



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101829116 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201010130082. 3

(22) 申请日 2004. 02. 24

(30) 优先权数据

60/449435 2003. 02. 25 US

60/449589 2003. 02. 26 US

(62) 分案原申请数据

200480011140. 3 2004. 02. 24

(73) 专利权人 大塚制药株式会社

地址 日本东京都千代田区神田司町 2 丁目 9 番地

(72) 发明人 洪起煊

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 温宏艳 李连涛

(51) Int. Cl.

A61K 31/4709(2006. 01)

A61P 25/08(2006. 01)

A61P 7/10(2006. 01)

A61P 25/00(2006. 01)

A61P 25/28(2006. 01)

A61P 25/16(2006. 01)

A61P 25/06(2006. 01)

A61P 25/04(2006. 01)

A61P 13/00(2006. 01)

A61P 1/00(2006. 01)

A61P 15/04(2006. 01)

A61P 25/22(2006. 01)

A61P 25/24(2006. 01)

(56) 对比文件

US 4277479 A, 1981. 07. 07, 说明书摘要和第 1 栏第 48 行 - 第 2 栏第 47 行, 以及权利要求 26.

US 6187790 B1, 2001. 02. 13, 说明书第 4 栏第 41-53 行, 权利要求 1.

WO 9414444 A1, 1994. 07. 07, 说明书摘要和第 1 页化学式(1).

审查员 吴亚男

权利要求书1页 说明书8页 附图4页

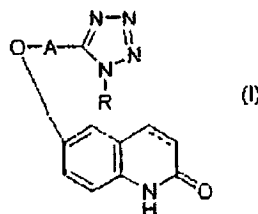
(54) 发明名称

PTEN 抑制剂或 MAXI-K 通道开放剂

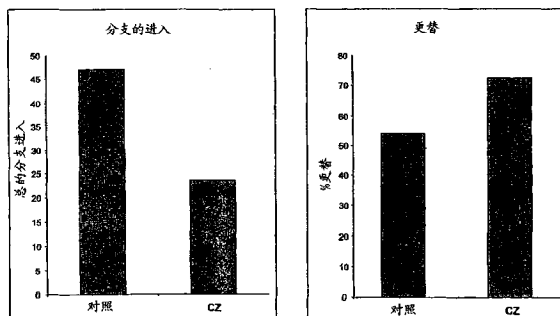
(57) 摘要

本发明涉及 PTEN 抑制剂或 MAXI-K 通道开放剂。本发明涉及一种新的 PTEN 抑制剂或一种新的大型电导 Ca<sup>2+</sup> 激活型 K<sup>+</sup> 通道 (Maxi-K 通道) 开放剂, 包括作为活性成分的通式 (I) 四唑基烷氧基 - 二氢喹诺酮化合物或其盐: 其中 R 为环烷基, A 为低级亚烷基, 并且喹诺酮核的 3- 和 4- 位之间的键为单键或双键, 其可被用作提高正常细胞、脑细胞、心肌细胞和皮肤存活率, 此外可抑制革兰氏阴性脓毒症和由 PTEN 抑制作用引起的细胞迁移和细胞侵染的药物, 并可进一步用作治疗神经元疾病的药物, 例如抗惊厥剂、神经保护剂、治疗局部脑水肿和神经运动性损伤、认知障碍、创伤性脑损伤、帕金森病、癫痫、偏头痛及阿耳茨海默病等

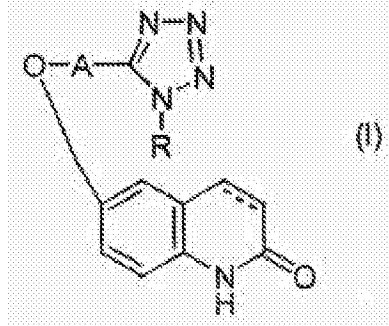
的药物。



Y-迷宫



1. 四唑基烷氧基 - 二氢喹诺酮化合物(I)或其盐在制备用于开放 Maxi-K 通道以便治疗神经元疾病的药物中的用途,



其中 R 为  $C_{3-8}$  环烷基, A 为  $C_{1-6}$  亚烷基, 并且喹诺酮核的 3- 和 4- 位之间的键为单键或双键,

其中所述神经元疾病选自认知障碍、帕金森病、和癫痫。

2. 根据权利要求 1 的用途, 其中的活性成分为 6-[4-(1-环己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氢喹诺酮或其盐。

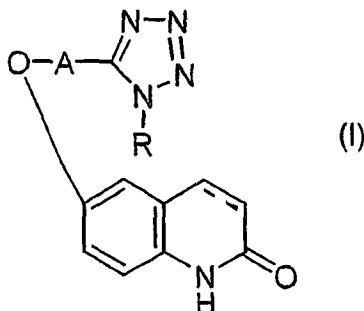
## PTEN 抑制剂或 MAXI-K 通道开放剂

[0001] 本发明是申请号为 200480011140.3、申请日为 2004 年 2 月 24 日的发明专利申请的分案申请。

## 技术领域

[0002] 本发明涉及一种新的 PTEN 抑制剂或一种新的 Maxi-K 通道开放剂 (opener)。更具体而言,涉及一种 PTEN 抑制剂或新的 Maxi-K 通道开放剂,其包含作为活性成分的通式 (I) 四唑基烷氧基 - 二氢喹诺酮化合物,或其盐:

[0003]



