



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104703604 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 10

(21) 申请号 201380038158. 1

(22) 申请日 2013. 07. 16

(30) 优先权数据

61/672, 239 2012. 07. 16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 01. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/050719 2013. 07. 16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/014937 EN 2014. 01. 23

(71) 申请人 神经孔疗法股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 W·赖斯德罗

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 杨昀

(51) Int. Cl.

A61K 31/496(2006. 01)

权利要求书5页 说明书34页

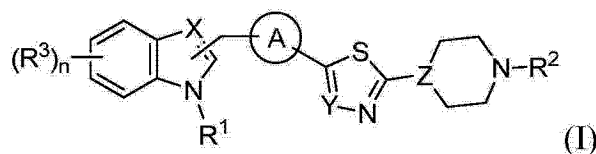
(54) 发明名称

作为蛋白质聚集抑制剂的二-和三-杂芳基
衍生物

(57) 摘要

本发明涉及某些二-和三-杂芳基衍生物、包含上述物质的药物组合物及其使用方法,所述方法包括防止、反转、延缓或抑制蛋白质聚集的方法和治疗蛋白质聚集相关疾病的方法,所述疾病包括神经变性疾病(如帕金森病、阿尔茨海默病、路易体病和多系统萎缩症)。

1. 一种式 I 的化合物,或其药学上可接受的盐:



其中

X、Y 和 Z 各自独立地是 CH 或 N;

R¹是 H、C₁₋₆烷基或 C₃₋₇环烷基;

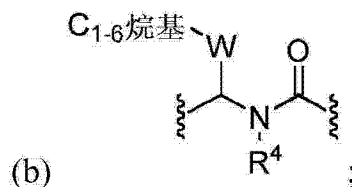
R²是 H、C₁₋₆烷基或 C₃₋₇环烷基;

R³各自独立地是卤素、羟基、C₁₋₄烷氧基、氰基、氨基或 -CF₃;

n 是 0、1 或 2;且

A 部分是:

(a) 由 C₁₋₆烷基取代的 5 元杂芳基环;或



其中 W 是 5 元杂芳基环、-C(O)NHNHC(O)-、-C(NH)NH- 或 -C(O)NHNH-;且

R⁴是 H 或 C₁₋₆烷基。

2. 如权利要求 1 所述的化合物,其特征在于, X 是 CH。

3. 如权利要求 1 所述的化合物,其特征在于, Y 是 CH。

4. 如权利要求 1 所述的化合物,其特征在于, Y 是 N。

5. 如权利要求 1 所述的化合物,其特征在于, Z 是 CH。

6. 如权利要求 1 所述的化合物,其特征在于, Z 是 N。

7. 如权利要求 1 所述的化合物,其中 R¹是 H 或甲基。

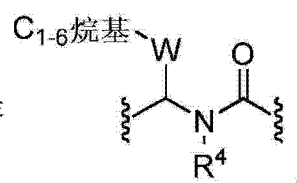
8. 如权利要求 1 所述的化合物,其中 R²是 H 或甲基。

9. 如权利要求 1 所述的化合物,其中 n 是 0 或 1。

10. 如权利要求 1 所述的化合物,其特征在于, A 部分是由 C₁₋₆烷基取代的 5 元杂芳基环。

11. 如权利要求 1 所述的化合物,其特征在于, A 部分是吡咯基、吡唑基、咪唑基、呋喃基、噁唑基、噁二唑基、噻吩基、噻唑基、噻二唑基、三唑基或四唑基,其各自由 C₁₋₆烷基取代。

12. 如权利要求 1 所述的化合物,其特征在于, A 部分是



13. 如权利要求 1 所述的化合物,其特征在于, W 是 5 元杂芳基环。

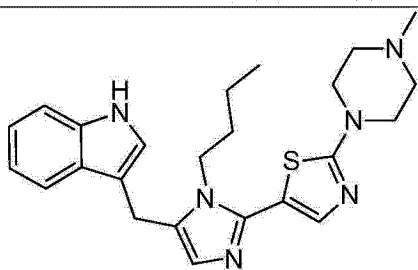
14. 如权利要求 1 所述的化合物,其特征在于, W 是吡咯基、吡唑基、咪唑基、呋喃基、噁

唑基、噁二唑基、噻吩基、噻唑基、噻二唑基、三唑基或四唑基。

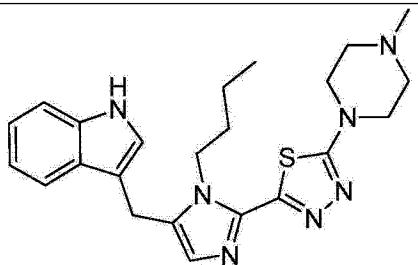
15. 如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, W 是 $-C(O)NHNHC(O)-$ 、 $-C(NH)NH-$ 或 $-C(O)NHNH-$ 。

16. 如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, R^4 是 H、甲基、乙基、丙基或异丙基。

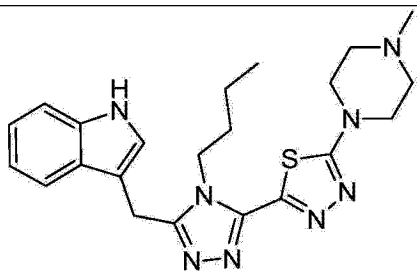
17. 一种选自下组的化合物:



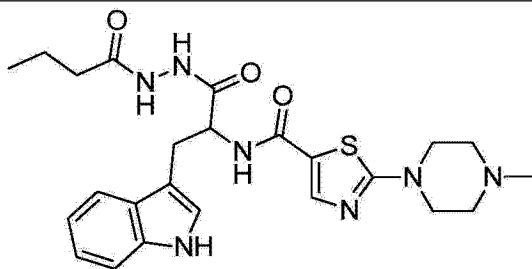
5-(5-((1*H*-吲哚-3-基)甲基)-1-丁基-1*H*-咪唑-2-基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑;



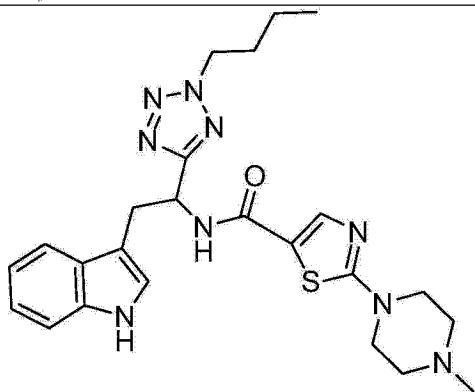
2-(5-((1*H*-吲哚-3-基)甲基)-1-丁基-1*H*-咪唑-2-基)-5-(4-甲基哌嗪-1-基)-1,3,4-噻二唑;



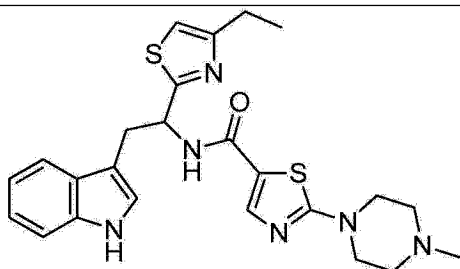
2-(5-((1*H*-吲哚-3-基)甲基)-4-丁基-4*H*-1,2,4-三唑-3-基)-5-(4-甲基哌嗪-1-基)-1,3,4-噻二唑;



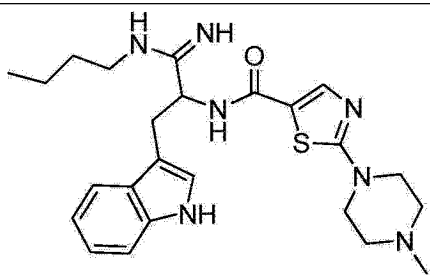
N-(1-(2-丁酰基胍基)-3-(1*H*-吲哚-3-基)-1-氧代丙-2-基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺;



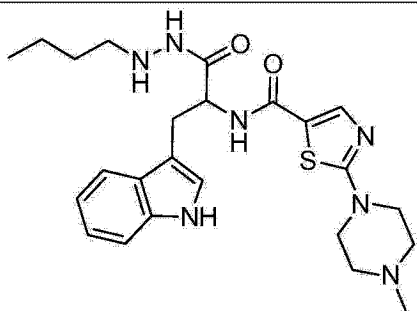
N-(1-(2-丁基-2*H*-四唑-5-基)-2-(1*H*-吲哚-3-基)乙基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺;



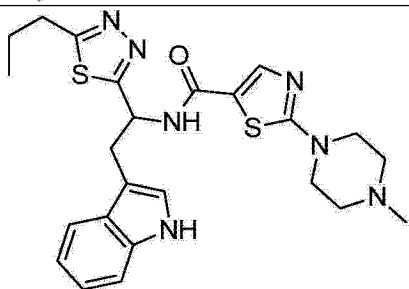
N-(1-(4-乙基噻唑-2-基)-2-(1*H*-吲哚-3-基)乙基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺;



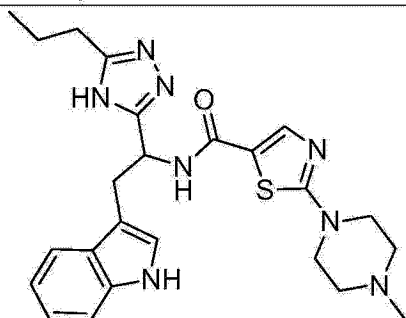
N-(1-(丁基氨基)-1-亚氨基-3-(1*H*-吡啶-3-基)丙-2-基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺;



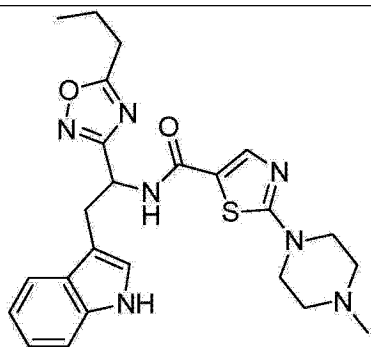
N-(1-(2-丁基胍基)-3-(1*H*-吡啶-3-基)-1-氧代丙-2-基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺;



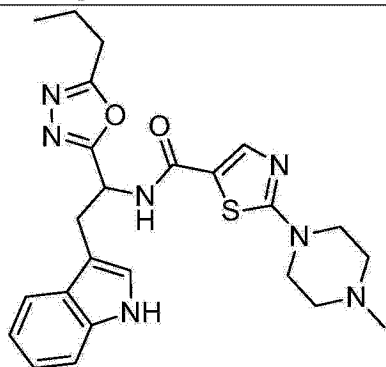
N-(2-(1*H*-吡啶-3-基)-1-(5-丙基-1,3,4-噻二唑-2-基)乙基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺;



N-(2-(1*H*-吡啶-3-基)-1-(5-丙基-4*H*-1,2,4-三唑-3-基)乙基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺;



N-(2-(1*H*-吲哚-3-基)-1-(5-丙基-1,2,4-噻二唑-3-基)乙基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺; 和



N-(2-(1*H*-吲哚-3-基)-1-(5-丙基-1,3,4-噻二唑-2-基)乙基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺;

及其药学上可接受的盐。

18. 一种药物组合物,所述药物组合物包含 (a) 至少一种式 I 的化合物,或其药学上可接受的盐,以及 (b) 药学上可接受的赋形剂。

19. 一种治疗与自噬或 PI3K-AKT-MTOR 通路相关联的疾病或医疗病症的方法,所述方法包括给予需要该治疗的患者有效量的至少一种式 I 的化合物或其药学上可接受的盐。

20. 如权利要求 25 所述的方法,所述疾病或医疗病症是阿尔茨海默病、帕金森病、额颞痴呆、路易体痴呆、PD 痴呆、多系统萎缩症和肌萎缩侧索硬化。

作为蛋白质聚集抑制剂的二 - 和三 - 杂芳基衍生物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2012 年 7 月 16 日提交的美国临时申请号 61/672, 239 的优先权, 其内容通过引用纳入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及某些二 - 和三 - 杂芳基衍生物、包含上述物质的药物组合物及其使用方法, 所述方法包括防止、反转、延缓或抑制蛋白质聚集的方法和治疗蛋白质聚集相关疾病的方法, 所述疾病包括神经变性疾病 (如帕金森病、阿尔茨海默病、路易体病和多系统萎缩症)。

背景技术

[0004] 老龄化群体的神经变性疾病 (如阿尔茨海默病 (AD)、帕金森病 (PD) 和额颞痴呆 (FTD)) 仅在美国和欧盟就影响了超过 2000 万人并成为老年人死亡的主要原因之一。这些神经疾病的共同点是蛋白质慢性累积成神经毒性的聚集体。各疾病的特征是受影响的特定神经元群体、涉及的特定蛋白质聚集体和神经元变性所导致的临床特征。

[0005] 研究表明, 蛋白质聚集的初始阶段涉及靶蛋白的突变或翻译后修饰 (如亚硝化、氧化), 其继而生成异常构象, 促进与类似错误折叠的蛋白质发生相互作用。异常蛋白随后聚集以形成二聚体、三聚体和更高级的多聚体 (也称作“可溶性寡聚体”), 其可能破坏突触功能。此外, 随后聚集体会固定在细胞膜中并形成球形寡聚体 (其进而会在膜中形成孔) 和 / 或原纤维或纤维。这些较大、不溶的纤维可以作为生物活性寡聚体的储器。

[0006] 这些神经变性疾病所涉及的特定蛋白质的特性和来源各异。例如, 在 AD 中, 神经毒性聚集体可由分泌蛋白质淀粉样 - β ($A\beta$) 组成。在原发性帕金森病 (IPD)、路易体痴呆 (LBD)、PD 痴呆 (PDD) 和多系统萎缩症 (MSA) 中, 神经毒性聚集体可由 α -突触核蛋白 (SYN) 组成, SYN 是一种正常条件下位于胞内的突触蛋白。在 FTD 和肌萎缩侧索硬化 (ALS) 中, 神经毒性聚集体源自其他胞内蛋白 (如 tau、TDP-43 或 SOD1)。对于特定疾病 (如 AD), SYN 与主要蛋白质聚集。因此, 干扰 SYN 聚集的化合物可能影响多种病因的神经变性疾病。

[0007] 这些神经变性过程涉及两种机制。在第一种机制中, 错误折叠和 / 或聚集的蛋白质固定至多种细胞膜结构。错误折叠或聚集的分子与质膜或细胞器 (如线粒体或溶酶体) 膜的结合会干扰蛋白质转录、自体吞噬、线粒体功能和孔形成。例如, 神经毒性 SYN 通过突触核蛋白 C 端区域的特定部分聚集并与细胞膜中的脂质相互作用。结合该区域的化合物可抑制蛋白质 - 蛋白质或蛋白质 - 脂质相互作用并因此用于阻碍神经毒性 SYN 寡聚化和膜相互作用。在第二过程中, 聚集的蛋白质从固定的亚基中释放并传播至相邻细胞。毒性蛋白聚集体的这一细胞至细胞传播可随后引起神经变性的解剖过程和症状恶化。与靶蛋白相互作用的小分子药物可限制释放和 / 或传播, 从而减少聚集蛋白质的神经毒性作用。因此, 该化合物可为 AD、PD、LBD、MSA 和相关神经变性病症提供新的疗法。

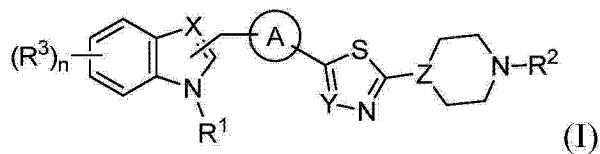
[0008] 仍然需要具有所需药物特性的蛋白质聚集抑制剂。本发明中, 已发现某些二 - 和

三-杂芳基衍生物具有蛋白质聚集调节活性。

发明内容

[0009] 在一个方面,本发明涉及以下式(I)的化学实体或其药学上可接受的盐:

[0010]



[0011] 其中

[0012] X、Y 和 Z 各自独立地是 CH 或 N;

[0013] R¹是 H、C₁₋₆烷基或 C₃₋₇环烷基;

[0014] R²是 H、C₁₋₆烷基或 C₃₋₇环烷基;

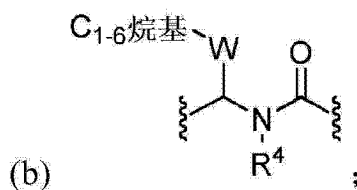
[0015] R³各自独立地是卤素、羟基、C₁₋₄烷氧基、氰基、氨基或 -CF₃;

[0016] n 是 0、1 或 2;且

[0017] A 部分是:

[0018] (a) 由 C₁₋₆烷基取代的 5 元杂芳基环;或

[0019]

