所述COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐。

[0060] 本发明还提供了一种用于预防和/或治疗TTR-相关的淀粉样变性的药物组合物,该药物组合物包括一个治疗有效量的COMT抑制剂连同药学上可接受的赋形剂和/或载体。优选地,所述COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合

物或其药学上可接受的盐。

[0061] 表述“治疗有效量”(也被称作“剂量”)是指当给予时,足够预防所处理的疾病的一种或多种症状的发展或在一定程度上缓解该疾病的一种或多种症状的化合物的量。根据本发明给予的化合物的具体剂量将由围绕病例的具体情况决定,包括所给予的化合物、给予途径、正在治疗的具体病症、以及类似考虑。

[0062] 表述“药学上可接受的赋形剂和/或载体”是指药学上可接受的材料、组合物或运载体。每种组分在与该药物组合物的其他成分相容的意义上必须是药学上可接受的。它还必须适用于以合理的受益/风险比率与人类和动物的组织或器官相接触,而不产生过度的毒性、刺激、过敏反应、免疫原性或其他问题或并发症。

[0063] COMT抑制剂的任何药学上可接受的盐都可以用于本发明的目的。术语“药学上可接受的盐”是指从药学上可接受的无毒基质制备的盐。优选地,该盐是一种碱金属盐或碱土金属盐。

[0064] 在本发明的一个实施例中,将该COMT抑制剂以口服单位剂型给予给一位患者。剂型包括固体剂型,像片剂、粉剂、胶囊剂、小袋,以及液体糖浆剂、混悬剂和酏剂。可以根据本领域已知的方法将COMT抑制剂和赋形剂配制成组合物和剂型。在一个具体实施例中,将该COMT抑制剂作为片剂、药丸或胶囊剂来给予。然而,COMT抑制剂也可以作为注射剂型的成分给予给一位患者。注射剂型可以包括用于真皮内、静脉内、肌内或皮下注射的液体,用于灌注的溶液,用于液体注射剂的重构的粉剂,以及预填充式注射剂(pre-filled syringe)。在本发明的意义上,将该COMT抑制剂进行配制以用于鼻内或吸入给予,或用于以例如乳膏、凝胶、软膏或皮肤贴片的形式的局部给予也可以是恰当的。用于制备这些配制品的方法在本领域是已知的。此外,可以将该COMT抑制剂配制为控释剂型。控释剂型是本领域已知的并且对于慢性疾病的治疗或对于当向这位患者给予时在高剂量下可以是有毒的或展示出低的半衰期模式的活性剂的给予而言是特别令人希望的。优选地,该COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐。

[0065] 如上所提及,在本发明的意义上,COMT抑制剂的治疗有效量(或剂量)是足够用于预防或在一定程度上缓解TTR-相关的淀粉样变性的一种或多种症状的所述化合物的量。例如,用于人类使用的托卡朋的有效每日剂量可以在20mg与600mg之间变化并且用于人类使用的恩他卡朋的有效每日剂量可以在1600mg与2000mg之间变化。

[0066] 因此,待给予的COMT抑制剂的剂量可以在0.1与16000mg/天之间、或在0.1与12000mg/天之间、或在0.1与10000mg/天之间、或在0.1与5000mg/天之间、或在0.1与3000mg/天之间。在一个具体实施例中,待给予的COMT抑制剂的剂量在1与3000mg/天之间。在另一个实施例中,该剂量在1与2000mg/天之间。优选地,该COMT抑制剂是如本发明的第一方面所定义的具有化学式I的硝基儿茶酚化合物或其药学上可接受的盐。

[0067] 贯穿本说明书和权利要求书,词语“包括”以及该词语的变形并不旨在排除其他的技术特征、添加剂、组分、或步骤。当审查本说明书时,本发明的另外的目的、优点以及特征对本领域的普通技术人员而言将变得显而易见,或通过本发明的实践是可以获悉的。通过说明提供了以下实例,并且它们并不旨在使限制本发明的。此外,本发明覆盖在此描述的具体以及优选实施例的所有可能的组合。

附图说明

[0068] 图1.与T4竞争结合TTR野生型(WT)的凝胶过滤测定:T4被不同的化合物取代而离开TTR WT的曲线.Y轴:结合TTR的T4/总T4的量;X轴:化合物的log10浓度(摩尔单位)。被表示为平均值 $\pm$ 标准差的值对应于一式两份地进行的代表性实验。测试化合物:甲状腺素(T4)、托卡朋(SOM)、氯苯唑酸(TAF)、以及(-)-表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(EGCG)。

