

(19)



SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10)

FI/EP1587821 T6

(12)

**RAJOITETUN EUROOPPAPATENTIN KÄÄNNÖS
ÖVERSÄTTNING AV BEGRÄNSAT EUROPEISKT PATENT
TRANSLATION OF LIMITED EUROPEAN PATENT SPECIFICATION**

(45)

Käännöksen kuulutuspäivä - Kungörelsedag av översättning -
Translation available to the public

17.06.2025

(97)

Eurooppapatentin rajoittamispäivä - Dagen för begränsning
av det europeiska patentet - Date of limiting European patent

30.04.2025

(51)

Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassificering -
International patent classification
G01N 33/68 (.)
C07D 263/56 (.)
A61P 25/28 (.)
A61K 31/423 (.)

(96)

Eurooppapatenttihakemus - Europeisk patentansökan -
European patent application

EP03813782.4

(22)

Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date

19.12.2003

(97)

Patenttihakemuksen julkiseksitulosopäivä - Patentansökans
publiceringsdag - Patent application available to the public

30.04.2025

(86)

Kansainvälinen hakemus - Internationell
ansökan - International application

19.12.2003 PCT/US2003040567

(30)

Etuoikeus - Prioritet - Priority

19.12.2002 US 435079 P

24.04.2003 US 465435 P

(73)

Haltija - Innehavare - Holder

1• THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE, 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, (US)

(72)

Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1• KELLY, Jeffrey, W., 8110 LeI Paseo Grande, 407, La Jolla, CA 92037, (US)

2• POWERS, Evan T., 8726 Villa la Jolla Drive, no. 79, La Jolla, CA 92037, (US)

3• RAZAVI, Hossein, 94W. Redding Road, Danbury, Connecticut 06870, (US)

(74)

Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki, (FI)

(54)

Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Koostumukset ja menetelmät transtyretiinin stabiloimiseksi ja transtyretiinin virhelaskostumisen estämiseksi

Kompositioner och förfaranden för stabilisering av transtyretin och hämning av felveckning av transtyretin

COMPOSITIONS AND METHODS FOR STABILIZING TRANSTHYRETIN AND INHIBITING TRANSTHYRETIN MISFOLDING

(56)

Viitejulkaisut - Anförda publikationer - References cited

US-A1- 3 551 443;

Koostumukset ja menetelmät transtyretiinin stabiloimiseksi ja transtyretiinin virhelaskostumisen estämiseksi

Keksinnön ala

- 5 Tämä keksintö koskee yleisesti proteiinin virhelaskostumista. Tarkemmin sanottuna tämä keksintö tarjoaa koostumuksia ja menetelmiä transtyretiinin stabiloimiseksi, transtyretiinin virhelaskostumisen estämiseksi ja koostumuksia siihen liittyvien amyloiditautien hoitamiseksi.

Keksinnön tausta

- 10 Transtyretiini (TTR) on seerumissa ja selkäydinnesteessä esiintyvä 55 kDa:n homotetrameeriproteiini. TTR:n tehtävänä on kuljettaa L-tyroksiinia (T_4 :ää) ja retinolia sitovaa holoproteiinia (RBP:tä). TTR on yksi yli 20 ei-homologisen amyloidogeenisen proteiinin joukosta, jotka proteiinit voidaan muuttaa ihmisissä esiintyvään taudin patologiaan johtaviksi fibrilleiksi ja joiksikin muiksi aggregaateiksi. Nämä sairaudet eivät näytä aiheutuneen proteiiniaggregaatiosta johtuvasta toiminnanvajauksesta. Sen
15 sijaan aggregaatio näyttää aiheuttavan neuronaalista/sellulaarista toimintahäiriötä mekanismilla, joka ei vielä ole selvillä.

- Denaturoivissa olosuhteissa nopeutta rajoittava villityypin TTR-tetrameerin hajoaminen ja nopea monomeerin virhelaskostuminen tekee mahdolliseksi virhekoostumisen amyloidiksi, joka putatiivisesti aiheuttaa seniiliä systeemistä amyloidoosia (SSA:ta).
20 Yhden useammasta kuin kahdeksastakymmenestä TTR-variantista hajoaminen ja virhelaskostuminen saa aikaan suvuiittaisen amyloidipolyneuropatian (FAP:n) ja suvuiittaisen amyloidikardiomyopatian (PAC:n).

- TTR-tetrameerilla on kaksi C_2 -symmetristä T_4 -sidoskohtaa. T_4 :n negatiivisesti yhteistoiminnallisen sidoksen tiedetään stabiloivan TTR-tetrameeria ja estävän amyloidifibrillien muodostumista. Valitettavasti ihmisperäisessä seerumissa T_4 on sitoutuneena vain alle 1 %:iin TTR:ää, koska tyroksiinia sitovalla globuliinilla (TBG:llä) on yhtä kertaluokkaa suurempi T_4 -affiniteetti kuin TTR:llä. Lisäksi seerumin T_4 -pitoisuus on suhteellisen matala (0,1 μ M) verrattuna TTR:n vastaavaan (3,6–7,2 μ M).
25

Keksinnön yhteenveto

- 30 Keksintö on patenttivaatimusten määrittämä. Keksintö pohjautuu ainakin osittain siihen havaintoon, että transtyretiinin natiivin tilan kineettinen stabilointi estää proteiinia laskostumasta virheellisesti. Tämä löytö on tärkeä proteiinin virhelaskostumisen

monenlaisten sairauksien, mukaan lukien transtyretiiniamyloidisairauksien, kehitymisessä esittämän roolin vuoksi. Sellaiseen tautiin voi puuttua, sen oireita voi parantaa ja/tai joissakin tapauksissa sairaus voidaan estää tai parantaa estämällä transtyretiinin virhelaskostuminen.

- 5 Kun transtyretiinin natiivin tilan kineettisen stabiloitumisen havaittiin tehokkaasti estävän virhelaskostumista, tehtiin mahdolliseksi kehittää terapeuttisia koostumuksia, joilla on potentiaalisesti korkea spesifisyys ja alhainen toksisuus. Vaikka tässä siis on esitetty esimerkkeinä biaryylyreagensseja, jotka pystyvät stabiloimaan transtyretiiniä, niin voidaan suunnitella joitakin muita proteiinia selektiivisesti stabiloivia reagensseja. Esimerkiksi tässä kuvatulla tavalla on mahdollista suunnitella ja valmistaa polyklooribifenyylejä, diflusinaalianalogeja tai bentsoksatsoleja, jotka ovat erittäin selektiivisiä transtyretiiniin sitoutumiselle ja jotka stabiloivat transtyretiinin natiivia tilaa.

- 15 Patenttihakemus tuo esiin menetelmän sellaisen yhdisteen seulomiseksi, joka estää tai vähentää transtyretiinitetrameerin hajoamista. Menetelmä voi sisältää seuraavat vaiheet: transtyretiinitetrameerin saattamisen kosketukseen kandidaattiyhdisteen kanssa ja sen määrittämisen, lisääkö kandidaattiyhdiste transtyretiinitetrameerin hajoamiseen liittyvää aktivaatioenergiaa ja siten estää tai vähentää transtyretiinitetrameerin hajoamista. Menetelmä voi valinnaisesti sisältää lisävaiheen, jossa mitataan
- 20 kandidaattiyhdisteen kyky estää fibrillien muodostumista.

- Patenttihakemus tuo esiin menetelmän, jonka sisältämässä vaiheessa määritetään, estääkö yhdiste transtyretiinitetrameerin hajoamisen destabiloimalla transtyretiinitetrameerin hajoamisen siirtymätilan. Patenttihakemus tuo esiin myös menetelmän, jonka sisältämässä vaiheessa määritetään, estääkö yhdiste transtyretiinitetrameerin hajoamisen stabiloimalla transtyretiinitetrameeriä enemmän kuin hajottavaa siirtymätilaa.
- 25

- Siinä menetelmässä käytetty kandidaattiyhdiste voi valinnaisesti olla pieni molekyyli. Sellainen pieni molekyyli voi stabiloida transtyretiinin natiivin tilan tetrameerisidoksen avulla ja siten hidastaa hajoamista ja amyloidoosia denaturoivissa ja fysiologisissa olosuhteissa kineettisellä stabilointimekanismilla. Yhdisteellä on valinnaisesti
- 30 0,1:n ylittävä sitomissoikiometria TTR:lle ihmisen veressä, kun sitä annetaan pitoisuutena 10,6 μM .

Pienellä molekyylillä voi valinnaisesti olla pienempi molekyylipaino kuin 1500 ja se voi sitoutua transtyretiiniin ei-positiivisesti tai positiivisesti yhteistoiminnallisesti ja antaa sidosenergiaksi $> 2,3$ kcal/mol. Pienellä molekyylillä K_{d1} ja K_{d2} voivat olla $<$

100 nM (esim. < 10 nM) ja/tai suuri plasmapitoisuus, jotka kumpikin myötävaikuttavat siihen, että proteiinistabilointi ylittää arvon 2,0 kcal/mol. Pieni molekyyli voi myös laskea amyloidoosisaantoa ja laskea happovälitteisen tai MeOH-välitteisen amyloidogeenin nopeutta ja/tai laskea ureavälitteisen TTR-hajoamisen nopeutta.

- 5 Patenttihakemus tuo esiin pienen molekyylin, joka käsittää bifenyylimiinit, bifenyylit, oksiimieetterit, bentsatsolit tai jotkin muut kahdesta aromaattisesta renkaasta muodostuvat rakenteet, joissa toisessa renkaassa on hydrofiilisiä ryhmiä kuten happo tai fenoli ja toisessa on hydrofobisia ryhmiä kuten halogeenit tai alkyylit. Keksinnön mukainen pieni molekyyli sisältää bentsatsolit.
- 10 Patenttihakemus tuo esiin kandidaattiyhdisteen, jossa kandidaattiyhdiste on biaryyli, jossa toisessa renkaassa on hydrofiilinen substituentti (hydrofiilisiä substituentteja) ja toisessa on hydrofobisia substituentteja, tai biaryyli, jonka kummassakin renkaassa on vähintään yksi hydrofiilinen substituentti. Hydrofiilinen ryhmä voi olla fenoli, COOH, bentsyylialkoholi, boronihappo tai -esteri, tetratsoli, aldehydi tai hydratoitu
- 15 aldehydi tai funktionaalinen ryhmä, joka toimii joko H-sidosdonorina tai -akseptorina proteiinille suoraan tai vesivälitteisen H-sidoksen kautta. Biaryyli voi olla symmetrinen biaryyli, jossa kumpikin rengas on substituoitu hydrofiilisella funktionaalisuudella, mukaan lukien fenolit, karboksylaattit ja alkoholit ja joissakin tapauksissa halogeenit halogeenia sitovien taskujen täydentämiseksi TTR:ssä, esim. biaryyli seuraavalla funktionaalisuudella 3-Cl, 4-OH, 5-Cl ja 3-Cl, 4'-OH, 5'-Cl. Yhdessä suoritus-
- 20 muodossa ainakin toinen biaryylin rengas on korvattu substituentteilla 2,4-difluori tai 3,5-difluori tai 2,6-difluori tai 3,5-dikloori tai 3-Cl, 4-OH, 5-Cl tai 3-F, 4-OH, 5-F, 3,COOH, 4-OH tai 3-OH tai 3-COOH tai 4-COOH tai 3-CH₂OH tai 4-CH₂OH. Esimerkkibiaryyli on polyklooribifenyli, esim. hydroksyloitu polyklooribifenyli, jol-
- 25 loin ainakin toisessa renkaassa on OH- ja/tai Cl-substituentteja, mukaan lukien 3-Cl, 4-OH, 5-Cl tai 2-Cl, 3-Cl, 4-OH, 5-Cl tai 3,4-DiCl tai 2,3,4-trikloori tai 2,3,4,5-tetra-
- 30 kloori. Kandidaattiyhdisteenä voidaan käyttää muita halogeeneja kuin klooria. Esillä olevan keksinnön mukainen kandidaattiyhdiste on bentsoksatsoli.

- Patenttihakemus tuo esiin kandidaattiyhdisteen, joka on diflunisaalianalogi. tässä on
- 30 kuvattu Tässä on kuvattu diflunisaalin samoin kuin monenlaisten diflunisaalianalogien rakenne. Diflunisaalianalogilla voi valinnaisesti olla alennettu NSAID-aktiivisuus tai sitä ei ole verrattuna diflunisaaliin. Diflunisaalianalogilla voi esimerkiksi diflunisaaliin verrattuna olla alennettu syklo-oksigenaasin estovaikutus tai sitä ei ole.

- Patenttihakemus tuo esiin lisävaiheen käsittävän menetelmän sen määrittämiseksi,
- 35 onko diflunisaalianalogilla NSAID-aktiivisuutta. Menetelmä voi esimerkiksi sisältää

vaiheen sen määrittämiseksi, onko diflunisaalianalogilla syklo-oksigenaasin estovai-
kutusta.

Seulontamenetelmissä käytetty transtyretiini voi olla villikannan transtyretiini tai mu-
tantti transtyretiini kuten luonnollinen mutantti transtyretiini, joka on kausaalisesti
5 yhdistynyt transtyretiiniamyloiditautin kuten suvuittaisen amyloidipolyneuropatian
tai suvuittaisen amyloidikardiomyopatian insidenssiin. Esimerkkejä luonnollisista
mutanteista transtyretiineista ovat V122I, V30M, L55P (mutanttinimistö kuvaa sub-
stituutiota luetellussa aminohappokohdassa suhteessa villikantaan; katso esim. Sa-
raiva et al. (2001) Hum. Mut. 17:493--503) näihin kuitenkin rajoittumatta.

10 Keksintö tarjoaa myös keksinnön mukaisten yhdisteiden käytön lääkevalmisteissa
transtyretiinin stabiloimiseksi kudoksessa tai biologisessa fluidissa ja siten virhelas-
kostumisen estämiseksi. Yleensä lääkkeen käytössä kudokseen tai biologiseen
fluidiin annetaan koostumusta, jossa on stabiloiva määrä tässä kuvattua yhdistettä,
joka sitoutuu transtyretiiniin ja estää transtyretiinitetrameerin hajoamisen stabiloii-
15 malla kineettisesti transtyretiinitetrameerin natiivia tilaa.

Siten sairastuneessa kudoksessa transtyretiiniä stabiloivat menetelmät parantavat vir-
helaskostumista ja vähentävät siihen liittyvän sairauden oireita ja riippuen sairaudesta
voivat myötävaikuttaa sairauden hoitoon. Keksintö tarkastelee transtyretiinin virhe-
laskostumisen estämistä kudoksessa ja/tai solun sisässä. Virhelaskostumisen laajuus
20 ja siten esillä olevilla menetelmillä saavutetun eston laajuus voidaan arvioida monen-
laisilla menetelmillä kuten esimerkeissä kuvatuilla.

Vastaavasti, keksinnön eräs muoto käsittää terapeuttisesti tehokkaan määrän käytön
6-karboksi-2-(3,5-dikloorifenyyli)bentsoksatsolia, joka estää transtyretiinitetramee-
rin hajoamisen transtyretiinitetrameerin natiivin tilan kineettisellä stabiloinnilla, lääk-
25 keen valmistamiseksi transtyretiiniamyloiditautin hoitamiseen yksilössä, jolla on
diagnosoitu transtyretiiniamyloiditauti.

Patenttihakemus tuo esiin terapeuttisesti tehokkaan määrän käytön diflunisaalianalo-
gia (esim. diflunisaalianalogia, joka estää transtyretiinitetrameerin hajoamisen), joka
estää transtyretiinitetrameerin hajoamisen, transtyretiiniamyloiditautin hoitamiseen
30 tarkoitetun lääkkeen valmistamiseksi sen sopiessa annettavaksi yksilölle, jolla on
diagnosoitu transtyretiiniamyloiditauti. Diflunisaalianalogilla voi valinnaisesti olla
alennettu NSAID-aktiivisuus (esim. syklo-oksigenaasiestoaineaktiivisuus) verrattuna
diflunisaaliin.

Patenttihakemus tuo esiin myös terapeuttisesti tehokkaan määrän käytön polyklooribifenyyliä (esim. polyklooribifenyyliä, joka estää transtyretiinitetrameerin hajoamisen), joka estää transtyretiinitetrameerin hajoamisen, transtyretiiniamyloiditautin hoitamiseen tarkoitetun lääkkeen valmistamiseksi sen sopiessa annettavaksi yksilölle, jolla on diagnosoitu transtyretiiniamyloiditauti. Polyklooribifenyyli voi olla hydroksyloitu polyklooribifenyyli.

Tiettyssä suoritusmuodossa keksintö sisältää terapeuttisesti tehokkaan määrän käytön 6-karboksi-2-(3,5-dikloorifenyyli)-bentsoksatsolia, joka estää transtyretiinitetrameerin hajoamisen, transtyretiiniamyloiditautin hoitamiseen tarkoitetun lääkkeen valmistamiseksi sen sopiessa annettavaksi yksilölle, jolla on diagnosoitu transtyretiiniamyloiditauti.

Transtyretiiniamyloiditauti voi olla esimerkiksi suvuittainen amyloidipolyneuropatia, suvuittainen amyloidikardiomyopatia tai seniili systeeminen amyloidoosi.

Esillä olevissa menetelmissä hoidettu yksilö voi olla ihminen, vaikka on selvää, että esillä olevan keksinnön periaatteet viittaavat siihen, että keksintö on tehokas kaikkien nisäkkäiden suhteen. Tässä yhteydessä "nisäkkään" on tarkoitus sisältää kaikki nisäkäslajit, joissa toivotaan transtyretiinin virhelaskostumiseen liittyvien tautien hoitoa, varsinkin maatalouden ja kodin nisäkäslajeissa.

Tässä kuvatut yhdisteet (esim. biaryyliyhdisteet kuten diflunisaalianalogit, polyklooribifenyyli tai bensoksatsolit) voidaan formuloida farmaseuttisesti hyväksyttäväksi valmistettaessa farmaseuttinen koostumus, jossa on yhdiste. Tässä käytetyllä tavalla termejä "farmaseuttisesti hyväksyttävä", "fysiologisesti siedettävä" ja niiden kielipillisiä variaatioita niiden liittyessä koostumuksiin, kantajiin, laimennusaineisiin ja reagensseihin, käytetään erotuksesta ja ne esittävät, että materiaalit pystytään antamaan nisäkkääseen tai nisäkkäälle tuottamatta ei-toivottuja fysiologisia vaikutuksia.

Keksintö käsittää myös 6-karboksi-2-(3,5-dikloorifenyyli)bentsoksatsolintai tässä kuvatuista farmaseuttisista koostumuksista käytön lääkkeen valmistamisessa transtyretiiniamyloiditautin hoitamiseksi (esim. suvuittaisen amyloidipolyneuropatian, suvuittaisen amyloidikardiomyopatian tai seniilin systeemisen amyloidoosin).

Yhdisteet ja käyttö tässä kuvatun lääkkeen valmistamiseksi saavat aikaan merkittäviä etuja TTR-amyloidoosiin nykyään saatavissa oleviin hoitovalintoihin nähden. TTR-amyloidoosi johtaa tavallisesti kuolemaan kymmenessä vuodessa ja aina viime aikoihin saakka sitä pidettiin parantumattomana. Maksasiirre on tehokas keino korvata sairauteen liittyvä alleeli WT-alleelilla suvuittaisissa tapauksissa, koska tavallisesti

amyloidogeenisen TTR:n lähde on maksa. Vaikka maksasiirre on tehoka geenitera-
pian muoto, niin se ei ole ongelmaton. Elimensiirtoa monimutkaistaa invasiivisen
leikkauksen tarve sekä vastaanottajalle että luovuttajalle, pitkäaikainen elimensiirtoa
seuraava immunosuppressiivinen terapia, pula luovuttajista, sen korkea kustannus ja
5 suuri määrä TTR-amyloidoosipotilaita, jotka eivät ole hyviä kandidaatteja sairautensa
etenemisen vuoksi. Valitettavasti kardiaalinen amyloidoosi etenee joissakin suvui-
taisissa potilaissa jopa maksansiirron jälkeen, koska WT-TTR usein jatkaa saostu-
mista. Elimensiirto ei myöskään lievitä TTR:n saostumista keskushermostossa
(CNS:ssä) johtuen sen synteisistä korioideapleksuksen avulla. Elimensiirto ei ole
10 käyttökelpoinen valinta yleisimmässä TTR-taudissa, seniilissä systeemisessä amy-
loidoosissa (SSA:ssa), joka vaikuttaa noin 25 %:iin niistä yli 80:stä johtuen WT-
TTR:n saostumisesta.

Ellei toisin mainita kaikilla tässä käytetyillä teknisillä ja tieteellisillä termeillä on
sama tarkoitus kuin ammatillainen alalla, johon tämä keksintö kuuluu, tavallisesti
15 niillä ymmärtää olevan. Vaikka tässä kuvattujen kanssa samanlaisia menetelmiä ja
materiaaleja voidaan käyttää esillä olevaa keksintöä harjoitettaessa tai testattaessa,
niin jäljempänä kuvataan edulliset menetelmät ja materiaalit.

Muut keksinnön ominaisuudet ja edut selviävät seuraavasta yksityiskohtaisesta seli-
tyksestä ja patenttivaatimuksista.

20 **Piirrokset lyhyesti selitettynä**

Kuviossa 1 on kaaviokuva T4:ää sitovasta transtyretiinikohdasta.

Kuvioissa 2A ja 2B on kaaviot transtyretiinin laskostumisen etenemisestä ajan funk-
tiona erilaisten estoaineiden läsnäollessa.

Kuvioiden 3A ja 3B kaavioissa kuvataan fibrillien muodostuminen ajan funktiona
25 erilaisten estoaineiden läsnäollessa.

Kuvioiden 4A ja 4B kaavioissa kuvataan fibrillien muodostuminen ajan funktiona
erilaisten estoaineiden läsnäollessa.

Kuviossa 5 kuvataan transtyretiiniin sitoutumisen perusteella veriplasmasta seulottu-
jen polyklooribifenyylien rakenteet.

30 Kuviossa 6 kuvataan niiden hydroksyloitujen polyklooribifenyylien rakenteet, joiden
transtyretiiniin sitoutuminen plasmassa arvioitiin yhdessä niiden amyloidifibrillien
esto-ominaisuuksien kanssa *in vitro*.

Kuviossa 7 on kaavio, joka kuvaa transtyretiinifibrillien muodostumisen estämistä bentsoksatsolihdisteillä. Karboksyylin sijainti bentsoksatsolissa esitetään vasemmalla puolella, kun taas C(2)-fenyylirengas esitetään alareunassa. Pylväät osoittavat prosentuaalisen fibrillimuodostuksen (ff), toisin sanoen transtyretiinistä (3,6 μM) muodostuneiden fibrillien määrä bentsoksatsolihdisteen (7,2 μM) läsnäollessa suhteessa transtyretiinillä muodostuneeseen määrään estoaineen puuttuessa (joka on määritetty 100 %:ksi).

Kuviossa 8 on ihmisen veri-plasmassa inkuboinnin jälkeen transtyretiiniin sitoutuneiden bentsoksatsolien stoikiometriaa (s) kuvaava kaavio. Transtyretiini siepattiin immuunisaostamalla hartsiin sidotulla vasta-aineella. Kun transtyretiini oli vapautettu hartsista, niin transtyretiinin ja estoaineen määrät kvantitoitiin niiden HPLC-kromatogrammissa näkyvien piikkien pinta-alojen perusteella. s:n suurin mahdollinen arvo on 2. Yhdistenumerot on esitetty x-akselilla. Ohuet vertikaaliviivat tarkoittavat mittausvirhettä.

Kuvion 9 kaavio kuvaa transtyretiinin (1,8 μM) hajoamista ajan funktiona 6 M ureassa ilman estoainetta tai yhdisteiden 20, 21 tai 27 läsnäollessa määränä 3,6 μM ja yhdisteen 20 määränä 1,8 μM .

Kuvio 10 esittää röntgenkuvana yhdisteen 20 kiderakenteen sen ollessa sitoutuneena transtyretiiniin. Eri alayksiköissä samanarvoiset tähteet samoin kuin halogeenia sitovat taskuparit (HBP:t) on erotettu merkityillä ja merkitsemättömillä tähdennumeroilla.

Keksintö yksityiskohtaisesti kuvattuna

Ainakin osa amyloiditaukeista näyttää aiheutuvan jonkin yli 20 ei-homologisesta proteiinista tai proteiinifragmentista saostuessa ja lopulta saadessa aikaan fibrillaarisen kvaternaarisen risti- β -levyrakenteen. Amyloidifibrillien muodostuminen normaalisti laskostuneesta proteiinista kuten transtyretiinistä vaatii proteiinin virhelaskostumisen tuottaakseen koostamiskelpoisen välituotteen. Transtyretiinin (TTR:n) amyloidogeenisprosessi näyttää aiheuttavan kolmea erilaista amyloiditautia – seniilin systeemisen amyloidoosin (SSA:n), suvuittaisen amyloidipolyneuropatian (FAP:n) ja suvuittaisen amyloidikardiopatian (FAC:n). SSA:han liittyy villikannan TTR:n saostuminen, kun taas FAP ja FAC aiheutuvat yhden yli 80 TTR-variantista amyloidogeenisista. Katso esimerkiksi Colon, W.; Kelly, J. W. *Biochemistry* 1992, 31, 8654–60; Kelly, J. W. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1996, 6, 11–7; Liu, K.; et al. *Nat. Struct. Biol.* 2000, 7, 754–7; Westermark, P.; et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990, 87, 2843–5; Saraiva, M. J.; et al. *J. Clin. Invest.* 1985, 76, 2171–7; Jacobson, D. R.; et al. *N.*

Engl. J. Med. 1997, 336, 466–73; Buxbaum, J. N.; Tagoe, C. E. Ann. Rev. Med. 2000, 51, 543–569; ja Saraiva, M. J. Hum. Mutat. 1995, 5, 191–6.

TTR on 55 kDa:n homotetrameeri 2,2,2-symmetrialla kahdella identtisellä tunnelin muotoisella sitoutumiskohdalla dimeeri–dimeeriliittymäpinnassa, joihin kohtiin kilpirauhashormoni (T4) voi sitoutua veri­plasmassa ja CSF:ssä. TTR on tavallisesti sidottuna alle 1 ekvivalenttiin retinolia sitovasta holoproteiinista. TTR-virhelaskostuminen mukaan lukien tetrameerin hajoaminen monomeereiksi ja sitä seuraavat tertiäariset rakennemuutokset monomeerissa saavat proteiinin koostumaan virheellisesti ja lopulta saavat aikaan amyloidin. FAP:n saatavissa oleva hoito käyttää maksansiirron välittämää geeniterapiaa ja korvaa veressä olevan TTR-variantin villikannan (WT:n) proteiinilla. Tämä lähestymistapa ei todennäköisesti ole tehokas FAC:n suhteen johtuen WT-TTR:n jatketusta saostumisesta eikä se ole käyttökelpoinen SSA:n hoidossa, jonka syynä näyttää olevan WT-TTR-saostumisprosessi. Maksansiirtohoito epäonnistuu suunnilleen 10:llä TTR-varianteista, jotka saostuvat amyloidifibrilleiksi leptomeningeissä johtaen CNS-tautiin, sillä tätä TTR:ää syntetisoidaan korioidaapleksuksessa. Sen tähden on toivottavaa kehittää yleinen ei-invasiivinen lääkepohjainen terapeuttinen strategia. Voi olla toivottavaa, että lääke ei perustu proteiiniin, peptidiin tai nukleiinihappoon. Katso esimerkiksi Blake, C. C.; et al. J. Mol. Biol. 1978, 121, 339–56; Wojtczak, A.; et al. Acta Crystallogr., Sect. D 1996, 52, 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.; et al. Lancet 1993, 341, 1113–6; Suhr, O. B.; Ericzon, B. G.; Friman, S. Liver Transpl. 2002, 8, 787–94; Dubrey, S. W.; et al. Transplantation 1997, 64, 74–80; Yezaki, M.; et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000, 274, 702–6; ja Cornwell, C. G. III; et al. Am. J. of Med. 1983, 75, 618–623.

Transtyretiinin amyloidifibrillimuodostusta estävien diflunisaalianalogien synteesi

Amyloidifibrillimuodostukseen johtava TTR-virhelaskostuminen voidaan estää stabiloimalla tetrameeri T4:n välityksellä. Useat rakenteellisesti erilaiset tetrameeristabiloijien perheet sitoutuvat toiseen tai kumpaankin TTR:n T4-kohtaan ja estävät amyloidoosin ilman todennäköisiä T4-hormonin sivuvaikutuksia. Nämä tetrameeria stabiloivat yhdisteet sisältävät useita ei-steroidisia tulehduslääkkeitä (NSAID:itä) kuten flufenamiinihappo, diklofenaakki, flurbiprofeeni ja diflunisaali, jotka näyttävät toimivan lisäämällä tetrameerin hajoamiseen liittyvää kineettistä kynnystä perustilan sitomisella ja stabiloinnilla. Koska TTR on sekundaarinen T4-kantaja veri­plasmassa, niin yli 95 % TTR:n T4:ää sitovasta kapasiteetista jää käyttämättä tehden

mahdolliseksi näihin kohtiin suuntaavan tetrameeria stabiloivan yhdisteen antamisen. Koska diflunisaali on syklo-oksigenaasi-2:n estoaine, niin pitkäaikainen antaminen voisi johtaa maha-suolikanavan sivuvaikutuksiin. Siten toivottavia ovat diflunisaalin analogit, joilla on alentunut NSAID-aktiivisuus tai joilla sitä ei ole mutta joilla on

5 korkea affiniteetti veriplasman TTR:ään. Ensimmäinen askel tähän tavoitteeseen on suunnitella ja syntetisoida amyloidifibrillimuodostusta estäviä diflunisaalianalogeja. Katso esimerkiksi Miroy, G. J.; et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996, 93, 15051–6; Klabunde, T.; et al. *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.; et al. *J. Am.*

10 *Chem. Soc.* 2000, 122, 2178–2192; Baures, P. W.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* 1999, 7, 1339–47; Sacchettini, J. C.; Kelly, J. W. *Nat. Rev. Drug Disc.* 2002, 1, 267–275; Oza, V. B.; et al. *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; ja Mao, H. Y.; et al. *J.*

15 *Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 10429–10435.

TTR-tetrameerin alayksiköt ovat suhteessa kolmeen kohtisuorassa olevaan C2-akseliin. Kuvio 1 on kaaviokuva TTR:n T4:ää sitovasta kohdasta osoittaen forward-sitomismallin, jossa estoainekarboksylaatti ottaa osaa elektrostaattisiin vuorovaikutuksiin Lys-15:n ja 15':n ϵ -ammoniumin kanssa. Rakenteeltaan kvaternaarisen liittymä-

20 pinnan luomat kaksi ekvivalenttia T4:ää sitovaa kohtaa ovat vaihdettavissa keskenään kahden C2-akselin avulla, jotka ovat kohtisuorassa kiteen C2-symmetria-akselia vastaan. Kumpikin T4:ää sitova kohta voidaan jakaa sitovaan sisä- ja ulko-onteloon. Katso esimerkiksi Blake, C. C.; Oatley, S. J. *Nature* 1977, 268, 115–20, joka liitetään tähän kokonaisuudessaan siihen viittaamalla. Sitovassa sisäontelossa on halogeenia

25 sitova taskupari (HBP), joka on nimetty HBP-3:ksi ja -3':ksi ja joka on tehty Leu-17:n, Ala-108:n, Val-121:n ja Thr-119:n sivuketjuista. Jokaisesta alayksiköstä peräisin olevan Ser-117:n neljän sivuketjun konvergenssi määrittää sisimmän alueen ja kahden identtisen sitomiskohdan välisen liittymäpinnan. Ser-11-hydroksyyli-ryhmät voivat toimia yhdisteellä vetysidoksen donoreina tai akseptoreina komplementaariselle funktionaalisuudelle (esim. amyloidimuodostuksen estoaine) tai välittää elekt-

30 rostaattisia vuorovaikutuksia yhdisteen kanssa vesimolekyylien välityksellä. Sitova ulompi kohta koostuu HBP-1:stä ja -1':sta, kun taas HBP-2 ja -2' sijaitsevat sitovien sisä- ja ulkoonteloiden liittymäpinnassa. Lys-15- ja -15'- ϵ -ammoniumryhmät rajaavat sitovan ulko-ontelon aivan uloimmat kantamat tehden mahdolliseksi yhdisteen anionisten substituenttien elektrostaattiset vuorovaikutukset. Monet TTR-tetrameeria

35 stabiloivista yhdisteistä sitovat forward-sitomismallissa, jossa hydrofiilisella fenyyli- renkaalla sitovaan ulkotaskuun sijoittunut anioninen substituentti osallistuu

elektrostaattiseen vuorovaikutukseen Lys-15-ε-ammoniumryhmien kanssa. Forward-sitomismallissa hydrofobinen fenyylirengas (usein substituoitu halogeeneilla) voi vallata sitovan sisätaskun. Kuitenkin on havaittu myös esimerkkejä sitomisesta vastakkaisessa orientaatiossa (käänteisessä sitovassa mallissa). Käänteisessä sitomismallissa hydrofiilinen aromaattinen rengas voidaan sijoittaa sisäonteloon, mikä tekee mahdolliseksi karboksylaatile muodostaa vetysidos Ser-117:n ja Ser-117':n kanssa. Käänteisessä sitovassa mallissa halogeenisubstituoitu hydrofobinen rengas voidaan sijoittaa ulko-onteloon.

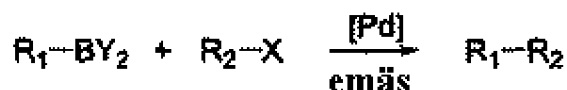
Diflunisaali voi vähentää happovälitteistä TTR-amyloidogeenia. Diflunisaalin rakennetta (katso esimerkki 2) voidaan käyttää pohjana niiden uusien yhdisteiden suunnittelemiseksi, jotka voivat estää TTR-amyloidogeenia. Katso esimerkiksi Verbeeck, R. K.; et al. *Biochem. Pharm.* 1980, 29, 571–576; ja Nuernberg, B.; Koehler, G.; Brune, K. *Clin. Pharmacokin.* 1991, 20, 81–89.

Keksinnön mukainen yhdiste on 6-karboksi-2-(3,5-dikloorifenyyl)-bentsoksatsoli.

Yhdistettä 6-karboksi-2-(dikloorifenyyl)-bentsoksatsoli voidaan käyttää epäorgaanisista tai orgaanisista hapoista tai emäksistä peräisin olevien farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen muodossa. Seuraavat suolat ovat sellaisten happosuolojen joukossa: asetaatti, adipaatti, alginaatti, aspartaatti, bentsoaatti, bentseenisulfonaatti, bisulfaatti, butyraatti, sitraatti, kamforaatti, kamforsulfaatti, syklopentaanipropionaatti, diglukonaatti, dodekyylisulfaatti, etaanisulfonaatti, fumaraatti, glukohheptanoaatti, glyserofosfaatti, hemisulfaatti, heptanoaatti, heksanoaatti, hydrokloridi, hydrobromidi, hydrojodidi, 2-hydroksietaanisulfonaatti, laktaatti, maleaatti, metaanisulfonaatti, 2-naftaleenisulfonaatti, nikotinaatti, oksalaatti, pamoatti, pektinaatti, persulfaatti, 3-fenyylipropionaatti, pikraatti, pivalaatti, propionaatti, sukkinaatti, tartaraatti, tiosyanaatti, tosylatti ja undekanoaatti. Emässuoloja ovat ammoniumsuolat, alkalimetallisuolat kuten natrium- ja kaliumsuolat, maa-alkalimetallisuolat kuten kalsium- ja magnesiumsuolat, suolat orgaanisilla emäksillä kuten disykloheksyyliamiinisuolat, N-metyyli-D-glukamiini ja suolat aminohapoilla kuten arginiini, lysiini jne. Myös emäksiset typpipitoiset ryhmät voidaan kvaternisoida niillä aineilla kuten pieniketjuisilla alkyylihalideilla kuten metyyli-, etyyli-, propyyli- ja butyylikloridi, -bromidi ja -jodidi; dialkyylisulfaatit kuten dimetyyli-, dietyyli-, dibutyyli- ja diamyyli-sulfaatit, pitkäketjuiset halidit kuten dekyyli-, lauryyli-, myristyyli- ja stearyylikloridit, -bromidit ja -jodidit, aralkyylihalidit kuten bentsyyli- ja fenetylibromidit ja jotkin muut. Siten saadaan veteen tai öljyyn liukenevia tai dispergoituvia tuotteita.

Yhdiste 6-karboksi-2-(3,5-dikloorifenyli)-bentsoksatsoli voi stabiloida TTR-tetrameereja ja estää TTR-amyloidin muodostumisen.

- Yleensä yhdiste 6-karboksi-2-(3,5-dikloorifenyli)-bentsoksatsoli voidaan syntetisoida alalla tunnetuilla menetelmillä. Yksi menetelmä yhdisteiden valmistamiseksi on Suzuki-kytkentä:



$BY_2 = B(OH)_2, B(OR)_2, 9\text{-BBN}, B(CHCH_3CH(CH_3)_2)_2$

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

$R_1 = \text{aryyli, alkenyyli, alkyyli}$

- 10 $R_2 = \text{aryyli, alkenyyli, bentsyyli, allyyli, alkyyli}$

- Bifenyylilyhdiste esimerkiksi voidaan muodostaa fenyyliboronihapon Suzuki-kytkennällä bromibentseenin tai jodibentseenin kanssa. Yhdisteen valmistuksen aikana voidaan tarvita soveltuvia suojaryhmiä sivutuotteiden muodostumisen välttämiseksi. Esimerkiksi aminosubstituentti voidaan suojata soveltuvalla aminosuojaryhmällä kuten trifluoriasetyylillä tai tert-butoksikarbonyylillä. Muita suojaryhmiä ja reaktio-olosuhteita on löydettävissä julkaisusta T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, (3rd, 1999, John Wiley & Sons, New York, N.Y.).

Farmaseuttiset koostumukset

- Tässä kuvatut yhdisteet (esim. diflunisaalianalogit, polyklooribifenyylit tai bentsoksatsolit) voidaan formuloida farmaseuttisiksi koostumuksiksi, jotka voidaan antaa oraalisesti, parenteraalisesti, inhalaatiosuihkeena, topikaalisesti, rektaalisesti, nasaa-
- 20 lisesti, bukkalisesti, vaginaalisesti tai implantoidun säiliön kautta. Termiin "parenteraalinen" tässä käytetyllä tavalla kuuluvat subkutaaniset, intravenoosiset, intramuskulaariset, intra-arteriaaliset, intrasynoviaaliset, intrasternaaliset, intratekaaliset, intra-
- 25 trahepaattiset, intralesionaaliset ja intrakraniaaliset injektio- tai infuusiomenetelmät.

- Farmaseuttiset koostumukset voivat sisältää minkä tahansa yhdisteistä tai niiden farmaseuttisesti hyväksyttävistä johdannaisista yhdessä jonkin farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan kanssa. Tässä mainittu termi "kantaja" sisältää hyväksyttävät adjuvantit ja vehikkelit. Farmaseuttisesti hyväksyttäviä kantajia, joita voidaan käyttää
- 30 keksinnön mukaisissa farmaseuttisissa koostumuksissa ovat ioninvaihtajat,

alumiinioksidi, alumiinistearaatti, lesitiini, seerumiproteiinit kuten humaani seerumialbumiini, puskuriaineet kuten fosfaatit, glysiini, sorbiinihappo, kaliumsorbaatti, kyllästettyjen kasvirasvahappojen osittaiset glyseridiseokset, vesi, suolat tai elektrolyytit kuten protamiinisulfaatti, dinatriumvetyfosfaatti, kaliumvetyfosfatti, natriumkloridi, sinkkisuolat, kolloidinen silika, magnesiumtrisilikaatti, polyvinyylipyrrolidoni, selluloosapohjaiset aineet, polyetyleeniglykoli, natriumkarboksimeetyliselluloosa, polyakrylaatit, vahat, polyeteenipolyoksiopropeenilohkopolymeerit, polyeteeniglykoli ja villarasva, näihin kuitenkin rajoittumatta.

Farmaseuttiset koostumukset voivat olla steriilin injektoitavan preparaatin muodossa, esimerkiksi steriilinä injektoitavana vesi- tai öljysuspensiona. Tämä suspensio voidaan formuloida alalla tunnettujen menetelmien mukaan käyttämällä soveltuvia dispergointi- tai kostutusaineita tai suspendoivia aineita. Steriili injektoitava preparaatti voi olla myös steriili injektoitava liuos tai suspensio ei-toksisessa parenteraalisesti hyväksyttävässä laimentimessa tai liuottimessa, esimerkiksi liuoksena 1,3-butaanidiolissa. Hyväksyttävien vehikkeiden ja liuottimien joukossa, joita voidaan käyttää, ovat vesi, Ringerin liuos ja isotoninen natriumkloridiliuos. Lisäksi liuottimena tai suspendointiväliaineena käytetään perinteisesti steriilejä rasvaöljyjä. Tässä tarkoituksessa voidaan käyttää kaikkia mietoja rasvaöljyjä, mukaan lukien synteettiset mono- tai diglyseridit. Injektiokelpoisten valmistuksessa käyttökelpoisia ovat rasvahapot, esimerkiksi öljyhappo ja sen glyseridijohdannaiset, samoin kuin luonnon farmaseuttisesti hyväksyttävät öljyt, esimerkiksi oliiviöljy tai risiiniöljy, erityisesti niiden polyoksietyloidussa muunnoksessa. Nämä öljyliuokset tai -suspensiot voivat sisältää myös pitkäketjuisen alkoholilaimentimen tai dispersantin.

Farmaseuttiset koostumukset voidaan antaa oraalisesti jossakin oraalisesti hyväksyttävässä annosmuodossa, mukaan lukien kapsелеissa, tableteissa, vesisuspensioissa tai -liuoksissa, näihin kuitenkin rajoittumatta. Oraalisesti annettavissa tableteissa tavallisesti käytettäviin kantajiin kuuluvat laktoosi ja maissitärkkelys. Tavallisesti lisätään myös liukuaineita, esimerkiksi magnesiumstearaattia. Oraalisesti annettavassa kapselimuodossa käyttökelpoisiin laimentimiin kuuluvat laktoosi ja kuivattu maissitärkkelys. Kun oraaliseen antamiseen tarvitaan vesisuspensioita, niin vaikuttava aineosa yhdistetään emulgointi- ja suspendoimisaineiden kanssa. Haluttaessa voidaan lisätä myös tiettyjä makeutus-, tuoksu- tai väriaineita.

