



(10) 授权公告号 CN 110869015 B

(45) 授权公告日 2023.08.18

(21) 申请号 201880043208.8

(22) 申请日 2018.04.26

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110869015 A

(43) 申请公布日 2020.03.06

(30) 优先权数据  
251949 2017.04.26 IL

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2019.12.26

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/IL2018/050463 2018.04.26

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02018/198123 EN 2018.11.01

(73) 专利权人 特拉维夫医学中心医学研究, 基础设施及健康服务基金  
地址 以色列特拉维夫

(72) 发明人 阿尔农·卡尔尼  
卡琳·伯纳特·法因伯格

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262  
专利代理师 高瑜 郑霞

(51) Int.Cl.  
A61K 31/381 (2006.01)  
A61K 31/165 (2006.01)  
A61K 31/345 (2006.01)  
A61K 31/425 (2006.01)  
A61K 31/44 (2006.01)  
A61K 31/42 (2006.01)  
A61P 25/00 (2006.01)  
A61P 25/28 (2006.01)  
A61K 31/395 (2006.01)  
A61K 31/4178 (2006.01)  
A61K 31/435 (2006.01)

(56) 对比文件  
W0 2013186777 A2, 2013.12.19  
PUBchem.Methyl 3-[(2E)-2-[cyano  
(thiophen-2-ylsulfonyl)methylidene]  
hydrazinyl]thiophene-2-carboxylate.  
《PUBchem》.2005,1-11.

审查员 孟晋东

权利要求书1页 说明书36页 附图16页

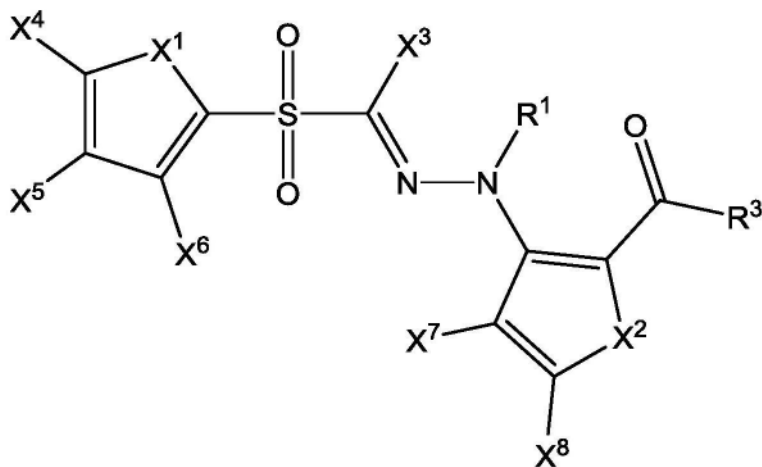
(54) 发明名称

用于治疗神经炎性紊乱的有机小分子

(57) 摘要

本发明提供了可用作神经退行性疾病的治疗剂的有机小分子。充当骨形态发生蛋白 (BMP) 的抑制剂的有机小分子可用于治疗神经炎性紊乱,特别是多发性硬化。

1. 一种药物组合物,所述药物组合物包含具有通式(Ia)的化合物或其盐:



(Ia)

其中

X<sup>1</sup>和X<sup>2</sup>中的每一个是S;

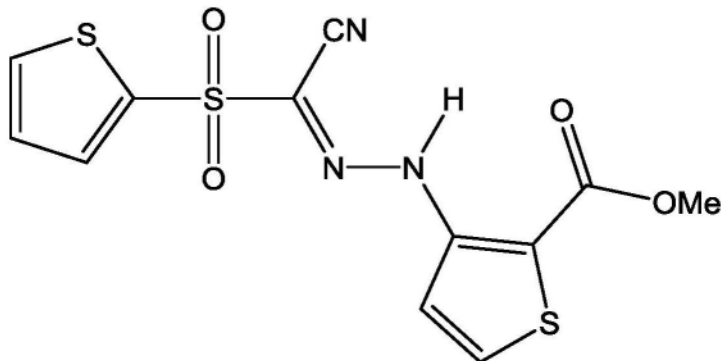
X<sup>3</sup>是CN;

X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup>和X<sup>8</sup>中的每一个是H;

R<sup>1</sup>是H或C<sub>1-6</sub>烷基;并且

R<sup>3</sup>是OR<sup>5</sup>,其中R<sup>5</sup>是甲基或乙基。

2. 如权利要求1所述的药物组合物,其中所述化合物是SM1:



SM1。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的药物组合物在制备用于治疗多发性硬化的药物中的用途。

4. 如权利要求3所述的用途,其中所述药物还包括另外的治疗剂。

5. 如权利要求3或4所述的用途,其中所述多发性硬化是复发缓解型多发性硬化。

## 用于治疗神经炎性紊乱的有机小分子

### 发明领域

[0001] 本发明涉及神经退行性疾病和神经炎性疾病的治疗剂的领域。公开了可以充当骨形态发生蛋白 (BMP) 抑制剂的有机小分子,其可用于治疗神经炎性紊乱,特别是多发性硬化。

### [0002] 发明背景

[0003] 多发性硬化 (MS) 是一种众所周知的脱髓鞘疾病,其中脑和脊髓中的髓鞘(神经细胞的绝缘覆盖物)受损[1]。骨形态发生蛋白 (BMP) 在发育和疾病状态期间被认为 (implicated) 是髓鞘形成的抑制剂(在[2]中综述)。

[0004] WO 2013/186777[17]公开了用于治疗神经炎性疾病或神经退行性疾病的药物组合物,该药物组合物包含BMP信号传导的单一阻断剂或若干种阻断剂的组合。

[0005] US 2015/139983[3]公开了用于治疗神经炎性疾病或神经退行性疾病的方法,该方法包括针对BMP-2和BMP-4的单一抗体或若干种抗体的组合。

[0006] US 2008/0249038[4]公开了使用BMP2A抑制剂,特别是siRNA分子或反义分子减轻或减少与受损的神经元组织相关的症状和体征的方法,无论受损的神经元组织是由组织创伤引起的还是由慢性或急性退行性改变引起的。

[0007] Simonini等人[5]检查了PPAR $\delta$  (过氧化物酶体增殖物激活受体) 激动剂GW0742对OPC(少突胶质细胞祖细胞)的影响,并且示出了GW0742降低OPC中的BMP2和BMP4 mRNA水平,对星形胶质细胞的影响较小。Simonini等人得出结论,PPAR $\delta$ 在部分地通过调节BMP和BMP拮抗剂介导的OPC成熟中起作用。

[0008] Li等人[6]评估了APP<sup>swe</sup>/PS1  $\Delta$  E9转基因小鼠(阿尔茨海默病的小鼠模型)的DG颗粒下区(subgranular zone) (DG-SGZ)中的海马细胞增殖和BMP4 mRNA水平。研究者发现了增加的BMP4 mRNA表达和减少的BrdU标记的细胞数目之间的显著相关性,并且表明海马体的DG内BMP4 mRNA表达的增加可能有助于减少APP<sup>swe</sup>/PS1  $\Delta$  E9转基因小鼠的细胞增殖。

[0009] Mabie等人[7]报道了,BMP促进少突胶质-星形胶质祖细胞(O-2A)向星形胶质细胞的选择性、剂量依赖性分化,同时抑制少突胶质细胞分化。

[0010] Gross等人[8]证明了,BMP引起星形胶质细胞谱系从鼠胚胎脑室下区(SVZ)多能祖细胞的选择性、剂量依赖性细化。

[0011] Gomes等人[9]构建了过表达BMP4的转基因小鼠。BMP4的过表达导致多个脑部区域中星形胶质细胞的密度显著增加,伴随着少突胶质细胞的密度的减小。未检测到神经元数目或髓鞘形成模式的变化,并且不存在明显的结构异常。这些观察结果表明,BMP4指导体内的祖细胞致力于(commit)星形胶质细胞谱系而不是少突胶质细胞谱系,并且BMP可能是体内星形胶质细胞发育的重要介导体。

[0012] Lim等人[10]表明BMP拮抗剂Noggin由邻近脑室下区(SVZ)的室管膜细胞表达。发现SVZ细胞表达BMP以及其同源受体。纯化的小鼠Noggin蛋白促进体外神经发生并且抑制胶质细胞分化,并且异位Noggin促进引入到纹状体的SVZ细胞的神经元分化。因此,研究者提出,室管膜Noggin的产生通过阻断内源性BMP信号传导在邻近的SVZ中创建了神经源性环

境。

[0013] WO 11/019678[11]公开了异噻唑用于治疗眼睛状况例如年龄相关性黄斑变性的用途。US 2006/217390[12]公开了用于治疗丙型肝炎的环烷基异噻唑、芳基异噻唑和杂芳基氨基异噻唑。WO 03/105857[13]公开了含有活性化合物的药物组合物,该药物组合物抑制趋化因子(MIP-1 $\alpha$ 和RANTES)的活性。其还涉及使用这些药物组合物治疗炎症性疾病的方法。US 2004/039037[14]公开了为了抑制各种蛋白激酶(特别是MEK和/或ERK)的取代的异噻唑化合物。其还涉及治疗与MEK和/或ERK功能异常相关的疾病的方法。

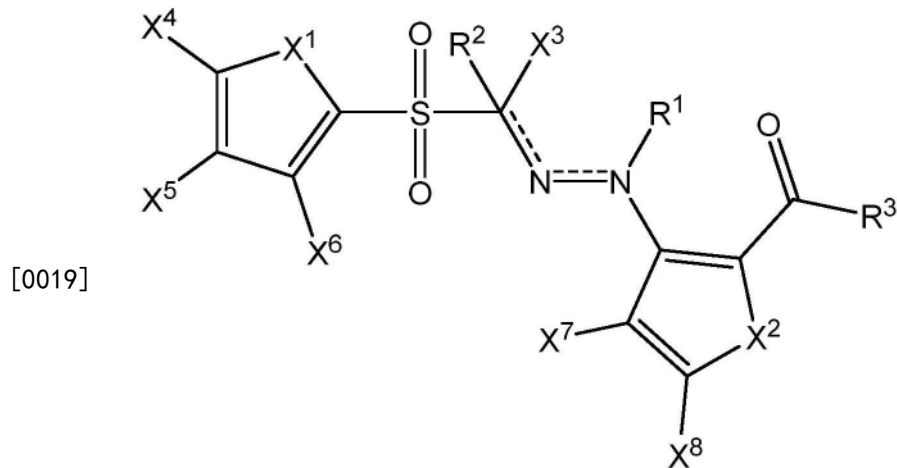
[0014] 对改善的用于多发性硬化的治疗仍然存在需求。

[0015] 发明概述

[0016] 现在首次公开了有机小分子可以充当骨形态发生蛋白(BMP)(包括但不限于BMP2)的抑制剂。还公开了基于其抑制BMP的能力被选择的分子可用于治疗神经炎性紊乱,特别是多发性硬化。根据本发明的一些方面,提供了能够以低于10 $\mu$ M的IC50抑制BMP2的有机小分子。根据本发明另外的方面,提供了能够抑制BMP2和BMP4两者的有机小分子。又根据另外的方面,能够抑制BMP2的有机小分子被提供在可用于治疗神经炎性疾病包括但不限于多发性硬化的药物组合物中。

[0017] 本发明部分地基于这样的发现:在基于细胞的测定中,式(I)-式(IX)的小的有机化合物,包括本文中指定的具体化合物SM1、SM6、SM7和SM9抑制骨形态发生蛋白2(BMP2)的活性。此外,这些分子在复发/缓解型实验性自身免疫性脑脊髓炎(RR-EAE)的动物模型中抑制疾病进展,该动物模型是一种模拟多发性硬化(MS)的得到确认的模型。不希望受任何特定的作用机制理论束缚,这些有机小分子显示出通过抑制脱髓鞘、诱导髓鞘再生或两者来诱导神经发生和少突胶质细胞形成(oligodendrogenesis),并维持髓鞘的量。

[0018] 根据一些实施方案,本发明提供了一种药物组合物,该药物组合物包含具有通式(I)的化合物或其盐:



(I)

[0020] 其中

[0021] X<sup>1</sup>和X<sup>2</sup>各自独立地是S、O或N-R<sup>4</sup>,其中R<sup>4</sup>选自由以下组成的组:H、烷基、环烷基、芳基和杂芳基;

[0022] X<sup>3</sup>选自由以下组成的组:CN、卤素、硝基、CO-X<sup>9</sup>和SO<sub>2</sub>X<sup>9</sup>,其中X<sup>9</sup>选自由以下组成的

组:OH、O<sup>-</sup>和NH<sub>2</sub>;

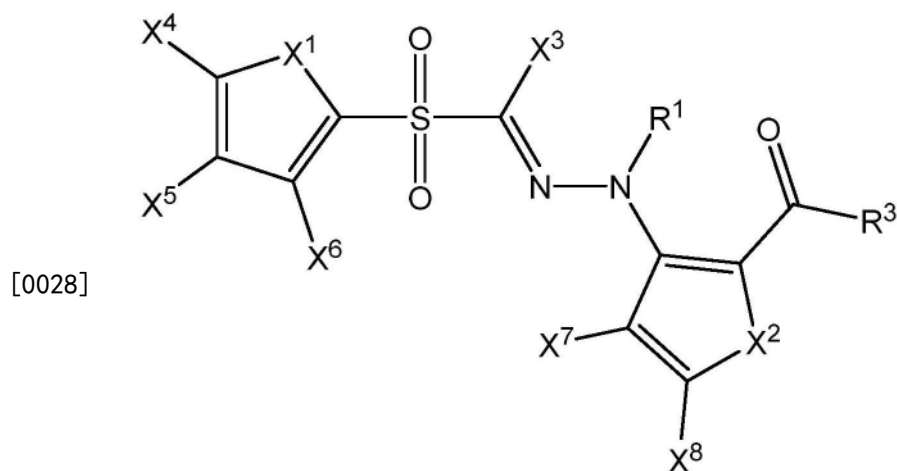
[0023] X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup>和X<sup>8</sup>各自独立地选自由以下组成的组:H、烷基、环烷基、芳基、胺、卤素、烷氧基、羟基、杂芳基、CN、硝基、CO-X<sup>10</sup>和SO<sub>2</sub>X<sup>10</sup>,其中X<sup>10</sup>选自由以下组成的组:OH、O<sup>-</sup>和NH<sub>2</sub>;

[0024] R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>中的一个不存在,并且R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>中的另一个选自由以下组成的组:H、烷基、环烷基、芳基、胺、卤素、烷氧基、杂芳基、CN、CO-X<sup>11</sup>和SO<sub>2</sub>X<sup>11</sup>,其中X<sup>11</sup>选自由以下组成的组:OH、O<sup>-</sup>和NH<sub>2</sub>;

[0025] R<sup>3</sup>选自由以下组成的组:OR<sup>5</sup>、O<sup>-</sup>和NR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>,其中R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>和R<sup>7</sup>各自独立地选自由以下组成的组:H、烷基、环烷基和芳基;并且

[0026] 其中每条虚线独立地表示单键或双键。

[0027] 根据一些实施方案,该药物组合物包含式(Ia)的化合物或其盐:



(Ia)。

[0029] 根据一些实施方案,提供了治疗神经炎性疾病的方法,该方法包括向有相应需要的受试者施用治疗有效量的具有通式(I)的化合物或其盐的步骤,其中X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup>、X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup>、X<sup>8</sup>、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>中的每一个是如本文描述的。

[0030] 根据一些实施方案,提供了治疗神经炎性疾病的方法,该方法包括向有相应需要的受试者施用治疗有效量的具有通式(Ia)的化合物或其盐的步骤,其中X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup>、X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup>、X<sup>8</sup>、R<sup>1</sup>和R<sup>3</sup>中的每一个是如本文描述的。

[0031] 根据一些实施方案,提供了具有通式(I)的化合物或其盐用于治疗患有神经炎性疾病的受试者的用途,其中X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup>、X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup>、X<sup>8</sup>、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>中的每一个是如已描述的。

[0032] 根据一些实施方案,X<sup>1</sup>和X<sup>2</sup>都是S。

[0033] 根据一些实施方案,X<sup>3</sup>是CN。

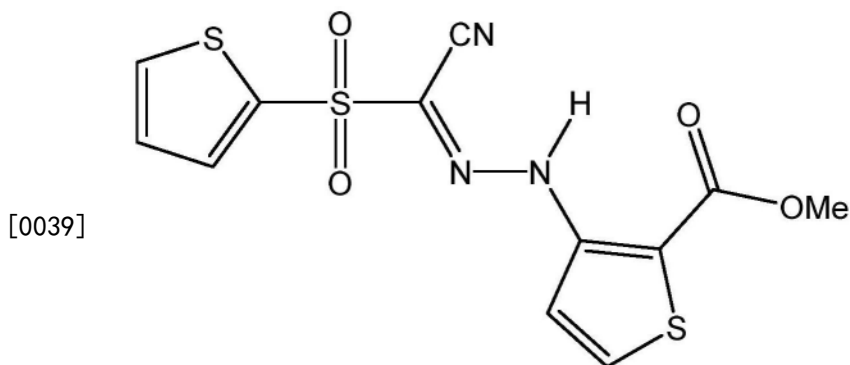
[0034] 根据一些实施方案,X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup>和X<sup>8</sup>中的每一个是H。

[0035] 根据一些实施方案,R<sup>1</sup>是H。

[0036] 根据一些实施方案,其中R<sup>3</sup>是OR<sup>5</sup>。

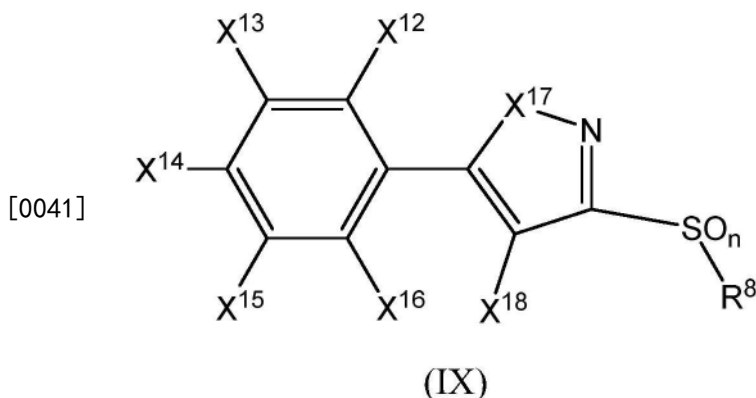
[0037] 根据一些实施方案,R<sup>5</sup>是甲基或乙基。

[0038] 根据一些实施方案,化合物具有式SM1:



SM1。

[0040] 根据一些实施方案,提供了一种药物组合物,该药物组合物包含具有通式(IX)的化合物或其盐:



[0042] 其中

[0043]  $X^{12}$ 、 $X^{13}$ 、 $X^{15}$ 和 $X^{16}$ 各自独立地选自由以下组成的组:H、烷基、环烷基、芳基、胺、卤素、烷氧基、羟基、杂芳基、CN、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{CO}-X^{19}$ 和 $\text{SO}_2X^{19}$ ,其中 $X^{19}$ 选自由以下组成的组:OH、 $\text{O}^-$ 和 $\text{NH}_2$ ;

[0044]  $X^{14}$ 和 $X^{18}$ 各自独立地选自由以下组成的组:H、烷基、环烷基、芳基、胺、卤素、烷氧基、羟基、杂芳基、CN、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{CO}-X^{20}$ 和 $\text{SO}_2X^{20}$ ,其中 $X^{20}$ 选自由以下组成的组:OH、 $\text{O}^-$ 和 $\text{NH}_2$ ;

[0045]  $X^{17}$ 是S、O或 $\text{N}-R^9$ ,其中 $R^9$ 选自由以下组成的组:H、烷基、环烷基、芳基和杂芳基;

[0046] n是1或2;并且

[0047]  $R^8$ 选自由以下组成的组:烷基、卤代烷基、环烷基和芳基;

[0048] 该药物组合物用于治疗神经炎性疾病。

[0049] 根据一些实施方案,提供了治疗神经炎性疾病的方法,该方法包括向有相应需要的受试者施用治疗有效量的具有通式(IX)的化合物或其盐的步骤,其中 $X^{12}$ 、 $X^{13}$ 、 $X^{14}$ 、 $X^{15}$ 、 $X^{16}$ 、 $X^{17}$ 、 $X^{18}$ 和 $R^8$ 中的每一个是如本文描述的。

[0050] 根据一些实施方案,提供了具有通式(IX)的化合物或其盐和药学上可接受的载体在制备用于治疗患有神经炎性疾病的受试者的药物组合物中的用途,其中 $X^{12}$ 、 $X^{13}$ 、 $X^{14}$ 、 $X^{15}$ 、 $X^{16}$ 、 $X^{17}$ 、 $X^{18}$ 和 $R^8$ 中的每一个是如本文描述的。

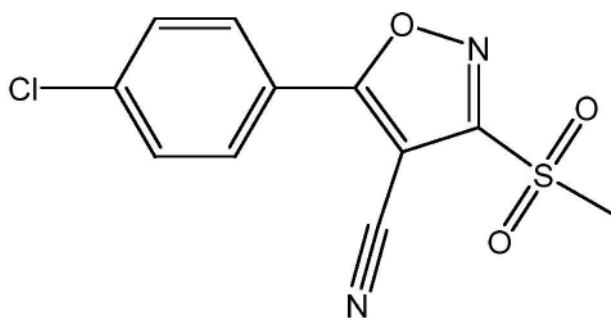
[0051] 根据一些实施方案, $X^{12}$ 、 $X^{13}$ 、 $X^{15}$ 和 $X^{16}$ 中的每一个是H。

[0052] 根据一些实施方案, $X^{14}$ 是卤素。

[0053] 根据一些实施方案, $X^{14}$ 是Cl。

[0054] 根据一些实施方案, $X^{18}$ 是CN。

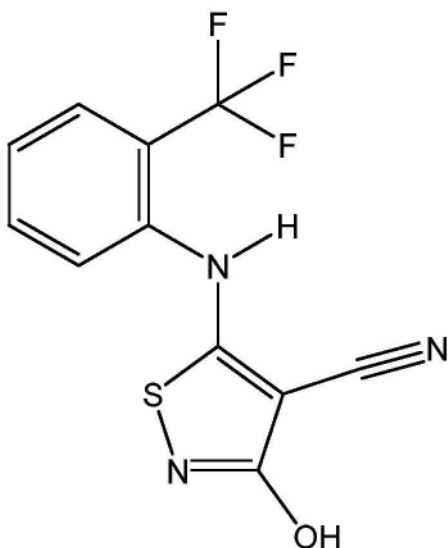
- [0055] 根据一些实施方案,  $X^{17}$  是O。  
[0056] 根据一些实施方案,  $R^8$  是甲基。  
[0057] 根据一些实施方案, n是2。  
[0058] 根据一些实施方案, 化合物具有式SM9:



[0059]

SM9。

- [0060] 根据一些实施方案, 提供了一种药物组合物, 该药物组合物包含具有通式SM7的化合物、其酯或盐:

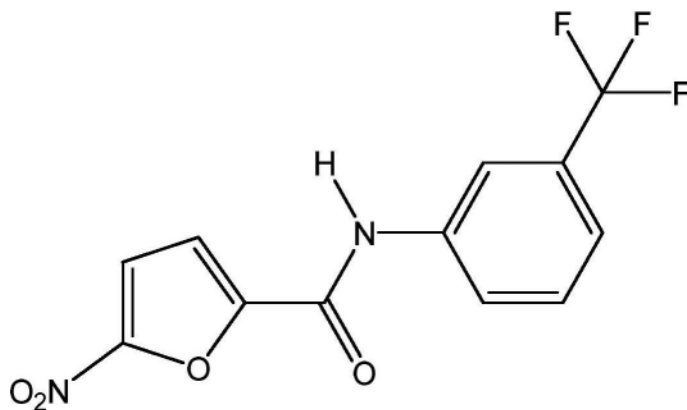


[0061]

SM7

- [0062] 该药物组合物用于治疗神经炎性疾病。  
[0063] 根据一些实施方案, 提供了一种药物组合物, 该药物组合物包含具有通式SM6的化合物或其盐:

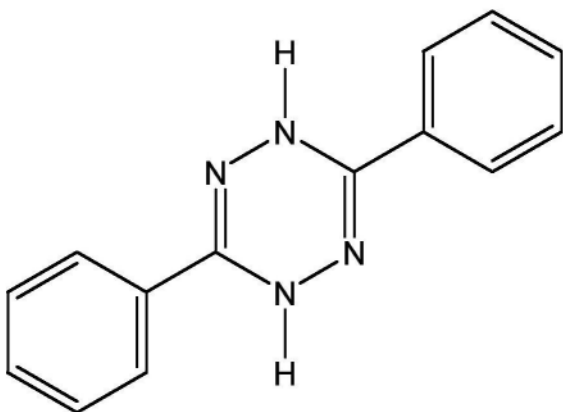
[0064]



