



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104411697 B

(45) 授权公告日 2016.08.10

(21) 申请号 201380033030.6

(22) 申请日 2013.06.20

(30) 优先权数据

61/662,592 2012.06.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014.12.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2013/051606 2013.06.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/190302 EN 2013.12.27

(73) 专利权人 阿斯利康(瑞典)有限公司

地址 瑞典南泰利耶

(72) 发明人 M·H·博林 C·R·斯图尔特

(74) 专利代理机构 北京市嘉元知识产权代理事

务所(特殊普通合伙) 11484

代理人 刘彬

(51) Int. Cl.

C07D 401/10(2006.01)

A61K 31/4439(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

(56) 对比文件

W0 2012087237 A1, 2012.06.28,

W0 2010105179 A2, 2010.09.16,

W0 2011002408 A1, 2011.01.06,

审查员 崔永涛

权利要求书2页 说明书14页 附图1页

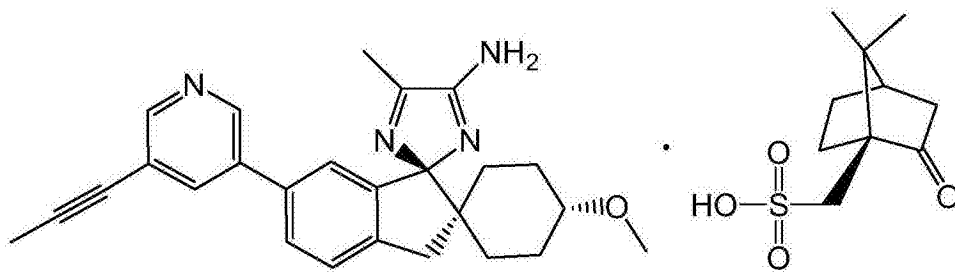
(54) 发明名称

樟脑磺酸盐

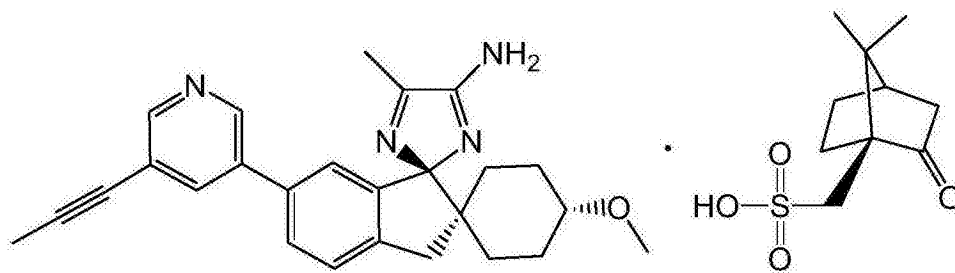
(57) 摘要

本发明涉及(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茚-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐,含有该盐的药物组合物和该盐用于治疗如下Aβ-相关病理的治疗用途:唐氏综合征、β-淀粉样蛋白血管病例如但不限于脑淀粉样蛋白血管病或遗传性脑出血,与认知缺损相关的病症例如但不限于MCI("轻度认知缺损")、阿尔茨海默病、记忆丧失、与阿尔茨海默病相关的注意力缺陷症状、与例如阿尔茨海默病的疾病相关的神经变性或痴呆包括混合型血管和变性源性痴呆、早发性痴呆、老年性痴呆、与帕金森病相关的痴呆、进行性核上性麻痹或皮质基质变性。

1. (1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茚-1'2"-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐:



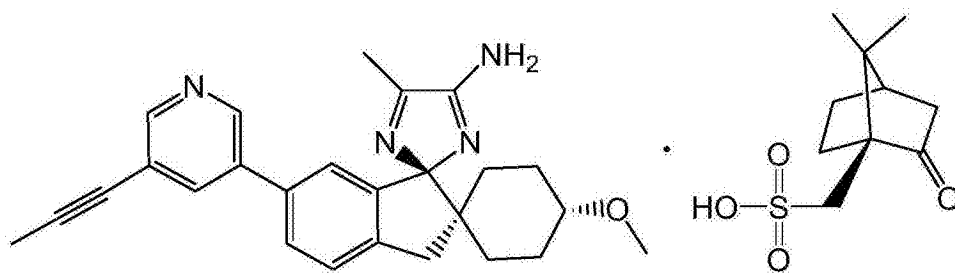
2. (1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茚-1'2"-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐:



其特征在于所述樟脑磺酸盐具有X-射线粉末衍射(XRPD)图,所述X-射线粉末衍射图展现了基本上以下的d-间距值的非常强、强和中等峰:

修正角	d-间距(Å)	相对强度
5.66	15.60	vs
7.72	11.44	m
11.30	7.83	m
12.35	7.16	s
12.83	6.89	m
15.24	5.81	m
15.47	5.72	m
17.17	5.16	m
18.13	4.89	m
19.71	4.50	m
20.77	4.27	m
21.12	4.20	m
23.63	3.76	m
24.50	3.63	m
26.18	3.40	m
26.54	3.36	m
34.30	2.61	m
36.78	2.44	m

3. (1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茚-1'2"-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐:



其特征在于所述樟脑磺酸盐具有基本上如图1所示的X-射线粉末衍射图。

4. 一种药物组合物,其包含作为活性成分的治疗有效量的权利要求1、2或3的盐,以及至少一种药用赋形剂、载体或稀释剂。

5. 治疗有效量的权利要求1、2或3的盐在制备用于在有此需要的患者中治疗或预防Aβ-相关病理的药物中的用途。

6. 权利要求5的用途,其中所述Aβ-相关病理为唐氏综合征、β-淀粉样蛋白血管病、脑淀粉样蛋白血管病、遗传性脑出血、与认知缺损相关的病症、MCI(“轻度认知缺损”)、阿尔茨海默病、记忆丧失、与阿尔茨海默病相关的注意力缺陷症状、与阿尔茨海默病相关的神经变性、进行性核上性麻痹或皮质基质变性。

7. 权利要求5的用途,其中所述Aβ-相关病理为混合型血管源性痴呆、变性源性痴呆、早老性痴呆、老年性痴呆或与帕金森病相关的痴呆。

8. 治疗有效量的权利要求1、2或3的盐在制备用于在有此需要的患者中治疗或预防阿尔茨海默病的药物中的用途。

9. 治疗有效量的权利要求1、2或3的盐在制备用于在有此需要的患者中治疗或预防Aβ-相关病理的药物中的用途,其中所述盐与至少一种认知增强剂、记忆增强剂或胆碱酯酶抑制剂联用。

