



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102977054 A

(43) 申请公布日 2013. 03. 20

(21) 申请号 201210543871. 9

(22) 申请日 2012. 12. 12

(71) 申请人 中国药科大学

地址 211198 江苏省南京市江宁区龙眠大道
639 号

(72) 发明人 严明 何玲 张陆勇 周涛涛

(51) Int. Cl.

C07D 285/24 (2006. 01)

A61P 25/28 (2006. 01)

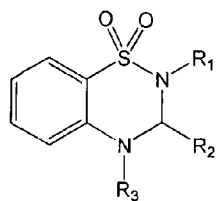
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一类选择性 α_{2A} 受体激动剂的治疗阿尔茨海默病用途

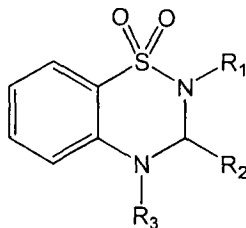
(57) 摘要

一类选择性 α_{2A} 受体激动剂的治疗阿尔茨海默病用途。本发明涉及一类具有 $\beta 1$ - 肾上腺素受体激动活性的化学式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐, 有很强的体外激动 $\beta 1$ - 肾上腺素受体的活性, EC_{50} 均为 nM 水平, 其中活性最强的化合物的 EC_{50} 为 24. 34, 可用于治疗阿尔茨海默病。



式 (I)

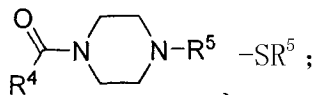
1. 下式化合物或其药学上可以接受的盐：



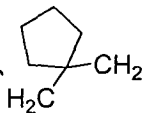
其中：

R_1 为氢原子；

R_2 为氢原子、 C_1-C_6 直链或支链的烷基、取代或未取代的苄基、 $-R^4CONR^5R^6$ 、



R_3 为氢原子、 C_1-C_6 直链或支链的烷基、取代或未取代的苄基；

R^4 为 C_1-C_6 直链或支链的烷基、；

R^5 、 R^6 各自独立地为氢、 C_1-C_6 直链或支链的烷基、取代或未取代的苄基、取代或未取代的苯基，其中所述的取代的苯基包括 1 ~ 2 个取代基；所述取代基为卤素、甲基、甲氧基。

2. 权利要求 1 要求保护的式 (I) 的化合物或其药学上可以接受的盐用于制备具有作为 α_{2A} 受体激动剂的药理作用的药物制剂的用途。

3. 按照权利要求 2 的用途，作为 α_{2A} 受体激动剂，用于治疗阿尔兹海默症。

一类选择性 α_{2A} 受体激动剂的治疗阿尔茨海默病用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一类具有 α_{2A} -肾上腺素受体激动剂活性的化合物,该类化合物作为 α_{2A} -肾上腺素受体受体激动剂具有很好的治疗阿尔茨海默病的活性。

背景技术

[0002] 阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 亦称老年性痴呆症或早老性痴呆症,是老年期常见的一类慢性、进行性神经细胞退行性病变。随着人口的老齡化,AD 已成为仅次于心血管病、肿瘤和中风而居第四位的死因,目前全球有 AD 患者约 2430 万人,预计到 2040 年全球将共有 AD 患者 8100 万。有关 AD 的病因、预防和治疗靶点的研究成为当今国际迫切热点课题之一。AD 病人的脑内病理特征主要为 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 沉积形成的老年斑 (Senile Plaque, SP)、微管相关蛋白 (Tau 蛋白) 过度磷酸化所致的神经纤维缠结以及神经元缺失。近年来许多研究者从各个不同的角度如淀粉样蛋白沉积、炎症介质、血管因素、胆固醇代谢等方面探讨 AD 的病因、病理机制和治疗手段。但到目前为止,AD 病因和病理机制尚未完全明了,对 AD 确切有效的药物尚少,也没有对因治疗根治 AD 的药物。

[0003] α_{2A} -肾上腺素受体 (α_{2A} -adrenoceptor, α_{2A} -AR) 属于 G 蛋白偶联的 7 次跨膜受体超家族成员中的一种亚型,广泛分布在血小板、脑、脊髓、脂肪细胞、肾、脾等组织器官,其生物学效应主要由 Gi/Go 蛋白介导。 α_{2A} -AR 激活后通过 Gi/Go 蛋白调节能够抑制腺苷酸环化酶 (AC) 活性,降低细胞内环磷酸腺苷 (cAMP) 的水平,抑制蛋白激酶 A (PKA) 及其调控的蛋白质磷酸化,在调控交感神经和中枢神经系统去甲肾上腺素神经元的神经递质释放方面起关键性作用。