[0004] 其中 R 为环烷基, A 为低级亚烷基, 并且喹诺酮核的 3- 和 4- 位之间的键为单键或双键。

## 背景技术

[0005] PTEN (磷酸酶和在 10 号染色体上删除的张力蛋白同系物) 是在 1997 年作为肿瘤抑制基因被分离出的, 从此已从各个方面分析了其生理功能。据 1998 年的报道 PTEN 基因产物具有出新的磷酸酶活性, 即, 它能使作为脂质第二信使的磷脂酰肌醇的 3, 4, 5- 三磷酸酯 (PIP3) 底物在其 D3 位置上脱去磷酸 (参照 Beitner-Johnson D, Millhorn DE, J. Biol. Chem., 273 :pp. 13375-13378, 1998)。

[0006] 考虑到 PTEN 的功能, 希望对 PTEN 的抑制作用将可有效促进正常细胞、脑细胞、心肌细胞和皮肤的存活率, 并可进一步有效抑制革兰氏阴性脓毒症和细胞迁移及细胞侵染。

[0007] 此外, 已知钾通道的开放诱发细胞内的钾离子流出细胞, 从而导致细胞内电位呈负性, 使钾通道为电压依从性并受细胞内钙浓度及细胞内 ATP 的控制。Maxi-K 通道是一类高电导钙敏感的钾通道, Maxi-K 通道的活性受到细胞内钙浓度和膜电位等的控制。Maxi-K 通道广泛分布在活体例如神经元、心肌细胞、平滑肌细胞中, Maxi-K 通道的开放诱导细胞超极化。同样已知可将 Maxi-K 通道的开放用于治疗神经神经元障碍, 例如, 作为药物诸如 (1) 抗惊厥剂, (2) 用于治疗局部脑水肿和神经运动性损伤、认知障碍、外伤性脑损伤、帕金森病、癫痫、偏头痛及阿耳茨海默病的神经保护药物, (3) 用于控制疼痛的药物, (4) 用于治疗急性尿失禁、肠能动性增强、子宫收缩性、焦虑和抑郁的药物。

## 发明内容

[0008] 发明公开

[0009] 在对 PTEN 的研究过程中, 本发明人已发现, 如上所述的通式 (I) 四唑基烷氧基-二氢喹诺酮化合物或其盐, 尤其是 6-[4-(1-环己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氢-喹诺酮或其盐, 已知其具有血小板凝集抑制活性和血管舒张活性、显示出抑制 PTEN 的活性, 并由此可用作 PTEN 抑制剂, 于是完成了本发明。

[0010] 进一步地, 在对 Maxi-K 通道的功能性分析研究期间, 本发明人已发现, 如上所述的通式 (I) 四唑基烷氧基-二氢喹诺酮化合物或其盐, 尤其是 6-[4-(1-环己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氢喹诺酮或其盐, 已知其具有血小板凝集抑制活性和血管舒张活性、显示出开放 Maxi-K 通道的活性, 并由此可用作 Maxi-K 通道开放剂, 于是完成了本发明。

[0011] 附图的简要说明

[0012] 图 1 显示了西洛他唑 (6-[4-(1-环己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氢-喹诺酮的商品名) 对 TNF- $\alpha$  (50ng/ml)-激发的增高的 PTEN 的磷酸化水平的抑制。

[0013] 图 2 显示了药物对在 SK-N-SH 细胞中开放钙激活的 K<sup>+</sup>电流的作用, 图 2A 显示了西洛他唑 (6-[4-(1-环己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氢喹诺酮的商品名) 的作用, 图 2B 显示了西洛他唑和 / 或格列本脲 (缩写为“GBC”, 是可购得的抗糖尿病剂, 暗示着不存在对 ATP-敏感性 K<sup>+</sup>通道的开放) 的作用, 图 2C 显示了西洛他唑和 / 或 iberiotoxin (缩写为“Ibtx”, 称为作为 Maxi-K<sup>+</sup>通道阻滞剂, 暗示着开放 Maxi-K<sup>+</sup>通道) 的作用。

[0014] 图 3 显示了对照组和接受西洛他唑治疗组的小鼠大脑中通过 ELISA 测量的总淀粉样- $\beta$  浓度 (A- $\beta$  40 和 A- $\beta$  42 水平)。

[0015] 图 4 显示了得自用于测试本发明化合物对阿耳茨海默疾病作用的 Y- 迷宫行为范例的试验结果的总结。

[0016] 发明详述

[0017] 本发明提供了一种新的 PTEN 抑制剂或新的 Maxi-K 通道开放剂, 其包含作为活性成分通式 (I) 四唑基烷氧基-喹诺酮化合物或其盐。本发明进一步提供了一种抑制 PTEN 的方法和一种开放 Maxi-K 通道的方法, 其包括对此治疗需求的患者施用四唑基烷氧基-喹诺酮化合物 (I) 或其盐, 并进一步提供了四唑基烷氧基-喹诺酮化合物 (I) 或其盐用于抑制 PTEN 并用于开放 Maxi-K 通道的用途。

[0018] 通式 (I) 化合物或其盐具有出色的 PTEN 抑制作用, 由此本发明的 PTEN 抑制剂包含作为活性成分通式 (I) 化合物或其盐, 其可被用作提高正常细胞、脑细胞、心肌细胞和皮肤存活率, 并可进一步在不产生由对 PTEN 的抑制作用导致的任何副作用的条件下抑制革兰氏阴性脓毒症及细胞迁移和细胞侵染的药物。

[0019] 此外, 通式 (I) 的化合物或其盐具有出色的开放高电导钙激活的 K<sup>+</sup>通道 (Maxi-K 通道) 的作用, 由此包含作为活性成分通式 (I) 化合物或其盐的本发明 Maxi-K 通道开放剂可作用于治疗神经元障碍的药物, 例如, 抗惊厥剂、神经保护剂, 治疗局部脑水肿和神经运动性损伤、认知障碍、创伤性脑损伤、帕金森病、癫痫、偏头痛及阿耳茨海默病、疼痛、急性尿失禁、肠能动性增强、子宫收缩性、焦虑和抑郁的药物。

