



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
1-0021380

(51)⁷ **C07D 401/10, A61K 31/4439, A61P**
25/28

(13) **B**

(21)	1-2014-04217	(22)	20.06.2013		
(86)	PCT/GB2013/051606	20.06.2013	(87)	WO2013/190302	27.12.2013
(30)	61/662,592	21.06.2012	US		
(45)	25.07.2019	376	(43)	25.05.2015	326
(73)	ASTRAZENECA AB (SE) SE-151 85 Sodertalje, Sweden				
(72)	BOHLIN, Martin, Hans (SE), STEWART, Craig Robert (GB)				
(74)	Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)				

(54) **MUỐI CAMSYLAT ĐỂ ĐIỀU TRỊ CÁC BỆNH LIÊN QUAN ĐẾN DẠNG TINH BỘT BETA (ABETA) VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA MUỐI NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến muối camsylat của (1r,1'R,4R)-4-metoxy-5"-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4"-amin và dược phẩm chứa muối này để điều trị các bệnh liên quan đến dạng tinh bột beta ($A\beta$) như bệnh Alzheimer, hội chứng Down, bệnh mạch máu do dạng tinh bột β và các tình trạng bệnh như chứng sa sút trí tuệ bao gồm chứng sa sút trí tuệ có nguồn gốc kết hợp bệnh mạch và thoái hóa, chứng sa sút trí tuệ trước tuổi già, chứng sa sút trí tuệ tuổi già và chứng sa sút trí tuệ liên quan đến bệnh Parkinson, chứng liệt trên nhân tiến triển hoặc chứng thoái hóa thần kinh vỏ não.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến muối axit camphorsulfonic (camsylat) của (1r,1'R,4R)-4-metoxý-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin, và dược phẩm chứa muối này. Muối này có thể sử dụng làm thuốc để điều trị và/hoặc phòng ngừa các bệnh liên quan đến A β như hội chứng Down, bệnh mạch máu do dạng tinh bột β như, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh mạch máu do dạng tinh bột ở não hoặc chứng xuất huyết não di truyền, các rối loạn liên quan đến sự suy giảm nhận thức như, nhưng không chỉ giới hạn ở, MCI ("mild cognitive impairment – chứng suy giảm nhận thức nhẹ"), bệnh Alzheimer, chứng mất trí nhớ, các triệu chứng thiếu tập trung liên quan đến bệnh Alzheimer, chứng thoái hóa thần kinh liên quan đến các bệnh như bệnh Alzheimer hoặc chứng sa sút trí tuệ bao gồm chứng sa sút trí tuệ có nguồn gốc bệnh mạch kết hợp và thoái hóa, chứng sa sút trí tuệ trước tuổi già, chứng sa sút trí tuệ tuổi già và chứng sa sút trí tuệ liên quan đến bệnh Parkinson, chứng liệt trên nhân tiền triển hoặc chứng thoái hóa thần nền vỏ não.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Dấu hiệu bệnh học thần kinh cơ bản giúp phân biệt bệnh Alzheimer (Alzheimer's disease - AD) là sự lắng đọng peptit dạng tinh bột β (amyloid β - A β) gốc 40-42 trong mạch máu của não và nhu mô não. Rất nhiều dữ liệu về di truyền, sinh hóa và *in vivo* cho thấy vai trò chủ chốt của A β trong tiến trình bệnh học mà cuối cùng dẫn đến AD. Các bệnh nhân thường biểu hiện các triệu chứng sớm (thường là mất trí nhớ) ở tuổi sáu mươi hoặc bảy mươi. Bệnh này tiến triển cùng với việc tăng chứng sa sút trí tuệ và tăng lắng đọng A β . Đồng thời, dạng tăng phosphoryl hóa của protein tau liên kết với vi cấu trúc hình ống dần tích tụ trong các noron, dẫn đến nhiều tác động có hại lên chức năng của noron. Giả thuyết phổ biến hiện nay về mối quan hệ thời gian giữa bệnh học A β và protein tau chỉ ra rằng sự lắng đọng A β xảy ra trước sự kết tập

protein tau trong các mô hình bệnh ở người và động vật. Trong trường hợp này, đáng lưu ý rằng bản chất phân tử chính xác của A β , có ảnh hưởng tới chức năng bệnh lý này, hiện là vấn đề đang được tích cực nghiên cứu. Rất nhiều khả năng là có một dải các dạng gây độc trải liên tục từ các oligome A β bậc thấp đến các tổ hợp siêu phân tử như các sợi A β .

Peptit A β là mảnh cấu thành của protein APP (A β amyloid precursor protein - protein tiền chất của dạng tinh bột A β) typ I, là protein được biểu hiện khắp nơi trong các mô của người. Do A β hòa tan có thể được tìm thấy trong cả dịch huyết tương và dịch não tủy (cerebrospinal fluid - CSF), và trong môi trường từ các tế bào được nuôi cấy, APP phải bị phân giải protein. Có ba phân cắt chủ yếu của APP liên quan đến bệnh học của AD, được gọi là phân cắt α , β , và γ . Phân cắt α , xảy ra mạnh ở giữa miền A β trên APP, được thực hiện bởi các metalloprotease ADAM10 hoặc ADAM17 (chất đứng sau còn được gọi là TACE). Phân cắt β , xảy ra ở đầu tận cùng N của A β , được thực hiện bởi enzym phân cắt APP vị trí Beta 1 (Beta site APP Cleaving Enzyme1 - BACE1) aspartyl proteaza xuyên màng. Phân cắt γ , xảy ra ở đầu tận cùng C của A β và sau đó giải phóng peptit, được thực hiện bởi nhiều tiểu đơn vị aspartyl proteaza được gọi là γ -secretaza. Phân cắt ADAM10/17 tiếp theo là phân cắt γ -secretaza dẫn đến giải phóng peptit p3 hòa tan, mảnh A β được cắt ngắn ở đầu tận cùng N không tạo ra sự lắng đọng dạng tinh bột ở người. Con đường phân giải protein này thường được gọi là con đường không tạo dạng tinh bột. Các phân cắt liên tiếp bởi BACE1 và γ -secretaza tạo ra peptit A β nguyên vẹn, vì vậy, quá trình xử lý này được gọi là con đường tạo dạng tinh bột. Với kiến thức có được này, có thể hình dung hai cách có thể để làm giảm sản xuất A β : kích thích quá trình không tạo dạng tinh bột, hoặc ức chế hoặc điều biến quá trình tạo dạng tinh bột. Đơn giản nhất tập trung vào cách sau, tức là ức chế hoặc điều biến quá trình tạo dạng tinh bột.

Các mảng lắng đọng dạng tinh bột và bệnh mạch máu dạng tinh bột cũng đặc trưng ở não của bệnh nhân bị Trisomy 21 (hội chứng Down), chứng xuất huyết não di truyền với sự thoái hóa dạng tinh bột kiểu Hà Lan (Hereditary Cerebral Hemorrhage with Amyloidosis of the Dutch-type - HCHWA-D), và các rối loạn suy thoái thần kinh khác. Các đám rối sợi thần kinh còn xảy ra ở các rối loạn suy thoái thần kinh khác bao gồm các rối loạn gây ra do chứng sa sút trí tuệ (Varghese, J., et al, Journal of

Medicinal Chemistry, 2003, 46, 4625-4630). Các mảng lắng đọng dạng tinh bột β chủ yếu là tập hợp của peptit $A\beta$, peptit này là sản phẩm của quá trình phân giải protein của protein tiền chất dạng tinh bột (APP). Cụ thể hơn, peptit $A\beta$ thu được từ phân cắt của APP ở đầu tận cùng C bởi một hoặc nhiều γ -secretaza, và ở đầu tận cùng N bởi enzym β -secretaza (BACE), còn được gọi là aspartyl proteaza hoặc Asp2 hoặc enzym phân cắt APP vị trí beta (BACE), như một phần của con đường tạo dạng tinh bột β .

