

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 2 月 6 日 (06.02.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/024977 A1

(51) 国际专利分类号:
C07D 311/30 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
C07D 405/10 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/098578

(22) 国际申请日: 2019 年 7 月 31 日 (31.07.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810865456.2 2018 年 8 月 1 日 (01.08.2018) CN

(71) 申请人: 陕西麦科奥特科技有限公司 (SHAANXI MICOT TECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国陕西省西安市高新区锦业路 69 号创业研发园 C 区 1 号, Shaanxi 710077 (CN)。

(72) 发明人: 王瑞玲 (WANG, Ruiling); 中国陕西省西安市高新区锦业路 69 号创业研发园 C 区 1 号, Shaanxi 710077 (CN)。 丁伟 (DING, Wei); 中国陕西省西安市高新区锦业路 69 号创业研发园 C 区 1 号, Shaanxi 710077 (CN)。 付国琴 (FU, Guoqin); 中国陕西省西安市高新区锦业路 69 号创业研发园 C 区 1 号, Shaanxi 710077 (CN)。

(74) 代理人: 北京集佳知识产权代理有限公司 (UNITALEN ATTORNEYS AT LAW); 中国北京

市朝阳区建国门外大街 22 号赛特广场 7 层, Beijing 100004 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

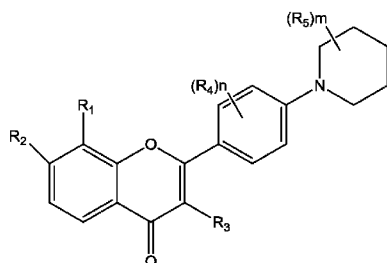
(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。

(54) Title: COMPOUND FOR TREATING NERVOUS SYSTEM DISEASES AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 用于治疗神经系统疾病的化合物及其应用



(I)

(57) Abstract: The present invention in particular relates to a class of compounds for treating nervous system diseases, the compounds are the compound as shown by formula (I) or a stereoisomer, a geometric isomer, a tautomer, a solvate, a metabolite, a pharmaceutically acceptable salt of the compound as shown by formula (I) or a prodrug of the compound (I). The present invention also relates to a pharmaceutical composition comprising this class of compounds, and the use of the compounds and pharmaceutical composition.

(57) 摘要: 本发明具体涉及一类用于治疗神经系统疾病的化合物, 该化合物为式 (I) 所示的化合物或式 (I) 所示化合物的立体异构体、几何异构体、互变异构体、溶剂化物、代谢产物、药学上可接受的盐或所述化合物 (I) 的前药。本发明还涉及包含这类化合物的药物组合物, 以及所述化合物和药物组合物的用途。



WO 2020/024977 A1

-1-

用于治疗神经系统疾病的化合物及其应用

本申请要求于 2018 年 08 月 01 日提交中国专利局、申请号为 201810865456.2、发明名称为“用于治疗神经系统疾病的化合物及其应用”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本发明涉及医药技术领域，具体涉及一种用于治疗神经系统疾病的化合物及其应用。

背景技术

神经系统疾病 (Neurological Disease) 是发生于中枢神经系统、周围神经系统、植物神经系统的以感觉、运动、意识、植物神经功能障碍为主要表现的疾病，又称神经病。主要临床表现为运动、感觉、反射、自主神经以及高级神经活动功能障碍 (Oliveira-Giacomelli A, Naaldijk Y, Sarda-Arroyo L, et al. Purinergic Receptors in Neurological Diseases With Motor Symptoms: Targets for Therapy[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 325)。

神经系统疾病中有许多病因不明，分类有重叠现象，但大致可按病因、部位、病理等分类。神经系统疾病的病因包括感染、中毒、遗传缺陷、营养障碍、免疫损伤、代谢紊乱、内分泌紊乱、先天畸形、血液循环障碍和异常增生。常见的神经系统疾病例如严重威胁人类健康的心脑血管疾病，颅脑损伤，和一些神经退行性病变疾病癫痫、阿尔茨海默症、帕金森症和亨廷顿氏舞蹈症等都属于神经系统疾病的范畴。伴随神经系统疾病的出现往往还有一些精神障碍，如抑郁、焦虑等。

亨廷顿舞蹈病(Huntington's disease, HD)是一种罕见的常染色体显性遗传病，又称慢性进行性舞蹈病、大舞蹈病、亨廷顿病。患者一般在中年发病，出现运动、认知和精神方面的症状。亨廷顿舞蹈病临床症状复杂多变，患者病情呈进行性恶化，通常在发病 15~20 年后死亡。亨廷顿舞蹈病的临床症状包括三方面，即运动障碍、认知障碍和精神障碍。HD 可合并其他疾病，个别患者可发生癫痫、遗传性共济失调和偏头痛等。

导致亨廷顿氏舞蹈症的突变基因 IT-15 位于人体第 4 号染色体上，它编码一个相对分子量为 3.5×10^5 的蛋白质，由 3144 个氨基酸组成，被命名为亨廷顿蛋白(Huntingtin, Htt)，从 Htt 氨基末端第 17 位氨基酸残基开始有一段重复的谷氨酰胺序列 (polyQ)，由 IT-15 基因第 1 个外显子 (exon1) 上的胞嘧啶-腺嘌呤-鸟嘌呤(CAG)重复序列编码。现已确认 CAG 重复突变可导致 HD 发生，在正常人群中亨廷顿基因中 CAG 序列重复数在 17 到 20 之间，当重复数在 40 及其以上者可引起发病，CAG 重复数在 36 到 39 之间是一种不完全外显性。IT-15 基因上的 CAG 重复编码 polyQ 重复序列导致其异常扩增一般会产生两个直接结果，其一是野生型亨廷顿蛋白(wild huntingtin, wHtt)的功能缺失，其二是产生突变型亨廷顿蛋白(mutant Htt, mHtt)从而发挥毒性作用。正常人群的 wHtt 在全身各个器官包括中枢神经系统广泛表达，它在神经系统的发育及

-2-

细胞的内吞和分泌中起的关键作用，在神经元中可促进脑源性神经营养因子（BDNF）生产和运输的能力，以及在抑制细胞凋亡中发挥作用。wHtt 缺失可能使其功能丧失，对细胞产生致毒性作用，可能会导致亨廷顿疾病。然而多数证据表明，mHtt 不管作为单体、中间体、成熟聚集体还是 N 端片段，均能够表现出毒性。单体是由突变的 IT-15 产生的全长 mHtt，中间体是单体形成聚集体过程中的过渡形式。随着 PolyQ 的延长，Htt 构型容易发生 β -片层结构的构象变化导致异常的剪接作用可能产生一个截断的 mRNA，其中包含了 ployQ 区域，它只编码 exon 1，被翻译成 mHtt 蛋白。即使完整的 Htt 基因被转录和翻译，在蛋白酶的作用下 Htt 断裂，也会形成含有突变的 ployQ 的 mHtt 蛋白 N 端碎片。转录后修饰也可以通过磷酸化、乙酰化和构象变化来产生更多有毒片段。mHtt 可以通过同质或异质二聚化作用形成较大的，不易溶的蛋白质聚集体，这种聚集在 HD 患者脑部的神经皮层及纹状体的细胞质或细胞核中可见，不能被泛素蛋白酶体系统所溶解，且能改变它的功能，从而对神经元产生一系列损害。另外，mHtt 和线粒体膜相互作用，干扰钙的体内平衡直到暴露线粒体失衡，mHtt 聚集的区域显示出高能量磷酸盐储存，ATP 水平降低，导致在亨廷顿患者中的新陈代谢负荷。

根据 US 神经学症状和休克国家学会(NINDS)的报道，目前还没有停止或逆转亨廷顿疾病进程的办法，目前尚缺乏特异性的治疗方法，多数情况下，针对不同的 HD 症状，会选择不同的药物进行对症治疗。一般来说，对于 HD 患者，运动障碍最容易显现出来，患有舞蹈病的病人会有无意识的舞蹈样动作，它会影响病人的生活质量、运动功能，对此症状被认为与多巴胺能神经元的过度激活有关，因此能够减少多巴胺能神经传递的药物为在临床上使用最多的药物。丁苯那嗪是美国食品药品监督管理局(FDA)批准治疗 HD 舞蹈动作的药物之一。用于治疗 HD 相关的舞蹈症和迟发性运动障碍。丁苯那嗪的主要机制是抑制单胺囊泡转运。其用药量大时，可以显著减轻亨廷顿的舞蹈症状，但如果停止用药，舞蹈症状会加重。使用此类药物须注意其副作用，包括运动迟缓伴震颤，还需注意抑郁症和自杀率增大，以及引起帕金森病和神经安定药恶性综合征(Neuroleptic Malignant Syndrome)。氘代丁苯那嗪在美国上市，用于治疗 HD 相关的舞蹈症和迟发性运动障碍，比丁苯那嗪体内代谢更缓慢，半衰期延长，剂量更低。

缺血性心脑血管疾病是指在供应脑的血管壁病变、血液成分改变或血流动力学变化的基础上发生脑部血液供应障碍，导致相应供血区脑组织由于缺血、缺氧而出现的脑组织坏死，并引起短暂或持久的局部或广泛性脑损害，造成一系列神经功能缺损的症状。由缺血造成的损伤分为缺血期原发性损伤（Cerebral ischemia primary injury, CIPI）和缺血期再灌注损伤（Cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI），缺血再灌注损伤是因脑缺血或心肌缺血致组织坏死前，闭塞的血管再通后，不仅功能未得到恢复，反而使损伤加重，是引起多种心脑血管疾病的主要病理生理过程。其中，脑卒中是我国排名第一的致死和致残原因。我国每年约有 200 万新发脑卒中患者，且发病率有逐年增高的趋势。目前，脑卒中常用药物有：（1）防止血小板凝聚的药物，如阿司匹林，（2）改善微循环、扩充血容量的药物，如右旋糖酐，（3）溶栓药物，如尿激酶，（4）抗凝药物，如肝素，（5）钙离子拮抗剂，如尼莫地平，这些药物都是针对部分脑卒中

— 3 —

患者起效，并且药物作用的机制都不包括对脑神经的保护作用。

综上所述，无论是亨廷顿病还是缺血性脑卒中，现有治疗药物都远不能达到安全性和有效性的治疗预期，需要继续开发具有更优治疗效果的新药。

5 发明内容

有鉴于此，本发明的目的在于提供一种新型的用于治疗神经系统疾病的化合物，所述化合物可以激活 TrkB 受体及其下游信号通路，TrkB 受体是脑源性神经营养因子的主要信号受体，激活 TrkB 受体及其下游信号通路可改善多种神经系统疾病的症状。

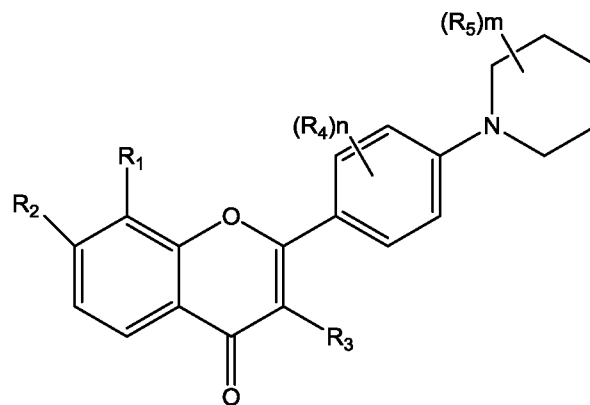
10 本发明的另外一个目的在于提供一种新型的用于治疗神经系统疾病的化合物，使所述化合物对神经系统退行性病变具有治疗作用，具体可应用于治疗和改善亨廷顿病、肌萎缩侧索硬化、阿尔茨海默氏病、多发性硬化症、帕金森氏病所导致的临床症状。

15 本发明的另外一个目的在于提供一种新型的用于治疗神经系统疾病的化合物，所述化合物对中枢性脑损伤具有保护和治疗作用，具体可应用于治疗和改善脑卒中导致的临床症状。

本发明的另外一个目的在于，提供上述化合物在相关神经系统疾病药物制备中的应用，以及提供具体的药物产品。

为了实现上述目的，本发明提供如下技术方案：

20 一种用于治疗神经系统疾病的化合物，为式 (I) 所示化合物，或式 (I) 所示化合物的立体异构体、几何异构体、互变异构体、溶剂化物、代谢产物、药学上可接受的盐，或式 (I) 所示化合物的前药；



式 I

25 其中，R₁ 和 R₂ 独立选自 -OH、-NH₂、F、Cl、Br、C₁-C₁₂ 烷基、C₁-C₁₂ 羟基烷基、C₁-C₁₂ 杂烷基、C₁-C₁₂ 卤代烷基、C₁-C₁₂ 烷氧基、C₁-C₁₂ 烷基氨基、-OC(=O)R₆ 和 -NHC(=O)R₇；R₆ 和 R₇ 独立选自 C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基和 C₁-C₆ 烷基氨基；

R₃ 为 H、D、F、Cl 或 Br；

R₄ 和 R₅ 独立选自 H、D、F、Cl、Br、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、C₁-C₆ 烷基氨基和 C₁-C₆ 烷基氨基；m 和 n 各自独立地为 0、1、2、3 或 4。

30 在一些实施方案中，所述 R₁ 和 R₂ 独立选自 -OH、-NH₂、F、C₁-C₆ 羟基烷基、C₁-C₆

-4-

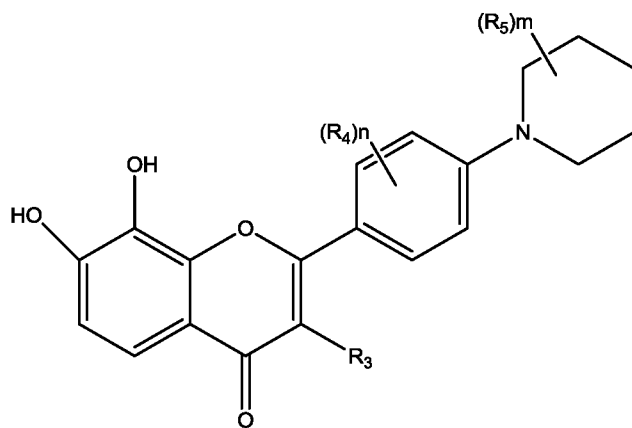
杂烷基、C₁-C₆ 烷氧基和 C₁-C₆ 烷基氨基。在另一些实施方案中，所述 R₁ 和 R₂ 独立选自 -OH、-NH₂、F 和 -OCH₃；在本发明的一些具体实施方案中，所述 R₁ 和 R₂ 有如下之一的选择方案：

- (1) R₁=-OH, R₂=-OH;
- (2) R₁=-OH, R₂=-OCH₃;
- (3) R₁=-OCH₃, R₂=-OCH₃;
- (4) R₁=-OCH₃, R₂=-OH;
- (5) R₁=-NH₂, R₂=-NH₂;
- (6) R₁=-OH, R₂=-F。

在本发明的一些实施方案中，所述 R₄ 和 R₅ 独立选自 H、D、F、Cl、Br、-CH₃、-CH₂CH₃、-CH₂CH₂CH₃、-CH(CH₃)₂、-N(CH₃)₂、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-OCH₂CH₂CH₃ 和 -OCH(CH₃)₂。在另一些具体实施方案中，所述 R₅ 为 -CH₃、-CH₂CH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-OCH₃、D 或 F。

在一些实施方案中，所述 m 和 n 各自独立地为 0、1 或 2。在本发明另一些具体实施方案中，所述 n 为 0，即没有取代基 R₄；所述 m 为 1 或 2。

当 R₁=-OH, R₂=-OH 时，式 (I) 所示化合物具有式 (II) 所示结构：



式 II

其中，R₃ 为 H、D、F、Cl 或 Br；

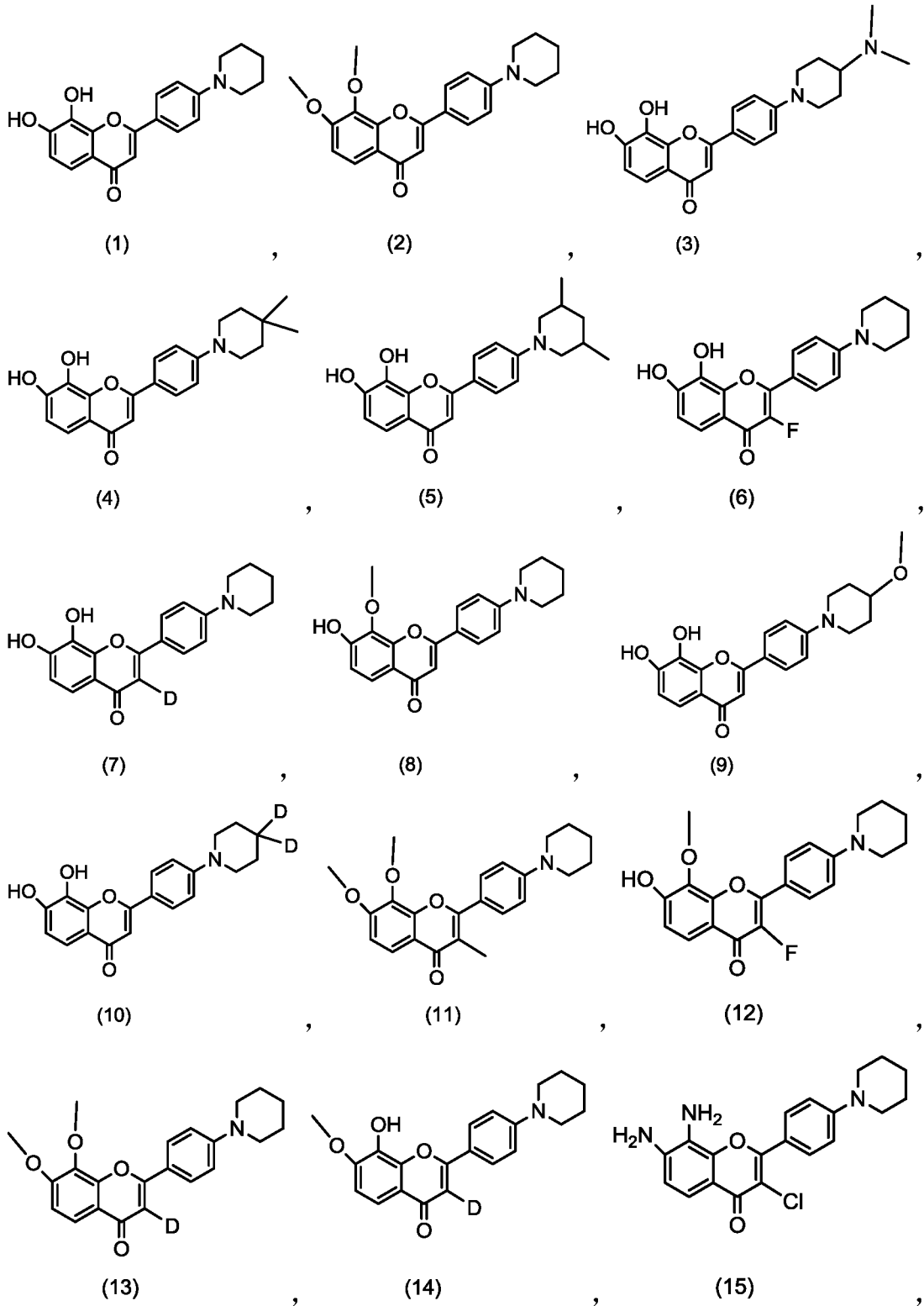
R₄ 和 R₅ 独立选自 H、D、F、Cl、Br、-CH₃、-CH₂CH₃、-CH₂CH₂CH₃、-CH(CH₃)₂、-N(CH₃)₂、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-OCH₂CH₂CH₃ 和 -OCH(CH₃)₂；

m 和 n 各自独立地为 0、1 或 2。

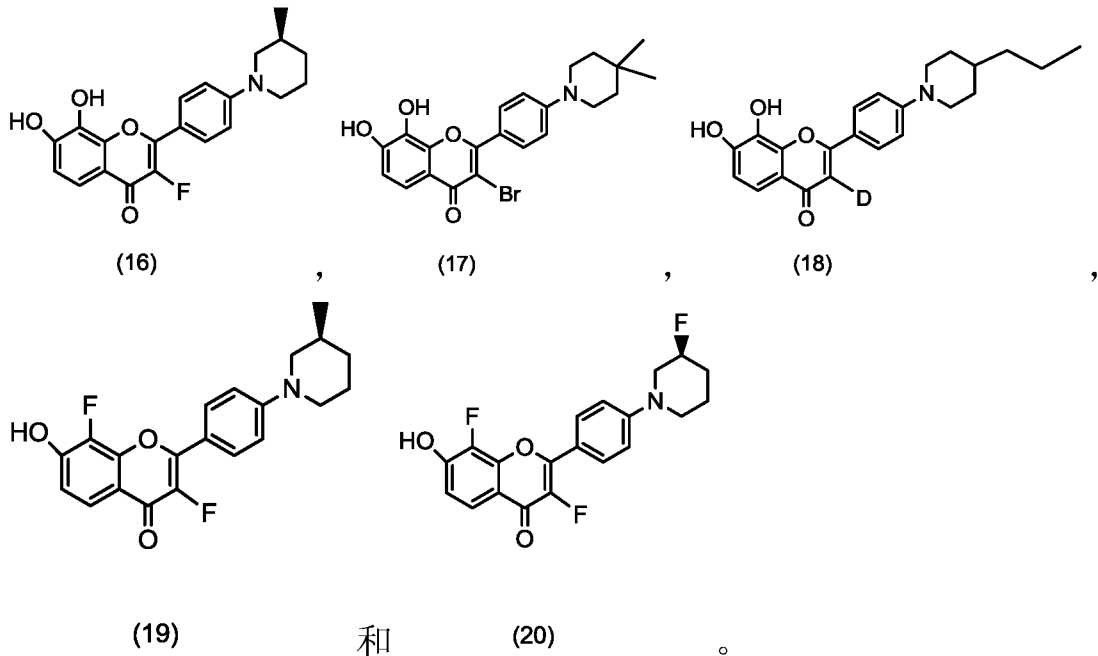
在本发明的一些具体实施方式中，所述 R₅ 为 -CH₃、-CH₂CH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-OCH₃、D 或 F；所述 n 为 0，即没有取代基 R₄；所述 m 为 0、1 或 2。