[0069] 图2.在不同化合物的存在下,通过IEF的TTR四聚物的稳定性:用测试化合物氯苯唑酸(T)、托卡朋(S)、表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(EGCG)处理来自对照个体(C)和来自携带V30M突变(V30M)的家族性淀粉状蛋白多神经病患者的血浆或不作处理(nt),并且在如正文中所描述的半变性条件下使其经受IEF。计算针对每个条件的TTR四聚物/总TTR的比例并且将其表示为平均值 $\pm$ sem(平均标准误)。

[0070] 图3:半胱天冬酶-3活化。在TTR Y78F寡聚体不存在或存在下将大鼠神经鞘瘤细胞(RN22细胞系)孵育24h,该寡聚体是在被测试化合物不存在或存在下获得的(在20 μ M处)。在细胞裂解物中测量半胱天冬酶-3的活化,并且将其表示为荧光/蛋白含量。样品:对照细胞(C1);用EGCG处理的细胞(C2);用氯苯唑酸处理的细胞(C3);用托卡朋处理的细胞(C4);用化合物不存在下获得的寡聚体处理的对照细胞(O1);用EGCG存在下获得的寡聚体处理的细胞(O2);用氯苯唑酸存在下获得的寡聚体处理的细胞(O3);用托卡朋存在下获得的寡聚体处理的细胞(O4)。结果表示4个重复的平均值和标准差。用T学生检验计算相对于O1对照的显著性差异:*, $P < 0.05$;***, $P < 0.005$ 。

[0071] 图4:用在36 μ M处的不同化合物孵育4天后,进行TTR原纤维的透射电镜术分析。从左上方开始,顺时针方向:对照、氯苯唑酸、EGCG、托卡朋。

具体实施方式

[0072] 实例

[0073] 实例1:动力学浊度测定。

[0074] 材料

[0075] 如在Dolado(多拉多)等人(多拉多I,Nieto(尼尔图)J,萨莱瓦MJ,阿斯奎丽G,瓦伦西亚G,Planas(普拉纳斯)A.“Kinetic Assay for High-Throughput Screening of In Vitro Transthyretin Amyloid Fibrillogenesis Inhibitors(甲状腺素运载蛋白类淀粉蛋白原纤维生成抑制剂的体外高通量筛选的动力学测定)”,J.Comb.Chem.(组合化学杂志),2005,第7卷,第246-252页)中所报道的产生重组Y78F TTR蛋白,该蛋白是人类TTR的Tyr78Phe高度促淀粉样蛋白生成的变体。

[0076] 托卡朋获得自圣克鲁斯生物技术有限公司(Santa Cruz Biotechnology,Inc.)。如由Barluenga(巴鲁恩格)等人(巴鲁恩格J,González(冈萨雷斯)JM,García-Martín(加西亚-马丁)MA,Campos(坎波斯)PJ,Asensio(阿森西奥)G.“An expeditious and general aromatic iodination procedure(一种迅速的并且通用的芳香碘化程序)”,J Chem Soc Chem Commun(化学学会与化学通讯杂志),1992,第14卷,第1016-1017页)所描述的,通过二氟尼柳(西格玛公司(Sigma))与双(吡啶)碘鎓四氟硼酸盐(IPy₂BF₄)的反应来制备碘代二氟尼柳。可以通过披露于国际专利申请WO 2005113523中的方法制备氯苯唑酸。将鉴定为抑

制剂的化合物的母液以1.5mM的浓度溶解于DMSO(来自西格玛公司,分光光度法等级)中。通过将母液以1:4稀释于H₂O/DMSO(2:1)中制备工作液。在所有情况下,将最终反应测定混合物中的DMSO浓度调至5%(v/v)。

[0077] 方法

[0078] 根据描述于多拉多等人(同上)中的程序进行测定。该测定包括两个阶段,将Y78F蛋白与抑制剂一起孵育30分钟的一个阶段,以及通过改变pH诱导原纤维形成并且在1.5h内测量吸光度的第二阶段。简言之,如下进行该测定:

