



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202229236 A

(43)公開日：中華民國 111 (2022) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：110136766

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 10 月 01 日

(51)Int. Cl.：

*C07D211/46 (2006.01)**A61K31/445 (2006.01)**A61P3/00 (2006.01)**A61P25/16 (2006.01)**A61P9/10 (2006.01)*

(30)優先權：2020/10/02

歐洲專利局

20199934.9

(71)申請人：荷蘭商雅捷法羅斯公司 (荷蘭) AZAFAROS B.V. (NL)

荷蘭

(72)發明人：海特 羅伯特 HETT, ROBERT (DE)；布雷特 弗列資 BLATTER, FRITZ (CH)；

羅賓 珍妮佛 ROBIN, JENNIFER (FR)；藍斯科拿 凱爾 LANDSKRONER, KYLE

(US)

(74)代理人：陳長文

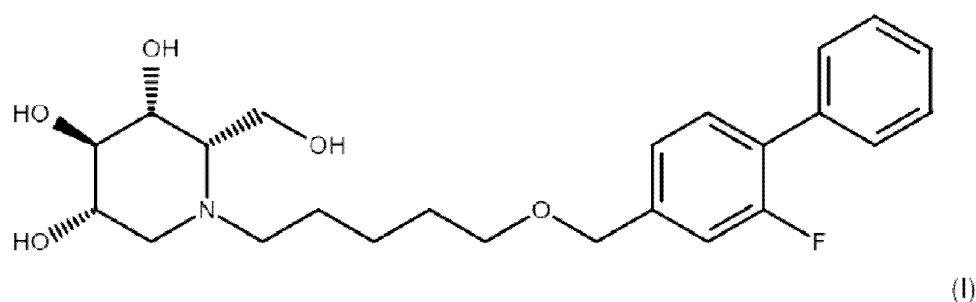
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：17 共 77 頁

(54)名稱

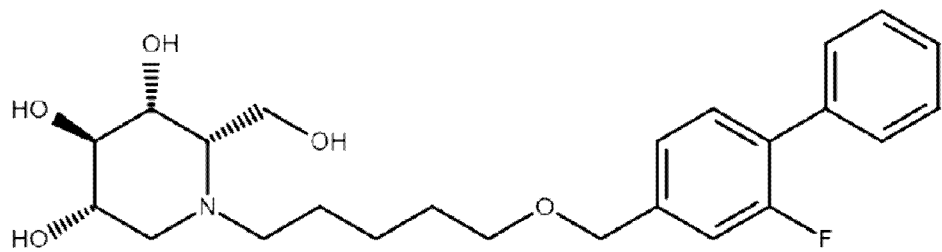
醫藥化合物之結晶形式

(57)摘要

本發明係關於化合物(I)之結晶形式及製備化合物(I)之結晶形式之方法。本發明亦提供包含化合物(I)之結晶形式之醫藥組合物。此外，本發明係關於使用此化合物(I)之結晶形式作為藥劑且於治療涉及葡糖神經醯胺之異常含量及/或醣神經鞘脂質之較高含量之疾病中的方法。

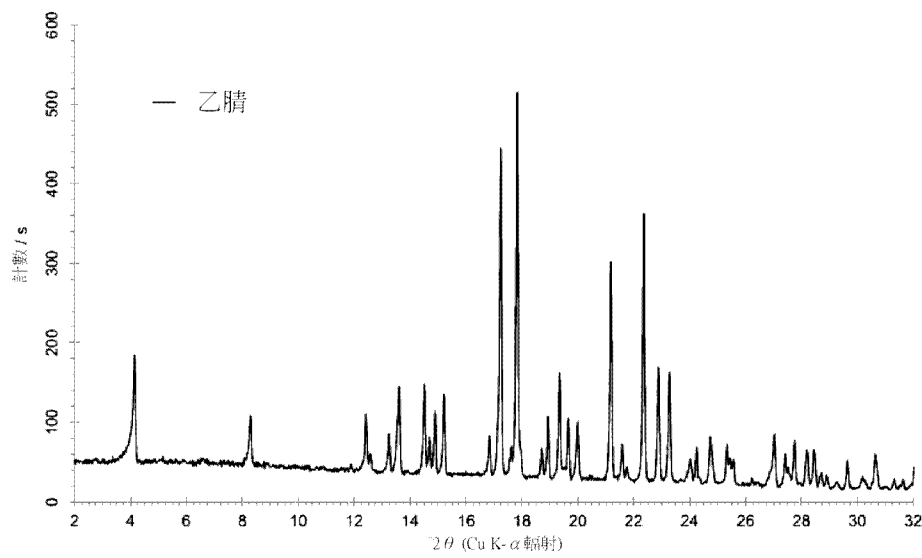


The present invention relates to a crystalline form of compound (I) and a method of making the crystalline form of compound (I). The invention also provides pharmaceutical compositions comprising the crystalline form of compound (I). Furthermore, the invention relates to methods of using this crystalline form of compound (I) as a medicament and in the treatment of a disease involving abnormal levels of glucosylceramide and/or higher levels of glycosphingolipids.



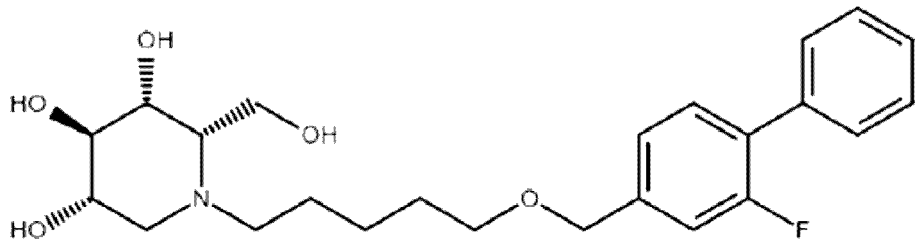
(I)

指定代表圖：



【圖6A】

特徵化學式：



(I)

[(發明摘要)]

[(中文發明名稱)]

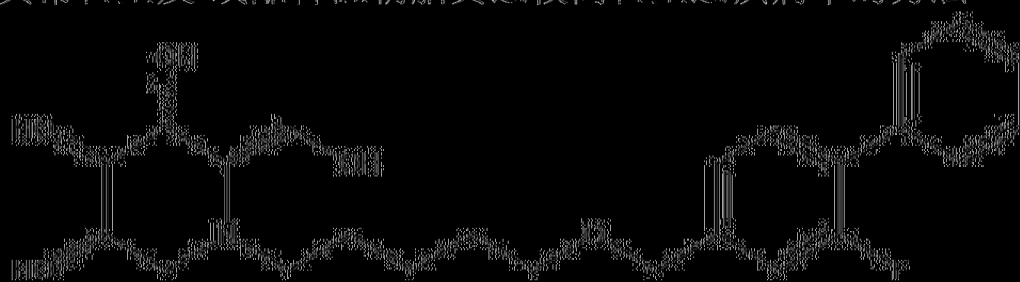
醫藥化合物之結晶形式

[(英文發明名稱)]

CRYSTALLINE FORMS OF A PHARMACEUTICAL COMPOUND

[(中文)]

本發明係關於化合物(I)之結晶形式及製備化合物(I)之結晶形式之方法。本發明亦提供包含化合物(I)之結晶形式之醫藥組合物。此外，本發明係關於使用此化合物(I)之結晶形式作為藥劑且於治療涉及葡萄糖神經醯胺之異常含量及/或醯神經鞘脂質之較高含量之疾病中的方法。



(I)。

[(英文)]

The present invention relates to a crystalline form of compound (I) and a method of making the crystalline form of compound (I). The invention also provides pharmaceutical compositions comprising the crystalline form of compound (I). Furthermore, the invention relates to methods of using this crystalline form of compound (I) as a medicament and in the treatment of a disease involving abnormal levels of glucosylceramide and/or higher levels of glycosphingolipids.