[0020] JP-63-20235 中公开了通式 (I) 四唑基烷氧基-二氢喹诺酮化合物及其制备方法。

[0021] 在通式 (I) 中, “环烷基”包括 C<sub>3-8</sub>环烷基, 例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基等, 但优选环己基。“低级亚烷基”包括 C<sub>1-6</sub>亚烷基, 例如亚甲基、亚乙基、亚丙

基、亚丁基等,但优选亚丁基。

[0022] 尤其优选的化合物为6-[4-(1-环己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氢-喹诺酮,其已被作为血管舒张剂以西洛他唑为商品名出售。

[0023] 可以散装或优选以含有常规药用载体或稀释剂的制药制剂形式使用本发明通式(I)的化合物。剂型不局限于特定形式,而可为任何常规剂型,例如,用于口腔内给药的制剂,例如,片剂、胶囊、颗粒剂、各种适于口腔内给药的液体制剂,或用于肠胃外给药的制剂,例如,注射剂、栓剂。剂量不局限于特定范围,但是通常在对成人每天100-400mg(50kg体重),一次给药或分成一次或几次给药。优选以每剂量单位50-100mg的量将活性成分包含在制剂中。

[0024] 用于注射的制剂通常被制成灭菌,并进一步优选被制成与血液等渗的液体制剂、乳剂、或混悬液的形式。通常通过应用常规药用稀释剂、例如水、乙醇、丙二醇、氧乙基化异硬脂醇、polyoxylated 异硬脂醇、聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯制备这些液体、乳剂或混悬液形式的制剂。可将这些制剂与以足够产生等渗的量的等渗剂例如氯化钠、葡萄糖、丙三醇混合,并可进一步与常规稳定剂、缓冲剂、麻醉剂、及可选地与着色剂、防腐剂、芳香物质、调味剂、甜味剂、及其他药物混合。

[0025] 可通过常规方法制备诸如用于口腔给药的片剂、胶囊、液体的制剂。可通过与常规药用载体例如,明胶、淀粉、乳糖、硬脂酸镁、滑石粉、阿拉伯胶等混合制备片剂。可通过与惰性药用填充剂或稀释剂混合并将其填充入明胶胶囊或软胶囊制备胶囊。可通过将活性化合物与甜味剂(例如蔗糖)、防腐剂(例如尼泊金甲酯、尼泊金丙酯)、着色剂、调味剂等混合制备口服液体制剂例如糖浆或酏剂。还可通过常规方法,例如通过将本发明的化合物(I)溶于灭菌的含水载体中,优选水或盐水溶液制备用于肠胃外给药的制剂。通过将约50-100mg的活性化合物(I)溶于水和一种有机溶剂中并进一步溶于具有300-5000分子量,优选混有诸如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮和聚乙烯醇的润滑剂的聚乙二醇中制备适于肠胃外给药的液体制剂。可优选进一步将上述液体制剂与一种消毒剂(例如苯甲醇、苯酚、硫柳汞)、杀真菌剂,并进一步任选地与等渗剂(例如蔗糖、氯化钠)、局部麻醉剂、稳定剂、缓冲剂等混合。由于要保持稳定性,可将用于肠胃外给药的制剂填充入胶囊,然后通过常规冻干技术除去含水介质,并在使用时通过溶于含水介质恢复成液体制剂。

## 具体实施方式

[0026] 本发明的最佳实施方式

[0027] 通过以下制备实施例及上述化合物对由TNF- $\alpha$ 激发的PTEN磷酸化的增加或对Maxi-K<sup>+</sup>通道开放的抑制效应的试验说明本发明,但本发明不应被解释为限于这些。

[0028] 制备1

[0029] 制备注射制剂:

[0030] 组分

用量

[0031] 6-[4-(1-环己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氢喹诺酮 5g

[0032] 聚乙二醇(分子量:4000) 0.3g

[0033] 氯化钠 0.9g

[0034]	聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯	0.4g
[0035]	偏亚硫酸氢钠	0.1g
[0036]	尼泊金甲酯	0.18g
[0037]	尼泊金丙酯	0.02g
[0038]	注射用蒸馏水	10.0ml

[0039] 在 80℃ 搅拌下将上述尼泊金、偏亚硫酸氢钠和氯化钠溶于一半量的上述蒸馏水中。将混合物冷却至 40℃，再将活性化合物，及进一步的聚乙二醇和聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯溶于此。向该混合物中加入剩余的注射用蒸馏水，通过用滤纸过滤灭菌从而获得所需的注射制剂。

#### [0040] 制备 2

[0041] 片剂的制备：

[0042]	组分	用量
[0043]	6-[4-(1-环己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氢喹诺酮	100g
[0044]	乳糖 (日本药典)	40g
[0045]	玉蜀黍淀粉 (日本药典)	40g
[0046]	微晶纤维素 (日本药典)	20g
[0047]	羟丙基纤维素 (日本药典)	4g
[0048]	硬脂酸镁 (日本药典)	2g

[0049] 充分混合本发明的上述化合物、乳糖、玉蜀黍淀粉和晶状纤维素，然后用羟丙基纤维素的 5% 含水溶液将该混合物制粒，将颗粒混合物过 200 目的筛从而小心干燥颗粒，然后用常规方法将这些颗粒压片以获得片剂 (1000 片)。

