(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120040470 A
(43)申请公布日 2025.05.27

(21)申请号 202510189944.6

(22)申请日 2019.11.20

(30)优先权数据
62/769,791 2018.11.20 US

(62)分案原申请数据
201980087338.6 2019.11.20

(71)申请人 乔治敦大学
地址 美国华盛顿哥伦比亚特区

(72)发明人 克里斯蒂安·沃尔夫
巴拉拉曼·卡卢伍 查贝尔·穆萨

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
专利代理师 王达佐 安佳宁

(51)Int.Cl.
C07D 495/04(2006.01)
A61K 31/4365(2006.01)
A61P 21/00(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)

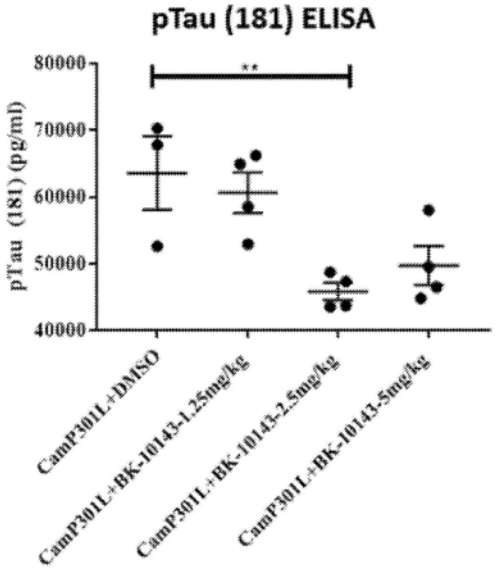
权利要求书1页 说明书30页 附图17页

(54)发明名称

用于治疗神经退行性、肌退行性和溶酶体贮积病症的组合物和方法

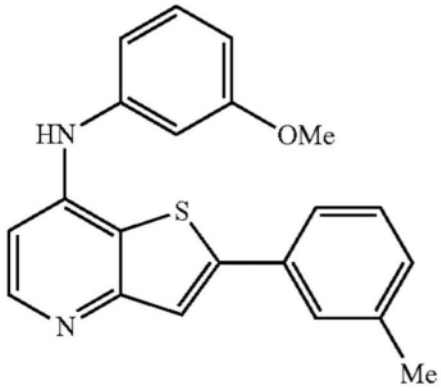
(57)摘要

本文提供用于治疗或预防受试者的神经退行性疾病、肌退行性疾病、朊病毒疾病或溶酶体贮积疾病的组合物和方法。

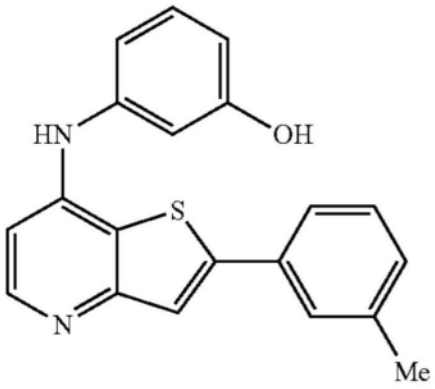


CN 120040470 A

1.选自化合物8或化合物10的化合物或其药学上可接受的盐：



化合物 8



化合物 10。

2.药物组合物,其包含权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐。

3.如权利要求2所述的药物组合物,其为固体剂型。

4.如权利要求2所述的药物组合物,其为液体剂型。

5.权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐或权利要求2-4中任一项所述的药物组合物在制备用于治疗或预防受试者的神经退行性疾病、肌退行性疾病或阮病毒疾病的药物中的用途,其中所述受试者患有中枢神经系统的所述神经退行性疾病、所述肌退行性疾病或所述阮病毒疾病,或处于发展所述中枢神经系统的所述神经退行性疾病、所述肌退行性疾病或所述阮病毒疾病的风险中。

用于治疗神经退行性、肌退行性和溶酶体贮积病症的组合物和方法

[0001] 本申请是2019年11月20日提交的发明名称为“用于治疗神经退行性、肌退行性和溶酶体贮积病症的组合物和方法”的第201980087338.6号中国专利申请的分案申请。

[0002] 本申请要求2018年11月20日提交的美国临时申请号62/769,791的优先权,所述临时申请由此以引用的方式整体并入。

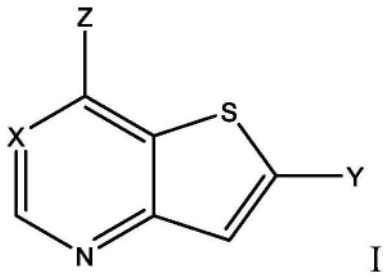
背景技术

[0003] 神经退行性疾病包括与进行性神经系统功能障碍相关的遗传和散发病症。这些疾病的特征在于神经细胞或神经细胞功能的进行性恶化。据估计,四名美国人中将有一人在其一生中发展神经退行性疾患。然而,一般说来,引起所述疾患的潜在机制尚未充分了解并且很少有效的治疗选项可用于预防或治疗神经退行性疾病。

[0004] 溶酶体贮积病症代表一些最具毁灭性的遗传疾病,并且开发针对这些病症的疗法的需要仍在很大程度上未得到满足。这些疾病中的一些对中枢神经系统(CNS)造成损害,但此类损害的潜在机制在很大程度上尚未可知。尽管溶酶体贮积病症的发生率很低(低于约1:100,000名个体受到影响,溶酶体贮积病症主要影响儿童,其通常在幼年死亡,一些在出生后数月或数年死亡。其他多名儿童在罹患其特定的溶酶体贮积病症的多种症状数年之后死亡。

发明内容

[0005] 本文提供用于治疗或预防受试者的神经退行性疾病、肌退行性疾病、朊病毒疾病或溶酶体贮积疾病的组合物和方法。本文提供具有式I的化合物

[0006] 

I

[0007] 其中

[0008] X是N或CH;

[0009] Y是未取代或经R^1取代的C_{6-10}芳基;或未取代或经R^1取代的C_{5-10}杂芳基,或N-甲基哌嗪基;

[0010] R^1是-$(CH_2)_n$-R^2、-(CH2)$_n$-C(O)-R^2或-O$(CH_2)_n$-R^2;

[0011] R^2是-H、-CN、卤素、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、苯基、吡啶基、氨基、C_{1-3}烷基氨基、二C_{1-3}烷基氨基、羟基C_{1-3}烷基氨基、羧基C_{1-3}烷基氨基、C_{3-6}环烷基C_{1-3}烷基氨基、吡咯烷基、羟基吡咯烷基、羟基C_{1-3}烷基吡咯烷基、羧基吡咯烷基、哌啶基、C_{1-3}烷基哌啶基、二C_{1-3}烷基哌啶基、哌嗪基、C_{1-3}烷基哌嗪基、C_{1-4}烷氧基羰基哌嗪基或吗啉基;

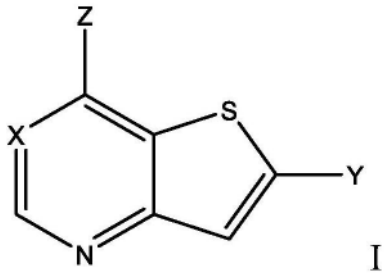
[0012] Z是杂芳基、杂环基或NR^3R^4;

[0013] R^3和R^4独立地为H、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基或未取代的苯基,并且

[0014] n是选自0至3的整数,

[0015] 或其异构体或药学上可接受的盐。

[0016] 还提供一种治疗或预防受试者的神经退行性疾病、肌退行性疾病或阮病毒疾病的方法,所述方法包括向患有所述神经退行性疾病、所述肌退行性疾病或所述阮病毒疾病或处于发展所述神经退行性疾病、所述肌退行性疾病或所述阮病毒疾病的风险中的受试者施用有效量的具有式I的化合物

[0017] 

I

[0018] 其中

[0019] X是N或CH;

[0020] Y是未取代或经R^1取代的C_{6-10}芳基;或未取代或经R^1取代的C_{5-10}杂芳基,或N-甲基哌嗪基;

[0021] R^1是$-(CH_2)_n-R^2$、$-(CH2)_n-C(O)-R^2$或$-O(CH_2)_n-R^2$;

[0022] R^2是-H、-CN、卤素、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、苯基、吡啶基、氨基、C_{1-3}烷基氨基、二C_{1-3}烷基氨基、羟基C_{1-3}烷基氨基、羧基C_{1-3}烷基氨基、C_{3-6}环烷基C_{1-3}烷基氨基、吡咯烷基、羟基吡咯烷基、羟基C_{1-3}烷基吡咯烷基、羧基吡咯烷基、哌啶基、C_{1-3}烷基哌啶基、二C_{1-3}烷基哌啶基、哌嗪基、C_{1-3}烷基哌嗪基、C_{1-4}烷氧基羰基哌嗪基或吗啉基;

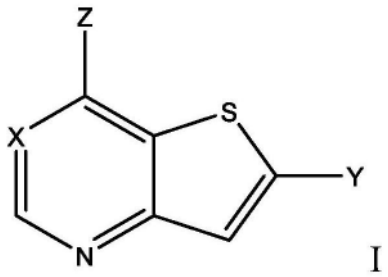
[0023] Z是杂芳基、杂环基或NR^3R^4;

[0024] R^3和R^4独立地为H、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基或未取代的苯基,并且

[0025] n是选自0至3的整数,

[0026] 或其异构体或药学上可接受的盐。

[0027] 还提供抑制或预防神经元中的毒性蛋白聚集的方法。所述方法包括使神经元与有效量的具有式I的化合物接触:

[0028] 

I

[0029] 其中,

[0030] X是N或CH;

[0031] Y是未取代或经R^1取代的C_{6-10}芳基;或未取代或经R^1取代的C_{5-10}杂芳基,或N-甲基哌嗪基;

[0032] R^1是-$(CH_2)_n$-R^2、-(CH2)$_n$-C(O)-R^2或-O$(CH_2)_n$-R^2;

[0033] R^2是-H、-CN、卤素、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、苯基、吡啶基、氨基、C_{1-3}烷基氨基、二C_{1-3}烷基氨基、羟基C_{1-3}烷基氨基、羧基C_{1-3}烷基氨基、C_{3-6}环烷基C_{1-3}烷基氨基、吡咯烷基、羟基吡咯烷基、羟基C_{1-3}烷基吡咯烷基、羧基吡咯烷基、哌啶基、C_{1-3}烷基哌啶基、二C_{1-3}烷基哌啶基、哌嗪基、C_{1-3}烷基哌嗪基、C_{1-4}烷氧基羰基哌嗪基或吗啉基;

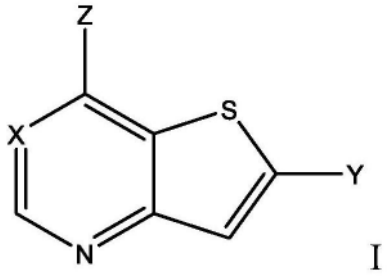
[0034] Z是杂芳基、杂环基或NR^3R^4;

[0035] R^3和R^4独立地为H、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基或未取代的苯基,并且

[0036] n是选自0至3的整数,

[0037] 或其异构体或药学上可接受的盐。

[0038] 还提供治疗或预防受试者的溶酶体贮积病症(LSD)的方法。所述方法包括向患有LSD或处于发展LSD的风险中的受试者施用有效量的具有式I的化合物:

[0039] 

I

[0040] 其中,

[0041] X是N或CH;

[0042] Y是未取代或经R^1取代的C_{6-10}芳基;或未取代或经R^1取代的C_{5-10}杂芳基,或N-甲基哌嗪基;

[0043] R^1是-$(CH_2)_n$-R^2、-(CH2)$_n$-C(O)-R^2或-O$(CH_2)_n$-R^2;

[0044] R^2是-H、-CN、卤素、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、苯基、吡啶基、氨基、C_{1-3}烷基氨基、二C_{1-3}烷基氨基、羟基C_{1-3}烷基氨基、羧基C_{1-3}烷基氨基、C_{3-6}环烷基C_{1-3}烷基氨基、吡咯烷基、羟基吡咯烷基、羟基C_{1-3}烷基吡咯烷基、羧基吡咯烷基、哌啶基、C_{1-3}烷基哌啶基、二C_{1-3}烷基哌啶基、哌嗪基、C_{1-3}烷基哌嗪基、C_{1-4}烷氧基羰基哌嗪基或吗啉基;

[0045] Z是杂芳基、杂环基或NR^3R^4;

[0046] R^3和R^4独立地为H、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基或未取代的苯基,并且

[0047] n是选自0至3的整数,

[0048] 或其异构体或药学上可接受的盐。

附图说明

[0049] 本申请包括以下各图。所述图意图说明所述组合物和方法的某些实施方案和/或特征,并且意图补充所述组合物和方法的任何描述。所述图不限制所述组合物和方法的范畴,除非书面描述明确地指示情况如此。

[0050] 图1(左图和中间图)示出在16小时治疗后,在用1μM BK41043治疗的B35细胞中观察到神经保护效应,如分别通过如与对照相比,乳酸脱氢酶(LDH)的减少和溴化(3-[4,5-二甲基噻唑-2-基]-2,5-二苯基-四唑(MTT)的增加所证明。图1(右图)示出在五小时治疗后,在减少的BK40143浓度下,经由LDH的减少存在细胞活力的逐步增加。

[0051] 图2示出在用pTau(左图)或α-突触核蛋白(右图)转染24小时并用BK41043治疗五小时后,B35细胞的细胞活力。在培养基中测量的脱氢酶(LDH)反映细胞死亡,在具有或不具有BK40143的情况下,其在对照与表达tau或a-突触核蛋白的细胞之间并无不同,指示这一化合物不会引起毒性或细胞死亡。

[0052] 图3示出在24小时转染后的pTau(181)水平(左图,学生t测试:非配对,双尾,*p<0.05,***p<0.01),并且BK41043降低pTau转染的B35细胞中的pTau(181)水平(右图,n=6,ANOVA:普通,单因素,Dunnett氏多重比较测试,p<0.05,****p<0.0001)。

[0053] 图4示出在24小时转染后的α-突触核蛋白水平(左图),并且BK41043降低α-突触核蛋白转染的B35细胞中的α-突触核蛋白(右图)。学生t测试:非配对,双尾,*p<0.05,**p<0.0,n=6)。在这一细胞培养模型中,介于10uM-1mM范围内的BK40143剂量看来降低α-突触核蛋白水平。

[0054] 图5示出在用BK40197治疗五小时后,B35细胞的细胞活力。

[0055] 图6示出在七天治疗后,BK40143降低Tau表达性转基因小鼠中的pTau(181)。pTau(181)水平经由ELISA测量。学生t测试:非配对,双尾,Welch氏校正,*p<0.05,***p<0.01

[0056] 使用Western印迹分析,图7示出用BK-40143(1.25mg/kg、2.5mg/kg或5.0mg/kg)治疗不会影响rTG4510转基因小鼠(n=4)中的pTau(231)(AT180)水平。

[0057] 图8示出在用1.25mg/kg和2.5mg/kg的BK-41043治疗七天后,Tau转基因小鼠中的Tau(HT7)显著降低。学生t测试:非配对,双尾,Welch氏校正,*p<0.05,***p<0.01,n=4

[0058] 图9示出用BK-40143(1.25mg/kg或2.5mg/kg)治疗导致DDR1的体内抑制,如通过磷酸化(活性)DDR1(pMCK10)的检测所测量。这一数据指示BK40143体内有效地抑制DDR。

[0059] 图10示出在用2.5mg/kg或5mg/kg BK-40143治疗后,CamP301L小鼠中的pTau(191)降低。学生t测试:非配对,Welch氏校正,单尾,*p>0.05,p=0.02,n=4。

[0060] 图11A示出1mM和100uM BK40196显著降低转染的B35细胞中的α-突触核蛋白水平。

[0061] 图11B示出BK40197不会显著降低转染的B35细胞中的α-突触核蛋白水平。

[0062] 图12A-D示出BK40143显著降低A53T小鼠中的α-突触核蛋白。雄性和雌性12月龄A53T小鼠用2.5mg/kg BK40143 i.p.治疗,持续连续21天。图12A是人类α-突触核蛋白的ELISA,其示出与DMSO治疗的对照A53T小鼠相比,BK40143治疗的动物中的α-突触核蛋白水平显著降低39%。C57BL/6J小鼠用作对照并且未示出可检测的(N.D.)人类α-突触核蛋白。图12B示出BK40143增加多巴胺的总体水平(30%)。BK40143确实增加A53T小鼠中的多巴胺代谢物高香草酸(HVA)的水平,指示更多的多巴胺周转,其可导致更好的多巴胺神经传递。图12C和12D是α-突触核蛋白的免疫印迹,其反映出ELISA中可见的α-突触核蛋白的40%降低。

[0063] 图13示出BK40143改进A53T小鼠的运动速度。A53T小鼠在旷场测试中经60-分钟试验测试总体运动能力。尽管所述小鼠在行进的总距离或移动所耗用的总时间方面未显示任何差异,其移动速度随着BK40143治疗显著增加。

[0064] 图14A-E示出BK40143选择性地使DDR(约50%)不活化,而非Src或Abl,并且降低rTG4510 tau蛋白病变小鼠模型中的磷酸化tau。雄性和雌性3月龄rTG4530小鼠用1.25mg/kg、2.5mg/kg或5mg/kg BK40143或DMSO i.p.治疗,持续连续7天。图14A是活化(磷酸化)DDR1的免疫印迹探测,其证明了1.25和2.5而非5mg/kg BK40143使DDR1不活化。图14B是活

化Src的免疫印迹探测,其证明了BK40143未衔接这一酪氨酸激酶。图14C是活化Abl的免疫印迹探测,其证明了BK40143未衔接这一酪氨酸激酶。图14D是磷酸化Tau(AT8)的免疫印迹探测,其示出所有三种剂量的BK40143均降低同一小鼠中的磷酸化tau水平达41-49%百分比,指示DDR抑制与pTau降低是并行的。图14E是磷酸化Tau(AT181)的ELISA,其示出2.5mg/kg BK40143显著降低磷酸化Tau。

[0065] 图15A-F示出BK40143显著降低转基因APP小鼠中的淀粉样蛋白、磷酸化tau并且使DDR1不活化。雄性和雌性7月龄APP小鼠用1.25和2.5mg/kg BK40143或DMSO i.p.治疗,持续连续21天。图15A是聚集的细胞外淀粉样蛋白-β(6E10)的免疫印迹,其证明了1.25和2.5mg/kg BK40143显著降低淀粉样蛋白-β斑块。图15B是磷酸化DDR1的免疫印迹探测,其证明了1.25和2.5mg/kg BK40143分别使DDR1不活化达40%和31%。图15C,活化(磷酸化Abl(245)的探测,证明了BK40143未衔接Abl。图15D和15E.经由ELISA发现,1.25和2.5mg/kg BK40143分别显著降低可溶性人类淀粉样蛋白-β,但未显著降低不溶性淀粉样蛋白-β。图15F示出2.5mg/kg BK40143显著降低人类磷酸化tau(Ser396)超过80%。

[0066] 图16示出BK40143可能改进APP小鼠在Morris水迷宫测试中的认知性能。测量包括平台入口的数目(左图)、第一个入口的等待时间(中间图)和在其进入平台的第一个入口之前行进的距离(右图)。尽管各组之间并无显著差异,1.25mg/kg BK显示在较高数目的平台入口和第一个入口的较短等待时间以及在第一个入口之前行进的较短距离下,性能增加的趋势。

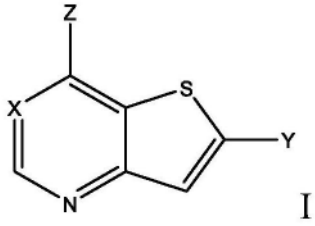
[0067] 图17示出BK40143不会引起APP小鼠的海马中的细胞死亡。代表性20um海马切片针对尼氏体进行染色(左图)。示出DMSO、1.25mg/kg和2.5mg/kg BK40143的4x和20x图像(左图)。在imagej软件中将平均染色强度定量为所有4x图像中的尼氏染色的总量(右图)。

具体实施方式

[0068] 本文提供用于治疗或预防受试者的神经退行性疾病、肌退行性疾病、朊病毒疾病或溶酶体贮积疾病的组合物和方法。

[0069] 化合物

[0070] 在一些实施例中,本文所述的一类化合物包括由式I表示的化合物:

[0071] 

I

[0072] 或其异构体或药学上可接受的盐。

[0073] 在式I中,X是N或CH。

[0074] 另外,在式I中,Y是未取代或经R^1取代的C_{6-10}芳基;或

[0075] 未取代或经R^1取代的C_{5-10}杂芳基,或N-甲基哌嗪基;

[0076] 另外,在式I中,R^1是-$(CH_2)_n$-R^2、-(CH2)$_n$-C(O)-R^2或-O$(CH_2)_n$-R^2;

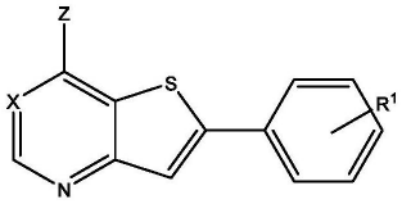
[0077] 另外,在式I中,R^2是-H、-CN、卤素、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、苯基、吡啶基、氨基、C_{1-3}烷基氨基、二C_{1-3}烷基氨基、羟基C_{1-3}烷基氨基、羧基C_{1-3}烷基氨基、C_{3-6}环烷基C_{1-3}烷基氨基、吡

咯烷基、羟基吡咯烷基、羟基C_{1-3}烷基吡咯烷基、羧基吡咯烷基、哌啶基、C_{1-3}烷基哌啶基、二C_{1-3}烷基哌啶基、哌嗪基、C_{1-3}烷基哌嗪基、C_{1-4}烷氧基羰基哌嗪基或吗啉基；