樟脑磺酸盐

技术领域

[0001] 本发明涉及(1*r*,1'*r*,4*R*)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'-H-二螺[环己烷-1,2'-茚-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐,并涉及含有所述盐的药物组合物。此外,本发明涉及使用所述盐治疗和/或预防如下A β -相关病理的治疗方法:唐氏综合征(Down's syndrome)和 β -淀粉样蛋白血管病(β -amyloid angiopathy)例例如但不限于脑淀粉样蛋白血管病(cerebral amyloid angiopathy)、遗传性脑出血(hereditary cerebral hemorrhage)、与认知缺损(cognitive impairment)相关的病状例例如但不限于MCI("轻度认知缺损(mild cognitive impairment)")、阿尔茨海默病、记忆丧失(memory loss)、与阿尔茨海默病相关的注意力缺陷症状(attention deficit symptom)、与疾病例如阿尔茨海默病相关的神经变性或痴呆(包括混合型血管和变性源性痴呆(dementia of mixed vascular and degenerative origin)、早老性痴呆(pre-senile dementia)、老年性痴呆(senile dementia)和与帕金森病相关的痴呆)、进行性核上性麻痹(progressive supranuclear palsy)或皮质基底变性(cortical basal degeneration)。

背景技术

[0002] 区分阿尔茨海默病(AD)的主要神经病理学事件为具有40-42个残基的淀粉样蛋白 β -肽(A β)在脑实质和大脑血管中的沉积。大量遗传学、生物化学和体内数据支持了A β 在最终导致AD的病理学级联中的关键作用。患者通常在其60或70岁时出现早期症状(通常为记忆丧失)。疾病随痴呆加重和A β 沉积增加而进展。另外,微管相关蛋白 τ 的高磷酸化形式积聚在神经元中,这对神经元的功能造成很大的有害影响。盛行的关于A β 和 τ 蛋白病理之间的时间关系的工作假设认为在人类和动物疾病模型中A β 沉积在 τ 蛋白聚集前发生。在该背景下值得注意的是,A β 介导该病理学功能的确切分子性质目前为集中研究的问题。最有可能的是,存在一系列毒性物质,其范围为低阶A β 低聚物至超分子装配物例如A β 纤维。

[0003] A β 肽为I型蛋白APP(A β 淀粉样蛋白前体蛋白)的整合片段,而I型蛋白APP是一种在人类组织中普遍表达的蛋白质。因为可在血浆和脑脊液(CSF)及培养细胞的培养基中发现可溶性A β ,所以APP必然经历蛋白水解。存在三种主要的与AD病理生物学相关的APP裂解即所谓的 α -、 β -和 γ -裂解。 α -裂解大致在APP的A β 域的中间进行且通过金属蛋白酶ADAM10或ADAM17(后者也称为TACE)来实现。 β -裂解在A β 的N-末端发生且通过跨膜天冬氨酰基蛋白酶 β 位点APP裂解酶1(BACE1)来进行。 γ -裂解在A β 的C-末端进行且随后释放肽且通过称为 γ -分泌酶的多重亚单位天冬氨酰基蛋白酶来实现。ADAM10/17裂解及随后的 γ -分泌酶裂解引起可溶性p3肽的释放,而可溶性p3肽为不能在人类中形成淀粉样蛋白沉积物的N-末端截短型A β 片段。该蛋白水解途径通常称为非淀粉样蛋白生成途径。BACE1和 γ -分泌酶所引起的连续裂解可产生完整的A β 肽,因此该加工过程称为淀粉样蛋白生成途径。在该现有认识下有可能设想出两种可能减少A β 产生的途径:刺激非淀粉样蛋白生成加工或抑制或调节淀粉样蛋白生成加工。本申请关注于后一种策略即抑制或调节淀粉样蛋白生成加工。

[0004] 淀粉样蛋白生成斑块和血管性淀粉样蛋白血管病也是以下患者的脑部特征,所述

患者患有第21对染色体三体症(Trisomy 21)(唐氏综合征)、具有荷兰型淀粉样变性的遗传性脑出血(HCHWA-D)和其它神经变性障碍。神经原纤维缠结也出现在其它神经变性障碍(包括引起痴呆的障碍)中(Varghese, J.等人, Journal of Medicinal Chemistry, 2003, 46, 4625-4630)。β-淀粉样蛋白沉积物主要为Aβ肽的聚集物, 而Aβ肽为淀粉样蛋白前体蛋白(APP)的蛋白水解产物。更具体地, 作为β-淀粉样蛋白生成途径的一部分, Aβ肽如下产生: APP在C-末端通过一种或多种γ-分泌酶来裂解且在N-末端通过β-分泌酶(BACE)[也称为天冬氨酰基蛋白酶或Asp2或β位点APP裂解酶(BACE)]来裂解。

[0005] BACE的活性与由APP产生Aβ肽直接相关(Sinha等人, Nature, 1999, 402, 537-540)且越来越多的研究表明对BACE的抑制可抑制Aβ肽的产生(Roberds, S. L. 等人, Human Molecular Genetics, 2001, 10, 1317-1324)。BACE为膜结合I型蛋白, 其被合成为具有部分活性的酶原且在脑组织中大量表达。其被认为代表了主要的β-分泌酶活性且被认为是产生淀粉样β肽(Aβ)的限速步骤。

[0006] 因此, 降低或阻断BACE活性的药物应该在脑中或在Aβ或其片段沉积的其它处降低Aβ水平和Aβ片段水平并由此减缓淀粉样蛋白斑块的形成和AD或其它涉及Aβ或其片段沉积的疾病的进展。因此, BACE就开发用于治疗的和/或预防Aβ相关病理的药物而言是重要的候选物, 所述Aβ相关病理例如唐氏综合征、β淀粉样蛋白血管病例如但不限于脑淀粉样蛋白血管病或遗传性脑出血、与认知缺损相关的病症例如但不限于MCI(“轻度认知缺损”)、阿尔茨海默病、记忆丧失、与阿尔茨海默病相关的注意力缺陷症状、与疾病例如阿尔茨海默病相关的神经变性或痴呆(包括混合型血管和变性源性痴呆、早老性痴呆、老年性痴呆、与帕金森病相关的痴呆)、进行性核上性麻痹或皮质基底变性。

[0007] 因此, 通过用抑制剂例如本申请提供的化合物抑制BACE来抑制Aβ及其部分的沉积是有用的。

[0008] 抑制Aβ沉积的治疗潜力已促使多个团队分离和表征分泌酶且鉴定它们的潜在抑制剂。

附图说明

[0009] 图1为(1r, 1'R, 4R)-4-甲氧基-5''-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1, 2'-茛-1'2'-咪唑]-4''-胺的樟脑磺酸盐的X-射线粉末衍射图。