[0079] 首先,制备以下溶液:蛋白Y78F母液:在20mM磷酸盐中的4mg/mL,100mM KCl,pH 7.6。孵育缓冲液:10mM磷酸盐,100mM KCl,1mM EDTA,pH 7.6。稀释缓冲液:400mM乙酸钠,100mM KCl,1mM EDTA,pH 4.2。

[0080] 对于每种抑制剂,遵循以下方案:通过Abs₂₈₀确定母液的精确蛋白浓度并且根据该值,计算有待添加以具有0.4mg/mL的最终蛋白浓度的Y78F母液的体积并且将其分配在96孔微板的6个孔中。添加不同体积的工作抑制剂溶液,以给出在0至40μM变化的终浓度,并且通过添加对应体积的H₂O/DMSO(1:1)溶液将每个孔中的最终的DMSO含量调至5%。然后添加孵育缓冲液,直到体积为100μL。将该板在恒温酶标仪中在37℃下进行孵育,同时每分钟轨道振荡15s,持续30min。为每个孔分配100μL的稀释缓冲液部分,并且将该混合物在该酶标仪中在37℃下进行孵育,同时振荡(每分钟15s)。以1min的间隔监测在340nm处的吸光度,持续1.5h。收集数据并且使用微软电子表格软件进行分析。所有测定一式两份地进行。

[0081] 结果分析

[0082] 在遵循上面指示的通用程序以后,获得时间-过程曲线,从该曲线中将原纤维形成的初始速率(V_0)计算为吸光度线性增加的斜率。当相对于抑制浓度标绘起始速率时,用所有被分析的抑制剂获得了一个指数式衰减。将数据拟合在等式(1)中:

$$[0083] \quad V_0 = A + B \cdot e^{-C[I]} \quad (1),$$

[0084] 其中 V_0 是原纤维形成的初始速率(以吸光度单位/小时,Abs*h⁻¹计),并且[I]是该抑制剂的浓度(μM)。可调参数是A(Abs*h⁻¹),在高浓度的抑制剂下的残余的聚集速率;B(Abs*h⁻¹),原纤维形成的初始速率的振幅或最大值减小;以及C(μM⁻¹),指数常数。A+B等于不存在抑制剂的测定条件下的原纤维形成的初始速率。

[0085] 估计以下参数,以评估一种化合物作为原纤维形成抑制剂的效价:IC₅₀:原纤维形成的初始速率是不存在抑制剂的情况下的初始速率的一半时的抑制剂的浓度。RA(%) = 100*B/(A+B):相对于在[I] = 0处的速率,在高抑制剂浓度处的原纤维形成速率的百分数减少。所测定的化合物的抑制特性的评估结果总结于表1中。

[0086] 表1. TTR原纤维形成抑制剂的IC₅₀和淀粉样变性减少(RA)的百分数

[0087]

化合物	IC ₅₀ (μM)	RA (%)
托卡朋	4.8	85.8
碘代二氟尼柳	3.9	99.8
氯苯唑酸	16.9	99

[0088] 由上面的结果可以观察到托卡朋是一种有效的TTR原纤维形成的抑制剂,因为它展示出低的IC₅₀和高的RA。根据其IC₅₀值,与碘代二氟尼柳相比,托卡朋具有类似的抑制能力,碘代二氟尼柳已经被报道为最有效力的体外TTR原纤维形成抑制剂之一。此外,根据IC₅₀,托卡朋比氯苯唑酸更有效,这是由于托卡朋展示出比氯苯唑酸低四倍的IC₅₀。这些结果说明托卡朋是一种用于TTR-有关的淀粉样变性,例如FAP、家族性类淀粉蛋白心肌病、老年系统性淀粉样变性以及柔脑膜淀粉样变性的有前途的药物。

[0089] 实例2:用TTR的家族性类淀粉蛋白心肌病突变的变体进行的终点浊度测定。

[0090] 材料

[0091] 通过遵循针对在实例1中使用的Y78F变体描述的相同的程序产生重组V122I TTR蛋白,该蛋白是与家族性类淀粉蛋白心肌病(FAC)相关的人类TTR的促淀粉样蛋白生成变体。如或多拉多等人(同上)中针对Y78F所报道的,通过定点诱变制备表达V122I突变体的质粒DNA,但是使用以下引物:5'-GGATTGGTGATGACAGCCGT-3'和5'-ACGGCTGTCATCACCAATCC-3'。如在实例1中所描述的获得托卡朋和碘代二氟尼柳。

