

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：9212/162

※ 申請日期：92-8-01

※IPC 分類：007D41/045

A61K31/4429

壹、發明名稱：(中文/英文)

用作 GSK-3 抑制劑之組合物

COMPOSITIONS USEFUL AS INHIBITORS OF GSK-3

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商維泰克斯製藥公司

VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED

代表人：(中文/英文)

肯尼斯 S. 伯格

KENNETH S. BOGER

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國麻薩諸塞州劍橋市威佛里街 130 號

130 WAVERLY STREET, CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02139,
U.S.A.

國籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

參、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 克娜麗亞 J. 佛思特

CORNELIA J. FORSTER

2. 賴瑞 C. 派克

LARRY C. PARK

3. 馬瑞恩 W. 溫漢每克

MARION W. WANNAMAKER

4. 姚揚梅

YUNG-MAE YAO

住居所地址：(中文/英文)

1. 美國新漢普西爾州珮翰市南西大道 8 號

8 NANCY AVENUE, PELHAM, NEW HAMPSHIRE 03076, U.S.A.

2. 美國麻州渥特漢市史登斯丘路 6206 號

6206 STEARNS HILL ROAD, WALTHAM, MASSACHUSETTS

02451, U.S.A.

3. 美國麻州史透市哈佛路 375 號

375 HAVARD ROAD, STOW, MASSACHUSETTS 01775, U.S.A.

4. 美國麻州紐頓市扶頓街 54 號

54 FULLER STREET, NEWTON, MASSACHUSETTS 02468,

U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 U.S.A.

2. 美國 U.S.A.

3. 美國 U.S.A.

4. 美國 U.S.A.

肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項☐第一款但書或☐第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

☒ 本案申請前已向下列國家（地區）申請專利：

1.美國；2002 年 08 月 02 日；60/400,967

2.

3.

4.

5.

☒ 主張國際優先權(專利法第二十四條)：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1.美國；2002 年 08 月 02 日；60/400,967

2.

3.

4.

5.

☐ 主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明：

相關申請案之交叉文獻

本申請案主張優先於2002年8月2日申請之美國臨時專利申請案60/400,967之權益，其揭示內容已以引用之方式併入本文中。

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關蛋白質激酶，尤指肝糖合成酶激酶-3 (GSK-3)，即絲胺酸/蘇胺酸蛋白質激酶之抑制劑。本發明亦提供包含本發明抑制劑之組合物及利用彼等組合物治療多種病變之方法，如：糖尿病、阿茲海默氏症、亨丁頓氏症、帕金森氏症、多發性硬化(MS)、中風、神經性與神經變性病變及精神病。

【先前技術】

近年來著重於尋求新穎醫療劑之作法對了解與目標疾病有關之酵素及其他生物分子之結構有極大助益。其中一種已積極探討之酵素為蛋白質激酶。

蛋白質激酶可媒介細胞內訊號轉導，使核苷三磷酸之磷酸基轉移至涉及訊號途徑之蛋白質受體。細胞外刺激及其他刺激透過許多種激酶與途徑引起細胞內發生多種細胞反應。此等刺激實例包括環境與化學壓力訊號(例如：滲透壓衝擊、熱衝擊、紫外線照射、細菌性內毒素與 H_2O_2)、細胞素(例如：間白素-1 (IL-1)與腫瘤壞死因子 α (TNF- α))及生長因子(例如：粒細胞-巨噬細胞-菌落-刺激因子(GM-CSF)及纖維母細胞生長因子(FGF))。細胞外刺激可能影響與細胞生長、

轉移、分化、激素分泌、轉錄因子活化、肌肉收縮、葡萄糖代謝、蛋白質合成控制及細胞循環調節等作用有關之一種或多種細胞反應。

許多種疾病與蛋白質激酶所媒介過程引起之異常細胞反應有關。此等疾病包括自體免疫疾病、發炎疾病、骨骼疾病、代謝疾病、神經性與神經變性疾病、癌症、心血管疾病、過敏與氣喘、阿茲海默氏症及與激素有關之疾病。因此，醫藥化學上仍持續努力尋找可作為有效醫療劑之蛋白質激酶抑制劑。

肝醣合成酶激酶-3 (GSK-3)為一種絲胺酸/蘇胺酸蛋白質激酶，其係由分別由獨特基因編碼之 α 與 β 異構型組成[Coghlan et al., Chemistry & Biology, 7, 793-803 (2000); Kim and Kimmel, Curr. Opinion Genetics Dev., 10, 508-514 (2000)]。GSK-3涉及多種疾病，包括糖尿病、阿茲海默氏症、CNS病變如：躁鬱症與神經變性疾病及心肌肥大[參見例如：WO 99/65897; WO 00/38675; Kaytor and Orr, Curr. Opin. Neurobiol., 12, 275-8 (2000); Haq et al., J. Cell Biol., 151, 117-30 (2000); Eldar-Finkelman, Trends Mol. Med., 8, 126-32 (2002)]。此等疾病與涉及GSK-3之某些細胞訊號途徑異常運作有關。

已發現GSK-3已磷酸化且調節許多種調節性蛋白質之活性。包括肝醣合成酶(其係肝醣合成作用中所需之速率限制酵素)、與微小管結合之蛋白質- τ 、基因轉錄因子 β -連接素、轉譯起始因子eIF-2B及ATP檸檬酸水解酶、艾克新(axin)、熱休克因子-1、c-Jun、c-myc、c-myb、CREB與CEP β 。此等不同

目標在許多細胞代謝、增生、分化與發展等方面上涉及 GSK-3。

與 II 型糖尿病之治療有關之 GSK-3 所媒介途徑中，胰島素誘發之訊號造成細胞葡萄糖吸收及肝醣合成作用。GSK-3 為一種此途徑中胰島素所誘發訊號之負向調節劑。正常時，胰島素之存在會抑制 GSK-3 所媒介之肝醣合成酶磷酸化及去活化作用。抑制 GSK-3 造成肝醣合成作用與葡萄糖吸收作用提高 [Klein et al., PNAS, 93, 8455-9 (1996); Cross et al., Biochem. J., 303, 21-26 (1994); Cohen, Biochem. Soc. Trans., 21, 555-567 (1993) 與 Massillon et al., Biochem J. 299, 123-128 (1994); Cohen and Frame, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2, 769-76 (2001)]。然而若糖尿病患者之胰島素反應受損時，儘管血液中含有相當高量胰島素，亦無法進行肝醣合成與葡萄糖吸收作用。結果造成急性與慢性之高血糖，最終造成心血管疾病、腎衰竭與失明。此等患者中，無法進行正常胰島素誘發之 GSK-3 抑制作用。亦有文獻指出，II 型糖尿病患者之 GSK-3 過度表現 [WO 00/38675]。GSK-3 之醫藥性抑制劑因此適用於治療對胰島素之反應受損之糖尿病患者。

細胞凋亡過程涉及絕血性腦傷害之病理生理學 (Li et al., 1997; Choi, et al., 1996; Charriaut-Marlangue et al., 1998; Grahm and Chen, 2001; Murphy et al., 1999; Nicotera et al., 1999)。最近之文獻指出，GSK-3 β 之活化作用可能涉及細胞凋亡機轉 (Kaytor and Orr, 2002; Culbert et al., 2001)。在大鼠之中腦動脈閉鎖 (MCAO) 試驗所誘發之絕血中風模式中發現，絕血後之 GSK-3 β 表現提高 (Wang et

al., Brain Res, 859, 381-5, 2000; Sasaki et al., Neurol Res, 23, 588-92, 2001)。
纖維母細胞生長因子(FGF)可在大鼠之永久性中腦動脈閉鎖(MCO)後降低絕血腦傷害(Fisher et al. 1995; Song et al. 2002)。大鼠之絕血模式中的確證實FGF之保護神經效果可受GSK-3 β 依賴PI-3激酶/AKT之去活化作用調節(Hashimoto et al., 2002)。因此，在發生腦絕血後抑制GSK-3 β 時，可能減輕絕血之腦傷害。

GSK-3亦涉及心肌梗塞。參見Jonassen et al., Circ Res, 89:1191, 2001(於再灌流時投與胰島素以減輕心肌梗塞之過程係經由依賴Akt之訊號途徑調節)；Matsui et al., Circulation, 104:330, 2001(Akt活化作用可於活體內在暫時性心絕血時保持心臟功能並預防心肌細胞受損)；Miao et al., J Mol Cell Cardiol, 32:2397, 2000(活體內絕血再灌流傷害後，冠狀動脈內由腺病毒所媒介之Akt基因於心臟中傳送，可降低蔓延之梗塞面積)；與Fujio et al., Circulation et al., 101:660, 2000(Akt訊號於活體外抑制心肌細胞之細胞凋亡並於小白鼠心臟中防止絕血-再灌流傷害)。

GSK-3活性在頭部創傷中扮演某種角色。參見Noshita et al., Neurobiol Dis, 9; 294, 2002(向上調節Akt/PI3-激酶途徑對腦創傷後之細胞存活性具有關鍵重要性)及Dietrich et al., J Neurotrauma, 13:309, 1996(在大鼠腦創傷模式中，於創傷後投與bFGF可顯著降低皮質神經元與挫傷總體積)。

亦已知GSK-3在精神病上扮演某種角色。參見Eldar-Finkelman, Trends Mol Med, 8:126, 2002; Li et al., Bipolar Disord, 4:137, 2002 (LiCl

與瓦普酸 (Valproic acid)，係抗精神病之情緒安定藥物，可降低 GSK3 活性及提高 β -連接素) 及 Lijam et al., Cell, 90:895, 1997 (狄斯維德 (Dishevelled) KO 小白鼠出現異常社交行為及感覺運動門控障礙。狄斯維德係一種涉及 WNT 途徑之細胞質蛋白質，抑制 GSK3 β 活性)。

已知鋰與瓦普酸抑制 GSK3 之作用會誘發軸突再造及改變突觸連接性。參見 Kaytor & Orr, Curr Opin Neurobiol, 12:275, 2002 (向下調節 GSK3 之結果改變與微小管結合之蛋白質： τ 、MAP 1&2) 及 Hall et al., Mol Cell Neurosci, 20:257, 2002 (鋰與瓦普酸誘發軸突上似生長錐結構形成)。

GSK-3 活性亦與阿茲海默氏症有關。此疾病之特徵為出現習知之 β -澱粉狀蛋白肽，並形成細胞內神經纖維纏結。該神經纖維纏結含有過度磷酸化之 τ 蛋白質，其中 τ 於異常位置上磷酸化。已知細胞與動物模式中此等異常位置上之 GSK-3 已磷酸化。此外，已知抑制 GSK-3 可預防細胞中 τ 蛋白質過度磷酸化 [Lovestone et al., Curr. Biol., 4, 1077-86 (1994); and Brownlees et al., Neuroreport 8, 3251-55 (1997); Kaytor and Orr, Curr. Opin. Neurobiol., 12, 275-8 (2000)]。經轉殖基因而過度表現 GSK3 之小白鼠中，觀察到過度磷酸化之 τ 與異常形態之神經元增加 [Lucas et al., EMBO J, 20:27-39 (2001)]。纏結前之神經元之細胞質中，活性 GSK3 累積結果造成 AD 患者腦中之神經纖維纏結 [Pei et al., J Neuropathol Exp Neurol, 58, 1010-19 (1999)]。因此，抑制 GSK-3 可延緩或遏止神經纖維纏結產生及因而治療或降低阿茲海默氏症之嚴重性。

GSK-3 於阿茲海默氏症中之角色已於活體外證實。參見 Aplin et al (1996), *J Neurochem* 67:699; Sun et al (2002), *Neurosci Lett* 321:61 (GSK3b使澱粉狀蛋白前體蛋白質(APP)之細胞質功能部位磷酸化及 GSK3b於 APP轉感染細胞中抑制 Ab40 & Ab42 分泌); Takashima et al (1998), *PNAS* 95:9637; Kirschenbaum et al (2001), *J Biol Chem* 276:7366 (GSK3b與早老素-1 (presenilin-1)複合及磷酸化, 後者係與由 APP合成 Ab之 γ -分泌酶活性有關); Takashima et al (1998), *Neurosci Res* 31:317 (Ab (25-35)活化 GSK3b之作用可加強海馬回神經元中 τ 蛋白質之磷酸化。此觀察結果提供 Ab與過度磷酸化之 τ 蛋白質(AD之另一種病理指標)所組成之神經纖維纏結之間之關連性); Takashima et al (1993), *PNAS* 90:7789(阻斷 GSK3b表現或活性可防止 Ab誘發皮質與海馬回初級培養物之神經變性); Suhara et al (2003), *Neurobiol Aging*. 24:437(細胞內 Ab42會干擾依賴 Akt/GSK-3b訊號之機轉之活化作用, 因而對內皮細胞有毒); De Ferrari et al (2003) *Mol Psychiatry* 8:195(鋰保護 N2A細胞與初級海馬回神經元免於 Ab纖維絲所誘發之細胞毒性及降低 β -連接素之核轉移/去安定化作用); 及 Pigino et al., *J Neurosci*, 23:4499, 2003 (阿茲海默氏症之早老素-1之突變作用可能失去調節 GSK-3活性之能力及提高其活性, 繼而損害神經元中軸突傳遞。受損神經元中軸突傳遞降低之結果最終造成神經變性)。

GSK-3於阿茲海默氏症中角色之證據已於活體內證實。參見 Yamaguchi et al (1996), *Acta Neuropathol* 92:232; Pei et al (1999), *J Neuropath Exp Neurol* 58:1010 (AD腦部之感受區中 GSK3b免疫反

應性提高)；Hernandez et al (2002), J Neurochem 83:1529(發生條件性 GSK3b 過度表現之轉殖基因小白鼠出現類似 AD 之轉殖基因 APP 小白鼠模式之認知力缺陷)；De Ferrari et al (2003) Mol Psychiatry 8:195(慢性鋰處理可挽救海馬回內注射 Ab 纖維所引起神經變性及行為受損(莫氏(Morris)水迷宮)；McLaurin et al., Nature Med, 8:1263, 2002 (AD 轉殖基因模式中，接種 Ab 可降低似 AD 之神經病變及空間記憶損害)與 Phiel et al (2003) Nature 423:435 (AD 轉殖基因小白鼠中，GSK3 經由直接抑制 γ -分泌酶來調節澱粉狀蛋白肽產生)。

早老素-1 與激動素(kinesin)-1 亦為 GSK-3 之受質，與 GSK-3 在阿茲海默氏症中所扮演角色之機轉有關，最近說明於 Pigino, G., et al., Journal of Neuroscience (23:4499, 2003)。已發現 GSK3 β 磷酸化激動素-1 輕鏈，使與膜結合之細胞器釋出激動素-1，造成快速順行之軸突傳遞下降(Morfini et al., 2002)。作者認為 PS1 之突變可能失去調節 GSK-3 活性之能力及提高其活性，繼而損害神經元中軸突傳遞。受損神經元中軸突傳遞降低之結果最終造成神經變性。