发明内容

[0010] 本发明涉及化合物(1r, 1'R, 4R)-4-甲氧基-5''-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1, 2'-茛-1'2'-咪唑]-4''-胺的樟脑磺酸盐。可供选择地, (1r, 1'R, 4R)-4-甲氧基-5''-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1, 2'-茛-1'2'-咪唑]-4''-胺的樟脑磺酸盐(camsylate salt)可描述为(1r, 1'R, 4R)-4-甲氧基-5''-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1, 2'-茛-1'2'-咪唑]-4''-胺的樟脑磺酸盐(camphorsulfonic acid salt)。

[0011] 本发明的一实施方案为化合物(1r, 1'R, 4R)-4-甲氧基-5''-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1, 2'-茛-1'2'-咪唑]-4''-胺的樟脑磺酸盐, 其特征在于提供了X-射线粉末衍射(XRPD)图, 所述X-射线粉末衍射图展现了基本上以下的d-间

距值的峰,如表1所示:

[0012] 表1:X-射线粉末衍射鉴别的峰

[0013]	修正角	d-间距 (Å)	相对强度
	5.66	15.60	vs
	7.72	11.44	m
	8.11	10.89	vw
	11.30	7.83	m

[0014]

12.35	7.16	s
12.83	6.89	m
14.07	6.29	w
15.05	5.88	w
15.24	5.81	m
15.47	5.72	m
16.24	5.45	w
16.68	5.31	w
17.17	5.16	m
17.33	5.11	w
17.62	5.03	vw
17.84	4.97	w
18.13	4.89	m
19.71	4.50	m
20.18	4.40	w
20.77	4.27	m
21.12	4.20	m
21.67	4.10	vw
21.88	4.06	vw
22.09	4.02	vw
22.29	3.99	w
22.73	3.91	w
23.11	3.84	vw
23.63	3.76	m
24.50	3.63	m
26.18	3.40	m
26.54	3.36	m
27.72	3.22	vw
27.95	3.19	vw
28.80	3.10	vw
28.93	3.08	vw
29.71	3.00	vw
30.56	2.92	vw
31.14	2.87	vw
31.64	2.83	vw
31.74	2.82	vw
32.11	2.79	vw
32.84	2.72	vw
33.86	2.65	vw
34.30	2.61	m
36.78	2.44	m
37.49	2.40	w
40.23	2.24	vw

[0015]

40.93	2.20	vw
41.32	2.18	vw
42.43	2.13	w
44.54	2.03	vw
46.29	1.96	vw
48.32	1.88	vw

[0016] 本发明另一实施方案为化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐,其特征在于提供了X-射线粉末衍射图,所述X-射线粉末衍射图展现了基本上以下的d-间距值的非常强、强和中等峰,如表2所示:

[0017] 表2:X-射线粉末衍射鉴别的峰

[0018]

修正角	d-间距(Å)	相对强度
5.66	15.60	vs
7.72	11.44	m
11.30	7.83	m
12.35	7.16	s
12.83	6.89	m
15.24	5.81	m
15.47	5.72	m
17.17	5.16	m
18.13	4.89	m
19.71	4.50	m
20.77	4.27	m
21.12	4.20	m
23.63	3.76	m
24.50	3.63	m
26.18	3.40	m
26.54	3.36	m
34.30	2.61	m
36.78	2.44	m

[0019] 如本申请中所使用的,术语“化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐”也涵盖其所有溶剂化物和共晶。

[0020] 化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4"-胺的替代盐包括琥珀酸盐、盐酸盐、磷酸盐、硫酸盐、富马酸盐和1.5-萘二磺酸盐。

[0021] 本发明的一个具体方面提供了药物组合物,其包含作为活性成分的治疗有效量的化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐,以及药用赋形剂、载体或稀释剂。

[0022] 本发明的另一方面提供了化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-

炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐,其用作药物。

[0023] 本发明的另一方面提供了化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐,用作治疗或预防A β -相关病理的药物的用途。

[0024] 本发明的另一方面提供了化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐用作治疗或预防A β -相关病理的药物的用途,其中所述A β -相关病理为唐氏综合征、 β -淀粉样蛋白血管病、脑淀粉样蛋白血管病、遗传性脑出血、与认知缺损相关的病症、MCI(“轻度认知缺损”)、阿尔茨海默病、记忆丧失、与阿尔茨海默病相关的注意力缺陷症状、与阿尔茨海默病相关的神经变性、混合型血管源性痴呆、变性源性痴呆、早老性痴呆、老年性痴呆、与帕金森病相关的痴呆、进行性核上性麻痹或皮质基质变性。

[0025] 本发明的另一方面提供了化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐用于治疗或预防阿尔茨海默病的药物的用途。

[0026] 本发明的另一方面提供了化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐在制备用于治疗或预防A β -相关病理的药物中的用途。

[0027] 本发明的另一方面提供了化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐在制备用于治疗或预防A β -相关病理的药物中的用途,其中所述A β -相关病理为唐氏综合征、 β -淀粉样蛋白血管病、脑淀粉样蛋白血管病、遗传性脑出血、与认知缺损相关的病症、MCI(“轻度认知缺损”)、阿尔茨海默病、记忆丧失、与阿尔茨海默病相关的注意力缺陷症状、与阿尔茨海默病相关的神经变性、混合型血管源性痴呆、变性源性痴呆、早老性痴呆、老年性痴呆、与帕金森病相关的痴呆、进行性核上性麻痹或皮质基质变性。

[0028] 本发明的另一方面提供化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐在制备治疗或预防阿尔茨海默病的药物中的用途。

[0029] 本发明的另一方面提供了抑制BACE活性的方法,其包括将所述BACE与化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐接触。

[0030] 本发明的另一方面提供了在有此需要的患者中治疗或预防A β -相关病理的方法,其包括向所述患者给予治疗有效量的化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐。

[0031] 本发明的另一方面提供了在有此需要的患者中治疗或预防A β -相关病理的方法,其包括向所述患者给予治疗有效量的化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐,其中所述A β -相关病理为唐氏综合征、 β -淀粉样蛋白血管病、脑淀粉样蛋白血管病、遗传性脑出血、与认知缺损相关的病症、MCI(“轻度认知缺损”)、阿尔茨海默病、记忆丧失、与阿尔茨

海默病相关的注意力缺陷症状、与阿尔茨海默病相关的神经变性、混合型血管源性痴呆、变性源性痴呆、早老性痴呆、老年性痴呆、与帕金森病相关的痴呆、进行性核上性麻痹或皮质基质变性。

[0032] 本发明的另一方面提供了在有此需要的患者中治疗或预防阿尔茨海默病的方法，其包括向所述患者给予治疗有效量的化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐。

