

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103237802 A

(43) 申请公布日 2013. 08. 07

(21) 申请号 201180053670. 4

(74) 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理

(22) 申请日 2011. 08. 30

有限公司 11006

(30) 优先权数据

代理人 徐金国

102010044561. 4 2010. 09. 07 DE

(51) Int. Cl.

C07D 417/06 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

C07D 417/14 (2006. 01)

2013. 05. 07

A61K 31/5415 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

A61P 25/28 (2006. 01)

PCT/EP2011/064893 2011. 08. 30

G01N 33/68 (2006. 01)

(87) PCT申请的公布数据

W02012/031941 DE 2012. 03. 15

(71) 申请人 免疫基因股份公司

权利要求书2页 说明书8页 附图10页

地址 德国罗斯托克

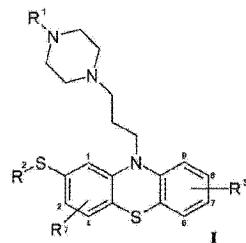
(72) 发明人 延斯·帕恩克

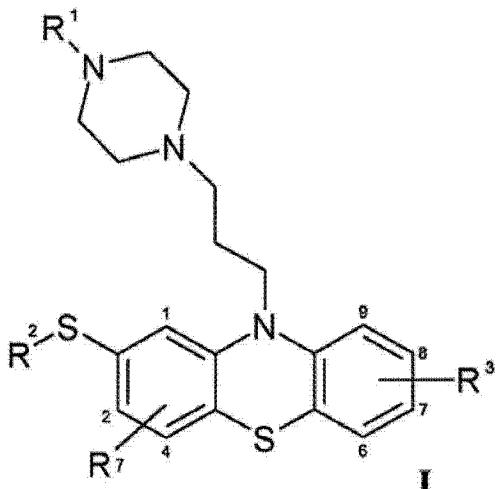
(54) 发明名称

2-(R²-硫代)-10-[3-(4-R¹-哌嗪-1-基)丙基]-10H-吩噻嗪用于治疗β-淀粉样病或α-共核蛋白病以及诊断或前诊断它们的方法

(57) 摘要

本发明涉及通式I的2-(R²-硫代)-10-[3-(4-R¹-哌嗪-1-基)丙基]-10H-吩噻嗪，用于治疗伴有脑蛋白沉积和脑ABCC1-转运蛋白活性降低的β-淀粉样病或α-共核蛋白病。本发明还涉及诊断或前诊断伴有脑蛋白沉积和脑ABCC1-转运蛋白活性降低的β-淀粉样病或α-共核蛋白病的方法，或者确定受试者罹患此种疾病的风险的方法，所述受试者已经累积了由脑ABCC1-转运蛋白转运的物质。



1. 通式 I 的 2-(R²- 硫代)-10-[3-(4-R¹- 味嗪-1-基)丙基]-10H- 吲噻嗪

其中,基团

R¹ 和 R² 相同或不同并且各自彼此独立地为 C₁-C₆ 烷基基团, 彼此独立地任选地包括一个另外的取代基, 所述取代基选自烷基、芳基、酰基、氨基、硝基、磺酰基、羟基、烷氧基、芳氧基、芳硫基、烷硫基和卤素原子, 其中各个烷基任选地包括至少一个另外的卤素原子, 和

R³ 位于呰噻嗪环体系的 6-9 位任一, 为氢原子或烷基、芳基、酰基、氨基、硝基、磺酰基、羟基、烷氧基、芳氧基、芳硫基或卤素原子, 其中各个烷基任选地包括至少一个另外的卤素原子, 或 NR⁴R⁵- , 或 OR⁶- 基团, 其中 R⁴、R⁵ 和 R⁶ 相同或不同, 并且各自彼此独立地选自氢和 C₁-C₃ 烷基, 和

R⁷ 位于呰噻嗪环体系的 1、2 或 4 位任一, 为氢原子或烷基、芳基、酰基、氨基、硝基、磺酰基、羟基、烷氧基、芳氧基、芳硫基或卤素原子, 其中各个烷基任选地包括至少一个另外的卤素原子, 或 NR⁸R⁹- , 或 OR¹⁰- 基团, 其中 R⁸、R⁹ 和 R¹⁰ 相同或不同, 并且各自彼此独立地选自氢和 C₁-C₃ 烷基,

用于治疗伴有脑蛋白沉积和脑 ABCC1 转运蛋白活性降低的 β - 淀粉样病或 α - 共核蛋白病。

2. 根据权利要求 1 的 2-(R²- 硫代)-10-[3-(4-R¹- 味嗪-1-基)丙基]-10H- 吲噻嗪的应用, 其特征在于卤素原子 / 多个卤素原子选择氟和氯。

3. 根据权利要求 1 或 2 的 2-(R²- 硫代)-10-[3-(4-R¹- 味嗪-1-基)丙基]-10H- 吲噻嗪的应用, 其特征在于 R¹ 和 R² 相同或不同并且各自彼此独立地为 C₁-C₃ 烷基。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项的 2-(R²- 硫代)-10-[3-(4-R¹- 味嗪-1-基)丙基]-10H- 吲噻嗪的应用, 其特征在于基团 R³ 和 R⁷ 是氢。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项的 2-(R²- 硫代)-10-[3-(4-R¹- 味嗪-1-基)丙基]-10H- 吲噻嗪的应用, 其特征在于基团 R¹ 是甲基, 基团 R² 是乙基并且基团 R³ 和 R⁷ 是氢。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项的 2-(R²- 硫代)-10-[3-(4-R¹- 味嗪-1-基)丙基]-10H- 吲噻嗪的应用, 其特征在于添加另外的添加剂。

7. 根据权利要求 6 的 2-(R²- 硫代)-10-[3-(4-R¹- 味嗪-1-基)丙基]-10H- 吲噻嗪的应用, 其特征在于添加 1- 二苯甲基味嗪作为另外的添加剂。

8. 根据权利要求 6 或 7 的 2-(R²- 硫代)-10-[3-(4-R¹- 味嗪-1-基)丙基]-10H- 吲

噻嗪的应用,其特征在于添加 1- 二苯甲基 -4- 肉桂基 - 噻嗪作为 1- 二苯甲基噻嗪。

9. 根据权利要求 1-8 中任一项的 2-(R²- 硫代)-10-[3-(4-R¹- 噻嗪 -1- 基) 丙基]-10H- 吡噻嗪的应用,其特征在于 β - 淀粉样病是阿尔茨海默痴呆。

10. 根据权利要求 1-8 中任一项的 2-(R²- 硫代)-10-[3-(4-R¹- 噻嗪 -1- 基) 丙基]-10H- 吡噻嗪的应用,其特征在于 α - 共核蛋白病是帕金森病或路易体痴呆。

11. 诊断或前诊断 β - 淀粉样病或 α - 共核蛋白病,或者测定受试者罹患此种疾病的风险的方法,所述 β - 淀粉样病或 α - 共核蛋白病伴有脑蛋白沉积和脑 ABCC1 转运蛋白活性降低,其中所述受试者已经接受了通过脑 ABCC1 转运蛋白转运的物质,所述方法包括如下步骤:

a) 测定受试者体液样品中至给定的时间点所接受的物质的量;

b) 重复步骤 a) 的测定至至少一个另外的之后的时间点;

c) 将步骤 a) 和 b) 中测定的量与在取样时未显示出 β - 淀粉样病或 α - 共核蛋白病的临床症状的受试者至相同时间点所限定的特征量进行比较。

12. 根据权利要求 11 的诊断或前诊断 β - 淀粉样病或 α - 共核蛋白病,或者测定受试者罹患此种疾病的风险的方法,其特征在于受试者的体液样品是来自血浆、血清和 / 或神经液的样品。

13. 根据权利要求 11 或 12 的诊断或前诊断 β - 淀粉样病或 α - 共核蛋白病,或者测定受试者罹患此种疾病的风险的方法,其特征在于 β - 淀粉样病是阿尔茨海默痴呆。

14. 根据权利要求 11 或 12 的诊断或前诊断 β - 淀粉样病或 α - 共核蛋白病,或者测定受试者罹患此种疾病的风险的方法,其特征在于 α - 共核蛋白病是帕金森病或路易体痴呆。

15. 根据权利要求 11-14 中任一项的诊断或前诊断 β - 淀粉样病或 α - 共核蛋白病,或者测定受试者罹患此种疾病的风险的方法,其特征在于,通过脑 ABCC1 - 转运蛋白转运的物质选自抗生素、抗病毒剂 / 抗病毒药、抗过敏药 / 抗组胺药、心血管药物、抗抑郁药、抗高尿酸血症药、细胞毒性药、维生素 / 维生素类似物、消炎药、抗癫痫药、激素 / 激素衍生物、白三烯、荧光样品、内源性产生的天然物质的 GSH- 、硫酸盐 - 或葡萄糖苷酸偶联的代谢物、毒素或药物。