【發明說明書】

【中文發明名稱】

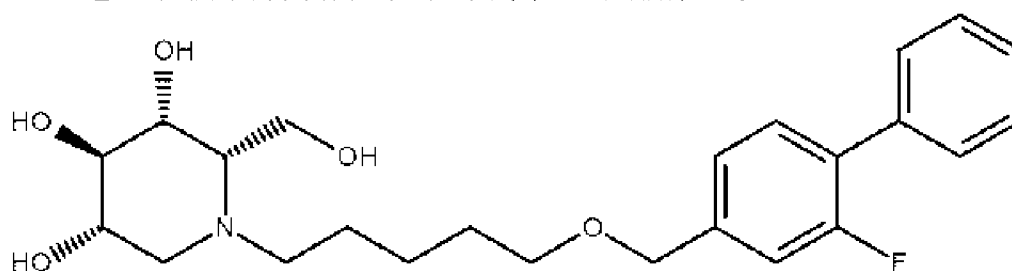
醫藥化合物之結晶形式

【英文發明名稱】

CRYSTALLINE FORMS OF A PHARMACEUTICAL COMPOUND

【技術領域】

【0001】 本發明係關於化合物(I)之結晶形式，



(I)。

【0002】 本發明亦關於製備化合物(I)之結晶形式之方法，以及包含化合物(I)之結晶形式之醫藥組合物。此外，本發明係關於使用此化合物(I)之結晶形式作為藥劑及於治療涉及葡萄糖神經鹼胺之異常含量及/或醣神經鞘脂質之較高含量之疾病中的方法。

【先前技術】

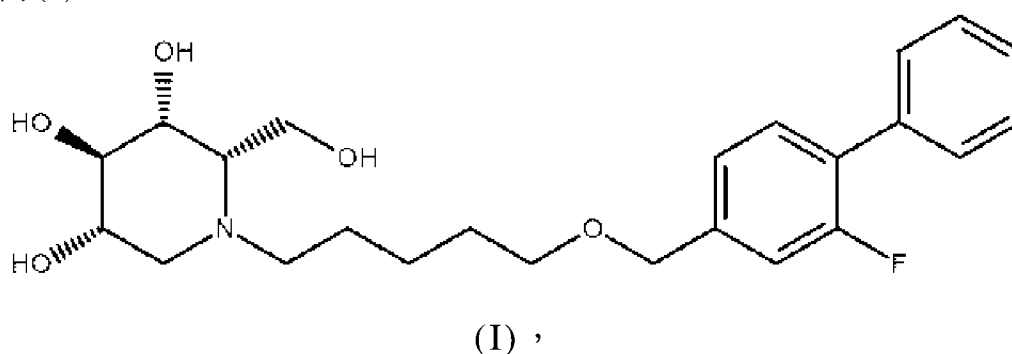
【0003】 當化合物係用於醫藥目的時，化合物之晶體狀態可係重要的。此係因為化合物之晶體狀態之形態學、粒子尺寸、多晶型現象、溶劑化或水合可影響醫藥劑之過濾、流動、製錠、溶解及生物可利用率。

【0004】 去氧野尻黴素(Deoxynojirimycin)衍生物為醫藥化學及藥物發現中之重要分子類別。*N*-(羥乙基)-去氧野尻黴素作為2型糖尿病之抗糖尿病劑以米格列醇(Miglitol)銷售。米格列醇亦充當若干腸糖苷酶(麥芽糖酶、蔗糖及乳糖酶)之廣譜抑制劑(Hillebrand等人，*Diabetes*, 1986年，

第35卷，A93至A93) (Scott及Spencer, *Drugs*, 2000年，第59卷，521至549)。

【0005】開發 *N*-丁基-去氧野尻黴素(美格魯特(miglustat)，Zavesca®)作為葡萄糖神經醯胺合成酶(亦稱作神經醯胺葡萄糖基轉移酶，EC 2.4.1.80，UniProt代碼：Q16739)之抑制劑及用於診所以治療患有溶酶體貯積症，高歇氏病(Gaucher disease) (Platt等人，*J. Biol. Chem.*, 1994年，第269卷，8362至8365) (Cox等人，*Lancet*, 2000年，第355卷，1481至1485)及C型尼曼-匹克氏(Niemann-Pick)病(Pineda等人，*Orphanet J. Rare Dis.*, 2018年，第13卷，140)之患者。

【0006】 WO2015/147639 A1描述去氧野尻黴素之新穎衍生物，包括化合物(I)，



其有效治療與細胞溶質或溶酶體葡萄糖神經醯胺之異常含量及/或醣神經鞘脂質之較高含量相關聯之疾病。化合物(I)為葡萄糖神經醯胺合成酶及非溶酶體葡萄糖神經醯胺酶(GBA2，UniProt代碼：Q9HCG7)之強效雙重抑制劑。

【0007】 可用於治療葡萄糖神經醯胺之異常含量及/或醣神經鞘脂質之較高含量之治療性化合物通常以錠劑之形式投與。當製備用於此等錠劑中之醫藥組合物及調配物時，高度期望具有治療性化合物之結晶形式，其具有低程度之吸濕性及/或低程度之潮解性，從而允許該化合物被壓縮成所

需形狀或尺寸。

【0008】 此外，治療性化合物之相對高熔點(通常大於約80°C)有利於對抗分解，從而有助於儲存及增加治療性化合物之貨架期，其為任何醫藥劑所需。

【0009】 當考慮醫藥劑之操作、製造及儲存時，治療性化合物係非吸濕性或實質上非吸濕性亦特別有益。若醫藥劑顯示吸濕性質，則許多問題可產生，例如：

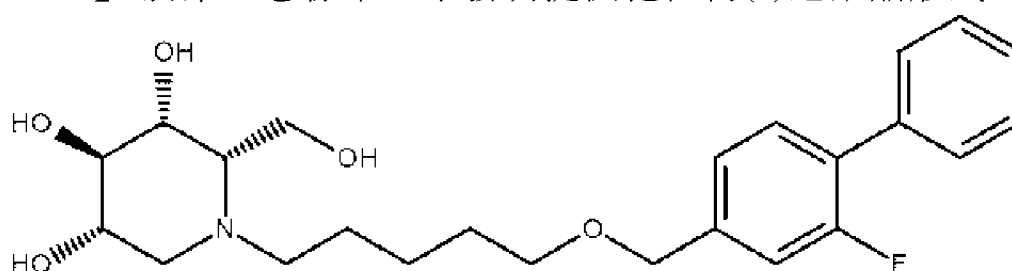
- 藉由壓碎將材料減少為小粒子或粉末有困難；
- 非所需水分妨礙適宜反應並形成非所需最終產物，其導致最低品質及減少之貨架期；
- 在製造期間產生軟錠劑，或在包裝內部水分滲透；
- 粉末黏附至傳送機，其可影響填充製程。

因此，期望具有治療性化合物之結晶形式，其係非吸濕性或實質上非吸濕性。

【0010】 先前尚未報導化合物(I)之結晶形式。因此，存在對穩定及/或非潮解化合物(I)之結晶形式之需求，其較佳地係實質上非吸濕性及/或具有相對高的熔點。

【發明內容】

【0011】 於第一態樣中，本發明提供化合物(I)之結晶形式，



(I)。

【0012】 除非明確相反指定，否則如本文中所述之各態樣或實施例可與任何其他態樣或實施例組合。特定言之，指定為較佳或有利之任何特徵可與指定為較佳或有利之任何一或多個其他特徵組合。

【0013】 於另一態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含如本文中所述之化合物(I)之結晶形式。