[0033] 在一些实施方案中，本发明提供了抑制BACE活性的方法，其包括使BACE与化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐接触。BACE被认为代表主要的 β -内分泌酶活性，并被视为生成淀粉样 β -蛋白(A β)的限速步骤。因此，通过抑制剂如本申请所提供的化合物抑制BACE可用于抑制A β 及其部分的沉积。因为A β 及其部分的沉积与疾病例如阿尔茨海默病有关，所以BACE是研发治疗和/或预防A β -相关病理的药物的重要候选物，所述A β -相关病理如唐氏综合征和 β -淀粉样蛋白血管病，例如但不限于脑淀粉样蛋白血管病、遗传性脑出血，与认知缺损相关的病症，例如但不限于MCI(“轻度认知缺损”)、阿尔茨海默病、记忆丧失、与阿尔茨海默病相关的注意力缺陷症状、与例如阿尔茨海默病的疾病相关的神经变性或痴呆包括混合型血管和变性源性痴呆、早老性痴呆、老年性痴呆、与帕金森病相关的痴呆、进行性核上性麻痹或皮质基质变性。

[0034] 在一些实施方案中，本发明提供预防A β -相关病理的方法，其包括向哺乳动物(包括人类)给予治疗有效量的化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑酸盐，其中所述A β -相关病理如唐氏综合征和 β -淀粉样蛋白血管病，例如但不限于脑淀粉样蛋白血管病、遗传性脑出血，与认知缺损相关的病症，例如但不限于MCI(“轻度认知缺损”)、阿尔茨海默病、记忆丧失、与阿尔茨海默病相关的注意力缺陷症状、与例如阿尔茨海默病的疾病相关的神经变性或痴呆包括混合型血管和变性源性痴呆、早老性痴呆、老年性痴呆、与帕金森病相关的痴呆、进行性核上性麻痹或皮质基质变性。

[0035] 在一些实施方案中，本发明提供治疗或预防A β -相关病理的方法，其通过向哺乳动物(包括人类)给予化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑酸盐以及认知和/或记忆增强剂进行，其中所述A β -相关病理如唐氏综合征和 β -淀粉样蛋白血管病，例如但不限于脑淀粉样蛋白血管病、遗传性脑出血，与认知缺损相关的病症，例如但不限于MCI(“轻度认知缺损”)、阿尔茨海默病、记忆丧失、与阿尔茨海默病相关的注意力缺陷症状、与例如阿尔茨海默病的疾病相关的神经变性或痴呆包括混合型血管和变性源性痴呆、早老性痴呆、老年性痴呆、与帕金森病相关的痴呆、进行性核上性麻痹或皮质基质变性。

[0036] 在一些实施方案中，本发明提供治疗或预防A β -相关病理的方法，其通过向哺乳动物(包括人类)给予化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑酸盐和胆碱酯酶抑制剂或抗炎药物进行，其中所述A β -相关病理如唐氏综合征和 β -淀粉样蛋白血管病，例如但不限于脑淀粉样蛋白血管病、遗传性脑出血，与认知缺损相关的病症，例如但不限于MCI(“轻度认知缺损”)、阿尔茨海默病、记忆丧失、与阿尔茨海默病相关的注意力缺陷症状、与例如阿尔茨

海默病的疾病相关的神经变性或痴呆包括混合型血管和变性源性痴呆、早老性痴呆、老年性痴呆、与帕金森病相关的痴呆、进行性核上性麻痹或皮质基质变性。

[0037] 在一些实施方案中,本发明提供治疗或预防Aβ-相关病理的方法,其通过向哺乳动物(包括人类)给予本发明化合物和非典型抗精神病药进行,其中所述Aβ-相关病理如唐氏综合征和β-淀粉样蛋白血管病,例如但不限于脑淀粉样蛋白血管病、遗传性脑出血,与认知缺损相关的病症,例如但不限于MCI(“轻度认知缺损”)、阿尔茨海默病、记忆丧失、与阿尔茨海默病相关的注意力缺陷症状、与例如阿尔茨海默病的疾病相关的神经变性或痴呆包括混合型血管和变性源性痴呆、早老性痴呆、老年性痴呆、与帕金森病相关的痴呆、进行性核上性麻痹或皮质基质变性。非典型抗精神病药包括但不限于奥氮平(商品名为Zyprexa)、阿立哌唑(商品名为Abilify)、利培酮(商品名为Risperdal)、喹硫平(商品名为Seroquel)、氯氮平(商品名为Clozaril)、齐拉西酮(商品名为Geodon)和奥氮平/氟西汀(商品名为Symbyax)。

[0038] 在一些实施方案中,使用化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茚-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐治疗的哺乳动物或人类被诊断为患有特定疾病或病症,如本申请所述的那些。在这些情况中,所述被治疗的哺乳动物或人类需要此治疗。然而,诊断并不需要在先进行。

[0039] 本申请中陈述的定义意欲阐明在本申请通篇中所用的术语。术语“本申请”意指整个申请。

[0040] 如本申请中所使用的,“药用”在本申请中用于指在合理的医学判断范围内适用于与人和动物组织接触而无过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症且与合理效益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0041] 本申请所定义的抗痴呆治疗可以单一疗法施用或可包含除本发明化合物外的常规化学疗法。此类化学疗法可包括一种或多种以下类别的药剂:乙酰胆碱酯酶抑制剂、抗炎药物、认知和/或记忆增强剂或非典型抗精神病药。

[0042] 此类组合疗法可通过附加、并行、同时、顺序或单独给药所述治疗的各别组分实现。此类组合产品使用本发明的化合物。

[0043] 其他的常规化学疗法可包括一种或更多种以下类别的药剂:

[0044] (i)抗抑郁药、(ii)非典型抗精神病药、(iii)抗精神病药、(iv)抗焦虑药、(v)抗惊厥药、(vi)目前使用的阿尔茨海默病疗法、(vii)帕金森病疗法、(viii)偏头痛疗法、(ix)中风疗法、(x)尿失禁疗法、(xi)神经性疼痛疗法、(xii)伤害性疼痛疗法、(xiii)失眠疗法和(xiv)情绪稳定剂。上述疗法的已知治疗可与本申请所述发明联用。

[0045] 此类组合产品使用在本申请所述剂量范围内的化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茚-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐和在所批准的剂量范围内和/或由本领域技术人员确定的剂量范围内的其它一种或多种其他药物活性化合物。

[0046] 本发明化合物可按以下方式来给药:口服、胃肠外、口腔、阴道、直肠、吸入、吹入、舌下、肌内、皮下、局部、鼻内、腹膜内、胸内、静脉内、硬膜外、鞘内、脑室内和注射至关节中。

