(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116829137 A
(43)申请公布日 2023.09.29

(21)申请号 202180091389.3
(22)申请日 2021.11.18
(30)优先权数据
2020-0087 2020.11.24 CU
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.07.20
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CU2021/050012 2021.11.18
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/111742 ES 2022.06.02
(71)申请人 古巴神经科学中心
地址 古巴哈瓦那
(72)发明人 C·罗德里格斯-坦提
M·萨布隆卡拉扎纳
R·梅嫩德斯索托德尔瓦耶
A·本科莫马丁内斯
S·里韦拉马列罗 L·加西亚普波
L·冈萨雷斯梅萨
S·里昂查维亚诺
A·阿奎拉科尔多瓦
K·卡斯特罗-帕罗米诺安黛拉
G·潘冬罗尔 L·奥达袅塔码尤
R·佩雷斯佩雷拉
M·赛尔梵特斯亚诺斯
O·D·J·迪亚斯加西亚
M·都雷斯特布朗
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 谭玮
(51)Int.Cl.
A61K 31/167(2006.01)

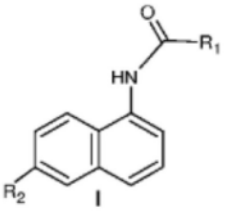
权利要求书5页 说明书24页 附图11页
按照条约第19条修改的权利要求书3页

(54)发明名称

用于治疗阿尔茨海默氏病的作为多靶标治疗剂的萘衍生物的药物组合物

(57)摘要

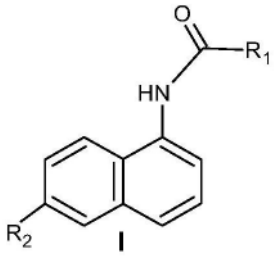
本发明涉及药物化学,并特别涉及对在阿尔茨海默氏病(AD)中受影响的胆碱能、谷氨酸能和线粒体系统显示出多靶向作用的化合物的药物组合物,其通式(I)为I,其中取代基R1和R2在说明书和权利要求书中阐述。这些化合物的制剂增加了在口服、舌下、胃肠外、透皮和鼻施用中的有效性和耐受性。它们可以作为单一疗法单独使用,作为目前用于AD的多重疗法的替代。作为用于治疗AD的活性成分的用于施用给人类的这些化合物、它们的盐、水合物、对映异构体、异构体、代谢物、前药的制剂会提高生物利用度、活性成分的停留时间和充分排泄,这会增加治疗的有效性、生物安全性、依从性和耐受性。



I (I)

CN 116829137 A

1.用于治疗阿尔茨海默氏病的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物，其特征在于所述化合物选自式I的化合物



其中：

R_1:-亚烷基-C(O)NH-亚烷基-R_3、-亚烷基-C(O)O-R_4；

R_3:-COOH、-OH、-SH、-NH_2、-NH-烷基-、-NH-亚烷基-NH_2、-NH-亚烷基-NH-C(O)-亚烷基-S-R_5、-NH-二硫代氨基甲酸酯-烷基、-N-烷基-二硫代氨基甲酸酯碱土金属盐；或上述基团的药学上可接受的盐；

R_4:琥珀酰亚胺基基团；

R_5:-H、-C(O)-烷基、-C(O)-C_6H_5；且

R_2:-H、-烷基；

术语“烷基”的特征在于为饱和碳原子和氢原子的直链或支链脂族链，优选甲基或乙基；术语“亚烷基”表示直链或支链烷基基团的二价类似物，优选亚甲基(-CH_2-)、亚乙基(-CH_2CH_2-)或亚丙基(-$CH_2CH_2CH_2$-)；

其中所述药物组合物含有药学上可接受的赋形剂，

其中这些化合物、它们的盐、水合物、对映异构体、异构体、代谢物、前药穿过活哺乳动物的脑的血脑屏障。

2.权利要求1所述的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物，其特征在于所述组合物与脑胆碱能细胞相互作用，抑制乙酰胆碱酯酶的病理学活性，并恢复乙酰胆碱的生理水平。

3.权利要求1所述的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物，其特征在于所述组合物与脑谷氨酸能细胞相互作用，抑制NMDA和红藻氨酸受体的病理学活化，并恢复谷氨酸能系统的生理功能。

4.权利要求1所述的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物，其特征在于所述组合物与脑线粒体相互作用，抑制线粒体膜电位的耗散，并阻止膨胀以维持活性氧的生理水平。

5.权利要求1所述的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物，其特征在于口服地、局部地、全身性地、静脉内地、皮下地、腹膜内地、肌肉内地和经鼻或其组合施用所述组合物。

6.权利要求1和5所述的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物，其特征在于呈片剂形式的所述药物组合物的口服制剂含有1mg至100mg活性成分。

7.权利要求1和6所述的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物，其特征在于所述药物组合物的片剂含有聚合物基质，其选自：聚氧化乙烯、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟丙基纤维素(HPC)、羧甲基纤维素钠(CCNa)、纤维素衍生物、丙烯酸树脂RS PO和聚乙烯吡咯烷酮或其组合。

8.权利要求7所述的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物，其特征在于所述药物

组合物的片剂的基质占5%w/w至80%w/w、优选10%w/w至70%w/w的比例。

9.权利要求1和5所述的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物，其特征在于所述药物组合物的鼻制剂每剂含有0.1mg至25mg活性成分。

10.权利要求1和9所述的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物，其特征在于所述药物组合物的鼻制剂含有0.05至6%比例的生物粘附赋形剂，其选自：羟丙基甲基纤维素(HMPC)、羟丙基纤维素(HPC)、甲基纤维素(MC)、羧甲基纤维素(CMC)和聚丙烯酸(carbol)衍生物或其组合。

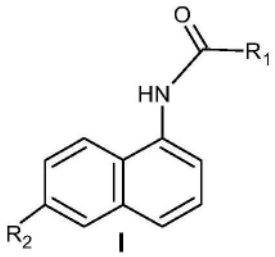
11.权利要求1和10所述的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物，其特征在于所述药物组合物的鼻制剂具有10至60mPas的粘度。

12.权利要求1、9、10和11所述的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物，其特征在于所述药物组合物的鼻制剂含有0.09至1.8%的浓度的PEG；0.08至1%的浓度的生育酚；抗微生物防腐剂，其选自：0.007至0.47%的浓度的苯扎氯铵、0.003至0.19%的浓度的EDTA二钠和0.005至0.04%的浓度的对羟基苯甲酸丙酯或其组合；和保湿剂，其选自：3.5至5.5%的浓度的甘油和0.17至0.38%的浓度的吐温80；或其组合。

13.权利要求1和12所述的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物，其特征在于所述药物组合物的鼻制剂具有5.5至6.5之间、优选6.3的pH。

14.用于阿尔茨海默氏病的单一疗法治疗的方法，其特征在于所述方法包含：

a)施用式I的具有多靶标作用的化合物的药物组合物，



I

其中：

R_1:-亚烷基-C(O)NH-亚烷基-R_3、-亚烷基-C(O)O-R_4；

R_3:-COOH、-OH、-SH、-NH_2、-NH-烷基-、-NH-亚烷基-NH_2、-NH-亚烷基-NH-C(O)-亚烷基-S-R_5、-NH-二硫代氨基甲酸酯-烷基、-N-烷基-二硫代氨基甲酸酯碱土金属盐；或上述基团的药学上可接受的盐；

R_4:琥珀酰亚胺基基团；

R_5:-H、-C(O)-烷基、-C(O)-C_6H_5；且

R_2:-H、-烷基；

术语“烷基”的特征在于为饱和碳原子和氢原子的直链或支链脂族链，优选甲基或乙基；术语“亚烷基”表示直链或支链烷基基团的二价类似物，优选亚甲基(-CH_2-)、亚乙基(-CH_2CH_2-)或亚丙基(-$CH_2CH_2CH_2$-)；

其中所述药物组合物含有药学上可接受的赋形剂，

其中通过口服、局部、全身、静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内和鼻途径或其组合施用所述药物组合物，

b)步骤a)的所述化合物的药物组合物穿过活哺乳动物的脑的血脑屏障，

c)使脑胆碱能细胞与步骤b)的所述药物组合物的化合物接触,并抑制乙酰胆碱酯酶的病理学活性以恢复乙酰胆碱的生理水平,

d)使脑谷氨酸能细胞与步骤b)的所述药物组合物的化合物接触,并抑制NMDA和红藻氨酸受体的病理学活化以恢复谷氨酸能系统的生理功能,和

e)使脑线粒体与步骤b)的所述药物组合物的化合物接触,以抑制线粒体膜电位的耗散和阻止膨胀以维持活性氧的生理水平。

15.权利要求14所述的用于阿尔茨海默氏病的单一疗法治疗的方法,其特征在于呈片剂形式的口服药物组合物含有1mg至100mg活性成分。

16.权利要求14和15所述的用于阿尔茨海默氏病的单一疗法治疗的方法,其特征在于片剂含有聚合物基质,其选自:聚氧化乙烯、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟丙基纤维素(HPC)、羧甲基纤维素钠(CCNa)、纤维素衍生物、丙烯酸树脂RS PO、聚乙烯吡咯烷酮或其组合。

17.权利要求14和16所述的用于阿尔茨海默氏病的单一疗法治疗的方法,其特征在于片剂的基质占5%w/w至80%w/w、优选10%w/w至70%w/w的比例。

18.权利要求14和15所述的用于阿尔茨海默氏病的单一疗法治疗的方法,其特征在于片剂使用选自以下的赋形剂:淀粉、乳糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇和其它糖、滑石粉、胶体二氧化硅、碳酸盐、氧化镁、磷酸钙、二氧化钛、聚维酮、明胶、乳蛋白、柠檬酸盐、酒石酸盐、海藻酸盐、葡聚糖、有机硅弹性体、聚山梨酯、支链淀粉、对羟基苯甲酸酯、动物和植物油、丙二醇、无菌水、一元或多元醇、硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酰富马酸钠、月桂基硫酸钠和甘油或其组合。

19.权利要求14所述的用于阿尔茨海默氏病的单一疗法治疗的方法,其特征在于鼻药物组合物含有0.1mg至25mg活性成分。

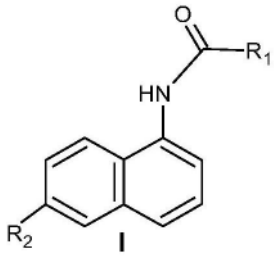
20.权利要求14和19所述的用于阿尔茨海默氏病的单一疗法治疗的方法,其特征在于鼻制剂含有0.05至6%比例的生物粘附赋形剂,其选自:羟丙基甲基纤维素(HMPC)、羟丙基纤维素(HPC)、甲基纤维素(MC)、羧甲基纤维素(CMC)和聚丙烯酸(carbol)衍生物或其组合。

21.权利要求14和20所述的用于阿尔茨海默氏病的单一疗法治疗的方法,其特征在于鼻制剂具有10至60mPas的粘度。

22.权利要求14和19所述的用于阿尔茨海默氏病的单一疗法治疗的方法,其特征在于鼻制剂含有PEG,生育酚,选自苯扎氯铵、EDTA二钠、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯或其组合的抗微生物防腐剂,和选自甘油和吐温80或其组合的保湿剂。

23.权利要求1和22所述的用于阿尔茨海默氏病的单一疗法治疗的方法,其特征在于鼻制剂具有6至7.5之间、优选6.3的pH。

24.用于治疗阿尔茨海默氏病的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物,其特征在于所述化合物选自式I的化合物



其中：

R_1:-亚烷基-C(O)NH-亚烷基-R_3、-亚烷基-C(O)O-R_4；

R_3:-COOH、-OH、-SH、-NH_2、-NH-烷基-、-NH-亚烷基-NH_2、-NH-亚烷基-NH-C(O)-亚烷基-S-R_5、-NH-二硫代氨基甲酸酯-烷基、-N-烷基-二硫代氨基甲酸酯碱土金属盐；或上述基团的药学上可接受的盐；

R_4:琥珀酰亚胺基基团；

R_5:-H、-C(O)-烷基、-C(O)-C_6H_5；且

R_2:-H、-烷基；

术语“烷基”的特征在于为饱和碳原子和氢原子的直链或支链脂族链，优选甲基或乙基；术语“亚烷基”表示直链或支链烷基基团的二价类似物，优选亚甲基(-CH_2-)、亚乙基(-CH_2CH_2-)或亚丙基(-$CH_2CH_2CH_2$)；

其中所述药物组合物含有药学上可接受的赋形剂，

其中这些化合物、它们的盐、水合物、对映异构体、异构体、代谢物、前药穿过活哺乳动物的脑的血脑屏障。

25.权利要求24所述的用于治疗阿尔茨海默氏病的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物，其特征在于所述组合物与脑胆碱能细胞相互作用，抑制乙酰胆碱酯酶的病理学活性，并恢复乙酰胆碱的生理效应水平。

26.权利要求24所述的用于治疗阿尔茨海默氏病的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物，其特征在于所述组合物与脑谷氨酸能细胞相互作用，抑制NMDA和红藻氨酸受体的病理学活化，并恢复谷氨酸能系统的生理功能。

27.权利要求24所述的用于治疗阿尔茨海默氏病的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物，其特征在于所述组合物与脑线粒体相互作用，抑制线粒体膜电位的耗散，并阻止膨胀以维持活性氧的生理水平。

28.权利要求24所述的用于治疗阿尔茨海默氏病的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物，其特征在于口服地、局部地、全身地、静脉内地、皮下地、腹膜内地、肌肉内地、经鼻或其组合施用所述组合物。

29.权利要求24和28所述的用于治疗阿尔茨海默氏病的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物，其特征在于呈片剂形式的口服药物组合物含有1mg至100mg活性成分。

30.权利要求24和29所述的用于治疗阿尔茨海默氏病的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物，其特征在于在所述药物组合物中，片剂含有聚合物基质，其选自：聚氧化乙烯、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟丙基纤维素(HPC)、羧甲基纤维素钠(CCNa)、纤维素衍生物、丙烯酸树脂RS PO和聚乙烯吡咯烷酮或其组合。

31.权利要求30所述的用于治疗阿尔茨海默氏病的充当多靶标治疗剂的化合物的药物

组合物,其特征在于在所述药物组合物中,片剂的基质占5%w/w至80%w/w、优选10%w/w至70%w/w的比例。

32.权利要求24和28所述的用于治疗阿尔茨海默氏病的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物,其特征在于鼻药物组合物每剂含有0.1mg至25mg活性成分。

33.权利要求24和32所述的用于治疗阿尔茨海默氏病的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物,其特征在于鼻制剂含有0.05至6%比例的生物粘附赋形剂,其选自:羟丙基甲基纤维素(HMPC)、羟丙基纤维素(HPC)、甲基纤维素(MC)、羧甲基纤维素(CMC)和聚丙烯酸(carbol)的衍生物或其组合。

34.权利要求24和33所述的用于治疗阿尔茨海默氏病的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物,其特征在于鼻制剂具有10至60mPas的粘度。

35.权利要求24、32和34所述的用于治疗阿尔茨海默氏病的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物,其特征在于鼻制剂含有0.09至1.8%的浓度的PEG;0.08至1%的浓度的生育酚;抗微生物防腐剂,其选自:0.007至0.47%的浓度的苯扎氯铵、0.003至0.19%的浓度的EDTA二钠和0.005至0.04%的浓度的对羟基苯甲酸丙酯或其组合;和保湿剂,其选自:3.5至5.5%的浓度的甘油和0.17至0.38%的浓度的吐温80;或其组合。

36.权利要求24和35所述的用于治疗阿尔茨海默氏病的充当多靶标治疗剂的化合物的药物组合物,其特征在于鼻制剂具有5.5至6.5、优选6.3的pH。

用于治疗阿尔茨海默氏病的作为多靶标治疗剂的萘衍生物的药物组合物

[0001] 本发明涉及药物化学,并且涉及式I的化合物的药物组合物,其对受阿尔茨海默氏病(AD)影响的胆碱能、谷氨酸能和线粒体系统的不同机制显示出多靶标作用。这些化合物的制剂通过其口服、舌下、胃肠外、透皮和鼻施用而增加效力和耐受性。

[0002] 本发明特别适用于提供一种有效的制剂,其中用于施用给人类的式I的化合物、它们的盐、水合物、对映异构体、异构体、代谢物和前药被认为是用于治疗AD的活性物质或成分。

[0003] 随着世界人口的预期寿命的增加,神经变性疾病也在增加,主要是与老年性痴呆有关的那些。具体地,阿尔茨海默氏病(AD)在60岁以上的人群中具有高发病率(在50%至60%之间)。这种疾病导致进行性痴呆,其特征在于遗忘发作、定向障碍、执行和认知功能障碍、幻觉、抑郁和激越的发生。

[0004] 目前,产生这种病因复杂的疾病的确切机制仍在讨论中。根据实验证据,淀粉样级联的假说和tau蛋白的磷酸化的假说在其起源中起基本作用(Hardy JA,等人.Science,1992;256:184-5;Haass C.等人.Cold Spring Harb Perspect Med.2012;2:a006270;Mucke L等人.Cold Spring Harb Perspect Med.2012;2:a006338)。但是,也存在被科学发现支持的其它替代假说,诸如线粒体活性的改变、神经炎症假说和代谢作用假说(与胆固醇和胰岛素有关)以及树突假说(Castello MA等人.Aging Res Rev.2013;12:282-8;Castello MA等人.Aging Res Rev.2014;13:10-2;Drachman DA.Alzheimers Dement 2014;10:372-80;Ferreira ST等人.Alzheimers Dement 2014;10(1Suppl):S76-83;De Felice FG,等人.Diabetes 2014;63:2262-72;De Felice FG.J Clin Invest.2013;123:531-9;Cochran JN等人.Brain Res Bull.2014;103:18-28)。

