

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03821985.9

[51] Int. Cl.

C07D 471/04 (2006.01)

C07D 403/12 (2006.01)

A61K 31/4427 (2006.01)

A61K 31/4155 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007年6月6日

[11] 授权公告号 CN 1319968C

[51] Int. Cl. (续)

A61P 29/00 (2006.01)

[22] 申请日 2003.7.31 [21] 申请号 03821985.9

[30] 优先权

[32] 2002.8.2 [33] US [31] 60/400,967

[86] 国际申请 PCT/US2003/023950 2003.7.31

[87] 国际公布 WO2004/013140 英 2004.2.12

[85] 进入国家阶段日期 2005.3.16

[73] 专利权人 沃泰克斯药物股份有限公司

地址 美国马萨诸塞

[72] 发明人 C·J·福斯特 L·C·帕克

M·W·沃纳梅克 Y-M·姚

[56] 参考文献

W00250065 2002.6.27

审查员 陈真

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利

商标事务所

代理人 李华英

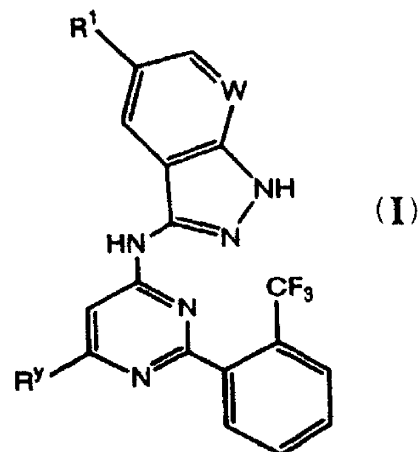
权利要求书 5 页 说明书 50 页 附图 2 页

[54] 发明名称

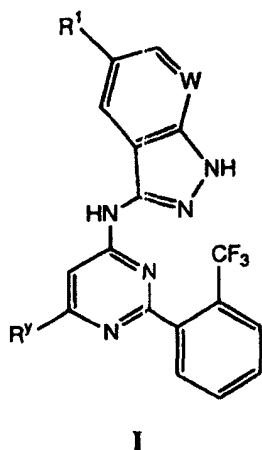
用作 GSK-3 的抑制剂的吡唑组合物

[57] 摘要

本发明提供一种式(I)的化合物或其药学可接受的衍生物。这些化合物是蛋白质激酶的抑制剂，特别是 GSK3 哺乳动物蛋白激酶的抑制剂。本发明还提供了包含本发明的化合物的药学可接受的组合物，和利用这些化合物和组合物治疗多种蛋白激酶介导的病症的方法。



1. 式 I 的化合物：



或其药学可接受的盐，其中：

W 是氮；

R¹ 选自氢或氟；和

R^ʸ 是 C₁₋₄ 脂族基，任选被 N(R²)₂ 或具有 1-2 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 5-6 元饱和环所取代，其中：

每个 R² 独立地选自氢或任选被 OH、N(R³)₂、或具有 1-2 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 5-6 元饱和环所取代的 C₁₋₃ 脂族基；并且其中：

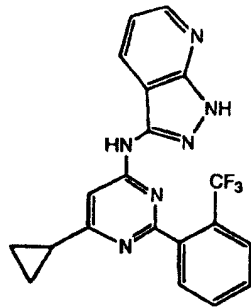
每个 R³ 独立地选自氢或 C₁₋₃ 脂族基。

2. 按照权利要求 1 的化合物，其中 R^ʸ 是 C₁₋₄ 脂族基。

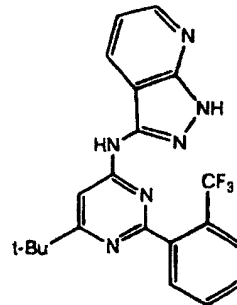
3. 按照权利要求 2 的化合物，其中 R^ʸ 选自甲基，乙基，环丙基，叔丁基或异丙基。

4. 按照权利要求 3 的化合物，其中 R^ʸ 选自甲基，环丙基或叔丁基。

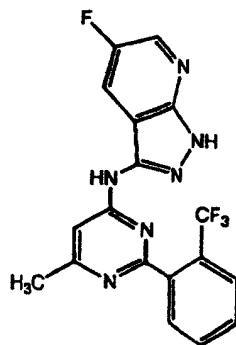
5. 按照权利要求 1 的化合物, 其中 R^1 是氢。
6. 按照权利要求 1 的化合物, 其中 R^1 是氟。
7. 按照权利要求 1 的化合物, 其中 R^y 是被具有 1-2 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 6 元饱和环取代的 C_{1-4} 脂族基。
8. 按照权利要求 7 的化合物, 其中 R^y 是被吗啉环、哌啶环或哌嗪环取代的 C_{1-4} 脂族基。
9. 按照权利要求 1 的化合物, 其中 R^y 是被 $N(R^2)_2$ 取代的 C_{1-4} 脂族基。
10. 按照权利要求 1 的化合物, 选自下列的化合物:



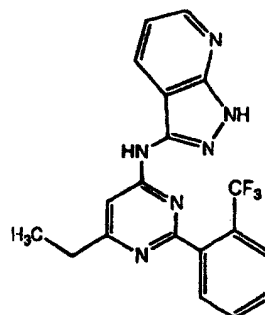
I-1



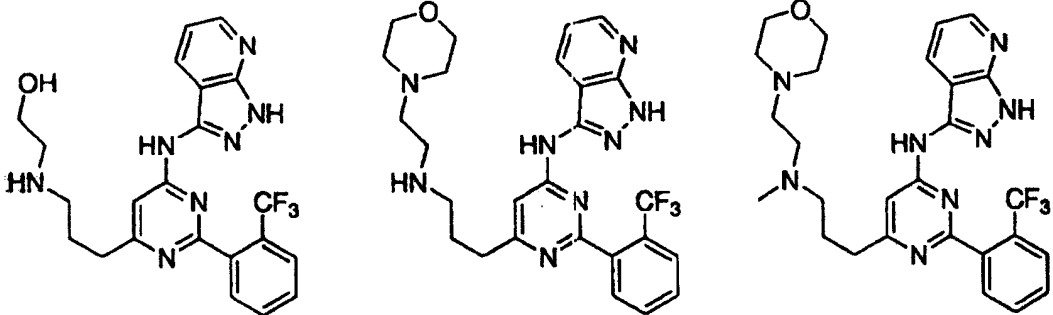
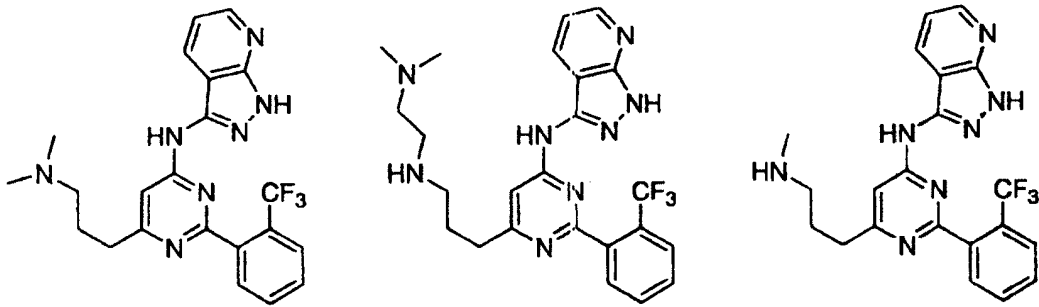
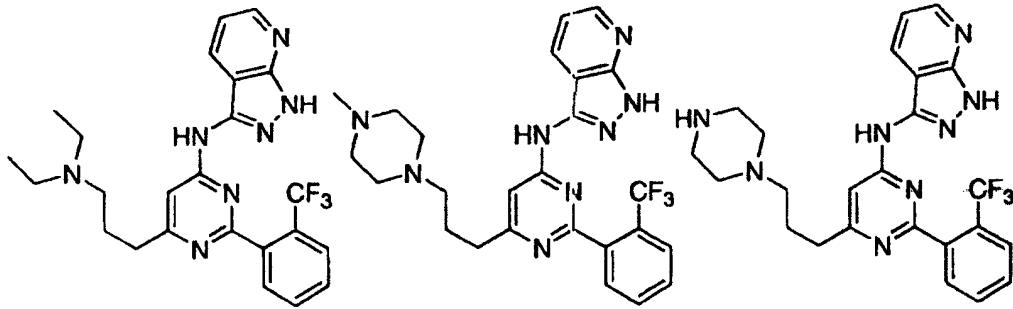
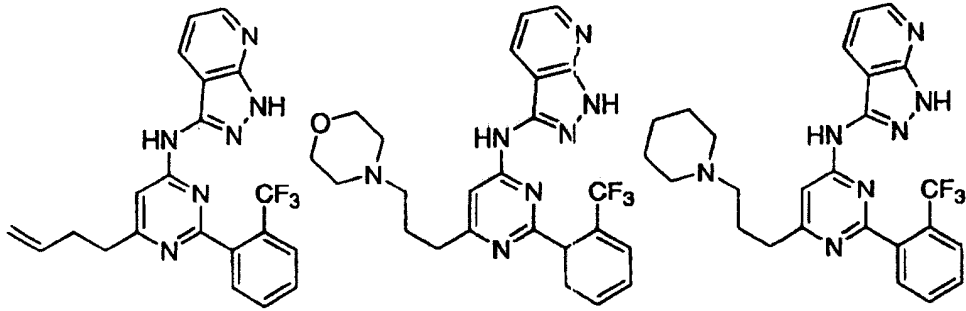
I-3



I-5



I-6



11. 按照权利要求 10 的化合物, 选自化合物 I-1、I-3、I-5、I-6 和 I-7。

12. 一种药学可接受的组合物, 包括按照权利要求 1 的化合物和药学可接受的载体、辅料或赋形剂。

13. 按照权利要求 12 的组合物, 另外包括选自下列的其它治疗剂: 用于治疗阿尔茨海默氏病的试剂、用于治疗帕金森氏症的试剂, 用于治疗多发性硬化的试剂、用于治疗哮喘的试剂, 抗炎剂, 免疫调控剂或免疫抑制剂, 神经营养因子, 用于治疗中风的试剂, 用于治疗心血管疾病的试剂, 抗抑郁药, 抗精神病药, 或用于治疗糖尿病的试剂。

14. 一种抑制离体的生物样品中的 GSK3 激酶活性的方法, 包括将所述生物样品与下述物质接触的步骤:

- a) 按照权利要求 12 的组合物; 或
- b) 按照权利要求 1 的化合物。

15. 按照权利要求 1 的化合物在制备用于抑制患者的 GSK3 激酶活性的药物中的用途。

16. 按照权利要求 1 的化合物在制备用于治疗下列疾病的药物中的用途, 所述疾病选自: 自身免疫性疾病、炎性疾病、代谢紊乱、精神错乱、糖尿病、血管生成疾病、tauopathy、神经学或神经变性疾病、脊髓损伤、青光眼、秃顶、或心血管疾病。

17. 按照权利要求 16 的用途, 其中所述疾病选自变态反应, 哮喘, 糖尿病, 阿尔茨海默氏病, 杭廷顿氏舞蹈病, 帕金森氏症, AIDS-有关的痴呆, 肌萎缩性侧索硬化, 多发性硬化, 由于头外伤引起的损伤,

精神分裂症，焦虑，双极障碍，tauopathy，脊髓或周围神经损伤，心肌梗塞，心肌肥大，青光眼，注意力缺陷障碍，抑郁症，睡眠障碍，再灌注/局部缺血，中风，血管生成疾病，或秃顶。

18. 按照权利要求 17 的用途，其中所述疾病是中风。

19. 按照权利要求 17 的用途，其中所述疾病是阿尔茨海默氏病。

20. 按照权利要求 16 的用途，其中所述疾病是神经学或神经变性疾病。

21. 按照权利要求 1 的化合物在制备用于减少男性患者精子运动的药物中的用途。

22. 按照权利要求 16 的用途，所述药物中包括选自下列的其它治疗剂：用于治疗阿尔茨海默氏病的试剂、用于治疗帕金森氏症的试剂，用于治疗多发性硬化的试剂、用于治疗哮喘的试剂，抗炎剂，免疫调控剂或免疫抑制剂，神经营养因子，用于治疗中风的试剂，用于治疗心血管疾病的试剂，抗抑郁药，抗精神病药，或用于治疗糖尿病的试剂，其中：

所述其它治疗剂对于所要治疗的疾病是适合的；且所述其它治疗剂是与所述权利要求 1 的化合物以单一剂量形式一起给予的、或作为多重剂量形式的一部分与所述权利要求 1 的化合物分开给予的。

用作 GSK-3 的抑制剂的吡唑组合物

有关申请的交叉引用

本申请要求以 2002 年 8 月 2 日提交的美国临时专利申请 60/400,967 为优先权，本文引入其内容作为参考。

技术领域

本发明涉及蛋白质激酶抑制剂，特别是糖原合酶激酶-3 (GSK-3) (一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶) 的抑制剂。本发明还提供了包括本发明的抑制剂的组合物，和利用该组合物治疗各种病症比如糖尿病、阿尔茨海默氏病、杭廷顿氏舞蹈病、帕金森氏症、多发性硬化 (MS)、中风、神经病症和神经变性病和精神病的方法。

背景技术

近年来，对酶和其它与目标疾病有关的生物分子的结构的深入理解已经极大地帮助了新治疗剂的研究。已经成为广泛研究主题的一类重要的酶是蛋白激酶。

蛋白激酶介导细胞内信号转导。它们通过影响磷酸基由三磷酸核苷转移至参与信号路径的蛋白受体来做到这一点。通过许多激酶和途径，细胞外的与其它的刺激导致在细胞内部发生各种细胞应答。这类刺激的例子包括环境与化学应激反应信号 (例如，渗透压震扰、热震扰、紫外辐射、细菌内毒素和 H_2O_2)，细胞因子 (例如白细胞介素-1 (IL-1) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α))，和生长因子 (例如粒细胞巨噬细胞-集落-刺激因子 (GM-CSF)，和成纤维细胞生长因子 (FGF))。细胞外的刺激可以影响一种或多种细胞应答，涉及细胞生长、迁移、分化、激素分泌、转录因子活化、肌肉收缩、葡萄糖代谢、蛋白质合成控制和细胞周期调节。

许多疾病与蛋白激酶介导的活动引发的异常细胞应答有关。这些疾病包括自身免疫疾病，炎症性疾病，骨疾病，新陈代谢病，神经学和神经变性疾病，癌症，心血管疾病，变态反应和哮喘，阿尔茨海默氏病和与激素相关的疾病。因此，药物化学界一直在努力发现蛋白激酶抑制剂，它们是有用的治疗剂。糖原合酶激酶-3 (GSK-3) 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，由 α 和 β 异构体构成，各自被不同的基因编码 [Coghlan 等, *Chemistry & Biology*, 7, 793-803 (2000); Kim 和 Kimmel, *Curr Opin Genetics Dev*, 10, 508-514 (2000)]。GSK-3 和各种疾病有牵连，包括糖尿病、阿尔茨海默氏病、CNS 病症（比如躁狂抑郁的病症和神经变性的疾病）和心肌肥大 [参见，例如，WO 99 / 65897; WO 00 / 38675; Kaytor 和 Orr, *Curr Opin Neurobiol*, 12, 275-8 (2000); Haq 等, *J. Cell Biol*, 151, 117-30 (2000); Eldar-Finkelman, *Trends Mol. Med*, 8, 126-32 (2002)]。这些疾病与 GSK-3 在其中起作用的某些细胞信号传导路径的异常运行有关。

已经发现 GSK-3 能磷酸化并调控许多调节蛋白的活性。这些蛋白质包括糖原合酶，即糖原合成所需要的限速酶，与微管有关的蛋白 Tau，基因转录因子 β -联蛋白，翻译起始因子 eIF-2B，以及 ATP 柠檬酸裂解酶，虫漆脂 (axin)，热休克因子-1，c-Jun, c-myc, c-myb, CREB 和 CEPB α 。这些不同的目标在细胞代谢、增殖、分化和发育的许多方面都牵连到 GSK-3。

在 II 型糖尿病治疗相关的 GSK-3 介导的路径中，胰岛素诱导的信号导致细胞葡萄糖摄取和糖原合成。在此路径中，GSK-3 是胰岛素诱导信号的负调节物。通常，胰岛素的存在导致 GSK-3 介导的磷酸化的抑制和糖原合酶的失活。GSK-3 的抑制导致糖原合成和葡萄糖摄取的增加 [Klein 等, *PNAS*, 93, 8455-9 (1996); Cross 等, *Biochem. J.*, 303, 21-26 (1994); Cohen, *Biochem. Soc. Trans.*, 21, 555-567 (1993); 和 Massillon 等, *Biochem. J.* 299, 123-128 (1994); Cohen 和 Frame, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2, 769-76 (2001)]。然而，在胰岛素应答被削弱的糖尿病患者中，尽管存在比较高的胰岛素血液水平，糖

