

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07D 209/08 (2006.01)

C07D 209/18 (2006.01)

A61K 31/404 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00815441.4

[45] 授权公告日 2006年2月1日

[11] 授权公告号 CN 1239482C

[22] 申请日 2000.11.1 [21] 申请号 00815441.4

[30] 优先权

[32] 1999.11.3 [33] SE [31] 9903997-6

[86] 国际申请 PCT/SE2000/002148 2000.11.1

[87] 国际公布 WO2001/032619 英 2001.5.10

[85] 进入国家阶段日期 2002.5.8

[71] 专利权人 阿斯特拉曾尼卡有限公司

地址 瑞典南泰利耶

[72] 发明人 D·古利 T·兰托恩 J·马科尔

J·罗萨蒙德

审查员 刘雷

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 马崇德 刘冬

权利要求书 3 页 说明书 14 页

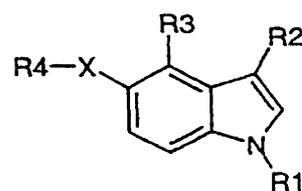
[54] 发明名称

烟碱性受体激动剂的正调节剂

[57] 摘要

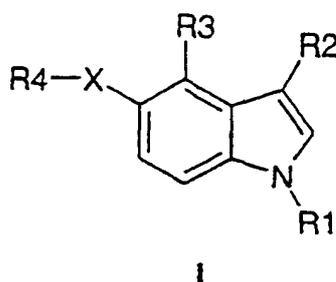
本发明涉及一种式(I)化合物或其对映体及其药学上可接受的盐,其中:R¹和R³独立地是氢或C₁-C₄烷基;R²是氢、C₁-C₄烷基或CH₂CN;R⁴是氢、C₁-C₄烷基、C₂-C₄链烯基、C₂-C₄炔基、CH₂C(W)=CH₂、(CH₂)_nAr、CH₂CH=CHAr、CH₂COPh、CH₂CONHAr、C(U)NH(CH₂)_mAr或(CH₂)_dY(CH₂)_eAr;U是氧或硫;W是卤素;X和Y独立地是O、S或NR⁵;R⁵是氢、C₁-C₄烷基、C₂-C₄链烯基;或R³和R⁵一起形成一个环;n和m独立地为0-4;d为1-3;e为0-1;Ar是苯基、萘基或者含有0-4个氮、0-1个硫和0-1个氧的5元或6元杂环;Ar可任选地用选自以下的一个或多个取代基取代:氢、卤素、C₁-C₄烷基、C₂-C₄链烯基、C₂-C₄炔基、CN、NO₂、CF₃、OR⁶、NR⁷R⁸、COOR⁹;R⁶、R⁷和R⁸独立地为氢、C₁-C₄烷基、芳

基、杂芳基、C(O)R¹⁰、C(O)NHR¹¹、SO₂R¹²;或R⁷和R⁸一起可以是(CH₂)_jQ(CH₂)_k,其中:Q是O、S、NR¹³或一个键;j是2-4;k是0-2;R⁹、R¹⁰、R¹¹、R¹²和R¹³独立地为氢、C₁-C₄烷基、芳基或杂芳基;涉及其制备方法、包含其的药用组合物以及它们在治疗中的应用,尤其是在与烟碱传递减弱相关的病症治疗中的应用。本发明的化合物增强烟碱性受体激动剂的效力。



(I)

1. 一种式 I 化合物或其药学上可接受的盐:



5

其中:

R^1 和 R^3 独立地是氢或 C_1 - C_4 烷基;

R^2 是氢、 C_1 - C_4 烷基或 CH_2CN ;

R^4 是 $(CH_2)_nAr$ 、 $CH_2CH=CHAr$ 、 CH_2COPh 、 $CH_2CONHAr$ 、
10 $C(U)NH(CH_2)_mAr$ 或 $(CH_2)_dY(CH_2)_eAr$;

U 是氧或硫;

X 是 O;

Y 是 O、S 或 NR^5 ;

R^5 是氢、 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 链烯基;

15 n 和 m 独立地为 0-4;

d 为 1-3;

e 为 0-1;

Ar 是苯基、萘基或者呋喃;

Ar 可任选地用选自以下的一个或多个取代基取代: 氢、卤素、
20 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 链烯基、 C_2 - C_4 炔基、CN、 NO_2 、 CF_3 、 OR^6 、 NR^7R^8 、
 $COOR^9$;