[0005] 一般而言,AD的神经病理学将自身表现为炎症性免疫反应,其包含先天性和适应性免疫系统的脑的活化,从而导致包含β-淀粉样肽(βA)和tau蛋白的聚集的神经化学级联。有人提出,淀粉样纤维或斑块的存在依次产生补体激活、小胶质细胞、细胞因子(趋化因子)的释放,并最后产生弥漫性神经毒性(Reitz C.International Journal of Alzheimer's disease.2012年1月;2012:369808;Rodrigue K.Neuropsychol Rev.2009年12月;19(4):436-450.Doi:10.1007/s11065-009-9118-x;Bateman,RJ等人.Alzheimer's disease.N.Engl.J Med.367,795-804,2012;Karran,E.,等人.Nat.Rev.Drug Discov.10,698-712,2011)。另一方面,Soyon Hong等人在Science(2016,doi:10.1126/science.aad8373)中描述,在无症状AD的初始阶段,在βA斑块的沉积之前,存在由互补物和小胶质细胞介导的早期突触损失,特别是由C1q蛋白的增加介导的早期突触损失。还已知,βA肽在其初始聚集状态下的参与对于C1q的过表达至关重要。慢性炎症作为脑中的免疫应答在许多变性疾病的进行性神经元死亡中起重要作用。因此,由浸润的巨噬细胞和附着至驻留小胶质细胞的单核细胞组成的吞噬细胞系统会产生过量的细胞因子诸如肿瘤坏死因子α(TNFα)、白介素1(IL1)、以及活性氧(EROS)和氮(ENOS),它们都与AD有关。这组对给定刺激的应答会触发由局部神经胶质细胞维持的攻击的恶性循环,其引发吞噬攻击,后者不可逆

地损伤神经元(Malm TM,Neurotherapeutics 2015,12:81-93;ElAli A.等人.Brain,Behavior,and Immunity,2015,doi:10.1016/j.bbi.2015.07.021;Michaud J.-P.等人,Neuron,85,4,450-2,2015)。

[0006] 线粒体功能障碍被描述为AD的病理生理学中的早期事件,并在AD患者和转基因小鼠中出现在βA沉积和记忆缺陷之前(Maurer,I.,等人.Neurobiol.Aging 2000,21,455-462;Caspersen,C.等人.FASEB J.2005,19,2040-2041;Mosconi,L等人.Ann.NY Acad.Sci.2008,1147,180-195)。在AD发病机制中,βA寡聚体在线粒体中积累,从而导致受损的能量代谢、增加的氧化性应激(OE)和细胞凋亡(Lustbader,等人.Science 2004,304,448 -0452;Caspersen,C.等人.FASEB J.2005,19,2040-2041;Manczak,等人.Hum.Mol.Genet.2006,15,1437-1449)。在AD患者和转基因小鼠中进行的研究中,描述了三羧酸循环的酶和细胞色素c氧化酶活性的持续降低(Yates,等人.J.Neurochem 1990,55,1624-1630;Maurer,I.,等人.Neurobiol Aging 2000,21,455-462;Caspersen,C.等人.FASEB J.2005,19,2040-2041;Leuner,等人.Mol.Neurobiol.2012,46,186-193)。对于从转基因小鼠的脑中分离的线粒体和暴露于βA寡聚体的分离的线粒体(其中还已经发现EO的增加,EO是AD的生理学中的一种关键要素),描述了类似的情况(Casley,等人,Neurobiol.Dis.2002a.10,258-267;Aleardi,AM,等人,J.Bioenerg.Biomembr.2005,37,207-225;Caspersen,C.等人.FASEB J.2005,19,2040-2041;Clementi,ME等人.FEBS Lett.2005,579,2913-2918;Leuner,等人.Mol.Neurobiol.2012,46,186-193;Smith,MA,等人.Nature 1996,382,120-121;Leuner,等人.Mol.Neurobiol.2012,46,186-193)。

[0007] 线粒体功能障碍的一种可能机制与线粒体通透性转换孔(mPTP)的开放有关,所述开放可以由Ca^{2+}和EO过载触发(Kroemer,G.和Reed,JC in Nat.Med.2000,6,513-519),并且其诱导促细胞凋亡因子(诸如促进mPTP形成的促细胞凋亡蛋白Bax)的释放(Jürgensmeier,JM,等人.Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1998,95,4997-5002;March,I.,等人.Science 1998,281,2027-2031;Narita,M.,等人.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1998,95,14681-14686)。结果,促进细胞凋亡的细胞色素c通过结合细胞凋亡蛋白酶活化因子(APAf-1)并形成被称为“凋亡体”的复合物而释放(Liu,X.,等人.Cell 1996,86,147-157;Yang,J.,等人.Science 1997,275,1129-1132)。

[0008] 此外,已知的是,与βA相关的线粒体生物能量功能障碍会促进谷氨酸能兴奋性中毒并因此促进细胞死亡。通过减少细胞能量储存,细胞质膜电位受到影响,这会消除N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体的Mg^{2+}阻断。这允许内源性谷氨酸的持续活化,并推测Ca^{2+}离子进入细胞的增加,这会造成神经元的兴奋性中毒,该事件已经与AD特有的记忆问题关联(Zádori D.Journal of Alzheimer's Disease,2018,62,523-547)。支持该假说的是经证实的事实:谷氨酸拮抗剂会减少线粒体毒素诱导的神经元死亡。这些和其它随后的证据提示,由电子传递链和/或与谷氨酸受体活化关联的细胞内途径产生的ROS可能是神经元变性的原因(Villegas S.Medicina Clínica,2015,145,2,76-83)。

[0009] AD的神经病理学复杂性指示它是一种多因素疾病,但是,从治疗角度来看,到目前为止还没有解决该问题的方法。

[0010] 监管机构只批准了四种药物。这些属于两组:乙酰胆碱酯酶抑制剂(AChEI)和N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂(NMDAr)(Chiang K等人.Annu Rev Pharmacol Toxicol.2014;

54:381-405;Francis PT等人.Trends Pharmacol Sci.2005;26:104-11;Huang Y.等人.Cell.2012;148:1204-22.)。

[0011] AChEI是多奈哌齐、利凡斯的明和加兰他敏。它们的作用机制是通过抑制突触间隙中的乙酰胆碱酯酶来增加胆碱能传递,并因此,它们可以提高AD患者的认知能力。AChEI可在多种制剂中得到,包括立即释放形式诸如片剂、胶囊剂和溶液,以及用于口服施用的控释形式,以及其它(Villegas S.Medicina Clínica,2015,145,2,76-83)。但是,这些AChEI对一些患者仅提供适度的临床益处,即使在安全性和耐受性方面以其最大剂量施用这些药物时。另外,这些化合物会引起副作用,包括厌食、恶心、呕吐、腹泻、腹痛和体重减轻(Physicians Desk Reference 2008,Thomson PDR等人.Clinical Geriatrics:Volume 2011,19,1;Ali T.等人.PLOS ONE,2015,7,1-10;Tsoi KKF,JAMDA,1-7,2015,doi:10.1016/j.jamda.2015.08.007)。

[0012] 另一方面,NMDAr是谷氨酸的离子通道型受体,谷氨酸是在神经元突触可塑性和记忆中起重要作用的神经递质。美金刚(这些受体的拮抗剂)因其在中度至重度AD中的神经保护作用而被用在临床实践中(National Institute for Clinical Excellence.Technology appraisal guidance 217.Donepezil,galantamine,rivastigmine and memantine for the treatment of Alzheimer's disease at www.nice.org.uk/guidance/TA217;O'Brien JT,等人.J Psychopharmacol Oxf Engl.2011;25:997-1019;Francis PT等人.Trends Pharmacol Sci.2005;26:104-11;Huang Y等人.Cell.2012;148:1204-22)。为了减少美金刚的副作用,已经开发了一种控释制剂,该制剂允许在两个时间阶段释放药物(US 5,382,601),和/或施用单个每日剂量(US 2006/0051416)。但是,这种治疗也不能阻止该疾病的进展,它只在某些阶段具有有益效果,并且效果根据患者有很大差异。

[0013] 目前,这种疾病还没有有效的治疗方法,这证明了开发其它治疗策略的合理性,所述策略旨在寻找这种复杂病因的其它靶标,诸如:

[0014] • ACh受体拮抗剂(Home-ClinicalTrials.gov[2016年3月21日访问].可得自:http://www.cli-nicaltrials.gov/.Zawieja P,等人.Geriatr Gerontol.Int.2012;12:365 -71Frolich L,等人.J Alzheimers Dis.2011;24:363-74。

[0015] • βA聚集的抑制剂(Aisen PS,等人.Arch Med Sci.2011;7:102-11.Caltagirone C,等人.Alzheimers Dis.2010;20:509-16.Salloway S,等人.Neurology.2011;77:1253-62.Home-ClinicalTrials.gov[2016年3月21日访问].可得自:http://www.cli-nicaltrials.gov/)

[0016] • 蛋白酶抑制剂/活化剂(Yan R,等人.Lancet Neurol.2014;13:319-29.Vellas B,等人.Curr Alzheimer Res.2011;8:203-12.Xia W,等.J Alzheimers Dis.2012;31:685-96.)

[0017] • 降低脂质的药物诸如他汀类药物(Home-ClinicalTrials.gov[2016年3月21日访问].可得自:http://www.cli-nicaltrials.gov/.Wong WB.等人.Pharmacoepidemiol Drug Saf.2013;22:345 -58;Frolich L,等人.J Alzheimers Dis.2011;24:363-74.)

[0018] • 主动免疫疗法(Panza F.等人.Expert Rev Clin Immunol.2014;10:405-19;Ryan R.JM等人.J Alzheimers Dis.2009;17:243;Winblad B.等人.Lancet Neurol.2012;

11:597-604;Schneeberger A.等人.NEngl J Med.2014;370:322-33.)

[0019] • 被动免疫疗法(Home-ClinicalTrials.gov[2016年3月21日访问]可得自:http://www.cli-nicaltrials.gov/.Panza F.等人.Expert Rev Clin Immunol.2014;10:405-19;Salloway S.等人.N Engl J Med.2014;370:322-33;Doody RS.等人.N.Engl J Med.2014;370:311-21;Ostrowitzki S.等人.Arch Neurol.2012;69:198-207)。

[0020] 迄今为止,这些治疗策略都没有被批准用于人类,也没有证明其效力,并且甚至绝大多数具有负面或矛盾的结果。在这些策略的开发中,开发一种能够在遭受AD的受试者的大脑代谢中受到影响的不同靶标上积极地相互作用的化合物的概念也没有出现。

[0021] Carrazana等人(WO2010118706 A4)宣布了新的中性、亲脂性和低分子量化合物的合成,所述化合物穿过血脑屏障(BBB)并粘附至淀粉样斑块,并且被用作诊断剂,通过SPECT、PET和MRI技术,用于这些结构的可视化。在本发明中指出,这些化合物可以用作阿尔茨海默病和帕金森病的治疗剂。另一方面,这些作者在WO2014131374A1中陈述了这些化合物作为该疾病的治疗剂的用途,因为它们可以:抑制、减少、重折叠和解聚可溶性低聚物、前纤维结构(prefibrillar structures)、原纤丝和淀粉样纤维,以及淀粉样斑块。但是,这些专利没有宣布这些化合物的抗胆碱能、抗氧化、抗谷氨酸能和抗炎作用,也没有宣布它们作为多靶标治疗剂的发现和概念,这允许开发一种新颖的单一疗法,该疗法将克服迄今为止在AD治疗中存在的困难。也没有宣布将式I的化合物、它们的盐、水合物、对映异构体、异构体、代谢物、前药作为用于治疗AD的活性物质或成分施用给人类的有效施用制剂。

[0022] 目前,控释药物形式的开发实际上与具有非常精确规格的聚合物材料在生物制药领域中的应用有关。由于这一点,它们能够使用单剂量将药物浓度维持在治疗平台上,以及在给定时间内连续释放它(Rodriguez,IC;Cerezo,A.;Salem,II Bioadhesive delivery systems.Ars Pharmaceutica,2000,41,1,115-128;Vintiloiu,A.,Leroux,JC.Organogels and their use in drug delivery.Journal of Controlled Release,2008,125,179-192)。在基质系统中,活性成分均匀分布在聚合物内作为混悬液或作为溶液,并且其释放动力学将取决于基质的结构和所用材料的化学性质(Frenkel,J.,Rubber Chemistry and Technology,1940,13,264-274;Tanaka等人.Encyclopedia of Polymer Science,1986,第26版,514;Fyfe,CA,Blazer,AI,Journal of Controlled Release,1998,52,221-225)。用于配制基质片剂的延迟或改性作用赋形剂可以是不溶性或惰性聚合物基质、脂质或水不溶性基质或亲水性基质。

[0023] 如下得到亲水性基质:将活性成分与亲水性聚合物混合,这产生聚合物基质。纤维素醚是广泛用于开发控释系统的亲水性聚合物,其具有生物相容性和无毒性。其中最著名的有:羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟丙基纤维素(HPC)、羧甲基纤维素钠(CMC Na)、甲基纤维素(MC)、乙基纤维素(EC)和微晶纤维素多糖和它们的衍生物、聚乙烯甘氨酸氧化物、聚乙二醇壳聚糖、聚(乙烯醇)、黄原胶、马来酸酐共聚物、聚(乙烯基吡咯烷酮)、淀粉和基于淀粉的聚合物、麦芽糊精、聚(2-乙基-2-噁唑啉)、聚(亚乙基亚胺)、水凝胶聚氨酯、交联的聚丙烯酸和它们的衍生物。在使用这些基质的制剂中,与其它合适的赋形剂一起,可能制备片剂或刚性明胶胶囊剂(Dabbagh,MA,等人.International.Journal of Pharmaceutics,1996,140,85-95)。

[0024] 近年来,由于鼻上皮的高渗透性,人们对探索药物递送至脑的鼻内途径非常感兴

趣,这允许施用较高分子量的药物,以及具有有时几乎与静脉内注射相同的血浆浓度分布曲线的快速药物吸收速率(Michael IU,等人.J Pharm Pharmacol 2001;53:3-22)。这种途径的其它优点是:吸收药物的大表面积,患者更好地坚持治疗,快速获得治疗性血液水平,不会出现侵袭性疾病,并且避免肝首过的影响。

[0025] 在文献中,描述了在脑中从鼻粘膜摄取药物主要通过三种不同的途径发生(Illum L.Eur J Pharm Sci 2000;11:1-18;Frey WH II.Drug Deliv Tech 2002;2:46-49.Vyas TK,等人.Curr Drug Deliv 2005;2(2):164-175)。一种是全身途径,其中药物被体循环吸收,并随后通过穿过BBB到达脑。另外两种直接途径是嗅觉途径和三叉神经途径,药物通过这两种途径部分地从鼻腔行进到脑脊液(CSF)和脑组织(Thorne RG,等人.Neuroscience 2004;127:481-496)。为了实现向中枢神经系统的药物递送,药物必须高效地和快速地穿透鼻粘膜。因此,剂型的设计在鼻内施用后的药代动力学和生物利用度方面起关键作用。药物在吸收处的滞留和紧密接触是在制剂中要考虑的两个重要因素。已知的是,随着制剂的粘度增加,制剂在鼻腔中的停留时间增加,并且因此吸收的概率增加(Pires,A,等人.J Pharm.Pharmaceut Sci.2009;12(3):288-311)。另一方面,鼻粘膜和粘液层含有多种酶,已经尝试了几种技术来防止酶降解,包括使用蛋白酶和肽酶抑制剂(Pires,A,等人.JPharm.Pharmaceut Sci.2009;12(3):288-311)。此外,还有一些吸收促进剂对上皮屏障产生可逆修饰,通过修饰脂质膜来增加该屏障的渗透性,增加其流动性,或打开细胞间隙,这会增加细胞旁运输。这些化合物与组织损伤的增加有关,但是,一些化合物诸如壳聚糖、环糊精和一些磷脂衍生物表现出吸收和生物利用度的增加,这超过了由粘膜修饰产生的任何负面影响(Pires,A.等人.J Pharm.Pharmaceut Sci.2009;12(3):288-311;Casettari,L.和Illum,L.J.Control.Release2014,190,189-200)。

[0026] 粘膜粘着化合物允许药物形式与粘膜层结合,这会增加粘膜与药物之间的接触时间,并有利于吸收。这些包括琼脂糖、壳聚糖、明胶、角叉菜胶、果胶、纤维素衍生物、聚丙烯酸酯、PEG、甲基丙烯酸酯、丙烯酸、PVA氨基葡聚糖、壳聚糖-EDTA、PAC、海藻酸盐、羧甲基纤维素和它的钠形式(CMC和Na-CMC)、羟乙基化淀粉、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、巯基化聚合物、聚丙烯酸(Mansuri,S.等人.React.Funct.Polym.100(2016)151 -172)。

[0027] 鼻内途径可以用于运输低分子量(小于1000Da)的药物(Behl CR,等人.Adv Drug Del Rev 1998;29(1):89-116)。各种专利宣布了将这些小分子递送到中枢神经系统的不同方案。

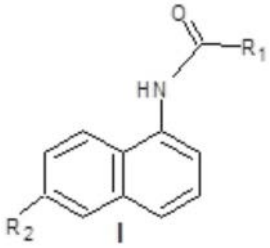
[0028] Quay,S.C.等人(US20030225031A1(2003)和US20060003989A1(2006))要求保护通过乙酰胆碱酯酶抑制剂(多奈哌齐、他克林、利凡斯的明、加兰他敏,以及其它)治疗痴呆、AD、学习障碍、烟碱戒断综合征的药物组合物,其包含液体溶液、凝胶或粉末(对于药物的鼻施用)和渗透性增强剂(对于通过鼻内施用在CSF中药物的透粘膜吸收)。