[0092] 方法

[0093] 当动力学浊度测定对精确测量不够敏感时,该测定用于具有比Y78F变体低的促淀粉样蛋白生成能力(amyloidegenicity)的TTR变体。遵循该程序以在第72h通过这一终点测定来测试抑制剂报道于多拉多等人(同上)中。在上面针对动力学浊度测定(实例1)描述的相同条件下将V122I TTR与抑制剂一起孵育,使用浓度为0.4mg/mL的V122I蛋白以及对应于0.5x[蛋白]、1x[蛋白]、以及3x[蛋白]的三个不同浓度的抑制剂:3.6、7.2以及21.8微摩尔。在酸诱导(添加稀释缓冲液)后,将样品在不振荡的情况下在37℃下孵育72h,并且然后通过混合使其匀质化以重悬存在的任何原纤维。在340nm处测量浊度并且在不存在抑制剂的情况下将其标准化为淀粉样蛋白生成。

[0094] 结果

[0095] 将所测试化合物的抑制效价评估为当与不含抑制剂的对照样品相比时,包含抑制剂的样品的吸光度减少的百分数。

[0096] 表2.V122I TTR原纤维形成抑制剂的%原纤维减少值

[0097]

抑制剂浓度:	0.5 x [蛋白]	1 x [蛋白]	3 x [蛋白]
托卡朋	79.3%	84.3%	100.0%
碘代二氟尼柳	83.2%	85.0%	88.2%

[0098] %原纤维减少 = $100 \times (1 - \text{样品浊度} / \text{空白浊度})$, 其中样品浊度是在抑制剂的存在下测量的浊度, 并且空白浊度是在抑制剂不存在下测量的浊度。

[0099] 上面的结果显示托卡朋通过V122I突变的ATTR有效地抑制原纤维形成, 甚至在1:2的抑制剂:蛋白摩尔比 (0.5x [蛋白]) 下。根据这些值, 与碘代二氟尼柳相比, 托卡朋具有类似的抑制能力。这些结果表明托卡朋是一种用于主要由V122I突变导致的TTR-有关的淀粉样变性 (包括家族性类淀粉蛋白心肌病) 的有前途的药物。

[0100] 实例3-6

[0101] 实例3-6的材料

[0102] 如在实例1中所描述的获得托卡朋和氯苯唑酸。从开曼化学制剂公司 (Cayman Chemicals) (#70935) 购买表没食子儿茶素-3-没食子酸酯 (EGCG, CAS号989-51-5)。使用大肠杆菌BL21, 在细菌表达系统中产生重组野生型TTR (TTR WT)、TTR Y78F以及TTR L55P变体。如先前所述的分离并纯化重组TTR (Ferreira (费雷拉) 等人, 2009, FEBS Lett (欧洲生物化学联合会杂志), 第583卷, 第3569-76页)。从一批在分子神经生物学集团 (Molecular Neurobiology Group), IBMC (波尔图大学) 可获得的样品中获得来自TTR V30M杂合子携带者和来自对照个体的全血。已经在EDTA的存在下收集血样并且将其离心用于分离血浆。将血浆在-20℃冷冻保存。