R^6 、 R^7 和 R^8 独立地为氢、 C_1 - C_4 烷基、芳基、 $C(O)R^{10}$ 、 $C(O)NHR^{11}$ 、
 SO_2R^{12} ; 其中:

R⁹、R¹⁰、R¹¹和R¹²独立地为氢、C₁-C₄烷基或芳基。

2. 权利要求1的化合物，所述化合物是：

5-肉桂基氧基吲哚；

5-苜氧基吲哚-3-乙腈；

5 5-(2-苜氧基乙氧基)吲哚；

5-(2-苜基甲氧基)吲哚；

2-(1H-吲哚-5-基氧基)-N-苜基-乙酰胺；

1-糠基-3-(5-吲哚基)-2-硫脲；

或其药学上可接受的盐。

10 3. 一种药用组合物，所述药用组合物包含与惰性、药学上可接受的稀释剂或载体混合的权利要求1或权利要求2中限定的化合物。

4. 用于治疗或预防精神病或智力减低疾病的权利要求3的药用组合物。

15 5. 用于治疗或预防下列疾病或病症的权利要求4的药用组合物，所述疾病或病症是老年性痴呆、学习缺陷、认知缺陷、注意力缺乏、记忆力丧失、注意力不集中的过度反应症、雷维小体性痴呆、焦虑、精神分裂症、或躁狂或躁狂性抑郁、帕金森病、亨廷顿舞蹈病、图雷特综合症、有胆碱能突触损失的神经变性疾病、时差综合症、停止吸烟、烟碱瘾、疼痛或溃疡性结肠炎。

20 6. 用于治疗或预防下列疾病或病症的权利要求4的药用组合物，所述疾病或病症是老年性痴呆、学习缺陷、认知缺陷、注意力缺乏、雷维小体性痴呆、记忆力丧失或注意力不集中的过度反应症。

7. 用于治疗或预防下列疾病或病症的权利要求4的药用组合物，所述疾病或病症是焦虑、精神分裂症、或躁狂或躁狂性抑郁。

25 8. 用于治疗或预防下列疾病或病症的权利要求4的药用组合物，所述疾病或病症是帕金森病、亨廷顿舞蹈病、图雷特综合症或有胆碱能突触损失的神经变性疾病。

9. 用于治疗或预防下列疾病或病症的权利要求4的药用组合物

物，所述疾病或病症是时差综合症、烟碱瘾、疼痛或溃疡性结肠炎。

10. 用于治疗或预防老年性痴呆的权利要求 4 的药用组合物。

11. 权利要求 1 或权利要求 2 的化合物在生产用于精神病或智力减低疾病的治疗或预防的药物中的用途。

5 12. 权利要求 1 或权利要求 2 的化合物在生产用于以下疾病或病症的治疗或预防的药物中的用途：老年性痴呆、学习缺陷、认知缺陷、注意力缺乏、记忆力丧失、注意力不集中的过度反应症、雷维小体性痴呆、焦虑、精神分裂症、躁狂或躁狂性抑郁、帕金森病、亨廷顿舞蹈病、图雷特综合症、有胆碱能突触损失的神经变性疾病、时差综合症、停止吸烟、烟碱瘾、疼痛或溃疡性结肠炎。

10 13. 权利要求 12 的用途，其中所述病症或疾病是老年性痴呆、学习缺陷、认知缺陷、注意力缺乏、记忆力丧失、雷维小体性痴呆或注意力不集中的过度反应症。

15 14. 权利要求 12 的用途，其中所述疾病是焦虑、精神分裂症、躁狂或躁狂性抑郁。

15 15. 权利要求 12 的用途，其中所述疾病是帕金森病、亨廷顿舞蹈病、图雷特综合症或有胆碱能突触损失的神经变性疾病。

16. 权利要求 12 的用途，其中所述病症或疾病是老年性痴呆。

20 17. 权利要求 12 的用途，其中所述病症或疾病是时差综合症、烟碱瘾、疼痛和溃疡性结肠炎。

烟碱性受体激动剂的正调节剂

5 本发明涉及新型化合物或其药学上可接受的盐、其制备方法、包含其的药用组合物以及它们在治疗中的应用。所述新型化合物被认为是烟碱性受体激动剂的正调节剂，所述正调节剂具有增强所述烟碱性受体激动剂效力的能力。

