



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107260726 A

(43)申请公布日 2017. 10. 20

(21)申请号 201710491989.4

(22)申请日 2012.08.27

(30)优先权数据

61/527,584 2011.08.25 US

61/527,963 2011.08.26 US

(62)分案原申请数据

201280052588.4 2012.08.27

(71)申请人 考格尼申治疗股份有限公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 S.M.卡塔拉诺 G.里什顿

N.J.伊佐

(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

代理人 龙淳 张燕

(51)Int.Cl.

A61K 31/4035(2006.01)

A61K 31/445(2006.01)

A61K 31/438(2006.01)

A61K 31/495(2006.01)

A61K 31/472(2006.01)

A61K 31/137(2006.01)

A61K 31/4453(2006.01)

A61K 31/4406(2006.01)

A61K 31/4402(2006.01)

A61K 31/4409(2006.01)

A61K 31/166(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

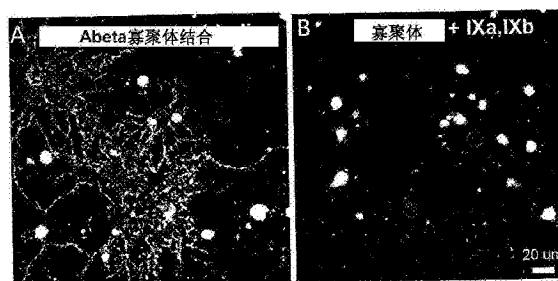
权利要求书8页 说明书173页 附图21页

(54)发明名称

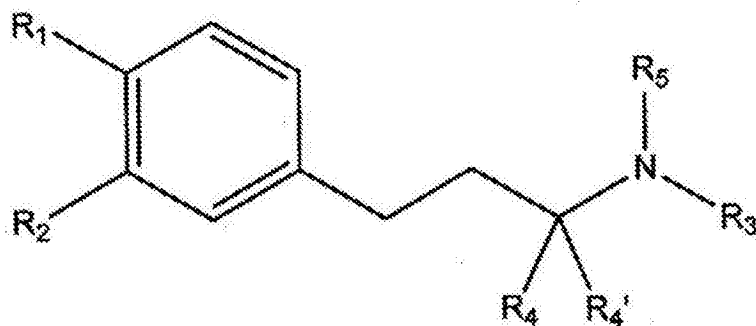
用于治疗神经退行性疾病的组合物和方法

(57)摘要

本发明涉及在用于抑制神经元细胞中Abeta相关的突触损失或突触功能障碍、调节神经元细胞中Abeta相关的膜运输改变以及治疗与Abeta病理相关的认知衰退的方法中使用 σ -2受体拮抗剂以及包括这样的化合物的药物组合物,更广泛地为使用这样的化合物和组合物来治疗与Abeta病理相关的神经退行性疾病和病症。本发明还涉及基于化合物与 σ -2受体结合的能力来筛选其在抑制认知衰退中的活性的方法。



1. 选择性 σ -2受体拮抗剂化合物在制备用于抑制 β 淀粉样蛋白对神经元细胞的作用的药物中的用途,其中所述化合物是式VIIIq及其药学上可接受的盐:



(VIIIq)

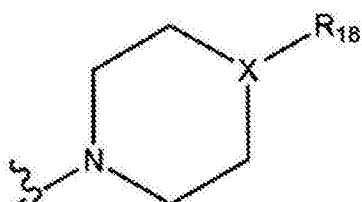
其中

R_1 和 R_2 独立地选自H、OH、卤素、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷基、 $(R_{16})(R_{17})N-C_{1-4}$ 亚烷基-O-,或者 R_1 和 R_2 连接在一起形成-O- C_{1-2} 亚甲基-O-基团,其中

R_{16} 和 R_{17} 独立地为 C_{1-4} 烷基或苄基,或者 R_{16} 和 R_{17} 与氮一起形成选自



和



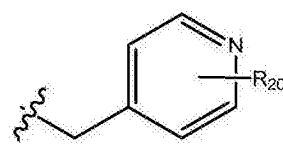
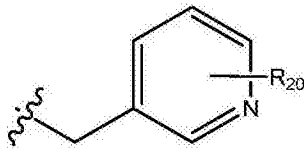
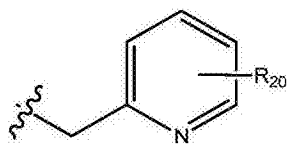
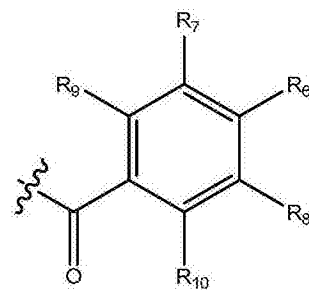
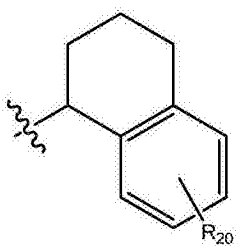
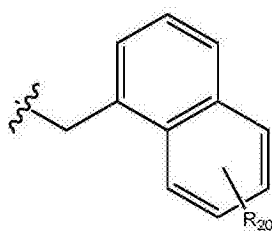
的环,其中

X是N或O,且 R_{18} 为H或未被取代的苯基;且

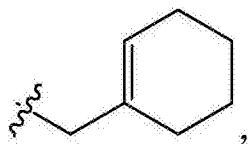
其中 R_1 和 R_2 中的至少一个不是H;并且其中

(A)

R_3 选自



和



其中

R₆、R₇、R₈、R₉和R₁₀独立地选自H、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷基和S(O)₂-C₁₋₆烷基；

R₂₀为H；且

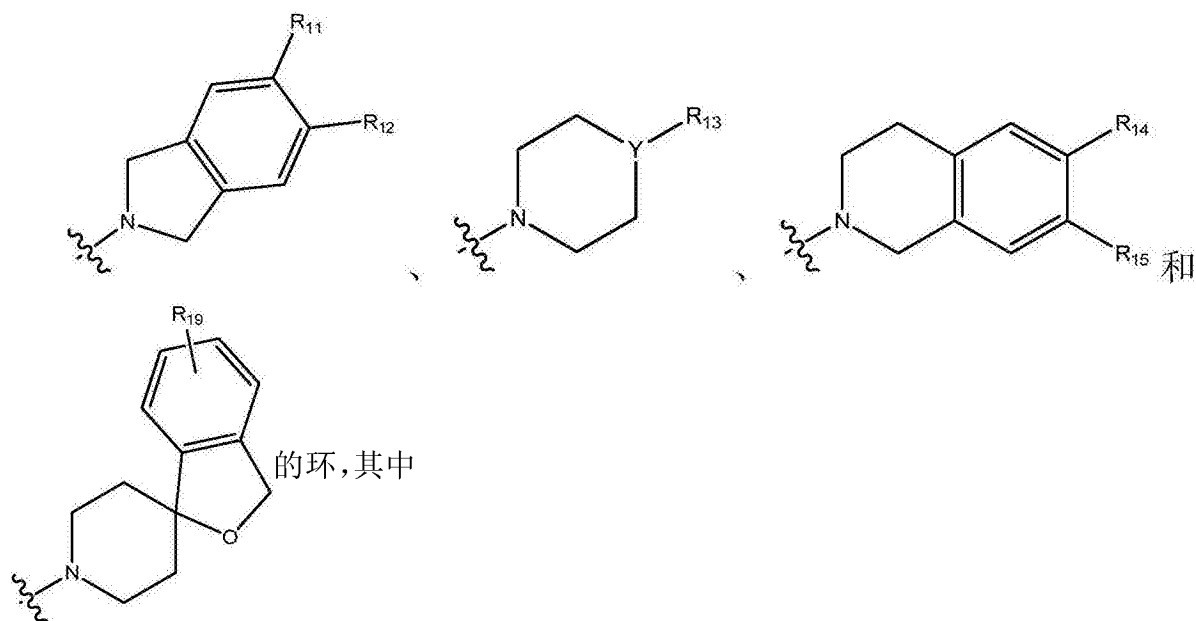
n为1~4

R₄为C₁₋₆烷基；

R₄'为H或C₁₋₆烷基；且

R₅为H、C₁₋₆烷基和C(O)O(C₁₋₄烷基)、C(O)(C₁₋₄烷基)或C(O)(C₁₋₄卤代烷基)；或

R₃和R₅与氮一起形成选自



R₁₁和R₁₂独立地选自H、卤素和C₁₋₆卤代烷基，且

Y为CH或N；

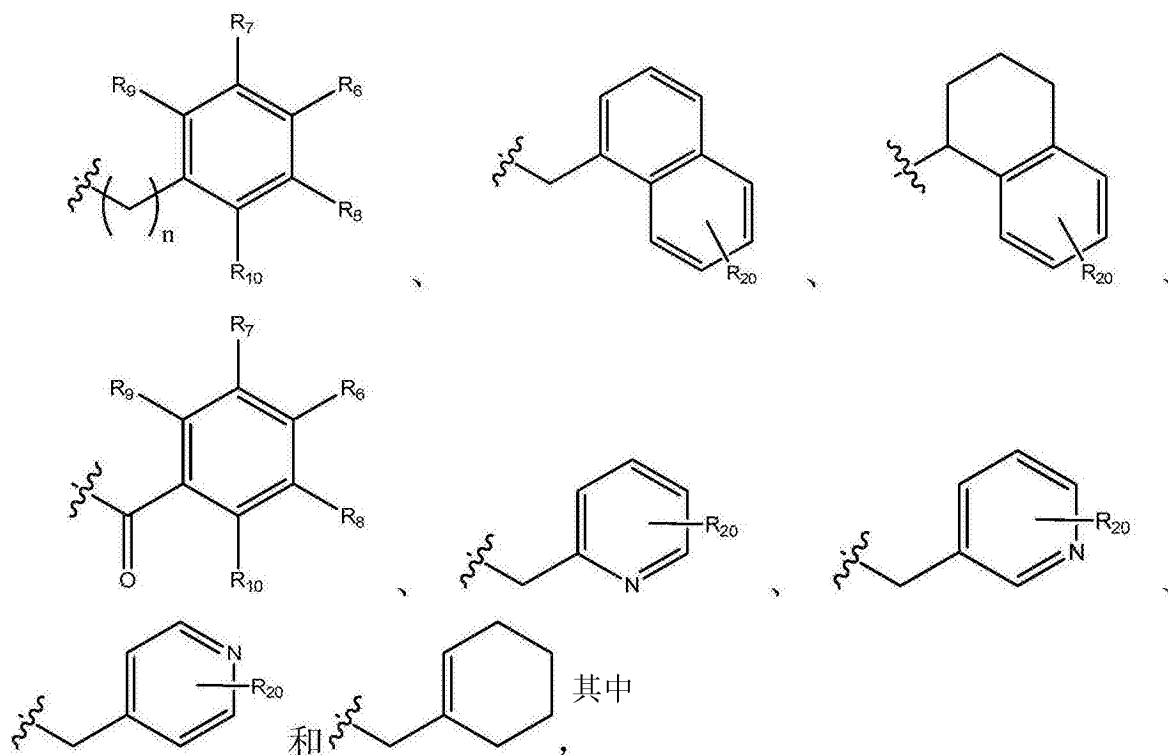
R₁₃为H、C₁₋₆烷基、C₃₋₆环烷基、未被取代的苯基或被C₁₋₆卤代烷基取代的苯基、或未被取代的苄基；

R₁₄和R₁₅独立地选自H和卤素；

R₁₉为H,或者

(B)

R₃选自



R₆、R₇、R₈、R₉和R₁₀独立地选自H、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷基和S(O)₂-C₁₋₆烷基；

R₂₀为H；且

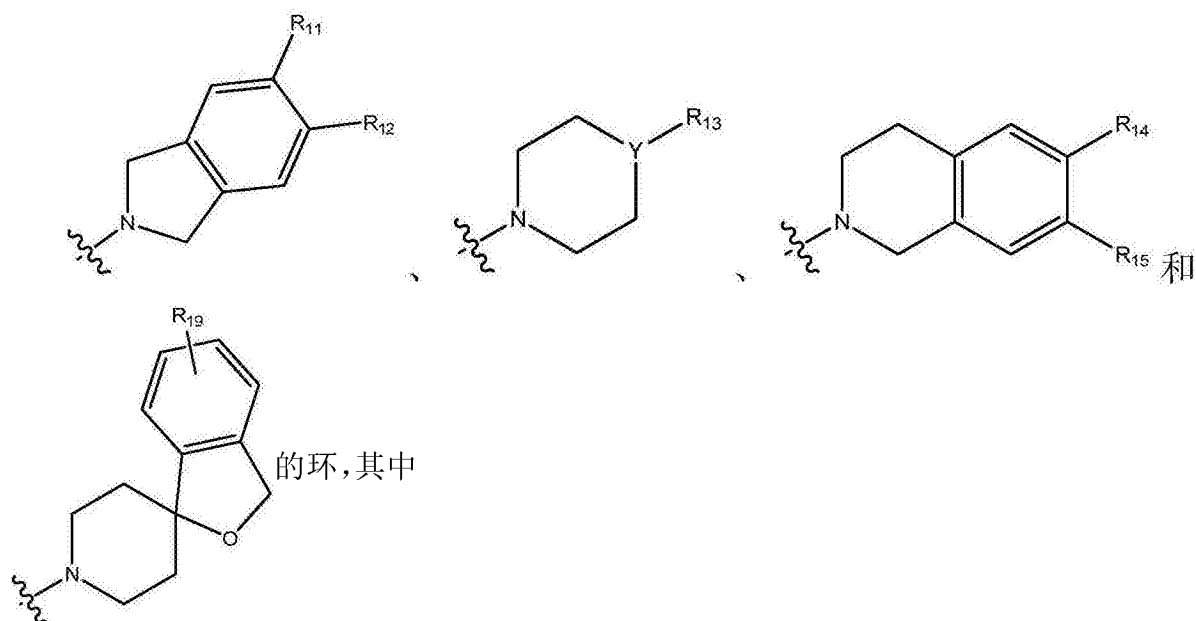
n为1~4

R₄为C₁₋₆烷基；

R₄'为H或C₁₋₆烷基；且

R₅为C(O)O(C₁₋₄烷基)、C(O)(C₁₋₄烷基)或C(O)(C₁₋₄卤代烷基)；或

R₃和R₅与氮一起形成选自



R₁₁和R₁₂独立地选自H、卤素和C₁₋₆卤代烷基,且

Y为CH或N;

R₁₃为H、C₁₋₆烷基、C₃₋₆环烷基、未被取代的苯基或被C₁₋₆卤代烷基取代的苯基、或未被取代的苄基;

R₁₄和R₁₅独立地选自H和卤素;

R₁₉为H。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述化合物还能够有效抑制所述细胞中的膜运输缺陷,所述膜运输缺陷与所述细胞暴露于可溶β淀粉样蛋白寡聚体相关。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中所述化合物能够有效抑制所述细胞中与所述细胞暴露于可溶β淀粉样蛋白寡聚体相关的寡聚体结合和突触损失两者。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中所述化合物能够有效抑制可溶β淀粉样蛋白寡聚体介导的认知效应。

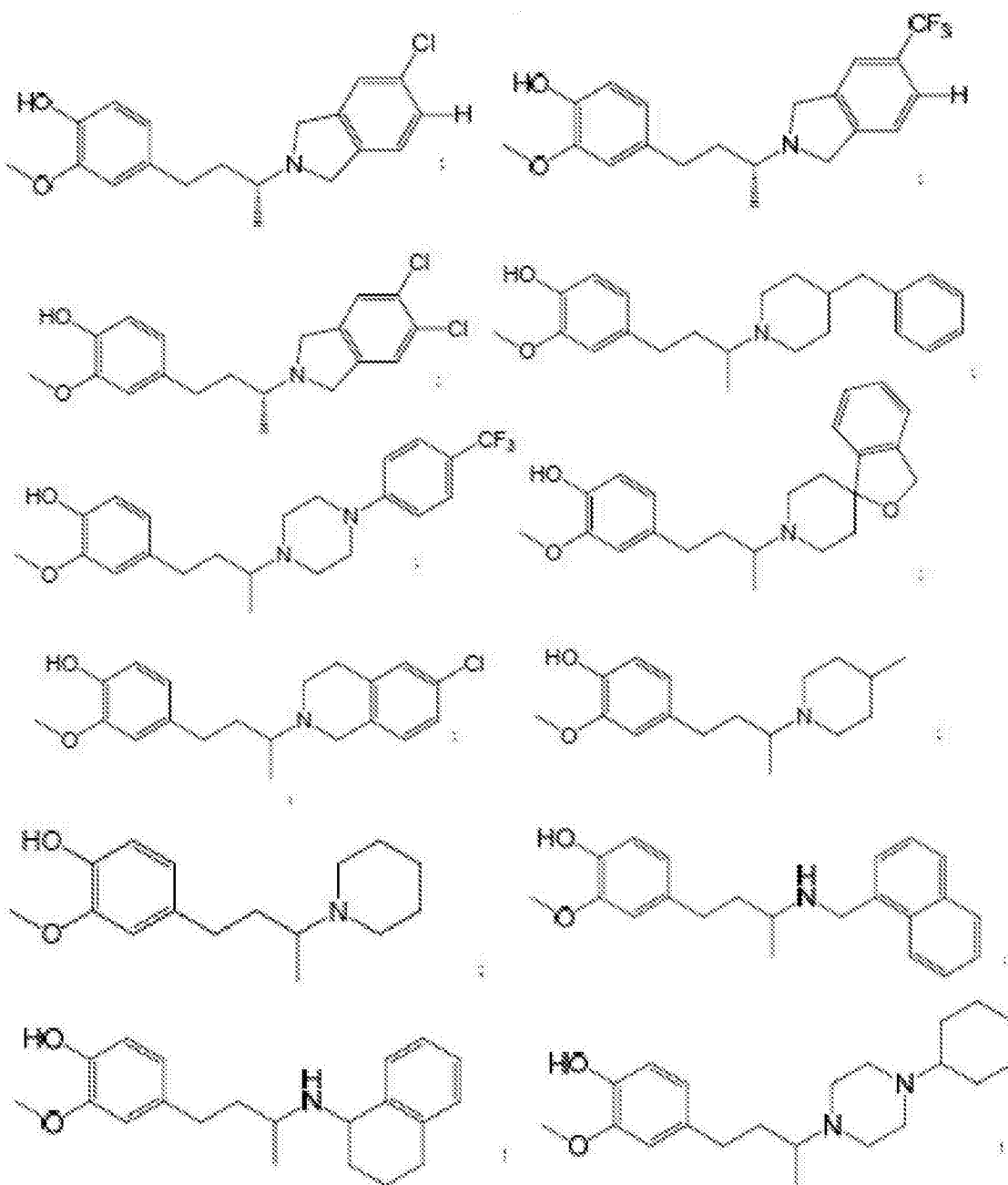
5. 根据权利要求4所述的用途,其中所述认知效应是在认知衰退的动物模型中测试的认知衰退。

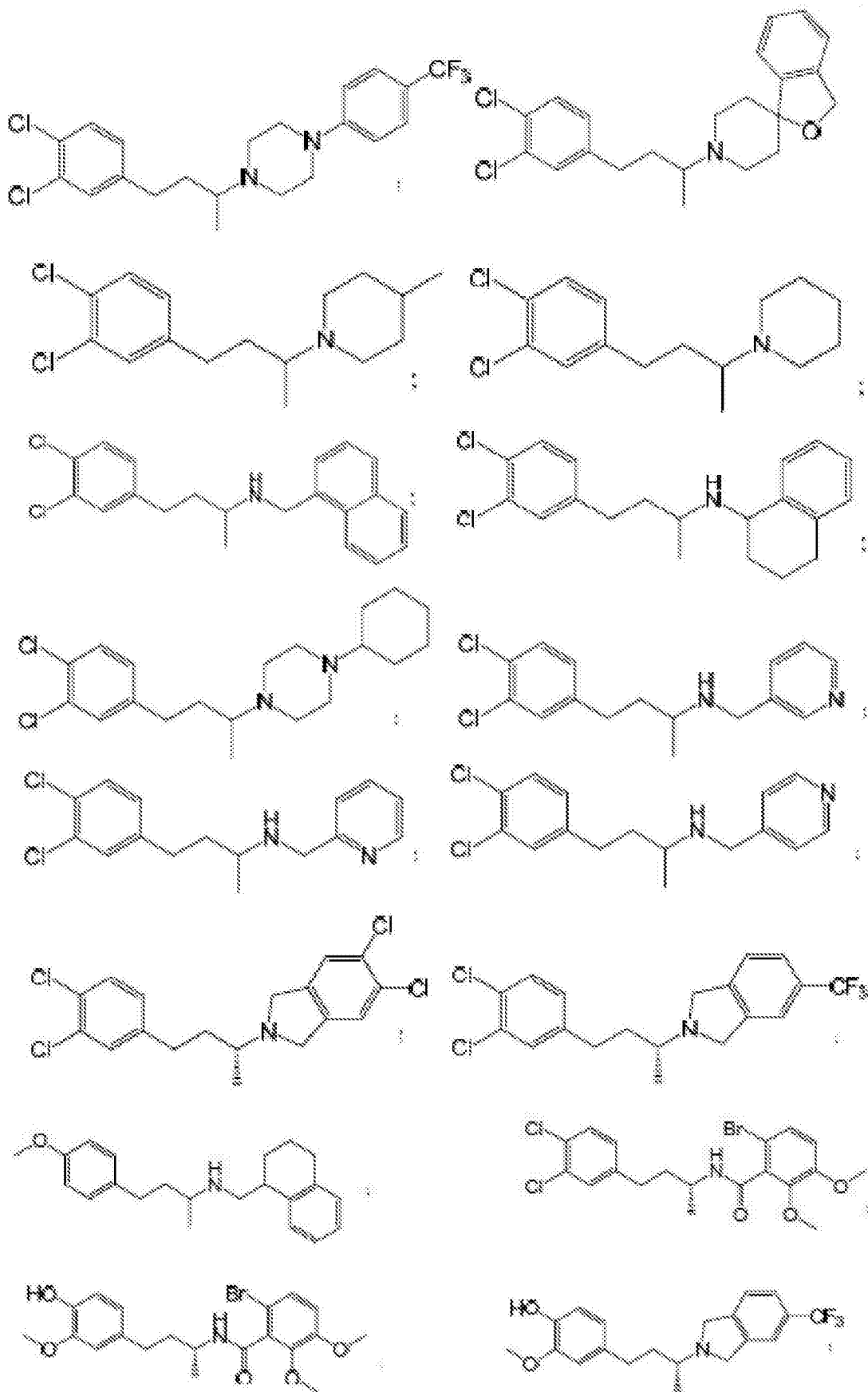
6. 根据权利要求5所述的用途,其中所述认知衰退是经由条件性恐惧检定所测试的学习衰退。

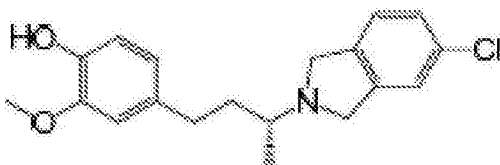
7. 根据权利要求5所述的用途,其中所述认知衰退是经由Morris水迷宫测试所测试的空间学习和记忆衰退。

8. 根据权利要求5所述的用途,其中所述认知衰退是在阿尔茨海默病的转基因动物模型中测试的基于海马的空间学习和记忆衰退。

9. 根据权利要求1~8中任一项所述的用途,其中R₃选自(A)且所述化合物是选自以下化合物中的一种或其药学上可接受的盐:

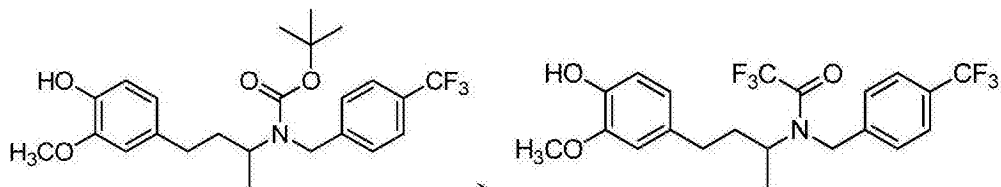






或

10. 根据权利要求1~8中任一项所述的用途,其中R₃选自(B)且所述化合物是选自以下化合物中的一种或其药学上可接受的盐:



11. 根据权利要求1~8中任一项所述的用途,用于抑制神经元细胞的β淀粉样蛋白寡聚体诱导的突触功能障碍,所述功能障碍与所述细胞暴露于可溶β淀粉样蛋白寡聚体相关。

12. 根据权利要求1~8中任一项所述的用途,用于抑制对长时程增强效应的压制。

13. 根据权利要求1~8中任一项所述的用途,用于在表现认知衰退或存在表现认知衰退风险的受试者中抑制认知衰退。

14. 根据权利要求1~8中任一项所述的用途,用于在受试者中抑制与β淀粉样蛋白寡聚体对中枢神经元的作用相关的认知衰退。

15. 根据权利要求1~8中任一项所述的用途,用于治疗阿尔茨海默病中的轻度认知障碍。

16. 根据权利要求1~8中任一项所述的用途,其中所述σ-2拮抗剂化合物具有一种或多种以下附加特性:

(a) 其以比一种或多种非σCNS受体高出至少10倍的亲和性与σ-2受体选择性结合,其中所述化合物以小于200nM的K_i与σ-2受体结合;

(b) 其抑制Aβ寡聚体与神经元细胞的结合或抑制神经元细胞中的突触损失,其中所述损失与所述细胞暴露于Aβ寡聚体相关;

(c) 其在中枢神经元中抑制膜运输异常,所述异常与所述细胞暴露于一种或多种Aβ寡聚体相关;

(d) 在不存在β淀粉样蛋白寡聚体时,其不影响中枢神经元中的运输或突触数目。

17. 根据权利要求16所述的用途,其中在(a)中,所述化合物以比一种或多种非σCNS受体高出至少20倍的亲和性与σ-2受体选择性结合。

18. 根据权利要求16所述的用途,其中在(a)中,所述化合物以比一种或多种非σCNS受体高出至少50倍的亲和性与σ-2受体选择性结合。

19. 根据权利要求16所述的用途,其中在(a)中,所述化合物以比一种或多种非σCNS受体高出至少100倍的亲和性与σ-2受体选择性结合。

20. 根据权利要求16所述的用途,其中在(a)中,所述化合物以小于150nM的K_i与σ-2受体结合。

21. 根据权利要求16所述的用途,其中在(a)中,所述化合物以小于100nM的K_i与σ-2受体结合。

22. 根据权利要求16所述的用途,其中在(a)中,所述化合物以小于60nM的K_i与σ-2受体

结合。

23. 根据权利要求2所述的用途,其中所述化合物在不存在 β 淀粉样蛋白寡聚体时,不影响中枢神经元中的运输或突触数目。

用于治疗神经退行性疾病的组合物和方法

[0001] 本申请是申请日为2012年8月27日、申请号为201280052588.4、发明名称为“用于治疗神经退行性疾病的组合物和方法”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及选择性 σ -2受体拮抗剂化合物、包含它们的药物组合物在用于抑制神经元细胞中 β 淀粉样蛋白 (A β) 相关的突触损失和突触功能障碍的方法中的用途。在一些实施方式中,组合物可用于调节神经元细胞中A β 相关的膜运输变化,以及用于在需要的患者中治疗与A β 病理相关的认知衰退。在一些实施方式中,化合物和组合物用于治疗与A β 病理相关的神经退行性疾病和病症。本发明还涉及基于化合物结合 σ -2受体并用作为 σ -2受体拮抗剂的能力来筛选其在抑制认知衰退中的活性的方法,以及涉及首先基于化合物是否阻断A β 诱导的膜运输缺陷、且阻断A β 诱导的突触损失但在不存在A β 寡聚体时不影响运输或突触数目来完善这些筛选方法的方法。 σ -2受体拮抗剂化合物选自对 σ -2受体有选择性的小分子、或抗体或其片段。

背景技术

[0003] β 淀粉样蛋白的过度产生和积聚是阿尔茨海默病的病理特征。人 β 淀粉样蛋白 (A β) 是在患有阿尔茨海默病的患者脑中发现的不可溶淀粉样蛋白斑沉积的主要成分。该斑由A β 的纤维状聚集物组成。 β 淀粉样蛋白原纤维与阿尔茨海默病的晚期相关联。

[0004] 早期阿尔茨海默病 (AD) 的认知标志是特别不能形成新记忆。早期记忆丧失被认为是由可溶 A β 寡聚体引起的突触障碍。这些寡聚体阻断长时程增强效应 (突触可塑性的经典实验范式), 并且它们在AD脑组织和转基因AD模型中显著升高。已假设,早期记忆丧失源自神经元死亡之前的突触障碍,并且突触障碍源自可溶 A β 寡聚体的作用而不是原纤维的作用。Lacor等人, Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid β oligomers, J. Neurosci. 2004, 24 (45): 10191-10200。

[0005] A β 是整合膜蛋白即淀粉样蛋白前体蛋白 (APP) 的剪切产物,被发现集中于神经元的突触中。A β 的可溶形式存在于阿尔茨海默患者的脑和组织中,且其存在与疾病进展相关。Yu等人, 2009, Structural characterization of a soluble amyloid beta-peptide oligomer, Biochemistry, 48 (9): 1870-1877。可溶 β 淀粉样蛋白寡聚体已证实为引起阻断学习和记忆的神经元突触的改变。

[0006] 较小的可溶 A β 寡聚体干扰大量对正常突触可塑性而言关键的信号传导通路,最终导致棘 (spine) 和突触损失。Selkoe等人, 2008, Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior, Behav Brain Res 192 (1): 106-113。阿尔茨海默病作为突触可塑性疾病开始并持续。

[0007] 可溶 A β 寡聚体的存在被认为是前兆阿尔茨海默病脑中的早期认知衰退的原因。已知 β 淀粉样蛋白寡聚体在神经元突触处结合且 σ -2受体大量存在于神经元和神经胶质。

[0008] 发展AD疗法的一个方法涉及A β 单克隆抗体的生成,其中一些处于临床发展的各个

阶段,包括巴匹珠单抗克隆抗体(bapineuzumab)(AAB-00;Janssen,Elan,Pfizer);茄尼醇单抗克隆抗体(solanezumab)(LY2062430;Eli Lilly);PF-04360365(Pfizer);MABT5102A(Genentech);GSK933776(GlaxoSmithKline)和更汀芦单抗克隆抗体(gantenerumab)(R1450,R04909832,Hoffman-LaRoche)。然而,迄今还没有批准静脉内 β 淀粉样蛋白特异性单抗克隆抗体用于治疗AD。近来,静脉内巴匹珠单抗克隆抗体的开发已终止,因为在患有轻度到中度阿尔茨海默病的患者中的两个晚期试验中缺乏效力。然而,近来报道,茄尼醇单抗克隆抗体在III期临床试验结果的二次分析中在患有轻度AD的患者而非患有中度AD的患者中显示出统计显著的认知衰退的减缓。这种方法的一个问题可能与缺乏充分的脑渗透性有关。

[0009] 目前仅有五种FDA批准用于治疗阿尔茨海默病(AD)的药物。四种是胆碱酯酶抑制剂:他克林(COGNEX®;Sciele)、多奈哌齐(ARICEPT®;Pfizer)、卡巴拉汀(EXELON®;Novartis)和加兰他敏(RAZADYNE®;Ortho-McNeil-Janssen)。多奈哌齐、卡巴拉汀和加兰他敏是他克林(第一代化合物,因其潜在的肝毒性而很少开进药方)的后继者;它们在AD的所有阶段提供认知和功能的症状改进方面大略同等有效。第五个批准的药物是美金刚(NAMENDA®;Forest),其是低亲和性、用途依赖的N-甲基-D-天冬氨酸谷氨酸受体拮抗剂,提供相似益处,但仅限于中度到严重AD。这些化合物的临床效果较小且非永久性的,并且目前没有结论性的数据支持其作为疾病调节剂的用途。参见例如Kerchner等人,2010,Bapineuzumab,Expert Opin Biol Ther.,10(7):1121-1130。明显地,需要另外可选的治疗AD的方法。

[0010] 本发明部分基于如下宽泛的发现,即满足某些条件的 σ -2受体拮抗剂抑制可溶A β 寡聚体的有害作用。在一些实施方式中,使用 σ -2受体拮抗剂化合物和组合物来治疗或预防受试者中的突触功能障碍。

发明内容

[0011] 本发明部分基于以下宽泛的发现,即 σ -2受体拮抗剂,优选为还表现出特定治疗表型的其它方面的拮抗剂,如下所述参与抑制并且抑制可溶 β 淀粉样蛋白(“Abeta”、“A β ”)肽和寡聚体及其其它可溶物对神经元细胞的作用,因此可以用于治疗与Abeta寡聚体诱导的病理例如阿尔茨海默病相关的包括疾病和障碍的病症。可溶Abeta寡聚体表现为与特异性受体结合并干扰对正常突触可塑性而言关键的信号传导通路的可逆药理学配体,最终导致棘和突触损失。已发现,与 σ -2受体结合且表现为功能性神经元拮抗剂的化合物表现出与Abeta寡聚体的药理学竞争。因此,本文所述的 σ -2拮抗剂化合物可以降低或防止Abeta寡聚体作用例如Abeta诱导的细胞毒性。本发明排除某些现有技术化合物,这些化合物不知是 σ -2受体拮抗剂且要么(i)已知与 σ -2受体结合并降低或消除Abeta诱导的病理例如神经元细胞中膜运输的缺陷或突触减少;要么(ii)已知针对阿尔茨海默病的症状有活性而没有提示 σ -2受体相互作用。本发明还包括用于抑制Abeta寡聚体或其它可溶Abeta种类对神经元细胞的作用、更广泛而言 β 淀粉样蛋白病理的方法,包括使细胞与根据本发明的 σ -2拮抗剂接触。在一些实施方式中,提供方法以用于治疗早期阶段的阿尔茨海默病,包括施用治疗有效量的 σ -2功能性拮抗剂。

[0012] 在一些实施方式中,本发明的 σ -2拮抗剂与 σ -2受体结合并且抑制A β 寡聚体与神经元特别是突触的结合。在一些实施方式中, σ -2拮抗剂与结合神经元特别是突触的A β 寡

聚体竞争,或者破坏 A β 寡聚体结合神经元的能力,例如通过干扰 A β 寡聚体形成或结合至 A β 寡聚体或可能地伴随其与神经元的结合干扰 A β 寡聚体介入运动信号传导机制的能力。在某些实施方式中, σ -2拮抗剂由此抑制非致死 A β 病理作用(“非致死 A β 病理”或“非致死 β 淀粉样蛋白病理”),除其它之外包括膜运输缺陷、突触功能障碍、动物中的记忆和学习缺陷、突触数目的减少、树突棘长度或棘形态的改变、或长时程增强效应(LTP)缺陷。换句话说,本发明者观察到,在本文说明的其它检定中具有活性的本发明的 σ -2拮抗剂具有将神经元恢复到正常状态或干扰 A β 寡聚体诱导的突触功能障碍的能力。不拘泥于理论,本发明的 σ -2拮抗剂干扰 A β 寡聚体结构、A β 寡聚体与神经元的结合或 A β 寡聚体诱导的分子信号传导机制中的一种或多种,这可用于对抗 A β 寡聚体的非致死作用以及治疗早期阶段的可溶 A β 寡聚体相关的病理。

[0013] 在一个实施方式中,本发明的 σ -2拮抗剂是功能性神经元拮抗剂并可以用在抑制神经元细胞中的突触损失的方法中,该丧失与细胞暴露于一种或多种Abeta寡聚体或其它Abeta复合物,或更广泛而言,包括单体或寡聚或可溶复合形式的Abeta肽(如下所述)的Abeta种类相关,该方法包括使所述细胞与一定量的一种或多种 σ -2拮抗剂接触,该一定量可有效避免或减少所述丧失或将所述细胞中的突触数目部分或完全恢复到暴露前的水平。

[0014] 在另一实施方式中,将本发明的 σ -2拮抗剂用于调节神经元细胞中膜运输变化的方法,所述变化与所述细胞暴露于一种或多种Abeta种类相关,该方法包括使所述细胞与一定量的一种或多种 σ -2拮抗剂接触,该一定量可有效避免或减少所述膜运输变化,或使其保持在或接近将所述细胞暴露于所述Abeta种类之前观察到的水平。

[0015] 在另一实施方式中,将本发明的 σ -2拮抗剂用于治疗认知衰退的方法,包括对受试者施用一种或多种本发明的 σ -2拮抗剂。

[0016] 在又一实施方式中,本发明的 σ -2拮抗剂是功能性神经元 σ -2拮抗剂,其被用于治疗认知衰退或神经退行性病症或突触功能和/或数目缺陷的方法,该方法包括对受试者施用一种或多种本发明的 σ -2拮抗剂。

[0017] 本发明还提供一种用于筛选抑制认知衰退或治疗神经退行性疾病的化合物的方法,该方法包括基于相对于其他非 σ 类CNS受体而偏好与 σ -2受体结合的能力来选择一种或多种测试用化合物。该 σ -2拮抗剂可以或者可以不与 σ -1受体结合。

[0018] 在一些实施方式中,本公开内容提供用于抑制神经元细胞的 β 淀粉样蛋白寡聚体诱导的突触功能障碍,以及用于抑制由神经元暴露于Abeta寡聚体所引起的海马长时程增强效应的压制的包括 σ -2受体拮抗剂的组合物和方法。

[0019] 本发明提供一种对抑制认知衰退或治疗神经退行性疾病的化合物进行识别的方法,该方法包括

[0020] 使细胞与结合 σ -2受体的化合物接触,并确定所述化合物是否具有至少一种以下附加特性:

[0021] (a) 其抑制中枢神经元中的突触损失,所述丧失与神经元暴露于Abeta寡聚体相关;

[0022] (b) 其抑制中枢神经元中的膜运输异常,该异常与所述细胞暴露于一种或多种Abeta寡聚体相关;

[0023] (c) 其抑制阿尔茨海默病动物模型中Abeta寡聚体介导的认知效应;或

[0024] (d) 其抑制阿尔茨海默病动物模型中基于海马的空间学习和记忆衰退。

[0025] 在一些实施方式中,公开体外检定平台法,其可预测用于筛选选择性 σ -2拮抗剂化合物的抑制认知衰退或治疗神经退行性疾病的能力的行为效力,该方法包括使细胞与结合 σ -2受体并用作为 σ -2受体拮抗剂的化合物接触,其中所述化合物具有各个以下特性:

[0026] (a) 其抑制中枢神经元中的突触损失,所述丧失与神经元暴露于Abeta寡聚体相关;

[0027] (b) 其抑制中枢神经元中的膜运输异常,该异常与所述细胞暴露于一种或多种Abeta寡聚体相关;以及

[0028] (c) 其在不存在Abeta寡聚体的情况下不影响运输或突触数目。

[0029] 本发明还提供一种对抑制认知衰退或治疗神经退行性疾病的化合物进行识别的方法。在一些实施方式中,该方法包括使细胞与结合 σ -2受体的化合物接触。在一些实施方式中,该方法还包括识别结合 σ -2受体的其他化合物。在一些实施方式中,对结合 σ -2受体的化合物进行识别的方法包括竞争性结合检定,其中测试化合物与 σ -2受体在已知 σ -2配体的存在下接触,其中竞争性地抑制已知配体的结合的测试化合物被识别为 σ -2受体配体。这些方法可以使用动物模型进行,动物模型可以是任何动物模型但优选为啮齿动物模型。任何合适的结合检定可以用于确定化合物是否与 σ -2受体结合(或者该化合物已经被确定或甚至已知这样做)。

附图说明

[0030] 图1A是示出膜运输检定中在体外保持21天的具有含有甲腈的胞内囊泡的初级海马和皮质培养物的显微照片,其中甲腈得自货物(cargo)四唑盐染料的胞吞以及化学还原。

[0031] 图1B是示出具有胞外甲腈结晶的姐妹培养物的显微照片,其中胞外甲腈结晶在甲腈胞吐时在神经元和胶质细胞的细胞膜的外部形成,且其中细胞已经在膜运输检定中暴露于Abeta寡聚体。该图示出人Abeta 1~42寡聚体改变货物染料产物甲腈的表型(胞内囊泡相对于胞外结晶),因此引起细胞膜运输缺陷。

[0032] 图1C是示出胞内囊泡的显微照片,其中细胞已经同时暴露于Abeta寡聚体和化合物II,化合物II为本发明的选择性的、高亲和性 σ -2拮抗剂化合物。该图示出化合物II能够阻断由Abeta寡聚体生成的膜运输缺陷,并将膜运输表型恢复至正常。

[0033] 图1D示出膜运输检定的定量,其中y轴表示在施用货物四唑盐染料后在给定时间点包含在胞内囊泡中的甲腈产物的标准化为媒介物处理值的量。红色圆圈表示Abeta寡聚体处理的培养物,蓝色方块表示媒介物处理的对照培养物,且黑色或灰色方块表示用多种浓度的cpd II+Abeta和cpd IXa、IXb+Abeta处理的培养物的值(当化合物在Abeta寡聚体之前添加时(预防))。在横坐标中使用化合物的对数浓度。该图示出,化合物以剂量依赖的方式抑制Abeta寡聚体对膜运输的作用。

[0034] 图1E示出膜运输检定剂量响应曲线,其为与图1D相同类型的图中但化合物在Abeta寡聚体之后添加(治疗)。在横坐标中使用化合物的对数浓度。该图示出,化合物以剂量依赖的方式抑制Abeta寡聚体对膜运输的作用。

[0035] 图1F示出在多种浓度的单独的合成Abeta寡聚体 (EC50 820nM) 的存在下的如图1D的相同类型的图的膜运输检定,其具有多种浓度的化合物II和各个浓度处的所得囊泡(%媒介物)。通过递增浓度的化合物II的存在,表现出EC50的右移 (Schild斜率=-0.75)。该图表明,cpd II在药理学上与寡聚体竞争对介导膜运输的分子靶标的接近,因此化合物II的存在使得合成Abeta寡聚体具有更小的突触毒性。

[0036] 图1G示出在多种浓度的单独的合成Abeta寡聚体的存在下的如图1D的相同类型的图的膜运输检定,其具有多种浓度的化合物混合物IXa、IXb和各个浓度处的所得囊泡(%媒介物)。通过递增浓度的化合物混合物IXa、IXb的存在,表现出EC50的右移 (Schild斜率=-0.51)。该图表明,cpd混合物IXa、IXb在药理学上与寡聚体竞争对介导膜运输的分子靶标的接近,因此化合物混合物IXa、IXb的存在使得合成Abeta寡聚体具有更小的突触毒性。

[0037] 图1H示出在多种浓度的单独的得自人阿尔茨海默病患者的Abeta寡聚体的存在下的如图1D的相同类型的图的膜运输检定,其具有多种浓度的化合物II和各个浓度处的所得囊泡(%媒介物)。通过递增浓度的化合物II的存在,表现出EC50的右移。该图表明,cpd II在药理学上与寡聚体竞争对介导膜运输的分子靶标的接近,因此化合物II的存在使得人阿尔茨海默病相关的Abeta寡聚体具有更小的突触毒性。

[0038] 图1I示出在多种浓度的单独的得自人阿尔茨海默病患者的Abeta寡聚体的存在下的如图1D的相同类型的图的膜运输检定,其具有多种浓度的化合物混合物IXa、IXb和各个浓度处的所得囊泡(%媒介物)。通过递增浓度的化合物混合物IXa、IXb的存在,表现出EC50的右移。该图表明,cpd混合物IXa、IXb在药理学上与寡聚体竞争对介导膜运输的分子靶标的接近,因此化合物混合物IXa、IXb的存在使得人阿尔茨海默病相关的Abeta寡聚体具有更小的突触毒性。

[0039] 图1J示出在多种浓度的单独的合成Abeta寡聚体的存在下的如图1D的相同类型的图的膜运输检定,其具有多种浓度的化合物CF和各个浓度处的所得囊泡(%媒介物)。通过递增浓度的化合物CF的存在,表现出EC50的右移。该图表明,cpd CF在药理学上与寡聚体竞争对介导膜运输的分子靶标的接近,因此化合物CF的存在使得合成Abeta寡聚体具有更小的突触毒性。

[0040] 图1K示出在多种浓度的单独的合成Abeta寡聚体的存在下的如图1D的相同类型的图的膜运输检定,其具有多种浓度的化合物W和各个浓度处的所得囊泡(%媒介物)。通过递增浓度的化合物W的存在,表现出EC50的右移。该图表明,cpd W在药理学上与寡聚体竞争对介导膜运输的分子靶标的接近,因此化合物W的存在使得合成Abeta寡聚体具有更小的突触毒性。

[0041] 图1L示出使用从阿尔茨海默病患者中分离的Abeta寡聚体的膜运输检定结果。化合物CF (20微摩尔浓度) 表现出与从AD患者分离的Abeta寡聚体在药理学上竞争对介导膜运输的分子靶标的接近,因此化合物CF的存在使得人阿尔茨海默病相关的Abeta寡聚体具有更小的突触毒性。

[0042] 图1M是有所识别(并定量)的神经元的甲腈填充囊泡的百分比的运输检定结果的条形图,在(i)单独的媒介物(第一条);(ii)来自人阿尔茨海默病患者脑的Abeta寡聚体制剂(第二条,与第一条相比显著降低);(iii)本文公开的化合物II+Abeta寡聚体(第三条,比第二条显著更高);以及(iv)化合物II而无Abeta寡聚体(第四条,与第一条没有显著差

异)的存在下。该图表明,化合物II阻断由人阿尔茨海默病相关Abeta寡聚体生成的膜运输缺陷,并将膜运输表型恢复至正常,但是在不存在Abeta寡聚体而以其自身给药时不影响膜运输。

[0043] 图1N是与图J类型相同但是示出使用从年龄匹配的组织学正常的人脑中分离的Abeta寡聚体制剂产生的数据的条形图。该图表明,得自正常人脑的Abeta寡聚体不显著影响膜运输,且cpd II在存在或不存在这样的寡聚体时不会进一步影响膜运输。

[0044] 图2A是药代动力学数据的图,其中示出在单一皮下(空心三角)和静脉(i.v.) (空心圆圈)施用化合物II时血浆中(左纵坐标,ng/mL)中得到的以及在单一i.v.施用化合物II(实心圆圈)时脑中(右纵坐标,ng/g)得到的化合物II的浓度。已知化合物II经受首过代谢,因此皮下给药;然而,在急性给药后,化合物II具有高度脑渗透性。该图表明,cpd II在急性皮下给药时具有高度脑渗透性。

[0045] 图2B是药代动力学数据的图,其中示出在每天一次皮下施用不同量的化合物II(0.5mg/kg/天;实心下三角;0.35mg/kg/天;实心上三角;以及0.1mg/天;实心方块)并持续5天时血浆中(左纵坐标)中得到的以及在皮下施用相同量(分别为空心下三角、空心上三角和空心方块)的化合物II时脑中(右纵坐标)得到的化合物II的浓度。已知化合物II经受首过代谢,因此皮下给药;然而,在慢性给药后,化合物II具有高度脑渗透性。该图表明,cpd II在慢性皮下给药时具有高度脑渗透性。

[0046] 图2C是药代动力学数据的图,其中示出在单一急性口服化合物CB(10mg/kg/天)时在血浆(左纵坐标,实心三角)和脑(右纵坐标,空心三角)中得到的在单一急性口服给药后获得的化合物CB的浓度。化合物CB在急性口服给药后具有高度脑渗透性并表现出血浆半衰期为3.5小时的50%生物利用度。该图表明,cpd CB在急性口服给药时具有高度脑渗透性。

[0047] 图2D是药代动力学数据的图,其中示出在每天一次口服施用化合物CB(10mg/kg/天,上三角,或30mg/kg/天,倒三角)时在血浆(左纵坐标,实心三角)和脑(右纵坐标,空心三角)中得到的在慢性每天一次口服给药并持续5天之后获得的化合物CB的浓度。化合物CB在慢性口服给药后具有高度脑渗透性并在高达5天的每天一次口服给药时表现出3的脑/血浆比率。该图表明,cpd CB在慢性口服给药时具有高度脑渗透性。

[0048] 图3A-板块A是在不存在化合物IXa、IXb的情况下暴露于Abeta寡聚体的体外保持21天的初级海马和皮质培养物的荧光显微图;Abeta(用单克隆抗体6E10免疫标记而可视化)与包括神经元突触后棘的细胞膜在突触处结合。

[0049] 图3A-板块B是图3A-板块A中所见的相同视野,示出与阴性对照(未示出)相比,突触数目(用突触素免疫标记而可视化)在Abeta寡聚体的存在下减少。

[0050] 图3A-板块C是在不存在化合物IXa、IXb的情况下暴露于Abeta寡聚体的体外保持21天的初级海马和皮质培养物的较低分辨率荧光显微图;Abeta(用单克隆抗体6E10免疫标记而可视化)与包括神经元突触后棘的细胞膜在突触处结合。

[0051] 图3A-板块D示出在存在化合物IXa、IXb的情况下暴露于Abeta寡聚体的体外保持21天的初级海马和皮质培养物的姐妹培养物;与包括神经元突触后棘的细胞膜结合的Abeta的量在视觉上减少。

[0052] 图3B-板块A是在存在化合物IXa、IXb的情况下暴露于Abeta寡聚体的体外保持21天的初级海马和皮质培养物的姐妹培养物的荧光显微图;与包括神经元突触后棘的细胞膜

结合的Abeta的量在视觉上减少。该图表明,化合物IXa、IXb的存在(i)显著地减少与包括神经元突触后棘的细胞膜结合的Abeta寡聚体的量。在化合物II的存在下观察到相似的保护(数据未示出)。

[0053] 图3B-板块B是如图3A-板块C中见到的相同视野,示出在化合物IXa、IXb的存在下,突触数目(用突触素免疫标记而可视化)恢复,与图3A-板块B相比,具有增加的可视突触素。该图表明,化合物混合物IXa、IXb显著地阻断Abeta寡聚体诱导的突触损失。在化合物II的存在下观察到相似的保护(数据未示出)。

[0054] 图3C是以突触损失检定实验的条形图对示于图3A-板块A~D中的数据的数据的定量。突触损失提供与认知功能的最紧密相关。在突触损失检定中,相对于媒介物,Abeta寡聚体在体外引起18.2%突触损失。化合物II或化合物混合物IXa、IXb的存在完全消除该突触消退。当化合物以单独的媒介物而不具有Abeta寡聚体给药时,没有观察到作用。具体而言,通过对荧光显微图的突触素免疫标记区的数目、强度和面积进行基于图像处理的定量来计算突触计数,表达为暴露于单独的媒介物(黑色第一条)、媒介物与化合物IXa、IXb或媒介物与化合物II(分别为第二条和第三条,示出化合物对突触数目没有作用)、Abeta寡聚体(第四条,示出与第一条相比显著的突触计数降低)以及在化合物IXa、IXb或II存在下的Abeta寡聚体(第五和第六条,示出与第一条相比没有突触数目的降低)的神经元中的阴性对照(媒介物)的百分比。该图表明,化合物IXa、IXb和II表现出保护性作用并阻断Abeta寡聚体诱导的突触数目减少。

[0055] 图3D是以Abeta结合强度的条形图对示于图3A-板块A~D中的数据的数据的定量,Abeta结合强度通过对在将Abeta单独添加至媒介物(第一条图)时的荧光显微图的6E10免疫标记区的数目、强度和面积以及在Abeta与化合物II或化合物混合物IXa、IXb的共存下它们的显著降低进行基于图像处理的定量来计算。该图表明,化合物IXa、IXb和II降低与细胞膜结合的Abeta的量。

[0056] 图4是记忆表现的条形图,记忆表现通过体内条件性恐惧检定中僵立行为的百分比而测量,僵立行为的百分比在基线训练和训练后24小时对施用单独的媒介物(第一条)、媒介物+Abeta寡聚体(第二条)、化合物II+Abeta寡聚体(第三条)和单独的化合物II(第四条)的小鼠进行测量并且在施用单独的媒介物(第一条)、媒介物+Abeta寡聚体(第二个显著降低的条)、化合物II+Abeta寡聚体(第三条)和单独的化合物II之后24小时时进行测量。与媒介物(N=18)相比,Abeta寡聚体(单一的200纳摩尔海马内注射)在3~4个月大的雄性wt C57BL/6小鼠(N=16)中产生显著的记忆形成缺陷。化合物II(在寡聚体之前一小时单一的2微摩尔海马内注射)消除由Abeta寡聚体生成的记忆缺陷(N=11)。单独的化合物没有作用,且没有观察到不利的行为效应。该图表明,化合物II可以预防Abeta寡聚体诱导的记忆缺陷,而当其自身给药时对记忆表现没有作用。

[0057] 图5A是 σ -2结合亲和性(表2)与运输检定中的效力(表5)之间的相关性的图。仅包括在运输检定中有活性的化合物;排除也是 σ -1拮抗剂的化合物。

[0058] 图5B是对于用来产生图5A的化合物的 σ -2结合亲和性(表2)与运输检定中的效力(表5)之间的同一相关性的图,但额外包括同时为 σ -2配体和 σ -1拮抗剂的化合物的数据点(这些离群数据点集中在图的右下象限,且没有被用来计算相关系数)。

[0059] 图5C是示出不存在 σ -1结合亲和性(表2)与运输检定中的 EC_{50} (表5)之间的相关性

的图, $r^2=0.06$, $p>0.05$ 。

[0060] 图5D是示出不存在 σ -2结合亲和性(表2)与运输检定中的Abeta的最大抑制(表5)之间的相关性的图。分析中包括所有数据点。

[0061] 图6是与图4相同类型的条形图, 示出当动物用(i)单独的媒介物(第一条)、(ii) Abeta寡聚体(第二条, 示出测试动物获取新记忆的能力显著降低)、(iii) 化合物IXa和IXb的混合物(第三条, 示出对Abeta寡聚体诱导的记忆缺陷的完全(且统计学显著的)抑制)、或(iv) 化合物IXa和IXb的混合物(不存在Abeta寡聚体)(第四条, 示出对记忆无作用)处理时, 通过与产生图4相同的情境条件性恐惧检定中的僵立行为而测量的记忆表现。没有观察到不利的行为作用。该图表明, 化合物混合物IXa、IXb可以预防Abeta寡聚体诱导的记忆缺陷, 而当以其自身给药时对记忆表现没有作用。

[0062] 图7A示出在预防模式中使用的在初级海马和皮质培养物中进行的膜运输检定, 其中在寡聚体前加入化合物II, 具有或不具有苏-艾芬地尔(TIF)。苏-艾芬地尔(TIF)是对其他受体具有亲和性(s_2 0.9nM, s_1 59nM, NR2B 222nM, K+ch 88nM等)的 σ -2受体配体(Monassier等人, JPET, 322(1):341-350, 2007), 当单独给药时其不引起细胞凋亡、影响运输或干扰Abeta寡聚体诱导的运输缺陷(数据未示出), 因而高亲和性 σ 受体结合不足以产生治疗表型。该图表明, TIF在神经元中在预防形式中表现出与II(以及IXa、IXb; 未示出)的药理学竞争, 表明它们在 σ 受体上的结合位点部分重叠。这是神经元中 σ 配体的功能性竞争的第一个证明, 表明 σ 受体参与Abeta寡聚体诱导的膜运输过程。

[0063] 图7B示出在治疗模式中使用的在初级海马和皮质培养物中进行的膜运输检定, 其中在寡聚体后加入化合物II, 具有或不具有苏-艾芬地尔(TIF)。该图表明, 苏-艾芬地尔(TIF)在神经元中在治疗形式中表现出与化合物II(以及IXa、IXb; 未示出)的药理学竞争, 表明它们在 σ 受体上的结合位点部分重叠。

[0064] 图7C示出在治疗模式中使用的在初级海马和皮质培养物中进行的膜运输检定。数据示出在存在媒介物(空心方块)和Abeta寡聚体(空心圆圈)时包含在胞内囊泡中的甲腈的量。Abeta寡聚体对膜运输的作用通过化合物CF(实心方块)的存在以剂量依赖的方式减轻。TIF的添加显著地降低由化合物CF引起的最大抑制, 并使EC50值右移; 因此TIF在治疗形式中(在Abeta后添加化合物)用作为化合物CF结合的同一受体的拮抗剂。

[0065] 图7D示出在存在媒介物(空心方块)和Abeta寡聚体(空心圆圈)时的膜运输数据。Abeta作用通过化合物II(实心方块)的存在以剂量依赖的方式减轻。TIF的添加显著地降低由化合物II引起的最大抑制, 并使EC50值移动。因此TIF在治疗形式中表现出与化合物II的药理学竞争。

[0066] 图8A示出来自正常患者、路易体痴呆(DLB)患者或阿尔茨海默病(AD)患者的人额皮质组织切片中(左板块)的 $[^3H]$ -(+)-戊唑辛(σ -1受体配体)的放射自显影结合, 其中BS是特异性结合, 且BNS是非特异性结合; (右板块)示出来自对照(正常)、DLB或AD患者的放射自显影实验的 $[^3H]$ 戊唑辛的平均特异性结合图。与年龄匹配的与AD中所见的神经元损失度平行的对照脑相比, 阿尔茨海默病脑中的 σ -1受体在统计学上更低。该图表明, σ -1受体表达可以在阿尔茨海默病脑中保持恒定。

[0067] 图8B示出来自正常患者、路易体痴呆(DLB)患者或阿尔茨海默病(AD)患者的相邻人额皮质组织切片中(左板块)的 $[^{125}I]$ -RHM-4(σ -2受体配体)的放射自显影结合; (右板块)

示出来自对照(正常)、DLB或AD患者的放射自显影实验的 $[^{125}\text{I}]$ -RHM-4的平均特异性结合图。与年龄匹配的对照脑相比,阿尔茨海默病和路易体痴呆脑中的 σ -2受体在统计学上没有更低,尽管在这些疾病中看到神经元损失。该图表明,存活的神元胞和/或胶质细胞上的 σ -2受体表达在DLB和阿尔茨海默病脑中可能上调。

[0068] 图8C示出(左板块)在猴额皮质、猴海马或人颞皮质中 σ -2配体对 18.4nM $[^3\text{H}]$ -RHM-1的替代,以及(右板块)具有和不具有 $1\mu\text{M}$ 西拉美新与化合物IXa、IXb和II中的每一个的 $[^3\text{H}]$ -RHM-1的结合密度图。该图表明,化合物II和混合物IXa、IXb在猴和人脑组织切片中从 σ -2受体竞争性地替代已知的放射性标记的 σ -2配体例如 $[^3\text{H}]$ -RHM-1,因此这些化合物均与 σ -2受体结合。

[0069] 图9A示出在用 σ 化合物处理48小时的SKOV-3人卵巢癌细胞系中,作为MTS检定中细胞活力的 σ -2受体激动剂的肿瘤细胞细胞毒性。 σ -2激动剂(西拉美辛、SV-119、WC-26)杀死肿瘤细胞。 σ -2拮抗剂(RHM-1、IXa、IXb和II)仅在不存在激动剂时在高得多的浓度下杀死肿瘤细胞。该图表明,cpd II和IXa、IXb在该检定中表现得与已知 σ -2拮抗剂相似,因此表明它们是肿瘤细胞中的 σ -2拮抗剂。

[0070] 图9B示出在用 σ -2化合物处理24小时的神元胞培养物中作为细胞核强度变化的 σ -2受体激动剂的神元胞细胞毒性。 σ -2激动剂(西拉美辛、SV-119、WC-26)引起神元胞中的异常细胞核形态。 σ -2拮抗剂(RHM-1、IXa、IXb和II)不会如此。该图表明,cpd II和IXa、IXb在该检定中表现得与已知 σ -2拮抗剂相似,因此表明它们是初级海马和皮质细胞中的 σ -2拮抗剂。

[0071] 图10A示出SKOV-3人卵巢癌细胞中由 σ -2激动剂西拉美新诱导的caspase-3活性,而 σ -2受体拮抗剂RHM-1、化合物II和IXa、IXb不诱导caspase-3活性。Abeta寡聚体引起低水平的caspase-3活化并引起LTD。高水平的寡聚体和caspase-3引起细胞死亡。 σ -2受体激动剂(SV-119、西拉美新)使肿瘤细胞和神元胞中的caspase-3活化; σ -2拮抗剂则不(图10A和10B)。该图表明,cpd II和IXa、IXb在该检定中表现得与已知 σ -2拮抗剂相似,因此表明它们是肿瘤细胞中的 σ -2拮抗剂。

[0072] 图10B示出神元胞中由 σ -2激动剂西拉美新诱导的caspase-3活性,而 σ -2受体拮抗剂RHM-1、化合物II和IXa、IXb不诱导caspase-3活性。该图表明,cpd II和IXa、IXb在该检定中表现得与已知 σ -2拮抗剂相似,因此表明它们是初级海马和皮质细胞中的 σ -2拮抗剂。

[0073] 图10C示出SKOV-3人卵巢癌细胞中由 σ -2激动剂SV-119诱导的caspase-3活化。 σ -2受体拮抗剂化合物IXa、IXb和II、RHM-1不阻断肿瘤细胞中由 σ -2受体激动剂SV-119引起的caspase-3活化。该图表明,cpd II和IXa、IXb在该检定中表现得与已知 σ -2拮抗剂相似,因此表明它们是肿瘤细胞中的 σ -2拮抗剂。

[0074] 图10D示出在多种浓度的激动剂24小时后神元胞培养中由 σ -2受体激动剂SV-119引起的caspase-3活化。该图表明, σ -2受体拮抗剂化合物IXa、IXb和II而非RHM-1阻断初级海马和皮质细胞中由 σ -2受体激动剂SV-119引起的caspase-3活化。

[0075] 图11A示出运输检定以及由Abeta寡聚体的存在而引起的运输缺陷(与媒介物相比,囊泡减少)。 σ -2激动剂西拉美新的添加在低浓度阻断Abeta寡聚体运输缺陷,但是在高浓度引起细胞毒性。 σ -2拮抗剂II在所有的测试浓度阻断寡聚体诱导的运输缺陷。该图表明,化合物II表现出治疗表型,并且表现得与已知 σ -2激动剂不相似。

[0076] 图11B示出运输检定以及由Abeta寡聚体的存在而引起的运输缺陷(与媒介物相比,囊泡减少)。σ-2激动剂SV119的添加在低浓度阻断Abeta寡聚体运输缺陷,但是在高浓度引起细胞毒性。σ-2拮抗剂RHM-1在所有的测试浓度阻断寡聚体诱导的运输缺陷,但是不表现出治疗表型,因为其结构不是药物样。该图表明,化合物II表现得与已知σ-2拮抗剂相似。

[0077] 图12A示出通过体内条件性恐惧检定中的僵立行为的百分比而测量的记忆表现,其中僵立行为的百分比在口服施用各种剂量的σ-2受体拮抗剂化合物5.5个月后,在15个月大的雄性转基因阿尔茨海默病小鼠模型中,在以1~3分钟训练24小时后测量。与用媒介物处理的Tg动物相比(Mann-Whitney U检测),在用10和30mg/kg/天的CB($p<0.05$)和30mg/kg/天的CF($p<0.005$)处理的转基因动物中发生记忆缺陷的显著改善。该图表明,化合物CB和CF在转基因阿尔茨海默病小鼠中在慢性长期给药后逆转已建立的记忆缺陷。

[0078] 图12B示出9个月大的雌性转基因(Tg)阿尔茨海默病小鼠的行为数据的条形图,该小鼠在用媒介物p.o.处理39天时,相对于媒介物处理的非转基因同窝仔,在Y-迷宫(%交替)中表现出显著的记忆缺陷(即,媒介物处理的Tg小鼠偶尔表现,媒介物处理的非Tg同窝仔表现得显著好于紧挨着各个条的机率可见(chance-see)的星号和线)。用化合物CF以30mg/kg/天口服处理Tg动物改善缺陷。没有观察到不利的行为效应。该图表明化合物CF在转基因阿尔茨海默病小鼠中在慢性短期给药后逆转已建立的记忆缺陷。

[0079] 图13A示出用6E10Abeta特异性抗体免疫标记而可视化的Abeta寡聚体与初级神经元培养物21DIV的结合的荧光显微图。

[0080] 图13B示出与13A相同的视野,其中神经元经神经元特异性MAP2免疫标记而选择性地可视化。

[0081] 图13C示出Abeta寡聚体(用6E10免疫标记而可视化)与用78nM PGRMC1C端抗体21DIV预处理的姐妹初级神经元培养物的结合的荧光显微图。该图表明,PGRMC C端抗体的存在引起显著降低的Abeta寡聚体结合,比仅Abeta处理的对照培养物低47%。

[0082] 图13D示出与13C相同的视野,其中神经元经神经元特异性MAP2免疫标记而选择性地可视化。如同在姐妹对照培养物中所见(图13A),在培养物中存在相似密度的神经元。

[0083] 图13E示出Abeta寡聚体(用6E10免疫标记而可视化)与用78nM对照抗体(非免疫IgG)预处理的姐妹初级神经元培养物的结合的荧光显微图。该图表明,与仅用Abeta处理的对照培养物(图13A)相比,非免疫IgG的存在不显著改变Abeta结合强度。

[0084] 图13F示出与13E相同的视野,其中神经元经神经元特异性MAP2免疫标记而选择性地可视化。如同在姐妹对照培养物中所见(图13A),在培养物中存在相似密度的神经元。

[0085] 图13G示出Abeta寡聚体(用6E10免疫标记而可视化)与用78nM PGRMC1N端抗体预处理的姐妹初级神经元培养物的结合的荧光显微图。该图表明,与仅用Abeta处理的对照培养物(图13A)相比,78nM PGRMC1N端抗体的存在不显著改变Abeta结合强度。

[0086] 图13H示出与13G相同的视野,其中神经元经神经元特异性MAP2免疫标记而选择性地可视化。如同在姐妹对照培养物中所见(图13A),在培养物中存在相似密度的神经元。化合尺=15微米。

[0087] 图14A以相对于每个神经元的Abeta结合强度的条形图示出图13中所示数据的定量,其中相对于每个神经元的Abeta结合强度通过对荧光显微图的6E10免疫标记区的数目、强度和面积进行基于图像处理的定量而进行计算。在不存在抗体的情况下(空心条标记的

“对照”)、以及在C端和N端特异性PGRMC1抗体以及非免疫对照IgG抗体(分别为标记条)中每一种的三种浓度下,相对于每个神经元的Abeta寡聚体结合强度。C端特异性PGRMC1抗体是以剂量依赖的方式显著地降低Abeta寡聚体结合的唯一抗体。抗体诱导的相对于每个神经元的结合点数目和结合面积的变化与针对强度所示的那些非常相似。该图与如下解释一致,即这些培养物中存在的较高百分比的Abeta寡聚体与 σ -2受体结合。

[0088] 图14B示出在图13和14A中相同的神经元培养物中的细胞核面积。当用递增浓度的抗体处理时,作为细胞毒性的量度的细胞核面积没有改变。因此,抗体的添加不影响神经元培养物的健康状况。

具体实施方式

[0089] 在详细描述本发明的化合物、组合物和方法之前,应理解本发明不限于所描述的具体操作、组合物或方法论,因为这些可以变化。还应理解,本说明书使用的术语仅出于描述具体的版本(versions)或实施方式的目的,而不意在限制本发明的范围,本发明的范围将由所附权利要求限定。除非另外限定,本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解相同的含义。尽管可以将任何与本文描述类似或等同的方法和材料用于本发明实施方式的实施和测试,但现在将描述优选的方法、装置和材料。

[0090] 还应理解的是为清楚起见而描述于单独的实施方式中的本发明的某些特征还可以在单个实施方式中组合提供。相反地,为简洁起见而描述于单个实施方式中的本发明的各种特征还可以单独或以任何合适的亚组合提供。

[0091] 定义

[0092] 单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数,除非上下文另外有清楚规定。因此,例如,关于“细胞”是指一个或多个细胞及其本领域技术人员已知的等同物,等等。

[0093] 本文使用的术语“约”是指给定数值加减10%。例如,“约50%”是指45%~55%的范围。

[0094] “ σ -2配体”是指与 σ -2受体结合的化合物,且包括激动剂、拮抗剂、部分激动剂、反向激动剂和简单地该受体或蛋白的其它配体的竞争者。

[0095] 术语“激动剂”是指其存在引起受体的如下生物学活性的化合物,该生物学活性与由该受体的天然出现的配体的存在所引起的生物学活性相同。

[0096] 术语“部分激动剂”是指其存在引起受体的如下生物学活性的化合物,该生物学活性的类型与由该受体的天然出现的配体的存在所引起的生物学活性相同,但量级更低。

[0097] 术语“拮抗剂”是指其存在引起受体的生物学活性的量级下降的实体,例如化合物、抗体或片段。在某些实施方式中,拮抗剂的存在导致受体的生物学活性的完全抑制。本文所用的术语“ σ -2受体拮抗剂”用来描述用作为 σ -2受体的“功能性拮抗剂”的化合物,其阻断Abeta作用,例如,Abeta寡聚体诱导的突触功能障碍,例如可见于体外检定中,例如膜运输检定或突触损失检定,或Abeta寡聚体介导的caspase-3的 σ -2受体活化,或行为检定中,或有需要的患者中。功能性拮抗剂可以通过抑制例如Abeta寡聚体与 σ -2受体的结合而直接作用,或者通过干扰Abeta寡聚体与 σ -2受体结合引起的下游信号传导而间接作用。

[0098] 术语“ σ -2受体拮抗剂化合物”是指小分子、抗体或其活性结合片段,其以可测量的量与 σ -2受体结合并针对由 σ -2受体结合引起的Abeta作用寡聚体诱导的突触功能障碍充当

功能性拮抗剂。

[0099] 术语“选择性”或“选择性的”是指化合物对 σ 受体例如 σ -2受体相比于对非 σ 受体的结合亲和性(K_i)差异。 σ -2拮抗剂对突触神经元中的 σ 受体具有高选择性。对 σ -2受体的 K_i 或对 σ -2和 σ -1受体两者的 K_i 与对非 σ 受体的 K_i 进行比较。在一些实施方式中,选择性的 σ -2受体拮抗剂或 σ -1受体配体对与 σ 受体结合相比于与非 σ 受体结合具有至少10倍、20倍、30倍、50倍、70倍、100倍或500倍或更高的亲和性,通过比较不同受体处的结合离解常数 K_i 值、或 IC_{50} 值或结合常数而评定。任何已知的检定方案均可以用来评定不同受体处的 K_i 或 IC_{50} 值,例如通过监测具有已知离解常数的放射性化合物从受体的竞争性置换,例如通过Cheng and Prusoff (1973) (Biochem.Pharmacol.22,3099-3108)的方法或本文具体提供的方法。在一些实施方式中, σ -2拮抗剂化合物是相比于非 σ 受体对 σ -2受体具有结合特异性的抗体或其活性结合片段。在抗体或片段的情况下, σ -2受体处的结合常数可以通过本领域已知的任何方式进行计算并与非 σ 受体处的结合常数进行比较,例如通过Beatty等人,1987,J Immunol Meth,100 (1-2):173-179的方法或Chalquest,1988,J.Clin.Microbiol.26 (12):2561-2563的方法。非 σ 受体例如选自毒蕈碱M1-M4受体、五羟色胺(5-HT)受体、 α 肾上腺素受体、 β 肾上腺素受体、阿片受体、五羟色胺转运体、多巴胺转运体、肾上腺素转运体、多巴胺受体或NMDA受体。

[0100] 在本申请中,术语“高亲和性”意在指在 σ 受体结合检定中表现出小于600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、小于150nM、小于100nM、小于80nM、小于60nM、或优选小于50nM的 K_i 值的化合物,例如相对于 $[^3H]$ -DTG,如Weber等人,Proc.Natl.Acad.Sci (USA) 83:8784-8788 (1986)中公开,其并入本文以供参考,其测量了化合物对于 σ -1和 σ -2受体位点两者的结合亲和性。特别优选的 σ 配体相对于 $[^3H]$ -DTG表现出小于约150nM、优选小于100nM、小于约60nM、小于约10nM、或小于约1nM的 K_i 值。

[0101] 术语“治疗表型”用来描述化合物在预测行为效力的体外检定中的活性模式。(1)选择性地以高亲和性与 σ -2受体结合且(2)在神经元中针对Abeta寡聚体诱导的作用充当功能性拮抗剂的化合物被认为具有“治疗表型”,如果(i)其阻断或减少A β 诱导的膜运输缺陷;(ii)阻断或减少A β 诱导的突触损失且(iii)在不存在Abeta寡聚体时不影响运输或突触数目。在体外检定中的活性模式被称为“治疗表型”并可以预测行为效力。

[0102] 术语“治疗分布(profile)”用来描述满足治疗表型、并具有较好的脑渗透性(跨越血脑屏障的能力)、较好的血浆稳定性和较好的代谢稳定性的化合物。

[0103] 术语“药物样特性”在本文中用来描述 σ -2受体配体在施用时的药代动力学和稳定性特性,包括脑渗透性、代谢稳定性和/或血浆稳定性。

[0104] “Abeta种类”或“A β ”包括组合物,该组合物包括含有可溶淀粉样蛋白肽的成分,例如Abeta单体、Abeta寡聚体、或Abeta肽(单体、二聚或多聚形式)与其它可溶肽或蛋白的复合物以及其它可溶Abeta组装(assemblies),包括淀粉样蛋白前体蛋白的任何加工产物。已知可溶A β 寡聚体具有神经毒性。甚至已知A β_{1-42} 二聚体破坏小鼠海马切片中的突触可塑性。在本领域已知的一个理论中,认为天然A β_{1-42} 单体具有神经保护性,且神经毒性需要A β 单体自缔合为可溶Abeta寡聚体。然而,某些A β 突变单体(北极型突变(E22G)被报道为与家族AD相关。参见例如Giuffrida等人, β -Amyloid monomers are neuroprotective.J.Neurosci.2009 29(34):10582-10587。包括Abeta种类的制剂的非限

制性实例公开于美国专利申请第13/021,872号;美国专利公开第2010/0240868号;国际专利申请第W0/2004/067561号;国际专利申请第W0/2010/011947号;美国专利公开第20070098721号;美国专利公开第20100209346号;国际专利申请第W0/2007/005359号;美国专利公开第20080044356号;美国专利公开第20070218491号;W0/2007/126473;美国专利公开第20050074763号;国际专利申请第W0/2007/126473号,国际专利申请第W0/2009/048631号,和美国专利公开第20080044406号,其各自引入本文以作参考。

[0105] 结合本发明的化合物使用的“施用”是指将化合物直接施用于目标组织中或目标组织上或将化合物全身或局部地施用于患者或其它受试者。

[0106] 本文使用的术语“动物”包括但不限于人和非人脊椎动物,例如野生动物、实验动物、家畜和农畜动物以及宠物。

[0107] 本文使用的术语“受试者”、“个体”和“患者”可互换使用,且是指何动物,包括哺乳动物、小鼠、大鼠、其他啮齿动物、兔、狗、猫、猪、牛、羊、马、灵长类动物、非人灵长类动物、人等。

[0108] 本文使用的术语“使……接触”是指使分子(或具有更高级结构的分子例如细胞或细胞膜)在一起或结合,使得它们处于允许分子间相互作用例如两个肽或一个蛋白与另一蛋白或其它分子之间的非共价相互作用的距离内。在一些实施方式中,接触发生在溶液中,其中所结合或所接触的分子在普通溶剂中混合并使得自由缔合。在一些实施方式中,接触可以发生在细胞处或在细胞内或在无细胞环境中。在一些实施方式中,无细胞环境是由细胞产生的裂解液。在一些实施方式中,细胞裂解液可以是全细胞裂解液、核裂解液、细胞质裂解液及其组合。在一些实施方式中,无细胞裂解液是得自核提取和分离的裂解液,其中将细胞群的核从细胞中去除然后裂解。在一些实施方式中,核不裂解,但仍认为是无细胞环境。可以通过混合例如涡旋、振摇等使分子在一起。

[0109] 术语“改善”被用于表示本发明改变了提供、应用或施用本发明的组织的特性和/或物理属性。术语“改善”还可结合疾病状态使用,使得当“改善”疾病状态时,与疾病状态相关的症状或物理特性减弱、减少、消除、延迟或避免。

[0110] 术语“抑制”包括阻断、避免某个结果或过程,或恢复到相反的结果或过程。在预防或治疗方面,通过施用本发明的化合物,“抑制”包括使免受(部分或全部)或延迟症状的发作、缓解症状,或使免受、减弱或消除疾病、病症或障碍。

[0111] 术语“抑制运输缺陷”是指阻断细胞、优选神经元细胞中可溶A β 寡聚体诱导的膜运输缺陷的能力。能够抑制运输缺陷的化合物在膜运输检定中的EC₅₀<20 μ M、小于15 μ M、小于10 μ M、小于5 μ M且优选小于1 μ M,且还能够至少50%、优选至少60%、且更优选至少70%地最大抑制可溶A β 寡聚体诱导的膜运输缺陷的A β 寡聚体作用,例如如实施例6中所述。

[0112] 在本说明书的多个地方,本发明化合物的取代基以组或范围公开。具体意图是,本发明的实施方式包括这样的组和范围的成员的各个和每个各自独立的亚组合。例如,术语“C₁₋₆烷基”具体意在各自独立地公开例如甲基(C₁烷基)、乙基(C₂烷基)、C₃烷基、C₄烷基、C₅烷基和C₆烷基,以及例如C₁-C₂烷基、C₁-C₃烷基、C₁-C₄烷基、C₂-C₃烷基、C₂-C₄烷基、C₃-C₆烷基、C₄-C₅烷基和C₅-C₆烷基。

[0113] 对于其中变量出现多于一次的本发明的化合物,各个变量可以是选自限定变量的马库什基团的不同组成部分。例如,当结构被描述为具有两个同时存在于同一化合物上的R

基团时,则这两个R基团可以表示选自针对R所限定的马库什基团的不同组成部分。

[0114] 其中n是整数的术语“n-元”通常描述组成部分中成环原子的数目,其中成环原子的数目是n。例如,吡啶是6元杂芳环的实例,而噻吩是5元杂芳基的实例。

[0115] 本文使用的术语“烷基”意指直链或支链的饱和烃基。实例烷基包括但不限于甲基(Me)、乙基(Et)、丙基(例如正丙基和异丙基)、丁基(例如正丁基、异丁基、叔丁基)、戊基(例如正戊基、异戊基、新戊基)等。烷基可以含有1至约20、2至约20、1至约10、1至约8、1至约6、1至约4、或1至约3个碳原子。术语“亚烷基”指二价烷基连接基团。亚烷基的实例是亚甲基(CH₂)。

[0116] 本文使用的“烯基”是指具有一个或多个碳碳双键的烷基。实例烯基包括但不限于乙烯基、丙烯基、环己烯基等。术语“亚烯基”是指二价连接烯基。

[0117] 本文使用的“炔基”是指具有一个或多个碳碳三键的烷基。实例炔基包括但不限于乙炔基、丙炔基等。术语“亚炔基”是指二价连接炔基。

[0118] 本文使用的“卤代烷基”是指具有一个或更多个卤素取代基的烷基。实例卤代烷基包括但不限于CF₃、C₂F₅、CHF₂、CCl₃、CHCl₂、C₂Cl₅、CH₂CF₃等。

[0119] 本文使用的“芳基”是指单环或多环(例如具有2、3或4个稠环)的芳族烃,例如苯基、萘基、蒽基、菲基、二氢茚基、茚基等。在一些实施方式中,芳基具有6至约20个碳原子。在一些实施方式中,芳基具有6至约10个碳原子。

[0120] 本文使用的“环烷基”是指非芳族环烃,包括环化的烷基、烯基和炔基,其含有高达20个成环碳原子。环烷基可以包括单环或多环(例如具有2、3或4个稠环)的环体系以及螺环体系。环烷基可以含有3至约15、3至约10、3至约8、3至约6、4至约6、3至约5或5至约6个成环碳原子。环烷基的成环碳原子可以任选地被氧(oxo)或硫(sulfido)取代。环烷基的实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环戊烯基、环己烯基、环己二烯基、环庚三烯基、降冰片基、降萘基(norpinyl)、降莰基(norcarnyl)、金刚烷基等。环烷基的定义中还包括的是具有一个或更多个稠合(即具有共用的键)到环烷基环的芳族环的组成部分,例如,戊烷、戊烯、己烷等的苯并或噻吩基衍生物(例如2,3-二氢-1H-茚-1-基,或1H-茚-2(3H)-酮-1-基)。优选地,“环烷基”是指含有高达20个成环碳原子的环化的烷基。环烷基的实例优选地包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、金刚烷基等。

[0121] 本文使用的“杂芳基”是指具有高达20个成环原子并具有至少一个杂原子环成员(成环原子)例如硫、氧或氮的芳族杂环。在一些实施方式中,杂芳基具有至少一个或多个杂原子成环原子,其各自独立地选自硫、氧和氮。杂芳基包括单环或多环(例如,具有2、3或4个稠环)体系。杂芳基的实例包括而限于吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基、三嗪基、呋喃基、噻吩基、异噻吩基、噻吩基、咪唑基、噻唑基、吡咯基、噁唑基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并噻唑基、异噻唑基、吡唑基、三唑基、四唑基、吡唑基、1,2,4-噻二唑基、异噻唑基、苯并噻吩基、嘌呤基、咪唑基、苯并咪唑基、二氢咪唑基等。在一些实施方式中,杂芳基具有1至约20个碳原子,且在其他实施方式中为约1至约5个、约1至约4个、约1至约3个、约1至约2个作为成环原子的碳原子。在一些实施方式中,杂芳基包含3至约14个、3至约7个或5至6个成环原子。在一些实施方式中,杂芳基具有1至约4个、1至约3个、或1至2个杂原子。

[0122] 本文使用的“杂环烷基”是指具有高达20个成环原子的非芳族杂环,包括环化的烷基、烯基和炔基,其中一个或多个成环碳原子被杂原子例如O、N或S原子取代。杂环烷基可以

是单环或多环(例如,稠环和螺环体系)。实例“杂环烷基”包括吗啉基、硫代吗啉基、哌嗪基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、2,3-四氢苯并呋喃基、1,3-苯并间二氧杂环戊烯、苯并-1,4-二噁烷、哌啶基、吡咯烷基、异噁唑烷基、异噻唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、咪唑烷基、吡咯烷-2-酮-3-基等。杂环烷基的成环碳原子和杂原子可以任选地被氧或硫取代。例如,成环S原子可以被1或2个氧取代[即,形成S(O)或S(O)₂]。再如,成环C原子可以被氧取代(即,形成羰基)。杂环烷基的定义中还包括的是具有一个或多个稠合(即具有共用的键)到非芳族杂环的芳族环的组成部分,例如,吡啶基、噻吩基、酞酰亚胺基、萘酰亚胺基和杂环的苯并衍生物例如吲哚基(indolene)、异吲哚基、异二氢吲哚-1-酮-3-基、4,5,6,7-四氢噻吩并[2,3-c]吡啶-5-基、5,6-二氢噻吩并[2,3-c]吡啶-7(4H)-酮-5-基和3,4-二氢异喹啉-1(2H)-酮-3-基。杂环烷基的成环碳原子和杂原子可以任选地被氧或硫取代。在一些实施方式中,杂环烷基具有1至约20个碳原子,且在其他实施方式中为约3至约20个碳原子。在一些实施方式中,杂环烷基包含约3至约14个、3至约7个、或5至6个成环原子。在一些实施方式中,杂环烷基具有1至约4个、1至约3个、或1至2个杂原子。在一些实施方式中,杂环烷基包含0至3个双键。在一些实施方式中,杂环烷基包含0至2个三键。

[0123] 本文使用的“卤代”或“卤素”包括氟、氯、溴和碘。

[0124] 本文使用的“烷氧基”是指-O-烷基。实例烷氧基包括甲氧基、乙氧基、丙氧基(例如正丙氧基和异丙氧基)、叔丁氧基等。

[0125] 本文使用的“卤代烷氧基”是指-O-卤代烷基。实例卤代烷氧基是OCF₃。本文使用的“三卤代甲氧基”是指具有三个卤素取代基的甲氧基。三卤代甲氧基的实例包括但不限于-OCF₃、-OCClF₂、-OCCl₃等。

[0126] 本文使用的“芳烷基”是指被芳基取代的C₁₋₆烷基,且“环烷基烷基”是指被环烷基取代的C₁₋₆烷基。

[0127] 本文使用的“杂芳烷基”是指被杂芳基取代的C₁₋₆烷基,且“杂环烷基烷基”是指被杂环烷基取代的C₁₋₆烷基。

[0128] 本文使用的“氨基”是指NH₂。

[0129] 本文使用的“烷基氨基”是指被烷基取代的氨基。

[0130] 本文使用的“二烷基氨基”是指被两个烷基取代的氨基。

[0131] 本文使用的C(O)是指C(=O)。

[0132] 本文使用的术语“任选地取代”意指取代是任选的,并且因此包括未被取代的和取代的原子和组成部分两者。“取代的”原子或组成部分表明指定的原子或组成部分上的任意氢可以被来自指明的取代基的选择代替,条件是不超过指定原子或组成部分的正常价态,并且取代产生稳定的化合物。例如,如果甲基(即CH₃)被任选地取代,则碳原子上的3个氢原子可以被所指明的取代基代替。