SM6。

[0065] 根据一些实施方案,提供了一种药物组合物,该药物组合物包含具有通式SM2的化合物或其盐:

[0066]

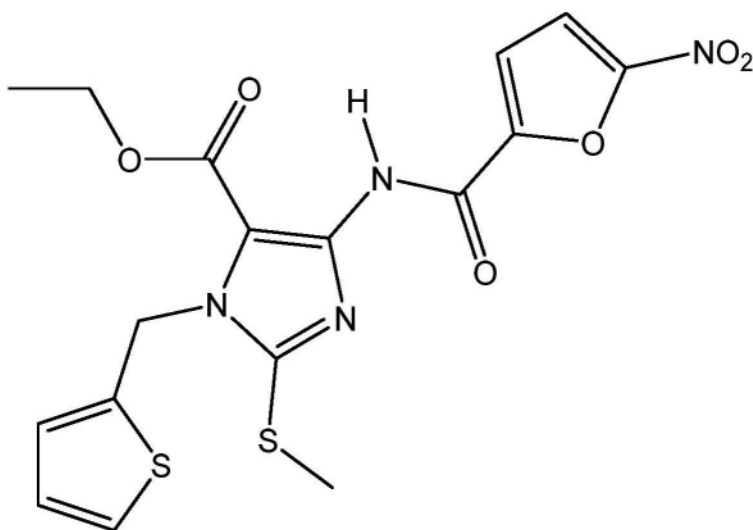


SM2

[0067] 该药物组合物用于治疗神经炎性疾病。

[0068] 根据一些实施方案,提供了一种药物组合物,该药物组合物包含具有通式SM3的化合物或其盐:

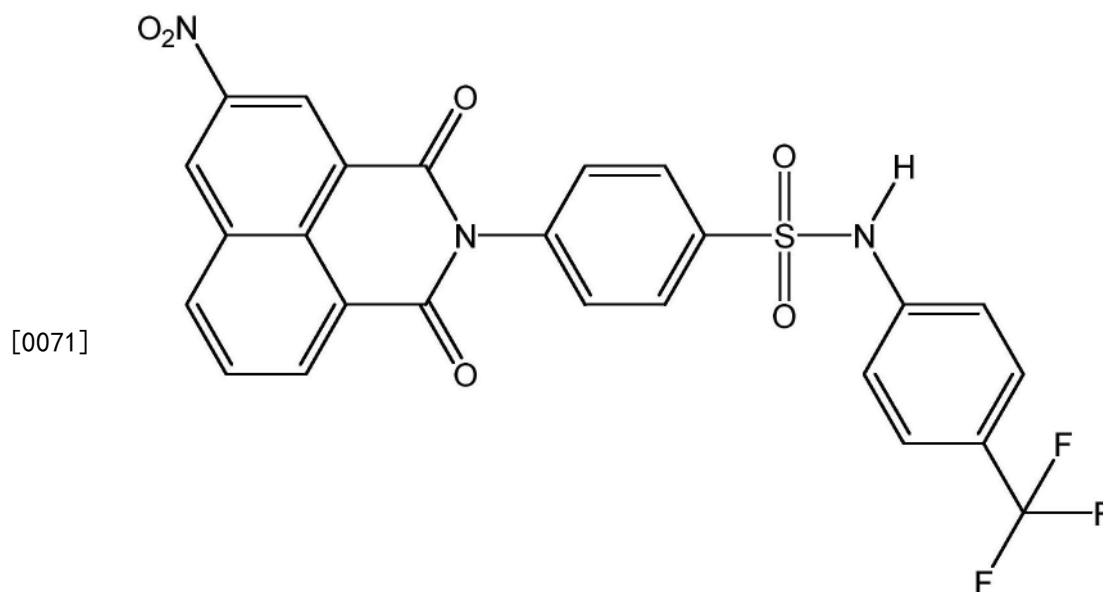
[0069]



SM3。

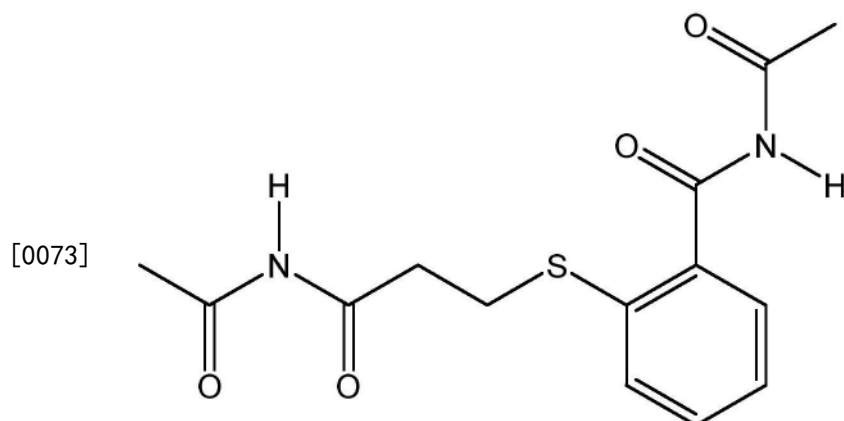


[0070] 根据一些实施方案,提供了一种药物组合物,该药物组合物包含具有通式SM4的化合物或其盐:



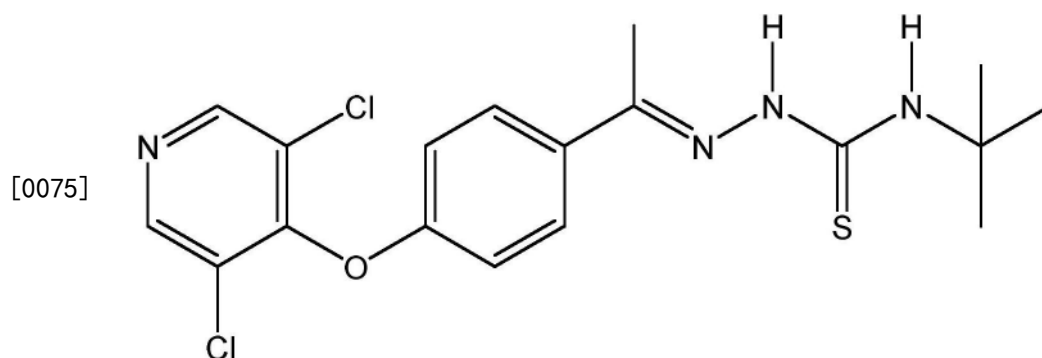
SM4。

[0072] 根据一些实施方案,提供了一种药物组合物,该药物组合物包含具有通式SM5的化合物或其盐:



SM5。

[0074] 根据一些实施方案,提供了一种药物组合物,该药物组合物包含具有通式SM8的化合物或其盐:



[0076]

## SM8。

[0077] 根据一些实施方案,所述药物组合物用于治疗神经炎性疾病。

[0078] 根据一些实施方案,所述药物组合物还包含另外的治疗剂。

[0079] 根据一些实施方案,所述神经炎性疾病是多发性硬化。

[0080] 根据一些实施方案,所述多发性硬化是复发缓解型多发性硬化。

[0081] 根据一些实施方案,所述方法还包括向所述受试者施用另外的治疗剂。

[0082] 根据一些实施方案,所述另外的治疗剂在施用所述至少一种化合物或包含所述至少一种化合物的药物组合物之前、同时或之后被施用。

[0083] 附图简述

[0084] 为了更好地理解本文公开的主题并且例示该主题可如何在实践中实施,现在将参考附图仅通过非限制性实例的方式描述实施方案,在附图中:

[0085] 图1-高通量筛选(HTS)生物测定评估。(A)在BMP-2存在或不存在(“有BMP-2”-正方形,“无BMP-2”-菱形)时的ALP活性,通过CDP-Star®化学发光底物确定,表示为 $0.D_{405nm}$ /孔。(B)在BMP-2存在或不存在(“有BMP-2”-正方形,“无BMP-2”-菱形)时的细胞存活力,通过Cell Titer-Glo®发光底物确定,表示为 $0.D_{405nm}$ /孔。(C)在BMP-2存在或不存在(“有BMP-2”-正方形,“无BMP-2”-菱形)时每个孔的ALP/细胞的比率。

[0086] 图2-SM1-SM9对BPM-2的ALP刺激和对细胞存活力的影响。示出了对于不同浓度的SM1-SM9分子(0.62 $\mu$ M、1.25 $\mu$ M、2.5 $\mu$ M、5 $\mu$ M和10 $\mu$ M)的ALP百分比(%) (菱形)和细胞存活力百分比(%) (正方形)。

[0087] 图3-SM1-SM9在RR-EAE中的作用。RR-EAE小鼠的EAE临床评分,每组(n=7)用小分子(分别为SM1-SM9,10mg/kg/天)治疗,与单独的媒介物(在PBS中的5%DMSO,200 $\mu$ g/小鼠)相比,从免疫接种后第9天起持续30天。SM-菱形,媒介物-正方形。

[0088] 图4-SM1、SM6、SM7和SM9在RR-EAE中的作用。RR-EAE小鼠的EAE临床评分,每组(n=14)用两个剂量10mg/kg/天(正方形)和20mg/kg/天(三角形)的SM1、SM7、SM9或SM6治疗,与单独的媒介物(在PBS中的5%DMSO,200 $\mu$ l/小鼠)(菱形)相比,从第9天起持续30天。

[0089] 图5-SM1、SM6、SM7和SM9对患有中度-重度EAE的小鼠的数目的影响。每组每天具有大于或等于2的临床评分的小鼠的数目(10mg/kg/天-正方形、20mg/kg/天-三角形、媒介物-菱形)。

[0090] 图6-SM1、SM6、SM7和SM9对脱髓鞘的影响。(A)用媒介物、SM1 10mg/kg/天、SM1 20mg/kg/天、SM7 10mg/kg/天、SM9 10mg/kg/天、SM9 20mg/kg/天,SM6 10mg/kg/天和SM6 20mg/kg/天治疗的小鼠的LFB(前外侧索)染色的腰段脊髓切片的代表性图像。(B)对有髓鞘区域的定量。该图示出了在免疫接种后第48天LFB染色的区域占总脊髓截面的百分比(%)。使用Image J软件对6只小鼠/组和3个切片/小鼠进行定量。

[0091] 图7-SM1、SM7和SM9对P19细胞中的神经元表型的影响。(A)在第8天用MAP-2和Hoechst染色的P19细胞的代表性图像。图像使用Olympus BX 81倒置荧光显微镜获得。(B)对MAP-2阳性细胞%的分析。分析通过Image J软件进行。

[0092] 图8-通过蛋白质印迹检测的SM1、SM7和SM9对SMAD1/5/8信号传导的影响。(A)磷酸化的SMAD(p-SMAD)、总SMAD和微管蛋白响应于无刺激(“对照”)或用BMP-2、BMP-2+抗BMP-2/4Ab、BMP-2+如所指示的2.5 $\mu$ M和5 $\mu$ M的SM1或SM7或SM9的刺激的蛋白质印迹。(B)如通过

Image J软件进行的对p-SMAD/微管蛋白的定量。

[0093] 图9-SM1、SM7、SM9和SM6在BMP-4/BMP-2诱导的ATDC5生物测定中的作用。在BMP-4刺激与BMP-2刺激的存在下,2.5 $\mu$ M和5 $\mu$ M的SM1、SM7、SM9和SM6的ALP诱导%和细胞存活力百分比。

[0094] 图10-SM1、SM7、SM9和SM6对SVZ中的成神经细胞标志物双皮质素的从头表达的影响。(A)免疫荧光图像,示出了对SVZ中的BrdU和双皮质素(DCX)的标记。使用Zeiss 710共焦显微镜获得冠状切片的图像。LV,侧脑室,SVZ,脑室下区。图像:a、c、e、g、i、k、m、o的比例尺=100 $\mu$ m(放大率 $\times$ 10),并且图像:b、d、f、h、j、l、n、p的比例尺=20 $\mu$ m(放大率 $\times$ 63)。(B)对SVZ中的BrdU<sup>+</sup>DCX<sup>+</sup>细胞的定量。分析使用image J软件在来自每只小鼠(每组3只小鼠,总数=9)的3个切片上进行。值以平均值 $\pm$ SEM给出,并且学生t检验的结果以\*p<0.05表示。

[0095] 图11-SM1、SM7、SM9和SM6对SGZ中的双皮质素的从头表达的影响。(A)是免疫组织化学图像,示出了对SGZ中的BrdU<sup>+</sup>DCX<sup>+</sup>细胞的标记。图像使用Olympus 8.1显微镜(放大率 $\times$ 10)获得。(B)对SGZ中的BrdU<sup>+</sup>DCX<sup>+</sup>细胞的定量。分析使用image J软件在每只小鼠(每组3只小鼠,总数=9)的3个切片上进行。值以平均值 $\pm$ SEM给出,并且学生t检验的结果以\*p<0.05表示。

[0096] 图12-SM1、SM7、SM9和SM6对SGZ中的成熟神经元标志物NeuN的从头表达的影响。(A)免疫组织化学图像,示出了对SGZ中的BrdU<sup>+</sup>NeuN<sup>+</sup>细胞的标记。图像使用Olympus 8.1显微镜(放大率 $\times$ 10)获得。(B)对SGZ中的BrdU<sup>+</sup>NeuN<sup>+</sup>的定量。分析使用image J软件在每只小鼠(每组3只小鼠,总数=9)的3个切片上进行。值以平均值 $\pm$ SEM给出,并且学生t检验的结果以\*p<0.05表示。

[0097] 发明详述

[0098] 本发明提供了能够抑制BMP的有机小分子,该有机小分子示出了在抑制EAE,特别是复发形式的EAE(其是模拟复发缓解型多发性硬化的模型)方面的治疗效用。

[0099] 本发明部分地基于这样的发现:在基于细胞的测定中,式(I)-式(IX)的小的有机化合物(包括但不限于本文中指定的具体化合物SM1、SM6、SM7和SM9)抑制骨形态发生蛋白2(BMP2)的活性。这些分子被示出在复发/缓解型实验性自身免疫性脑脊髓炎(RR-EAE)动物模型中抑制疾病进展,该动物模型是一种模拟多发性硬化(MS)的得到确认的模型。不希望受任何特定的作用机制理论束缚,这些分子显示出通过抑制脱髓鞘、诱导髓鞘再生或两者来诱导神经发生和少突胶质细胞形成,并维持髓鞘的量。

[0100] 因此,根据一些实施方案,提供了一种药物组合物,该药物组合物包含骨形态发生蛋白2(BMP2)抑制剂,其中BMP2抑制剂是小分子。根据一些实施方案,该药物组合物用于治疗神经炎性疾病,诸如多发性硬化。

[0101] 根据一些实施方案,提供了一种用于治疗神经炎性疾病的方法,该方法包括向有相应需要的受试者施用治疗有效量的骨形态发生蛋白2(BMP2)抑制剂的步骤,其中BMP2抑制剂是小分子。

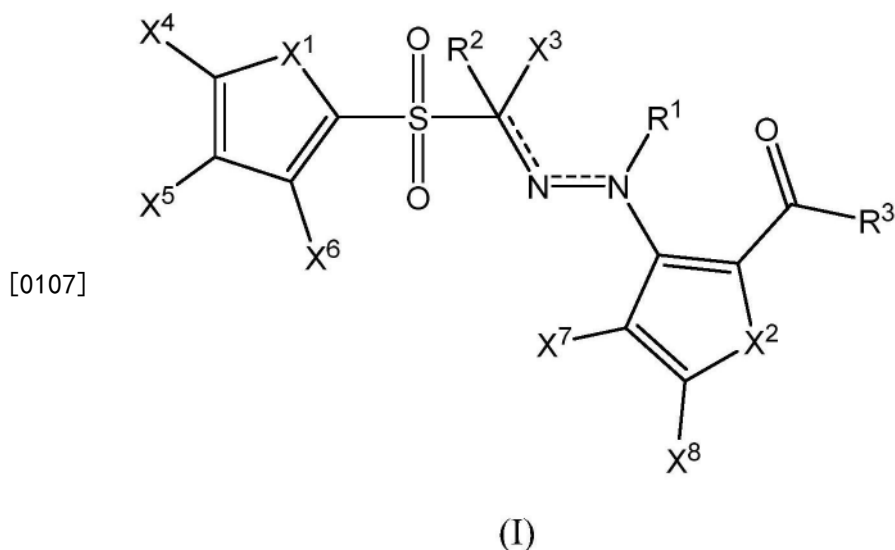
[0102] 根据一些实施方案,提供了骨形态发生蛋白2(BMP2)抑制剂在制备用于治疗患有神经炎性疾病的受试者的药物组合物中的用途,其中BMP2抑制剂是小分子。

[0103] 根据一些实施方案,提供了骨形态发生蛋白2(BMP2)抑制剂用于治疗患有神经炎性疾病的受试者的用途,其中BMP2抑制剂是小分子。

[0104] 根据一些实施方案,小分子具有不多于1000gr/mol的分子量。

[0105] 根据一些实施方案,小分子具有选自自由以下组成的组的式:式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)及其盐。根据一些实施方案,小分子具有选自自由以下组成的组的式:式(I)、式(VI)、式(VII)、式(IX)及其盐。根据一些实施方案,小分子具有选自自由以下组成的组的式:式(I)、式(IX)及其盐。根据一些实施方案,小分子具有选自自由以下组成的组的式:SM1、SM2、SM3、SM4、SM5、SM6、SM7、SM8、SM9及其盐。根据一些实施方案,小分子具有选自自由以下组成的组的式:SM1、SM6、SM7、SM9及其盐。根据一些实施方案,小分子具有选自自由以下组成的组的式:SM1、SM9及其盐。

[0106] 根据一些实施方案,本发明提供了一种药物组合物,该药物组合物包含具有通式(I)的化合物或其盐:



[0108] 其中

[0109] X<sup>1</sup>和X<sup>2</sup>各自独立地是S、O或N-R<sup>4</sup>,其中R<sup>4</sup>选自自由以下组成的组:H、烷基、环烷基、芳基和杂芳基;

[0110] X<sup>3</sup>选自自由以下组成的组:CN、卤素、硝基、CO-X<sup>9</sup>和SO<sub>2</sub>X<sup>9</sup>,其中X<sup>9</sup>选自自由以下组成的组:OH、O<sup>-</sup>和NH<sub>2</sub>;

[0111] X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup>和X<sup>8</sup>各自独立地选自自由以下组成的组:H、烷基、环烷基、芳基、胺、卤素、烷氧基、羟基、杂芳基、CN、硝基、CO-X<sup>10</sup>和SO<sub>2</sub>X<sup>10</sup>,其中X<sup>10</sup>选自自由以下组成的组:OH、O<sup>-</sup>和NH<sub>2</sub>;

[0112] R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>中的一个不存在,并且R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>中的另一个选自自由以下组成的组:H、烷基、环烷基、芳基、胺、卤素、烷氧基、杂芳基、CN、CO-X<sup>11</sup>和SO<sub>2</sub>X<sup>11</sup>,其中X<sup>11</sup>选自自由以下组成的组:OH、O<sup>-</sup>和NH<sub>2</sub>;

[0113] R<sup>3</sup>选自自由以下组成的组:OR<sup>5</sup>、O<sup>-</sup>和NR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>,其中R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>和R<sup>7</sup>各自独立地选自自由以下组成的组:H、烷基、环烷基和芳基;并且

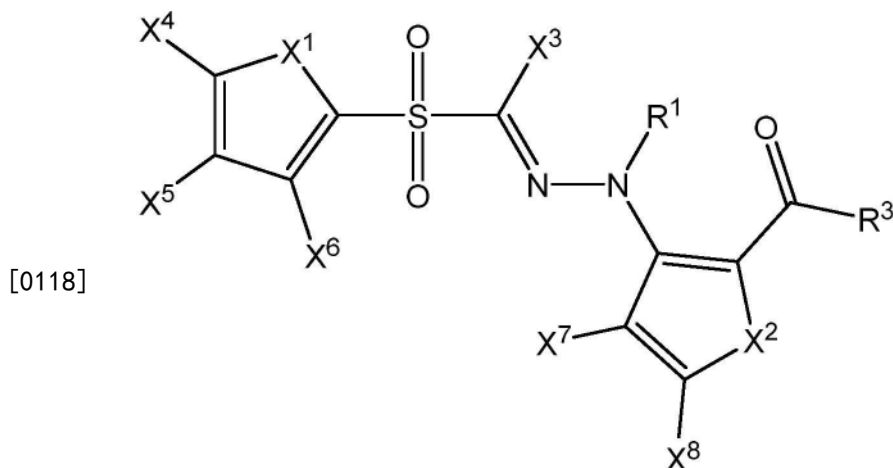
[0114] 其中每条虚线独立地表示单键或双键。

[0115] 根据一些实施方案,提供了一种治疗神经炎性疾病的方法,该方法包括向有相应需要的受试者施用治疗有效量的具有通式(I)的化合物或其盐的步骤,其中X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup>、X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup>、X<sup>8</sup>、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>中的每一个是如本文描述的。

[0116] 根据一些实施方案,提供了具有通式(I)的化合物或其盐用于治疗患有神经炎性

疾病的受试者的用途,其中 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $X^6$ 、 $X^7$ 、 $X^8$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 和 $R^3$ 中的每一个是如本文描述的。

[0117] 根据一些实施方案,药物组合物包含式(Ia)的化合物或其盐:



(Ia).

[0119] 根据一些实施方案,提供了一种治疗神经炎性疾病的方法,该方法包括向有相应需要的受试者施用治疗有效量的具有通式(Ia)的化合物或其盐的步骤,其中 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $X^6$ 、 $X^7$ 、 $X^8$ 、 $R^1$ 和 $R^3$ 中的每一个是如本文描述的。

[0120] 根据一些实施方案,提供了具有通式(Ia)的化合物或其盐用于治疗患有神经炎性疾病的受试者的用途,其中 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $X^6$ 、 $X^7$ 、 $X^8$ 、 $R^1$ 和 $R^3$ 中的每一个是如本文描述的。

[0121] 根据一些实施方案, $X^1$ 和 $X^2$ 各自独立地是S或O。根据一些实施方案, $X^1$ 是S或O。根据一些实施方案, $X^2$ 是S或O。根据一些实施方案, $X^1$ 是S。根据一些实施方案, $X^2$ 是S。根据一些实施方案, $X^1$ 和 $X^2$ 都是S。

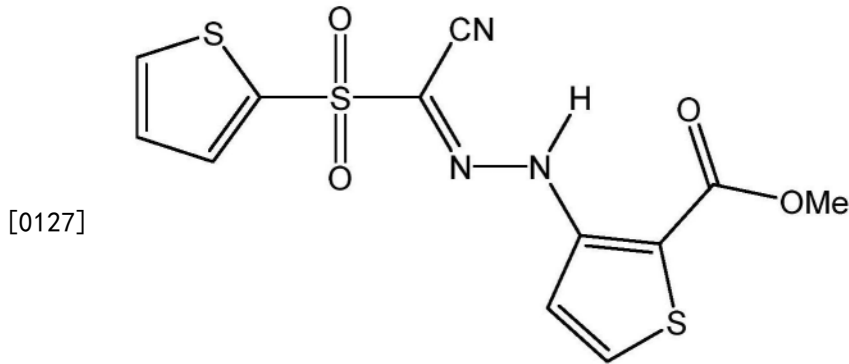
[0122] 根据一些实施方案, $X^3$ 选自由以下组成的组:CN、卤素和硝基。根据一些实施方案, $X^3$ 是CN。

[0123] 根据一些实施方案, $X^4$ 、 $X^5$ 、 $X^6$ 、 $X^7$ 和 $X^8$ 各自独立地选自由以下组成的组:H、烷基、卤素、羟基和烷氧基。根据一些实施方案, $X^4$ 、 $X^5$ 、 $X^6$ 、 $X^7$ 和 $X^8$ 各自独立地是H或卤素。根据一些实施方案, $X^4$ 是H。根据一些实施方案, $X^5$ 是H。根据一些实施方案, $X^6$ 是H。根据一些实施方案, $X^7$ 是H。根据一些实施方案, $X^8$ 是H。根据一些实施方案, $X^4$ 、 $X^5$ 、 $X^6$ 、 $X^7$ 和 $X^8$ 中的至少一个是H。根据一些实施方案, $X^4$ 、 $X^5$ 、 $X^6$ 、 $X^7$ 和 $X^8$ 中的至少两个是H。根据一些实施方案, $X^4$ 、 $X^5$ 、 $X^6$ 、 $X^7$ 和 $X^8$ 中的至少三个是H。根据一些实施方案, $X^4$ 、 $X^5$ 、 $X^6$ 、 $X^7$ 和 $X^8$ 中的至少四个是H。根据一些实施方案, $X^4$ 、 $X^5$ 、 $X^6$ 、 $X^7$ 和 $X^8$ 各自独立地是H。

[0124] 根据一些实施方案, $R^1$ 和 $R^2$ 中的一个不存在,并且 $R^1$ 和 $R^2$ 中的另一个选自由以下组成的组:H、烷基、环烷基、芳基、 $CO-X^{11}$ 和 $SO_2X^{11}$ 。根据一些实施方案, $R^2$ 不存在,并且 $R^1$ 选自由以下组成的组:H、烷基、环烷基、芳基、 $CO-X^{11}$ 和 $SO_2X^{11}$ 。根据一些实施方案, $R^1$ 是H。

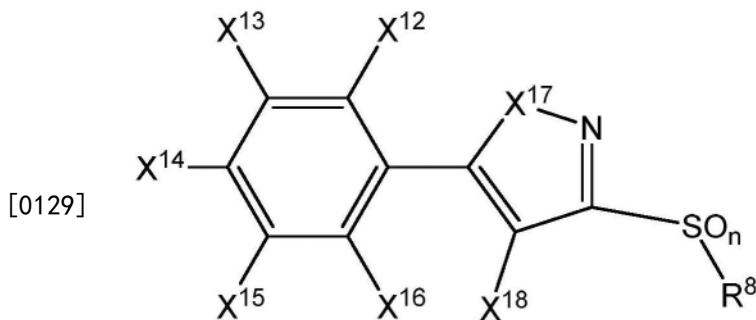
[0125] 根据一些实施方案, $R^3$ 选自由以下组成的组: $OR^5$ 和 $O^-$ 。根据一些实施方案, $R^3$ 是 $OR^5$ 。根据一些实施方案, $R^5$ 是烷基链。根据一些实施方案, $R^5$ 选自由以下组成的组:甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、正丁基、仲丁基和异丁基。根据一些实施方案, $R^5$ 是甲基或乙基。根据一些实施方案, $R^5$ 是甲基。根据一些实施方案, $R^3$ 是OMe或OEt。根据一些实施方案, $R^3$ 是OMe。

[0126] 根据一些实施方案,化合物具有式SM1:



SM1.

