



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118845759 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 29

(21) 申请号 202410870792.1

(22) 申请日 2019.06.19

(30) 优先权数据

18382439.0 2018.06.19 EP

(62) 分案原申请数据

201980054686.3 2019.06.19

(71) 申请人 帕布罗·德奥拉韦德大学

地址 西班牙塞维利亚

(72) 发明人 曼纽尔·J·穆诺兹

安吉尔·M·卡里安

梅赛德斯·M·佩雷斯-吉美内兹

(74) 专利代理机构 华进联合专利商标代理有限

公司 44224

专利代理师 黄爱娇

(51) Int. Cl.

A61K 31/366 (2006.01)

A61K 31/445 (2006.01)

A61K 31/27 (2006.01)

A61K 31/55 (2006.01)

A61K 31/13 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61P 25/14 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

权利要求书1页 说明书16页 附图9页

(54) 发明名称

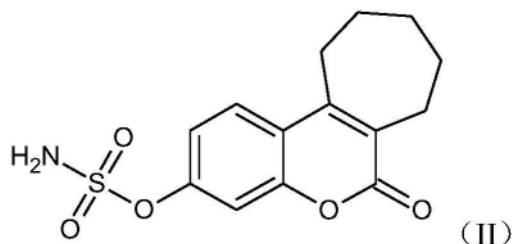
用于治疗和/或预防蛋白质聚集疾病的组合物

(57) 摘要

蛋白质病变涵盖了广泛的病痛,包括神经退行性疾病(例如阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、多谷氨酸胺疾病如亨廷顿氏病的亨廷顿蛋白、朊病毒病);其他非神经系统蛋白的淀粉样变性,所述非神经系统蛋白例如I1-抗胰蛋白酶、免疫球蛋白轻链和重链,乳凝集素、载脂蛋白、凝溶胶蛋白、溶菌酶、纤维蛋白原、心房利钠因子、角蛋白、乳铁蛋白和 β -2微球蛋白等);镰状细胞疾病;白内障;囊性纤维化;色素性视网膜炎;和肾原性尿崩症。出乎意料的是,硫酸酯酶抑制剂的施用适合于治疗和/或预防通常与蛋白质病变相关的蛋白毒性。因此,本发明提供了包含硫酸酯酶抑制剂的用于治疗蛋白质病变的组合物。

1. 组合物在制备用于在蛋白质聚集疾病发作后治疗所述蛋白质聚集疾病的药物中的用途,其中,向需要其的患者施用所述组合物;

所述组合物包含具有式(II)结构的硫酸酯酶抑制剂或其药学上可接受的盐,



其中所述蛋白质聚集疾病为阿尔茨海默氏病、帕金森氏病或亨廷顿氏病。

2. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,向患者施用0.01mg/kg至100mg/kg的剂量。

3. 根据权利要求1或2所述的用途,其特征在于,所述组合物还包含药学上可接受的载体。

4. 根据权利要求1或2所述的用途,其特征在于,经皮、舌下、静脉内、鼻内、脑室内、动脉内、脑内、肌内、腹膜内、口服或经由吸入施用所述组合物。

5. 根据权利要求1或2所述的用途,其特征在于,口服所述组合物。

6. 根据权利要求1或2所述的用途,其特征在于,所述组合物与多奈哌齐、卡巴拉汀、加兰他敏、美金刚、左旋多巴、卡比多巴或四苯喹啉一起用于联合治疗。

7. 根据权利要求1或2所述的用途,其特征在于,向患者施用0.01mg/kg至10mg/kg的剂量。

8. 根据权利要求1或2所述的用途,其特征在于,向患者施用0.05mg/kg至1mg/kg的剂量。

9. 根据权利要求1或2所述的用途,其特征在于,所述组合物为冻干的。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的用途,其特征在于,所述蛋白质聚集疾病为阿尔茨海默氏病。

11. 根据权利要求1至9中任一项所述的用途,其特征在于,所述蛋白质聚集疾病为帕金森氏病。

12. 根据权利要求1至9中任一项所述的用途,其特征在于,所述蛋白质聚集疾病为亨廷顿氏病。

用于治疗和/或预防蛋白质聚集疾病的组合物

技术领域

[0001] 本发明被包括在医学领域内,并且提供了用于治疗 and/或预防蛋白质聚集疾病的组合物。

背景技术

[0002] 生物体内的器官和细胞的适当起作用取决于蛋白质的适当功能。蛋白质是具有如下的生物实体:一级氨基酸序列;二级结构,其形成蛋白质结构域,最重要的是,包括 α 螺旋和 β 折叠;三级结构,即肽链在三个维度上复杂折叠的结果,这种结果涉及多肽链主链和氨基酸侧链相互作用。一些蛋白质在多亚基复合物中起作用,在多亚基复合物中,多种蛋白质排列成四级结构对于它们的适当功能至关重要。

[0003] 蛋白质无法折叠成正确的三维结构可导致被称为蛋白质病(protopathy)的疾病(有时也称为蛋白质聚集疾病、蛋白质错误折叠疾病、蛋白质病或蛋白质构象病)。无法折叠可能是由于蛋白质基因中的一种或多种突变,也可能是由于诸如氧化应激、碱中毒、酸中毒、pH移变和渗透压休克等环境因素造成的。蛋白质的错误折叠有时可能导致团集或聚集成淀粉样蛋白斑块或原纤维,从而可加剧疾病。蛋白质病涵盖了广泛的病痛,包括神经退行性疾病(例如阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、多谷氨酰胺疾病如亨廷顿氏病的亨廷顿蛋白、朊病毒病);其他非神经系统蛋白的淀粉样变性,所述非神经系统蛋白例如I β -抗胰蛋白酶、免疫球蛋白轻链和重链,乳凝集素、载脂蛋白、凝溶胶蛋白、溶菌酶、纤维蛋白原、心房利钠因子、角蛋白、乳铁蛋白和 β -2微球蛋白等;镰状细胞疾病;白内障;囊性纤维化;色素性视网膜炎;和肾原性尿崩症。

[0004] 淀粉样变性是指嗜刚果红性绿色双折射原纤维形式的蛋白质的病理性沉积,在用刚果红染色时,呈分散性或呈局部淀粉样瘤形式。这样的沉积是数种疾病的症状,所述疾病例如阿尔茨海默氏病、炎症相关性淀粉样蛋白、II型糖尿病、牛海绵状脑病(BSE)、克雅氏病(CJD)、瘙痒病和原发性淀粉样变性。

[0005] 淀粉样变性一般分为三类:主要系统性淀粉样变性,主要局部淀粉样变性和其他淀粉样变性。主要系统性淀粉样变性包括:慢性炎性病况(例如结核、骨髓炎等);非感染性病况,例如青少年类风湿性关节炎、强直性脊柱炎和克罗恩氏病等;家族性地中海热、浆细胞病(原发性淀粉样变)和各种家族性多发性神经病和心肌病。主要局部淀粉样变性包括:透析相关性淀粉样变性、阿尔茨海默氏病、唐氏综合征、遗传性脑出血(荷兰)和老年人非创伤性脑出血。其他淀粉样变性包括:家族性多神经病(Iowa)、家族性淀粉样变性(Finnish)、遗传性脑出血(Icelandic)、CJD、甲状腺髓样癌、心房淀粉样蛋白和糖尿病(胰岛素瘤)。其他淀粉样变性包括可以在以下中参考的那些:Louis W.Heck,“The Amyloid Diseases”in Cecil’s Textbook of Medicine 1504-6(W.B.Saunders&Co.,Philadelphia,Pa.;1996)。

[0006] 引起CJD和Gerstmann-Sträussler-Scheinker(GSS)病的传染性海绵状脑病由B.Chesebro等人,“Transmissible Spongiform Encephalopathies:A Brief Introduction”in FIELD’S VIROLOGY 2845-49(3rd Edition;Raven Publishers,

Philadelphia, Pa.; 1996) 以及在 D.C. Gajdusek, "Infectious amyloids: Subacute Spongiform Encephalopathies as Transmissible Cerebral Amyloidoses," 2851-2900 in *FIELDS VIROLOGY* (1996) 中描述。这些疾病中的许多疾病可能由朊病毒(一种传染性蛋白质)介导。参见 S.B. Prusiner, "Prions" in *FIELDS VIROLOGY* 2901-50 (1996) 以及其中包含的参考文献。

[0007] 试图消除特定的原纤维一直是淀粉样变性重要研究的目标,但没有成功。当前淀粉样变性的治疗涉及化学治疗剂或类固醇,例如美法仑和地塞米松。然而,由于缺乏特异性,这样的治疗不适用于所有患者并且在许多情况下无效(WO 2017/075540 A1)。类似地,不一定与淀粉样蛋白的形成相关的其他蛋白质病变的治疗也取得了有限的成功。因此,非常需要可以安全有效地治疗或预防蛋白质病变的替代方案。

[0008] 本发明的发明人最初有志于揭示掌控对衰老的遗传控制的新元素,以增进我们对这种复杂的生物过程的理解。为此,他们分离了耐热突变体,并鉴定了含有失活点突变的 *sul-2* 基因(编码秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*) 硫酸酯酶家族三个成员之一的基因)的等位基因。发明人发现携带失活形式的 *sul-2* 基因的蠕虫比野生型活得更久。

[0009] 硫酸酯酶是参与不同生物学过程的大蛋白家族,它们影响广泛的底物。*sul-2* 在硫酸酯酶系统发生树中的位置(collocation)尚不确定。但是,与哺乳动物硫酸酯酶相比,*sul-2* 簇接近于可能起源于共同的祖先基因的 H、F、E、D 型芳基硫酸酯酶和 C 型类固醇硫酸酯酶。发明人假设 *sul-2* 可以通过修饰硫酸化类固醇激素来发挥其活性。

[0010] 类固醇激素硫酸酯酶是参与不同过程诸如刺激激素依赖性癌症增殖的保守蛋白(Mueller 等人, 2015. *Endocr Rev.* 36(5):526-63)。已经产生了这类酶的特异性抑制剂,其中之一是 STX64(Nussbaumer 和 Billich, 2004. *Med Res Rev.* 24(4):529-76)。STX64 已被用于治疗激素依赖性癌症的患者(Stanway 等人, 2006. *Clin Cancer Res.* 12(5):1585-92)。发明人用 STX64 处理野生型蠕虫并观察到与 *sul-2* 突变体相同的长寿效应。然而, STX64 没有进一步增加 *sul-2* 缺失突变体的寿命,表明 STX64 增加寿命的机制是通过抑制 SUL-2 的硫酸酯酶活性导致的(WO 2014/154927 A1)。

附图说明

[0011] 图1:类固醇激素硫酸酯酶(STS)活性的降低减轻了秀丽隐杆线虫帕金森氏病模型品系 NL5901 的蛋白毒性症状(Van Ham 等人, 2010. *Cell* 142:601-612)。肌肉细胞中表达 α -突触核蛋白的线虫随着其年龄的增长而活动性降低(以每分钟蠕虫的头部穿过身体的纵轴的次数(摇摆(pitch))来衡量),但是当(A)线虫包含 *sul-2*(*gk187*)等位基因,以及(B)线虫用 STX64 处理时,速率会减慢。 $n=20$;***表示 $p<0.001$ 。

[0012] 图2:类固醇激素硫酸酯酶(STS)活性的降低改变了秀丽隐杆线虫帕金森氏病模型品系 NL5901 中 α -突触核蛋白聚集的方式(Van Ham 等人, 2010. *Cell* 142:601-612)。图中显示了表达与 YFP 融合的 α -突触核蛋白的线虫和另外包含失活 *sul-2* 等位基因即 *sul-2*(*gk187*)的表达相同 α -突触核蛋白构建体的线虫的(A)聚集体总数、(B)大小 $\geq 3\mu\text{m}$ 的聚集体的数目,以及(C)大小 $\leq 1\mu\text{m}$ 的聚集体的数目。 $n=20$;***表示 $p<0.001$; *表示 $p<0.05$ 。