[0133] 本文使用的“β淀粉样蛋白作用”,例如“非致死β淀粉样蛋白作用”或Abeta寡聚体作用是指与Abeta种类接触的细胞上的作用,特别是非致死作用。例如,已发现当神经元细胞与可溶β淀粉样蛋白(“Abeta”)寡聚体接触时,寡聚体在体外与神经元细胞的子集上的突触子集结合。该结合可以在例如测量体外Abeta寡聚体结合的检定中被定量。Abeta种类的另一文献记载的作用是突触数目的减少,其已被报道在人海马中为约18%(Scheff等人,2007)且可以被定量(例如,在测量突触数目的检定中)。作为另一例子,已发现,当神经元细

胞与β淀粉样蛋白 (“Abeta”) 寡聚体接触时,调节膜运输且继而发生膜运输的改变。该异常可以用许多检定包括但不限于MTT检定进行可视化。例如,黄色四唑盐被细胞胞吞,且盐被位于胞内体途径的囊泡内的酶还原为不可溶紫色甲臆。紫色甲臆的水平反映出培养中的活性代谢细胞的数目,并且甲臆量的减少被认为是对培养中的细胞死亡或代谢毒性的测量。当通过显微镜观察与黄色四唑盐接触的细胞时,首先在填充细胞的细胞内囊泡中可见紫色甲臆。随着时间的推移,囊泡被胞吐,并且在不可溶甲臆暴露于水性介质环境时,甲臆作为针状结晶在质膜外表面上析出。Abeta种类的其它作用包括认知衰退例如形成新记忆的能力衰退和记忆丧失,其可以在使用动物模型的体内检定中进行测量。在一些实施方式中,Abeta作用选自Abeta寡聚体诱导的突触功能障碍,例如可见于体外检定中,例如膜运输检定或突触损失检定,或Abeta寡聚体介导的caspase-3的σ-2受体活化,或Abeta诱导的神经元功能障碍,Abeta介导的长时程增强效应(LTP)下降,或行为检定中的认知衰退中,或在有需要的患者中。

[0134] 在一些实施方式中,当与阴性对照相比,测试化合物可以将神经元细胞上的与可溶Abeta寡聚体种类相关的作用抑制大于约10%、优选大于15%且优选大于20%时,其被认为可有效治疗认知衰退或与其相关的疾病。在一些实施方式中,当与阳性对照相比,测试剂可以将淀粉样蛋白前体蛋白的加工产物所介导的作用抑制大于约10%、优选大于15%且优选大于20%时,其被认为是有效的。例如,如以下实施例所示,将Abeta寡聚体结合仅抑制18%可完全抑制突触减少。例如,参见图3C和3D。尽管本说明书关注对Abeta种类的非致死作用(例如神经元代谢的异常和突触数目减少)的抑制,但这些显示为与认知功能相关,而且随时间推移期望可引起淀粉样蛋白病理的下游可测量症状的减少,尤其是临床症状例如1)通过淀粉样蛋白成像剂例如fluorbetapir、PittB或任何其它成像剂而测量的原纤维或斑块积聚,2)通过用FDG-PET检测的葡萄糖代谢减退而测量的突触损失或细胞死亡,或3)通过得自患者的脑脊液、脑组织活检或血浆中的经ELISA的成像或蛋白/代谢物检测而可检测的脑或身体内的蛋白表达或代谢物量的改变(例如经ELISA测量的Abeta 42、磷酸化tau、全部tau的水平或比率的变化,或ELISA板中可检测的蛋白表达改变的模式)(参见文献:Wyss-Coray T.等人.Modeling of pathological traits in Alzheimer's disease based on systemic extracellular signaling proteome.Mol Cell Proteomics 2011Jul 8,其全部引入本文以供参考),4)通过血管水肿的存在来测量的脑血管异常或通过MRI可检测的微出血和任何其它通过成像技术可检测的症状,以及5)通过任何施用的认知测试例如ADAS-Cog、MMSE、CBIC或任何其它认知测试仪器测量的认知丧失。

[0135] 本文使用的术语“神经元细胞”可以用来指单个细胞或细胞群。在一些实施方式中,神经元细胞是初级(primary)神经元细胞。在一些实施方式中,神经元细胞是永生化或转化的神经元细胞或干细胞。初级神经元细胞是不能分化成其它类型的神经元细胞例如神经胶质细胞的神经元细胞。干细胞是可以分化成神经元和其它类型的神经元细胞例如神经胶质的细胞。在一些实施方式中,检定使用包括至少一种神经元细胞而没有神经胶质细胞的组合物。在一些实施方式中,组合物包括少于约30%、25%、20%、15%、10%、5%、或1%的神经胶质细胞,已知其内化和积聚Abeta。初级神经元细胞可以源自动物脑的任何区域。在一些实施方式中,神经元细胞是海马或皮质细胞。可以通过任何方法确定神经胶质细胞

的存在。在一些实施方式中,通过GFAP的存在检测神经胶质细胞,并且可以通过针对MAP2用抗体阳性染色来检测神经元。

[0136] 短语“药学上可接受的”是指通常被认为安全无毒性的分子实体和组合物。具体地,本发明的药物组合物中使用的药学上可接受的载体、稀释剂或其它赋形剂是生理学上可耐受的,与其它成分相容的,且在对患者施用时常不产生过敏或相似不宜反应(例如胃不适、眩晕等)。优选地,本文使用的术语“药学上可接受的”是指被联邦管制机构或州政府批准或列于美国药典或其它通常认可的用于动物、更优选人的药典中。本文使用的短语“药学上可接受的盐”包括本发明化合物的用于哺乳动物安全有效且具有期望的生物学活性的盐。药学上可接受的盐包括本发明化合物中或根据本发明的方法识别的化合物中存在的酸性基团或碱性基团的盐。药学上可接受的酸加成盐包括但不限于盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硝酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乙酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐(gentisinate)、富马酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐(glucaronate)、糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐(即1,1'-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸盐))。本发明的某些化合物可以与各种氨基酸形成药学上可接受的盐。合适的碱盐包括但不限于铝、钙、锂、镁、钾、钠、锌、铁和二乙醇胺盐。药学上可接受的碱加成盐也与胺例如有机胺形成。合适的胺的实例是N,N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、二环己胺、乙二胺、N-甲基葡糖胺和普鲁卡因。

[0137] 本文使用的术语“治疗性”是指用于治疗、反抗、改良、使免受或改善受试者的不希望的病症或疾病的试剂。

[0138] 本文使用的术语“有效量”是指对具体的病症或病理过程的至少一种症状或参数引起可测量的抑制的量。例如,在Aβ寡聚体的存在下提供可测量的较低的突触减少的本发明的σ-2配体的量被认为是有效量,因为其减少病理过程,即使没有淀粉样蛋白病理的临床症状被改变,至少没有被立即改变。

[0139] 本发明的化合物或组合物的“治疗有效量”或“有效量”是以适用于任何医疗的合理收益/风险比,对被治疗的受试者赋予治疗效果的预定量。治疗效果可以是客观的(即通过一些测试或标记物可测量的)或主观的(即受试者给出表示或感觉到效果或医师观察到变化)。本发明的化合物的有效量可以广泛地为约0.01mg/Kg至约500mg/Kg、约0.1mg/Kg至约400mg/Kg、约1mg/Kg至约300mg/Kg、约0.05至约20mg/Kg、约0.1mg/Kg至约10mg/Kg、或约10mg/Kg至约100mg/Kg。本文考虑的效果适当地包括医疗和/或预防处理。根据本发明施用以获得治疗和/或预防效果的化合物的具体剂量当然根据案例周围的具体情况确定,包括例如施用的化合物、施用途、其它有效成分的共同施用、经治疗的病症、所采用的具体化合物的活性、所采用的具体组合物、患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食、施用时间、施用途、所采用的具体化合物的排泄速率以及治疗时长。施用的有效量由医师鉴于前述相关情况并运用合理的医学判断来确定。本发明化合物的治疗有效量通常是如下量,使得当其以生理学上可耐受的赋形剂组合物施用,足以实现有效全身浓度或组织局部浓度。以单剂量或分开剂量施用至人或其它动物的本发明的化合物的日总剂量的量可以是例如0.01mg/Kg至约500mg/Kg、约0.1mg/Kg至约400mg/Kg、约1mg/Kg至约300mg/Kg、约10mg/Kg至约100mg/Kg、或更通常约0.1~25mg/kg体重/天。单剂量组合物可以含有这样的量或其因

数以组成日剂量。通常,根据本发明的治疗方案包括对需要这样的治疗的患者以单剂量或多剂量每天施用约1mg至约5000mg、10mg至约2000mg、20~1000mg、优选20~500mg且最优选约50mg本发明的化合物。

[0140] 本文使用的术语“治疗”是指治疗处理和预防或防护措施两者,其中目的是使免受(部分或全部)或减缓(减轻或延迟发作)不期望的生理病症、障碍或疾病,或获得有益的或期望的临床结果,例如部分或完全恢复或抑制已经或将会变得异常的参数、值、功能或结果的减退。对于本发明的目的,有益的或期望的临床结果包括但不限于减轻症状;减弱病症、障碍或疾病的发展程度或活力或速度;稳定(即不恶化)病症、障碍或疾病的状态;延迟病症、障碍或疾病的发作或减缓病症、障碍或疾病的进展;改良病症、障碍或疾病状态;以及缓解(无论是部分还是全部),不论其是否转化为实际的临床症状的立即减轻,或增强或改善病症、障碍或疾病。治疗寻求引起临床上显著的反应而无过度水平的副作用。治疗还包括与如果不接受治疗的预期存活相比延长存活。

[0141] 通常而言,术语“组织”是指统一执行特定功能的相似的专门细胞的集合。

[0142] 本文使用的“认知衰退”可以是动物认知功能的任何负面变化。例如,认知衰退包括但不限于记忆丧失(例如行为记忆丧失)、无法获得新记忆、混乱、判断受损、人格改变、定向障碍、或其任意组合。因此,可有效治疗认知衰退的化合物可以通过以下而有效:恢复长时程神经元增强(LTP)或长时程神经元抑制(LTD)或电生理测量的突触可塑性的平衡;抑制、治疗、和/或减轻神经退行;抑制、治疗、和/或减轻一般淀粉样变性;抑制、治疗、减轻淀粉样蛋白产生、淀粉样蛋白组装、淀粉样蛋白聚集、和淀粉样蛋白寡聚体结合中的一种或多种;抑制、治疗、和/或减轻一种或多种Abeta种类对神经元细胞的非致死作用(例如突触损失或功能障碍和异常膜运输);以及其任意组合。此外,该化合物还可以有效地治疗Abeta相关的神经退行性疾病和病症,包括但不限于痴呆,包括但不限于阿尔茨海默病(AD),包括轻度阿尔茨海默病、唐氏综合征、血管性痴呆(脑淀粉样血管病和中风)、路易体痴呆、HIV痴呆、轻度认知障碍(MCI)、年龄相关的记忆受损(AAMI)、年龄相关的认知衰退(ARCD)、临床前阿尔茨海默病(PCAD)和非痴呆认知障碍(CIND)。

[0143] 本文使用的术语“天然配体”是指存在于受试者中的可以与蛋白质、受体、膜脂或体内或体外复制的其他结合配偶体结合的配体。天然配体可以是合成来源的,但也须在受试者中天然存在而无人为干预。例如,已知Abeta寡聚体在人受试者中存在。因此,受试者中发现的Abeta寡聚体将被视为天然配体。Abeta寡聚体与结合配偶体的结合可以使用重组或合成技术在体外进行复制,但不管Abeta寡聚体如何制备或制造,Abeta寡聚体仍被认为是天然配体。也可以与同一结合配偶体结合的合成小分子如果在受试者中不存在,则其不是天然配体。例如,本文描述的化合物II、化合物IXa和IXb以及所有其他化合物通常不存在于受试者中,因此将不会被认为是天然配体。

[0144] σ -2受体

[0145] σ 受体是以组织和状态相关的方式参与数个不同的蛋白信号传导复合体的多功能衔接子/分子伴侣蛋白。 σ -2受体以低水平在脑和多种外周组织中表达。(Walker等人, 1990Sigma receptors:biology and function.Pharmacol.Rev.42:355-402)。 σ -2受体存在于人的海马和皮质中。 σ -2受体还在先前被确认为肿瘤细胞增殖的生物标记物。(Mach等人,Sigma-2receptors as potential biomarkers of proliferation in breast

cancer. *Cancer Res.* 57:156-161, 1997)。

[0146] σ -受体涉及到很多信号传导通路中,例如血红素结合、细胞色素P450代谢、胆固醇合成、孕酮信号传导、细胞凋亡和膜运输。仅有一个子集的 σ 受体结合位点/信号传导通路与AD中的寡聚体信号传导相关。 σ -2受体基因敲除目前尚不可得,且 σ -2序列中的人突变还没有在神经退行情况下进行过研究。

[0147] 近来,通过使用可逆地标记大鼠肝脏中的 σ -2受体的光亲和性探针WC-21, σ -2受体被识别为大鼠肝脏中的孕酮受体膜成分1 (PGRMC1)。Xu等人. Identification of the PGRMC1 protein complex as the putative sigma-2receptor binding site. *Nature Communications* 2, 文章数第380, 2011年7月5日, 其并入本文以供参考。PGRMC1 (孕酮受体膜成分1) 在2011年8月被Xu等人识别为 σ -2受体活性的关键性25kDa成分。PGRMC1是单跨膜蛋白,与 σ -1蛋白没有同源性;家族成员包括PGRMC2和neudesin。PGRMC1包含细胞色素b5血红素结合域。PGRMC1是与S1蛋白没有同源性的单跨膜蛋白;家族成员包括PGRMC2和neudesin。PGRMC1包含细胞色素b5血红素结合域。内源性PGRMC1配体包括孕酮/类固醇、胆固醇代谢物、糖皮质激素和血红素。PGRMC1用作为与不同亚细胞位置中的不同蛋白复合物相关的分子伴侣/衔接子 (Cahill 2007. Progesterone receptor membrane component 1: an integrative review. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 105:16-36)。PGRMC1以降低的活性与血红色结合,与CYP450蛋白复合 (调节的氧化还原反应),与PAIRBP1缔合并介导细胞凋亡的孕酮阻断,与Insig-1和SCAP缔合以诱导应答于低胆固醇的SRE相关的基因转录。秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 同源物VEM1与UNC-40/DCC缔合以介导轴突导向。PGRMC1包含两个SH2靶序列、SH3靶序列、酪氨酸激酶位点、两个嗜酸激酶位点 (CK2) 和对于ERK1和PDK1的一致性结合位点。PGRMC1包含数个参与膜运输 (囊泡转运、含有calveolin的窝的网格蛋白依赖的胞吞) 的ITAM序列。

[0148] σ -2受体疗法对于其他CNS适应征已经达到了人II期临床试验,但对于AD的治疗并未如此。很多 σ -2受体配体不是非常有选择性,并且对其他非 σ CNS受体具有高亲和性。例如, Cyr-101/MT-210 (Cyrenaic Pharmaceuticals; Mitsubishi) 是精神分裂症IIa期临床试验中的 σ -2受体拮抗剂,但是具有多种其他受体相互作用包括在5HT2a、ADRA1和组胺H1处。希拉美新 (Lundbeck, Forest Lu28179) 是先前用于焦虑临床试验但没有继续的 σ -2受体激动剂。 σ -1受体配体用于针对多种CNS适应征的临床试验。库他美新二盐酸盐 (AGY SA4503, M's Sience Corp.) 是用于中风II期临床试验以及抑郁II期试验的 σ -1受体激动剂。Anavex 2-73是 σ -1受体激动剂,其还在毒蕈碱胆碱能受体处用作为M2/3拮抗剂、M1激动剂,并且是相对于多种离子通道 (NMDAR, Na⁺, Ca⁺⁺) 的拮抗剂。Anavex 2-73进入了具有AD和轻度认知障碍的患者的IIa期临床试验。之前没有在AD中进行高度选择性 σ -2受体配体疗法的临床试验。

[0149] σ -2拮抗剂

[0150] 不拘泥于理论,提出 σ -2受体是神经元中Abeta寡聚体的受体。文献中针对可溶Abeta寡聚体已提出多种受体,包括朊蛋白、胰岛素受体、 β 肾上腺素能受体和RAGE (糖基化终末产物的受体)。Laurén, J. 等人, 2009, *Nature*, 457 (7233): 1128-1132; Townsend, M. 等人, *J. Biol. Chem.* 2007, 282: 33305-33312; Sturchler, E. 等人, 2008, *J. Neurosci.* 28 (20): 5149-5158。很多研究者确实相信, Abeta寡聚体可以与多于一种的受体蛋白结合。不拘泥于

理论,基于本文呈现的证据,本发明的发明者假定出位于(不必须专门地)神经元中的Abeta寡聚体的其他受体。

[0151] 不拘泥于理论,Abeta寡聚体是与 σ 蛋白复合物结合并引起异常运输和突触损失的 σ 受体激动剂。本文证实,在神经元的该相互作用和/或 σ 受体功能中起拮抗作用的高亲和性 σ -2配体会与Abeta寡聚体竞争并将神经元应答回复至正常。这样的配体被认为是功能性 σ -2受体拮抗剂并如此称谓或更简单地称为 σ -2受体拮抗剂或 σ -2拮抗剂。

[0152] 在一些实施方式中,本发明的 σ -2受体拮抗剂用作为神经元细胞中的功能性拮抗剂,有关于抑制可溶AB寡聚体诱导的突触损失和抑制膜运输检定中的可溶AB寡聚体诱导的缺陷;表现出在 σ -2受体处的高亲和性;以及与其他非 σ 受体相比对于一种或多种 σ 受体具有高选择性;以及表现出较好的药物样特性。

[0153] 在一些实施方式中,本文详述的满足某些体外检定标准的 σ -2受体功能性拮抗剂在本说明书中公开的一种或多种相关动物行为模型中表现出行为效力,或被预测具有行为效力。在一些实施方式中,在10mg/kg p.o.或更低确定行为效力。

[0154] 在一些实施方式中,本公开内容提供可预测高亲和性 σ -2受体配体的行为效力的体外检定平台。根据该体外检定平台,配体以高亲和性与 σ -2受体结合;用作为相对于神经元中Abeta寡聚体诱导的作用的功能性拮抗剂;抑制中枢神经元中Abeta寡聚体诱导的突触损失或降低Abeta寡聚体与神经元的结合以抑制突触损失;以及在不存在Abeta寡聚体时不影响运输或突触数目。体外检定中的该活性模式被称为“治疗表型”。 σ -2受体拮抗剂阻断成熟神经元中的Abeta寡聚体作用而在不存在Abeta寡聚体时不影响正常功能的能力满足治疗表型的标准。如今公开了具有治疗表型的选择性 σ -2拮抗剂能够阻断Abeta寡聚体诱导的突触功能障碍。

[0155] 在一些实施方式中,具有治疗表型且同时具有以下特征的高亲和性的选择性 σ -2拮抗剂适合作为用于在有需要的患者中治疗Abeta寡聚体诱导的突触功能障碍的治疗候选物:在 σ 受体处的高亲和性;与其他非 σ CNS受体相比,对 σ 受体的高选择性;对 σ -2受体的更高的亲和性或可比的亲和性,例如在 σ -2和 σ -1受体处为一个数量级内;对 σ 受体的与中枢神经系统中相关的其它受体相反的选择性,以及较好的药物样特性。药物样特性包括可接受的脑渗透性(跨越血脑屏障的能力)、较好的血浆稳定性和较好的代谢稳定性,例如通过对肝脏微粒体的暴露而测量的。不拘泥于理论,高亲和性 σ -2受体拮抗剂与Abeta寡聚体竞争,且/或停止引起阿尔茨海默病的病理 σ 受体信号传导。

[0156] 在一些实施方式中,本发明的拮抗剂可以以比 σ -2受体更高的亲和性与 σ -1受体结合,但是必须仍关于阻断或抑制Abeta寡聚体诱导的作用(Abeta作用)表现为功能性神经元拮抗剂。

[0157] 在一些实施方式中,具有治疗表型且具有以下特征的 σ -2拮抗剂适合作为用于在有需要的患者中治疗Abeta寡聚体诱导的突触功能障碍的治疗候选物:在 σ 受体处的高亲和性;相比于其他非 σ CNS受体,对 σ 受体的高亲和性;对 σ -2受体的高亲和性或在 σ -2和 σ -1受体处可比的亲和性;以及较好的药物样特性。药物样特性包括较高的脑渗透性、血浆稳定性和代谢稳定性。

[0158] 在一些实施方式中,在结合活性研究中,至多约600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、150nM、100nM、优选为至多约75nM、优选为至多约60nM、优选为至多约40nM、最优选为

至多10nM、最优选为至多1nM的IC₅₀或K_i值表明关于σ受体结合位点的高结合亲和性。

[0159] 在一些实施方式中,相比于其他非σCNS或靶标受体对σ受体具有高于约20倍、30倍、50倍、70倍或优选高于100倍的选择性、具有较好的药物样特性包括脑渗透性和较好的代谢和/或血浆稳定性且具有治疗表型的在σ-2受体处具有高亲和性(优选K_i小于约600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、150nM、100nM、70nM、60nM、50nM、30nM或10nM)的σ-2受体拮抗剂被预测为具有行为效力并且可以用于在有需要的患者中治疗Abeta寡聚体诱导的突触功能障碍。

[0160] 本文使用的术语“脑渗透性”是指药物、抗体或片段跨越血脑屏障的能力。在一些实施方式中,动物药代动力学(pK)研究例如小鼠药代动力学/血脑屏障研究可以用于确定或预测脑渗透性。在一些实施方式中,可以施用多个浓度的药物,例如以3、10和30mg/kg,例如p.o.施用5天,并且测量多个pK特性,例如在动物模型中。在一些实施方式中,确定剂量相关的血浆和脑中水平。在一些实施方式中,脑C_{max}>100、300、600、1000、1300、1600或1900ng/mL。在一些实施方式中,较好的脑渗透性被定义为,脑/血浆比率为>0.1、>0.3、>0.5、>0.7、>0.8、>0.9、优选>1、且更优选>2、>5或>10。在其他实施方式中,较好的脑渗透性被定义为,在预定时间段后高于约0.1%、1%、5%、高于约10%、且优选高于约15%的所施用剂量跨越BBB。在某些实施方式中,剂量为经口服施用(p.o.)。在其他实施方式中,在测量pK特性之前,剂量为经静脉施用(i.v.)。检定和脑渗透性在实施例7中描述,且化合物II的数据显示在图2A和2B中,已知化合物II经受首过代谢,因此皮下给药;尽管如此,化合物II在急性和慢性给药后均具有高脑渗透性。化合物II的脑/血浆比率为>8。

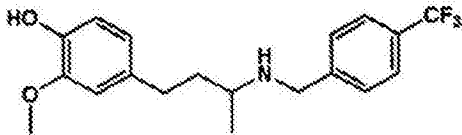
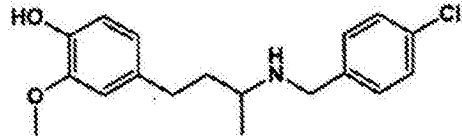
[0161] 本文使用的术语“血浆稳定性”是指化合物在血浆中例如通过酶例如水解酶和酯酶的降解。可以采用多种体外检定中的任一种。药物在血浆中孵育多种时间段。在各个时间点剩余的百分比母体化合物(分析物)反映出血浆稳定性。较差的血浆稳定性特征可以趋向于具有较低的生物利用度。较好的血浆稳定性可以定义为,在30分钟后剩余高于50%的分析物,在45分钟后剩余高于50%的分析物,且优选为在60分钟后剩余高于50%的分析物。

[0162] 本文使用的术语“代谢稳定性”是指化合物从首过代谢(口服药物的肠和肝降解或结合)中幸存的能力。这可以例如在体外通过将化合物暴露于小鼠或人肝脏微粒体而评测。在一些实施方式中,较好的代谢稳定性是指在将化合物暴露于小鼠或人肝脏微粒体时,t_{1/2}>5min、>10min、>15分钟、>20分钟、优选>30分钟。在一些实施方式中,较好的代谢稳定性是指内在清除率(C_{int})<300uL/min/mg,优选≤200uL/min/mg,且更优选≤100uL/min/mg。

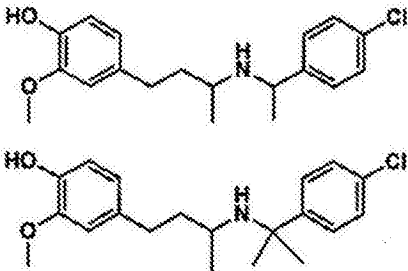
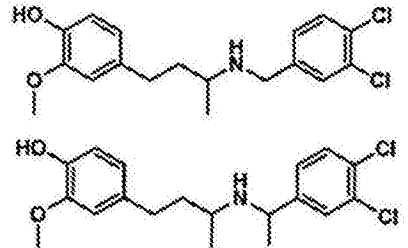
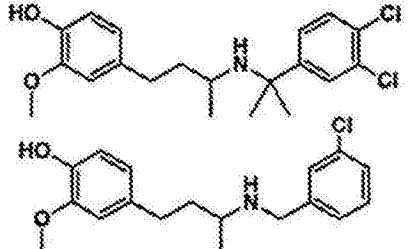
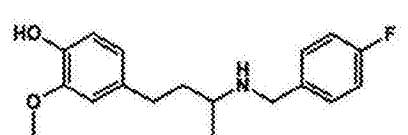
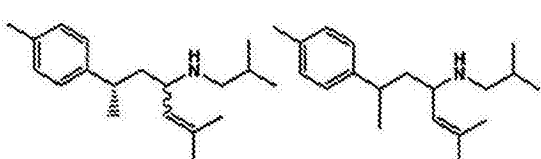
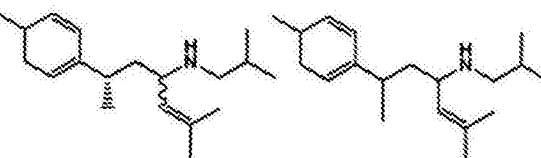
[0163] 在一些实施方式中,排除某些现有技术化合物,其已知为σ-2拮抗剂,并且要么(i)已知与σ-2受体结合并减少或消除Abeta诱导的病理,例如神经元细胞中膜运输的缺陷或突触减少,要么(ii)已知针对阿尔茨海默病症状具有活性而不涉及σ-2受体相互作用。在一些实施方式中,表1A中记载的化合物关于本公开内容的组合物或方法而不要求保护,关于表1A,R、R₁和R₂可以独立地为烷基、烷氧基、卤素、卤代烷基或卤代烷氧基,且n=0~8。

[0164] 表1A. 不要求保护的化合物

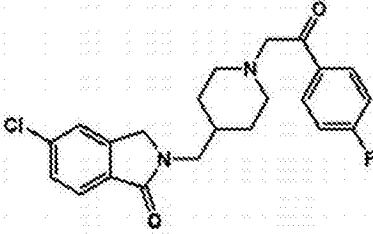
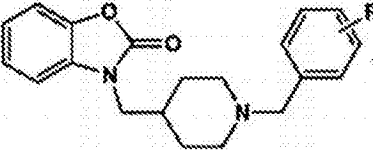
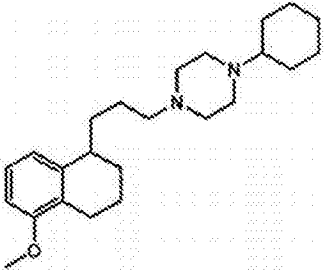
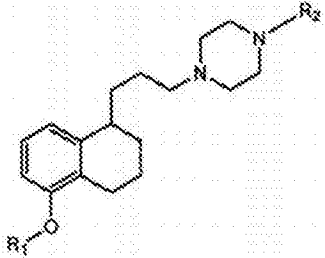
[0165]

不要求保护的化合物	参考文献
 <chem>COc1cc(OC)cc(cc1C/C=C/C(C)CNCc2ccc(C(F)(F)F)cc2)c3ccc(O)cc3</chem>	CogRx Rishton, Catalano WO 2010/118055 A1 实施例 2, pp. 46-47
 <chem>COc1cc(OC)cc(cc1C/C=C/C(C)CNCc2ccc(Cl)cc2)c3ccc(O)cc3</chem>	CogRx Rishton, Catalano WO 2010/118055 A1 实施例 1, pp. 43-44

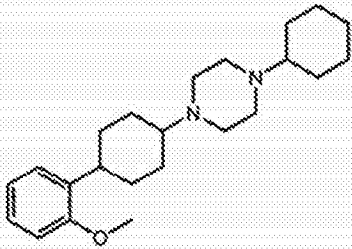
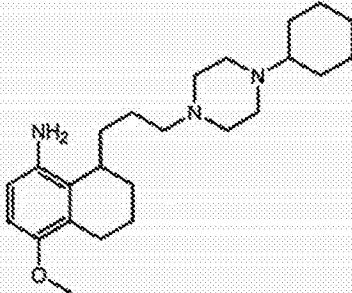
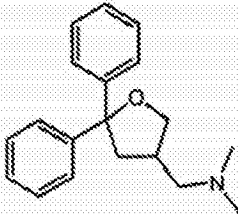
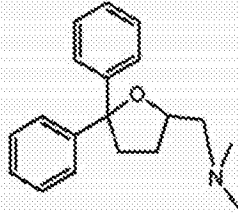
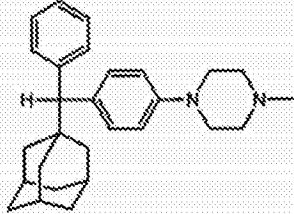
[0166]

不要求保护的化合物	参考文献
	CogRx Rishton, Catalano WO 2010/118055 A1 p. 32
	CogRx Rishton, Catalano WO 2010/118055 A1 p. 32
	CogRx Rishton, Catalano WO 2010/118055 A1 p. 32
	CogRx Rishton, Catalano WO 2010/118055 A1 p. 32
	CogRx Rishton, Catalano WO 2011/014880 A1 实施例 1, pp. 41-42
	CogRx Rishton, Catalano WO 2011/014880 A1

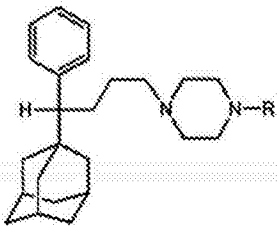
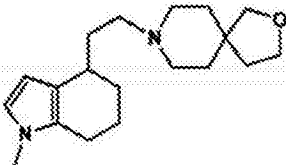
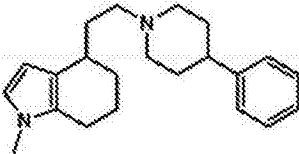
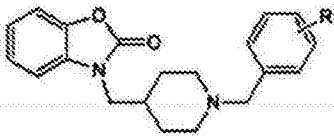
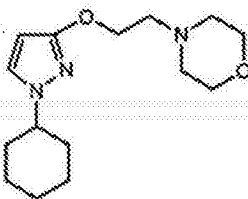
[0167]

不要求保护的化合物	参考文献
	实施例 1, p. 42
	Rocher, Yamabe WO 2001/64670 A1 Laurini, <i>et al.</i> Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 20 (2010) 2954-2957
	Rocher, Yamabe WO 2001/64670 A1 Laurini, <i>et al.</i> Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 20 (2010) 2954-2957
	Rocher, Yamabe WO 2001/64670 A1 Laurini, <i>et al.</i> Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 20 (2010) 2954-2957
	Colabufo WO 2007/077543 A2
	Colabufo WO 2007/077543 A2

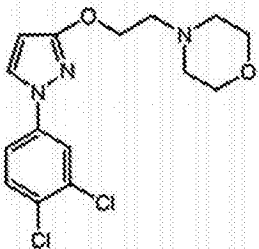
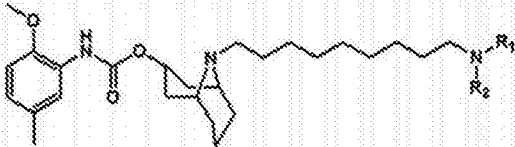
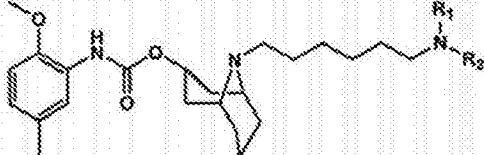
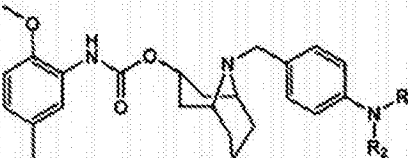
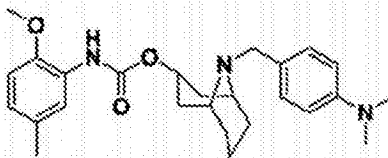
[0168]

不要求保护的化合物	参考文献
	Colabufosine WO 2007/077543 A2
	Abate WO 2009/104058 A1
	Anavex US 2010/0069484 A1 Anavex WO 2008/087458 A2
	Anavex US 2010/0069484 A1 Anavex WO 2008/087458 A2
	Anavex US 2010/0069484 A1 Anavex WO 2008/087458 A2

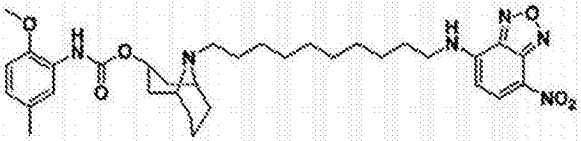
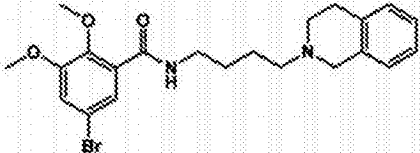
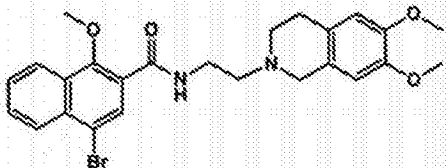
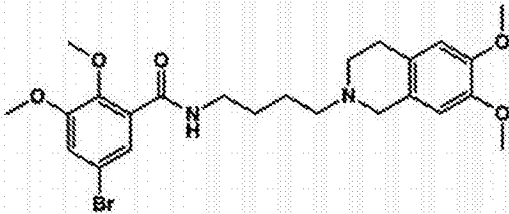
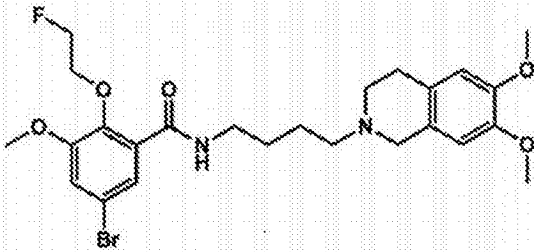
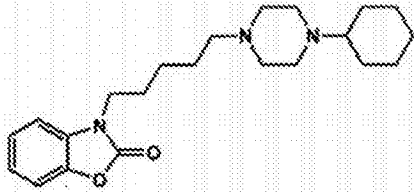
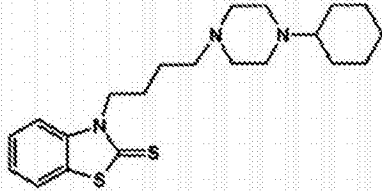
[0169]

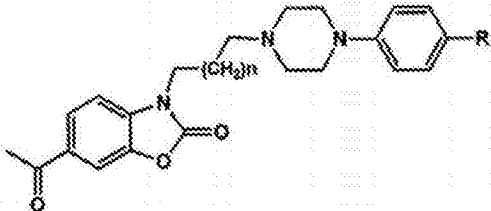
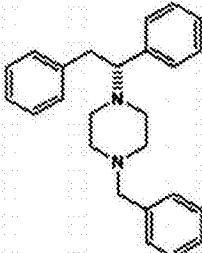
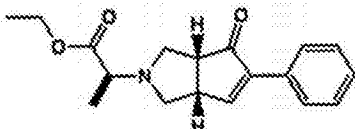
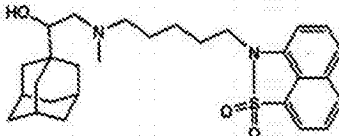
不要求保护的化合物	参考文献
	Anavex US 2010/0069484 A1 Anavex WO 2008/087458 A2
	Corbrera EP 1829862 A1 2007
	Corbrera EP 1829862 A1 2007
	Rocher, Yamabe WO 0164670 A1
	Rocher, Yamabe WO 0164670 A1
	Cuberes EP 1829867 A1 2007
	Cuberes EP 1829867 A1 2007

[0170]

不要求保护的化合物	参考文献
	Cuberes EP 1829867 A1 2007
	Hawkins, Mach US 2009/0176705 A1
	Hawkins, Mach US 2009/0176705 A1
	Hawkins, Mach US 2009/0176705 A1
	Hawkins, Mach US 2009/0176705 A1
	化合物 WC-26 Hawkins, Mach US 2009/0176705 A1
	化合物 SV-119 Hawkins, Mach US 2009/0176705 A1

[0171]

不要求保护的化合物	参考文献
	化合物 SW-120 Hawkins, Mach US 2009/0176705 A1
	Mach US 2005/0107398 A1
	Mach US 2005/0107398 A1
	Mach US 2005/0107398 A1
	Mach US 2005/0107398 A1
	McCurdy WO 2009/026227 A2
	McCurdy JPET 333:491-500, 2010 US 2011/0280804 A1

	不要求保护的化合物	参考文献
		McCurdy WO 2009/026227 A2
[0172]		Mita JP 2001/26584
		Pericas WO 2007/128458 A1
		Rocher, Yamabe WO 1996/05185

[0173] 在一些实施方式中,关于本公开内容的组合物或方法,已知为RHM-1、RHM-4、PB28、SM-21、M-14、NE100、BD1008、BD1047、氟伏沙明、PPBP、戊唑星或氟哌啶醇的化合物不要求保护。在某些检定中,西拉美辛、SV-119和WC-26是功能性 σ -2受体激动剂。在一些实施方式中,本公开内容的组合物和方法不包括西拉美辛、SV-119或WC-26。

[0174] σ -2激动剂引起细胞毒性

[0175] 不拘泥于理论,提出Abeta寡聚体是与 σ 蛋白复合物结合并能够引起多种有害的Abeta作用例如神经元毒性、异常运输和突触损失的 σ -2受体激动剂。本文证实,已知的 σ -2受体激动剂例如西拉美辛、SV-119和WC-26对肿瘤细胞和神经元有细胞毒性,如通过杀死肿瘤细胞以及引起神经元中异常核形态(图9A和9B)的能力所表现的。 σ -2激动剂(西拉美辛、SV-119),尽管能够以低浓度阻断寡聚体诱导的运输缺陷,但其高浓度引起细胞毒性和caspase-3活化(参见图10A中的激动剂西拉美辛和图10B中的SV119)。 σ -2拮抗剂例如化合物II以及IXa、IXb能够阻断神经元细胞中由 σ -2受体激动剂例如SV-119引起的caspase-3活化,如图10D中所示。 σ -2拮抗剂在所有的测试浓度阻断Abeta寡聚体诱导的运输缺陷而不引起细胞毒性,例如,参见图11A中的II和图11B中的RHM-1。

[0176] 本文公开了具有治疗表型和较好药物样特性的高亲和性的选择性 σ -2功能性拮抗剂可以用于治疗Abeta寡聚体诱导的突触功能障碍。

[0177] 在某些实施方式中,本发明的组合物包括对 σ 受体具有高结合亲和性的选择性 σ -2功能性拮抗剂。 σ 受体包括 σ -1和 σ -2亚型两者。参见Hellewell, S.B. and Bowen, W.D., Brain Res. 527:224-253 (1990); 和Wu, X.-Z. 等人, J. Pharmacol. Exp. Ther. 257:351-359 (1991)。对两种 σ 位点的推定配体的结合亲和性进行定量的 σ 受体结合检定(针对 ^3H -DTG, 其以约相等的亲和性标记两种位点)经Weber等人, Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 83:8784-8788 (1986) 公开。或者, [^3H]戊唑辛可以用来在结合检定中选择性地标记 σ -1结合位点。[^3H]DTG和未标记的(+)戊唑辛的混合物用来在结合检定中选择性地标记 σ -2位点。本发明还涉及包括某些对 σ -1和 σ -2受体具有选择性并用作为 σ -2功能性拮抗剂的配体的组合物, 以及这些组合物在治疗Abeta寡聚体诱导的突触功能障碍中的用途。这样的对两种 σ 受体亚型中的一种具有选择性的配体的发现可能是在识别可有效治疗中枢神经系统病症而副作用最小化的化合物中的重要因素。

[0178] 在一些实施方式中, σ -2拮抗剂选自小分子或抗体、或其活性结合片段, 对 σ -2受体具有高亲和性, 且具有阻断可溶Abeta寡聚体结合或Abeta寡聚体诱导的突触功能障碍的能力。

[0179] Abeta抗体

[0180] 一些Abeta单克隆抗体处于用于治疗阿尔茨海默病的临床研发。在一些实施方式中, 本公开内容提供包括 σ -2受体拮抗剂与Abeta抗体的组合物。例如, 巴匹珠单克隆抗体(AAB-00; Janssen, Elan, Pfizer) 是静脉治疗轻度到重度阿尔茨海默病的III期临床研发中的 β -淀粉样蛋白人化IgG₁单克隆抗体。在II期临床研究中, 某些接受2mg/kg高剂量的患者经历了可逆的血管性水肿。尽管在初级效力分析中没有发现显著差异, 但元分析显示出非APOE ϵ 4携带者中的潜在治疗差异。Salloway等人, 2009, A phase 2 ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer's disease Neurol. 2009; 73 (24): 2061-70。现在进行的III期研究, 巴匹珠单克隆抗体约每13周一次通过静脉输注以0.5或1.0mg/kg施用, 同时施用允许的胆碱脂酶抑制剂或memantine。巴匹珠单克隆抗体识别Abeta: Abeta₁₋₅的N端表位。其他AB人化单克隆抗体处于临床研发的各个阶段中, 包括针对Abeta₁₃₋₂₈提出的茄尼醇单克隆抗体(LY2062430; Lilly)、靶向Abeta₃₃₋₄₀的PF-04360365 (Pfizer); MABT5102A (Genentech); GSK933776 (GlaxoSmithKline) 和更汀芦单克隆抗体(gantenerumab) (R1450, R04909832, Hoffman-LaRoche)。近来报道, 茄尼醇单克隆抗体在III期临床试验结果的二次分析中在患有轻度AD的患者而非患有中度AD的患者中显示出统计显著的认知衰退的减缓。在一个实施方式中, 将包括 σ -2拮抗剂和茄尼醇单克隆抗体的组合物用于减缓患有轻度AD的患者中认知衰退的方法。

[0181] 公认的是外周施用的抗体可能不能到达目标组织, 尽管被动免疫似乎在小鼠中可行。一个假设是, 将抗体循环到AB改变AB肽从脑脊液到血浆的平衡, 间接降低脑的AB负荷。Kerchner等人, 2010, Bapineuzumab, Expert Opin Biol Ther., 10 (7): 1121-1130。或者, 提出可能静脉施用的抗体可以在脑中与AB直接结合。参见, 例如Yamada等人, 2009, A β immunotherapy: Intracerebral sequestration of A β by an anti-Ab monoclonal antibody 266 with high affinity to soluble A β . J Neurosci 29 (36): 11393-11398。不幸的是, 迄今, 静脉 β 淀粉样蛋白特异性单克隆抗体还没有被证实为特别有效; 例如, 近来, 静脉巴匹珠单克隆抗体的研发因在患有轻度到中度阿尔茨海默病的患者的两个后期试验

中缺乏效力而终结。

[0182] Abeta多克隆抗体在静脉免疫球蛋白 (IVIg或IGIV) 的混合制剂中天然出现,其已被FDA批准用于治疗其他神经病症。至少两个在AD中使用IVIg的临床试验正通过Baxter和Octapharma而在进行中。Kerchner等人,2010同上。在一些实施方式中,本公开内容提供用于治疗认知衰退或阿尔茨海默病的方法和组合物,其中组合物包括 σ -2受体拮抗剂化合物和Abeta抗体以及药学上可接受的载体。

[0183] σ -2受体抗体

[0184] 在一些实施方式中, σ -2受体拮抗剂化合物是 σ -2受体特异性抗体、或其活性结合片段,其具有阻断可溶Abeta寡聚体结合或Abeta寡聚体诱导的突触功能障碍的能力。在优选实施方式中,用在本文公开方法中的 σ -2拮抗剂抗体或其免疫特异性片段不会在将要治疗的动物例如人中引发有害的免疫应答。在某些实施方式中,用在本文公开的治疗方法中的 σ -2拮抗剂抗体或其活性结合片段可以使用领域认可的技术改性以降低其免疫原性。例如,抗体可以被入化、灵长类化(primatized)、去免疫化,可以制备合成或嵌合抗体。这些类型的抗体源自非人抗体,通常是鼠科或灵长类抗体,其保持有或基本保持有亲代抗体的抗原结合特性,但是其在人中具有较小免疫原性。这可以通过多种方法实现,例如但不限于,(a) 将整个非人可变结构域植入人恒定区中,以产生嵌合抗体,(b) 将一种或多种非人互补决定区(CDR)的至少一部分植入人类框架和恒定区中,保留或不保留关键框架残基,(c) 移植整个非人可变结构域,但是通过表面残基的替换而用人样区域将其“掩盖”,或(d) 使用遗传改性的小鼠,其中小鼠工程设计为表达人的全部特征点,例如人免疫球蛋白重链和轻链可变结构域。这样的方法公开于Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.81:6851-6855 (1984);Morrison等人,Adv.Immunol.44:65-92 (1988);Verhoeyen等人,Science239:1534-1536 (1988);Padlan,Molec.Immun.28:489-498 (1991);Padlan,Molec.Immun.31:169-217 (1994),Peterson,ILAR Journal 46(3):314-319 (2005),Lonberg,Nat.Biotechnol.23(9):1119-1125 (2005)以及美国专利第5,585,089号、第5,693,761号、第5,693,762号、第6,190,370号和US2012/0021409中公开,所有这些均全部并入本文以供参考。

[0185] 去免疫化也可以用于降低抗体的免疫原性。本文使用的术语“去免疫化”包括改变抗体以使T细胞表位改性(参见,例如W09852976A1、W00034317A2)。例如,分析来自起始抗体的V_H和V_L序列,且人T细胞表位从示出与互补决定区(CDR)相关的表位和序列内其他关键残基的位置的各个V区域进行“映射(map)”。分析来自T细胞表位映射的各个T细胞表位,以便识别具有较小的改变最终抗体活性风险的可选氨基酸取代。设计一系列可选的V_H和V_L序列,包括氨基酸取代的组合,并且这些序列随后引入到一系列结合多肽中,例如用在本文公开的方法中的 σ -2拮抗剂抗体或其免疫特异性片段,之后测试其功能。通常而言,产生并测试12~24个变体抗体。之后,将包括改性的V和人C区的完整重链和轻链基因克隆到表达载体中,随后质粒被引入至细胞系中,以用于产生整个抗体。之后将抗体在合适的生物化学和生物检定中进行比较,并识别最佳变体。

[0186] 用在本发明方法中的 σ -2拮抗剂抗体或其片段可以通过任何本领域已知的适当方法产生。多克隆抗体可以通过本领域熟知的多种程序来产生。例如, σ -2多肽片段可以施用到多种宿主动物,包括但不限于兔、小鼠、大鼠等,以诱导含有对抗原特异的多克隆抗体的血清的制备。多种佐剂可以根据宿主物种用于增加免疫学应答,包括但不限于Freund's (完

整和非完整),矿物凝胶例如氢氧化铝,表面活性物质例如溶血卵磷脂、复合(pluronic)多元醇、聚阴离子、肽、油乳剂、钥孔虫凝集素蛋白、二硝基酚和潜在可用的人佐剂例如BCG(卡介苗)和短棒状杆菌。这样的佐剂也在领域内熟知。

[0187] 单克隆抗体可以使用本领域已知的多种技术进行制备,包括杂交瘤、重组和噬菌体展示技术或其组合的使用。例如,单克隆抗体可以使用杂交瘤技术进行制备,包括领域内所知的和例如在Harlow等人, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988); Hammerling等人, *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981) 中教导的那些(所述参考文献全部并入本文以供参考)。本文使用的术语“单克隆抗体”不限于经由杂交瘤技术制备的抗体。术语“单克隆抗体”是指源自单个克隆(包括任何真核、原核或噬菌体克隆)而非制备其的方法的抗体。因此,术语“单克隆抗体”不限于经由杂交瘤技术制备的抗体。单克隆抗体可以使用本领域已知的多种技术制备,包括杂交瘤和重组和噬菌体展示技术的使用。

[0188] 在一些实施方式中,对 σ -2受体特异的 σ -2拮抗剂,例如单克隆抗体或其活性结合片段,可以使用本领域已知的任何可得技术经工程设计为增强跨越血脑屏障的能力。重组蛋白疗法通常无法用于脑输送,因为它们无法跨越血脑屏障;然而,本领域已知用于生物学疗法的脑输送的技术。例如,参见Pardridge and Boado, *Reengineering biopharmaceuticals for targeted delivery across the blood-brain barrier*, *Methods Enzymol.* 2012; 503: 269-292, 其并入本文以供参考。Pardridge和Boado报道,重组蛋白可以再工程设计为BBB渗透的IgG融合蛋白,其中IgG部分是针对内源性BBB受体例如人胰岛素受体(HIR)或转铁蛋白受体(TfR)的遗传工程单克隆抗体(MAb)。在融合蛋白疗法中,IgG与内源性胰岛素受体或TfR结合以引发跨越BBB的转运,并用作为分子特洛伊木马(MTH)以运送到脑中。IgG融合蛋白的药代动力学(PK)特性不同于典型的MAb药物,并由于快速被外周组织以及脑摄取而类似于小分子的PK分布。IgG融合蛋白的脑摄取,2~3%的注射剂量/脑,与小分子的脑摄取可比。IgG融合蛋白已经在小鼠模型中慢性施用,且免疫应答为低效价(titer),且对体内的从血或脑摄取中清除融合蛋白没有作用。例如,Zhou等人使用“特洛伊木马”来将Abeta淀粉样蛋白抗体(AAA)再工程设计为与血脑屏障(BBB)分子特洛伊木马的融合蛋白。AAA被工程设计为单链Fv(ScFv)抗体,且ScFv融合到针对小鼠转铁蛋白受体(TfR)的嵌合单克隆抗体(Mab)的重链中。cTfRMab-ScFv蛋白从血液经BBB TfR上的转运而穿透小鼠脑,且脑摄取在静脉施用后为3.5%的注射剂量/克脑。Zhou等人, *Receptor-mediated Abeta Amyloid Antibody Targeting to Alzheimer's Disease Mouse Brain*. *Mol. Pharm.* 2011, Feb 7; 8(1): 280-285。BBB MTH技术使得能够再工程设计广谱重组蛋白疗法,以用于对脑的靶向药物输送。

[0189] 在一些实施方式中,抗体可以通过Yu等人,2011的方法工程设计为增强脑摄取。由构成BBB的内皮细胞高度表达的靶标转铁蛋白受体的抗体已经被报道为经由受体介导的胞转作用而跨越BBB。该方法的一个问题是靶向转铁蛋白受体的高亲和性抗体可以降低抗体从CNS脉管系统释放的可能性。Yu等人设计了对转铁蛋白具有低亲和性的抗体,以增加抗体从脑脉管内皮释放,并增强对脑的摄取和分布。Yu报道,较低亲和性TfR抗体显示出增加的脑摄取。在一些实施方式中, σ -2受体抗体是经Y. Joy Yu等人, *Sci Transl Med* 3, 84ra44 (2011) 和US2012/0171120(各自并入本文以供参考)的方法制备的双特异性抗体,其中一个

臂包括低亲和性转铁蛋白受体抗体,而另一个臂包括高亲和性 σ -2受体抗体或PGRMC1抗体。

[0190] 在一些实施方式中, σ -2拮抗剂选自任何PGRMC1抗体,或选自对结合 σ -2受体特异且还阻断Abeta寡聚体结合或Abeta寡聚体诱导的突触功能障碍或用作功能性神经元拮抗剂或阻断Abeta寡聚体结合和Abeta作用的任何抗体或其片段。

[0191] 在一些实施方式中, σ -2受体抗体或其结合片段可以再工程设计为BBB渗透的IgG融合蛋白或结合体,其中IgG部分是针对内源性BBB受体例如人胰岛素受体(HIR)或转铁蛋白受体(TfR)的遗传工程单克隆抗体(MAb)。 σ -2受体抗体或其片段经由例如壳聚糖纳米颗粒与HIR或TfR Mabs的结合物,或聚苹果酸结合物。参见,例如Yemisci等人,Transport of a caspase inhibitor across the blood-brain barrier by chitosan nanoparticles, Methods Enzymol., 2012;508:243-269;和Ding等人,Inhibition of brain tumor growth by intravenous poly(b-L-malic acid) nanobioconjugate with a pH-dependent drug release. PNAS, 2010 107 (42) 18143-18148,其各自并入本文以供参考。在一些实施方式中,针对进行跨越血脑屏障的细胞摄入的受体提出的单个结构域抗体被采用于融合蛋白或结合物中。参见,例如Abulrob等人,J Neurochem 2005,95 (4):1201-121,其并入本文以供参考。

[0192] 在一些实施方式中, σ -2受体抗体被提出(raised)为人膜相关的孕酮受体成分1(人PGRMC1)或其同工型、同源物、变体、胞外结构域或片段的表位。例如,人PGRMC1的一个蛋白序列为195氨基酸(aa)蛋白;GI:48146103:

[0193] maaedvvatg adpsdlesgg llheiftspl nllllglcif llykivrgdq paasgdsddd
epplprlkr rdftpaelrr fdgvqdpril maingkvfdv tkgrkfygpe gpygvfagr d asrglatfcl
dkealkdeyd dlsdltaaqq etlsdwesqf tfkyhhvgkl lkegeeptvy sdeekpkdes arknd SEQ
ID NO:1。

[0194] 例如,孕酮受体膜成分1,同工型CRA_a[智人],195aa蛋白;GI:119610285:

[0195] maaedvvatg adpsdlesgg llheiftspl nllllglcif llykivrgdq
paasgdsddddeppplprlkr rdftpaelrr fdgvqdpril maingkvfdv tkgrkfygpe
gpygvfagr dasrglatfcl dkealkdeyd dlsdltaaqq etlsdwesqf tfkyhhvgkl
lkegeeptvysdeekpkdes arknd SEQ ID NO:2。

[0196] 例如,孕酮受体膜成分1,同工型CRA_b[智人],170aa蛋白;GI:119610286:

[0197] maaedvvatg adpsdlesgg llheiftspl nllllglcif llykivrgdq
paasgdsddddeppplprlkr rdftpaelrr fdgvqdpril maingkvfdv tkgrkfygpe
gpygvfagr dasrglatfcl dkemrknqkm rvpqgmikaf sgsisifvfc kiicnsplclSEQ ID NO:3。

[0198] 例如,孕酮受体膜成分1,同工型CRA_c[智人],143aa蛋白;GI:119610287:

[0199] maaedvvatg adpsdlesgg llheiftspl nllllglcif llykivrgdq
paasgdsddddeppplprlkr rdftpaelrr fdgvqdpril maingkvfdv tkgrkfygpv
kyhhvgkl lkegeeptvysd eeekpkdes arknd SEQ ID NO:4。

[0200] 人PGRMC1的同源物包括例如大鼠PGRMC1。例如大鼠PGRMC1,243aa蛋白;GI:11120720:

[0201] maaedvvatg adpseleggg llqeiftspl nllllglcif llykivrgdq
pgasgdndddeppplprlkr rdftpaelrr ydgvqdpril maingkvfdv tkgrkfygpe

gpygvfagrdsrglatfcl dkealkdeyd dlsltltpaqq etlndwdsqf sspsstitwg
kllegaeepivysddeeqkm rllgrvteav sgaylflyfa ksfvtfqsvf ttw SEQ ID NO:5。

[0202] 另一个同源物是大鼠PGRMC1,195aa蛋白;GI:38303845:

[0203] maaedvvatg adpseleggg llqeiftspl nllllglcif llykivrgdq
pgasgdndddeppplprlkr rdftpaelrr ydgvqdpril maingkvfdv tkgrkfygpe
gpygvfagrdsrglatfcl dkealkdeyd dlsltltpaqq etlndwdsqf tfkyhhvgkl
lkegeeptvysddeepkdea arksd SEQ ID NO:6。

[0204] 在一些实施方式中,特异性 σ -2受体拮抗剂化合物是阻断可溶Abeta寡聚体与 σ -2受体之间的结合的 σ -2受体抗体。在一些实施方式中, σ -2受体抗体识别与PGRMC1氨基酸序列相应的表位。在一些实施方式中, σ -2受体特异性抗体可以对于与如下氨基酸序列相应的表位具有特异性,该氨基酸序列源自与PGRMC1相应的N端序列、C端序列、内部序列或全长蛋白。在实施方式中, σ -2受体特异性抗体可以对于与SEQ ID NOs:1、2、3、4、5、6、7、8、9或10中的一个或多个的结合具有特异性。在一些实施方式中,特异性 σ -2受体拮抗剂化合物为识别合成肽EPKDESARKND (SEQ ID NO:7) (与人PGRMC1的C端氨基酸185~195相应)的PGRMC1抗体。在一些实施方式中, σ -2受体拮抗剂化合物不是对人PGRMC1蛋白的N端残基1~46 (MAAEDVVATGADPSDLESGLLHEIFTSPNLLLLGLCIFLLYKI (SEQ ID NO:9), #sc-98680, Santa Cruz) 具有特异性的抗体。

[0205] 在一些实施方式中, σ -2受体抗体包括针对或在任何情况下识别任何已知的全长PGRMC1蛋白或其任何变体、片段、免疫原或表位的那些;包括PGRMC1或其同源物、免疫原或变体的N端、中央片段或C端区域。分离的、纯化的或合成的蛋白或肽可以用作免疫原。蛋白或片段任选地通过本领域已知的多种方法成为佐剂或结合物,以增强免疫原性。PGRMC1的异名包括孕酮结合蛋白、HPR6.6;HGNC:16090、孕酮受体膜结合成分1和MPR。在一个实施方式中,片段或表位是EPKDESARKND SEQ ID NO:7,与人PGRMC1的C端氨基酸185~195相应。该片段用于引出市售可得的山羊抗人PGRMC1多克隆抗体(例如,Abcam ab48012;Sigma-Aldrich SAB2500782;和Everest Biotech,Ltd.EB07207)。另一片段由人PGRMC1的残基50~150组成,taaqq etlsdwesqf tfkyhhvgkl lkegeeptvy sdeeeepkdes arknd (SEQ ID NO:10);该片段通过本领域已知的方法与KLH结合;生成兔抗PGRMC1多克隆抗体;市售可得为Abcam ab88948。其他市售可得的抗体包括Santa Cruz Biotechnology sc-98680(针对N端aa 1~46 (MAAEDVVATG ADPSDLESGG LLHEIFTSPNLLLLGLCIF LLYKIV (SEQ ID NO:9))提出的山羊抗人PGRMC1多克隆抗体);sc-82694(针对内部表位提出的山羊抗人PGRMC1多克隆抗体);sc-133906(针对合成PGRMC1肽提出的兔抗人PGRMC1多克隆抗体);sc-135720(PGRMC1 (12B7) 小鼠Mab);sc-271275(针对N端1~46提出的PGRMC1 (c-3) 小鼠Mab);以及针对膜相关的孕酮受体成分1重组蛋白表位信号标签(PrEST)提出的Sigma-Aldrich HPA002877PGRMC1兔多克隆抗体。

[0206] 针对 σ -1受体(阿片受体, σ -1;Oprs 1)蛋白、片段、表位或免疫原提出的其他抗体被用于本文提供的实施例中。这样的 σ -1受体抗体包括Thermo Scientific PAS-12326(针对与KLH结合的OPRS1的N端区域提出的兔 σ -1受体多克隆抗体);针对 σ -1受体的内部区域提出的Santa Cruz Biotechnology, Inc. σ 受体(L-20) sd-16203,山羊抗人;针对兔抗人全长 σ 受体aa 1~223提出的Santa Cruz Biothechnology, Inc. σ 受体(FL-223) sd-20935;针对人

σ 受体的内部区域提出的Santa Cruz Biotechnology, Inc. σ 受体 (S-18) sc-22948山羊抗人多克隆抗体;对人 σ -1受体的内部区的氨基酸136~169之间的表位定位具有特异性的Santa Cruz Biotechnology, Inc. σ 受体 (B-5) sc-137075, 小鼠单克隆抗体 (Mab); 以及针对全长人 σ -1受体的氨基酸1~223提出的Santa Cruz Biotechnology, Inc. σ 受体 (F-5) 小鼠单克隆抗体。

[0207] 人 σ -1受体是223aa蛋白;GI:74752153:

[0208] mqwavgrrwa waalllavaa vltqvvlwl gtqsfvfqre eiaqlarqya gldhelafsr livelrrlhp ghvlpdeelq wfvnaggwm gamcllhasl seyvlifgta lgsrghsgry waeisdttiis gtfhqwregt tksevfypge tvvhgpgreat avewgpntwm veygrgvips tla faladtv fstqdflltf ytlrsyargl rlelttylfg qdp SEQ ID NO:8。

[0209] 在一些实施方式中,可以采用任何 σ -1受体全长蛋白、同源物变体或片段,包括N端、C端、中央区域,来通过本领域已知的任何方法来引出作为 σ -1受体拮抗剂的抗体。

[0210] 在一些实施方式中, σ -2拮抗剂是对 σ -2受体具有高亲和性的小分子化合物。

[0211] 选择为 σ -2受体拮抗的 σ -2受体配体

[0212] 在一些实施方式中,用于本发明的 σ -2受体拮抗剂选自还满足附加选择标准的 σ -2受体配体化合物。附加标准用来从 σ -2受体配体中选择用于本发明的 σ -2受体拮抗剂。附加选择标准包括:关于抑制可溶A β 寡聚体诱导的突触损失以及抑制膜运输检定中可溶A β 寡聚体诱导的缺陷,用作为神经元细胞中的功能性拮抗剂;与任何其他非 σ 受体相比,对一种或多种 σ 受体具有高选择性;表现出 σ -2受体处的高亲和性;以及表现出较好的药物样特性,包括较好的脑渗透性、较好的代谢稳定性和较好的血浆稳定性。在一些实施方式中, σ -2受体拮抗剂基于表现出一种或多种以下附加特性而进行进一步选择:在不存在A β 寡聚体时不影响运输或突触数目;不诱导神经元细胞中的caspase-3活性;抑制由 σ -2受体激动剂对caspase-3活性的诱导;和/或降低或使免受神经元细胞中由 σ -2受体激动剂引起的神经毒性。

[0213] 在一些实施方式中,经受进一步的选择标准的某些 σ -2受体配体化合物选自本文描述的化合物并可以根据本文描述的方法或在WO 2011/014880 (申请第PCT/US2010/044136号)、WO 2010/118055 (申请第PCT/US2010/030130号)、申请第PCT/US2011/026530号和WO2012/106426中描述的方法进行合成,各个申请全部并入本文以供参考。其他用于制备这些化合物的选项在以下详细讨论。

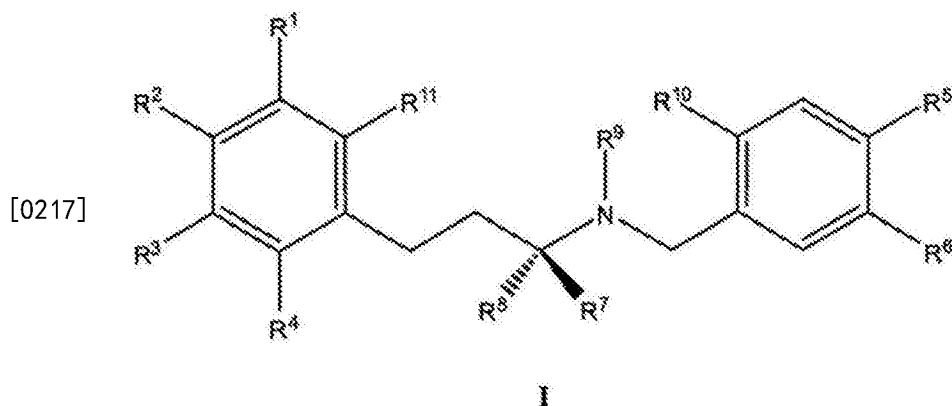
[0214] 在一些实施方式中, σ -2配体是任选取代的哌嗪、苯基四氢呋喃-N,N-二甲基甲胺、二苯基四氢呋喃-N,N-二甲基甲胺、4-苯基戊基-哌嗪、苄基苯基-哌嗪、吡啶-氧杂-氮杂螺-癸烷、哌啶-吡啶、苯基哌啶-吡啶、吡啶-吗啉、吡啶-哌啶、吡啶-N,N-二乙基乙胺、吡啶-吡咯烷、苯基-吡啶-吗啉、苯甲酰胺-喹啉化合物或其衍生物。

[0215] 在一些实施方式中, σ -2配体为任选取代的N-(4-(3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)丁基)苯甲酰胺、1-环己基-4-(3-(1,2,3,4-四氢萘-1-基)丙基)哌嗪、(5,5-二苯基四氢呋喃-3-基)甲胺、1-(5,5-二苯基四氢呋喃-3-基)-N,N-二甲基甲胺、N,N-二甲基-1-(5-苯基四氢呋喃-3-基)甲胺、1-(4-苯基丁基)哌嗪、1-(4-苄基苯基)-4-甲基哌嗪、环己基-4-(4-苯基环己基)哌嗪、1-环己基-4-(4-苯基环己基)哌嗪、环己基-4-(3-(1,2,3,4-四氢萘-1-基)丙基)哌嗪、1-环己基-4-(3-(1,2,3,4-四氢萘-1-基)丙基)哌嗪、8-(2-(4,5,6,7-四氢-1H-吡

噪-4-基)乙基)-2-氧杂-8-氮杂螺[4.5]癸烷、4-(2-(4-苯基哌啶-1-基)乙基)-4,5,6,7-四氢-1H-吡啶、4-(2-(1H-吡啶-3-基氧)烷基)吗啉、4-(2-(1H-吡啶-3-基氧)乙基)吗啉、1-(2-(1H-吡啶-3-基氧)乙基)哌啶、1-(2-(1H-吡啶-3-基氧)烷基)哌啶、2-(1H-吡啶-3-基氧)-N,N-二乙基乙胺、2-(1H-吡啶-3-基氧)-N,N-二烷基-烷胺、3-(2-(吡咯烷-1-基)乙氧基)-1H-吡啶、3-(2-(吡咯烷-1-基)烷氧基)-1H-吡啶、1-(1H-吡啶-3-基氧)-3-(哌嗪-1-基)丙-2-醇、1-(1H-吡啶-3-基氧)-3-(哌嗪-1-基)烷-2-醇、1-(1-芳基-1H-吡啶-3-基氧)-3-(哌嗪-1-基)烷-2-醇、1-(1-苯基-1H-吡啶-3-基氧)-3-(哌嗪-1-基)烷-2-醇、1-(1-芳基-1H-吡啶-3-基氧)-3-(哌嗪-1-基)丙-2-醇、1-(1-杂芳基-1H-吡啶-3-基氧)-3-(哌嗪-1-基)烷-2-醇、1-(1-(二卤代芳基)-1H-吡啶-3-基氧)-3-(哌嗪-1-基)烷-2-醇、1-(1-(二卤代杂芳基)-1H-吡啶-3-基氧)-3-(哌嗪-1-基)烷-2-醇、1-(1-(3,4-二卤代芳基)-1H-吡啶-3-基氧)-3-(哌啶-1-基)烷-2-醇、1-(1-(3,4-二卤代杂芳基)-1H-吡啶-3-基氧)-3-(哌啶-1-基)烷-2-醇、1-(1-(二卤代杂芳基)-1H-吡啶-3-基氧)-3-(二烷基氨基)烷-2-醇、1-(1-(二卤代杂芳基)-1H-吡啶-3-基氧)-3-(二烷基氨基)烷-2-醇、1-(1-(二氯杂芳基)-1H-吡啶-3-基氧)-3-(二烷基氨基)烷-2-醇、N-(4-(3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)丁基)苯甲酰胺、N-(4-(3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)烷基)苯甲酰胺、N-(4-(3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)烷基)-2-羟基苯甲酰胺、N-(4-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)丁基)苯甲酰胺、N-(4-(6,7-二烷氧基-3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)烷基)苯甲酰胺、N-(4-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)丁基)-2-萘甲酰胺、N-(4-(6,7-二烷氧基-3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)烷基)-2-萘甲酰胺、N-(4-(3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)丁基)-2-萘甲酰胺、N-(4-(3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)烷基)-2-萘甲酰胺、N-(2-(3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)乙基)-2,3-二甲氧基苯甲酰胺、N-(2-(3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)烷基)-2,3-二烷氧基苯甲酰胺、N-(2-(3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)乙基)苯甲酰胺、N-(2-(3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)烷基)苯甲酰胺、N-(2-(4-(2,3-二氯苯基)哌啶-1-基)乙基)-2-萘甲酰胺、N-(2-(4-(2,3-二卤代芳基)哌啶-1-基)烷基)-2-萘甲酰胺、2,3-二甲氧基-N-(4-(4-苯基哌啶-1-基)丁基)苯甲酰胺、2,3-二烷氧基-N-(4-(4-苯基哌啶-1-基)烷基)苯甲酰胺、N-(4-(4-(2,3-二卤代苯基)哌啶-1-基)烷基)-2,3-二烷氧基苯甲酰胺、5-卤代-N-(4-(4-(2,3-二卤代苯基)哌啶-1-基)烷基)-2,3-二烷氧基苯甲酰胺(其中2、3&5位卤素相同或独立地为F、Cl、Br或I)、N-(4-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)丁基)-2-(2-氟乙氧基)-5-碘-3-甲氧基苯甲酰胺、N-(4-(6,7-二烷氧基-3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)烷基)-2-(2-卤代乙氧基)-5-卤代-3-甲氧基苯甲酰胺(其中卤素取代基相同或独立地为F、Cl、Br或I)、9-苄基-9-氮杂双环[3.3.1]壬-3-基苯基氨基甲酸酯、9-苄基-9-氮杂双环[3.3.1]壬-3-基2-烷氧基苯基氨基甲酸酯、9-(5-苯基烷基)-9-氮杂双环[3.3.1]壬-3-基2-甲氧基-5-甲基苯基氨基甲酸酯、9-烷基-9-氮杂双环[3.3.1]壬-3-基苯基氨基甲酸酯、3-(2-(4-环己基哌嗪-1-基)烷基)苯并[d]噁唑-2(3H)-酮、6-乙酰基-3-(4-(4-环己基哌嗪-1-基)烷基)苯并[d]噁唑-2(3H)-酮、1-苄基-4-(1,2-二苯基乙基)哌嗪、1-芳基-4-(1,2-二苯基乙基)哌嗪、2-(6-氧-5-苯基-3,3a,6,6a-四氢环戊[c]吡咯-2(1H)-基)丙酸乙酯、2-(5-烷基-6-氧-3,3a,6,6a-四氢环戊[c]吡咯-2(1H)-基)丙酸乙酯、2-((3-(2H-萘并[1,8-cd]异噻唑-2-基)烷基)(甲基)氨基)烷醇、2-((1-(2-(1-烷基-1H-吡咯-2-基)-2-氧乙基)哌啶-4-基)烷基)异吡啶啉-1-酮、2-((1-(2-氧烷基)哌啶-4-基)烷基)异吡啶啉-1-酮、1'-(4-(1-(4-卤代芳基)-1H-吡

噪-3-基)烷基)-3H-螺[异苯并呋喃-1,4'-吡啶]、1'-(4-(1-(4-卤代杂芳基)-1H-吡噪-3-基)烷基)-3H-螺[异苯并呋喃-1,4'-吡啶]、3-(3-烷基丁-2-炔基)-1,2,3,4,5,6-六氢苯并[d]吡辛因-8-醇、戊唑辛化合物、或其类似物或衍生物。

[0216] 在一些实施方式中,σ-2配体包括式I的化合物或其药学上可接受的盐:



[0218] 其中:

[0219] R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^{11} 各自独立地选自H、OH、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基和NH(C_{1-4} 烷基);

[0220] R^5 和 R^6 各自独立地选自H、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷基和 C_{3-7} 环烷基和NH(C_{1-4} 烷基);

[0221] R^7 和 R^8 各自独立地选自H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基和 C_{3-7} 环烷基;

[0222] 或者 R^2 和 R^3 与它们连接的C原子一起形成任选地被1、2、3、4或5个独立选自OH、氨基、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基和杂环烷基的取代基所取代的4~8元环烷基、芳基、杂芳基、杂芳烷基、或杂环烷基,且 R^2 和 R^3 各自独立地选自键、C、N、S和O;

[0223] 或者 R^9 和 R^{10} 与它们连接的N和C原子一起形成任选地被1、2、3、4或5个独立选自OH、氨基、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基和杂环烷基的取代基所取代的4~8元杂环烷基或杂芳基,且 R^9 和 R^{10} 各自独立地选自键、C、N、S和O;

[0224] 或者 R^9 和 R^{11} 与它们连接的N和C原子一起形成任选地被1、2、3、4或5个独立选自OH、氨基、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基和杂环烷基的取代基所取代的6~8元杂环烷基或杂芳基,且 R^9 和 R^{11} 各自独立地选自键、C、N、S和O;

[0225] 或者 R^1 和 R^{11} 与它们连接的C原子一起形成任选地被1、2、3、4或5个独立选自OH、氨基、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基和杂环烷基的取代基所取代的4、5、6、7或8元环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基,且 R^1 和 R^{11} 各自独立地选自键、C、N、S和O;

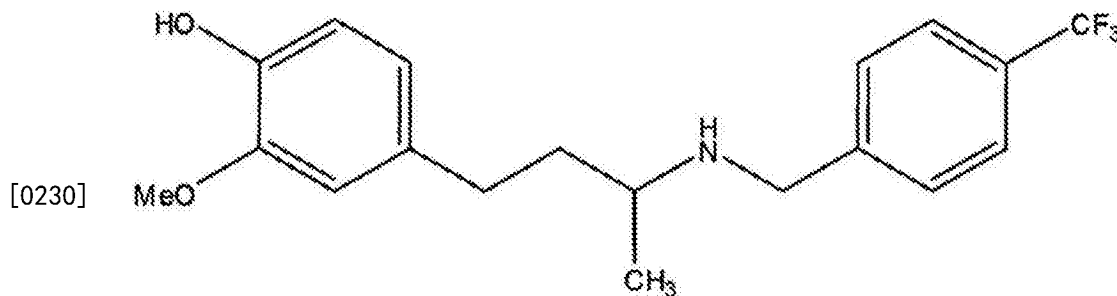
[0226] 或者 R^1 和 R^2 与它们连接的C原子一起形成任选地被1、2、3、4或5个独立选自OH、氨基、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基和杂环烷基的取代基所取代的4、5、6、7或8元环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基,且 R^1 和 R^2 各自独立地选自键、C、N、S和O;

[0227] 或者 R^3 和 R^4 与它们连接的C原子一起形成任选地被1、2、3、4或5个独立选自OH、氨

基、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷氧基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基和杂环烷基的取代基所取代的4、5、6、7或8元环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基，且R³和R⁴各自独立地选自键、C、N、S和O；

[0228] 其中O、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、杂芳基、芳基、杂芳基、杂环烷基和环烷基中的每一个任选且独立地被1、2、3、4或5个独立选自OH、氨基、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷氧基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基和杂环烷基的取代基所取代。

[0229] 在一些实施方式中，σ-2配体包括化合物II的外消旋混合物或对映异构体：



[0231] 在一些实施方式中，σ-2配体是式I的化合物或药学上可接受的盐，其中R²和R³独立地选自OH和C₁₋₆烷氧基。

[0232] 在一些实施方式中，σ-2配体是式I的化合物或药学上可接受的盐，其中R²和R³独立地选自OH和NH(C₁₋₄烷基)。

[0233] 在一些实施方式中，σ-2配体是式I的化合物或药学上可接受的盐，其中R²和R³独立地选自H、卤素和C₁₋₆卤代烷基。

[0234] 在一些实施方式中，σ-2配体是式I的化合物或药学上可接受的盐，其中R²和R³各自独立地选自OH和C₁₋₆烷氧基，且R⁷和R⁸各自独立地为C₁₋₆烷基。在一些实施方式中，R⁷和R⁸各自为甲基。

[0235] 在一些实施方式中，σ-2配体是式I的化合物或药学上可接受的盐，其中R⁵和R⁶各自独立地选自H和C₁₋₆卤代烷基。

[0236] 在一些实施方式中，σ-2配体是式I的化合物或药学上可接受的盐，其中R⁹为H。

[0237] 在一些实施方式中，σ-2配体是式I的化合物或药学上可接受的盐，其中R²和R³或R³和R⁴与它们连接的C碳原子一起形成6元环烷基、环杂烷基、芳基或杂芳基环。在一些实施方式中，R²和R³为O。

[0238] 在一些实施方式中，σ-2配体是式I的化合物或药学上可接受的盐，其中R⁷为C₁₋₆烷基且R⁸为H。

[0239] 在一些实施方式中，σ-2配体是式I的化合物或药学上可接受的盐，其中R⁷为H且R⁸为C₁₋₆烷基。

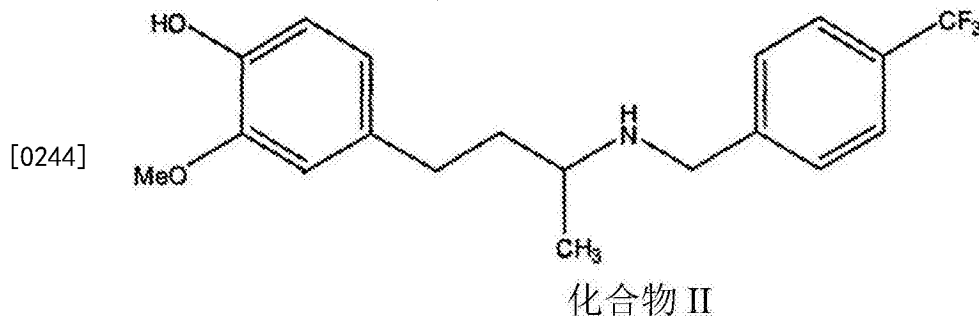
[0240] 在一些实施方式中，σ-2配体是式I的化合物或药学上可接受的盐，其中R²和R³独立地选自H、OH、卤素、C₁₋₆烷氧基和C₁₋₆卤代烷基。

[0241] 在一些实施方式中，σ-2配体是式I的化合物或药学上可接受的盐，其中R²和R³独立地选自H、OH、Cl、F、-OMe和-CF₃。

[0242] 在一些实施方式中，σ-2配体是式I的化合物或药学上可接受的盐，其中R²和R³独立

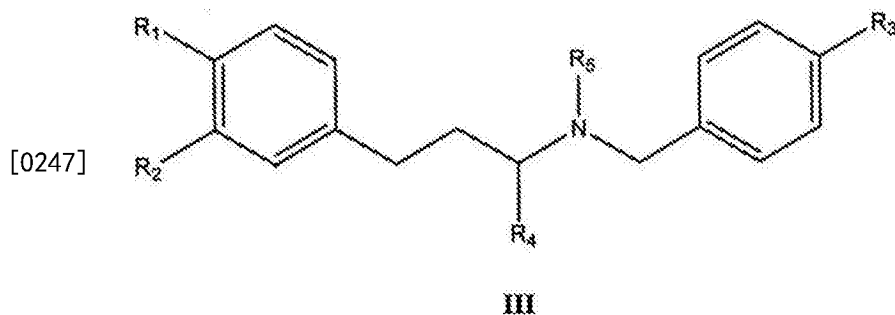
地选自H、OH、Cl、F、-OMe和-CF₃,其中R⁷和R⁸各自独立地选自H和C₁₋₆烷基,其中R⁹为H,且其中R⁵和R⁶各自独立地选自H和C₁₋₆卤代烷基。

[0243] 在一些实施方式中,式I的化合物是化合物II的基本纯的(+)或(-)对映异构体:



[0245] 其中,基本纯的对映异构体包括至少90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的化合物II的一种对映异构体。在一些实施方式中,包括基本纯的化合物II对映异构体的组合物为至少99.5%的一种对映异构体,且在其他实施方式中,组合物仅包括化合物II的一种对映异构体。

[0246] 在一个更具体的实施方式中,本发明的σ-2配体为由式III表示的新化合物:



[0248] 其中,

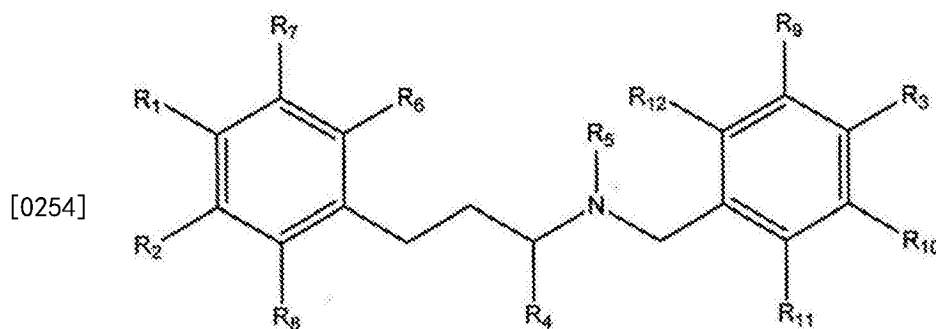
[0249] R₁和R₂独立地选自H、OH、卤素、CN、NO₂、NH₂、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆卤代烷氧基、C₃₋₇环烷基、NH(C₁₋₄烷基)、N(C₁₋₄烷基)₂、NH(C₃₋₇环烷基)、NHC(O)(C₁₋₄烷基)、(C₁₋₄烷基)₂N-C₁₋₄亚甲基-O-、SH、S(C₁₋₆烷基)、C(O)OH、C(O)O(C₁₋₄烷基)、C(O)(C₁₋₄烷基)、和C(O)NH(C₁₋₄烷基),或者R₁和R₂连接在一起形成-O-C₁₋₄亚甲基-O-基团,且其中R₁和R₂中的至少一个不是H;

[0250] R₃选自H、OH、卤素、CN、NO₂、NH₂、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆卤代烷氧基、C₃₋₇环烷基、NH(C₁₋₄烷基)、N(C₁₋₄烷基)₂、NH(C₃₋₇环烷基)、NHC(O)(C₁₋₄烷基)、SH、S(C₁₋₆烷基)、C(O)OH、C(O)O(C₁₋₄烷基)、C(O)(C₁₋₄烷基)和C(O)NH(C₁₋₄烷基);

[0251] R₄为C₁₋₆烷基;且

[0252] R₅为H、C₁₋₆烷基和C(O)O(C₁₋₄烷基)、C(O)(C₁₋₄烷基)和C(O)(C₁₋₄卤代烷基)。

[0253] 在另一更加具体的实施方式中,本发明的σ-2配体为由式IV表示的新化合物:



IV

[0255] 其中

[0256] R_1 、 R_2 、 R_6 、 R_7 和 R_8 独立地选自H、OH、卤素、CN、NO₂、NH₂、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆卤代烷氧基、C₃₋₇环烷基、NH(C₁₋₄烷基)、NH(C₁₋₄烷基)₂、NH(C₃₋₇环烷基)、NHC(O)(C₁₋₄烷基)、SH、S(C₁₋₆烷基)、C(O)OH、C(O)O(C₁₋₄烷基)、C(O)(C₁₋₄烷基)和C(O)NH(C₁₋₄烷基)，或者 R_1 和 R_2 连接在一起形成-O-C₁₋₄亚甲基-O-，且其中 R_1 、 R_2 、 R_6 、 R_7 和 R_8 中的至少一个不是H；

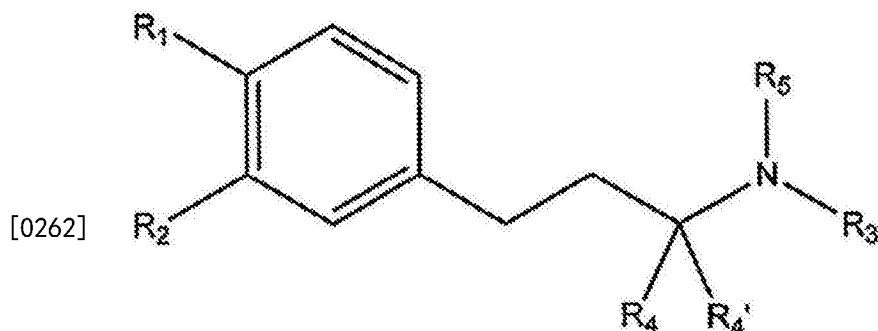
[0257] R_3 选自H、卤素和C₁₋₆卤代烷基；

[0258] R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 和 R_{12} 独立地选自H、C₁₋₆烷氧基和卤素。