原合成和葡萄糖摄取也没能提高。这就导致了异常高的葡萄糖血液水平，其急性和慢性后果可最终导致心血管疾病、肾衰竭和失明。GSK-3 在这类患者中，正常的胰岛素诱导的抑制没能发生。另据报道，GSK-3 在 II 型糖尿病患者中过度表达 [WO 00 / 38675]。因此 GSK-3 的治疗性抑制剂可用于治疗胰岛素应答被削弱的糖尿病患者。

细胞凋亡与缺血性脑损伤的病理生理学有关 (Li 等, 1997; Choi, 等, 1996; Charriaut-Marlangue 等, 1998; Grahm 和, Chen, 2001; Murphy 等, 1999; Nicotera 等, 1999)。近期出版物表明, GSK-3 β 的活化可能涉及细胞凋亡的机理 (kaytor 和 Orr, 2002; Culbert 等, 2001)。在因大脑中动脉闭塞 (MCAO) 导致的缺血性中风的大鼠模型的研究中显示, 局部缺血后 GSK-3 β 表达增加 (Wang 等, Brain Res, 859, 381-5, 2000; Sasaki 等, Neurol Res, 23, 588-92, 2001)。成纤维细胞生长因子 (FGF) 可减轻大鼠永久性的大脑中动脉闭塞 (MCO) 后的缺血性脑损伤 (Fisher 等 1995; Song 等 2002)。实际上, 大鼠局部缺血模型中所显示的 FGF 神经保护效应可由 PI-3 激酶/ AKT 依赖的 GSK-3 β 灭活作用介导 (Hashimoto 等, 2002)。因此, 脑缺血反应活动后 GSK-3 β 的抑制可以改善缺血性脑损伤。

GSK-3 还和心肌梗塞有关。见 Jonassen 等, Circ Res, 89: 1191, 2001 (在再灌注中通过给予胰岛素减少心肌梗塞是由 Akt 依赖性信号路径介导的); Matsui 等, Circulation, 104: 330, 2001 (Akt 活化作用可在暂时心脏局部缺血后体内地保持心脏功能并预防心肌细胞损伤; Miao 等, J Mol Cell Cardiol, 32: 2397, 2000 (冠状动脉内的腺病毒-介导的 Akt 基因送递可体内地减小局部缺血-再灌注损伤后的总梗塞面积); 和 Fujio 等, Circulation 等, 101: 660, 2000 (Akt 信号可体外地抑制心肌细胞程序性死亡并防止小鼠心脏局部缺血-再灌注损伤)。

GSK-3 活性在头外伤中起一定的作用。见 Noshita 等, Neurobiol Dis, 9: 294, 2002 (Akt / PI3-激酶路径的上调可能对外伤性脑损伤后的细胞存活是至关紧要的) 和 Dietrich 等, J Neurotrauma, 13:

309, 1996 (外伤后给予 bFGF 可显著地减少外伤性脑损伤大鼠模型中损伤的皮层神经元和总的挫伤体积)。

还已知 GSK-3 在精神病学障碍中起一定作用。见 Eldar-Finkelman, Trends Mol Med, 8: 126, 2002; Li 等, Bipolar Disord, 4: 137, 2002 (LiCl 和丙戊酸, 抗精神病的、情绪稳定化药物, 可减少 GSK3 活性并增加 β -联蛋白) 和 Lijam 等, Cell, 90: 895, 1997 (散乱的 KO 小鼠显示出异常的社会行为和有缺陷的感觉运动控制。散乱的, WNT 路径中涉及的细胞质蛋白, 可抑制 GSK3 β 活性)。

已经表明, 锂和丙戊酸对 GSK3 的抑制作用会引起轴突改变并改变突触的接合。见 Kaytor & Orr, Curr Opin Neurobiol, 12: 275, 2002 (GSK3 的下调导致与微管有关的蛋白: tau, MAP1 & 2 的改变) 和 Hall 等, Mol Cell Neurosci, 20: 257, 2002 (锂和丙戊酸诱发沿着轴突的生长锥状结构的形成)。

GSK-3 活性还与阿尔茨海默氏病有关。该疾病的特征为存在众所周知的 β -淀粉样肽并形成细胞内神经纤维缠结。神经纤维缠结含有过磷酸化的 Tau 蛋白, 其中 Tau 在异常位点上被磷酸化。细胞和动物模型中已经显示 GSK-3 磷酸化这些异常位点。此外, 已表明 GSK-3 的抑制作用可预防 Tau 在细胞中的过磷酸化 [Lovestone 等, Curr. Biol, 4, 1077-86 (1994); 和 Brownlees 等, Neuroreport 8, 3251-55 (1997); Kaytor 和 Orr, Curr Opin Neurobiol, 12, 275-8 (2000)]。

在过表达 GSK3 的转基因小鼠中, 观察到 Tau 过磷酸化的显著增加和神经元的异常形态 [Lucas 等, EMBO J, 20: 27-39 (2001)]。活性 GSK3 在失缠结的神经元的细胞质中堆集, 可以导致患有 AD 的患者脑中神经纤维缠结 [Pei 等, J Neuropathol Exp Neurol, 58, 1010-19 (1999)]。因此, GSK-3 的抑制可减缓或阻止神经纤维缠结的产生, 并由此治疗阿尔茨海默氏病或降低阿尔茨海默氏病的严重程度。

现已有体外证据表明 GSK-3 在阿尔茨海默氏病中的作用。见 Aplin 等, (1996), J Neurochem 67: 699; Sun 等 (2002), Neurosci Lett

321: 61 (GSK3b 可磷酸化淀粉样前体蛋白 (APP) 的细胞质域且 GSK3b 的抑制可减少 APP-转染的细胞中 Ab40 & Ab42 的分泌); Takashima 等 (1998), PNAS 95: 9637; Kirschenbaum 等 (2001), J Biol Chem 276: 7366 (GSK3b 与早老素基因 (presenilin-1) 络合并将其磷酸化, 而早老素基因 (presenilin-1) 与从 APP 合成 A β 中的 γ -分泌酶活性有关); Takashima 等 (1998), Neurosci Res 31: 317 (由 Ab(25-35) 进行的 GSK3b 活化可提高海马神经元中 tau 的磷酸化作用。这种观点提供了 A β 和神经纤维缠结之间的联系, 神经纤维缠结由过磷酸化的 tau 组成, 其为 AD 的另一种病理标志); Takashima 等 (1993), PNAS 90: 7789 (GSK3b 表达或活性的阻抑可防止 Ab-诱发的皮层和海马原始培养物的神经退化); Suhara 等 (2003), Neurobiol Aging 24: 437 (细胞内 Ab42 由于妨碍 Akt / GSK-3b 信号-依赖性机理的活化作用而对内皮细胞是有害的); De Ferrari 等 (2003) Mol Psychiatry 8: 195 (锂可保护 N₂A 细胞 & 原始海马神经元免于 AD 原纤维-诱导的细胞毒性并减少核移位 / β -联蛋白的去稳定作用); 和 Pignino 等, J Neurosci, 23: 4499, 2003 (阿尔茨海默氏病的 presenilin 1 中的突变可以去调节 (deregulate) 和增加 GSK-3 活性, 其反过来削弱神经元的轴突运输。受影响的神经元中的轴突运输的随即减少可最终导致神经变性)。

现已有体内证据表明 GSK-3 在阿尔茨海默氏病中起作用。见 Yamaguchi 等 (1996), Acta Neuropathol 92: 232; Pei et al (1999), J Neuropath Exp Neurol 58: 1010 (AD 脑的易感部位中 GSK3b 免疫反应性被提高); Hernandez 等 (2002), J Neurochem 83: 1529 (具有条件性 GSK3b 过量表达的转基因小鼠显示出类似于 AD 转基因 APP 小鼠模型中的认知缺陷); DePerrari 等 (2003) Mol Psychiatry 8: 195 (长期锂治疗可救护由海马内注射 AP 原纤维所引起的神经变性和行为损伤 (Morris 水迷宫)); McLaurin 等, Nature Med, 8: 1263, 2002 (AD 的转基因模型中用 A β 免疫可减少类 AD 神经病理学和空间记忆损伤); 和 Phiel 等 (2003) Nature 423: 435 (GSK3 可在 AD tg 小鼠中通过 γ 分泌酶的直接抑制调节淀粉样- β 肽的生产)。

Presenilin-1 和驱动蛋白-1 还是 GSK-3 的底物,且与 GSK-3 在阿尔茨海默氏病中起作用的另一种机理有关,如最近 Pigino, G 等所述, *Journal of Neuroscience* (23: 4499, 2003)。现已发现 GSK3 β 磷酸化驱动蛋白-I 轻链,其可导致驱动蛋白-1 由结合膜的细胞器分离,从而导致迅速顺行轴突运输的减少 (Morfini 等, 2002)。作者提出 PS1 中的突变可以去调节 (deregulate) 和增加 GSK-3 活性,其反过来削弱神经元的轴突运输。感染的神经元中的轴突运输的随即减少可最终导致神经变性。

GSK-3 还与肌萎缩性侧索硬化 (ALS) 有关。见 Williamson 和 Cleveland, 1999 (在 mSOD1 小鼠中 ALS 的极早期中轴突运输被延缓); Morfini 等, 2002 (GSK3 可磷酸化驱动蛋白轻链并抑制顺行的轴突运输); Warita 等, *Apoptosis*, 6: 345, 2001 (大多数脊运动神经元在前述 ALS SOD1 tg 动物模型中神经元显著损失的早期和症状发生前期可失去对 PI3-K 和 Akt 二者的免疫反应性); 和 Sanchez 等, 2001 (PI-3K 的抑制作用引起 GSK3 活化作用介导的轴突退缩)。

GSK-3 活性还与脊髓和周围神经损伤有关。已经表明通过锂和丙戊酸的 GSK3 抑制作用可以引起轴突改变并改变突触的接合。见 Kaytor & Orr, *Curr Opin Neurobiol*, 12: 275, 2002 (GSK3 的下调导致微管与有关的蛋白: tau, MAP1 & 2 的改变) 和 Hall 等, *Mol Cell Neurosci*, 20: 257, 2002 (锂和丙戊酸可诱导沿着轴突的生长锥状结构的形成)。也参见 Grothe 等, *Brain Res*, 885: 172, 2000 (FGF2 刺激施旺细胞增殖并抑制轴突生长期间的髓鞘形成); Grothe 和 Nikkha, 2001 (在神经压碎后 5 小时内近端和末梢神经残端中的 FGF-2 被上调); 和 Sanchez 等, 2001 (PI-3K 的抑制作用引起 GSK3 活化作用介导的轴突退缩)。

GSK-3 的另一种底物是 β -联蛋白,其在 GSK-3 磷酸化作用后被降解。已经报到在精神分裂症患者中 β -联蛋白水平降低,且也与其它与神经元的细胞死亡增加有关的疾病相关。[Zhong 等, *Nature*, 395, 698-702 (1998); Takashima 等, *PNAS*, 90, 7789-93 (1993); Pei 等,

J. Neuropathol Exp, 56, 70-78 (1997); 和 Smith 等, Bio-org. Med. Chem 11, 635-639 (2001)]. 此外, β -联蛋白和 Tcf-4 通过抑制血管平滑肌细胞程序性死亡并促进增殖, 而在血管改变中起双重作用 (Wang 等, Circ Res, 90: 340, 2002)。因此, GSK-3 与血管生成疾病有关。也参见 Liu 等, FASEBJ, 16: 950, 2002 (GSK3 的活化可减少肝细胞生长因子, 从而导致内皮细胞屏障功能的改变和血管完整性的减小) 和 Kim 等, J Biol Chem, 277: 41888, 2002 (用 Matrigel 栓测定 GSK3 β 活化作用可体内地抑制血管形成: GSK3 β 信号的抑制增进毛细管形成)。

已表明 GSK-3 和杭廷顿氏舞蹈病之间的关联。见 Carmichael 等, J Biol Chem, 277: 33791, 2002 (GSK3 β 抑制作用可通过在 β -联蛋白和其有关的转录路径中的提高而保护细胞免于聚谷酰胺诱导的神经元和非神经元细胞死亡)。GSK3 的过量表达可减少热休克转录因子-1 和热休克蛋白 HSP70 的活化 (Bijur 等, J Biol Chem, 275: 7583, 2000), 其表明体外 HD 模型中聚 (Q) 聚集体和细胞死亡的减少 (Wytttenbach 等, Hum Mol Genet, 11: 1137, 2002)。

GSK-3 影响 FGF-2 水平, 且它们的受体在脑聚集体培养物使大鼠脑再形成髓鞘期间也增加。见 Copelman 等, 2000, Messersmith, 等, 2000; 以及 Hinks 和 Franklin, 2000。还发现 FGF-2 在髓鞘再形成中通过涉及 FGF 的少突神经胶质细胞诱导突起长出 (Oh 和 Yong, 1996; Gogate 等, 1994)。现已表明 FGF-2 基因疗法可增进实验性变应性脑脊髓炎 (EAE) 小鼠的康复 (Ruffini, 等, 2001)。

GSK-3 还与头发生长有关, 因为已表明 Wnt / β -联蛋白信号在毛囊形态形成和分化中起举足轻重的作用 (Kishimoto 等, Genes Dev, 14: 1181, 2000; Millar, J Invest Dermatol, 118: 216, 2002)。现已发现, 患有皮肤中 Wnt 信号抑制剂的构成性过量表达的小鼠不能形成毛囊。毛囊的初始形成需要 Wnt 信号, 且 GSK3 可通过抑制 β -联蛋白构成性地调节 Wnt 路径。 (Andl 等, Dev Cell 2: 643, 2002)。瞬时的 Wnt 信号通过活化上皮毛囊前体中的 β -联蛋白和 TCF-调节的基

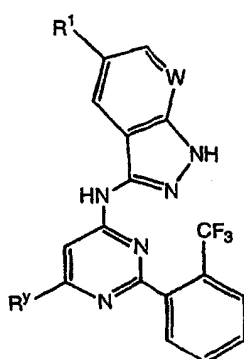
因转录, 可为新头发生长周期的开端提供关键的初始刺激 (Van Mater 等, *Genes Dev*, 17: 1219, 2003)。

因为 GSK-3 活性与精子活力有关, GSK-3 抑制作用可有效地用于男性避孕。现已表明牛和猴子的精子中 GSK3 活性的降低与附睾中精子的活力演变有关 (Vijayaraghavan 等, *Biol Reprod*, 54: 709, 1996 ; Smith 等, *J Androl*, 20: 47, 1999)。此外, 在公牛中 GSK3 的酪氨酸和丝氨酸/苏氨酸磷酸化作用在游动的精子中比在不能游动的精子中高 (Vijayaraghavan 等, *Biol Reprod*, 62: 1647, 2000)。这种效果也被人类的精子所证实 (Luconi 等, *Human Reprod*, 16: 1931, 2001)。

由于目前对于与 GSK-3 蛋白激酶有关的大多数病症仍没有可用的治疗选择, 仍非常需要可抑制这种蛋白目标的新的药物。

发明内容

本发明通过提供式 I 的化合物或其药学可接受的盐来满足这种需要:



I

其中 W, R¹ 和 R^y 如下所述。

本发明的化合物能够抑制 GSK-3 活性。根据本发明, 这些化合物也可用于组合物中, 和用于抑制 GSK-3 活性的方法中以及用于治疗或减轻患者中与 GSK-3 有关的疾病或病症的严重程度的方法中。

本发明的方法适用的疾病或病症包括, 例如, 神经学以及神经变性障碍, 糖尿病, 精神病学障碍, 多发性硬化 (MS), 心肌梗塞, 再灌

注/局部缺血，秃顶，以及中风。

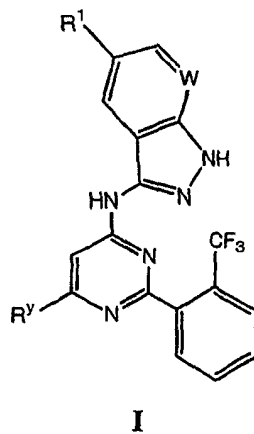
附图说明

图 1 描述了在大脑中动脉闭塞模型 (MCAO) 后 6 小时给药，用式 I 的化合物与赋形剂对照组相比较的治疗效果（以总梗塞体积、皮层梗塞体积，纹状体缺血性损伤，以及水肿形成的减少表示）。