GSK-3 亦與肌萎縮性側索硬化(ALS)有關。參見 Williamson and Cleveland, 1999 (mSOD1 小白鼠在 ALS 極早期之軸突傳遞已延滯)；Morfini et al., 2002 (GSK3 磷酸化激動素輕鏈，並抑制順行之軸突傳遞)；Warita et al., Apoptosis, 6:345, 2001(此 ALS 之 SOD1 轉殖基因動物模式中，在顯著喪失神經元之前之出現症狀之前及出現症狀早期，大多數脊柱運動神經元已喪失對 PI3-K 及 Akt 之免疫反應性)及 Sanchez et al., 2001(抑制 PI-3K 會

誘發 GSK3 活化作用所媒介之軸索收縮)。

GSK-3 活性亦與脊柱及周邊神經傷害有關。已知鋰與瓦普酸抑制 GSK3 之結果可誘發誘發軸突再造及改變突觸連接性。參見 Kaytor & Orr, *Curr Opin Neurobiol*, 12:275, 2002(向下調節 GSK3 之結果改變與微小管結合之蛋白質： τ 、MAP 1&2)及 Hall et al., *Mol Cell Neurosci*, 20:257, 2002(鋰與瓦普酸誘發軸突上似生長錐結構形成)。亦參見 Grothe et al., *Brain Res*, 885:172, 2000 (FGF2 刺激施萬細胞 (Schwann cell) 增生及於軸突生長期間抑制髓鞘形成)；Grothe and Nikkhah, 2001 (FGF-2 於神經壓碎後 5 小時內向上調節近端與遠端神經殘株)；及 Sanchez et al., 2001 (抑制 PI-3K 會誘發 GSK3 活化作用所媒介之軸索收縮)。

GSK-3 之另一種受質為 β -連接素，會在經 GSK-3 磷酸化後降解。已有報告指出精神分裂患者中 β -連接素含量下降，其亦與其他有關神經元細胞死亡之疾病相關 [Zhong et al., *Nature*, 395, 698-702 (1998); Takashima et al., *PNAS*, 90, 7789-93 (1993); Pei et al., *J. Neuropathol. Exp*, 56, 70-78 (1997); and Smith et al., *Bio-org. Med. Chem. II*, 635-639 (2001)]。此外， β -連接素與 Tcf-4 在血管再造中扮演雙重角色，即抑制血管平滑肌細胞之細胞凋亡及促進增生 (Wang et al., *Circ Res*, 90:340, 2002)。因此，GSK-3 與血管新生病變有關。亦參見 Liu et al., *FASEB J*, 16:950, 2002 (GSK3 之活化作用減少肝細胞生長因子，造成內皮細胞障壁功能改變，減低血管整合性)及 Kim et al., *J Biol Chem*, 277:41888, 2002(採用馬奇膠填料分析法 (Matrigel plug assay) 證實活體內之 GSK3 β 活化作用抑制血管新生作用：抑制 GSK3 β 訊號可加強

毛血管形成)。

GSK-3與亨丁頓氏症之間關係已經證實。參見Carmichael et al., J Biol Chem., 277:33791, 2002 (GSK3 β 抑制作用可保護細胞免於因 β -連接素增加及其相關之轉錄途徑所致之聚麩醯胺誘發之神經元與非神經元細胞死亡)。GSK3過度表現會降低熱休克轉錄因子-1與熱休克蛋白質HSP70之活化作用(Bijur et al., J Biol Chem, 275:7583, 2000)，其於活體外HD模式中顯示可同時降低聚-(Q)凝集物及細胞死亡(Wytenbach et al., Hum Mol Genet, 11:1137, 2002)。

GSK-3影響FGF-2含量，並於可使大鼠腦髓鞘再形成之腦凝集培養物再形成髓鞘期間增加其受體含量。參見Copelman et al., 2000, Messersmith, et al., 2000及Hinks與Franklin, 2000。亦發現，FGF-2可誘發寡突神經膠質細胞向外生長，此表示FGF涉及髓鞘再形成作用(Oh and Yong, 1996; Gogate et al., 1994)及FGF-2基因療法已顯示可改善過敏性腦脊髓炎(EAE)實驗小白鼠之恢復率(Ruffini, et al., 2001)。

GSK-3亦與毛髮生長有關，因為Wnt/ β -連接素訊號在毛囊形態發生及分化作用中扮演主要角色(Kishimoto et al. Genes Dev, 14:1181, 2000; Millar, J Invest Dermatol, 118:216, 2002)。已發現小白鼠皮膚中Wnt訊號之抑制劑出現構成性過度表現時，無法發展成毛囊。Wnt訊號係毛囊初期發展時所必需，且GSK3在構成上藉由抑制 β -連接素來調節Wnt途徑(Andl et al., Dev Cell 2:643, 2002)。暫時性Wnt訊號提供啟動新的毛髮生長循環之重要初始刺激，其係活化 β -連接素及表皮毛囊前體

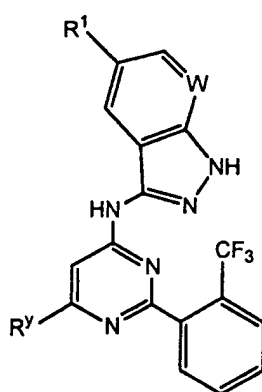
中 TCF-調節基因之轉錄作用 (Van Mater et al., Genes Dev, 17:1219, 2003)。

由於 GSK-3 活性與精子活動性有關，因此 GSK-3 抑制作用適用為雄性避孕劑。已知精子 GSK3 活性下降與牛及猴子附睪中精子活動性之發展有關 (Vijayaraghavan et al., Biol Reprod, 54: 709, 1996; Smith et al., J Androl, 20:47, 1999)。此外，公牛中可活動精子中，GSK3 之酪胺酸與絲胺酸/蘇胺酸磷酸化作用比不動精子高 (Vijayaraghavan et al., Biol Reprod, 62:1647, 2000)。此結果亦於人類精子中證實 (Luconi et al., Human Reprod, 16:1931, 2001)。

基於目前仍缺乏與 GSK-3 蛋白質激酶有關之大多數疾病之治療法，因此仍極需要可抑制目標蛋白質之醫療劑。

【發明內容】

本發明提供式 (I) 化合物或其醫藥上可接受之鹽來說明此需要：



I

其中 W、R¹ 與 Rʸ 如下述定義。

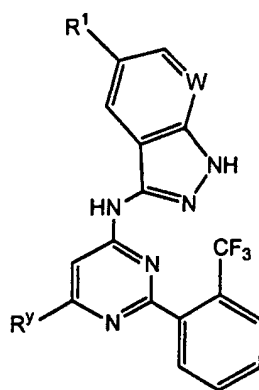
本發明化合物可抑制 GSK-3 活性。根據本發明，此等化合物亦可用於抑制 GSK-3 活性之組合物與方法及治療或減輕與

患者與 GSK-3 有關之疾病或病症嚴重性之方法。

可採用本發明方法之疾病或病症包括例如：神經性與神經變性病變、糖尿病、精神病、多發性硬化 (MS)、心肌梗塞、再灌流/絕血、禿髮與中風。

【實施方式】

本發明提供式 I 化合物：



I

或其醫藥上可接受之鹽，其中：

W 為氮或 CH；

R¹ 係選自氫或氟；及

R^ʸ 為 C₁₋₄脂系基團，可視需要經 N(R²)₂ 或含有 1-2 個分別獨立選自：氮、氧或硫中雜原子之 5-6 員飽和環取代，其中：
各 R² 分別獨立選自：氫或 C₁₋₃脂系基團，其可視需要經 OH、N(R³)₂ 或含有 1-2 個分別獨立選自：氮、氧或硫中雜原子之 5-6 員飽和環取代，其中：

各 R³ 分別獨立選自：氫或 C₁₋₃脂系基團；

但其限制條件為：

當 R¹ 為氫且 W 為 CH 時，則 R^ʸ 不為甲基。

本文中所使用 "脂系" 或 "脂系基團" 意指直鏈或分支 C₁-C₄

烴鏈，其係完全飽和或包含一個或多個不飽和單位或為單環之 C_3 - C_4 烴鏈，其係完全飽和或包含一個或多個不飽和單位，但其係非芳香系(本文中亦稱為"碳環"或"環烷基")，其在單一附接點連接其餘分子。例如：合適之脂系基團包括(但不限於)：直鏈或分支之烷基、烯基、炔基及其氫化物，如：(環烷基)烷基、(環烯基)烷基或(環烷基)烯基。

"烷基"、"烯基"與"炔基"單獨使用或作為較大部份體之一部份時，應包括含有1-4個碳原子與至少2個碳原子與一個雙鍵(若為烯基時)及至少二個碳原子與一個參鍵(若為炔基時)之直鏈與分支鏈。

本發明所利用之化合物限於彼等化學上可行且安定者。因此，僅當上述化合物中取代基或代號之組合可形成安定或化學上可行之化合物時，此等組合才可行。安定化合物或化學上可行之化合物係指其化學結構當保持在 40°C 或以下溫度，在沒有濕氣或其他化學反應性條件下歷時至少一週後，實質上不會改變。

習此相關技藝之人士咸了解，本發明某些化合物可能出現互變異構型。化合物之所有此等互變異構型均在本發明範圍內。

除非另有說明，否則本文所示結構式亦包括該結構之所有立體化學型；亦即各不對稱中心之R與S組態。因此，本發明化合物之單一立體化學異構物及對映異構物與非對映異構物均在本發明之範圍內。除非另有說明，否則本發明所示結構式亦包括僅因含有一個或多個同位素原子而出現

差異之化合物。例如：化合物結構中氫被氘或氚置換者或碳被含 ^{13}C -或 ^{14}C -之碳置換者均在本發明範圍內。

本發明化合物涵括在PCT公告案WO 02/22607所說明之化合物範圍內。然而，申請者已發現本化合物在保護神經元對抗絕血傷害及治療中風上具有令人驚訝之提高效力。

本發明一方面係有關式I化合物，其中 R^y 為未取代之 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 脂系基團。式I化合物之較佳脂系基團為烷基。此等烷基較佳為甲基、乙基、環丙基、第三丁基或異丙基。式I化合物之更佳烷基為甲基、環丙基、與第三丁基。

根據一項具體實施例，本發明係有關式I化合物，其中 R^y 為經含有1-2個分別獨立選自：氮、氧或硫中雜原子之6員飽和環取代之 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 脂系基團。此等6-員飽和環包括嗎啉基六氫吡啶基與六氫吡嗪基。

根據另一項具體實施例，本發明係有關式I化合物，其中 R^y 為經 $\text{N}(\text{R}^2)_2$ 取代之 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 脂系基團。

某些具體實施例中，本發明係有關式I化合物，其中 R^2 為氫。

根據另一項具體實施例，本發明係有關式I化合物，其中 R^2 為未取代之 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 脂系基團。

另一項具體實施例中，本發明係有關式I化合物，其中 R^2 為經OH或 $\text{N}(\text{R}^3)_2$ 取代之 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 脂系基團。

根據另一項具體實施例，本發明係有關式I化合物，其中 R^2 為經含有1-2個分別獨立選自：氮、氧或硫中雜原子之6員飽和環取代之 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 脂系基團。此等6-員飽和環包括嗎、