[0259] R_4 为C₁₋₆烷基；且

[0260] R_5 为H、C₁₋₆烷基和C(O)O(C₁₋₄烷基)、C(O)(C₁₋₄烷基)、C(O)(C₁₋₄卤代烷基)。

[0261] 在一些实施方式中，本发明的σ-2配体为式Va的那些或其药学上可接受的盐：

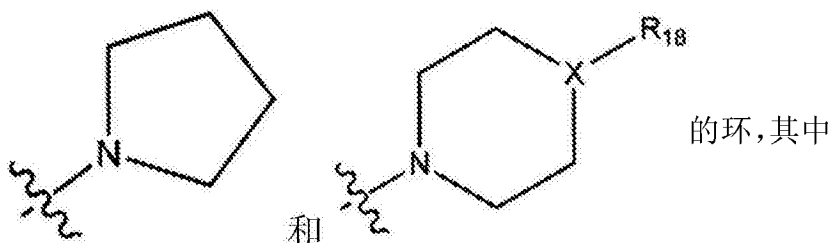


Va

[0263] 其中，

[0264] R_1 和 R_2 独立地选自H、OH、卤素、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆卤代烷氧基、(R₁₆)(R₁₇)N-C₁₋₄亚烷基-O-，或者 R_1 和 R_2 连接在一起形成-O-C₁₋₂亚甲基-O-基团，其中

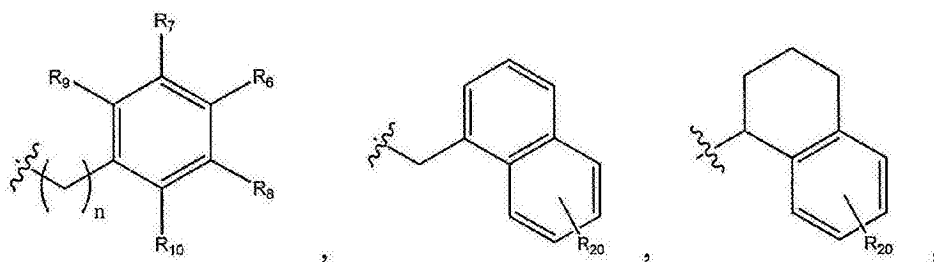
[0265] R_{16} 和 R_{17} 独立地为C₁₋₄烷基或苄基，或者 R_{16} 和 R_{17} 与氮一起形成选自



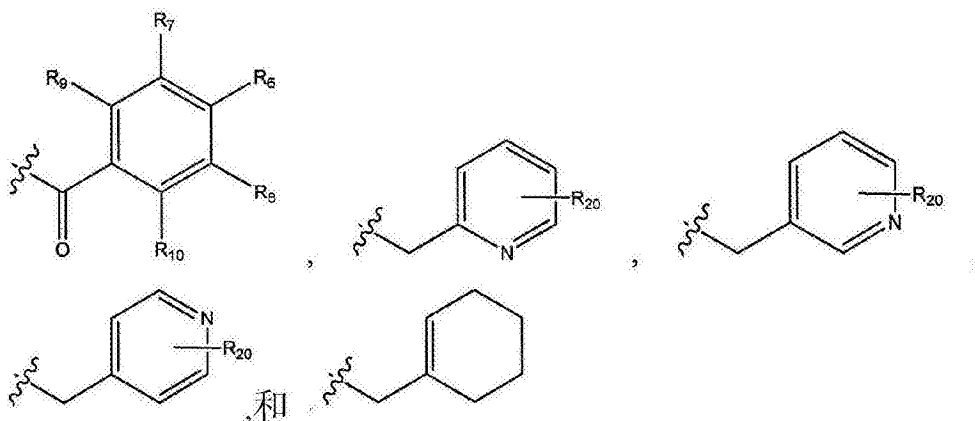
[0266] X是N或O，且 R_{18} 为H或未被取代的苄基；且

[0267] 其中R₁和R₂中的至少一个不是H;

[0268] R₃选自



[0269]



[0270] 其中

[0271] R₆、R₇、R₈、R₉和R₁₀独立地选自H、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷基和S(O)₂-C₁₋₆烷基;

[0272] R₂₀为H;且

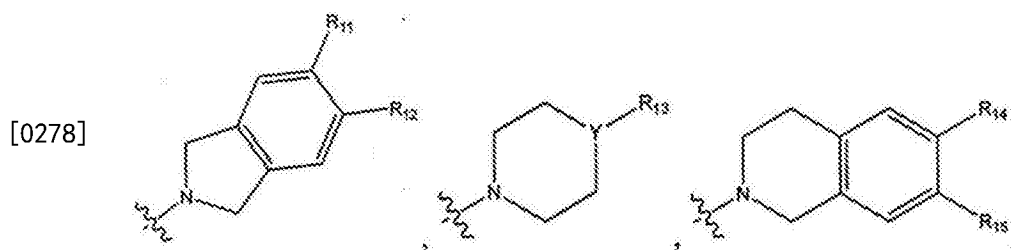
[0273] n为1~4,

[0274] R₄为C₁₋₆烷基;

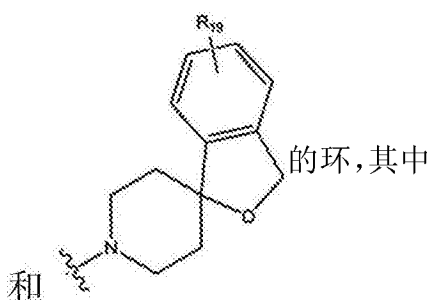
[0275] R_{4'}为H或C₁₋₆烷基;且

[0276] R₅为H、C₁₋₆烷基和C(O)O(C₁₋₄烷基)、C(O)(C₁₋₄烷基)或C(O)(C₁₋₄卤代烷基);或

[0277] R₃和R₅与氮一起形成选自



[0278]



[0279] R₁₁和R₁₂独立地选自H、卤素和C₁₋₆卤代烷基,且

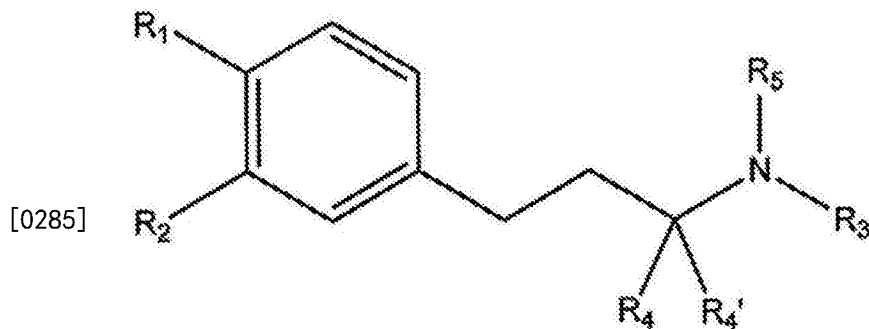
[0280] Y为CH或N;

[0281] R_{13} 为H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、未被取代的苯基或被 C_{1-6} 卤代烷基取代的苯基、或未被取代的苄基;

[0282] R_{14} 和 R_{15} 独立地选自H和卤素;

[0283] R_{19} 为H。

[0284] 在一些实施方式中,本发明的 σ -2配体为式Va的那些或其药学上可接受的盐:

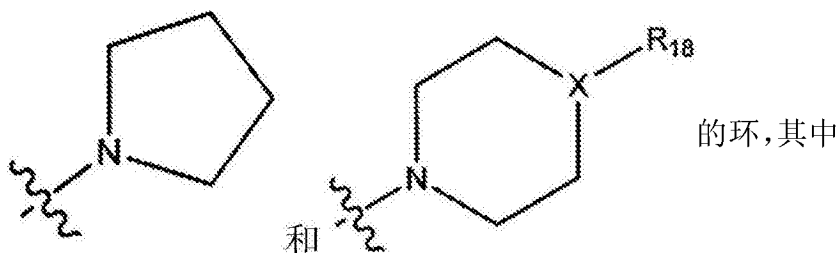


Va

[0286] 其中

[0287] R_1 和 R_2 独立地选自H、OH、卤素、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、(R_{16}) (R_{17}) N- C_{1-4} 亚烷基-O-,或者 R_1 和 R_2 连接在一起形成-O- C_{1-2} 亚甲基-O-基团,其中

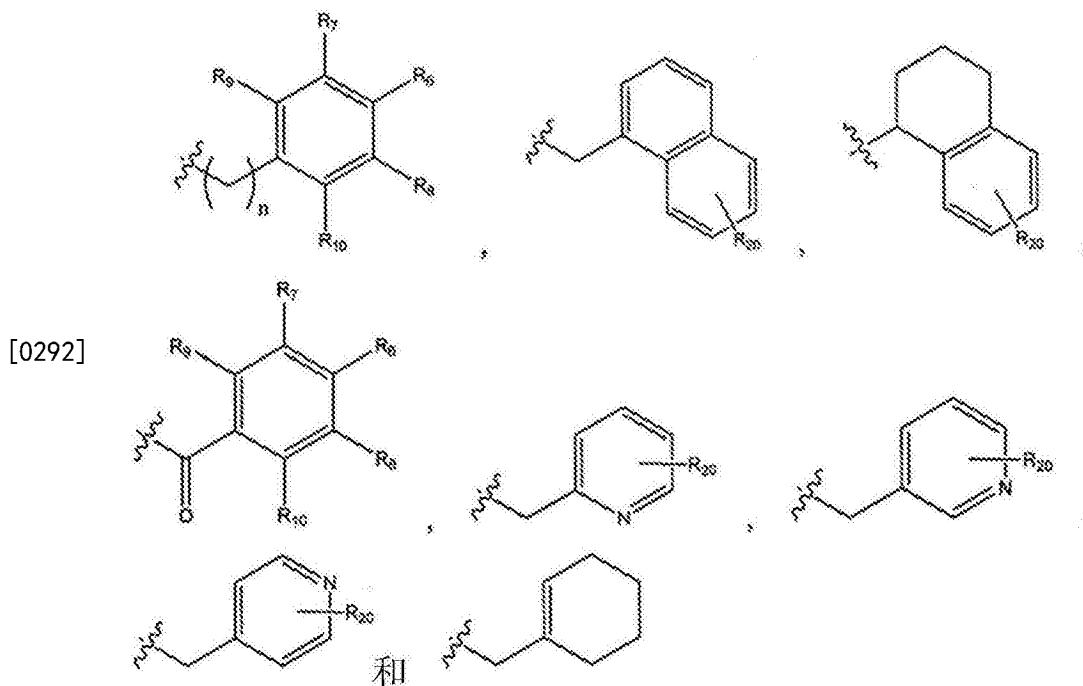
[0288] R_{16} 和 R_{17} 独立地为 C_{1-4} 烷基或苄基,或者 R_{16} 和 R_{17} 与氮一起形成选自



[0289] X为N或O,且 R_{18} 不存在或为H或未被取代的苯基;且

[0290] 其中 R_1 和 R_2 中的至少一个不是H;

[0291] R_3 选自



[0293] 其中

[0294] R_6, R_7, R_8, R_9 和 R_{10} 独立地选自 H、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷基和 $S(0)_2-C_{1-6}$ 烷基；

[0295] R_{20} 为 H；且

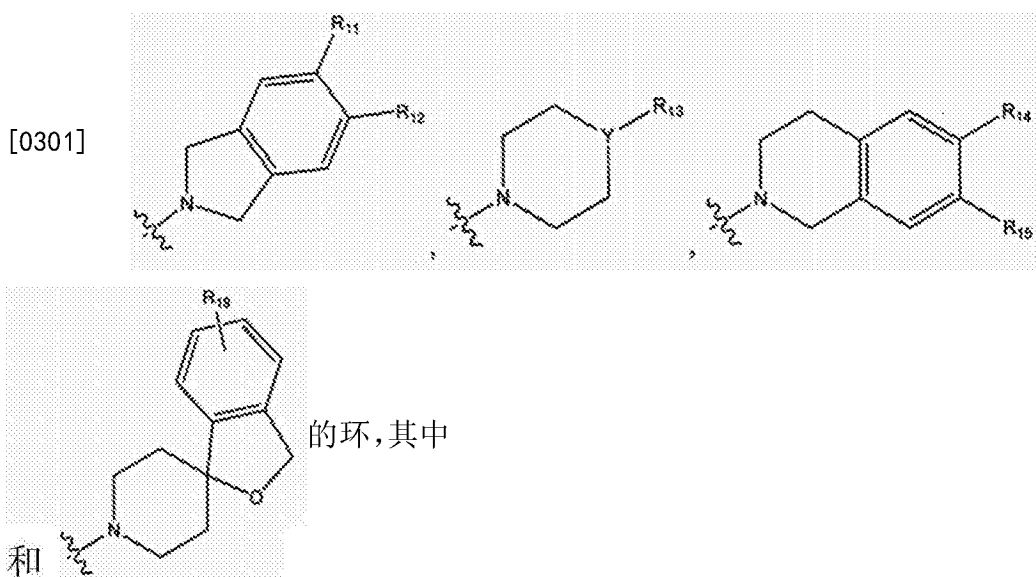
[0296] n 为 1~4，

[0297] R_4 为 C_{1-6} 烷基；

[0298] C_4' 为 H 或 C_{1-6} 烷基；且

[0299] R_5 为 H、 C_{1-6} 烷基和 $C(=O)O(C_{1-4}$ 烷基)、 $C(=O)(C_{1-4}$ 烷基) 或 $C(=O)(C_{1-4}$ 卤代烷基)；或

[0300] R_3 和 R_5 与氮一起形成选自



[0302] R_{11} 和 R_{12} 独立地选自 H、卤素和 C_{1-6} 卤代烷基，且

[0303] Y 是 CH 或 N；

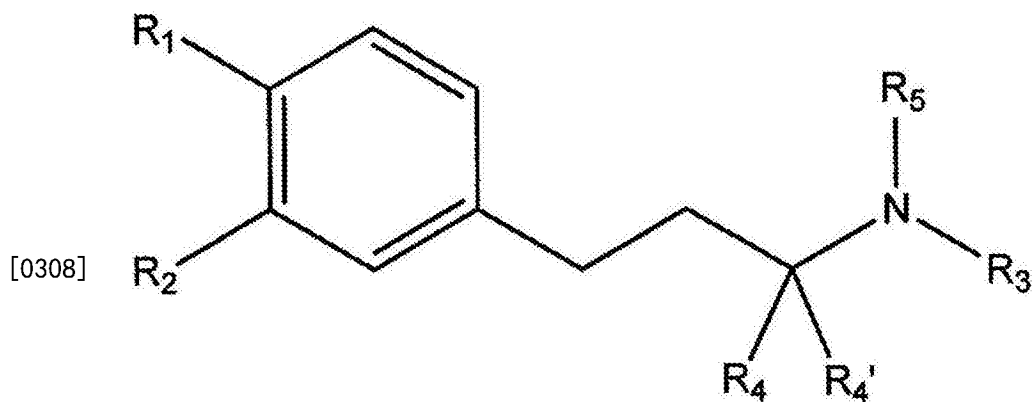
[0304] R_{13} 是 H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、未被取代的苯基或被 C_{1-6} 卤代烷基取代的苯基或未被

取代的苄基；

[0305] R_{14} 和 R_{15} 独立地选自H和卤素；且

[0306] R_{19} 为H。

[0307] 在一些实施方式中，本发明的 σ -2配体为式Va的那些或其药学上可接受的盐：

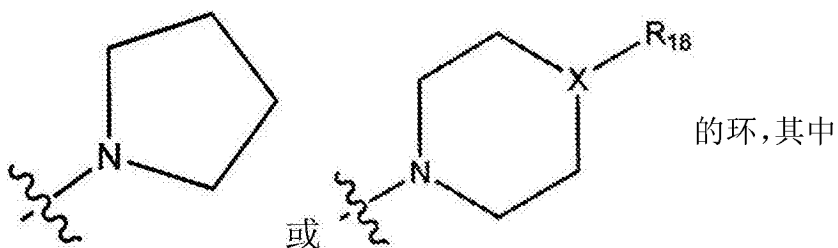


Va

[0309] 其中

[0310] R_1 选自OH、OMe、F、Cl、 CF_3 、(R_{16}) (R_{17}) N-亚乙基-O-，其中

[0311] R_{16} 和 R_{17} 各自为甲基、异丙基、正丁基或苄基，或者 R_{16} 和 R_{17} 与氮一起形成选自

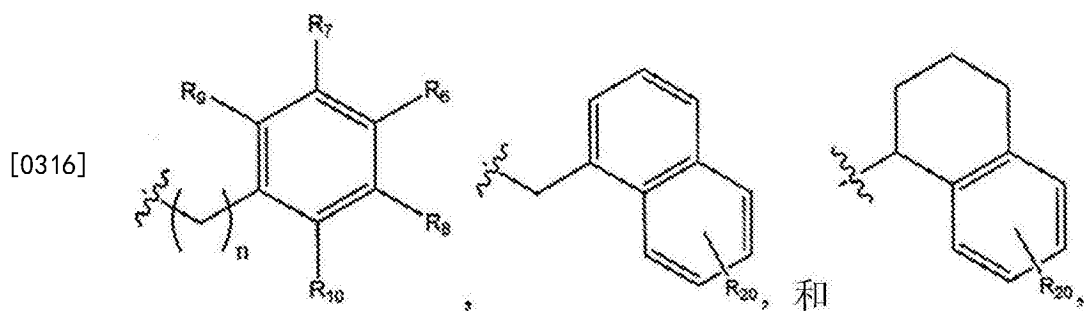


[0312] X为N或O，且 R_{18} 不存在或为未被取代的苄基；且

[0313] R_2 为H、Cl、F、 CF_3 、OMe、OCF₃或

[0314] R_1 和 R_2 连接在一起形成-O-C₁₋₂亚甲基-O-基团，

[0315] R_3 选自



[0317] 其中，

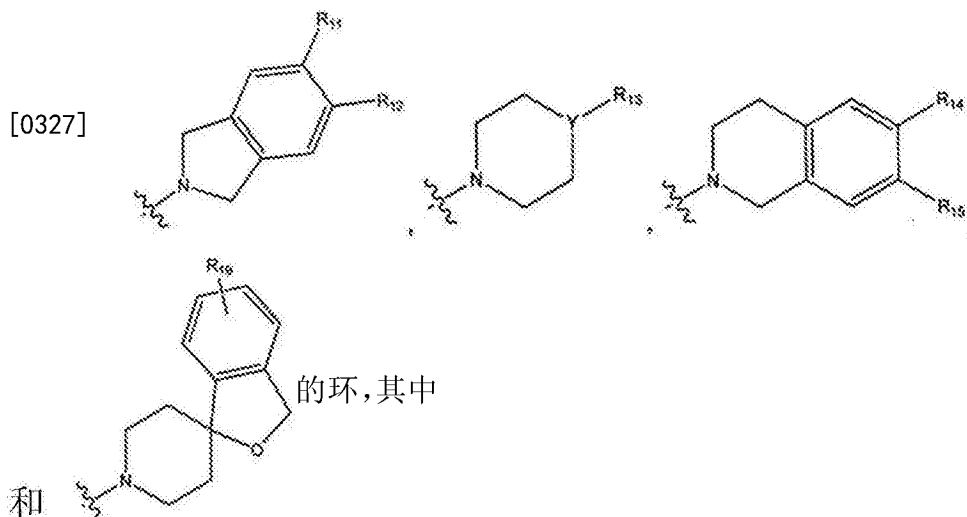
[0318] R_6 为H、F、Cl、Me、异丙基、叔丁基、OMe、 CF_3 、或S(O)₂Me，

[0319] R_7 和 R_8 独立地为H、OMe、F、Cl或 CF_3 ，

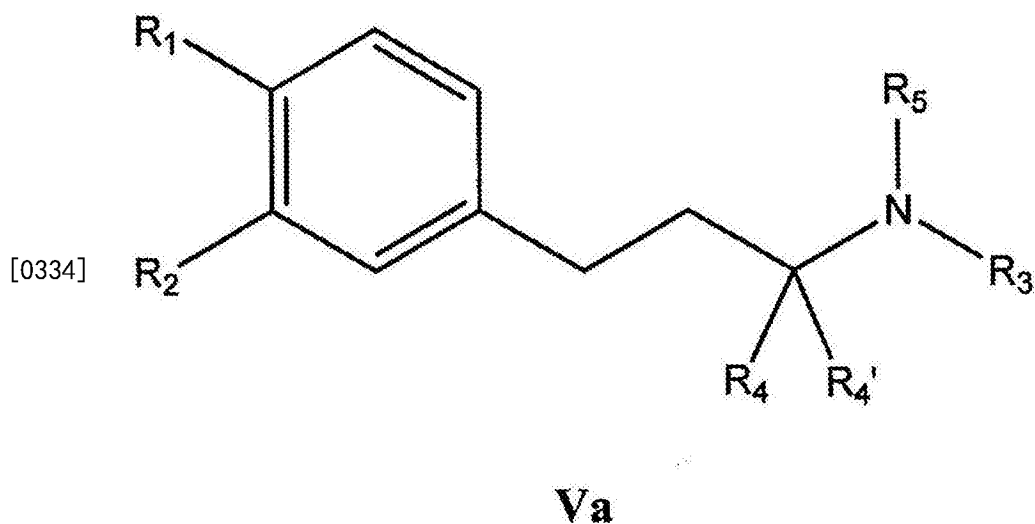
[0320] R_9 和 R_{10} 独立地选自H、OMe、F和Cl，

[0321] R_{20} 为H；且

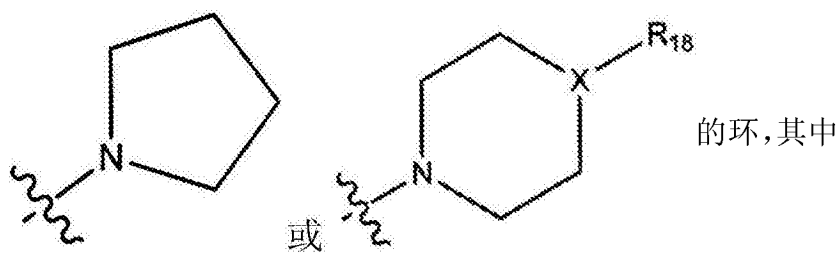
- [0322] n为1，
 [0323] R₄为Me；
 [0324] R₄'为H或Me；且
 [0325] R₅为H；或者
 [0326] R₃和R₅与氮一起形成选自



- [0328] R₁₁和R₁₂独立地选自H、Cl和CF₃，且
 [0329] Y为CH或N；
 [0330] R₁₃为H、Me、环己基、未被取代的苯基或被CF₃取代的苯基或未被取代的苄基，
 [0331] R₁₄和R₁₅独立地选自H和Cl；且
 [0332] R₁₉为H。
 [0333] 在一些实施方式中，本发明的σ-2配体为式Va的那些或其药学上可接受的盐：



- [0335] 其中
 [0336] R₁选自OH、OMe、F、Cl、CF₃、(R₁₆) (R₁₇) N-亚乙基-O-，其中
 [0337] R₁₆和R₁₇各自为甲基、异丙基、正丁基或苄基，或者R₁₆和R₁₇与氮一起形成选自

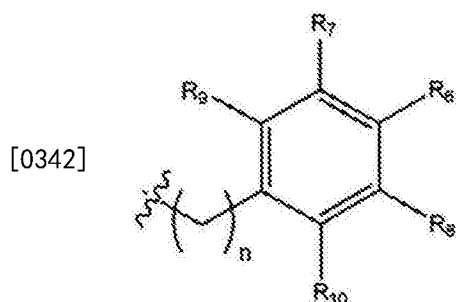


[0338] X为N或O, 且R₁₈不存在或为未被取代的苯基; 且

[0339] R₂为H、Cl、F、CF₃、OMe、OCF₃或

[0340] R₁和R₂连接在一起形成-O-C₁₋₂亚甲基-O-基团

[0341] R₃选自



[0343] 其中,

[0344] R₆为H、F、Cl、Me、异丙基、叔丁基、OMe、CF₃、或S(O)₂Me,

[0345] R₇和R₈独立地为H、OMe、F、Cl或CF₃,

[0346] R₉和R₁₀独立地选自H、OMe、F和Cl, 且

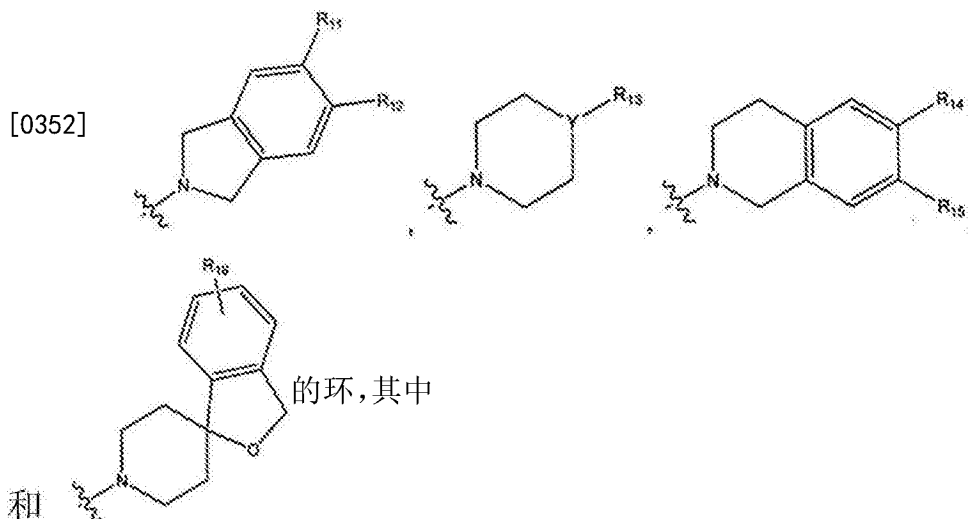
[0347] n为1

[0348] R₄为Me;

[0349] R_{4'}为H; 且

[0350] R₅为H; 或者

[0351] R₃和R₅与氮一起形成选自



[0353] R₁₁和R₁₂独立地选自H、Cl和CF₃, 且

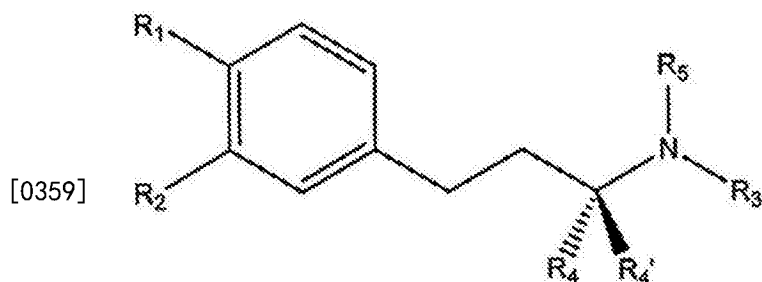
[0354] Y为CH或N;

[0355] R₁₃为H、Me、环己基、未被取代的苯基或被CF₃取代的苯基或未被取代的苄基,

[0356] R_{14} 和 R_{15} 独立地选自H和Cl;且

[0357] R_{19} 为H。

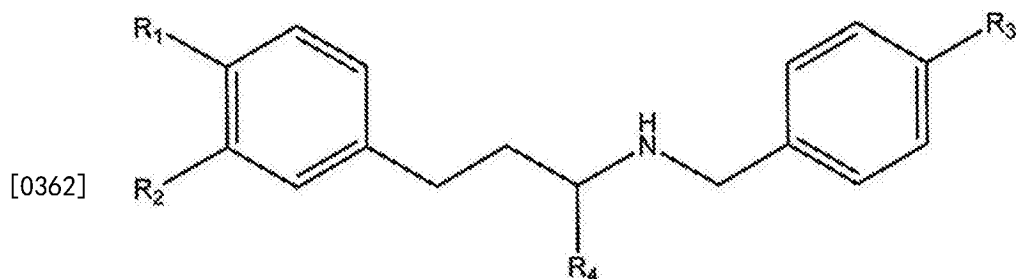
[0358] 在一些更加具体的实施方式中,本发明的 σ -2配体为式Vb的那些或其药学上可接受的盐:



Vb

[0360] 其中 R_4 为H,且剩余的基团如以上针对式Va的化合物所定义。

[0361] 在一些实施方式中,本发明的 σ -2配体为式IIIa的那些或其药学上可接受的盐:



IIIa

[0363] 其中

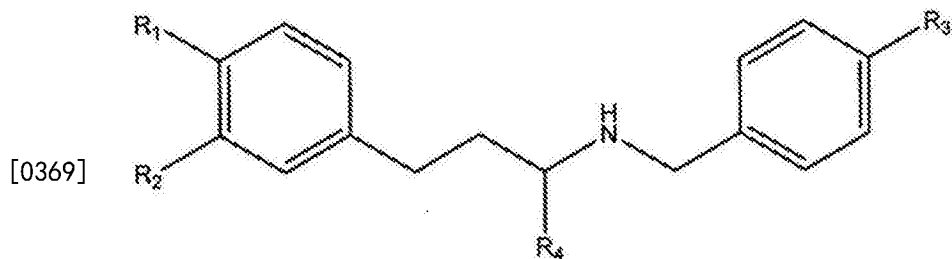
[0364] R_1 =卤素、 C_{1-6} 卤代烷基或OH;

[0365] R_2 =H、卤素或 C_{1-6} 卤代烷基,或 R_1 和 R_2 连接在一起形成-O-亚甲基-O-基团;

[0366] R_3 = C_{1-6} 卤代烷基;且

[0367] R_4 = C_{1-6} 烷基。

[0368] 在一些更加具体的实施方式中,本发明的 σ -2配体为式IIIa那些或其药学上可接受的盐:



IIIa

[0370] 其中

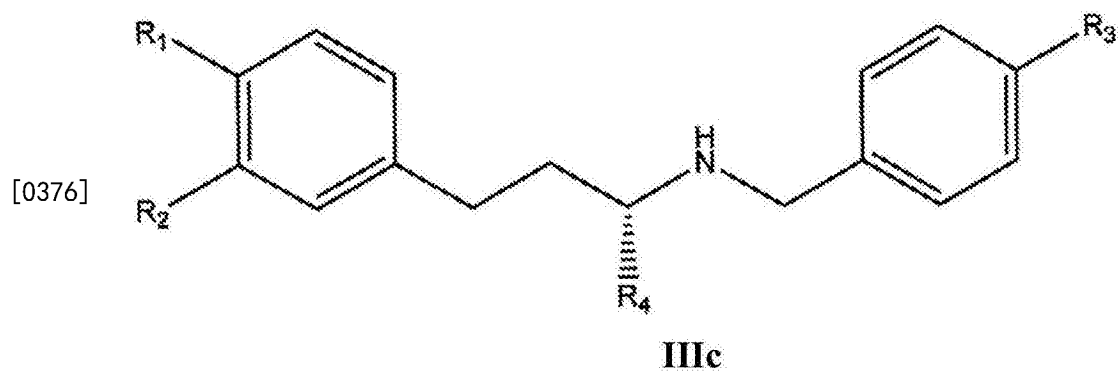
[0371] R_1 =Cl、F、 CF_3 或OH;

[0372] R_2 =H、Cl、F、 CF_3 ,或者 R_1 和 R_2 连接在一起形成-O-亚乙基-O-基团;

[0373] $R_3 = CF_3$; 且

[0374] $R_4 =$ 甲基。

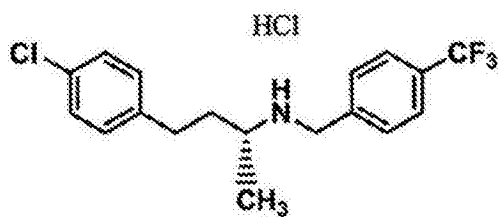
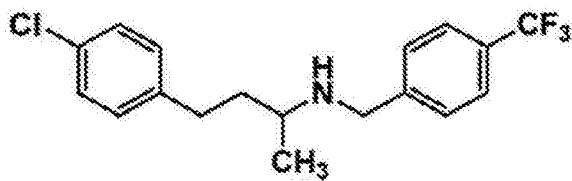
[0375] 在一些更加具体的实施方式中, 本发明的 σ -2配体为式IIIb那些或其药学上可接受的盐:



[0377] 其中 R_1 至 R_4 如以上针对式IIIa的化合物所定义。

[0378] 式III和IV及IIIa和IIIb以及其他化合物的具体示例性化合物列在以下表1B中。

表 1B. 式 III、IIIa、IIIb、IIIc、IV、Va 和 Vb 的示例性化合物



[0379]

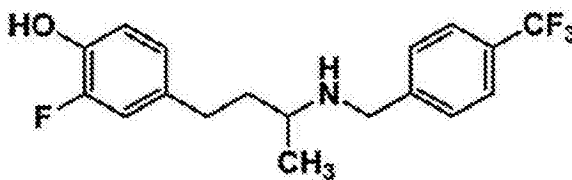
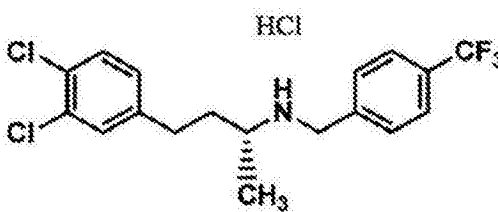
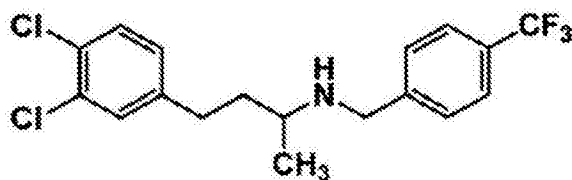
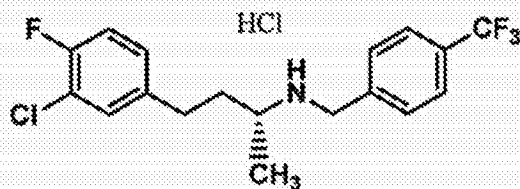
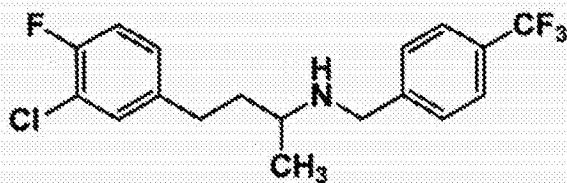
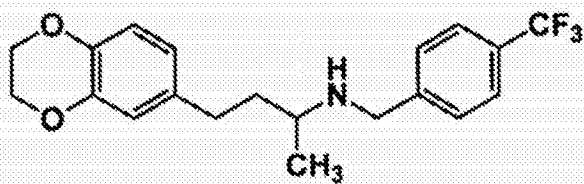


表 1B. 式 III、IIIa、IIIb、IIIc、IV、Va 和 Vb 的示例性化合物



[0380]

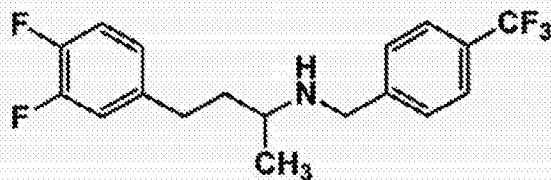
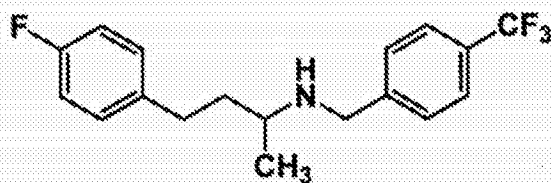
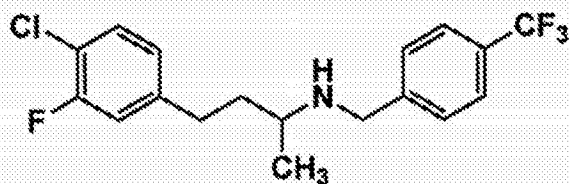
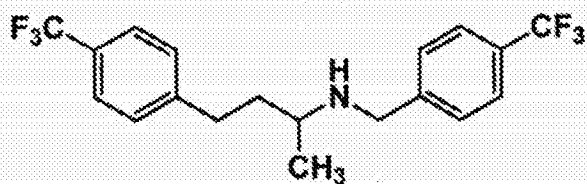
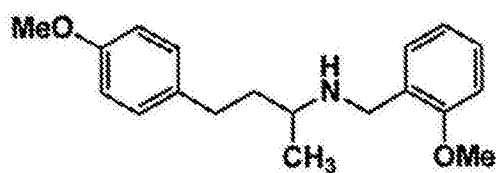
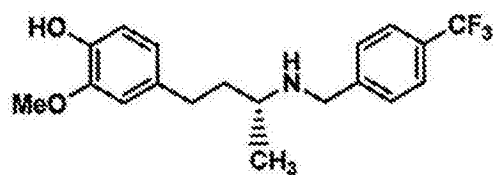
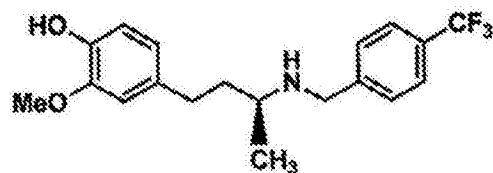
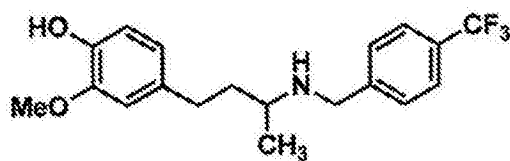
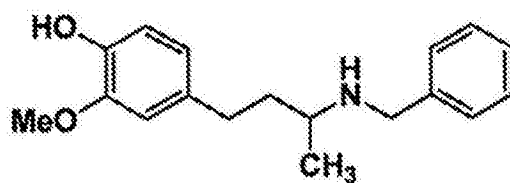
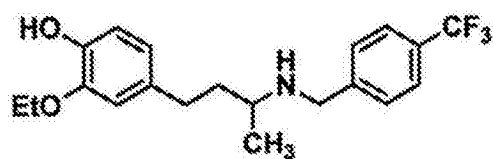
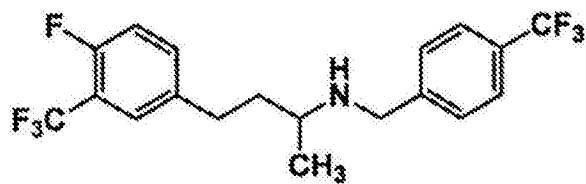
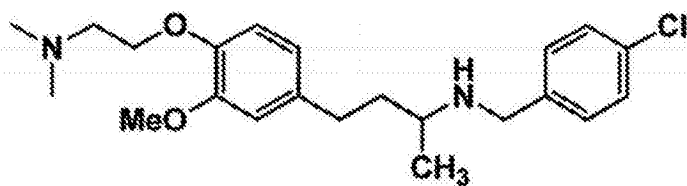
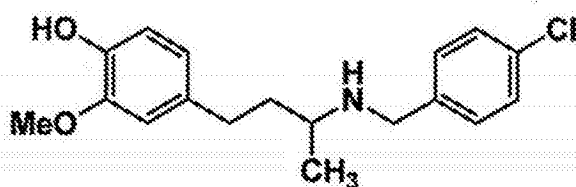
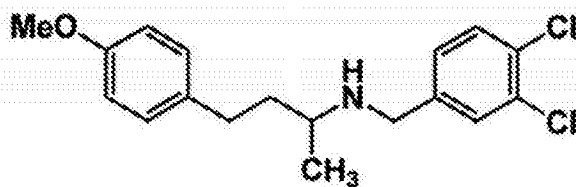
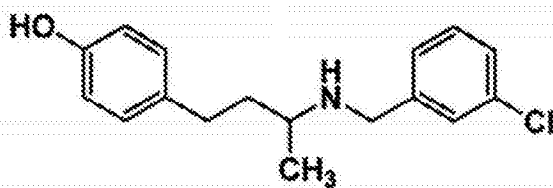
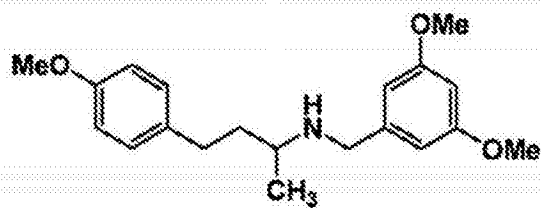


表 1B. 式 III、IIIa、IIIb、IIIc、IV、Va 和 Vb 的示例性化合物



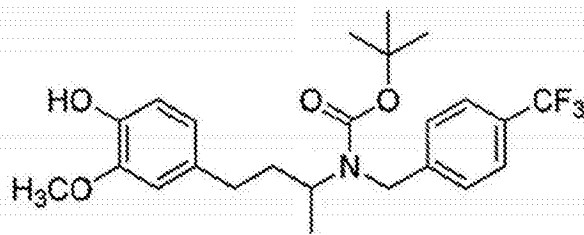
[0381]

表 1B. 式 III、IIIa、IIIb、IIIc、IV、Va 和 Vb 的示例性化合物



[0382]

表 1B. 式 III、IIIa、IIIb、IIIc、IV、Va 和 Vb 的示例性化合物



[0383]

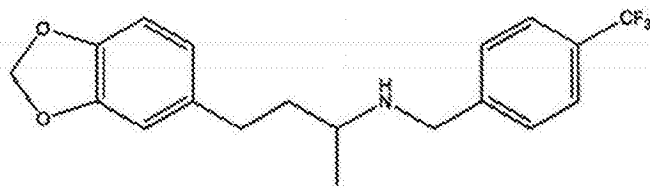
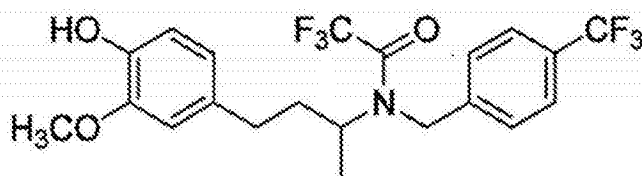
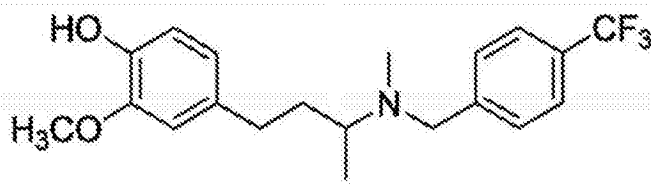
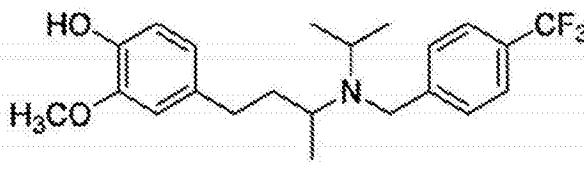
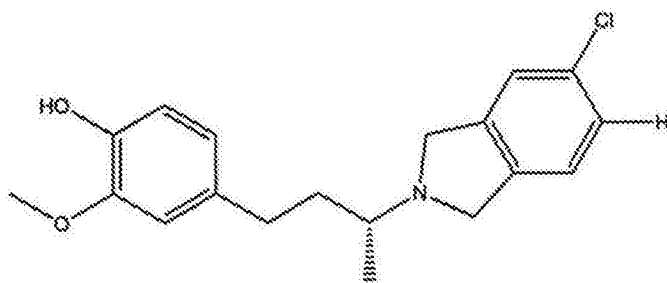
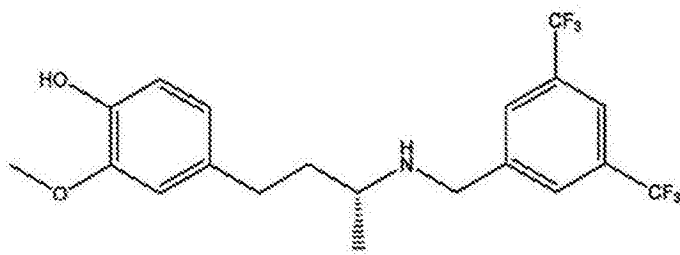
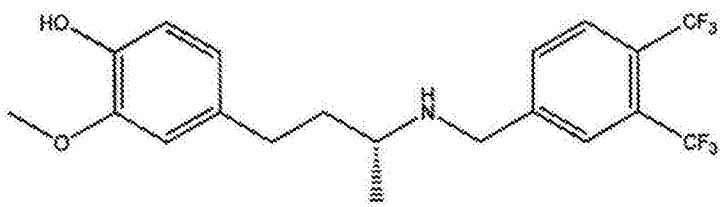
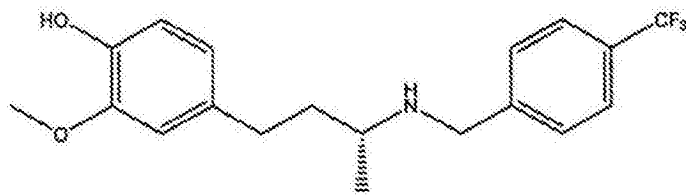
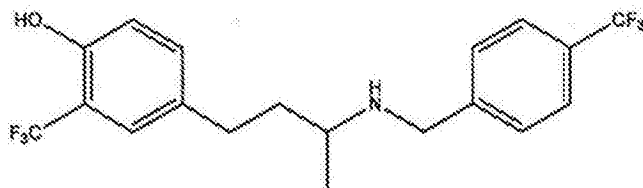
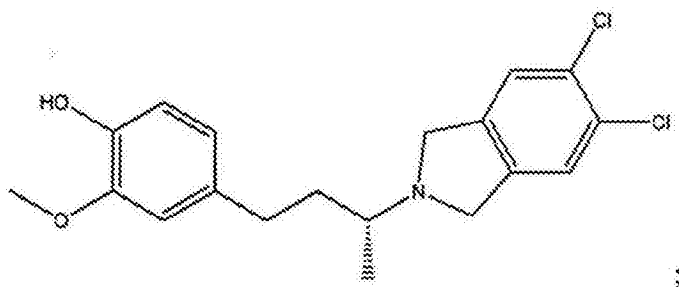
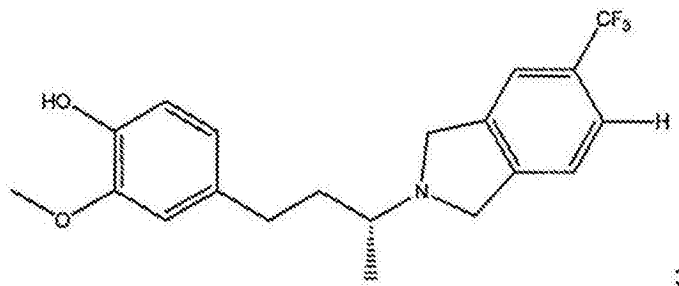


表 1B. 式 III、IIIa、IIIb、IIIc、IV、Va 和 Vb 的示例性化合物



[0384]

表 1B. 式 III、IIIa、IIIb、IIIc、IV、Va 和 Vb 的示例性化合物



[0385]

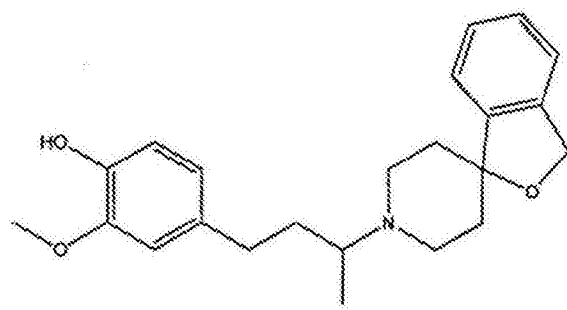
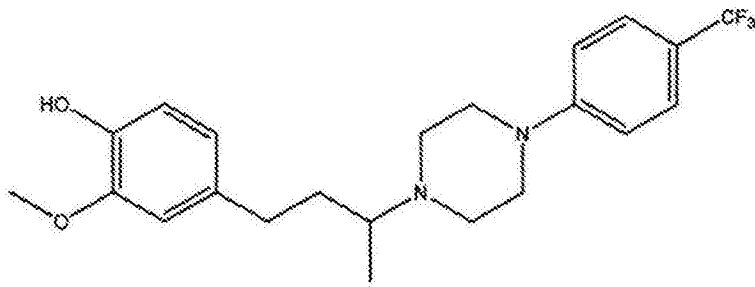
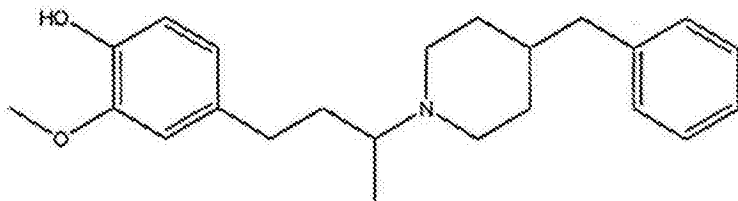
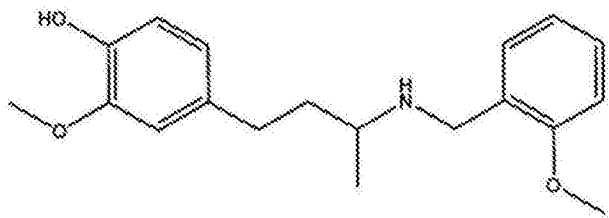
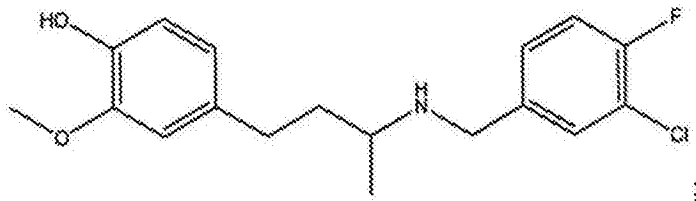
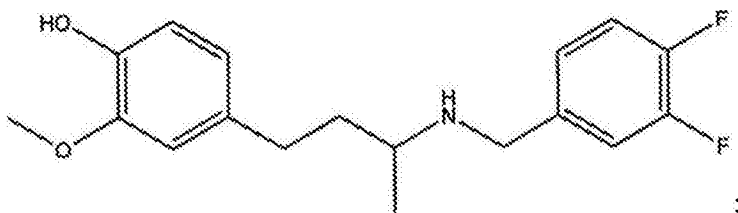
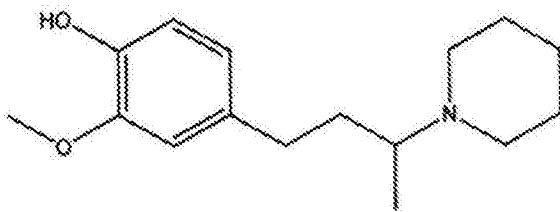
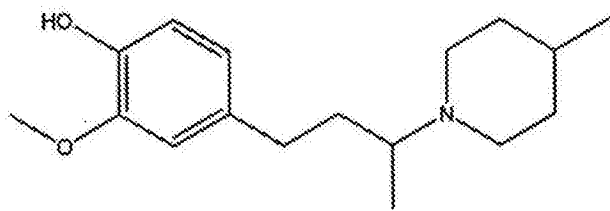
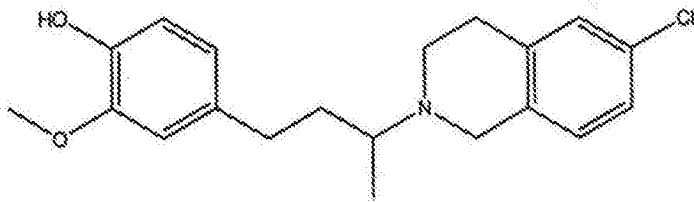
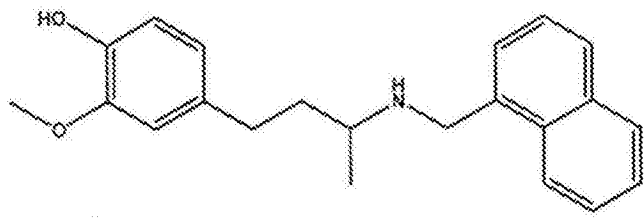
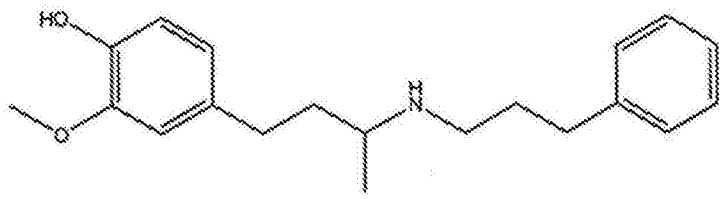
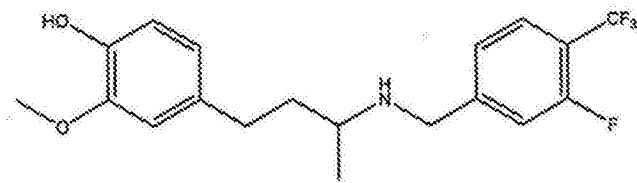
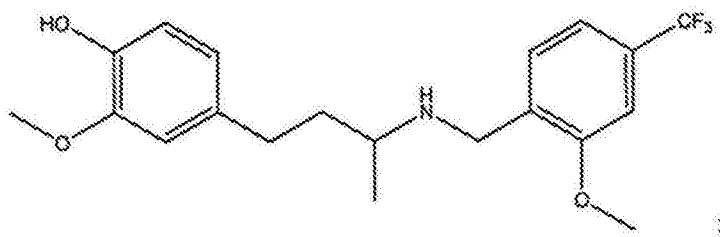
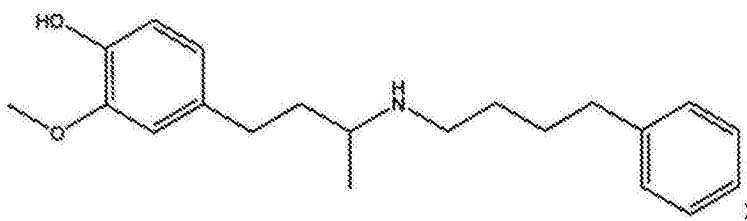
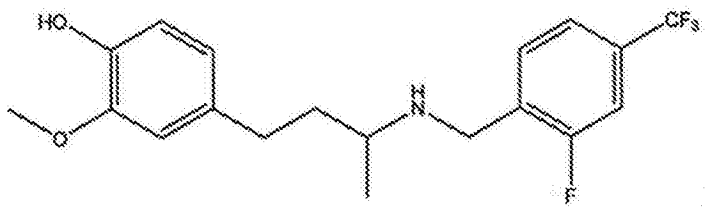


表 1B. 式 III、IIIa、IIIb、IIIc、IV、Va 和 Vb 的示例性化合物



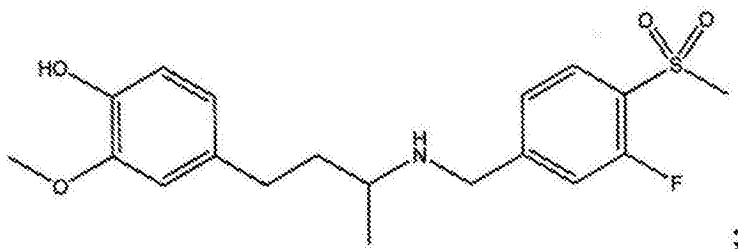
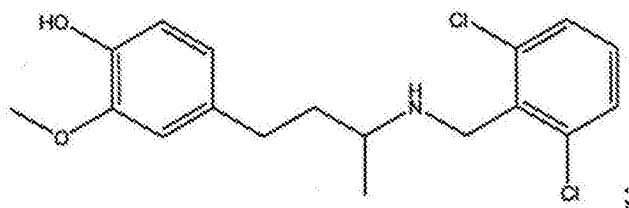
[0386]

表 1B. 式 III、IIIa、IIIb、IIIc、IV、Va 和 Vb 的示例性化合物



[0387]

表 1B. 式 III、IIIa、IIIb、IIIc、IV、Va 和 Vb 的示例性化合物



[0388]

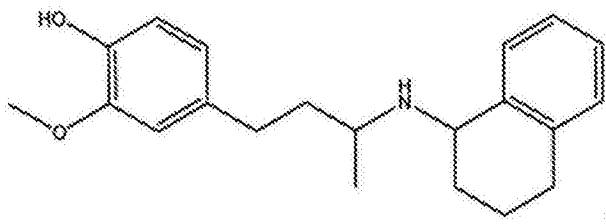
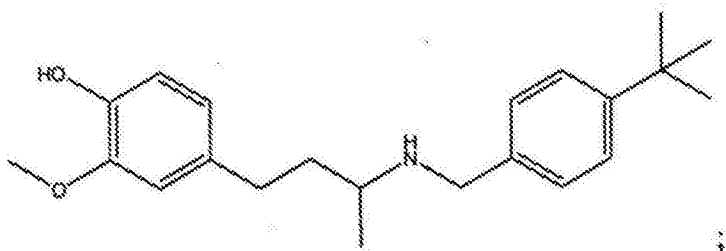
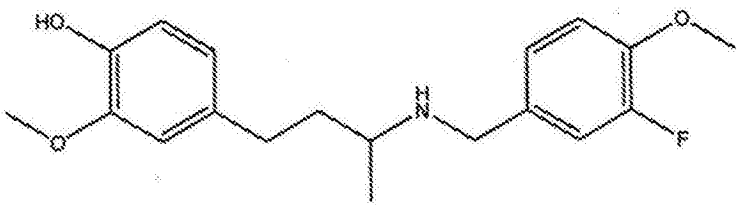
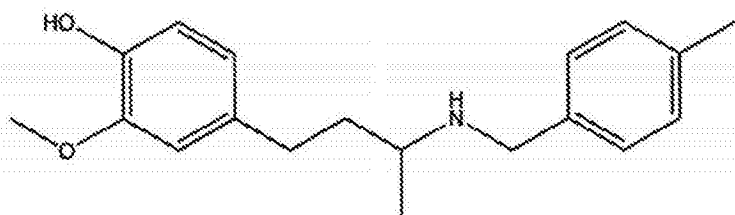
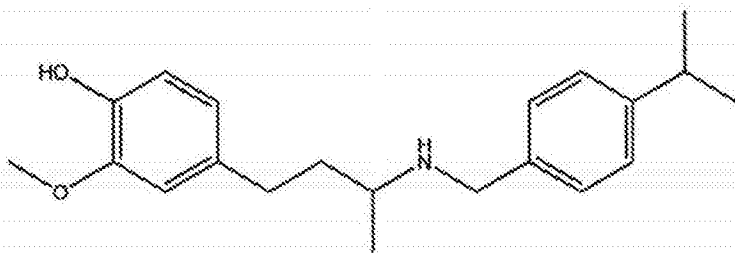


表 1B. 式 III、IIIa、IIIb、IIIc、IV、Va 和 Vb 的示例性化合物



[0389]

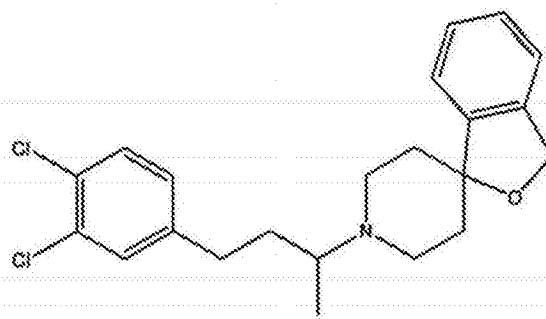
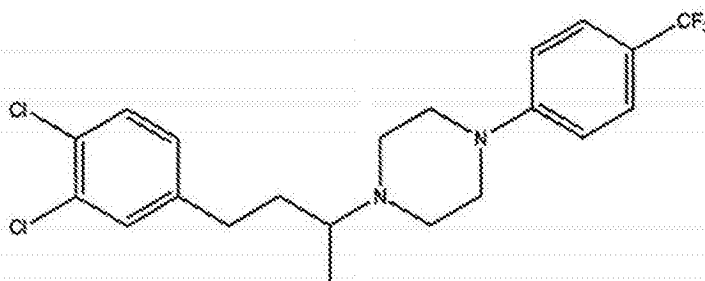
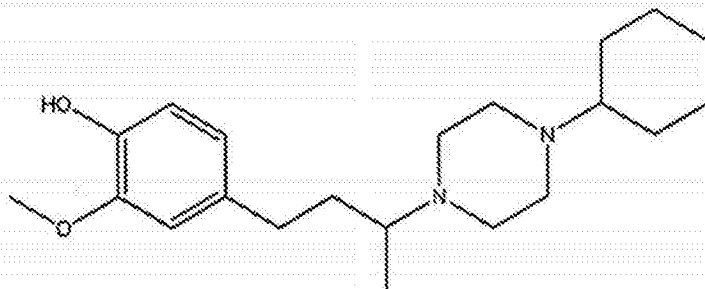
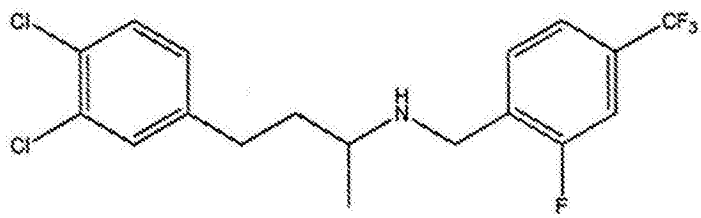
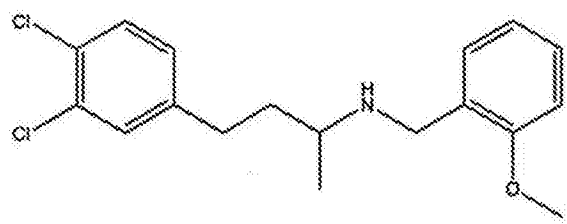
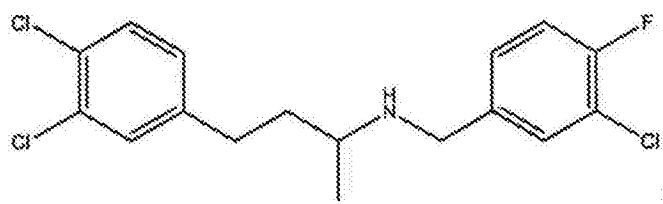
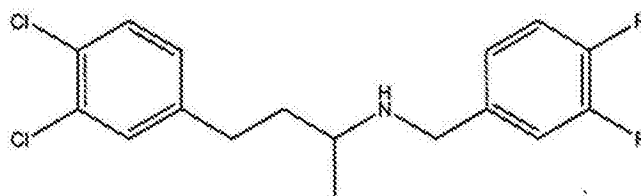
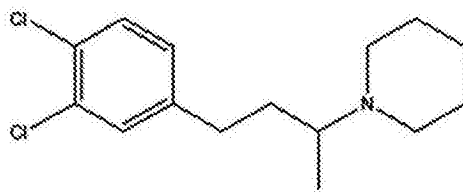
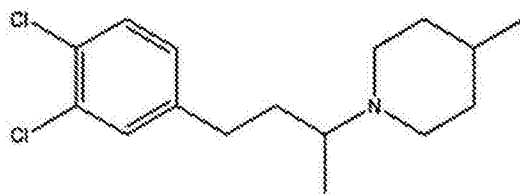
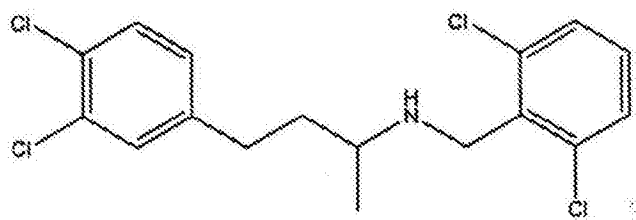
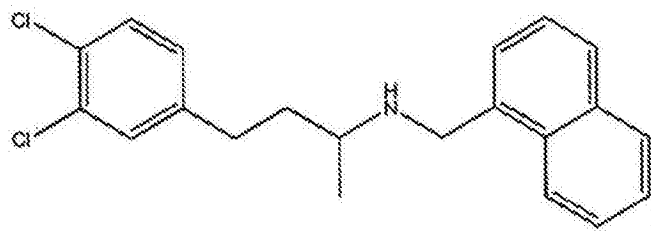
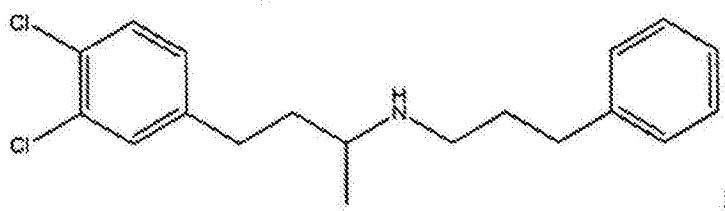
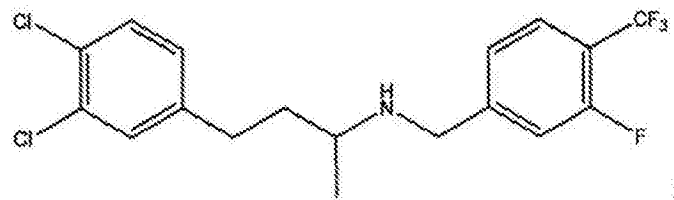
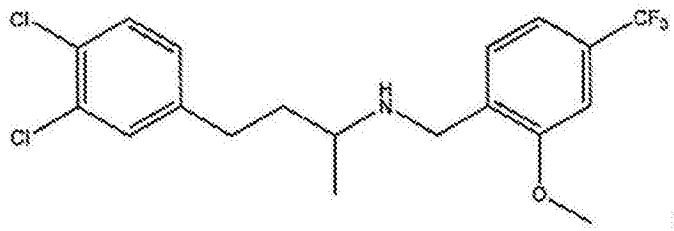
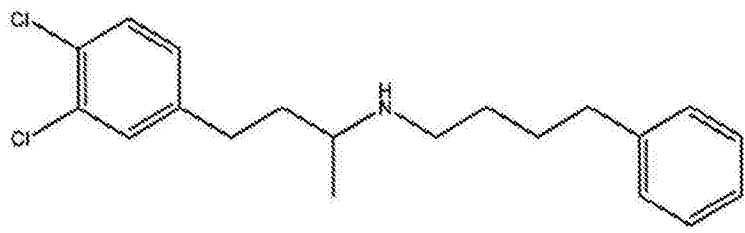


表 1B. 式 III、IIIa、IIIb、IIIc、IV、Va 和 Vb 的示例性化合物



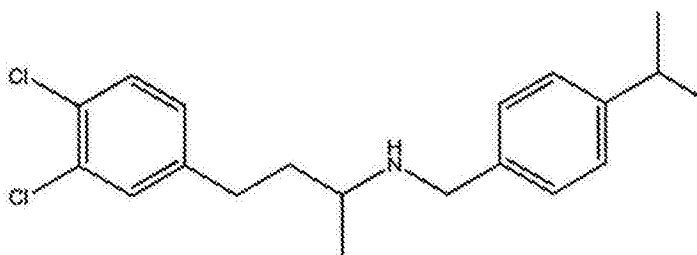
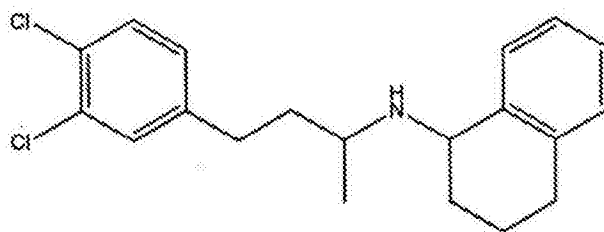
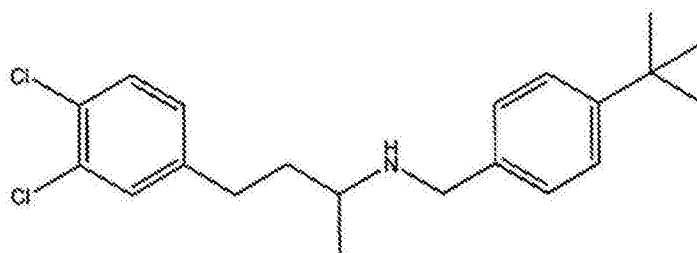
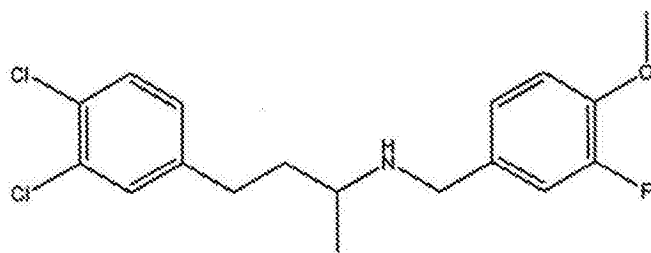
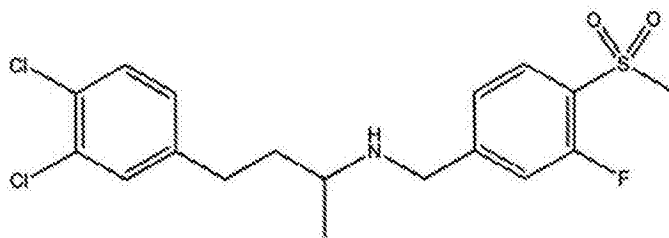
[0390]

表 1B. 式 III、IIIa、IIIb、IIIc、IV、Va 和 Vb 的示例性化合物



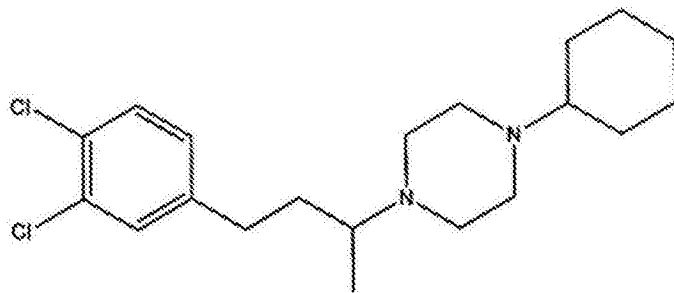
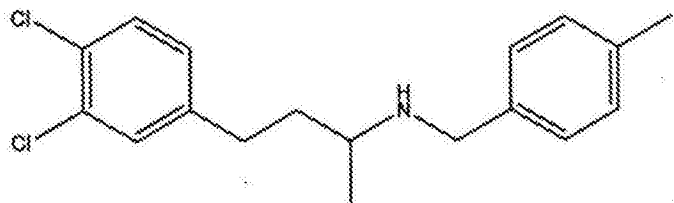
[0391]

表 1B. 式 III、IIIa、IIIb、IIIc、IV、Va 和 Vb 的示例性化合物



[0392]

表 1B. 式 III、IIIa、IIIb、IIIc、IV、Va 和 Vb 的示例性化合物



[0393]

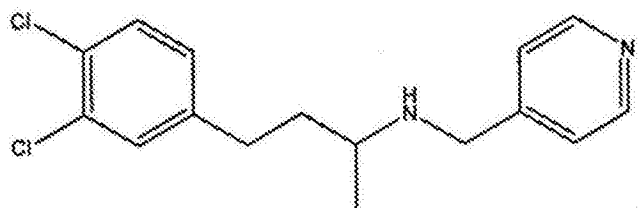
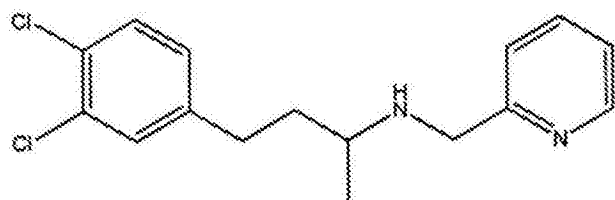
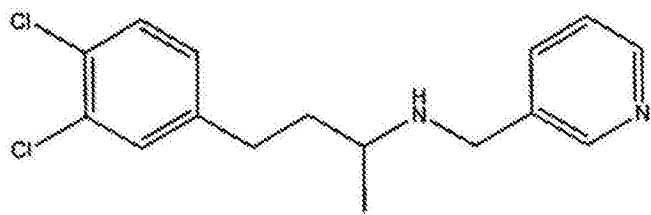
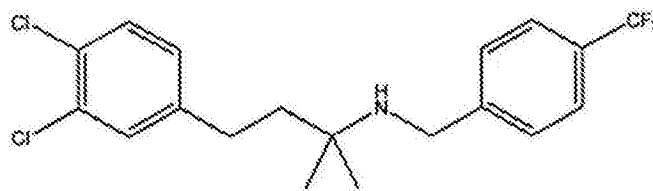
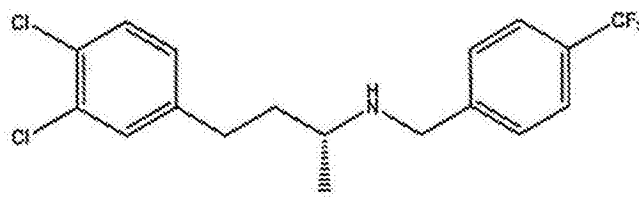
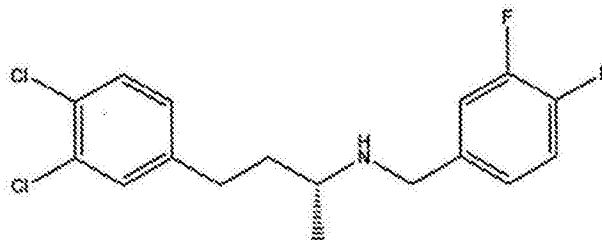
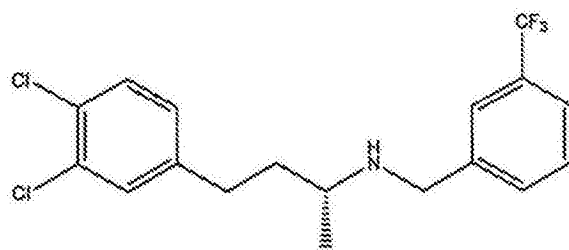
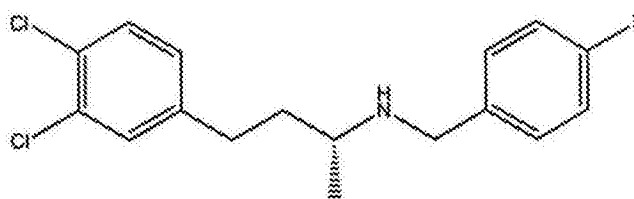
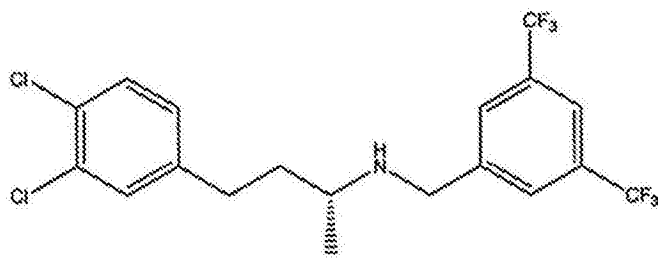
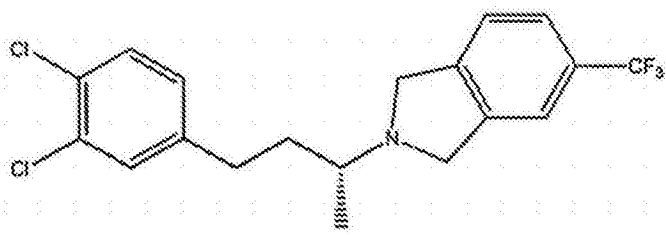
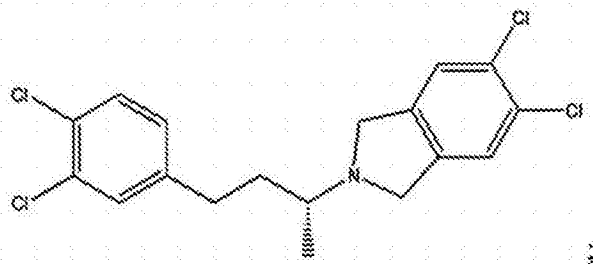


表 1B. 式 III、IIIa、IIIb、IIIc、IV、Va 和 Vb 的示例性化合物



[0394]

表 1B. 式 III、IIIa、IIIb、IIIc、IV、Va 和 Vb 的示例性化合物



[0395]

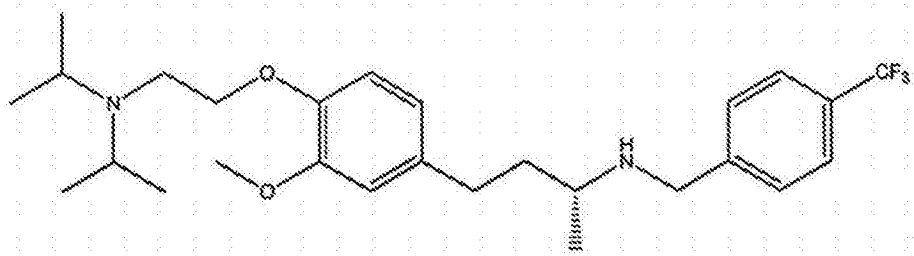
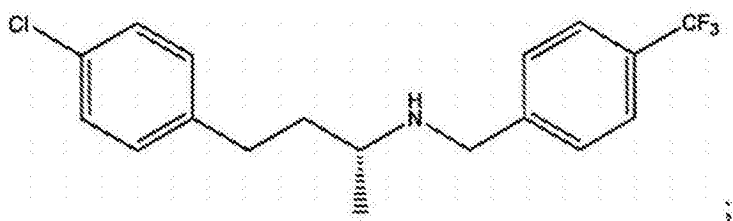
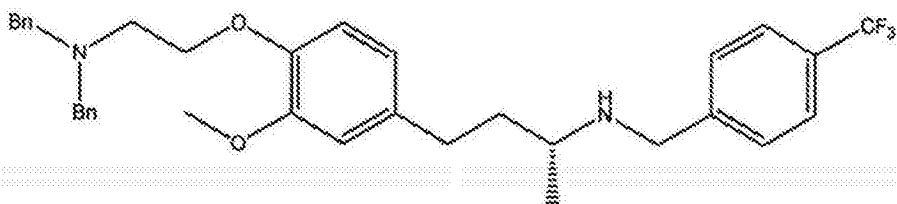
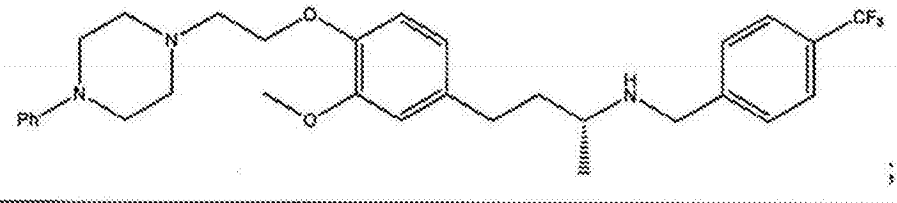
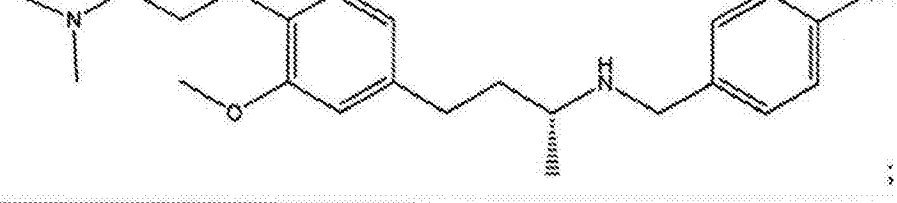
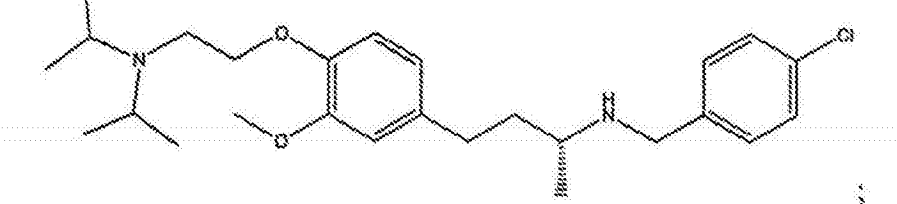
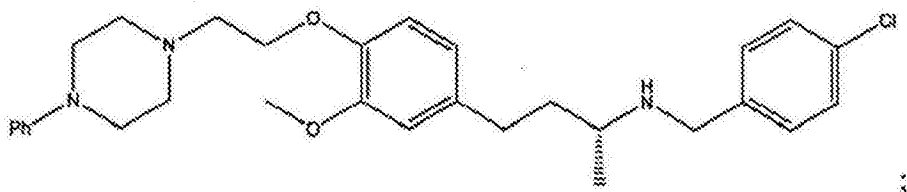
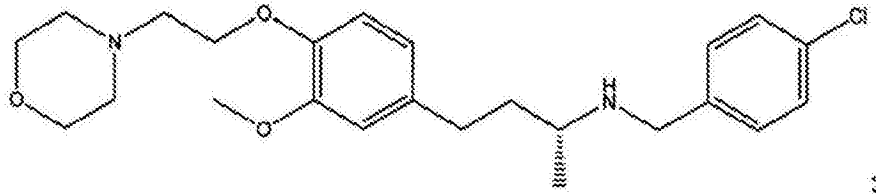
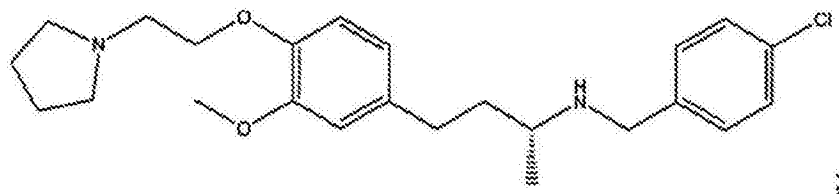


表 1B. 式 III、IIIa、IIIb、IIIc、IV、Va 和 Vb 的示例性化合物

	;
	;
	;
	;
	;
	;

[0396]

表 1B. 式 III、IIIa、IIIb、IIIc、IV、Va 和 Vb 的示例性化合物



[0397]

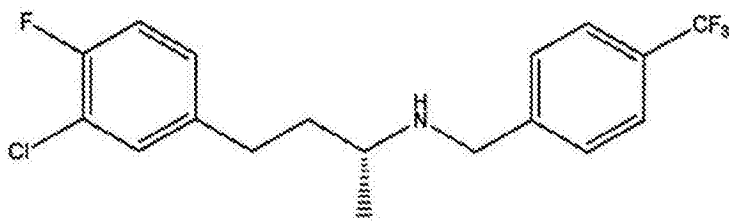
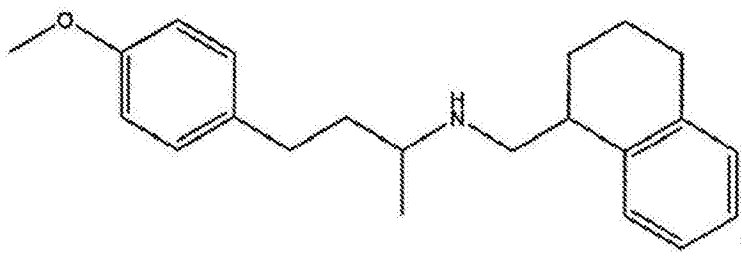
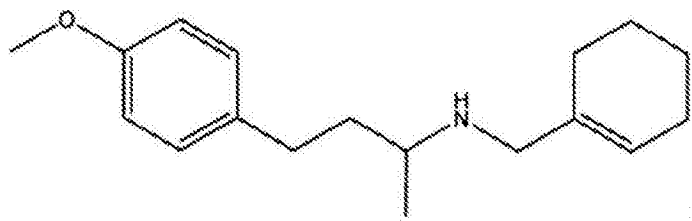
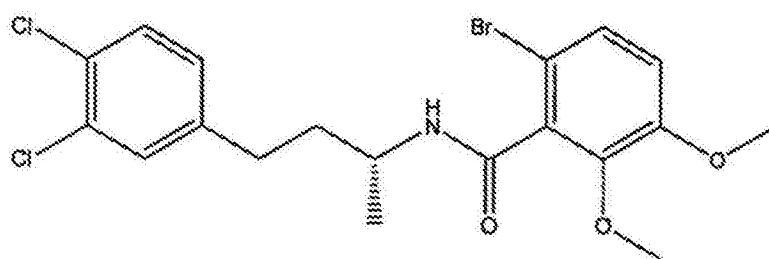
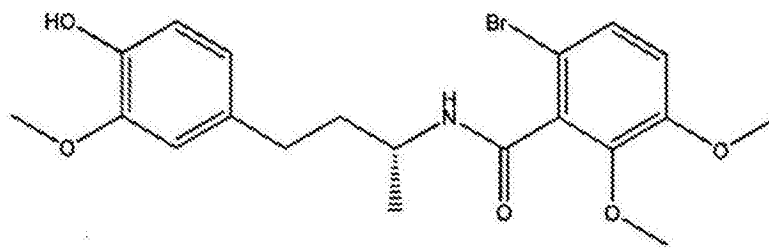
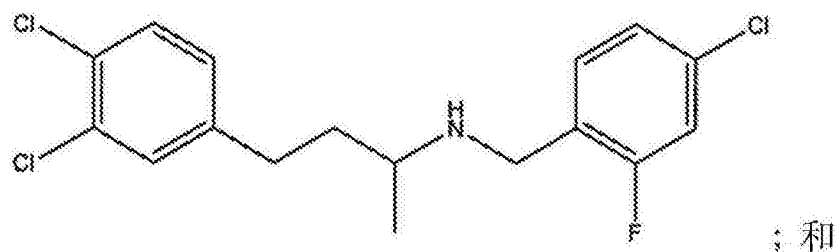
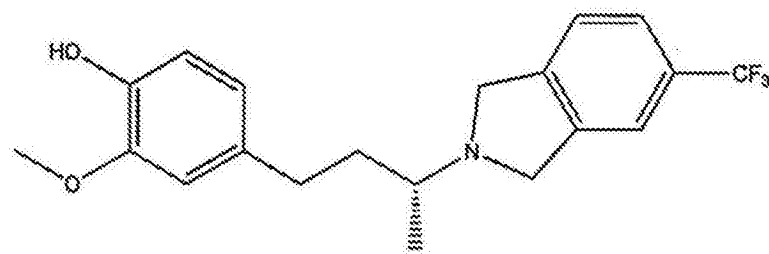
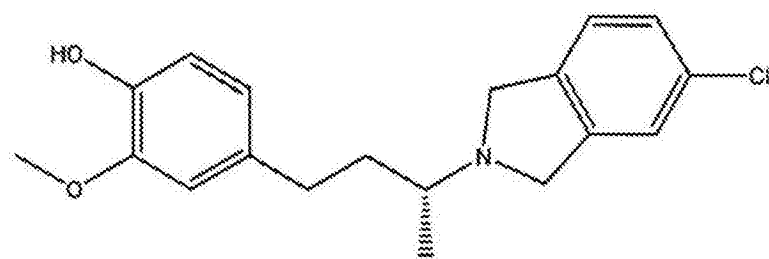