**2-(R²- 硫代)-10-[3-(4-R¹- 味嗪 -1- 基) 丙基]-10H- 吲
噻嗪用于治疗 β - 淀粉样病或 α - 共核蛋白病以及诊断或
前诊断它们的方法**

[0001] 蛋白或蛋白片段（肽）在脑中的累积是年龄相关的神经退行性疾病的重要特征。阿尔茨海默痴呆（阿尔茨海默病，AD）和 β - 脑淀粉样血管病（CAA）是 β - 淀粉样肽（Aβ）累积所引发的疾病，尚不清楚它们可能的机制。Aβ - 蛋白内稳态，即通过受体或蛋白酶生产和降解 / 转运的平衡，在 AD 和 CAA 中受到干扰。然而目前为止，对于通过细胞转运蛋白（ABC 转运蛋白）除去 Aβ - 肽的关注很少。在帕金森病（帕金森氏症）中累积 α - 共核蛋白（α-synuclein），所述 α - 共核蛋白特别调控在黑质中的多巴胺释放。在 α - 共核蛋白病帕金森氏症中，已知 ABC - 转运蛋白在转运中起到至关重要的作用 (Kortekaas et al., Ann Neurology 2005, 57, 176-179)。在此，存在若干亚家族 A-G，能够转运互相不同的底物（代谢物、药物、肽、蛋白、离子）并且甚至能够在转运功能上互相替代（例如 ABCB1 和 ABCC1, Tao et al. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 64, 5, 961-969）。

[0002] 利用各种遗传改造的小鼠模型，发现 ACB - 转运蛋白（ABC 转运蛋白的共同结构元件是 ATP - 结合盒和转运子）ABCC1，一种重要的蛋白 / 肽转运蛋白，特别是 Aβ 转运蛋白，在影响脑蛋白积累上有杰出的功能。ABCC1 也是重要的 α - 共核蛋白转运蛋白。

[0003] 下文，以 Aβ - 转运蛋白为实例来描述转运蛋白活性。

[0004] 为了测定体内 ABCC1 活性，使用遗传上缺失 ABCB1-、ABCG2- 或 ABCC1- 转运蛋白的转基因小鼠（敲除小鼠）测定 APP 表达。

[0005] 发现：

[0006] i) 在缺失 ABCC1 转运蛋白的小鼠中，Aβ 的量增加了 12 倍，

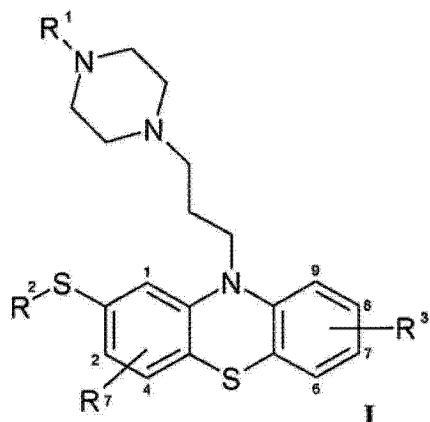
[0007] ii) ABCB1 转运蛋白的缺失导致只增加了 3 倍，以及

[0008] iii) ABCG2 的缺失没有 Aβ 累积效应。

[0009] 因此，本发明的目的在于提供以适当的方式影响 ABCC1 转运蛋白以治疗神经退行性疾病，特别是 β - 淀粉样病（β-amyloidopathie）或 α - 共核蛋白病（α-synucleinopathie）的物质。这一目的是通过权利要求 1 的 2-(R²- 硫代)-10-[3-(4-R¹- 味嗪 -1- 基) 丙基]-10H- 吲噻嗪来实现的。进一步优选的实施方式将由从属权利要求中显见。

[0010] 换言之，该目的是通过通式 1 的 2-(R²- 硫代)-10-[3-(4-R¹- 味嗪 -1- 基) 丙基]-10H- 吲噻嗪来实现的。

[0011]



[0012] 其中，基团

[0013] R^1 和 R^2 相同或不同并且各自彼此独立地为 C_1-C_6 烷基基团，彼此独立地任选地包括一个另外的取代基，所述取代基选自烷基、芳基、酰基（优选乙酰基）、氨基、硝基、磺酰基、羟基、烷氧基、芳氧基、芳硫基、烷硫基和卤素原子，其中各个烷基任选地包括至少一个另外的卤素原子，和

[0014] 其余的 R^3 位于吩噻嗪环体系的 6-9 位任一，为氢原子或烷基、芳基、酰基（优选乙酰基）、氨基、硝基、磺酰基、羟基、烷氧基、芳氧基、芳硫基、或烷硫基或卤素原子，其中各烷基任选地包括至少一个另外的卤素原子，或 NR^4R^5- ，或 OR^6- 基团，其中 R^4 、 R^5 和 R^6 相同或不同，并且各自彼此独立地选自氢和 C_1-C_3 烷基，和

[0015] 其余的 R^7 位于吩噻嗪环体系的 1、2 或 4 位任一，为氢原子或烷基、芳基、酰基（优选乙酰基）、氨基、硝基、磺酰基、羟基、烷氧基、芳氧基、芳硫基、或烷硫基或卤素原子，其中各烷基任选地包括至少一个另外的卤素原子，或 NR^8R^9- ，或 $OR^{10}-$ 基团，其中 R^8 、 R^9 和 R^{10} 相同或不同，并且各自彼此独立地选自氢和 C_1-C_3 烷基，

[0016] 用于治疗伴有脑蛋白沉积的 β -淀粉样病或 α -共核蛋白病。

[0017] 此外，需要用于检测或诊断或前诊断 α -共核蛋白病以及 β -淀粉样病的方法。

[0018] 本发明的目的是提供一种可以诊断或前诊断 α -共核蛋白病以及 β -淀粉样病的方法。这一目的通过根据权利要求 11 的方法实现。优选的实施方式将通过从属权利要求变得显而易见。换言之，本发明的目的是开发一种诊断或前诊断 β -淀粉样病或 α -共核蛋白病或者测定受试者患有此种疾病的风险的方法，其中所述受试者接受了通过脑 ABCC1- 转运蛋白转运的物质，所述方法由下述步骤组成：

[0019] a) 测定受试者体液样品中至给定的时间点所接受的物质的量；

[0020] b) 重复步骤 a) 的测定至至少一个另外的之后的时间点；

[0021] c) 将步骤 a) 和 b) 中测定的量与在取样时未显示出 β -淀粉样病或 α -共核蛋白病的临床症状的受试者至相同时间点所限定的特征量进行比较。

[0022] 受试者已经具有影响 ABCC1- 转运蛋白的至少一种物质意味着必须给予这一物质。甚至，例如，由于另一疾病的药物治疗，这一物质已经存在于受试者的身体中。将被检查的受试者的体液样品优选血清、血浆和 / 或神经液的样品。 β -淀粉样病优选阿尔茨海默病， α -共核蛋白病优选帕金森病。任选地， α -共核蛋白病是路易体痴呆 (DLB)。通过脑 ABCC1- 转运蛋白转运的物质，优选选自抗生素（如，二氟沙星，格雷沙星）、抗病毒剂 / 抗病毒药（如，沙奎那韦，利托那韦）、抗过敏药 / 抗组胺药（如，甲氯咪胍）、心血管药物

(如,维拉帕米)、抗抑郁药(如,西酞普兰)、抗高尿酸血症药(如,丙磺舒)、细胞毒性药(如,甲氨蝶呤,依托泊苷,依达曲沙, ZD1694)、维生素 / 维生素类似物(例如,甲氨蝶呤,叶酸, L- 甲酰四氢叶酸)、消炎药(如,吲哚美辛)、抗癫痫药(如,丙戊酸)、激素 / 激素衍生物(如,17 β - 雌二醇)、白三烯(如, LTC4)、荧光样品(如,钙黄绿素, Fluo-3, BCECF, SNARF)、天然物质的(内源性产生的)GSH-、硫酸盐 - 或葡萄糖酸偶联的代谢物、毒素或药物(如,2,4- 二硝基苯基 -SG, Bimane-SG, N- 乙马来酰亚胺 -SG, 阿霉素 -SG, 噻替派 -SG, 环磷酰胺 -SG, 马法兰 -SG, 苯丁酸氮芥 -SG, 依他尼酸 -SG, 异丙甲草胺 -SG, 阿特拉津 -SG, 萝卜硫素 -SG, 黄曲霉毒素 B1- 环氧化物 -SG, 4- 硝基喹啉 1- 氧化物 -SG, As (SG) 3, 依托泊苷 -Gluc, 4-(甲基亚硝胺基)-1-(3- 吡啶基)-1- 丁醇 (NNAL)-3 β -0-Gluc, SN-38-gluc, 4- 甲基伞形酮基 - β -d-gluc, 6- 羟基 -5,7- 二甲基 -2- 甲氨基 -4-(3- 吡啶甲基)-benzo thiazolsulfat (E3040S)-Gluc, 白三烯 C4, 前列腺素 A2-SG, 15- 脱氧 -A12, 14- 前列腺素 J2-SG, 羟基壬烯酸 -SG, 17 β - 雌二醇 -17- β -d-gluc, 葡萄糖醛酸基胆红素, 二葡萄糖醛酸基胆红素 (Bis-lucuronosylbilirubin), 猪去氧胆酸酯 (Hyodeoxycholate)-6- α -Gluc, 雌素酮 -3- 硫酸盐, 脱氢表雄酮 - 硫酸盐, 石胆酸硫酸盐 (Sulfatolithocholat))(也参见 Deeley RG et al. Substrate recognition and transport by multi drug resistance protein 1 (ABCC1), FEBS letters 2006, 580 (4), pp. 1103-1111)。

[0023] 这一对 ABCC1- 转运蛋白的转运活性的间接分析可以用于诊断 / 前诊断相应的疾病。在已经通过其他途径自身摄取了 ABCC1 可转运的物质的受试者中, 检查体液, 例如血浆、血清和 / 或神经液中的药物浓度谱。对受试者的时间依赖性测量表明, 相比于健康受试者, ABCC1- 转运蛋白的减少, 物质浓度曲线(浓度 c 对时间 t) 存在延迟或停止, 即发生曲线最大值的时间改变。