图 2 描述了与赋形剂对照组相比较用式 I 的化合物处理大鼠，在实验进程中大鼠的神经学功能。

发明的详细说明：

本发明提供了式 I 的化合物：



或其药学可接受的盐，其中：

W 是氮或 CH；

R¹ 选自氢或氟；和

R^y 是 C₁₋₄ 脂族基，任选被 N(R²)₂ 或具有 1-2 个独立地选自氮、氧或硫杂原子的 5-6 元饱和环所取代，其中：

每个 R² 独立地选自氢或任选被 OH、N(R³)₂、或具有 1-2 个独立地选自氮、氧或硫杂原子的 5-6 元饱和环所取代的 C₁₋₃ 脂族基；并且其中：

每个 R³ 独立地选自氢或 C₁₋₃ 脂族基；

条件是：

当 R^1 是氢并且 W 是 CH 时， R^y 不是甲基。

本文中使用的术语“脂族的”或“脂族基”，是指完全饱和的或含有一个或多个不饱和单元的直链或支链 C_1-C_4 烃链，或完全饱和的或含有一个或多个不饱和单元的单环 C_3-C_4 烃，但其不是芳族的（本文中称作“碳环”或“环烷基”），其与分子的其余部分具有单个的联结点。例如，合适的脂族基包括，但不局限于，直链或支链的烷基，链烯基，炔基和其杂化物，例如（环烷基）烷基，（环烯基）烷基或（环烷基）链烯基。

术语“烷基”、“链烯基”和“炔基”单独或作为较大部分的一部分使用时，均包括含有一到四个碳原子的直链和支链，并且就链烯基而论，包括至少两个碳原子和一个双键，就炔基而论，至少包括两个碳原子和一个三键。

本发明所使用的化合物限于那些化学上是可行和稳定的化合物。因此，对于如上所述化合物的取代基或变量的组合，只有这样的组合产生稳定的或化学上可行的化合物时才是允许的。稳定的化合物或化学上可行的化合物是一种当温度在 $40^\circ C$ 或更低、在没有湿度或其它化学反应条件的情况下保持至少一周而基本上没有改变的化合物。

对本领域技术人员显而易见的是，本发明的某些化合物可以以互变异构形式存在，化合物的所有这类互变异构形式都在本发明的范围之内。

除非另有说明，本文中所描述的结构还包括该结构的所有立体化学形式；即每个不对称中心的 R 和 S 构型。为此，本发明化合物的单一立体化学异构体、以及对映体和非对映体的混合物都在本发明的范围之内。除非另有说明，本文中所描述的结构还包括仅存在一或多种同位素富集原子方面不同的化合物。例如，具有本结构的化合物，只不过用氘或氚替换氢、或用 ^{13}C -或 ^{14}C -富集的碳替换碳，都在本发明的范围之内。

本发明的化合物落入 PCT 公开 WO 02 / 22607 中所描述的化合物

的种类范围内。然而，申请人发现本化合物在保护神经元细胞防止缺血性损伤和中风治疗方面能够令人惊讶地和出乎意料地增加功效。

本发明的一方面涉及一种式 I 的化合物，其中 R^7 是未取代的 C_{1-4} 脂族基。优选式 I 化合物的脂族基是烷基。这样的烷基优选甲基，乙基，环丙基，叔丁基或异丙基。更优选式 I 的烷基是甲基、环丙基和叔丁基。

根据一个实施方案，本发明涉及一种式 I 的化合物，其中 R^7 是被具有 1-2 个独立地选自氮、氧或硫杂原子的 6 元饱和环取代的 C_{1-4} 脂族基。这样的 6 元饱和环包括吗啉基，哌啶基和哌嗪基。

根据另一个实施方案，本发明涉及一种式 I 的化合物，其中 R^7 是被 $N(R^2)_2$ 取代的 C_{1-4} 脂族基。

在某些实施方案中，本发明涉及式 I 的化合物，其中 R^2 是氢。

根据另一个实施方案，本发明涉及一种式 I 的化合物，其中 R^2 是未取代的 C_{1-3} 脂族基。

还有另一个实施方案涉及一种式 I 的化合物，其中 R^2 是被 OH 或 $N(R^3)_2$ 取代的 C_{1-3} 脂族基。

还有另一个实施方案涉及一种式 I 的化合物，其中 R^2 是被具有 1-2 个独立地选自氮、氧或硫杂原子的 6 元饱和环取代的 C_{1-3} 脂族基。这样的 6 元饱和环包括吗啉基，哌啶基和哌嗪基。

按照一个实施方案，本发明涉及式 I 的化合物，其中 W 是氮。

按照另一个实施方案，本发明涉及式 I 的化合物，其中 W 是 CH。

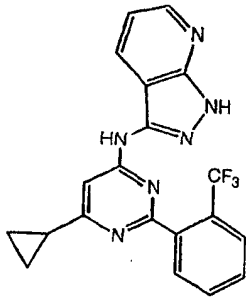
按照又一个实施方案，本发明涉及式 I 的化合物，其中 R^1 是氢。

按照另一个实施方案，本发明涉及式 I 的化合物，其中 R^1 是氟。

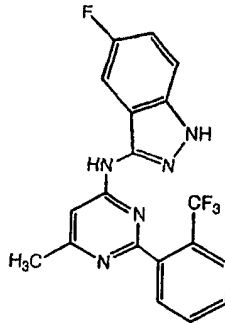
当然在此描述的实施方案的所有组合和亚组合都在本发明的范围之内。

下面的表 1 中列出了式 I 化合物的代表性例子。

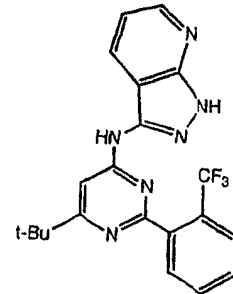
表 1. 式 I 化合物



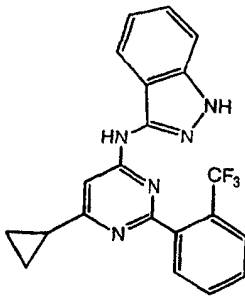
I-1



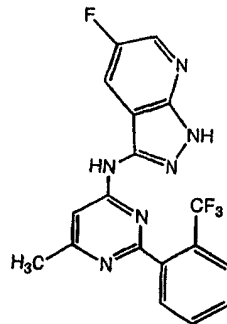
I-2



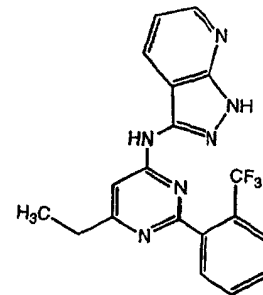
I-3



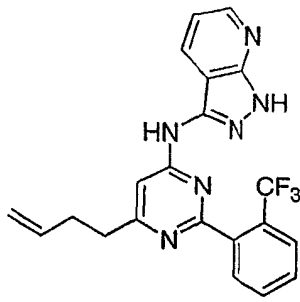
I-4



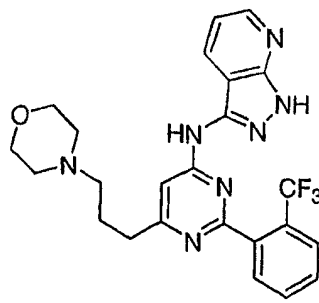
I-5



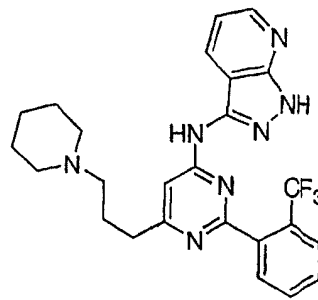
I-6



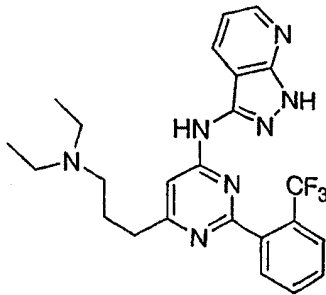
I-7



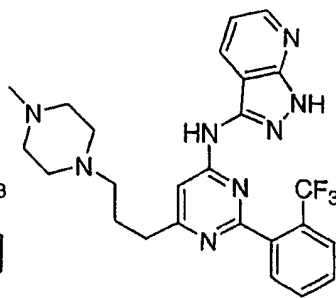
I-8



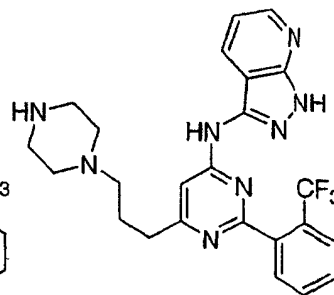
I-9



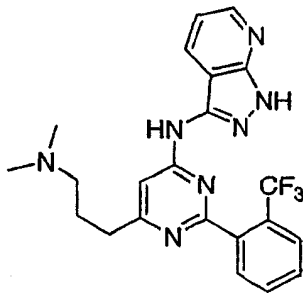
I-10



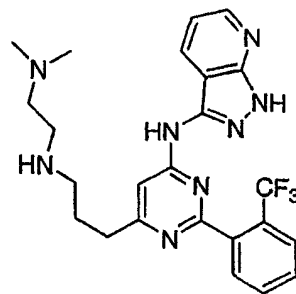
I-11



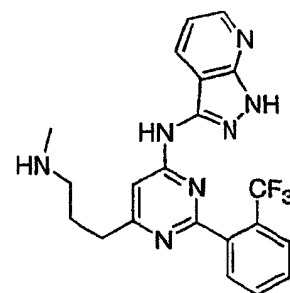
I-12



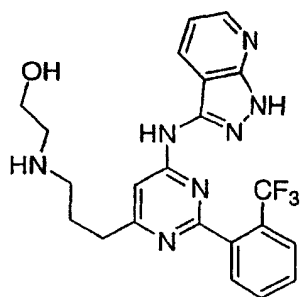
I-13



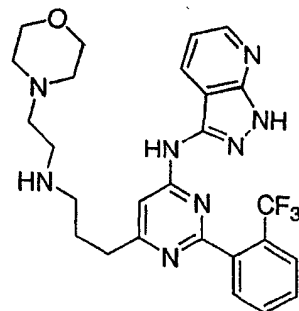
I-14



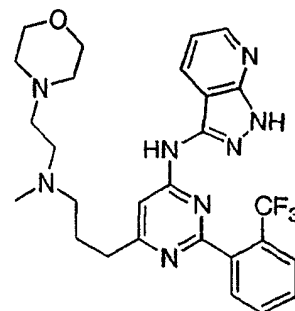
I-15



I-16



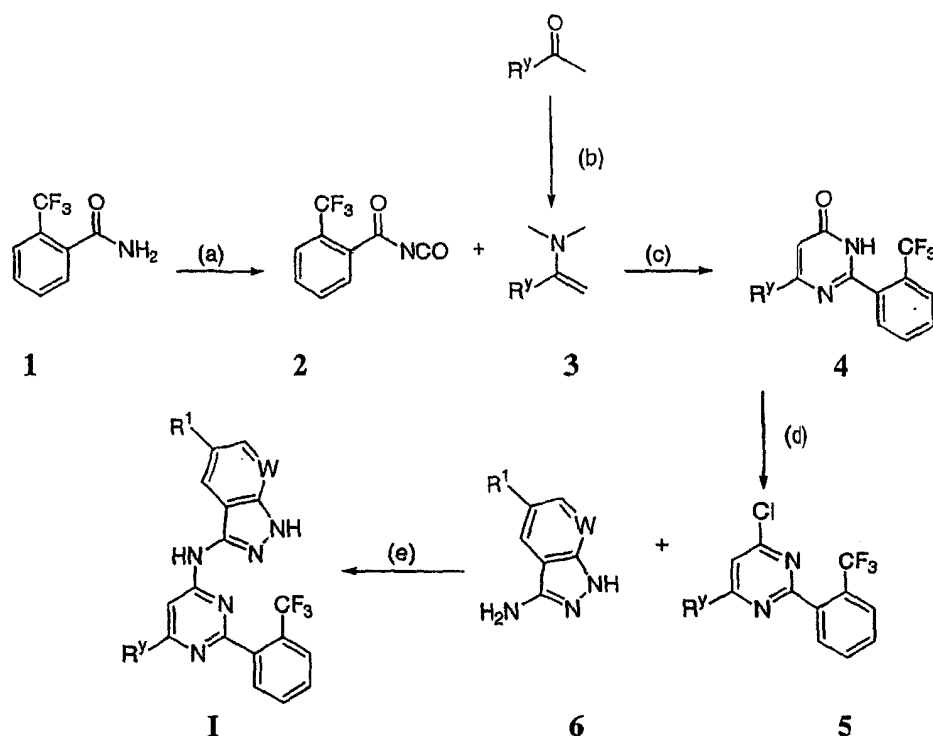
I-17



I-18

本发明的化合物可以按照下列的反应路线 I-II 所示的方法和本领域技术人员已知的一般方法来制备。

反应路线 I

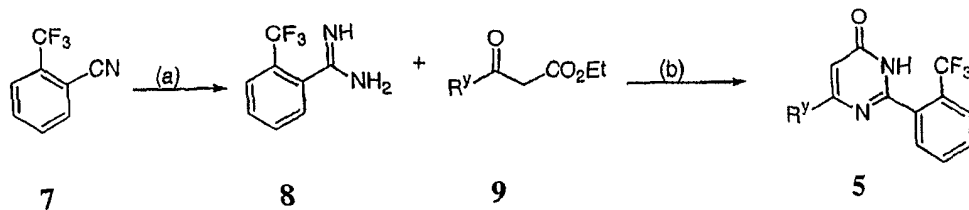


试剂和条件：(a)草酰氯，二氯乙烷，70℃；(b)二甲胺，戊烷，TiCl₄；(c)NH₄OAc, HOAc, THF, 回流；(d)POCl₃, n-Pr₃N, 回流；(e)160℃，纯的。

上述的反应路线 I 表示了用于制备本发明化合物的一般方法。在步骤 (a)，用草酰氯处理芳基酰胺 1，形成酰基异氰酸酯 2。如步骤 (c) 所示，可用酰基异氰酸酯 2 与烯胺 3 缩合，形成嘧啶酮 4 (J. Org. Chem (1993), 58, 414-418; J. Med. Chem., (1992), 35, 1515-1520; J. Org. Chem., 1967, 32, 313-214)。用 POCl₃ 处理中间体 4 形成氯代化合物 5，然后化合物 5 与氨基吲唑衍生物 6 化合形成式 I 的化合物。制备氨基-吲唑衍生物 6 的方法是本领域已知的。具体地，这些衍生物的合成

在 WO 02 / 22607 中已列出。

反应路线 II



试剂和条件：(a) $i\text{LiN}(\text{TMS})_2$, 醚, THF, $i\text{HCl}$; (b) NaOEt , EtOH, 回流。

上面的反应路线 II 表示制备嘧啶酮中间体 5 的另一个方法, 该中间体可用于上面所描述的反应路线 I 中的步骤 (e) 的式 I 化合物的制备。在步骤 (a) 中, 芳基腈 7 (形成) 苯甲脒中间体 8, 然后用 β -酮酯 9 处理, 形成可如上述使用的嘧啶酮化合物 5。

本领域普通技术人员可以按照说明书的教导使用易于合成或可商业购买的试剂来合成本发明的其它化合物。

在本发明中作为 GSK-3 抑制剂所使用的化合物的活性可在体外、体内或在细胞系中进行测定。体外测定包括鉴定活化的 GSK-3 的磷酸化活性或 ATP 酶活性的抑制实验。体外测定对抑制剂与 GSK-3 结合的能力进行定量。抑制剂的结合可以通过在结合之前将抑制剂进行放射性标记、分离抑制剂 / GSK-3 的配合物和确定结合的放射性标记的量来测定。或者, 抑制剂的结合可以通过操作一个竞争性实验来测定, 其中将结合有已知的放射性配体的 GSK-3 与新的抑制剂一起温育。

按照另一个实施方案, 本发明提供了包含了本发明化合物或其药学可接受的盐和药学可接受的载体、辅料或赋形剂的组合物。本发明组合物中化合物的用量是在生物样品或在患者中应有效可测地抑制蛋白激酶 (特别是 GSK-3) 的量。优选将本发明的组合物加以制剂用于对需要这样组合物的患者给药。最优选, 将本发明的组合物配制成对患者经口给药的形式。

本文中使用的术语“患者”是指动物，优选哺乳动物，最优选人类。

术语“药学可接受的载体，辅料，或赋形剂”是指不破坏与其配制的化合物的药理学活性的无毒的载体，辅料，或赋形剂。可以用于本发明组合物的药学可接受的载体、辅料或赋形剂包括，但不局限于，离子交换树脂，氧化铝，硬脂酸铝，卵磷脂，血清蛋白，例如人血清白蛋白，缓冲剂例如磷酸盐，甘氨酸，山梨酸，山梨酸钾，饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物，水，盐或电解质，例如硫酸鱼精蛋白，磷酸氢二钠，磷酸氢钾，氯化钠，锌盐，胶态二氧化硅，三硅酸镁，聚乙烯吡咯烷酮，基于纤维素的物质，聚乙二醇，羧甲基纤维素钠，聚丙烯酸酯，石蜡，聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段共聚物，聚乙二醇和羊毛脂。