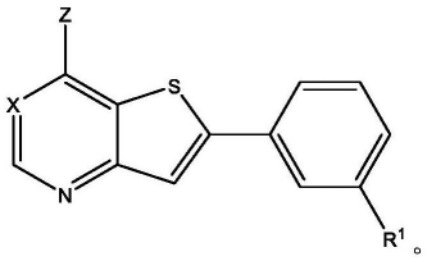
[0078] Z是杂芳基、杂环基或NR^3R^4；

[0079] 另外，在式I中，R^3和R^4独立地选自H、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基或未取代的苯基，并且n是选自0至3的整数。

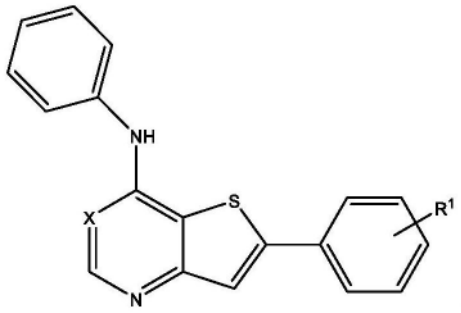
[0080] 在式I的一些实施例中，Y是经R^1取代的苄基：

[0081] 

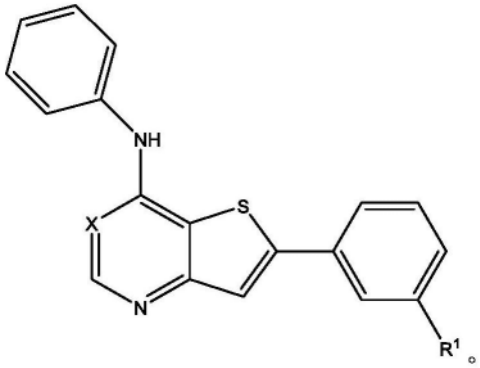
[0082] 在式I的一些实施例中，Y是间位经R^1取代的苄基：

[0083] 。

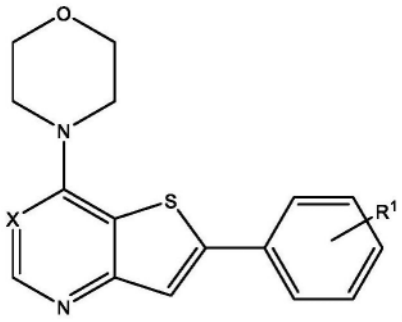
[0084] 在式I的一些实施例中，Z是NR^3R^4，R^3是苄基或H，R^4是苄基或H，并且Y是经R^1取代的苄基：

[0085] 。

[0086] 在式I的一些实施例中，Z是NR^3R^4，R^3是苄基或H，R^4是苄基或H，并且Y是间位经R^1取代的苄基：

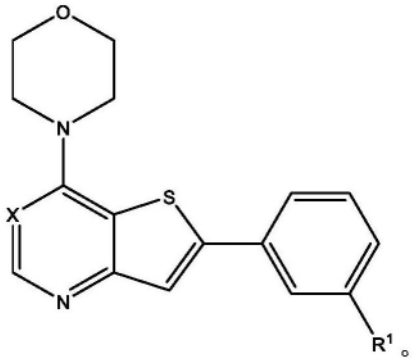
[0087] 。

[0088] 在式I的一些实施例中，Z是吗啉基并且Y是经R^1取代的苄基：

[0089] 

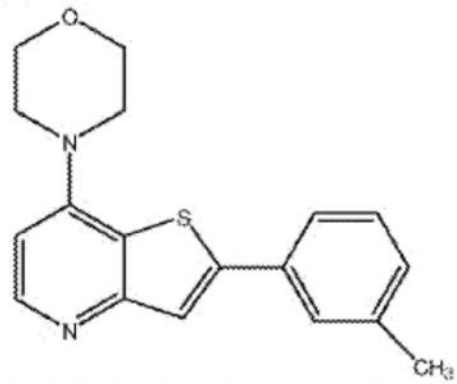
。

[0090] 在式I的一些实施例中,Z是吗啉基并且Y是间位经R^1取代的苄基:

[0091] 

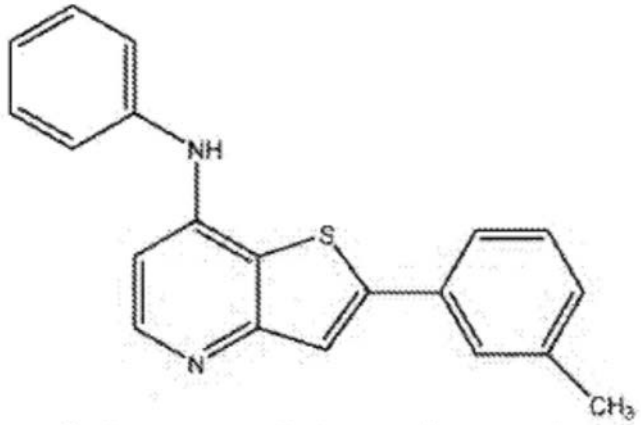
。

[0092] 式I化合物是化合物1(BK40197):

[0093] 

4-(2-(间甲苯基)噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基)吗啉

[0094] 另一式I化合物是化合物2(BK40193):

[0095] 

N-苯基-2-(间甲苯基)噻吩并[3,2-b]吡啶-7-胺

[0096] 在式I的一些实施例中,所述化合物不包含一个或多个卤素原子。在式I的一些实

施例中,Y是2-间甲苯甲酰基。在式I的一些实施例中,Z是杂环基。在式I的一些实施例中,Z是吗啉-1-基。在式I的一些实施例中,R^3是H并且R^4是未取代的苯基。

[0097] 如本文所用,术语烷基、烯基和炔基包括直链和分支链单价取代基。实例包括甲基、乙基、异丁基、3-丁炔基等。可用于本文所述的化合物和方法的这些基团的范围包括C_1-C_{20}烷基、C_2-C_{20}烯基和C_2-C_{20}炔基。可用于本文所述的化合物和方法的这些基团的额外范围包括C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯基、C_2-C_{12}炔基、C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_1-C_4烷基、C_2-C_4烯基和C_2-C_4炔基。

[0098] 如本文所用,术语烷氧基是通过单一、末端醚键结合的烷基。如本文所用,术语羟基由式—OH表示。

[0099] 如本文所用,术语胺或氨基由式—NR^3R^4表示,其中R^3和R^4可各自是如本文所述的取代基,如上文所述的氢、烷基、环烷基、卤化烷基、烯基或炔基。

[0100] 本文所用的烷氧基、氨基、烷基、烯基、炔基或羰基分子可经取代或未取代。如本文所用,术语经取代包括将烷氧基、氨基、烷基、烯基、炔基或羰基添加至与所述烷氧基、氨基、烷基、烯基、炔基或羰基的主链附接的位置中,例如由这些分子之一置换氢。取代基的实例包括但不限于羟基、卤素(例如,F、Br、Cl或I)和羧基。相反地,如本文所用,术语未取代指示所述烷氧基、氨基、烷基、烯基、炔基或羰基具有氢的完全补足,即与其饱和水平相称,而无取代,例如直链癸烷(-$(CH_2)_9$-CH_3)。

[0101] 杂烷基、杂烯基和杂炔基与烷基、烯基和炔基类似地定义,但可在骨架内含有O、S或N杂原子或其组合。可用于本文所述的化合物和方法的这些基团的范围包括C_1-C_{20}杂烷基、C_2-C_{20}杂烯基和C_2-C_{20}杂炔基。可用于本文所述的化合物和方法的这些基团的额外范围包括C_1-C_{12}杂烷基、C_2-C_{12}杂烯基、C_2-C_{12}杂炔基、C_1-C_6杂烷基、C_2-C_6杂烯基、C_2-C_6杂炔基、C_1-C_4杂烷基、C_2-C_4杂烯基和C_2-C_4杂炔基。

[0102] 术语环烷基、环烯基和环炔基包括具有单环或多个稠环的环状烷基。实例包括环己基、环戊基乙基和金刚烷基。可用于本文所述的化合物和方法的这些基团的范围包括C_3-C_{20}环烷基、C_3-C_{20}环烯基和C_3-C_{20}环炔基。可用于本文所述的化合物和方法的这些基团的额外范围包括C_5-C_{12}环烷基、C_5-C_{12}环烯基、C_5-C_{12}环炔基、C_5-C_6环烷基、C_5-C_6环烯基和C_5-C_6环炔基。

[0103] 术语杂环烷基、杂环烯基和杂环炔基与环烷基、环烯基和环炔基类似地定义,但可在环状骨架内含有O、S或N杂原子或其组合。可用于本文所述的化合物和方法的这些基团的范围包括C_3-C_{20}杂环烷基、C_3-C_{20}杂环烯基和C_3-C_{20}杂环炔基。可用于本文所述的化合物和方法的这些基团的额外范围包括C_5-C_{12}杂环烷基、C_5-C_{12}杂环烯基、C_5-C_{12}杂环炔基、C_5-C_6杂环烷基、C_5-C_6杂环烯基和C_5-C_6杂环炔基。

[0104] 芳基分子包括例如并入由离域电子连接的一般六个碳原子的一个或多个平面集合的环状烃,所述平面集合就如同其由交替的共价单键和共价双键组成般编号。芳基分子的实例为苯。杂芳基分子包括沿着其原子的主要环状链的取代,如O、N或S。当杂原子被引入时,五个原子(例如,四个碳和一个杂原子)的集合可产生芳族系统。杂芳基分子的实例包括呋喃、吡咯、噻吩、咪唑、噁唑、吡啶和吡嗪。芳基和杂芳基分子也可包括额外稠环,例如苯并呋喃、吲哚、苯并噻吩、萘、蒽和喹啉。除非另外注明,否则所述芳基和杂芳基分子可在环上的任何位置处进行附接。

[0105] 任选地,所述具有式I的化合物是抑制选自由Abl、PDGFRα、PDGFRβ、DDR 1、DDR2、cKIT、精氨酸酶II、Src、Fyn、VEGFR和Zac组成的组的一种或多种受体酪氨酸激酶的酪氨酸激酶抑制剂。在一些实施例中,所述具有式I的化合物选择性地抑制Abl、PDGFRα、PDGFRβ、DDR 1、DDR2、cKIT、精氨酸酶II、Src、Fyn或VEGR或Zac。在一些实施例中,所述具有式I的化合物抑制DDR 1和/或DDR2。

[0106] 如本文所用,术语药学上可接受的盐是指在合理医学判断的范围内适合与人类和低等动物的组织接触使用而无不当毒性、刺激、过敏性反应等,并且与合理效益/风险比相称的那些盐。药学上可接受的盐是本领域中众所周知的。本文所提供的化合物的药学上可接受的盐(例如尼洛替尼、博舒替尼帕唑帕尼和式I化合物的药学上可接受的盐)包括由合适的无机和有机酸和碱衍生的那些。药学上可接受的无毒酸加成盐的实例是用无机酸,如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和高氯酸,或用有机酸,如乙酸、草酸、顺丁烯二酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸,或通过使用本领域中使用的其他方法(如离子交换)形成的氨基的盐。其他药学上可接受的盐包括己二酸盐、褐藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙烷磺酸盐、甲酸盐、反丁烯二酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙烷磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、顺丁烯二酸盐、丙二酸盐、甲烷磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟碱酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、特戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、三氟乙酸、十一烷酸盐、戊酸盐等。

[0107] 本文所述的化合物可以多种方式制备。所述化合物可使用多种合成方法,包括实施例中提供的那些来合成。这些方法中的至少一些是合成有机化学领域中已知的。本文所述的化合物可由可容易获得的起始材料制备。最佳反应条件可随着所用的特定反应物或溶剂变化,但所述条件可由本领域技术人员通过常规优化程序确定。

[0108] 关于式I的变化形式包括如关于各化合物所述的多种组分的添加、扣除或移动。同样,当一个或多个手性中心存在于分子中时,包括所有可能的手性变体。另外,化合物合成可涉及多个化学基团的保护和保护基脱除。保护和保护基脱除的使用和适当保护基的选择可由本领域技术人员确定。保护基化学可发现于例如Wuts,Greene's Protective Groups in Organic Synthesis,第5版,Wiley&Sons,2014中,其以全文引用的方式并入本文中。

[0109] 产生本文所述的化合物的反应可在溶剂中进行,所述溶剂可由有机合成领域的技术人员选择。溶剂可大体上不与起始材料(反应物)、中间物或产物在进行所述反应的条件(即,温度和压力)下反应。反应可在一种溶剂或超过一种溶剂的混合物中进行。产物或中间物形成可根据本领域中已知的任何合适方法进行监测。例如,产物形成可通过光谱手段,如核磁共振光谱法(例如^{1}H或^{13}C)红外光谱法、分光光度法(例如UV-可见光)或质谱分析,或通过色谱,如高效液相色谱(HPLC)或薄层色谱进行监测。

[0110] 任何本文所述的化合物均可经修饰以增强血脑屏障渗透性。任选地,一种或多种本文所述的化合物可用增强所述化合物的血脑屏障渗透性的剂施用。

[0111] 用于治疗或预防神经退行性疾病、肌退行性疾病或朊病毒疾病的方法

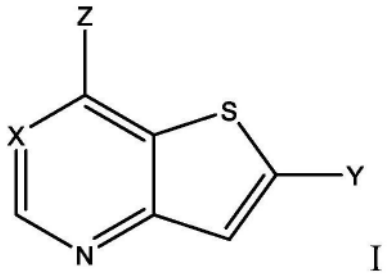
[0112] 本文提供治疗或预防神经退行性疾病、肌退行性疾病或朊病毒疾病的方法。所述

神经退行性疾病或病症可为中枢神经系统的神经退行性疾病。这些包括但不限于肌萎缩性侧索硬化、阿尔兹海默氏病、额颞叶痴呆、TDP-43病理(包括TDP-43额颞叶痴呆)、与染色体17相关的额颞叶痴呆、淀粉样变性、皮克氏病、亨廷顿氏病、轻度认知障碍、α-突触核蛋白病(例如帕金森氏病、路易体病)、多发性硬化、神经胶质细胞包涵体(包括多系统萎缩)、慢性创伤性脑病、Tau蛋白病变、进行性核上性麻痹和皮层基底节变性。所述神经退行性疾病也可为通过创伤性脑损伤、中风或感染,例如细菌或病毒感染(例如HIV、单纯疱疹病毒(HSV))诱导的继发性神经退行性疾病。

[0113] 肌退行性疾病或病症包括但不限于营养不良(例如肌肉营养不良)、肌病(例如线状体肌病、多核/微核肌病、中央核肌病、线粒体肌病、代谢性肌病等)或肌强直(例如先天性肌强直、先天性副肌强直或肌强直性营养不良)。

[0114] 举几个例子,朊病毒疾病或病症包括但不限于Creutzfeldt-Jakob疾病、变异型Creutzfeldt-Jakob疾病、Gerstmann-Straussler-Scheinker综合征、致命性家族性失眠症、库鲁病、牛海绵状脑病、慢性消耗性疾病和羊搔痒症。

[0115] 所述方法包括向患有所述神经退行性疾病、肌退行性疾病或阮病毒疾病或处于发展所述神经退行性疾病、所述肌退行性疾病或所述阮病毒疾病的风险中的受试者施用有效量的具有式I的化合物:

[0116] 

I

[0117] 其中,

[0118] X是N或CH;

[0119] Y是未取代或经R^1取代的C_{6-10}芳基;或未取代或经R^1取代的C_{5-10}杂芳基,或N-甲基哌嗪基;

[0120] R^1是-$(CH_2)_n$-R^2、-(CH2)$_n$-C(O)-R^2或-O$(CH_2)_n$-R^2;

[0121] R^2是-H、-CN、卤素、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、苯基、吡啶基、氨基、C_{1-3}烷基氨基、二C_{1-3}烷基氨基、羟基C_{1-3}烷基氨基、羧基C_{1-3}烷基氨基、C_{3-6}环烷基C_{1-3}烷基氨基、吡咯烷基、羟基吡咯烷基、羟基C_{1-3}烷基吡咯烷基、羧基吡咯烷基、哌啶基、C_{1-3}烷基哌啶基、二C_{1-3}烷基哌啶基、哌嗪基、C_{1-3}烷基哌嗪基、C_{1-4}烷氧基羰基哌嗪基或吗啉基;

[0122] Z是杂芳基、杂环基或NR^3R^4;

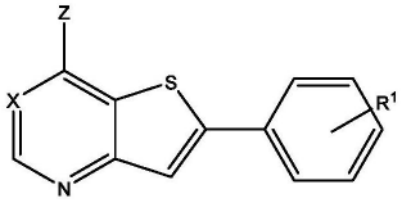
[0123] R^3和R^4独立地为H、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基或未取代的苯基,并且

[0124] n是选自0至3的整数,

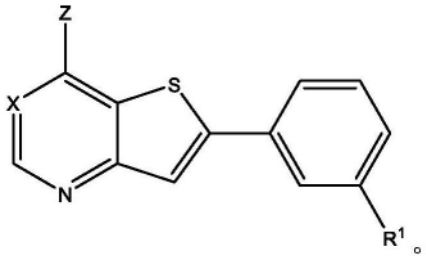
[0125] 或其异构体或药学上可接受的盐。

[0126] 在一些方法中,所述具有式I的化合物不包含一个或多个卤素原子。在一些方法中,在所述具有式I的化合物中,Y是2-间甲苯甲酰基。在一些方法中,在所述具有式I的化合物中,Z是杂环基。在一些方法中,在所述具有式I的化合物中,Z是吗啉-1-基。在一些方法中,在所述具有式I的化合物中,R^3是H并且R^4是未取代的苯基。

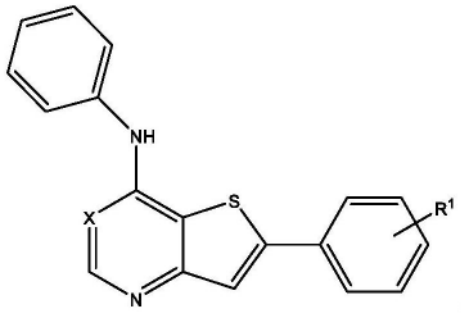
[0127] 在一些方法中,具有式I的化合物(其中Y是经R^1取代的苄基)施用于所述受试者:

[0128] 

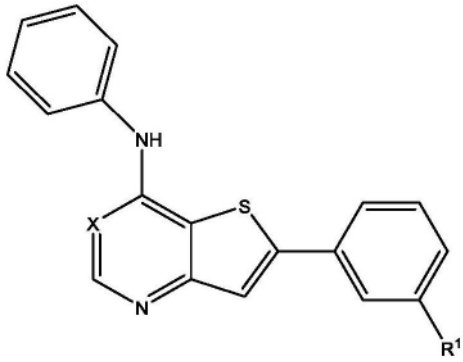
[0129] 在一些方法中,具有式I的化合物(其中Y是间位经R^1取代的苄基)施用于所述受试者:

[0130] 

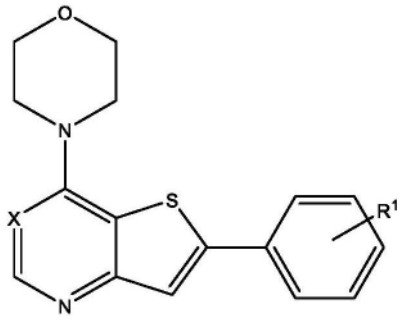
[0131] 在一些方法中,具有式I的化合物(其中Z是NR^3R^4,R^3是苄基或H,R^4是苄基或H,并且Y是经R^1取代的苄基)施用于所述受试者:

[0132] 

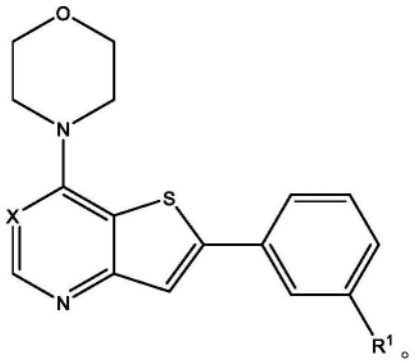
[0133] 在一些方法中,式I化合物(其中Z是NR^3R^4,R^3是苄基或H,R^4是苄基或H,并且Y是间位经R^1取代的苄基)施用于所述受试者:

[0134] 

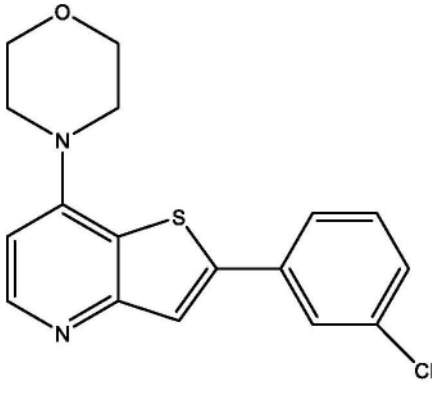
[0135] 在一些方法中,式I化合物(其中Z是吗啉基并且Y是经R^1取代的苄基)施用于所述受试者:

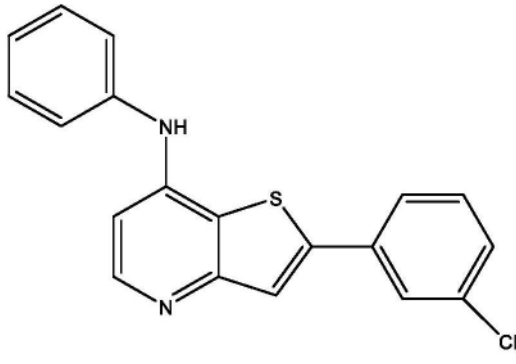
[0136] 。

[0137] 在一些方法中,式I化合物(其中Z是吗啉基并且Y是间位经R^1取代的苄基)施用于所述受试者:

[0138] 。

[0139] 可用于任何本文所述的方法中的式I的实例包括以下化合物:

[0140] 
CH_3 化合物 1 (BK40197)

[0141] 
CH_3 化合物 2 (BK40143)