[0103] 实例3: 与甲状腺素 (T4) 竞争结合TTR野生型 (WT) 的凝胶过滤测定

[0104] 小分子配体与TTR的T4结合位点的结合可能稳定TTR四聚体并且减缓体外四聚体解离和淀粉样蛋白生成。为了评价结合, 通过凝胶过滤程序定量测定测试化合物与T4 (西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich)) 对结合TTR WT的竞争, 使用与痕量的放射性标记的 $[^{125}\text{I}]$ T4 (对应于50,000cpm; 来自珀金埃尔默公司 (Perkin-Elmer), 马萨诸塞州, 美国的 ^{125}I -T4, 比活性1250 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) 以及与不同浓度 (即0、20、60、200、600、2000、6000以及20000nM) (0-10 μM 终浓度) 的100 μL 的测试化合物或T4 (阳性对照) 溶液一起孵育的定量TTR (100 μL 的60nM溶液) (费雷拉等人, 2011, FEBS Lett. (欧洲生物化学联合会杂志), 第585卷, 第2424-30页)。用蛋白加上加有100 μL 的TNE的标记的T4制备阴性对照 (不存在竞争者)。在TNE缓冲液 (Tris 0.1M, NaCl 0.1 M, EDTA 1mM) 中制备所有溶液。一式两份地制备所有样品。在 γ 闪烁计数器Wizard (威赛德) 14701, Wallac (华莱士) 中测定每个样品的放射性。然后将样品在4℃下孵育过夜。孵育后, 通过经由一个P6DG凝胶过滤柱 (1mL, BioRad (伯乐公司)) 过滤将与TTR结合的T4与未结合的T4分开。测量每个洗脱的样品的放射性。将结果表示为与TTR结合的T4/总T4的量对测试化合物 (竞争者) 的Log总浓度。用GraphPad Prism软件将数据拟合成位点结合竞争的非线性回归曲线 (one-site binding competition non-

linear regression curve),使用以下等式: $Y = \text{底部} + (\text{顶部} - \text{底部}) / (1 + 10^{-(X - \text{LogEC}_{50})})$

[0105] 图1示出了竞争者:甲状腺素(T4)、托卡朋(SOM)、氯苯唑酸(TAF)、以及(-)-表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(EGCG)与T4竞争结合TTR野生型的结果。将这些结果显示为T4被不同的化合物取代而离开TTR WT的曲线。从每个剂量-反应曲线中,确定每种化合物的EC₅₀值(一半的结合T4被取代时的抑制剂浓度)。此外,还计算了T4结合的抑制的相对效价(被定义为EC₅₀(T4)/EC₅₀(被测试的化合物)的比)并且将其示于表3中。

[0106] 表3:EC₅₀和T4结合的药物抑制的相对效价

[0107]

	EC ₅₀ nM	T4 结合的药物抑制的相对效价
甲状腺素 (T4)	50.11 nM	1
托卡朋	41.85 nM	1.19
氯苯唑酸	214.4 nM	0.23
EGCG	-	无亲和力

[0108] 这些结果表明托卡朋和氯苯唑酸呈现出对TTR的类似的结合亲和力,而EGCG不与T4竞争结合TTR。托卡朋的EC₅₀比氯苯唑酸低四倍,这表明托卡朋更有效地结合TTR四聚体,这说明一种更高的抗促淀粉样蛋白生成潜能。

[0109] 实例4:通过等电聚焦(IEF)评价TTR四聚体稳定性

[0110] 为了评估所测试的化合物对TTR四聚体对抗解离的效果,通过IEF在如先前所述的半变性条件下(费雷拉等人,2009,FEBS Lett (欧洲生物化学联合会杂志),第583卷,第3569-76页)评价TTR稳定性。如下制备样品:将30μL来自对照和TTR V30M携带者的人血浆与5μL的测试化合物和对照(EGCG)化合物的10mM溶液一起在4℃下孵育过夜,随后在室温下孵育1h。使这些制品经受非变性PAGE(5%丙烯酰胺)并且切下包含TTR的凝胶带并将其应用至IEF凝胶(5%丙烯酰胺)。在包含5%(v/v)两性电解质pH 4-6.5(GE医疗保健公司(GE Healthcare))的半变性条件(4M尿素)下,在1200V下进行IEF,持续6小时。用考马斯蓝对蛋白进行染色,扫描凝胶并且使用ImageQuant程序(HP Scanjet 4470c,惠普公司(Hewlett Packard))使其经受光密度测定法。在不存在任何化合物的情况下,血浆TTR呈现出一个特征带型,该带型包括单体、氧化单体以及对应于不同形式的四聚体的若干较低的等电点(pI)带。在3个IEF凝胶中分析总共12个血浆样品(5个对照以及7个TTR V30M携带者)。对于每个处理条件而言,对来自不同供体的至少4个样品进行处理。计算每个血浆样品的TTR四聚体对总TTR(TTR四聚体+单体)的比例并且将其表示在图2中。如在图2中所观察到的,来自正常个体的血浆的这一比例正常地高于来自杂合的TTR V30M携带者血浆的这一比例。与未处理的正常的或突变的TTR的对照血浆相比,用托卡朋进行处理增加TTR四聚体对单体形式的量;并且在更高程度上大于氯苯唑酸。