[0128] 根据一些实施方案,本发明提供了一种药物组合物,该药物组合物包含具有通式(IX)的化合物或其盐:



(IX)

[0130] 其中

[0131]  $X^{12}$ 、 $X^{13}$ 、 $X^{15}$ 和 $X^{16}$ 各自独立地选自由以下组成的组:H、烷基、环烷基、芳基、胺、卤素、烷氧基、羟基、杂芳基、CN、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{CO}-X^{19}$ 和 $\text{SO}_2X^{19}$ ,其中 $X^{19}$ 选自由以下组成的组:OH、 $\text{O}^-$ 和 $\text{NH}_2$ ;

[0132]  $X^{14}$ 和 $X^{18}$ 各自独立地选自由以下组成的组:H、烷基、环烷基、芳基、胺、卤素、烷氧基、羟基、杂芳基、CN、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{CO}-X^{20}$ 和 $\text{SO}_2X^{20}$ ,其中 $X^{20}$ 选自由以下组成的组:OH、 $\text{O}^-$ 和 $\text{NH}_2$ ;

[0133]  $X^{17}$ 是S、O或N- $\text{R}^9$ ,其中 $\text{R}^9$ 选自由以下组成的组:H、烷基、环烷基、芳基和杂芳基;

[0134] n是1或2;并且

[0135]  $\text{R}^8$ 选自由以下组成的组:烷基、卤代烷基、环烷基和芳基;

[0136] 该药物组合物用于治疗神经炎性疾病。

[0137] 根据一些实施方案,提供了一种治疗神经炎性疾病的方法,该方法包括向有相应需要的受试者施用治疗有效量的具有通式(IX)的化合物或其盐的步骤,其中 $X^{12}$ 、 $X^{13}$ 、 $X^{14}$ 、 $X^{15}$ 、 $X^{16}$ 、 $X^{17}$ 、 $X^{18}$ 和 $\text{R}^8$ 中的每一个是如本文描述的。

[0138] 根据一些实施方案,提供了具有通式(IX)的化合物或其盐用于治疗患有神经炎性疾病的受试者的用途,其中 $X^{12}$ 、 $X^{13}$ 、 $X^{14}$ 、 $X^{15}$ 、 $X^{16}$ 、 $X^{17}$ 、 $X^{18}$ 和 $\text{R}^8$ 中的每一个是如本文描述的。

[0139] 根据一些实施方案, $X^{12}$ 、 $X^{13}$ 、 $X^{15}$ 和 $X^{16}$ 各自独立地选自由以下组成的组:H、烷基、环烷基、芳基、胺、卤素、烷氧基、羟基、CN和 $\text{NO}_2$ 。根据一些实施方案, $X^{12}$ 、 $X^{13}$ 、 $X^{15}$ 和 $X^{16}$ 各自独立地选自由以下组成的组:H、烷基、卤素、羟基和烷氧基。根据一些实施方案, $X^{12}$ 、 $X^{13}$ 、 $X^{15}$ 和 $X^{16}$ 各自独立地是H或卤素。根据一些实施方案, $X^{12}$ 是H。根据一些实施方案, $X^{13}$ 是H。根据一些实施方案, $X^{15}$ 是H。根据一些实施方案, $X^{16}$ 是H。根据一些实施方案, $X^{12}$ 、 $X^{13}$ 、 $X^{15}$ 和 $X^{16}$ 中的至少一

个是H。根据一些实施方案， $X^{12}$ 、 $X^{13}$ 、 $X^{15}$ 和 $X^{16}$ 中的至少两个是H。根据一些实施方案， $X^{12}$ 、 $X^{13}$ 、 $X^{15}$ 和 $X^{16}$ 中的至少三个是H。根据一些实施方案， $X^{12}$ 、 $X^{13}$ 、 $X^{15}$ 和 $X^{16}$ 各自独立地是H。

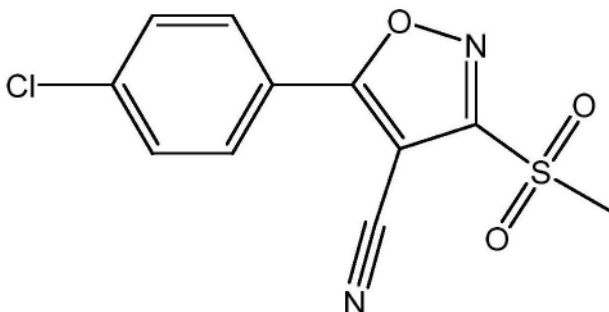
[0140] 根据一些实施方案， $X^{14}$ 选自由以下组成的组：H、胺、卤素、烷氧基、羟基、CN和 $\text{NO}_2$ 。根据一些实施方案， $X^{14}$ 选自由以下组成的组： $\text{NH}_2$ 、卤素、烷氧基、羟基、CN和 $\text{NO}_2$ 。根据一些实施方案， $X^{14}$ 选自由以下组成的组：卤素和羟基。根据一些实施方案， $X^{14}$ 是卤素。根据一些实施方案， $X^{14}$ 选自由以下组成的组：F和Cl。根据一些实施方案， $X^{14}$ 是Cl。

[0141] 根据一些实施方案， $X^{18}$ 选自由以下组成的组：卤素、CN、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{CO}-X^{20}$ 和 $\text{SO}_2X^{20}$ ，其中 $X^{20}$ 选自由以下组成的组： $\text{OH}$ 、 $\text{O}^-$ 和 $\text{NH}_2$ 。根据一些实施方案， $X^{18}$ 是CN。

[0142] 根据一些实施方案，n是2。

[0143] 根据一些实施方案， $R^8$ 选自由以下组成的组：烷基和卤代烷基。根据一些实施方案， $R^8$ 是烷基基团。根据一些实施方案， $R^8$ 是 $\text{C}_{1-4}$ 烷基。根据一些实施方案， $R^8$ 选自由以下组成的组：Me、Et和 $\text{CF}_3$ 。根据一些实施方案， $R^8$ 是Me。

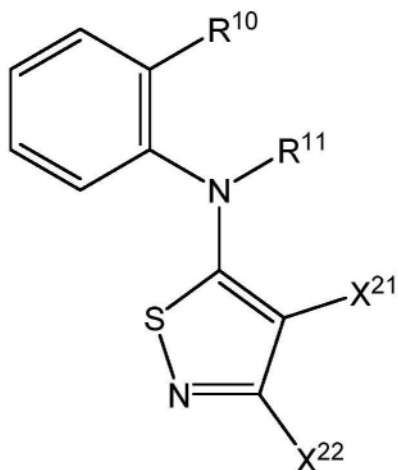
[0144] 根据一些实施方案，化合物具有式SM9：



[0145]

SM9。

[0146] 根据一些实施方案，本发明提供了一种药物组合物，该药物组合物包含具有通式(VII)的化合物或其盐：



[0147]

(VII)

[0148] 其中

[0149]  $X^{21}$ 和 $R^{10}$ 各自独立地选自由以下组成的组：烷基、卤代烷基、环烷基、芳基、胺、卤素、烷氧基、羟基、杂芳基、CN、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{CO}-X^{23}$ 和 $\text{SO}_2X^{23}$ ，其中 $X^{23}$ 选自由以下组成的组： $\text{OH}$ 、 $\text{O}^-$ 和 $\text{NH}_2$ ；

[0150]  $X^{22}$ 选自由以下组成的组： $OR^{12}$ 、 $O^-$ 和 $NR^{13}R^{14}$ ，其中 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 和 $R^{14}$ 各自独立地选自由以下组成的组： $H$ 、烷基、环烷基和芳基；并且

[0151]  $R^{11}$ 选自由以下组成的组： $H$ 、烷基、环烷基、芳基、胺、卤素、烷氧基、杂芳基、 $CN$ 、 $CO-X^{24}$ 和 $SO_2X^{24}$ ，其中 $X^{24}$ 选自由以下组成的组： $OH$ 、 $O^-$ 和 $NH_2$ ；

[0152] 该药物组合物用于治疗神经炎性疾病。

[0153] 根据一些实施方案，提供了一种治疗神经炎性疾病的方法，该方法包括向有相应需要的受试者施用治疗有效量的具有通式(VII)的化合物或其盐的步骤，其中 $X^{21}$ 、 $X^{22}$ 、 $R^{10}$ 和 $R^{11}$ 中的每一个是如本文描述的。

[0154] 根据一些实施方案，提供了具有通式(VII)的化合物或其盐用于治疗患有神经炎性疾病的受试者的用途，其中 $X^{21}$ 、 $X^{22}$ 、 $R^{10}$ 和 $R^{11}$ 中的每一个是如本文描述的。

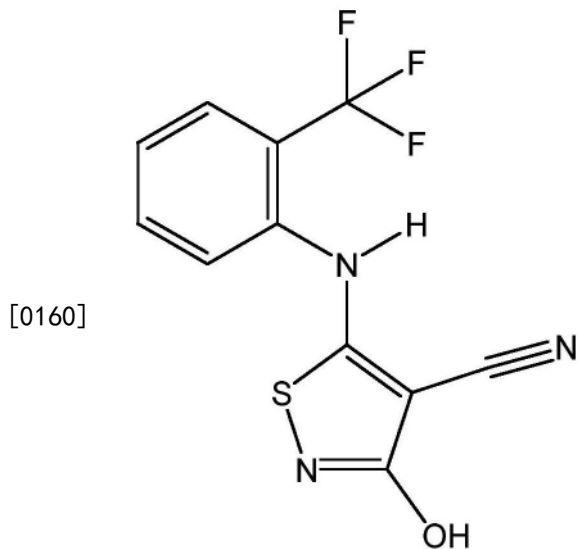
[0155] 根据一些实施方案， $X^{21}$ 选自由以下组成的组： $卤素$ 、 $CN$ 、 $NO_2$ 、 $CO-X^{23}$ 和 $SO_2X^{23}$ 。根据一些实施方案， $X^{21}$ 是 $CN$ 。

[0156] 根据一些实施方案， $X^{22}$ 是 $OR^{12}$ 。根据一些实施方案， $R^{12}$ 是 $H$ 或烷基。根据一些实施方案， $R^{12}$ 是 $H$ 。根据一些实施方案， $X^{22}$ 是 $OH$ 。

[0157] 根据一些实施方案， $R^{10}$ 选自由以下组成的组： $烷基$ 、 $卤代烷基$ 、 $环烷基$ 和 $卤素$ 。根据一些实施方案， $R^{10}$ 是 $卤代烷基$ 。根据一些实施方案， $R^{10}$ 是 $氟化烷基$ 。根据一些实施方案， $R^{10}$ 是 $CF_3$ 。

[0158] 根据一些实施方案， $R^{11}$ 选自由以下组成的组： $H$ 、 $烷基$ 、 $环烷基$ 、 $芳基$ 、 $胺$ 、 $卤素$ 、 $烷氧基$ 、 $杂芳基$ 、 $CN$ 、 $CO-X^{24}$ 和 $SO_2X^{24}$ 。根据一些实施方案， $R^{11}$ 是 $H$ 或 $CO-X^{24}$ 。根据一些实施方案， $R^{11}$ 是 $H$ 。

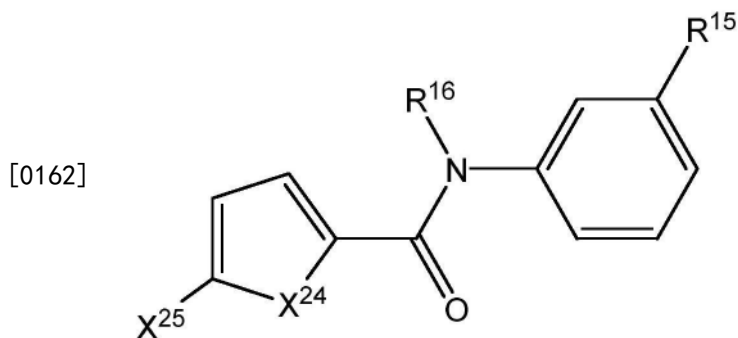
[0159] 根据一些实施方案，化合物具有式SM7：



SM7。

[0161] 根据一些实施方案，本发明提供了一种药物组合物，该药物组合物包含具有通式(VI)的化合物或其盐：





[0163] (VI)

[0164] 其中

[0165]  $X^{24}$ 是O或S;

[0166]  $R^{15}$ 和 $X_{25}$ 各自独立地选自由以下组成的组:烷基、卤代烷基、环烷基、芳基、胺、卤素、烷氧基、羟基、杂芳基、CN、 $NO_2$ 、 $CO-X^{26}$ 和 $SO_2X^{26}$ ,其中 $X^{26}$ 选自由以下组成的组:OH、 $O^-$ 和 $NH_2$ ;并且

[0167]  $R_{16}$ 选自由以下组成的组:H、烷基、环烷基、芳基、胺、卤素、烷氧基、杂芳基、CN、 $CO-X^{24}$ 和 $SO_2X^{24}$ ,其中 $X^{24}$ 选自由以下组成的组:OH、 $O^-$ 和 $NH_2$ 。

[0168] 根据一些实施方案,提供了一种治疗神经炎性疾病的方法,该方法包括向有相应需要的受试者施用治疗有效量的具有通式(VI)的化合物或其盐的步骤,其中 $X^{24}$ 、 $X^{25}$ 、 $R^{15}$ 和 $R^{16}$ 中的每一个是如本文描述的。

[0169] 根据一些实施方案,提供了具有通式(VI)的化合物或其盐用于治疗患有神经炎性疾病的受试者的用途,其中 $X^{24}$ 、 $X^{25}$ 、 $R^{15}$ 和 $R^{16}$ 中的每一个是如本文描述的。

[0170] 根据一些实施方案, $X^{24}$ 是O。

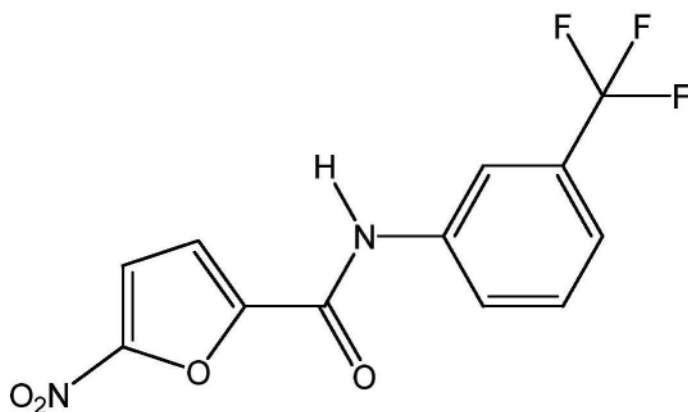
[0171] 根据一些实施方案, $X_{25}$ 选自由以下组成的组:胺、卤素、CN、 $NO_2$ 、 $CO-X^{26}$ 和 $SO_2X^{26}$ 。根据一些实施方案, $X_{25}$ 包含氮原子。根据一些实施方案, $X_{25}$ 是 $NO_2$ 。

[0172] 根据一些实施方案, $R^{15}$ 选自由以下组成的组:烷基、卤代烷基、环烷基和卤素。根据一些实施方案, $R^{15}$ 是卤代烷基。根据一些实施方案, $R^{15}$ 是氟化烷基。根据一些实施方案, $R^{15}$ 是 $CF_3$ 。

[0173] 根据一些实施方案, $R^{16}$ 选自由以下组成的组:H、烷基、环烷基、芳基、胺、卤素、烷氧基、杂芳基、CN、 $CO-X^{24}$ 和 $SO_2X^{24}$ 。根据一些实施方案, $R^{16}$ 是H或 $CO-X^{24}$ 。根据一些实施方案, $R^{16}$ 是H。

[0174] 根据一些实施方案,化合物具有式SM6:

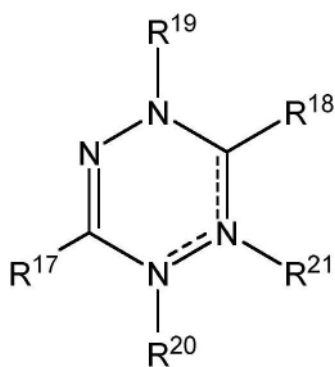
[0175]



SM6。

[0176] 根据一些实施方案,本发明提供了一种药物组合物,该药物组合物包含具有通式(II)的化合物或其盐:

[0177]



(II)

[0178] 其中

[0179]  $R^{17}$ 和 $R^{18}$ 各自独立地是任选地被取代的苯基环;

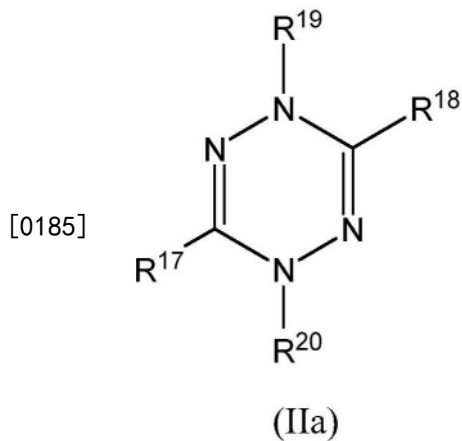
[0180]  $R^{19}$ 选自由以下组成的组:H、烷基、环烷基和芳基;

[0181]  $R^{20}$ 和 $R^{21}$ 中的一个不存在,并且 $R^{20}$ 或 $R^{21}$ 中的另一个选自由以下组成的组:H、烷基、环烷基和芳基;并且

[0182] 每条虚线独立地表示单键或双键;

[0183] 该药物组合物用于治疗神经炎性疾病。

[0184] 根据一些实施方案,化合物具有通式(IIa):



[0186] 其中 $R^{17}$ 、 $R^{18}$ 、 $R^{19}$ 和 $R^{20}$ 中的每一个是如本文描述的。

[0187] 根据一些实施方案,提供了一种治疗神经炎性疾病的方法,该方法包括向有相应需要的受试者施用治疗有效量的具有通式(IIa)的化合物或其盐的步骤,其中 $R^{17}$ 、 $R^{18}$ 、 $R^{19}$ 和 $R^{20}$ 中的每一个是如本文描述的。

[0188] 根据一些实施方案,提供了具有通式(IIa)的化合物或其盐用于治疗患有神经炎性疾病的受试者的用途,其中 $R^{17}$ 、 $R^{18}$ 、 $R^{19}$ 和 $R^{20}$ 中的每一个是如本文描述的。

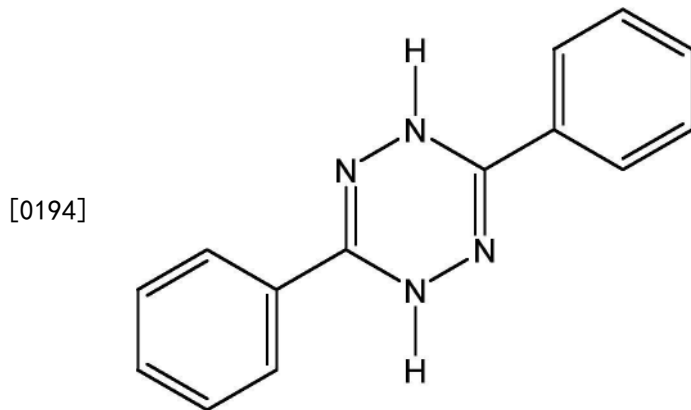
[0189] 根据一些实施方案, $R^{17}$ 是 $C_6H_5$ 。根据一些实施方案, $R^{18}$ 是 $C_6H_5$ 。根据一些实施方案, $R^{17}$ 和 $R^{18}$ 都是 $C_6H_5$ 。

[0190] 根据一些实施方案, $R^{19}$ 是H。

[0191] 根据一些实施方案, $R^{20}$ 是H。

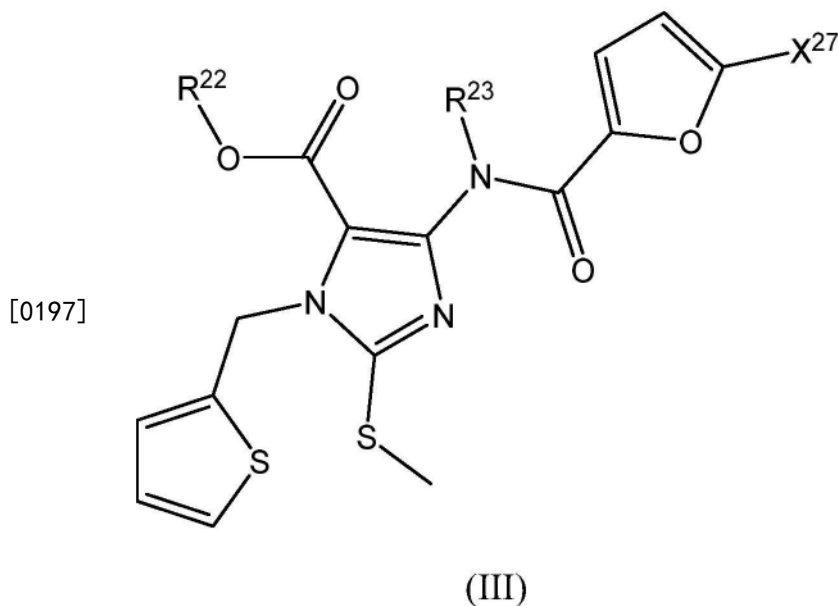
[0192] 根据一些实施方案, $R^{21}$ 不存在。

[0193] 根据一些实施方案,化合物具有式SM2:



[0195] SM2。

[0196] 根据一些实施方案,本发明提供了一种药物组合物,该药物组合物包含具有通式(III)的化合物或其盐:



[0198] 其中

[0199]  $R^{22}$ 和 $R^{23}$ 各自独立地选自由以下组成的组:H、烷基、环烷基和芳基;并且

[0200]  $X^{27}$ 选自由以下组成的组:卤代烷基、胺、卤素、烷氧基、羟基、CN和 $NO_2$ 。

[0201] 根据一些实施方案,提供了一种治疗神经炎性疾病的方法,该方法包括向有相应需要的受试者施用治疗有效量的具有通式(III)的化合物或其盐的步骤,其中 $X^{27}$ 、 $R^{22}$ 和 $R^{23}$ 中的每一个是如本文描述的。