Hoạt tính của BACE có liên quan trực tiếp đến việc sản sinh peptit $A\beta$ từ APP (Sinha, et al, Nature, 1999, 402, 537-540), và các nghiên cứu ngày càng chỉ rõ rằng việc ức chế BACE sẽ ức chế quá trình sản xuất peptit $A\beta$ (Roberds, S. L., et al, Human Molecular Genetics, 2001, 10, 1317-1324). BACE là protein liên kết màng typ 1 được tổng hợp dưới dạng tiền enzym hoạt động một phần, và được biểu hiện nhiều trong mô não. Nó được cho là biểu hiện hoạt tính β -secretaza chủ yếu, và được coi là bước giới hạn tốc độ trong quá trình sản xuất peptit β dạng tinh bột ($A\beta$).

Do đó, các thuốc làm giảm hoặc phong bế hoạt tính BACE sẽ phải làm giảm hàm lượng $A\beta$ và hàm lượng của các mảnh $A\beta$ trong não, hoặc ở những nơi mà $A\beta$ hoặc mảnh của nó lắng đọng, và do đó, làm chậm sự tạo ra các mảng dạng tinh bột và tiến triển của AD hoặc các bệnh khác liên quan đến sự lắng đọng $A\beta$ hoặc mảnh của nó. Do đó, BACE là chất dự tuyển quan trọng để phát triển các thuốc điều trị và/hoặc dự phòng các bệnh liên quan đến $A\beta$ như hội chứng Down, bệnh mạch máu do dạng tinh bột β như, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh mạch máu do dạng tinh bột ở não hoặc chứng xuất huyết não di truyền, các rối loạn liên quan đến sự suy giảm nhận thức như, nhưng không chỉ giới hạn ở, MCI (“chứng suy giảm nhận thức nhẹ”), bệnh Alzheimer, chứng mất trí nhớ, các triệu chứng thiếu tập trung liên quan đến bệnh Alzheimer, chứng thoái hóa thần kinh liên quan đến các bệnh như bệnh Alzheimer hoặc chứng sa sút trí tuệ bao gồm chứng sa sút trí tuệ có nguồn gốc bệnh mạch kết hợp và thoái hóa, chứng sa sút trí tuệ trước tuổi già, chứng sa sút trí tuệ tuổi già và chứng sa sút trí tuệ liên quan đến bệnh Parkinson, chứng liệt trên nhân tiến triển hoặc chứng thoái hóa thần kinh vỏ não.

Do đó, sẽ là hữu ích khi ức chế sự lắng đọng $A\beta$ và các phần của nó bằng cách ức chế BACE bằng các chất ức chế như các hợp chất được đề xuất trong bản mô tả này.

Tiềm năng trị liệu của việc ức chế sự lắng đọng A β đã thúc đẩy nhiều nhóm nghiên cứu tìm cách phân tách và mô tả đặc trưng các enzym secretaza và nhận diện các chất ức chế tiềm năng của chúng, như được bàn luận trong WO 2011/002408 A1 và WO 2012/087237 A1 .

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metoxo-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin. Muối camsylat của (1r,1'R,4R)-4-metoxo-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin có thể được gọi theo cách khác là muối axit camphorsulfonic của (1r,1'R,4R)-4-metoxo-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là giản đồ nhiễu xạ bột tia X của muối camsylat của (1r,1'R,4R)-4-metoxo-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề xuất muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metoxo-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin, đặc trưng ở chỗ có phổ nhiễu xạ bột tia X (X-ray powder diffraction - XRPD) chủ yếu có các pic sau với giá trị khoảng cách d như được thể hiện trong bảng 1:

Bảng 1: Các pic được nhận diện trên phổ nhiễu xạ bột tia X

Góc hiệu chỉnh	Khoảng cách d (Å)	Cường độ tương đối
5,66	15,60	vs
7,72	11,44	m
8,11	10,89	vw

11,30	7,83	m
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
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

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metoxi-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro-[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin, đặc trưng ở chỗ có phổ nhiễu xạ bột tia X, chủ yếu có các pic rất mạnh, mạnh và trung bình sau với giá trị khoảng cách d như được thể hiện trong bảng 2:

Bảng 2:

Các pic được nhận diện trên phổ nhiễu xạ bột tia X

Góc hiệu chỉnh	Khoảng cách d (Å)	Cường độ tương đối
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

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metoxi-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-dispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin còn bao gồm tất cả các solvat và các đồng tinh thể của nó.

Các muối khác của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metoxi-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-dispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin bao gồm muối succinat, clo hydric, phosphat, sulfat, fumarat và 1.5 naphthalendisulfonat.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hoạt chất là muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metoxi-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-dispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin với lượng hữu hiệu trị liệu, cùng với các tá dược, chất mang hoặc chất pha loãng được dùng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metoxi-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-dispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin để sử dụng làm thuốc.

Sáng chế mô tả việc sử dụng muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metox-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2''-imidazol]-4''-amin, làm thuốc để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến Aβ.

Sáng chế mô tả việc sử dụng muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metox-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2''-imidazol]-4''-amin, làm thuốc để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến Aβ, trong đó bệnh liên quan đến Aβ này là hội chứng Down, bệnh mạch máu do dạng tinh bột β, bệnh mạch máu do dạng tinh bột ở não, chứng xuất huyết não di truyền, rối loạn liên quan đến sự suy giảm nhận thức, MCI (“chứng suy giảm nhận thức nhẹ”), bệnh Alzheimer, chứng mất trí nhớ, các triệu chứng thiếu tập trung liên quan đến bệnh Alzheimer, chứng thoái hóa thần kinh liên quan đến bệnh Alzheimer, chứng sa sút trí tuệ có nguồn gốc bệnh mạch kết hợp, chứng sa sút trí tuệ có nguồn gốc thoái hóa, chứng sa sút trí tuệ trước tuổi già, chứng sa sút trí tuệ tuổi già, chứng sa sút trí tuệ liên quan đến bệnh Parkinson, chứng liệt trên nhân tiền triển hoặc chứng thoái hóa thân nền vỏ não.

Sáng chế mô tả việc sử dụng muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metox-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2''-imidazol]-4''-amin, làm thuốc để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer.

Sáng chế mô tả việc sử dụng muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metox-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2''-imidazol]-4''-amin, trong việc bào chế thuốc để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến Aβ.

Sáng chế mô tả việc sử dụng muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metox-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2''-imidazol]-4''-amin, trong việc bào chế thuốc để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến Aβ, trong đó bệnh liên quan đến Aβ này là hội chứng Down, bệnh mạch máu do dạng tinh bột β, bệnh mạch máu do dạng tinh bột ở não, chứng xuất huyết não di truyền, rối loạn liên quan đến sự suy giảm nhận thức, MCI (“chứng suy giảm nhận thức nhẹ”), bệnh Alzheimer, chứng mất trí nhớ, các triệu chứng thiếu tập

trung liên quan đến bệnh Alzheimer, chứng thoái hóa thần kinh liên quan đến bệnh Alzheimer, chứng sa sút trí tuệ có nguồn gốc bệnh mạch kết hợp, chứng sa sút trí tuệ có nguồn gốc thoái hóa, chứng sa sút trí tuệ trước tuổi già, chứng sa sút trí tuệ tuổi già, chứng sa sút trí tuệ liên quan đến bệnh Parkinson, chứng liệt trên nhân tiền triển hoặc chứng thoái hóa thần kinh vỏ não.

