



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104906103 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 16

(21) 申请号 201510246272. 4

A61P 21/00(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 12. 14

(30) 优先权数据

1021161. 3 2010. 12. 14 GB

1109162. 6 2011. 06. 01 GB

(62) 分案原申请数据

201180060132. 8 2011. 12. 14

(71) 申请人 电泳有限公司

地址 英国萨里郡

(72) 发明人 J·M·谢里丹 J·R·希尔

W·D·O·汉密尔顿 I·派克

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 安佩东 黄革生

(51) Int. Cl.

A61K 31/506(2006. 01)

A61P 25/28(2006. 01)

A61P 25/16(2006. 01)

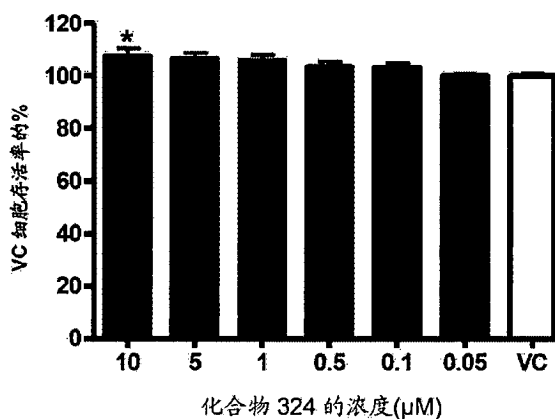
权利要求书2页 说明书60页 附图4页

(54) 发明名称

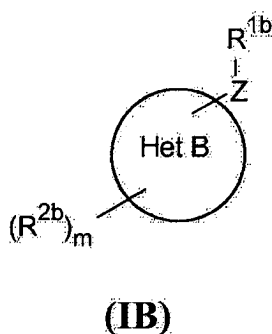
酪蛋白激酶 1 δ (CK1 δ) 抑制剂

(57) 摘要

本发明涉及包含酪蛋白激酶 1 δ (CK1 δ) 抑制剂的药物组合物以及所述抑制剂在治疗神经退行性疾病诸如阿尔茨海默氏病中的用途。



1. 包含式 (IB) 化合物或其可药用盐或溶剂化物的药物组合物：



其中

“Het B”代表苯并噁唑基；

Z 代表键；

R^{1b} 代表噻啉基，其中 R^{1b} 可被一个或多个（例如1、2或3个） R^{4b} 基团取代； R^{4b} 代表卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烯基、 C_{1-6} 炔基、 C_{3-8} 环烷基、卤代 C_{1-6} 烷基、羟基、 C_{1-6} 烷氧基、 $-O-C_{1-6}$ 烯基、卤代 C_{1-6} 烷氧基、 $-COOH$ 、 $-CO-C_{1-6}$ 烷基、 $-COO-C_{1-6}$ 烷基、 $-CONH_2$ 、 $-CH_2-CONH_2$ 、 $-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-NH-C_{2-6}$ 烯基、 $-NH-CO-C_{1-6}$ 烷基、 $-CO-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-O-CH_2-CO-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-CH_2-CH_2-CO-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-S-C_{1-6}$ 烷基、 $-SO-C_{1-6}$ 烷基、 $-SO_2-C_{1-6}$ 烷基、 $-SO_2-NH_2$ 、 $-SO_2-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-S-CH_2-CO-C_{2-6}$ 烯基、 $-SO_2-OH$ 、氨基、氰基、 NO_2 、 $=O$ 、 $-CO-NH-(CH_2)_2-OMe$ 、 $-NH-C_{3-8}$ 环烷基、 $-CH_2-CO-NH-C_{3-8}$ 环烷基、 $-CO-$ 杂环基、 $-CO-$ 杂芳基、 $-COO-(CH_2)_2-$ 杂环基、 $-CH_2-$ 芳基、 $-OCH_2-$ 芳基、 $-OCH_2-$ 杂芳基、 $-CH_2-O-CO-$ 芳基、 $-O-$ 芳基、 $-NH-CO-$ 芳基、 $-NH-CO-$ 杂芳基、 $-NH-CO-CH_2-$ 芳基、 $-NH-$ 芳基、芳基或杂芳基基团，其中所述的 R^{4b} 的芳基、杂环基或杂芳基基团可任选地被一个或多个卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 $=S$ 或羟基基团取代，并且其中所述的 R^{4b} 的 C_{1-6} 烷基或 C_{2-6} 烯基基团可任选地被一个或多个羟基、氨基、氰基、 C_{1-6} 烷氧基、 $CONH_2$ 或 $-COO-C_{1-6}$ 烷基基团取代；

m 代表 0 至 3 的整数；

R^{2b} 代表卤素、卤代 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、羟基、 C_{1-6} 烷氧基、 $-S-C_{1-6}$ 烷基、 $-CH_2-S-C_{1-6}$ 烷基、 $-S-C_{2-6}$ 炔基、氨基、氰基、 NO_2 、 $=O$ 、 $=S$ 、 $-SO_2-C_{1-6}$ 烷基、 $-CONH_2$ 、 $-CO-C_{1-6}$ 烷基、 $-COO-C_{1-6}$ 烷基、 $-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-NH-CO-C_{1-6}$ 烷基、 $-NH-CO-CH=CH-CH_2-N(Me)_2$ 、 C_{1-6} 烷基、 $-CO-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-CO-NH-CH(Me)-COOH$ 、 $-S-CH_2-CO-N(Et)_2$ 、 $-NH-(CH_2)_2-OH$ 、 $-NH-(CH_2)_3-OH$ 、 $-NH-CH(Et)-CH_2-OH$ 、 $-CO-NH-(CH_2)_3-OH$ 、 $-CH(CH_2OH)_2$ 或 $-S-CH_2-CO-NH-CO-NH-C_{1-6}$ 烷基，其中所述的 R^{2b} 的 C_{1-6} 烷基基团可任选地被一个或多个氰基或羟基基团取代。

2. 如权利要求 1 所定义的药物组合物，其中 R^{4b} 代表卤素、羟基、 $-O-C_{1-6}$ 烯基、 $-COO-C_{1-6}$ 烷基、 $-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-SO_2-NH_2$ 、氨基、氰基、 $=O$ 、 $-CH_2-CO-NH-C_{3-8}$ 环烷基、 $-CH_2-$ 芳基、 $-OCH_2-$ 杂芳基、 $-O-$ 芳基、 $-NH-CO-$ 芳基、 $-NH-$ 芳基或杂芳基基团，其中所述的 R^{4b} 的芳基、杂环基或杂芳基基团可任选地被一个或多个卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 $=S$ 或羟基基团取代，并且其中所述的 R^{4b} 的 C_{1-6} 烷基或 C_{2-6} 烯基基团可任选地被一个或多个羟基、氨基、氰基、 C_{1-6} 烷氧基、 $CONH_2$ 或 $-COO-C_{1-6}$ 烷基基团取代。

3. 如权利要求 2 所定义的药物组合物，其中 R^{4b} 代表卤素（例如氟）、氨基或杂芳基（例如吡啶基）。

4. 如权利要求 2 或权利要求 3 所定义的药物组合物, 其中 R^{4b} 代表氨基。
5. 如权利要求 2 或权利要求 3 所定义的药物组合物, 其中 R^{4b} 代表杂芳基 (例如吡啶基)。
6. 如权利要求 1 至 5 中的任一项所定义的药物组合物, 其中 m 代表 0 至 2 的整数。
7. 如权利要求 6 所定义的药物组合物, 其中 m 是 0。
8. 如权利要求 1 至 7 中的任一项所定义的药物组合物, 其中 R^{2b} 代表卤素、卤代 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、羟基、 C_{1-6} 烷氧基、 $-S-C_{1-6}$ 烷基、氨基、氰基、 NO_2 、 $=O$ 、 $-CONH_2$ 、 $-CO-C_{1-6}$ 烷基、 $-COO-C_{1-6}$ 烷基、 C_{1-6} 烷基、 $-CO-NH-C_{1-6}$ 烷基或 $-CO-NH-CH(Me)-COOH$, 其中所述的 R^{2b} 的 C_{1-6} 烷基基团可任选地被一个或多个氰基或羟基基团取代。
9. 如权利要求 8 所定义的药物组合物, 其中 R^{2b} 代表氨基或 $-CONH_2$ 。
10. 如权利要求 1 所定义的药物组合物, 其中式 (IB) 化合物是 5-(1, 3- 苯并噁唑-2-基)-4-(吡啶-4-基) 嘧啶-2-胺 (化合物 324) 或其可药用盐或溶剂化物。
11. 用于治疗的前述权利要求任意一项所述的药物组合物或权利要求 1 至 10 中的任一项所定义的式 (IB) 化合物。
12. 在神经退行性疾病、诸如 Tau 病变的治疗中用作酪蛋白激酶 δ (CK1 δ) 抑制剂的权利要求 1 至 10 中任一项所述的药物组合物或权利要求 1 至 10 中的任一项所定义的式 (IB) 化合物。
13. 用于权利要求 12 所定义的用途的药物组合物或化合物, 其中的 Tau 病变选自阿尔茨海默氏病、17 号染色体相关的额颞痴呆兼帕金森综合征 (FTDP-17)、进行性核上性麻痹 (PSP)、匹克氏病、皮质基底节变性、多系统萎缩 (MSA)、伴有铁聚集的神经基底节变性、I 型 (Hallervorden-Spatz)、嗜银颗粒性痴呆、唐氏综合症、伴有钙化的弥散性神经原纤维缠结、拳击员痴呆症、Gerstmann-Straussler-Scheinker 病、强直性肌营养不良症、Niemann-Pick 病 C 型、渐进型皮层下神经胶质增生、朊蛋白脑淀粉样血管病、仅缠结性老年痴呆、脑炎后帕金森综合征、亚急性硬化性全脑炎、克雅氏病、肌萎缩性侧索硬化症 / 帕金森痴呆复合征、伴有神经原纤维缠结 / 痴呆的非-Guamanian 运动神经元疾病以及帕金森氏病。
14. 用于权利要求 12 或权利要求 13 所定义的用途的药物组合物或化合物, 其中的 Tau 病变包含阿尔茨海默氏病。
15. 用于权利要求 12 至 14 中任意一项所定义的用途的药物组合物或化合物, 其中的化合物是 5-(1, 3- 苯并噁唑-2-基)-4-(吡啶-4-基) 嘧啶-2-胺 (化合物 324) 或其可药用盐或溶剂化物。

酪蛋白激酶 1 δ (CK1 δ) 抑制剂

[0001] 本申请为 2011 年 12 月 14 日提交的申请号为 PCT/GB2011/052473、发明名称为“酪蛋白激酶 1 δ (CK1 δ) 抑制剂”的国际申请的分案申请,该国际申请于 2013 年 6 月 14 日进入中国国家阶段,申请号为 201180060132.8。

技术领域

[0002] 本发明涉及包含酪蛋白激酶 1 δ (CK1 δ) 抑制剂的药物组合物以及所述抑制剂在治疗神经退行性疾病诸如阿尔茨海默氏病中的用途。

背景技术

[0003] 阿尔茨海默氏病 (AD ;也被称作阿尔茨海默型老年痴呆症 (SDAT)、阿尔茨海默型原发性退行性痴呆 (PDDAT) 或阿尔茨海默症) 是痴呆的最常见形式。通常,阿尔茨海默氏病的诊断是针对 65 岁以上的人,但有些少见的早发性阿尔茨海默氏病可能出现的要早得多。在 2006 年,全世界有 2660 万患者。预计到 2050 年,全球每 85 人中就将有 1 名阿尔茨海默氏病患者。

[0004] 阿尔茨海默氏病是神经退行性疾病,其特征存在于脑中存在老年斑和神经原纤维缠结。死亡时的痴呆程度与神经原纤维缠结数的相关性高于老年斑计数。在神经元中存在神经原纤维缠结导致这些神经元的死亡,这意味着防止缠结的形成是一个重要的治疗目标。形成神经原纤维缠结的主要蛋白质是微管相关蛋白 tau,其组装成具有以成对方式相互缠绕的外观的细丝,这些细丝被称作配对螺旋丝 (PHF)。PHF 存在于阿尔茨海默氏病患者脑中的退化神经元的不同位置,当有许多在神经元细胞体中聚集时,它们产生神经原纤维缠结 (Lee 等人,2001)。

[0005] Tau 蛋白以 AD 患者典型的神经原纤维缠结的形式、或在多种其它神经退行性疾病中以其它形态学上不同的 tau 聚集体的形式在神经元内沉积是将这些病症分组为 Tau 病变的基础。因此,除 AD 外,Tau 病变的主要例子是 17 号染色体相关的额颞痴呆兼帕金森综合征 (FTDP-17)、进行性核上性麻痹 (PSP)、匹克氏病、皮质基底节变性和多系统萎缩 (MSA)。细胞内的 tau 沉积 (通常是神经元细胞,但也可以是胶质细胞) 都是丝状的,并且与对照人脑的 tau 的磷酸化水平相比大多数处于过度磷酸化状态。在 AD 的情况下,该过度磷酸化的 tau 通常被称作 PHF-tau,因为其衍生自 PHF。

[0006] Tau 是一种磷酸化蛋白,磷酸化的功能还没有明确确定。但是,在多个丝氨酸和苏氨酸残基上增加的 tau 的磷酸化减弱了 tau 促进微管组装以及稳定组装好的微管的能力,在体外和细胞内均证实了这些效果。许多研究表明,AD 脑的 PHF-tau 在丝氨酸和苏氨酸上的磷酸化比对照脑的 tau 更严重。这一点已部分通过蛋白测序证实,并部分通过证实某些单克隆抗体仅标记 PHF-tau 或仅标记非磷酸化的 tau 而不标记 PHF-tau 来证明;许多这些抗体的抗原表位被图示到存在于 PHF-tau 而在对照脑 tau 中缺乏的特定磷酸化残基上。大部分其它 Tau 病变的其它病例的病理性 tau 似乎对 PHF-tau 具有类似的过度磷酸化。

[0007] 这些发现强烈暗示在包括 AD 在内的所有 Tau 病变中均存在类似的调节 tau 磷酸

化的异常。

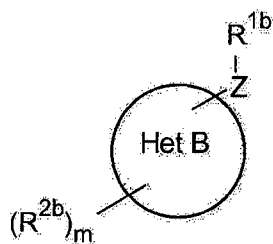
[0008] 有许多脯氨酸定向的和非脯氨酸定向的蛋白激酶被认为在阿尔茨海默氏病患者脑中的 PHF-tau 的产生中起作用,包括酪蛋白激酶 1。哺乳动物的酪蛋白激酶-1 存在多种亚型,CK1 α 、CK1 β 、CK1 γ 1、CK1 γ 2、CK1 γ 3、CK1 δ 和 CK1 ϵ 。CK1 δ 作为潜在的 tau 激酶的作用是特别令人感兴趣的,因为已有报道表明,与同等对照物相比,CK1 δ 蛋白在阿尔茨海默氏病患者脑的海马中增加了 30 倍以上 (Ghoshal, N. 等人 (1999) Am. J. Pathol 155, 1163-1172), 而其 mRNA 含量增加了 24 倍 (Yasojima, K. 等人 (2000) Brain Res 865, 116-120), 并且 CK1 还表现出与 PHF 密切相关 (Kuret, J. 等人 (1997) J. Neurochem 69, 2506-2515)。利用 tau 的磷酸特异性单克隆抗体进行检测, 发现 CK1 δ 在两个抗原表位上磷酸化 tau, 并且 CK1 δ 在非神经元细胞中的外源性表达减弱了 tau 与微管的结合 (Li, G. 等人 (2004) J. Biol. Chem. 279, 15938-15945)。关于阿尔茨海默氏病, 值得关注的一篇报道是 CK1 活性受 β -淀粉样肽 ($A\beta$) 的刺激, $A\beta$ 是老年神经炎斑块的组成部分, 其与缠结一起构成了阿尔茨海默氏型脑的特征 (Chauhan, A. 等人 (1993) Brain Res. 629, 47-52)。在阿尔茨海默氏病中 CK1 可能参与的其它证据来自所报道的在神经元中 CK1 对 $A\beta$ 产生的调节的影响 (Flajolet, M. 等人 (2007) PNAS USA 104, 4159-4164)。进一步的工作已证实, 可以通过 CK1 δ 在 PHF-tau 中产生至少 6 个新发现的磷酸化位点 (都在丝氨酸或苏氨酸残基上)。在 PHF-tau 中, CK1 是许多磷酸化位点的强的候选激酶, 对于其中三个位点, CK1 是唯一已知的激酶, 这一发现意味着 CK1 对阿尔茨海默氏病的发病具有重要的贡献 (Hanger 等人 (2007) J. Biol. Chem. 282, 23645-23654)。

[0009] 因此, 需要可在神经退行性疾病诸如 Tau 病变、包括阿尔茨海默氏病、17 号染色体相关的额颞痴呆兼帕金森综合征 (FTDP-17)、进行性核上性麻痹 (PSP)、匹克氏病、皮质基底节变性和多系统萎缩 (MSA) 的治疗中产生潜在的治疗益处的 CK1 δ 抑制剂。

发明内容

[0010] 本发明的第一方面提供了包含式 (IB) 化合物或其可药用盐或溶剂化物的药物组合物:

[0011]



(IB)

[0012] 其中

[0013] “Het B”代表包含 1 至 3 个选自 O、N 或 S 的杂原子的 5 元杂环环系, 其中所述的环系稠合到一个或多个 (例如 1-3 个) 另外的环上以形成包含最多 4 个环的多环环系;

[0014] Z 代表键、-C(R^{7b})(R^{8b})-、(CH₂)₂-、-O-、-S-、-CH₂-O-、-(CH₂)₂-O-、NR^{6b}-、-N(R^{6b})-C(R^{7b})(R^{8b})-、-N(R^{6b})-(CH₂)₂-、-N(R^{6b})-(CH₂)₃-、-CH₂-N(R^{6b})-(CH₂)₂-、-N(R⁶

^{b)} -CO-、-CH₂-NH-CO-(CH₂)₂-、-N(R^{6b})-CO-CH₂-、=N-、-N(R^{7b})-CH=、-C(H)(CN)-、-C(=N-NH-COC₁₋₆烷基)-、-CH=C(R^{6b})-CO-、=CH-、-N=CH-、-N=C(Me)-、-C(R^{6b})=CH-、-NH-CO-C(=CH-杂芳基)-、-C(=C(R^{7b})(R^{8b}))-、-CH=CH-CO-N(R^{6b})-、-CH=C(R^{6b})-CO-NH-CH₂-、-CH=C(R^{6b})-NH-CO-、-CH=C(R^{6b})-CO-O-CH₂-、-CS-S-CH₂-、-NH-CS-NH-、-NH-CS-NH-CH₂-、-NH-CS-NH-(CH₂)₂-、-CH₂-N(CSNH₂)-CH₂-、-S-C(R^{5b})(R^{6b})-、-S-(CH₂)₂-O-、SO₂-、-NH-SO₂-、-CH₂-NH-SO₂-、CO-、-CH₂-CO-、-(CH₂)₂-CO-、-O-CH₂-CO-、-(CH₂)₂-CO-、COO-、-COO-C(R^{7b})CO-、-CH=C(R^{5b})-CONH-CH₂-、-CO-CH₂-N(R^{6b})-CO-、-CO-CH₂-C(R^{6b})-CH₂-CO-、-CO-CH₂-N(R^{6b})-CH₂-、-CO-NH-N=C(R^{7b})-、-S-CH₂-CO-、-S-CH₂-CO-N(R^{6b})-、-S-CH₂-CO-N(R^{6b})-CH₂-、-SO₂-N(R^{6b})-C(R^{7b})(R^{8b})-CONH-、-SO₂-N(R^{6b})-CH(-CH₂-芳基)-CONH-CH₂-、-CH(-S-C₁₋₆烷基)-C(Me)(OH)-、-CH₂-C(R^{6b})(OH)-、-C(OH)(CH(Me)(C₃₋₈环烷基))-CH₂-、-C(OH)(R^{6b})-CH₂-、-CH(Me)-NH-CO-CH₂-、-CO-N(R^{6b})-CH₂-、-C(H)(R^{6b})-CO-N(R^{5b})-CH₂-、-CO-N(R^{6b})-CH₂-CH₂-、-CO-N(R^{6b})-CH₂-CH₂-CO-NH-CH₂-、-CO-NH-C(-CONH₂)=CH-、-CO-NH-CH(-CONH₂)-CH₂-、-CH₂-C(H)(Me)-CH₂-S-、-O-CH₂-CO-NH-、-CH₂-N(R^{6b})-CO-CH₂-O-、-N(R^{6b})-CO-CH₂-O-、-C(H)(-CH₂-芳基)-、-C(H)(-CH₂-杂芳基)-、-C(NH-芳基)=N-N=CH-、-C(NH-芳基)=N-N=CH-、-NH-CO-CH₂-N(R^{6b})-、-NH-N=C(-芳基)-、-NH-N=C(-芳基)-CO-、-NH-C(=N-CO-C₁₋₆烷基)-NH-(CH₂)₂-、-C(-NH-芳基)=N-N=CH-、-NH-C(-NH-芳基)=N-CONH-、-C(=CH-芳基)-CONH-CH₂-、-CH=C(R^{6b})-CONH-、-CH(-CH₂-芳基)-NH-CO-或-CH(OH)-, 其中所述的 Z 的芳基或杂芳基基团可任选地被一个或多个卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、NO₂或羟基基团取代;