10 背景技术

胆碱能受体通常结合内源神经递质乙酰胆碱(ACh)，由此触发离子通道的开放。哺乳动物中枢神经系统中的 ACh 受体根据分别对毒蝇碱和烟碱的激动剂活性，可以分为毒蝇碱(mAChR)和烟碱(nAChR)亚型。烟碱性乙酰胆碱受体是含有 5 个亚基的配体门控离子通道(有关综述参见 Colquhoun 等(1997) *Advances in Pharmacology* 39, 191-220; Williams 等(1994) *Drug News & Perspectives* 7, 205-223; Doherty 等(1995) *Annual Reports in Medicinal Chemistry* 30, 41-50)。nAChR 基因家族受体的成员根据其序列被分为两个组；一个组的成员被认为是 β 亚基，而第二组被分类为 α 亚基(有关综述，参见 Karlin 和 Akabas (1995) *Neuron*, 15, 1231-1244; Sargent (1993) *Annu. Rev. Neurosci.* 16, 403-443)。三个所述 α 亚基 - $\alpha 7$ 、 $\alpha 8$ 和 $\alpha 9$ 当单独表达时构成功能受体，因此推断形成同源寡聚受体。

nAChR 的一个别构转换状态模型涉及至少一个静止态、一个活化态和一个“脱敏”关闭通道态(Williams 等，参见上文; Karlin 和 Akabas, 参见上文)。因此，不同的 nAChR 配体可以有差异地稳定它们优先结合的构象态。例如，激动剂 ACh 和(-)-烟碱稳定活化态和脱敏态。

25 已将烟碱性受体活性的改变与多种疾病相关联。这些疾病中的某些疾病，例如重症肌无力和 ADNFLE (常染色体显性夜发性前叶性癫

痛) (Kuryatov 等(1997) *J. Neurosci.* 17(23):9035-47)与或者由于受体数目减少或者由于脱敏增加引起的烟碱传递活性降低有关,脱敏是一种受体变得对所述激动剂不敏感的过程。也已经假定烟碱性受体的减少介导在例如老年性痴呆和精神分裂症等疾病中见到的认知缺陷
5 (Williams 等, 参见上文)。得自烟草的烟碱的效应也由烟碱性受体介导。烟碱性受体活性的提高可能减弱对吸烟的需求。

在 McDonald 等(1995) “烟碱性乙酰胆碱受体: 分子生物学、化学和药理学” (载于 *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 第 30 卷, 41-50 页, 第 5 章, Academic Press Inc., San Diego, CA)和 Williams 等(参
10 见上文)中, 已经讨论了结合烟碱性乙酰胆碱受体的化合物在治疗涉及胆碱能功能降低的各种各样的障碍中的应用, 所述障碍包括例如老年性痴呆、认知或注意力障碍、注意力不集中的过度反应症、焦虑、抑郁、停止吸烟、神经保护、精神分裂症、痛觉缺失、图雷特综合征和帕金森病。

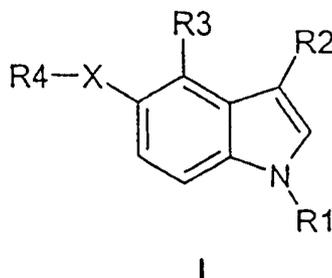
然而, 用作用位点与 ACh 相同的烟碱性受体激动剂来治疗成问题, 因为 ACh 不仅活化受体, 而且通过包括脱敏(有关综述, 参见 Ochoa
15 等(1989) *Cellular and Molecular Neurobiology* 9, 141-178)和非竞争性阻断(开放-通道阻断); Forman 和 Miller (1988) *Biophysical Journal* 54(1):149-58)在内的过程阻断受体活性。此外, 延长的活化看来诱导长期持续的失活。因此, 可以预期 ACh 激动剂降低活性, 也增强活性。
20 一般在烟碱性受体上的脱敏, 特别值得注意的是在 $\alpha 7$ -烟碱性受体上的脱敏, 限制了激动剂应用期间的电流持续时间。

发明的公开

25 已经令人惊讶地发现, 某些化合物可以增强烟碱性受体上的激动剂的效力。认为具有这种作用类型的化合物(在下文称为“正调节剂”)将在与烟碱传递减弱相关的病症治疗方面特别有用。在治疗环境下, 这类化合物可能恢复正常的神经元间通讯, 而不影响活化的瞬时分布