表 1B. 式 III、IIIa、IIIb、IIIc、IV、Va 和 Vb 的示例性化合物



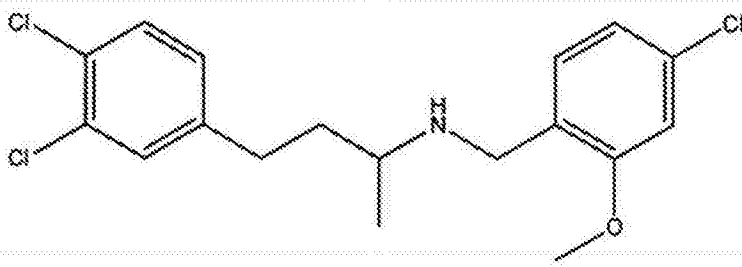
[0398]



; 和

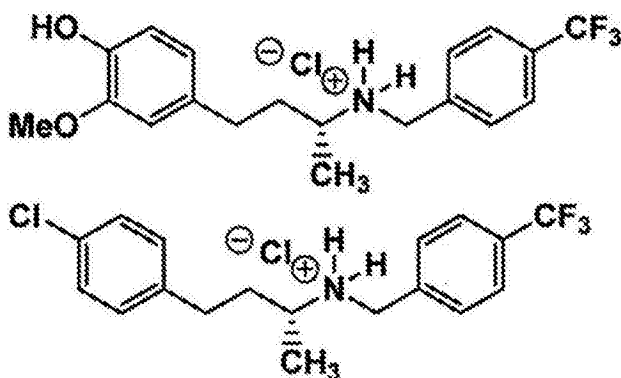
表 1B. 式 III、IIIa、IIIb、IIIc、IV、Va 和 Vb 的示例性化合物

[0399]

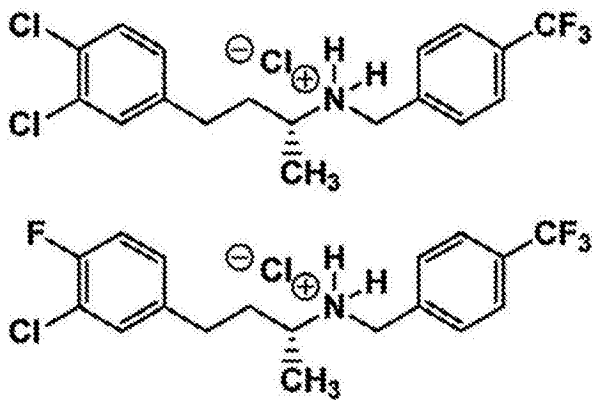


[0400] 或其药物学可接受的盐。

[0401] 用于本发明的优选盐包括以上化合物的盐酸盐, 包括以下:



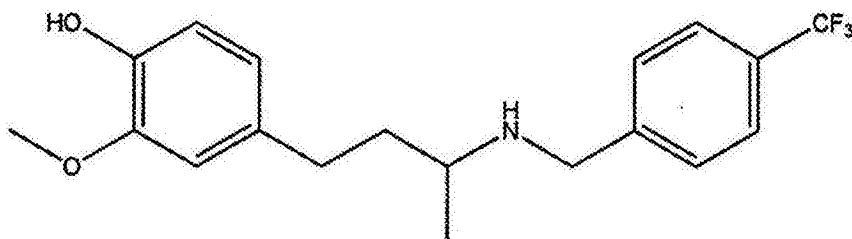
[0402]



[0403] 这些已经根据本文提供的一般方法以及任何额外步骤均在本领域技术内的具体合成实例进行了合成。数种这些化合物已经在本文详述的各个检定中进行了检测并已经被发现有活性。通过参考W02010/110855中公开的化合物, 测试的化合物还表现出增加的生物利用度。

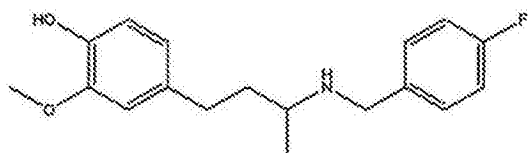
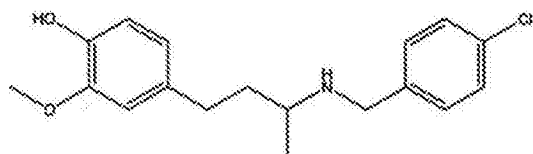
[0404] 化合物II具有式:

[0405]

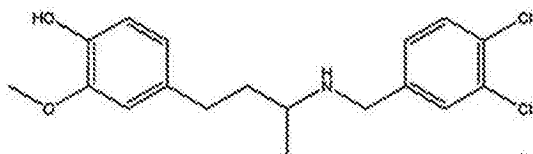
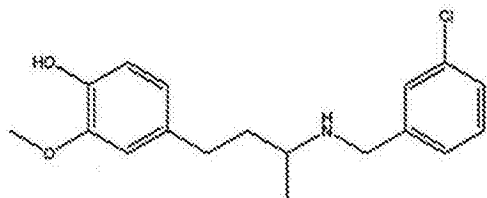


[0406] 在一些实施方式中,各个以上通式可以包含排除式II化合物的条件。

[0407] 在一些实施方式中,各个以上通式可以包含排除一种或多种以下化合物的条件:



[0408]



和

[0409] 这些已经根据本文提供的一般方法以及任何额外步骤均在本领域技术内的具体合成实例进行了合成。数种这些化合物已经在本文详述的各个检定中进行了检测并已经被发现有活性。通过参考W02010/110855 (其并入本文以供参考) 中公开的化合物,测试的化合物还表现出增加的生物利用度。

[0410] 本文使用的术语“氢键受体基团”是指能够接受氢键的基团。氢键受体基团的实例为已知的且包括但不限于烷氧基、噁唑烷-2-酮基团、 $-O-C(O)-N-$; $-C(O)-N-$; $-O-$; 环杂烷基中的杂原子(例如氧); $-N-SO_2-$ 等。基团可以在任一方向结合,并且可以与另一个碳或杂原子连接。氢键受体基团还可以存在于疏水脂族基团中或邻近疏水脂族基团。例如,四氢呋喃基包括氢键受体基团和疏水脂族基团两者。存在于四氢呋喃环中的氧用作为氢键受体且四氢呋喃环中的碳用作为疏水脂族基团。

[0411] 本文使用的术语“疏水脂族基团”是指碳链或碳环。碳链可以存在于环杂烷基中,但是疏水脂族基团不包括杂原子。以上提供的四氢呋喃实例是一个这样的例子,但是还有很多其他的。在一些实施方式中,疏水脂族基团是任选取代的C1~C6烷基、环烷基或杂环烷基的C1~C6碳。“疏水脂族基团”不是疏水芳族基团。

[0412] 本文使用的术语“可正离子化的基团”是指存在于结构中的原子或原子群,其可以在某些条件例如存在于溶液或细胞中的生物学条件下荷正电。在一些实施方式中,可正离

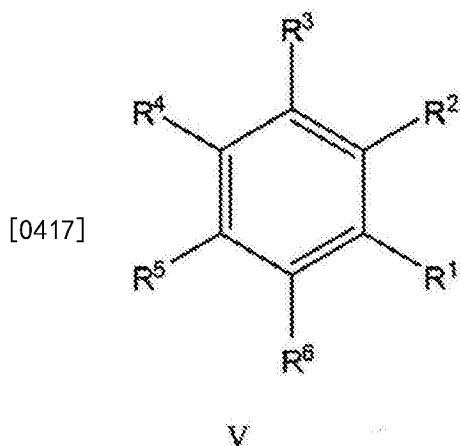
子化的基团是氮。在一些实施方式中,可正离子化的基团是存在于环杂烷基环中的氮。例如,在哌嗪基团中,两个氮被认为是两个可正离子化的基团。然而,在一些实施方式中,与可正离子化的基团连接的碳不被认为是疏水脂族基团。在一些实施方式中,可正离子化的基团是含氮环。含氮环的实例包括但不限于哌嗪、哌啶、三嗪(triazine)、四嗪(tetrazine)等。在一些关于可正离子化的基团的实施方式中,含氮环包括1、2、3或4个氮。在一些实施方式中,可正离子化的基团不是存在于-N-SO₂-基团中的氮。

[0413] 在一些实施方式中,基团包括氢键受体和可正离子化的基团。例如,吗啉基团同时包括氧基中的氢键受体和氮中的可正离子化的基团。

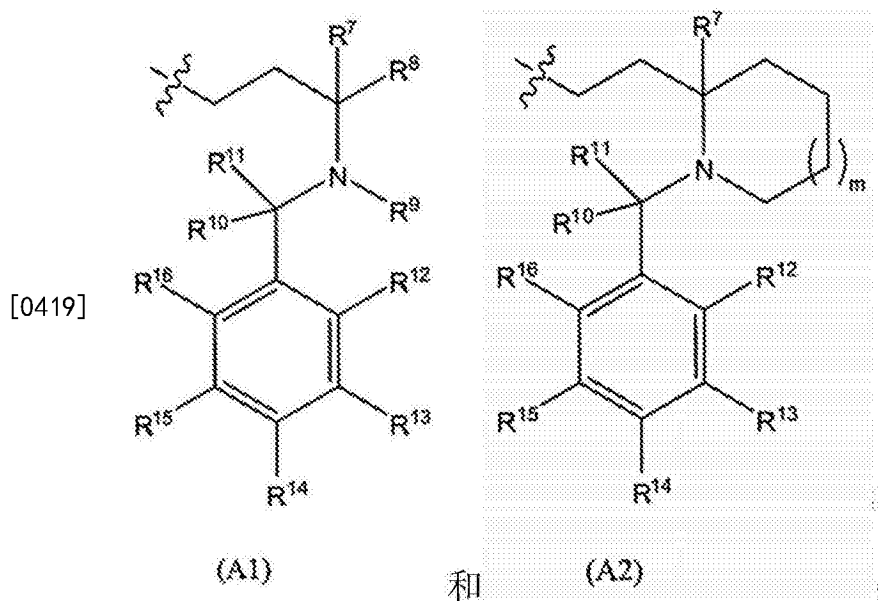
[0414] 本文使用的术语“氢键供体”是指能够提供氢键的基团。氢键供体基团的实例包括但不限于-OH等。

[0415] 在一些实施方式中, σ -2受体配体是任选取代的哌嗪、苯基四氢呋喃-N,N-二甲基甲胺、二苯基四氢呋喃-N,N-二甲基甲胺、4-苯基戊基-哌嗪、苄基苯基-哌嗪、吡啶-氧杂-氮杂螺-癸烷-哌啶-吡啶、苯基哌啶-吡啶、吡啶-吗啉、吡啶-哌啶、吡啶-N,N-二乙基乙胺、吡啶-吡咯烷、苯基-吡啶-吗啉、苯甲酰胺-喹啉化合物或其衍生物。

[0416] 此外, σ -2受体配体可以是任何记载于W02011/014880(申请第PCT/US2010/044136号)、W02010/118055(申请第PCT/US2010/030130号)和申请第PCT/US2011/026530号和W02012/106426的化合物,各个申请全部并入本文以供参考。例如,在一些实施方式中, σ -2配体是式V的化合物:



[0418] 或其药物学上可接受的盐,其中:R¹选自(A1)和(A2):



[0420] 其中在式V的化合物中, R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 各自独立地选自H、OH、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、卤素、CN、 NO_2 、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{3-7} 环烷基、 NH_2 、 NH (C_{1-4} 烷基)、 NH (C_{3-7} 环烷基)、 N (C_{1-4} 烷基) $_2$ 、 $NHC(O)$ (C_{1-4} 烷基)、SH、S (C_{1-6} 烷基)、 $C(O)OR^a$ 、 $C(O)R^b$ 、 $C(O)NR^cR^d$ 、 $OC(O)R^b$ 、 $OC(O)NR^cR^d$ 、 NR^cR^d 、 $NR^cC(O)R^b$ 、 $NR^cC(O)OR^a$ 、 $NR^cS(O)_2R^b$ 、 $NR^cS(O)_2NR^cR^d$ 、 $S(O)R^b$ 、 $S(O)_2R^b$ 和 $S(O)_2NR^cR^d$;

[0421] 其中在式V的化合物中, R^7 是H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、或 C_{3-7} 环烷基;

[0422] 其中在式V的化合物中, R^8 为 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、或 C_{3-7} 环烷基;

[0423] 其中在式V的化合物中, R^9 为H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基或 C_{3-7} 环烷基;

[0424] 其中在式V的化合物中, R^{10} 为H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、或 C_{3-7} 环烷基;

[0425] 其中在式V的化合物中, R^{11} 为H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、或 C_{3-7} 环烷基;

[0426] 其中在式V的化合物中, R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 和 R^{16} 各自独立地选自H、OH、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、卤素、CN、 NO_2 、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{3-7} 环烷基、 NH_2 、 NH (C_{1-4} 烷基)、 NH (C_{3-7} 环烷基)、 N (C_{1-4} 烷基) $_2$ 、 $NHC(O)$ (C_{1-4} 烷基)、SH、S (C_{1-6} 烷基)、 $C(O)OR^{a1}$ 、 $C(O)R^{b1}$ 、 $C(O)NR^{c1}R^{d1}$ 、 $OC(O)R^{b1}$ 、 $OC(O)NR^{c1}R^{d1}$ 、 $NR^{c1}R^{d1}$ 、 $NR^{c1}C(O)R^{b1}$ 、 $NR^{c1}C(O)OR^{a1}$ 、 $NR^{c1}S(O)_2R^{b1}$ 、 $NR^{c1}S(O)_2NR^{c1}R^{d1}$ 、 $S(O)R^{b1}$ 、 $S(O)_2R^{b1}$ 和 $S(O)_2NR^{c1}R^{d1}$;

[0427] 其中在式V的化合物中, 各个 R^a 独立地选自H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基烷基、杂环烷基烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、芳基、环烷基、杂芳基和杂环烷基, 其中 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基烷基、杂环烷基烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、芳基、环烷基、杂芳基和杂环烷基中的各个任选地被1、2、3、4或5个独立选自OH、CN、氨基、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基和杂环烷基的取代基所取代;

[0428] 其中在式V的化合物中, 各个 R^b 独立地选自H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基烷基、杂环烷基烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、芳基、环烷基、杂芳基、杂环烷基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基烷基和杂环烷基烷基, 其中 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基烷基、杂环烷基烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、芳基、环烷基、杂芳基、杂环烷基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基烷基和杂环烷基烷基中的各个任选地被1、2、3、4或5个独立选自OH、氨基、卤

素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷氧基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基和杂环烷基的取代基所取代；

[0429] 其中在式V的化合物中，R^c和R^d独立地选自H、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基烷基、杂环烷基烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、芳基、杂芳基、环烷基、杂环烷基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基烷基和杂环烷基烷基，其中C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基烷基、杂环烷基烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、芳基、杂芳基、环烷基、杂环烷基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基烷基和杂环烷基烷基中的各个任选地被1、2、3、4或5个独立选自OH、氨基、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷氧基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基和杂环烷基的取代基所取代；

[0430] 或者其中在式V的化合物中，R^c和R^d与它们连接的N原子一起形成任选地被1、2、3、4或5个独立选自OH、氨基、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷氧基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基和杂环烷基的取代基所取代的4、5、6或7元杂环烷基；

[0431] 其中在式V的化合物中，各个R^{a1}独立地选自H、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基烷基、杂环烷基烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、芳基、环烷基、杂芳基和杂环烷基，其中C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基烷基、杂环烷基烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、芳基、环烷基、杂芳基和杂环烷基中的各个任选地被1、2、3、4或5个独立选自OH、CN、氨基、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷氧基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基和杂环烷基的取代基所取代；

[0432] 其中在式V的化合物中，各个R^{b1}独立地选自H、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基烷基、杂环烷基烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、芳基、环烷基、杂芳基、杂环烷基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基烷基和杂环烷基烷基，其中C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基烷基、杂环烷基烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、芳基、环烷基、杂芳基、杂环烷基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基烷基和杂环烷基烷基中的各个任选地被1、2、3、4或5个独立选自OH、氨基、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷氧基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基和杂环烷基的取代基所取代；

[0433] 其中在式V的化合物中，R^{c1}和R^{d2}独立地选自H、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基烷基、杂环烷基烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、芳基、杂芳基、环烷基、杂环烷基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基烷基和杂环烷基烷基，其中C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基烷基、杂环烷基烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、芳基、杂芳基、环烷基、杂环烷基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基烷基和杂环烷基烷基中的各个任选地被1、2、3、4或5个独立选自OH、氨基、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷氧基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基和杂环烷基的取代基所取代；

[0434] 或者其中在式V的化合物中，R^{c1}和R^{d1}与它们连接的N原子一起形成任选地被1、2、3、4或5个独立选自OH、氨基、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷氧基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基和杂环烷基的取代基所取代的4、5、6或7元杂环烷基；且

[0435] m为0、1或2。

[0436] 在一些实施方式中，在式V的化合物中，当R¹为(A1)的组成部分时，则R²、R³、R⁴、R⁵和R⁶中的两个独立地选自OH、C₁₋₆烷氧基和C₁₋₆卤代烷氧基。

[0437] 在一些实施方式中，在式V的化合物中，当R¹为(A1)的组成部分时，则R¹²、R¹³、R¹⁴、

R^{15} 和 R^{16} 中的至少一个不是H。

[0438] 在一些实施方式中,在式V的化合物中, R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 中的两个独立地选自OH、 C_{1-6} 烷氧基和 C_{1-6} 卤代烷氧基。在一些其他实施方式中, R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 中剩余的每一个为H。

[0439] 在一些实施方式中,在式V的化合物中, R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 各自独立地选自H、OH、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、卤素、CN、 NO_2 、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{3-7} 环烷基、 NH_2 、NH(C_{1-4} 烷基)、NH(C_{3-7} 环烷基)、N(C_{1-4} 烷基)₂、NHC(O)(C_{1-4} 烷基)、SH、S(C_{1-6} 烷基)、C(O)OH、C(O)O(C_{1-4} 烷基)、C(O)(C_{1-4} 烷基)和C(O)NH(C_{1-4} 烷基)。

[0440] 在一些实施方式中,在式V的化合物中, R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 中的一个为OH;且 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 中的一个为OH、 C_{1-6} 烷氧基、或 C_{1-6} 卤代烷氧基。在一些其他实施方式中, R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 中剩余的每一个为H。

[0441] 在一些实施方式中,在式V的化合物中, R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 中的一个为OH;且 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 中的一个为 C_{1-3} 烷氧基或 C_{1-3} 卤代烷氧基(在一些其他实施方式中, R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 中剩余的每一个为H)。在一些其他实施方式中, R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 中的一个为OH;且 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 中的一个为甲氧基或三卤代甲氧基(在一些其他实施方式中, R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 中剩余的每一个为H)。在其他实施方式中, R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 中的一个为OH;且 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 中的一个为甲氧基(在一些其他实施方式中, R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 中剩余的每一个为H)。

[0442] 在一些实施方式中,在式V的化合物中, R^4 为OH;且 R^5 为甲氧基。在一些其他实施方式中, R^4 为OH; R^5 为甲氧基;且 R^2 、 R^3 和 R^6 各自为H。

[0443] 在一些实施方式中,在式V的化合物中, R^7 为H或 C_{1-6} 烷基。在一些其他实施方式中, R^7 为H或 C_{1-3} 烷基。

[0444] 在一些实施方式中,在式V的化合物中, R^7 为 C_{1-3} 烷基。在一些其他实施方式中, R^7 为甲基或乙基。在其他实施方式中, R^7 为甲基。

[0445] 在一些实施方式中,在式V的化合物中, R^7 为H。

[0446] 在一些实施方式中,在式V的化合物中, R^8 为 C_{1-6} 烷基。在一些其他实施方式中, R^8 为 C_{1-3} 烷基。在其他实施方式中, R^8 为甲基。

[0447] 在一些实施方式中,在式V的化合物中, R^9 为H或 C_{1-6} 烷基。在一些其他实施方式中, R^9 为H或 C_{1-3} 烷基。

[0448] 在一些实施方式中,在式V的化合物中, R^9 为H。

[0449] 在一些实施方式中,在式V的化合物中, R^9 为 C_{1-3} 烷基。

[0450] 在一些实施方式中,在式V的化合物中, R^{10} 为H或 C_{1-6} 烷基。在一些其他实施方式中, R^{10} 为H或 C_{1-3} 烷基。在其他实施方式中, R^{10} 为H。在其他实施方式中, R^{10} 为 C_{1-3} 烷基。

[0451] 在一些实施方式中,在式V的化合物中, R^{11} 为H或 C_{1-6} 烷基。在一些其他实施方式中, R^{11} 为H或 C_{1-3} 烷基。在其他实施方式中, R^{11} 为H。在其他实施方式中, R^{11} 为 C_{1-3} 烷基。

[0452] 在一些实施方式中,在式V的化合物中, R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 和 R^{16} 中的至少一个不是H。

[0453] 在一些实施方式中,在式V的化合物中, R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 和 R^{16} 各自独立地选自H、OH、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、卤素、CN、 NO_2 、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{3-7} 环烷基、 NH_2 、NH(C_{1-4} 烷基)、NH(C_{3-7} 环烷基)、N(C_{1-4} 烷基)₂、NHC(O)(C_{1-4} 烷基)、SH、S(C_{1-6} 烷基)、C(O)OH、C(O)O(C_{1-4} 烷基)、C(O)(C_{1-4} 烷基)、和C(O)NH(C_{1-4} 烷基)。

[0454] 在一些实施方式中,在式V的化合物中, R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 和 R^{16} 各自独立地选自H、卤

素、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₃₋₇环烷基、C(O)O(C₁₋₄烷基)、C(O)(C₁₋₄烷基)和C(O)NH(C₁₋₄烷基)。

[0455] 在一些实施方式中,在式V的化合物中,R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中的至少一个选自卤素、CN、NO₂、C₁₋₆卤代烷基、C(O)O(C₁₋₄烷基)、C(O)(C₁₋₄烷基)和C(O)NH(C₁₋₄烷基)。

[0456] 在一些实施方式中,在式V的化合物中,R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中的至少一个选自卤素和C₁₋₆卤代烷基。在一些其他实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中的至少一个选自卤素和C₁₋₆卤代烷基,且R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中剩余的每一个为H。在其他实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中的一个或两个选自卤素和C₁₋₆卤代烷基,且R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中剩余的每一个为H。在其他实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中的一个选自卤素和C₁₋₆卤代烷基,且R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中剩余的每一个为H。

[0457] 在一些实施方式中,在式V的化合物中,R¹⁴为卤素或C₁₋₆卤代烷基(在一些其他实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁵和R¹⁶中的每一个为H)。在一些其他实施方式中,R¹⁴为卤素或C₁₋₃卤代烷基(在一些其他实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁵和R¹⁶中的每一个为H)。在其他实施方式中,R¹⁴为卤素或C₁卤代烷基(在一些其他实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁵和R¹⁶中的每一个为H)。

[0458] 在一些实施方式中,在式V的化合物中,R¹⁴为卤素(在一些其他实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁵和R¹⁶中的每一个为H)。在一些实施方式中,R¹⁴为Cl或F。在一些实施方式中,R¹⁴为Cl。在一些实施方式中,R¹⁴为F。

[0459] 在一些实施方式中,在式V的化合物中,R¹⁴为C₁₋₆卤代烷基(在一些其他实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁵和R¹⁶中的每一个为H)。在一些其他实施方式中,R¹⁴为C₁₋₃卤代烷基。在其他实施方式中,R¹⁴为C₁卤代烷基。在其他实施方式中,R¹⁴为CF₃。

[0460] 在一些实施方式中,在式V的化合物中,R¹⁵为卤素或C₁₋₆卤代烷基(在一些其他实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁴和R¹⁶中的每一个为H)。在一些其他实施方式中,R¹⁵为卤素或C₁₋₃卤代烷基(在一些其他实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁴和R¹⁶中的每一个为H)。在其他实施方式中,R¹⁵为卤素或C₁卤代烷基(在一些其他实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁴和R¹⁶中的每一个为H)。

[0461] 在一些实施方式中,在式V的化合物中,R¹⁵为卤素。在一些实施方式中,R¹⁵为Cl或F。在一些实施方式中,R¹⁵为Cl。在一些实施方式中,R¹⁵为F。

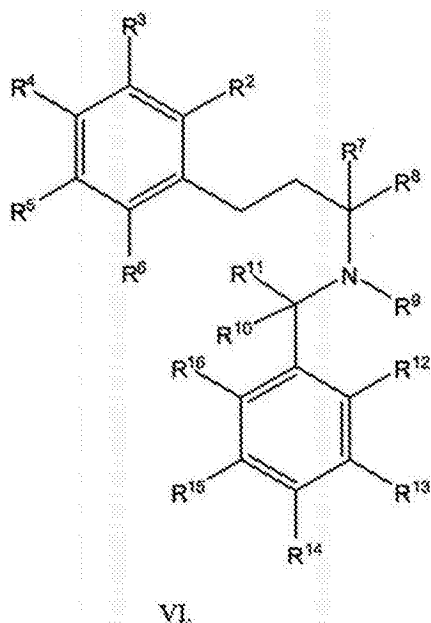
[0462] 在一些实施方式中,在式V的化合物中,R¹⁵为C₁₋₆卤代烷基。在一些其他实施方式中,R¹⁵为C₁₋₃卤代烷基。在其他实施方式中,R¹⁵为C₁卤代烷基。在其他实施方式中,R¹⁵为CF₃。

[0463] 在一些实施方式中,在式V的化合物中,R¹⁴和R¹⁵各自独立地为卤素或C₁₋₃卤代烷基(在一些其他实施方式中,R¹²、R¹³和R¹⁶中的每一个为H)。在一些其他实施方式中,R¹⁴和R¹⁵各自独立地为卤素或C₁卤代烷基。

[0464] 在一些实施方式中,在式V的化合物中,R¹⁴和R¹⁵各自独立地为卤素。

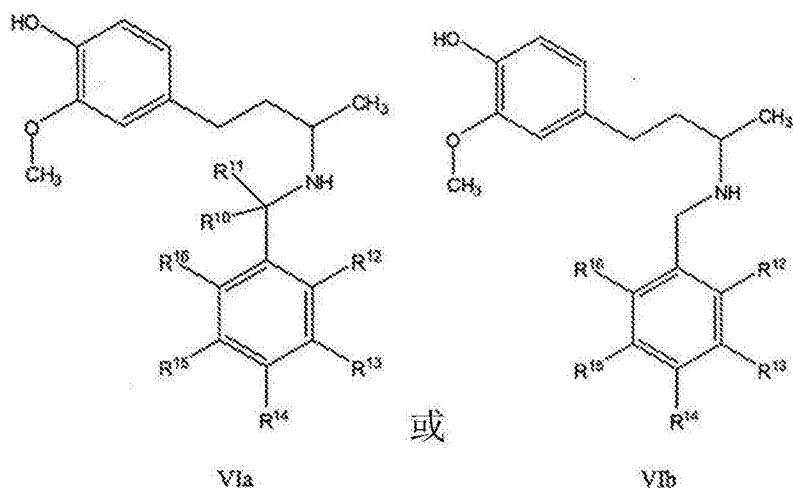
[0465] 在一些实施方式中,式V的化合物为式VI的化合物:

[0466]



[0467] 在一些实施方式中,式VI的化合物或其药学上可接受的盐为式VIa或VIb的化合物或其药学上可接受的盐:

[0468]



[0469] 在一些实施方式中,式VI的化合物为式VIa的化合物。在一些其他实施方式中, R^{10} 和 R^{11} 各自独立地选自H和 C_{1-3} 烷基。在其他实施方式中, R^{10} 和 R^{11} 各自独立地选自H和甲基。在其他实施方式中, R^{10} 和 R^{11} 各自为H。

[0470] 在式VIa的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中, R^{10} 和 R^{11} 中的一个选自H和 C_{1-3} 烷基且另一个为H。在一些其他实施方式中, R^{10} 和 R^{11} 中的一个为 C_{1-3} 烷基。在其他实施方式中, R^{10} 和 R^{11} 中的一个为甲基。

[0471] 在式VIa的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中, R^{10} 和 R^{11} 两者均选自 C_{1-3} 烷基。在一些其他实施方式中, R^{10} 和 R^{11} 两者均为甲基。

[0472] 在式VIa的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中, R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 和 R^{16} 各自独立地选自H、OH、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、卤素、CN、NO₂、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{3-7} 环烷基、NH₂、NH(C_{1-4} 烷基)、NH(C_{3-7} 环烷基)、N(C_{1-4} 烷基)₂、NHC(O)(C_{1-4} 烷基)、SH、S(C_{1-6} 烷基)、C(O)OH、C(O)O(C_{1-4} 烷基)、C(O)(C_{1-4} 烷基)和C(O)NH(C_{1-4} 烷基)。

[0473] 在式VIa的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中, R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 和 R^{16}

各自独立地选自H、卤素、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₃₋₇环烷基、C(O)O(C₁₋₄烷基)、C(O)(C₁₋₄烷基)和C(O)NH(C₁₋₄烷基)。

[0474] 在式VIa的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中，R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶各自独立地选自H、卤素、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基和C₃₋₇环烷基。在一些其他实施方式中，R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶各自独立地选自H、卤素、CN、C₁₋₆烷基和C₁₋₆卤代烷基。在其他实施方式中，R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶各自独立地选自H、卤素、C₁₋₆烷基和C₁₋₆卤代烷基。

[0475] 在式VIa的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中，R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中的至少一个选自卤素和C₁₋₆卤代烷基，且R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中剩余的每一个为H。在一些其他实施方式中，R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中的一个或两个选自卤素和C₁₋₆卤代烷基，且R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中剩余的每一个为H。在其他实施方式中，R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中的一个选自卤素和C₁₋₆卤代烷基，且R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中剩余的每一个为H。

[0476] 在式VIa的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中，R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中的至少一个选自卤素、CN、NO₂、C₁₋₆卤代烷基、C(O)O(C₁₋₆烷基)、C(O)(C₁₋₄烷基)和C(O)NH(C₁₋₄烷基)。

[0477] 在式VIa的化合物的一些实施方式中，R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中的至少一个选自卤素和C₁₋₆卤代烷基。

[0478] 在式VIa的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中，R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中的至少一个选自卤素和C₁₋₃卤代烷基。在一些其他实施方式中，R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中的至少一个选自卤素和C₁卤代烷基。

[0479] 在式VIa的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中，R¹⁴为卤素或C₁₋₆卤代烷基。在一些其他实施方式中，R¹⁴为卤素或C₁₋₃卤代烷基。在其他实施方式中，R¹⁴为卤素或C₁卤代烷基。

[0480] 在式VIa的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中，R¹⁴为卤素(在一些其他实施方式中，R¹²、R¹³、R¹⁵和R¹⁶中的每一个为H)。在一些实施方式中，R¹⁴为Cl或F。在一些实施方式中，R¹⁴为Cl。在一些实施方式中，R¹⁴为F。

[0481] 在式IIa的化合物的一些实施方式中，R¹⁴为C₁₋₆卤代烷基(在一些其他实施方式中，R¹²、R¹³、R¹⁵和R¹⁶中的每一个为H)。在一些其他实施方式中，R¹⁴为C₁₋₃卤代烷基。在其他实施方式中，R¹⁴为C₁卤代烷基。在其他实施方式中，R¹⁴为CF₃。

[0482] 在式VIa的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中，R¹⁴为卤素或C₁₋₆卤代烷基，且R¹²、R¹³、R¹⁵和R¹⁶中的每一个为H。

[0483] 在式VIa的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中，R¹⁵为卤素或C₁₋₆卤代烷基(在一些其他实施方式中，R¹²、R¹³、R¹⁴和R¹⁶中的每一个为H)。在一些其他实施方式中，R¹⁵为卤素或C₁₋₃卤代烷基。在其他实施方式中，R¹⁵为卤素或C₁卤代烷基。

[0484] 在式VIa的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中，R¹⁵为卤素。在一些实施方式中，R¹⁵为Cl或F。在一些实施方式中，R¹⁵为Cl。在一些实施方式中，R¹⁵为F。

[0485] 在式VIa的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中，R¹⁵为C₁₋₆卤代烷基。在一些其他实施方式中，R¹⁵为C₁₋₃卤代烷基。在其他实施方式中，R¹⁵为C₁卤代烷基。在其他实施方式中，R¹⁵为CF₃。

[0486] 在式VIa的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中，R¹⁴和R¹⁵各自独立地

为卤素或C₁₋₃卤代烷基(在一些其他实施方式中,R¹²、R¹³和R¹⁶中的每一个为H)。在一些其他实施方式中,R¹⁴和R¹⁵各自独立地为卤素或C₁卤代烷基。在其他实施方式中,R¹⁴和R¹⁵各自独立地为卤素。

[0487] 在一些实施方式中,式VI的化合物或其药学上可接受的盐为式VIb的化合物或其药学上可接受的盐。

[0488] 在式VIb的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶各自独立地选自H、OH、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷氧基、卤素、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₃₋₇环烷基、NH₂、NH(C₁₋₄烷基)、NH(C₃₋₇环烷基)、N(C₁₋₄烷基)₂、NHC(O)(C₁₋₄烷基)、SH、S(C₁₋₆烷基)、C(O)OH、C(O)O(C₁₋₄烷基)、C(O)(C₁₋₄烷基)和C(O)NH(C₁₋₄烷基)。

[0489] 在式VIb的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶各自独立地选自H、卤素、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₃₋₇环烷基、C(O)O(C₁₋₄烷基)、C(O)(C₁₋₄烷基)和C(O)NH(C₁₋₄烷基)。

[0490] 在式IIb的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶各自独立地选自H、卤素、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基和C₃₋₇环烷基。在一些其他实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶各自独立地选自H、卤素、CN、C₁₋₆烷基和C₁₋₆卤代烷基。在其他实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶各自独立地选自H、卤素、C₁₋₆烷基和C₁₋₆卤代烷基。

[0491] 在式VIb的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中的至少一个选自卤素和C₁₋₆卤代烷基,且R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中剩余的每一个为H。在一些其他实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中的一个或两个选自卤素和C₁₋₆卤代烷基,且R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中剩余的每一个为H。在其他实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中的一个选自卤素和C₁₋₆卤代烷基,且R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中剩余的每一个为H。

[0492] 在式VIb的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中的至少一个选自卤素、CN、NO₂、C₁₋₆卤代烷基、C(O)O(C₁₋₄烷基)、C(O)(C₁₋₄烷基)和C(O)NH(C₁₋₄烷基)。

[0493] 在式VIb的化合物的一些实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中的至少一个选自卤素和C₁₋₆卤代烷基。

[0494] 在式VIb的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中的至少一个选自卤素和C₁₋₃卤代烷基。在一些其他实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵和R¹⁶中的至少一个选自卤素和C₁卤代烷基。

[0495] 在式VIb的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中,R¹⁴为卤素或C₁₋₆卤代烷基。在一些其他实施方式中,R¹⁴为卤素或C₁₋₃卤代烷基。在其他实施方式中,R¹⁴为卤素或C₁卤代烷基。

[0496] 在式VIb的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中,R¹⁴为卤素(在一些其他实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁵和R¹⁶中的每一个为H)。在一些实施方式中,R¹⁴为Cl或F。在一些实施方式中,R¹⁴为Cl。在一些实施方式中,R¹⁴为F。

[0497] 在式VIb的化合物的一些实施方式中,R¹⁴为C₁₋₆卤代烷基(在一些其他实施方式中,R¹²、R¹³、R¹⁵和R¹⁶中的每一个为H)。在一些其他实施方式中,R¹⁴为C₁₋₃卤代烷基。在其他实施方式中,R¹⁴为C₁卤代烷基。在其他实施方式中,R¹⁴为CF₃。

[0498] 在式VIb的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中,R¹⁴为卤素或C₁₋₆卤代

烷基,且 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{15} 和 R^{16} 中的每一个为H。

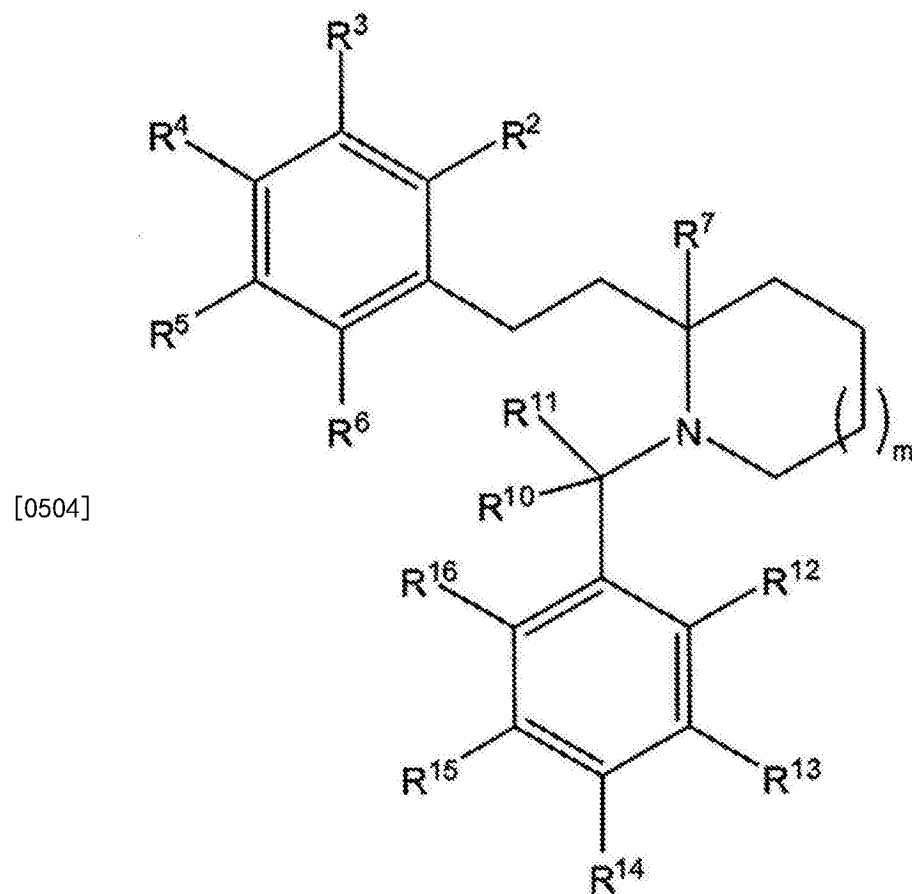
[0499] 在式VIb的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中, R^{15} 为卤素或 C_{1-6} 卤代烷基(在一些其他实施方式中, R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 和 R^{16} 中的每一个为H)。在一些其他实施方式中, R^{15} 为卤素或 C_{1-3} 卤代烷基。在其他实施方式中, R^{15} 为卤素或 C_1 卤代烷基。

[0500] 在式VIb的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中, R^{15} 为卤素。在一些实施方式中, R^{15} 为Cl或F。在一些实施方式中, R^{15} 为Cl。在一些实施方式中, R^{15} 为F。

[0501] 在式VIb的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中, R^{15} 为 C_{1-6} 卤代烷基。在一些其他实施方式中, R^{15} 为 C_{1-3} 卤代烷基。在其他实施方式中, R^{15} 为 C_1 卤代烷基。在其他实施方式中, R^{15} 为 CF_3 。

[0502] 在式VIb的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中, R^{14} 和 R^{15} 各自独立地为卤素或 C_{1-3} 卤代烷基(在一些其他实施方式中, R^{12} 、 R^{13} 和 R^{16} 中的每一个为H)。在一些其他实施方式中, R^{14} 和 R^{15} 各自独立地为卤素或 C_1 卤代烷基。在其他实施方式中, R^{14} 和 R^{15} 各自独立地为卤素。

[0503] 在一些实施方式中,式V的化合物为式VII的化合物:



VII.

[0505] 在式VII的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中, m 为1。

[0506] 在式VII的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中, m 为0。

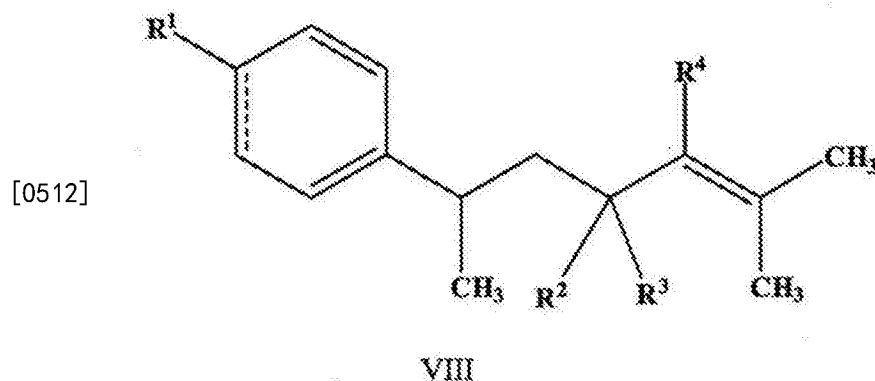
[0507] 在式VII的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中, R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 中的至少一个选自OH、 C_{1-6} 烷氧基和 C_{1-6} 卤代烷氧基。

[0508] 在式VII的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中, R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 中的至少两个独立地选自OH、 C_{1-6} 烷氧基和 C_{1-6} 卤代烷氧基。

[0509] 在式VII的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中, R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 和 R^{16} 中的至少一个不是H。

[0510] 在式VII的化合物或其药学上可接受的盐的一些实施方式中, R^{14} 和 R^{15} 各自独立地为卤素或 C_{1-3} 卤代烷基。在一些其他实施方式中, R^{14} 和 R^{15} 各自独立地为卤素或 C_1 卤代烷基。

[0511] 在一些实施方式中, σ -2配体为式VIII的化合物:



[0513] 或其药学上可接受的盐, 其中:

[0514] 是单键或双键;

[0515] R_1 为H、 CH_3 、 CF_3 、F、Cl、Br或 $-OCF_3$;

[0516] R_2 为H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{3-7} 环烷基或 C_{6-10} 芳基, 其中 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{3-7} 环烷基或 C_{6-10} 芳基中的每一个被0、1、2、3、4或5个各自独立选自OH、氨基、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 C_{1-6} 卤代烷氧基的取代基所取代;

[0517] R^3 为OH或 $NR^{3a}NR^{3b}$;

[0518] R^{3a} 为H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、环烷基烷基、 C_{3-7} 环烷基、芳烷基或 C_{6-10} 芳基, 其中 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{3-7} 环烷基、芳烷基或 C_{6-10} 芳基中的每一个被0、1、2、3、4或5个各自独立选自OH、氨基、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 C_{1-6} 卤代烷氧基的取代基所取代;

[0519] R^{3b} 为H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、环烷基烷基、 C_{3-7} 环烷基、芳烷基、或 C_{6-10} 芳基, 其中 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{3-7} 环烷基或 C_{6-10} 芳基中的每一个被0、1、2、3、4或5个各自独立选自OH、氨基、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 C_{1-6} 卤代烷氧基的取代基所取代;

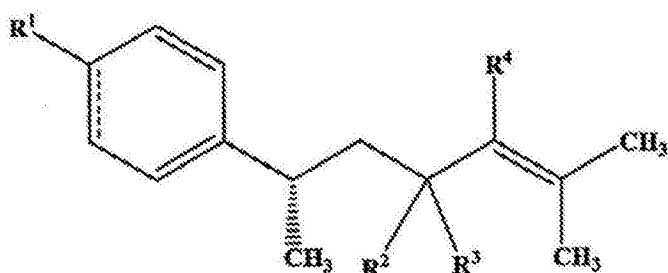
[0520] 或者 R^{3a} 和 R^{3b} 与它们连接的N原子一起形成被0、1、2、3、4或5个各自独立选自OH、氨基、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷氧基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基和杂环烷基的取代基所取代的4、5、6或7元杂环烷基; 且

[0521] R^4 为H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{3-7} 环烷基或 C_{6-10} 芳基, 其中 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{3-7} 环烷基或 C_{6-10} 芳基中的每一个被0、1、2、3、4或5个各自独立选自OH、氨基、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 C_{1-6} 卤代烷氧基的取代基所取代。

[0522] 在化合物VIII的一些实施方式中, 当是双键且 R^3 为OH时, 则 R^1 、 R^2 和 R^4 中的至少一个不是H。在一些实施方式中, 式VIII的化合物不是2-甲基-6-对甲苯基庚-2-烯-4-醇。

[0523] 在一些实施方式中, 本发明的化合物或其药学上可接受的盐为式VIIIa的化合物:

[0524]

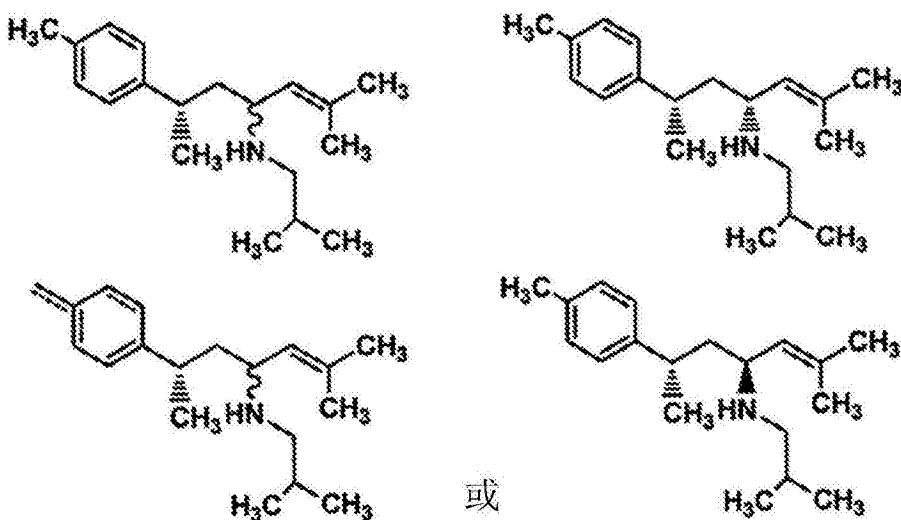


VIIIa

[0525] 或其药学上可接受的盐。

[0526] 在一些实施方式中, VIII种类选自一种或多种以下化合物:

[0527]

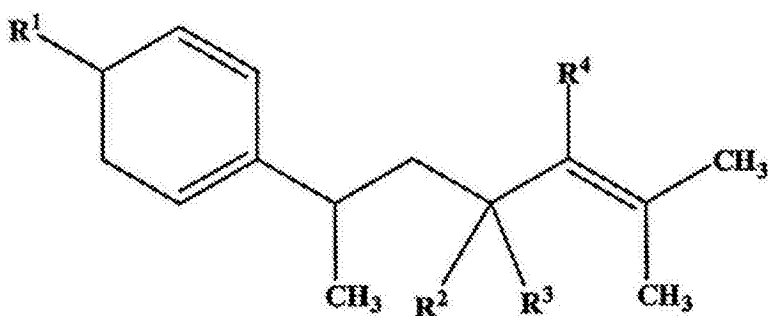


或

[0528] 在一些实施方式中, 式VIIIa的化合物不是 (6S)-2-甲基-6-对甲苯基庚-2-烯-4-醇。

[0529] 在一些实施方式中, 本发明的化合物或其药学上可接受的盐为式VIIIb的化合物:

[0530]

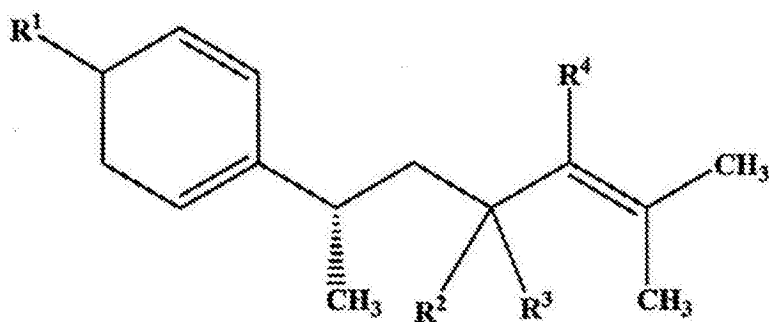


VIIIb

[0531] 或其药学上可接受的盐。

[0532] 在一些实施方式中, 本发明的σ-2配体或其药学上可接受的盐为式VIIIc的化合物:

[0533]

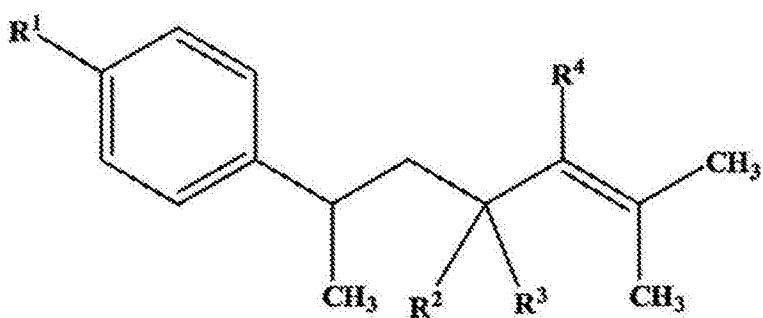


VIIIc

[0534] 或其药学上可接受的盐。

[0535] 在一些实施方式中,本发明的σ-2配体或其药学上可接受的盐为式VIIIId的化合物:

[0536]

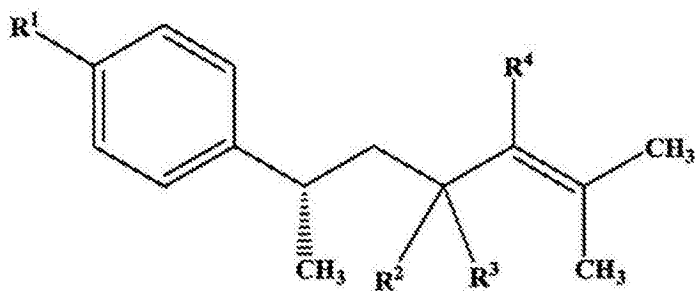


VIIIId

[0537] 或其药学上可接受的盐。

[0538] 在一些实施方式中,本发明的化合物或其药学上可接受的盐为式VIIIIf的化合物:

[0539]

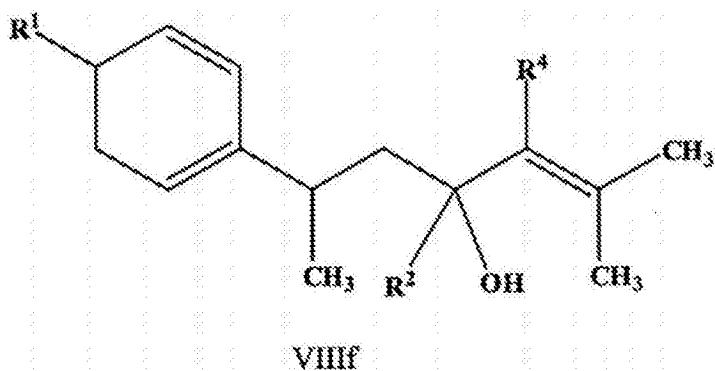


VIIIIf

[0540] 或其药学上可接受的盐。

[0541] 在一些实施方式中,本发明考虑的σ-2配体或其药学上可接受的盐为式VIIIIf的化合物:

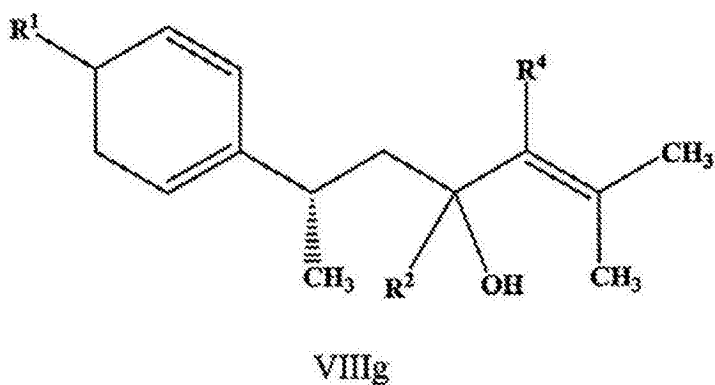
[0542]



[0543] 或其药学上可接受的盐。

[0544] 在一些实施方式中,本发明的化合物或其药学上可接受的盐为式VIIIg的化合物:

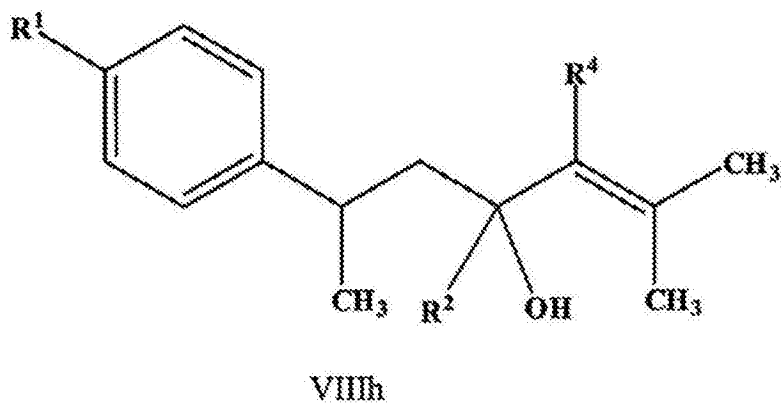
[0545]



[0546] 或其药学上可接受的盐。

[0547] 在一些实施方式中,本发明考虑的σ-2配体或其药学上可接受的盐为式VIIIh的化合物:

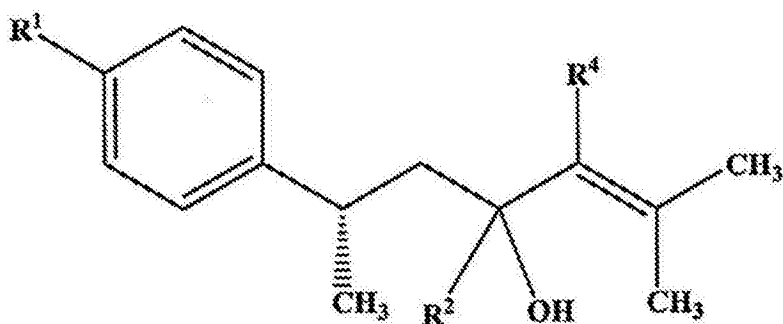
[0548]



[0549] 或其药学上可接受的盐。

[0550] 在一些实施方式中,本发明的化合物或其药学上可接受的盐为式VIIIi的化合物:

[0551]

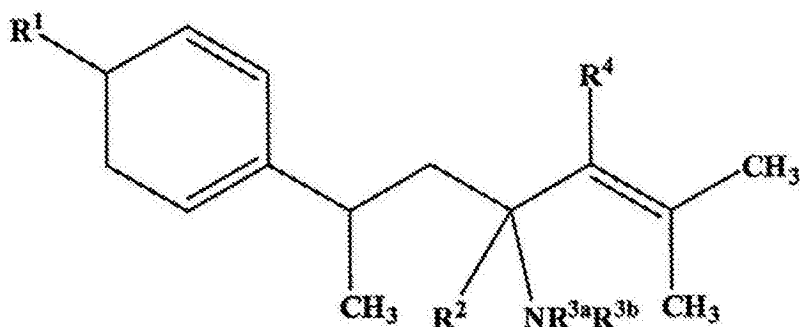


VIIIi

[0552] 或其药学上可接受的盐。

[0553] 在一些实施方式中,本发明的化合物或其药学上可接受的盐为式VIIIj的化合物:

[0554]

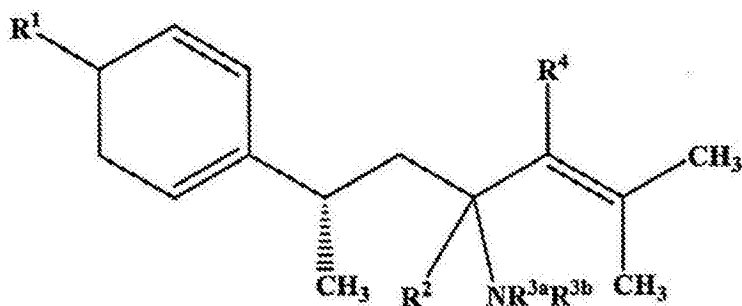


VIIIj

[0555] 或其药学上可接受的盐。

[0556] 在一些实施方式中,本发明考虑的σ-2配体或其药学上可接受的盐为式VIIIk的化合物:

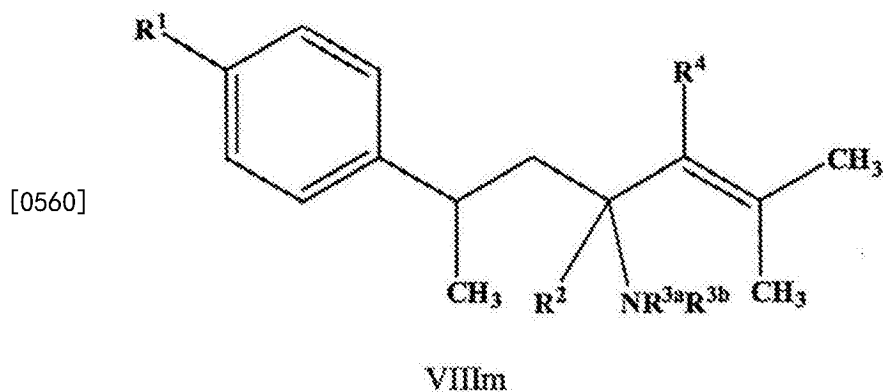
[0557]



VIIIk

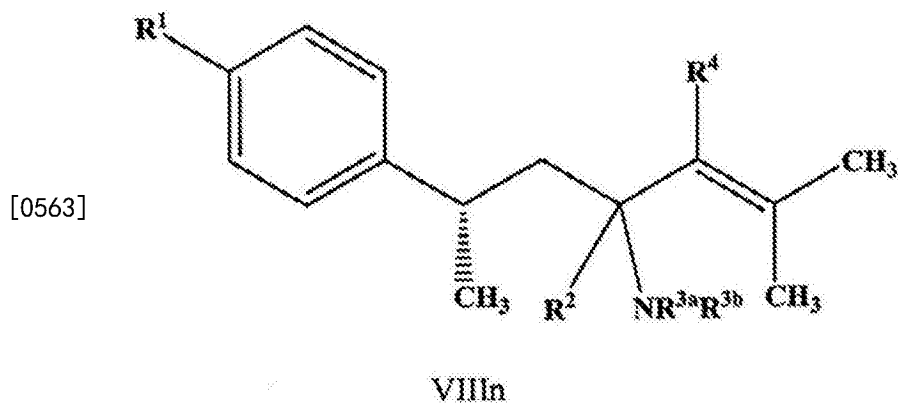
[0558] 或其药学上可接受的盐。

[0559] 在一些实施方式中,本发明的化合物或其药学上可接受的盐为式VIIIm的化合物:



[0561] 或其药学上可接受的盐。

[0562] 在一些实施方式中,本发明的化合物或其药学上可接受的盐为式VIIIIn的化合物:



[0564] 或其药学上可接受的盐。

[0565] 在化合物VIII和其子集通式的一些实施方式中, R^1 为H、 CH_3 或 CF_3 。在一些其他实施方式中, R^1 为 CH_3 或 CF_3 。在其他实施方式中, R^1 为 CH_3 。

[0566] 在化合物VIII和其子集通式的一些实施方式中, R^1 为H或 CH_3 。

[0567] 在化合物VIII和其子集通式的一些实施方式中, R^1 为F、Cl或Br。在其他实施方式中, R^1 为 OCF_3 。

[0568] 在化合物VIII和其子集通式的一些实施方式中, R^2 为H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{3-7} 环烷基或 C_{6-10} 芳基。在一些其他实施方式中, R^2 为H、 C_{1-6} 烷基或 C_{3-7} 环烷基。

[0569] 在化合物VIII和其子集通式的一些实施方式中, R^2 为H或 C_{1-6} 烷基。在一些其他实施方式中, R^2 为H或甲基。在其他实施方式中, R 为H。

[0570] 在化合物VIII和其子集通式的一些实施方式中, R^1 为H、 CH_3 或 CF_3 ;且 R^2 为H或 C_{1-6} 烷基。在一些其他实施方式中, R^1 为 CH_3 或 CF_3 ;且 R^2 为H。在其他实施方式中, R^1 为 CH_3 ;且 R^2 为H。

[0571] 在化合物VIII和其子集通式的一些实施方式中, R^{3a} 为H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、环烷基烷基、 C_{3-7} 环烷基、芳烷基或 C_{6-10} 芳基,其中 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、环烷基烷基、 C_{3-7} 环烷基、芳烷基或 C_{6-10} 芳基中的每一个被0、1、2、3、4或5个各自独立选自卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 C_{1-6} 卤代烷氧基的取代基所取代。在一些其他实施方式中, R^{3a} 为H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、环烷基烷基、 C_{3-7} 环烷基、芳烷基或 C_{6-10} 芳基。

[0572] 在化合物VIII和其子集通式的一些实施方式中, R^{3b} 为H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、环烷基烷基、 C_{3-7} 环烷基、芳烷基或 C_{6-10} 芳基,其中 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、环烷基烷基、 C_{3-7} 环烷基、芳烷基或 C_{6-10} 芳基中的每一个被0、1、2、3、4或5个各自独立选自卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤

代烷基、C₁₋₆烷氧基和C₁₋₆卤代烷氧基的取代基所取代。在一些其他实施方式中,R为H、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、环烷基烷基、C₃₋₇环烷基、芳烷基或C₆₋₁₀芳基。

[0573] 在化合物VIII和其子集通式的一些实施方式中,R^{3a}为H、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₃₋₇环烷基或C₆₋₁₀芳基,其中C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₃₋₇环烷基或C₆₋₁₀芳基中的每一个被0、1、2、3、4或5个各自独立选自OH、氨基、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基和C₁₋₆卤代烷氧基的取代基所取代。

[0574] 在化合物VIII和其子集通式的一些实施方式中,R^{3b}为H、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₃₋₇环烷基或C₆₋₁₀芳基,其中C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₃₋₇环烷基或C₆₋₁₀芳基中的每一个被0、1、2、3、4或5个各自独立选自OH、氨基、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基和C₁₋₆卤代烷氧基的取代基所取代。

[0575] 在化合物VIII和其子集通式的一些实施方式中,R^{3a}为H;且R^{3b}为H、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、环烷基烷基、C₃₋₇环烷基、芳烷基或C₆₋₁₀芳基,其中C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、环烷基烷基、C₃₋₇环烷基、芳烷基或C₆₋₁₀芳基中的每一个被0、1、2、3、4或5个各自独立选自OH、氨基、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基和C₁₋₆卤代烷氧基的取代基所取代。在一些其他实施方式中,R^{3a}为H;且R^{3b}为H、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、环烷基烷基、C₃₋₇环烷基、芳烷基或C₆₋₁₀芳基,其中C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、环烷基烷基、C₃₋₇环烷基、芳烷基或C₆₋₁₀芳基中的每一个被0、1、2、3、4或5个各自独立选自卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基和C₁₋₆卤代烷氧基的取代基所取代。

[0576] 在化合物VIII和其子集通式的一些实施方式中,R^{3a}为H;且R^{3b}为H、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、环烷基烷基、C₃₋₇环烷基、芳烷基或C₆₋₁₀芳基。

[0577] 在化合物VIII和其子集通式的一些实施方式中,R^{3a}为H、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₃₋₇环烷基或C₆₋₁₀芳基;且R^{3b}为H、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₃₋₇环烷基或C₆₋₁₀芳基。

[0578] 在化合物VIII和其子集通式的一些实施方式中,R^{3a}为H、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₃₋₇环烷基或C₆₋₁₀芳基;且R^{3b}为H、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₃₋₇环烷基或C₆₋₁₀芳基;

[0579] 在化合物VIII和其子集通式的一些实施方式中,R^{3a}为H;且R^{3b}为H、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基或C₃₋₇环烷基。

[0580] 在化合物VIII和其子集通式的一些实施方式中,R^{3a}为H;且R^{3b}为C₁₋₆烷基或C₁₋₆卤代烷基。

[0581] 在化合物VIII和其子集通式的一些实施方式中,R^{3a}为H;且R^{3b}为C₁₋₆烷基。

[0582] 在化合物VIII和其子集通式的一些实施方式中,R^{3a}和R^{3b}与它们连接的N原子一起形成吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基或吗啉基,其各自被0、1、2、3、4或5个各自独立选自OH、氨基、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷氧基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基和杂环烷基的取代基所取代。

[0583] 在化合物VIII和其子集通式的一些实施方式中,R^{3a}和R^{3b}与它们连接的N原子一起形成吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基或吗啉基,其各自被0、1、2、3、4或5个各自独立选自OH、氨基、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷氧基、苯基和苄基的取代基所取代。

[0584] 在化合物VIII和其子集通式的一些实施方式中,R⁴为H、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₃₋₇环烷基或C₆₋₁₀芳基。在一些其他实施方式中,R⁴为H、C₁₋₆烷基或C₃₋₇环烷基。

[0585] 在一些实施方式中,R⁴为H或C₁₋₆烷基。在一些其他实施方式中,R⁴为H或甲基。在其

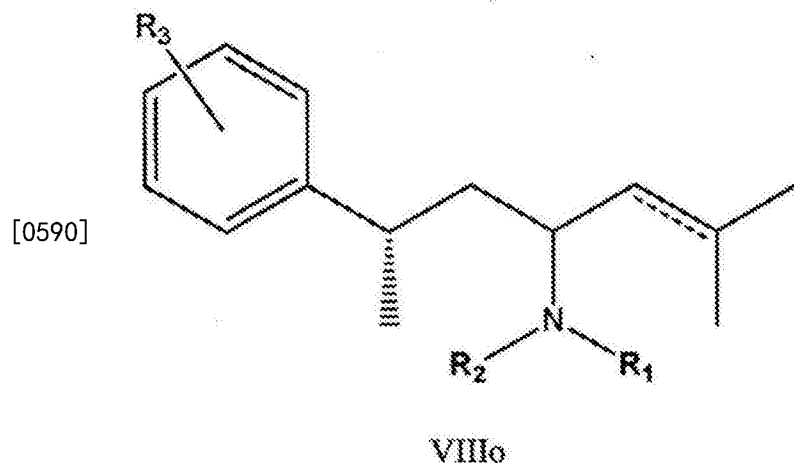
他实施方式中, R^4 为 H。

[0586] 在化合物 VIII 和其子集通式的一些实施方式中, R^2 为 H 或 C_{1-6} 烷基, 且 R^4 为 H 或 C_{1-6} 烷基。

[0587] 在化合物 VIII 和其子集通式的一些实施方式中, R^2 为 H 或甲基且 R^4 为 H 或甲基。

[0588] 在化合物 VIII 和其子集通式的一些实施方式中, R^1 为 H、 CH_3 、或 CF_3 ; R^2 为 H 或 C_{1-6} 烷基, 且 R^4 为 H 或 C_{1-6} 烷基。在一些其他实施方式中, R^1 为 CH_3 或 CF_3 ; R^2 为 H; 且 R^4 为 H。在其他实施方式中, R^1 为 CH_3 ; R^2 为 H; 且 R^4 为 H。

[0589] 在另一实施方式中, 本发明的 σ -2 配体为式 VIIIo 的那些或其药学上可接受的盐:



[0591] 其中:

[0592] 为单键或双键;

[0593] R_1 为 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、未被取代的苄基或被卤素、 C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 卤代烷基取代的苄基;

[0594] R_2 为 H, 或者

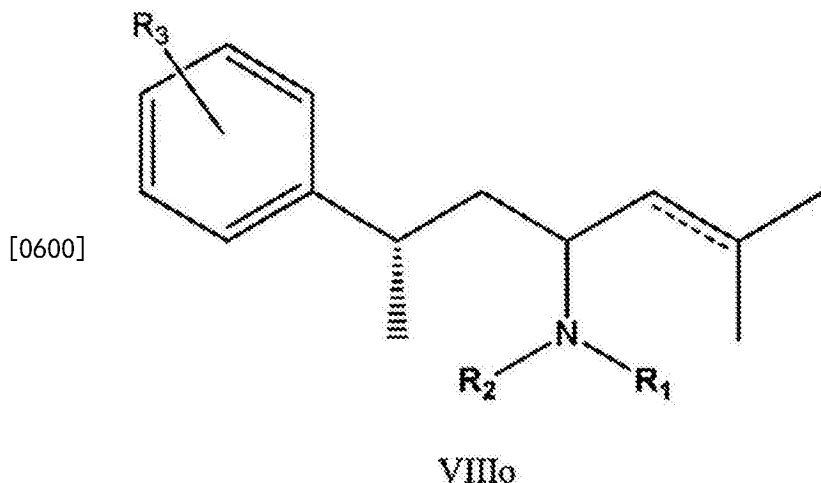


[0596] X 为 CH、N 或 O, 且

[0597] R_4 不存在或为 H、 C_{1-6} 烷基或未被取代的苄基或被卤素、 C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 卤代烷基取代的苄基; 且

[0598] R_3 为 C_{1-4} 烷基、卤素或 C_{1-6} 卤代烷氧基。

[0599] 在一些实施方式中, 本发明的 σ -2 配体为式 VIIIo 的那些或其药学上可接受的盐:



[0601] 其中:

[0602] 为单键或双键;

[0603] R₁为异丁基、苄基或被氯、甲基或CF₃取代的苄基;

[0604] R₂为H,或者

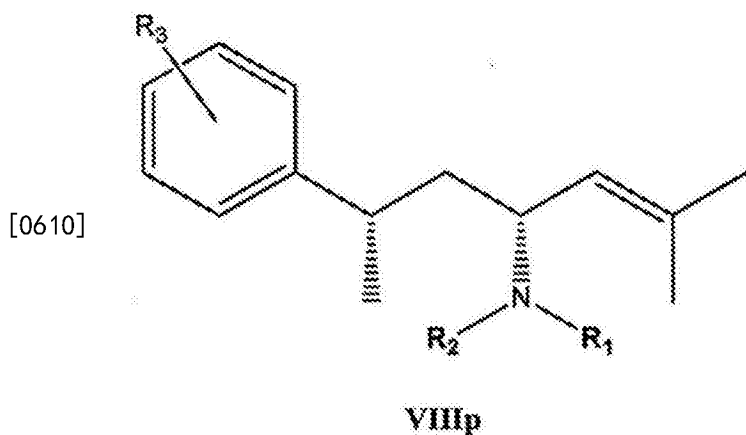


[0606] X为CH、N或O,且

[0607] R₄不存在或为H、异丙基或未被取代的苯基;且

[0608] R₃为邻-Me、间-Me、对-Me、对-F或对-OCF₃。

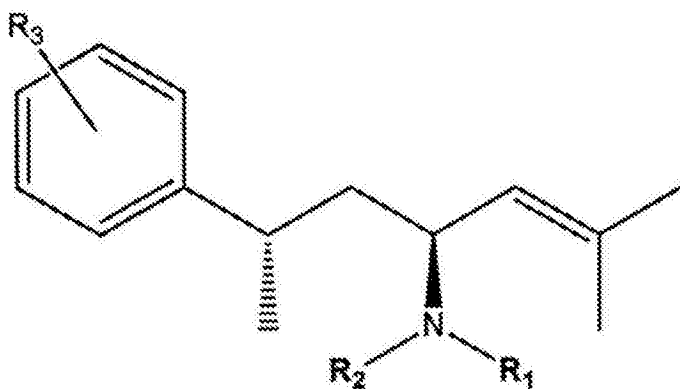
[0609] 在一些更加具体的实施方式中,本发明的σ-2配体为式VIIIp的那些或其药学上可接受的盐:



[0611] 其中R₁~R₃如以上针对式VIIIa所定义。

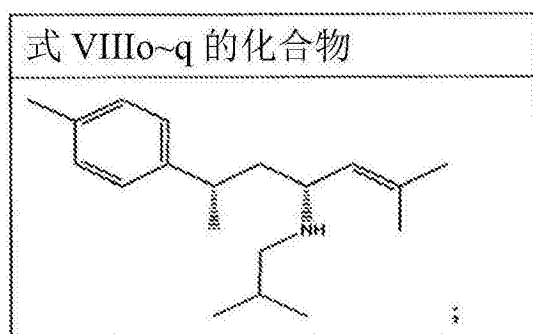
[0612] 在一些更加具体的实施方式中,本发明的σ-2配体为式VIIIq的那些或其药学上可接受的盐:

[0613]

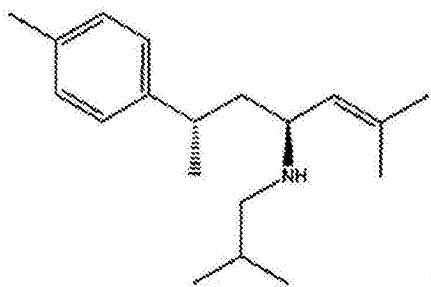
**VIIIq**[0614] 其中R₁~R₃如以上针对式VIIIa所定义。

[0615] 表1C: 本发明的式VIIIo~q化合物的具体示例性化合物列于以下表格中:

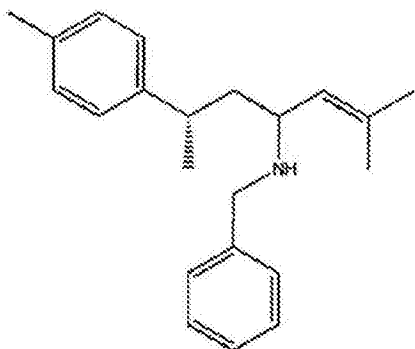
[0616]



式 VIIIo~q 的化合物

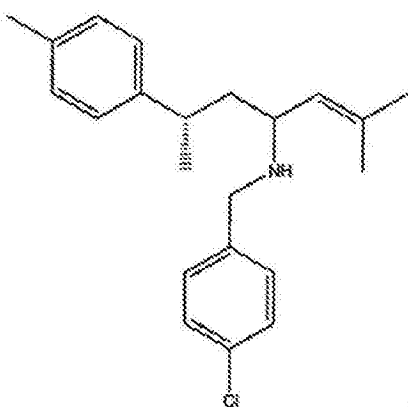


o

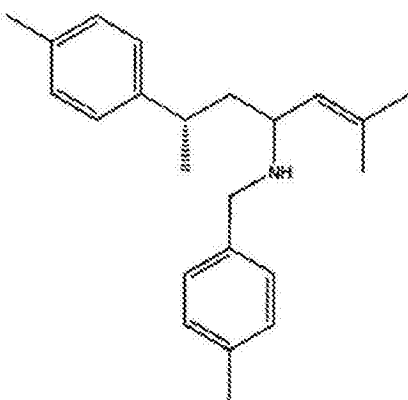


p

[0617]

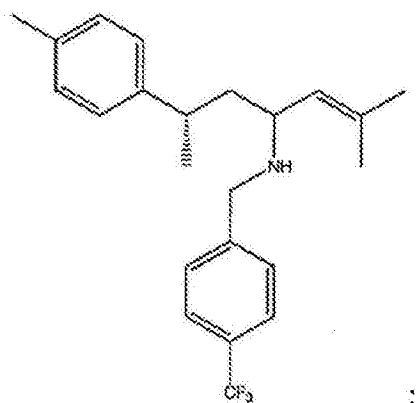


q

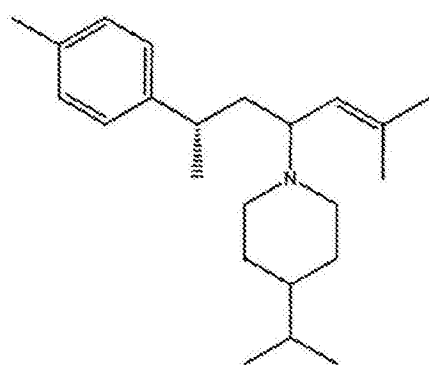


r

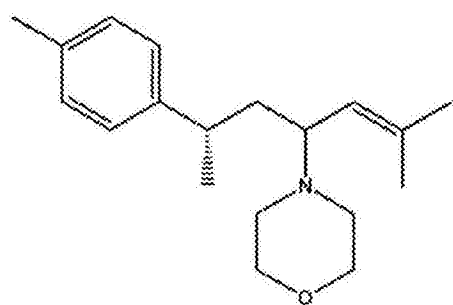
式 VIIIo~q 的化合物



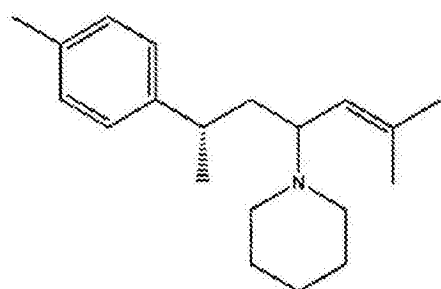
s



s



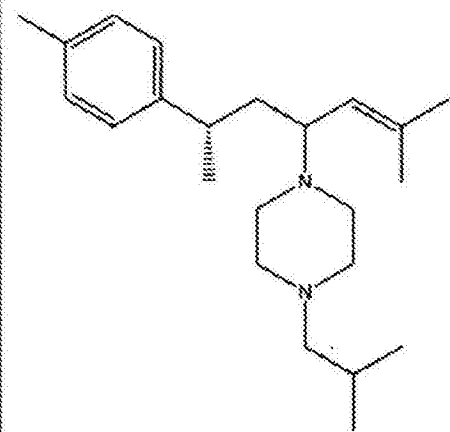
s



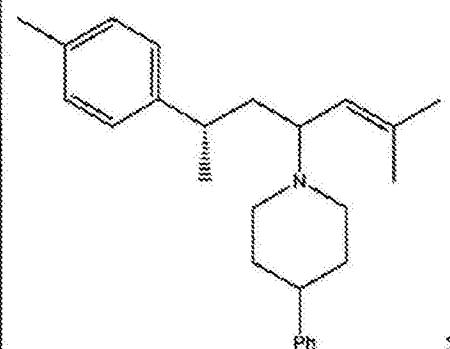
s

[0618]

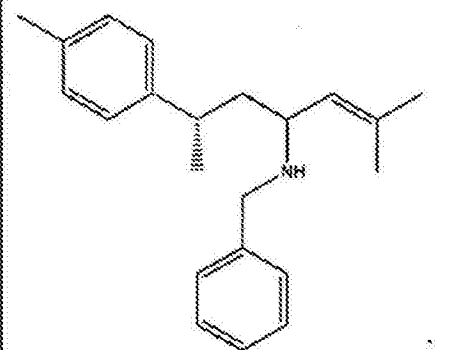
式 VIIIo~q 的化合物



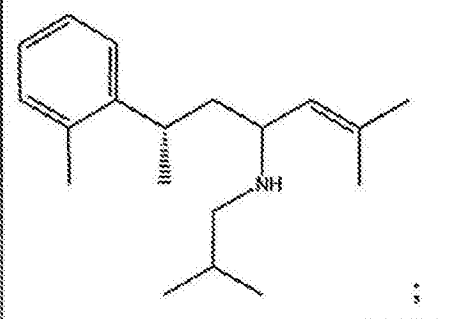
s



s



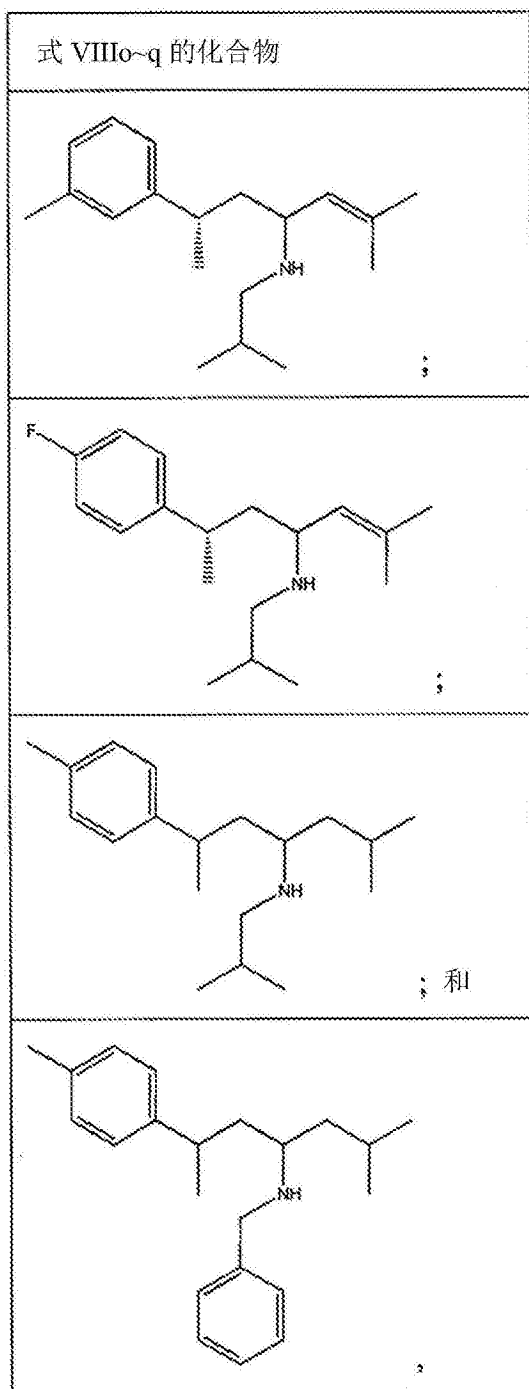
s



s

[0619]

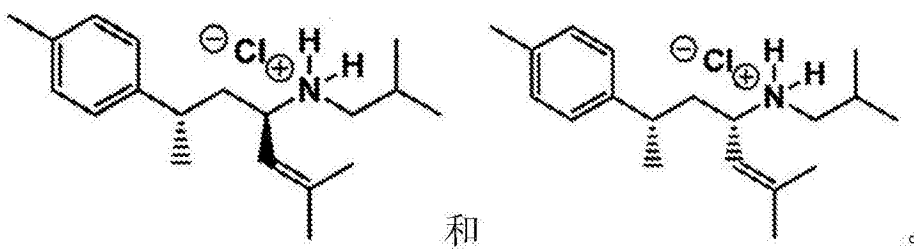
[0620]



[0621] 或其药学上可接受的盐。

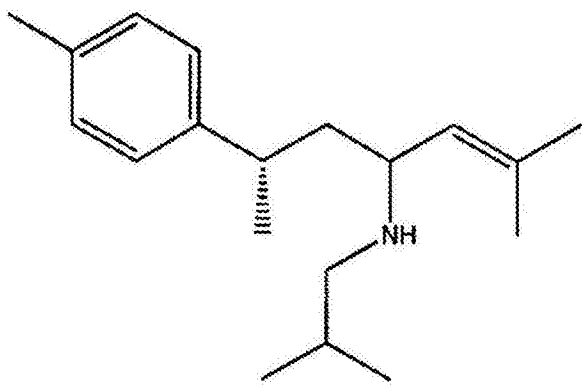
[0622] 用于本发明的优选盐包括上述化合物的盐酸盐,包括以下:

[0623]

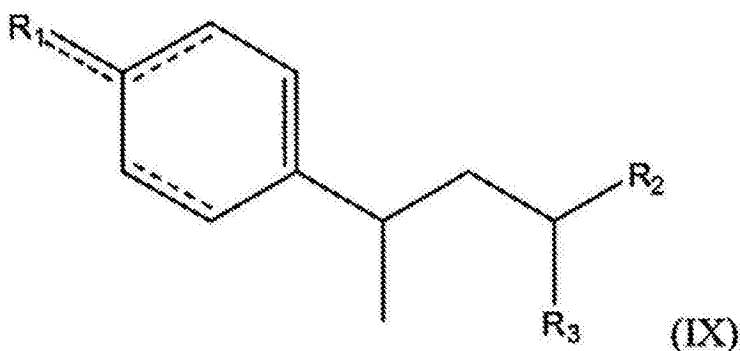


[0624] 在一些实施方式中,以上通式中的每一个可以包含排除一种或多种以下化合物的条件:

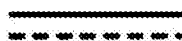
[0625]

[0626] 在其他实施方式中, σ -2配体为式IX的化合物:

[0627]