Sáng chế mô tả việc sử dụng muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metox-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-dispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin, trong việc bào chế thuốc để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer.

Sáng chế mô tả phương pháp ức chế hoạt tính của BACE bao gồm bước cho BACE này tiếp xúc với muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metox-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-dispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến A β ở bệnh nhân cần điều trị, bao gồm bước cho bệnh nhân này dùng muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metox-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-dispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin với lượng hữu hiệu trị liệu.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến A β ở bệnh nhân cần điều trị, bao gồm bước cho bệnh nhân này dùng muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metox-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-dispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin với lượng hữu hiệu trị liệu, trong đó bệnh liên quan đến A β này là hội chứng Down, bệnh mạch máu do dạng tinh bột β , bệnh mạch máu do dạng tinh bột ở não, chứng xuất huyết não di truyền, rối loạn liên quan đến sự suy giảm nhận thức, MCI ("chứng suy giảm nhận thức nhẹ"), bệnh Alzheimer, chứng mất trí nhớ, các triệu chứng thiếu tập trung liên quan đến bệnh Alzheimer, chứng thoái hóa thần kinh liên quan đến bệnh Alzheimer, chứng sa sút trí tuệ có nguồn gốc bệnh mạch kết hợp, chứng sa sút trí tuệ có nguồn gốc thoái hóa, chứng sa sút trí tuệ trước tuổi già, chứng sa sút trí tuệ tuổi già, chứng sa sút trí tuệ liên quan đến bệnh Parkinson, chứng liệt trên nhân tiền triển hoặc chứng thoái hóa thần kinh vỏ não.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer ở bệnh nhân cần điều trị, bao gồm bước cho bệnh nhân này dùng muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metoxi-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-dispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin với lượng hữu hiệu trị liệu.

Sáng chế mô tả phương pháp ức chế hoạt tính của BACE bao gồm bước cho BACE này tiếp xúc với muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metoxi-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-dispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin. BACE được cho là biểu hiện hoạt tính β -secretaza chủ yếu, và được coi là bước giới hạn tốc độ trong việc sản xuất protein β dạng tinh bột ($A\beta$). Do đó, việc ức chế BACE qua các chất ức chế như các hợp chất được đề xuất trong bản mô tả này sẽ hữu ích để ức chế sự lắng đọng của $A\beta$ và các phần của nó. Do sự lắng đọng $A\beta$ và các phần của nó được liên kết với các bệnh như bệnh Alzheimer, BACE là chất dự tuyển quan trọng để phát triển các thuốc điều trị và/hoặc dự phòng các bệnh liên quan đến $A\beta$ như hội chứng Down, và bệnh mạch máu do dạng tinh bột β như, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh mạch máu do dạng tinh bột ở não, chứng xuất huyết não di truyền, các rối loạn liên quan đến sự suy giảm nhận thức như, nhưng không chỉ giới hạn ở, MCI ("chứng suy giảm nhận thức nhẹ"), bệnh Alzheimer, chứng mất trí nhớ, các triệu chứng thiếu tập trung liên quan đến bệnh Alzheimer, chứng thoái hóa thần kinh liên quan đến các bệnh như bệnh Alzheimer hoặc chứng sa sút trí tuệ bao gồm chứng sa sút trí tuệ có nguồn gốc kết hợp bệnh mạch và thoái hóa, chứng sa sút trí tuệ trước tuổi già, chứng sa sút trí tuệ tuổi già và chứng sa sút trí tuệ liên quan đến bệnh Parkinson, chứng liệt trên nhân tiến triển hoặc chứng thoái hóa thần kinh vỏ não.

Sáng chế mô tả phương pháp dự phòng các bệnh liên quan đến $A\beta$ như hội chứng Down và bệnh mạch máu do dạng tinh bột β như, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh mạch máu do dạng tinh bột ở não, chứng xuất huyết não di truyền, các rối loạn liên quan đến sự suy giảm nhận thức như, nhưng không chỉ giới hạn ở, MCI ("chứng suy giảm nhận thức nhẹ"), bệnh Alzheimer, chứng mất trí nhớ, các triệu chứng thiếu tập trung liên quan đến bệnh Alzheimer, chứng thoái hóa thần kinh liên quan đến các bệnh như bệnh Alzheimer hoặc chứng sa sút trí tuệ bao gồm chứng sa sút trí tuệ có nguồn gốc kết hợp bệnh mạch và thoái hóa, chứng sa sút trí tuệ trước tuổi già, chứng sa sút trí tuệ tuổi già và chứng sa sút trí tuệ liên quan đến bệnh Parkinson, chứng liệt

trên nhân tiến triển hoặc chứng thoái hóa thần nền vỏ não, bao gồm bước cho động vật có vú (kể cả người) dùng muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metoxy-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin với lượng hữu hiệu trị liệu.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh liên quan đến Aβ như hội chứng Down và bệnh mạch máu do dạng tinh bột β như, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh mạch máu do dạng tinh bột ở não, chứng xuất huyết não di truyền, các rối loạn liên quan đến sự suy giảm nhận thức như, nhưng không chỉ giới hạn ở, MCI (“chứng suy giảm nhận thức nhẹ”), bệnh Alzheimer, chứng mất trí nhớ, các triệu chứng thiếu tập trung liên quan đến bệnh Alzheimer, chứng thoái hóa thần kinh liên quan đến các bệnh như bệnh Alzheimer hoặc chứng sa sút trí tuệ bao gồm chứng sa sút trí tuệ có nguồn gốc kết hợp bệnh mạch và thoái hóa, chứng sa sút trí tuệ trước tuổi già, chứng sa sút trí tuệ tuổi già và chứng sa sút trí tuệ liên quan đến bệnh Parkinson, chứng liệt trên nhân tiến triển hoặc chứng thoái hóa thần nền vỏ não, bằng cách cho động vật có vú (kể cả người) dùng muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metoxy-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin và chất tăng cường nhận thức và/hoặc trí nhớ.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh liên quan đến Aβ như hội chứng Down và bệnh mạch máu do dạng tinh bột β như, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh mạch máu do dạng tinh bột ở não, chứng xuất huyết não di truyền, các rối loạn liên quan đến sự suy giảm nhận thức như, nhưng không chỉ giới hạn ở, MCI (“chứng suy giảm nhận thức nhẹ”), bệnh Alzheimer, chứng mất trí nhớ, các triệu chứng thiếu tập trung liên quan đến bệnh Alzheimer, chứng thoái hóa thần kinh liên quan đến các bệnh như bệnh Alzheimer hoặc chứng sa sút trí tuệ bao gồm chứng sa sút trí tuệ có nguồn gốc kết hợp bệnh mạch và thoái hóa, chứng sa sút trí tuệ trước tuổi già, chứng sa sút trí tuệ tuổi già và chứng sa sút trí tuệ liên quan đến bệnh Parkinson, chứng liệt trên nhân tiến triển hoặc chứng thoái hóa thần nền vỏ não, bằng cách cho động vật có vú (kể cả người) dùng muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metoxy-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin và chất ức chế cholin esteraza hoặc chất chống viêm.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh liên quan đến Aβ như hội chứng Down và bệnh mạch máu do dạng tinh bột β như, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh mạch máu do dạng tinh bột ở não, chứng xuất huyết não di truyền, các rối loạn liên quan đến sự suy giảm nhận thức như, nhưng không chỉ giới hạn ở, MCI (“chứng suy giảm nhận thức nhẹ”), bệnh Alzheimer, chứng mất trí nhớ, các triệu chứng thiếu tập trung liên quan đến bệnh Alzheimer, chứng thoái hóa thần kinh liên quan đến các bệnh như bệnh Alzheimer hoặc chứng sa sút trí tuệ bao gồm chứng sa sút trí tuệ có nguồn gốc kết hợp bệnh mạch và thoái hóa, chứng sa sút trí tuệ trước tuổi già, chứng sa sút trí tuệ tuổi già và chứng sa sút trí tuệ liên quan đến bệnh Parkinson, chứng liệt trên nhân tiến triển hoặc chứng thoái hóa thân nền vỏ não, hoặc bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh khác bất kỳ được nêu trong bản mô tả này, bằng cách cho động vật có vú (kể cả người) dùng hợp chất theo sáng chế và chất chống loạn thần không điển hình. Các chất chống loạn thần không điển hình bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Olanzapin (được đưa ra thị trường dưới dạng Zyprexa), Aripiprazol (được đưa ra thị trường dưới dạng Abilify), Risperidon (được đưa ra thị trường dưới dạng Risperdal), Quetiapin (được đưa ra thị trường dưới dạng Seroquel), Clozapin (được đưa ra thị trường dưới dạng Clozaril), Ziprasidon (được đưa ra thị trường dưới dạng Geodon) và Olanzapin/Fluoxetin (được đưa ra thị trường dưới dạng Symbyax).