[0142] 本文所提供的方法任选地包括选择患有神经退行性疾病、肌退行性疾病或阮病毒疾病或处于发展神经退行性疾病、肌退行性疾病或阮病毒疾病的风险中的受试者。本领域技术人员知晓如何诊断患有神经退行性疾病、肌退行性疾病或阮病毒疾病或处于发展神经退行性疾病、肌退行性疾病或阮病毒疾病的风险中的受试者。例如,可使用以下测试中的一

者或多者:遗传测试(例如TDP-43基因中的突变的鉴别)或家族分析(例如家族史)、中枢神经系统成像(例如磁共振成像和正电子发射断层扫描)、脑电图、临床或行为测试(例如肌肉虚弱、震颤、步态或记忆力的评估)或实验室测试。

[0143] 所述方法任选地还包括向所述受试者施用第二治疗剂。所述第二治疗剂是选自由左旋多巴、多巴胺激动剂、抗胆碱能剂、胆碱能剂(例如5-羟基色胺(5-HT)抑制剂)、单胺氧化酶抑制剂、COMT抑制剂、多奈哌齐、美金刚、利培酮、金刚烷胺、利斯的明、NMDA拮抗剂、乙酰胆碱酯酶抑制剂、胆碱酯酶抑制剂、利鲁唑、抗精神病剂、抗抑郁剂、糖皮质激素(例如泼尼松)、酪氨酸激酶抑制剂(例如尼洛替尼、博舒替尼、伊马替尼、帕唑帕尼等)和丁苯那嗪组成的组。所述第二治疗剂或疗法可在所述具有式I的化合物的施用之前、同时或之后施用于所述受试者。

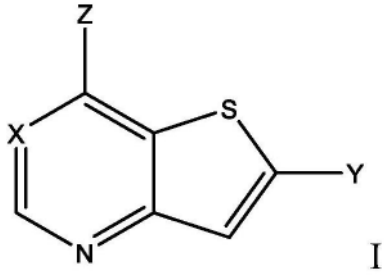
[0144] 在其中酪氨酸激酶抑制剂作为第二治疗剂施用的方法中,所述酪氨酸激酶抑制剂可为不抑制由所述式I化合物抑制的酪氨酸激酶受体或如与式I化合物相比对酪氨酸激酶受体具有减少的选择性的酪氨酸激酶抑制剂。

[0145] 本文还提供一种抑制或预防神经元中的毒性蛋白聚集和/或解救神经元免于变性的方法。如本文所用,对抑制(inhibiting)、减少(decreasing)或降低(reducing)的提及包括如与对照水平相比,10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多变化。

[0146] 所述方法包括使神经元与有效量的式I化合物接触。任选地,所述具有式I的化合物是化合物1或化合物2。毒性蛋白聚集体任选地包含致淀粉样变性蛋白、α-突触核蛋白、tau或TDP-43中的一者或多者。致淀粉样变性蛋白意指具有聚集的能力的肽、多肽或蛋白质。致淀粉样变性蛋白的实例是β-淀粉样蛋白。所述接触是体内或体外执行的。所述体内方法可用于治疗具有毒性蛋白聚集体或处于发展毒性蛋白聚集体的风险中的受试者并且包括如下文所述向受试者施用所述式I化合物。所述体外方法可用于例如在移植之前治疗神经细胞。在此类情形中,所述式I化合物一般添加至培养基中。任选地,使靶神经元与如上文所述的第二治疗剂接触。

[0147] 用于治疗或预防溶酶体贮积病症的方法

[0148] 还提供用于治疗或预防受试者的LSD的方法。所述方法包括向患有LSD或处于发展LSD的风险中的受试者施用有效量的具有式I的化合物:

[0149] 

I

[0150] 其中,

[0151] X是N或CH;

[0152] Y是未取代或经R^1取代的C_{6-10}芳基;或未取代或经R^1取代的C_{5-10}杂芳基,或N-甲基哌嗪基;

[0153] R^1是-$(CH_2)_n$-R^2、-(CH2)$_n$-C(O)-R^2或-O$(CH_2)_n$-R^2;

[0154] R^2是-H、-CN、卤素、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基、苯基、吡啶基、氨基、C_{1-3}烷基氨基、二C_{1-3}

烷基氨基、羟基C_{1-3}烷基氨基、羧基C_{1-3}烷基氨基、C_{3-6}环烷基C_{1-3}烷基氨基、吡咯烷基、羟基吡咯烷基、羟基C_{1-3}烷基吡咯烷基、羧基吡咯烷基、哌啶基、C_{1-3}烷基哌啶基、二C_{1-3}烷基哌啶基、哌嗪基、C_{1-3}烷基哌嗪基、C_{1-4}烷氧基羰基哌嗪基或吗啉基；

[0155] Z是杂芳基、杂环基或NR^3R^4；

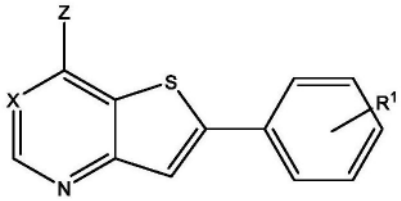
[0156] R^3和R^4独立地为H、C_{1-3}烷基、C_{1-3}烷氧基或未取代的苯基，并且

[0157] n是选自0至3的整数，

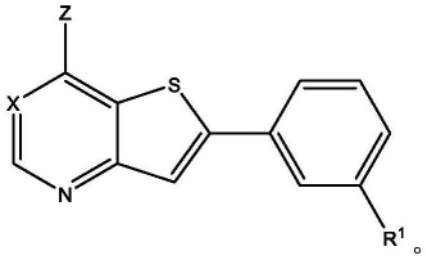
[0158] 或其异构体或药学上可接受的盐。

[0159] 在一些方法中，所述具有式I的化合物不包含一个或多个卤素原子。在一些方法中，在所述具有式I的化合物中，Y是2-间甲苯甲酰基。在一些方法中，在所述具有式I的化合物中，Z是杂环基。在一些方法中，在所述具有式I的化合物中，Z是吗啉-1-基。在一些方法中，在所述具有式I的化合物中，R^3是H并且R^4是未取代的苯基。

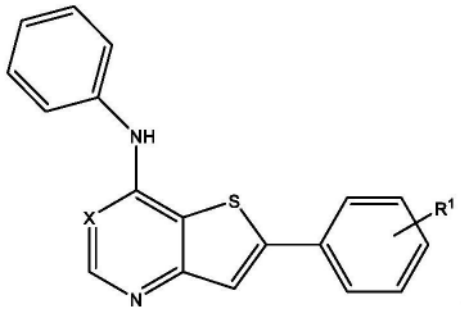
[0160] 在一些方法中，具有式I的化合物(其中Y是经R^1取代的苄基)施用于所述受试者：

[0161] 

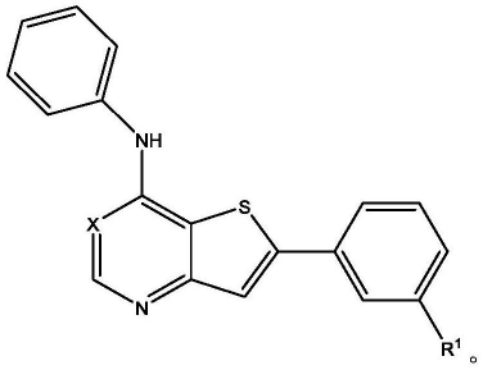
[0162] 在一些方法中，具有式I的化合物(其中Y是间位经R^1取代的苄基)施用于所述受试者：

[0163] 。

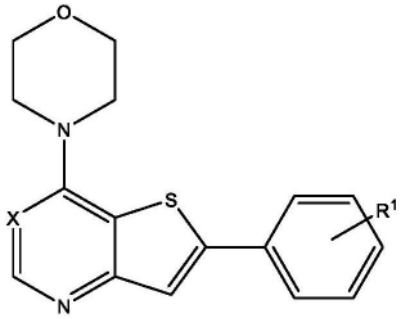
[0164] 在一些方法中，具有式I的化合物(其中Z是NR^3R^4，R^3是苄基或H，R^4是苄基或H，并且Y是经R^1取代的苄基)施用于所述受试者：

[0165] 。

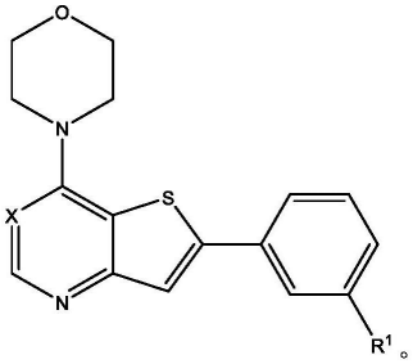
[0166] 在一些方法中，式I化合物(其中Z是NR^3R^4，R^3是苄基或H，R^4是苄基或H，并且Y是间位经R^1取代的苄基)施用于所述受试者：

[0167] 

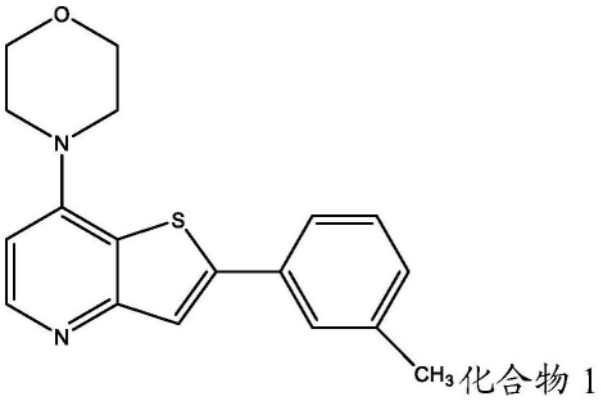
[0168] 在一些方法中,式I化合物(其中Z是吗啉基并且Y是经R^1取代的苄基)施用于所述受试者:

[0169] 

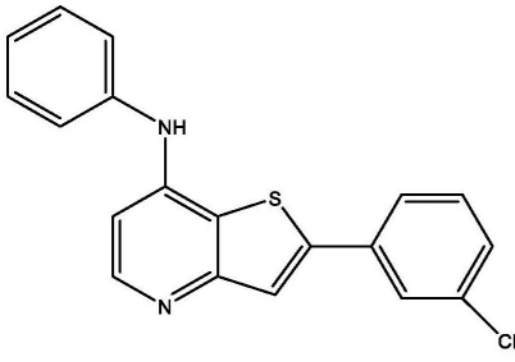
[0170] 在一些方法中,式I化合物(其中Z是吗啉基并且Y是间位经R^1取代的苄基)施用于所述受试者:

[0171] 

[0172] 可用于治疗或预防LSD的式I的实例包括以下化合物:

[0173] 

化合物 1

[0174] 

化合物 2

[0175] 任选地,所述式I化合物抑制选自由Abl、PDGFRα、PDGFRβ、DDR 1、DDR2、cKIT、精氨酸酶II、Src、Fyn、VEGFR和Zac组成的组的一种或多种受体酪氨酸激酶。在一些实施例中,所述式I化合物选择性地抑制Abl、PDGFRα、PDGFRβ、DDR 1、DDR2、cKIT、精氨酸酶II、Src、Fyn或VEGR或Zac。在一些实施例中,所述具有式I的化合物抑制DDR 1和/或DDR2。例如并且不打算为限制性的,化合物1或化合物2可用于抑制DDR1和/或DDR2。在另一实施例中,所述具有式I的化合物(例如化合物1或化合物2)选择性地抑制DDR 1或DDR2。

[0176] LSD是由溶酶体功能缺陷引起的遗传性代谢病症。在大多数情形中,LSD是由可负责存在于溶酶体中的脂质和糖蛋白的降解的特异性酶的缺乏引起的。在一些情形中,溶酶体生物合成中牵涉的缺陷性非酶溶酶体蛋白或非溶酶体蛋白引起LSD。未降解代谢物的进行性溶酶体积聚导致全身性细胞和组织功能障碍,并且因此导致多系统病理。可使用本文所提供的方法治疗或预防的LSD包括但不限于粘多糖贮积症I型(例如Hurler综合征、Hurler-Scheie综合征和Scheie综合征)、粘多糖贮积症I型(例如Hunter综合征)、粘多糖贮积症III型(例如Sanfillipo综合征A、Sanfillipo综合征B、Sanfillipo综合征C和Sanfillipo综合征D)、粘多糖贮积症IV型(例如Morquio综合征A和Morquio综合征B)、粘多糖贮积症VI型(例如Maroteaux-Lamy综合征)、粘多糖贮积症VII型(例如Sly综合征)、粘多糖贮积症IX型(例如Natowicz综合征)、假Hurler多种营养不良、Tay-Sachs、Gaucher疾病、Niemann-Pick疾病、岩藻糖苷贮积症、半乳糖唾液酸贮积症、球状细胞脑白质营养不良、G_{M1}神经节苷脂贮积症、G_{M2}神经节苷脂贮积症、α-甘露糖苷贮积症、异染性脑白质营养不良和Pompe疾病。本文所提供的LSD是与减少的溶酶体清除相关的疾病或病症的实例。

[0177] 还提供促进受试者的一个或多个细胞中的溶酶体清除的方法,所述方法包括向患有与减少的溶酶体清除相关的病症的受试者施用有效量的具有式I的化合物。任选地,所述具有式I的化合物是化合物1或化合物2。如通篇所用,溶酶体清除是使得积聚的脂质、蛋白质、糖蛋白或其组合在所述受试者的一个或多个细胞的溶酶体中代谢或降解的过程。溶酶体清除的减少意指如与对照相比,例如如与健康受试者的一个或多个细胞中的溶酶体清除相比,所述受试者的一个或多个细胞的溶酶体中的脂质、蛋白质和/或糖蛋白的降解减少。与减少的溶酶体清除相关的任何病症均可使用本文所提供的方法治疗,包括但不限于通篇所陈述的LSD中的任一种。如本文所用,对促进(promoting)或增加(increasing)的提及包括如与对照水平相比,10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%100%、200%、400%或更多变化。任选地,促进溶酶体清除会减少受试者的一个或多个细胞的溶酶体中的现存聚集体中的脂质、蛋白质、糖蛋白或其组合的量。任选地,促进溶酶体清除会抑制或预防受试者的一个或多个细胞的溶酶体中形成包含脂质、蛋白质、糖蛋白或其组合的聚集体。

任选地,如与对照相比,促进溶酶体清除会减少使受试者的一个或多个细胞中的脂质、蛋白质、糖蛋白或其组合降解或代谢所需的时间量。

[0178] 任选地,在本文所提供的方法中,如与对照相比,有效量的具有式I的化合物会抑制或预防受试者的一个或多个细胞中的毒性物质聚集或积聚。如本文所用,对减少(decreasing)、降低(reducing)或抑制(inhibiting)的提及包括如与对照水平相比,10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多变化。所述术语可包括但不必包括受试者的一个或多个细胞中的毒性物质的完全消除。任选地,所述一个或多个细胞是脑细胞、在受试者的一个或多个外周组织中的细胞或其组合。任选地,所述脑细胞可为神经元和/或神经胶质细胞。在本文所提供的方法中,可在细胞中聚集或积聚的毒性物质可为脂质、蛋白质或糖蛋白中的一者或多者。所述毒性物质可增加受试者的一个或多个细胞中的细胞损坏和/或增加细胞死亡。在本文所提供的方法中,所述毒性物质可处于受试者的一个或多个细胞中的溶酶体中或别处。例如,并且不打算为限制性的,特征是脂质积聚于受试者细胞中的LSD包括但不限于神经鞘脂贮积症(包括Gaucher氏疾病和Niemann-Pick疾病)、神经节苷脂贮积症(包括Tay-Sachs疾病)、脑白质营养不良;粘多糖贮积症(包括Hunter综合征和Hurler疾病)、糖蛋白贮积病症、粘脂贮积症和糖原贮积疾病II型(Pompe疾病)。

[0179] 神经鞘脂贮积症中积聚的脂质和糖蛋白包括脑和红细胞中的鞘磷脂(Nieman Pick疾病);脑心脏和肾中的糖脂,包括神经酰胺三己糖苷(Fabry疾病);少突胶质细胞中的半乳糖脑苷脂(Krabbe疾病);红细胞、脾和肝中的葡糖脑苷脂(Gaucher疾病);神经元中的GM2神经节苷脂(Tay-Sachs疾病)和Sandhoff疾病;GM1神经节苷脂;和神经组织中的硫苷脂化合物(异染性脑白质营养不良)。

[0180] 溶酶体贮积疾病还包括粘多糖贮积症(MP),其具有一种或多种溶酶体酶的缺乏,例如α-L-艾杜糖醛酸盐(Hurler疾病、Scheie综合征和Hurler Schei综合征);艾杜糖硫酸盐(hunter疾病)硫酸乙酰肝素(Sanfilipo A型)、N-乙酰基-α-D-葡糖胺(Sanfilipo B型)、CoA-α-氨基葡糖苷-N-乙酰基转移(Sanfilipo C型)、N-乙酰基-α-D-氨基葡糖苷-6-硫酸盐(Sanfilipo D型和Morquio综合征A型)、B-半乳糖(Morquio综合征B型)和N-乙酰基氨基半乳糖(Maroteaus-Lamy疾病),但所有这些MP疾病均是硫酸乙酰肝素、硫酸皮肤素或硫酸角质素的溶酶体积聚的结果。糖原贮积疾病(即Pompe疾病)由溶酶体中的糖和磷酸化糖贮积引起。

[0181] 本文所提供的方法任选地包括选择患有LSD的受试者。本领域技术人员知晓如何诊断患有LSD的受试者。例如,可使用以下测试中的一者或多者:遗传测试(例如与LSD相关的突变的鉴别)或家族分析(例如家族史、双亲的遗传测试)、中枢神经系统成像(例如磁共振成像和正电子发射断层扫描)、临床或行为测试(例如鉴别情绪障碍、攻击性和/或认知异常的评估)或实验室测试(例如鉴别代谢物或酶缺乏的异常水平的血液和/或尿液测试)。

[0182] 本文所提供的方法任选地还包括向所述受试者施用有效量的第二治疗剂或疗法。所述第二治疗剂或疗法可在式I化合物的施用之前、同时或之后施用于所述受试者。所述第二治疗剂或疗法是选自由酶、造血干细胞、骨髓移植、基因疗法或小分子组成的组。例如,并且不打算为限制性的,与酶缺乏相关的LSD可用酶治疗以增加所述受试者中的所述缺乏酶的量。例如,使用如伊米苷酶(Cerezyme®)、阿葡糖苷酶α(VPRIV®)或他利苷酶

α(Elelyso®)的重组酶的酶替代疗法(ERT)可用作第二治疗剂以治疗I型Gaucher疾病。抑制糖基神经酰胺合酶的小分子(例如米格鲁他和依鲁司他)也可用于治疗I型Gaucher疾病。也可使用充当伴侣以使所述受试者产生的缺乏酶稳定化的小分子,或降低通常将由所述受试者中的酶加工的一种或多种物质的量的小分子。

[0183] 也可施用减轻LSD的症状的一种或多种治疗剂。例如,如加巴喷丁或拉莫三嗪的抗癫痫药可用于预防受试者的惊厥。抗生素可用于治疗细菌感染,如肺炎。其他剂包括但不限于消炎剂(例如NSAID和消炎类固醇)和肌肉松弛剂。本文中还预期透析、物理疗法和手术作为治疗LSD的疗法。

[0184] 在用于治疗或预防LSD的一些方法中,所述第二治疗剂可为酪氨酸激酶抑制剂(例如尼洛替尼、博舒替尼、伊马替尼、帕唑帕尼等)。因此,在一些实施例中,酪氨酸激酶和式I化合物施用于所述受试者。在其中酪氨酸激酶作为第二治疗剂施用的方法中,所述酪氨酸激酶可为如与式I化合物相比对一种或多种受体酪氨酸激酶的选择性不同的酪氨酸激酶抑制剂。

[0185] 药物组合物

[0186] 如通篇所用,术语有效量是定义为产生所需的生理反应,例如抑制或预防神经元中的毒性蛋白聚集或促进溶酶体清除所必需的任何量。

[0187] 用于任何本文所述的化合物(例如式I化合物)的施用的示例性剂量包括每天约0.5至约200mg活性化合物/kg体重的剂量,其可以单一剂量或呈个别分次剂量的形式施用,如每天1至4次。或者,所述剂量可为每天约0.5至约150mg活性化合物/kg体重、每天约0.5至100mg活性化合物/kg体重、每天约0.5至约75mg活性化合物/kg体重、每天约0.5至约50mg活性化合物/kg体重、每天约0.5至约25mg活性化合物/kg体重、每天约1至约50mg活性化合物/kg体重、每天约1至约40mg活性化合物/kg体重、每天约1至约30mg活性化合物/kg体重、每天约1至约30mg活性化合物/kg体重、每天约30mg活性化合物/kg体重每天约20mg活性化合物/kg体重、每天约10mg活性化合物/kg体重或每天约5mg活性化合物/kg体重。

[0188] 任选地,所述剂量小于约10mg/kg并且可小于约9.5、9、8.5、8、7.5、7、6.5、6、5.5、5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5、1.25、1.0、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1mg/kg或这些量之间的任何剂量。所述剂量可介于约0.1mg/kg至约10mg/kg、约0.1mg/kg至约9mg/kg、约0.1mg/kg至约8mg/kg、约0.1mg/kg至约7mg/kg、约0.1mg/kg至约6mg/kg、约0.1mg/kg至约5mg/kg、约0.1mg/kg至约4mg/kg、约0.1mg/kg至约3mg/kg、约0.1mg/kg至约2mg/kg、约0.1mg/kg至约1mg/kg或约0.1mg/kg至约0.5mg/kg范围内。本领域技术人员将如下文所述基于所述抑制剂的特定特征和接受所述抑制剂的受试者调节剂量。

[0189] 所述组合物可包含单一单位剂量的式I化合物,例如约50mg/kg或更低、40mg/kg或更低、30mg/kg或更低、20mg/kg或更低、10mg/kg或更低、约5mg/kg或更低、约2.5mg/kg或更低或约1.5mg/kg或更低的单一单位剂量的化合物1或化合物2,或其药学上可接受的盐。还提供包括一个或多个单一单位剂量的具有式I的化合物,例如多个单一单位剂量的化合物1或化合物2的包装。所述包装可进一步包括单一或多个单位剂量的一种或多种本文所述的第二治疗剂。