Vaihtoehtoisesti farmaseuttiset koostumukset voidaan antaa rektaalisesti annettavien peräpuikkojen muodossa. Nämä voidaan valmistaa sekoittamalla aine sopivan ei-ärsyttävän apuaineen kanssa, joka on kiinteä huoneenlämmössä mutta neste

rektaalilämmössä, ja siis sulaa rektumissa ja lääkeaine vapautuu. Sellaisia aineita ovat kaakaovoi, mehiläisvaha ja polyeteeniglykolit.

- 5 Farmaseuttiset koostumukset voidaan antaa myös topikaalisesti, erityisesti silloin kun hoidon kohde sisältää topikaalisessa antamisessa helposti lähestyttäviä alueita tai elimiä, mukaan lukien silmän, ihon tai alasuolikanavan sairaudet. Soveltuvat topikaaliset formulaatiot on helppo valmistaa jokaiseen näistä alueista tai elimistä.

Alasuolistokanavaan tarkoitettua topikaalista käyttöä voidaan tehostaa rektaalisessa peräpuikkoformulaatiossa (katso edellä) tai sopivassa enemaformulaatiossa. Myös voidaan käyttää topikaalisesti transdermaalisia laastareita.

- 10 Topikaalisissa käytöissä farmaseuttiset koostumukset voidaan formuloida sopivaan voiteeseen, joka sisältää vaikuttavan komponentin suspendoituna tai liuotettuna yhteen tai useampaan kantajaan. Tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden topikaaliseen antamiseen tarkoitettuja kantajia ovat mineraaliöljy, vaseliiniöljy, valkoinen vaseliini, propyleeniglykoli, polyoksietyleni, polyoksipropyleeniyhdiste, emulgointi-
15 vaha ja vesi. Vaihtoehtoisesti farmaseuttiset koostumukset voidaan formuloida sopivaan lotion tai emulsiovoiteeseen, joka sisältää vaikuttavat komponentit suspendoituna tai liuotettuna yhteen tai useampaan farmaseuttisesti hyväksyttävään kantajaan. Sopivia kantajia ovat mineraaliöljy, sorbitaanimonostearaatti, polysorbaatti-60, setyyliesterien vaha, setearyylialkoholi, 2-oktyylidodekanoli, bentsyylialkoholi ja vesi,
20 näihin kuitenkin rajoittumatta.

- Oftalmiseen käyttöön tarkoitetut farmaseuttiset koostumukset voidaan formuloida mikronisoiduiksi suspensioiksi isotonisessa, pH-säädetyssä steriilissä suolaliuoksessa tai edullisesti liuoksiksi isotonisessa, pH-säädetyssä steriilissä suolaliuoksessa joko säilöntäaineen, esim. bentsyylialkoniumkloridin, kanssa tai ilman sitä. Vaihtoehtoisesti oftalmisiin käyttöihin tarkoitetut farmaseuttiset koostumukset voidaan formuloida voiteeseen, esimerkiksi vaseliiniin.

- 30 Farmaseuttiset koostumukset voidaan antaa myös nasaalisen aerosolin tai inhalaation avulla käyttämällä sumutinta, kuivajauheinhalaattoria tai annosteluinhalaattoria. Sellaisia koostumuksia valmistetaan farmaseuttisen formulaation alalla hyvin tunnettujen menetelmien mukaisesti, ja niitä voidaan valmistaa liuoksina suolaliuoksessa, käyttämällä bentsyylialkoholia tai joitakin muita sopivia säilytysaineita, absorptiopromootoreita hyötyosuuden tehostamiseksi, hiilifluorideja ja/tai joitakin muita tavomaisia liuottamis- tai dispergointiaineita.

- Vaikuttavan ainesosan määrä, joka voidaan yhdistää kantaja-aineiden kanssa yksittäisen annosmuodon valmistamiseksi, vaihtelee riippuen hoidettavasta isännästä ja nimenomaisesta antotavasta. On kuitenkin selvää, että jollekin tietylle potilaalle tarkoitettu spesifinen annos- ja hoito-ohjelma riippuu monenlaisista tekijöistä, joihin kuuluvat nimenomaisen käytetyn yhdisteen aktiivisuus, ikä, ruumiinpaino, yleinen terveys, sukupuoli, ruokavalio, antoaika, ekskreetionopeus, lääkeyhdistelmä ja hoitavan lääkärin arviointi ja nimenomaisen hoidettavan sairauden vakavuusaste. Vaikuttavan ainesosan määrä voi riippua myös mahdollisesta terapeuttisesta tai profylaktisesta aineesta, jonka kanssa ainesosa annetaan samanaikaisesti.
- 10 Farmaseuttisen koostumuksen tehokas määrä on määrä, joka on välttämätön annettaessa hoidettavalle potilaalle terapeuttinen vaikutus, ja se riippuu monenlaisista tekijöistä kuten estoaineen luonteesta, potilaan koosta, hoidon tavoitteesta, hoidettavan patologian luonteesta, käytetystä nimenomaisesta farmaseuttisesta koostumuksesta ja hoitavan lääkärin arvioinnista. Tutustu tarvittaessa julkaisuihin Freireich et al., Cancer Chemother. Rep. 1966, 50, 219 ja Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardley, New York, 1970, 537. Käyttökelpoisia vaikuttavan ainesosayhdisteen annostasoja voivat olla noin 0,001–100 mg/kg ruumiinpainoa vrk:ssa, noin 0,1 – noin 10 mg/kg ruumiinpainoa vrk:ssa.

Yhdiste 19 Esimerkissä 5 on keksinnön mukainen yhdiste.

20 Esimerkit

Esimerkki 1: Transtyretiiniamyloiditautin estäminen muuttamalla proteiinin virhelaskostumisen energetiikkaa

- Proteiinin virhelaskostuminen liittyy satoihin ihmisessä esiintyviin tauteihin, mukaan lukien amyloidooseihin. 80 suvuittaista mutaatiota, jotka pahentavat [esimerkiksi Val30 → Met30 (V30M) ja Leu55 → Pro55 (L55P)] tai parantavat [Thr119 → Met119 (T119M)] transtyretiiniamyloidipatologiaa (TTR-amyloidipatologiaa), tarjoavat arvokkaita mekanistisia näkemyksiä. Toistaiseksi karakterisoidut kaikki sairauteen liittyvät mutaatiot destabiloivat TTR-tetrameeria ja monet vaikuttavat määrävän tetrameerin hajoamisnopeutta nopeiden nopeuksien kiihdyttäessä ja hitaiden nopeuksien hidastaessa amyloidoosia. Me käytimme hyödyksi mekanismia, jolla T119M estää sairauden V30M-yhdisteheterotsygooteissa kehittäessämme pienimolekyyllisiä TTR-amyloidiestoaineita, jotka hidastivat dramaattisesti osittaiseen monomeeridenaturoitumiseen tarvittavaa ensimmäistä virhelaskostumistapahtumaa

(tetrameerin hajoamista), joka tekee mahdolliseksi virheellisen koostumisen amyloidi- ja joiksikin muiksi aggregaateiksi.

Hybriditetrameerit eristettiin transsuppressiomekanismin ymmärtämiseksi aiempaa paremmin. T119M-alayksikköstoikiometrian lisääminen suhteessa V30M:ään [eli
 5 L55P:hen] siirsi happovälitteisen fibrillimuodostuksen maksimia pienempään pH:hon, laski amyloidin kokonaissaantoa fysiologisesti saavutettavissa oleviin pH-arvoihin ($> 4,0$) ja hidasti happoindusoidun (pH 4,4) ja metanolivälitteisen amyloidogeneesin nopeutta. On löydetty useita pienimolekyyllisiä TTR-amyloidifibrillestoaineita, joiden alaryhmää tässä tutkittiin mukaan lukien USA:n Food and Drug
 10 Administrationin (FDA:n) kahta lääkeainetta (estoaineet 8 ja 10) (Sacchettini et al., Nature Rev. Drug Discovery 1, 267 (2002)). Pienimolekyyllisen estoaineen sitoutumisen vaikutus villikannan (WT) TTR-fibrillimuodostuksen saantoon ja nopeuteen oli samanlainen kuin sisällytettäessä T119M-alayksikkö. Siirtymää alempaan pH-optimiin fibrillimuodostusta varten ei kuitenkaan havaittu kaikkien estoaineiden kohdalla. Nämä estoaineet toimivat sitoutumalla kahteen ekvivalenttiin tyroksiinikohtaan
 15 (T4-kohtaan) TTR-tetrameerissa, eivät monomeerissa.

Tetrameerin hajoamisnopeudet mitattiin kytkemällä hitaat kvaternaariset rakennemuutokset laskostumisen purkautumistransitioon nopeudella 5×10^5 kertaa hajoamisnopeus (Hammarström et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16427 (2002)). Denaturaatiosta osoitettu hajoaminen on irreversiibeli, koska käytetyn urean pitoisuus ($> 6,0$ M) ei voi tukea uudelleenlaskostumista. Kun T119M-alayksikön stoikiometriaa suhteessa V30M:ään [eli L55P:hen] lisättiin, niin TTR:n ($1,8 \mu\text{M}$) tetrameerin hajoamisnopeus laski dramaattisesti (määräävä vaihe amyloidogeneesissa) kolmessa erila
 20 isessa denaturoitumisympäristössä (hapan pH, vesipitoinen metanoli tai urea), mikä selittää sairauden estämisen alkuperän.

WT-TTR-tetrameerin ($1,8 \mu\text{M}$) hajoamisnopeuden mittaukset estoaineiden 6–10 läsnäollessa ($1,8 \mu\text{M}$ ja $3,6 \mu\text{M}$) osoittivat kaikilla TTR-estoainekomplekseilla annoksesta riippuvan hidastumisen. Tetrameerihajoamisen alkunopeus oli suunnilleen kääntäen verrannollinen kahteen estoaineeseen sitoutuneen tetrameerin moolifraktioon ($T \cdot I_2$). Estoaineiden 6, 7 ja 9 tapauksessa ($1,8 \mu\text{M}$) yhden eksponentiaalisen amplitudi vastasi etupäässä ligandoitumattoman tetrameerin hajoamista (ja vähemmässä määrin $T \cdot I_2$) viitaten siihen, että $T \cdot I_2$ esti tetrameerihajoamista 6 M ureassa. Sen vastakohtana $T \cdot I_1$ ja $T \cdot I_2$:n muodostuminen estoaineille 8 ja 10 ei olennaisesti suojannut tetrameeria hajoamiselta ureassa ja toi esiin, että pelkkä sitoutuminen ei
 35 riittänyt. Estoaineiden 6, 7 ja 9 ($3,6 \mu\text{M}$) tapauksessa huomattu tehokas esto johtui $T \cdot I_2$ -kompleksia stabiloivasta sidosenergiasta vapaiden energioiden ylittäessä $2,3$

- kcal/mol ($\Delta G1 = RT \ln([T \cdot I]/[T]) = RT \ln([I]/K_{d1})$ ja $\Delta G2 = RT \ln([T \cdot I_2]/[T]) = RT \ln \{[I]^2/(K_{d1} \cdot K_{d2})\}$). $T \cdot I_2$:n stabilointi T :n suhteen 2,7 kcal:lla/mol johtaisi TTR-tetrameerin hajoamisnopeuden kahden suuruusluokan laskuun. Estoaineiden 8 ja 10 (3,6 μ M) voimakas negatiivisesti yhteistoiminnallinen sitoutuminen sanelee sen, että toiseen kohtaan sitoutuminen ($T \cdot I_2$, μ M-dissosiaatiovakiot) ei stabiloi enää TTR:ää suhteessa ensimmäiseen kohtaan ($T \cdot I$). Estoaineiden 6, 7 ja 9 nM-dissosiaatiovakiot (K_{d1} ja K_{d2}) varmistavat, että perustilan stabilointi ($> 2,3$ kcal/mol) riittää olennaisesti nostamaan TTR-tetrameerihajoamisen aktivoitumiskynnystä, sillä ehdolla että estoaineet eivät sitoutuneet eivätkä samalla tavalla stabiloineet dissosiativista siirtymätilaa. Estoaineen hajoamisnopeudet $T \cdot I$ - ja $T \cdot I_2$ -kompleksista voisivat myös esittää osaa estoaineiden 6, 7 ja 9 tehokkuudessa. Estoaineella kyllästetty TTR immobilisoitiin vasta-ainehartsilla, jonka läpi virtautettiin puskurin vesiliuosta nopeudella 5,0 ml/min tehokkaiden hajoamisnopeuksien 6–10 arvioimiseksi. Parhailla estoaineilla oli alimmat näennäiset hajoamisnopeudet.
- 15 Vaikka amyloidogeenisnopeuksien (happamat olosuhteet) ja tetrameerin hajoamisnopeuksien (ureassa) välillä on yleensä hyvä vastaavuus estoaineiden läsnäollessa, niin asianlaita ei aina ole niin. Amyloidogeenesi tarvitsee pitoisuudesta riippuvan virhekkönnin hajoamisen jälkeen. Pienet molekyylit ovat siis yleensä tehokkaampia fibrillimuodostuksen kuin tetrameerin hajoamisen estämisessä, varsinkin kun estoaine voi pitää monomeerisen amyloidogeenisen välituotteen pitoisuuden alhaisena ($> 3,6$ μ M), jolloin fibrillimuodostus on hyvin tehotonta. Silloin tällöin ureassa mitatut tetrameerin hajoamisnopeudet eivät tarkasti ennusta estoaineen tehokkuuden arvojärjestystä happamissa olosuhteissa. Esimerkiksi FDA-hyväksytty lääke diflunisali (8) oli paljon parempi amyloidiestoaine kuin tetrameerin hajoamisen estoaine. Todennäköinen selitys tähän havaintoon on se, että K_{d1} ja/tai K_{d2} ovat pienempiä hapossa kuin ureassa. Lisäksi jotkin estoaineet toimivat paljon paremmin denaturoivissa olosuhteissa kuin niiden fysiologisissa olosuhteissa määritetyt sidosvakiot antavat ymmärtää. Esimerkiksi yhdiste 9 oli tehokkaampi tai yhtä tehokas estämään tetrameerin hajoamista (urea) ja fibrillimuodostusta (happo) kuin estoaine 7 oli huolimatta siitä, että estoaineen 9 K_{d1} - ja K_{d2} -arvot olivat vastaavasti 10- ja 83-kertaiset 7:ään nähden (mitattu fysiologisissa olosuhteissa). Siten on tärkeää arvioida virhelaskostusta estävien aineiden tehokkuus monenlaisissa denaturoivissa olosuhteissa eikä vain fysiologisissa olosuhteissa.
- 35 T119M-transsuppressorialayksikköjen inkluusio tautiin liittyvistä alayksiköistä muuten koottuihin tetrameereihin voisi laskea tetrameerihajoamisen nopeutta stabilomalla tetrameerin perustilaa suuremmassa määrin kuin siirtymätilaa (kuten on laita

pienimolekyylisten estoaineiden kohdalla) ja/tai destabiloimalla hajoamisen siirtymätila. Näiden mahdollisuuksien erottamiseksi toisistaan vertasimme WT- ja T119M-homotetrameerien uudelleenmuodostumisen kinetiikkaa. T119M-monomeerien uudelleenlaskostuminen oli nopea ja WT-TTR-monomeerien laskostumisnopeuden virheen rajoissa. Laskostuneiden T119M-monomeerien uudelleenkoonti oli kuitenkin kaksi suuruusluokkaa hitaampaa kuin urealaimennuksella alkuun saatettu WT-TTR-monomeerien tetramerisaatio. Uudelleenkoontiprosessi on kaksivaiheinen, mikä voidaan selittää havaittavan välituotteen läsnäololla koontireitissä (luultavasti dimeeri). Vastakkaisessa suunnassa T119M-tetrameeri hajoaa 1/37-osalla WT-TTR-tetrameerin esittämästä nopeudesta. Näitä kineettisiä vaikutuksia ei voida pitää tertiärisen rakenteen stabiilisuuden ja/tai tetrameerin stabiilisuuden erojen aiheuttamana. WT- ja T119M-monomeerien termodynaamisen stabiiliteetin suora vertailu (käyttäen teknistä monomeerista TTR-konstruktia (M-TTR)) paljasti laskostumisen purkautumisessa vapaan energian eroksi $\Delta\Delta G$ vain 0,4 kcal/mol, paljon vähemmän kuin 2,1 ja 2,7 kcal/mol, jotka tarvitaan selittämään vastaavasti hajoamis- ja koon-
 5 tinopeuserot. T119M:n ja WT-TTR:n termodynaaminen jaksoanalyysi paljasti, että T119M estää tetrameerin hajoamista destabiloimalla hajoamisen siirtymätilan noin 3,1 kcal:lla/mol, ei tetrameerin stabiloinnilla. Tämän analyysin mukaan T119M-tetrameeri destabiloidaan itse asiassa 0,9 kcal:lla/mol suhteessa WT:hen, mikä tukee edel-
 10 leen kineettistä stabilointimekanismia. WT- ja T119M-tetrameerin hajoamisen vapaan energian eroa ei voida mitata ureavälitteisellä laskostumisen purkautumisella, koska T119M-denaturointiin ureassa tarvitaan äärimmäisen pitkät inkubointiajat (useita viikkoja), jonka aikana TTR muokataan. Guanidiniumkloridin (GdmCl:n) ja guanidiniumtiosyanaatin (GdmSCN:n) denaturointikäyrien vertailu paljasti, että WT-
 20 TTR oli resistentimpi GdmCl-denaturoinnille kuin T119M, kun taas GdmSCN:n kohdalla kävi päinvastoin. Näitä eroja denaturoinnin keskikohdissa voidaan pitää differentiaalisen anionistabiloinnin aiheuttamana, mikä viittaa siihen, että näiden proteiinien oikeat termodynaamiset stabiilisuudet ovat hyvin samanlaisia, vaikka kvantitatiivinen analyysi ei ole mahdollinen näissä kaotroopeissa.
 25
 30 T119M-transsuppressiota välittää ensi sijassa dissosiatiivisen siirtymätilan destabilointi, mikä on yhtäpitävä T119M:n sijoittamisessa dimeeri–dimeeriliittymäpinnalle. Dissosiatiivisen siirtymätilaenergian lisääminen 3,1 kcal:lla/mol estää tehokkaasti tetrameerihajoamisen, koska aktivoitumiskynnyksestä tulee ylipääsemätön (hajoamisen puoliintumisaika $t_{1/2}$ lisääntyy noin 42 tunnista yli 1500 tuntiin). Pienimolekyylinen
 35 sitominen lisää samalla tavalla tetrameerin hajoamiseen liittyvää aktivoitumiskynnystä annoksesta riippuvalla tavalla, vaikka tätä välittää tetrameerin stabilointi (verrattuna siirtymätilan stabilointiin). Stabiloinnin laajuus on maksimaalinen, kun

pienimolekyyliset hajoamisvakiot K_{d1} ja K_{d2} ovat mahdollisimman pieniä ja estoaineen pitoisuus on mahdollisimman suuri. Kokeissamme käytetyt perustilan stabilointiin tarkoitetut pitoisuudet vastaavat usealla oraalisesti käytettävällä lääkkeellä plasmassa havaittuja.

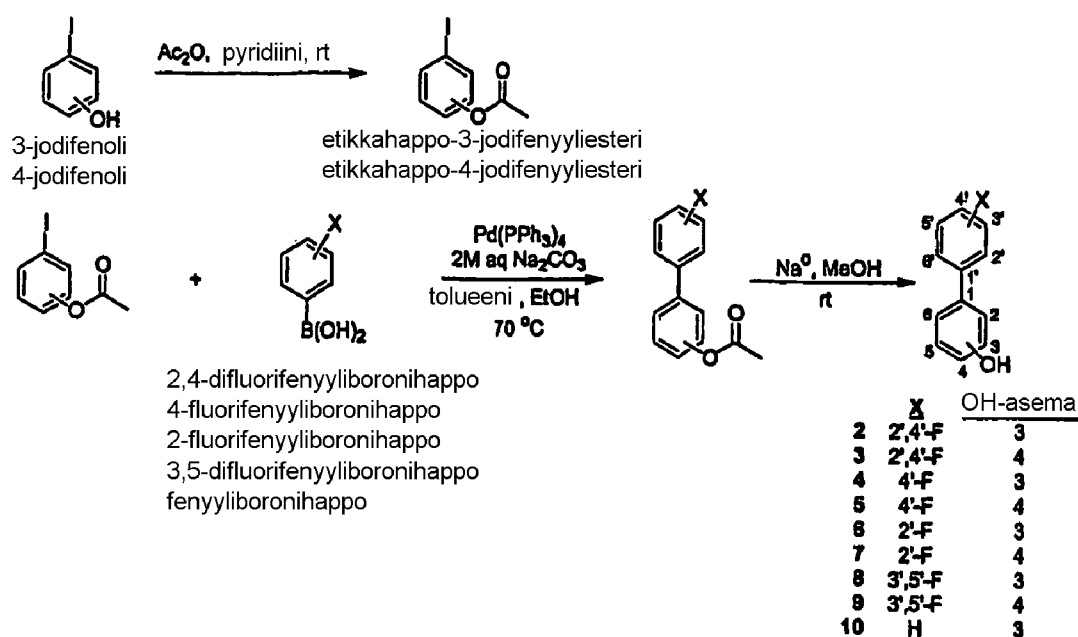
- 5 Pienimolekyylinen sitominen ja transsuppressio lisäävät tetrameerin hajoamiseen, TTR-fibrillimuodostuksen määräävään vaiheeseen, liittyvää aktivoitumisenergiaa. Tämän analogian osoittaminen todeksi on tärkeätä, koska transsuppression tiedetään estävän tautia V30M-yhdisteheterotsygooteissa. Natiivin tilan kineettinen stabilointi on erityisen houkutteleva terapeutinen strategia ottaen huomioon esiintulevat todisteet, että pienet virhelaskostuneet oligomeerit ovat neurotoksisia. Nyt pitäisi tarkastella pienimolekyylisten sideaineiden löytämistä tai transsuppressiomenettelyn kehittämistä joidenkin muiden virhelaskostumiseen taipuvaisten patologistesti merkityksellisten proteiinien energiamaaoston säätämiseksi.

15 **Esimerkki 2: Diflunisaalianalogit stabiloivat transtyretiinin natiivia tilaa ja ovat transtyretiinin amyloidifibrillimuodostuksen estoaineita**

- Diflunisaali (1) voi vähentää transtyretiinin (TTR:n) amyloidogeneesia. Esimerkiksi tietyissä olosuhteissa (esim. 3,6 μM TTR, diflunisaali, pH 4,472 h) diflunisaali laskee TTR-amyloidogeneesia 63 %:lla. Näissä olosuhteissa diflunisaalipitoisuuden kaksinkertaistaminen (72 μM :iin) alentaa amyloidogeneesia 97:lla. Diflunisaali on yksi parimmista amyloidifibrilliestoaineista tähän mennessä raportoiduista ja oraalisesti annettavan diflunisaalin biologinen hyötyosuus on erittäin korkea saaden aikaan jatkuvan plasmapitoisuuden, joka ylittää 100 μM annoksella 250 mg kahdesti vuorokaudessa. Koska diflunisaali on syklo-oksigenaasi-2-estoaine, niin pitkäaikainen antaminen voisi johtaa maha-suolikanavan sivuvaikutuksiin. Siten valinnaisesti toivottavia ovat diflunisaalin analogit, joilla on alentunut NSAID-aktiivisuus tai joilla sitä ei ole mutta joilla on korkea affiniteetti veriplasmassa olevaan TTR:ään. Diflunisaalin rakennetta voidaan siis käyttää pohjana niiden uusien yhdisteiden suunnittelemiseksi, jotka voivat estää TTR-amyloidogeneesia. Katso esimerkiksi Verbeeck, R. K.; et al. Biochem. Pharm. 1980, 29, 571–576; ja Nuernberg, B.; Koehler, G.; Brune, K. Clin. Pharmacokin. 1991, 20, 81–89.

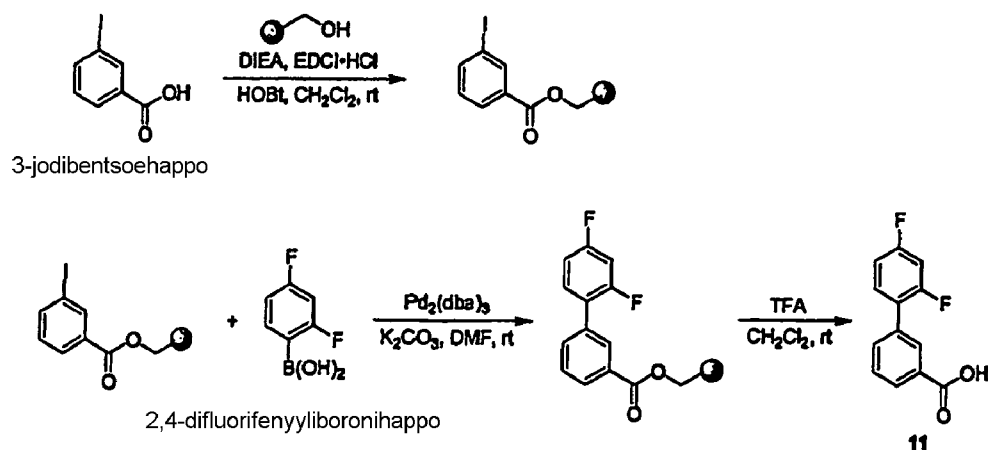
- Diflunisaalianalogit syntetisoitiin käyttämällä aryylihalidin ja aryyliboronihapon välistä Pd-välitteistä Suzuki-kytkentää. Analogien 2–10 synteesi saatiin aikaan asetyloimalla joko 3- tai 4-jodifenoli etikkahapon anhydridillä ja pyridiinillä ja sen jälkeen Suzuki-kytkennällä soveltuvan fluorifenyliboronihapon kanssa normaaleissa Suzuki-kytkentäreaktio-olosuhteissa kaaviossa 1 esitetyllä tavalla. Esterin poistaminen

- Na⁰:lla ja MeOH:lla (Zemplén-olosuhteet) sai aikaan fenolit 2–10. Katso esimerkiksi 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; ja Kelm, J.; Strauss, K. *Spectrochim. Acta, Part A* 1981, 37, 689–692. *Acta, Part A* 1981, 37, 689–692.



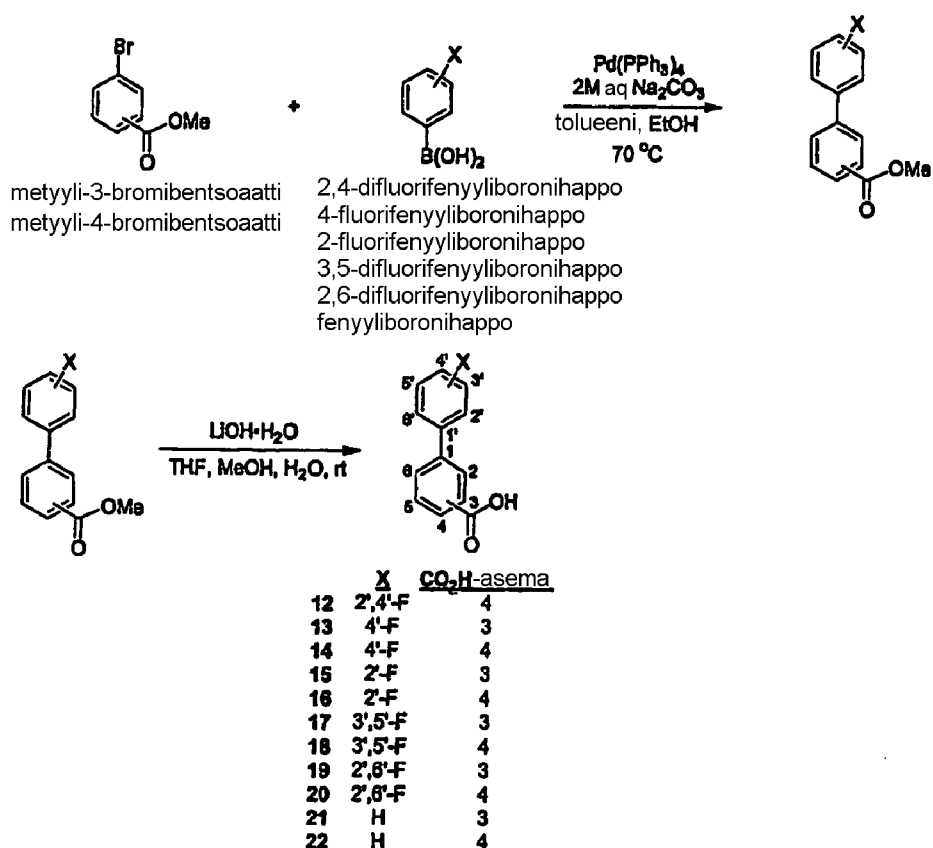
Kaavio 1

- 10 Diflunisaalianalogi 11 syntetisoitiin käyttämällä kiinteäfaasimenetelmiä kaaviossa 2 esitetyllä tavalla. 3-jodibentsoehappo liitettiin Wang-hartsin esterisidoksen välityksellä, jolloin saatiin hartsin sidottu fenyylijodidi, joka kytkettiin sitten 2,4-difluorifenyyliboronihappoon ja pilkottiin hartsista 1:1-seoksella TFA:CH₂Cl₂. Katso esimerkiksi Guiles, J. W.; Johnson, S. G.; Murray, W. V. *J. Org. Chem.* 1996, 61, 5169–5171.



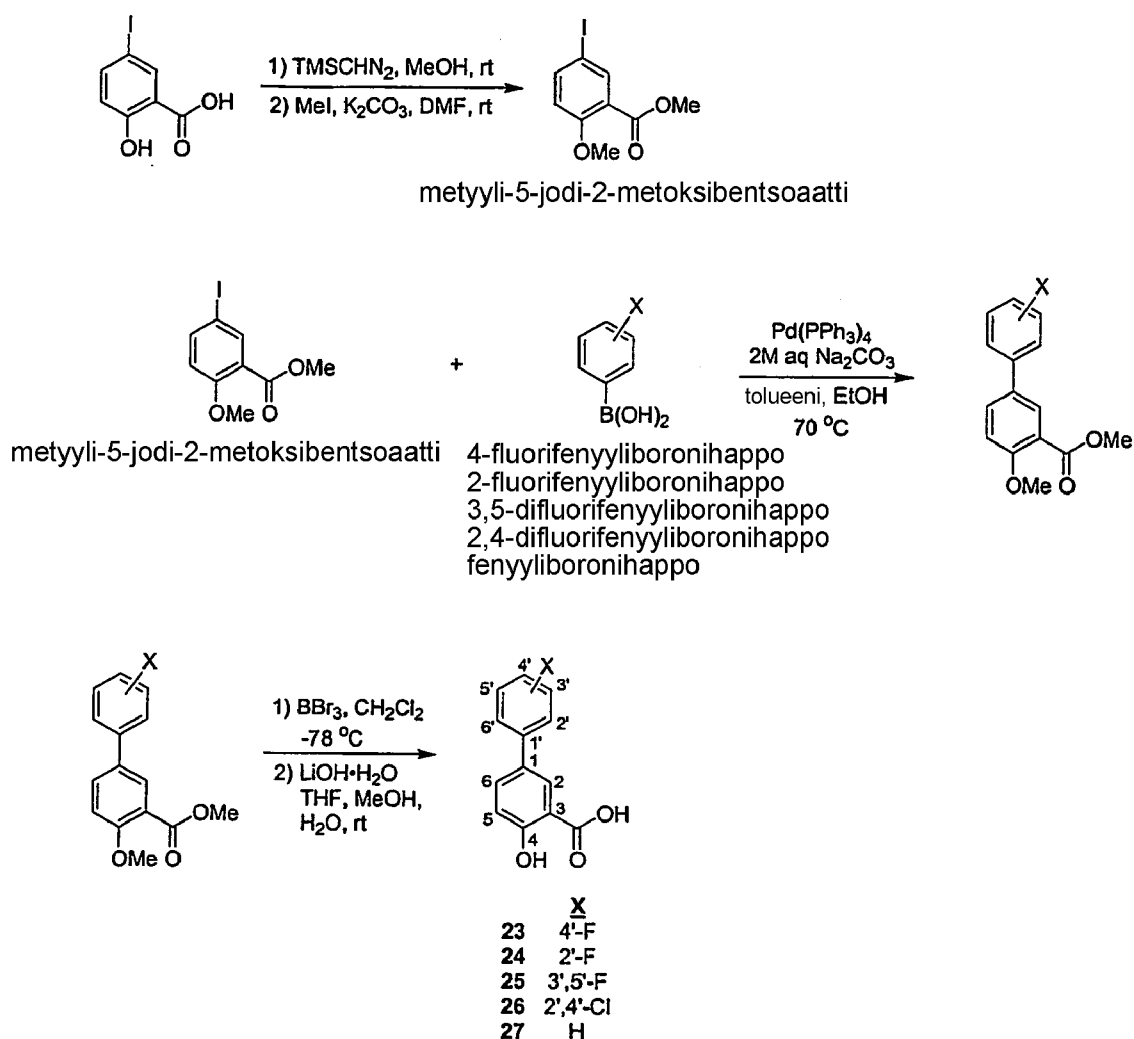
Kaavio 2

- Karboksylaattipitoiset substraatit 12–22 koottiin kytkemällä joko metyyli-3-bromi-bentsoaatti tai metyyli-4-bromibentsoaatti (kumpikin saatavissa kaupallisesti) soveltu­van fluorifenyyliboroni­hapon kanssa käyttämällä normaaleja Suzuki-kytkentäolo­suhteita (katso edellä) kaaviossa 3 osoitetulla tavalla. Sitten esteri saippu­oit­tiin LiOH-H₂O:lla, jolloin saatiin vastaava karboksylaatti. Katso esimerkiksi Bumagin, N. A.; Bykov, V. V. *Tetrahedron* 1997, 53, 14437–14450; Ananthakrishnanadar, P.; Kannan, N. J. *Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1982, 1305–1308; Homs, F.; Nozaki, K.; Hiyama, T. *Tetrahedron Lett.* 2000, 41, 5869–5872; ja Hajduk, P. J.; et al. *J. Med. Chem.* 1997, 40, 3144–3150.



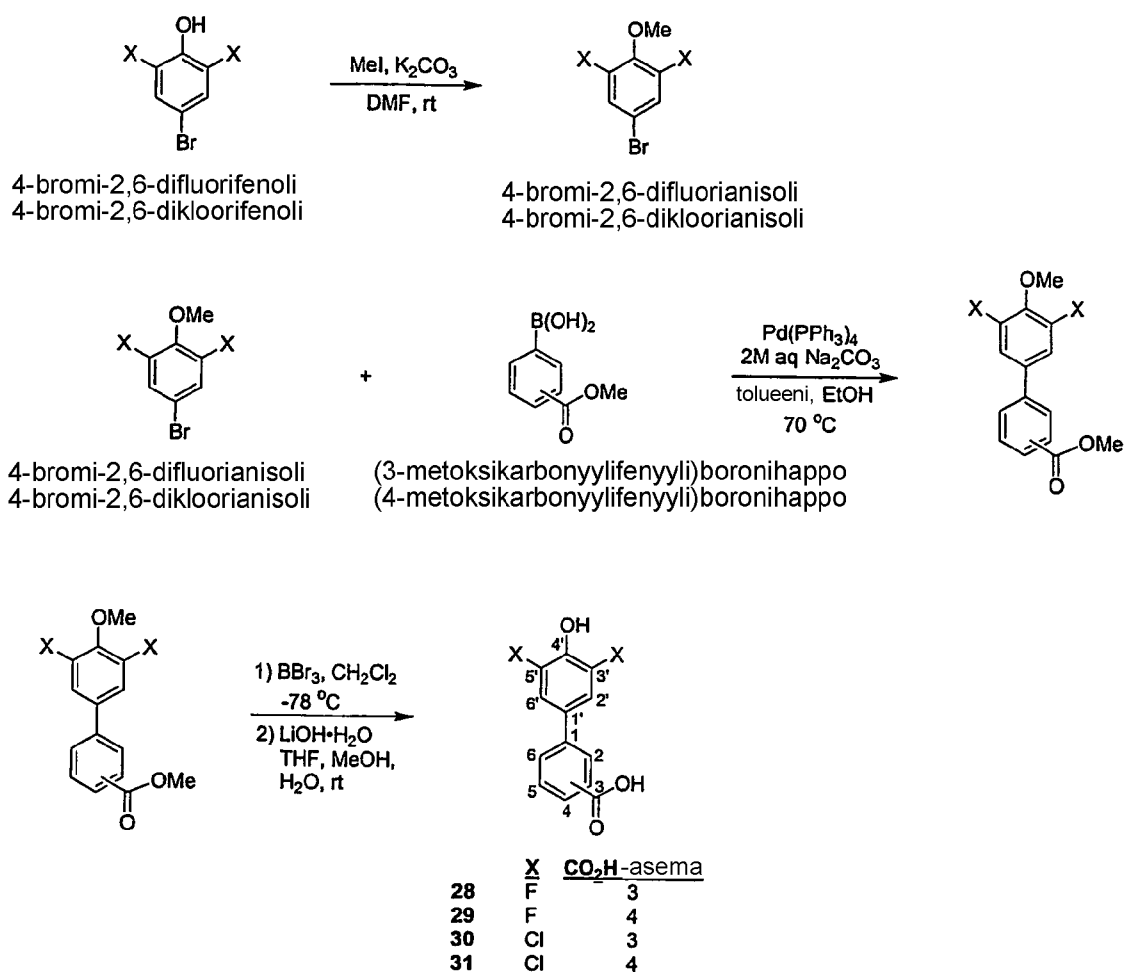
Kaavio 3

- 5 5-jodisalisyylihappo esteröitiin käyttämällä TMS-CH₂N₂:ta ja fenoli muutettiin metyylietteriksi käyttämällä MeI:tä. Suojattu salisyylihappo kytkettiin eri fluorifenyyliboroni happojen kanssa ja sen jälkeen suojaus poistettiin LiOH·H₂O-saippuoinnilla ja BBr₃-demetyloinnilla, jolloin saatiin salisyylihappojohdannaiset 23–27 kaaviossa 4 esitetyllä tavalla. Katso esimerkiksi Nicolaou, K. C.; et al. Chem. Eur. J. 1999, 5, 2602–2621; ja Chu-Moyer, M. Y.; et al. J. Med. Chem. 2002, 45, 511–528.



Kaavio 4

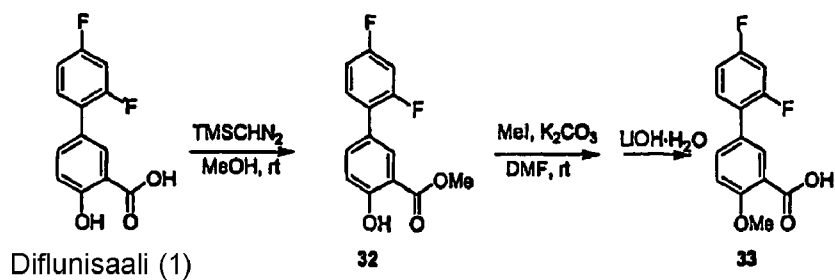
- 3',5'-dihalo-4'-hydroksyylipitoiset analogit 28–31 syntetisoitiin suojaamalla ensin kaupallisesti saatavissa oleva bromifenoli metyylieetterinä (MeI ja K_2CO_3). Suzuki-kytkentä (metoksikarbonyylifenyylin) boronihapon kanssa johti täysin suojattujen bifenyylisubstraattien muodostumiseen. BBr_3 -välitteinen metyylieetterin lohkaaminen ja saippuointi $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$:lla sai aikaan täysin funktionalisoidut diflunisaaliaanalogit 28–31 kaaviossa 5 osoitetulla tavalla.



Kaavio 5

Diflunisaalin metyylietteri- ja metyyliesterianalogit syntetisoitiin esteröimällä karboksyylihappo TMS-diatso metaanilla, jolloin saatiin 32, mitä seurasi valinnaisesti etteröinti MeI:llä ja K_2CO_3 :lla ja esterihydrolyysi $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$:lla, jolloin saatiin 33.

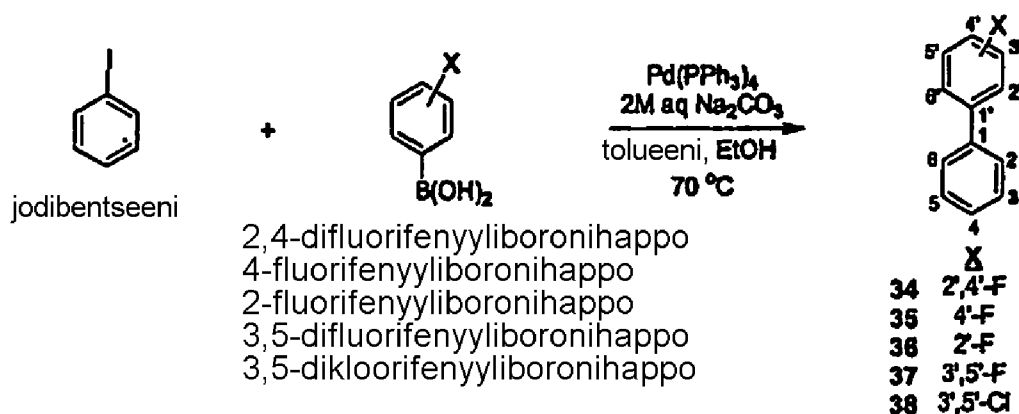
5 Katso kaavio 6.