[0024] 当曲线相对于健康情形偏移时, 表明 ABCC1 转运活性的改变。这意味着诸如 A β 或 α - 共核蛋白的物质转运更差并且因此指示相应的疾病。

[0025] 两种小鼠模型都显示, ABCC1 的药物调控表明它是重要的细胞跨膜转运蛋白用于 A β 蛋白, 并且表明血脑屏障和脉络丛对于从脑中消除 A β 的重要的作用。已经发现, ABCC1- 转运蛋白的选择性的药物活化将显著降低脑负载的 A β 并且对于患有脑蛋白内稳态受损的疾病的治疗是治疗上有用的。此外, 如上所述对于 ABCC1- 转运蛋白的转运活性分析可以用于直接或间接诊断 / 前诊断上述相应的疾病。通过给予经 ABCC1- 转运蛋白转运的物质, 能够进行直接分析及其测定。上面已经解释了间接分析。

[0026] 与 ABC- 转运蛋白相关的输送机制的改变可实质上影响 A β 和其他脑蛋白的时间上的累积谱。结果, ABCC1- 转运蛋白的功能影响患上神经退行性疾病, 尤其是阿尔茨海默病的风险。在此意义下, 神经退行性疾病的治疗指现有疾病的预防和治疗。

[0027] 首先以使得显示出 ABCC1 能够转运 A β 的方式来研究 ABC- 转运蛋白在 A β 分泌中的作用。为此, 使用来自原代培养的小鼠大脑毛细血管内皮的内皮细胞(细胞培养物制备), 体外进行 Transwell-Assay(内皮细胞通透迁移室检测, ECTA)。

[0028] 使用来自 ABCB1- 缺陷型、ABCC1- 缺陷型(敲除)小鼠和来自对照小鼠(C57BL/6, FVB/N)的脑毛细血管的内皮细胞的原代培养物, 调查 A β - 特异的转运活性。在 ABCB1- 缺陷型、ABCC1- 缺陷型内皮细胞中, 从近腔(脑)到血管内膜腔(血液)的 A β 转运受损。对于对照细胞, 在给予 A β - 肽(A β 42)后首个六小时期间, 平均 A β 转运率为 2.2 pg/min。相

比之下,ABCC1- 缺陷型细胞只达到该负载能力的一半 (1,0pg/min)。在 ABCB1- 缺陷型细胞中,几乎没有 A β 转运 (0.3pg/min)。对于来自毛细血管内皮细胞和脉络丛的细胞进行进一步研究表明,ABCB1 转运蛋白在大脑毛细血管内皮中高度表达,而内皮 ABCC1- 表达在脑毛细血管中很低。

[0029] 基于新产生的 ABC- 转运蛋白缺陷型阿尔茨海默病小鼠模型,在体内调查 ABC- 转运蛋白家族成员的相对重要性。遗传修饰的小鼠各存在特异的 ABC- 转运蛋白 ABCG2、ABCB1 或 ABCC1 缺陷 (敲除)。

[0030] 脑切片的 A β - 免疫组化分析显示 :

[0031] i) 相比于对照小鼠,在 ABCC1- 缺陷型小鼠中,皮质 A β - 阳性斑块的数量和尺寸显著增加 (参见图 1 和 2a-c)。

[0032] ii) 相比于 ABCC1- 缺陷型小鼠,ABCB1- 缺陷型小鼠显示出 A β - 斑块的数量和尺寸的增加较小。

[0033] iii) 在对照小鼠和 ABCG2- 缺陷型小鼠之间,没有观察到显著差异 (图 2a-c)。

[0034] 为了测定缓冲液可溶性的 A β (多数为小单体和寡聚体) 和胍可溶的 A β (主要是纤维化或聚集的材料) 的量,使用酶联免疫吸附检测 (ELISA) 用于 A β 。

[0035] 根据免疫组化分析的形态学结果,在所有所测的时间点,相比对照,ABCC1 缺陷型小鼠显示出累积的 A β 的显著增加。A β 的脑负载在 25 周龄时最大。此时,A β 值 (A β 42) 比对照小鼠高 12 倍。在 ABCC1 缺陷型组中,缓冲液可溶性 A β 也随着年龄增加,但在 25 周,在最高斑块负载后,可溶性 A β 的数值急剧下降。

[0036] 进行进一步调查,以提供在需要时,缺乏 ABCC1 转运和 A β 积累之间的关联的进一步证据。

[0037] ABC 转运蛋白的转运动力主要取决于特异的蛋白 / 肽特性。淀粉样蛋白前体蛋白的荷兰型变体 (荷兰型变体 APP_{dt}) 的 α - 分泌酶分泌在 APP 附近引入另外的负电荷,因此影响 A β 跨血脑屏障的消除,导致脑淀粉样血管病 (CAA)。对来自对照小鼠的脑毛细血管和脉络丛 (CP) 的 Western 印迹分析显示 ABCB1 在脑毛细血管内皮细胞 (BC) 中的强烈表达和 ABCC1 在 CP 中强烈表达 (图 3d)。由于 ABC 转运蛋白对于消除 A β 起重要作用,假设 ABC 转运蛋白缺陷型 APP_{dt}- 转基因小鼠具有增加的脑膜血管 A β _{dt} 累积 (在血脑屏障和血脑屏障脉络丛)。在 24 月龄的 ABC 缺陷型 APP_{dt} 小鼠中量化 CAA 的程度。在 ABCC1- 缺陷型动物中,估测至少 51% 的血管受影响 (>75% 血管壁负载 A β),相比之下,对照为 23% (图 3c)。

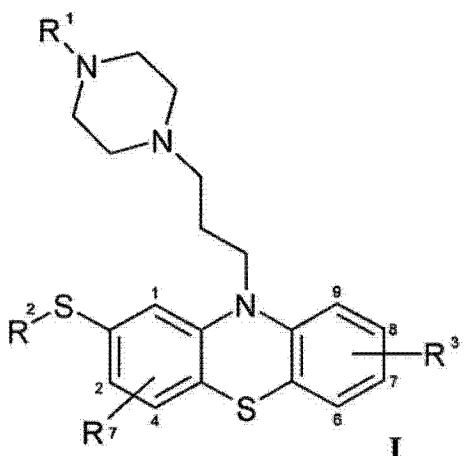
[0038] 根据这些结果,检查到通过药物介导的 ABC- 转运蛋白的活化可影响 / 降低脑中可溶性 A β 的量的程度。用止吐药硫乙哌丙嗦 (Thiethylperazine, Torecan®, 2-(乙硫基)-10-[3-(4- 甲基哌嗪-1- 基) 丙基]-10H- 吡唑嗪) 处理具有淀粉样蛋白沉积的小鼠并孵育小鼠 30 天。每天 3mg/kg 体重肌内给予 2 次。小鼠老年斑块形成前,就要采用预防性的措施。对于被处理动物的 ELISA 测量显示相比于载体处理的动物 (载体 = 水),在处理小鼠中, A β 的量降低至少 31% (图 3e)。结果如图 3 所示。

[0039] 除去 A β 的能力证明是 A β 在脑中积累调节的主要因素。

[0040] 已证明 Thiethylperazin(Torecan®) 为高度有效的 ABCC1- 转运蛋白活化剂。从相同的基本结构出发得到的进一步的衍生物也在 ABCC1- 转运蛋白的活化方面显示出优良

的结果。相应的衍生物如通式 I 所示

[0041]



[0042] 其中，基团

[0043] R¹ 和 R² 相同或不同并且各自彼此独立地为 C₁-C₆ 烷基基团，彼此独立地任选地包括一个另外的取代基，所述取代基选自烷基、芳基、酰基（优选乙酰基）、氨基、硝基、磺酰基、羟基、烷氧基、芳氧基、芳硫基、烷硫基和卤素原子，其中所述烷基各任选地包括至少一个另外的卤素原子，和

[0044] R³ 位于吩噻嗪环体系的 6-9 位任一，优选位于 6、7 或 8 位，为氢原子或烷基、芳基、酰基（优选乙酰基）、氨基、硝基、磺酰基、羟基、烷氧基、芳氧基、芳硫基、或烷硫基或卤素原子，其中各个烷基任选地包括至少一个另外的卤素原子，或 NR⁴R⁵-，或 OR⁶- 基团，其中 R⁴、R⁵ 和 R⁶ 相同或不同，并且各自彼此独立地选自氢和 C₁-C₃ 烷基，和

[0045] R⁷ 位于吩噻嗪环体系的 1、2 或 4 位任一，优选位于 2 或 4 位，为氢原子或烷基、芳基、酰基（优选乙酰基）、氨基、硝基、磺酰基、羟基、烷氧基、芳氧基、芳硫基、或烷硫基或卤素原子，其中各烷基任选地包括至少一个另外的卤素原子，或 NR⁸R⁹-，或 OR¹⁰- 基团，其中 R⁸、R⁹ 和 R¹⁰ 相同或不同，并且各自彼此独立地选自氢和 C₁-C₃ 烷基。