[0190] 关于施用一种或多种本文所述的具有式I的化合物的有效量和时间表可凭经验确定并且进行此类确定是在本领域的技能内。关于施用的剂量范围是足够大以产生所需效应

的那些,其中所述疾病或病症的一种或多种症状受到影响(例如减轻或延迟)。所述剂量不应大到引起实质性不良副作用,如不需要的交叉反应、不需要的细胞死亡等。一般说来,所述剂量将随着抑制剂的类型、受试者的物种、年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食、施用模式和时间、排泄率、药物组合以及特定疾患的严重程度变化并且可由本领域技术人员确定。所述剂量可由个别医师在任何禁忌症的情况下加以调节。剂量可变化并且可以每天一次或多次分次施用来施用。

[0191] 本文所述的具有式I的化合物和其他剂可以药物组合物形式提供。这些药物组合物包括例如包含治疗有效量的一种或多种具有式I的化合物和药物载体的药物组合物。术语载体意指当与化合物或组合物组合时帮助或促进所述化合物或组合物的制备、存储、施用、递送、有效性、选择性或任何其他特征以达成其预期用途或目的的化合物、组合物、物质或结构。例如,可选择载体以最小化活性成分的任何降解并且最小化受试者的任何不良副作用。此类药学上可接受的载体包括无菌生物相容性药物载体,包括但不限于生理盐水、缓冲生理盐水、人工脑脊髓液、右旋糖和水。

[0192] 视预期施用模式而定,所述药物组合物可呈固体、半固体或液体剂型的形式,例如片剂、栓剂、丸剂、胶囊、粉剂、液体或悬浮液,优选地呈可用于精确剂量的单一施用的单位剂型。所述组合物将包括与药学上可接受的载体组合的治疗有效量的本文所述的剂或其衍生物,并且另外可包括其它药用剂、药剂、载体或稀释剂。药学上可接受意指在生物学上或其他方面均合乎需要的材料,其可连同所选的剂施用于个体而不引起不可接受的生物效应或以有害方式与其中含有所述材料的药物组合物的其他组分相互作用。

[0193] 如本文所用,术语载体涵盖任何赋形剂、稀释剂、填充剂、盐、缓冲液、稳定剂、增溶剂、脂质、稳定剂或本领域中已知用于药物制剂的其他材料。用于组合物的载体的选择将取决于预期用于所述组合物的施用途径。药学上可接受的载体和含有这些材料的制剂的制备描述于例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第22版,Loyd V.Allen等人编辑,Pharmaceutical Press(2012)中。

[0194] 生理学上可接受的载体的实例包括缓冲液,如磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液和具有其他有机酸的缓冲液;包括抗坏血酸的抗氧化剂;低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖醇,如甘露醇或山梨醇;成盐抗衡离子,如钠;和/或非离子性表面活性剂,如TWEEN® (ICI,Inc.;Bridgewater,New Jersey);聚乙二醇(PEG),和PLURONICS™ (BASF;Florham Park,NJ)。

[0195] 可用于肠胃外注射的含有本文所述的剂的组合物可包含生理学上可接受的无菌水溶液或非水溶液、分散液、悬浮液或乳液,和用于复原成无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。合适的水性和非水性载体、稀释剂、溶剂或媒剂的实例包括水、乙醇、多元醇(丙二醇、聚乙二醇、甘油等)、其合适混合物、植物油(如橄榄油)和可注射有机酯(如油酸乙酯)。适当流动性可例如通过使用涂层(如卵磷脂),在分散液的情况下通过维持所需的粒径和通过使用表面活性剂来维持。

[0196] 这些组合物也可含有佐剂,如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。微生物作用的预防可通过多种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等促进。也

可包括等张剂,例如糖、氯化钠等。可通过使用延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来引起可注射药物形式的延长吸收。

[0197] 用于本文所述的化合物或其衍生物的口服施用的固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、粉剂和颗粒。在此类固体剂型中,本文所述的化合物或其衍生物与至少一种惰性惯常赋形剂(或载体)混合,如柠檬酸钠或磷酸二钙,或(a)填充剂或增量剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸,(b)粘合剂,例如羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶,(c)保湿剂,例如甘油,(d)崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、褐藻酸、某些复合硅酸盐和碳酸钠,(e)溶液缓凝剂,例如石蜡,(f)吸收促进剂,例如季铵化合物,(g)湿润剂,例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯,(h)吸附剂,例如高岭土和膨润土,和(i)润滑剂,例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠或其混合物。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,所述剂型也可以包含缓冲剂。

[0198] 相似类型的固体组合物也可以在使用如乳糖(lactose/milk sugar)以及高分子量聚乙二醇等赋形剂的软和硬填充明胶胶囊中用作填充剂。

[0199] 如片剂、糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒的固体剂型可用包衣和壳,如肠溶包衣和本领域中已知的其它物质制备。其可以含有乳浊剂并且也可具有使得其以延迟方式在肠道的某一部分中释放所述一种或多种活性化合物的组成。可使用的包埋组合物的实例是聚合物质和蜡。所述活性化合物也可呈微封装形式,适当时具有一种或多种上文所提及的赋形剂。

[0200] 本文所述的化合物可并入允许将那些化合物立即释放或递送至哺乳动物的药物组合物中。本文所述的化合物也可并入允许将那些化合物修饰释放,例如延迟释放或延长释放(例如持续释放或控制释放)至哺乳动物持续数天、数周或一个月或更久时期的药物组合物中。此类制剂描述于例如美国专利号5,968,895和6,180,608中并且在本领域中另有所知。预期本领域中已知的任何药学上可接受的延迟释放或持续释放制剂。

[0201] 用于本文所述的化合物或其衍生物的口服施用的液体剂型包括药学上可接受的乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。除了活性化合物以外,所述液体剂型也可以含有本领域中通常使用的惰性稀释剂,如水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(尤其棉籽油、花生油、玉米胚芽油、橄榄油、蓖麻油、芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇以及山梨聚糖的脂肪酸酯或这些物质的混合物等。

[0202] 除此类惰性稀释剂外,所述组合物也可包括额外剂,如湿润剂、乳化剂、悬浮剂、甜味剂、调味剂或芳香剂。

[0203] 所述组合物以多种方式施用,视需要局部或全身性治疗而定,并且视待治疗的区域而定。所述组合物经由数种施用途径中的任一种施用,包括口服、肠胃外、静脉内、腹膜内、颅内、脊椎内、鞘内、心室内、肌肉内、皮下、腔内或经皮。药物组合物也可局部递送至需要治疗的区域,例如通过表面涂覆或局部注射。用于任何本文所述的施用方法的有效剂量可由从体外或动物模型测试系统导出的剂量-反应曲线推断。

[0204] 在通篇中,治疗(treat/treating/treatment)是指一种减轻或延迟神经退行性疾病、肌退行性疾病、朊病毒疾病或溶酶体贮积疾病的一种或多种效应或症状的方法。所述受试者可经诊断患有疾病或病症。治疗也可指一种减轻基础病理而非仅症状的方法。施用于受试者所产生的效应可具有但不限于以下效应:减轻所述疾病的一种或多种症状、所述疾

病的严重程度的降低、所述疾病的完全消融或一种或多种症状的发作或恶化的延迟。例如，当与治疗之前的受试者相比时或当与对照受试者或对照值相比时，如果受试者中存在所述疾病的一种或多种症状的约10％减轻，那么所公开的方法被视为治疗。因此，所述减轻可为约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100％或其间任何减轻量。

[0205] 如通篇所用，受试者意指个体。所述受试者可为成年受试者或儿科受试者。儿科受试者包括年龄介于出生至十八岁范围内的受试者。因此，小于约10岁、五岁、两岁、一岁、六月龄、三月龄、一月龄、一周龄或一日龄的儿科受试者也作为受试者包括在内。优选地，所述受试者为哺乳动物，如灵长类动物，并且更优选为人类。非人类灵长类动物也是受试者。术语受试者包括家养动物(如猫、狗等)、家畜(例如牛、马、猪、绵羊、山羊等)和实验室动物(例如雪貂、南美栗鼠、小鼠、兔、大鼠、沙鼠、豚鼠等)。因此，本文中预期兽医用途和医学制剂。

[0206] 公开可用于所公开的方法和组合物的产物、可结合所公开的方法和组合物的产物使用、可用于制备所公开的方法和组合物的产物或作为所公开的方法和组合物的产物的材料、组合物和组分。这些和其他材料公开于本文中，并且应理解，当公开这些材料的组合、子集、相互作用、组等时，虽然可能未明确地公开对这些化合物的每一种不同的个别和集合组合和排列的特定提及，但每一者均特定地涵盖于并且描述于本文中。例如，如果公开并且论述一种方法并且论述了可对包括于所述方法中的多种分子进行的多种修饰，那么除非特定地相反指示，否则特定地预期所述方法的每一种组合和排列，和可能的修饰。同样，也特定地预期并且公开其任何子集或组合。这一概念适用于本公开的所有方面，包括但不限于使用所公开的组合物的方法步骤。因此，如果可执行多个额外步骤，那么应理解这些额外步骤中的每一者均可与所公开的方法的任何特定方法步骤或方法步骤的组合一起执行，并且特定地预期每一种此类组合或组合的子集并且应将其视为公开的。

[0207] 本文所引用的公布和所述公布被引用的材料由此特定地以全文引用的方式并入。

[0208] 实施例

[0209] 噻吩并[3,2-b]吡啶衍生物的合成和表征

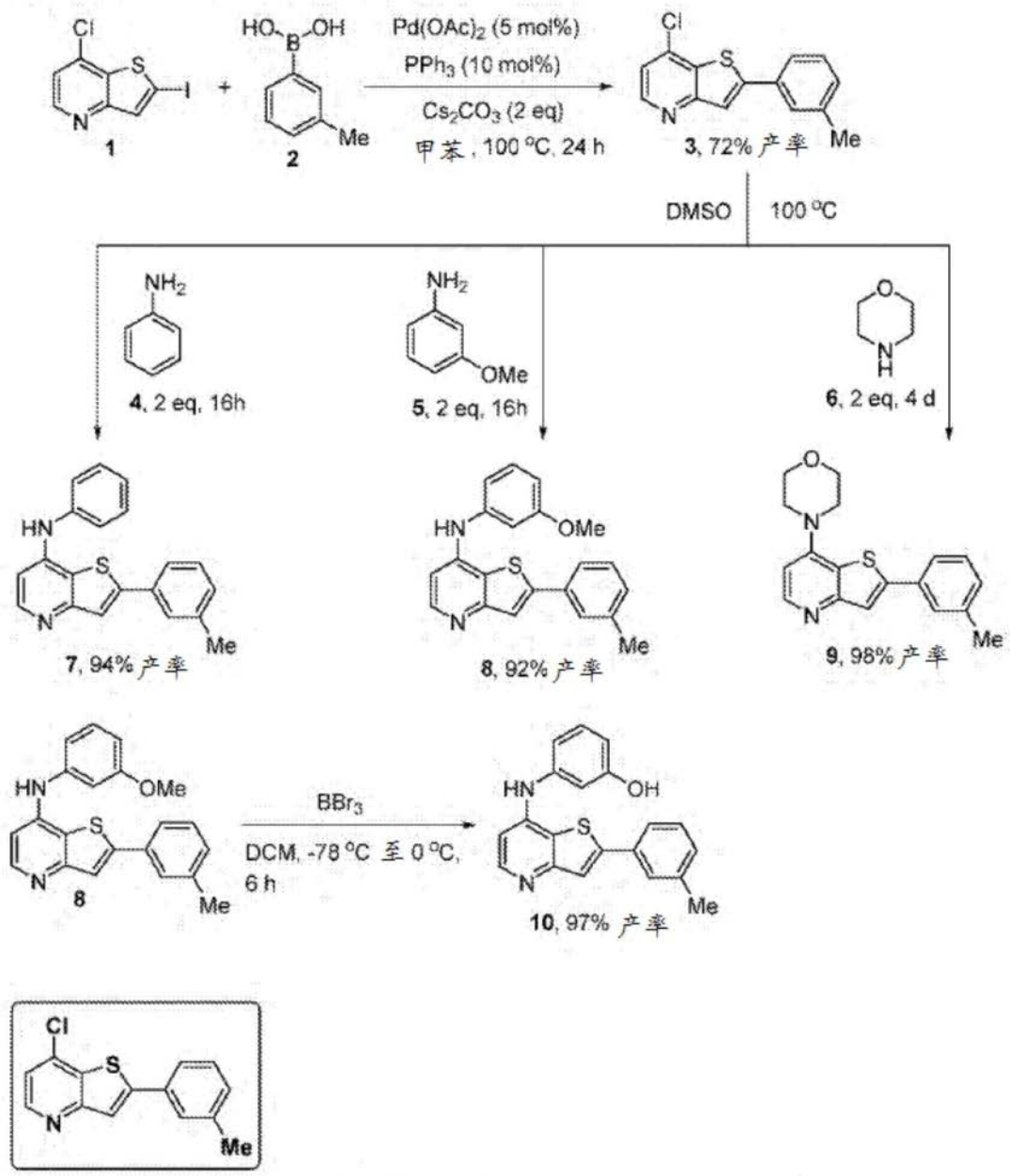
[0210] 一般信息

[0211] 市面上有售的7-氯-2-碘噻吩并[3,2-b]吡啶(1)、间甲苯基硼酸(2)、苯胺(4)、间茴香胺(5)、吗啉(6)、试剂、催化剂和溶剂按购买形式使用，而无进一步纯化。NMR谱在400MHz(^{1}H NMR)和100MHz(^{13}CNMR)下在氘化溶剂中获得。如下文所述，反应产物通过硅胶柱色谱(粒径40-63μm)纯化。

[0212] 合成方法和化合物表征

[0213] 合成噻吩并[3,2-b]吡啶化合物7-10

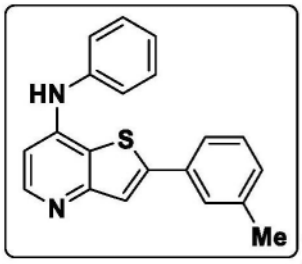
[0214]



[0215] 7-氯-2-(间甲苯基)噻吩并[3,2-b]吡啶(3)。7-氯-2-碘噻吩并[3,2-b]吡啶(1)(500mg,1.69mmol)、3-甲基苯基硼酸(2)(230mg,1.69mmol)、乙酸钯(II)(19mg,0.084mmol)、三苯膦(44mg,0.169mmol)和碳酸铯(1.101g,3.38mmol)在15mL甲苯中的混合物在回流下加热持续24h。所述反应混合物冷却至室温并且分配于水与二氯甲烷之间。有机层用饱和氯化钠水溶液洗涤,经硫酸钠干燥,过滤,并且在真空中浓缩。粗产物通过硅胶快速色谱使用已烷-乙酸乙酯(8:2)作为流动相来纯化。获得呈无色固体状的化合物3,产率为72%(315mg,1.21mmol)。R_f=0.2(已烷/EtOAc,1:1);^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ=8.54(d,J=5.1Hz,1H),7.73(s,1H),7.55-7.52(m,2H),7.34(dd,J=7.8,7.8Hz,1H),7.23(m,1H),7.21(d,J=5.1Hz,1H),2.42(s,3H);^{13}CNMR(100MHz,氯仿-d)δ=158.2,149.6,148.2,139.0,137.6,133.2,133.0,130.4,129.2,127.3,123.8,120.8,118.6,21.5;$C_{14}H_{10}ClNS$的分析计算值:C,64.74;H,3.88;N,5.39。实验值:C,64.76;H,4.05;N,5.28。

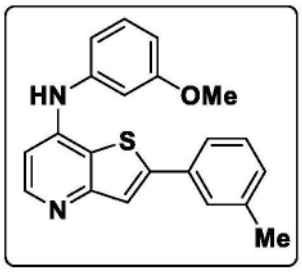
[0216] 关于亲核性芳族取代反应的一般程序

[0217] 向5mL压力容器中装入7-氯-2-(间甲苯基)噻吩并[3,2-b]吡啶(3)(0.3mmol)、所述胺(0.6mmol)和DMSO(1.0mL)。所述压力容器接着放置于100℃油浴中并且搅拌持续16h至4天。在基于^{1}H NMR分析实现完全转化后,所述反应混合物用EtOAc萃取并且用水洗涤。组合的有机层经硫酸钠干燥并且在真空中去除溶剂。如下文所述,粗产物通过硅胶快速色谱使用已烷-乙酸乙酯作为流动相来纯化。

[0218] 

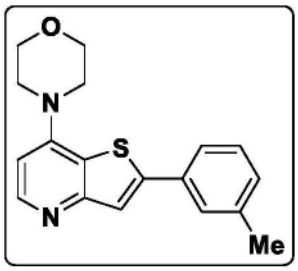
BK-40143

[0219] N-苯基-2-(间甲苯基)噻吩并[3,2-b]吡啶-7-胺(7)。根据上文所述的一般程序,在100℃下16小时后,由1mL DMSO中的7-氯-2-(间甲苯基)噻吩并[3,2-b]吡啶(78mg,0.3mmol)和苯胺(56mg,0.6mmol)获得呈无色固体状的化合物7,产率为94%(89mg,0.282mmol)。R_f=0.2(已烷/EtOAc,1:1);^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ=8.38(m,1H),7.70(s,1H),7.57-7.50(m,2H),7.43-7.38(m,2H),7.37-7.23(m,3H),7.21-7.17(m,2H),6.90(m,1H),6.15(s,1H),2.43(s,3H);^{13}C NMR(100MHz,氯仿-d)δ=158.5,148.9,146.5,145.9,139.4,139.0,133.7,129.9,129.7,129.6,129.1,127.3,124.8,123.8,122.7,122.5,121.6,120.7,102.6,21.6;$C_{20}H_{16}N_2S$的分析计算值:C,75.92;H,5.10;N,8.85。实验值:C,75.71;H,5.32;N,9.11。

[0220] 

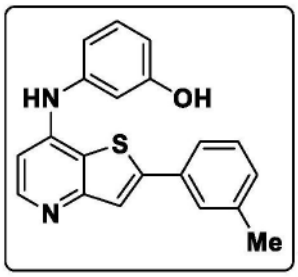
BK40195

[0221] N-(3-甲氧基苯基)-2-(间甲苯基)噻吩并[3,2-b]吡啶-7-胺(8)。根据上文所述的一般程序,在100℃下16小时后,由1mL DMSO中的7-氯-2-(间甲苯基)噻吩并[3,2-b]吡啶(78mg,0.3mmol)和间茴香胺(74mg,0.6mmol)获得呈无色固体状的化合物8,产率为92%(95mg,0.276mmol)。R_f=0.2(已烷/EtOAc,2:1);^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ=8.41(d,J=5.6Hz,1H),7.70(s,1H),7.58-7.51(m,2H),7.36-7.29(m,2H),7.21(d,J=7.9Hz,1H),6.96(d,J=5.6Hz,1H),6.87(dd,J=7.9,2.4Hz,1H),6.83(dd,J=7.8,7.7Hz,1H),6.73(dd,J=7.9,2.5Hz,1H),6.07(s,1H),3.83(s,3H),2.44(s,3H);^{13}C NMR(100MHz,氯仿-d)δ=160.8,158.6,148.9,146.5,145.6,140.7,139.0,133.7,130.5,130.0,129.1,127.3,123.8,121.7,120.9,114.5,110.1,108.1,103.0,55.5,21.6;$C_{21}H_{18}N_2OS$的分析计算值:C,72.80;H,5.24;N,8.09。实验值:C,72.53;H,5.61;N,8.19。

[0222] 

BK40197

[0223] 4-(2-(间甲苯基)噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基)吗啉(9)。根据上文所述的一般程序,在100℃下4天后,由1mL DMSO中的7-氯-2-(间甲苯基)噻吩并[3,2-b]吡啶(78mg,0.3mmol)和吗啉(52mg,0.6mmol)获得呈无色固体状的化合物9,产率为98%(91mg,0.294mmol)。R_f=0.2(己烷/EtOAc,1:1);^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ=8.48(d,J=5.4Hz,1H),7.69(s,1H),7.59-7.52(m,2H),7.34(dd,J=7.9,7.8Hz,1H),7.20(dd,J=7.9,2.1Hz,1H),6.64(d,J=5.4Hz,1H),4.03-3.85(m,4H),3.54-3.39(m,4H),2.43(s,3H);^{13}C NMR(100MHz,氯仿-d)δ=158.8,153.0,149.0,146.6,139.0,133.6,129.9,129.1,127.2,123.7,123.4,121.4,105.9,66.9,49.7,21.6;$C_{18}H_{18}N_2OS$的分析计算值:C,69.65;H,5.85;N,9.02。实验值:C,69.89;H,5.72;N,9.38。

[0224] 

BK40196

[0225] 3-((2-(间甲苯基)噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基)氨基)苯酚(10)。在-78℃下在惰性气氛下,向N-(3-甲氧基苯基)-2-(间甲苯基)噻吩并[3,2-b]吡啶-7-胺(8)(69mg,0.2mmol)于无水二氯甲烷(3mL)中的溶液中添加三溴化硼(4当量)。所述混合物搅拌持续4h并且使反应温度达到0℃。在用1M HCl淬灭后,粗反应混合物用EtOAc萃取并且用水洗涤。组合的有机层经硫酸钠干燥并且在真空中去除溶剂。粗产物通过硅胶快速色谱使用DCM-MeOH(19:1)作为流动相来纯化。获得呈无色固体状的化合物10,产率为97%(64mg,0.194mmol)。R_f=0.4(DCM/MeOH,9:1);^{1}H NMR(399MHz,甲醇-d_4)δ=8.22(d,J=6.7Hz,1H),7.70(s,1H),7.65(s,1H),7.61(dd,J=7.5,2.1Hz,1H),7.40(dd,J=7.6,7.6Hz,1H),7.34-7.31(m,2H),6.93(d,J=6.7Hz,1H),6.88(m,1H),6.85-6.79(m,2H),2.44(s,3H);^{13}C NMR(100MHz,甲醇-d_4)δ=160.1,154.7,153.5,149.5,141.1,140.7,139.5,133.3,132.4,131.9,131.7,130.5,128.2,125.0,117.4,115.7,114.9,113.5,102.7,21.3;$C_{20}H_{16}N_2OS$的分析计算值:C,72.26;H,4.85;N,8.43。实验值:C,72.29;H,4.97;N,8.61。