Theo một số phương án, động vật có vú hoặc người cần điều trị bằng muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metoxo-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-dispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin đã được chẩn đoán bị bệnh hoặc rối loạn cụ thể, như bệnh hoặc rối loạn được mô tả trong bản mô tả này. Trong các trường hợp này, động vật có vú hoặc người cần điều trị nêu trên là cần việc điều trị này. Tuy nhiên, việc chẩn đoán không cần phải được thực hiện trước.

Các định nghĩa được nêu trong bản mô tả này được dự định để làm rõ các thuật ngữ được sử dụng trong toàn bộ bản mô tả này. Thuật ngữ “trong bản mô tả này” có nghĩa là toàn bộ bản mô tả.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, “được dụng” dùng để chỉ các hợp chất, nguyên liệu, chế phẩm, và/hoặc dạng liều mà, trong phạm vi đánh giá y học đúng đắn, thích hợp để sử dụng tiếp xúc với mô của người và động vật mà không có độc tính,

kích ứng, đáp ứng dị ứng, hoặc vấn đề hoặc biến chứng khác quá mức, tương ứng với tỷ lệ lợi ích/rủi ro hợp lý.

Việc điều trị chứng sa sút trí tuệ được định nghĩa trong bản mô tả này có thể được áp dụng như phép trị liệu duy nhất hoặc có thể bao gồm, ngoài hợp chất theo sáng chế, hóa trị liệu thông thường. Hóa trị liệu này có thể bao gồm một hoặc nhiều các nhóm chất sau: chất ức chế axetyl cholinesteraza, chất chống viêm, chất tăng cường nhận thức và/hoặc trí nhớ hoặc chất chống loạn thần không điển hình.

Việc điều trị kết hợp này có thể đạt được bằng cách dùng liều các thành phần điều trị riêng theo cách hỗ trợ, đồng thời, cùng lúc, lần lượt hoặc riêng rẽ. Các sản phẩm kết hợp như vậy sử dụng các hợp chất theo sáng chế.

Hóa trị liệu thông thường khác có thể bao gồm một hoặc nhiều các loại chất sau: (i) thuốc chống trầm cảm, (ii) thuốc chống loạn thần không điển hình, (iii) thuốc chống loạn thần, (iv) thuốc chống lo âu, (v) thuốc chống co giật, (vi) các phép trị liệu bệnh Alzheimer hiện đang được sử dụng, (vii) các phép trị liệu bệnh Parkinson, (viii) các phép trị liệu chứng đau nửa đầu, (ix) các phép trị liệu bệnh đột quỵ, (x) các phép trị liệu bệnh sỏi tiểu, (xi) các phép trị liệu chứng đau thần kinh, (xii) các phép trị liệu chứng đau do cảm thụ thần kinh, (XIII) các phép trị liệu chứng mất ngủ và (xiv) thuốc ổn định tâm thần. Các biện pháp điều trị đã biết đối với các phép trị liệu nêu trên có thể được dùng kết hợp với sáng chế được mô tả trong bản mô tả này.

Các sản phẩm kết hợp này sử dụng muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metoxi-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-dispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2''-imidazol]-4''-amin trong khoảng liều được nêu trong bản mô tả này và hợp chất hoặc các hợp chất được dùng khác trong khoảng liều được phê chuẩn và/hoặc như được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Các hợp chất theo sáng chế có thể được dùng qua đường miệng, ngoài đường tiêu hóa, qua má, âm đạo, trực tràng, hít, bơm, dưới lưỡi, trong cơ, dưới da, tại chỗ, trong mũi, trong màng bụng, trong ngực, trong tĩnh mạch, ngoài màng cứng, nội tủy mạch, trong não thất và bằng cách tiêm vào các khớp.

Liều sẽ phụ thuộc vào đường dùng, mức độ nghiêm trọng của bệnh, tuổi và cân nặng của bệnh nhân và các yếu tố khác thường được xem xét bởi thầy thuốc chăm sóc, khi xác định chế độ riêng và mức liều thích hợp nhất đối với bệnh nhân cụ thể.

Lượng hữu hiệu của hợp chất theo sáng chế để sử dụng trong trị liệu chứng sa sút trí tuệ là lượng đủ để làm giảm triệu chứng sa sút trí tuệ ở động vật máu nóng, cụ thể là người, làm chậm tiến triển chứng sa sút trí tuệ, hoặc làm giảm nguy cơ bệnh xấu đi ở các bệnh nhân có triệu chứng sa sút trí tuệ.

Ngoài hợp chất theo sáng chế, dược phẩm theo sáng chế cũng có thể chứa, hoặc được dùng phối hợp (đồng thời hoặc lần lượt) với, một hoặc nhiều chất có tác dụng dược lý có tác dụng trong điều trị một hoặc nhiều tình trạng bệnh được nêu trong bản mô tả này.

Lượng muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metoxý-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin được dùng sẽ thay đổi đối với bệnh nhân cần điều trị và sẽ thay đổi trong khoảng từ 10 ng/kg thể trọng đến 100 mg/kg thể trọng mỗi ngày và tốt hơn là sẽ thay đổi trong khoảng từ 10 ng/kg đến 10 mg/kg mỗi ngày. Ví dụ, các liều mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng biết được từ sáng chế và các hiểu biết trong lĩnh vực này. Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng xác định được lượng hợp chất và các chất phụ gia, chất dẫn, và/hoặc chất mang tùy chọn trong chế phẩm và được dùng trong các phương pháp theo sáng chế.

Các phương pháp điều chế

Muối camsylat của (1r,1'R,4R)-4-metoxý-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin

Muối camsylat của hợp chất (1r,1'R,4R)-4-metoxý-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin có thể thu được bằng cách bắt đầu từ dung dịch chứa (1r,1'R,4R)-4-metoxý-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin trong dung môi thích hợp, ví dụ, 2-propanol, axetonitril, hoặc axeton hoặc hỗn hợp của các dung môi này với nước, tiếp theo trộn dung dịch thu được với axit (1S)-(+)-10-camphorsulfonic trực tiếp hoặc đã được hòa tan trong dung môi thích hợp, ví dụ, 2-propanol hoặc nước, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ nhiệt độ phòng đến 80°C. Việc kết tinh có thể thu được bằng cách làm bay hơi dung môi và/hoặc bằng cách làm lạnh dung dịch hoặc trực tiếp dưới dạng kết tinh phản ứng muối. Các hạt tinh thể có

thể được sử dụng để khơi mào kết tinh. Các hạt có thể được điều chế từ chính mẻ này bằng cách lấy mẫu một thể tích nhỏ dung dịch và sau đó làm lạnh nhanh để tạo ra sự kết tinh. Sau đó, bổ sung các tinh thể dưới dạng hạt vào mẻ này.