Kaavio 6

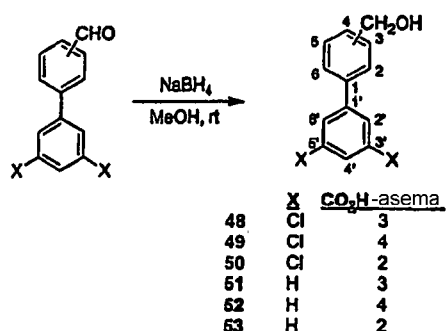
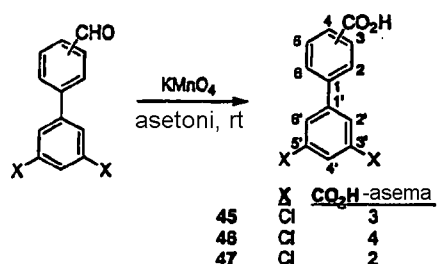
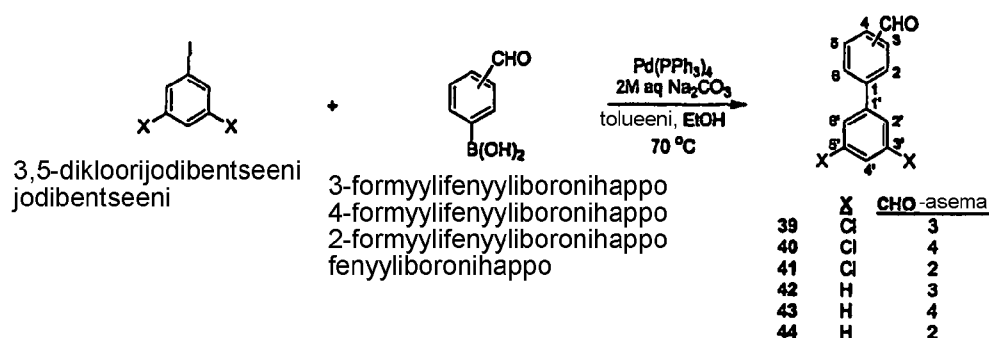
Joukko halogenoituja bifenyylejä koottiin jodibentseenin Suzuki-kytkennällä joukolla halogeenipitoisia boronihappoja kaaviossa 7 osoitetulla tavalla. Katso

- esimerkiksi Patrick, T. B.; Willaredt, R. P. DeGonia, D. J. J. Org. Chem. 1985, 50, 2232–2235; Kuchar, M.; et al. 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.; et al. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1989, 62, 3122–3126; ja Weingarten, H. J. Org Chem. 1961, 26, 730–733.



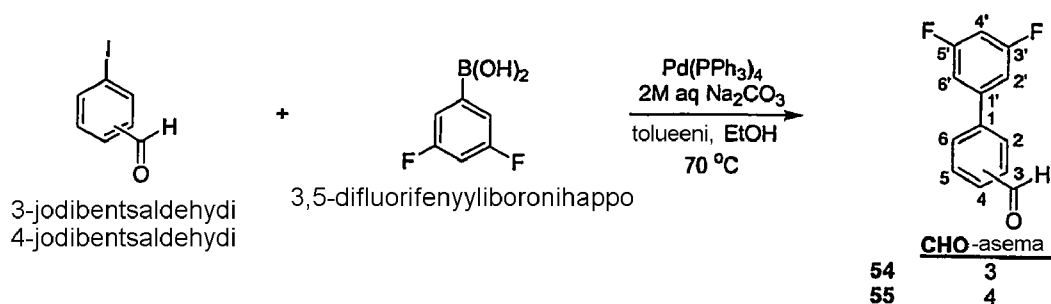
Kaavio 7

- Klooratut biaryylialdehydit koottiin käyttämällä 3,5-dikloorijodibentseeniä ja joko 2-, 3- tai 4-formyylibenyyliboronihappoa kaaviossa 8 osoitetulla tavalla. Aldehydit 42–44, joista puuttui halogeenisubstituutio, valmistettiin vastaavalla tavalla. Aldehydit 39–41 joko oksidoitiin KMnO₄:llä asetonin ja veden liuoksessa, jolloin saatiin vastaavat karboksyylihapot 45–47, tai pelkistettiin NaBH₄:llä MeOH:ssa, jolloin saatiin vastaavat bentsyylialkoholit 48–50, kaavio 8. Klooraamattomien aldehydien 42–44 pelkistäminen NaBH₄:llä ja MeOH:lla tuotti bifenyylibentsyylialkoholit 51–53. Katso esimerkiksi Song, X. P.; He, H. T.; Siahaan, T. J. Org. Lett. 2002, 4, 549–552; ja Nicolaou, K. C.; et al. J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 9313–9323; Hashizume, H.; et al. 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; Wendeborn, S.; et al. 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; ja Clive, D. L. J.; Kang, S. Z. J. Org. Chem. 2001, 66, 6083–6091.



Kaavio 8

- 3',5'-difluoriformyylifunktionalisoidut bifenyylit 54–55 syntetisoitiin 3,5-difluorifenyyliboronihapon Suzuki-kytkennällä joko 2- tai 3-jodibentsaldehydin kanssa kaaviossa 9 esitetyllä tavalla. Kaikki muut estoaineet syntetisoitiin samantlaisilla menetelmillä ja ne esitettiin aikaisemmin. Yhdisteet 10, 21, 35, 36 ja 43 ovat kaupallisesti saatavissa.



Kaavio 9

Reagenssien ja liuottimien toimittajat olivat Aldrich, Lancaster, Acros, Combi-Blocks, Matrix ja Pfaltz-Bauer. THF ja CH_2Cl_2 kuivattiin viemällä Al_2O_3 :n yli. Muut liuottimet ja reagenssit hankittiin kaupallisilta toimittajilta ja niitä käytettiin ilman jatkopuhdistusta ellei toisin mainita. Reaktioita seurattiin analyyttisellä ohutker-

5 roskromatografialla (TLC:llä) silikageelillä 60 F254 esipäällystetyillä levyillä EM Sciencelta hankitun fluoresoivan indikaattorin kanssa. TLC-levyjen visualisointi tehtiin UV-valolla, fosfomolybdeenihappokäsittelyllä ja sen jälkeen lämmöllä tai sesiumammoniummolybdaattikäsittelyllä ja sitä seuraavalla lämmöllä. Pikakromatografia tehtiin käyttämällä EM Sciencen silikageeliä 60 (230–400 mesh). Tekstissä

10 vedetyille johtopäätöksille olennaisten uusien yhdisteiden puhtaus määritettiin HPLC:llä. Normaalifaasi-HPLC tehtiin Watersin 600-pumpulla/ohjaimella, Watersin 996-valodiodirivi-ilmaissimella ja Watersin NovaPak-silikakolonilla. Käytetty liuotinjärjestelmä oli heksaanit ja etyyliasetaatti ja gradientit ajettiin 50:50-suhteesta heksaanit:etyyliasetaatti 0:100-suhteeseen heksaanit:etyyliasetaatti 30 minuutissa.

15 Käänteisfaasi-HPLC tehtiin Watersin 600-pumpulla/ohjaimella, Watersin 2487-kaksoisaallonpituusilmaissimella ja Vydacin proteiini- ja peptidi-C18-kolonilla. Liuotinjärjestelmä A oli 95:5 vesi:asetonitriili 0,5 %:lla trifluorietikkahappoa ja liuotin B oli 5:95 vesi:asetonitriili 0,5 %:lla trifluorietikkahappoa. Gradientit ajettiin alkaen suhteesta 100:0 A:B suhteeseen 0:100 A:B 20 minuutissa pysyttäen vielä 10 minuuttia

20 100 %:ssa B:tä. Sirkulaaridikroismispektroskopia tehtiin AVIV Instrumentsin spektrometrilla, mallia 202SF. NMR-spektrit talletettiin Varianin FT-NMR-spektrometrilla protonitiheydellä 400 MHz. Protonin kemialliset siirtymät raportoitiin miljoonasosina (ppm) vertaamalla sisäisenä kemiallisena siirtymästandardina käytettyyn CHCl_3 :een (7,26 ppm) ellei toisin mainita. Kytkevävakiot on kerrottu

25 hertseinä (Hz). Hiilen kemialliset siirtymät on kerrottu miljoonasosina (ppm) vertaamalla sisäisenä kemiallisena siirtymästandardina käytettyyn CDCl_3 :een (77,23 ppm) ellei toisin mainita. Kaikki massaspektrit hankittiin laboratoriossa The Scripps Research Institute Center for Mass Spectrometry or the University of Illinois Mass Spectrometry Laboratory.

30 Yhdisteet 2–10 valmistettiin kaavion 1 mukaan. Soveltuvan etikkahappo-jodifenyyliesterin (01,0 ekviv.) liuokseen liuotettuna riittävään määrään tolueenia pitoisuuden saamiseksi 0,05 M:ksi lisättiin fenyyliboronihiapon (1,1 ekviv.) liuosta liuotettuna EtOH:hon 0,6 M liuoksen saamiseksi suhteessa boronihappoon. 2 M Na_2CO_3 -vesiliuos lisättiin, jolloin lopulliseksi reaktiopitoisuudeksi saatiin 0,03 M suhteessa etikkahappo-jodifenyyliesteriin, ja sen jälkeen lisättiin $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$:ää (4,0 mol-%). Reaktiota kuumennettiin refluksioimalla argonin alla 20 h ja valmiiksi saamisen jälkeen jäähdytettiin huoneenlämpöön (rt) ja uutettiin CH_2Cl_2 :lla (2×), pestiin kyllästetyllä

35

suolalioksella (1×), kuivattiin MgSO₄:n päällä ja väkevöitiin tyhjiössä. Jäännös puhdistettiin pikakromatografialla (10:1 heksaani:etyyliasettaatti), jolloin saatiin asetyloitu bifenyylä.

5 Katalyyttinen määrä Na⁰:sta lisättiin asetyloidun bifenyylin liuokseen MeOH:ssa, jolloin saatiin lopullinen reaktiopitoisuus 0,3 M. Reaktioon annettiin sekoitusta rt:ssä argonin alla, minkä jälkeen lisättiin Dowex 50W-X8 -kationinvaihtohartsin reaktioseoksen neutraloimiseksi. Hartsin suodatettiin ja suodosta väkevöitiin alipaineessa ja pikakromatografioitiin (3:1 heksaani:etyyliasettaatti), jolloin saatiin hydroksibifenyylituotteet valkoisina kiinteinä aineina saantojen ollessa 22–25 %.

10 2',4'-difluoribifenyl-3-oli (2). ¹H-NMR(DMSO-d₆, 400 MHz) δ 9,63 (br s, 1H), 7,54 (td, 1H, J = 8,9, 6,7 Hz), 7,34 (ddd, 1H, J = 11,1, 9,2, 2,6 Hz), 7,27 (m, 1H), 7,17 (tdd, 1H, J = 8,3, 2,6, 1,2 Hz), 6,92 (m, 2H), 6,81 (ddd, 1H, J = 8,1, 2,5, 1,0 Hz). ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ 162, 8, 160,3, 157,4, 135,4, 131,8, 129,7, 119,4, 115,6, 114,9, 111,9, 104,4. HRESIMS laskentatuloksena C₁₂H₈F₂O (M-H) 205,0466, havaittu 205,0465. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 10,5 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 1,3 min. Puhtaus >99 %.

20 2',4'-difluoribifenyl-4-oli (3). ¹H-NMR(DMSO-d₆, 400 MHz) δ 7,49 (td, 1H, J = 9,4, 8,6 Hz), 7,34 (AA'XX', 2H, J_{AA'} = J_{XX'} = 2,5 Hz, J_{XA} = 8,7 Hz, J_{X'A'} = 8,5 Hz, J_{X'A} = 0,3 Hz, J_{XA'} = 0,3 Hz, ν_A = ν_{A'} = 2934,1 Hz, ν_X = ν_{X'} = 2746,2 Hz), 7,28 (ddd, 2H, J = 11,3, 9,4, 2,6 Hz), 7,13 (dddd, 1H, J = 8,3, 7,5, 2,8, 1,0 Hz), 6,87 (AA'XX', 2H, kuten edellä). ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ 162,3, 160,0, 157,2, 131,4, 129,9, 124,8, 115,4, 111,8, 104,3. HRESIMS laskentatuloksena C₁₂H₈F₂O (M-H) 205,0464, havaittu 205,0465. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 11,2 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 12,6 min. Puhtaus > 98 %.

25 3',5'-difluoribifenyl-3-oli (8). ¹H-NMR(DMSO-d₆, 400 MHz) δ 9,65 (br s, 1H), 7,34 (m, 2H), 7,28 (t, 1H, J = 7,9 Hz), 7,19 (tt, 1H, J = 9,1, 2,2 Hz), 7,13 (ddd, 1H, J = 7,8, 1,8, 1,0 Hz), 7,08 (t, 1H, J = 2,1 Hz), 6,86 (ddd, 1H, J = 8,0, 2,4, 1,0 Hz). ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ 162,9, 158,0, 144,1, 139,1, 130,1, 117,6, 115,7, 109,7, 102,6. HRESIMS laskentatuloksena C₁₂H₈F₂O (M-H) 205,0465, havaittu 205,0468. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 11,4 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 12,9 min. Puhtaus > 99 %.

3',5'-difluoribifenyl-4-oli (9). ¹H-NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ 7,44 (AA'XX', 2H, J_{AA'} = J_{XX'} = 3,0 Hz, J_{XA} = 8,0 Hz, J_{X'A'} = 8,5 Hz, J_{X'A} = 0,7 Hz, J_{XA'} = 0,5 Hz, ν_A = ν_{A'} = 2973,8 Hz, ν_X = ν_{X'} = 2766,0 Hz), 7,05 (dtd, 2H, J = 6,6, 2,4, 0,7 Hz), 6,92 (AA'XX',

2H, kuten edellä), 6,74 (tt, 1H, $J = 8,9, 2,4$ Hz), 5,11 (s, 1H). ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 164,7, 156,1, 144,2, 131,8, 128,6, 116,1, 109,6, 102,1. HRESIMS laskentatulos $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_2$ (M-H) 205,0465, havaittu 205,0465. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 10,8 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 12,9 min. Puhtaus > 99 %.

5 2',4'-difluoribifenylyli-3-karboksylihappo (11). Yhdiste 11 valmistettiin kaavion 2 mukaan. 3-jodibentsoehappo (200 mg, 0,81 mmol), DIEA (140 μl , 0,81 mmol), EDCI-HCl ja HOBt lisättiin CH_2Cl_2 :ssa (10 ml) turvotetun Wang-hartsin liuokseen (265 mg, 0,67 mmol, 2,53 mmol/g). 22 h jatkuneen perusteellisen ravistelun jälkeen peptidiravistimella rt:ssä liuotin poistettiin ja hartsi pestiin DMF:llä (3 x 10 ml) ja
10 CH_2Cl_2 :ssa (3 x 10 ml) ja kuivattiin perusteellisesti alipaineessa.

2,4-difluorifenyyliboronihappo (112 mg, 0,71 mmol), K_2CO_3 (98 mg, 0,71 mmol) ja $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (4 mg, 0,01 mmol) lisättiin DMF:ssä (2 ml) turvotetun funktionalisoidun Wang-hartsin (140 mg, 0,35 mmol) liuokseen. Rt:ssä sekoittamisen jälkeen reaktio suodatettiin ja hartsi pestiin DMF:llä (3x), H_2O :lla (3x), CH_2Cl_2 :lla (3x) ja MeOH:lla
15 (3x) ja kuivattiin perusteellisesti alipaineessa.

Funktionalisoituun hartsiin (140 mg, 0,35 mmol) lisättiin TFA: CH_2Cl_2 -liuos (3 ml, 1:1) ja ravisteltiin perusteellisesti peptidiravistimella 13 tuntia rt:ssä. Reaktion valmistumisen jälkeen se suodatettiin, hartsi pestiin CH_2Cl_2 :lla (3x), suodos väkevöitiin alipaineessa ja puhdistettiin pikakromatografialla (2:1 heksaani:etyyliasetatti, 0,5 %
20 etikkahappo), jolloin saatiin 11 (81 mg, 100 %) valkoisena kiinteänä aineena. ^1H -NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 13,19 (br s, 1H), 8,07 (q, 1H, $J = 1,7$ Hz), 7,99 (dt, 1H, $J = 7,9, 1,6$ Hz), 7,78 (dq, 1H, $J = 7,8, 1,3$ Hz), 7,64 (m, 2H), 7,40 (ddd, 1H, $J = 11,1, 8,8, 2,5$ Hz), 7,22 (tdd, 1H, $J = 8,4, 2,8, 1,0$ Hz), ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) 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,
25 104,6, HRESIMS laskentatulos $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_2$ (M-H) 233,0414, havaittu 233,0426, Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 13,7 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 12,5 min. Puhtaus > 99 %.

Yhdisteet 12–22 valmistettiin kaavion 3 mukaan. Soveltuvan metyylibromibentsoaatin liuokseen (1,0 ekviv.) liuotettuna riittävään määrään tolueenia pitoisuuden saamiseksi 0,1 M:ksi lisättiin fenyyliboronihapon (2,0 ekviv.) liuosta liuotettuna EtOH:hon boronihapon 1 M liuoksen saamiseksi. 2 M Na_2CO_3 -vesiliuos lisättiin, jolloin lopulliseksi reaktiopitoisuudeksi saatiin 0,06 M suhteessa bromibentsoaattiin, ja sen jälkeen lisättiin $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (10,0 mol-%). Reaktiota sekoitettiin 70 °C:ssa argonin
alla 25 h ja valmiiksi saamisen jälkeen jäähdytettiin huoneenlämpöön ja uutettiin
35 CH_2Cl_2 :lla (2x) ja pestiin (1x, kuivattiin MgSO_4 :n päällä ja väkevöitiin tyhjiössä.

Jäännös puhdistettiin pikakromatografialla (10:1 heksaani:etyyliasetatti), jolloin saatiin metyyliesteri.

Metyyliesterin liuokseen (1,0 ekviv.) seoksessa THF:MeOH:H₂O (1:1:1) pitoisuudella 0,06 M lisättiin LiOH:H₂O (3,0 ekviv.). Reaktiota sekoitettiin huoneenlämmössä 4 h ja valmiiksi saamisen jälkeen tehtiin happamaksi 30-prosenttisella HCl:llä, uutettiin etyyliasetatilla (3 x 5 ml) kuivattiin MgSO₄:n päällä ja väkevöitiin tyhjiössä. Jäännös puhdistettiin pikakromatografialla (CH₂Cl₂, 1 % MeOH, 0,2 % etikkahappo), jolloin saatiin bifenylikarboksyylihapot valkoisina kiinteinä aineina saantojen ollessa 6–93 %.

10 2',4'-difluoribifenylyli-4-karboksyylihappo (12). ¹H-NMR(DMSO-d₆, 400 MHz) δ 13,09 (br s, 1H), 8,04 (AA'XX', 2H, J_{AA'} = J_{XX'} = 2,0 Hz, J_{XA} = J_{X'A'} = 8,0 Hz, J_{X'A} = J_{XA'} = 0,7 Hz, ν_A = ν_{A'} = 3213,3 Hz, ν_X = ν_{X'} = 3056,2 Hz), 7,65 (AA'XX', 2H, kuten edellä), 7,63 (m, 1H), 7,38 (ddd, 1H, J = 11,2, 9,0, 2,8 Hz), 7,21 (td, 1H, J = 8,4, 2,2 Hz). ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ 167,1, 160,8, 158,0, 138,6, 132,1, 130,1,
15 129,6, 129,0, 123,9, 112,2, 104,7. HRESIMS laskentatulos C₁₃H₈F₂O₂ (M-H) 233,0414, havaittu 233,0407. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 13,3 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 12,6 min. Puhtaus > 99 %.

2'-fluoribifenylyli-3-karboksyylihappo (15). ¹H-NMR(CD₃OD, 400 MHz) δ 8,18 (q, 1H, J = 1,4 Hz), 8,03 (dt, 1H, J = 7,8, 1,3 Hz), 7,76 (dq, 1H, J = 7,7, 1,5 Hz), 7,55 (t, 1H, J = 7,8 Hz), 7,48 (td, 1H, J = 7,8, 1,7 Hz), 7,38 (dddd, 1H, J = 8,3, 7,5, 5,1, 1,8 Hz), 7,26 (td, 1H, J = 7,6, 1,3 Hz), 7,20 (ddd, 1H, J = 11,0, 8,2, 1,2 Hz). ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) 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. HRESIMS laskentatulos C₁₃H₉FO₂ (M-H) 215,0508, havaittu 215,0498. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 10,6 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 12,1 min. Puhtaus > 99 %.

2'-fluoribifenylyli-4-karboksyylihappo (16). ¹H-NMR(DMSO-d₆, 400 MHz) δ 13,10 (br s, 1H), 8,05 (AA'XX', 2H, J_{AA'} = J_{XX'} = 1,7 Hz, J_{XA} = J_{X'A'} = 8,5 Hz, J_{X'A} = J_{XA'} = 0,3 Hz, ν_A = ν_{A'} = 3217,9 Hz, ν_X = ν_{X'} = 3070,0 Hz), 7,67 (AA'XX', 2H, kuten edellä), 7,58 (td, 1H, J = 8,0, 1,8 Hz), 7,34 (m, 1H). ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ 167,1, 159,1, 139,4, 130,8, 130,3, 130,2, 129,6, 129,0, 127,3, 125,1, 116,2. HRESIMS laskentatulos C₁₃H₉FO₂ (M-H) 215,0508, havaittu 215,0515. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 12,3 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 12,2 min. Puhtaus > 99 %.

3',5'-difluoribifenylyli-3-karboksyylihappo (17). ¹H-NMR(asetoni-d₆, 400 MHz) δ 8,30 (td, 1H, J = 2, 0,5 Hz), 8,10 (dtd, 1H, J = 7,6, 1,1, 0,5 Hz), 7,97 (ddd, 1H, J =

7,8, 2,0, 1,1 Hz), 7,64 (td, 1H, $J = 7,8, 0,6$ Hz), 7,39 (m, 2H), 7,06 (tt, 1H, $J = 9,3, 2,4$ Hz). ^{13}C -NMR (asetoni- d_6 , 100 MHz) 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. HRESIMS laskentatulos $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_2$ (M-H) 233,0414, havaittu 233,0425. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 13,5 min. Käänteis-
 5 faasi-HPLC-retentioaika: 12,7 min. Puhtaus > 99 %.

3',5'-difluoribifenyyli-4-karboksyylihappo (18). ^1H -NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 13,15 (br s, 1H), 8,02 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz), 7,85 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz), 7,49 (m, 2H), 7,26 (tt, 1H, $J = 9,4, 2,4$ Hz). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 166,4, 164,1, 161,7, 142,6, 141,6, 130,9, 130,0, 127,1, 110,2, 103,5. HRESIMS laskentatulos $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_2$ (M-H) 233,0414, havaittu 233,0423. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 13,0 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 12,8 min. Puhtaus > 99 %.

2',6'-difluoribifenyyli-3-karboksyylihappo (19). ^1H -NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 8,03 (dt, 1H, $J = 7,8, 1,6$ Hz), 8,00 (m, 1H), 7,72 (dt, 1H, $J = 7,8, 1,4$ Hz), 7,64 (t, 1H, $J = 7,7$ Hz), 7,53 (m, 1H), 7,26 (t, 2H, $J = 8,3$ Hz). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 167,7, 158,7, 135,0, 132,2, 131,4, 131,1, 129,9, 129,5, 129,5, 112,8, 110,9. HRESIMS laskentatulos $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_2$ (M-H) 233,0414, havaittu 233,0410. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 12,1 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 12,1 min. Puhtaus > 97 %.

2',6'-difluoribifenyyli-4-karboksyylihappo (20). ^1H -NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 8,06 (AA'XX', 2H, $J_{\text{AA}'} = J_{\text{XX}'} = 2,0$ Hz, $J_{\text{XA}} = J_{\text{X'A}'} = 8,0$ Hz, $J_{\text{X'A}} = J_{\text{XA}'} = 0,7$ Hz, $\nu_{\text{A}} = \nu_{\text{A}'} = 3243,6$ Hz, $\nu_{\text{X}} = \nu_{\text{X}'} = 3018,6$ Hz), 7,60 (AA'XX', 2H, kuten edellä), 7,54 (m, 1H), 7,27 (t, 2H, $J = 8,3$ Hz). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 171,0, 164,0, 134,1, 125,7, 122,0, 121,9, 121,1, 103,4. HRESIMS laskentatulos $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_2$ (M-H) 233,0414, havaittu 233,0425. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 14,5 min. Käänteis-
 25 faasi-HPLC-retentioaika: 12,1 min. Puhtaus > 99 %.

Bifenyyli-4-karboksyylihappo (22). ^1H -NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 13,07 (br s, 1H), 8,03 (AA'XX', 2H, $J_{\text{AA}'} = J_{\text{XX}'} = 1,8$ Hz, $J_{\text{XA}} = J_{\text{X'A}'} = 8,3$ Hz, $J_{\text{X'A}} = J_{\text{XA}'} = 0,3$ Hz, $\nu_{\text{A}} = \nu_{\text{A}'} = 3210,7$ Hz, $\nu_{\text{X}} = \nu_{\text{X}'} = 3122,0$ Hz), 7,81 (AA'XX', 2H, kuten edellä), 7,75 (m, 2H), 7,51 (tt, 2H, $J = 7,2, 1,1$ Hz), 7,43 (tt, 1H, $J = 7,4, 1,2$ Hz). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 167,2, 144,2, 139,0, 130,0, 129,8, 129,1, 128,3, 127,0, 126,8. HREIMS laskentatulos $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_2$ (M $^{+}$) 198,0683, havaittu 198,0683. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 13,8 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 12,2 min. Puhtaus > 99 %.

Metyyli-5-jodi-2-metoksibentsoaatti. TMS-diatsometaani (19,25 ml, 38,50 mmol, 2 M liuos heksaanissa) lisättiin 5-jodisalisyylihapon (5,08 g, 19,24 mmol) liuokseen MeOH:ssa (20 ml) ja sekoitettiin rt:ssä 11 h. Reaktion valmistumisen jälkeen se vä-
 5 kevoitiin alipaineessa ja jäännös vietiin seuraavaan vaiheeseen ilman jatkopuhdistusta.

Metyylijodidi (2,40 ml, 38,48 mmol) ja K_2CO_3 (10,60 g, 76,96 mmol) lisättiin 5-jodi-2-metoksibentsoaatin (5,37 g, 19,24 mmol) liuokseen DMF:ssä (20 ml) ja sekoitettiin rt:ssä argonin alla 24 h. Reaktion valmistumisen jälkeen lisättiin etyyliasetaatti ja reaktio pestiin 1-prosenttisella HCl:llä (2 x 20 ml), kyllästetyllä suolaliuoksella (1x),
 10 kuivattiin $MgSO_4$:n päällä ja väkevoitiin tyhjiössä. Jäännös puhdistettiin pikakromatografialla (3:1 heksaani:etyyliasetaatti), jolloin saatiin metyyli-5-jodi-2-metoksibentsoaatti (4,93 g, 88 %) valkoisena kiinteänä aineena. Katso esimerkiksi Corey, E. J.; Myers, A. G. J. Am. Chem. Soc. 1985, 107, 5574–5576, joka lisätään tähän kokonaisuudessaan siihen viittaamalla. 1H -NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7,90 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 7,80 (dd, 1H, J = 8,8, 2,4 Hz), 6,96 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 3,81 (s, 3H), 3,79 (s, 3H). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 164,7, 158,0, 141,6, 138,5, 122,2, 115,2, 82,1, 55,9, 52,0. HREIMS laskentatulos $C_9H_9IO_3$ (M $^{+}$) 291,9608, havaittu 291,9596.
 15

Yhdisteet 23–27 valmistettiin kaavion 4 mukaan. Metyyli-5-jodi-2-metoksibentsoaatin (1,0 ekviv.) liuokseen liuotettuna riittävään määrään tolueenia pitoisuuden saamiseksi 0,08 M:ksi lisättiin fenyyliboronihapon (2,0 ekviv.) liuos liuotettuna EtOH:hon 0,8 M boronihappoliuoksen saamiseksi. 2 M Na_2CO_3 -vesiliuos lisättiin, jolloin lopulliseksi reaktiopitoisuudeksi saatiin 0,06 M suhteessa metoksibentsoaattiin, ja sen jälkeen lisättiin $Pd(PPh_3)_4$ (10,0 mol-%). Reaktiota sekoitettiin 60 °C:ssa argonin alla 15 h ja valmiiksi saamisen jälkeen jäähdytettiin huoneenlämpöön ja uutettiin CH_2Cl_2 :lla (2x), pestiin kyllästetyllä suolaliuoksella (1x), kuivattiin $MgSO_4$:n päällä ja väkevoitiin tyhjiössä. Jäännös puhdistettiin pikakromatografialla (3:1 heksaani:etyyliasetaatti), jolloin saatiin metyloidut salisylaattit.
 20
 25

Metyloidun salisylaatin (1,0 ekviv.) liuokseen riittävässä määrässä CH_2Cl_2 :ta pitoisuuden 0,06 M saamiseksi lisättiin BBR_3 :a (2,0 ekviv., 1 M liuos CH_2Cl_2 :ssa). Reaktiota sekoitettiin rt:ssä argonin alla 4 h ja valmiiksi saamisen jälkeen sammutettiin H_2O :lla (10 ml), uutettiin CH_2Cl_2 :lla, pestiin kyllästetyllä suolaliuoksella (1x), kuivattiin $MgSO_4$:n päällä ja väkevoitiin tyhjiössä. Jäännös siirrettiin seuraavaan vaiheeseen ilman jatkopuhdistusta.
 30

Metyyliesterin liuokseen (1,0 ekviv.) seoksessa THF:MeOH: H_2O (1:1:1) pitoisuudella 0,06 M lisättiin LiOH: H_2O (3,0 ekviv.). Reaktiota sekoitettiin rt:ssä 4 h ja
 35

valmiiksi saamisen jälkeen tehtiin happamaksi 30-prosenttisella HCl:llä, uutettiin etyyliasetaatilla (3 x 5 ml), kuivattiin MgSO₄:n päällä ja väkevöitiin tyhjiössä. Jäännös puhdistettiin pikakromatografialla (CH₂Cl₂, 1 % MeOH, 0,2 % etikkahappo), jolloin saatiin bifenyylisalisylaattit valkoisina kiinteinä aineina saantojen ollessa 12–42 %.

4'-fluori-4-hydroksibifenyyli-3-karboksyylihappo (23). ¹H-NMR(CD₃OD, 400 MHz) δ 8,01 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 7,65 (dd, 1H, J = 8,7, 2,5 Hz), 7,51 (m, 2H), 7,11 (tt, 2H, J = 10,0, 3,0 Hz), 6,97 (d, 1H, J = 8,7 Hz). ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) 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. HRESIMS laskentatulos C₁₃H₉FO₃ (M-H) 231,0459, havaittu 231,0457. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 14,2 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 12,8 min. Puhtaus > 99 %.

2'-fluori-4-hydroksibifenyyli-3-karboksyylihappo (24). ¹H-NMR(CD₃OD, 400 MHz) δ 7,98 (dd, 1H, J = 2,2, 1,4 Hz), 7,59 (ddd, 1H, J = 8,7, 2,4, 1,7 Hz), 7,36 (td, 1H, J = 7,8, 1,7 Hz), 7,26 (dddd, 1H, J = 9,9, 7,4, 4,9, 1,7 Hz), 7,16 (td, 1H, J = 7,5, 1,2 Hz), 7,10 (ddd, 1H, J = 11,1, 8,2, 1,3 Hz), 6,95 (d, 1H, J = 8,5 Hz). ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) 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. HRESIMS laskentatulos C₁₃H₉FO₃ (M-H) 231,0457, havaittu 231,0446. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 13,8 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 12,7 min. Puhtaus > 99 %.

3',5'-difluori-4-hydroksibifenyyli-3-karboksyylihappo (25). ¹H-NMR(CD₃OD, 400 MHz) δ 8,07 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 7,73 (dd, 1H, J = 8,5, 2,7 Hz), 7,15 (m, 2H), 7,01 (d, 1H, J = 8,9 Hz), 6,86 (tt, 1H, J = 9,0, 2,5 Hz). ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 173,3, 166,3, 163,8, 145,1, 135,2, 131,0, 129,8, 119,2, 114,4, 110,4, 103,0. HRESIMS laskentatulos C₁₃H₈F₂O₃ (M-H) 249,0363, havaittu 249,0356. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 14,5 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 13,3 min. Puhtaus > 99 %.

2',4'-dikloori-4-hydroksibifenyyli-3-karboksyylihappo (26). ¹H-NMR(CD₃OD, 400 MHz) δ 7,83 (d, 1H, J = 2,2 Hz), 7,70 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 7,58 (dd, 1H, J = 8,6, 2,4 Hz), 7,48 (ABX, 1H, J_{AB} = 8,4 Hz, J_{AX} = 2,2 Hz, J_{BX} = 0,0 Hz, ν_A = 2989,4 Hz, ν_B = 2973,0 Hz), 7,44 (ABX, 1H, kuten edellä), 7,06 (d, 1H, J = 8,7 Hz). ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) 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. HRESIMS laskentatulos C₁₃H₈Cl₂O₃ (M-H) 280,9772, havaittu 280,9782. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 13,1 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 14,4 min. Puhtaus > 99 %.

4-hydroksibifenyyli-3-karboksyylihappo (27). $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD}, 400 \text{ MHz})$ 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, $J = 8,5 \text{ Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}(\text{CD}_3\text{OD}, 100 \text{ MHz})$ δ 161,5, 140,1, 134,0, 132,4, 128,7, 128,3, 126,9, 126,3, 117,5, 112,9. HRESIMS laskentatulos $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_3$ (M-H) 213,0552, havaittu 213,0545. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 12,9 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 12,6 min. Puhtaus > 99 %.

4-bromi-2,6-difluorianisoli. Metyylijodidi (580 ml, 10,06 mmol) ja K_2CO_3 (2,80 g, 20,12 mmol) lisättiin 4-bromi-2,6-difluorifenolin (1,05 g, 5,03 mmol) liuokseen DMF:ssä (10 ml) ja sekoitettiin rt:ssä argonin alla 24 h. Reaktion valmistumisen jälkeen lisättiin etyyliasetaatti ja reaktio pestiin 1-prosenttisella HCl:llä (2 x 20 ml), kyllästetyllä suolaliuoksella (1x), kuivattiin MgSO_4 :n päällä ja väkevöitiin tyhjiössä. Jäännös puhdistettiin pikakromatografialla (heksaani), jolloin saatiin 4-bromi-2,6-difluorianisoli (747 mg, 67 %) valkoisena kiinteänä aineena. Katso esimerkiksi Chambers, R. D.; et al. J. Fluorine Chem. 2000, 102, 169–174. $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 400 \text{ MHz})$ δ 7,06 (m, 2H), 3,97 (q, 3H, $J = 1,1 \text{ Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3, 100 \text{ MHz})$ δ 155,8, 136,3, 116,2, 113,8, 61,9. LREIMS havaittu $\text{C}_7\text{H}_5\text{F}_2\text{OBr}$ (M⁺) 223,0.

4-bromi-2,6-dikloorianisoli. Metyylijodidi (467 μl , 8,12 mmol) ja K_2CO_3 (2,24 g, 16,24 mmol) lisättiin 4-bromi-2,6-kloorifenolin (982 mg, 4,06 mmol) liuokseen DMF:ssä (10 ml) ja sekoitettiin rt:ssä argonin alla 40 min. Reaktion valmistumisen jälkeen lisättiin etyyliasetaatti ja reaktio pestiin 1-prosenttisella HCl:llä (2 x 20 ml), kyllästetyllä suolaliuoksella (1x), kuivattiin MgSO_4 :n päällä ja väkevöitiin tyhjiössä. Jäännös puhdistettiin pikakromatografialla (heksaani), jolloin saatiin 4-bromi-2,6-dikloorianisoli (768 mg, 74 %) valkoisena kiinteänä aineena. Katso esimerkiksi Li, J.; et al. J. Med. Chem. 1996, 39, 1846–1856. $^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-d}_6, 400 \text{ MHz})$ δ 7,75 (s, 2H), 3,81 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}(\text{DMSO-d}_6, 100 \text{ MHz})$ δ 151,3, 131,5, 129,6, 116,5, 60,6. HREIMS laskentatulos $\text{C}_7\text{H}_5\text{BrCl}_2\text{O}$ (M⁺) 253,8905, havaittu 253,8901.

Yhdisteet 28–31 valmistettiin kaavion 5 mukaan. Soveltuvan haloanisolin liuokseen (1,0 ekviv.) liuotettuna riittävään määrään tolueenia pitoisuuden saamiseksi 0,25 M:ksi lisättiin fenyyliboronihapon (2,0 ekviv.) liuosta liuotettuna EtOH:hon 1,5 M boronihappoliuoksen saamiseksi. 2 M Na_2CO_3 -vesiliuos lisättiin, jolloin lopulliseksi reaktiopitoisuudeksi saatiin 0,08 M suhteessa haloanisoliin, ja sen jälkeen lisättiin $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (10,0 mol-%). Reaktiota sekoitettiin 65 °C:ssa 17 h ja valmiiksi saamisen jälkeen jäähdytettiin rt:hen ja uutettiin CH_2Cl_2 :lla (2x), pestiin kyllästetyllä suolaliuoksella (1x), kuivattiin MgSO_4 :n päällä ja väkevöitiin tyhjiössä. Jäännös puhdistettiin

pikakromatografialla (20:1 heksaani:etyyliasetatti), jolloin saatiin metyloitu bifenyylä valkoisena kiinteänä aineena.

Metyloidun bifenyylin (1,0 ekviv.) liuokseen riittävässä määrässä CH_2Cl_2 :ta pitoisuuden 0,20 M saamiseksi lisättiin BBr_3 (2,0 ekviv., 1 M liuos CH_2Cl_2 :ssa). Reaktiota sekoitettiin rt:ssä argonin alla 3 h ja valmiiksi saamisen jälkeen sammutettiin H_2O :lla (10 ml), uutettiin CH_2Cl_2 :lla (2x), pestiin kyllästetyllä suolaliuoksella (1x), kuivattiin MgSO_4 :n päällä ja väkevöitiin tyhjiössä. Jäännös siirrettiin seuraavaan vaiheeseen ilman jatkopuhdistusta.

Metyyliesterin liuokseen (1,0 ekviv.) seoksessa THF:MeOH: H_2O (1:1:1) pitoisuudella 0,04 M lisättiin LiOH: H_2O (3,0 ekviv.). Reaktiota sekoitettiin rt:ssä 5 h ja valmiiksi saamisen jälkeen tehtiin happamaksi 30-prosenttisella HCl:llä, uutettiin etyyliasetaatilla (3 x 5 ml), kuivattiin MgSO_4 :n päällä ja väkevöitiin tyhjiössä. Jäännös puhdistettiin pikakromatografialla (CH_2Cl_2 , 1 % MeOH, 0,2 % etikkahappo), jolloin saatiin bifenyylituotteet valkoisina kiinteinä aineina saantojen ollessa 14–39 %.

3',5'-difluori-4'-hydroksibifenyylä-3-karboksyylähappo (28). ^1H -NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10,60 (br s, 1H), 8,14 (t, 1H, $J = 1,7$ Hz), 7,91 (dt, 1H, $J = 7,7, 1,1$ Hz), 7,88 (ddd, 1H, $J = 8,0, 2,0, 1,1$ Hz), 7,55 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz), 7,41 (m, 2H). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) 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. HRESIMS laskentatulost $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_3$ (M-H) 249,0363, havaittu 249,0358. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 18,3 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 10,5 min. Puhtaus > 98 %.

3',5'-difluori-4'-hydroksibifenyylä-4-karboksyylähappo (29). ^1H -NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7,98 (AA'XX', 2H, $J_{\text{AA}'} = J_{\text{XX}'} = 1,7$ Hz, $J_{\text{XA}} = J_{\text{X'A}'} = 8,2$ Hz, $J_{\text{X'A}} = J_{\text{XA}'} = 0,5$ Hz, $\nu_{\text{A}} = \nu_{\text{A}'} = 3189,9$ Hz, $\nu_{\text{X}} = \nu_{\text{X}'} = 3122,0$ Hz), 7,81 (AA'XX', 2H, kuten edellä), 7,51 (m, 2H). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 167,7, 154,5, 142,5, 136,0, 130,5, 130,5, 130,4, 126,9, 111,0. HRESIMS laskentatulost $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_3$ (M-H) 249,0363, havaittu 249,0375. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 18,9 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 10,2 min. Puhtaus > 99 %.

3',5'-dikloori-4'-hydroksibifenyylä-3-karboksyylähappo (30). ^1H -NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 8,13 (t, 1H, $J = 1,6$ Hz), 7,91 (m, 2H), 7,70 (s, 2H), 7,56 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) 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. HRESIMS laskentatulost $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_3$ (M-H) 280,9772, havaittu 280,9767. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 16,2 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 11,6 min. Puhtaus > 99 %.

3',5'-dikloori-4'-hydroksibifenyyli-4-karboksyylihappo (31). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7,98 (AA'XX', 2H, $J_{AA'} = J_{XX'} = 1,7$ Hz, $J_{XA} = J_{X'A'} = 8,1$ Hz, $J_{X'A} = J_{XA'} = 0,5$ Hz, $\nu_A = \nu_{A'} = 3189,9$ Hz, $\nu_X = \nu_{X'} = 3110,0$ Hz), 7,81 (AA'XX', 2H, kuten edellä), 7,78 (s, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 167,2, 141,8, 141,7, 134,7, 129,9, 129,7, 126,9, 126,4, 123,0. HRESIMS laskentatulos $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_3$ (M-H) 280,9772, havaittu 280,9785. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 15,9 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 11,4 min. Puhtaus > 97 %.

Metyyli-2',4'-difluori-4-hydroksibifenyyli-3-karboksylaatti (32). Yhdisteet 32 ja 33 valmistettiin kaavion 6 mukaan. TMS-diatsumetaani (5,87 ml, 11,75 mmol, 2 M liuos heksaanissa) lisättiin diflunisaalin (1,03 g, 4,11 mmol) liuokseen MeOH:ssa (10 ml) ja sekoitettiin rt:ssä 5 h. Reaktion valmistumisen jälkeen se väkevöitiin alipaineessa ja jäännös puhdistettiin pikakromatografialla (10:1, heksaani:etyyliasetatti), jolloin saatiin 32 (774 mg, 71 %) valkoisena kiinteänä aineena. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,97 (dd, 1H, $J = 2,2, 1,3$ Hz), 7,59 (dt, 1H, $J = 8,8, 2,1$ Hz), 7,36 (dq, 1H, $J = 7,7, 1,5$ Hz), 7,48 (td, 1H, $J = 7,8, 1,7$ Hz), 7,38 (dddd, 1H, $J = 8,8, 6,4$ Hz), 7,05 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz), 6,93 (m, 1H), 6,90 (ddd, 1H, $J = 10,6, 8,9, 2,5$ Hz), 3,96 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) 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. HRFABMS laskentatulos $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{O}_3$ (M $^+$) 264,0596, havaittu 264,0598. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 6,9 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 14,7 min. Puhtaus > 99 %.