型。另外，它们可能不产生延长应用激动剂可能发生的长期失活。

按照本发明，已经发现了式 I 化合物或其对映体及其药学上可接受的盐增强烟碱性受体上的激动剂的效力，所述式 I 化合物为：



其中：

- 5 R^1 和 R^3 独立地是氢或 C_1 - C_4 烷基；
 R^2 是氢、 C_1 - C_4 烷基或 CH_2CN ；
 R^4 是氢、 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 链烯基、 C_2 - C_4 炔基、 $CH_2C(W)=CH_2$ 、
 $(CH_2)_nAr$ 、 $CH_2CH=CHAr$ 、 CH_2COPh 、 $CH_2CONHAr$ 、 $C(U)NH(CH_2)_mAr$
 或 $(CH_2)_dY(CH_2)_eAr$ ；
- 10 U 是氧或硫；
 W 是卤素；
 X 和 Y 独立地是 O、S 或 NR^5 ；
 R^5 是氢、 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 链烯基；或 R^3 和 R^5 一起形成一个环；
 n 和 m 独立地为 0-4；
- 15 d 为 1-3；
 e 为 0-1；
 Ar 是苯基、萘基或者含有 0-4 个氮、0-1 个硫和 0-1 个氧的 5 元或
 6 元杂环；
- 20 Ar 可任选地用选自以下的一个或多个取代基取代：氢、卤素、
 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 链烯基、 C_2 - C_4 炔基、CN、 NO_2 、 CF_3 、 OR^6 、 NR^7R^8 、
 $COOR^9$ ；
 R^6 、 R^7 和 R^8 独立地为氢、 C_1 - C_4 烷基、芳基、杂芳基、 $C(O)R^{10}$ 、
 $C(O)NHR^{11}$ 、 SO_2R^{12} ；或 R^7 和 R^8 一起可以是 $(CH_2)_jQ(CH_2)_k$ ，其中：

Q 是 O、S、NR¹³ 或一个键；

j 是 2-4；

k 是 0-2；

R⁹、R¹⁰、R¹¹、R¹² 和 R¹³ 独立地为氢、C₁-C₄ 烷基、芳基或杂芳基。

5 本发明的优选化合物包括以下化合物：

5-肉桂基氧基吲哚；

5-苄氧基吲哚-3-乙腈；

5-(2-苯氧基乙氧基)吲哚；

5-(2-萘基甲氧基)吲哚；

10 5-苯基氨基甲酰基甲基吲哚；

1-糠基-3-(5-吲哚基)-2-硫脲；

或其对映体及其药学上可接受的盐。

除非另有说明，否则本文所指的 C₁-C₄ 烷基可以是直链或支链的，例如甲基、乙基、正丙基、正丁基、异丙基、异丁基、叔丁基、
15 仲丁基，C₃-C₄ 烷基也可以是环状的，例如环丙基、环丁基。

除非另有说明，否则本文所指的 C₂-C₄ 链烯基可以含有一个或两个双键，例如乙烯基、异丙烯基、正丁烯基、异丁烯基、烯丙基、1,3-
丁二烯基。

除非另有说明，否则本文所指的 C₂-C₄ 炔基含有一个三键，例如
20 乙炔基、丙炔基、1-丁炔基或 2-丁炔基。

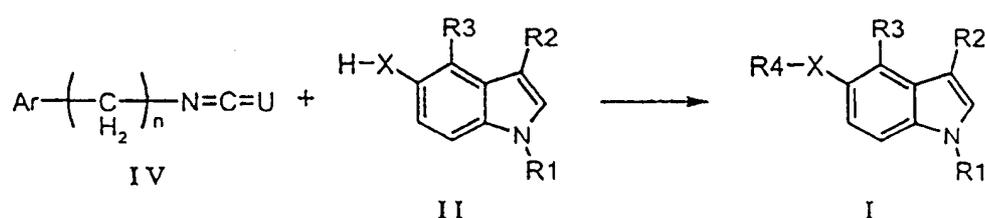
本文所指的卤素可以是氟、氯、溴或碘。

本发明的化合物的优点是，它们可能毒性较低，效力更强，作用
时间更长，具有更宽的活性范围，更有效，产生的副作用更小，吸收
更容易，或具有其它有用的药理学特性。

25

制备方法

在所述反应方案和以下正文中，R¹、R²、R³、R⁴ 和 X 如式 I 所限定，除非另有说明。可以按照方案 1 中概述的方法制备式 I 化合物。



方案 2

式 II 化合物或者为市售的，或者可以通过本领域技术人员已知的方法制备(参见例如“Heterocyclic Chemistry”，第 3 版中的“Indoles: Reactions and Synthesis”，J. A. Joule, K. Mills 和 G F. Smith, (Pub.) Stanley Thornes Ltd. (1998)和其中的参考文献)。