基、六氫吡啶基與六氫吡咩基。

根據一項具體實施例，本發明係有關式I化合物，其中W為氮。

根據另一項具體實施例，本發明係有關式I化合物，其中W為CH。

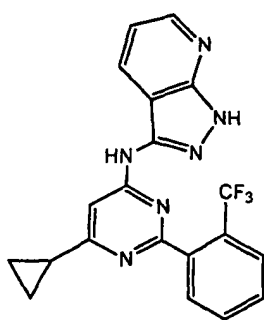
根據另一項具體實施例，本發明係有關式I化合物，其中 R^1 為氫。

根據另一項具體實施例，本發明係有關式I化合物，其中 R^1 為氟。

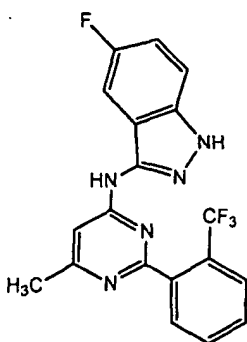
咸了解，本文所述具體實施例之所有組合與次組合均在本發明範圍內。

式I化合物之代表性實例示於下表I。

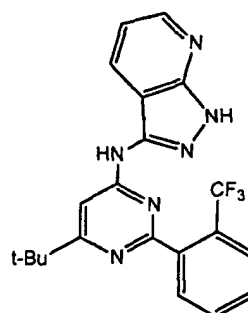
表I. 式I化合物



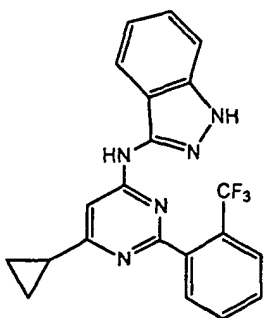
I-1



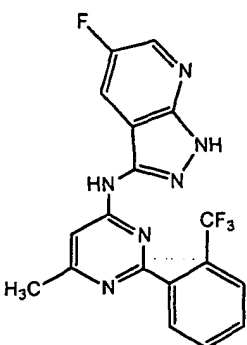
I-2



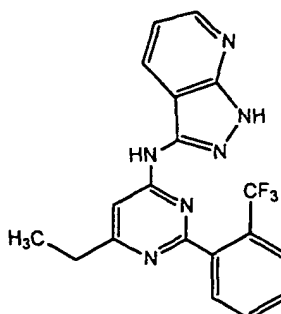
I-3



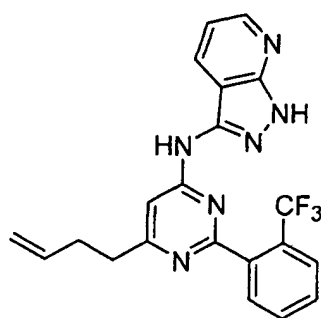
I-4



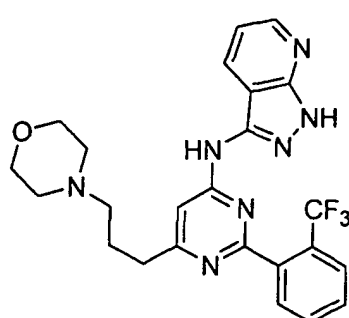
I-5



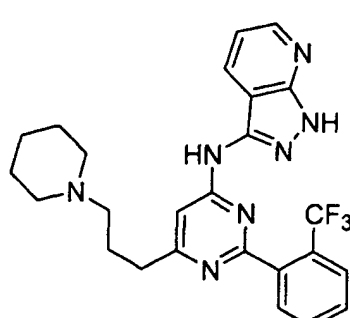
I-6



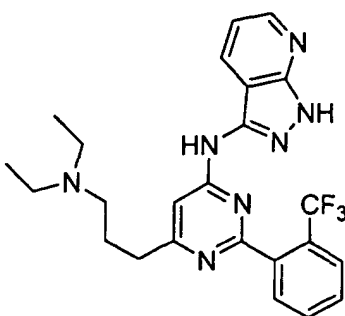
I-7



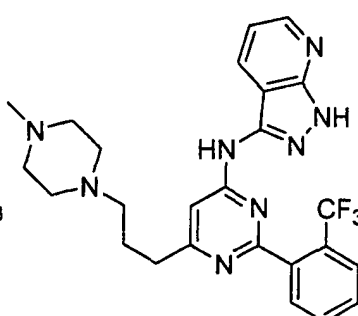
I-8



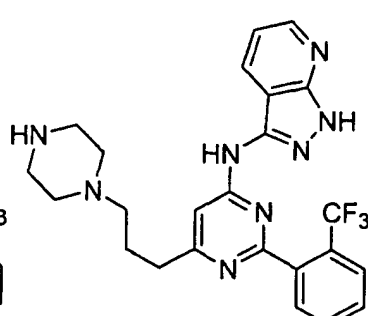
I-9



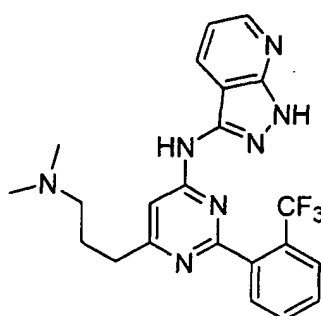
I-10



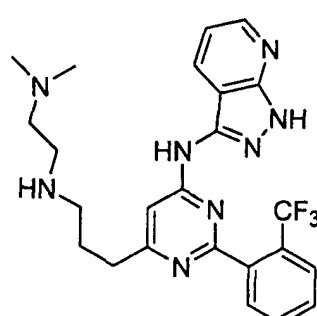
I-11



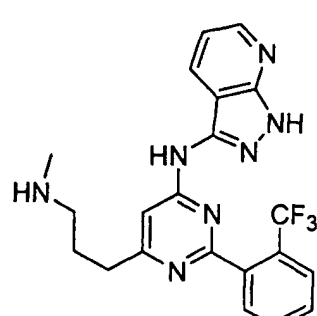
I-12



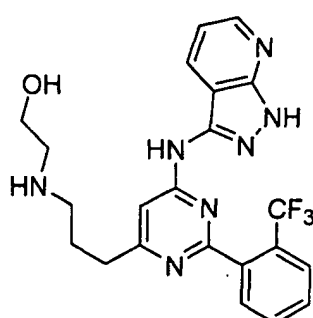
I-13



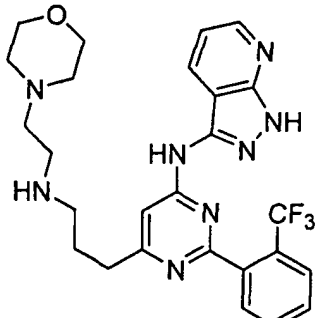
I-14



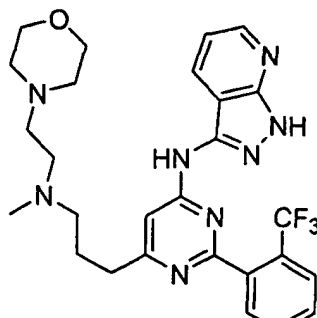
I-15



I-16



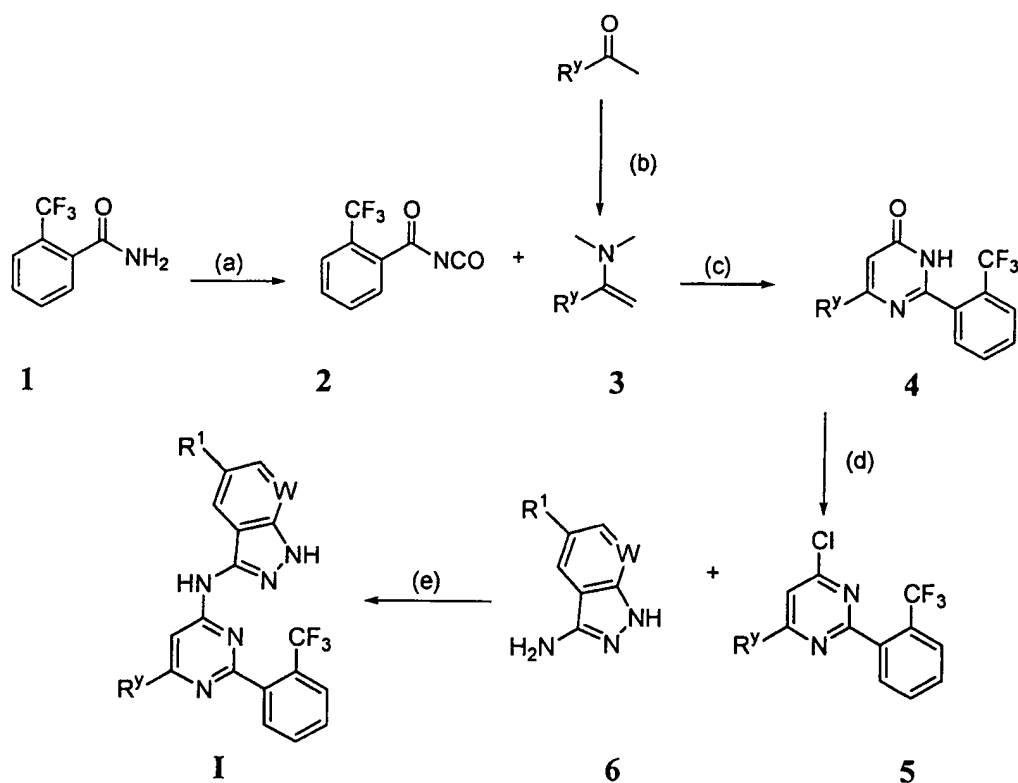
I-17



與 I-18

本發明化合物可依下列反應圖I-II及習此相關技藝之人士已知之一般方式製備。

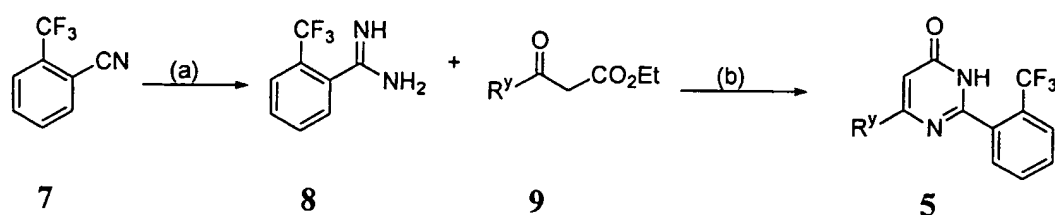
反應圖 I



試劑與條件：(a)草醯氯，二氯乙烷，70°C；(b)二甲胺，戊烷，TiCl₄；(c) NH₄OAc，HOAc，THF，回流；(d) POCl₃，n-Pr₃N，回流；(e) 160°C，無溶劑。

上述反應圖I出示製備本發明化合物之一般方法。步驟(a)中，由芳基醯胺I經草醯氯處理，形成醯基異氰酸酯2。如步驟(c)所示，由醯基異氰酸酯2與烯胺3縮合，產生嘓啶酮4 (J. Org. Chem (1993), 58, 414-418; J. Med. Chem., (1992), 35, 1515-1520; J. Org. Chem., 1967, 32, 313-214)。中間物4再經POCl₃處理，形成氯化化合物5，其再與胺基-吡唑衍生物6組合，產生式I化合物。製備胺基-吡唑衍生物6之方法係相關技藝已知。明確言之，此等衍生物之合成法示於WO 02/22607中。

反應圖 II



試劑與條件：(a) *i* $LiN(TMS)_2$ ，醚，THF，*ii* HCl；(b) NaOEt，EtOH，回流。

上述反應圖 II 出示另一種製備嘧啶酮中間物 5 之方法，其可用於製備上述反應圖 I 步驟 (e) 所示式 I 化合物。步驟 (a) 中，芳基腈 7 為苯甲腈中間物 8，其隨後經 β -酮基酯 9 處理，形成嘧啶酮化合物 5，其可用於上述反應。

習此相關技藝之人士可使用容易合成或可自商品取得之試劑，依指定技術合成本發明其他化合物。

用於本發明之化合物作為 GSK-3 抑制劑之活性可於活體外、活體內或細胞株中分析。活體外分析法包括測定活化之 GSK-3 之磷酸化活性或 ATP 酶活性。活體外分析法亦可定量抑制劑與 GSK-3 結合之能力。抑制劑結合性之測定法為在結合之前先在抑制劑上進行放射性標記，單離抑制劑/GSK-3 複合物，測定所結合之放射性標記物含量。或者，可進行競爭性實驗，測定抑制劑結合性，其中由新抑制劑與已結合已知放射性標記物之 GSK-3 培養。

根據另一項具體實施例，本發明提供一種組合物，其包含本發明化合物或其醫藥上可接受之鹽與醫藥上可接受之載劑、輔劑或媒劑。本發明組合物中化合物之用量應使生物檢體或患者體內抑制蛋白質激酶，特定言之 GSK-35 之效

果被有效檢測到。本發明組合物最好經過調配，供投與需要此等組合物之患者。最佳者，本發明組合物調配成經口投藥給患者。

本文所採用"患者"一詞係指動物，較佳為哺乳動物，最佳指人類。

"醫藥上可接受之載劑、輔劑或媒劑"係指不會破壞用其所調配化合物之藥理活性之無毒性載劑、輔劑或媒劑。本發明組合物可使用之醫藥上可接受之載劑、輔劑或媒劑或包括(但不限於)：離子交換劑、礬土、硬脂酸鋁、卵磷脂、血清蛋白如：人類血清白蛋白、緩衝物質如：磷酸鹽、甘胺酸、山梨酸、山梨酸鉀、飽和植物性脂肪酸之部份甘油酯混合物、水、鹽類或電解質如：魚精蛋白硫酸鹽、磷酸氫二鈉、磷酸氫鉀、氯化鈉、鋅鹽、膠體矽石、三矽酸鎂、聚乙烯吡咯啉酮、以纖維素為主之物質、聚乙二醇、羧甲基纖維素鈉、聚丙烯酸鹽、蠟類、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚乙二醇與羊毛脂。

本文中所採用"可檢測之抑制"指包含該組合物與GSK-3激酶之樣本與包含GSK-3激酶但不含該組合物之同等樣本之間GSK-3活性出現可測得之變化。

"醫藥上可接受之鹽"指本發明化合物之任何無毒性鹽、酯、酯之鹽或其他衍生物當投與接受者時，可直接或間接產生本發明化合物或其抑制活性代謝物或殘質。

本文所採用"其抑制活性代謝物或殘質"意指亦可抑制GSK-3激酶之本發明化合物之代謝物或其殘質。

本發明化合物之醫藥上可接受之鹽包括彼等衍生自醫藥上可接受之無機與有機酸或鹼者。合適酸鹽之實例包括乙酸鹽、己二酸鹽、藻酸鹽、天冬胺酸鹽、苯甲酸鹽、苯磺酸鹽、硫酸氫鹽、丁酸鹽、檸檬酸鹽、樟腦酸鹽、樟腦磺酸鹽、環戊烷丙酸鹽、二葡萄糖酸鹽、十二烷基硫酸鹽、乙磺酸鹽、甲酸鹽、富馬酸鹽、葡庚酸鹽、甘油磷酸鹽、乙醇酸鹽、半硫酸鹽、庚酸鹽、己酸鹽、鹽酸鹽、氫溴酸鹽、氫碘酸鹽、2-羥基乙磺酸鹽、乳酸鹽、馬來酸鹽、丙二酸鹽、甲磺酸鹽、2-萘磺酸鹽、菸酸鹽、硝酸鹽、草酸鹽、棕櫚酸鹽、果膠酸鹽、過硫酸鹽、3-苯基丙酸鹽、磷酸鹽、苦味酸鹽、特戊酸鹽、丙酸鹽、水楊酸鹽、琥珀酸鹽、硫酸鹽、酒石酸鹽、硫代氰酸鹽、甲苯磺酸鹽與十一碳烷酸鹽。其他酸類如：草酸，雖然本身並非醫藥上可接受，但仍可作為適用於製得本發明化合物及其醫藥上可接受之酸加成鹽之鹽中間物。

衍生自適當鹼之鹽類包括鹼金屬(例如：鈉與鉀)、鹼土金屬(例如：鎂)、銨與 $N^+(C1-4\text{烷基})_4$ 之鹽類。本發明亦包括本發明所揭示化合物任何含鹼性氮基團之四級化。水或油溶性或勻散性產物均可依此等四級化反應製得。

本發明組合物可經口、非經腸式、經吸入式噴液、局部、經直腸、鼻、頰內、陰道或經由植入式儲存器投藥。本文所採用"非經腸式"一詞包括皮下、靜脈內、肌內、椎管內、滑膜內、胸骨內、鞘內、肝內、損害部位內及顱內、注射或輸液技術。較佳者，組合物經口、腹膜內或靜脈內

投藥。本發明組合物之無菌注射型可呈水性或油性懸浮液。此等懸浮液可根據相關技藝已知之技術，採用合適勻散或濕化劑與懸浮劑調配。無菌注射劑亦可為含於無毒性非經腸式可接受之稀釋劑或溶劑中形成之無菌注射溶液或懸浮液，例如：含於1,3-丁二醇中形成溶液。可使用之可接受媒劑與溶劑為水、林格氏溶液及等張性氯化鈉溶液。此外，亦常使用無菌之固體油類作為溶劑或懸浮劑。

此目的可使用任何品牌之固定油類，包括合成之單或二-甘油酯。脂肪酸如：油酸及其甘油酯衍生物均適用於製備注射劑，天然之醫藥上可接受之油類亦可使用，如：橄欖油或蓖麻油，尤指其聚氧乙基化型。此等油溶液或懸浮液亦可包含長鏈醇稀釋劑或勻散劑，如：羧甲基纖維素或醫藥上可接受之劑型(包括乳液與懸浮液)之調配上常用之類似勻散劑。其他常用之界面活性劑如：Tweens、Spans與其他常用於製造醫藥上可接受之固體、液體或其他劑型之乳化劑或生物利用率加強劑亦可用於調配之目的。

本發明醫藥上可接受之組合物可呈任何口服可接受之劑型經口投藥，其包括(但不限於)膠囊、錠劑、水性懸浮液或溶液。若為口服用錠劑時，常用之載劑包括乳糖與玉米澱粉。典型亦添加潤滑劑如：硬脂酸鎂。適合口服用膠囊型之稀釋劑包括乳糖與乾燥之玉米澱粉。當需要口服用水性懸浮液時，由活性成分與乳化劑及懸浮劑組合。若需要時，亦可添加某些甜味劑、調味劑或著色劑。