[0047] 剂量将取决于给药途径、疾病的严重度、患者的年龄和体重以及在确定最适于特定患者的个别方案和剂量水平时主治医师通常考虑的其他因素。

[0048] 用于痴呆疗法的本发明化合物的有效量是足以使温血动物症状缓解,尤其是人类痴呆症状缓解,减慢痴呆进展或者降低具有痴呆症状的患者病情加重风险的量。

[0049] 除本发明的化合物外,本发明的药物组合物还可包含一种或多种在治疗一种或多种本申请所述的疾病病状种有价值的药理学试剂,或者与一种或多种在治疗一种或多种本申请所述的疾病病状中有价值的药理学试剂共给药(同时或者顺序)。

[0050] 待给药的化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5''-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4''-胺的樟脑磺酸盐的量将随所治疗的患者而变化且将为每天约100ng/kg体重至100mg/kg体重。例如,剂量可由本领域技术人员根据本申请公开的内容和本领域的知识来容易地确定。因此,本领域技术人员可容易地确定化合物及任选的添加剂、媒介物和/或载体在组合物中的量 and 在本发明方法中的给药量。

[0051] 制备方法

[0052] (1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5''-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4''-胺的樟脑磺酸盐

[0053] 化合物(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5''-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4''-胺的樟脑磺酸盐可通过在室温至80°C之间的温度自(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5''-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4''-胺于适宜的溶剂(例如2-丙醇、乙腈或丙酮或这些与水的混合物)中的溶液起始,随后将所获得的溶液与(1S)-(+)-10-樟脑磺酸直接混合或与溶于适宜溶剂(例如2-丙醇或水)中的(1S)-(+)-10-樟脑磺酸混合获得。结晶可通过蒸发溶剂和/或通过冷却溶液或直接以盐反应结晶获得。可使用晶种来开始结晶。可通过取样小体积的溶液然后快速对其冷却以诱导结晶,从而从该批次本身制得晶种。然后将晶体添加至该批次中作为晶种。

[0054] XRPD分析:

[0055] 在根据标准方法制备的样品上进行X-射线粉末衍射分析(XRPD),例如描述于以下文献中的方法:Giacovazzo,C.et al(1995),Fundamentals of Crystallography,Oxford University Press;Jenkins,R.and Snyder,R.L.(1996),Introduction to X-Ray Powder Diffractometry,John Wiley&Sons,New York;Bunn,C.W.(1948),Chemical Crystallography,Clarendon Press,London;或Klug,H.P.&Alexander,L.E.(1974),X-ray Diffraction Procedures,John Wiley and Sons,New York。使用PANalytical X'Pert PRO MPD衍射仪从1至60° 2 θ 进行X-射线衍射分析96分钟。XRPD间距值可在最后一位小数位的 ± 2 范围内变化。

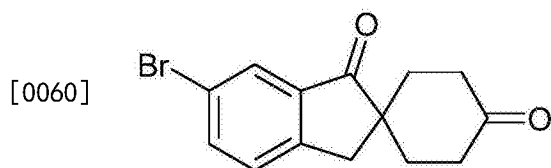
[0056] 相对强度衍生自经可变狭缝测量的衍射图。

[0057] 所测量的相对强度vs.最强峰如下表示:最强(vs)为大于50%,强(s)为25至50%,中等(m)为10至25%,弱(w)为5至10%和非常弱(vw)为低于5%相对峰高。本领域技术人员应当理解的是,由于各种各样的原因(包括优选取向),XRPD强度可在不同样品和不同样品制备物间变化。本领域技术人员还应当理解的是,测量角中存在更小的偏移,因此由于各种各样的原因(包括衍射仪中样品表面水平的变化)可存在d-间距。

实施例

[0058] 实施例1

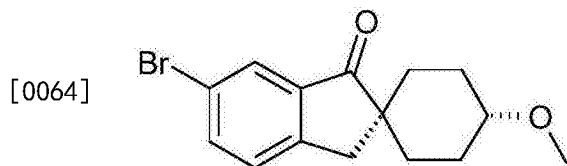
[0059] 6'-溴螺[环己烷-1,2'-茚]-1',4(3'H)-二酮



[0061] 在20-30℃将叔丁醇钾(223g, 1.99mol)加入含有6-溴-1-茚满酮(8.38kg, 39.7mol)于THF(16.75L)中的搅拌混合物的100L反应器中。然后保持温度在20-30℃之间, 在15分钟内将丙烯酸甲酯(2.33L, 25.8mol)加至混合物中。在20-30℃在20分钟内添加丙烯酸甲酯(2.33L, 25.8mol), 然后添加叔丁醇钾(89.1g, 0.79mol)溶于(400mL)中的溶液。然后在20-30℃在20分钟内添加第三份溶于THF(400mL)的叔丁醇钾(90g, 0.80mol), 然后第三次加入丙烯酸甲酯(2.33L, 25.8mol)。在20-30℃在1小时内将溶于THF(21.9L)的叔丁醇钾(4.86kg, 43.3mol)加入反应器中。将反应混合物加热至约65℃并蒸馏除去23L溶剂。将反应混合物温度降低至60℃并在60℃搅拌该混合物6小时后在55-60℃在30分钟内将50%溶于水(51.1L)的氢氧化钾(2.42L, 31.7mol)加至该混合物中, 在2小时内冷却至20℃。在20℃搅拌12小时后, 将固体物质滤出, 用水(8.4L)和THF(4.2L)的混合物洗涤2次, 然后在50℃真空干燥, 得到6'-溴螺[环己烷-1,2'-茚]-1',4(3'H)-二酮(7.78kg; 26.6mol)。¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆)δppm 1.78-1.84(m, 2H), 1.95(td, 2H), 2.32-2.38(m, 2H), 2.51-2.59(m, 2H), 3.27(s, 2H), 7.60(d, 1H), 7.81(m, 1H), 7.89(m, 1H)。