[0226] 细胞培养

[0227] 大鼠神经母细胞瘤B35细胞在具有10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素/链霉素的杜氏改良伊格尔培养基(DMEM)中生长并且在37℃和5%CO_2下孵育。对于所述实验,细胞被转移至12孔板(目录号150628,ThermoFisher,Waltham,MA)中并且生长至至少70%汇合。用3μgP301L tau(目录号30145,Addgene)cDNA或3μg人类α-突触核蛋白cDNA使用Fugene HD转染

试剂(目录号E2311,Promega,Madison WI)执行瞬时转染持续24小时。细胞用溶解于DMSO中的1mM、100μM、10μM、1μM、0.1μM、0.01μM和0.001μM或相等5uL DMSO处理持续5小时。收集细胞培养基,并且使用钠-tris、EDTA、NP-40(STEN)缓冲液收获细胞并且在4℃下在10,000x g下离心持续20分钟,并且收集上清液。经由乳酸脱氢酶分析(目录号88954,Thermofisher)和MTT分析(目录号V13154,Thermofisher)确定细胞活力。通过去除培养基萃取蛋白质并且向细胞层中添加0.2ml 1x STEN缓冲液(50mM Tris(pH 7.6)、150mM NaCl、2mM EDTA、0.2% NP-40、0.2% BSA、20mM PMSF和蛋白酶混合液抑制剂),并且在冰上孵育持续10分钟。刮擦孔的底部并且使其在冰上再孵育持续10分钟。收集细胞溶解产物,存储于-80℃下,并且用于额外分析。

[0228] 药物制备

[0229] 分别具有310.1和316.4g/mol的分子量的化合物1(BK40197)和化合物2(BK40143)稀释于二甲亚砜(DMSO)中,达到100μM、10μM、1μM、0.1μM、0.01μM和0.001μM的最终浓度。药物存储于-80℃下。

[0230] MTT分析

[0231] 为了测量细胞活力,细胞在37℃和5% CO_2下用含有50μL溴化(3-[4,5-二甲基噻唑-2-基]-2,5-二苯基-四唑(MTT))的500μL杜氏改良伊格尔培养基(DMEM)孵育持续4小时。抽吸所述培养基,使得保留125uL培养基。甲臜盐溶解于250uL DMSO中。在570nm下,针对含有125uL培养基和MTT,以及250uL DMSO的空白读取吸光度。

[0232] 乳酸脱氢酶(LDH)分析

[0233] 通过评估在初始剂量后暴露于药物5小时之后从受损细胞释放至细胞培养基中的胞浆酶LDH定量地测量细胞毒性。收集细胞培养基,并且使等分试样与乳酸盐和NAD+偶联。LDH催化将乳酸盐转化为丙酮酸盐的反应以产生NADH。NADH又将四唑盐(INT)还原为红色甲臜产物。培养基中的LDH的量与甲臜的量成比例,甲臜的量在490nm下测量。从490nm下的吸光度减去为了测量仪器的背景信号而测量的680nm下的吸光度以计算LDH活性。

[0234] 细胞培养物转染和处理

[0235] 为了将α-突触核蛋白瞬时转染至大鼠神经母细胞瘤B35细胞中,使用FuGene® HD转染试剂(Promega Corporation,Madison,WI)。细胞在12孔皿中生长。孵育含有12μg cDNA、540μg含有2% FBS的DMEM和60μl FuGene®HD转染试剂的混合物持续10分钟。所述细胞用50μl FuGene®HD转染试剂/DNA混合物处理持续24小时。在转染后收获细胞,抽吸培养基,所述细胞用200ul钠Tris EDTA NP40(STEN)溶解缓冲液处理,接着从板中刮掉并且收集至1.5ml离心管中。

[0236] 小鼠治疗

[0237] 对以下小鼠进行实验:(a)TgAPP小鼠,其在小鼠胸腺细胞抗原1,θ(Thy1)启动子的控制下表达神经元源性人类APP基因770同种型,所述基因含有Swedish(K670N/M671L,Dutch E693Q和Iowa D694N突变(Davis等人"Early-onset and robust cerebral microvascular accumulation of amyloid beta-protein in transgenic mice expressing low levels of a vasculotropic Dutch/Iowa mutant form of amyloid beta-protein precursor,"The Journal of biological chemistry.279(19):20296-20306(2004);(b)rTg4510小鼠,其表达人类P301L tau并且具有指导人类四重复微管相关

蛋白tau的P301L突变型变体(4RONTau P301L)的表达的tet反应元件(TRE或tetO)和小鼠朊病毒蛋白启动子序列(PrP或Prnp)(Santacruz等人“Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function,”Science 309(5733):476-48(2005);或(c)TgA53T小鼠,其在朊病毒启动子的控制下表达突变型精氨酸-苏氨酸(A53T)人类α-突触核蛋白(Giasson等人“Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53Thuman alpha-synuclein,”Neuron34(4):521-533(2002)。小鼠接受每天腹膜内(i.p.)注射BK40143(BK)(Medicinal Chemistry Program,Georgetown University)、尼洛替尼(Nilo)(目录号S1033,Selleckchem Inc.,Houston,TX)、博舒替尼(bos)(目录号S1014,Selleckchem Inc.)或BK+Nilo、BK+Bos或Nilo+Bos以1.25mg/kg、2.5mg/kg或5.0mg/kg溶解于二甲亚砜(DMSO)(目录号D128-500,Fisher Scientific,Hampton,NH)中的组合溶液,或相等剂量的单独DMSO的治疗。如图例中所指定,治疗期为连续7天或连续21天。

[0238] Xmap

[0239] Xmap技术使用磁性微球,所述磁性微球在内部用两种荧光染料编码。通过这两种染料的精确组合,测量样品内的多种蛋白质。这些球中的每一者用特异性捕捉抗体涂布。所述捕捉抗体结合于检测抗体和报告分子,从而在珠粒的表面上完成反应。来自用5mg/kg、2.5mg/kg和1.25mg/kg BK40143或DMSO治疗的转基因Tg4510小鼠的25μl可溶性脑组织溶解产物在室温下用25μl检测抗体溶液和25μl混合珠粒溶液孵育过夜(16-20小时),所述混合珠粒溶液含有以下分析物:人类磷酸化tau(181)。在充分洗涤所述板之后,样品用添加至各孔中的25μl链霉亲和素-藻红蛋白孵育并且在室温下孵育持续30分钟。接着洗涤样品并且使其悬浮于100ul鞘液中。在再悬浮之后,在MAGPIX上用Xponent软件运行样品。使用5参数逻辑或样条曲线拟合方法来分析中值荧光强度(MFI)数据以计算样品中的分析物浓度。

[0240] 蛋白质萃取

[0241] 与DMSO治疗的小鼠相比,来自经治疗小鼠的脑在STEN溶解缓冲液[50mM钠Tris(pH 7.6)、150mM NaCl、2mM EDTA、0.2%NP-40、0.2% BSA、20mM PMSF和蛋白酶混合液抑制剂]中均质化,在48℃下在10 000g下离心持续20min,并且收集含有可溶性蛋白部分的上清液。通过SDS-NuPAGE Bis-Tris凝胶(Invitrogen,Carlsbad,CA)上的Western印迹(WB)和ELISA分析所述上清液。

[0242] 药物动力学研究

[0243] 用BK的i.p.注射对C57BL/6J小鼠注射一次。在2、4、6或12h收集脑和血清(每种药物n＝18,每个剂量和时间点n＝3)。用媒剂(DMSO)注射的动物用于背景减除。在甲醇/二氯甲烷(50:50)中制备药物储备溶液(各自大约1mg/mL)。单独地在甲醇/HPLC级水(50:50)中产生各标准物的连续稀释液以用于研究。通过将所述储备溶液混合于空白样品中来执行校准曲线标准物和品质样品(QC)的制备。血清和脑样品存储于-80℃下,接着在制备之前解冻至室温。将解冻的血清样品(20uL)注入含有100uL水的管中。500uL萃取溶剂、乙腈/甲醇(50:50)添加至所述样品中。使所述混合物涡旋并且在冰上孵育持续20min以加速蛋白质沉淀。在孵育后,再次使所述样品涡旋并且在4℃下在13,000rpm下离心持续20min。接着收集上清液并且将其转移至新管中,使用速比韦克(speed vac)干燥,并且在200uL甲醇/水(50:50)中复原。所述混合物再次在4℃下在13,000rpm下短暂离心持续20min200。接着将上清液

收集至质谱样品管帽中并且在质谱仪中运行。对于脑,将解冻的来自各动物的脑样品的一小部分转移至平底管中。添加200uL甲醇/水(90:10),并且使所述组织均质化。乙腈接着添加至所述混合物中,从而促进蛋白质沉淀。所述混合物接着在冰上孵育持续10min。在孵育后,使所述样品涡旋并且在210 4℃下在13,000rpm下离心持续20min。接着收集上清液并且将其转移至新管中,使用速比韦克干燥,并且在200uL甲醇/水(50:50)中复原。所述混合物在4℃下在13,000rpm下离心持续20min。接着将上清液收集至质谱样品管帽中并且在质谱仪中运行。所述样品在Acquity UPLC BEH C18 1.7μm,2.1×50mm柱上进行拆分,所述柱与以多反应监测(MRM)模式操作的三重四极杆质谱仪(Xevo-TQ-S,Waters Corporation)联机。针对两种分析物优化样品锥孔电压和碰撞能量以使用MassLynx软件(Waters Corporation)的"IntelliStart"特征获得针对母离子和子离子的最大离子强度。优化仪器参数以得到针对母离子[m/z=438.25]和子离子[m/z=357.33]的最大特异性和电离灵敏度。对所有MRM Q1/Q3离子对针对分析物的信号强度分等级以确保选择最强烈的前体和片段离子对用于基于MRM的定量。这种方法导致选择最大化各片段离子种类的产生的锥孔电压和碰撞能量。用六点至八点校准曲线执行分析,使样品队列随机化并且注射溶剂空白以评估样品携带。使用TargetLynx 4.1处理MRM数据。通过计算样品的过渡峰面积针对内部标准的峰面积归一化的比率来确定分析物的相对定量值。

[0244] 组织收集和蛋白质萃取。

[0245] 用甲苯噻嗪和氯胺酮的混合物(1:8)使动物深度麻醉,并且经由心脏穿刺收集500μl全血,在2000×g下离心以使血细胞沉淀,并且收集血清。为了从容器中洗出剩余血液并且降低污染,用25ml 1X磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)灌注动物持续5min。收集脑并且使其在1.0ml 1x STEN缓冲液中均质化。均质化样品在4℃下在12,000x g下离心持续20min,并且收集上清液(可溶性蛋白部分)并且存储于-80℃下。在去除上清液后萃取不溶性蛋白质。用1X STEN缓冲液洗涤组织集结粒。所述集结粒再悬浮于750ul 70%甲酸中并且在室温下孵育持续30min,随后在4℃下在28,000g下离心持续1h。收集上清液作为"不溶性部分"。来自70%甲酸部分的样品存储于-80℃下并且在使用之前即刻用1M Tris-碱(1:20)中和。使用Pierce BCA蛋白分析(ThermoFisher,23225)经由制造商的说明书定量蛋白水平。

[0246] 免疫印迹分析

[0247] 从小鼠脑溶解产物萃取的可溶性和不溶性蛋白在SDS NuPAGE Bis-Tris凝胶(目录号NP0301BOX,Invitrogen)上运行,并且用(1:1000)小鼠单克隆AT180(目录号MN1040,ThermoFisher)和(1:1000)小鼠单克隆AT8(目录号MN1020,ThermoFisher)探测磷酸化tau,用(1:3000)小鼠单克隆Tau-5抗体探测总tau,用(1:250)兔多克隆MCK10(目录号PA5-64780,ThermoFisher)探测磷酸化DDR1,用(1:5000)兔多克隆(目录号PA3-16717,ThermoFisher)探测泛素,用(1:1000)兔单克隆(目录号mAb 12994,Cell Signaling,Danvers,MA)探测Atg5,用(1:1000)兔单克隆(目录号mAb 3495,Cell Signaling)探测Beclin-1,并且用(1:8000)兔多克隆(目录号MAB1501R,EMDMillipore,Burlington,MA)探测肌动蛋白。在Amersham™Imager 600(GE Healthcare Life Sciences,Pittsburgh,PA)上,使用Super Signal™West Dura Extended持久性底物(目录号37071,ThermoFisher)使印迹显现。通过测密度术,使用Image J软件定量Western印迹。

[0248] 酶联免疫吸附剂分析(ELISA)

[0249] 在RT下使用用50μl第一抗体(3h)和100μl抗兔第二抗体(30min)检测的50μl(1μg/μl)细胞溶解产物执行人类α-突触核蛋白和p-tau ELISA。使用人类特异性ELISA(Invitrogen Inc.,Carlsbad,CA),根据制造商的方案来测量α-突触核蛋白水平。根据制造商的方案,在丝氨酸396处使用特异性tau测量Tau。每种样品都是一式两份。

[0250] 使用Milliplexed ELISA进行针对总Tau、AB_{40}和AB_{42}(Millipore目录号HNABTMAG60K)的ELISA。如上文所陈述,Xmap技术使用磁性微球,所述磁性微球在内部用两种荧光染料编码。通过这两种染料的精确组合,同时测量样品内的多种蛋白质。这些球中的每一者用特异性捕捉抗体涂布。所述捕捉抗体结合于检测抗体和报告分子,从而在珠粒的表面上完成反应。使用相同试剂平行分析在基线和52周处的所有样品,包括安慰剂和白藜芦醇。总计25μl可溶性蛋白在4℃下用25μl含有总Tau、AB_{40}和AB_{42}的混合珠粒溶液孵育过夜。在洗涤后,样品在室温下用25μl检测抗体溶液孵育持续1.5h。链霉亲和素-藻红蛋白(25μl)添加至含有25μl检测抗体溶液的各孔中。接着洗涤样品并且使其悬浮于100μl鞘液中。接着在MAGPIX上用Xponent软件运行样品。使用5参数逻辑或样条曲线拟合方法来分析中值荧光强度(MFI)数据以计算样品中的分析物浓度。根据制造商的方案,在来自1XSTEN缓冲液(参见上文)中的中脑溶解产物的组织可溶性萃取物上执行特异性p-Tau ser396(Invitrogen,KHB7031)、人类Tau thr181(Invitrogen,KHO0631)和Aβ1-42(Invitrogen,KHB3442)。

[0251] 行为

[0252] 转棒:将小鼠放置于配备有针对各小鼠的个别计时器的加速棒(目录号76-0770,Panlab,Harvard Apparatus)上。经4次试验、3次训练和1次测试对小鼠进行测试。训练小鼠在恒定的每分钟4转(rpm)下待在所述棒上持续至少5分钟,并且接着将经300秒逐渐地增加速度至40rpm,并且测量跌落的等待时间。

[0253] 旷场:将小鼠放置于旷场竞技装置(25cm×25cm)中持续60分钟。通过光电管光束沿着竞技地板追踪动物。在60-分钟试验期间,收集数据并且分析行进的总距离(cm)、移动所耗用的总时间(sec)和速度(距离/时间)。中心区在所述软件中以数位方式定义为所述装置的中心和中心区入口中的(25cm×25cm),记录在60-分钟试验期间行进的中心区距离(cm)和中心区中耗用的时间(sec)。

[0254] Morris水迷宫:水迷宫装置由填充有维持于25℃下的水的4-英尺-直径池(San Diego Instruments)组成并且用白漆制成不透明,并且以数位方式分成4个象限区(ANYMaze软件,San Diego Instruments)。迷宫外视觉线索悬挂于围绕所述池的壁上,并且隐蔽平台(4英寸直径)浸没于在'平台区'的中心处的水的表面下方1cm。训练由每天三次试验持续四天、随后第五天的探针试验组成。在三个进入点(每个非平台象限区中一个)之一处将小鼠引入所述池中,其中在一天当中使用每个进入点。所述平台的位置在整个训练期中保持恒定。给予小鼠60sec使其在平台上定位,并且在平台上保持10sec,接着取出所述小鼠。将60sec内未在平台上定位的小鼠放置于平台上持续10sec,接着从迷宫中取出。在第五天的探针试验期间,取出平台并且使用追踪软件(ANYMaze)来记录发现平台的等待时间、平台象限区、游泳速度和游泳路径。在治疗前和治疗后进行这一训练和探针试验范例。

[0255] 大理石掩埋测试:如先前所述[35]在修改下执行大理石掩埋测试。简单地说,20块具有15mm直径的大理石间隔开4cm,呈五排四块大理石,每块都在双倍大的大鼠笼中的轻柔包装的5-cm深玉米芯垫料的表面上。小鼠单独留在所述笼中持续30分钟。不了解所述治疗

的观察者对被掩埋的大理石的数目计数。对超过其大小的三分之二被掩埋的任何大理石计数。在治疗前和治疗后对每只小鼠评估一次并且将数据报告为每只动物掩埋的大理石的百分率的平均值±SEM。相继使用Kuskal-Wallis测试、Wilcoxon事后测试来确定用药物或DMSO治疗的小鼠的大理石掩埋的统计学显著性。

[0256] 统计学分析

[0257] 使用GraphPad Prism 8.0版(GraphPad software Inc.)执行所有统计学分析。对于涉及小鼠的实验,在图例中指示各实验中所用的样品大小(n)和雌性:雄性定量。对于使用细胞系的实验,报告独立的生物重复样品的数目(N)。数据以平均值±SEM呈递。当比较两组中的平均值时,执行双尾学生t测试或Welch氏t测试。当比较多个组的平均值时,相继执行单因子方差分析(ANOVA)、Tukey氏多重比较事后测试。星号或英镑符号表示各组之间或组内的实际p-值显著性(*<0.05,**<0.01,***<0.001,****<0.0001)并且在个别图例中注明。

[0258] 结果

[0259] 如图1(左图和中间图)所示,在16小时治疗后,在用1μMBK41043治疗的B35细胞中观察到神经保护效应,如分别通过如与对照相比,LDH的减少和MTT的增加所证明。图1(右图)示出在五小时治疗后,在减少的BK40143浓度下,经由LDH的减少存在细胞活力的逐步增加。

[0260] 图2示出在用pTau(左图)或α-突触核蛋白(右图)转染24小时并用BK41043治疗五小时后,B35细胞的细胞活力。

[0261] B35细胞在完全培养基中生长,并且使用FuGene HD转染试剂,根据制造商的说明书用人类突变型Tau和α-突触核蛋白的cDNA转染所述细胞。在24小时之时,经由ELISA发现与非转染细胞相比,所述转染已经产生显著较高量的磷酸化Tau和α-突触核蛋白。图3示出在24小时转染后的pTau(181)水平(左图),并且BK41043降低pTau转染的B35细胞中的pTau(181)水平(右图),返回对照水平。这在LDH水平无任何变化的情况下发生,指示在实验期间毒性未增加。图4示出在24小时转染后的α-突触核蛋白水平(左图),并且BK41043未降低α-突触核蛋白转染的B35细胞中的α-突触核蛋白(右图)。

[0262] 图5示出在用BK40197治疗五小时后,B35细胞的细胞活力。

[0263] 图6示出在七天治疗后,BK40143降低Tau表达性转基因小鼠中的pTau(181)。pTau(181)水平经由ELISA测量。

[0264] 图7示出用BK-40143(1.25mg/kg、2.5mg/kg或5.0mg/kg)治疗不会影响转基因小鼠中的pTau(231)(AT180)水平。

[0265] 图8示出在用1.25mg/kg和2.5mg/kg的BK-41043治疗七天后,Tau转基因小鼠中的Tau(HT7)显著降低。

[0266] 图9示出用BK-40143(1.25mg/kg或2.5mg/kg)治疗导致DDR1的体内抑制,如通过磷酸化DDR1(pMCK10)的检测所测量。

[0267] 图10示出在用2.5mg/kg或5mg/kg BK-40143治疗后,CamP301L小鼠中的pTau降低。

[0268] 如图11所示,BK40196在高浓度下降低α-突触核蛋白并且BK40197未降低α-突触核蛋白。1mM和100uM BK40196显著降低转染的B35细胞中的α-突触核蛋白水平(图11A)。BK40197未展示任何降低转染的B35细胞中的α-突触核蛋白水平的能力(图11B)。

[0269] 如图12A所示,与DMSO治疗的对照A53T小鼠相比,BK-40143显著减少A53T小鼠中的α-突触核蛋白。C57BL/6J小鼠用作对照并且未示出可检测的(N.D.)人类α-突触核蛋白。图12B示出BK-40143未显著增加(约30%)多巴胺的总体水平,然而,BK-40143确实增加A53T小鼠中的多巴胺代谢物高香草酸(HVA)的水平,指示更多的多巴胺周转,其可能导致更好的多巴胺神经传递。图12C和图12D中关于α-突触核蛋白示出的免疫印迹(ThermoFisher,MA1-12874)反映出ELISA中可见的α-突触核蛋白的40%降低。

[0270] 动物研究还示出,BK-40143改进A53T小鼠的运动速度。A53T小鼠在旷场测试中经60-分钟试验测试总体运动能力。尽管所述小鼠在行进的总距离或移动所耗用的总时间方面未显示任何差异,其移动速度随着BK-40143治疗显著增加(图13)。这可能反映出更好的多巴胺神经传递,如通过BK之后增加的HVA水平所指示(图12B)。