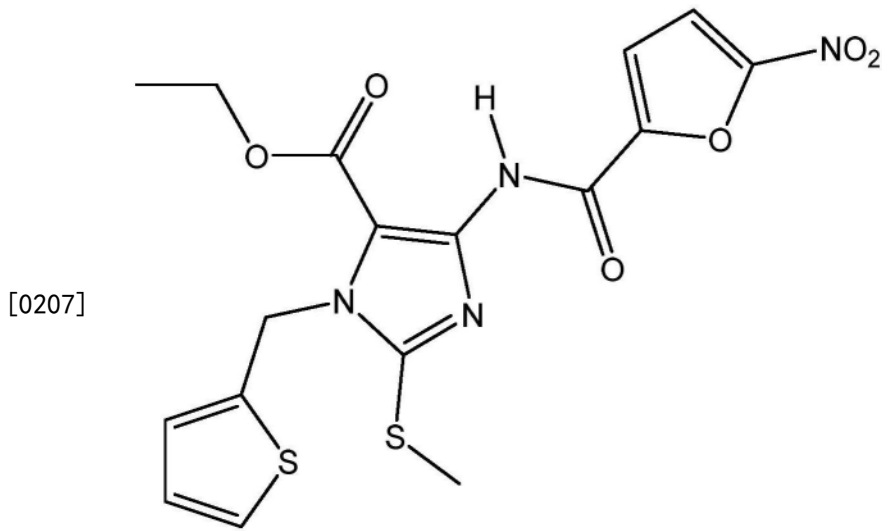
[0202] 根据一些实施方案,提供了具有通式(III)的化合物或其盐用于治疗患有神经炎性疾病的受试者的用途,其中 $X^{27}$ 、 $R^{22}$ 和 $R^{23}$ 中的每一个是如本文描述的。

[0203] 根据一些实施方案, $X_{27}$ 包含氮原子。根据一些实施方案, $X_{27}$ 是 $NO_2$ 。

[0204] 根据一些实施方案, $R^{22}$ 是烷基链。根据一些实施方案, $R^{22}$ 选自由以下组成的组:甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、正丁基、仲丁基和异丁基。根据一些实施方案, $R^{22}$ 是甲基或乙基。根据一些实施方案, $R^{22}$ 是乙基。

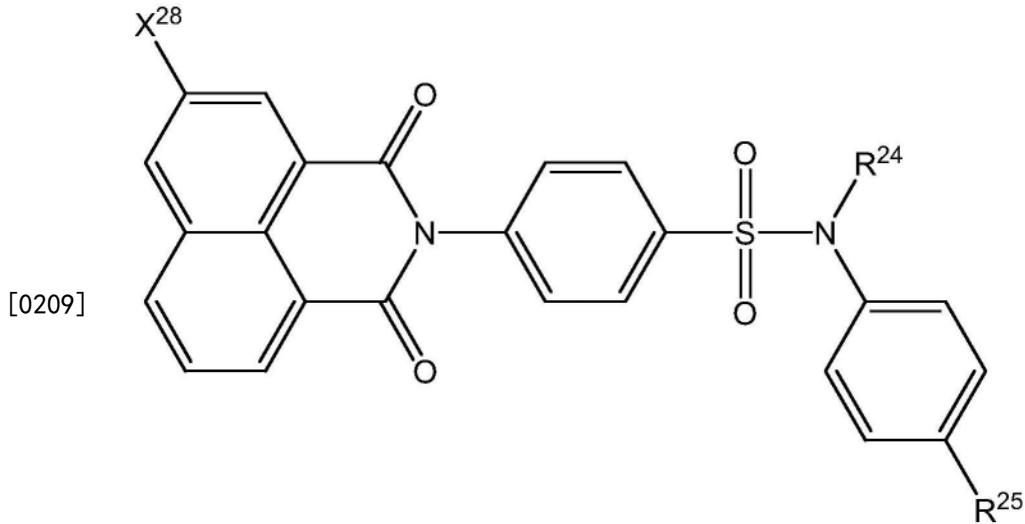
[0205] 根据一些实施方案, $R^{23}$ 是H。

[0206] 根据一些实施方案,化合物具有式SM3:



SM3.

[0208] 根据一些实施方案,本发明提供了一种药物组合物,该药物组合物包含具有通式(IV)的化合物或其盐:



(IV)

[0210] 其中

[0211]  $X^{28}$ 选自由以下组成的组:卤代烷基、胺、卤素、烷氧基、羟基、CN和 $NO_2$ ;

[0212]  $R^{24}$ 选自由以下组成的组:H、烷基、环烷基和芳基;并且

[0213]  $R^{25}$ 选自由以下组成的组:烷基、卤代烷基、环烷基、芳基、胺、卤素、烷氧基、羟基、杂芳基、CN和 $NO_2$ 。

[0214] 根据一些实施方案,提供了一种治疗神经炎性疾病的方法,该方法包括向有相应需要的受试者施用治疗有效量的具有通式(IV)的化合物或其盐的步骤,其中 $X^{28}$ 、 $R^{24}$ 和 $R^{25}$ 中的每一个是如本文描述的。

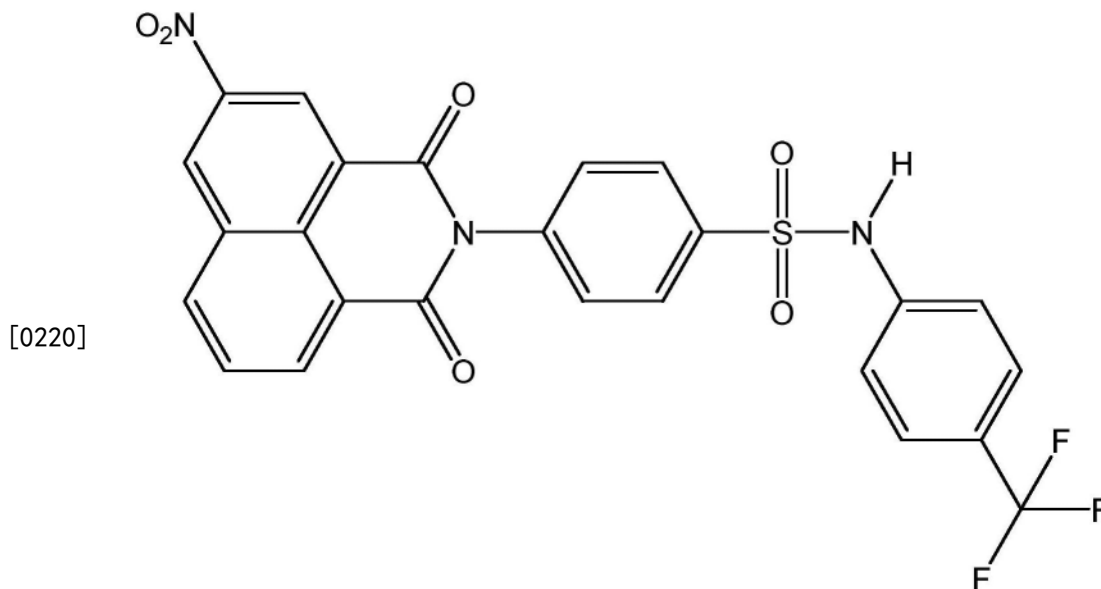
[0215] 根据一些实施方案,提供了具有通式(IV)的化合物或其盐用于治疗患有神经炎性疾病的受试者的用途,其中 $X^{28}$ 、 $R^{24}$ 和 $R^{25}$ 中的每一个是如本文描述的。

[0216] 根据一些实施方案, $X_{28}$ 包含氮原子。根据一些实施方案, $X_{28}$ 是 $NO_2$ 。

[0217] 根据一些实施方案,  $R^{24}$  是 H。

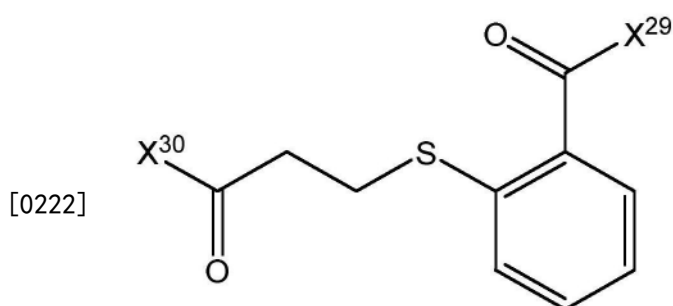
[0218] 根据一些实施方案,  $R^{25}$  选自由以下组成的组: 烷基、卤代烷基、环烷基和卤素。根据一些实施方案,  $R^{25}$  是卤代烷基。根据一些实施方案,  $R^{25}$  是氟代烷基。根据一些实施方案,  $R^{25}$  是  $CF_3$ 。

[0219] 根据一些实施方案, 化合物具有式 SM4:



SM4。

[0221] 根据一些实施方案, 本发明提供了一种药物组合物, 该药物组合物包含具有通式 (V) 的化合物或其盐:



(V)

[0223] 其中

[0224]  $X^{29}$  选自由以下组成的组:  $OR^{26}$ 、 $O^-$  和  $NR^{27}R^{28}$ , 其中  $R^{26}$ 、 $R^{27}$  和  $R^{28}$  各自独立地选自由以下组成的组: H、 $COR^{29}$ 、烷基、环烷基和芳基, 其中  $R^{29}$  选自由以下组成的组: H、烷基、环烷基和芳基; 并且

[0225]  $X^{30}$  选自由以下组成的组:  $OR^{30}$ 、 $O^-$  和  $NR^{31}R^{32}$ , 其中  $R^{30}$ 、 $R^{31}$  和  $R^{32}$  各自独立地选自由以下组成的组: H、 $COR^{33}$ 、烷基、环烷基和芳基, 其中  $R^{33}$  选自由以下组成的组: H、烷基、环烷基和芳基。

[0226] 根据一些实施方案, 提供了一种治疗神经炎性疾病的方法, 该方法包括向有相应需要的受试者施用治疗有效量的具有通式 (V) 的化合物或其盐的步骤, 其中  $X^{29}$  和  $X^{30}$  中的每

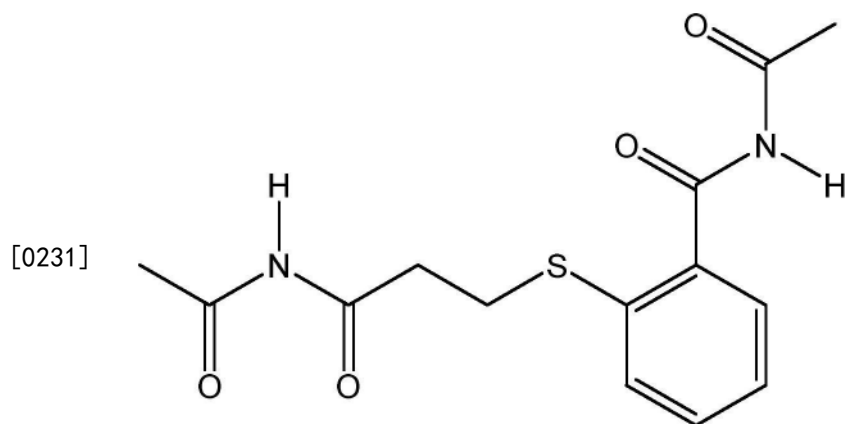
一个是如本文描述的。

[0227] 根据一些实施方案,提供了具有通式(V)的化合物或其盐用于治疗患有神经炎性疾病的受试者的用途,其中 $X^{29}$ 和 $X^{30}$ 中的每一个是如本文描述的。

[0228] 根据一些实施方案, $X^{29}$ 是 $NR^{27}R^{28}$ 。根据一些实施方案, $R^{27}$ 是H。根据一些实施方案, $R^{28}$ 是 $COR^{29}$ 。根据一些实施方案, $R^{29}$ 是烷基基团。根据一些实施方案, $R^{29}$ 是 $C_{1-4}$ 烷基。根据一些实施方案, $R^{29}$ 是甲基。根据一些实施方案, $X^{29}$ 是NHAc。

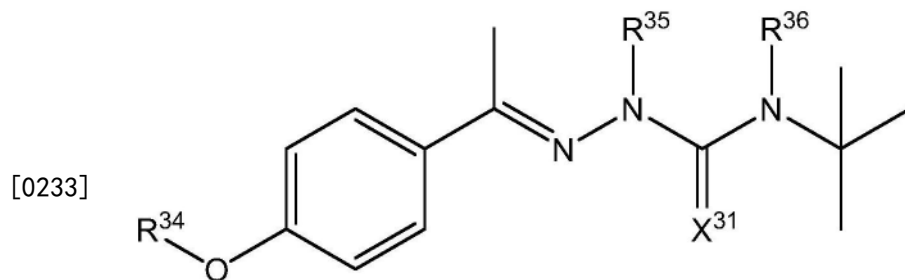
[0229] 根据一些实施方案, $X^{30}$ 是 $NR^{31}R^{32}$ 。根据一些实施方案, $R^{31}$ 是H。根据一些实施方案, $R^{32}$ 是 $COR^{33}$ 。根据一些实施方案, $R^{33}$ 是烷基基团。根据一些实施方案, $R^{33}$ 是 $C_{1-4}$ 烷基。根据一些实施方案, $R^{33}$ 是甲基。根据一些实施方案, $X^{33}$ 是NHAc。

[0230] 根据一些实施方案,化合物具有式SM5:



SM5。

[0232] 根据一些实施方案,本发明提供了一种药物组合物,该药物组合物包含具有通式(VIII)的化合物或其盐:



(VIII)

[0234] 其中

[0235]  $X^{31}$ 选自S和O;

[0236]  $R^{34}$ 选自卤代芳基和卤代杂芳基;并且

[0237]  $R^{35}$ 和 $R^{36}$ 各自独立地选自由以下组成的组:H、烷基、环烷基和芳基。

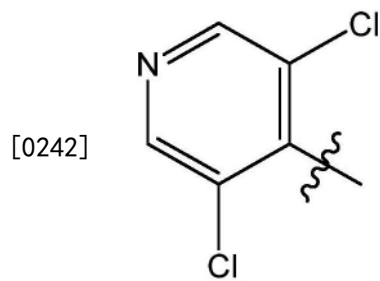
[0238] 根据一些实施方案,提供了一种治疗神经炎性疾病的方法,该方法包括向有相应需要的受试者施用治疗有效量的具有通式(VIII)的化合物或其盐的步骤,其中 $X^{31}$ 、 $R^{34}$ 、 $R^{35}$ 和 $R^{36}$ 中的每一个是如本文描述的。

[0239] 根据一些实施方案,提供了具有通式(VIII)的化合物或其盐用于治疗患有神经炎

性疾病的受试者的用途,其中 $X^{31}$ 、 $R^{34}$ 、 $R^{35}$ 和 $R^{36}$ 中的每一个是如本文描述的。

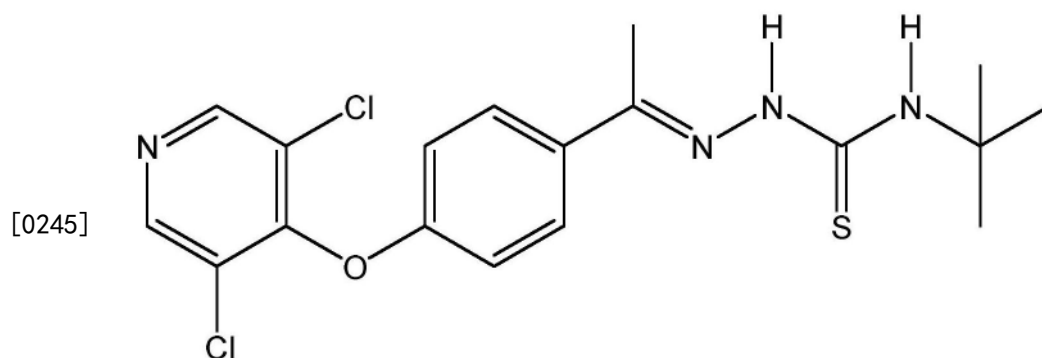
[0240] 根据一些实施方案, $X^{31}$ 是S。

[0241] 根据一些实施方案, $R^{34}$ 是卤代杂芳基。根据一些实施方案, $R^{34}$ 包含至少两个卤素原子。根据一些实施方案, $R^{34}$ 包含两个卤素原子。根据一些实施方案,卤素原子是氯原子。根据一些实施方案, $R^{34}$ 是卤代吡啶。根据一些实施方案, $R^{34}$ 是:



[0243] 根据一些实施方案, $R^{35}$ 是H。根据一些实施方案, $R^{36}$ 是H。根据一些实施方案, $R^{35}$ 和 $R^{36}$ 都是H。

[0244] 根据一些实施方案,化合物具有式SM8:



SM8。

[0246] 根据一些实施方案,所述药物组合物用于治疗神经炎性疾病。

[0247] 根据一些实施方案,所述药物组合物还包含另外的治疗剂。

[0248] 根据一些实施方案,所述神经炎性疾病是多发性硬化。

[0249] 根据一些实施方案,所述多发性硬化是复发缓解型多发性硬化。

[0250] 根据一些实施方案,所述方法还包括向所述受试者施用另外的治疗剂。

[0251] 根据一些实施方案,所述另外的治疗剂在施用所述至少一种化合物或包含所述至少一种化合物的药物组合物之前、同时或之后被施用。

[0252] 在根据本发明使用的化合物中:

[0253] 如本文使用的术语“小分子”和“有机小分子”是可互换的,并且是指具有不多于2000gr/mol的分子量的有机分子。根据一些实施方案,小分子的分子量不多于1000gr/mol。根据一些实施方案,小分子的分子量不多于750gr/mol。根据一些实施方案,小分子的分子量不多于500gr/mol。

[0254] 如本文使用的术语“碳环基”是指包含多个碳原子和一个或多个选自N、S和O的杂原子的环结构。碳环基可以是包含单个环结构的5元或6元环或者包含两个或多个环的环结构,所述两个或多个环中的每个可以是5元或6元环。环结构中的两个或多个环可



以经由共价键彼此稠合或彼此连接。

[0255] 术语“烷基”、“烯基”和“炔基”碳链,如果未具体指定,是指各自包含从1个至20个碳或从1个或2个至16个碳的碳链,并且是直链的或支链的。每个这样的基团可以被取代。在一些实施方案中,碳链包含1个至10个碳原子。在一些实施方案中,碳链包含1个至6个碳原子。在一些实施方案中,碳链包含2个至6个碳原子。在一些实施方案中,烷基是卤代烷基。术语卤代烷基是指与至少一个卤素原子共价连接的任何烷基链,诸如但不限于三氟甲基。烯基碳链可以包含从2个至20个碳、或2个至18个碳、或2个至16个碳、或2个至14个碳、或2个至12个碳、或2个至10个碳、或2个至8个碳、或2个至6个碳、或2个至4个碳。烯基碳链可以同样地包含1个至8个双键、或1个至7个双键、或1个至6个双键、或1个至5个双键、或1个至4个双键、或1个至3个双键、或1个双键、或2个双键。炔基碳链包含从2个至20个碳、或2个至18个碳、或2个至16个碳、或2个至14个碳、或2个至12个碳、或2个至10个碳、或2个至8个碳、或2个至6个碳、或2个至4个碳。炔基碳链可以同样地包含1个至8个三键、或1个至7个三键、或1个至6个三键、或1个至5个三键、或1个至4个三键、或1个至3个三键、或1个三键、或2个三键。示例性烷基基团、烯基基团和炔基基团包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、异丁基、正丁基、仲丁基、叔丁基、异己基、烯丙基(丙烯基)以及炔丙基(丙炔基)。术语“卤代烷基”是指具有至少一个卤素与其共价地连接的烷基基团。示例性卤代烷基基团包括但不限于三氟甲基、氯甲基以及类似基团。

[0256] 被命名为“-C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-亚烷基-”的基团是具有1个和5个之间的碳原子的亚烷基。在一些实施方案中,该基团选自亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基和亚戊基或任何其他具有1个和5个之间的碳原子的烷基,诸如异亚丙基以及其他。该基团可以被取代。

[0257] 被命名为“-C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>-亚烯基-”的基团是包含至少两个碳原子和一个或更多个C=C键(双键)的碳基团。该基团可以被取代。

[0258] “环烷基”是指饱和的单环环体系或多环环体系,在某些实施方案中具有3个至10个碳原子,在其他实施方案中具有3个至6个碳原子;环烯基和环炔基是指各自包含至少一个双键和至少一个三键的单环环体系或多环环体系。环烯基基团和环炔基基团在一些实施方案中,可以包含在3个至10个之间的碳原子,在另外的实施方案中,可以包含在4个至7个之间的碳原子,并且环炔基在另外的实施方案中包含8个至10个碳原子。环烷基基团、环烯基基团和环炔基基团的环体系可以包含一个环或可以以稠合的、桥接的或螺连接的方式被连接在一起的两个或更多个环。

[0259] “芳基”是指包含从6个至10个碳原子的芳香族的单环或多环基团。芳基基团包括但不限于,诸如未被取代的或被取代的苄基、未被取代的或被取代的苯基和未被取代的或被取代的萘基的基团。基团“-C<sub>6</sub>-亚芳基-”是苯基基团或苯基取代的基团。

[0260] 在某些实施方案中,“杂芳基”是指约5元至约15元的单环或多环芳香族环体系,其中环体系中的原子的一个或更多个(在一些实施方案中1个至3个)是杂原子,即除了碳之外的元素,包括例如氮、氧或硫。杂芳基基团可以任选地被稠合至苯环。杂芳基基团包括但不限于咪唑基、咪唑基、噻唑基、四唑基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、噻唑基、异噻唑基、噁唑基、三唑基、喹啉基和异喹啉基。

[0261] “杂环基”在一个实施方案中是指3元至10元、在另一实施方案中是指4元至7元、在另外的实施方案中是指5元至6元的饱和的单环环体系或多环环体系,其中环体系中的原子

的一个或更多个(在某些实施方案中1个至3个)是杂原子,即除了碳之外的元素,包括但不限于氮、氧或硫。在其中杂原子是氮的实施方案中,氮任选地被烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基、杂环基、环烷基烷基、杂环基烷基、酰基、胍取代,或者氮可以被季铵化以形成其中取代基是如上选择的铵基团。

[0262] 术语“卤化物”、“卤素(halogen)”和“卤素(halo)”描述氟、氯、溴或碘。

[0263] 术语“烷氧基”是指—O-烷基。因此,烷氧基基团是单独地与氧结合的烷基(碳和氢的链)基团。非限制性实例包括甲氧基(OMe)和乙氧基(OEt)。

[0264] 基团“-O”和“O”是指带负电荷的氧原子。应理解,带负电荷的氧原子与阳离子偶联,所述阳离子诸如金属阳离子,包括但不限于 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Li}^+$ ;或有机阳离子,诸如 $\text{NR}^+ \text{R}^+ \text{R}^+ \text{R}'^+$ ,其中 $\text{R}^+ \text{R}^+ \text{R}^+ \text{R}'^+$ 各自可以独立地是氢原子或烷基基团。

[0265] 术语“胺”是指 $-\text{NR}' \text{R}_2$ 基团。基团“ $-\text{NR}' \text{R}_2$ ”是指胺基团,其中 $\text{R}'$ 和 $\text{R}_2$ 独立地选自氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、杂环基、酯和羰基,每个是如本文定义的或替代地是本领域已知的。

[0266] 如本文使用的,术语“盐”或“其盐”是指本文公开的化合物的药学上可接受的盐。非限制性实例包括酸加成阳离子盐和阴离子盐。“酸加成阳离子盐”通常在具有碱性原子的化合物暴露于酸性环境时形成。作为非限制性实例,这些包括铵离子,诸如通过含氮化合物的质子化形成的铵离子。“阴离子盐”通常在具有氢原子的化合物暴露于碱性环境时形成。作为非限制性实例,这些包括可以在羧酸的去质子化或酯的皂化时形成的羧酸盐;以及具有去质子化氮原子的化合物。

[0267] 当提及可能的取代时,任何一个被叙述为“任选地被取代”或“被取代”的基团被表述为具有取代其任何原子上的天然原子或基团(诸如氢原子)的一个或更多个原子或原子基团。在一些实施方案中,取代基选自烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、杂环基、卤素、亚烷基-COOH、酯、-OH、-SH和-NH。在一些实施方案中,在某个配体上的取代基的数目是0个或1个或2个或3个或4个或5个或6个或7个或8个或9个或20个取代基。

[0268] 本发明还提供了本文中被指定为SM1、SM6、SM7或SM9的化合物中的任一种的用途。

[0269] 本发明还提供了组合物,例如药物组合物,该药物组合物包含至少一种式(I)的化合物,例如本文中被指定为“SM1”或“SM9”的化合物,和任选地药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0270] 通过另一个方面,本发明提供了药物组合物,该药物组合物包含至少一种被指定为“SM1”、“SM6”、“SM7”或“SM9”的化合物和任选地药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂,该药物组合物用于治疗神经炎性紊乱,例如多发性硬化、神经毒性或脑损伤。