[0046] 这些衍生物因此适于治疗神经退行性疾病，特别是 β - 淀粉样病或 α - 共核蛋白病，如上所述，其中治疗包括对已有疾病的预防以及治疗。一个卤素原子 / 多个卤素优选选自氟和氯。R^{1,2,3,7} 的 (-(C=O)-R) 酰基基团优选乙酰基基团 (-C(=O)CH₃)。基团 R¹ 和 R² 可以相同或不同，并且各自独立地为 C₁-C₆ 烷基（优选 C₁- 烷基）或者被乙酰基取代的 C₁-C₆ 烷基（优选 C₁- 烷基），基团 R³ 和 R⁷ 是氢或乙酰基。在优选的实施方式中，基团 R¹ 和 R² 相同或不同并且各自独立地为 C₁-C₃ 烷基。此外，优选基团 R³ 和 R⁷ 是氢。特别优选的是，当 R¹ 是甲基，R² 是乙基并且基团 R³ 和 R⁷ 是氢时，是 Thiethylperazin(Torecan®))。当用于治疗神经退行性疾病时，已证明向 2-(R²- 硫代)-10-[3-(4-R¹- 呓嗪-1- 基)丙基]-10H- 吩噻嗪中添加其他活性成分，优选 1- 二苯甲基哌嗪，高度优选 1- 二苯甲基-4- 肉桂基- 哒嗪 (Cinnarizine) 是有益的。可以使用根据本发明的 2-(R²- 硫代)-10-[3-(4-R¹- 呓嗪-1- 基)丙基]-10H- 吩噻嗪衍生物，通过上述间接分析来治疗或诊断各种神经退行性疾病。在特别优选的实施方式中，神经退行性疾病是 β - 淀粉样病，特别是阿尔茨海默病 (AD)。另一个实施方式涉及神经退行性疾病是 α - 共核蛋白病，尤其是帕金森病 (PD) 的情形。两种情形，即 β - 淀粉样病和 α - 共核蛋白病的特征在于蛋白的脑沉积，所述疾病可以通过 ABCC1- 转

运蛋白的活化来治疗或通过其活性来诊断。

[0047] 另外,通过 ABCC1- 转运蛋白活化可治疗的或者通过 ABCC1- 转运蛋白活化可诊断的疾病也在下面提及。所以进一步地,可治疗的疾病是路易体痴呆 (LBD)。它的特征也在于脑蛋白累积,即 α - 共核蛋白病如帕金森病。

[0048] 另一个实施方式涉及神经退行性疾病是亨廷顿舞蹈症 (HD) 的情形。另一个实施方式涉及神经退行性疾病是朊病毒疾病,尤其是克雅氏疾病 (CJD) 或致死性家族性失眠症 (FFI) 的情形。另一个实施方式涉及神经退行性疾病是 tau 蛋白病,特别是皮质基底节变性 (CBD)、Steel-Richardson-Olszewski 综合症 (PSP, 进行性核上性麻痹) 和皮克病 (PiD) 的情形。另一个实施方式涉及神经退行性疾病是额颞叶变性 (FTLD),特别是泛素阳性变性 TDP43 阳性变性或泛素 TDP43 阴性变性的形式。另一个实施方式涉及神经退行性疾病是肌萎缩侧索硬化 (ALS) 的情形。另一个实施方式涉及神经退行性疾病是脊髓小脑共济失调 (SCA) 或痉挛性轻截瘫 (SPG) 的情形。另一个实施方式涉及神经退行性疾病 / 神经免疫性疾病是多发性硬化症 (MS) 或 MS- 相关的症状,例如 ADEM 或 Devic 症状的情形。

附图说明

[0049] 图 1a 示出在 ABCC1- 缺陷型小鼠 (ABCC1ko) 中,皮质神经斑块的密度增加 75% ;

[0050] 图 1b,c 示出由于尺寸大于 $700 \mu m^2$ 斑块量 (+63%),和小斑块 (-24%) 的较小频率,平均斑块大小增加 (+34%)。误差棒,标准误 ($n \geq 3$) ;

[0051] 图 1d 示出在 ABCG2- 缺陷型 (ABCG2ko), ABCB1- 缺陷型 (ABCB1ko), ABCC1- 缺陷型 (ABCC1ko) 小鼠和对照小鼠中的 IHC 染色,示出 ABCC1- 缺陷型动物的 $A\beta$ 的较高表面密度。详细示出了相同尺寸的典型斑块,坐标尺表示为 $500 \mu m$ (概况) 和 $50 \mu m$ (切取的部分) (* $p < 0.05$) ;

[0052] 图 2a 是在特异的 ABC- 转运蛋白敲除小鼠中,皮质 (覆盖) 的斑块密度和大小。尤其是 ABCC1- 缺陷型 (ABCC1ko) 小鼠展现出增加的 $A\beta$ - 淀粉样变性负载 (浅灰色条,各在不同组中的最右侧), x 轴的 w= 周 ;

[0053] 图 2b 是在 25 周龄的 ABCC1- 缺陷型 (ABCC1ko) 和 ABCB1- 缺陷型 (ABCB1ko) 小鼠中,总斑块尺寸增加, x 轴的 w= 周 ;

[0054] 图 2c 示出较小尺寸的斑块发生和更大尺寸的斑块 ($>700 \mu m^2$) 发生的总体增加是相关的,而中等尺寸的斑块数量保持相同值,误差棒,标准误 ($n \geq 5$), * $P < 0.05$;

[0055] 图 3 是 ABCC1 的缺陷促进 $A\beta$ 和 $A\beta_{dt}$ 的积累并且 ABCC1 的活化 (通过给予 Torecan) 降低 $A\beta$ 值 ;

[0056] 图 3a 示出在 25 周龄的 ABCC1 缺陷型中,不溶性 $A\beta$ 显著增加 (~ 12 倍);和

[0057] 图 3b 示出相比于 22 周龄 (-56%),在 25 周龄,缓冲液可溶的 $A\beta 42$ 的量显著降低。这可能是由于不溶性 $A\beta$ 在沉淀物中的沉积。通过免疫组化测量,在相同的年龄,由 $A\beta$ 沉积占据的表面积增加 83% (误差棒,标准误 $n \geq 5$, $p < 0.05$) ;

[0058] 图 3c 示出 53% 的血管受到 CAA 的严重影响 ($>75\%$ 血管壁具有 $A\beta$)。这涉及 ABCC1- 缺陷型小鼠 (ABCC1ko),相比之下,在对照中是 23% ($n=3$) ;

[0059] 图 3d 示出可以看出 ABCC1 主要在脉络丛 (CP) 中表达,而 ABCB1 主要在脑毛细血管 (BP) 中表达 ;

[0060] 图 3e 示出通过 Thiethylperazine (Torecan) 的 ABCC1 的活化,降低小鼠中所获得的 A β 值 (-28%),误差棒,标准误 (n=4, *p<0. 05)。

[0061] 实例

[0062] 动物

[0063] APP 转基因小鼠 (APP, APP_{dt}) 购自 The Jackson Laboratory (Bar Harbor, 美国) 和图宾根大学 (Tübingen, 德国)。NEP 缺陷型小鼠购自 Riken Brain Research Institute (Saitama, 日本)。ABCG2-、ABCB1- 和 ABCC1- 缺陷型小鼠购自 Taconic-Farms (丹麦)。所有的转基因和基因敲除小鼠系都在 FVB 遗传背景下饲养至少 9 代。小鼠保持在 23°C, 12h/12h 光 / 暗循环, 食物和水供应不限。

[0064] 方法

[0065] 组织制备

[0066] 对于组织制备,通过颈脱位处死小鼠并且用 PBS (磷酸盐缓冲的生理盐水溶液) 心脏灌注。移除脑并将一个脑半球存储在 4% 多聚甲醛缓冲液中用于石蜡包埋和免疫组化。另一脑半球在液氮中快速冷冻,并且存储在 -80°C 用于生化分析。

[0067] ELISA

[0068] 使用 Genetics Company (TGC, Schlieren, 瑞士) 的 ELISA-Kits (TH40HS, TK42HS) 进行 A β 的量化。使用 PreCelllys24 (12s, 6. 500rpm) 将脑半球均浆。添加碳酸盐缓冲液 (pH8. 0) 后, 使用 PreCelllys (5s, 5000rpm) 将脑组织匀浆进行混合并且在 4°C 以 24, 000g 离心 90min 以将不溶物与可溶性 A β 物质分离。将剩余的上清液 (缓冲液可溶部分) 用 8M 盐酸胍以 1 : 1. 6 比例混合进行处理。对于聚集的 A β - 物质的提取, 将沉淀溶解在 8 倍体积的 5M 盐酸胍中, 室温振荡 3 小时并在 4°C 以 24, 000g 离心 20min。剩余的上清液为盐酸胍成分 (GuaHCl)。使用 Nanodrop1000 分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, 美国), 以三个重复来测量所有样品的蛋白含量。ELISA 试验要根据制造商的说明书来进行适当的稀释。

[0069] Western 印迹

[0070] 制备组织匀浆用于 Westernblot 试验。使用 BCA-Assays (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) 来测定提取物的总蛋白浓度。每个泳道上样 10 μ g 总蛋白进行电泳后, 将蛋白点印到 PVDF 膜上。在室温下, 用含有 5% 干乳的 TBST 缓冲液 (50mMTris, pH7. 4, 150mMNaCl, 0. 1%Tween20) 在室温下封闭 1 小时, 在 4°C 过夜检测 ABCB1 (1:500, D-11, Santa Cruz)、ABCC1 (1:200, Alexis Bio) 或 β -Actin (1:20, 000, Sigma) 几种蛋白。作为检测抗体, 使用抗小鼠 -HRP, 抗大鼠 HRP 或抗兔 HRP。并用 Amersham ECL Plus 检测试剂盒以及 RoperCoolSnap HQ² 照相机进行显影。