本文中使用的术语“可测地抑制”是指在包含所述组合物和 GSK-3 激酶的样品以及包含 GSK-3 激酶而不含所述组合物的等量样品之间 GSK-3 活性的可测量的改变。

“药学可接受的盐”是指在对接受者给药时能够直接或间接地提供本发明的化合物或抑制剂的活性代谢物或其残余物的本发明化合物的任何无毒的盐、酯、酯的盐或其它衍生物。

本文中使用的术语“抑制剂活性的代谢物或其残余物”是指本发明化合物的代谢物或其残余物也是 GSK-3 激酶的抑制剂。

本发明化合物的药学可接受的盐包括那些源于药学可接受的无机和有机酸和碱的盐。合适的酸盐的例子包括乙酸盐，己二酸盐，藻朊酸盐，天冬氨酸盐，苯甲酸盐，苯磺酸盐，硫酸氢盐，丁酸盐，柠檬酸盐，樟脑酸盐，樟脑磺酸盐，环戊烷丙酸盐，二葡糖酸盐，十二烷基硫酸盐，乙磺酸盐，甲酸盐，富马酸盐，葡庚糖酸盐，甘油磷酸盐，羟乙酸盐，半硫酸盐，庚酸盐，己酸盐，盐酸盐，氢溴酸盐，氢碘酸盐，2-羟基乙磺酸盐，乳酸盐，马来酸盐，丙二酸盐，甲磺酸盐，2-萘磺酸盐，烟酸盐，硝酸盐，乙二酸盐，棕榈酸盐，果胶酯酸盐，过硫酸盐，3-苯丙酸盐，磷酸盐，苦味酸盐，特戊酸盐，丙酸盐，水杨

酸盐，琥珀酸盐，硫酸盐，酒石酸酯，硫氰酸盐，甲苯磺酸盐和十一烷酸盐。其它的酸，例如草酸，尽管它们本身不是药学可接受的，但可以用于制备可用作获得本发明的化合物及其药学可接受的酸加成盐的中间体的盐。

来源于合适的碱的盐，包括碱金属(例如，钠和钾)，碱土金属(例如镁)，铵和 $N+(C_{1-4} \text{烷基})_4$ 盐。本发明也预想到了本文所公开的化合物的任何含有碱性氮的基团的季铵化作用。通过这样的季铵化作用可以获得水或油溶的或可分散的产品。

本发明的组合物可以通过经口、胃肠外、吸入喷雾剂、局部、直肠、鼻、向颊、阴道或嵌入式储液囊给药。本文中使用的术语“肠胃外的”包括皮下的、静脉内的、肌肉内的、关节内的、滑液内的、胸骨内的、鞘内的、肝内的、病灶内的和颅内的注射或输液技术。优选，组合物以经口、腹膜内的或静脉内的方式给药。本发明组合物的无菌注射形式可以是含水的或油性的悬浮液。这些悬浮液可以按照本领域已知的技术、使用合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂来配制。无菌注射制剂还可以是在无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液或悬浮液，例如在 1,3-丁二醇中的溶液。其中可接受的赋形剂和可使用的溶剂是水、林格溶液和等渗氯化钠溶液。另外，通常使用无菌的不挥发油作为溶剂或悬浮介质。

为此目的，可以使用的任何温和的不挥发油包括合成的单-或二酸甘油酯。脂肪酸，例如油酸和其甘油酯衍生物可有效用于注射剂的制备，例如天然的药学上可接受的油类，比如橄榄油或蓖麻油，特别是它们的聚氧乙烯形式。油剂或悬浮液还可以含有长链醇稀释剂或分散剂，例如羧甲基纤维素或类似的分散剂，它们通常用在药学可接受的剂型包括乳状液和悬浮液的制剂中。为制剂的目的也可以使用其它通常使用的表面活性剂，例如吐温、Spans 及其它乳化剂或生物利用度增强剂，它们通常用于制造药学可接受的固体、液体，或用作此目的其它剂型。

本发明的药学可接受的组合物可以以任一经口地可接受的剂型包

括但不限于胶囊、片剂、水悬浮液或溶液的形式口服给予。在用于经口使用的片剂的情况下，通常使用的载体包括乳糖和玉米淀粉。也可典型地加入润滑剂，例如硬脂酸镁。对于以胶囊的形式经口给药，有用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当需要经口使用水悬浮液时，将活性组分与乳化剂和悬浮剂相结合。如果需要的话，也可以加入某些甜味剂、调味剂或着色剂。

作为替代的方案，本发明的药学可接受的组合物可以以用于直肠给药的栓剂的形式给予。这些组合物可以通过将试剂与合适的无刺激性的赋形剂混合来制备，该赋形剂在室温下是固体，但在直肠温度下是液体，因此能在直肠中融化以释放药物。这种材料包括可可脂，蜂蜡和聚乙二醇。

本发明的药学可接受的组合物也可以局部给予，特别是当治疗的靶位包括通过局部施用易达到的部位或器官的时候，包括眼病、皮肤疾病或下肠道疾病。可容易地制备对于每个这些部位或器官的合适的局部制剂。

用于下肠道的局部施用可以以直肠栓剂(参见上面)或合适的灌肠制剂的形式来实施。也可以使用局部-透皮贴剂。

就局部施用而言，药学可接受的组合物可以配制成含有悬浮于或溶于一种或多种载体中的活性组分的合适的油膏形式。用于本发明化合物的局部给药的载体包括但不限于矿物油，液体矿脂，白凡士林，丙二醇，聚氧乙烯，聚氧丙烯化合物，乳化蜡和水。或者，可以将药学可接受的组合物配制成含有悬浮于或溶于一种或多种药学可接受的载体中的活性组分的合适的洗剂或乳膏剂。合适的载体包括但不限于矿物油，单硬脂酸山梨糖醇酐酯，聚山梨酸酯 60，鲸蜡基酯蜡，鲸蜡硬脂醇，2-辛基十二烷醇，苯甲醇和水。

就眼科用途而言，不论是否有防腐剂例如氯化苄基烷鎓存在，药学可接受的组合物可以配制成等渗的、pH 值调整的无菌的生理盐水的微粉化悬浮液，或优选配制成等渗的、pH 值调整的无菌的生理盐水溶液。或者，对于眼科用途，可以将药学可接受的组合物配制在油膏比

如石蜡油中。

本发明的药学可接受的组合物也可以经鼻用气雾剂或吸入剂给予。这样的组合物是按照药物制剂领域所熟知的技术来制备的，并且可以制成生理盐水溶液，采用苯甲醇或其它合适的防腐剂、提高生物利用度的吸收促进剂、氟碳化合物和 / 或其它常规的增溶剂或分散剂。

最优选地，将本发明的药学可接受的组合物配制成口服形式。

可以与载体材料结合以制备单一剂量形式的组合物的本发明化合物的量可根据所治疗的宿主和具体的给药方式加以改变。优选将组合物配制成能给予接受组合物的患者 0.01-100 mg / kg 体重/天剂量的抑制剂的制剂。

还应该了解，对于任一具体患者的具体剂量和治疗方案取决于多种因素，包括所采用的具体化合物的活性、年龄、体重、常规健康状况、性别、饮食、给药的时间、排泄速度、药物组合、和治疗医师的判断和所治疗的具体的疾病的严重程度。组合物中的本发明化合物的用量还取决于组合物中所含的具体化合物。

根据治疗或预防的具体病症或疾病，在本发明的组合物中也可以存在通常用来治疗或预防病症的其它治疗剂。

例如，用于治疗神经学或神经变性障碍的神经营养因子或其它试剂可以与本发明的化合物相结合以治疗神经学和神经变性的障碍。已知的神经营养因子的例子包括但不局限于，乙酰胆碱酯酶抑制剂，MAO 抑制剂，干扰素，抗惊厥剂，离子通道封阻剂，利鲁唑和抗似帕金森氏病的试剂。

已知的用于中风治疗的例子包括 Activase[®]，重组的或遗传工程的组织纤溶酶原激活物 (rt-PA)，肝素，谷氨酸盐拮抗剂，钙拮抗剂，阿片剂拮抗剂，GABA 激动剂和抗氧化剂。

可与本发明化合物结合的试剂的其它例子包括但不限于，抗压抑制剂，比如盐酸舍曲林[®]、盐酸氟西汀[®]、Paxil[®]和盐酸丁螺环酮[®]；抗炎药比如皮质甾类、TNF 阻断剂、IL-1 RA、咪唑硫嘌呤、环磷酰胺和柳氮磺胺吡啶；免疫调控剂和免疫抑制剂比如环孢菌素、他克莫司、

雷帕霉素、mycophenolate mofetil、干扰素、皮质甾类、环磷酰胺、咪唑硫嘌呤和柳氮磺胺吡啶；神经营养因子比如乙酰胆碱酯酶抑制剂、MAO 抑制剂、干扰素、抗惊厥剂、离子通道封阻剂、利鲁唑和抗似帕金森氏病的试剂；用于治疗心血管疾病的试剂比如 β -阻断剂、ACE 抑制剂、利尿剂、硝酸脂、钙通道阻断剂和抑制素；用于治疗糖尿病的试剂比如胰岛素、胰岛素类似物、麦芽糖酶抑制剂、双缩脲和胰岛素敏化剂；和用于治疗免疫缺陷障碍的试剂比如丙种球蛋白。

存在于本发明组合物中的其它治疗剂的用量将不超过包含该治疗剂作为唯一活性剂的组合物中的正常给予量。在目前公开的组合物中，优选其它治疗剂的用量约为正常存在于包含该试剂作为唯一治疗活性剂的组合物中用量的 50%-100%范围。

按照另一个实施方案，本发明涉及给予患者选自下面的其它治疗剂：用于治疗阿尔茨海默氏病 (AD)、用于治疗帕金森氏症的试剂，用于治疗多发性硬化 (MS)、用于治疗哮喘的试剂，抗炎剂，免疫调变剂或免疫抑制剂，神经营养因子，用于治疗中风的试剂，用于治疗心血管疾病的试剂，抗抑郁药，抗精神病试剂，或用于治疗糖尿病的试剂，其中：

所述其它治疗剂对所治疗的疾病是适合的；

并且所述其它治疗剂可与所述组合物以单一剂一起给药，或与所述组合物以多剂量形式的一部分分别给药。

按照另一个实施方案，本发明涉及在生物样品中抑制 GSK-3 激酶活性的方法，包含将所述生物样品与本发明的化合物或包含所述化合物的组合物接触的步骤。

本文中使用的术语“生物样品”包括，但不限于，细胞培养物或其提取物；从哺乳动物或其提取物获得的活组织检查原料；和血液，唾液，尿，排泄物，精液，眼泪，或其它体液或其提取物。

抑制 GSK-3 在生物样品中的活性可用于各种对于本领域熟练技术人员已知的目的。这样的目的的例子包括但不局限于，输血，器官移植，生物标本贮存和生物学实验。

按照另一个实施方案，本发明涉及在患者中抑制 GSK-3 激酶活性的方法，包含给予所述患者本发明化合物或包含所述化合物的组合物的步骤。

按照另一个实施方案，本发明提供了一种用于治疗或减轻 GSK-3 介导的疾病或病症的严重程度的方法，包含给予所述患者按照本发明的组合物的步骤。

本文中使用的术语“GSK-3 介导的疾病”是指已知 GSK-3 在其中起作用的任何疾病或其它有害的病症或疾病。这样的疾病或病症包括但不限于，自身免疫性疾病，炎症性疾病，代谢紊乱，精神错乱，糖尿病，血管生成疾病，tauopathy，神经学或神经变性障碍，脊髓损伤，青光眼，秃顶或心血管疾病。

按照另一个实施方案，本发明涉及一种在需要治疗的患者中治疗或减轻选自下列的疾病、障碍或病症的严重程度的方法：自身免疫性疾病、炎症性疾病、代谢紊乱、精神错乱、糖尿病、血管生成疾病、tauopathy、神经学或神经变性的障碍、脊髓损伤、青光眼、秃顶或心血管疾病，包括给予所述患者本发明的化合物或其组合物。

按照另一个实施方案，本发明涉及一种治疗或减轻选自下列的疾病或病症的严重程度的方法：敏感症，哮喘，糖尿病，阿尔茨海默氏病，杭廷顿氏疾病，帕金森氏症，与 AIDS 有关的痴呆，肌萎缩性侧索硬化 (ALS, Lou Gehrig ' s 疾病)，多发性硬化 (MS)，由于外伤造成的损伤，精神分裂症，焦虑症，双极神经元障碍，tauopathy，脊髓或周围神经损伤，心肌梗塞，心肌细胞肥大，青光眼，注意力缺陷障碍 (ADD)，抑郁症，睡眠障碍，再灌注/局部缺血，中风，血管生成疾病，或秃顶，其中所述方法包括给予需要治疗的患者本发明的化合物或其组合物。

按照另一个优选实施方案，本发明涉及一种治疗或减轻中风的严重程度的方法。

按照另一个优选实施方案，本发明涉及一种治疗或减轻神经变性或神经系统紊乱的严重程度的方法。

本发明的另一个方面涉及一种在男性患者中降低精子活力的方法，包括给予所述患者本发明的化合物或其组合物。

在一个替代的实施方案中，利用不含有其它治疗剂的组合物的本发明的方法包括另外分开地给予所述患者其它治疗剂的步骤。当分开给予其它治疗剂时，可以在给予本发明的组合物之前、依次或之后给予患者其它治疗剂。

具体实施方式

为了更充分地了解本文中描述的本发明，给出下面的实施例。

应该理解这些实施例仅仅为了举例性的目的，并不被看作是以任何方式限制本发明。

实施例

本文中所使用的、指定为“方法 A”的 HPLC 方法如下所示：

柱：C18，3 μ m，2.1 X 50 mm，通过 Jones 色谱“Lighting”。

梯度：从 100% 水 (包含 1% 乙腈，0.1% TFA) 至 100% 乙腈 (含有 0.1% TFA) 经历 4.0 分钟，在 100% 乙腈保持 1.4 分钟，然后回到初始条件。

总运行时间 7.0 分钟。

流速：0.8 毫升/分钟；

本文中使用的术语“ R_t ”是指保留时间，以分钟为单位，由使用所指定的 HPLC 方法的化合物获得。列在下列实施例中的化合物编号对应于上文中列在表 1 中的化合物编号。

实施例 1

6-甲基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘧啶-4-酮：

用乙酰乙酸甲酯 (0.44 mL, 4 mmol) 处理 2-三氟甲基-苯甲脒 (2.13 g, 4 mmol) 与乙醇钠 (0.83 g, 12 mmol) 在乙醇 (20 mL) 中的混合物，并加热 24 小时。将反应冷却、浓缩、用水稀释、再用 2 N 盐酸酸化。将得到的溶液用乙酸乙酯提取，用硫酸钠干燥并浓缩。用快速色谱 [SiO_2 ，甲醇：二氯甲烷 (3: 97)] 纯化，形成标题化合物的黄色固体

(0.51 g, 50%产率); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 12.7 (br s, 1H), 7.9 (m, 1H), 7.8 (m, 2H), 7.7 (m, 1H), 6.3 (s, 1H), 2.21 (s, 3H) ppm; MS (FIA) 255.0 (M+H); R_t (方法 A) 2.578 分钟。

实施例 2

4-氯-6-甲基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶:

将 6-甲基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘧啶-4-酮 (10.7 g, 41.9 mmol) 的氯化氧磷 (39 mL, 419 mmol) 溶液用三正丙胺 (16 mL, 83.9 mmol) 处理, 并在 110-120°C 下回流 1 小时。将溶剂蒸发, 用甲苯共沸三次, 而后真空干燥。将残余物在乙酸乙酯中处理, 依次用 1 N 氢氧化钠、水和盐水洗涤, 然后用硫酸钠干燥并浓缩。用快速色谱 [SiO_2 , 乙酸乙酯: 己烷 (1: 9)] 纯化, 形成标题化合物的橙色油 (9.61 g, 84% 产率)。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 2.63 (3H, s), 7.26 (s, 1H), 7.61 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.67 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.76 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.82 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H) ppm; MS (FIA) 273.0 (M+H); R_t (方法 A) 3.499 分钟。

实施例 3

(5-氟-1H-吡唑 [6-甲基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶-4-基] 胺 (I-2):