[0013] 图3:类固醇激素硫酸酯酶(STS)活性的降低改变了秀丽隐杆线虫帕金森氏病模型品系 NL5901 中 α -突触核蛋白聚集的方式(Van Ham 等人, 2010. *Cell* 142:601-612)。图中显

示了表达与YFP融合的 α -突触核蛋白的线虫和另外用STX64处理的表达相同 α -突触核蛋白构建体的线虫的(A)聚集体总数、(B)大小 $\geq 3\mu\text{m}$ 的聚集体的数目,以及(C)大小 $\leq 1\mu\text{m}$ 的聚集体的数目。 $n=20$;***意为 $p<0.001$;*表示 $p<0.05$ 。

[0014] 图4:类固醇激素硫酸酯酶(STS)活性的降低减轻了秀丽隐杆线虫帕金森氏病模型品系UA44的蛋白毒性症状(Cooper等人,2006.Science 313:324-328)。(A)当线虫包含失活sul-2(gk187)等位基因时,表达人 α -突触核蛋白的GFP标记的多巴胺能神经元的存活率增加。图中表示当线虫包含野生型sul-2等位基因或失活sul-2(gk187)等位基因时,在第6天,线虫中活神经元的数目。(B)在第9天,包含野生型sul-2等位基因的线虫和包含失活sul-2(gk187)等位基因的线虫的代表性图像。黑色箭头指向活多巴胺能神经元。 $n=37$; $p<0.0001$ 。

[0015] 图5:类固醇激素硫酸酯酶(STS)活性的降低减轻了秀丽隐杆线虫亨廷顿氏病模型品系AM140的蛋白毒性症状(Morley等人,2002.PNAS.99:10417-10422)。线虫已被修饰为表达与YFP融合的35多聚谷氨酰胺重复序列,并且在成虫期第5天时对荧光聚集体的数目计数。(A)图中显示了包含sul-2的野生型等位基因的线虫和包含sul-2的失活突变体等位基因的线虫之间的比较。(B)图中显示了包含sul-2的野生型等位基因的线虫和另外用STX处理的包含sul-2的失活突变体等位基因的线虫之间的比较。 $n=20$;***表示 $p<0.001$ 。

[0016] 图6:类固醇激素硫酸酯酶(STS)活性的降低减轻了秀丽隐杆线虫阿尔茨海默氏病模型品系CL2006的蛋白毒性症状(Link,1995.PNAS.92:9368-9372)。肌肉细胞中表达 β -淀粉样蛋白的线虫会随着其年龄的增长而患上麻痹症(paralysis),但是当(A)线虫包含sul-2(gk187)等位基因,以及(B)线虫用STX64处理时,速率会减慢。 $n=50$; $p<0.001$ 。

[0017] 图7:STX64处理缓解了阿尔茨海默氏病小鼠模型中的 β -淀粉样蛋白沉积和认知缺陷。(A)在海马体中注射了 β -淀粉样蛋白寡聚体的野生型小鼠的被动回避试验中,海马体内施用STX64和口服施用STX64的效果。每组中的小鼠的数目 >5 。(B)在3到4周的溶媒或STX64摄入后(以 0.005mg/ml 在饮用水中),评估大于15月龄的APP-PS1小鼠的额叶皮质和海马体中的代表性 β -淀粉样蛋白免疫反应图像。(C)至(E),在口服施用溶媒或STX64到4周后,大于15月龄的APP-PS1小鼠的额叶皮质和海马体中的 β -淀粉样蛋白面积的百分比(C)、沉积密度(D)和平均斑块大小(E)的定量。每组 $n=4$ 只小鼠。(F)APP-PS1小鼠中 β -淀粉样蛋白沉积的时程以及3到4周STX64口服治疗对额叶皮质和海马体中 β -淀粉样蛋白面积的影响。使用的显微照片数为每只小鼠大于三张。(G)大于15月龄的APP-PS1小鼠中口服施用STX64的效果,以及在被动回避测试中大于15月龄的APP-PS1和野生型小鼠的比较。每组中的小鼠的数目 >5 。在组织学分析中,*表示同一实验组的短期和长期记忆练习(memory session)(分别为STM和LTM)与训练练习之间的统计学显著差异;+表示每个实验组和 β -淀粉样蛋白组之间的STM和LTM练习之间的统计学显著差异。一个符号表示 $p<0.05$;两个重复符号表示 $p<0.01$,三个两个重复符号表示 $p<0.001$ 。

[0018] 图8:在亨廷顿氏病小鼠模型中,STX64阻止了运动活动的退化。每天用包含STX64的饮用水或用溶媒本身治疗1月龄的R6/1小鼠。在2月龄时,测试了小鼠的运动活动。每组 $n>5$ 只小鼠。结果表示平均值 \pm SEM。*, $p<0.05$ 。

[0019] 图9:阿尔茨海默氏病模型(即秀丽隐杆线虫的GMC101品系)中STX64和EMATE的比

较(McColl等人,2012.Mol Neurodegener.7:57)。(A)在 $su1-2(gk187)$ 缺失背景下,麻痹的蠕虫的数目有所减少。图中显示了从三个生物重复样($n=100$ 条蠕虫)中获得的总数。双侧卡方, p 值=0.0161。(B)用 $1\mu\text{g/ml}$ 的STX64处理减少了麻痹的蠕虫的数目。图中显示了从三个生物重复样($n=120$ 条蠕虫)中获得的总数。双侧卡方, p 值=0.0014。(C)用 $1\mu\text{g/ml}$ 的EMATE处理减少了麻痹的蠕虫的数目。图中显示了从三个生物重复样($n=117$ 条蠕虫)中获得的总数。双侧卡方, p 值=0.0091。

发明内容

[0020] 令人惊讶地,发明人发现STX64能够治疗或预防秀丽隐杆线虫帕金森模型、秀丽隐杆线虫亨廷顿模型和秀丽隐杆线虫阿尔茨海默氏病模型中的寡聚体和/或淀粉样蛋白的形成(参见图1-6)。在帕金森氏病、亨廷顿氏病和阿尔茨海默氏病中,发病机理是由蛋白质聚集体的产生和/或沉积所驱动的(Murphy和Levine,2010.J Alzheimers Dis.19(1):311; Stefanis,2012.Cold Spring Harb Perspect Med.2(2):a009399;Daldin等人,2017.Sci Rep.7(1):5070)。因此,在这些模型中对聚集体类的治疗或预防使得以下变得合理:STX64可用于治疗和/或预防这些蛋白质聚集疾病。这在阿尔茨海默氏病的小鼠模型中得到证实,在该模型中,发现STX64减少了 β -淀粉样蛋白斑块形成并逆转了由海马体内施用 β -淀粉样蛋白寡聚体而引起的以及阿尔茨海默氏病转基因小鼠模型中的认知缺陷(参见图7)。

[0021] 进一步地,包含硫酸酯酶基因中的失活突变的秀丽隐杆线虫同样不太容易形成有害的聚集体,这使得以下变得合理:该作用不仅与STX64有关,而且适用于任何硫酸酯酶抑制剂。这种预防/治疗效果在三种不同的蛋白质聚集疾病(这些疾病中毒性蛋白在肌肉细胞或神经元细胞中表达)的模型中获得,这一事实使得以下变得合理:硫酸酯酶抑制剂可用于治疗和/或预防任何蛋白质聚集疾病。

[0022] 因此,在第一方面,本发明提供了一种用于治疗和/或预防蛋白质聚集疾病的组合物,其包含硫酸酯酶抑制剂,所述组合物用于治疗 and/或预防优选患者和/或动物的蛋白质聚集疾病。

[0023] 进一步地,在第二方面,本发明提供了一种试剂盒,其用于制造用于治疗 and/或预防蛋白质聚集疾病的药物,该试剂盒包含:(i)硫酸酯酶抑制剂;(ii)药学上可接受的载体和/或稀释剂。

具体实施方式

[0024] 定义

[0025] 术语“个体”、“患者”或“对象”在本申请中可互换使用以指定人类,并且绝不意味着以任何方式进行限制。“个人”、“患者”或“对象”可以为任何年龄、性别和身体状况。本申请中使用的术语“动物”是指非人的任何多细胞真核异养生物。在优选的实施方式中,动物选自由以下组成的组:猫、狗、猪、雪貂、兔子、沙鼠、仓鼠、豚鼠、马、蠕虫、大鼠、小鼠、牛、绵羊、山羊、羊驼、骆驼、驴、美洲驼、牦牛、长颈鹿、大象、猫鼬、狐猴、狮子、老虎、袋鼠、考拉、蝙蝠、猴子、黑猩猩、大猩猩、熊、儒艮、海牛、海豹和犀牛。

[0026] 如本文所使用,“药学上可接受的载体”或“药学上可接受的稀释剂”是指任何和所有与药学施用相容的溶剂、分散介质、涂料、抗菌和抗真菌剂、等张和延缓吸收剂。术语“药

学上可接受的赋形剂”是指这样的任何物质：与药物的活性成分一起配制、出于长期稳定性目的而包含、对含有少量有效成分的固体制剂进行填充；或是指在最终剂型中对活性成分赋予治疗的增强，例如促进药物吸收、降低粘度或增强溶解性。赋形剂还可用于制造过程中，例如通过促进粉末的流动性或不粘特性，以有助于操控有关的活性物质，此外还有助于体外稳定性，例如防止在预期的货架期内变性或聚集。这样的用于药学活性物质的介质和试剂的使用是本领域中熟知的。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对受体是无毒性的，并且在不限本本发明范围的情况下，包括：另外的缓冲试剂；防腐剂；共溶剂；抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸；螯合剂，例如EDTA；金属配合物（例如Zn-蛋白质配合物）；生物可降解聚合物，诸如聚酯；形成盐的平衡离子，例如钠、多元糖醇；氨基酸，诸如丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸和苏氨酸；有机糖或糖醇，例如乳糖醇、水苏糖、甘露糖、山梨糖、木糖、核糖、核糖醇、myoinositol、myoinositol、半乳糖、乳糖醇、甘油、环多元醇（例如，肌醇）、聚乙二醇；含硫还原剂，例如尿素、谷胱甘肽、硫辛酸、硫代乙酸钠、硫代甘油、 α -单硫代甘油和硫代硫酸钠；低分子量蛋白质，例如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或其他免疫球蛋白；和亲水聚合物，例如聚乙烯吡咯烷酮。也可以包括其他药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂，例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy 22nd edition, Pharmaceutical press (2012), ISBN-13: 9780857110626中描述的那些。

[0027] 如本申请中所使用的，术语“治疗”和“疗法”是指以修复健康问题为目标，旨在治愈和/或缓解疾病和/或症状而使用的一套卫生、药理、外科和/或物理手段。术语“治疗”和“疗法”包括预防性和治愈性方法，因为二者均是针对维持和/或重建个体或动物的健康。不论症状、疾病和失能的起源如何，在本申请的上下文中，应将施用合适的药物以缓解和/或治愈健康问题解释为治疗或疗法的一种形式。

[0028] 如本申请中所使用的，术语“预防”是指用于预防疾病和/或症状的发作和/或发展的一套卫生、药理、外科和/或物理手段。术语“预防”涵盖预防性方法，因为这些方法用于维持动物或个体的健康。

