



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108473516 B

(45) 授权公告日 2021.06.18

(21) 申请号 201680073089.1

(22) 申请日 2016.12.14

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108473516 A

(43) 申请公布日 2018.08.31

(30) 优先权数据
15199972.9 2015.12.14 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.06.13

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2016/081084 2016.12.14

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/102893 EN 2017.06.22

(73) 专利权人 马克斯·普朗克科学促进协会
地址 德国慕尼黑
专利权人 阿米尼·吉斯
 菲利克斯·施密特

(72) 发明人 阿米尼·吉斯 菲利克斯·施密特
 克里斯蒂安·格里辛格
 安德烈·列昂诺夫
 谢尔盖·梁赞诺夫

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
 有限公司 11262
代理人 凌翠 郑霞

(51) Int.Cl.
C07F 9/11 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 102056903 A, 2011.05.11
CN 104350042 A, 2015.02.11
Jarkko Rautio等. Prodrugs: design and
clinical applications.《nature reviews》
.2008,第7卷

审查员 杨杰

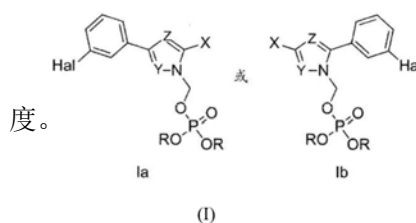
权利要求书2页 说明书28页 附图3页

(54) 发明名称

3,5-二苯基-二唑化合物的水溶性衍生物

(57) 摘要

本发明涉及3,5-二苯基-二唑化合物的衍生物,其是用于治疗与蛋白质聚集相关的疾病和/或神经退行性疾病例如阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)和传染性海绵状脑病(TSE)例如克-雅病(CJD)的有效治疗剂。治疗效果是通过抑制受影响的组织例如脑中的蛋白质聚集引起的,3,5-二苯基-二唑衍生物已经示出在抑制蛋白质的聚集方面是有效的,但特征还在于它们在水溶液中差的溶解度。本发明的前药是改性的3,5-二苯基-二唑衍生物,其特征还在于它们在水溶液中改进的溶解度,以及特征还在于它们提高的生物利用



的疾病药物中的用途,其中当所述药物被施用至需要其的患者时,将治疗有效量的如权利要求1至7中任一项所述的化合物施用至需要其的患者。

11.如权利要求10所述的用途,其中所述与蛋白质聚集相关的疾病的特征在于存在至少一种蛋白质或其片段或衍生物的聚集形式,其中所述蛋白质选自由以下组成的组:朊病毒蛋白、淀粉样前体蛋白(APP)、 α -突触核蛋白、超氧化物歧化酶、tau、免疫球蛋白、淀粉样蛋白-A、转甲状腺素蛋白、 β 2-微球蛋白、胱抑素C、载脂蛋白A1、TDP-43、胰岛淀粉样多肽、ANF、凝溶胶蛋白、胰岛素、溶菌酶、纤维蛋白原、亨廷顿蛋白和共济失调蛋白以及具有Poly-Q段的其他蛋白。

12.如权利要求10或11所述的用途,其中所述与蛋白质聚集相关的疾病选自由以下组成的组:帕金森病、朊病毒病、阿尔茨海默病、多系统萎缩症、弥漫性路易体病、额颞痴呆症、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿病、脊髓小脑共济失调和其他Poly-Q疾病、遗传性脑淀粉样血管病、家族性淀粉样多发性神经病、原发性全身性淀粉样变性即AL淀粉样变性、反应性全身性淀粉样变性即AA淀粉样变性、II型糖尿病、注射局部性淀粉样变性、 β -2微球蛋白淀粉样变性、遗传性非神经性淀粉样变性和芬兰遗传性全身性淀粉样变性。

13.如权利要求12所述的用途,其中所述朊病毒病选自散发性和遗传性克-雅病、变异型克-雅病(vCJD)、由牛海绵状脑病(BSE)的感染因子引起的人类紊乱、杰茨曼-斯脱司勒-史茵克综合征、致命家族性失眠、库鲁病、牛的BSE、绵羊和山羊的瘙痒病、猫的猫科海绵状脑病(FSE)、水貂的传染性水貂脑病(TME)、白斑羚和大种弯角羚的外来性有蹄类脑病(EUE)以及鹿和麋鹿的慢性消耗性疾病(CWD)。

14.如权利要求8或9所述的组合物在制备用于治疗或预防与蛋白质聚集相关的疾病的药物中的用途,其中当所述药物被施用至需要其的患者时,将治疗有效量的如权利要求8或9所述的组合物施用至需要其的患者。

15.如权利要求14所述的用途,其中所述与蛋白质聚集相关的疾病的特征在于存在至少一种蛋白质或其片段或衍生物的聚集形式,其中所述蛋白质选自由以下组成的组:朊病毒蛋白、淀粉样前体蛋白(APP)、 α -突触核蛋白、超氧化物歧化酶、tau、免疫球蛋白、淀粉样蛋白-A、转甲状腺素蛋白、 β 2-微球蛋白、胱抑素C、载脂蛋白A1、TDP-43、胰岛淀粉样多肽、ANF、凝溶胶蛋白、胰岛素、溶菌酶、纤维蛋白原、亨廷顿蛋白和共济失调蛋白以及具有Poly-Q段的其他蛋白。

16.如权利要求14或15所述的用途,其中所述与蛋白质聚集相关的疾病选自由以下组成的组:帕金森病、朊病毒病、阿尔茨海默病、多系统萎缩症、弥漫性路易体病、额颞痴呆症、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿病、脊髓小脑共济失调和其他Poly-Q疾病、遗传性脑淀粉样血管病、家族性淀粉样多发性神经病、原发性全身性淀粉样变性即AL淀粉样变性、反应性全身性淀粉样变性即AA淀粉样变性、II型糖尿病、注射局部性淀粉样变性、 β -2微球蛋白淀粉样变性、遗传性非神经性淀粉样变性和芬兰遗传性全身性淀粉样变性。

17.如权利要求16所述的用途,其中所述朊病毒病选自:散发性和遗传性克-雅病、变异型克-雅病(vCJD)、由牛海绵状脑病(BSE)的感染因子引起的人类紊乱、杰茨曼-斯脱司勒-史茵克综合征、致命家族性失眠、库鲁病、牛的BSE、绵羊和山羊的瘙痒病、猫的猫科海绵状脑病(FSE)、水貂的传染性水貂脑病(TME)、白斑羚和大种弯角羚的外来性有蹄类脑病(EUE)以及鹿和麋鹿的慢性消耗性疾病(CWD)。

3,5-二苯基-二唑化合物的水溶性衍生物

发明领域

[0001] 本发明涉及3,5-二苯基-二唑化合物的水溶性衍生物,其是用于治疗与蛋白质聚集相关的疾病和/或神经退行性疾病例如阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)和传染性海绵状脑病(TSE)例如克-雅病(Creutzfeldt-Jakob disease)(CJD)的有效治疗剂。

[0002] 背景

[0003] 已知大量神经和神经退行性疾病,其中许多目前是无法治愈的。所有常见的神经退行性疾病的特征在于特定蛋白在脑中的错误折叠、聚集和/或沉积。这些疾病包括医学状况例如帕金森病(PD)、阿尔茨海默病(AD)、传染性海绵状脑病(TSE)例如克-雅病(CJD)、老年痴呆症(senile dementia)、AA淀粉样变性、动脉硬化性痴呆症、亨廷顿病(HD)、脑血栓闭塞性脉管炎(cerebral thrombngitis obliteran)、路易体痴呆症(DLB)、多系统萎缩症(MSA)和许多其他疾病。2型糖尿病是又另一种疾病,其发病机制涉及有序蛋白聚集。

[0004] 在TSE的情况下,形成聚集体的错误折叠的蛋白质被称为“朊病毒(prion)”,其衍生自“蛋白质(proteinaceous)”和“感染性(infectious)”。因此TSE也被称为朊病毒病。TSE的发病机制中的中心事件是细胞朊病毒蛋白PrP^C转化为病理性PrP^{Sc}同种型,其积聚成大的蛋白质聚集体。朊病毒通过传递错误折叠的蛋白质状态而繁殖。当朊病毒进入健康生物体时,它诱导现有的、适当折叠的蛋白质转化成疾病相关的朊病毒形式。这些新形成的朊病毒本身然后可以继续转化更多的蛋白质;这触发产生大量朊病毒形式的链反应。所有已知的朊病毒都诱导淀粉样折叠的形成,其中蛋白质聚合成由紧密堆积的 β 折叠(β sheet)组成的聚集体。淀粉样聚集体是纤丝(fibril),在其末端生长,并且当断裂造成两个生长末端变成四个生长末端时复制。这种改变的结构是极其稳定的并且积聚在感染的组织中。针对朊病毒蛋白质描述的繁殖理论也可以应用于其他蛋白错误折叠紊乱(PMD)中的淀粉样蛋白的形成。

[0005] 另一类神经退行性疾病,即所谓的突触核蛋白病,其特征主要在于主要含有 α -突触核蛋白的蛋白质聚集体、低聚物、原纤丝(protofibril)和纤丝的细胞内积聚。在突触核蛋白病的情况下,据信对神经细胞的病理作用是由 α -突触核蛋白的低聚聚集体的形成和随后膜孔的形成引起的。突触核蛋白病的实例是帕金森病、路易体痴呆症(DLB)和多系统萎缩症。

[0006] 事实上,与大多数PMD的发病机制相关的蛋白质构象变化导致异常蛋白质的形成,这些异常蛋白质富含 β -折叠结构,部分地抵抗蛋白质水解,并且具有形成类似于朊病毒的较大级别的聚集体的高趋势。淀粉样蛋白的形成取决于错误折叠的蛋白质单体形成低聚核的缓慢相互作用,在低聚核周围发生更快的伸长阶段。低聚物种接种(seed)其自身生长的能力类似于朊病毒的自繁殖活性。

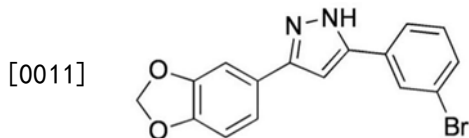
[0007] 这些在聚集期间出现的低聚物在文献中被描述为是导致细胞功能障碍和细胞死亡的主要毒性剂。导致细胞死亡的一种可能机制是由蛋白质聚集体引起的膜穿孔。为了治疗由患者组织中的蛋白质聚集引起的疾病,必须防止、减少或最好从组织中除去蛋白质聚集。

[0008] 在朊病毒病的情况下,这可以通过以干扰感染性蛋白质(PrP^{Sc})的形成和扩增为目

标的治疗方法来实现。来自细胞培养和体内研究的证据表明,在PrP^{Sc}的形成被抑制后,可以发生PrP^{Sc}的清除。因此,这种治疗策略在潜伏期(incubation period)的后期并且甚至在疾病的临床体征出现之后也是有效的,这对于在解决人类朊病毒病中使用是必要的。

[0009] 存在许多已经被示出在体外干扰PrP^{Sc}扩增方面是有效的化合物,例如吡啉衍生物、刚果红、卟啉/酞菁、Cp-60、 β -折叠状破坏肽(beta-sheet breaker peptide)和PrP的变体。然而,迄今为止,这些化合物中没有一种被成功地用于疾病治疗或作为先导化合物用于开发具有提高的治疗效力和药理学性质的化合物。

[0010] 在W02010/00372中,公开了化合物,其已示出在抑制蛋白质的聚集方面是有效的。基于强荧光靶扫描(SIFT)和测量 α -突触核蛋白(PD)和朊病毒蛋白(CJD)的聚集量的细胞测定的组合的宽筛选。在该筛选中,3,5-二苯基吡唑(DPP)化合物被证明是可以容易地通过有机合成修饰的高度活性的支架。合成了一批(array)该类中的约250种化合物,并且评估了这些化合物在模拟各种上述疾病(AD、CJD、PD)的动物模型中的口服可用性和功效。称为“anle138b”的具有以下结构的化合物:



[0012] 5-(3-溴苯基)-3-(3,4-亚甲基二氧基苯基)-1H-吡唑

[0013] 已经被证实在模拟帕金森病(PD)(1,2)、阿尔茨海默病(AD)(3)和克-雅病(CJD)(1,2)的动物模型中有效调节低聚物的形成。膜穿孔,其可能是低聚物引起的神经毒性的机制,可以被示出为被anle138b(1)抑制。

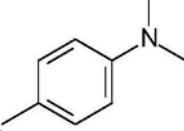
[0014] 由于蛋白质聚集持续发生并导致神经功能障碍和神经元丢失,因此神经保护治疗将需要长期应用治疗剂。这种治疗需要在长期给药的情况下和在有效化合物浓度下是无毒的。anle138b在治疗持续超过一年的情况下的无毒性已经在如上所述的几种小鼠模型中示出。为了使必要的口服剂量最小化并且仍然达到有效的化合物水平,治疗化合物也应当在口服应用之后被最有效地再吸收。已经示出,为了有效,治疗剂必须口服应用,并且随后被转移至肠道,在肠道中,治疗剂将被摄取并经由血流被输送到受蛋白质聚集影响的组织中。因此,化合物必须能够通过血脑屏障。为了有效,在摄取到血流中之前肠道中的化合物的浓度必须足够高。

[0015] 然而,虽然3,5-二苯基吡唑(DPP)衍生物已经被示出在抑制蛋白质的聚集方面是有效的,但是已经发现DPP衍生物的特征还在于它们在水溶液中的差的溶解度。例如,anle138b在水中具有0.2 μ M的溶解度。

[0016] 此问题在anle138b的情况下已经通过将化合物稀释在DMSO中并将稀释的化合物分散在油或花生酱中被解决。在DMSO中,1份的anle138b可以被溶解在2份的DMSO中。已经发现从这样的橄榄油/DMSO悬浮液中再吸收是高度有效的。该组合物被证明在小鼠和大鼠中是良好耐受的。然而,DMSO对于人类的口服应用是不可接受的。因此,必须研究可选择的应用。

[0017] 另一种方法是研磨干燥的化合物并将其与干燥的小鼠/大鼠食物混合。然而,这仅在小鼠中导致可接受的物质水平,而在大鼠中没有。药代动力学研究示出,大鼠不从干燥的食物中摄取该化合物。这种应用方式也不适合于人类患者的长期治疗。