Phân tích XRPD:

Phân tích nhiễu xạ bột tia X (X-ray powder diffraction - XRPD) được thực hiện trên các mẫu được chuẩn bị theo các phương pháp chuẩn, ví dụ, các mẫu được mô tả trong Giacobozzo, 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; or Klug, H. P. & Alexander, L. E. (1974), *X-ray Diffraction Procedures*, John Wiley and Sons, New York. Phân tích nhiễu xạ tia X được thực hiện bằng cách sử dụng nhiễu xạ kế PANalytical X'Pert PRO MPD trong 96 phút ở góc 2θ từ 1° đến 60° . Các giá trị khoảng cách XRPD có thể thay đổi trong khoảng ± 2 ở chữ số thập phân cuối.

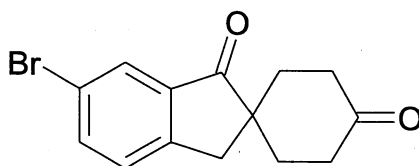
Cường độ tương đối được tính từ giản đồ nhiễu xạ đo được với khe biến đổi.

Các cường độ tương đối đo được so với pic mạnh nhất được đưa ra dưới dạng rất mạnh (vs) trên 50%, mạnh (s) nằm trong khoảng từ 25 đến 50%, trung bình (m) nằm trong khoảng từ 10 đến 25%, yếu (w) nằm trong khoảng từ 5 đến 10% và rất yếu (vw) dưới 5% so với chiều cao pic tương ứng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải hiểu rằng các cường độ XRPD có thể thay đổi giữa các mẫu khác nhau và các cách điều chế mẫu khác nhau vì nhiều nguyên nhân bao gồm định hướng ưu tiên. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng cần phải hiểu rằng độ dịch chuyển góc được đo và do đó, khoảng cách d nhỏ hơn có thể xảy ra vì nhiều nguyên nhân bao gồm sự thay đổi độ bằng phẳng bề mặt của mẫu trong nhiễu xạ kế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

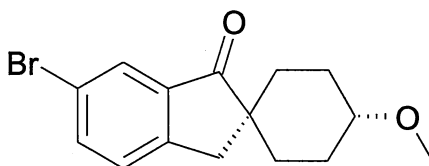
6'-Bromospiro[xyclohexan-1,2'-inden]-1',4(3'H)-dion



Nạp kali tert-butoxit (223 g, 1,99 mol) vào thiết bị phản ứng dung tích 100 l chứa hỗn hợp đã khuấy gồm 6-bromo-1-indanon (8,38 kg, 39,7 mol) trong THF (16,75 l) ở nhiệt độ 20-30°C. Sau đó, nạp methyl acrylat (2,33 l, 25,8 mol) vào hỗn hợp này trong 15 phút, giữ nhiệt độ nằm trong khoảng 20-30°C. Bổ sung dung dịch chứa kali tert-butoxit (89,1 g, 0,79 mol) đã hòa tan trong THF (400 ml) sau đó, bổ sung methyl acrylat (2,33 l, 25,8 mol) trong 20 phút ở nhiệt độ 20-30°C. Sau đó, bổ sung phần kali tert-butoxit thứ ba (90 g, 0,80 mol) đã hòa tan trong THF (400 ml), tiếp theo bổ sung lần thứ ba methyl acrylat (2,33 l, 25,8 mol) trong 20 phút ở nhiệt độ 20-30°C. Nạp kali tert-butoxit (4,86 kg, 43,3 mol) đã hòa tan trong THF (21,9 l) vào thiết bị phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ 20-30°C. Làm nóng hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ xấp xỉ 65°C và chưng cất 23 l dung môi. Nhiệt độ phản ứng được hạ xuống 60°C và bổ sung nước kali hydroxit 50% (2,42 l, 31,7 mol) đã hòa tan trong nước (51,1 l) vào hỗn hợp này trong 30 phút ở nhiệt độ 55-60°C, sau đó, khuấy hỗn hợp này trong thời gian 6 giờ ở nhiệt độ 60°C, làm mát xuống nhiệt độ 20°C trong 2 giờ. Sau khi khuấy trong 12 giờ ở nhiệt độ 20°C, lọc nguyên liệu rắn, rửa hai lần bằng hỗn hợp chứa nước (8,4 l) và THF (4,2 l) và sau đó, làm khô ở nhiệt độ 50°C trong chân không thu được 6'-bromospiro[xyclohexan-1,2'-inden]-1',4(3'H)-đion (7,78 kg; 26,6 mol). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,78 - 1,84 (m, 2 H), 1,95 (td, 2 H), 2,32 - 2,38 (m, 2 H), 2,51 - 2,59 (m, 2 H), 3,27 (s, 2 H), 7,60 (d, 1 H), 7,81 (m, 1 H), 7,89 (m, 1 H).

Ví dụ 2

(1r,4r)-6'-Bromo-4-metoxyspiro[xyclohexan-1,2'-inden]-1'(3'H)-on

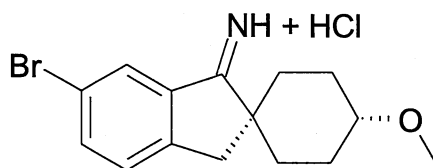


Nạp phức hợp boran tert-butylamin (845 g, 9,7 mol) đã hòa tan trong DCM (3,8 l) vào huyền phù đặc chứa 6'-bromospiro[xyclohexan-1,2'-inden]-1',4(3'H)-đion (7,7 kg, 26,3 mol) trong DCM (42,4 l) ở nhiệt độ xấp xỉ 0-5°C trong khoảng 25 phút. Để phản ứng kết hợp khuấy ở nhiệt độ 0-5°C trong 1 giờ, sau đó, phân tích xác nhận rằng mức chuyển hoá là >98%. Nạp dung dịch được pha từ natri clorua (2,77 kg), nước (13,3 l) và axit clohydric 37% (2,61 l, 32 mol). Làm ấm hỗn hợp đến nhiệt độ xấp xỉ

15°C và tách các pha sau khi lắng thành các lớp. Đưa pha hữu cơ trở lại thiết bị phản ứng, cùng với metyl metansulfonat (2,68 l, 31,6 mol) và tetrabutylamoni clorua (131 g, 0,47 mol) và khuấy mạnh hỗn hợp này ở nhiệt độ 20°C. Sau đó, nạp natri hydroxit 50% (12,5 l, 236 mol) vào hỗn hợp phản ứng đã được khuấy mạnh trong khoảng 1 giờ và để phản ứng kết hợp khuấy mạnh qua đêm ở nhiệt độ 20°C. Bổ sung nước (19 l) và loại bỏ pha nước sau khi tách. Làm nóng lớp hữu cơ đến nhiệt độ xấp xỉ 40°C và chưng cất 33 l dung môi. Nạp etanol (21 l) và tiếp tục cất kết hợp tăng dần nhiệt độ (22 l được cất ở nhiệt độ lên đến 79°C). Nạp etanol (13,9 l) ở nhiệt độ xấp xỉ 75°C. Nạp nước (14,6 l) trong thời gian 30 phút, giữ nhiệt độ nằm trong khoảng 72-75 °C. Rút khoảng 400 ml dung dịch vào lọ polythen 500 ml và mẫu này tự kết tinh. Để nguội mẻ này xuống nhiệt độ 30°C, đưa mẫu huyền phù đặc đã kết tinh trở lại dung dịch. Để nguội hỗn hợp này xuống nhiệt độ 40°C. Làm mát hỗn hợp này xuống nhiệt độ 20°C trong 4 giờ, sau đó, khuấy qua đêm. Lọc chất rắn, rửa bằng hỗn hợp chứa etanol (6,6 l) và nước (5 l) và làm khô ở nhiệt độ 50°C trong chân không để thu được (1r,4r)-6'-bromo-4-metoxyspiro[xyclohexan-1,2'-inden]-1'(3'H)-on (5,83 kg, 18,9 mol) ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,22-1,32 (m, 2 H), 1,41 - 1,48 (m, 2 H), 1,56 (td, 2 H), 1,99 - 2,07 (m, 2 H), 3,01 (s, 2 H), 3,16 – 3,23 (m, 1 H), 3,27 (s, 3 H), 7,56 (d, 1 H), 7,77 (d, 1 H), 7,86 (dd, 1 H).