[0029] 术语“硫酸酯酶抑制剂”是指能够降低催化硫酸酯水解的酯酶类的酶的活性的任何物质。该物质可以是与任何以下元件结合，并降低或抑制与该物质结合的分子的表达和活性和/或该物质的细胞内或细胞外信号传导，从而导致硫酸酯酶的活性被全部或部分抑制的分子：编码硫酸酯酶的基因、所述基因的转录因子、所述基因的任何表达产物，例如但不限于信使RNA或硫酸酯酶。抑制剂可以选自但不限于由以下组成的清单：针对硫酸酯酶的拮抗剂（优选化学的）、针对硫酸酯酶的沉默RNA或特异性抗体（优选的抗体是单克隆的）；在本发明中，该抗体可以定义为针对硫酸酯酶的作用的中和抗体。硫酸酯酶活性的化学抑制剂的实例是但不限于替代性底物（例如系列2-（羟苯基）吲哚硫酸酯中的替代性底物）、对STS表现出抑制活性的合成或天然类固醇（例如5-雄甾烯-3 β , 17 β -二醇-3硫酸酯）、竞争性抑制剂（例如E1-MTP或EMATE）、非雌激素抑制剂（例如DU-14 (CAS NO: 186303-55-9)、COUMATE (4-甲基香豆素-7-O-氨基磺酸盐) 或STX64 (即式(II)的化合物) 或其他，例如KW-2581或STX213, 其针对硫酸酯酶的IC₅₀已在不同研究中确定 (Purohit和Foster, 2012, J. Endocrinol., 212(2): 99-110)。

[0030] 术语“类固醇激素硫酸酯酶”（“STS”）是指参与类固醇代谢的任何硫酸酯酶。特别

地,所述酶催化硫酸化类固醇前体向游离类固醇的转化。已经对人类中发现的示例性STS进行了测序和表征,并将数据以登录号P08842保藏在UniProtKB数据库中。术语“类固醇激素硫酸酯酶抑制剂”是指能够降低类固醇激素硫酸酯酶活性的任何物质。该物质可以是与任何以下元件的任何元件结合,并降低或抑制与该物质结合的分子的表达和活性和/或该物质的细胞内信号传导,从而导致STS酶的活性被全部或部分抑制的分子:编码STS酶的基因、所述基因的转录因子、所述基因的任何表达产物,例如但不限于信使RNA或STS酶。抑制剂可以选自但不限于由以下组成的清单:针对STS酶的拮抗剂(优选化学的)、针对STS酶的沉默RNA或特异性抗体(优选的抗体是单克隆的);在本发明中,该抗体可以定义为针对STS酶的作用的中和抗体。STS酶活性的化学抑制剂的实例是但不限于替代性底物(例如系列2-(羟苯基)吲哚硫酸酯中的替代性底物)、对STS表现出抑制活性的合成或天然类固醇(例如5-雄甾烯-3 β ,17 β -二醇-3硫酸酯)、竞争性抑制剂(例如E1-MTP或EMATE)、非雌激素抑制剂(例如DU-14、COUMATE(4-甲基香豆素-7-0-氨基磺酸盐)或STX64(即式(II)的化合物))或其他,例如KW-2581或STX213,其针对硫酸酯酶的IC₅₀已在不同研究中确定(Purohit和Foster,2012, J.Endocrinol.,212(2):99-110)。

[0031] 术语“蛋白质聚集疾病”、“蛋白质病变”、“蛋白质病(proteinopathy)”或“蛋白质错误折叠疾病”是指其中某些蛋白质在结构上变得异常,从而破坏身体细胞、组织和器官功能的任何疾病。通常,蛋白质无法折叠成它们的正常构型。在这种错误折叠状态下,蛋白质可能会以某种方式变得有毒性,或者它们可能失去其正常功能。蛋白质聚集疾病的非限制性实例包括:系统性AL淀粉样变性、阿尔茨海默氏病、2型糖尿病、帕金森氏病、传染性海绵状脑病例如牛海绵状脑病、致命性家族性失眠症、亨廷顿氏病、甲状腺髓样癌、心律失常、动脉粥样硬化、类风湿性关节炎、主动脉内侧淀粉样蛋白、泌乳素瘤、家族性淀粉样多神经病、遗传性非神经性系统性淀粉样变性、透析相关性淀粉样变性、芬兰型淀粉样变性、格子状角膜营养不良、大脑淀粉样血管病、脑淀粉样血管病(冰岛型)、偶发性包涵体肌炎、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、朊病毒相关性或海绵状脑病,如克雅氏病、路易氏体痴呆、额颞叶痴呆伴帕金森病、脊髓小脑共济失调、脊髓小脑共济失调、脊髓延髓肌肉萎缩症、遗传性齿状核红核苍白球丘脑下部萎缩、家族性英国型痴呆、家族性丹麦型痴呆、非神经性局部疾病如在II型糖尿病中的非神经性局部疾病、甲状腺髓样癌、心房淀粉样变性、遗传性脑出血伴淀粉样变性、垂体性泌乳素瘤、注射局部淀粉样变性、主动脉内侧淀粉样变性、遗传性格子状角膜营养不良、倒睫症相关角膜淀粉样变性、白内障、钙化上皮牙源性肿瘤、肺泡蛋白沉着症、包涵体肌炎、皮肤苔藓淀粉样变性、和非神经性系统性淀粉样变性如AL淀粉样变性、AA淀粉样变性、家族性地中海热、老年性系统性淀粉样变性、家族性淀粉样变性多神经病、血液透析相关淀粉样变性、ApoAI淀粉样变性、ApoAII淀粉样变性、ApoAIV淀粉样变性、芬兰型遗传性淀粉样变性、溶菌酶淀粉样变性、纤维蛋白原淀粉样变性、冰岛型遗传性脑淀粉样血管病、家族性淀粉样变性和多个组织中发生的系统性淀粉样变性,如轻链淀粉样变性,以及其他各种神经退行性失调。

[0032] 术语“蛋白质聚集体”是指引起蛋白质聚集疾病的消极进展和/或与蛋白质聚集疾病的消极进展相关的异常折叠的蛋白质的任何积累。

[0033] 术语“淀粉样蛋白”是蛋白质聚集体的一种形式,其中聚集体形成结合刚果红的无分支纤维,然后在正交偏光器之间观察时显示绿色双折射(例如,参见Eisenberg和Jucker,

2012.Cell.148(6):1188-203以及Sipe等人,2012.Amyloid.19(4):167-70。

[0034] 术语“寡聚体”是指引起蛋白质聚集疾病的消极进展和/或与蛋白质聚集疾病的消极进展相关的异常折叠的蛋白质的任何积累,并且不满足淀粉样蛋白的定义。例如,聚谷氨酰胺寡聚体导致亨廷顿氏病的消极进展和/或与亨廷顿氏病的消极进展相关(参见Hoffner和DiJan,2014.Brain Sci.4(1):91-122)。

[0035] 组合物和试剂盒

[0036] 在第一方面,本发明提供了一种用于治疗 and/或预防蛋白质聚集疾病的组合物,所述组合物包含硫酸酯酶抑制剂。

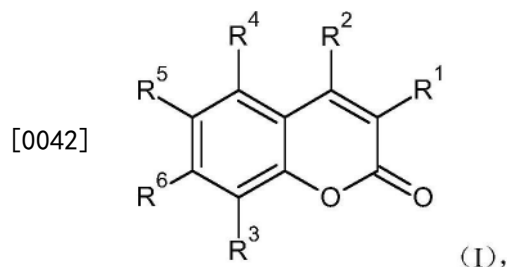
[0037] 在第二方面,本发明提供了一种试剂盒,其用于制造用于治疗 and/或预防蛋白质聚集疾病的药物,该试剂盒包含:(i) 硫酸酯酶抑制剂;(ii) 药学上可接受的载体和/或稀释剂。在优选的实施方式中,试剂盒进一步包含药学上可接受的赋形剂。

[0038] 下文提供了本发明的试剂盒和组合物的优选的实施方式。

[0039] 硫酸酯酶抑制剂

[0040] 在优选的实施方式中,硫酸酯酶抑制剂是类固醇激素硫酸酯酶抑制剂。优选地,类固醇激素硫酸酯酶抑制剂选自自由以下组成的清单:2-(羟苯基)吲哚硫酸酯、DU-14、5-雄甾烯-3 β ,17 β -二醇-3硫酸酯、E1-MTP、EMATE、COUMATE、STX64、KW-2581、STX213、吗啉、沉默RNA和针对STS酶的特异性抗体。

[0041] 在优选的实施方式中,硫酸酯酶抑制剂或类固醇激素硫酸酯酶抑制剂是式(I)的化合物:



[0043] 其中:

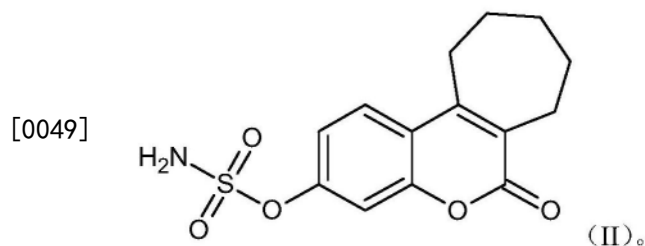
[0044] (a) R_1 至 R_6 独立地选自氢、卤素(氟、氯、溴、碘或砷)、羟基、氨基磺酸基(OSO_2NH_2)、烷基及其盐;

[0045] (b) R_1 至 R_6 中的至少一个为氨基磺酸基;并且

[0046] R_1 至 R_6 中的两个或更多个连接在一起形成另外的环状结构。

[0047] 在优选的实施方式中, R_1 和 R_2 形成包含3至10个碳的另外的环状结构。在优选的实施方式中, R_6 是 OSO_2NH_2 。在优选的实施方式中,烷基为 C_1 至 C_6 烷基。

[0048] 在优选的实施方式中,硫酸酯酶抑制剂是式(II)的化合物:



[0050] WO 97/30041中已经公开了合成上述式(I)和(II)的化合物的方法。

[0051] 蛋白质聚集疾病

[0052] 蛋白质聚集体如淀粉样蛋白和寡聚体已经与许多疾病相关联。在某些情况下,这些蛋白质聚集体可能会变得有毒性,并可能引起对细胞和组织的严重破坏。该毒性被认为是引起和/或促成蛋白质聚集疾病的病理的促成因素之一。

[0053] 进一步地,与蛋白质聚集疾病有关的蛋白质的异常加工和折叠可以在蛋白质聚集疾病的外在症状可被观察到的数十年之前开始(Jack等人,2010.Lancet Neurol.9(1):119-28)。因此,在优选的实施方式中,由于施用本发明的组合物中的任一种,在患者和/或动物中,淀粉样蛋白和/或寡聚体被去除,和/或所述淀粉样蛋白和/或寡聚体的形成被阻止。此外,在优选的实施方式中,硫酸酯酶抑制剂治疗和/或预防蛋白质聚集疾病中的蛋白毒性。术语“蛋白毒性”是指由蛋白质错误折叠引起的细胞功能的任何损害。

[0054] 通过直接靶向蛋白质聚集体的形成,本发明的组合物和试剂盒能够治疗和/或预防处于蛋白质聚集疾病的早期但尚未显示任何外在症状的患者和/或动物的蛋白质聚集疾病。此外,如实施例2以及图7F和7G所示,本发明的组合物和试剂盒也治疗晚期蛋白质聚集疾病。

[0055] 在优选的实施方式中,患者和/或动物已经经历引起蛋白质聚集的病理生理变化,但是尚未达到可观察到外在症状的疾病阶段。换句话说,患者和/或动物处于疾病的早期阶段。术语“外在症状”是指医师使用任何非侵入性程序可观察到的任何症状。