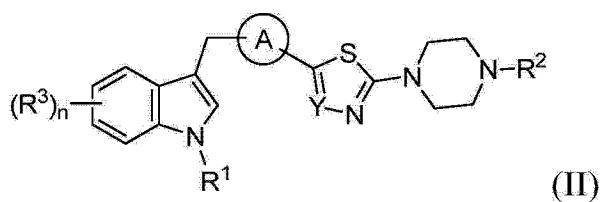


[0020] 其中 W 是 5 元杂芳基环、-C(O)NHNHC(O)-、-C(NH)NH- 或 -C(O)NHNH-;且

[0021] R⁴是 H 或 C₁₋₆烷基。

[0022] 在一个方面,本发明涉及以下式(II)的化学实体,或其药学上可接受的盐:

[0023]



[0024] 其中

[0025] Y 是 CH 或 N;

[0026] R¹是 H、C₁₋₆烷基或 C₃₋₇环烷基;

[0027] R²是 H、C₁₋₆烷基或 C₃₋₇环烷基;

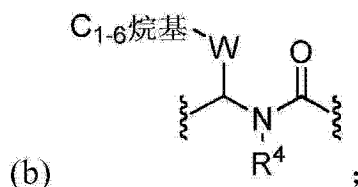
[0028] R³各自独立地是卤素、羟基、C₁₋₄烷氧基、氰基、氨基或 -CF₃;

[0029] n 是 0、1 或 2;且

[0030] A 部分是:

[0031] (a) 由 C₁₋₆烷基取代的 5 元杂芳基环;或

[0032]

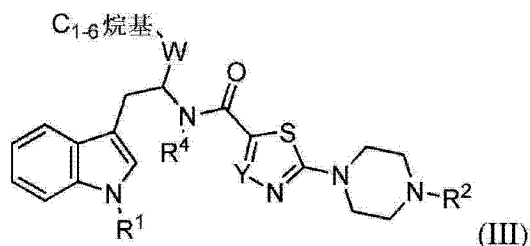


[0033] 其中 W 是 5 元杂芳基环、 $-C(O)NHNHC(O)-$ 、 $-C(NH)NH-$ 或 $-C(O)NHNH-$ ；且

[0034] R^4 是 H 或 C_{1-6} 烷基。

[0035] 在一个方面，本发明涉及以下式 (III) 的化学实体，或其药学上可接受的盐：

[0036]



[0037] 其中

[0038] Y 是 CH 或 N；

[0039] R^1 是 H 或 C_{1-6} 烷基；

[0040] R^2 是 H 或 C_{1-6} 烷基；

[0041] R^4 是 H 或 C_{1-6} 烷基；且

[0042] W 是 5 元杂芳基环、 $-C(O)NHNH-C(O)-$ 、 $-C(O)NHNH-$ 或 $-C(NH)NH-$ 。

[0043] 在某些实施方式中，式 (I)、(II) 或 (III) 的化合物是选自下文详述中所描述或列举的那些种类的化合物。

[0044] 在另一个方面，本发明涉及一种药物组合物，所述药物组合物包括至少一种式 (I)、(II) 或 (III) 的化合物或其药学上可接受的盐。根据本发明的药物组合物还可包括药学上可接受的赋形剂。本发明还涉及用作药物的式 (I)、(II) 或 (III) 的化合物或其药学上可接受的盐。

[0045] 在另一个方面，本发明涉及治疗与蛋白质聚集相关的神经变性疾病或病症的方法，所述方法包括向需要该治疗的患者给予有效量的至少一种式 (I)、(II) 或 (III) 的化合物或其药学上可接受的盐。

[0046] 在另一个方面，本发明涉及治疗与蛋白质聚集相关的疾病或医疗病症的方法，所述方法包括向需要该治疗的患者给予有效量的至少一种式 (I)、(II) 或 (III) 的化合物或其药学上可接受的盐。本发明还涉及式 (I)、(II) 或 (III) 的化合物在制备用于治疗所述疾病和医疗病症的药物中的用途，以及该化合物和盐用于治疗所述疾病和医疗病症的用途。

[0047] 在另一个方面，本发明涉及干扰细胞中蛋白质或肽聚集的累积或防止、延缓、反转或抑制细胞中蛋白质或肽聚集的方法，所述方法包括将细胞与有效量的至少一种式 (I)、(II) 或 (III) 的化合物或其盐和 / 或与至少一种本发明的药物组合物接触，其中所述接触是体外、离体或体内。

[0048] 本领域普通技术人员应理解，式 (II) 和式 (III) 的化合物是式 (I) 的化合物。

[0049] 从下文的详述中和通过本发明的实践能够很容易地了解本发明的其他实施方式、

特征和优点。

[0050] 为简便起见,该说明书中引用的出版物的内容(包括专利)通过引用纳入本文。

具体实施方式

[0051] 本发明涉及某些二-和三-杂芳基衍生物、包含上述物质的药物组合物及其使用方法,所述方法包括防止、反转、延缓或抑制蛋白质聚集的方法和治疗蛋白质聚集相关疾病的方法,所述疾病包括神经变性疾病(如帕金森病、阿尔茨海默病、路易体病和多系统萎缩症)。

[0052] 在进一步描述本发明之前,应理解,本发明不限于所述的具体实施方式,因为它们当然可能变化。还应理解,本文所用术语的目的仅是描述具体实施方式,不用来构成限制,因为本发明的范围仅受所附权利要求书的限制。

[0053] 必须注意到,本文和所附权利要求书所用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数含义,除非上下文另有明确说明。还应注意到,权利要求书可撰写成排除任何任选要素。同样,这种说明应用作引用权利要求元素相关地使用这类排除性术语,如“只有”、“仅仅”等,或使用“负/否”限制的前提基础。

[0054] 本文所用术语“包含”、“含有”和“包括”以其开放、非限定的含义使用。

[0055] 为提供更简明的描述,本文中的一些定量表达前不使用术语“约”。应理解无论是否明确地使用术语“约”,本文中的每个含量均表示实际给定的数值,且其还表示基于本领域普通技术所能合理推断的给定数值的近似值,包括由于实验和/或测量条件产生的这类给定数值的等同值和近似值。无论何时以百分比表示产率时,这类产率表示在特定的化学计量比条件下用于计算产率的实体质量与同一实体所能获得的最大量的比值。百分比形式的浓度表示质量比率,除非另有说明。

[0056] 除非另有说明,本文所用的所有科技术语与本发明所属领域普通技术人员所理解的通常含义相同。虽然也可采用与本文所述类似或等同的任何方法和材料实施或测试本发明,但以下描述优选的方法和材料。本文提及的所有出版物均通过引用纳入本文,以公开和描述与所引用出版物相关的方法和/或材料。

[0057] 除非另有说明,本发明实施方式的方法和技术一般遵循本领域熟知的传统方法进行并如若干一般的或更特定的参考文献中所述,所述参考文献贯穿本说明书引用和讨论。参见,例如, Loudon, Organic Chemistry(《有机化学》),第四版;纽约:牛津大学出版社(Oxford University Press),2002,第360-361、1084-1085页;Smith和March, March's Advanced Organic Chemistry:Reactions, Mechanisms, and Structure(《麻尺高级有机化学:反应、机制和结构》),第五版,韦利科学公司(Wiley-Interscience),2001。

[0058] 本文用于命名主题化合物的命名法在本文的实施例中说明。该命名法一般采用市售可得的 AutoNom 软件(加利福尼亚州圣里安德鲁的 MDL 公司)获得。

[0059] 应理解,为清楚起见,在单独的各实施方式的上下文内容中描述的本发明的一些特征还可以合并单个的实施方式中提供。反之,在单个实施方式的内容中简短描述的本发明的各特征也可以单独提供或以任何合适的子组合的形式提供。与由可变形式代表的化学基团相关的实施方式的所有组合均特定包含在本发明范围内并由本文公开,形同本文单独且明确地公开每个和各个组合以至此类组合包含自身为稳定化合物的化合物(即,可分

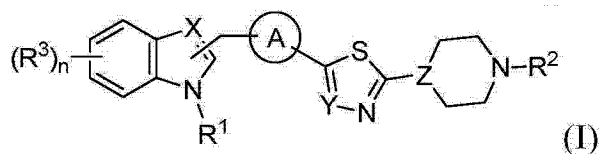
离、表征和检测生物学活性的化合物)。此外,描述此类可变形式的实施方式中所列的化学基团的所有子组合也特定包含在本发明范围内并由本文公开,形同本文单独且明确地公开所述化学基团的每个和各个此类子组合。

[0060] 代表性实施方式

[0061] 式 (I)

[0062] 在一个方面,本发明涉及以下式 (I) 的化学实体或其药学上可接受的盐:

[0063]



[0064] 其中

[0065] X、Y 和 Z 各自独立地是 CH 或 N;

[0066] R¹ 是 H、C₁₋₆烷基或 C₃₋₇环烷基;

[0067] R² 是 H、C₁₋₆烷基或 C₃₋₇环烷基;

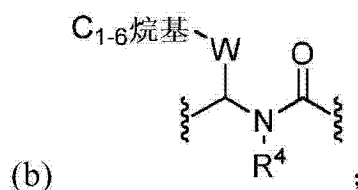
[0068] R³ 各自独立地是卤素、羟基、C₁₋₄烷氧基、氰基、氨基或 -CF₃;

[0069] n 是 0、1 或 2;且

[0070] A 部分是:

[0071] (a) 由 C₁₋₆烷基取代的 5 元杂芳基环;或

[0072]



[0073] 其中 W 是 5 元杂芳基环、-C(O)NHNHC(O)-、-C(NH)NH- 或 -C(O)NHNH-;且

[0074] R⁴ 是 H 或 C₁₋₆烷基。

[0075] 在式 (I) 的一些实施方式中, X 是 CH。在某些示例中, X 是 N。在某些示例中, Y 是 CH。在某些示例中, Y 是 CH。在某些示例中, Z 是 CH。在某些示例中, Z 是 N。

[0076] 在式 (I) 的一些实施方式中, R¹ 是 H 或 C₁₋₆烷基。在某些示例中, R¹ 是 C₁₋₆烷基。在某些示例中, R¹ 是甲基或乙基。在某些示例中, R¹ 是甲基。在某些示例中, R¹ 是 H 或甲基。在某些示例中, R¹ 是 C₃₋₇环烷基。在某些示例中, R¹ 是环丙基、环丁基、环戊基或环己基。

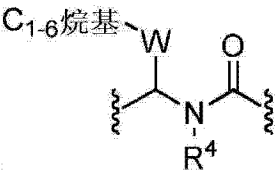
[0077] 在式 (I) 的一些实施方式中, R² 是 H 或 C₁₋₆烷基。在某些示例中, R² 是甲基或乙基。在某些示例中, R² 是 H 或甲基。在某些示例中, R² 是 C₃₋₇环烷基。在某些示例中, R² 是环丙基、环丁基、环戊基或环己基。

[0078] 在式 (I) 的某些实施方式中, R³ 各自独立地是 Br、Cl、F、羟基、甲氧基、氰基、氨基或 -CF₃。

[0079] 在式 (I) 的一些实施方式中, n 是 0 或 1。在其它实施方式中, n 是 0。

[0080] 在式 (I) 的一些实施方式中, A 部分是由 C₁₋₆烷基取代的 5 元杂芳基环。在某些示例中, 所述 5 元杂芳基环包含选自 N、S 和 O 的一个、两个、三个或四个杂原子。在某些实

施方式中,所述 5 元杂芳基环包含一个、两个或三个杂原子。在某些示例中,A 部分是吡咯基、吡唑基、咪唑基、呋喃基、噁唑基、噁二唑基、噻吩基、噻唑基、噻二唑基、三唑基或四唑基,其各自由 C_{1-6} 烷基取代。在某些示例中,A 部分是咪唑基或 1,3,4-三唑基,其各自由 C_{1-6} 烷基取代。

[0081] 在其它实施方式中,A 部分是  在一些实施方式中,W 是 5 元杂

芳基环。在某些示例中,所述 5 元杂芳基环包含选自 N、S 和 O 的一个、两个、三个或四个杂原子。在某些实施方式中,所述 5 元杂芳基环包含一个、两个或三个杂原子。在其它实施方式中,W 是吡咯基、吡唑基、咪唑基、呋喃基、噁唑基、噁二唑基、噻吩基、噻唑基、噻二唑基、三唑基或四唑基。在某些示例中,W 是四唑基、噻佐剂、噻二唑基、三唑基或噁二唑基,其各自由 C_{1-6} 烷基取代。在某些示例中,W 是四唑基、噻唑基、噻二唑基、三唑基或噁二唑基,并且所连接的 C_{1-6} 烷基是甲基、乙基、丙基或丁基。

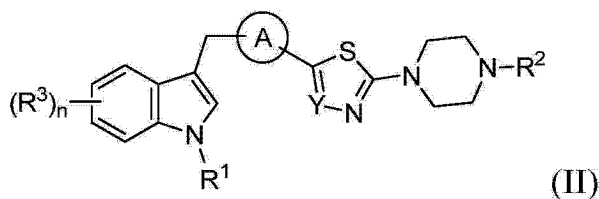
[0082] 在式 (I) 的其它实施方式中,W 是 $-C(O)NHNHC(O)-$ 、 $-C(NH)NH-$ 或 $-C(O)NHNH-$ 。

[0083] 在式 (I) 的一些实施方式中, R^4 是 H、甲基、乙基、丙基或异丙基。在其它实施方式中, R^4 是 H。

[0084] 式 II

[0085] 在另一方面,本发明提供式 (II) 化合物,或其药学上可接受的盐:

[0086]



[0087] 其中

[0088] Y 是 CH 或 N;

[0089] R^1 是 H、 C_{1-6} 烷基或 C_{3-7} 环烷基;

[0090] R^2 是 H、 C_{1-6} 烷基或 C_{3-7} 环烷基;

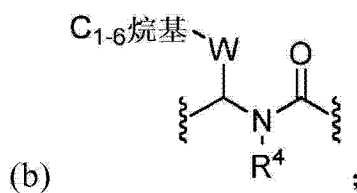
[0091] R^3 各自独立地是卤素、羟基、 C_{1-4} 烷氧基、氰基、氨基或 $-CF_3$;

[0092] n 是 0、1 或 2;且

[0093] A 部分是:

[0094] (a) 由 C_{1-6} 烷基取代的 5 元杂芳基环;或

[0095]



[0096] 其中 W 是 5 元杂芳基环、 $-C(O)NHNHC(O)-$ 、 $-C(NH)NH-$ 或 $-C(O)NHNH-$;且

[0097] R^4 是 H 或 C_{1-6} 烷基。

[0098] 在式 (II) 的一些实施方式中, Y 是 CH。在某些示例中, Y 是 N。

[0099] 在式 (II) 的一些实施方式中, R^1 是 H 或 C_{1-6} 烷基。在某些示例中, R^1 是 C_{1-6} 烷基。在某些示例中, R^1 是甲基或乙基。在某些示例中, R^1 是甲基。在某些示例中, R^1 是 H 或甲基。在某些示例中, R^1 是 C_{3-7} 环烷基。在某些示例中, R^1 是环丙基、环丁基、环戊基或环己基。

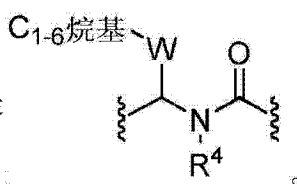
[0100] 在式 (II) 的一些实施方式中, R^2 是 H 或 C_{1-6} 烷基。在某些示例中, R^2 是甲基或乙基。在某些示例中, R^2 是 H 或甲基。在某些示例中, R^2 是 C_{3-7} 环烷基。在某些示例中, R^2 是环丙基、环丁基、环戊基或环己基。

[0101] 在式 (II) 的某些实施方式中, R^3 各自独立地是 Br、Cl、F、羟基、甲氧基、氰基、氨基或 $-CF_3$ 。

[0102] 在式 (II) 的一些实施方式中, n 是 0 或 1。在其它实施方式中, n 是 0。

[0103] 在式 (II) 的一些实施方式中, A 部分是由 C_{1-6} 烷基取代的 5 元杂芳基环。在某些示例中, 所述 5 元杂芳基环包含选自 N、S 和 O 的一个、两个、三个或四个杂原子。在某些实施方式中, 所述 5 元杂芳基环包含一个、两个或三个杂原子。在某些示例中, A 部分是吡咯基、吡唑基、咪唑基、呋喃基、噁唑基、噁二唑基、噻吩基、噻唑基、噻二唑基、三唑基或四唑基, 其各自由 C_{1-6} 烷基取代。在某些示例中, A 部分是咪唑基或 1, 3, 4-三唑基, 其各自由 C_{1-6} 烷基取代。

[0104] 在其它实施方式中, A 部分是



在一些实施方式中, W 是 5 元杂

芳基环。在某些示例中, 所述 5 元杂芳基环包含选自 N、S 和 O 的一个、两个、三个或四个杂原子。在某些实施方式中, 所述 5 元杂芳基环包含一个、两个或三个杂原子。在其它实施方式中, W 是吡咯基、吡唑基、咪唑基、呋喃基、噁唑基、噁二唑基、噻吩基、噻唑基、噻二唑基、三唑基或四唑基。在某些示例中, W 是四唑基、噻佐剂、噻二唑基、三唑基或噁二唑基, 其各自由 C_{1-6} 烷基取代。在某些示例中, W 是四唑基、噻唑基、噻二唑基、三唑基或噁二唑基, 并且所连接的 C_{1-6} 烷基是甲基、乙基、丙基或丁基。