或者，本發明之醫藥上可接受之組合物可呈經直腸投藥

之栓劑型投藥。其製法為混合藥劑與於室溫下呈固態，但於直腸溫度下卻呈液態之合適之無刺激性賦形劑，因此將會於直腸中融化釋出藥物。此等材料包括可可奶油、蜂蠟與聚乙二醇。

本發明之醫藥上可接受之組合物亦可局部投藥，尤其當治療目標包括容易經由局部施用到之區域或器官時，包括眼睛、皮膚或下腸道之疾病。合適之局部用調配物很容易針對各區域或器官製備。

下腸道之局部施用法可使用直腸用栓劑調配物(如上述)或合適之灌腸調配物進行。亦可使用局部用穿皮式貼布。

局部投藥時，醫藥上可接受之組合物可調配成合適油膏，由活性成分懸浮或溶於一種或多種載劑中。本發明化合物之局部投藥用載劑包括(但不限於)礦物油、液態石蠟、白色凡士林、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化蠟與水。或者，醫藥上可接受之組合物可調配成合適洗液或乳霜，其中含有活性成分懸浮或溶於一種或多種醫藥上可接受之載劑中。合適載劑包括(但不限於)礦物油、山梨糖醇酐單硬脂酸酯、聚山梨酸酯60、鯨蠟基酯蠟、鯨蠟基硬脂醇、2-辛基十二烷醇、苯甲醇與水。

眼用之醫藥上可接受之組合物可於已調整pH之等張性無菌生理食鹽水中調配成微粉化之懸浮液或較佳為使用或不使用防腐劑(如：氯苄烷銨)，於已調整pH之等張性無菌生理食鹽水中調配成溶液。或者，眼用之醫藥上可接受之組合物可於油膏(如：石蠟)中調配。

本發明醫藥上可接受之組合物亦可呈鼻噴液或吸入劑投藥。此等組合物係依據醫藥調配物相關技藝已知之技術製備，且可於生理食鹽水中，使用苯甲醇或其他合適防腐劑、加強生物利用率之促進吸收劑、氟碳化物與/或其他常用溶解劑或勻散劑等，製成溶液。

最佳者，本發明醫藥上可接受之組合物係調配成經口投藥用。

可與載劑材料組合製成單一劑型組合物之本發明化合物用量將隨所治療之宿主、特定之投藥途徑而定。較佳者，應調配組合物，使接受此等組合物投藥之患者可接受0.01 - 100 mg/kg體重之間之抑制劑劑量。

咸了解，對任何特定患者之明確劑量與療程將依多種因素而定，包括所使用特定化合物之活性、年齡、體重、一般健康情形、性別、飲食、投藥時間、排泄速度、藥物組合及治療醫師之判斷與所治療特定疾病之嚴重性。組合物中本發明化合物之用量亦依組合物中特定化合物而異。

依據該需要預防或治療特定病症或疾病而定，本發明組合物中亦可包含通常用於治療或預防該病症之醫療劑。

例如：神經營養因子或其他用於治療神經性或神經變性病變之藥劑可與本發明化合物組合，供治療神經性或神經變性病變。已知神經營養因子實例包括(但不限於)乙醯膽鹼酯酶抑制劑、MAO抑制劑、干擾素、抗痙攣劑、離子通道阻斷劑、利路唑(riluzole)與抗帕金森氏症劑。

已知治療中風之藥劑實例包括Activase®，一種組織血纖維

蛋白溶酶原活化劑(rt-PA)之重組體或基因工程產物、肝素、麩胺酸鹽抗劑、鈣鹽抗劑、鴉片製劑鹽抗劑、GABA促效劑與抗氧化劑。

亦可與本發明化合物組合之其他藥劑實例包括(但不限於)：抗抑鬱劑如：Zoloft®、Prozac®、Paxil®與Buspar®；消炎劑如：皮質類固醇、TNF阻斷劑、IL-1 RA、氮唑嘌呤(azathioprine)、環磷醯胺與柳氮磺胺嘧啶；免疫調節劑與免疫抑制劑如：環孢素、塔克利姆斯(tacrolimus)、阮帕黴素(rapamycin)、黴酚酸鹽莫非太(mycophenolate mofetil)、干擾素、皮質類固醇、環磷醯胺、氮唑嘌呤與柳氮磺胺嘧啶；神經營養因子如：乙醯膽鹼酯酶抑制劑、MAO抑制劑、干擾素、抗痙攣劑、離子通道阻斷劑、利路唑(riluzole)與抗帕金森氏症劑；治療心血管疾病之藥劑如： β 阻斷劑、ACE抑制劑、利尿劑、硝酸鹽、鈣通道阻斷劑與抑制素(statins)；治療糖尿病之藥劑如：胰島素、胰島素類似物、 α 葡萄糖苷酶抑制劑、雙胍類與胰島素敏化劑；及治療免疫缺乏症之藥劑如： γ 球蛋白。

本發明組合物中其他醫療劑之用量將不超過包含該醫療劑作為唯一活性劑之組合物之正常投藥量。本發明所揭示組合物中所含其他醫療劑用量在包含該醫療劑作為唯一活性劑之組合物中之正常含量之約50%至100%範圍內。

根據另一項具體實施例，本發明係有關對患者投與另一種選自下列之藥劑：治療阿茲海默氏症(AD)、治療帕金森氏症、治療多發性硬化(MS)、治療氣喘之藥劑、消炎劑、免疫調節劑或免疫抑制劑、神經營養因子、治療中風之藥

劑、治療心血管疾病之藥劑、抗抑鬱劑、抗精神病劑或治療糖尿病之藥劑，其中：

該另一種醫療劑適合所治療之疾病；且

該另一種醫療劑與該組合物共同形成單一劑型投藥或與

該組合物分開形成多重劑型之一部份投藥。

根據另一項具體實施例，本發明係有關於生物樣本中抑制 GSK-3 激酶活性之方法，其包括之步驟為由該生物樣本與本發明化合物或含該化合物之組合物接觸。

本文所採用"生物樣本"包括(但不限於)細胞培養物或其萃取物；得自哺乳動物之生物檢體材料或其萃取物及血液、唾液、尿、糞、精液、淚液或其他體液或其萃取物。

生物樣本中 GSK-3 激酶活性適用於習此相關技藝之人士已知之多種目的。此等目的實例包括(但不限於)輸血、器官移植、生物檢體保存及生物分析法。

根據另一項具體實施例，本發明係有關為患者抑制 GSK-3 激酶活性之方法，其包括之步驟為對該患者投與本發明化合物或含該化合物之組合物。

根據另一項具體實施例，本發明提供一種治療或減輕患者之 GSK-3 所媒介疾病或病症之方法，其包括之步驟為對該患者投與根據本發明組合物。

本文所採用"GSK-3 所媒介疾病"意指 GSK-3 在其中扮演某種角色之任何疾病或其他有害病症或疾病。此等疾病或病症包括(但不限於)自體免疫疾病、炎症、代謝異常、精神病、糖尿病、血管新生性疾病、 τ -蛋白質形成異常(tauopathy)

、神經性或神經變性病變、脊柱傷害、青光眼、禿髮或心血管疾病。

根據另一項具體實施例，本發明係有關一種為有需要之患者治療或減輕選自下列之疾病、病變或病症之方法：自體免疫疾病、炎症、代謝異常、精神病、糖尿病、血管新生性疾病、 τ -蛋白質形成異常、神經性或神經變性病變、脊柱傷害、青光眼、禿髮或心血管疾病，其包括之步驟為對該患者投與根據化合物或其組合物。

根據另一項具體實施例，本發明係有關一種治療或減輕選自下列之疾病、病變或病症之方法：過敏、氣喘、糖尿病、阿茲海默氏症、亨丁頓氏症、帕金森氏症、與AIDS-有關之癡呆症、肌萎縮性側索硬化(ALS路格威氏症(Lou Gehrig's disease))、多發性硬化(MS)、因頭部創傷造成之傷害、精神分裂症、焦慮症、兩極化病變、 τ -蛋白質形成異常、脊柱或周邊神經傷害、心肌梗塞、心肌細胞肥大、青光眼、注意力缺乏異常(ADD)、抑鬱症、睡眠障礙、再灌注/絕血、中風、血管新生性病變或禿髮，其中該方法包括之步驟為對有需要之患者投與化合物或其組合物。

根據較佳具體實施例，本發明方法係有關治療或減輕中風嚴重性之方法。

根據另一項較佳具體實施例，本發明方法係有關治療或減輕神經性或神經變性病變嚴重性之方法。

本發明另一方面係有關一種降低男性患者精子活動力之方法，其包括對該患者投與化合物或其組合物。

另一項具體實施例中，使用不含其他醫療劑之組合物之本發明方法包括另一個對該患者分開投與該另一種醫療劑之步驟。當此等其他醫療劑分開投藥時，可在投與本發明組合物之前、接續或之後投與患者。

為了更了解本發明，出示下列實例。咸了解，此等實例僅供說明用，並未以任何方式限制本發明。

實例

本文所採用稱為"方法 A"之 HPLC 法如下：

管柱：C18, 3 μ m, 2.1 X 50 mm，品名為 Jones Chromatography 公司之 "Lighting"。

梯度：100% 水 (含 1% 乙腈，0.1% TFA) 至 100% 乙腈 (含 0.1% TFA)，歷時 4.0 分鐘，保持 100% 乙腈 1.4 分鐘，然後回到初始條件。

總運作時間 7.0 分鐘。

流速：0.8 mL/分鐘。

本文所採用 " R_t " 一詞指滯留時間 (以分鐘計)，由化合物依指定之 HPLC 法取得。下列實例中之化合物編號相當於上表 1 中所示之化合物編號。

實例 1

6-甲基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘧啶-4-酮：取含 2-三氟甲基-苯甲脒 (2.13 g, 4 mmol) 與乙醇鈉 (0.83 g, 12 mmol) 之乙醇 (20 mL) 混合物經乙醯乙酸甲酯 (0.44 mL, 4 mmol) 處理，加熱 24 小時。反應冷卻，濃縮，加水稀釋，以 2 N 鹽酸酸化。所得溶液經乙酸乙酯萃取，經硫酸鈉脫水及濃縮。經急驟層析法純化

[SiO₂, 甲醇:二氯甲烷(3:97)], 產生標題化合物(0.51 g, 收率 50%)之黃色固體; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 12.7 (br s, 1H), 7.9 (m, 1H), 7.8 (m, 2H), 7.7 (m, 1H), 6.3 (s, 1H), 2.21 (s, 3H) ppm; MS (FIA) 255.0 (M+H); R_t(方法 A) 2.578 分鐘。

實例 2

4-氯-6-甲基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶: 取含 6-甲基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘧啶-4-酮(10.7 g, 41.9 mmol)之磷鹽氯(39 mL, 419 mmol)溶液經三-正丙胺(16 mL, 83.9 mmol)處理, 於 110-120°C 下回流 1 小時。蒸發溶劑, 與甲苯共沸三次後, 真空乾燥。殘質溶於乙酸乙酯中, 依序以 1 N 氫氧化鈉、水與鹽水洗滌後, 經硫酸鈉脫水及濃縮。經急驟層析法純化[SiO₂, 乙酸乙酯:己烷(1:9)], 產生標題化合物(9.61 g, 收率 84%)之橙色油狀物。¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 2.63 (3H, s), 7.26 (s, 1H), 7.61 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.67 (t, J=7.5Hz, 1H), 7.76 (d, J=7.6Hz, 1H), 7.82 (d, J=7.8Hz, 1H) ppm; MS (FIA) 273.0 (M+H); R_t(方法 A) 3.499 分鐘。

實例 3

(5-氟-1H-吡啶-3-基)-[6-甲基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶-4-基]胺(I-2): 取含 4-氯-6-甲基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶(0.10g, 0.37 mmol)與 5-氟-1H-吡啶-3-基胺(0.072 g, 0.48 mmol)於無溶劑下, 在 160-170°C 下加熱 8 小時。所得殘質冷卻至至周溫後, 溶於 N-甲基-吡咯啶酮(2 mL)中。此混合物倒至水(20 mL)中, 添加碳酸氫鈉(5 mL), 所得混合物過濾, 以水洗滌。經製備性 HPLC 純化, 產生標題化合物(0.081 g, 收率 43%)之黃褐色固體。

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 12.8 (br s, 1H), 10.6 (br s, 1H), 7.86 (d,

$J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.77 (m, 4H), 7.62 (br s, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.29 (m, 1H), 2.44 (s, 3H) ppm LC-MS 388.05 (M+H); R_t (方法 A) 2.900 分鐘。

實例 4

6-第三丁基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘓啶-4-酮：取含 2-三氟甲基苯甲脒 (1.12 g, 5 mmol)、乙醇鈉 (1.02 g, 15 mmol) 與 4,4-二甲基-3-氧代-戊酸甲酯 (0.80 mL, 5 mmol) 之乙醇 (50 mL) 混合物回流加熱 16 小時。反應冷卻，濃縮，加水稀釋，以 2 N 鹽酸酸化。此溶液經乙酸乙酯萃取，經硫酸鈉脫水及濃縮。經急驟層析法純化 [SiO_2 ，甲醇：二氯甲烷 (2:98)] 產生標題化合物 (0.48 g，收率 32%) 之黃色固體； $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 12.8 (br s, 1H), 7.89 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.78 (m, 2H), 7.71 (d, $J=7.4\text{Hz}$, 1H), 6.24 (s, 1H), 1.20 (s, 9H) ppm; LC-MS 297.03 (M+H); R_t (方法 A) 3.30 分鐘。

實例 5

6-第三丁基-6-氯-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘓啶：取含 6-第三丁基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘓啶-4-酮 (0.47 g, 1.59 mmol) 之磷醯氯 (1.65 mL, 15.9 mmol) 溶液經三-正丙胺 (0.61 mL, 3.17 mmol) 處理，於 110-120°C 下加熱 1 小時。蒸發排除溶劑後，與甲苯共沸三次。殘質溶於乙酸乙酯中，依序以 1N 氫氧化鈉、水與鹽水洗滌後，經硫酸鈉脫水及濃縮。經急驟層析法純化 [SiO_2 ，乙酸乙酯：己烷 (1:9)]，產生標題化合物 (0.33 g，收率 66%) 之黃色油狀物。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 1.31 (9H, s), 7.25 (s, 1H), 7.51 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.58 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.74 (t, $J=8.5\text{Hz}$, 2H) ppm; MS (FIA) 314.9 (M+H); R_t (方法 A) 4.156 分鐘。