在本发明具体实施方式中，式 (I) 所示化合物为如下之一化合物：

— 5 —



—6—



与 Vehicle 组相比,本发明提供的化合物可使神经元细胞中 p-TrkB/t-TrkB 蛋白相对强度增强 2.06~2.34 倍,表现出了显著性的差异 ($P<0.05$), p-Akt/t-Akt 蛋白相对强度增强 2.09~2.40 倍,与 BDNF 效果相当。表明本发明提供的化合物可以激活 TrkB 受体及其下游 AKT 信号通路,进而说明这些化合物对神经系统疾病有治疗作用以及对神经元有较好地保护作用。

在更加具体的神经系统疾病药效分析中,本发明分别通过小鼠模型模拟亨廷顿疾病和脑卒中的病变症状,通过行为学、生理生化指标等检测项目证实了本发明所提供的化合物可对神经系统退行性病变和中枢性脑损伤具有保护和治疗作用。

基于此,本发明提供了一种药物组合物,其包含本发明所提供的任何一种化合物。进一步地,还可包括药学上可接受辅料和/或其他神经系统疾病治疗药物。本发明所用“药学上可接受的辅料”意指与给药剂型或药物组合物一致性相关的药学上可接受的材料、载体、赋形剂、混合物或溶媒。每种辅料在混合时必须与药物组合物的其它成分相容,以避免对患者给药时会大大降低本发明公开化合物的功效的相互作用和会导致不是药学上可接受的药物组合物的相互作用。此外,每种辅料必须是药学上可接受的,例如,具有足够高的纯度。合适的药学上可接受的辅料会依所选具体剂型而不同。此外,可根据它们在组合物中的特定功能来选择药学上可接受的辅料。例如,可选择能有助于生产均一剂型的某些药学上可接受的辅料。可选择能有助于生产稳定剂型的某些药学上可接受的辅料。可选择对患者给药时有助于携带或运输本发明公开化合物从身体的一个器官或部分到身体的另一个器官或部分的某些药学上可接受的辅料。可选择增强患者依从性的某些药学上可接受的辅料。合适的药学上可接受的辅料包括以下类型的辅料:赋形剂、稀释剂、填充剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、助流剂、造粒剂、包衣剂、润湿剂、溶剂、共溶剂、助悬剂、乳化剂、甜味剂、矫味剂、掩味剂、着色剂、防结块剂、保湿剂、螯合剂、塑化剂、增粘剂、抗氧化剂、防腐剂、稳定剂、表面活性剂和缓冲剂。技术人员可认识到,某些药学上可接受的辅料可提供不

-7-

止一种功能，并提供可供选择的功能，这取决于制剂中存在多少该辅料和制剂中存在哪些其他辅料。

本发明化合物可以作为单独的活性试剂给药，或者可以与其它神经系统疾病治疗药物联合给药，包括具有相同或相似治疗活性并且对于此类联合给药确定为安全且有效的其它化合物。一方面，本发明提供治疗、预防或改善疾病或病症的方法，包括给予安全有效量的包含本发明公开化合物与一种或多种其它神经系统疾病治疗药物的联合药物。所述其他神经系统疾病治疗药物包括用于治疗亨廷顿病的药物、用于治疗帕金森病的药物、用于治疗抑郁症的药物、用于治疗运动失调的药物、用于治疗脑卒中的药物、用于治疗中枢神经系统损伤疾病的药物、用于治疗肌萎缩侧索硬化的药物和用于治疗多发性硬化症的药物。在一些实施方案中，这些其它神经系统疾病治疗药物选自用于治疗运动失调的药物、用于治疗亨廷顿病的药物、用于治疗缺血性脑血管疾病的药物中的一种或多种。在一些实施方案中，联合药物包含一种或两种其他神经系统疾病药物。用于治疗亨廷顿病的药物包括但不限于，丁苯那嗪、氘代丁苯那嗪、Pridopidine；用于治疗脑卒中的药物包括但不限于，丁苯酞、依达拉奉；用于治疗多发性硬化症的药物选自Ocrelizumab, Tecfidera, 格拉替雷、克帕松，芬戈莫德、那他珠单抗、Avonex、利比（Rebif）、特立氟胺、Plegridy、倍泰龙、Ampyra；用于治疗抑郁症的药物包括但不限于，西酞普兰、依地普仑、氟西汀、氟伏沙明、帕罗西汀、舍曲林、或维拉佐酮；5-羟色胺-去甲肾上腺素再摄取抑制剂，例如地文拉法辛、度洛西汀、米那普仑、文拉法辛；去甲肾上腺素能和特定血清素能抗抑郁剂，例如米安色林和米氮平；去甲肾上腺素再摄取抑制剂，例如阿托西汀、马吲哚、瑞波西汀、维洛沙秦；去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂，例如安非他酮；选择性5-羟色胺再摄取增强剂，例如噻奈普汀和安咪奈丁；去甲肾上腺素-多巴胺去抑制剂，例如阿戈美拉汀；三环类抗抑郁剂，例如阿米替林、氯米帕明、多虑平、丙咪嗪、曲米帕明、去郁敏、去甲替林、普罗替林；单胺氧化酶抑制剂，例如异卡波肼、吗氯贝胺、苯乙肼、司来吉兰、反苯环丙胺。用于治疗肌萎缩侧索硬化的药物包括但不限于，IL-6 受体单抗（Tocilizumab）、奥扎尼珠单抗、BIIB067 (Isis-SOD1Rx)。

本发明公开的化合物或所述药物组合物通常被配制成适合于通过所需途径对患者给药的剂型。例如，剂型包括那些适合于以下给药途径的剂型：(1)口服给药，例如片剂、胶囊剂、囊片剂、丸剂、含片剂、粉剂、糖浆剂、酏剂、混悬剂、溶液剂、乳剂、颗粒剂和扁囊剂；(2)胃肠外给药，例如无菌溶液剂、混悬剂和冻干粉末剂；(3)透皮给药，例如透皮贴片剂；(4)直肠给药，例如栓剂；(5)吸入，例如气雾剂、溶液剂和干粉剂；和(6)局部给药，例如乳膏剂、油膏剂、洗剂、溶液剂、糊剂、喷雾剂、泡沫剂和凝胶剂。

在一些实施方案中，本发明公开的治疗方法包括对有需要的患者给予安全有效量的本发明化合物或包含本发明化合物的药物组合物。本发明公开的各实施方案包括通过对有需要的患者给予安全有效量的本发明公开化合物或给予包含本发明公开化合物的药物组合物，来治疗神经系统疾病的方法。

根据本发明记载的试验结果，本发明提供了所述的化合物和所述的药物组合物在

—8—

制备用于预防或治疗神经系统疾病的药物中的用途。所述神经系统疾病包括神经元损伤、神经元退化、脑萎缩相关疾病或病症、中枢神经系统损伤、脑卒中（中风）、抑郁症、焦虑症、肌萎缩侧索硬化、阿尔茨海默氏病、自闭症、亨廷顿氏病、瑞特综合征、癫痫症、帕金森氏病、创伤后应激障碍、糖尿病性神经病变、多发性硬化症和周围神经病。

根据本发明记载的试验结果，本发明还提供了所述的化合物和所述的药物组合物在制备用于激动 TrkB 受体的药物中的用途。

还在另一方面，本发明提供一种用于激动 TrkB 受体的方法，包括向有需要的个体或样本给予治疗有效量的本发明公开的化合物、本发明制备方法制备的化合物或本发明公开的化合物的药物组合物。同时，本发明提供一种用于预防、治疗或减轻神经系统疾病的方法，包括向有需要的个体或样本给予治疗有效量的本发明公开的化合物、本发明制备方法制备的化合物或本发明公开的化合物的药物组合物。

本发明所述化合物的“治疗有效量”或“有效量”可以是 0.1mg/kg~100 mg/kg。在一些实施例中，本发明所述化合物的“治疗有效量”或“有效量”可以是 0.5 mg/kg~50 mg/kg；在另一些实施例中，本发明所述化合物的“治疗有效量”可以是 0.2 mg/kg~25 mg/kg。

由以上技术方案可知，本发明提供了一种新型的具有式（I）或式（II）结构的黄酮衍生物，其可以激活 TrkB 受体及其下游 AKT 信号通路，进而说明所述化合物对神经系统疾病有较好地治疗作用以及对神经元有较好地保护作用，特别是对亨廷顿疾病这种神经系统退行性病变和脑卒中这种中枢性脑损伤具有较佳的治疗作用。

附图说明

图 1 所示为实施例 1 提供的受试化合物的 p-TrkB/t-TrkB 和 p-AKT/t-AKT 电泳图和蛋白相对强度图，其中，A 为 p-TrkB/t-TrkB 蛋白电泳图，B 为 p-TrkB/t-TrkB 蛋白水平统计结果，C 为 p-AKT/t-AKT 的蛋白电泳图；D 为 p-AKT 和 t-AKT 的蛋白水平统计结果；

图 2 所示为各受试化合物的 ELISA 检测 p-Akt 相对含量统计结果；

图 3 所示为实施例 1 提供的受试化合物的全脑、纹状体及神经皮层的体积 MRI 检测结果，其中，A 为全脑体积统计结果，B 为纹状体体积统计结果，C 为神经皮层体积统计结果；

图 4 所示为实施例 1 提供的受试化合物的 DARPP32 蛋白相对强度实验结果；其中，A 为 DARPP32 电泳图；B 为 DARPP 32/ β -action 蛋白水平相对强度；

图 5 所示为实施例 1 提供的受试化合物的脑组织 mHtt 蛋白聚集体经 EM48 抗体免疫染色的神经皮层代表性图像；

图 6 所示为各组 5 个大鼠脑组织样本 TTC 染色结果。

具体实施方式

本发明公开了一种用于治疗神经系统疾病的化合物及其应用，本领域技术人员可

以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明中。本发明所述化合物及其相关应用通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的化合物及其相关应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

除非另作说明,式(I)或(II)所示化合物的立体异构体、互变异构体、溶剂化物、代谢产物、盐和药学上可接受的前药都包含在本发明范围内。

本发明公开化合物可含有不对称或手性中心,因此可以不同的立体异构体形式存在。本发明旨在使式(I)或(II)所示化合物的所有立体异构体形式,包括但不限于非对映异构体、对映异构体、阻转异构体和几何(或构象)异构体,以及它们的混合物如外消旋混合物,成为本发明的组成部分。

在本发明公开的结构中,当任意特定的手性原子的立体化学未指明时,则该结构的所有立体异构体都考虑在本发明之内,并且作为本发明公开化合物包括在本发明中。当立体化学被表示特定构型的实楔形线(solid wedge)或虚线指明时,则该结构的立体异构体就此明确和定义。

式(I)或(II)所示化合物可以以不同的互变异构体形式存在,并且所有这些互变异构体,如本发明所述的互变异构体,都包括在本发明范围内。

式(I)或(II)所示化合物可以以盐的形式存在。在一些实施方案中,所述盐是指药学上可接受的盐。在另一些实施方案中,所述盐还可以是用于制备和/或提纯式(I)或(II)所示化合物和/或用于分离本式(I)或(II)所示化合物的对映体的中间体。

除非另外说明,本发明所使用的所有科技术语具有与本发明所属领域技术人员的通常理解相同的含义。本发明涉及的所有专利和公开出版物通过引用方式整体并入本发明。

“立体异构体”是指具有相同化学构造,但原子或基团在空间上排列方式不同的化合物。立体异构体包括对映异构体、非对映异构体、构象异构体(旋转异构体)、几何异构体、(顺/反)异构体、阻转异构体,等等。“对映异构体”是指一个化合物的两个不能重叠但互成镜像关系的异构体。“非对映异构体”是指有两个或多个手性中心并且其分子不互为镜像的立体异构体。非对映异构体具有不同的物理性质,如熔点、沸点、光谱性质和反应性。非对映异构体混合物可通过高分辨分析操作如电泳和色谱,例如HPLC来分离。

术语“互变异构体”或“互变异构形式”是指具有不同能量的可通过低能垒(low energy barrier)互相转化的结构异构体。若互变异构是可能的(如在溶液中),则可以达到互变异构体的化学平衡。例如,质子互变异构体(proton tautomer)(也称为质子转移互变异构体(prototropic tautomer))包括通过质子迁移来进行的互相转化,如酮-烯醇异构化和亚胺-烯胺异构化。价键互变异构体(valence tautomer)包括通过一些成键电子的重组来进行的互相转化。酮-烯醇互变异构的具体实例是戊烷-2,4-二酮和4-羟基戊-3-烯-2-酮互变异构体的互变。互变异构的另一个实例是酚-酮互变异构。酚-酮互变异构

的一个具体实例是吡啶-4-醇和吡啶-4(1*H*)-酮互变异构体的互变。除非另外指出，本发明化合物的所有互变异构体形式都在本发明的范围之内。

术语“取代的”表示所给结构中的一个或多个可被取代的氢原子被具体取代基所取代。除非其他方面表明，一个取代的基团可以有一个取代基在基团各个可取代的位置进行取代。当所给出的结构式中不只一个位置能被选自具体基团的一个或多个取代基所取代，那么取代基可以相同或不同地在各个位置取代。

术语“任选”或者“任选地”意味着随后所描述的事件或者环境可以但不必发生，该说明包括该事情或者环境发生或者不发生的场合。例如，“任选被烷基取代的杂环基团”意味着烷基可以但不必须存在，该说明包括杂环基团被烷基取代的情景和杂环基团不被烷基取代的情景。

术语“未取代的”，表示指定基团不带有取代基。术语“任选地被.....所取代”，可以与术语“未取代或被.....所取代”交换使用，即所述结构是未取代的或者被一个或多个本发明所述的取代基取代，本发明所述的取代基包括，但不限于D、-OH、-NH₂、F、Cl、Br、C₁-C₁₂烷基、C₁-C₁₂卤代烷基、C₁-C₁₂烷氧基或C₁-C₁₂烷氨基、-OC(=O)R₆或-NHC(=O)R₇，其中R₆和R₇具有本发明所述含义。

在本发明中所采用的描述方式“.....独立选自”、“各.....独立地为”、“.....各自独立地为”和“.....独立地为”可以互换，均应做广义理解，其既可以是指在不同基团中，相同符号之间所表达的具体选项之间互相不影响，也可以表示在相同的基团中，相同符号之间所表达的具体选项之间互相不影响。

在本说明书的各部分，本发明公开化合物的取代基按照基团种类或范围公开。特别指出，本发明包括这些基团种类和范围的各个成员的每一个独立的次级组合。例如，术语“C₁-C₆烷基”特别指独立公开的甲基、乙基、C₃烷基、C₄烷基、C₅烷基和C₆烷基。

本发明使用的术语“烷基”或“烷基基团”，表示含有1至20个碳原子，饱和的直链或支链一价烃基基团，其中，所述烷基基团可以任选地被一个或多个本发明描述的取代基所取代。除非另外详细说明，烷基基团含有1-20个碳原子。在一些实施方案中，烷基基团含有1-12个碳原子；在另一些实施方案中，烷基基团含有2-12个碳原子；在另一些实施方案中，烷基基团含有1-6个碳原子；在另一些实施方案中，烷基基团含有2-6个碳原子；在又一些实施方案中，烷基基团含有1-4个碳原子；还在一些实施方案中，烷基基团含有1-3个碳原子。所述烷基基团可以任选地被一个或多个本发明描述的取代基所取代。烷基基团的实例包含，但并不限于，甲基(Me、-CH₃)，乙基(Et、-CH₂CH₃)，正丙基(*n*-Pr、-CH₂CH₂CH₃)，异丙基(*i*-Pr、-CH(CH₃)₂)，正丁基(*n*-Bu、-CH₂CH₂CH₂CH₃)，异丁基(*i*-Bu、-CH₂CH(CH₃)₂)，仲丁基(*s*-Bu、-CH(CH₃)CH₂CH₃)，叔丁基(*t*-Bu、-C(CH₃)₃)，等等。

术语“杂烷基”表示烷基中可以插入一个或多个杂原子，其中烷基和杂原子具有如本发明所述的含义。杂烷基通过碳原子与其他基团相连。除非另外详细说明，杂烷基基团含有1-12个碳原子，另外一些实施方案是，杂烷基基团含有1-8个碳原子，另外一些实施方案是，杂烷基基团含有1-6个碳原子，另外一些实施方案是，杂烷基基团含有1-4个碳原子，另外一些实施方案是，杂烷基基团含有1-3个碳原子。“杂烷基”的实

- 11 -

例包括, 但并不限于, $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{SCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{OCH}_2(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 等。

术语“烷氧基”表示烷基基团通过氧原子与分子其余部分相连, 其中烷基基团具有如本发明所述的含义。除非另外详细说明, 所述烷氧基基团含有1-12个碳原子。在一些实施方案中, 烷氧基基团含有1-6个碳原子; 在另一些实施方案中, 烷氧基基团含有1-4个碳原子; 在又一些实施方案中, 烷氧基基团含有1-3个碳原子。所述烷氧基基团可以任选地被一个或多个本发明描述的取代基所取代。

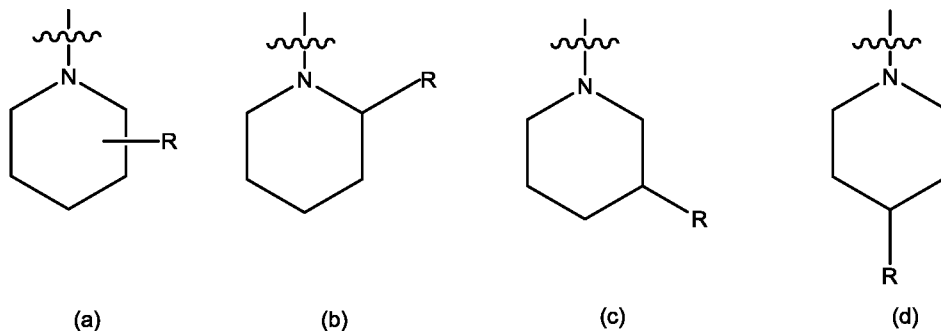
术语“卤代烷基”、“卤代烯基”或“卤代烷氧基”表示烷基, 烯基或烷氧基基团被一个或多个卤素原子所取代, 这样的实例包含, 但并不限于, 二氟乙基($-\text{CH}_2\text{CHF}_2$, $-\text{CF}_2\text{CH}_3$, $-\text{CHFCH}_2\text{F}$)、三氟乙基($-\text{CH}_2\text{CF}_3$, $-\text{CF}_2\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{CFHCHF}_2$)、三氟甲基($-\text{CF}_3$)、三氟甲氧基($-\text{OCF}_3$)等。

术语“羟基烷基”表示烷基基团被一个或多个羟基所取代, 这样的实例包含, 但并不限于, 羟甲基($-\text{CH}_2\text{OH}$)、羟乙基($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)等。