[0015] R^{5b}代表氢、C₁₋₆烷基或氰基;

[0016] R^{6b}代表氢、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、氰基、COOH、-COOC₁₋₆烷基、C₃₋₈环烷基、-CH₂-C₃₋₈环烷基、芳基、杂芳基、-C₁₋₆亚烷基-芳基、-CO-芳基、-O-CO-杂芳基、-CO-杂芳基或-C(R^{7b})(R^{8b})-杂芳基, 其中所述的 R^{6b}的芳基基团可任选地被一个或多个卤素或 C₁₋₆烷氧基基团取代;

[0017] R^{7b}和 R^{8b}独立地代表氢或 C₁₋₆烷基;

[0018] R^{1b}代表芳基、C₃₋₈环烷基、单环或二环杂环基或单环或二环杂芳基环系, 其中 R^{1b}可被一个或多个(例如 1、2 或 3 个)R^{4b}基团取代;

[0019] R^{4b}代表卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烯基、C₁₋₆炔基、C₃₋₈环烷基、卤代 C₁₋₆烷基、羟基、C₁₋₆烷氧基、-O-C₁₋₆烯基、卤代 C₁₋₆烷氧基、-COOH、-CO-C₁₋₆烷基、-COO-C₁₋₆烷基、-CONH₂、-CH₂-CONH₂、-NH-C₁₋₆烷基、-NH-C₂₋₆烯基、-NH-CO-C₁₋₆烷基、-CO-NH-C₁₋₆烷基、-O-CH₂-CO-NH-C₁₋₆烷基、-CH₂-CH₂-CO-NH-C₁₋₆烷基、-S-C₁₋₆烷基、-SO-C₁₋₆烷基、-SO₂-C₁₋₆烷基、-SO₂-NH₂、-SO₂-NH-C₁₋₆烷基、-S-CH₂-CO-C₂₋₆烯基、-SO₂-OH、氨基、氰基、NO₂、=O、-CO-NH-(CH₂)₂-OMe、-NH-C₃₋₈环烷基、-CH₂-CO-NH-C₃₋₈环烷基、-CO-杂环基、-CO-杂芳基、-COO-(CH₂)₂-杂环基、-CH₂-芳基、-OCH₂-芳基、-OCH₂-杂芳基、-CH₂-O-CO-芳基、-O-芳基、-NH-CO-芳基、-NH-CO-杂芳基、-NH-CO-CH₂-芳基、-NH-芳基、芳基或杂芳基基团, 其中所述的 R^{4b}的芳基、杂环基或杂芳基基团可任选地被一个或多个卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、=S 或羟基基团取代, 并且其中所述的 R^{4b}的 C₁₋₆烷基或 C₂₋₆烯基基团可任选地被一个或多个羟基、氨基、氰基、C₁₋₆烷氧基、CONH₂或 -COO-C₁₋₆烷基基团取代;

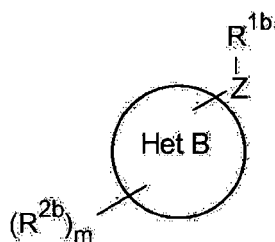
[0020] m 代表 0 至 3 的整数;

[0021] R^{2b} 代表卤素、卤代 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、羟基、 C_{1-6} 烷氧基、 $-S-C_{1-6}$ 烷基、 $-CH_2-S-C_{1-6}$ 烷基、 $-S-C_{2-6}$ 炔基、氨基、氰基、 NO_2 、 $=O$ 、 $=S$ 、 $-SO_2-C_{1-6}$ 烷基、 $-CONH_2$ 、 $-CO-C_{1-6}$ 烷基、 $-COO-C_{1-6}$ 烷基、 $-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-NH-CO-C_{1-6}$ 烷基、 $-NH-CO-CH=CH-CH_2-N(Me)_2$ 、 C_{1-6} 烷基、 $-CO-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-CO-NH-CH(Me)-COOH$ 、 $-S-CH_2-CO-N(Et)_2$ 、 $-NH-(CH_2)_2-OH$ 、 $-NH-(CH_2)_3-OH$ 、 $-NH-CH(Et)-CH_2-OH$ 、 $-CO-NH-(CH_2)_3-OH$ 、 $-CH(CH_2OH)_2$ 或 $-S-CH_2-CO-NH-CO-NH-C_{1-6}$ 烷基，其中所述的 R^{2b} 的 C_{1-6} 烷基基团可任选地被一个或多个氰基或羟基基团取代；

[0022] 条件是化合物不是序号为 54、373、458、496、585、590、594、596-597、601-602、649、703、778、877、891、910、912、926 和 962-963 的化合物。

[0023] 根据本文所述的本发明的一个特定方面，提供了作为酪蛋白激酶 1 δ (CK1 δ) 抑制剂用于治疗神经退行性疾病诸如 Tau 病变的式 (IB) 化合物或其可药用盐或溶剂化物：

[0024]



(IB)

[0025] 其中

[0026] “Het B”代表包含 1 至 3 个选自 O、N 或 S 的杂原子的 5 元杂环环系，其中所述的环系稠合到一个或多个（例如 1-3 个）另外的环上以形成包含最多 4 个环的多环环系；

[0027] Z 代表键、 $-C(R^{7b})(R^{8b})-$ 、 $(CH_2)_2$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-CH_2-O-$ 、 $-(CH_2)_2-O-$ 、 NR^{6b} 、 $-N(R^{6b})-C(R^{7b})(R^{8b})-$ 、 $-N(R^{6b})-(CH_2)_2-$ 、 $-N(R^{6b})-(CH_2)_3-$ 、 $-CH_2-N(R^{6b})-(CH_2)_2-$ 、 $-N(R^{6b})-CO-$ 、 $-CH_2-NH-CO-(CH_2)_2-$ 、 $-N(R^{6b})-CO-CH_2-$ 、 $=N-$ 、 $-C(H)(CN)-$ 、 $-C(=N-NH-COC_{1-6}烷基)-$ 、 $-CH=C(R^{6b})-CO-$ 、 $=CH-$ 、 $-N=CH-$ 、 $-N=C(Me)-$ 、 $-C(R^{6b})=CH-$ 、 $-NH-CO-C(=CH-杂芳基)-$ 、 $-C=C(Me)_2-$ 、 $-CH=CH-CO-N(R^{6b})-$ 、 $-CH=C(R^{6b})-CO-NH-CH_2-$ 、 $-CH=C(R^{6b})-NH-CO-$ 、 $-CH=C(R^{6b})-CO-O-CH_2-$ 、 $-CS-S-CH_2-$ 、 $-NH-CS-NH-$ 、 $-NH-CS-NH-CH_2-$ 、 $-NH-C-S-NH-(CH_2)_2-$ 、 $-CH_2-N(CSNH_2)-CH_2-$ 、 $-S-C(R^{5b})(R^{6b})-$ 、 $-S-(CH_2)_2-O-$ 、 SO_2 、 $-NH-SO_2-$ 、 $-CH_2-NH-SO_2-$ 、 CO 、 $-CH_2-CO-$ 、 $-(CH_2)_2-CO-$ 、 $-O-CH_2-CO-$ 、 $-(CH_2)_2-CO-$ 、 COO 、 $-COO-C(R^{7b})CO-$ 、 $-CH=C(R^{5b})-CONH-CH_2-$ 、 $-CO-CH_2-N(R^{6b})-CO-$ 、 $-CO-CH_2-C(R^{6b})-CH_2-CO-$ 、 $-CO-CH_2-N(R^{6b})-CH_2-$ 、 $-CO-NH-N=C(R^{7b})-$ 、 $-S-CH_2-CO-$ 、 $-S-CH_2-CO-N(R^{6b})-$ 、 $-S-CH_2-CO-N(R^{6b})-CH_2-$ 、 $-SO_2-N(R^{6b})-C(R^{7b})(R^{8b})-CONH-$ 、 $-SO_2-N(R^{6b})-CH(-CH_2-芳基)-CONH-CH_2-$ 、 $-CH(-S-C_{1-6}烷基)-C(Me)(OH)-$ 、 $-CH_2-C(R^{6b})(OH)-$ 、 $-C(OH)(CH(Me)(C_{3-8}环烷基))-CH_2-$ 、 $-C(OH)(R^{6b})-CH_2-$ 、 $-CH(Me)-NH-CO-CH_2-$ 、 $-CO-N(R^{6b})-CH_2-$ 、 $-C(H)(R^{6b})-CO-N(R^{5b})-CH_2-$ 、 $-CO-N(R^{6b})-CH_2-CH_2-$ 、 $-CO-N(R^{6b})-CH_2-CH_2-CO-NH-CH_2-$ 、 $-CO-NH-C(-CONH_2)=CH-$ 、 $-CO-NH-CH(-CONH_2)-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(H)(Me)-CH_2-S-$ 、 $-O-CH_2-CO-NH-$ 、 $-CH_2-N(R^{6b})-CO-CH_2-O-$ 、 $-N(R^{6b})-CO-CH_2-O-$ 、 $-C(H)(-CH_2-芳基)-$ 、 $-C(H)(-CH_2-杂芳基)-$ 、 $-C(NH-芳基)=N-N=CH-$ 、 $-C(NH-芳基)=N-N=CH-$ 、 $-NH-CO-CH_2-N(R^{6b})-$ 、 $-NH-N=C(-芳基)-$ 、 $-NH-N=C(-芳基)-CO-$ 、 $-NH-C(=N-CO-C_{1-6}烷基)-NH-(CH_2)_2-$ 、 $-C(-NH-芳基)=N-N=CH-$ 、 $-NH-C(-NH-芳基)=N-CONH-$ 、 $-C(=CH-芳基)-CONH-CH_2-$ 、 $-CH=$

$C(R^{6b})-CONH-$ 、 $-CH(-CH_2-$ 芳基 $)-NH-CO-$ 或 $-CH(OH)-$ ，其中所述的 Z 的芳基或杂芳基基团可任选地被一个或多个卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 NO_2 或羟基基团取代；

[0028] R^{5b} 代表氢、 C_{1-6} 烷基或氰基；

[0029] R^{6b} 代表氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、氰基、 $COOH$ 、 $-COOC_{1-6}$ 烷基、 C_{3-8} 环烷基、 $-CH_2-C_{3-8}$ 环烷基、芳基、杂芳基、 $-C_{1-6}$ 亚烷基-芳基、 $-CO-$ 芳基、 $-O-CO-$ 杂芳基、 $-CO-$ 杂芳基或 $-C(R^{7b})(R^{8b})-$ 杂芳基，其中所述的 R^{6b} 的芳基基团可任选地被一个或多个卤素或 C_{1-6} 烷氧基基团取代；

[0030] R^{7b} 和 R^{8b} 独立地代表氢或 C_{1-6} 烷基；

[0031] R^{1b} 代表芳基、 C_{3-8} 环烷基、单环或二环杂环基或单环或二环杂芳基环系，其中 R^{1b} 可被一个或多个（例如 1、2 或 3 个） R^{4b} 基团取代；

[0032] R^{4b} 代表卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烯基、 C_{1-6} 炔基、 C_{3-8} 环烷基、卤代 C_{1-6} 烷基、羟基、 C_{1-6} 烷氧基、 $-O-C_{1-6}$ 烯基、卤代 C_{1-6} 烷氧基、 $-COOH$ 、 $-CO-C_{1-6}$ 烷基、 $-COO-C_{1-6}$ 烷基、 $-CONH_2$ 、 $-CH_2-CONH_2$ 、 $-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-NH-C_{2-6}$ 烯基、 $-NH-CO-C_{1-6}$ 烷基、 $-CO-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-O-CH_2-CO-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-CH_2-CH_2-CO-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-S-C_{1-6}$ 烷基、 $-SO-C_{1-6}$ 烷基、 $-SO_2-C_{1-6}$ 烷基、 $-SO_2-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-S-CH_2-CO-C_{2-6}$ 烯基、 $-SO_2-OH$ 、氨基、氰基、 NO_2 、 $=O$ 、 $-CO-NH-(CH_2)_2-OMe$ 、 $-NH-C_{3-8}$ 环烷基、 $-CH_2-CO-NH-C_{3-8}$ 环烷基、 $-CO-$ 杂环基、 $-CO-$ 杂芳基、 $-COO-(CH_2)_2-$ 杂环基、 $-OCH_2-$ 芳基、 $-OCH_2-$ 杂芳基、 $-CH_2-O-CO-$ 芳基、 $-O-$ 芳基、 $-NH-CO-$ 芳基、 $-NH-CO-$ 杂芳基、 $-NH-CO-CH_2-$ 芳基、 $-NH-$ 芳基、芳基或杂芳基基团，其中所述的 R^{4b} 的芳基、杂环基或杂芳基基团可任选地被一个或多个卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 $=S$ 或羟基基团取代，并且其中所述的 R^{4b} 的 C_{1-6} 烷基或 C_{2-6} 烯基基团可任选地被一个或多个羟基、氨基、氰基、 C_{1-6} 烷氧基、 $CONH_2$ 或 $-COO-C_{1-6}$ 烷基基团取代；

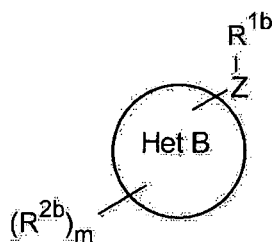
[0033] m 代表 0 至 3 的整数；

[0034] R^{2b} 代表卤素、卤代 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基、羟基、 C_{1-6} 烷氧基、 $-S-C_{1-6}$ 烷基、 $-CH_2-S-C_{1-6}$ 烷基、 $-S-C_{2-6}$ 炔基、氨基、氰基、 NO_2 、 $=O$ 、 $=S$ 、 $-SO_2-C_{1-6}$ 烷基、 $-CONH_2$ 、 $-CO-C_{1-6}$ 烷基、 $-COO-C_{1-6}$ 烷基、 $-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-NH-CO-C_{1-6}$ 烷基、 $-NH-CO-CH=CH-CH_2-N(Me)_2$ 、 C_{1-6} 烷基、 $-CO-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-CO-NH-CH(Me)-COOH$ 、 $-S-CH_2-CO-N(Et)_2$ 、 $-NH-(CH_2)_2-OH$ 、 $-NH-(CH_2)_3-OH$ 、 $-NH-CH(Et)-CH_2-OH$ 、 $-CO-NH-(CH_2)_3-OH$ 、 $-CH(CH_2OH)_2$ 或 $-S-CH_2-CO-NH-CO-NH-C_{1-6}$ 烷基，其中所述的 R^{2b} 的 C_{1-6} 烷基基团可任选地被一个或多个羟基基团取代；

[0035] 条件是化合物不是序号为 54、373、496 和 585 的化合物。

[0036] 根据本文所述的本发明的另一个特定方面，提供了作为酪蛋白激酶 1 δ (CK1 δ) 抑制剂用于治疗神经退行性疾病诸如 Tau 病变的式 (IB) 化合物或其可药用盐或溶剂化物：

[0037]



(IB)

[0038] 其中

[0039] “Het B”代表包含 1 至 3 个选自 O、N 或 S 的杂原子的 5 元杂环环系,其中所述的环系耦合到一个或多个(例如 1-3 个)另外的环上以形成包含最多 4 个环的多环环系;

[0040] Z 代表键、 $-C(R^{7b})(R^{8b})-$ 、 $(CH_2)_2$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-CH_2-O-$ 、 $-(CH_2)_2-O-$ 、 NR^{6b} 、 $-N(R^{6b})-C(R^{7b})(R^{8b})-$ 、 $-N(R^{6b})-(CH_2)_2-$ 、 $-N(R^{6b})-(CH_2)_3-$ 、 $-CH_2-N(R^{6b})-(CH_2)_2-$ 、 $-N(R^{6b})-CO-$ 、 $-CH_2-NH-CO-(CH_2)_2-$ 、 $-N(R^{6b})-CO-CH_2-$ 、 $=N-$ 、 $-C(H)(CN)-$ 、 $-C(=N-NH-COC_{1-6}烷基)-$ 、 $-CH=C(R^{6b})-CO-$ 、 $=CH-$ 、 $-N=CH-$ 、 $-N=C(Me)-$ 、 $-C(R^{6b})=CH-$ 、 $-NH-CO-C(=CH-杂芳基)-$ 、 $-C=C(Me)_2-$ 、 $-CH=CH-CO-N(R^{6b})-$ 、 $-CH=C(R^{6b})-NH-CO-$ 、 $-CH=C(R^{6b})-CO-O-CH_2-$ 、 $-CS-S-CH_2-$ 、 $-NH-CS-NH-$ 、 $-NH-CS-NH-CH_2-$ 、 $-NH-CS-NH-(CH_2)_2-$ 、 $-CH_2-N(CSNH_2)-CH_2-$ 、 $-S-CH_2-$ 、 $-S-(CH_2)_2-O-$ 、 SO_2 、 $-NH-SO_2-$ 、 $-CH_2-NH-SO_2-$ 、 CO 、 $-CH_2-CO-$ 、 $-(CH_2)_2-CO-$ 、 $-O-CH_2-CO-$ 、 $-(CH_2)_2-CO-$ 、 COO 、 $-COO-C(R^{7b})CO-$ 、 $-CH=C(R^{6b})-CONH-CH_2-$ 、 $-CO-CH_2-N(R^{6b})-CO-$ 、 $-CO-CH_2-C(R^{6b})-CH_2-CO-$ 、 $-CO-CH_2-N(R^{6b})-CH_2-$ 、 $-CO-NH-N=C(R^{7b})-$ 、 $-S-CH_2-CO-$ 、 $-S-CH_2-CO-N(R^{6b})-$ 、 $-S-CH_2-CO-N(R^{6b})-CH_2-$ 、 $-SO_2-N(R^{6b})-C(R^{7b})(R^{8b})-CONH-$ 、 $-SO_2-N(R^{6b})-CH(-CH_2-芳基)-CONH-CH_2-$ 、 $-CH(-S-C_{1-6}烷基)-C(Me)(OH)-$ 、 $-CH_2-C(R^{6b})(OH)-$ 、 $-C(OH)(CH(Me)(C_{3-8}环烷基))-CH_2-$ 、 $-C(OH)(R^{6b})-CH_2-$ 、 $-CH(Me)-NH-CO-CH_2-$ 、 $-CO-N(R^{6b})-CH_2-$ 、 $-CO-N(R^{6b})-CH_2-CH_2-$ 、 $-CO-N(R^{6b})-CH_2-CH_2-CO-NH-CH_2-$ 、 $-CO-NH-C(-CONH_2)=CH-$ 、 $-CO-NH-CH(-CONH_2)-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(H)(Me)-CH_2-S-$ 、 $-O-CH_2-CO-NH-$ 、 $-CH_2-N(R^{6b})-CO-CH_2-O-$ 、 $-N(R^{6b})-CO-CH_2-O-$ 、 $-C(H)(-CH_2-芳基)-$ 、 $-C(H)(-CH_2-杂芳基)-$ 、 $-C(NH-芳基)=N-N=CH-$ 、 $-C(NH-芳基)=N-N=CH-$ 、 $-NH-N=C(-芳基)-$ 、 $-NH-N=C(-芳基)-CO-$ 、 $-NH-C(=N-CO-C_{1-6}烷基)-NH-(CH_2)_2-$ 、 $-C(-NH-芳基)=N-N=CH-$ 、 $-NH-C(-NH-芳基)=N-CONH-$ 、 $-C(=CH-芳基)-CONH-CH_2-$ 、 $-CH=C(R^{6b})-CONH-$ 、 $-CH(-CH_2-芳基)-NH-CO-$ 或 $-CH(OH)-$,其中所述的 Z 的芳基或杂芳基基团可任选地被一个或多个卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 NO_2 或羟基基团取代;

[0041] R^{5b} 代表氢、 C_{1-6} 烷基或氰基;

[0042] R^{6b} 代表氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、氰基、 C_{3-8} 环烷基、 $-CH_2-C_{3-8}$ 环烷基、芳基、杂芳基、 $-C_{1-6}$ 亚烷基-芳基、 $-CO-$ 芳基、 $-CO-$ 杂芳基或 $-C(R^{7b})(R^{8b})-$ 杂芳基,其中所述的 R^{6b} 的芳基基团可任选地被一个或多个卤素或 C_{1-6} 烷氧基基团取代;

[0043] R^{7b} 和 R^{8b} 独立地代表氢或 C_{1-6} 烷基;

[0044] R^{1b} 代表芳基、 C_{3-8} 环烷基、单环或二环杂环基或单环或二环杂芳基环系,其中 R^{1b} 可被一个或多个(例如 1、2 或 3 个) R^{4b} 基团取代;