[0029] Went G.T.等人在US20050245617A1(2005)中要求保护N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂(美金刚)、单胺氧化酶(MAO)抑制剂或GADPH(司来吉兰)抑制剂与药学上可接受的载体的药物组合物,其组合物作为持续释放剂型施用,用于口服、局部、经上皮、真皮下、静脉内、鼻内或吸入施用用于治疗中枢神经系统相关病症,诸如帕金森病、多发性硬化和AD。这些作者在US20060252788A1(2006)中宣布了一种组合物,其中他们将美金刚与多奈哌齐组合,并且在US20060189694A1(2006)中,他们揭示了氨基金刚烷(aminoadamantine)的

衍生物(美金刚、金刚乙胺、金刚烷胺)与脱羧酶抑制剂(左旋多巴、卡比多巴)或儿茶酚-O-甲基转移酶抑制剂(托卡朋、恩他卡朋)、以及载体的以延长释放剂型的组合物,用于治疗各种神经变性疾病。

[0030] Cummings,C.J.,等人在US20070037800A1(2007)中宣布了通过使用克霉唑及其衍生物来治疗神经学障碍诸如亨廷顿病或AD的鼻内方法。另一方面,Tao,T.等人在CN1621039(2005)中公开了石杉碱甲及其衍生物或盐的可生物利用的制品,其经鼻施用用于预防和治疗老年性痴呆以及改善青少年的记忆和学习能力。

[0031] 本发明涉及药物化学,并且涉及式I的化合物的药物组合物,其对受阿尔茨海默氏病(AD)影响的胆碱能、谷氨酸能和线粒体系统显示出多靶标作用。这些化合物的制剂通过其口服、舌下、胃肠外、透皮和鼻施用而增加效力和耐受性。

[0032] 

[0033] 其中:

[0034] R_1:-亚烷基-C(O)NH-亚烷基-R_3、-亚烷基-C(O)O-R_4;

[0035] R_3:-COOH、-OH、-SH、-NH_2、-NH-烷基-、-NH-亚烷基-NH_2、-NH-亚烷基-NH-C(O)-亚烷基-S-R_5、-NH-二硫代氨基甲酸酯-烷基、-N-烷基-二硫代氨基甲酸酯碱土金属盐;或上述基团的药学上可接受的盐;

[0036] R_4:琥珀酰亚胺基基团;

[0037] R_5:-H、-C(O)-烷基、-C(O)-C_6H_5;且

[0038] R_2:-H、-烷基。

[0039] 术语"烷基"的特征在于为饱和碳原子和氢原子的直链或支链脂族链,优选甲基或乙基。术语"亚烷基"表示直链或支链烷基基团的二价类似物,优选亚甲基(-CH_2-)、亚乙基(-CH_2CH_2-)或亚丙基(-$CH_2CH_2CH_2$-)。

[0040] 具体而言,配制的式I的化合物可以单独用作现今使用的多重疗法(multitherapy)的替代品,在所述多重疗法中几种活性成分的组合用于改善AD的症状。式I的化合物单独具有抗胆碱能、抗氧化、抗谷氨酸能和抗炎活性,这使它们成为AD的单一疗法的有效活性成分。此外,它们能够抑制淀粉样生成肽聚集和斑块形成(WO2010118706A4)。这样,患者接受单一疗法,其显著改善患有AD的受试者的临床症状和在脑中存在的生物学改变。

[0041] 作为用于治疗AD的活性物质或成分,为了施用给人类而用式I的化合物、它们的盐、水合物、对映异构体、异构体、代谢物、前药配制的制剂允许通过口服、舌下、胃肠外、透皮和鼻施用而增加生物利用度、活性成分的停留时间和充分的排泄,这会增加效力、生物安全性、对治疗的依从性和耐受性。

[0042] 可以方便地如在古巴专利号2009-57,PCT-CU2010-000001中所述制备式I的化合物。

[0043] 在本发明中，式I的化合物出乎意料地表现出线粒体保护性能。图2(来自非限制性实施例1)显示了化合物1对线粒体膜电位(Δψ)的耗散的影响，其与穿过电子传递链(CTE)的蛋白复合物的电子流有关。用乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(ethylene-bis(oxyethyleneitrile)tetraacetic acid,EGTA)处理过的线粒体显示出线粒体电位的最小耗散，因为这是实验的对照组。在这种情况下，EGTA充当反应介质中Ca^{2+}污染物质的螯合剂，使得线粒体处于其最佳状态，并将其电位保持在最大值。EGTA+3-氯苯基腙羰基氰化物(CCCP)对照是其中发生线粒体损伤的组，因为CCCP通过充当氧化磷酸化解联剂来耗散Δψ。在0.1μmol/L至100μmol/L的浓度范围内的化合物1显示出与对照组(EGTA)相似的电位耗散值。根据这些结果，在试验的剂量范围内，化合物1降低了电位耗散的易感性。

[0044] 图3显示了由50μmol/L的Ca^{2+}和2mmol/L的无机磷酸盐(Pi)诱导的线粒体膨胀的评价结果，其通过分光光度计法从在540nm的吸光度的降低来评价。在这种情况下，观察到在对照组(在有Ca^{2+}存在下)中显示最大吸光度值，作为最大膨胀的量度。另一方面，用EGTA(Ca^{2+}的螯合剂)处理的样品显示出低吸光度值($p<0.001$)，因为这是未损坏的对照。用CCCP处理的组也显示出低吸光度值($p<0.001$)，因为当解偶联时，它阻止Ca^{2+}离子的进入，并从而阻止线粒体膨胀。类似浓度的化合物1逆转了Ca^{2+}诱导的膨胀的效应，因此它可以被认为是线粒体完整性和功能性的保护剂。这些效应对应于观察到的对线粒体膜电位耗散的效应。

[0045] 还评价了化合物1对过氧化氢(H_2O_2)产生的影响，这与线粒体膜电位(Δψ)的保存状态直接相关。在基础条件下，线粒体产生大量的反应性物质，这在用EGTA处理的对照组中得到了证实。当用CCCP处理时，观察到类似的行为(图4，来自非限制性实施例1)，但在这种情况下，推断出反应性物质的产生与诱导CCCP的解偶联有关，而与线粒体ATP酶产生ATP无关，也就是说与线粒体的最佳功能状态无关。在试验的剂量范围内，用化合物1处理会保护免于H_2O_2产生。

[0046] 总之，我们的结果提示，该化合物充当线粒体功能的保护剂，因为线粒体不太容易受到膜电位耗散的影响，它会减少膨胀和活性氧的产生。

[0047] 基于计算机模拟的(in silico)研究，式I的化合物以与多奈哌齐相似的方式与酶AChE相互作用。这些与氨基酸Trp 84、Trp 279和Phe330的相互作用是疏水性的。以同样的方式，这些化合物通过形成三个氢键(其使配体/酶键具有稳定性)与参与与乙酰胆碱的反应的空腔中的所有丝氨酸残基相互作用，从而提示，所述化合物可能阻断酶活性。东莨菪碱诱导的遗忘症(ESC)模型是最广泛用于诱导与痴呆和衰老相关的认知缺陷的模型之一(Bajo R,等人.Scientific reports 2015,5:9748;Gilles C和Ertle S.Dialogues Clin.Neurosci.2000,2(3):247-255;Haider S等人.Brain Res.Bull.2016,127(Supplement C):234-247)。这种竞争性的非选择性的毒蕈碱样胆碱能受体拮抗剂的应用是阻断胆碱能神经传递并从而诱导痴呆的有效途径。ESC还诱导酶乙酰胆碱酯酶AChE的活性增加，这与受体的阻断一起促进胆碱能神经传递的缺陷。该模型被用在那些酶活性抑制剂诸如多奈哌齐的体内试验中(Shin CY,等人.Biomolecules&Therapeutics 2018,26(3):274-281)。除了这些作用外，还观察到其它机制，诸如EO诱导、神经炎症、线粒体功能障碍、降低的cAMP磷酸化和NFDB(来源于脑的亲神经因子)的负调节，和胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAD)(Haider等人,Brain Research Bulletin 2016,127,234-247;Jung等人,Biol.Pharm.Bull.2009,32(2),242 -246;Konar等人,PLOS ONE,2011,6,11,e27265;Lee等

人,Scientific reports,2015,5,9651.;Wong-Guerra等人,Neurol Res.2017;39(7),649-659),所有这些都促进了在该模型中观察到的认知功能障碍。

[0048] 使用Y-迷宫的“空间版”进行在急性ESC模型中的行为评估,该迷宫评估短期空间记忆(McGaugh JL,Science,153(1966)1351),并且是基于动物自发识别迷宫内新空间的能力。在该方案中评价的记忆涉及海马的功能(Csiszar A.,等人.Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.(2013),305H1120-1130;Olton DS和Paras BC,Neuropsychologia,17(1979)669-682.)。

[0049] 图5(非限制性实施例2)显示了在ESC模型中评价的化合物(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3)在Y-迷宫中的行为试验结果。在该实验中,观察到,对照组动物对新臂有偏好,这通过在两个家族臂上花费的时间的显著减少来证明($p<0.001$)。在训练前30分钟施用ESC后,这种偏好行为特征没有重现。在这种情况下,在新臂中花费的时间减少,相对于其它两个臂没有观察到统计上显著的差异。相反,在施用化合物3(剂量从0.1mg/kg至10mg/kg)的组中,由ESC诱导的遗忘症显著逆转($p<0.001$)。因此,动物表现出与对照组相似的偏好行为特征,其特征在于,与熟悉的臂相比,在新臂中的持久性显著增加。在该试验中,在试验前30分钟施用多奈哌齐(阳性对照;剂量:1mg/kg,腹膜内),也逆转了由ESC诱导的缺陷,这与其它作者以及该药物的抗胆碱能作用一致(Lee JS,等人.Scientific reports 2015,5:9651;Riedel G,等人.Behav.Brain Res.2009,204(1):217-225)。因此,我们的结果指示,在训练前30分钟以在0.1至10mg/kg范围内的单剂量施用的化合物3令人惊讶地阻止了由ESC的施用诱导的遗忘效应。对比了不同实验组在新臂中的停留时间(图6,非限制性实施例2)。因此,对照组与ESC组相比的时间显示在后一组中的明显减少(对照:133.8±9.3秒;ESC:98.8±4.2秒),这是统计学上显著的($p<0.001$)。用化合物3治疗的组中动物的行为取决于施用的浓度。直到1mg/kg剂量,探究时间逐渐增加,这与ESC组显著不同($p<0.01$)。在更高剂量,观察到该参数的下降。在多奈哌齐治疗组的情况下,正如预期的那样,停留时间明显长于ESC。总之,在该经验中,1mg/kg的3的剂量表现为具有最大效果的剂量。

[0050] 为了研究长期记忆(McGaugh JL,Science,153(1966)1351),已经开发了“水迷宫”(称为莫里斯水迷宫,MWM;Morris R,Journal of Neuroscience Methods 1984,11(1):47-6)。该行为模型已经被证明作为海马依赖性空间导航和参考记忆的量度是有效的。为此,报道了一种为期两天的MWM方案,该方案是基于使用可视平台的一系列初始训练试验,然后在24小时后进行记忆试验,但将平台隐藏(Gulinello M.,M.Gertner等人.Behav.Brain Res.,196(2009)220-227)。该方案已经在年长(15-18个月)三重转基因(3xTG)小鼠中得到验证。评价的标准是逃避潜伏期的差异和/或比率:使用可视平台训练的最后一次试验的逃避潜伏期,和使用隐藏平台的第一次试验(24小时后)的逃避潜伏期。因此,产生正确空间策略的动物会迅速向隐藏平台区域移动,这指示它们保持其完整的长期记忆能力。相比之下,花时间来定位隐藏平台的动物具有长期空间记忆故障,具有更高的逃避潜伏期。

[0051] 图7(非限制性实施例2)显示了使用MWM在急性ESC模型中对化合物3的行为评价结果。结果指示,施用ESC的小鼠具有长期空间记忆缺陷,但用化合物3治疗的小鼠没有。算术差异以及用可视平台训练的最后一次试验和用隐藏平台训练的第一次试验的潜伏时间的比率表明,用化合物3治疗的组与用ESC治疗的组显著不同。以此方式,本实验的结果证实了

先前关于短期空间记忆的经验所得到的结果。

[0052] 在这些动物中，在脑匀浆物的可溶性级分的样品中，离体测定了AChE活性(μmol/L/min/mg蛋白)(图8，非限制性实施例3)。结果表明，与对照组相比，在ESC治疗组中的AChE活性显著增加($p<0.001$)。但是，与ESC组相比，在用3治疗的组中AChE活性出乎意料地显著降低($p<0.05$)，并且如在用多奈哌齐治疗的组中所预期的那样($p<0.01$)。

[0053] 慢性ESC模型最近在用于治疗AD的新药剂的实验评价中作为另一种替代方案出现(Klinkenberg I和Blokland A,Neurosci Biobehav Rev 2010,34(8):1307-1350)。在啮齿类动物中，以每天一次施用的速度连续10天施用ESC的系列剂量(腹膜内)会诱发认知功能障碍。利用这个模型，在急性期表现出的一些特征得以维持，并且其它特征与AD更好地相关。因此，胆碱能系统发生变性，诸如：乙酰胆碱酯酶的活性/表达的增加，合成酶胆碱乙酰基转移酶的活性/表达的降低，以及在突触前末端水平胆碱活性消耗的不足(Haider,S.等人.Brain research bulletin,2016,127,234-247)。淀粉样前体蛋白(AβPP)的表达以及聚集体βA和过度磷酸化的tau的存在也增加(Bihaqi SW,等人.Indian J.Pharmacol.2012,44(5):593-598;Ramandeep K,等人.Int J Prev Med Res.2015.第1卷，第2期，第45-64页)。

[0054] 图9(非限制性实施例4)显示了化合物3在慢性ESC模型(1.5mg/kg每日剂量，2周)中的长期记忆行为评估结果。在ESC施用前3天和在接下来的两周ESC期间施用化合物3。MWM结果表明，施用ESC的小鼠存在记忆缺陷。另一方面，在施用化合物3(1和10mg/kg)的组的情况下，与ESC组相比，使用隐藏平台的试验(T7)与使用可视平台的最后一次试验(T6)的第一次逃避潜伏期的比率显著降低。结果表明，1mg/kg剂量表现为最大效应剂量。总之，结果表明，在该模型中，胆碱能系统的变性被诱导，这被MWM中的长期空间记忆的损害证明，其被化合物3的应用阻止。

[0055] 应当认识到，谷氨酸受体介导的兴奋性中毒可能是包括AD和帕金森病(PD)在内的许多神经学异常的病理生理学基础。在正常生理条件下，谷氨酸在神经发育、传递和突触可塑性中起核心作用。这种神经递质还参与记忆和学习过程。在急性细胞毒性事件(诸如低氧-缺血)中或在慢性神经变性疾病(诸如阿尔茨海默病和帕金森病)中，脑组织中的谷氨酸浓度响应于不同的病因而升高，这种现象会引发神经元死亡，特别是由于增加的细胞内Ca^{2+}浓度。令人惊讶的是，已经在体外试验中发现式I的化合物对谷氨酸诱导的兴奋性中毒损伤具有神经保护作用，如在实施例5和图10中以非限制性方式所示。在这里，用化合物3(1.8-60μmol/L)预处理SH细胞-SY5Y 24小时，并随后与相同浓度的3和60mmol/L的谷氨酸共温育(24小时)。化合物3在7.5和15μmol/L的浓度显著减少($p<0.05$)神经元死亡。这些结果提示，神经保护可以不同程度地调节线粒体代谢。

[0056] 兴奋性中毒的细胞死亡也受谷氨酸能系统中的其它受体的影响。因此，可能通过施用红藻氨酸(KA)或α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸(AMPA)来实验性地诱导损伤，这两种都是有效的谷氨酸激动剂(Wang Q,等人.Mol Neurobiol.2005,31:3-16)。已知KA的啮齿动物施用会诱导复发性癫痫发作、行为变化和随后的神经元变性，特别是在海马的CA1和CA3区域中(Wang Q,等人.Mol Neurobiol.2005,31:3-16)。由KA诱导的神经元死亡伴有小胶质细胞和星形胶质细胞的活化的增加，从而增加炎症性细胞因子的产生(Chen,Z.等人.J.Neurobiol.,2005,62(2),207-218)。此外，KA受体的活化会产生线粒体膜的去极化，并因此产生细胞内Ca^{2+}浓度的改变(Brorson,JR等人.J.Neurosci.,1994,14(1),187-197)。

因此，诱导线粒体功能的损伤(Wang,Q.等人.Mol.Neurobiol.,2005,31(1-3),3-16)以及EROS和ENOS的产生的增加，从而产生OE和亚硝基化应激(NE)，其通过其有害的神经元作用诱导细胞死亡(Ueda,Y.等人.Exp.Brain Res.2002,147(2),219-226)。

[0057] 在我们的经验中，在KA对照组的动物中，在KA注射后10至20分钟内观察到不动、口腔和面部运动以及僵硬姿势，并在某些情况下观察到中度强度的强直阵挛发作。在接下来的20-60分钟内，观察到点头、重复动作和升降，并随后观察到连续升降，直到最终产生更严重的强直阵挛发作。但是，在用化合物3(剂量:5和50mg/kg)治疗的那些中，这些作用出人意料地以更低的频率和强度表现出来(图11，非限制性实施例6)。图11显示了用3(5和50mg/kg)治疗的组的总评分(0-120分钟)的显著下降，50mg/kg剂量的效果更大。