[0271] 本发明还涵盖本文列举的化合物中的任一种的对映体、立体异构体或任何其他异构体。

[0272] 本发明的化合物或其任何对映体、立体异构体或异构体的治疗效力可以在体外或在动物模型(例如EAE动物模型)中测试。

[0273] 所有这些化合物可从商业来源,例如Thermo Fisher Scientific Inc获得。

[0274] 本发明的化合物可以被修饰并且作为前药被施用。

[0275] 如本文使用的,术语“药物组合物”是指至少一种如本文描述的有机小分子的制品。此外,本发明的药物组合物包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0276] 术语“药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂”包括任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂等，并且是指不对生物体造成显著刺激并且不消除所施用的小的有机化合物的生物活性和性质的载体或稀释剂。该术语包括佐剂。在本文中，术语“赋形剂”是指添加至药物组合物中以进一步促进活性成分的施用的惰性物质。

[0277] 赋形剂或无毒载体的非限制性实例包括但不限于碳酸钙、磷酸钙、各种糖和各种类型的淀粉、葡萄糖、蔗糖、糖精钠、甘露醇、乳糖、纤维素衍生物、明胶、植物油、硬脂酸镁、碳酸镁、滑石、聚亚烷基二醇和聚乙二醇。

[0278] 根据本发明的药物组合物可以使用一种或更多种药学上可接受的载体通过本领域熟知的工艺，例如借助于常规的混合、溶解、制粒、乳化、包封、包埋或冻干工艺来制备。适当的制剂取决于所选择的施用途径。药物组合物可以被制成固体剂型，例如粉末、丸剂、片剂等，或者被制成溶液、乳液、悬浮液、气雾剂、糖浆或酞剂。

[0279] 如本文定义的术语“治疗”或“治疗方法”是指试图改变被治疗的受试者的自然疾病过程的临床干预，并且可以通过预防来进行或者在临床病理过程期间进行。期望的治疗效果包括预防疾病的发生或复发，减少、减轻或消除症状，降低疾病进展的速率，改善或降低疾病的严重程度或状态，改善预后，延迟疾病症状的发作，延迟复发以及诱导神经发生和髓鞘形成。

[0280] 在一些实施方案中，根据本发明的治疗对患有MS的受试者的效果可以通过“扩展残疾状态量表” (EDSS) 来监测，该量表是在从0至10的范围内以0.5单位增量表示残疾水平的量表。评分基于神经科医师的检查。EDSS梯级(step) 1.0至4.5是指能够在没有任何帮助的情况下行走的患有MS的人，并且基于对如下八个功能系统(FS)的损伤的测量：锥体、小脑、脑干、感觉、肠&膀胱、视觉、大脑和其他功能系统(行走) [15]。每个功能系统以0(正常)至5或6(最大损伤)的标度来评分。EDSS梯级5.0至9.5由行走障碍定义。

[0281] 术语“神经炎性紊乱”、“神经炎性疾病”或“神经炎性状况”在本文中可互换使用，并且是指其中免疫应答损伤神经系统的组成部分的状况。常见的实例是多发性硬化(MS)和视神经脊髓炎(NMO)，它们的特征在于中枢神经系统的炎性脱髓鞘和随后对神经细胞和轴突的损伤。炎性机制也已涉及许多其他CNS紊乱的发病机制，所述CNS紊乱包括具有中枢神经系统受累的全身炎性状况，诸如血管炎、结节病和白塞病(Behcet disease)，以及神经退行性疾病、精神紊乱、神经毒性状况、中风和脑损伤。

[0282] 如本文定义的术语“神经退行性疾病、状况或紊乱”是脑或脊髓中神经元的结构或功能的逐渐丧失，包括神经元的死亡。在病毒损害之后并且主要在通常在老年人中观察到的各种所谓的‘神经退行性疾病’，诸如阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)和肌萎缩性侧索硬化症(ALS，也被称为葛雷克氏症(Lou Gehrig's disease))中观察到神经退行性。

[0283] 在一些具体实施方案中，根据本发明的药物组合物用于治疗“脱髓鞘疾病”。如本文定义的术语“脱髓鞘疾病”是其中神经元的髓鞘被损伤或被除去导致神经元细胞的功能丧失的任何神经系统疾病。

[0284] 在一些实施方案中，根据本发明的神经退行性疾病是多发性硬化。在另外的具体实施方案中，根据本发明的药物组合物用于治疗多发性硬化。

[0285] 如本文定义的术语“多发性硬化”(MS)是中枢神经系统的慢性炎性神经退行性疾病，其破坏髓鞘、少突胶质细胞和轴突。MS是年轻人中最常见的神经系统疾病，通常出现在

20岁和40岁之间。MS的症状相同,从出现视觉障碍诸如一只眼睛视觉丧失、复视到肌肉无力、疲劳、疼痛、麻木、僵硬和不稳定、失去协调以及其他症状诸如震颤、头晕、口齿不清、吞咽困难和情绪障碍。随着疾病的进展,患者可能丧失其行走能力,可能出现认知下降、对日常活动的自我管理的丧失,并且可能变得严重残疾和依赖性的。

[0286] MS症状因为免疫系统元件攻击脑细胞(神经胶质和/或神经元)并且损伤轴突的保护性髓鞘而得以发展。其中这些攻击发生的区域被称为病灶,其破坏通过脑的信息传递。

[0287] 多发性硬化以疾病进展为特征被分为四种类型:(1)复发缓解型MS(RRMS),其特征在于复发(症状发作(attack)突然爆发(flare-up)),随后缓解(稳定并且可能恢复的时期;虽然在某些缓解中存在完全恢复,但在其他缓解中存在部分恢复或不恢复)。RRMS的症状可以从轻微到严重变化,并且复发可能持续数天或数月。多于80%的具有MS的患者开始于复发缓解周期;(2)继发进展型MS(SPMS)在具有复发缓解型MS的患者中发展。在SPMS中,复发可能发生,但在有意义的时间内不存在缓解(稳定),并且残疾逐渐恶化;(3)原发进展型MS(PPMS),其从发作开始缓慢且稳定地进展,并且占MS病例的少于20%。不存在缓解期,并且症状通常在强度上不减轻;以及(4)进展复发型MS(PRMS)。在此类型的MS中,人们在缓解期期间经历稳定地恶化的症状和发作两者。

[0288] 目前,多发性硬化无法治愈。治疗通常集中于治疗MS发作、控制症状和减少疾病进展的策略。已知的用于治疗MS的剂是皮质类固醇,其主要用于减少复发期间到达高峰的炎症; $\beta$ 干扰素,其减缓多发性硬化的进展、减少发作次数并且减轻发作的严重程度;醋酸格拉替雷(Copaxone®),其减少MS发作次数;芬戈莫德(Fingolimod)(Gilenya®);那他珠单抗(Tysabri®)和本领域已知的其他剂。新出现的降低复发率且轻微影响残疾进展的治疗剂包括富马酸二甲酯(BG-12, Tecfidera®)、特立氟胺(Aubagio®)、阿仑单抗(Campath® 1-H, Lemtrada®)和Ocrelizumab(Ocrevus™)。

[0289] 对多发性硬化的诊断可以通过本领域已知的任何方法进行,并且包括用于脑脊液测试(包括CSF寡克隆条带)的腰椎穿刺(脊椎穿刺)、脑的MRI扫描和脊椎(脊髓)的MRI扫描以及神经元通路功能研究(诱发电位测试)。

[0290] 如下文的实施例(例如实施例2和实施例3)所示,腹膜内施用本发明的小的有机化合物SM1、SM7和SM9改善了复发/缓解型实验性自身免疫性脑脊髓炎(RR-EAE)动物模型中的临床症状,该动物模型是模拟多发性硬化(MS)的得到确认的模型。

[0291] 如本文定义的术语“实验性自身免疫性脑脊髓炎”(EAE,或实验性变应性脑脊髓炎)通常是指中枢神经系统(CNS)的诱导性炎性脱髓鞘疾病,其被广泛地接受为人类CNS脱髓鞘疾病的动物模型,所述人类CNS脱髓鞘疾病包括但不限于多发性硬化(MS)和急性播散性脑脊髓炎(ADEM)。

[0292] EAE可以在许多物种中诱导,包括小鼠、大鼠、豚鼠、兔和灵长类动物。疾病诱导通常通过将动物暴露于各种抗原来进行。最常用的抗原是脊髓匀浆(SCH)、纯化的髓鞘、髓鞘蛋白质诸如髓鞘碱性蛋白(MBP)、髓鞘蛋白脂质蛋白(PLP或亲脂素)和髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)或这些蛋白质的肽,所有这些都导致在免疫学和病理学两者方面具有不同疾病特征的不同模型。

[0293] 取决于所使用的抗原和动物的基因组成,啮齿动物可以表现出EAE的单相型发作

(monophasic bout)、复发缓解形式或慢性EAE。典型的易感啮齿动物将在免疫接种后约两周首次出现临床症状,并且将呈现出复发缓解型疾病的症状。

[0294] 多发性硬化的建模可以用SJL/J小鼠进行。该EAE模型是在8周龄的SJL/J雌性小鼠中通过蛋白脂质蛋白(PLP)片段(连同百日咳毒素)诱导的。该模型显示出复发缓解型(RR)疾病过程,类似于在MS患者中观察到的复发缓解型疾病过程。

[0295] 多发性硬化的建模也可以使用C57BL/6雌性小鼠进行,其中疾病由髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白肽(MOG)诱导。该模型代表疾病的进展(也被称为慢性)形式。

[0296] 如本领域已知的,通常使用以下评分指数对模型动物的疾病活动进行评分(被称为“疾病活动指数”,DAI):“0”,正常小鼠,无明显的疾病体征;“1”,柔软的尾巴或后肢无力,但并非两者都存在;“2”,柔软的尾巴和后肢无力;“3”,部分后肢瘫痪;“4”,完全后肢瘫痪;以及“5”,出于人道原因的死亡或处死。还存在其他DAI,例如使用以下评分的DIA:“1”,尾巴无力;“2”,轻度至中度后肢无力;“3”,重度后肢无力;“4”,一条或更多条肢的完全瘫痪;“5”,濒死。

[0297] 因此上文的评分指数可以用于监测疾病的严重程度和复发的开始,以便确定本发明的有机小分子的治疗效果。

[0298] 因此,在一个实施方案中,本发明的化合物可以被用于治疗RR-MS。

[0299] 在其他实施方案中,本发明的化合物可以被用于治疗继发进展型MS(SPMS)、或原发进展型MS(PPMS)、或进展复发型MS(PRMS)。

[0300] 在另一个方面中,本发明提供了一种治疗多发性硬化的方法,该方法包括向有相应需要的受试者施用治疗有效量的选自由以下组成的组的至少一种化合物:“SM1”、“SM6”、“SM7”和“SM9”,或包含所述至少一种化合物的药物组合物的步骤。

[0301] 举例来说,施用本发明的化合物或本发明的药物组合物的步骤可以通过但不限于以下施用途来进行:口服、直肠、经粘膜、经鼻、肠或肠胃外递送(包括肌内、皮下和髓内注射,以及鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内、鼻内或眼内注射)。可选择地,人们可以以局部而不是全身的方式施用根据本发明的药物组合物,例如经由将药物组合物直接注射到受试者的组织区域中,例如注射到受影响的CNS区域中。

[0302] 在一些实施方案中,本发明的有机小分子与另外的治疗剂组合施用。

[0303] 另外的治疗剂可以是适合于或已知用于治疗多发性硬化或用于降低复发率和影响残疾进展的任何治疗剂。非限制性实例包括干扰素- $\beta$ 1(诸如Avonex®、Betaferon®、Rebif®)、醋酸格拉替雷(Copaxone®)、芬戈莫德(Gilenya®)、那他珠单抗(Tysabri®)、Ocrelizumab(Ocrevus®)和本领域已知的其他剂。

[0304] 另外的治疗剂可以是包括施用细胞的细胞疗法,所述细胞包括但不限于间充质干细胞(MSC)、MSC样细胞、神经祖细胞、CD34<sup>+</sup>细胞、来自所有可得来源的CD133<sup>+</sup>细胞、诱导的多能干细胞(iPSC)、分化的多能干细胞以及类似细胞。

[0305] 在一个实施方案中,所述另外的治疗剂是介导BBB打开的剂,例如可以静脉内注射的甘露醇。

[0306] 另外的治疗剂可以与本发明的小的有机化合物一起配制,或者是单独的组合物的一部分。另外的剂可以与本发明的化合物一起施用或单独施用。它可以在施用本发明的化

合物或药物组合物之前、同时或之后被施用。

[0307] 如本领域已知的,术语“血脑屏障(BBB)”涉及中枢神经系统与循环血液的膜结构分离。

[0308] 根据本发明的至少一种有机小分子的术语“治疗有效量”(或量)由本领域已知的考虑因素来确定以治愈、阻止或至少减轻医学状况。精确剂量和施用频率取决于患者的疾病的严重程度、施用途径和化合物的药代动力学。确定剂量是常规程序,并且是医师和本领域其他普通技术人员熟知的。对于在本发明的方法中使用的任何制品,剂量或治疗有效量可以最初通过体外测定、细胞培养测定和在动物模型(例如EAE)中进行的体内实验来评估。

[0309] 例如,下文提供的剂量基于多发性硬化的EAE小鼠模型来评估。如下文的实施例2和实施例3所示,用10 mg/kg或20 mg/kg的SM1、SM7或SM9中的每一种的治疗改善了EAE。明显地,在研究的每个阶段,被治疗的EAE小鼠的症状没有对照的症状严重。此效果还表现为这样的事实:在被治疗的EAE小鼠组中,较少的小鼠表现出疾病的更严重形式(即2-5的临床评分)。此外,已示出,治疗导致EAE小鼠的脊髓中髓鞘的量增加,指示响应于这些SM治疗的增加的髓鞘再生过程或减少的脱髓鞘,或两者。

[0310] 治疗剂量的非限制性实例包括但不限于每个约70kg人400mg-800mg。

[0311] 应注意,考虑到具体的剂的分子量和其他特征,待施用的有机小分子的量可以变化约5%-25%。因此,如本文定义的术语“约”是指如本文定义的量的5%-25%的波动。优选地,术语“约”涵盖从指定的值的+/-10%、更优选地+/-5%、甚至更优选地+/-1%、并且仍然更优选地+/-0.1%的变化。

[0312] 根据本发明的有机小分子或包含所述有机小分子的任何药物组合物可以以单次或多次施用被施用至患者。如通过本领域技术人员已知的考虑因素所确定的,有机小分子或包含所述有机小分子的药物组合物可以连续地施用至患者或持续不连续的时间段,,以便治愈、阻止或至少减轻医学状况。

[0313] 本文描述的有机小分子的毒性和治疗效力可以通过体外、细胞培养或动物实验中的标准药物程序来确定。从这些体外和细胞培养测定和动物研究获得的数据可以被用于配制成用于人类的剂量范围。剂量可以取决于采用的剂型和施用途径而变化。

[0314] 如本文使用的术语“受试者”意指恒温动物,诸如例如大鼠、小鼠、狗、猫、豚鼠、灵长类动物和人类。尽管本发明的方法特别意图用于治疗患有神经退行性疾病的人类受试者,但也包括其他哺乳动物受试者。术语受试者和患者在本文中可互换使用。

[0315] 本发明还公开了用于在治疗患有多发性硬化的受试者的方法中使用的式“SM1”、“SM6”、“SM7”或“SM9”的化合物和药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂,其中所述方法包括向所述受试者施用所述至少一种有机小分子和药学上可接受的载体。

[0316] 还公开了至少一种式“SM1”、“SM6”、“SM7”或“SM9”的化合物和药学上可接受的载体在制备用于治疗患有多发性硬化的受试者的药物组合物中的用途。

[0317] 本发明的化合物最初基于它们在体外抑制BMP-2信号传导的能力来选择。如实施例1所示,有机小分子SM1、SM6、SM7和SM9根据它们在体外抑制BMP-2而不在小鼠ATDC5细胞中产生细胞毒性的能力而从大文库中筛选到。此外,如实施例4、实施例7和实施例8所示,这些化合物示出了若干种指示体外神经分化的标志物的增加。

[0318] 如本文定义的术语“骨形态发生蛋白”(BMP)是指一组也被称为细胞因子或形态发

生素 (metabologen) 的生长因子。BMP 诱导骨和软骨的形成, 并且在胚胎脑发育中具有多重作用。迄今已经发现了 20 种 BMP, 在这些中有 6 种 BMP (即 BMP-2 至 BMP-7) 属于转化生长因子  $\beta$  (beta) 蛋白质超家族。特别地, 本发明涉及与神经元增殖和发育相关的 BMP。非限制性实例包括 BMP-2 和 BMP-4。在具体实施方案中, BMP 是人 BMP。

[0319] “骨形态发生蛋白 2” (或 BMP-2) 和其他骨形态发生蛋白一样, BMP-2 在骨和软骨的发育中发挥重要的作用。它参与刺猬信号通路 (hedgehog pathway)、TGF $\beta$  信号传导通路和细胞因子-细胞因子受体相互作用。它还参与心脏细胞分化和上皮间充质转换。BMP-2 作为二硫键连接的同二聚体发挥作用, 并且被示出刺激骨的产生。

[0320] 在一些实施方案中, 根据本发明的骨形态发生蛋白 2 是具有 NCBI (美国国家生物技术信息中心) 登录号 NM\_001200.2 的人 BMP-2。

[0321] “骨形态发生蛋白 4” (或 BMP-4) 也参与骨和软骨发育, 特别是牙齿和肢体发育以及骨折修复。这个特定的家族成员在人类的软骨内骨形成的起始中发挥重要的作用。已经示出它参与肌肉发育、骨矿化和输尿管芽发育。在人类胚胎发育中, BMP-4 是胚胎的早期分化和背腹轴的建立所需的关键信号传导分子。BMP-4 从脊索的背侧部分分泌, 并且它与音猬因子 (sonic hedgehog) (从脊索的腹侧部分释放) 协同作用, 以为后期结构的分化建立背腹轴。

[0322] 在一些实施方案中, 根据本发明的骨形态发生蛋白 4 是具有 NCBI (美国国家生物技术信息中心) 登录号 P12644 的人 BMP-4。

[0323] BMP 与细胞表面上的特定受体相互作用, 该受体被称为骨形态发生蛋白受体 (BMPR)。通过 BMPR 的信号转导导致 SMAD 蛋白质家族成员的动员 (mobilization)。如本文使用的, 术语“BMP 信号传导”是指通过 BMP 与其受体的结合而启动的信号传导通路, 以及由该结合诱导的后续细胞处理, 例如 SMAD 蛋白质家族成员的动员。

[0324] 应理解, 本发明不限于本文公开的特定实施例、工艺步骤和材料, 因为这样的工艺步骤和材料可以稍微变化。还应理解, 本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的, 并且不意图是限制性的, 因为本发明的范围将仅由所附的权利要求及其等同形式限定。

[0325] 必须要注意的是, 如本说明书和所附的权利要求中使用的, 单数形式“一 (a)”、“一 (an)”和“该 (the)”包括复数指代物, 除非该内容另外明确地规定。

[0326] 除非另外定义, 否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明相关领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。为了如本文描述的本发明的目的, 定义了以下术语。

## 实施例

[0327] 无需进一步详尽说明, 认为本领域技术人员可以使用前述描述, 在其最大程度上利用本发明。因此, 以下优选的具体实施方案应被解释为仅是说明性的, 并且不以任何方式限制要求保护的发明。

[0328] 本文中未具体描述的本领域已知的标准分子生物学方案通常基本上遵循 Sambrook & Russell, 2001。

[0329] 缩写:

[0330] 小分子-SM

- [0331] 实验性自身免疫性脑脊髓炎-EAE;
- [0332] 复发和缓解-RR;
- [0333] 多发性硬化-MS;
- [0334] 复发和缓解型实验性自身免疫性脑脊髓炎-RR-EAE;
- [0335] 蛋白脂质蛋白肽-PLP;
- [0336] 髓鞘-少突胶质细胞糖蛋白肽-MOG;
- [0337] 磷酸盐缓冲盐水-PBS;
- [0338] 完全弗氏佐剂-CFA;
- [0339] 百日咳毒素-PTX;
- [0340] 骨形态发生蛋白-BMP;
- [0341] 血脑屏障-BBB;
- [0342] 中枢神经系统-CNS;
- [0343] 小时-hr、h;
- [0344] 分钟-min。
- [0345] 实验程序
- [0346] 高通量筛选(HTS)生物测定
- [0347] 将聚-L-赖氨酸(Sigma-Aldrich)添加至384孔板中,并且在RT孵育30min之后取出。将包含DMEM/F12、2%FBS、100单位/ml青霉素、100mg/ml链霉素(Biological industries)的测定培养基添加至每个孔中。然后将重组人BMP-2(rhBMP-2,R&D Systems)添加至每个孔中至2 $\mu$ g/ml的最终浓度。收获ATDC5细胞(Sigma-Aldrich),将其重悬在测定培养基中并且添加至2000个细胞/孔的最终浓度。最后,添加肝素(Sigma-Aldrich)至2 $\mu$ g/ml的最终浓度。将细胞在BPM-2的可能的小分子抑制剂的存在或不存在下,在37 $^{\circ}$ C、具有5%CO<sub>2</sub>、在加湿的室中孵育48小时。在孵育之后,使用完全自动化方案确定ALP水平和细胞存活力。将细胞用PBS洗涤,使用含有在补充有蛋白酶抑制剂混合物(Sigma-Aldrich)的PBS中的0.2%Triton X-100的裂解缓冲液裂解,并且在RT孵育25min。然后通过添加**CDP-Star<sup>®</sup>**化学发光底物(Sigma-Aldrich)并且在RT在黑暗中孵育25min之后测量发光来确定ALP水平。通过添加**CellTiter-Glo<sup>®</sup>**试剂(Biological Industries)并且在孵育10min之后进行发光测量来最终确定细胞存活力。
- [0348] 在小鼠中诱导实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)
- [0349] 在SJL雌性小鼠(6-8周龄)中通过皮下免疫接种(第0天)在0.1ml PBS中的100 $\mu$ g/小鼠的蛋白脂质蛋白肽(PLP<sub>139-151</sub>,由Sigma-Aldrich合成)来诱导RR-EAE。将肽乳化在等体积的含有500 $\mu$ g结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)H37RA(MT,来自DIFCO)的完全弗氏佐剂(CFA,来自DIFCO)中。小鼠还接受在0.2ml PBS中的300ng百日咳毒素(PTX,来自Sigma-Aldrich)的腹膜内注射。在48h后给予PTX的第二次注射(300ng/小鼠)。
- [0350] 监测小鼠的RR-EAE症状,并且按照以下进行评分:“0”,无疾病;“1”,尾巴瘫痪;“2”,后肢无力;“3”,后肢瘫痪;“4”,后肢和前肢无力/瘫痪;“5”,濒死。
- [0351] 所有涉及小鼠的程序都是根据Sourasky医学中心的动物伦理委员会的指导方针进行的。
- [0352] P19细胞的体外分化测定



[0353] 使P19细胞在37℃、5%CO<sub>2</sub>、在含有7.5%小牛血清、2.5%胎牛血清和0.4μl/ml青霉素-链霉素(Gibco)的α-最低必需培养基(αMEM)(Gibco)中生长。每48h为细胞补充新鲜培养基。对于分化研究,将P19细胞以2×10<sup>5</sup>个细胞/60mm细菌培养皿的浓度培养,并且不刺激细胞或与以下刺激物一起孵育:

[0354] 1) 5×10<sup>-7</sup>M全反式视黄酸(RA)(Sigma)

[0355] 2) RA+5ng/ml rhBMP2(R&D systems)

[0356] 3) RA+rhBMP-2+500ng/ml小鼠抗人BMP-2/4mAb(R&D systems)

[0357] 4) RA+rhBMP-2+SM1/SM7/SM9(Maybridge(HitFinder™ Collection)), SM1/SM7/SM9的浓度为:0.625μM、1.25μM和2.5μM。

[0358] 在48h之后补充包含RA、BMP补充剂和SM的培养基。在4天之后,在RA处理期间形成的聚集体通过酶(0.05%v/v胰蛋白酶-0.02%v/v EDTA)和机械手段分散,并且将其铺板在组织培养级培养皿中。在该阶段,将细胞在无RA、BMP和SM的培养基中培养,每48h更新该培养基一次。在第8天(即,RA处理后的第4天)通过免疫荧光检查MAP-2阳性神经元。简言之,在第7天,将细胞以5×10<sup>4</sup>个细胞/孔的最终浓度再培养于具有盖玻片的24孔板中。在第8天,将细胞用PBS洗涤,用4%PFA固定15min,用0.5%Triton Tx透化,用10%FCS、0.1%BSA和0.05%Tween封闭30min,并且用MAP2兔mAb(1:100,D5G1,Cell Signaling)染色1hr。第二抗体步骤通过用AlexaFluor® 488缀合的抗兔IgG抗体(1:1000;Molecular Probes USA)标记进行1h。