[0004] 随着 α_{2A} -AR 在大脑皮质中的大量发现,越来越多的研究转向了 α_{2A} -AR 在中枢神经系统方面的作用。近几年有少量关于 α_{2A} -AR 激动剂在治疗精神分裂症、镇静、镇痛、抗惊厥、抗焦虑、改善记忆,以及药物成瘾方面有一定成效的报道。此外,亦有报道 α_{2A} -AR 激动剂能够通过抑制额前皮质的 cAMP,超极化环核苷酸信号途径而增强帕金森症中衰退的工作记忆。近年国外有极少数几篇报道,认为 α_{2A} -AR 激动剂可能通过减少微管相关蛋白 2 (MAP-2) 在丝氨酸及苏氨酸残基上的磷酸化而增加皮质神经元的生长、进一步对 AD 产生治疗作用。

[0005] 神经保护剂,神经营养剂,神经再生剂是一类新型的用于治疗 AD 的药物,国内外临床应用表明,在 AD 病变的急性期或慢性期开始使用美金刚,神经营养因子,鼠神经生长因子等神经保护剂,具有良好的治疗效果。神经保护剂的市场份额也正在逐年增加。目前,我国研制的注射用神经生长因子在获得 SFDA 颁发的一类生物制品新药证书后,已加快了药物临床和商品化的进程。

[0006] α_{2A} -AR 激动剂刺激皮质神经元生长这一作用对于开发神经保护剂具有重要的意义,为 AD 的预防和治疗提供了新的途径。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种治疗阿尔茨海默病的化合物,该化合物是 α_{2A} -AR 激动剂,对阿尔茨海默病有预防或者治疗作用。本发明所述的化合物包括含治疗有效量的化学式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐。本发明采用高通量筛选技术,建立了 α_{2A} -AR 激动剂高通量筛选模型并应用于化合物大规模筛选,通过筛选一批从 CHEMDIV 公司购买的化合物并进行功能性验证寻找到了具有化学式 (I) 的 α_{2A} -AR 激动剂。

[0008] 本发明的技术方案为:在中国仓鼠卵巢癌细胞 (CHO) 内稳定转染 α_{2A} 受体,建立 α_{2A} -AR 激动剂高通量筛选模型,进行初筛,复筛,构效关系分析,得到一类具有 α_{2A} 受体激动活性的候选药物。具体步骤如下:

[0009] 步骤一:建立及培养稳定转染 α_{2A} 受体的 CHO 细胞株。

[0010] 步骤二:标准曲线的测定及最佳细胞数确定。

[0011] 步骤三:阳性药验证。

[0012] 步骤四:采用稳转细胞株和摸索的最佳检测条件对化合物进行 α_{2A} 受体激动剂的高通量筛选,得到有明显量效关系的化合物。

附图说明

[0013] 图 1:标准曲线及最佳细胞数曲线 (600cell/ μ l)

[0014] 图 2:阳性药胍法辛 (Guanfacine) 量效曲线

具体实施方式

[0015] 以下结合附图说明本发明的具体实施方式

[0016] 1. 建立及培养稳定转染 α_{2A} -AR 的 CHO 细胞株。

[0017] 应用重组酶介导的盒交换技术 (Recombinase-Mediated Cassette Exchange, RMCE) 批量构建 G 蛋白偶联受体细胞株,并使其稳定转染 α_{2A} -AR,培养 CHO- α_{2A} 细胞使其达到稳定生长状态。

[0018] 2. 标准曲线的测定及最佳细胞数确定。

[0019] 为验证实验体系的正确性以及能筛选出可靠的 α_{2A} -AR 激动剂,在建立模型时需要测定标准曲线并确定最佳细胞数。待 CHO- α_{2A} 细胞生长到 80% 的时用 0.5mM EDTA 的 PBS 消化细胞,离心去除上层液体,最后将细胞用刺激缓冲液重悬用于确定最佳细胞数。使用 PerkinElmer 公司的 LANCE™ cAMP 384Kit 试剂盒,配制标准 cAMP 梯度稀释液及腺苷酸环化酶激活剂 (forskolin) 梯度稀释液。标准曲线测定方法:将 cAMP 的标准溶液 4 μ mol/L (LANCE® cAMP 检测试剂盒自带),用刺激缓冲液逐级稀释为终浓度 4 倍的工作浓度,cAMP 与抗体溶液各 5 μ l 加入 384 孔板中共同孵育 45 分钟,加入 10 μ l 终止液,孵育一个小时后检测;最佳细胞数检测方法:将 50mM 的 forskolin 母液用刺激缓冲液逐级稀释为终浓度 4 倍的工作浓度, forskolin 与含有细胞的抗体溶液各 5 μ l 加入 384 孔板中共同孵育 45 分钟,加入 10 μ l 终止液,孵育一个小时后在 EnVision 微孔板测读仪上检测。根据 forskolin 量效曲线窗口 (性噪比 S/B) 及曲线与 cAMP 标准曲线斜率相近的细胞浓度作为最佳细胞数。标准曲线及最佳细胞数确定见图 1。