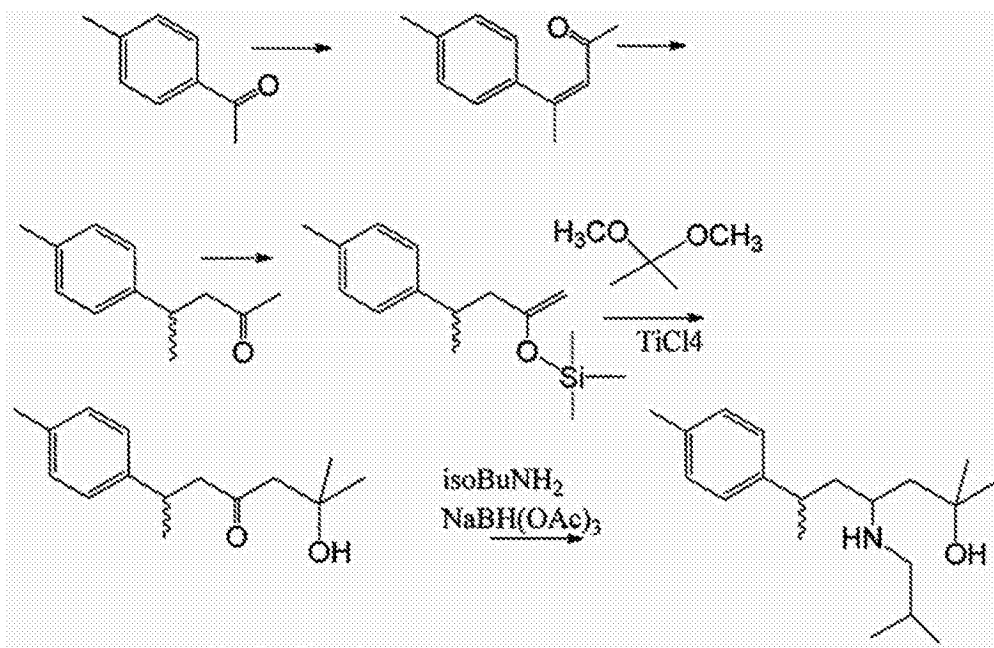


[0628] 或其药学上可接受的盐, 其中

[0629]  为单键或双键;[0630] R_1 选自 CH_3 、 CH_2 、F、Cl、Br、 CF_3 、O-烷基和 OCF_3 ;[0631] R_2 选自 $CH_2C(CH_3)_2OH$ 和 $CH=C(CH_3)_2$;[0632] R_3 选自OH或 $NHCH_2CH(CH_3)_2$ 或其混合物。

[0633] 在一些实施方式中, 式IX的化合物可以通过还原胺化来制备, 例如方案8中所示的路线。

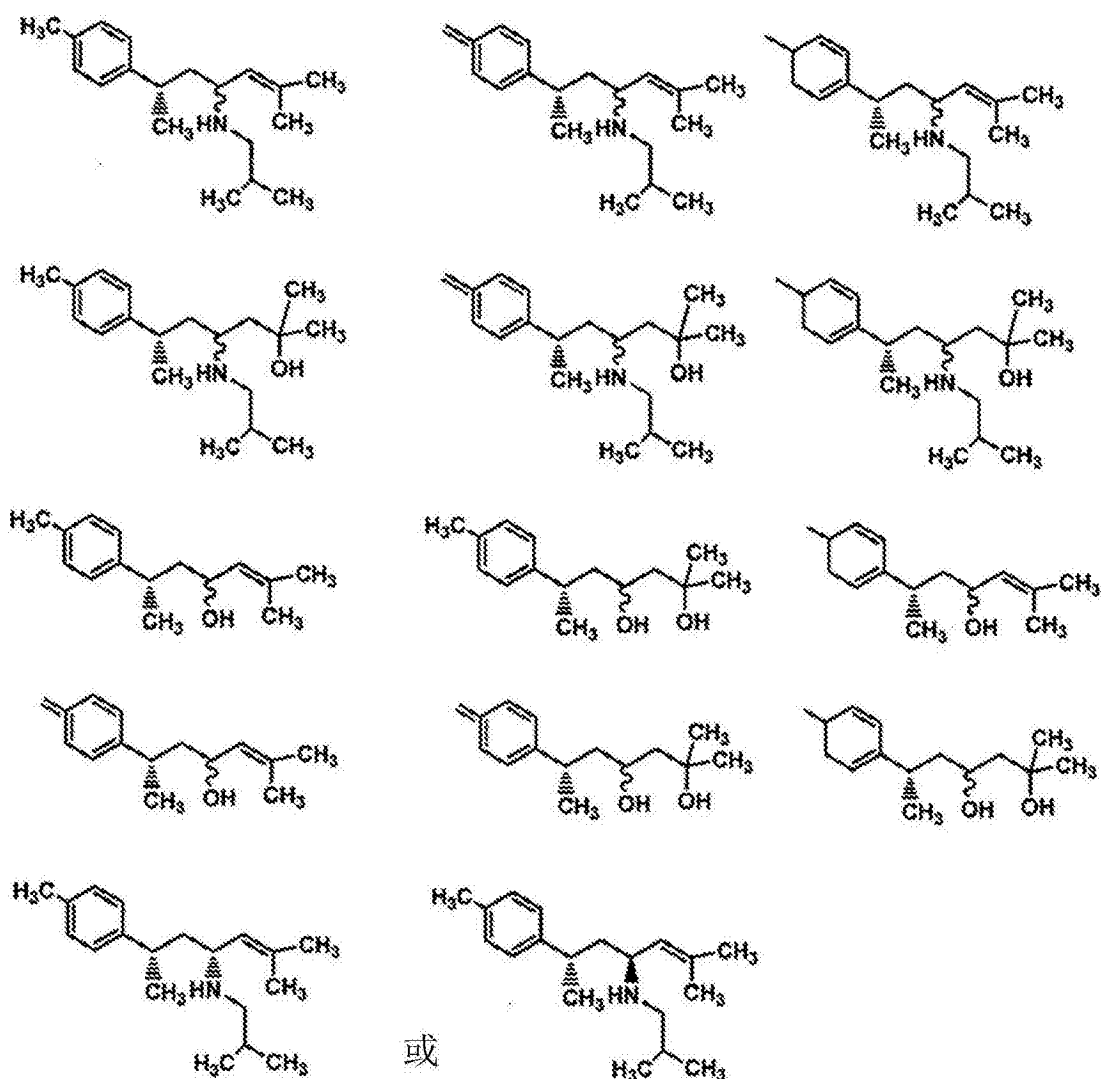
[0634]



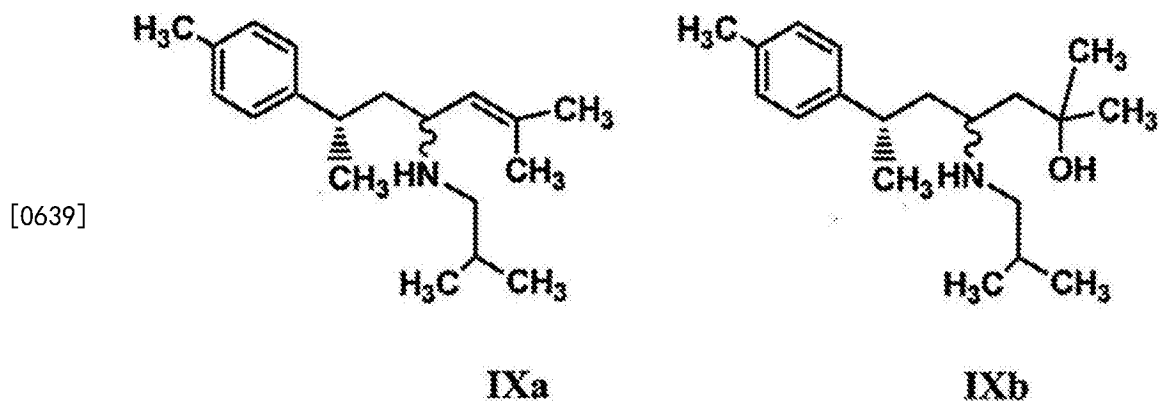
[0635] 方案8

[0636] 在一些实施方式中,式IX的种类可以选自:

[0637]



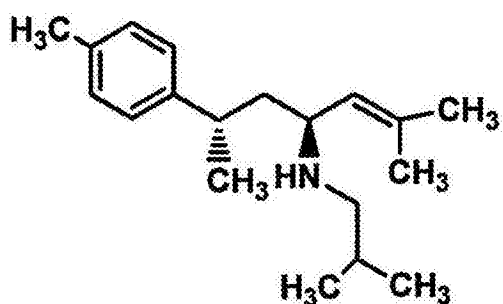
[0638] 式IX的化合物的实例包括以下化合物,其为非对映异构体的混合物,并包括活性芳族胺烯烃和氨基醇成分IXa和IXb



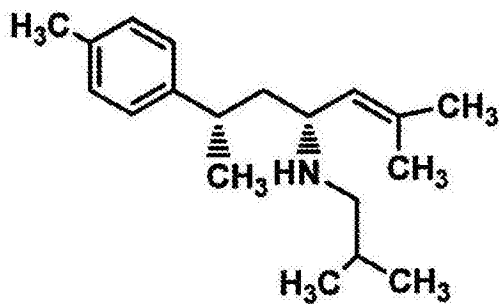
[0640] 在具体实施方式中, σ -2受体拮抗剂选自化合物IXa和IXb以及对映异构体和药学上可接受的盐。

[0641] 在具体实施方式中,选择性的、高亲和性 σ -2受体拮抗剂选自IXa-1和IXa-2

[0642]



IXa-1



IXa-2

[0643] 本发明的新化合物的盐、溶剂化物、立体异构体、衍生物、前药和活性代谢物

[0644] 本发明还包括任意上式化合物的盐、溶剂化物、立体异构体、前药和活性代谢物。

[0645] 术语“盐”可以包括酸加成盐或游离碱的加成盐。优选地，盐为药学上可接受的。可以用于形成药学上可接受的酸加成盐的酸的实例包括但不限于得自无毒无机酸以及得自无毒有机酸的盐，无机酸例如硝酸、磷酸、硫酸或氢溴酸、氢碘酸、氢氟酸、亚磷酸，有机酸例如脂族单羧酸和二羧酸、苯基取代的烷酸、羟基烷酸、烷二酸、芳族酸、脂族和芳族磺酸、和醋酸、马来酸、琥珀酸或柠檬酸。这样的盐的非限制性实例包括萘二磺酸盐、苯磺酸盐、硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、硝酸盐、磷酸盐、磷酸一氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、醋酸盐、三氟醋酸盐、丙酸盐、辛酸盐、异丁酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、富马酸盐、马来酸盐、扁桃酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、邻苯二甲酸盐、苯磺酸盐、甲苯磺酸盐、苯基醋酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐等。还包括氨基酸的盐例如精氨酸盐等以及葡糖酸盐、半乳糖醛酸盐 (参见，例如Berge等人“Pharmaceutical Salts,” J. Pharma. Sci. 1977;66:1)

[0646] 在一些实施方式中， σ -2受体配体化合物选自以下表1D中的化合物。

[0647] 表1D. σ -2受体配体盐酸盐化合物。

[0648]

HCl 盐制剂	σ -1 (Ki,nM)	σ -2 (Ki,nM)	MTTX (EC50,uM)
W	270	120	1.2
CF	180	50	12
CB	19	48	6.5
CU	5.8	1.3	3.9
DC	330	3200	10
DB	530	4000	5

[0649] 任意上式的化合物的酸加成盐可以通过使游离碱形式与足量的所需酸接触而制备,从而以常规方式产生盐。游离碱形式可以通过使盐形式与碱接触并以常规方式分离游离碱而再生。游离碱形式在某些物理特性(例如极性溶剂中的溶解度)方面某种程度上不同于其各自的盐形式,但其他方面,出于本发明目的,盐等同于其各自的游离碱。

[0650] 还包括全部盐和部分盐,也就是说相对于每摩尔的例如式I化合物的酸具有1、2或3优选为2当量的碱的盐,或者相对于每摩尔的任意上式化合物的碱具有1、2或3当量优选为1当量的酸的盐。

[0651] 出于分离或纯化的目的,也可以使用药学上不可接受的盐。然而,仅药学上可接受的非毒性盐在治疗上使用,因此被优选。

[0652] 药学上可接受的碱加成盐与金属或胺形成,例如碱金属和碱土金属或有机胺。用作阳离子的金属的实例为钠、钾、镁、钙等。合适的胺的实例为N,N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、二环己胺、乙二胺、N-甲基葡糖胺和普鲁卡因。

[0653] 该酸性化合物的碱加成盐通过使游离酸形式与足量的所需碱接触而制备,从而以常规方式产生盐。游离酸形式可以通过使盐形式与酸接触并分离游离酸而再生。

[0654] 本发明的化合物可以同时具有碱性和酸性中心,因此可以为两性离子形式或内盐形式。

[0655] 通常而言,任意上式的化合物的药学上可接受的盐可以容易地通过合适地使用所需酸或碱而制备。盐可以从溶液中沉淀并可以通过过滤而收集或者可以通过蒸发溶剂而回收。例如,酸例如盐酸的水溶液可以加至任意上式的化合物的水性混悬液中,并将所得的混

合物蒸发至干(冻干)以获得作为固体的酸加成盐。或者,任意上式的化合物可以溶解在合适的溶剂中,例如醇如异丙醇中,且酸可以加到同一溶剂或另一合适溶剂中。所得的酸加成盐之后可以直接沉淀,或通过添加极性较小的溶剂例如二异丙基醚或己烷来沉淀,并通过过滤而分离。

[0656] 有机化学领域的技术人员应理解,很多有机化合物可以与它们在其中反应的或它们从其中沉淀或结晶的溶剂形成复合物。这些复合物被称为“溶剂化物”。例如,与水的复合物被称为“水合物”。本发明化合物的溶剂化物在本发明的范围内。任意上式的化合物的盐可以形成溶剂化物(例如,水合物),且本发明还包括所有这些溶剂化物。词语“溶剂化物”的含义被本领域技术人员熟知为通过溶剂和溶质的相互作用(即溶剂化)形成的化合物。用于制备溶剂化物的技术在领域内已较好地建立(参见,例如Brittain, Polymorphism in Pharmaceutical solids, Marcel Decker, New York, 1999)。

[0657] 本发明还包括式I化合物的N氧化物。术语“N氧化物”是指,对于含有另外未被取代的 sp^2 N原子的杂环,N原子可以带有共价结合的O原子,即 $N \rightarrow O$ 。这样的N氧化物取代的杂环的实例包括吡啶基N氧化物、嘧啶基N氧化物、吡嗪基N氧化物和吡唑基N氧化物。

[0658] 任何上式的化合物可以具有一个或多个手性中心,且根据单个取代基的性质,也可以具有几何异构体。空间上原子排布不同的异构体被称为“立体异构体”。不互为镜像的立体异构体被称为“非对映异构体”,且互为非重合镜像的立体异构体被称为“对映异构体”。当化合物具有手性中心时,一对对映异构体是可能的。对映异构体的特征可以是其非对称中心的绝对构型,并且通过Cahn和Prelog的R—和S—排序规则而描述,或者通过分子旋转偏振光的平面的方式而描述,并命名为右旋或左旋(即,分别为(+)或(-)异构体)。手性化合物可以以单个对映异构体或对映异构体的混合物存在。含有等比例对映异构体的混合物称为“外消旋混合物”。含有非等比例对映异构体的混合物被描述为具有R或S化合物的“对映异构体过量”(ee)。混合物中一种对映异构体的过量经常用下式确定的%对映异构体过量(%ee)值来描述:

$$[\text{0659}] \quad \%ee = (R) - (S) / (R) + (S)$$

[0660] 对映异构体的比率还可以通过“光学纯度”来定义,其中将对映异构体的混合物旋转平面偏振光的度数与单个光学纯的R和S化合物进行比较。光学纯度可以使用下式确定:

$$[\text{0661}] \quad \text{光学纯度} = \text{对映异构体}_{\text{主要}} / (\text{对映异构体}_{\text{主要}} + \text{对映异构体}_{\text{次要}})$$

[0662] 化合物还可以是本文所述化合物的基本纯的(+)或(-)对映异构体。在一些实施方式中,包括基本纯的对映异构体的组合物包括至少90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的一种对映异构体。在一些实施方式中,包括基本纯的对映异构体的组合物为至少99.5%的一种对映异构体。在一些实施方式中,组合物仅包括本文所述化合物的一种对映异构体。

[0663] 本发明包括任意上式化合物的所有单个异构体。说明书和权利要求书中对特定化合物的描述或命名意在包括单个对映异构体或其混合物、外消旋物或其他。用于确定立体异构体的立体化学和拆分或立体定向合成的方法为本领域熟知。具体而言,在任意上式化合物中显示有手性中心,其引起一组对映异构体。其他手性中心可以根据取代基而存在。

[0664] 对于很多应用,优选执行立体选择性合成和/或使反应产物进行合适的纯化步骤,从而制备基本光学纯的材料。用于制备光学纯的材料的合适的立体选择性合成程序为领域内熟知,用于将外消旋混合物纯化为光学纯的部分的程序也是。本领域技术人员还将认识

到,本发明化合物可以以多晶型存在,其中化合物能够以不同形式结晶。用于识别和分离多晶型的适当方法为本领域已知。

[0665] 非对映异构体在物理特性和化学反应性两方面不同。非对映异构体的混合物可以基于溶解度、分级结晶或色谱特性例如薄层色谱、柱色谱或HPLC而分离成对映异构体对。

[0666] 将非对映结构体的复杂混合物纯化化为对映异构体通常需要两个步骤。在第一步骤中,将非对映结构体的混合物拆分为对映异构体对,如上所述。在第二步骤中,还将对映异构体对纯化化为富集一种或另一种对映异构体的组成,更优选拆分为含有纯对映异构体的组成。对映异构体的拆分通常需要与手性试剂例如溶剂或柱基质的反应或分子相互作用。可以例如通过与第二试剂(即拆分剂)的纯对映异构体的反应,将对映异构体的混合物例如外消旋混合物转化为非对映异构体的混合物而实现拆分。之后可以分离两种所得的非对映异构产物。分离的非对映异构体之后通过逆转初始的化学变换而再转化为纯对映异构体。

[0667] 对映异构体的拆分还可以通过它们与手性物质的非共价结合的差异而实现,例如,通过在纯手性吸附剂上的层析。对映异构体与层析吸附剂之间的非共价结合创建非对映异构复合物,引起层析体系中移动和结合状态的差异。因此,两种对映异构体经层析体系例如柱以不同速率移动,使得它们分离。

[0668] 手性拆分柱在领域内熟知,并市售可得(例如,从MetaChem Technologies Inc., ANSYS Technologies, Inc., Lake Forest, CA的分部)。对映异构体可以使用例如HPLC用的手性固定相(CSP)而分析和纯化。手性HPLC柱通常含有固定至二氧化硅填充料的表面的一种形式的对映异构体化合物。

[0669] D-苯基甘氨酸和L-亮氨酸是I型CSP的实例并使用 π - π 相互作用、氢键、偶极-偶极相互作用和空间相互作用的组合来实现手性识别。为在I型柱上拆分,分析物对映异构体必须含有与CSP的官能性互补的官能性,以使分析物进行与CSP的重要相互作用。样品应该优选包含一种以下的官能团: π -酸或 π -碱、氢键供体和/或受体、或酰胺偶极。有些时候使用衍生来向缺乏相互作用位点的化合物添加相互作用位点。最常见的衍生物涉及由胺和羧酸形成酰胺。

[0670] MetaChiral ODMTM是II型CSP的实例。形成溶质-CSP复合物的主要机制是通过吸引相互作用,但是包合复合物也起重要作用。氢键、 π - π 相互作用和偶极堆叠对于MetaChiralTM ODM上的手性拆分较为重要。当溶质分子不包含溶质-柱相互作用所需的基团时,衍生可能是必须的。通常向苄基酰胺的衍生对于一些强极性分子例如胺和羧酸是所需的,否则其会经由非特异性立体相互作用而与固定相强烈相互作用。

[0671] 在适用的地方,任意上式的化合物可以通过例如经由柱色谱或硅胶上TLC的分离而分离成非对映异构体对。这些非对映异构体对在本文中称为具有高TLC R_f的非对映异构体以及具有低TLC R_f的非对映异构体。非对映异构体还可以使用本领域熟知的方法例如本文描述的那些而富集特定对映异构体,或拆分为单个对映异构体。

[0672] 非对映异构体对的相对构型可以通过应用理论模型或规则(例如Cram规则、Felkin-Ahn模型)或使用计算化学程序产生的更可靠的三维模型来进行推导。在很多情况中,这些方法能够预测哪个非对映异构体是化学变换的能量上有利的产物。作为可选的方法,非对映异构体的相对构型可以通过发现非对映异构体对的一种(或两种)中的单个对映异构体的绝对构型而间接确定。

[0673] 立体中心的绝对构型可以通过本领域技术人员非常熟知的方法(例如,X射线衍射、圆二色性)而确定。绝对构型的确定还可用于证实理论模型的可预测性,并且可有助于将这些模型的使用拓展到通过具有类似机制的反应(例如,经由氢化物的酮还原或酮的还原胺化)制备的相似分子。

[0674] 本发明还可以包括由于不直接与环连接的双键上的 $R_2 \sim R_3$ 取代基而产生的Z-E型的立体异构体及其混合物。当m不是1且m和n不同时,会遇到其他Z-E立体异构体。应用Cahn-Ingold-Prelog优先级规则来确定由于双键连接的取代基的双键平面中的各个位置引起的立体异构体是否为Z或E。如果最高优先级的2个基团位于经过C=C键的参考平面的同一侧,则立体异构体被命名为Z(zusammen=一起)。另一种立体异构体被命名为E(entgegen=相反)。

[0675] E-Z型的立体异构体的混合物可以使用基于这些化合物的不同化学物理特性的经典纯化方法而分离(和/或表现)为它们的组分。包括在这些方法中的是分级结晶,通过低、中或高压技术执行的色谱,分级蒸馏和本领域技术人员非常熟知的任何其他方法。

[0676] 本发明还包括任意上式化合物的前药,即,当施用至哺乳动物受试者时,在体内释放任意上式的活性药物的化合物。前药是药理上有活性的化合物,或者更通常地为无活性化合物,其通过代谢转化而转化成药理学活性剂。任意上式化合物的前药通过对任意上式化合物中存在的官能团进行修饰而制备,使得该修饰可以在体内断裂以释放母体化合物。在体内,前药容易在生理条件下进行化学变化(例如,水解或通过天然出现的酶而作用),引起药理学活性剂的释放。前药包括任意上式的化合物,其中羟基、氨基或羧基与可以在体内断裂的任意基团键合以分别再生游离羟基、氨基或羧基。前药的实例包括但不限于任意上式化合物的酯(例如乙酸酯、甲酸酯和苯甲酸酯衍生物)或任何其他在生理pH时或通过酶作用被转化为活性母体药物的衍生物。选择和制备适当前药衍生物的常规程序在本领域中有记载(参见,例如,Bundgaard.Design of Prodrugs.Elsevier,1985)。

[0677] 前药可以以与它们所转化的活性成分相同的方式进行施用,或者它们可以以储库(reservoir)形式例如经皮贴剂或其他适用于(通过提供酶或其他合适试剂)将前药随时间缓慢转化为活性成分并将活性成分输送至患者的其他储库而进行输送。

[0678] 除非特别指明,术语“活性成分”被理解为指代本文定义的任意上式的化合物。

[0679] 本发明还包括代谢物。本文公开化合物的“代谢物”是在化合物被代谢时形成的化合物的衍生物。术语“活性代谢物”是指当化合物被代谢时形成的化合物的生物学活性衍生物。术语“代谢”是指特定物质在活体内变化的过程的总和。简单而言,身体内存在的所有化合物通过身体内的酶操控,以获取能量和/或从将其从身体中去除。特定的酶对化合物生成特定的结构变化。例如,细胞色素P450催化多种氧化和还原反应,而尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶催化活化的葡萄糖醛酸分子转移到芳族醇、脂族醇、羧酸、胺和游离巯基。其他代谢信息可以从The Pharmacological Basis of Therapeutics,第九版,McGraw-Hill(1996),第11~17页中获得。本文公开的化合物的代谢物可以通过将化合物施用至宿主并分析宿主的组织样品、或通过将化合物与肝细胞在体外孵育并分析所得化合物而进行识别。两种方法均为本领域熟知。

[0680] σ -2受体拮抗剂的使用

[0681] 在一些实施方式中,本发明提供通过施用 σ -2受体拮抗剂来抑制与神经元细胞暴

露于Abeta种类相关的突触数目减退或膜运输异常的方法。本发明还提供在患者中治疗认知衰退和/或神经退行性疾病例如阿尔茨海默病或轻度认知障碍(MCI)的方法,包括向患者施用本文记载的 σ -2拮抗剂,例如任意本文所述通式包括的那些或其药学上可接受的盐。在一些实施方式中,抑制或治疗认知衰退和/或神经退行性疾病例如阿尔茨海默病的方法包括抑制或治疗一种或多种选自记忆丧失、混乱、判断受损、人格改变、定向障碍和语言技能丧失的认知衰退症状。在一些实施方式中,方法包括抑制或治疗由Abeta寡聚体介导的或与Abeta寡聚体相关的疾病或病症或障碍(参见段落002)。在一些实施方式中,抑制或治疗认知衰退和/或神经退行性疾病例如阿尔茨海默病的方法包括以下的一种或多种:(i)恢复经电生理测量可检测的长时程增强效应(LTP)、长时程抑制效应(LTD)或突触可塑性或者任何在以上术语定义中提及的认知功能的负面变化;和/或(ii)抑制或治疗神经退行;和/或(iii)抑制或治疗一般的淀粉样变性;和/或(iv)抑制或治疗淀粉样蛋白产生、淀粉样蛋白组装、淀粉样蛋白聚集和淀粉样蛋白寡聚体结合和淀粉样蛋白沉积中的一种或多种;和/或(v)抑制、治疗和/或减轻一种或多种Abeta寡聚体对神经元细胞的作用、特别是非致死作用。在一些实施方式中,抑制、治疗和/或减轻认知衰退和/或神经退行性疾病例如阿尔茨海默病的方法包括抑制、治疗和/或减轻淀粉样蛋白产生、淀粉样蛋白组装、一种或多种Abeta寡聚体对神经元细胞的活性/作用、淀粉样蛋白聚集、淀粉样蛋白结合和淀粉样蛋白沉积中的一种或多种。在一些实施方式中,抑制、治疗和/或减轻认知衰退和/或神经退行性疾病例如阿尔茨海默病的方法包括抑制、治疗和/或减轻一种或多种Abeta寡聚体对神经元细胞的一种或多种的活性/作用。

[0682] 在一些实施方式中,一种或多种Abeta寡聚体对神经元细胞、淀粉样蛋白聚集和淀粉样蛋白结合的活性/作用是Abeta寡聚体对膜运输或突触数目的作用。在一些实施方式中, σ -2拮抗剂抑制对膜运输或突触数目或Abeta寡聚体结合的Abeta寡聚体作用。

[0683] 在一些实施方式中,本发明提供治疗与Abeta寡聚体毒性(具体为非致死Abeta寡聚体作用)相关的蛋白病态(proteopathic)疾病的方法。在一些实施方式中,方法包括使具有这样的蛋白病态疾病的受试者与本发明的与 σ -2受体结合的 σ -2拮抗剂或含有该拮抗剂的组合物接触。

[0684] 在一些实施方式中,蛋白病态疾病是CNS蛋白病态,特征为Abeta蛋白增加,例如MCI、唐氏综合症、黄斑变性或阿尔茨海默病等。

[0685] 在一些实施方式中,本发明提供通过施用本发明的 σ -2拮抗剂来治疗一种或多种轻度认知障碍(MCI)或痴呆的方法。在一些实施方式中,本发明提供治疗MCI和痴呆的方法。

[0686] 在一些实施方式中,本发明提供用本发明的 σ -2拮抗剂治疗个体,以在受到Abeta种类例如Abeta寡聚体不利影响的功能方面部分地或全部地将受试者的细胞恢复到正常表型的方法。实例是可以通过多种方法包括本文所述测定测量的突触数目减少和膜运输异常。正常的表型可以是例如正常的膜运输。在一些实施方式中,正常的表型是正常的认知能力。“正常”表型可以通过将受试者的结果与正常受试者的样品进行比较而确定。样品可以至少1个受试者或1个样品,或者可以多于10个样品或受试者,且标准是基于多个受试者计算的均值。

[0687] 在一些实施方式中,方法包括向遭受认知衰退或神经退行性疾病的受试者施用与 σ -2蛋白结合并抑制 β 淀粉样蛋白病理的化合物或组合物。在一些实施方式中, β 淀粉样蛋白

病理是膜运输缺陷、突触数目的减少、树突棘数目的减少、树突棘形态的变化、LTP的变化、LTD的变化、动物的记忆和学习测量中的缺陷或其任意组合等。以上使用得自发明者举出的以下证据：

[0688] 以上通式内的 σ -2受体配体已经显示为选择性的、高亲和性 σ -2受体配体。例如化合物II显示出在大鼠新皮质匀浆的 σ -2受体处的 $[^3\text{H}]\text{DTG}/300\text{nM}(+)$ -戊唑辛替代的 K_i $9+/-4\text{nM}$ 以及在人Jurkat细胞膜的 σ -1受体处的 $[3\text{H}]-((+)-\text{戊唑辛})$ 替代的 K_i $500+/-200\text{nM}$ 。化合物IXa、IXb显示出在大鼠新皮质匀浆的 σ -2受体处的 $[^3\text{H}]\text{DTG}/300\text{nM}(+)$ -戊唑辛替代的 K_i $54+/-22\text{nM}$ 以及在人Jurkat细胞膜的 σ -1受体处的 $[3\text{H}]-((+)-\text{戊唑辛})$ 替代的 K_i $31+/-12\text{nM}$ 。相似地，化合物II显示出在大鼠肝脏匀浆的 σ -2受体处的 $[^3\text{H}]\text{DTG}/500\text{nM}(+)$ -戊唑辛替代的 K_i $59.7+/-10.4\text{nM}$ 以及在豚鼠脑膜的 σ -1受体处的 $[3\text{H}]-((+)-\text{戊唑辛})$ 替代的 K_i $108.1+/-19.9\text{nM}$ 。化合物IXa、IXb显示出在大鼠肝脏匀浆的 σ -2受体处的 $[^3\text{H}]\text{DTG}/500\text{nM}(+)$ -戊唑辛替代的 K_i $30.8+/-2.3\text{nM}$ 以及在豚鼠脑膜的 σ -1受体处的 $[3\text{H}]-((+)-\text{戊唑辛})$ 替代的 K_i $6.37+/-0.81\text{nM}$ 。

[0689] 以上通式内的 σ -2受体配体已经显示出用作为 σ -2受体功能性神经元拮抗剂；例如，化合物II以及IXa和IXb已在本文显示为抑制神经元细胞中与可溶Abeta寡聚体相关的突触减少，以及当在引入Abeta寡聚体之前或之后添加时，抑制神经元细胞中的膜运输异常（例如，使用下述的MTT检定），其伴随于将这些细胞暴露于合成制剂或从阿尔茨海默病人脑中分离的制剂形式（后者在体外介导淀粉样病理中更有效力）的Abeta寡聚体。以上通式内的其他化合物也显示为抑制膜运输中的异常。化合物II以及化合物IXa和IXb在本文中还可显示为抑制在如本文所述的阿尔茨海默病的转基因和诱导动物模型中展现的认知缺陷，认知缺陷与认知衰退和记忆丧失相关。化合物II以及以上通式内的其他化合物例如化合物B还已经在药代动力学研究中显示为全身性吸收并跨越血脑屏障并可生物利用。由于这些特性，并鉴于将强作用[看这个]归因于Abeta寡聚体和其他Abeta种类例如淀粉样蛋白病理例如阿尔茨海默病早期的发展中的组装的技术状态，预期化合物II和本文公开的其他化合物会在治疗和使免受轻度认知障碍以及治疗（如本文所述）阿尔茨海默病中有活性。此外，因为与化合物II结构相似以及因为已经证实化合物II的以上体外活性，以上具体公开的化合物中的式I、II、III、IV、V、VI和VII内的典型数目的其他化合物，即式I、II、III、IV、V、VI和VII内的所有化合物的药代动力学特性和 σ -2配体状态预期在体内具有相似活性。类似地，因为与化合物IXa和IXb结构相似以及因为已经证实化合物IXa和IXb的上述体外活性，式VIII和IX特别是式IX内的所有化合物也预期在体内具有相似活性。

[0690] 化合物II行为效力：小鼠条件性恐惧中Abeta寡聚体诱导的记忆缺陷是在哥伦比亚大学Ottavio Arancio博士的实验室中建立的模型（Puzzo' 08）。一些制药公司在他们的发现工作中使用该同一模型。情境条件性恐惧是与人认知功能特别是新记忆创建相关的联想记忆形成的已接受模型（Delgado' 06）。将Abeta寡聚体在条件性训练前即刻注射到野生型动物的海马中，且在24小时后经僵立行为（freezing behavior）评估记忆。参见，例如图4和8。详情提供在实施例9中。其中，化合物II能够完全消除小鼠中的记忆缺陷而不抑制记忆（当单独给药时）或引起任何行为或动作毒性。选择该模型系统是因为寡聚体的海马内施用使得可以快速比较评估化合物活性和脱靶毒性。结果图示在图4中。

[0691] 化合物II还在两个转基因阿尔茨海默病模型中进行体内测试，以示出在化合物在

逆转Abeta寡聚体相关的记忆丧失中的作用。具体而言,化合物II恢复两个不同突变小鼠模型的能力(该突变小鼠模型随着年龄增长而逐渐发展出以记忆丧失为特征的认知衰退),以记起记忆丧失发生前获取的机能。此外,在上述条件性恐惧检定中,化合物II以及化合物IXa和IXb显著抑制野生型小鼠的海马Abeta寡聚体暴露的作用,从而保护小鼠获取新记忆的能力。

[0692] 这些行为研究统一证实了,化合物II在两个不同行为任务中引起学习和记忆的改善,使用两个不同的阿尔茨海默病模型,以两种性别,并按照短期或长期给药,并且证实了体外检定与体内活性相关。尽管结构不同,化合物IXa/IXb具有相似的体外和体内活性,并且也是 σ -2拮抗剂。最后,一些 σ -2拮抗剂还显示出体外活性,尽管结构不同。因此,综合来说,这些结果表明化合物II可以用于治疗神经退行性疾病例如阿尔茨海默病。式I、II、III、IV、V、VI和VII内的其他化合物也被发现与 σ -2受体结合并具有与化合物II相似的体外活性。基于它们与化合物II的相似性,预期它们具有与化合物II相似的体外活性和体内活性。确实,到这些化合物已经在体外进行测试的程度,它们具有与化合物II相同类型的活性,因此预期它们具有相似的体内活性,因此可用于相同的治疗适应症。式I、II、III、IV、V、VI和VII内的多种其他 σ -2拮抗剂化合物已经或将在本文所述的突触减少和/或膜运输检定中进行测试,并预期在抑制Abeta寡聚体相关的突触损失中以及在抑制Abeta寡聚体相关的膜运输异常中具有活性,并且在抑制例如认知衰退和治疗阿尔茨海默病中具有相似活性。类似地,因为化合物IXa和IXb还显示出在体外和体内模型中有活性,因此结构相似的式VIII和IX特别是式IX的化合物也大体预期为同时在体外和体内具有活性,因此可用于本发明的治疗方法中。到被检测的程度,这些化合物为 σ -2配体,且预期剩余者为 σ -2配体。

[0693] 如本文所讨论的,证据表明,由膜运输介导的神经元表面受体表达中Abeta寡聚体介导的减少是突触可塑性(LTP)以及因此的学习和记忆的电生理测量的寡聚体抑制的基础(参见Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R. APP processing and synaptic function. *Neuron*. 2003 Mar 27; 37 (6) :925-37; 和 Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, Malinow R. AMPAR removal underlies Abeta oligomer-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron*. 2006 Dec 7; 52 (5) :831-43)。经甲腈形态转变测量由寡聚体诱导的膜运输率变化已被用于细胞系中,以发现阻断Abeta寡聚体的药物[Maezawa I, Hong HS, Wu HC, Battina SK, Rana S, Iwamoto T, Radke GA, Pettersson E, Martin GM, Hua DH, Jin LW. A novel tricyclic pyrone compound ameliorates cell death associated with intracellular amyloid-beta oligomeric complexes. *J Neurochem*. 2006 Jul; 98 (1) :57-67; Liu Y, Schubert D. Cytotoxic amyloid peptides inhibit cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by enhancing MTT formazan exocytosis. *J Neurochem*. 1997 Dec; 69 (6) :2285-93; Liu Y, Dargusch R, Banh C, Miller CA, Schubert D. Detecting bioactive amyloid beta peptide species in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2004 Nov; 91 (3) :648-56; Liu Y, Schubert D. Treating Alzheimer's disease by inactivating bioactive amyloid beta peptide. *Curr Alzheimer Res*. 2006 Apr; 3 (2) :129-35; Rana S, Hong HS, Barrigan L, Jin LW, Hua DH. Syntheses of tricyclic pyrones and pyridinones and protection

of Abeta-peptide induced MC65 neuronal cell death. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009 Feb 1; 19 (3) : 670-4. Epub 2008 Dec 24; 和 Hong HS, Maezawa I, Budamagunta M, Rana S, Shi A, Vassar R, Liu R, Lam KS, Cheng RH, Hua DH, Voss JC, Jin LW. Candidate anti-Abeta fluorene compounds selected from analogs of amyloid imaging agents. *Neurobiol Aging*. 2008 Nov 18. (电子出版)], 其在啮齿动物体内降低 Abeta 脑水平 [Hong HS, Rana S, Barrigan L, Shi A, Zhang Y, Zhou F, Jin LW, Hua DH. Inhibition of Alzheimer's amyloid toxicity with a tricyclic pyrone molecule in vitro and in vivo. *J Neurochem*. 2009 Feb; 108 (4) : 1097-1108]。因此, 上述测试已经建立了在识别化合物以治疗早期阿尔茨海默病和轻度认知障碍中的相关性。

[0694] 在一些实施方式中, 关于抑制 Abeta 寡聚体对神经元 (例如脑中的神经元)、淀粉样蛋白组装或其破裂和淀粉样蛋白 (包括淀粉样蛋白寡聚体) 结合和淀粉样蛋白沉积的一种或多种作用, 任意上式的化合物具有小于 100 μ M、50 μ M、20 μ M、15 μ M、10 μ M、5 μ M、1 μ M、500 nM、100 nM、50 nM 或 10 nM 的 IC₅₀ 值。在一些实施方式中, 关于抑制 Abeta 种类例如寡聚体对神经元 (例如中枢神经系统神经元) 的活性/作用, 化合物具有小于 100 μ M、50 μ M、20 μ M、15 μ M、10 μ M、5 μ M、1 μ M、500 nM、100 nM、50 nM 或 10 nM 的 IC₅₀ 值。

[0695] 在一些实施方式中, 本发明化合物对 Abeta 种类例如寡聚体对神经元 (例如脑中神经元) 的一种或多种作用 (例如淀粉样蛋白 (包括淀粉样蛋白寡聚体) 与突触的结合以及由 Abeta 寡聚体介导的膜运输异常) 的抑制百分比在 10 nM 至 10 μ M 的浓度进行测量。在一些实施方式中, 所测量的抑制百分比为约 1% 至约 20%、约 20% 至约 50%、约 1% 至约 50%、或约 1% 至约 80%。抑制可以例如通过在暴露于 β 淀粉样蛋白种类之前和之后对神经元的突触数目进行定量或者在同时存在 σ -2 拮抗剂和 Abeta 种类时对突触数目进行定量而评测, 其中 σ -2 拮抗剂与 Abeta 种类暴露同时、或在之前或在之后。作为另一实例, 抑制可以通过在存在和不存在 Abeta 种类时以及在存在和不存在本发明 σ -2 拮抗剂时确定膜运输并对测量胞吐速率和程度、胞吞速率和程度或其他细胞代谢指示物的一个或多个参数进行比较而进行评测。本发明的发明者已举出生化检定证据, 即本发明的化合物还抑制淀粉样蛋白聚集 (数据未示出)。

[0696] 在一些实施方式中, 本文所述的化合物与 σ -2 受体特异性地结合。与特异受体特异性结合的化合物是指相对于另一受体偏好一种受体的化合物。例如, 尽管化合物可能能够同时结合 σ -1 和 σ -2 受体, 但当以高出 σ -1 受体至少 10% 的亲合性结合时, 化合物可以被认为对 σ -2 受体特异。在一些实施方式中, 特异性对于一种结合配偶体 (例如受体) 相比于第二结合配偶体高出至少 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500 或 1000%。

[0697] 在一些实施方式中, 本发明提供使用标记的 σ -2 配体在动物中测量 β 淀粉样蛋白相关的认知衰退的方法。在一些实施方式中, 方法包括使动物与本发明的标记 σ -2 配体接触并测量 σ -2 活性或表达。在一些实施方式中, 方法包括将动物中的 σ -2 活性或表达与已知具有 β 淀粉样蛋白诱导的认知衰退的动物进行比较。如果活性或表达与已知具有 β 淀粉样蛋白诱导的认知衰退的动物相同, 认为该动物具有相同水平的认知衰退。动物可以根据与在 β 淀粉样蛋白诱导的认知衰退的各个阶段中的已知活性或表达的相似度来分级。本文所述的任意 σ -2 配体可以被标记, 以使标记的 σ -2 配体可以在体内使用。

[0698] 在确定任意上式的化合物和描述为以上 σ -2 拮抗剂的其他化合物否可有效治疗本

文所述的各种病症时,可以使用体外检定。已经使用化合物II将体外检定与体内作用进行了相关。例如,如果与化合物II结构相似的式III-IV化合物例如在本文所述体外检定中有活性,则其也可以在体内使用以治疗或改善本文所述的病症,包括抑制或恢复突触损失、调节神经元细胞中的膜运输变化、使免受或恢复记忆丧失,以及治疗认知衰退病症、疾病和障碍例如MCI和阿尔茨海默病。检定部分基于 β 淀粉样蛋白寡聚体和它们在突触处结合神经元的功能和 β 淀粉样蛋白寡聚体对神经元的体外作用。在一些实施方式中,本发明的发明者相信包括 σ -2蛋白的神经元中的Abeta寡聚体受体与本文所述的 β 淀粉样蛋白组装接触,且与 σ -2蛋白结合的式I、III、IV、V、VI和VII的化合物会抑制 β 淀粉样蛋白组装与受体的结合。在竞争性放射性配体结合检定中,本发明的发明者已经显示出本发明的化合物对 σ -2受体有特异性。本发明的发明者还已经显示出,本发明的化合物抑制Abeta寡聚体与其在神经元表面上的在此之前未识别的受体进行结合。在一些实施方式中,提供方法来确定任意上式化合物在神经元信号传导中的 σ -2配体效力。在一些实施方式中,方法包括使细胞例如但不限于初级神经元与 σ -2配体接触并测量神经元功能。在一些实施方式中,细胞在体外接触。在一些实施方式中,细胞在体内接触。神经元活性可以是信号传导活性、电活性、突触蛋白的产生或释放等。增强或恢复信号传导的 σ -2拮抗剂被识别为可有效调节神经元活性的化合物。在一些实施方式中,细胞得自病理样品。在一些实施方式中,细胞得自患有神经退行性疾病的受试者。在一些实施方式中,神经退行性疾病为MCI或阿尔茨海默病,特别是轻度阿尔茨海默病。

[0699] 受体结合检定和化合物筛选

[0700] 本发明还提供识别抑制认知衰退或治疗神经退行性疾病的另一化合物的方法。在一些实施方式中,方法包括使细胞与结合 σ -2受体的化合物接触。在一些实施方式中,方法包括确定化合物是否抑制 β 淀粉样蛋白病理,其中抑制 β 淀粉样蛋白病理的化合物被识别为与 σ -2受体结合并抑制认知衰退或治疗神经退行性疾病的化合物。在一些实施方式中,方法还包括识别与 σ -2受体结合的其他化合物。在一些实施方式中,识别与 σ -2受体结合的化合物的方法包括竞争性结合检定,其中在已知 σ -2配体例如任意上式的化合物和描述为以上 σ -2配体的其他化合物的存在下使测试化合物与 σ -2受体接触,其中竞争性地抑制已知配体的结合的测试化合物被识别为 σ -2受体配体。

[0701] 确定化合物是否能够与 σ -2受体结合的方法是已知的,并且可以使用任何方法。例如,通过合同研究组织来进行测试,可以用来确定化合物是否与 σ -2结合。可以进行多种检定以确定化合物是否与 σ -2受体结合。在一些实施方式中,使用稳定表达人受体包括但不限于 σ -2受体的同源群体的细胞,例如但不限于人胚胎肾细胞(HEK293)、Jurkat细胞或中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在其他情况下,使用 σ -2受体的组织来源例如啮齿动物新皮质膜。该实例在本文的实施例部分中描述。

[0702] 在一些实施方式中,测试化合物与细胞或细胞膜接触,以确定测试化合物是否可以与 σ -2受体结合。在一些实施方式中,测试化合物溶解在载体或媒介物中,例如但不限于二甲基亚砜。在一些实施方式中,培养细胞直至铺满(confluent)。在一些实施方式中,在铺满时,细胞可以通过温柔的刮擦来脱离。在一些实施方式中,细胞通过胰蛋白酶化或任何其他合适的脱离方式来脱离。

[0703] 在一些实施方式中,测试化合物与 σ -2受体的结合可以通过例如竞争性放射性配

体结合检定来确定。放射性配体结合检定可以在稳定表达人受体的完整细胞或组织来源上进行。脱离的细胞或组织可以例如被洗涤、离心和/或再混悬于缓冲液中。测试化合物可以根据包括但不限于本文所述方法的任何方法来进行放射标记。放射性配体可以在多种浓度(范围可以是例如 $10^{10} \sim 10^3 \text{M}$ 或 $10^{11} \sim 10^4 \text{M}$)的竞争药物的不存在和存在下以 $0.1 \mu\text{Ci}$ 的固定浓度进行使用。这些药物可以添加到缓冲液中的组织或细胞(~例如50,000个细胞),并使其孵育。非特异性结合可以在各个受体亚型的广谱活化剂或抑制剂或功能性激动剂或拮抗剂的存在下(例如,对于 σ 受体,在例如 $10 \mu\text{M}$ 的各个受体的合适配体的存在下)进行确定。反应可以通过快速过滤而终止,之后可以用冰冷缓冲液洗涤两次。干燥的过滤盘上的放射活性可以使用任何方法测量,包括但不限于液体闪烁分析仪。可以绘制出替代曲线并且对于受体亚型的测试配体的 K_i 值可以使用例如GraphPad Prism(GraphPad Software Inc., San Diego, CA)进行确定。特异性结合的百分比可以通过将总结合(每分钟衰变)与非特异性结合(每分钟衰变)之间的差值除以总结合(每分钟衰变)而确定。

[0704] 在一些实施方式中,对于细胞系或组织来源中的结合研究,在各个实验内添加变化浓度的各个药物,一式两份,且各个 IC_{50} 值使用例如GraphPad Prism软件确定。各个配体的 K_i 值可以根据由Cheng和Prusoff (1973)描述的等式而确定,且最终数据可以呈现为 $pK_i \pm \text{S.E.M.}$,其中在一些实施方式中,测试数目为约1~6。

[0705] 在一些实施方式中,方法还包括确定与 σ -2受体结合的化合物是否通过抑制可溶A β 寡聚体诱导的神经毒性(有关于抑制可溶A β 寡聚体诱导的突触损失)且抑制膜运输检定中A β 寡聚体诱导的缺陷而用作为 σ -2受体处的功能性拮抗剂。在一些实施方式中,方法还确定 σ -2受体拮抗剂在不存在A β 寡聚体时不影响运输或突触数目;不诱导神经元细胞中的caspase-3活性;抑制经由 σ -2受体激动剂对caspase-3活性的诱导;且/或降低或使免受神经元细胞中由 σ -2受体激动剂引起的神经元毒性。

[0706] 测试还可以包括确定测试化合物对结合配偶体(其可以是,但不限于 σ -2受体)功能的作用的功能性检定。可以使用多种标准检定技术。例如,可以使用方法来测量化合物在活细胞或组织中的功能性激动剂样或拮抗剂样活性。方法包括但不限于,确定cAMP浓度和IP1水平的TR-FRET,监测钙能量的实时荧光,测量阻抗调节、回肠收缩、肿瘤细胞凋亡的细胞介电泳。还可以通过例如确定化合物是否与 σ -1受体、 σ -2受体、两者均不或两者均结合来确定测试化合物的特异性。用于确定测试化合物是否与 σ -1受体结合的方法在Ganapathy, M.E等人(1999) J.Pharmacol.Exp.Ther., 289:251-260中记载,其全部并入本文以供参考。用于确定测试化合物是否与 σ -1受体结合的方法在Bowen, W.D等人(1993) Mol.Neuropharmacol., 3:117-126中(其全部并入本文以供参考)以及Xu, J.等人, Nature Communications, 2011, 2:380 DOI:10.1038/ncomms_1386(其全部也并入本文以供参考)中记载。

[0707] 在多个实施方式中,本公开内容提供用于识别能够通过抑制可溶A β 寡聚体诱导的神经毒性(有关于抑制可溶A β 寡聚体诱导的突触损失)而用作为 σ -2受体处的功能性拮抗剂、抑制膜运输检定中可溶A β 寡聚体诱导的缺陷、在不存在A β 寡聚体时不影响运输或突触数目、且如本文所述表现出较好的药物样特性的选择性、高亲和性 σ -2受体配体的检定方案,使得由此识别的选择性、高亲和性 σ -2受体拮抗剂化合物可以用于在体内治疗可溶A β 寡聚体诱导的突触功能障碍。

[0708] 在一些实施方式中,提供用于识别在减轻或使免受非致死Abeta寡聚体毒性中有活性的化合物的筛选方法,其大大受益于将测试化合物与 σ -2受体结合的能力引入为筛选标准,该能力例如通过其替代已知配体的能力或通过任何其它方法来评估。此外,测试化合物应进行至少一种可以评估化合物阻断或减轻Abeta寡聚体对神经元的非致死有害作用的能力的体外测试,例如本文所述的膜运输检定或突触数目或寡聚体结合检定,或者评估认知衰退的治疗的体内检定,例如本文所述的那些。

[0709] 在一些实施方式中,本发明提供确定受试者是否应该用 σ -2拮抗剂治疗的方法,其中受试者被怀疑具有认知衰退或神经退行性疾病或本文所述的其他病症、疾病或障碍。在一些实施方式中,方法包括使得自患者的样品与 σ -2拮抗剂接触以及确定 σ -2调节化合物是否抑制或改善样品中的 β 淀粉样蛋白病理,其中显示出抑制或改善样品中存在的 β 淀粉样蛋白病理的样品表明受试者应该用 σ -2拮抗剂治疗。

[0710] 此外,本发明包括识别抑制A β 寡聚体诱导的突触数目减少等的 σ -2拮抗剂的方法。在一些实施方式中,可以使用方法来识别用于治疗 β 淀粉样蛋白病理的 σ -2拮抗剂。在一些实施方式中,使用方法来确定治疗 β 淀粉样蛋白病理的治疗效力。在一些实施方式中, β 淀粉样蛋白病理是膜运输缺陷、突触功能障碍、动物中的记忆和学习缺陷、突触数目的减少、树突棘长度或棘形态的变化、LTP缺陷或Tau蛋白磷酸化的增加。

[0711] 用于本公开内容中的 β 淀粉样蛋白

[0712] 人 β 淀粉样蛋白是集中于神经元突触中的整合膜蛋白即淀粉样蛋白前体蛋白(APP)的剪切产物。 β 淀粉样蛋白自缔合形成可代谢的寡聚组装。在更高的浓度下,Abeta会聚合并组装成线形原纤维,由较低pH促进。目前并不清楚原纤维是否由寡聚体形成。 β 淀粉样蛋白寡聚体已经被证实通过诱导神经元突触的阻断学习和记忆的变化而引起动物模型中的阿尔茨海默病,且 β 淀粉样蛋白原纤维长久以来与动物和人的晚期阿尔茨海默病相关。实际上,阿尔茨海默病的现代可行的且已得到大量支持的假设是,Abeta组装尤其是Abeta寡聚体处于与阿尔茨海默病相关的早期病理的中心以及与较少严重痴呆相关的病理例如MCI和轻度AD的中心。Cleary, James P. 等人"Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function." *Nature Neuroscience* Vol.8 (2005):79-84; Klyubin, I. 等人"Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization." *J Neurosci*. Vol.28 (2008):4231-4237。然而,几乎不知道寡聚体如何形成以及寡聚体的结构状态。例如,缔合形成寡聚体的 β 淀粉样蛋白亚基的数目在目前是未知的,如同寡聚体的结构形式或暴露哪些残基。有证据表明寡聚体的多于一种结构状态是有神经活性的。Reed, Jess D. 等人"MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols." *Phytochemistry* 66:18 (2005年9月):2248-2263; Cleary, James P. 等人"Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function." *Nature Neuroscience* Vol.8 (2005):79-84。

[0713] β 淀粉样蛋白对脑中发现的很多蛋白具有亲和性,包括ApoE和ApoJ。然而,不清楚分子伴侣或其他蛋白是否与能影响其最终结构状态和/或其神经活性的蛋白形成缔合。

[0714] 可溶的Abeta肽很可能通过扰乱突触功能障碍和认知过程而在AD早期中发挥重要作用。例如,Origlia等人显示出可溶Abeta (Abeta 42) 通过神经元受体来破损害嗅皮质的

长时程增强效应 (LTP), 该神经元受体用于 p38MAPK 的糖基化终末产物 (RAGE) 介导的活化。Origlia 等人 2008, Receptor for advanced glycation end product-dependent activation of p38 mitogen-activated protein kinase contributes to amyloid-beta-mediated cortical synaptic dysfunction. J. Neuroscience 28 (13): 3521-3530, 其并入本文以供参考。

[0715] 突触功能障碍涉及到阿尔茨海默病的早期中。 β 淀粉样蛋白肽已经显示出改变突触功能。Puzzo 等人报道到, Abeta 的合成原纤维形式损害 LTP 的晚期蛋白合成依赖期而不影响早期蛋白合成期。该报道与 Abeta 寡聚体对细胞高度毒性并涉及到突触功能障碍中的早期报道一致。Puzzo 等人, 2006, Curr Alzheimer's Res 3 (3): 179-183, 其并入本文以供参考。已经发现 Abeta 通过多种第二信使级联反应包括一氧化氮级联反应而显著地损害海马长时程增强效应 (LTP)。NO/cGMP/cGK/CREB。Puzzo 等人, J Neurosci. 2005。在一些实施方式中, 公开内容提供包括 σ -2 受体拮抗剂的组合物和方法, 以用于抑制神经元细胞的 β 淀粉样蛋白寡聚体诱导的突触功能障碍, 以及抑制由神经元对 Abeta 寡聚体的暴露引起的海马长时程增强效应的压制。

[0716] 任何形式的 β 淀粉样蛋白可以用于实施本发明的筛选方法和检定, 包括 β 淀粉样蛋白单体、寡聚体、原纤维以及与蛋白缔合的 β 淀粉样蛋白 (“蛋白复合物”) 且更一般地 β 淀粉样蛋白组装。例如, 筛选方法可以采用多种形式的可溶 β 淀粉样蛋白寡聚体, 例如在美国专利申请序列号 13/021,872; 美国专利公开 2010/0240868; 国际专利申请 WO/2004/067561; 国际专利申请 WO/2010/011947; 美国专利公开 20070098721; 美国专利公开 20100209346; 国际专利申请 WO/2007/005359; 美国专利公开 20080044356; 美国专利公开 20070218491; WO/2007/126473; 美国专利公开 20050074763; 国际专利申请 WO/2007/126473; 国际专利申请 WO/2009/048631、和美国专利公开 20080044406、美国专利第 7,902,328 号和美国专利第 6,218,506 号中公开的, 其各自并入本文以供参考。

[0717] β 淀粉样蛋白的形式, 包括 β 淀粉样蛋白的单体或寡聚体, 可以得自任何来源。例如, 在一些实施方式中, 市售可得的 β 淀粉样蛋白单体和/或 β 淀粉样蛋白寡聚体可以用于水溶液中, 且在其他实施方式中, 用于水性蛋白溶液中的 β 淀粉样蛋白单体和/或 β 淀粉样蛋白寡聚体可以通过技术人员使用任何数目的已知技术来分离并纯化。通常而言, 用于制备各个实施方式的蛋白和 β 淀粉样蛋白的水溶液的 β 淀粉样蛋白单体和/或 β 淀粉样蛋白寡聚体可以在水溶液中可溶。因此, 水溶液的蛋白和 β 淀粉样蛋白均可以是可溶的。

[0718] 添加的 β 淀粉样蛋白可以是任何同工型。例如, 在一些实施方式中, β 淀粉样蛋白单体可以是 β 淀粉样蛋白 1~42, 且在其他实施方式中, β 淀粉样蛋白单体可以是 β 淀粉样蛋白 1~40。在其他实施方式中, β 淀粉样蛋白可以是 β 淀粉样蛋白 1~39 或 β 淀粉样蛋白 1~41。因此, 各个实施方式的 β 淀粉样蛋白可以包括 β 淀粉样蛋白的 C 端同工型。其他实施方式包括 N 端已磨损的 β 淀粉样蛋白, 且在一些实施方式中, 上述任何 β 淀粉样蛋白 C 端同工型的 N 端可以是氨基酸 2、3、4、5 或 6。例如, β 淀粉样蛋白 1~42 可以包括 β 淀粉样蛋白 2~42、 β 淀粉样蛋白 3~42、 β 淀粉样蛋白 4~42 或 β 淀粉样蛋白 5~42 及其混合物, 而且相似地, β 淀粉样蛋白 1~40 可以包括 β 淀粉样蛋白 2~40、 β 淀粉样蛋白 3~40、 β 淀粉样蛋白 4~40 或 β 淀粉样蛋白 5~40。

[0719] 用在各个实施方式中的 β 淀粉样蛋白形式可以是野生型, 即具有与大部分群体在

体内合成的 β 淀粉样蛋白的氨基酸序列相同的氨基酸序列,或者在一些实施方式中, β 淀粉样蛋白可以是突变 β 淀粉样蛋白。实施方式不限于任何特定种类的突变 β 淀粉样蛋白。例如,在一些实施方式中,引入水溶液中的 β 淀粉样蛋白可以包括已知的突变,例如具有“道奇”(Dutch)突变(E22Q)或“Arctic”(E22G)突变的 β 淀粉样蛋白。这些突变的单体可以包括天然出现的突变,例如从易患例如阿尔茨海默病的个体群中分离的 β 淀粉样蛋白形式, β 淀粉样蛋白的家族形式。在其他实施方式中,突变 β 淀粉样蛋白单体可以通过使用分子技术而合成产生,从而生成具有特定突变的 β 淀粉样蛋白突变体。在其他实施方式中,突变 β 淀粉样蛋白单体可以包括先前未识别的突变,例如在随机生成的 β 淀粉样蛋白突变体中发现的那些突变体。本文使用的术语“ β 淀粉样蛋白”意在包括 β 淀粉样蛋白的野生型形式以及 β 淀粉样蛋白的任何突变形式。

[0720] 在一些实施方式中,水性蛋白溶液中的 β 淀粉样蛋白可以是单个同工型。在其他实施方式中, β 淀粉样蛋白的多种C端同工型和/或 β 淀粉样蛋白的多种N端同工型可以组合形成能够在水性蛋白溶液中提供的 β 淀粉样蛋白混合物。在其他实施方式中, β 淀粉样蛋白可以得自添加至含蛋白水溶液并原位剪切的淀粉样蛋白前体蛋白(APP),并且在这些实施方式中, β 淀粉样蛋白的多种同工型可以包含在溶液中。在添加 β 淀粉样蛋白后,可能水溶液中发生N端的磨损和/或C端氨基酸的移除。因此,即使在初始将单个同工型添加到溶液中时,如本文所述制备的水溶液也可以包括多种 β 淀粉样蛋白同工型。

[0721] 添加到水溶液中的 β 淀粉样蛋白单体可以从天然来源例如活组织中分离,且在其它实施方式中, β 淀粉样蛋白可以得自合成来源例如转基因小鼠或经培养的细胞。在一些实施方式中, β 淀粉样蛋白形式,包括单体、寡聚体或其组合,从正常受试者和/或被诊断为具有认知衰退或与其相关的疾病例如但不限于阿尔茨海默病的患者中分离。在一些实施方式中, β 淀粉样蛋白单体、寡聚体或其组合是已从正常受试者或疾病患者中分离的A β 组装。在一些实施方式中,A β 组装具有高分子量,例如大于100KDa。在一些实施方式中,A β 组装具有中等分子量,例如10~100KDa。在一些实施方式中,A β 组装小于10kDa。

[0722] 一些实施方式的 β 淀粉样蛋白寡聚体可以由任何数目的 β 淀粉样蛋白单体组成,与“寡聚体”的常用定义一致。例如,在一些实施方式中, β 淀粉样蛋白寡聚体可以包括约2至约300、约2至约250、约2至约200个 β 淀粉样蛋白单体,且在其它实施方式中, β 淀粉样蛋白寡聚体可以由约2至约150、约2至约100、约2至约50、或约2至约25个 β 淀粉样蛋白单体组成。在一些实施方式中, β 淀粉样蛋白寡聚体可以包括2个或更多个单体。各个实施方式的 β 淀粉样蛋白寡聚体可以基于单体的确认而与 β 淀粉样蛋白原纤维和 β 淀粉样蛋白初原纤维区别开。具体地, β 淀粉样蛋白寡聚体的 β 淀粉样蛋白单体通常是由 β 折叠片组成的球状,而原纤维和初原纤维的 β 淀粉样蛋白单体的二级结构是平行 β 片。

[0723] 具有阿尔茨海默病或存在具有阿尔茨海默病风险的受试者的识别

[0724] 通过大脑皮质中细胞外 β 淀粉样蛋白(A β)斑块和神经元内神经原纤维缠结的存在来从组织学上定义阿尔茨海默病(AD)。各种诊断和预后生物标记物在本领域内已知,例如磁共振成像、单光子发射断层成像术、FDG PET、PiB PET、CSF tau和A β 分析,以及其诊断精确性的可得数据在Alves等人,2012,Alzheimer's disease:a clinical practice-oriented review,Frontiers in Neurology, April, 2012, vol 3, Article 63, 1-20中讨论,其引入本文以供参考。

[0725] 痴呆的诊断以及对将患痴呆的人的预测受到磁共振成像和通过使用[(18)F]氟脱氧葡萄糖(FDG)的正电子发射断层成像术(PET)的帮助。这些技术不特定用于AD。参见例如Vallabhajosula S. Positron emission tomography radiopharmaceuticals for imaging brain Beta-amyloid. *Semin Nucl Med*. 2011 Jul; 41 (4): 283-99。最近FDA批准用于成像的对于具有认识障碍的患者中的频繁淀粉样蛋白神经斑温和的另一PET配体是Florbetapir F 18注射剂, (4-((1E)-2-(6-{2-(2-(2-(18F) 氟乙氧基) 乙氧基) 乙氧基) 吡啶-3-基) 乙烯基)-N-甲基苯胺, **AMYVID®**, Lilly)。Florbetapir与原纤维Abeta特异结合, 但不与神经原纤维缠结特异结合。参见例如, Choi SR等人, Correlation of amyloid PET ligand florbetapir F 18 binding with A β aggregation and neuritic plaque deposition in postmortem brain tissue. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2012 Jan; 26 (1): 8-16。PET配体florbetapir相对于PET扫描的定性视觉评估具有较低特异性。Camus等人, 2012, *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 39: 621-631。然而, 许多具有神经斑的人看似认知正常。

[0726] 对于阿尔茨海默病的CSF标记物包括总tau、磷-tau和Abeta42。参见例如, Andreasen, Sjogren and Blennow, *World J Biol Psychiatry*, 2003, 4 (4): 147-155, 其引入本文以供参考。在许多研究中已经发现, 在AD中Abeta的42氨基酸形式(Abeta42)的CSF水平降低且总tau的CSF水平增高。此外, 对于可用于识别存在患AD风险的受试者的APP基因中的突变, 存在已知的基因标记物。参见例如, Goate等人, Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease, *Nature*, 349, 704-706, 1991, 其引入本文以供参考。在实施方式中, 可以采用任何已知的诊断或预后方法来识别具有阿尔茨海默病或存在具有阿尔茨海默病风险的受试者。

[0727] 包括 σ -2受体拮抗剂的药物组合物

[0728] 通过本发明的方式识别的 σ -2受体拮抗剂化合物、抗体或片段可以以药物组合物的形式施用。这些组合物可以以制药领域熟知的方式制备, 且可以通过多种途径施用, 取决于是否需要局部或全身治疗以及待治疗的区域。

[0729] 因此, 本发明的另一实施方式包括药物组合物, 该药物组合物包括药学上可接受的赋形剂或稀释剂以及治疗有效量的本发明的 σ -2受体拮抗剂化合物(包括其对映异构体、非对映异构体、N-氧化物或药学上可接受的盐)。

[0730] 尽管化合物可以作为散装物质(bulk substance)施用, 但优选以药物制剂提供活性成分, 例如, 其中活性剂与药学上可接受的载体混合, 该药学上可接受的载体关于既定的施用途径和标准的制药实践进行选择。

[0731] 因此, 一方面, 本发明提供一种药物组合物, 其包括任何上式以及描述为以上 σ -2受体拮抗剂的其它化合物的至少一种化合物、抗体或片段, 或其药学上可接受的衍生物(例如盐或溶剂化物), 以及任选地, 药学上可接受的载体。具体地, 本发明提供一种药物组合物, 其包括治疗有效量的任何上式的至少一种化合物或其药学上可接受的衍生物, 以及任选地, 药学上可接受的载体。

[0732] 组合

[0733] 对于本发明的组合物和方法, 任何上式的化合物和描述为以上 σ -2受体拮抗剂的其它化合物可以与其它治疗和/或活性剂组合使用。

[0734] 在一些实施方式中, σ -2拮抗剂化合物可以与胆碱酯酶抑制剂、N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)谷氨酸受体拮抗剂、 β 淀粉样蛋白特异抗体、 β 分泌酶1(BACE1, β 淀粉样蛋白前体蛋白分裂酶1)抑制剂、肿瘤坏死因子 α (TNF α)调节剂、静脉内免疫球蛋白(IVIG)、或阮蛋白拮抗剂中的一种或多种组合。在一些实施方式中, σ -2受体拮抗剂与选自他克林(COGNEX®;Sciel)、多奈哌齐(ARICEPT®;Pfizer)、卡巴拉汀(EXELON®;Novartis)、或加兰他敏(RAZADYNE®;Ortho-McNeil-Janssen)的胆碱酯酶抑制剂组合。在一些实施方式中, σ -2受体拮抗剂与作为髓周依那西普(ENBREL®,Amgen/Pfizer)的TNF α 调节剂组合。在一些实施方式中, σ -2受体拮抗剂与选自巴匹珠单抗克隆抗体(Pfizer)、茄尼醇单抗克隆抗体(Lilly)、PF-04360365(Pfizer)、GSK933776(GlaxoSmithKline)、Gammagard(Baxter)或Octagam(Octapharma)的 β 淀粉样蛋白特异性抗体组合。在一些实施方式中, σ -2受体拮抗剂与作为美金刚(NAMENDA®;Forest)的NMDA受体拮抗剂组合。在一些实施方式中,BACE1抑制剂是MK-8931(Merck)。在一些实施方式中, σ -2受体拮抗剂与IVIG组合,如描述于Magga等人,J Neuroinflamm 2010,7:90,Human intravenous immunoglobulin provides protection against Ab toxicity by multiple mechanisms in a mouse model of Alzheimer's disease,以及Whaley等人,2011,Human Vaccines 7:3,349-356,Emerging antibody products and Nicotiana manufacturing;其各自引入本文以供参考。在一些实施方式中, σ -2受体拮抗剂与阮蛋白拮抗剂组合,如公开于Strittmatter等人,US 2010/0291090,其引入本文以供参考。

[0735] 因此,另一方面,本发明提供一种药物组合物,其包括任意上式的至少一种化合物或其药学上可接受的衍生物、第二活性剂、以及任选地药学上可接受的载体。

[0736] 当组合到同一制剂中时,应理解,两种化合物、抗体或片段须稳定且互相相容且与制剂的其它组分相容。当单独配制时,它们可以以任何便利的制剂提供,便利得对于这样的化合物领域内已知。

[0737] 可以在药物组合物中提供防腐剂、稳定剂、染料以及甚至调味剂。防腐剂的实例包括苯甲酸钠、抗坏血酸和对羟基苯甲酸酯。还可使用抗氧化剂和助悬剂。

[0738] 关于生物学例如单抗克隆抗体或片段,可以采用合适的赋形剂来防止抗体或片段在具有低内毒素的溶液中的聚集并使其稳定,通常用于肠道外例如静脉给药。例如,参见Formulation and Delivery Issues for Monoclonal Antibody Therapeutics, Daugherty等人,在Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing中,第4部分,2010,Springer,New York pp 103-129。

[0739] 本发明的化合物可以使用已知的研磨程序例如湿磨进行研磨,以获得适用于片剂形成和其他制剂类型的粒径。本发明化合物的细分(纳米颗粒)制剂可以通过本领域已知的方法进行制备,例如参见WO 02/00196(SmithKline Beecham)。

[0740] 施用途途和单位剂型

[0741] 施用(输送)途径包括但不限于以下一种或多种:口服(例如作为片剂、胶囊或作为可吸收的溶液)、局部、粘膜(例如作为吸入用鼻腔喷雾剂或气雾剂)、肠胃外(例如通过可注射形式)、胃肠、脊柱内、腹膜内、肌内、静脉内、脑室内、或其它储库(depot)施用等。

[0742] 因此,本发明的组合物包括尤其配制用于施用模式的形式形式的组合物。在某些实施方式中,本发明的药物组合物配制成适用于口服输送的形式。例如,化合物CB和化合物CF是

在动物模型中口服可生物利用且已每天口服一次在条件性恐惧模型中显示效力的 σ -2受体拮抗剂化合物,参见例如图12B。本文所述的口服可生物利用的化合物可以以口服制剂制备。在一些实施方式中, σ -2拮抗剂化合物是口服可生物利用的化合物,适用于口服输送。在其它实施方式中,本发明的药物组合物配制成适用于肠胃外输送的形式。在一些实施方式中, σ -2受体拮抗剂化合物是其抗体或片段,其中抗体或片段配制成肠胃外组合物。例如,阻断Abeta寡聚体与 σ -2受体的结合的 σ -2受体抗体例如PGRMC1抗体可以配制用于肠胃外输送。

[0743] 本发明的化合物可以配制成以用于人或兽药的任何便利方式施用,因此本发明的范围内包括含有适用于人或兽药的本发明化合物的药物组合物。这样的组合物可以在一种或多种合适载体的帮助下以常规方式进行使用。用于治疗用途的可接受的载体在制药领域内熟知,且描述于例如Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985)。药物载体可以关于既定的施用途和标准的制药实践进行选择。除载体之外,药物组合物还可以包括任何合适的粘合剂、润滑剂、助悬剂、涂覆剂和/或增溶剂作为载体。

[0744] 根据不同的输送体系可存在不同的组合物/制剂要求。应理解,并不是所有的化合物都需要通过相同的途径施用。同样地,如果组合物包括多于一种活性组分,则这些组分可以通过不同途径施用。通过实施例的方式,本发明的药物组合物可以配制成使用微型泵,或通过粘膜途径例如作为吸入用鼻腔喷雾剂或气雾剂或可吸收溶液,或肠胃外(其中,组合物配制成可注射形式,以便通过例如静脉内、肌内或皮下途径进行输送)进行输送。或者,制剂可以设计成通过多个途径进行输送。

[0745] 本发明的抗体或抗体片段分子可以通过多种途径中的任意种进行配制和施用,并以对适应症或出于所寻求的目的治疗有效的浓度进行施用。为完成该目标,抗体可以使用多种本领域已知的可接受的赋形剂进行配制。通常而言,抗体通过注射而施用,例如静脉内注射。实现该施用的方法为本领域普通技术人员已知。例如, Gokarn等人, 2008, J Pharm Sci 97 (8): 3051-3066 (其并入本文以供参考) 描述了多种高浓度抗体自缓冲制剂。例如, 自缓冲制剂中的单克隆抗体, 以例如5.25%山梨糖醇, pH 5.0中的50mg/mL mAb, 或5%山梨糖醇、0.01%聚山梨醇酯20, pH 5.2中的60mg/mL mAb; 或常规缓冲制剂, 例如5.25%山梨糖醇、25或50mM乙酸盐、谷氨酸盐或琥珀酸盐, pH 5.0中的50mg/mL mAb1; 或10mM乙酸盐或谷氨酸盐、5.25%山梨糖醇、0.01%聚山梨醇酯20, pH 5.2中的60mg/mL; 可以采用其他低浓度制剂, 如本领域已知。

[0746] 因为本发明的优选 σ -2受体拮抗剂化合物跨越血脑屏障, 因此它们可以以多种方式进行施用, 例如全身(例如通过iv、SC、口服、粘膜、经皮途径)或局部方式(例如颅内)。在本发明的化合物经由胃肠粘膜进行粘膜输送时, 其应该能够在经由胃肠道的运输过程中保持稳定; 例如, 其应该耐受蛋白质降解, 在酸pH下稳定, 且耐受胆汁的净化(detergent)作用。例如, 选自 σ -2配体并制备用于上述的口服的 σ -2拮抗剂化合物可以由肠溶包衣层包衣。肠溶包衣层材料可以分散或溶解于水或合适有机溶剂中。作为肠溶包衣层聚合物, 可以单独或组合使用以下的一种或多种: 例如甲基丙烯酸共聚物、邻苯二甲酸乙酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、羟丙甲基纤维素邻苯二甲酸酯、醋酸羟丙甲基纤维素琥珀酸酯、聚乙酸乙烯邻苯二甲酸酯、乙酸纤维素偏苯三酸酯、羧甲基乙基纤维素、虫胶、或其它合适的肠溶包衣层聚

合物的溶液或分散液。由于环境原因,优选水性包衣工艺。在这样的水性工艺中,最优选甲基丙烯酸共聚物。

[0747] 合适时,药物组合物可通过吸入、通过使用皮肤贴剂施用,以含有赋形剂如淀粉或乳糖的片剂形式、或者以单独或与赋形剂混合的胶囊或胚珠(ovule)形式、或者以含有调味剂或着色剂的酏剂、溶液或混悬液形式口服施用,或者它们可以经肠胃外注射,例如静脉内、肌肉或皮下。对于颊(buccal)或舌下施用,组合物可以以片剂或锭剂的形式施用,其可以以常规方式进行配制。

[0748] 在本发明的组合物经胃肠外施用时,这样的施用包括但不限于:静脉内、动脉内、鞘内、心室内、颅内、肌肉或皮下施用本发明的化合物,和/或通过使用输注技术。抗体或片段通常经肠道外施用,例如静脉施用。

[0749] 适用于注射或输注的药物组合物可以是无菌水溶液、分散液或无菌粉末形式,其含有调整(若需要)用于这样的适用于输注或注射的无菌溶液或分散液制剂的活性成分。该制剂可任选地包入脂质体中。在所有情况下,最终制剂在制备和储存条件下须无菌、液态且稳定。为提高储存稳定性,这样的制剂还可含有防腐剂以防止微生物生长。对微生物作用的防止可通过添加各种抗菌剂和抗真菌剂来实现,例如尼泊金类(paraben)、氯丁醇或抗坏血酸。在很多情况下,推荐等张物质例如糖、缓冲液和氯化钠,以保证与体液特别是血液相似的渗透压。对这样的可注射混合物的延长吸收可通过引入吸收延迟剂例如单硬脂酸铝或明胶来实现。

[0750] 分散液可以在液体载体或媒介物(intermediate)例如甘油、液体聚乙二醇、三醋酸甘油酯油及其混合物中制备。液体载体或媒介物可以是溶剂或液体分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如丙三醇、丙二醇等)、植物油、非毒性甘油酯及其合适混合物。合适的流动性可以通过生成脂质体、在分散液的情况下施用合适的粒径或通过添加表面活性剂来得到保持。

[0751] 对于肠胃外施用,最好以无菌水溶液的形式使用化合物,该无菌水溶液可含有其它物质,例如足够的盐或葡萄糖以使溶液与血液等张。若需要,水溶液应被适当地缓冲(优选到3~9的pH)。在无菌条件下制备合适的肠胃外制剂可通过本领域技术人员熟知的标准制药技术来容易地完成。

[0752] 无菌注射液可以通过使式I的化合物与合适的溶剂以及一种或多种前述载体混合,随后无菌过滤来制备。在适用于制备无菌注射液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法包括在真空下干燥以及冻干,这提供 α -2受体拮抗剂和所需赋形剂的粉状混合物以便随后制备无菌溶液。

[0753] 根据本发明的化合物可以配制成通过注射(例如通过静脉内推注或输注或经肌肉内、皮下或鞘内途径)用于人或兽药且可以以单位剂型、以安瓿或其它单位剂量容器、或以多剂量容器提供,若需要添加防腐剂。注射用组合物可以是混悬液、溶液或乳液的形式,处于油性或水性媒介物中,且可以含有配制剂例如助悬剂、稳定剂、增溶剂和/或分散剂。或者,活性成分可以是在使用前与合适的媒介物例如无菌无热原水重构的无菌粉末形式。

[0754] 本发明的化合物可以以片剂、胶囊、胚珠(ovules)、酏剂、溶液或混悬液的形式施用,用于即释、延释、调释、缓释、脉冲释放或控释应用。

[0755] 本发明的化合物还可以以适用于口服或颊服的形式提供用于人或兽用,例如以溶

液、凝胶、糖浆或混悬液形式,或在使用前与水或其它合适的媒介物重构的干燥粉末形式。还可以使用固体组合物例如片剂、胶囊、锭剂、软锭剂、丸剂、大丸剂(boluses)、粉末、糊剂、颗粒、药筒(bullets)或预混制剂。用于口服用途的固体和液体组合物可以根据领域内熟知的方法制备。这样的组合物还可以含有一种或多种可为固体或液体形式的药学上可接受的载体和赋形剂。

[0756] 片剂可含有赋形剂例如微晶纤维素、乳糖、柠檬酸钠、碳酸钙、二碱式磷酸钙和甘氨酸,崩解剂例如淀粉(优选玉米、马铃薯或木薯淀粉)、羟乙酸淀粉钠、交联羧甲基纤维素钠和某些复合硅酸盐,以及制粒粘合剂例如聚乙烯吡咯烷酮、羟丙甲基纤维素(HPMC)、羟丙基纤维素(HPC)、蔗糖、明胶和阿拉伯胶。

[0757] 另外,可以包括润滑剂例如硬脂酸镁、硬脂酸、山嵛酸甘油酯和滑石。

[0758] 组合物可以口服施用,以速释或控制的片剂、微粒、微型片剂、胶囊、囊剂(sachets)、以及口服溶液或混悬液、或用于其制备的粉末的形式。口服制剂可以任选地包括各种标准的制药载体和赋形剂,例如粘合剂、填充剂、缓冲剂、润滑剂、助流剂、染料、崩解剂、香味剂、甜味剂、表面活性剂、脱模剂、防粘合剂和包衣。一些赋形剂在组合物中可以具有多种作用,例如同时起粘合剂和崩解剂的作用。

[0759] 可用于本发明的口服组合物的药学上可接受的崩解剂的实例包括但不限于淀粉、预胶化淀粉、羟乙酸淀粉钠、羧甲基纤维素钠、交联羧甲基纤维素钠、微晶纤维素、藻酸盐、树脂、表面活性剂、泡腾组合物、水性硅酸铝和交联聚乙烯吡咯烷酮。

[0760] 本文可用的口服组合物的药学上可接受的粘合剂的实例包括但不限于阿拉伯胶;纤维素衍生物,例如甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟丙甲基纤维素、羟丙基纤维素、或羟乙基纤维素;明胶、葡萄糖、右旋糖、木糖醇、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯吡咯烷酮、山梨醇、淀粉、预胶化淀粉、黄蓍胶、黄嘌呤树脂、藻酸盐、硅酸镁铝、聚乙二醇或膨润土。

[0761] 口服组合物的药学上可接受的填充剂的实例包括但不限于乳糖、脱水乳糖、一水合乳糖、蔗糖、右旋糖、甘露醇、山梨醇、淀粉、纤维素(特别是微晶纤维素)、磷酸二氢钙或无水磷酸钙(anhydro-calcium phosphate)、碳酸钙和硫酸钙。

[0762] 可用于本发明的组合物的药学上可接受的润滑剂的实例包括但不限于硬脂酸镁、滑石、聚乙二醇、氧化乙烯的聚合物、月桂基硫酸钠、月桂基硫酸镁、油酸钠、硬脂酰富马酸钠、和胶体二氧化硅。

[0763] 口服组合物的合适的药学上可接受的香味剂的实例包括但不限于合成香料和天然芳香油例如油、花、果(例如香蕉、苹果、酸樱桃、桃)以及其组合的提取物,以及类似的香料。它们的使用取决于很多因素,最重要的是将要服用该药物组合物的群体的感官可接受性。

[0764] 口服组合物的合适的药学上可接受的染料的实例包括但不限于合成和天然染料例如二氧化钛、 β -胡萝卜素和葡萄柚皮提取物。

[0765] 口服组合物的通常用于促进吞咽、改变释放性质、改善外观且/或掩盖组合物的味道的有用的药学上可接受的包衣的实例包括但不限于羟丙甲基纤维素、羟丙基纤维素和丙烯酸酯-甲基丙烯酸酯共聚物。

[0766] 口服组合物的药学上可接受的甜味剂的合适实例包括但不限于阿司帕坦、糖精、糖精钠、甜蜜素、木糖醇、甘露醇、山梨醇、乳糖和蔗糖。

[0767] 药学上可接受的缓冲剂的合适实例包括但不限于柠檬酸、柠檬酸钠、碳酸氢钠、二碱式磷酸钠、氧化镁、碳酸钙和氢氧化镁。

[0768] 药学上可接受的表面活性剂的合适实例包括但不限于月桂基硫酸钠和聚山梨醇酯。

[0769] 相似类型的固体组合物还可用作明胶胶囊中的填充剂。鉴于此,优选的赋形剂包括乳糖、淀粉、纤维素、奶糖或高分子量聚乙二醇。对于水性混悬液和/或酞剂,试剂可以与各种甜味剂或调味剂、着色物质或染料,与乳化剂和/或助悬剂,且与稀释剂例如水、乙醇、聚乙二醇和甘油,及其组合进行组合。

[0770] 如所示,本发明的化合物可以经鼻内或通过吸入进行施用,且以干粉吸入剂或气雾喷雾剂形式从加压容器、泵、喷雾或雾化器使用合适的抛射剂例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、氢氟烷烃例如1,1,1,2-四氟乙烷(HFA134AT)或1,1,1,2,3,3,3-七氟丙烷(HFA227EA)、二氧化碳或其它合适的气体进行便利的输送。在加压气雾剂的情况下,剂量单位可以通过设置筏来确定以输送计量的量。加压容器、泵、喷雾或雾化器可以含有活性化合物的溶液或混悬液,例如使用乙醇和抛射剂的混合物作为溶剂,其可额外含有润滑剂例如脱水山梨糖醇三油酸酯。

[0771] 用于吸入剂或吹入剂的胶囊和药筒(例如,由明胶制成)可以配制为含有化合物和合适粉末基底例如乳糖或淀粉的粉末混合物。

[0772] 对于通过吸入进行的局部施用,可以经雾化器输送用于人或兽药的本发明化合物。

[0773] 本发明的药物组合物可以含有0.01~99%wt/v活性材料。对于局部施用,例如,组合物通常含有0.01-10%、更优选0.01-1%的活性材料。

[0774] 化合物还可以以脂质体输送体系的形式进行施用,例如小单层囊泡、大单层囊泡和多层囊泡。脂质体可以由多种磷脂例如胆固醇、硬脂酰胺或卵磷脂形成。

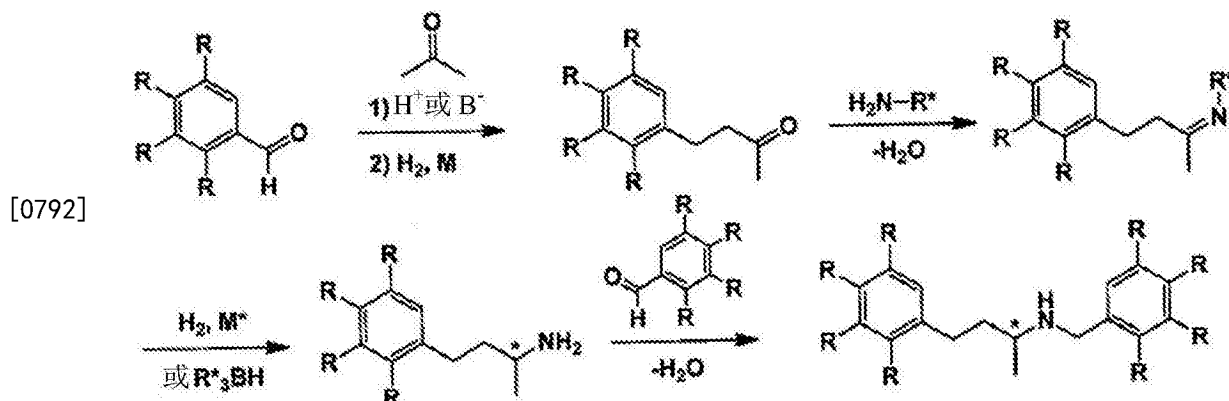
[0775] 本发明的药物组合物或单位剂型可以根据通过鉴于以上指导而进行的常规测试所限定的剂量和施用方案来进行施用,以便获得最佳活性,同时使对于具体患者的毒性或副作用最小化。然而,治疗方案的这样的微调鉴于本文所给出的指导是常规的。