将 4-氯-6-甲基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶 (0.10 g, 0.37 mmol) 和 5-氟-1H-吡唑-3-基胺 (0.072 g, 0.48 mmol) 的混合物在 160-170°C 下加热 8 小时。将得到的残余物冷却至室温, 然后将其溶于 N-甲基-吡咯烷酮 (2 mL) 中。将混合物倒入水 (20 mL) 中, 加入碳酸氢钠 (5 mL), 过滤得到的混合物, 再用水洗涤。用制备 HPLC 纯化, 得到标题化合物的黄褐色固体 (0.081 g, 产率 43%)。 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 12.8 (br s, 1H), 10.6 (br s, 1H), 7.86 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.77 (m, 4H), 7.62 (br s, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.29 (m, 1H), 2.44 (s, 3H) ppm; LC-MS388.05 (M+H); R_t (方法 A) 2.900 分钟。

实施例 4

6-叔丁基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘧啶-4-酮：

在回流下加热 2-三氟甲基苯基脒(1.12 克, 5 mmol)、乙醇钠(1.02 克, 15 mmol)和 4,4-二甲基-3-氧代-戊酸甲酯(0.80ml, 5 mmol)在乙醇(50 毫升)中的混合物 16 小时。将反应冷却、浓缩、用水稀释、再用 2 N 盐酸酸化。用乙酸乙酯提取溶液,用硫酸钠干燥并浓缩。用快速色谱 [SiO₂, 甲醇:二氯甲烷(2: 98)]纯化,形成标题化合物的黄色固体(0.48 g, 32%产率); ¹H NMR(500 MHz, DMSO-d₆) δ 12.8(br s, 1H), 7.89(d, J=7.5Hz, 1H), 7.78(m, 2H), 7.71(d, J=7.4Hz, 1H), 6.24(s, 1H), 1.20(s, 9H) ppm; LC-MS 297.03(M+H); R_t(方法 A)3.30 分钟。

实施例 5

6-叔丁基-6-氯-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶：

用三正丙胺(0.61 毫升, 3.17 mmol)处理 6-叔丁基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘧啶-4-酮(0.47 克, 1.59 mmol)的氯化氧磷(1.65 毫升, 15.9 mmol)溶液,在 110-120℃下加热 1 小时。蒸发除去溶剂,然后用甲苯共沸三次。将残余物在乙酸乙酯中处理,依次用 1 N 氢氧化钠、水和盐水洗涤,然后用硫酸钠干燥并浓缩。用快速色谱[SiO₂, 乙酸乙酯:己烷(1: 9)]纯化,形成标题化合物的黄色油(0.33g, 66%产率)。¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 1.31(9H, s), 7.25(s, 1H), 7.51(t, J=7.6Hz, 1H), 7.58(t, J=7.5Hz, 1H), 7.74(t, J=8.5Hz, 2H) ppm; MS(FIA) 314.9 (M+H); R_t(方法 A)4.156 分钟。

实施例 6

[6-叔丁基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶-4-基]-(1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基)-胺(I-3)：

在 160-170℃下加热 4-氯-6-叔丁基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶(0.10 克, 0.32 mmol)和 1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基胺(0.064 克, 0.48 mmol)的混合物 16 小时。将残余物冷却,溶于 N-甲基-吡咯烷酮(2mL)中,然后倾倒入水(20 mL)和碳酸氢钠(5mL)中,用乙酸乙酯提取

两次。将合并的有机层用水洗涤四次，再用盐水洗涤一次，然后用硫酸钠并浓缩。用制备 HPLC 纯化粗产品，形成标题化合物的黄色固体 (0.007 g, 产率 4%)。¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (br s, 1H), 10.6 (br s, 1H), 8.49 (m, 2H), 7.84 (d, J=7.8Hz, 2H), 7.76 (m, 2H), 7.68 (m, 1H), 7.12 (m, 1H), 1.32 (s, 9H) ppm; LC-MS 413.08 (M+H); R_t (方法 A) 3.112 分钟。

实施例 7

6-环丙基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘧啶-4-酮：

(1-环丙基-乙烯基)-二甲胺：在 0℃ 及氮气氛围下，向环丙基甲基酮 (19.8 mL, 200 mmol) 的戊烷 (600 mL) 溶液中加入二甲胺/四氢吡喃 (2M, 500 mL, 1000 mmol)，然后以滴加方式加入在戊烷 (60 mL) 中的氯化物钛 (IV) 溶液 (12.1 mL, 110 mmol)。将反应混合物在 0℃ 下搅拌 0.5 小时，而后在室温下搅拌 5 小时。将反应混合物通过硅藻土过滤，用戊烷和醚洗涤，在 15-20℃ 浴温下真空浓缩，然后在 -4℃ 下以橙色油形态储存过夜。

2-三氟甲基苯甲酰基异氰酸酯：

在室温及氮气氛围下，将 2-三氟甲基苯甲酰胺 (34.9 克, 185 mmol) 的 1,2-二氯乙烷 (600 毫升) 溶液用快速滴加的草酰氯 (20.2 毫升, 230 mmol) 处理，将反应在 70-80℃ 搅拌过夜。蒸发除去溶剂，然后残余物用甲苯共沸两次。

6-环丙基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘧啶-4-酮：

在 0℃ 及氮气氛围下，以滴加方式向 (1-环丙基-乙烯基)-二甲胺的四氢吡喃 (400 毫升) 溶液中加入 2-三氟甲基苯甲酰基异氰酸酯的四氢吡喃 (50 毫升) 溶液。将反应混合物搅拌 0.5 小时，然后加入乙酸铵 (78 g, 1000 mmol) 和乙酸 (400 mL)。在回流下将反应混合物加热 3 小时以连续除去四氢吡喃，然后冷却并倾倒入水 (1.2 L) 中。过滤收集得到的沉淀，用水和醚洗涤，形成 6-环丙基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘧啶-4-酮 (28.79 克, 56% 产率) 白色固体，该固体是标题化合

物和(2-三氟甲基-苯甲酰基)-脲(通过 HPLC 比例为 91: 9)的混合物。

^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 12.7 (br s, 1H), 7.87 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.79 (m, 2H), 7.73 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.32 (s, 1H), 1.93 (m, 1H), 0.90 (m, 4H), [urea: 10.8 (br s, 1H), 7.45 (br s, 1H)] ppm; LC-MS 280.96 (M+H); R_t (方法 A) 2.961 分钟(标题化合物), 2.313 分钟(脲杂质)。

实施例 8

4-氯-6-环丙基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶:

将在氯化氧磷(40ml, 428 mmol)中的 6-环丙基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘧啶-4-酮(12.0 克, 42.8 mmol)在 75-80°C 下加热 1 小时。蒸发除去溶剂, 用甲苯共沸三次。将残余物冷却到 0°C, 在乙酸乙酯中处理, 再用冰碎屑和水处理。将混合物依次用饱和碳酸氢钠、水和盐水洗涤, 用硫酸钠干燥并浓缩。用快速色谱 [SiO_2 , 乙酸乙酯: 己烷(5: 95)] 纯化, 形成标题化合物的无色油(9.71g, 76%产率)。

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 1.12 (m, 2H), 1.30 (m, 2H), 2.02 (m, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.56 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.64 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.79 (m, 2H) ppm; MS (FIA) 299.1/300.9 (M+H); R_t (方法 A) 3.882 分钟。

实施例 9

[6-环丙基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶-4-基]-(1H-吡唑-3-基)-胺(I-4):

将 4-氯-6-环丙基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶(0.08 克, 0.27 mmol)和 1H-吡唑-3-基胺(0.036 克, 0.41 mmol)的混合物在 160-170°C 下加热 6 小时。将残余物冷却, 并溶于 N-甲基-吡咯烷酮(2 mL)中, 将其倾倒入水(30 mL)和碳酸氢钠(5 mL)中, 然后过滤, 用水和醚洗涤。将收集的沉淀与洗涤用的醚合并和浓缩。用快速色谱 [SiO_2 , 甲醇: 二氯甲烷(2: 98)] 纯化, 形成标题化合物的浅黄色固体(0.017 g, 15%

产率)。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 12.6 (br s, 1H), 10.2 (br s, 1H), 8.00 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.81 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.71 (m, 3H), 7.65 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.36 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.06 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 2.04 (m, 1H), 1.01 (m, 2H), 0.96 (m, 2H) ppm; LC-MS 396.10 (M+H); R_t (方法 A) 3.122 分钟。

实施例 10

[6-环丙基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶-4-基]-(1H-吡唑并[3,4-B]吡啶-3-基)-胺 (I-1) :

将 4-氟-6-环丙基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶 (7.00 克, 23.4 mmol, 按上述在实施例 8 中的方法制备) 和 1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基胺 (9.43 克, 70.3 mmol) 的 *N*-甲基吡咯烷酮 (50 毫升) 混合物在 130 $^{\circ}\text{C}$ 下加热 12 小时。将残余物冷却, 溶于 *N*-甲基-吡咯烷酮 (2mL) 中, 倾倒入水 (500mL) 和碳酸氢钠 (15mL) 中, 过滤后, 用水洗涤。用快速色谱 [SiO_2 , 乙酸乙酯: 己烷 (35: 65)] 纯化, 形成标题化合物的白色固体 (5.25g, 57% 产率)。 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 13.1 (br s, 1H), 10.5 (br s, 1H), 8.50 (m, 2H), 7.82 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.73 (m, 3H), 7.66 (t, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.12 (m, 1H), 2.07 (m, 1H), 1.02 (m, 2H), 0.97 (m, 2H) ppm; LC-MS 397.22 (M+H); R_t (方法 A) 3.412 分钟。

实施例 11

[6-环丙基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶-4-基]-(1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基)-胺, 盐酸盐 :

通过在 6N 盐酸中溶解化合物 I-1 (8.42 g, 21.4 mmol) 并冻干形成标题化合物的黄色固体 (9.242 g, 99 %) 来制备 HCl 盐。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 13.3 (br s, 1H), 10.9 (br s, 1H), 8.53 (dd, $J=4.4, 1.4$ Hz, 1H), 8.48 (br d, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.79 (m, 2H), 7.72 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 7.15 (m, 1H), 2.14 (m, 1H), 1.07 (m, 4H) ppm; MS (FIA) 397.3 (M+H), 395.2 (M-H),

431.2 (M-H+HCl); R_t (方法 A) 2.798 分钟。

实施例 12

6-丁-3-烯基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘧啶-4-酮：

除了使用 3-氧代-庚-6-烯酸乙酯之外，6-丁-3-烯基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘧啶-4-酮是按上述实施例 1 中所述的方法制备的。反应生成了标题化合物的米色固体 (2.545 g, 49%产率)。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12.8 (s, 1H), 7.88 (d, 1H), 7.79 (t, 1H), 7.75 (t, 1H), 7.68 (d, 1H), 6.22 (s, 1H), 5.80 (m, 1H), 5.03 (dd, 1H), 4.98 (dd, 1H), 2.56 (t, 2H), 2.36 (m, 2H) ppm; MS (FIA) 295.1 (M+H); R_t (方法 A) 3.160 分钟。

实施例 13

4-丁-3-烯基-6-氯-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶：

除了使用 6-丁-3-烯基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘧啶-4-酮之外，按实施例 2 中所述的方法制备标题化合物，形成黄色油 (0.49 g, 99%产率)。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.72 (d, 1H), 7.67 (d, 1H), 7.57 (t, 1H), 7.51 (t, 1H), 7.13 (s, 1H), 5.77 (m, 1H), 4.98 (m, 2H), 2.84 (t, 2H), 2.49 (m, 2H) ppm; MS (FIA) 313.0 (M+H); R_t (方法 A) 4.220 分钟。

实施例 14

[6-丁-3-烯基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶-4-基]-(1H-吡唑并 [3,4-b] 吡啶-3-基)-胺 (I-7)：

除了使用 4-丁-3-烯基-6-氯-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶之外，按如实施例 6 所述的方法制备标题化合物，形成米色的固体 (2.712 克, 62%产率)。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13.1 (s, 1H), 10.56 (s, 1H), 8.50 (m, 1H), 8.47 (d, 1H), 7.84 (d, 1H), 7.76 (t, 1H), 7.69 (m, 3H), 7.13 (m, 1H), 5.86 (m, 1H), 5.06 (dd, 1H), 4.98 (dd, 1H), 2.76 (t, 2H), 2.46 (m, 2H) ppm; MS (FIA) 411.2 (M+H); R_t (方法 A) 3.019 分钟。

实施例 15

[6-(3-吗啉-4-基-丙基)-2-(2-三氟甲基-苯基)嘧啶-4-基]-(1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基)-胺(I-8)：

将[6-丁-3-烯基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶-4-基]-(1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基)-胺(0.10克, 0.25 mmol)的甲醇(5毫升)和四氢呋喃(5毫升)溶液在-78℃下用臭氧鼓泡5分钟。向混合物中加入吗啉(0.05mL, 0.56 mmol)和三乙酰氧基硼氢化钠(0.39 g, 1.85 mmol)。将反应在室温下搅拌24小时,当加入额外的吗啉(0.10mL, 1.28 mmol)和三乙酰氧基硼氢化钠(0.39 g, 1.85 mmol)时,再持续搅拌另外2小时。将反应用碳酸氢钠淬灭,并蒸发。用快速色谱[SiO₂, 用1:9的甲醇:二氯甲烷洗脱]纯化,而后利用制备HPLC,形成标题化合物的亮黄色冷冻干燥物(0.068 g, 38%产率)。484.3(M+H)⁺。¹H NMR(500 MHz, DMSO-d₆) δ 13.2(s, 1H), 10.7(s, 1H), 9.60(br s, 1H), 8.52(m, 1H), 8.47(d, 1H), 7.86(d, 1H), 7.77(m, 1H), 7.70(m, 2H), 7.14(m, 1H), 3.97(br m, 2H), 3.61(br m, 2H), 3.44(br m, 2H), 3.18(br m, 2H), 3.05(br m, 2H), 2.78(t, 2H), 2.08(m, 2H) ppm.

实施例 16

利用基本上类似于本文中实施例1-15所描述的方法、常规反应路线和本领域普通技术人员已知的方法制备下列化合物。

[6-(3-哌啶-1-基-丙基)-2-(2-三氟甲基-苯基)嘧啶-4-基]-(1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基)-胺(I-9)：

482.2(M+H)⁺。¹H NMR(500 MHz, DMSO-d₆) δ 13.2(s, 1H), 10.7(s, 1H), 9.04(br s, 1H), 8.52(m, 1H), 8.47(d, 1H), 7.85(d, 1H), 7.78(m, 1H), 7.70(m, 2H), 7.14(m, 1H), 3.42(m, 2H), 3.10(m, 2H), 2.85(m, 2H), 2.77(t, 2H), 2.09(m, 2H), 1.79(m, 2H), 1.61(m, 3H), 1.35(m, 1H) ppm.

[6-(3-二乙基氨基-丙基)-2-(2-三氟甲基-苯基)嘧啶-4-基]-(1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基)-胺(I-10) :

470 (M+H). ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 9.07 (s, 1H), 8.50 (m, 1H), 7.85 (m, 1H), 7.78 (d, 1H), 7.76 (m, 1H), 7.71 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.11 (m, 6H), 2.80 (t, 2H), 2.05 (m, 2H), 1.15 (t, 6H) ppm.

[6-(3-(4-甲基-哌嗪-1-基)-丙基)-2-(2-三氟甲基-苯基)嘧啶-4-基]-(1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基)-胺(I-11) :

497.2 (M+H). ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 8.52 (m, 1H), 8.47 (m, 2H), 7.85 (d, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.72 (m, 3H), 7.14 (m, 1H), 3.0-3.7 (br, 10H), 2.83 (s, 3H), 2.77 (t, 2H), 2.05 (m, 2H) ppm.

[6-(3-哌嗪-1-基-丙基)-2-(2-三氟甲基-苯基)嘧啶-4-基]-(1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基)-胺(I-12) :

483.3 (M+H). ^1H -NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 9.06 (br s, 2H), 8.52 (m, 1H), 8.47 (d, 1H), 7.85 (d, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.34 (br m, 8H), 3.15 (br m, 2H), 2.77 (t, 2H), 2.06 (m, 2H) ppm.

[6-(3-二甲基氨基-丙基)-2-(2-三氟甲基-苯基)嘧啶-4-基]-(1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基)-胺(I-13) :

442.1 (M+H). ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 9.40 (br s, 1H), 8.52 (m, 1H), 8.47 (d, 1H), 7.85 (d, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.71 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.12 (m, 2H), 2.77 (m, 8H), 2.06 (m, 2H) ppm.

N,N-二甲基-N'-{3-[6-(1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基-氨基)-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶-4-基]-丙基}-乙烷-1,2-二胺 (I-14) :

485.3 (M+H). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 9.7 (br, 1H), 8.8 (br s, 1H), 8.52 (m, 1H), 8.48 (d, 1H), 7.85 (d, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.71 (m, 2H) 7.14 (m, 1H), 3.32 (s, 4H), 3.07 (br m, 2H), 2.84 (s, 6H), 2.80 (m, 2H), 2.04 (m, 2H) ppm.