其中 X 是 NR⁵ (其中 R³ 和 R⁵ 一起形成环)的式 II 化合物，可以用本领域技术人员已知的方法制备(参见例如 J. E. Macor, J. T. Froman, R.J Post, K. Ryan, Tetrahedron Lett., 38, 1673-1676, 1997)。

式 III 化合物是市售的，或者可以用本领域技术人员已知的方法制备。

式 IV 化合物是市售的，或者可以用本领域技术人员已知的方法制备。

必要时，羟基、氨基或其它反应基可以用保护基保护，所述保护基如以下标准教科书中所述：“Protecting Groups in Organic Synthesis”，第 3 版，T. W. Greene 和 P. G. M. Wuts, 1999, J Wiley & Sons, Inc.

除非另有说明，否则上述反应通常在约 1 个至约 3 个大气压下进行，最好在环境压力(约一个大气压)下进行。

除非另有说明，否则上述反应在惰性环境中进行，最好在氮气环境下进行。

可以采用标准技术，将本发明的化合物和中间体从其反应混合物中分离出来。

可以提及的式 I 化合物的酸加成盐包括无机酸的盐，例如盐酸盐和氢溴酸盐；与有机酸形成的盐，例如甲酸盐、乙酸盐、马来酸盐、苯甲酸盐、酒石酸盐和富马酸盐。通过使式 I 化合物的游离碱或盐、

对映体或受保护的衍生物与一个或更多个当量的所述合适的酸反应，可以生成式 I 化合物的酸加成盐。该反应可以在所述盐不溶于其中的溶剂或介质中进行，或者在所述盐可溶于其中的溶剂中进行，所述溶剂例如为水、二噁烷、乙醇、四氢呋喃或乙醚，或溶剂的混合物，所述溶剂可以在真空下除去或通过冷冻干燥除去。该反应可以是复分解过程，或它可以在离子交换树脂上进行。

式 I 化合物以互变异构体形式或对映体形式存在，所有这些都包括在本发明范围内。可以通过用常规技术，例如分级结晶或手性 HPLC 分离所述化合物的外消旋混合物，分离出各种光学异构体。或者，可以通过使合适的旋光原料在不引起外消旋的反应条件下反应，制备各对映体。

药用组合物

本发明的另一方面涉及一种药用组合物，它用于治疗或预防哺乳动物(最好是人类)由于烟碱性乙酰胆碱受体神经递功能障碍所致的以下所列病症或疾病，所述药用组合物包含有效治疗或预防这类疾病或病症量的一种式 I 化合物、其对映体或其药学上可接受的盐以及一种惰性药学上可接受的载体。

关于上述应用，所给予的剂量当然将根据所用的化合物、给药方式和所需的治疗而变化。然而，一般而言，当本发明的化合物以每日约 0.1 mg 至约 20 mg/kg 动物体重的剂量给予，最好是以分剂量每日 1-4 次给予或以缓释形式给予时，获得令人满意的结果。对于人类，总日剂量范围为 5 mg-1,400 mg，更优选 10 mg-100 mg，适用于口服给药的单位剂型包含 2 mg-1,400 mg 的与固体或液体药用载体或稀释剂混合的所述化合物。

式 I 化合物或其对映体及其药学上可接受的盐，可以照原样使用，或以用于肠给药或胃肠外给药的合适的药物制剂形式使用。按照本发明的又一个方面，提供一种药用组合物，所述药用组合物优选包