[0071] 免疫组化分析 (IHC)

[0072] 将用福尔马林固定的脑包埋在石蜡中并切成厚度 4 μ m 的切片。切片在去除石蜡后用 BondMaxTM Autostainer (Menarini/Leica, 德国) 进行后续染色。通过在 95% 甲酸 (用于抗体 6F3D, Dako, 德国) 和 70% 甲酸 (用于抗体 4G8, Millipore, 德国) 中 5min 阻断内源性过氧化酶 (5min) 并进行抗原决定簇回复后再开始免疫染色。在室温下, 以下述稀释: 6F3D (1:100), 4G8 (1:500) 将一抗孵育 30min。根据标准方法 DAB R30, 利用 BondMaxTM Bond Polymer Refine 检测试剂盒来检测一抗。在 230nm 分辨率下, 使用 MiraxDesk/MiraxMidi

扫描仪对染色后切片进行完全数字化扫描,然后使用 AxioVision 软件包 (Zeiss, 德国) 进行自动分析。

[0073] CAA 严重性的评估

[0074] 对 APP_{dt} 小鼠模型的脑切片用 4G8 抗体染色。以盲实验的方式检测至少两个不连续的切片的 CAA 脑膜血管。人工计数所有脑膜血管,并将 CAA 严重性按下面分类:

[0075] 分类 I :未影响

[0076] 分类 II :≤ 25% 外周阳性染色

[0077] 分类 III :≤ 50% 外周阳性染色

[0078] 分类 IV :≤ 75% 外周阳性染色

[0079] 分类 V :≤ 100% 外周阳性染色

[0080] 所有类中的平均血管数是相对于被发现的血管的总数来计算。

[0081] 内皮细胞 -Transwell 检测 (ECTA)

[0082] 按 Coisne 等人所述来制备鼠脑毛细血管内皮细胞 (Coisne, C., et al. Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model:a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium. Laboratory Investigation, 85, 734-746 (2005))。将至少 10 只 3-4 周龄的小鼠斩首并移除脑。在将脑干, 白质和脑皮质解剖后, 将组织放在两倍体积的洗涤缓冲液 B (WBB) (Hanks buffered salts solution (HBSS), 10mM HEPES, 0.1% BSA) 中在 15ml 的 Glassdouncers (Wheaton Industries, Millville, NJ, USA) 中匀浆。向匀浆中添加一体积 30% 的葡聚糖。以 3,000g 在 4°C 离心两次。将含有血管的沉淀在 WBB 中重悬并且通过用力吹打溶液来分离大血管。使用 60 μm 膜真空过滤以将大血管与毛细血管分离。在用胶原蛋白酶 / 分散酶 (HBSS, 10mM HEPES, 0.15g/ml TCLK, 10 μg/ml DNase-1, 1mg/ml 胶原蛋白酶 / 分散酶 (Roche) 联合处理后, 进一步通过用力吹打溶液获得单细胞悬液。将内皮细胞以每孔 120,000 细胞的密度引入到涂有 Matrigel 的 Transwell inserts (0.4 μm Poren, Greiner Bio-One, 德国) 中, 并放到有胶质细胞培养物的条件下进行生长。

[0083] 在测试期间, 使用硫磺来测定细胞旁流。用含有 10ng 的 Aβ 42 (1.6nM 终浓度) 的溶液来更换近腔室处的培养基。随后, 在 2h、6h 和 24h 从腔室中取样并通过 ELISA 来测定 Aβ 含量 (TK42-highsense, TGC, 瑞士)。转运率的确定如 Coisne 等人在 (文章) 中的描述 (Coisne, C. et al. Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model:a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium. Laboratory Investigation, 85, 734-746 (2005))。

[0084] ELISA 统计

[0085] 将 Lilliefors-godness-of-fit-Test ($\alpha = 0.05$) 应用于 ELISA 数据和对数转换的 ELISA 数据以区分正常分布的样品数据估测值和对数正态分布样品数据的估测值。尽管样品量小,但是对两组数据设定,在 44 个样品中有 5 个都不符合无效假设 (H_0)。根据主要的正偏离 (偏移) 的观察以及严格的阳性样品数据,正常分布的数据的估测值被放弃。对可能的对数正态分布的估测值计算平均值和置信区间。使用 Wilcoxon-Rank-sum-Test 来比较每个时间点处不同小鼠品系的 ELISA 数据。