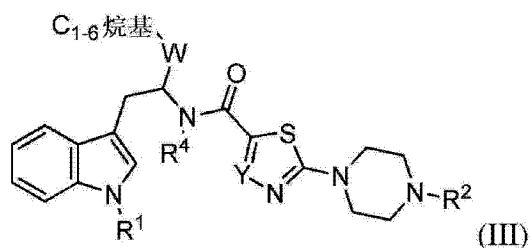
[0105] 在式 (II) 的其它实施方式中, W 是 $-C(O)NHNHC(O)-$ 、 $-C(NH)NH-$ 或 $-C(O)NHNH-$ 。

[0106] 在式 (II) 的一些实施方式中, R^4 是 H、甲基、乙基、丙基或异丙基。在其它实施方式中, R^4 是 H。

[0107] 式 III

[0108] 在另一方面, 本发明提供式 (III) 化合物, 或其药学上可接受的盐:

[0109]



[0110] 其中

[0111] Y 是 CH 或 N；

[0112] R^1 是 H 或 C_{1-6} 烷基；

[0113] R^2 是 H 或 C_{1-6} 烷基；

[0114] R^4 是 H 或 C_{1-6} 烷基；且

[0115] W 是 5 元杂芳基环、 $-C(O)NHNH-C(O)-$ 、 $-C(O)NHNH-$ 或 $-C(NH)NH-$ 。

[0116] 在式 (III) 的一些实施方式中, W 是 5 元杂芳基环。在某些示例中, 所述 5 元杂芳基环包含选自 N、S 和 O 的一个、两个、三个或四个杂原子。在某些实施方式中, 所述 5 元杂芳基环包含一个、两个或三个杂原子。在其它实施方式中, W 是吡咯基、吡唑基、咪唑基、呋喃基、噁唑基、噁二唑基、噻吩基、噻唑基、噻二唑基、三唑基或四唑基。在某些示例中, W 是四唑基、噻佐剂、噻二唑基、三唑基或噁二唑基, 其各自由 C_{1-6} 烷基取代。在某些示例中, W 是四唑基、噻唑基、噻二唑基、三唑基或噁二唑基, 并且所连接的 C_{1-6} 烷基是甲基、乙基、丙基或丁基。

[0117] 在式 (III) 的其它实施方式中, W 是 $-C(O)NHNHC(O)-$ 、 $-C(NH)NH-$ 或 $-C(NH)NH-$ 。

[0118] 在式 (III) 的一些实施方式中, Y 是 CH。在其它实施方式中, Y 是 N。

[0119] 在式 (III) 的一些实施方式中, R^1 是 H、甲基、乙基、丙基或异丙基。在其它实施方式中, R^1 是 H。

[0120] 在式 (III) 的一些实施方式中, R^2 是 H、甲基、乙基、丙基或异丙基。在其它实施方式中, R^2 是 H 或甲基。而在其它实施方式中, R^2 是甲基。

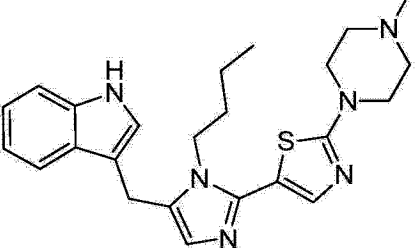
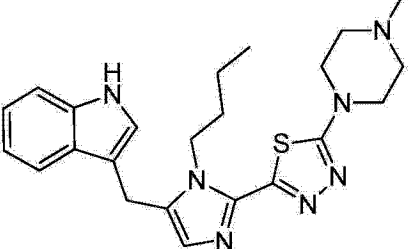
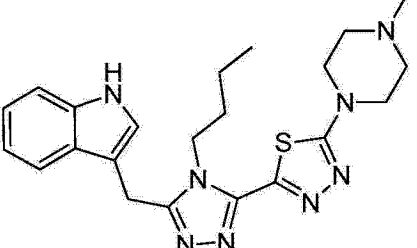
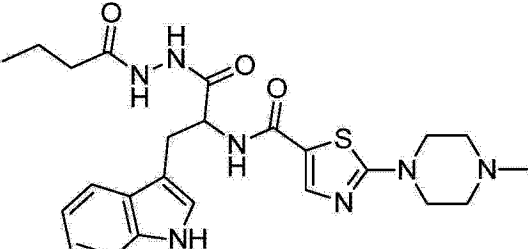
[0121] 在式 (III) 的一些实施方式中, R^4 是 H 或甲基。而在其它实施方式中, R^4 是 H。

[0122] 在其他实施方式中, 本发明涉及选自以下组的化合物：

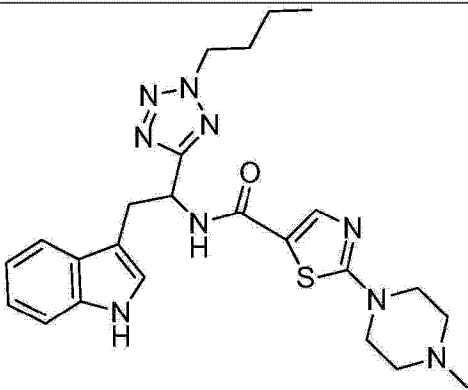
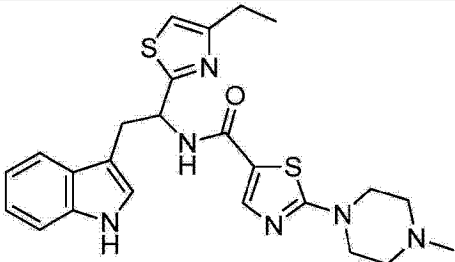
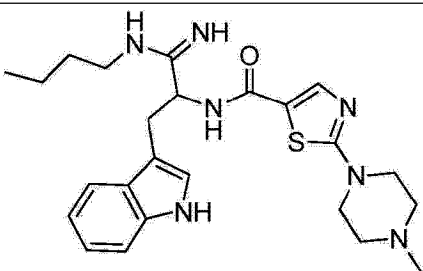
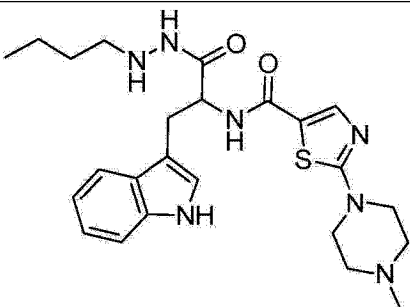
[0123]

实 施 例	结构/化学名

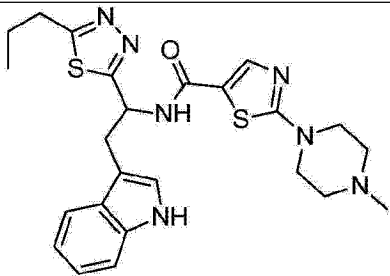
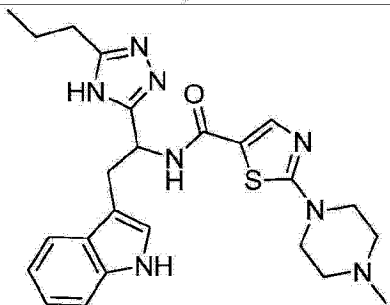
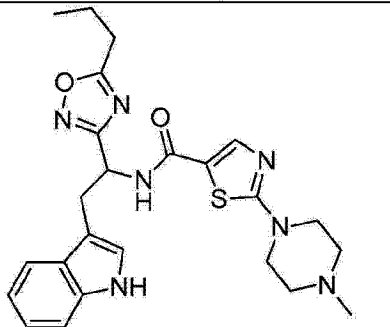
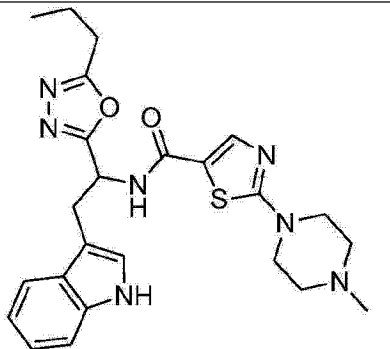
[0124]

1	 5-(5-((1<i>H</i>-吡啶-3-基)甲基)-1-丁基-1<i>H</i>-咪唑-2-基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑;
2	 2-(5-((1<i>H</i>-吡啶-3-基)甲基)-1-丁基-1<i>H</i>-咪唑-2-基)-5-(4-甲基哌嗪-1-基)-1,3,4-噻二唑;
3	 2-(5-((1<i>H</i>-吡啶-3-基)甲基)-4-丁基-4<i>H</i>-1,2,4-三唑-3-基)-5-(4-甲基哌嗪-1-基)-1,3,4-噻二唑;
4	 <i>N</i>-(1-(2-丁酰基肼基)-3-(1<i>H</i>-吡啶-3-基)-1-氧代丙-2-基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺;

[0125]

5	 <i>N</i>-(1-(2-丁基-2<i>H</i>-四唑-5-基)-2-(1<i>H</i>-吲哚-3-基)乙基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺;
6	 <i>N</i>-(1-(4-乙基噻唑-2-基)-2-(1<i>H</i>-吲哚-3-基)乙基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺;
7	 <i>N</i>-(1-(丁基氨基)-1-亚氨基-3-(1<i>H</i>-吲哚-3-基)丙-2-基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺;
8	 <i>N</i>-(1-(2-丁基胍基)-3-(1<i>H</i>-吲哚-3-基)-1-氧代丙-2-基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺;

[0126]

9	 <i>N</i>-(2-(1<i>H</i>-吲哚-3-基)-1-(5-丙基-1,3,4-噻二唑-2-基)乙基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺;
10	 <i>N</i>-(2-(1<i>H</i>-吲哚-3-基)-1-(5-丙基-4<i>H</i>-1,2,4-三唑-3-基)乙基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺;
11	 <i>N</i>-(2-(1<i>H</i>-吲哚-3-基)-1-(5-丙基-1,2,4-噻二唑-3-基)乙基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺; 和
12	 <i>N</i>-(2-(1<i>H</i>-吲哚-3-基)-1-(5-丙基-1,3,4-噻二唑-2-基)乙基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺;

[0127] 及其药学上可接受的盐。

[0128] 公开的药物组合物可作为公开化合物的药学上可接受的盐的形式制备。药学上可

接受的盐是具有游离碱的所需药物活性的化合物的游离碱形式的无毒盐。这些盐可源自无机或有机酸。药学上可接受的盐的非限制性示例包括硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、磷酸盐、磷酸一氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、乙酸盐、丙酸盐、癸酸盐、辛酸盐、丙烯酸盐、甲酸盐、异丁酸盐、己酸盐、庚酸盐、丙炔酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、反丁烯二酸盐、马来酸盐、丁炔-1,4-二酸盐、己炔-1,6-二酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、邻苯二甲酸盐、磺酸盐、甲基磺酸盐、丙基磺酸盐、甲磺酸盐、二甲苯磺酸盐、萘-1-磺酸盐、萘-2-磺酸盐、苯基乙酸盐、苯基丙酸盐、苯基丁酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、 γ -羟基丁酸盐、羟基丁酸盐、乙醇酸盐、酒石酸盐和扁桃酸盐。其它合适的药学上可接受的盐的列表可见于Remington's Pharmaceutical Sciences(《雷明顿药物科学》),第17版,宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版公司(Mack Publishing Company),1985。

[0129] 一般定义

[0130] 除非另有说明,本文所用的所有科技术语与本发明所属领域普通技术人员所理解的通常含义相同。本文所引用的所有专利、申请、公开申请和其它出版物均通过引用全文纳入。如果这部分所列定义与通过引用纳入本文的专利、申请或其他出版物中所列的定义相反或不一致,则这部分所列的定义优于通过引用纳入本文的定义。

[0131] 本文所用术语“包含”、“含有”和“包括”以其开放、非限定的含义使用。

[0132] 为提供更简明的描述,本文中的一些定量表达前不使用术语“约”。应理解无论是否明确地使用术语“约”,本文中的每个含量均表示实际给定的数值,且其还表示基于本领域普通技术所能合理推断的给定数值的近似值,包括由于实验和/或测量条件产生的这类给定数值的等同值和近似值。无论何时以百分比表示产率时,这类产率表示在特定的化学计量比条件下用于计算产率的实体质量与同一实体所能获得的最大量的比值。百分比形式的浓度表示质量比率,除非另有说明。

[0133] 化学定义

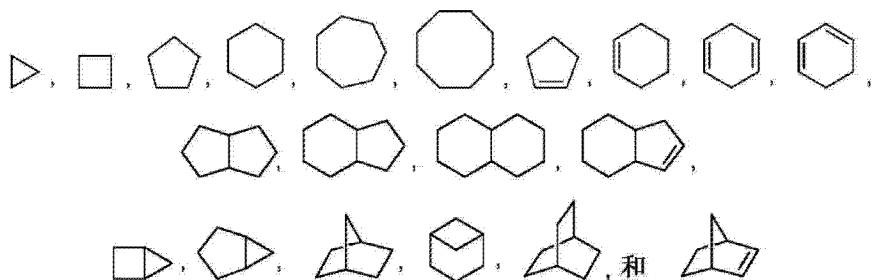
[0134] 术语“烷基”表示主链上具有1至12个碳原子的直链或支链烷基基团。烷基基团的示例包括甲基(Me)、乙基(Et)、正丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基(tBu)、戊基、异戊基、叔戊基、己基、异己基以及本领域普通技术中的基团,且本文提供的教导被认为相当于任一前述实施例。

[0135] 术语“烷氧基”指与氧原子连接的烷基,烷基如上文所定义。烷氧基基团通过氧原子连接至母体结构。

[0136] 属于“氨基”指 $-NH_2$ 基团,或单-或二烷基氨基基团。

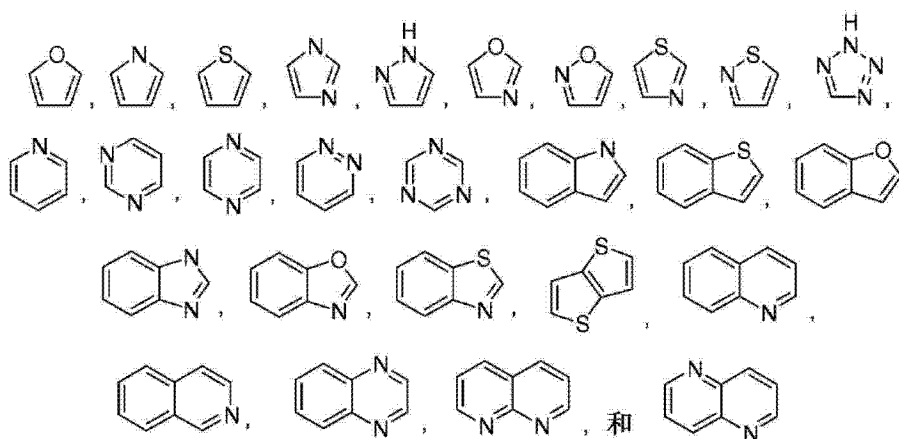
[0137] 术语“环烷基”表示饱和或部分饱和的、单环、稠合多环、桥接多环或螺环多环的碳环,每个碳环含有3至12个环原子。环烷基基团的示范性示例包括以下实体(以适当连接部分的形式):

[0138]



[0139] 术语“杂芳基”表示单环、稠合双环或稠合多环的芳族杂环（环结构含有选自碳原子和至多四个杂原子（选自氮、氧和硫）的环原子），每个杂环含有 3 至 12 个环原子。杂芳基基团的示范性示例包括以下实体（以适当连接部分的形式）：

[0140]



[0141] 术语“卤素”指氯、氟、溴或碘。术语“卤代”指氯、氟、溴或碘。术语“卤代烷基”表示被一个或多个卤素原子取代的烷基，烷基如上文所定义。术语“卤代烷氧基”表示被一个或多个卤素原子取代的烷氧基，烷氧基如上文所定义。

[0142] 本领域技术人员应认识到上文所列或所示的种类不是穷举性的，也可选择这些定义的术语范围内的其他种类。

[0143] 术语“（经）取代的”表示特定基团或部分带有一个或多个取代基。术语“未（经）取代的”表示特定基团不带有取代基。术语“任选（经）取代的”表示特定基团是未取代的或被一个或多个取代基取代。在使用术语“（经）取代的”描述结构系统时，取代可发生在系统上任意价态允许的位置上。

[0144] 本文描述的任意化学式旨在表示该结构式的化合物以及某些变化或形式。例如，本文给出的化学式旨在包括外消旋形式，或一种或多种对映异构体、非对映异构体或几何异构体或其混合物。此外，本文给出的任意化学式还旨在表示该化合物的水合物、溶剂合物或多形体或其混合物。