[0271] 还示出BK40143选择性地使DDR不活化,而非Src或Abl,并且降低rTG4510 tau蛋白病变小鼠模型中的磷酸化tau。雄性和雌性3月龄rTG4530小鼠用1.25mg/kg、2.5mg/kg或5mg/kg BK40143或DMSO i.p.治疗,持续连续7天。图14A是活化(磷酸化)DDR1的免疫印迹探测,其证明了1.25和2.5而非5mg/kg BK40143使DDR1不活化。图14B是活化Src的免疫印迹探测,其证明了BK-40143未衔接这一酪氨酸激酶。图14C是活化Abl的免疫印迹探测,其证明了BK-40143未衔接这一酪氨酸激酶,即DDR1。在探测磷酸化Tau(AT8)时,图14D示出所有三种剂量的BK-40143均降低磷酸化tau水平达41-49%百分比。如图14E所示,磷酸化Tau(AT181)的ELISA披露出2.5mg/kg BK40143显著降低磷酸化Tau。

[0272] BK40143还显著降低淀粉样蛋白、磷酸化tau并且使DDR1不活化。雄性和雌性7月龄APP小鼠用1.25和2.5mg/kg BK40143或DMSO i.p.治疗,持续连续21天。聚集的细胞外淀粉样蛋白-β(6E10)的免疫印迹证明了1.25和2.5mg/kg BK40143显著降低淀粉样蛋白-β斑块(图15A)。磷酸化DDR1的探测证明了1.25和2.5mg/kg BK40143分别使DDR1不活化达40%和31%(图15B)。活化(磷酸化Abl(245)的探测证明了BK40143未衔接Abl(图15C)。图15D和图15E示出经由ELISA发现,1.25和2.5mg/kg BK-40143分别显著降低可溶性人类淀粉样蛋白-β,但未显著降低不溶性淀粉样蛋白-β。还示出2.5mg/kg BK40143显著降低人类磷酸化tau(Ser396)超过80%(图15F)。

[0273] 还示出BK40143可能改进APP小鼠在Morris水迷宫测试中的认知性能。APP小鼠在治疗后在morris水迷宫中测试其发现靶平台的能力。测量包括平台入口的数目(图16,左图)、第一个入口的等待时间(图16,中间图)和在其进入平台的第一个入口之前行进的距离(图16,右图)。尽管各组之间并无显著差异,1.25mg/kg BK-40143显示在较高数目的平台入口和第一个入口的较短等待时间以及在第一个入口之前行进的较短距离下,性能增加的趋势(图16)。

[0274] 研究还示出BK40143不会引起APP小鼠的海马中的细胞死亡。代表性20um海马切片针对尼氏体进行染色。图17示出DMSO、1.25mg/kg和2.5mg/kg BK40143的4x和20x图像(左图)。在imagej软件中将平均染色强度定量为所有4x图像中的尼氏染色的总量(图17,右图)。

[0275] 这些数据表明,式I化合物(例如BK41043或BK40197)可用于治疗或预防神经退行性病症、肌退行性病症或溶酶体贮积病症。

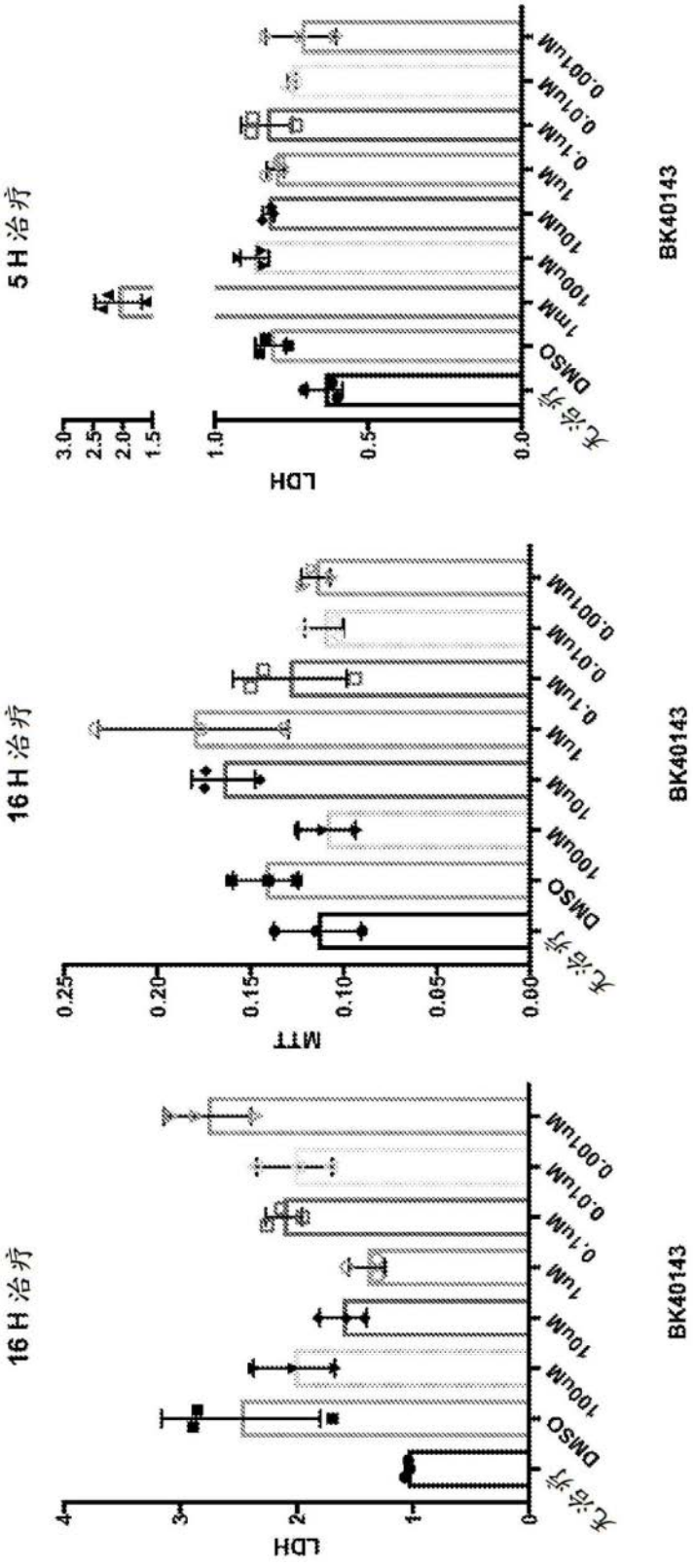

5 H 治疗
16 H 治疗
16 H 治疗
LDH
MTT
LDH
无治疗
DMSO
100uM
10uM
1uM
0.1uM
0.01uM
0.001uM
BK40143
BK40143
BK40143

图1

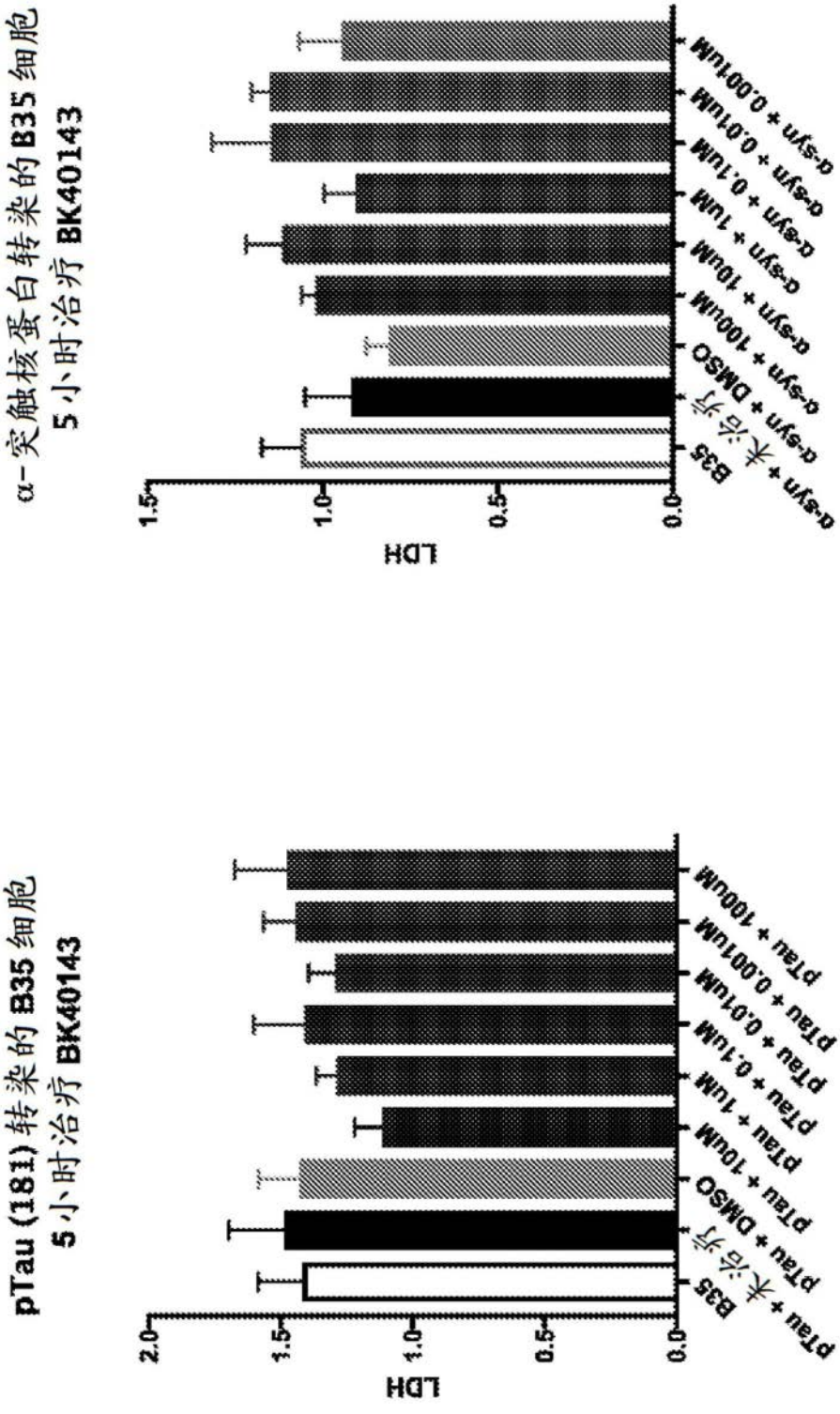
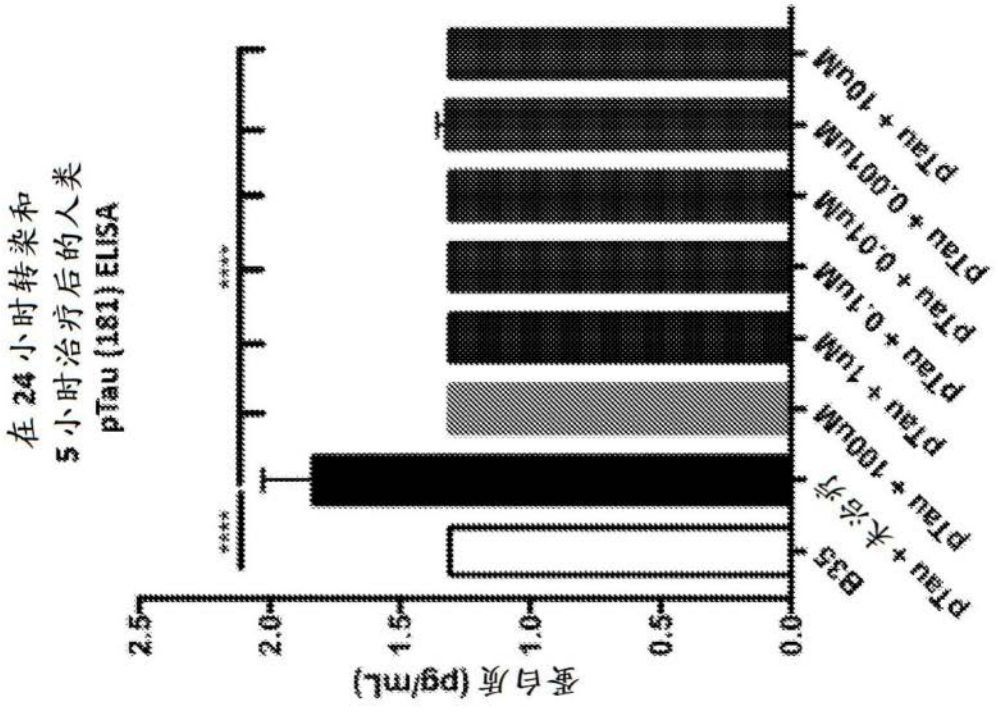

α-突触核蛋白转染的B35细胞
5小时治疗 BK40143
LDH
1.5
1.0
0.5
0.0
B35
未治疗
α-syn + DMSO
α-syn + 100uM
α-syn + 10uM
α-syn + 1uM
α-syn + 0.1uM
α-syn + 0.01uM
α-syn + 0.001uM
pTau (181) 转染的 B35 细胞
5小时治疗 BK40143
LDH
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
B35
未治疗
pTau + DMSO
pTau + 10uM
pTau + 1uM
pTau + 0.1uM
pTau + 0.01uM
pTau + 0.001uM
pTau + 100uM

图2


在 24 小时转染和
5 小时治疗后的人类
pTau (181) ELISA
蛋白质 (pg/mL)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
****
****
B35
pTau + 未治疗
pTau + 100uM
pTau + 1uM
pTau + 0.1uM
pTau + 0.01uM
pTau + 0.001uM
pTau + 10uM

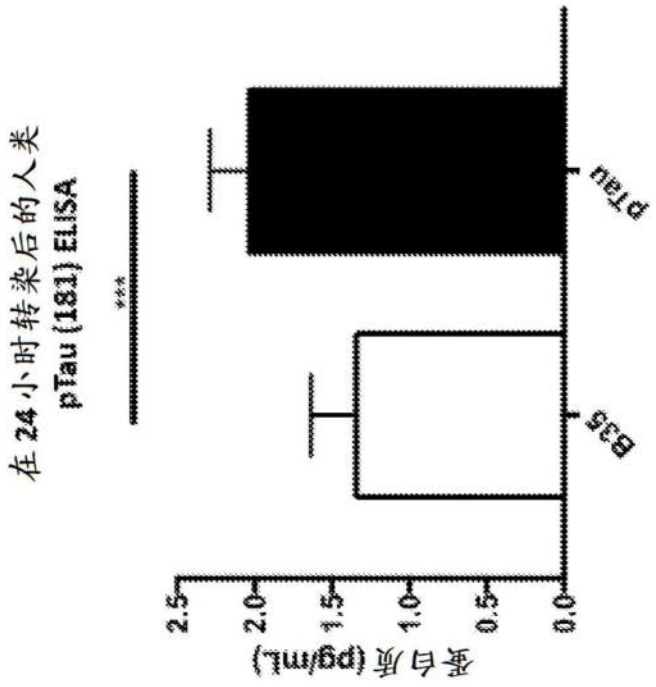

在 24 小时转染后的人类
pTau (181) ELISA
***
蛋白质 (pg/mL)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
B35
pTau

图3

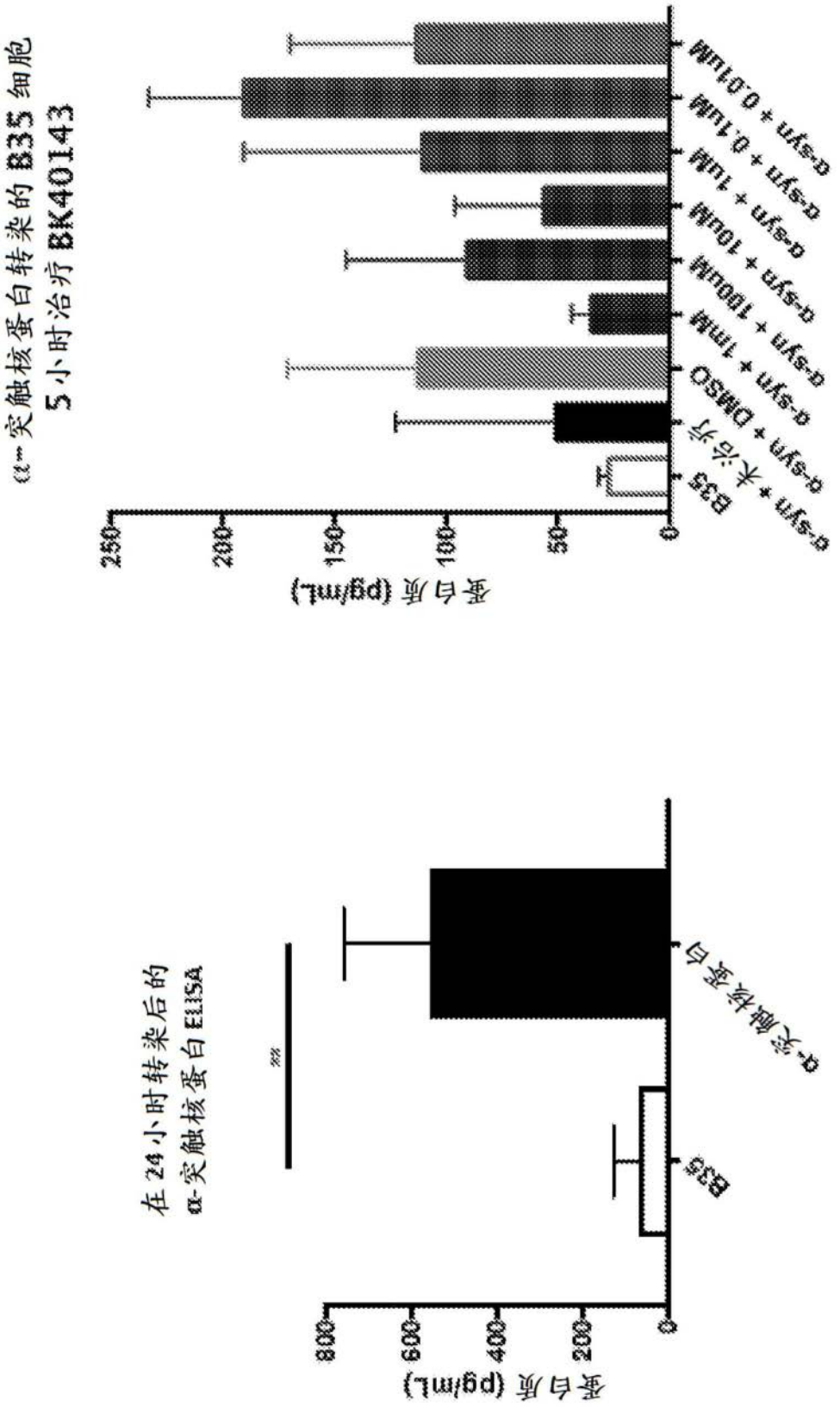

α-突触核蛋白转染的 B35 细胞
5 小时治疗 BK40143
蛋白质 (pg/mL)
250
200
150
100
50
0
B35
α-syn + 未治疗
α-syn + DMSO
α-syn + 1nM
α-syn + 100nM
α-syn + 10uM
α-syn + 1uM
α-syn + 0.1uM
α-syn + 0.01uM
在 24 小时转染后的
α-突触核蛋白 ELISA
蛋白质 (pg/mL)
800
600
400
200
0
B35
α-突触核蛋白

图4

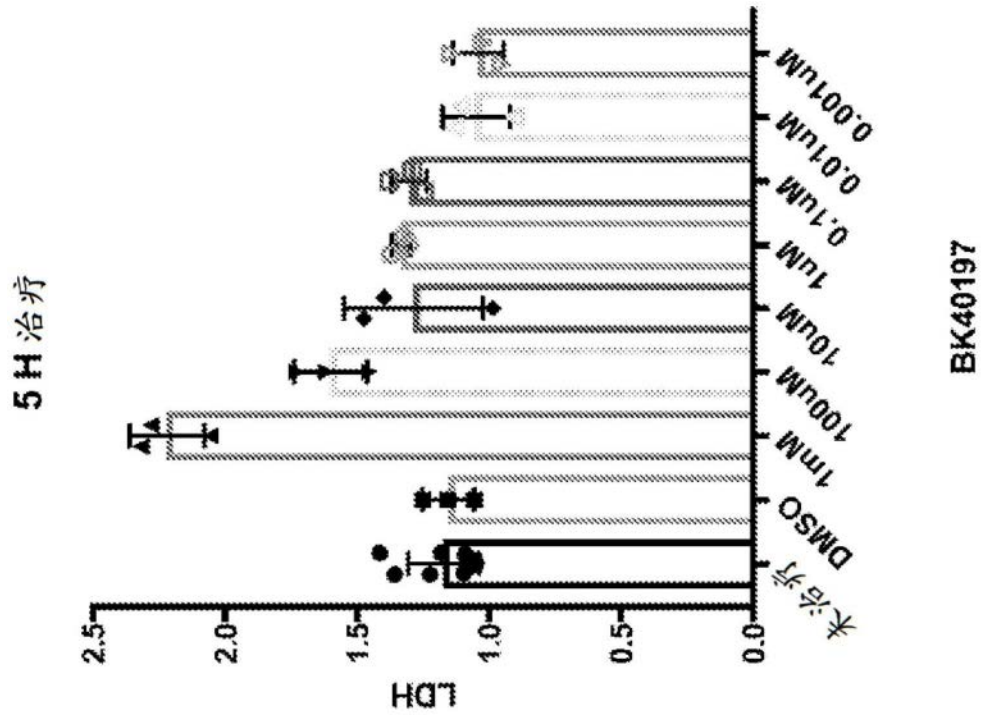

5 H 治疗
BK40197
LDH
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
未治疗
DMSO
1mM
100uM
10uM
1uM
0.1uM
0.01uM
0.001uM