[0056] 在优选的实施方式中,硫酸酯酶抑制剂通过抑制蛋白质聚集体的形成来减慢蛋白质聚集疾病的进展,和/或硫酸酯酶抑制剂通过抑制蛋白质聚集体的形成来延迟蛋白质聚集疾病的发作。

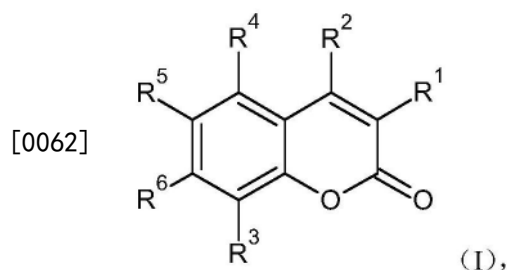
[0057] 在优选的实施方式中,蛋白质聚集疾病选自由以下组成的清单:系统性AL淀粉样变性、阿尔茨海默氏病、2型糖尿病、帕金森氏病、传染性海绵状脑病,例如牛海绵状脑病、致命性家族性失眠症、亨廷顿氏病、甲状腺髓样癌、心律失常、动脉粥样硬化、类风湿性关节炎、主动脉内侧淀粉样蛋白、泌乳素瘤、家族性淀粉样多神经病、遗传性非神经性系统性淀粉样变性、透析相关性淀粉样变性、芬兰型淀粉样变性、格子状角膜营养不良、大脑淀粉样血管病、脑淀粉样血管病(冰岛型)、偶发性包涵体肌炎、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、朊病毒相关性或海绵状脑病,如克雅氏病、路易氏体痴呆、额颞叶痴呆伴帕金森病、脊髓小脑共济失调、脊髓小脑共济失调、脊髓延髓肌肉萎缩症、遗传性齿状核红核苍白球丘脑下部萎缩、家族性英国型痴呆、家族性丹麦型痴呆、非神经性局部疾病如在II型糖尿病中的非神经性局部疾病、甲状腺髓样癌、心房淀粉样变性、遗传性脑出血伴淀粉样变性、垂体性泌乳素瘤、注射局部淀粉样变性、主动脉内侧淀粉样变性、遗传性格子状角膜营养不良、倒睫症相关角膜淀粉样变性、白内障、钙化上皮牙源性肿瘤、肺泡蛋白沉着症、包涵体肌炎、皮肤苔藓淀粉样变性、和非神经性系统性淀粉样变性如AL淀粉样变性、AA淀粉样变性、家族性地中海热、老年性系统性淀粉样变性、家族性淀粉样变性多神经病、血液透析相关淀粉样变性、ApoAI淀粉样变性、ApoAII淀粉样变性、ApoAIV淀粉样变性、芬兰型遗传性淀粉样变性、溶菌酶淀粉样变、纤维蛋白原淀粉样变性、冰岛型遗传性脑淀粉样血管病、家族性淀粉样变性和多个组织中发生的系统性淀粉样变性,如轻链淀粉样变性和其他各种神经退行性失调。优选地,蛋白质聚集疾病选自由阿尔茨海默氏病、帕金森氏病和亨廷顿氏病组成的清单。在优选的实施方式中,蛋白质聚集疾病不是阿尔茨海默氏病和/或癌症类型。

[0058] 在优选的实施方式中,蛋白质聚集疾病选自由阿尔茨海默氏病、帕金森氏病和亨廷顿氏病组成的清单。在优选的实施方式中,在阿尔茨海默氏病、帕金森氏病或亨廷顿氏病患者中,淀粉样蛋白和/或寡聚体被去除,和/或所述淀粉样蛋白和/或寡聚体的形成被阻止。

[0059] 在优选的实施方式中,蛋白质聚集疾病是位于中枢神经系统的蛋白质聚集疾病。在优选的实施方式中,蛋白质聚集疾病也是神经退行性疾病。术语“神经退行性疾病”是指以包括神经元死亡在内的神经元结构或功能的进行性丧失为特征的任何失调。例如,阿尔茨海默氏病就是一个实例,或者是蛋白质聚集疾病,也是神经退行性疾病的实例。

[0060] 硫酸酯酶抑制剂与蛋白质聚集疾病的组合实施方式

[0061] 在优选的实施方式中,硫酸酯酶抑制剂选自由以下组成的清单:2-(羟苯基)吡啶硫酸酯,5-雄烯基-3 β -DU-14、17 β -二醇-3硫酸酯、E1-MTP、EMATE、COUMATE、STX64、KW-2581、STX213、吗啉、沉默RNA和针对STS酶的特异性抗体;或硫酸酯酶抑制剂是式(I)的化合物:



[0063] 其中:

[0064] (a) R_1 至 R_6 独立地选自氢、卤素(氟、氯、溴、碘或砹)、羟基、氨基磺酸基(OSO_2NH_2)、烷基及其盐;

[0065] (b) R_1 至 R_6 中的至少一个为氨基磺酸基;和

[0066] R_1 至 R_6 中的两个或更多个连接在一起形成另外的环状结构;和

[0067] 蛋白质聚集疾病选自由阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病和帕金森氏病组成的清单。

[0068] 在优选的实施方式中,硫酸酯酶抑制剂是STX64(即式(II)的化合物),并且蛋白质聚集疾病选自由阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病和帕金森氏病组成的清单。在优选的实施方式中,硫酸酯酶抑制剂是STX64,并且蛋白质聚集疾病是阿尔茨海默氏病。在优选的实施方式中,硫酸酯酶抑制剂是STX64,并且蛋白质聚集疾病是亨廷顿氏病。在优选的实施方式中,硫酸酯酶抑制剂是STX64,并且蛋白质聚集疾病是帕金森氏病。

[0069] 药物组合物

[0070] 在优选的实施方式中,该组合物是进一步包含药学上可接受的载体和/或稀释剂的药物组合物。优选地,药物组合物可以进一步包含药学上可接受的赋形剂。

[0071] 本文所述的药物组合物还可含有其他物质。这些物质包括但不限于低温保护剂、冻干保护剂、表面活性剂、填充剂、抗氧化剂和稳定剂。在一些实施方案中,药物组合物可以是冻干的。

[0072] 本文所用的术语“低温保护剂”包括为组合物提供抗冷冻诱导应力的稳定性的试剂。低温保护剂还可在一次和二次干燥以及产品长期储存期间提供保护。低温保护剂的非限制性实例包括:糖,例如蔗糖、葡萄糖、海藻糖、甘露醇、甘露糖和乳糖;和聚合物,例如葡聚糖、羟乙基淀粉和聚乙二醇;表面活性剂,例如聚山梨酸酯(例如PS-20或PS-80);和氨基

酸,例如甘氨酸、精氨酸、亮氨酸和丝氨酸。通常使用在生物系统中表现出低毒性的低温保护剂。

[0073] 在一种实施方式中,将冻干保护剂添加至本文所述的药物组合物中。本文所用的术语“冻干保护剂”包括在冷冻干燥或脱水过程(一次和二次冷冻干燥循环)中为组合物提供稳定性的试剂。这有助于最大程度地减少冻干循环中的产品降解,并改善产品长期稳定性。冻干保护剂的非限制性实例包括:糖,例如蔗糖或海藻糖;氨基酸,例如谷氨酸一钠、非晶态甘氨酸或组氨酸;甲胺,例如甜菜碱;感胶离子盐,例如硫酸镁;多元醇,例如三元糖醇或更高级的糖醇,例如甘油、赤藓糖醇、丙三醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露糖醇;丙二醇;聚乙二醇;普朗尼克类(pluronic)及其组合。添加到药物组合物中的冻干保护剂的量通常是在冻干药物组合物时不会导致降解的量不可接受的量。

[0074] 在一些实施方式中,药物组合物中包含填充剂。本文所用的术语“填充剂”包括提供冷冻干燥产品的结构而不直接与药物产品相互作用的试剂。除了提供药学上上等的块状物(pharmaceutically elegant cake)外,填充剂还可以在改善塌陷温度方面赋予有用的品质,从而提供冻融保护,以及增强长期储存的稳定性。填充剂的非限制性实例包括甘露醇、甘氨酸、乳糖和蔗糖。填充剂可以是结晶的(例如甘氨酸、甘露醇或氯化钠)或非晶形的(例如葡聚糖、羟乙基淀粉),并且通常以0.5%至10%的量用于制剂中。

[0075] 其他药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂,例如在Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition,Osol,A.Ed.(1980)或Remington:The Science and Practice of Pharmacy 22nd edition,Pharmaceutical press(2012),ISBN-13:9780857110626中描述的那些也可以被包含在本文所述的药物组合物中,只要它们不会对药物组合物的所需特性产生不利影响。

[0076] 对于固体药物组合物,可以使用常规的无毒固体载体,所述无毒固体载体包括例如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石粉、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等。对于注射用溶液,药物组合物可进一步包含低温保护剂、冻干保护剂、表面活性剂、填充剂、抗氧化剂、稳定剂和药学上可接受的载体。对于气雾剂施用,通常以良好分隔的形式与表面活性剂和推进剂一起提供药物组合物。表面活性剂当然必须是无毒的,并且通常可溶于推进剂中。这样的试剂的代表是含有6到22个碳原子的脂肪酸(例如己酸、辛酸、月桂酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、olestercic酸和油酸)与脂族多元醇或其环状酸酐的酯或偏酯。可以使用混合酯,例如混合甘油酯或天然甘油酯。如果需要,也可包括载体,例如用于鼻内输送的卵磷脂。对于栓剂,传统的粘合剂和载体可包括例如聚亚烷基二醇或甘油三酯。

[0077] 在优选的实施方式中,制备本发明的组合物以用于口服、舌下、颊、鼻内、静脉内、肌内、腹膜内和/或吸入介导施用。

[0078] 施用

[0079] 本发明的组合物可以使用技术人员已知的任何途径来施用。在优选的实施方式中,经皮、舌下、静脉内、鼻内、脑室内、动脉内、脑内、肌内、腹膜内、口服或经由吸入施用本发明的组合物。

[0080] 在优选的实施方式中,经皮、舌下、静脉内、腹膜内、口服或经由吸入施用本发明的组合物。在经由吸入施用该组合物的情况下,可以将该组合物雾化并经由例如麻醉面罩施用。

[0081] 在优选的实施方式中,经皮、舌下、静脉内、皮下、口服或经由吸入施用本发明的组合物。优选地,口服或舌下施用该组合物。

[0082] 在优选的实施方式中,该组合物包含治疗有效量的硫酸酯酶抑制剂。术语“治疗有效量”是指具有治疗作用并且能够治疗和/或预防蛋白质聚集疾病的组合物中的硫酸酯酶抑制剂的量。在优选的实施方式中,向患者施用剂量为0.01mg/kg至100mg/kg的硫酸酯酶抑制剂。优选地,向患者施用0.01mg/kg至10mg/kg的剂量。优选地,向患者施用0.05mg/kg至1mg/kg的剂量。

[0083] 在优选的实施方式中,该组合物与通常用于治疗 and/或预防蛋白质聚集疾病的任何其他治疗或疗法一起用于联合疗法。在优选的实施方式中,该组合物与多奈哌齐(donepezil)、卡巴拉汀(rivastigmine)、加兰他敏(galantamine)、美金刚(memantine)、左旋多巴(levodopa)、卡比多巴(carbidopa)和/或四苯喹啉一起用于联合治疗。

[0084] 本发明的组合物可以施用一次或不止一次。技术人员将能够为患者确定最有效的剂量方案。例如,最有效的剂量方案可以是向患者每天两次、每天一次、每三天一次、每周一次、每月一次、每三个月一次、每六个月一次或每年一次地施用组合物。