[0045] R^{4b} 代表卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烯基、 C_{1-6} 炔基、 C_{3-8} 环烷基、卤代 C_{1-6} 烷基、羟基、 C_{1-6} 烷氧基、 $-O-C_{1-6}$ 烯基、卤代 C_{1-6} 烷氧基、 $-COOH$ 、 $-CO-C_{1-6}$ 烷基、 $-COO-C_{1-6}$ 烷基、 $-CONH_2$ 、 $-CH_2-CONH_2$ 、 $-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-NH-C_{2-6}$ 烯基、 $-NH-CO-C_{1-6}$ 烷基、 $-CO-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-O-CH_2-CO-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-CH_2-CH_2-CO-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-S-C_{1-6}$ 烷基、 $-SO-C_{1-6}$ 烷基、 $-SO_2-C_{1-6}$ 烷基、 $-SO_2-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-S-CH_2-CO-C_{2-6}$ 烯基、 $-SO_2-OH$ 、氨基、氰基、 NO_2 、 $=O$ 、 $-CO-NH-(CH_2)_2-OMe$ 、 $-NH-C_{3-8}$ 环烷基、 $-CO-$ 杂环基、 $-CO-$ 杂芳基、 $-COO-(CH_2)_2-$ 杂环基、 $-OCH_2-$ 芳基、 $-OCH_2-$ 杂芳基、 $-CH_2-O-CO-$ 芳基、 $-O-$ 芳基、 $-NH-CO-$ 杂芳基、 $-NH-CO-CH_2-$ 芳基、芳基或杂芳基基团,其中所述的 R^{4b} 的芳基、杂环基或杂芳基基团可任选地被一个或多个卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 $=S$ 或羟基基团取代,并且其中所述的 R^{4b} 的 C_{1-6} 烷基或 C_{2-6} 烯基基团可任选地被一个

或多个羟基、氨基、氰基、 C_{1-6} 烷氧基、 $CONH_2$ 或 $-COO-C_{1-6}$ 烷基基团取代；

[0046] m 代表 0 至 3 的整数；

[0047] R^{2b} 代表卤素、卤代 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基、羟基、 C_{1-6} 烷氧基、 $-S-C_{1-6}$ 烷基、 $-CH_2-S-C_{1-6}$ 烷基、 $-S-C_{2-6}$ 炔基、氨基、氰基、 NO_2 、 $=O$ 、 $=S$ 、 $-SO_2-C_{1-6}$ 烷基、 $-CONH_2$ 、 $-CO-C_{1-6}$ 烷基、 $-COO-C_{1-6}$ 烷基、 $-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-NH-CO-C_{1-6}$ 烷基、 $-NH-CO-CH=CH-CH_2-N(Me)_2$ 、 C_{1-6} 烷基、 $-CO-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-CO-NH-CH(Me)-COOH$ 、 $-S-CH_2-CO-N(Et)_2$ 、 $-NH-(CH_2)_2-OH$ 、 $-NH-(CH_2)_3-OH$ 、 $-NH-CH(Et)-CH_2-OH$ 、 $-CO-NH-(CH_2)_3-OH$ 、 $-CH(CH_2OH)_2$ 或 $-S-CH_2-CO-NH-CO-NH-C_{1-6}$ 烷基，其中所述的 R^{2b} 的 C_{1-6} 烷基基团可任选地被一个或多个羟基基团取代。

[0048] 在式 (IB) 化合物的一种实施方案中，

[0049] “Het B” 代表包含 1 至 3 个选自 O、N 或 S 的杂原子的 5 元杂环环系，其中所述的环系稠合到 6 元环上形成二环杂环环系；

[0050] Z 代表键、 $-C(R^{7b})(R^{8b})-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-CH_2-O-$ 、 $-N(R^{6b})-C(R^{7b})(R^{8b})-$ 、 $-N(R^{6b})-(CH_2)_2-$ 、 $-N(R^{6b})-(CH_2)_3-$ 、 $-N(R^{6b})-CO-$ 、 $-N(R^{6b})-CO-CH_2-$ 、 $-N(R^{7b})-CH=$ 、 $=CH-$ 、 $-N=CH-$ 、 $-C(R^{6b})=CH-$ 、 $-C(=C(R^{7b})(R^{8b}))-$ 、 SO_2 、 $-CH_2-NH-SO_2-$ 、 CO 、 $-O-CH_2-CO-$ 、 $-SO_2-N(R^{6b})-C(R^{7b})(R^{8b})-CONH-$ 、 $-SO_2-N(R^{6b})-CH(-CH_2-芳基)-CONH-CH_2-$ 、 $-CH(-S-C_{1-6}烷基)-C(Me)(OH)-$ 、 $-C(H)(R^{6b})-CO-N(R^{5b})-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-CO-NH-$ 、 $-N(R^{6b})-CO-CH_2-O-$ 、 $-C(H)(-CH_2-芳基)-$ 、 $-C(NH-芳基)=N-N=CH-$ 、 $-NH-CO-CH_2-N(R^{6b})-$ 、 $-NH-N=C(-芳基)-$ 、 $-NH-C(=N-CO-C_{1-6}烷基)-NH-(CH_2)_2-$ 、 $-C(=CH-芳基)-CONH-CH_2-$ 或 $-CH(-CH_2-芳基)-NH-CO-$ ，其中所述的 Z 的芳基或杂芳基基团可任选地被一个或多个卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 NO_2 或羟基基团取代；

[0051] R^{5b} 代表氢；

[0052] R^{6b} 代表氢、甲基、 C_{1-6} 烷氧基、 $-COOH$ 、 $-CO-$ 芳基、 $-O-CO-$ 杂芳基或 $-CO-$ 杂芳基，其中所述的 R^{6b} 的芳基基团可任选地被一个或多个卤素或 C_{1-6} 烷氧基基团取代；

[0053] R^{7b} 和 R^{8b} 独立地代表氢或 C_{1-6} 烷基；

[0054] R^{1b} 代表单环芳基或杂芳基环系，其中 R^{1b} 可被一个或多个（例如 1、2 或 3 个） R^{4b} 基团取代；

[0055] R^{4b} 代表卤素、羟基、 $-O-C_{1-6}$ 烯基、 $-COO-C_{1-6}$ 烷基、 $-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-SO_2-NH_2$ 、氨基、氰基、 $=O$ 、 $-CH_2-CO-NH-C_{3-8}$ 环烷基、 $-CH_2-$ 芳基、 $-OCH_2-$ 杂芳基、 $-O-$ 芳基、 $-NH-CO-$ 芳基、 $-NH-$ 芳基或杂芳基基团，其中所述的 R^{4b} 的芳基、杂环基或杂芳基基团可任选地被一个或多个卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 $=S$ 或羟基基团取代，并且其中所述的 R^{4b} 的 C_{1-6} 烷基或 C_{2-6} 烯基基团可任选地被一个或多个羟基、氨基、氰基、 C_{1-6} 烷氧基、 $CONH_2$ 或 $-COO-C_{1-6}$ 烷基基团取代；

[0056] m 代表 0 至 2 的整数；并且

[0057] R^{2b} 代表卤素、卤代 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、羟基、 C_{1-6} 烷氧基、 $-S-C_{1-6}$ 烷基、氨基、氰基、 NO_2 、 $=O$ 、 $-CONH_2$ 、 $-CO-C_{1-6}$ 烷基、 $-COO-C_{1-6}$ 烷基、 C_{1-6} 烷基、 $-CO-NH-C_{1-6}$ 烷基或 $-CO-NH-CH(Me)-COOH$ ，其中所述的 R^{2b} 的 C_{1-6} 烷基基团可任选地被一个或多个氰基或羟基基团取代。

[0058] 在一个实施方案中，Het B 代表包含 1 至 3 个选自 O、N 或 S 的杂原子的 5 元杂环环系，其中所述的环系稠合到 6 元环上形成二环杂环环系。在另一个实施方案中，Het B 代表苯并咪唑基、吲哚基或中氮茛基。

[0059] 在一个实施方案中, R^{5b} 代表氢。

[0060] 在一个实施方案中, R^{6b} 代表氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 $-COOH$ 、 $-CO-$ 芳基、 $-O-CO-$ 杂芳基、 $-CO-$ 杂芳基或 $-C(R^{7b})(R^{8b})-$ 杂芳基, 其中所述的 R^{6b} 的芳基基团可任选地被一个或多个卤素或 C_{1-6} 烷氧基基团取代。

[0061] 在一个实施方案中, R^{1b} 代表单环芳基或杂芳基环系, 其中 R^{1b} 可被一个或多个 (例如 1、2 或 3 个) R^{4b} 基团取代。在另一个实施方案中, R^{1b} 代表单环芳基, 例如任选地被一个或多个 (例如 1 个) R^{4b} 基团取代的苯基。在另一个实施方案中, R^{1b} 代表单环杂芳基, 例如任选地被一个或多个 (例如 1 或 2 个) R^{4b} 基团取代的噻吩基、嘧啶基或吡唑啉基。

[0062] 在一个实施方案中, R^{4b} 代表卤素、羟基、 $-O-C_{1-6}$ 烯基、 $-COO-C_{1-6}$ 烷基、 $-NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-SO_2-NH_2$ 、氨基、氰基、 $=O$ 、 $-CH_2-CO-NH-C_{3-8}$ 环烷基、 $-CH_2-$ 芳基、 $-OCH_2-$ 杂芳基、 $-O-$ 芳基、 $-NH-CO-$ 芳基、 $-NH-$ 芳基或杂芳基基团, 其中所述的 R^{4b} 的芳基、杂环基或杂芳基基团可任选地被一个或多个卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 $=S$ 或羟基基团取代, 并且其中所述的 R^{4b} 的 C_{1-6} 烷基或 C_{2-6} 烯基基团可任选地被一个或多个羟基、氨基、氰基、 C_{1-6} 烷氧基、 $CONH_2$ 或 $-COO-C_{1-6}$ 烷基基团取代。

[0063] 在另一个实施方案中, R^{4b} 代表卤素 (例如氟)、氨基或杂芳基 (例如吡啶基)。

[0064] 在一个实施方案中, Z 代表键、 $-C(R^{7b})(R^{8b})-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-CH_2-O-$ 、 $-N(R^{6b})-C(R^{7b})(R^{8b})-$ 、 $-N(R^{6b})-(CH_2)_2-$ 、 $-N(R^{6b})-(CH_2)_3-$ 、 $-N(R^{6b})-CO-$ 、 $-N(R^{6b})-CO-CH_2-$ 、 $-N(R^{7b})-CH=$ 、 $=CH-$ 、 $-N=CH-$ 、 $-C(R^{6b})=CH-$ 、 $-C(=C(R^{7b})(R^{8b}))-$ 、 SO_2 、 $-CH_2-NH-SO_2-$ 、 CO 、 $-O-CH_2-CO-$ 、 $-SO_2-N(R^{6b})-C(R^{7b})(R^{8b})-CONH-$ 、 $-SO_2-N(R^{6b})-CH(-CH_2-$ 芳基) $-CONH-CH_2-$ 、 $-CH(-S-C_{1-6}$ 烷基) $-C(Me)(OH)-$ 、 $-C(H)(R^{6b})-CO-N(R^{5b})-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-CO-NH-$ 、 $-N(R^{6b})-CO-CH_2-O-$ 、 $-C(H)(-CH_2-$ 芳基) $-$ 、 $-C(NH-$ 芳基) $=N-N=CH-$ 、 $-NH-CO-CH_2-N(R^{6b})-$ 、 $-NH-N=C(-$ 芳基) $-$ 、 $-NH-C(=N-CO-C_{1-6}$ 烷基) $-NH-(CH_2)_2-$ 、 $-C(=CH-$ 芳基) $-CONH-CH_2-$ 或 $-CH(-CH_2-$ 芳基) $-NH-CO-$, 其中所述的 Z 的芳基或杂芳基基团可任选地被一个或多个卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 NO_2 或羟基基团取代。

[0065] 在另一个实施方案中, Z 代表键或 CO 。

[0066] 在一个实施方案中, m 代表 0 至 2 的整数。在一个实施方案中, m 代表 0。在另一个实施方案中, m 代表 2。

[0067] 在一个实施方案中, R^{2b} 代表卤素、卤代 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、羟基、 C_{1-6} 烷氧基、 $-S-C_{1-6}$ 烷基、氨基、氰基、 NO_2 、 $=O$ 、 $-CONH_2$ 、 $-CO-C_{1-6}$ 烷基、 $-COO-C_{1-6}$ 烷基、 C_{1-6} 烷基、 $-CO-NH-C_{1-6}$ 烷基或 $-CO-NH-CH(Me)-COOH$, 其中所述的 R^{2b} 的 C_{1-6} 烷基基团可任选地被一个或多个氰基或羟基基团取代。

[0068] 在另一个实施方案中, R^{2b} 代表氨基或 $-CONH_2$ 。

[0069] 在一个实施方案中, 式 (IB) 化合物选自本文所述的化合物 2-3、26-28、30-33、35、47-48、51、57-60、63-64、78、84、113、123、127-129、145、155-157、171-173、204、206-207、210、225、227、233、235-236、241-242、244、249、269、285、288、303、307-312、314-316、320、324-325、333、336、351、357-360、374-375、384-391、396、399-402、404-405、407-411、414、424-425、427-428、437、448、456-457、482、484-485、489-491、495、497-498、505、507、516、519、524、526、553、559-560、568、570、575、609、615-616、618、626-627、638、653、669、

692-694、705、709、712、716、719、725、734、738、740、746、749、753-754、756、758-759、767、770、777、784-785、790、792、796、800-801、804-805、808、819、821、827-828、831、833、838、844、847、857-858、869、872、875、933、952、955、969、987、990 或 999 中的任何一种或其可药用盐或溶剂化物。

[0070] 在另一个实施方案中, 式 (IB) 化合物选自本文所述化合物 2-3、26-28、30、32-33、47-48、51、59-60、84、113、123、127、129、145、155、157、172-173、204、206-207、210、225、233、235-236、241、244、269、285、288、307-311、315-316、320、324-325、333、336、351、357-360、374-375、385-386、388-391、396、399-402、404-405、407-410、414、424、427-428、437、457、482、490、495、497-498、505、516、519、553、559-560 或 568 中的任何一种或其可药用盐或溶剂化物。

[0071] 在另一个实施方案中, 式 (IB) 化合物选自本文所述化合物 30、314、324-325、391、405、626、705、753-754、759、770、784、808、833 或 847 中的任何一种或其可药用盐或溶剂化物。

[0072] 在另一个实施方案中, 式 (IB) 化合物选自本文所述化合物 324-325、405、754 或 847 中的任何一种或其可药用盐或溶剂化物。

[0073] 在一个实施方案中, 式 (IB) 化合物选自本文所述化合物 30、288、314、324-325、336、374、391、405、615-616、626、705、740、753-754、756、759、770、784、808、819、833、844、847、869、872、875、933、952、955、969、987、990 和 999 中的任何一种或其可药用盐或溶剂化物。该实施方案的化合物在本文所述的 CK1 δ 抑制试验中进行了测试并且表现出抑制活性大于 5%。

[0074] 在另一个实施方案中, 式 (IB) 化合物选自本文所述化合物 324-325、405、754、847、952、987、990 和 999 中的任何一种或其可药用盐或溶剂化物。该实施方案的化合物在本文所述的 CK1 δ 抑制试验中进行了测试并且表现出抑制活性大于 50%。

[0075] 在另一个实施方案中, 式 (IB) 化合物选自以下化合物或其可药用盐或溶剂化物中的任一种:

[0076] 5-(1, 3- 苯并噻唑-2-基)-4-(吡啶-4-基) 嘧啶-2-胺 (化合物 324);

[0077] 2-氨基-3-[(噻吩-2-基) 羰基] 中氮茛-1-甲酰胺 (化合物 847);

[0078] 2-[3-(吡啶-4-基)-1H-吡唑-4-基]-1, 3- 苯并噻唑 (化合物 952);

[0079] 2-氨基-3-[(4-氟苯基) 羰基] 中氮茛-1-甲酰胺 (化合物 987);

[0080] 2-氨基-3-苯甲酰基中氮茛-1-甲酰胺 (化合物 990); 和

[0081] 2-氨基-1-[(4-氟苯基) 羰基]-1H-吡唑-3-甲酰胺 (化合物 999)。

[0082] 在另一个实施方案中, 式 (IB) 化合物选自本文所述化合物 324、952、987、990 和 999 中的任何一种或其可药用盐或溶剂化物。该实施方案的化合物在本文所述的 CK1 δ 抑制试验中进行了测试并且表现出抑制活性大于 90%。

[0083] 在另一个实施方案中, 式 (IB) 化合物选自本文所述化合物 324、952、987 和 999 中的任何一种或其可药用盐或溶剂化物。该实施方案的化合物在一系列激酶抑制试验中进行了测试, 其不仅在本文所述的 CK1 δ 抑制试验中表现出抑制活性大于 90%, 而且与其它激酶相比, 对于 CK1 δ 表现出显著的和选择性抑制。

[0084] 例如, 化合物编号 324 (5-(1, 3- 苯并噻唑-2-基)-4-(吡啶-4-基) 嘧啶-2-胺)

表现出对 CK1 δ 的选择性超过 ABL2/ARG、ALK4/ACVR1B、ALK5/TGFBR1、CDK5/p25、CK1a1、CK1g1、CK1g3、CLK2、c-SRC、EGFR、EPHA2、FGFR1、GSK3b、HGK/MAP4K4、JNK2、KDR/VEGFR2、LCK、MSK1/RPS6KA5、PDK1/PDPK1、PIM3、PKA、PKCa、PKCb2、RIPK2、ROCK1、TNIK 和 YES/YES1, 对它们的抑制活性均小于 40%。

[0085] 例如, 化合物编号 952 (2-[3-(吡啶-4-基)-1H-吡唑-4-基]-1,3-苯并噁唑) 表现出对 CK1 δ 的选择性超过 ABL2/ARG、ALK4/ACVR1B、ALK5/TGFBR1、CDK5/p25、CK1g1、CK1g2、CK1g3、c-SRC、EGFR、EPHA2、FGFR1、KDR/VEGFR2、LCK、MSK1/RPS6KA5、PDK1/PDPK1、PIM3、PKA、PKCa、PKCb2、ROCK1 和 YES/YES1, 对它们的抑制活性均小于 40%。

[0086] 例如, 化合物编号 987 (2-氨基-3-[(4-氟苯基)羰基]中氮茛-1-甲酰胺) 表现出对 CK1 δ 的选择性超过 ABL2/ARG、CDK5/p25、CK1g1、CK1g2、CK1g3、CLK2、c-SRC、FGFR1、GSK3b、HGK/MAP4K4、JNK2、KDR/VEGFR2、LCK、MSK1/RPS6KA5、PDK1/PDPK1、PIM3、PKCa、PKCb2、ROCK1 和 TNIK, 对它们的抑制活性均小于 40%。

[0087] 例如, 化合物编号 999 (2-氨基-1-[(4-氟苯基)羰基]-1H-吡啶-3-甲酰胺) 表现出对 CK1 δ 的选择性超过 ABL2/ARG、CDK5/p25、CK1g1、CK1g2、CLK2、c-SRC、FGFR1、GSK3b、HGK/MAP4K4、KDR/VEGFR2、LCK、MSK1/RPS6KA5、PDK1/PDPK1、PIM3、PKCa、PKCb2 和 ROCK1, 对它们的抑制活性均小于 40%。

[0088] 在另一个实施方案中, 式 (IB) 化合物选自本文所述化合物 324 和 987 中的任何一种或其可药用盐或溶剂化物。该实施方案的化合物已被证实对细胞存活具有保护作用, 这一点可从本文提供的数据、尤其是从图 1 和 2 中看出。该实施方案的化合物还被证实可抑制 Tau 蛋白内的两个不同氨基酸残基 (即 Ser 396 和 Thr 391) 的磷酸化, 如图 4 和 5 所示。

[0089] 在另一个实施方案中, 式 (IB) 化合物是本文所述的化合物 324 或其可药用盐或溶剂化物。该实施方案的化合物已被证实以剂量依赖的方式对细胞存活产生保护作用, 这一点可从本文提供的数据、尤其是从图 1 中看出。该实施方案的化合物还被证实可抑制 Tau 蛋白内的两个不同氨基酸残基 (即 Ser 396 和 Thr 391) 的磷酸化, 如图 4A 和 5 所示。

附图说明

[0090] 1. 图 1 显示了化合物 324 对 SH-SY5Y-TMHT 细胞的细胞存活率的影响。

[0091] 2. 图 2 显示了化合物 987 对 SH-SY5Y-TMHT 细胞的细胞存活率的影响

[0092] 3. 图 3 显示了 PF670462 对 SH-SY5Y-TMHT 细胞的细胞存活率的影响

[0093] 4. 图 4 显示了 CK1d- 选择性化合物对 SH-SY5Y-TMHT 细胞中的丝氨酸 396 磷酸化的质谱测定。

[0094] 5. 图 5 显示了在用选择性 CK1d 抑制剂处理的 SH-SY5Y-TMHT 细胞中 pT231 (A 组) 和总 Tau (B 组) 水平的蛋白质印记测定结果。

具体实施方式

[0095] 在本文中, 术语“可药用盐”是指对患者无害的盐。所述的盐包括可药用酸加成盐、可药用金属盐和可药用碱加成盐。酸加成盐包括无机酸以及有机酸的盐。

[0096] 适当的无机酸的代表性的例子包括盐酸、氢溴酸、氢碘酸、磷酸、硫酸、硝酸等。适当的有机酸的代表性的例子包括甲酸、乙酸、三氯乙酸、三氟乙酸、丙酸、苯甲酸、肉桂酸、柠