[0145] 本文给出的任意化学式还旨在表示该化合物的未标记形式以及同位素标记的形式。同位素标记的化合物具有本文给定的化学式所描述的结构，不同之处在于一个或多个原子被具有所选原子质量或质量数的原子替代。可掺入本发明化合物的同位素示例包括氢、碳、氮、氧、磷、氟、氯和碘的同位素，分别例如 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{17}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{36}Cl 和 ^{125}I 。这类同位素标记的化合物可用于代谢研究（优选使用 ^{14}C ）、反应动力学研究（使用例如 ^2H 或 ^3H ）、包括检测或成像技术（如正电子发射断层成像术（PET）或单光子

发射计算体层成像术 (SPECT)) 的药物或底物组织分布试验、或对患者的放射性治疗中。具体而言, ^{18}F 或 ^{11}C 标记的化合物对于 PET 或 SPECT 研究是特别优选的。另外,用重同位素如氘 (即 ^2H) 取代能提供因代谢稳定性较高 (例如体内半衰期延长或剂量要求降低) 而产生的某些治疗优势。通过使用易于获得的同位素标记试剂取代非同位素标记试剂,可使用方案或实施例中公开的方法和下文所述制备方法制备本发明的同位素标记化合物及其前药。

[0146] 在本文中对一类取代基使用时,命名法 " C_{i-j} " (其中 $j>i$) 表示独立地实现从 i 至 j (包括 i 和 j) 的每一个碳原子数目的本发明实施方式。例如,术语 C_{1-3} 独立地表示含有一个碳原子 (C_1) 的实施方式、含有两个碳原子 (C_2) 的实施方式和含有三个碳原子 (C_3) 的实施方式。

[0147] 本文所提到的任意双取代基包括多种连接可能性,其中允许多于一种的该可能性。例如,双取代基 $-\text{A}-\text{B}-$ (其中 $\text{A} \neq \text{B}$) 在本文中表示 A 连接至第一取代原子且 B 连接至第二取代原子的双取代基,也表示 A 连接至第二取代原子且 B 连接至第一取代原子的双取代基。

[0148] 本发明还包括式 (I) 所代表化合物的药学上可接受的盐,优选上文所述的那些以及本文所示的特定化合物,以及包括该盐的药学组合物,以及使用该盐的方法。

[0149] “药学上可接受的盐”旨在表示本文所示化合物的游离酸或碱的盐,其没有毒性、生物学上可以容忍或者生物学上适于向对象给药。通常参见, S. M. Berge 等, “Pharmaceutical Salts (《药用盐》)” J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19。优选的药学上可接受的盐是指药理学上有效且适于与对象的组织接触而不会产生过度的毒性、刺激或过敏反应。本文所述化合物可具有足够酸性的基团、足够碱性的基团、两种类型的功能基团、或超过一种的各类型,并相应地与多种无机或有机碱以及无机和有机酸反应以形成药学上可接受的盐。

[0150] 药学上可接受的盐的示例包括硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、磷酸盐、磷酸一氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、乙酸盐、丙酸盐、癸酸盐、辛酸盐、丙烯酸盐、甲酸盐、异丁酸盐、己酸盐、庚酸盐、丙炔酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、反丁烯二酸盐、马来酸盐、丁炔-1, 4-二酸盐、己炔-1, 6-二酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、邻苯二甲酸盐、磺酸盐、甲基磺酸盐、丙基磺酸盐、甲磺酸盐、二甲苯磺酸盐、萘-1-磺酸盐、萘-2-磺酸盐、苯基乙酸盐、苯基丙酸盐、苯基丁酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、 γ -羟基丁酸盐、羟基丁酸盐、乙醇酸盐、酒石酸盐和扁桃酸盐。

[0151] 对于含有碱性氮的式 (I) 的化合物,可通过本领域中可采用的任意适当方法制备药学上可接受的盐,例如使用酸处理游离碱,例如使用无机酸 (如盐酸、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、硝酸、硼酸、磷酸等) 或者使用有机酸 (如乙酸、苯乙酸、丙酸、硬脂酸、乳酸、抗坏血酸、马来酸、羟基马来酸、羟乙磺酸、琥珀酸、戊酸、富马酸、丙二酸、丙酮酸、草酸、乙醇酸、水杨酸、油酸、棕榈酸、月桂酸、吡喃糖苷酸 (如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸)、 α -羟基酸 (如扁桃酸、柠檬酸或酒石酸)、氨基酸 (如天冬氨酸或谷氨酸)、芳族酸 (如苯甲酸、2-乙酰氧基苯甲酸、萘甲酸或肉桂酸)、磺酸 (如十二烷基磺酸、对甲苯磺酸、甲磺酸或乙磺酸)) 或任意相容的酸混合物 (如本文实施例中所述) 以及任意本领域普通技术中视为等同物或可接受

的取代物的其他酸及其混合物。

[0152] 本发明还涉及式 (I) 的化合物的药学上可接受的前药, 以及使用该药学上可接受的前药的治疗方法。术语“前药”表示指定的化合物的前体, 在向对象给药后其在体内通过化学或生理过程 (如溶剂分解或酶切) 或者在生理条件下生成化合物 (例如将前药置于生理 pH 下使其转化为式 (I) 的化合物)。“药学上可接受的前药”指没有毒性、生物学上可以容忍且生物学上适于向对象给药的前药。选择和制备适当前药衍生物的示范性步骤描述于例如“Design of Prodrugs (《前药设计》)”, H. Bundgaard 编, 埃尔斯威尔出版社 (Elsevier), 1985。

[0153] 本发明还涉及式 (I) 的化合物的药物活性代谢物, 以及该代谢物在本发明方法中的用法。“药物活性代谢物”表示式 (I) 的化合物及其盐在体内的药物活性代谢产物。可使用本领域已知或可采用的常规技术确定化合物的前药和活性代谢物。参见例如 Bertolini 等, J. Med. Chem. 1997, 40, 2011-2016; Shan 等, J. Pharm. Sci. 1997, 86(7), 765-767; Bagshawe, Drug Dev. Res. 1995, 34, 220-230; Bodor, Adv. Drug Res. 1984, 13, 255-331; Bundgaard, Design of Prodrugs (《前药设计》) (埃尔斯威尔出版社 (Elsevier Press), 1985); 以及 Larsen, Design and Application of Prodrugs (《前药设计与应用》)、Drug Design and Development (《药物设计与开发》) (Krogsgaard-Larsen 等编, 哈伍德学术出版公司 (Harwood Academic Publishers), 1991)。

[0154] 药物组合物

[0155] 为治疗目的, 包括本文所述化合物的药物组合物还可包括一种或多种药学上可接受的赋形剂。药学上可接受的赋形剂指没有毒性且生物学上适于向对象给药的物质。该赋形剂促进本文所述化合物的给药过程且与活性成分相容。药学上可接受的赋形剂的示例包括稳定剂、润滑剂、表面活性剂、稀释剂、抗氧化剂、粘结剂、着色剂、膨胀剂、乳化剂或味道调节剂。在优选实施方式中, 根据本发明的药物组合物是无菌组合物。可使用本领域技术人员已知或可以使用的复合技术制备药物组合物。

[0156] 本发明也涉及无菌组合物, 包括符合决定该组合物的国家和当地规定的组合物。

[0157] 根据本领域中用于多种剂型制备的常规方法, 本文所述药物组合物和化合物可配制为适当药物溶剂或载剂中的溶液剂、乳剂、混悬剂或分散剂, 或者丸剂、片剂、锭剂、栓剂、囊剂、糖衣剂、颗粒剂、粉末剂、用于重建的粉末剂或连同固态载剂的胶囊剂。本发明的药物组合物可以通过适当的给药途径给予, 如口服、胃肠外、直肠、经鼻、局部或经眼途径, 或通过吸入。优选地, 所述组合物配置用于静脉内或口服给药。

[0158] 对于口服给药, 本发明的化合物可以固体形式 (如片剂或胶囊剂) 或溶液剂、乳剂或混悬剂的形式提供。为制备口服组合物, 可配制本发明的化合物以形成例如每天约 0.01 至约 50mg/kg、或每天约 0.05 至约 20mg/kg、或每天约 0.1 至约 10mg/kg 的剂量。口服片剂可包括与相容的药学上可接受的赋形剂 (如稀释剂、崩解剂、粘结剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂) 混合的活性成分。合适的惰性填料包括碳酸钠和碳酸钙、磷酸钠和磷酸钙、乳糖、淀粉、糖、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露醇、山梨糖醇等。示例性液体口服赋形剂包括乙醇、甘油、水等。淀粉、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、淀粉乙醇酸钠、微晶纤维素和海藻酸是示例性崩解剂。粘结剂可包括淀粉和明胶。如果存在, 润滑剂可以是硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。如果需要, 可以使用某种材料 (如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯) 包被片

剂以延缓胃肠道中的吸收,或者使用肠溶衣包被。

[0159] 用于口服给药的胶囊包括硬和软明胶胶囊。为制备硬明胶胶囊,可将活性成分与固体、半固体或液体稀释剂混合。软明胶胶囊可以通过将活性成分与水、油(如花生油或橄榄油)、液体石蜡、短链脂肪酸的单和二甘油酯的混合物、聚乙二醇 400 或丙二醇混合的方式制备。

[0160] 用于口服给药的液体可以是混悬剂、溶液剂、乳剂或糖浆剂的形式,或者可以是临用前用水或其他合适载剂重建的干燥产品。该液体组合物可任选包含:药学上可接受的赋形剂,如助悬剂(例如山梨糖醇、甲基纤维素、藻酸钠、明胶、羟乙基纤维素、羧甲基纤维素、硬脂酸铝凝胶等);非水性载剂,例如油(例如杏仁油或分级椰子油)、丙二醇、乙醇或水;防腐剂(例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸);润湿剂(如卵磷脂);以及(如果需要)调味剂或着色剂。

[0161] 本发明的组合物可配制为栓剂用于直肠给药。对于胃肠外使用(包括静脉内、肌肉内、腹膜内、鼻内或皮下途径),本发明的试剂可以无菌水性溶液剂或混悬剂,缓冲至合适 pH 和等渗性或者以胃肠道外可接受的油的形式提供。合适的水性载剂包括林格氏溶液和等渗氯化钠。该形式可以是单位剂量形式(如安瓿或一次性注射设备)、多剂量形式(如可以从中取出合适剂量的药瓶)或固体形式或可用于制备可注射制剂的预浓缩液。在数分钟至数天的时间内,示范性输注剂量的范围是约 1 至 1000 $\mu\text{g/kg/分钟}$ 的与药物载剂混合的试剂。

[0162] 对于经鼻、吸入或口服给药,可使用例如也包含合适载剂的喷雾制剂给予本发明的药物组合物。

[0163] 对于局部使用,优选将本发明的化合物配制为乳膏或软膏或适用于局部给药的类似载剂。对于局部给药,可将本发明的化合物与药物载剂混合,浓度为药物占载剂的约 0.1% 至约 10%。另一个给予本发明的试剂的模式是利用贴片制剂以达到透皮递送的效果。

[0164] 本文所用术语“治疗”或“处理”包括“预防性”和“治疗性”治疗或处理。“预防性”治疗指推迟疾病、疾病症状或医疗病症的发展、抑制可能出现的症状或降低疾病或症状发展或复发的风险。“治疗性”治疗包括降低已有疾病、症状或病症的严重程度或抑制其恶化。因此,治疗包括改善或防止已有疾病症状的恶化、防止出现其他症状、改善或防止症状的根本性系统原因、抑制失调或疾病,例如阻止失调或疾病的发展、减轻失调或疾病、促使失调或疾病退行、减轻疾病或失调引起的病症或停止疾病或失调的症状。

[0165] 术语“对象”指需要该治疗的哺乳动物患者,例如人。

[0166] 以蛋白质聚集为特征的示例性神经变性疾病包括阿尔茨海默病、帕金森病、额颞痴呆、路易体痴呆、PD 痴呆、多系统萎缩症和肌萎缩侧索硬化。

[0167] 在一个方面,本发明的化合物和药物组合物特异性靶向 α -突触核蛋白、 β -淀粉样蛋白和/或 tau 蛋白聚集体。因此,这些化合物和药物组合物可用于防止、反转、延缓或抑制 α -突触核蛋白、 β -淀粉样蛋白和/或 tau 蛋白的聚集,并用于本发明的方法中以治疗聚集(如 α -突触核蛋白、 β -淀粉样蛋白和/或 tau 蛋白的聚集)相关或引起的神经变性疾病。优选地,本发明的方法靶向与 α -突触核蛋白、 β -淀粉样蛋白和/或 tau 蛋白的聚集相关的神经变性疾病。在优选实施方式中,治疗方法靶向帕金森病、阿尔茨海默病、路易体病或多系统萎缩症。本发明的化合物、组合物和方法还可用于减轻蛋白质聚集继发

的有害作用,如神经元细胞死亡。

[0168] 在另一个的方面,本发明的化合物、组合物和方法用于靶向突触核蛋白聚集。虽然本发明不受任何特定作用机制的限制,但突触核蛋白聚集被认为由疾病过程早期蛋白质的错误排列引起,所述错误排列会形成蛋白质多聚体。随着单体单元数目的增多,聚集的蛋白质可形成类似孔的结构,嵌入神经元的膜中,从而破坏离子流和细胞内稳态。

[0169] 在本发明的抑制性方法中,有效量指足以减少、延缓或反转蛋白质聚集的量。可通过如下文所述的常规分析方法对聚集的量进行测量。这类调节可用于多种设置,包括体外试验。在该方法中,所述细胞优选是神经细胞。

[0170] 在根据本发明的治疗方法中,“有效量”指足以使需要这类治疗的对象获得所需治疗益处的量或剂量。本发明的化合物的有效量或剂量可通过常规方法(如建模、剂量递增或临床试验)确定,其中考虑常规因素,例如给药或药物递送的模式或途径、试剂的药代动力学、感染的严重程度和过程、对象的健康状态、病情和体重以及主治医生的判断。示例性剂量的范围为每天每千克对象体重约 1 μ g 至 2mg 活性试剂,优选约 0.05 至 100mg/kg/天、或约 1 至 35mg/kg/天、或约 0.1 至 10mg/kg/天。总剂量可以单个或分开的剂量单元(例如 BID、TID、QID)给予。

[0171] 一旦患者的疾病出现改善,即可调节剂量用于预防性或维持治疗。例如,给药的剂量或频率或两者可以随着症状变化降至保持所需治疗或预防效果的水平。当然,如果症状已减轻至合适水平,可以停止治疗。但任何症状复发时,患者可以要求长期基础上的间歇治疗。患者还可要求长期基础上的慢性治疗。

[0172] 联合用药

[0173] 本发明的化合物可在神经变性疾病的治疗中与一种或多种其他活性成分联用,用于药物组合物或方法。例如,其他活性成分是那些已知或被发现能够有效治疗神经变性疾病的成分,包括对疾病相关的另一个靶标有活性的那些,诸如但不限于:a) 解决蛋白质错误折叠的化合物(如减少这些蛋白质生成、提高其清除或改变其聚集和/或传播的药物);b) 治疗该疾病症状的化合物(例如多巴胺替代疗法);以及 c) 通过互补机制作为神经保护剂的药物(例如靶向自体吞噬的那些药物,抗氧化的那些药物以及通过其他机制作用的那些药物(如腺嘌呤 A2A 拮抗剂))。

[0174] 例如,其他活性成分是那些已知或被发现能够有效治疗神经变性疾病的成分,包括对疾病相关的另一个靶标有活性的那些,诸如但不限于:a) 靶向不同的蛋白质错误折叠机制(如聚集和/或传播)的化合物;b) 治疗该疾病症状的化合物(例如多巴胺替代疗法);以及 c) 通过互补机制作为神经保护剂的药物(例如靶向自体吞噬的那些药物,抗氧化剂和腺嘌呤 A2A 拮抗剂)。

[0175] 例如,本发明的组合物和制剂以及治疗方法还可包括其他药物或药品,例如用于治疗或缓解蛋白质聚集(例如突触核蛋白、 β -淀粉样蛋白和/或 tau 蛋白的聚集)相关或引起的神经变性疾病(例如帕金森病、阿尔茨海默病(AD)、路易体病(LBD)和多系统萎缩症(MSA)或相关症状或病症)的其他活性剂。例如,本发明的药物组合物还可包括一种或多种该活性剂,且治疗方法还可包括给予有效量的一种或多种该活性剂。在某些实施方式中,其他活性剂可以是抗生素(例如抗菌或抑菌肽或蛋白质,例如有效对抗革兰氏阳性或阴性细菌的那些)、流体、细胞因子、免疫调节剂、抗炎剂、补体活化剂(如包括胶原