[0776] 本发明的化合物剂量可以根据多种因素变化,例如潜在的疾病状态,个体的状态、体重、性别和年龄,以及施用模式。用于治疗病症的有效量可以通过本领域普通技术人员已知的经验方法来容易地确定,例如通过建立剂量和施用频率的矩阵并比较矩阵中各点处的一组实验单元或受试者。施用于患者的精确量会根据病症的状态和严重程度以及患者的身体状态而变化。任何症状或参数的可测量的改善可以通过本领域技术人员确定或通过患者向医师报告。应理解,尿道病症的任何症状或参数的任何临床或统计学显著的减轻或改善都在本发明的范围内。临床显著的减轻或改善是指对于患者和/或医师可感知。

[0777] 待施用的化合物的量的范围可以为约0.01~25mg/kg/天,通常约0.1~10mg/kg/天,且最通常约0.2~5mg/kg/天。应理解,本发明的药物制剂并不必然需要含有可有效治疗病症的全部量的化合物,因为这样的有效量可以通过施用多个分开剂量的这样的药物制剂来达到。

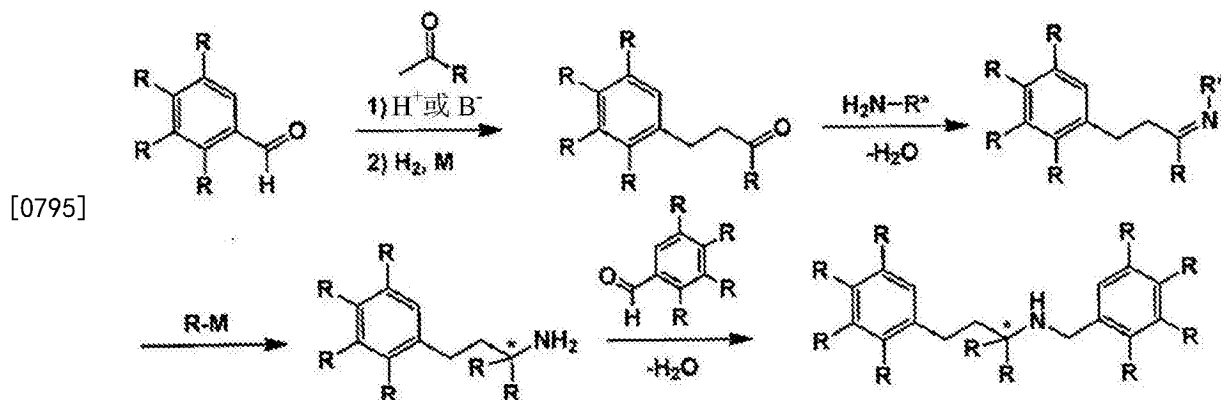
[0778] 在本发明的优选实施方式中,化合物I配制成胶囊或片剂,通常含有10~200mg本发明的化合物,且优选以10~300mg、优选20~150mg且最优选约50mg的全天剂量施用于患

[0791] 在一些实施方式中,不对称地进行合成,以便产生一个类似物的基本上纯的或纯的对映异构体。在一些实施方式中,本文所述化合物的不对称合成根据方案2(*表示手性中心)制备:



[0793] 方案2

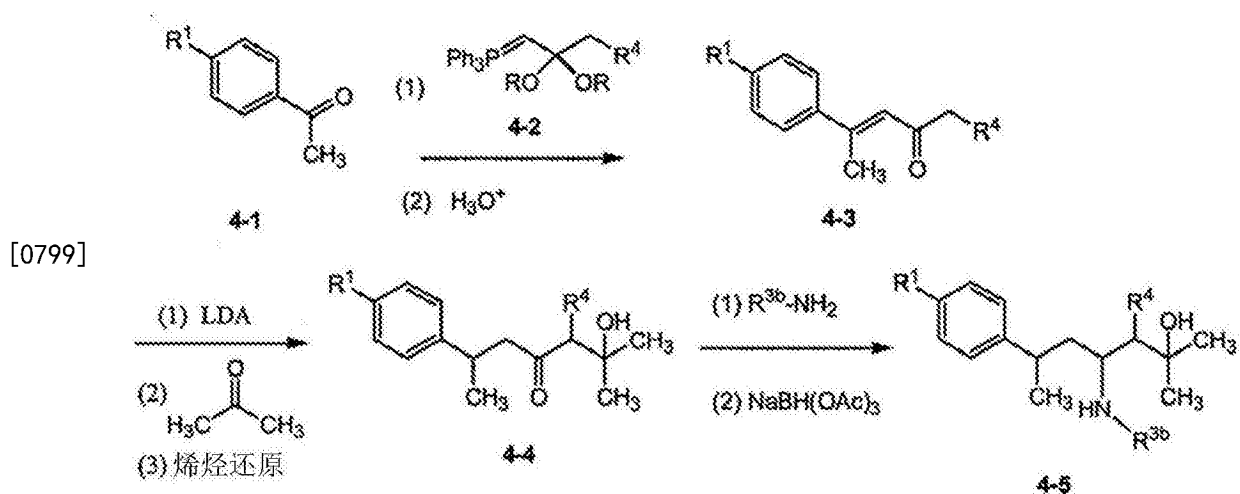
[0794] 在一些实施方式中,本文所述的化合物的不对称合成根据方案3(*表示手性中心)制备:



[0796] 方案3

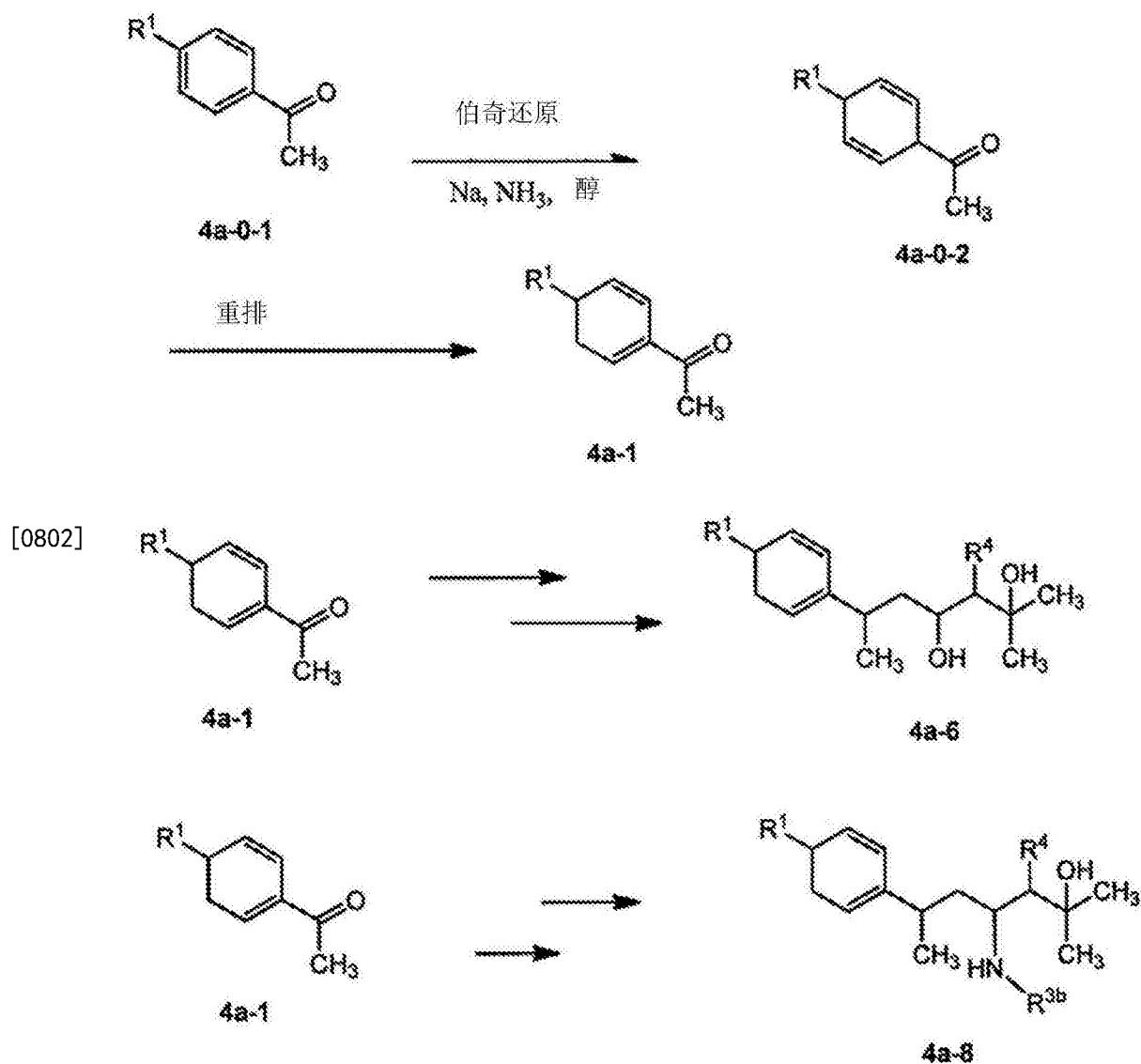
[0797] 合成方案可以根据所需的终产物而改变。“R”基团是例示性的且可以被本文所述的任何取代基取代。

[0798] 以下是用于制备式IX的化合物的一般方法。如方案4所示,酮4-1可以与维蒂希试剂例如4-2反应,之后水解(例如在酸性条件下),得到酮4-3。使用试剂例如LDA,酮4-3的烯醇化物与丙酮缩合,后接烯烃的共轭还原,以形成酮4-4。在合适的氢化物例如硼氢化钠的存在下,酮4-5与合适的胺 $R^{3b}NH_2$ 的还原胺化可以得到胺4-6。胺4-6的不同非对映异构体可以通过本领域技术人员已知的方法例如柱层析而分离。



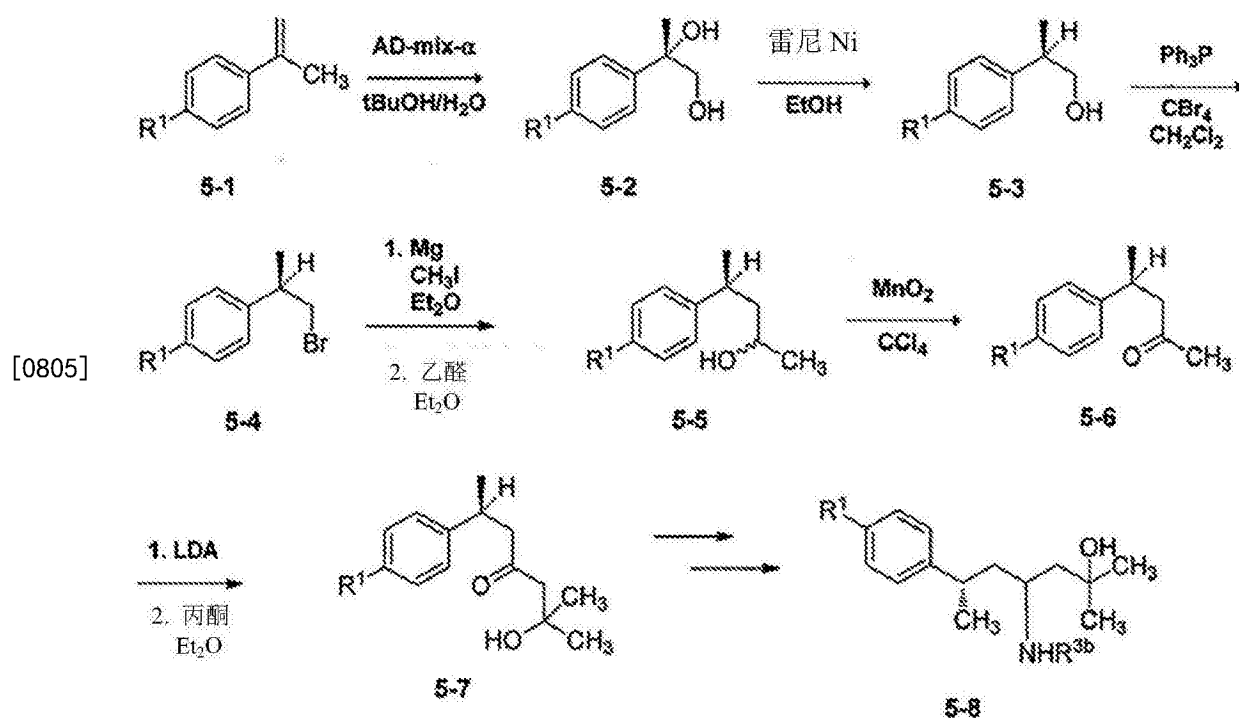
[0800] 方案4

[0801] 如方案4a所示,芳族化合物4a-0-1可以在伯奇还原条件下还原为环己-1,4-二烯4a-02。参见例如Rabideau, P.W., "The metal-ammonia reduction of aromatic compounds", Tetrahedron, 第45卷, 第6期, 1989, 第1579-1603页。在酸性条件下(例如在催化量的HCl或乙酸的存在下),环己-1,4-二烯4a-02可以重排为在热力学上更稳定的环己-1,3-二烯4a-1。环己-1,3-二烯4a-1可以根据与方案4中所述相似的方法转化为醇4a-6或胺4a-8。



[0803] 方案4a

[0804] 如方案5所示,用AD-mix- α 处理苯乙烯衍生物5-1(参见,例如Sharpless,K.B.;Amberg,W.;Bennani,Y.L.;Crispino,G.A.;等人J.Org.Chem.1992,57,2771)得到二醇5-2。参见A.Li等人"Total asymmetric synthesis of (7S,9R)-(+)-bisacumol",Tetrahedron:Asymmetry (2003),14(1),75-78。用雷尼镍使二醇5-2的苯OH立体选择性还原,得到醇5-3。参见,同上。5-2的两种异构体均可以基于Sharpless催化剂的选择而获得。用合适溶剂例如二氯甲烷中的PPh₃和CBr₄处理醇5-3,得到溴化物5-4。在镁粉末和CH₃I的存在下将溴化物5-4转化为相应的格氏试剂(通过金属-卤素交换),后接与乙醛的反应,得到醇5-5。醇5-5的不同非对应异构体可以通过本领域技术人员已知的方法例如柱层析而分离。参见,同上。醇5-5可以使用与方案4概述相似的方法而转化为其相应的氨化合物5-6。胺化合物5-8的异构体可以通过立体选择性亚胺还原而得到。

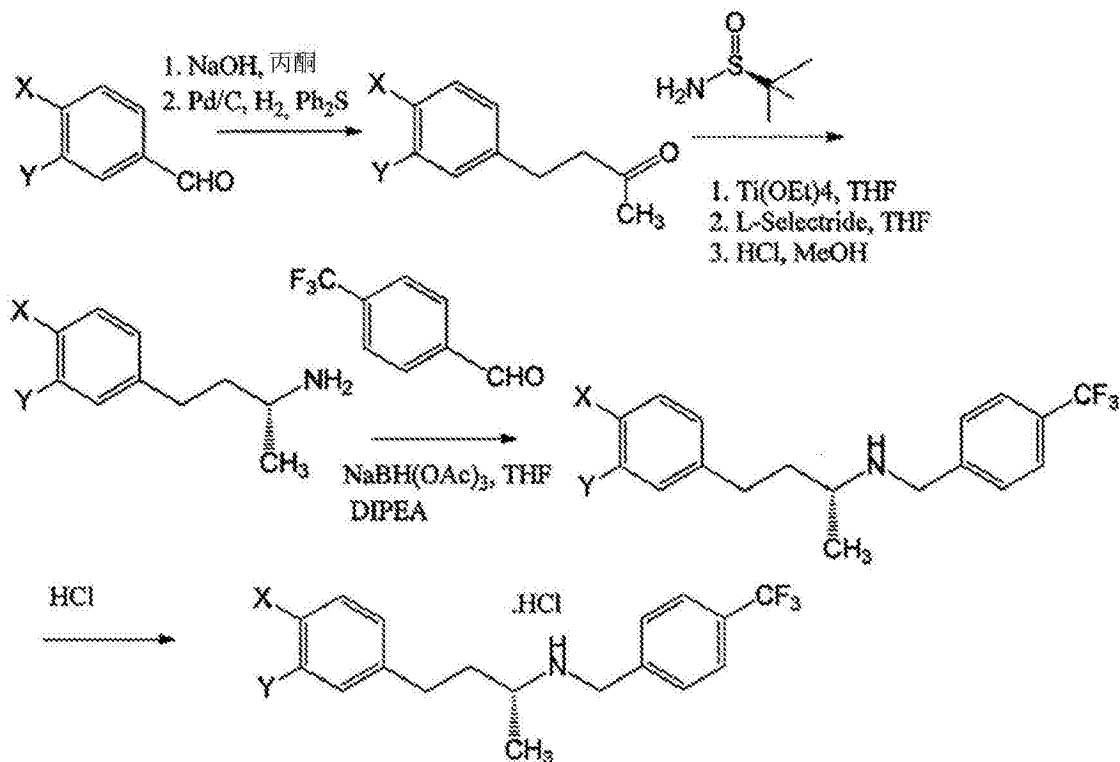


[0806] 方案5

[0807] 本领域技术人员可以识别出,在本文记载的所有方案中,如果在取代基例如R¹、R²、R³和R⁴等上存在官能(反应)团,若合适和/或需要,可以做出进一步的修饰。例如,OH基团可以转化为更好的离去基团例如甲磺酸根,其进而适用于亲核取代,例如通过Br。因此,具有含官能团的取代基的式I化合物(例如方案4的化合物4~8)可以转化为式I的具有不同取代基的另一化合物。

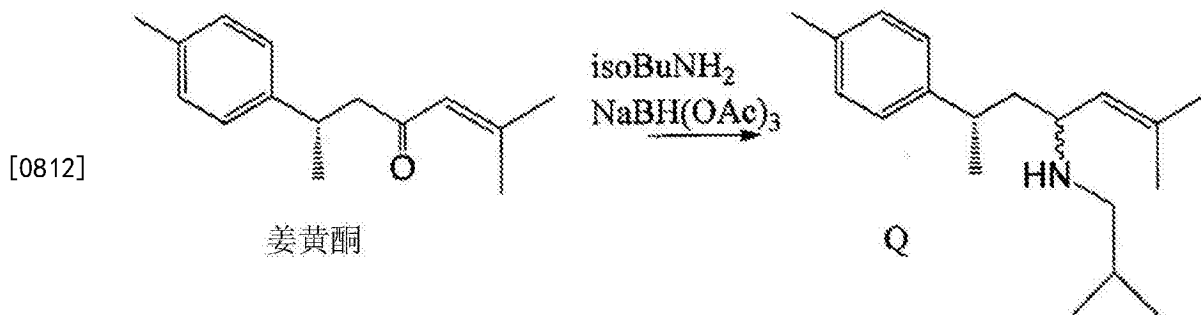
[0808] 在一些实施方式中,式I~VI的某些化合物例如通过方案6中所示的对映选择性路线进行制备。

[0809]



[0810] 方案6. 式I~VI的化合物的对映选择性合成

[0811] 在一些实施方式中, σ -2拮抗剂是式VIIIa的化合物。各个式VIII的某些化合物可以通过相应酮中间体的还原胺化来制备, 例如通过方案7所示的代表性路线。



[0812]

[0813] 方案7

[0814] 工作例和合成例

[0815] 实施例1和2描述可以用于例如本文所述实验的Abeta寡聚体制剂。用在膜运输和寡聚体结合/突触减少检定中的特定制剂以及用在以下所述体内检定中的特定制剂各自在其所属的实施例中描述。

[0816] 实施例1: 制备 β 淀粉样蛋白寡聚体

[0817] 重新创建 β 淀粉样蛋白可以在神经组织中寡聚的条件, 即其可以缔合的水性可溶蛋白的环境, 从而识别 β 淀粉样蛋白寡聚体和原纤维的更多的疾病相关的结构状态。通过超速离心由大鼠脑制备水性可溶蛋白。具体而言, 将每克脑组织5体积的TBS缓冲液 (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 34mM NaCl和完整蛋白酶抑制剂混合物 (cocktail) (Santa Cruz)) 添加至冰上的大鼠脑组织。之后用紧定杵进行杜恩斯匀浆。之后将匀浆后的脑组织在4℃以150,

000x g离心1小时(40,000rpm Ty65)。之后除去次层清液(infranatant,在漂浮的髓磷脂与丸粒(pellet)之上半cm之间)并将等份在-75℃冰冻。之后将丸粒再悬于TBS中至原始体积,并以等份冷冻于-75℃。将合成的单体人β淀粉样蛋白1~42添加到该混合物以提供终浓度为1.5μM的β淀粉样蛋白,并将溶液在4℃孵育24小时。混合物以5,800g离心10分钟,以移除原纤维组装然后使用6E10结合的琼脂离心柱(Pierce Chemical Company)在4℃进行24小时免疫沉淀。之后将洗脱的β淀粉样蛋白寡聚体进行MALDI-Tof质谱分析,以识别样品的内容物,图1。

[0818] β淀粉样蛋白在含有蛋白的溶液中自缔合,以形成22,599Da的5亚基五聚体以及31,950Da的7亚基7聚体的亚基组装。49,291Da处的另一个峰可能表示12亚基的12聚体,尽管这不是β淀粉样蛋白12聚体的精确分子量。值得注意的是,在表示β淀粉样蛋白单体和二聚体的4518Da或9036Da处均没有观察到峰。然而,9,882Da和14,731Da处的峰可分别表示与786Da(或2x 393Da)脂质或蛋白缔合的β淀粉样蛋白二聚体以及与3x 393Da脂质或蛋白缔合的β淀粉样蛋白三聚体。此外,19,686Da处峰的存在表明可能涉及三聚体复合物和4954Da大鼠β淀粉样蛋白片段的组装状态。因此,这些数据可以反映出较小的脂质或蛋白与β淀粉样蛋白的二聚体和三聚体的缔合,这可以指引生理系统独特的构象状态的组装。

[0819] 实施例2:制备β淀粉样蛋白寡聚体

[0820] 将1.5μM单体人β淀粉样蛋白1-42于大鼠脑可溶蛋白的混合物中的溶液如实施例1所述在4℃孵育24小时。之后用三氟乙醇(TFE)在进行光谱前处理该溶液。在TFE中,组装的蛋白结构和非共价结合的蛋白复合物解离成变性蛋白,且预期与组装的寡聚体相关的峰消失。大多数在实施例1中观察到的蛋白峰消失,包括以上识别的9822Da、14,731Da、31,950Da和49,291Da峰。然而,在4518Da处观察到高丰度峰,其表示β淀粉样蛋白单体峰。4954.7处的峰很明显,其可表示与β淀粉样蛋白1-46相似的较长Aβ片段。在7086Da处观察到额外的峰,其在实施例1所述的制剂中不存在,可能表示与2550Da共价结合的蛋白缔合的β淀粉样蛋白单体。

[0821] 实施例3:从人AD脑组织中分离β淀粉样蛋白寡聚体

[0822] TBS可溶提取物:经组织病理学分析特征为Braak Stage V/VI阿尔茨海默病(AD)的人患者的死后脑组织的样品得自医院脑组织库。年龄和性别匹配的AD和正常组织样本在含有1mM EDTA和1mg/ml完整蛋白酶抑制剂混合物(Sigma P8340)的20mM Tris-HCl、137mM NaCl,pH7.6中稀释为0.15gm组织/ml并进行匀浆。在Beckman Optima XL-80K超速离心机中以105,000g对组织匀浆进行超速离心1小时。将所得的TBS可溶部分使用蛋白-A和蛋白-G琼脂糖柱(Pierce Chemical)免疫耗竭,然后用Amicon Ultra 3、10&100kDa NMWCO过滤器(Millipore Corporation)进行尺寸分级。

[0823] 免疫沉淀:将尺寸分级且免疫耗竭的TBS可溶提取物在合适的NMWCO Amicon Ultra过滤器中浓缩到约200ul。将浓缩的TBS可溶提取物用TBS样品缓冲液(Pierce Chemical)稀释到400ul,并以5,800g离心10分钟以移除原纤维。然后将所得的上清液用6E10-结合的琼脂糖小球在4℃免疫沉淀过夜,随后使用高渗强度Gentle洗脱缓冲液(Pierce Chemical)进行抗原洗脱以分离含有Aβ的蛋白种类。

[0824] MALDI-质谱:使用Applied Biosystems(ABI) Voyager DE-Pro MALDI-Tof仪器对免疫分离的β淀粉样蛋白进行质谱分析。根据分析的目标分子量范围,使用多种基质类型例

如 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)、芥子酸(SA)或6-氮杂-2-硫代胸腺嘧啶(ATT)来分析样品。仪器以线性正离子模式以及可变提取延迟来运行。非累积谱表示每次获取100次“热点”击中,而累积谱由每次获取200次激光击中的各个点的12个单独区域表示。

[0825] 数据分析:使用Voyager's Data Explorer软件包来进行数据获取和分析。质谱的标准处理除信噪比的变化之外还包括光谱的平滑和基线扣减功能。

[0826] 用于Ab定量的ELISA:使用改良的夹心ELISA技术对免疫沉淀的TBS可溶部分分析“总”Abeta和Abeta寡聚体浓度。简单来说,将6E10和4G8涂覆的Nunc MaxiSorp 96孔板用含有Abeta的样品进行孵育,然后用生物素化的4G8检测抗体进行探测。与链霉亲和素-HRP (Rockland)的孵育以及之后的四甲基联苯胺(TMB)底物的显色使得可以在BioTEk Synergy HT酶标仪上对Abeta进行比色检测(OD450)。使用单体Abeta 1-42来产生标准曲线,并且连同GEN 5软件一起使得可以对免疫沉淀的样品中的Abeta水平进行定量。

[0827] 实施例4A:受体结合检定

[0828] 化合物II与数种受体通过阻断其激动剂或拮抗剂的结合或作用而相互作用。测试化合物II以观察其是否与已知的细胞受体或信号传导蛋白直接相互作用。测试化合物II (10 μ M)对给定人受体的已知激动剂或拮抗剂的结合的替代能力,该人受体在细胞系中过表达或从组织中分离。还测试其阻断由给定人受体的激动剂或拮抗剂所诱导的下游信号传导的能力。测试化合物II在100个已知受体处的作用,并且化合物II仅在5个这些受体处显示出活性>50% (检定窗) (表1E)。这表明化合物II仅在小子集CNS相关的受体处具有高度特异性和活性。其以最高亲和性结合 σ -2受体,因此是 σ -2配体。

[0829] 表1E. 化合物II (10 μ M)对已知受体结合的抑制

[0830]

化合物 II (10 μ M) 对已知受体结合的抑制	%对照抑制	SEM%对照
σ -2 (激动剂放射性配体)	89	0.6
Mu (MOP) (h) (激动剂放射性配体)	60	1.4
Na ⁺ 通道 (位点 2) (拮抗剂放射性配体)	54	4.7
D3 (h) (激动剂作用)	66	4.0
α 1A (h) (拮抗剂作用)	56	1.1

[0831] 使用相同的方案,测试膜运输数据已经在表5 (以下)中给出的化合物对 σ -2受体的识别。结果证实,与化合物II结构相似的这些化合物为 σ -2受体配体,即优选与 σ -2受体结合。最后,与化合物IXa和IXb相似的化合物,例如式VIII和IX的化合物也是 σ -2受体配体。

[0832] 竞争性放射性配体结合检定

[0833] 通过商业合同研究组织进行 σ -1受体和 σ -2受体的放射性配体结合检定。对于 σ -1结合,使用从100 μ M至1nM的各个浓度的测试化合物,在Jurkat细胞膜上替代内源受体的8nM [³H] (+) 戊唑辛 (Ganapathy ME等人1991, J Pharmacol. Exp. Ther. 289:251-260)。使用10 μ M的氟哌啶醇来定义非特异性结合。对于 σ -2受体,在存在300nM (+) 戊唑辛掩盖 σ -1受体的情

况下,使用从100 μ M至1nM的各个浓度的测试化合物,在大鼠大脑皮质的膜上替代内源受体的5nM[³H]1,3-二-(2-甲苯基)胍。(Bowen WD等人,1993,Mol.Neuropharmacol 3:117-126)。使用10 μ M的氟哌啶醇来定义非特异性结合。使用Brandel 12R细胞收集器经由Whatman GF/C过滤器通过快速过滤来终止反应,之后用冰冷缓冲液进行两次洗涤。干燥过滤盘上的放射性使用液体闪烁分析仪(Tri-Carb 2900TR;PerkinElmer Life and Analytical Sciences)来测量。绘制替代曲线,并使用GraphPad Prism(GraphPad Software Inc.,San Diego,CA)来确定测试配体对受体亚型的K_i值。特异性结合的百分比通过将总结合(每分钟衰变)与非特异性结合(每分钟衰变)之间的差值除以总结合(每分钟衰变)而确定。

[0834] 对于已知的现有技术化合物,对于 σ -1和 σ -2受体的亲和性得自己公开的研究,已公开的研究使用脑组织匀浆,用[³H](+)戊唑辛测量来自 σ -1受体的替代且在300nM(+)戊唑辛的存在下用[³H]1,3-二-(2-甲苯基)胍来测量来自 σ -2受体的替代。结果显示在表2中。

[0835] 表2. σ -2和 σ -1受体亲和性。

[0836]

化合物	σ -1 结合 Ki (nM)	σ -2 结合 Ki (nM)
II (三个不同批次: 外消旋混合物、(+) 异构体和 (-) 异构体)	500	9
	100	52
	46	63
化合物 A	47	16
化合物 B	47	16
化合物 E	1890 (对 σ -1 受体基本上没有亲和性)	16
化合物 P	320	110
化合物 R'	26	27
化合物 S'	31	27
化合物 IXa	89	21
化合物 IXb	190	23
化合物 W	270	120
化合物 AC	23	240
化合物 AE	16	35
化合物 AF	8	110

[0837]

化合物	σ -1 结合 Ki (nM)	σ -2 结合 Ki (nM)
化合物 AH	23	50
化合物 AI	250	130
化合物 AL	3100	690
化合物 AX	620	440
化合物 AY	5	23
化合物 AZ	34	340
化合物 BB	0.72	5.2
化合物 BC	4.2	13
化合物 BD	2.1	19
化合物 BE	7.4	14
化合物 BH	4	7.4
化合物 BJ	6.2	25
化合物 BP	53	8.9
化合物 BT	1	4
化合物 CB	19	48
化合物 CC	12	3.9
化合物 CD	56	2.7
化合物 CE	33	2.2

[0838]

化合物	σ -1 结合 Ki (nM)	σ -2 结合 Ki (nM)
化合物 CF	180	50
化合物 CG	360	3200
化合物 CJ	44	810
化合物 CL	190	5,000
化合物 CO	130	7,200
化合物 CR	3.5	16
化合物 CS	78	85
化合物 DH	23	8.3
化合物 DR	330	3,200
其他化合物	σ -1 结合 Ki (nM) (活性类型)	σ -2 结合 Ki (nM)
BD1047	0.9 (拮抗剂)	47
DTG	88 (激动剂)	35
氟哌啶醇	5 (拮抗剂)	110
艾芬地尔	26	4.9
Mach-14	12,900	8
NE 100	1.1 (拮抗剂)	170

[0839]

化合物	σ -1 结合 K_i (nM)	σ -2 结合 K_i (nM)
PB 28	15	0.8
PRE-84	2.2 (激动剂)	13,091
SM-21	1050 (拮抗剂)	145
苏-艾芬地尔	59	0.9 (激动剂) *
舍曲林	8.6 (拮抗剂)	170
PPBP	0.8 (激动剂)	1
BD1008	2.2 (拮抗剂)	8
氟伏沙明	13 (激动剂)	710
BD1063	8.8 (拮抗剂)	625
SFK10047	597 (激动剂)	39,740
西拉美新	19	0.19 (激动剂)

[0840] *Monassier等人, JPET, 322 (1) :341-350, 2007。

[0841] 竞争性放射性配体结合检定2

[0842] 候选 σ -2配体化合物在 σ -1和 σ -2受体处的亲和性还通过对不同的已知的标记 σ -2或 σ -1配体的替代而确定。过滤检定根据之前公开的步骤(Xu等人, 2005)进行。测试化合物溶解在N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基亚砜(DMSO)或乙醇中,之后在含有150mM NaCl和100mM EDTA的50mM Tris-HCl pH7.4缓冲液中稀释。由豚鼠脑制备用于 σ -1结合检定的膜匀浆且由大鼠肝脏制备用于 σ -2结合检定的膜匀浆。膜匀浆用50mM Tris-HCl缓冲液pH8.0稀释,并在具有浓度为0.1nM~10uM的放射性配体和测试化合物的96孔板中以总体积150uL于25℃孵育。在完成孵育后,使用96通道移液器(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)通过添加150uL的冰冷洗涤缓冲液(10mM Tris HCl, 150mM NaCl, pH 7.4)来终止反应,收集样品并通过经100uL的50mM Tris-HCl缓冲液预浸的96孔纤维玻璃滤板(Millipore, Billerica, MA)进行快速过滤。各个过滤器用200uL冰冷洗涤缓冲液(10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.4)洗涤4次。使用Wallac 1450MicroBeta液体闪烁计数器(Perkin Elmer, Boston, MA)对结合放射活性进行定量。

[0843] 使用豚鼠脑膜匀浆(~300ug蛋白)和~5nM [3 H] (+)-戊唑辛(34.9Ci/mmol, Perkin Elmer, Boston, MA)来进行 σ -1受体结合检定,室温下孵育时间为90min。由含有10uM的冷氟哌啶醇的样品确定非特异性结合。

[0844] 使用大鼠肝脏膜匀浆(~300ug蛋白)和仅~2nM σ -2高度选择性放射性配体 [3 H] RHM-1 (没有其他阻断物) (America Radiolabeled Chemicals Inc. St. Louis, MO)、~10nM [3 H] DTG (58.1Ci/mmol, Perkin Elmer, Boston, MA) 或~10nM [3 H] 氟哌啶醇 (America Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, MO) 在1uM阻断 σ -1位点的 (+)-戊唑辛的存在下进行 σ -2受体结合检定,室温下孵育时间对于 [3 H] RHM-1为6分钟,对于 [3 H] DTG和 [3 H] 氟哌啶醇

为120分钟。由含有10uM的冷氟哌啶醇的样品确定非特异性结合。

[0845] 使用非线性回归分析来对竞争性抑制实验中的数据进行建模,以确定抑制50%放射性配体的特异性结合的抑制剂浓度(IC₅₀值)。使用Cheng和Prusoff的方法来计算结合亲和性K_i值。豚鼠脑中用于[³H] (+)-戊唑辛的K_d值为7.89nM,大鼠肝脏中用于[³H] RHM-1和[³H] DTG的K_d值分别为0.66nM和30.73nM。标准化合物氟哌啶醇用于质量保证。化合物IXa、IXb和化合物II在σ-1和σ-2受体处的亲和性数据显示在表3中。因此,可以采用领域内已知的任何σ-2受体结合检定来确定候选化合物的K_i或IC₅₀。

[0846] 表3. 竞争性放射性配体结合检定2中候选σ-2配体的σ-2和σ-1受体亲和性。

[0847]

编号	化合物	σ-1 (K _i , nM) ±平均 SEM	σ-2 (K _i , nM) ±平均 SEM
1	IXa、IXb	6.37±0.81	30.8±2.3
2	II	108.1±19.9	59.7±10.4

[0848] 实施例4B. 受体抗体介导的寡聚体与受体结合的降低

[0849] 如本文所述,近来孕酮受体膜成分1 (PGRMC1) 被Xu等人2011识别为σ-2受体活性的关键25kDa成分。具体而言,通过使用光亲和性探针WC-21在大鼠肝脏中识别出PGRMC1,该光亲和性探针WC-21可逆地标记大鼠肝脏中的σ-2受体。Xu等人, Identification of the PGRMC1 protein complex as the putative sigma-2receptor binding site. Nature Communications 2, article number 380, July 5, 2011, 其并入本文以供参考。因此,在这些实验中采用对人PGRMC1的多种C端或N端氨基酸序列特异的单克隆抗体。

[0850] 使用以下一般检定程序来测试受体抗体影响Abeta寡聚体结合的能力。阳性对照: 6E10抗体 (Covance) (识别所有Abeta种类的N端,且将通过在溶液中的受体结合前与寡聚体的高亲和性结合而降低Abeta与神经元的结合)。准备培养液中的神经元以用于膜运输检定。阴性对照: 非免疫IgG。方法:

[0851] 1. 抽吸板至10uL体积

[0852] 2. 添加30uL指定浓度的受体单克隆抗体 (mAb)、6E10或非免疫IgG, 37℃ 30分钟

[0853] 3. 添加10uL指定浓度的Abeta寡聚体; 37℃ 孵育1小时

[0854] 4. 固定,并用PBS洗涤板3次

[0855] 5. 使用封闭化合物 (1L PBS, 50mL 正常山羊血清, 50mL 10% TritonX) 封闭板1小时

[0856] 6. 抽吸板至10uL

[0857] 7. 添加25uL 检测一抗4G8和MAP2; 密封并冷藏过夜。

[0858] 8. 用封闭化合物洗涤板3次 (抽吸至10uL, 用60uL 封闭液洗涤)

[0859] 9. 添加25uL的二抗 (Alexa fluor 647 山羊抗小鼠、Alexa flour 488 山羊抗兔、Alexa fluor 646 山羊抗鸡); 室温下静置1小时。

[0860] 10. 抽吸板至10uL, 用60uL PBS洗涤, 抽吸板至10uL, 添加60uL Dapi, 抽吸板至10uL, 用60uL PBS洗涤。

[0861] 11. 用铝密封物覆盖

[0862] 12. 用专门的Cellomics Arrayscan方案来扫描并分析图像。

[0863] 特异性抗体阻断实验

[0864] 在这些实验中采用识别与人PGRMC1 (#EB07207, Everest Biosciences) 的C端氨基酸185~195相应的合成肽C-EPKDESARKND (SEQ ID NO:7) 或人PGRMC1蛋白N端残基1~46 (MAAEDVVATGADPSDLESGLLHEIFTSPNLNLLLGLCIFLLYKI (SEQ ID NO:9), #sc-98680, Santa Cruz) 或非免疫对照IgG的抗体。将各个抗体以38nM (5x)、58nM (7.5x) 或77nM (10x) 最终检定浓度应用于神经元30分钟。

[0865] 之后以500nM总Abeta浓度添加Abeta 1~42寡聚体并使其与神经元再结合15分钟。之后固定培养物并使用6E抗体来对结合的Abeta种类进行免疫标记。以特征性点状模式与突触后膜结合的寡聚体通过自动图像处理进行定量。经MAP2免疫标记而识别出神经元。对于神经元健康状况的定量测量例如平均核面积通过图像处理进行定量, 且结果显示在图13A至13H中。

[0866] 与对照Abeta (图13A) 相比, 用C端抗体 (图13C) 而非N端抗体 (图13G) 或非免疫IgG (图13E) 孵育的神经元与Abeta寡聚体的结合强度呈剂量依赖的降低。该强度降低看似由寡聚体阳性点的数目和面积降低组成。该寡聚体结合强度的降低是由于寡聚体与抗体之间对结合表位的竞争还是由于抗体介导的表面PGRMC1蛋白表达的降低是未知的。在一些实施方式中, 阻断可溶Abeta寡聚体与 σ -2受体之间的结合的 σ -2受体抗体和PGRMC1抗体被认为是 σ -2受体拮抗剂化合物。

[0867] 实施例5: 转基因小鼠的记忆丧失: Morris游泳测试

[0868] 测试化合物II以确定其是否能够逆转较老的阿尔茨海默病转基因小鼠模型 (其中寡聚体随年龄增加) 中见到的记忆丧失。对于该研究, 选择在鼠科Thy-1启动子控制下表达人APP751瑞典 (670/671) 和伦敦 (717) 突变的hAPP小鼠。这些小鼠的Abeta量表现出年龄依赖性增加, 斑块在3~6个月开始形成, 并在8个月年龄时表现出建立的认知缺陷。在该研究中, 治疗已经建立的缺陷, 而非防止缺陷发生。这些研究按照不知道实验条件的科学家的服务合同而进行。在8个月大的雌性小鼠中经皮下微型泵将化合物以0.5和0.1mg/kg/天输注一个月, 并且在Morris水迷宫 (一种基于海马的空间学习和记忆的测试) 中测试认知表现。该小鼠模型不表现神经元丧失, 因此记忆的恢复不能归因于凋亡的避免。

[0869] 将游泳速度作为Morris测量的一部分进行分析, 以确定是否存在任何的运动或动机缺陷。媒介物是5%DMSO/5% Solutol、90% 盐水混合物。用低剂量 (0.1mg/kg/天) 和高剂量 (0.5mg/kg/天) 的化合物II处理转基因动物。确定连续四天中的每天三次试验的平均值。可检测没有显著的运动缺陷或任何种类的异常行为, 且在研究的过程中仅损失了一只转基因媒介物组的动物, 低于在该年龄的预期死亡数。另外, 保留了周期性抽血的啮齿动物组, 以监测化合物的血浆水平, 且这些显示出初步PK研究中所见的血浆水平非常小的改变。

[0870] 进行Morris水迷宫测试中的逃跑潜伏期测量。在测试的第二天, 观察到野生型和转基因动物之间的显著差异, 野生型学得比转基因型更快。在这一天, 还观察到转基因表现的较高化合物剂量相对于媒介物的显著改善。因此, 结论为, 以0.5mg/kg/天施用的化合物II能够改善AD转基因模型中的认知表现。

[0871] Abeta 42寡聚体引起突触数目降低18%; 100%的该类损失由化合物II及其对映异构体消除。与化合物II相似, 一些其他 σ -2受体拮抗剂也阻断突触损失。已知的现有技术 σ -2受体配体NE-100和氟哌啶醇完全消除突触损失, 而选择性 σ -1配体SM-21在消除突触损

失中仅有较弱活性(20%恢复)。

[0872] 还使用相似的检定测试化合物IXa和IXb的混合物。化合物IXa和IXb的混合物(1mg/kg/天,N=8或10mg/kg/天,N=8)或媒介物(5%DMSO/5%Solutol/90%盐水,N=15)经皮下给药(Alzet微型泵)向9个月大的雄性hAPPSL转基因小鼠(N=8)或非转基因同窝仔(N=6)全身性施用20天并在Morris水迷宫中评价这些小鼠的空间学习和记忆。在处理的最后4天中,以3次试验/天测试小鼠以寻找隐藏的平台。计算机化的追踪系统自动定量逃跑潜伏期或游泳长度。

[0873] 在测试的任何一天,转基因动物相对于非转基因动物的表现均没有显著差异(分析限于这两组;重复测量的双因素(基因型和时间)ANOVA,后接Bonferroni事后比较测试)。限于转基因组(处理和时间)的相似分析显示出,用10mg/kg/天的化合物IXa和IXb的混合物处理的转基因动物在测试的第二天和第四天表现得显著好于媒介物处理的转基因动物($p < 0.05$,经学生t检验分析)。媒介物处理的非转基因动物在测试的第一天和第二天表现得显著好于媒介物处理的转基因动物。用化合物IXa和IXb的混合物进行的处理,与媒介物处理相比,在测试的第一天(两种剂量)、第二天(10mg/kg/天剂量)和第四天(10mg/kg/天剂量)显著改善转基因动物的表现($p < 0.05$;游泳长度)。

[0874] 这表明,化合物IXa和IXb的混合物能够以剂量依赖的方式在老龄转基因动物中逆转学习和记忆中已建立的行为缺陷。

[0875] 实施例6:在膜运输检定中抑制Abeta寡聚体对神经元细胞的作用

[0876] 对选自以上表2的 σ -2配体测试其抑制 β 淀粉样蛋白对细胞的作用的能力。 σ -2配体能够抑制经膜运输/胞吐检定(MTT检定)测量的 β 淀粉样蛋白作用。结果显示在以下表5中。该检定的基本原理如下:

[0877] 因为突触和记忆缺陷而非广泛的细胞死亡在阿尔茨海默病的最早期中占主导地位,测量这些变化的检定特别适合于发现寡聚体活性的小分子抑制剂。通常使用MTT检定作为培养中毒性的测量。黄色的四唑盐被细胞胞吞并在胞内体途径中被还原为不溶的紫色甲臞。紫色甲臞的水平反映出培养中活性代谢细胞的数目,且甲臞的量的减少被认为是培养中的细胞死亡或代谢毒性的测量。当经由显微镜观察时,紫色甲臞首先在填充细胞的胞内囊泡中可见。随着时间推移,囊泡被胞吐,且在不溶甲臞暴露于水性介质环境时,甲臞在细胞质膜的外表面上沉淀为针状结晶。Liu和Schubert('97)发现,细胞通过选择性地加速还原甲臞的胞吐速率来应答Abeta寡聚体的亚致死水平,而不影响胞吞速率。本明的发明者已经在培养的成熟初级神经元中重复了这些发现,并经由自动显微镜术和图像处理来对这些形态变化进行定量。在这些情况下,还原甲臞的总量没有总体改变,仅仅是反映其形成和/或从细胞中排出的速度变化的形态学具有变化。本明的发明者已经证实了先前的发现,即该检定对不引起细胞死亡的低水平寡聚体敏感(Liu和Schubert'04,Hong等人'07)。确实,引起LTP抑制的低量寡聚体不引起细胞死亡(Tong等人'04)并且预期不会改变培养(或脑切片)中甲臞的总量。

[0878] 由其他研究者举出的证据表明,由膜运输介导的神经元表面受体表达中Abeta寡聚体介导的降低是突触可塑性(LTP)以及因此的学习和记忆的电生理测量的寡聚体抑制的基础(Kamenetz等人'03,Hsieh等人'06)。经由甲臞形态变化测量由寡聚体诱导的膜运

输速率改变已经被用在细胞系中以发现降低啮齿动物体内Abeta脑水平 (Hong等人'09) 的阻断Abeta寡聚体的药物 (Maezawa等人'06, Liu和Schubert'97、'04、'06, Rana等人'09, Hong等人'08)。用于胞吐检定/MTT检定的相似程序可以在文献中找到。参见, 例如Liu Y等人, Detecting bioactive amyloid beta peptide species in Alzheimer's disease. J Neurochem. 2004 Nov; 91 (3): 648-56; Liu Y和Schubert D. "Cytotoxic amyloid peptides inhibit cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by enhancing MTT formazan exocytosis." J Neurochem. 1997 Dec; 69 (6): 2285-93; 以及Liu Y和Schubert D. "Treating Alzheimer's disease by inactivating bioactive amyloid beta peptide" Curr. Alzheimer Res. 2006 Apr; 3 (2): 129-35。因此该方法是有效的。

[0879] 本发明的胞吐检定适用于体外生长3周的成熟初级神经元培养物。参见W0/2011/106785, 其全部并入本文以供参考。Abeta寡聚体对填充有还原的紫色甲臞的胞内囊泡(点)的量引起剂量依赖性降低, 这使用Cellomics VTI自动显微系统经图像处理而测量。例如比较图1A(仅暴露于媒介物的培养神经元细胞的显微照片, 示出填充有甲臞的囊泡)与图1B(暴露于媒介物+Abeta寡聚体的神经元细胞的显微图片, 示出相当少的填充有甲臞的囊泡, 相反, 胞吐的甲臞在遇到胞外环境时沉淀为结晶)。增加Abeta寡聚体的量最终引起明显的毒性。因此, 用在检定中的神经活性Abeta寡聚体的浓度远低于引起细胞死亡的浓度。本发明的发明者通过显示Abeta寡聚体的作用在添加Abeta抗体时被阻断但仅抗体自身无作用(数据未示出), 证实检定是有效的。当以该方式配置时, 检定能够检测抑制Abeta寡聚体的非致死作用的化合物是否经由破坏寡聚体、抑制寡聚体与神经元的结合或对抗由寡聚体结合起始的作用的信号传导机制而起作用。

[0880] 用于产生结果的方法如下示于膜运输/胞吐(MTT)检定。

[0881] 将E18 Sprague-Dawley大鼠胚胎的初级海马神经元以优化浓度在NB培养基(Invitrogen)的384孔板中进行铺板。将神经元保持培养3周, 每周两次提供N₂补充的NB培养基(Invitrogen)。这些神经元表达成熟脑中神经元特有的突触蛋白的全补体(full complement), 并表现出活性依赖的电信号传导的复杂网络。这样的培养中的神经元和胶质细胞具有表现出优异的登记(registration)且脑回路完整的分子信号传导网络, 且出于该原因, 已被用作学习和记忆的模型系统多于20年(参见例如Kaeck S, Banker G. Culturing hippocampal neurons. Nat Protoc. 2006; 1 (5): 2406-15. Epub 2007 Jan 11; 同时参见Craig AM, Graf ER, Linhoff MW. How to build a central synapse: clues from cell culture. Trends Neurosci. 2006 Jan; 29 (1): 8-20. Epub 2005 Dec 7. 综述)。

[0882] 以100 μM至0.001 nM的浓度向细胞中添加测试化合物, 之后添加媒介物或Abeta寡聚体制剂(3 μM部Abeta蛋白浓度), 并在5% CO₂中于37℃孵育1~24小时。将MTT试剂(3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑)(Roche Molecular Biochemicals)在磷酸盐缓冲盐水中重构为5 mg/mL。将10 μM的MTT标记试剂添加到各个孔中, 并在37℃孵育1小时, 然后拍照。通过自动显微术和图像处理来评价胞吐, 以对胞吞和胞吐的甲臞的量进行定量。

[0883] 使各个检定板格式化, 使得在各个板上在具有和不具有Abeta寡聚体的情况下测试化合物。该设计在筛选级联的早期消除毒性或代谢活性的化合物(在初级筛选的水平)。

还原的甲脒首先在胞内囊泡中可见。最终的甲脒胞吐经Abeta寡聚体加速。图1A和1B是神经元显微图的实例,第一个是首先看到甲脒的胞内囊泡,第二个是覆盖有经胞吐排出的不溶紫色染料。染料沉淀在培养的水性环境中并在神经元的表面上形成针状结晶。

[0884] 在15微摩尔化合物II的存在下,图1B中采集的膜运输变化被阻断(参见1C)且图1C中的细胞无法与媒介物处理的神经元区分开。此外,化合物II的该作用看似与化合物II是在细胞暴露于Abeta寡聚体之前还是之后添加无关,这表明治疗以及预防效果。参见图1D,膜运输变化的图(剂量响应曲线)表达为,在添加各种量的化合物II或IXa与IXb的混合物之前(图1D)或之后(图1E)添加的各种量的Abeta寡聚体的存在下,在图像处理中见到的囊泡百分比相对于化合物II对数浓度。单独的Abeta寡聚体由图1D和1E左下角的圆圈表示。单独的囊泡由实心方块表示。当在寡聚体之前添加时(预防模式),化合物II以 $EC_{50}=2.2\mu M$ 阻断寡聚体作用,且化合物IXa、IXb以 $EC_{50}=4.9\mu M$ 阻断寡聚体作用。当在寡聚体之后添加时(治疗模式),化合物II以 $EC_{50}=4.1\mu M$ 阻断寡聚体作用,且化合物IXa、IXb以 $EC_{50}=2.0\mu M$ 阻断寡聚体作用。在任一情况中,化合物II或IXa与IXb的混合物各自阻断Abeta寡聚体的膜运输作用,如该检定中所见。递增剂量的来自两个结构不同系列(II和IXa、IXb)的选择性、高亲和性 σ -2受体拮抗剂化合物阻止寡聚体作用并使得培养物看上去更像媒介物处理的培养物。

[0885] 基于这些结果,如本文公开的可有效用于抑制Abeta寡聚体毒性的选择性、高亲和性 σ -2受体拮抗剂化合物,作为 β 淀粉样蛋白寡聚体毒性相关的认知衰退(例如在阿尔茨海默病中见到的)的治疗(非常早的阶段)和预防方式是有前景的。与Abeta寡聚体的可饱和的竞争性结合不能在这些实验中表明,因为毒性限制更高浓度。

[0886] 在膜运输检定中进行合成的Abeta寡聚体的给药,如图1F和1G所示,其中其表现出820nM的 EC_{50} 。针对数个浓度的各个选择性、高亲和性 σ -2受体拮抗剂化合物药物候选物II和IXa、IX(其各自引起 EC_{50} 右移几乎两个数量级),测试各个浓度的Abeta。当将数据拟合到经典的线性和非线性模型时,数据对于Schild分析为线性(斜率nH为1),其表明 σ -2受体化合物在寡聚体与化合物之间对介导膜运输的靶标表现出真实药理学竞争。得自阿尔茨海默病患者脑的Abeta寡聚体针对这些化合物进行给药,如图1J和1K所示,也通过化合物暴露而显示出右移。具体而言,以有效剂量,化合物II和IXa、IXb表现出与合成的(图1F、G,Schild斜率=-0.75、-0.51)和得自人阿尔茨海默病患者(图1J、1K)的寡聚体的药理学竞争。其净效果为这两种选择性、高亲和性 σ -2受体拮抗剂化合物候选药物有效地使Abeta寡聚体具有更少的突触毒性,且这些是目前为止我们所知的已证实该特性的仅有的疗法。不拘泥于理论,作用的最简单可能的机制是 σ -2受体化合物起到竞争性受体拮抗剂的作用。

[0887] 在相关实验中,基于0或20 μM 的化合物II对映异构体的效果观察到剂量响应曲线中的右移(%囊泡针对Abeta寡聚体浓度):参见以下表4。(+)对映异构体被示出为在较高浓度Abeta寡聚体下更有效。

[0888] 表4

[0889]

化合物	针对 0 μ M 浓度 Abeta 的 EC50	针对 20 μ M 浓度 Abeta 的 EC50	曲线移动 (倍)	使用单一浓度 Abeta 寡聚体的筛选检定中的 EC50
Cpd II 的(+)对映异构体	1.19	1.46	2.86	5.6 μ M
Cpd II 的(-)对映异构体	1.05	2.82	1.22	10.9 μ M

[0890] 如以上表4所示,20 μ M对映异构体相对于0 μ M对映异构体(即单独Abeta寡聚体)在%囊泡针对Abeta寡聚体浓度的剂量响应曲线中的右移,在较高浓度的Abeta寡聚体下对于(+)对映异构体显著地更明显。

[0891] 实验对照:

[0892] 根据公开的方法制备的Abeta 1-42寡聚体用作阳性对照。[参见,例如Dahlgren等人,"Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability"J Biol Chem.2002Aug30;277 (35):32046-53.Epub 2002Jun 10.;LeVine H 3rd."Alzheimer's beta-peptide oligomer formation at physiologic concentrations"Anal Biochem.2004Dec 1;335 (1):81-90;Shrestha等人,"Amyloid beta peptide adversely affects spine number and motility in hippocampal neurons" Mol Cell Neurosci.2006Nov;33 (3):274-82.Epub 2006Sep 8;Puzzo等人,"Amyloid-beta peptide inhibits activation of the nitric oxide/cGMP/cAMP-responsive element-binding protein pathway during hippocampal synaptic plasticity"J Neurosci.2005Jul 20;25 (29):6887-97;Barghorn等人,"Globular amyloid beta-peptide oligomer-a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease"J Neurochem.2005Nov;95 (3):834-47.Epub 2005Aug 31;Johansson等人,Physiochemical characterization of the Alzheimer's disease-related peptides A beta 1-42Arctic and A beta 1-42wt.FEBS J.2006Jun;273 (12):2618-30]以及得自脑的Abeta寡聚体(参见,例如Walsh等人,Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo.Nature (2002).416,535-539;Lesne等人,A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory.Nature.2006Mar16;440 (7082):352-7;Shankar等人,Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory.Nat Med.2008Aug;14 (8):837-42.Epub 2008Jun 22)。应该注意到,任何Abeta寡聚体制剂可以用在该检定中或作为对照,包括以上引用并全部并入以作参考的专利文献中记载的制剂。

[0893] 多种不同的Abeta寡聚体制剂被证实引起膜运输检定中的Abeta作用,包括尤其是

从阿尔茨海默病患者的脑中分离的寡聚体制剂。

[0894] 寡聚体从死后人海马或前额皮质中分离而使用清洁剂,并以剂量依赖的方式以6皮摩尔的Kd抑制膜运输。与媒介物(第一条,图1J)相比,得自人阿尔茨海默病患者的Abeta寡聚体(137pM,图1J中的第二条)产生统计学上显著的膜运输抑制。化合物II(第三条)消除由得自AD脑的Abeta寡聚体诱导的膜运输缺陷,但是当不存在Abeta而给药时不影响运输(第四阴影(hatched)条)。对3次实验(n=3)的数据取平均值。

[0895] 尽管各种Abeta寡聚体制剂的效力不同(例如,天然阿尔茨海默病分离物比任何所测试的合成制剂更有效力-数据未示出),但结果在性质上相同:由寡聚体介导的病理被本发明包括 σ -2受体拮抗剂化合物的组合物所对抗。

[0896] 在黑条所示的过量化合物II的存在下(15uM,第三条,图1J),完全消除寡聚体诱导的膜运输缺陷。当其自身进行给药时,化合物II对膜运输没有显著作用(黑色斜条,图1J)。

[0897] 相反,从取自认知正常的年龄匹配的个体的同一死后脑区分离的寡聚体通常相对于每克组织重量以较低的浓度存在,相对于137pM的90pM(图1K,第二条),并且相对于媒介物(图1K,第一条)不产生显著的膜运输缺陷。在这些条件下,化合物II在与寡聚体一起给药或单独给药时没有作用(图1K,分别为第三和第四条)。对数据也取平均值(n=3,除了其中n=5的第二条)。

[0898] 阴性对照包括媒介物处理的神经元以及用超生理的28 μ M浓度的美金刚处理的神经元。美金刚在该剂量产生50%的寡聚体作用抑制。各给板上的这些对照用作为标准化工具,以校准逐个板的检定表现。

[0899] 初级神经元培养物

[0900] 基于对Abeta寡聚体的细胞应答(使用胞吐检定作为读出)、以及培养物中胶质细胞与神经元的相对比例的免疫组化分析来确定最佳细胞密度。用免疫组化和基于图像处理的定量来每周监测培养物,以监测神经元相对于胶质细胞的培养物百分比。排除在21天的体外筛选年龄(21DIV)含有多余20%的胶质细胞(对于GFAP为阳性)相对于神经元(针对MAP2用1:5000(浓度可变)(鸡多克隆)抗体(Millipore)阳性染色)的培养物。

[0901] Abeta寡聚体制剂

[0902] 从大量商业供应商例如California Peptide获得人淀粉样蛋白肽1~42,视质量控制分析而定具有大量选择。寡聚体制剂的质量控制由确定寡聚体尺寸范围和相对浓度的蛋白印迹以及证实胞吐加速而无毒性的MTT检定构成。在各个基于图像的检定中经由使用DNA结合蓝色染料DAPI(Invitrogen)可视化的核形态的定量而监测毒性。片段化的细胞核被认为处于晚期细胞凋亡(Majno and Joris '95),且测试可以被排除。产生不寻常的肽尺寸范围或在标准1.5 μ M浓度对神经元产生显著毒性的肽群(lots)也将被排除。

[0903] 基于板的对照-当重新格式化的板在常规基础上在媒介物与Abeta寡聚体处理的神经元之间实现统计学显著的两倍分离的最小值($p < 0.01$,学生t检验,不等方差),且各板间不多于10%CV时,检定优化被视为完成。

[0904] 统计软件和分析:

[0905] 通过Cellomics VTI图像分析软件和STORE自动化数据库软件完成数据处理和分析。因为在培养三周后较低动态范围和神经元孔间的可变性,经成对Tukey-Kramer分析进行统计表学比较,以确定化合物+Abeta寡聚体与单独的Abeta之间以及单独的化合物与

媒介物之间的分离的显著性。成熟初级神经元更密切地接近于电生理介导的成人脑信号传导网络的能力证实该筛选策略合理。对于使假阴性最小化的大量重复筛选孔(例如, N=4)设定检定力分析(power analysis)。本发明的测试化合物显著逆转Abeta寡聚体对膜运输的作用且不影响神经元代谢本身。

[0906] 所选择的本发明通式内的化合物, 包括以下表5中示出的式III~IV、VIIIIq和VIIIIo, 在本文所述的MTT检定中在Abeta寡聚体添加前给药, 并显示出以所指示的EC₅₀阻断Abeta寡聚体诱导的膜运输缺陷。具体而言, 这些结果表明, 化合物以微摩尔浓度阻断/减轻Abeta寡聚体对神经元细胞的膜运输的活性/作用。

[0907] 表5. σ -2受体配体和抑制淀粉样蛋白寡聚体对膜运输的作用的能力

[0908]

σ -2 受体配体	通过膜运输检定测量的抑制细胞中 β 淀粉样蛋白作用的 EC ₅₀	Abeta 的最大抑制 (%)
化合物 II (三个不同批次: 外消旋混合物、(+)-异构体和(-)-异构体)	2.2 μ M 5.6 μ M 10.9 μ M	68 (78 (64)
化合物 A	3.4 μ M	78
化合物 B	5.5 μ M	84
化合物 C	5.4 μ M	93
化合物 D	8.9 μ M	58
化合物 E	8.2 μ M	68
化合物 F	2.6 μ M	69
化合物 G	5.8 μ M	92
化合物 H	2.2 μ M	-
化合物 I	3.4 μ M	100
化合物 J	3.9 μ M	97
化合物 K	14 μ M	13
化合物 L	2.4 μ M	34
化合物 M	0.6 μ M	60
化合物 N	5.2 μ M	46
化合物 O	2.7 μ M	27
化合物 P	20.0 μ M (19.5 μ M)	43 (73)
化合物 Q	0.5 μ M	82
化合物 R	6.7 μ M	55
化合物 R'	39 μ M (无活性)	38
化合物 S	5.4 μ M	100

[0909]

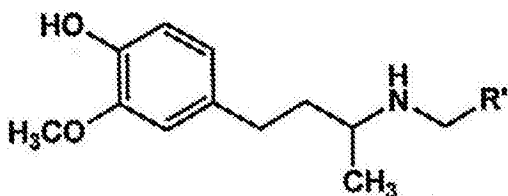
化合物 S'	>30 uM (无活性)	0
化合物 T	7.7 uM	45
化合物 IXa	4.9 uM	76
化合物 IXb	6.9 uM	97
化合物 AC	2.4 uM	-
化合物 AD	0.7 uM	-
化合物 AG	6.1 uM	-
化合物 BA	<1.0 uM	-
化合物 BT	0.4 uM	-
化合物 BY	0.8 uM	-
化合物 CA	1.9 uM	-
化合物 CB	18.2 uM	-
化合物 CR	1 uM	-
化合物 CS	6.9 uM	-
化合物 CT	3 uM	-
化合物 CW	2.5 uM	-
化合物 CX	1.3 uM	-
化合物 CY	14 uM	-
化合物 DE	>20.0 uM	-
化合物	通过膜运输检定测量的抑制细胞中 β 淀粉样蛋白作用的 EC ₅₀	Abeta 的最大抑制 (%)
BD1047	11	100
DTG	N/A	23
氟哌啶醇	6.2	100
艾芬地尔	1.3	38
Mach-14	1	80
NE 100	9.1	98
PB 28	2.2	84
PRE-84	N/A	38
SM-21	11	65
苏-艾芬地尔	N/A	39

[0910] 表5中的化合物显示为以所示的EC₅₀阻断Abeta寡聚体诱导的胞吐加速。因此,表5中的化合物显著地阻断Abeta寡聚体介导的膜运输变化。这些结果表明,化合物阻断/减轻Abeta寡聚体对神经元细胞的活性/作用,且 σ -2配体可以用来阻断Abeta寡聚体诱导的膜运输异常。

[0911] 表6A显示出对于某些其他化合物的膜运输EC₅₀。

[0912] 表6A:其他膜运输数据

[0913]



[0914]

条目	R'	膜运输EC ₅₀ (μM)
1	4-CF ₃ -Ph-	2.2
2	4-Cl-Ph-	12
3	Ph-	20
4	isoBu-	>30
5	H-	30

[0915] 运输检定与σ受体结合数据之间的相关性

[0916] 使用Spotfire软件来分析化合物与σ-1或σ-2受体的结合亲和性(表2)以及它们在膜运输检定中的EC₅₀和最大作用(表5),以发现受体结合与检定活性之间的相关性。计算MTTX中EC₅₀的对数相对于对数σ-1和σ-2结合K_i、Abeta的最大抑制相对于对数σ-1和σ-2结合K_i、以及运输检定中对数EC₅₀相对于σ-1结合K_i与σ-2结合K_i的比率的拟合优度。对于4组化合物进行所有计算:A)表5中所列的粗体化合物+已知的现有技术化合物,B)仅表5中的粗体化合物,C)仅表5中的参照化合物,以及D)除σ-1拮抗剂(NE-100、氟哌啶醇、BD1047、SM21)以外的所有A组化合物。

[0917] 表6B:σ结合亲和性与运输检定活性之间的相关性

[0918]

Y 轴	X 轴	R ² (P 值) 所有 19 种 化 合 物	R ² (P 值) 表 5 粗体 化合物	R ² (P 值) 10 种参 照化 合 物	R ² (P 值) W/O σ-1 拮 抗剂

[0919]

MTTX log(EC 50)	Vs Log S1 Ki	0.06 (ns)	0.01 (ns)	0.02 (ns)	0.02 (ns)
	Vs Log S2 Ki	0.15 (ns)	0.70 (< 0.001)	0.27 (ns)	0.78 (< 0.001)
Abeta 的最大 抑制	Vs Log S1 Ki	0.00 (ns)	0.14 (ns)	0.06 (ns)	0.00 (ns)
	Vs Log S2 Ki	0.00 (ns)	0.00 (ns)	0.00 (ns)	0.00 (ns)
MTTX log(EC 50)	S1/S2	0.01 (ns)	0.11 (ns)	0.04 (ns)	0.01 (ns)

[0920] 从表6B中可以看出,单独粗体化合物的最高相关性在其MTTX中的Log (EC₅₀) 与σ-2结合的Log (Ki) 之间 ($R^2=0.70$, $P<0.001$)。其他比较均为统计学不显著。当将参照化合物添加到分析中时,该相同的相关性统计学不显著 ($R^2=0.15$, $P>0.05$),且单独的参照化合物在这些参数之间不显示统计学显著的相关性 ($R^2=0.27$, $P>0.05$)。

[0921] 该相关性的不同表现的图还显示在图5A~5D中。

[0922] 在已知的现有技术化合物中,Mach-14对于σ-2受体具有高选择性 (σ-1Ki=12,900nM,σ-2Ki=9nM),且其抑制运输检定中80%的Abeta作用。相反,PRE-84对于σ-1受体具有高特异性 (σ-1Ki=2.2nM,σ-2Ki=13,091nM),且在运输检定中为较差的抑制剂(最大抑制38%)。该结果如下理论一致,即σ-2受体结合而非σ-1受体结合与逆转Abeta在运输检定中的作用相关。该检定的结果还对治疗表型的研发提供支持。

[0923] 当对表5中的粗体化合物以及已知的现有技术化合物PB28、氟哌啶醇和Mach 14进行作图时(图5A),在σ-2结合亲和性与运输检定中的效力之间具有强相关性 ($R^2=0.79$, $P<0.001$)。相比之下,在σ-1受体结合与MTTX检定中的效力之间不存在显著相关性 ($R^2=0.02$, $P=0.18$) (图5C)。该结果显示出结合σ-2受体与抑制运输中Abeta作用之间的较强关系,且看似表明结合σ-1受体与抑制Abeta之间的较弱关系。

[0924] 三种其他已知的现有技术化合物(BD1047、NE100和SM-21)在膜运输MTTX检定中相比于可归因于它们单独的σ-2结合亲和性的效力更有效力。氟哌啶醇、PB 28和Mach-14表明了σ-2结合与运输检定中的效力之间的紧密相关性。

[0925] PRE-084在运输检定中无活性,且这与其是有效的σ-1激动剂而在σ-2受体处没有

效力这一观察一致。

[0926] 两种粗体化合物R'和S'在运输检定中无活性,尽管它们对 σ -2受体具有较大的亲和性。在一些实施方式中,化合物R'和S'不满足治疗分布。

[0927] 此外,化合物IXa和IXb的混合物以 $5.2\mu\text{M} \pm 1.1$ 的可重现 EC_{50} 协同地抑制100%的寡聚体对膜运输的作用(图7)。相似地,其他化合物将在该实施例报道的检定中进行测试。这些也将选自式I、II、III~VII和IX以及由其他通式(例如式XIII)包括的化合物和描述为以上 σ -2配体的其他化合物。

[0928] 表2中所选的化合物在膜运输检定中进行给药,并显示为以所示的 EC_{50} 阻断Abeta寡聚体诱导的膜运输异常。因此,表2中的化合物显著地阻断Abeta寡聚体介导的膜运输变化。这些结果表明,化合物阻断/减轻Abeta寡聚体对神经元细胞的活性/作用,且 σ -2受体配体可以用作阻断Abeta寡聚体诱导的膜运输异常的候选化合物。因为由以上通式包括的化合物也预期为 σ -2配体,因此也可用于阻断Abeta寡聚体诱导的胞吐加速。

[0929] 实施例7.药代动力学和代谢稳定性研究

[0930] 通过商业合同研究组织在小鼠的微粒体中进行第一个药代动力学研究。该研究根据Obach,R.S等人(1997) J.Pharmacol.Exp.Ther.,283:46-58来进行,其引入本文以供参考。表7A中所测试的化合物的半衰期为2~72分钟,且剩余化合物的半衰期预期在大约相同的范围内。

[0931] 微粒体中半衰期的结果显示在表7A和7B中。

[0932] 表7A:化合物小鼠微粒体稳定性

[0933]

化合物	小鼠微粒体中 $t_{1/2}$
II	16
A	33
B	55
C	10
D	2
E	46
F	72
G	42
H	24
I	33
J	47

[0934] 结果表明,一些测试化合物在小鼠肝脏微粒体中比化合物II具有实质上更长的半衰期。该结果预示这些化合物后在口服后更大的生物利用度。相同的化合物已通过上述的膜运输检定进行测试,以及其本文所指的活性。

[0935] 化合物II的内在清除的速度较为快速,表明大量的首过代谢。为改善药代动力学性质,设计其它化合物以提高代谢稳定性并改善药物样特性。进行微粒体稳定性实验和血浆稳定性实验以确定候选化合物的代谢和肝脏稳定性。

[0936] 第二个PK研究在体内进行并涉及测量经多种途径以急性或慢性方式施用的测试

化合物的血浆水平和脑水平,具体如下:

[0937] HPLC-MS优化

[0938] 制备各个测试化合物的溶液并经注射泵以恒定速率输入到TSQ Quantum光谱仪(Fisher Thermo Scientific)源中。进行全扫描MS(质谱)分析,并对于各个测试化合物以正离子化和负电离子化模式产生总离子流色谱图和相应的质谱。MS/MS的前体离子选自正质谱和负质谱,作为各离子丰度的函数。此外,进行产物离子MS/MS分析,以确定用于定量分析的合适选择的裂解反应。选择最终反应监测参数,以使对存在于复杂的组分混合物中的测试化合物进行定量的能力最大化。在识别出待用于各个测试化合物的特定SRM跃迁之后,使用TSQ Quantum化合物优化工作区中的自动操作指南来优化检测参数。最后,通过在合适的LC柱中注射并分离分析物并按需调整梯度条件而识别用于LC-MS分析的色谱条件。

[0939] 用于IV给药的配方

[0940] 首先通过视觉检查来评价测试化合物在磷酸盐缓冲盐水pH 7.4(PBS)中的溶解度。如果化合物在目标浓度可溶,则使用PBS作为媒介物。(如果化合物在PBS中不完全溶解,则可以评价与IV给药相容的其他媒介物。这样的媒介物除其它之外包括DMSO、聚乙二醇(PEG 400)、Solutol HS 15和Cremophor EL。)在此处报道的实验中,IV施用单次推注的10mg/kg化合物II。

[0941] 用于PO给药的配方:首先评价测试化合物在PBS中的溶解度。如果化合物在目标浓度可溶,则使用PBS作为媒介物。(如果测试化合物在各个浓度在PBS中不完全溶解,则可以使用DMSO/Solutol HS15/PBS(5/5/90,v/v/v)或DMSO/1%甲基纤维素(5/95,v/v)。

[0942] 血浆中的线性

[0943] 在等份的血浆中掺入(spiked)指定浓度的测试化合物。使用乙腈沉淀处理所掺的样品,并通过HPLC-MS或HPLC-MS/MS分析。构建峰面积相对于浓度的校准曲线。确定该检定的可报告的线性范围,以及定量下限(LLQ)。

[0944] 血浆样品的定量生物分析

[0945] 使用乙腈沉淀处理血浆样品,并通过HPLC-MS或HPLC-MS/MS分析。生成血浆校准曲线。在等份的无药血浆中掺入指定浓度水平的测试化合物。将所掺的血浆样品与未知的血浆样品一起使用相同的步骤进行处理。处理的血浆样品(干燥提取物)在HPLC-MS或HPLC-MS/MS分析之前通常冷冻储存(-20℃)。将干燥提取物重构到合适的溶剂中且在离心后通过HPLC-MS或HPLC-MS/MS分析。记录峰面积,且使用各校准曲线确定未知血浆样品中测试化合物的浓度。确定该检定的可报告的线性范围,以及定量下限(LLQ)。

[0946] 用于研究的动物是各自称重为20-30g的雄性C57BL/6小鼠或称重为180-250g的雄性Sprague-Dawley大鼠。针对各个施用条件和各个时间点处理三只动物,使得各个动物仅抽血一次。通过腹膜内注射完成皮下化合物施用。通过灌胃完成口服。经颈静脉导管完成静脉内施用。

[0947] 在施用各种浓度的化合物后,在10、30、60、120、240、360、480和1440min收集血浆样品。

[0948] 从小鼠和大鼠收集血浆样品

[0949] 在一般吸入麻醉(3%异氟烷)下使动物镇静,以通过心脏穿刺(小鼠)或颈静脉导管(大鼠)收集血液。将血液等份(300~400μL)收集在涂布有肝素锂的管中,温和混合,之后

保持在冰上并在4℃于2,500x g离心15分钟,在1小时内收集。之后收获血浆并在-20℃保持冷冻直至进一步处理。

[0950] 动物给药设计-体内PK-非插管、非禁食动物

[0951] 组1:SC,每个时间点n=3只动物(共24只动物)或IV,每个时间点n=3只动物(共24只动物)

[0952] 组2:P0,每个时间点n=3只动物(共24只动物)

[0953] 组3:对照动物(用于无药血液),n=5只小鼠

[0954] 各个动物进行一次抽血和一次脑收集。

[0955] 从动物收集脑样品

[0956] 紧接着血液取样,将动物断头,并快速取出整个脑,用冷盐水(0.9%NaCl,g/mL)清洗,使表面脉管系统破裂,用纱布擦干,称重,保持于冰上直到进一步处理,在一小时内收集。使各个脑在冰上使用PowerGen 125在1.5mL冷磷酸盐缓冲盐水pH 7.4(小鼠=1.5mL,大鼠=)中匀浆10秒钟。然后将来自各个脑的脑匀浆储存在-20℃直到进一步处理。

[0957] 脑样品中的线性

[0958] 在等份的脑匀浆中掺入指定浓度的测试化合物。向各个脑等份中,添加等体积的冷26%(g/mL)中性右旋糖(来自Sigma,平均分子量65,000-85,000,目录号D-1390)溶液以得到13%的最终右旋糖浓度。将匀浆在4℃以54000x g离心15分钟。随后使用乙腈沉淀处理上清液并通过HPLC-MS/MS分析。构建峰面积相对于浓度的校准曲线。确定该检定的可报告的线性范围,以及定量下限(LLQ)。

[0959] 脑样品的定量分析

[0960] 向各个脑匀浆等份中,添加等体积的冷26%(g/mL)中性右旋糖(来自Sigma,平均分子量65,000-85,000,目录号D-1390)溶液以得到13%的最终右旋糖浓度。将匀浆在4℃以54000x g离心15分钟。随后使用乙腈沉淀处理上清液并通过HPLC-MS/MS分析。生成脑校准曲线。在等份无药脑匀浆中掺入指定浓度水平的测试化合物。将所掺的脑匀浆样品与未知的脑匀浆样品一起使用相同的步骤进行处理。将处理的脑样品在-20℃储存直到LC-MS/MS分析,分析时记录峰面积,并使用各校准曲线确定未知脑样品中的测试化合物的浓度。确定该检定的可报告的线性范围,以及定量下限(LLQ)。

[0961] 脑渗透性

[0962] 通过LC-MS/MS确定测试化合物在脑中(ng/g组织)和血浆中(ng/mL)的浓度以及各个时间点脑浓度与血浆浓度的比率,并如上所述进行报告。

[0963] 药代动力学

[0964] 构建化合物的血浆浓度相对于时间的图。口腔和SC给药后化合物的基本药代动力学参数(AUClast、AUCINF、T_{1/2}、T_{max}和C_{max})得自使用WinNonlin(Pharsight)的血浆数据的非房室分析(NCA)。非房室分析不需要假定用于药物或代谢物的特定的房室模型。NCA允许应用梯形法则来测量血浆浓度-时间曲线下的面积(Gabrielsson,J.and Weiner,D.Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis:Concepts and Applications.Swedish Pharmaceutical Press.1997)。

[0965] 报告项的定义

[0966] 曲线下面积(AUC)-达到全身循环的未变化的药物的总量的量度。曲线下面积是几

何测量,其通过绘制浓度相对于时间的图并对各个梯形的增量面积求和来计算。

[0967] WinNonlin具有两种用于计算该面积的方法:线性梯形法和线性对数梯形法。因为线性梯形法对浓度-时间曲线的下降部分可能提供有偏结果并高估AUC,因此WinNonlin对AUC的计算提供线性对数选项。默认使用对数线性梯形法来测量Tmax后剩余血浆浓度-时间曲线的面积。

[0968] AUC_{last}:大于定量限的从给药时间至最后观察时间的曲线下面积。

[0969] AUC_{INF}:从给药时间外推到无穷大的曲线下面积。

[0970] C_{max}-在给药时间与最后观察时间点之间口服或非IV施用药物后的最大血浆药物浓度。

[0971] T_{max}-在施用药物后观察的最大血浆浓度(C_{max})处以分钟计的时间。

[0972] T_{1/2}-IV及非IV给药的末端消除半衰期。

[0973] 其中λ_Z(z)是与血浆浓度-时间曲线的末端(对数线性)部分相关的一级速率常数。Z通过时间相对于对数浓度的线性回归而估计。

[0974] 结果显示,当以范围为0.1~0.5mg/kg的剂量急性或慢性(在5天内每天)施用时,所测试的化合物II和B生物利用度高且脑渗透性高。急性施用化合物II的结果显示于图2A中。图2A是其中化合物的血浆水平以ng/mL为单位显示于左边y轴的图。脑水平以绿色以ng/g为单位显示于右边y轴。X轴显示在零时推注IV或SC施用之后的时间。在以10mg/kg i.v.急性IV施用之后,化合物II达到高脑浓度且在给药后180分钟仍具有171ng/g的浓度(57x体内有效脑剂量,由空心菱形显示)。在急性SC施用之后为相似的模式。化合物B在肠胃外施用时显示相同水平的生物利用度,但通过口腔途径生物利用度显著更大。发现两种所测试的化合物均具有明显较高的BBB渗透性,且化合物II在3小时具有8的脑/血浆比率。

[0975] 化合物B的结果和化合物II急性施用的结果显示在表8中。

[0976] 表8. 化合物B和II在小鼠中的药代动力学

[0977]

参数	化合物 B-10 mg/kg		化合物 II-10 mg/kg	
	PO 血浆	SC 血浆	PO 血浆	SC 血浆
T _{max} (min)	30	120	NC	30
C _{max} (ng/mL)	599.3	607.7	NC	279
t _{1/2} (min)	210	218	NC	100
AUC _{all} (ng*hr)/mL)	2,851.1	5,242.3	NC	384.7
F _{rel} (%)	54.4		NC	

[0978] 如该表中所示,化合物B的口服生物利用度及它的其它PK参数相对于化合物II有改善。

[0979] 在5天的时程内慢性施用,0.1、0.35和0.5mg/kg范围内的给药提供化合物II相对稳定的血浆水平,脑暴露较好且脑/血浆比率与急性设置相似。结果显示于图2B中。图2B是在每天一次皮下施用不同量的化合物II(0.5mg/kg/天:实心下三角;0.35mg/kg/天:实心上

三角;以及0.1mg/天:实心方块)时在血浆(左纵坐标)中以及在SC施用相同量(各自是空心下三角、空心上三角和空心方块)的化合物II时在脑中获得的药代动力学数据的图。

[0980] 化合物B的脑水平测量比化合物II显示出更低的峰浓度,但处于更高的持续水平。在三小时点处,脑中化合物II的量相比于针对化合物II确定的50ng/mL有效剂量,对PO几乎高40x且对SC高60x。然而,化合物II的三小时点相比于该化合物的有效剂量对于SC仍高>3x(数据未显示)。

[0981] 当在小鼠中以1mg/kg静脉给药时,化合物IXa和IXb的混合物显示出2.7小时的半衰期。然而,当化合物以5mg/kg口服给药时,其在血浆中显示出可忽略量的药物。对化合物IXa和IXb的混合物+药物标准物在小鼠肝脏微粒体中随后的研究(表6)测量混合物的半衰期为8.7分钟且内在清除率为267microL/min/mg,表明混合物易受首过代谢影响。通常,CNS活性化合物倾向于具有低至中度的内在清除率($CL_{int} \leq 100$ 微升/min/mg)(Wager等人'10)。13个CNS活性药物的人肝脏微粒体稳定性数据提供 51 ± 29 分钟的平均半衰期(Orbach'99)。因此,化合物II首过代谢的改善的合理目标是 $T_{1/2} > 30$ 分钟且 $CL_{int} \leq 100$ 微升/min/mg。化合物IXa、IXb相比于某些已知的药物表现出可比的肝脏稳定性,如表9中所示。

[0982] 表9.对于化合物IXa和IXb的小鼠肝脏微粒体数据并选择CNS药物标准物。 CL'_{int} = 内在清除率。通过合同研究组织进行实验,且以化合物II作为标准物进行。

[0983]

药物	作用模式	微粒体浓度 (mg/mL)	T1/2 (min)	CL' INT (uL/min/mg)
化合物 IXa 和 IXb 的混合物	候选化合物	0.3	8.7+/-0.1	267
丙咪嗪	抗抑郁	0.3	11.5	200

[0984]

普萘洛尔	β 阻断剂	0.3	16.4+/-0.5	141
特非那定	抗组胺	14.6	8.7+/-1.1	159
维拉帕米	Ca++通道阻断剂	0.3	11.4+/-0.5	204

[0985] 实施例8:Abeta 1~42寡聚体结合和突触损失检定

[0986] 在该检定中,使Abeta寡聚体与培养中的成熟初级神经元接触,

[0987] 且通过免疫组化(Abeta抗体)确定其结合并通过图像处理进行定量。神经元树突中的Abeta的量通过对神经炎上标记点的数目进行计数来评价。已知Abeta寡聚体与初代培养中以海马神经元显著百分数(30~50%)存在的突触后神经元的子集饱和(K_d 约400nM; Laurén2009)且高亲和性地结合(Lacor等人,2004; Lambert等人,2007),且这与阿尔茨海默病患者的脑中的Abeta结合的观察很好地相关(Lambert等人,2007)。该标记与突触相关联,与突触后支架蛋白PSD-95共定位(Lacor等人'04)。还已知Abeta寡聚体介导突触损失(在脑切片的人海马神经元中报道为18%(Scheff等人,2007))且抑制长时程增强效应(LTP)。突触

数目还可以在该检定中通过免疫荧光化学进行定量。用于结合检定的相似步骤可在文献中找到。参见例如,Look GC等人Discovery of ADDL-targeting small molecule drugs for Alzheimer's disease.Curr Alzheimer Res.2007Dec;4(5):562-7.Review。