含低于 80%、更优选低于 50%(重量)的与惰性、药学上可接受的稀释剂或载体混合的本发明化合物。

稀释剂和载体的实例是：

5 - 对于片剂和糖锭剂：乳糖、淀粉、滑石粉、硬脂酸；对于胶囊：
酒石酸或乳糖；

- 对于注射液：水、醇、甘油、植物油；对于栓剂：天然或硬化油或蜡。

也提供一种制备这类药用组合物的方法，所述方法包括混合所述组分。

10 人们会理解，包含烟碱性受体激动剂的正调节剂和药学上可接受的载体的药用组合物，所述正调节剂具有增强所述受体激动剂效力的能力。对于本发明的目的而言，术语“正调节剂”或“烟碱性受体激动剂的正调节剂”应该理解为具有增强烟碱性受体激动剂的最大效力的能力的化合物。

15 人们会理解，本发明包括或者包含一种作为唯一活性物质、并因此调节内源烟碱性受体激动剂例如乙酰胆碱或胆碱活性的正调节剂的组合物，或者包含与烟碱性受体激动剂联合的正调节剂的组合物。因此，所述含有烟碱性受体激动剂的正调节剂的药用组合物可以另外包含一种烟碱性受体激动剂。

20 在本发明的一个优选形式中，所述烟碱性受体激动剂是 $\alpha 7$ -烟碱性受体激动剂。 $\alpha 7$ -烟碱性受体激动剂的实例是(-)-螺[1-氮杂双环[2.2.2]辛烷-3,5*-咪唑烷]-2*-酮。例如从 WO 96/06098、WO 97/30998 和 WO 99/03859 中可了解几种 $\alpha 7$ -烟碱性受体激动剂。

25 本发明的另一方面提供一种治疗与烟碱传递减弱相关的病症的方法，所述方法包括给予需要这种治疗的患者医疗上有效量的烟碱性受体激动剂的正调节剂，所述正调节剂具有增强所述烟碱性受体激动剂效力的能力。

人们会理解，本发明的治疗方法包括或者一种作为唯一活性物

质、并因此调节内源烟碱性受体激动剂例如乙酰胆碱或胆碱的活性的正调节剂，或者与烟碱性受体激动剂一起给予的一种正调节剂。

在本发明的另一优选形式中，所述治疗方法包括一种烟碱性受体激动剂，它为 $\alpha 7$ -烟碱性受体激动剂。 $\alpha 7$ -烟碱性受体激动剂的实例是
5 (-)-螺[1-氮杂双环[2.2.2]辛烷-3,5*-咪唑烷]-2*-酮。例如从 WO 96/06098、WO 97/30998 和 WO 99/03859 中可了解几种 $\alpha 7$ -烟碱性受体激动剂。

实用性

10 本发明的再一方面是按照本发明的化合物在治疗或预防与烟碱性受体传递减弱相关的病症或与烟碱密度降低相关的病症的药物生产中的应用，所述疾病或病症可以是下述疾病或病症中的一种，所述方法包括给予患者治疗有效量的按照本发明的化合物。

人们会理解，所述应用包括或者包含一种作为唯一活性物质、并
15 因此调节内源烟碱性受体激动剂活性的正调节剂的组合物，或者包含与烟碱性受体激动剂联合的正调节剂的组合物。因此，所述应用的含有烟碱性受体激动剂的正调节剂的药用组合物可以另外包含一种烟碱性受体激动剂。

在本发明的一个优选形式中，所述烟碱性受体激动剂的应用以 $\alpha 7$ -
20 烟碱性受体激动剂为代表。 $\alpha 7$ -烟碱性受体激动剂的实例是(-)-螺[1-氮杂双环[2.2.2]辛烷-3,5*-咪唑烷]-2*-酮。例如从 WO 96/06098、WO 97/30998 和 WO 99/03859 中可了解几种 $\alpha 7$ -烟碱性受体激动剂。

疾病或病症的实例包括精神分裂症、躁狂和躁狂性抑郁、焦虑、
25 早老性痴呆、学习缺陷、认知缺陷、注意力缺乏、记忆力丧失、雷维小体性痴呆、注意力不集中的过度反应症、帕金森病、亨廷顿舞蹈病、图雷特综合征、时差综合症和烟碱瘾(包括由于接触含烟碱制品所致的瘾)。