样结构域或血纤蛋白原样结构域（如纤维凝胶蛋白（ficolin））、碳水化合物结合结构域等的肽或蛋白质）及其组合。其他活性剂包括用于该组合物和方法的那些，包括多巴胺疗法药物、邻苯二酚-O-甲基转移酶（COMT）抑制剂、单胺氧化酶抑制剂、认知增强剂（如乙酰胆碱酯酶抑制剂或美金刚胺）、腺嘌呤 2A 受体拮抗剂、 β -分泌酶抑制剂或 γ -分泌酶抑制剂。在特定实施方式中，本发明的至少一种化合物可在药物组合物或治疗方法中与一种或多种药物联用，所述药物选自：他克林（Cognex）、多奈哌齐（Aricept）、利凡斯的明（Exelon）、加兰他敏（Reminyl）、毒扁豆碱、新斯的明、艾考哌齐（Icopezil）（CP-118954，5,7-二氢-3-[2-[1-(苯基甲基)-4-哌啶基]乙基]-6H-吡咯并-[4,5-f]-1,2-苯并异噻唑-6-酮马来酸盐）、ER-127528（4-[(5,6-二甲氧基-2-氟-1-茛酮)-2-基]甲基-1-(3-氟苄基)哌啶盐酸盐）、扎那普齐（zanapexil）（TAK-147；3-[1-(苯基甲基)哌啶-4-基]-1-(2,3,4,5-四氢-1H-1-苯并氮杂-8-基)-1-丙烷富马酸盐）、美曲磷酯（Metrifonate）（T-588；(-)-R- α -[2-(二甲基氨基)乙氧基]甲基]苯并[b]噻吩-5-甲醇盐酸盐）、FK-960（N-(4-乙酰-1-哌嗪基)-对氟苯甲酰胺水合物）、TCH-346（N-甲基-N-2-丙酰联苯并[b,f]氧杂萘-10-甲胺）、SDZ-220-581（(S)- α -氨基-5-(膦酰基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-丙酸）、美金刚胺（Namenda/Exiba）和 1,3,3,5,5-五甲基环己烷-1-胺（Neramexane）、氟比洛芬（tarenflurbil）（Flurizan）、3-氨基丙烷磺酸（tramiprosate）（Alzhemed）、氯碘喹啉（clioquinol）、PBT-2（8-羟基喹诺酮衍生物）、1-(2-(2-萘基)乙基)-4-(3-三氟甲基苯基)-1,2,3,6-四氢吡啶、石杉碱 A、泊替瑞林（posatirelin）、亮丙瑞林（leuprolide）或其衍生物、异丙克兰（ispronidine）、(3-氨基丙基)（正丁基）次膦酸（SGS-742）、N-甲基-5-(3-(5-异丙氧基吡啶基))-4-戊-2-胺（ispronidine）、1-癸基铵（1-decanaminium）、N-(2-羟基-3-磺丙基)-N-甲基-N-辛基-、内盐（zt-1）、水杨酸酯、阿司匹林、阿莫比林、贝诺酯、胆碱水杨酸镁、二氟尼柳、法西阿明、水杨酸甲酯、水杨酸镁、双水杨酯、双氯芬酸、醋氯芬酸、阿西美辛、溴芬酸、依托度酸、吲哚美辛、萘丁美酮、舒林酸、托美汀、布洛芬、卡洛芬、芬布芬、非诺洛芬、氟比洛芬、酮洛芬、酮咯酸、洛索洛芬、萘普生、噻洛芬酸、舒洛芬、甲芬那酸、甲氯灭酸、苯基丁氮酮、阿扎丙宗、安乃近、羟布宗、磺吡酮、吡罗昔康、氯诺昔康、美洛昔康、替诺昔康、塞来昔布、依他昔布、罗美考昔布、帕瑞昔布、罗非昔布、伐地昔布、尼美舒利、芳基烷酸、2-芳基丙酸（profens）、N-芳基邻氨基苯甲酸（灭酸）、吡唑烷衍生物、昔康类、COX-2 抑制剂、磺酰苯胺（sulphonanilides）、必需脂肪酸和米诺扎（Minozac）（2-(4-(4-甲基-6-苯基哒嗪-3-基)哌嗪-1-基)噻啶二盐酸水合物）或其组合物。该组合可用于增加效力、改善其他疾病症状、减少一种或多种副作用或减少所需的本发明化合物剂量。其他活性成分可以独立于本发明化合物的药物组合物形式给予，或者可与本发明化合物一起包含在单个药物组合物中。其他活性成分可以与本发明的组合物同时给予，或者在给予本发明的组合物后给予。

[0176] 化学合成

[0177] 现在通过参考用于以下通用制备和随后具体实施例的示范性合成方案描述用于本发明方法的示例性化学实体。本领域技术人员应认识到，为获得本文中的多种化合物，可对起始材料进行适当选择，从而通过适当地带有或不带有保护的方案使用最终所需的取代基以生成所需的产物。或者，可能需要或想要在最终所需的取代基位置上采用可通过

反应方案使用并在适当时可被所需取代基替代的合适基团。此外,本领域技术人员应认识到,以下方案中显示的转化可以任意与特定侧基功能相容的顺序进行。通用方案中描述的各反应均优选在约0℃至所用有机溶剂的回流温度下进行。除非另有说明,变量如上文所定义,可参考式(I)。

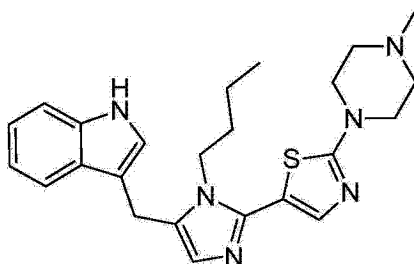
[0178] **实施例**

[0179] 以下实施例用于说明但非限制本发明。本领域技术人员应理解,以下合成反应和方案可通过选择合适的起始物质和试剂来做修改,从而获得式(I)的其它化合物。

[0180] **实施例 1:**

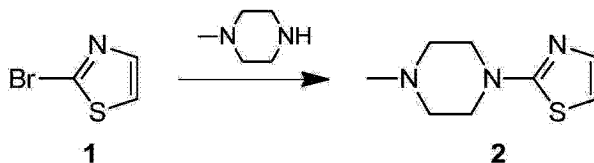
[0181] 5-(5-((1H-吡啶-3-基)甲基)-1-丁基-1H-咪唑-2-基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑。

[0182]



[0183] 步骤 1. 制备中间体 2 的一般方法。

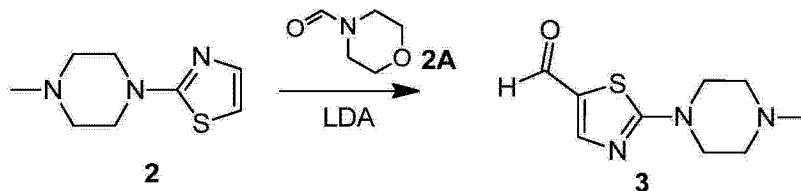
[0184]



[0185] 内含中间体 1 (164.0g, 1mol)、甲基-哌嗪 (100.0g, 1mol) 和 K_2CO_3 (414.0g, 3mol) 的 DMF (1650mL) 溶液在 140℃ 下搅拌 12 小时。TLC R_f 0.2 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 10:1) 显示反应完全。浓缩反应混合物并将残留物在 EtOAc 和水之间分配。用 Na_2SO_4 干燥有机层, 过滤并浓缩。残余物通过柱色谱 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 50:1) 纯化以获得黄色油状的中间体 2 (120g, 66%)。 1H NMR (400MHz $CDCl_3$) δ 2.35 (s, 3H), 2.51-2.54 (m, 4H), 3.50-3.53 (m, 4H), 6.56 (d, J = 3.6Hz, 1H), 7.19 (d, J = 3.6Hz, 1H)。

[0186] 步骤 2. 制备中间体 3 的一般方法。

[0187]

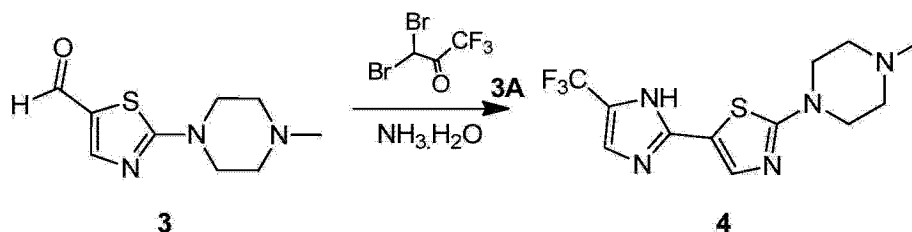


[0188] 在 -78℃, N_2 下, 向内含二异丙胺 (27g, 0.27mol) 的 THF (250mL) 溶液添加正-BuLi (117mL, 0.27mol)。使该混合物缓慢升温至 0℃。在 -78℃ 逐滴添加内含中间体 2 (33g, 0.18mol) 的 THF (250mL), 持续 1 小时。然后, 在 -78℃ 逐滴添加内含化合物 2A (31g, 0.27mol) 的 THF (250mL), 持续 30 分钟。使该混合物在 -30℃ 搅拌 1 小时。用饱和

NH_4Cl 淬灭该反应混合物,并将残留物在 EtOAc 和水之间分配。有机层用 Na_2SO_4 干燥,浓缩,然后残余物通过柱色谱 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:1) 纯化以获得黄色固态的中间体 3 (17g, 45%)。 ^1H NMR (400MHz, MeOD) δ 2.35 (s, 3H), 2.55-2.57 (m, 4H), 3.60-3.68 (m, 4H), 8.00 (s, 1H), 9.63 (s, 1H)。

[0189] 步骤 3. 制备中间体 4 的一般方法。

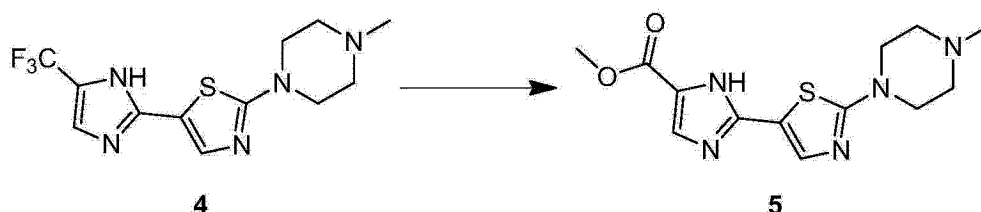
[0190]



[0191] 在室温下,向内含 NaOAc (19.1g, 0.23mol) 的 H_2O (125mL) 溶液添加化合物 3A (33g, 0.13mol)。然后使该混合物在回流下搅拌 30 分钟。冷却至室温后,将该混合物添加至内含中间体 3 (24.6g, 0.12mol) 的 0°C 的 MeOH (375mL) 和 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (138mL) 的混合物的溶液。该混合物室温搅拌 36 小时。TLC R_f 0.2 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10:1) 显示反应完全。浓缩反应混合物并将残留物在 EtOAc 和水之间分配。有机层用 Na_2SO_4 干燥,浓缩,然后残余物通过柱色谱 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 50:1) 纯化以获得黄色固态的中间体 4 (7.4g, 20%)。 ^1H NMR (400MHz, MeOD) δ 2.35 (s, 3H), 2.56-2.58 (m, 4H), 3.55-3.57 (m, 4H), 7.56 (s, 1H), 7.61 (s, 1H)。

[0192] 步骤 4. 制备中间体 5 的一般方法。

[0193]



[0194] 在室温下,向内含中间体 4 (6g, 19mmol) 的 MeOH (46mL) 和 H_2O (1.6mL) 溶液添加 NaOMe (6g, 0.11mol)。然后,使该混合物在 70°C , N_2 下搅拌 12 小时。TLC R_f 0.4 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10:1) 显示反应完全。然后,用浓 HCl 调节该混合物的 $\text{pH} = 1$, 并搅拌 2 小时。在 0°C , 用 NaHCO_3 调节该混合物的 $\text{pH} = 9$ 。然后,使该混合物浓缩以去除 MeOH , 并且收集固体并使其干燥以获得黄色固态的中间体 5 (4.6g, 80%)。

[0195] 步骤 5. 制备中间体 6 的一般方法。

[0196]

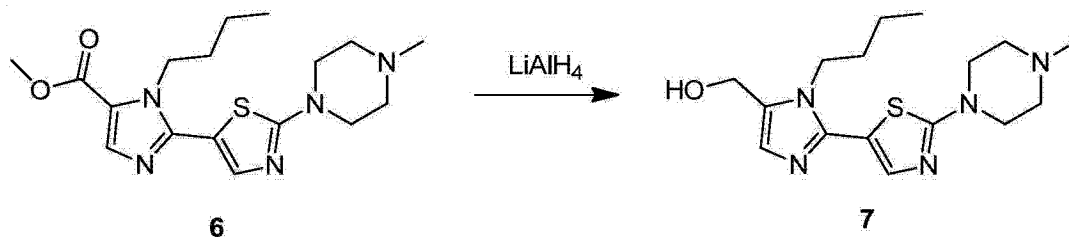


[0197] 在 0°C , 向内含中间体 5 (7g, 22.8mmol) 的 DMF (40mL) 溶液添加 NaH (1.36g, 34.2mmol) 和正 -BuI (4.2g, 22.8mmol)。然后,室温下搅拌该混合物 18 小时。

TLC R_f 0.6 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10:1) 显示反应完全。浓缩反应混合物并将残留物在 EtOAc 和水之间分配。有机层用 Na_2SO_4 干燥, 浓缩, 并且残余物通过制备型 HPLC 纯化以获得白色固态的中间体 6 (0.3g, 4%)。 ^1H NMR (400MHz, MeOD) δ 0.95 (t, $J = 7.6\text{Hz}$, 3H), 1.38 (t, $J = 7.6\text{Hz}$, 3H), 1.75 (t, $J = 8.0\text{Hz}$, 3H), 2.36 (s, 3H), 2.56-2.60 (m, 4H), 3.57-3.60 (m, 4H), 3.86 (s, 3H), 4.80 (m, 4H), 7.52 (m, 1H), 7.71 (s, 1H)。

[0198] 步骤 6. 制备中间体 7 的一般方法。

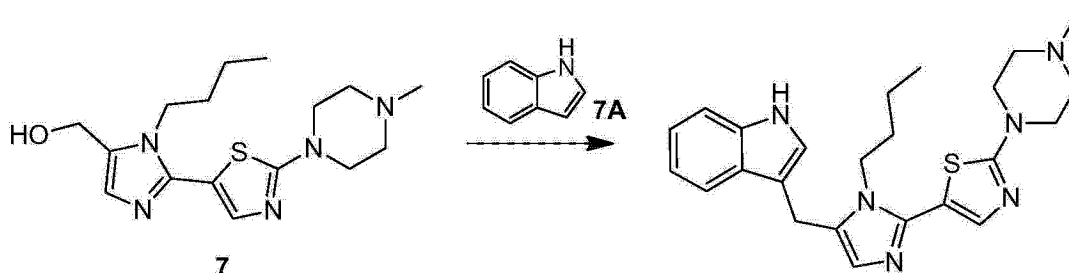
[0199]



[0200] 在 0°C 和 N_2 下向内含 LiAlH_4 (0.5g, 13.5mmol) 的 THF (5mL) 溶液逐滴添加内含中间体 6 (0.2g, 0.55mmol) 的 THF (3mL)。添加完成后, 将反应混合物在 25°C 下搅拌 12 小时。TLC R_f 0.2 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10:1) 显示反应完全。使反应混合物冷却至 -10°C , 并逐滴添加 5% NaOH (2mL)。然后, 使该溶液过滤并浓缩以获得黄色固态的中间体 7 (0.18g, 97%), 其无需纯化即可直接使用。

[0201] 步骤 7. 用于实施例 1 的制备的一般方法。

[0202]

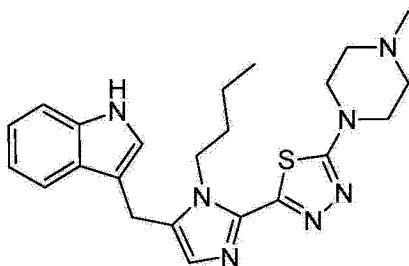


[0203] 向内含中间体 7 (0.18g, 0.54mmol) 和化合物 7A (0.13g, 1mmol) 的 DCE (6mL) 溶液添加 TFA (0.15mL)。添加后, 使反应混合物在 50°C 下搅拌 12 小时。TLC R_f 0.4 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10:1) 显示反应完全。用饱和 NaHCO_3 洗涤反应混合物并用 EtOAc 提取。有机层用盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥, 并浓缩。残余物通过柱色谱 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 50:1) 纯化以获得浅黄色固态的主题化合物 (0.07g, 30%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 0.75-0.79 (m, 3H), 1.15-1.25 (m, 2H), 1.48-1.56 (m, 2H), 2.30 (s, 3H), 2.48-2.51 (m, 4H), 3.49-3.51 (m, 4H), 3.82-3.86 (m, 2H), 4.00 (s, 2H), 6.81 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 7.04-7.51 (m, 5H), 8.19 (s, 1H). MS: $(\text{M}+1)^+$: 435.3.