[0359] 通过蛋白质印迹分析确定SMAD1/5/8信号传导

[0360] 将P19细胞接种在6孔板(3.5×10<sup>5</sup>个细胞/孔)中。在第二天,不对细胞进行处理,或者用5×10<sup>-7</sup>M RA、5ng/ml BMP-2或SM处理4h。将细胞用冰冷的PBS洗涤,收获并且用补充有蛋白酶抑制剂混合物和原钒酸钠(Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)作为磷酸酶抑制剂(Sigma-Aldrich)的冰冷的RIPA缓冲液(Sigma-Aldrich)裂解。蛋白质浓度使用BCA蛋白质测定试剂盒(Pierce, Rockford, IL)来确定。细胞裂解物(40μg-60μg蛋白质)通过4%-15%SDS-PAGE凝胶电泳分离,并且然后转移至0.2A的硝化纤维素膜,持续2h。将膜在室温在5%(w/v)脱脂奶粉中封闭1h,并且然后在室温与抗磷酸Smad1/5/9抗体、抗Smad1抗体(Cell signaling Technology, Beverly, MA, USA)和抗微管蛋白抗体(Sigma-Aldrich)孵育2h。洗涤膜,并且与碱性磷酸酶缀合的第二抗体(Jackson Laboratories Immune Research, PA, USA)一起孵育。使用增强的化学发光试剂盒(Clarity, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)检测信号,并且通过MicroChemi(DNR Bio-imaging Systems, Jerusalem, Israel)捕获数字图像。蛋白质水平使用ImageJ软件来定量,并且相对于{α}-微管蛋白归一化。

[0361] 实施例1

[0362] 对小分子的高通量筛选

[0363] Keller等人(Nature Structural&Molecular Biology 2004 11,481-488)最初描述了一种用于评估BMP-2和BMP受体IA的结构-功能关系的基于ATDC5细胞的测定。为了筛选大量可能的治疗剂,将用于检测BMP抑制的基于ATDC5细胞的生物测定调整为适用于高通量筛选。该生物测定基于通过施用BMP-2和肝素在小鼠ATDC5细胞中刺激碱性磷酸酶(ALP)产生,以及测量在可能的抑制剂的存在下的ALP水平。该测定通过以下特征表征:

[0364] (a) 找到了用于HTS自动化仪器的最佳条件,以在BMP-2的存在下的ALP产生至在

BMP-2的不存在(无刺激)下的ALP产生之间获得令人满意的差距(即正Z因子(positive Z-prime),高于0.5)。

[0365] (b) 设计了对于HTS确定ALP的灵敏方法:即,使用**CDP-Star®**化学发光底物和发光测量。

[0366] (c) 同时测量ALP产生和细胞存活力两者。这通过在**CDP-Star®**的发光信号减弱之后,使用用于评估细胞存活力的**CellTiter-Glo®**发光细胞存活力测定来实现。同时评估ALP产生和细胞存活力两者是必要的,因为可能有毒的受试小分子可能因细胞毒性而不是干扰BMP-2信号传导而导致ALP水平降低。因此必要的是,检查同一细胞培养物中的ALP水平和细胞存活力两者,以便排除仅导致细胞死亡的分子。生物测定的细节在上文的实验程序部分中详细描述。

[0367] 这个完全自动化测试的效力在图1中展示。图1(A)示出了在肝素的存在下,ATDC5细胞响应于rhBMP-2刺激的ALP活性。ALP活性通过使用**CDP-Star®**化学发光底物来确定。明显地,如图1(B)所示,用rhBMP-2刺激细胞减少了细胞数目。这可能是BMP-2诱导的ATDC5细胞的软骨形成随后增殖减少的结果。如图1(C)所示,诱导的ALP/细胞的比率是4.3倍, $Z' = 0.59$ 。 $Z'$ 是一个指示效果的显著性的参数,即在BMP2存在下的ALP信号与BMP2不存在下的信号水平相比有多高。 $Z'$ 越接近1,差异越大。

[0368] 计算按照以下进行:

$$[0369] \quad Z' = 1 - 3(\sigma_p + \sigma_n) / I\mu_p + \mu_n I$$

[0370] 其中 $\sigma$ =标准偏差, $\mu$ =平均值, $p$ =阳性(有BMP), $n$ =阴性(没有BMP),并且 $I$ =值。

[0371] 小分子(SM)的文库使用上文描述的高通量筛选生物测定来筛选。使用预铺板的HitFinder™ Collection,从由有机“药物样”化合物组成的Maybridge文库中筛选约7600种SM。在用聚-L-赖氨酸涂覆步骤之后且在添加rhBMP-2之前,将化合物添加至每个孔中至5 $\mu$ M的最终浓度。在第一次筛选之后,针对BMP-2的抑制选择96种可能的分子(在本文中被称为“击中物(hits)”),它们显示出高于25%的对BMP-2信号传导的抑制百分比和低于20%的细胞毒性百分比。在生物测定中进一步测试各种浓度(0.62 $\mu$ M、1.25 $\mu$ M、2.5 $\mu$ M、5 $\mu$ M和10 $\mu$ M)的这些分子,以计算IC<sub>50</sub>。在IC<sub>50</sub>确定之后,获得了17个阳性击中物。选择显示出最佳IC<sub>50</sub>值的9种分子用于进一步分析。这些分子在本文中被称为SM1-SM9。SM1-SM9的抑制活性及其对细胞系的细胞毒性作用在图2中示出。ALP水平和细胞存活力在图2中以存在BMP-2而没有SM情况下的ALP或存活力发光水平的百分比示出。测试了不同浓度,即0.62 $\mu$ M、1.25 $\mu$ M、2.5 $\mu$ M、5 $\mu$ M和10 $\mu$ M的SM。

[0372] 表1总结了SM1-SM9的化学名称、结构和IC50值。

[0373] 表1

SM 编号	Maybridge 编号	化学名称	IC 50 ( $\mu\text{M}$ )
SM1	KM03702	3-[(2E)-2-[氟基(噻吩-2-基磺酰基)亚甲基]胍基]噻吩-2-羧酸甲酯	2.6
SM2	XBX00117	1,4-二氢-3,6-二苯基-1,2,4,5-四嗪	8.5
SM3	SEW00102	2-(甲基硫代)-4-[[[(5-硝基-2-呋喃基)羰基]氨基]-1-(2-噻吩基甲基)-1H-咪唑-5-羧酸乙酯	2.6
[0374] SM4	GK01385	4-(5-硝基-1,3-二氧化苯并(de)异喹啉-2-基)-N-[4-(三氟甲基)苯基]苯磺酰胺	10
SM5	BTB11505	N1-乙酰基-2-[(3-(乙酰氨基)-3-氧代丙基]硫代)苯甲酰胺	3.8
SM6	BR00086	N2-[3-(三氟甲基)苯基]-5-硝基-2-糠酰胺	9.7
SM7	RF02433	3-羟基-5-[2-(三氟甲基)苯胺]异噻唑-4-甲脒	2.2
SM8	SPB07118	1-叔丁基-3-[E-1-(4-(3,5-二氯吡啶-4-基)氧基苯基]亚乙基氨基)硫脲	2.8
SM9	KM01484	5-(4-氟苯基)-3-甲基磺酰基-1,2-噁唑-4-甲脒	4.4

[0375] 实施例2

[0376] SM在体内对使用RR-EAE模型的疾病进展的影响

[0377] 在上文的实施例1中鉴定的小分子抑制剂的效果使用S<sub>JL</sub>小鼠的实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型进一步在体内测试。EAE用作复发/缓解型多发性硬化(MS)的模型。EAE按实验程序部分中描述地诱导。从免疫接种后第9天开始,通过腹膜内注射250 $\mu\text{g}$ /小鼠(10mg/kg/天)每天施用SM1-SM9或单独的媒介物(在PBS中的5%DMSO),持续接下来的30天。监测动物的EAE的症状,直到诱导后第45天,并且按照以下进行评分:0=无疾病、1=尾巴瘫痪、2=后肢无力、3=后肢瘫痪、4=后肢加前肢瘫痪、以及5=濒死。

[0378] 如图3展示的,对于用分子SM1、SM7和SM9的治疗,观察到有益效果(相对于媒介物 $p < 0.01$ )。对于用SM1-KM03702的治疗,观察到最明显的效果。在免疫接种后第19天已经观察到有益效果(EAE临床评分 $0.5 \pm 0.2$ ,相对于媒介物组的 $1.1 \pm 0.3$ )。此效果增加到第27天,此时临床评分达到 $0.3 \pm 0.3$ 。

[0379] SM7-RF02433和SM9-KM01484也从免疫接种后第21天开始改善EAE(SM7治疗组和SM9治疗组的EAE临床评分分别为 $0.6 \pm 0.1$ 和 $0.8 \pm 0.3$ ,相对于媒介物组的 $1.1 \pm 0.3$ )。明显地,SM6在该实验中未示出任何有益效果,但是它也被选择用于在下一个实验中进行进一步分析以提供一些对比性结果。

[0380] 用4种上文提及的分子SM1、SM6、SM7&SM9重复实验。该实验在与前一个实验类似的条件下进行,不同之处是在第9天-第38天施用两个剂量的分子:10mg/kg的剂量和20mg/kg的剂量,即250 $\mu\text{g}$ /小鼠和500 $\mu\text{g}$ /小鼠(参见图4)。

[0381] 对于用低剂量10mg/kg SM1的治疗,观察到显著的有益效果(相对于媒介物 $p =$

0.0005)。对于高剂量的SM1,虽然也观察到改善的趋势,但是它不是统计学显著的( $p=0.09$ )。此外,用低剂量和高剂量的SM9的治疗改善了EAE。此处,20mg/kg的高剂量与低剂量相比更有效(对于10mg/kg  $p=0.049$ ,而对于20mg/kg  $p=0.0001$ )。与先前的实验类似,改善主要在第二次复发和第三次复发期间被观察到(分别在第23-31天和第37-44天)。

[0382] 用SM6治疗的效果较弱且不明显。然而,与先前的实验相比,观察到SM7具有导致大多数被治疗的小鼠死亡的毒性作用:到实验结束(第48天),在10mg/kg的低剂量组中8只小鼠死亡,而在20mg/kg的高剂量组中所有小鼠都死亡。

[0383] 还分析了在研究期间的任何时间显示出至少2的评分(后肢轻度瘫痪)的动物的数目(参见图5)。如所表明的,与平均临床评分分析类似,SM1(主要是10mg/kg的低剂量)和SM9(主要是20mg/kg的高剂量)两者就减少具有中度-重度EAE评分的小鼠的数目而言展示出有益效果。

[0384] 有趣的是,在用SM6治疗的小鼠的组中,具有更严重的EAE的小鼠的数目减少(在第二次复发期间:SM6治疗组中2-3只小鼠相对于媒介物组中5-6只小鼠,并且在第三次复发期间:SM6治疗组中5-7只相对于媒介物组中8-9只小鼠)。明显地,SM6对重度EAE的改善具有作用。

[0385] 实施例3

[0386] SM1、SM6、SM7和SM9对EAE的脱髓鞘的影响

[0387] 分析了SM对脱髓鞘和髓鞘再生过程的直接影响。从每组的6只小鼠中取出脊髓,并对脊髓的腰节段进行切片(10 $\mu$ m冠状石蜡切片),并且将其处理以便进行针对髓鞘和浸润部位的LFB-H&E(luxol fast blue与H&E)染色。如图6A所示,在媒介物治疗的组中观察到增加的浸润部位数目以及脱髓鞘。对于所有检查的SM,有髓鞘区域%略微上升的趋势(图6B),但是对于10mg/kg SM7(10mg/kg SM7治疗组的 $34.0 \pm 0.8\%$ ,相对于媒介物的 $28.3 \pm 1.8\%$ , $p=0.04$ ,由于毒性未检查高剂量)以及对于20mg/kg SM9( $34.6 \pm 1.6\%$ , $p=0.03$ )和10mg/kg SM6( $34.8 \pm 1.6\%$ , $p=0.03$ ),观察到显著效果。这些结果可以指示响应于这些SM治疗的髓鞘再生过程增加或脱髓鞘减少,或两者。

[0388] 实施例4

[0389] SM1、SM7和SM9对体外神经发生的影响

[0390] 接下来,在P19分化模型中测量了这些小分子对神经发生的影响。已经证明P19细胞,鼠胚胎来源的畸胎瘤细胞,响应于视黄酸(RA)刺激分化成神经元,并且此分化可以通过添加rhBMP-2(骨形态发生蛋白-2)来阻断[8]。神经元分化的标志是神经元标志物MAP-2的表达,而BMP-2的添加降低了该标志物水平。鼠抗BMP-2/4单克隆抗体的添加逆转BMP-2的作用并且诱导神经元表型的获得。因此,在RA和BMP-2的存在下,检查了SM1、SM7和SM9对P19细胞中神经元标志物MAP-2表达的影响。测试了这些分子的三个浓度:0.625 $\mu$ M、1.25 $\mu$ M和2.5 $\mu$ M。

[0391] 在不存在任何刺激下,未观察到MAP-2阳性细胞。如图7A-图7B展示的,对P19细胞的RA刺激增加了MAP-2<sup>+</sup>细胞的数目( $73.8 \pm 6.5\%$ )。rhBMP-2的添加显著减少了MAP-2<sup>+</sup>细胞的数目( $31.4 \pm 4.3\%$ ),即阻断神经元表型,而抗BMP-2/4mAb的添加通过增加MAP-2<sup>+</sup>细胞的数目( $83.6 \pm 3.5\%$ ,相对于RA+BMP-2 $p<0.01$ )逆转了BMP-2的作用。与抗BMP-2/4中和mAb的作用类似,SM1、SM7和SM9逆转BMP-2的作用,并且与单独的RA+BMP-2刺激相比,增加了MAP-2

<sup>+</sup>细胞(神经元)的数目。

[0392] SM1在所有检查的浓度下都诱导了神经元表型,但在2.5 $\mu$ M的较高浓度下最显著(62.2 $\pm$ 3.9%,相对于RA+BMP-2 $p$ <0.01)。

[0393] 对于SM7,还观察到剂量依赖性影响,SM7在低浓度和适中浓度(mild concentration)(特别是在1.25 $\mu$ M的适中浓度(76.1 $\pm$ 3.1%,相对于RA+BMP-2 $p$ <0.01))均诱导神经元表型。对于较高浓度未观察到显著的影响,可能是因为毒性作用。SM9在低浓度下是无效的,并且在1.25 $\mu$ M和2.5 $\mu$ M的适中浓度和较高浓度下均诱导神经发生(分别为76.4 $\pm$ 12.6%和80.6 $\pm$ 10.0%,相对于RA+BMP-2 $p$ <0.05)。

[0394] 实施例5

[0395] SM1、SM7和SM9对P19细胞中SMAD信号传导的影响

[0396] 已知典型的BMP信号经由SMAD磷酸化介导。BMP通过与I型和II型丝氨酸/苏氨酸激酶受体的复合物结合来转换信号。配体结合诱导受体的磷酸化,然后经由受体Smad(R-Smad)1、5和8激活典型的信号传导。R-Smad被激活的I型受体磷酸化。然后它们与Smad4复合,触发核易位[16]。检查了SM对P19细胞中响应于BMP-2刺激诱导的典型的SMAD1/5/8信号传导的磷酸化的影响。

[0397] 如图8A和图8B展示的,用rhBMP-2刺激P19细胞4小时诱导p-SMAD表达(相对于微管蛋白表达归一化)改变4.9倍。与用单独的BMP-2刺激相比,抗BMP-2/4mAb的添加抑制了76.2%的p-SMAD表达。SM7和SM9,特别是在2.5 $\mu$ M的较低浓度下,对SMAD磷酸化具有最明显的影响(与用单独的BMP-2刺激相比,SM7和SM9的p-SMAD/微管蛋白分别减少40.0%和42.7%)。SM1对SMAD磷酸化仅具有轻微的影响(对于2.5 $\mu$ M和5 $\mu$ M分别抑制24.2%和19.9%)。

[0398] 实施例6

[0399] SM1、SM7、SM9和SM6对BMP-4抑制的影响

[0400] 由于BMP-2和BMP-4之间的高度同源性,还检查了SM抑制BMP-2和BMP-4信号传导的能力(与抗BMP-2/4mAb的作用类似)。使用与用于筛选相同的生物测定(即,具有ALP和存活力检测的ATDC5生物测定)来分析BMP-4中和,不同之处是使用rhBMP-4代替rhBMP-2刺激ATDC5细胞。

[0401] 如图9所示,SM1和SM6对BMP-4和BMP-2诱导的ALP产生具有相同的影响。SM7和SM9两者对BMP-2的抑制似乎略高于BMP-4(对于2.5 $\mu$ M SM7—对BMP-2的47.3%抑制,相比于对BMP-4的29.8%抑制;并且对于2.5 $\mu$ M SM9—对BMP-2的29.1%抑制,相比于对BMP-4的18.9%抑制)。

[0402] 实施例7

[0403] SM1、SM7、SM9和SM6对脑室下区(SVZ)和颗粒下区(SGZ)中的成神经细胞标志物双皮质素(DCX)的从头表达的影响

[0404] RR-EAE诱导的小鼠被腹膜内注射250 $\mu$ g/小鼠(低-L)或500 $\mu$ g/小鼠(高-H)的小分子SM1、SM7、SM9、SM6或相应的媒介物。从免疫接种后第9天开始,每天注射SM,持续30天。对于免疫组织化学分析,每组的3只小鼠从免疫接种后第9天开始每天被腹膜内注射溴-2'-脱氧尿苷(BrdU),持续接下来的8天。如从图10A-图10B中可以看出的,对患有EAE的小鼠的SVZ中的BrdU<sup>+</sup>DCX<sup>+</sup>细胞的定量揭示了,SM9L(低剂量SM9)导致BrdU<sup>+</sup>DCX<sup>+</sup>细胞显著增加。结果还

揭示了与对照媒介物相比,SM9H、SM1L、SM1H和SM6H诱导BrdU<sup>+</sup>DCX<sup>+</sup>细胞增加的趋势。

[0405] 接下来,评估了小鼠的SGZ中BrdU<sup>+</sup>DCX<sup>+</sup>细胞的量。图11A-图11B示出了在用SM或用媒介物治疗之后,患有EAE的小鼠中的BrdU<sup>+</sup>DCX<sup>+</sup>细胞的免疫组织化学标记。对BrdU<sup>+</sup>DCX<sup>+</sup>细胞的定量揭示了,与用媒介物治疗相比,SM9H诱导的SGZ中BrdU<sup>+</sup>DCX<sup>+</sup>细胞的显著增加,以及SM9L、SM6L和SM7L诱导BrdU<sup>+</sup>DCX<sup>+</sup>细胞增加的趋势。

[0406] 实施例8

[0407] SM1、SM7、SM9和SM6对SGZ中成熟神经元标志物NeuN的从头表达的影响。

[0408] 在本实验中,评估了小鼠的SGZ中BrdU<sup>+</sup>NeuN<sup>+</sup>细胞的量。图12A-图12B使用Olympus 8.1显微镜(放大率×10)示出了对用SM或媒介物治疗的患有EAE的小鼠中BrdU<sup>+</sup>NeuN<sup>+</sup>细胞的免疫组织化学标记。对BrdU<sup>+</sup>NeuN<sup>+</sup>细胞的定量揭示了与用媒介物治疗相比,经SM1H和SM9L治疗的小鼠的SGZ中BrdU<sup>+</sup>NeuN<sup>+</sup>细胞诱导的显著增加,以及SM9H诱导BrdU<sup>+</sup>NeuN<sup>+</sup>细胞增加的趋势。

[0409] 引用的参考文献

[0410] 以下列出了被认为与本公开的主题的背景相关的参考文献:

[0411] [1]Trapp,B.D.and Nave,K.A.Annu.Rev.Neurosci.2008;31:247-269.

[0412] [2]Grinspan J.B.(2015)Vitamins and Hormones,Chapter 6,volume 99,pages 195-222.

[0413] [3]US 2015/139983

[0414] [4]US 2008/0249038

[0415] [5]Simonini M.V.et al.ASN Neuro.2010 Jan 15;2(1);e00025

[0416] [6]Li D.et al.Hippocampus 2008;18:692-8

[0417] [7]Mabie P.C.et al.J.Neurosci.1997,17:4112-4120

[0418] [8]Gross R.E.et al.Neuron 1996,17:595-606

[0419] [9]Gomes W.A.et al.Dev.Biol.2003,255:164-177

[0420] [10]Lim D.A.et al.Neuron 2000,28:713-726

[0421] [11]WO 11/019678

[0422] [12]US 2006217390

[0423] [13]WO 03/105857

[0424] [14]US 2004039037

[0425] [15]Kurtzke,J.F.neurology 1983;33(11):1444-1452

[0426] [16]Bani-Yaghoub M,Felker JM,Sans C,Naus CC.Exp Neurol.2000;162:13-26.