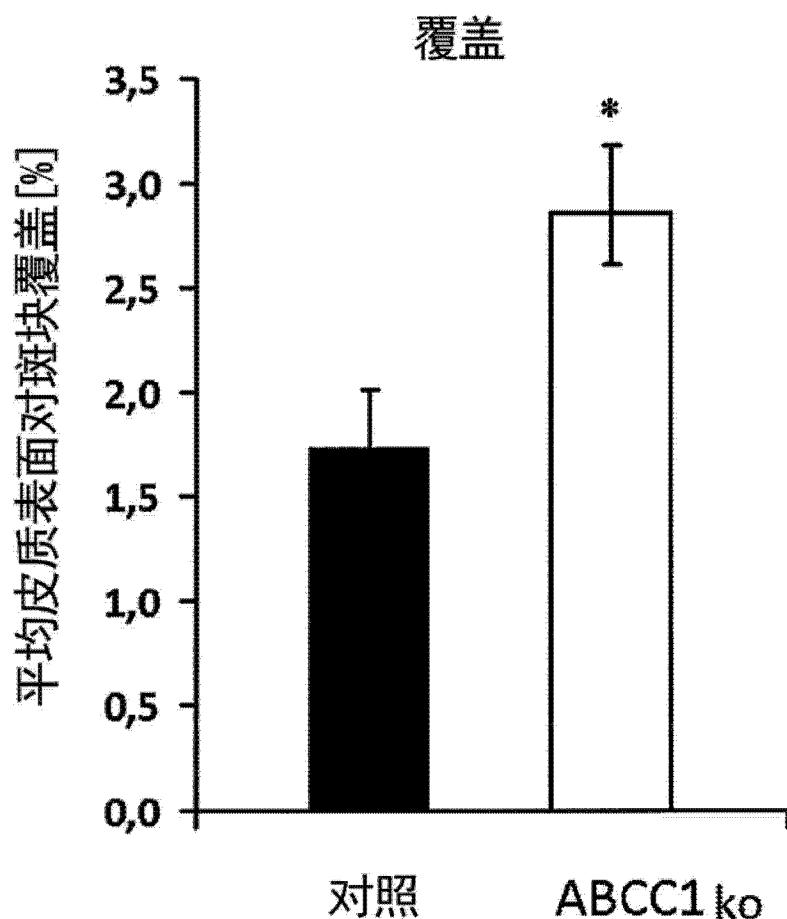


图 1a

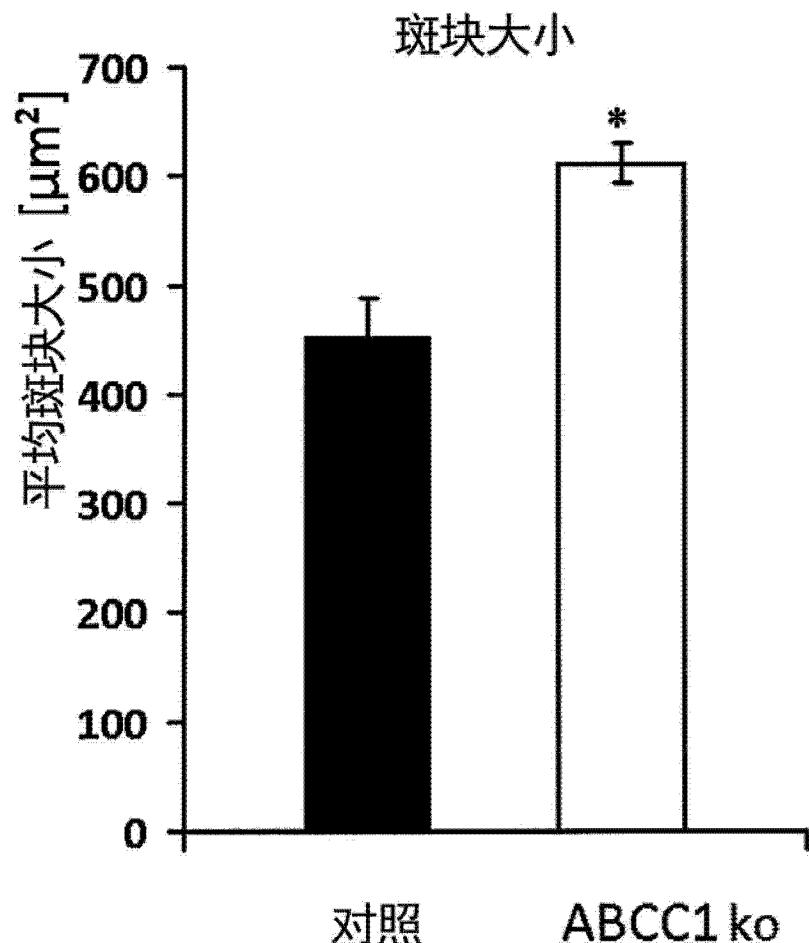


图 1b

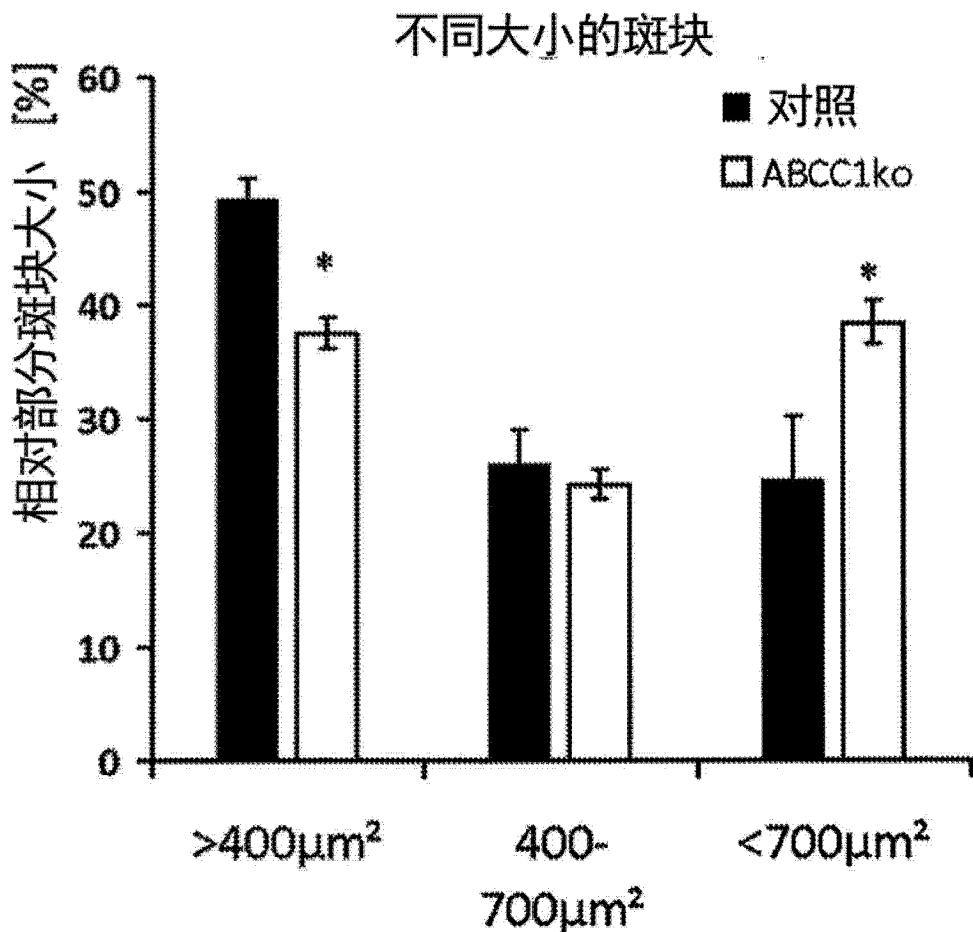


图 1c

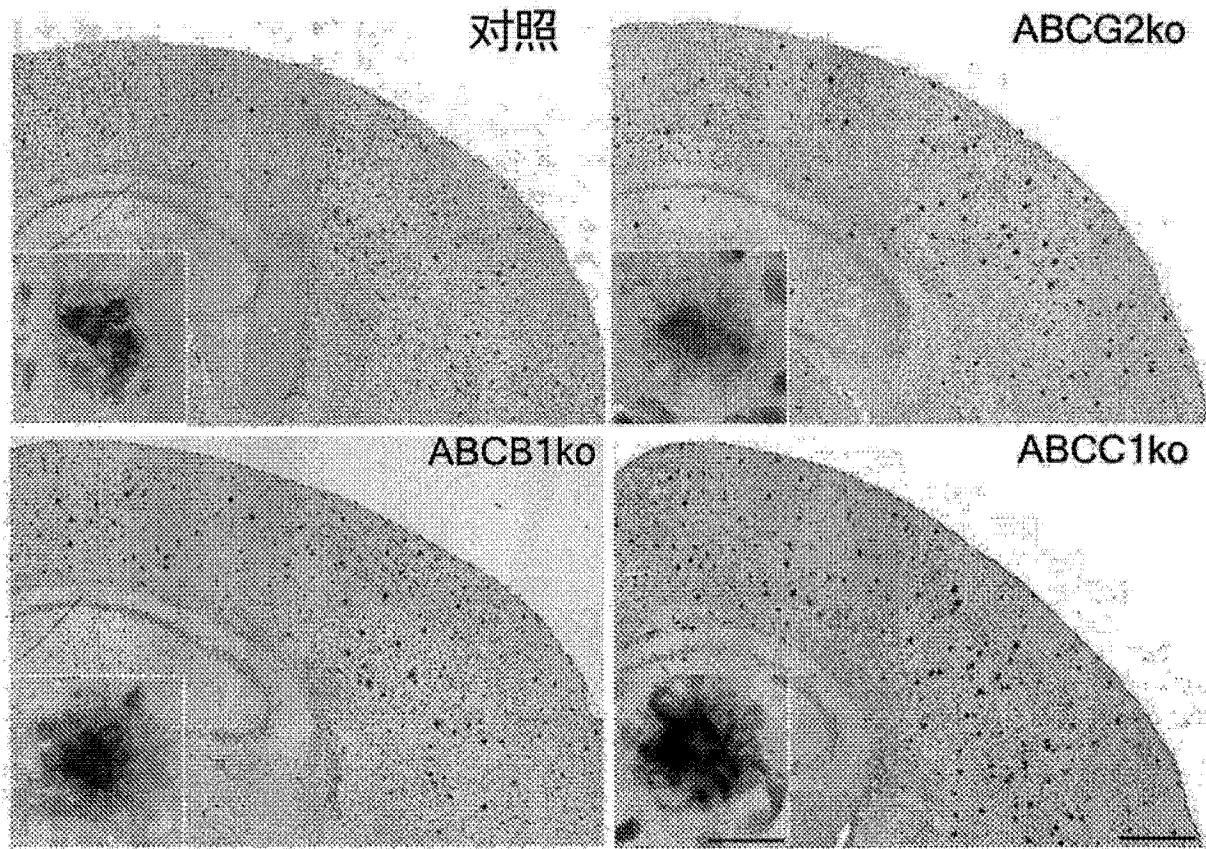


图 1d