[0204] 实施例 2:

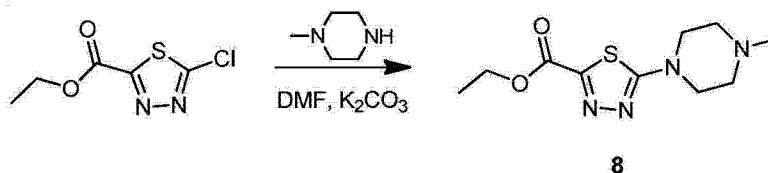
[0205] 2-(5-((1H-吡啶-3-基)甲基)-1-丁基-1H-咪唑-2-基)-5-(4-甲基哌嗪-1-基)-1,3,4-噻二唑。

[0206]



[0207] 步骤 1. 制备中间体 8 的一般方法。

[0208]

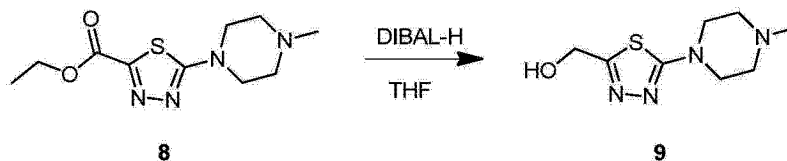


8

[0209] 内含 5-氯-1,3,4-噻二唑-2-羧酸乙酯 (60g, 0.313mol)、 K_2CO_3 (130g, 0.94mol) 和甲基哌嗪的 DMF (300mL) 溶液在 40℃ 下搅拌 3 小时。TLC R_f 0.5 (石油醚/EtOAc, 10/1) 显示反应完全。将反应混合物倒入水中, 用 CH_2Cl_2 萃取。有机层用水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥, 并浓缩以获得黄色固态的中间体 8 (58.5g, 73%)。 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 1.35-1.47 (m, 3H), 2.34 (s, 3H), 2.47-2.60 (m, 4H), 3.60-3.71 (m, 4H), 4.37-4.47 (m, 2H), 5.30 (s, 1H)。

[0210] 步骤 2. 制备中间体 9 的一般方法。

[0211]



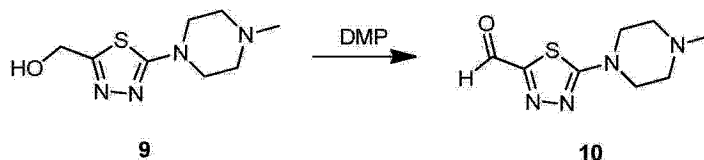
8

9

[0212] 在 -78℃ 下, 向内含中间体 8 的 (40g, 0.156mol) THF (400mL) 溶液逐滴添加 DIBAL-H (313mL), 在 0℃ 搅拌 2 小时, 并另在室温搅拌 3 小时。TLC R_f 0.8 (CH_2Cl_2 /MeOH, 10/1) 显示反应完全。该反应混合物用水 (12.5mL)、15% NaOH (12.5mL) 和水 (31.3mL) 依次淬灭。过滤所述混合物并收集过滤物, 浓缩所述过滤物以获得粗制产物。粗制产物通过柱色谱纯化以获得黄色固态的中间体 9 (20g, 60%)。 1H NMR (400MHz, DMSO) δ 2.33 (s, 3H), 2.51-2.58 (m, 4H), 3.39-3.49 (m, 4H), 3.88 (s, 1H), 4.84 (s, 2H)。

[0213] 步骤 3. 制备中间体 10 的一般方法。

[0214]



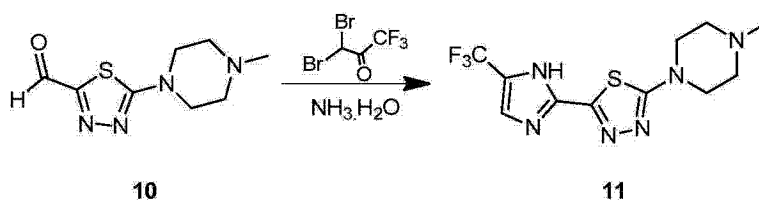
9

10

[0215] 在 -78℃ 下, 向内含中间体 9 (30g, 0.14mol) 的 CH_2Cl_2 (300mL) 溶液添加戴斯-马丁氧化剂 (119g, 0.28mol)。使该混合物缓慢升温至室温, 并另搅拌 5 小时。TLC R_f 0.4 (CH_2Cl_2 /MeOH, 10:1) 显示反应完全。该反应混合物用 $NaCO_3$ 溶液淬灭, 用 EtOAc 提取, 用盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥, 并浓缩以获得黄色固态的中间体 10 (22.5g, 76%)。 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 2.39-2.44 (s, 3H), 2.64-2.70 (m, 4H), 3.73-3.75 (m, 4H)。

[0216] 步骤 4. 制备中间体 11 的一般方法。

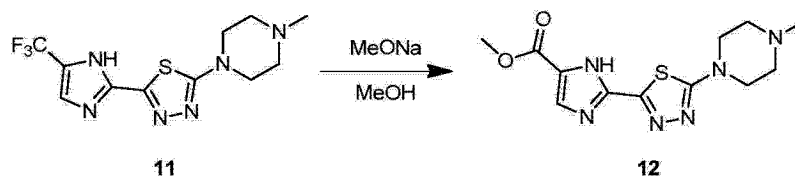
[0217]



[0218] 室温下, 向内含 NaOAc (21.2g, 0.265mol) 的 H_2O (150mL) 溶液添加 1,1-二溴-3,3,3-三氟丙酮 (37g, 0.138mol)。然后使该混合物回流 30 分钟。冷却至室温后, 将该混合物添加至 0℃ 下的内含中间体 10 (22.5g, 0.106mol) 的 MeOH (450mL) 和 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ (150mL) 溶液中。将混合物在室温下搅拌 48 小时。TLC R_f 0.5 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 15:1) 显示反应完全。浓缩反应混合物并将残留物在 EtOAc 和水之间分配。有机层用 Na_2SO_4 干燥, 浓缩, 然后残余物通过柱色谱 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 50:1) 纯化以获得黄色固态的中间体 11 (7.5g, 22%)。 ^1H NMR (400MHz, DMSO) δ 2.22 (s, 3H), 2.41-2.49 (m, 4H), 3.51-3.53 (m, 4H), 7.92 (s, 1H)。

[0219] 步骤 5. 制备中间体 12 的一般方法。

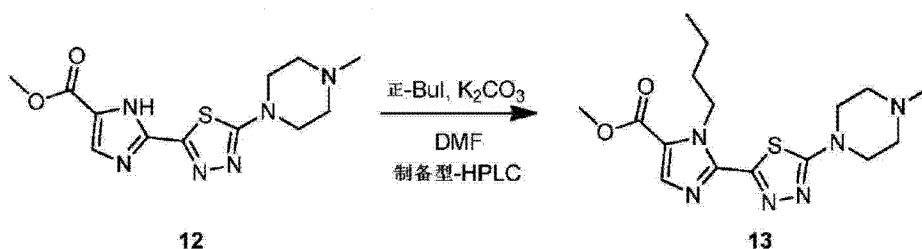
[0220]



[0221] 在室温下, 向内含中间体 11 (16.7g, 31mmol) 的 MeOH (124mL) 和 H_2O (2.8mL) 溶液添加 NaOMe (6g, 0.11mol)。然后, 使该混合物在 70℃, N_2 下搅拌过夜。TLC R_f 0.4 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10/1) 显示反应完全。然后, 用浓 HCl 调节该混合物的 $\text{pH} = 1$, 并搅拌 2 小时。在室温下, 用 NaHCO_3 溶液调节该混合物 $\text{pH} = 9$ 。然后, 该混合物经浓缩以去除 MeOH, 并收集固体, 用 CH_2Cl_2 洗涤, 并干燥以获得黄色固态的中间体 12 (8.2g, 82%)。 ^1H NMR (400MHz, DMSO) δ 2.2 (s, 3H), 2.42-2.44 (m, 4H), 3.43-3.49 (m, 4H), 3.70 (s, 3H), 7.76 (s, 1H)。

[0222] 步骤 6. 制备中间体 13 的一般方法。

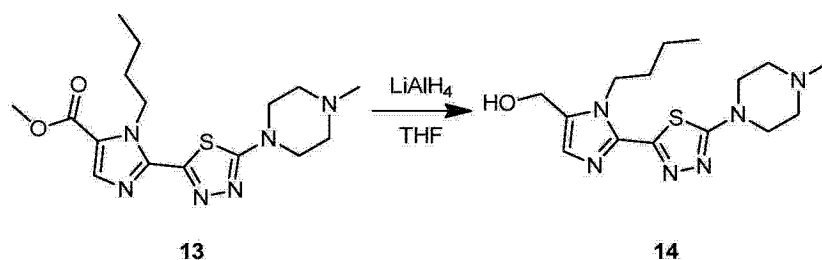
[0223]



[0224] 向内含中间体 12 (7.7g, 25mmol) 的 DMF (80mL) 溶液添加 K_2CO_3 (4.14g, 0.03mol) 和正-BuI (5.52g, 30mmol), 在室温下搅拌 3 小时。TLC R_f 0.3 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10:1) 显示反应完全。将反应混合物倒入水中, 用 CH_2Cl_2 萃取。有机层用 Na_2SO_4 干燥, 浓缩, 并且残余物通过制备型 HPLC 纯化以获得白色固态的中间体 13 (0.65g, 15%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 0.81-0.88 (m, 3H), 1.30-1.39 (m, 2H), 1.70-1.77 (m, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.43-2.50 (m, 4H), 3.56-3.62 (m, 4H), 3.81 (s, 3H), 4.84-4.88 (m, 2H), 7.69 (s, 1H)。

[0225] 步骤 7. 制备中间体 14 的一般方法。

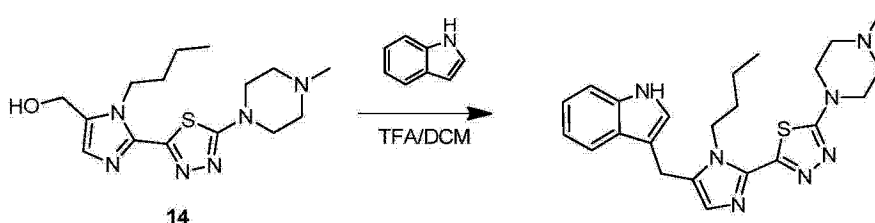
[0226]



[0227] 在 0℃和 N₂下向内含 LiAlH₄ (274mg, 7.2mmol) 的 THF (30mL) 溶液逐滴添加内含中间体 13 (1.3g, 3.6mmol) 的 THF (30mL)。添加后,使反应混合物在 25℃下搅拌 3 小时。TLC R_f 0.6 (CH₂Cl₂/MeOH, 10:1) 显示反应完全。该反应混合物用水 (0.3mL)、15% NaOH (0.3mL) 和水 (0.9mL) 依次淬灭。过滤所述混合物,并使过滤物浓缩以获得白色固态的中间体 14 (1.0g, 83%)。¹H NMR (400MHz, MeOD) δ 0.94-0.95 (m, 3H), 1.37-0.44 (m, 2H), 1.77-1.85 (m, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.59-2.61 (m, 4H), 3.60-3.62 (m, 4H), 4.51-4.55 (m, 2H), 4.64 (s, 2H), 7.04 (s, 1H)。

[0228] 步骤 8. 用于实施例 2 的制备的一般方法。

[0229]

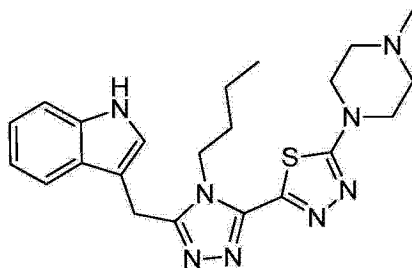


[0230] 向内含中间体 14 (1.0g, 3.0mmol) 和吲哚 (702mg, 6.0mmol) 的 DCE (20mL) 溶液添加 TFA (1.0mL)。添加后,使反应混合物在 80℃搅拌过夜。TLC R_f 0.4 (CH₂Cl₂/MeOH, 10:1) 显示反应完全。反应混合物用 NaHCO₃溶液洗涤并用 CH₂Cl₂提取。有机层用盐水洗涤,用 Na₂SO₄干燥并浓缩。残余物通过制备型 HPLC 纯化以获得白色固态的标题化合物 (240mg, 18%)。¹H NMR (400MHz, MeOD) δ 0.75-0.79 (m, 3H), 1.20-1.25 (m, 2H), 1.46-1.48 (m, 2H), 2.74 (s, 3H), 3.16 (s, 4H), 3.76 (s, 4H), 4.14 (s, 2H), 4.34-4.38 (s, 2H), 6.83 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 7.05 (d, J = 6.0Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.42 (d, J = 8.0Hz, 1H)。MS: (M+1⁺): 436. 3。

[0231] 实施例 3:

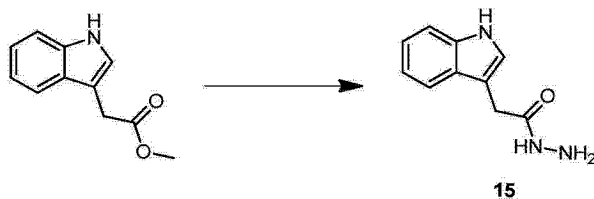
[0232] 2-(5-((1H-吲哚-3-基)甲基)-4-丁基-4H-1,2,4-三唑-3-基)-5-(4-甲基哌嗪-1-基)-1,3,4-噁二唑。

[0233]



[0234] 步骤 1. 制备中间体 15 的一般方法。

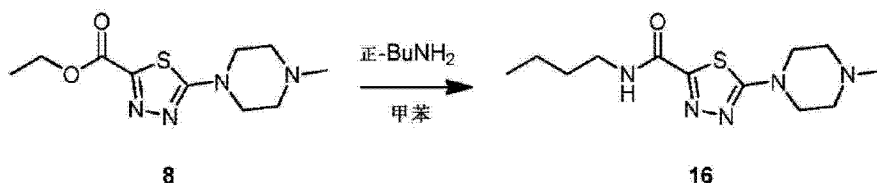
[0235]



[0236] 内含 2-(1H-吲哚-3-基)乙酸甲酯 (20.0g, 0.106mol) 和 $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (12.5g, 0.53mol) 的 MeOH (200mL) 溶液在 60℃ 搅拌过夜。TLC R_f 0.5 (石油醚/EtOAc, 4/1) 显示反应完全。反应混合物经浓缩, 并向残余物添加 CH_2Cl_2 以使产物重结晶。使混合物过滤, 并使滤饼 50℃ 真空干燥以获得黄色固态的中间体 15 (20g, 100%)。 ^1H NMR (400MHz, MeOD) δ 3.61 (s, 2H), 6.99–7.02 (m, 1H), 7.07–7.11 (m, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.32–7.34 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 1H), 7.53–7.55 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 1H)。

[0237] 步骤 2. 制备中间体 16 的一般方法。

[0238]



[0239] 内含中间体 8 (4.5g, 17.6mmol) 和正-BuNH₂ (5.14g, 70.32mmol) 的甲苯溶液在密封管中于 160℃ 下搅拌 4 小时。TLC R_f 0.6 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 15:1) 显示反应完全。反应混合物在 60℃ 真空浓缩以获得黄色固态的中间体 16 (4.2g, 84%), 其无需进一步纯化即可用于下一步骤。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 0.91–0.95 (m, 3H), 1.35–1.44 (m, 2H), 1.55–1.62 (m, 2H), 2.34–2.36 (s, 3H), 2.52–2.53 (m, 4H), 3.39–3.44 (m, 2H), 3.60–3.73 (m, 4H), 7.06 (s, 1H)。

[0240] 步骤 3. 制备中间体 17 的一般方法。

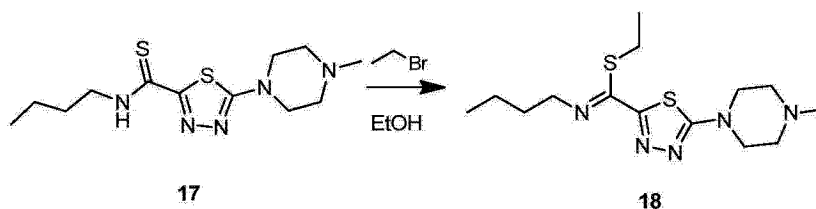
[0241]



[0242] 内含中间体 16 (16.8g, 0.059mmol) 和拉韦松试剂 (21.7g, 0.059mmol) 的甲苯 (170mL) 溶液在 110℃ 搅拌 12 小时。TLC R_f 0.5 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10:1) 显示反应完全。然后, 浓缩该混合物并使残余物溶解于 CH_2Cl_2 。有机层用 NaHCO_3 溶液、盐水洗涤, 并用 Na_2SO_4 干燥并浓缩。粗产物通过柱色谱 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100/1) 纯化以获得浅黄色固态的中间体 17 (15.2g, 86%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 0.82–0.92 (m, 3H), 1.33–1.42 (m, 2H), 1.61–1.69 (m, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.54 (s, 4H), 3.57–3.60 (m, 4H), 3.67–3.75 (m, 2H), 6.73 (s, 1H)。