【0014】 於另一態樣中，本發明提供如本文中所述之化合物(I)之結晶形式，或如本文中所述之醫藥組合物，其用於療法中。

【0015】 於另一態樣中，本發明提供如本文中所述之化合物(I)之結晶形式，或如本文中所述之醫藥組合物，其用作藥物。

【0016】 本發明之另一態樣係關於如本文中所述之化合物(I)之結晶形式，或如本文中所述之醫藥組合物，其用於治療涉及葡萄糖神經醯胺之異常含量及/或醣神經鞘脂質之較高含量之疾病。

【0017】 於另一態樣中，本發明提供如本文中所述之化合物(I)之結晶形式，或如本文中所述之醫藥組合物，其用於治療C型尼曼-匹克氏病。

【0018】 於另一態樣中，本發明提供一種治療人類或動物患者之涉及葡萄糖神經醯胺之異常含量及/或醣神經鞘脂質之較高含量之疾病的方法，其包括向有需要患者投與治療上有效量之如本文中所述之化合物(I)之結晶形式，或如本文中所述之醫藥組合物。

【0019】 於另一態樣中，本發明提供一種治療人類或動物患者之C型尼曼-匹克氏病之方法，其包括向有需要患者投與治療上有效量之如本文中所述之化合物(I)之結晶形式，或如本文中所述之醫藥組合物。

【0020】 於另一態樣中，本發明提供一種製備如本文中所述之化合物(I)之結晶形式之方法，其包括使化合物(I)之樣品與溶劑接觸。

【0021】 於另一態樣中，本發明提供化合物(I)之結晶形式，其藉由進行如本文中所述之方法獲得。

【0022】 於另一態樣中，本發明提供化合物(I)之游離鹼於製備化合物(I)之結晶形式之用途。

【0023】 於另一態樣中，本發明提供一種製備化合物(I)之結晶形式之方法，其包括使該化合物(I)之游離鹼結晶。

【0024】 於另一態樣中，本發明提供化合物(I)之結晶形式，其藉由製備化合物(I)之結晶形式之方法獲得，該方法包括使化合物(I)之游離鹼結晶。

【0025】 根據本發明之化合物之其他較佳實施例在整篇本說明書及特定言之於實例中出現。

【0026】 本發明者出人意料地發現穩定且非潮解之化合物(I)之結晶形式。本發明具有另外有利性質，諸如實質缺少吸濕性及相對高的熔點。出乎意料地，本發明者另外發現顯示於水中良好溶解度之化合物(I)之結晶形式。此等性質使本發明之結晶形式特別適用於醫藥組合物中。

【0027】 治療性化合物之結晶通常涉及使用不同鹽。通常，鹽容易經歷結晶，及所得物質促進治療性化合物之後續結晶。針對此原因，使用鹽通常為使治療性化合物結晶之較佳方法。因此，出人意料地本發明者已發現化合物(I)之結晶游離鹼形式。

【0028】 因為任何治療性化合物之結晶游離鹼形式不需要存在抗衡離子，呈游離鹼結晶形式粉末之治療性化合物之濃度通常高於對應鹽形式，其係高度有益，因為其降低製造治療性化合物之成本。

【0029】 不希望侷限於理論，認為本發明之結晶形式由於其晶體結

構傾向於顯示以上所討論之有利效應。

【圖式簡單說明】

【0030】 本發明之此等及其他態樣現將參考附圖描述，其中：

【0031】 圖1顯示使用化合物(I)之結晶形式(稱作形式2)之偏振光顯微鏡獲得的示例性影像，該形式2藉由利用乙腈平衡獲得之；左：呈乾粉末，右：分散於石蠟油中。

【0032】 圖2顯示藉由利用乙腈平衡獲得之形式2之X-射線粉末繞射圖。

【0033】 圖3A顯示藉由利用乙腈平衡獲得之形式2之TG-FTIR溫譜圖。

【0034】 圖3B顯示藉由利用乙腈平衡獲得之形式2之示差掃描量熱法(DSC)溫譜圖。

【0035】 圖4A顯示藉由利用乙腈平衡獲得之形式2之動態蒸汽吸附(DVS)等溫線：水含量(紅色曲線)及相對濕度(藍色曲線)作為時間函數的變化。

【0036】 圖4B顯示藉由利用乙腈平衡獲得之形式2之DVS等溫線：水含量作為相對濕度之函數的變化。

【0037】 圖5顯示使用化合物(I)之結晶形式(稱作形式3)之偏振光顯微鏡獲得的示例性影像，該形式3藉由各自利用乙腈、苯甲醚或乙酸乙酯平衡獲得。

【0038】 圖6A顯示藉由利用乙腈平衡獲得之形式3之X-射線粉末繞射圖。

【0039】 圖6B顯示藉由各自利用TBME、水、異丙醇、乙酸乙酯、

乙腈或苯甲醚平衡獲得之形式3之X-射線粉末繞射圖的重疊。

【0040】 圖7顯示藉由利用乙腈平衡獲得之化合物(I)之兩種結晶形式之X-射線粉末繞射圖的重疊：

- 1)形式3 (實例3)，及
- 2)形式2 (實例2)。

【0041】 圖8A顯示藉由利用乙酸乙酯平衡獲得之形式3之TG-FTIR溫譜圖。

【0042】 圖8B顯示藉由利用異丙醇平衡獲得之形式3之TG-FTIR溫譜圖。

【0043】 圖8C顯示藉由利用乙酸乙酯平衡獲得之形式3之DSC溫譜圖。

【0044】 圖9A顯示藉由利用乙酸乙酯平衡獲得之形式3之DVS等溫線：水含量(紅色曲線)及相對濕度(藍色曲線) 作為時間函數的變化。

【0045】 圖9B顯示藉由利用乙酸乙酯平衡獲得之形式3之DVS等溫線：水含量作為相對濕度之函數的變化。

【0046】 圖10顯示遵循基於Paxinos及Franklin 「The Mouse Brain Atlas，第2版」之切片協定獲得之中間矢狀層面，其顯示立體定位坐標。

【0047】 圖11顯示出生後天數(PND)第11天與第9週之間小鼠體重之變化%。

【0048】 圖12顯示自PND 11至70重複口服投與後之葡糖神經鹼胺C16:0及C18:0含量。

【0049】 圖13顯示NPC (-/-)經媒劑及經AZ-3102治療之小鼠之臨床徵兆自PND 56至70之評分。

【0050】 圖14顯示NPC (-/-)經媒劑及經AZ-3102治療之小鼠自PND 56至70之震顫評分。

【0051】 圖15顯示受關注區域(ROI)之定義。該影像顯示小腦、海馬形成、胼胝體及紋狀體(尾殼核)之ROI之輪廓。

【0052】 圖16顯示腦免疫組織化學：與NPC (+/+，野生型小鼠)及NPC (-/-)經治療小鼠相比之NPC(-/-)及NPC(+/-)經媒劑治療之小鼠中之鈣結合蛋白(calbindin)-D28k標記。

【0053】 圖17概述化合物(I)之結晶形式(AZ-3102)之作用模式。

【實施方式】

【0054】 除非本文中另有定義，否則結合本發明所用之科學及技術術語應具有由一般技術者通常理解之含義。術語之含義及範圍應係清晰，然而，於任何潛在含糊性之事件中，本文中所提供之定義優於任何字典或外在定義。

【0055】 應瞭解，出於方便，通常使用單數介詞，諸如「一(a/an)」及「該」，然而，除非明確或自上下文另有指定，否則單數之所有實例意欲包含複數。術語「包括」、「包含」及「具有」意欲係包含且意指可存在除了所列要素外之另外要素。另外，應瞭解，於本發明中提及之所有參考文獻(包括期刊文章、書籍、專利、技術檔案及類似者)之全文且出於所有目的以引用的方式併入本文中。