Ví dụ 3

(1r,4r)-6'-bromo-4-metoxyspiro[xyclohexan-1,2'-inden]-1'(3'H)-imin hydroclorua



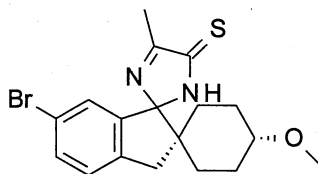
Nạp (1r,4r)-6'-bromo-4-metoxyspiro[xyclohexan-1,2'-inden]-1'(3'H)-on (5,82 kg; 17,7 mol) vào thiết bị phản ứng dung tích 100 l ở nhiệt độ môi trường tiếp theo nạp titan (IV)etoxit (7,4 l; 35,4 mol) và dung dịch chứa tert-butylsulfonamid (2,94 kg; 23,0 mol) trong 2-metyltetrahydrofuran (13,7 l). Khuấy hỗn hợp và làm nóng đến nhiệt độ 82°C. Sau 30 phút ở nhiệt độ 82°C, tăng nhiệt độ lên thêm nữa (lên đến 97°C) và chưng cất 8 l dung môi. Để nguội hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ 87°C và bổ sung 2-metyltetrahydrofuran (8,2 l) làm cho nhiệt độ phản ứng xuống còn 82°C. Để phản

ứng kết hợp khuấy ở nhiệt độ 82°C qua đêm. Tăng nhiệt độ phản ứng (đến 97°C) và chưng cất 8,5 l dung môi. Để nguội hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ 87°C và bổ sung 2-metyltetrahydrofuran (8,2 l) làm cho nhiệt độ phản ứng xuống 82°C. Sau 3,5 giờ, tăng nhiệt độ phản ứng lên (đến 97°C) và chưng cất 8 l dung môi. Để nguội hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ 87°C và bổ sung 2-metyltetrahydrofuran (8,2 l) làm cho nhiệt độ phản ứng xuống còn 82°C. Sau 2 giờ, tăng nhiệt độ phản ứng lên (đến 97°C) và chưng cất 8.2 l dung môi. Để nguội hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ 87°C và bổ sung 2-metyltetrahydrofuran (8,2 l) làm cho nhiệt độ phản ứng xuống còn 82°C. Khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm ở nhiệt độ 82°C. Tăng nhiệt độ phản ứng lên (đến 97°C) và chưng cất 8 l dung môi. Làm lạnh hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ 25°C. Nạp điclotetan (16,4 l) vào. Bổ sung nước (30 l) vào thiết bị phản ứng riêng và khuấy mạnh và bổ sung natri sulfat (7,54 kg) và làm lạnh dung dịch thu được xuống nhiệt độ 10°C. Bổ sung axit sunfuric (2,3 l, 42,4 mol) vào dung dịch nước và điều chỉnh nhiệt độ đến 20°C. Rút 6 l dung dịch nước axit và cất để dùng sau. Nạp hỗn hợp phản ứng hữu cơ vào dung dịch nước axit trong 5 phút kết hợp khuấy đều. Rửa bình phản ứng hữu cơ bằng điclotetan (16,4 l), và dung dịch rửa điclotetan cũng được bổ sung vào nước axit. Khuấy hỗn hợp này trong thời gian 15 phút và sau đó, để lắng trong 20 phút. Pha nước bên dưới được cho chảy đi, và bổ sung 6 l nước rửa axit đã cất tiếp theo là nước (5,5 l). Khuấy hỗn hợp này trong thời gian 15 phút và sau đó, để lắng trong 20 phút. Lớp hữu cơ bên dưới được cho chảy vào bình axit và lớp nước bên trên được loại bỏ. Nạp lớp hữu cơ trở lại bình, tiếp theo nạp natri sulfat (2,74 kg), và khuấy hỗn hợp này trong 30 phút. Lọc natri sulfat và rửa bằng điclotetan (5,5 l) và nạp pha hữu cơ gộp lại vào bình sạch. Mẻ này được làm nóng để cất (thu được tối đa 31 l ở nhiệt độ 57°C). Để nguội mẻ này xuống nhiệt độ 40°C và bổ sung điclotetan (16,4 l). Mẻ này được làm nóng để cất (thu được tối đa 17 l ở nhiệt độ 54°C). Làm lạnh mẻ này xuống nhiệt độ 20°C và bổ sung điclotetan (5,5 l) và etanol (2,7 l). Nạp hydroclorua 2 M trong ete dietyl (10,6 l; 21,2 mol) vào phản ứng trong 45 phút, giữ nhiệt độ nằm trong khoảng 16-23°C. Khuấy huyền phù đặc thu được ở nhiệt độ 20°C trong 1 giờ, sau đó, lọc chất rắn và rửa 3 lần bằng hỗn hợp điclotetan và ete dietyl với tỷ lệ 1:1 (3 x 5,5 l). Làm khô chất rắn này ở nhiệt độ 50°C trong chân không thu được (1r,4r)-6'-bromo-4-metoxyspiro[xyclohexan-1,2'-inden]-1'(3'H)-imin hydroclorua (6,0 kg; 14,3

mol; 82% khối lượng/khối lượng thử nghiệm bằng ^1H NMR) ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 130 (m, 2 H), 1,70 (d, 2 H), 1,98 (m, 2 H), 2,10 (m, 2 H), 3,17 (s, 2 H), 3,23 (m, 1 H), 3,29 (s, 3 H), 7,61 (d, 1 H), 8,04 (dd, 1 H), 8,75 (d, 1 H), 12,90 (br s, 2H).

Ví dụ 4

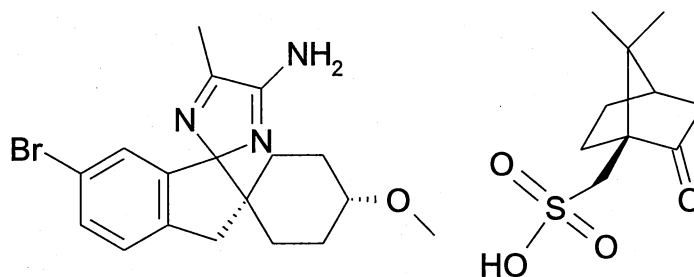
(1r,4r)-6'-Bromo-4-metoxi-5''-metyl-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''(3''H)-thion



Nạp trimethylorthoformat (4,95 l; 45,2 mol) và diisopropyletylamin (3,5 l; 20,0 mol) vào thiết bị phản ứng chứa (1r,4r)-6'-bromo-4-metoxyspiro[xyclohexan-1,2'-inden]-1'(3'H)-imin hydroclorua (6,25 kg; 14,9 mol) trong isopropanol (50,5 l). Khuấy hỗn hợp phản ứng này và làm nóng đến nhiệt độ 75°C trong 1 giờ sao cho thu được dung dịch trong. Thiết đặt nhiệt độ đến 70°C và nạp dung dịch 2-oxopropanthioamit 2 M trong isopropanol (19,5 kg; 40,6 mol) trong 1 giờ, sau đó, khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm ở nhiệt độ 69°C. Mẻ này được tạo hạt bằng (1r,4r)-6'-bromo-4-metoxi-5''-metyl-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''(3''H)-thion (3 g; 7,6 mmol) và hạ nhiệt độ xuống 60°C và khuấy trong 1 giờ. Cô hỗn hợp này bằng cách cất (nhiệt độ cất xấp xỉ 60°C; cất được 3 l). Bổ sung nước (3 l) trong 1 giờ và nhiệt độ 60°C trước khi hạ nhiệt độ xuống 25°C trong 90 phút, sau đó, khuấy hỗn hợp này trong thời gian 3 giờ. Lọc chất rắn, rửa bằng isopropanol hai lần (2 x 5,2 l) và làm khô trong chân không ở nhiệt độ 40°C thu được (1r,4r)-6'-bromo-4-metoxi-5''-metyl-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''(3''H)-thion (4,87 kg; 10,8 mol; thử nghiệm thu được nồng độ 87% khối lượng/khối lượng bằng ^1H NMR).