[0058] 到目前为止尚未配制式I的化合物，因此本发明的药物组合物是独特的，其考虑了这些化合物的物理化学性质，并且以独特的方式考虑了组合物中成分的重量比。因此，所提供的制剂保证了具有抗胆碱能、抗氧化、抗谷氨酸能和抗炎作用的这些多靶标治疗剂的性能。这些制剂允许有效血浆浓度的活性成分随着时间的持续剂量，这会确保其效力(到目前为止尚未描述)，并允许通过其口服、舌下、胃肠外、透皮和鼻施用而增加依从性和耐受性。

[0059] 本发明的用于施用给人类的式I的化合物、它们的盐、水合物、对映异构体、异构体、代谢物、前药的药物制剂包括合适的赋形剂，并且可以呈固体、半固体、凝胶状或液体形式，诸如片剂、胶囊剂、混悬剂、乳剂、胃肠外溶液、透皮贴剂、鼻溶液、粘膜粘着剂，以及其它。通常，所述制剂将含有0.1至99％、优选1至80％的活性化合物以及制剂的媒介物或组分。赋形剂是液体、固体或半固体辅助物质，天然或合成来源的有机和无机性质的化合物，在生理上可接受的，并通常用于活性成分的配制中。

[0060] 本发明中选择的药物形式是片剂，其将每天至少施用一次，并且含有选自式I的化合物或其药学上可接受的盐的治疗活性成分，以及固体、半固体、凝胶状或液体聚合物基质的药学上可接受的载体。当所述剂型暴露于水溶液时，本发明的剂型维持治疗活性剂的释放2至24小时。在施用所述制剂后，活性成分的溶出率在6至18小时之间超过80％，并且药物的有效血浆水平维持24小时。所述活性成分以约1至100mg/制剂的量存在。

[0061] 在本发明中，片剂特别用作聚合物:聚氧化乙烯、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟丙基纤维素(HPC)、羧甲基纤维素钠(CCNa)、纤维素衍生物、丙烯酸树脂RS PO(Eudragit RS PO)、聚乙烯吡咯烷酮或其组合。在24小时调释制剂中，聚合物的存在量为5％w/w至80％w/w，优选10％至70％w/w。在12小时调释制剂中，聚合物优选以5％w/w至50％w/w存在。以在文献中描述的常规方式制备所述制剂。

[0062] 图12、13和14显示了三种片剂制剂的控释曲线，这三种制剂不应被视为本发明的限制(实施例7、8和9)，用于获得活性成分的片剂:(N-[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]-β-丙氨酸(1)，6-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}己酸)(2)，和(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3)。这些制剂含有10mg活性成分，和不同比例的其它添加剂诸如淀粉作为粘合剂、微晶纤维素作为崩解剂、乳糖作为稀释剂、二氧化硅作为光滑剂和硬脂酸镁作为润滑剂，并且它用作聚合物基质:HMPC、HPC和丙烯酸树脂RS PO。图12、13和14显示，在三种制剂中，有两个释放阶段，取决于介质的pH。因此，在片剂(HMPC、HPC和丙烯酸树脂RS PO)暴露于非酶促酸性介质60分钟后，活性成分从基质中的释放并不显著，释放的成分小于1％。另一方面，当三种制剂的片剂暴露于pH 7.5的缓冲溶

液时，活性成分的释放过程逐渐增加，在24小时内几乎完全(超过96％)递送到介质中。这种释放关于作为非限制性示例的三种活性成分而发生。

[0063] 具有本发明的非限制性质的三种制剂的这些释放曲线清楚地表明，当pH变化时，溶出曲线中的斜率增加，这意味着活性成分存在超时持续释放。这种释放模式对人类使用的影响表明，释放分两个阶段进行，其中血液中活性成分的浓度存在逐渐且适度增加，从而减少不希望的副作用。这在避免可能的胃副作用方面特别有效，因为仅约1％的活性成分含量在胃中释放。除此之外，通常以长给药间隔进行的可靠缓释会改善在患者中的药理学作用，从而增加对治疗的依从性和耐受性。

[0064] 总之，本发明的式I的化合物的片剂制剂具有最佳的释放特性。它使用可获得的聚合物基质，因此可以以简单且经济的方式生产片剂，并加入生理上相容的组分，这提供了两个阶段的延长释放组合物，这有助于剂量，而不会产生不利的副作用。

[0065] 在本发明中开发的透皮系统由以下连续层制成：a)亲脂性保护外层；b)含有式I的活性成分的层，呈凝胶、混悬剂、乳剂或其它形式；其中化合物被掺入基质(其可以是丙烯酸)中，这确保了其有效储存；c)释放活性成分的双面控制膜；d)释放模块，其包括活性成分蓄池和药物释放控制器系统，并且通常由聚合物材料(羧甲基纤维素(CMC)、乙基纤维素、明胶、甲基纤维素、淀粉等；合成的弹性体：聚丁二烯、聚异戊二烯、氯丁橡胶、聚硅氧烷等；合成的聚合物：聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯、聚苯乙烯、聚氨酯、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等制成；e)低变应原粘合层，其允许通过压力固定贴片，并含有聚合物丙烯酸、低变应原的有机硅、树脂、矿物油、聚异丁烯等；和f)内部保护膜，在将该系统应用于皮肤之前将其除去。这些局部贴剂的涂层确保药物通过皮肤连续且温和地释放到血流中；没有不良反应。根据其大小和剂量容量，公开了两种类型的贴剂。一个的面积为5cm^2，剂量为5mg活性成分，并释放4mg/天的化合物。另一个具有双倍的比例和容量。治疗从每日剂量的较小贴剂开始，并在良好耐受性和至少4周后，施用较大的贴剂(10cm^2，10mg/24h)。

[0066] 本发明的用于施用给人类的式I的化合物、它们的盐、水合物、对映异构体、异构体、代谢物、前药的鼻制剂采用不同的组分，它们作为溶剂、生物粘附剂、防腐剂、抗氧化剂和表面活性剂/保湿剂起作用。非限制性的生物粘附赋形剂可以是：羟丙基甲基纤维素(HMPC)、羟丙基纤维素(HPC)、甲基纤维素(MC)、羧甲基纤维素(CMC)，所有它们具有0.5至7％的浓度，和0.01至1.5％的聚丙烯酸(carbol)的衍生物。PEG用作活性成分的溶剂。生物粘附聚合物以非限制性的方式具有10至60mPas的粘度，目的是增加在鼻腔中的停留时间。作为抗微生物防腐剂赋形剂，优选地使用0.005至0.5％的苯扎氯铵，或与0.002至0.2％浓度的EDTA二钠和0.005至0.05％浓度的对羟基苯甲酸丙酯组合。使用磷酸盐或柠檬酸盐缓冲剂的等渗溶液将pH调节在6至7.5之间。所述等渗剂可以是：氯化钠、甘露醇、山梨醇、葡萄糖，以及其它。使用的优选抗氧化剂是0.05至2％的生育酚。3至6％的甘油和0.1至0.4％的吐温80用作润湿剂，其允许增加渗透性。在所有情况下使用的溶剂都是注射用水。

[0067] 鼻内施用被认为是一种向中枢神经系统(CNS)递送治疗剂的方法。药物释放在几分钟内沿着嗅觉和三叉神经途径发生，这些细胞外途径不需要药物与任何受体或轴突运输系统结合(Thorne,RG等人.Neuroscience.2002,127,481-496)。

[0068] 图15显示了化合物3鼻制剂施用对ESC的急性施用诱导的遗忘症的影响的行为评价(Y-迷宫实验)的结果。可以看出，对照组之间没有差异，这表明所使用的制剂不会影响动

物在Y-迷宫实验中的表现。正如预期的那样，与两个对照组相比，在ESC治疗的动物的新臂中观察到扫描时间的显著减少($p<0.001$)。但是，用化合物3治疗的组中的动物显示出与对照组(盐水和媒介物)相似的值，表明化合物3预防ESC诱导的遗忘症。图16显示了物体辨别试验(ODT)的结果。在对照组和用化合物3治疗的组之间没有观察到新物体的辨别指数(DI)的显著差异。另一方面，在ESC施用的组中，观察到DI的显著降低($p<0.001$)。

[0069] 该实验的结果表明，ESC的急性施用在Y-迷宫模型和ODT中诱导认知功能障碍，类似于其它作者观察到的结果(de Bruin N，等人，JNeurodegener Dis.2015;2015:242505.Doi:10.1155/2015/242505)。除此之外，化合物3的鼻内施用在两种模型中预防认知功能障碍，这与在急性和慢性ESC模型中口服施用的该化合物的先前结果一致。化合物3的鼻内施用使得可能在比口服途径中使用的剂量更低的剂量预防ESC的遗忘效应。

[0070] 以下不应以任何方式解释为限制本发明的实施例和图解释了用于施用给人类的式I的化合物、它们的盐、水合物、对映异构体、异构体、代谢物和前药的药物制剂对胆碱能、谷氨酸能和线粒体系统的不同机制的多靶标作用。

附图说明

[0071] 图1：为本发明的非限制性实施例选择的一些式I的化合物的结构和物理化学性质。

[0072] 图2：式I的化合物(N-[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]-β-丙氨酸(1)对从大鼠肝脏分离的线粒体的膜电位的影响。

[0073] 图3：式I的化合物(N-[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]-β-丙氨酸(1)对从大鼠肝脏分离的线粒体的膨胀的影响。***$p<0.001$，通过Student氏t检验相对于对照组的对比，$p<0.05$被认为是统计上显著的差异。

[0074] 图4：式I的化合物(N-[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]-β-丙氨酸(1)对从大鼠肝脏分离的线粒体中的活性氧产生的影响。***$p<0.001$，使用Student氏t检验相对于EGTA组的对比，$p<0.05$被认为是统计上显著的差异。

[0075] 图5：化合物(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3)在东莨菪碱(ESC)的急性施用所诱导的记忆丧失模型中的抗胆碱能调节作用。在对照组、ESC组和单剂量的化合物3(0.1、1、10和20mg/kg，腹膜内)治疗的组的学习期以后，在Y-迷宫中的短期空间记忆。*$p<0.05$，**$p<0.01$，***$p<0.001$。单向方差分析之后是Turkey氏事后检验。

[0076] 图6：化合物(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3)在东莨菪碱(ESC)的急性施用所诱导的记忆丧失模型中的抗胆碱能调节作用。在对照组、ESC组和用0.1、1、10和20mg/kg剂量的化合物3治疗的组的训练期以后，在新臂中的持久时间。*$p<0.05$，相对于对照组的对比，≈$p<0.05$，相对于ESC的对比。单向方差分析之后是Turkey氏事后检验。

[0077] 图7：化合物(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3)在东莨菪碱(ESC)的急性施用所诱导的记忆丧失模型中的抗胆碱能调节作用。上图：在不同实验组的为期两天的方案中MWM中的表现。下图：长期空间记忆，使用可视平台的最后一次试验(D1T4)的逃避潜伏期；使用可视平台的第一次试验(D2T1)的逃避潜伏期。**$p<$

0.01,***p<0.001,相对于ESC组的对比。≈p<0.05,相对于对照组的对比。单向方差分析之后是Turkey氏事后检验。

[0078] 图8:化合物(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3)在东莨菪碱(ESC)的急性施用所诱导的记忆丧失模型中的抗胆碱能调节作用。在动物脑匀浆物的可溶性级分中的抗胆碱酯酶活性,所述动物脑匀浆物来自对照组、ESC-治疗组和(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3)和多奈哌齐的急性ESC模型。条对应于平均值±SEM,n=10只动物/组。***p<0.001,相对于对照组的对比。≈p<0.05,≈≈p<0.01,相对于ESC组的对比。p<0.05被认为是统计上显著的差异。使用的统计检验:单向方差分析之后是Turkey氏事后检验。

[0079] 图9:化合物(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3)在东莨菪碱的长期使用所诱导的记忆丧失模型中的抗胆碱能调节作用。***p<0.001,相对于对照组的对比。≈p<0.05,≈≈p<0.01,相对于ESC组的对比。单向方差分析之后是Turkey氏事后检验。

[0080] 图10:在细胞系SH-SY5Y中,化合物(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3)对由谷氨酸诱导的兴奋性中毒损伤的神经保护作用。将SH-SY5Y细胞用不同浓度的化合物3(1.8-60μmol/L)处理24小时,然后用再次通过含有该化合物和谷氨酸60mmol/L的新培养基代替培养基。对照:未处理的细胞(NT)和谷氨酸(Glut)。通过MTT试验确定其生存力。(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯在(7.5和15μmol/L)浓度显著减少了由谷氨酸产生的细胞死亡。每个条代表平均值±SEM,n=3。p<0.05被认为是统计上显著的差异。

[0081] 图11:化合物(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3)对红藻氨酸的icv施用所诱导的癫痫发作的神经保护作用,表示为不同动物组的最终评分(0-120分钟)。条代表平均值±SEM,n=7/组。*p<0.05;**p<=.001,相对于对照组的对比。单向方差分析之后是Turkey氏事后检验。p<0.05的值被认为是统计上显著的差异。

[0082] 图12:以下化合物的片剂的制剂1的释放曲线:(N-[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]-β-丙氨酸(1)和(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3),没有酶,在pH 1.2、在pH 7.5和从pH 1.2变为7.5,持续18小时。

[0083] 图13:以下化合物的片剂的制剂2的释放曲线:6-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}己酸)(2)和(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3),没有酶,在pH 1.2、在pH 7.5和从pH 1.2变为7.5,持续18小时。

[0084] 图14:以下化合物的片剂的制剂3的释放曲线:(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3),没有酶,在pH1.2、在pH 7.5和从pH 1.2变为7.5,持续18小时。

[0085] 图15:在Y-迷宫实验中单次鼻内剂量(7.2mg/kg)的化合物3的施用对东莨菪碱(1.5mg/kg,腹膜内)的急性施用所诱导的遗忘症的影响。条代表在新臂中花费的时间的平均值±SEM,n=10只动物/组。***p<0.001;相对于盐水对照组和媒介物对照的对比。≈≈p<0.01,相对于ESC组的对比。简单方差分析检验之后是Turkey氏多重比较检验。

[0086] 图16:在物体辨别试验中化合物3通过鼻内途径的单剂量(74μg/kg)施用对东莨菪碱(1.5mg/kg.,腹膜内)的急性施用所诱导的遗忘症的影响。条代表辨别指数的平均值±

SEM,n＝10只动物/组。***p<0.001;相对于盐水对照组和媒介物对照的对比。≈≈≈p<0.001,相对于东莨菪碱组的对比。简单方差分析检验之后是Turkey氏多重比较检验。

[0087] 下面列出了三种式I的化合物的实施例,其不应解释为以任何方式限制本发明。

[0088] 实施例1.式1化合物(N-[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]-β-丙氨酸(1)对从大鼠肝脏分离的线粒体中的膜电位、膨胀和活性氧产生的影响评价.

[0089] 大鼠线粒体的分离:通过差速离心的经典方法从雄性Wistar大鼠的肝脏中分离线粒体(Mirandola SR,等人,J Neurosci Res 2010;88:630-39)。

[0090] 温育程序:在30℃,在含有125mmol/L蔗糖、65mmol/L KCl和10mmol/L的HEPES-KOH的标准温育培养基(pH 7.4)中,用5mmol/L琥珀酸钾(+2.5μmol/L鱼藤酮)给线粒体供能。

[0091] 线粒体测定

[0092] 在有辣根过氧化物酶(1IU/mL)存在下,分别使用番红(10μmol/L)(Zanotti A.,和Azzone GF,Archives of Biochemistry and Biophysics1980,201(1),255-265)和Amplex Red(Molecular Probes,OR,Eugene)作为荧光探针,通过分光光度法确定线粒体膜电位和EROS(Votyakova和Reynolds,J Neurochem.2001,79(2),266-77)。在$\lambda_{激发}$495/$\lambda_{发射}$586nm(番红)和在$\lambda_{激发}$563/$\lambda_{发射}$587nm(Amplex Red),在Hitachi荧光分光光度计,型号F-4500(Tokyo,日本)中进行测量。在有0.1mmol/L的EGTA存在下进行这些实验,并且评价的化合物是在0.1至100μmol/L的浓度范围内的N-[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]-β-丙氨酸(1)。使用Hitachi分光光度计,型号U-2910(日本),通过分光光度计法从在540nm的吸光度的降低来估计线粒体膨胀。

[0093] 数据分析:在所有情况下,分别使用Kolmogorov Smirnov和Levene检验评价数据的正态分布和方差同质性。借助于Student氏t-检验进行线粒体功能变量的对比。我们工作的显著性水平为0.05,并使用Statistica 8.0程序(StatSoft Ink)进行数据分析。在GraphPad Prism 5.0程序(GraphPad Software,California,美国)中进行结果的图解表示。

[0094] 实施例2.在用东莨菪碱的急性使用诱导的记忆丧失模型中评价化合物(2-[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3)的抗胆碱能调节作用

[0095] 动物

[0096] 使用由国家实验动物生产中心(CENPALAB,古巴)提供的年轻雄性OF-1小鼠(20-25g)。在实验前,使动物适应实验室条件(控制温度25±2℃、相对湿度60±10%和12h的光照/黑暗周期)7天。在此期间和在实验期间,动物随意接受水和由CENPALAB提供的啮齿动物标准饮食。所有程序根据欧洲委员会实验室动物使用和护理指南进行,并经研究动物护理委员会批准。使用了获得一致数据所需的最小动物数目和观察持续时间。

[0097] 实验设计

[0098] 在适应阶段结束时,将动物根据其体重随机分为5个实验组,每组12只动物。使用氢溴酸东莨菪碱(ESC,Sigma Aldrich)诱导认知缺陷,将其溶解在生理盐水中,并在试验前30分钟以1.5mg/kg的剂量腹膜内地(ip)施用(Miranda HF等人.J.Biomed.Sci.,2014 21(1):62-62)。所使用的化合物3的剂量为0.1、1、10和20mg/kg体重。使用羧甲基纤维素(CMC)配制该化合物。施用方案设计如下:

[0099] 具有正常认知功能的组1(阴性对照)。分别用媒介物(5%CMC)通过口服途径和用

盐水溶液通过腹膜内途径施用2次，间隔30分钟。

[0100] 具有认知功能障碍的组2(阳性对照)。第一次用媒介物(5％CMC)，第二次用ESC 1mg/kg，施用2次，间隔30分钟。

[0101] 用化合物3(0.1、1、10和20mg/kg)治疗的组3、4、5和6。第一次以与每组对应的剂量用化合物3，第二次用ESC 1mg/kg，施用2次，间隔30分钟。在第二次施用后30分钟进行行为评价。

[0102] 行为试验

[0103] Y迷宫

[0104] 通过研究新空间偏好来进行短期空间记忆的研究，其中使用Y-迷宫行为范例(40cm长x9cm宽x16cm高)，在迷宫周围有额外的迷宫轨道。该试验由间隔2小时的两次试验组成。在第一次训练试验(学习)中，小鼠被放置在迷宫的中心，并面对其中一只臂的末端，这只臂的选择是随机的。在放置后，允许他们在其中一只臂闭合的情况下(新臂)探究迷宫10分钟。在该试验结束时，将小鼠返回其原始笼子，直到第二次试验(恢复)，在此期间，它们自由探究迷宫的三个臂5分钟。通过视频记录测量和分析在每只臂中的总停留时间(探究)。进入臂被定义为动物的四条腿进入所述臂中。在学习任务的恢复试验期间在每个臂中的停留时间(秒)被用于统计分析。在两次运行之间用70％的乙醇清洁迷宫。在试验前至少1天，将所有小鼠运输至其居住笼中的行为试验室。在上午8:00至下午12:30之间进行实验。

[0105] 莫里斯水迷宫(MWM)。

[0106] 这次体验进行了两天：第一天的训练和第二天的试验。在试验前至少1天将所有小鼠运输至其居住笼中的行为试验室，并在上午8:00至下午12:30之间进行实验。根据第1天(D1)在直径120cm、深度51cm、水温24±2℃的池中进行的一系列可视平台试验的标准，对动物进行训练，其中高对比度视觉信号被放置在每个象限的墙上和室的外部标志上。训练阶段包括四次使用可视平台的试验(V1-V4)，并且最后一次试验被认为是其习惯化后的基本逃避潜伏期。这被指定为D1V4(第1天，试验可视平台4)。动物的训练在时间上错开，因此每只小鼠在两次试验之间具有相同的间隔，即每次试验之间有30±10分钟，并且每次从随机选择的迷宫的不同位置开始。为了使平台可视，用相对于池底的高对比度物体标识它。在1分钟内无法逃逸的动物被手动引导到平台上，并在被移走之前允许它在平台上停留5-10秒。随后，将它们干燥并放置在用白炽灯照明的它们各自的笼子中以避免低体温。在最后一次可视平台试验后24小时(D2)，在使用隐藏平台的一系列三次试验(T1-T3)中评价动物。每30分钟进行一次试验，并且每次试验的持续时间最长为1分钟。对于所有试验，平台都保持在同一位置。

[0107] 统计分析

[0108] 将所有数据表示为平均值±平均值标准误差(SEM)。以两种方式分析莫里斯水迷宫数据。使用双因素方差分析(治疗x试验)分析在可视平台训练阶段中的逃避潜伏期。对于长期记忆的研究，使用了使用可视平台的训练阶段的最后一个逃避潜伏期值(D1V4)和在24小时后使用隐藏平台进行的试验的第一个值(D2T1)。具有完整长期记忆能力的小鼠应该在第一次试验中迅速到达隐藏的平台。用D2T1-D1V4差值和D2T1/D1V4比率生成了评分系统。成功受试者的D2T1-D1V4评分应接近0，并且D2T1/D1V4评分为约1或更低。较高的值指示在24小时后较长的逃避潜伏期，这意味着动物的空间表现的缺乏。使用单向方差分析，随后

Turkey氏事后检验,进行这种对比。也使用上述的相同试验进行Y-迷宫数据的分析。$p<0.05$被认为是统计上显著的差异。使用GraphPadPrism版本5(GraphPad Software,Inc.,San Diego,美国)进行统计分析。

[0109] 实施例3.通过全脑匀浆物中的AChE活性在用东莨菪碱的急性使用诱导的记忆丧失模型中评价化合物(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3)的抗胆碱能调节作用

[0110] 根据适合确定脑匀浆物上清液中的酶活性的Ellman等人的比色测定(Ellman GL,等人.Biochem Pharmacol.,1961;7:88-95),确定小鼠脑中的AChE活性。简单地说,程序如下:在行为实验结束时,将小鼠麻醉并斩首以快速取出脑,将其放在冰冷的平板上。将它们称重并在含有160mmol/L蔗糖的冷的10mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.2)中匀浆化(1/10,w/v)。将匀浆物在4℃在10,000XG离心10分钟,并将所得的澄清上清液用作酶源,将其等分(n=10/组)并在-20℃储存。使用Ellman氏试剂(DTNB 10mmol/L)、50μL匀浆物和10μL乙酰胆碱碘化物(AChI,20mmol/L)(终体积200μL)在96-孔微量滴定板中进行测定。以1分钟的间隔在412nm测量5-硫代-2-硝基苯甲酸二价阴离子的黄色水解产物(摩尔消光系数:13700mol/$L^{-1}cm^{-1}$)的吸光度20分钟。一式三份进行AChE活性,并以水解的AchI的nmol/分钟/mg蛋白表示。通过改进的劳里法(Markwell MAK等人.Anal.Biochem.1978,87(1):206-210)确定蛋白浓度。

[0111] 统计分析

[0112] 将所有数据表示为平均值±平均值标准误差(SEM)。借助于单向方差分析,随后Turkey事后检验,进行胆碱酯酶活性值的对比。使用GraphPadPrism版本5(GraphPad Software,Inc.,San Diego,美国)进行统计分析。

[0113] 实施例4.在用东莨菪碱的长期使用诱导的记忆丧失模型中评价化合物(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3)的抗胆碱能调节作用

[0114] 动物:

[0115] 使用由国家实验动物生产中心(CENPALAB,古巴)提供的雄性C57BL/6小鼠(20-25g)。在实验期间,动物随意接受水和由CENPALAB提供的标准饮食。所有程序根据欧洲委员会实验室动物使用和护理指南进行,并经研究动物护理委员会批准。使用了获得一致数据所需的最小动物数目和观察持续时间。

[0116] 实验设计

[0117] 在适应阶段结束时,将动物根据其体重随机分为5个实验组,每组12只动物。为了诱导认知缺陷,使用ESC(Sigma Aldrich),将其溶解在生理盐水中,并在早上以1.5mg/kg的剂量每天腹膜内(ip)施用2周(Park JH,等人.J Mol Neurosci.2016;59(4):579-589)。将化合物3制备为在0.5%可溶性淀粉(Merck Millipore)中的悬浮液,并通过胃内插管以0.1、1、10mg/kg体重(0.01mL/kg)的每日剂量口服施用。

[0118] 实验组为:

[0119] 具有正常认知功能的组1(阴性对照)。每天施用媒介物:淀粉0.5%(口服)和生理盐水溶液(腹膜内),持续2周。

[0120] 具有认知功能障碍的组2(阳性对照)。每天施用ESC 1.5mg/kg持续2周和媒介物(淀粉0.5%,口服)。

[0121] 组3、4、5:化合物3的施用在开始施用ESC前4天开始。将每组中的动物分别以0.1、1和10mg/kg的剂量用化合物3口服治疗。每天施用ESC(1.5mg/kg),持续2周。在该治疗结束时,开始行为评估。

[0122] 莫里斯水迷宫(MWM):类似于实施例2,使用为期两天的MWM试验来确定长期空间记忆。在这种情况下,由于使用了1.35m直径池,因此在训练期中进行了六次试验(D1V1至D1V6),并在24小时后进行了三次试验(D2T1至D2T3)。以这种方式,通过逃避潜伏期值D2T1/D1V6的商来确定长期空间记忆。

[0123] 统计分析

[0124] 为了分析长期记忆数据,在GraphPadPrism版本5程序(GraphPad Software,Inc.,San Diego,美国)的帮助下,执行了类似于非限制性实施例2的统计程序。

[0125] 实施例5.在细胞系SH-SY5Y中,化合物(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3)对由谷氨酸诱导的兴奋性中毒损伤的神经保护作用

[0126] 将化合物3以100mmol/L的浓度溶解在DMSO中,并随后等分并在-20℃储存。给含有HEPES缓冲液(25mmol/L)和L-谷氨酰胺(2mmol/L)的RPMI 1640(1X)+GlutaMax培养基(Gibco Laboratorios Life Technologies,Inc.;Rockville,MD,美国)补充10%胎牛血清(FBS)、1%丙酮酸钠(100mmol/L)、1%抗生素混合物青霉素(10,000U/mL)-链霉素(10mg/mL)、1%庆大霉素(10mg/mL)、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)和磷酸盐缓冲盐水(1X DPBS)。3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基四唑(MTT)溴化物、二甲基亚砜(DMSO)和谷氨酸来自Sigma ChemicalCo.(St.Louis,MO,美国)。

[0127] 细胞培养:在T-75cm^{2}烧瓶中用补充了10%胎牛血清(FBS)(预先热灭活)、1mmol/L丙酮酸钠、苄基青霉素抗生素混合物(100U/mL)和链霉素(100μg/mL)的含有HEPES缓冲液(25mmol/L)和L-谷氨酰胺(2mmol/L)的RPMI 1640培养基培养SH-SY5Y人神经母细胞瘤细胞(ATCC CRL-2266)。另外,加入庆大霉素(100μg/mL),然后加入完全培养基(CM)。将培养物在5%CO_2、95%空气的控湿气氛和37℃的温度下温育。每两天更换一次培养基,并将细胞每五天通过胰蛋白酶消化以4-5x10^{6}个细胞/75cm^{2}烧瓶的密度进行传代培养,用于实验工作和/或新一代细胞的传代培养以备以后使用。

[0128] (2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3)细胞毒性:将SH-SY5Y人神经母细胞瘤细胞在RPMI 1640(CM)中在37℃温育在CO_2 5%和空气95%的气氛下培养。当它们达到80-90%之间的汇合时,将它们用0.25%胰蛋白酶EDTA混合物(1mL/25cm^2)胰蛋白酶化2-3分钟以脱离细胞。然后将该悬浮液用相同体积的MC中和。随后,将它们以112X G离心8分钟,通过倾析除去上清液,并将沉淀物重新悬浮在1mL完全培养基中用于在血细胞计数器中计数。

[0129] 一旦知道细胞密度,将它们以80x10^{4}个细胞/孔的浓度接种在96-孔培养板(每个孔200μL)中,在温育24小时后,在每个孔中除去100μL上清液,并随后加入100μL在CM中以不同浓度(0.93、1.87、3.75、7.5、15、30、60和100μmol/L)制备的化合物3,并在37℃在5%CO_2、95%空气的条件下再次温育24小时。温育时间结束后,通过MTT测定确定细胞生存力。

[0130] (2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯对谷氨酸诱导的神经元死亡的神经保护:为了评价化合物3的神经保护作用,将细胞系SH-SY5Y培养直到达到80-90%的汇合,将细胞胰蛋白酶消化(tripzinized),并随后在血细胞计数器中

计数。一旦知道细胞密度，就将它们以80x10^{4}个细胞/孔的浓度接种在96-孔培养板中(每个孔200μL)。随后，在含有5％CO_2的控湿环境中在37℃温育24小时后，在每个孔中消除100μL上清液，并添加100μL在完全培养基中制备的不同浓度(0.93;1.87;3.75;7.5;15;30;60μmol/L)的化合物3，并在5％CO_2、95％空气的条件下在37℃再次温育24h。温育时间结束后，在每个孔中消除100μL上清液，并以与前一天相同的浓度加入100μL新鲜制备的化合物3混合物和60mmol/L的在完全培养基中新鲜制备的谷氨酸，并在CO_2 5％、空气95％的条件下在37℃再次温育24小时。温育时间结束后，通过MTT测定确定细胞生存力。

[0131] 细胞生存力.MTT测定：通过仅在活细胞中具有活性的线粒体脱氢酶对MTT(3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基-2H四氮唑溴化物)的酶促转化所得到的甲臜蓝色产物来测量细胞生存力。在96-孔平板中进行测定，以不同时间和浓度将细胞暴露于作为应激源的谷氨酸、化合物3或两者。经过不同的处理以后，加入MTT(在MC中以5mg/mL新鲜制备)，加入50μL/孔，并在5％CO_2、95％空气的气氛中在37℃温育4小时。然后向每个孔中加入100μL异丁醇(SDS 10％、2-丁醇50％、0.25μL HCl 2mmol/L)以溶解甲臜晶体，并在30分钟内在Clariostar分光光度计(BMG Labtech)中在570nm测量每个孔的光密度。在690nm进行OD值的校正。对每个实验进行三次重复。将结果表示为每种实验变体的光密度相对于未用谷氨酸处理的细胞组所获得的光密度的百分比。

[0132] 实施例6.化合物(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3)对通过红藻氨酸的icv施用所诱导的癫痫发作的神经保护作用.

[0133] 实验动物和组

[0134] 使用由国家实验动物生产中心(CENPALAB，古巴)提供的年轻雄性OF-1小鼠(20-25g)。在进行实验之前动物的适应和维持条件类似于在非限制性实施例2中开发的条件。将小鼠分为5个实验组(7只动物/组)，分布于：对照组(PBS 2μL,icv)、癫痫发作对照组(KA 2μL,icv)和通过胃套管插入术用1、5、50mg/kg(0.01mL/kg)剂量的化合物3口服治疗的三个组，和KA(2μL,icv)。将化合物3制备为在5％羧甲基纤维素(CMC)媒介物中的悬浮液。在KA的icv注射前1小时进行对照组中化合物3和媒介物的施用。给所有动物施用在PBS中制备的浓度为0.5mg/mL的KA(Sigma Aldrich)。

[0135] KA icv施用

[0136] 对于KA的icv施用，将小鼠用685.71mg/kg水合氯醛腹膜内麻醉，并置于双操纵器上。将立体定位架和头盖骨暴露出来。将侧脑室的立体定位坐标精确测量为：相对于前囟点和腹侧硬脑膜，前后侧-0.8mmol/L，侧面±1.0mmol/L和背腹侧-3.0mmol/L，齿棒为0mmol/L。通过连接至立体定位设备的臂的自动微穿孔仪在头盖骨上形成一个钻孔。通过该孔，放置一个10μL 28-号**Hamilton®**注射器，其连接至立体定位设备的另一个臂，并手动将注射器的活塞降低到右侧脑室，排空其内容物3分钟。

[0137] 行为观察

[0138] 使用下述测量标准根据Racine量表(R.J.Racine,Clin.Neurophysiol.1972,32 281-294)进行癫痫发作评分：(1)不动，口腔和面部运动；(2)前肢伸展和/或尾部伸展，僵硬的姿势；(3)重复运动，摇头；(4)直立和落下(steepness and fall)；(5)连续的直立和落下；(6)严重强直阵挛发作；(7)死亡。每只动物由两名独立的观察者进行观察，并对其行为量化2小时。将在此时间区间内每只动物的累积评分之和用于统计分析。

[0139] 统计分析

[0140] 将所有数据表示为平均值±平均值标准误差(SEM),并使用单向方差分析和之后的Turkey氏事后检验进行分析。为了在组之间进行对比,在进行KA的icv施用后2小时使用每个实验组的累积评分的平均值。$p<0.05$被认为是统计上显著的差异。使用GraphPadPrism版本5(GraphPad Software,Inc.,San Diego,美国)进行统计分析。

[0141] 实施例7.用羟丙基甲基纤维素(HPMC)制备活性成分N-[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]-β-丙氨酸(1)和(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3)的片剂的制剂1.