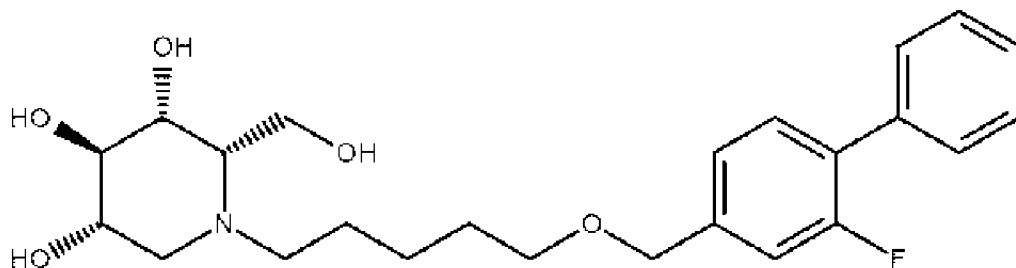
【0056】 如本文中所用，針對數值資料之術語「約」係指基礎參數之10%內之值(即，加上或減去10%)，及在一串值開始處使用術語「約」修飾該等值各者(即，「約1、2及3」係指約1、約2及約3)。例如，「約85°C」之溫度可包含75°C與95°C之間之溫度。

【0057】術語「熔點」係此項技術中熟知。如本文中所用，術語「相對高熔點」意在包含足夠穩定以經調配成醫藥組合物之結晶形式。較佳地，術語「相對高熔點」描述大於約65°C之熔點。仍更佳地，熔點係大於約80°C。

【0058】如本文中所用，術語「組合物」意欲包涵包含指定量之指定成分之產物，以及自指定量之指定成分之組合直接或間接產生之任何產物。與醫藥組合物相關之此術語意在包涵包含化合物(I)之結晶形式，及視情況組成載劑之另外成分之產物，以及自成分中之任兩者或更多者之組合、複合或附聚，或自成分中之一或多者之解離，或自成分中之一或多者之其他類型之反應或相互作用直接或間接產生之任何產物。因此，本發明之醫藥組合物包涵包含本發明之結晶形式及視情況醫藥上可接受之載劑之任何組合物。「醫藥上可接受」意指載劑、稀釋劑或賦形劑必須與調配物之其他成分相容且對其接受者無害。

【0059】術語「治療上有效量」意指當向患者投與用於治療疾病時足以實現該疾病之此治療之結晶形式或醫藥組合物之量。「治療上有效量」將取決於疾病及其嚴重度，及待治療之患者之年齡及體重變化。術語「患者」(或「個體」)包括(但不限於)動物，諸如，例如，哺乳動物。較佳地，該患者為人類。

【0060】本發明提供化合物(I)之結晶形式，



(I)。

【0061】 化合物(I)之結晶形式可處於任何晶體狀態。化合物(I)之結晶形式可為結晶鹽或結晶游離鹼(非離子形式)。較佳地，化合物(I)之結晶形式為結晶游離鹼。此外，化合物(I)可形成共晶體。

【0062】 若化合物(I)之結晶形式為結晶鹽，則以上化合物(I)之分子結構包含質子化氮原子。

【0063】 本發明不限於化合物(I)之單晶形式。固體材料可以超過一種結晶形式存在。此等替代結晶形式被稱作多晶型物。各多晶型物具有分子於晶格中之不同取向及/或構象。由於晶體結構之差異，各晶體狀態或「多晶型物」展示獨特物理化學性質集。

【0064】 多晶型形式可具有不同機械性質，諸如流動性及可壓縮性，其影響化合物之技術性質。化合物之穩定性及儲存持續時間亦可取決於多晶型物。

【0065】 多晶型物可以不同方式彼此區分。多晶型物清晰地展示光譜性質，及其可使用(例如)紅外光譜法、拉曼光譜法及 ^{13}C -NMR光譜法測定。鑑於各結晶形式以不同方式折射X-射線之事實，亦可使用X-射線粉末繞射(XPD)表徵多晶型物。此外，熱方法，諸如示差掃描量熱法(DSC)及熱重分析(TTA)可提供關於特定多晶型物之獨特資訊。

【0066】 如粉末X-射線繞射之領域中熟知，可使用粉末X-射線繞射光譜之相對峰高來描述不同結晶形式。因此，於「形式3」態樣中，本發明提供化合物(I)之結晶形式，其顯示於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $17.8 \pm 0.2^\circ$ 處之反射，其中在 $17.8 \pm 0.2^\circ$ 處之反射為X-射線粉末繞射圖中之四個最強反射中之一者。較佳地，在 $17.8 \pm 0.2^\circ$ 處之反射為X-射線粉末繞射圖中之三個最強反射中之一者，或其中在 $17.8 \pm 0.2^\circ$ 處之反射為

X-射線粉末繞射圖中之兩個最強反射中之一者。更佳地，在 $17.8 \pm 0.2^\circ$ 處之反射為X-射線粉末繞射圖中之最強反射。仍更佳地，於「形式3」態樣中，化合物(I)之結晶形式顯示於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $17.8 \pm 0.1^\circ$ 處之反射，其中在 $17.8 \pm 0.1^\circ$ 處之反射為X-射線粉末繞射圖中之四個最強反射中之一者。較佳地，在 $17.8 \pm 0.1^\circ$ 處之反射為X-射線粉末繞射圖中之三個最強反射中之一者，或其中在 $17.8 \pm 0.1^\circ$ 處之反射為X-射線粉末繞射圖中之兩個最強反射中之一者。更佳地，在 $17.8 \pm 0.1^\circ$ 處之反射為X-射線粉末繞射圖中之最強反射。

【0067】 術語「最強反射」描述X-射線粉末繞射圖之最高峰。粉末X-射線繞射圖之峰高係基於X-射線強度(以計數或計數/秒為單位)測定。因此，最強反射為顯示X-射線粉末繞射圖中之最高X-射線強度之反射。例如，圖6A中所示之X-射線繞射圖之最強反射為指定 2θ 值之在 $17.8 \pm 0.2^\circ$ 處之反射。

【0068】 除非明確相反指定，否則所有X-射線粉末繞射圖係使用銅K- α 輻射在約 25°C 下測定。

【0069】 較佳地，於「形式3」態樣中，化合物(I)之結晶形式進一步顯示於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $4.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $8.3 \pm 0.2^\circ$ 、 $12.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $13.6 \pm 0.2^\circ$ 、 $14.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $14.9 \pm 0.2^\circ$ 、 $15.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $17.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $19.3 \pm 0.2^\circ$ 、 $21.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $22.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $22.9 \pm 0.2^\circ$ 及 $23.3 \pm 0.2^\circ$ 中之一或多者處之一或多個反射。仍更佳地，於「形式3」態樣中，化合物(I)之結晶形式進一步顯示於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $4.1 \pm 0.1^\circ$ 、 $8.3 \pm 0.1^\circ$ 、 $12.4 \pm 0.1^\circ$ 、 $13.6 \pm 0.1^\circ$ 、 $14.5 \pm 0.1^\circ$ 、 $14.9 \pm 0.1^\circ$ 、 $15.2 \pm 0.1^\circ$ 、 $17.2 \pm 0.1^\circ$ 、 $19.3 \pm 0.1^\circ$ 、 $21.2 \pm 0.1^\circ$ 、 $22.4 \pm 0.1^\circ$ 、 22.9