术语“卤素”是指氟(F)、氯(Cl)、溴(Br)或碘(I)。

术语“烷氨基”包括“*N*-烷氨基”和“*N,N*-二烷氨基”, 其中, 氨基基团分别独立地被一个或两个烷基基团所取代。其中, 一些实施方案中, 烷氨基是一个或两个 C_1 - C_{12} 烷基连接到氮原子上形成的较低级的烷基氨基基团。在另一些实施方案中, 烷氨基是一个或两个 C_1 - C_6 烷基连接到氮原子上形成的较低级的烷基氨基基团。在另一些实施方案中, 烷氨基是一个或两个 C_1 - C_4 烷基连接到氮原子上形成的较低级的烷基氨基基团。还在另外一些实施方案中, 烷氨基是一个或两个 C_1 - C_3 烷基连接到氮原子上形成的较低级的烷基氨基基团。合适的烷氨基基团可以是单烷基氨基或二烷基氨基, 烷氨基的实例包括, 但并不限于, *N*-甲氨基($-\text{NH}(\text{CH}_3)$), *N*-乙氨基($-\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$), *N,N*-二甲氨基($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), *N,N*-二乙氨基($-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), *N*-乙基丙基-2-氨基等等。

像本发明所描述的, 取代基画一个键连接到中心的环上形成的环体系(如式a所示)代表取代基在该环体系上所有可取代的位置择一取代。例如, 式a代表取代基R可以择一取代D环上所有可以被取代的位置, 如式b~式d所示。若该取代基不止一个, 则各取代基可以选择不同的取代位置或相同的取代位置。以下结构式b~式d中波浪线表示连接键。



术语“药学上可接受的”是指物质或组合物必须与包含制剂的其它成分和/或用其治疗的哺乳动物化学上和/或毒理学上相容。

本发明的“药学上可接受的盐”可以用常规化学方法由母体化合物、碱性或酸性部

-12-

分来合成。一般而言, 该类盐可以通过使这些化合物的游离酸形式与化学计量量的适宜碱(如Na、Ca、Mg或K的氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐等)反应, 或者通过使这些化合物的游离碱形式与化学计量量的适宜酸反应来进行制备。该类反应通常在水或有机溶剂或二者的混合物中进行。一般地, 在适当的情况中, 需要使用非水性介质如乙醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈。在例如“Remington's Pharmaceutical Sciences”, 第20版, Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); 和“药用盐手册: 性质、选择和应用(Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use)”, Stahl and Wermuth(Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002)中可找到另外一些适宜盐的列表。

另外, 本发明公开的化合物、包括它们的盐, 也可以以它们的水合物形式或包含其溶剂(例如乙醇、DMSO, 等等)的形式得到, 用于它们的结晶。本发明公开化合物可以与药学上可接受的溶剂(包括水)固有地或通过设计形成溶剂化物; 因此, 本发明旨在包括溶剂化的和未溶剂化的形式。

此外, 本发明公开的化合物可以以前药形式给药。在本发明中, 本发明公开化合物的“前药”是对患者给药时, 最终能在体内释放出本发明公开化合物的功能性衍生物。

本发明所使用的术语“前药”, 代表一个化合物在体内转化为式(I)或式(II)所示的化合物。这样的转化受前体药物在血液中水解或在血液或组织中经酶转化为母体结构的影响。本发明前体药物类化合物可以是酯, 在现有的发明中酯可以作为前体药物的芳香酯类, 脂肪族(C₁-C₂₄)酯类, 酰氧基甲基酯类, 碳酸酯, 氨基甲酸酯类和氨基酸酯类。例如本发明里的一个化合物包含羟基, 即可以将其酰化得到前体药物形式的化合物。其他的前体药物形式包括磷酸酯, 如这些磷酸酯类化合物是经母体上的羟基磷酸化得到的。

“代谢产物”是指具体的化合物或其盐在体内通过代谢作用所得到的产物。一个化合物的代谢产物可以通过所属领域公知的技术来进行鉴定, 其活性可以通过如本发明所描述的那样采用实验的方法进行表征。这样的产物可以通过给药化合物经过氧化, 还原, 水解, 酰氨化, 脱酰氨作用, 酯化, 脱脂作用, 酶裂解等方法得到。相应地, 本发明包括化合物的代谢产物, 包括将本发明的化合物与哺乳动物充分接触一段时间所产生的代谢产物。

本发明具体实施方式中采用的试剂购买于商品供应商如Aldrich Chemical Company, Arco Chemical Company and Alfa Chemical Company, 使用时都没有经过进一步纯化, 除非其他方面表明。一般的试剂从阿拉丁试剂、天津市福晨化学试剂厂、武汉鑫华远科技发展有限公司、青岛腾龙化学试剂有限公司和青岛海洋化工厂购买得到。Neurobasal-SFM、Leibovitz's、PBS、FBS、GlutaMAX-I(100×)购自Thermo Fisher Scientific; PDL、DNase、Trypsin-EDTA (0.25%)、异氟烷、DPBS购自Sigma-Aldrich; Anti-TrkB、Anti-AKT购自Cell signalling。Western blot 实验装置购自美国 Invitrogen 公司。BDNF 购自Peprotech公司。

¹H NMR谱使用Bruker 400MHz或600MHz核磁共振谱仪记录。¹H NMR谱以CDCl₃、D₂O、DMSO-*d*₆、CD₃OD或丙酮-*d*₆为溶剂 (以ppm为单位), 用TMS(0 ppm)

—13—

或氯仿(7.26ppm)作为参照标准。当出现多重峰的时候,将使用下面的缩写: s (singlet, 单峰)、d (doublet, 双峰)、t(triplet, 三重峰)、m(multiplet, 多重峰)、br (broad ened, 宽峰)、dd (d oublet of doublets, 双二重峰)、ddd (doublet of doublet of doublets, 双重双二重峰)、dt (doublet of triplets, 双三重峰)、tt(triplet of triplets, 三三重峰)。偶合常数J, 用赫兹(Hz)表示。

低分辨率质谱(MS)数据的测定条件是: Agilent 6120四级杆HPLC-M (柱子型号: Zorbax SB-C18, 2 .1×30 mm, 3.5微米, 6 min, 流速为0.6 mL/min。流动相: 5%~95%(含0.1%甲酸的CH₃CN)在(含0.1%甲酸的H₂O)中的比例), 采用电喷雾电离(ESI), 在210 nm/254 nm下, 用UV检测。

10 纯的化合物的使用Agilent 1260pre-HPLC或Calesep pump 250pre-HPLC(柱子型号: NOVASEP 50/80 mm DAC), 在210 nm/254 nm用UV检测。

下面简写词的使用贯穿本发明:

BDNF 脑源性神经营养因子

CMC-Na 羧甲基纤维素钠

15 DARPP-32 多巴胺和cAMP调节的磷蛋白

DPBS 杜氏磷酸缓冲液

EtOAc 乙酸乙酯

FBS 胎牛血清

HRP 辣根过氧化物酶

20 MCAO 中脑血管阻塞

MSNs 纹状体中等棘状神经元

MRI 磁共振成像

THF 四氢呋喃

TrkB 酪氨酸激酶受体B

25 Xphos 2-二环己基磷-2',4',6'-三异丙基联苯

Pd₂(dba)₃ 三(二亚苄基茚丙酮)二钯

Pd/C 钯/碳

PE 石油醚

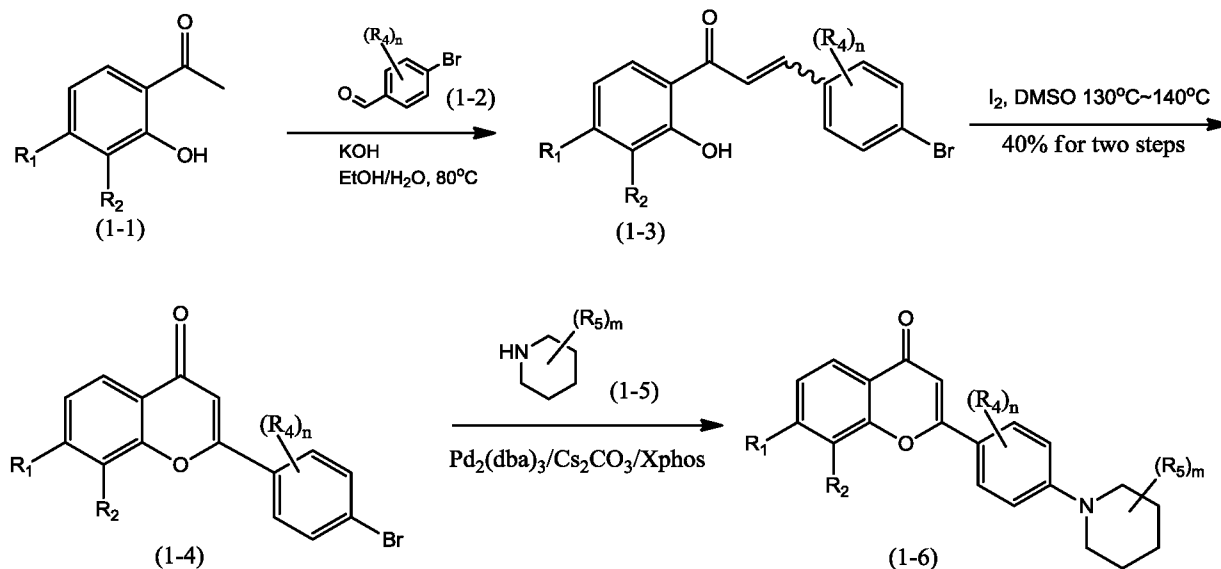
PBS 磷酸盐缓冲液

30 WT 野生型

制备本发明公开化合物的典型合成步骤如下面的合成方案所示。除非另外说明, 各R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、n和m具有如本发明所述的定义。

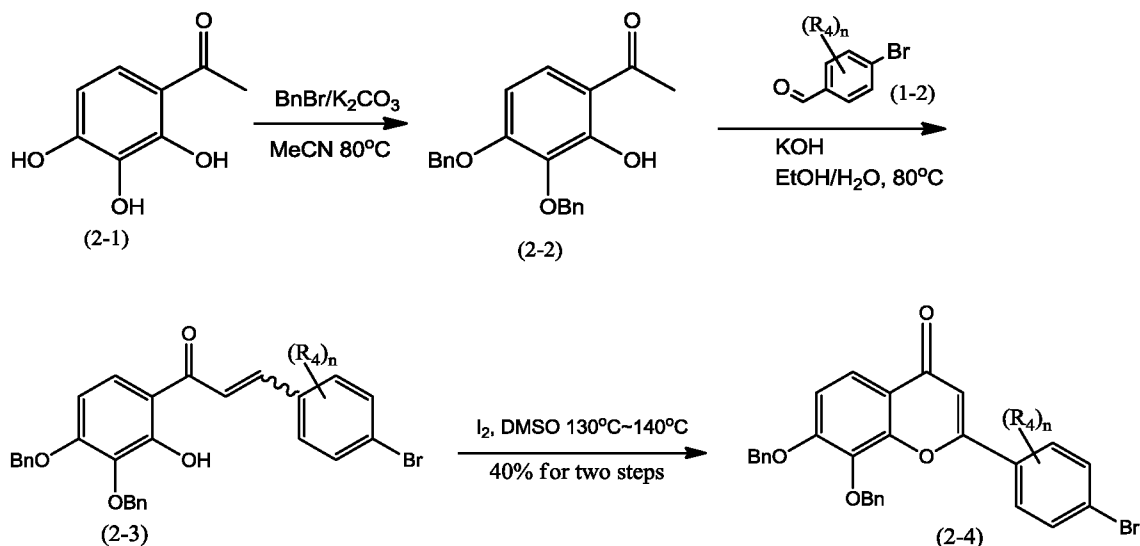
合成方案一:

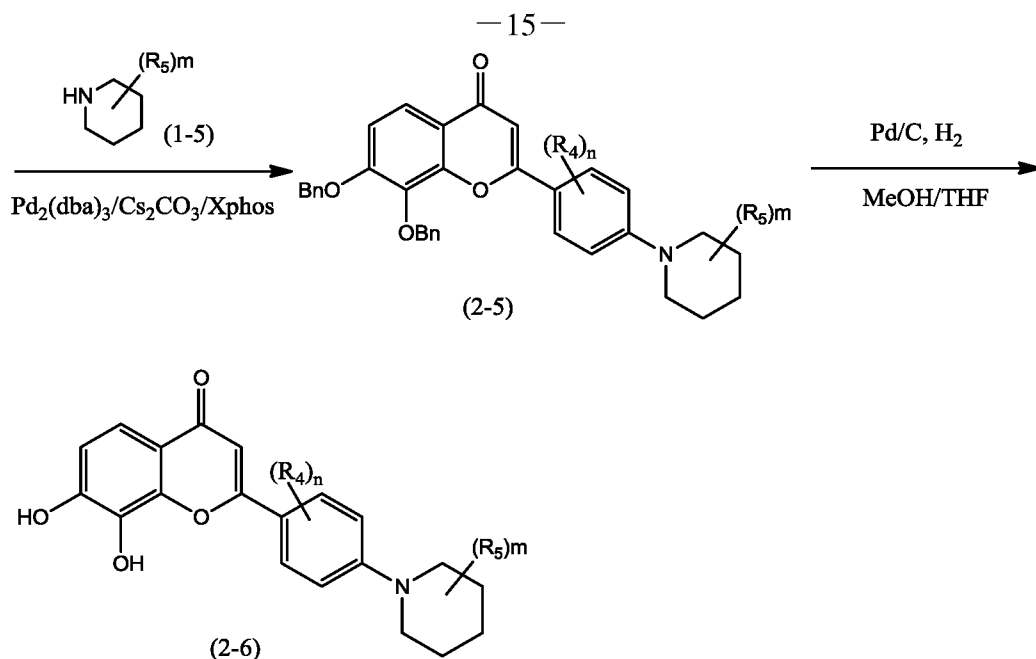
— 14 —



具有如式(1-6)所示结构的本发明公开化合物可以通过合成方案1描述的一般合成方法制备得到，具体步骤可参考实施例。合成方案一中，取代的2-羟基苯乙酮类化合物(1-1)与任选取代的4-溴苯甲醛(1-2)在碱性条件下发生羟醛缩合反应，生成化合物(1-3)。接着，化合物(1-3)在高温条件下先与碘反应得到活化的中间体，再经关环反应，生成化合物(1-4)，最后化合物(1-4)和任选取代的哌啶(1-5)在Xphos和Pd₂(dba)₃的催化下偶联，得到化合物(1-6)。

合成方案二：





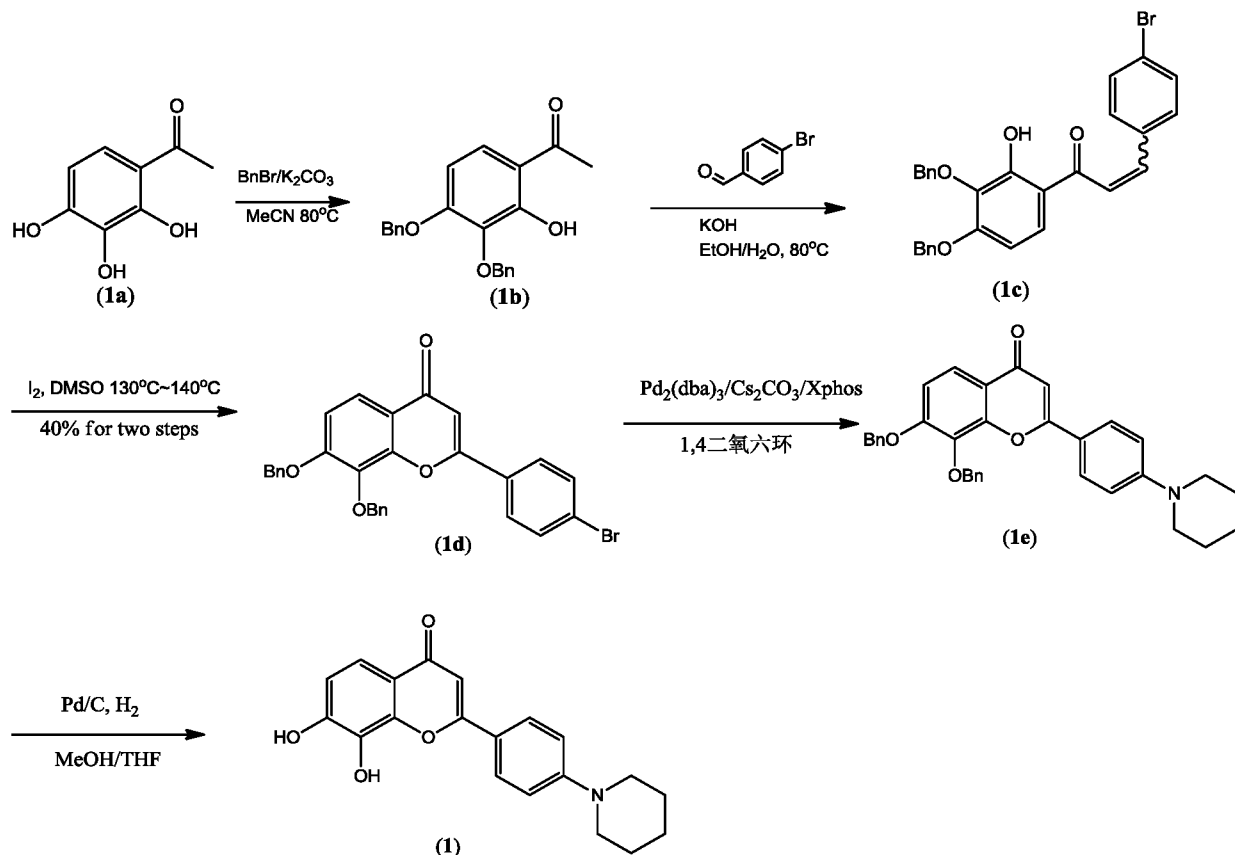
具有如式(2-6)所示结构的本发明公开化合物可以通过合成方案二描述的一般合成方法制备得到，具体步骤可参考实施例。合成方案二中，取代的1-(2,3,4-三羟基)苯基乙酮(2-1)在碱性条件下与BnBr发生反应，得到双苄基保护的化合物(2-2)，化合物(2-2)与任选取代的4-溴苯甲醛(1-2)在碱性条件下发生羟醛缩合反应，生成化合物(2-3)。接着，化合物(2-3)在高温条件下先与碘反应得到活化的中间体，再经关环反应，生成化合物(2-4)，化合物(2-4)和任选取代的哌啶(1-5)在Xphos和 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ 的催化下偶联，得到化合物(2-5)，化合物(2-5)经催化氢化脱去苄基保护基，就得到化合物(2-6)。

所属领域的专业人员将认识到：本发明所描述的化学反应可以用来合适地制备许多本发明的其他化合物，且用于制备本发明的化合物的其它方法都被认为是在本发明的范围之内。例如，根据本发明那些非例证的化合物的合成可以成功地被所属领域的技术人员通过修饰方法完成，如适当的保护干扰基团，通过利用其他已知的试剂除了本发明所描述的，或将反应条件做一些常规的修改。另外，本发明所公开的反应或已知的反应条件也公认地适用于本发明其他化合物的制备。

以下就本发明所提供的一种用于治疗神经系统疾病的化合物及其应用做进一步说明。

实施例 1：7,8-二羟基-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4H-色烯-4-酮

(1; 7,8-dihydroxy-2-(4-(piperidin-1-yl)phenyl)-4H-chromen-4-one)



5 步骤 (1) 1-(3,4-二(苄氧基)-2-羟基苯基)乙酮 (**1b**) 的合成

向 1-(2,3,4-三羟基苯基)乙酮 (**1a**, 50.0 g, 297.4 mmol)、溴化苄 (101.7 g, 594.7 mmol) 和乙腈 (1200 mL) 的混合物中, 加入碳酸钾 (82.2 g, 594.7 mmol), 所得混合物在 80°C 下搅拌 15 小时。反应结束后, 冷却至室温, 减压抽滤除去不溶物, 所得滤液减压浓缩得到残留物。残留物溶于乙醇 (1000 mL) 中, 升温至 80°C 搅拌 1 小时, 冷却至室温, 有固体析出, 过滤得到滤饼, 减压干燥后得黄色固体, 即为化合物 1-(3,4-二(苄氧基)-2-羟基苯基)乙酮 (**1b**, 60.0 g, 产率 58%)。LC-MS(ESI): m/z 348.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

10 步骤 (2) 1-(3,4-二(苄氧基)-2-羟基苯基)-3-(4-溴苯基)丙-2-烯-1-酮 (**1c**) 的合成

向 1-(3,4-二(苄氧基)-2-羟基苯基)乙酮 (**1b**, 60.0 g, 172.2 mmol)、4-溴苯甲醛 (31.9 g, 172.2 mmol)、乙醇 (300 mL) 和 H_2O (100 mL) 的混合物中加入氢氧化钾 (19.3 g, 344.4 mmol)。所得混合物升温至 80°C , 搅拌过夜。反应结束后, 冷却至室温, 然后用 1N 的盐酸溶液调节至 $\text{pH} = 5$, 有固体析出。减压抽滤, 收集滤饼, 减压干燥后得到红色固体 75.1 g, 即为粗产物 1-(3,4-二(苄氧基)-2-羟基苯基)-3-(4-溴苯基)丙-2-烯-1-酮 (**1c**)。化合物不需纯化直接用于下一步反应。LC-MS(ESI): m/z 515.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

15 步骤 (3) 7,8-二(苄氧基)-2-(4-溴苯基)-4H-色烯-4-酮 (**1d**) 的合成

向 1-(3,4-二(苄氧基)-2-羟基苯基)-3-(4-溴苯基)丙-2-烯-1-酮 (**1c**, 103.7 g, 201.2 mmol) 的 DMSO (800 mL) 溶液中, 加入碘单质 (5.0 g, 20.0 mmol), 所得混合物升温至 130°C ~ 140°C 搅拌 6 小时。混合物冷却至室温, 加入 EtOAc (300 mL) 稀释, 所得溶液依次用水 (100 mL $\times$ 3)、饱和食盐水 (100 mL $\times$ 3) 洗涤, 然后用无水硫酸钠干燥, 滤液减压浓缩, 得到残留物。所得残留物经硅胶柱层析 (洗脱剂: PE/EtOAc (v/v) =

-17-

3/1~1/1)纯化,得到黄色固体,即为产物 7,8-二(苄氧基)-2-(4-溴苯基)-4*H*-色烯-4-酮(**1d**, 41.0g, 两步总产率 40%)。LC-MS(ESI): m/z 513.1[M+H]⁺.