#### [0050] 药理试验

[0051] 测验了本发明的代表化合物：西洛他唑对 TNF- $\alpha$  - 激发的增高的 PTEN 磷酸化水平的抑制效应。

[0052] 此外，还测验了本发明的代表化合物：西洛他唑及一些可商购得的 Maxi-K 通道开放剂或阻滞剂对 Maxi-K 通道开放的作用。

#### [0053] 试验 1

[0054] 西洛他唑对 TNF- $\alpha$  - 激发的 PTEN 磷酸化水平增加的效果：

[0055] 材料：

[0056] 细胞培养：在伊格尔 (氏) 最低必需培养基 (MEM) 中用 2mM 左旋谷氨酰胺和含 10% 热灭活胎牛血清的 1.0mM 丙酮酸钠培养 SK-N-SH (KCLB 30011, 人脑成神经细胞瘤) 细胞。在 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 中使细胞生长至融合，以不高于 passage 20 用于试验。

[0057] TNF- $\alpha$  溶液的制备：将 TNF- $\alpha$  (Upstate, Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY) 溶于用磷酸盐缓冲的盐水中制成 10  $\mu$ g/ml 的储液。

[0058] 方法：

[0059] Western 蛋白印迹分析：在用 TNF- $\alpha$  进行刺激之前 3 小时用 1% FBS 和西洛他唑处理接受融合细胞的 MEM 介质，然后将其暴露于 TNF- $\alpha$  1 小时。

[0060] 将细胞溶解在含有 50mM Tris-Cl (pH8.0), 150mM NaCl, 0.02% 叠氮化钠, 100  $\mu$ g/ml 苯甲磺酰氟, 1  $\mu$ g/ml 抑肽酶和 1% 聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton)  $\times$ -100 的溶菌缓冲液

中。接着以 12,000rpm 离心分离,将 50  $\mu$ g 的总蛋白装入 8 或 10% SDS-PAGE 凝胶中,然后将其转移到硝基纤维素膜 (Amersham Pharmacia Biotech,Piscataway,NJ)。然后用标示抗体培养阻滞膜,并按 Supersignal West Dura ExtendedDuration Substrate Kit(Pierce, Rockford,IL) 的介绍用免疫化学发光试剂使免疫反应谱带显像。用 GS-710 校准显像光密度计 (Bio-RadLaboratories, Hercules, CA) 定量谱带的显像。以相对密度表示结果。抗 PTEN、磷酸 -PTEN(Ser 380/Thr 382/383) 多克隆抗体源自细胞信号技术 (Beverly, MA)。

[0061] 统计分析:以平均值  $\pm$  SEM 表示结果。通过 Student' s t- 试验测定组之间的统计学差异。p < 0.05 被认为是显著的。

[0062] 结果:

[0063] Western 蛋白质印迹和密度计分析显示在随图 1 中。

[0064] 可从图 1 中看出,西洛他唑 (1、10 和 100  $\mu$ M) 浓度依赖性地抑制了 TNF- $\alpha$  (50ng/ml)- 激发的增加的 PTEN 磷酸化水平。

[0065] 从上述试验结果可清楚地表明,西洛他唑显示出了有效的抑制 PTEN 磷酸化的活性。

[0066] 试验 2

[0067] 材料:

[0068] 细胞培养:在伊格尔(氏)最低必需培养基(MEM)中用 2mM 左旋谷氨酰胺和含 10% 热灭活胎牛血清的 1.0mM 丙酮酸钠培养 SK-N-SH(KCLB 30011,人大脑成神经细胞瘤)细胞。在 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub>中使细胞生长至融合,以不高于 passage 20 用于试验。

[0069] 测试药物:

[0070] (1) 西洛他唑(本发明的一个化合物,6-[4-(1-环己基-1H-四唑-5-基)丁氧基]-3,4-二氢-喹诺酮的商品名)。

[0071] (2) 格列本脲(缩写为“GBC”,通用名:降糖灵,化学名:5-氯-N-[2-[4-[[[(环己基-氨基)羰基]氨基]磺酰基]苯基]乙基]-2-甲氧基-苯甲酰胺,是可购得的抗糖尿病剂,一种 ATP- 敏感的 K<sup>+</sup>通道阻滞剂)。

[0072] (3) Iberiotoxin(缩写为“Ibtx”,是已知的 Maxi-K<sup>+</sup>通道阻滞剂)。

[0073] 方法:

[0074] 全细胞 K<sup>+</sup>电流的记录:试验在置于以 1ml/ 分钟的流速连续灌流的倒置显微镜(Nikon model TE300,东京,日本)的平台上的小浴槽(0.5ml)中进行。利用膜片钳技术的全细胞构型,在室温下(20-22 $^{\circ}$ C)用 Axopatch-200B 膜片钳放大器(Axon Instruments, Foster city, CA)记录 K<sup>+</sup>电流。在 0.5-5kHz 处进行图形保真过滤后在 1-10kHz 处抽取电流样品。通过 pClamp 6.0.3 软件(Axon Instruments, Foster City, CA)控制数据获取和指令电位。为了确保电压钳质量,要将电极电阻保持在低于 3M $\Omega$ 。用在标准浴溶液中的电极将接头电位调为零。通过抽吸形成 Gigaohm 封,建立全细胞构型后,通过在 50kHz 处记录从 -80mV 起对称的 10mV 电压钳阶引起的电容瞬变以计算细胞电容。用于全细胞记录的常规浴溶液为:NaCl 130mM, KCl 5mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8mM, HEPES 10mM, 葡萄糖 5.2mM 并用 NaOH 将 pH 值调至 7.4。向吸量管中装满 KCl 140mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5mM, CaCl<sub>2</sub> 0.1mM, 亚乙基双(氧代次氨基)四乙酸(EGTA)0.09mM, HEPES 10mM, 葡萄糖 10mM 并用 KOH 将 pH 值调至 7.4。

[0075] 建立了全细胞记录并收集了控制记录约 5 分钟直至通过去极化诱导的电流稳定后,将西洛他唑置于浴槽中。在这些试验中,施用格列本脲或 iberiotoxin 后,将格列本脲或 iberiotoxin,西洛他唑置于浴槽中。