[0142] 根据制剂中要求的量称量所有组分。将活性成分和聚合物基质通过40号筛网过筛,并随后以30rpm混合5分钟。然后,每15分钟,以50rpm的速度加入其余组分,直到获得均匀的混合物。然后将混合物使用平坦的、有斜面的且无槽的模具在高速旋转机器上压片。

[0143] 所获得的片剂是光滑的且均匀的,重量变化小于1%,具有足够的硬度(4.51±0.37kgf),具有良好的耐磨损性,足够的崩解时间,并且活性成分的含量是在90%至110%之间。

[0144] 使用Origin 5.0软件以95%的置信水平对所研究的亲水性基质中活性成分的释放曲线进行统计处理。

[0145] 每片的制备制剂1:

[0146]

组分	重量(mg)	%
活性成分	10	10
HPMC	25	25
乳糖一水合物	9	9
淀粉	21	21
微晶纤维素	32	32
二氧化硅	1.5	1.5

[0147]

硬脂酸镁	1.5	1.5
片剂重量(mg)	100	100

[0148] 实施例8.用羟丙基纤维素(HPC)制备活性成分N-[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]-β-丙氨酸(1)和(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3)的片剂的制剂2

[0149] 根据制剂中要求的量称量所有组分。将活性成分和聚合物基质通过40号筛网过筛,并随后以30rpm混合5分钟。然后,每15分钟,以50rpm的速度加入其余组分,直到获得均匀的混合物。然后将混合物使用平坦的、有斜面的且无槽的模具在高速旋转机器上压片。

[0150] 所获得的片剂是光滑的且均匀的,重量变化小于1%,具有足够的硬度(4.51±0.37kgf),具有良好的耐磨损性,足够的崩解时间,并且活性成分的含量是在90%至110%

之间。

[0151] 使用Origin 5.0软件以95％的置信水平对所研究的亲水性基质中活性成分的释放曲线进行统计处理。

[0152] 每片的制备制剂2:

[0153]

组分	重量(mg)	％
活性成分	10	10
羟丙基纤维素(HPC)	30	30
乳糖一水合物	8	8
淀粉	20	20
微晶纤维素	30	30
二氧化硅	1	1
硬脂酸镁	1	1
片剂重量(mg)	100	100

[0154] 实施例9:用丙烯酸树脂和乳糖制备活性成分(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3)的片剂的制剂3

[0155] 根据制剂中要求的量称量所有组分。将活性成分和聚合物基质通过20号筛网过筛,并随后以30rpm混合5分钟。然后,每15分钟,以50rpm的速度加入其余组分,直到获得均匀的混合物。然后将混合物使用平坦的、有斜面的且无槽的模具在高速旋转机器上压片。

[0156] 所获得的片剂是光滑的且均匀的,重量变化小于1％,具有足够的硬度(5.01±0.68kgf),具有良好的耐磨损性,足够的崩解时间,并且活性成分的含量是在90％至110％之间。

[0157] 使用Origin 5.0软件以95％的置信水平对所研究的亲水性基质中活性成分的释放曲线进行统计处理。

[0158] 每片的制备制剂3:

[0159]

组分	重量(mg)	％
活性成分	10	10
丙烯酸树脂RS PO	39	39
乳糖一水合物	40	40
微晶纤维素	9	9
二氧化硅	1	1
硬脂酸镁	1	1
片剂重量(mg)	100	

[0160] 实施例10:(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3)的鼻制剂

[0161] 溶液A:将化合物3溶解在PEG 400、生育酚和甘油中。

[0162] 溶液B:将HPMC重新悬浮在40％的水中,直到它在搅拌和加热(80℃)下完全溶解。

[0163] 溶液C:在60％的水中,溶解苯扎氯铵、NaH_2PO_4、Na_2HPO_4、NaCl、EDTA和吐温80。验证pH维持在6.3。

[0164] 然后将溶液B和C混合并搅拌,直到获得均匀的溶液。然后,将溶液A缓慢地加入该

溶液中，搅拌，并最后通过0.2μmol/L膜过滤。

[0165]

组分	浓度(mg/mL)
活性成分 3	6

[0166]

PEG 400	3
HPMC	5
苯扎氯铵	0.2
NaH_2PO_4	2
Na_2HPO_4	0.7
NaCl	7.4
吐温 80	0.25
EDTA	0.15
甘油	5
水	补充至 1 mL 的终体积

[0167] 实施例11:1(N-[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]-β-丙氨酸(1)的鼻制剂

[0168] 溶液A:将化合物3溶解在PEG 400、生育酚和甘油中。

[0169] 溶液B:将HPMC重新悬浮在40％的水中，直到它在搅拌和加热(80℃)下完全溶解。

[0170] 溶液C:在60％的水中，溶解苯扎氯铵、NaH_2PO_4、Na_2HPO_4、NaCl、EDTA和吐温80。验证pH维持在6.3。

[0171] 然后将溶液B和C混合并搅拌，直到获得均匀的溶液。然后，将溶液A缓慢地加入该溶液中，搅拌，并最后通过0.2μmol/L膜过滤。

[0172]

组分	浓度(mg/mL)
活性成分 1	6
PEG 400	3
CMC	5
苯扎氯铵	0.2
NaH_2PO_4	2
Na_2HPO_4	0.7
NaCl	7.4

[0173]

生育酚	0.1
吐温 80	0.2
EDTA	0.1
甘油	5
水	补充至 1 mL 的终体积

[0174] 实施例12.制剂1、2和3的溶出度性质研究

[0175] 溶出度研究考虑了古巴标准(CECMED:分析方法验证,第41号法规.Havana:CECMED;2007)和在美国药典中呈现的那些(USP 36,Rockville:Mack Printing,New York 2013,第3220-3221页)。

[0176] 验证了每批制剂(实施例7、8和9)的20片的重量。它们都在允许的片剂的重量值范围内,在没有与初始制剂相关的误差的情况下确定了所选基质的药物释放曲线。

[0177] 释放曲线的确定方法:

[0178] 介质1.-不含酶的模拟胃液pH1.2±0.05

[0179] 将2g的NaCl(分析纯)称量出并在1000mL烧瓶中溶解在7mL的HCl中。将烧瓶用蒸馏水补至刻度线。溶液的pH为1.2。

[0180] 介质2.-不含酶的模拟肠液pH7.5±0.1

[0181] 称取6.8g磷酸二氢钾并转移至1000mL容量瓶。随后,加入250mL水,溶解固体,并加入190mL的0.2N NaOH溶液和400mL双蒸馏水。最后,用双蒸馏水将其补充至1000mL。用0.2N NaOH将溶液的pH调节至7.5±0.1的pH。

[0182] 程序:

[0183] 将每个片剂与在37±0.5℃的600mL溶出介质-1一起放入溶出设备(Distek,Evolution 6100型)中,在30rpm搅拌60分钟。在试验的5、15、30和60分钟时,立即通过0.45μmol/L过滤器过滤试验介质的一部分。

[0184] 随后,将溶出介质-1从溶解设备中排出,并用在37±0.5℃温度的600mL溶出介质-2替换,在30rpm搅拌另外8小时。

[0185] 对样品进行5至1080分钟,在指定的时间立即通过0.45μmol/L过滤器过滤样品。

[0186] 在确定的最大吸光度长度,获得样品溶液在每种溶出介质中的吸光度值。为了定量配制的化合物,在0.025至0.150mg/mL的浓度范围内进行紫外-可见光分光光度测量校正曲线(λmax),并使用调节空白(溶出介质)。

[0187] 根据所得数据的分析,所使用的方法符合分析方法所需的线性(R>0.999)、精确度(再现性和可重复性)和准确度的参数,从而能够在本研究中使用的浓度范围内和实验条件下获得精确且准确的结果。

[0188] 实施例13.在由东莨菪碱的长期使用诱导的记忆丧失模型中评价经鼻施用的化合物(2-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯(3)(根据实施例10的制剂)的抗胆碱能调节作用

[0189] 动物

[0190] 使用由国家实验动物生产中心(CENPALAB,古巴)提供的雄性C57BL/6小鼠(20-25g)。在进行实验之前动物的适应和维持条件类似于在非限制性实施例4中开发的条件。

[0191] 实验设计

[0192] 在适应阶段结束时,将动物根据其体重随机分为四个实验组,每组10只动物:两个健康对照组,一个通过鼻途径施用媒介物(G1),并且另一个通过腹膜内途径施用盐水溶液(G2);给患病对照组施用鼻盐水,并然后施用溶解在盐水溶液中的ESC(1.5mg/kg,腹膜内)(G3);和给治疗组施用根据非限制性实施例10的制剂制备的化合物3,并在15分钟以后施用ESC(1.5mg/kg,腹膜内)(G4)。在所描述的相同条件下分两个实验系列进行本实验,以研究化合物3的鼻制剂在两种行为模型中的影响:在隐藏臂模式和物体辨别模型下的Y-迷宫。以这种方式,总共使用了60只动物。

[0193] 对于鼻内施用,遵循先前描述的方法(Hanson,L.R.,等人.inJ.Vis.Exp.2013(74),e4440,doi:10.3791/4440)。简单地说:将小鼠头部保持在仰卧位,使颈部伸展,然后用惯用手在自动移液器中加入6μL药物或媒介物。将移液器尖端放置在左鼻孔附近,并排出移液器的大约3μL内容物。2-3秒后,在同一鼻孔中重复相同的操作。在该操作结束时,将动物保持在仰卧位,并在该情况下对右鼻孔重复相同的程序。结束后,将小鼠置于其笼中,并在两分钟后,在两个鼻孔中再次施用。使用该系统,将动物固定三次,并施加30μL的总体积,相当于7.2mg/kg重量的化合物3的剂量。在最后一次施用结束后15分钟,给每只动物腹膜内施用1.5mg/kg的ESC或它的媒介物(盐水溶液),并在30分钟后进行行为实验。

[0194] 行为试验

[0195] Y迷宫

[0196] 通过研究新的空间偏好来进行短期空间记忆的研究,其中使用Y-迷宫行为范例(40cm长x9cm宽x16cm高),在迷宫周围有额外的迷宫轨道,以评估依赖于海马的空间记忆的识别。按照在非限制性实施例2中描述的相同方案进行试验。在上午8点到12点30分之间进行实验。

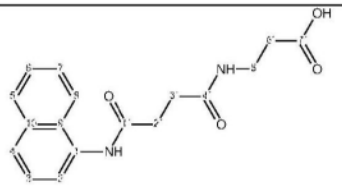
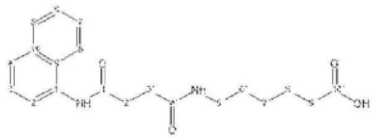
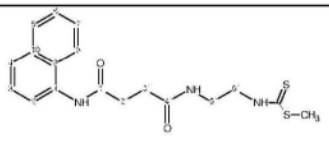
[0197] 物体辨别

[0198] 物体辨别试验(ORT)是一种常用的行为试验,用于在中枢神经系统障碍的啮齿动物模型中研究学习和记忆的各个方面,特别是识别记忆。所使用的方案由三个阶段组成:第一个习惯化阶段(第1天)、第二个熟悉阶段(第2天)和最后的试验阶段(第3天)。所有阶段持续五分钟,并在连续三天进行。在第一阶段,将动物放在一个有机玻璃盒子(25cm x25cm x25cm)内。使用摄像机记录动物的行为。该第一天,在实验前30分钟将动物带到试验室以熟悉环境。然后允许小鼠在没有物体的情况下自由探究盒子五分钟。在第二天,每只小鼠接受训练试验,其中将两个相同的物体同时放置在盒子内两个相反的位置,距离最近的角落相同的距离。在这一阶段,允许小鼠探究相同的物体五分钟,并然后返回至其居住笼。在试验阶段(第3天),将动物放回同一个盒子中,在此阶段之前将两个熟悉的物体中的一个换成新的。在本研究中使用的所有物体具有不同的形状和颜色,但尺寸相同。它们被固定在盒子的地板上以防止移动。为了避免嗅觉信号的存在,在每次试验后总是用70%的酒精清洁整个盒子和物体。通过探究物体所需的时间,观察辨别新物体和相对物体的能力。物体探究时间被定义为动物将其鼻子靠近距离物体2cm的距离或闻或踢物体的时间阶段。坐在或站在物体上不被视为探究。使用智能视频软件手动分析扫描时间。如下计算辨别指数(ID)。

[0199] ID＝新物体探究时间/(新物体探究时间+熟悉物体探究时间)。

[0200] 统计分析

[0201] 将所有数据表示为平均值±平均值标准误差(SEM),并使用单向方差分析和然后的Turkey氏事后检验进行分析。$p<0.05$被认为是统计上显著的差异。使用GraphPadPrism版本5(GraphPad Software,Inc.,San Diego,美国)进行统计分析。

化合物	结构	物理化学性质
N-[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]-β-丙氨酸 (1)		分子质量: 314.3 g/mol。白色，结晶性粉末。质量规范. HR-TOF/MS (m/z): $C_{17}H_{18}N_2O_4$ 的计算值: 314.33; 实测值 315.13 $(M+H)^+$. T.f: 172.5-174.8°C. Rf: 0.1 (乙酸乙酯)。HPLC. Phenomenex C18 色谱柱(150 x 4.6/mmol/L, 4/ µmol/L, 80Å)。流动相: H_2O/TFA (0.1%) ACN/TFA (0.05%)。保留时间: 25.051 分钟，纯度: 99.76%.
酸 6-{[4-(1-萘基氨基)-4-氧代丁酰基]氨基}己酸 (2):		分子质量: 356.3 g/mol。白色，结晶性粉末。质量规范. HR-TOF/MS (m/z): $C_{20}H_{24}N_2O_4$ 的计算值: 357.42 $(M+H)^+$; 实测值 357.18. T.f: 129.9-133°C. Rf: 0.6 ($CHCl_3$: CH_3OH, 10: 3)。HPLC. Phenomenex C18 色谱柱(150 x 4.6/mmol/L, 4/ µmol/L, 80Å)。流动相: H_2O/TFA (0.1%) ACN/TFA (0.05%)。保留时间: 27.935 分钟，纯度: 99.19%.
(2-{[4-(1-萘基氨基) -4-氧代丁酰基]氨基}乙基)二硫代氨基甲酸甲酯 (3):		分子质量: 375.5 g/mol。浅黄色，结晶性粉末。质量规范. HR-TOF/MS (m/z): $C_{18}H_{21}N_3O_2S_2$ 的计算值:

		375.511; 实测值 377.121 $(M+D)^+$. T.f: 140-141°C. Rf: 0.3 (乙酸乙酯)。 HPLC. Phenomenex C18 色谱柱(150 x 4.6/mmol/L, 4/ μmol/L, 80Å)。流动相: H_2O/TFA (0.1%) ACN/TFA (0.05%)。保留时间: 31.428 分钟, 纯度: 96.59%.

图1

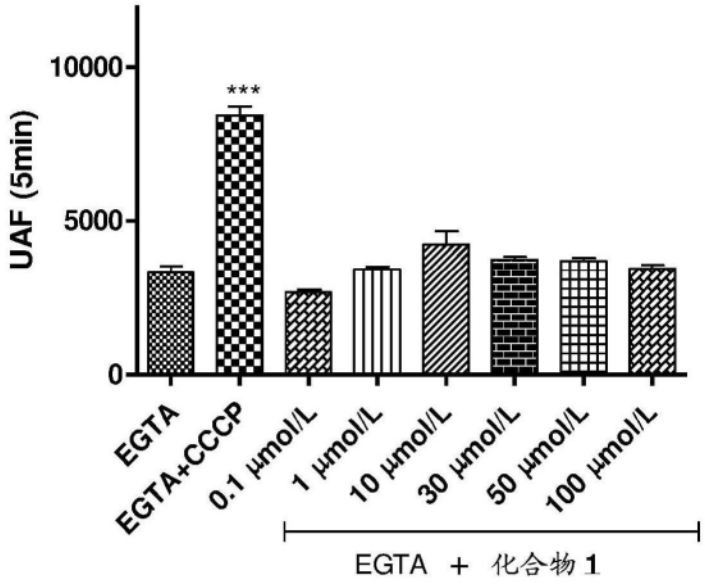


图2

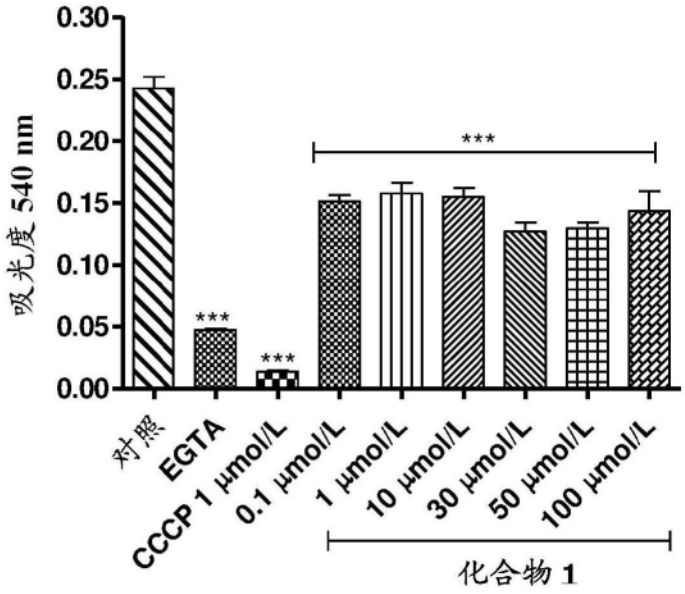

0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
吸光度 540 nm
***
***
***
对照
EGTA
CCCP 1 μmol/L
0.1 μmol/L
1 μmol/L
10 μmol/L
30 μmol/L
50 μmol/L
100 μmol/L
化合物 1

图3

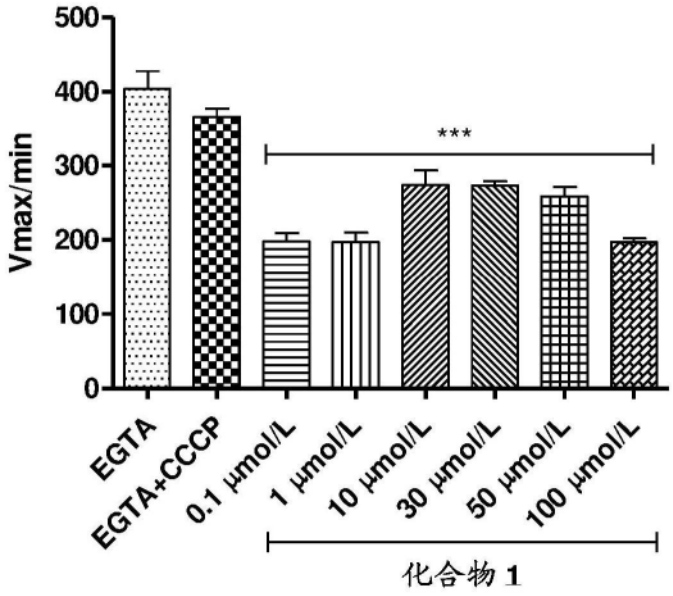

500
400
300
200
100
0
Vmax/min
***
EGTA
EGTA+CCCP
0.1 μmol/L
1 μmol/L
10 μmol/L
30 μmol/L
50 μmol/L
100 μmol/L
化合物 1