[0085] 本发明包括以下项目。

[0086] [1]一种用于治疗 and/或预防蛋白质聚集疾病的组合物,其包含硫酸酯酶抑制剂,优选地,其中:

[0087] (i) 在患者和/或动物中,淀粉样蛋白和/或寡聚体被去除,和/或所述淀粉样蛋白和/或寡聚体的形成被阻止;和/或;

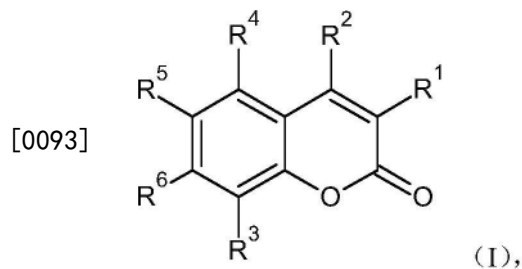
[0088] (ii) 硫酸酯酶抑制剂治疗和/或预防蛋白质聚集疾病中的蛋白毒性。

[0089] [2]根据项目[1]所述的用途的组合物,其中,所述硫酸酯酶抑制剂通过抑制蛋白质聚集体的形成来减慢蛋白质聚集疾病的进展,和/或所述硫酸酯酶抑制剂通过抑制蛋白质聚集体的形成来延迟蛋白质聚集疾病的发作。

[0090] [3]根据项目[1]至[2]中任一项所述的用途的组合物,其中,所述蛋白质聚集疾病是位于中枢神经系统的蛋白质聚集疾病。

[0091] [4]根据项目[1]至[3]中任一项所述的用途的组合物,其中,在阿尔茨海默氏病、帕金森氏病或亨廷顿氏病患者中,淀粉样蛋白和/或寡聚体被去除,和/或所述淀粉样蛋白和/或寡聚体的形成被阻止;或其中,所述蛋白质聚集疾病为阿尔茨海默氏病、帕金森氏病或亨廷顿氏病。

[0092] [5]根据项目[1]至[4]中任一项所述的用途的组合物,其中,所述硫酸酯酶抑制剂是式(I)的化合物:



[0094] 其中:

[0095] (a) R_1 至 R_6 独立地选自氢、卤素、羟基、氨基磺酸基、烷基及其盐;

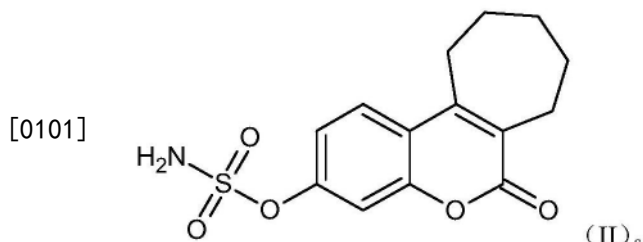
[0096] (b) R_1 至 R_6 中的至少一个为氨基磺酸基;和

[0097] (c) R_1 至 R_6 中的两个或更多个连接在一起形成另外的环状结构。

[0098] [6]根据项目[5]所述的用途的组合物,其中, R_1 和 R_2 形成包含3至10个碳的另外的环状结构。

[0099] [7]根据项目[5]至[6]中任一项所述的用途的组合物,其中, R_6 是 OSO_2NH_2 。

[0100] [8]根据项目[5]至[7]中任一项所述的用途的组合物,其中,所述硫酸酯酶抑制剂是式(II)的化合物:



[0102] [9]根据项目[1]至[8]中任一项所述的用途的组合物,其中,所述组合物是包含根据项[1]至[8]中任一项所述的硫酸酯酶抑制剂和药学上可接受的载体和/或稀释剂的药物组合物。

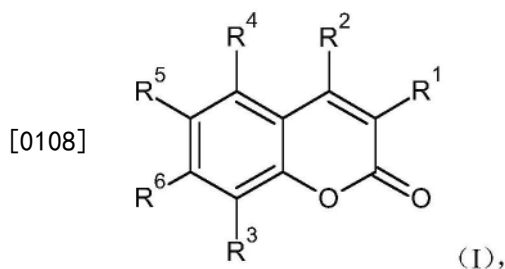
[0103] [10]根据项目[1]至[9]中任一项所述的用途的组合物,其中,口服施用所述组合物。

[0104] [11]根据项目[1]至[10]中任一项所述的用途的组合物,其中,向患者施用0.01mg/kg至100mg/kg的剂量,优选施用0.01mg/kg至10mg/kg的剂量,更优选施用0.05mg/kg至1mg/kg的剂量。

[0105] [12]根据项目[1]至[11]中任一项所述的用途的组合物,其中,所述组合物与多奈哌齐、卡巴拉汀、加兰他敏、美金刚、左旋多巴、卡比多巴和/或四苯喹啉一起用于联合治疗。

[0106] [13]一种试剂盒,其用于制造用于治疗 and/或预防蛋白质聚集疾病的药物,所述试剂盒包含:(i)硫酸酯酶抑制剂;(ii)药学上可接受的载体和/或稀释剂。

[0107] [14]根据项目[13]所述的用途的试剂盒,其中,所述硫酸酯酶抑制剂是式(I)的化合物:



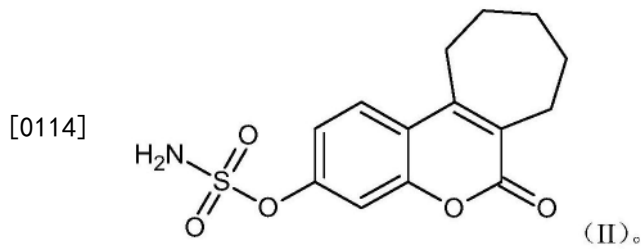
[0109] 其中:

[0110] (a) R_1 至 R_6 独立地选自氢、卤素、羟基、氨基磺酸基、烷基及其盐;

[0111] (b) R_1 至 R_6 中的至少一个为氨基磺酸基;和

[0112] R_1 至 R_6 中的两个或更多个连接在一起形成另外的环状结构。

[0113] [15]根据项目[14]所述的用途的试剂盒,其中,所述硫酸酯酶抑制剂是式(I)的化合物:



[0115] 实施例

[0116] 含有sul-2(gk187)敲除等位基因(WormBase ID:WBVar00145594)的秀丽隐杆线虫(*C.elegans*)由秀丽隐杆线虫基因敲除联合会(*C.elegans* Gene Knockout Consortium)(The *C.elegans* Deletion Mutant Consortium,2012.G3:GENES,GENOMES,GENETICS.2(11):1415-1425)产生,并保藏在Caenorhabidits遗传中心(<https://cbs.umn.edu/cgc/home>)。sul-2(gk187)等位基因由包括硫酸酯酶的催化核心的131个氨基酸缺失组成。缺失产生移码,并且仅保留原始序列的前四个氨基酸。因此,我们认为sul-2(gk187)是sul-2的无效突变体等位基因。可在线虫信息库(wormbase)(http://www.wormbase.org/species/c_elegans/variation/WBVar00145594#02-45-3)上找到突变体病变。

[0117] 实施例1:STX64对神经退行性疾病的线虫模型的影响

[0118] 帕金森氏病的秀丽隐杆线虫模型:我们测试了sul-2突变或以1 μ g/ml浓度溶解于DMSO中的STX64(Sigma目录号S1950)治疗是否改善了肌肉细胞中人 α -突触核蛋白过表达引起的症状(有关所用模型的信息参见以下参考文献:van Ham等人,2008.PLoS Genet.4(3):e1000027;Gidalevitz等人,2009.PLoS Genet.5(3):e1000399;van Ham等人,2010.Cell.142(4):601-12)。特别地,线虫在20 $^{\circ}$ C下同步化并每两天进行一次监测。在监测的每一天,将线虫放在一滴M9缓冲液中,适应30秒,然后假设当线虫的头部穿过轴向轴时则发生一次摇摆,计算1分钟内摇摆次数,。每天对N=20进行测定和条件(该方案改编自Van Ham等人,2010.Cell.142:601-612)。如图1A和1B可见,sul-2突变或STX64处理显著地改善移动性。

[0119] 进一步地,我们测试了sul-2缺失和施用STX64对 α -突触核蛋白聚集的影响。为了定量聚集体,将动物转移至包含2%琼脂糖的垫中,并使用25mM左旋咪唑固定。从第一个咽管球到第二个球,通过以40倍放大倍数对荧光聚集体进行计数,确定 α -突触核蛋白聚集体的数目。SUL-2的功能丧失或抑制减少了较小聚集体的数目,同时增加了较大 α -突触核蛋白聚集体的数目(参见图2和3),提示动物中的蛋白质聚集体被更好地操控,并减少了STS活性(Roberts和Brown,2015.Biomolecules.5(2):282-305;Moll等人,2016.FASEB J.30(4):1656-69)。

[0120] 在帕金森氏病的替代秀丽隐杆线虫模型中,该模型在GFP标记的多巴胺能神经元中表达 α -突触核蛋白,发现多巴胺能神经元由于 α -突触核蛋白毒性而死亡(Cooper等人,2006.Science.313(5785):324-8)。与先前的发现一致,sul-2突变体显示神经元存活增加(参见图4),表明减少STS活性具有神经保护作用。

[0121] 亨廷顿氏病的秀丽隐杆线虫模型:在表达与荧光蛋白融合的35多聚谷氨酰胺(polyQ)重复序列的亨廷顿氏病模型中,我们发现sul-2突变和施用以1 μ g/ml浓度溶解于DMSO中的STX64均降低了聚合体的总数(请参见图5)。为了定量聚集体,将动物转移至包含2%琼脂糖的垫中,并使用25mM左旋咪唑固定。从第一个咽管球到第二个球,通过以10倍放

大倍数对荧光聚集体进行计数,确定polyQ聚集体的数目。

[0122] 阿尔茨海默氏病的秀丽隐杆线虫模型:我们还测试了在肌肉细胞中表达 β -淀粉样蛋白的阿尔茨海默氏病模型, β -淀粉样蛋白会随着年龄的增长而导致线虫麻痹。线虫在20°C下同步化。从成虫期第一天开始,通过观察用铂金针刺激线虫后是否缺乏运动来监测麻痹。此外,为了追踪麻痹的线虫,我们对哪些线虫的头部周围有细菌晕进行可视化,因为麻痹阻止了食物的移位。与我们先前的数据一致,sul-2突变和STX64处理延迟了麻痹(参见图6)。

[0123] 实施例2:STX64对神经退行性疾病的哺乳动物模型的影响

[0124] 小鼠品系和条件:用于该项研究的雄性Swiss (CD1) 和APP-PS1 (Blanchard等人, 2003. *Exp Neurol*. 184(1):247-63) 小鼠购买自获得授权的提供者(西班牙塞维利亚大学),使它们适应标准动物的饲养条件,持续2到3周(12小时的明/暗循环、温度和湿度)。用8周龄Swiss小鼠和C57Black背景的大于15月龄的APP-PS1小鼠进行行为研究。为了进行组织学研究,使用了2到大于15月龄的雄性APP-PS1小鼠。所有实验均根据欧盟指南(2010/63/EU)和西班牙关于在慢性实验中使用实验动物的规定(RD 53/2013关于实验动物护理:BOE 08/02/2013)进行,并在进行该项研究之前获得了Pablo de Olavide大学动物护理委员会的批准。