[0076] 结果:

[0077] 测试结果显示在附图 2 中,其中图 2A 显示了西洛他唑的效果,图 2B 显示了西洛他唑和 / 或格列本脲 (“GBC”,意味着对 Maxi-K<sup>+</sup>通道的开放)的效果,和图 2C 显示了西洛他唑和 / 或 iberiotoxin (“Ibtx”,Maxi-K<sup>+</sup>通道阻滞剂)的效果。

[0078] 从图 2 中可看出,西洛他唑显著增强了电流,但在另一方面,其可逆地被加入浴槽的 iberiotoxin(100nM) 阻断了,但没有被格列本脲 (10 μM) 可逆地阻断。即使在同时存在格列本脲时西洛他唑也增加了 Maxi-K 通道介导的电流,然而格列本脲单独不能增加 Maxi-K 通道介导的电流。当向细胞中一起加入西洛他唑和 iberiotoxin-Maxi-K 通道阻断剂时,电流的增强比单独用 iberiotoxin 时低很多。

[0079] 试验 3

[0080] 1. 化合物的制备

[0081] 载体对照 ;0.5%羧甲基纤维素。每天两次 (n = 10)

[0082] 西洛他唑 ;100mg/kg,每天两次 (n = 10)

[0083] 用玛瑙研钵研磨少量粉末 (西洛他唑)。加入两或三滴 0.5%羧甲基纤维素 (CMC) 并充分研磨。加入 4-5ml 0.5% CMC 并将混悬的西洛他唑移回至光保护性玻璃瓶中。

[0084] 每周以 1000mg/50ml 的浓度测试化合物制剂,并在 4℃ 下避光保存。

[0085] 化合物的施用

[0086] 施用前,通过超声发生器对测试化合物的原料瓶进行超声处理然后充分混合。

[0087] 通过口入灌胃法 (gavage) 每天两次作为每组分配施用化合物。

[0088] 赋形剂对照 (0.5%羧甲基纤维素 :CMC ;1kg/5ml) 每天两次灌胃。测试化合物 (西洛他唑 ;100mg/kg/5ml) 每天两次灌胃。

[0089] 2. 观察、检测和测量方法

[0090] a. 将动物 (8 周大,表达突变的人 APP<sub>K670N, M671I</sub>/Line Tg2576 的半合转基因小鼠) 随机分成两组双转基因 APP/PS1 小鼠 (控制组和西洛他唑组,总数 = 20 只)。对每只小鼠每天两次通过灌胃给药 6 周,如以下表中所示:

[0091]

方案设计			
治疗	起始时年龄	小鼠数目	结束时年龄
对照 (赋形剂)	8 周	10	14 周
测试化合物	8 周	10	14 周
小鼠总数 = 20			

[0092] b. 研究起始或结束时测定小鼠的基因型。

[0093] c. 在完成 in-life 阶段试验前对小鼠进行 Y- 迷宫行为范例试验 (paradigm)。

[0094] d. 当小鼠 14 周大时将其处死。

[0095] e. 处死时,收集 1ml 的血液以进行西洛他唑血液浓度测量,并用盐水给 APP/PS1 小

鼠灌注。将大脑直切成对半,固定一半大脑半球,冷冻另一半球。

[0096] f. 均化冷冻的大脑半球并通过 ELISA 分析总淀粉状蛋白- $\beta$  浓度。

[0097] 测量对照组和西洛他唑治疗组小鼠大脑中的总 A- $\beta$  40 和总 A- $\beta$  42 水平。结果显示在附图 3 中。

[0098] 3. 步骤

[0099] 以下过程概括了进行“Y- 迷宫中自发更替”试验所需的步骤。小鼠具有探索它们所处环境本能倾向。成功的探索依赖于避免近期已去过,并且在那里食物已耗尽或缺乏的地方的能力(自发更替)。该 Y- 迷宫是基于行为性的试验,不涉及给予奖励。小鼠用缺乏抵抗力的“工作记忆”功能无法在它们的工作记忆中保留有关刚去过地方的信息,因此它们表现出降低了的自发更替。

[0100] 已公布的结果显示在某些转基因小鼠品系,例如 APP/PS1 小鼠中自发更替降低与探索增强。

[0101] 西洛他唑具有抗血小板和血管扩张作用,其对 ASO 有适应症,并可预防续发性脑梗塞。

[0102] 西洛他唑的这些作用可归因于降低了淀粉状蛋白- $\beta$  蛋白的沉积,并改善了阿耳茨海默痴呆的行为。

[0103] i. 将待测试小鼠放在测试房间中。避免将一次将太多小鼠(超过 3 笼)带入测试区,因为这可能影响它们的行为。(任选地,仅当没有对动物做不同标志时,例如通过应答器或清楚可见的纹身时才进行)。用无毒有色记号笔按一下顺序对它们的尾巴进行标志:

[0104] 1:红

[0105] 2:绿

[0106] 3:蓝

[0107] 4:黑

[0108] ii. 用录像机记录这些试验。这样可产生永久记录并可使研究人员当出现任何问题时重临试验。

[0109] iii. 从尾巴根部将第一只待测小鼠从其所住的笼中取出,称量。将重量记录在 Y- 迷宫数据电子表格中。将该小鼠放回笼中。(或者,在开始试验前,例如在前一天,可以对小鼠进行称重。)

[0110] iv. 在开始测试前将小鼠无干扰地放在一旁 1 小时,从而使它们能够适应房间的环境。还需留意其他问题,从而确保不要使笼毗邻一个具体分支 (arm),因为例如气味可能影响小鼠进入单个分支中。因此,使笼放在远离仪器或保证笼围绕房间作均匀分布。(例如,可一次放入 3 笼,每个邻近一个分支)。技术人员应出现在试验房间中,但是一定不要打扰小鼠。