[6-(3-甲基氨基-丙基)-2-(2-三氟甲基-苯基)嘧啶-4-基]-(1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基)-胺 (I-15) :

428.1 (M+H). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 8.51 (m, 1H), 8.48 (d, 1H), 8.37 (br s, 2H), 7.85 (d, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 2.97 (m, 2H), 2.78 (t, 2H), 2.55 (m, 3H), 2.01 (m, 2H) ppm.

2-{3-[6-(1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基氨基)-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶-基]丙氨基}-乙醇 (I-16) :

458.2 (M+H). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 8.52 (m, 1H), 8.47 (m, 2H), 7.85 (d, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.69 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.62 (t, 2H), 2.99 (m, 4H), 2.78 (t, 2H), 2.04 (m, 2H) ppm.

[6-(3-(2-吗啉-4-基-乙胺基)-丙基)-2-(2-三氟甲基-苯基)嘧啶-基]-(1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基)-胺 (I-17)

527.2 (M+H). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 8.76 (br s, 2H), 8.52 (m, 1H), 8.48 (d, 1H), 7.85 (d, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.81 (br s, 4H), 3.1-3.3 (br m, 8H), 3.06 (t, 2H), 2.80 (t, 2H), 2.05 (t, 2H) ppm.

[6-{3-[甲基-(2-吗啉-4-基-乙基)-氨基]-丙基}-2-(2-三氟甲基

-苯基)嘧啶-4-基]-(1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基)-胺 (I-18)

541.2 (M+H). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 8.52 (m, 1H), 8.47 (d, 1H), 7.85 (d, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.73 (br s, 4H), 3.39 (m, 2H), 3.21 (m, 2H), 2.8-3.3 (br m, 6H), 2.81 (s, 3H), 2.78 (t, 2H), 2.09 (m, 2H) ppm.

实施例 17

GSK-3 抑制作用的 Ki 值测定

使用标准结合酶系统来筛选化合物抑制 GSK-3β (AA 1-420) 活性的能力 (Fox 等 (1998) Protein Sci 7, 2249)。反应在含有 100 mM HEPES (pH 值 7.5)、10 mM MgCl₂、25 mM NaCl、300 μM NADH、1 mM DTT 和 1.5% DMSO 的溶液中进行。在测定中最终底物浓度是 20 μM 的 ATP (Sigma Chemicals, St Louis, MO) 和 300 μM 的肽 (HSSPHQS (PO₃H₂) EDEEE, American Peptide, Sunnyvale, CA)。反应在 30°C 和 20 nM 的 GSK-3β 中进行。结合酶系统中的组分的最后浓度是 2.5 mM 的磷酸烯醇丙酮酸、300 μM 的 NADH、30 μg /毫升的丙酮酸激酶和 10 μg /毫升的乳酸脱氢酶。

制备含有除 ATP 和目标试验化合物外的上列所有试剂的测定用缓冲原溶液。在装有 5 μl 最后浓度为 0.002 μM 到 30 μM 的待测试验化合物的 96 孔平皿中, 将测定缓冲原溶液 (175 μl) 在 30°C 下孵育 10 分钟。典型地, 通过在子系平皿中制备试验化合物的 DMSO 系列稀释液 (由 10 mM 化合物原液稀释) 进行 12-点滴定。通过加入 20 μl 的腺苷三磷酸 (最后浓度为 20 μM) 引起反应。在 30°C 使用 Molecular Devices Spectramax 平皿读数器 (Sunnyvale, CA) 于 10 分钟内获得反应速率。用随抑制剂浓度而变的速度数据确定 Ki 值。

使用上述测定方法发现本发明的化合物具有小于 100 nM 的 Ki 值。

实施例 18

神经保护百分数的测定

本文中所使用的术语“保护作用百分数”代表受到保护避免缺血性损伤(OGD)的神经细胞的百分数,且计算如下:

$$\% \text{保护作用} = (\text{试验-OGD}) / (\text{正常-OGD}) * 100$$

本方案描述了通过在所培养的海马趾神经元细胞中的缺氧症复氧作用来诱导实验性局部缺血所使用的步骤。评估了试验化合物对于缺血性诱发神经元细胞的损伤和细胞死亡的神经保护作用。

在测定日之前进行下列步骤:

将 LoG-Neurobasal [LoG-Neurobasal 含有 NoG Neurobasal 培养基 (Invitrogen Corp, 客户自订) 加 0.5 mM 葡萄糖、0.5 mM L-谷氨酰胺和 0.25x 青霉素/链霉素] 在含氧量低的箱中过夜预平衡。

将 LoG-Neurobasal 在标准培养箱 (5% CO₂) 中过夜预平衡。

在标准培养箱中 (5% CO₂), 将 Neurobasal / B27A0 [Neurobasal / B27A0 含有 Neurobasal 培养基 (Invitrogen Corp 目录号 21103-049)、用 2x B27 minus A0 补充 (Invitrogen Corp 目录号 10889-038)、0.5 mM L-谷氨酰胺和 0.25x 青霉素/链霉素] 过夜预平衡。

在测定当天进行下列步骤:

由含氧量低的箱中取出 LoG-Neurobasal 培养基, 并用 100% N₂ 给培养基轻轻鼓泡 30 分钟, 至去氧完全。

使用附装有无菌玻璃吸量管的真空泵从每个 12-孔平皿中的细胞中吸出 Neurobasal / B27m 培养基 [Neurobasal / B27m 含有具有 2x B27 补充液和 0.5 mM L-谷氨酰胺的 Neurobasal 培养基 (Invitrogen Corp 目录号 -17504-044)]。

将平皿用由以下制备的 2 毫升不含葡萄糖的-BSS₀ (pH 值 7.4) 洗涤: 143.6 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 26.2 mM NaHCO₃, 10 mg/l 酚红, 和 0.25x P/ S。

将神经元 (从初始培养起 10-11 天) 用 LoG-Neurobasal (对于 12-孔平皿的每个孔每孔 1 毫升) 重新补足。神经元细胞按照以下文献制备: Park LC, Calingasan NY, Uchida K, Zhang H, Gibson GE (2000)

“Metabolic impairment elicits brain cell type-selective

changes in oxidative stress and cell death in culture.” *J Neurochem* 74(1): 114-124.

直接向每个孔加入试验化合物(3种浓度的化合物加阳性对照,每个样品一式三份)。将化合物溶于100% DMSO,其中DMSO的浓度从不超过0.5%,然后将平皿在含氧量低的箱中放置5小时,使平皿盖半开着。

对于氧正常对照组,将预平衡过的含氧量正常的LoG-Neurobasal培养基加入到每个孔中,并将放回到标准培养箱中培养4小时。

在缺氧4小时后,小心地吸出现有的介质,并向每个孔中加入2ml新的充氧的(预平衡过的)Neurobasal / B27A0。再充氧介质是通过在使用之前将介质在培养箱(5%CO₂ / 95%O₂)中放置过夜实现的。

将相同浓度的相同试验化合物加回到相应的孔中,并将平皿放入细胞培养箱中(5% CO₂/ 95% O₂),再充氧20-24小时。再充氧20-24小时后,使用如下所述的细胞跟踪器绿色荧光法对活神经元数目计数。

从12孔平皿的每个孔中吸出存在的培养基,将神经元用预温热至30-37℃的2毫升HBSS(pH值7.4, Invitrogen Corp, 目录号14170-112)洗涤一次。

向平皿的每个孔中加入1毫升2.5 μM细胞跟踪器绿(Molecular Probes, 目录号2925),并将5 μM Hoechst 33342荧光染料溶于HBSS中。然后将平皿在室温下在黑暗中放置15分钟,然后将神经元用2ml HBSS洗涤一次。向每个孔中加入1毫升HBSS,并使用Cellomics®自动成像系统对活的和死的荧光细胞数目进行计数。

发现本发明的化合物的%保护作用值≥30%。

实施例 19

大脑中动脉闭塞模型(MCAO)

在此研究中使用的动物是重量在270和333克之间的雄性Sprague-Dawley大鼠(Charles River, NC)。使大鼠在12-小时光/黑暗昼夜循环中对动物设施适应至少一星期。它们可自由获取食物和水。

用于阻挡大脑中动脉(MCA)来源的管腔内动脉限光器由切至 25 mm 长片段的 4-0 尼龙单丝缝线制成。通过接触热源将缝线的线头弄圆。为提高限光器阻挡动脉腔管的效果,将它们涂上 1%聚 L-赖氨酸悬浮液,并在设置为 60℃的烘箱内干燥 1 小时。缝线购买于 Ethelon, Somerville, NJ。使用如下的化学试剂:

1. 2, 3, 5-三苯基四唑氯化物,或 TTC,目录号 8877, Lot #50K1435, 和 PEG400, 目录号 P-3265, 购买自 Sigma Chemical Co, St Louis, Missouri。

2. 磷酸盐缓冲液福尔马林, 目录号 245-685, 购买自 Fisher Scientific Co, Mddletown, VA。

3. 蒸馏水是自行生产的。

4. 乙醇, 目录号 E702-3, 购买自 Aldridge, Milwaukee, WI。

基本上使用 Longa 等在 *Stroke*, 20: 84-91(1989)中描述的病灶脑缺血的管腔内缝线模型。在左侧外颈静脉插入导管用于给予赋形剂或化合物。

为帮助大鼠在研究期间维持水化作用,在 MCAO 后 10, 24, 和 48 小时时在肋部的每边皮下注射 5%葡萄糖水溶液和乳酸盐林格氏溶液(各 5 毫升)。

将满足初始包含标准(神经学分数为 2 且体温 > 38.5℃)的大鼠进行随机地按顺序分配给赋形剂或化合物试验组。每天将初始每天分配的大鼠交换到一个特定的组。

MCAO 后 6 小时通过静脉内快速注射来开始用化合物或赋形剂处理,并通过使用 Infu Disk 泵继续持续输液 18 小时。将大鼠略麻醉,并通过背侧的颈切口露出颈静脉的导管。将推剂量的化合物或赋形剂快速浓注给大鼠施用,5 分钟后启动灌流泵。通过一个夹套将灌流泵附于大鼠的背後。

使用以体积比 5: 4: 1 的水: PEG400: 乙醇的载体每天制备新鲜的化合物溶液。在此模型中各组 and 所用剂量在下面的表 2 中列出。

表 2. 用于 t-MCAO 模型的化合物给药剂量

组	n	处理	推注剂量* (毫克/千克)	输液剂量 (mg/kg/小时)	推注化合物 (mg/ mL)	输液**化合物 (mg/ mL)
1	12	赋形剂	---	---	---	---
2	10	化合物	35	14	21.4	21.4

*推注剂量 0.49 毫升体积

**0.21ml / hr 的输液速度和 18 小时的输液时间。

使用改进的 Bederson 等 (1986) 描述的方法, 通过 7 份连续的 2, 3, 5-三苯基四唑氯化物 (TTC) 染色剂的图像分析来测定梗塞的体积。MCAO 三天后, 通过二氧化碳窒息将大鼠杀死并切去头。将脑迅速地从颅盖中取出, 并放置在冰浴上的含有 PBS 的专用烧杯中 30 分钟。使用脑基质切片获得 2 mm 厚度的花冠脑切片。在 37°C 下, 将脑切片放置在做了标记的、含有在 PBS 中的 2% TTC 的培氏培养皿中 20 分钟。TTC 将活脑组织染成红色, 余下白色缺血性部位。然后在 4°C 下将脑切片浸于 10% 中性缓冲液福尔马林中至少 24 小时。在死亡的 3 天之内将所有切片成像。

使用 Adobe Photoshop 程序和数字式摄像机, 数字化捕获经福尔马林稳定的 TTC 染色的脑切片 (7 个连续切片)。将图像导入 IPLab 图像分析程序。勾勒出并测定皮层梗塞的部位 (白色部位)。使用下面的公式计算梗塞体积:

$$\text{梗塞体积} = \sum \text{梗塞面积} \times 2 \text{ (在每个切片之间的距离)}$$

可类似地测定总的同侧和对侧的半球形的体积。从同侧半球形体积减去对侧半球形体积可计算出水肿的体积。让对大鼠的处理不知情的科学家进行分析。

使用 Bederson 等 (1986b) 描述的打分系统, 在 MCAO 后 2、24、48 和 72 小时评定大鼠的神经学功能。分数范围从 0-3, 用 0 作为正常, 3 表明严重缺陷。

使用局部缺血 2 小时的神经学分数作为研究中的包含标准。如果大鼠没有至少 2 分的神经学分数, 或如果具有 3 分的分数, 则将其从

研究中淘汰。让对大鼠的试验组不知情的研究员进行神经学评价。

在快速注射后的 5 分钟和在 4、22、46 和 70 小时从大鼠获得血样 (约 0.5 毫升) 用于药物动力学分析。将大鼠用异氟烷稍微麻醉。使用 23-规格的蝶形输液装置, 从侧面的尾部静脉将血液收集在肝素化的血液接收管 (0.6mL 容积) 中。在微型离心机中将血样旋转 4 分钟 (设定 10)。除去血浆, 放入做了标记的小瓶中, 并在 -20°C 冷冻存储。

MCAO 后七十二小时, 将大鼠用 CO_2 吸入剂深麻醉, 并通过心脏穿刺尽可能多地获得血液。将血液输入肝素化的血液接收管中 (6 毫升容积)。通过在 4000 rpm 下离心 5 分钟从血液中分离出血浆 (Allegra R6,)。收集血浆, 放入做了标记的塑料管中, 并在 -20°C 冷冻存储。

通过双尾 Student's t 检验来进行赋形剂和试验组之间的梗塞面积、血浆葡萄糖、体温和体重的统计分析。利用非变量分析来进行神经学分数的统计分析。数据用平均值 \pm SEM 表示。

在 MCAO 后 6 小时用式 I 的化合物处理能非常有效地减少暂时聚焦性中风模型的梗塞体积 (图 1)。与赋形剂对照组 ($418 \pm 31 \text{ mm}^3$, $p < 0.0001$) 相比, 化合物处理组 ($88 \pm 31 \text{ mm}^3$) 中的大鼠在总的梗塞体积上具有相当显著的 79% 的减少。与赋形剂对照组 ($272 \pm 22 \text{ mm}^3$, $p < 0.0001$) 对比, 在化合物处理组 ($32 \pm 20 \text{ mm}^3$) 中皮层缺血性损伤也有 88% 的显著减少。与赋形剂对照组 ($146 \pm 13 \text{ mm}^3$, $p < 0.0001$) 相比较, 用式 I 的化合物处理 ($55 \pm 12 \text{ mm}^3$) 能够显著地减少 62% 的纹状体的缺血性损伤。最后, 与赋形剂对照组 ($97 \pm 10 \text{ mm}^3$, $p < 0.0001$) 相比较, 用式 I 的化合物处理 ($21 \pm 10 \text{ mm}^3$) 能减少 79% 浮肿形成量。

在实验进程中, 用式 I 的化合物处理的大鼠在神经学功能方面显示了明显的改进 (图 2)。开始给药后 18 小时, 与赋形剂对照组相比, 能够观察到化合物处理组在神经学功能方面的显著改进 (分别为 1.3 ± 0.3 和 2 ± 0 单位, $p < 0.01$)。用化合物处理的大鼠的神经学分数继续改进, 以致于 MCAO 后 72 小时, 大鼠的功能有很少或没有可注意到的缺陷。相比之下, 在实验的进程中, 赋形剂处理的大鼠在神经学功能方面没有显示出改进。

实施例 20

抗抑郁剂的动物模型

通过基本上类似于 Porsolt R. D., 等, 1977; 229: 327-336; Bourin M. *Fundam Clin Phannacol* 1990; 4: 49-64 描述的方法, 在大鼠身上测定本发明的化合物的抗抑郁活性。

大鼠的游泳试验(抑郁试验)

将大鼠放置在一个可透明的装满水的圆筒中。将不动持续时间(=不动-时间)定义为大鼠为了保持其头在水面上而做最小的身体活动的时间, 人工记录这个时间。在第二个试验中, 在第 4 天将大鼠再次放置在圆筒中, 这次放置 5 分钟。人工记录整个试验的不动-时间。

试验 I(初次试验):

在第 1 天将雄性 Wistar 大鼠(RA239 系; 160-180g)放置在一个圆筒中 15 分钟。不动持续时间(=不动-时间), 定义为大鼠为了保持其头在水面上而做最小的身体活动的时间, 人工记录这个时间。为了测试动物在一天之内合理的数目, 将记录限制在下列 15 分钟内的三个子周期中。试验: 0-2.5 分钟(即在试验开始时), 6.25-8.75 分钟(正好在试验当中)和 12.5-15 分钟(试验全部结束)。以前已经发现这个方法可代表动物在整个试验中表现的行为。

试验 II(第二次试验):