[0125] 小鼠局部药物输注:将小鼠用4%水合氯醛(10 μ L/kg体重,腹腔内)麻醉,完全麻醉后,将小鼠置于立体定位框架中。为了损伤海马体,将0.5 μ l的5 μ M β -淀粉样蛋白寡聚体溶液以如下立体定位坐标从前囟双侧注入小鼠的海马体背侧:AP=-2.2mm,ML= \pm 1.5mm,V=-1.5mm。然后使小鼠恢复至少15天。对于还接受STX64的那些小鼠,在施用 β -淀粉样蛋白寡聚体前20分钟,施用0.5 μ l的1mg/ml STX64溶液。在相同的喙侧海马体(rostral hippocampus)座标输注STX64。通过注射用注射器(Hamilton)以0.2 μ l/分钟的速率来递送STX64和 β -淀粉样蛋白寡聚体,并在输注后放置2.5分钟。

[0126] 小鼠口服STX:将STX64以0.005mg/ml溶解于饮用水中。使小鼠暴露于STX溶液3到4周,并在治疗期间每天记录水摄入量。STX64的估计每日剂量为1至2mg/Kg体重。

[0127] 分步被动回避(PA)测试:小鼠天生偏好黑暗和封闭的环境。在适应阶段,操控小鼠,使该小鼠在对称地分成一个明亮隔室和一个黑暗隔室(每个测出大小为28.5cm \times 18cm \times 26cm)的小室(47 \times 18 \times 26cm,由Ugo Basile制造)中自由移动1分钟。在训练阶段,将小鼠短暂地限制在明亮隔室内,然后30秒后,打开隔开黑暗隔室的门。一旦小鼠进入黑暗隔室,门就会自动关闭,并且小鼠会收到通过金属地板传递的电刺激(对于Swiss和C57Black小鼠分别为0.5mA持续5秒和0.3mA持续5秒)。在指定时间进行的保留测试中,放回明亮隔室时回想起电击经历的小鼠避免或至少花费更长的时间进入黑暗隔间。因此,进入黑暗隔室的等待时间(逃逸等待时间)是信息学习或记忆保留的度量,这取决于测试是在训练练习之后多久进行的。展示了逃逸等待时间、训练练习、短期记忆练习和长期记忆练习(分别为STM和LTM)。

[0128] 免疫组织化学和组织学分析:对于免疫组织化学,使用了针对 β -淀粉样蛋白的抗体(1:3000, Sigma-Aldrich)。抗体染色用H₂O₂和二氨基联苯胺可视化,并用镍增强。为了使变异性最小化,在明场DMRB RFY HC显微镜(Leica)下每只小鼠至少分析了5个切片。在每个切片中,使用Image-J软件(作为免费软件包下载自公共领域:<http://rsb.info.nih.gov/>)

ij/download.html), 定量了 β -淀粉样蛋白占据的面积百分比、 β -淀粉样蛋白积累的密度和平均大小。

[0129] 结果: 由于STX64在秀丽隐杆线虫神经退行性模型中显示出显著的治疗效果, 因此我们测试了该药物对海马体内 β -淀粉样蛋白寡聚体输注(急性阿尔茨海默氏病(AD)小鼠模型)引起的认知改变的影响(图7A)。局部和系统性STX64治疗均逆转了海马体内施用 β -淀粉样蛋白寡聚体引起的认知缺陷。

[0130] 为了评价STX64口服治疗对慢性AD小鼠模型中淀粉样蛋白病理学的影响, 我们评估了口服施用STX64持续3至4周对大于15月龄的APP-PS1小鼠新皮质(大脑皮质和海马体)中淀粉样蛋白的沉积的影响(图7B)。在大于15月龄(也与APP-PS1模型新皮层中后期淀粉样蛋白沉积有关)时, 在用STX64处理的小鼠中, 除了海马体中的斑块大小以外, 对 β -淀粉样蛋白免疫反应面积、斑块密度和大小的分析均显示出显著的减少(图7C-E)。有趣的是, 当我们比较用STX64治疗的老年(大于15月龄)APP-PS1小鼠中的 β -淀粉样蛋白沉积与未治疗的APP-PS1小鼠的淀粉样蛋白的正常沉积率时, 我们观察到, 与10至12月龄的APP-PS1小鼠中所观察到的相比, STX64使大于15月龄的APP-PS1小鼠中的 β -淀粉样蛋白沉积减少(图7F)。

[0131] 所有这些结果表明, 对APP-PS1小鼠进行STX64处理减少了 β -淀粉样蛋白沉积。为了评估组织学改善是否与认知行为缺陷的改善相关, 我们比较了用溶媒或STX64治疗在3至4周的大于15月龄的APP-PS1小鼠的认知能力。用溶媒治疗的APP-PS1小鼠在被动回避测试中表现出缺陷(图7G), 而用STX64治疗的那些小鼠完全逆转了认知缺陷, 从而达到了与小于15月龄的野生型小鼠相似的水平。所有这些结果指出, STX64引起的 β -淀粉样蛋白代谢的改变减少了急性和慢性AD小鼠模型中由 β -淀粉样蛋白积累引起的认知行为缺陷, 这表明STX64和其他硫酸酯酶抑制剂可用于治疗蛋白质病变是合理的。

[0132] 实施例3: STX64对亨廷顿氏病小鼠模型的影响

[0133] 小鼠品系和条件: 用于该项研究中的R6/1小鼠(Yi Li等人, 2005. NeuroRX. 2(3): 447-464; Mangiarini等人, 1996. Cell. 87(3): 493-506) 购买自获得授权的提供者, 使它们适应于标准动物饲养条件, 持续2到3周(12小时的明/暗循环、温度和湿度)。用2月龄R6/1小鼠进行运动活动研究。所有实验均根据欧盟指南(2010/63/EU)和西班牙关于在慢性实验中使用实验动物的规定(RD 53/2013关于实验动物护理: BOE 08/02/2013)进行, 并在进行该项研究之前获得了Pablo de Olavide大学动物护理委员会的批准。

[0134] 小鼠口服STX: 将STX64以0.005mg/ml溶解于饮用水中。使1月龄的小鼠暴露于STX溶液1个月, 并在治疗期间每天记录水摄入量。STX64的估计每日剂量为1至2mg/Kg体重。

[0135] 运动活动测试: 在无应力的开放视野(56x40x40cm)中测试运动者(Locomotor)活动15分钟。用智能视频跟踪软件(Panlab)估算小鼠的行进距离。

[0136] 结果: R6/1小鼠在2月龄时表现出活动减少。这种运动活动的下降可以通过在小鼠达到1月龄时口服STX64来避免(参见图8)。该实施例提供了进一步的证据, 该证据证明本发明的组合物适用于治疗蛋白质聚集疾病。

[0137] 实施例4: 阿尔茨海默氏病秀丽隐杆线虫模型中STX64与EMATE的比较

[0138] 简介: 为了确定不同的类固醇硫酸酯酶(STS)抑制剂在蛋白质聚集中的作用, 我们在线虫的AD改良模型品系GMC101(McColl等人, 2012. Mol Neurodegener. 7:57)中测定了EMATE(CAS编号: 148672-09-7)。EMATE, 也称为雌酮氨基磺酸盐, 是一种有效的不可逆的雌

酮硫酸酯酶 (E1-STs) 和脱氢表雄酮硫酸酯酶 (DHA-STs) 抑制剂, 但具有强雌激素活性。

[0139] 品系: GMC101, 基因型: $dvIs100[pCL354(unc-54:DA-A\beta 1-42)+pCL26(mt1-2:GFP)]$ 。

[0140] 麻痹试验: 蠕虫在16°C的非限制性温度下生长, 直到达到L4年轻成虫期。然后将温度变至25°C。在25°C的限制性温度下孵育18小时后, 对麻痹和未麻痹的动物进行计数。

[0141] 统计学分析: 在列联表中使用2尾卡方检验分析数据。使用GraphPad Prism软件(7.00版)进行统计学分析。

[0142] 结果: 我们测定了在不同背景和条件下麻痹的温度依赖性表型。 $su1-2$ 的缺失改善了GMC101品系的麻痹症状(参见图9A)。对于STX64(参见图9B)和EMATE(参见图9C)也看到了类似的效果。然而, STX64似乎具有最大的作用。