步骤(4) 7,8-二(苄氧基)-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮(**1e**)的合成

5 在手套箱中,向 7,8-二(苄氧基)-2-(4-溴苯基)-4*H*-色烯-4-酮(**1d**, 41.0 g, 79.9 mmol)、Xphos (7.4 g, 15.6 mmol), Pd₂(dba)₃ (7.15g, 7.8 mmol)和碳酸铯 (50.7g, 15.6 mmol) 的混合物中加入 1,4-二氧六环(400 mL)和哌啶(9.9 g, 117 mmol)。所得混合物升温至 110°C 搅拌 2.5 小时。反应结束后,混合物冷却至室温,倾入水 (300 mL) 中,加入 EtOAc (200 mL×3)萃取,分出有机相,用无水硫酸钠干燥。滤液减压浓缩,所得残留物经硅胶柱层析(洗脱剂: DCM/MeOH (v/v) = 40/1)到 10:1)纯化,得到黄色固体,即为产物(**1e**, 21.2 g, 产率 51%)。LC-MS(ESI): m/z 518.2[M+H]⁺.

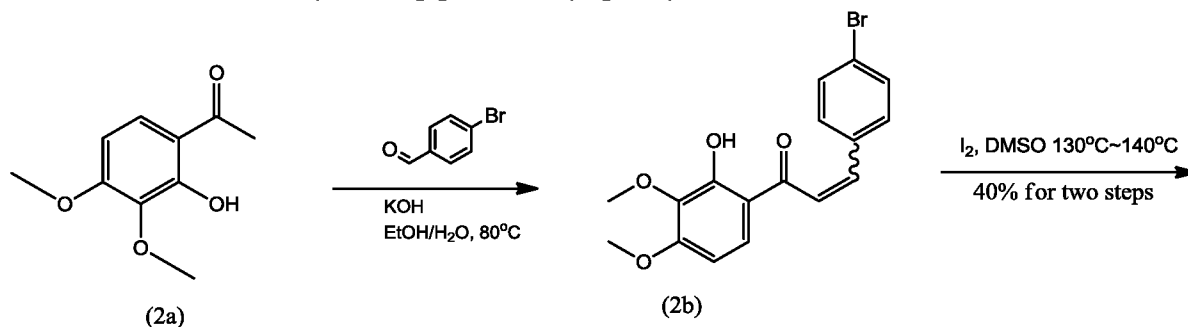
步骤(5) 7,8-二羟基-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮(**1**)的合成

15 向化合物 7,8-二(苄氧基)-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮(**1e**, 21.0g, 40.6 mmol)、THF (200 mL) 和甲醇 (50 mL)的混合物中,加入 Pd/C (2.1g, 10%含量),所得混合物抽除空气用氢气填充,重复三次。所得混合物在室温下搅拌过夜。反应结束后,硅藻土过滤,除去催化剂,滤液减压浓缩得到棕色残留物。向残留物中加入 MeOH (30 mL) 和 Et₂O(50 mL),升温至 50 °C 搅拌 15 分钟,有固体析出。减压过滤,滤饼用乙醚洗涤,收集滤饼,减压干燥得到黄色固体,即为产物 7,8-二羟基-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮(**1**, 共 11.04 g, 产率 81%)。LC-MS: 337.9 [M+H]⁺, 98.12% (纯度, UV 214 nm);

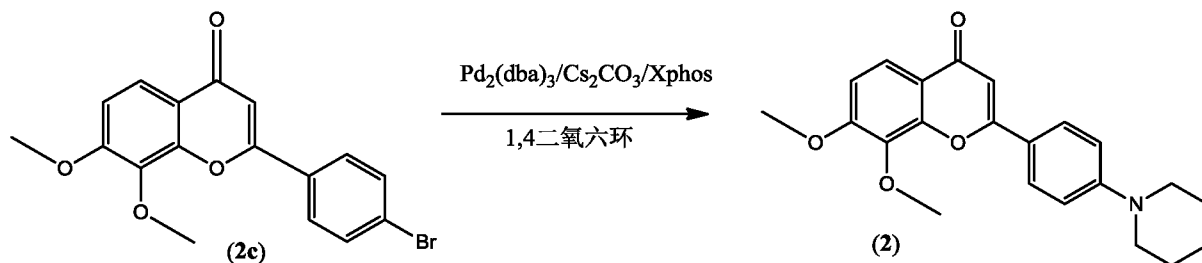
20 ¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.23(s, 1H), 9.37(s, 1H), 7.96(d, *J*= 9.2Hz, 2H), 7.36(d, *J* = 8.4Hz, 1H), 7.04(d, *J*= 8.8Hz,2H), 6.91(d, *J*= 8.8Hz,1H), 6.67(s, 1H) , 3.34-3.33(m, 4H), 1.63-1.53(m, 6H).

实施例 2: 7,8-二甲氧基-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮

25 (**2**; 7,8-dimethoxy-2-(4-(piperidin-1-yl)phenyl)-4*H*-chromen-4-one)



— 18 —



步骤 (1) 3-(4-溴苯基)-1-(2-羟基-3,4-二甲氧基苯基)-丙-2-烯-1-酮 (2b) 的合成
向 1-(2-羟基-3,4-二甲氧基苯基)乙酮(2a, 33.7 g, 172.2 mmol)、4-溴苯甲醛 (31.9g,
5 172.2 mmol)、乙醇 (300 mL) 和 H₂O (100 mL)的混合物中加入氢氧化钾 (19.3 g,
344.4 mmol)。所得混合物升温至 80 °C, 搅拌过夜。反应结束后, 冷却至室温, 然后
用 1N 的盐酸溶液调节至 PH = 5, 有固体析出。减压抽滤, 收集滤饼, 减压干燥后得
到红色固体 52.9 g, 即为粗产物 3-(4-溴苯基)-1-(2-羟基-3,4-二甲氧基苯基)-丙-2-烯-1-
酮 (2b)。化合物不需纯化直接用于下一步反应。LC-MS(ESI): m/z 364.1[M+H]⁺。

步骤 (2) 2-(4-溴苯基)-7,8-二甲氧基-4H-色烯-4-酮 (2c) 的合成

向 3-(4-溴苯基)-1-(2-羟基-3,4-二甲氧基苯基)-丙-2-烯-1-酮 (2b, 73.0 g, 201.2
mmol) 的 DMSO (800 mL)溶液中, 加入碘单质 (5.0 g, 20.0 mmol), 所得混合物升温
至 130~140 °C 搅拌 6 小时。混合物冷却至室温, 加入 EtOAc (300 mL)稀释, 所得溶
液依次用水(100 mL×3)、饱和食盐水 (100 mL×3)洗涤, 然后用无水硫酸钠干燥, 滤
液减压浓缩, 得到残留物。所得残留物经硅胶柱层析 (洗脱剂: PE/ EtOAc (v/v) =
15 3/1~1/1)纯化, 得到黄色固体, 即为产物 2-(4-溴苯基)-7,8-二甲氧基-4H-色烯-4-酮 (2c,
25.2 g, 两步总产率 40%)。LC-MS(ESI): m/z 361.1[M+H]⁺。

步骤 (3) 7,8-二甲氧基-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4H-色烯-4-酮 (2) 的合成

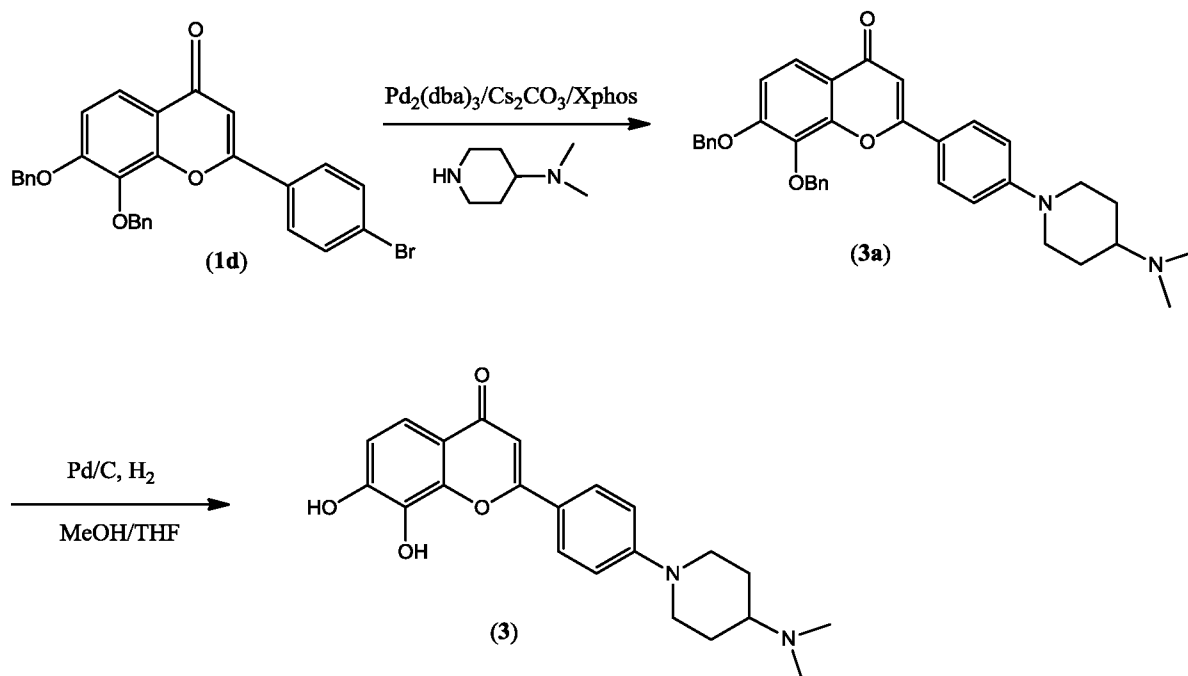
在手套箱中, 向 2-(4-溴苯基)-7,8-二甲氧基-4H-色烯-4-酮 (2c, 25.2 g, 79.9 mmol)、
20 Xphos (7.4 g, 15.6 mmol), Pd₂(dba)₃ (7.15 g, 7.8 mmol)和碳酸铯 (50.7 g, 15.6 mmol) 的
混合物中加入 1,4-二氧六环(400 mL)和哌啶(9.9 g, 117 mmol)。所得混合物升温至
110 °C 搅拌 2.5 小时。反应结束后, 混合物冷却至室温, 倾入水 (300 mL) 中, 加入
EtOAc (200 mL×3) 萃取, 分出有机相, 用无水硫酸钠干燥。滤液减压浓缩, 所得残
留物经硅胶柱层析 (洗脱剂: DCM/MeOH (v/v) = 30/1) 到 20/1) 纯化, 得到黄色固
体, 即为产物 (2, 共 14.9 g, 产率 51%)。LC-MS(ESI): m/z 366.2[M+H]⁺。

¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.66(d, J = 9.2Hz, 2H), 7.26(d, J = 8.4Hz, 1H),
7.04(d, J = 8.8Hz, 2H), 6.91(d, J = 8.8Hz, 1H), 6.47(s, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.80(s, 3H),
3.34-3.33(m, 4H), 1.63-1.53(m, 6H)。

实施例 3: 2-(4-(4-(二甲氨基)哌啶-1-基)苯基)-7,8-二羟基-4H-色烯-4-酮

(3; 2-(4-(4-(dimethylamino)piperidin-1-yl)phenyl)-7,8-dihydroxy-4H-chromen-4-one)

—19—



步骤（1）7,8-二(苄氧基)-2-(4-(4-(二甲氨基)哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮（**3a**）

5 的合成

在手套箱中，向 7,8-二(苄氧基)-2-(4-溴苯基)-4*H*-色烯-4-酮（**1d**, 41.0 g, 79.9 mmol）、Xphos (7.4g, 15.6mmol), Pd₂(dba)₃ (7.15 g, 7.8 mmol)和碳酸铯 (50.7 g, 15.6 mmol) 的混合物中加入 1,4-二氧六环(400 mL)和 4-二甲氨基哌啶 (15.0 g, 117 mmol)。所得混合物升温至 110°C 搅拌 2.5 小时。反应结束后，混合物冷却至室温，倾入水 (300 mL) 中，加入 EtOAc (200 mL×3) 萃取，分出有机相，用无水硫酸钠干燥。滤液减压浓缩，所得残留物经硅胶柱层析（洗脱剂：DCM/MeOH (v/v) = 40/1）到 10:1）纯化，得到黄色固体，即为产物 7,8-二(苄氧基)-2-(4-(4-(二甲氨基)哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮（产物 **3a**, 26.88 g, 产率 60%）。LC-MS(ESI): *m/z* 561.68 [M+H]⁺。

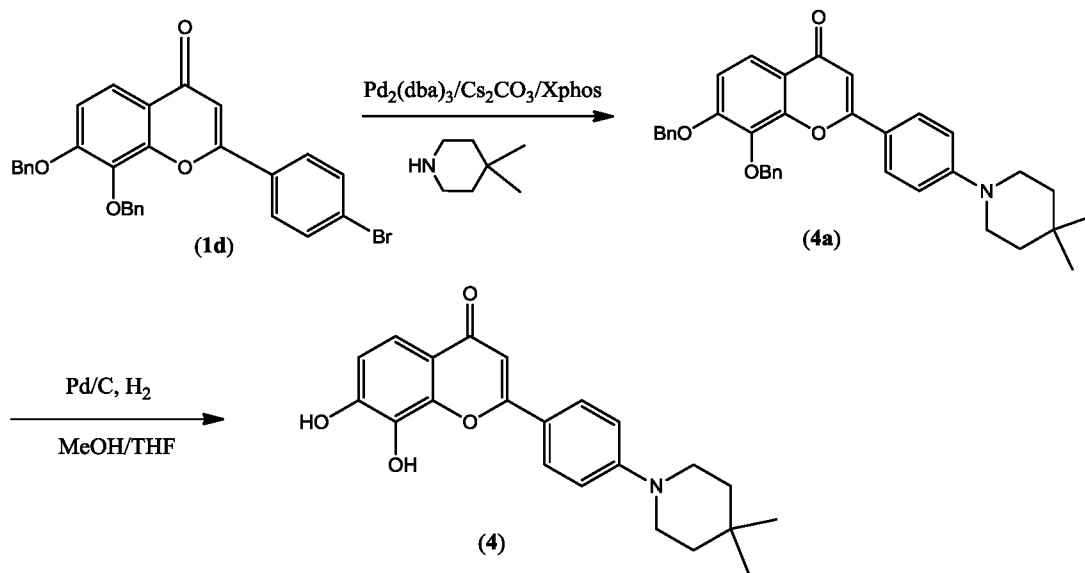
步骤（2）2-(4-(4-(二甲氨基)哌啶-1-基)苯基)-7,8-二羟基-4*H*-色烯-4-酮（**3**）的合

15 成

向化合物 7,8-二(苄氧基)-2-(4-(4-(二甲氨基)哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮（**3a**, 26.88 g, 47.94 mmol）、THF (200 mL) 和甲醇 (50 mL)的混合物中，加入 Pd/C (2.6 g, 10%含量)，所得混合物抽除空气用氢气填充，重复三次。所得混合物在室温下搅拌过夜。反应结束后，硅藻土过滤，除去催化剂，滤液减压浓缩得到棕色残留物。向残留物中加入 MeOH (30 mL) 和 Et₂O (50 mL)，升温至 50 °C 搅拌 15 分钟，有固体析出。减压过滤，滤饼用乙醚洗涤，收集滤饼，减压干燥得到黄色固体，即为产物 2-(4-(4-(二甲氨基)哌啶-1-基)苯基)-7,8-二羟基-4*H*-色烯-4-酮(产物 **3**, 15.50g, 产率 85%)。LC-MS: 381.44 [M+H]⁺, 96.92% (纯度, UV 214 nm)。

¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.18 (s, 1H), 9.37(s, 1H), 7.96 (d, *J* = 9.2Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 8.4Hz, 1H), 7.04 (d, *J* = 8.8Hz, 2H), 6.91 (d, *J* = 8.8Hz, 1H), 6.67 (s, 1H), 3.34-3.33 (m, 4H), 2.63 (m, 1H), 2.26 (s, 6H), 1.83-1.93 (m, 4H)。

25

实施例 4: 2-(4-(4-(二甲基)哌啶-1-基)苯基)-7,8-二羟基-4*H*-色烯-4-酮(**4** ; 2-(4-(4,4-dimethylpiperidin-1-yl)phenyl)-7,8-dihydroxy-4*H*-chromen-4-one)

5

步骤 (1) 7,8-二(苄氧基)-2-(4-(4,4-二甲基哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮 (**4a**) 的合成

在手套箱中, 向 7,8-二(苄氧基)-2-(4-溴苯基)-4*H*-色烯-4-酮 (**1d**, 41.0 g, 79.9 mmol)、Xphos (7.4g, 15.6mmol), Pd₂(dba)₃ (7.15g, 7.8 mmol)和碳酸铯 (50.7 g, 15.6 mmol) 的混合物中加入 1,4-二氧六环(400 mL)和 4,4-二甲基哌啶 (13.24 g, 117 mmol)。所得混合物升温至 110°C 搅拌 2.5 小时。反应结束后, 混合物冷却至室温, 倾入水 (300 mL) 中, 加入 EtOAc (200 mL×3) 萃取, 分出有机相, 用无水硫酸钠干燥。滤液减压浓缩, 所得残留物经硅胶柱层析 (洗脱剂: DCM/MeOH (v/v) = 40/1 到 10:1) 纯化, 得到黄色固体, 即为产物 (**1e**, 26.11 g, 产率 60%)。LC-MS(ESI): m/z 546.6 [M+H]⁺。

步骤 (2) 2-(4-(4,4-二甲基哌啶-1-基)苯基)-7,8-二羟基-4*H*-色烯-4-酮 (**4**) 的合成
向化合物 7,8-二(苄氧基)-2-(4-(4,4-二甲基哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮 (**4a**, 26.88g, 47.94 mmol)、THF (200 mL) 和甲醇 (50 mL)的混合物中, 加入 Pd/C (2.6 g, 10%含量), 所得混合物抽除空气用氢气填充, 重复三次。所得混合物在室温下搅拌过夜。反应结束后, 硅藻土过滤, 除去催化剂, 滤液减压浓缩得到棕色残留物。向残留物中加入 MeOH (30mL) 和 Et₂O (50 mL), 升温至 50 °C 搅拌 15 分钟, 有固体析出。减压过滤, 滤饼用乙醚洗涤, 收集滤饼, 减压干燥得到黄色固体, 即为产物 2-(4-(4,4-二甲基哌啶-1-基)苯基)-7,8-二羟基-4*H*-色烯-4-酮 (**4**, 共 14.01g, 产率 80%)。

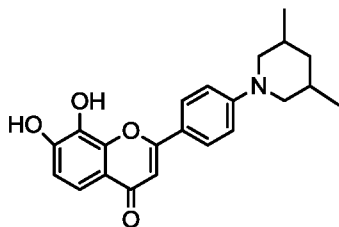
LC-MS: 366.41 [M+H]⁺, 97.02% (纯度, UV 214 nm);

¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.18 (s, 1H), 9.37(s, 1H), 7.96 (d, *J* = 9.2Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 8.4Hz, 1H), 7.04 (d, *J* = 8.8Hz, 2H), 6.91 (d, *J* = 8.8Hz, 1H), 6.67 (s, 1H), 3.34-3.33 (m, 4H), 1.63-1.53 (m, 4H) 1.23-1.33 (s, 6H)。