[0243] 步骤 4. 制备中间体 18 的一般方法。

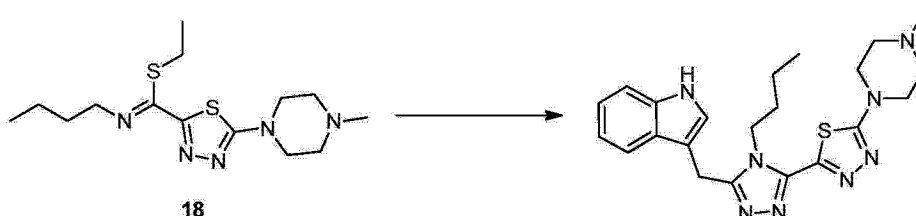
[0244]



[0245] 向内含 EtONa (2.4g, 8.0mmol) 的 EtOH (64mL) 溶液添加中间体 17 和溴乙烷。混合物在 50℃ 搅拌过夜。通过 LC/MS 分析显示反应完全。然后, 浓缩该混合物并使残余物溶解于 CH_2Cl_2 。有机层用水、盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥并浓缩以获得浅黄色固态中间体 18 (2.1g, 81%)。 ^1H NMR (400MHz, MeOD) δ 0.92-0.95 (m, 3H), 1.24-1.27 (m, 3H), 1.40-1.41 (m, 2H), 1.66-1.70 (m, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.50-2.52 (m, 4H), 3.43-3.44 (m, 2H), 3.58-3.63 (m, 6H)。

[0246] 步骤 5. 用于实施例 3 的制备的一般方法。

[0247]

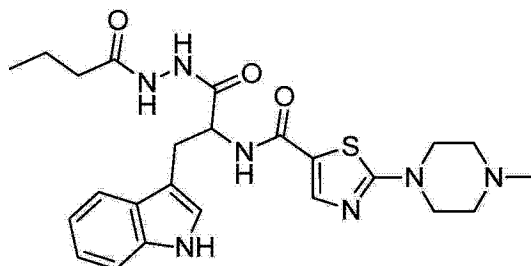


[0248] 内含中间体 18 (2.1g, 1.94mmol) 和中间体 15 (3.5g, 1.94mmol) 的正-BuOH (20mL) 溶液在 120℃ 搅拌 5 小时。TLC R_f 0.6 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10:1) 显示反应完全。反应混合物浓缩, 并通过柱色谱 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 50:1) 纯化以获得粗产物。然后, 粗产物通过制备型 HPLC 纯化以获得黄色固态的标题化合物 (169mg, 6%)。 ^1H NMR (400MHz, MeOD) δ 0.58-0.62 (m, 3H), 1.06-1.07 (m, 2H), 1.11-1.19 (m, 2H), 2.30 (s, 3H), 2.56-2.58 (m, 4H), 3.55-3.57 (m, 4H), 4.20-4.23 (m, 2H), 4.34 (s, 2H), 6.88-6.92 (m, 1H), 6.99-7.03 (m, 1H), 7.08 (s, 1H), 7.26-7.28 (m, 1H), 7.39-7.41 (m, 1H)。MS: $(\text{M}+1)^+$: 437.3。

[0249] 实施例 4:

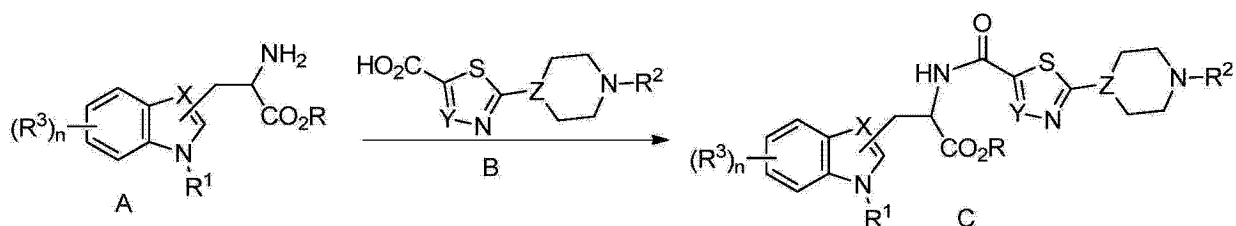
[0250] N-(1-(2-丁酰基肼基)-3-(1H-吡啶-3-基)-1-氧代丙-2-基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺。

[0251]



[0252] 根据如下方案制备该标题化合物。

[0253]

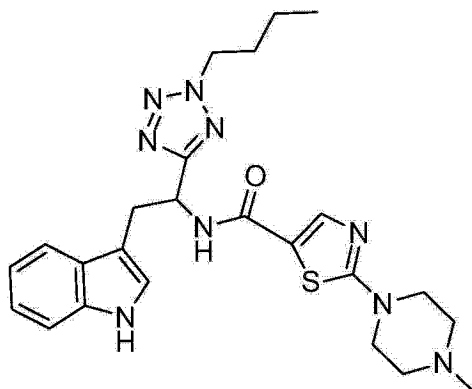


[0254] 化合物 A 市售可得,例如,色氨酸和取代的色氨酸衍生物。化合物 A 的酸基团,其中 R 是 H,可经保护作为酯或其它羧酸等同物。胺 A 和芳基酸 B 在酰胺偶联条件下的偶联产生酰胺 C。芳基酸 B 可采用与上文关于中间体 8 所述那些和本领域中已知的合适的酯水解方法类似的方法获得。用于在式 (I) 化合物的合成中制备中间体的其它方法描述于 PCT 国际专利公开文本 W02011/084642,其通过引用纳入本文。化合物 C 中的 $-CO_2R$ 部分可被转换回酸基团,并且与 C_{1-6} 烷基芳基酰肼在酰胺偶联条件下偶联以形成实施例 4。

[0255] 实施例 5:

[0256] N-(1-(2-丁基-2H-四唑-5-基)-2-(1H-吡啶-3-基)乙基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺。

[0257]



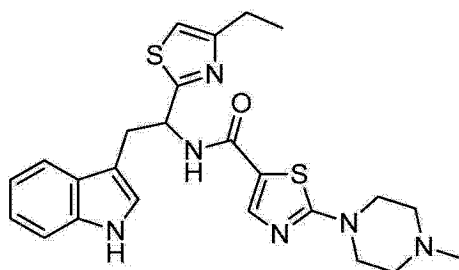
[0258] 实施例 5 和实施例 6、9 以及 11-12 的化合物(见下文)可如实施例 4 中所示制备,但然后采用本领域普通技术人员已知的环化方法将化合物 C 的酸转化成所需的 C_{1-6} 烷基取代的杂芳基部分。用于形成此类杂芳基基团的合适方法描述于 Streitwieser, Jr., A. 等, Introduction to Organic Chemistry(《有机化学入门》),第三版,1985,第 31 章;Joule, J. A. 等, Heterocyclic Chemistry(《杂环化学》),第三版,1995;Bartlett, R. K. 等, J. Chem. Soc. Soc., C. 1967, 1664;Wadsworth, H. J. 等, J. Med. Chem. 1992, 35, 1280;Finnegan, W. G. 等, J. Am. Chem. Soc. 1958, 80, 3908;Goddard, C. J. J. Het. Chem. 1991, 28, 17-28;Clapp, L. B., “1,2,4-Oxadiazoles, (1,2,4-噁二唑)”, 刊于 Advances in Heterocyclic Chemistry, 第 20 卷, 1976, 65。其它的环化方法示于实施例 1-3。代表性的方法包括 Robinson-Gabriel 环化法或 Hantzsch 合成法以形成噻唑, 酯与脒或脞反应以形成 1,2-噻, 脒在 Pinner 条件下反应以形成三唑, 或与 NaN_3 反应以形成四唑, 或与羟胺随后与酸性氯化物反应以形成噁二唑。例如, 实施例 4 的化合物可与合适的胺反应并环化以形成三唑。

[0259] 实施例 6:

[0260] N-(1-(4-乙基噻唑-2-基)-2-(1H-吡啶-3-基)乙基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)

噻唑-5-羧酰胺。

[0261]

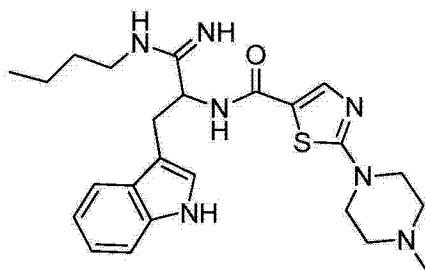


[0262] 参见关于实施例 5 的描述。

[0263] 实施例 7：

[0264] N-(1-(丁基氨基)-1-亚氨基-3-(1H-吡咯-3-基)丙-2-基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺。

[0265]

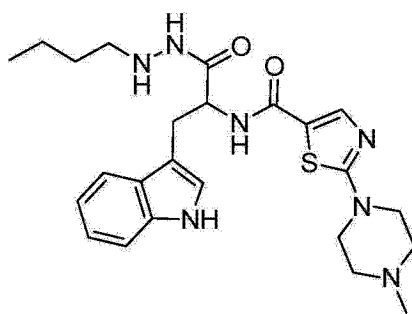


[0266] 实施例 7 可按照关于实施例 4 所示制备,但使所得的酸 C 与 C_{1-6} 烷基 NH_2 反应,然后与 NH_3 反应,以形成实施例 7 的脒。

[0267] 实施例 8：

[0268] N-(1-(2-丁基胍基)-3-(1H-吡咯-3-基)-1-氧代丙-2-基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺。

[0269]

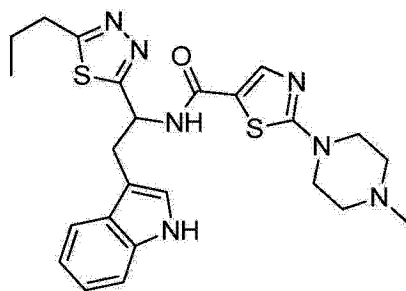


[0270] 实施例 8 可按照实施例 4 中所示方案制备,但使酸 C 或其酯类似物与 C_{1-6} 烷基胍在酰胺偶联条件下反应。例如,该化合物可采用与用于制备中间体 15 的那些方法类似的方法制备。

[0271] 实施例 9：

[0272] N-(2-(1H-吡咯-3-基)-1-(5-丙基-1,3,4-噻二唑-2-基)乙基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺。

[0273]

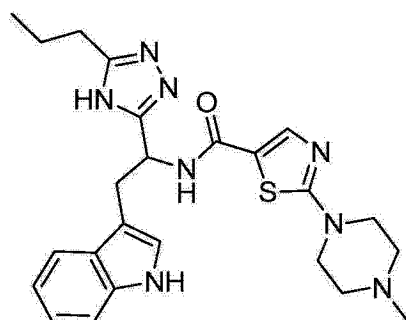


[0274] 参见关于实施例 5 的描述。

[0275] 实施例 10:

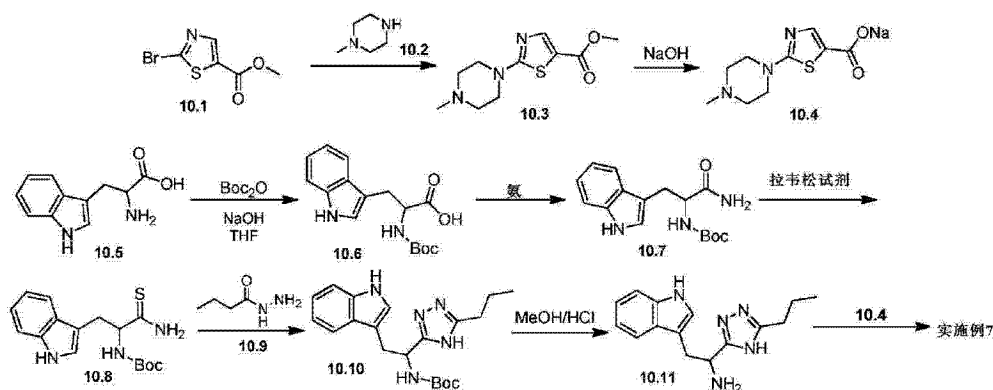
[0276] N-(2-(1H-吡啶-3-基)-1-(5-丙基-4H-1,2,4-三唑-3-基)乙基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺。

[0277]



[0278] 一般方案:

[0279]



[0280] 步骤 1. 用于制备化合物 10.3 的一般方法。将内含化合物 10.1 (2.2g, 10.0mmol)、化合物 10.2 (1.1g, 11.0mmol) 和 K_2CO_3 (3.4g, 24.9mmol) 的 MeCN (70mL) 混合物在 80℃ 搅拌 24 小时。TLC R_f 0.5 (CH_2Cl_2 :MeOH = 10:1) 显示反应完全。该混合物浓缩, 用 H_2O (50mL) 稀释, 并用 EtOAc (30mL x 3) 萃取。有机层经干燥并浓缩以获得棕色固态的化合物 10.3 (2.5g, >100%)。 1H NMR: (400MHz $CDCl_3$) δ 2.34 (s, 3H), 2.51 (s, 4H), 3.61 (s, 4H), 3.83 (s, 3H), 7.87 (s, 1H)。

[0281] 步骤 2. 用于制备化合物 10.4 的一般方法。向内含化合物 10.3 (2.0g, 8.3mmol) 的 THF (20mL) 混合物添加内含 NaOH (1.33g, 33.2mmol) 的 H_2O (40mL) 溶液。该混合物在 80℃ 下搅拌 24 小时。TLC R_f 0.5 (CH_2Cl_2 :MeOH = 10:1) 显示起始物质消耗完全。使该混合物浓缩以移出 THF, 并用正-BuOH 提取。有机层经干燥、浓缩以获得白色固态的化合物

10.4 (1.38g, 66.7%)。¹H NMR: (400MHz MeOD) δ 2.36 (s, 3H), 2.53–2.56 (m, 4H), 3.49–3.52 (m, 4H), 7.55 (s, 1H)。

[0282] 步骤3. 用于制备化合物 10.6 的一般方法。向内含 NaOH (2.2g, 55.0mmol) 的 H₂O (54mL) 混合物添加化合物 10.5 (10.0g, 49.0mmol) 和 1,4-二噁烷 (36mL)。然后,向该混合物逐滴添加 Boc₂O (10.7g, 49.1mmol),并使所得混合物在室温下搅拌 24 小时。TLC R_f 0.5 (CH₂Cl₂:MeOH = 10:1) 显示反应完全。用固体柠檬酸调节该混合物的 pH 为 6.0,并用 EtOAc (30mL x 3) 提取。有机层经干燥并浓缩以获得无色油状物。剩余物用石油醚 (100mL) 洗涤并过滤。滤饼用石油醚洗涤并干燥以获得白色固态化合物 10.6 (14.8g, 99.0%)。

[0283] 步骤4. 用于制备化合物 10.7 的一般方法。室温下,向内含化合物 10.6 (14.8g, 48.7mmol) 的 DMF (100mL) 溶液添加 CDI (9.5g, 58.4mmol),所得混合物在室温下搅拌 30 分钟。然后,向该混合物添加氨,室温下搅拌 24 小时。TLC R_f 0.4 (CH₂Cl₂:MeOH = 10:1) 显示反应完全。该混合物用 H₂O (100mL) 稀释,并用 EtOAc (100mL x 3) 提取。有机层用盐水洗涤 (100mL x 3),干燥并浓缩以获得白色固态的化合物 10.7 (15.8g, >100%)。¹H NMR: (400MHz DMSO) δ 1.31 (s, 7H), 2.93–2.96 (m, 1H), 3.08–3.13 (m, 1H), 4.07–4.21 (m, 2H), 6.63–6.65 (d, J = 8Hz, 1H), 6.95–6.99 (t, J = 8Hz, 1H), 7.03–7.07 (t, J = 8Hz, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.32–7.33 (d, J = 4Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.60–7.62 (d, J = 8Hz, 1H), 10.78 (s, 1H)。

[0284] 步骤5. 用于制备化合物 10.8 的一般方法。内含化合物 10.7 (15.8g, 52.1mmol) 的 THF (160mL) 混合物用拉韦松试剂 (26.3g, 25.2mmol) 处理。该混合物在 80℃ 下搅拌 5 小时。TLC R_f 0.6 (CH₂Cl₂:MeOH = 10:1) 显示反应完全。使该混合物浓缩以去除 THF,剩余物溶解于 CH₂Cl₂ (100mL) 并用 H₂O (100mL*3) 洗涤。有机层通过硅胶柱 (CH₂Cl₂:MeOH = 1:0–10:1) 浓缩纯化以获得黄色固态的粗制化合物 10.8 (14.0g, 84%),其直接用于下一步骤。