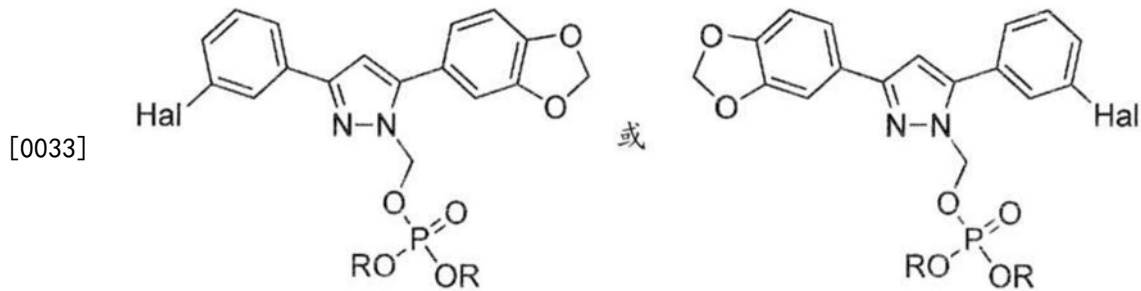
[0028] 其中X是  并且Hal是选自氯或溴的卤素,或者

[0029] 其中X是  并且Hal是溴;并且

[0030] 其中每个R独立地是氢或阳离子。

[0031] 2). 如1)所述的化合物,其中Y是N并且Z是-CH-。

[0032] 3). 如1)所述的化合物,所述化合物为



[0034] 其中Hal是选自氯或溴的卤素,优选地其中Hal是溴,并且其中每个R独立地选自氢或阳离子,优选地其中R是钠。

[0035] 4). 组合物,包含如1)至3)中任一项所述的异构体结构Ia和Ib的化合物中的一种或其混合物以及任选地药学上可接受的添加剂。

[0036] 5). 如1)至3)中任一项所述的化合物或如4)所述的组合物,其中至少一个R是选自钠、锂、钾和铵的阳离子,或乙醇胺、胆碱、赖氨酸、葡甲胺、哌嗪和氨丁三醇的质子化形式。

[0037] 6). 如5)所述的化合物或组合物,其中两个R都是钠。

[0038] 7). 如1)至6)中任一项所述的化合物或组合物,其中Hal是溴。

[0039] 8). 如1)至6)中任一项所述的化合物或组合物,其中Hal是氯。

[0040] 9). 如4)至8)中任一项所述的组合物,包含具有结构Ia的化合物和具有结构Ib的化合物的混合物。

[0041] 10). 如4)至9)中任一项所述的化合物或组合物,用于作为药物使用。

[0042] 11). 如4)至10)中任一项所述的化合物或组合物,用于在治疗或预防与蛋白质聚集相关的疾病中使用。

[0043] 12). 如11)所述的用于使用的化合物或组合物,其中所述与蛋白质聚集相关的疾病的特征在于存在至少一种蛋白质或其片段或衍生物的聚集形式,其中所述蛋白质选自由以下组成的组:朊病毒蛋白、淀粉样前体蛋白(APP)、 α -突触核蛋白、超氧化物歧化酶、tau、免疫球蛋白、淀粉样蛋白-A、转甲状腺素蛋白、 β 2-微球蛋白、朊抑素C、载脂蛋白A1、TDP-43、胰岛淀粉样多肽、ANF、凝溶胶蛋白、胰岛素、溶菌酶、纤维蛋白原、亨廷顿蛋白和共济失调蛋白以及具有Poly-Q段的其他蛋白。

[0044] 13). 如11)或12)所述的用于使用的化合物或组合物,其中所述疾病选自由以下组成的组:帕金森病、朊病毒病、阿尔茨海默病、多系统萎缩症、弥漫性路易体病、额颞痴呆症、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿病、脊髓小脑共济失调和其他Poly-Q疾病、遗传性脑淀粉样血管病、家族性淀粉样多发性神经病、原发性全身性淀粉样变性(AL淀粉样变性)、反应性全身

性淀粉样变性(AA淀粉样变性)、II型糖尿病、注射局部性淀粉样变性、 β -2微球蛋白淀粉样变性、遗传性非神经性淀粉样变性和芬兰遗传性全身性淀粉样变性。

[0045] 14).如13)所述的用于使用的化合物或组合物,其中所述朊病毒病选自:散发性和遗传性克-雅病、变异型克-雅病(vCJD)、由牛海绵状脑病(BSE)的感染因子引起的人类紊乱、杰茨曼-斯脱司勒-史茵克综合征、致命家族性失眠、库鲁病、牛的BSE、绵羊和山羊的瘙痒病、猫的猫科海绵状脑病(FSE)、水貂的传染性水貂脑病(TME)、白斑羚和大种弯角羚的外来性有蹄类脑病(EUE)以及鹿和麋鹿的慢性消耗性疾病(CWD)。

[0046] 15).一种治疗或预防与蛋白质聚集相关的疾病的方法,所述方法包括将治疗有效量的如1)至3)中任一项所述的化合物施用至需要其的患者。

[0047] 16).如15)所述的方法,其中所述与蛋白质聚集相关的疾病的特征在于存在至少一种蛋白质或其片段或衍生物的聚集形式,其中所述蛋白质选自由以下组成的组:朊病毒蛋白、淀粉样前体蛋白(APP)、 α -突触核蛋白、超氧化物歧化酶、tau、免疫球蛋白、淀粉样蛋白-A、转甲状腺素蛋白、 β 2-微球蛋白、胱抑素C、载脂蛋白A1、TDP-43、胰岛淀粉样多肽、ANF、凝溶胶蛋白、胰岛素、溶菌酶、纤维蛋白原、亨廷顿蛋白和共济失调蛋白以及具有Poly-Q段的其他蛋白。

[0048] 17).如15)或16)所述的方法,其中所述疾病选自由以下组成的组:帕金森病、朊病毒病、阿尔茨海默病、多系统萎缩症、弥漫性路易体病、额颞痴呆症、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿病、脊髓小脑共济失调和其他Poly-Q疾病、遗传性脑淀粉样血管病、家族性淀粉样多发性神经病、原发性全身性淀粉样变性(AL淀粉样变性)、反应性全身性淀粉样变性(AA淀粉样变性)、II型糖尿病、注射局部性淀粉样变性、 β -2微球蛋白淀粉样变性、遗传性非神经性淀粉样变性和芬兰遗传性全身性淀粉样变性。

[0049] 18).如17)所述的方法,其中所述朊病毒病选自散发性和遗传性克-雅病、变异型克-雅病(vCJD)、由牛海绵状脑病(BSE)的感染因子引起的人类紊乱、杰茨曼-斯脱司勒-史茵克综合征、致命家族性失眠、库鲁病、牛的BSE、绵羊和山羊的瘙痒病、猫的猫科海绵状脑病(FSE)、水貂的传染性水貂脑病(TME)、白斑羚和大种弯角羚的外来性有蹄类脑病(EUE)以及鹿和麋鹿的慢性消耗性疾病(CWD)。

[0050] 19).如1)至3)中任一项所述的化合物用于制备用于治疗或预防与蛋白质聚集相关的疾病的药物的用途。

[0051] 20).根据19)所述的用途,其中所述与蛋白质聚集相关的疾病的特征在于存在至少一种蛋白质或其片段或衍生物的聚集形式,其中所述蛋白质选自由以下组成的组:朊病毒蛋白、淀粉样前体蛋白(APP)、 α -突触核蛋白、超氧化物歧化酶、tau、免疫球蛋白、淀粉样蛋白-A、转甲状腺素蛋白、 β 2-微球蛋白、胱抑素C、载脂蛋白A1、TDP-43、胰岛淀粉样多肽、ANF、凝溶胶蛋白、胰岛素、溶菌酶、纤维蛋白原、亨廷顿蛋白和共济失调蛋白以及具有Poly-Q段的其他蛋白。

[0052] 21).根据19)或20)所述的用途,其中所述疾病选自由以下组成的组:帕金森病、朊病毒病、阿尔茨海默病、多系统萎缩症、弥漫性路易体病、额颞痴呆症、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿病、脊髓小脑共济失调和其他Poly-Q疾病、遗传性脑淀粉样血管病、家族性淀粉样多发性神经病、原发性全身性淀粉样变性(AL淀粉样变性)、反应性全身性淀粉样变性(AA淀粉样变性)、II型糖尿病、注射局部性淀粉样变性、 β -2微球蛋白淀粉样变性、遗传性非神

经性淀粉样变性和芬兰遗传性全身性淀粉样变性。

[0053] 22). 根据21)所述的用途,其中所述朊病毒病选自散发性和遗传性克-雅病、变异型克-雅病(vCJD)、由牛海绵状脑病(BSE)的感染因子引起的人类紊乱、杰茨曼-斯脱司勒-史茵克综合征、致命家族性失眠、库鲁病、牛的BSE、绵羊和山羊的瘙痒病、猫的猫科海绵状脑病(FSE)、水貂的传染性水貂脑病(TME)、白斑羚和大种弯角羚的外来性有蹄类脑病(EUE)以及鹿和麋鹿的慢性消耗性疾病(CWD)。

附图说明

[0054] 本发明还参照以下的附图来解释。

[0055] 图1示出了anle138b的前药sery433的HPLC分析的色谱图。

[0056] 图2示出了anle253b的前药anle423b的HPLC分析的色谱图。

[0057] 图3示出了在应用1mg剂量的前药sery433后在小鼠组织中的anle138b的浓度。

[0058] 图4示出了在应用前药sery433后在大鼠的血浆样品中的anle138b随时间的浓度。在实验中,向雄性Sprague Dawley大鼠施用以10mg/kg的标称剂量(nominal dose)的单次口服剂量的在PEG/Cremophor中的anle138b(“阶段1”)和在水溶液中的sery433(“阶段2”)。实验用三只被识别为“1M”、“2M”和“3M”的大鼠进行。

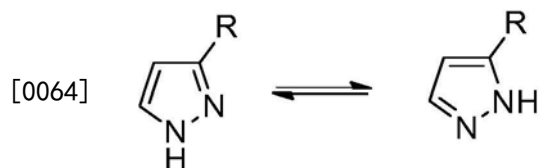
[0059] 定义

[0060] 在本描述和权利要求书中,将参考多个术语,其应当被定义为具有以下含义:

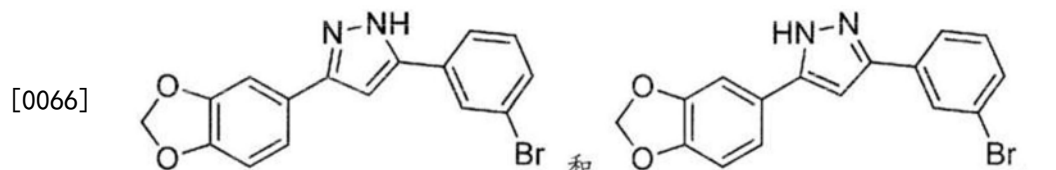
[0061] 本发明的上下文中的“3,5-二苯基-二唑化合物”指的是具有二唑芯的化合物,所述二唑芯在3位和5位、或在2位和4位、或在2位和5位被两个被取代的或未被取代的苯基基团取代。二唑芯衍生自吡唑或衍生自咪唑。换句话说,本发明的3,5-二苯基-二唑化合物特别是3,5-二苯基-吡唑(DPP)化合物或2,4-二苯基-咪唑(DPI)或2,5-二苯基咪唑(DPI)化合物,其中苯基基团可以是被取代的或未被取代的。无论何时公开DPP化合物,应当理解为,只要上下文允许,该公开内容也适用于相应的DPI化合物。

[0062] 本发明的化合物的二唑芯可以以两种互变异构形式存在。每种单独的互变异构体形式以及两者的混合物被术语“二唑”涵盖。

[0063] 术语“anle138b”被用于描述也被称为5-(3-溴苯基)-3-(3,4-亚甲基二氧基苯基)-1H-吡唑的治疗剂。该化合物的吡唑环以两种互变异构形式存在:



[0065] 因此,“anle138b”可以由以下结构式描述:



[0067] 无论何时在说明书中公开了上述结构中的一种,另一种结构以及两种结构的混合物都意图被涵盖。这同样适用于描述本发明的二唑衍生物的其他结构式,例如本发明的DPP

衍生物,例如sery335b和anle253b。

[0068] 术语“与蛋白质聚集相关的疾病”被用于特征在于存在至少一种蛋白质或其片段或衍生物的聚集形式的所有状况、紊乱或疾病,其中所述蛋白质优选地选自由以下组成的组:朊病毒蛋白、淀粉样前体蛋白(APP)、 α -突触核蛋白、超氧化物歧化酶、tau、免疫球蛋白、淀粉样蛋白-A、转甲状腺素蛋白、 β 2-微球蛋白、胱抑素C、载脂蛋白A1、TDP-43、胰岛淀粉样多肽、ANF、凝溶胶蛋白、胰岛素、溶菌酶、纤维蛋白原、亨廷顿蛋白和共济失调蛋白以及具有Poly-Q段(stretch)的其他蛋白。

[0069] 术语“朊病毒病”或TSE被用于由朊病毒的形成引起的所有状况、紊乱或疾病,朊病毒即错误折叠并诱导其他蛋白质分子的错误折叠的蛋白质。用于朊病毒病的实例包括散发性和遗传性克-雅病、变异型克-雅病(vCJD)、由牛海绵状脑病(BSE)的感染因子引起的人类紊乱、杰茨曼-斯脱司勒-史茵克综合征(Gerstmann-**Sträussler**-Scheinker syndrome)、致命家族性失眠和库鲁病。其他哺乳动物的TSE包括牛的BSE、绵羊和山羊的瘙痒病、猫的猫科海绵状脑病(FSE)、水貂的传染性水貂脑病(TME)、白斑羚(Nyala)和大种弯角羚(Greater Kudu)的外来性有蹄类脑病(EUE)以及鹿和麋鹿的慢性消耗性疾病(CWD)。

[0070] 术语“神经退行性疾病”包括例如帕金森病(PD)、阿尔茨海默病(AD)、传染性海绵状脑病(TSE)例如克-雅病(CJD)、老年痴呆症、AA淀粉样变性、动脉硬化性痴呆症、亨廷顿病(HD)、脑血栓闭塞性脉管炎、路易体痴呆症(DLB)、额颞痴呆症、肌萎缩性侧索硬化症、脊髓小脑共济失调和其他Poly-Q疾病、多系统萎缩症(MSA)、遗传性脑淀粉样血管病、家族性淀粉样多发性神经病、原发性全身性淀粉样变性(AL淀粉样变性)、反应性全身性淀粉样变性(AA淀粉样变性)、II型糖尿病、注射局部性淀粉样变性、 β -2微球蛋白淀粉样变性、遗传性非神经性淀粉样变性和芬兰遗传性全身性淀粉样变性的疾病或状况。