实施例 5: 2-(4-(3,5-二甲基哌啶-1-基)苯基)-7,8-二羟基-4*H*-色烯-4-酮

—21—

(**5**; 2-(4-(3,5-dimethylpiperidin-1-yl)phenyl)-7,8-dihydroxy-4*H*-chromen-4-one)

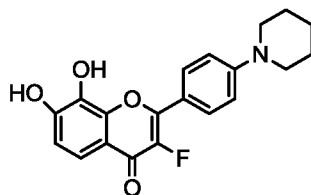


参照实施例 4 的合成方案合成上述结构化合物, 即 2-(4-(3,5-二甲基哌啶-1-基)苯基)-7,8-二羟基-4*H*-色烯-4-酮; LC-MS:366.41 [M+H]⁺。

5

实施例 6: 3-氟-7,8-二羟基-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮

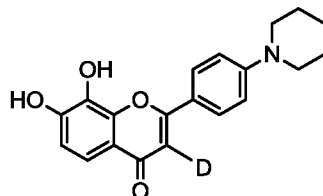
(**6**; 3-fluoro-7,8-dihydroxy-2-(4-(piperidin-1-yl)phenyl)-4*H*-chromen-4-one)



参照实施方案二的合成方案合成上述结构化合物, 即 3-氟-7,8-二羟基-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮; LC-MS:356.11 [M+H]⁺。

10

实施例 7: 3-氘代-7,8-二羟基-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮

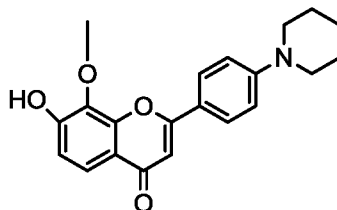


参照实施方案二的合成方案合成上述结构化合物, 即 3-氘代-7,8-二羟基-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮; LC-MS:339.14 [M+H]⁺。

15

实施例 8: 7-羟基-8-甲氧基-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮

(**8**; 7-hydroxy-8-methoxy-2-(4-(piperidin-1-yl)phenyl)-4*H*-chromen-4-one)

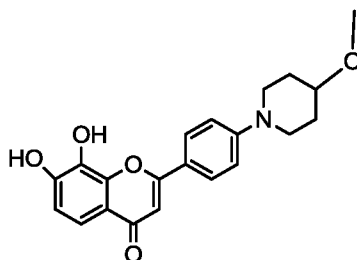


参照实施方案一的合成方案合成上述结构化合物, 即 7-羟基-8-甲氧基-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮; LC-MS:352.15 [M+H]⁺。

20

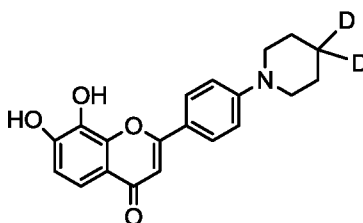
实施例 9: 7,8-二羟基-2-(4-(4-甲氧基哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮

—22—

(9; 7,8-dihydroxy-2-(4-(4-methoxypiperidin-1-yl)phenyl)-4*H*-chromen-4-one)

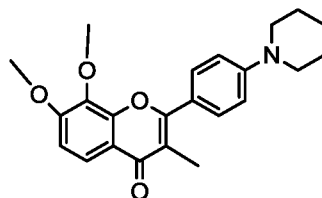
参照实施方案二的合成方案合成上述结构化合物, 即 7,8-二羟基-2-(4-(4-甲氧基哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮; LC-MS: 368.15 [M+H]⁺。

5

实施例 10: 7,8-二羟基-2-(4-(4,4-二氘代-哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮

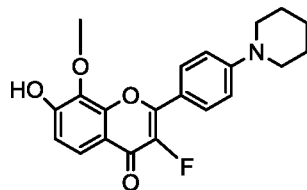
参照实施方案二的合成方案合成上述结构化合物, 即 7,8-二羟基-2-(4-(4,4-二氘代-哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮; LC-MS: 340.51 [M+H]⁺。

10

实施例 11: 7,8-二甲氧基-3-甲基-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮(11; 7,8-dimethoxy-3-methyl-2-(4-(piperidin-1-yl)phenyl)-4*H*-chromen-4-one)

参照实施方案一的合成方案合成上述结构化合物, 即 7,8-二甲氧基-3-甲基-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮; LC-MS: 380.21 [M+H]⁺。

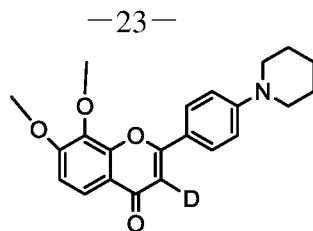
15

实施例 12: 3-氟-7-羟基-8-甲氧基-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮(12; 3-fluoro-7-hydroxy-8-methoxy-2-(4-(piperidin-1-yl)phenyl)-4*H*-chromen-4-one)

参照实施方案二的合成方案合成上述结构化合物, 即 3-氟-7-羟基-8-甲氧基-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮; LC-MS: 370.57 [M+H]⁺。

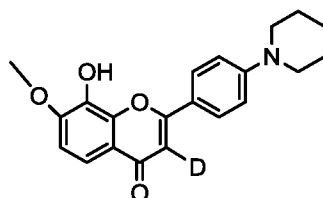
20

实施例 13: 7,8-二甲氧基-3-氘代-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮



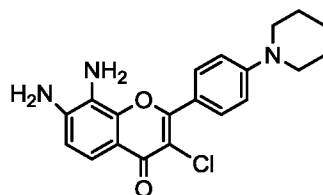
参照实施方案一的合成方案合成上述结构化合物，即 7,8-二甲氧基-3-氘代-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮；LC-MS:367.43 [M+H]⁺。

5 **实施例 14:** 3-氘代-7-甲氧基-8-羟基-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮



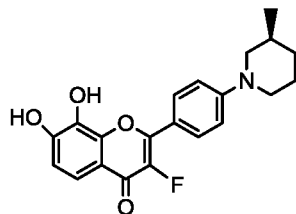
参照实施方案二的合成方案合成上述结构化合物，即 3-氘代-7-甲氧基-8-羟基-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮；LC-MS:353.31 [M+H]⁺。

10 **实施例 15:** 7,8-二氨基-3-氯-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮



参照实施方案二的合成方案合成上述结构化合物，即 7,8-二氨基-3-氯-2-(4-(哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮；LC-MS:371.12 [M+2H]⁺。

15 **实施例 16:** (*S*)-3-氟-7,8-二羟基-2-(4-(3-甲基哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮 (16; e(*S*)-3-fluoro-7,8-dihydroxy-2-(4-(3-methylpiperidin-1-yl)phenyl)-4*H*-chromen-4-one)

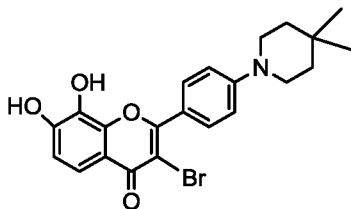


参照实施方案二的合成方案合成上述结构化合物，即(*S*)-3-氟-7,8-二羟基-2-(4-(3-甲基哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮；LC-MS:369.94[M+H]⁺。

20

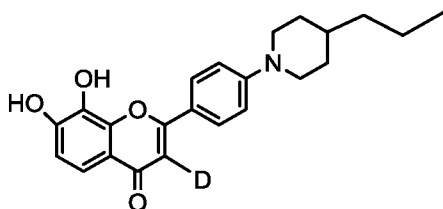
实施例 17: 3-溴-2-(4-(4,4-二甲基哌啶-1-基)苯基)-7,8-二羟基-4*H*-色烯-4-酮
(**17**;
3-bromo-2-(4-(4,4-dimethylpiperidin-1-yl)phenyl)-7,8-dihydroxy-4*H*-chromen-4-one)

—24—



参照实施方案二的合成方案合成上述结构化合物，即 3-溴-2-(4-(4,4-二甲基哌啶-1-基)苯基)-7,8-二羟基-4*H*-色烯-4-酮；LC-MS:445.07[M+H]⁺。

5 **实施例 18:** 3-氘代-2-(4-(4-丙基哌啶-1-基)苯基)-7,8-二羟基-4*H*-色烯-4-酮



参照实施方案二的合成方案合成上述结构化合物，即 3-氘代-2-(4-(4-丙基哌啶-1-基)苯基)-7,8-二羟基-4*H*-色烯-4-酮；LC-MS:381.25[M+H]⁺。

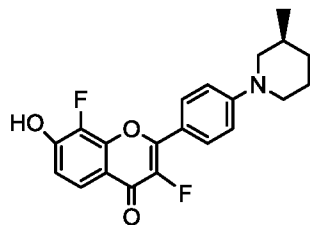
10 **实施例 19:** (*S*)-3,8-二氟-7-羟基-2-(4-(3-甲基-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮

(

19

;

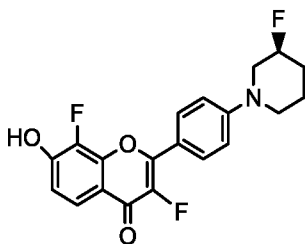
(*S*)-3,8-difluoro-7-hydroxy-2-(4-(3-methylpiperidin-1-yl)phenyl)-4*H*-chromen-4-one)



15 参照实施方案二的合成方案合成上述结构化合物，即(*S*)-3,8-二氟-7-羟基-2-(4-(3-甲基哌啶-1-基)苯基)-4*H*-色烯-4-酮；LC-MS:372.21[M+H]⁺。

实施例 20: (*S*)-3,8-二氟-2-(4-(3-氟哌啶-1-基)苯基)-7-羟基-4*H*-色烯-4-酮

(**20**; (*S*)-3,8-difluoro-2-(4-(3-fluoropiperidin-1-yl)phenyl)-7-hydroxy-4*H*-chromen-4-one)



20 参照实施方案二的合成方案合成上述结构化合物，即(*S*)-3,8-二氟-2-(4-(3-氟哌啶-1-基)苯基)-7-羟基-4*H*-色烯-4-酮；LC-MS:376.43[M+H]⁺。

实施例 21: 本发明化合物对 TrkB 受体的激活作用

—25—

(1) **实验方法:** N171-82Q WT雄性小鼠与雌性B6C3F1/J杂种小鼠交配, 取18天B6C3F1/J孕鼠, 异氟烷麻醉, 解剖取出胚胎, 放到含有Leibovitz's buffer的10 cm培养皿中。断头, 剥离脑壳, 取出完整鼠脑, 放入新的Leibovitz's buffer的10cm培养皿中。分离脑中的神经皮层放入含有3 mL Leibovitz's buffer的15 mL离心管中。1000rpm离心1分钟, 轻柔的移去离心管内Leibovitz's buffer, 加入750 μ L的0.25% trypsin-EDTA, 75 μ L的0.1% DNase (2000 U/mL), 37 $^{\circ}$ C消化15 min。加入750 μ L 含有5%FBS的DMEM 培养液终止消化, 混匀细胞, 1000rpm离心5分钟。移去Trypsins/DNase混合液, 加入750 μ L的Neurobasal medium(B-27, Glutamax, P/S), 用移液枪轻轻吹吸30下使细胞混匀。用40 μ m过滤器过滤细胞悬浮液, 转移至另一全新50 mL离心管中。取10 μ L细胞悬浮液, 加入90 μ L DMEM中 (稀释10倍), 吸取10 μ L上述液体于血球计数板上, 使悬液充满盖片和计数板之间, 计数, 计算板四大格细胞总数, 压线细胞只计算左侧和上侧细胞, 按以下公式计算:

细胞数/mL=四大格细胞总数/ 4×10^4 /mL

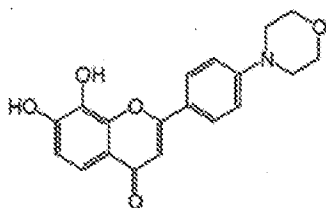
细胞总数/mL =四大格细胞总数/ 4×10^4 /mL $\times$ 稀释倍数。

计数后, 用Neurobasal 选择培养基稀释细胞, 使1 mL Neurobasal 培养液含有 0.5×10^6 个细胞。

将PDL溶液提前在37 $^{\circ}$ C水浴锅加热, 6孔板每孔加PDL溶液200 μ L, 37 $^{\circ}$ C过夜, 使PDL均匀涂满细胞孔板, 吸去PDL溶液, PBS洗2遍。使用前, 在超净台里将PBS吸干, 开盖晾干。每个孔加入2 mL细胞悬液 (37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂), 培养细胞贴壁后, 换培养液, 培养3d, 观察神经元生长状况。每隔3d换全培养液1次, 每次换半液。培养至原代皮层神经元细胞成熟 (一般培养至第14天即可成熟)。

待原代皮层神经元细胞成熟后, 重新加入适量新鲜配制的培养液最终使每孔终体积为2 mL。设置空白对照组 (Vehicle), 阳性对照组 BDNF (10 ng/mL) 和对照化合物组 (500 nM), 受试化合物组 6 组 (500 nM)。每个剂量设置三组平行组。在37 $^{\circ}$ C培养 10 min, 然后倒掉培养液, 用预冷的 PBS 洗涤细胞, 每孔内加 40 μ L 预冷好的裂解液 (RIPA buffer 10 mL 和蛋白酶和磷酸酶抑制剂 100 μ L), 冰上裂解 30 min。裂解完后, 超声波细胞粉碎机粉碎细胞, 于 4 $^{\circ}$ C下 14000 rpm 离心 20 min, 上清分装转移至新的 1.5 mL 离心管中, 提取蛋白。Western blotting 实验检测细胞内 (A) p-TrkB 和 t-TrkB; (B) p-AKT 和 t-AKT 的蛋白水平。

对照化合物为现有技术中公开的具有 TrkB 激动活性的化合物:



对照化合物

(2) **数据处理:** 应用软件 Sigmaplot 13.0 对资料进行统计学分析, 各组数据以均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) 表示。计量资料多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 及 LSD 两两事后检验, $P < 0.05$ 即认为有统计学差异。

(3) **实验结果:** 实验结果如表 1 所示, 其中受试化合物实施例 1 的 p-TrkB/t-TrkB 和 p-AKT/t-AKT 电泳图和蛋白相对强度图如图 1 所示。其中, 图 1A 为 p-TrkB/t-TrkB 蛋白电泳图, 图 1C 为 p-AKT/t-AKT 的蛋白电泳图; Sigmaplot 13.0 软件统计 p-TrkB/t-TrkB 和 p-AKT/t-AKT 蛋白水平相对强度, 图 1B 为 p-TrkB/t-TrkB 蛋白水平统计结果; 图 1D 为 p-AKT/t-AKT 的蛋白水平统计结果。

表 1 p-TrkB/t-TrkB 和 p-AKT/t-AKT 蛋白相对强度

组别	p-TrkB/t-TrkB 蛋白相对强度	p-AKT/t-AKT 蛋白相对强度
Vehicle	100.000 $\pm$ 13.095	100.001 $\pm$ 1.856
BDNF	274.260 $\pm$ 8.047*	229.306 $\pm$ 3.912*
受试化合物/实施例 1	216.727 $\pm$ 8.642*	219.663 $\pm$ 8.085*
受试化合物/实施例 2	206.453 $\pm$ 7.574*	209.651 $\pm$ 3.294*
受试化合物/实施例 3	234.685 $\pm$ 14.695*	240.213 $\pm$ 8.376*
受试化合物/实施例 4	216.198 $\pm$ 8.865*	215.698 $\pm$ 5.487*
受试化合物/实施例 5	213.254 $\pm$ 12.379*	219.904 $\pm$ 6.954*
受试化合物/实施例 7	218.156 $\pm$ 12.556*	220.514 $\pm$ 3.476*
对照化合物组	138.890 $\pm$ 15.547*	147.748 $\pm$ 4.832*

注: 与 Vehicle 组相比, $*P < 0.05$, $n = 3$ 。

(4) **实验结论:** 原代神经皮层神经元细胞经 BDNF (10 ng/mL) 培养后, p-TrkB 的相对强度显著增强, 为 Vehicle 组的 2.74 倍 ($P < 0.05$), 受试化合物组实施例 1~5 化合物使蛋白相对强度增强了 2.06~2.34 倍, 也表现出了显著性的差异 ($P < 0.05$)。以上数据证明实施例化合物在 500nM 剂量下对于 BDNF-TrkB 信号通路的下游信号 AKT 增强的效果与 BDNF 相当; 本发明化合物的 TrkB 激动活性显著优于公开的具有 TrkB 激动活性的对照化合物。本发明实施例化合物在原代神经皮层神经元细胞中可以激活 TrkB 受体及其下游 AKT 信号通路。

脑源性神经营养因子 (BDNF) 对多种神经元集群具有神经营养性作用, 这些神经元集群包括感觉神经元、运动神经元、黑质多巴胺能神经元以及基底前脑胆碱能神经元, 这些神经元涉及数种神经和神经精神病症。临床前证据表明 BDNF 可能适用于多种神经和神经精神病症的治疗; 然而, 这种肽的体内不稳定性和其无法有效穿过血脑屏障限制了它的有用性。

实施例22: 本发明化合物磷酸-Akt S473 ELISA 分析

(1) 实验方法: 实施例21相同方法培养原代皮层神经元细胞, 待成熟后, 重新

-27-

加入适量新鲜配制的培养液最终使每孔终体积为2 mL。设置空白对照组 (Vehicle), 阳性对照组BDNF(10 ng/mL)和对照化合物组(500 nM), 受试化合物组6组(500 nM)。每个剂量设置三组平行组。在37℃培养10 min, 然后倒掉培养液, 用预冷的PBS洗涤细胞, 每孔内加40 μ L预冷好的裂解液 (RIPA buffer 10 mL和蛋白酶和磷酸酶抑制剂 100 μ L), 冰上裂解30 min。裂解完后, 超声波细胞粉碎机粉碎细胞, 于4℃下14000 rpm 离心20 min, 上清分装转移至新的1.5 mL 离心管中, 提取蛋白。p-Akt ELISA实验定量检测细胞内p-Akt蛋白水平。

配置系列浓度p-Akt标准溶液, 测定吸光度值, 绘制标准曲线。磷酸-Akt1(Ser473)夹心ELISA试剂盒购自细胞信号传导公司(目录号7160)。将抗体包被到96孔板中4℃过夜, 洗涤。包被后的平板使用2%牛血清白蛋白 (BSA) 封闭, 充分洗涤后, 用样品稀释液(供应于试剂盒中) 100 μ L添加至每个孔中稀释所提取的蛋白, 并且在4℃下孵育过夜。在用200 μ L 洗涤缓冲液(供应于试剂盒中) 洗涤4 次后, 添加100 μ L/孔检测抗体并且在37℃下孵育1 小时。4次洗涤后, 添加100 μ L的HRP-联第二抗体(供应于试剂盒中) 并且在37℃下孵育30分钟。最终洗涤后, 将100 μ L的TMB底物添加至每个孔中并且在37℃下孵育10 分钟, 用TMB作为底物检测信号, 因为TMB可被氧化为蓝色溶液。通过添加100 μ L/孔终止溶液来终止反应, 反应终止后一个小时内检测结果可以维持稳定。使用酶标仪记录每个孔在450nm和650nm下的值。通过从450nm处的读数中减去650nm处的读数(溶液本身的干扰)确定光密度 (OD)。根据OD值对应标准曲线, 得到各孔中的p-Akt浓度。

(2)数据处理: 各组数据以均数 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm \text{SEM}$)表示。将各阳性对照组(BDNF)、对照化合物组(同实施例 21 中的对照化合物)和各受试化合物组的检测结果与空白对照组的比值作为指标, 对比阳性对照组、对照化合物组和各受试化合物组的 p-Akt 检测结果。计量资料多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 及 LSD 两两事后检验, $P < 0.05$ 即认为有统计学差异。

(3) 实验结果: 实验结果如图 2 所示, 图 2 中可以清楚的观察到阳性对照组 (BDNF)、对照化合物组和各受试化合物组(实施例 1~5 和实施例 7)的 p-Akt 蛋白相对含量; 阳性对照组 p-Akt 蛋白相对含量 231%, 实施例 1~5 和实施例 7 的 p-Akt S473 蛋白相对含量分别为: $212.00 \pm 2.122\%$, $221.67 \pm 3.69\%$, $247.33 \pm 3.18\%$, $224.33 \pm 3.27\%$, $217.32 \pm 2.57\%$, $218.33 \pm 2.31\%$; 对照化合物的 p-Akt 蛋白相对含量为 $138.33 \pm 2.08\%$ 。

(4) 实验结论:

本发明实施例化合物对于 BDNF-TrkB 信号通路的下游信号 AKT 的激活效果与 BDNF 相当; 本发明化合物的 AKT 的激活效果显著优于对照化合物。本实验结果与实施例 21 Western blotting 实验结果相符。