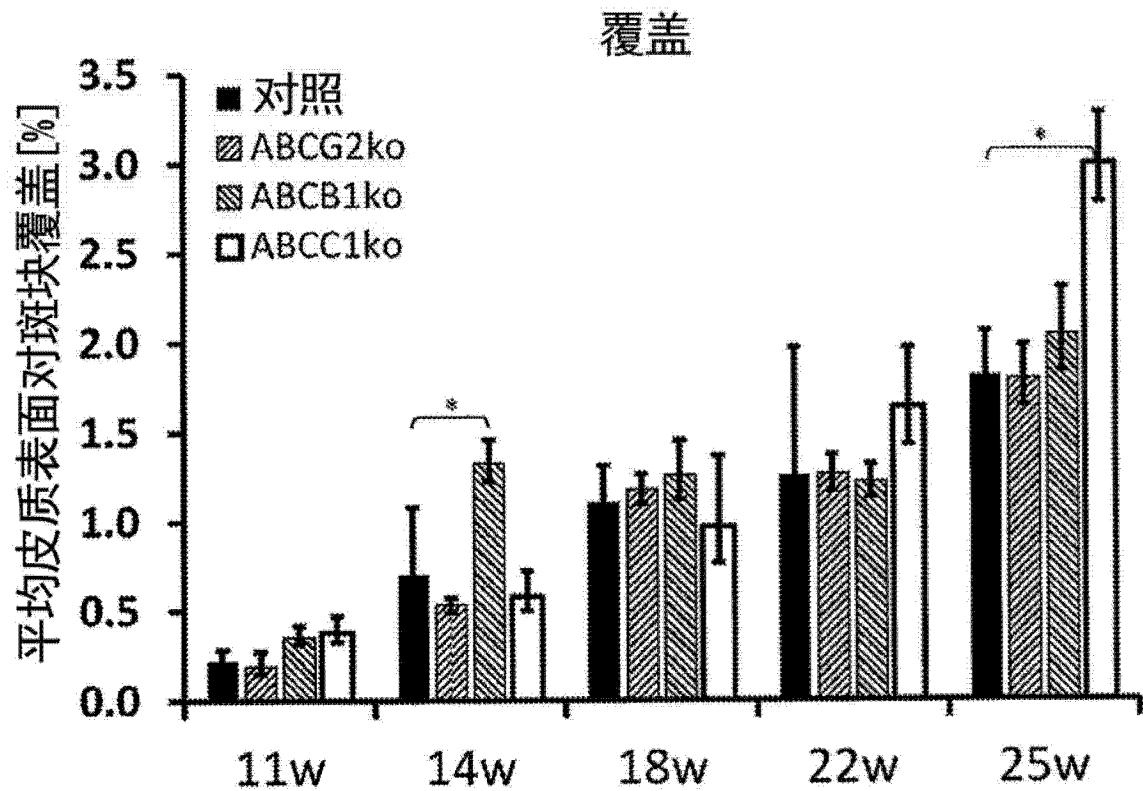


图 2a

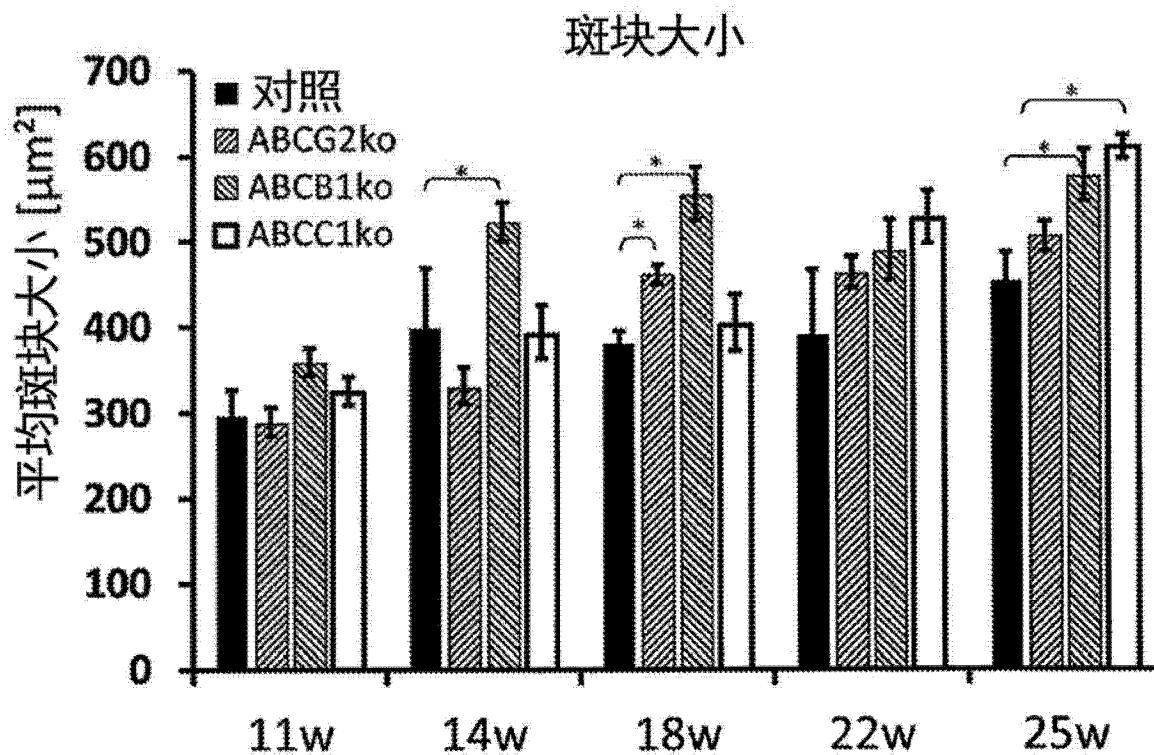


图 2b

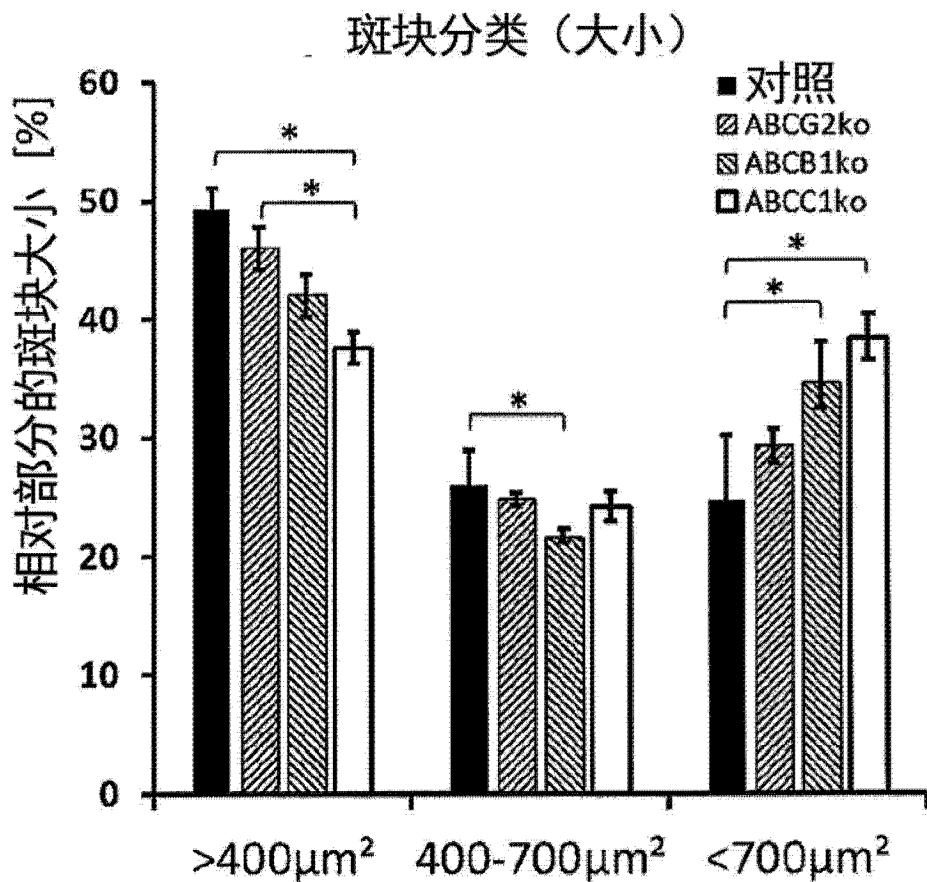


图 2c

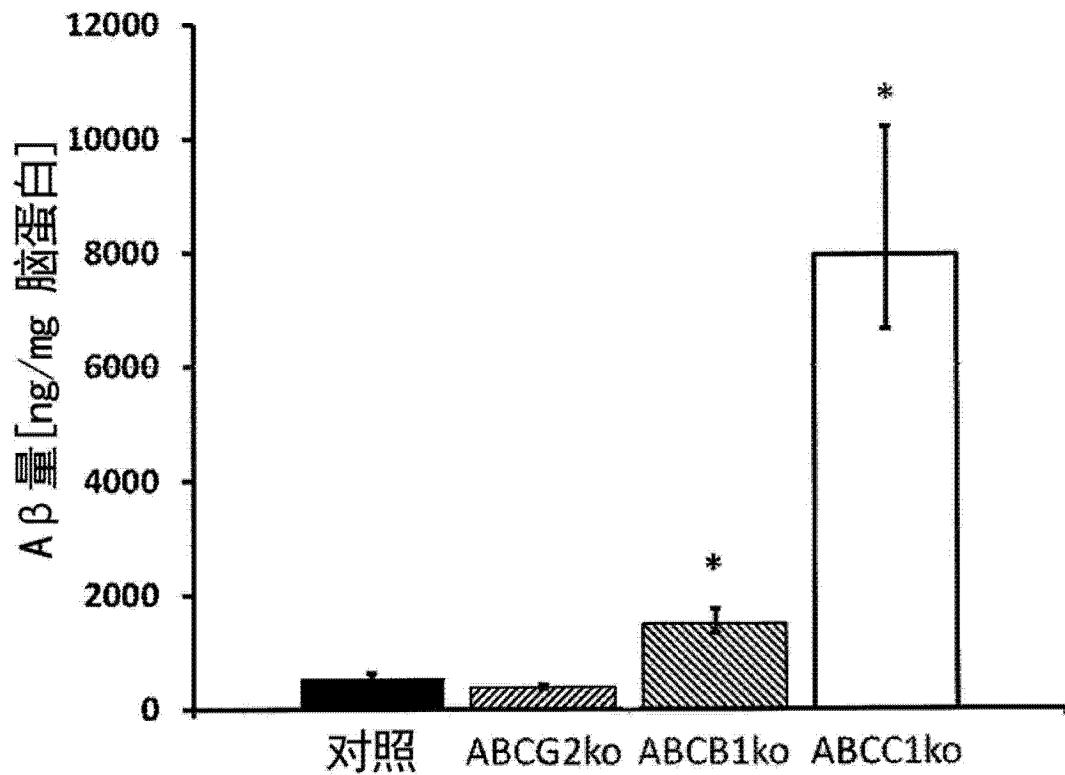


图 3a