柠檬酸、富马酸、乙醇酸、乳酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、草酸、苦味酸、丙酮酸、水杨酸、琥珀酸、甲磺酸、乙磺酸、酒石酸、抗坏血酸、双羟萘酸、二亚甲基水杨酸、乙二磺酸、葡萄糖酸、柠康酸、天冬氨酸、硬脂酸、棕榈酸、EDTA、乙醇酸、对-氨基苯甲酸、谷氨酸、苯磺酸、对-甲苯磺酸等。其它的可药用无机或有机酸加成盐的例子包括 J. Pharm. Sci. 1977, 66, 2 中列出的可药用盐,在此将其引入作为参考。金属盐的例子包括锂、钠、钾、镁盐等。铵和烷基化铵盐的例子包括铵、甲基铵、二甲基铵、三甲基铵、乙基铵、羟基乙基铵、二乙基铵、丁基铵、四甲基铵盐等。

[0097] 碱金属盐的代表性的例子包括例如钠、钾、锂、钙、镁或铵或有机碱诸如甲基胺、乙基胺、丙基胺、三甲基胺、二乙基胺、三乙基胺、N,N-二甲基乙醇胺、三(羟基甲基)氨基甲烷、乙醇胺、吡啶、哌啶、哌嗪、甲基吡啶、二环己基胺、吗啉、苄基胺、普鲁卡因、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、N-甲基葡萄糖胺。

[0098] 根据本发明,式(1B)化合物可以是外消旋形式以及纯对映体形式或对映体的非外消旋混合物,包括当式(1B)化合物具有一个以上的手性中心的情况。在式(1B)化合物具有不饱和碳碳双键的情况下,顺式(Z)和反式(E)异构体及其混合物都属于本发明。

[0099] 本文所提及的“卤素”是指氟、氯、溴或碘原子。

[0100] 本文所提及的“C₁₋₆烷基”是指任何具有1至6个碳原子的直链、支链烃基团或具有3至6个碳原子的环烃基团。该烷基基团的代表性的例子包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基和叔丁基、正-戊基、异戊基、新戊基、环丙基、环丁基、环戊基和环己基。所提及的“卤代C₁₋₆烷基”是指被本文所定义的一个或多个卤素原子取代的C₁₋₆烷基。

[0101] 本文所提及的“C₁₋₆亚烷基”是指具有指定数目的成员原子的饱和二价烃链。例如,C₁₋₆亚烷基是指键或具有1至6个成员原子的亚烷基。亚烷基基团可以是直链或支链。代表性的支链亚烷基基团具有一个或两个分支。亚烷基包括亚甲基、亚乙基、亚丙基(正亚丙基和异亚丙基)和亚丁基(正亚丁基、异亚丁基和叔亚丁基)。

[0102] 本文所提及的“C₂₋₆烯基”是指具有至少一个双键的任何具有2至6个碳原子的直链、支链烃基团或具有3至6个碳原子环烃基。烯基基团的代表性的例子包括乙烯基、丙烯基、丁烯基和环己烯基。

[0103] 本文所提及的“C₂₋₆炔基”是指具有至少一个三键的任何具有2至6个碳原子的直链或支链烃基团。该炔基基团的代表性的例子包括乙炔基、丙炔基和丁炔基。

[0104] 本文所提及的“C₁₋₆烷氧基”是指-O-C₁₋₆烷基,其中C₁₋₆烷基如本文所定义。该基团的例子包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、戊氧基或己氧基等。

[0105] 本文所提及的“C₃₋₈环烷基”是指3至8个碳原子的饱和单环烃环。该基团的例子包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基或环辛基等。

[0106] 本文所提及的“芳基”是指C₆₋₁₂单环或二环烃环,其中至少一个环是芳香族的。该基团的例子包括苯基、茚基或萘基等。

[0107] 本文所提及的“杂原子”是指氮、硫或氧原子。

[0108] 本文所提及的“杂环基”是指包含1至4个杂原子作为环中成员原子的饱和或不饱和的非芳香族环。包含1个以上杂原子的杂环基基团可含有不同的杂原子。杂环基基团可任选地被一个或多个本文所定义的取代基取代。杂环基基团是单环环系或稠合的二环或多环环系,或是被称作杂环“螺”环系的二环结构。在某些实施方案中,杂环基是饱和的。

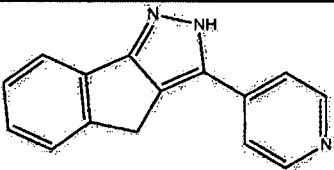
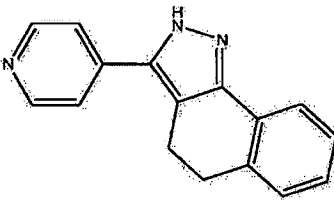
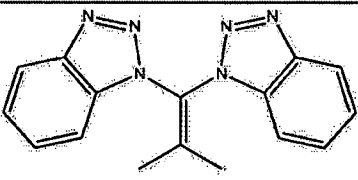
在其它实施方案中,杂环基是不饱和的并且是非芳香族的。单环杂环基环系的非限制性的例子包括吡咯烷基、四氢呋喃基、二氢呋喃基、吡喃基、四氢吡喃基、二氢吡喃基、四氢噻吩、吡唑烷基、~~咪唑~~唑烷基、噻唑烷基、哌啶基、高哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、1,3-二氧戊环基、1,3-二氧杂环己基、1,4-二氧杂环己基、1,3-氧硫杂环戊基、1,3-氧硫杂环己基、1,3-二硫杂环己基和氮杂环丁基。

[0109] 本文所提及的“杂芳基”是指含有1至4个杂原子作为环中的成员原子的芳环。包含1个以上的杂原子的杂芳基基团可含有不同的杂原子。杂芳基基团可任选地被一个或多个本文所定义的取代基取代。杂芳基基团是单环环系或是稠合的二环或多环环系。单环杂芳基环具有5或6个成员原子。二环杂芳基环具有7至11个成员原子。二环杂芳基环包括其中苯基和单环杂环基环相连形成稠合的二环环系的那些环,以及其中的单环杂芳基环和单环环烷基、环烯基、杂环基或杂芳基环相连形成稠合的二环环系的那些环。杂芳基的非限制性的例子包括吡咯基、吡唑基、咪唑基、~~噻唑~~唑基、异~~噻唑~~唑基、噻唑基、异噻唑基、呋喃基、呋喃基、噻吩、三唑基、吡啶基、嘧啶基、哒嗪基、吡嗪基、三嗪基、四嗪基、吡啶基、异吡啶基、中氮茛基、吡唑基、嘌呤基、喹啉基、异喹啉基、喹喔啉基、喹唑啉基、蝶啶基、噌啉基、苯并咪唑基、苯并吡喃基、苯并~~噻唑~~唑基、苯并呋喃基、异苯并呋喃基、苯并噻唑基、苯并噻吩基、呋喃并吡啶基和萘啶基。

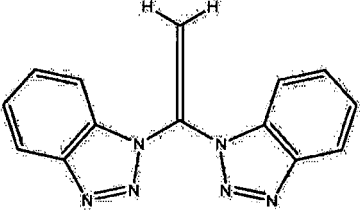
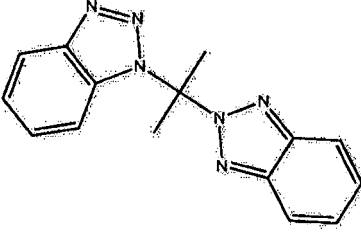
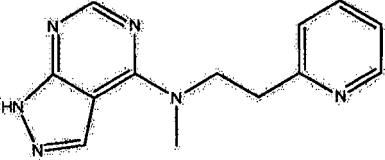
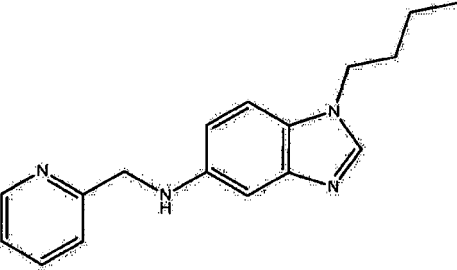
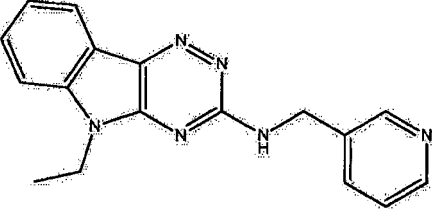
[0110] 本文所提及的“杂环环系”是指上文所定义的杂环基环系或杂芳基环系。

[0111] 代表性的式(1B)化合物包括以下所列出的化合物:

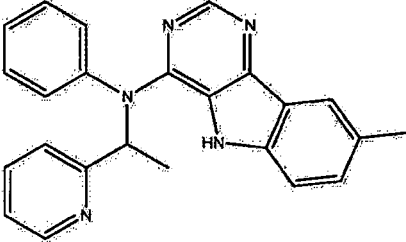
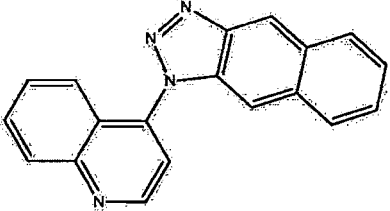
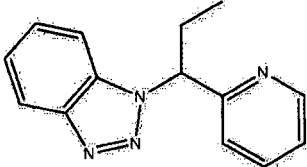
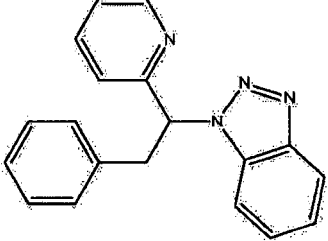
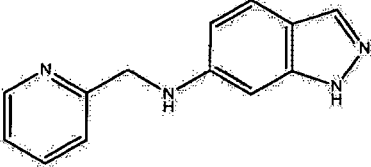
[0112]

化合物序号	结构
2	
3	
26	

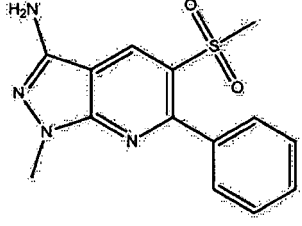
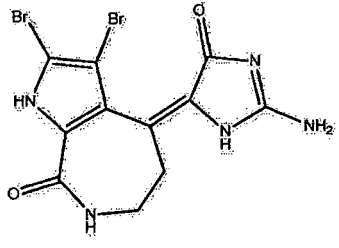
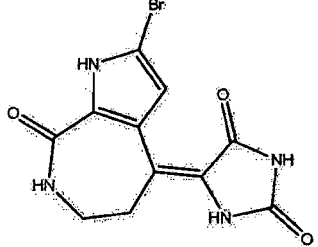
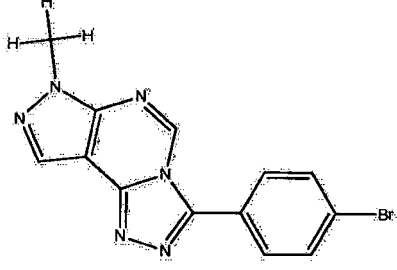
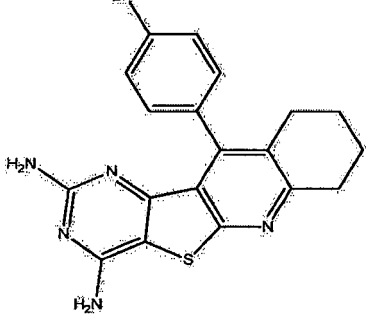
[0113]

27	
28	
30	
31	
32	

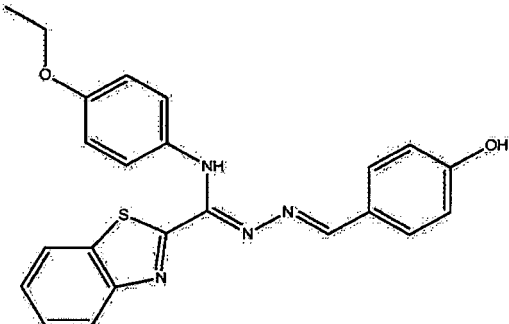
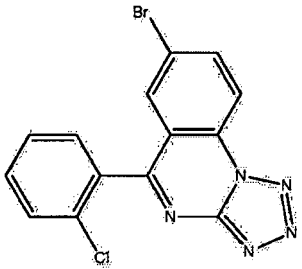
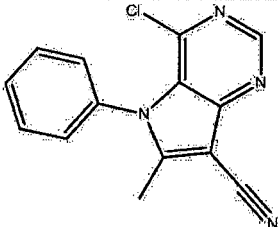
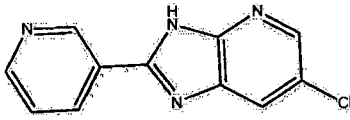
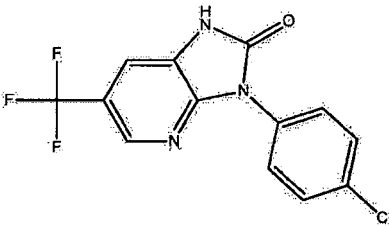
[0114]

33	
35	
47	
48	
51	

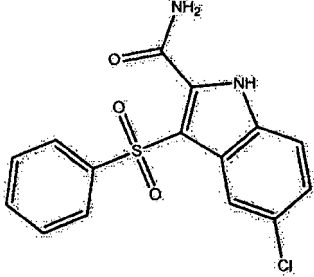
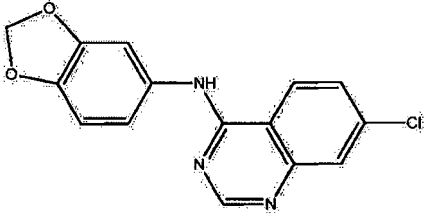
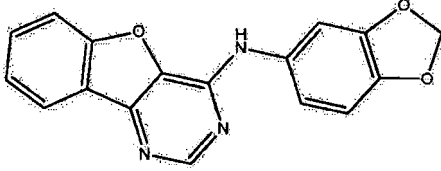
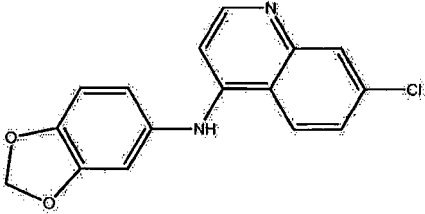
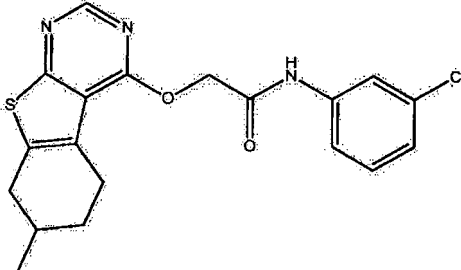
[0115]

54	
57	
58	
59	
60	

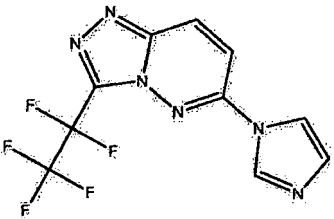
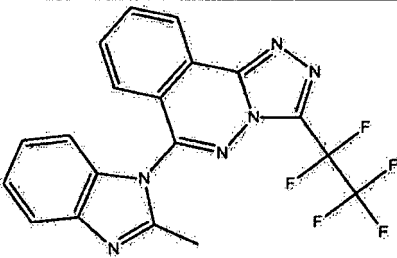
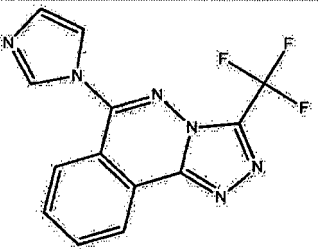
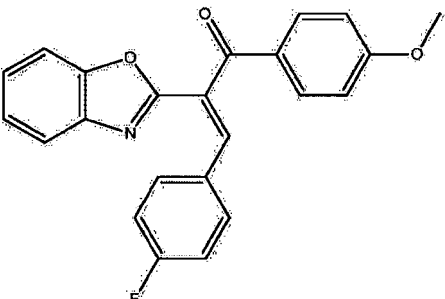
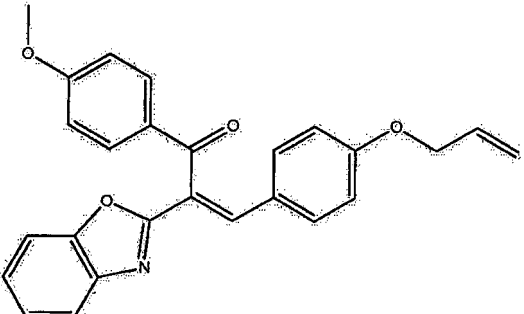
[0116]

63	 <chem>COc1ccc(NC(=N/N=C/c2ccc(O)cc2)c3nc4ccccc4s3)cc1</chem>
64	 <chem>Brc1ccc2c(c1)c3ccccc3n2Cl</chem>
78	 <chem>N#Cc1c2c(c1)c3ccccc3n2Cl</chem>
84	 <chem>Clc1c2c(c1)c3ccccc3n2</chem>
113	 <chem>Clc1c2c(c1)c3ccccc3n2C(F)(F)F</chem>

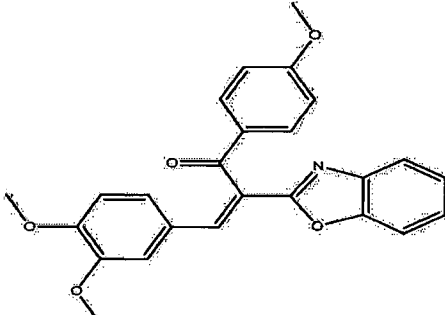
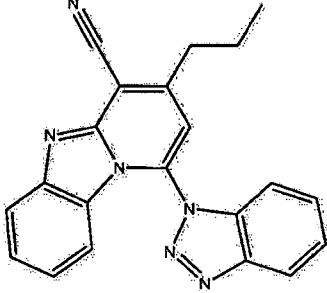
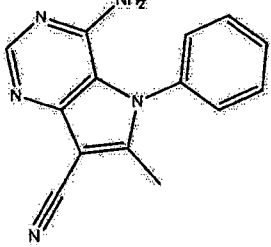
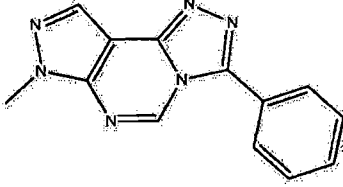
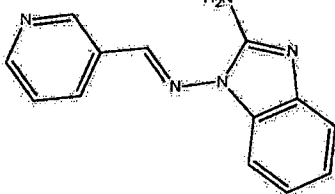
[0117]

123	
127	
128	
129	
145	

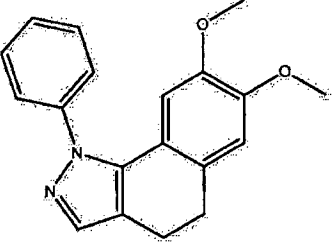
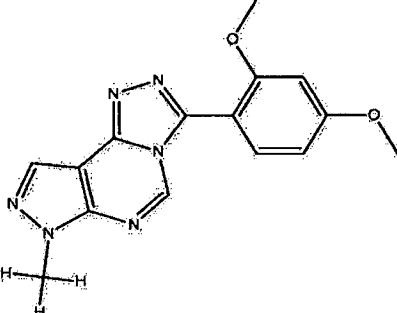
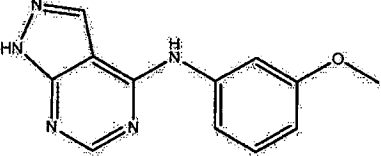
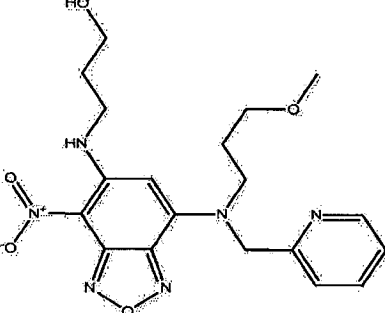
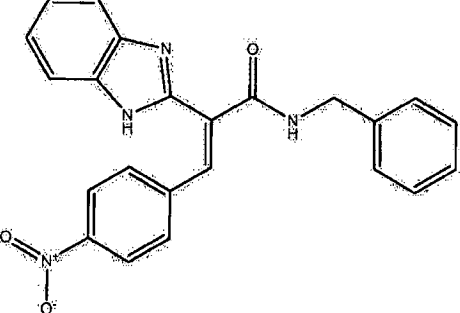
[0118]

155	
156	
157	
171	
172	

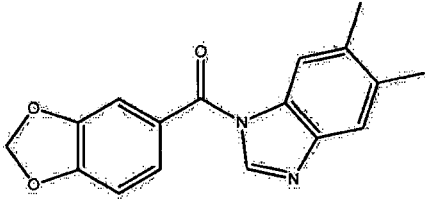
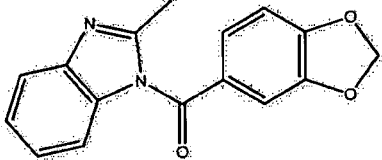
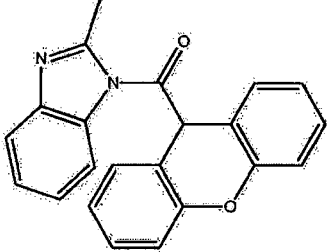
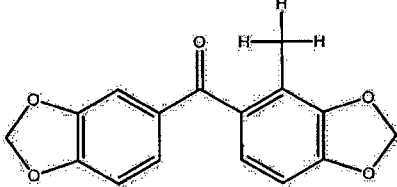
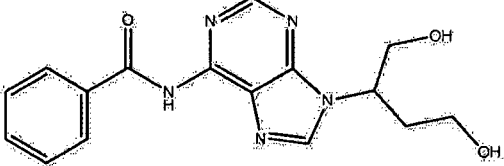
[0119]