[0111] 将所有样品的通过用测试化合物进行处理诱导的四聚体/总TTR比例的增加进行

合并并且在表4中将其表示为%稳定作用。将获得的每个样品的四聚体/总TTR比例标准化后,计算这些值,其中获得的对应的单独供体的未处理的血浆的比例如下所述:

[0112] %稳定作用=100x((样品比例-nt比例)/nt比例)。其中“样品比例”是在化合物的存在下的四聚体/总TTR比例;并且“nt比例”是来自同一供体的未处理的血浆的四聚体/总TTR比例。

[0113] 表4.在化合物的存在下的TTR四聚体的稳定性

[0114]

%稳定作用 (平均值 +/- sem)	
托卡朋	29.9 +/- 7.64
氯苯唑酸	16.4 +/- 5.49
EGCG	51.26 +/- 14.21

[0115] 用一种TTR稳定剂(例如氯苯唑酸或托卡朋)进行处理增加四聚体对单体形式的比例。上面展示的这些结果清楚地表明托卡朋呈现出比氯苯唑酸更好的对TTR四聚体的稳定效果。

[0116] 实例5:细胞毒性测定

[0117] 为了评估TTR-诱导的细胞毒性以及所测试化合物的预防效果,使在含有10%胎牛血清的达尔伯克氏极限必需培养基(Dulbecco's minimal essential medium)中的80%融合细胞的大鼠神经鞘瘤细胞(RN22,获得自美国典型细胞收藏中心(American Type Cell Collection)ATCC)暴露于2μM的TTR Y78F寡聚体24小时。在10x摩尔过量(终浓度是20μM)的测试化合物或对照(EGCG)的不存在或存在的情况下,通过将可溶性TTR Y78F在37℃下孵育6天获得这些寡聚体。然后,将细胞胰蛋白酶化并且用CaspACE荧光96孔板测定系统(西格玛公司),将细胞裂解物用于确定半胱天冬酶-3活化。用Bio-Rad(伯乐)蛋白测定试剂盒确定裂解物中的蛋白浓度。

[0118] 获得的半胱天冬酶3活性以及每个细胞培养孔中的蛋白定量的结果表示于图3中。细胞外添加未处理的TTR Y78F寡聚体(对照,01)增加半胱天冬酶-3的细胞内水平,并且因此细胞死亡。在抑制有毒的寡聚种类的形成的化合物的存在下获得的TTR Y78F寡聚体(02-04)在RN22细胞中引起较低水平的半胱天冬酶-3活化。在化合物的存在下的细胞毒性的减少(被表示为相对于对照01的100-%)示于表5中。可以观察到,与氯苯唑酸(12%)相比,托卡朋显示出较大的细胞毒性减少(29%)。

[0119] 表5.在化合物的存在下的细胞毒性的减少

[0120]	托卡朋	29%
	氯苯唑酸	12%
	EGCG	50%

[0121] 实例6:原纤维破坏

[0122] 为了研究测试化合物对TTR原纤维破坏的效果,我们使用了通过将TTR L55P的过滤(0.2 μ m过滤器)溶液(2mg/ml,在PBS约3.6 μ M中)在37℃下孵育15天制备的TTR预成型原纤维。随后,将样品在10x摩尔过量(36 μ M)(终浓度)的测试化合物的不存在(对照)或存在下在37℃下孵育4天。如先前所述的(费雷拉等人,2009,FEBS Lett(欧洲生物化学联合会杂志),第583卷,第3569-76页),通过透射电镜术(TEM)和动态光散射(DLS)评估破坏效果。

[0123] 观察到TTR预成型原纤维的对照样品(对照)主要由大的凝集体和原纤维(具有高于1000nm的直径的颗粒)组成并且仅有少量的蛋白质处于可溶态(10nm直径的颗粒)。因为原纤维被所测试的化合物所破坏,所以大的凝集体的相对量下降并且小的凝集体和可溶性蛋白增加(参见图4)。

[0124] 将来自DLS分析的原纤维破坏活性量化为用36 μ M的化合物处理4天后凝集体和可溶性颗粒的相对强度(%) (表6)。

[0125] 表6.TTR原纤维的DLS分析

	相对强度 (%)		
	可溶性颗粒	凝集体	凝集体
	(约 10 nm)	(约 10-100 nm)	(约 1000 nm)
[0126] 对照	28.2	-	71.8
托卡朋	56.1	5.9	38
氯苯唑酸	35.2	6.7	58.1
	相对强度 (%)		
	可溶性颗粒	凝集体	凝集体
	(约 10 nm)	(约 10-100 nm)	(约 1000 nm)
[0127] EGCG	49.1	26.3	24.6