[0111] v. 测试开始前,用异丙醇擦拭 Y- 迷宫内部。

[0112] vi. 轻轻拿放小鼠,从尾巴拿起并放在手臂上,注意不要使小鼠头部向下首次跳入迷宫。将小鼠分别置于 Y- 迷宫的中心,使所有 3 个分支(分支 A、分支 B 和分支 C)都有可能被探索 8 分钟时间。

[0113] vii. 在 Y- 迷宫数据单打印输出内容上记录所有入口。如果小鼠完全进入分支 A,就在所进入分支 (ARM ENTERED) 领域中输入“A”等。如果小鼠彻底探索了该分支,就在

同一排的观测结果 (OBSERVATIONS) 中输入“end”, 每次小鼠直立 (举起前腿坐在其后腿上) 就记录“R”, 或如果其倚靠 (前腿触墙“扒墙探望”) 为“L”, 如果小鼠僵直 (保持静止不动 5 秒或更久) 就计为“F”。如果该小鼠在分支 A 中来回走动, 在同一排的观测结果 (OBSERVATION) 中输入另一个“bf”。详细输入任何其他观测结果。如果没有足够时间写入观测结果就跳过它们。如果该小鼠返回中心, 就重新开始一行。如果该小鼠返回分支 A, 就在新的一行中输入“A”, 分支 B 就计为“B”, 或分支 C 就计为“C”。

[0114] viii. 8 分钟后, 从尾部撤走小鼠并将它们放回其所在的笼中。并在 Y- 迷宫电子表格中记录 boli 的数量及小鼠是否排尿。用异丙醇擦拭 Y- 迷宫内部。用刷子清扫角落, 清理墙壁和地面。确保 Y- 迷宫干净并没有任何可能被先前的小鼠带进迷宫的气味, 垫草或食物。确保在用醇清洁后 Y- 迷宫是干的确保在迷宫内没有留下清理物质 (例如纸巾)。

[0115] ix. 对所有待测小鼠重复以上步骤。

[0116] x. 测试后, 将数据从硬拷贝转换为 Excel 电子表格。

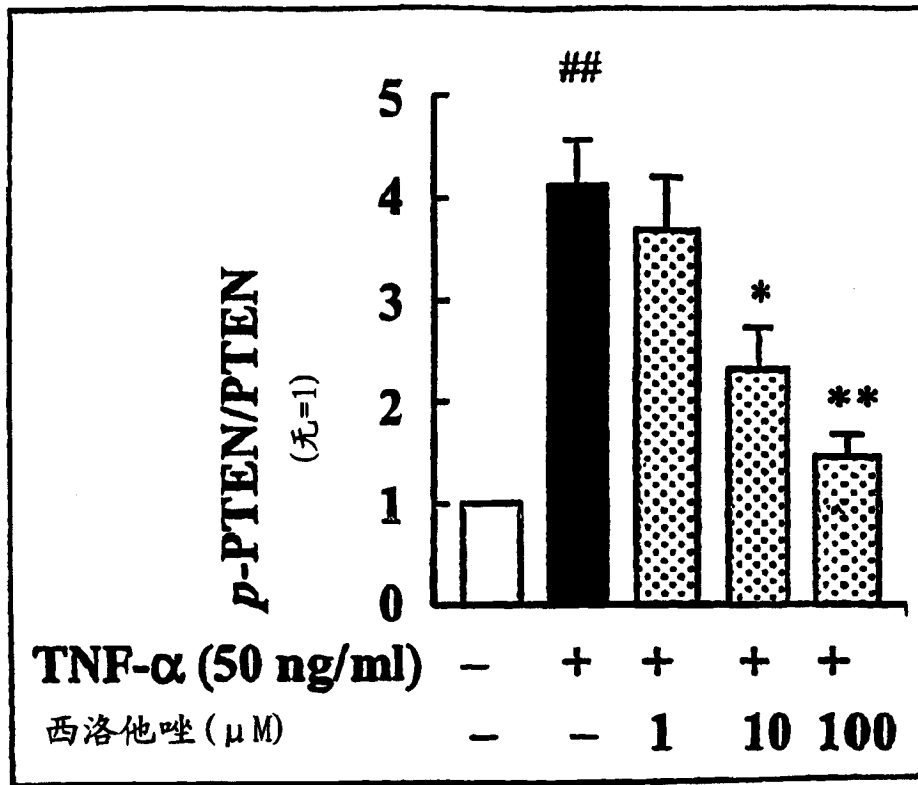
[0117] 从 Y- 迷宫行为范例试验中获得的结果总结在附图 4 中。

[0118] xi. 数据分析: 如果在没有折返的情况下探望了所有三个分支 (ABC, ACB, BAC, BCA, CAB 或 CBA) 则被定义为更替。分别分析每个分支进入 (ARM ENTRY) 并测定小鼠是否完成了一个更替。ABCABC 顺序有四个更替, 第一个以 C 结束, 下一个以 A 结束, 然后是 B, 再是 C。顺序 ABCBAC 仅有三个更替, 第一个以 C 结束, 第二个以 A 结束, 第三个为 C。%更替是 (观测到的更替数目)/(可能的更替的数目)。如果 n 个分支被访问过, 可能的最高更替数目为 n-2。如果动物随便走动, 那么 22%更替是可以预期的 ( $3 * 2 * 1/3 * 3 * 3$ )。总体 (Global) 活性反映在对不同分支访问的总数中。因此活性 (ACTIVITY) 为 (进入的分支总数)/(观测的分钟数)。

[0119] 因此, 本发明的四唑基烷氧基 - 二氢喹诺酮化合物 (I) 或其盐可有效开放 Maxi-K 通道, 并可用于治疗神经元疾病, 尤其用于治疗阿耳茨海默病。

[0120] 工业实用性

[0121] 本发明提供了一种包含作为活性成分的四唑基烷氧基 - 二氢喹诺酮化合物 (I) 或其盐的组合物, 其具有优秀的 PTEN 抑制作用并可用作提高正常细胞、脑细胞、心肌细胞和皮肤的存活率的药物, 并可进一步在不引起由对 PTEN 的抑制作用导致的任何副作用的条件下用于抑制革兰氏阴性脓毒症和细胞迁移和细胞侵染。本发明的组合物进一步可被用作高电导  $Ca^{+}$ - 激活型  $K^{+}$  通道 (Maxi-K 通道) 的开放剂, 并由此作为治疗神经元疾病的药物, 例如, 抗惊厥剂、神经保护剂、治疗局部脑水肿和神经运动性损伤、认知障碍、创伤性脑损伤、帕金森病、癫痫、偏头痛及阿耳茨海默病等的药物。



**##**  $P < 0.01$  vs. 不含TNF- $\alpha$ 和西洛他唑  
**\***  $P < 0.05$ ; **\*\***  $P < 0.01$  vs. 只含TNF- $\alpha$   
**†**  $P < 0.05$  vs. 只含西洛他唑 (10  $\mu$ M)

图 1

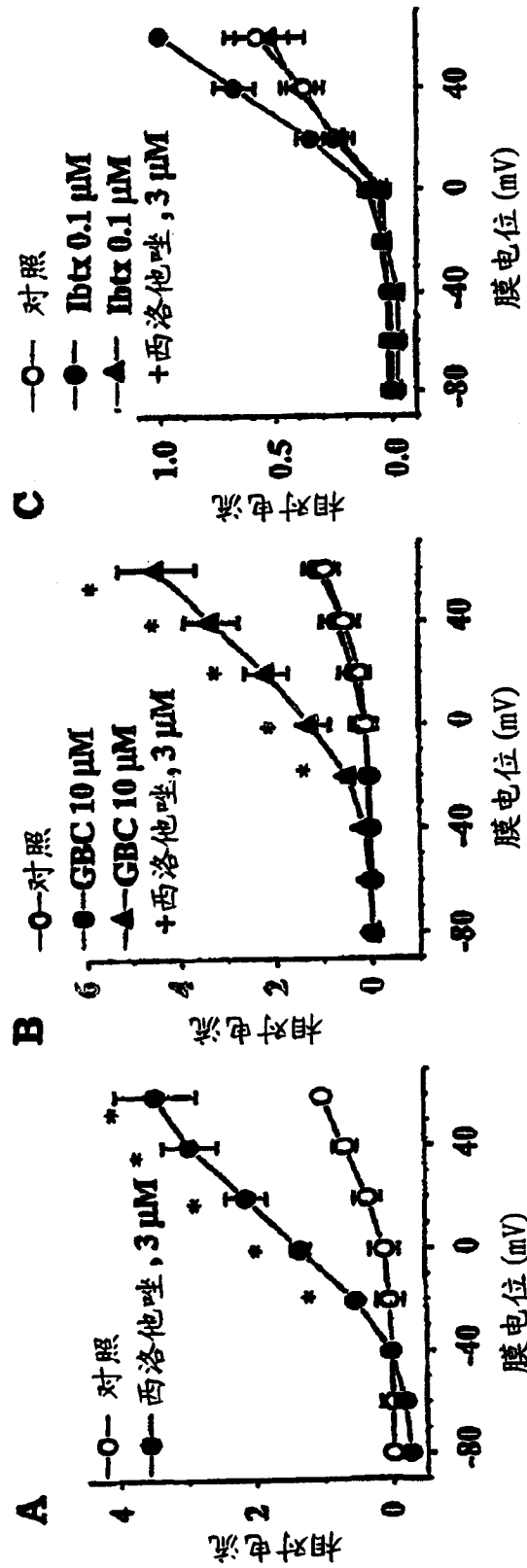


图 2

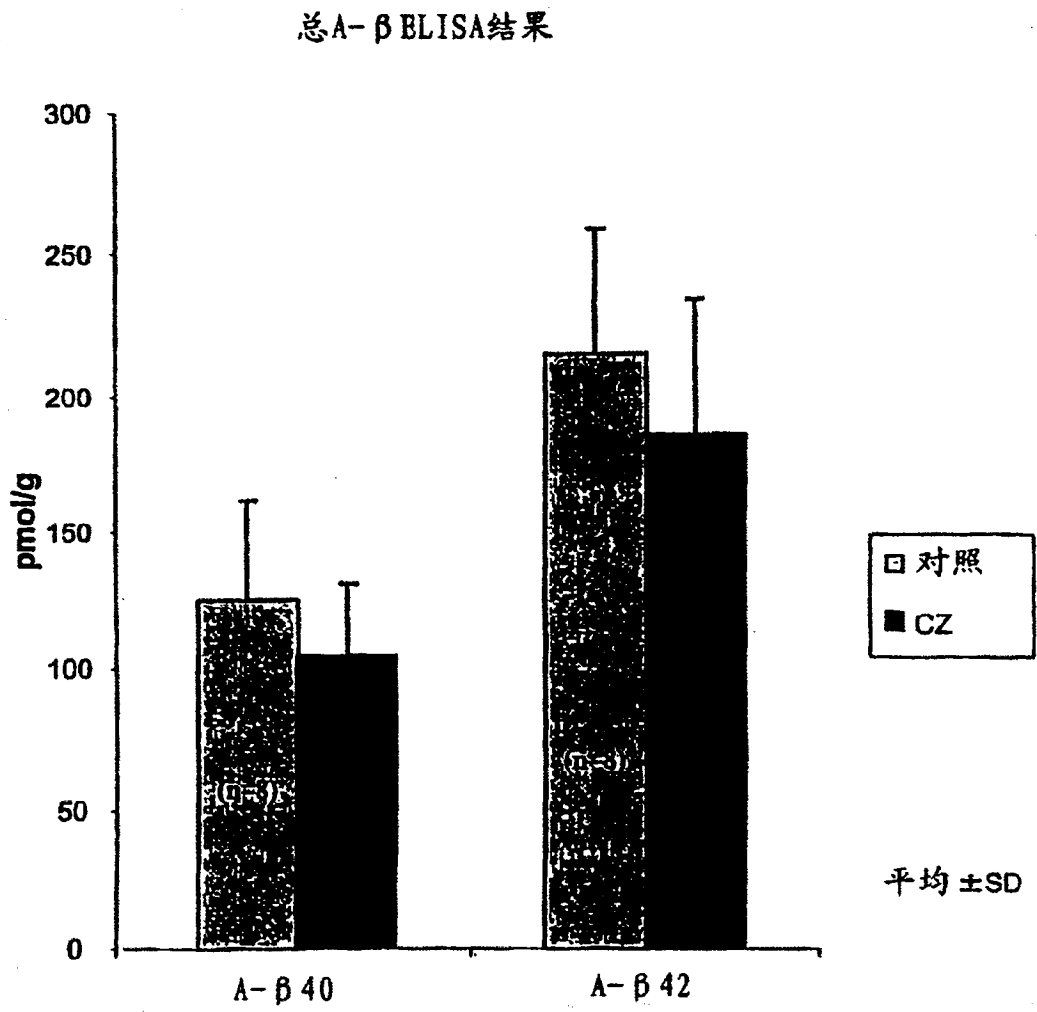


图 3

Y-迷宫

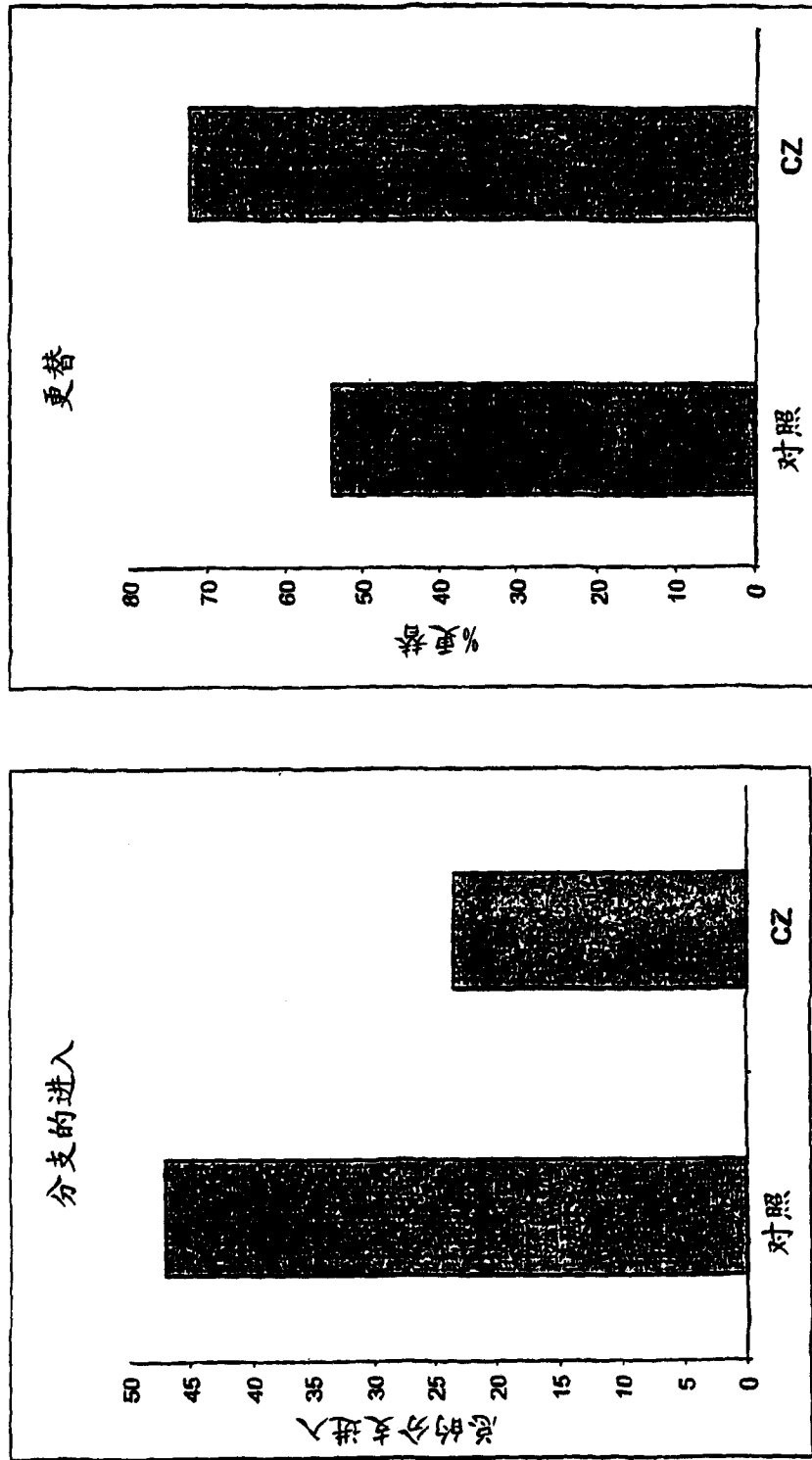


图 4