[0427] [17]WO 2013/186777

[0428] 本文对以上参考文献的承认不应被推断为意味着这些参考文献以任何方式与本公开的主题的可专利性相关。

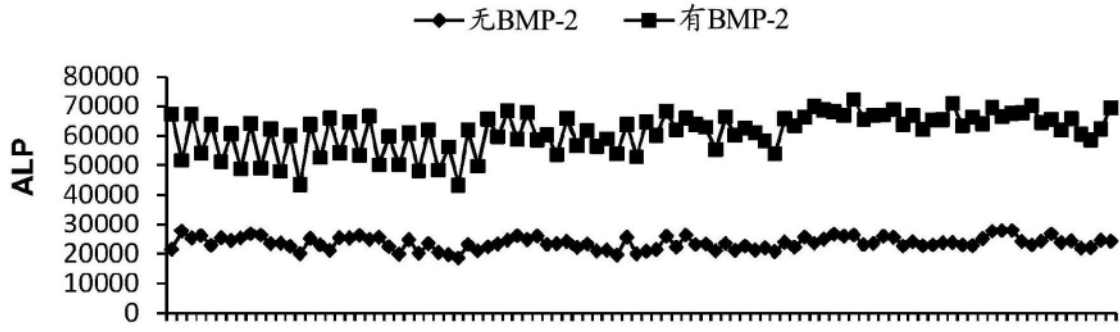


图1A

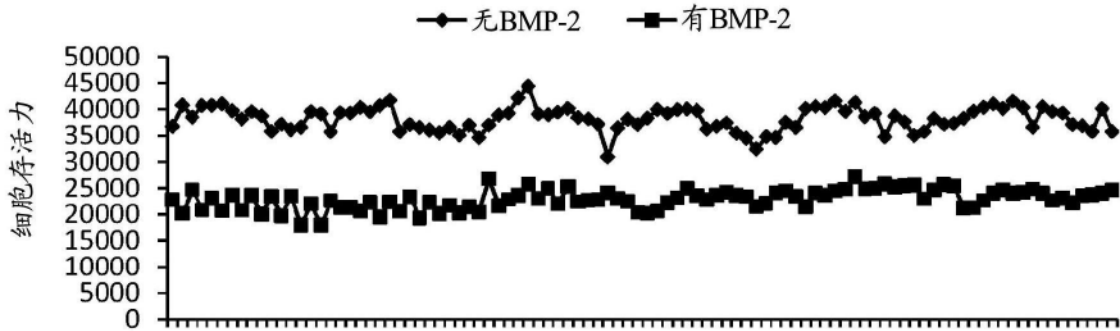


图1B

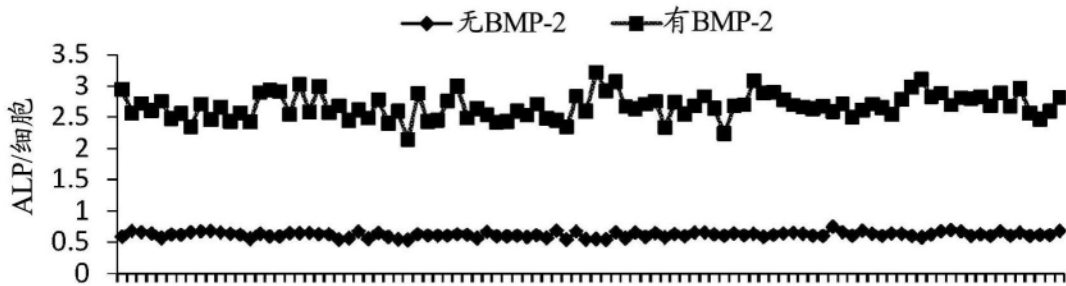


图1C

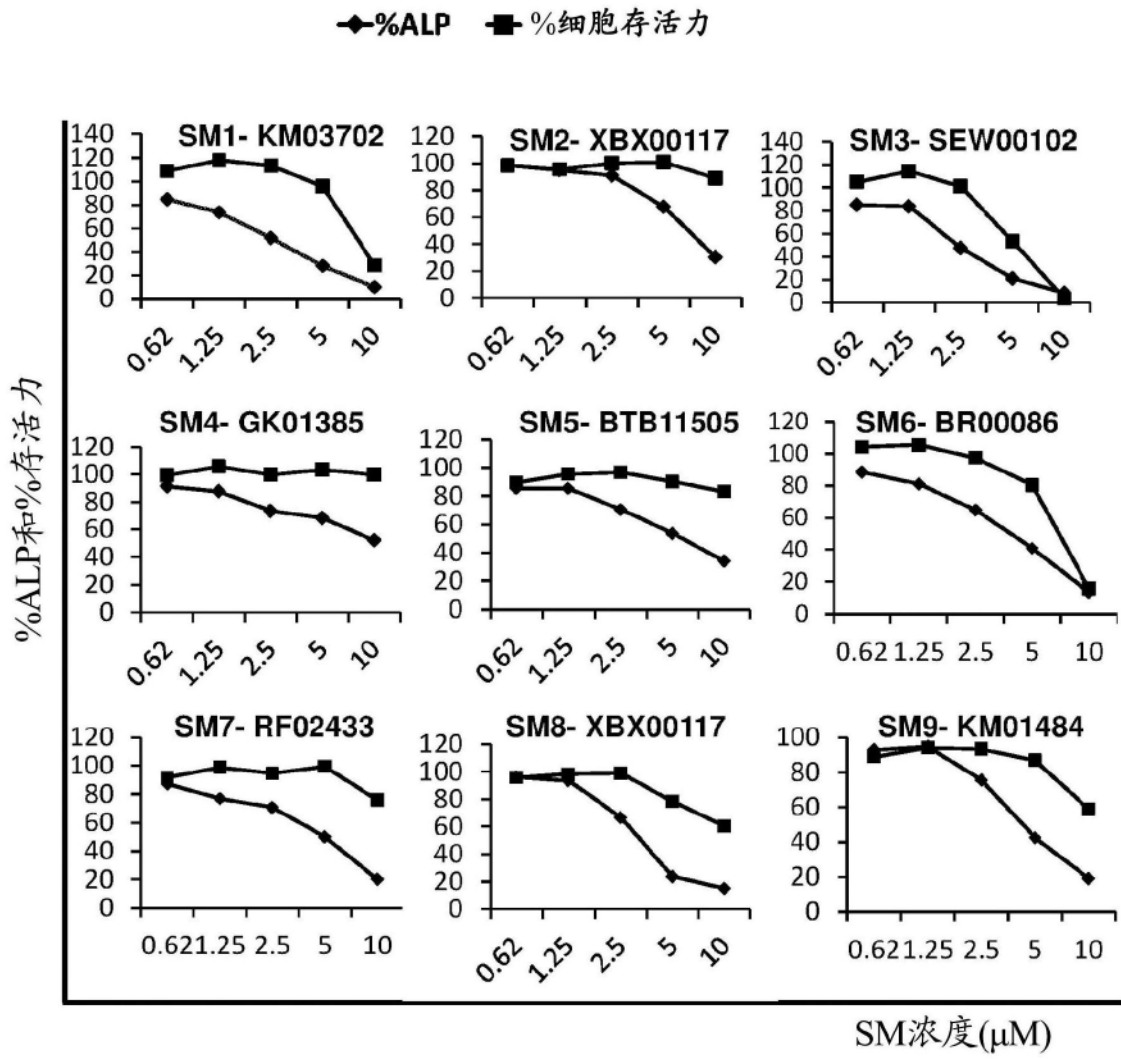


图2



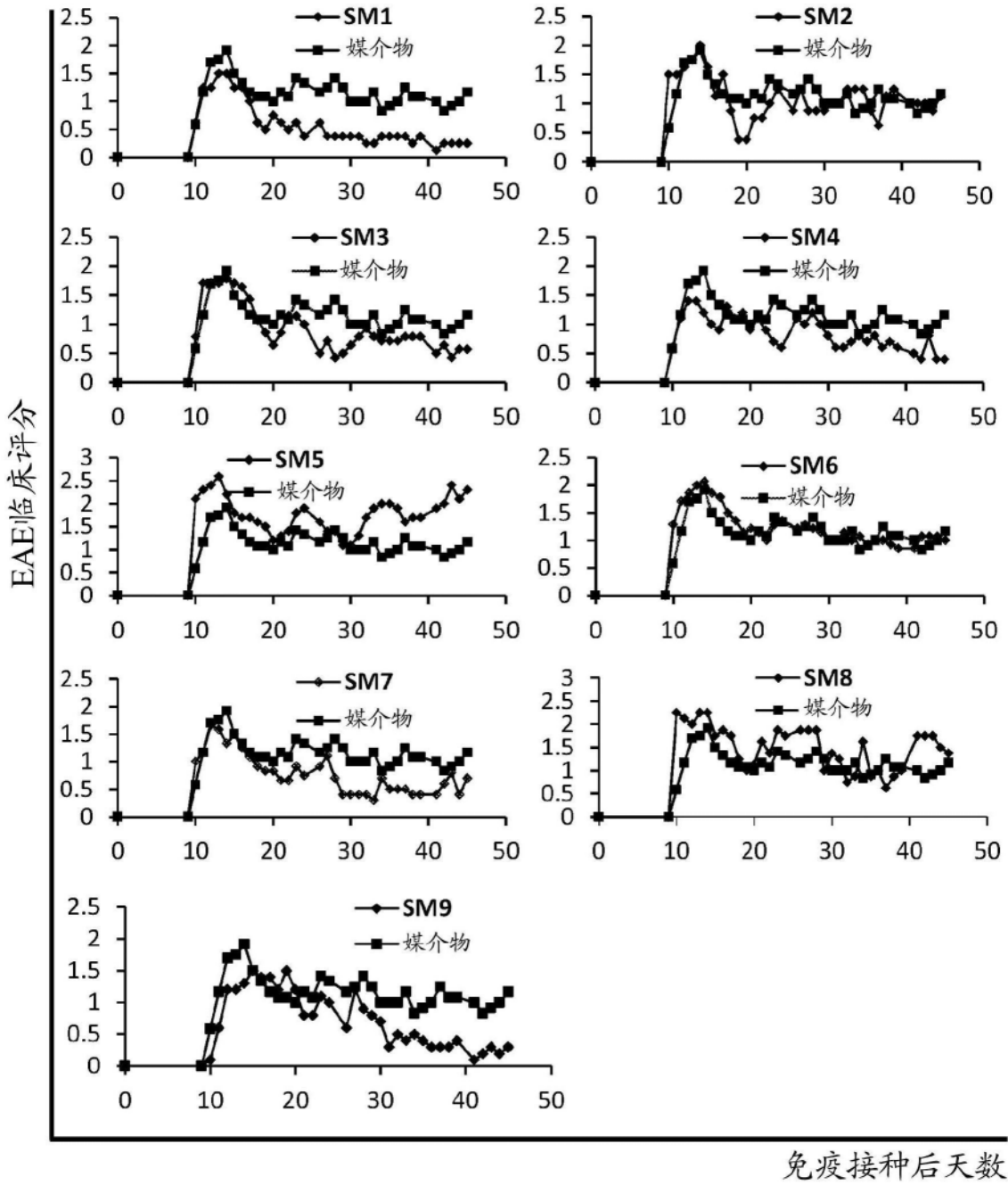


图3

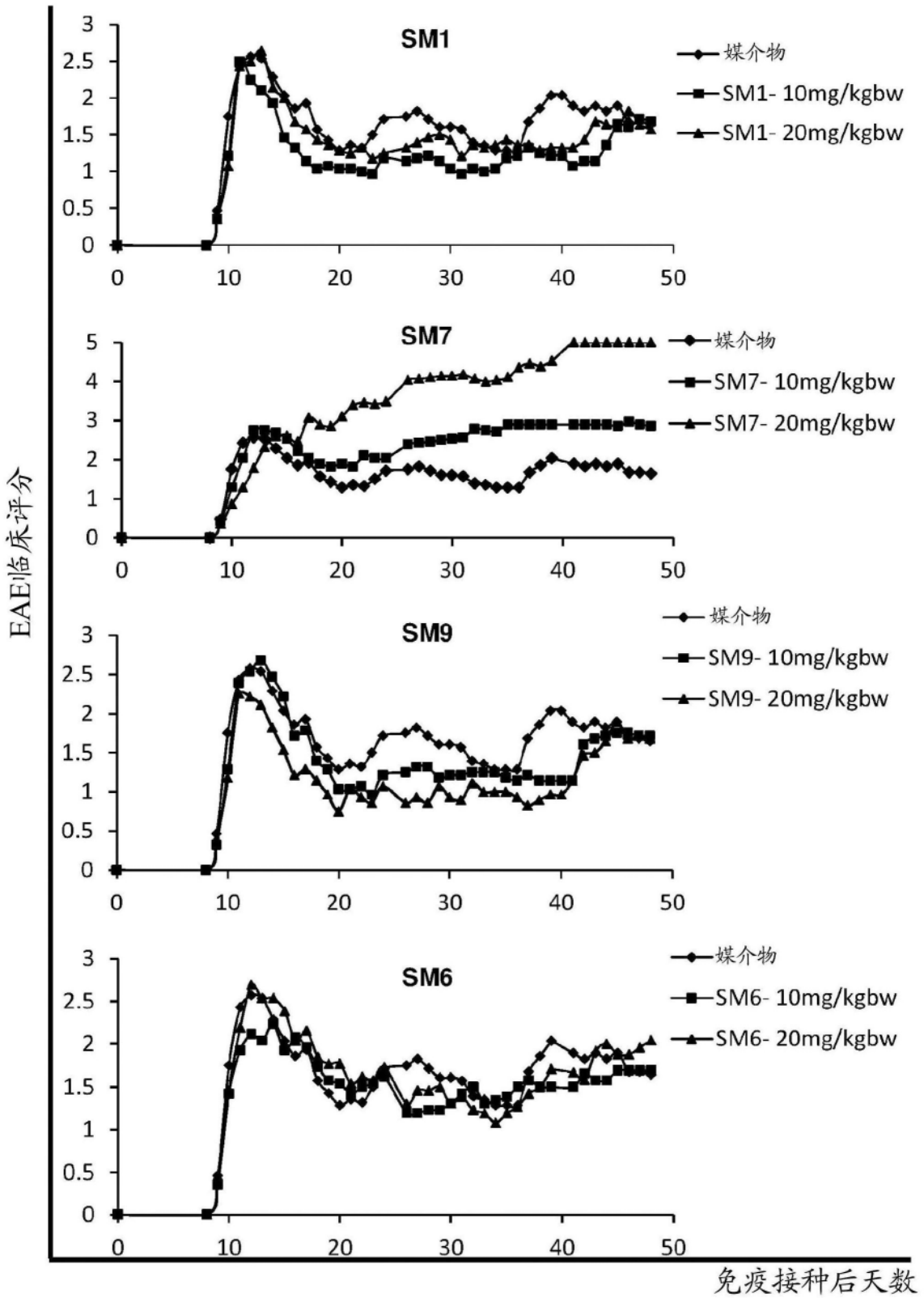


图4

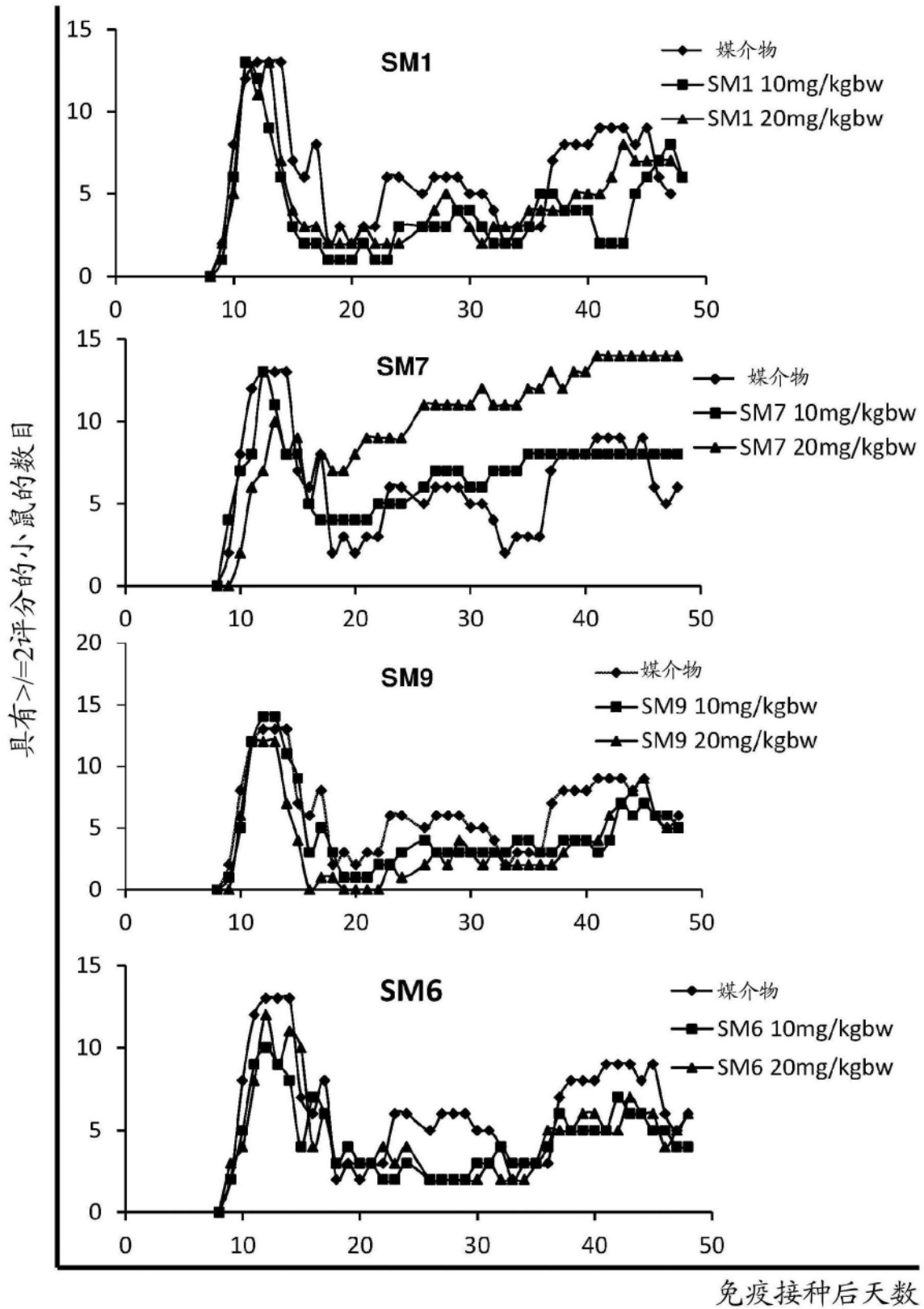


图5

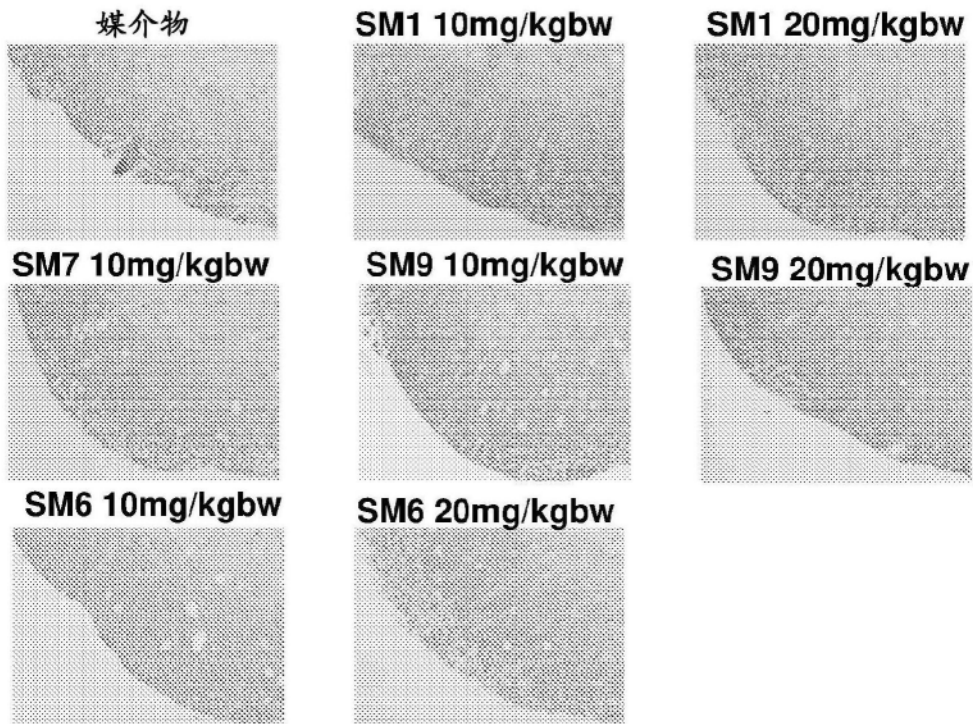


图6A

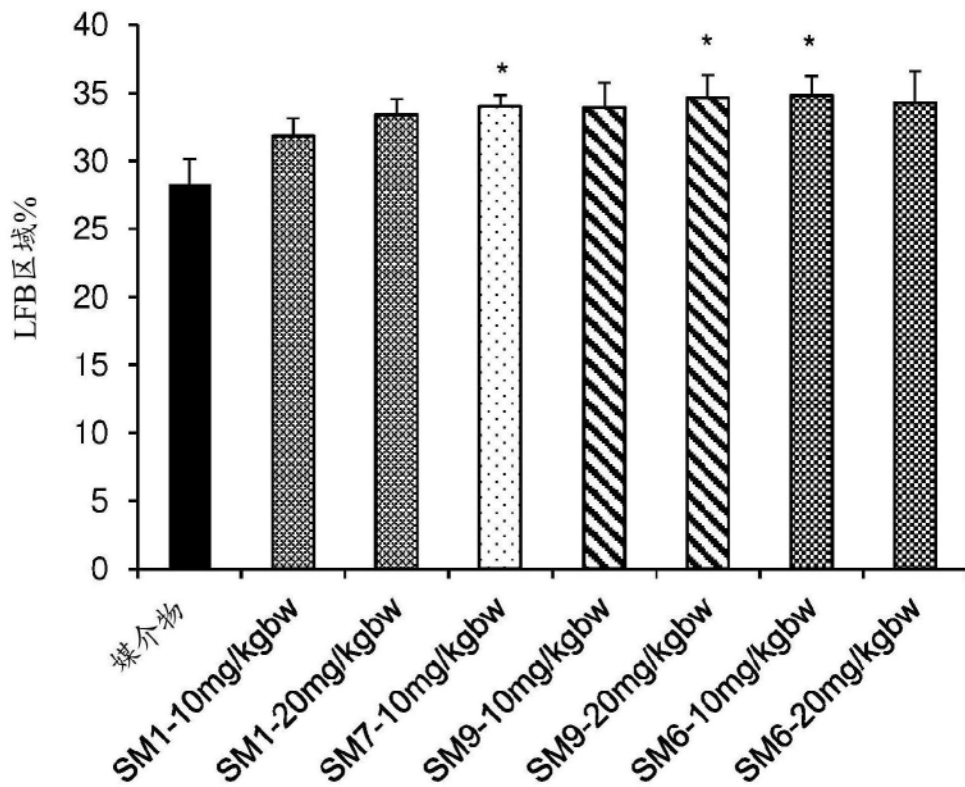


图6B