$\pm 0.1^\circ$ 及 $23.3 \pm 0.1^\circ$ 中之一或多者處之一或多個反射。

【0070】 粉末X-射線繞射光譜之峰之位置對實驗細節相對不敏感。因此，本發明之結晶化合物可藉由具有某些峰位置之粉末X-射線繞射圖表徵。因此，於「形式3」態樣中，化合物(I)之結晶形式較佳地藉由於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $17.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $17.8 \pm 0.2^\circ$ 、 $21.2 \pm 0.2^\circ$ 及 $22.4 \pm 0.2^\circ$ 處之反射表徵。更佳地，於「形式3」態樣中，化合物(I)之結晶形式藉由於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $4.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $8.3 \pm 0.2^\circ$ 、 $12.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $13.6 \pm 0.2^\circ$ 、 $14.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $14.9 \pm 0.2^\circ$ 、 $15.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $17.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $17.8 \pm 0.2^\circ$ 、 $19.3 \pm 0.2^\circ$ 、 $21.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $22.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $22.9 \pm 0.2^\circ$ 及 $23.3 \pm 0.2^\circ$ 處之反射表徵。仍更佳地，於「形式3」態樣中，化合物(I)之結晶形式藉由於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $17.2 \pm 0.1^\circ$ 、 $17.8 \pm 0.1^\circ$ 、 $21.2 \pm 0.1^\circ$ 及 $22.4 \pm 0.1^\circ$ 處之反射表徵。最佳地，於「形式3」態樣中，化合物(I)之結晶形式藉由於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $4.1 \pm 0.1^\circ$ 、 $8.3 \pm 0.1^\circ$ 、 $12.4 \pm 0.1^\circ$ 、 $13.6 \pm 0.1^\circ$ 、 $14.5 \pm 0.1^\circ$ 、 $14.9 \pm 0.1^\circ$ 、 $15.2 \pm 0.1^\circ$ 、 $17.2 \pm 0.1^\circ$ 、 $17.8 \pm 0.1^\circ$ 、 $19.3 \pm 0.1^\circ$ 、 $21.2 \pm 0.1^\circ$ 、 $22.4 \pm 0.1^\circ$ 、 $22.9 \pm 0.1^\circ$ 及 $23.3 \pm 0.1^\circ$ 處之反射表徵。

【0071】 化合物之結晶形式可藉由示差掃描量熱法(DSC)溫譜圖表徵。因此，於「形式3」態樣中，化合物(I)之結晶形式較佳地藉由DSC溫譜圖表徵，其顯示在約 87°C 下開始吸熱熱流及/或約 92.4°C 之熔點，如圖8C中所見。因此，較佳地，於「形式3」態樣中，化合物(I)之結晶形式具有 89°C 至 96°C 之熔點，如藉由DSC所測定。較佳地，於「形式3」態樣中，結晶形式具有 90°C 至 95°C 之熔點，如藉由DSC所測定。仍更佳地，

於「形式3」態樣中，化合物(I)之結晶形式具有91°C至94°C之熔點，如藉由DSC所測定。最佳地，於「形式3」態樣中，化合物(I)之結晶形式具有92°C至93°C之熔點，如藉由DSC所測定。

【0072】 化合物之結晶形式可藉由其吸濕性表徵。產物之吸濕性表示其水含量在特定溫度下作為相對濕度之函數的增加或減少。實質上非吸濕性產物展示其水含量不變化或僅稍微變化，作為相對濕度變化之結果。於強烈吸濕性產物中，水含量可廣泛變化。因此，較佳地，化合物(I)之結晶形式實質上非吸濕性。

【0073】 化合物之結晶形式可以其熱重跡線表徵。因此，化合物(I)之結晶形式可藉由其熱重跡線表徵。於一個實施例中，化合物(I)之結晶藉由於圖8A或圖8B中所述之熱重跡線表徵。

【0074】 化合物之結晶形式亦可藉由其動態蒸汽吸附(DVS)譜表徵。因此，化合物(I)之結晶形式較佳地可藉由其DVS譜表徵，如圖9A及9B中所見。較佳地，化合物(I)之結晶形式具有可逆吸附/解吸附譜。較佳地，DVS譜顯示結晶形式之實質上非吸濕性質。

【0075】 實質上非吸濕性物質顯示在約25°C之溫度下量測之約95%之相對濕度下小於約2%之水吸收。較佳地，水吸收在約25°C之溫度下量測之約95%之相對濕度下小於約1%。水吸收之值藉由量測所測試結晶形式在約95%之相對濕度及約25°C之溫度下相對於初始質量之質量增加來獲得。

【0076】 因此，較佳地，化合物(I)之結晶形式在約25°C之溫度下在約95%之相對濕度下吸收0%至2%水。仍更佳地，化合物(I)之結晶形式在約25°C之溫度下在約95%之相對濕度下吸收0%至1.5%水。最佳地，化合

物(I)之結晶形式在約25°C之溫度下在約95%之相對濕度下吸收0%至1%水。

【0077】 因此，本發明之結晶形式較佳地係穩定的。例如，在約25°C下於乙酸乙酯中延長之培育(1週)產生良好品質之化合物(I)之結晶形式，如圖5中所示。

【0078】 於「形式2」態樣中，本發明提供化合物(I)之另外結晶形式。此結晶形式(形式2)顯示於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $16.9 \pm 0.2^\circ$ 處之反射，其中在 $16.9 \pm 0.2^\circ$ 處之反射為X-射線粉末繞射圖中之四個最強反射中之一者。較佳地，在 $16.9 \pm 0.2^\circ$ 處之反射為X-射線粉末繞射圖中之三個最強反射中之一者，或其中在 $16.9 \pm 0.2^\circ$ 處之反射為X-射線粉末繞射圖中之兩個最強反射中之一者。更佳地，在 $16.9 \pm 0.2^\circ$ 處之反射為X-射線粉末繞射圖中之最強反射。仍更佳地，於「形式2」態樣中，該結晶形式顯示於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $16.9 \pm 0.1^\circ$ 處之反射，其中在 $16.9 \pm 0.1^\circ$ 處之反射為X-射線粉末繞射圖中之四個最強反射中之一者。較佳地，在 $16.9 \pm 0.1^\circ$ 處之反射為X-射線粉末繞射圖中之三個最強反射中之一者，或其中在 $16.9 \pm 0.1^\circ$ 處之反射為X-射線粉末繞射圖中之兩個最強反射中之一者。更佳地，在 $16.9 \pm 0.1^\circ$ 處之反射為X-射線粉末繞射圖中之最強反射。

【0079】 較佳地，於「形式2」態樣中，化合物(I)之結晶形式顯示於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $15.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $16.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $16.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $18.9 \pm 0.2^\circ$ 、 $23.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $25.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $27.7 \pm 0.2^\circ$ 及 $28.5 \pm 0.2^\circ$ 中之一或多者處之一或多個反射。仍更佳地，於「形式2」態樣中，化合物(I)之結晶形式顯示表述為 2θ 值之在 $15.2 \pm 0.1^\circ$ 、 $16.1 \pm 0.1^\circ$ 、 $16.5 \pm$

0.1° 、 $18.9 \pm 0.1^{\circ}$ 、 $23.1 \pm 0.1^{\circ}$ 、 $25.5 \pm 0.1^{\circ}$ 、 $27.7 \pm 0.1^{\circ}$ 及 $28.5 \pm 0.1^{\circ}$ 中之一或多者處之一或多個反射。

【0080】於「形式2」態樣中，化合物(I)之結晶形式亦可藉由於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $16.1 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $16.5 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $16.9 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $18.9 \pm 0.2^{\circ}$ 及 $23.1 \pm 0.2^{\circ}$ 處之反射表徵。較佳地，於「形式2」態樣中，化合物(I)之結晶形式亦可藉由於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $16.1 \pm 0.1^{\circ}$ 、 $16.5 \pm 0.1^{\circ}$ 、 $16.9 \pm 0.1^{\circ}$ 、 $18.9 \pm 0.1^{\circ}$ 及 $23.1 \pm 0.1^{\circ}$ 處之反射表徵。