[0020] 3. 选用 α_{2A} -AR 选择性激动剂 Guanfacine 对所建立的高通量筛选模型进行验证并且根据量效曲线计算其的 EC_{50} 。

[0021] 阳性药测定方法：将 100mM 的 Guanfacine 母液，用刺激缓冲液逐级稀释为终浓度 4 倍的工作浓度，配置能引起最佳细胞数 Ratio EC_{90} 效应的 forskolin 稀释液。阳性药 Guanfacine 2.5 μ l 与含有最佳细胞数的抗体溶液 5 μ l 加入 384 孔板中共同孵育 15 分钟，再将 forskolin 稀释液 2.5 μ l 加入 384 孔板中孵育 30 分钟，加入 10 μ l 终止液再孵育一个小时后用 EnVision 微孔板测读仪检测。阳性药量效曲线见图 2。

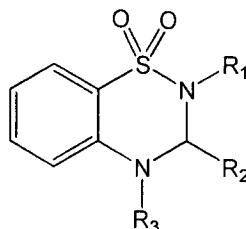
[0022] 4. 在上述的最佳检测条件下进行 α_{2A} -AR 激动剂的初筛和复筛。

[0023] 初筛与复筛过程相同，初筛只选用一个浓度对 8 万个化合物进行初步筛选，再选择初筛有效的化合物梯度稀释 8 个浓度进行复筛，过程如下：用 Janus 全自动加样工作站稀释化合物并吸取 5 μ l 转移到 384 孔板中，再用 Multidrop 自动加样仪将含有最佳细胞数的抗体溶液 5 μ l 加入 384 孔板中，两者共同孵育 45 分钟后，Multidrop 自动加样仪将 10 μ l 终止液加入 384 孔板中，再次孵育一个小时，用 EnVision 微孔板测读仪检测。复筛得到一系列具有 α_{2A} -AR 激动作用的化合物。

[0024] 复筛实验结果


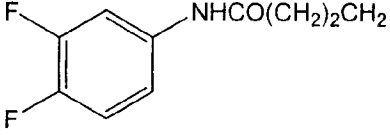
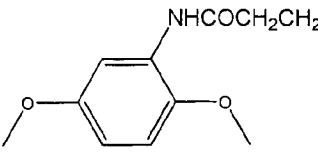
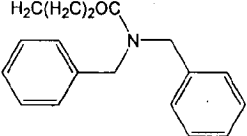
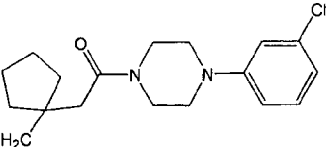
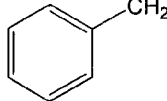
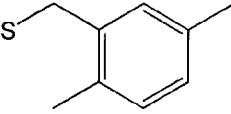
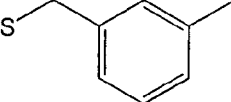
[0025] 筛选得到的化合物可以根据母核的结构总结为一类，结构式与 EC_{50} 如下：

[0026]

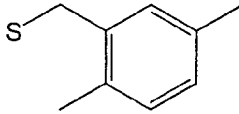
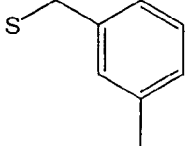


[0027] 表 1 复筛得到的对 α_{2A} -AR 有激动作用的一类化合物结构

[0028]

化合物	R ₁	R ₂	R ₃
化合物 1	H	CH(CH ₃) ₂	H
化合物 2	H		H
化合物 3	H	CH ₂ CH ₂ CONHC(CH ₃) ₃	
化合物 4	H	CH ₂ C(CH ₃) ₂ CH ₂ CONH(CH ₂) ₄ CH ₃	
化合物 5	H	CH ₂ C(CH ₃) ₂ CH ₂ CONH(CH ₂) ₂ CH(CH ₃) ₂	
化合物 6	H		
化合物 7	H		
化合物 8	H		
化合物 9	H		
化合物 10	H		CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃
化合物 11	H		
化合物 12			H
化合物 13			CH ₂ CH ₃

[0029]

化合物 14		CH ₂ CH ₃
化合物 15		CH ₂ CH ₂ CH ₃
化合物 16	S(CH ₂) ₂ CH ₃	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃
化合物 17	SCH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃

[0030] 表 2 复筛得到的对 α_{2A} -AR 有激动作用的化合物 EC₅₀

化合物	EC ₅₀ (nM)
化合物 1	50.25±1.33
化合物 2	175.5±1.24
化合物 3	6.55±0.35
化合物 4	10.5±1.10
化合物 5	15.51±1.14
化合物 6	53.34±2.27
化合物 7	101.8±1.89
化合物 8	103.9±1.15
[0031] 化合物 9	117.7±1.06
化合物 10	48.13± 1.92
化合物 11	84.81±1.24
化合物 12	153.3±1.17
化合物 13	185.4±1.20
化合物 14	220.0±1.20
化合物 15	254.1±2.39
化合物 16	304.4±1.23
化合物 17	343.9±2.20

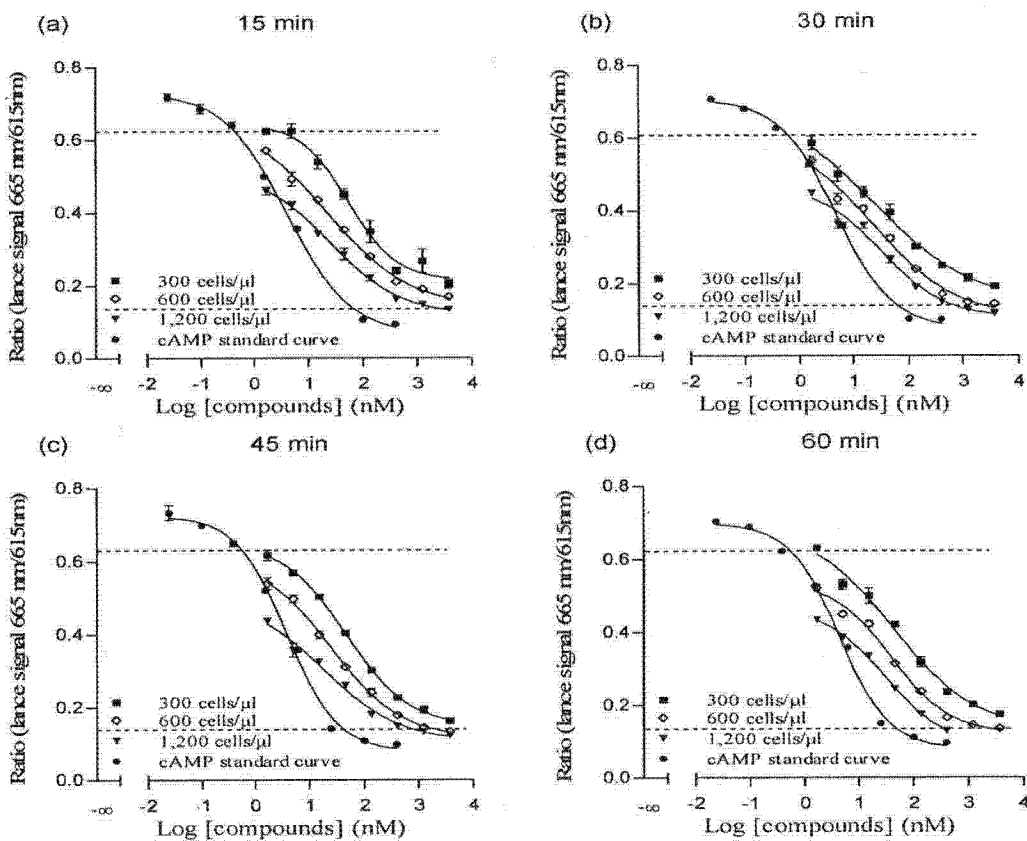


图 1

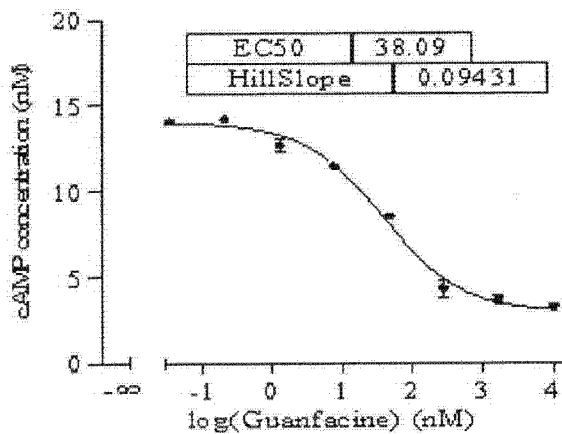


图 2