图4

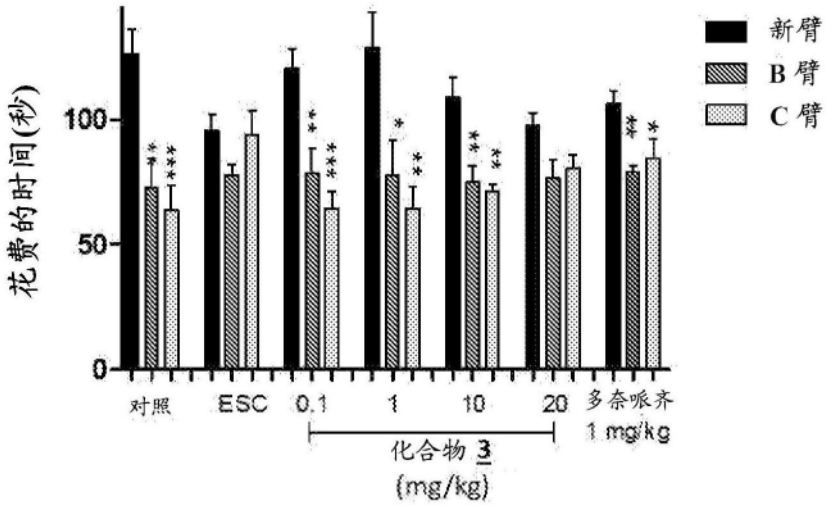

新臂
B 臂
C 臂
花费的时间(秒)
100
50
0
对照
ESC
0.1
1
10
20
多奈哌齐
1 mg/kg
化合物 3
(mg/kg)

图5

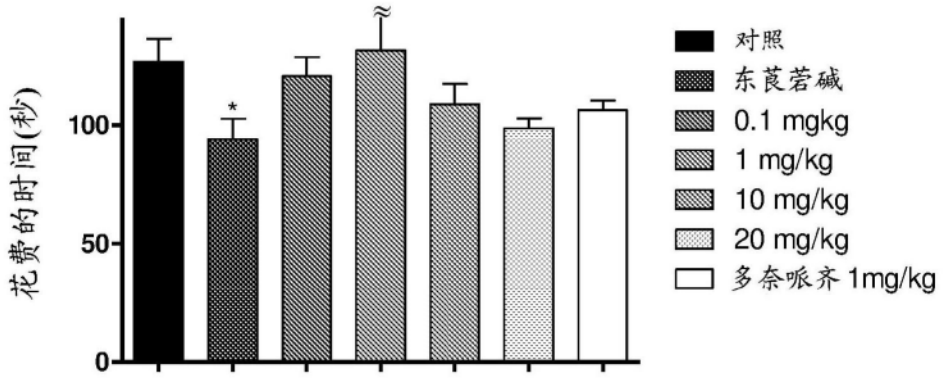

对照
东莨菪碱
0.1 mgkg
1 mg/kg
10 mg/kg
20 mg/kg
多奈哌齐 1mg/kg
花费的时间(秒)
100
50
0

图6

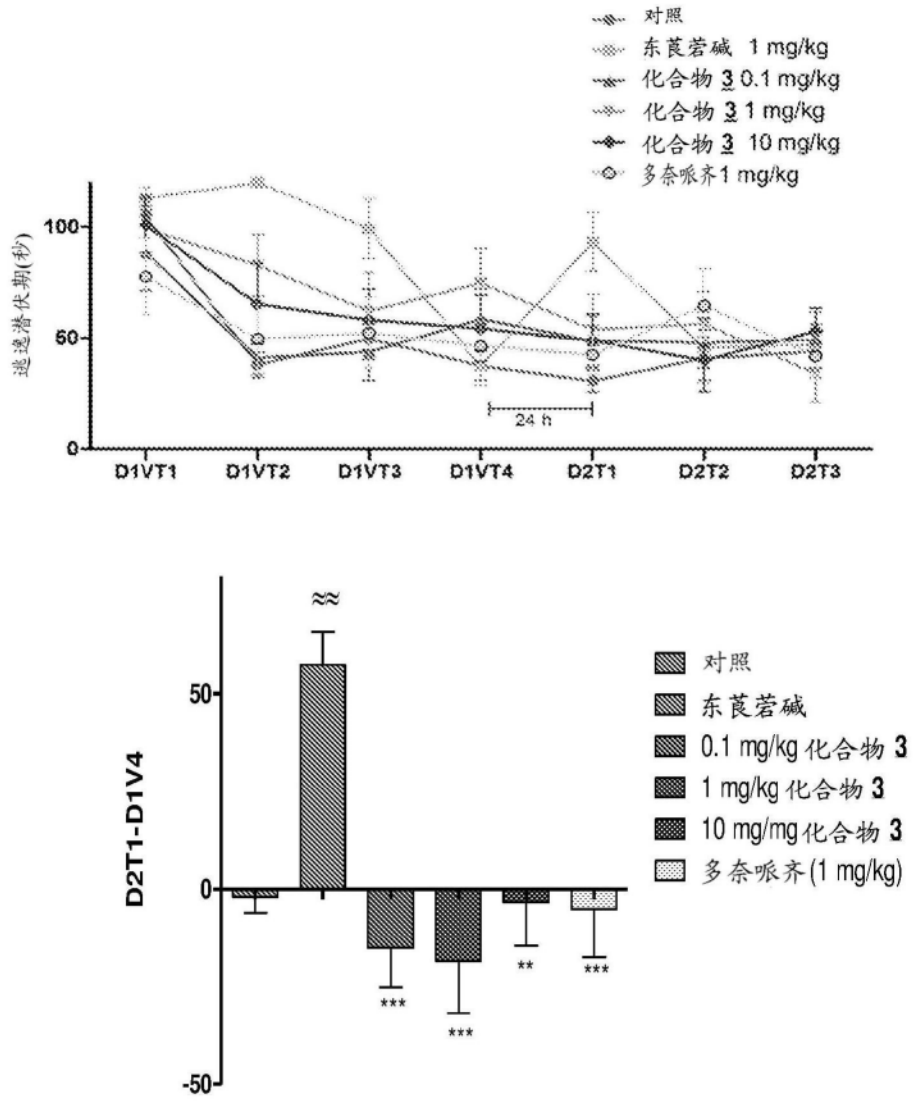

对照
东莨菪碱 1 mg/kg
化合物 3 0.1 mg/kg
化合物 3 1 mg/kg
化合物 3 10 mg/kg
多奈哌齐1 mg/kg
逃逸潜伏期(秒)
100
50
0
24 h
D1VT1
D1VT2
D1VT3
D1VT4
D2T1
D2T2
D2T3
D2T1-D1V4
50
0
-50
≈≈
***
***
**
***
对照
东莨菪碱
0.1 mg/kg 化合物 3
1 mg/kg 化合物 3
10 mg/mg 化合物 3
多奈哌齐(1 mg/kg)

图7

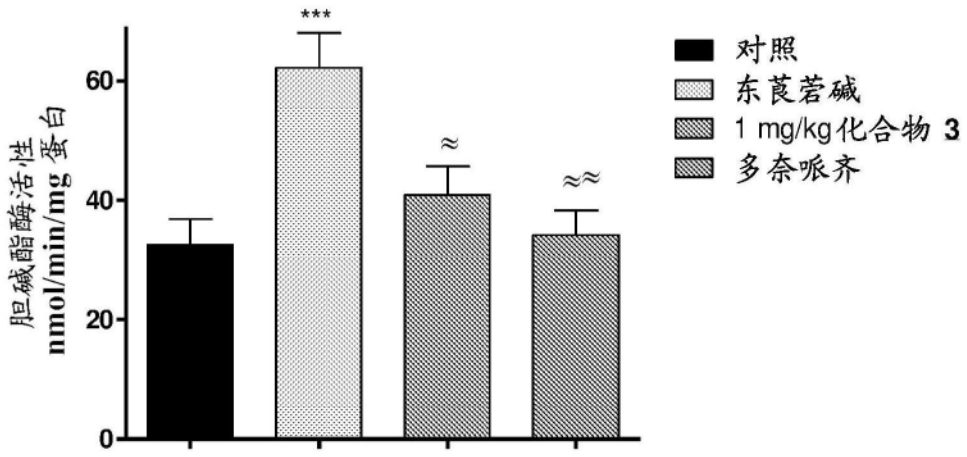

胆碱酯酶活性
nmol/min/mg 蛋白
60
40
20
0
***
≈
≈≈
对照
东莨菪碱
1 mg/kg 化合物 3
多奈哌齐

图8

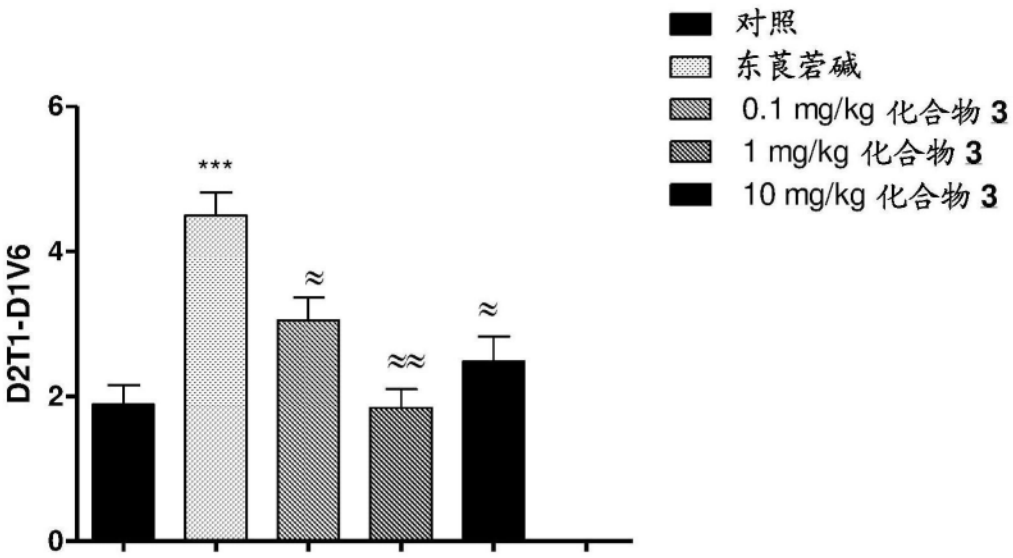

对照
东莨菪碱
0.1 mg/kg 化合物 3
1 mg/kg 化合物 3
10 mg/kg 化合物 3
D2T1-D1V6
6
4
2
0
***
≈
≈≈
≈

图9

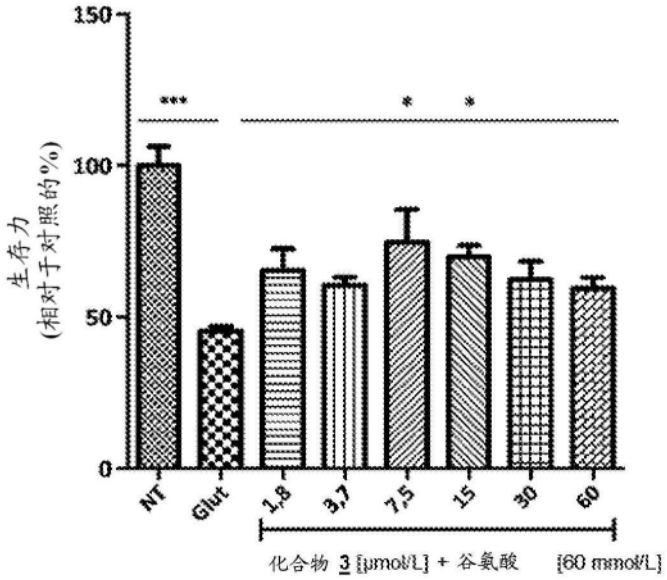

生存力
(相对于对照的%)
150
100
50
0
***
*
*
NT
Glut
1,8
3,7
7,5
15
30
60
化合物 3 [µmol/L] + 谷氨酸 [60 mmol/L]

图10

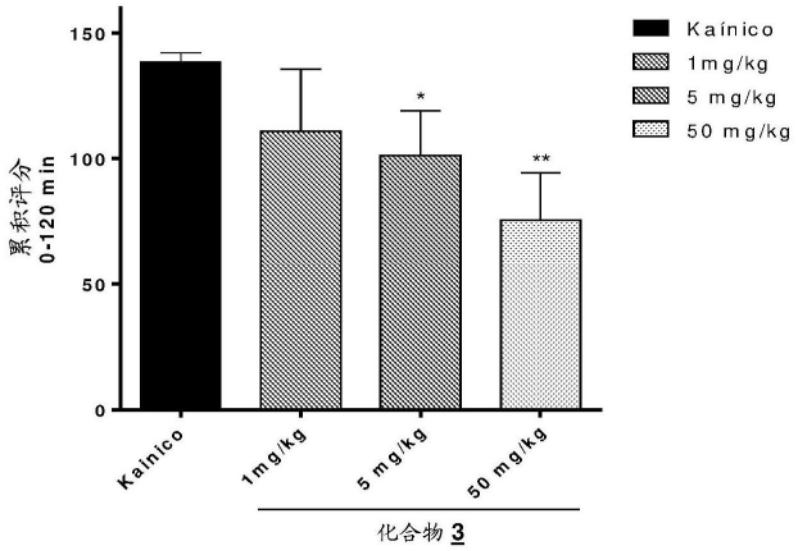

Kainico
1mg/kg
5 mg/kg
50 mg/kg
累积评分
0-120 min
150
100
50
0
*
**
Kainico
1mg/kg
5 mg/kg
50 mg/kg
化合物 3

图11

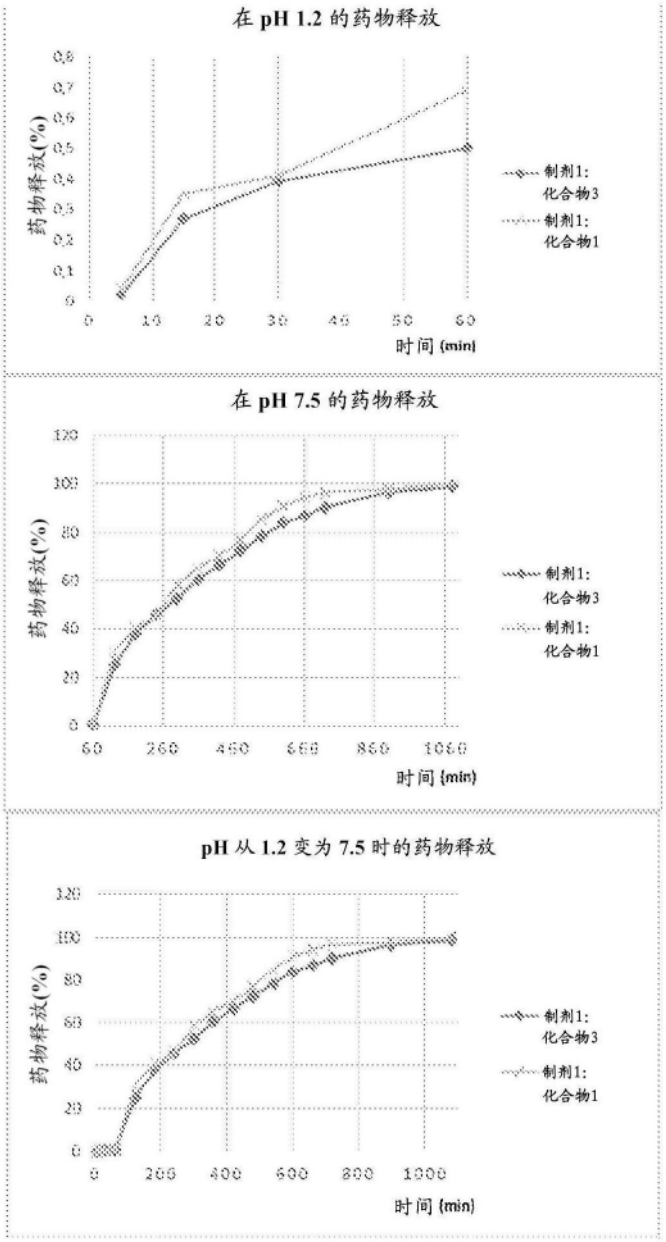

在 pH 1.2 的药物释放
药物释放(%)
时间 (min)
制剂1:
化合物3
制剂1:
化合物1
在 pH 7.5 的药物释放
药物释放(%)
时间 (min)
制剂1:
化合物3
制剂1:
化合物1
pH 从 1.2 变为 7.5 时的药物释放
药物释放(%)
时间 (min)
制剂1:
化合物3
制剂1:
化合物1

图12

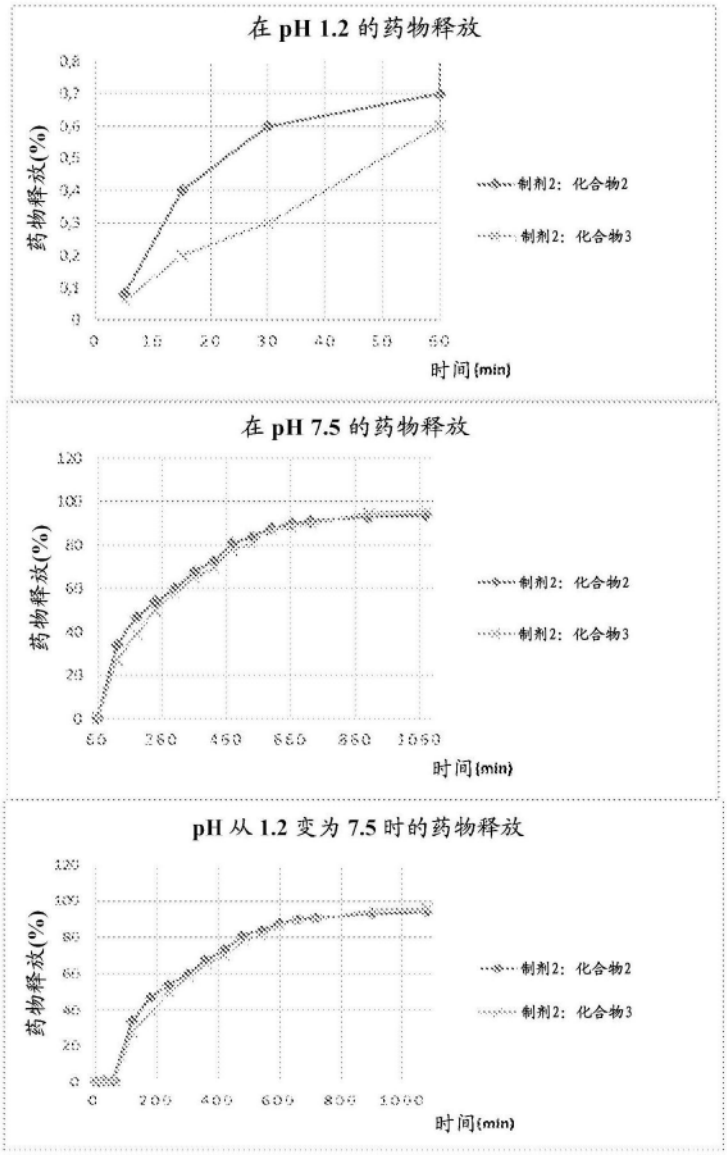

在 pH 1.2 的药物释放
药物释放(%)
时间(min)
制剂2：化合物2
制剂2：化合物3
在 pH 7.5 的药物释放
药物释放(%)
时间(min)
制剂2：化合物2
制剂2：化合物3
pH 从 1.2 变为 7.5 时的药物释放
药物释放(%)
时间(min)
制剂2：化合物2
制剂2：化合物3