實例 6

[6-第三丁基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶-4-基]-(1H-吡唑並[3,4-b]吡啶-3-基)-胺(I-3)：取含4-氯-6-第三丁基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶(0.10 g, 0.32 mmol)與1H-吡唑並[3,4-b]吡啶-3-基胺(0.064 g, 0.48 mmol)於無溶劑下，在160-170°C下加熱16小時。所得殘質冷卻，溶於N-甲基-吡咯啉酮(2 mL)中後，倒至水(20 mL)中，添加碳酸氫鈉(5 mL)，以乙酸乙酯萃取2次。合併之有機層經水洗滌4次，以鹽水洗滌1次後，經硫酸鈉脫水與濃縮。粗產物經製備性HPLC純化，產生標題化合物(0.007 g，收率4%)之黃色固體。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (br s, 1H), 10.6 (br s, 1H), 8.49 (m, 2H), 7.84 (d, J=7.8Hz, 2H), 7.76 (m, 2H), 7.68 (m, 1H), 7.12 (m, 1H), 1.32 (s, 9H) ppm; LC-MS 413.08 (M+H); R_t(方法A)3.112分鐘。

實例 7

6-環丙基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘧啶-4-酮：

- (1-環丙基-乙烯基)-二甲胺：

於0°C與氮蒙氣下，在含環丙基甲基酮(19.8 mL, 200 mmol)之戊烷(600 mL)溶液中添加二甲胺/四氫呋喃(2M, 500 mL, 1000 mmol)，然後滴加含氯化鈦(IV)(12.1 mL, 110 mmol)之戊烷(60 mL)溶液。反應於0°C下攪拌0.5小時後，於室溫下攪拌5小時。反應經寅氏鹽過濾，以戊烷與醚洗滌，於槽溫15-20°C下真空濃縮後，呈橙色油狀物於-4°C下存放一夜。

- 2-三氟甲基苯甲醯基異氰酸酯：

於室溫下與氮蒙氣下，取含2-三氟甲基苯醯胺(34.9 g, 185

mmol)之1,2-二氯乙烷(600 mL)溶液，快速滴加草醯氯(20.2 mL, 230 mmol)處理，反應於70-80°C下攪拌一夜。蒸發排除溶劑殘質與甲苯共沸2次。

• 6-環丙基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘓啉-4-酮：

於0°C與氮蒙氣下，在含(1-環丙基-乙烯基)-二甲胺之四氫呋喃(400 mL)溶液中滴加含2-三氟甲基苯甲醯基異氰酸酯之四氫呋喃(50 mL)溶液處理。攪拌反應0.5小時後，添加乙酸鉍(78 g, 1000 mmol)與乙酸(400 mL)。反應混合物回流加熱3小時，同時連續排除四氫呋喃後，冷卻，倒至水(1.2 L)中。過濾收集所得沉澱，以水與醚洗滌，產生6-環丙基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘓啉-4-酮(28.79 g，收率56%)之白色固體，其係標題化合物與(2-三氟甲基-苯甲醯基)-脲之混合物(91:9，HPLC測定)。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 12.7 (br s, 1H), 7.87 (d, J=7.6Hz, 1H), 7.79 (m, 2H), 7.73 (d, J=7.5Hz, 1H), 6.32 (s, 1H), 1.93 (m, 1H), 0.90 (m, 4H), [脲：10.8 (br s, 1H), 7.45 (br s, 1H)] ppm; LC-MS 280.96 (M+H); R_t(方法A)2.961分鐘(標題化合物)，2.313分鐘(脲雜質)。

實例 8

4-氯-6-環丙基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘓啉：取6-環丙基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘓啉-4-酮(12.0 g, 42.8 mmol)之磷醯氯(40 mL, 428 mmol)溶液於75-80°C下加熱1小時。蒸發排除溶劑，與甲苯共沸3次。殘質冷卻至0°C，溶於乙酸乙酯中，以碎冰及水處理。混合物依序經碳酸氫鈉、水與鹽水洗滌，經硫酸鈉脫水及濃縮。經急驟層析法純化[SiO₂，5:95 乙酸乙酯:己

烷(5:95)]，產生標題化合物(9.71 g，收率76%)之無色油狀物。
 ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 1.12 (m, 2H), 1.30 (m, 2H), 2.02 (m, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.56 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.64 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.79 (m, 2H) ppm; MS (FIA) 299.1/300.9 (M+H); R_t (方法A)3.882分鐘。

實例 9

[6-環丙基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶-4-基]-(1H-吡啶-3-基)-胺 (I-4)：取含4-氯-6-環丙基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶(0.08 g, 0.27 mmol)與1H-吡啶-3-基胺(0.036 g, 0.41 mmol)之混合物於無溶劑下，在160-170°C下加熱6小時。所得殘質冷卻，溶於N-甲基-吡咯啶酮(2 mL)中後，倒至水(30 mL)中，添加碳酸氫鈉(5 mL)後，過濾，以水與醚洗滌。收集沉澱，合併醚洗液，濃縮。經急驟層析法純化 [SiO_2 ，甲醇：二氯甲烷(2:98)]，產生標題化合物(0.017 g，收率15%)之淺黃色固體。 ^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.6 (br s, 1H), 10.2 (br s, 1H), 8.00(d, $J=8.1\text{Hz}$, 2H), 7.81 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 7.71 (m, 3H), 7.65 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 1H), 7.45 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 7.36 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.06 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 2.04 (m, 1H), 1.01 (m, 2H), 0.96 (m, 2H) ppm; LC-MS 396.10 (M+H); R_t (方法A) 3.122分鐘。

實例 10

[6-環丙基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶-4-基]-(1H-吡啶並[3,4-b]吡啶-3-基)-胺 (I-1)：取含4-氯-6-環丙基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶(7.00 g, 23.4 mmol，依上述實例8所述製備)與1H-吡啶並[3,4-b]吡啶-3-基胺(9.43 g, 70.3 mmol)之N-甲基吡咯啶酮(50 mL)溶液於130°C下加熱12小時。殘質冷卻，溶於N-甲基吡

咯啉酮(2 mL)中，倒至水(500 mL)與碳酸氫鈉(15 mL)中後，過濾，以水洗滌。經急驟層析法純化[SiO₂，乙酸乙酯:己烷(35:65)]，產生標題化合物(5.25 g，收率57%)之白色固體。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13.1 (br s, 1H), 10.5 (br s, 1H), 8.50 (m, 2H), 7.82 (d, J=7.8Hz, 1H), 7.73 (m, 3H), 7.66 (t, J=7.7Hz, 1H), 7.12 (m, 1H), 2.07 (m, 1H), 1.02 (m, 2H), 0.97 (m, 2H) ppm; LC-MS 397.22 (M+H); R_t(方法 A)3.412分鐘。

實例 11

[6-環丙基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘓啉-4-基]-(1H-吡啶並[3,4-b]吡啶-3-基)-胺鹽酸鹽：HCl鹽之製法為取化合物 I-1 (8.42 g, 21.4 mmol)溶於6 N鹽酸中，冷凍乾燥後，產生標題化合物(9.242 g, 99 %)之黃色固體。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13.3 (br s, 1H), 10.9 (br s, 1H), 8.53 (dd, J=4.4, 1.4Hz, 1H), 8.48 (br d, J=7.4Hz, 1H), 7.87 (d, J=7.8Hz, 1H), 7.79 (m, 2H), 7.72 (t, J=6.8Hz, 2H), 7.15 (m, 1H), 2.14 (m, 1H), 1.07 (m, 4H) ppm; MS (FIA) 397.3 (M+H), 395.2 (M-H), 431.2 (M-H+HCl); R_t(方法 A)2.798分鐘。

實例 12

6-丁-3-烯基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘓啉-4-酮：依上述實例1所述，但改用3-氧代-庚-6-烯酸乙酯製備6-丁-3-烯基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘓啉-4-酮。此反應產生標題化合物(2.545 g，收率49%)之乳色固體。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 12.8 (s, 1H), 7.88 (d, 1H), 7.79 (t, 1H), 7.75 (t, 1H), 7.68 (d, 1H), 6.22 (s, 1H), 5.80 (m, 1H), 5.03 (dd, 1H), 4.98 (dd, 1H), 2.56 (t, 2H), 2.36 (m, 2H) ppm; MS (FIA) 295.1 (M+H); R_t(方法 A)3.160分鐘。

實例 13

4-丁-3-烯基-6-氯-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘓啶：依上述實例2所述，但改用6-丁-3-烯基-2-(2-三氟甲基-苯基)-3H-嘓啶-4-酮製備標題化合物，產生黃色油狀物(0.49 g，收率99%)。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7.72 (d, 1H), 7.67 (d, 1H), 7.57 (t, 1H), 7.51 (t, 1H), 7.13 (s, 1H), 5.77 (m, 1H), 4.98 (m, 2H), 2.84 (t, 2H), 2.49 (m, 2H) ppm; MS (FIA) 313.0 (M+H); R_t(方法A)4.220分鐘。

實例 14

[6-丁-3-烯基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘓啶-4-基]-(1H-吡啶並[3,4-b]吡啶-3-基)-胺(I-7)：依實例6所述，但改用4-丁-3-烯基-6-氯-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘓啶製備標題化合物，產生乳色固體(2.712 g，收率62%)。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13.1 (s, 1H), 10.56 (s, 1H), 8.50 (m, 1H), 8.47 (d, 1H), 7.84 (d, 1H), 7.76 (t, 1H), 7.69 (m, 3H), 7.13 (m, 1H), 5.86 (m, 1H), 5.06 (dd, 1H), 4.98 (dd, 1H), 2.76 (t, 2H), 2.46 (m, 2H) ppm; MS (FIA) 411.2 (M+H); R_t(方法A)3.019分鐘。

實例 15

[6-(3-嗎啉-4-基-丙基)-2-(2-三氟甲基-苯基)嘓啶-4-基]-(1H-吡啶並[3,4-b]吡啶-3-基)-胺(I-8)：取含[6-丁-3-烯基-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘓啶-4-基]-(1H-吡啶並[3,4-b]吡啶-3-基)-胺(0.10 g, 0.25 mmol)之甲醇(5 mL)與四氫呋喃(5 mL)溶液於-78°C下通入臭氧5分鐘。在此混合物中添加嗎啉(0.05 mL, 0.56 mmol)與三乙醯氧基氫硼化鈉(0.39 g, 1.85 mmol)。反應於室溫下攪拌24小時，此期間再添加嗎啉(0.10 mL, 1.28 mmol)與三乙醯氧基氫硼化鈉(0.39 g, 1.85 mmol)，然後繼續攪拌2小時。添加碳酸氫

鈉中止反應及蒸發。經急驟層析法純化(SiO_2 ，以 1:9 甲醇：二氯甲烷溶離)，然後經製備性 HPLC 純化，產生標題化合物之鮮黃色冷凍乾燥物(0.068 g，收率 38 %)。484.3 (M+H)。 ^1H -NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 9.60 (br s, 1H), 8.52 (m, 1H), 8.47 (d, 1H), 7.86 (d, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.70(m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.97 (br m, 2H), 3.61 (br m, 2H), 3.44 (br m, 2H), 3.18 (br m, 2H), 3.05 (br m, 2H), 2.78 (t, 2H), 2.08 (m, 2H) ppm。

實例 16

實質上依本文中實例 1-15、一般反應圖及採用習此相關技藝之人士已知之方法製備下列化合物。

[6-(3-六氫吡啶-1-基-丙基)-2-(2-三氟甲基-苯基)嘧啶-4-基]-(1H-吡啶並[3,4-b]吡啶-3-基)-胺 (I-9): 482.2(M+H)。 ^1H -NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 9.04 (br s, 1H), 8.52 (m, 1H), 8.47 (d, 1H), 7.85 (d, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.42 (m, 2H), 3.10 (m, 2H), 2.85 (m, 2H), 2.77(t, 2H), 2.09 (m, 2H), 1.79 (m, 2H), 1.61 (m, 3H), 1.35 (m, 1H) ppm。

[6-(3-二乙胺基-丙基)-2-(2-三氟甲基-苯基)嘧啶-4-基]-(1H-吡啶並[3,4-b]吡啶-3-基)-胺 (I-10): 470 (M+H)。 ^1H -NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 9.07 (s, 1H), 8.50 (m, 1H), 7.85 (m, 1H), 7.78 (d, 1H), 7.76 (m, 1H), 7.71 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.11 (m, 6H), 2.80 (t, 2H), 2.05 (m, 2H), 1.15 (t, 6H) ppm。

[6-(3-(4-甲基-六氫吡啶-1-基)-丙基)-2-(2-三氟甲基-苯基)嘧啶-4-基]-(1H-吡啶並[3,4-b]吡啶-3-基)-胺 (I-11): 497.2 (M+H)。 ^1H -NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 8.52 (m, 1H), 8.47

(m, 2H), 7.85 (d, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.72 (m, 3H), 7.14 (m, 1H), 3.0-3.7 (br, IOH), 2.83 (s, 3H), 2.77 (t, 2H), 2.05 (m, 2H) ppm。

[6-(3-六氫吡咩-1-基-丙基)-2-(2-三氟甲基-苯基)嘧啶-4-基]-(1H-吡啶並[3,4-b]吡啶-3-基)-胺(I-12): 483.3 (M+H)。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 9.06 (br s, 2H), 8.52 (m, 1H), 8.47 (d, 1H), 7.85 (d, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.34 (br m, 8H), 3.15 (br m, 2H), 2.77 (t, 2H), 2.06 (m, 2H) ppm。

[6-(3-二甲胺基-丙基)-2-(2-三氟甲基-苯基)嘧啶-4-基]-(1H-吡啶並[3,4-b]吡啶-3-基)-胺(I-13): 442.1 (M+H)。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 9.40 (br s, 1H), 8.52 (m, 1H), 8.47 (d, 1H), 7.85 (d, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.71 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.12 (m, 2H), 2.77 (m, 8H), 2.06 (m, 2H) ppm。

N,N-二甲基-N'-{3-[6-(1H-吡啶並[3,4-b]吡啶-3-基-胺基)-2-(2-三氟甲基-苯基)-嘧啶-4-基]-丙基}-乙烷-1, 2-二胺(I-14): 485.3 (M+H)。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 9.7 (br, 1H), 8.8 (br s, 1H), 8.52 (m, 1H), 8.48 (d, 1H), 7.85 (d, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.71 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.32 (s, 4H), 3.07 (br m, 2H), 2.84 (s, 6H), 2.80 (m, 2H), 2.04 (m, 2H) ppm。

[6-(3-甲胺基-丙基)-2-(2-三氟甲基-苯基)嘧啶-4-基]-(1H-吡啶並[3,4-b]吡啶-3-基)-胺(I-15): 428.1 (M+H)。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 8.51 (m, 1H), 8.48 (d, 1H), 8.37 (br s, 2H), 7.85 (d, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 2.97 (m, 2H), 2.78 (t, 2H), 2.55 (m, 3H), 2.01 (m, 2H) ppm。