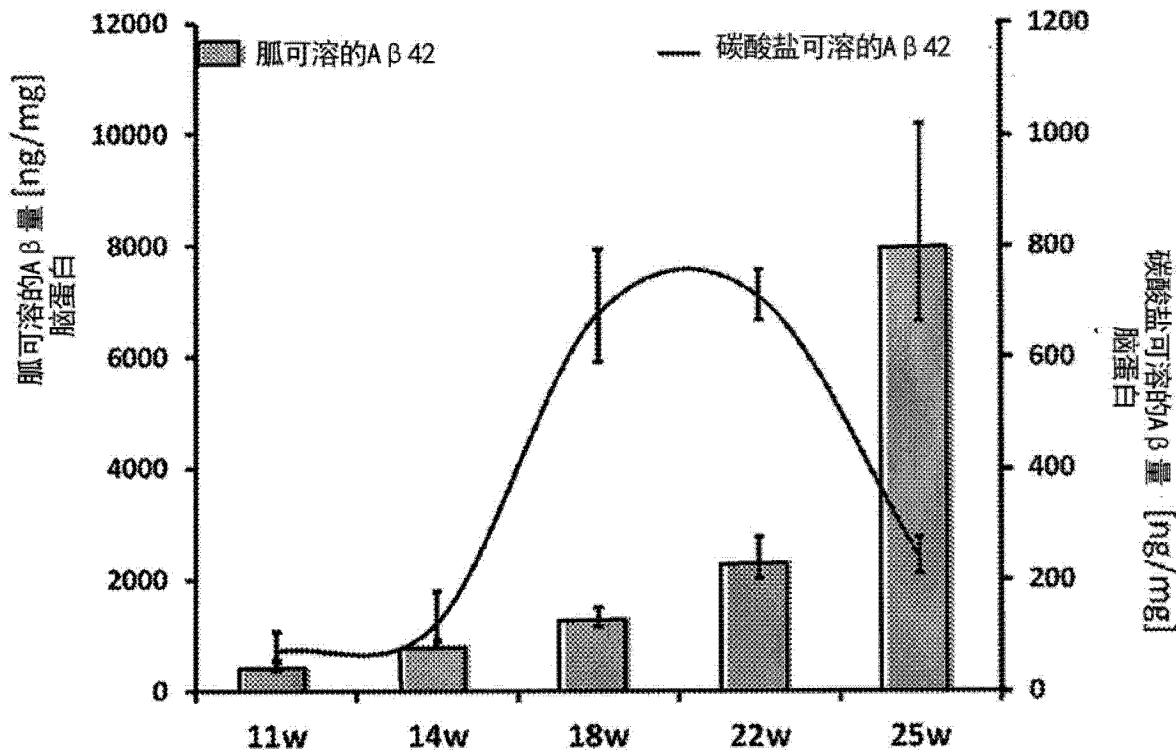


图 3b

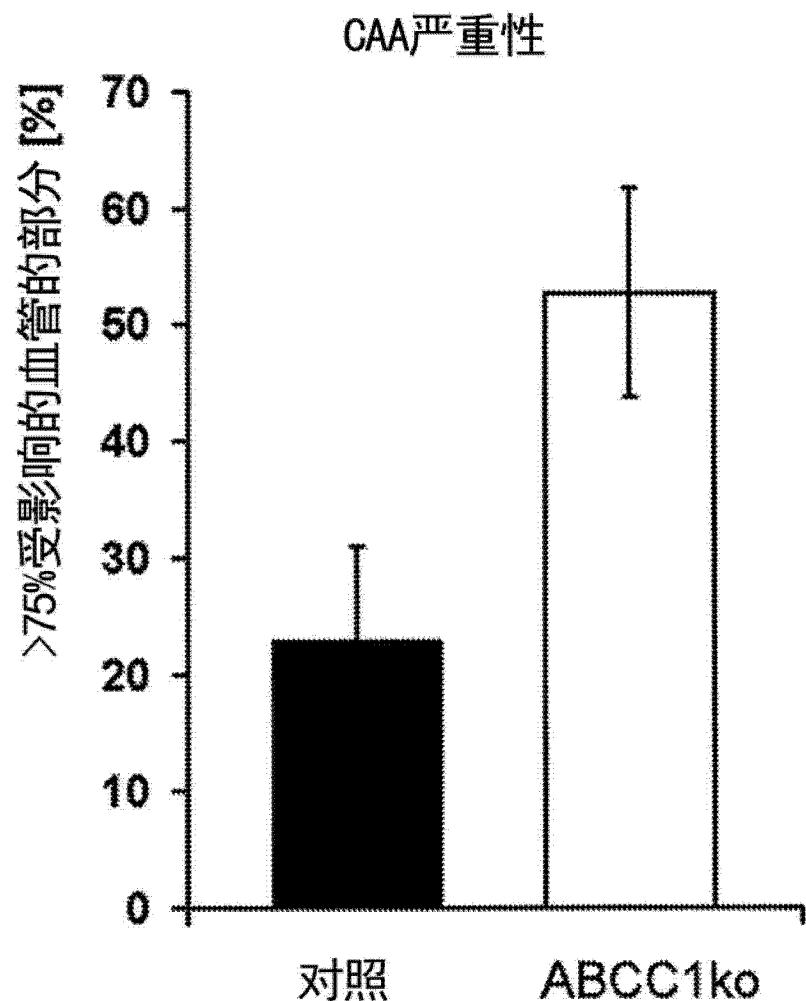


图 3c

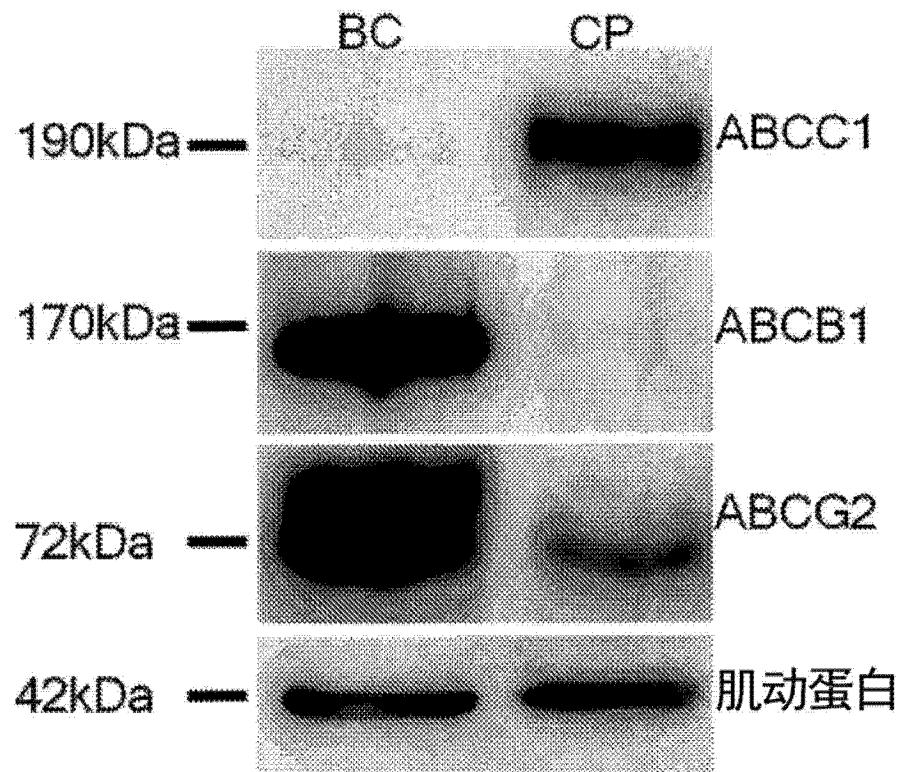


图 3d

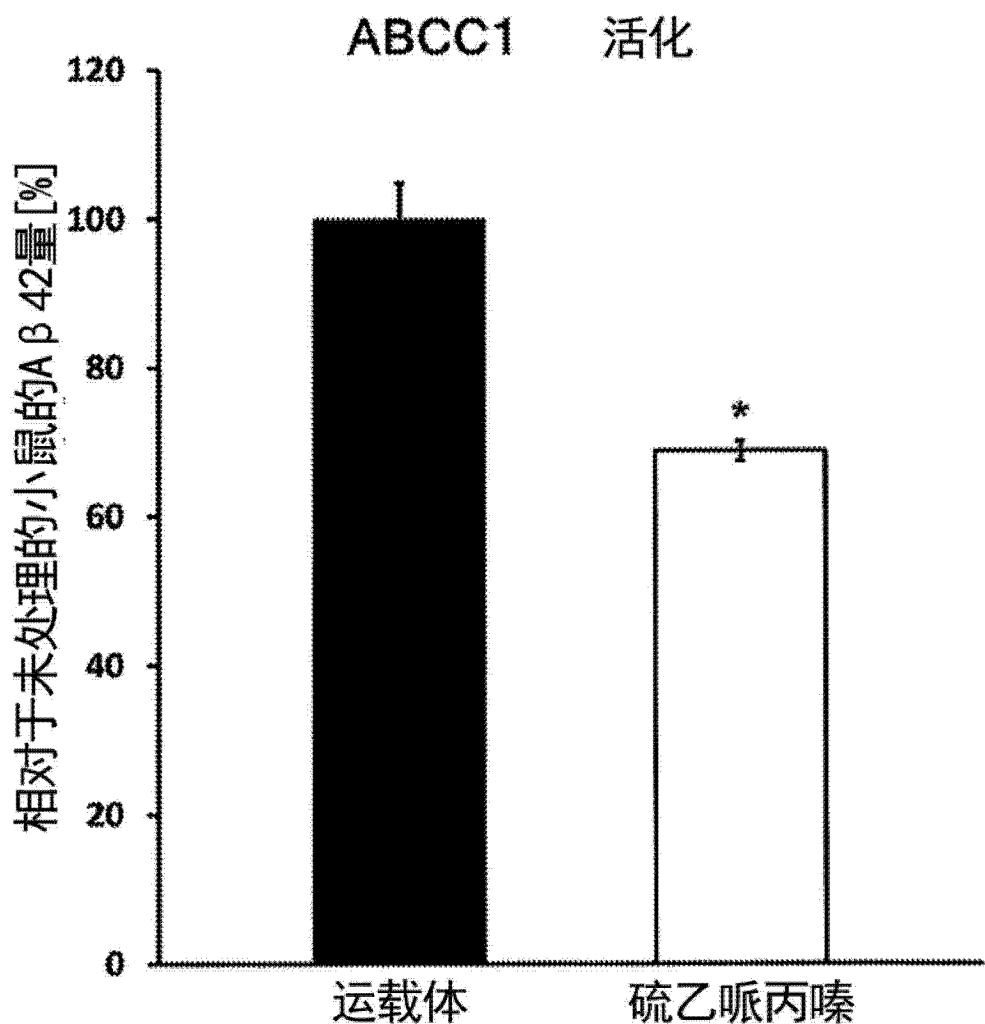


图 3e