【0081】於「形式2」態樣中，化合物(I)之結晶形式可藉由DSC溫譜圖表徵，其顯示在約 58°C 下開始吸熱熱流及約 70°C 之熔點，如圖3B中所見。因此，於「形式2」態樣中，化合物(I)之結晶形式具有 67°C 至 74°C 之熔點。較佳地，於「形式2」態樣中，化合物(I)之結晶形式具有 68°C 至 73°C 之熔點。仍更佳地，於「形式2」態樣中，化合物(I)之結晶形式具有 69°C 至 72°C 之熔點。最佳地，於「形式2」態樣中，化合物(I)之結晶形式具有 69°C 至 71°C 之熔點。

【0082】本申請案之發明者已出人意料地發現，於「形式2」態樣中，化合物(I)之結晶形式特別可溶於水中。因此，較佳地，於「形式2」態樣中，化合物(I)之結晶形式具有約75 mg/mL至約85 mg/mL之水溶解度，在約 25°C 下量測。更佳地，於「形式2」態樣中，該結晶形式具有約78 mg/mL至約82 mg/mL之水溶解度，在約 25°C 下量測。最佳地，於「形式2」態樣中，化合物(I)之結晶形式具有約80 mg/mL之水溶解度，在約 25°C 下量測。

【0083】量測溶解度之方法係此項技術中已知；例如，搖瓶法、音

波處理、管柱溶離法及紫外或可見光譜法。除非明確相反指定，否則水溶解度係使用搖瓶法及/或音波處理測定。

【0084】 本發明亦提供醫藥組合物，其包含如本文中所述之化合物(I)之結晶形式。

【0085】 通常，化合物(I)之結晶形式以醫藥組合物或調配物之形式向患者投與。此等醫藥組合物可藉由任何可接受投與途徑，包括(但不限於)口服、局部(包括透皮)及非經腸投與模式向患者投與。

【0086】 本發明之醫藥組合物通常藉由醫藥上可接受之載劑及一或多種可選成分製備。若必要或所需，則可將所得均勻摻合之混合物使用習知程序及裝置成形或裝入錠劑、膠囊、丸劑、罐、筒、分配器及類似者中。

【0087】 當意欲呈固體劑型(即，呈膠囊、錠劑、丸劑及類似者)口服投與時，本發明之醫藥組合物通常將包含化合物(I)之結晶形式作為活性成分。較佳地，本發明之醫藥組合物包含化合物(I)之結晶形式及無其他成分。較佳地，本發明之醫藥組合物含於膠囊中。較佳地，本發明之醫藥組合物含於不具有任何其他成分之膠囊中。該膠囊可為明膠膠囊或經丙基甲基纖維素(HPMC)膠囊。或者，本發明之醫藥組合物可包含化合物(I)之結晶形式作為活性成分及一或多種醫藥上可接受之載劑。適宜醫藥上可接受之載劑將為熟習此項技術者已知，例如，脂肪、水、生理鹽水、醇(例如，乙醇)、甘油、多元醇、水性葡萄糖溶液、增量劑、崩解劑、黏合劑、潤滑劑、潤濕劑、穩定劑、乳化劑、分散劑、防腐劑、甜味劑、著色劑、調味劑或芳香劑、濃縮劑、稀釋劑、緩衝物質、溶劑或增溶劑、用於達成儲存效應之化學品、用於修改滲透壓之鹽、包衣劑或抗氧化劑、糖

(諸如乳糖或葡萄糖)；玉米、小麥或水稻澱粉；脂肪酸，諸如硬脂酸；無機鹽，諸如偏矽酸鋁酸鎂或無水磷酸鈣；合成聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮或聚烷二醇；醇，諸如硬脂醯醇或苧醇；合成纖維素衍生物，諸如甲基纖維素、羧甲基纖維素、乙基纖維素或羥丙基甲基纖維素；及其他習知使用之添加劑，諸如明膠、滑石、植物油及阿拉伯膠。

【0088】 包含化合物(I)之結晶形式之醫藥組合物亦可使用已知遞送系統及賦形劑經皮或經黏膜投與。例如，該醫藥組合物可與滲透增強劑(諸如丙二醇、聚乙二醇單月桂酸酯、氮雜環烷-2-酮及類似者)混合，及併入貼片或相似遞送系統中。亦可使用另外賦形劑，包括膠凝劑、乳化劑及緩衝劑。

【0089】 用於非經腸投與之注射劑包括無菌水性或非水性溶液、懸浮液及乳液。水性溶劑包括(例如)注射用蒸餾水及/或生理鹽水。非水性溶劑之實例包括醇，諸如乙醇。

【0090】 較佳地，該醫藥組合物包含一或多種另外醫藥上活性劑。此組合療法涉及使用化合物(I)之結晶形式與另外醫藥上活性劑中之一或多者組合，一起調配(例如，呈單一調配物一起包裝)或分開調配(例如，呈分開單位劑型包裝)。

【0091】 於健康個體中，核心醣神經鞘脂質(葡萄糖神經醯胺)於溶酶體中藉由酸性葡萄糖神經醯胺酶(亦稱作葡萄糖腦苷脂酶或GBA1，EC 3.2.1.45，UniProt代碼：P04062)水解。此外，駐留於細胞質中之非溶酶體葡萄糖神經醯胺酶(GBA2，UniProt代碼：Q9HCG7)亦能加工葡萄糖神經醯胺。結果，GBA1及GBA2二者涉及若干溶酶體貯積症中觀察到之神經病理學效應。

【0092】 於患有溶酶體貯積症之患者中，醣神經鞘脂質生物合成或降解之缺乏發生，從而導致葡萄糖神經醯胺及/或其他醣神經鞘脂質之異常含量。

【0093】 先前顯示(於WO2015/147639 A1中)化合物(I)有效治療與細胞溶質或溶酶體葡萄糖神經醯胺之不規則含量及/或醣神經鞘脂質之較高含量相關聯之疾病。因為化合物(I)之結晶形式之生物可利用率與非晶型化合物(I)之生物可利用率相當，所以化合物(I)之結晶形式亦有效治療與細胞葡萄糖神經醯胺之異常含量及/或醣神經鞘脂質之較高含量相關聯之疾病。特定言之，化合物(I)之結晶形式有效治療與細胞溶質或溶酶體葡萄糖神經醯胺之異常含量及/或醣神經鞘脂質之較高含量相關聯之疾病。

【0094】 如實例4中所示，化合物(I)之結晶形式(形式3)有效治療與細胞溶質或溶酶體葡萄糖神經醯胺之不規則含量及/或醣神經鞘脂質之較高含量相關聯之疾病。具體而言，顯示形式3改善C型尼曼-匹克氏病小鼠之臨床徵兆。

【0095】 因此，本發明提供如本文中所述之化合物(I)之結晶形式，或如本文中所述之醫藥組合物，其用於療法中。

【0096】 本發明亦提供如本文中所述之結晶形式，或如本文中所述之醫藥組合物，其用作藥劑。

【0097】 較佳地，本發明提供如本文中所述之化合物(I)之結晶形式，或如本文中所述之醫藥組合物，其用於治療涉及葡萄糖神經醯胺之異常含量及/或醣神經鞘脂質之較高含量之疾病。較佳地，涉及葡萄糖神經醯胺之異常含量及/或醣神經鞘脂質之較高含量之疾病為溶酶體貯積病，諸如高歇氏病(1、2及3型)、Fabry氏病(Fabry disease)、GM1神經節苷脂沉積