[0071] 最普遍的是阿尔茨海默病,其目前在欧洲、日本和美国影响约700万患者,并且其标志是形成阿尔茨海默斑块的蛋白A β 和形成神经原纤维缠结的tau蛋白的聚集。tau的聚集也是进行性核上性麻痹(PSP)、皮质基底变性(CBD)和额颞痴呆症(包括Morbus Pick)的原因。

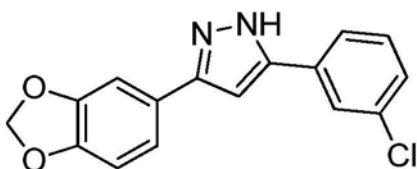
[0072] 帕金森病目前影响上文列出的国家中的约350万患者,并且其特征是 α -突触核蛋白的聚集形成路易体。多系统萎缩症(MSA)和路易体病(LBD)也与 α -突触核蛋白的聚集有关。

[0073] 克-雅病在欧洲作为散发性形式较少流行,其中每年约有500名新患者。新的屠宰规则已经或多或少地根除青少年CJD的发生。与蛋白质的聚集相关的另外的神经退行性疾病是亨廷顿病(HD)以及肌萎缩性侧索硬化症(ALS)。

[0074] 术语“蛋白质错误折叠紊乱”(PMD)或蛋白质构象病(proteopathy)被用于描述其中某些蛋白质变得结构异常并且从而扰乱身体的细胞、组织和器官的功能的疾病、紊乱或状况。除了上文提及的朊病毒病和神经退行性疾病(其中神经元是受影响的细胞)之外,其他细胞类型也可以受到蛋白质错误折叠的影响。一个实例是2型糖尿病,其中蛋白质胰淀素,也称为“胰岛淀粉样多肽(IAPP),是糖尿病相关的胰岛淀粉样沉积物的主要组分。

[0075] 术语“前药”被用于描述用于以药理学无活性形式施用至患者的化合物,该药理学无活性形式然后通过正常代谢过程被转化为活性形式。因此,“前药”是药物的前体化学化合物。本发明的衍生物被用作前药。

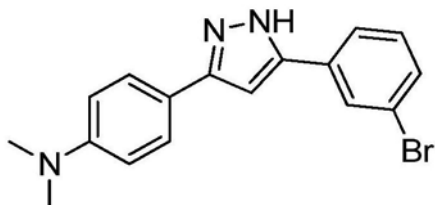
[0086]



[0087] 5-(3-氯苯基)-3-(3,4-亚甲基二氧基苯基)-1H-吡唑

[0088] Anle253b,其甚至比anle138b更少溶解,由以下结构定义:

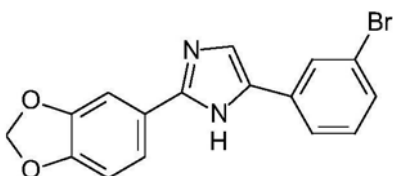
[0089]



[0090] 5-(3-溴苯基)-3-(4-二甲基氨基苯基)-1H-吡唑

[0091] Sery345由以下结构定义:

[0092]

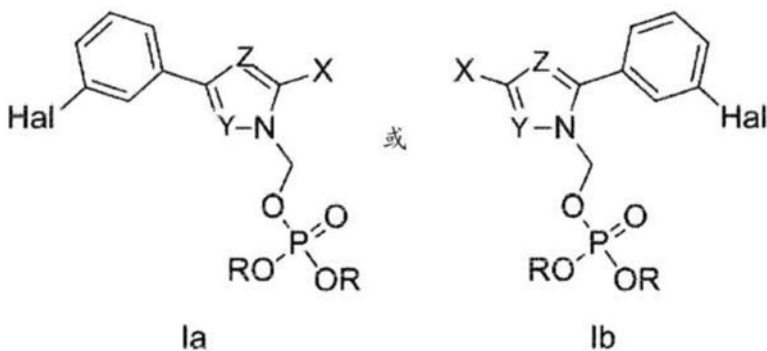


[0093] 2-(1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-5-(3-溴苯基)-1H-咪唑

[0094] 已知这些化合物在治疗涉及蛋白质聚集的疾病中的功效。例如,Anle138b具有恢复神经元的功能性的能力(1,2)。然而,这些化合物的特征还在于它们在水中非常低的溶解度,这在用于口服施用的医学制剂中是更少期望的。本发明现在提供对于在人类中口服使用是稳定的且适合的前药的衍生物。

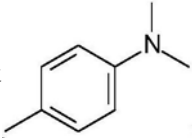
[0095] 发明人惊奇地发现,在3,5-二苯基-吡唑或3,5-二苯基-咪唑化合物的二唑环中的一个氮上磷酸甲酯的取代改进了水溶性而不损害稳定性。根据本发明的这种化学改性导致提供这种有价值的治疗剂的前药,其由以下异构体结构定义:

[0096]

[0097] 其中Y和Z中的一个为N,并且另一个为CR²;

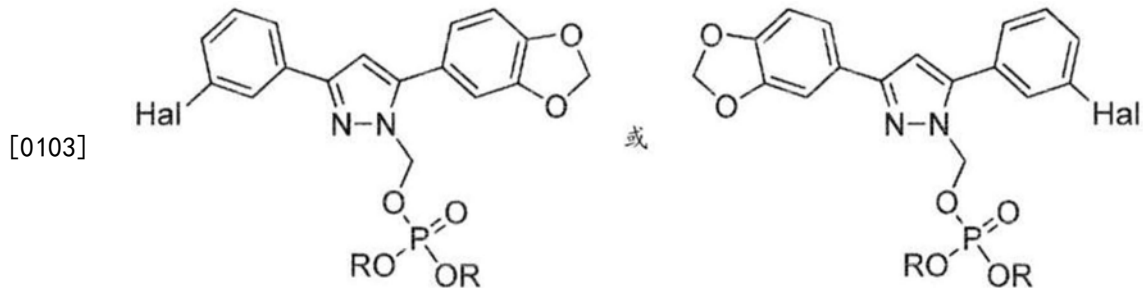
[0098] 其中R²选自氢、C₁₋₄烷基、被至少一个卤素取代的C₁₋₄烷基;和C₆₋₁₀芳基,其中芳基环可以任选地被C₁₋₄烷基或卤素取代;

[0099] 其中X是  并且Hal是选自氯或溴的卤素,或者

[0100] 其中X是  并且Hal1是溴;并且

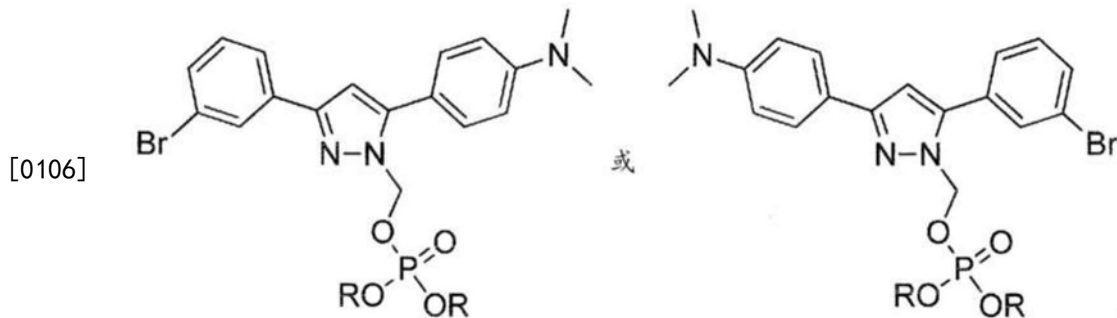
[0101] 其中每个R独立地是氢或阳离子。

[0102] 在优选的实施方案中,本发明的化合物由以下异构体结构定义:



[0104] 其中Hal1是选自氯或溴的卤素,并且其中每个R独立地选自氢或阳离子。

[0105] 在另一个优选的实施方案中,本发明的衍生物是具有以下异构体结构的anle253b的前药:



[0107] 其中每个R独立地选自氢或阳离子。

[0108] 阳离子可以是对于这类化合物是药学上可接受的任何阳离子。优选地,阳离子是单价阳离子。实例是钠、锂、钾、铵,特别是钠。用于与本发明的化合物的磷酸酯基团相容的基团的另外的实例包括结构为RR' R''N的基团,例如乙醇胺、胆碱、赖氨酸、葡甲胺、哌嗪和以其质子化形式RR' R''NH⁺的氨丁三醇。在本发明的化合物中,两个R都可以是氢,两个R都可以是阳离子(相同或不同的阳离子),或者一个R可以是氢,并且另一个可以是阳离子。二价阳离子例如Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺或三价阳离子例如Al³⁺不是优选的,因为产生的盐是更少水溶性的。

[0109] 此外,本发明的磷酸甲酯衍生物的游离酸形式(R=H)也适合作为前药。

[0110] 本发明还提供药物组合物,所述药物组合物包含由以下异构体结构Ia和Ib中的一种定义的化合物中的至少一种:

胶化的淀粉及其组合。

[0118] 合适的崩解剂包括而限于羧甲基纤维素钙(CMC-Ca)、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、交联的PVP(例如交聚维酮、Polyplasdone®或Kollidon®XL)、海藻酸、海藻酸钠、瓜尔胶、交联的CMC(交联羧甲基纤维素钠,例如Ac-Di-Sol®)、羧甲基淀粉-Na(羟乙酸淀粉钠)(例如Primojel®或Explotab®)。

[0119] 合适的润滑剂包括而限于硬脂酸镁、硅酸铝或硅酸钙、硬脂酸、氢化蓖麻油、滑石、山嵛酸甘油酯、富马酸硬脂酸钠及其组合。

[0120] 合适的助流剂包括而限于胶体SiO₂(例如Aerosil®200)、三硅酸镁、粉状纤维素、滑石及其组合。

[0121] 因此,片剂可以含有赋形剂例如微晶纤维素、乳糖、柠檬酸钠、碳酸钙、磷酸氢钙和甘氨酸,崩解剂例如淀粉(例如玉米、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,以及造粒粘合剂例如聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟丙基纤维素(HPC)、蔗糖、明胶和阿拉伯胶。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。

[0122] 类似类型的固体组合物也可以被用作明胶胶囊中的填料。在这方面优选的赋形剂包括乳糖、淀粉、纤维素或高分子量聚乙二醇。

[0123] 此外,如本文所述的药物组合物/剂型(dosage form)可以使用采用膜包衣或改性的释放包衣,使用本领域技术人员熟知的包衣方法,使用可商购的包衣材料,例如成膜聚合物、遮光剂、着色剂和增塑剂的混合物进行包衣。

[0124] 另外的合适的赋形剂的清单也可以在教科书中找到,所述教科书例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,(Alfonso R.Gennaro编辑;Mack Publishing Company,Easton,PA,1990);Remington:the Science and Practice of Pharmacy,第19版,(Lippincott,Williams&Wilkins,1995);Handbook of Pharmaceutical Excipients,第3版,(Arthur H.Kibbe编辑;Amer.Pharmaceutical Assoc,1999);the Pharmaceutical Codex:Principles and Practice of Pharmaceutics,第12版(Walter Lund编辑;Pharmaceutical Press,London,1994);The United States Pharmacopeia:The National Formulary(United States Pharmacopeial Convention);以及Goodman and Gilman's:the Pharmacological Basis of Therapeutics,(Louis S.Goodman and Lee E.Limbird编辑;McGraw Hill,1992),其公开内容通过引用据此并入。

[0125] 如本文所述的剂型可以根据本领域技术人员熟知的方法配制,例如如在“Pharmazeutische Technologie”,第11版,Deutscher apoetherker Verlag 2010,或“Pharmazeutische Techologie”,第9版,Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart,2012中描述的。

[0126] 考虑到个体患者的临床状况、药物组合物的递送部位、施用的方法、施用的时间表和从业人员已知的其他因素,药物组合物将以与良好医疗实践一致的方式配制和给药。因此,用于本文目的的药物组合物的“治疗有效量”由这些考虑因素确定。

[0127] 典型地,医生将确定将最适合于个体受试者的实际剂量。对于任何特定个体的特定剂量水平和剂量频率可以变化,并且将取决于多种因素,包括所使用的特定化合物、施用

的方式和时间、特定状况的严重程度以及经历治疗的个体(年龄、体重、一般健康状况、性别等)。

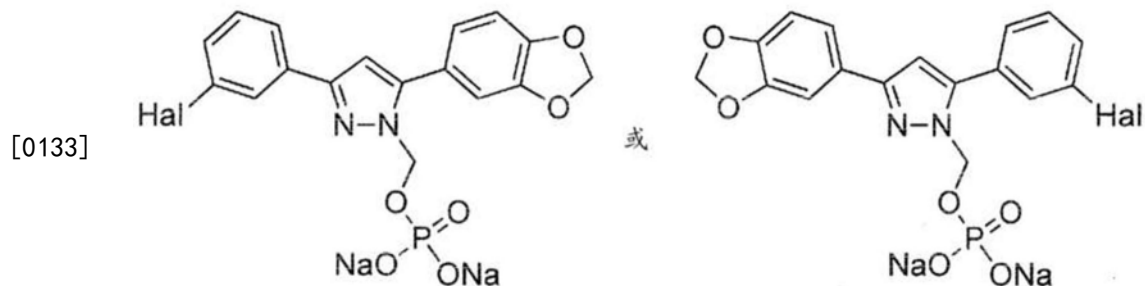
[0128] 药物组合物优选地以单位剂型提供。本发明的化合物典型地以治疗有效量施用。该量没有特别限制,并且用于施用至人类(约70kg体重)的根据本发明的化合物的建议剂量为每单位剂量约10mg至约1000mg、优选地约50mg至约500mg的活性成分。单位剂量可以例如每天施用1到4次。所述剂量将取决于施用的途径。将理解,可能需要根据患者的年龄和体重以及待治疗的状况的严重程度对剂量进行常规变化。精确的剂量和施用的途径最终将由主治医师决定。