[0988] 与神经元表面结合的Abeta量的测量可以用作识别经一种或多种以下机制起作用的化合物的第二筛选:通过干扰Abeta寡聚体与神经元表面的结合或通过影响寡聚体自身的变化(反向激动或寡聚体解离)或寡聚体结合的表面受体的变化(变构调节或经典受体拮抗)来阻断Abeta作用。其还可以将这些化合物与在下游信号传导事件中起作用的化合物区分开。因此,该检定与特征为神经元上的Abeta寡聚体非致死作用的疾病状态相关,且形成本发明的发明人所采用的筛选级联的一部分,从而识别临床相关的化合物。重要地,本文公开的化合物之一即化合物II在膜运输检定且在该结合/突触损失检定中具有活性,且已被证明还在两种不同的阿尔茨海默病转基因模型中且在诱导的模型中也具有活性。因此,这以及膜运输检定可用于识别临床相关的化合物且似乎具有用于体内结果的预测值。该检定的预测有效性通过使用本发明范围外的化合物证实其预测化合物性质的能力来确认。

[0989] 初级海马神经元培养物如在以上膜运输检定中确立。添加化合物II(以 10^{-8} ~30微摩尔的浓度),且将任何其它待在未来测试的化合物(以 10^{-8} ~30微摩尔的浓度)添加到板中,随后以达到饱和和结合的浓度添加含有Abeta 1-42寡聚体的制剂。用待测试的化合物进行的预处理持续1小时,且以70ul的终浓度添加Abeta寡聚体或无寡聚体(单独的媒介物),之后孵育另外23小时。

[0990] 用3.7%的多聚甲醛于磷酸盐缓冲盐水中的溶液将板固定15min。然后用PBS洗涤板3x,每次5min。在室温在PBS中的5%山羊血清和0.5%Triton X-100中将板封闭1小时。将一抗(MAP 2多克隆,Millipore#AB5622和 β 淀粉样蛋白6E10单克隆,Covance#SIG-39300,以1微克/ml,以及兔多克隆突触素抗体Anaspe,以0.2微克/ml)在PBS中的5%山羊血清中1:1000稀释。将一抗在4℃孵育过夜。然后用PBS洗涤板3x,每次5min。将二抗(Alexa Flor 488多克隆,Invitrogen#A 11008和Alexa Flor 647单克隆,Invitrogen#A21235)在PBS中的5%山羊血清中1:1000稀释。将二抗在室温孵育1小时。用PBS将板洗涤一次。然后以0.03ug/ul施用DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吡啶,Invitrogen)且将其在室温孵育5min,然后用PBS洗涤。结果显示,如预期,如下详述制备且根据所使用的制剂以3或1 μ M给药的Abeta寡聚体与突触处的神经元结合,如由红色染料所显示。在具有早期阿尔茨海默病的人中,与年龄匹配的认知正常的个体相比,海马中的突触数目显示为减少18%(Scheff等人'07),且该结果还可以在该检定中通过荧光点以及因此的突触数目的20%消退而可视化。然而,在化合物II(15uM)的共存下,Abeta结合基本上减少到对照水平,且绿色荧光未受影响,表明突触数目未减少。参见图3A、3B、3C和3D。在图3A-板块A中,Abeta 42寡聚体与突触后棘结合,图3A-板块B显示突触前棘在初级神经元中经突触素标记(21DIV)。图3A-板块C和D分别显示当已将IXa、IXb添加到培养物时处于基本上对照水平的突触后棘和突触。如在图3C的条形图所示定量显示,相比于单独的媒介物(第一条),单独添加的Abeta 42寡聚体在24小时后(第四条)引起突触素点密度降低20%(如计算)。该损失被化合物II或IXa、IXb(第五或第六条)逆转,且该结果统计学显著。在不存在Abeta寡聚体的情况下,化合物IXa、IXb或化合物II均不影响突触数目(阴影条)且其保持于与对照(单独的媒介物)可比的水平。比例尺=20um。 $p<0.001$ ANOVA。图3D($p<0.001$ ANOVA)也是条形图且显示通过Abeta点计算的Abeta结合强度在

化合物II或IXa、IXb的存在下减少18%，而该降低足以允许突触计数在该化合物的存在下达到对照水平。

[0991] 此外，在以浓度依赖方式存在化合物IXa和IXb的混合物时，点状突触Abeta寡聚体结合减少38%，IC₅₀为1.2μM(数据未示出)。点强度的条形图显示，正常双峰结合群(具有亮点的神经元和具有较不亮点的群)在药物存在下左移(数据未示出)。已经报道对Abeta寡聚体结合的部分抑制恢复100%的LTP功能(Strittmatter SM等人, Cellular Prion Protein Mediates Impairment of Synaptic Plasticity by Amyloid-Beta Oligomers Nature (2009) 457 (7233:1128-32))。此外，如图3C所示，与媒介物处理(第一条)相比，Abeta寡聚体(第四条)在24小时后引起突触素点密度降低20%，其被5μM的化合物IXa和IXb的混合物逆转(第五条)。不存在Abeta时(第二条)，化合物IXa和IXb的混合物不影响突触数目。Abeta寡聚体引起突触数目降低18.2%；该损失的100%被5μM的化合物IXa、IXb或II消除(图3C)。化合物IXa和IXb的混合物以1.21μM的IC₅₀引起Abeta标记点密度降低17.7%(图3D)。

[0992] 用DAPI可视化的细胞核表现出正常的形态，表明不存在神经退化。使用选自被式I~IX包括的那些、以及描述为以上σ-2配体的其他化合物的其他测试化合物重复该步骤。

[0993] Abeta寡聚体制剂：

[0994] 人淀粉样蛋白肽1~42得自California Peptide，视质量控制分析而定具有大量选择。根据上述的公开方法来制备Abeta 1~42寡聚体。[参见，例如Dahlgren等人，“Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability”J Biol Chem.2002Aug30;277 (35):32046-53.Epub 2002Jun 10.;LeVine H 3rd.“Alzheimer’s beta-peptide oligomer formation at physiologic concentrations”Anal Biochem.2004Dec 1;335 (1):81-90;Shrestha等人，“Amyloid beta peptide adversely affects spine number and motility in hippocampal neurons”MolCell Neurosci.2006Nov;33 (3):274-82.Epub 2006Sep 8;Puzzo等人，“Amyloid-beta peptide inhibits activation of the nitric oxide/cGMP/cAMP-responsive element-binding protein pathway during hippocampal synaptic plasticity”J Neurosci.2005Jul 20;25 (29):6887-97;Barghorn等人，“Globular amyloid beta-peptide oligomer-a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer’s disease”J Neurochem.2005Nov;95 (3):834-47.Epub 2005Aug 31;Johansson等人,Physiochemical characterization of the Alzheimer’s disease-related peptides A beta 1-42Arctic and A beta 1-42wt.FEBS J.2006Jun;273 (12):2618-30]以及得自脑的Abeta寡聚体(参见，例如Walsh等人,Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo.Nature (2002).416,535-539;Lesne等人,A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory.Nature.2006Mar 16;440 (7082):352-7;Shankar等人,Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer’s brains impair synaptic plasticity and memory.Nat Med.2008Aug;14 (8):837-42.Epub 2008Jun 22)。寡聚体制剂的质量控制由确定寡聚体尺寸范围和相对浓度的蛋白印迹以及证实胞吐加速而没有毒性的MTT检定构成。在各个基于图像的检定中经由使用DNA结合染料DAPI (Invitrogen)可视化的核形态的定量而监测毒性。片段化的细胞

核被认为处于晚期细胞凋亡,且测试被排除 (Majno and Joris Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol 1995;146:3-16)。产生不寻常的肽尺寸范围或在标准浓度对神经元产生显著毒性的肽群也将被排除。

[0995] 对照

[0996] 用寡聚体制剂对Abeta抗体6E10的预吸附以剂量依赖的方式 (7.84×10^{-6}) 抑制突触结合,并用作阳性对照。抗体以1:1000 (1微克/ml) 使用。对于突触损失检定,NMDA拮抗剂地佐环平(MK-801)以80uM用作阳性对照。

[0997] 图像处理

[0998] 拍摄图像,并用Cellomics VTI自动显微平台使用神经元分布 (profiling) 算法进行分析。对于统计分析,使用不等方差的Turkey-Kramer成对比较。

[0999] 蛋白免疫印迹

[1000] 将含有Abeta 1~42的样品在非还原示踪样品缓冲液 (Pierce#1859594) 中稀释 (1:5)。将30微升 (μL) 样品装载到十八个孔的预制4~15% Tris-HCl凝胶 (BIO-RAD#345-0028) 中。在BIO-RAD标准预制凝胶系统中使用Tris-甘氨酸缓冲液在125伏特 (V) 进行90分钟的电泳。在Tris-甘氨酸/10% 甲醇缓冲液中,在30V,经120分钟将凝胶转印到0.2μM硝酸纤维素膜上。将膜在PBS溶液中煮5分钟并用TBS/5% 牛奶溶液在4℃封闭过夜。将膜在TBS/1% 牛奶溶液中用稀释成10μg/mL的6E10-HRP (Covance#SIG-39345) 在室温杂交 (probed) 1小时。将膜用TBS/0.05% 吐温-20的溶液洗涤三次,每次40分钟,并用ECL试剂 (BIO-RAD#162-0112) 显色5分钟。在Alpha Innotech FluoChem Q定量成像系统中进行图像获取,并用Alpha View Q软件分析。

[1001] 活性

[1002] 示出化合物II,且预期选自本文具体公开的那些的化合物会显示出根据结合检定 (使用成像处理算法) 部分地阻断约25%的Abeta寡聚体配体与神经元的结合。

[1003] 实施例9:条件性恐惧检定

[1004] 在已知为条件性恐惧的记忆依赖的行为任务的动物模型中测试化合物II。基于所公开的方案来设计研究方案 (参见,例如Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fa M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. J Neurosci. 2008 Dec 31;28 (53):14537-45)。情境记忆的形成取决于内侧颞叶结构例如海马的完整性。在该检定中,将小鼠训练成记住,特定的突出情境 (条件性刺激,CS) 与厌恶事件相关 (在该情况下为轻度足部电击) (非条件性刺激,US)。示出较好学习的动物在放回到相同情境时会增加僵立行为。该僵立不存在于新情境中。情境中增加的僵立表明动物中较强的海马依赖的记忆形成。条件性恐惧中测试的记忆对可溶Aβ的升高较为敏感。化合物II可有效阻止Abeta寡聚体介导的对膜运输的作用。当在施用Abeta寡聚体前施用于动物时,化合物II以剂量依赖的方式阻断寡聚体对记忆的作用。化合物以2pmol的剂量完全阻断寡聚体介导的记忆缺陷。

[1005] 确实,如图4所示,化合物II完全消除Abeta寡聚体诱导的记忆缺陷 (黑条) 而当单独给药时不影响记忆 (阴影条)。单独Abeta寡聚体的作用由红条示出。此外,如图6所示,化合物IXa和IXb的混合物提供相似的结果。该行为效力表明,膜运输检定能够预测哪些化合物可有效治疗由寡聚体引起的行为记忆丧失。如本文所述进行对于记忆的恐惧条件模型。

在任何剂量均没有观察到不利的行为变化。因此,在该化合物在膜运输检定中的表现与其在条件性恐惧检定中的表现之间具有相关性,后者是记忆丧失的标识。预测表2中所列的化合物会在条件性恐惧检定中有活性,因此会显示出可有效治疗记忆丧失。化合物在恐惧条件模型中的表现与其在治疗记忆丧失中的有用性之间的相关性已经在文献中确定。(Delgado MR,Olsson A,Phelps EA."Extending animal models of fear conditioning to humans"Biol.Psychol.2006Jul;73(1):39-48)。

[1006] 实施例10.对大鼠、猕猴和人死后脑样品的放射自显影研究

[1007] 对于 σ -2和 σ -1受体配体的神经学和药理学分布的放射自显影成像研究通过改良先前由Xu等人,2010报道的方案来进行Xu,J.,Hassanzadeh B,Chu W,Tu Z,Vangveravong S,.Tones LA,Leudtke RR,Perlmutter JS,Mintun MA,Mach RH. [^3H]4-(Dimethylamino)-N-[4-(4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)butyl]benzamide,a selective radioligand for dopamine D(3)receptors.II.Quantitative analysis of dopamine D3and D2receptor density ratio in the caudate-putamen.Synapse 64:449-459 (2010),其并入本文以供参考。标记的RHM-1通过Xu J,Tu Z,Jones LA,Wheeler KT,Mach RH. [^3H]N-[4-(3,4-dihydro-6,7-dimethoxyisoquinolin-2(1 H)-yl)butyl]-2-methoxy-5-methylbenzamide:a Novel Sigma-2Receptor Probe.Eur.J.Pharmacol.525:8-17 (2005)的方法得到,其并入本文以供参考。

[1008] 对来自大鼠、猕猴和死后人脑的20 μM 厚的脑切片使用Microm冷冻切片机进行切片,并贴附在superfrost plus载玻片(Fisher Scientific,Pittsburgh,PA)上,并在该研究中使用经过大脑皮质和海马的脑区的连续切片。在 σ -1受体阻断剂(+)-戊唑辛的存在下,将脑切片与5nM [^3H] (+)-戊唑辛(用于 σ -1受体分布)、4nM [^3H] RHM-1(仅用于 σ -2受体表征)、10nM [^3H] DTG和 [^3H] 氟哌啶醇孵育,以对 σ -2受体分布进行成像;在与放射性配体孵育30分钟后,将含有脑切片的载玻片用冰冷缓冲液清洗5次,每次一分钟。

[1009] 将载玻片干燥,并通过在自由侧涂覆铜箔带而使其导电,并将其放置在气体检测器Beta Imager 2000Z Digital Beta成像系统(Biospace,France)的气体室[氩和三乙胺(Sigma-Aldrich,USA)的混合物]中。在气体较好混合并达到均质状态时,再暴露24小时至48小时直至观察到高质量图像。同时对 [^3H] Microscale ([^3H] 微尺度)(American Radiolabeled Chemicals,Inc.,St.Louis,MO)计数,作为对总放射性定量分析的参考,即将cpm/mm²转化为nCi/mg组织。对感兴趣的解剖区域(ROI)用Beta-Image Plus程序(BioSpace,France)进行定量分析,即,在皮质和海马区域获得定量放射性摄取(cpm/nlln2)。基于相应放射性配体的特定活性以及标准 [^3H] Microscale的校准曲线,将结合密度标准化为fmol/mg组织。使用定量放射自显影,对于四种放射性配体 [^3H] (+)-戊唑辛、 [^3H] RHM-1、 [^3H] DTG和 [^3H] 氟哌啶醇,测试一系列稀释的候选化合物(10nM、100nM、1,000nM和10,000nM)对结合位点的竞争,之后分析特异性结合(%对照)以得到皮质和海马区域(齿状回、海马CA 1和CA3)的结合亲和性。

[1010] σ -1和 σ -2受体处的放射自显影分别示于图8A和8B中。图8C示出(A)正常患者、路易体痴呆(DLB)患者或阿尔茨海默病(AD)患者的人额皮质切片中的 [^3H] -(+)-戊唑辛(σ -1受体配体)放射自显影,以及(B)与对照相比的特异性结合的图。如图8A所示,与正常对照相比, σ -1受体在阿尔茨海默病和可能的DLB中在统计学上下调。该发现证实了Mishina等人的

发现,Mishina等人报道早期阿尔茨海默病中的低密度 σ -1受体。Mishina等人,2008,Low density of sigmal receptors in early Alzheimer's disease. Ann.Nucl Med 22:151-156。图8B示出(A)正常患者、路易体痴呆(DLB)患者或阿尔茨海默病(AD)患者的人额皮质切片中的 $[^{125}\text{I}]\text{-RHM-4}$ (σ -2受体配体)放射自显影,以及(B)与对照相比的特异性结合的图。 σ -2受体在AD中在统计学上没有下调。图8C示出(A)在猴额皮质、猴海马或人颞皮质中 σ -2配体对 $18.4\text{nM}[^3\text{H}]\text{-RHM-1}$ 的替代,以及(B)在具有和不具有 $1\mu\text{M}$ 西拉美新和化合物IXA、IXB中每一个的情况下 $[^3\text{H}]\text{-RHM-1}$ 的结合密度图,且西拉美新以及化合物IXA、IXB和II部分替代目标组织中的 $[^3\text{H}]\text{-RHM-1}$ 。

[1011] 实施例11.MTS检定:确定多种 σ -2配体的激动剂或拮抗剂活性

[1012] 以下示出的化合物的细胞毒性使用CellTiter96Aqueous One Solution检定(Promega, Madison, WI)来确定。简单而言,将MDA-MB-435或MDA-MB231或SKOV-3细胞以2000细胞/孔的密度在用 σ -2受体选择性配体处理前的一天接种在96孔板中。在24小时处理后,向各个孔加入CellTiter 96Aqueous One Solution试剂,且将板在 37°C 孵育2小时。将板在Victor3酶标仪(PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT)中于490nm读取。 EC_{50} 值,定义为相对于未处理细胞抑制50%细胞活力所需的 σ 配体浓度,从各个细胞系的剂量响应曲线中确定。西拉美新被接收为激动剂。 σ -2配体的激动剂和拮抗剂被定义如下:如果 σ -2配体的 EC_{50} 小于西拉美新 EC_{50} 的2倍,该 σ -2配体被认为是激动剂;如果 σ -2配体的 EC_{50} 为西拉美新 EC_{50} 的2~10倍,该 σ -2配体被认为是部分激动剂;如果 σ -2配体的 EC_{50} 大于西拉美新 EC_{50} 的10倍,该 σ -2配体被认为是拮抗剂。用于研究的 σ -2配体是:激动剂(西拉美新和SV 119)、部分激动剂(WC26)、拮抗剂(RHM-1)和候选化合物(II和IXa、IXb)。结果显示在图9A中。图9A的数据显示在表10中。

[1013] 表10.肿瘤细胞活力检定的 IC_{50} 值

[1014]

化合物	IC_{50} , 48 小时 (uM)	作用
RHM-1	203 ± 13	拮抗剂
西拉美新	11.8 ± 2.7	完全激动剂
SV-119	21.7 ± 2.9	完全激动剂
WC-26	65.6 ± 6.3	部分激动剂
IXa、IXb	169 ± 9	拮抗剂
II	150 ± 12	拮抗剂

[1015] 将神经元培养物用多种浓度的 σ 化合物处理24小时,并测量相对于媒介物的细胞核强度。与在测试浓度不降低细胞核强度的 σ -2拮抗剂(RHM-1、IXa、IXb和II)相反, σ -2激动剂(西拉美新、SV-119、WC-26)在神经元中引起显著异常的细胞核形态,如图9B所示。因此, σ -2受体激动剂对神经元和癌症细胞有细胞毒性;然而, σ -2受体拮抗剂无毒性且进一步阻断由 σ -2受体激动剂引起的细胞毒性。

[1016] 实施例12.caspase-3检定.确定 σ -2配体的激动剂或拮抗剂活性

[1017] 如本文所述,Xu等人将PGRMC1蛋白复合物识别为推定的 σ -2受体结合位点。Xu等人,2011.Nature Commun.2,文章数380,其并入本文以供参考。 σ -2受体激动剂可以诱导

caspase-3依赖的细胞死亡。Xu等人2011公开了检测PGRMC1通过 σ -2受体激动剂WC-26来调节caspase-3活化的能力的功能性检定。

[1018] Abeta寡聚体引起低水平的caspase-3活化,并引起LTD。高水平的Abeta寡聚体和caspase-3活化引起细胞死亡。Li等人,2010;Olsen和Sheng,2012。本文已表明, σ -2受体激动剂(SV-119、西拉美新)使肿瘤细胞和神经元中的caspase-3活化;参见,例如图10A和10B。 σ -2受体拮抗剂RHM-1抑制肿瘤细胞中的活化(图10A),但是在该实验中不能阻断神经元中由激动剂SV-119引起的活化(图10B)。测试化合物II和IXa、IXb(所有这些为 σ -2受体拮抗剂,如下所示)能够抑制肿瘤细胞中的caspase-3活化,并阻断神经元中 σ -2受体激动剂SV-119对caspase-3的活化。因此,测试化合物II和IXa、IXb用作为肿瘤细胞和神经元的caspase-3检定中的 σ -2受体拮抗剂,如该实施例所证实。

[1019] 根据制造商的操作指南,使用caspase-3比色活性检定试剂盒(Milipore, Billerica, MA)来测量内源caspase-3经由 σ -2受体配体的活化。简单而言,将MDA-MB 435或MDA-MB231细胞以 0.5×10^6 细胞/100mm皿进行铺板。在铺板后24小时,将 σ -2配体添加到培养皿中,以诱导caspase-3的活化。 σ -2配体的终浓度为其EC50。在处理24小时后,收集细胞,在300 μ L的细胞裂解缓冲液中裂解,并以10,000x g离心5分钟。收集上清液,并与caspase-3底物DEVD-pNA在37 $^{\circ}$ C孵育2小时。使用Dc蛋白检定试剂盒(Bio-Rad, Hercules, CA1)确定蛋白浓度。使用Victor³酶标仪(PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT)在405nm测量所得的游离pNA。所测试的配体包括: σ -2激动剂(西拉美新、SV119、WC26)和 σ -2拮抗剂RHMWU-I-102(RHM-1)以及候选化合物(II和IXa、IXb)。使caspase-3活化的配体被认为是激动剂,而不使caspase-3活化的配体被认为是拮抗剂。如图10A所示, σ -2激动剂西拉美新诱导caspase-3的活性,而 σ -2拮抗剂RHM-1以及候选化合物II和IXa、IXb不诱导caspase-3的活性。图10B显示出由 σ -2激动剂SV-119引起的caspase-3活化,其被化合物IXa、IXb和II阻断。化合物IXa、IXb和II在癌细胞和神经元中表现得类似于 σ -2拮抗剂。

[1020] 实施例13. 治疗表型

[1021] 在一些实施方式中,公开内容提供可预测行为效力的体外检定平台。(1)以高亲和性与 σ -2受体选择性结合;且(2)用作为神经元中的功能性拮抗剂的化合物,如果阻断AB诱导的膜运输缺陷、阻断AB诱导的突触损失且在不存在Abeta寡聚体时不影响运输或突触数目,则被预测为具有行为效力。该体外检定中的该活性模式被称为“治疗表型”。 σ -2受体拮抗剂阻断成熟神经元中的Abeta寡聚体作用且在不存在Abeta寡聚体时不影响正常功能的能力是治疗表型的一个标准。在不存在寡聚体时影响运输或突触数目的化合物并非在行为上有效。仅有选择性地阻断寡聚体而不影响正常运输或改变突触数目的那些化合物,在预防和治疗Abeta寡聚体诱导的记忆丧失中是行为上有效的。在一个实施方式中,体外检定平台可以预测行为效力。因此,该平台检定中的该活性模式是治疗表型。

[1022] 例如,参见表11A。

[1023] 表11A. 治疗表型

[1024]

化合物	阻断 A β 诱导的膜运输缺陷 EC50 (uM)	阻断 A β 诱导的突触损失	不存在 A β 时的检定效果	行为效力
II	2.2	++	否	是
Z	6.1	+++	是	否
Z'	4.3	+++	是	否
IXa+IXb	4.9	+++	否	是

[1025] 概括起来,在 σ -2受体处具有高亲和性(优选 K_i 小于约600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、150nM、100nM或70nM)且相比于其他非 σ CNS或靶标受体对 σ 受体具有高于约20倍、30倍、50倍、70倍或优选高于100倍选择性的 σ -2拮抗剂具有较好的药物样特性(包括脑渗透性和较好的代谢和/或血浆稳定性),且具有治疗表型的 σ -2拮抗剂被预测为具有行为效力且可以用于在需要的患者中治疗Abeta寡聚体诱导的突触功能障碍。

[1026] 预测为具有口服生物利用度的一些化合物II类似物的功能性神经元表型示于表11B中。

[1027] 表11B. 功能性神经元表型

[1028]

选择性	化合物	抑制 Abeta 寡 聚体诱导 的膜运输 EC50 (uM)	S1 结合 Ki (nM)	S2 结合 Ki (nM)	阻断突触 损失	功能性神 经元表型
在 σ -2 处 较高的亲和性	II	2.2	500	9	100%	拮抗剂
	II(+) 异构体	5.6	100	80	47%	拮抗剂
	W	8.7	110	36	43%	拮抗剂
	S'	>20	25	8	0%	无活性
	P	>20	320	110	0%	无活性
在 σ -1 处 较高的亲和性	A	3.4	3	13	100%	拮抗剂
	B	5.5	1.3	3.9	100%	拮抗剂
	X	6.1	3.5	16	100%	拮抗剂
	E	8.2	2	3.6	34%	拮抗剂
	II(-) 异构体	10.9	46	63	0%	拮抗剂
在 σ -2 和 σ -1 处的 相当的亲和性	Y	4.3	78	85	100%	拮抗剂
	R'	>20	11	16	33%	无活性

[1029] 治疗表型

[1030] 表11C示出对 σ -2或 σ -1受体具有高亲和性的已知现有技术化合物。一些 σ -2配体落入三种功能神经元表型：拮抗剂(阻断Abeta信号传导)；激动剂(以U形剂量响应曲线以及高剂量下的毒性阻断Abeta信号传导)；以及无活性(在神经元培养物中没有作用)。已知的现有技术 σ -1受体配体落入两个类别：拮抗剂(阻断Abeta信号传导)和无活性(在神经元培养物中没有作用)。大多数现有技术化合物具有低选择性，即它们对其他非 σ 受体具有显著亲和性。一些现有技术化合物可能无法穿透血脑屏障(BBB)且很可能是氧化代谢的底物，因此不符合治疗分布。

[1031] 表11C. 化合物-选择性 σ -2和 σ -1受体配体

[1032]

选择性	化合物	抑制 Abeta 寡聚体诱导的膜运输 EC50 (uM)	S1 结合 Ki (nM)	S2 结合 Ki (nM)	功能性神经元表型
在 σ -2 处较高的亲和性	PB 28	1	15	0.8	拮抗剂
	西拉美新	1.3	19	0.19	激动剂
	WC-26	1.6	1,400	3	激动剂
	SM-21	2.2	1050	145	拮抗剂
	SV119	2.6	1,400	8	激动剂
	M-14	6.2	12,900	8	拮抗剂
	艾芬地尔	>20	26	4.9	无活性
	苏-艾芬地尔	>20	59	0.9	无活性
	DTG	>20	88	35	无活性
在 σ -1 处较高的亲和性	NE 100	1.3	1.1	170	拮抗剂
	BD1008	1.5	2.2	8	拮抗剂
	BD1047	2.4	0.9	47	拮抗剂
	氟伏沙明	2.5	13	710	拮抗剂
	戊唑辛	7.6	3	>5,000	拮抗剂
	PPBP	10.9	0.8	1	拮抗剂
	氟哌啶醇	11	5	110	拮抗剂
	PRE-84	>30	2.2	13,091	无活性
	BD1063	>30	8.8	625	无活性
	SKF 10,047	>30	149	>10,000	无活性

[1033] 尽管一些临床化合物具有期望的功能性表型,但它们不满足期望的治疗分布。具有期望的拮抗剂功能性神经元表型但是不满足治疗分布的标准(非选择性或无法跨越BBB或被预测为氧化底物并具有代谢不稳定性)的已知现有技术化合物示于表11D。

[1034] 表11D. 某些已知化合物的表征

[1035]

Cpd	膜运输	功能性神	σ -1 受体	σ -2 受体	选择性其	药物样特
-----	-----	------	----------------	----------------	------	------

[1036]

	IC50 (μ M)	经元表型	Ki (nM)	Ki (nM)	他活性	性
PB 28	1	拮抗剂	15	0.8	未报道	氧化底物
SM-21	2.2	拮抗剂	1050	145	毒蕈碱拮抗剂	氧化底物
M-14	6.2	拮抗剂	12,900	8	D3	不 BBB, 氧化底物
NE 100	1.3	拮抗剂	1.1	170	未报道	氧化底物
BD1008	1.5	拮抗剂	2.2	8	未报道	氧化底物
BD1047	2.4	拮抗剂	0.9	47	D2, β_3 -AR	氧化底物
氟伏沙明	2.5	拮抗剂	13	710	5HT、DA、AR 转运体	是
(+)戊唑辛	7.6	拮抗剂	3	>5,000	NMDAR、PCP	是
PPBP	10.9	拮抗剂	0.8	1	未报道	氧化底物
氟哌啶醇	11	拮抗剂	5	110	D2、D3、D4、5HT2A、 α 1B、 α 2A、 α 2B、 α 2C、NMDAR、Ach、GluR、Ca ²⁺	是

[1037] 此外,与 σ -2和/或 σ -1受体结合的很多临床化合物不具有高选择性,如表11E所示。实际上,相比于其他非 σ 受体,对于 σ 受体为10倍、20倍以及特别是100倍的选择性是很罕见的。

[1038] 表11E.临床化合物选择性

[1039]

药物	治疗作用	σ 亲和性 (S1/S2) nM	其他靶标
氟西汀	SSRI 抗抑郁	75/260	5-HT2C (33 nM)、 2A (141 nM)、毒 蕈碱 M1~M4 (500 nM)、五羟色胺转 运体 (1~270 nM)

[1040]

氟伏沙明	SSRI 抗抑郁	13/710	多巴胺转运体 (1.5 nM)、五羟色胺 (12 nM)、肾上腺素能转运体 (299 nM)
戊唑辛	阿片类镇痛	1.2/5,000	NMDAR2B (2.5 uM)、2A (2.7 uM)、PCP (2.9 uM)
奥匹哌醇	抗抑郁, 抗焦虑	7/56	5-HT _{2A} 、B、C (120 nM), α 1A、1B (200 nM)
西拉美新	抗抑郁, 抗焦虑	19/0.19	D ₂ (800 nM), α 1A、1B (300 nM)
库他美新	抗抑郁, 中风	17/>1800	VACht (50 nM), 毒蕈碱 M ₁ 、2, D ₂ (2 uM), α 1 AR, 5-HT _{1a/2} , H ₁ (2 uM)
Anavex 1-41	阿尔茨海默病	7/>10,000	毒蕈碱 M ₁ ~M ₄ (18~114 nM)、Na+ch ₂ (>10 uM)
Anavex 2-73	阿尔茨海默病	860/>20,000	毒蕈碱 M ₁ ~M ₄ (3~5 uM)、NMDAR2B (8 uM)、Na+ch ₂ (5 uM)
II	阿尔茨海默病	500/9	D ₃ (4 uM)、Mu 阿片样物质 (4 uM)、Na+ch ₂ (2 uM)
IXa、IXb	阿尔茨海默病	31/54	DA 转运体 (1.5 uM)

[1041] 实施例14: 体外毒性

[1042] 代表性 σ -2拮抗剂II和IXa、IXb在急性或慢性体外给药时不引起神经元或胶质细胞毒性。 σ -2受体拮抗剂消除或降低Abeta寡聚体诱导的膜运输变化。当在不存在寡聚体的情况下给药时, 没有出现化合物对膜运输的显著作用。当以EC₅₀浓度 (高达50 μ M II或IXa、IXb) 在三天内测试达10次时, 相对于神经元数目、胶质细胞数目、细胞核尺寸、细胞核形态、

轴突长度、细胞骨架形态没有毒性。参见表12。表12

[1043]

化合物	IXa、IXb	II
EC50 (uM)	4.9	2.2
Abeta的最大抑制(浓度)	100% (14)	85% (10)
计算的Ki*	0.58	0.26
Ki处的单独Cpd	+9%	+1%

[1044] *Abeta的 $K_m = 0.4 \mu\text{M}$; 检定浓度 $3 \mu\text{M}$ 总Abeta。

[1045] 在大量标准检定中测试化合物II的体外毒性。体外毒性研究中的测试显示,在 $10 \mu\text{M}$ 没有基因毒性(AMES,微核,细菌细胞毒性)。在 $10 \mu\text{M}$ 的66%的HepG2毒性(在受体x处为100倍以上亲和性)可能是由于化合物亲脂性或HepG2肿瘤细胞系中的受体过表达。CYP 450酶2D6、3A4和2C19的部分抑制(46~73%)发生在 $10 \mu\text{M}$ 。在 100nM 处观察到中度hERG抑制(24%)。化合物II在PGP处表现出非常弱($\text{IC}_{50} > 30 \mu\text{M}$)的活性。

[1046] 实施例15:化合物对映异构体在膜运输检定中的分离和活性

[1047] 将化合物II分离成其(+)和(-)对映异构体。将外消旋混合物施用至手性柱CHIRALPAK AD-H(直链淀粉三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)涂覆在硅胶上; $4.6 \times 250 \text{mm}$)。将15微升体积的样品注射到柱中。洗脱液为己烷/EtOH/TEA(95/5/0.1),25摄氏度,流速为 1ml/min 。两种对映异构体分离为不同的峰。(+)对映异构体在约16分钟洗脱到第一个峰,且(-)对映异构体在约20分钟洗脱到第二个峰。对映异构体为至少98%纯。(+)对映异构体具有+10.1的比旋度(c 1.80于MeOH中),且(-)对映异构体具有-7.2的比旋度(c 1.80于MeOH中)。在实施例6所述的膜运输检定中,(+)对映异构体比(-)对映异构体更有效力。在一个样品中,在抑制膜运输检定中的 β 淀粉样蛋白诱导的缺陷中,(+)对映异构体具有5.6的 EC_{50} ,且(-)对映异构体具有 $10.9 \mu\text{M}$ 的 EC_{50} 。

[1048] 实施例16.口服可利用的化合物的行为效力-改善转基因阿尔茨海默病小鼠模型中的记忆缺陷

[1049] 将雄性hAPP Swe/Ldn转基因(Tg)小鼠用作AD的TG模型。用媒介物、10或 30mg/kg/天 的CB或CF经p.o.处理5.5个月的转基因小鼠,以及媒介物处理的非转基因同窝仔进行标准条件性恐惧范例。在情境条件性恐惧中,相对于媒介物处理的非转基因同窝仔,用媒介物p.o.处理5.5个月的媒介物处理9个月大雄性hAPP Swe/Ldn转基因(Tg)小鼠表现出显著的记忆缺陷。

[1050] 当在训练24小时后,测试动物的联想记忆时,使用反复测量的双因素(基因型和时间)ANOVA没有检测出转基因和非转基因媒介物处理小鼠之间的总僵立时间的显著差异。然而,在各个定时的时间间隔内,僵立行为的更加敏感的分析表明,相比于媒介物处理的非转基因动物,转基因小鼠在1~3分钟时间间隔内表现得更差(Mann-Whitney U测试, $p < 0.05$)。在该时间间隔内,与媒介物相比,用10和 30mg/kg/天 的CB($p < 0.05$)和 30mg/kg/天 的CF($p < 0.005$)处理的转基因动物显著改善表现(Mann-Whitney U测试)。结果显示在图12中,两种剂量的CB显著地逆转AD小鼠中的记忆缺陷;且较高剂量的CF逆转AD小鼠中的记忆缺陷。用10和 30mg/kg/天 的CB或 30mg/kg/天 的CF处理Tg动物,分别在 394 ± 287 、 793 ± 325 或 $331 \pm 373 \text{nM}$ (AVG $\pm$ S.D.)的测量脑浓度改善缺陷。对于口服可利用的化合物的脑/谷血浆和脑/峰

血浆比率示于表13中。

[1051] 表13. 对于口服可利用的化合物的脑/谷血浆和脑/峰血浆比率

[1052]

化合物	剂量 (p.o.)	脑/谷血浆比率	脑/峰血浆比率
CF	30mg/kg	13	0.5
CF	10mg/kg	11	0.2
CB	30mg/kg	14	0.4
CB	10mg/kg	17	0.7

[1053] 因此, 化合物CB和CF均为口服可利用的, 能够实现显著的脑渗透并在老年转基因阿尔茨海默病小鼠模型动物中在慢性长期给药后逆转已建立的记忆缺陷。没有观察到不利的行为效应。

[1054] CB和CF均为选择性、高亲和性 σ -2受体拮抗剂化合物。CB和CF均以高亲和性与 σ -2以及 σ -1受体结合, 如表14中所示。针对一组40种脑受体进行反筛选, 且结果显示CB和CF对 σ 受体具有高选择性, 如表14中所示。

[1055] 表14. 对于口服生物可利用的化合物的受体亲和性

[1056]

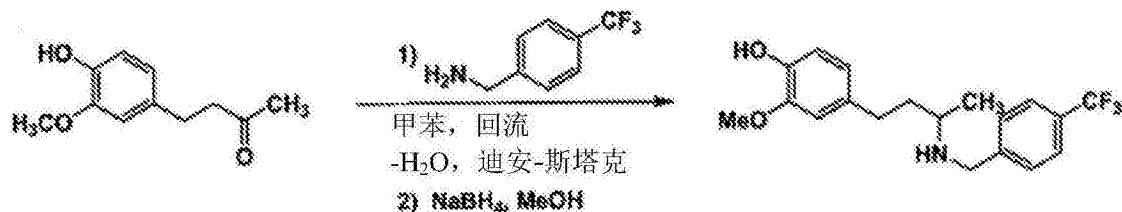
药物	治疗作用	σ 受体亲和性 (σ -1/ σ -2) (Ki, nM)	其他受体亲和性 (Ki, nM)
CB	阿尔茨海默病	19/48	毒蕈碱 M1 (1.5 uM)、M2(1.5 uM)、M3 (1.8 uM)
			κ 阿片样物质 (1.5 uM)
			Ca ⁺⁺ ch-L-型 (860 nM)
			转运体: NE (1.4 uM)、DA (220 nM)、5-HT (970 nM)
CF	阿尔茨海默病	180/50	毒蕈碱 M1 (1.1 uM)、M2(2.5 uM)、M3 (3.7 uM)
			κ 阿片样物质 (6.1 uM)
			Ca ⁺⁺ ch-L-型 (2.5 uM)
			转运体: NE (1.9 uM)、DA (940 nM)、5-HT (3.2 uM)

[1057] 10mg/kg/天剂量的CB引起化合物脑水平处于或高于对 σ 和多巴胺转运体的Ki, 30mg/kg/天剂量则击中这些加上Ca⁺⁺ch和5-HT转运体。随后的研究可以用来确定该化合物的最小有效剂量。30mg/kg/天剂量的CF引起化合物脑水平仅对 σ 受体具有选择性,因此其在 σ 受体处的亲和性解释了其在这些脑浓度的行为效力。

[1058] 合成例

[1059] 合成例1:通过还原胺化合成化合物

[1060]



[1061] 将姜酮(5.00g, 25.7mmol)溶于甲苯(250mL)并且添加4-三氟甲基苄基胺(4.73g, 27.0mmol)。将混合物保持在氮氛下并在回流下加热16小时,通过迪安-斯塔克蒸馏去除水。这时,移除迪安-斯塔克阱并将反应混合物在冰浴上冷却到0℃。在大力搅拌下在30内分钟分批添加硼氢化钠(5g)于甲醇(100mL)中的溶液。当完成添加时,将混合物在回流下加热16小时。这时,将反应混合物冷却到室温并倒入饱和碳酸氢钠水溶液(300mL)。将所得混合物通过旋转蒸发浓缩并且水性残余物在水与氯仿之间分隔开。使氯仿层在无水硫酸钠上干燥,然后过滤和浓缩。然后使用硅胶柱层析采用5%氨-甲醇于氯仿中的溶液的流动相纯化产物。将含有产物的馏分合并和浓缩,然后在高真空下干燥过夜,以提供浅棕色油(6.72g, 74%)。¹H NMR(500MHz, CDCl₃) δ: 7.57 (d, J=7.8Hz, 2H), 7.43 (d, J=7.9Hz, 2H), 6.82 (d, J=7.3Hz, 1H), 6.65 (m, 2H), 5.16-4.42 (br s, 2H), 3.90 (d, J=13.7Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.80 (d, J=13.7Hz, 1H), 2.76-2.70 (m, 1H), 2.67-2.55 (m, 2H), 1.84-1.77 (m, 1H), 1.69-1.63 (m, 1H), 1.17 (d, J=6.3Hz, 3H)。¹³C NMR(125MHz, CDCl₃) δ: 146.7, 144.6, 143.9, 134.0, 129.1, 128.4, 127.5, 125.4, 125.3, 123.2, 120.8, 114.6, 111.0, 55.7, 52.1, 50.6, 38.8, 32.0, 20.1。MS (CI) m/z 353 (M⁺)。

[1062] 经¹H NMR的化学位移测量可能变化例如高达0.2ppm。经¹³HNMR的化学位移测量可能变化例如高达0.5ppm。分析质谱可以具有+/-0.3的实验误差。

[1063] 纯度确定

[1064] 通过HPLC测量产物的纯度。保留时间为2.22分钟的主峰表明纯度大于约80%、85%、90或95%。所使用的HPLC条件如下。

[1065] HPLC条件:

[1066] 流动相A: 13.3mM甲酸铵/6.7mM甲酸于水中的溶液

[1067] 流动相B: 6mM甲酸铵/3mM甲酸于水中的溶液/CH₃CN (1/9, v/v)

[1068] 柱: Synergi Fusion-RP 100A Mercury, 2x 20mm, 2.5微米 (Phenomenex Part No 00M-4423-B0_CE)

[1069] 梯度程序: RT=2.22分钟

[1070]

时间, 分钟	%相B	流速, ml/min
0	100	0.5
1	100	0.5
2.5	40	0.5
3.4	40	0.5
3.5	100	0.5
4.5	100	0.5

[1071] 还通过¹H NMR测量产物的纯度,表明其是纯度大于90%或95%的单一化合物。本文所述的合成可以根据待合成的终产物进行修改。

[1072] 合成例2:通过还原胺化合成化合物



[1074] 将姜酮(5.00g, 25.7mmol)溶于甲苯(250mL)并添加4-氯苄基胺(4.73g, 27.0mmol)。将混合物保持在氮氛下并在回流下加热16小时,通过迪安-斯塔克蒸馏去除水。这时,移除迪安-斯塔克阱并将反应混合物在冰浴上冷却到0℃。在大力搅拌下在30分钟内分批添加硼氢化钠(5g)于甲醇(100mL)中的溶液。当完成添加时,将混合物在回流下加热16小时。这时,将反应混合物冷却到室温并倒入饱和碳酸氢钠水溶液(300mL)。将所得混合物通过旋转蒸发浓缩并且水性残余物在水与氯仿之间分隔开。使氯仿层在无水硫酸钠上干燥,然后过滤和浓缩。然后使用硅胶柱层析采用5%氨-甲醇于氯仿中的溶液的流动相纯化产物。将含有产物的馏分合并和浓缩,然后在高真空下干燥过夜,以提供浅棕色油(6.16g, 75%)。¹H NMR(500MHz, CDCl_3) δ : 7.30–7.24 (m, 4H), 6.81 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 6.66–6.62 (m, 2H), 4.25 (br s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.82 (d, $J=13.2\text{Hz}$, 1H), 3.72 (d, $J=13.2\text{Hz}$, 1H), 2.73 (m, 1H), 2.66–2.51 (m, 1H), 1.86–1.78 (m, 1H), 1.72–1.63 (m, 1H), 1.62–1.51 (m, 1H), 1.17 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H). ¹³C NMR(125MHz, CDCl_3) δ : 146.6, 143.8, 133.9, 132.8, 129.9, 129.7, 128.6, 120.8, 114.5, 110.9, 55.8, 51.9, 50.2, 38.5, 31.9, 31.6, 29.7, 26.9, 22.6, 19.9. MS (MH^+): m/z 320.

[1075] 经¹H NMR的化学位移测量可能变化例如高达0.2ppm。经¹³HNMR的化学位移测量可能变化例如高达0.5ppm。分析质谱可以具有+/-0.3的实验误差。

[1076] 纯度确定

[1077] 通过HPLC测量产物的纯度。保留时间为2.22分钟的主峰表明纯度大于约80%、85%、90或95%。所使用的HPLC条件如下。

[1078] HPLC条件:

[1079] 流动相A:13.3mM甲酸铵/6.7mM甲酸于水中的溶液

[1080] 流动相B:6mM甲酸铵/3mM甲酸于水中的溶液/ CH_3CN (1/9, v/v)

[1081] 柱:Synergi Fusion-RP 100A Mercury, 2x 20mm, 2.5微米 (Phenomenex Part No 00M-4423-B0_CE)

[1082] 梯度程序:RT=2.22分钟

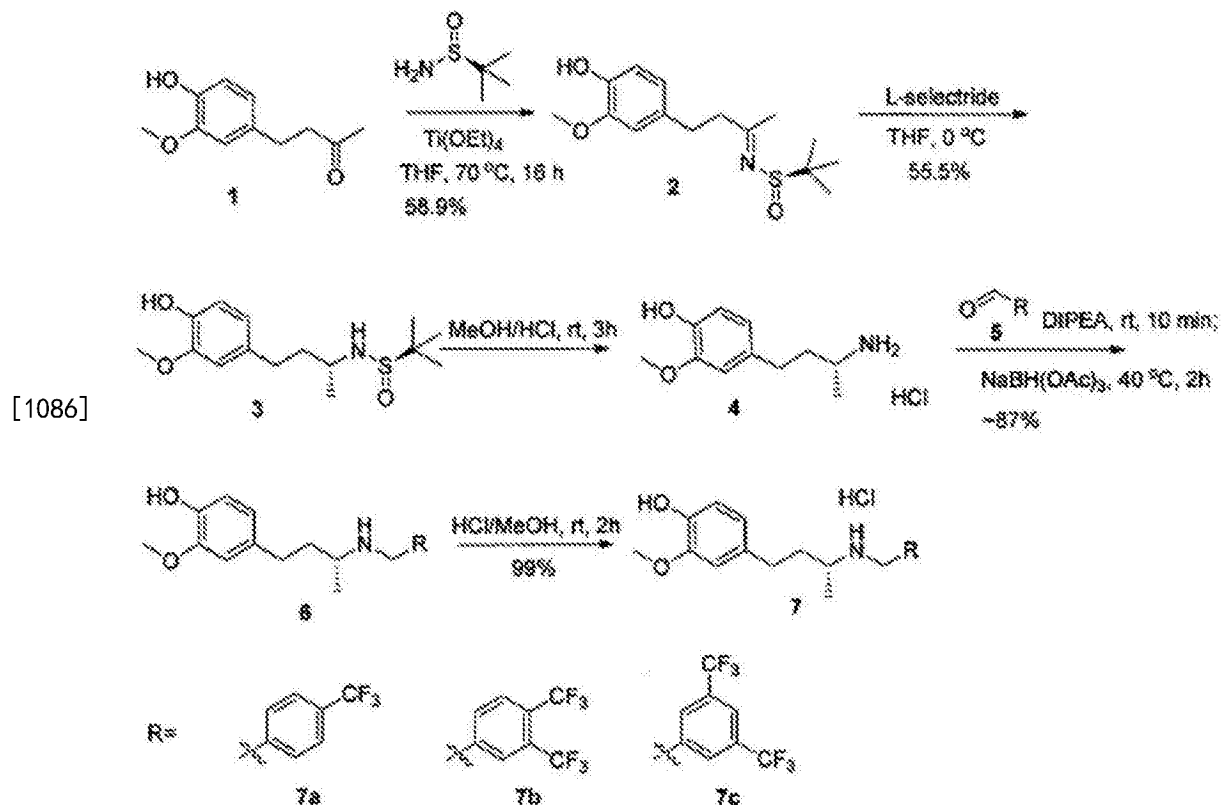
[1083]

时间,分钟	%相B	流速,ml/min
0	100	0.5
1	100	0.5
2.5	40	0.5
3.4	40	0.5

3.5	100	0.5
4.5	100	0.5

[1084] 还通过¹H NMR测量产物的纯度,表明其是纯度大于90%或95%的单一化合物。本文所述的合成可以根据待合成的终产物进行修改。

[1085] 合成例3



[1087] 方案9

[1088] 步骤1:向4-(4-羟基-3-甲氧基-苯基)-丁-2-酮(38.8g,200mmol)于THF(600mL)中的溶液中添加 $\text{Ti}(\text{OEt})_4$ (136.9g,600mmol)和(S)-(-)-叔丁基亚磺酰胺(29g,240mmol)。将混合物在 70°C 搅拌16h,通过冰水猝灭,用EA(3x 300mL)萃取,在 Na_2SO_4 上干燥,浓缩以获得粗产物,其通过柱层析(PE/EA:3/1)纯化以得到标题化合物2(35g,59%)。

[1089] 步骤2:在 0°C 向化合物2(18g,60mmol)于THF(180mL)中的溶液中添加L-selectride(三仲丁基硼氢化锂)(180mL,THF中1.0M,180mmol)。使反应在3h时间内温热至室温。经TLC对反应混合物的分析显示起始亚胺2的完全消耗。然后通过添加水使溶液猝灭,并通过EA(3x 200mL)萃取。将合并的有机层用盐水洗涤,在 Na_2SO_4 上干燥,并在真空下浓缩,以得到残余物,其通过柱层析(PE/EA:2/1)纯化以提供产物。继续用PE/EA(1:1)通过重结晶纯化产物以得到产物3(9.9g,55%)。通过HPLC确定ee值。

[1090] 步骤3:向3(7.0g,23.4mmol)于MeOH(20mL)中的溶液中添加HCl(MeOH中2M,20mL),并将所得溶液在室温下搅拌3h时间。反应混合物的TLC分析显示化合物3的完全消耗。然后在真空下去除溶剂,并将所得残余物4直接用于下一步骤。

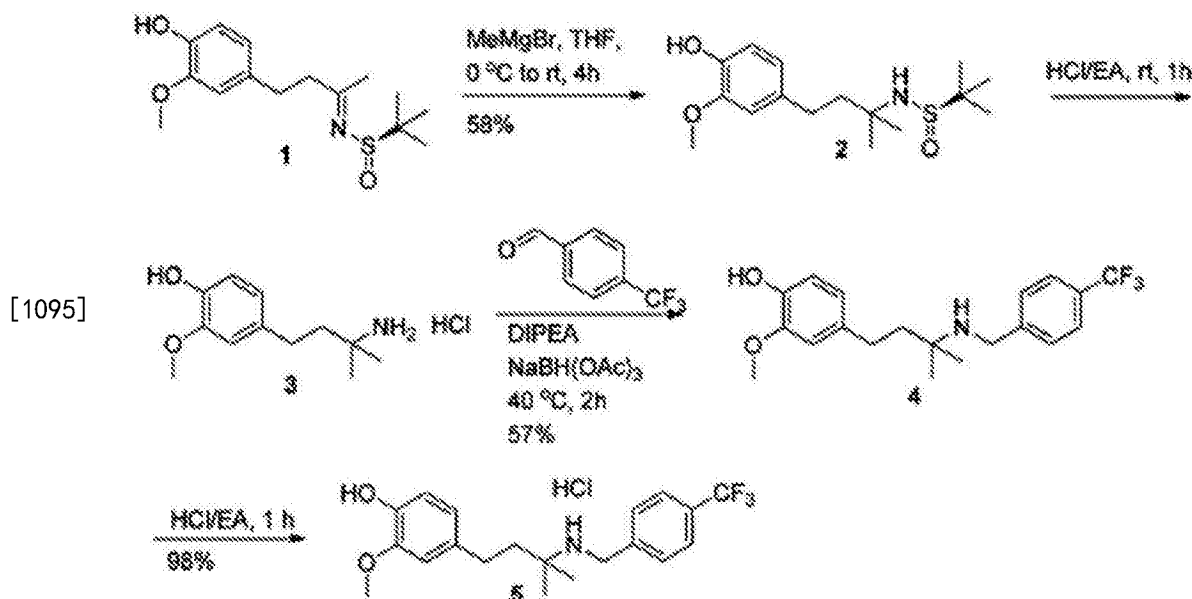
[1091] 步骤4:向粗化合物4(5.4g,23.4mmol)于THF(100mL)中的溶液中添加DIPEA(4.53g,35.1mmol)和4-三氟甲基苯甲醛5(4.28g,24.6mmol)。将所得溶液在室温搅拌10min。然后,添加 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (14.9g,70.2mmol),并将混合物在 40°C 搅拌2h。使混合物经0

℃水淬灭,过滤并通过EtOAc萃取。将有机层通过盐水洗涤,在硫酸钠上干燥,过滤,并在减压下浓缩滤液以提供残余物。将残余物通过柱层析(PE/EA=1:2)纯化以得到产物6(7.0g, 87%)。

[1092] 步骤5:向6(1.0g, 2.8mmol)于MeOH(5mL)中的溶液中添加HCl(MeOH中2M, 20mL),并将所得溶液在室温搅拌30min。去除溶剂以得到产物7a(1.1g, 99%),其为白色固体。化合物7b和7c通过用合适的苯甲醛替换化合物5来相似地制备。

[1093] m/z (ESI+) (M+H)⁺: 7a[354.2]; 7b[422.2]; 7c[422.2]。

[1094] 合成例4



[1096] 步骤1:在0℃向溴化甲镁于THF(5mL)中的溶液中添加1(1.0g, 3.3mmol)于THF(5mL)中的溶液。将混合物在室温搅拌4h,通过添加冰水淬灭,用乙酸乙酯(3x 30mL)萃取,通过真空干燥,以提供粗产物,其通过柱层析(PE/EA:3/1)纯化以得到化合物2(0.6g, 58%)。

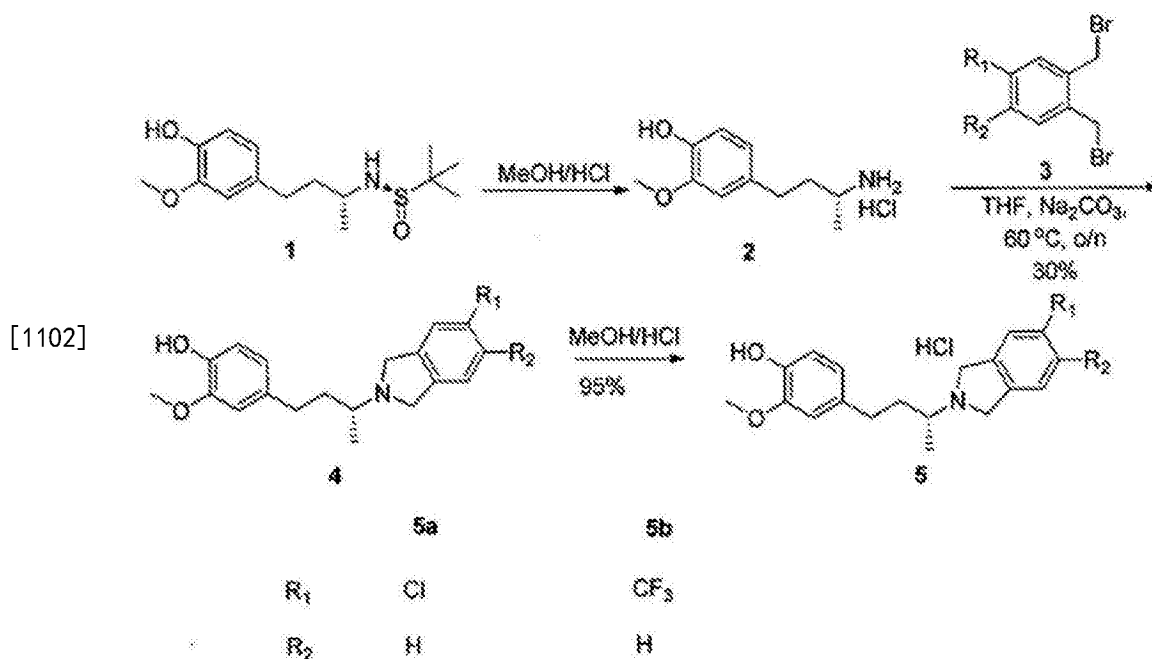
[1097] 步骤2:在0℃向2于EA(10mL)中的溶液中加入HCl(EA中2M, 3mL),并将所得溶液在室温搅拌1h。经TLC对反应混合物的分析显示2的完全消耗。在真空下浓缩,将粗产物直接用于下一步骤。

[1098] 步骤3:随后,向3(0.4g, 1.9mmol)于THF(20mL)中的溶液中加入DIPEA(0.6g, 4.6mmol)和三氟甲基苯甲醛(0.4g, 2.3mmol)。将所得溶液在室温搅拌10min。添加三乙酰氧基硼氢化钠(1.63g, 7.7mmol),并将混合物在40℃搅拌2h。使混合物经0℃水淬灭,过滤,并通过乙酸乙酯(3x 40mL)萃取。将有机层用盐水洗涤,在硫酸钠上干燥,过滤,并在减压下浓缩滤液以提供残余物。将残余物通过柱层析(PE/EA=1:1)纯化以得到4(0.4g, 57%)。

[1099] 步骤4:向4于EA(10mL)中的溶液中添加HCL(MeOH中2M, 2mL),并将所得溶液在室温下搅拌1h。在真空浓缩之后,将残余物用乙酸乙酯洗涤以提供5(0.4g, 98%)。

[1100] m/z (ESI+) (M+H)⁺: 5[368.2]。

[1101] 合成例5



[1103] 方案11

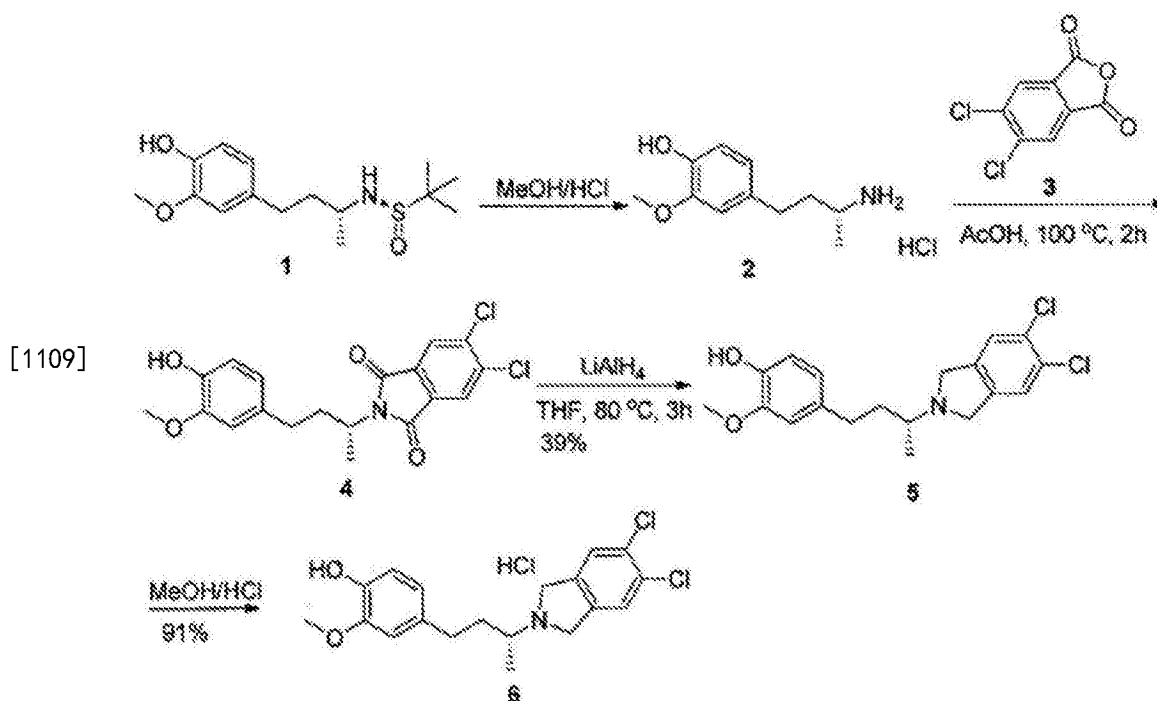
[1104] 步骤1:向化合物1 (2g, 6mmol) 于MeOH (30mL) 中的溶液中添加HCl (MeOH中2M, 30mL), 并将所得溶液在室温搅拌3h。反应混合物的TLC分析显示化合物1的完全消耗。然后在真空下去除溶剂, 并将其直接用于下一步骤。

[1105] 步骤2:向2 (0.4g, 2mmol) 于THF (10mL) 中的溶液中添加化合物3a (0.54g, 2mmol) 于THF (5mL) 中的溶液。添加 Na_2CO_3 (0.6g, 6mmol), 并将所得溶液在 60°C 搅拌过夜。在浓缩之后, 将残余物通过FCC纯化以得到化合物4 (0.2g, 30%)。

[1106] 步骤3:向4于EA (5mL) 中的溶液中添加HCl (MeOH中2M, 3mL), 并将所得溶液在室温搅拌1h。在真空内浓缩之后, 将残余物通过乙酸乙酯洗涤以得到化合物5 (0.2g, 95%)。化合物5b通过用合适的二苄基溴替换化合物3来相似地制备。

[1107] m/z (ESI+) ($\text{M}+\text{H}$)⁺: 5a [332.1]; 5b [366.1]。

[1108] 合成例6



[1110] 方案12

[1111] 步骤1:向化合物1 (0.4g, 1.3mmol) 于MeOH (10mL) 中的溶液中添加HCl (MeOH中2M, 10mL), 并将所得溶液在室温搅拌3h。反应混合物的TLC分析显示化合物1的完全消耗。在真空中去除溶剂, 并将其直接用于下一步骤。

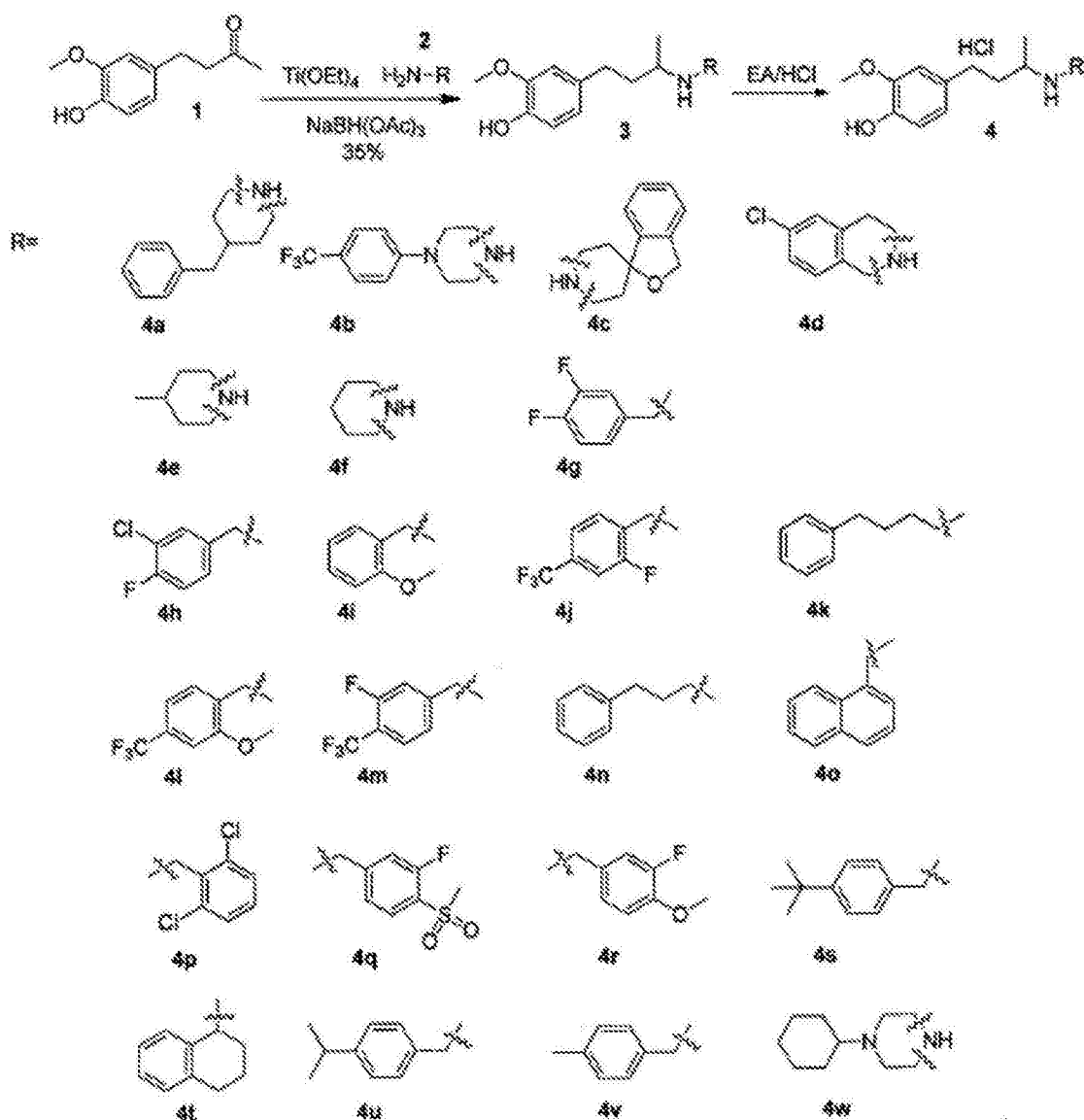
[1112] 步骤2:将化合物2 (0.2g, 1mmol) 和3 (0.2g, 1mmol) 溶于乙酸 (10mL), 在100 °C搅拌2h。将混合物冷却到室温, 经水 (10mL) 猝灭, 通过EtOAc (3x 20mL) 萃取, 干燥, 浓缩, 以得到标题化合物4 (0.3g, 76%)。

[1113] 步骤3:向4 (0.3g, 0.7mmol) 于THF (10mL) 中的溶液中添加LAH (0.1g, 3.5mmol)。将混合物在80 °C搅拌3h。使混合物经水 (0.1mL)、15% NaOH (0.1mL) 和水 (0.3mL) 猝灭, 过滤, 浓缩。将粗产物通过柱层析 (PE/EA=5:1) 纯化以得到化合物5 (0.1g, 39%)。

[1114] 步骤4:向5于乙酸乙酯 (5mL) 中的溶液中添加HCl (MeOH中2M, 3mL) 并将所得溶液在室温搅拌1h。将反应通过真空浓缩以提供标题化合物6 (0.16g, 91%)。

[1115] m/z (ESI+) (M+H)⁺: 6 [366.2]。

[1116] 合成例7



[1117]

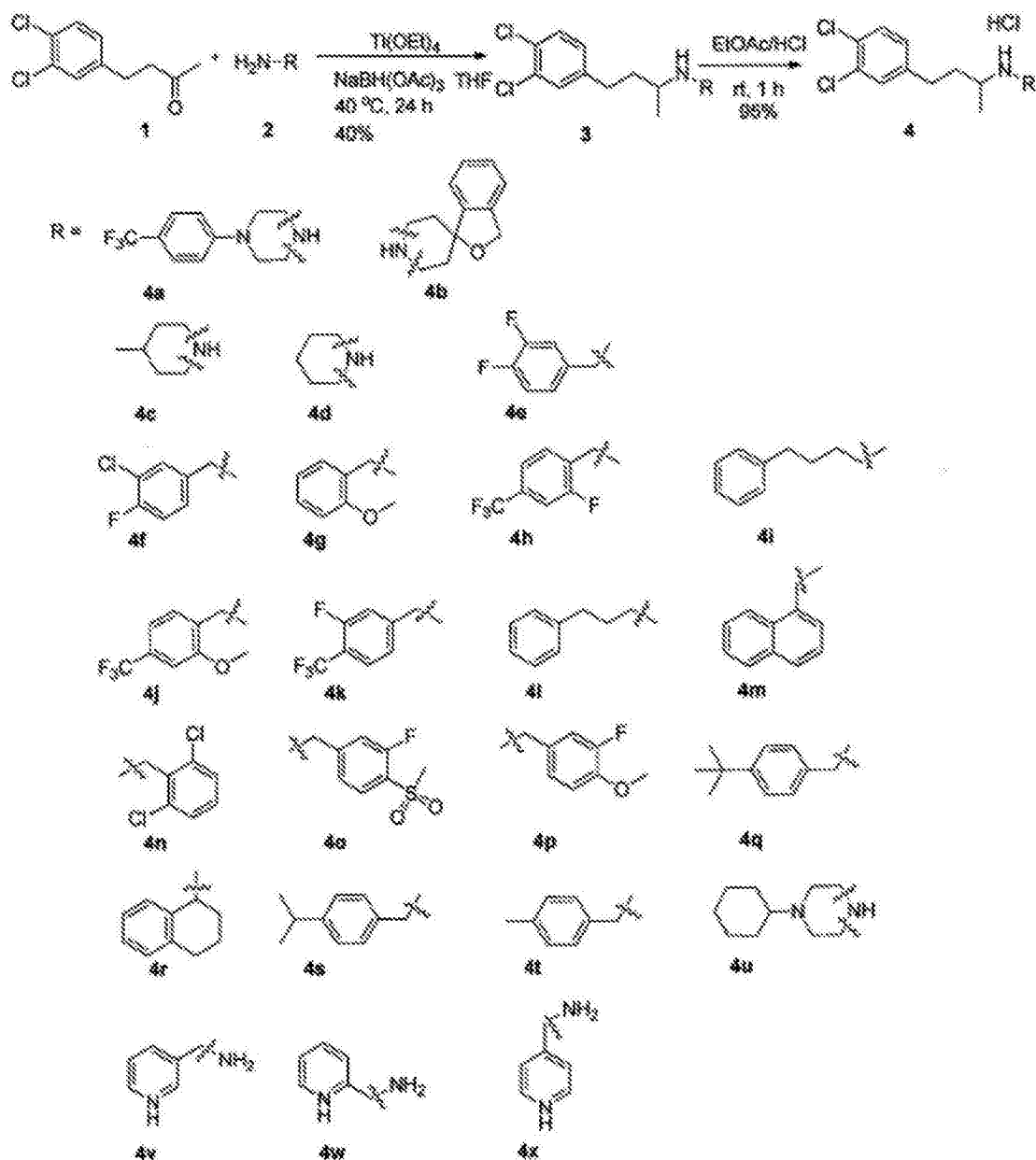
[1118] 方案13

[1119] 步骤1: 向1 (0.278g, 1.43mmol) 于THF (20mL) 中的溶液中添加Ti (OEt)₄ (2.1g, 9.2mmol) 和4-苄基哌啶 (0.34g, 1.3mmol)。将混合物在40℃搅拌一天, 经冰水猝灭, 用乙酸乙酯 (3x 20mL) 萃取。在真空内浓缩之后, 将粗产物通过柱层析 (PE/EA: 1/1) 纯化以得到3 (205mg, 35%)。

[1120] 步骤2: 向3 (0.2g, 0.47mmol) 于乙酸乙酯 (5mL) 中的溶液中添加HCl (MeOH中2M, 3mL) 并将所得溶液在室温搅拌1h。将反应通过真空浓缩以得到4a (0.2g, 95%)。化合物4b~4w通过用合适的胺替换胺化合物2来相似地制备。

[1121] m/z (ESI+) (M+H)⁺: 4a [354.3]; 4b [409]; 4c [368.2]; 4d [346.1]; 4e [278.50]; 4f [264.05]; 4g [322.10]; 4h [338.05]; 4i [316.15]; 4j [372.10]; 4k [328.25]; 4l [384.15]; 4m [372.10]; 4n [314.10]; 4o [336.15]; 4p [354.10]; 4q [382.20]; 4r [334.15]; 4s [342.15]; 4t [326.15]; 4u [328.20]; 4v [300.10]; 4w [347.6]。

[1122] 合成例8



[1123]

[1124] 方案14

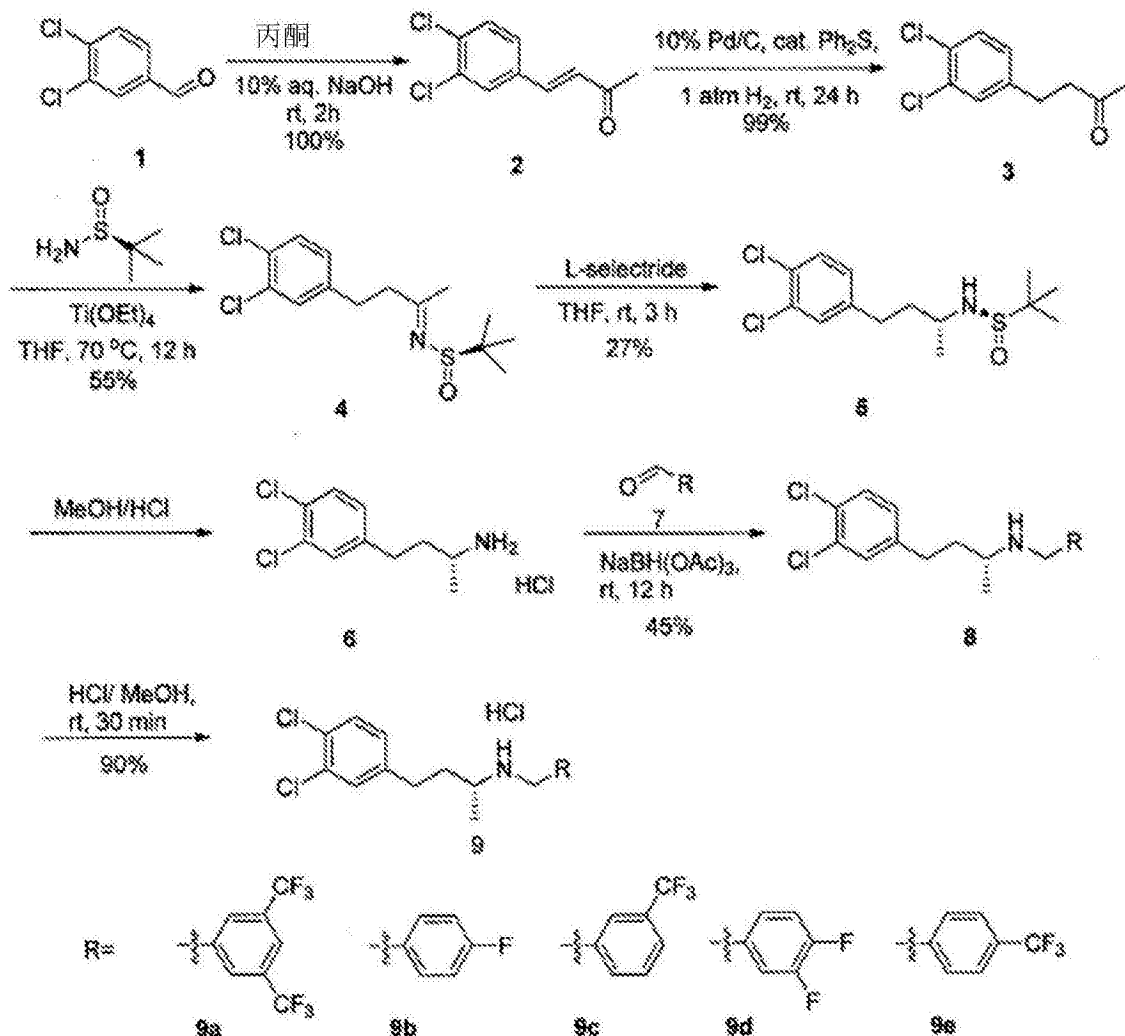
[1125] 步骤1: 向1 (0.31g, 1.43mmol) 于THF (20mL) 中的溶液中添加Ti(OEt)₄ (0.595g, 2.58mmol) 和N-(4-三氟甲基苯基)-哌嗪2 (0.3g, 1.3mmol)。将混合物在40℃搅拌24h, 通过添加冰水猝灭, 用乙酸乙酯 (3x 20mL) 萃取, 干燥。通过柱层析 (PE/EA: 1/1) 纯化得到产物3 (0.25g, 41%)。

[1126] 步骤2: 向化合物3 (0.25g, 0.58mmol) 于乙酸乙酯 (5mL) 中的溶液中添加MeOH-HCl (2N, 4mL)。将混合物在室温搅拌1 h。真空内的浓缩得到化合物4 (0.25g, 95%)。化合物4b~4x通过用合适的胺替换胺化合物2来相似地制备。

[1127] m/z (ESI+) (M+H)⁺: 4a [431.2]; 4b [390.2]; 4c [300.05]; 4d [286.00]; 4e [344.05]; 4f [362.00]; 4g [338.05]; 4h [394.10]; 4i [350.05]; 4j [406.05]; 4k [394.15]; 4l [336.05]; 4m [358.05]; 4n [378.05]; 4o [445.20]; 4p [356.10]; 4q [364.10]; 4r [348.05]; 4s [350.10]; 4t [322.10]; 4u [369.2]; 4v [309.00]; 4w [308.95]; 4x [309.00]。

[1128] 合成例9

[1129]



[1130] 方案15

[1131] 步骤1: 向1 (3.5g, 20mmol) 于丙酮 (20mL) 和乙醇 (2mL) 中的溶液中添加NaOH水溶液 (10%, 15mL) 和水 (80mL)。将混合物在室温搅拌2h, 用EA (3x 50mL) 萃取。将有机层干燥并浓缩以得到2 (4.3g, 100%)。

[1132] 步骤2: 向2 (4.3g, 20mmol) 于MeOH (50mL) 中的溶液中添加二苯基硫 (0.15mL) 和Pd/C (10%, 0.43g)。将混合物在25 °C在1atm氢下大力搅拌24h。将反应混合物经硅藻土 (Celite) 垫过滤, 用甲醇洗涤, 并将滤液浓缩以提供3 (4.3g, 99%)。

[1133] 步骤3: 向3 (10g, 46mmol) 于THF (100mL) 中的溶液中添加 $\text{Ti}(\text{OEt})_4$ (21g, 92mmol) 和(S)-(-)-叔丁基亚磺酰胺 (6.1g, 50mmol)。将混合物在70 °C搅拌12h, 经冰水猝灭, 用乙酸乙酯 (3x 250mL) 萃取。在真空浓缩之后, 将粗产物通过柱层析 (PE/EA: 10/1) 纯化以提供化合物4 (8.1g, 55%)。

[1134] 步骤4: 在0 °C向化合物4 (3.3g, 10mmol) 于THF (30mL) 中的溶液中添加L-Selectride (33mL, THF中1.0M, 33mmol)。使反应在3h时间内温热至室温。经TLC对反应混合物的分析显示起始亚胺4的完全消耗。将溶液通过水猝灭, 并通过乙酸乙酯 (3x 30mL) 萃取。将合并的有机层用盐水洗涤, 在 Na_2SO_4 上干燥, 并在真空下浓缩以得到残余物, 其通过柱层析 (PE/EA: 2/1) 纯化以提供产物5 (0.9g, 27%)。

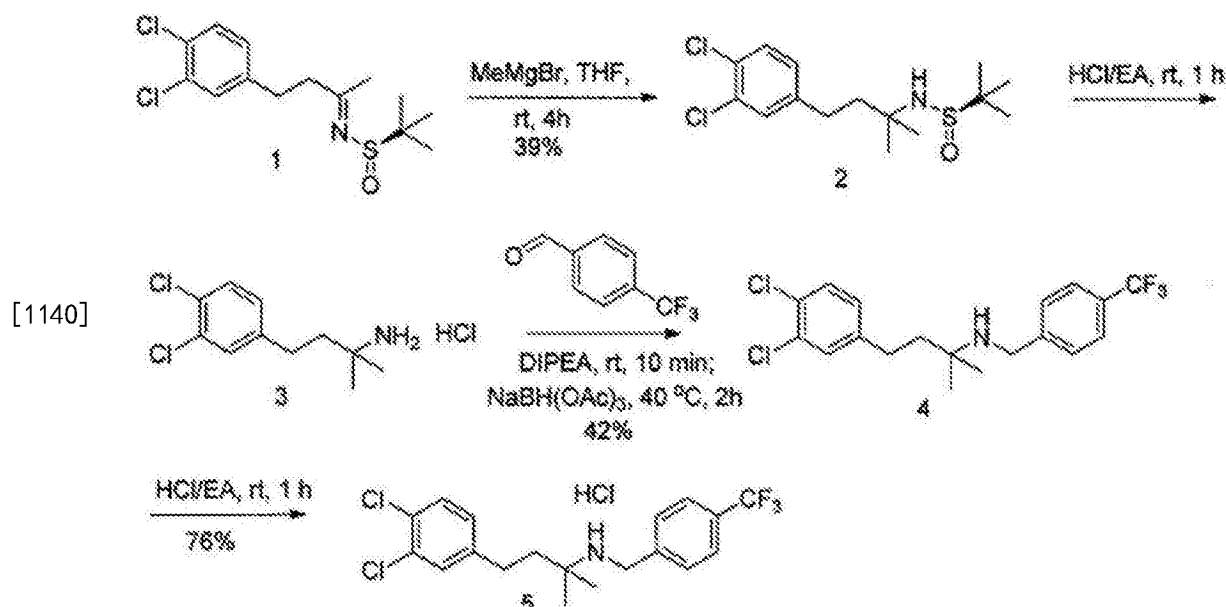
[1135] 步骤5:向化合物5 (5g, 15.5mmol) 于MeOH (10mL) 中的溶液中添加HCl (MeOH中2M, 10mL) 并将所得溶液在室温搅拌3h。反应混合物的TLC分析显示化合物5的完全消耗。在真空中去除溶剂, 并将粗6 (3.95g, 100%) 直接用于下一步骤而无需进一步纯化。

[1136] 步骤6:随后向6 (0.6g, 2.4mmol) 于THF (10mL) 中的溶液中添加DIPEA (0.4g, 3.1mmol) 和3-三氟甲基苯甲醛 (0.41g, 2.4mmol)。将所得溶液在室温搅拌10min。添加NaBH(OAc)₃ (1.0g, 4.7mmol) 并将混合物搅拌12h。将混合物经0℃水淬灭, 过滤并通过EtOAc (3x 30mL) 萃取。将有机层用盐水洗涤, 在硫酸钠上干燥, 过滤, 并在减压下浓缩滤液以提供残余物。将残余物通过柱层析 (PE/EA=1:1) 纯化以得到化合物8 (0.4g, 45%)。

[1137] 步骤7:向8 (0.4g, 1.08mmol) 于MeOH (5mL) 中的溶液中添加HCl (MeOH中2M, 4mL) 并将所得溶液在室温搅拌0.5h。将反应浓缩以得到胺9a (0.4g, 90%)。化合物9b~9e通过用合适的苯甲醛替换化合物7来相似地制备。

[1138] m/z (ESI+) (M+H)⁺: 9a [444.2]; 9b [326.25]; 9c [376.2]; 9d [344.2]; 9e [376.1]。

[1139] 合成例10



[1141] 方案16

[1142] 步骤1:在0℃向溴化甲镁于THF (3M, 15mL) 中的溶液中添加1 (1.5g, 4.6mmol) 于THF (20mL) 中的溶液。将混合物在室温搅拌4h, 经冰水淬灭, 用乙酸乙酯 (3x 30mL) 萃取。在浓缩之后, 将粗产物通过柱层析 (PE/EA:3/1) 纯化以提供化合物2 (0.6g, 39%)。

[1143] 步骤2:向化合物2 (0.6g, 1.8mmol) 于乙酸乙酯 (10mL) 中的溶液中添加HCl (MeOH中2M, 3mL) 并将所得溶液在室温搅拌1h。反应混合物的TLC分析显示出化合物2的完全消耗。然后在真空中去除溶剂, 并将粗化合物3直接用于下一步骤。

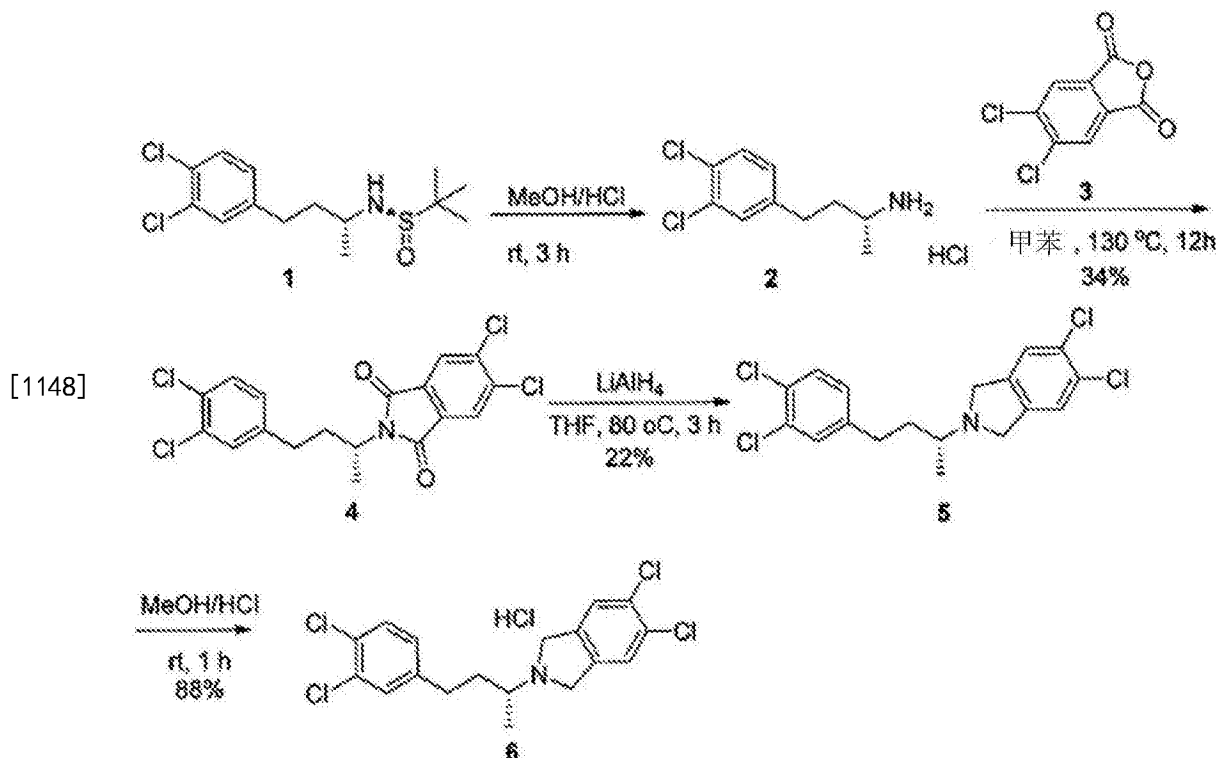
[1144] 步骤3:向3 (0.43g, 1.8mmol) 于THF (20mL) 中的溶液中相继添加DIPEA (0.54g, 4.0mmol) 和4-三氟甲基苯甲醛 (0.36g, 2.0mmol)。将所得溶液在室温搅拌10min。添加NaBH(OAc)₃ (1.57g, 7.4mmol) 并将混合物在40℃搅拌2h。将混合物经0℃水淬灭, 过滤, 并通过EtOAc (3x 30mL) 萃取。将有机层通过盐水洗涤, 在硫酸钠上干燥, 过滤, 并将滤液在减压下浓缩以提供残余物, 其通过柱层析 (PE/EA=3:1) 纯化以得到化合物4 (0.3g, 43%)。