2-{3-[6-(1H-吡啶並[3,4-b]吡啶-3-基胺基)-2-(2-三氟甲基-苯基)-

嘧啶-基]丙胺基}-乙醇(I-16): 458.2 (M+H)。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 8.52 (m, 1H), 8.47 (m, 2H), 7.85 (d, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.69 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.62 (t, 2H), 2.99 (m, 4H), 2.78 (t, 2H), 2.04 (m, 2H) ppm。

[6-(3-(2-嗎啉-4-基-乙胺基)-丙基)-2-(2-三氟甲基-苯基)嘧啶-4-基]-(1H-吡唑並[3,4-b]吡啶-3-基)-胺(I-17): 527.2 (M+H)。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 8.76 (br s, 2H), 8.52 (m, 1H), 8.48 (d, 1H), 7.85 (d, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.81 (br s, 4H), 3.1-3.3 (br m, 8H), 3.06 (t, 2H), 2.80 (t, 2H), 2.05 (t, 2H) ppm。

[6-{3-[甲基-(2-嗎啉-4-基-乙基)-胺基]-丙基}-2-(2-三氟甲基-苯基)嘧啶-4-基]-(1H-吡唑並[3,4-b]吡啶-3-基)-胺(I-18): 541.2 (M+H)。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13.2 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 8.52 (m, 1H), 8.47 (d, 1H), 7.85 (d, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 3.73 (br s, 4H), 3.39 (m, 2H), 3.21 (m, 2H), 2.8-3.3 (br m, 6H) 2.81 (s, 3H), 2.78 (t, 2H), 2.09 (m, 2H) ppm。

實例 17

抑制 GSK-3 之 K_i 測定法

採用標準之偶合酵素系統篩選化合物抑制 GSK-3β (AA 1-420) 之能力 (Fox et al. (1998) Protein Sci. 7, 2249)。於含 100 mM HEPES (pH 7.5)、10 mM MgCl₂、25 mM NaCl、300 μM NADH、1 mM DTT 與 1.5% DMSO 之溶液中進行反應。分析法中最終受質濃度為 20 μM ATP (Sigma Chemicals, St Louis, MO) 與 300 μM 肽 (HSSPHQS(PO₃H₂)EDEEE, American Peptide, Sunnyvale, CA)。於 30°C

下與 20 nM GSK-3 β 反應。偶合酵素系統中最終成分濃度為 2.5 mM 磷酸烯醇丙酮酸酯、300 μ M NADH、30 μ g/ml 丙酮酸酯激酶及 10 μ g/ml 乳酸酯脫氫酶。

製備含有上述所有試劑，但不含 ATP 及所需試驗化合物之分析母液緩衝液。取分析母液緩衝液 (175 μ l) 於 96 孔分析板中與 5 μ l 所需試驗化合物 (終濃度範圍在 0.002 μ M 至 30 μ M)，於 30°C 下培養 10 分鐘。典型地，於子分析板中，使用試驗化合物之 DMSO 製備一系列稀釋液 (由 10 mM 化合物母液製備) 進行 12 點滴定。添加 20 μ l ATP (終濃度 20 μ M) 開始反應。採用 Molecular Devices Spectramax 分析板讀數機 (Sunnyvale, CA) 於 30°C 下操作 10 分鐘，得到反應速率。由反應速率隨抑制劑濃度之變化函數，得到 K_i 值。

已採用上述分析法發現本發明化合物之 K_i 值小於 100 nM。

實例 18

神經保護性百分比測法

本文所採用 "保護性百分比" 代表保護神經元細胞對抗絕血傷害 (OGD) 之百分比，其計算法如下：

$$\text{保護性 \%} = (\text{試驗值} - \text{OGD}) / (\text{正常值} - \text{OGD}) * 100$$

此方法說明採用缺氧-再灌氧方法，於培養之海馬回神經元細胞中誘發實驗性絕血之方法。試驗化合物之保護神經效應係針對絕血誘發之神經元細胞傷害及細胞死亡分析。

在分析前一天進行下列步驟：

取 LoG-Neurobasal [LoG-Neurobasal 含有 NoG-Neurobasal 培養基 (Invitrogen Corp, 客戶訂製) 加 0.5 mM 葡萄糖、0.5 mM L-麩醯胺

與 0.25x 青黴素/鏈黴素]於低氧室中預平衡一夜。

取 LoG-Neurobasal 於正常培養箱 (5% CO₂) 中預平衡一夜。

在正常培養箱 (5% CO₂) 中，取 Neurobasal/B27AO [Neurobasal/B27AO 含有 Neurobasal 培養基 (Invitrogen Corp 目錄編號 21103-049) 與減去 AO 之 2x B27 補充物 (Invitrogen Corp 目錄編號 10889-038)，0.5 mM L-麩醯胺與 0.25x 青黴素/鏈黴素]預平衡一夜。

在分析當天進行下列步驟：

自低氧室中取出 LoG-Neurobasal 培養基，使 100% 氮氣流輕輕通過培養基 30 分鐘，使之完全脫氧化。

採用附接無菌玻璃吸管之真空幫浦，自各 12 孔板中之細胞吸出 Neurobasal/B27m 培養基 [Neurobasal/B27m 含有 Neurobasal 培養基與 2x B27 補充物 (Invitrogen Corp 目錄編號 17504-044) 及 0.5 mM L-麩醯胺]。

以 2 ml 無葡萄糖-BSS₀ (pH 7.4)(由下列材料製備：143.6 mM NaCl、5.4 mM KCl、1.8 mM CaCl₂、0.8 mM MgSO₄、1 mM NaH₂PO₄、26.2 mM NaHCO₃、10 mg/l 酚紅與 0.25x P/S)洗滌分析板一次。

在神經元(自初次培養後 10-11 天)中補充脫氧之 LoG-Neurobasal(各 12-孔分析板中每孔 1 ml)。此等神經元細胞係依據 Park LC, Calingasan NY, Uchida K, Zhang H, Gibson GE. (2000) "培養物中代謝損傷誘發腦細胞型態選擇性之氧化壓力與細胞死亡變化"，J Neurochem 74(1):114-124 之方法製備。

直接添加試驗化合物至各孔中(3種試驗化合物濃度加陽性對照組，各進行三重覆)。取化合物溶於 100% DMSO 中，

其中DMSO之濃度不可超過0.5%，將分析板加上蓋子後置於低氧室中5小時。

正常含氧控制組中，在各孔中添加預先平衡之正常含氧LoG-Neurobasal培養基，分析板置於正常培養箱中4小時。

缺氧4小時後，小心吸出原有培養基，在各孔中添加2 mL新近通氧(預先平衡)之Neurobasal/B27AO。使用前，培養基於培養箱(5% CO₂/95% O₂)中培養一夜，使培養基再度含氧。

再添加相同濃度之相同試驗化合物至相應孔中，分析板置於細胞培養箱(5% CO₂/95% O₂)中，再度通氧20-24小時。通氧20-24小時後，採用下文說明之綠色細胞追蹤劑螢光法計算活的神經元數目。

自12孔分析板之各孔中吸出原有之培養基，以預溫熱至30-37°C之2 ml HBSS (pH 7.4, Invitrogen Corp, 目錄編號14170-112)洗滌神經元一次。

在分析板之各孔中添加已溶於HBSS之1ml 2.5 μM綠色細胞追蹤劑(Cell Tracker Green)(Molecular Probes目錄編號2925)與5 μM Hoechst 33342螢光染料。分析板置於室溫下之暗室中15分鐘後，以2 ml HBSS洗滌神經元一次。在各孔中添加1 ml HBSS，採用Cellomics®自動化顯影系統計算活的與死的螢光細胞數目。

已發現本發明化合物之保護值 $\geq 30\%$ 。

實例 19

中腦動脈閉鎖模式(MCAO)

此研究法採用之動物為雄性Sprague-Dawley大鼠，體重270

至 333 g 之間 (Charles River, NC)。使大鼠於 12 小時光/暗日夜循環中適應動物試驗設備至少一週。可以自由飲水與攝食。

用於阻斷中腦動脈 (MCA) 源頭之管腔內動脈閉鎖器係由 4-0 號尼龍單絲縫合線切成長 25 mm 之線段所組成。縫合線尖端經加熱而呈圓鈍端。為了提高閉鎖器阻斷動脈管腔之有效性，使用 1% 聚-L-離胺酸懸浮液塗覆，於 60°C 烘箱中乾燥 1 小時。縫合線係購自 Ethelon, Somerville, NJ。所使用之化學試劑如下：

1. 2,3,5-三苯基四唑鎢氯化物或 TTC，目錄編號 T8877，批號 50K1435 及 PEG400，目錄編號 P-3265，購自 Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri。
2. 磷酸鹽緩衝之福馬林。目錄編號 245-685，購自 Fisher Scientific Co., Middletown, VA。
3. 自行製造之蒸餾水。
4. 乙醇，目錄編號 E702-3，購自 Aldridge, Milwaukee, WI。

採用實質上依 Longa, et al.. Stroke, 20:84-91 (1989) 所述之方法進行局部性腦絕血之管腔內縫合模式。在左外頸靜脈上插管供投與媒劑或化合物。

為了在試驗期間保持大鼠在含水狀態，於 MCAO 後 10、24 及 48 小時時，在各下腹經皮下注射含 5% 右旋糖之水溶液與含乳酸鹽之林格氏溶液 (各 5 ml)。

取出符合初閉鎖條件之大鼠 (神經性分數為 2 且體溫 $>38.5^{\circ}\text{C}$) 隨機依序分配至媒劑組或化合物處理組。分配至指定組之大鼠之每日處理將於每天輪流交替。

於MCAO後6小時，經靜脈內注射大丸劑開始進行化合物或媒劑處理，並採用Infu Disk幫浦持續注射18小時。暫時麻醉大鼠，切開頸背部，露出頸靜脈導管。投與化合物或媒劑之大丸劑劑量，5分鐘後再啟動輸液幫浦。輸液幫浦係利用一件外套固定在鼠背上。

化合物溶液係使用含水:PEG400:乙醇(體積比5:4:1)之溶液，每天新鮮製備。此模式使用之組別與劑量示於下表2中。

表2. t-MCAO模式之化合物劑量

組別	n	處理	大丸劑 劑量* (mg/kg)	輸液劑量 (mg/kg/小時)	大丸劑 化合物 (mg/mL)	輸液 化合物** (mg/mL)
1	12	媒劑	---	---	---	---
2	10	化合物	35	14	21.4	21.4

*大丸劑劑量體積0.49 mL

**輸液速率0.21 mL/小時，輸液時間歷時18小時。

修改Bederson等人(1986)所述之方法，由7個連續2, 3, 5-三苯基四唑鎢氯化物(TTC)染色之切片進行影像分析，決定梗塞體積。MCAO後3天，以CO₂窒息法殺死大鼠及斷頭。迅速自頭中取出腦部，置於在冰浴中之含PBS之燒杯內30分鐘。採用腦組織手術刀片切下厚2毫米之冠狀腦部切片。腦部切片置於含2% TTC之PBS溶液之有標記之培養皿中，於37°C下20分鐘。TTC使活的腦組織染成紅色，留下絕血區域呈白色。將腦切片浸入10%中性緩衝之福馬林中，於4°C下至少24小時。所有切片均在殺死後3天內顯影。

福馬林固定之TTC染色腦切片(7張連續切片)採用Adobe Photoshop軟體與數位相機捕捉數位影像。將影像輸入IPLab影像分析程式中。標出皮質梗塞區域(白色區)並測量。使用下列公式計算梗塞體積：

$$\text{梗塞體積} = \Sigma \text{梗塞面積} \times 2 \text{ (各切片之間距離)}$$

同樣測定同側與反側半球總體積。水腫體積之計算法為自同側半球體積中扣除反側半球體積。大鼠之處理並未告知進行此分析之科學家。

依Bederson等人(1986b)所述，使用記分系統，於MACO後2、24、48及72小時時，分析大鼠之神經功能。分數範圍為0至3，0分表示正常，3分表示嚴重缺陷。

採用絕血2小時時之神經學分數作為試驗之閉鎖標準。若大鼠之神經學分數不到至少2分或若得到3分時，則自試驗中淘汰。大鼠之處理並未告知進行神經分析法之研究者。

於注射大丸劑後5分鐘及4、22、46與70小時時，自大鼠體內抽出血樣(約0.5 mL)，供進行藥物動力學分析。大鼠經異氟烷醚輕微麻醉。使用23號蝴蝶型輸液組，自外側尾靜脈抽血至含肝素之血液收集管中(容量0.6 mL)。血樣於微離心機中離心4分鐘(設定在10)。排出血漿，置入有標籤之小瓶中，存放在-20℃冷凍庫中。

MCAO後72小時時，使用大鼠吸入CO₂深度麻醉，並由心臟儘可能抽出血液。血液置入含肝素之血液收集管中(容量6 mL)。血液於4000 rpm下離心5分鐘(Allegra R6)，分離血漿。收集血漿，置入有標籤之塑膠管中，存放在-20℃冷凍庫中。

採用雙尾史都登氏(Student's) t-試驗，進行媒劑組與處理組之間梗塞區域、血漿葡萄糖、體溫及體重之統計分析。以非變數分析法統計分析神經學分數。數據以平均值 $\pm$ SEM表示。

在暫時性局部中風模式中，於MCAO後6小時投與式I化合物之處理對降低梗塞體積極為有效(圖1)。化合物處理組之大鼠之梗塞總體積($88\pm 31\text{ mm}^3$)相較於媒劑對照組($418\pm 31\text{ mm}^3$, $p<0.0001$)具有高度顯著之79%降低效果。化合物處理組之大鼠之皮質絕血傷害($32\pm 20\text{ mm}^3$)相較於媒劑對照組($272\pm 22\text{ mm}^3$, $p<0.0001$)亦具有高度顯著之88%降低效果。式I化合物處理組之紋狀體絕血傷害($55\pm 12\text{ mm}^3$)相較於媒劑對照組($146\pm 13\text{ mm}^3$, $p<0.0001$)可以顯著降低62%。最後，式I化合物處理組($21\pm 10\text{ mm}^3$)相較於媒劑對照組($97\pm 10\text{ mm}^3$, $p<0.0001$)降低79%水腫形成量。

接受式I化合物處理之大鼠證實可以隨實驗時間顯著改善神經功能(圖2)。開始投藥後18小時時，即可由化合物處理組相較於媒劑對照組觀察到神經功能之顯著改善(1.3 ± 0.3 相對於 2 ± 0 單位，分別為 $p<0.01$)。MCAO後72小時之化合物處理組大鼠之分數仍持續改善，這些大鼠之功能缺陷很少或沒有。反之，媒劑處理組大鼠之神經功能則在實驗期間沒有改善。

實例 20

抗抑鬱劑之動物模式

實質上類似 Porsolt, R.D., et al., 1977; 229: 327-336; Bourin M.