[0062] 实施例2

[0063] (1r,4r)-6'-溴-4-甲氧基螺[环己烷-1,2'-茚]-1'(3'H)-酮

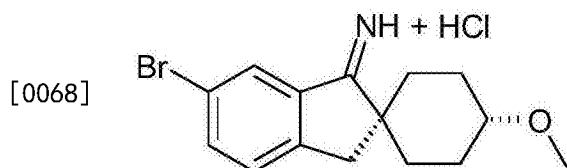


[0065] 在约0-5℃历时约25分钟, 将溶于DCM(3.8L)中的甲硼烷叔丁胺络合物(845g, 9.7mol)添加至6'-溴螺[环己烷-1,2'-茚]-1',4(3'H)-二酮(7.7kg, 26.3mol)于DCM(42.4L)中的浆液中。在分析确认转化为>98%后, 将反应混合物在0-5℃搅拌1小时。添加自氯化钠(2.77kg)、水(13.3L)和37%盐酸(2.61L, 32mol)制备的溶液。将该混合物温热至约15℃, 并在分层后分离各相。将有机相与甲磺酸甲酯(2.68L, 31.6mol)和氯化四丁铵(131g, 0.47mol)一起返回至反应器中, 并在20℃剧烈搅动该混合物。然后历时约1小时将50%氢氧化钠(12.5L, 236mol)加至剧烈搅动的混合物中, 并在20℃剧烈搅动该反应混合物过夜。添加水(19L), 并在分离后弃除水相。将有机层加热至约40℃并蒸馏除去33L溶剂。加入乙醇(21L)并升高温度重新开始蒸馏(在高达79℃蒸馏除去22L)。在约75℃加入乙醇(13.9L)。保持温度在72-75℃之间历时30分钟加入水(14.6L)。约400ml溶液被取出置于500ml聚乙烯瓶中且该样品自发结晶。将该批次冷却至50℃, 并将结晶的浆液样品添加回溶液中。将混合物冷却至40℃。在过夜搅拌后将该混合物冷却至20℃。滤出固体, 用乙醇(6.6L)和水(5L)的混合物洗涤, 并在50℃真空干燥, 得到(1r,4r)-6'-溴-4-甲氧基螺[环己烷-1,2'-茚]-1'(3'H)-酮(5.83kg, 18.9mol)。¹H NMR(500MHz, DMSO-d₆)δppm 1.22-1.32(m, 2H), 1.41-1.48(m,

2H), 1.56(td, 2H), 1.99-2.07(m, 2H), 3.01(s, 2H), 3.16-3.23(m, 1H), 3.27(s, 3H), 7.56(d, 1H), 7.77(d, 1H), 7.86(dd, 1H).

[0066] 实施例3

[0067] (1r,4r)-6'-溴-4-甲氧基螺[环己烷-1,2'-茚]-1'(3'H)-亚胺盐酸盐

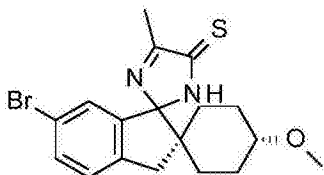


[0069] 在环境温度,向100L反应器中加入(1r,4r)-6'-溴-4-甲氧基螺[环己烷-1,2'-茚]-1'(3'H)-酮(5.82kg;17.7mol),随后加入乙醇钛(IV)(7.4L;35.4mol)和叔丁基亚磺酰胺(2.94kg;23.0mol)于2-甲基四氢呋喃(13.7L)中的溶液。搅拌该混合物并加热至82℃。在82℃保持30分钟后,将温度进一步升高(高达97℃)并蒸馏除去8L溶剂。将反应混合物冷却至87℃并在给定反应温度82℃添加2-甲基四氢呋喃(8.2L)。将反应混合物在82℃搅拌过夜。将反应温度升高(至97℃)并蒸馏除去8.5L溶剂。将反应混合物冷却至87℃,并在给定反应温度82℃添加2-甲基四氢呋喃(8.2L)。在3.5小时后,将反应温度进一步升高(至97℃)并蒸馏除去8L溶剂。将反应冷却至87℃并在给定反应温度82℃添加2-甲基四氢呋喃(8.2L)。在2小时后,将反应温度进一步升高(至97℃)并蒸馏除去8.2L溶剂。将反应冷却至87℃并在给定反应温度82℃添加2-甲基四氢呋喃(8.2L)。在82℃将反应混合物搅拌过夜。将反应温度进一步升高(至97℃)并蒸馏除去8L溶剂。将反应冷却至25℃。加入二氯甲烷(16.4L)。向单独的反应器添加水(30L)并剧烈搅动,添加硫酸钠(7.54kg)并将所得溶液冷却至10℃。向该水溶液中添加硫酸(2.3L,42.4mol)并将温度调整至20℃。取出6L该酸性水溶液并保存备用。历时5分钟在良好搅动下向该酸性水溶液添加有机反应混合物。用二氯甲烷(16.4L)洗涤有机反应容器,并也将该二氯甲烷洗涤液加至酸性水中。将混合物搅拌15分钟,然后静置20分钟。将下层水相排出,并添加所保存的6L酸性洗涤液然后添加水(5.5L)。将混合物搅拌15分钟,然后静置20分钟。将下层的有机相排出至酸坛(carboy)并将上层水层弃除。将有机层加回至容器中并添加硫酸钠(2.74kg),将该混合物搅动30分钟。滤出硫酸钠,用二氯甲烷(5.5L)洗涤,并将合并的有机相加至干净的容器中。将该批次加热蒸馏(收集31L最大温度57℃)。将该批次冷却至40℃并添加二氯甲烷(16.4L)。将该批次加热蒸馏(收集17L最大温度54℃)。将该批次冷却至20℃并添加二氯甲烷(5.5L)和乙醇(2.7L)。保持温度在16-23℃之间历时45分钟将2M盐酸的乙醚溶液(10.6L;21.2mol)加入该反应。在20℃搅拌所得浆液1小时,此后将固体滤出,并用1:1二氯甲烷和乙醚的混合物洗涤3次(3x 5.5L)。所述固体在50℃真空干燥,得到(1r,4r)-6'-溴-4-甲氧基螺[环己烷-1,2'-茚]-1'(3'H)-亚胺盐酸盐(6.0kg;14.3mol;¹H NMR测定82%w/w)。¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆)δppm 130(m,2H),1.70(d,2H),1.98(m,2H),2.10(m,2H),3.17(s,2H),3.23(m,1H),3.29(s,3H),7.61(d,1H),8.04(dd,1H),8.75(d,1H),12.90(br s,2H)。

[0070] 实施例4

[0071] (1r,4r)-6'-溴-4-甲氧基-5"-甲基-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茚-1'2'-咪唑]-4"(3'H)-硫酮

[0072]

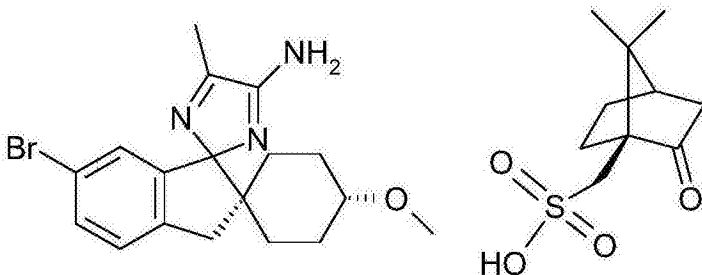


[0073] 将原甲酸三甲酯(4.95L;45.2mol)和二异丙基乙基胺(3.5L;20.0mol)加至含有于异丙醇(50.5L)中的(1r,4r)-6'-溴-4-甲氧基螺[环己烷-1,2'-茛]-1'(3'H)-亚胺盐酸盐(6.25kg;14.9mol)的反应器。搅拌该反应混合物并在1小时内加热至75℃从而获得澄清的溶液。将温度设置为70℃,并历时1小时加入2M2-氧代丙硫酰胺于异丙醇中的溶液(19.5kg;40.6mol),其后将反应在69℃搅拌过夜。对该批次用(1r,4r)-6'-溴-4-甲氧基-5''-甲基-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4''(3''H)-硫酮(3g;7.6mmol)种晶,并将温度降低至60℃且搅拌1小时。通过蒸馏浓缩该混合物(蒸馏温度约为60℃;蒸馏除去31L)。在60℃在1小时内添加水(31L),将混合物搅拌3小时,然后在90分钟内将温度降低至25℃。将固体滤出,用异丙醇洗涤两次(2x 5.2L)并在40℃真空干燥,得到(1r,4r)-6'-溴-4-甲氧基-5''-甲基-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4''(3''H)-硫酮(4.87kg;10.8mol;¹H NMR测定87%w/w)。