人们会理解，所述正调节剂可以或者为了作用于内源烟碱性受体

激动剂例如乙酰胆碱或胆碱而给予，或者与一种外源烟碱性受体激动剂联合给予。

5 本发明的再一方面涉及用于治疗或预防哺乳动物(最好是人类)由于烟碱性乙酰胆碱受体神经递功能障碍所致的以上所列病症或疾病的化合物，或者包含一种作为唯一活性物质、并因此调节内源烟碱性受体激动剂活性的正调节剂，或者包含与烟碱性受体激动剂联合的正调节剂的组合物。因此，所述应用的含有烟碱性受体激动剂正调节剂的药用组合物可以另外包含有效治疗或预防这类疾病或病症的一种烟碱性受体激动剂和一种惰性、药学上可接受的载体。

10

实验方法

本发明化合物的活性可以在以下所述试验中进行测量：

(a) 非洲爪蟾属(*Xenopus*)卵母细胞电流记录

15 非洲爪蟾属卵母细胞提供了一种评价被认为是配体门控离子通道亚基的蛋白质的功能的有效方法。注射从编码所述合适受体亚基的cDNA克隆转录的RNA，或注射其中所述编码序列置于启动子下游的cDNA，导致在卵母细胞表面出现功能性配体门控离子通道(参见例如Boulter等(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 7763-7767)。

20 因此，评价烟碱效力增强的一种方便的技术是来自由cRNA表达 $\alpha 7$ -烟碱性受体的非洲爪蟾属卵母细胞的双电极电压钳记录(two-electrode voltage-clamp recording)。

25 用0.15%三卡因麻醉爪蟾(*Xenopus laevis*)蛙(Xenopus I, Kalamazoo, MI)。将卵母细胞取出，置于OR2溶液(82 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 5 mM HEPES, 1.5 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA; pH 7.4)中。将卵母细胞在以1 Hz振动的平台上在含有0.2%胶原酶1A (Sigma)的25 ml OR2中孵育2次，每次60分钟，将其去卵泡；然后贮存于Leibovitz L-15培养基(50 μ g/ml庆大霉素(gentomycin)、10单位/ml青霉素和10 μ g/ml链霉素)中。第二天，向每个卵母细胞中注射约50 ng cRNA。用

Message Machine (购自 Abion), 由 cDNA 合成 cRNA。

外部记录溶液由 90 mM NaCl、1 mM KCl、1 mM MgCl₂、1 mM BaCl₂、5 mM HEPES; pH 7.4 组成。用卵母细胞钳放大器(OC 725C; Warner Instrument, Hamden, CT)进行双电极电压钳记录。当填充 3M KCl 时, 用 1-2 MΩ 尖端阻抗的两个电极刺穿卵母细胞。当膜电位变得稳定在相对于 -20mV 为负值的电位(当在浴溶液中 Ba⁺⁺ 置换 Ca⁺⁺ 时, 静息膜电位负值更大)时, 开始记录。将膜电位钳在 -80 mV。ACh 购自 Sigma。卵母细胞用含或不含 ACh 的记录溶液连续灌注(5 ml/min)。

测量从基线至峰值的电流振幅。通过用 GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) 将数据与逻辑斯谛等式拟合, 估计 EC₅₀ 值、最大效应和希耳斜率。

正调节剂诱发的激动剂效力的增强可以以两种方式计算:

(1) 以电流振幅加强的百分比计算, 其定义为 $100(I_m - I_c)/I_c$, 其中 I_m 是在调节剂存在下的电流振幅, 而 I_c 是无调节剂时的电流。

(2) 以激动剂记录图的“曲线下面积”的增强百分比计算, 它是在一定时间内净电流的积分。曲线下的面积通常代表通过所述通道的总离子通量。

(b) Ca²⁺ 通量成像

通过细胞系中瞬时表达的 nAChR α7 受体的 Ca²⁺ 通量的成像, 是分析调节剂活性的另一种方法。

让表达 α7 受体的细胞(例如 HEK-293 细胞或经细胞培养的神经元)在 96 孔板中生长至汇合, 加入一种荧光钙指示剂 - fluo-3。为了筛选 α7 调节活性, 将 96 孔板置于荧光成像平板读出仪(FLIPR)中, 将受试化合物和 α7 激动剂同时加入所有孔中。根据通过每孔荧光强度的增加而定量的流入细胞中的钙, 测量受体活化, 同时由 FLIPR 记录。根据与单独的激动剂相比的荧光增加, 测定调节效应。同样, 为了测试 nAChR α7 激动剂活性, 将受试化合物和 α7 调节剂同时加入所有孔