Ví dụ 5

Muối axit D(+)-10-camphorsulfonic của (1r,1'R,4R)-6'-bromo-4-metoxymethyl-3'H-dispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin



Nạp amoniac 7 M trong metanol (32 l; 224 mol) vào thiết bị phản ứng chứa (1r,4r)-6'-bromo-4-metoxymethyl-3'H-dispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''(3''H)-thion (5,10 kg; 11,4 mol) và kẽm axetat đihydrat (3,02 kg; 13,8 mol). Đậy kín thiết bị phản ứng và làm nóng hỗn hợp này đến nhiệt độ 80°C và khuấy trong 24 giờ, sau đó, làm lạnh xuống nhiệt độ 30°C. Nạp 1-butanol (51 l) và cô hỗn hợp phản ứng bằng cách cất trong chân không khoảng 50 l. Bổ sung 1-butanol (25 l) và cô hỗn hợp này bằng cách cất trong chân không 27 l. Làm lạnh hỗn hợp này xuống nhiệt độ 30°C và nạp natri hydroxit 1 M (30 l; 30 mol) vào. Khuấy hỗn hợp hai pha này trong 15 phút. Tách pha nước bên dưới. Nạp nước (20 l) và khuấy hỗn hợp này trong 30 phút. Tách pha nước bên dưới. Làm nóng pha hữu cơ đến nhiệt độ 70°C, sau đó, nạp axit (1S)-(+)-10-camphorsulfonic (2,4 kg; 10,3 mol) vào. Khuấy hỗn hợp này trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 70°C và sau đó, giảm xuống còn 20°C trong 3 giờ. Lọc chất rắn này, rửa bằng etanol (20 l) và làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C thu được muối axit (+)-10-camphor sulfonic của (1r,4r)-6'-bromo-4-metoxymethyl-3'H-dispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin (3,12 kg; 5,13 mol; thử nghiệm thu được 102% khối lượng/thể tích bằng ^1H NMR).

Ví dụ 6

(1r,1'R,4R)-4-metoxymethyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-dispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin

Nạp Na_2PdCl_4 (1,4 g; 4,76 mmol) và 3-(di-tert-butylphosphoni)propan sulfonat (2,6 g; 9,69 mmol) được hòa tan trong nước (0,1 l) vào bình chứa muối axit (+)-10-camphorsulfonic của (1r,4r)-6'-bromo-4-metoxymethyl-3'H-dispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin (1 kg; 1,58 mol), kali cacbonat (0,763 kg; 5,52

mol) trong hỗn hợp gồm 1-butanol (7,7 l) và nước (2,6 l). Hỗn hợp được làm trơ cẩn thận bằng khí nitơ, sau đó nạp axit 5-(prop-1-ynyl)pyridin-3-yl boronic (0,29 kg; 1,62 mol) và hỗn hợp được làm trơ cẩn thận lần nữa bằng khí nitơ. Làm nóng hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ 75°C và khuấy trong 2 giờ, sau đó, phân tích cho thấy chuyển hóa hoàn toàn. Điều chỉnh nhiệt độ xuống 45°C. Ngừng khuấy và tách pha nước bên dưới. Rửa lớp hữu cơ 3 lần bằng nước (3 x 4 l). Điều chỉnh nhiệt độ phản ứng xuống 22°C và nạp chất khử Phosphonics SPM32 (0,195 kg) và khuấy hỗn hợp này qua đêm. Lọc chất khử này và rửa bằng 1-butanol (1 l). Cô phản ứng bằng cách cất dưới áp suất giảm đến 3 l. Nạp butyl axetat (7,7 l) và cô hỗn hợp lần nữa xuống còn 3 l bằng cách cất dưới áp suất giảm. Nạp butyl axetat (4,8 l) và làm nóng hỗn hợp đến nhiệt độ 60°C. Khuấy hỗn hợp này trong thời gian 1 giờ, sau đó, cô hỗn hợp này xuống còn khoảng 4 l bằng cách cất dưới áp suất giảm. Thiết đặt nhiệt độ đến 60°C và bổ sung heptan (3,8 l) trong 20 phút. Làm lạnh hỗn hợp xuống nhiệt độ 20°C trong 3 giờ và sau đó, để hỗn hợp kết hợp khuấy qua đêm. Lọc chất rắn và rửa hai lần bằng hỗn hợp gồm butyl axetat:heptan với tỷ lệ 1:1 (2 x 2 l). Làm khô sản phẩm trong chân không ở nhiệt độ 50°C để thu được (1*r*,1'*r*,4*R*)-4-metoxi-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin (0,562 kg; 1,36 mol; thử nghiệm thu được 100% khối lượng/khối lượng bằng ¹H NMR). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0,97 (d, 1 H), 1,12-1,30 (m, 2 H), 1,37-1,51 (m, 3 H), 1,83 (d, 2 H), 2,09 (s, 3 H), 2,17 (s, 2 H), 2,89-3,12 (m, 3 H), 3,20 (s, 3 H), 6,54 (s, 2 H), 6,83 (s, 1 H), 7,40 (d, 1 H), 7,54 (d, 1 H), 7,90 (s, 1H). 8,51 (d, 1H), 8,67 (d, 1H)

Ví dụ 7

Điều chế muối camsylat của (1*r*,1'*r*,4*R*)-4-metoxi-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin

Hòa tan 1,105 kg (1*r*,1'*r*,4*R*)-4-metoxi-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin trong 8,10 l 2-propanol và 475 ml nước ở nhiệt độ 60°C. Sau đó, nạp 1,0 mol đương lượng (622 gam) axit (1*S*)-(+)-10 camphorsulfonic ở nhiệt độ 60°C. Khuấy huyền phù đặc cho đến khi tất cả axit (1*S*)-(+)-10 camphorsulfonic được hoà tan. Bổ sung phần 2-propanol thứ hai (6,0 l) ở nhiệt độ 60°C và sau đó, các thành phần được cất cho đến

khi gom được 4,3 l phần cất. Sau đó, nạp 9,1 l heptan ở nhiệt độ 65°C. Sau thời gian một giờ, mẻ này trở nên đục. Sau đó, việc cất bổ sung được thực hiện ở nhiệt độ khoảng 75°C và gom 8,2 L phần cất. Sau đó, làm lạnh mẻ này xuống nhiệt độ 20°C trong 2 giờ và giữ ở nhiệt độ đó qua đêm. Sau đó, lọc mẻ và rửa bằng hỗn hợp chứa 1,8 L 2-propanol và 2,7 L heptan. Cuối cùng, làm khô chất này ở áp suất giảm và nhiệt độ 50°C. Hiệu suất là 1,44 kg (83,6% khối lượng/khối lượng). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 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).