[0285] 步骤6. 用于制备化合物 10.10 的一般方法。向内含化合物 10.8 (1.0g, 3.1mmol) 和化合物 10.9 (0.32g, 3.1mmol) 的正-BuOH (10mL) 溶液添加 Cs₂CO₃ (3.0g, 9.4mmol),并且使所得混合物密封并在微波中于 85℃ 加热 3 小时。TLC R_f 0.6 (CH₂Cl₂:MeOH = 10:1) 显示反应完全。该混合物用 EtOAc (100mL) 稀释,并用 H₂O (60mL x 3) 洗涤。合并的有机层经干燥并浓缩。剩余物经硅胶柱 (CH₂Cl₂:MeOH = 1:0–10:1) 纯化以获得橙色固态化合物 10.10 (3.1g, 24.4%,与其它 10 批合并)。¹H NMR: (400MHz DMSO) δ 0.83–0.88 (m, 3H), 1.32 (s, 7H), 1.63–1.65 (d, J = 8Hz, 2H), 2.56 (s, 2H), 3.24–3.25 (d, J = 4Hz, 1H), 5.06–5.08 (d, J = 8Hz, 1H), 5.64–5.65 (d, J = 4Hz, 1H), 6.90–6.94 (t, J = 16Hz, 1H), 7.00–7.04 (d, J = 16Hz, 1H), 7.14–7.16 (d, J = 8Hz, 1H), 7.31–7.33 (d, J = 8Hz, 1H), 8.25 (s, 1H)。

[0286] 步骤7. 用于制备化合物 10.11 的一般方法。内含化合物 10.10 (2.0g, 5.4mmol) 的 MeOH/HCl (10mL) 在室温下搅拌 2 小时。TLC R_f 0.4 (CH₂Cl₂:MeOH = 10:1) 显示反应完全。用 NaOH (2M) 溶液调节混合物 pH 为 12,并用 EtOAc (30mL x 5) 提取。有机层经干燥并浓缩以获得橙色固态的化合物 10.11 (1.0g, 68.5%)。¹H NMR: (400MHz DMSO) δ 0.86–0.90 (d, J = 8Hz, 2H), 1.63–1.72 (m, 2H), 2.59–2.63 (t, J = 8Hz, 2H), 2.96–3.02 (m, 1H), 3.25–3.30 (m, 1H), 4.30–4.33 (m, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.94–6.98 (t, J = 8Hz, 1H), 7.04–7.08 (d, J = 8Hz, 1H), 7.18–7.20 (m, 1H), 7.39–7.41 (d, J = 8Hz, 1H), 8.43 (s, 1H)。

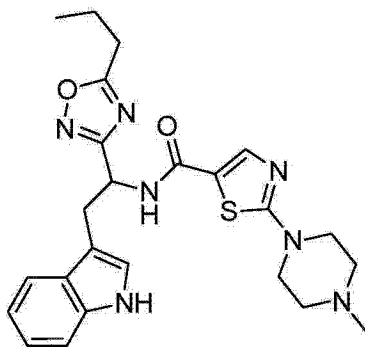
[0287] 步骤8. 用于实施例 10 的制备的一般方法。向内含化合物 10.11 (0.5g, 1.86mmol)

的溶剂 CH_2Cl_2 (20mL) 和 THF (2mL) 的混合物添加化合物 10.4 (0.69g, 2.79mmol)。然后, 将 PyBOP (1.16g, 2.23mmol) 和 DIPEA (0.96g, 7.44mmol) 添加至该混合物, 其在室温下于 N_2 气氛下搅拌 24 小时。TLC R_f 0.5 (CH_2Cl_2 :MeOH = 10:1) 显示反应完全。该混合物用 H_2O (20mL) 稀释并用 CH_2Cl_2 (10mL x3) 提取。用 Na_2SO_4 干燥合并的有机层, 然后浓缩。剩余物用制备型 HPLC 纯化 (Shimadzu LC-8A 制备型-HPLC; 柱:Luna(2)C18, 250x50mm i.d. 10u; 流动相:A 为 H_2O (0.09% TFA) 且 B 为 CH_3CN ; 梯度:B% = 5% 至 30% 于 23 分钟内; 流速:80mL/分钟; 波长:220 和 254nm; 0.6g/注射) 以获得白色固态的实施例 10 (249mg, 28%)。 ^1H NMR: (400MHz DMSO) δ 0.95-0.99 (t, J = 8Hz, 3H), 1.28 (s, 1H), 1.72-1.82 (m, 3H), 2.32 (s, 3H), 2.44 (s, 4H), 2.66-2.70 (t, J = 8Hz, 2H), 3.39-3.50 (m, 6H), 5.60-5.62 (d, J = 8Hz, 1H), 6.99-7.11 (m, 3H), 7.21-7.23 (d, J = 8Hz, 1H), 7.41-7.46 (d, J = 8Hz, 2H), 8.50 (s, 1H); MS: ($M+1^+$): 479.3; HPLC: 98.23%。

[0288] 实施例 11:

[0289] N-(2-(1H-吲哚-3-基)-1-(5-丙基-1,2,4-噁二唑基-3-基)乙基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺。

[0290]

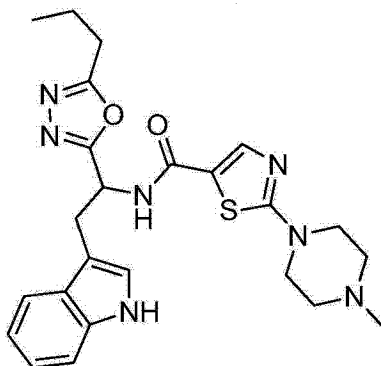


[0291] 参见关于实施例 5 的描述。

[0292] 实施例 12:

[0293] N-(2-(1H-吲哚-3-基)-1-(5-丙基-1,3,4-噁二唑-2-基)乙基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)噻唑-5-羧酰胺。

[0294]



[0295] 参见关于实施例 5 的描述。

[0296] 实施例 26: 体外无细胞和基于细胞的试验

[0297] 无细胞试验. 将重组 α -突触核蛋白 (10 μM) 在 37°C 下孵育 16 小时, 随后在

56℃下与测试化合物一起孵育 6 小时。使用不识别 α -突触核蛋白的无活性化合物,使用 β -和 γ -突触核蛋白和突变的 α -突触核蛋白分子进行对照实验。孵育后,对混合物进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,随后使用 α -突触核蛋白抗体进行免疫印记测试。该研究测试测试化合物抑制 α -突触核蛋白聚集成寡聚物的能力。

[0298] 基于细胞的试验。

[0299] (a) 聚集。将使用表达 α -突触核蛋白(野生型)或空载体(对照)的慢病毒(LV)感染的神经元细胞系暴露于一定浓度范围的测试化合物中 24 小时,所示浓度范围例如 0.01-10 μM 。通过免疫印记和共聚焦显微镜分析细胞中是否出现 α -突触核蛋白聚集。通过免疫印记,与对照相比,感染 LV- α -突触核蛋白的神经元细胞在可溶和不溶组分中显示出高的 SYN 单体(14kDa)以及寡聚体(即二聚体、三聚体和四聚体)表达水平。在用测试化合物处理后,检测不同部分中聚集物水平的降低。使用载剂或使用对照的无活性化合物处理不影响 α -突触核蛋白的水平。以类似方式,通过共聚焦显微镜,与 LV-空载体对照相比,感染 LV- α -突触核蛋白的神经元细胞显示高水平的 α -突触核蛋白累积(与在患有 PD 的 SYN Tg 小鼠和患者的脑中所观察到的现象类似)。在用测试化合物处理后,检测神经元细胞体和神经突中聚集物水平的降低。

[0300] (b) 神经元活性/完整性。 α -突触核蛋白的聚集物破坏细胞膜的完整性。采用钙黄绿素来检测 α -突触核蛋白的破坏作用和测试化合物修复 α -突触核蛋白介导的细胞膜破坏的能力。钙黄绿素是荧光标志物,其保留在健康细胞中但不保留在细胞完整性受损的细胞中。为确定对神经元活性的影响,细胞用 LV- α -突触核蛋白感染 24 小时,在无血清培养基中以例如 0.01-10 μM 的浓度范围的测试化合物处理 24 小时,加载 Fluo-4 或钙黄绿素,并通过 FLIPR 试验分析以确定 Ca^{2+} 和钙黄绿素水平。与 LV-空载体对照相比,感染 LV- α -突触核蛋白的神经元细胞显示高 25-30%的 Ca^{2+} 水平。评价测试化合物使 Ca^{2+} 浓度恢复至未受 LV- α -突触核蛋白感染的细胞中的那些浓度的能力。使用载剂或使用对照的无活性化合物处理对 Ca^{2+} 水平没有影响。与 LV-空载体对照相比,感染 LV- α -突触核蛋白的神经元细胞显示胞质中钙黄绿素滞留存在 50%的减少。以浓度依赖性方式评价测试化合物的使 α -突触核蛋白对钙黄绿素的水平的作用逆转的能力。使用载剂或使用对照的无活性化合物处理不会重新建立钙黄绿素水平。

[0301] 下表显示了钙黄绿素试验中所测试化合物的膜完整性数据:

[0302]

实施例	α -Syn介导的细胞完整性破坏的反转百分比(0.01 μM 测试化合物)
5	110
6	137
7	189
8	135
9	187

[0303]

10	115
----	-----

[0304] (c) 神经元存活。为检测测试化合物对神经元存活的作用,进行了 MTT 细胞活力试验。评价一定剂量范围(例如,0.01-10 μ M)的测试化合物的毒性作用。

[0305] 实施例 27:体内试验

[0306] 测试化合物的体内效力在 α -突触核蛋白转基因(Tg)小鼠中评估。通过行为学、神经病理学和生物化学分析小鼠中 α -突触核蛋白聚集和神经变性。通过质谱和 NMR 分析了血液和 CSF 中的 α -突触核蛋白和测试化合物的水平。采用了 PD 的 Tg 小鼠模型,其在 Thy1 启动子控制下,在混合 C57Bl6/DBA 背景中过表达野生型人 α -突触核蛋白(Rockenstein E, Mallory M, Hashimoto M, Song D, Shults CW, Lang I, Masliah E(2002). Differential neuropathological alterations in transgenic mice expressing alpha-synuclein from the platelet-derived growth factor and Thy-1 promoters(表达来自血小板源性的生长因子和 Thy-1 启动子的 α -突触核蛋白的转基因小鼠中的不同神经病理学变化). J Neurosci Res., 68(5):568-78)(称作 61 系 tg 小鼠)。该 Tg 小鼠在 3 月龄时开始发展出进展性 PD-样机动缺陷和神经病理学指数(包括 α -突触核蛋白聚集物和突触标志物减少)(Fleming SM, Salcedo J, Fernagut PO, Rockenstein E, Masliah E, Levine MS, Chesselet MF(2004)Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein(过表达野生型人 α -突触核蛋白的小鼠中的早期和进展性感觉运动异常状况). J Neurosci., 24(42):9434-40)。因此,在动物 3 个月龄时开始处理并在处理后 3 个月(即 6 个月龄)时评估运动行为(动作和圆点束表现测试(locomotor activity and round beam performance test),以及对 α -突触核蛋白聚集和神经变性的神经病理学和生物化学测量)。

[0307] 化合物给药:测试化合物溶解在载剂溶液中并以每 10 克体重 0.1cc 的量给药。动物在周一至周五每天接受腹膜内注射载剂或 10mg/kg 的测试化合物,持续 90 天。在或约在治疗的第 80 天开始行为评估。

[0308] 动作设备和测试步骤:使用 Kinder SmartFrame Cage Rack Station 活动监测系统(金德科学公司(Kinder Scientific),加利福尼亚州波韦)在连续四天内收集动作数据。动作测试方案由连续四天中的四个部分(各 15 分钟)组成。在各测试日,将各单个动物置于测试箱中,随后立即开始数据收集。数据经处理并导入 MS Excel 中用于后续分析并使用 GraphPad Prism(GraphPad 软件公司(GraphPad Software, Inc.),加利福尼亚州拉由拉市)制图。对各动物所分析的自发性动作的依赖性测量包括调查饲养(investigatory rearing)、总行走距离、在周边所占时间的百分比、在中央所占时间的百分比和趋触性。组平均值来源于各测量值并使用基因型和处理组作为对象间因素通过双向 ANOVA 分析。在主要影响或相互作用方面,使用 Bonferroni 多重比较检验进行事后比较。统计显著性的标准是 $p < 0.05$ 。

[0309] 圆点束设备和测试步骤:使用定制设备收集圆点束数据,所述设备由抬升至试台上方 17.5 至 22.5cm 的光滑的丙烯酸支架上可移动的 2 个 Delrin®醋酸纤维塑料杆(直径 3 和 1cm)组成。各动物经连续测试,在各 1 米的束 A(3cm)和 D(1cm)上试验三次,各试验间有短暂间隔。使用手动计数器,由实验者记录各个明显的滑过标线的脚步。此外,记录了

各试验中各动物的向前行走距离（使用光束边缘上标记的 10cm 部分评估并随后评分）和摔倒延迟时间（最高 60 秒）。当动物摔出光束、达到最大允许时间（60 秒）或穿过全部距离时停止试验。手动收集原始数据并将其输入 MS Excel 中用于后续分析并使用 GraphPad Prism(GraphPad 软件公司 (GraphPad Software, Inc.),加利福尼亚州拉由拉市)制图。各直径光束上行为的依赖性测量包括:脚步滑动的 #、向前行走距离和摔倒延迟时间。对各动物确定这些测量并以平均值 $\pm$ 平均值标准误 (SEM) 的形式呈现。确定各测量的组平均值并使用基因型和处理组作为对象间因素通过双向 ANOVA 分析。在主要影响或相互作用方面,使用 Bonferroni 多重比较检验进行事后比较。统计显著性的标准是 $p < 0.05$ 。

[0310] 神经病理学:在行为评估和处理完成时,如前所述进行组织收集、处理和成像方法 (Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, Sagara, Sisk A, Mucke L(2000) Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders(α -突触核蛋白小鼠中的多巴胺能缺失和内体形成:对神经变性疾病的意义). Science 287:1265 - 1269)。简单地说,移除并矢状 (sagittally) 分离脑和外周组织。右半脑在磷酸盐缓冲的 4% PFA (pH 7.4) 中 4℃ 下后固定 48 小时以用于神经病理学分析,同时对左半脑速冻并储存在 -70℃ 下以用于后续 RNA 和蛋白质分析。随后使用振动切片机将固定的半脑切成 40 μ M 厚的冠状切片。使切片自由漂浮并使用一抗在 4℃ 下孵育过夜。为确定一抗的特异性,进行了对照实验,其中在不存在一抗(缺失)、免疫前血清或使用 20 倍过量的相应肽预先吸附一抗 48 小时的条件下将切片孵育过夜。使用多克隆兔抗 α -突触核蛋白抗体 (1:1000;密理博公司 (Millipore),加利福尼亚州特美克拉) 进行 α -突触核蛋白的免疫标记研究,在蛋白酶 K 消化后进行寡聚体的研究。神经变性相关标记的免疫标记研究使用抗 NeuN (1:1000, ABN78)、MAP2 (1:40, AB5622)、突触小泡蛋白 (1:100, MAB5258) 和 GFAP (1:500, AB5804) 的抗体 (密理博公司 (Millipore),加利福尼亚州特美克拉)。使用如前文所述 Masliah 及其同事的方法 (Masliah 等, 2000) 对来自 tg 和非 tg 小鼠的编码隐藏切片进行成像和分析。

[0311] 离体 Western 印迹蛋白质分析:如前所述进行对小鼠脑匀浆的胞质(可溶)和膜(不可溶)部分的处理 (Hashimoto M, Rockenstein E, Mante M, Mallory M, Masliah E(2001) beta-Synuclein inhibits alpha-synuclein aggregation: a possible role as an anti-parkinsonian factor(β -突触核蛋白抑制 α -突触核蛋白聚集:可能作为抗帕金森病因子起作用). Neuron, 32(2):213-23) 用于 SDS-PAGE 分析。简单地说,对各组分,使用 4-12% Bis-Tris 凝胶 (英杰公司 (Invitrogen),加利福尼亚州卡尔斯巴德),在各泳道中加载 20 μ g。在 PDGF 膜 (密理博公司 (Millipore),加利福尼亚州特美克拉) 上进行电泳,随后:(1) 封闭;(2) 使用一抗孵育;(3) 使用二抗孵育;(4) ECL 显色 (帕金埃尔默公司 (PerkinElmer), 马萨诸塞州韦尔斯利);(4) 使用 VersaDoc 凝胶成像系统 (伯乐公司 (Bio-Rad),加利福尼亚州赫尔克里斯) 进行成像和分析并使用 GraphPad Prism(GraphPad 软件公司 (GraphPad Software, Inc.),加利福尼亚州拉由拉市) 进行制图和统计分析。