2',4'-difluori-4-metoksibifenyyli-3-karboksyylihappo (33). Metyylijodidi (350 μl , 1,16 mmol) ja K_2CO_3 (320 mg, 2,32 mmol) lisättiin 32:n (152 mg, 0,58 mmol) liuokseen DMF:ssä (4 ml) ja sekoitettiin rt:ssä argonin alla 14 h. Reaktion valmistumisen jälkeen lisättiin etyyliasetatti ja reaktio pestiin 1-prosenttisellä HCl:llä (2 x 20 ml), kyllästetyllä suolaliuksella (1x), kuivattiin MgSO_4 :n päällä ja väkevöitiin alipaineessa ja vietiin seuraavaan vaiheeseen ilman jatkopuhdistusta.

Täysin metyloidun diflunisaalin (140 mg, 0,50 mmol) liuokseen seoksessa MeOH:THF:H $_2$ O (4,5 mml, 1:1:1) lisättiin LiOH·H $_2$ O (60 mg, 1,43 mmol) ja sekoitettiin rt:ssä argonin alla 4 h. Reaktion valmistumisen jälkeen se tehtiin happamaksi 30-prosenttisellä HCl:llä, uutettiin etyyliasetatilla (3 x 5 ml), kuivattiin MgSO_4 :n päällä ja väkevöitiin alipaineessa. Jäännös puhdistettiin pikakromatografialla (2:1, etyyliasetatti:heksaani, 1-prosenttinen etikkahappo), jolloin saatiin 33 (122 mg, 93 %) valkoisena kiinteänä aineena. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 10,77 (br s, 1H), 8,31 (dd, 1H, $J = 2,5, 0,9$ Hz), 7,75 (dt, 1H, $J = 8,6, 2,1$ Hz), 7,41 (dt, 1H, $J = 8,9, 6,6$ Hz), 7,15 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 6,94 (m, 1H), 4,13 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) 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. HRESIMS laskentatulos $C_{14}H_{10}F_2O_3$ (M-H) 263,0520, havaittu 263,0514. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 21,6 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 11,9 min. Puhtaus > 99 %.

Yhdisteet 34–38 valmistettiin kaavion 7 mukaan. Yhdisteet 39–44 valmistettiin kaavion 8 mukaan. Aryylijodidin (1 ekviv.) liuokseen riittävässä määrässä tolueeni pitoisuuden saamiseksi 0,07 M:ksi lisättiin sopiva formyylibifenyliboroni happo liuotettuna riittävään EtOH-määrään boronihapon pitoisuuden saamiseksi 0,4 M:ksi. Na_2CO_3 :n 2 M vesiliuos lisättiin lopullisen reaktiopitoisuuden saamiseksi 0,04 M:ksi aryylijodidin suhteen ja sen jälkeen lisättiin $Pd(PPh_3)_4$ (3,0 mol-%). Reaktiota kuumennettiin refluksioimalla argonin alla 18 h ja valmistumisen jälkeen jäähdytettiin rt:hen ja CH_2Cl_2 :lla (2×), pestiin kyllästetyllä suolaliuoksella (1×), kuivattiin $MgSO_4$:n päällä ja väkevöitiin alipaineessa. Jäännös puhdistettiin pikakromatografi-alla (40:1, heksaani:etyyliasetatti), jolloin saatiin bifenyylialdehydit valkoisina kiinteinä aineina saantojen ollessa 40–91 %.

15 3',5'-dikloori-3-formyylibifenyyl (39). 1H -NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ 10,09 (s, 1H), 8,04 (t, 1H, $J = 1,8$ Hz), 7,91 (dt, 1H, $J = 7,6, 1,3$ Hz), 7,80 (ddd, 1H, $J = 7,8, 2,0, 1,3$ Hz), 7,64 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz), 7,49 (d, 2H, $J = 1,8$ Hz), 7,38 (t, 1H, $J = 1,9$ Hz). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 192,0, 142,8, 139,7, 137,2, 135,8, 133,0, 130,1, 130,0, 128,1, 128,0, 125,9. HRFABMS laskentatulos $C_{13}H_8Cl_2O$ (M+H) 251,0027, havaittu 251,0027. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 8,0 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 15,2 min. Puhtaus > 99 %.

25 3',5'-dikloori-4-formyylibifenyyl (40). 1H -NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7,99 (AA'XX', 2H, $J_{AA'} = J_{XX'} = 2,1$ Hz, $J_{XA} = J_{XA'} = 8,5$ Hz, $J_{XA} = J_{XA'} = 0,7$ Hz, $\nu_A = \nu_{A'} = 3193,7$ Hz, $\nu_X = \nu_{X'} = 3077,8$ Hz), 7,70 (AA'XX', 2H, kuten edellä), 7,47 (t, 1H, $J = 1,9$ Hz), 7,39 (d, 2H, $J = 1,9$ Hz). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 191,8, 144,4, 142,9, 136,2, 135,8, 130,6, 128,5, 127,9, 126,1. HREIMS laskentatulos $C_{13}H_8Cl_2O$ (M-H) 248,9873, havaittu 248,9874. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 7,9 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 15,2 min. Puhtaus > 99 %.

30 3',5'-dikloori-2-formyylibifenyyl (41). 1H -NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ 9,98 (s, 1H), 8,03 (dd, 1H, $J = 7,8, 1,3$ Hz), 7,66 (td, 1H, $J = 7,6, 1,5$ Hz), 7,55 (tt, 1H, $J = 7,6, 1,0$ Hz), 7,44 (t, 1H, $J = 1,9$ Hz), 7,39 (dd, 1H, $J = 7,7, 1,0$ Hz), 7,27 (d, 2H, $J = 1,9$ Hz). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 191,4, 142,9, 141,0, 135,3, 134,0, 133,7, 130,7, 129,0, 128,5, 128,4, 128,4. HRFABMS laskentatulos $C_{13}H_8Cl_2O$ (M+H) 251,0030, havaittu 251,0029. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 7,0 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 14,9 min. Puhtaus > 99 %.

Yhdisteet 45–47 valmistettiin kaavion 8 mukaan. Bifenyyli-aldehydin (1,0 ekviv.) liuokseen riittävissä määrässä asetonin pitoisuuden saamiseksi 0,07 M:ksi lisättiin KMnO_4 (2,0 ekviv.) riittävissä määrässä H_2O :ta permanganaattipitoisuuden saamiseksi 0,2 M:ksi. Reaktiota sekoitettiin 16 h rt:ssä ja valmistumisen jälkeen väkevöitiin alipaineessa ja saatu jäännös liuotettiin uudestaan 1:1-seokseen CH_2Cl_2 :MeOH ja suodatettiin lasivillatupon läpi. Raakatuote puhdistettiin pikakromatografiolla (10:1, CH_2Cl_2 :MeOH), jolloin saatiin karboksyylihapot (58 mg, 100 %) valkoisina kiinteinä aineina saantojen ollessa 82–100 %.

2',4'-diklooribifenyyli-3-karboksyylihapo (45). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 8,22 (br s, 1H), 8,00 (br s, 1H), 7,94 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz), 7,76 (s, 2H), 7,63 (s, 1H), 7,60 (br s, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 168,0, 143,7, 138,1, 135,4, 131,6, 129,9, 127,9, 126,2. HRESIMS laskentatulos $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_2$ (M-H) 264,9823, havaittu 264,9810. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 12,3 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 14,2 min. Puhtaus > 99 %.

2',4'-diklooribifenyyli-4-karboksyylihapo (46). $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ 8,11 (br s, 2H), 7,72 (m, 2H), 7,64 (d, 2H, $J = 1,9$ Hz), 7,46 (t, 1H, $J = 1,7$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 170,3, 140,6, 135,2, 127,2, 126,4, 119,3, 118,6, 117,4. HRESIMS laskentatulos $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_2$ (M-H) 264,9830, havaittu 264,9823. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 12,5 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 14,4 min. Puhtaus > 99 %.

2',4'-diklooribifenyyli-2-karboksyylihapo (47). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7,75 (br s, 1H), 7,56 (s, 2H), 7,48 (m, 2H), 7,36 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 170,1, 152,5, 145,2, 133,3, 130,0, 129,6, 128,0, 127,2, 126,3. HRESIMS laskentatulos $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_2$ (M-H) 264,9823, havaittu 264,9834. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 11,4 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 13,6 min. Puhtaus > 99 %.

Yhdisteet 48–53 valmistettiin kaavion 8 mukaan. Bifenyyli-aldehydin (1,0 ekviv.) liuokseen riittävissä määrässä MeOH:ta pitoisuuden saamiseksi 0,1 M:ksi lisättiin NaBH_4 (2,0 ekviv.) riittävissä määrässä MeOH:ta boorihydridipitoisuuden saamiseksi 0,3 M:ksi. Reaktiota sekoitettiin 0 °C:ssa ja lämmitettiin hitaasti rt:hen, ja kun sekoitusta oli jatkettu 16 h väkevöitiin alipaineessa ja puhdistettiin pikakromatografiolla (3:1, heksaani:etyyliasetatti), jolloin saatiin bifenyylialkoholit valkoisina kiinteinä aineina saantojen ollessa 94–100 %.

3',5'-diklooribifenyl-3-yyli-metanoli (48). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,54 (m, 1H), 7,46 (d, 2H, $J = 1,8$ Hz), 7,45 (m, 2H), 7,39 (m, 1H), 7,34 (t, 1H, $J = 1,9$ Hz), 4,77 (s,

2H), 1,90 (br s, 1H). ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 144,1, 141,9, 139,0, 135,5, 129,5, 127,4, 127,1, 126,5, 125,8, 125,7, 65,3. HREIMS laskentatulos $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{O}$ (M^+) 252,0103, havaittu 252,0109. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 13,9 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 14,0 min. Puhtaus > 99 %.

- 5 3',5'-diklooribifenyl-4-yylimetanoli (49). ^1H -NMR(CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,53 (AA'XX', 2H, $J_{\text{AA}'} = 1,9$ Hz, $J_{\text{XX}'} = 3,1$ Hz, $J_{\text{XA}} = 8,7$ Hz, $J_{\text{X'A}'} = 6,4$ Hz, $J_{\text{X'A}} = J_{\text{XA}'} = 0,5$ Hz, $\nu_{\text{A}} = \nu_{\text{A}'} = 3009,8$ Hz, $\nu_{\text{X}} = \nu_{\text{X}'} = 2977,8$ Hz), 7,45 (AA'XX', 2H, kuten edellä), 7,45 (d, 2H, $J = 1,9$ Hz), 7,33 (t, 1H, $J = 1,9$ Hz), 4,75 (br d, 2H, $J = 4,8$ Hz), 1,81 (br t, 1H, $J = 5,2$ Hz). ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 144,0, 141,4, 138,0, 135,5,
10 127,8, 127,4, 127,4, 125,8, 65,1. HREIMS laskentatulos $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{O}$ (M^+) 251,0110, havaittu 252,0109. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 15,4 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 14,0 min. Puhtaus > 97 %.

- 3',5'-diklooribifenyl-2-yylimetanoli (50). ^1H -NMR(CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,55 (dd, 1H, $J = 7,5, 1,3$ Hz), 7,43 (td, 2H, $J = 7,5, 1,4$ Hz), 7,38 (m, 2H), 7,29 (d, 2H, $J = 1,9$ Hz),
15 7,24 (dd, 1H, $J = 7,4, 1,4$ Hz), 4,58 (s, 2H), 1,79 (s, 1H). ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 143,7, 138,9, 137,9, 134,9, 130,0, 129,0, 128,9, 128,2, 127,9, 127,6, 63,0. BREIMS laskentatulos $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{O}$ (M^+) 252,0110, havaittu 252,0109. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 11,5 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 14,0 min. Puhtaus > 99 %.

- Yhdisteet 54 ja 55 valmistettiin kaavion 9 mukaan. Soveltuvan jodibentsaldehydin
20 (1,0 ekviv.) liuokseen riittävässä määrässä tolueenia pitoisuuden saamiseksi 0,07 M:ksi lisättiin 3,5-difluorifenyyliboronihappo (2,0 ekviv.) liuotettuna riittävään EtOH-määrään boronihapon pitoisuuden saamiseksi 1,0 M:ksi. Na_2CO_3 :n 2 M vesi-liuos lisättiin lopullisen reaktiopitoisuuden saamiseksi 0,04 M:ksi jodibentsaldehydin suhteen ja sen jälkeen lisättiin $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (4,0 mol-%). Reaktiota sekoitettiin
25 60 °C:ssa 17 h ja valmistumisen jälkeen jäähdytettiin rt:hen ja uutettiin CH_2Cl_2 :lla (2x), pestiin kyllästetyllä suolaliuoksella (1x), kuivattiin MgSO_4 :n päällä ja väkevöitiin alipaineessa. Jäännös puhdistettiin pikakromatografiaal (10:1 heksaani:etyyliase-taatti), jolloin saatiin bifenyylialdehydit valkoisina kiinteinä aineina saantojen ollessa 78–80 %.

- 30 3',5'-difluori-3-formyylibifenyyli (54). ^1H -NMR(CDCl_3 , 400 MHz) δ 10,06 (s, 1H), 8,02 (t, 1H, $J = 1,4$ Hz), 7,88 (dt, 1H, $J = 7,8, 1,4$ Hz), 7,78 (ddd, 2H, $J = 7,8, 2,0, 1,2$ Hz), 7,61 (t, 2H, $J = 7,7$), 7,10 (m, 2H), 6,80 (tt, 1H, $J = 8,8, 2,3$ Hz). ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 192,0, 164,8, 162,3, 143,0, 139,8, 137,1, 132,9, 129,9, 127,9, 110,4, 103,5. HRFABMS laskentatulos $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}$ ($\text{M}+\text{H}$) 219,0620, havaittu 219,0621.

Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 8,9 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 13,7 min. Puhtaus > 99 %.

3',5'-difluori-4-formyylibifenyyli (55). ¹H-NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ 9,98 (s, 1H), 8,02 (dd, 1H, J = 7,8, 1,5 Hz), 7,65 (td, 1H, J = 7,3, 1,4 Hz), 7,54 (t, 1H, J = 7,8 Hz), 7,40 (dd, 1H, J = 7,6, 1,2 Hz), 6,90 (m, 3H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) 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. HRFABMS laskentatulos C₁₃H₈F₂O (M+H) 219,0620, havaittu 219,0621. Normaalifaasi-HPLC-retentioaika: 7,0 min. Käänteisfaasi-HPLC-retentioaika: 13,4 min. Puhtaus > 99 %.

- 10 Muutamia *in vitro* -testejä voidaan käyttää arvioitaessa yhdisteiden kyky stabiloida transtyretiinitetrameereja tai estää fibrillien muodostumista. Testit voivat sisältää fibrillimuodostusanalyysin, plasmaselektiivisyysanalyysin, transtyretiini:yhdiste-kompleksin kolmiulotteisen rakenteen määrittämisen (esim. röntgenkristallografialla), transtyretiinitetrameerin hajoamisen tai fibrillimuodostusten kinetiikan ja transtyretiini:yhdiste-vuorovaikutusten stoikiometrian ja energiaopin määrittämisen esimerkiksi sentrifugoimalla tai kalorimetrisesti. Esikuvallisten *in vitro* -analyysien yksityiskohdat esitetään jäljempänä.

- Kunkin yhdisteen fibrillimuodostus pysähtyneessä tilassa (stagnant fibril formation) analysoitiin. Yhdisteet kuivattiin P₂O₅:n päällä yön ajan ja liuotettiin DMSO:hon lopulliseen pitoisuuteen 7,2 mM, jolloin saatiin primaari perusliuos (10 x perusliuos). Sekundaari perusliuos valmistettiin laimentamalla primaari perusliuos viidenteen osaan DMSO:lla lopulliseen pitoisuuteen 1,44 mM (2 x perusliuos). TTR:n happovälitteinen amyloidogeenisuus (3,6 μM) estoaineiden läsnäollessa mitattiin seuraavasti (1,44 mM). Kertakäyttöiseen UV-kyvettein lisättiin 495 μl WT-TTR-proteiiniliuosta pitoisuudella 0,4 mg/ml 10 mM natriumfosfaatissa, 100 mM KCl:ää ja 1 mM EDTA:ta (pH 7,6) ja 5 μl sekundaarista perusestoaineliuosta DMSO:ssa pitoisuudella 1,44 mM (2 x perusliuos). Seosta vorteksoitiin ja inkuboitiin 30 minuuttia (25 °C:ssa), jolloin pH alennettiin 4,4:ksi 500 μl:lla 2 mM asetaattia, 100 mM KCl:ää ja 1 mM EDTA:ta (pH 4,2). Lopullista 1 ml:n liuosta vorteksoitiin ja inkuboitiin 72 h 37 °C:ssa sekoittamatta. 72 h:n kuluttua kyvettejä vorteksoitiin kaikkien läsnä olevien fibrillien suspendoimiseksi ja suspension turbiditeetti mitattiin 350 ja 400 nm:ssä UV-vis-spektrometrillä. Prosentuaalinen fibrillimuodostus saatiin jakamalla jokaisen TTR- ja estoainenäytteen havaitut turbiditeetit samalla tavalla valmistetun näytteen kanssa, jossa ei ollut estoainetta, ja kertomalla sadalla. Fibrillimuodostusanalyysi, jossa käytettiin ekvimolaarisia estoaine- ja TTR-pitoisuuksia (3,6 μM), tehtiin edellä kuvatulla tavalla käyttämällä 1 x sekundaarista perusliuosta. 1 x perusliuos

valmistettiin laimentamalla 7,2 mM 10 x primaari perusliuos kymmenenteen osaan DMSO:lla lopulliseen pitoisuuteen 0,72 mM ja käytettiin fibrillimuodostusanalyysissä edellä kuvatulla tavalla. Kaikki analyysit tehtiin kolmena kappaleena ja kaikki yhdisteet analysoitiin käyttämällä villikannan TTR:ää. Kaikkien yhdisteiden havaittiin olevan liukoisia koko kokeen ajan testaamalla liuosten turbiditeetit WT-TTR:n puuttuessa, mikä vahvisti sen, että turbiditeetti oli seurausta TTR-amyloidimuodostuksesta.

TTR:n potentiaalisten estoaineiden sitoutumisstoikiometriat arvioitiin veren plas-
masta vasta-ainesieppauksella/HPLC-menetelmällä. 1,5 ml:n eppendorffputki täytet-
tiin 1,0 ml:lla ihmisen veri-plasmaa ja 7,5 µl:lla arvioitavana olevan estoaineen 1,44
mM DMSO-liuosta. Liuosta inkuboitettiin ja ravistettiin hellävaroen 37 °C:ssa 24 tun-
tia. Liuokseen lisättiin sammutetun sepharoosin 1:1-suhteessa oleva geeli:TSA(Tris-
suolaliuos)-liete (125 µl) ja ravistettiin hellävaroin 4 °C:ssa 1 tunti. Liuos sentrifugoi-
ttiin (16 000 x g) ja supernatantti jaettiin kahdeksi 400 µl:n alikvootiksi, jotka sitten
lisättiin erilaisiin 200 µl:n näytteisiin 1:1-suhteessa olevaa TTR-vasta-ainekon-
jugoidun sepharoosin geeli:TSA-lietettä. Liuoksia ravistettiin hellävaroin 4 °C:ssa 20
minuuttia, sentrifugoitettiin (16 000 x g) ja supernatantti poistettiin. Geeli pestiin 1
ml:lla TSA:ta/0,05 saponiinia (3 x, 10 min kerta) 4 °C:ssa ja sen jälkeen 1 ml:lla
TSA:ta (2 x, 10 min kerta) 4 °C:ssa. Näytteet sentrifugoitettiin (16 000 x g), lopullinen
pesuvesi poistettiin ja lisättiin 155 µl 100 mM trietyyliamiinia, pH 11,5, TTR:n ja
sitoutuneiden estoaineiden eluoimiseksi vasta-aineista. Varovaisen 30 minuuttia jat-
kuneen ravistelun jälkeen 4 °C:ssa eluutionäyte sentrifugoitettiin (16 000 x g) ja pois-
tettiin 145 µl TTR:n ja estoaineen sisältävää supernatanttia. Sitten supernatantti ana-
lysoitiin käänteisfaasi-HPLC:llä edellä kuvatulla tavalla. Katso esimerkiksi Purkey,
H. B.; Dorrell, M.L; Kelly, J. W. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2001, 98, 5566–71.

WT-TTR-kiteet hankittiin proteiiniliuoksista, joiden pitoisuus oli 7 mg/ml (liuok-
sessa 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM natriumfosfaattia, pH 7,0, 0,35–0,50 M
ammoniumsulfaattia) tasapainotettuna 2 M ammoniumsulfaattia vastaan riippuvissa
pisaroissa (hanging drops). TTR-ligandikompleksit oli valmistettu kiteistä, joita oli
liotettu yli kolme viikkoa ligandin 10-kertaisella mooliylimäärällä. 20:llä tai 26:lla
liotettujen kiteiden tiedot kerättiin pyörivällä anodilla varustettuun RU200-röntgen-
generaattoriin kytketyllä CCD-PXL-L600-detektorilla (Bruker instruments). 1:llä tai
18:lla liotettujen kiteiden tiedot kerättiin Quantum-4-detektorilla monokromaattisella
korkeaenergisellä lähteellä 14-BM-C, BIOCARs, Advance Photon Source. Kiteet
laitettiin kryosuojeluaineena toimivaan paratoniöljyyn ja jäähdytettiin diffraktioko-
keita varten (120 K yhdisteille 20 ja 26 ja 100 K yhdisteille 1 ja 18). TTR-ligandi-

kompleksirakenteiden kiteet ovat isomorfisia apo-kidemuodolla yksikkökoppimitoilla $a = 43 \text{ \AA}$, $b = 85 \text{ \AA}$ ja $c = 66 \text{ \AA}$; avaruusryhmitys $P2_12_12$ kahdella monomeerilla epäsymmetrisessä yksikössä. 1:n ja 18:n tiedostot redusointiin DENZO:lla ja SCALEPACK:lla. Katso Otwinowski, Z.; Minor, W. *Macromolecular Crystallography, Part A*, julkaisussa *Methods in Enzymology*; Carver, C. W., Sweet, R. M., Eds.; Academic Press: 1997; Vol. 276, s. 307–326. 20:n ja 26:n tiedostot redusointiin SAINT:llä ja PROSCALE:llä (Bruker AXS, Inc.).

Proteiinitietopankista (talletusnumero 1BMZ) saatuja TTR:n proteiinin atomikoordinaatteja käytettiin lähtömallina haettaessa moleulaarisia korvauksia EPMR:llä. BPMR:n parhaat ratkaisut hienosäädettiin CNS:n molekyylidynamiikalla ja energianminimointikäytännöillä. Saadut Fourierin differenssikartat toivat esiin ligandien sitoutumisen (kahdessa 18:n, 20:n ja 26:n konformaatioissa ja neljässä 1:n konformaatioissa) jokaiseen TTR-tetrameerin sitovaan taskuun. Näitä karttoja käyttäen ligandi voitiin paikantaa yksiselitteisesti tiheyteen ja sisällytettiin kidehienosäätöön. Usean simuloidun lämpökäsittelyjakson ja myöhemmän paikannus- ja lämpötilatekijän hienosäädön jälkeen vesimolekyylit sijoitettiin Fourierin differenssikarttoihin. Karttaan sovittamisen viimeinen jakso tehtiin käyttämällä esijännitteetöntä painotettua elektronitiheyskarttaa, joka oli laskettu shake/warp-esijännitteenpoistokäytännöllä. Ligan-

10 din kaikki sitovat konformaatiot pitivät hyvin yhtä esijännitteettömien lämpökäsittelyjen omit-karttojen samoin kuin shake/warp-esijännitteettömien painotettujen karttojen kanssa, jotka oli vaiheistettu estoaineen poissa ollessa. Hienosäädön viimeiset jaksot tehtiin Refmac:n rajoitetulla hienosäätökäytännöllä. Koska lopullisesta kartasta puuttuivat tulkittavissa olevat elektronitiheydet, niin lopulliseen malliin ei sisällytetty yhdeksää N-terminaalista eikä kolmea C-terminaalista tähdettä. Kideanalyysin yhteenveto on esitetty taulukossa 2. Katso esimerkiksi Kissinger, C. R.; Gehlhaar, D. K.; Fogel, D. B. *Acta Crystallogr., Sect. D* 1999, 55, 484–491; Brunger, A. T.; et al. *Acta Crystallogr., Sect. D* 1998, 54, 905–921; Kantardjief, K.; et al. *Acta Crystallogr., Sect. D* 2002, 58, 735–743; Bailey, S. *Acta Crystallogr., Sect. D* 1994, 50, 760–763; and Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Dodson, E. J. *Acta Crystallogr., Sect. D* 1997,

25 53, 240–255.

TTR-tetrameerin hajoamiskinetiikka arvioitiin kytketyllä monomeerin laskostumisen purkamisella ureassa. Hidas tetrameerin hajoaminen ei ole havaittavissa kauko-UV-CD-spektroskopiolla, vaan liitetään nopeaan (500 000 kertaa nopeampaan) laskostumisen purkautumisvaiheeseen, joka on helposti havaittavissa kauko-UV-CD:llä edellä kuvatulla tavalla. TTR-tetrameerin (3,6 μM) hajoamiskinetiikka estoaineen funktiona (3,6 μM) arvioitiin lisäämällä 3,6 μl kiinnostuksen kohteena olevan

estoaineen 1 mM liuosta (etanolissa) 69 µl:aan WT-TTR:ää (2,90 mg/ml, 10 mM natriumfosfaatti, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 7,0), johon lisättiin 127,4 µl fosfaattipuskuria. Kun estoaineen pitoisuus (7,2 µM) oli kaksi kertaa TTR:n pitoisuus (3,6 µM), niin 7,2 µl kiinnostuksen kohteena olevan estoaineen 1 mM liuosta (etanolissa) lisättiin 69 µl:aan WT-TTR:ää (2,90 mg/ml, 10 mM natriumfosfaatti, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 7,0), johon lisättiin 123,8 µl fosfaattipuskuria. 100 µl kiinnostuksen kohteena olevaa proteiiniestoaineliuosta lisättiin liuokseen, jossa oli 600 µl 10,3 M ureaa ja 300 µl fosfaattipuskuria, jolloin lopulliseksi ureapitoisuudeksi saatiin 6,5 M. Liuokset vorteksoitiin ja sirkulaaridikroismispektrit kerättiin seuraavin aikaväleihin: 0, 5, 8, 23, 46, 71, 95, 118, 144 ja 168 h. 7,2 µl etanolia mieluummin kuin estoainetta sisältävä kontrollinäyte valmistettiin vertailua varten ja spektrit kerättiin edellä kuvattuina ajankohtina. CD-spektrit kerättiin 220 ja 213 nm:n väliltä skannaten aina 0,5 nm:n välein ja keskiarvon laskevalla ajalla 10 s. Jokainen aallonpituus skannattiin kerran. Amplitudiarvoista laskettiin keskiarvo 220 ja 213 nm:n välillä β-lasoksen menetyksen laajuuden määrittämiseksi koko kokeen ajan.

Happovälitteisen fibrillimuodostuksen nopeutta seurattiin pH:ssa 4,4 turbiditeetin avulla. Yhdisteet kuivattiin P₂O₅:n päällä yön ajan ja liuotettiin DMSO:hon lopulliseen pitoisuuteen 7,2 mM, jolloin saatiin primaari perusliuos (10 x perusliuos). Sekundaari perusliuos valmistettiin laimentamalla primaari perusliuos viidenteen osaan DMSO:lla lopulliseen pitoisuuteen 1,44 mM (2 x perusliuos). Fibrillimuodostusanalyysi, jossa käytettiin estoaine-pitoisuutta 7,2 µM suhteessa TTR:n (tetrameerin) pitoisuuteen 3,6 µM tehtiin seuraavasti: Kertakäyttöiseen UV-kyvettiin lisättiin 495 µl WT-TTR-proteiiniliuosta pitoisuudella 0,4 mg/ml 10 mM natriumfosfaatissa, 100 mM KCl:ää ja 1 mM EDTA:ta (pH 7,6) ja 5 µl sekundaarista perusestoaineliuosta pitoisuudella 1,44 mM (2 x perusliuos). Seosta vorteksoitiin ja inkuboitiin 30 min (25 °C). 30 min:n kuluttua pH alennettiin 4,4:ksi 500 µl:n kanssa 200 mM asetaattia, 100 mM KCl, 1 mM EDTA (pH 4,2). Lopullista 1 ml:n liuosta vorteksoitiin ja inkuboitiin 37 °C:ssa sekoittamatta. Liuoksia vorteksoitiin ja turbiditeetti 350 ja 400 nm:sä mitattiin. UV-spektrit kerättiin seuraavin aikaväleihin: 0, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 ja 192 h:n kuluttua happamaksi tekemisestä. 5 µl DMSO:ta sisältävä kontrollinäyte valmistettiin vertailua varten ja spektrit kerättiin edellä mainittuina ajankohtina. Kukin estoaineliuos valmistettiin 10:n ryhmissä kyvettien aiheuttaman häiriön estämiseksi ennen lukeman ottamista. Kun UV-absorbanssi oli hankittu, niin sitä ajankohtaa vastaavat kyvetit otettiin pois käytöstä. Fibrillimuodostusanalyysi, jossa käytettiin ekvimolaarisia TTR- ja estoaine-pitoisuuksia (3,6 µM), tehtiin edellä kuvatulla tavalla käyttämällä 1 x sekundaarista estoaineperusliuosta, joka oli valmistettu seuraavasti: Perusliuos valmistettiin laimentamalla 7,2 mM 10 x primaari

perusliuos kymmenenteen osaan DMSO:lla lopulliseen pitoisuuteen 0,72 mM ja käytettiin fibrillimuodostusanalyysissä edellä kuvatulla tavalla. Kaikkien yhdisteiden havaittiin olevan liukoisia koko kokeen ajan, mikä vahvisti sen, että turbiditeetti oli seurausta TTR-amyloidimuodostuksesta.

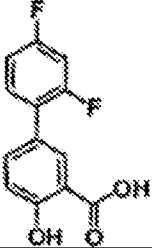
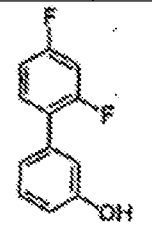
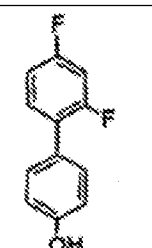
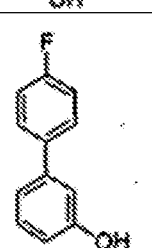
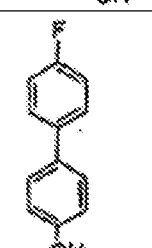
- 5 TTR:n kvaternaarinen rakenne pH:lla 4,4 estoaineiden läsnäollessa analysoitiin. Mekanismi, jolla 18 ja 20 estävät TTR:ää, arvioitiin inkuboimalla proteiinia (3,6 μM) 72 h pysähtyneen tilan fibrillimuodostusanalyysin olosuhteissa joko 3,6 μM :n tai 7,2 μM :n estoainetta läsnäollessa. 72 h:n kuluttua näytteet sentrifugoitiin (14 000 $\times$ g) ja supernatantti poistettiin kaikesta analyysissä muodostuneesta kiintoaineesta. Tasa-
- 10 paino- ja nopeusultrasentrifugointianalyysit saatiin aikaan analyttisellä Beckman XL-I -ultrasentrifugilla. Tietojen hankkiminen ja analysointi tehtiin edellä kuvatulla tavalla. Katso esimerkiksi Lashuel, H. A.; Lai, Z.; Kelly, J. W. *Biochemistry* 1998, 37, 17851-64; ja Lashuel, H. A.; et al. *Biochemistry* 1999, 38, 13560-73.

- 18:n ja 20:n sitoutumista WT-TTR:ään karakterisoivat hajoamisvakiot määritettiin
- 15 isotermaalisella titrauskalorimetrillä käyttämällä Microcalin laitetta (Microcal Inc., Northhampton, MD). Valmistettiin estoaineliuos (300 μM tai 500 μM 25 mM Tris-puskurissa, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 12 % EtOH, pH 8,0) ja titrattiin WT-TTR:ää sisältävään (15 μM tai 25 μM 25 mM Tris-puskurissa, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 12 % EtOH, pH 8,0) ITC-kennoon. Ensimmäisen 2,5 μl :n injektion jälkeen seurasi
- 20 50 injektiota, joista kukin oli 5,0 μl (25 °C). Termogrammin integrointi tyhjien poistamisen jälkeen tuotti sitoutumisisoltermin, joka sopi parhaiten kahden peräkkäisen sitovan kohdan malliin negatiivisella yhteistoiminnalla. Tiedot sovitettiin ei-lineaarisella pienimpien neliösummien menetelmällä neljällä säädettävällä parametrilla, nimittäin K_1 , ΔH_1 , K_2 , ΔH_2 ITC-tietoanalyysimoduulilla Microcalin toimittamassa
- 25 ORIGIN-versiossa 2.9.

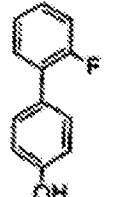
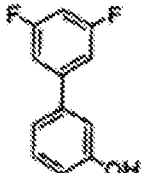
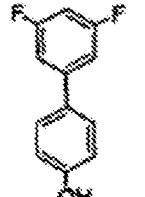
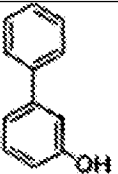
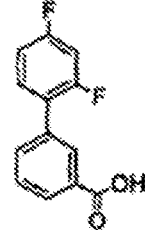
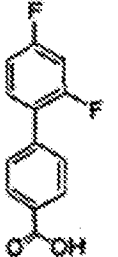
- Kuvatut yhdisteet arvioitiin TTR-amyloidifibrilliestoaineina turbiditeettikokeella. WT-TTR-amyloidoosi käynnistettiin tekemällä estoaineella esi-inkuboitu TTR happamaksi (25 °C, 30 min), lisäämällä puskuria pH:n nostamiseksi lopulliseen arvoon 4,4. Kun jokaista seosta oli inkuboitu 72 h (37 °C), niin turbiditeetti mitattiin 350 ja
- 30 400 nm:ssä UV-vis-spektrometrillä. Kaikki amyloidifibrillimuodostustiedot normalisoitiin WT-TTR-amyloidogeneesille estoaineen puuttuessa ja se määrettiin 100 %:n fibrillimuodostukseksi. Siten 5 %:n fibrillimuodostus vastaa yhdistettä, joka estää 95-prosenttisesti WT-TTR-fibrillimuodostusta 72 h:n kuluttua. Jokainen potentiaalinen estoaine arvioitiin ensin pitoisuudella 7,2 μM suhteessa TTR-tetrameeripitoisuuteen
- 35 3,6 μM . Alle 15 % fibrillimuodostusta sallineet yhdisteet arvioitiin uudestaan pitoisuuden vastatessa TTR-pitoisuutta (3,6 μM) kaikkein tehokkaimpien estoaineiden

valitsemiseksi. Fibrillimuodostus alle 40 % näissä olosuhteissa on erittäin hyvän estoaineen ominaisuus, kun taas 40–70 %:n esto viittaa kohtuulliseen yhdisteeseen. Fibrillimuodostustiedot esitetään taulukossa 1.

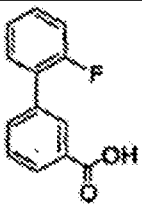
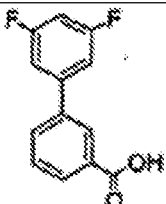
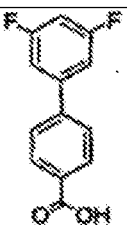
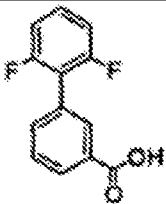
Taulukko 1: Yhdisteiden vaikutus fibrillimuodostukseen

Yhdiste-numero	Rakenne	Fibrillimuodostus % (3,6 µM esto- aine)	Fibrillimuodostus % (7,2 µM esto- aine)	Plasmaselektiivisuus (ekviv. sidottu)
Diflunisaali (1)		37,0	3,4	0,13 ± 0,02
2			31,5	
3			32,4	
4			46,3	
5			53,1	

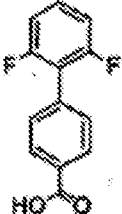
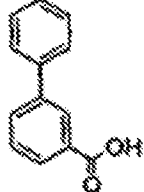
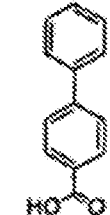
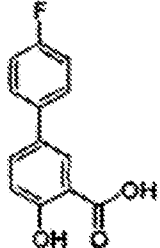
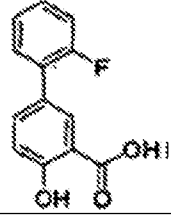
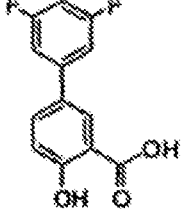
Taulukko 1 jatkuu

Yhdiste-numero	Rakenne	Fibrillimuodostus % (3,6 µM estoaine)	Fibrillimuodostus % (7,2 µM estoaine)	Plasmaselektiivisuus (ekviv. sidottu)
6			19,5	
7			19,6	
8		40,9	10,2	0,18 ± 0,05
9			16,4	
10			61,2	
11		39,4	9,1	ei havaittu
12		32,6	2,6	0,20 ± 0,05

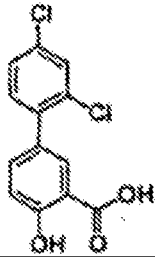
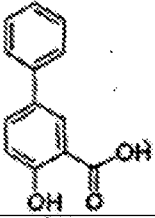
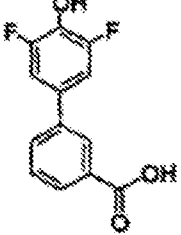
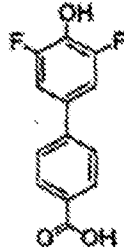
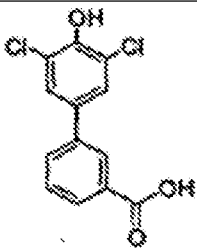
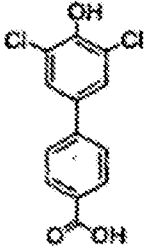
Taulukko 1 jatkuu

Yhdiste-numero	Rakenne	Fibrillimuodostus % (3,6 µM esto- aine)	Fibrillimuodostus % (7,2 µM esto- aine)	Plasmaselektiiv- isuus (ekviv. sidottu)
13			15,7	
14			13,3	
15		39,4	9,8	ei havaittu
16		32,4	4,8	0,08 ± 0,00
17		35,7	5,6	0,23 ± 0,00
18		35,7	3,7	1,27 ± 0,12
19		35,1	6,7	0,29 ± 0,12

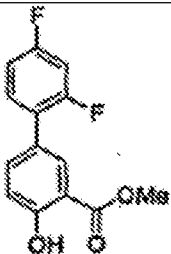
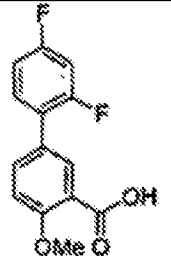
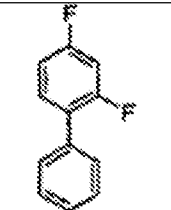
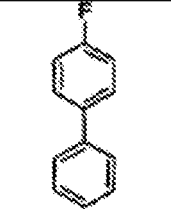
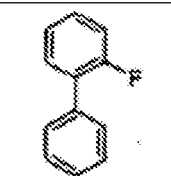
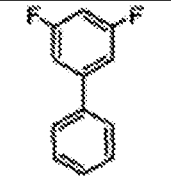
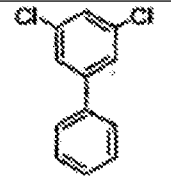
Taulukko 1 jatkuu

Yhdiste-numero	Rakenne	Fibrillimuodostus % (3,6 µM esto- aine)	Fibrillimuodostus % (7,2 µM esto- aine)	Plasmaselektiiv- isuus (ekviv. sidottu)
20		28,5	4,5	0,50 ± 0,05
21			30,8	
22		51,5	14,3	0,08 ± 0,01
23		38,7	2,6	0,09 ± 0,00
24		38,7	2,5	0,07 ± 0,02
25		35,5	1,0	ei havaittu

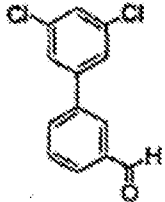
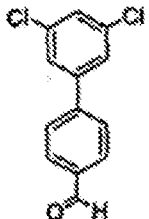
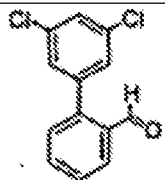
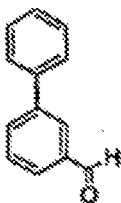
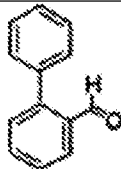
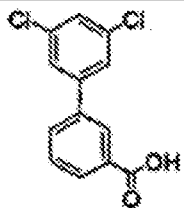
Taulukko 1 jatkuu

Yhdiste-numero	Rakenne	Fibrillimuodostus % (3,6 µM esto- aine)	Fibrillimuodostus % (7,2 µM esto- aine)	Plasmaselektiiv- isuus (ekviv. sidottu)
26		29,9	3,6	0,27 ± 0,02
27		47,4	15,4	ei havaittu
28		38,5	3,5	ei havaittu
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

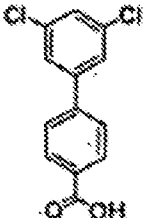
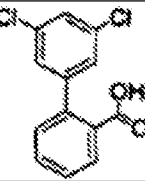
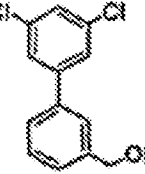
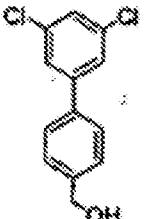
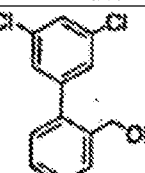
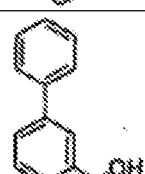
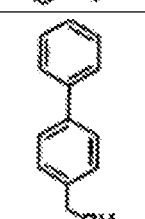
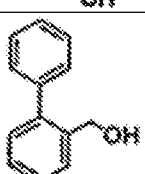
Taulukko 1 jatkuu

Yhdiste-numero	Rakenne	Fibrillimuodostus % (3,6 µM esto- aine)	Fibrillimuodostus % (7,2 µM esto- aine)	Plasmaselektiiv- isuus (ekviv. sidottu)
32			69,9	
33			38,5	
34			100,0	
35			100,0	
36			99,4	
37			100,0	
38			52,2	

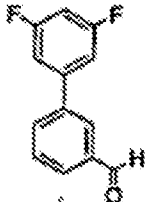
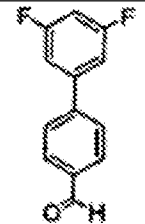
Taulukko 1 jatkuu

Yhdiste-numero	Rakenne	Fibrillimuodostus % (3,6 µM esto-aine)	Fibrillimuodostus % (7,2 µM esto-aine)	Plasmaselektiivisuus (ekviv. sidottu)
39		30,6	4,4	1,30 ± 0,15
40			25,4	
41		34,5	7,1	1,96 ± 0,11
42			35,4	
43			93,5	
44			72,5	
45		32,7	3,0	0,80 ± 0,08

Taulukko 1 jatkuu

Yhdiste-numero	Rakenne	Fibrillimuodostus % (3,6 µM esto- aine)	Fibrillimuodostus % (7,2 µM esto- aine)	Plasmaselektiiv- isuus (ekviv. sidottu)
46		41,2	4,9	1,56 ± 0,01
47			45,4	
48		30,0	3,3	0,89 ± 0,09
49		38,9	5,9	0,54 ± 0,10
50		33,6	7,7	ei havaittu
51			85,5	
52			100,0	
53			81,0	

Taulukko 1 jatkuu

Yhdiste-numero	Rakenne	Fibrillimuodostus % (3,6 μ M estoaine)	Fibrillimuodostus % (7,2 μ M estoaine)	Plasmaselektiivisuus (ekviv. sidottu)
54			64,3	
55			69,6	

Yhdisteiden 2–55 estoainetehokkuustietojen perusteella näyttää siltä, että dihalogeenifunktionalisoituun hydrofobiseen renkaaseen suoraan liitetty karboksylaattisubstituoitu hydrofiilinen rengas on riittävä erinomaiseen aktiivisuuteen (taulukko 1). Fenolisubstituentti karboksylaatin sijasta (2–10) saa aikaan huomattavasti vähemmän aktiivisia estoaineita, paljon huonompia kuin kantayhdiste 1. Estoaineet, joissa on halogeeni hydrofobisen renkaan orto- tai meta-asemassa, ovat ylivoimaisia niihin yhdisteisiin nähden, joista halogeenit puuttuvat tai joissa on ainoastaan para-halogeeni. Tämä osoittaa, että parahalogeenit eivät täydennä HBP:itä samalla tavalla kuin meta- ja ortohalogenoidut biaryylit. Kaikkien halogeenien täydellinen poistaminen voi saada aikaan huonon estoaineen, johtuen luultavasti steerisen komplementaarisuuden puutteesta halogeenia sitovien taskujen täyttämiseksi (esimerkiksi yhdisteet 10, 21–22, 27, 42–44 ja 51–53). Testatuissa olosuhteissa paras fenolinen yhdiste (8) on huonompi kuin 1, jossa on sekä fenolinen että karboksylaatin funktionalisuus hydrofiilisellä renkaalla. Yhdellä ainoalla karboksylaatilla stabiloidut biaryyliyhdisteet (kuten 11–22) voivat olla erinomaisia amyloidifibrilliestoaineita, esimerkiksi yhdisteet 11, 12, 15–20. Nämä vetävät vertoja diflunisaalille estossa niiden muodostaessa poikkeuksen, jotka sisältävät vain para-halogeenin (esim. yhdisteet 13 ja 14). Meta- tai para-substituoitu aryylikarboksylaatti voi olla riittävä antamaan erinomaiset estominaisuudet, mikä viittaa siihen, että 1:ssä olevaa hydroksyyli-substituenttia ei tarvita hyvään estoaktiivisuuteen. Lisäksi karboksylaatin sijoittuminen para-asemaan näyttää antavan ylivoimaiset estoaineet viitaten siihen, että para-karboksylaatti pysyy paremmin hyötymään elektrostaattisista vuorovaikutuksista Lys-15:n ja -15':n ϵ -ammoniumryhmien kanssa (forward-sitomismalli) kuten 20:n tapauksessa tai

vetysidosvuorovaikutuksista Ser-117:n ja -117':n hydroksyyli-ryhmien kanssa (reverse-sitomismalli) kuten 18:n tapauksessa. Biaryylit, joissa hydrofobinen rengas on substituoitu halogeeneilla muissa kuin para-asemassa ja hydrofiilinen rengas meta- ja erityisesti para-karboksylaateilla, aikaansaavat hyvin TTR-amyloidifibrilliestoaineita.