[0129] 所述组合物可以包含本发明的化合物的一种异构体形式或两种异构体形式。该组合物也可以包含多于一种的化合物,并且组合物中使用的化合物中的任一种可以是两种异构体中的一种或其混合物。因此,用于治疗上文提及的疾病的药物组合物可以包含异构体中的一种或两种异构体的混合物。两种异构体形式都在体内被转化成生物活性药物。

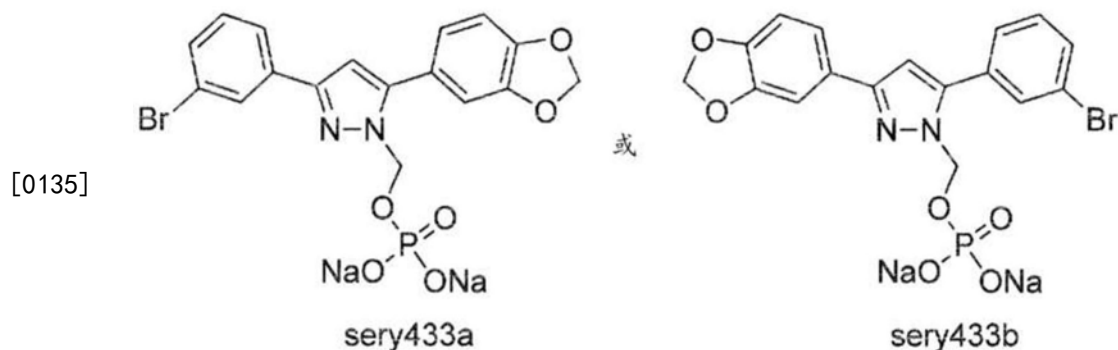
[0130] 在一种实施方案中,本发明化合物以溶解的形式提供在水溶液中。在本发明中,“溶解的形式”意指本发明化合物在室温(例如25°C)以所选的浓度在溶剂中是完全溶解的,使得通过肉眼不能看到未溶解的化合物。

[0131] 已经发现磷酸二钠衍生物是稳定的并且在脑和血液中产生高水平的活性化合物。

[0132] 在一种优选的实施方案中,化合物是具有以下结构之一的磷酸二钠或其混合物:



[0134] 在优选的实施方案中,本发明的衍生物是治疗剂anle138b的甲基磷酸酯二钠,即如上所示的化合物,其中Hal是氯或溴。前一种衍生物被称为sery335b,后一种衍生物被称为sery433。两者都可以呈异构体之一的形式,或者可以是两种异构体的混合物。异构体sery433a或sery433b如下所示:



[0136] 在优选的实施方案中,sery433是sery433a和sery433b的异构体混合物,例如根据通过2D-NOESY NMR获得的实验数据,sery433b:sery433a的比率=2:3。两种异构体形式都在体内被转化成生物活性药物。

[0137] 已经令人惊奇地发现,根据本发明的化学改性提供了具有以下有利特性的治疗化

合物:

- [0138] • 通过正常代谢过程有效转化为活性形式,
- [0139] • 在正常储存条件下的稳定性,
- [0140] • 在水中的改进的溶解度,
- [0141] • 活性化合物的改进的生物利用度,
- [0142] • 无毒性,和
- [0143] • 在从口腔通过到肠道期间的稳定性。

[0144] 由于改进的在水中的溶解度以及提高的生物利用度,因此可以以显著较小体积的药学上可接受的添加剂提供本发明的化合物。这改进了患者的依从性。此外,可以采用通常的药学上可接受的添加剂。与此相反,在anle138b的情况下,需要特殊添加剂(例如cremaphore),以便施用这种高度亲脂性化合物。因此,本发明的化合物可以被有利地用于长期应用。最后,由于使用标准添加剂,因此本发明的化合物可以容易地以标准剂型例如片剂、丸剂或粉末(包括用于溶解的粉末)提供,并且不需要以更复杂的剂型例如胶囊提供它们。

[0145] 如从下文呈现的实施例中可以看出,若干其他前药方法都失败,并且因此完全令人惊讶的是,用本文要求保护的化合物可以获得上文提及的优点。

[0146] 本发明的前药是改性的3,5-二苯基-二唑衍生物,其特征在于与母体化合物相比它们在水溶液中的改进的溶解度。在优选的前药sery433的情况下,实现了比在anle138b/赋形剂施用的情况下高4倍的anle138b的暴露。因此,对高剂量添加剂不耐受的缺点被避免,并且可以实施需要更少和/或更小胶囊/片剂的有利施用方案。

[0147] 本发明的前药的特征在于在水中非常高的溶解度(参见实施例8)。本发明的前药的特征还在于它们在水中的稳定性(参见实施例9)。

[0148] 当使用本发明的衍生物时,治疗活性化合物以治疗有用的量存在于脑和血液中。在不受理论的束缚的情况下,假定活性治疗化合物通过膜结合的肠碱性磷酸酶(IAP)从本发明的前药中释放,并且因此接近肠道上皮,在肠道上皮中其被直接转移到血流中。可能地,化合物以主要单分散的形式释放,其然后可以从肠道被摄取到血液中。本发明的前药的药代动力学特性导致活性化合物在小鼠和大鼠中的脑和血液中的治疗有用水平(参见实施例10和实施例11)。最重要的是,本发明的前药sery433的药代动力学评价揭示暴露的显著改善,如由AUC和C_{max}值所示出的。具体而言,与在赋形剂PEG/Cremophor中的anle138b的应用相比,前药sery433的施用导致anle138b全身性暴露,在C_{max}和AUC方面,在前药sery433的情况下显著增加为约4倍高(参见图4)。

[0149] 例如,活性化合物anle138b通过由膜结合的肠碱性磷酸酶(IAP)酶促裂解来自化合物的磷酸酯基团而在肠壁处从前药sery43释放。不受理论的束缚,预期血液和脑中的高水平的活性化合物是可能的,因为在肠壁处活性化合物的浓度低于导致活性化合物沉淀的浓度。此外,预期IAP在裂解后没有将活性治疗化合物释放到肠道的腔中,而是保持该化合物直到其到达肠道膜上并穿过肠道膜用于被动运输到血液中。

实施例

[0150] 本发明的优选实施方案在以下实施例中概述,这些实施例不应被解释为限制本发

明的范围或精神。

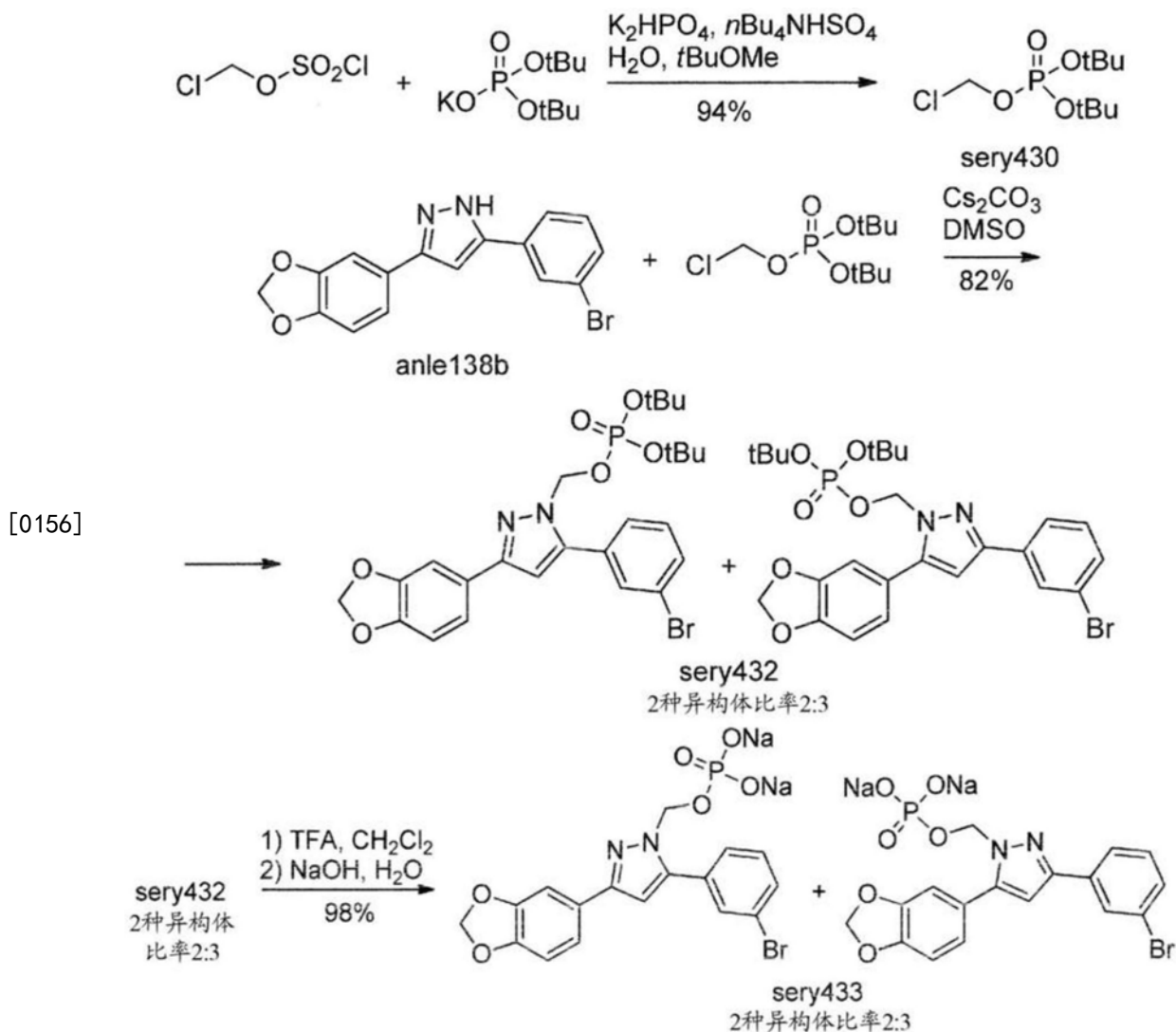
[0151] 存在增溶亲脂性化合物以使化合物是水溶性的(即,使其带电)的各种理念。关于这样的方法的最近概述由Müller在Chem.Biodiversity(7)中给出。在实施例中,已经测试了各种理念,其中大多数没有导致有用的产品。

[0152] 在下文的实施例中,举例说明了本发明的衍生物的制备和用于比较的产生前药的另外的方法。

[0153] 材料和方法

[0154] 除非另有说明,否则所有起始材料和溶剂均购自ABCR、Acros、Alfa Aesar、Fluorochem、Sigma-Aldrich或Merck,并且按原样使用。熔点在Stuart Scientific(BIBBY, 英国)熔点设备上使用开放玻璃毛细管确定并且未校正。薄层色谱法(TLC):Macherey-Nagel预涂布的片材、0.25mm ALUGRAM® SIL G/UV254板,用UV检测和/或通过用10wt%乙醇磷钼酸试剂炭化、随后在200°C加热。快速柱色谱法通过使用Merck硅胶60(0.063-0.100mm)进行。分析型和制备型高效液相色谱法(HPLC)通过使用具有Waters 996光电二极管阵列检测器的Waters HPLC系统进行。所有分离均涉及在水中的0.1%三氟乙酸(TFA)(v/v)(溶剂A)和在乙腈中的0.1%TFA(溶剂B)的流动相。HPLC通过使用反相(RP)柱Eurospher RP 18, 100Å, 5µm, 250×4.6mm(分析型)和250×16mm(制备型)在1mL·min⁻¹(分析型)和7mL·min⁻¹(制备型)的流速下进行。电喷雾电离质谱法(ESI-MS)和液相色谱法/质谱法(LC/MS)分析是通过使用Waters Micromass ZQ 4000质谱仪结合上述Waters HPLC设备获得的。高分辨率质谱(HRMS)通过使用Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL hybrid FTMS质谱仪记录,并且以m/z报道。NMR光谱通过使用装备有TXI HCN z-梯度探针的400MHz Bruker Avance光谱仪(Bruker AG, Rheinstetten, 德国)在298K的温度记录。所有光谱都通过使用TOPSPIN2(Bruker AG, Karlsruhe, 德国)来处理。¹H NMR化学位移(δ)相对于作为内部标准的CHCl₃和[D₅]DMSO以百万分率(ppm)报告。数据报告如下:化学位移、多重性(s=单峰、d=双峰、t=三重峰、b=加宽、m=多重峰)、耦合常数(J,以Hz给出)、积分。¹³C NMR化学位移(δ)相对于作为内部标准的CDCl₃和[D₅]DMSO以百万分率(ppm)报告。以下实验用于记录化合物的共振:¹H-1D、¹³C-1D NMR光谱和¹³C-APT(具有1/145秒的单J演化时间的附接质子测试,处理光谱使得季铵和亚甲基基团具有正号,并且甲基和次甲基基团具有负号)。为了解析¹H和APT光谱中的共振重叠和恢复不可检测的共振,针对一些化合物记录了2D-[¹³C, ¹H]-HSQC(异核单量子相干)、2D-[¹³C, ¹H]-HMBC(异核多键相关)和2D-NOESY。1,3-二芳基丙烷-1,3-二酮在图中呈现为二酮,尽管烯醇形式在光谱中占优势的事实。

[0155] 实施例1:Sery433(一种待被IAP裂解的anle138b的前药)的合成



[0157] 磷酸二叔丁基氯甲基酯 (sery430)

[0158] 化合物sery433根据公开的方案(7)制备。在0℃下在25分钟内在连续剧烈搅拌的情况下向二叔丁基磷酸酯钾(35g, 141mmol)、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (127g, 557mmol)、 $n\text{-Bu}_4\text{NHSO}_4$ (4g, 11mmol)、 H_2O (125ml) 和 $t\text{BuOMe}$ (170ml) 的混合物中逐滴加入在 $t\text{BuOMe}$ (35ml) 中的氯甲基氯代硫酸酯(35g, 212mmol) 的溶液。在添加完成后, 在室温继续搅拌持续2小时(如果内部温度超过30℃, 则冷却反应混合物)。反应混合物用 H_2O (350ml) 和 $t\text{BuOMe}$ (200ml) 猝灭, 分离有机相, 用1M K_2HPO_4 水溶液(200ml)、水(200ml)、盐水(50ml) 洗涤, 并用 Na_2SO_4 干燥。在过滤硫酸钠后, 向溶液中加入 $n\text{-Bu}_3\text{N}$ (3ml), 并将溶液在减压下浓缩以提供作为油的产物(34.4g, 94%)。向产物中加入另外一部分 $n\text{-Bu}_3\text{N}$ (3ml), 以便增加在冷冻箱(-21℃) 中储存期间的稳定性。