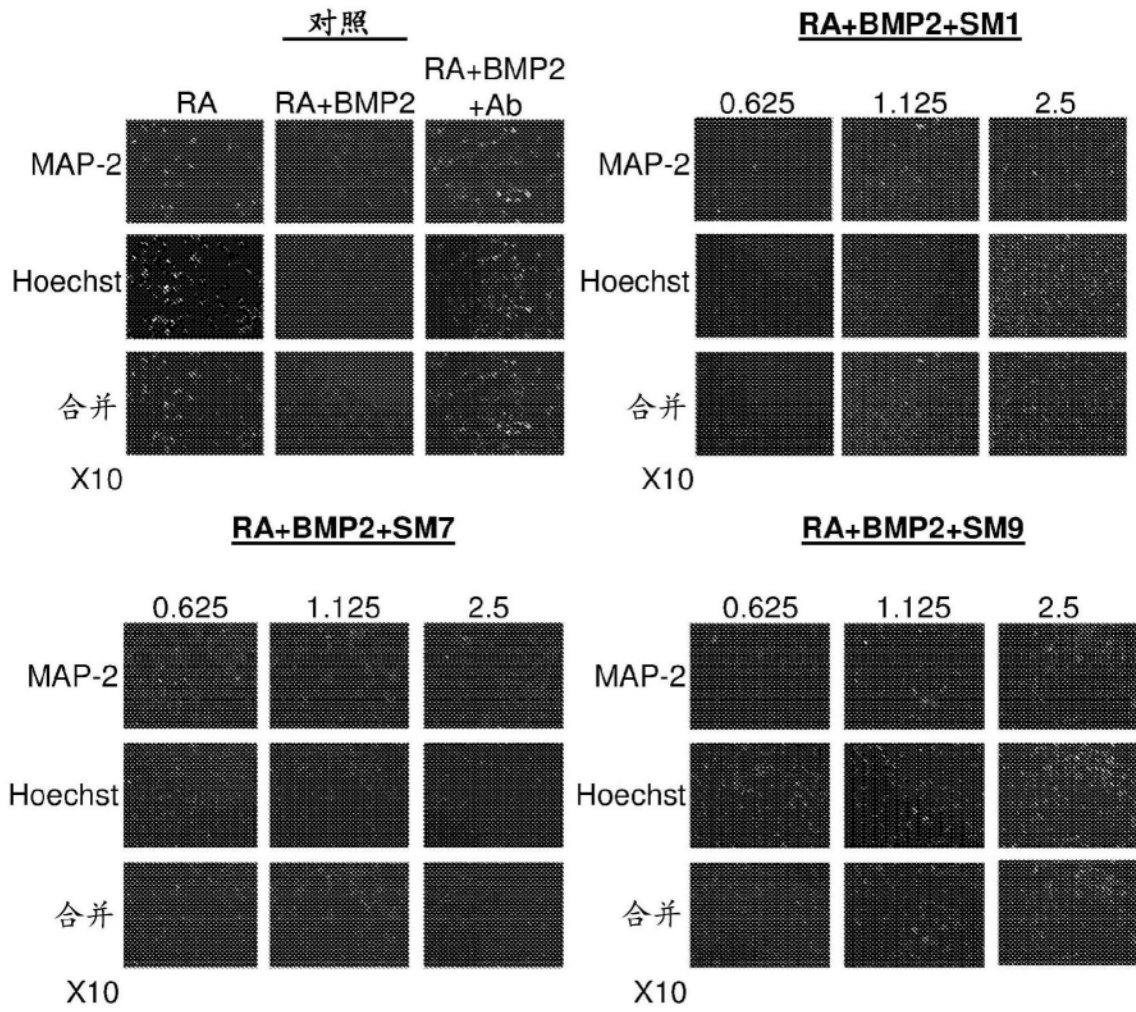


图7A

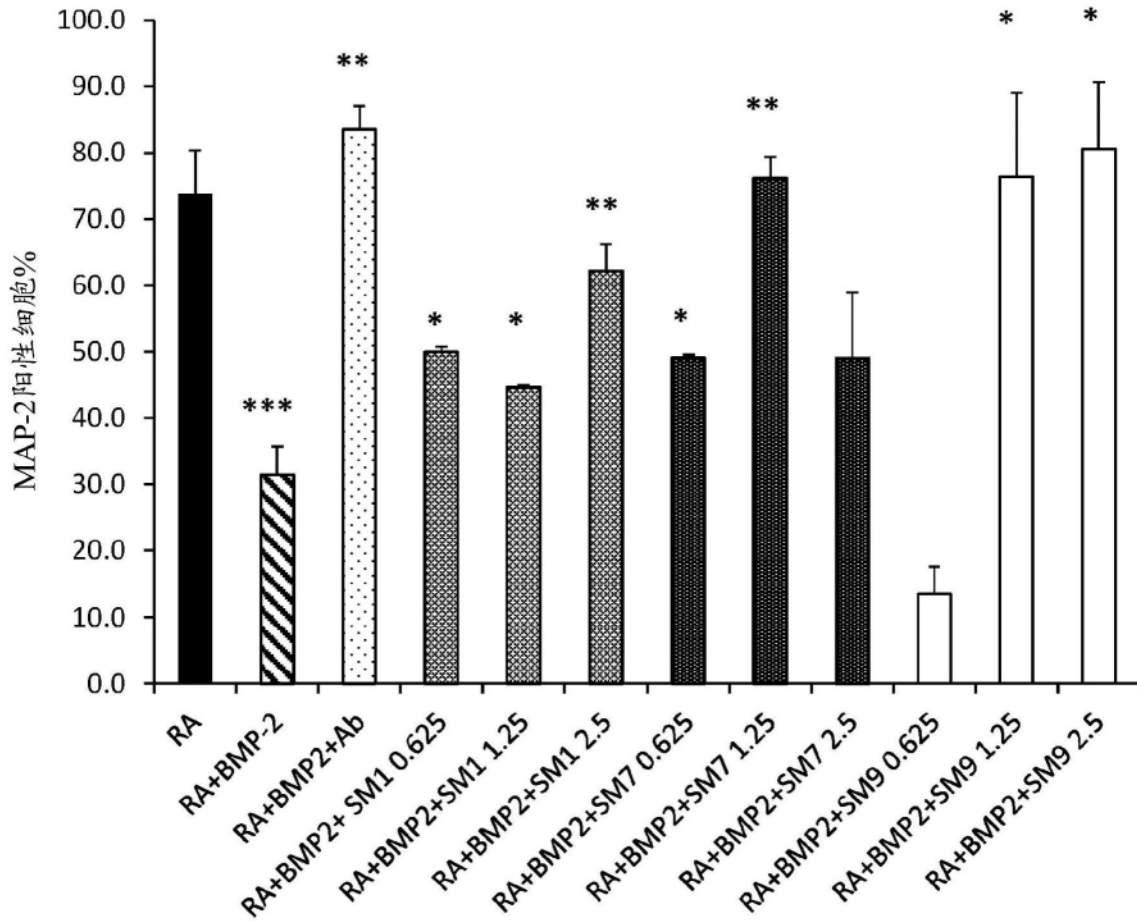


图7B

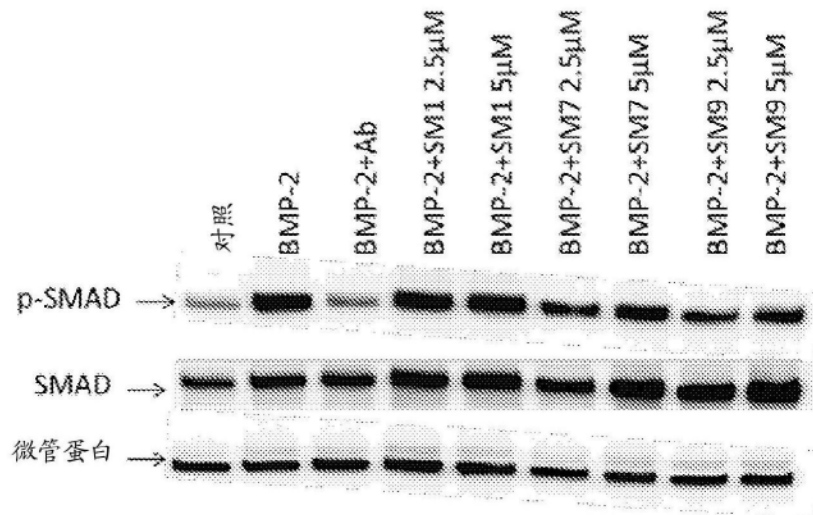


图8A

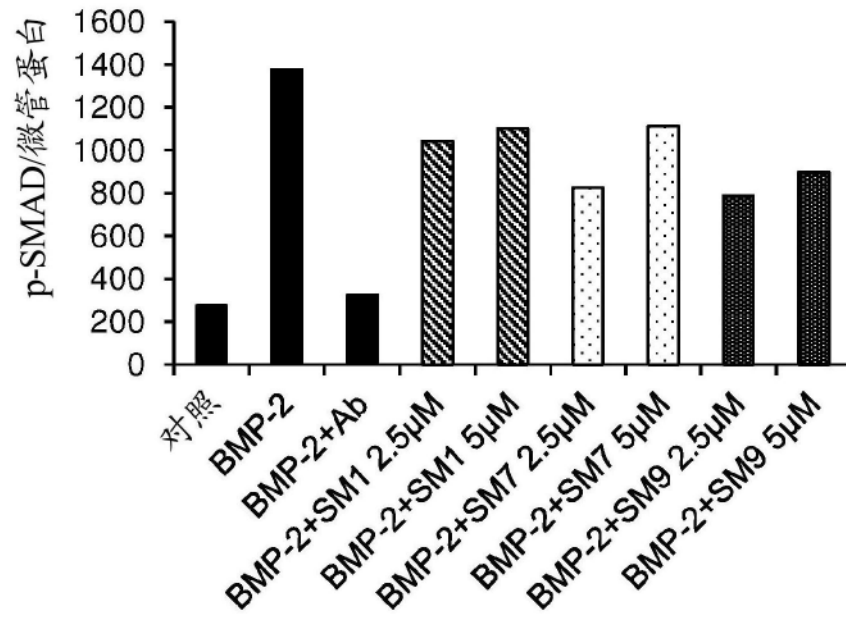


图8B

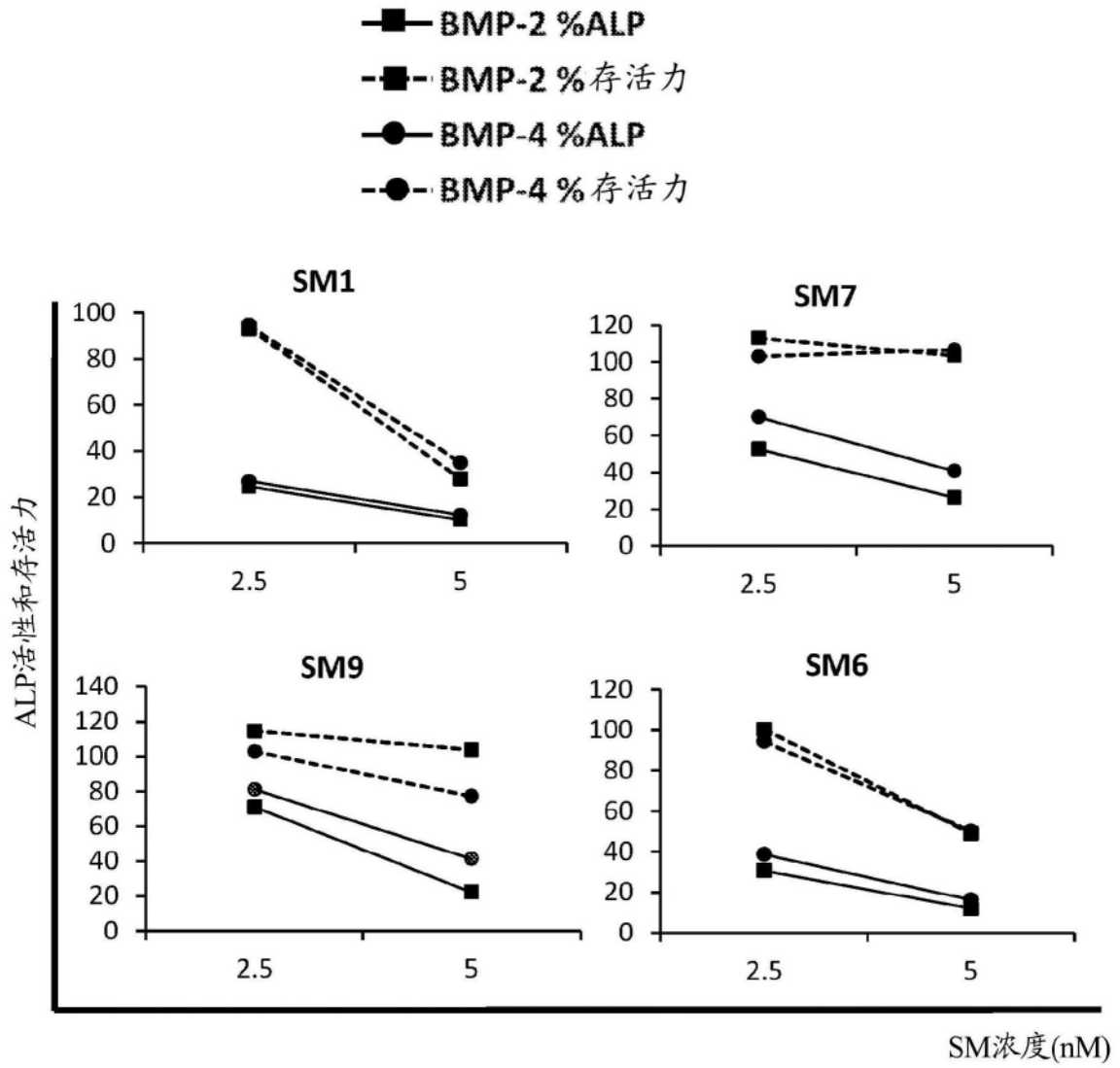


图9



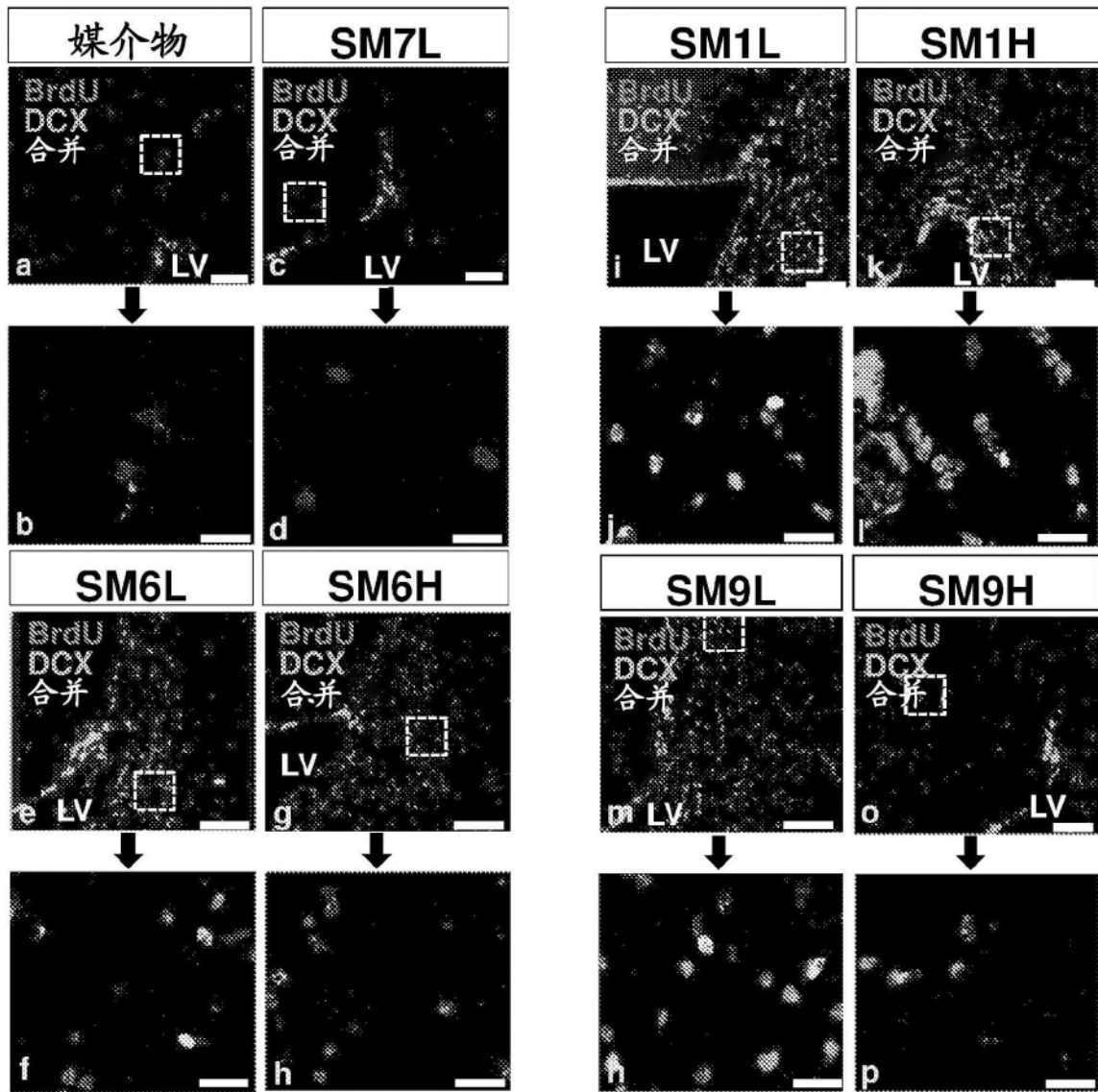


图10A

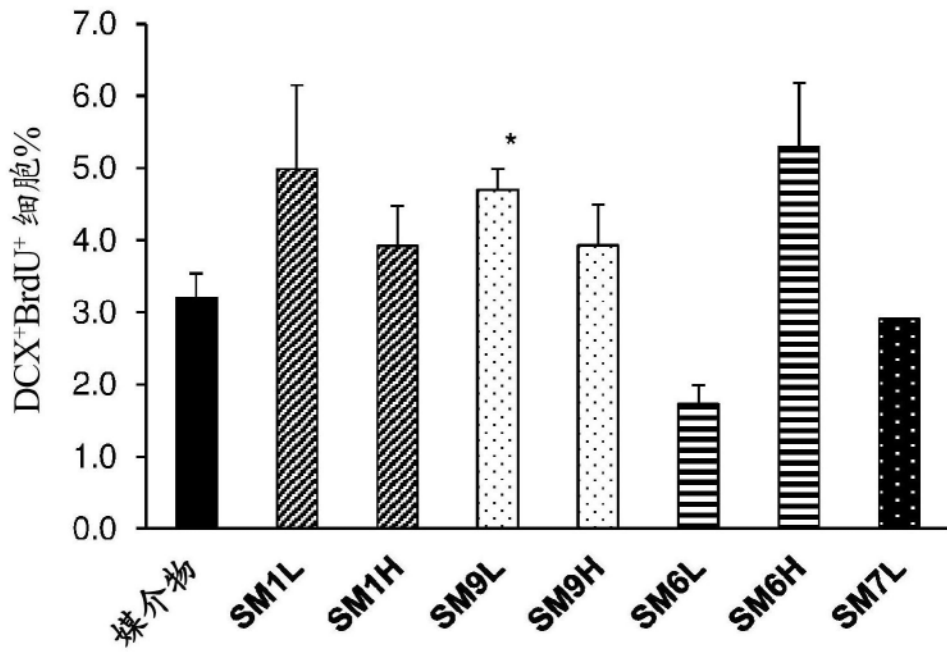


图10B

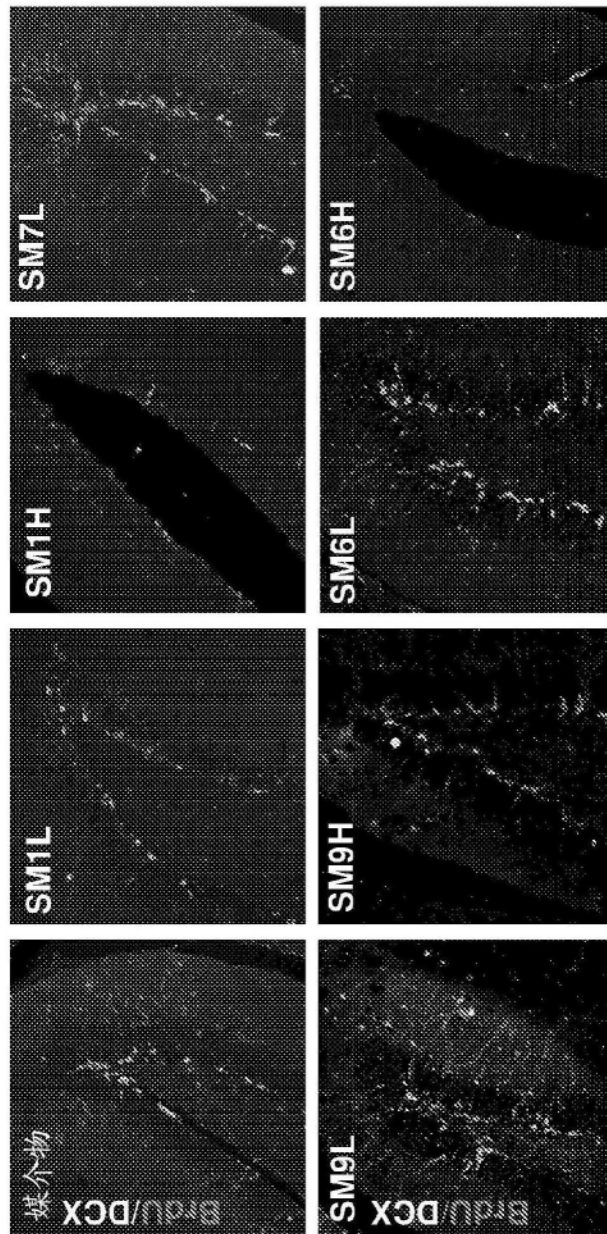


图11A

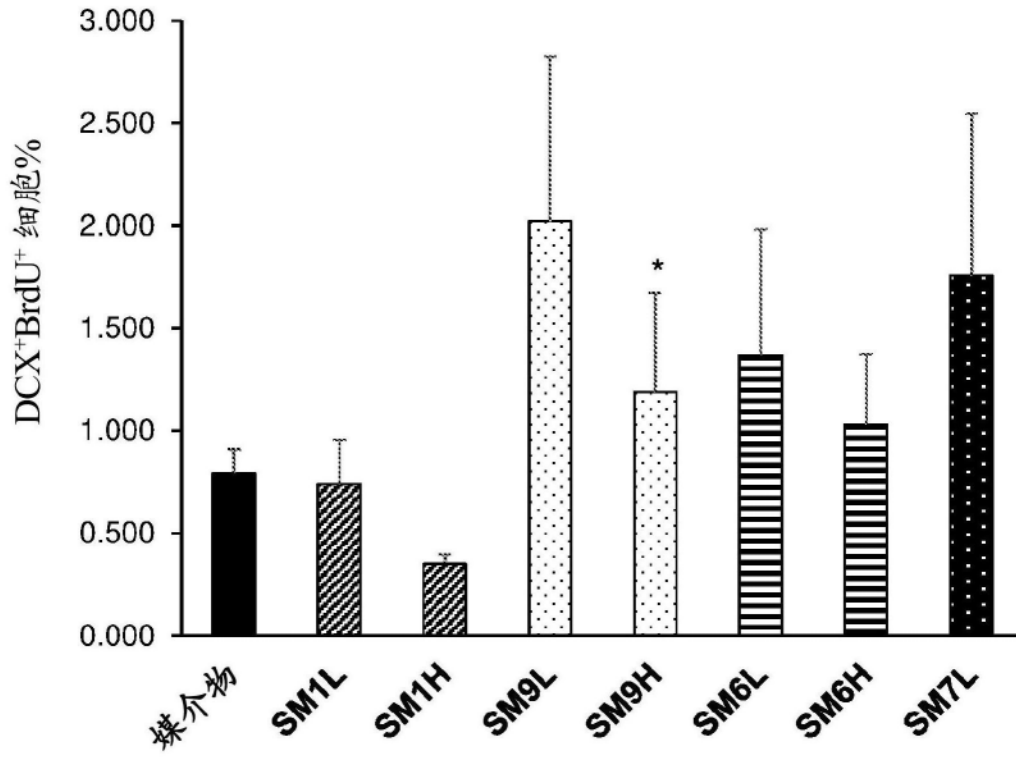


图11B

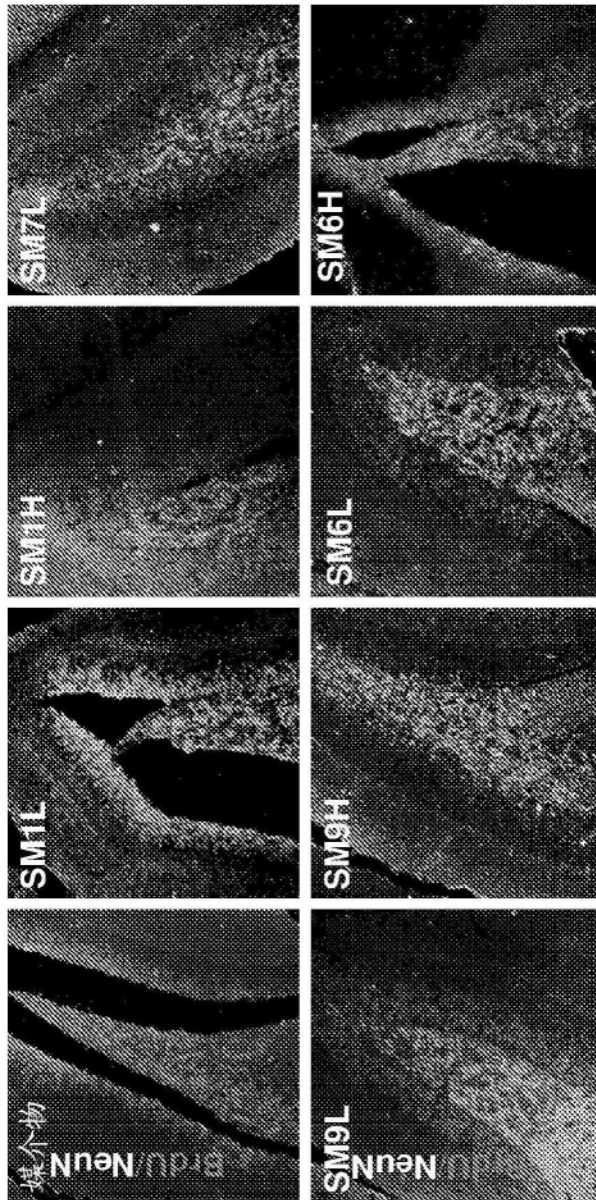


图12A

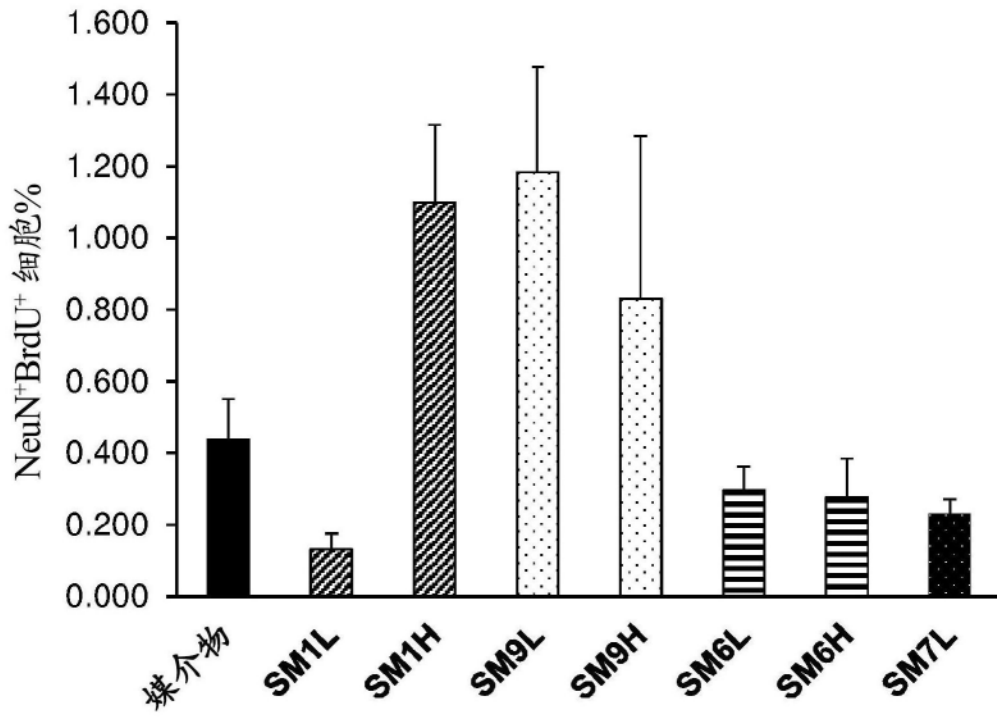


图12B