Karboksylaattisubstituentin sisältävän hydroksyyli-*substituentin* lisääminen renkaaseen (salisyylilihapposubstituutio, esimerkiksi 23–27) voi myös saada aikaan estoaineita samanlaisella korkealla aktiivisuudella kuin diflunisaali. Biaryyleissä salisyylilihappoytimellä halogeenien tarkka sijainti ei näytä olevan niin ratkaiseva kuin edeltävissä tapauksissa viitaten siihen, että tämä rengas myötävaikuttaa epäsuhtaisesti sidosenergiaan. Para-hydroksyyli voi osallistua vetysidokseen Lys-15:n ja -15':n ϵ -ammoniumryhmillä (forward-sidosmalli) tai Ser-117:n ja -117':n hydroksyyleillä (reverse-sidosmalli). Fluorin substituutio 1:ssä kloorilla (26) voi saada aikaan estoaineen yhtä suurella tai suuremmalla aktiivisuudella, kun taas halogeenien täydelleen poistaminen (27) voi johtaa kohtuulliseen estoaineeseen. On huomattava, että 27 on vain hieman parempi kuin para-karboksylaatti 22 *in vitro* ja kumpikin on parempi kuin halogeenittomat estoaineet karboksylaatilla meta-asemassa, 21, ja hydroksyyli-pitoinen analogi 10.

3',5'-dihalo-4'-hydroksyyli-*substituentin* inkluusio halogeenipitoiseen renkaaseen karboksylaateilla joko para- tai meta-asemissa (28–31) voi saada aikaan samanlaisen korkean estoaktiivisuuden kuin diflunisaali. 4-hydroksyyli-*substituutio* sisällytettiin tyroksiinin, TTR:n luonnollista ligandia, jäljittelyn lisäämiseksi. Nämä estoaineet voivat jäljittää enemmän myös tyroksiinin hormoniaktiivisuutta ja siten voivat toimia tyreidea-agonisteina tai -antagonisteina, mikä voi olla ei-toivottu vaikutus.

Karboksylaatin suojaus metyyliesterinä tai hydroksyylin metyylietterinä (32 ja 33) voi johtaa 1:tä huonompiin estoaineisiin. Nämä havainnot selittyvät todennäköisesti varauksen menetyksen ja steerisen koon lisääntymisen yhdistelmällä. Kaikkien hydrofiilisten substituenttien poistaminen (esim. 34–38) voi saada aikaan huonoja estoaineita. Vain metakloorisubstituution sisältävä biaryyliyhdiste (esim. 38) voi olla kohtuullinen estoaine, mikä viittaa siihen, että kloorit tekevät tehostettuja kosketuksia halogeeneja sitovissa taskuissa fluoripitoisiin biaryyleihin verrattuna (37).

Syntetisoitiin useita klooripitoisia estoaineita ja arvioitiin niiden TTR-fibrillejä estävä aktiivisuus. Kun tämän estoaineluokan jäsenet sisältävät karboksylaatteja meta- tai para-asemissa (esim. 45 ja 46), niin niillä voi olla korkea aktiivisuus, kun taas orto-karboksylaatilla varustetut (kuten 47) voivat olla huonompi estoaine. Tämä

havainto viittaa siihen, että orto-karboksylaatti saattaa olla liian kaukana Lys-15:n ja -15':n e-ammoniumryhmistä luodakseen suotuisia elektrostaattisia vuorovaikutuksia (forward-sidosmalli) tai Ser-117:n ja -117':n hydroksyyli-ryhmistä joutuakseen vetysidosvuorovaikutuksiin (reverse-sidosmalli). Bentsyylipitoiset alkoholit 48–50 osoittautuivat yllättäen erinomaisiksi fibrillimuodostuksen estoaineiksi. Meta-dikloorisubstituutio yhteen renkaaseen näyttää täydentyvän bentsyylialkoholifunktionaalisuudella joko orto-, meta- tai para-asemassa johtuen potentiaalisesti vetysidoksesta tai vesivälitteisestä vetysidoksesta. Aldehydianalogisarja (39–41), jossa -CH₂OH-ryhmät oli korvattu aldehydifunktionaalisuudella, osoitti hyvää estoa paitsi para-aldehydin 41 tapauksessa johtuen mahdollisesti aldehydin hydraatiosta gemdioliksi. On mahdollista, että aldehydit, bentsyylipitoiset alkoholit ja karboksylaattit sitoutuvat tas-kuun eri mekanismin välityksellä. Rakenneinformaation puutteessa samanlaista sidosmallia ei kuitenkaan voida sulkea pois. On myös mahdollista, että aldehydit sitovat kovalenttisesti joko Ser-117:ää (-117':a) hemiasetaalin välityksellä tai Lys-15:tä (-15':a) imiinisidoksen välityksellä. Kloorien substituutio fluoreilla (54 ja 55) aldehydien tapauksessa voi johtaa jokseenkin heikkoihin estoaineisiin (39 ja 41). Edellä kuvatulla tavalla halogeenien täydellinen poistaminen voi saada aikaan estoaineita heikolla aktiivisuudella (42 ja 44), paitsi että meta-aldehydin 43 tapauksessa aktiivisuus on kohtuullinen. Tämä kohtalainen aktiivisuus saattaa johtua korkea-asteisesta hydraatiosta. On yllättävää, että 3',5'-difluori-meta-aldehydi (54) on huonompi kuin aldehydi, josta halogeenit puuttuvat (42).

Edelleen arvioitiin estoaineiden, jotka pitävät TTR-fibrillimuodostuksen alle 50 %:ssa pitoisuuden ollessa yhtä suuri kuin TTR:n (3,6 µM), kykyä sitoa TTR selektiivisesti kaikkiin muihin veriplasman proteiineihin nähden. Veren diflunisaalipitoisuus voi ylittää 30 µM 20 h yhden 500 mg:n annoksen jälkeen tai 300 µM 4 h saman annoksen jälkeen. Vaikka tämä korkealla tasolla pidetty plasmapitoisuus viittaa loistavaan biologiseen hyötyosuuteen, niin selektiivisemmät estoaineet tekevät mahdolliseksi pienemmän annostuksen ja potentiaalisesti harvemmat sivuvaikutukset; siksi ihmisen plasmaa inkuboitii tällä estoaineiden osajoukolla lopullisella pitoisuudella 10,8 µM (keskimääräinen TTR-pitoisuus ihmisen plasmassa suunnilleen 5 µM). Sitten TTR siepattiin hartsiin sidotulla vasta-aineella ja immobilisoitu TTR pestiin kolme kertaa liuoksella TSA (Tris-suolaliuos)/0,05 % saponiini ja sen jälkeen pestiin kahdesti TSA:lla. TTR-estoainekompleksi vapautettiin hartsista 100 mM trietyyliamiinilla (pH 11,5) ja läsnä olevan estoaineen stoikiometria suhteessa TTR:ään määritettiin käänteisfaasi-HPLC-analyysillä. TTR-tetrameeria kohti voi sitoutua korkeintaan 2 ekvivalenttia estoainetta. Taulukossa 1 on yhteenveto pesunjälkeisistä plasman sidostoikiometreista ja se esittää alarajoja johtuen pesuhävikistä.

Klooripitoiset bifenyyliä voivat olla selektiivisiä TTR:n sitomisessa ihmisen veri-
 plasmassa (keskimääräinen stoikiometria 0,8 teoreettisen enimmäisstoikiometrian ollessa
 2,0, katso taulukko 1). Keskimääräisen stoikiometrian havaittiin olevan 0,4 kaikilla
 testatuilla estoaineilla. Fluoria sisältävistä estoaineista 18 ja 20 osoittivat vastaavasti
 5 erittäin hyvää ja hyväksyttävää sitoutumisselektiivisyyttä TTR:ään, parempaa kuin
 1:n samanlaisissa olosuhteissa esittämä stoikiometria 0,13. Taulukossa 1 esitetyt stoi-
 kiometria-arvot voivat esittää alemmaa raja-arvoa johtuen estoaineen pesuun liitty-
 vistä häviöistä TTR:stä, joka oli takavarikoitu polyklonaaliselle vasta-ainehartsille.
 39:n ja 41:n TTR:n sidosselektiivisyydestä pitäisi tarkastella varoen, koska nämä
 10 yhdisteet saattavat olla kovalenttisesti TTR:ään liittyneitä edellä kuvatulla tavalla.

Erinomaisia TT-amyloidifibrilliestotietoja *in vitro* ja silti heikkoa plasmaselektiivi-
 syyttä esittävät estoaineet saattavat sitoutua ensisijassa lääkeainetta sitoviin kohtiin
 albumiinissa ja/tai samanlaisiin kohtiin joissakin muissa plasmasta löytyvissä prote-
 iineissa. Saattaa olla epätodennäköistä, että ne estoaineet estävät TTR:n virhelaskos-
 15 tumista ja amyloidoosia monimutkaisessa ympäristössä kuten veri-plasmassa tai
 CSF:ssä.

TTR:ään sitoutuneen 1:n ja sen analogeista kolmen, 26, 18 ja 20, sekakiderakenteet
 korkean erotuskyvyn röntgeniä varten hankittiin liottamalla TTR-kiteitä 10-kertaisen
 ylimäärän kanssa estoainetta yli kolme viikkoa. Kiteiden tilastotiedoista on yhteen-
 20 veto taulukossa 2.

Taulukko 2: Kiteen tilastotiedot

Tietojen keruu	TTR•1	TTR•18	TTR•20	TTR•26
Resoluutio (Å)	35,58–1,85	42,18–1,54	64,5–1,7	51,30–1,7
Ainutlaatuisten heijastusten lkm	20,478	33,741	25,634	25,486
Löytyvyys (%) (kaikki/ulkokehä)	98,4/99,0	95,0/98,0	98,0/99,0	99,0/98,0
R _{sym} (kaikki/ulkokehä)	0,09/0,31	0,03/0,32	0,08/0,39	0,07/0,40
Hienosäätö				
Resoluutio (Å)	35,58–1,85	42,18–1,50	64,5–1,7	51,30–1,7
R-tekijä/R-vapaa (%)	21,2/23,6	22,2/24,5	22,5/24,0	21,5/24,2
Rmsd-sidospituus (Å)	0,03	0,06	0,02	0,02
Rmsd-sidoskulmat (°)	2,3	2,7	1,9	1,9

- Diflunisaali (1) sitoutuu TTR:ään sekä forward- että reverse-malleissa. TTR:n kummassakin hormonia sitovassa kohdassa havaittiin neljä diflunisalin sitovaa konformaatiota suunnilleen samanlaisella varaamisella – sekä forward- että reverse-sidosmalli kumpikin kahdella symmetrisesti ekvivalentilla sidosmallilla. Diflunisaalin biaryylijärjestelmä siirrettiin kauemmas hormonia sitovan taskun keskuksesta ja valtaa kaksi erillistä kohtaa muodostaen 'V'-muotoisen elektronitiheyskartion TTR:n hormonia sitovaan taskuun. Tämä sitomismalli lisää sekä hydrofobisia että van der Waals -vuorovaikutuksia estoaineen ja Leu17:n, Ala-108:n, Leu-110:n, Thr-119:n ja Val-121:n muodostaman TTR:n hydrofobisen taskun välillä. Diflunisaalin reverse-sitomismallia vahvennettiin karboksyyliyhdyntymän ja Thr-119:n sivuketjun hapen ja Ala-118:n pääketjun hapen välisellä vetysidosvuorovaikutuksella sitovassa sisätaskussa. Yllättäen Ser-117 ei hyväksy monia konformaatioita eikä muodosta mitään elektrostaattista vuorovaikutusta estoaineen kanssa. Reverse-sitomismallissa yksi diflunisaalin fluorisubstituenteista oli vetysidosetäisyydellä Thr-119:n sivuketjuhapsesta (3,3 Å). Sitovassa ulkotaskussa Lys-15':n sivuketjuatomien elektronitiheys oli näkyvä vain alhaisella sigma-tasolla, mikä viittaa siihen, että se saattaa olla useammassa kuin yhdessä konformaatiossa. Lys-15-tähteen parasta mahdollista konformaatiota mallinnettiin vetysidosetäisyydellä diflunisaalin karboksyyliyhdyntymästä forward-sitomismallissa.
- Yhdiste 20 sitoutuu TTR:ään forward-sitomismallissa, jolloin sitovaan ulkotaskuun orientoitunut karboksylaattisubstituoitu hydrofiilinen rengas vuorovaikuttaa elektrostaattisesti Lys-15:n ja -15':n kanssa. Fluorattu aryylirengas sijaitsee sitovassa sisätaskussa, jolloin halogeenit on sijoitettu HBP-2:een ja -2':uun. Kiinnostavaa kyllä, kummankin sitovan kohdan tarkka tutkiminen tuo esiin bifenyylirenkaiden orientaatiossa merkittävän eron. Fenyylirenkaiden tasojen väliset kulmat vaihtelevat toisen sitovan kohdan 32,6 asteesta toisen 63,8 asteeseen. Tämä havainto voi olla seurausta negatiivisesti yhteistoiminnallisesta 20:n sitomisesta TTR:n kanssa.
- Yhdiste 18 sitoutuu TTR:ään reverse-mallissa karboksylaattisubstituoitu hydrofiilinen aryylirengas orientoituneena sisätaskuun vetysidosetäisyydelle Ser-117:stä ja Ser-117':sta. Aryylirenkaat ovat kiertyneet 34 astetta suhteessa toisiinsa ja hyötyvät hydrofobisista vuorovaikutuksista Leu-17:n, Ala-108:n, Val-121:n ja Thr-119:n kanssa. Fluorit on sijoitettu halogeenia sitoviin taskuihin 1 ja 1'. Reverse-sitomismalli ei ollut odotettu, sen sijaan karboksylaatin kuviteltiin sijaitsevan ulkotaskussa ja hyötyvän elektrostaattisista vuorovaikutuksista Lys-15:n ja -15':n kanssa fluorien ollessa takavarikoituina halogeeneja sitoviin taskuihin 2 ja 2'. Reverse-sitomismalli ei

kuitenkaan ollut täydellinen yllätys, sillä aikaisemmin se oli havaittu diklofenaakin (biaryyliamiinin) ja useiden diklofenaakkianalogien yhteydessä.

Kloorien substituuutio fluorien tilalle indusoi diflunisaalissa merkittäviä eroja 26:n sitoutumisessa TTR:ään. Yhdiste 26 sitoutuu TTR:ään reverse-sitomismallissa sitovaan sisätaskuun orientoidulla karboksyyli-substituoidulla aryyli-renkaalla ja kloorit takavarikoidaan halogeenia sitoviin taskuihin 2 ja 2'. Yhdisteiden 18 ja 20 tavoin myös yhdiste 26 valtaa hormonia sitovan taskun keskuksen. TTR-promoottorien tähteet Ala-108, Lys-15, Leu-17, Leu-110, Lys-17 ja Thr-119 muodostavat van der Waals- ja hydrofobisia vuorovaikutuksia estoaineen kanssa. Sitovassa sisätaskussa Ser-117:n sivuketju on kahdessa konformaatioissa ja vuorovaikuttaa 26:n karboksyyli-substituution ja muiden monomeerien Ser-117:n kanssa. 26:n sama karboksyyli-happi muodostaa myös vetysidosvuorovaikutuksen Ser-117:n pääketjun hapen kanssa. 26:n toinen karboksyyli-happi muodostaa vetysidoksen Ala-108:n pääketjun hapen kanssa. Diflunisaalin vastakohtana Thr-119-tähde suuntautuu pois estoaineesta ja myötävaikuttaa pikemminkin sitovan taskun hydrofobisuuteen kuin estoaineen vetysidokseen.

Näiden estoaineiden toimintamekanismia tutkittiin edelleen arvioimalla niiden kyky stabiloida TTR ureaindusoitua hajoamista vastaan ajan funktiona. Tetrameerihajoamisen nopeus liitettiin irreversiibelisti nopeaan, helposti seurattavaan, monomeerin laskostumisen avautumiseen käyttämällä monomeerin uudelleen laskostumisen mahdolliseksi tekeviä pitoisuuksia ylittäviä ureapitoisuuksia. Kun hajoamista seurattiin tutkimalla laskostumisen purkautumista kauko-UV-CD:llä 6,5 M ureassa, niin saatiin selville, että kaikki happovälitteisen amyloidogeneesin hyvät estoaineet hidastivat tetrameerihajoamisen nopeutta annoksesta riippuvalla tavalla (kuvat 2A ja 2B). Useat estoaineet, mukaan lukien 20, 46 ja 48, vaikuttivat dramaattisesti TTR-tetrameerin hajoamiseen, amyloidogeneesin määräävään askeleeseen. Katso esimerkiksi Hammarstrom, P.; et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002, 25, 16427–32.

Koska TTR-fibrillimuodostuksen estotavan näillä yhdisteillä epäillään olevan tetrameerin hajoamiskynnyksen annoksesta riippuva säätäminen perustilan stabiloinnilla, niin parhaiden estoaineiden täytyisi hidastaa tetrameerihajoamista eniten. Fibrillimuodostuksen nopeutta seurattiin turbiditeetin avulla lopullisessa pH:ssa 4,4 yli 192 h. Katso kuviot 3A, 3B, 4A ja 4B. Estoaineet, joilla on kyky stabiloida tetrameerinen TTR matalassa pH:ssa, estävät tetrameerin hajoamisen, virhelaskostumisen ja virhekoonnin amyloidiksi. Amyloidifibrillimuodostuksen parhaat estoaineet hidastavat tetrameerin hajoamista eniten (kuviot 2A ja 2B). Korrelaatio ei kuitenkaan ole

täydellinen, sillä jotkin estoaineet sitoutuvat paremmin ureassa kuin happamissa olosuhteissa ja päinvastoin.

Sen varmistamiseksi, että estoaineet ovat stabiloimassa TTR:n (3,6 μM) tetrameerimuotoa, TTR:n kvaternaarinen rakenne tutkittiin tasapainon ja nopeuden analyytisellä ultrasentrifugointitutkimuksella. Määritettiin proteiinin kvaternaarinen rakenne, kun sitä oli inkuboitu 72 tuntia 18:n ja 20:n kanssa (3,6 μM tai 7,2 μM) pH:ssa 4,4. Tetrameeri oli vallitseva laji estoainepitoisuudella 3,6 μM ja 7,2 μM tasapaino-AUC:ssä samoin kuin nopeustutkimuksissa.

18:n ja 20:n sitoutumisvakiot TTR:ään pH:ssa 8,0 (25 °C) määritettiin isotermisellä titrauskalorimetrialla (ITC:llä). Diflunisaali ja kaksi analogia sitoutuvat TTR:ään negatiivisella yhteistoiminnalla, monien muiden ligandien osoittamalla ominaisuudella. Sitoutuminen ensimmäiseen kohtaan on 15 kertaa suurempi kuin sitoutuminen toiseen kohtaan diflunisaalin ja 20:n tapauksessa. Biaryyli 18:n K_{d1} on suunnilleen 120 kertaa matalampi kuin K_{d2} (taulukko 3). Taulukossa 3 on yhteenveto 1:n, 18:n ja 20:n sitoutumisen ensimmäisestä ja toisesta ITC:llä määritetystä dissosiaatiovakiosta. 1:n sitoutumisvakiot kerrottiin aikaisemmin ja on annettu tässä vertailutarkoituksessa. Katso esimerkki 1.

Taulukko 3: Villikannan TTR:ään sitoutuvien yhdisteiden dissosiaatiovakiot

Estoaine	K_{d1}	K_{d2}
1	75 nM	1100 nM
18	9 nM	1100 nM
20	80 nM	1300 nM

Tetrameerinen WT-TTR hajoaa $t_{1/2}$:lla 42 h ja suoristuu 500 000 kertaa nopeammin. Siten sen dissosiaationopeutta voidaan tutkia kytkemällä se suoristumiseen, joka on irreversiibeli 6,5 M ureassa. Koska tetrameerin hajoaminen on amyloidogeneesin hitain vaihe, niin kaikki erinomaista in vitro -aktiivisuutta esittävien ja plasmassa 0,50 sitovan stoikiometrian ylittävien estoaineiden täytyisi hidastaa tetrameerin hajoamista, jos oletettu vaikutusmekanismi on oikea, kineettinen stabilointi selektiivisellä sitoutumisella natiiviin tilaan (katso kuvat 2A ja 2B).

TTR-tetrameerin hajoamisnopeudet mitattiin estoainepitoisuuden funktiona 168 tunnin pituisena ajanjaksona 6,5 M ureassa. Valitut estoaineet, erityisesti 18, 20, 39, 41, 45, 46, 48 ja 49, osoittavat kokonaisvähenemisen tetrameerin hajoamislaajuudessa 160 h:n kuluessa, mitä kuvaavat amplitudimuutokset suhteessa TTR:ään ilman

estoaINETTA. Tetrameerin hajoamisnopeus on myös dramaattisesti hidastunut estoai-
 neen läsnäollessa, mitä kuvaa aikakäyrän kulmakertoimen pieneneminen. Estoaineet
 20, 45, 46 ja 48 ovat ylivoimaisia, oletettavasti koska estoaine hajoaa hyvin hitaasti
 TTR·I:stä ja TTR·I₂:sta johtuen niiden korkeasta sidosaaffiniteetista ureassa. TM·ja
 5 TTR·I₂:n muodostuminen voi merkittävästi stabiloida natiivia tilaa johtuen niiden
 kompleksien matalista K_d:istä ja nostaa tetrameerihajoamisen kineettistä kynnystä,
 huomattavasti 20:n, 45:n, 46:n ja 48:n tapauksessa. Vaikka 16 ja 18 sitoutuvat
 TTR:ään, niiden affiniteetti näyttää olevan riittämätön vaikuttaakseen kineettiseen
 stabilointiin. On todennäköisesti merkittävää, että estoainetehokkuuden arvojärjestys
 10 ureassa estoainepitoisuudella 3,6 μM (3,6 μM proteiinia) on 20 ≈ 45 > 46 ≈ 48, joka on
 erilainen kuin estoainepitoisuudella 7,2 μM (20 ≈ 46 > 45 ≈ 48). Tämä heijastaa to-
 dennäköisesti K_{d2}-arvojen eroa ureassa.

Natiivin tilan kineettinen stabilointi on houkutteleva terapeutinen strategia johtuen
 esiintulevista todisteista, että virhelaskostuneet oligomeerit ovat neurotoksisia, olivat
 15 ne amyloidireitillä tai eivät. Kineettisen stabiloinnin saavuttaminen estoaineilla voi
 saada aikaan ei-invasiivisen SSA-, FAP- ja FAC-hoidon.

Tetrameerin hajoamisnopeudet ureassa annetun estoaineen läsnäollessa eivät aina en-
 nusta estoaineen kykyä estää amyloidoosi matalassa pH:ssa. Koska amyloidin muo-
 dostumistapa ja -paikka ihmisessä eivät vielä ole selvillä, niin toivotaan TTR-
 20 tetrameeristabiloijia, jotka toimivat hyvin monenlaisissa denaturointiympäristöissä.
 TTR-fibrillimuodostuksen nopeutta estoainepitoisuuden funktiona tutkittiin happa-
 missa olosuhteissa (kuviot 3A, 3B, 4A ja 4B). Estoaineet 20, 45 ja 48 toimivat poik-
 keuksellisen hyvin myös tässä ympäristössä. Estoaine 46 on parempi tetrameeristabi-
 loija ureassa kuin hapossa, kun taas 1 on paljon parempi hapossa kuin ureassa. TTR·I-
 25 ja TTR·I₂-kompleksien muodostumiseen liittyvä vapaan energian stabilointi tietyssä
 ympäristössä määrittää perustilan stabiloinnin ja siihen liittyvän vapaan energian li-
 sääntymislaajuuden tetrameerin hajoamisessa. Nämä tiedot viittaavat siihen, että es-
 toaineet hidastavat TTR-amyloidoosia matalassa pH:ssa paljon tehokkaammin kuin
 ne hidastavat TTR-tetrameerin hajoamista 6,5 M ureassa. Tämä ehkä siksi, että amy-
 30 loidogeneesi tarvitsee pitoisuudesta riippuvan uudelleen koonnin hajoamisen jälkeen.
 Tehokkaampia estoaineita ovat ne, jotka pystyvät pitämään TTR:n monomeerisen
 amyloidogeenisen välituotteen pitoisuuden tarpeeksi matalilla tasoilla ja tekevät fib-
 rillimuodostuksesta hyvin tehottoman. Kuten TTR:n denaturoitumisesta ureassa es-
 toaineiden läsnäollessa havaitaan, niin estoainetehokkuuden arvojärjestyksessä ma-
 35 talassa pH:ssa on huomattava ero estoainepitoisuuden 3,6 μM (kuviot 3A ja 3B) ja
 estoainepitoisuuden 7,2 μM (kuviot 4A ja 4B) välillä. Tämä havainto heijastaa

todennäköisesti kunkin estoaineista K_{d2} -arvojen eroa alhaisessa pH:ssa. Dramaattisin esimerkki on diflunisaalista – yksi fibrillimuodostuksen tehokkaimmista estoaineista 3,6 μM :ssa mutta yksi tehottomimmista 7,2 μM :ssa johtuen sen suhteellisen korkeasta K_{d2} :sta.

- 5 Diflunisaalianalogit esittävät lupaavaa yhdisteluokkaa TTR-amyloidoosin hoitamiseksi. Vaikka useat diklofenaakkianalogit ovat erittäin hyviä fibrillimuodostuksen estoaineita, niin diflunisaalianalogit tarjoavat uuden luokan erittäin tehokkaita TTR-tetrameeristabiloijia. Useilla diklofenaakkianalogeilla on kyky estää fibrillimuodostus johtuen kahden TTR-mutantin hajoamisesta ja virhelaskostumisesta – mutanttien
- 10 Val30Met ja Leu55Pro. Röntgensekakiderakenteet osoittavat, että diklofenaakkianalogit sitoutuvat etupäässä reverse-sitoutumismallissa, vaikka pienet häiriöt diflunisaalianalogien rakenteissa antavat myöten joko forward- tai reverse-sitoutumiselle. Diflunisaali pystyy lisäksi sitoutumaan joko forward- tai reverse-sitoutumismallissa melkein yhtä suurella kummankin mallin käytöllä. Diklofenaakin hajoamis-
- 15 vakiot (60 nM K_{d1} ja 1200 nM K_{d2}) olivat verrattavissa diflunisaalilla ja 20:llä saatuihin 18:n osoittaessa lähes 10-kertaisesti tiukempaa sitoutumista ensimmäisessä sitoutumistapahtumassa sen K_{d1} -arvon osoittamalla tavalla. Lisäksi kumpikin estoaineluokka esitti negatiivisesti yhteistoiminnallista sitoutumista. Mikä huomattavinta, useat diflunisaalianalogit olivat hyvin selektiivisiä ihmisen veriplasman TTR:lle ja
- 20 tarjosivat mahdollisuuden alentuneille toksisuudelle ja sivuvaikutuksille. Katso Oza, V. B.; et al. J. Med. Chem. 2002, 45,321–32.

- Syntetisoiduista yhdisteistä kaksikymmentäkahdeksan voi olennaisesti estää TTR-amyloidogeneesia. Niistä useiden sitomissoikiometriä ylitti 0,50 ekvivalenttia ihmisen veriplasmassa. Tunnetuissa lääkkeissä on parempien estoaineiden sekä kloor- että
- 25 fluoriaryylierakenteita ja siksi on hyvä syy uskoa, että nämä yhdisteet tai niiden analogit voitaisiin kehittää lääkkeiksi, joilla ei ole 1:n NSAID-aktiivisuutta. 18:n ja 20:n fluoriyhdisteet voivat sitoa ja stabiloida tetrameerista TTR:ää 6,5 M ureassa hidastaen dramaattisesti ensimmäisen vaiheen virhelaskostumista ja amyloidogeneesia, TTR-tetrameerin hajoamista. Nämä yhdisteet ja jotkin muut hidastavat dramaattisesti
 - 30 myös happovälitteistä TTR-amyloidogeneesia. Testatuista yhdisteistä 18, 20, 39, 41, 45, 46, 48 ja 49 suoriutuivat parhaiten TTR-tetrameerin stabiloinnista ureassa ja happamissa olosuhteissa. Nämä biaryyliyhdisteet näyttävät lisäävät tetrameerin hajoamiseen liittyvää aktivointikynnystä, amyloidimuodostuksen määräävää vaihetta, perustilastabiloinnilla.

Esimerkki 3: Oraalisesti annettu diflunisaali stabiloi transtyretiiniä denaturoitumista vastaan

Transtyretiini (TTR) on homotetrameeriproteiini, joka kuljettaa tyroksiinia ja holoretinolia sitovaa proteiinia. Denaturoivissa olosuhteissa määräävä tetrameerin hajoaminen ja nopea monomeerin virhelaskostuminen tekee mahdolliseksi virhekoonnin amyloidiksi aiheuttaen seniiliä systeemistä amyloidoosia, suvuittaista amyloidipolyneuropatiaa ja suvuittaista amyloidikardiopatiaa. Diflunisaalin sitoutumisen ainakin toiseen kahdesta miehittämättömästä tyroksiinia sitovasta TTR-kohdasta tiedetään stabiloivan TTR-tetrameeriä myös lisäämällä hajoamisen aktivointikynnystä *in vitro*. Diflunisaalin käytön soveltuvuus TTR-amyloidogeneesin hoitoon tutkittiin.

Menetelmät

Tutkimukseen värvättiin kolmekymmentä tervettä vapaaehtoista (25 miespuolista, 5 naispuolista) heidän suostuttuaan siihen perehdytyksen jälkeen. Koehenkilöidät iät olivat 23–53 vuotta (keski-ikä $37,6 \pm 8,8$) ja keskimääräinen ruumiinpaino $78,0 \pm 12,1$ kg. Jokaista koehenkilöä hoidettiin diflunisaalilla (Dolobid®) annoksella 125, 250 tai 500 mg kahdesti vuorokaudessa (joka 12. tunti) 7 vrk:n ajan (13 täydellistä annosta). Veri kerättiin vuorokautena 1 ennen hoitoa ja 8. vuorokautena 4 ja 12 tuntia diflunisaalin nauttimisen jälkeen. Human Subjects Committee of Scripps Clinic, Scripps Green Hospital, The Scripps Research Institute, ja The Scripps General Clinical Research Center hyväksyivät tämän tutkimussuunnitelman.

Seerumin diflunisaalitasot mitattiin. Sata μ l seerumia lisättiin 900 μ l:aan asetonitriiliä proteiinien saostamiseksi. Sentrifugoinnin jälkeen 100 μ l supernatanttia lisättiin 900 μ l:aan 100 mM vesipitoista trietyyliamiinia, pH 11,5. Suodatuksen jälkeen kutakin näytettä injektoidiin 100 μ l Keystonen 3 cm:n C18-käänteisfaasikoloonniin käyttämällä liuoksen B gradienttia 40–100 % 10 minuutissa (liuos A: 94,8 % vesi / 5 % asetonitriili / 0,2 % trifluorietikkahappo; liuos B: 94,8 % asetonitriili / 5 % vesi / 0,2 % trifluorietikkahappo), Watersin 600E-moniliuotinsyöttöjärjestelmän ohjaamana. Detektio tehtiin 280 nm:ssä Watersin säädettävällä 486-absorbanssidetektorilla ja piikit integroitiin, jolloin saatiin diflunisaalin pitoisuus standardikäyristä.

Diflunisaalin TTR:ään sitoutumisen stoikiometria ihmisen seerumissa analysoitiin. 1:1 geeli / 10 mM Tris•HCl, pH 8,0 / 140 mM NaCl / 0,025 % NaN_3 (TSA) Sepharosen liete (62,5 μ l) lisättiin 500 μ l:aan seerumia ja inkuboitiin 4 °C:ssa 1 h. Sentrifugoinnin jälkeen 400 μ l supernatanttia lisättiin 200 μ l:aan TTR-vasta-ainekonjugoidun Sepharosen lietettä 1:1 geeli / TSA ja ravisteltiin hitaasti 4 °C:ssa 20 min.

Sentrifugoinnin jälkeen geeli pestiin 1 ml:lla seosta TSA / 0,05 % saponiini (Fisher Scientific) (kahdesti, 10 min kerta) ja lisäksi 1 ml:lla TSA:ta (kerran, 10 min) 4 °C:ssa. Sitten lisättiin 155 µl 100 mM vesipitoista trietyyliamiinia, pH 11,5, TTR:n ja sitoutuneen diflunisaalin eluoimiseksi vasta-aineista. Varovaisen 30 minuuttia jat-

5 kuneen ravistelun jälkeen 4°C näyte sentrifugoitiin ja 145 µl supernatanttia poistettiin. 135 µl:n injektio näytettä erotettiin ja analysoitiin aikaisemmin kuvatulla tavalla (Purkey et al., Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 5566–71).

Seerumin TTR-tetrameerin stabiilius urean denaturoitumista vasten arvioitiin. Seerumin 10 µl:n näytteitä inkuboitiin (25 °C) 90 µl:ssa erilaisia ureapitoisuuksia 50 mM

10 fosfaattipuskurissa (pH 7,0; 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT). Urealuokset tarkastettiin valontaitekertoimella painon mukaan valmistettujen pitoisuuksien tarkistamiseksi. Proteiinin glutaraldehydiristisointi tehtiin lisäämällä 10 µl glutaraldehydiä (25 %). Ristisidosreaktion annettiin jatkua 4 min, ennen kuin se sammutettiin lisäämällä 10 µl NaBH₄:ää (7 % 0,1 M NaOH:ssa). Näytteet sekoitettiin 120 µl:n

15 kanssa SDS:ää pelkistävää geelitäytöseosta (lopullinen SDS-pitoisuus = 2,5 %) ja keitettiin 5 min. Näytteet erotettiin käyttämällä 12 % SDS-PAGE:tä ja geelit analysoitiin immunoblottauksella käyttämällä TTR-antiseerumia (Purkey et al., supra).

Seerumin TTR-tetrameerin stabiilius hapon denaturoitumista vasten arvioitiin. Seerumin 10 µl:n näytteitä inkuboitiin (37 °C) 90 µl:ssa 100 mM happamaksi tekevää

20 puskuria. Käytettiin sitraattipuskuria, kun lopulliseksi pH:ksi haluttiin ≤ 3,8; asetaattipuskuria käytettiin, kun pH-alue arvioinnissa oli 4,2–5,4. Ristisitoamisen jälkeen näytteet analysoitiin SDS-PAGE:llä ja immunoblottauksella edellä kuvatulla tavalla.

Rekombinantti-WT-TTR:ää ja variantteja ilmennettiin BL21/DE3 Epicurian gold *Escherichia coli* (Stratagene), joka oli transformoitu TTR- ja ampicilliiniresistens-

25 sigeenit sisältävällä pmmHα-plasmidilla. Ilmentäminen ja puhdistaminen tehtiin aikaisemmin kuvatulla tavalla (Lashuel et al., Biochemistry 1999; 38: 13560–73).

TTR-tetrameerin hajoamisnopeus mitattiin sirkulaaridikroismispektroskopiolla. Tetrameerin hajoamisnopeuksien arviointi tehtiin käyttämällä rekombinantti-TTR-näyt-

30 teitä (3,6 µM) 6,5 M ureassa, pitoisuus tertiaarisen rakennemuutoksen transition jälkeisellä alueella (Hammarström et al., Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 16427–32). TTR:n kauko-UV-CD-spektrit (210–220 nm) ajan funktiona mitattiin arvioitaessa hidas tetrameerihajoamisnopeus liittämällä se nopeisiin tertiaarisiin rakennemuutoksiin.

Fibrillimuodostusanalyysi tehtiin seuraavasti. Rekombinantti-TTR-perusliuoksesta (7,2 μM) tehtiin 1:1-laimennus happamaksi tekevällä 100 mM puskurilla. Käytettiin sitraattipuskuria, kun lopulliseksi pH:ksi haluttiin $\leq 3,8$; asetaattipuskuria käytettiin, kun arvioitaessa pH-alue oli 4,2–6,0, ja fosfaattipuskuria käytettiin amyloidogeneesin arvioimiseksi pH:ssa 6,5. Näytteitä inkuboitii 37 °C:ssa 72 h sekoittamatta happamaksi tekemisen jälkeen. Fibrillimuodostuksen laajuutta tutkittiin turbiditeettimitauksilla 400 nm:ssä.

Fibrillimuodostuksen kinetiikka mitattiin seuraavasti. Rekombinantti-TTR:n liuokset (7,2 μM) sekoitettiin yhtä suuren tilavuuden kanssa 100 mM asetaattipuskuria, jolloin lopulliseksi pH:ksi saatiin 4,4. Näytteitä inkuboitii 37 °C:ssa ja turbiditeettia 400 nm:ssä seurattiin 168 h:n ajan. Jokaista ajankohtaa varten valmistettiin erillinen näyte.

Diflunisaalin vaikutus ureavälitteiseen tetrameerihajoamiseen ja pH-välitteiseen fibrillimuodostukseen arvioitiin lisäämällä diflunisaalia TTR-liuokseen, jota oli inkuboitu 3 h (37 °C) ennen proteiinin altistamista denaturoinnille ureassa tai pH-välitteiselle amyloidoosille.

Tulokset

Keskimääräiset seerumin diflunisaalipitoisuudet HPLC:n avulla mitattuina 4 ja 12 h:n kuluttua 13. annoksen ottamisesta olivat $20,1 \pm 7,1$ ja $6,9 \pm 3,0$ μM 125 mg:n bid-ryhmässä, $233,5 \pm 76,0$ ja $145,8 \pm 38,9$ μM 250 mg:n bid-ryhmässä ja $517,0 \pm 79,5$ ja $421,9 \pm 78,1$ μM 500 mg:n bid-ryhmässä. Yli 99 % diflunisaalista on proteiinisiidottua. Nämä 250 mg:n bid-ryhmässä ja 500 mg:n bid-ryhmässä havaitut pitoisuudet ovat erittäin korkeita suhteessa seerumin TTR-pitoisuuteen (3,6–7,2 μM), ja niiden pitäisi tuottaa maksimiin 2 yltävä diflunisaalisidosstoikiometria, jos sitoutuminen kilpaileviin proteiineihin kuten TBG (0, –0,5 μM) ja/tai albumiini (580 - 725 μM), joilla on monia pienille molekyyleille tarkoitettuja sidoskohtia, ei ole affiniteetiltään korkea.