[0159] Sery432

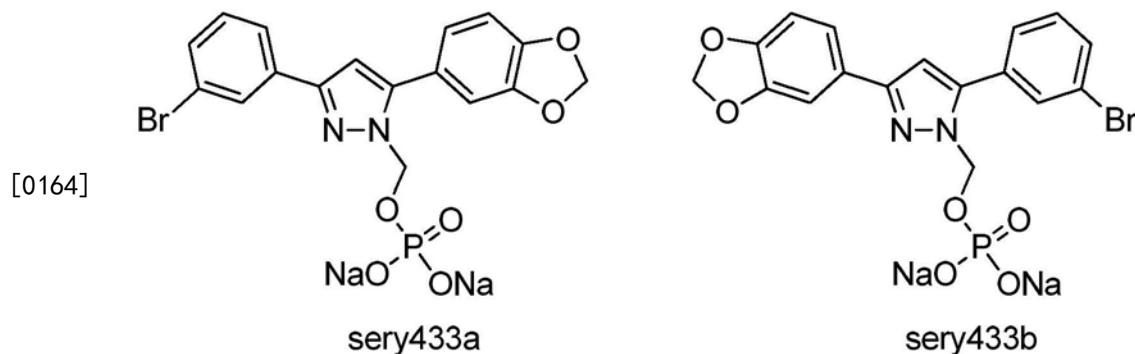
[0160] 向在DMSO (200ml) 中的anle138b (1) (25g, 72.8mmol)、 Cs_2CO_3 (35.6g, 109mmol) 的混合物中, 一次性加入二叔丁基氯甲基磷酸酯(28.1g, 109mmol)。在室温搅拌持续5小时后, 反应混合物用水(1200ml) 稀释并用二乙醚(500+200+100ml) 提取。合并的有机级分用水(500ml)、盐水(100ml) 洗涤并用 Na_2SO_4 干燥。在过滤硫酸钠后, 将溶液在减压下浓缩, 以提供作为油的产物(总共49.5g, 40.8g sery432, 82%, 以比率2:3的两种异构体的混合物)。基

于¹H NMR光谱,产生的产物还含有10.5%的sery430和7.1%的Bu₃N。产物被用于下一步骤而无需进一步纯化。Sery432是以比率2:3的异构体的混合物(¹H NMR)。

[0161] Sery433

[0162] 在0℃在5分钟内在连续的剧烈搅拌的情况下,向在DCM(400ml)中的sery432(34.4g,60.9mmol)的冷却溶液中加入TFA(23.5ml)。在2小时后,加入另外一部分TFA(23ml),并将反应混合物在0℃搅拌持续8小时。在用冷甲苯(300ml)稀释后,反应混合物在0℃在减压下浓缩,残余物与冷甲苯(300ml)混合,并在0℃再次浓缩。(DCM在50-100毫巴蒸发,TFA和甲苯用高真空旋转蒸发器蒸发)。产生的混合物用冷乙腈(300ml)稀释,并在0℃搅拌持续1小时。滤出白色沉淀并在减压下干燥,以提供以酸形式的sery433(总共31.0g,29.0g以酸形式的sery433和2g乙腈)。向以酸形式的粗sery433中加入1M NaOH水溶液(129ml,129mmol,2eq)和水(80ml),滤出产生的溶液(Millipore Express Plus过滤器),并且滤液被冷冻干燥,以提供作为白色粉末的sery433二钠盐(30.0g,99%,以比率2:3的两种异构体的混合物)。

[0163] sery433的两种异构体,本发明的衍生物,如下所示。



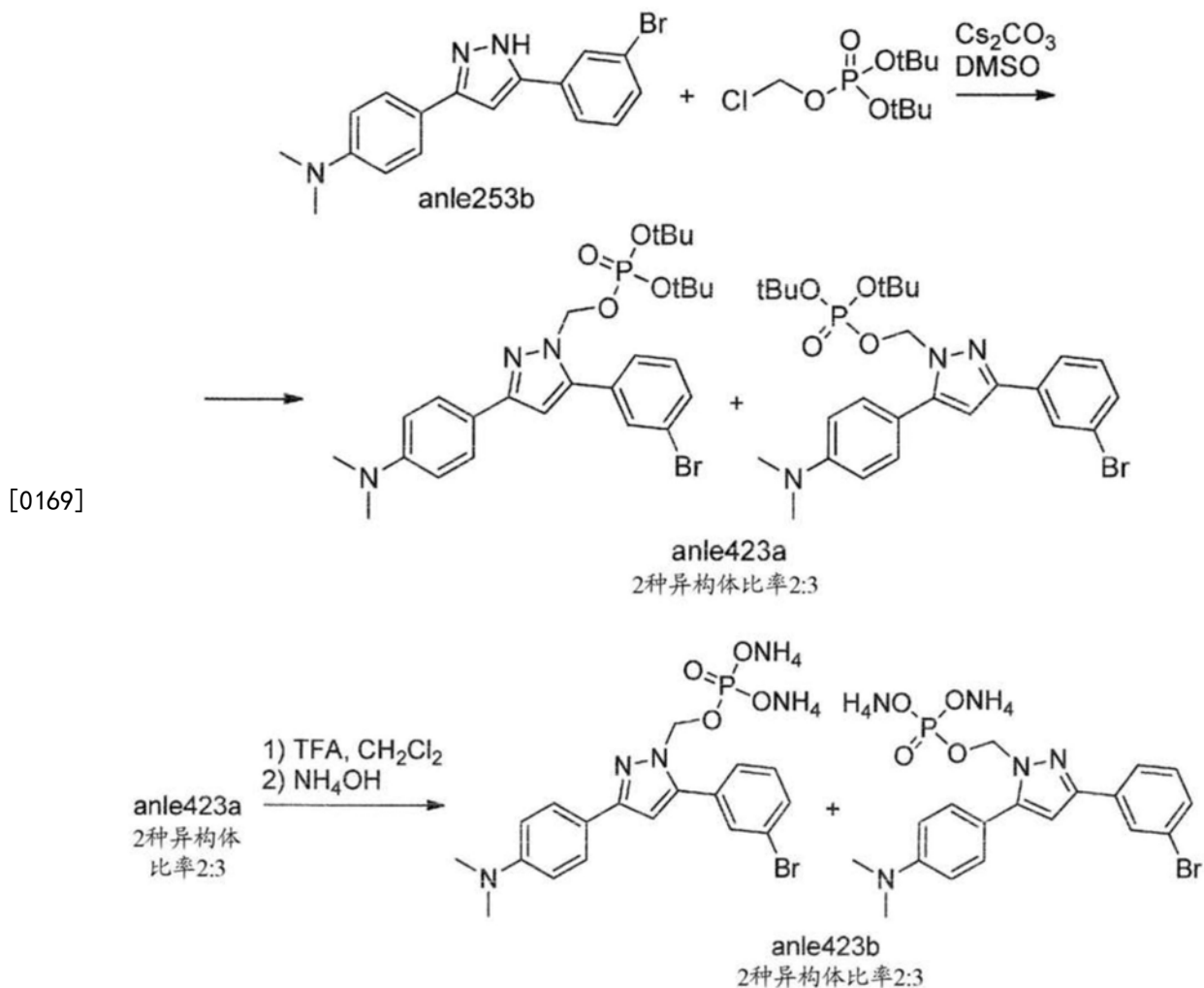
[0165] 已经制备了另外的前药:

[0166] 化合物在水溶液中的稳定性通过NMR确定。将含有在D₂O(0.5ml)中的化合物(5mg)的溶液的样品在室温孵育持续1天;每12h记录并分析¹H谱,即0h、12h、24h时间点。结果总结在下文的表中。

[0167]

化合物	稳定性测试的结果
sery433	稳定的
sery453	稳定的
anle423b铵盐	稳定的

[0168] 实施例2:anle423b(anle253b的前药)的合成



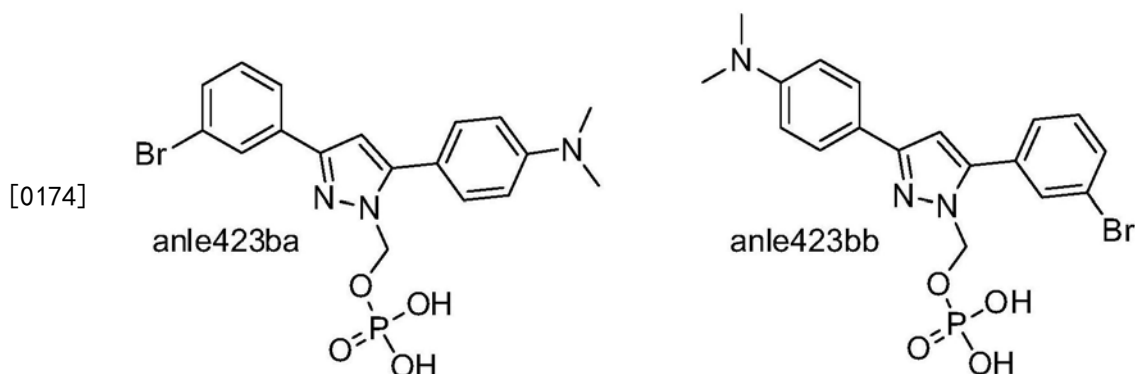
[0170] Anle423a

[0171] 向在DMSO (5ml) 中的anle138b (500mg, 1.46mmol)、 Cs_2CO_3 (620mg, 1.9mmol) 的混合物中一次性加入二叔丁基氯甲基磷酸酯 (525mg, 1.9mmol)。在室温搅拌15小时后,通过薄层色谱法(TLC) (SiO_2 , 己烷:EtOAc=2:1, R_f 析出物 (educt) 0.33, R_f 产物0.18) 示出反应的完全。将反应混合物用水 (50ml) 稀释并且用乙酸乙酯 ($2 \times 15\text{ml}$) 提取。合并的提取物用水 (10ml)、盐水 (10ml) 洗涤,用 Na_2SO_4 干燥,并且在减压下浓缩,以提供作为油的产物 (1.08g)。产物被用于下一步骤而无需进一步纯化。

[0172] Anle423b (二铵盐)

[0173] 在 0°C 在连续的剧烈搅拌的情况下在1分钟内,向在DCM (10ml) 中的anle423a (1.08g) 的冷却溶液中加入TFA (2ml),并将反应混合物在 0°C 搅拌持续8小时。过滤混合物 (GHP 0.45 μm),用甲苯 (10ml) 稀释,并在 20°C 在减压下浓缩,将残余物与甲苯 (10ml) 混合,并在 20°C 再次浓缩。(DCM在50-100毫巴蒸发,TFA和甲苯用高真空旋转蒸发器蒸发)。产生的玻璃状粘稠残余物用冷丙酮 (30ml) 研磨,在 0°C 搅拌持续1小时。滤出白色沉淀,用丙酮 (10ml) 洗涤并在减压下干燥,以提供作为淡黄色粉末的以酸形式的anle423b (448mg, 0.99mmol, 68%, 两种异构体的混合物,根据2D-NOESY NMR实验,比率anle423ba:anle423bb=3:2)。向anle423b (二酸, 156mg, 0.345mmol) 中加入水 (3ml) 和25% NH_4OH (12.6M, 150 μL , 1.89mmol)。搅拌混合物直到溶解完全,将产生的溶液冷冻并冷冻干燥,以提供作为

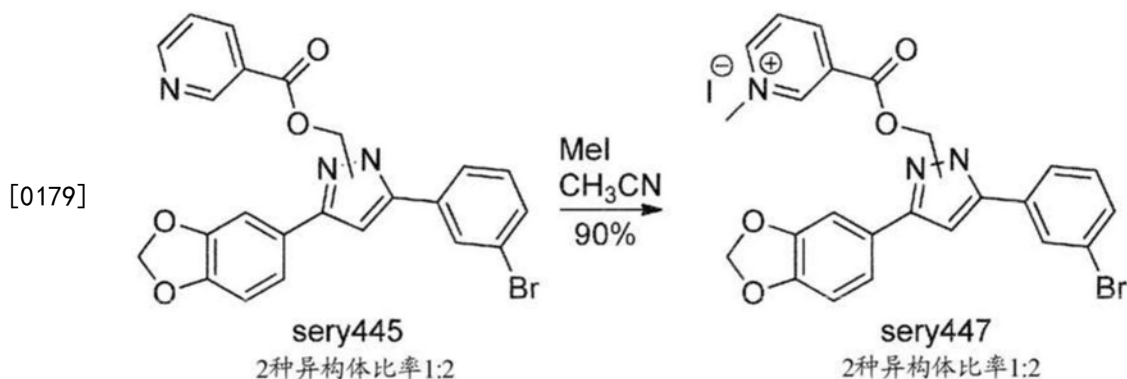
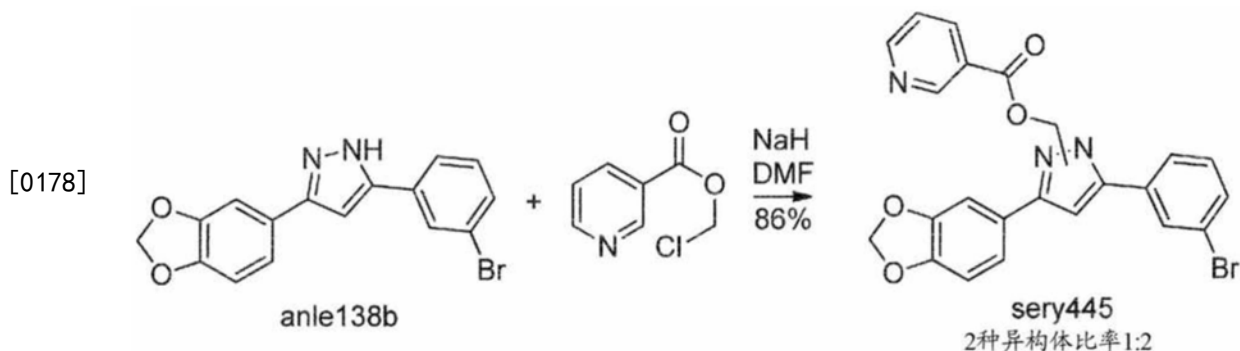
淡黄色粉末的二铵盐anle423b (161mg, 331 μ mol, 96%, 两种异构体的混合物, 其中比率anle423ba:anle423bb=3:2)。