Fundam Clin Pharmacol 1990; 4: 49-64所述之方法，分析本發明化合物於大鼠中之抗抑鬱劑活性。

大鼠之游泳試驗(抑鬱症試驗)

將大鼠置入充水之透明圓筒中。手動記錄大鼠之不動時間，其定義為大鼠僅做最小幅之身體動作，以保持頭在水面上之時間。第4天進行第二次試驗時，再度將大鼠置於圓筒中，歷時5分鐘。整個試驗期間均記錄其不動時間。

試驗I(初次試驗)：

第1天時，取雄性 Wistar 大鼠(RA239品種；160-180 g)置入圓筒中15分鐘。手動記錄大鼠之不動時間，其定義為大鼠僅做最小幅之身體動作，以保持頭在水面上之時間。為了在一天內測試合理之動物數量，在15分鐘試驗期內限於下列三個小試驗期：0-2.5分鐘(亦即試驗開始時)，6.25-8.75分鐘(試驗中期)及12.5-15分鐘(試驗結束時)。過去即發現此方法可代表動物在整個試驗期之‘效能’。

試驗II(第二次試驗)：

第4天時，再將大鼠置入圓筒中5分鐘。整個試驗期間均記錄其不動時間。

試驗化合物懸浮於0.5%甲基纖維素(Methocel)中，經口投藥(5 ml/kg)。藥物係於第一天(試驗I當天)傍晚(約16:00)，第2與3天之早晨(約08:00)與傍晚及試驗II(第4天)前1小時整時投藥。一天中兩隻大鼠之處理可以相似或相異，依進行試驗I之隨機分配而定。以Methocel處理組之大鼠或15 mg/kg經口投與狄帕胺(Despiramine (DMI))處理組之大鼠分別作為對照組與陽

性標準組。

已發現本發明化合物在上述模式中具有抗抑鬱活性。

實例 21

精神分裂症之動物模式：驚嚇之前脈衝抑制作用

(Pre-pulse Inhibition of Startle (PPI))

與注意力及認知力障礙有關之感覺運動門控受損之現象常見於精神分裂患者。精神分裂患者之驚嚇之前脈衝抑制作用(PPI)亦受損。當先有微弱聲音出現後，隨後出現之聲音刺激會抑制驚嚇反射，此時即發生前脈衝抑制作用。PPI被視為可預測精神分裂症，具有良好之表面上及結構上有效性之試驗。

陽性對照組為氯氮平(clozapine)，係一種可自商品取得之非典型抗精神病藥物(Clozaril®)。氯氮平對D4多巴胺與5-HT₂受體之親和性高，可在動物模式中有效加強PPI反應。

依下列方法進行PPI分析法，該方法實質上類似Spooren等人之說明(原型趨代謝性麩胺酸鹽受體5拮抗劑2-甲基-6-(苯乙炔)吡啶於啮齒類中之似解焦慮效果，J Pharmacol Exp Ther. 295: 1267-1275 (2000))。

實驗前至少3天，取雄性C57BL/6 (20-30 g)依每組4隻分置於麥克隆飼養籠(macrolon cages)中(42x26x15 cm)。飼養設備均控制溫度與濕度，並加裝人工照明(照光時間6:00 AM至6:00 PM)。動物可自由飲水及攝食。所有動物均沒有接受實驗之經驗。

試驗動物先經試驗化合物(30、60、100 mg/kg)、氯氮平(30

mg/kg)(陽性對照組)或媒劑(0.5%甲基纖維素)前處理。45分鐘後，小白鼠分置於背景有白色噪音70 dB之驚嚇試驗箱中，在無干擾下留置10分鐘。然後在15分鐘內進行56次試驗。驚嚇刺激為40 ms - 120 dB - 白色噪音，前脈衝為20 ms - 白色噪音72、74與78 dB，然後為100 ms之驚嚇。

進行8種試驗：前脈衝加驚嚇(每種前脈衝強度有7次試驗)、單獨前脈衝(每種前脈衝強度有7次試驗)、單獨驚嚇(7次試驗)及無刺激(7次試驗)試驗之間平均間隔15秒(10至20秒之間)。無刺激試驗中，取得底線測定值。在單獨驚嚇試驗中，測量基礎聽覺驚嚇振幅(g)，及於前脈衝加驚嚇試驗中，測量正常驚嚇之抑制量，並以相對於基礎驚嚇之百分比表示。單獨前脈衝之試驗中，測量對微弱噪音之反應，作為對照組。根據公式 $\%PPI = 100 - 100 \times [(PA2 - PPP)/PA2]$ 計算前脈衝抑制百分比。已發現本發明化合物於小白鼠之聽覺驚嚇反射中加強PPI。

實例 22

解焦慮劑之動物模式

依下列方法進行解焦慮分析法，該方法實質上類似Spooren等人(原型驅代謝性麩胺酸鹽受體5拮抗劑2-甲基-6-(苯乙炔)吡啶於啮齒類中之似解焦慮效果，J Pharmacol Exp Ther. 295: 1267-1275 (2000))與Lecci A, Borsini F, Volterra G and Meli A，(預測小白鼠焦慮症之新穎動物模式之醫藥有效性，Psychopharmacology 101: 255-261 (1990))中之說明。

I. 壓力誘發之體溫過高：

壓力誘發體溫過高(SIH)之試驗法係稍微修改擷用自 Lecci 等人(1990)之原始說明。使用溫度計(丹麥哥本哈根 ELLAB 儀器公司)，經由已潤滑之熱敏電阻探針(直徑2毫米)，插入直腸內20毫米處，測量直腸溫度至接近0.1°C，同時用手固定小白鼠尾巴基部。探針留置至得到穩定讀數為止(15秒內)。

每個麥克隆飼養籠(42 x 26 x 15 cm)內有15隻動物。至少在實驗前24小時，在同一籠動物之皮毛上做記號，以便將來辨識。量取直腸溫度前60分鐘，使同一籠內所有動物依序間隔1分鐘使用試驗化合物處理(劑量：1.3、10或30 mg/kg，經口投藥；注射體積：10 ml/kg)，氯達普賽(chlordiazepoxide)-HCl (10 mg/kg，經口投藥；Research Biochemicals International)，亦即陽性對照組或媒劑(0.5%甲基纖維素；Animed)。30分鐘整之後，依序自籠中取出小白鼠(仍間隔1分鐘)，測量直腸溫度並記錄。一旦記錄後，將動物移至另一個(相鄰)籠內。相關之變數，亦即壓力誘發之體溫過熱之定義為同一籠內先取出6隻小白鼠之直腸溫度中間值與後取出6隻之直腸溫度中間值之 δ 值。依明確處理組而定，計算這6至8個籠子之 δ 值，最後使用這6至8個值之平均值代表。此外，採用第一隻動物之直腸溫度分析該化合物本身對基礎體溫之潛在影響力。

II. 大鼠之社交探索試驗：

採用成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠(="原住民"大鼠；350-400 g)與幼小 Lister Hooded 大鼠(="侵入者"大鼠；100-120 g)。試驗前2週，侵入者大鼠成對分置於籠內，原住民大鼠則個別安置

於麥克隆飼養籠內(42 x 26 x 15 cm)。所有動物均在同一間屋內。飼養設備為控制溫度與濕度，並加裝人工照明(照光時間6:00AM至6:00 PM)。動物可自由飲水及攝食。所有動物均沒有接受實驗之經驗。

試驗動物接受試驗化合物(劑量：0.3、3、10或30 mg/kg)、氯達普賽(chlordiazepoxide)-HCl (5 mg/kg，經口投藥；CDZ，Research Biochemicals International, Natick, MA)、LiCl (10、30 mg/kg) (作為參考/陽性化合物)或媒劑(0.5%甲基纖維素)。注射體積為2 ml/kg。侵入者大鼠僅接受口服處理，在投與化合物後1小時進行試驗。所有觀察結果均在原住民大鼠(如上述)之原來籠內，於照光期(8:00 AM至1:00 PM)進行。籠子地板上鋪有鋸屑。其中一組實驗組或對照組隨機分配到一隻侵入者大鼠與一隻原住民大鼠配成一對。手動記錄侵入者大鼠對原住民大鼠之積極探索行為(嗅、鼻觸、整毛、舔、玩耍)所費之時間(=耗費在社交活動之時間)。並累積計錄5分鐘。

III. 架高之十字迷宮試驗：

實驗前至少3天，取雄性Sprague-Dawley大鼠(180-220 g)依每組4隻分置於麥克隆飼養籠中(42 x 26 x 15 cm)。飼養設備均控制溫度與濕度，並加裝人工照明(照光時間6:00 AM至6:00 PM)。動物可自由飲水及攝食。所有動物均沒有接受實驗之經驗。

架高之十字迷宮有兩個開口臂(40 x 12 cm)及兩個封閉臂(40 x 12 x 20 cm)，均由一個共同中心平台延伸出(12 x 12 cm)。

其組態形成十字形，相對兩端之長臂安排類似，此裝置架在底座上離地60 cm高處。此迷宮由灰色Plexiglas玻璃製成。開放臂上之握把周邊有稍微升高之圍籬(0.25 cm)。

依下列方法進行解焦慮分析法，該方法實質上類似Handley, S.L.與Mithani S.所述(α 腎上腺素激導性受體促效劑與拮抗劑於以"恐懼"刺激行為之迷宮模式中之效應，Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 327:1-5 (1984))。大鼠隨機分配至其中一種處理。於試驗前至少1小時將動物自飼養室中移至實驗室。經口投與化合物後，大鼠單獨置於麥克隆飼養籠內(22 x 16 x 14 cm)，60分鐘後，放在中心平台上，面向封閉臂。進行8分鐘試驗，個體之間徹底清潔迷宮。由觀察者坐在接近迷宮處，直接記錄，並採用下列常用參數：進入開口臂與封閉臂之次數(進入臂內之定義為所有四隻爪均進入臂內)及在開口臂上耗費之時間(不包括中心平台)。取不同處理組之動物交替試驗，於8:30 AM至12:30 PM之間，亦即在照光期之前半段時間進行試驗。記錄下列焦慮反射參數：耗費在開口臂上之時間比(開口臂/總時間)、離開第一隻臂前之滯留時間及進入臂內之總次數。

本發明化合物於上述動物模式中展現類似解焦慮之效果。

實例 23

阿茲海默氏症之細胞分析法- 神經元存活性

實質上類似Kienlen-Campard, et al., J Biol Chem 277:15666 (2002)所述之方法進行下列分析法。自E 18大鼠胚胎製備海馬回神經元之初級培養物 (Park et al., J Neurochem, 74:114, 2000)。細

胞塗覆在經聚(D-離胺酸)前處理之6-或96-孔培養盤中(4×10^5 個細胞/ cm^2)或玻離蓋玻片上(1.25×10^5 個細胞/ cm^2)，在感染重組腺病毒之前，於活體外，在NEUROBASAL™培養基(補充2% B-27與0.5 mM L-麩醯胺)中培養6天。在此等條件下，神經元培養物(高達98%神經元)展現高度分化及存活率。

重組腺病毒與神經元感染-製備APP695之編碼腺病毒之突變株之方法，增生法與純化法。於活體外6天後，於最少體積之培養基中，依100之感染比例感染神經元培養物4小時。然後將感染培養基換成新鮮培養基3-5天。在此等條件下，至少75%神經元表現重組腺病毒所編碼之蛋白質。

細胞存活性-神經元存活性係採用比色MTT分析法測定或使用Cellomics自動影像分析系統進行CellTracker螢光細胞活力分析法。進行核染色時，固定細胞(0.37%甲醛/0.2%戊二醛之磷酸鹽緩衝生理食鹽溶液)，於Hoechst 33342染料中($1 \mu\text{g/ml}$)培養30分鐘。

Abeta生產定量法-收集培養基，使用蛋白酶抑制劑處理($1 \mu\text{g/ml}$ 胃蛋白酶抑制素， $10 \mu\text{g/ml}$ 抗纖維蛋白溶酶肽，1 mM 苯甲磺醯基氟化物)，離心澄清($16,000 \times g$ ，5分鐘， 4°C)。取 $100 \mu\text{l}$ 上澄液定量Abeta。

實例 24

β 澱粉狀蛋白(1-40)生產之抑制作用

阿茲海默氏症之特徵為腦中出現細胞外斑點及細胞內神經纖維纏結。此等斑點之主要蛋白質成分為 β 澱粉狀蛋白("A β ")肽，其係自澱粉狀蛋白前體蛋白質("APP")裂解而來。

細胞株與化合物處理：

於人類 H4 神經膠質瘤細胞中，經同時表現含瑞典突變 (K595N, M596L) 之 APP695 與作為選拔標記物之 YFP 之反轉錄病毒載體轉導，構築可以分泌 A β 之穩定細胞株。篩選表現高量 YFP 之細胞，選拔表現 APP695 之穩定轉導體。

細胞塗覆在含杜氏改良伊格氏培養基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Invitrogen, 目錄編號 11965-092) (補充 10% 胎牛血清 (FBS) 與青黴素/鏈黴素) 之 96 孔板中，每孔 80,000 個細胞。24 小時後，培養基換成含有試驗化合物之新鮮培養基，其中化合物試驗濃度在 20 μ M 至 10 nM 之範圍內，在 7 個滴定點上進行二重覆。於 37°C 下，與試驗化合物培養 18-24 小時後，使用 hA β 40 ELISA 測定上澄液中 hA β (1-40) 濃度。

所分泌 A β 之 ELISA 分析法

採用 The Biosource International, Inc. Signal Select™ 人類 β 澱粉狀蛋白 (hA β 40) ELISA (目錄編號 KHB3482) 定量樣本之培養物上澄液中 hA β 40。取針對 hA β 之 NH₂ 末端之單株抗體塗覆在微滴定板之孔上。吸取樣本 (包括已知 hA β 含量之標準物) 加至此等孔中，然後添加針對 hA β 之 1-40 序列之兔子抗體。採用標記辣根過氧化酶之抗兔子抗體檢測已結合之兔子抗體。排出過量抗兔子抗體後，添加受質溶液，經結合之酵素裂解後，產生顏色。所產生顏色強度與樣本中所含 hA β (1-40) 濃度成正比。

ELISA 分析法如下：

取樣本與含有已知濃度 hA β (1-40) 肽之標準物於標準物/樣

本稀釋劑中稀釋(Biosource試劑)。添加蛋白酶抑制劑AEBSF、抗蛋白酶肽、胺肽酵素抑制劑(Bestatin)、E-64、抗纖維素蛋白溶酶肽與胃蛋白酶抑制素A(Calbiochem, 蛋白酶抑制劑混合液第III組, 目錄編號539134)至所有樣本中, 以防止A β 肽發生蛋白質分解。添加100 μ l樣本與標準物至96-孔ELISA分析板之孔中, 於室溫下培養2小時或於4°C下培養一夜。以100 μ l洗滌緩衝液(Biosource試劑)洗滌孔四次後, 添加100 μ l檢測抗體, 分析板於室溫下培養2小時。檢測抗體可以辨識hA β (1-40)序列。