实施例 23: 本发明化合物在亨廷顿疾病的转基因小鼠中的药效实验分析

本发明实施例化合物的活性, 通过以下实验进行说明。所有使用动物的实验操作

均根据IACUC 指南进行。

(1) **实验方法:** 7 周龄 N171-82Q HD 雄性小鼠与雌性 B6C3F1/J 杂种小鼠配对后得到新生小鼠, 21 日龄时将雄性小鼠分笼饲养, 取 0.5 cm 小鼠尾组织提取 DNA, 确定小鼠基因型, 得到实验所需 N171-82Q HD 小鼠和 WT 小鼠。随机分为 WT Vehicle 组 (正常小鼠)、WT 受试化合物组 (正常鼠给药组, 5 mg/kg/d, n=10)、HD Vehicle 组 (HD 鼠空白组, n=15)、HD 受试化合物组 (HD 鼠给药组 1~5, 5 mg/kg/d, n=10)。受试化合物混悬于 1%CMC-Na 溶液中, 灌胃给药至研究结束。每周测量一次体重。在小鼠第 12 周、18 周、24 周龄时进行行为学测试考察运动功能。20 周各取 3 例组织进行 western blotting 和免疫组化实验, 在 24 周进行 MRI 扫描, 研究结束时统计受试化合物对小鼠死亡率的影响。

(2) **数据处理:** 应用软件 Sigmaplot 13.0 对资料进行统计学分析, 各组数据以均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) 表示。行为学测试结果采用双因素 (基因型和处理因素) 方差分析 (Two-way ANOVA) 及两两事后比较检验, 体重数据的比较体重统计采用双因素 (基因型和年龄) 重复测量方差分析, 死亡率采用 Kaplan-Meier 方法统计。其它计量资料用单因素方差分析进行统计, $P < 0.05$ 即认为有统计学差异。

(3) 具体检查方法如下:

①行为学测试考察运动功能

通过转棒实验和三种规格平衡木实验评估小鼠运动功能, 穿越平衡木时间越短, 掉落潜伏期越长则证明小鼠运用协调能力越强。

斜坡平衡木实验: 采用 100 厘米长和 11 毫米宽的方形平衡木, 与水平地面呈 45 度角放置。平衡木末端放置以黑箱子 (12 $\times$ 12 $\times$ 12 厘米), 明亮的灯光照亮起始平台。在平衡木下方放置垫片提供缓冲, 以防动物从梁上脱落。在测试前 1 小时, 分别在距黑箱子八分之一、四分之一和全长距离处训练小鼠穿过梁 3 次。如果小鼠在训练期间停止走动, 手持长镊子轻轻按压尾部以鼓励运动。训练实验后, 小鼠在不会受到干扰的环境下休息至少一个小时。开始正式实验, 每个小鼠横穿平衡梁的最大时间截至 60 秒, 如果移动时间大于 60 秒, 则记录为 60 秒。

高空行走平衡木 (11 mm) 实验一: 采用 80 厘米长和直径为 11 毫米的圆形平衡木, 放置离地面约 50 cm 高度。以下步骤同斜坡平衡木实验。

高空行走平衡木 (5 mm) 实验二: 采用 80 厘米长和 5 毫米宽的方形平衡木, 放置离地面约 50 cm 高度。以下步骤同斜坡平衡木实验。

转棒实验: 小鼠疲劳转棒仪最大时间设置为 5 分钟, 加速度设置由 4 rpm 加至 40 rpm, 将小鼠放置到正在运转的转棒仪上, 开始计时, 记录小鼠保持在杆上的时间, 即为掉落潜伏期, 以此表示其运动协调能力。在转棒实验开始的前一天, 每只老鼠历经训练 5 分钟, 训练课程之后在笼中休息。第二天开始正式实验, 将小鼠放到转盘上进行三轮实验, 每次实验完毕休息 30 分钟, 进行下一轮实验。结果统计取三轮实验的平均值。

对 WT Vehicle 组、WT 受试化合物组、HD Vehicle 组、HD 受试化合物组的受试小鼠在四种运动功能考察实验中的表现进行统计, 实验结果如下表 2~表 5。

—29—

表 2 斜坡平衡木实验小鼠横穿平衡梁时间实验结果

组别	剂量 (mg/kg)	横穿平衡梁时间(s)		
		12w	18w	24w
WT Vehicle	1% CMC-Na	16.36±6.20	13.64±6.47	13.64±3.38
WT 受试化合物/实施例 1	5 mg/kg/d	18.82±28.33	12.45±6.23	15.50±6.11
HD Vehicle	1% CMC-Na	28.33±10.77 [#]	25.58±13.08 [#]	41.50±13.64 [#]
HD 受试化合物/实施例 1	5 mg/kg/d	15.18±3.95 ^{**}	14.09±3.18 ^{**}	18.09±6.02 ^{**}
HD 受试化合物/实施例 2	5 mg/kg/d	17.88±2.83 ^{**}	17.13±4.76 ^{**}	19.00±6.84 ^{**}
HD 受试化合物/实施例 3	5 mg/kg/d	13.64±6.90 ^{**}	14.37±5.81 ^{**}	15.43±4.58 ^{**}
HD 受试化合物/实施例 4	5 mg/kg/d	16.78±5.98 ^{**}	17.00±5.65 ^{**}	18.38±5.10 ^{**}
HD 受试化合物/实施例 5	5 mg/kg/d	14.94±6.59 ^{**}	16.67±5.77 ^{**}	18.58±7.34 ^{**}

注：与 WT Vehicle 组相比，[#] $P < 0.05$ ，与 HD Vehicle 组相比，^{**} $P < 0.05$ ， $n=10\sim15$ 。

5 表 3 高空行走平衡木（11 mm）实验一小鼠横穿平衡梁时间实验结果

组别	剂量(mg/kg)	横穿平衡梁时间(s)		
		12w	18w	24w
WT Vehicle	1% CMC-Na	7.73±1.49	7.91±2.88	10.91±3.53
WT 受试化合物/实施例 1	5 mg/kg/d	8.18±1.99	7.55±2.42	8.18±4.29
HD Vehicle	1% CMC-Na	11.08±3.92 [#]	11.92±7.66 [#]	27.75±18.29 [#]
HD 受试化合物/实施例 1	5 mg/kg/d	8.20±1.64 ^{**}	7.55±2.42 ^{**}	9.18±3.84 ^{**}
HD 受试化合物/实施例 2	5 mg/kg/d	8.98±1.75 ^{**}	8.59±2.18 ^{**}	9.68±2.97 ^{**}
HD 受试化合物/实施例 3	5 mg/kg/d	7.94±1.64 ^{**}	8.15±1.96 ^{**}	8.38±3.78 ^{**}
HD 受试化合物/实施例	5 mg/kg/d	8.57±2.12 ^{**}	8.99±2.29 ^{**}	9.38±2.94 ^{**}

—30—

例 4				
HD 受试化合物/实施	5 mg/kg/d	8.04±1.67**	8.61±3.25**	9.77±4.89**
例 5				

注：与 WT Vehicle 组相比， $^{\#}P < 0.05$ ，与 HD Vehicle 组相比， $^{**}P < 0.05$ ， $n = 10 \sim 15$ 。

表 4 高空行走平衡木（5 mm）实验二小鼠横穿平衡梁时间实验结果

组别	剂量 (mg/kg)	横穿平衡梁时间(s)		
		12w	18w	24w
WT Vehicle	1% CMC-Na	10.73±3.72	12.45±6.12	15.45±7.31
WT 受试化合物/实施	5 mg/kg/d	11.64±4.20	9.91±3.05	14.18±7.07
例 1				
HD Vehicle	1% CMC-Na	18.25±8.68 [#]	20.00±9.26 [#]	32.00±14.46 [#]
HD 受试化合物/实施	5 mg/kg/d	13.09±4.39**	12.09±3.27**	13.91±3.33**
例 1				
HD 受试化合物/实施	5 mg/kg/d	12.13±4.97**	13.96±2.74**	14.32±5.44**
例 2				
HD 受试化合物/实施	5 mg/kg/d	12.20±4.45**	12.99±4.72**	13.11±5.30**
例 3				
HD 受试化合物/实施	5 mg/kg/d	13.22±4.59**	13.88±5.63**	15.92±7.87**
例 4				
HD 受试化合物/实施	5 mg/kg/d	14.25±5.34**	14.98±5.05**	16.80±5.97**
例 5				

5 注：与 WT Vehicle 组相比， $^{\#}P < 0.05$ ，与 HD Vehicle 组相比， $^{**}P < 0.05$ ， $n = 10 \sim 15$ 。

表 5 转棒实验掉落潜伏期实验结果

组别	剂量(mg/kg)	掉落潜伏期(s)		
		12w	18w	24w
WT Vehicle	1% CMC-Na	86.64±27.05	83.68±24.74	81.88±37.95
WT 受试化合物/实施	5 mg/kg/d	98.33±30.03	78.97±23.84	73.72±18.25
例 1				
HD Vehicle	1% CMC-Na	86.09±22.01	66.18±16.68	49.76±22.15 [#]
HD 受试化合物/实施	5 mg/kg/d	95.90±23.32**	101.03±32.39**	83.55±29.07**

—31—

组别	剂量(mg/kg)	掉落潜伏期(s)		
		12w	18w	24w
例 1				
HD 受试化合物/实施例 2	5 mg/kg/d	98.89±21.35**	107.40±27.48**	89.67±30.76**
HD 受试化合物/实施例 3	5 mg/kg/d	94.15±30.15**	103.40±37.86**	90.06±33.45**
HD 受试化合物/实施例 4	5 mg/kg/d	95.09±27.23**	99.86±30.27**	79.15±34.17**
HD 受试化合物/实施例 5	5 mg/kg/d	98.19±29.17**	101.03±32.39**	81.71±30.15**

注：与 WT Vehicle 组相比， $^{\#}P < 0.05$ ，与 HD Vehicle 组相比， $^{**}P < 0.05$ ， $n=10\sim15$ 。

根据以上表 2~表 4 平衡木实验结果可知：与 WT Vehicle 对照组的小鼠相比，在第 12 周时，HD Vehicle 小鼠即表现出了运动缺失症状，18 周与第 12 周相比，HD 小鼠在平衡梁上的时间相当，第 24 周的 HD 小鼠运动功能急剧恶化，从第 12 到第 24 周，HD 小鼠穿越平衡梁的时间逐渐增加，这表明这些 N171-82Q HD 小鼠表现出了典型的进行性运动障碍。

相比于 HD Vehicle 组，HD 受试化合物组表现出对运动能力极好的改善作用。从三种规格的平衡木实验结果来看，在第 12 周、18 周、24 周三个时间点的所有实验，与 HD Vehicle 组相比，HD 受试化合物组穿越平衡梁所用时间均显著缩短 ($P < 0.05$)，与 WT Vehicle 组用时相当。

根据表 5 的转棒仪实验结果，与 WT Vehicle 组相比，HD Vehicle 组在第 12 周尚未表现出显著性的运动障碍，在第 18 周运动能力缺失，但无显著性差异；但在 24 周时运动能力显著下降 ($P < 0.05$)。相比于 HD Vehicle 组，HD 受试化合物组表现出对运动能力极好的改善作用。在第 12 周、18 周、24 周三个时间点的所有实验，与 HD Vehicle 组相比，HD 受试化合物组小鼠的掉落潜伏期均显著延长 ($P < 0.05$)；在第 24 周的实验结果中，HD 给药组的掉落潜伏期与 WT Vehicle 组小鼠相当。

综合平衡木实验和转棒仪实验证明本发明实施例所制备的受试化合物对 HD 模型小鼠表现出了极好的改善运动障碍的作用。

②体重和生存率研究

所有小鼠每周测量一次体重。每天对小鼠的生存情况进行监测，记录死亡情况，统计生存率。若小鼠被翻转放置后无法恢复到正常位置，并在轻轻刺激 30 秒后才开始运动也可认定为生命结束。

HD Vehicle 组小鼠整体开始死亡时间较早，在小鼠约七个月月龄时 (210 天)，11 只中有 6 只小鼠死亡，死亡率为 54.5%；HD 给药组小鼠仅死亡了 3 只，死亡率为 30%。由此可以说明本发明化合物可以推迟 HD 小鼠的发病时间。

③体内 MRI 扫描及脑体积测量

对 WT Vehicle 组、WT 受试化合物组、HD Vehicle 组和 HD 受试化合物组，给药至 24 周，每组各取 4 只小鼠进行体内 MRI 扫描及脑体积测量。采用 9.4 T 核磁共振成像仪，配备有三轴梯度和动物成像探头。用 1%异氟烷麻醉小鼠，监测呼吸，整个扫描过程中保持恒温。用三维的 T2 加权快速自旋回声序列技术获得图像，该技术成像分辨率和对比度足以自动对小鼠的大脑和子结构进行体积描述。其参数如下：回声时间（TE）/重复时间（TR） $1/4$ 40/700 ms，分辨率为 $1/4$ 0.1 × 0.1 × 0.1 毫米，回声列车长度为 $1/4$ 4，平均数 $1/4$ 2 和翻转角度为 $1/4$ 408。该仪器含有一个强大的 linux 集群，可以编码运行大型变形扩散度量映射（LDDMM），从而得到高强度标准化图像。这些转换编码了图像之间的形态差异，并可以基于变形形态学测量（DBM）来进行分析，以检测脑容量的区域变化。对全脑（Brain），纹状体（Neocortex）及神经皮层（CaudatePutamen）的体积进行分析。

用 MRI 扫描技术，通过对实验对象和模板图像之间的形态差异进行分析，并运用 LDDMM 方法对小鼠脑组织结构进行计算分析统计。实验结果见表 6，其中受试化合物实施例 1 的脑体积、纹状体体积和神经皮层体积统计结果见图 3，图 3 中 A 为全脑体积统计结果，图 3 中 B 为纹状体体积统计结果，图 3 中 C 为神经皮层体积统计结果。

表 6 MRI 检测全脑、纹状体及神经皮层的体积结果（mm³）

组别	剂量 (mg/kg)	MRI 检测结果/体积（mm ³ ）		
		全脑	纹状体	神经皮层
WT Vehicle	1% CMC-Na	472.03±17.29	84.99±3.94	19.45±0.683
WT 受试化合物/实施例 1	5 mg/kg/d	489.08±7.14	88.99±0.985	20.11±0.377
HD Vehicle	1% CMC-Na	424.02±12.423 [#]	73.53±1.637 [#]	17.18±0.381 [#]
HD 受试化合物/实施例 1	5 mg/kg/d	460.47±2.145 ^{**}	79.47±1.079 ^{**}	18.90±0.341 ^{**}
HD 受试化合物/实施例 2	5 mg/kg/d	449.97±7.279 ^{**}	79.10±0.976 ^{**}	18.68±0.598 ^{**}
HD 受试化合物/实施例 3	5 mg/kg/d	465.33±9.218 ^{**}	80.34±1.238 ^{**}	19.05±0.997 ^{**}
HD 受试化合物/实施例 4	5 mg/kg/d	461.31±3.451 ^{**}	79.03±1.834 ^{**}	18.59±0.899 ^{**}
HD 受试化合物/实施例 5	5 mg/kg/d	462.19±2.178 ^{**}	79.43±0.898 ^{**}	19.01±0.557 ^{**}

与 WT Vehicle 组相比，[#]*P* < 0.05，与 HD Vehicle 组相比，^{**}*P* < 0.05，n=4。

由上表 6 可知，与 WT Vehicle 鼠相比， HD Vehicle 小鼠显示出了显著的全脑区域、纹状体和神经皮层的萎缩。HD 鼠给予本发明实施例制备的受试化合物 1~5 (5mg/kg/d) 后，整个大脑、神经皮层和纹状体的萎缩程度显著降低 ($P<0.05$)。本发明受试化合物可阻止 HD 鼠的脑萎缩，给药 24 周后，HD 受试化合物组的整个大脑、神经皮层和纹状体的体积和正常的 WT Vehicle 鼠体积相当。

④DARPP32 蛋白水平的检测

多巴胺和 cAMP 调节的磷蛋白 (Dopamine and adenosine 3'5'-monophosphate-regulated phospho-protein, DARPP-32)，分子量为 32 kDa，是多巴胺信号级联的一个基本组成部分，HD 病理学的特征是在纹状体中大量丢失 MSNs，而 MSNs 可以表达高水平的 DARPP32，因此，DARPP32 可以作为 HD 模型中神经损伤和神经功能障碍的标志。各实验组小鼠待行为学评价全部完成，给药至 25 周时，每组各取 3 只老鼠，分离海马组织、纹状体、神经皮层组织，提取纹状体组织中的总蛋白，Western blotting 实验检测 DARPP 32 的蛋白水平。

纹状体组织中总蛋白的提取方法如下：将纹状体组织块置于 100 μ L 裂解液 (RIPA buffer 10 mL，蛋白酶抑制剂 100 μ L，磷酸酶抑制剂 100 μ L) 中，置于冰上裂解 30 min，超声波细胞粉碎机粉碎组织，于 4℃ 下 14000 rpm 离心 20 min。上清分装转移至新的 1.5 mL 离心管中，提取蛋白，Western blotting 实验检测 DARPP 32 蛋白水平。

Western blotting 实验测量 DARPP32 水平的结果如表 7 所示，其中受试化合物实施例 1 的 DARPP32 电泳图和 DARPP 32/ β -action 蛋白水平相对强度见图 4；图 4 中 A 为 DARPP32 电泳图，图 4 中 B 为 DARPP 32/ β -action 蛋白水平相对强度统计图。

表 7 DARPP32 水蛋白相对强度实验结果

组别	DARPP 32 蛋白相对强度
WT Vehicle	100.000 $\pm$ 4.948
WT 受试化合物/实施例 1	96.066 $\pm$ 5.805
HD Vehicle	56.168 $\pm$ 4.978 [#]
HD 受试化合物/实施例 1	96.971 $\pm$ 3.607 ^{**}
HD 受试化合物/实施例 2	96.113 $\pm$ 2.681 ^{**}
HD 受试化合物/实施例 3	97.032 $\pm$ 3.887 ^{**}
HD 受试化合物/实施例 4	97.348 $\pm$ 3.438 ^{**}
HD 受试化合物/实施例 5	96.797 $\pm$ 3.018 ^{**}

注：与 WT Vehicle 组相比，[#] $P < 0.05$ ，与 HD Vehicle 组相比，^{**} $P < 0.05$ ，n = 3。

由表 7 可知，与 WT Vehicle 组相比，HD Vehicle 组的纹状体中 DARPP-32 的水平显著降低；与 HD Vehicle 组相比，HD 受试化合物组（实施例 1~5，5 mg/kg/d）鼠的纹状体中 DARPP-32 的水平均显著升高。

上述实验结果显示：在 HD 小鼠的纹状体中，DARPP-32 的水平显著降低 ($P <$

0.05)，说明HD小鼠的纹状体存在神经损伤和神经功能障碍；HD受试化合物组DARPP-32的水平相较于HD Vehicle组显著升高，表明本发明实施例制备的受试化合物有效阻止了DARPP32的这种损失，进而可以有效治疗神经损伤和神经功能障碍。

⑤免疫组化法观察小鼠神经皮层中 mHtt 蛋白聚集体的情况

5 各实验组小鼠待行为学评价全部完成，给药至25周时，每组各取3只老鼠，用于检测DARPP 32 蛋白水平小鼠分离出的右侧脑于4%多聚甲醛中后固定24 h，经后固定的脑组织再放入30%蔗糖溶液中至沉底后，用冰冻切片机沿冠状切取厚度为35 μm的脑片置于DPBS中储存。取储存的脑片，PBS漂洗一次，封闭用1 mL山羊血清+9 mL PBS+1% TritonX-100，常温置于摇床封闭2~3h。封闭完成后，用PBS漂洗3次，每次5
10 min，用小毛笔刷将脑片取出放于添加了一抗（anti-Huntingtin，clone mEM48，1:25，mouse，一抗用封闭液配制）的24孔板中进行孵育，置于-4℃冷室摇床过夜。PBS洗涤后，放于添加了二抗的24孔板中（555，anti-mouse）进行洗涤，置于室温摇床孵育2 h。PBS洗涤后，放入含有800μL DAPI（用PBS配制，1:10000）的24孔板中进行染色，室温摇床10 min。再将脑片取出放在含有800μL PBS的24孔板中洗1次，10 min，
15 室温摇床。将载玻片放平于实验台上，正面朝上，在载玻片上滴加PBS，脑片在PBS上展开。等待晾干后，EM48抗体（anti-Huntingtin）对mHtt蛋白进行免疫荧光染色，拍照观察。

脑组织免疫荧光染色后，对右侧大脑皮层中的六个视野的 mHtt 蛋白聚集的细胞进行计数，取平均值进行分析统计。大脑皮层中具有 mHtt 蛋白聚集的平均细胞数量统计结果如表 8 所示。其中受试化合物实施例 1 的 EM48 抗体免疫染色的神经皮层代表性图像如图 5 所示，Scale bars 为 50 μm，其中浅色点即为具有 mHtt 蛋白聚集的细胞。