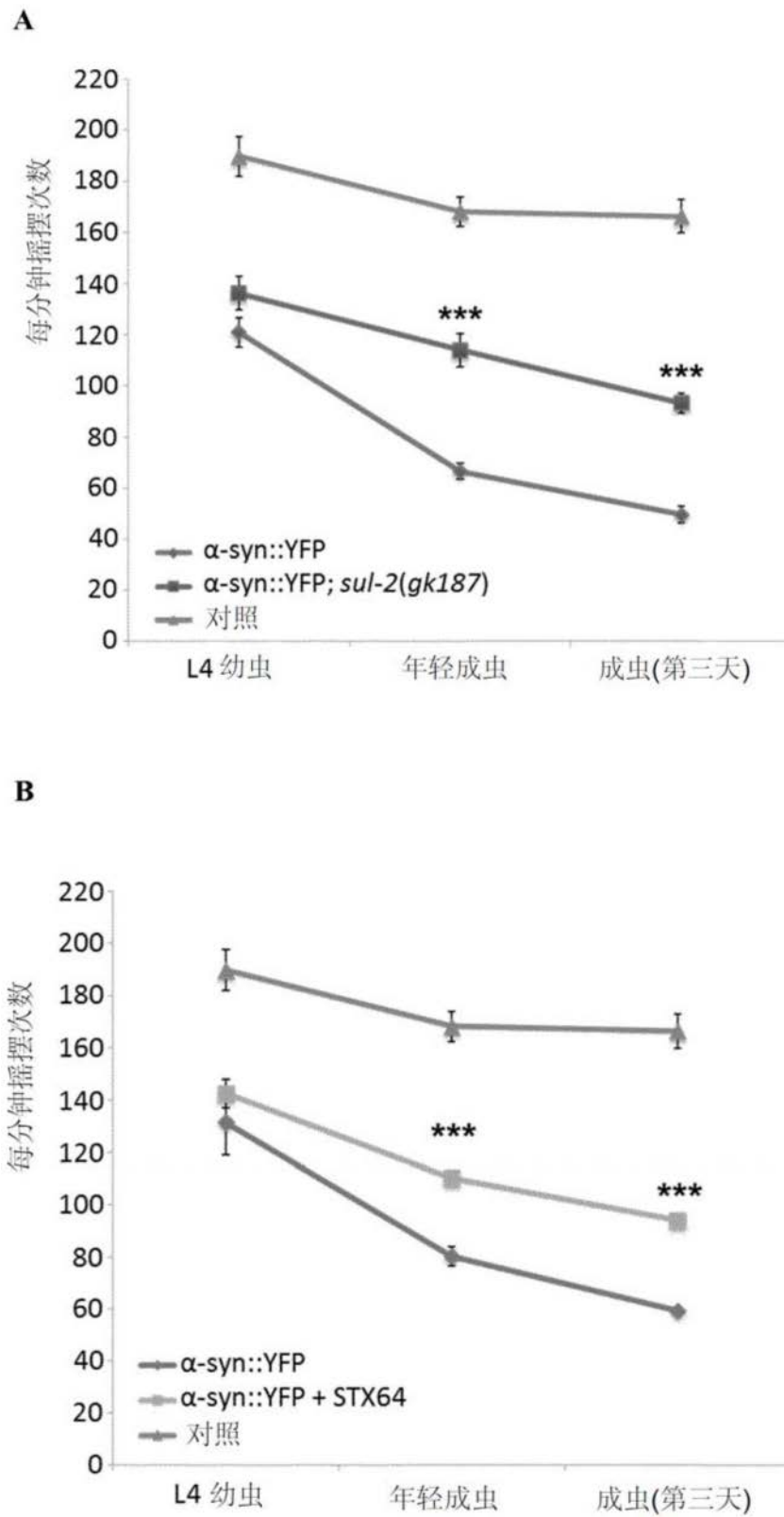


图1

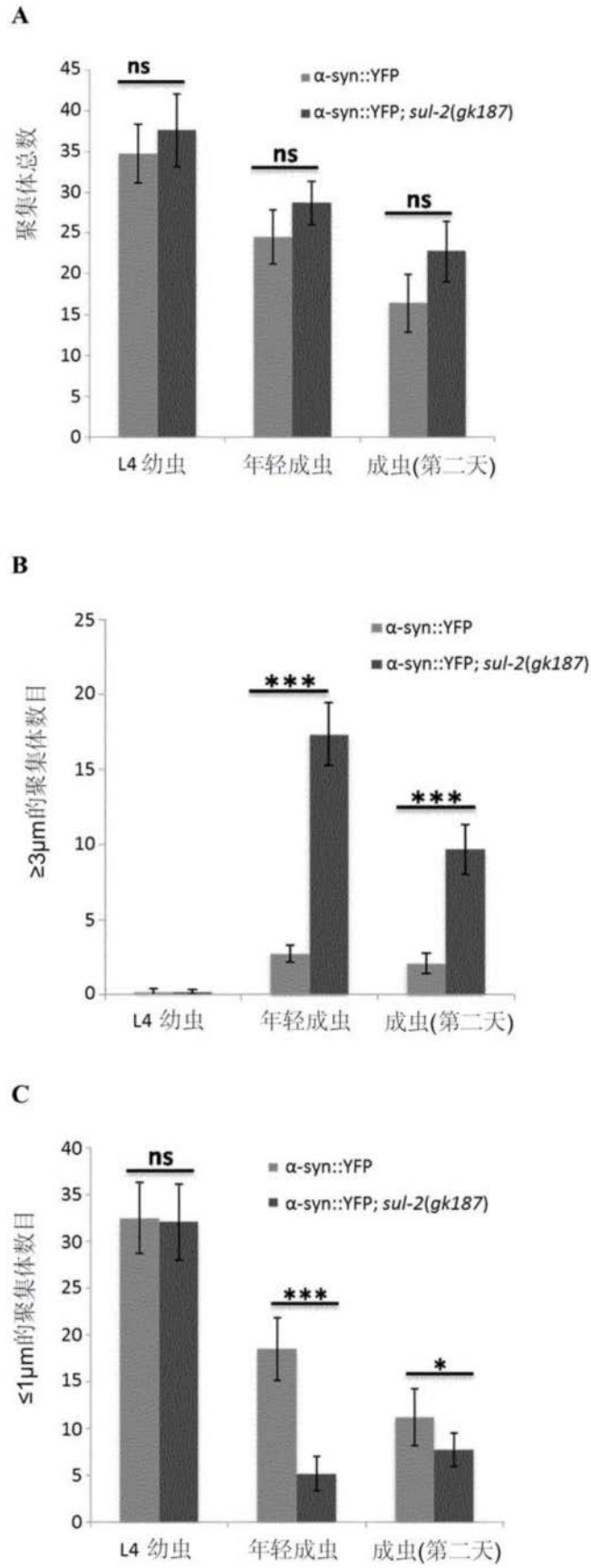


图2

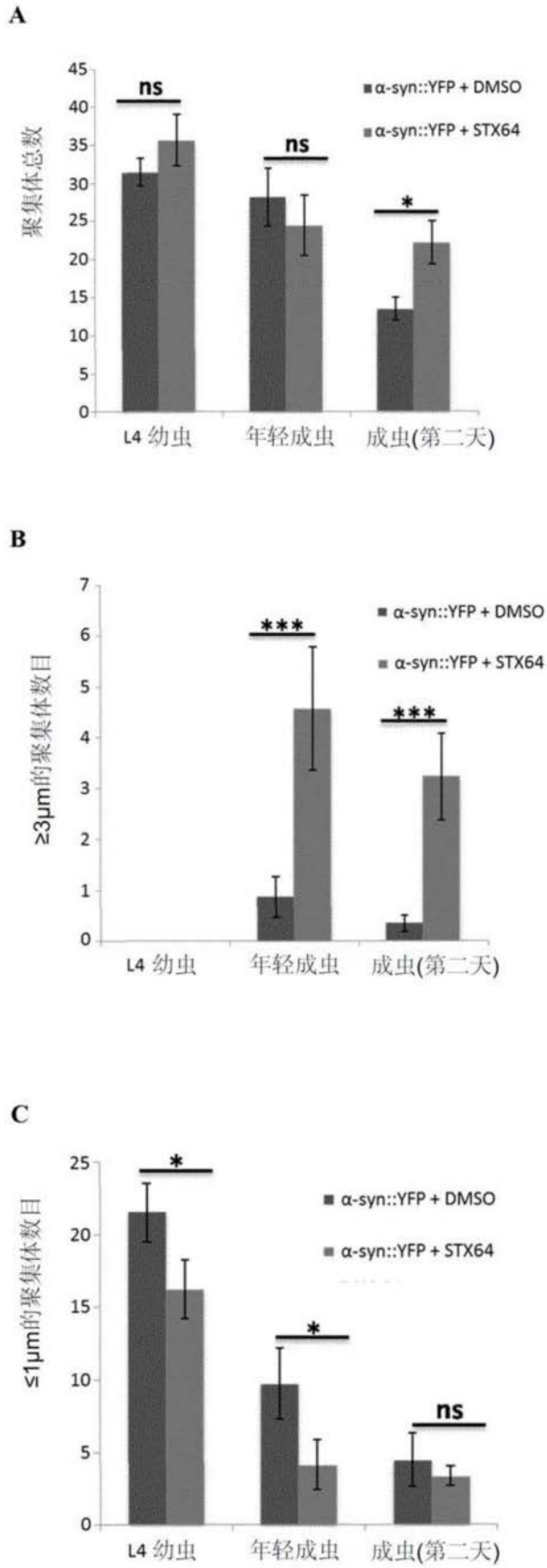


图3

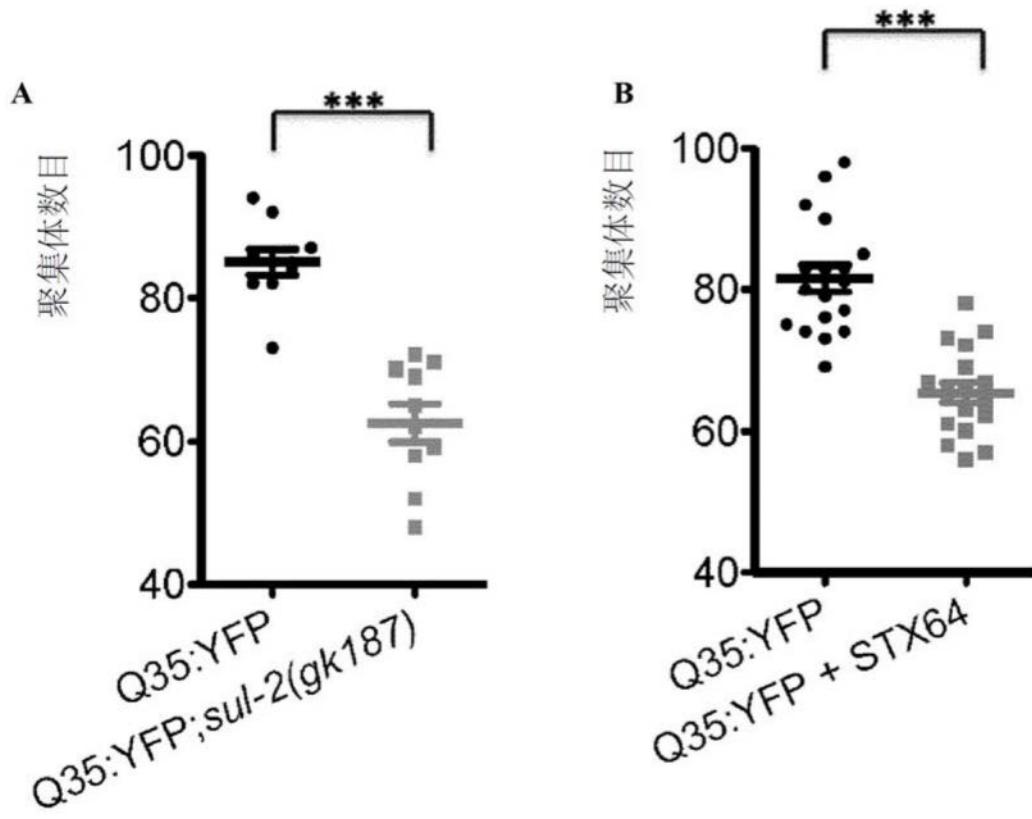


图5

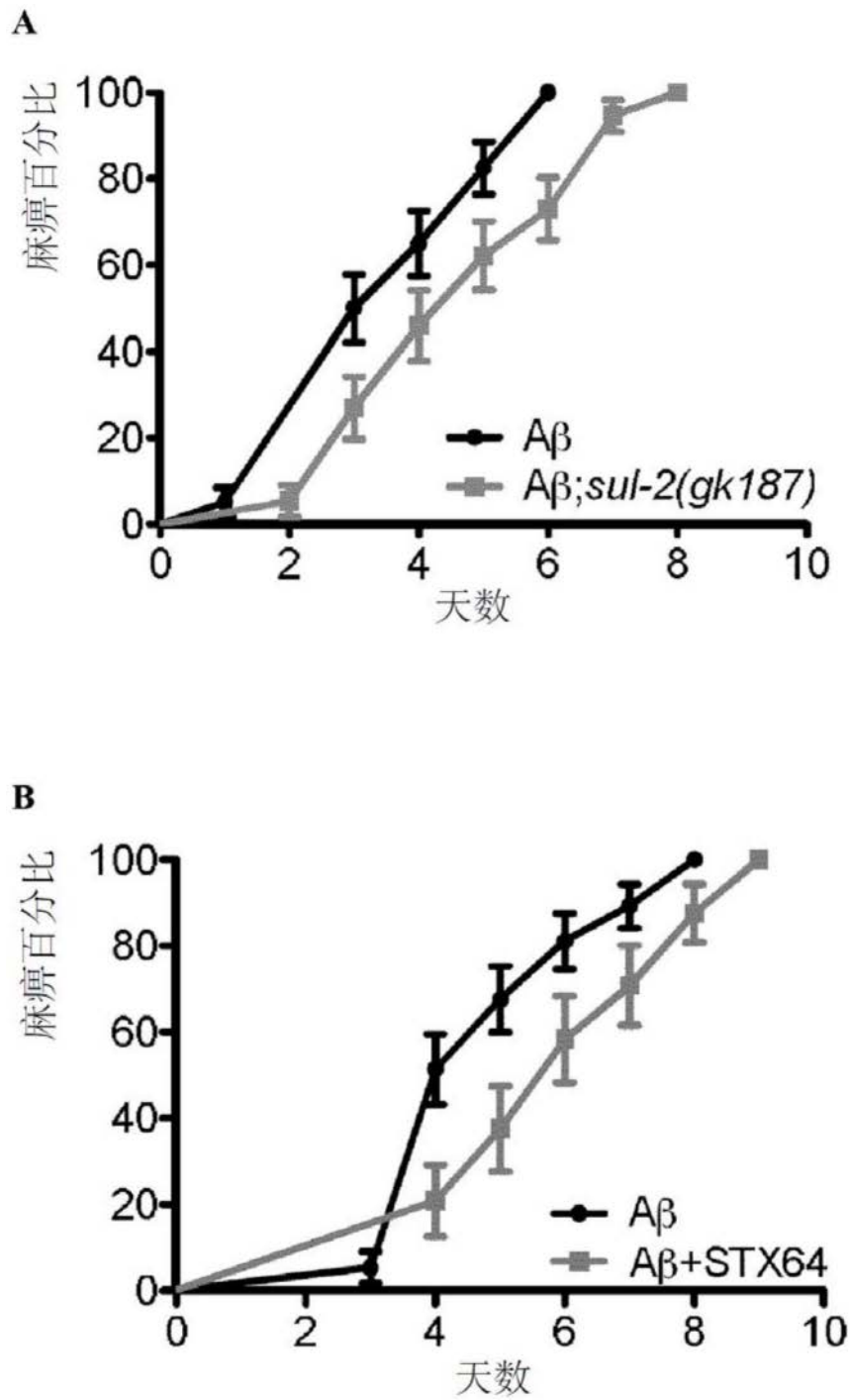
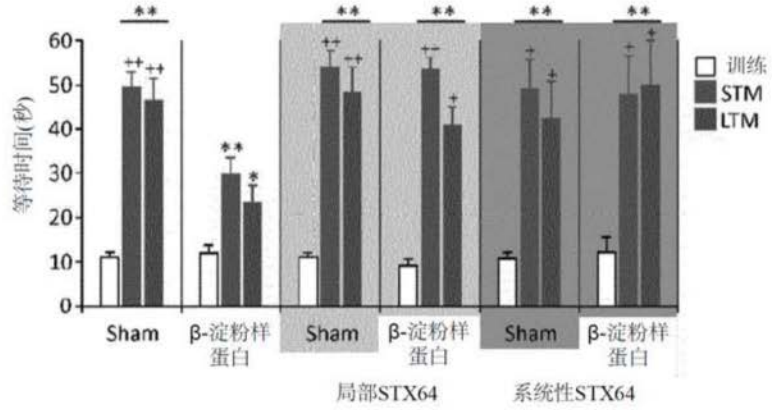
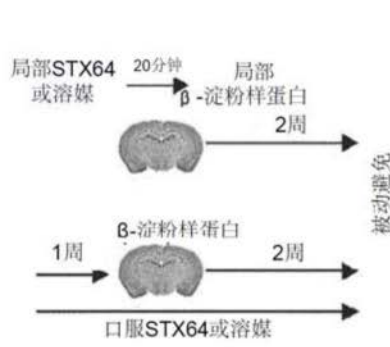
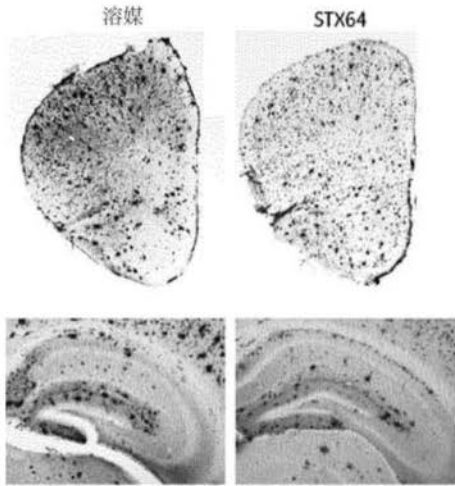