Diflunisaali sitoutuu edullisesti tetrameeriseen TTR:ään veressä stoikiometrialla vähintään 1 ja ihanteellisesti 2, jolloin havaitaan suurin mahdollinen kineettinen stabiointi. Diflunisaalin stoikiometrian alaraja asetettiin jokaiselle koehenkilölle immunoaostamalla transtyretiini seerumista kiinteäfaasihartsiin sidotuilla polyklonaalisilla vasta-aineilla aikaisemmin kuvatulla tavalla (Purkey et al., supra). Kun immobilisoitu TTR oli pesty 3 kertaa ei-spesifisen sitoutumisen poistamiseksi TTR-diflunisaalikompleksi hajotettiin hartsista ja diflunisaalin stoikiometria määritettiin

HPLC:llä käyttämällä standardikäyriä. TTR:ään seerumissa sitoutuneen diflunisaalin stoikiometria 4 ja 12 h:n jälkeen nauttimisesta oli $0,45 \pm 0,11$ ja $0,31 \pm 0,12$ 125 mg:n bid-ryhmässä, $1,12 \pm 0,08$ ja $0,95 \pm 0,13$ 250 mg:n bid-ryhmässä ja $1,51 \pm 0,09$ ja $1,48 \pm 0,08$ 500 mg:n bid-ryhmässä. Diflunisaalin stoikiometria lisääntyi sen seerumipitoisuuden myötä jopa $\approx 300 \mu\text{M}$:ksi. Odotettua pienempi maksimaalinen stoikiometria 1,5 seerumipitoisuudella $300 \mu\text{M}$ johtuu joko menetelmän rajoituksesta (pesuun liittyvät hävikit) ja/tai diflunisaalin sitoutumisesta joihinkin muihin plasmaproteiineihin, ja siitä syystä teimme diflunisaalin sitoutumisen stoikiometria tutkimuksen rekombinantti-TTR:n kanssa. Pesuun liittyvät hävikit selittävät maksimisitoutumisstoikiometrian 1,5 johtuvan etupäässä irtoamisesta alhaisen affiniteetin kohdasta. Diflunisaali sitoutuu TTR:ään negatiivisella yhteistoiminnalla, ja siten irtoaminen alhaisen affiniteetin kohdasta on dramaattisesti nopeampaa. Odotettu sitoutumisstoikiometria puskurissa laskettiin isotermisellä titrauskalorimetrialla määritettyjen dissosiaatiovakioiden perusteella (K_{d1} , 75 nM; K_{d2} , 1,1 μM). Lasketun ja kokeellisesti määritetyn stoikiometrian käyrien piirtäminen yhdessä jälkimmäisen ollessa peräisin immunosaostuksesta (3 pesua) ja HPLC-analyysistä tekee mahdolliseksi arvioida todelliseksi stoikiometriaksi 1,75–1,91 250 mg:n bid:ssä, mikä viittaa siihen, että tätä annosta voitaisiin käyttää.

Diflunisaalin (100 μM) sitoutumisstoikiometrian vertailu koehenkilöissä (0,8–1) rekombinantti-TTR:n kanssa (1,5) paljastaa merkittävän sitoutumisen seerumiproteiineihin TTR:n lisäksi, kannustaen kehittämään diflunisaalianalogeja, jotka sitoutuvat aiempaa selektiivisemmin TTR:ään. TTR:n seerumitasot lisääntyivät ja totaali-T4:n ja -RBP:n seerumitasot laskivat diflunisaalin antamisen jälkeen kaikissa ryhmissä. Nämä löydöt viittaavat siihen, että diflunisaali TTR:n metaboliaan. Tutkimuksen aikana tai sen jälkeen ei havaittu selviä sivuvaikutuksia. Kuitenkin seerumin albumiinitaso laski merkittävästi ja BUN:n ja kreatiniinin tasot lisääntyivät hieman 500 mg:n bid-ryhmässä. 250 mg:n bid-ryhmässä seerumin albumiinitaso laski kohtalaisesti ja BUN:n taso lisääntyi hieman.

Uusi menetelmä kehitettiin sen osoittamiseksi, että oraalisesti annettu diflunisaali stabiloi seerumin TTR:ää denaturoitumisstressiä mukaan lukien amyloidoosia vastaan. Tämä menetelmä toimii sijaismerkkiaineena tunnistettaessa yhdisteitä, joiden täytyisi estää TTR:n virhelaskostumistaudit. Koehenkilöiden kokoseerumit altistettiin denaturoitumiselle joko lisäämällä ureaa (0–9 M) tai lisäämällä happoa (p 3,8–5,4). Koska TTR:n täytyy hajota denaturoituakseen, niin voidaan käyttää kvaternaarisia rakennemuutoksia laskostumisen purkautumislaajuuden seuraamiseksi (Hammarström et al, supra). Lisättiin glutaraldehydiä kaikkien proteiinien ristisitomiseksi seerumissa

denaturoitumistressille altistamisen jälkeen ja sen selvittämiseksi, mikä TTR-fraktio tavallisesti laskostetaan (tetrameeri vai dimeeri) verrattuna denaturoituun (monomeeri). Kokoseerumin SDS-PAGE erottaa ristisidotun TTR-tetrameerin ja -dimeerin (näiden edustaessa laskostunutta TTR:ää) monomeerista. Immunoblottaus tekee mahdolliseksi laskostetun TTR-määrän kvantitatiiviset vertailut. Polyklonaaliset vasta-aineet eivät sitoudu laskostumattomaan TTR-monomeeriin läheskään niin hyvin kuin laskostuneeseen TTR:äään, ja siksi on hyödyllisintä verrata tetrameeri- ja dimeerivyohekkeiden intensiteettiä diflunisaalin poissaollessa ja läsnäollessa. Tällä menetelmällä voidaan tutkia myös TTR-denaturaation diflunisaalieston aikariippuvuutta. Tämän prosessin tuskin havaittava aikariippuvuus diflunisaalin läsnäollessa tukee vahvasti kineettistä stabilointimekanismia (esimerkki 1), jolloin perustilan stabilointi diflunisaalin avulla saa tetrameerin hajoamiskynnyksen ylipääsemättömäksi. Diflunisaalin tehokkuus (250 mg bid) näissä denaturoitumisen aikakäyrissä on parempi kuin mitattu stoikiometria (0,8–1,2) antaisi olettaa, antaen lisätodisteita siitä, että immunosaostusmenetelmä aliarvioi todellisen sitoutumisstoikiometrian varsinkin sen ylittäessä arvon 1.

Tiedettäessä diflunisaalin sitoutumisstoikiometria-alue ihmisissä ja tarvittava diflunisaalipitoisuus näiden sitoutumisstoikiometrioiden jäljittelemiseksi koeputkessa on mahdollista suorittaa asiaan kuuluvat biofysikaaliset tutkimukset *in vitro* ja tutkia mekanismeja, jolla TTR·diflunisaali- ja TTR·diflunisaali₂-kompleksit estävät hajoamista ja amyloidoosia. Ureavälitteisen (6,5 M) hajoamisen nopeutta ja happovälitteisen (pH 4,4) amyloidifibrillimuodostuksen nopeutta tutkittiin diflunisaalipitoisuuden funktiona (5, 10, 20 ja 60 µM), mikä paljasti annoksesta riippuvan hidastumisen. Koska tetrameerin hajoaminen on amyloidifibrillimuodostuksen määräävä vaihe, niin siitä seuraa, että tetrameerin hajoamisnopeuksien ureassa täytyisi ennustaa happovälitteisen amyloidifibrillimuodostuksen laajuus. Diflunisaali on parempi amyloidoosin estämisessä kuin ureavälitteisen hajoamisen estämisessä, koska myös amyloidoosisissa tarvitaan pitoisuudesta riippuvaa uudelleenkoontia. On myös mahdollista, että diflunisaalin TTR-sitoutumiseen liittyvät K_{d1} ja K_{d2} ovat pienempiä hapossa kuin ureassa.

Yli 80 TTR-mutaatiota saavat yksilöt alttiiksi perinnölliselle amyloidoosille denaturaatioenergiamaaston sekvenssirippuvaisilla häiriöillä. Näistä V122I:n amyloidikertyminen johtaa suvuttaiseen amyloidikardiomyopatiaan (FAC:hen) 3–4 %:ssa afroamerikkalaisia, kun taas V30M on huomattava suvuittaisen amyloidipolyneuropatian (FAP:n) mutaatio. Diflunisaali estää sekä V122I- että V30M-amyloidogeneesiä annoksesta riippuvalla tavalla, mikä osoittaa tämän menettelytavan yleisyyden.

On erittäin toivottavaa kehittää yleinen, ei-invasiivinen terapeuttinen strategia TTR-amyloidoosin parantamiseksi. Tässä esitetyt tulokset viittaavat siihen, että diflunisaalin oraalinen antaminen voi hidastaa tetrameerin hajoamista sitoutumalla ei-amyloidogeeniseen natiiviin tilaan ja stabiloimalla se. Natiivin tilan stabilointi on erityisen puoleensavetävä strategia ottaen huomioon äskeiset raportit, että virhelaskostuneet oligomeerit eivätkä amyloidifibrillit aiheuttavat neurodegeneraatiota. Diflunisaalin kliininen käyttö (250–500 mg bid) nivelreumassa ja osteoartriitissa osoittaa sen alhaisen toksisuuden pitkäaikaisissa käytöissä. TTR:n puoliintumisaika seerumissa on 12–15 h, ja siksi kaksi päivittäistä annosta näyttää optimaaliselta ottaen huomioon diflunisaalin puoliintumisajan 8–10 h. Diflunisaalin täytyisi olla tehokas SSA:ta, FAC:tä ja FAP:tä vastaan, koska se sitoo sekä WT- että variantti-TTR:ää ja säättää kineettistä stabilointia sen ollessa samankaltainen mekanismille, jota hyödynnetään transsuppressorialayksiköiden inkluusiossa muutoin tautiin liittyvistä alayksiköistä koostuviin TTR-tetrameereihin ja jonka tiedetään parantavan ihmisellä esiintyvää sairautta. Diflunisaali voi olla vähemmän tehokas CNS-amyloidoosia vastaan, koska se ei pääse veri-aivoesteen lävitse, vaikka diflunisaalianalogeilla (esim. tässä kuvatulla analogilla) voi olla sellainen kyky.

Esimerkki 4: Hydroksyloidut polyklooribifenyyli sitovat selektiivisesti transtyretiiniä veressä ja estävät amyloidogeneesiä

Polyklooribifenyyli (PCB:t) ovat tunnettuja hajoamattomia ympäristösaasteita, joiden on raportoitu olevan toksisia jyrksijöille ja mahdollisesti ihmisille. Näiden yhdisteiden pitkäikäisyys ympäristössä johtuu niiden hitaasta hajoamisesta ja korkeasta lipofiilisyydestä, mikä tekee mahdolliseksi niiden bioakkumulaation ja rikastumisen niiden yletessä ravintoketjussa. Hydroksyloidut PCB:t (OH-PCB:t) ovat metaboliitteja, jotka muodostuvat PCB:iden hapettuessa P450-mono-oksigenaaseilla. Lopullista tietoa yksittäisten PCB-yhdisteiden toksisuudesta ihmisille on vaikeata löytää johtuen siitä tosiasiasta, että kaupallisesti saatavissa olevat PCB:t ovat yleensä seoksia, jotka sisältävät monia erilaisia isomeereja samoin kuin vähäisiä määriä tunnettuja toksiineja, esim. kloorattuja dibentsofuraaneja. Useiden puhdistettujen PCB:iden toksisuus on kuitenkin osoitettu laboratorioeläimissä. Näiden yhdisteiden antoon liittyy luukatoa, immunologista toksisuutta, neurotoksisuutta ja alentuneet kilpirauhashormonitasot OH-PCB:iden estrogeenisuuden lisäksi.

Lukuisat tutkimukset osoittavat, että PCB:t ja OH-PCB:t sitoutuvat transtyretiiniin (TTR:ään) *in vitro*. On viitattu siihen, että TTR on ihmisen veressä proteiinikohde, joka myötävaikuttaa OH-PCB:iden pysyvyyteen altistuneissa yksilöissä. Vaikka lukuisat raportit ehdottavat TTR:ää PCB:tä sitovaksi proteiiniksi *in vivo*, niin ehdotonta

5 todistusaineistoa PCB:iden sitoutumisesta transtyretiiniin plasmassa ei ole. Olemme kehittäneet immunosäostusmenetelmän, jota voidaan käyttää alarajan asettamiseksi pienien molekyylien TTR-sitoutumisstoikiometrialle biologisissa fluideissa. Tässä on arvioitu PCB:iden ja OH-PCB:iden TTR-sitoutumisstoikiometriä ihmisperäisen plasman TTR:ään.

10 Plasman TTR:n sekreetion jälkeinen amyloidogeneesi, joka tarvitsee tetrameerin määräävän hajoamisvaiheen, monomeerin virhelaskostumisen ja virhekoonnin, aiheuttaa putatiivisesti seniiliä systeemistä amyloidoosia, suvuittaista amyloidipolyneuropatiaa ja suvuittaista amyloidikardiopatiaa. Tässä on osoitettu useiden OH-PCB:iden sitoutuvan selektiivisesti TTR:ään ihmisen plasmassa ja estävän amyloidifibrillimuodostumista tetrameerin stabiloinnilla johtaen osoittaiseen tai täydelliseen natiivin tilan kineettiseen stabilointiin. Neljä tyypillistä TTR•(OH-PCB)₂-kompleksia karakterisoitiin röntgenkristallografialla sitoutumisen molekyyli-

15 amyloidogeneesistoaineiden suunnittelulle.

PCB:iden ja OH-PCB:iden sitoutumisselektiivisyys transtyretiiniin ihmisen veriplasmassa

20 Arvioitiin sitoutumisselektiivisyys kahdeksalla PCB:llä (yhdisteet 1–8, kuvio 5), joiden on raportoitu syrjäyttävän kilpirauhashormonin TTR:stä IC₅₀:llä alle 50 nM, ja neljällätoista OH-PCB:llä (yhdisteet 9–22, kuvio 6), tunnetuilla PCB-metaboliiteilla, joiden on raportoitu sitoutuvan TTR:ään tai alentavan tyroksiinitasoa hiirissä tai rotissa. PCB:n TTR-sitoutumisstoikiometrian plasmassa alarajat selvitettiin käyttämällä Sepharose-hartsin, joka oli sekoitettu PCB:llä tai OH-PCB:llä (10,8 µM) esikäsitellyn ihmisen veriplasman kanssa, kovalenttisesti liitettyjä polyklonaalisia TTR-

25 vasta-aineita. Pesun jälkeen PCB:n tai OH-PCB:n sitoutumisstoikiometriä TTR:ään (≈5 µM) arvioitiin käänteisfaasi-HPLC:llä.

30 Korkeintaan kaksi PCB:tä voi sitoutua kahteen identtiseen kilpirauhashormonia sitovaan kohtaan TTR-tetrameerissa. PCB:itä 1 ja 3 lukuunottamatta jäljelle jääneillä ei-hydroksyloiduilla PCB:illä oli suhteellisen alhainen sitoutumisselektiivisyys plasman TTR:ään (taulukko 4). Sen vastakohtana OH-PCB:t osoittivat hyvää erinomaiseen sitoutumisselektiivisyyttä plasman TTR:ään (taulukko 5). Useat hydroksyloiduista PCB:istä (esim. 16 ja 22) saavuttavat sitoutumisstoikiometrian 2. OH-PCB:iden sitoutumisselektiivisyys kokoveressä on hyvin samanlainen kuin plasmassa havaittu, ja siten erytrosyyttikalvot eivät merkittävästi takavarikoi tutkittuja OH-PCB:itä.

Taulukko 4: PCB:iden sitoutumisstoikiometria TTR:ään ihmisen veriplasmassa

Yh- diste	Sitoutuneita ekvivalentteja
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	Ei sitoutumista
8	Ei sitoutumista

Taulukko 5: Hydroksyloitujen PCB:iden sitoutumisstoikiometria TTR:ään ihmisen veriplasmassa

Yh- diste	Ekvivalentteja sitoutunut (Plasma)	Ekvivalentteja sitoutunut (Veri)
16	1,86 ± 0,14	ND
22	1,67 ± 0,40	1,69
17	1,63 ± 0,05	ND
19	1,48 ± 0,16	1,55
21	1,40 ± 0,22	1,33
18	1,36 ± 0,21	ND
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

- 5 TTR•PCB-kompleksin vasta-ainesieppauksella on potentiaalia aliarvioida PCB:n sitoutumisstoikiometria johtuen PCB:n irtoamisesta TTR:stä 5 pesuvaiheen aikana. PCB:itä ja OH-PCB:itä (10,8 µM) inkuboitii rekombinantti-TTR:llä (3,6 µM) immobilisoituun TTR:ään sitoutuneen pienen molekyylin stoikiometrian arvioimiseksi jokaisen pesuvaiheen jälkeen. PCB:n 2 ja OH-PCB:n 18 stoikiometria laski 10–17

%:lla 5 pesun jälkeen, kun taas PCB-4:n laski 45 %. Pesuun liittyvien hävikkien kvantitointi tekee mahdolliskesi arvioida PCB:iden ja OH-PCB:iden todellinen sitoutumisstoikiometria plasmassa. Lisäksi plasmassa rekombinantti-TTR:ään sitoutuneen OH-PCB:n lopullisen stoikiometrian ja TTR:ään sitoutuneen määrän välinen hyvä
 5 korrelaatio osoittaa, että yhdiste on erittäin selektiivinen TTR-sitoja plasmassa, esim. PH-PCB 18. Sen vastakohtana PCB:t 2 ja 4 esittävät suurempaa sitoutumisstoikiometriaa TTR:ään puskurissa kuin plasmassa, mikä viittaa vahvasti siihen, että ne sitoutuvat plasmassa sekä kilpailevaan proteiiniin (kilpaileviin proteiineihin) että TTR:ään.

10 TTR-amyloidifibrilliesto hydroksyloiduilla PCB:illä

OH-PCB:iden ja PCB-3:n kyky estää TTR-fibrillimuodostusta *in vitro* arvioitiin, koska nämä yhdisteet esittävät veressä hyvää sitoutumisselektiivisyyttä TTR:ään. Maksasta vereen erittyvä TTR näyttää olevan systeemisen TTR-amyloidin lähde. Vaikka vielä ei ole selvillä, missä ja miten amyloidi muodostuu ihmisissä, niin tyy-
 15 pillinen denaturoiva aine soluissa on happo, joka on tehokas lähes kaikkien amyloidogeenisten peptidien ja proteiinien muuttamisessa amyloidiksi ja/tai vastaaviksi aggregaateiksi. PCB:iden tehokkuutta estoaineina seurattiin siis tarkkailemalla turbiditeetin avulla happovälitteistä (pH 4,4) fibrillimuodostusta. Hydroksyloidut PCB:t ja PCB 3 olivat erittäin tehokkaita TTR-fibrilliestoaineita. WT-TTR:n pitoisuutta vastaavalla estoainepitoisuudella (3,6 µM) havaittiin vain 12–50 % normaalista fibrilli-
 20 muodostusmäärästä 72 h:n inkubaatiojakson jälkeen. Tämä aktiivisuus vastaa tähän mennessä löydettyjen parhaiden fibrilliestoaineiden esittämää aktiivisuutta, kuten flufenaamihapon (Flu), joka sisällytettiin positiivisena kontrollina.

OH-PCB 18:n sitoutuminen TTR:ään

Edeltävät massaspektrometrikokeet viittaavat siihen, että OH-PCB 18 esittää positiivista sitomisen yhteistoiminnallisuutta TTR:n kahdelle C2:een liittyvälle kilpirauhashormonia sitovalle kohdalle. Kun TTR:ään lisätään melkein stoikiometriset (< 1:1) määrät 18:aa, niin massaspektrometrissa havaitut vallitsevat lajit ovat apo-TTR- ja TTR•18₂-kompleksi, mikä pitää yhtä positiivisen yhteistoimintasitomisen kanssa.
 30 18:n TTR:ää sitovat ominaisuudet ovat ristiriidassa negatiivisella yhteistoiminnalla sitoutuvien lukuisien muiden TTR-amyloidifibrillimuodostuksen estoaineiden kanssa. Fysiologisissa olosuhteissa tehdyt isotermitiset titrauskalorimetriatutkimukset tuovat esiin sen, että OH-PCB:n 18 sitoutuminen WT-TTR:ään sopii parhaiten malliin, jossa hajoamisvakiot ovat identtisiä K_d:itä (3,2 ± 1,8 nM). Tämä tulos ei osoita
 35 vääräksi positiivista yhteistoimintasitomista, koska TTR-pitoisuutta ei saada riittävän

pieneksi positiivisen yhteistoiminnan tutkimiselle riittämättömän lämmön vapautumisen vuoksi. Yritykset sovittaa kerätyt tiedot positiivisesti tai negatiivisesti yhteistoiminnallisen sitomisen malleihin tuotti heikkoja yhteensopivuuksia.

OH-PCB:iden 12, 16, 17 ja 18 sekakiderakenteet

5 WT-TTR:ään sitoutuneet OH-PCB:iden 12, 16, 17 ja 18 kiteet saatiin liottamalla TTR-kiteitä 10-kertaisella estoaineylimäärällä neljä viikkoa. Sen jälkeen ratkaistiin jokaisen komplekseista röntgenrakenteet. TTR-dimeeri kiteen epäsymmetrisessä yksikössä muodostaa puolet kahdesta ligandia sitovasta taskusta. Koska kumpikin sidoskohta on puolitetty samalla kaksinkertaisella symmetria-akselilla, niin tavallisesti
10 estoaineilla havaitaan kaksi symmetrialtaan ekvivalenttia sitovaa mallia. Kukin TTR:ää sitova kohta voidaan puolittaa sisä- ja ulko-onteloihin. Näissä onteloissa on kolme niin kutsuttua halogeenia sitovaa taskua (HPB:t), koska ne ovat jodien valtaamia tyrokseen kahdella aromaattisella renkaalla. HBP-3 ja -3' sijaitsevat syvällä sitovassa sisäontelossa, HBP-2 ja -2' rajaavat sitovan sisä- ja ulko-ontelon välisen rajapinnan, kun taas HBP-1 ja -1' sijaitsevat sitovan ulko-ontelon reunan tuntumassa.
15 Sekakiderakenteet paljastivat, että OH-PCB:n kaksi aromaattista rengasta yhdistävä C–C-sidos on asettunut melkein keskelle 2-kertaista symmetria-akselia antaen vaikutelman yhdestä sidoskonformaatiosta. Fenyylirenkaiden välinen diedrikulma on 59° yhdisteillä 12, 37° sekä yhdisteellä 16 että 17, ja 44° yhdisteellä 18. OH-PCB:istä
20 kaikki valtaavat samanlaiset asemat sitovissa sisä- ja ulkotaskuissa. Biaryylirengasjärjestelmän van der Waals -komplimentaarisuus helpottaa useita alayksikköjen välisiä vuorovaikutuksia, joka koskee kummankin sitovan kohdan muodostavia tähteitä X, Y ja Z toisessa alayksikössä ja tähteitä n', m' ja o' toisessa alayksikössä. Useat fenyylirenkaan substituentteista ovat akselin ulkopuolella ja voidaan mallintaa moniin
25 asemiin havaitussa elektronitiheydessä.

TTR:ään sitoutunut OH-PCB 18

TTR•18₂-kompleksin 1,8 Å:n röntgenrakenne osoittaa, että estoaineella on erinomainen steerinen komplementaarisuus TTR:n sitovan kohdan kanssa. Molekyylimekaniikka (Insight II, Accelrys) osoittaa, että 18:n sitoutumaton konformaatio muistuttaa
30 läheisesti sen sitoutunutta rakennetta. Tarkka rakenne rajaa suorat ja vesivälitteiset elektrostaattiset vuorovaikutukset, jotka myötävaikuttavat 18:n korkean affiniteetin sitoutumiseen. Toinen substituentteilla 3-Cl, 4-OH, 5-Cl identtisesti substituoiduista aromaattisista renkaista valtaa sitovan sisätaskun sen kloorisubstituenttien työntyessä HPB-3:een ja -3':uun. Ser117:n ja Thr119:n sivuketjut omaksuvat vaihtoehtoisen
35 konformaation kiertäessään niiden Cα–Cβ-sidosten ympäri esijännitteettömien

- elektronitiheyskarttojen osoittamalla tavalla. Ser117:n sivuketju omaksuu kaikki kolme rotomeerikonformaatiota elektronitiheysjakaman osoittamalla tavalla. Kiinnostavaa kyllä, kaksi vesimolekyyliä sijaitsevat vierekkäisten Ser117-tähteiden välissä kaksinkertaisella akselilla 50 %:n tilanvarauksella ja helpottavat Ser117-tähteitä,
- 5 läheisiä vesimolekyyliä ja 18:n fenolifunktionaalisuutta yhdistävien vetysidosten verkkoa. Rakenteen tarkastelu ei paljasta miksi 18 sitoutuu ei- tai positiivisesti yhteistoiminnallisella tavalla. Toinen identtisesti substituoitunut rengas varaa TTR:n sitovan ulkotaskun sen halogeenien työntyessä HPB:ihin 1 ja 1'.

TTR:ään sitoutunut yhdiste 16

- 10 Kolmella substituentilla 3-Cl, 4-OH, 5-Cl substituoitunut 16:n fenolirengas on suuntautunut TTR:n sitovaan sisäkohtaan tehden samat elektrostaattiset ja hydrofobiset vuorovaikutukset TTR:n kanssa kuin tämä rengas tekee edellä kuvatussa TTR•18₂-rakenteessa. 3,4-dikloorattu aromaattinen rengas varaa sitovan ulkotaskun halogeeni suunnattuna HPB:ihin 1 tai -1' riippuen tarkasteltavana olevasta symmetriaekvivalentista sitovasta muodosta. 16:n elektronitiheys kuten OH-PCB:n 18 on symmetrinen
- 15 eikä para-OH:ta ja para-Cl:ää siis ole mahdollista asettaa paikalleen yksiselitteisesti elektronitiheyskartan perusteella. Esijännitteetön elektronitiheyskartta on yhtäpitävä Ser117:n kolmen rotomeerikonformaation kanssa ja sisältää TTR•18₂-rakennetta vastaavat kaksi vesimolekyyliä Ser117-tähteiden välissä.

20 TTR:ään sitoutunut OH-PCB 17

- Estoaine 17 sitoutuu 3-Cl-, 4-OH-, 5-Cl-substituoituun aryyliirenkaseen, joka on suuntautunut sitovaan sisätaskuun käyttäen samoja vuorovaikutuksia kuin mitä tämä rengas käyttää edellä kuvatuissa TTR•16₂- ja TTR•18₂-rakenteissa. 2,3,4-trikloorattu rengas varaa sitovan ulkotaskun käyttäen vuorovaikutuksia HBP-1:n, HBP-1':n,
- 25 HBP-2:n, HBP-2':n kanssa kahdessa symmetriaekvivalentissa sitovassa mallissa. Ser117:n monet konformaatiot ja kaksi suojattua vesimolekyyliä ovat myös TTR•17₂-rakenteen ominaisuuksia. Thr119:n sivuketjun konformaatiomuutos oli ilmeinen esijännitteettömien elektronitiheyskarttojen perusteella.

TTR:ään sitoutunut yhdiste 12

- 30 Biaryyli 12 asettaa sen 3-Cl-, 4-OH-substituoidun aryyliirenkansa sitovaan ulkotaskuun kahden kloorin vuorovaikuttaessa HBP-1:n ja -1':n kanssa. Vastakohtana TTR•16₂- ja TTR•17₂-rakenteille, joissa fenoli sijaitsee sitovassa sisätaskussa. Hydroksyyli ryhmä (todennäköisesti ionisoidussa muodossa) on vetysidosetäisyydellä Lys15:n sivuketjuista. Tetrakloorattu rengas on sijoitettu sitovaan sisätaskuun, jolloin

halogeenit suuntautuvat sekä HBP:ihin 2 ja 2' että 3 ja 3'. Ser117- ja Thr119-sivuketjut omaksuvat konformaatiot, jotka ovat identtisiä apo-TTR-rakenteessa havaituille toisin kuin tilanne on yhdisteiden 16, 17 ja 18 kohdalla.

Tässä 8 PCB:stä, joiden on aikaisemmin kerrottu syrjäyttävän T4:n IC₅₀:llä alle 50 nM, vain 1:n ja 3:n osoitettiin sitoutuvan TTR:ään havaittavalla stoikiometrialla ihmisen plasmassa. Sen vastakohtana kaikki neljätoista O-PCB:tä, joiden on aikaisemmin kerrottu sitoutuvan TTR:ään, osoittivat merkittävää sitomisselektiivisyyttä TTR:ään plasmassa. Tämä on yhtäpitävä sen havainnon kanssa, että OH-PCB:itä havaitaan etupäässä plasmassa, ja näyttävät pidättyneen siihen selektiivisesti eivätkä lipideihin ja joihinkin muihin kudoksiin, joihin PCB:t tavallisesti kasautuvat. OH-PCB:t sitoutuvat selektiivisesti myös TTR:n kokoveressä, mikä on yhtäpitävä sen idean kanssa, että ne eivät jakaudu lipidikalvoihin.

Rekombinantti-WT-TTR:ää käyttämällä arvioitiin se PCB:n (OH-PCB:n) määrä, joka pesee pois vasta-aine•TTR•PCB-kompleksin pesuvaiheiden aikana. Pesuun liittyvän PCB-hajoamisen laajuus on molekyyllispesifinen. Joillakin yhdisteillä on pesujen jälkeen korkea sitomisstokiommetria, mikä on yhtäpitävä merkittävän alkuvaiheen sitoutumisen ja alhaisten pesuhävikkien kanssa ja merkitsee hidasta hajoamisnopeutta. Alhaisen sitoutumisstokiommetrian yhdisteet jaetaan ainakin kahteen kategoriaan: korkea alkuvaiheen sitoutumisstokiommetria merkittävillä pesuhävikkeillä tai alhainen alkuvaiheen sitoutumisstokiommetria ilman merkittäviä pesuhävikkejä, jälkimmäisen sopiessa yhdisteisiin, jotka sitoutuvat TTR:ään korkealla affiniteetillä mutta vielä korkeammalla affiniteetillä johonkin toiseen plasmaproteiiniin (joihinkin muihin plasmaproteiineihin). PCB:t 2 ja 4 esittävät kumpikin alhaista pesunjälkeistä sitoutumisstokiommetriaa rekombinantti-TTR:ään. Neljäkymmentäviisi % PCB:stä 4 hävisi pesuista johtuen, kun taas PCB:n 2 sitoutumisstokiommetria on alkuvaiheessa heikko pesuhävikkien ollessa minimaalisia (10 %). Pesunjälkeiset selektiivisyysarvot kuvastavat plasmaan aluksi sitoutuneen PCB-määrän alarajaa. PCB-18:n kaltaisilla yhdisteillä, joilla on korkea pesunjälkeinen sitoutumisstokiommetria, täytyy olla korkea sitoutumisaffiniteetti ja -selektiivisyys, mikä on yhtäpitävä havaitun hitaan hajoamisnopeuden kanssa.

Sen lisäksi, että OH-PCB:llä ja PCB-3:lla on korkea sitoutumisselektiivisyys plasman TTR:ään, ne esittävät erinomaista TTR-fibrillimuodostuksen estoa *in vitro*. Estoaineiden 14, 15 ja 18 tehokkuus on tähän mennessä havaituista korkeimpien joukossa ekvimolaarisella estoaineen ja TTR:n pitoisuudella (3,6 µM). Tämä johtuu todennäköisesti niiden korkeasta sitoutumisaffiniteetista (myös yhtäpitävä niiden alhaisen hajoamisnopeuden kanssa) ja niiden epätavallisista ei- tai positiivisesti

yhteistoiminnallisista TTR:ää sitovista ominaisuuksista. Parhaan estoaineen, OH-PCB-18:n, $nM\text{-}K_d$:t sanelevat sen, että TTR:n natiivi tila tulee stabiloiduksi > 3 kcal:lla/mol. Perustilan stabilointi nostaa huomattavasti tetrameerihajoamisen kyn-
 5 nystä (määrävä vaihe TTR-amyloidogeenisissä), niin että tetrameeri ei pysty hajoa-
 maan biologisesti merkityksellisellä aikavälillä. Natiivin ei-amyloidogeenisen tilan
 kineettinen stabilointi 18:n sitoutuessa perustilaan varmistettiin dramaattisesti hidas-
 tettuna tetrameerihajoamisena 6 M ureassa ja hitaana amyloidogeenisuutena pH:ssa
 4,4. OH-PCB-18:n (3,6 μM) uskotaan olevan vaikuttava amyloidiestoaine, koska se
 on tetrameerisen TTR:n erinomainen kineettinen stabilointiaine, i.e. se estää 3,6 μM
 10 TTR-näytteestä 2/3:n amyloidogeenisuudn pH:lla 4,4, sillä TTR•18 ja TTR•18₂ eivät
 pysty muodostamaan amyloidia, jäljelle jäänyt TTR (1,18 μM) muodostaa amyloidia
 hyvin tehottomasti sen alhaisen pitoisuuden vuoksi. Parhaiden OH-PCB-estoaineiden
 hajoamisnopeudet voivat myös olla odotettua hitaampia johtuen TTR:n rakenteelli-
 sesta anniilauksesta OH-PCB:n ympärillä, mutta tätä ei ole vielä arvioitu niin huolel-
 15 lisesti kuin on tarpeen. Vähimmillään nämä yhdisteet ohjaavat poikkeuksellisten es-
 toaineiden synteesiä tai voivat itse osoittautua käyttökelpoisiksi estoaineiksi riippuen
 niiden toksisuusprofiilista.

OH-PCB:ihin 12, 16, 17 ja 18 sitoutuneen TTR:n rakennetiedot tuovat esiin, että
 nämä biaryylit sitoutuvat yleensä kiteen kaksinkertaista symmetria-akselia pitkin.
 20 Kahden renkaan välinen diedrikulma on $-40\text{--}60^\circ$ ja tekee mahdolliseksi kahdella vie-
 reisellä alayksiköllä halogeenia sitovien taskujen (HBP:iden) samanaikaisen varaa-
 misen johtaen tetrameerin rakenteeltaan kvaternaarisen liittymäpinnan stabiloitumi-
 seen. Hydroksyloidulla PCB-18:lla on optimaalinen rakenteellinen komplementaari-
 suus TTR:n kanssa, koska sen kloorit pystyvät sitoutumaan samanaikaisesti sekä
 25 HBP:ihin 1 ja 1' että 3 ja 3'. Näin ei ole asianlaita yhdisteiden 16 ja 17 kanssa niiden
 tarvitessa kummankin symmetriaekvivalentin sitomismallin huomioonottamista ulot-
 taakseen kloorit HBP:ihin 1, 1', 3 ja 3'.

Fenolirenkaan orientaatio sitovaan sisätaskuun näyttää esittävän tärkeää osaa siksi,
 että se sallii vesivälitteisen vetysidosverkon muodostuvan sen ja viereisten TTR-
 30 alayksikköjen välille, mikä oletettavasti edelleen stabiloii TTR:n natiivia kvaterna-
 aaria rakennetta. Ser117:n kolme lomittaista konformaatiota, estoaineen fenoliryhmän
 ja kaksi suojattua vesimolekyyliä käsittävä H-sidosverkko luo elektrostaattisen ver-
 kon, joka yhdistää PCB:n sitomiskohdan muodostavat kaksi alayksikköä. Kaikissa
 kolmessa rakenteessa Thr119 varaa myös monia rotomeerikonformaatioita. Sen vas-
 35 takohtana tämä elektrostaattisten vuorovaikutusten verkko ei esiinny 12₂•TTR-

kompleksissa, jossa hydroksyyli-substituoitu fenyylirengas on orientoitunut sitovaan ulkotaskuun ja jossa Ser-117 ja Thr-119 omaksuvat apo-sivuketjukoformaatiot.

OH-PCB:iden toksisuutta ei ole paljon selvitetty kirjallisuudessa. Monenlaisissa *in vitro*- ja eläintutkimuksissa OH-PCB:t näyttävät olevan joko lievästi estrogeenisia tai anti-estrogeenisia. Joitakin muita toksisuusmekanismeja on ehdotettu ja on myös raportoitu alentuneista kilpirauhashormonitasoista näille yhdisteille altistuneissa eläimissä. On vaikeata suoraan tukea sitä esitystä, että OH-PCB:n sitoutuminen TTR:ään alentaa T4-tasoa ja että alentuneet T4-tasot kuvaavat pienen molekyylin TTR:ään sitoutumista. Koska albumiini kuljettaa noin puolet T4:stä, niin T4:n syrjäyttäminen albumiinin sidospaikoista näyttää todennäköisemmältä syytä alentuneisiin T4-tasoihin PCB:ille altistuneissa yksilöissä. Tyroksiinia sitovalla globuliinilla on korkein tyroksiiniaffiniteetti ja se on ihmisissä tärkein kuljettaa mutta sitä ei esiinny monissa alemmissa nisäkkäissä mukaan lukien rotissa ja hiirissä, joissa on tutkittu monia näiden yhdisteiden toksikologisista profiileista. Näissä lajeissa on siten todennäköisempää, että TTR:ään sitoutuvilla yhdisteillä on vaikutus kokonaissitoutumiseen ja T4:n kuljetukseen. PCB:iden sitoutumisen TBG:hen osoittavat tiedot viittaavat niukkaan vuorovaikutukseen lukuunottamatta yhtä tai kahta heikosti sitoutuvaa yhdistettä. Siksi OH-PCB:iden vaikutuksen ihmisen kilpirauhasosoihin täytyisi olla minimaalinen, elleivät ne sitoudu albumiiniin. Näiden yhdisteiden on myös raportoitu häiritsevän kilpirauhashormonin aktivaatiota tai lisäävän T4:n sulfaationopeutta ja siis inaktivaatiota. OH-PCB:t voisivat sitoutua myös joihinkin muihin kilpirauhashormonikohteisiin, mukaan lukien kilpirauhashormonireseptoreihin, mikä näyttää järkevältä ottaen huomioon rakenteellinen vastaavuus T4:n kanssa.

On selvä, että vain vähän on osoitettu todeksi hydroksyloitujen PCB:iden toksisuuden suhteen, varsinkin ihmisissä. Jyrsijöissä toksikologian odotetaan olevan vakavampi johtuen TTR:n roolista primaarina kilpirauhashormonikuljettajana. Se on kuitenkin selvä, että hydroksyloituilla PCB:illä on erinomainen aktiivisuus transtyretiinin fibrillimuodostuksen estoaineina, mikä viittaa siihen, että tällä yhdisteryhmällä on potentiaalia olla käyttökelpoisia amyloidifibrillimuodostuksen estoaineita.

30 Materiaalit ja menetelmät

Transtyretiinivasta-aineen puhdistaminen ja konjugointi Sepharoseen

Vasta-aineet valmistettiin, puhdistettiin ja kytkettiin Sepharoseen. Hartsia säilytettiin 1:1-lietteenä TSA:ssa (10 mM Tris, pH 8,0 / 140 mM NaCl / 0,025 % NaN₃). Lisäksi

valmistettiin sammutettu Sepharose kytkemällä hartsiin vasta-aineen sijasta 200 mM Tris, pH 8,0.

Ihmisperäisen plasman valmistaminen

- Kokoveri otettiin terveistä vapaaehtoisista Scripps General Clinical Research Centerin
- 5 normaalilla verenotto-ohjelmalla ja siirrettiin 50 ml:n kartioputkiin. Putkia sentrifugoitiin kierrosnopeudella 3000 rpm (1730 x g) Sorvallin RT7-pöytäseentrifugissa, joka oli varustettu kääntösiipiroottorilla, 10 min 25 °C:ssa. Plasman supernatantti otettiin erilleen ja sentrifugoitiin uudestaan 3000 rpm:llä 10 min jäljelle jääneiden solujen poistamiseksi. Lisättiin natriumatsidia, jolloin saatiin 0,05-prosenttinen liuos.
- 10 Plasmaa säilytettiin 4 °C:ssa ennen käyttöönottoa.

Transtyretiinin ja sitoutuneiden PCB:iden immunosaostus

- 2 ml:n eppendorffputki täytettiin 1,5 ml:lla ihmisen veriplasmaa ja 7,5 µl:lla arvioitava olevan PCB:n 2,16 mM DMSO-liuosta Tätä liuosta inkuboitiin 37 °C:ssa 24 h. Liuokseen lisättiin sammutetun Sepharosen 1:1-suhteessa oleva hartsi:TSA-liete
- 15 (187 µl) ja ravisteltiin varovasti 4 °C:ssa 1 tunti. Liuosta sentrifugoitiin (16 000 x g) ja supernatantti jaettiin 3 alikvoottiin jokaisen ollessa 400 µl. Näistä jokainen lisättiin 200 µl:aan 1:1-suhteessa olevaan transtyretiinivasta-ainekonjugoituu Sepharoseen hartsi/TSA-lietteeseen ja ravisteltiin hitaasti 4 °C:ssa 20 min. Näytteet sentrifugoitiin (16 000 x g) ja supernatantti poistettiin. Hartsi pestiin 1 ml:lla TSA/0,05 % saponiini
- 20 (Acros) -liuosta (3 x 10 min)) 4 °C:ssa ja lisäksi 1 ml:lla TSA:ta (2 x 10 min) 4 °C:ssa. Näytteet sentrifugoitiin (16 000 x g), lopullinen pesuvesi poistettiin ja lisättiin 155 µl 100 mM trietyyliamiinia, pH 11,5 TTR:n ja sitoutuneiden pienten molekyylien eluoimiseksi vasta-aineista. Varovaisen 30 minuuttia jatkuneen ravistelun jälkeen 4 °C:ssa näytteet sentrifugoitiin (16 000 x g) ja 145 µl TTR:n ja estoaineen
- 25 sisältävää supernatanttia poistettiin.