表 8 大脑皮层中具有 mHtt 蛋白聚集的平均细胞数量统计结果

组别	具有 mHtt 蛋白聚集的平均细胞数量
HD Vehicle	228.489±24.035
HD 受试化合物/实施例 1	152.500±7.920*
HD 受试化合物/实施例 2	158.449±13.260*
HD 受试化合物/实施例 3	148.794±10.157*
HD 受试化合物/实施例 4	155.286±9.567*
HD 受试化合物/实施例 5	151.687±8.365*

注：与 HD Vehicle 组相比，* $P < 0.05$ ， $n=3$ 。

25 由表 8 的实验结果表明，HD 小鼠神经皮层中具有明显的 mHtt 蛋白聚集，本发明受试化合物可以显著减少 HD 小鼠大脑皮层中的 mHtt 蛋白聚集（* $P < 0.05$ ）。

（4）实验结论：

① 本发明受试化合物在行为学测试中表现出了卓越的挽救 HD 小鼠运动功能障碍的性能，显著提高 HD 小鼠的运动协调能力，在第 12 周、18 周、24 周三个时间点，

—35—

各 HD 受试化合物组小鼠在三种规格平衡木实验中穿越横梁的时间均与 Vehicle 处理的 HD 小鼠相当；24 周给药的转棒法实验中，给药组 HD 小鼠掉落潜伏期明显增长，各 HD 受试化合物组小鼠的掉落潜伏期与 WT Vehicle 组小鼠相当。

5 ② 本发明受试化合物可以推迟 HD 小鼠的发病时间，延长 HD 小鼠的发病潜伏期。

③ 本发明受试化合物大大的减弱了 HD 小鼠整个大脑、神经皮层和纹状体的萎缩程度。

④ 本发明受试化合物可阻止 HD 小鼠纹状体中 DARPP32 的损失，保持纹状体内 DARPP32 水平，改善 HD 小鼠纹状体中的 MSNs 的功能。

10 ⑤ 本发明受试化合物减少 HD 小鼠神经皮层中 mHtt 蛋白聚集体从而减弱神经元的损伤。

本项实验证明本发明受试化合物具有显著的神经保护作用，可以用于治疗神经系统疾病。

15 **实施例 24：** 本发明化合物对永久性脑缺血损伤大鼠的保护作用

(1) **实验方法：** SD 大鼠，雄性，220-250g 左右，由西安交通大学医学院实验动物中心提供。每 14 只/组，随机分组。分为假手术 (Sham) 组，模型 (Model) 组、阳性对照依达拉奉 (Edaravone) 组和受试化合物组 (1~5)。手术前 12 小时禁食，自由饮水，运用线栓阻塞中脑动脉的造模方法造模。大鼠麻醉后固定与木板上，近心端结扎颈总动脉，远心端结扎颈外动脉，保留颈内动脉入颅骨主干。在颈内动脉分叉处预留结扎线，使用动脉夹暂时夹闭颈内动脉远端，在颈总动脉分叉处剪一小口，插入 5cm 长且顶端烧制为直径 0.3 mm 的圆球状 3-0 尼龙线，松开动脉夹，将线栓缓缓推进 18~20 mm 处，有阻力时停止进线，此时尼龙线栓进入中动脉并阻断血流，缺血期开始，缝合皮肤。假手术组除不插入线栓外，其余步骤同上。

25 缺血后 0 h、3 h、6 h 和 12 h 各给一次药，之后分别在每天给药一次，连续给药 7 天。受试化合物以 1%CMC-Na 溶液配置成 4 mg/mL 的溶液，口服灌胃给药，依达拉奉组静脉给药剂量 0.078 mg/kg。

① 缺血后密切观察小鼠的活动，记录其死亡情况，对小鼠缺血后 6 h、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d 的死亡率进行统计。

30 ② 提鼠尾离开地面约 1 尺，观察两前肢状况；将大鼠置于水平地面，推动其双肩，观察两侧抵抗力有无差异；大鼠置于地面，观察其行走情况。采用五级四分评分法 (0~4 分)，分数越高，说明其神经行为损伤越严重。

0 分：行为完全正常为；

1 分：提起鼠尾离开地面，手术对侧前肢内旋、内收；

35 2 分：大鼠置地面，用手挤压两侧检查其抗力，手术对侧抗力下降；

3 分：大鼠置地面，观察其行走，围绕手术对侧转圈；

4 分：损伤极其严重，已无法自主活动。

③ 缺血 7 天后脑梗死体积百分比：TTC 染色观察梗死面积。

—36—

各组大鼠手术再灌 24h 后脊椎脱臼处死，迅速剥离出脑组织，放于冰箱-20℃冻至适当硬度去除嗅球、小脑和低位脑干，以 1mm 间隔行连续冠状切片，共 5 片，放入 0.5%氯化三苯基四氮唑（TTC）磷酸盐缓冲液中（pH=7.4），37℃孵育恒温箱内避光孵育 15 min，后置于多聚甲醛中固定后观察（固定时间以 24h 以内为宜），正常脑组织着玫瑰红色，梗塞脑组织呈苍白色。拍照后将切片扫描入扫描仪中保存图像。运行 Image J 处理软件，计算脑梗死面积及层面总面积。

脑梗塞体积（%）=（手术对侧半球的体积—手术侧半球未梗塞部分的体积）/手术对侧半球的体积×100%

（2）数据统计分析：应用 SPSS18.0 统计软件，进行统计学分析，各组数据以均值±标准误（ $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ）表示，计量资料多组均数比较采用单因素方差分析及组间多重比较，行为学评分等级资料采用秩和检验，死亡率采用 Kaplan-Meier 方法统计。P < 0.05 即认为有统计学差异。

（3）实验结果

①对缺血 6 h、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d 各时间点进行神经行为学评分，评估受试化合物对永久性脑缺血大鼠神经行为学的影响，实验结果如下表 9 所示。

表 9 受试化合物对永久性脑缺血大鼠神经行为学的影响（ $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ）

组别	剂量 (mg/kg)	6 h	1 d	2 d	3 d
Sham	NS	0.92±0.08	0.42±0.15	0.42±0.15	0.33±0.14
Model	NS	2.53±0.21 [#]	2.58±0.23 [#]	2.63±0.33 [#]	3±0.38 [#]
Edaravone	0.078	2±0.18	2.36±0.29	2.89±0.31	2.38±0.37
受试化合物/实施例 1	20	2.07±0.22	2.11±0.2	1.88±0.35	2.13±0.23**
受试化合物/实施例 2	20	2.13±0.17	2.04±0.13	2.20±0.25	1.98±0.45**
受试化合物/实施例 3	20	1.98±0.25	2.23±0.34	1.91±0.26	1.87±0.33**
受试化合物/实施例 4	20	2.23±0.36	1.99±0.36	1.85±0.45	2.23±0.36**
受试化合物/实施例 5	20	2.03±0.29	1.86±0.44	1.75±0.25	1.94±0.23**
组别	剂量 (mg/kg)	4d	5d	6d	7d
Sham	NS	0.33±0.14	0.33±0.141	0.58±0.15	0.5±0.15
Model	NS	2.5±0.38 [#]	2±0.19 [#]	2.25±0.25 [#]	2.5±0.33 [#]

—37—

Edaravone	0.078	2±0.33	2.14±0.46	2±0.31	1.67±0.21**
受试化合物/实施例 1	20	1.88±0.35	2±0.38	1.86±0.34	1.17±0.17**
受试化合物/实施例 2	20	1.87±0.27	2.11±0.16	1.79±0.28	1.21±0.22**
受试化合物/实施例 3	20	1.74±0.26	1.63±0.20	1.78±0.34	1.01±0.27**
受试化合物/实施例 4	20	1.54±0.27	1.78±0.11	1.68±0.27	1.12±0.23**
受试化合物/实施例 5	20	1.85±0.34	1.93±0.20	1.72±0.44	1.19±0.30**

注：与 Sham 组相比， $^{\#}P < 0.05$ ；与 Model 组相比， $^{**}P < 0.05$ 。n 为实验各组动物起始数量

由表 9 可知，在所有时间点，Model 组与 Sham 组均表现出了显著性差异，说明造模成功。缺血后第 0~3 天，模型组行为学症状有进行性加重的趋势，随后有所缓解。阳性对照依达拉奉组仅在第 7 天表现出了差异。Model 组第 3 天和第 7 天的神经行为学评分分别为 3 ± 0.38 和 2.5 ± 0.33 ，受试化合物实施例 1~5（20 mg/kg）给药后第 3 天和第 7 天神经行为学评分分别为 $1.87\pm0.33\sim2.23\pm0.36$ 和 $1.01\pm0.27\sim1.21\pm0.22$ ，因此，受试化合物（20 mg/kg）组给药后第 3 天和第 7 天的神经行为学评分均显著低于模型组（ $P<0.05$ ），本实验证明了本发明受试化合物能够有效减轻大鼠的神经行为学症状。

②大鼠取脑进行 TTC 染色，正常脑组织着玫瑰红色，梗死区为白色。统计各组的脑梗死体积百分比结果见表 10。假手术组（Sham）、模型组（Model）、对照组（Edaravone）和其中 1 组受试化合物组（实施例 1 化合物）的脑组织 TTC 染色实验结果如图 6 所示。

表 10 受试化合物对永久性脑缺血大鼠脑梗死体积的影响

组别	剂量 (mg/kg)	脑梗死体积百分比 (%)
Sham	NS	0
Model	NS	44.40±6.31
Edaravone	0.078	33.50±7.21
受试化合物/实施例 1	20	19.58±9.56
受试化合物/实施例 2	20	19.93±8.89
受试化合物/实施例 3	20	20.93±7.65

—38—

受试化合物/实施例 4	20	21.33±7.68
受试化合物/实施例 5	20	20.50±6.38

由表 10 可知，Model 组梗死体积百分比为 $44.4\% \pm 6.31\%$ ，说明造模成功。实施例 1~5 所制备的受试化合物（20mg/kg）组能够减少梗死体积，梗死体积百分比为 $19.58\% \pm 9.56\% \sim 21.33\% \pm 7.68\%$ ，因此本实验结果证明受试化合物实施例 1~5（20 mg/kg）可显著降低脑梗死体积（ $P < 0.05$ ）。

5 （4）实验结论：

本实验证明受试化合物对永久性脑缺血损伤有保护作用，能减轻大鼠的行为学症状，减少脑梗死体积。

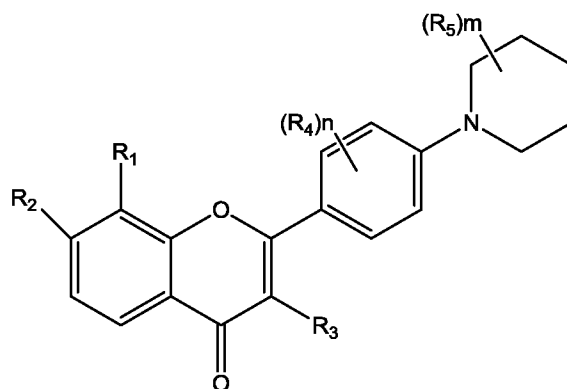
综合上述实验结果，本发明化合物对神经系统退行性病变和中枢性脑损伤具有保护和治疗作用。

10 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

—39—

权 利 要 求

- 1、一种用于治疗神经系统疾病的化合物，其特征在于，其为式 (I) 所示化合物，或式 (I) 所示化合物的立体异构体、几何异构体、互变异构体、溶剂化物、代谢产物、药学上可接受的盐，或式 (I) 所示化合物的前药：



式 (I)

- 其中， R_1 和 R_2 独立选自 -OH、-NH₂、F、Cl、Br、C₁-C₁₂ 烷基、C₁-C₁₂ 羟基烷基、C₁-C₁₂ 杂烷基、C₁-C₁₂ 卤代烷基、C₁-C₁₂ 烷氧基、C₁-C₁₂ 烷基氨基、-OC(=O) R_6 和 -NHC(=O) R_7 ； R_6 和 R_7 独立选自 C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基和 C₁-C₆ 烷基氨基；

R_3 为 H、D、F、Cl 或 Br；

R_4 和 R_5 独立选自 H、D、F、Cl、Br、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、C₁-C₆ 烷基氨基和 C₁-C₆ 烷基氨基；m 和 n 各自独立地为 0、1、2、3 或 4。

- 2、根据权利要求 1 所述化合物，其特征在于，所述 R_1 和 R_2 独立选自 -OH、-NH₂、F、C₁-C₆ 羟基烷基、C₁-C₆ 杂烷基、C₁-C₆ 烷氧基和 C₁-C₆ 烷基氨基。

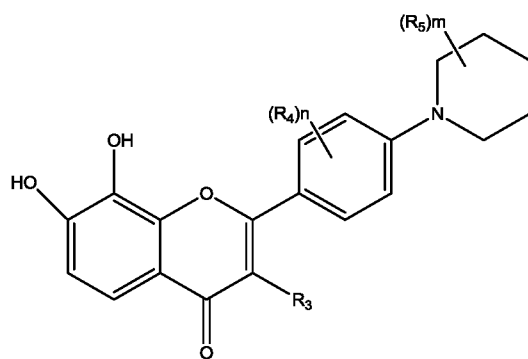
3、根据权利要求 1 或 2 所述化合物，其特征在于，所述 R_1 和 R_2 独立选自 -OH、-NH₂、F 和 -OCH₃。

- 4、根据权利要求 1 所述化合物，其特征在于，所述 R_4 和 R_5 独立选自 H、D、F、Cl、Br、-CH₃、-CH₂CH₃、-CH₂CH₂CH₃、-CH(CH₃)₂、-N(CH₃)₂、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-OCH₂CH₂CH₃ 和 -OCH(CH₃)₂。

5、根据权利要求 1 所述化合物，其特征在于，所述 m 和 n 各自独立地为 0、1 或 2。

- 6、根据权利要求 1 所述化合物，其特征在于，式 (I) 所示化合物具有式 (II) 所示结构：

—40—



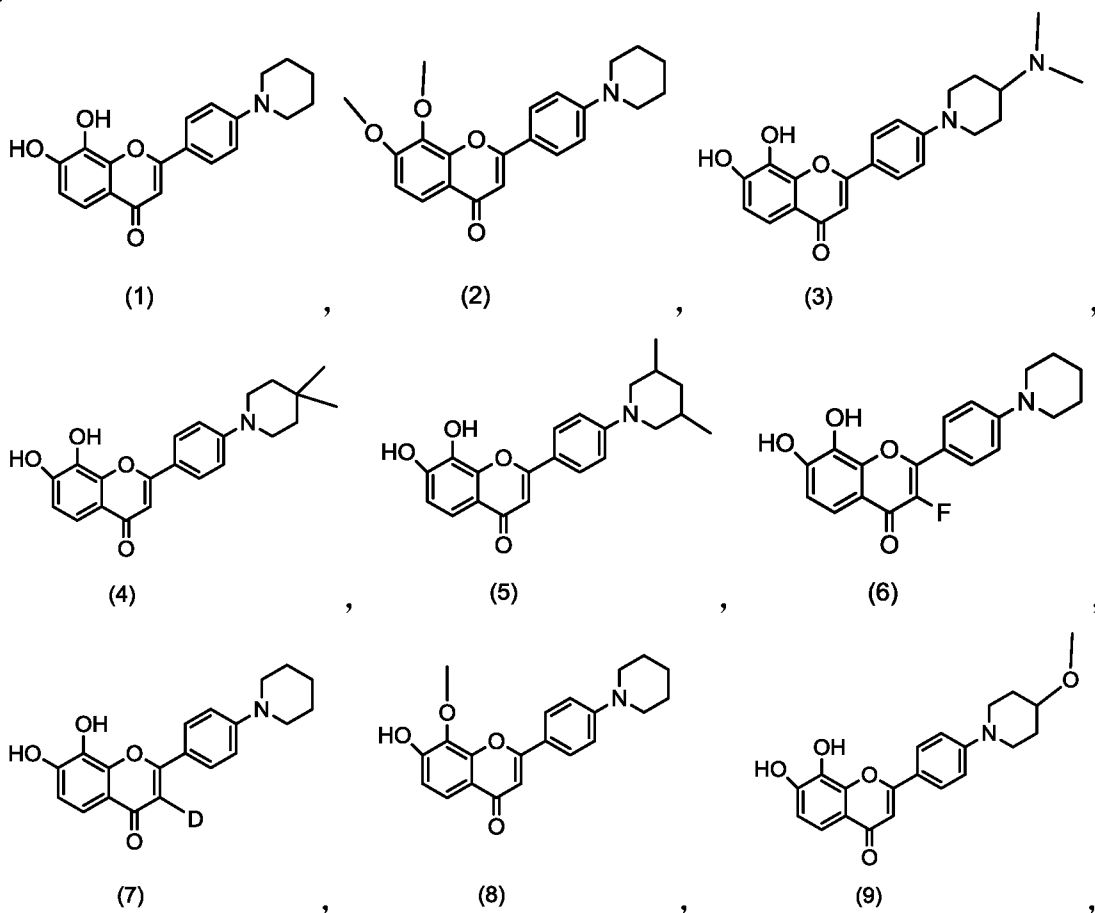
式 (II)

其中, R_3 为 H、D、F、Cl 或 Br;

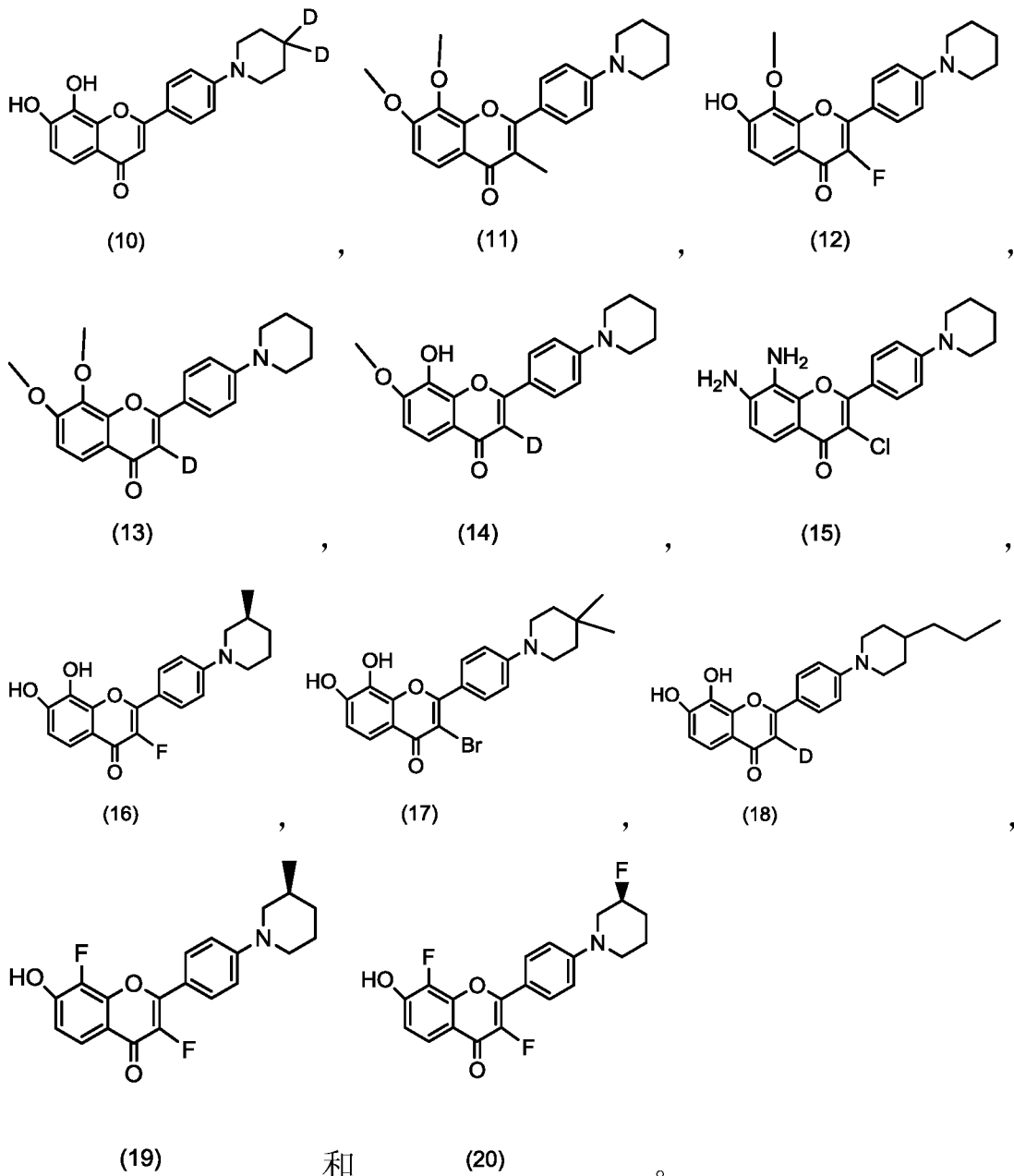
R_4 和 R_5 独立选自 H、D、F、Cl、Br、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、
5 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 和 $-\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$;

m 和 n 各自独立地为 0、1 或 2。

7、根据权利要求 1 所述化合物, 其特征在于, 式 (I) 所示化合物为如下之一化合物:



—41—



5 8、一种药物组合物，其特征在于，包含权利要求 1~7 任一项所述的化合物。

9、根据权利要求 8 所述药物组合物，其特征在于，还包括药学上可接受辅料和/或其他神经系统疾病治疗药物，所述其他神经系统疾病治疗药物包括用于治疗亨廷顿病的药物、用于治疗帕金森病的药物、用于治疗抑郁症的药物、用于治疗运动失调的药物、用于治疗脑卒中的药物、用于治疗中枢神经系统损伤疾病的药物、用于治疗肌萎缩侧索硬化的药物和用于治疗多发性硬化症的药物。

10、权利要求 1-7 中任一项所述的化合物和权利要求 8-9 任一项所述的药物组合物在制备用于预防或治疗神经系统疾病的药物中的用途。

11、根据权利要求 10 所述的用途，其特征在于，所述神经系统疾病包括神经元损伤、神经元退化、脑萎缩相关疾病或病症、中枢神经系统损伤、脑卒中、抑郁症、
 15 焦虑症、肌萎缩侧索硬化、阿尔茨海默氏病、自闭症、亨廷顿病、瑞特综合征、癫痫

—42—

症、帕金森氏病、创伤后应激障碍、糖尿病性神经病变、多发性硬化症、周围神经病。

12、权利要求 1-7 中任一项所述的化合物和权利要求 8-9 任一项所述的药物组合物在制备用于激动 TrkB 受体的药物中的用途。

5 13、一种用于激动 TrkB 受体的方法，包括向有需要的个体或样本给予有效量的权利要求 1~7 任一项所述的化合物或权利要求 8~9 任一项所述的药物组合物。

14、一种用于预防、治疗或减轻神经系统疾病的方法，包括向有需要的个体给予治疗有效量的权利要求 1~7 任一项所述的化合物或权利要求 8~9 任一项所述的药物组合物。

10 15、根据权利要求 14 所述的方法，其中，所述神经系统疾病包括神经元损伤、神经元退化、脑萎缩相关疾病或病症、中枢神经系统损伤、脑卒中、抑郁症、焦虑症、肌萎缩侧索硬化、阿尔茨海默氏病、自闭症、亨廷顿病、瑞特综合征、癫痫症、帕金森氏病、创伤后应激障碍、糖尿病性神经病变、多发性硬化症、周围神经病。

—1/3—

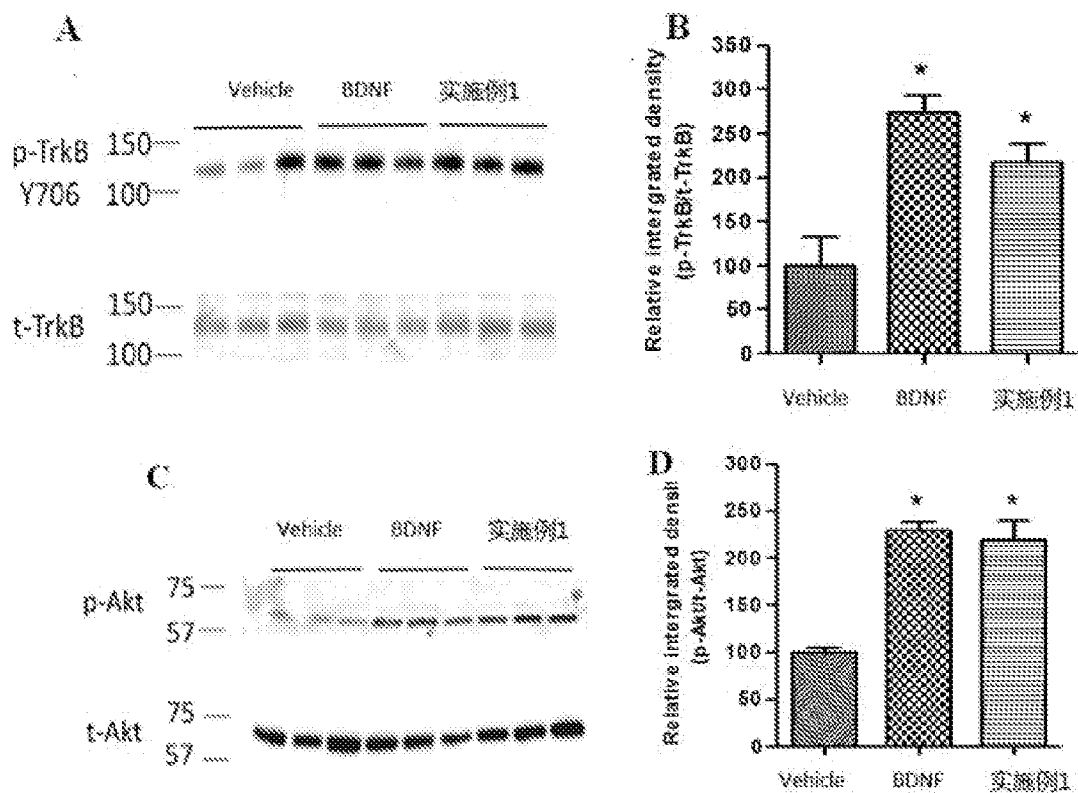


图 1

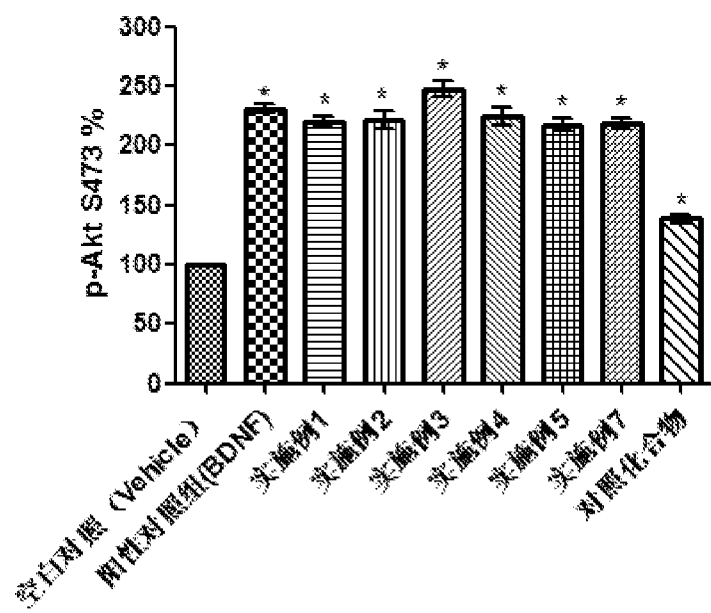


图 2

—2/3—

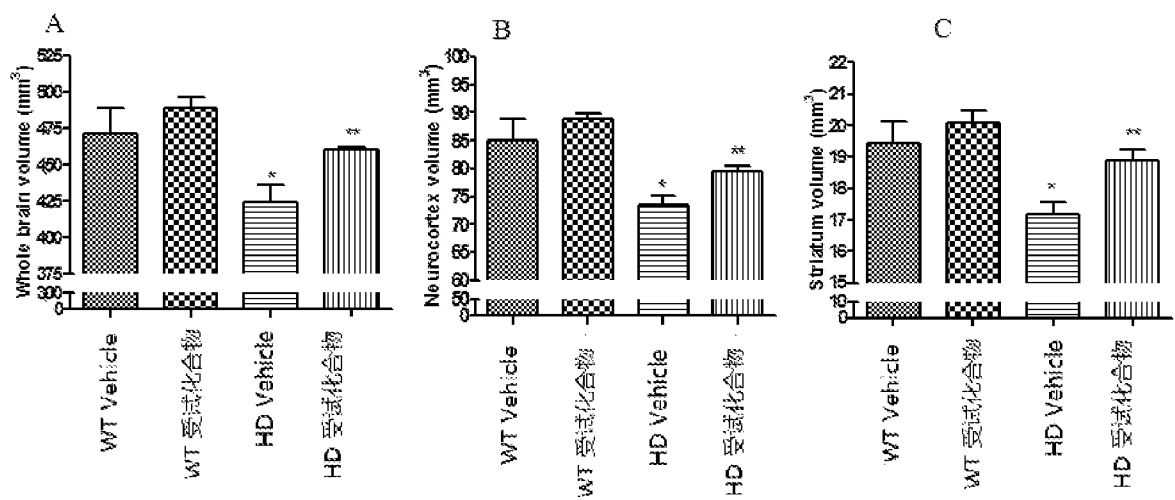


图 3

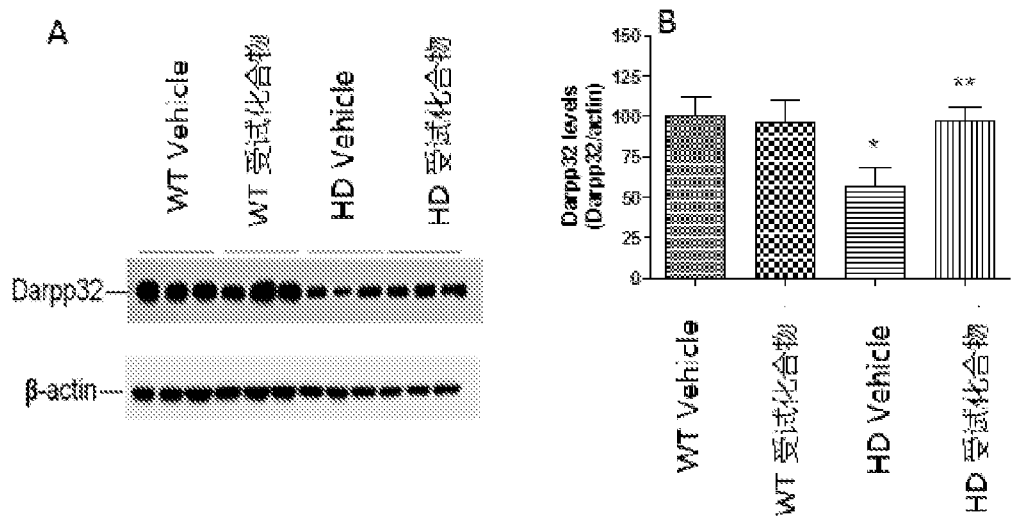


图 4

—3/3—

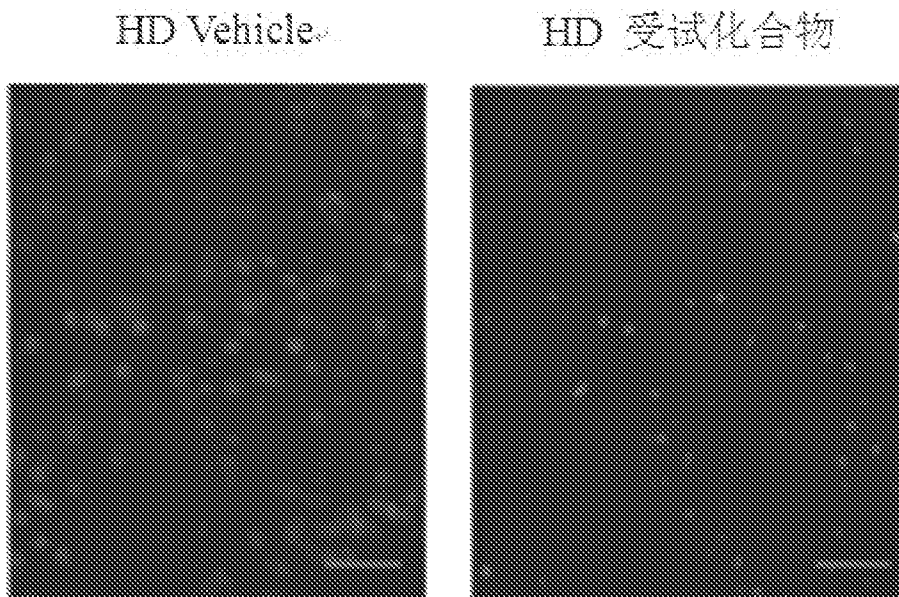


图 5

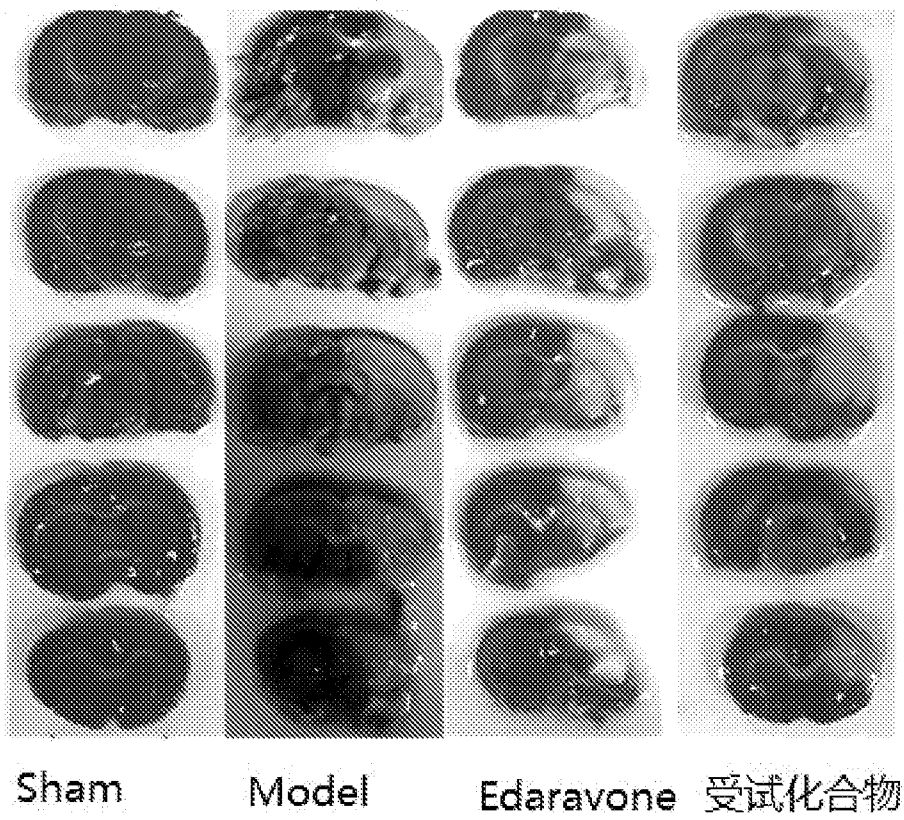


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/098578

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 311/30(2006.01)i; C07D 405/10(2006.01)i; A61K 31/352(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D311/- C07D405/- A61K31/- A61P25/- A61P9/- A61P3/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; VEN; CNTXT; ISI WEB OF SCIENCE; CNKI; STN; EPTXT; USTXT; WOTXT; 万方; WANFANG; 陕西麦科奥特科技有限公司, 王瑞玲, 丁伟, 付国琴, 神经系统, 色烯-4-酮, 哌啶, 黄酮, +piperidin+, +chromen-4-one, TrkB, neurolog+, 结构式I, formula I

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 104487429 A (EMORY UNIVERSITY) 01 April 2015 (2015-04-01) description, paragraphs [0014]-[0027]	1-15
A	US 20140275156 A1 (NEUPROTECT PTY LTD.) 18 September 2014 (2014-09-18) entire document	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 August 2019

Date of mailing of the international search report

12 October 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/098578

Box No. II **Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **13-15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claim 13 relates to a method for agonizing a TrkB receptor, and claims 14 and 15 relate to a method for preventing, treating or alleviating nervous system diseases, which are a treatment method practiced on a living human or animal body and for the immediate purpose of the treatment of diseases, and fall within the cases set forth in PCT Rule 39.1(iv) for which an international search is not required.
 - [2] The search on claims 13-15 is provided based on the reasonable expectation of amending same into the following: the subject matter of claim 13 is amended to be "a use of a compound as claimed in any one of claims 1-7 or a pharmaceutical composition as claimed in any one of claims 8 and 9 in the preparation of a drug for agonizing a TrkB receptor", the subject matter of claim 14 is amended to be "a use of a compound as claimed in any one of claims 1-7 or a pharmaceutical composition as claimed in any one of claims 8 and 9 in the preparation of a drug for preventing, treating or alleviating nervous system diseases", and the subject matter of claim 15 is amended to be "a use according to claim 14".
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/098578

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	104487429	A	01 April 2015	CN	104487429	B	14 July 2017
				EP	2877461	A1	03 June 2015
				EP	2877461	A4	23 March 2016
				US	2018280342	A1	04 October 2018
				WO	2014018741	A1	30 January 2014
				US	2015191481	A1	09 July 2015
				US	2017165225	A1	15 June 2017
				US	2019160040	A1	30 May 2019
				US	9593125	B2	14 March 2017
				EP	2877461	B1	09 May 2018
				US	10010526	B2	03 July 2018
US	20140275156	A1	18 September 2014	AU	2012292967	B2	17 September 2015
				JP	6122431	B2	26 April 2017
				CA	2844511	A1	14 February 2013
				JP	2014522869	A	08 September 2014
				EP	2742033	B1	19 September 2018
				AU	2012292967	A1	21 March 2013
				AU	2012292967	A9	20 February 2014
				WO	2013020184	A9	18 April 2013
				EP	2742033	A4	29 July 2015
				EP	2742033	A1	18 June 2014
				WO	2013020184	A1	14 February 2013

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/098578

A. 主题的分类

C07D 311/30(2006.01)i; C07D 405/10(2006.01)i; A61K 31/352(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07D311/- C07D405/- A61K31/- A61P25/- A61P9/- A61P3/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS;VEN;CNTXT;ISI WEB OF SCIENCE;CNKI;STN;EPTXT;USTXT;WOTXT;万方:陕西麦科奥特科技有限公司, 王瑞玲, 丁伟, 付国琴, 神经系统, 色烯-4-酮, 哌啶, 黄酮, +piperidin+, +chromen-4-one, TrkB, neurolog+, 结构式I

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 104487429 A (爱默生大学) 2015年 4月 1日 (2015 - 04 - 01) 说明书第[0014]-[0027]段	1-15
A	US 20140275156 A1 (NEUPROTECT PTY LTD) 2014年 9月 18日 (2014 - 09 - 18) 全文	1-15

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2019年 8月 16日

国际检索报告邮寄日期

2019年 10月 12日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局 (ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

王瑞

电话号码 (86-512)88996909

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 13-15
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
 - [1] 权利要求13涉及用于激动TrkB受体的方法，权利要求14、15涉及预防、治疗或减轻神经系统疾病的方法，是以有生命的人体或动物体为实施对象，以治疗疾病为直接目的的疾病的治疗方法，属于PCT细则39.1(iv)中所列的无需进行国际检索单位检索的情形。
 - [2] 对权利要求13-15的检索是基于合理预期将其作如下修改作出的：权利要求13的主题修改为“权利要求1-7任一项所述的化合物或权利要求8-9任一项所述的药物组合物在制备用于激动TrkB受体的药物中的用途”，权利要求14的主题修改为“权利要求1-7任一项所述的化合物或权利要求8、9任一项所述的药物组合物在制备用于预防、治疗或减轻神经系统疾病的药物中的用途”，权利要求15的主题修改为“根据权利要求14所述的用途”。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/098578

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	104487429	A	2015年 4月 1日	CN	104487429	B	2017年 7月 14日
				EP	2877461	A1	2015年 6月 3日
				EP	2877461	A4	2016年 3月 23日
				US	2018280342	A1	2018年 10月 4日
				WO	2014018741	A1	2014年 1月 30日
				US	2015191481	A1	2015年 7月 9日
				US	2017165225	A1	2017年 6月 15日
				US	2019160040	A1	2019年 5月 30日
				US	9593125	B2	2017年 3月 14日
				EP	2877461	B1	2018年 5月 9日
				US	10010526	B2	2018年 7月 3日
US	20140275156	A1	2014年 9月 18日	AU	2012292967	B2	2015年 9月 17日
				JP	6122431	B2	2017年 4月 26日
				CA	2844511	A1	2013年 2月 14日
				JP	2014522869	A	2014年 9月 8日
				EP	2742033	B1	2018年 9月 19日
				AU	2012292967	A1	2013年 3月 21日
				AU	2012292967	A9	2014年 2月 20日
				WO	2013020184	A9	2013年 4月 18日
				EP	2742033	A4	2015年 7月 29日
				EP	2742033	A1	2014年 6月 18日
				WO	2013020184	A1	2013年 2月 14日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)