Thử nghiệm sinh học

Mức độ hoạt tính của muối camsylat của (1*r*,1'*r*,4*R*)-4-metoxi-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin có thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng các phương pháp sau:

Thử nghiệm TR-FRET

Enzym β-secretaza được sử dụng trong TR-FRET được điều chế như sau: ADN bổ trợ đối với phần hòa tan của β-secretaza của người (AA 1 – AA 460) được tách dòng bằng cách sử dụng vector biểu hiện ở động vật có vú ASP2-Fc10-1-IRES-GFP-neoK. Gen này được dung hợp với miền Fc của IgG1 (gắn ái lực) và được tách dòng một cách ổn định vào tế bào HEK 293. sBACE-Fc đã tinh chế được lưu giữ ở nhiệt độ -80°C trong glyxin 50 mM pH=2,5, được điều chỉnh đến độ pH=7,4 bằng Tris 1 M và có độ tinh khiết bằng 40%.

Enzym (dạng được cắt ngắn) được pha loãng đến nồng độ 6 µg/ml (dịch dự trữ 1,3 mg/ml) và cơ chất TruPoint BACE1 đến 200 nM (dịch dự trữ 120 µM) trong dung dịch đệm phản ứng (NaAcetat, chaps, triton x-100, EDTA pH4,5). Enzym và hợp chất trong dimethylsulphoxid (nồng độ DMSO cuối bằng 5%) được trộn và ủ trước trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, bổ sung cơ chất và ủ hỗn hợp phản ứng trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Làm ngừng phản ứng bằng cách bổ sung 0,35 thể tích dung dịch làm ngừng (NaAcetat, pH 9). Huỳnh quang của sản phẩm được đo trên máy

đọc đĩa Victor II với bước sóng kích thích là 340-485 nm và bước sóng phát xạ là 590-615 nm. Nồng độ cuối của enzym này là 2,7 $\mu\text{g/ml}$; nồng độ cuối của cơ chất là 100 nM (K_m là ~ 250 nM). Đối chứng dimethylsulphoxid, thay cho hợp chất thử nghiệm, xác định mức độ hoạt tính 100% và mức độ hoạt tính 0% được xác định bởi các lỗ không có enzym (được thay thế bằng dung dịch đệm phản ứng) hoặc bằng liều bão hòa của chất ức chế đã biết, 2-amino-6-[3-(3-metoxypheyl)phenyl]-3,6-dimetyl-5H-pyrimidin-4-on. Chất ức chế đối chứng cũng được sử dụng trong thử nghiệm đáp ứng liều và có IC_{50} là ~ 150 nM.

Muối camsylat của (1r,1'R,4R)-4-metoxi-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-dispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1'2'-imidazol]-4''-amin có IC_{50} trung bình là 0,2 nM trong thử nghiệm này.

Thử nghiệm giải phóng sAPP β

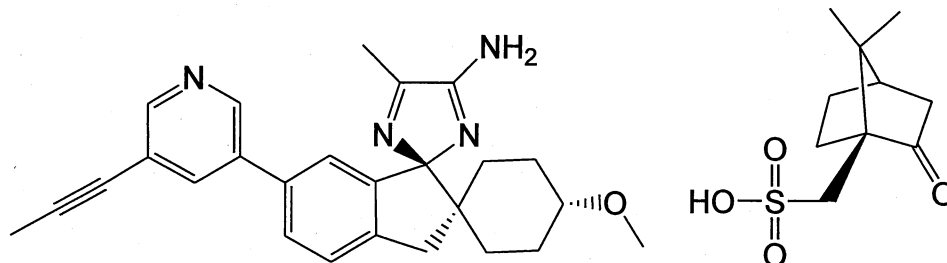
Tế bào SH-SY5Y được nuôi cấy trong DMEM /F-12 với Glutamax, 10% FCS và 1% các axit amin không thiết yếu và được bảo quản cryo và bảo quản ở nhiệt độ -140°C ở nồng độ bằng $7,5-9,5 \times 10^6$ tế bào trên mỗi lọ. Các tế bào được làm tan và tạo hạt ở nồng độ khoảng 10000 tế bào/lỗ trong DMEM /F-12 với Glutamax, 10% FCS và 1% các axit amin không thiết yếu vào đĩa xử lý nuôi cấy mô 384 lỗ, 100 μL huyền phù tế bào/lỗ. Sau đó, các đĩa tế bào được ủ trong 7-24 giờ ở nhiệt độ 37°C , 5% CO_2 . Loại bỏ môi trường tế bào, tiếp theo bổ sung 30 μL hợp chất được pha loãng trong DMEM /F-12 với Glutamax, 10% FCS, 1% các axit amin không thiết yếu và 1% PeSt đến nồng độ cuối bằng 1% DMSO. Các hợp chất được ủ với các tế bào trong 17 giờ (qua đêm) ở nhiệt độ 37°C , 5% CO_2 . Đĩa Meso Scale Discovery (MSD) được sử dụng để phát hiện sự giải phóng sAPP β . Đĩa MSD sAPP β được phong bế trong BSA 1% trong dung dịch đệm rửa Tris (40 $\mu\text{L/lỗ}$) trong 1 giờ kết hợp lắc ở nhiệt độ phòng và rửa 1 lần trong dung dịch đệm rửa Tris (40 $\mu\text{L/lỗ}$). 20 μL môi trường được chuyển sang các vi đĩa MSD sAPP β đã được rửa và phong bế trước, và các đĩa tế bào được sử dụng tiếp trong thử nghiệm ATP để đo tính độc tế bào. Các đĩa MSD được ủ kết hợp lắc ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ và loại bỏ môi trường. Bổ sung 10 μL kháng thể phát hiện (1 nM) mỗi lỗ tiếp theo ủ kết hợp lắc ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ và sau đó, loại bỏ. Bổ sung 40 μL dung dịch đệm đọc mỗi lỗ và các đĩa được đọc trong bộ tạo ảnh SECTOR.

Thử nghiệm ATP

Như đã chỉ ra trong thử nghiệm giải phóng sAPP β , sau khi chuyển 20 μ l môi trường từ đĩa tế bào để phát hiện sAPP β , các đĩa được sử dụng để phân tích tính độc tế bào bằng cách sử dụng kit tăng sinh tế bào/tính độc tế bào ViaLightTM Plus của Cambrex BioScience đo tổng ATP tế bào. Thử nghiệm này được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất. Nói ngắn gọn, 10 μ l chất gây tan tế bào được bổ sung vào mỗi lỗ. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Hai phút sau khi bổ sung 25 μ l chất phản ứng ATP ViaLightTM Plus đã hoàn nguyên, mức độ phát quang được đo. Ngưỡng Tox là tín hiệu dưới 75% của đối chứng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Muối camsylat của (1r,1'R,4R)-4-metoxy-5''-metyl-6'-[5-(prop-1-yn-1-yl)pyridin-3-yl]-3'H-đispiro[xyclohexan-1,2'-inden-1',2''-imidazol]-4''-amin:



2. Muối camsylat theo điểm 1, có phổ nhiễu xạ bột tia X (XRPD) chủ yếu có các pic rất mạnh, mạnh và trung bình với các giá trị d như sau:

Góc hiệu chỉnh	Khoảng cách d (Å)	Cường độ tương đối
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. Muối camsylat theo điểm 1, có phổ nhiễu xạ bột tia X về cơ bản như được thể hiện trên Fig.1.

4. Dược phẩm chứa hoạt chất là muối theo các điểm 1, 2 hoặc 3 với lượng hữu hiệu trị liệu kết hợp với ít nhất một tá dược, chất mang hoặc chất pha loãng được dụng.

Fig.1