[0175] 比较实施例3:待被酯酶裂解的sery447的合成

[0176] 被测试的一种方法是引入基团,所述基团可以被酯酶裂解并且应该经由阳离子提供稳定性。

[0177] 因此,合成另外的潜在的anle138b的前药,被称为sery447:



[0180] 烟酸氯甲基酯

[0181] 根据公布的方案(8)从烟酸开始制备化合物sery447,并通过硅胶上的快速柱色谱法(CH_2Cl_2)纯化以提供作为黄色油的烟酸氯甲基酯(收率55%)。TLC(CH_2Cl_2):RF=0.2。

[0182] Sery445

[0183] 在室温在连续的剧烈搅拌的情况下在10分钟内,向在无水DMF (10ml)中的氢化钠(220mg, 5.5mmol; 在矿物油中的60%悬浮液)的悬浮液中加入在无水DMF (5ml)中的anle138b (1.71g, 5mmol)的溶液。混合物在室温搅拌持续30分钟,并且然后逐滴加入在无水DMF (5ml)中的烟酸氯甲基酯(0.94g, 5.5mmol)的溶液。在室温孵育持续24小时接着在减压下蒸发DMF后,将残余物溶解在EtOAc (50ml)中,并且溶液用水(50ml)、盐水(25ml)洗涤并在

减压下浓缩。粗产物通过硅胶上的柱色谱法以梯度洗脱 (EtOAc:己烷, 1:3v/v至1:1v/v) 纯化, 以提供作为固体的sery445 (2.05g, 86%)。Sery445是以比率1:2的异构体的混合物 (^1H NMR)。TLC (EtOAc:己烷, 1:3v/v):RF=0.13。

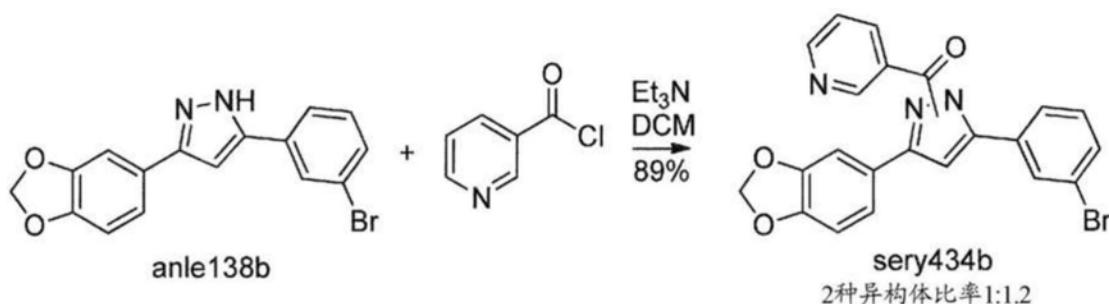
[0184] Sery447

[0185] 将在乙腈 (15ml) 中的sery445 (1g, 2.09mmol) 和MeI (1.48g, 10.4mmol) 的溶液在室温搅拌持续22小时, 随后加入另外一部分MeI (0.45g, 3.2mmol)。在室温搅拌持续另外的24小时后, 将混合物在减压下浓缩并将残余物再悬浮于EtOAc (30ml) 中。产生的沉淀通过过滤收集并干燥, 以提供作为黄色固体的sery447 (1.17g, 90%)。Sery447是以比率1:1.2的异构体的混合物 (^1H NMR)。

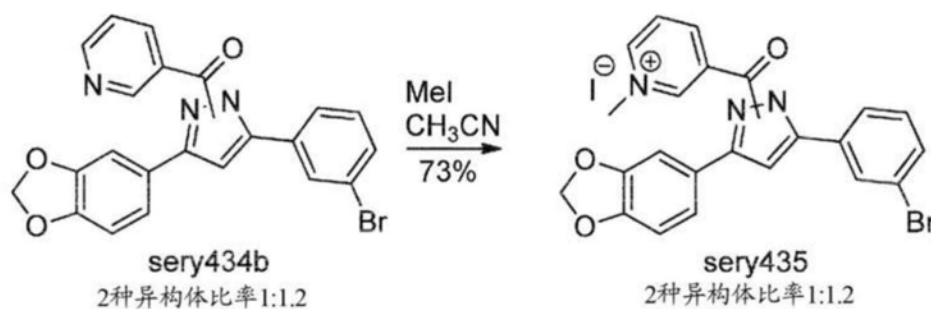
[0186] 然而, 实验数据示出sery447在水中具有差的溶解度 (<1mM)。因此sery447未被归类为解决上述问题的合适前药。

[0187] 比较实施例4: 待被肽酶裂解的sery435的合成

[0188] 在另一种方法中, 测试了应被肽酶裂解的基团的引入。稳定性应经由阳离子提供。合成另外的潜在的anle138b的前药, 被称为sery435:



[0189]



[0190] Sery434b

[0191] 在室温在连续的剧烈搅拌的情况下, 向在DCM (25ml) 中的anle138b (1.03g, 3.0mmol) 和 Et_3N (0.81g, 8mmol) 的悬浮液中分小份加入烟酰氯盐酸盐 (0.62g, 3.5mmol)。在室温搅拌持续4天后, 加入另外部分的烟酰氯盐酸盐 (0.20g, 1.9mmol) 和 Et_3N (0.22g, 2.2mmol), 并继续搅拌持续另外的3天。混合物用DCM (25ml) 猝灭, 用含水的1M磷酸盐缓冲液 (25ml, pH 7.0)、水 (25ml)、盐水 (10ml) 洗涤, 并用 Na_2SO_4 干燥。在减压下蒸发溶剂, 并且残余物通过硅胶上的快速柱色谱法纯化 (EtOAc:己烷, 1:1v/v), 以提供作为固体的sery434b (1.2g, 89%)。Sery434b是以比率1:1.2的异构体的混合物 (^1H NMR)。TLC (EtOAc:己烷, 1:1v/v):RF=0.64。

[0192] Sery435

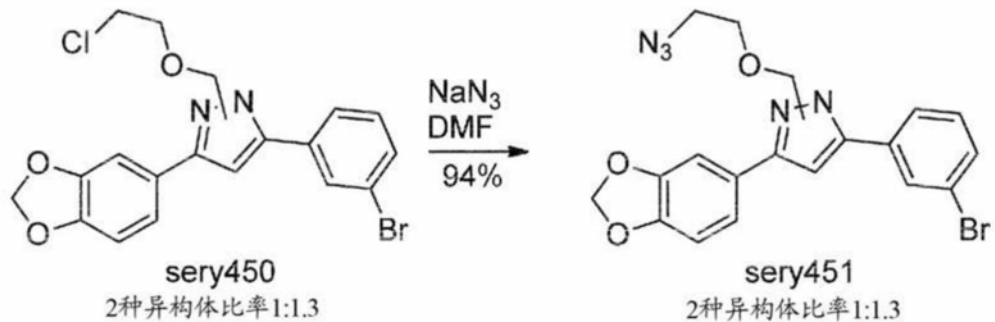
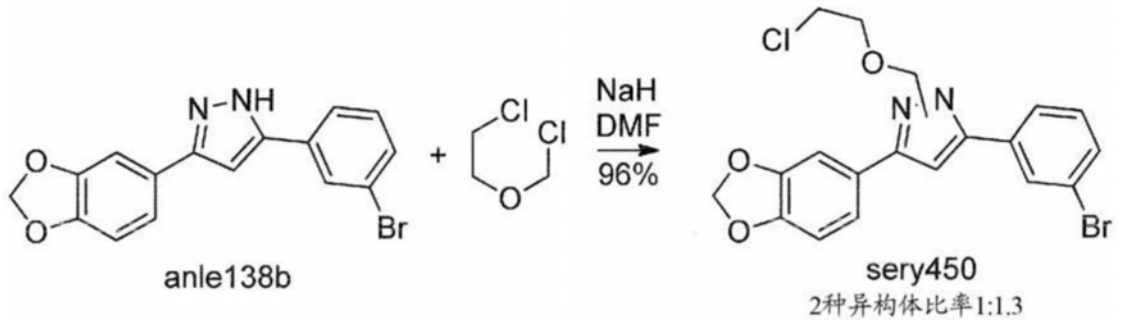
[0193] 将在乙腈(12ml)中的sery434b(1g, 2.23mmol)和MeI(1.5g, 10.56mmol)的溶液在室温搅拌持续24小时。产生的沉淀通过过滤收集并干燥,以提供作为黄色固体的sery435(1g, 76%)。Sery435是以比率1:1.2的异构体的混合物(¹H NMR)。

[0194] 然而,实验数据示出sery435在水中具有差的溶解度(<1mM)。因此,sery435未被归类为解决上述问题的合适前药。

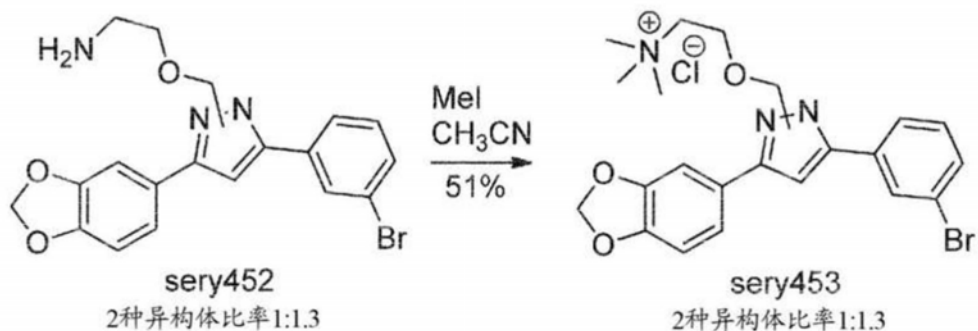
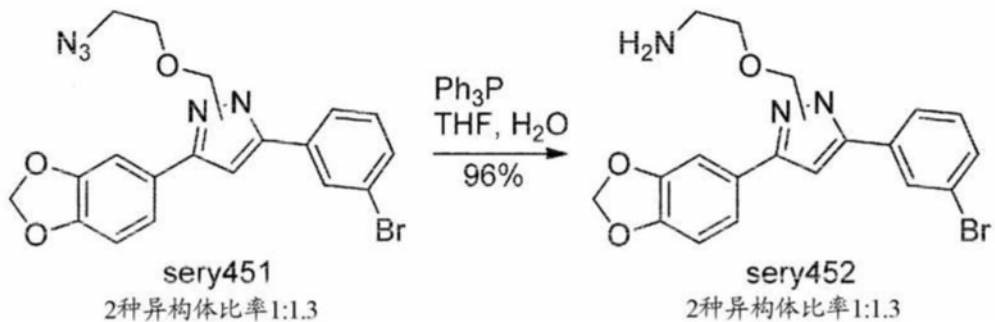
[0195] 比较实施例5:待通过水解裂解的sery453的合成

[0196] 在另外的方法中,测试可水解的基团是否可以提供水溶性且稳定的前药,其中治疗剂anle138b的释放将经由水解发生。

[0197] 合成另外的潜在的anle138b的前药,被称为sery453:



[0198]



[0199] Sery450

[0200] 在室温在连续的剧烈搅拌的情况下在10分钟内,向在无水DMF (10ml) 中的氢化钠 (220mg, 5.5mmol; 在矿物油中的60%悬浮液) 的悬浮液中加入在无水DMF (5ml) 中的anle138b (1.71g, 5mmol) 的溶液。混合物在室温搅拌持续30分钟, 并且然后逐滴加入2-氯乙基氯甲基醚 (0.7g, 5.5mmol)。在室温孵育持续30分钟接着在减压下蒸发DMF后, 将残余物溶解在EtOAc (60ml) 中, 并且溶液用水 (50ml)、盐水 (25ml) 洗涤并在减压下浓缩。粗产物通过硅胶上的柱色谱法纯化 (EtOAc: 己烷, 1:3v/v), 以提供sery450 (2.1g, 96%)。Sery450是以比率1:1.3的异构体的混合物 ($^1\text{H NMR}$)。TLC (EtOAc: 己烷, 1:3v/v): RF=0.58。

[0201] Sery451

[0202] 将在DMF (25ml) 中的sery450 (1.87g, 4.3mmol)、 NaN_3 (2.79g, 43mmol)、NaI (0.1g) 的混合物在80°C搅拌持续15小时, 并且然后在减压下浓缩。将残余物溶解在EtOAc (90ml) 中, 有机相用水 (2×50ml)、盐水洗涤, 并用 Na_2SO_4 干燥。在过滤硫酸钠后, 将溶液在减压下浓缩, 并且产生的混合物通过硅胶上的柱色谱法纯化 (EtOAc: 己烷, 1:4v/v), 以提供sery451 (1.81g, 95%)。Sery451是以比率1:1.3的异构体的混合物 ($^1\text{H NMR}$)。TLC (EtOAc: 己烷, 1:5v/v): RF=0.36。

[0203] Sery452

[0204] 将在THF (25ml) 中的sery451 (1.67g, 3.78mmol)、 Ph_3P (1.49g, 5.67mmol)、水 (2ml) 的混合物在室温搅拌持续18小时, 并且然后在减压下浓缩。产生的混合物通过硅胶上的柱色谱法以梯度洗脱 (CHCl_3 :MeOH, 30:1v/v至9:1v/v) 纯化, 以提供sery452 (0.38g, 96%)。Sery452是以比率1:1.3的异构体的混合物 ($^1\text{H NMR}$)。TLC (CHCl_3 :MeOH, 9:1v/v): RF=0.19。