173	
204	
206	
207	
210	

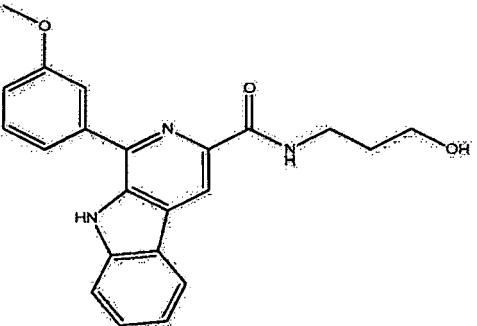
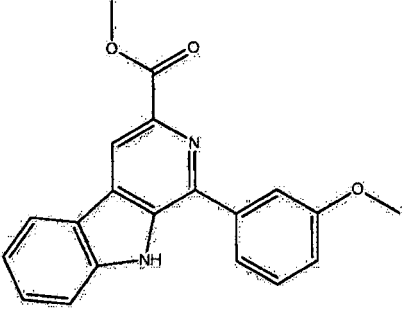
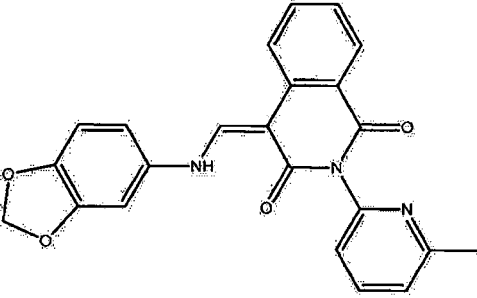
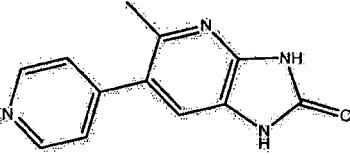
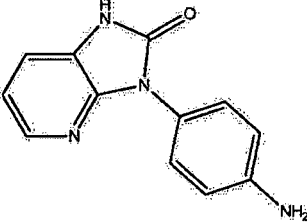
[0120]

225	
227	
233	
235	
236	

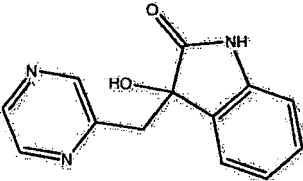
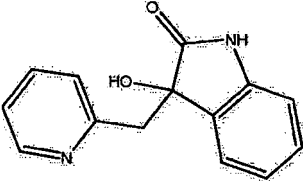
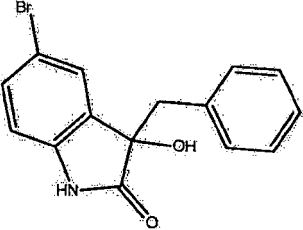
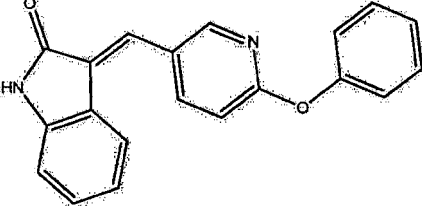
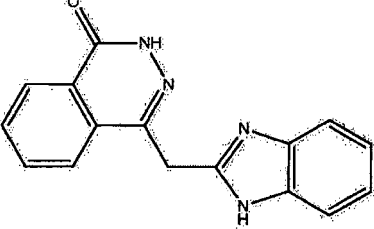
[0121]

241	
242	
244	
249	
269	

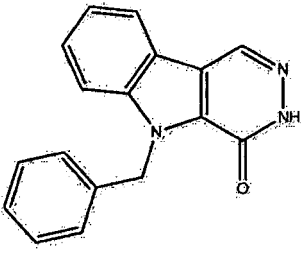
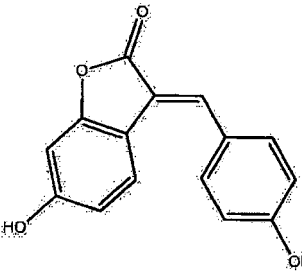
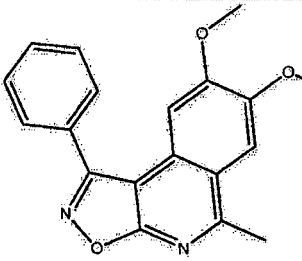
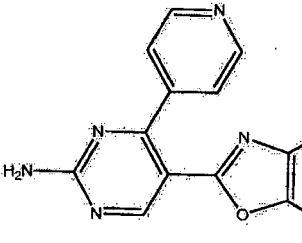
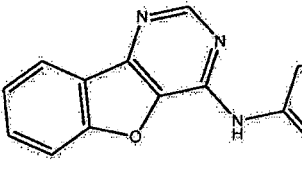
[0122]

285	
288	
303	
307	
308	

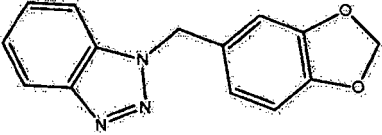
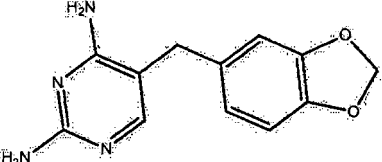
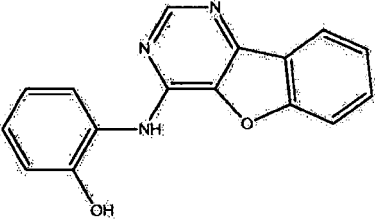
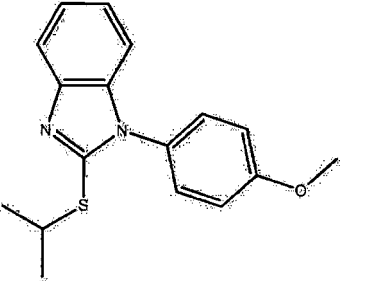
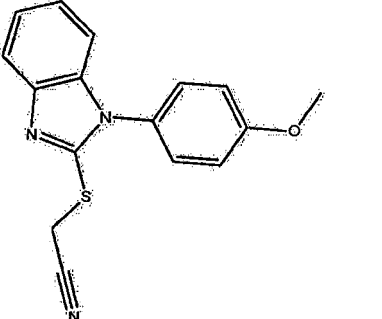
[0123]

309	
310	
311	
312	
314	

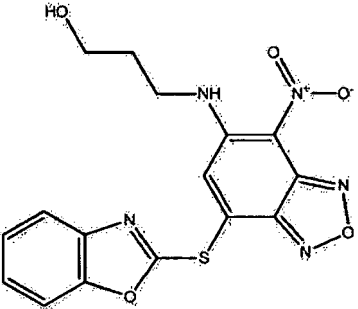
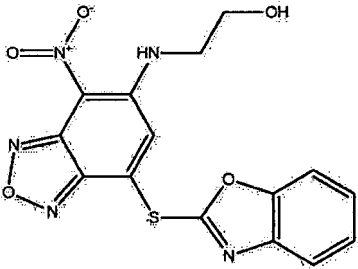
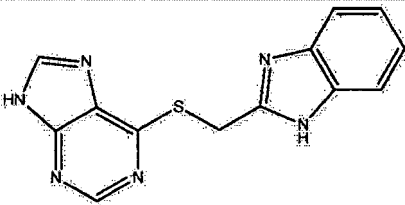
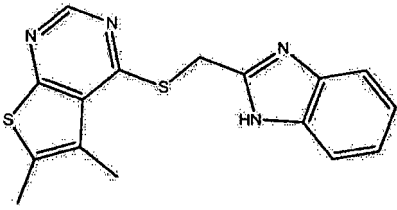
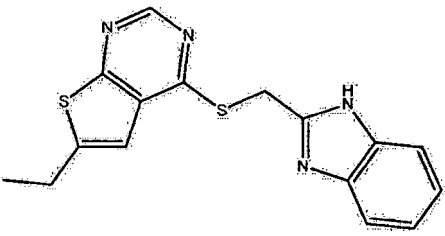
[0124]

315	
316	
320	
324	
325	

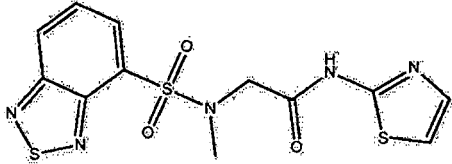
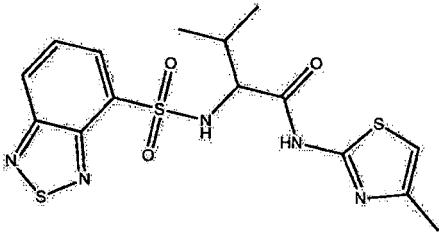
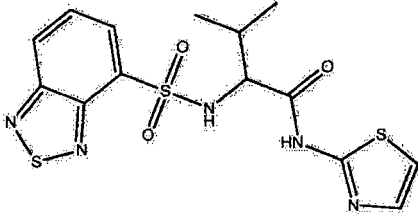
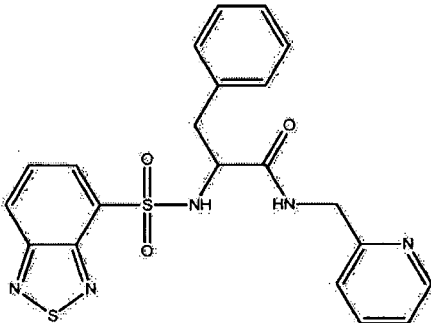
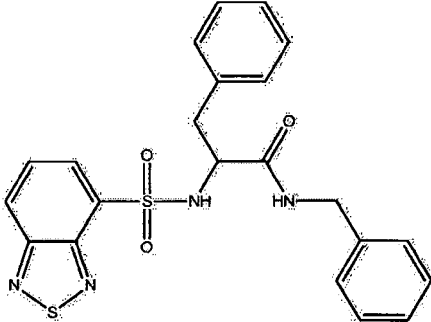
[0125]

333	
336	
351	
357	
358	

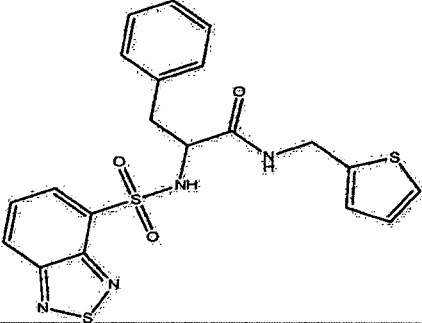
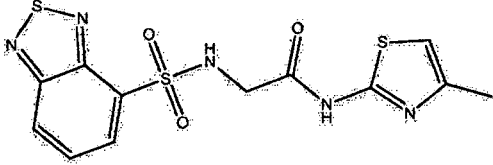
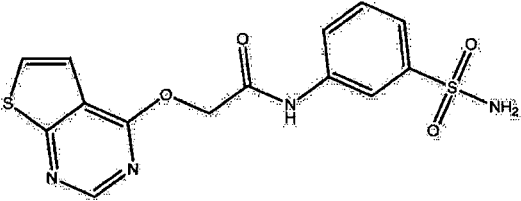
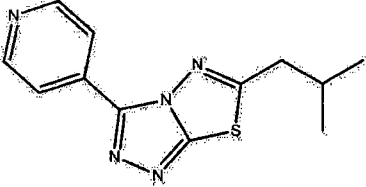
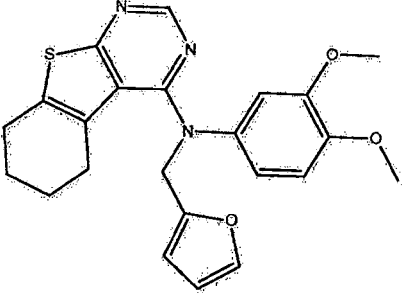
[0126]

359	
360	
373	
374	
375	

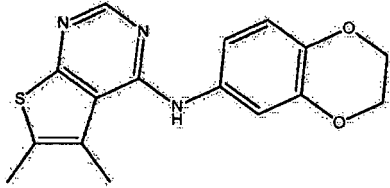
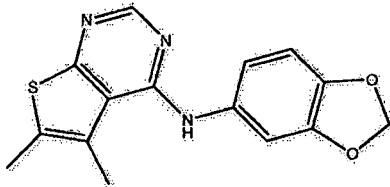
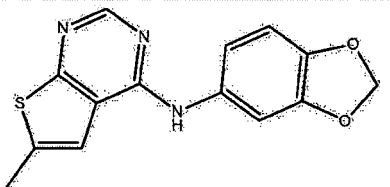
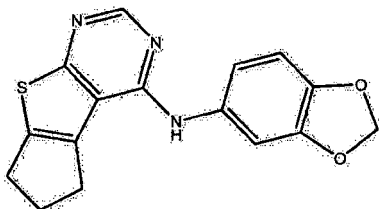
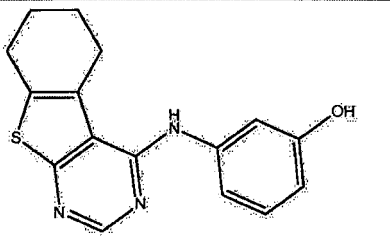
[0127]

384	
385	
386	
387	
388	

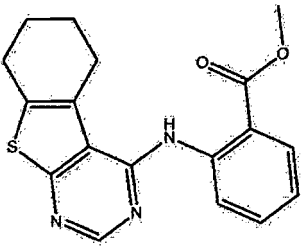
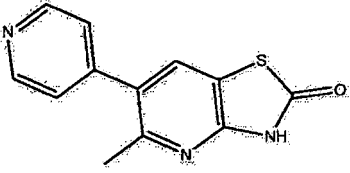
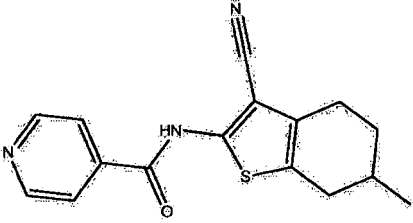
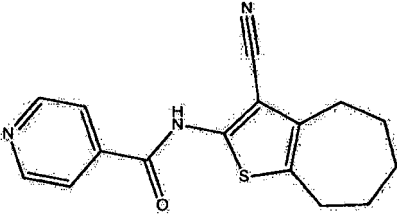
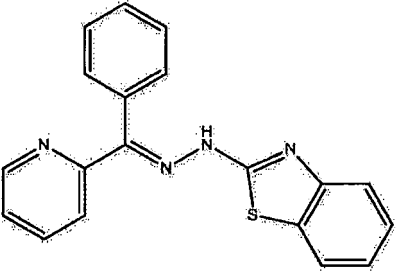
[0128]

389	
390	
391	
396	
399	

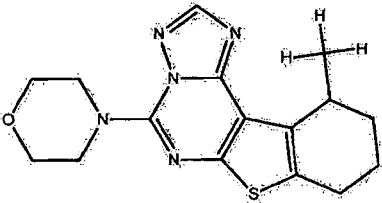
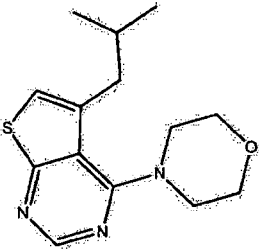
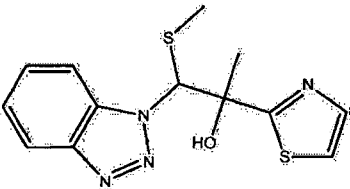
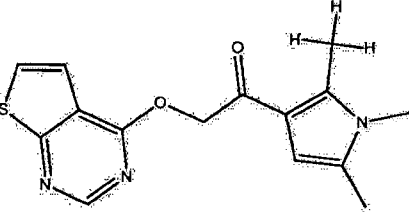
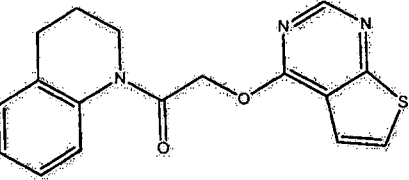
[0129]

400	
401	
402	
404	
405	

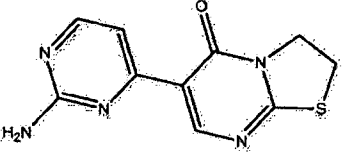
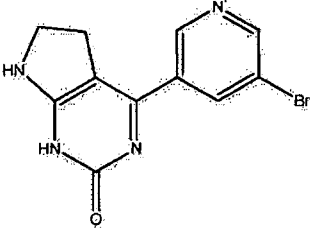
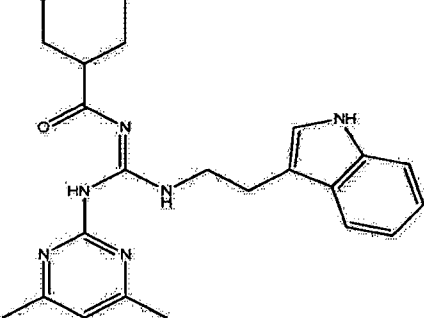
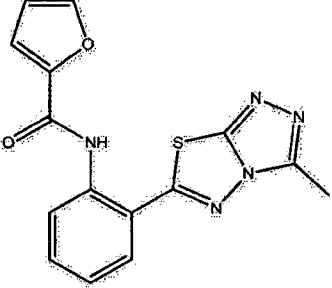
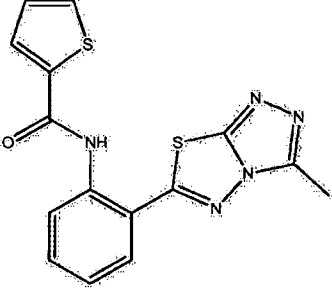
[0130]

407	 <chem>COc1ccccc1NC2=NC3=CC=CC=C3S2C4CCCCC4</chem>
408	 <chem>O=C1NC2=CC=C(C=C2N1)C3=CC=CC=N3</chem>
409	 <chem>CC1=CC=CC=C1S2=CC(=NC2)C(=O)N3C=CC=CC=N3</chem>
410	 <chem>N#CC1=CC2=CC=CC=C2S1C(=O)N3C=CC=CC=N3</chem>
411	 <chem>c1ccc2c(c1)nc3ccccc3s2C(=O)N4C=CC=CC=N4</chem>

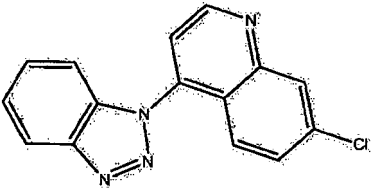
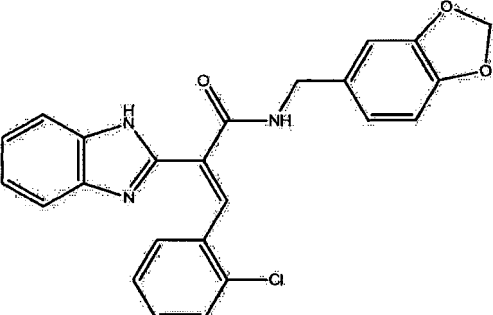
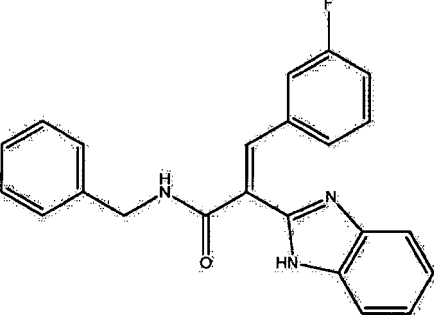
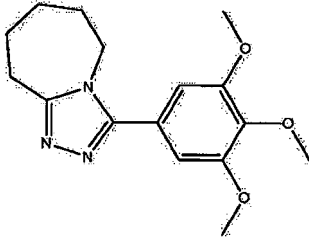
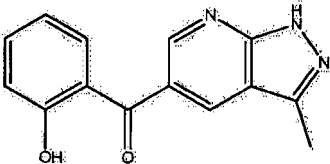
[0131]

414	
424	
425	
427	
428	

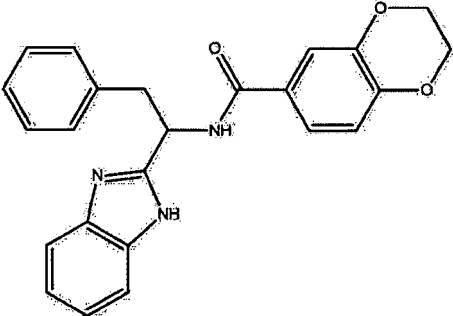
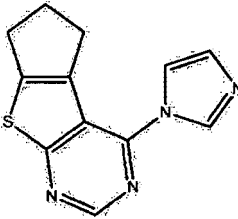
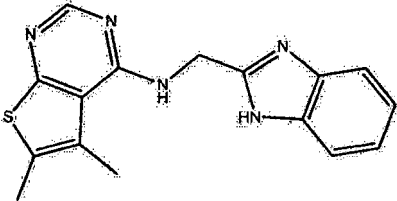
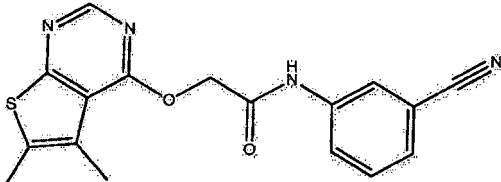
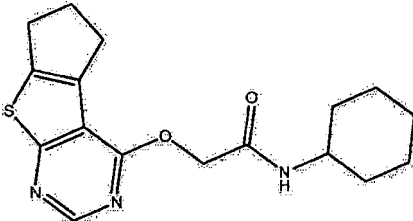
[0132]