[0074] 实施例5

[0075] (1r,1'R,4R)-6'-溴-4-甲氧基-5''-甲基-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4''-胺D(+)-10-樟脑磺酸盐

[0076]



[0077] 将7M氨的甲醇溶液(32L;224mol)加至含有(1r,4r)-6'-溴-4-甲氧基-5''-甲基-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4''(3''H)-硫酮(5.10kg;11.4mol)和醋酸锌二水合物(3.02kg;13.8mol)的反应器中。将反应器密封,将混合物冷却至30℃,然后将混合物加热至80℃并搅拌24小时。加入1-丁醇(51L)并真空浓缩反应混合物蒸馏除去约50L。添加1-丁醇(25L)并真空浓缩混合物蒸馏除去27L。将混合物冷却至30℃并加入1M氢氧化钠(30L;30mol)。将双相性混合物搅动15分钟。分离除去下层水相。加入水(20L)并将混合物搅动30分钟。分离除去下层水相。加入(1S)-(+)-10-樟脑磺酸(2.4kg;10.3mol),然后将有机相加热至70℃。在70℃搅拌该混合物1小时,然后历时3小时斜降至20℃。将固体滤出,用乙醇(20L)洗涤并在50℃真空干燥,得到(1r,4r)-6'-溴-4-甲氧基-5''-甲基-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4''-胺(+)-10-樟脑磺酸盐(3.12kg;5.13mol;¹H NMR测定102%w/w)。

[0078] 实施例6

[0079] (1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5''-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4''-胺

[0080] 将溶于水(0.1L)中的Na₂PdCl₄(1.4g;4.76mmol)和3-(二叔丁基膦)丙烷磺酸盐(2.6g;9.69mmol)加至含有于1-丁醇(7.7L)和水(2.6L)的混合物中的(1r,4r)-6'-溴-4-甲

氧基-5''-甲基-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4''-胺(+)-10-樟脑磺酸盐(1kg; 1.58mol)、碳酸钾(0.763kg;5.52mol)的容器中。将混合物用氮气小心惰化,此后加入5-(丙-1-炔基)吡啶-3-基硼酸(0.29kg;1.62mol)并再次将混合物用氮气小心惰化。将反应混合物加热至75℃并在分析显示完全转化后搅拌2小时。将温度调整至45℃。停止搅拌并将下层水相分离。将有机层用水洗涤3次(3x 4L)。将反应温度调整至22℃并加入膦SPM32清除剂(0.195kg),将混合物搅动过夜。滤出清除剂,并用1-丁醇(1L)洗涤。将反应减压蒸馏浓缩至3L。加入乙酸丁酯(7.7L)并再次将混合物减压蒸馏浓缩至3L。加入乙酸丁酯(4.8L)并将混合物加热至60℃。减压蒸馏将混合物浓缩至约4L,然后将该混合物搅拌1小时。将温度设置为60℃,并历时20分钟添加庚烷(3.8L)。历时3小时将混合物冷却至20℃,然后搅拌过夜。滤出固体并用1:1乙酸丁酯:庚烷的混合物洗涤2次(2x 2L)。将产物在50℃真空干燥,得到(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5''-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4''-胺(0.562kg;1.36mol;¹H NMR测定100%w/w)。¹H NMR(500MHz, DMSO-d₆)ppm 0.97(d,1H),1.12-1.30(m,2H),1.37-1.51(m,3H),1.83(d,2H),2.09(s,3H),2.17(s,2H),2.89-3.12(m,3H),3.20(s,3H),6.54(s,2H),6.83(s,1H),7.40(d,1H),7.54(d,1H),7.90(s,1H),8.51(d,1H),8.67(d,1H)

[0081] 实施例7

[0082] (1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5''-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4''-胺的樟脑磺酸盐的制备

[0083] 在60℃将1.105kg(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5''-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4''-胺溶于8.10L 2-丙醇和475mL水中。然后在60℃加入1.0mol当量(622gram)的(1S)-(+)-10-樟脑磺酸。搅动该浆液直至所有(1S)-(+)-10-樟脑磺酸溶解。在60℃添加第二份2-丙醇(6.0L),然后蒸馏内容物直至收集到4.3L馏出液。然后在65℃加入9.1L庚烷。在1小时后,该批次变得不透明。然后在约75℃进行再次蒸馏并收集8.2L馏出液。然后历时2小时将该批次冷却至20℃并维持在该温度过夜。然后过滤该批次并用1.8L 2-丙醇和2.7L庚烷的混合物洗涤。最后,该物质在50℃减压干燥。收率为1.44kg(83.6%w/w)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆)δppm 12.12(1H,s),9.70(2H,d,J 40.2),8.81(1H,d,J 2.1),8.55(1H,d,J 1.7),8.05(1H,dd,J 2.1,1.7),7.77(1H,dd,J 7.8,1.2),7.50(2H,m),3.22(3H,s),3.19(1H,d,J 16.1),3.10(1H,d,J 16.1),3.02(1H,m),2.90(1H,d,J 14.7),2.60(1H,m),2.41(1H,d,J 14.7),2.40(3H,s),2.22(1H,m),2.10(3H,s),1.91(3H,m),1.81(1H,m),1.77(1H,d,J 18.1),1.50(2H,m),1.25(6H,m),0.98(3H,s),0.69(3H,s)。

[0084] 生物测定

[0085] 可使用以下方法测试(1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5''-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茛-1'2'-咪唑]-4''-胺的樟脑磺酸盐的活性水平:

[0086] TR-FRET测定

[0087] 用于TR-FRET的β-分泌酶如下制备:

[0088] 人β-分泌酶的可溶性部分(AA 1-AA 460)的cDNA使用ASP2-Fc10-1-IRES-GFP-neoK哺乳动物表达载体来克隆。将基因与IgG1(亲和标签)的Fc结构域融合并稳定地克隆到HEK 293细胞中。经纯化的sBACE-Fc在-80℃贮存于50mM甘氨酸(pH 2.5)中,用1M Tris调节

至pH 7.4且具有40%的纯度。

[0089] 在反应缓冲液(NaAcetate, chaps, triton x-100, EDTA pH 4.5)将酶(截短形式)稀释至6 μ g/mL(储备液1.3mg/mL)并将TruPoint BACE1底物稀释至200nM(储备液120 μ M)。将酶和化合物在二甲基亚砜(DMSO的终浓度为5%)中的溶液混合并在室温预孵育10分钟。然后加入底物并将反应混合物在室温孵育15分钟。反应通过加入0.35体积终止液(乙酸钠, pH 9)来停止。用Victor II读板器以340-485nm的激发波长和590-615nm的发射波长测量产物的荧光。酶的终浓度为2.7 μ g/mL;底物的终浓度为100nM(K_m 为约250nM)。二甲基亚砜对照品(而不是测试化合物)定义了100%活性水平且0%活性通过缺乏酶(替换为反应缓冲液)的孔或通过已知抑制剂即2-氨基-6-[3-(3-甲氧基苯基)苯基]-3,6-二甲基-5H-嘧啶-4-酮的饱和剂量来定义。在剂量响应测定中还使用了对照抑制剂且其 IC_{50} 为约150nM。

[0090] (1r,1'R,4R)-4-甲氧基-5"-甲基-6'-[5-(丙-1-炔-1-基)吡啶-3-基]-3'H-二螺[环己烷-1,2'-茚-1'2'-咪唑]-4"-胺的樟脑磺酸盐在此测定中平均 IC_{50} 为0.2nM。

[0091] sAPP β 释放测定

[0092] 在具有Glutamax、10%FCS和1%非必需氨基酸的DMEM/F-12中培养SH-SY5Y细胞,冷藏并以 $7.5-9.5 \times 10^6$ 个细胞/小瓶的浓度贮存在-140 $^{\circ}$ C。解冻细胞并以约10000个细胞/孔的浓度在具有Glutamax、10%FCS和1%非必需氨基酸的DMEM/F-12中以100 μ L细胞悬浮液/孔接种在384孔组织培养板中。然后在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂的条件下将细胞板孵育7-24小时。除去细胞培养基,然后加入30 μ L稀释在具有Glutamax、10%FCS、1%非必需氨基酸和1%PeSt的DMEM/F-12中的化合物(DMSO的终浓度为1%)。在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂的条件下将化合物与细胞一起孵育17小时(过夜)。Meso Scale Discovery(MSD)板用于检测sAPP β 释放。将MSD sAPP β 板在1%BSA/Tris洗涤缓冲液(40 μ L/孔)中在室温和振荡下阻断1小时并在Tris洗涤缓冲液(40 μ L/孔)中洗涤1次。将20 μ L培养基转移到预先阻断并洗涤的MSD sAPP β 微量板中且细胞板在ATP测定中进一步用于测量细胞毒性。在室温和振荡下将MSD板孵育2小时并弃去培养基。每孔加入10 μ L检测抗体(1nM),然后在室温和振荡下孵育2小时,然后弃去。每孔加入40 μ L读取缓冲液并在SECTOR成像仪中对板进行读取。

[0093] ATP测定

[0094] 如在sAPP β 释放测定中所述,从细胞版中转移20 μ L培养基用于sAPP β 检测后,板用于分析细胞毒性,其中使用对总细胞ATP进行测量的ViaLightTM Plus细胞增殖/细胞毒性试剂盒(Cambrex BioScience)。测定按照厂商方案来进行。简言之,每孔加入10 μ L细胞溶解试剂。将板在室温孵育10min。加入25 μ L复溶的ViaLightTM Plus ATP试剂后2min,测量发光。毒性阈值为在对照品的75%以下的信号。

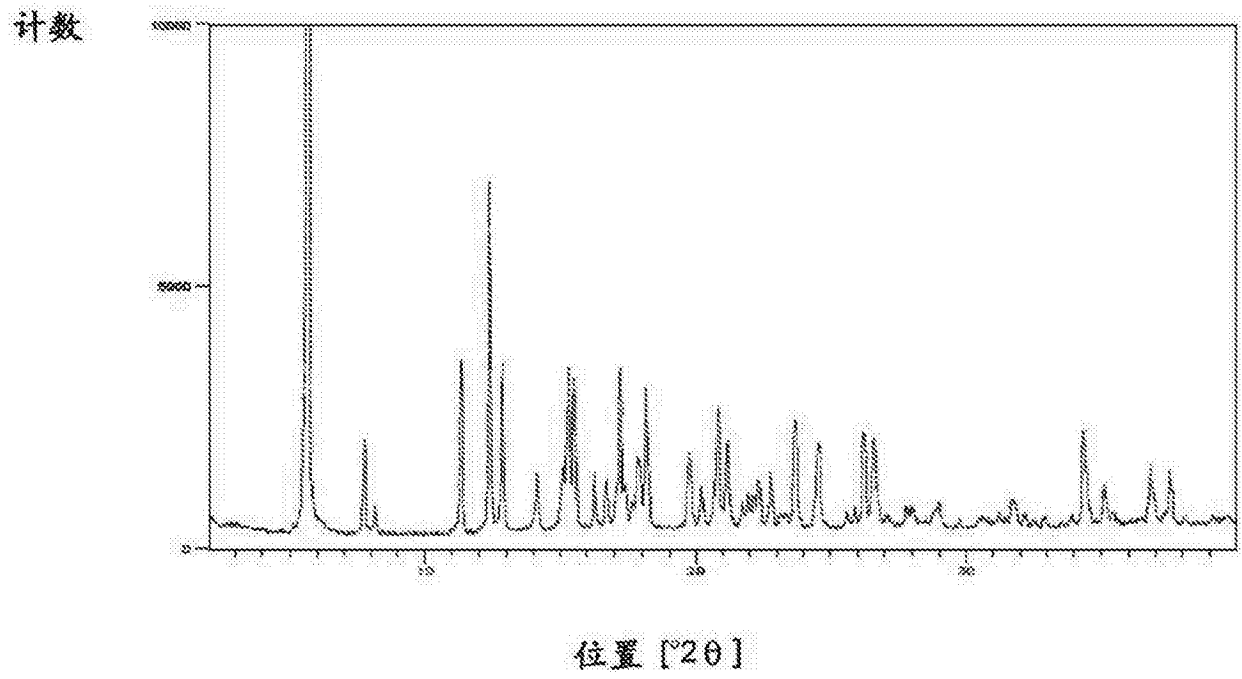


图1