[0205] Sery453

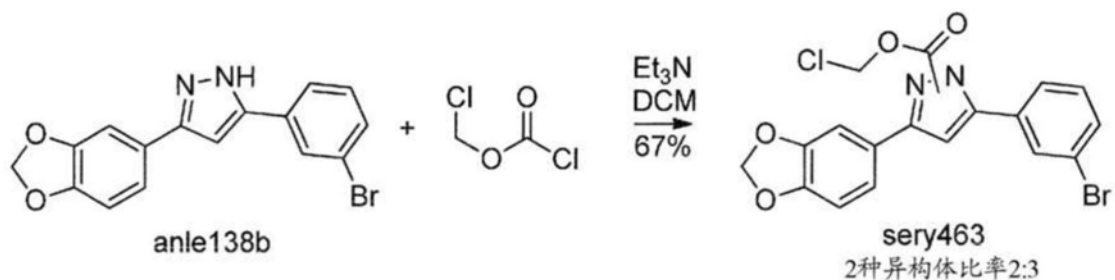
[0206] 将在乙腈 (25ml) 中的sery452 (1.45g, 3.48mmol)、MeI (2.97g, 20.9mmol)、 KHC_3 (2.1g, 21mmol) 的混合物在室温搅拌持续24小时。滤出不溶性材料, 并且将滤液在减压下浓缩以提供具有碘作为抗衡离子的sery453。使用阴离子交换树脂, 碘抗衡离子被氯抗衡离子替换以提供作为白色固体的sery453 (0.88mg, 51%)。Sery453是以比率1:1.3的异构体的混合物 ($^1\text{HNMR}$)。

[0207] 虽然实验数据示出sery453在水中具有良好的溶解度, 但是该化合物也没有解决上述问题, 因为小鼠的脑和血液中的anle138b的浓度相对较低 (参见实施例10)。与sery433相比, Sery453达到低8-10倍的水平 (2h和4h时间点), 并且因此没有被进一步考虑。

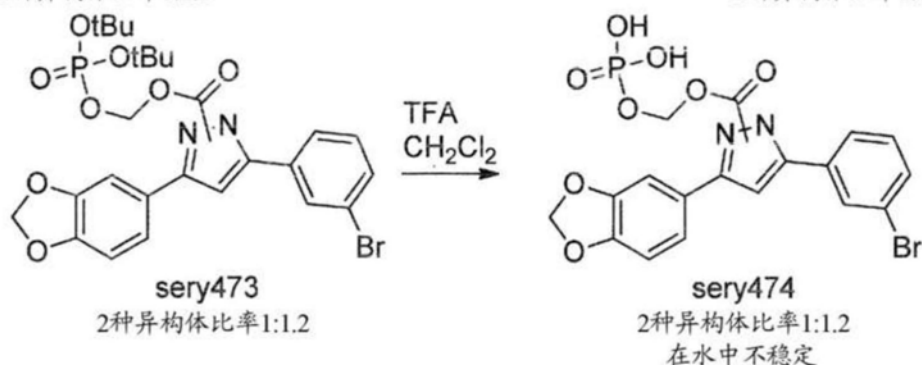
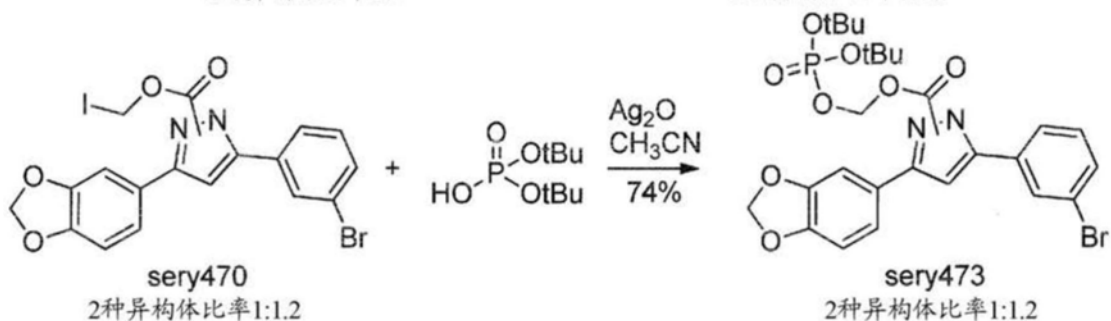
[0208] 比较实施例6: 待被IAP裂解的sery474的合成

[0209] 使用另一种方法试图提供水溶性稳定的前药: 引入可被内部碱性磷酸酶裂解的基团。

[0210] 合成了另外的潜在的anle138b的前药, 被称为sery474:



[0211]



[0212] Sery463

[0213] 在室温在连续的剧烈搅拌的情况下在10分钟内,向在DCM(10ml)中的anle138b (1g, 2.9mmol) 和吡啶 (0.276g, 3.5mmol) 的混合物中加入在DCM(5ml)中的氯甲酸氯甲酯 (0.452g, 3.5mmol) 的溶液。在室温搅拌持续2h后,用DCM(20ml) 稀释反应混合物,有机相用水 (2×30ml)、盐水洗涤并在减压下浓缩。产生的残余物从乙腈中重结晶,以提供作为白色固体的sery463 (0.85g, 67%)。Sery463是以比率2:3的异构体的混合物 (¹H NMR)。

[0214] Sery470

[0215] 将在丙酮(15ml)中的sery463 (0.8g, 1.84mmol)、NaI (0.413g, 2.76mmol) 的混合物在40℃搅拌持续3天,并且然后在减压下浓缩。将残余物溶解在DCM(30ml)中,有机相用水 (20ml)、1M Na₂S₂O₃水溶液 (20ml)、盐水洗涤,并用Na₂SO₄干燥。在过滤硫酸钠后,将溶液在减压下浓缩,并且产生的混合物通过硅胶上的柱色谱法纯化 (EtOAc:己烷, 1:3v/v), 以提供作为固体的sery470 (0.73g, 75%)。Sery470是以比率1:1.2的异构体的混合物 (¹H NMR)。TLC

(EtOAc:己烷,1:3v/v):RF=0.55。

[0216] Sery473

[0217] 将在乙腈(3ml)中的sery470(53mg,0.1mmol)、二叔丁基磷酸酯钾盐(42mg,0.2mmol)和Ag₂O(24mg,0.1mmol)的混合物在室温搅拌持续2小时。然后滤出不溶性材料,并且固体在过滤器上用乙腈(2ml)洗涤。在减压下浓缩合并的有机溶液,并且产生的油通过硅胶上的柱色谱法纯化(EtOAc:己烷,1:2v/v),以提供作为油的sery473(45mg,74%)。Sery473是以比率1:1.2的异构体的混合物(¹H NMR)。TLC(EtOAc:己烷,1:2v/v):RF=0.24。

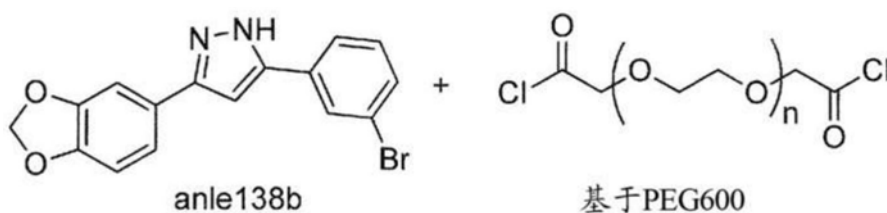
[0218] Sery474

[0219] 将在氘代氯仿(0.7ml)中的sery473(10mg)、TFA(20mg)的混合物放置在NMR管中,并通过NMR监测反应进程。在室温孵育6h后,¹H谱证实反应完全,在中性条件下的含水处理(workout)导致sery474的分解,导致anle138b的形成。

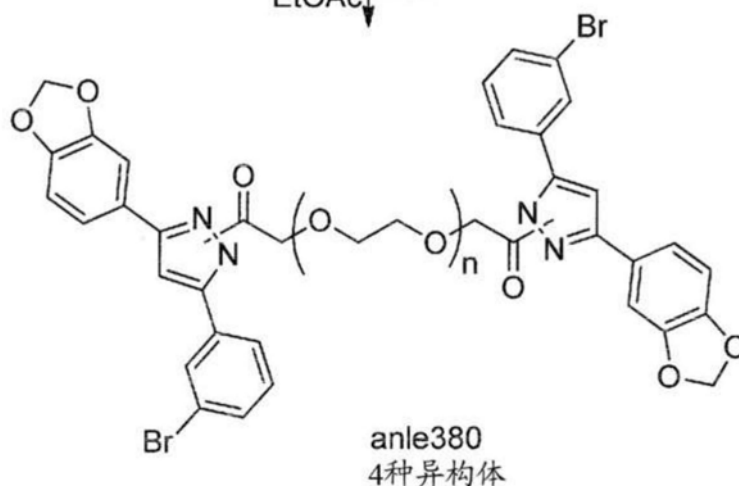
[0220] 实验数据示出,虽然sery474可溶于水中,但由于其不具有足够的稳定性,因此不能解决问题。假定这是由于缩醛官能团的自水解。因此,sery474未被分类为合适的前药。由于sery474在水溶液中的低稳定性,因此进一步的开发被终止。

[0221] 比较实施例7:待被肽酶裂解的基于PEG600的anle380的合成

[0222] 当设计水溶性和稳定的前药时通常的方法是经由PEG600二碳酸的衍生,PEG600二碳酸本身可与水以所有比率混溶。因此,合成了另外的潜在的anle138b的前药,被称为anle380:



[0223]



[0224] Anle380

[0225] 将在EtOAc(150ml)中的基于PEG的双氯酸酐(通过相应的二酸(聚(乙二醇)双(羧甲基)醚,平均Mn 600)(3g,5mmol)和SOCl₂的反应制备)、anle138b(3.43g,10mmol)和Et₃N(1.01g,10mmol)的混合物在室温搅拌持续24小时。滤出不溶性材料;滤液用5%柠檬酸的水

溶液 (50ml) 和盐水洗涤。将产生的溶液在减压下浓缩至约20ml体积,并且然后缓慢地倒入己烷 (150ml) 中。白色沉淀通过过滤收集并干燥,以提供作为白色固体的anle380 (5.8g)。根据此混合物的LC-MS分析,期望的产物的4种异构体是主要组分,而anle138b和具有1个杂环部分的化合物被检测为主要杂质。

[0226] 然而,实验数据示出,anle380在水中具有差的溶解度 (<1mM)。出乎意料的是,PEG600二碳酸衍生物在附接两个anle138b部分的情况下没有达到溶解度。因此,anle380不能被用作合适的前药。

[0227] 实施例8:水溶性测试

[0228] 每种化合物在水中的溶解度通过以下方案评价。将去离子水 (1ml) 加入到含有10mg化合物的玻璃管中。在摇动持续10分钟后,目视观察样品并记录溶液或悬浮液的形成。结果总结在下文的表中。

化合物	溶解度测试的结果
sery433	可溶的、澄清的溶液; 最大溶解度约 150mg/ml
sery435	不溶的、悬浮液
[0229] sery447	不溶的、悬浮液
sery453	可溶的、澄清的溶液; 最大溶解度约 150mg/ml
anle380	不溶的、悬浮液
anle138b	不溶的(仅 68.6ng/ml 可溶)

[0230] 结果示出,sery433和sery453比anle138b在水中更可溶约219万倍。

[0231] 实施例9:稳定性测试

[0232] 化合物在水溶液中的稳定性通过NMR确定。将含有在D2O (0.5ml) 中的化合物 (5mg) 的溶液的样品在室温孵育持续1天;每12小时记录并分析¹H谱,即0h、12h、24h时间点。示例性的结果总结在下文的表中。

化合物	稳定性测试的结果
sery433	稳定的
sery453	稳定的
anle423b铵盐	稳定的

[0234] 因此,与上文的比较实施例相比,本发明的衍生物是稳定的。活性化合物被用于裂解的高度丰富的酶释放,并且令人惊讶的是,该酶没有将疏水性化合物释放到肠道的腔中,而是“保持”它,直到其被传递到肠道膜用于被动运输到血液中。

[0235] 实施例10:sery433和sery453在小鼠中的药代动力学分析

[0236] 在无菌Millipore水 (50μl) 中的作为二钠盐的Sery433和sery453 (7.25mg;相当于5mg的anle138b) 的溶液通过灌胃应用至小鼠 (C57/BL6, 77日龄)。在应用后1h、2h、4h和8h的时间点通过颈脱臼处死动物 (每个时间点2只动物)。脑被取出,用pH 7.0的50mM Tris缓冲液洗涤并立即在液氮中冷冻。样品储存在-80℃。

[0237] 使用前在4℃解冻组织。组织使用均化器 (IKA ULTRA-TURRAX Tube drive workstation, 德国) 在5ml的乙腈中以最大速度均化两次持续3分钟。将匀浆在30℃超声处

理持续5分钟,并且以5.000x g离心持续10分钟。将等份(100 μ l)的上清液注入到HPLC系统中。样品使用化合物与外部标准物的峰面积比定量(参见图3)。

化合物	剂量, mg	动物编号	时间, h	脑中的 anle138b 水平, nmol/g
sery433	1.45	1	1	6.15
		2	1	11.39
		3	2	6.42
		4	2	27.72
		5	4	12.92
		6	4	13.82
		7	8	49.06
		8	8	35.76
sery453	1.44	1	1	4.72
		2	1	2.29
		3	2	13.61
		4	2	2.75
		5	4	1.44
		6	4	1.47
		7	8	6.38
		8	8	1.48

[0239] 实施例11:sery433在大鼠中的药代动力学分析

[0240] 将在25mM磷酸盐缓冲液pH 7中的作为二钠盐的sery433(剂量水平10mg/kg,剂量体积10ml/kg)的溶液通过灌胃应用至CD大鼠。在相应的时间点收集血浆样品,在液氮中冷冻并储存在-80 $^{\circ}$ C。使用前在4 $^{\circ}$ C解冻组织。组织使用均化器(IKA ULTRA-TURRAX Tube drive workstation,德国)在5mL的乙腈中以最大速度均化两次持续3分钟。将匀浆在30 $^{\circ}$ C超声处理持续5分钟,并且以5.000x g离心持续10分钟。将等份(100 μ L)的上清液注入到HPLC系统中。样品使用化合物与外部标准物的峰面积比定量(参见图3)。

[0241] 实施例12:sery433在大鼠中的药代动力学分析

[0242] 此研究被设计成评估在单次口服施用anle138b(阶段1)和sery433(阶段2)后,anle138b和sery433在雄性Sprague Dawley大鼠中的药代动力学。在阶段1和阶段2期间,动物在交叉设计中的两个单独的剂量场合之一接受适当配制的每种测试化合物。剂量水平对于两种化合物均为10mg/kg。Sery433的量没有被校正为存在于前药中的anle138b的量,使得由于sery433的较高分子量,实际上较低量的活性剂被施用。