[1145] 步骤4:向4 (0.3g, 0.8mmol) 于乙酸乙酯 (10mL) 中的溶液中添加HCl (MeOH中2M,

2mL) 并将所得溶液在室温搅拌1h。将沉淀过滤,得到化合物5 (0.25g,76%)。

[1146] m/z (ESI+) (M+H)⁺:5 [390.14]。

[1147] 合成例11



[1149] 方案17

[1150] 步骤1:将化合物1 (1.75g,5.43mmol) 于MeOH-HCl (2M,10mL) 中的混合物在室温搅拌3h。将反应混合物在真空内浓缩,得到粗2,其用于下一步骤而无需进一步纯化。

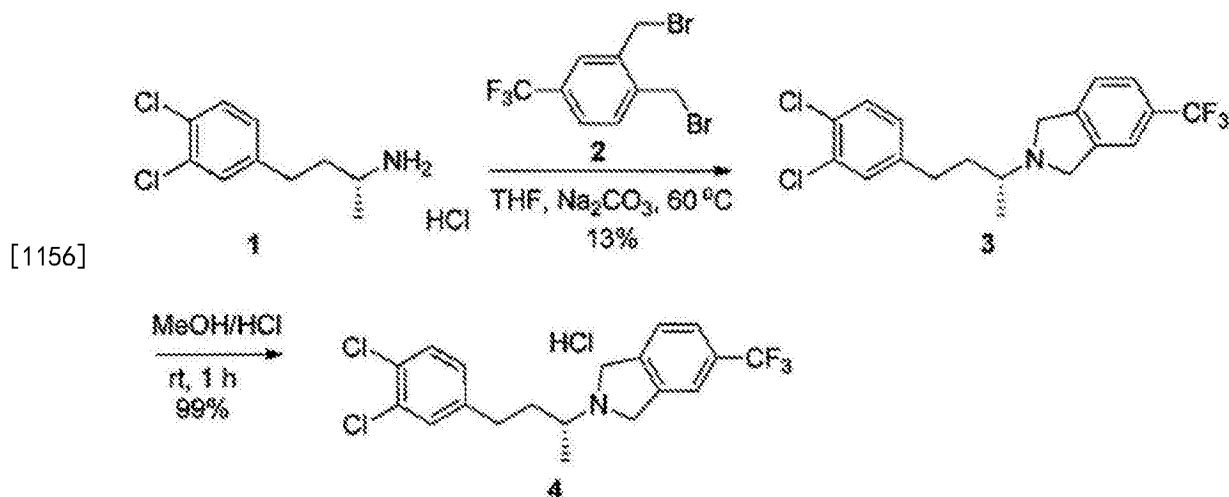
[1151] 步骤2:将化合物胺2 (1.4g,5.43mmol) 和酐3 (1.18g,5.43mmol) 于甲苯 (12mL) 中的溶液在130℃加热12h。将混合物冷却到室温并添加水 (10mL),通过EtOAc (3x 20mL) 萃取,干燥,浓缩。将粗产物通过柱层析 (PE/EA=10:1) 纯化得到产物4 (0.78g,34%)。

[1152] 步骤3:向化合物4 (0.78g,1.87mmol) 于THF (20mL) 中的溶液中添加LAH (0.36g,9.1mmol)。将混合物在80℃搅拌3h。将冷却的混合物通过水 (3.46mL)、15%NaOH (3.46mL) 和水 (13.5mL) 猝灭。将反应混合物过滤,浓缩。将粗产物通过柱层析 (PE/EA=5:1) 纯化得到产物5 (0.16g,23%)。

[1153] 步骤4:将化合物5 (0.3g,0.8mmol) 溶于乙酸乙酯 (5mL),添加MeOH-HCl (2N,3mL)。将混合物在室温搅拌1 h,浓缩以得到化合物6 (0.16g,89%)。

[1154] m/z (ESI+) (M+H)⁺:6 [390.0]。

[1155] 合成例12



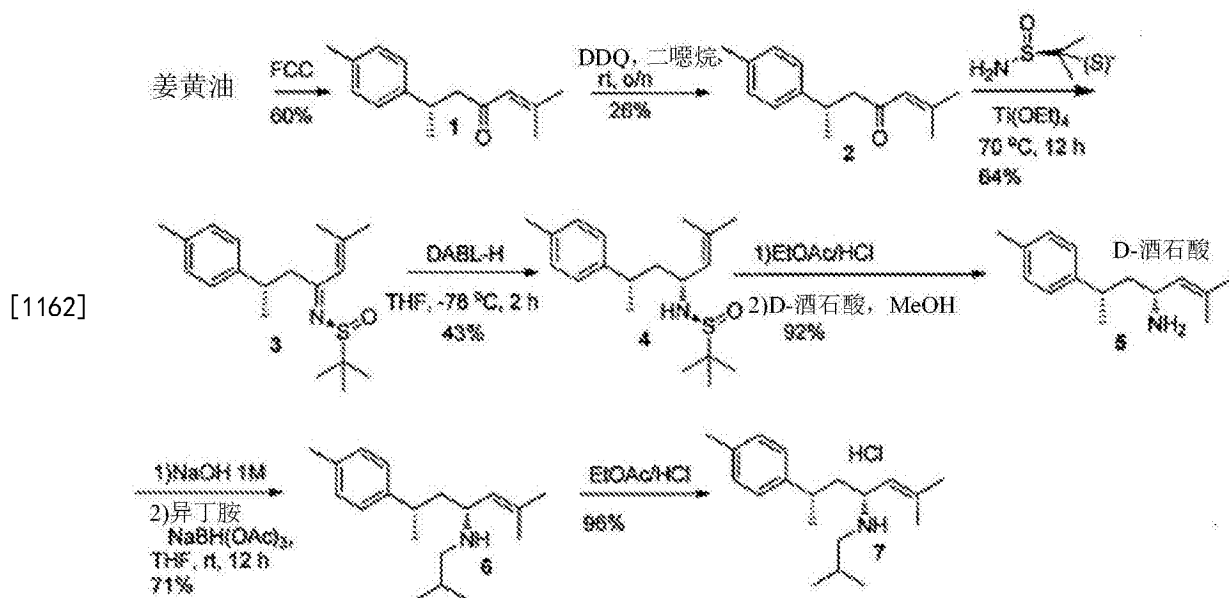
[1157] 方案18

[1158] 步骤1:向化合物1 (0.4g, 2mmol) 于DMF (6mL) 中的溶液中添加二溴化物2 (0.6g, 2mmol)。将所得溶液在80℃搅拌过夜, 浓缩, 通过制备HPLC纯化, 得到化合物3 (0.1g, 13%)。

[1159] 步骤2:将化合物3 (0.1g, 0.2mmol) 溶于乙酸乙酯 (5mL), 添加MeOH-HCl (2N, 3mL)。将混合物在室温搅拌1 h。将混合物过滤以得到化合物4 (0.11g, 99%)。

[1160] m/z (ESI+) (M+H)⁺: 4 [388.1]。

[1161] 合成例13



[1163] 方案19

[1164] 步骤1:将姜黄油 (100g) 通过柱层析 (PE:EA/100:1) 纯化以提供粗产物1 (60g)。

[1165] 步骤2:将粗产物1 (60g) 溶于二噁烷 (200mL), 添加DDQ (81.7g, 360mmol)。将混合物在室温搅拌过夜, 然后经水 (500mL) 猝灭, 通过硅藻土垫过滤。将滤液通过乙酸乙酯 (3x 200mL) 萃取。将有机层干燥, 浓缩并通过柱层析 (PE:EA/30:1) 纯化以提供化合物2 (15.6g, 26%)。

[1166] 步骤3:向2 (7.4g, 34.2mmol) 于Ti(OEt)₄ (23.4g, 102.6mmol) 中的溶液中添加 (S)-(-)-2-甲基-2-丙烷亚磺酰胺。将混合物在70℃搅拌12h, 经冰水猝灭, 用乙酸乙酯 (3x

100mL) 萃取, 并干燥, 以得到残余物, 其通过柱层析 (PE/EA: 5/1) 纯化得到产物3 (7.1g, 64%)。

[1167] 步骤4: 在-78℃向化合物3 (7.0g, 21.9mmol) 于THF (70mL) 中的溶液中添加DIBAL-H (22mL, THF中1.5M, 33mmol)。将所得溶液在-78℃搅拌2h。经TLC对反应混合物的分析显示出起始亚胺的完全消耗, 得到亚磺酰胺化合物4。将溶液经水猝灭, 并通过乙酸乙酯 (3x 200mL) 萃取。将合并的有机层用盐水洗涤, 在Na₂SO₄上干燥, 并浓缩以提供橙色油。使粗产物进行柱层析 (PE:EA/3:1) 以提供产物4 (3.1g, 43%)。

[1168] 步骤5: 向化合物4 (1.6g, 5.0mmol) 于乙酸乙酯 (10mL) 中的溶液中添加HCl-乙酸乙酯 (2N, 10mL), 并将所得溶液在室温搅拌3h。反应混合物的TLC分析显示出化合物3的完全消耗。在真空中去除溶剂。将残余物溶于水 (10mL), 并将pH通过K₂CO₃的饱和水溶液调整为9~10, 通过乙酸乙酯 (3x 20mL) 萃取, 干燥, 并浓缩以得到游离胺。将游离胺 (1.1g, 5.0mmol) 溶于甲醇 (15mL)。将D-酒石酸 (0.75g, 5.0mmol) 添加到溶液。将混合物在回流下搅拌1 h。将溶液缓慢冷却到室温。将所形成的结晶过滤, 得到产物5 (1.7g, 93%)。

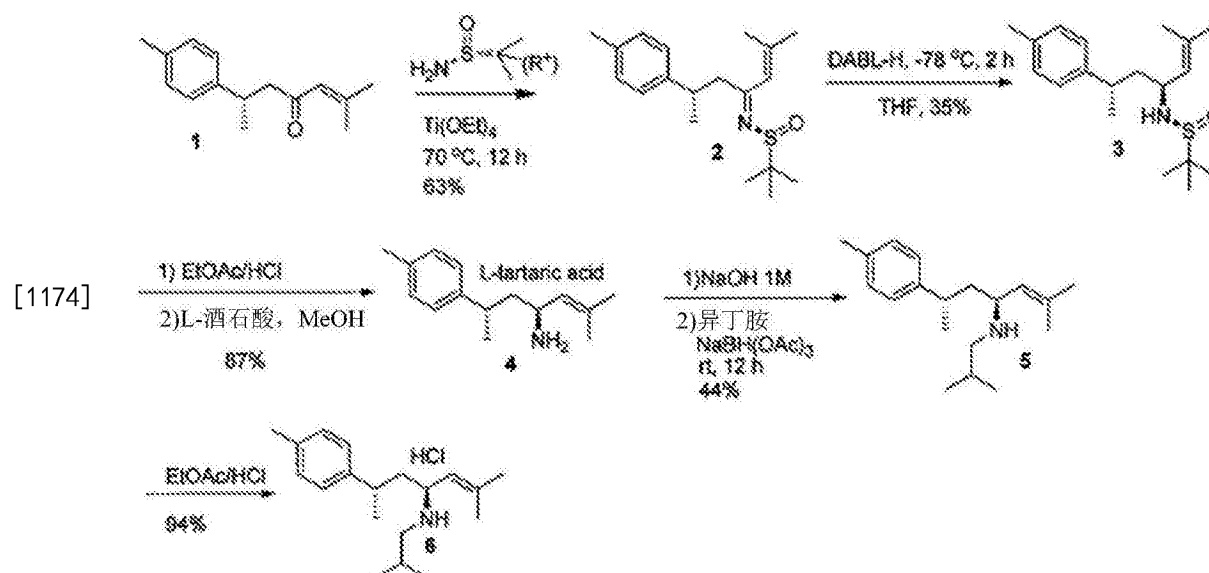
[1169] Mp. 172~174℃。通过X-射线结晶学确定化合物5的绝对立体化学。

[1170] 步骤6: 将化合物5 (1.7g, 4.6mmol) 于水 (20mL) 中的溶液通过1M NaOH调整为pH 9~10。将产物用乙酸乙酯 (3x 20mL) 萃取。将有机层干燥, 浓缩, 以得到游离胺。将游离胺溶于THF (10mL), 添加异丁基胺 (0.40g, 5.5mmol) 和NaBH(OAc)₃ (3.90g, 18.4mmol)。将混合物在室温搅拌12h, 用水猝灭, 通过乙酸乙酯 (3x 30mL) 萃取。将有机层干燥, 浓缩, 并通过柱层析 (PE:EA/3:1) 纯化以提供产物6 (0.9g, 72%)。

[1171] 步骤7: 向化合物6 (0.9g, 3.2mmol) 于乙酸乙酯 (10mL) 中的溶液中添加乙酸乙酯-HCl (2N, 5mL)。将混合物在室温搅拌1 h。在真空中去除乙酸乙酯, 得到化合物7 (0.95g, 96%)。

[1172] m/z (ESI+) (M+H)⁺: 7 [274.20]。

[1173] 合成例14



[1175] 方案20

[1176] 步骤1: 向1 (7.4g, 34.2mmol) 于Ti(OEt)₄ (23.4g, 102.6mmol) 中的溶液中添加(R)-(+)-2-甲基-2-丙烷亚磺酰胺。将混合物在70℃搅拌12h, 经冰水猝灭, 用乙酸乙酯 (3x

100mL) 萃取,干燥。通过柱层析(PE/EA:5/1)纯化,得到产物2(6.9g,63%)。

[1177] 步骤2:将化合物2(7.0g,21.9mmol)溶于THF(70mL)并冷却到-78℃。然后向容器中添加DIBAL-H(22mL,THF中1.5M,33mmol),并将所得溶液在-78℃搅拌2h。经TLC对反应混合物的分析显示出起始亚胺的完全消耗,得到亚磺酰胺化合物3。然后将溶液经水淬灭并通过乙酸乙酯(3x 200mL)萃取。将合并的有机层用盐水洗涤,在Na₂SO₄上干燥,并在真空下浓缩以提供橙色油。使粗产物进行柱层析(PE:EA/3:1)以提供产物3(2.5g,36%)。

[1178] 步骤3:向3(2.5g,7.8mmol)于乙酸乙酯(10mL)中的溶液中添加2M HCl于乙酸乙酯(10mL)中的溶液,并将所得溶液在室温搅拌3h。反应混合物的TLC分析显示出化合物3的完全消耗。以真空去除溶剂。将残余物溶于水(10mL),通过添加饱和K₂CO₃将其pH调整为9~10。将混合物通过乙酸乙酯(3x 20mL)萃取,干燥,浓缩,以得到游离胺4。将游离胺4溶于甲醇(15mL),添加L-酒石酸(1.17g,7.8mmol)。将混合物在回流下搅拌1h,冷却到室温,过滤以得到结晶盐4(2.5g,87%)。

[1179] 步骤4:将L-酒石酸盐4(2.5g,6.8mmol)溶于水(20mL),通过添加1M NaOH将其pH调整为9~10。然后将混合物通过乙酸乙酯(3x 50mL)萃取,干燥,浓缩以得到游离胺4。将游离胺4再溶解于THF,添加异丁基胺(0.60g,8.2mmol)和NaBH(OAc)₃(5.85g,27.6mmol)。将混合物在室温搅拌12h,经水淬灭,通过乙酸乙酯(3x30mL)萃取。将有机层干燥,浓缩,并通过柱层析(PE:EA/3:1)纯化以提供产物5(0.83g,45%)。

[1180] 步骤5:向5(0.83g,3.0mmol)于乙酸乙酯(10mL)中的溶液中添加HCl(乙酸乙酯中2M,5mL),并将所得溶液在室温搅拌1h。去除溶剂以得到产物6(0.88g,94%)。

[1181] m/z (ESI+) (M+H)⁺:6[274.20]

[1182] 所有在说明书(包括摘要和附图)中公开的特征、以及所有在任意所公开方法或工序中的步骤可以以任意组合进行组合,除其中至少一些这样的特征和/或步骤相互排斥的组合之外。说明书(包括摘要和附图)中公开的各个特征可以用提供相同、等同或相似目的的可选特征进行替换,除非明确指出相反情况。因此,除非明确指出相反情况,所公开的各个特征仅是通用系列的等同或相似特征的一个实例。根据上述说明,除本文记载的那些外,本发明的多种修改对于本领域技术人员也是明显的。这些修改也意在落入所附权利要求的范围内。

[1183] 所有本文提及的公开物全部并入本文以供参考。本文中没有事物被认为是承认本发明由于在先的发明而没有早于这些公开的资格。

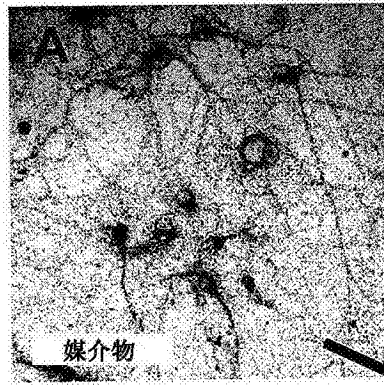


图1A

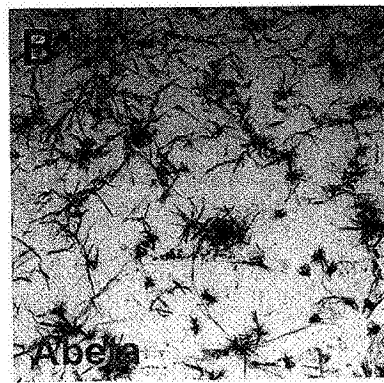


图1B

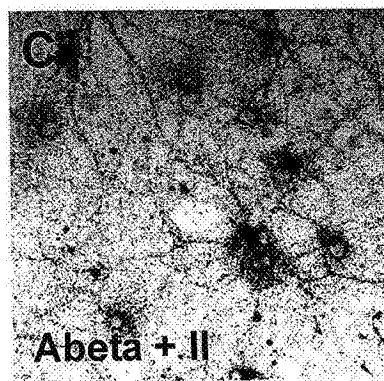


图1C

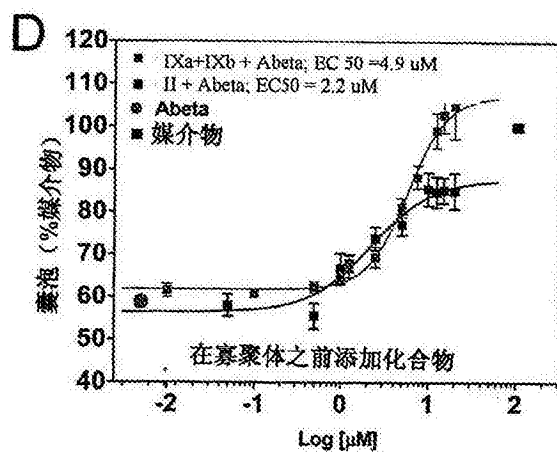


图1D

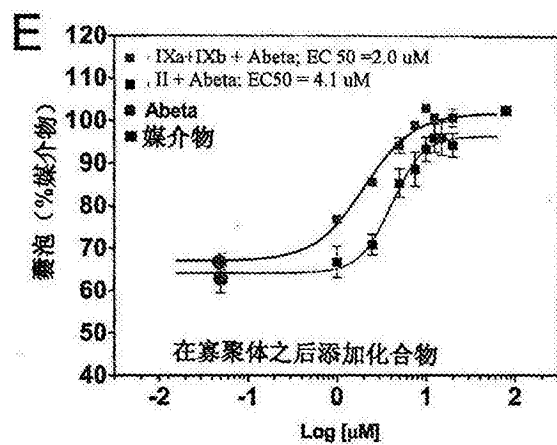


图1E

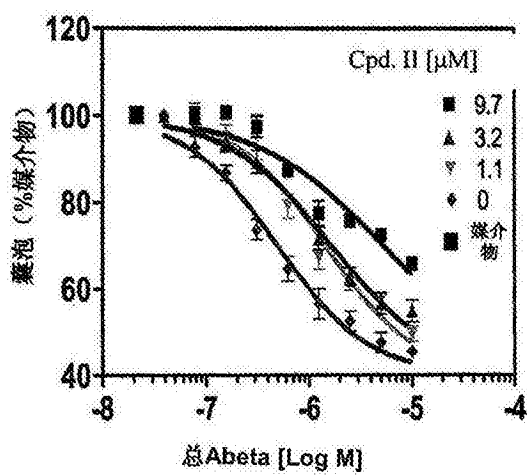


图1F

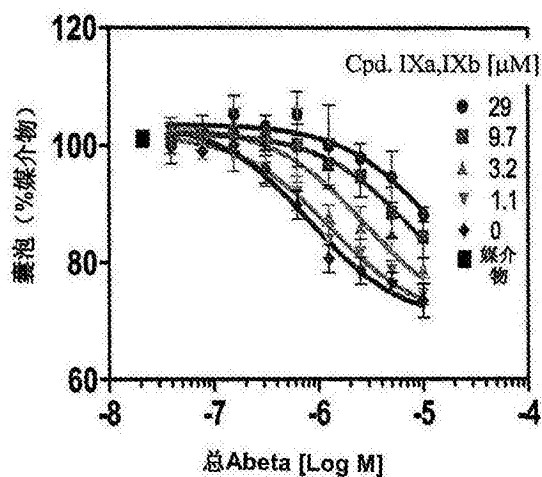


图1G

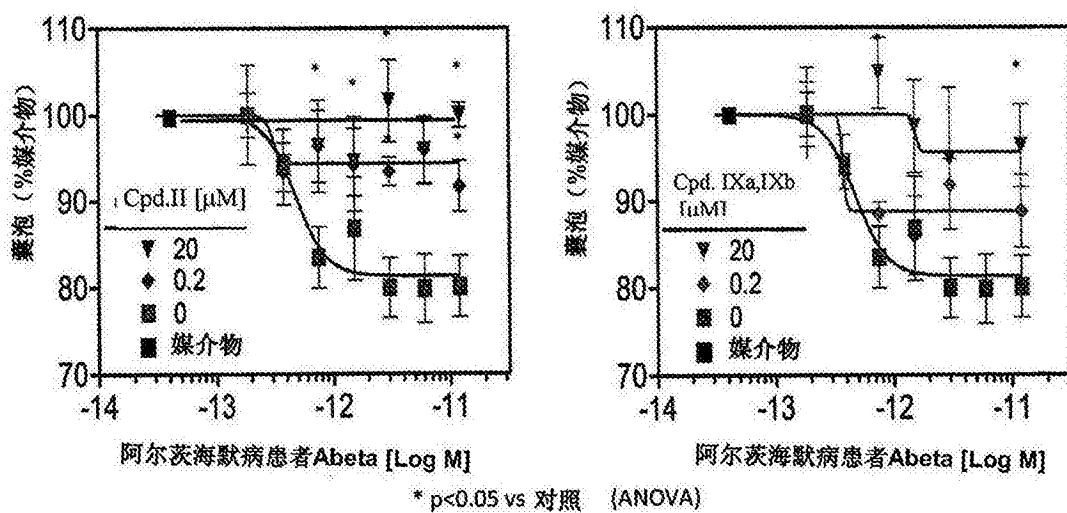


图1H

图1I

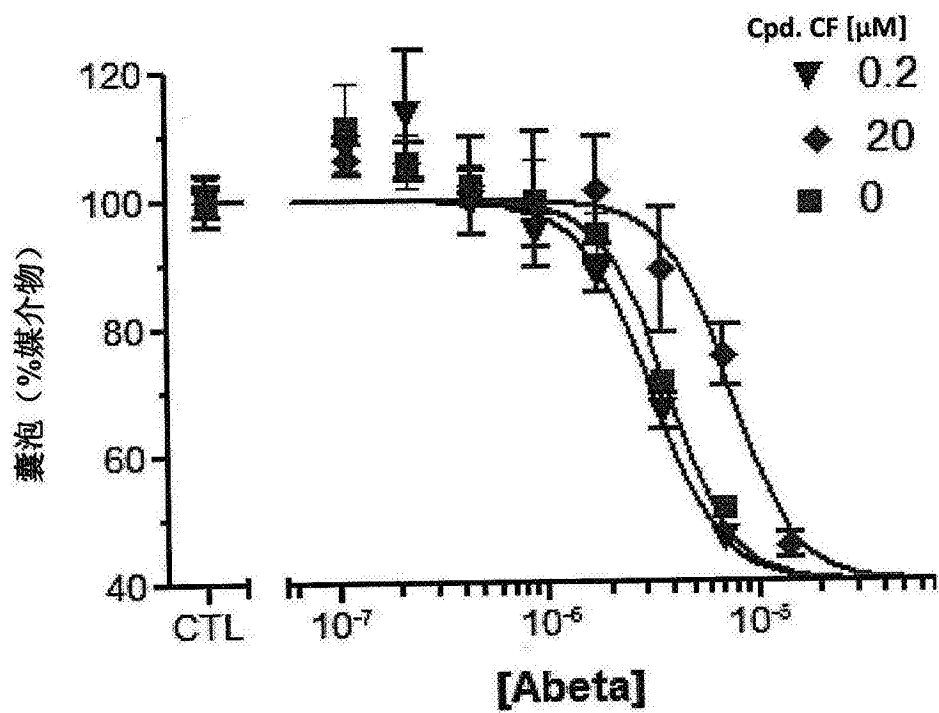


图1J

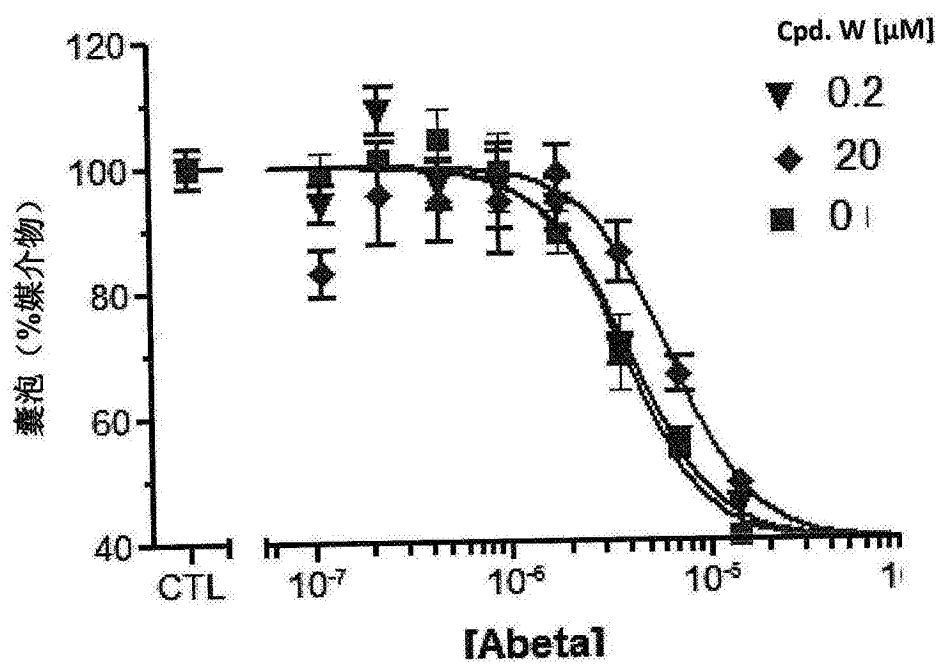


图1K

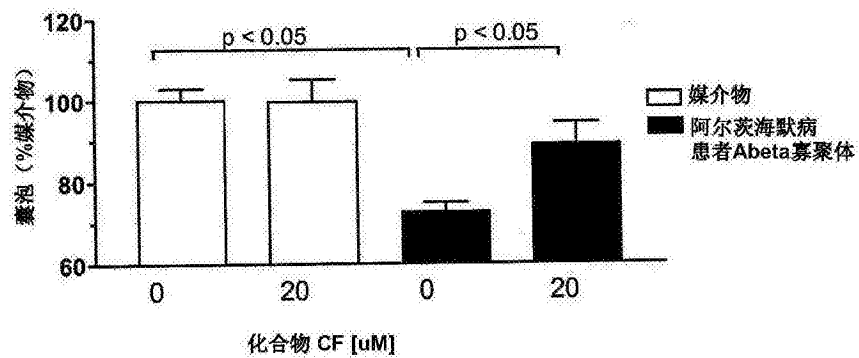


图1L

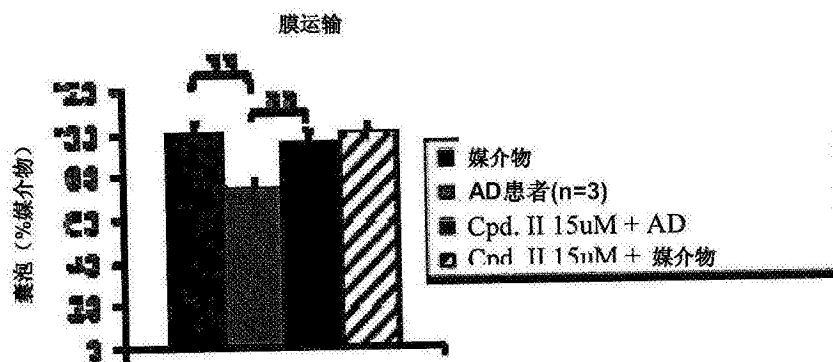


图1M

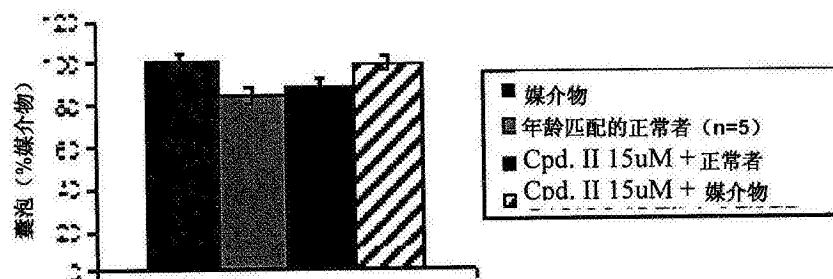


图1N

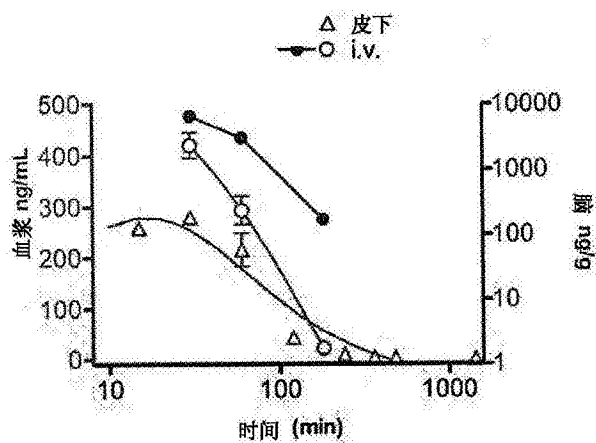


图2A

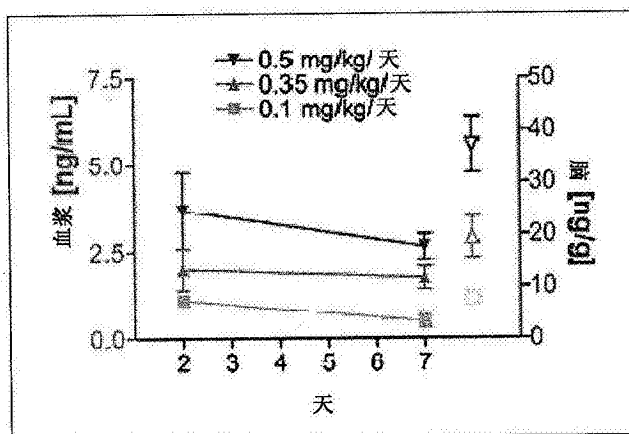


图2B

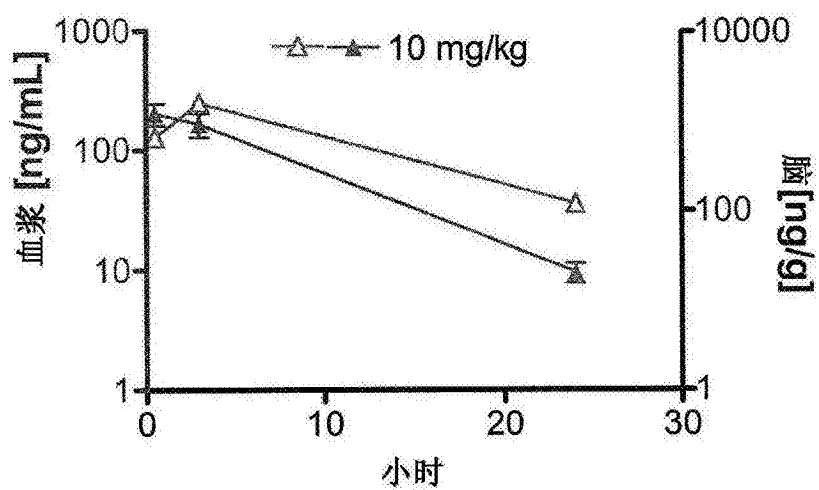


图2C

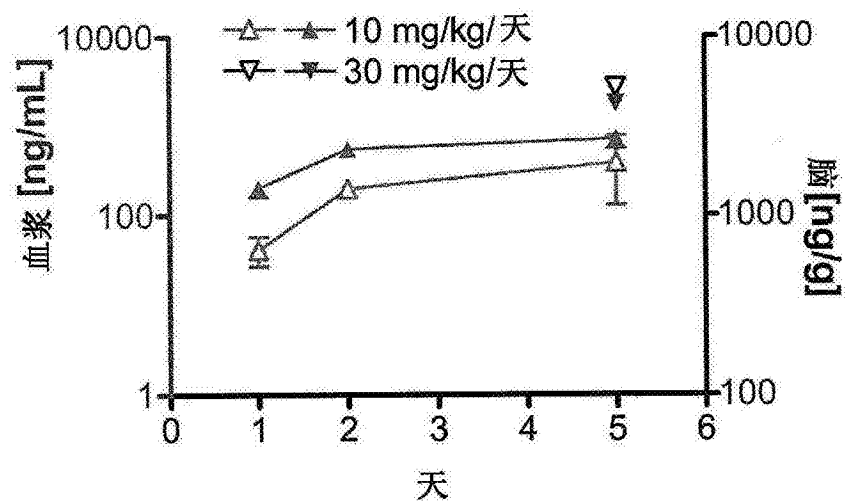


图2D

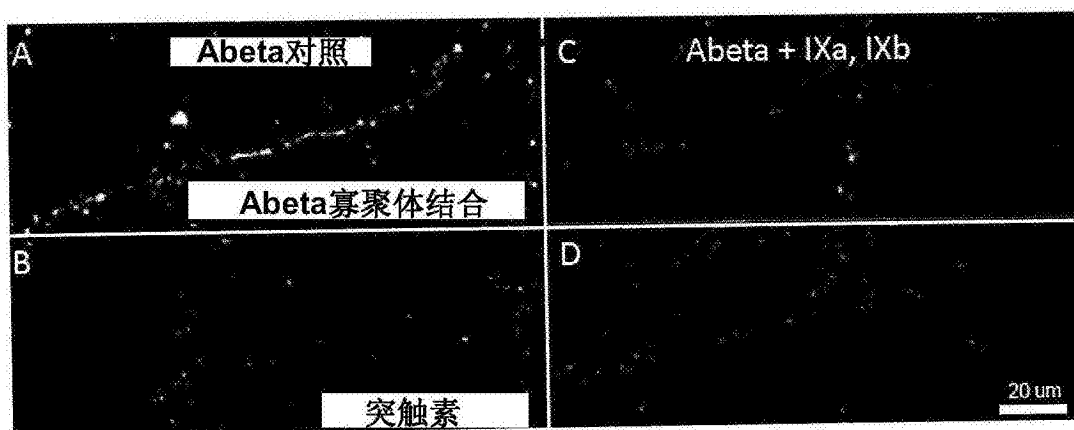


图3A

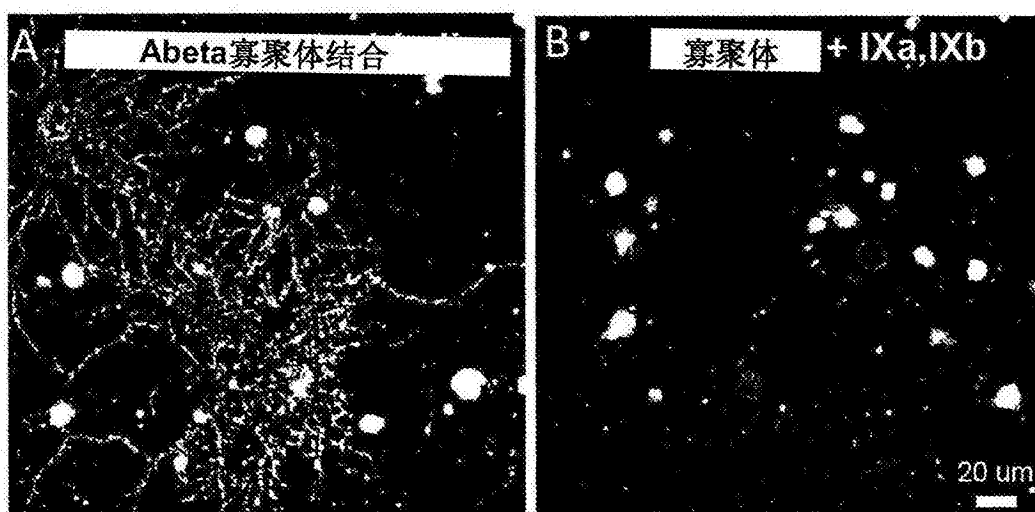


图3B

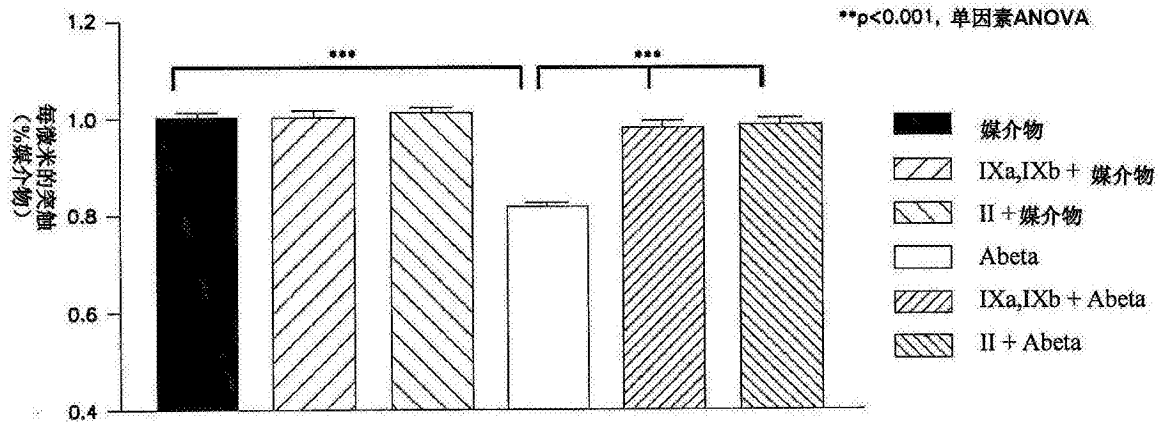


图3C

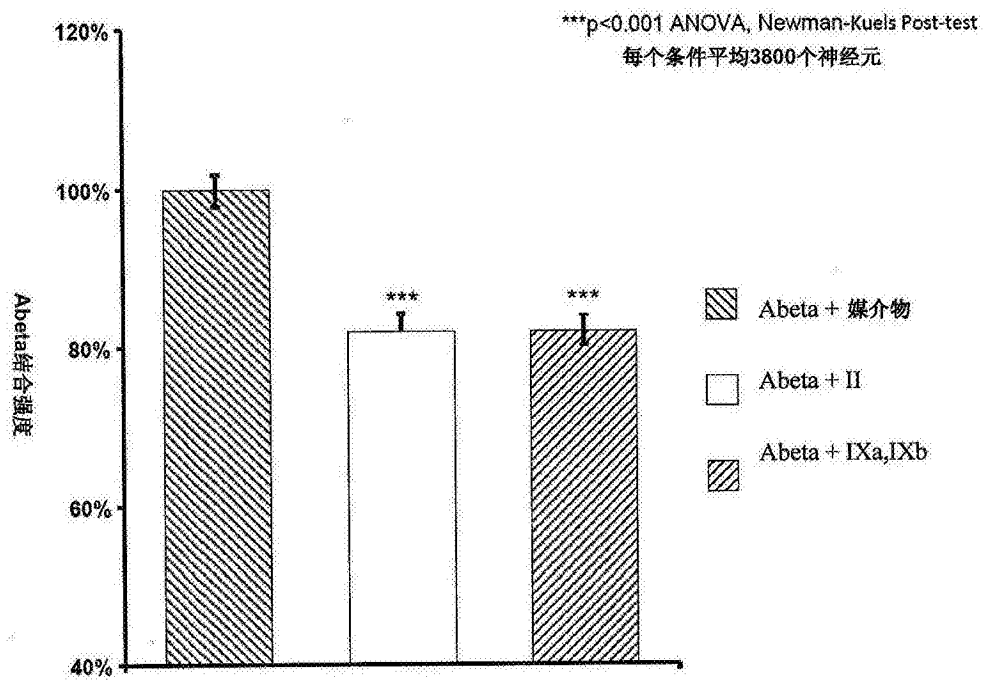


图3D

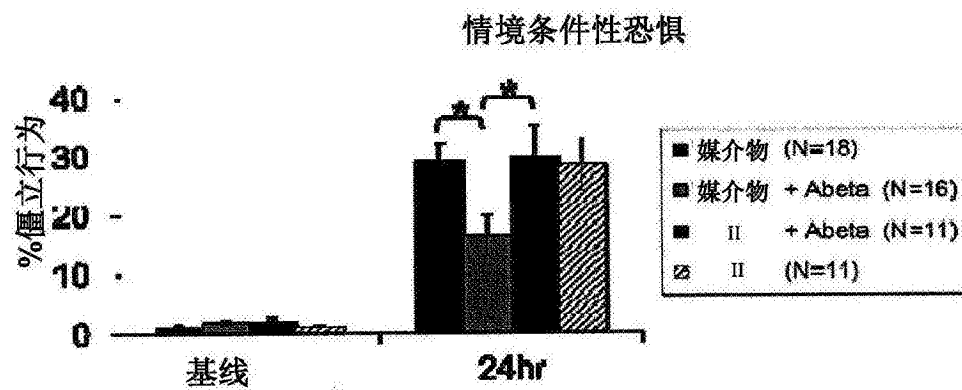


图4

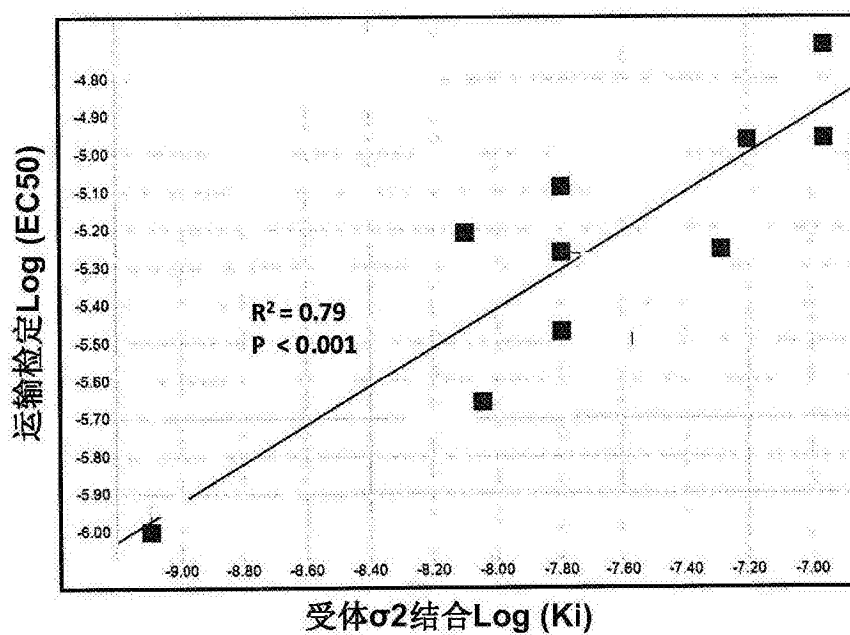


图5A

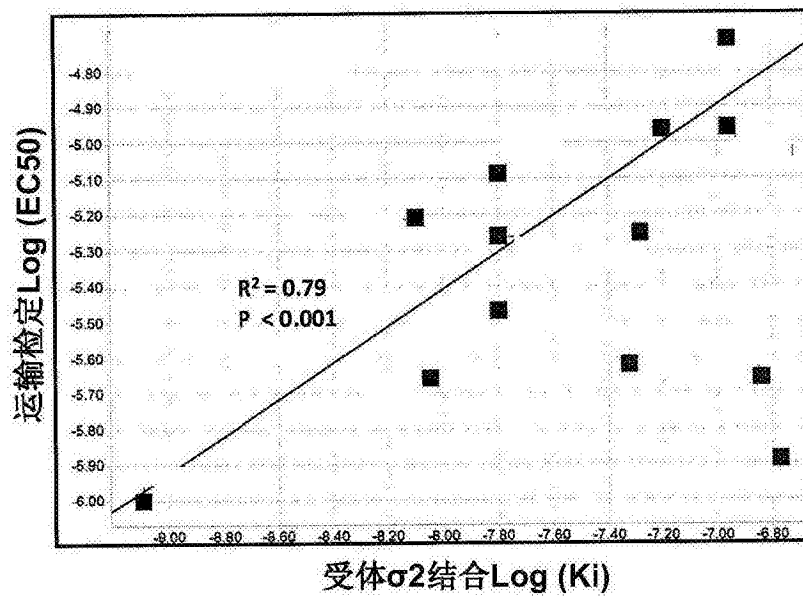


图5B

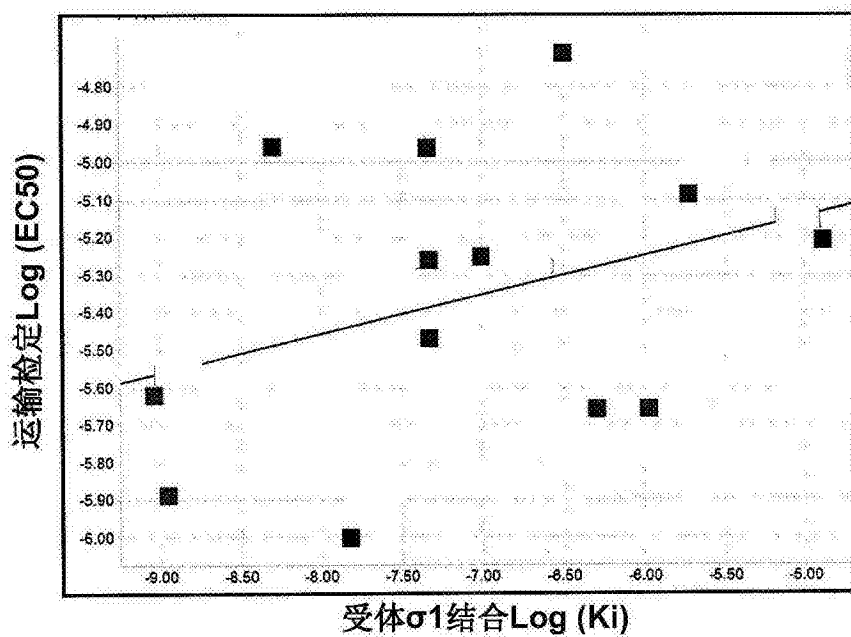


图5C

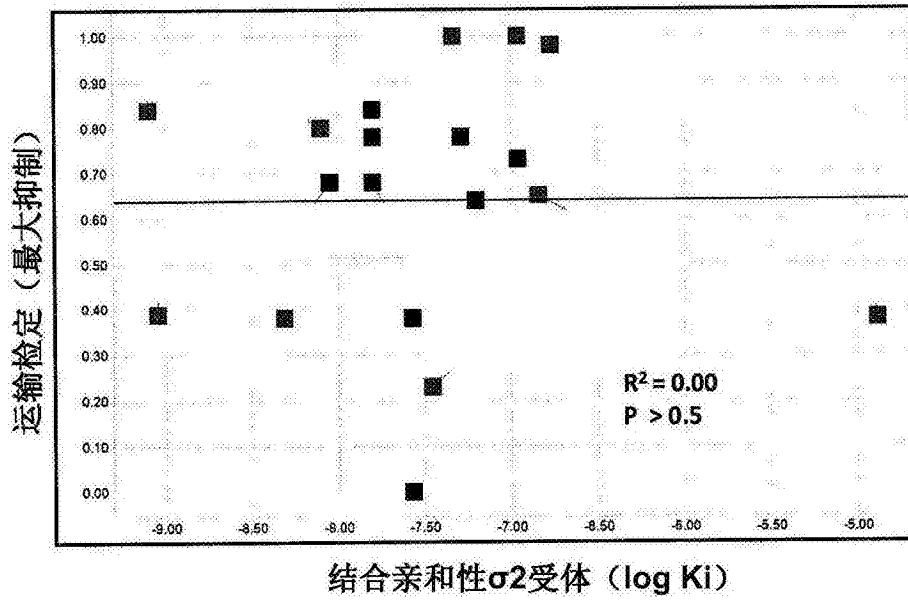


图5D

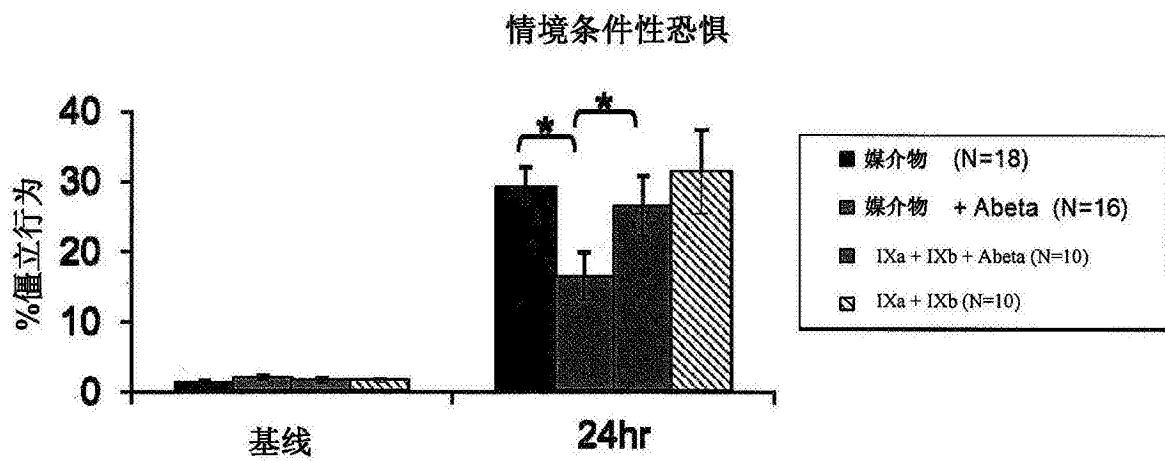


图6

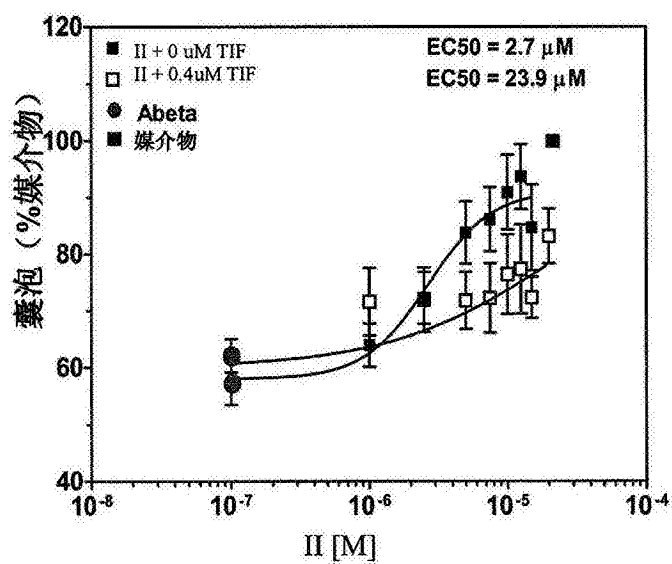


图7A

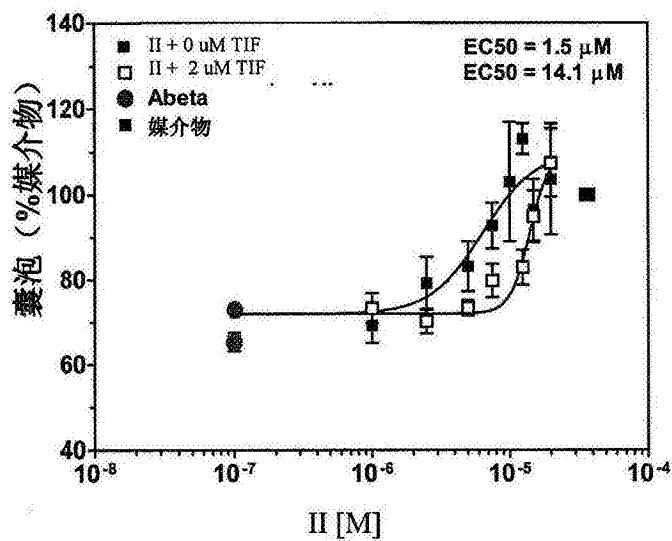


图7B

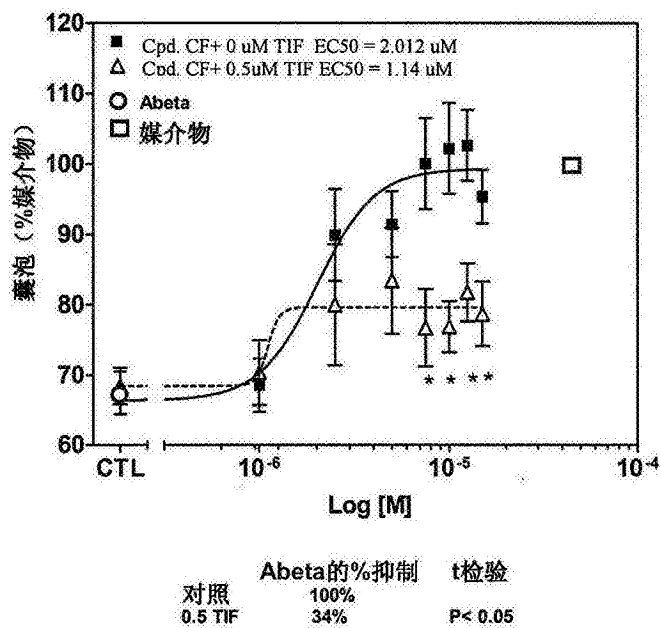


图7C

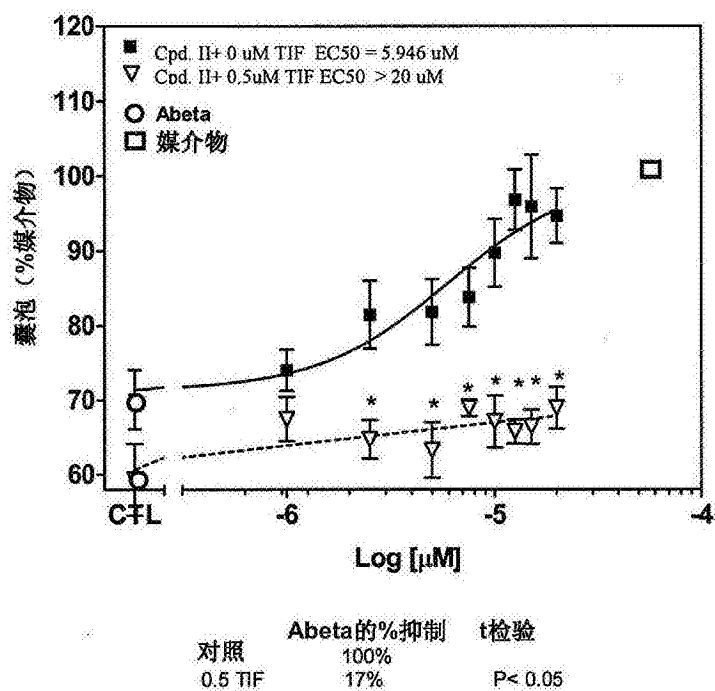


图7D

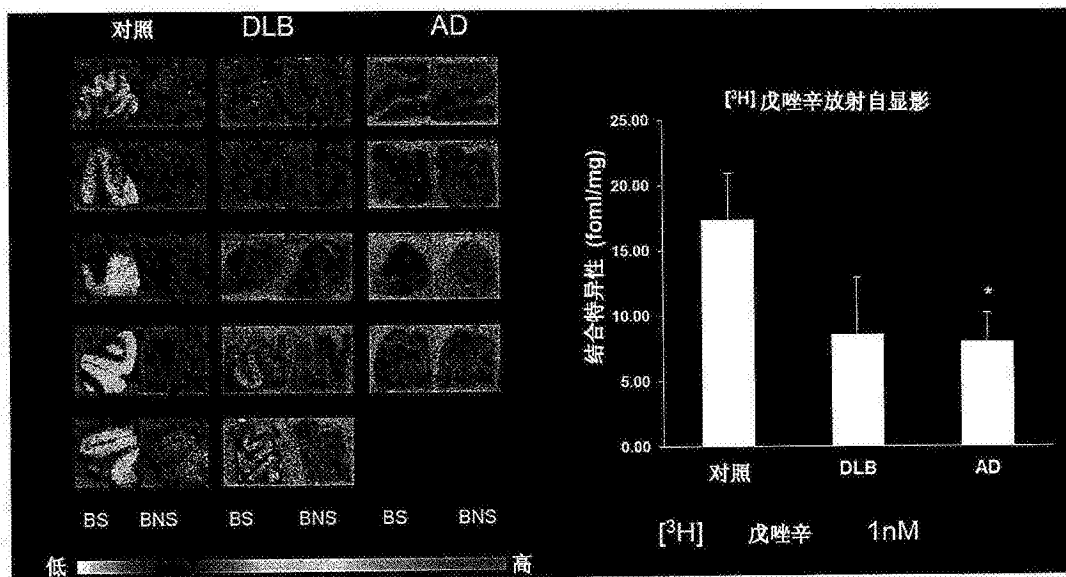


图8A

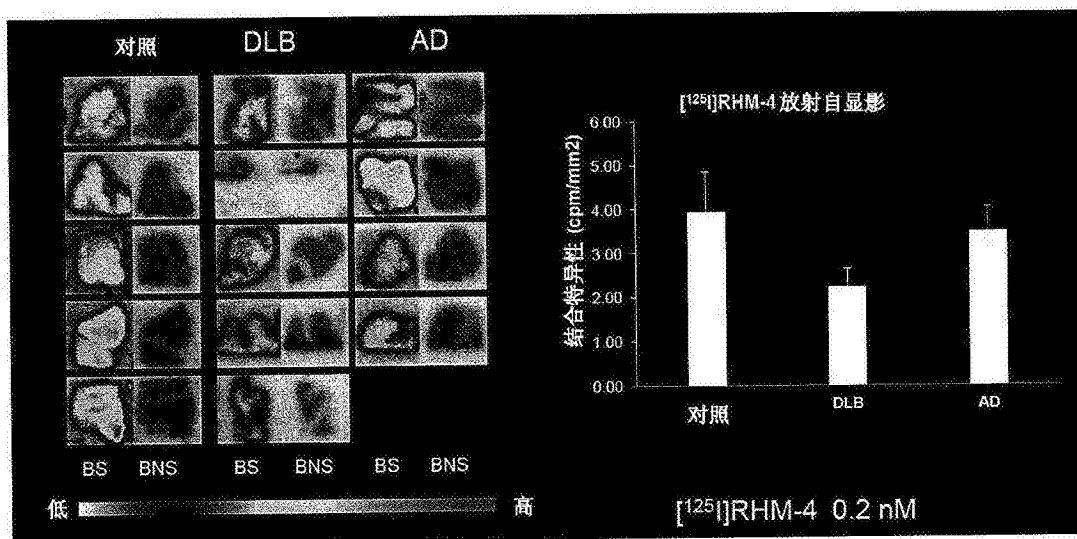


图8B

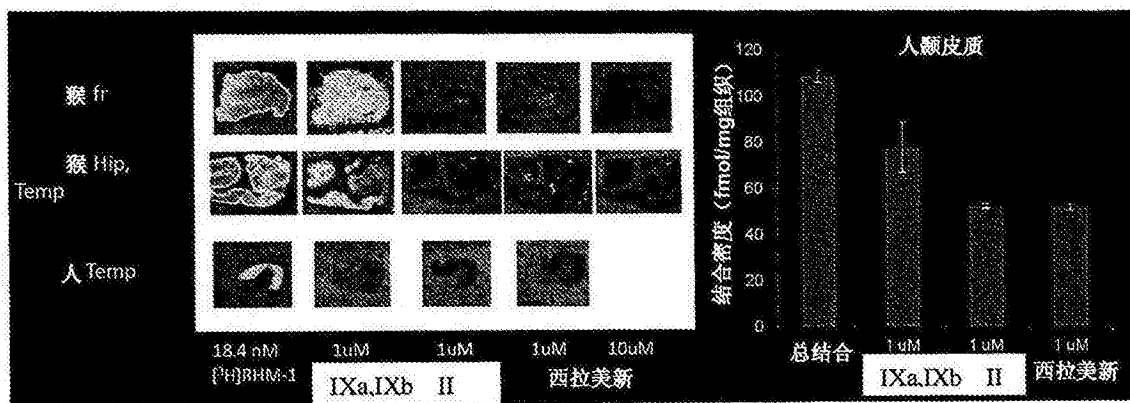


图8C

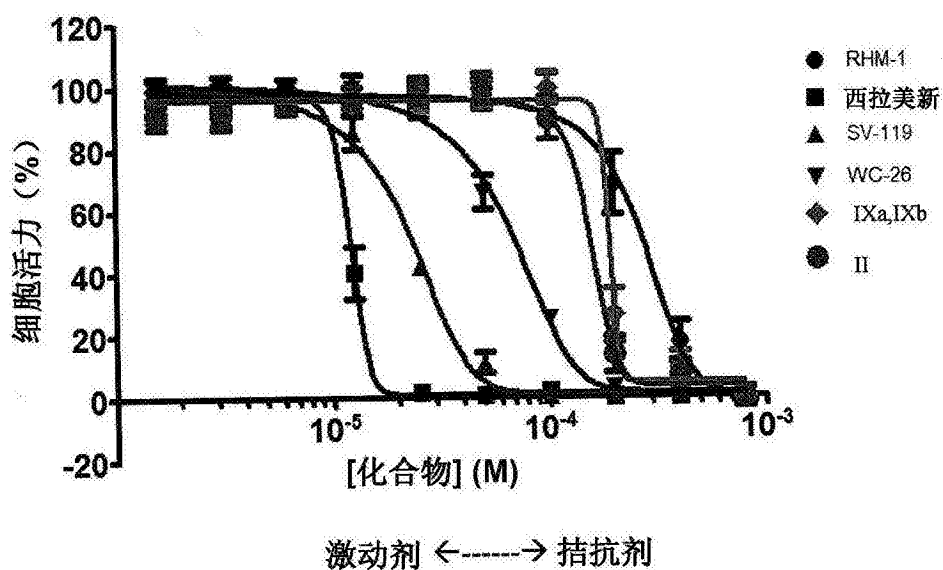


图9A

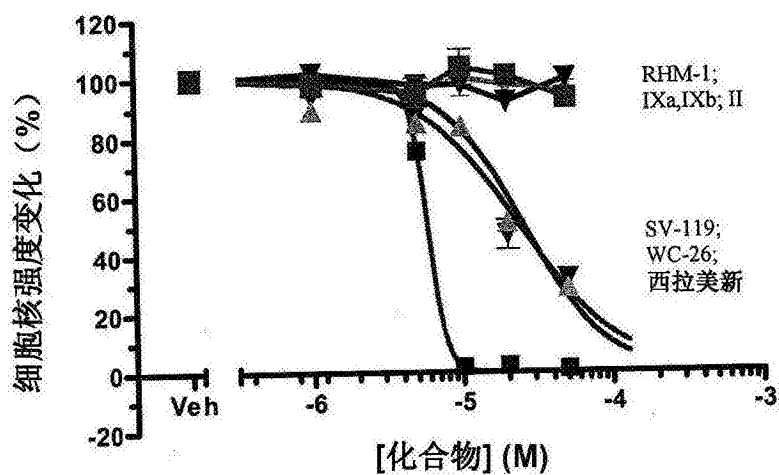


图9B

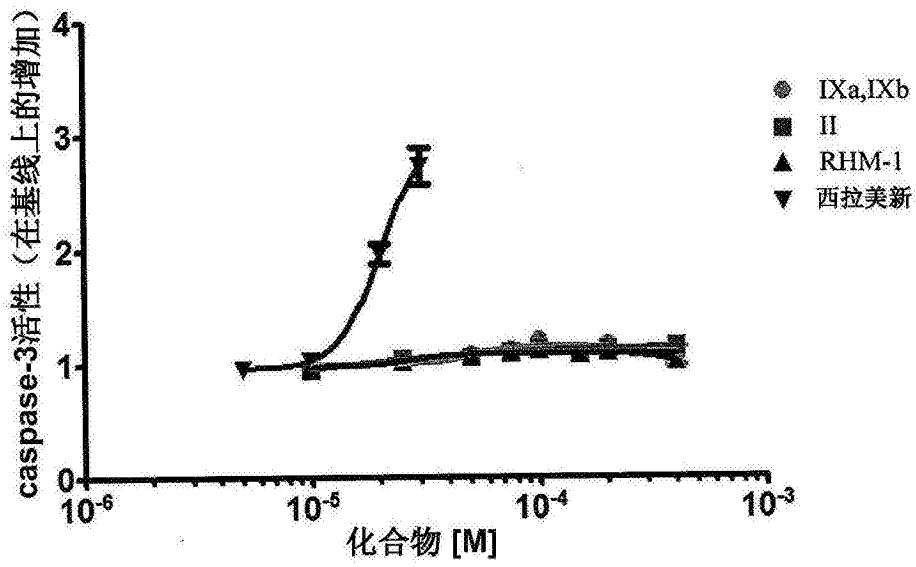
caspase-3活性-用 σ 受体配体处理的SKOV-3人卵巢癌细胞

图10A

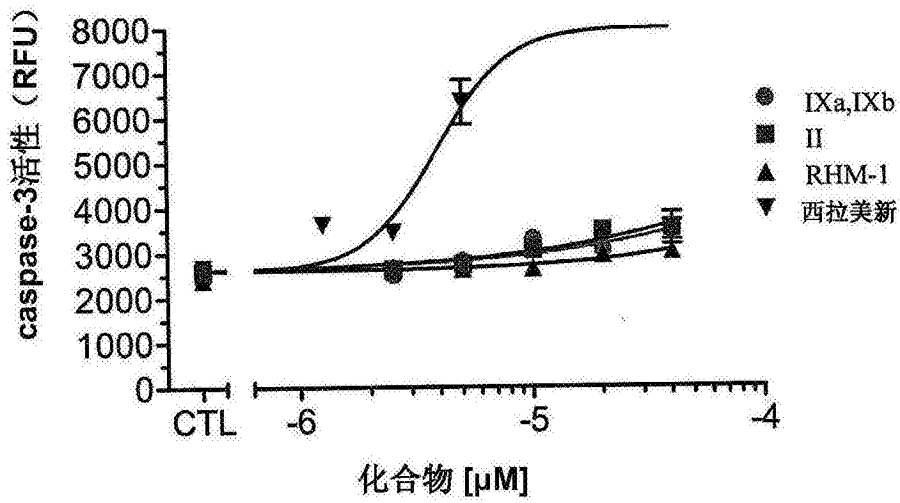
caspase-3活性-用 σ 配体
处理24小时的初级神经元

图10B

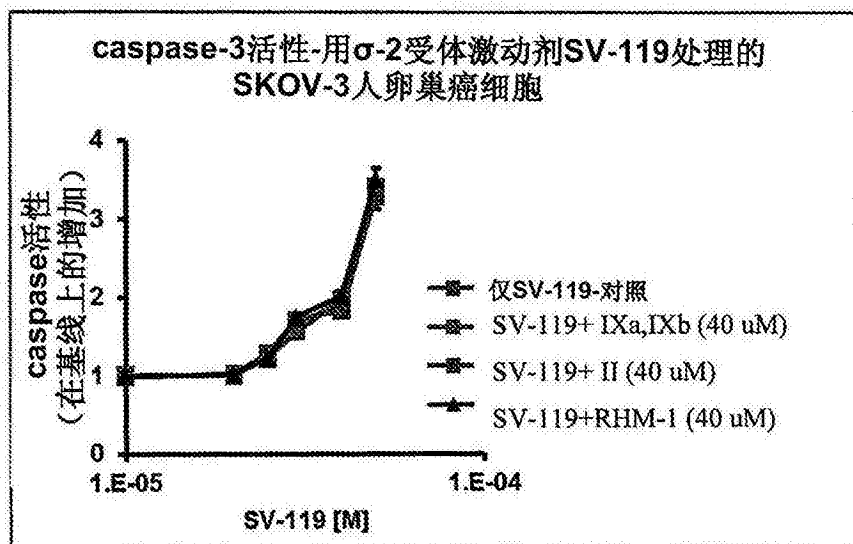


图10C

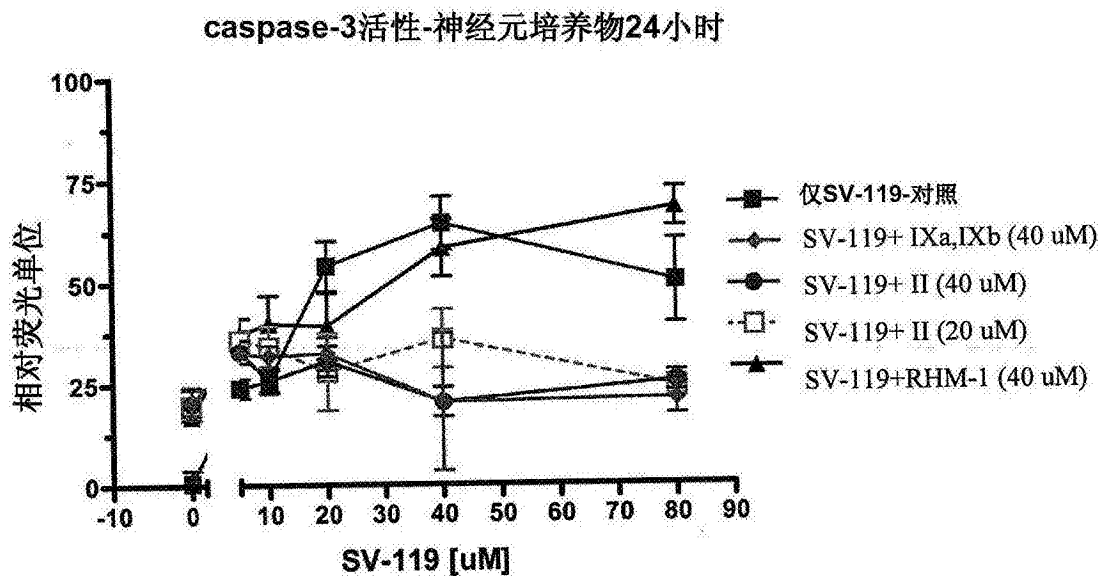


图10D

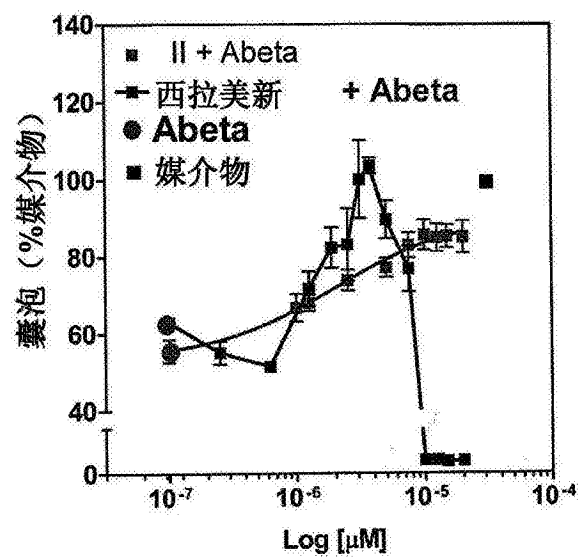


图11A

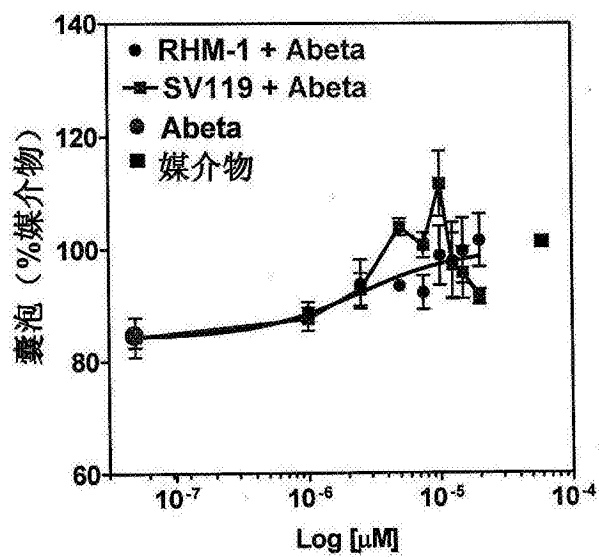


图11B

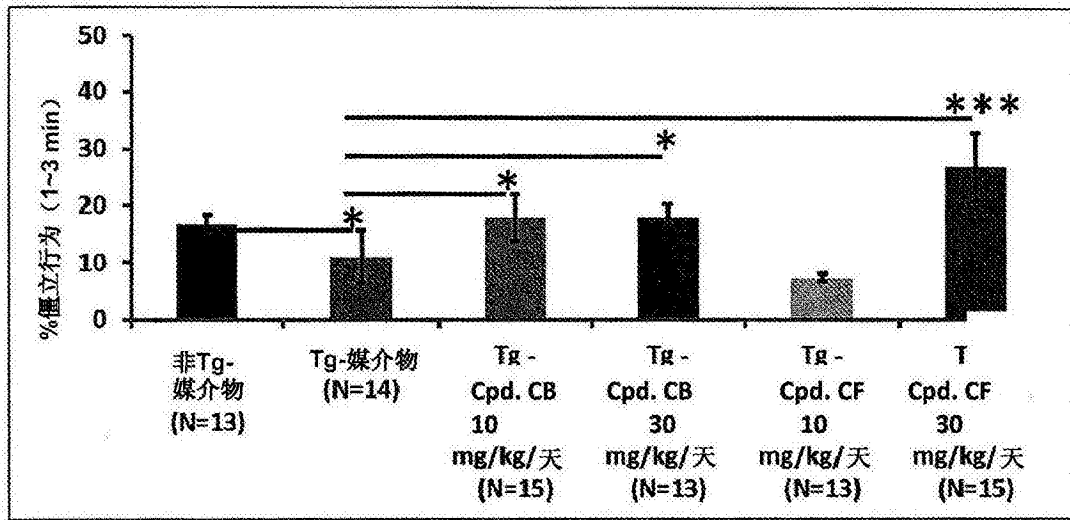


图12A

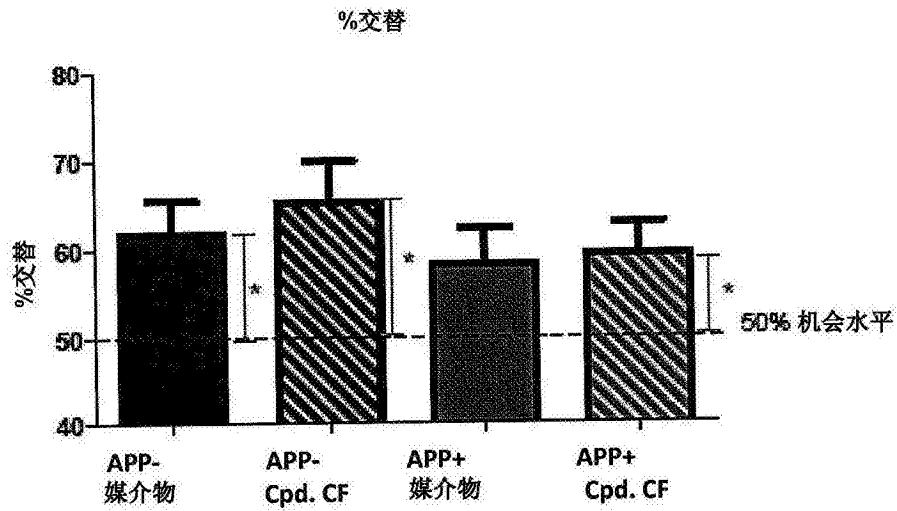


图12B

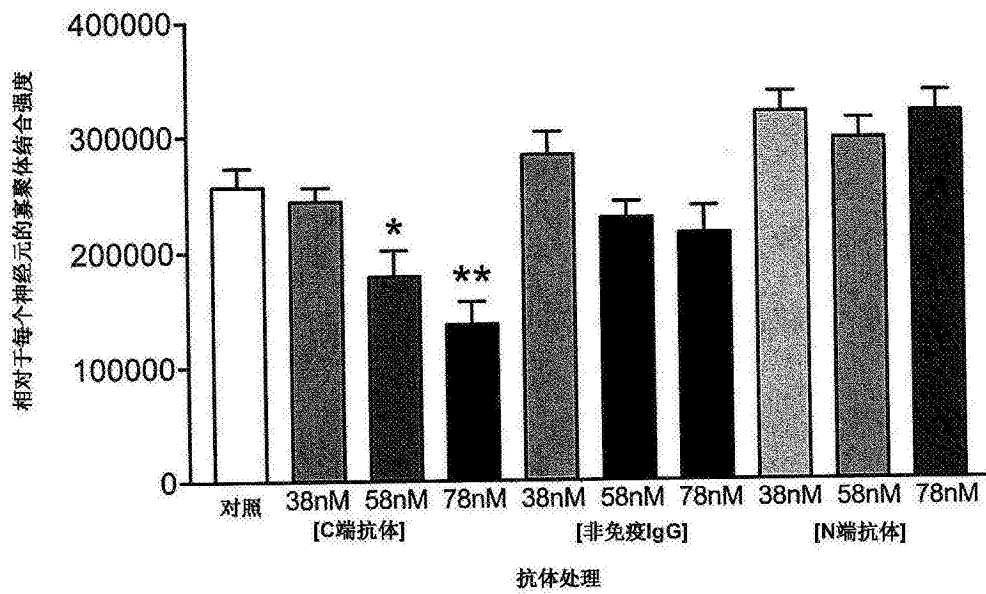
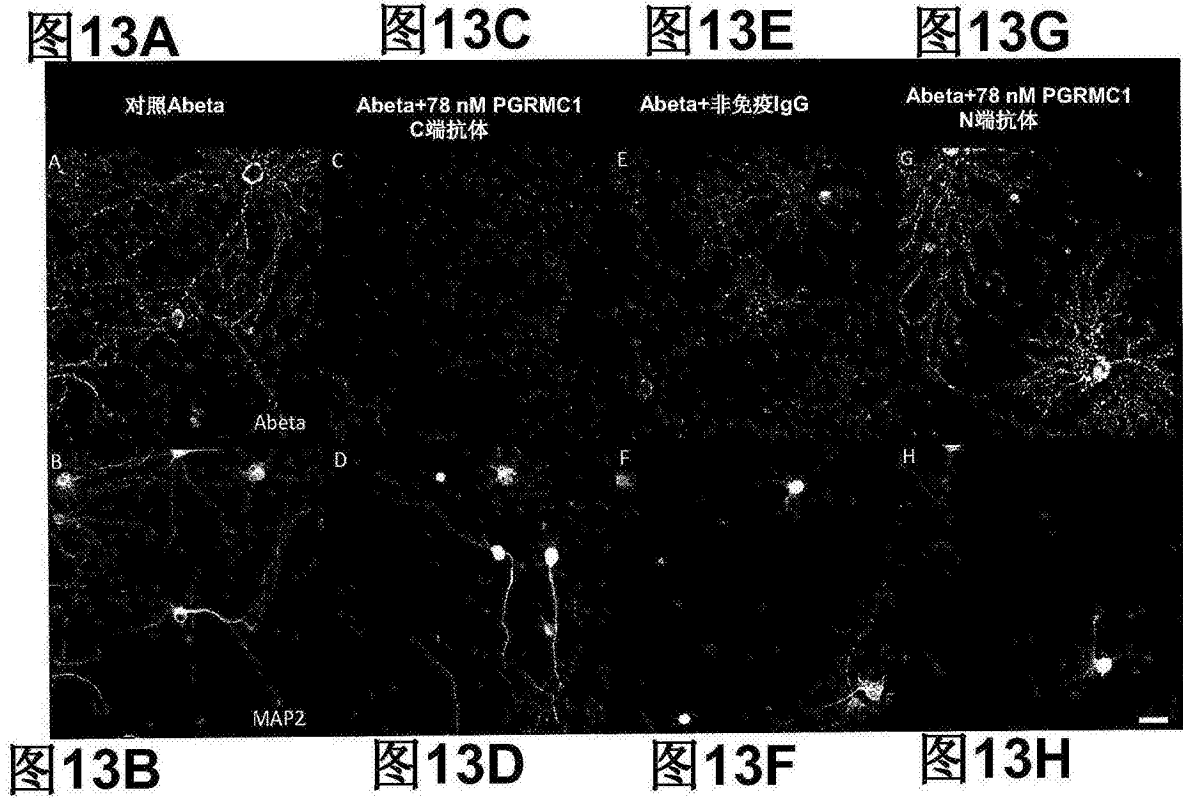


图14A

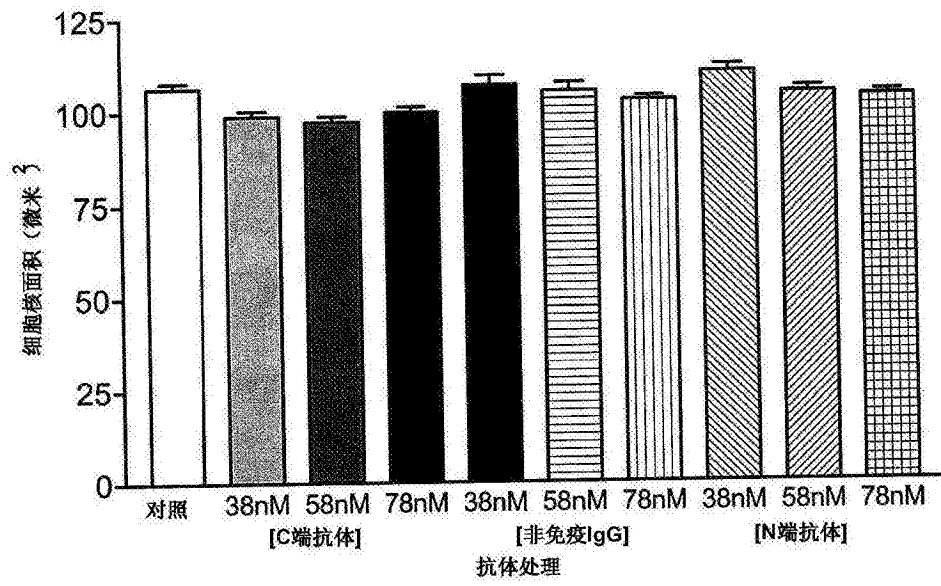


图14B