[0128] 可以观察到,用托卡朋处理的样品形成较大量的小的凝集体和可溶性蛋白,因此展示出重要的破坏活性。这些结果还显示托卡朋具有比氯苯唑酸高的原纤维破坏活性。

[0129] 由实验1-6获得的这些结果清楚地说明托卡朋具有高的抑制TTR类淀粉蛋白原纤维的形成的活性并且这样的抑制活性高于已经被描述用于治疗FAP的氯苯唑酸。此外,托卡朋可以比氯苯唑酸更有效地破坏预成型的TTR类淀粉蛋白原纤维。总而言之,这些结果指示托卡朋可以有效地用作治疗所有类型的TTR-相关的淀粉样变性的药物。

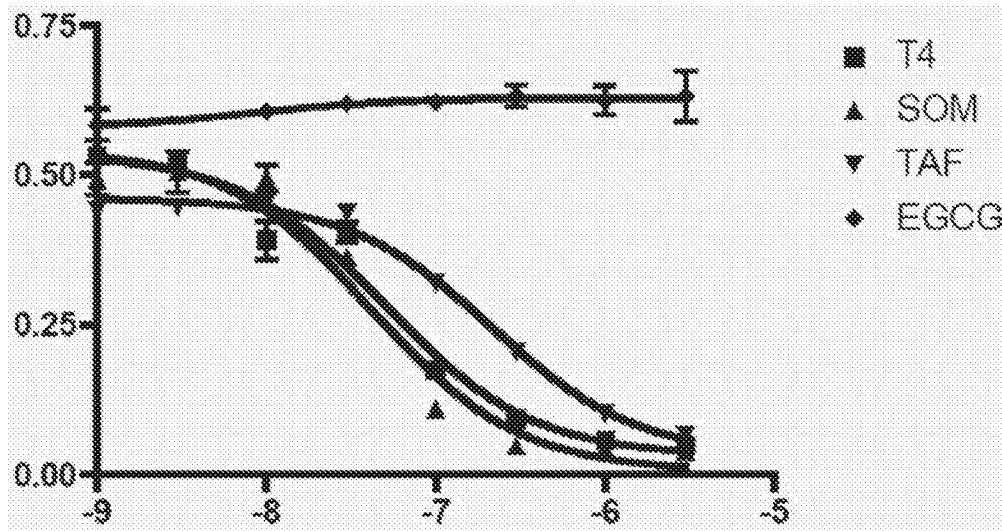


图1

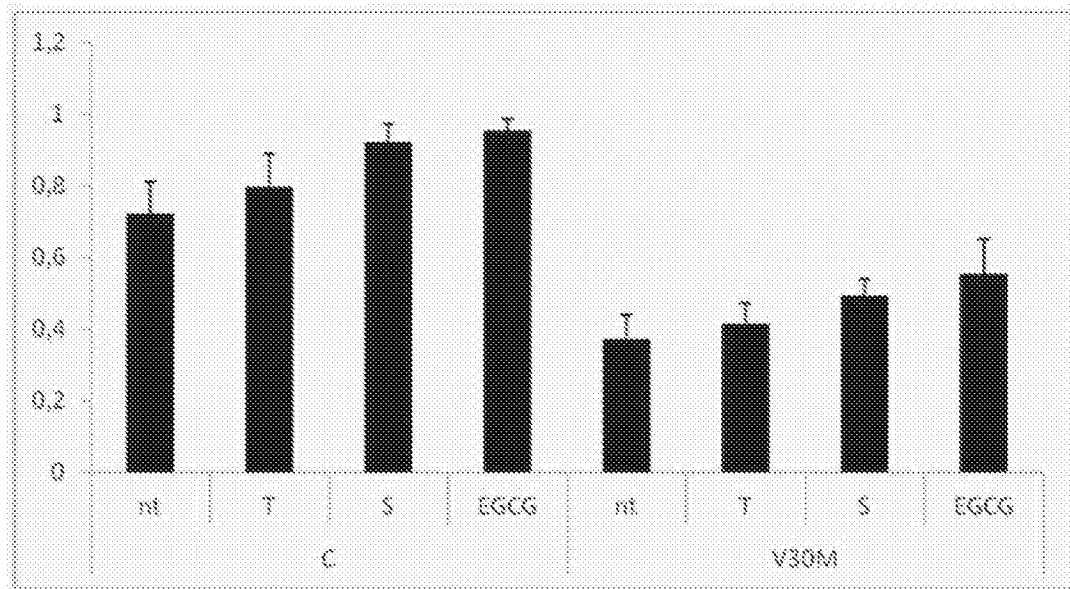


图2

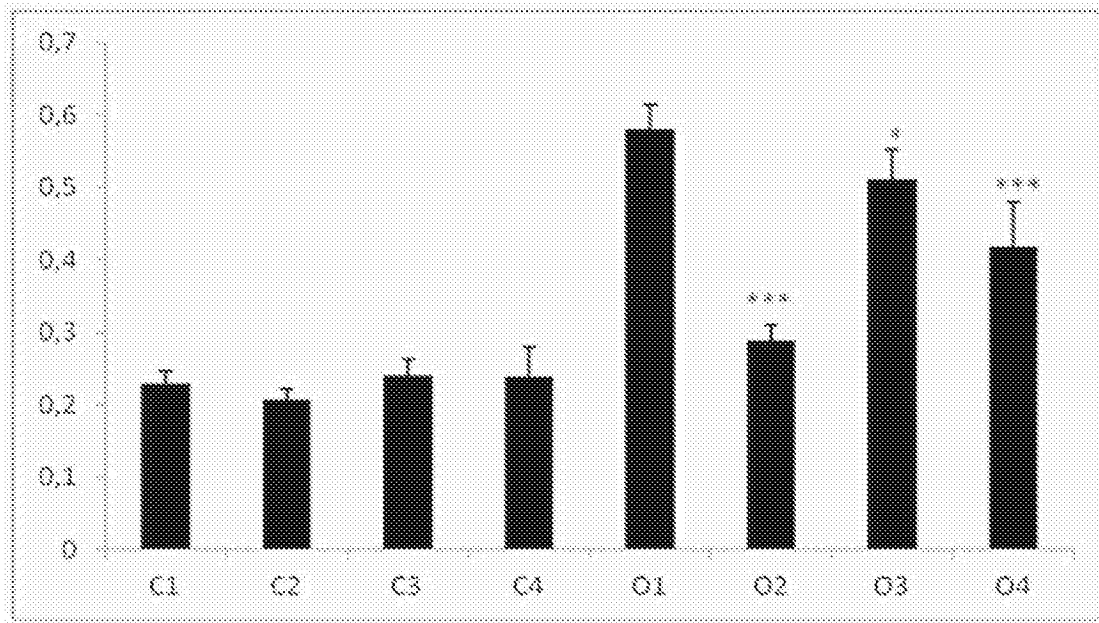


图3

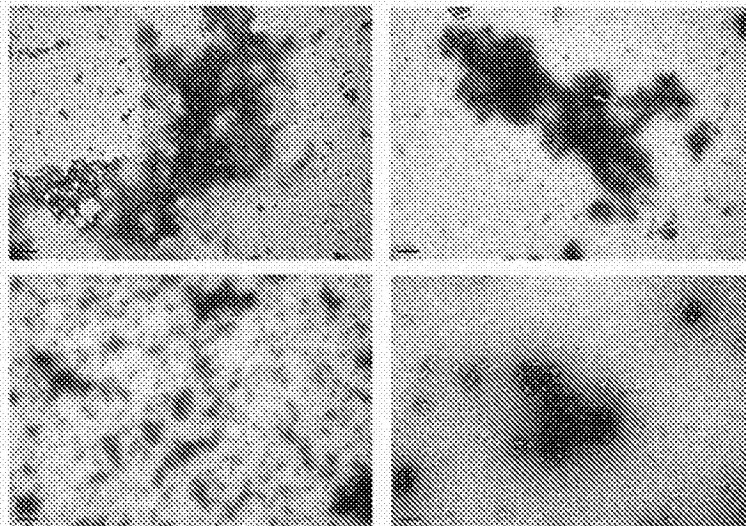


图4