图5

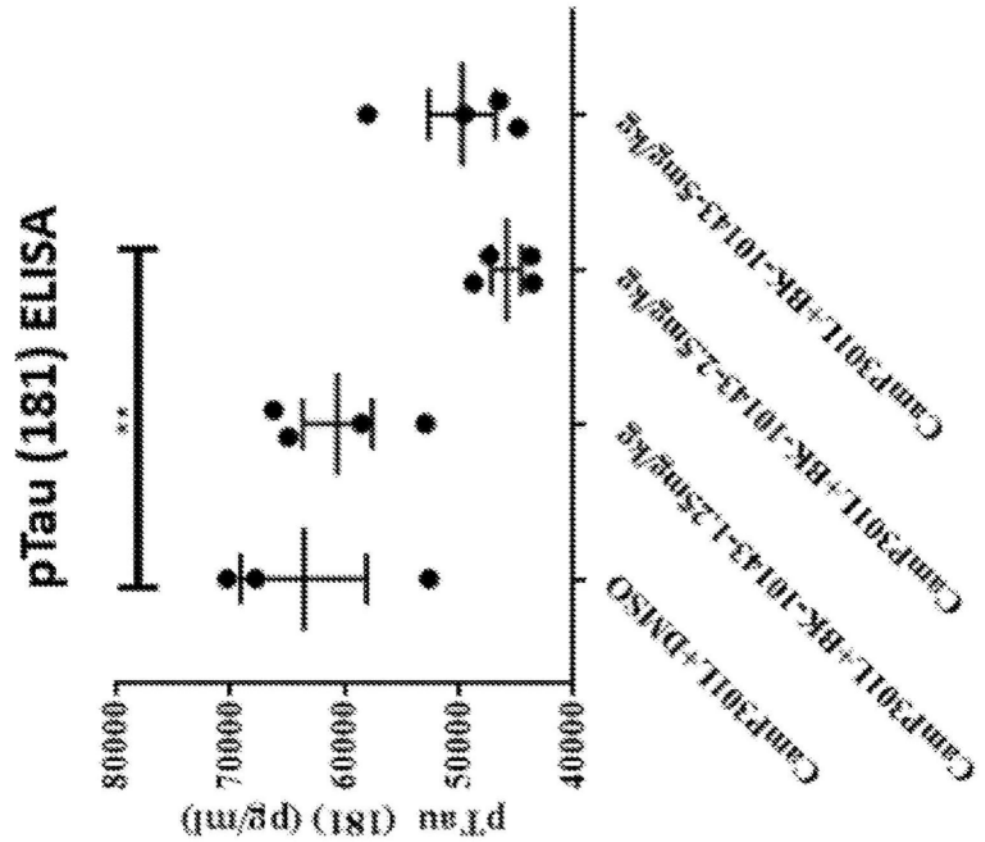

pTau (181) ELISA
pTau (181) (pg/ml)
80000
70000
60000
50000
40000
**
CamP3011+DMSO
CamP3011+BK-10143-1.25mg/kg
CamP3011+BK-10143-2.5mg/kg
CamP3011+BK-10143-5mg/kg

图6

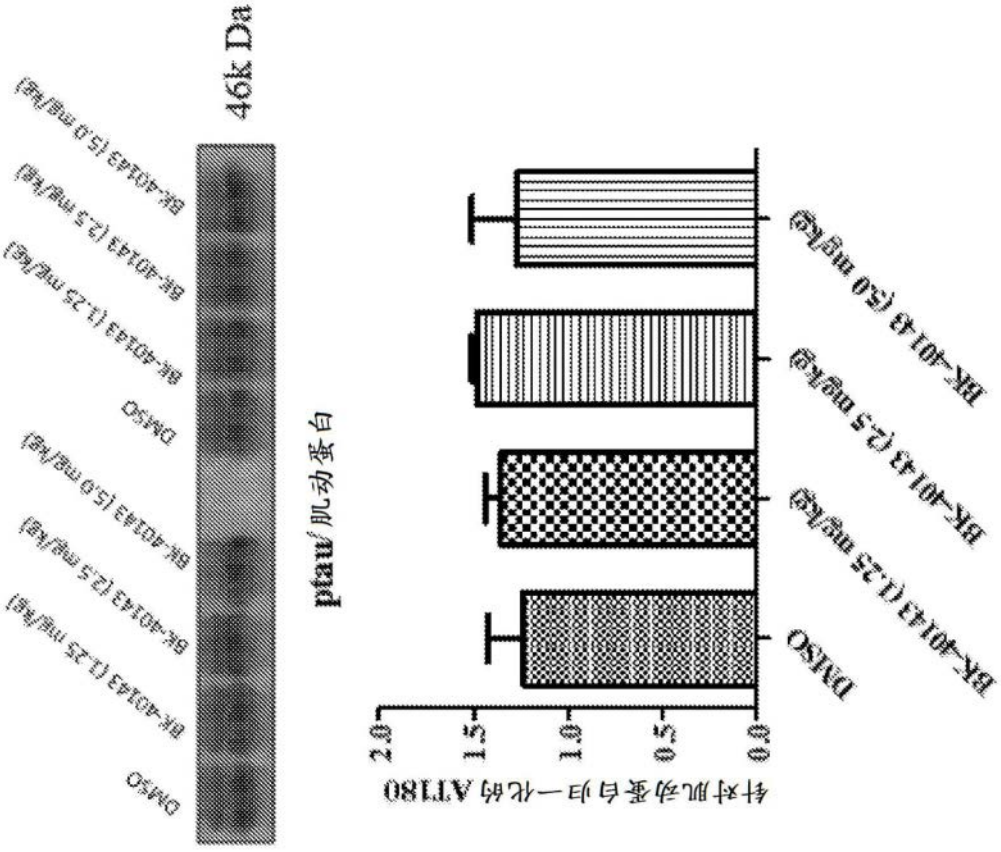

46k Da
ptau/肌动蛋白
DMSO
BK-40143 (1.25 mg/kg)
BK-40143 (2.5 mg/kg)
BK-40143 (5.0 mg/kg)
DMSO
BK-40143 (1.25 mg/kg)
BK-40143 (2.5 mg/kg)
BK-40143 (5.0 mg/kg)
针对肌动蛋白归一化的 AT180
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
DMSO
BK-40143 (1.25 mg/kg)
BK-40143 (2.5 mg/kg)
BK-40143 (5.0 mg/kg)

图7

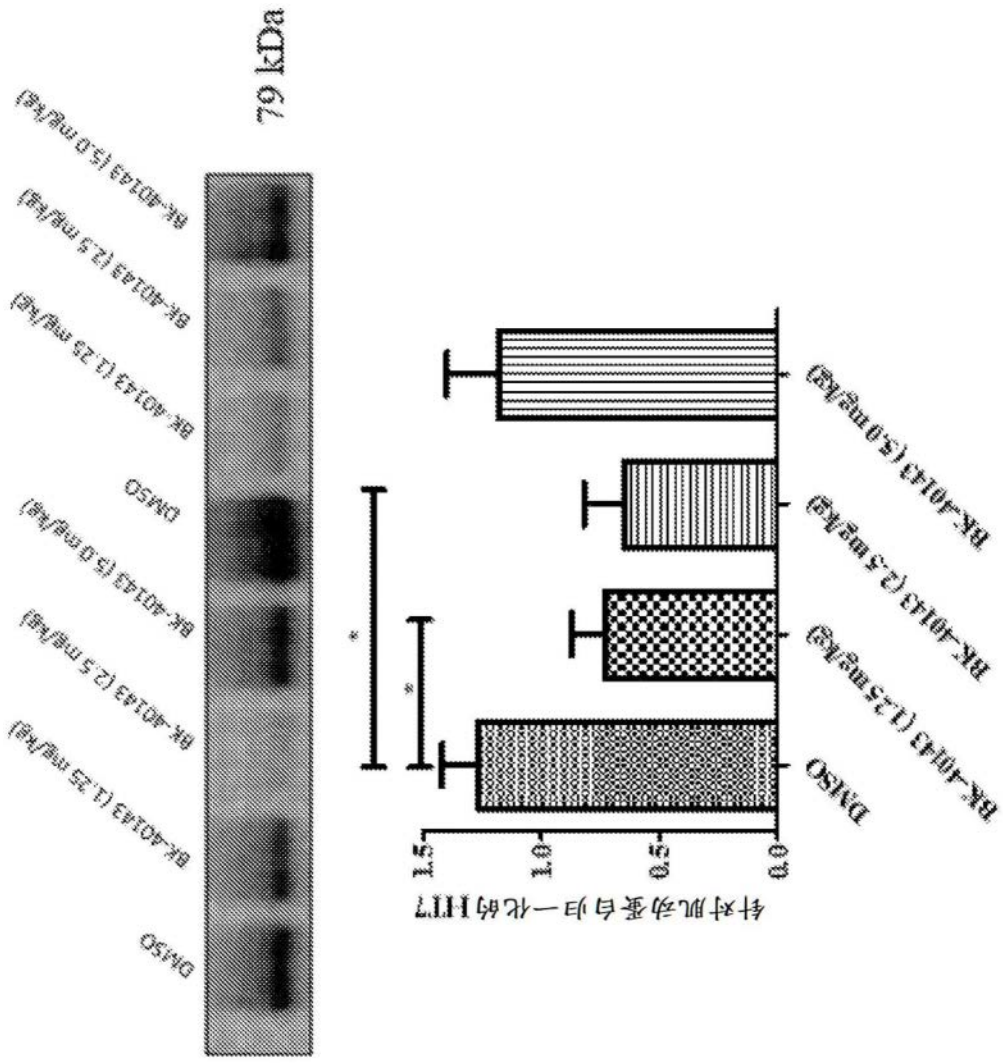

79 kDa
DMSO
BK-A01A3 (1.25 mg/kg)
BK-A01A3 (2.5 mg/kg)
BK-A01A3 (5.0 mg/kg)
DMSO
BK-A01A3 (0.25 mg/kg)
BK-A01A3 (2.5 mg/kg)
BK-A01A3 (5.0 mg/kg)
针对肌动蛋白归一化的 HIF1
1.5
1.0
0.5
0.0
DMSO
BK-A01A3 (1.25mg/kg)
BK-A01A3 (2.5 mg/kg)
BK-A01A3 (5.0 mg/kg)
*
*

图8

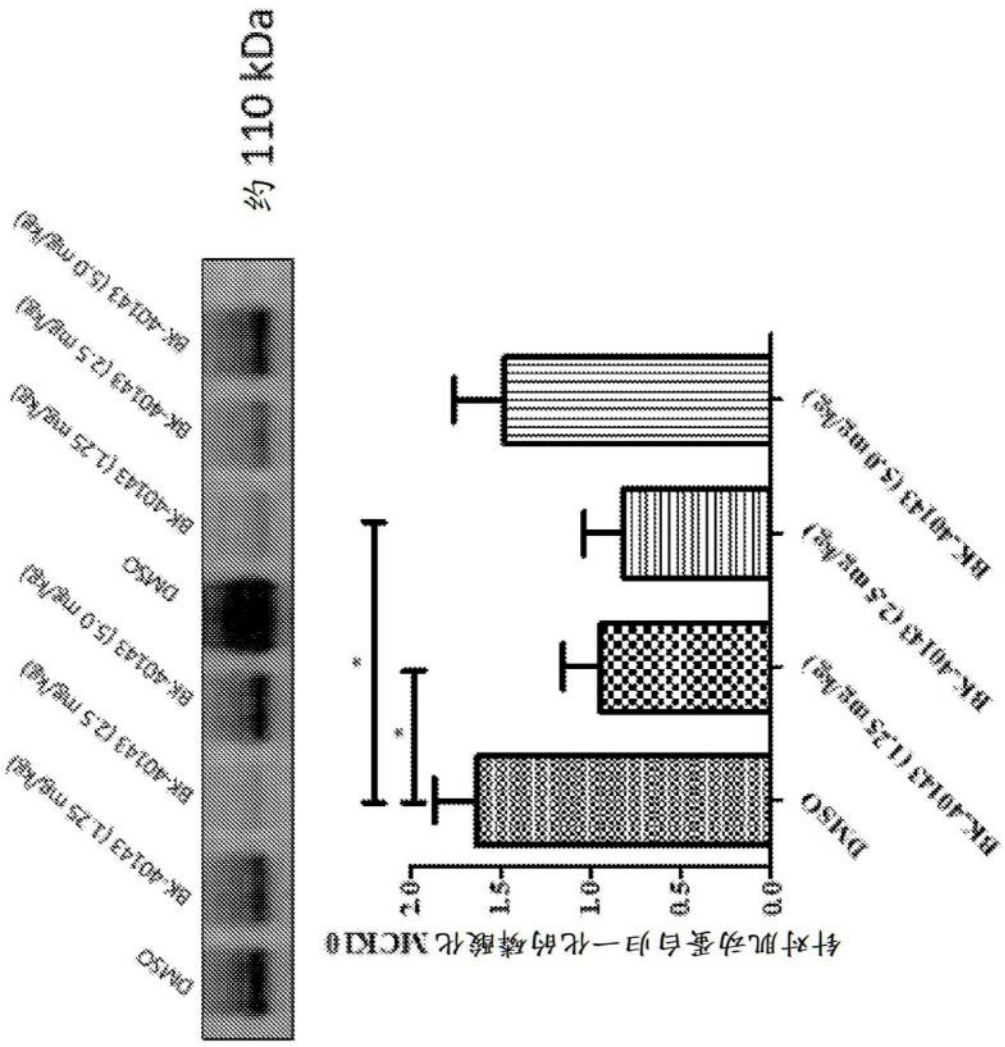

约 110 kDa
DMSO
BK-40143 (1.25 mg/kg)
BK-40143 (2.5 mg/kg)
BK-40143 (5.0 mg/kg)
DMSO
BK-40143 (1.25 mg/kg)
BK-40143 (2.5 mg/kg)
BK-40143 (5.0 mg/kg)
针对肌动蛋白归一化的磷酸化 MCK10
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
DMSO
BK-40143 (1.25 mg/kg)
BK-40143 (2.5 mg/kg)
BK-40143 (5.0 mg/kg)
*
*

图9

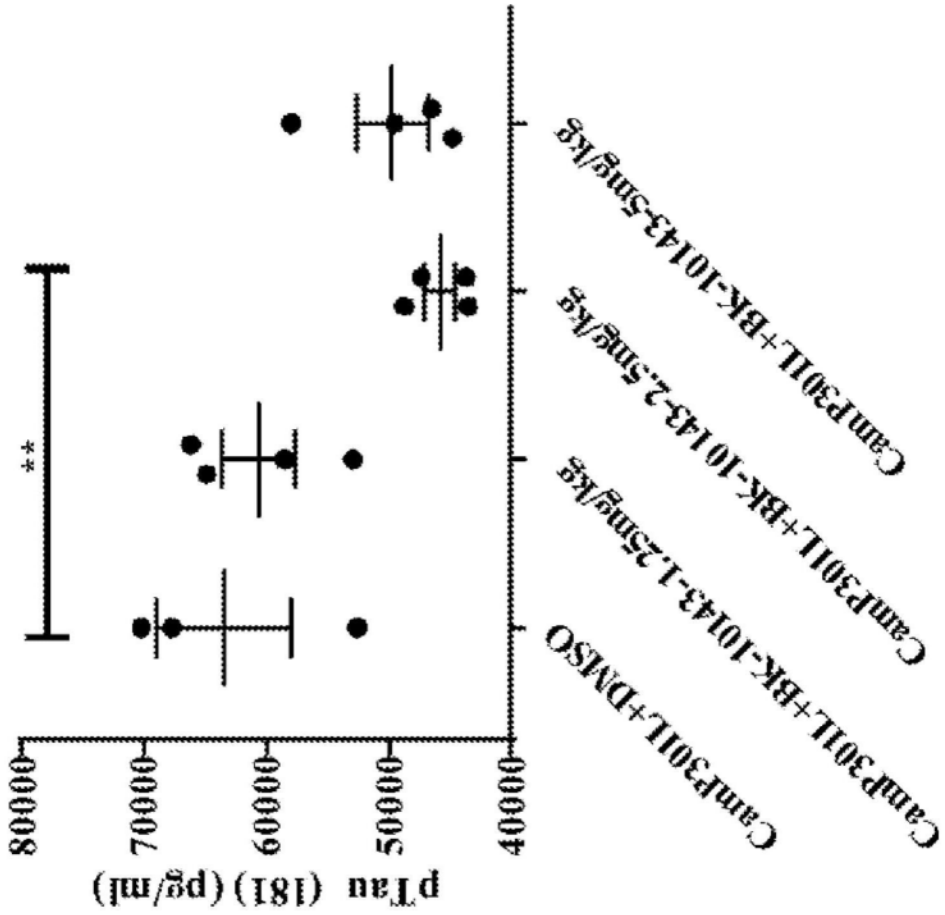

pTau (181) (pg/ml)
80000
70000
60000
50000
40000
**
CamP30IL+DMSO
CamP30IL+BK-1043-1.25mg/kg
CamP30IL+BK-1043-2.5mg/kg
CamP30IL+BK-1043-5mg/kg

图10

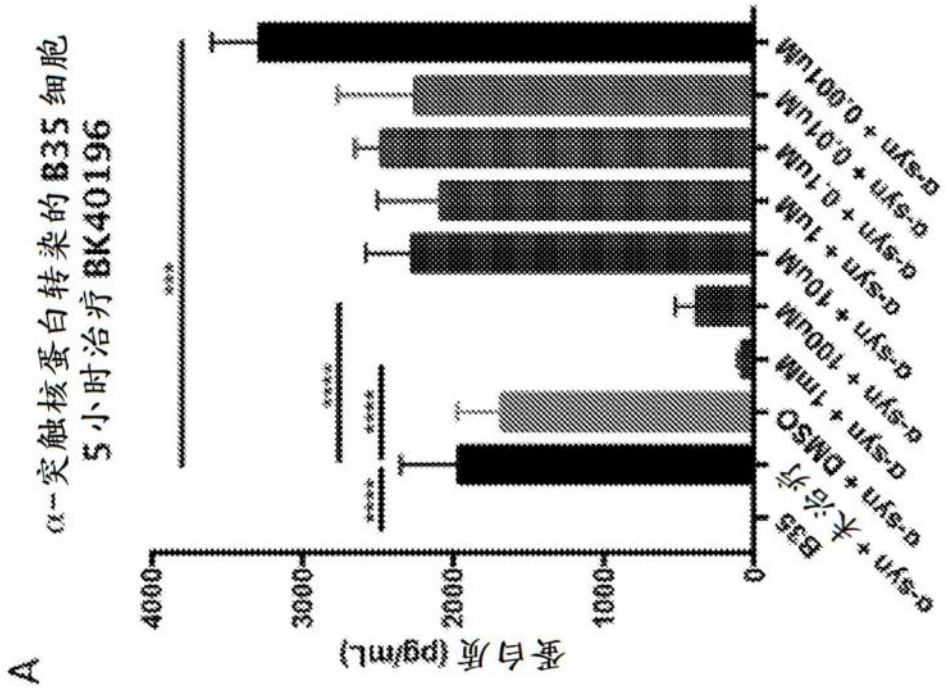

A
α-突触核蛋白转染的B35细胞
5小时治疗BK40196
蛋白质 (pg/mL)
4000
3000
2000
1000
0
B35
未治疗
DMSO
1mM
100uM
10uM
1uM
0.1uM
0.01uM
0.001uM
****
***

图11A

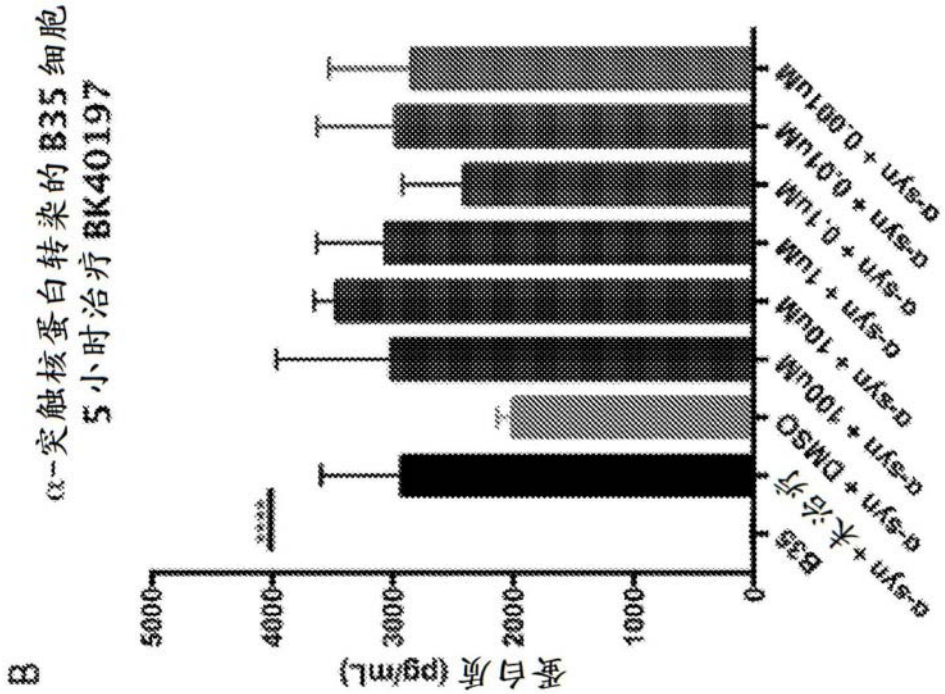

B
α-突触核蛋白转染的B35细胞
5小时治疗BK40197
蛋白质 (pg/mL)
5000
4000
3000
2000
1000
0
B35
未治疗
DMSO
100uM
10uM
1uM
0.1uM
0.01uM
0.001uM
****