Transtyretiinin ja sitoutuneiden PCB:iden HPLC-analyysi ja kvantitointi

- TTR-vasta-ainehelmistä peräisin olevat supernatanttieluutionäytteet (145 µl) ladattiin Watersin automaattiseen 71P-näytteenottimeen. 135 µl:n injektio kutakin näytettä erotettiin Keystonen 3 cm:n C18-käänteisfaasikolonnilla käyttämällä 40–100 %
- 30 B -gradienttia 8 minuutissa (A: 94,8 % H₂O / 5 % asetonitrili / 0,2 % TFA; B: 94,8 % asetonitriliä / 5 % H₂O / 0,2 % TFA) Watersin 600E-moniliuotinsyöttöjärjestelmällä. Detektio tehtiin 280 nm:ssä Watersin säädettävällä 486-absorbanssidetektorilla ja piikit integroitiin, jolloin saatiin sekä TTR:n että pienen molekyylin pinta-ala. Kunkin lajin määrän määrittämiseksi HPLC:hen injektioitiin tunnettuja määriä

tetrameerista TTR:ää tai PCB:tä. Piikit integroitiin kalibrointikäyrien luomiseksi tietojen lineaarisista regressioista Kaleidagraphilla (Synergy Software). Plasmanäytteessä esiintyvien kunkin lajin moolien lukumäärä määritettiin kalibrointikäyristä. Pienen molekyylin suhde proteiiniin laskettiin, jolloin saatiin TTR:ään plasmassa sitoutuneen pienen molekyylin stoikiometria.

Transtyretiinin amyloidifibrillimuodostuksen analyysi

Yhdisteet liuotettiin DMSO:hon pitoisuutena 720 μM . 5 μl arvioitavana olevan yhdisteen liuosta lisättiin 0,5 ml:aan 7,2 μM TTR-liuosta 10 mM fosfaatissa, pH 7,6, 100 mM KCl, 1 mM EDTA-puskuri, ja yhdisteen annettiin inkuboitua TTR:n kanssa 30 min. Lisättiin 495 μl 0,2 mM asetaattia pH:lla 4,2, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, jolloin proteiinin ja estoaineen lopullisiksi pitoisuuksiksi saatiin 3,6 μM kumpaakin ja pH:ksi 4,4. Sitten seosta inkuboitiin 37 °C:ssa 72 h, minkä jälkeen putkia vorteksoitiin 3 s ja optinen tiheys mitattiin 400 nm:ssä. Fibrillimuodostuksen laajuus määritettiin normalisoimalla kukin optinen tiheys TTR:n avulla ilman estoainetta, joka oli määritetty 100 %:n fibrillimuodostukseksi. Myös testattiin kunkin yhdisteen kontrolliliuokset TTR:n poissaollessa eikä yksikään absorboinut havaittavasti 400 nm:ssä.

PCB-18:n ja TTR:n isoterminen titrauskalorimetria

Yhdisteen 18 25 μM liuos (10 mM fosfaatissa, pH 7,6, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 8 % DMSO) titrattiin 1,2 μM TTR-liuokseen identtisessä puskurissa käyttämällä Microcalin isotermistä MCS-titrauskalorimetria (Microcal, Northampton, MA). Ensimmäistä 2 μl :n injeksiota seurasi 25 10 μl :n injeksiota 25 °C:ssa. Termogrammi integroitiin ja nollanäyte vähennettiin, jolloin saatiin sitomisisotermi, joka sopi parhaiten kahden identtisen sitomiskohdan malliin käyttämällä ITC-tietoanalyysipakettia ORIGIN 5.0:ssa (Microcal).

Kiteytys ja röntgentietojen keruu

Rekombinantti-TTR-kiteet saatiin 5 mg/ml-pitoisista proteiiniliuoksista (liuoksessa 100 mM KCl, 100 mM EDTA, pH 7,4, 1mM natriumfosfaattia) tasapainotettuna 2 M ammoniumsulfaattia vastaan riippuva pisara -kokeissa. TTR•ligandi-kompleksit valmistettiin kiteistä, joita oli liotettu 2 viikkoa 10-kertaisella mooliylimäärällä ligandia kummankin sitoutumiskohdan täydellisen kyllästymisen varmistamiseksi. Liotusaineena käytettiin asetoni:vesi-liuosta 1:1. Tiedot kerättiin pyörivän RU200-anodin röntgengeneraattoriin kytkettyä DIP2030b-kuvantamislevyjärjestelmällä (MAC Science, Yokohama, Japani). Kiteet laitettiin kryosuojaa-aineena toimivaan paratoniöljyyn ja jäähdytettiin 120 K:hon diffraktiokokeita varten. TTR•ligandikompleksin

kiteet ovat isomorfisia apo-kidemuodolla yksikkökoppimitoilla $a = 43 \text{ \AA}$, $b = 86 \text{ \AA}$ ja $c = 65 \text{ \AA}$. Ne kuuluvat avaruusryhmyykseen $P2_12_12$ ja sisältävät puolet homotetrameerista epäsymmetrisessä yksikössä. Tiedot redusointiin DENZO:lla ja SCALEPACK:lla.

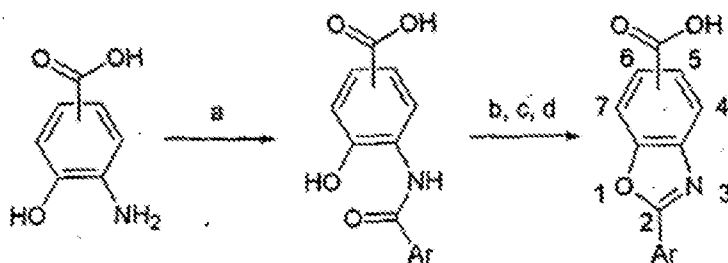
5 Rakenteen määrittäminen ja hienosäätö

Proteiinitietopankista (talletusnumero 1BMZ) saatuja TTR:n proteiinin atomikoordinaatteja käytettiin lähtömallina natiivin TTR:n ja TTR-ligandikompleksien hienosäädössä molekyyldynamiikkaa ja energianminimointia käyttävällä CNS-ohjelmalla. Kartat laskettiin joko PCB:illä liotetuilla tai samanaikaisesti kiteytetyillä TTR-kiteillä kerätyistä diffraktiotiedoista. TTR-komplekseille PCB:iden kanssa saadut kartat toivat esiin ligandin likimääräiset sijainnit TTR-tetrameerin kummassakin sidostaskussa piikinkorkeuksilla yli 5–9 r.m.s. Pienen molekyylin elektronitiheyden edelleen parantamiseksi ja mallin esijännitteen poistamiseksi mallille tehtiin useita jaksoja warp/shake-käytäntöjä, jotka saivat aikaan kartan huomattavan parantumisen erityisesti estoaineen ympäriltä. Senjälkeinen mallin sovittaminen tehtiin näillä kartoilla ja ligandimolekyyli sijoitettiin tiheyteen. Kaikissa kolmessa tapauksessa InsightII-ohjelmalla (Accelrys) laskettu estoaineen minimienergiakonformaatio piti hyvin yhtä kartan kanssa. Sitovaa kanavaa pitkin kulkevan 2-kertaisen kidesymmetria-akselin vuoksi täytyy soveltaa tilastollista häiriömallia, mikä sai aikaan kaksi ligandia sitovaa mallia kummassakin tetrameerisen TTR:n kahdesta sitovasta kohdasta. Vesimolekyylit lisättiin esijännitteettömän elektronitiheyskartan perusteella. Koska lopullisesta kartasta puuttuivat tulkittavissa olevat elektronitiheydet, niin lopulliseen malliin ei sisällytetty yhdeksää N-terminaalista eikä kolmea C-terminaalista tähdettä.

Esimerkki 5: Bentsoksatsolit transtyretiiniamyloidifibrillien estoaineina

Transtyretiinin kaksi tyroksiinia sitovaa kohtaa luodaan sen kvaternaarisen rakenteen liittymäpinnan avulla. Tetrameeri voidaan stabiloida sitomalla näihin kohtiin pieni molekyyli, joka potentiaalisesti tarjoaa keinon hoitaa TTR-amyloiditautia pienillä molekyyllilääkkeillä. On löydetty monia yhdisteperheitä, joiden sitominen stabiloi tetrameerista perustilaa pienen molekyylin dissosiaatiovakioita K_{d1} ja K_{d2} vastaavassa määrin. Tämä myös tehokkaasti kasvattaa dissosiaatiivista aktivoitumiskynnystä ja inhiboi amyloidoosia stabiloimalla kineettisesti. Ne estoaineet koostuvat tavallisesti kahdesta aromaattisesta renkaasta, joista toisessa on halogeenisubstituentit ja toisessa hydrofiiliset substituentit. Karboksyylihapolla substituoidut bentsoksatsolit hiilissä C(4)–C(7) ja halogenoitu fenyylirengas hiilessä C(2) näyttivät myös täydentävän tyroksiinia sitovaa TTR-kohtaa. Siksi näitä yhdisteitä valmistettiin pieni kirjasto

dehydro sykli soimalla N-asyyliami nohydroksibentsoehapot kaaviossa 1 kuvatulla tavalla.



Kaavio 1: Bentsoksatsolien yleinen synteesi

- 5 Reagenssit: (a) ArCOCl , THF, pyridiini (Ar = fenyyli, 3,5-difluorifenyyli, 2,6-difluorifenyyli, 3,5-dikloorifenyyli, 2,6-dikloorifenyyli, 2-(trifluorimetyyli)fenyyli ja 3-(trifluorimetyyli)fenyyli); (b) $\text{TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$, refluksioivat ksyleenit; (c) TMSCHN_2 , bentseeni, MeOH; (d) LiOH, THF, MeOH, H_2O (8–27 % saanto 4 vaiheen jälkeen).

- 10 Bentsoksatsolit arvioitiin käyttämällä analyysisarjaa lisääntyvällä tiukkuudella. WT-TTR:ää (3,6 μM) inkuboitiin 30 min (pH 7, 37 °C) testiyhdisteellä (7,2 μM). Koska ainakin yhden testiyhdistemolekyylin täytyy sitoa TTR-tetrameerin jokaista molekyyliä pystyäkseen stabiloimaan sen, niin testiyhdistepitoisuus 7,2 μM on vain kaksinkertainen pienimpään tehokkaaseen pitoisuuteen nähden. Sitten pH säädettiin 4,4:ksi, fibrillien muodostumista ajatellen optimaaliseksi pH:ksi. 72 h:n kuluttua
- 15 muodostetun amyloidin määrä (37 °C) testiyhdisteen läsnäollessa määritettiin turbiditeetista 400 nm:ssä ja on ilmaistu prosentuaalisena fibrillimuodostuksena (ff), 100 %:n ollessa pelkästään TTR:llä muodostettu määrä. 28 testatusta yhdisteestä 11 alensi fibrillimuodostuksen häviävän pienille tasoille (ff < 10 %; kuvio 7).

- Sitten arvioitiin 11:n aktiivisimman yhdisteen kyky sitoutua selektiivisesti TTR:ään
- 20 kaikkiin muihin veressä oleviin proteiineihin nähden. Ihmisen veri-plasmaa (TTR-pit. 3,6–5,4 μM) inkuboitiin 24 h testiyhdisteellä (10,8 μM) 37 °C. TTR ja kaikki sitoutunut estoaine immuno-saostettiin Sepharoseen sidotulla polyklonaalisella TTR-vastaaineella. TTR estoaineen kanssa tai ilman sitä vapautettiin hartsista korkeassa pH:ssa ja estoaine:TTR-stoikiometria varmistettiin HPLC-analyysillä (kuvio 8). Bentsoksatsoli karboksyylihapoilla 5- tai 6-asemassa ja substituentit 2,6-dikloorifenyyli (13, 20)
- 25 tai 2-trifluorimetyylifenyyli (11, 18) 2-asemassa osoittivat korkeimpia sitomisstoikiometrioita. Varsinkin 20 esitti erinomaista estoaktiivisuutta ja sidosselektiivisyyttä. Siten sen toimintamekanismia tutkittiin edelleen.

Sen varmistamiseksi, että 20 estää TTR-fibrillimuodostusta sitoutumalla vahvasti tetrameeriin, WT-TTR:llä tehtiin isoterminen titrauskalorimetria (ITC) ja sedimentaationopeuskokeet. ITC osoitti, että 20:n kaksi ekvivalenttia sitovat fysiologisissa olosuhteissa keskimääräisillä dissosiaatiovakioilla $K_{d1} = K_{d2} = 55 (\pm 10)$ nM. Ne vastaavat monien muiden erittäin tehokkaiden TTR-amyloidogeneesiainesten dissosiaatiovakioita. Sedimentaationopeuskokeissa TTR:ää (3,6 μ M) inkuboitii 20:n kanssa (3,6 μ M, 7,2 μ M, 36 μ M) optimaalisissa fibrilloitumisolosuhteissa (72 h, pH 4,4, 37 °C). Tetrameeri (55 kDa) oli ainoa havaittava laji 20:n liuoksessa pitoisuudella 7,2 tai 36 μ M. 20:n kanssa muodostui joitakin suuria aggregaatteja, mutta liuokseen jäävä TTR oli tetrameerinen.

Sekä T119M-alayksikön inkluusio että pienen molekyylin sitominen esti TTR-amyloidimuodostusta nostamalla tetrameerin hajoamiseen tarvittavaa aktivointikynnystä. Estoaineen kyky tehdä tämä testataan kaikkein tarkimmin mittaamalla sen teho hidastaa tetrameerihajoamista 6 M ureassa, vakavassa denaturaatiopaineessa. Siksi verrattiin TTR-tetrameerihajoamisen nopeuksia 6 M ureassa estoaineiden 20, 21 tai 27 läsnäollessa ja poissaollessa (kuvio 9). TTR (1,8 μ M) denaturoitiin täydellisesti 168 h:n kuluttua 6 M ureassa. Sen vastakohtana 20 pitoisuudella 3,6 μ M esti tetrameerihajoamista ainakin 168 h ($> 3 \times$ TTR:n puoliintumisaika ihmisen plasmassa). 20:n yhtä suurella määrällä TTR:stä denaturoitui vain 27 % 168 h:ssa. Yhdiste 27 (3,6 μ M) pystyi paljon heikommin estämään tetrameerihajoamista (90 % laskostumisesta purkautunut 168 h:n kuluttua), vaikka se oli aktiivinen fibrillimuodostusanalyysissä. Yhdiste 21 ei estänyt TTR:n hajoamista lainkaan. Nämä tulokset osoittavat, että estoaineen sitoutuminen TTR:ään on välttämätön mutta se ei riitä kineettisesti stabiloimaan TTR-tetrameeriä vahvasti denaturoivissa olosuhteissa; on myös tärkeätä, että dissosiaatiovakiot ovat hyvin pieniä (tai että hajoamisnopeudet ovat hyvin hitaita). Myös funktionaalisten ryhmien esiintyminen 20:llä on ilmeisesti optimaalinen TTR-tetrameerin stabiloinnin kannalta, karboksyylihapon siirtäminen C(6):sta C(7):ään kuten 27:ssä tai kloorien poistaminen kuten 21:ssä vähentää rajusti sen aktiivisuutta.

Substituenttien rooli 20:ssä on ilmeinen sen sekakiderakenteesta TTR:n kanssa (kuvio 10). Yhdiste 20 orientoi sen kaksi klooriatomia lähelle halogeeneja sitovia taskuja 2 ja 2' (niin kutsuttuja, koska jodit valtaavat ne tyroksiinin sitoutuessa TTR:ään). 2,6-substituutiomalli fenyyllirenkaalla pakottaa bentsoksatsolin ja fenyyllirenkaat pois tasosta sijoittaen karboksyylihapon bentsoksatsolilla optimaalisesti vetysidokseen Lys-15:n/-15':n ϵ -NH₃⁺-ryhmiin. 20:n aromaattisten renkaiden ja Leu-117:n, Leu-110:n, Ser-117:n ja Val-121:n sivuketjujen väliset hydrofobiset vuorovaikutukset antavat lisäsidosenergiaa.

Menetelmät

Yleinen bentsoksatsolisynteesiin ja tuotteiden karakterisointiin (^1H - ja ^{13}C -NMR ja suuren erotuskyvyn massaspektrit) tarkoitettu menettelytapa on kuvattu yksityiskoh-
taisesti jäljempänä.

5 Analyytinen ultrasentrifugointi

TTR:n kvaternaarinen rakenne 20:n läsnäollessa havaittiin käyttämällä sedimentaa-
tionopeuden analyttistä ultrasentrifugointia. Näytteitä inkuboitiin 20:llä pitoisuuksina 3,6, 7,2 tai 36 μM 72 tunnin ajan. Tiedot kerättiin lämpötilasäädetyllä analyytti-
sellä Beckman XL-I -ultrasentrifugilla (varustettu An60Ti-roottorilla ja valosähköi-
10 sellä skannerilla). Kaksoisektorikennoon, joka oli varustettu 12 mm:n Epon keski-
kappaleella ja safiiri-ikkunalla, ladattiin 00–420 μl näytettä käyttämällä ruiskua. Tie-
dot kerättiin roottorinopeuksilla 3000 ja 50000 rpm jatkuvatoimisesti 25 °C:ssa as-
kelkoolla 0,005 cm käyttämällä keskimäärin 1 pyyhkäisyn paikkaa kohti. Detektio
tehtiin 280 nm:ssä. Tiedoilla suoritettiin aikaan perustuva analyysi käyttämällä Phi-
15 lon kehittämää DCDT+-ohjelmaa (Philo, 2000; Stafford, 1992). Analyysi osoitti, että
lajien jakaantumista liuoksessa edusti s-arvojen valikoima. Tämä jakauma sitten so-
vitettiin erilaisiin malleihin sedimentaation ja diffuusiokertoimien määrittämiseksi
järjestelmässä oleville lajeille. Kunkin lajin molekyylipaino määritettiin aikaisemmin
raportoiduilla menetelmillä (Petrassi, et al 2000). TTR:n s-arvot osoittivat, että se
20 pysyi tetrameerina 20:n pitoisuuksilla 7,2 ja 36 μM , vaikka pitoisuudella 3,6 μM liu-
okseen jäävä TTR oli tetrameeri huolimatta vähäisen aggregaattimäärän muodostu-
misesta.

Kiteytys ja röntgentietojen keruu

WT-TTR:n kiteet saatiin proteiiniliuoksista pitoisuudella 12 mg/ml (liuoksessa 100
25 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM natriumfosfaattia ja pH 7,0, 0,35 M ammoniumsul-
faattia) tasapainotettuna 2 M ammoniumsulfaattia vastaan riippuvan pisaran ko-
keissa. TTR-20-kompleksi valmistettiin kiteistä, joita oli liotettu 3 viikkoa 10-kertai-
sella mooliylimäärällä ligandia kummankin sitoutumiskohdan täydellisen kyllästy-
misen varmistamiseksi. Ligandissa liotettu kide taipui jopa 1,55 Å Quantum-4-detek-
30 torilla monokromaattisella korkeaenergisellä lähteellä 14-BM-C, BIOCARs, Advan-
ced Photon Source (Argonne National Laboratory). Kiteitä liotettiin paratoniöljyssä
ja pikajäähdytettiin 100 K:hon diffraktiokokeita varten. TTR-20-kompleksin kiteet
ovat isomorfisia apo-kidemuodolla yksikkökoppimitoilla $a = 43,1 \text{ Å}$, $b = 84,7 \text{ Å}$ ja
 $c = 64,7 \text{ Å}$, avaruusryhmitys P21212 kahdella TTR-alayksiköllä epäsymmetrisessä

yksikössä. Tiedot redusoiitiin HKL2000-ohjelmiston DENZO:lla ja SCALEPACK:lla (Otwinowski, 1997).

Rakenteen määrittäminen ja hienosäätö

Proteiinitietopankista saatuja TTR:n proteiinin atomikoordinaatteja käytettiin lähtö-
 5 mallina haettaessa molekulaarisia korvauksia. TTR-kompleksirakenteen hienosäätö
 tehtiin käyttämällä CNS:n molekyyliidynamiikkaa ja energian minimointikäytäntöjä.
 Saadut Fourier-differenssikartat toivat esiin ligandin sitoutumisen TTR-tetrameerin
 kumpaanakin sitovaan taskuun. Näitä karttoja käyttäen ligandi voitiin paikantaa yksi-
 selitteisesti tiheyteen ja sisällytettiin kidehienosäätöön. Ohjelmalla Insight II (Accel-
 10 rys Inc.) laskettua estoaineen pienintä mahdollista energiakonformaatiota käytettiin
 kidehienosäädön alkumallina. Koska 2-kertainen kidesymmetria-akseli kulkee pitkin
 sitovaa kanavaa, niin täytyi soveltaa tilastollista häiriömallia, mikä sai aikaan kaksi
 ligandia sitovaa mallia sitovaa TTR-taskua kohti. Usean simuloidun lämpökäsittely-
 15 jakson ja myöhemmän paikannus- ja lämpötilatekijän hienosäädön jälkeen vesimole-
 kyylit sijoitettiin Fourierin differenssikarttoihin. Karttaan sovittamisen viimeinen
 jakso tehtiin käyttämällä esijännitteetöntä painotettua elektronitiheyskarttaa, joka oli
 laskettu shake/warp-esijännitteidenpoistokäytännöllä. Ligandin symmetriaan liittyvät
 20 sitovat konformaatiot pitivät hyvin yhtä esijännitteettömien lämpökäsittelyjen omit-
 karttojen samoin kuin shake/warp-esijännitteettömien painotettujen karttojen kanssa,
 jotka oli vaiheistettu estoaineen poissa ollessa. Koska lopullisesta kartasta puuttuivat
 tulkittavissa olevat elektronitiheydet, niin lopulliseen malliin ei sisällytetty yhdeksää
 N-terminaalista eikä kolmea C-terminaalista tähdettä. Kideanalyysin yhteenveto on
 esitetty taulukossa 6.

Taulukko 6: Röntgenkiderakenteen tilastotiedot

Löytyvyys (%) (kaikki/ulkokehä)	86/90
R _{sym} (kaikki/ulkokehä)	0,05/0,33
Hienosäätötiedot	
Resoluutio (Å)	33,02–1,55
R-faktori/R-vapaa (%)	21,1 / 24,3
Rmsd-sidospituus (Å)	0,03
Rmsd-sidoskulmat (°)	2,5
Muut tilastotiedot	
Kidemitat (mm)	0,3×0,2×0,15
Kidejärjestelmä	Ortorombinen
Yksikkökoppimitat (a,b,c yksikkö Å)	43,1, 84,7, 64,7
Yksikkökopin tilavuus (Å ³)	236123
Maksimiresoluutio (Å)	1,54
Pyyhkäisymalli	fii
Mittauslämpötila	100 K
Riippumattomien heijastusten lukumäärä	30705
Rakenneliuoksen menetelmä	Molekulaarinen korvaaminen EPMPR:llä (Kissinger, 1999)
Hienosäätö vastaan	F _{obs}
Hienosäädön tavoite	Suurin todennäköisyys
Hienosäädössä käytetty ohjelma	CNS-Solve (Brunger 1998)
Tietokanta	Proteiinitietopankki

Bentsoksatsolisynthese – tavalliset menetelmät

- Ellei toisin mainita, niin kaikki reaktiot tehtiin uunikuivatussa lasitavarassa kuivassa argonilmakehässä käyttämällä laitetta FirstMate Organic Synthesizer (Argonaut Technologies). Kaikki liuottimet ja reagenssit hankittiin Aldrichilta ja käytettiin ilman jatkopuhdistusta. ¹H-NMR-spektrit mitattiin 500 MHz:ssa Bruker DRX-500 -spektrometrilla tai 600 MHz:ssa Bruker DRX-600 -spektrometrilla ja verrattiin sisäiseen CHD₂-S(O)-CD₃ (2,49 ppm). ¹³C-NMR-spektrit mitattiin 125 MHz:ssa Bruker DRX-500:lla tai 150 MHz:ssa Bruker DRX-600:lla ja verrattiin sisäiseen (CD₃)₂SO (39,5 ppm). Ohutkerroskromatografiset analyysit tehtiin analyyttisillä lasivahvistetuilla ohutkerroslevyillä (Kieselgel 60 F254, 0,25 mm, EM Science no. 5715-7). Visualisointi tehtiin käyttämällä UV-absorbanssia tai 10-prosenttista

fosfomolybdeenihappoa etanolissa. Kromatografia tehtiin kromatotronilla (Harrison Research, Model 7924T, 2 mm levy) tai preparatiivisella silikageelilevyllä (Kieselgel 60 F254, 1 mm, EM Science no. 13895-7).

Bentsoksatsolisynthesin yleinen menettelytapa

- 5 Aminohydroksibentsoehapon (0,2 mmol) seos THF:ssä (3 ml) käsiteltiin peräkkäin pyridiinillä (500 µl, 0,6 mmol) ja halutulla happokloridilla (0,2 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin ympäristölämpötilassa 10 h, refluksoitii 1 h, konsentroitiin alipaineessa ja käytettiin seuraavassa vaiheessa puhdistamattomana.

- 10 Puhdistamattomaan reaktioseokseen lisättiin p-tolueenisulfonihappomonohydraattia (380,4 mg, 2,0 mmol) ksyleeneissä (5 ml) ja saatua seosta sekoitettiin refluksaamalla yli yön. 12 h:n kuluttua reaktio jäähdytettiin ympäristölämpötilaan, sammutettiin NaOH:lla (2 ml, 1 N) ja faasit erotettiin. Vesikerros tehtiin happamaksi HCl:llä (1 N) pH:hon 2 ja uutettiin EtOAc:hen (4 x 3 ml). Yhdistetyt orgaaniset kerrokset kuivattiin MgSO₄:n päällä, suodatettiin ja konsentroitiin alipaineessa. Saatua jäännös liuotettiin
- 15 MeOH:bentseeni-seokseen (2 ml; 1:4), käsiteltiin TMS-CHN₂:lla (200 µl 2,0 M liuosta heksaaneissa, 0,4 mmol) 25 °C:ssa ja reaktion edistymistä seurattiin TLC:llä (valmis tavallisesti 0,5 h:n kuluttua). Reaktioseos konsentroitiin alipaineessa ja jäännös kromatografoitiin (10–25 % EtOAc/heksaanit-gradientti), jolloin saatiin haluttu bentsoksatsolimetyyliesteri.

- 20 Bentsoksatsolimetyyliesteri liuotettiin THF:MeOH:H₂O-seokseen (3:1:1, 0,07 M) ja käsiteltiin LiOH.H₂O:lla (4 ekviv.) Reaktiota sekoitettiin ympäristölämpötilassa ja seurattiin TLC:llä. Kun reaktio oli valmis, niin seos tehtiin happamaksi pH:hon 2 1-normaalilla HCl:llä ja uutettiin EtOAc:hen (4 x). Yhdistetyt orgaaniset kerrokset kuivattiin MgSO₄:n päällä, suodatettiin ja konsentroitiin. Jäännös puhdistettiin pre-
- 25 paratiivisella ohutkerroskromatografiolla (4,9 % MeOH, 95 % CH₂Cl₂, 0,1 % HOAc), jolloin tuote saatiin valkoisena kiinteänä aineena.

- 4-karboksi-2-(3,5-difluorifenyyli)bentsoksatsoli (1). Valmistettu 3-hydroksiantranii-
 lihaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saadaan 1 valkoisena kiinteänä ai-
 neena (7,0 mg, 13 %). 1:n tiedot: ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13,70-12,50 (br,
 30 s, 1H, CO₂H), 8,04 (AMX, 1H, J = 8,1 Hz, Ar), 7,94 (AMX, 1H, J = 7,3 Hz, Ar), 7,84
 (br, d, 2H, J = 5,6 Hz, Ar), 7,62-7,58 (m, 1H, Ar), 7,56 (AMX, 1H, J = 7,3, 8,1 Hz,
 Ar); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 165,8, 162,7 (d, J = 248 Hz), 162,6 (d, J =
 248 Hz), 161,1, 151,0, 140,3, 129,3, 127,0, 125,8, 123,6, 115,2, 110,8 (d, J = 28 Hz),

107,8 (t, J = 26 Hz); HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulok $C_{14}H_7F_2NO_3$ (MH^+) 276,0467, havaittu 276,0463.

4-karboksi-2-(2,6-difluorifenyyli)bentsoksatsoli (2). Valmistettu 3-hydroksiantraniilihaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 2 valkoisena kiinteänä aineena (8,2 mg, 15 %), 2:n tiedot: 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,00 (br, s, 1H, CO₂H), 8,06 (AMX, 1H, J = 8,1 Hz, Ar), 7,94 (AMX, 1H, J = 7,6 Hz, Ar), 7,80-7,74 (m, 1H, Ar), 7,57 (AMX, 1H, J = 7,6, 8,1 Hz, Ar), 7,40-7,38 (m, 2H, Ar); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 166,1, 160,4 (d, J = 256 Hz), 160,3 (d, J = 256 Hz), 154,9, 150,6, 139,6, 134,7 (t, J = 10 Hz), 126,8, 125,8, 114,8, 112,8 (d, J = 22 Hz), 105,2 (t, J = 16 Hz); HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulok $C_{14}H_7F_2NO_3$ (MH^+) 276,0467, havaittu 276,0461.

4-karboksi-2-[(3-trifluorimetyyli)fenyyli]bentsoksatsoli (3). Valmistettu 3-hydroksiantraniilihaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 3 valkoisena kiinteänä aineena (9,5 mg, 15 %). 3:n tiedot: 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,70-12,80 (br, s, 1H, CO₂H), 8,50 (ABX 1H, J = 7,8 Hz, Ar), 8,43 (s, 1H, Ar), 8,06 (AMX 1H, J = 8,1 Hz, Ar), 8,03 (ABX, 1H, J = 8,1 Hz, Ar), 7,94 (AMX, 1H, J = 7,8 Hz, Ar), 7,88 (ABX, 1H, J = 7,8 Hz, Ar), 7,54 (AMX, 1H, J = 8,1 Hz, Ar); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 165,8, 161,9, 151,0, 140,6, 131,4, 130,8, 130,0 (q, J = 33 Hz), 128,7 (d, J = 4 Hz), 127,2, 127,0, 125,5, 123,8, 123,7 (q, J = 273 Hz), 123,2, 115,2; HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulok $C_{15}H_8F_3NO_3$ (MH^+) 308,0529, havaittu 308,0535.

4-karboksi-2-[(2-trifluorimetyyli)fenyyli]bentsoksatsoli (4). Valmistettu 3-hydroksiantraniilihaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 4 valkoisena kiinteänä aineena (15,2 mg, 25 %). 4:n tiedot: 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,15 (br, s, 1H, CO₂H), 8,18 (d, 1H, J = 7,6 Hz, Ar), 8,06 (AMX, 1H, J = 0,9, 8,2 Hz, Ar), 8,02 (d, 1H, J = 7,9 Hz, Ar), 7,96 (AMX, 1H, J = 0,9, 7,9 Hz, Ar), 7,94-7,87 (m 2H, Ar), 7,58 (AMX, 1H, J = 8,2 Hz, Ar); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 165,8, 161,6, 151,2, 140,0, 133,0, 132,6, 132,3, 127,6 (q, J = 32 Hz), 127,2 (q, J = 6 Hz), 127,0, 125,6, 124,9, 123,5, 123,4 (q, J = 273 Hz), 115,2; HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulok $C_{15}H_8F_3NO_3$ (MH^+) 308,0529, havaittu 308,0531.

4-karboksi-2-(3,5-dikloorifenyyli)bentsoksatsoli (5). Valmistettu 3-hydroksiantraniilihaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 5 valkoisena kiinteänä aineena (8,0 mg, 13 %). Tiedot 5: 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,60-12,60 (br, s, 1H, CO₂H), 8,16 (A2M, 2H, J = 2,0 Hz, Ar), 8,05 (AMX 1H, J = 0,9, 8,2 Hz, Ar), 7,96 (A2M, 1H, J = 2,0 Hz, Ar), 7,94 (AMX, 1H, J = 0,9, 7,6 Hz, Ar), 7,56 (AMX,

1H, J = 7,9 Hz, Ar); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ 165,8, 160,8, 51,0, 140,4, 135,2, 131,5, 129,4, 127,0, 126,3, 125,9, 125,8, 123,6, 115,2; HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulos C₁₄H₇Cl₂NO₃ (MH⁺) 307,9876, havaittu 307,9876.

5 4-karboksi-2-(2,6-dikloorifenyyli)bentsoksatsoli (6). Valmistettu 3-hydroksiantraniilihaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 6 valkoisena kiinteänä aineena (5,2 mg, 8 %). 6:n tiedot: ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 13,80-12,50 (br, s, 1H, CO₂H), 8,07 (AMX, 1H, J = 8,2 Hz, Ar), 7,95 (AMX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar), 7,77-7,71 (m, 3H, Ar), 7,59 (AMX, 1H, J = 7,9, 8,2 Hz, Ar); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ 165,8, 158,2, 150,8, 139,3, 134,8, 134,0, 128,7, 126,8, 126,7, 125,9, 10 122,4; HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulos C₁₄H₇Cl₂NO₃ (MH⁺) 307,9876, havaittu 307,9880.

4-karboksi-2-fenyylibentsoksatsoli (7). Valmistettu 3-hydroksiantraniilihaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 7 valkoisena kiinteänä aineena (10,2 mg, 21 %). 7:n tiedot: ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 13,50-12,60 (br, s, 1H, CO₂H), 15 8,24-8,22 (m, 2H, Ar), 8,03 (AMX 1H, J = 0,9, 8,2 Hz, Ar), 7,91 (AMX, 1H, J = 0,9, 7,9 Hz, Ar), 7,68-7,61 (m, 3H, Ar), 7,51 (AMX, 1H, J = 7,9, 8,2 Hz, Ar); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆) 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; HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulos C₁₄H₉NO₃ (MH⁺) 240,0655, havaittu 240,0656.

20 5-karboksi-2-(3,5-difluorifenyyli)bentsoksatsoli (8). Valmistettu 3-amino-4-hydroksibentsoehaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 8 valkoisena kiinteänä aineena (10,2 mg, 19 %). 8:n tiedot: ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 13,60-12,80 (br, s, 1H, CO₂H), 8,32 (ABM 1H, J = 1,5 Hz, Ar), 8,07 (ABM, 1H, J = 1,5, 8,5 Hz, Ar), 7,90 (ABM, 1H, J = 8,5 Hz, Ar), 7,86-7,85 (m, 2H, Ar), 7,60 (tt, 1H, J = 25 2,4, 9,2 Hz, Ar); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ 166,8, 162,8 (d, J = 248 Hz), 162,7 (d, J = 248 Hz), 161,5, 153,0, 141,2, 129,1 (t, J = 11 Hz), 128,2, 127,7, 121,4, 111,2, 110,8 (d, J = 23 Hz), 110,7 (d, J = 22 Hz), 107,8 (t, J = 26 Hz); HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulos C₁₄H₇F₂NO₃ (MH⁺) 276,0467, havaittu 276,0469.

30 5-karboksi-2-(2,6-difluorifenyyli)bentsoksatsoli (9). Valmistettu 3-amino-4-hydroksibentsoehaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 9 valkoisena kiinteänä aineena (6,8 mg, 12 %). 9:n tiedot: ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 13,50-12,80 (br, s, 1H, CO₂H), 8,39 (ABM, 1H, J = 0,7, 1,6 Hz, Ar), 8,10 (ABM, 1H, J = 1,6, 8,7 Hz, Ar), 7,95 (ABM, 1H, J = 0,7, 8,7 Hz, Ar), 7,77 (m, 1H, Ar), 7,40 (t, 2H, J = 8,8 Hz, Ar); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ 166,8, 160,4 (d, J = 257 Hz), 35 160,3 (d, J = 257 Hz), 155,4, 152,6, 140,8, 134,8 (t, J = 11 Hz), 128,2, 127,7, 121,6,

113,0 (d, $J = 22$ Hz), 112,9 (d, $J = 22$ Hz), 111,2, 104,9; HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulokset $C_{14}H_7F_2NO_3$ (MH^+) 276,0467, havaittu 276,0467.

5 5-karboksi-2-[(3-trifluorimetyyli)fenyyli]bentsoksatsoli (10). Valmistettu 3-amino-4-hydroksibentsoehaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 10 valkoisena kiinteänä aineena (6,7 mg, 11 %). 10:n tiedot: 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,30-12,80 (br, s, 1H, CO₂H), 8,51 (ABX, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar), 8,45 (s, 1H, Ar), 8,35 (ABM 1H, $J = 1,7$ Hz, Ar), 8,08 (ABM, 1H, $J = 1,7, 8,6$ Hz, Ar), 8,04 (ABX, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar), 7,93 (ABM, 1H, $J = 8,6$ Hz, Ar), 7,89 (ABX, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 166,8, 162,2, 153,1, 141,4, 131,4, 130,9, 130,1 (q, $J = 33$ Hz), 128,8, 128,2, 127,5, 127,1, 123,8 (q, $J = 4$ Hz), 123,7 (q, $J = 273$ Hz), 121,3, 111,2; HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulokset $C_{15}H_8F_3NO_3$ (MH^+) 308,0529, havaittu 308,0530.

15 5-karboksi-2-[(2-trifluorimetyyli)fenyyli]bentsoksatsoli (11). Valmistettu 3-amino-4-hydroksibentsoehaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 11 valkoisena kiinteänä aineena (10,3 mg, 17 %). 11:n tiedot: 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,19 (br, s, 1H, CO₂H), 8,38 (m, 1H, Ar), 8,19 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, Ar), 8,09 (dd, 1H, $J = 1,8, 8,5$ Hz, Ar), 8,03 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar), 7,94-7,88 (m, 3H, Ar); ^{13}C -NMR (150 MHz, 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, $J = 32$ Hz), 127,2 (q, $J = 6$ Hz), 124,7, 123,4 (q, $J = 274$ Hz), 121,6, 20 111,2; HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulokset $C_{15}H_8F_3NO_3$ (MH^+) 308,0529, havaittu 308,0531.

25 5-karboksi-2-(3,5-dikloorifenyyli)bentsoksatsoli (12). Valmistettu 3-amino-4-hydroksibentsoehaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 12 valkoisena kiinteänä aineena (7,3 mg, 12 %). 12:n tiedot: 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,14 (br, s, 1H, CO₂H), 8,33 (AMX, 1H, $J = 0,6, 1,8$ Hz, Ar), 8,16 (AM, 2H, $J = 1,8$ Hz, Ar), 8,08 (AMX, 1H, $J = 1,8, 8,5$ Hz, Ar), 7,95 (AM 1H; $J = 1,8$ Hz, Ar), 7,91 (AMX, 1H, $J = 0,6, 8,5$ Hz, Ar); ^{13}C -NMR (150 MHz, 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; HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulokset $C_{14}H_7Cl_2NO_3$ (MH^+) 307,9876, havaittu 307,9879.

30 5-karboksi-2-(2,6-dikloorifenyyli)bentsoksatsoli (13). Valmistettu 3-amino-4-hydroksibentsoehaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 13 valkoisena kiinteänä aineena (10,8 mg, 18 %). 13:n tiedot: 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,08 (br, s, 1H, CO₂H), 8,43 (AMX, 1H, $J = 0,6, 1,8$ Hz, Ar), 8,13 (AMX, 1H, $J = 1,8, 8,5$ Hz, Ar), 7,98 (AMX, 1H, $J = 0,6, 8,5$ Hz, Ar), 7,77-7,72 (m, 3H, Ar); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,7, 158,6, 152,8, 140,4, 134,8, 134,2, 128,8, 128,4, 35

127,8, 126,2, 121,8, 111,5; HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulos $C_{14}H_7Cl_2NO_3$ (MH^+) 307,9876, havaittu 307,9879.

5 5-karboksi-2-fenyylibentsoksatsoli (14). Valmistettu 3-amino-4-hydroksibentsoehaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 14 valkoisena kiinteänä aineena (11,5 mg, 24 %). 14:n tiedot: 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,12 (br, s, 1H, CO₂H), 8,30 (ABX, 1H, J = 1,8 Hz, Ar), 8,20 (dt, 2H, J = 1,5, 6,7 Hz, Ar), 8,03 (ABX, 1H, J = 1,8, 8,5 Hz, Ar), 7,87 (ABX, 1H, J = 8,5 Hz, Ar), 7,67-7,60 (m, 3H, Ar); ^{13}C -NMR (150 MHz, 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; HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulos $C_{14}H_9NO_3$ (MH^+) 240,0655, havaittu 240,0656.

15 6-karboksi-2-(3,5-difluorifenyyli)bentsoksatsoli (15). Valmistettu 4-amino-3-hydroksibentsoehaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 15 valkoisena kiinteänä aineena (10,3 mg, 19 %). 15:n tiedot: 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,22 (br, s, 1H, CO₂H), 8,20 (ABM, 1H, J = 1,5 Hz, Ar), 7,98 (ABM, 1H, J = 1,5, 8,2 Hz, Ar), 7,86 (ABM, 1H, J = 8,2 Hz, Ar), 7,79-7,78 (m, 2H, Ar), 7,57 (tt, 1H, J = 2,4, 9,4 Hz, Ar); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,7, 162,7 (d, J = 248 Hz), 162,6 (d, J = 248 Hz), 162,4, 150,0, 144,7, 129,0 (t, J = 11 Hz), 128,7, 126,5, 120,0, 112,1, 110,9 (d, J = 23 Hz), 110,8 (d, J = 22 Hz), 108,0 (t, J = 26 Hz); HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulos $C_{14}H_7F_2NO_3$ (MH^+) 276,0467, havaittu 276,0468.

20 6-karboksi-2-(2,6-difluorifenyyli)bentsoksatsoli (16). Valmistettu 4-amino-3-hydroksibentsoehaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 16 valkoisena kiinteänä aineena (8,5 mg, 15 %). 16:n tiedot: 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,25 (br, s, 1H, CO₂H), 8,30 (ABM 1H, J = 0,6, 1,5 Hz, Ar), 8,04 (ABM, 1H, J = 1,5, 8,2 Hz, Ar), 7,96 (ABM, 1H, J = 0,6, 8,2 Hz, Ar), 7,76 (m, 1H, Ar), 7,39 (t, 2H, J = 8,8 Hz, Ar); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,7, 160,4 (d, J = 257 Hz), 160,3 (d, J = 257 Hz), 156,6, 149,7, 144,2, 134,9 (t, J = 11 Hz), 128,8, 126,4, 120,1, 113,1, 112,9, 112,2 (d, J = 5 Hz), 105,0 (t, J = 16 Hz); HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulos $C_{14}H_7F_2NO_3$ (MH^+) 276,0467, havaittu 276,0466.