437	
448	
456	
457	
458	

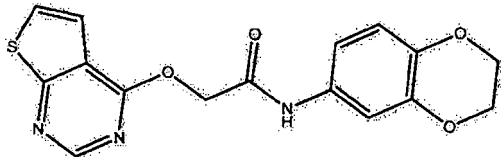
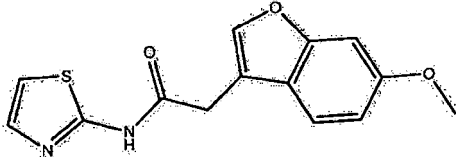
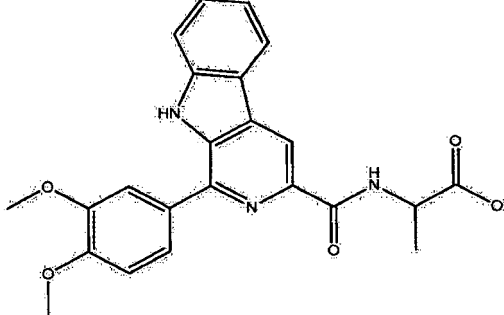
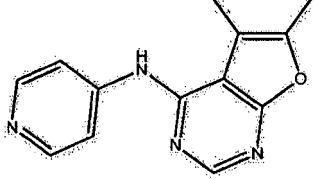
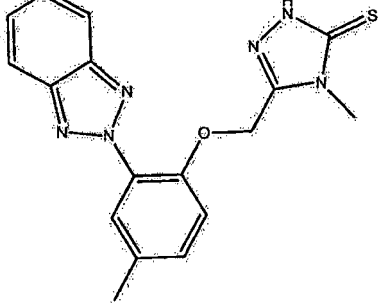
[0133]

482	
484	
485	
489	
490	

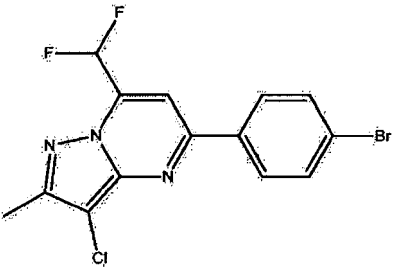
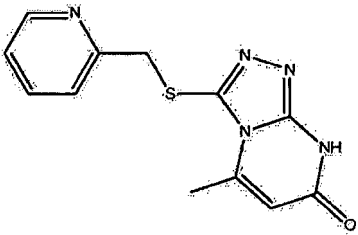
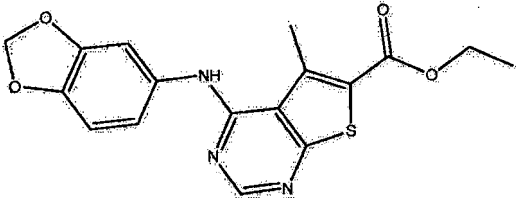
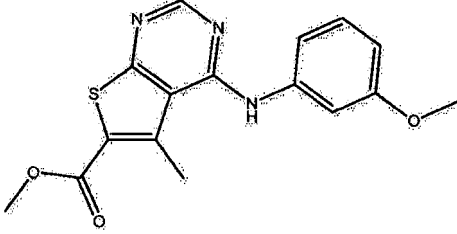
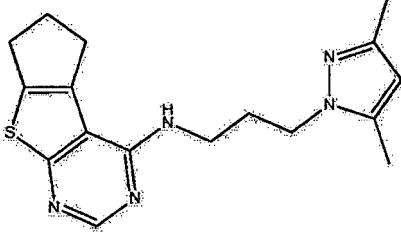
[0134]

491	 <chem>c1ccc(cc1)C2=NC3=CC=CC=C3N=C2NC(=O)c4ccc5c(c4)OCO5</chem>
495	 <chem>Cc1cc[nH]1Nc2nc3c(ncn3C4CCCC4)sc5ccccc25</chem>
496	 <chem>Cc1c2c(ncn2C3CCCC3)sc4c1ncn4CNC5=CN6C=CC=CC=C6N5</chem>
497	 <chem>Cc1c2c(ncn2C3CCCC3)sc4c1ncn4COC(=O)Nc5ccc(C#N)cc5</chem>
498	 <chem>C1CCCC1c2c3c(ncn3C4CCCC4)sc5c2ncn5COC(=O)Nc6ccccc6</chem>

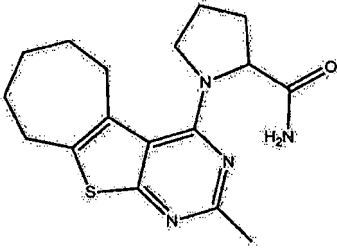
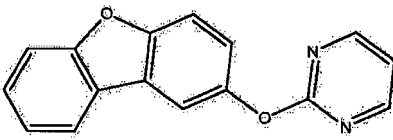
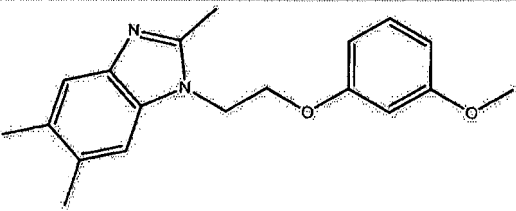
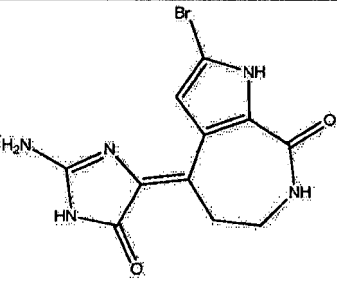
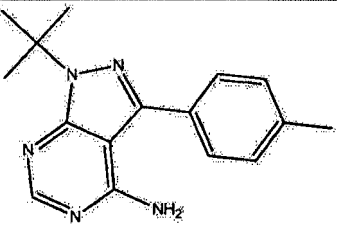
[0135]

505	
507	
516	
519	
524	

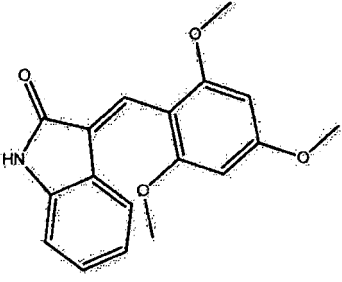
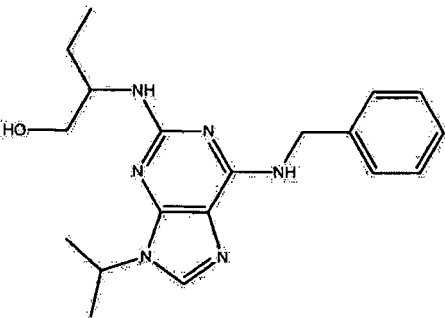
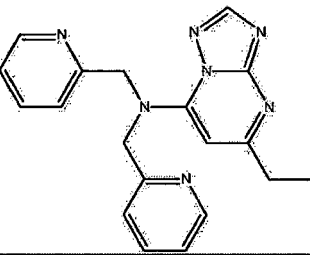
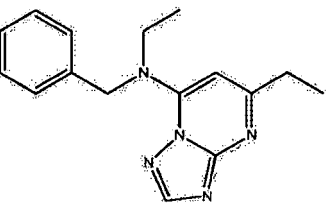
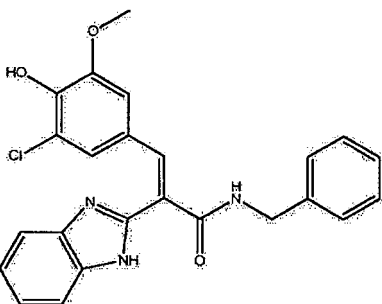
[0136]

526	
553	
559	
560	
568	

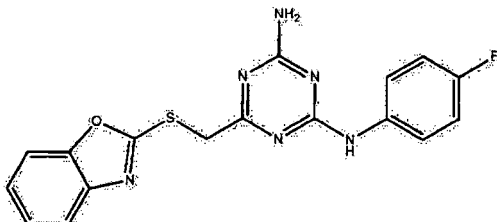
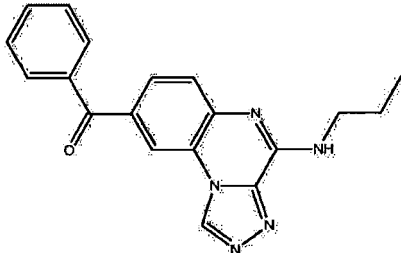
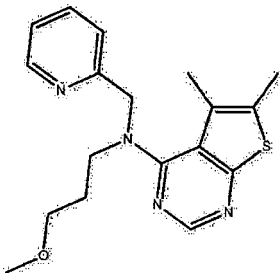
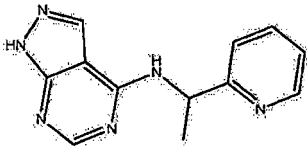
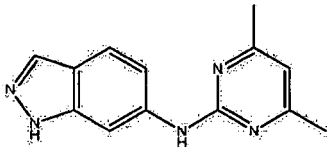
[0137]

570	 <chem>C1=NC2=C(N1)SC3CCCCC3=C2N(CN)C(=O)O</chem>
575	 <chem>c1ccc2c(c1)oc3ccccc3c2Oc4ccncc4</chem>
585	 <chem>COc1ccc(OCCN2C(=N)C3=C(C)C=C(C)C3=N2)cc1</chem>
590	 <chem>NC(=O)N1C(=O)C(=N1)C(=O)C2=CC(=C(C(=C2)N)Br)C3CCCCC3C(=O)N3</chem>
594	 <chem>Cc1ccc(cc1)C2=C3N=CN(C3=NC2=NC4=NC=NC=C4N)N</chem>

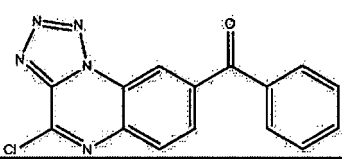
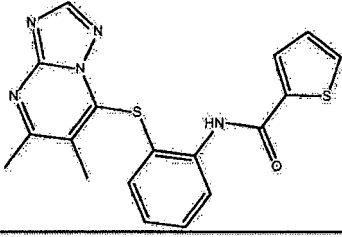
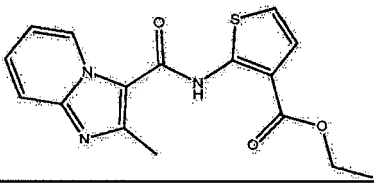
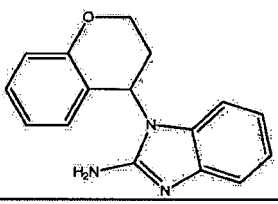
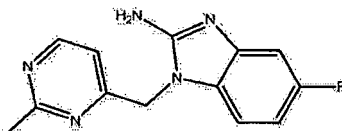
[0138]

596	
597	
601	
602	
609	

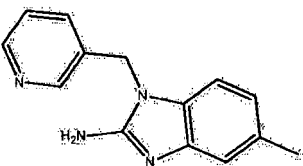
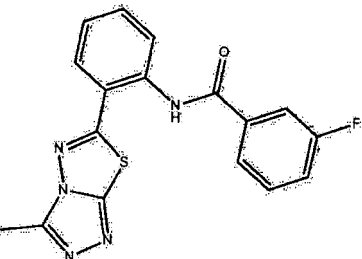
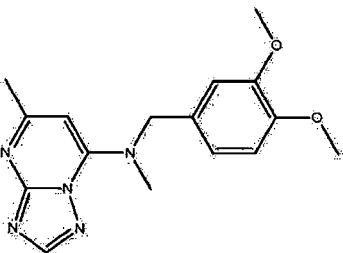
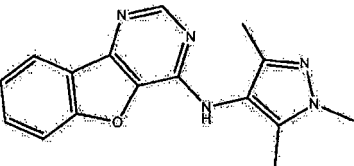
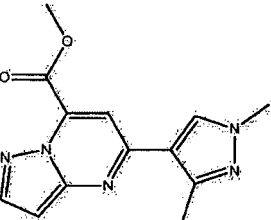
[0139]

615	
616	
618	
626	
627	

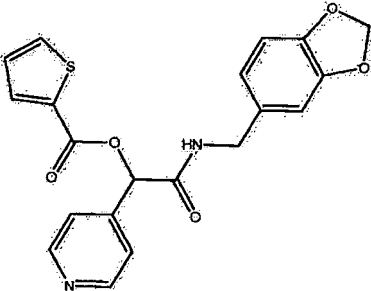
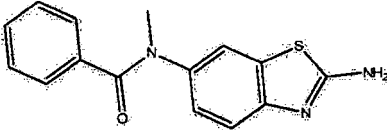
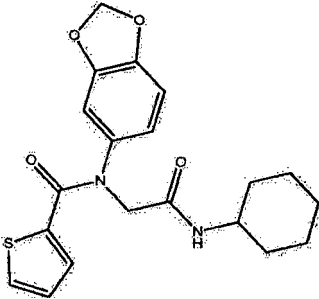
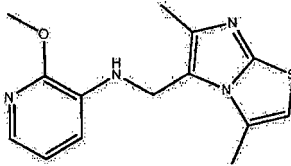
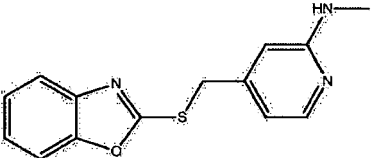
[0140]

638	
649	
653	
669	
692	

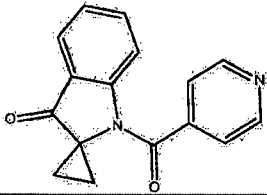
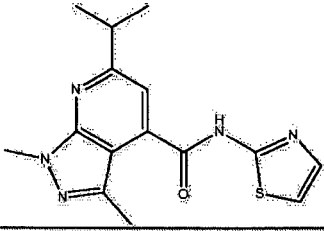
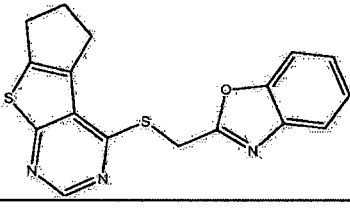
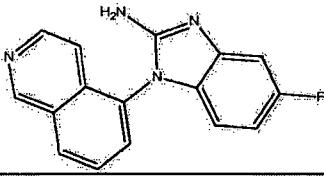
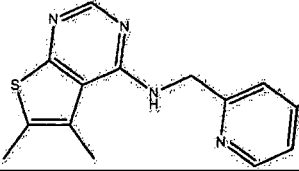
[0141]

693	
694	
703	
705	
709	

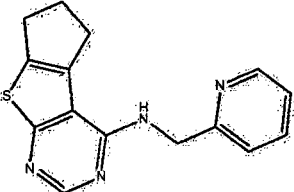
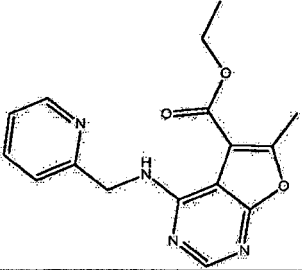
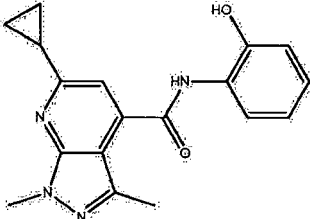
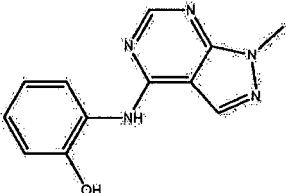
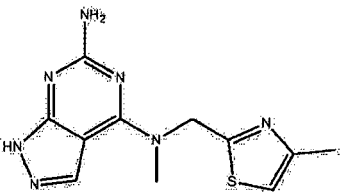
[0142]

712	
716	
719	
725	
734	

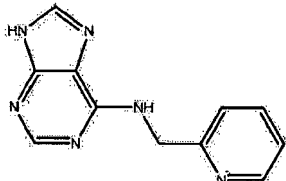
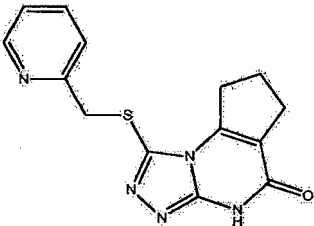
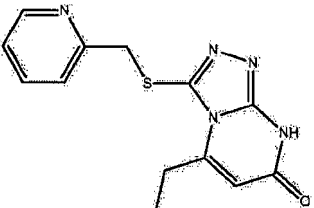
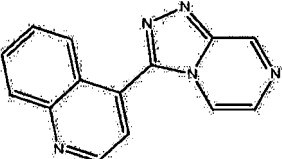
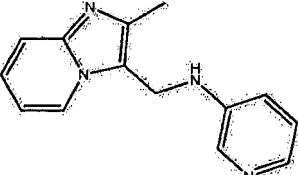
[0143]

738	
740	
746	
749	
753	

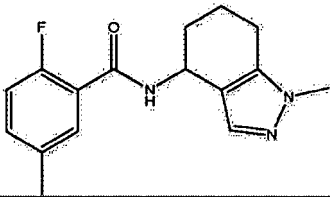
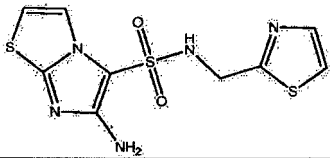
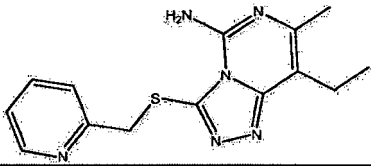
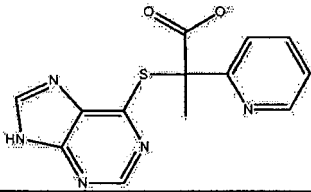
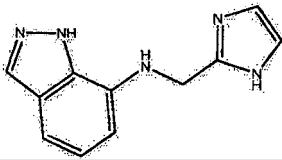
[0144]

754	
756	
758	
759	
767	

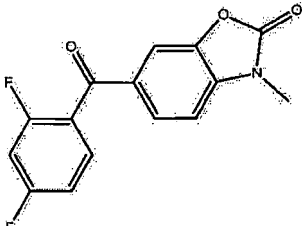
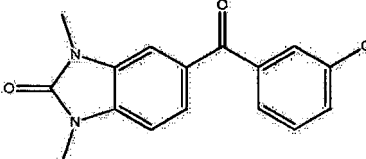
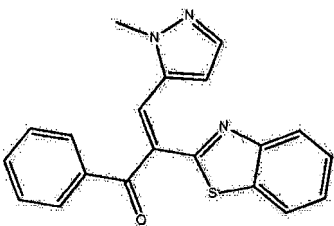
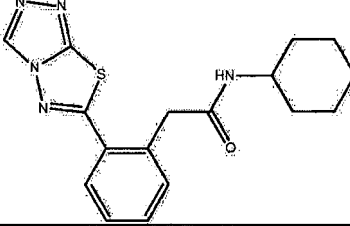
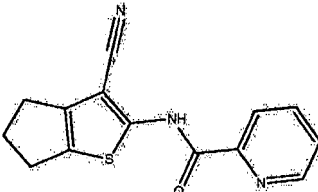
[0145]

770	
777	
778	
784	
785	

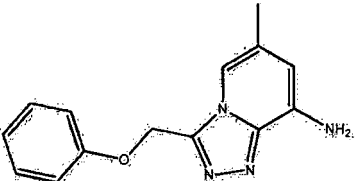
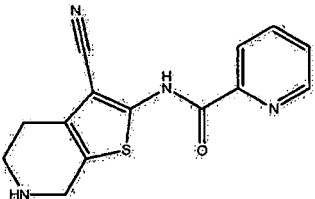
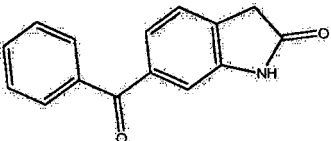
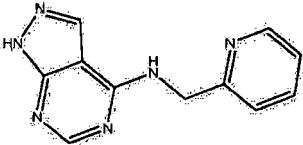
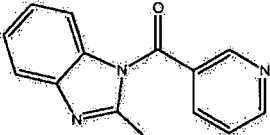
[0146]

790	
792	
796	
800	
801	

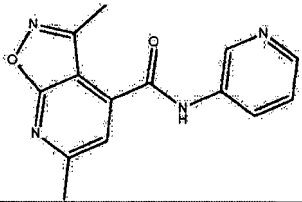
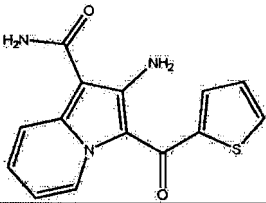
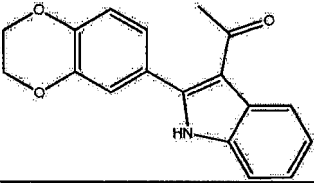
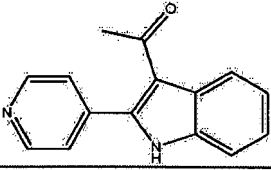
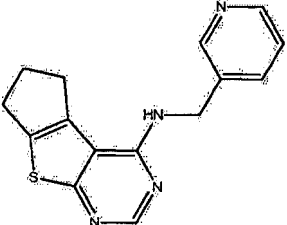
[0147]