图13

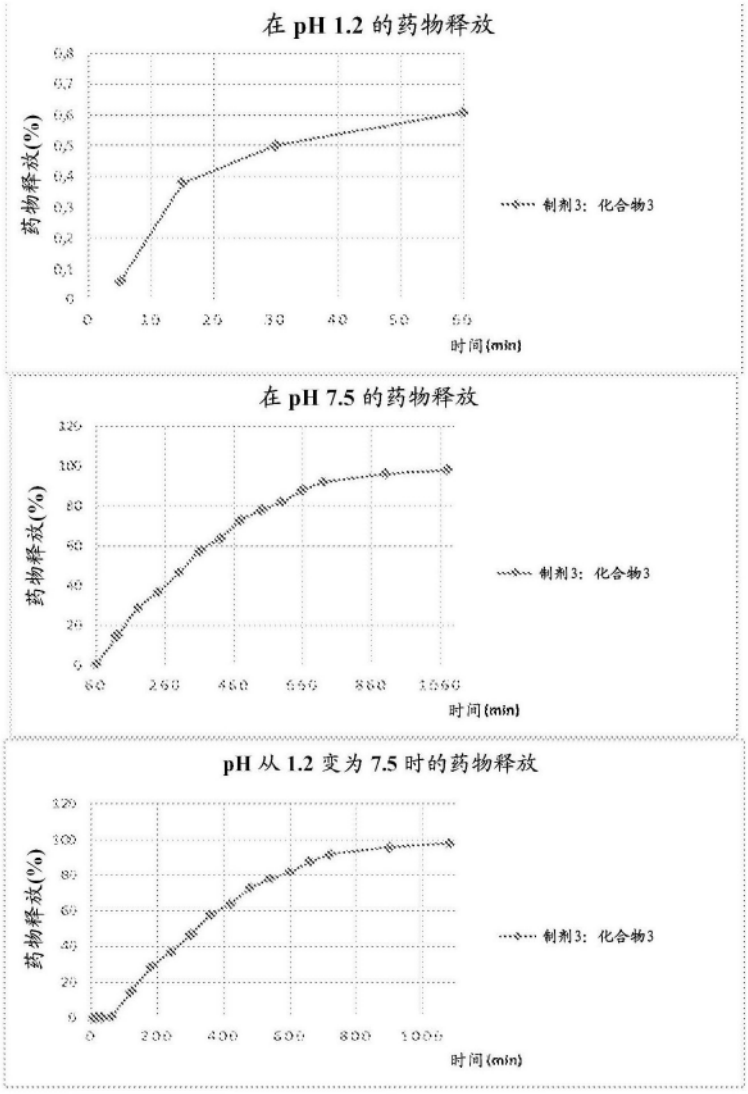

在 pH 1.2 的药物释放
药物释放(%)
时间(min)
制剂3：化合物3
在 pH 7.5 的药物释放
药物释放(%)
时间(min)
制剂3：化合物3
pH 从 1.2 变为 7.5 时的药物释放
药物释放(%)
时间(min)
制剂3：化合物3

图14

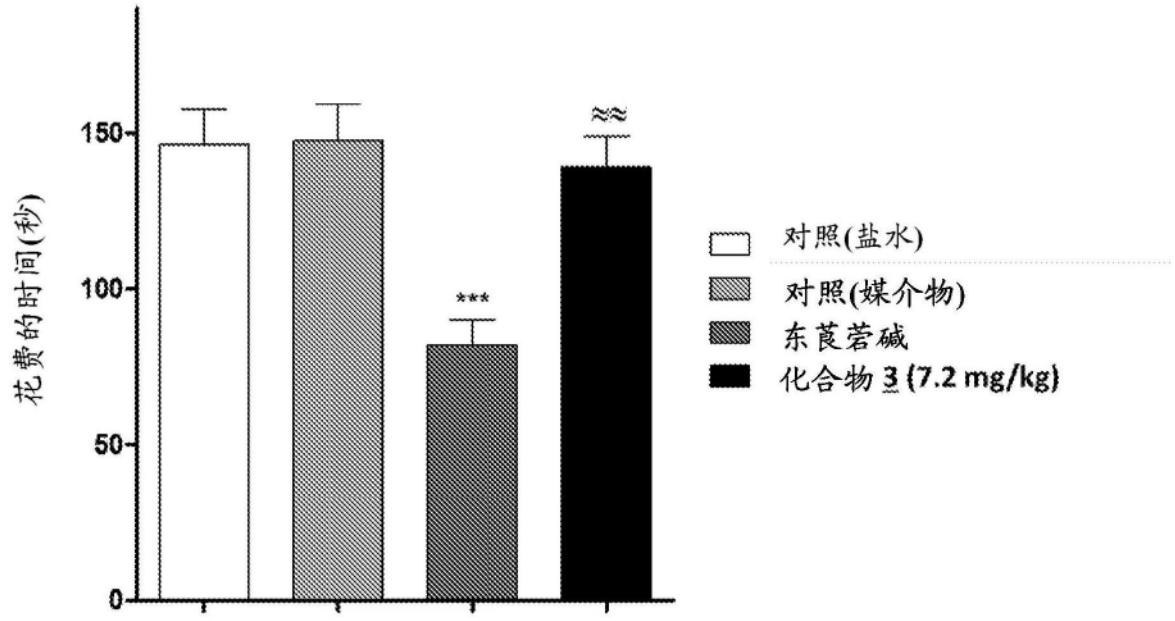

花费的时间(秒)
150
100
50
0
***
≈≈
对照(盐水)
对照(媒介物)
东莨菪碱
化合物 3 (7.2 mg/kg)

图15

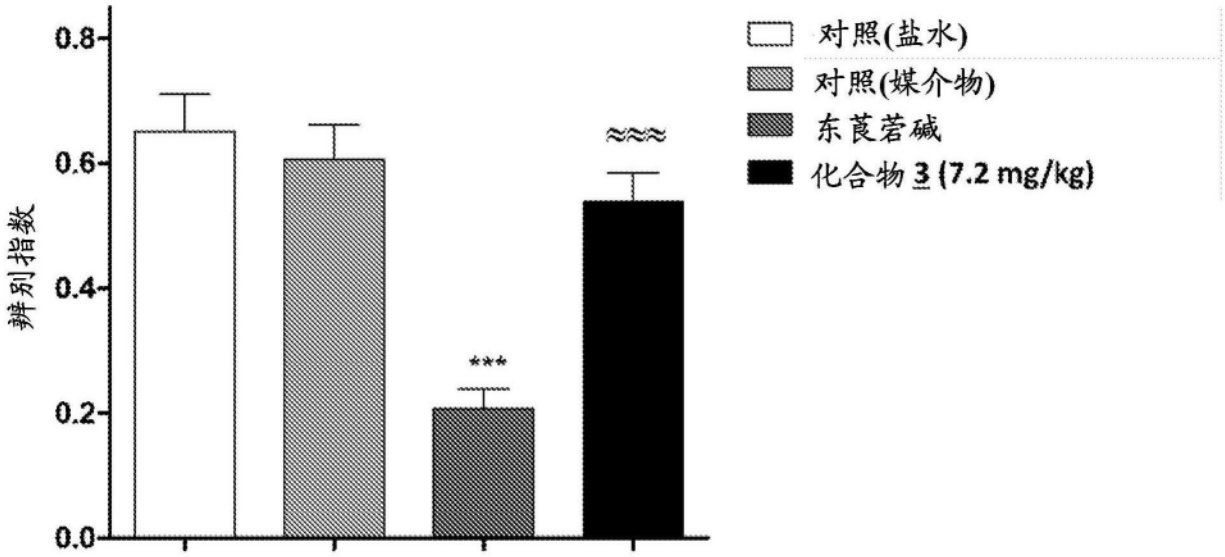
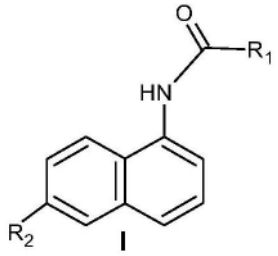

辨别指数
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
***
≈≈≈
对照(盐水)
对照(媒介物)
东莨菪碱
化合物 3 (7.2 mg/kg)

图16

1.-控释口服药物组合物,其包含:

a.-式I的多靶标化合物



其中:

R_1:-亚烷基-C(O)NH-亚烷基-R_3、-亚烷基-C(O)O-R_4;

R_3:-COOH、-OH、-SH、-NH_2、-NH-烷基-、-NH-亚烷基-NH_2、-NH-亚烷基-NH-C(O)-亚烷基-S-R_5、-NH-二硫代氨基甲酸酯-烷基、-N-烷基-二硫代氨基甲酸酯碱土金属盐;或上述基团的药学上可接受的盐;

R_4:琥珀酰亚胺基基团;

R_5:-H、-C(O)-烷基、-C(O)-C_6H_5;且

R_2:-H、-烷基;

术语"烷基"的特征在于为饱和碳原子和氢原子的直链或支链脂族链,优选甲基或乙基;术语"亚烷基"表示直链或支链烷基基团的二价类似物,优选亚甲基(-CH_2-)、亚乙基(-CH_2CH_2-)或亚丙基(-$CH_2CH_2CH_2$-);

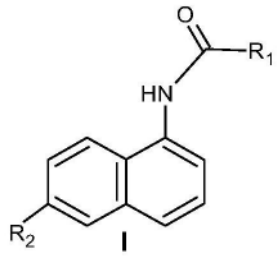
b.-实质上有助于式I的活性成分的控释的聚合物基质,

所述组合物在其使用环境中维持活性成分释放2小时至24小时;其中6-18小时溶出率达80%,24小时溶出率超过90%。

2.-权利要求1所述的控释口服药物组合物,其特征在于片剂含有在聚合物基质中的1mg至100mg活性成分,所述聚合物基质占5%w/w至80%w/w、优选10%w/w至70%w/w的比例,其选自:聚氧化乙烯、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟丙基纤维素(HPC)、羧甲基纤维素钠(CCNa)、纤维素衍生物、丙烯酸树脂RS PO和聚乙烯吡咯烷酮或其组合。

3.-鼻药物组合物,其包含:

a.-式I的多靶标化合物



其中:

R_1:-亚烷基-C(O)NH-亚烷基-R_3、-亚烷基-C(O)O-R_4;

R_3:-COOH、-OH、-SH、-NH_2、-NH-烷基-、-NH-亚烷基-NH_2、-NH-亚烷基-NH-C(O)-亚烷基-S-R_5、-NH-二硫代氨基甲酸酯-烷基、-N-烷基-二硫代氨基甲酸酯碱土金属盐;或上述基团的药学上可接受的盐;

R_4:琥珀酰亚胺基基团;

R_5:-H、-C(O)-烷基、-C(O)-C_6H_5;且

R_2:-H、-烷基;

术语“烷基”的特征在于为饱和碳原子和氢原子的直链或支链脂族链,优选甲基或乙基;术语“亚烷基”表示直链或支链烷基基团的二价类似物,优选亚甲基(-CH_2-)、亚乙基(-CH_2CH_2-)或亚丙基(-$CH_2CH_2CH_2$-);

b.-实质上有助于增加式I的活性成分在鼻腔中的停留时间的生物粘附聚合物,

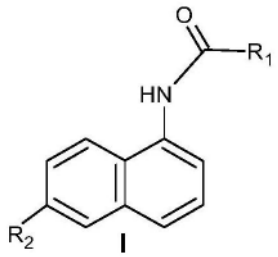
所述药物剂型保证药物有效进入到神经通路。

4.-权利要求3所述的鼻药物组合物,其特征在于其每剂含有在0.05至6%比例的赋形剂中配制的0.1mg至25mg活性成分,所述赋形剂选自羟丙基甲基纤维素(HMPC)、羟丙基纤维素(HPC)、甲基纤维素(MC)、羧甲基纤维素(CMC)和聚丙烯酸(carbol)衍生物或其组合,并且具有10至60mPas的粘度。

5.-权利要求4所述的鼻药物组合物,其特征在于其含有0.09至1.8%的浓度的PEG;0.05至0.7%浓度的CMC,0.08至1%的浓度的生育酚;抗微生物防腐剂,其选自:0.007至0.47%的浓度的苯扎氯铵、0.003至0.19%的浓度的EDTA二钠和0.005至0.04%的浓度的对羟基苯甲酸丙酯或其组合;和保湿剂,其选自:3.5至5.5%的浓度的甘油和0.17至0.38%的浓度的吐温80;或其组合,用磷酸盐缓冲剂调节的pH在5.5至6.5之间、优选6.3。

6.-权利要求4所述的鼻药物组合物,其特征在于其含有0.09至1.8%的浓度的PEG;0.05至0.7%浓度的CMC,0.08至1%的浓度的生育酚;抗微生物防腐剂,其选自:0.007至0.47%的浓度的苯扎氯铵、0.003至0.19%的浓度的EDTA二钠和0.005至0.04%的浓度的对羟基苯甲酸丙酯或其组合;和保湿剂,其选自:3.5至5.5%的浓度的甘油和0.17至0.38%的浓度的吐温80;或其组合,用磷酸盐缓冲剂调节的pH在5.5至6.5之间、优选6.3。

7.-用于在存在于AD中的胆碱能、谷氨酸能系统的障碍、线粒体和炎症性氧化还原系统的失衡中使用的多靶标化合物的药物组合物,其特征在于所述化合物选自具有式I的化合物



I

其中:

R_1:-亚烷基-C(O)NH-亚烷基-R_3、-亚烷基-C(O)O-R_4;

R_3:-COOH、-OH、-SH、-NH_2、-NH-烷基-、-NH-亚烷基-NH_2、-NH-亚烷基-NH-C(O)-亚烷基-S-R_5、-NH-二硫代氨基甲酸酯-烷基、-N-烷基-二硫代氨基甲酸酯碱土金属盐;或上述基团的药学上可接受的盐;

R_4:琥珀酰亚胺基基团;

R_5:-H、-C(O)-烷基、-C(O)-C_6H_5;且

R_2:-H、-烷基;

术语“烷基”的特征在于为饱和碳原子和氢原子的直链或支链脂族链，优选甲基或乙基；术语“亚烷基”表示直链或支链烷基基团的二价类似物，优选亚甲基(-CH_2-)、亚乙基(-CH_2CH_2-)或亚丙基(-$CH_2CH_2CH_2$-)；

其中所述药物组合物含有药学上可接受的赋形剂。

8.-权利要求7所述的用于在存在于AD中的胆碱能、谷氨酸能系统的障碍、线粒体和炎症性氧化还原系统的失衡中使用的多靶标化合物的药物组合物，其特征在于片剂含有在聚合物基质中的1mg至100mg活性成分，所述聚合物基质占5％w/w至80％w/w、优选10％w/w至70％w/w的比例，其选自：聚氧化乙烯、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟丙基纤维素(HPC)、羧甲基纤维素钠(CCNa)、纤维素衍生物、丙烯酸树脂RS PO和聚乙烯吡咯烷酮或其组合。

9.-权利要求7所述的用于在存在于AD中的胆碱能、谷氨酸能系统的障碍、线粒体和炎症性氧化还原系统的失衡中使用的多靶标化合物的药物组合物，其特征在于所述鼻药物组合物每剂含有在0.05至6％比例的赋形剂中配制的0.1mg至25mg活性成分，所述赋形剂选自羟丙基甲基纤维素(HMPC)、羟丙基纤维素(HPC)、甲基纤维素(MC)、羧甲基纤维素(CMC)和聚丙烯酸(carbol)衍生物或其组合，并且具有10至60mPas的粘度。

10.-权利要求7所述的用于在存在于AD中的胆碱能、谷氨酸能系统的障碍、线粒体和炎症性氧化还原系统的失衡中使用的多靶标化合物的药物组合物，其特征在于其含有0.09至1.8％的浓度的PEG；0.05至0.7％浓度的CMC，0.08至1％的浓度的生育酚；抗微生物防腐剂，其选自：0.007至0.47％的浓度的苯扎氯铵、0.003至0.19％的浓度的EDTA二钠和0.005至0.04％的浓度的对羟基苯甲酸丙酯或其组合；和保湿剂，其选自：3.5至5.5％的浓度的甘油和0.17至0.38％的浓度的吐温80；或其组合，用磷酸盐缓冲剂调节的pH在5.5至6.5之间、优选6.3。