30 6-karboksi-2-[(3-trifluorimetyyli)fenyyli]bentsoksatsoli (17). Valmistettu 4-amino-3-hydroksibentsoehaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 17 valkoisena kiinteänä aineena (7,4 mg, 12 %). 17:n tiedot: 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,20 (br, s, 1H, CO₂H), 8,48 (ABX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar), 8,41 (s, 1H, Ar), 8,28 (ABM, 1H, J = 1,5 Hz, Ar), 8,03 (ABX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar), 8,02 (ABM, 1H, J = 1,5, 8,2 Hz, Ar), 7,90 (ABM, 1H, J = 8,2 Hz, Ar), 7,86 (ABX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 168,0, 164,6, 151,4, 146,2, 132,8, 132,2, 131,4 (q, J

= 32 Hz), 130,2, 129,8, 128,4, 127,8, 125,2, 125,0 (q, J = 272 Hz), 121,2, 113,6; HRMS (MALDI-FTMS) laskentatuloks $C_{15}H_8F_3NO_3$ (ME^+) 308,0529, havaittu 308,0530, HRMS (MALDI-FTMS) laskentatuloks $C_{15}H_8F_3NO_3$ (MH^+) 308,0529, havaittu 308,0531.

- 5 6-karboksi-2-[(2-trifluorimetyyli)fenyyli]bentsoksatsoli (18). Valmistettu 4-amino-3-hydroksibentsoehaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 18 valkoisena kiinteänä aineena (6,6 mg, 11 %). 18:n tiedot: 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,22 (br, s, 1H, CO₂H), 8,30 (ABX, 1H, J = 0,6, 1,5 Hz, Ar), 8,20 (d, 1H, J = 7,3 Hz, Ar), 8,06 (ABX, 1H, J = 1,5, 8,2 Hz, Ar), 8,04 (d, 1H, J = 7,9 Hz, Ar), 7,98 (ABX, 1H, J = 0,6, 8,2 Hz, Ar), 7,94 (t, 1H, J = 7,3 Hz, Ar), 7,90 (t, 1H, J = 7,9 Hz, Ar); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 168,0, 164,0, 151,6, 145,9, 133,8, 130,0, 129,0 (q, J = 32 Hz), 128,6 (q, J = 6), 127,7, 126,0, 124,7 (q, J = 273 Hz), 121,6, 113,6; HRMS (MALDI-FTMS) laskentatuloks $C_{15}H_8F_3NO_3$ (MH^+) 308,0529, havaittu 308,0530.

- 15 6-karboksi-2-(3,5-dikloorifenyyli)bentsoksatsoli (19). Valmistettu 4-amino-3-hydroksibentsoehaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 19 valkoisena kiinteänä aineena (6,0 mg, 10 %). 19:n tiedot: 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,20 (br, s, 1H, CO₂H), 8,17 (ABX, 1H, J = 0,6, 1,5 Hz, Ar), 8,00 (AB, 1H, J = 2,0 Hz, Ar), 7,96 (ABX, 1H, J = 1,5, 8,5 Hz, Ar), 7,83 (AB, 1H, J = 2,0 Hz, Ar), 7,82 (ABX, 1H, J = 0,6, 8,5 Hz, Ar); ^{13}C -NMR (150 MHz, 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; HRMS (MALDI-FTMS) laskentatuloks $C_{14}H_7Cl_2NO_3$ (MH^+) 307,9876, havaittu 307,9879.

- 25 6-karboksi-2-(2,6-dikloorifenyyli)bentsoksatsoli (20). Valmistettu 4-amino-3-hydroksibentsoehaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 20 valkoisena kiinteänä aineena (12,7 mg, 21 %). 20:n tiedot: 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,27 (br, s, 1H, CO₂H), 8,38 (ABX, 1H, J = 0,5, 1,5 Hz, Ar), 8,09 (ABX, 1H, J = 1,5, 8,3 Hz, Ar), 8,02 (ABX, 1H, J = 8,3, 0,5 Hz, Ar), 7,78-7,71 (m, 3H, Ar); ^{13}C -NMR (125 MHz, 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; HRMS (MALDI-FTMS) laskentatuloks $C_{14}H_7Cl_2NO_3$ (MH^+) 307,9876, havaittu 307,9877.

- 30 6-karboksi-2-fenyylibentsoksatsoli (21). Valmistettu 4-amino-3-hydroksibentsoehaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 21 valkoisena kiinteänä aineena (7,0 mg, 15 %). 21:n tiedot: 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,16 (br, s, 1H, CO₂H), 8,27 (d, 1H, J = 0,9 Hz, Ar), 8,25-8,22 (m, 2H, Ar), 8,01 (dd, 1H, J = 1,5, 8,5 Hz, Ar), 7,89 (d, 1H, J = 8,5 Hz, Ar), 7,69-7,62 (m, 3H, Ar); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,8, 164,7, 150,0, 145,2, 132,6, 129,4, 128,0, 127,6, 126,3, 126,0,
- 35

119,6, 112,0; HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulos $C_{14}H_9NO_3$ (MH^+) 240,0655, havaittu 240,0655.

5 7-karboksi-2-(3,5-difluorifenyyli)bentsoksatsoli (22). Valmistettu 3-aminosalisyylilihaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 22 valkoisena kiinteänä aineena (8,8 mg, 16 %). 22:n tiedot: 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,55 (br, s, CO₂H), 8,10 (AMX, 1H, J = 1,2, 7,9 Hz, Ar), 7,97 (AMX, 1H, J = 1,2, 7,9 Hz, Ar), 7,80-7,79 (m, 2H, Ar), 7,63 (tt, 1H, J = 2,4, 9,2 Hz, Ar), 7,55 (AMX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 164,5, 162,8 (d, J = 248 Hz), 162,6 (d, J = 248 Hz), 160,9, 149,2, 142,6, 129,2, 128,0, 125,2, 124,9, 116,1, 110,6 (d, J = 28 Hz),
10 107,7 (q, J = 25 Hz); HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulos $C_{14}H_7F_2NO_3$ (MH^+) 276,0467, havaittu 276,0469.

15 7-karboksi-2-(2,6-difluorifenyyli)bentsoksatsoli (23). Valmistettu 3-aminosalisyylilihaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 23 valkoisena kiinteänä aineena (7,3 mg, 13 %). 23:n tiedot: 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,48 (br, s, 1H, CO₂H), 8,16 (ABX, 1H, J = 1,2, 8,2 Hz, Ar), 8,00 (ABX, 1H, J = 1,2, 7,6 Hz, Ar), 7,78 (m, 1H, Ar), 7,57 (ABX, 1H, J = 7,6, 8,2 Hz, Ar), 7,40 (t, 2H, J = 8,5 Hz, Ar); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 164,5, 160,4 (d, J = 256 Hz), 160,3 (d, J = 257 Hz), 154,9, 148,9, 142,1, 134,8 (t, J = 10 Hz), 128,0, 125,1, 125,0, 116,0, 113,0 (d, J = 22 Hz), 112,9 (q, J = 21 Hz), 105,1 (t, J = 17 Hz); HRMS (MALDI-FTMS)
20 laskentatulos $C_{14}H_7F_2NO_3$ (MH^+) 276,0467, havaittu 276,0467.

25 7-karboksi-2-[(3-trifluorimetyyli)fenyyli]bentsoksatsoli (24). Valmistettu 3-aminosalisyylilihaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 24 valkoisena kiinteänä aineena (7,9 mg, 13 %). 24:n tiedot: 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,51 (br, s, CO₂H), 8,48 (ABX, 1H, J = 8,2 Hz, Ar), 8,40 (s, 1H, Ar), 8,10 (AMX, 1H, J = 1,2, 7,9 Hz, Ar), 8,05 (ABX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar), 7,96 (AMX, 1H, J = 1,2, 7,6 Hz, Ar), 7,94 (ABX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar), 7,54 (AMX, 1H, J = 7,9, 7,6 Hz, Ar); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 164,6, 161,7, 149,3, 142,7, 131,3, 131,0, 130,0 (q, J = 32 Hz), 128,6 (d, J = 3 Hz), 127,7, 127,2, 125,0, 124,8, 123,7 (q, J = 272 Hz), 123,5, 116,0; HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulos $C_{15}H_8F_3NO_3$ (MH^+) 308,0529, havaittu
30 308,0532.

35 7-karboksi-2-[(2-trifluorimetyyli)fenyyli]bentsoksatsoli (25). Valmistettu 3-aminosalisyylilihaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 25 valkoisena kiinteänä aineena (13,8 mg, 22 %). 25:n tiedot: 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,46 (br, s, 1H, CO₂H), 8,18 (d, 1H, J = 7,6 Hz, Ar), 8,14 (AMX, 1H, J = 1,2, 7,9 Hz, Ar), 8,03 (d, 1H, J = 7,9 Hz, Ar), 7,98 (AMX, 1H, J = 1,2, 7,6 Hz, Ar), 7,94 (t, 1H, J = 7,3

Hz, Ar), 7,89 (t, 1H, J = 7,6 Hz, Ar), 7,56 (AMX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ 164,6, 161,1, 149,3, 142,4, 133,0, 132,4, 132,2, 127,8, 127,6, 127,2 (q, J = 6 Hz), 125,0, 124,9, 123,4 (q, J = 273 Hz), 116,2; HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulos $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3$ (MH^+) 308,0529, havaittu 308,0534.

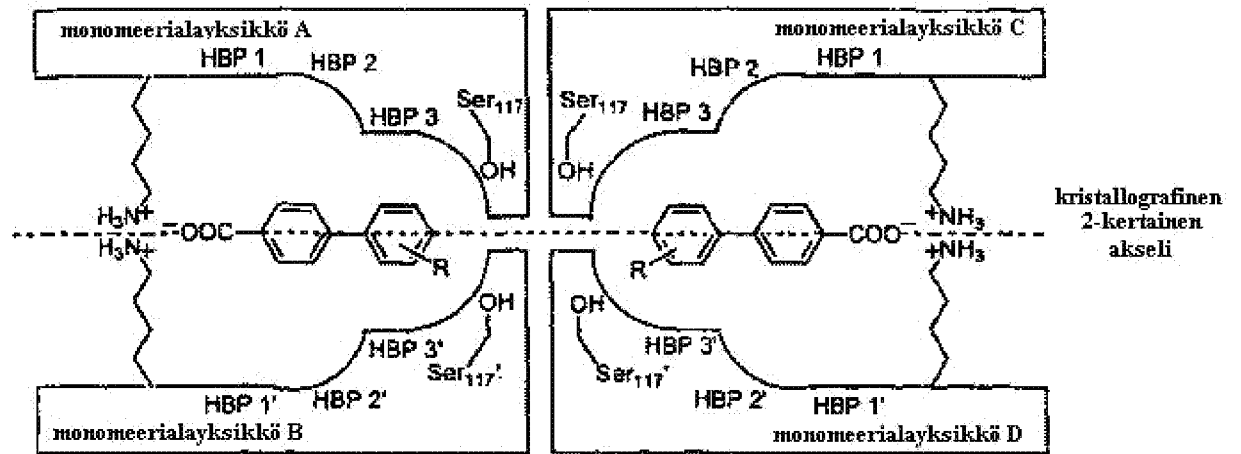
- 5 7-karboksi-2-(3,5-dikloorifenyyli)bentsoksatsoli (26). Valmistettu 3-aminosalisyylilihaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 26 valkoisena kiinteänä aineena (7,0 mg, 11 %). 26:n tiedot: ^1H -NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 14,00-12,80 (br, s, CO₂H), 8,10-8,08 (m, 3H, Ar), 7,98-7,96 (m, 2H, Ar), 7,55 (t, 1H, J = 7,8 Hz, Ar); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ 164,5, 160,5, 149,2, 142,6, 135,2, 131,5,
10 129,4, 128,0, 125,6, 125,2, 124,8, 116,2; HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulos $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 307,9876, havaittu 307,9874.

- 7-karboksi-2-(2,6-dikloorifenyyli)bentsoksatsoli (27). Valmistettu 3-aminosalisyylilihaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 27 valkoisena kiinteänä aineena (10,3 mg, 17 %). 27:n tiedot: ^1H -NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 13,90-13,10
15 (br, s, CO₂H), 8,16 (AMX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar), 8,02 (AMX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar), 7,78-7,72 (m, 3H, Ar), 7,60 (AMX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO-d₆) 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; HRMS (MALDI-FTMS) laskentatulos $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 307,9876, havaittu 307,9875.

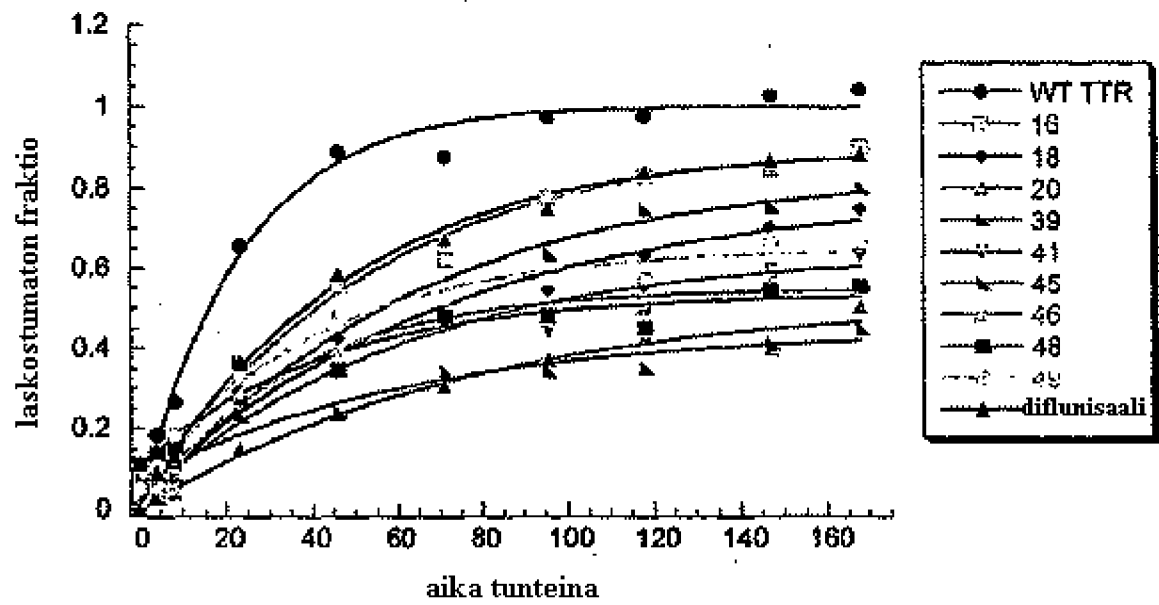
- 20 7-karboksi-2-fenyylibentsoksatsoli (28). Valmistettu 3-aminosalisyylilihaposta yleisen menettelytavan mukaan, jolloin saatiin 28 valkoisena kiinteänä aineena (13,1 mg, 27 %). 28:n tiedot: ^1H -NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 13,48 (br, s, 1H, CO₂H), 8,20-8,19 (m, 2H, Ar), 8,05 (AMX, 1H, J = 1,2, 7,9 Hz, Ar), 7,92 (AMX, 1H, J = 1,2, 7,6 Hz, Ar), 7,66-7,62 (m, 3H, Ar), 7,50 (AMX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar); ^{13}C -NMR (150
25 MHz, DMSO-d₆) 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; HRMS (MALDI-FIMS) laskentatulos $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_3$ (MH^+) 240,0655, havaittu 240,0656.

Patenttivaatimukset

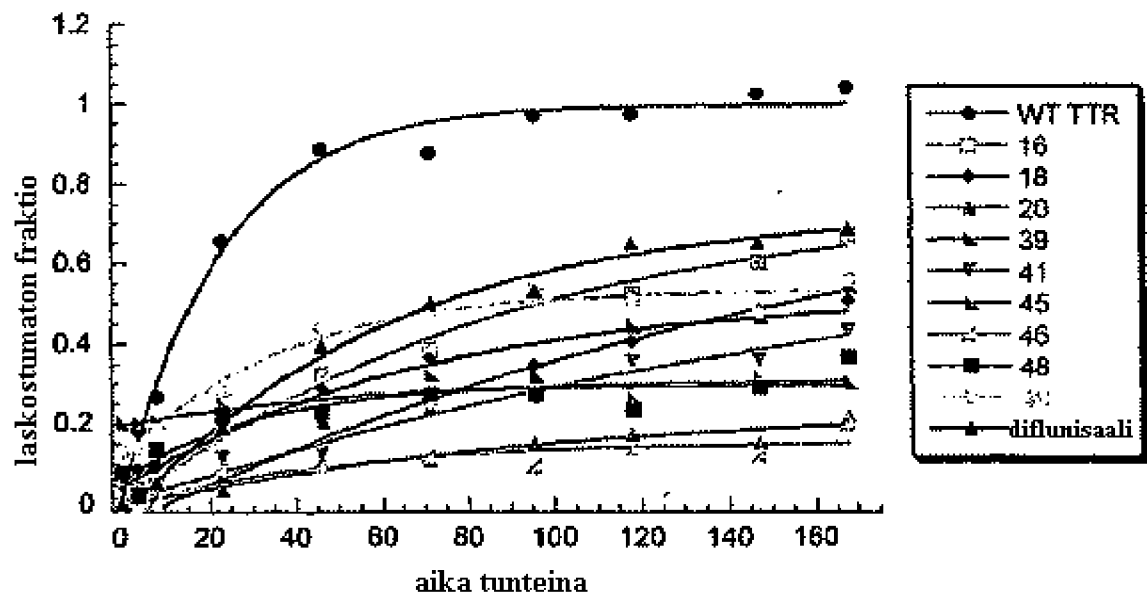
1. Yhdiste 6-karboksi-2-(3,5-dikloorifenyyli)-bentsoksatsoli tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.
2. 6-karboksi-2-(3,5-dikloorifenyyli)-bentsoksatsolin tai sen farmaseuttisen suolan
5 käyttö transtyretiiniamyloiditautin hoitoon tarkoitetun lääkkeen valmistamiseksi.
3. Yhdiste 6-karboksi-2-(3,5-dikloorifenyyli)-bentsoksatsoli tai sen farmaseuttinen suola, käytettäväksi transtyretiiniamyloiditautin hoidossa.
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, yhdiste käytettäväksi patenttivaatimuksen 3 mukaisesti tai patenttivaatimuksen 2 mukainen käyttö, jossa farmaseuttisesti
10 hyväksyttävä suola on N-metyyli-D-glukamiini.
5. Farmaseuttinen koostumus, joka käsittää yhdisteen, kuten on kuvattu vaatimuksessa 1 tai vaatimuksessa 4, ja farmaseuttisesti hyväksyttävää kantajaa.
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen farmaseuttinen koostumus, jossa farmaseuttinen koostumus on formuloitu kerta-annoksen antamista varten.
- 15 7. Patenttivaatimuksen 2 tai patenttivaatimuksen 4 mukainen käyttö, jossa transtyretiiniamyloiditauti on perinnöllinen amyloidinen polyneuropatia, perinnöllinen amyloidinen kardiomyopatia, perinnöllinen systeeminen amyloidoosi tai maksan siirrosta seuraava sydämen amyloidoosi.



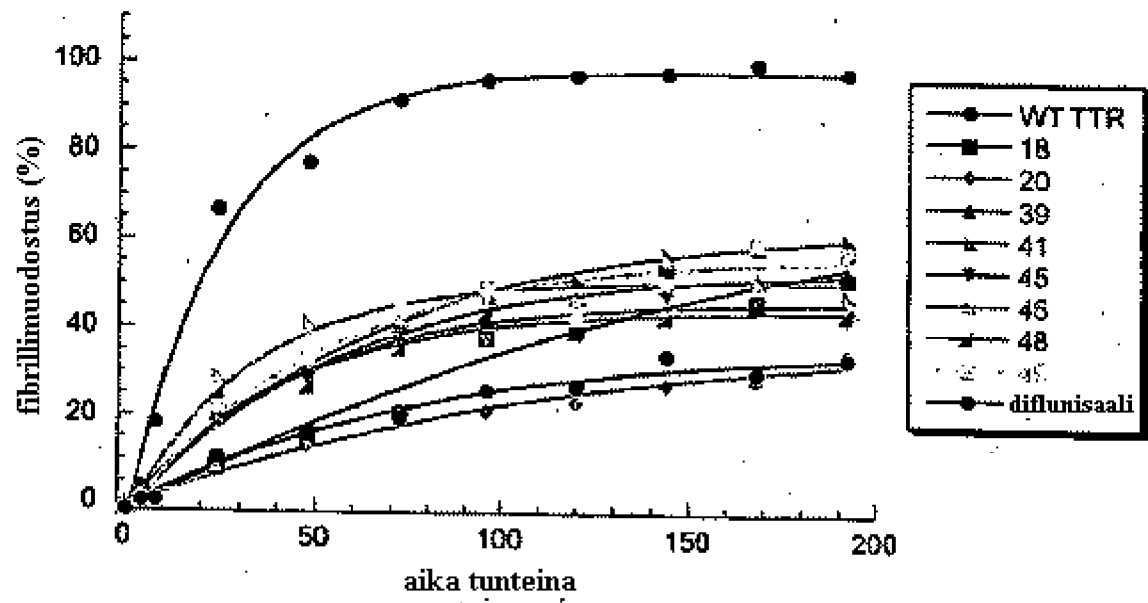
Kuvio 1



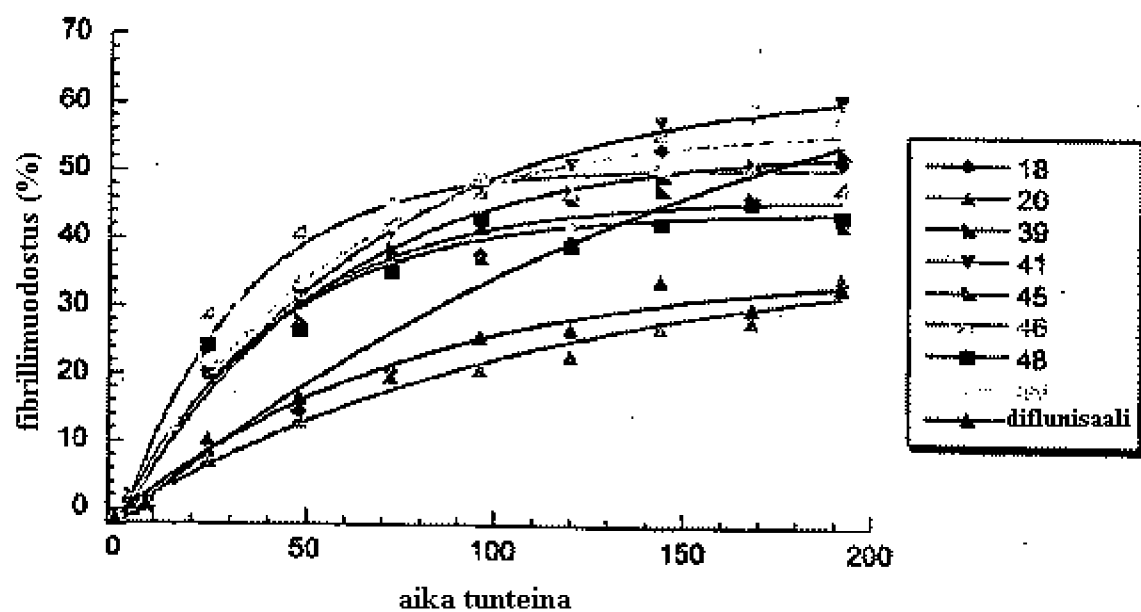
Kuvio 2A



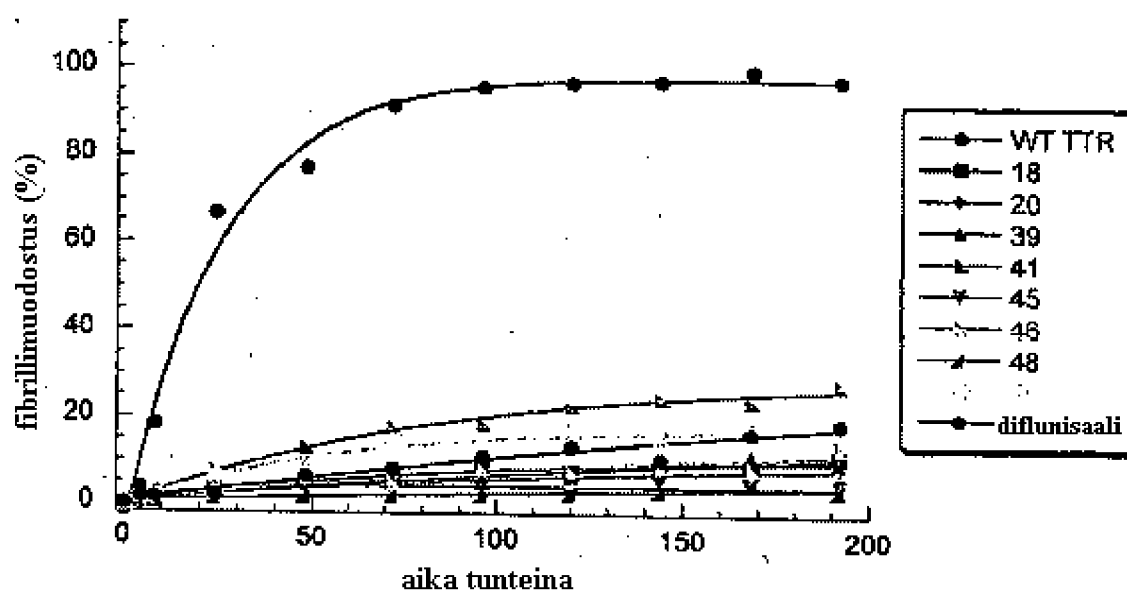
Kuvio 2B



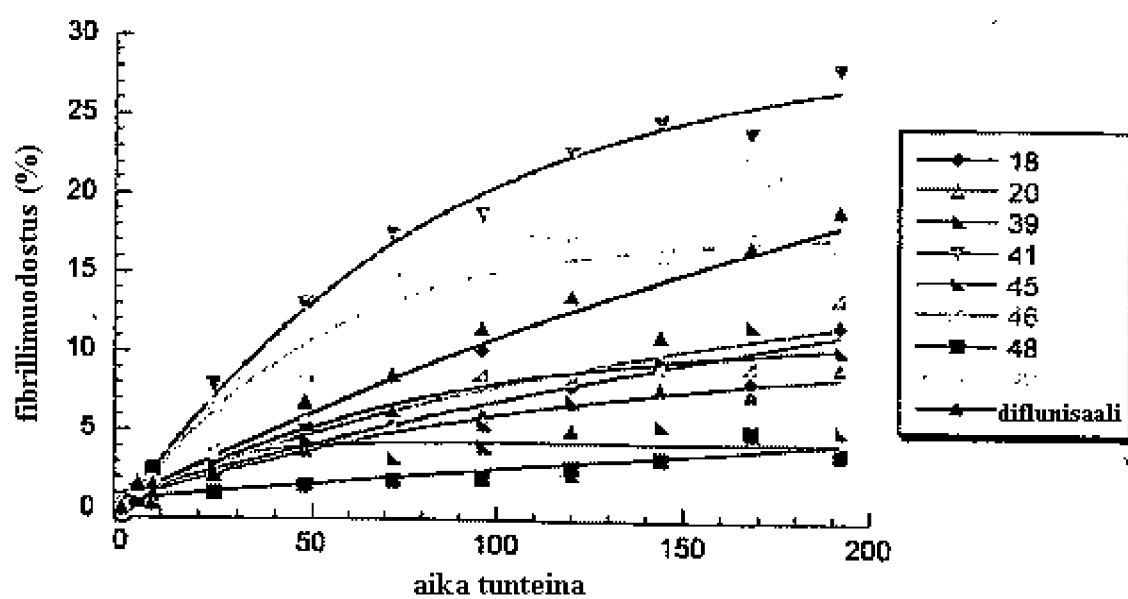
Kuvio 3A



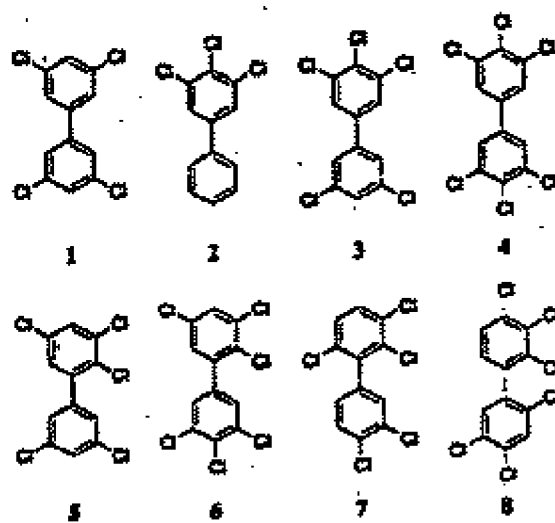
Kuvio 3B

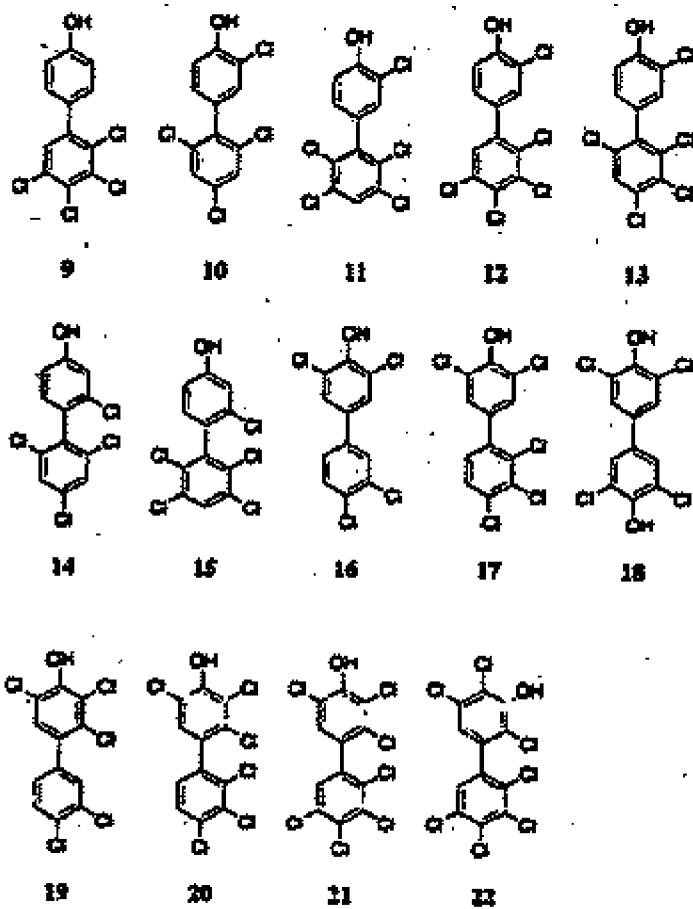


Kuvio 4A

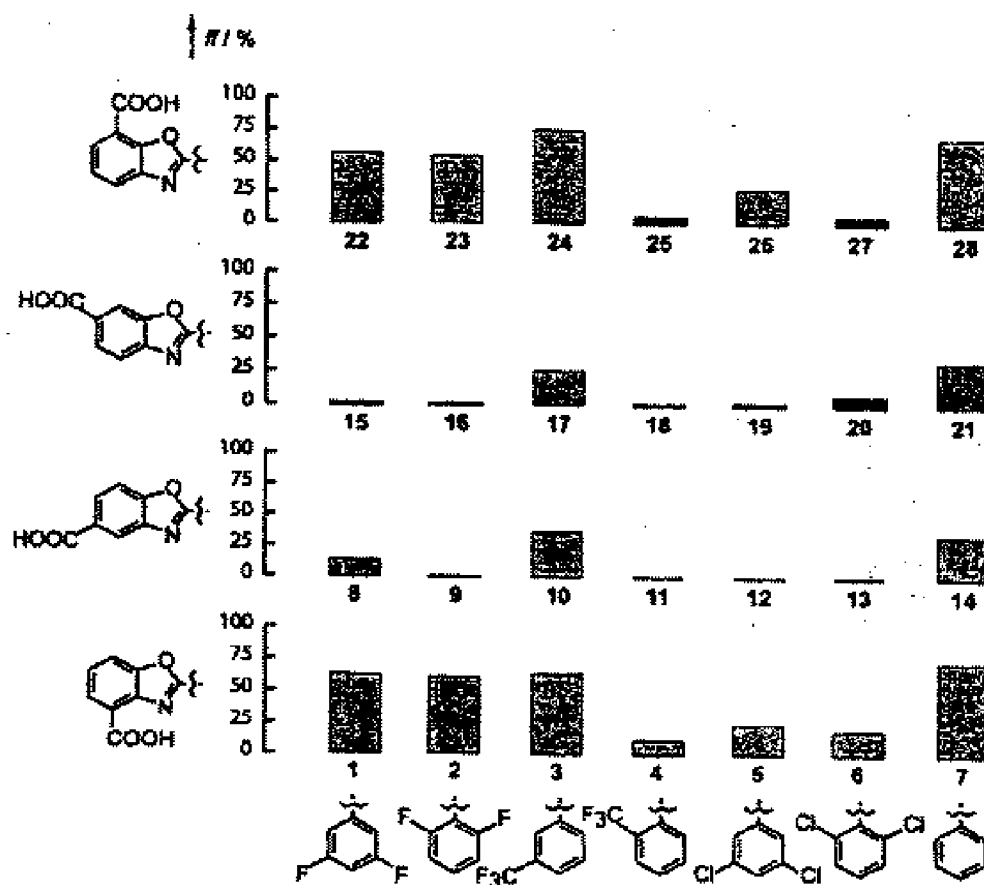


Kuvio 4B

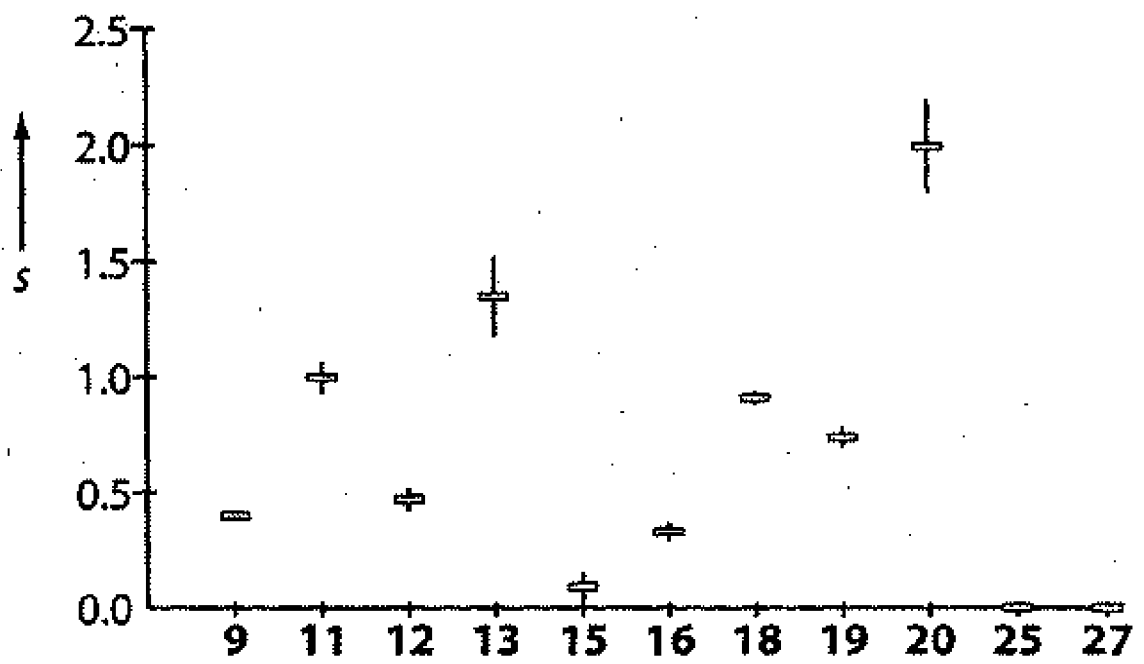
**Kuvio 5**



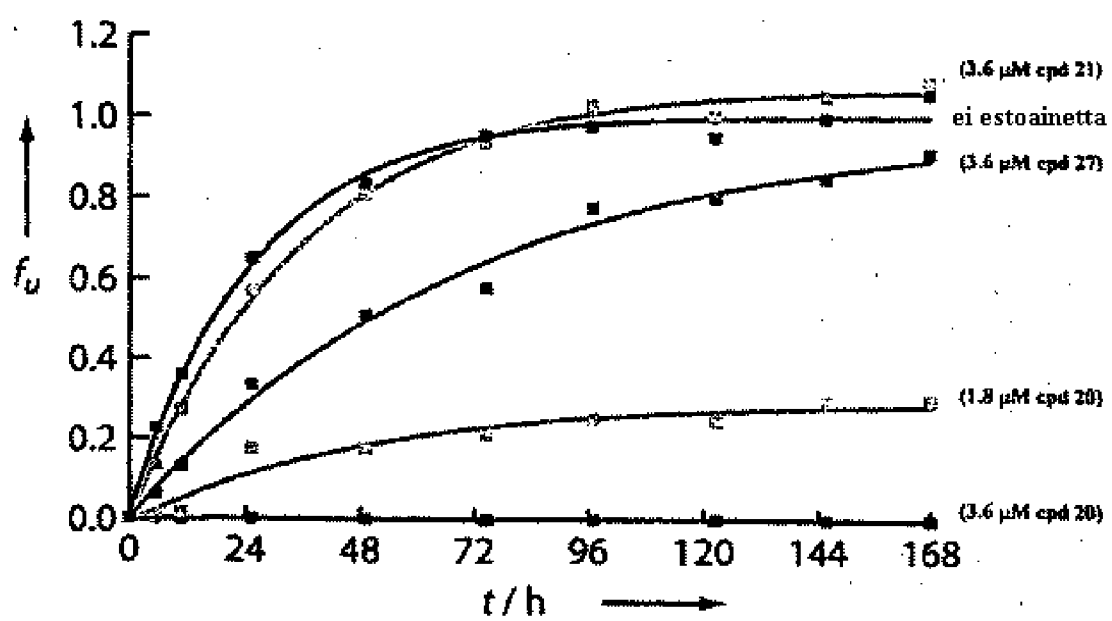
Kuvio 6



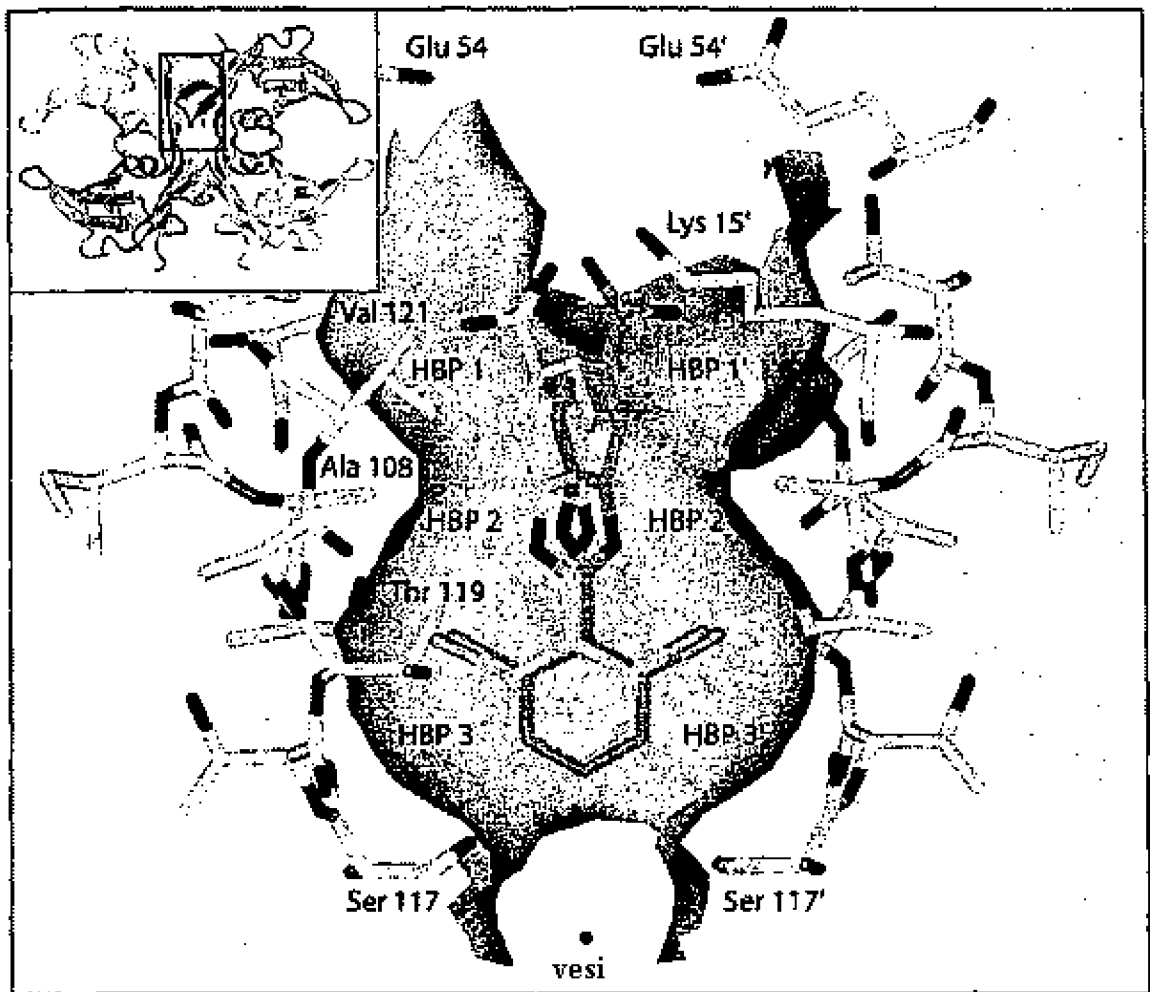
Kuvio 7



Kuvio 8



Kuvio 9



Kuvio 10