用于 anle138b 的媒介物(阶段1)	由 Sigma Aldrich 供应的 PEG 400(35%) 由 Gattefosse 供应的 CAPRYOL 90(20%) 由 Sigma Aldrich 供应的 CREMOPHOR RH40(45%)
储存条件	室温
用于 sery433 的媒介物(阶段2)	磷酸盐缓冲液 pH 7(20-25mM)
储存条件	室温

[0244] 研究以两个阶段进行。

[0245] 阶段1:3只未作过实验对象的雄性CD大鼠用以10mg/kg的目标剂量水平的anle138b口服给药。

[0246] 阶段2:一周后(洗脱期),以10mg/kg的目标剂量的sery433被口服施用至相同动物。

[0247] 在每个阶段期间,在给药后的24小时时间段内来自每只动物的单独的系列血浆概况被绘制。

[0248] 口服给药制剂的制备(阶段1)

[0249] 媒介物通过称量Cremophor RH40(最终体积的45%);PEG400(最终体积的35%)和Capryol 90(最终体积的20%)来制备。将混合物搅拌并在约50°C下熔融(例如恒温浴)持续约15分钟(min),直到获得澄清液体。然后称重测试化合物并加入到保持在50°C搅拌下的媒介物中,将混合物搅拌持续另外的15分钟,并且声处理持续10分钟,直到获得澄清(目视检查)溶液。

[0250] 口服给药制剂的制备(阶段2)

[0251] 媒介物通过称重Na₂HPO₄(3.0g/L)和NaCl(2.64g/L)制备;然后将HCl1N(1.9mL以达到pH 7)与总烧瓶体积1/2的H₂O一起加入,并将混合物声处理持续10分钟。然后称重测试化合物并在磁力搅拌下加入到媒介物中持续约15分钟。然后将混合物声处理持续约5分钟,并且再次搅拌持续15分钟,直到获得澄清(目视检查)溶液。

[0252] 磷酸盐缓冲液的标称浓度为20mM。

[0253] 在口服施用后,在以下时间点从每只大鼠的尾静脉收集血液样品:在给药前、在给药后0.5小时、1小时、2小时、4小时、6小时、8小时和24小时。

[0254] 结果示于图4中。如可以看出的,在施用sery433后anle138b的血浆浓度远高于在施用anle138b本身后anle138b的相应的血浆浓度。

[0255] 参考文献

[0256] [1]J.Wagner等人,"Anle138b:a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinson's disease",Acta Neuropathol.125,795-813(2013)

[0257] [2]J.Levin等人,"The oligomer modulator anle138b inhibits disease progression in a Parkinson mouse model even with treatment started after disease onset"Act.Neuropath.127,779-780(2014)

[0258] [3]J.Wagner等人,"Reducing tau aggregates with anle138b delays disease progression in a mouse model of tauopathies"Act.Neuropathol(2015),已出版(doi:10.1007/s0041-015-1483-3)

[0259] [4]J.Rautio等人,"Prodrugs:design and clinical applications"Nat.Rew Drug Disc.7,255-270(2008)

[0260] [5]A.H.Burstein,D.Cox,B.Mistry,N.Eddington"Phenytoin pharmacokinetics following oral administration of phenytoin suspension and fosphenytoin solution to rats"Epilepsy Res.34:129-133(1999)

[0261] [6]T.Heimbach等人,"Enzyme-mediated precipitation of parent drugs from their phosphate prodrugs"Int.J.Pharm.261,81-92(2003)

[0262] [7]C.E.Müller, "Prodrug approaches for enhancing the bioavailability of drugs with low solubility" Chem. Biodiversity 6, 2071-2083 (2009) ato, K.等人, Composition containing chloromethyl phosphate derivative with improved stability and method for producing the same. EP2133355A1 (2009)。

[0263] [8]Bodor, N.S. Redox systems for brain-targeted drug delivery. EP0327766A2 (1990)。

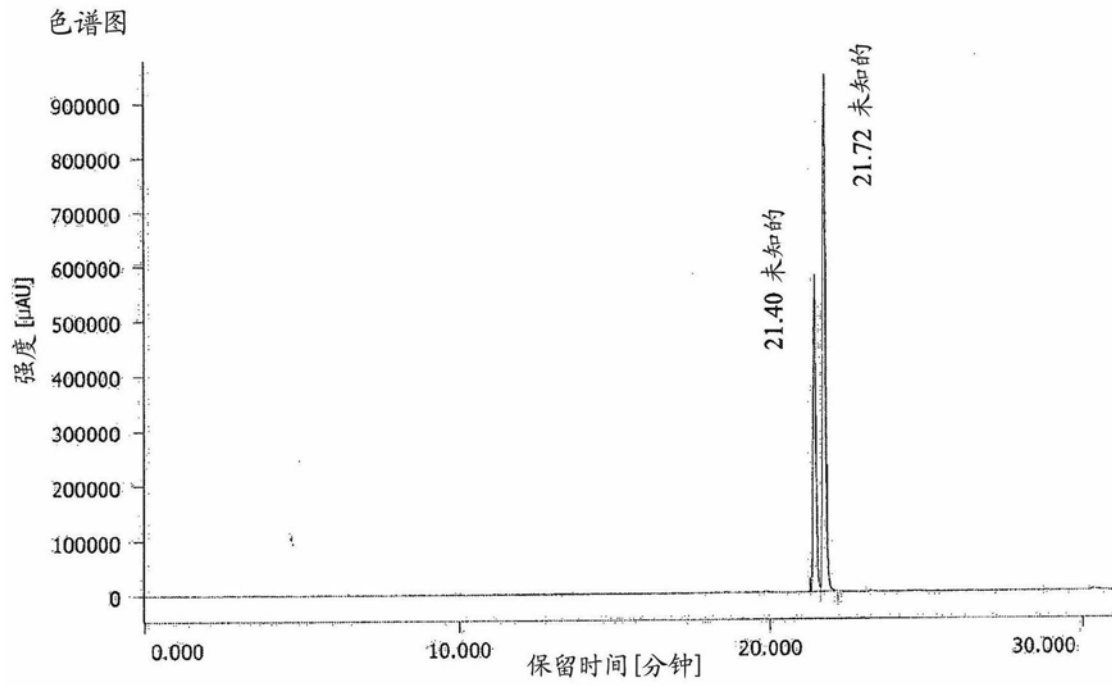


图1

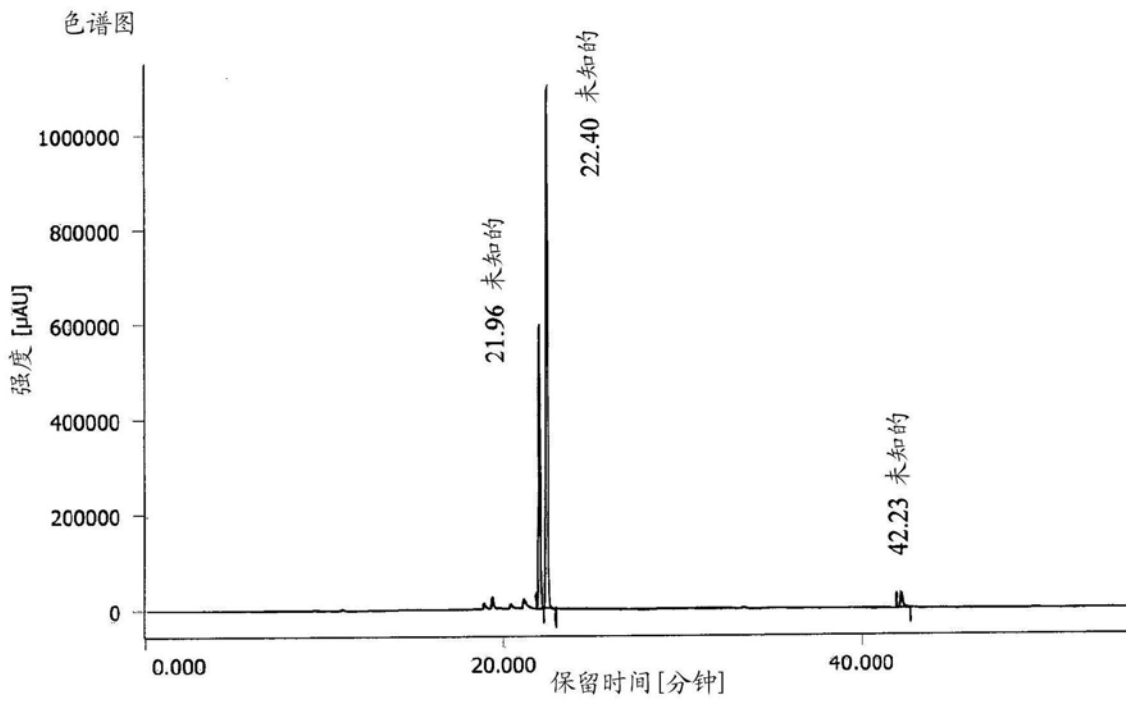


图2

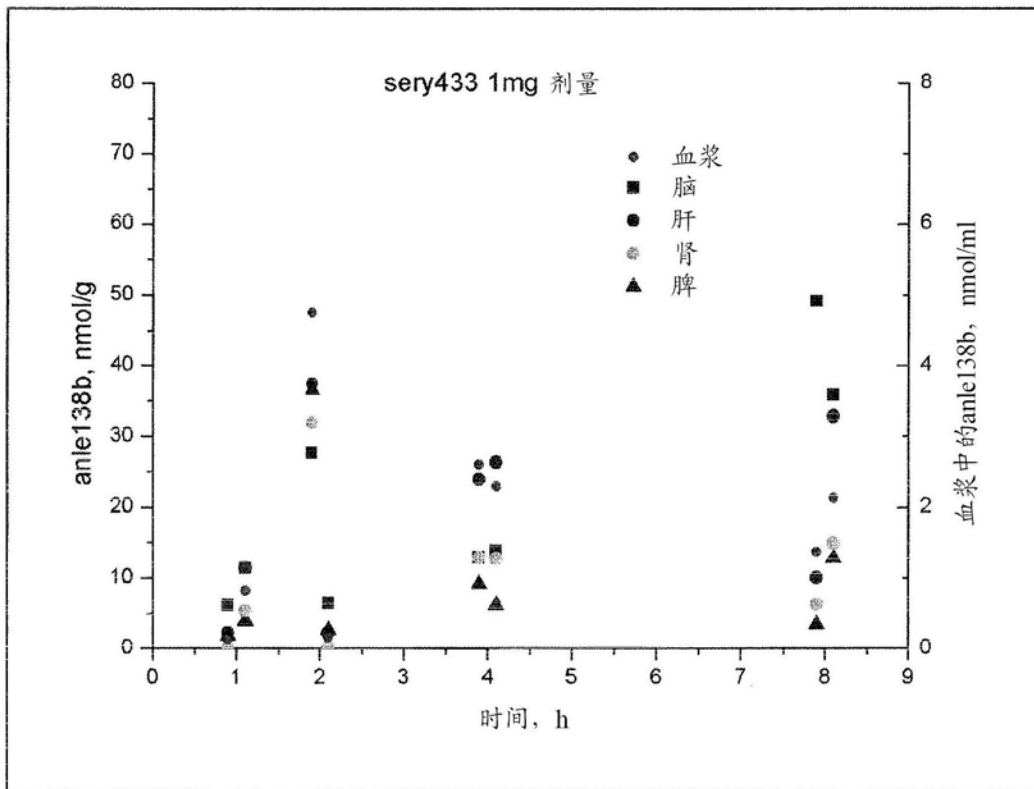


图3

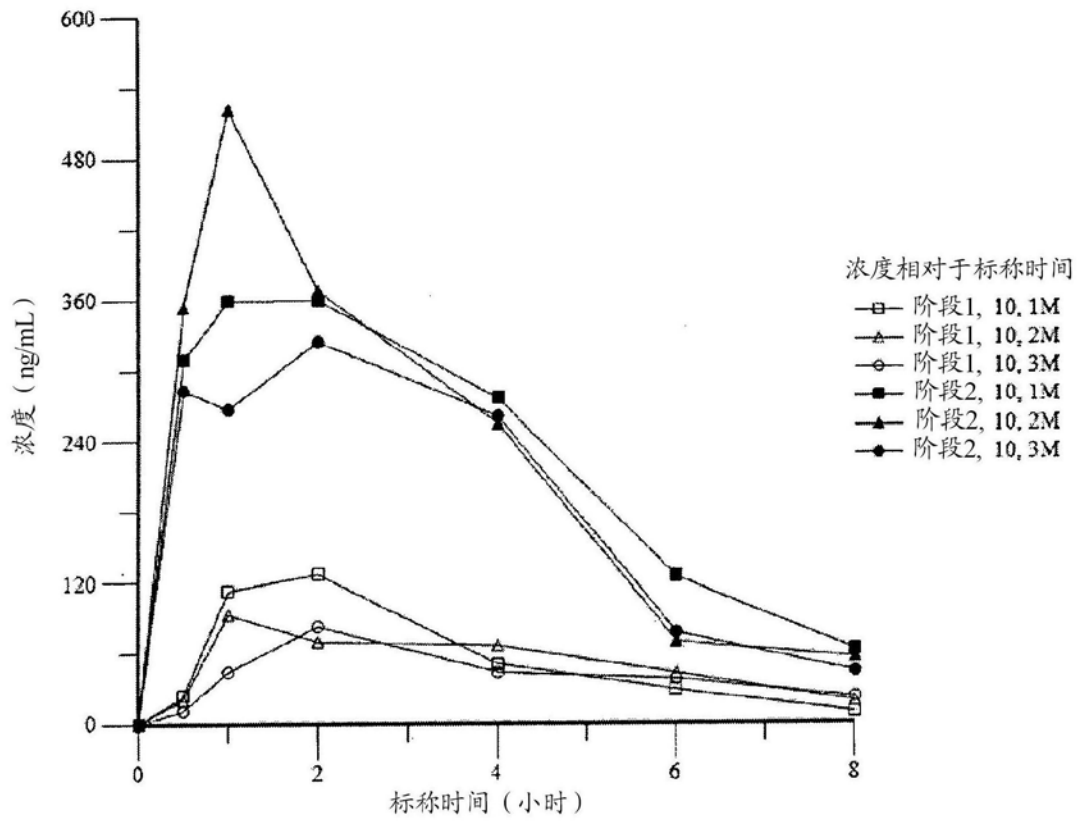


图4