以100 μ l洗滌緩衝液洗滌孔四次後, 添加100 μ l標記辣根過氧化酶(HRP)之抗兔子二級抗體。分析板於室溫下培養2小時。然後以100 μ l洗滌緩衝液洗滌孔5次, 添加100 μ l安定之發色原。分析板於室溫與黑暗下培養30分鐘。安定之發色原為一種受質溶液, 當被已結合之HRP裂解時, 會轉呈藍色, 因此可於標準微滴定板讀數機中追蹤。然後添加100 μ l中止反應溶液, 使用Molecular Devices SpectraMAX 340分析板讀數機, 於450 nm下測定孔中顏色強度。典型地, 在化合物濃度20 μ M至10 nM之範圍內, 以二重覆測定7個點之劑量反應, 分析化合物。由含有已知A β 肽濃度之標準物產生之標準曲線中計算樣本中A β (1-40)濃度。

測試本發明化合物3天。每一天均包括Calbiochem γ 分泌酶"抑制劑X"作為對照組。其係已知IC₅₀為50 nM之可通透細胞之羥乙烯二肽電子等排物。(目錄編號565771)。

雖然上文中已說明本發明多項具體實施例, 但咸了解吾

等之基本實例可利用本發明化合物與方法變化形成其他具體實施例，因此，咸了解本發明之範圍係由附錄之申請專利範圍界定，而非由實例代表之明確具體實施例所界定。

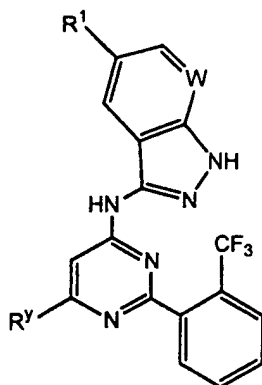
【圖式簡單說明】

圖1說明式I化合物處理組相較於媒劑對照組，於中腦動脈閉鎖模式(MCAO)中投藥6小時後，降低梗塞總體積、皮質梗塞體積、紋狀體絕血傷害及水腫形成上之效果。

圖2說明式I化合物處理組相較於媒劑對照組，大腦之神經功能隨實驗時間之變化。

伍、中文發明摘要：

本發明提供一種式I化合物：

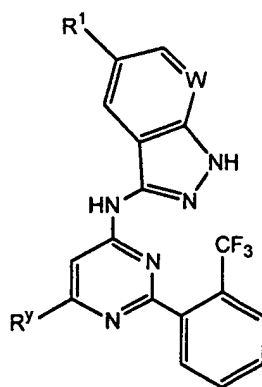


I

或其醫藥上可接受之衍生物。此等化合物為蛋白質激酶之抑制劑，特定言之GSK3哺乳動物蛋白質激酶之抑制劑。本發明亦提供包含本發明化合物之醫藥上可接受之組合物及利用彼等化合物與組合物治療多種蛋白質激酶所媒介病變之方法。

陸、英文發明摘要：

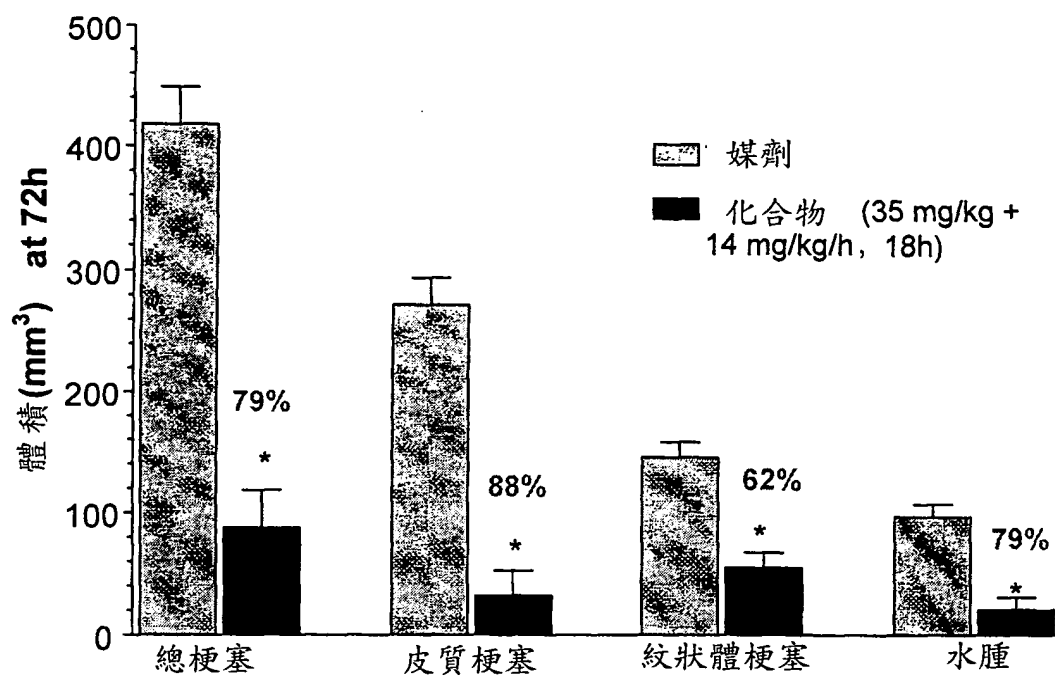
The present invention provides a compound of formula I:



I

or a pharmaceutically acceptable derivative thereof. These compounds are inhibitors of protein kinases, particularly inhibitors of GSK3 mammalian protein kinase. The invention also provides pharmaceutically acceptable compositions comprising the compounds of the invention and methods of utilizing those compounds and compositions in the treatment of various protein kinase mediated disorders.

拾壹、圖式：



* $p < 0.0001$ 相較於媒劑對照組 (雙尾史都登氏t-試驗)
($n=12$ 媒劑, 10)

圖 1

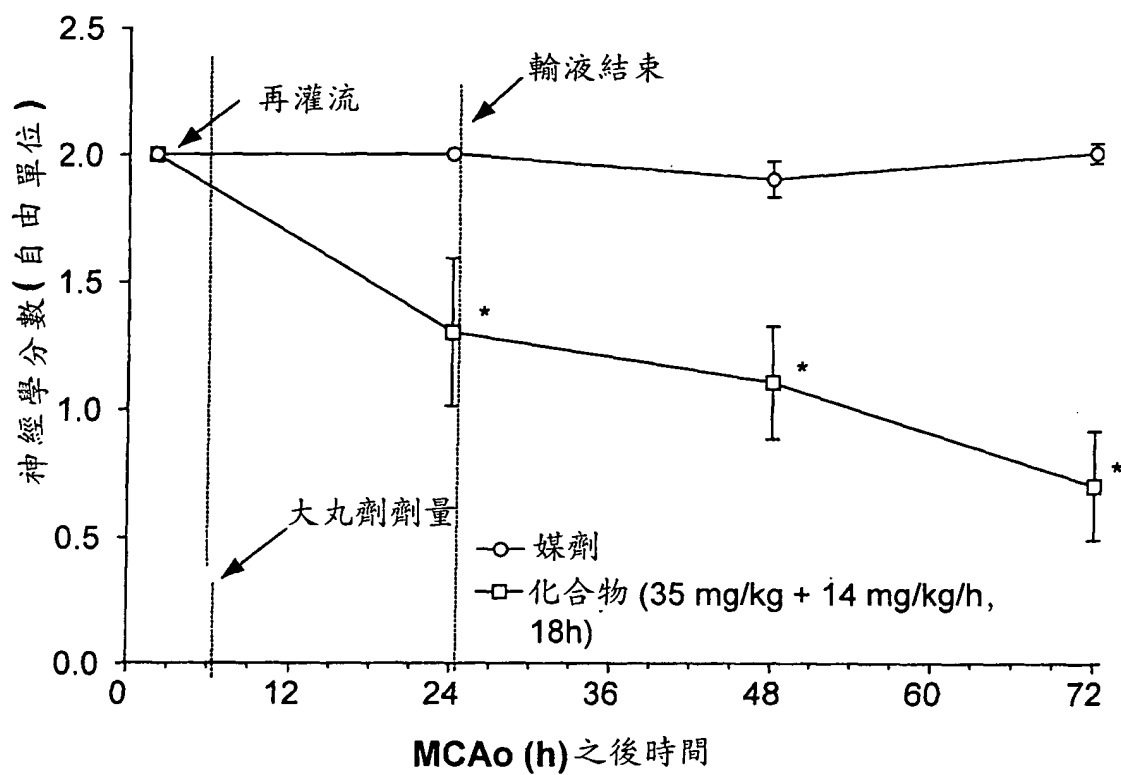


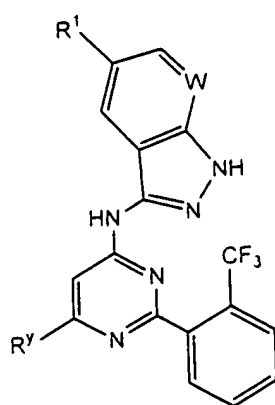
圖 2

柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 1 ）圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



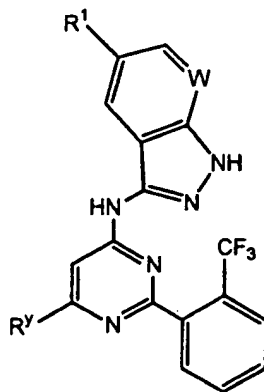
I

拾、申請專利範圍：

公告本

99年1月28日修(更)正替換本

1. 一種式 I 化合物：



I

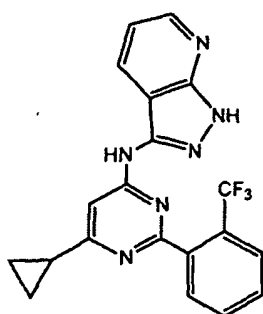
或其醫藥上可接受之鹽，其中：

W 為氮；

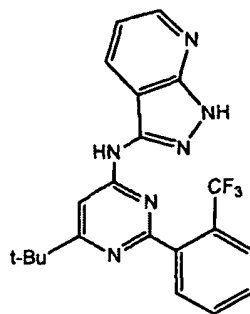
R¹ 係選自氫或氟；及

R^y 為 C₁₋₄ 脂系基團。

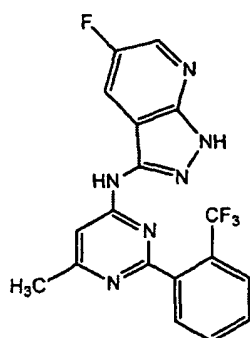
2. 根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其中 R^y 係選自：甲基、乙基、環丙基、第三丁基或異丙基。
3. 根據申請專利範圍第 2 項之化合物，其中 R^y 係選自：甲基、環丙基或第三丁基。
4. 根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其中 R¹ 為氫。
5. 根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其中 R¹ 為氟。
6. 一種化合物，其係選自下列各物組成之群中：



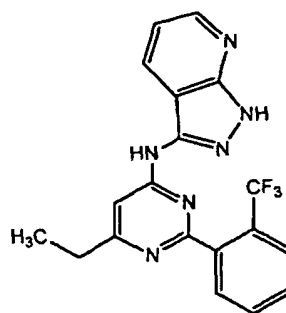
I-1



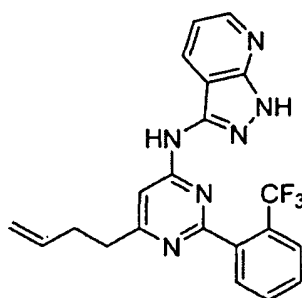
I-3



I-5



I-6



I-7

7. 一種醫藥上可接受之組合物，其包含根據申請專利範圍第1項之化合物及其醫藥上可接受之載劑、輔劑或媒劑。
8. 根據申請專利範圍第7項之組合物，其另包含一種選自下列之醫療劑：治療阿茲海默氏症(AD)、治療帕金森氏症、治療多發性硬化(MS)之藥劑、治療氣喘之藥劑、消炎劑、免疫調節劑或免疫抑制劑、神經營養因子、治療中風之藥劑、治療心血管疾病之藥劑、抗抑鬱劑、抗精神病

劑或治療糖尿病之藥劑。

9. 一種抑制生物樣本中 GSK-3 激酶活性之方法，其包括之步驟為使該生物樣本與
 - a) 根據申請專利範圍第 7 項之組合物接觸；或與
 - b) 根據申請專利範圍第 1 項之化合物接觸。
10. 根據申請專利範圍第 7 或 8 項之醫藥上可接受之組合物或根據申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之化合物，其係用於治療用途，特別是用於抑制患者之 GSK-3 激酶活性。
11. 根據申請專利範圍第 7 項之醫藥上可接受之組合物，其係用於治療自體免疫疾病、炎症、代謝異常、精神病、糖尿病、新血管形成性疾病、 τ -蛋白質形成異常、神經性或神經變性病變、脊柱傷害、青光眼、禿髮或心血管疾病。
12. 根據申請專利範圍第 11 項之醫藥上可接受之組合物，其中該疾病、病變或病症係選自下列：過敏、氣喘、糖尿病、阿茲海默氏症、亨丁頓氏症、帕金森氏症、與 AIDS-有關之癡呆症、肌萎縮性側索硬化 (ALS，路格威氏症 (Lou Gehrig's disease))、多發性硬化 (MS)、因頭部創傷造成之傷害、精神分裂症、焦慮症、兩極化病變、 τ -蛋白質形成異常、脊柱或周邊神經傷害、心肌梗塞、心肌細胞肥大、青光眼、注意力缺乏異常 (ADD)、抑鬱症、睡眠障礙、再灌注/絕血、中風、血管新生性病變或禿髮。
13. 根據申請專利範圍第 12 項之醫藥上可接受之組合物，其中該疾病、病變或病症為中風。

14. 根據申請專利範圍第12項之醫藥上可接受之組合物，其中該疾病、病變或病症為阿茲海默氏症。
15. 根據申請專利範圍第11項之醫藥上可接受之組合物，其中該病變為神經性或神經變性病變。
16. 根據申請專利範圍第7或8項之醫藥上可接受之組合物，其係用於降低精子活動力。
17. 根據申請專利範圍第11項之醫藥上可接受之組合物，其係與選自以下之另一種醫療劑共用：治療阿茲海默氏症(AD)之藥劑、治療帕金森氏症之藥劑、治療多發性硬化(MS)之藥劑、治療氣喘之藥劑、消炎劑、免疫調節劑或免疫抑制劑、神經營養因子、治療中風之藥劑、治療心血管疾病之藥劑、抗抑鬱劑、抗精神病劑或治療糖尿病之藥劑。