图11B

A

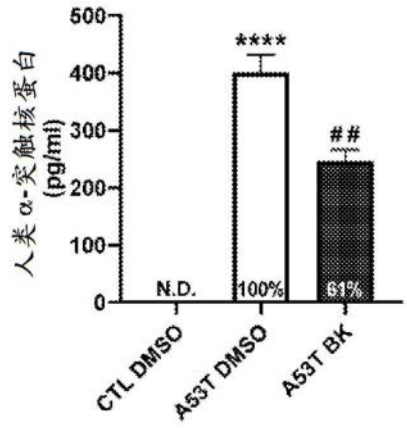


图12A

B

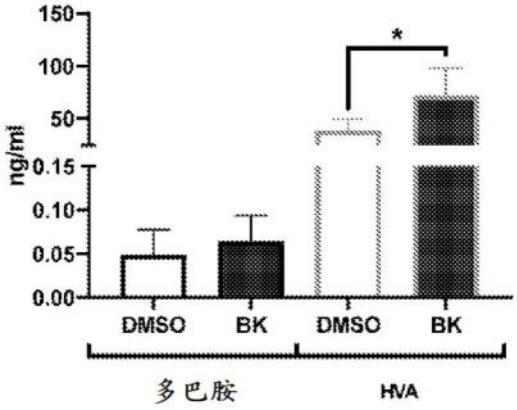


图12B

C

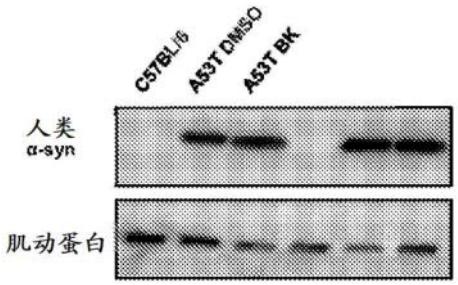


图12C

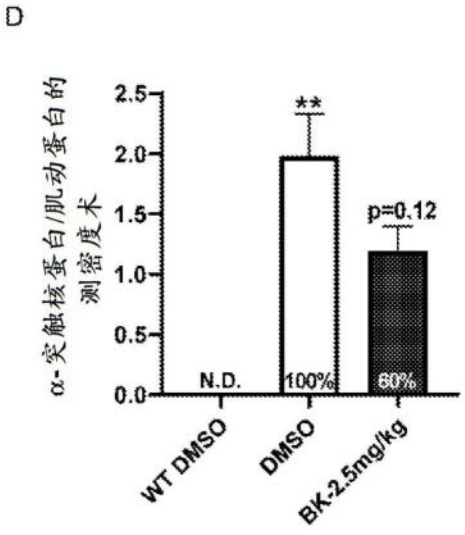

D
α-突触核蛋白/肌动蛋白的测密度术
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
p=0.12
N.D.
100%
60%
WT DMSO
DMSO
BK-2.5mg/kg

图12D

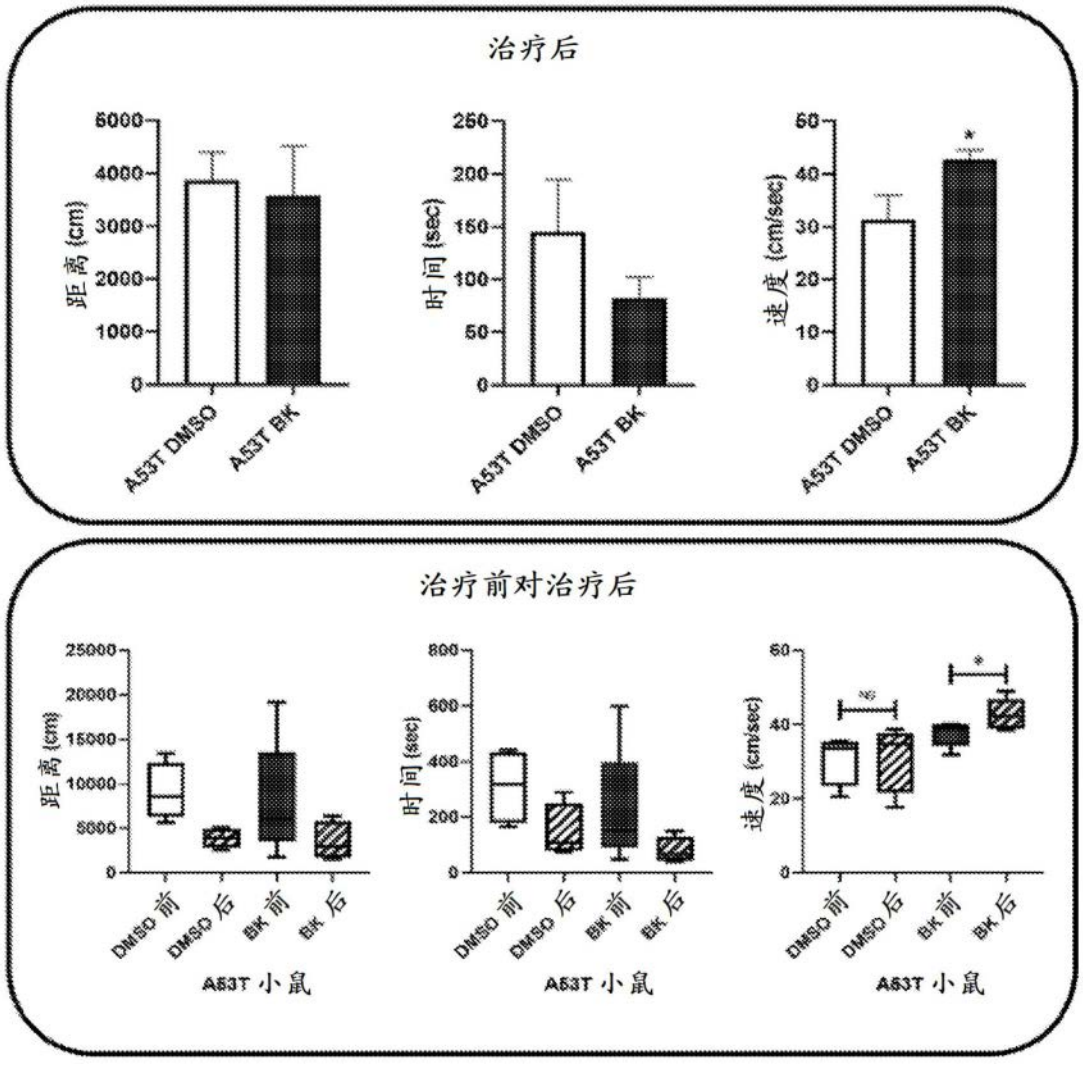

治疗后
距离 (cm)
时间 (sec)
速度 (cm/sec)
A53T DMSO
A53T BK
治疗前对治疗后
DMSO 前
DMSO 后
BK 前
BK 后
A53T 小鼠

图13

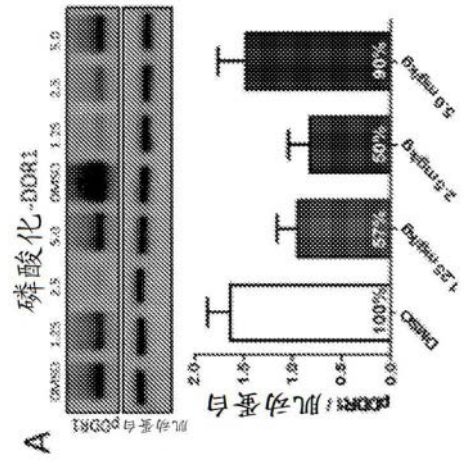


图14A

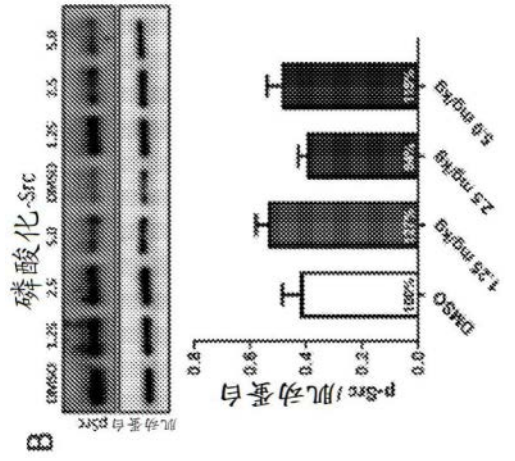


图14B

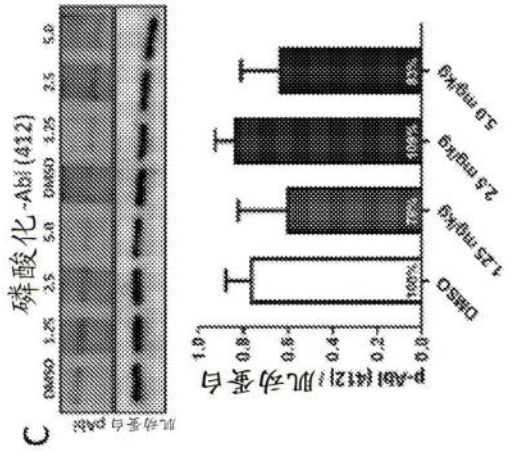


图14C

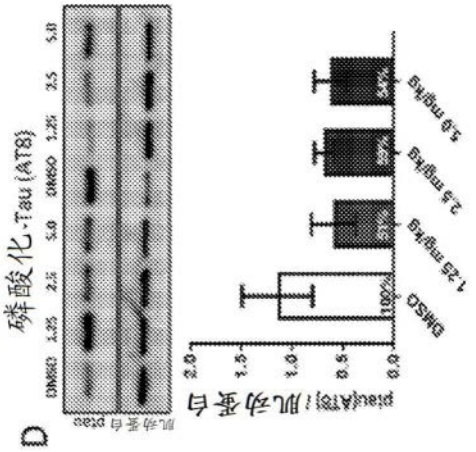

D
磷酸化-Tau (AT8)
肌动蛋白
ptau
DMSO
1.25
2.5
5.0
2.5
5.0
pTau(AT8)/肌动蛋白
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
100%
DMSO
1.25 mg/kg
2.5 mg/kg
5.0 mg/kg

图14D

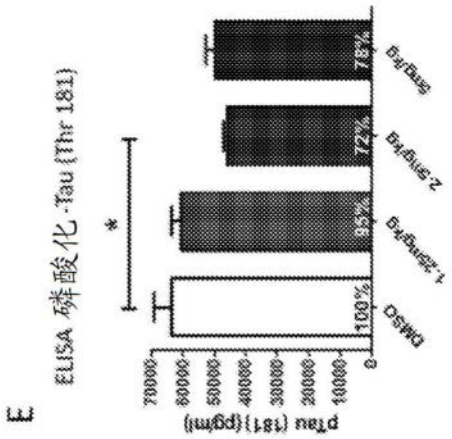
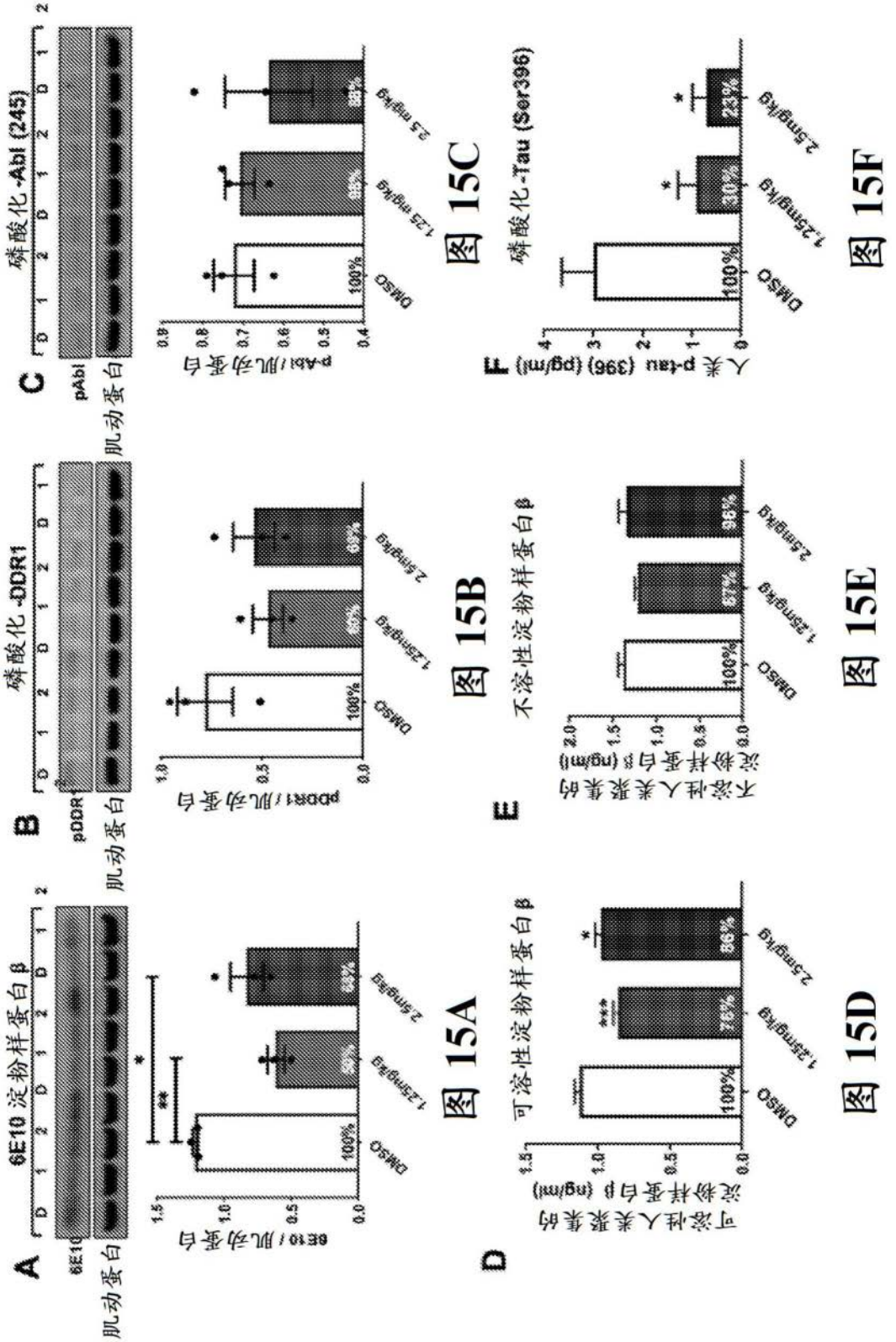

E
ELISA 磷酸化-Tau (Thr 181)
*
ptau (181) (pg/ml)
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
100%
85%
72%
78%
DMSO
1.25mg/kg
2.5mg/kg
5mg/kg

图14E


A
6E10 淀粉样蛋白β
6E10
肌动蛋白
6E10 / 肌动蛋白
DMSO
1.25mg/kg
2.5mg/kg
图 15A
B
磷酸化 -DDR1
pDDR1
肌动蛋白
pDDR1 / 肌动蛋白
图 15B
C
磷酸化-Abl (245)
pAbl
肌动蛋白
图 15C
D
可溶性淀粉样蛋白β
可溶性人类聚集的淀粉样蛋白β (ng/ml)
图 15D
E
不溶性淀粉样蛋白β
不溶性人类聚集的淀粉样蛋白β (ng/ml)
图 15E
F
磷酸化-Tau (Ser396)
人类 p-tau (396) (pg/ml)
图 15F

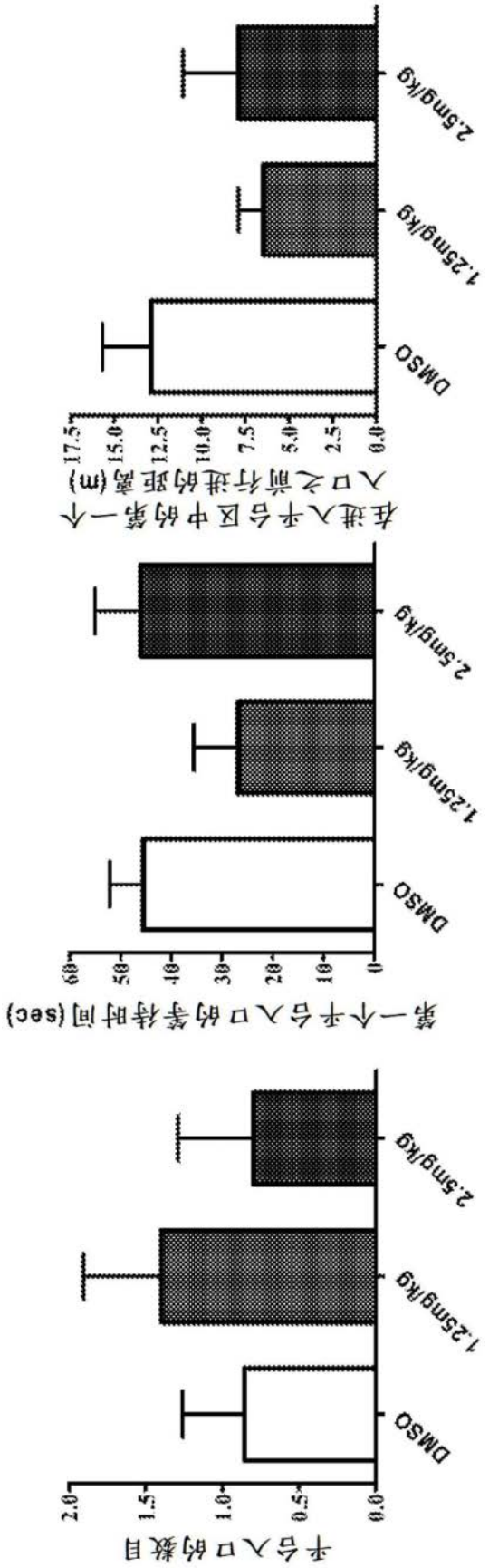

平台入口的数目
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
DMSO
1.25mg/kg
2.5mg/kg
第一个平台入口的等待时间(sec)
0
10
20
30
40
50
60
DMSO
1.25mg/kg
2.5mg/kg
在进入平台区中的第一个
入口之前行进的距离(m)
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0
17.5
DMSO
1.25mg/kg
2.5mg/kg

图16

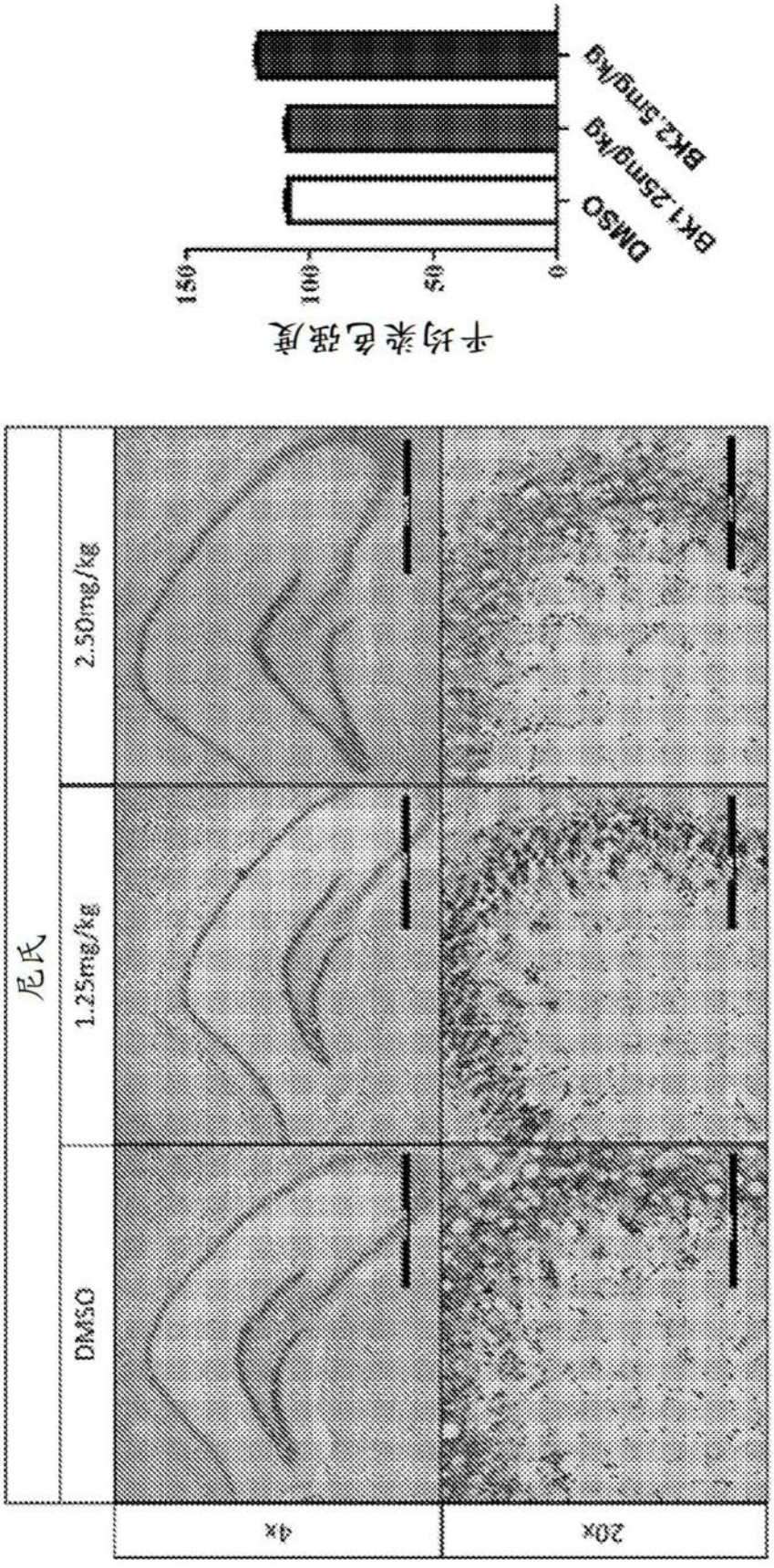

平均染色强度
150
100
50
0
DMSO
BK1.25mg/kg
BK2.5mg/kg
尼氏
DMSO
1.25mg/kg
2.50mg/kg
4x
20x

图17