



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101835759 A

(43) 申请公布日 2010.09.15

- (21) 申请号 200880112882.3 *A61K 31/517*(2006.01)
- (22) 申请日 2008.10.17 *A61P 25/00*(2006.01)
- (30) 优先权数据 *A61P 25/16*(2006.01)
60/982247 2007.10.24 US *A61P 25/22*(2006.01)
A61P 25/24(2006.01)
- (85) PCT申请进入国家阶段日 *A61P 25/28*(2006.01)
2010.04.23
- (86) PCT申请的申请数据
PCT/US2008/080256 2008.10.17
- (87) PCT申请的公布数据
W02009/055308 EN 2009.04.30
- (71) 申请人 詹森药业有限公司
地址 比利时比尔斯
- (72) 发明人 B·C·舒克 P·F·杰克逊
- (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 曹小刚 艾尼瓦尔
- (51) Int. Cl.
C07D 239/70(2006.01)

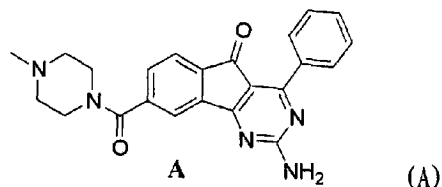
权利要求书 1 页 说明书 8 页

(54) 发明名称

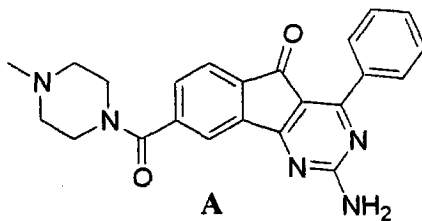
芳基茛并噻啉及其作为腺苷 A2a 受体拮抗剂的用途

(57) 摘要

本发明涉及一种新型芳基茛并噻啉 A 及其用作腺苷 A2a 受体拮抗剂的治疗和预防用途。可治疗的和 / 或预防的障碍包括帕金森氏病。



1. 化合物及其溶剂化物、水合物、互变异构体和可药用盐,其为:



2. 药物组合物,包含根据权利要求1所述的化合物和可药用载体。
3. 治疗患有通过拮抗受试者体内合适细胞中的腺苷 A2a 受体来改善的障碍的受试者的方法,其包括给所述受试者施用治疗有效剂量的根据权利要求1所述的化合物。
4. 预防通过拮抗受试者体内合适细胞中的腺苷 A2a 受体来改善的障碍的方法,包括在预计会引起通过拮抗所述受试者体内合适细胞中的腺苷 A2a 受体来改善的障碍的事件之前或之后,给所述受试者施用预防有效剂量的根据权利要求1所述的化合物。
5. 根据权利要求3所述的方法,包括给所述受试者施用治疗或预防有效剂量的根据权利要求2所述的药物组合物。
6. 根据权利要求4所述的方法,包括给所述受试者施用治疗或预防有效剂量的根据权利要求2所述的药物组合物。
7. 根据权利要求3所述的方法,其中所述障碍为神经变性障碍或运动障碍。
8. 根据权利要求3所述的方法,其中所述障碍选自帕金森氏病、亨廷顿氏舞蹈病、多系统萎缩症、皮质基底节变性、阿耳茨海默氏病和老年性痴呆。
9. 根据权利要求4所述的方法,其中所述障碍为神经变性障碍或运动障碍。
10. 根据权利要求4所述的方法,其中所述障碍选自帕金森氏病、亨廷顿氏舞蹈病、多系统萎缩症、皮质基底节变性、阿耳茨海默氏病和老年性痴呆。
11. 根据权利要求3所述的方法,其中所述障碍为帕金森氏病。
12. 根据权利要求3所述的方法,其中所述障碍为成瘾。
13. 根据权利要求3所述的方法,其中所述障碍为 ADHD。
14. 根据权利要求3所述的方法,其中所述障碍为抑郁症。
15. 根据权利要求3所述的方法,其中所述障碍为焦虑症。

芳基茛并啞啉及其作为腺苷 A2a 受体拮抗剂的用途

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于 2007 年 10 月 24 日提交的美国临时专利申请序列 No. 60/982, 247 的优先权。藉此将上述相关美国专利申请的全部公开内容以引用方式并入本文以用于各种目的。

技术领域

[0003] 本发明涉及新型芳基茛并啞啉及其治疗和预防用途。可治疗和 / 或预防的障碍包括通过拮抗腺苷 A2a 受体来改善的神经变性障碍和运动障碍。

背景技术

[0004] 腺苷 A2a 受体腺苷是一种由机体所有代谢活性细胞产生的嘌呤核苷酸。腺苷通过四种细胞表面受体亚型 (A1、A2a、A2b 和 A3) 发挥其作用, 这些亚型属于 G 蛋白偶联受体超家族 (Stiles, G. L. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267, 6451)。A1 和 A3 偶联成抑制型 G 蛋白, 而 A2a 和 A2b 偶联成激动型 G 蛋白。A2a 受体主要存在于脑中, 在神经元和神经胶质细胞两者中均有发现 (在纹状体和伏隔核中水平最高, 在嗅结节、下丘脑和海马等区域中水平中等至高水平) (Rosin, D. L. ; Robeva, A. ; Woodard, R. L. ; Guyenet, P. G. ; Linden, J. Journal of Comparative Neurology, 1998, 401, 163)。

[0005] 在外周组织中, A2a 受体见于血小板、嗜中性粒细胞、血管平滑肌和内皮中 (Gessi, S. ; Varani, K. ; Merighi, S. ; Ongini, E. ; Bores, P. A. British Journal of Pharmacology, 2000, 129, 2)。纹状体是调节运动活动 (特别是通过其起源于黑质的多巴胺能神经元发出的神经支配) 的主要脑部区域。纹状体是帕金森氏病 (PD) 患者中多巴胺能神经元变性的主要靶标。在纹状体中, A2a 受体与多巴胺 D2 受体共区域化, 提示这是脑中腺苷整合和多巴胺信号传导的主要部位 (Fink, J. S. ; Weaver, D. R. ; Rivkees, S. A. ; Peterfreund, R. A. ; Pollack, A. E. ; Adler, E. M. ; Reppert, S. M. Brain Research Molecular Brain Research, 1992, 14, 186)。

[0006] 神经化学研究已表明, A2a 受体的活化可降低 D2 激动剂对其受体的结合亲和性。在大鼠纹状体膜制备物 (Ferre, S. ; con Euler, G. ; Johansson, B. ; Fredholm, B. B. ; Fuxe, K. Proceedings of the National Academy of Sciences I of the United States of America, 1991, 88, 7238) 以及在使用 A2aR 和 D2R cDNA 转染后的成纤维细胞系 (Salim, H. ; Ferre, S. ; Dalal, A. ; Peterfreund, R. A. ; Fuxe, K. ; Vincent, J. D. ; Lledo, P. M. Journal of Neurochemistry, 2000, 74, 432) 中已证明了这种 D2R 和 A2aR 的受体 - 受体相互作用。在体内, 用 A2a 拮抗剂药理上阻断 A2a 受体可在包括小鼠、大鼠和猴的多种物种中导致多巴胺能神经毒素 MPTP (1- 甲基 -4- 苯基 -1, 2, 3, 6- 四氢吡啶) 诱导的 PC 中产生有益作用 (Ikeda, K. ; Kurokawa, M. ; Aoyana, S. ; Kuwana, Y. Journal of Neurochemistry, 2002, 80, 262)。

[0007] 此外, 已经发现, A2a 功能被基因阻断的 A2a 敲除小鼠在其暴露于神经毒素 MPTP 时对运动损伤和神经化学变化敏感性较低 (Chen, J. F. ; Xu, K. ; I Petzer, J. P. ; Steal,

R. ;Xu, Y.H. ;Beilstein, M. ;Sonsalla, P.K. ;Castagnoli, K. ;Castagnoli, N., Jr. ;Schwarzschild, M.A. *Journal of Neuroscience*, 2001, 121, RC1 43)。

[0008] 在人中,已发现腺苷受体拮抗剂茶碱在PD患者中产生有益作用(Mally, J. ;Stone, T.W. *Journal of the Neurological Sciences*, 1995, 132, 129)。与此相一致,最近的流行病学研究表明,高咖啡因消耗使人不太可能患PD(Ascherio, A. ;Zhang, S.M. ;Hernan, M.A. ;Kawachi, I. ;Colditz, G.A. ;Speizer, F.E. ;Willett, W.C. *Annals of Neurology*, 2001, 50, 56)。概括地说,腺苷 A_{2a} 受体阻滞剂可提供一类新的抗震颤麻痹药剂(Impagnatiello, F. ;Bastia, E. ;Ongini, E. ;Monopoli, A. *Emerging Therapeutic Targets*, 2000, 4, 635)。

[0009] A_{2A} 受体拮抗剂是用于治疗成瘾的特别有用的疗法。滥用(阿片制剂、可卡因、乙醇等)的主要用药可直接或间接调节神经元(特别是伏隔核中存在的那些)中的多巴胺信号传导,伏隔核中含有高水平的 A_{2A} 腺苷受体。已经显示腺苷信号传导途径可增强依赖性,并且还显示施用 A_{2A} 受体拮抗剂可减少对成瘾性物质的嗜欲(Ivan Diamond 和 Lina Yao 的“The Critical Role of Adenosine A_{2A} Receptors and G_i β γ Subunits in Alcoholism and Addiction: From Cell Biology to Behavior”(The Cell Biology of Addiction, 2006, 第 291-316 页)和 Stephen P. Hack and Macdonald J. Christie 的“Adaptations in Adenosine Signaling in Drug Dependence: Therapeutic Implications”, *Critical Review in Neurobiology*, 第 15 卷, 235-274 (2003))。还可参见 *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* (2007), 31 (8), 1302-1307。

[0010] A_{2A} 受体拮抗剂可用于治疗注意力缺陷多动障碍(ADHD),因为咖啡因(一种非选择性腺苷拮抗剂)可用于治疗 ADHD,并且多巴胺和腺苷神经元之间存在许多相互作用。*Clinical Genetics* (2000), 58 (1), 31-40 以及其中的参考文献。

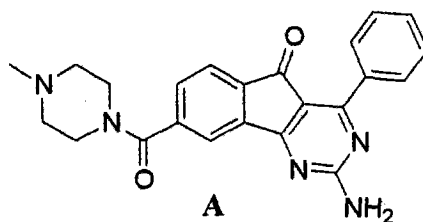
[0011] A_{2A} 受体拮抗剂是用于治疗抑郁症的特别有用的疗法。A_{2A} 拮抗剂已知可在多种抑郁症模型(包括强迫游泳试验和大鼠悬尾实验)中诱导活性。该阳性响应由多巴胺能性传递所介导并且由逃生引导的行为引起而不是由运动刺激效果引起。*Neurology* (2003), 61 (增刊 6) S82-S87。

[0012] A_{2A} 受体拮抗剂是用于治疗焦虑症的特别有用的疗法。A_{2A} 拮抗剂已显示可抑制体内情绪/焦虑反应。*Neurobiology of Disease* (2007), 28 (2) 197-205。

发明内容

[0013] 化合物 A 是有效的腺苷 A_{2a} 受体的小分子拮抗剂。

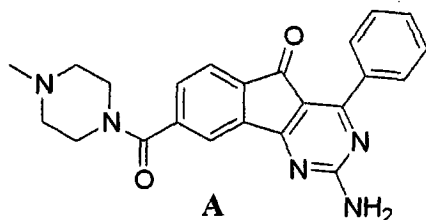
[0014]



具体实施方式

[0015] 本发明提供了化合物 A

[0016]



[0017] 和它们的溶剂化物、水合物、互变异构体及可药用盐。

[0018] 本发明还提供了治疗患有通过拮抗腺苷 A2a 受体来改善的病症的受试者的方法，该方法包括给该受试者施用治疗有效剂量的本发明的药物组合物。

[0019] 本发明还提供了预防受试者中通过拮抗腺苷 A2a 受体来改善的障碍的方法，包括在预计会引起通过拮抗该受试者中的腺苷 A2a 受体来改善的障碍的事件之前或之后，给该受试者施用预防有效剂量的根据权利要求 1 所述的化合物。

[0020] 本发明的化合物可作为游离碱分离和使用。它们也可作为可药用盐分离和使用。

[0021] 这样的盐的例子包括氢溴酸盐、氢碘酸盐、盐酸盐、高氯酸盐、硫酸盐、马来酸盐、富马酸盐、苹果酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、己二酸盐、苯甲酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、羟乙磺酸盐、苯磺酸盐、草酸盐、棕榈酸盐 (palmoic), 2- 萘磺酸盐、对甲苯磺酸盐、环己烷基氨基磺酸盐和葡糖二酸盐。

[0022] 本发明还提供了包含本发明化合物和可药用载体的药物组合物。

[0023] 可药用载体是本领域技术人员所熟知的，包括但不限于约 0.01 至约 0.1M，优选 0.05M 的磷酸盐缓冲液或 0.8% 的盐水。这样的可药用载体可以是水性的或非水性的溶液、悬浮液或乳液。非水溶剂的例子为丙二醇、聚乙二醇、诸如橄榄油之类的植物油和诸如油酸乙酯之类的注射用有机酯。水性载体包括水、乙醇、醇 / 水溶液、甘油、包括盐水和缓冲介质的乳液或悬浮液。口服载体可以是酞剂、糖浆剂、胶囊剂、片剂等。典型的固体载体是惰性物质，如乳糖、淀粉、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、磷酸二钙、甘露醇等。胃肠外用载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸盐林格氏溶液和不挥发油。静脉内用载体包括流体和营养补充物、电解质补充物，例如基于林格氏葡萄糖的那些等等。

[0024] 还可存在防腐剂和其添加剂，例如抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。可以采用本领域已知的常规技术，根据需要将所有载体与崩解剂、稀释剂、制粒剂、润滑剂、粘合剂等混合。

[0025] 本发明还提供了治疗患有通过拮抗腺苷 A2a 受体来改善的病症的受试者的方法，该方法包括给该受试者施用治疗有效剂量的本发明的药物组合物。

[0026] 在一个实施例中，所述障碍为神经变性障碍或运动障碍。可用本发明药物组合物治疗的障碍的例子包括但不限于帕金森氏病、亨廷顿舞蹈病、多系统萎缩、皮质基底节变性、阿耳茨海默氏病和老年性痴呆。

[0027] 在一个优选实施例中，所述障碍是帕金森氏病。

[0028] 如本文所用，术语“受试者”包括但不限于患有通过拮抗腺苷 A2a 受体来改善的障碍的任何动物或经人工修饰的动物。在一个优选的实施例中，受试者是人。

[0029] 可使用本领域技术人员已知的多种方法中的任意一种来实现或实施本发明药物组合物的施用。本发明的化合物可例如经静脉内、肌内、口服或皮下施用。在一个优选实施例中，本发明的药物组合物通过口服施用。另外，施用可包括在一段合适的时间周期内将多次剂量给予受试者。这样的给药方案可根据常规方法来确定。

[0030] 如本文所用，药物组合物的“治疗有效剂量”是足以停止、逆转或减缓障碍进程的量。药物组合物的“预防有效剂量”是足以预防疾病，即消除、改善和 / 或延缓疾病发作的量。用于确定本发明药物组合物的治疗和预防有效剂量的方法是本领域已知的。例如可根据动物实验的结果用数学方法来确定给人施用药物组合物的有效剂量。

[0031] 在一个实施例中，治疗和 / 或预防有效剂量是足以递送约 0.001mg/kg 体重至约 200mg/kg 体重的本发明药物组合物的剂量。在另一个实施例中，治疗和 / 或预防有效剂量是足以递送约 0.05mg/kg 体重至约 50mg/kg 体重的剂量。更具体地讲，在一个实施例中，口服剂量在每日约 0.05mg/kg 至约 100mg/kg 的范围内。在另一个实施例中，口服剂量在每日约 0.05mg/kg 至约 50mg/kg 的范围内，并且在另一个实施例中，在每日约 0.05mg/kg 至约 20mg/kg 的范围内。在又一个实施例中，输注剂量的范围为在约数分钟至约数日的周期内约 1.0ug/kg/min 至约 10mg/kg/min 的与可药用载体混合的抑制剂。在另一个实施例中，对于局部给药而言，本发明的化合物可与药用载体以约 0.001 至约 0.1 的药物 / 载体比混合。

[0032] 本发明还提供了在哺乳动物中治疗成瘾的方法，包括施用治疗有效剂量的式 A 化合物。

[0033] 本发明还提供了在哺乳动物中治疗 ADHD 的方法，包括施用治疗有效剂量的式 A 化合物。

[0034] 本发明还提供了在哺乳动物中治疗抑郁症的方法，包括施用治疗有效剂量的式 A 化合物。

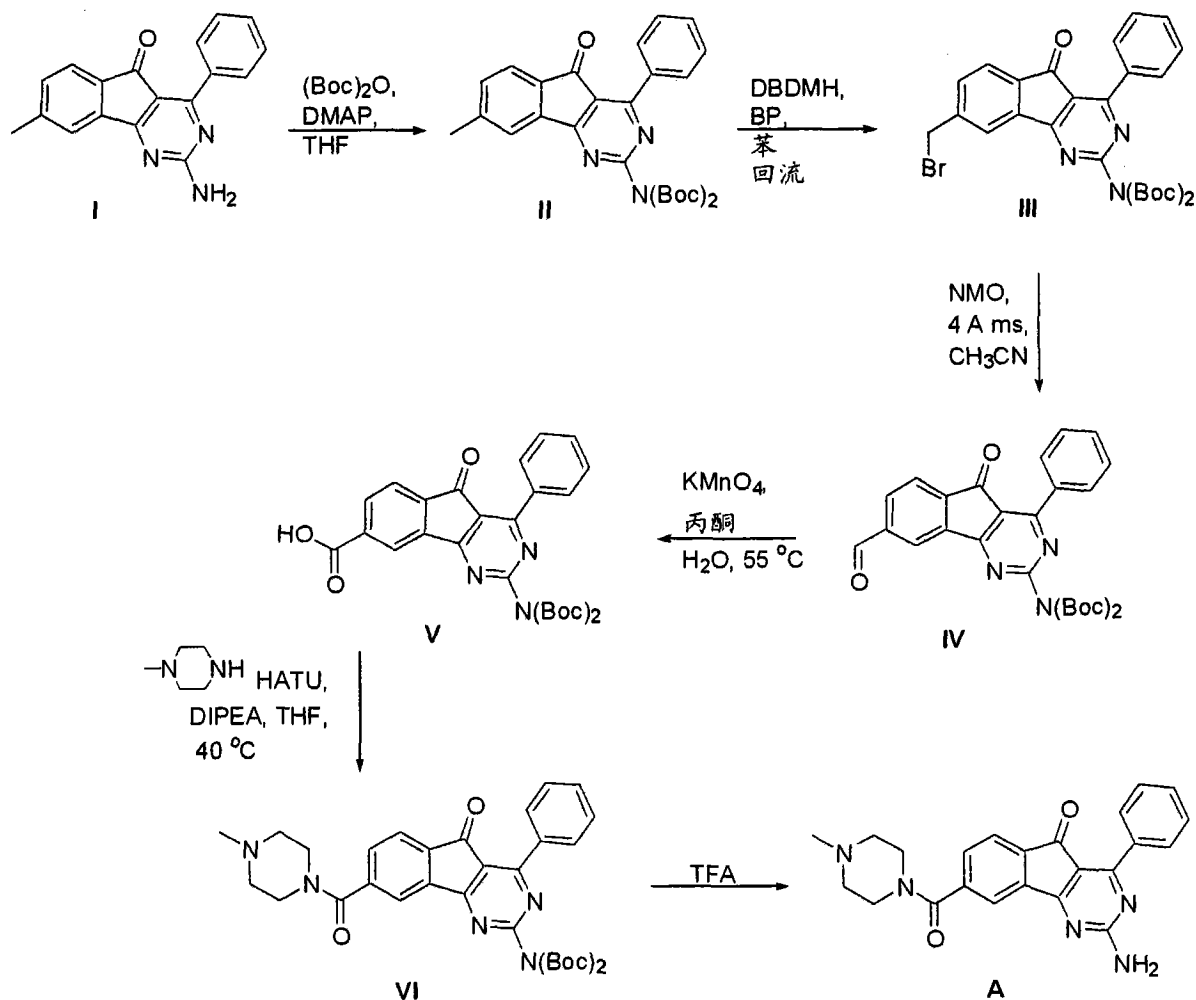
[0035] 本发明还提供了在哺乳动物中治疗焦虑症的方法，包括施用治疗有效剂量的式 A 化合物。

[0036] 实例：

[0037] 化合物 A 可通过本领域技术人员已知的方法制备。下面的反应方案仅意在给出本发明的实例并且绝不意在限制本发明。

[0038] 方案 1

[0039]



[0040] 化合物 A 可通过本领域技术人员已知的方法制备。下面的反应方案仅意在给出本发明的实例并且绝不意在限制本发明。

[0041] 方案 1 示出了可得到化合物 A 的合成路线。从氨基嘧啶 I 开始并按照箭头指示的路线,可在存在二甲基氨基吡啶 (DMAP) 的情况下在四氢呋喃 (THF) 中用二叔丁基二碳酸酯 $(\text{Boc})_2\text{O}$ 来实现氨基 (NH_2) 的保护。在苯中使用 1,3-二溴-5,5-二甲基乙内酰脲 (DBDMH) 和过氧化苯甲酰 (BP) 在回流下,所得的二 Boc 保护的 II 可发生自由基引发的苄基溴化而得到相应的苄基溴 III。然后在乙腈 (CH_3CN) 中使用 4-甲基吗啉 N-氧化物 (NMO) 和 4 Å 分子筛 (ms), 苄基溴 III 可被氧化成相应的醛 IV。在 55°C 下在丙酮/水混合物中使用高锰酸钾 (KMnO_4), 所得的醛 IV 可进一步氧化成相应的羧酸 V。然后在 40°C 下在 THF 中使用 1-甲基哌嗪、O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯 (HATU) 和二异丙基乙胺 (DIPEA), 羧酸 V 可转化为相应的酰胺 VI。最后,酰胺 VI 可用三氟乙酸 (TFA) 去保护而得到化合物 A。

[0042] 实例 A: 步骤 a

[0043] (II): 将纯二甲基氨基吡啶 (850mg, 7.0mmol) 加至 I (20.0g, 69.7mmol) 和 $(\text{Boc})_2\text{O}$ (38.0g, 174.2mmol) 的 THF 溶液 (300mL) 中。2 小时后,用乙酸乙酯 (EtOAc) 稀释该混合物,然后用水和盐水洗涤,干燥 (Na_2SO_4) 并浓缩。将所得的固体悬浮于 EtOAc (250mL) 中并过滤。用 EtOAc ($2 \times 100\text{mL}$) 洗涤该固体,然后真空干燥而得到 25.6g II。

[0044] 实例 A: 步骤 b

[0045] (III) :通过升温将 II (25.6g, 52.6mmol) 完全溶解于苯 (200mL) 中, 然后连续加入二溴二甲基乙内酰胺 (8.3g, 28.9mmol) 和过氧化苯甲酰 (1.0g, 4.2mmol)。将该混合物加热至回流 16 小时。然后使溶液冷却至室温, 用 EtOAc 稀释, 然后用饱和的含水 NaHCO₃、水和盐水洗涤。对溶液进行干燥 (Na₂SO₄)、浓缩并通过柱层析 (5-20% EtOAc/ 庚烷) 进行纯化。第一次层析得到 6g 含有约 10% II 的 III, 第二次层析得到另外 12g 含有 10% II 的 III。

[0046] 实例 A : 步骤 c

[0047] (IV) :将固体 N- 甲基吗啉 N- 氧化物 (2.5g, 21.2mmol) 加入 III (6.0g, 10.6mmol) 和 4 Å ms (10.5g) 的 CH₃CN (300mL) 溶液中。室温下 18 小时后, 过滤该混合物并用 EtOAc 对滤液进行稀释、用水和盐水洗涤、干燥 (Na₂SO₄), 并进行层析而得到 3.6g 的 IV。

[0048] 实例 A : 步骤 d

[0049] (V) :将固体 KMnO₄ 加入 IV (3.6g, 7.2mmol) 的丙酮 / 水溶液 (100mL/25mL) 中, 并将所得的混合物加热至 55°C。14 小时后, 将混合物冷却至室温并过滤。将滤液用 EtOAc 稀释并用水和盐水洗涤、干燥 (Na₂SO₄)、浓缩并通过柱层析纯化而得到 2.1g 的 V。

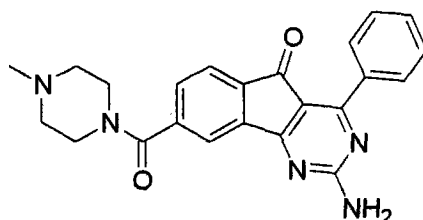
[0050] 实例 A : 步骤 e

[0051] (VI) :将纯哌嗪 (0.4mL, 3.6mmol) 加入酸 V (1.7g, 3.3mmol)、二异丙基乙胺 (1.7mL, 9.9mmol) 和 HATU (1.3g, 3.3mmol) 的 THF 溶液 (60mL) 中。将所得的混合物加热至 40°C。18 小时后, 将该混合物浓缩并通过柱层析进行纯化而得到 1.8g 酰胺 VI。

[0052] 实例 A : 步骤 f

[0053] 2- 氨基 -8-(4- 甲基 - 哌嗪 -1- 羰基) -4- 苯基 - 茚并 [1,2-d] 嘧啶 -5- 酮

[0054]



JNJ-39928122

[0055] (A) :然后将酰胺 VI 在 25mL CH₂Cl₂/TFA (4 : 1) 中搅拌。3 小时后, 浓缩混合物, 用饱和的含水 NaHCO₃ 中和并过滤而得到 1g 粗的 A。通过柱层析纯化固体而得到 893mg 的该游离碱, 将其溶解于 THF 中并加入 10mL 乙醚中的 1N HCl, 浓缩, 并真空干燥而得到 (A) 的二盐酸盐。¹H NMR (400MHz, 氯仿 -d) δ ppm 2.34 (s, 3H), 2.39 (br. s., 2H), 2.52 (d, J = 2.20Hz, 2H), 3.46 (br. s., 2H), 3.84 (br. s., 2H), 5.86 (br. s., 2H), 7.46-7.64 (m, 4H), 7.78 (d, J = 7.58Hz, 1H), 7.85 (s, 1H), 8.07 (dd, J = 7.83, 1.71Hz, 2H); MS m/e 400 (M+H)。

[0056] 生物学测定及活性腺苷 A2a 受体的配体结合测定

[0057] 使用含有人 A2a 腺苷受体 (PerkinElmer, RB-HA2a) 的 HEK293 细胞的质膜和放射性配体 [3H]CGS21680 (PerkinElmer, NET1021), 进行腺苷 A2a 受体的配体结合测定。在总体积为 200 μL 的 96-孔聚丙烯板中, 通过顺序加入 20pL1 : 20 稀释膜、含有 [3H]CGS21680 的测定缓冲液 (50mM Tris HCl, pH7.4, 10mM MgCl₂, 1mM EDTA)、50 μL 用试验缓冲液稀释的化合物 (4x) 或溶媒对照来建立测定。通过 80mM 的 NECA 测定非特异性结合。在室温下进行反应 2 小时, 然后通过预先在含有 0.3% 聚乙烯亚胺的 50mM Tris HCl (pH7.4) 中浸泡

过的 96 孔 GF/C 滤板进行过滤。然后用冷的 50mM Tris HCl (pH7.4) 将板洗涤 5 次、干燥并在底部密封。每孔加 30 μ L 的微闪烁液 (Microscintillation fluid) 并密封顶部。针对 [3H], 用 Packard Topcount 对所述板进行计数。用 Microsoft Excel 和 GraphPad Prism 程序对数据进行分析 (Varani, K. ; Gessi, S. ; Dalpiaz, A. ; Borea, P. A. British Journal of Pharmacology, 1996, 117, 1693)。腺苷 A_{2a} 受体功能测定 : 将过量表达人腺苷 A_{2a} 受体且含有 cAMP- 诱导型 β -半乳糖苷酶报道基因的 CHO-K1 细胞以 40-50K/ 孔接种至 96- 孔组织培养板中, 并培养两天。在测定当天, 用 200 μ L 测定培养基 (F-12 营养混合物 / 0.1% BSA) 洗涤细胞一次。对于激动剂测定, 随后加入腺苷 A_{2a} 受体激动剂 NECA, 并在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下将细胞温育 5 小时, 然后终止反应。就拮抗剂测定而言, 将细胞在室温下与拮抗剂一起温育 5 分钟, 然后添加 50nM NECA。然后将细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下温育 5 小时, 之后通过用 PBS 洗涤细胞两次来终止实验。将 50 μ L 1X 溶胞缓冲液 (Promega, 5X 储液, 在使用前需要将其稀释至 1x) 加至每孔, 并将板在 -20 $^{\circ}$ C 下冷冻。对于 β -半乳糖苷酶的酶比色测定, 将板在室温下解冻, 并将 50 μ L 2X 测定缓冲液 (Promega) 加至每孔中。让其在 37 $^{\circ}$ C 下显色 1 小时或直到出现适当的信号为止。然后用 150AL 的 1M 碳酸钠停止反应。在 Vmax Machine (Molecular Devices) 上于 405nm 对板进行计数。用 Microsoft Excel 和 GraphPad Prism 程序对数据进行分析。(Chen, W. B. ; Shields, T. S. ; Cone, R. D. Analytical Biochemistry, 1995, 226, 349 ; Stiles, G. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267, 6451) ; 氟哌啶醇诱导的 C57b1/6 小鼠僵住症研究 : 在啮齿动物房中, 每笼装两只雄性成年 C57b1/6 小鼠 (9-12 周龄, 来自 ACE)。使室温保持在 64-79 度, 且湿度在 30-70%, 并按 12 小时照明 / 12 小时黑暗周期进行室内照明。在所述研究的那天, 将小鼠转移至研究室。以 1.5mg/kg、7.5ml/kg, 给小鼠皮下注射氟哌啶醇 (Sigma H1512, 用 0.3% 酒石酸配制成 1.0mg/ml, 然后用盐水稀释至 0.2mg/ml) 或溶媒。然后将小鼠置于其所住笼中, 可获得水和食物。30 分钟后, 将溶媒 (盐水中的 0.3% 的吐温 80) 或化合物以 10mg/kg, 10ml/kg (化合物, 1mg/ml, 用盐水中的 0.3% 的吐温 80 配制, 用超声处理而获得均一悬浮液) 经口对所述小鼠进行给药。然后, 将小鼠置于其所住笼中, 可获得水和食物。在口服给药后 1 小时, 进行所述僵住症试验。对于该试验, 使用一种竖直的金属线栅 (1.0cm 的方格)。

[0058] 将小鼠置于所述栅格上并且给几秒钟以安定下来, 记录它们的不动时间, 直到所述小鼠移动它们的后爪为止。轻轻地将小鼠从所述栅格移出并放回所述栅格上, 再次对它们不动的时间计时。重复所述测定三次。将三次测量结果的平均值用于数据分析。

[0059] A_{2a} 测定数据

[0060]	化合物	基于 A _{2a} 细胞的功能 K _i	基于 A ₁ 细胞的功能 K _i
	A	8.2nM	58.4nM

[0061] AMES 测定条件

[0062] 本研究的目的是体外评估在存在和不存在微粒体活化系统的情况下处理时, 本发明化合物在细菌中诱导逆向点突变 (reverse-point mutation) 的能力。

[0063] 使用鼠伤寒沙门氏菌 (Salmonella typhimurium) 菌株 TA98、TA100、TA1535、TA1537 和大肠杆菌 (Escherichia coli) 菌株 WP₂uvrA, 在细菌 / 微粒体活化平板掺入测定法中对化合物进行检测。该实验包括在不存在通过 Aroclor[®] 1254- 诱导的大鼠肝脏微粒体制剂 (S9mix) 实现代谢活化的情况下 (使用缓冲液) 和在存在 Aroclor[®] 1254- 诱导的

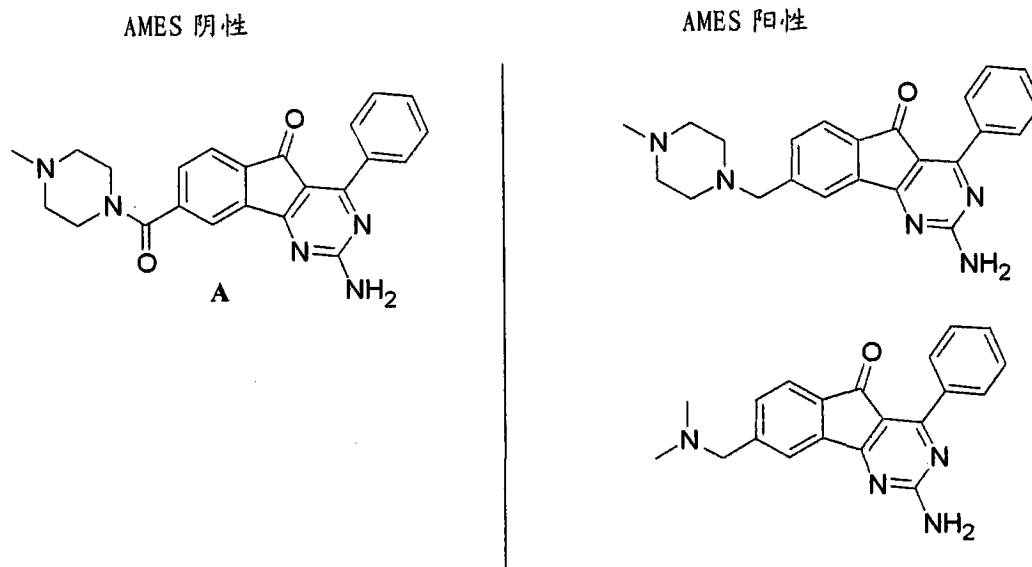
大鼠肝脏微粒体制剂 (S9mix) 实现代谢活化的情况下进行的测试。将化合物在两种代谢条件下在所有菌株中以每个平板 5、10、25、50、100、250、500、1000、2500 和 5000 μ g 的剂量进行检测。通过表型反转为氨基酸原养型来检测突变 (对鼠伤寒沙门氏菌或大肠杆菌分别是组氨酸或色氨酸)。如果其诱导回复突变体频率剂量依赖性增加为合适的同期溶媒对照中所观察到的增加值的至少 2 倍 (对 TA1535 和 TA1537 为 3 倍), 则检测品将被认为是阳性的 (有诱变)。此外, 该响应应该是可重复的。通过剂量依赖性的菌落计数降低和 / 或菌苔减少 / 不存在来检测毒性。将用溶媒处理过的平板作为用于突变和毒性两者的比较的标准。阳性对照板用于确保该检测体系的功能性。

[0064] 对所有菌株在不存在和存在 S9mix 的情况下均获得了可接受的阴性对照和阳性指示物结果。这确保该检测体系有用并且灵敏。

[0065] AMES 测定结果

[0066] 针对本发明的三种化合物, 下面的结果可证明所需的 AMES- 阴性性质。不是所有该测定中检测的化合物发现为 AMES- 阴性。为了进行比较, 显示了两种具有不期望的 AMES- 阳性性质的相似分子。对于该测定, AMES- 阴性被认为是所期望的特性。

[0067]



[0068] 虽然上述说明书以提供实例用于说明目的的方式教授了本发明的原理, 但应当理解, 本发明的实践涵盖了在如下权利要求书和它们的等同物范围内的所有常见变型形式、改变形式和 / 或修改形式。

[0069] 藉此将上面说明书中公开的所有出版物全文以引用的方式并入本文。