中。根据通过每孔荧光强度的增加而定量的流入细胞中的钙，测量受体活化，同时由 FLIPR 记录。根据与单独的调节剂相比的荧光增加，测定激动剂的效应。

按照以下方法制备经细胞培养的神经元：将 18 日龄的 Sprague-Dawley 大鼠胎儿(E-18)从妊娠雌鼠体内无菌取出，将其处死，取出脑的前皮质，剥离脑膜，并将经清除后的皮质置于冷 HBSS 中。如果需要海马，则从皮质中解剖出海马，然后置于冷 HBSS 中。将组织机械分散，在 HBSS (200 g, 于 4°C 30 分钟)中洗涤 1 次，重悬于补充谷氨酰胺、抗生素、氯化钾、胰岛素、运铁蛋白、硒和 5%热灭活胎牛血清 (FBS, 无内毒素)的改进的 Sato 培养基中，然后接种到 24 孔板(包被有聚 L-赖氨酸)的各孔中。各孔可以带有也用 PLL 包被的盖玻片。将平板在 CO₂ 培养箱中于 37°C 孵育。24 小时后，除去培养基，加入新鲜培养基，并让细胞再生长至少 11 天，必要时进行流加培养。

本发明的化合物是在低浓度乙酰胆碱(30 μM)下测量基线至峰值时引起基线电流(如上所述) 100%增加(2 倍增加)的化合物，表明预料它们具有有用的治疗活性。本发明的化合物也是当如上所述用于 Ca²⁺ 通量成像测定时引起 Ca²⁺ 通量增加的化合物。与单独的激动剂所引起的 Ca²⁺ 通量(以荧光强度单位测量)相比，本发明化合物引起的 Ca²⁺ 通量的任何增加表明，预料它们具有有用的治疗活性。

本发明化合物的应用的优点是，它们的毒性可能较低，效力更强，作用时间更长，活性范围更宽，更有效，产生的副作用更小，吸收更容易，或具有其它有用的药理学特性。

通用实验方法

市售的试剂可不用进一步纯化而使用。质谱或者用 Hewlett Packard 5988A 质谱仪记录，或者用 MicroMass Quattro-1 质谱仪记录，并且以母体分子离子的 m/z 报告。室温是指 20-25°C。

实施例

以下实施例是优选的非限制性实施例，具体体现本发明的优选方面。

5 实施例 1

5-肉桂基氧基吲哚

向 5-羟基吲哚(0.25 g)的乙腈(10 ml)溶液中加入碳酸铯(1.22 g)和肉桂基溴(0.37 g)。将悬浮液在氮气、环境温度下搅拌过夜。经过滤除去铯盐，并用丙酮洗涤。浓缩合并的滤液和洗涤液后留下残余物，用
10 乙酸乙酯和己烷的混合物经硅胶色谱分离，从乙醚及己烷中结晶后，得到 0.23 g 标题化合物。MS CI (MH⁺) = 250

实施例 2

5-苄氧基吲哚-3-乙腈

15 采用类似于实施例 1 中所述的方法，由苄基溴和 5-羟基吲哚-3-乙腈制备标题化合物。MS ES (MH⁺) = 263。

实施例 3

5-(2-苯氧基乙氧基)吲哚

20 采用类似于实施例 1 中所述的方法，由 2-苯氧基乙基溴和 5-羟基吲哚制备标题化合物。MS ES (MH⁺) = 254。

实施例 4

5-(2-萘基甲氧基)吲哚

25 采用类似于实施例 1 中所述的方法，由 2-萘基甲基氯和 5-羟基吲哚制备标题化合物。MS ES (MH⁺) = 274。

实施例 5

2-(1H-吲哚-5-基氧基)-N-苯基-乙酰胺

采用类似于实施例 1 中所述的方法, 由 N-氯代乙酰基苯胺和 5-羟基吲哚制备标题化合物。MS CI (MH^+) = 267。

5

实施例 6

1-糠基-3-(5-吲哚基)-2-硫脲

向 5-氨基吲哚(0.26 g)的乙醇(10 ml)溶液中加入异硫氰酸糠基酯(0.28 g)。将溶液于室温下搅拌过夜, 蒸发至残余物, 将残余物溶于温乙醇中, 并用水沉淀, 得到 0.32 g 标题化合物。MS ES (MH^+) = 272。

10