804	
805	
808	
819	
821	

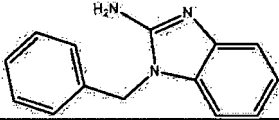
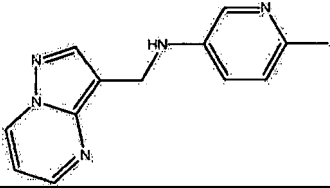
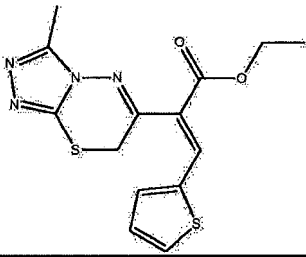
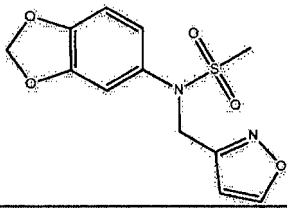
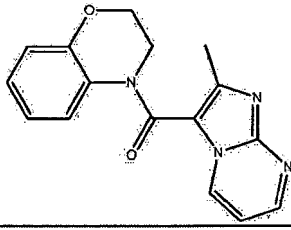
[0148]

827	 <chem>Cc1cc(N)ccc1n2c(COCC3=CC=CC=C3O)ncn2</chem>
828	 <chem>N#Cc1c2c(s1)CNC2C(=O)NC3=CC=CC=N3</chem>
831	 <chem>O=C1C(=O)Nc2ccccc21C(=O)c3ccccc3</chem>
833	 <chem>C1=CC=CC=C1n2c(CNC3=CC=CC=N3)ncn2</chem>
838	 <chem>O=C1C(=O)Nc2ccccc21C(=O)Nc3ccccc3</chem>

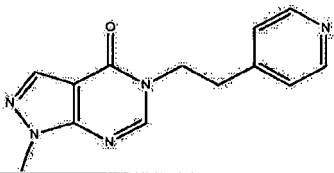
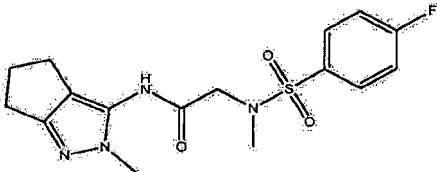
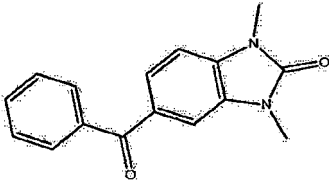
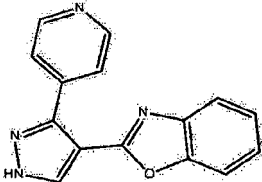
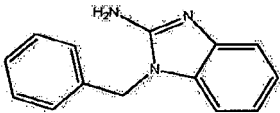
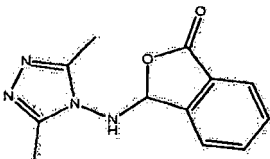
[0149]

844	
847	
857	
858	
869	

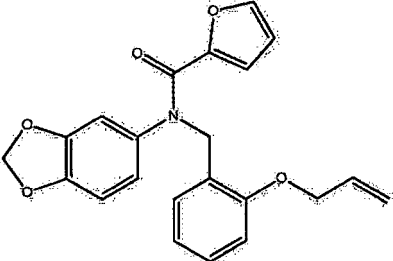
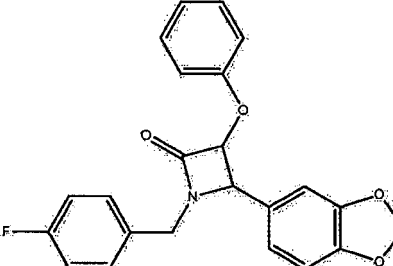
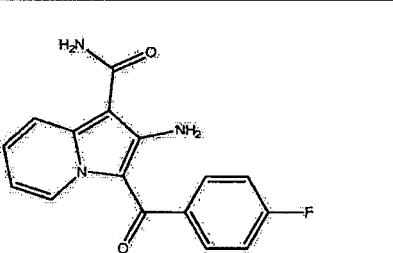
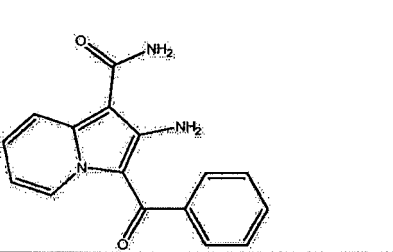
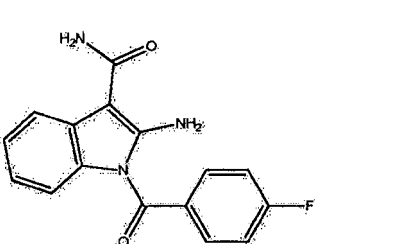
[0150]

872	 <chem>Nc1nc2ccccc2n1Cc3ccccc3</chem>
875	 <chem>Cc1ccc(NCc2nc3ccccc3n2)cc1</chem>
877	 <chem>CCOC(=O)C=Cc1ccsc1C2=CN3C(=N2)SC3</chem>
891	 <chem>COS(=O)(=O)N(Cc1ccoc1)c2ccc3c(c2)OCO3</chem>
910	 <chem>Cc1nc2ccccc2n1Cc3cc4ccccc4o3</chem>

[0151]

912	
926	
933	
952	
955	
962	

[0152]

963	
969	
987	
990	
999	

[0153] 本发明的另一个方面提供了作为酪蛋白激酶 1 δ (CK1 δ) 抑制剂用于治疗神经退行性疾病诸如 Tau 病变的式 (IB) 化合物。

[0154] 式 2-3、26-28、30-33、35、47-48、51、57-60、63-64、78、84、113、123、127-129、145、155-157、171-173、204、206-207、210、225、227、233、235-236、241-242、244、249、269、285、288、303、307-312、314-316、320、324-325、333、336、351、357-360、374-375、384-391、396、399-402、404-405、407-411、414、424-425、427-428、437、448、456-457、482、484-485、489-491、495、497-498、505、507、516、519、524、526、553、559-560、568、570、575、609、615-616、618、626-627、638、653、669、692-694、705、709、712、716、719、725、734、738、740、746、749、753-754、756、758-759、767、770、777、784-785、790、792、796、800-801、804-805、808、819、821、827-828、831、833、838、844、847、857-858、869、872、875、933、952、955、969、

987、990 或 999 的化合物要么是可购买的,要么可按照已知的合成方法制备。

[0155] 本方面的另一方面提供了用于治疗神经退行性疾病诸如 Tau 病变的包含式 (IB) 化合物的药物组合物。

[0156] 除了上述物质之一外,本发明的药物组合物还可包含可药用赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或其它本领域技术人员已知的物质。所述的物质应该是无毒的,并且不应该干扰活性成分的效能。载体或其它物质的确切性质取决于给药途径,例如口服、静脉注射、皮肤或皮下、鼻内、肌内、腹膜内途径。

[0157] 用于口服给药的药物组合物可以是片剂、胶囊、粉剂或液体形式。片剂可包括固体载体诸如明胶或辅助剂。

[0158] 液体药物组合物通常包括液体载体诸如水、石蜡油、动物或植物油、矿物油或合成油。

[0159] 生理盐水溶液、葡萄糖或其它糖类溶液或二醇类诸如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇也可包括在内。

[0160] 对于静脉、皮肤或皮下注射或在患病部位注射,活性成分可以是胃肠外可接受的水溶液形式,该溶液是无热原的并且具有适当的 pH、等渗性和稳定性。本领域的有关技术人员能够利用例如等渗溶媒诸如氯化钠注射液、林格注射液、乳酸钠林格注射液制备适当的溶液。在需要时还包括防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和 / 或其它添加剂。

[0161] 确信式 (IB) 化合物是酪蛋白激酶 1 δ (CK1 δ) 抑制剂。某些式 (IB) 化合物的抑制活性大于 5%,特别是大于 10%、更特别是大于 25%、更特别是大于 50%,尤其是大于 75%,诸如大于 90%。该化合物可用于治疗神经退行性疾病诸如 Tau 病变。Tau 病变是特在于神经原纤维缠结或 tau 蛋白聚集的状况。Tau 病变是本领域技术人员已知一类病症,包括阿尔茨海默氏病、17 号染色体相关的额颞痴呆兼帕金森综合征 (FTDP-17)、进行性核上性麻痹 (PSP)、匹克氏病、皮质基底节变性、多系统萎缩 (MSA)、伴有铁聚集的神经基底节变性、I 型 (Hallervorden-Spatz)、嗜银颗粒性痴呆、唐氏综合症、伴有钙化的弥散性神经原纤维缠结、拳击员痴呆症、Gerstmann-Straussler-Scheinker 病、强直性肌营养不良症、Niemann-Pick 病 C 型、渐进型皮层下神经胶质增生、朊蛋白脑淀粉样血管病、仅缠结性老年痴呆、脑炎后帕金森综合征、亚急性硬化性全脑炎、克雅氏病、肌萎缩性侧索硬化症 / 帕金森痴呆复合征、伴有神经原纤维缠结 / 痴呆的非 -Guamanian 运动神经元疾病以及帕金森氏病。细胞内的 tau 沉积通常是神经元或神经胶质性的,并且是细丝状的,与对照人脑中的 tau 的磷酸化水平相比,通常是过度磷酸化的状态。在 AD 的情况下,该过度磷酸化的 tau 通常被称作配对螺旋丝 tau (PHF) tau,因为其衍生自 PHF。在一种实施方案中,tau 病变包括阿尔茨海默氏病。

[0162] 本发明的另一个方面提供了治疗神经退行性疾病诸如 Tau 病变的方法,该方法包括施用治疗有效量的式 (IB) 化合物。

[0163] 生物学数据

[0164] 1. CK1 δ 抑制试验

[0165] 可将本发明化合物根据 US 2010/0152157、EP 1,636,375 或 Hanger 等人 (2007) J. Biol. Chem. 282, 23645-23654 所述的试验方案测试对酪蛋白激酶 1 δ (CK1 δ) 的抑制。具体的讲,该试验按照以下方案进行:

[0166] 反应缓冲液：

[0167] 基础反应缓冲液；20mM Hepes(pH 7.5), 10mM $MgCl_2$, 1mM EGTA, 0.02 % Brij35, 0.02mg/ml BSA, 0.1mM Na_3VO_4 , 2mM DTT, 1% DMSO。应注意,将所需的辅助因子单独加入到每个激酶反应液中。

[0168] 反应方法：

[0169] 1. 在新制备的上述基础反应缓冲液中制备所示的底物

[0170] 2. 将任何所需的辅助因子加入到底物溶液中

[0171] 3. 将所示的激酶加入到底物溶液中并轻轻混合

[0172] 4. 将化合物的 DMSO 溶液加入到激酶反应混合物中

[0173] 5. 将 ^{33}P -ATP(最终的比活性 0.01 $\mu Ci/\mu l$) 加入到反应混合物中以引发反应

[0174] 6. 将激酶反应液在室温下保温 120min

[0175] 7. 将反应液点到 P81 离子交换纸 (Whatman#3698-915) 上

[0176] 8. 用 0.75%磷酸充分洗涤过滤器

[0177] 激酶信息：

[0178] CK1 δ - Genbank 登录号 NP_620693

[0179] 重组人全长构建体。GST- 标记,在昆虫细胞中表达。

[0180] 试验中的终浓度 = 4nM

[0181] 底物:CK1tide

[0182] 底物序列:[KRRRAL[pS]VASLPGL]

[0183] 试验中最终的底物浓度 = 20 μM

[0184] 应注意,不向反应混合物中添加额外的辅助因子。

[0185] 化合物 30、288、314、324-325、336、374、391、405、615-616、626、705、740、753-754、756、759、770、784、808、819、833、844、847、869、872、875、933、952、955、969、987、990 和 999 在 CK1 δ 抑制试验中进行了测试并且表现出大于 5%的抑制活性。

[0186] 尤其是化合物 324-325、405、754、847、952、987、990 和 999 表现出大于 50%的抑制活性。

[0187] 化合物 324、952、987、990 和 999 表现出大于 90%的抑制活性。

[0188] 2.测定化合物对 Ck1 δ -介导的 Tau磷酸化的影响

[0189] Tau 蛋白的体内磷酸化非常复杂,涉及多种推定的蛋白激酶。普遍认为,激酶 GSK3b 和 CDK5 在 PHF Tau(在阿尔茨海默氏病的神经原纤维缠结中发现的致病形式)的生成中起重要作用。最近,已经有越来越多的证据支持其它激酶尤其是 CK1 δ 在体内 Tau 过度磷酸化中的作用。Hanger 等人 2007(J. Biol. Chem. 282, 23645-23654) 在人的 PHF Tau 中确定了 37 个磷酸化位点,并且能够利用重组的 tau 和各种纯化的激酶制剂在体外重述这些。这些研究证实,某些位点只被 CK1 δ 磷酸化,并且某些其它位点需要 CK1 δ 和其它激酶,其中 CK1 δ 提供上游磷酸化以使目标位点可被第二种激酶利用。因此,为了评价候选化合物是否能够直接地或通过阻断其启动其它激酶来选择性地抑制 CK1 δ 活性,已经进行了多种不同的筛选。在 W02005/001114 中提供了这些筛选的一般概念。

[0190] 为了测定推定 CK1 δ 抑制剂对 CK1 δ -介导的磷酸化水平的影响,进行选择的反应监测试验,该试验提供在 Tau 的转基因人和内源性鼠形式的特定定位点上磷酸根占据的定量

相关测定。

[0191] PhosphoTau SRM V2 试验在 5 个最常用的 Tau 研究位点上测定总的 tau 和相对磷酸化水平,并且从 Proteome Sciences plc(Cobham, England) 得到。在 V2 试验中没有一位点是仅能被 CK1 δ 磷酸化的,并且一种可能性是,通过该方法测定的化合物诱导的对磷酸化的抑制可能是通过其它激酶诸如 GSK3b 和 / 或 CDK5 的混杂抑制来实现的。为了解决该限制, Proteome Sciences 开发了 V3 试验,该试验除了测定四个其它已被证实在体外被至少一个除了 CK1 δ 之外的其它 Tau 激酶磷酸化的位点之外,还测定总的 tau 和两个仅能被 CK1 δ 磷酸化的位点。表 1 列出了各个被覆盖的位点以及在 Hanger 等人 (2007) 中所报道的候选的 Tau 激酶。

[0192] 表 1: Tau 磷酸化 SRM V2 和 V3 试验覆盖的 Tau 磷酸化位点

[0193]

位点编号	候选激酶
V2 试验	
Ser181	GSK3b
Ser199	CK2, GSK3b, PKA
Thr231	GSK3b, PKA
Ser262	CK1δ, GSK3b, PKA

[0194]

Ser396	CK1δ, CK2, GSK3b
V3 试验	
Ser46	CK1δ, GSK3b
Thr50	CK1δ, GSK3b
Ser113*	CK1δ
Ser396	CK1δ, CK2, GSK3b
Ser404	CK1δ, CK2, GSK3b
Ser433*	CK1δ

[0195] 基于人 2N4R tau 的编号。

[0196] *-CK1d 的专属位点

[0197] SH-SY5Y-TMHT 细胞系

[0198] SH-SY5Y-TMHT 细胞系 (JSW Life Sciences, Graz, Austria) 代表 tau 病变的体外模型。细胞系通过用含有全长人 2N4R Tau 亚型 (其带有两个常见病相关性突变 (V337M/R406W)) 的载体稳定转染人神经母细胞瘤衍生的 SH-SY5Y 细胞系来产生。在最近的研究

(Flunkert 等人 2011 提交, Loeffler 等人 2011 提交) 中, SH-SY5Y-TMHT 细胞系和带有相同的人类转基因的转基因小鼠细胞系均显示出表达高水平的人 Tau, 其在多个抗原表位被过度磷酸化, 而这些抗原表位之前已被证实在包括阿尔茨海默氏病在内的各种人类 Tau 病变中被磷酸化。此外, 在接触不同激酶抑制剂、包括 JNK- 抑制剂 SP600125 和 CK1 抑制剂 IC261 的 SH-SY5Y-TMHT 细胞中, Tau 在关键致病位点的磷酸化水平以与靶向激酶的已知的位点特异性相一致的方式减少。因此, SH-SY5Y-TMHT 细胞系非常适于新的 Tau 激酶抑制剂的筛选。

[0199] 在 SH-SY5Y-TMHT 细胞中筛选化合物

[0200] 将 SH-SY5Y-TMHT 细胞在培养基 (DMEM 培养基, 10% FCS, 1% NEAA, 1% L- 谷氨酰胺, 100 μ g/ml 庆大霉素, 300 μ g/ml 遗传霉素 G-418) 中培养 2 天直至 80-90% 融合。然后将细胞在补充有 10 μ M 维甲酸 (RA) 的培养基中分化 7 天, 每 2 至 3 天更换培养基。将分化的细胞分别以每孔 1.25×10^6 和 8×10^5 个细胞的密度接种到 6 孔板和 96 孔板上。在分化后的第 8 天, 将待测化合物、参照化合物和溶媒对照物加入到培养基中。与化合物接触 6 小时后, 将一个板的细胞进行 MTT 试验以评价待测化合物和参照化合物对细胞存活率的影响。将剩余的孔用冷的 PBS 洗涤一次并在 300 μ l RIPA- 缓冲液 [50mM Tris pH 7.4, 1% Nonident P40, 0.25% 脱氧胆酸钠, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1 μ M NaF, 1 μ M 原硫酸钠, 80mM 磷酸甘油, 补充有新鲜加入的蛋白酶 (Calbiochem) 和磷酸酶 (Sigma) 抑制剂合剂] 中收获。将细胞悬浮液转移到 1.5ml 试管中并在冰上超声溶解。取出 20 μ l 等分试样以确定蛋白浓度 (BCA 试验)。随后将溶解液快速冷冻并储存在 -80°C 下直至使用。

[0201] 如表 2 所示以一式三 (四) 份进行两个独立的实验。

[0202] 表 2

[0203]

实验	细胞	处理	浓度	评价	
ExpA	SH-SY5Y-TMHT	溶媒	-	MTT	BSA TauP V2 TauP V3
		化合物 324	10-5-1-0.5-0.1-0.05 μM		
		化合物 987	10-5-1-0.5-0.1-0.05 μM		
		PF670462	1-0.5-0.1 μM		
ExpB	SH-SY5Y-TMHT	溶媒	-	MTT	BSA TauP V2 TauP V3
		化合物 324	10-5-1-0.5-0.1-0.05 μM		
		化合物 987	10-5-1-0.5-0.1-0.05 μM		
		PF670462	1-0.5-0.1 μM		

[0204] 细胞存活率测试

[0205] 为了测定化合物的活性, 需要控制所有分子的潜在的细胞毒性。培养物的存活率通过 MTT 试验确定。该试验能够测定可将黄色的 MTT 还原成深蓝色甲 酞结晶的线粒体脱氢酶活性。由于该反应仅在活细胞内催化, 所以该试验可用于确定细胞存活率。将 MTT 溶液以终浓度 0.5mg/ml 加入到每个孔中。2 小时后吸出包含 MTT 的培养基。将细胞溶解于 3% SDS 并将甲 酞结晶溶于异丙醇 /HCl。用板式读数器在波长 570nm 处测定光密度。将细胞存活率用光密度 (OD) 表达。以对照值的百分比的形式计算该数值。

[0206] 总蛋白含量的定量测定

[0207] 在评价具体的 Tau 磷酸化状态之前, 将各细胞溶解液中的总蛋白浓度利用标准的 BCA 试验 (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) 测定。简单地讲, 在试验中根据制造商的说明使用 20 μl 细胞溶解液。

[0208] 总 Tau 和磷酸化的 Tau 的定量测定

[0209] 质谱试验

[0210] 将来自分别用化合物 324、化合物 987、PF670462 和相关的溶媒对照物处理的 TMHT 细胞系的全细胞溶解液首先进行一维的 SDS-PAGE 以纯化蛋白质级分。基于 BCA 试验结果, 在堆积凝胶上负载约 100 μg 总蛋白。跑胶直至总蛋白含量在堆积凝胶中形成单一离散带。然后将各蛋白带从凝胶中切下并用胰蛋白酶或 Asp-N 消化, 然后分别用 PhosphoTau SRM 试验 V2 或 V3 分析。所有试验方法均利用三重四级杆质谱仪 (TSQ Vantage, Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK) 定量临床前材料中的磷酸化。在 SRM 分析之前, 将磷酸

肽和临床前样品通过 RP- 色谱 (XBridge 柱, Waters, Manchester, UK) 拆分, 9 分钟内的梯度为 0-30% ACN (缓冲液 A ; 0.1% FA, 缓冲液 B ; ACN, 0.1% FA)。通过多次 SRM 转换, 利用优化的 S 镜头值和碰撞能量设置监测每种肽和磷酸肽的轻质和重质形式。采用 SRM LC 峰下的面积定量各细胞溶解液中存在的分析物的量, 结果表示为参照重肽添加物信号的单一点。还绘制了轻质磷酸肽的 11 点校正曲线以确定试验特性 (LOD, LOQ, 精度和准确度), 在曲线中的每一个点添加 100fmol 重质磷酸肽。对于各个特定的 tau 群体, 将各 tau 磷酸肽的内源性水平用其校准曲线 (在柱上 0.25-1000fmol) 进行定量。在进行 LC-SRM 分析之前, 向各个 tau 群体中添加 100fmol 重质磷酸肽标准物。将所有数据用 Pinpoint 软件 (Thermo Scientific) 处理并将结果以 pg 磷酸肽 / μ g 总蛋白的形式报告。