症、GM2神經節苷脂沉積症(諸如泰薩二氏病(Tay-Sachs disease)、山多夫氏病(Sandhoff disease)或AB變型)、唾液酸沉積症(Sialidosis)、C型尼曼-匹克氏病及動作性肌陣攣性腎衰竭症候群，或共同歸類為代謝症候群之疾病中之一者之症狀，諸如肥胖症、胰島素抗性、高脂血症、高膽固醇血症、多囊性腎病、II型糖尿病及慢性發炎，或神經退化性病症，諸如帕金森氏病(Parkinson disease)或路易體(Lewy-body)癡呆，或動脈粥樣硬化。仍更佳地，化合物(I)之結晶形式或包含化合物(I)之結晶形式之醫藥組合物可用於治療GM1神經節苷脂沉積症及/或GM2神經節苷脂沉積症(諸如泰薩二氏病、山多夫氏病或AB變型)。

【0098】 仍更佳地，本發明提供如本文中所述之化合物(I)之結晶形式，或如本文中所述之醫藥組合物，其用於治療C型尼曼-匹克氏病。

【0099】 本發明提供如本文中所述之化合物(I)之結晶形式，或如本文中所述之醫藥組合物，其用於治療山多夫氏病。

【0100】 本發明提供一種治療人類或動物患者之涉及葡糖神經醯胺之異常含量及/或醣神經鞘脂質之較高含量之疾病的方法，其包括向有需要患者投與治療上有效量之如本文中所述之化合物(I)之結晶形式，或如本文中所述之醫藥組合物。

【0101】 本發明提供如本文中所述之化合物(I)之結晶形式，或如本文中所述之醫藥組合物，其用於減輕涉及葡糖神經醯胺之異常含量及/或醣神經鞘脂質之較高含量之疾病之症狀。

【0102】 仍更佳地，本發明提供如本文中所述之化合物(I)之結晶形式，或如本文中所述之醫藥組合物，其用於減輕C型尼曼-匹克氏病之症狀。

【0103】 本發明提供如本文中所述之化合物(I)之結晶形式，或如本文中所述之醫藥組合物，其用於減輕山多夫氏病之症狀。

【0104】 本發明提供一種減輕人類或動物患者之涉及葡糖神經醯胺之異常含量及/或醣神經鞘脂質之較高含量之疾病之症狀的方法，其包括向有需要患者投與治療上有效量之如本文中所述之化合物(I)之結晶形式，或如本文中所述之醫藥組合物。

【0105】 化合物(I)之結晶形式(例如，形式3)可用於改善不同臨床徵兆，例如：

- 1)疾病相關聯之體重損失；
- 2)震顫；及/或
- 3)共濟失調步態。

【0106】 如實例4中所示，化合物(I)之結晶形式(例如，形式3)有效滲透至腦。因此，化合物(I)之結晶形式(例如，形式3)可用於治療或減輕起源於腦中之疾病或疾病症狀。例如，化合物(I)之結晶形式(例如，形式3)可用於預防或減少小腦浦金耶(Purkinje)細胞損失。化合物(I)之結晶形式(例如，形式3)可用於預防或減少神經元死亡。化合物(I)之結晶形式(例如，形式3)可用於預防或減少腦萎縮。

【0107】 應瞭解，化合物(I)之結晶形式於治療涉及葡糖神經醯胺之異常含量及/或醣神經鞘脂質之較高含量之疾病中之高有效性來源於化合物(I)之結晶形式對葡糖神經醯胺合成酶(GCS)及非溶酶體葡糖腦苷脂酶(GBA2)之高效力。

【0108】 本文中所述之方法可為活體外方法或活體內方法。

【0109】 投與可藉由口服投與經由錠劑、丸劑、膠囊、顆粒、粉

末、溶液及類似者，或非經腸投與，諸如注射劑(諸如關節內、靜脈內及肌肉內注射劑)、栓劑、眼用溶液、眼膏或用於外部使用之劑，諸如透皮液體製劑、軟膏、透皮貼片、經黏膜液體製劑、經黏膜貼片、吸入劑及類似者實現。

【0110】 於口服投與中，每日劑量一般為約0.0001至10 mg/kg，較佳地0.001至1 mg/kg，或0.005至5 mg/kg，及更佳地0.01至0.5 mg/kg體重，以一個部分或2至4個分開部分投與。例如，針對70 kg之人類患者，用於口服投與之最佳每日劑量為約0.01至30 mg/天。於靜脈內投與之情況下，每日劑量以約0.00001至10 mg/kg體重，每天一次或每天兩次或更多次適宜投與。此外，經黏膜劑以約0.0001至10 mg/kg體重之劑量每天一次或每天兩次或更多次投與。該劑量在對個別情況反應後考慮症狀、年齡及性別及類似者適當決定。

【0111】 因為化合物(I)之結晶形式於治療涉及葡糖神經醯胺之異常含量及/或醣神經鞘脂質之較高含量之疾病(例如，C型尼曼-匹克氏病)中之效力係極高的，及所需劑量相對較低，所以化合物(I)之結晶形式較用於治療此等疾病之已知化合物，例如米格列醇(劑量1200 mg/kg/天)產生更少副作用。

【0112】 本發明亦提供一種製備如本文中所述之結晶形式之方法，其包括使化合物(I)之樣品與溶劑接觸。較佳地，該溶劑係選自乙腈、乙酸乙酯、異丙醇、苯甲醚、水及第三丁基甲基醚(TBME)。仍更佳地，該溶劑為乙酸乙酯、乙腈或異丙醇。較佳地，在使化合物(I)之樣品與溶劑接觸之前，將化合物(I)之樣品純化以移除硼酸酯。較佳地，化合物(I)之樣品係使用層析法純化。仍更佳地，化合物(I)之樣品係使用矽膠層析法

管柱純化。另外及/或或者，化合物(I)之樣品藉由利用甲醇蒸餾純化。

【0113】 化合物(I)之形式3結晶形式可藉由下列示例性方法中之任一者獲得：

1)將約74 mg化合物(I)及2.0 ml乙腈之混合物在範圍自20°C至30°C (例如，約25°C)之溫度下攪拌3天，然後過濾，以獲得化合物(I)之結晶形式；

2)將約74 mg化合物(I)及2.0 ml苯甲醚之混合物在範圍自20°C至30°C (例如，約25°C)之溫度下攪拌3天，然後過濾，以獲得化合物(I)之結晶形式；

3)將約82 mg化合物(I)及1.0 ml乙酸乙酯之混合物在範圍自20°C至30°C (例如，約25°C)之溫度下攪拌3天，然後過濾，以獲得化合物(I)之結晶形式；

4)將約82 mg化合物(I)及1.0 ml異丙醇之混合物在範圍自20°C至30°C (例如，約25°C)之溫度下攪拌3天，然後過濾，以獲得化合物(I)之結晶形式；

5)將約45 mg化合物(I)及1.0 ml水之混合物在範圍自20°C至30°C (例如，約25°C)之溫度下攪拌3天，然後過濾，以獲得化合物(I)之結晶形式；

6)將約100 mg化合物(I)及3.0 ml TBME之混合物在範圍自20°C至30°C (例如，約25°C)之溫度下攪拌3天，然後過濾，以獲得化合物(I)之結晶形式。

【0114】 較佳地，在將化合物(I)與溶劑混合之前，將化合物(I)之樣品純化以移除硼酸酯。較佳地，化合物(I)之樣品係使用層析法純化。仍

更佳地，化合物(I)之樣品係使用矽膠層析法管柱純化。另外及/或或者，化合物(I)之樣品係藉由利用甲醇蒸餾純化。

【0115】 過濾方法為熟習此項技術者已知，且包括(但不限於)紙過濾及燒結玻璃過濾。

【0116】 本文中所述之化合物(I)之形式3之製備方法可以維持所用試劑之相似比率在較大規模下進行。例如，化合物(I)之形式3結晶形式可藉由以下獲得：將化合物(I)與乙酸乙酯以0.05至1 g之間:1 mL [化合物(I):乙酸乙酯]之比率之混合物在範圍自20°C至30°C (例如，約25°C)之溫度下攪拌3天，然後過濾，以獲得化合物(I)之結晶形式。