在第 4 天将大鼠再次放置在圆筒中, 这次放置 5 分钟。人工记录整个试验的不动-时间。将化合物处理剂悬浮在 0.5%的甲基纤维素(甲基纤维素)中, 并口服给予(5ml / kg)。在第 1 天(试验 I 的当天)的晚上(约 16: 00)、在第 2 和第 3 天的早上(约 08: 00)和晚上和正好在试验 II(在第 4 天)之前 1 小时给予药物。对于二次试验的两个大鼠的处理是相似的或不同的, 取决于在试验 I 中的行为的随机性。用甲基纤维素或 15mg p. o. 地昔帕明(DMI)处理的大鼠组分别作为对照组和阳性

标准。

在上述模型中发现本发明的化合物显示出抗抑郁活性。

实施例 21

精神分裂症的动物模型：惊吓的悸动前抑制作用 (PPI)

与注意力和识别力的失调相联系的感觉运动控制的损伤在精神分裂症患者中是常见的。在精神分裂症患者中削弱了惊吓的悸动前抑制作用 (PPI)。当先于强声刺激的弱音抑制惊吓反射时，出现悸动前抑制作用。PPI 被认为是一种对于精神分裂症具有良好预见性、表面和内在验证的试验。

阳性对照，氯氮平，是可商业上获得的非典型的抗精神病药物 (Clozaril®)。氯氮平对于 D4 多巴胺和 5-HT₂ 受体具有高亲合性，并能在动物模型中有效地增强 PPI 响应值。

以下面的方式，通过基本上类似于 Spooren 等在 *Anxiolytic-like effects of the prototypical metabotropic glutamate receptor 5 antagonist 2-methyl-6-(phenylethynyl) pyridine in rodents. J Pharmacol Exp Ther.* 295: 1267-1275 (2000) 中描述的方法进行 PPI 的测定。

在实验之前至少 3 天，把四组雄性 C57BL / 6 (20-30g) 放入 macrolon 笼 (42x26x15 cm) 中。该套设施对温度和湿度进行了控制，并装有人工照明 (6: 00 AM-6: 00 PM, 开灯)。动物可以使用水和食物，不限量。所有的动物是试验性的当地动物。

将用于试验的动物用测试化合物 (30, 60, 100mg / kg)、氯氮平 (30mg / kg)、阳性对照或赋形剂 (0.5% 甲基纤维素) 预先处理。45 分钟后，将小鼠分别放入具有 70 dB 白噪声背景的箱中，使小鼠 10 分钟不受干扰。然后在 15 分钟期间进行 56 个试验。惊吓刺激物是 40ms-120db-白噪声声音，悸动前是 20ms-72、74 和 78 dB 的白噪声声音，然后惊吓 100ms。

进行八种类型的试验：悸动前加惊吓 (每个悸动前强度 7 个试

验), 单独的悸动前(每个悸动前强度 7 个试验), 单独的惊吓(7 个试验), 和没有刺激作用(7 个试验)。可变的试验间间隔平均为 15s(在 10 和 20 s 之间)。在没有-刺激作用的试验中, 测定基线。在惊吓单独试验中, 测定基础听觉惊吓振幅(g), 并在悸动前加惊吓试验中, 测定正常惊吓抑制作用的量并表示为基础惊吓的百分数。在悸动前单独试验中, 作为对照组来测定对微弱噪音的正常响应。按照下式计算悸动前的抑制作用, % PPI= $100-100 \times [(PA2 - PPP) / PA2]$ 。

我们发现本发明的化合物能够提高在小鼠身上的声学惊吓反射的 PPI。

实施例 22

抗焦虑剂的动物模型

以下面的方式, 通过基本上类似于 Spooren 等在 Anxiolytic-like effects of the prototypical metabotropic glutamate receptor 5 antagonist 2-261(1990) pyridine in rodents. J Pharmacol Exp Ther. 295: 1267-1275(2000)和 Lecci A, Borsini F, Voltera G 和 Meli A, Pharmacological validation of a novel animal model of anticipatory anxiety in mice. Psychopharmacology 101 : 255-261(1990)中描述的方法进行抗焦虑药的测定。

I. 紧张引起的高热症:

采用 Lecci 等(1990)原始描述的紧张引起的高热症的试验步骤, 稍有改进。手持小鼠接近尾根的部分, 将温度计(ELLAB instruments, Copenhagen, Denmark) 通过润滑的热敏探头(直径 2 mm)插入直肠内 20 mm 来测定直肠温度, 近似至 0.1°C。将探头放在适当的位置, 直到获得稳定的读数(在 15 s 之内)。

将十五个动物放置在一个 macrolon 笼中(42 x 26 x 15 cm)。实验之前至少 24 小时, 在动物的毛皮上用颜色给一个笼中的动物做出标记, 以便随后进行鉴别。测定直肠温度之前六十分钟, 用测试化合物(剂

量：1.3, 10 或 30 mg / kg, p. o.; 注射体积：10 ml / kg)、阳性对照物利眠宁-HCl(10 mg / kg, p. o.; Research Biochemicals International)或赋形剂(0.5%甲基纤维素; 硬树脂)以1分钟间隔连续处理一个笼内的所有个体。正好30分钟后,从笼中连续取出小鼠(再次以1分钟间隔),测定直肠温度并记录。一旦已经记录温度后,将动物放置在一个不同的(相邻的)笼内。因变量,即紧张引起的高热症,被定义为一个笼内的最初取出的六只小鼠的直肠温度中间值和最后取出的六只小鼠的直肠温度中间值的增量 δ 。根据具体试验组计算六至八笼的 δ ,使用六至八笼的平均值来代表最终值。此外,利用最初的动物的直肠温度来评定化合物本身对基础体温的潜在影响。

II. 大鼠的社交探索性试验:

使用成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠(=“常驻”大鼠; 350-400克)和幼年的 Lister Hooded 大鼠(=“闯入者”大鼠; 100-120克)。测试之前,将闯入者大鼠成对放置在 macrolon 笼(42 x 26 x 15 cm)内,常驻大鼠单个放置在 macrolon 笼(42 x 26 x 15 cm)内,放置2星期。所有的动物都被放在同一个房间。该套设施对温度和湿度进行了控制,并装有人工照明(6:00 AM-6:00 PM, 开灯)。动物可以使用水和食物,不限量。所有的大鼠是试验性的当地大鼠。

让动物接受测试化合物(剂量:0.3, 3, 10 或 30 毫克/千克)、利眠宁-HCl(5 毫克/千克, p. o.; cdz, Research Biochemicals International, Natick, MA), LiCl(10, 30 毫克/千克)作为参考/阳性化合物或赋形剂(0.5%甲基纤维素)。注射体积是2毫升/千克。只给闯入者大鼠口服给药,测试在给予化合物后1小时进行。在光照期间(8:00 AM-1:00 PM),在常驻大鼠的笼中进行所有观测(参见上面)。将笼底板用木屑覆盖。将由一只闯入者大鼠和一只常驻大鼠组成的一对大鼠随机地分配到实验或对照组中的一组中。人工评分闯入者大鼠对常驻大鼠的主动接近行为(嗅,肛门与生殖器的探究,用鼻子拱,梳毛,舔,游戏)的时间(=花在社交活动上的时间),并在5分钟内累积

报告。

III. 高架十字迷宫模型：(Elevated Plus Maze Test)

实验之前至少 3 天,将雄性成年 Sprague-Dawley 大鼠(180-220 g)以四个一群放入 macrolon 笼内(42 X 26 X 15 cm)。该套设施对温度和湿度进行了控制,并装有人工照明(6: 00 AM-6: 00 PM, 开灯)。动物可以使用水和食物,不限量。所有的动物是试验性的当地动物。

高架十字迷宫由两个开放式的悬臂(40 x 12 cm)和两个密封的悬臂(40 x 12 x 20 cm)组成,所有的悬臂从一个普通的中心平台上(12 x 12 cm)伸出。这种构型形成了加号的形状,相似的悬臂彼此相对,并将装置升高至超过中央基座的底板 60 cm。迷宫由灰色有机玻璃制成。围绕悬臂周长的小卷边(0.25 cm)有助于抓住开放悬臂。

以下面的方式,通过基本上类似于 Handley, S.L. 和 Mithani, S 在 *Naunyn-Schvziedeberg ' s Arch Pharmacol* 327: 1-5(1984)中的 Effects of α -adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of "fear"-motivated behaviour 所描述的方法来进行本方法。将大鼠随机地分配给各种处理组中的一组。至少在测试之前 1 小时将动物从放置房间运送到实验室。口服给予化合物后,将大鼠分别放在 macrolon 笼(22 x 16 x 14cm)中,60 分钟后将其放置在面对密封悬臂的中心平台上。进行 8 分钟的试验,彻底清理受试者之间迷宫。由位置接近于迷宫的观测者直接做记录,使用以下常规的参数:进入开放的和密封的悬臂的次数(将进入悬臂解释为所有的四只爪子都进入悬臂)和处于开放悬臂中的时间(不包括中心平台)。对来自不同试验组的动物进行交替测试,试验在 8: 30 AM 和 12: 30 PM 之间进行,即在光照阶段的前半段之内进行。记录了以下焦虑反射参数:在开放臂中的时间比例(开放式/总时间),离开第一个悬臂的等待时间,进入的悬臂总数。

在上述动物模型中,本发明的化合物显示了抗焦虑类药的效果。

实施例 23

对于阿尔茨海默氏病神经元存活的细胞测定

利用基本上类似于 Kienlen-Campard 等在 *J Biol Chem* 277: 15666 (2002) 中所描述的方法来进行以下测定。由 E18 大鼠胚胎来制备海马趾神经元的原始培养物 (Park 等, *J Neurochem*, 74: 114, 2000)。将细胞放在 6 或 96 孔培养皿 (4×10^5 个细胞/cm²) 中或玻璃盖片 (1.25×10^5 个细胞/cm²) 上, 用聚(D-赖氨酸)预处理, 并在补充有 2% B-27 和 0.5 mM L-谷氨酰胺的 NEUROBASAL™ 培养基中体外培养 6 天, 然后用重组腺病毒感染。在这样的条件下, 神经元培养物 (高达 98% 的神经元) 表现了高分化和高存活率。

制作了重组腺病毒和神经元感染 - 进行了编码 APP695 形式的突变株的腺病毒的产生、繁殖和纯化。体外 6 天后, 将神经元培养物在最小体积的培养基中以 4 小时重复 100 次的感染次数进行感染。然后用新鲜的培养基替代感染培养基 3-5 天。在这样的条件下, 至少 75% 神经元能表达重组腺病毒编码的蛋白质。

细胞存活-神经元存活是通过比色 MTT 测定法或利用 CellTracker 荧光细胞存活度测定法使用 Cellomics 自动成像系统测定的。为了核染色, 将细胞固定在 (0.37% 甲醛 / 0.2% 戊二醛的磷酸盐缓冲盐水溶液) 中, 并在 Hoechst 33342 染料 (1 μg / ml) 中孵育 30 分钟。

Aβ 产物的定量分析--收集培养基, 用蛋白酶抑制剂 (1 μg / ml 抑胃肽, 10 μg / ml 亮肽素, 1 mM 苯甲基磺酰氟) 处理, 离心 (16,000 x g, 5 min, 4°C) 清洗。使用如下所述的 ELISA 方法, 用 100 μl 的上清液来进行 β 淀粉样的定量分析。

实施例 24

β 淀粉样 (1-40) 产物的抑制作用

阿尔茨海默氏病的特征是, 在脑部存在细胞外动脉粥样斑和细胞间神经纤维缠结。这些动脉粥样斑的主要蛋白组分是从淀粉样前体蛋白 (“APP”) 断裂的 β 淀粉样 (“Aβ”) 肽。

细胞系和化合物的处理：

通过用既表达含有 Swedish 突变 (K595N, M596L) 的 APP695 又表达作为选择标示物的 YFP 的逆转录病毒载体进行转导，在人 H₄ 神经胶质瘤细胞中构建了能分泌 A β 的稳定的细胞株。表达 APP695 的稳定转导子是通过将表达高水平 YFP 的细胞分类来选择的。

将细胞以 80,000 个细胞/孔的量置于 96 孔平皿中，其中装有补充以 10% 胎牛血清 (FBS) 和青霉素/链霉素的 Dulbecco 's 改进的 Eagle 培养基。24 小时后，将培养基用新鲜的、含有目标化合物的培养基替换，其中以七-点滴定法一式两份测定从 20 μ M 至 10 nM 的化合物浓度范围。在 37°C 下，与测试化合物孵育 18-24 小时后，使用 hA β 40 ELISA 确定上清液中的 hA β (1-40) 浓度。

分泌出的 A β 的 ELISA 测定

用 Biosource International, Inc, Inc. Signal Select™ Human β Amyloid (hA β 40) ELISA (目录号 KHB3482) 来进行样品培养上清液中 hA β 40 的体外定量测定。将对 hA β 的 NH₂ 末端特异性的单克隆抗体涂布在微量滴定板的孔中。将包括已知 hA β 含量的标准的样品吸取到这些孔中，而后加入对 hA β 的 1-40 序列特异性的兔抗体。然后利用辣根过氧化物酶标记的抗兔抗体来检测结合的兔抗体。除去过量的抗兔抗体后，加入底物溶液，其被结合的酶切断而产生颜色。所产生的颜色强度与存在于样品中的 hA β (1-40) 的浓度直接成正比。

ELISA 测定以如下方式进行：

将样品和含有已知浓度 hA β (1-40) 肽的标准物在标准物/样品稀释剂 (Biosource 试剂) 中稀释。将蛋白酶抑制剂 AEBSF、抑肽酶、贝他定、E-64、亮肽素和抑胃肽 A (Calbiochem, Protease Inhibitor Cocktail Setm, catalog # 539134) 加入到所有的样品中，以防止 A β 肽的水解。将 100 μ l 的样品和标准物加入到 96 孔 ELISA 平皿的孔中，并在室温下培养 2 小时，或在 4°C 下过夜。用 100 μ l 洗涤缓冲液 (Biosource 试剂) 将孔洗涤 4 次，然后加入 100 μ l 的检测抗体，并将

平皿在室温下孵育 2 小时。检测抗体能够识别 hA β (1-40) 序列。

将孔用 100 μ l 的洗涤缓冲液洗涤 4 次，然后加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗兔二代抗体。将平皿在室温下孵育 2 小时。然后用 100 μ l 的洗涤缓冲液将孔洗涤 5 次，而后加入 100 μ l 的稳定化的色原。将平皿在室温下、在暗处孵育 30 分钟。稳定化的色原是一种底物溶液，其被结合的 HRP 切断后转变为蓝色，并因此可以在标准微量滴定板读数器上监控。然后加入 100 μ l 的停止溶液，使用 Molecular Devices SpectraMAX 340 平皿读数器在 450 nm 处测定孔中的颜色强度。典型地，以一式两份在 7-点剂量响应中进行化合物浓度范围从 20 μ M 至 10 nM 的化合物的分析。由含有已知 A β 肽浓度的标准物制出的标准曲线来计算样品中 A β (1-40) 的浓度。

用 3 天的时间测试本发明的化合物。每天，均包括作为对照物的 Calbiochem γ 分泌酶“抑制剂 X”。这是一种可渗透细胞的羟基乙烯二肽等排体 (目录号 565771)，据报道 IC₅₀ 值为 50 nM。

实施例 25

阿尔茨海默氏病 (AD) 的转基因动物实验

I. AD 转基因动物

过表达人类阿尔茨海默氏 β -淀粉样 (A β) 前体蛋白 (其含有 Lys670 \rightarrow 天冬酰胺、Met671 \rightarrow Leu 突变) 的 695-氨基酸异构体的转基因小鼠 (Tg2576 小鼠，从 Taconic N.Y 商购)，在空间参照物中具有正常的学习和记忆、以及在 3 月龄时的可改变任务功能，但显示其在 9 至 10 个月龄时这种功能受到削弱。A β (1-40) 增加五倍和 A β (1-42 / 43) 增加 14 倍会伴随着这些行为缺陷的出现。在 A β 数量提高的小鼠皮层和边缘组织中存在大量的用刚果红染料染色的 A β 动脉粥样斑。在这些转基因小鼠中出现暗示阿尔茨海默氏病的相关行为的、生化的和病理的反常，预示着探索这些疾病的病理生理学和神经生物学的新的时机。参见 Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice (在转基因小鼠中相关的记忆

缺陷、A β 提高和淀粉状动脉粥样斑)，Science 1996 年 10 月 4 日；274(5284)：99-102。

尽管在本文描述的模型中具体应用了 Tg2576 小鼠，但可以理解，可商业和私人提供的其它转基因小鼠，也可用于所述模型。

II. β -淀粉状 ELISA 方案

在阿尔茨海默氏病的 Tg2576 小鼠模型中 A β 和记忆之间的关系。*Journal of Neuroscience*, 3 月 1 日, 2002, 22(5): 1858-1867。