[0211] 蛋白质印记法

[0212] 在 Laemmli 缓冲液中制备处理过的细胞的溶解液并将 10 μ g 上样到 10% Nu-PAGE 凝胶 (Invitrogen, UK) 的每个泳道内。展开样品, 直至考马斯亮蓝染料前沿在凝胶底部的 1cm 内。将分离的蛋白质转移到硝基纤维素上并分别用总 tau 特异性抗体 (多克隆兔抗人 tau, Dako, UK (cat#A0024)) 和磷酸化 - 苏氨酸 231 特异性抗体 (Tau (Phospho-Thr231) 抗体, Signalway Antibody, USA (cat#11110)) 展开印记。在所有情况下, 将结合的抗体用 ECL Rabbit IgG, HRP-Linked (来自驴) (GE Healthcare, UK (cat#NA934)) 进行检测。

[0213] 结果

[0214] 待测和参比化合物对 SH-SY5Y-TMHT 细胞的细胞存活率的影响

[0215] 通过 MTT 试验在分化的 SH-SY5Y-TMHT 细胞中测定细胞存活率。待测和参比化合物的使用浓度分别为 0.05 μ M 至 10 μ M 和 0.1 μ M 至 1 μ M。处理 6 小时后评价细胞存活率。图 1 显示了化合物 324 对 SH-SY5Y-TMHT 细胞的细胞存活率的影响, 其中该图以溶媒对照 (VC, 白色条棒) 的 % 的形式表示化合物 324 对 SH-SY5Y-TMHT 细胞的细胞存活率的影响。统计学意义用 * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 表示并且通过 One-Way ANOVA 测定。将来自两个独立实验的数据表示为组平均 $\pm$ SEM ($n = 8$)。从图 1 可以看出, 化合物 324 以剂量依赖的方式对 SH-SY5Y-TMHT 细胞的细胞存活率表现出保护作用, 尽管该作用仅在 10 μ M 的浓度下具有统计学意义。图 2 显示了化合物 987 对 SH-SY5Y-TMHT 细胞的细胞存活率的影响, 其中该图以溶媒对照 (VC, 白色条棒) 的 % 的形式表示化合物 987 对 SH-SY5Y-TMHT 细胞的细胞存活率的影响。统计学意义用 * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 表示并且通过 One-Way ANOVA 测定。将来自两个独立实验的数据表示为组平均 $\pm$ SEM ($n = 8$)。从图 2 可以看出, 化合物 987 在较低和较高的浓度范围内降低了细胞存活率。在 1 和 0.5 μ M 浓度下未观察到细胞毒性作用。图 3 显示了 PF670462 对 SH-SY5Y-TMHT 细胞的细胞存活率的影响, 其中该图以溶媒对照 (VC, 白色条棒) 的 % 的形式表示 PF670462 对 SH-SY5Y-TMHT 细胞的细胞存活率的影响。统计学意义用 * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 表示并通过 One-Way ANOVA 测定。将来自两个独立实验的数据表示为组平均 $\pm$ SEM ($n = 8$)。从图 3 可以看出, 参比化合物 PF 670462 仅在浓度 0.5 μ M 下对 SH-SY5Y-TMHT 细胞的细胞存活率显示出显著的保护作用。

[0216] 处理后的 SH-SY5Y-TMHT 细胞的蛋白测定

[0217] 利用标准 BCA 试验测定处理的 SH-SY5Y-TMHT 细胞的细胞溶解液的蛋白质浓度。一式两份地测定所有样品的蛋白质量。样品的蛋白浓度在预期的范围内 (根据每个 12-孔板的细胞接种量, 预期的蛋白浓度范围为 150 - 350 μ g/ml)。

[0218] 测定化合物处理对特定磷酸化位点的影响

[0219] 质谱试验

[0220] SH-SY5Y-TMHT 细胞溶解液的测定利用 PhosphoTau SRM 试验 V2 和 V3 进行。当将各位点上磷酸化的相对水平与溶媒处理的对照的比值相比较时,用化合物 324 (给出了 $10\ \mu\text{M}$ 时的数据) 和化合物 987 (给出了 $10\ \mu\text{M}$ 时的数据) 处理的细胞中磷酸肽的水平明显减少。显示在丝氨酸 396 上的磷酸化减少的例子如图 4 所示。该图显示了 CK1d- 选择性化合物对 SH-SY5Y-TMHT 细胞中的丝氨酸 396 磷酸化的质谱测定。A 组表示用溶媒对照 (VC) 或化合物 324 (T. I. 1_ $10\ \mu\text{M}$) 处理的细胞, B 组表示用溶媒对照 (VC) 或化合物 987 (T. I. 2_ $10\ \mu\text{M}$) 处理的细胞。

[0221] 在与溶媒对照接触的细胞中,约 83% 的 Tau 在 S396 磷酸化。用 $10\ \mu\text{M}$ 化合物 324 处理可将其降至 38%, 而用 $10\ \mu\text{M}$ 化合物 987 处理可将 pS396 水平降低至 24%。这些结果证实了 CK1d 选择性试剂对 pS396 的抑制作用。

[0222] 蛋白质印记试验

[0223] 通过蛋白质印记法定量用溶媒对照、化合物 394 ($10\ \mu\text{M}$)、化合物 987 ($10\ \mu\text{M}$) 和 PF670462 ($5\ \mu\text{M}$) 处理的 SH-SY5Y-TMHT 细胞溶解液中在苏氨酸 231 上的总 Tau 和磷酸化 Tau 的量。图 5 显示了在用选择性 CK1d 抑制剂处理的 SH-SY5Y-TMHT 细胞中 pT231 (A 组) 和总 Tau (B 组) 水平的蛋白质印记测定结果。如图 5 所示,所有三种化合物均减少了 Tau 蛋白中 pT231 的可检测水平, 而该抗原表位强烈地存在于溶媒处理的细胞中。除了用 PF670462- 处理的溶解液 (其似乎含有比其它物质处理的溶解液略少的总 Tau) 之外,在制剂之间的可检测的总 Tau 水平没有明显差别。这些结果证实了 CK1d 选择性试剂对 pT231 的抑制作用。

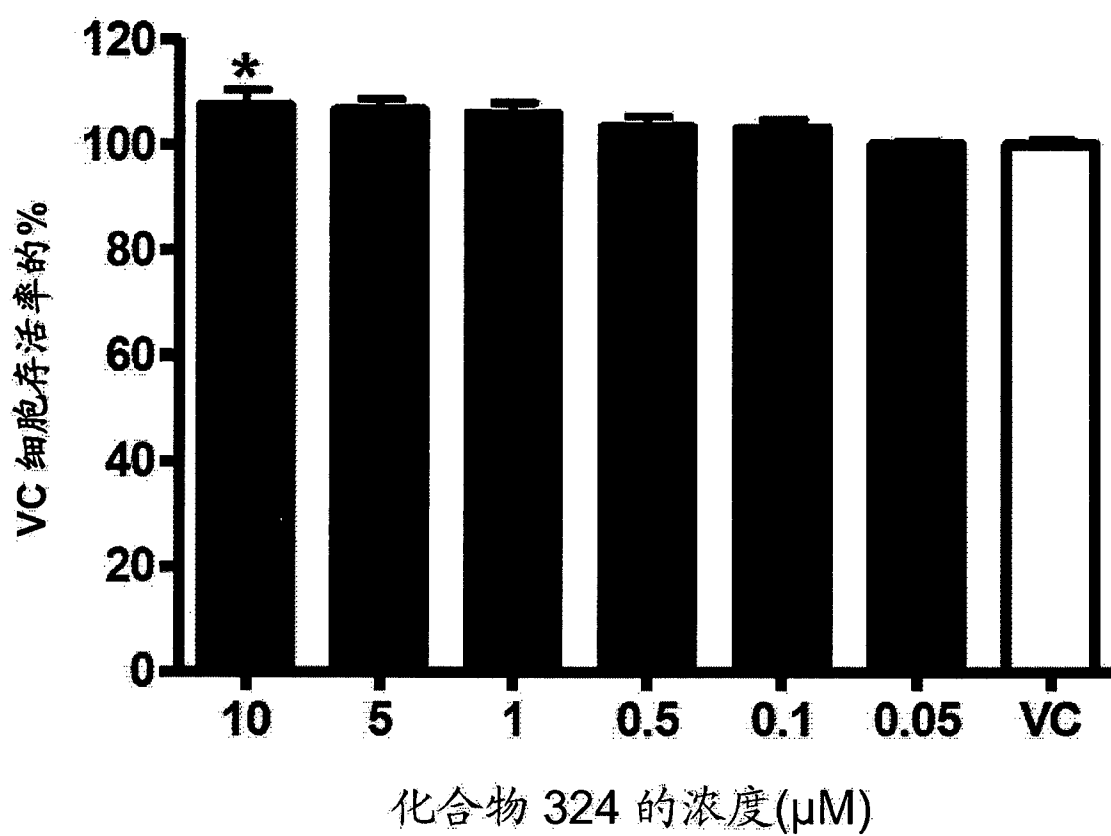


图 1

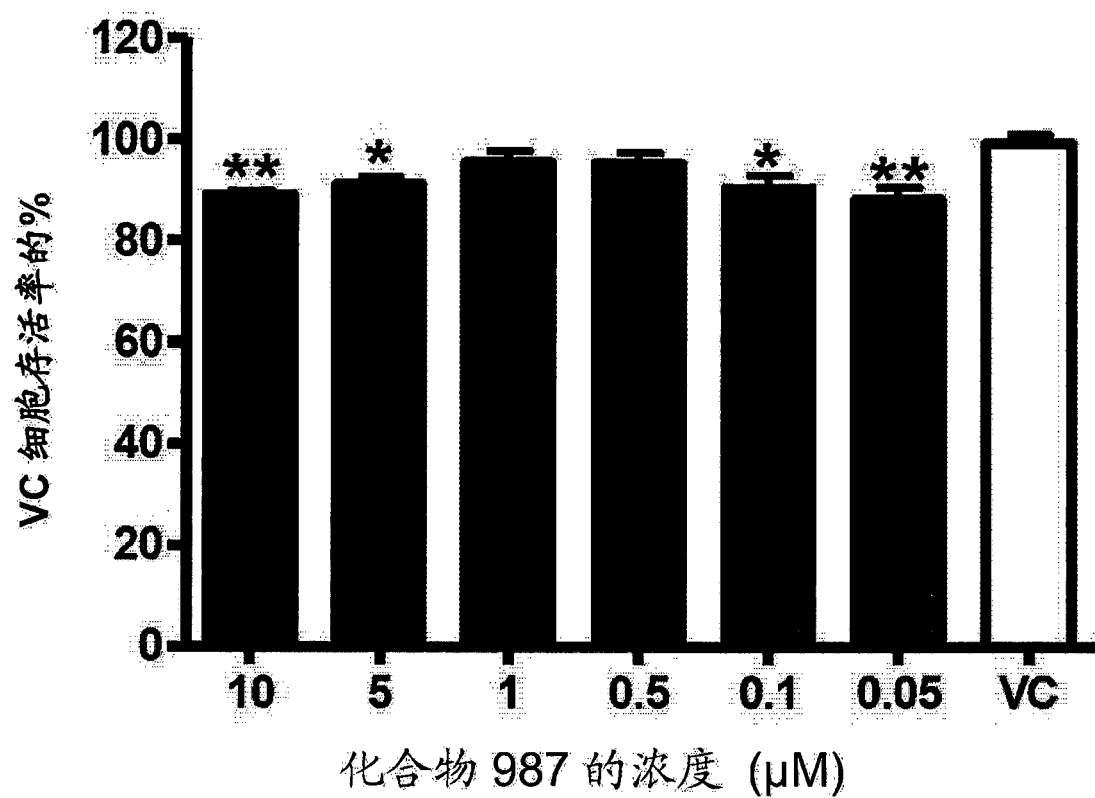


图 2

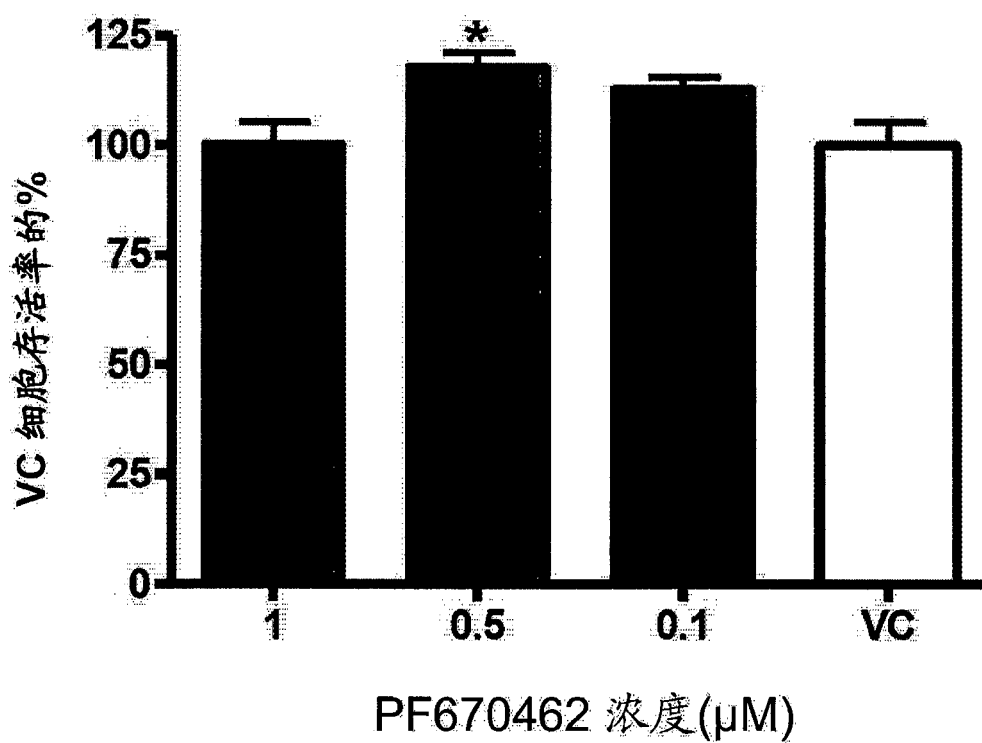


图 3

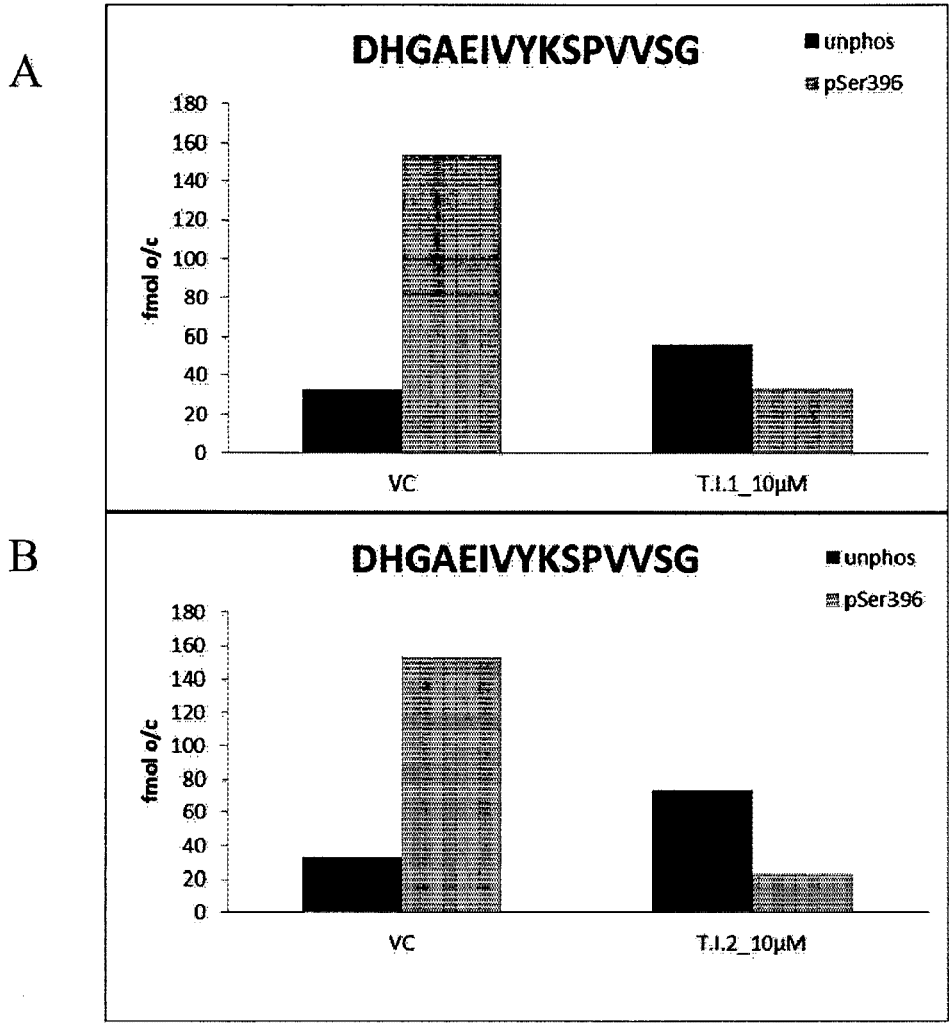


图 4

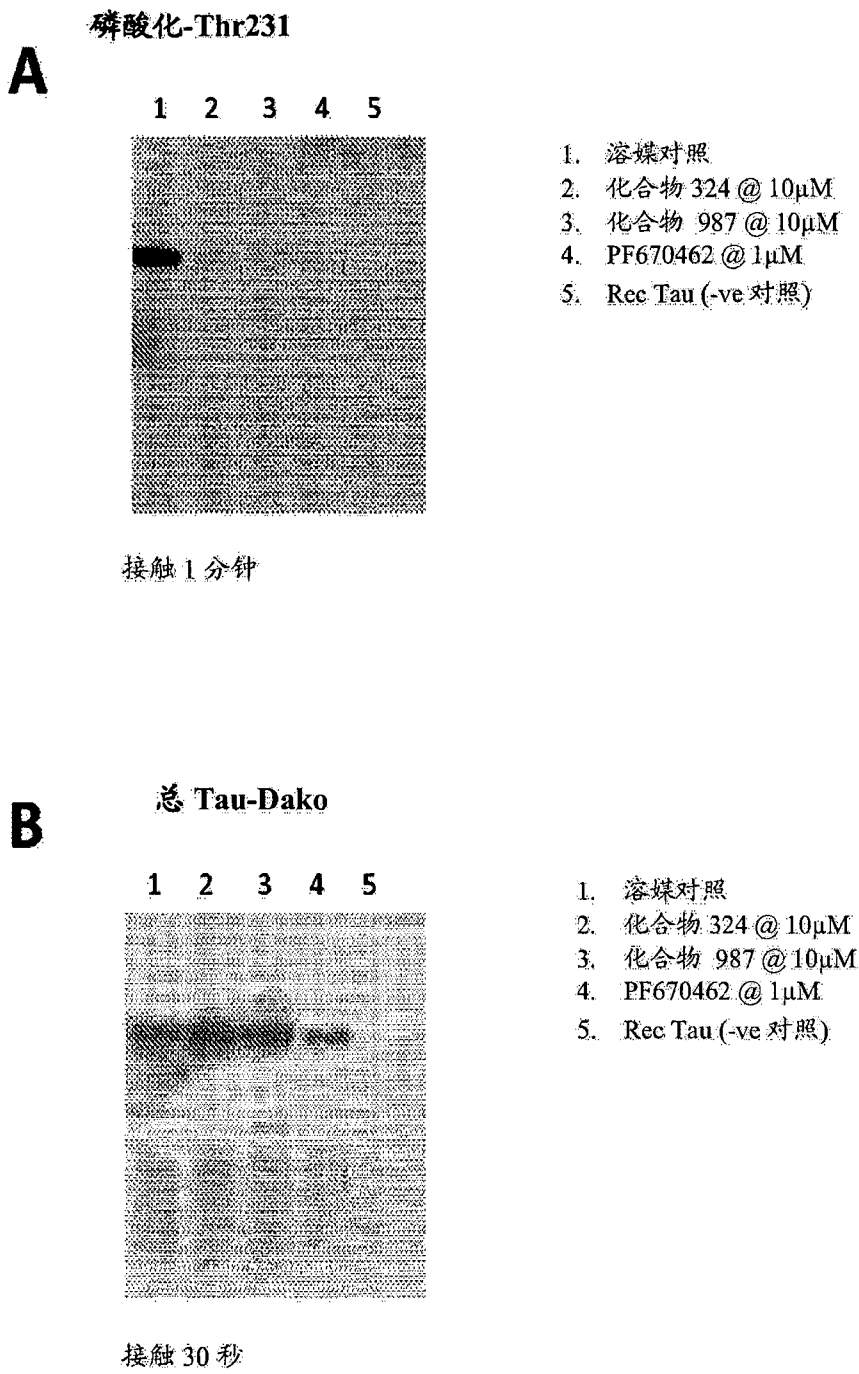


图 5

Abstract

The invention relates to pharmaceutical compositions comprising casein kinase 1 δ (CK1 δ) and to the use of said inhibitors in the treatment of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease.