

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07D333/34

A61K 31/38



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99803301.4

[45] 授权公告日 2004 年 1 月 28 日

[11] 授权公告号 CN 1136212C

[22] 申请日 1999.1.14 [21] 申请号 99803301.4

[30] 优先权

[32] 1998.1.16 [33] US [31] 60/072,790

[86] 国际申请 PCT/US99/00786 1999.1.14

[87] 国际公布 WO99/36420 英 1999.7.22

[85] 进入国家阶段日期 2000.8.24

[71] 专利权人 桑道药品有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 J·A·凯莱赫 K·R·梅普斯

张永康

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 陈昕

权利要求书 8 页 说明书 32 页

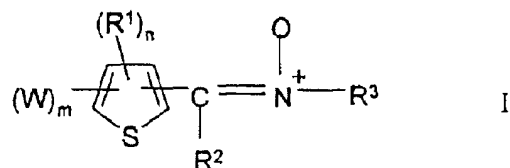
[54] 发明名称 噻吩硝酮化合物

[57] 摘要

公开了新的噻吩硝酮化合物和含有该类化合物的药物组合物。所公开的组合物可以用作预防和/或治疗哺乳动物的神经变性疾病、自身免疫疾病和炎症性疾病的治疗剂和用作监测自由基的分析试剂。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 式 I 的化合物、其光学异构体和外消旋体及其可药用盐:



其中,

各 R^1 分别选自氢、烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、烷氧基、取代烷氧基、环烷基和卤素;

R^2 选自氢、烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基和环烷基烷基;

R^3 选自烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基、环烷基烷基和环烯基;

各 W 分别选自 $-SR^4$ 、 $-S(O)R^5$ 、 $-SO_2R^6$ 、 $-SO_3Y$ 和 $-SO_2NR^7R^8$, 其中 Y 是氢或药学允许的阳离子;

R^4 选自烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基、环烷基烷基和环烯基;

R^5 选自烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基、环烷基烷基和环烯基;

R^6 选自烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基、环烷基烷基和环烯基;

R^7 和 R^8 分别选自氢、烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基、环烷基烷基和环烯基; 或者 R^7 和 R^8 与其相连的氮原子合在一起形成含有 2-8 个碳原子的杂环, 其中可选再含有 1-3 个杂原子, 选自氧、氮和硫;

m 是 1-3 的整数; n 是 0-2 的整数, 条件是 $m+n=3$ 。

2. 权利要求 1 的化合物, 其中 m 为 1。

3. 权利要求 2 的化合物, 其中 R^1 是氢。

4. 权利要求 3 的化合物, 其中 R^2 是氢。

5. 权利要求4的化合物, 其中 R^3 选自烷基、取代烷基和环烷基。
6. 权利要求5的化合物, 其中 R^3 是异丙基、叔丁基或环己基。
7. 权利要求5的化合物, 其中 R^4 选自烷基、取代烷基、芳烷基、芳基和环烷基。
8. 权利要求7的化合物, 其中 R^4 是取代苯基, 如下式所示:

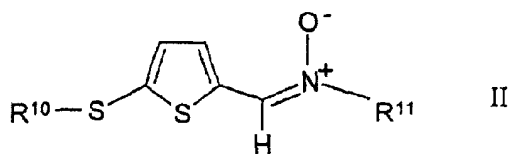


其中各 R^9 分别选自烷基、取代烷基、环烷基、芳烷基、芳基、烷氧基、取代烷氧基、芳氧基、芳烷氧基、环烷氧基、酰基、酰基氨基、氨基羰基、烷氧基羰基、羧基、氰基、卤素、羟基、硝基、磺基、烷硫基和 $NR^{10}R^{11}$, 其中 R^{10} 和 R^{11} 分别选自氢、烷基、取代烷基或芳基; 或者两个相邻的 R^9 共同形成亚烷基或亚烷二氧基基团;

p 是1-5的整数。

9. 权利要求8的化合物, 其中 p 是1或2。
10. 权利要求5的化合物, 其中 R^5 选自烷基、取代烷基、芳烷基、芳基和环烷基。
11. 权利要求5的化合物, 其中 R^6 选自烷基、取代烷基、芳烷基、芳基和环烷基。
12. 权利要求5的化合物, 其中 R^7 和 R^8 分别选自氢、烷基和环烷基; 或者 R^7 和 R^8 与其相连的氮原子合在一起形成含有4-6个碳原子的杂环。

13. 权利要求1的化合物, 是式II的化合物, 其光学异构体和外消旋体及其可药用盐:

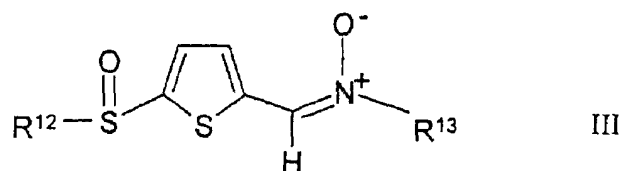


其中,

R^{10} 选自烷基、取代烷基、芳烷基、芳基和环烷基;

R^{11} 选自烷基和环烷基。

14. 权利要求 1 的化合物，是式 III 的化合物、其光学异构体和外消旋体及其可药用盐：

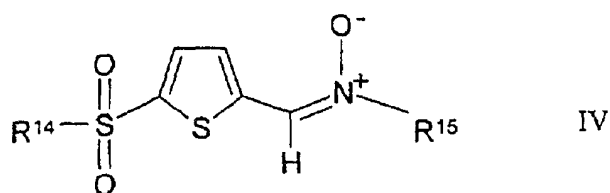


其中，

R^{12} 选自烷基、取代烷基、芳烷基、芳基和环烷基；

R^{13} 选自烷基和环烷基。

15. 权利要求 1 的化合物，是式 IV 的化合物、其光学异构体和外消旋体及其可药用盐：

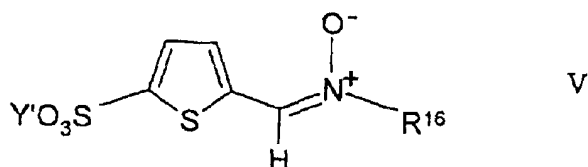


其中，

R^{14} 选自烷基、取代烷基、芳烷基、芳基和环烷基；

R^{15} 选自烷基和环烷基。

16. 权利要求 1 的化合物，是式 V 的化合物、其光学异构体和外消旋体及其可药用盐：



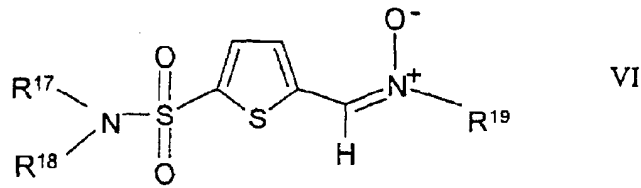
其中，

R^{16} 选自烷基、取代烷基、芳烷基、芳基和环烷基；

Y' 是氢或药学允许的阳离子。

17. 权利要求 1 的化合物，是式 VI 的化合物、其光学异构体和外

消旋体及其可药用盐:



其中,

R^{17} 和 R^{18} 分别选自氢、烷基、取代烷基、芳烷基、芳基和环烷基;
或 R^{17} 和 R^{18} 与其相连的氮原子一起形成含有 4-6 个碳原子的杂环, 其中可选再含有 1-3 个选自氧、氮和硫的杂原子;

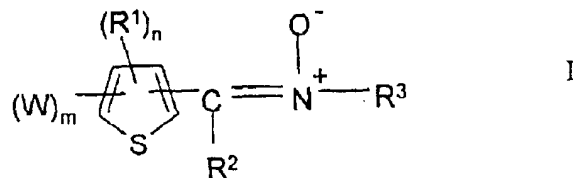
R^{19} 选自烷基和环烷基。

18. 权利要求 1 的化合物, 是选自下列的化合物:

α -[2-(4-甲氧基苯硫基)-5-噻吩基]-N-叔丁基硝酮

α -[2-(4-甲氧基苯硫基)-5-噻吩基]-N-环己基硝酮。

19. 含有可药用载体和有效药物量的式 I 化合物、其光学异构体、外消旋体及其可药用盐的药用组合物:



其中,

各 R^1 分别选自氢、烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、烷氧基、取代烷氧基、环烷基和卤素;

R^2 选自氢、烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基和环烷基烷基;

R^3 选自烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基、环烷基烷基和环烯基;

各 W 分别选自 $-SR^4$ 、 $-S(O)R^5$ 、 $-SO_2R^6$ 、 $-SO_3Y$ 和 $-SO_2NR^7R^8$, 其中 Y 是氢或药学允许的阳离子;

R^4 选自烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、

环烷基、环烷基烷基和环烯基；

R^5 选自烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基、环烷基烷基和环烯基；

R^6 选自烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基、环烷基烷基和环烯基；

R^7 和 R^8 分别选自氢、烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基、环烷基烷基和环烯基；或者 R^7 和 R^8 与其相连的氮原子合在一起形成含有 2-8 个碳原子的杂环，其中可选再含有 1-3 个杂原子，选自氧、氮和硫；

m 是 1-3 的整数； n 是 0-2 的整数，条件是 $m+n=3$ 。

20. 权利要求 19 的药用组合物，其中 m 为 1。

21. 权利要求 20 的药用组合物，其中 R^1 是氢。

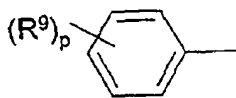
22. 权利要求 21 的药用组合物，其中 R^2 是氢。

23. 权利要求 22 的药用组合物，其中 R^3 选自烷基、取代烷基和环烷基。

24. 权利要求 23 的药用组合物，其中 R^3 是异丙基、叔丁基或环己基。

25. 权利要求 23 的药用组合物，其中 R^4 选自烷基、取代烷基、芳烷基、芳基和环烷基。

26. 权利要求 25 的药用组合物，其中 R^4 是取代苯基，如下式所示：



其中各 R^9 分别选自烷基、取代烷基、环烷基、芳烷基、芳基、烷氧基、取代烷氧基、芳氧基、芳烷氧基、环烷氧基、酰基、酰基氨基、氨基羰基、烷氧基羰基、羧基、氰基、卤素、羟基、硝基、磺基、烷硫基和 $NR^{10}R^{11}$ ，其中 R^{10} 和 R^{11} 分别选自氢、烷基、取代烷基或芳基；或者两个相邻的 R^9 共同形成亚烷基或亚烷二氧基基团；

p 是 1-5 的整数。

27. 权利要求 26 的药用组合物，其中 p 是 1 或 2。

28. 权利要求 23 的药用组合物，其中 R⁵ 选自烷基、取代烷基、芳烷基、芳基和环烷基。

29. 权利要求 23 的药用组合物，其中 R⁶ 选自烷基、取代烷基、芳烷基、芳基和环烷基。

30. 权利要求 23 的药用组合物，其中 R⁷ 和 R⁸ 分别选自氢、烷基和环烷基；或者 R⁷ 和 R⁸ 与其相连的氮原子合在一起形成含有 4-6 个碳原子的杂环。

31. 权利要求 19 的药物组合物，载体是口服载体。

32. 权利要求 19 的药物组合物，载体是注射用载体。

33. 权利要求 1 化合物在制备治疗神经变性病人或预防有发展成神经变性疾病危险性的病人神经变性疾病发生的药物中的应用。

34. 权利要求 33 的应用，神经变性疾病为早老性痴呆、帕金森氏病或 HIV 痴呆。

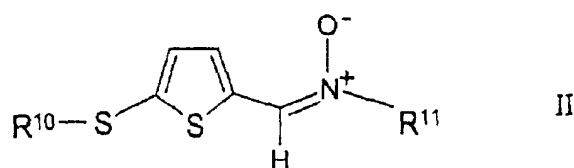
35. 权利要求 1 化合物在制备治疗自身免疫疾病患者或预防具有发展成自身免疫疾病危险性患者自身免疫疾病发生的药物中的应用。

36. 权利要求 35 的应用，自身免疫疾病为全身性狼疮或多发性硬化。

37. 权利要求 1 的化合物在制备治疗患者炎症疾病或预防具有发展成炎症疾病危险的患者炎症疾病发生的药物中的应用。

38. 权利要求 37 的应用，炎症疾病为类风湿性关节炎、脓毒性休克、红斑结节状麻风病、败血症、成人呼吸窘迫综合症、炎症性肠疾病和眼色素层炎。

39. 制备式 II 化合物的方法，

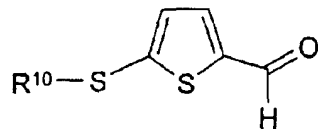


其中，

R^{10} 选自烷基、取代烷基、芳烷基、芳基和环烷基；

R^{11} 选自烷基和环烷基；所述方法包括以下步骤：

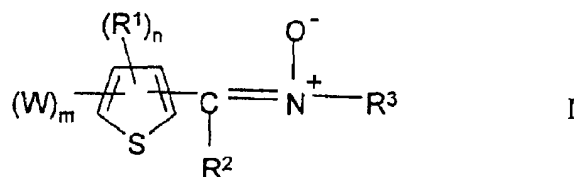
(a) 用 2-溴-5-噻吩甲醛在碱存在下处理如式 $R^{10}-SH$ 所示的硫醇(酚)衍生物，得到下式的硫醚羰基化合物，



(b) 用下式的羟基胺化合物处理硫醚羰基化合物，得到式 II 的化合物，其中 R^{10} 和 R^{11} 定义同上。



40. 式 I 的化合物、其光学异构体和外消旋体及其可药用盐在制备药物中的应用：



其中，

各 R^1 分别选自氢、烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、烷氧基、取代烷氧基、环烷基和卤素；

R^2 选自氢、烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基和环烷基烷基；

R^3 选自烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基、环烷基烷基和环烯基；

各 W 分别选自 $-SR^4$ 、 $-S(O)R^5$ 、 $-SO_2R^6$ 、 $-SO_3Y$ 和 $-SO_2NR^7R^8$ ，其中 Y 是氢或药学允许的阳离子；

R^4 选自烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基、环烷基烷基和环烯基；

R^5 选自烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基、环烷基烷基和环烯基；

R^6 选自烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基、环烷基烷基和环烯基；

R^7 和 R^8 分别选自氢、烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基、环烷基烷基和环烯基；或者 R^7 和 R^8 与其相连的氮原子合在一起形成含有2-8个碳原子的杂环，其中可选再含有1-3个杂原子，选自氧、氮和硫；

m 是1-3的整数； n 是0-2的整数，条件是 $m+n=3$ 。

41. 权利要求1的化合物在制备用于治疗或预防神经变性疾病药物中的应用。

42. 权利要求1的化合物在制备用于治疗或预防自身免疫疾病药物中的应用。

43. 权利要求1的化合物在制备用于治疗或预防炎症疾病药物中的应用。

噻吩硝酮化合物

相关申请的交叉参考文献

本申请要求保护下列美国专利申请的权益：1998年1月16日申请的60/072,790号美国在先申请，该申请在此整体引入作为参考。

发明背景

发明领域

本发明涉及新的噻吩硝酮类化合物及其作为治疗剂和分析试剂的应用。更具体地说，本发明涉及新噻吩硝酮类化合物及其作为用于治疗 and/或预防哺乳动物神经性、自身免疫性和炎症疾病的治疗剂和作为自由基分析试剂的应用。

现有技术

老年性痴呆 (Alzheimer's disease) 是一种神经变性疾病，其中脑中的神经细胞被系统地破坏，导致进行性记忆丧失和精神错乱并最终导致死亡。国家老年研究院 (The National Institute on Aging (NIA)) 最近估计：目前在美国约有 4 百万人患有老年性痴呆。目前对于有效地预防该疾病或消除其症状尚缺乏治疗方法。

近年来，对老年性痴呆的病因学理解取得了明显的进步。例如，现在知道：患有老年性痴呆的病人在它们的脑神经细胞周围或之间发展成淀粉样斑状沉积。这些斑状沉积由一种小分子肽的丝状聚合体组成，其中的小分子肽称为淀粉样 β -肽或 $A\beta$ 。这种斑状沉积起初在脑部的海马和皮层区域 (同记忆和认知相关的区域) 形成，然后随着疾病的进展扩展到其它区域。原纤维和斑的沉积也在周围支持细胞 (称神经胶

质)的炎症后发生,这可能引起进一步的神经元损失。最后,许多早老性痴呆脑部的神经细胞发展成微管相关蛋白的缠结,称为 tau,其被认为是损害神经细胞的反应。

对早老性痴呆的潜在机理的理解进程导致开发出各种体内体外模型用于识别对预防和治疗早老性痴呆和其它神经变性疾病有效的化合物。在一种这样的体外模型中,评价化合物干扰 A β (1-40)或 A β (1-42) β -折叠片形成的能力。由于淀粉样 β -肽的沉积和早老性痴呆的形成有关,如果化合物能够有效地破坏 A β (1-40) β -折叠片的形成,则这些化合物可能能够用于预防和/或治疗早老性痴呆有关的淀粉样沉积。

在另一种体外模型中,评价化合物在大鼠胚胎海马的神经元/星形细胞培养物中抵抗 A β (25-35)诱导的神经元细胞损失的保护能力。如上所论述的那样,患有早老性痴呆的病人会遭受神经元细胞的进行性损失。因此,在这种体外测试中有效的化合物可能能够用于降低或预防患有早老性痴呆或其它神经变性疾病的神经元细胞损失。

第三种体外早老性痴呆模型是基于这样的观测:在用脂多糖(LPS)诱导的人单核细胞中, β -淀粉样蛋白增加细胞因子例如白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6 (IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF α)的释放。IL-1 β 、IL-6 和 TNF α 是同炎症和免疫反应相关的蛋白质。如前所述,在早老性痴呆病人的脑中,原纤维的沉积同周围支持细胞炎症有关。参见: S. D. Yan 等, 美国国家科学院院报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 94. 5296 (1997)。因此,在这种体外测试中有效的化合物可能能够用于降低和/或预防同早老性痴呆有关的炎症。

另外, IL-1 β 、IL-6、TNF α 和其它细胞因子的高含量与许多炎症和自身免疫性症状有关,包括脓毒性休克 (septic shock)、类风湿性关节炎、结节性红斑麻风病、脑膜炎双球菌性脑膜炎、多发性硬化和全身性狼疮 (systemic lupus) 等。参见: L. Sekut 等., 药物新闻展望 (Drug News Perspect.) 1196. 9, 261; 和 A. Waage 等, 实验医学杂志 (J. Exp. Med.) 1989, 170, 1859-1867。因此,抑制这些细胞因子产生的化合物可能能够用于治疗这样的炎症和自身免疫性症状。

在另外一种体外模型中，评估了化合物在大鼠胚胎皮层细胞培养物中降低细胞因子引起的神经元细胞损伤的作用。如上所述，细胞因子与很多种免疫和自身免疫疾病有关。因此，如果化合物在体外试验中有效的话，则有可能减缓或预防免疫或自身免疫症状。

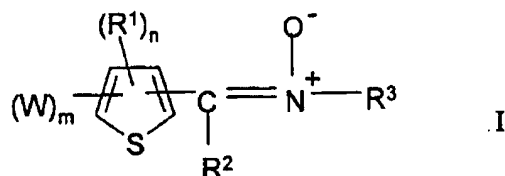
现在已经发现：某些新的噻吩硝酮化合物能够有效地抑制 Aβ(1-42)β-折叠片的形成或抑制细胞因子的释放。因此，这样的化合物能够用于预防和/或治疗哺乳动物的神经变性、自身免疫和炎症症状。

本发明的噻吩硝酮化合物还可用作检测自由基的分析试剂。在这方面，本发明的化合物通过和不稳定自由基反应形成相对稳定的自由基自旋加成物(可通过电子自旋共振(ESR)光谱观测)，这样本发明的化合物用作“自旋稳定剂”(“spin traps”)。因此，如果用作自旋稳定剂，本发明的化合物可以允许应用 ESR 和相关技术鉴别和研究自由基。

发明概述

本发明提供新的噻吩硝酮化合物，该化合物用作治疗和/或预防哺乳动物的神经性、自身免疫性和炎症性疾病的治疗试剂和用作检测自由基的分析试剂。具体地说，本发明的化合物用于预防和/或治疗早老性痴呆。

因此，在组合物的一个方面，本发明涉及式 I 的化合物、其光学异构体和外消旋体及其可药用盐：



其中：

各 R¹ 选自氢、烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、烷氧基、取代烷氧基、环烷基和卤素；

R² 选自氢、烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、

芳基、环烷基和环烷基烷基；

R^3 选自烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基、环烷基烷基和环烯基；

各 W 分别选自 $-SR^4$ 、 $-S(O)R^5$ 、 $-SO_2R^6$ 、 $-SO_3Y$ 和 $-SO_2NR^7R^8$ ，其中 Y 是氢或药学允许的阳离子；

R^4 选自烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基、环烷基烷基和环烯基；

R^5 选自烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基、环烷基烷基和环烯基；

R^6 选自烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基、环烷基烷基和环烯基；

R^7 和 R^8 分别选自氢、烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、芳烷基、芳基、环烷基、环烷基烷基和环烯基；或者 R^7 和 R^8 与其相连的氮原子合在一起形成含有 2-8 个碳原子的杂环，其中可选再含有 1-3 个杂原子，选自氧、氮和硫；

m 是 1-3 的整数；n 是 0-2 的整数，条件是 $m+n=3$ 。

在优选的上述式 I 化合物中， R^1 选自氢和烷基，更优选 R^1 是氢。

R^2 优选选自氢、烷基和芳基。更优选 R^2 为氢或烷基。进一步优选 R^2 是氢。

优选的， R^3 选自烷基、取代烷基、芳烷基、环烷基和环烷基烷基。更优选 R^3 为烷基、取代烷基或环烷基。进一步优选 R^3 是烷基或取代烷基。

特别优选的 R^3 基团包括正丙基、异丙基、2, 2-二甲基-3-羟基丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、环戊基、正己基和环己基。进一步优选的 R^3 基团包括异丙基、叔丁基和环己基。

优选 R^4 选自烷基、取代烷基、芳烷基、芳基和环烷基。更优选的， R^4 是烷基、芳基或环烷基。

优选 R^5 选自烷基、取代烷基、芳烷基、芳基和环烷基。更优选的， R^5 是烷基、芳基或环烷基。

优选 R^6 选自烷基、取代烷基、芳烷基、芳基和环烷基。更优选的， R^6 是烷基、芳基或环烷基。

在本发明的优选实施方案中， R^4 、 R^5 和 R^6 分别为下式表示的取代苯基：



其中各 R^9 分别选自烷基、取代烷基、环烷基、芳烷基、芳基、烷氧基、取代烷氧基、芳氧基、芳烷氧基、环烷氧基、酰基、酰基氨基、氨基羧基、烷氧基羧基、羧基、氰基、卤素、羟基、硝基、磺基、烷硫基和 $NR^{10}R^{11}$ ，其中 R^{10} 和 R^{11} 分别选自氢、烷基、取代烷基或芳基；或者两个相邻的 R^9 共同形成亚烷基或亚烷二氧基基团；

p 是 1-5 的整数。

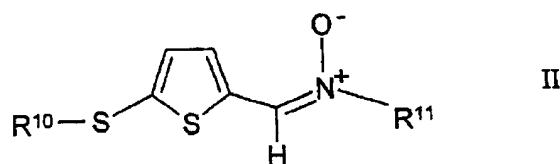
优选 p 是 1-3 的整数。更优选的， p 是 1 或 2。

优选的， n 是 0 或 1。更优选的， n 是 0。

R^7 和 R^8 优选分别选自氢、烷基和环烷基。另外， R^7 和 R^8 优选与其相连的氮原子合在一起形成含有 4-6 个碳原子的杂环。更优选的，当 X 是 $-SO_2NR^7R^8$ ， R^7 是氢， R^8 选自氢、烷基和环烷基。

优选式 I 中 m 是 1 或 2。更优选 m 是 1。

在另一优选的实施方案中，本发明涉及式 II 的化合物、其光学异构体和外消旋体及其可药用盐：

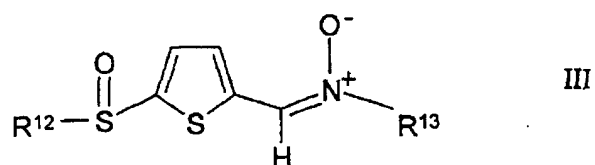


其中：

R^{10} 选自烷基、取代烷基、芳烷基、芳基和环烷基；

R^{11} 选自烷基和环烷基。

在再一优选的实施方案中，本发明涉及式 III 的化合物、其光学异构体和外消旋体及其可药用盐：

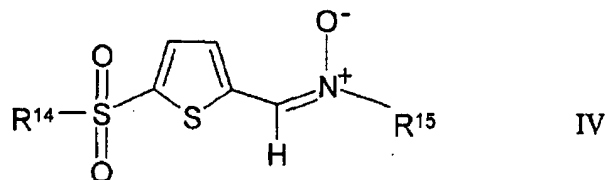


其中：

R^{12} 选自烷基、取代烷基、芳烷基、芳基和环烷基；

R^{13} 选自烷基和环烷基。

在又一优选的实施方案中，本发明涉及式 IV 的化合物、其光学异构体和外消旋体及其可药用盐：

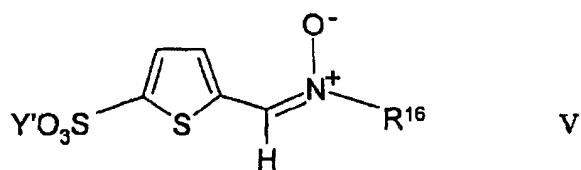


其中：

R^{14} 选自烷基、取代烷基、芳烷基、芳基和环烷基；

R^{15} 选自烷基和环烷基。

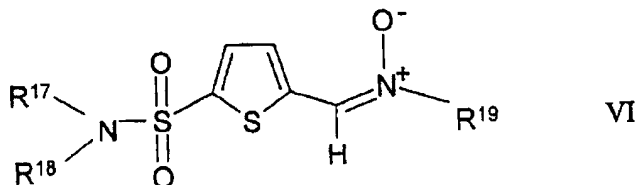
在另一优选的实施方案中，本发明涉及式 V 的化合物、其光学异构体和外消旋体及其可药用盐：



其中：

R^{16} 选自烷基、取代烷基、芳烷基、芳基和环烷基；
 Y' 是氢或药学允许的阳离子。

在再一优选的实施方案中，本发明涉及式 VI 的化合物、其光学异构体和外消旋体及其可药用盐：

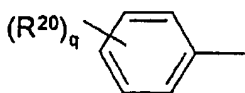


其中：

R^{17} 和 R^{18} 分别选自氢、烷基、取代烷基、芳烷基、芳基和环烷基；
 或 R^{17} 和 R^{18} 与其相连的氮原子一起形成含有 4-6 个碳原子的杂环，其中优选含有 1-3 个选自氧、氮和硫的杂原子；

R^{19} 选自烷基和环烷基。

优选的，在式 II、III 和 IV 中， R^{10} 、 R^{12} 和 R^{14} 分别为下式表示的取代苯基：



其中各 R^{20} 分别选自烷基、取代烷基、环烷基、芳烷基、芳基、烷氧基、取代烷氧基、芳氧基、芳烷氧基、环烷氧基、酰基、酰基氨基、氨基羰基、烷氧基羰基、羧基、氰基、卤素、羟基、硝基、磺基、烷硫基和 $NR^{21}R^{22}$ ，其中 R^{21} 和 R^{22} 分别选自氢、烷基、取代烷基或芳基；
 或者两个相邻的 R^9 共同形成亚烷基或亚烷二氧基基团；

q 是 1-5 的整数。

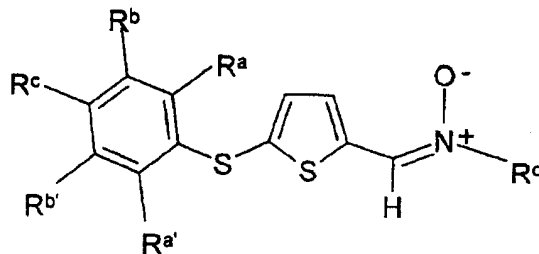
优选 q 是 1-3 的整数。更优选的， q 是 1 或 2。

式 VI 中，优选 R^{17} 是氢， R^{18} 是烷基或环烷基。另外， R^{17} 和 R^{18} 与其相连的氮原子一起形成吡啶-1-基或吗啉-4-基。

优选的，在式 II-VI 中相应的 R^{11} 、 R^{13} 、 R^{15} 、 R^{16} 和 R^{19} 分别选自正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、环戊基、正己基和环己基。更进一步优选的 R^{11} 、 R^{13} 、 R^{15} 、 R^{16} 和 R^{19} 基团包括异丙基、叔丁基和环己基。

特别优选的噻吩硝酮化合物具有如表 1 中所示的结构。

表 1



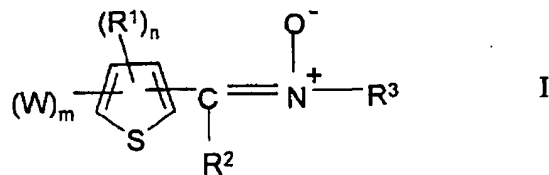
实施例号	R^a	$R^{a'}$	R^b	$R^{b'}$	R^c	R^d
1	H	H	H	H	$-\text{OCH}_3$	$-\text{C}(\text{CH}_3)_3$
2	H	H	H	H	$-\text{OCH}_3$	环己基

因此，在另一个组合物方面，本发明涉及下列各个独立的化合物：

α -[2-(4-甲氧基苯硫基)-5-噻吩基]-N-叔丁基硝酮

α -[2-(4-甲氧基苯硫基)-5-噻吩基]-N-环己基硝酮。

在本发明组合物的另一方面，本发明涉及含有可药用载体和有效药物量的式 I 化合物的药用组合物：



其中 R^1 - R^3 、 W 、 m 和 n 如上定义。

在另外的组合物方面，本发明涉及含有可药用载体和有效药物量的上面式 II、III、IV、V 或 VI 化合物的药物组合物。

如前面所述，本发明的噻吩硝酮化合物被发现能够抑制 A β (1-42) β -折叠片的形成或降低 β -淀粉样蛋白诱导的细胞因子如 IL-1 β 在人单核细胞中的释放。具有这样特性的化合物能够用于预防和/或治疗神经变性、自身免疫和炎症性疾病。

因此，在方法的一个方面，本发明涉及治疗神经变性病人的方法，该方法包括：对所述病人给药有效量的药用组合物，所述药用组合物包括可药用载体和对神经变性疾病治疗有效量的上面式 I、II、III、IV、V 或 VI 化合物。

在方法的另一个方面，本发明涉及预防有发展成神经变性疾病危险性的病人神经变性疾病发生的方法，该方法包括对所述病人给药药用组合物，所述药用组合物含有可药用载体和预防神经变性疾病有效量的上面式 I、II、III、IV、V 或 VI 化合物。

在本发明的优选实施方案中，上面方法中治疗和/或预防的神经变性疾病为早老性痴呆、帕金森氏病和 HIV 痴呆等。

在另一个方法方面，本发明涉及治疗自身免疫疾病患者的方法，该方法包括：对所述病人给药有效量的药用组合物，所述组合物含有可药用载体和自身免疫疾病治疗有效量的上面式 I、II、III、IV、V 或 VI 化合物。

在另一个方法方面，本发明涉及预防具有发展成自身免疫疾病危险性患者自身免疫疾病发生的方法，该方法包括：对所述病人给药药用组合物，所述组合物含有可药用载体和预防自身免疫疾病有效量的上面式 I、II、III、IV、V 或 VI 化合物。

在本发明的优选实施方案中，上述方法所治疗和/或预防的自身免疫疾病为全身性狼疮和多发性硬化等。

在另一个方法方面，本发明涉及治疗患者炎症疾病的方法，该方法包括：把药用组合物给药至所述患者，所述药用组合物含有可药用

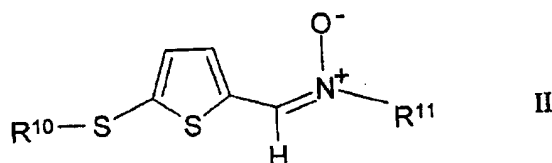
载体和治疗炎症疾病有效量的上面式 I、II、III、IV、V 或 VI 化合物。

在另一个方法方面，本发明涉及预防具有发展成炎症疾病危险的患者炎症疾病发生的方法，该方法包括把药用组合物给药至所述患者，其中的药用组合物含有可药用载体和预防炎症疾病有效量的上面式 I、II、III、IV、V 或 VI 化合物。

在本发明的优选实施方案中，上述方法中所治疗和/或预防的炎症疾病为类风湿性关节炎、脓毒性休克、红斑结节状麻风病、败血症、成人呼吸窘迫综合症 (ARDS)、炎症性肠疾病 (IBD) 和眼色素层炎等。

在另一方面，本发明涉及上面式 I、II、III、IV、V 或 VI 化合物作为药物的应用。因此，本发明涉及上述式 I、II、III、IV、V 或 VI 化合物在制备用于治疗或预防神经变性疾病、自身免疫疾病或炎症疾病或状况的药物中的应用。

在另一方法方面，本发明涉及制备式 II 化合物的方法，

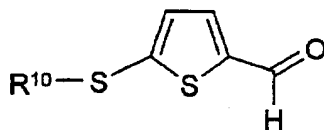


式 II 中，

R^{10} 选自烷基、取代烷基、芳烷基、芳基和环烷基；

R^{11} 选自烷基和环烷基；所述方法包括以下步骤：

(a) 用 2-溴-5-噻吩甲醛在碱存在下处理硫醇(酚)衍生物 $R^{10}-SH$ ，得到下式的硫醚羰基化合物，



(b) 用下式的羟基胺化合物处理硫醚羰基化合物, 得到式 II 的化合物, 其中 R^{10} 和 R^{11} 同前述。



发明详述

在本发明的式 I 噻吩硝酮化合物中, 取代基可以位于噻吩环的任一碳原子上。噻吩环上的位置按照常规的定义方式, 即其上的硫原子为 1 位, 硫原子相邻的两个碳原子分别为 2 和 5 位, 另外两个碳原子为 3 和 4 位。

在有些场合, 本发明的噻吩硝酮可能具有一个或多个手性中心。一般来说, 这类化合物是以外消旋体混合物的形式得到的。根据需要, 这些化合物也可以制备成或分离为纯的立体异构体即单独的对映异构体或非对映异构体, 或者为立体异构体富集的混合物。所有这些式 I 的噻吩硝酮的立体异构体(和富集的混合物)均处于本发明的范围内。纯立体异构体(或富集的混合物)可通过本领域熟悉的方法如采用光活起始原料或立体选择试剂而制备。另外, 上述化合物的外消旋体混合物也可以通过例如手性柱或者手性选择试剂等而加以分离。

定义

当描述本发明的噻吩硝酮、药用组合和方法时, 下列术语具有下列意义:

术语“ β -淀粉样肽”指分子量约 4.2KD 的 39-43 氨基酸肽, 该肽与 Glenner 等, 生物化学与生物物理学研究通讯(Biochem. Biophys. Res. Commun.,)120: 885-890(1984)中所描述的蛋白质形式是基本上同源的, 包括普通 β -淀粉样肽的突变和翻译后修饰物。

术语“细胞因子”指由免疫细胞产生用于调节细胞功能的肽蛋白质介质。细胞因子的例子包括白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (TNF α)。

“酰基”指下列基团：烷基-C(O)-、取代烷基-C(O)-、环烷基-C(O)-和芳基-C(O)-，其中烷基、取代烷基、环烷基和芳基定义如本文。

“酰基氨基”指基团“-NRC(O)R”，其中各R分别表示氢或烷基。

“烯基”指优选具有2-10个碳原子、更优选2-6个碳原子的、具有至少1个烯烃不饱和位点、优选1-2个烯烃不饱和位点的烯基。优选的烯基包括乙烯基(-CH=CH₂)、正丙烯基(-CH₂CH=CH₂)和异丙烯基(-C(CH₃)=CH₂)等。

“取代烯基”指优选具有2-10个碳原子、更优选2-6个碳原子的、具有至少1个烯烃不饱和位点、优选1-2个烯烃不饱和位点的烯基，其被选自烷氧基、氨基、单或二烷基氨基、酰基氨基、氨基羰基、烷氧基羰基、芳氧基、羧基、氰基、卤素、羟基、硝基、烷硫基等的1-3个取代基所取代。

“烷氧基”指“烷基-O-”基团，烷基基团具有1-12个碳原子，更优选1-8个碳原子。优选的烷氧基包括例如：甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、叔丁氧基、仲丁氧基、正戊氧基、正己氧基和1,2-二甲基丁氧基等。

“取代烷氧基”指被1-3个取代基取代的烷氧基，取代基选自烷氧基、氨基、单或二烷基氨基、酰基氨基、氨基羰基、烷氧基羰基、芳氧基、羧基、氰基、卤素、羟基、硝基、烷硫基等。优选的取代烷氧基基团包括例如三氟甲氧基等。

“烷氧基羰基”指基团“-C(O)OR”，其中R为烷基。

“烷基”指优选具有1-约12个碳原子、更优选1-8个碳原子、再更优选1-6个碳原子的单价烷基。该术语的例子如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正己基、正辛基和叔辛基

等。术语“低级烷基”指具有 1-6 个碳原子的烷基。

“取代烷基”指具有 1-12 个碳原子、更优选 1-8 个碳原子、再更优选 1-6 个碳原子的具有 1-3 个取代基的烷基，取代基选自：烷氧基、氨基、单或二烷基氨基、酰基氨基、氨基羰基、烷氧基羰基、芳氧基、羧基、氰基、卤素、羟基、硝基、烷硫基等。优选的取代烷基基团包括例如三氟甲基等。

“亚烷基”指优选具有 1-12 个碳原子、更优选 1-6 个碳原子的直链或支链二价亚烷基。该术语可以举例如：亚甲基(-CH₂-)、亚乙基(-CH₂CH₂-)和亚丙基异构体(例如-CH₂CH₂CH₂-和-CH(CH₃)CH₂-)等。

“亚烷二氧基”指优选具有 1-10 个碳原子、更优选 1-6 个碳原子的直链或支链“-O-亚烷基-O-”。该术语举例如：亚甲二氧基(-OCH₂O-)和亚乙二氧基(-OCH₂CH₂O-)等。

“炔基”指优选具有 2-10 个碳原子、更优选 2-6 个碳原子、具有至少 1 个炔烃不饱和位点、优选 1-2 个炔烃不饱和位点的炔基。优选的炔基包括乙炔基(-CH≡CH₂)和炔丙基(-CH₂CH≡CH₂)等。

“氨基羰基”指基团“-C(O)NRR”，其中各个 R 独立地为氢或烷基。

“芳烷基”指“芳基-亚烷基-”基团，亚烷基部分优选具有 1-10 个碳原子，芳基部分优选具有 6-14 个碳原子。上述芳烷基例如苄基、苯乙基等。

“芳烷氧基”指“芳基-亚烷基-O-”，亚烷基部分优选具有 1-10 个碳原子，芳基部分优选具有 6-14 个碳原子。上述芳烷氧基例如苄氧基、苯乙氧基等。

“芳基”指具有单环(例如苯基)或多稠和环(例如萘基或蒽基)的、含 6-14 个碳原子的不饱和芳香碳环基。优选的芳基包括苯基和萘基等。除非被各个取代基的定义另有限制，这样的芳基可以被 1-5 个优选 1-3 个取代基取代，所述取代基选自：烷基、取代烷基、亚烷基、取代亚烷基、烯基、取代烯基、亚烷基、亚烷二氧基、环烷基、芳烷基、芳烷基、芳基、烷氧基、取代烷氧基、芳氧基、芳烷氧基、环烷

氧基、酰基、酰基氨基、氨基羰基、烷氧基羰基、羧基、氰基、卤素、羟基、硝基、磺基、巯基、烷硫基、烷硫羰基和 $-NRR$ ，其中 R 分别选自氢、烷基、取代烷基和芳基。

“芳氧基”指 $-O-$ 芳基，其中的“芳基”如上定义。

“羧基”指基团 $-C(O)OH$ 及其盐。

“氰基”指基团 $-CN$ 。

“环烯基”指具有单环结构、含有至少一个环内不饱和度、含 4-10 个碳原子的环烯基，其可任选地被 1-3 个烷基取代。合适的环烯基例子包括：例如环戊-3-烯基、环己-2-烯基和环辛-3-烯基等。

“环烷氧基”指 $-O-$ 环烷基。这样的环烷氧基包括例如：环戊氧基和环己氧基等。

“环烷基”指具有单环或多缩合环（包括稠环和桥环系）、含 3-10 个碳原子的环烷基，其可任选地被 1-3 个烷基取代。这样的环烷基包括例如：单环结构如环丙基、环丁基、环戊基、环辛基、1-甲基环丙基、2-甲基环戊基和 2-甲基环辛基等；多环结构如金刚烷基等。

“环烷基烷基”指“环烷基-亚烷基-”基团，优选亚烷基部分具有 1-10 个碳原子，环烷基部分具有 3-8 个碳原子。这样的环烷基烷基包括例如 $-CH_2-$ 环丙基、 $-CH_2-$ 环戊基、 $-CH_2CH_2-$ 环己基等。

“卤”或“卤素”指氟、氯、溴和碘。

“杂环”或“杂环的”指单价的单环或稠合环的饱和或不饱和的基团，环内具有 1-10 个碳原子和 1-4 个选自氮、硫或氧的杂原子。杂环包括但不限于吗啉、哌嗪、咪唑烷、吡啶等。

“羟基”指 $-OH$ 。

“硝基”指 $-NO_2$ 。

“磺基”指 $-SO_3OH$ 及其盐。

“烷硫基”指基团“烷基-S-”，优选的烷硫基包括例如甲硫基、乙硫基、正丙硫基、异丙硫基、正丁硫基等。

“烷硫基羰基”指基团“烷基-S-C(O)-”。

“硫醇”指基团 $-SH$ 。

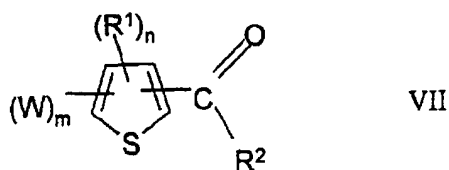
“可药用盐”指从本领域公知的多种有机和无机抗衡离子衍生得到的可药用盐，仅仅以举例的方式，其包括：钠盐、钾盐、钙盐、镁盐、铵盐和四烷基铵盐等；当分子含有碱性官能团时，包括无机酸盐或有机酸盐，例如盐酸盐、氢溴酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、乙酸盐、马来酸盐和草酸盐等。术语“可药用阳离子”指酸性官能团的可药用的抗衡阳离子。这样的阳离子例如：钠离子、钾离子、钙离子、镁离子、铵离子和四烷基铵离子等。

一般合成步骤

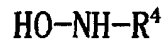
可以从容易获得的起始原料应用下面的一般方法和步骤制备得到本发明的噻吩硝酮类。必须理解：其中仅仅给出典型的和优选的方法条件（即反应温度、时间、反应物摩尔比、溶剂和压力等），除非另有说明，也可应用其它方法条件。随着所用具体反应物或溶剂的变化，最佳反应条件也可变化，但这样的条件可以通过本领域技术人员以常规优化步骤确定。

另外，为了防止某些官能团进行不必要的反应，常规保护基团是必须的，这一点对本领域技术人员来说是显而易见的。对于一个具体的官能团，对合适保护基团、合适的保护和脱保护条件的选择是本领域熟知的。例如，各种保护基团及其引入和除去描述在：T. W. Greene 和 G. M. Wuts. 《有机合成中的保护基团》(Protecting Groups in Organic Synthesis)，第二版，Wiley，纽约，1991 中。该文献在此引入作为参考。

在优选的合成方法中，应用常规的反应条件，把式 VII 的噻吩羰基化合物和式 VIII 的羟基胺偶联，制备得到本发明的噻吩硝酮化合物：



其中 R^1 、 R^2 、 W 、 m 和 n 如上定义；



VIII

其中 R^3 如上定义。

一般通过把噻吩羰基化合物 VII 和至少 1 当量、优选约 1.1-约 2 当量的羟基胺 VIII 在惰性极性溶剂中接触，进行偶联反应；其中的惰性溶剂例如甲醇、乙醇、1,4-二氧六环、四氢呋喃、二甲亚砜和二甲基甲酰胺等。优选地，该反应在约 0-约 100℃ 的温度下进行约 1-48 小时。任选地可以在该反应中应用催化量的酸例如盐酸、乙酸和对甲苯磺酸等。反应完成后，通过常规方法例如沉淀、层析、过滤和蒸馏等技术回收该噻吩硝酮。

在该偶联反应中，应用的式 VII 的噻吩羰基化合物中 W 是 $-SR^4$ 的化合物可以通过使卤代噻吩羰基化合物（如 5-溴-2-噻吩甲醛）与具有结构 R^4SH （其中 R^4 定义同上）的硫醇（酚）衍生物的硫醇（酚）阴离子（如 4-甲氧基苯硫酚）反应而制得。一般的，该反应如下进行：在碱存在下，在惰性溶剂中用过量的，优选 1.1~1.5 倍当量的硫醇（酚）衍生物处理卤代噻吩羰基化合物，其中惰性溶剂如丙酮、2-丁酮，碱例如碳酸钾。一般该反应在温度范围 0℃~100℃ 内进行约 18~48 小时。

本反应中使用的卤代噻吩羰基化合物为已知化合物或者可以通过常规方法和试剂从市售起始原料制备。在这些反应中，5-溴-2-噻吩甲醛是特别优选的。类似的，上述反应中使用的硫醇（酚）衍生物也为市售的或者可以通过常规方法和试剂从市售起始原料制备。

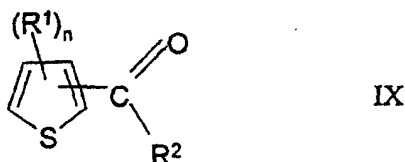
本发明中应用的另一组优选的噻吩羰基化合物是式 VII 化合物中 W 是 $-S(O)R^5$ 或 $-SO_2R^6$ 的，上述 R^5 和 R^6 定义同上。上述化合物可以由相应的硫醚噻吩羰基化合物（即式 VII 中 W 是 $-SR^4$ 或 SR^5 的化合物）采用常规试剂和反应条件方便地制得。适于把硫化物氧化成为亚砷化

物的氧化剂例如过氧化氢、3-氯过苯甲酸 (MCPBA)、过氧化钠等。相应于所使用的氧化剂, 优选将噻吩中间体的羰基以例如缩醛或缩酮的形式保护起来, 以防止出现不期望的氧化反应。

氧化反应典型的地是用于在惰性溶剂中约 0.95 - 1.1 当量的氧化剂作用于硫醚噻吩化合物, 惰性溶剂如二氯甲烷, 反应温度为约 -52°C - 约 75°C, 反应时间为约 1 - 24 小时。所得的亚砷然后可以用至少另外 1 当量的氧化剂进一步氧化为砷, 氧化剂如过氧化氢、MCPBA、过氧化钠等。另外, 砷也可以通过用至少 2 当量、优选过量的氧化剂作用亚砷而制备。必要时, 上述氧化反应也可以在噻吩羰基化合物 VII 和羟基胺化合物 VIII 的偶合反应之后进行。

此外, 式 VII 的砷化合物中的一个或多个 W 是 $-SO_2R^6$ (R^6 定义同上) 的也可以通过使相应的溴代噻吩羰基化合物与例如亚磺酸钠盐 (即具有 R^6-SO_2Na 结构的化合物, 其中 R^6 定义同上) 反应制得。典型的, 该反应是在惰性溶剂中通过用过量、优选 1.2-3 倍当量的亚磺酸处理溴代噻吩羰基化合物而进行的, 惰性溶剂例如 2-乙氧基乙醇, 反应温度约 50°C - 约 150°C, 反应时间约 2 - 24 小时。所得的砷噻吩羰基化合物然后可以与具有式 VIII 结构的羟基胺化合物按常规条件进行反应。

本发明中应用的另一组优选的噻吩羰基化合物是式 VII 化合物中 W 是 $-SO_3Y$ 的, 其中 Y 定义同上。这些化合物可以通过采用本领域技术人员熟知的试剂和反应条件磺化式 IX 的噻吩羰基化合物而方便地获得:

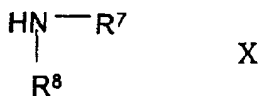


式 IX 中, R^1 、 R^2 和 n 定义同上。本发明中, 可以采用任意的磺化试剂, 如三氟化硫吡啶配合物。一般的, 磺化反应是通过在惰性溶剂中用约 1 到约 5 摩尔当量的磺化试剂处理式 IX 化合物而进行的, 惰性溶剂如

1, 2-二氯乙烷, 反应温度范围从约 50℃到约 200℃, 优选为约 100℃到约 150℃, 反应时间为约 6 小时到 48 小时。反应完成以后, 采用常规方法回收磺化的噻吩羰基化合物, 所用方法如沉淀、层析、过滤等。

当在与羟基胺化合物 VIII 的偶合反应中使用磺化的噻吩羰基化合物时, 优选在用羟基胺处理羰基噻吩化合物之前将磺基转变为适当的盐, 如锂盐、钠盐或钾盐。采用至少 1 当量的适当碱处理磺酸可以将磺酸根基团方便地转变为相应的盐, 上述适当的碱如氢氧化锂、氢氧化钠、氢氧化钾、氯化钠等。

本发明中应用的又一组优选的噻吩羰基化合物是式 VII 化合物中 W 是 $-\text{SO}_2\text{NR}^7\text{R}^8$ 的化合物, 其中 R^7 和 R^8 定义同上。通过把相应的磺化噻吩羰基化合物 (即式 VII 中 W 是 $-\text{SO}_3\text{H}$ 的化合物) 中磺酸根基团转变为磺酰氯, 然后使磺酰氯与式 X 的胺偶合, 可以方便地制备上述化合物:



式 X 中, R^7 和 R^8 定义同上。式 X 的胺或者是已知的化合物或者可以按照常规步骤制备得到。本反应中合适的胺包括但不限于氨、甲胺、乙胺、正丙胺、异丙胺、正丁胺、异丁胺、仲丁胺、叔丁胺、正戊胺、环戊胺、正己胺、环己胺、正辛胺、叔辛胺、二甲胺、二乙胺、二正丙胺、二异丙胺、二正丁胺、二异丁胺、二仲丁胺、二正己胺、甲基乙基胺、甲基正丙基胺、甲基异丙基胺、甲基正丁基胺、甲基叔丁基胺、甲基叔辛基胺、甲基环戊基胺、乙基正丙基胺、乙基异丙基胺、乙基正丁基胺、乙基环己基胺、苯胺、(4-甲基)苯胺、吡咯烷、哌啶、吗啉等。

磺酸, 即式 VII 中 W 是 $-\text{SO}_3\text{H}$ 的化合物可以采用三氯化磷和五氯化磷转变为相应的磺酰氯。除了可以把磺基转变为磺酰基以外, 该反应还可以把式 VII 化合物的羰基转变为偕-二氯基。这样的转变可以

在接下来的形成磺酰胺的反应中保护羰基。

一般的，化合物 VII 与 $\text{PCl}_3/\text{PCl}_5$ 反应时，使用约 2-5 摩尔当量的三氯化磷和五氯化磷，无溶剂或在惰性溶剂如二氯甲烷中，反应温度为约 0°C - 约 80°C ，反应时间约 1-约 48 小时。

用约 1-10 摩尔当量的胺 X 与磺酰氯反应，得到相应的磺酰胺偕-二氯化物。该反应优选在约 -70°C - 约 40°C 下进行约 1-24 小时。典型的，该反应是在适当的碱存在下进行的，加碱以除去反应所产生的酸。合适的碱包括例如三乙胺、二异丙基乙胺、N-甲基吗啉等。另外，过量的胺 X 也可以用来消除反应生成的酸。

偕-二氯基团然后通过水化重新变成羰基。优选通过将磺酰胺偕-二氯化物用甲酸水溶液处理（优选约 75%）完成这一反应，反应温度约 50°C - 约 150°C ，反应时间约 1-24 小时。反应完成后，所得的磺酰胺噻吩羰基化合物采用常规方法包括沉淀、层析、过滤等回收。

上面式 VIII 的羟基胺化合物也是已知的化合物或者可以通过常规步骤从已知化合物制备得到。典型地，应用合适的还原剂例如活化锌/乙酸、活化锌/氯化铵或铝/汞合金，将相应的硝基化合物（即 $\text{R}^5\text{-NO}_2$ ，其中 R^5 如上定义）还原，可以制备得到式 IV 的羟基胺化合物。该反应一般在下列条件下进行：温度约 15°C - 约 100°C ，反应时间约 0.5-12 小时，优选约 2-6 小时，在水性反应介质中，例如醇/水（应用锌试剂时）或醚/水混合物（应用铝汞合金时）。应用在四氢呋喃中的硼烷时，还可以把脂肪硝基混合物（以盐的形式）还原成羟基胺。由于一些羟基胺稳定性有限，这样的化合物通常在和式 VII 的芳基羰基化合物反应前立即制备。

本发明所用的优选羟基胺包括但不限于：N-异丙基羟基胺、N-正丙基羟基胺、N-正丁基羟基胺、N-叔丁基羟基胺、N-环戊基羟基胺、N-环己基羟基胺、N-2,4,4-三甲基戊-2-基羟基胺等。

药物组合物

当用作药物时，本发明化合物通常以药物组合物形式给药。这样

的组合物可以通过药学领域公知的方式制备，并且这样的药物组合物含有至少一种活性化合物。

通常地，本发明化合物以药学有效量给药。化合物的实际给药量通常由内科医师根据相关因素确定，所述因素包括：治疗的疾病、给药途径、给药的实际化合物、年龄、体重和各个患者的反应以及患者症状的严重程度等。

本发明的药用组合物可以通过多种途径给药，包括：口服、经皮、皮下、静脉内、肌肉内和鼻内。根据预定的给药途径，本发明的化合物优选制备成注射用或口服组合物。

口服药物组合物的形式有：散装液体溶液剂或混悬剂、或散剂。更具体地说，该组合物以单位剂型存在以有助于精确给药。术语“单位剂型”指适合作为人或其它哺乳动物单位剂量的物理离散单元，各个单位含有计算出能够产生期望药理效应的预定量的活性物质和合适的药用赋形剂。典型的单位剂型包括：预先充填并预先测定的液体组合物安瓿或注射管，或者固体组合物的丸剂、片剂或胶囊等。在这样的组合物中，噻吩硝酮化合物通常是较少量的成分（约 0.1-约 50%重量、优选约 1-约 40%重量），其它成分为各种赋形剂或载体或制剂辅料以有助于形成需要的剂型。

适合口服给药的液体剂型可能包括含有缓冲剂的合适水基或非水载体、悬浮剂和分散剂，着色剂和矫味剂等。固体剂型可能含有例如：任意的下面成分或相似特性的化合物：粘合剂例如微晶纤维素、黄耆胶或明胶；赋形剂例如淀粉或乳糖、崩解剂例如藻酸、Primogel 或玉米淀粉；润滑剂如硬脂酸镁；助流剂例如胶体二氧化硅；甜味剂例如蔗糖或糖精；矫味剂例如薄荷、水杨酸甲酯或橙味调味剂。

注射用组合物典型地基于注射用无菌生理盐水或磷酸盐缓冲的生理盐水或本领域已知的其它注射用载体。如前所述，这样组合物中的噻吩硝酮通常是较少量的组份，含量通常为约 0.05-10%重量，剩余物质为注射用载体等。

上面描述的口服或注射用组合物的成分仅仅是代表性的。其它物

质以及方法技术等列于：《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Science)第8部分，第17版，1985年，Mack 出版公司，Easton、宾夕法尼亚。该文献在此引入作为参考。

本发明的化合物还可能以缓释剂型或从缓释药物给药系统中给药。代表性缓释物质的描述可以在《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Science)的引用材料中发现。

下面的制剂例子显示代表性的本发明药物组合物。然而，本发明并不限于下面的药物组合物。

制剂 1-片剂

干燥粉末形式的式 I 化合物和干燥明胶粘合剂以约 1: 2 的重量比混合。加入少量的硬脂酸镁作为润滑剂。该混合物在压片机中形成 240-270mg 的片剂(每片含 80-90mg 活性化合物)。

制剂 2-胶囊

干燥粉末形式的式 I 化合物和淀粉稀释剂以约 1: 1 的重量比混合。将该混合物装入 250mg 胶囊(每胶囊含 125mg 活性化合物)。

制剂 3-液剂

将式 I 的化合物(125mg)、蔗糖(1.75g)和黄原胶(4g)混合，使其通过 10 目的美国筛，然后将其同预先制备的微晶纤维素和羧甲基纤维素钠(11:89, 50mg)的水溶液混合。用水稀释苯甲酸钠(10mg)、矫味剂和色素，然后在搅拌下加入。再加入足够的水得到 5mL 的总体积。

制剂 4-片剂

干粉形式的式 I 化合物同干燥明胶粘合剂以约 1: 2 的重量比混合。加入少量的硬脂酸镁作为润滑剂。在压片机中将混合物压成 450-900mg 的片剂(150-300mg 的活性化合物)。

制剂 5- 注射剂

将式 I 化合物溶解在缓冲的无菌盐水注射用水基介质中，得到浓度约 5mg/ml 的溶液。

化合物实用性

已经发现本发明化合物能够抑制 $A\beta(1-42)\beta$ -折叠片的形成或抑制细胞因子例如 IL-1 β 的释放。如前所述， $A\beta(1-42)\beta$ -折叠片的形成同神经变性疾病如老年性痴呆和/或免疫症状有关。另外，细胞因子水平升高同神经变性、自身免疫和/或炎症性症状有关。因此，发现本发明的化合物和药物组合物能够用于预防和/或治疗哺乳动物(包括人)的神经变性、自身免疫和炎症性疾病的治疗剂。

式 I 化合物能够治疗和/或预防的疾病包括：神经变性疾病例如老年性痴呆、帕金森氏病和 HIV 痴呆等；自身免疫疾病例如全身性狼疮和多发性硬化等；和炎症性疾病例如炎性肠疾病(IBM)、类风湿性关节炎、脓毒性休克、红斑结节状麻风病、败血症、眼色素层炎、成人呼吸窘迫综合症(ARDS)等。

另外，由于发现本发明化合物能够有效地抑制细胞因子例如 IL-1 β 、IL-6 和 TNF α 的释放，这样的化合物能够用于治疗以细胞因子(特别是 IL-1 β 、IL-6 和 TNF α)过度产生或生成失调为特征的疾病，包括许多自身免疫和/或炎症性疾病。

如上所述，此处描述的化合物适合用于许多药物释放系统。治疗神经变性、自身免疫和炎症性疾病的注射剂量水平范围约 0.1mg/kg/小时 - 至少 10mg/kg/小时，共注射约 1-120 小时，特别是 24-96 小时。也可以给药约 0.1mg/kg-10mg/kg 或更多的预先装载的大丸剂以达到足够的稳定状态含量。对于体重为 40-80 公斤的患者，希望最大总剂量不超过约 2g/天。

为了预防和/或治疗长期疾病，例如神经变性和自身免疫疾病。治疗方案通常持续许多月或许多年，这样为了病人的方便和可耐受性，口服制剂是优选的。口服时，1-5 次/天、尤其是 2-4 次/天、典型地

为3次/天的口服频率是代表性的方案。应用这些口服方案，各个剂量提供式 I 化合物约 0.1-约 20mg/kg，优选的各个剂量提供约 0.1-10mg/kg，特别是约 1-5mg/kg。

当用于预防神经变性、自身免疫或炎症疾病的发生时，对具有发展成这些疾病危险性的患者给药本发明化合物，一般在内科医师的建议和监督下按照上面所述的剂量水平给药。具有发展成特定疾病危险性的患者通常包括那些具有这类疾病家族史的人、或者那些经基因测试或筛选鉴定容易发生这些疾病的人。

本发明的化合物可作为单一的活性成分给药，也可以结合其它试剂给药，包括其它活性硝酮衍生物。

本发明的新噻吩硝酮还可以用作分析试剂，即自旋稳定剂，用于通过电子自旋共振(ESR)光谱和相关技术来监测不稳定自由基。当用作分析试剂时，本发明化合物一般和溶液中所研究的自由基接触，以通常方式产生 ESR 光谱。具体地说，本发明化合物可以用于监测和识别生物系统中的自由基。这些实验中可以应用任何的 ESR 波谱仪例如 JEOL JES-FE3XG 波谱仪。典型地，在进行 ESR 实验前，将氩气或氮气鼓入含自旋稳定剂的溶液以对该溶液去氧。优选地，在这些 ESR 实验中应用过量的硝酮。

该自旋稳定实验所用的实际实验步骤会取决于许多因素，例如游离基产生方式、溶剂惰性、关于自旋稳定的试剂和自旋加合物的寿命等。自旋稳定方法是本领域熟知的，所用的实际步骤可以通过本领域技术人员确定。进行自旋稳定的典型方法和器械描述在例如：C. A. Evans, “自旋稳定”，Aldrichimica Acta, (1979), 12(2), 23-29, 该文献在此引入作为参考。

提供下列合成和生物学例子来举例说明本发明，它们不能认为是以任意方式来限定本发明的范围。

实施例

下列实施例中，下列缩写具有下列意义。下面没有定义的缩写具有它们通常接受的意义。

Bd	=	宽双峰
Bs	=	宽单峰
d	=	双峰
dd	=	双双峰
dec	=	分解
dH ₂ O	=	蒸馏水
ELISA	=	酶联免疫吸附测定
EtOAc	=	乙酸乙酯
EtOH	=	乙醇
FBS	=	胎牛血清
g	=	克
h	=	小时
Hz	=	赫兹
IL-1 β	=	白介素-1 β
IL-6	=	白介素-6
L	=	升
LPS	=	脂多糖
m	=	多重峰
min	=	分钟
M	=	摩尔/升
MeOH	=	甲醇
mg	=	毫克
MHz	=	兆赫兹
mL	=	毫升
mmol	=	毫摩尔
m. p.	=	熔点

N	=	当量
q	=	四重峰
quint	=	五重峰
s	=	单峰
t	=	三重峰
THF	=	四氢呋喃
ThT	=	硫黄素 T
tlc	=	薄层层析
TNF α	=	肿瘤坏死因子- α
μg	=	微克
μL	=	微升
UV	=	紫外

在下面的实施例中，所有温度指摄氏度(除非另有说明)。实施例 A-D 描述制备噻吩硝酮所用的中间体。实施例 1-2 描述本发明各噻吩硝酮的合成，实施例 3-7 描述这些化合物的测试。

实施例 A

N-叔丁基羟胺的合成

把锌粉(648g)分次加入到冷却的 2-甲基-2-硝基丙烷(503g)和氯化铵(207g)的去离子水(6L)混合物中，控制加入的速率使温度维持在 18℃ 以下。机械搅拌该反应混合物 15 小时然后过滤。用热水(1.75L)洗涤固体。用碳酸钾(4.6kg)饱和合并后的滤液，再用乙酸乙酯(2 × 1300mL)提取。用无水硫酸钠干燥该有机溶液，过滤后旋转蒸发得到白色晶体标题化合物(329g, 收率 75.7%)。应用该物质不需要进一步纯化。

光谱数据如下： $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 270MHz) $\delta=1.090$ (s, 3 CH_3)。

实施例 B

N-异丙基羟胺的合成

应用上面实施例 A 中的步骤和 2-硝基丙烷, 制备该标题化合物。
应用该羟基胺粗产品不需进一步纯化。

实施例 C

N-环己基羟胺的合成

应用上面实施例 A 中的步骤和硝基环己烷, 制备标题化合物。或者从美国 Milwaukee, WI 的 Aldrich 化学公司购买得到 N-环己基羟胺盐酸盐, 然后用碱例如碳酸钾中和得到标题化合物。

实施例 D

α -(2-溴-5-噻吩基)-N-叔丁基硝酮的合成

5-溴-2-噻吩苯甲醛(19.11g, 100mmol)、N-叔丁基羟胺(16.15g, 181.05mmol)、分子筛(50g)和硅胶(10g)在 CHCl_3 (200mL) 中的混合物回流 28 小时, 过滤, 旋转蒸发。所得的固体用己烷(240mL)和乙二醇二甲醚(30mL)重结晶, 得到浅黄色晶体(22.50g, 收率 85.8%), 熔点 121.1°C ($R_f=0.54$, 硅胶板, 流动相 己烷/EtOAc, 1:1, v:v)。

光谱数据如下:

IR (KBr, cm^{-1}): 2979 (CH)、1649 (C=N)、1566 (苯环)、和 1102 (N-O)。

^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz) $\delta=7.93$ (1H, s, 氮羰基 H)、7.17 (1H, d, $J=4.2\text{Hz}$, 噻吩 H)、7.07 (1H, d, $J=4.2\text{Hz}$, 噻吩 H)、1.55 (9H, s, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$)。

^{13}C NMR (CDCl_3 , 270MHz) $\delta=134.68$ 、129.27、128.78、125.52、117.14、69.00、28.11。

实施例 1

α -[2-(4-甲氧基苯硫基)-5-噻吩基]-N-叔丁基硝酮的合成

步骤 A: 2-(4-甲氧基苯硫基)-5-噻吩甲醛的合成

将 4-甲氧基苯硫酚(13.12g, 93.58mmol)和碳酸钾(15g)加入 2

- 溴-5-噻吩甲醛 (16.25g, 85.05mmol) 的丙酮 (150mL) 溶液。反应混合物室温搅拌 17 小时, 然后过滤, 用旋转蒸发器浓缩。所得的棕色残留物无需纯化直接投入下一步反应。

步骤 B: α -[2-(4-甲氧基苯硫基)-5-噻吩基]-N-叔丁基硝酮的合成

步骤 A 所得的 2-(4-甲氧基苯硫基)-5-噻吩甲醛与 N-叔丁基羟胺 (10.0g, 112.11mmol)、分子筛 (4A, 50g)、硅胶 (10g) 和 CHCl_3 (200mL) 混合。混合物回流 15 小时, 然后过滤, 用旋转蒸发器浓缩。残留物用硅胶层析纯化, 洗脱液: 己烷/EtOAc (2:1, v:v), 得到略带粉色的粉末 (4.60g, 收率 16.8%), 熔点 100.9°C ($R_f=0.19$, 硅胶板, 流动相 己烷/EtOAc, 2:1, v:v)。

光谱数据如下:

IR(KBr, cm^{-1}): 2977(CH)、1634(C=N)、1590(苯环)、1245 (Ar-O) 和 1117(N-O)。

^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz) $\delta=7.89$ (1H, s, 氮羰基 H)、7.27 (2H, d, $J=8.8\text{Hz}$, 苯 2H)、7.26 (1H, d, $J=4.0\text{Hz}$, 噻吩 H)、7.09 (1H, d, $J=4.0\text{Hz}$, 噻吩 H)、6.79 (2H, d, $J=8.8\text{Hz}$, 苯 H)、3.75 (3H, s, CH_3O)、1.529 (9H, s, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$)。

^{13}C NMR (CDCl_3 , 270MHz) $\delta=159.68$ 、139.31、133.43、130.06、129.40、126.33、125.62、114.94、68.95、55.43、28.16。

实施例 2

α -[2-(4-甲氧基苯硫基)-5-噻吩基]-N-环己基硝酮的合成

按照实施例 1 叙述的步骤操作, 但用 N-环己基羟胺代替 N-叔丁基羟胺。步骤 A 延长为 30 小时。标题化合物为略带灰色的固体 (收率 61.5%), 熔点 107.7°C ($R_f=0.24$, 硅胶板, 流动相 己烷/EtOAc, 2:1, v:v)。

光谱数据如下:

IR(KBr, cm^{-1}): 2931(CH)、1634(C=N)、1591(苯环)、1243 (Ar-O) 和 1127(N-O)。

^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz) δ =7.79(1H, s, 氮羰基 H)、7.37(2H, d, J =8.7Hz, 苯 H)、7.24(1H, d, J =4.1Hz, 噻吩 H)、7.09(1H, d, J =4.1Hz, 噻吩 H)、6.80(2H, d, J =8.7 Hz, 苯 2H)、3.85 - 3.70(1H, m, N- CH_3), 3.76(3H, s, CH_3O)、2.03-2.00(2H, m, 环己基 2H)、1.94-1.80(4H, m, 环己基 4H)、1.70-1.65(1H, m, 环己基 H)、1.40-1.17(3H, m, 环己基 3H)。

^{13}C NMR(CDCl_3 , 270MHz) δ =159.42、139.02、133.07、129.93、128.88、127.48、126.10、114.70、72.80、55.20、30.96、24.82。

实施例 3

电子自旋共振研究

采用以下步骤, 应用 ESR 自旋捕捉技术, 可见本发明的噻吩硝酮化合物捕捉自由基的能力。实验的其它详细内容参见, 例如 K. R. Maples 等., “自由基代谢物的体内研究”, 合成和生物学中的自由基(Free Radicals in Synthesis and Biology(F. Minisci 编)第 423-436 页(Kluwer Academic 出版社, 波士顿, 1989); 和 J. A. Degray 等., “生物学自旋捕捉”, 电子自旋共振(Electron Spin Resonance), 14: 246-300(1994)。在本实验中应用了过氧化叔丁醇/亚铁(ferrous iron)自由基产生系统。该自由基产生系统产生叔丁基烷氧自由基、叔丁基过氧自由基和甲基自由基。如果本发明的噻吩硝酮能够将任意的这些基团捕捉转变成稳定的基团加合物, 这样的基团加成物应该能够被 ESR 光谱检测到。

把 5 μl 的 100mM 硫酸亚铁加入到 490 μl 100mM 的硫醚噻吩硝酮的水溶液中。加入 5 μl 100mM 叔丁基过氧化氢来引发该反应。试剂的最终浓度为 1mM 亚铁离子、1mM 叔丁基过氧化氢和 98mM 的硝酮化合物的水溶液。一旦混合后, 迅速将该溶液转移到石英平底池中, 然后把该石英池转移到 Bruker ESP 300 ESR 光谱仪的腔室中, 在 5 分钟混合期间内扫描, ESR 光谱仪设置: 3480G 中心场, 200G 场宽, 480 秒扫描时间, 9.76GHz 频率, 10dB 强度, 1.6×10^5 接受增益(receive gain), 0.200G 调节幅度。0.320 秒时间常数和 270°位相。由得到的 ESR 光谱显示: 硫醚噻吩硝酮

能够有效地捕捉自由基；这样的化合物可以作为 ESR 应用中的分析试剂。

实施例 4

A β -折叠片形成的抑制

淀粉样 β -肽 (A β) 的沉积和老年性痴呆的发病有关。参见例如：G. G. Glenner 等, (1984) 生物化学生物物理学研究通讯 (Biochem. Biophys. Res. Commun.) 120 : 885-890 ; 和 R. E. Tanzi (1989) 医学年刊 (Ann. Med. ,) 21: 91 - 94。因此, 如果化合物能够有效地干扰 A β (1-40) 或 A β (1-42) 折叠片的形成, 则其能够用于阻止和/或逆转这样的淀粉样蛋白沉积。已知, 硫黄素 T (ThT) 迅速同 β -折叠片、特别是合成 A β (1-42) 的聚合纤维结合。这种结合使最大激发波长在 440nm 处, 最大发射波长在 490nm 处。在本实验中, 某些上式 I 的噻吩硝酮抑制 ThT 关联合成 A β (1-42) 的能力可以通过测定荧光变化来证明。

进行该实验应用的 CytoFluor II 荧光板读数计具有下列参数:

滤光器: 激发 440nm/20

发射 490nm/20

增益: 75

周期 - 周期时间: 30 分钟

运行时间: 720 分钟 (24 周期) 或者取决于实验设计

培养皿: 96 孔

在各个孔中等份样加入在 PBS (pH6.0) 中制备的 95 μ l ThT (3 μ M)、2 μ L 在 PBS (pH6.0) 制备的含 0.05% 甲基纤维素的所测试化合物 (10 μ M) 和 3 μ L 用 dH₂O 制备的 A β (1-42) (3 μ g)。当加入 A β (1-42) 后开始荧光测定, 并持续 12 小时。在含有和不含有所测试化合物时聚合体之间的相对荧光单位差别计算出 β -折叠片形成的百分比抑制。同对照组相比, 如果 A β (1-42) β -折叠片的形成被抑制至少 30% 时, 这样的抑制在本测试中被认为是显著的。这些体内测试结果描述如下。

实施例 5

保护免受 A β (25-35) - 诱导的神经元细胞损失

已知早老性痴呆患者发生神经元细胞的进行性损失。参见例如：P. J. Whitehouse 等., (1982) 科学 (Science), 215: 1237 - 1239. 在本实验中, 证明某些上面式 I 的噻吩硝酮类化合物保护免受 A β (25-35) 诱导的神经细胞损失的能力。取出 18 天孕期胚胎的 Sprague Dawley 大鼠海马, 然后磨碎分离制备初级神经细胞培养物。将细胞 (3×10^5) 置于 35mm 聚 D-赖氨酸包被的培养皿中 (培养皿含有补充 10% 胎牛血清的 Eagle' s 最少必要成分)。经 3-5 小时后, 撤掉原始培养基, 用 1mL 新鲜培养基替换。将培养物维持在 37℃ 的含 5% CO₂/95% 空气湿润的培养箱中。观察到神经元单层细胞下的胶质细胞生长。

把 30 μ M A β (25-35) 的 dH₂O (在 -20℃ 下储存) 和 100 μ M 在 1% 甲基纤维素中的测试化合物加入到这些细胞 (7DIV) 中。同时不应用测试化合物进行对照实验。经 96 小时处理 (3 区域/孔, n=6 孔) 后, 通过计算活神经细胞的数目测定形态学活神经细胞的百分比。同对照组相比, A β (25-35) 诱导的神经细胞损失至少抑制 30% 时被认为在本测试中是显著的。这些体外测试的结果描述如下。

实施例 6

减少由 β -淀粉样蛋白诱导的白介素-1 β 释放增加

同单独用 LPS 相比, 显示上面式 I 的某些噻吩硝酮具有减少由 β -淀粉样蛋白诱导的白介素-1 β 释放增加的能力。在 T 型瓶 (T-flask) 中, 将 THP-1 细胞 (美国典型培养物收集中心的人单核细胞系) 在含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基 (FBS, 未经热消毒) 中培养。通过离心 (800rpm, 5min) 使细胞下沉将培养基每两天更换一次, 然后加入同样的新鲜培养基。或者, 通过补充新培养基来维持培养。该培养物维持的细胞浓度范围是 1×10^5 和 1×10^6 细胞/mL。由于血浆可能含有未知因子, 这些因子可能影响巨噬细胞/单核细胞 IL-1 的产生, 将 FBS 降低到 5% 共 24 小时。在每个实验开始的两天以前, 将该 FBS 进一步降低到 2%。离心收集细胞, 重悬于含 2% FBS 的培养基中, 计算出细胞数目, 然后将细胞置

于 24 孔培养皿中 (3×10^5 细胞/0.6mL/孔)。然后单独用 LPS (0.5 μ g/ml) 或者用 LPS 结合 A β 肽 (5 μ M) 处理。当测定测试化合物对 IL-1 β 释放有效时, 加入 100 μ M 测试化合物以及 LPS 和 A β (25-35), 在进行 ELISA 前将该混合物培养 48 小时。

在淀粉样肽和测试化合物存在或不存在的条件下, 应用市售 ELISA 试剂盒 (R&D System) 对由 LPS 刺激的 THP-1 细胞分泌到培养基中的 IL-1 β 进行测定。简单地, 用鼠抗人 IL-1 β 单克隆抗体包被的微滴培养皿由制造商提供。将标准品和样品移液到孔中, 用固定抗体结合任意的 IL-1 β 。洗掉未结合的蛋白, 辣根过氧化物酶相连的对 IL-1 β 有特异性的多克隆抗体加入到孔中, 这样在开始时挤进 IL-1 β 结合物中。经洗涤除去所有未结合的抗体-酶试剂后, 将底物溶液 (1:1 过氧化氢: 四甲基联苯胺, v/v) 加入到孔中, 颜色的形成同起始步骤中 IL-1 β 结合物的量成正比。用 2N 的硫酸终止颜色形成, 在 450nm 处测定标准品和测试样品的光密度。基于标准曲线测定样品中 IL-1 β 的含量。在一式四份的孔中进行测定。同对照组相比, 如果样品能够对 β -淀粉样蛋白诱导的白介素-1 β 的释放增加的抑制至少在 30% 以上, 则认为在这些测试中是显著的。这些体外测试结果描述如下。

实施例 7

对 IL-1 β 诱导细胞毒性的降低

本实验显示, 某些式 I 的咪喃硝酮能够降低细胞因子诱导的大鼠皮层神经元细胞损伤。将 Sprague-Dawley 大鼠胚胎自母鼠体内迅速摘出, 置于冷的无钙-镁离子的 Hank's 平衡盐溶液 (HBSS) 中作进一步解剖。含有神经元和胶质的皮层细胞培养物是通过把胎大鼠皮层细胞接种到皮层胶质的融合层上而制得的。混合的胶质培养物自出生后一日大鼠的皮层制得。为制备这种培养物, 于无菌状态下分离皮层并小心地去除血管和膜, 在冷的无钙-镁离子的 HBSS 缓冲液中分散。分散的细胞置于 24 孔板 (每板约 1.5 半球) 上, 在 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO $_2$ 下的含有 DMEM/F12、10% 热灭活 FBS 和 100 单位/mL 青霉素/100 μ g/mL 链霉素的培养基中培养 2.5

周。

为建立神经元的组分，分离大鼠妊娠 16 日胚胎的大脑皮层，在含有 0.1% 胰蛋白酶的 HBSS 中 37℃ 温育 30 分钟。然后将组织混悬于含有 DMEM/F12、10% 热灭活 FBS 和 100 单位/mL 青霉素/100μg/mL 链霉素的培养基铺板培养基中。研磨后，将细胞以 5.0×10^5 /mL 的密度接种在胶质培养物上。培养物于 37℃ 下的含 5% CO₂ 湿润空气中温育。通过加入 10μM 阿糖胞苷 3 天抑制处于体外 5 天 (5 DIV) 的非神经元细胞，在不含 FBS 的相同培养液中对 8 DIV 神经元和 25 DIV 胶质培养物进行实验。

在每一孔中加入 1mL 含有 200 单位/mL 重组小鼠 IL-1β (Genzyme) 的培养液。每孔中立即加入 1% 甲基纤维素中的待测化合物 (10μL、终浓度 100μM)。对照孔中含有 IL-1β 和 1% 甲基纤维素。在 37℃ 含有 5% CO₂ 的湿润大气中温育培养物 48 小时。在所有实验中，通过用相差显微镜检查培养物和通过测量释放到细胞培养液中的胞溶胶乳酸脱氢酶 (LDH) 定量，评估神经元损伤。与对照相比，在这些实验中，LDH 释放减少至少 30% 被认为是显著的。这些体外测试的结果描述如下。

体外测试结果:

上述实施例 1 和 2 中制备的化合物，至少进行一种上面描述的体外测试，实施例 18 化合物未进行测试。实施例 1-2 化合物均抑制 Aβ (1-42) β-折叠片形成或 β-淀粉样蛋白诱导的白介素-1β 释放增加至少 30% (与对照品相比)。

从上面的描述中，可以对本发明的组合物和方法进行各种修改和变化，这对本领域技术人员来说是显而易见的。此处包括所有在权利要求范围内的这些修改和变化。