将冷冻的半脑用两步提取法依次提取[超声处理，在(1)2% SDS 和(2)70%甲酸(FA)中]。将后一部分称为 Abnsol。超声处理后，将样品在 4 $^{\circ}$ C 下以 100,000 x g 离心 1 小时，回收上清液，将沉淀用下一个溶液进行超声处理。通过夹入先前描述的 ELISA 来测定脑提取物(Suzuki 等, 1994; Gravina 等, 1995)。使用以下系统：(1)BAN-50 捕获和 BA-27 或 BC-05 检测或(2)3160 捕获和 BA-27 或 BC-05 检测，以上两种方法均分别检测 A β 1-40 和 A β 1-42。将由所有年龄组的小鼠获得的 Tg2576 脑直接比较，表明用 3160 捕获 ELISAs 检测的 A β 40 和 A β 42 的量基本上与用 BAN-50 捕获时的量相同。将 2%的 SDS 提取物以至少 1: 40 的比例稀释，以使测定可以在 0.05% SDS 中进行。对于 SDS 可使用更大量的稀释剂，以使其也可在 0.05% SDS 中测定。通过以 1: 20 的稀释比例加入到 1 M Tris 磷酸盐缓冲液 (pH8.0) 中来中和 FA 提取物。使用 Softmax 程序，通过比较样品的吸光度与已知浓度的合成的 A β -40 和 A β -42 (其在与样品相同的溶液中) 的吸光度，来计算每毫升毫微微摩尔值，并用原始组织均浆的湿重来校正这些值，最终以皮摩尔每克湿重来表示。在所有这些情况下，将非转基因组织与转基因组织并行同等地处置。

III. 转基因小鼠的行为实验：Morris 水迷宫

使 B6 /SJL 族背景的 Tg2576 小鼠以能够使我们检测和判别记忆丧失的整个阶段的方式适应水迷宫。此方案提供了所需要的敏感性、特

异性和动态范围，以测定生命早期敏感的和生命晚期迟钝的变化。在训练期间插入探头提供敏感性。采用行为缺陷的排除标准排举出特异性。广泛地训练提供了动态范围。平均探头分数的指定(MPSs)，即小鼠在三次探头试验期间在目标象限内所花时间的平均百分数，改进了与分子标示物相关的个体小鼠的认知行为的定量分析，并提供了具有广泛的动态范围的单一测定方法。用于其它族背景的 Tg2576 的方案，在学习速率和行为缺陷方面可能需要按族特异性的差别进行调整。参见 *The Relationship between A β and Memory in the Tg2576 Mouse Model of 阿尔茨海默氏病 Disease (在阿尔茨海默氏病的 Tg2576 小鼠模型中 A β 和记忆之间的关系)*。 *The Journal of Neuroscience*, 三月 1日, 2002 年, 22(5): 1858-1867。

水迷宫是一个环形的 1 或 1.2 m 的池子，装满 25-27℃ 的水，并通过加入无毒的白色涂料使其不透明。池子位于在由醒目图案的幕布和放有差别明显的物品的架子组成的固定空间记号中间。将小鼠放置在一个量杯中，并轻轻地将其面对池壁降入到水里。首先将小鼠进行 3 个连续日(每日八次试验)的可视平台训练，使其游泳至一个用黑色和白色条纹标杆标明的高台处(正方形表面 12 x 12 cm²)。将可视平台训练天数分成两个训练板块，每个板块进行四个试验用于统计分析。在可视平台训练期间，平台位置(NE, SE, SW 或 NW)和开始位置(N, NE, E, SE, S, SW, W 或 NW, 不包括与平台紧密相邻的位置)在每个试验中是伪随机改变的。伪随机化可保证所有的位置在所指定的位置重复之前都被抽样过。用 9 个连续日(每日四个试验)进行隐藏平台训练，其中使小鼠搜索淹没在水表面之下 1.5 厘米的平台。将在 60 秒之内没能达到平台的小鼠引向具有金属逃逸口的平台。在隐藏平台试验期间，平台位置保持恒定(NE, SE, SW, 或 NW)，并且小鼠在七个伪随机化选择的位置(N, NE, E, SE, S, SW, W 或 NW, 不包括与平台紧密邻接的位置)进入池子。每个隐藏平台试验结束后，将小鼠在平台上保留 30 秒钟，从平台取出，并使其回到它们的具有逃逸口的家笼中。小鼠迅速地学会将出口与从池子逃逸出来相关联，并不断地以出口为目标或在

出口出现时跟踪出口。小鼠取向或跟踪逃逸口的能力代表视觉和注意力的独立测定。在隐藏平台训练的第4、7和10天的开始时,进行探头试验,其中从池中取出平台,并使小鼠搜索平台60秒钟。用一架直接安装在池子上的相机监控所有的试验,并使用计算机处理跟踪系统进行报告和分析。

计算每个小鼠的MPS,并用其评价在Morris水迷宫中的空间信息的记忆力。通过整合由插入探头得来的信息,MPS表示与先前描述的学习指数在概念上相似的学习量度(Gallagher等,1993),其中抽样检验了在不同学习阶段的记忆。发现用MPS、学习指数和学习分数(在探头试验期间在目标象限耗费的时间百分数的加权总数)具有相似的统计结果,我们选择使用MPS表示我们的数据是由于其表示方法简单。

测试后,将每个小鼠组的子组进行安乐死,并将右半脑在液氮中冷冻,以用于A β 测量。将所有的脑以编码方式进行分析。

IV. 转基因小鼠的行为实验:探索活动,焦虑,和运动协调

参见 Transgenic mice expressing the β APP695SWE mutation: effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination. *Brain Res* 2003年7月; 977(1): 38-45.

在由白色丙烯酸制成的T-迷宫中测试自发交替。迷宫由一个每个边的侧面带有两个悬臂(长度:30 cm)的中心柄(长度:30 cm)组成。迷宫宽度是9 cm,每个壁高20 cm。在试验的初始阶段,将小鼠放置在T-迷宫柄中,利用塑料阻片阻断右悬臂(强迫选择)。进入可获取后的悬臂后,利用封闭它们后面的阻片将小鼠关在里面60秒钟。然后将小鼠取回,除去阻片后,立即将其放回在柄中做自由选择试验,其中小鼠可以探索相对的悬臂或同一个悬臂(四个爪的标准)。在以下的9天中,除了将在第一个试验中被阻断的悬臂在奇数天从右边转换过来,在偶数天保持在右边之外,重复相同的两个试验步骤。测定在选择试验期间的交替数目和响应之前的潜伏数目,每个试验具有1分钟的截止周期。如果小鼠在1分钟之内没有响应,并远离选择点,可从它们

后面略略进行刺针，通常不超过一次，以报告每个试验的响应值。

在开放领域测定机动活性，开放领域由具有 50x50 cm 表面积和 38 cm 高的侧壁的白色丙烯酸制成。通过高架的图像摄像机来报告并分析在中央和周围区的活动。中央带是正方形形状，并从距每个壁 25 厘米的距离处开始。将小鼠放置在开放领域的角落里，放置三天，每天 5-分钟时间。在每个区域中测定移动距离，并测定休息 ($< 2 \text{ cm / s}$)、迟缓移动 ($2-5 \text{ cm / s}$) 或迅速移动 ($> 5 \text{ cm / s}$) 所耗费的时间，以及在装置周围和中心所花费的时间。

高台十字迷宫由四个以十字形的悬臂(长度: 70 cm, 宽度: 10 cm, 由底板开始的高度: 40 cm) 和一个中心区 (10 cm^2) 组成。将两个悬臂的三个侧面用隔板(高度: 10 cm) 围起来, 而其它两个悬臂开放, 但带有用于避免下落的边缘(高度: 0.5 cm)。两个围起来或开放的悬臂彼此面对。将小鼠放置在中心区, 并测定进入次数和在封闭的和开放的悬臂中的时间, 测定两天, 每天 5 分钟, 用预先测试中使用的相同的电视轨道装置来测定。然后计算进入和停留开放/全部悬臂比例。在极少的时候, 当小鼠从开放悬臂掉下时, 停止报告时间并将小鼠放回到其掉下处的精确位置。每个自发交替时段、开放领域和十字迷宫测验后, 将装置用湿润布擦干净并在下一个试验开始之前进行干燥, 以降低可能产生的气味线索影响。

固定的横梁由直径 2.5 厘米和长度 110 cm 的塑料建造成。将横梁用一层白色胶纸带包上, 以确保稳固地控制, 并通过绘线型图分成 11 个部分。将横梁放置在距有保护层的底板高 45 cm 处, 该底板是用来缓冲下落并由此防止对小鼠造成损伤。将一个硬纸板隔板插入横梁的末端以防止小鼠从中逃逸。通过将小鼠放置在中部而开始试验。在单一四个试验期间, 测定交叉部分数目(四个爪的标准)、下落前潜伏时间和下落次数。截止周期是每个试验 1 分钟, 试验间的间隔为 15 分钟。

加速旋转棒 (Model 17650, Stoelting, Wood Dale, IL, USA) 是由有棱纹的塑料(直径: 3 厘米) 制成的。将横梁放置在距地平面 13.5 cm 的高度上, 并用塑料隔板分成五个部分(宽度: 5.5 cm)。面对远离实验者的视野, 将小鼠放置在与活动方向正相反的已旋转的棒 (4 rpm)

的上端，以使其下落时可以避免向前运动。将旋转棒在每个 5 分钟试验期间从 4 至 40 rpm 逐渐且平稳地加速。测定下落之前等待时间，在四个试验期间每天测定三次，试验期间间隔 15 分钟。只要小鼠在没有移动的情况下抓住棒(被动式旋转)连续两个整转，可认为小鼠已经下落。由于没有小鼠出现故意跳跃的行为，可以得到运动技能的有效评价。训练后，评定出现的各种正常的和病理的反射。

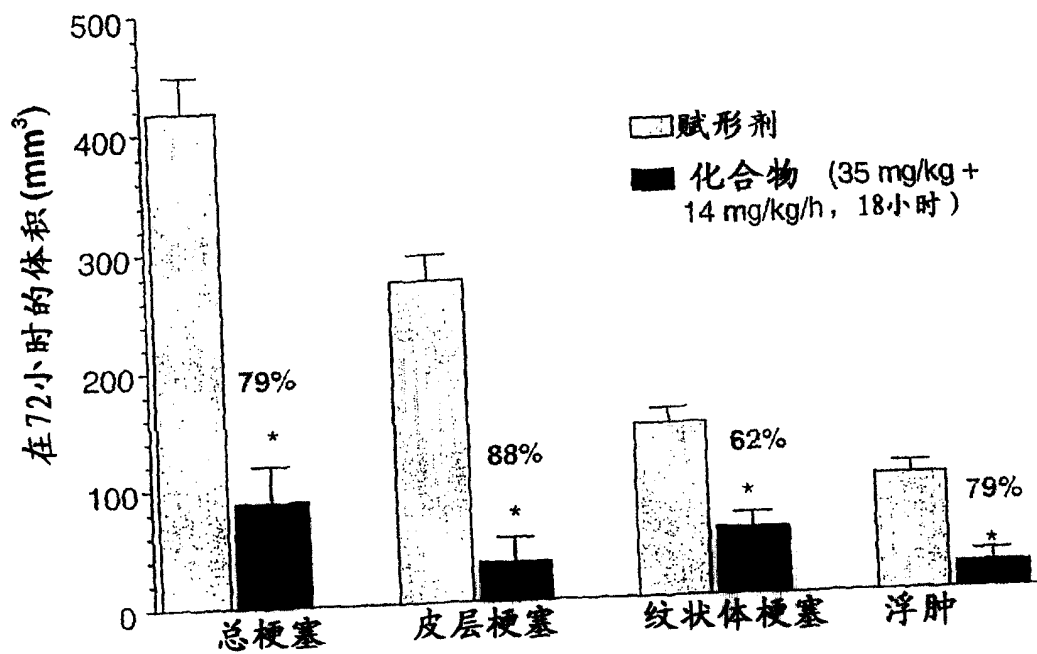
V. 利用免疫组织化学测定脑 β 淀粉状的累积

参见“在共表达突变的人类早老素基因 1 和淀粉状前体蛋白质的转基因小鼠中的加速动脉粥样斑累积，相伴随的学习缺陷，和 $\alpha 7$ 烟碱性受体蛋白的上调”(Accelerated plaque accumulation, associative learning deficits, and upregulation of $\alpha 7$ nicotinic receptor protein in transgenic mice co-expressing mutant human presenilin 1 and amyloid precursor proteins)。 *J Biol Chem* 2002 年六月 21 日; 277(25): 22768-80

用磷酸盐缓冲盐水(10 mM NaHPO₄, 150 mM NaCl, pH 7.2)给小鼠进行心脏灌注并用 4%多聚甲醛固定。使用恒冷切片机将冷冻脑部分切成 12 μ m 厚的花冠状切片，放在 ProbeOn Plus 载玻片(Fisher Scientific)上，并空气干燥。用丙酮将脑切片固定，然后立即染色。在 0.3% H₂O₂ 和 0.3% 正常山羊血清中将组织切片孵育 30 分钟，在磷酸缓冲盐水中洗涤，并在 1.5% 的正常山羊血清的磷酸缓冲盐水溶液中孵育 30 分钟。然后将脑切片用生物素化的抗小鼠 IgG(1: 200, Vector Laboratories)染色的抗- $\text{A}\beta$ 抗体 6E10(1: 1000, Senetik)一起孵育，并用 Vectastain ABC 试剂(1: 100, Vector Laboratories)进行免疫检测。对各切片用苏木素进行负染。

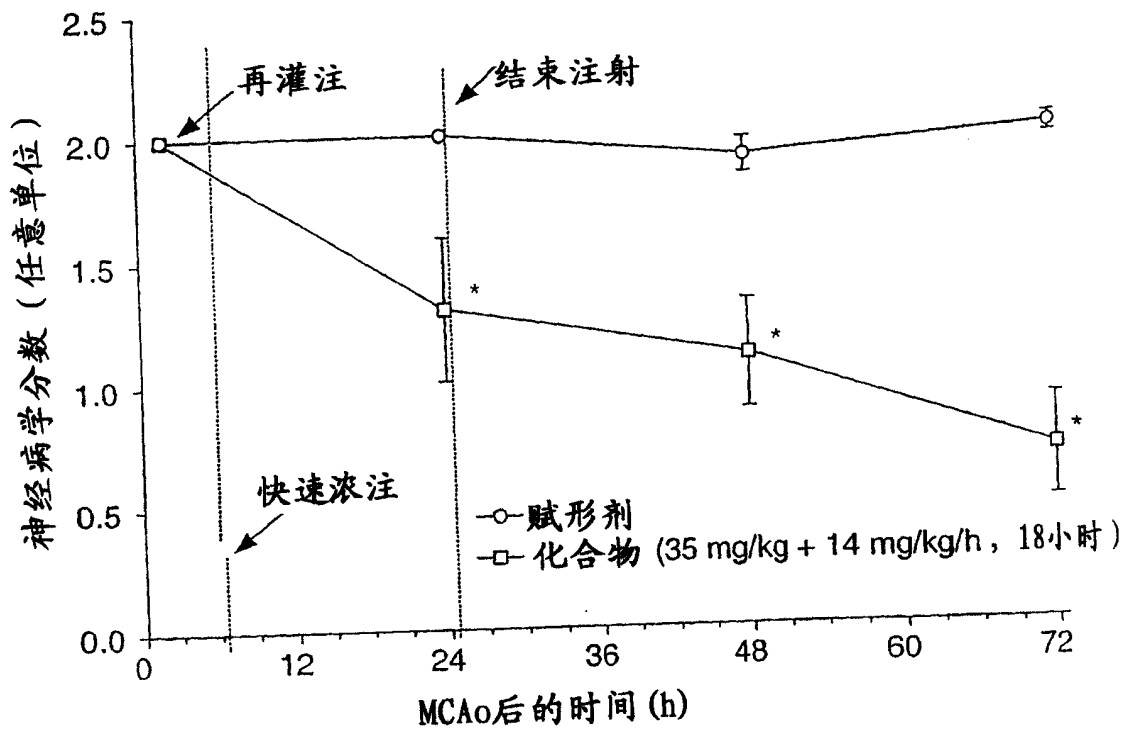
尽管上面已经描述了许多本发明的实施方案，但很明显可以改变我们的基础实施例，利用本发明的化合物和方法提供其它实施方案。因此，应理解本发明的范围是通过附加的权利要求而不是通过已经通过实施例表示的具体实施方案来定义的。

图1



* $p < 0.0001$, 与赋形剂对照组比较 (双尾Student's t-检验)
($n=12$ 赋形剂, 10)

图2



* $p < 0.05$, 与赋形剂对照组比较 (双尾Student's t-检验)