图6

A

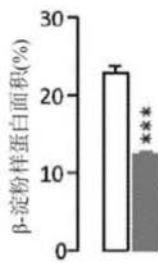


B



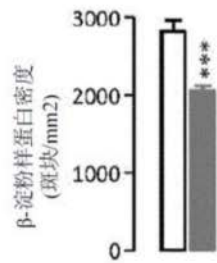
C

额叶皮质



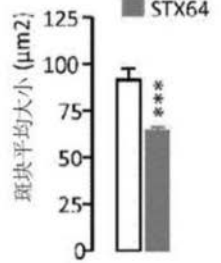
D

β-淀粉样蛋白密度 (斑块/mm²)

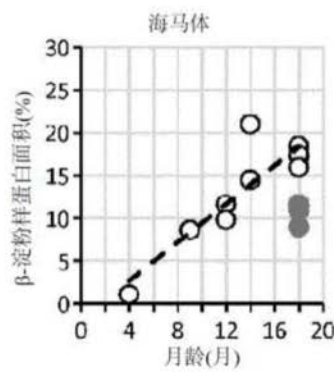
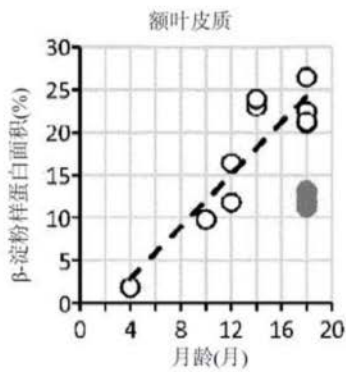


E

斑块平均大小 (μm²)



F



G

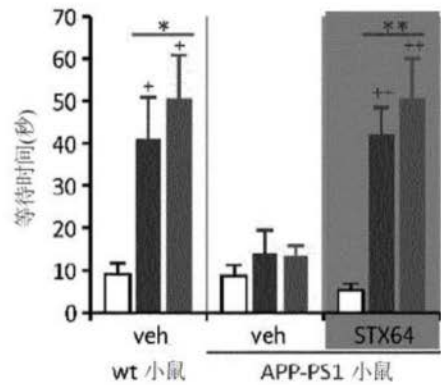


图7

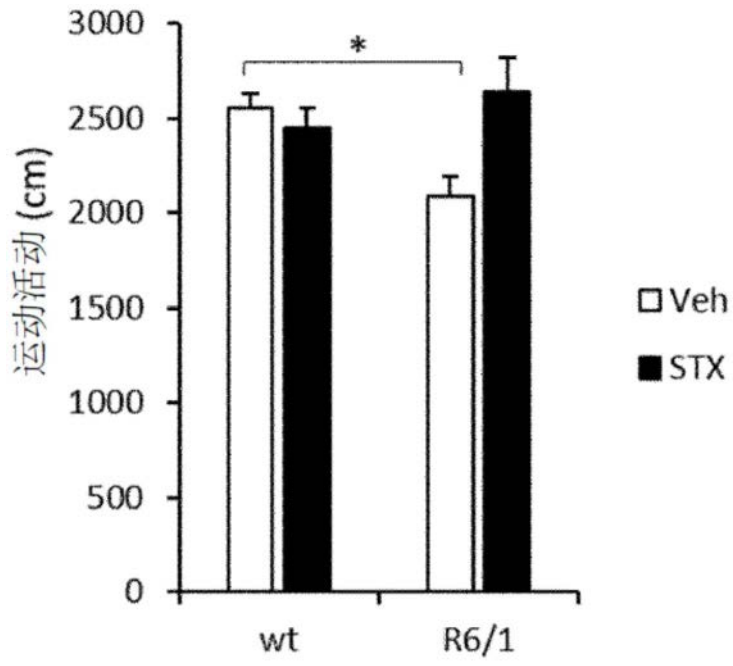
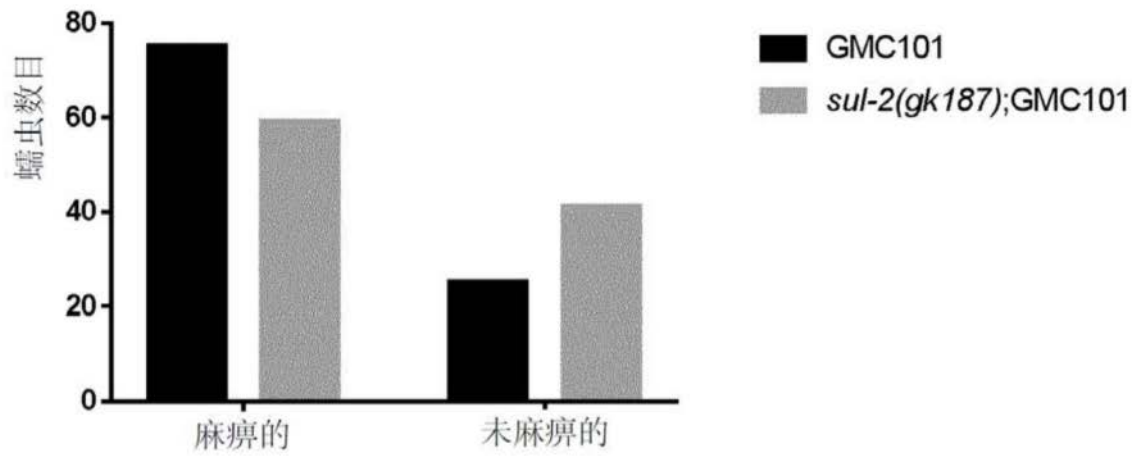
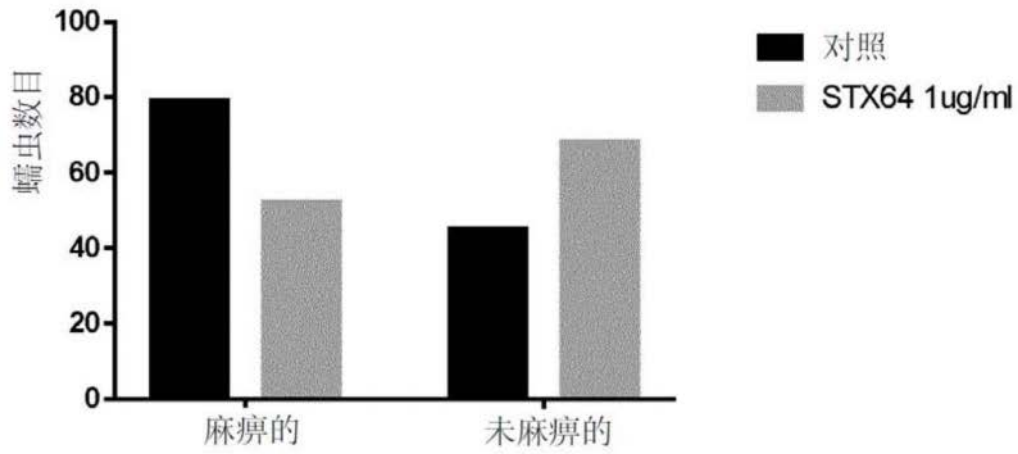


图8

A



B



C

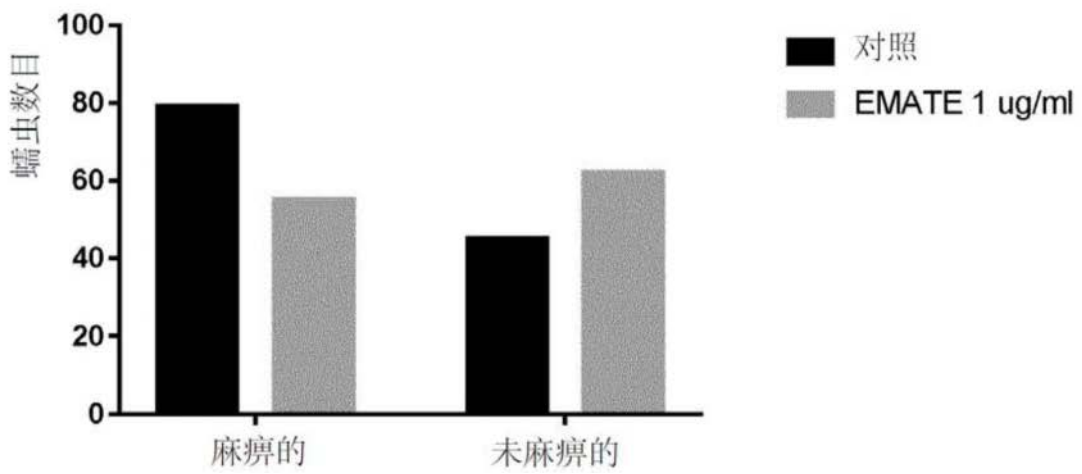


图9