【0117】 獲得本文中所述之化合物(I)之形式3之方法係極有效。本文中所述方法之產率通常大於70% (作為所獲得之形式3之量與初始所用之化合物(I)之量之重量比率)。較佳地，本文中所述方法之產率大於75%。

【0118】 較佳地，形式2結晶形式作為中間體在形成形式3結晶形式之前形成。

【0119】 較佳地，藉由於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $16.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $16.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $16.9 \pm 0.2^\circ$ 、 $18.9 \pm 0.2^\circ$ 及 $23.1 \pm 0.2^\circ$ 處之反射表徵之形式2結晶形式作為中間體在形成藉由於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $17.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $17.8 \pm 0.2^\circ$ 、 $21.2 \pm 0.2^\circ$ 及 $22.4 \pm 0.2^\circ$ 處之反射表徵之形式3結晶形式之前形成。

【0120】 本發明亦提供藉由進行如本文中所述之方法獲得之化合物(I)之結晶形式。

【0121】 本發明亦提供化合物(I)之游離鹼於製備化合物(I)之結晶形式之用途。

【0122】 本發明亦提供一種製備化合物(I)之結晶形式之方法，其包括使化合物(I)之游離鹼結晶。

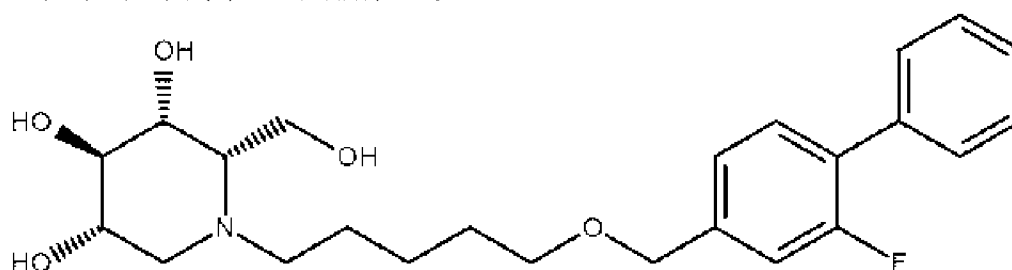
【0123】 本發明亦提供藉由製備化合物(I)之結晶形式之方法獲得之化合物(I)之結晶形式，該方法包括使化合物(I)之游離鹼結晶。

【0124】 在優點中，尤其認為形成化合物(I)之結晶形式可用於純化化合物(I)。例如，藉由本文中所述方法獲得之化合物(I)之結晶形式具有大於90%，及通常大於95%之純度。

【0125】 上述詳細描述已經由解釋及說明之方式提供，且不意欲限制隨附申請專利範圍之範圍。本文中說明之目前較佳實施例中之許多變化將對一般技術者顯然，且仍於隨附申請專利範圍及其等效物之範圍內。

【0126】 於下列條項中進一步揭示本發明：

1.一種化合物(I)之結晶形式，



(I)。

2.如條項1之結晶形式，其中該結晶形式為結晶游離鹼。

3.如條項1或條項2之結晶形式，其中該結晶形式顯示於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $17.8 \pm 0.2^\circ$ 處之反射，其中該在 $17.8 \pm 0.2^\circ$ 處之反射為該X-射線粉末繞射圖中之四個最強反射中之一者。

4.如條項3之結晶形式，其進一步顯示於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $4.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $8.3 \pm 0.2^\circ$ 、 $12.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $13.6 \pm 0.2^\circ$ 、 $14.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $14.9 \pm 0.2^\circ$ 、 $15.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $17.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $19.3 \pm 0.2^\circ$ 、 $21.2 \pm$

0.2°、 $22.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $22.9 \pm 0.2^\circ$ 及 $23.3 \pm 0.2^\circ$ 中之一或多者處之一或多個反射。

5.如條項1至4中任一項之結晶形式，其藉由於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $17.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $17.8 \pm 0.2^\circ$ 、 $21.2 \pm 0.2^\circ$ 及 $22.4 \pm 0.2^\circ$ 處之反射表徵。

6.如條項1至5中任一項之結晶形式，其具有89°C至96°C之熔點。

7.如條項1至6中任一項之結晶形式，其具有92°C至93°C之熔點。

8.如條項1至7中任一項之結晶形式，其中該結晶形式係實質上非吸濕性。

9.如條項1或條項2之結晶形式，其中該結晶形式顯示於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $16.9 \pm 0.2^\circ$ 處之反射，其中該在 $16.9 \pm 0.2^\circ$ 處之反射為該X-射線粉末繞射圖中之四個最強反射中之一者。

10.如條項9之結晶形式，其進一步顯示於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $15.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $16.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $16.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $18.9 \pm 0.2^\circ$ 、 $23.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $25.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $27.7 \pm 0.2^\circ$ 及 $28.5 \pm 0.2^\circ$ 中之一或多者處之一或多個反射。

11.如條項1、2、9或10中任一項之結晶形式，其藉由於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $16.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $16.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $16.9 \pm 0.2^\circ$ 、 $18.9 \pm 0.2^\circ$ 及 $23.1 \pm 0.2^\circ$ 處之反射表徵。

12.如條項9至11中任一項之結晶形式，其具有67°C至74°C之熔點。

13.如條項9至12中任一項之結晶形式，其具有69°C至71°C之熔點。

14.如條項9至13中任一項之結晶形式，其具有75 mg/mL至85 mg/mL之水溶解度。

15.一種醫藥組合物，其包含如條項1至14中任一項之結晶形式。

16.如條項15之醫藥組合物，其中該醫藥組合物含於膠囊中。

17.如條項16之醫藥組合物，其中該醫藥組合物含於膠囊中而無任何其他成分。

18.如條項15或條項16之醫藥組合物，其包含至少一種醫藥上可接受之載劑。

19.如條項1至14中任一項之結晶形式，或如條項15至18中任一項之醫藥組合物，其用於療法中。

20.如條項1至14中任一項之結晶形式，或如條項15至18中任一項之醫藥組合物，其用作藥劑。

21.如條項1至14中任一項之結晶形式，或如條項15至18中任一項之醫藥組合物，其用於治療涉及葡糖神經醯胺之異常含量及/或醣神經鞘脂質之較高含量之疾病。

22.一種如條項21使用之結晶形式或醫藥組合物，其中該涉及葡糖神經醯胺之異常含量及/或醣神經鞘脂質之較高含量之疾病為溶酶體貯積病，諸如高歇氏病、Fabry氏病、GM1神經節苷脂沉積症、GM2神經節苷脂沉積症(諸如泰薩二氏病、山多夫氏病或AB變型)、唾液酸沉積症、C型尼曼-匹克氏病及動作性肌陣攣性腎衰竭症候群，或共同歸類為代謝症候群之疾病中之一者之症狀，諸如肥胖症、胰島素抗性、高脂血症、高膽固醇血症、多囊性腎病、II型糖尿病及慢性發炎，或神經退化性病症，諸如帕金森氏病或路易體癡呆、或動脈粥樣硬化。

23.一種如條項21或條項22使用之結晶形式或醫藥組合物，其中該疾病為GM1神經節苷脂沉積症或GM2神經節苷脂沉積症(諸如泰薩二氏病、

山多夫氏病或AB變型)。

24.一種治療人類或動物患者之涉及葡萄糖神經鹼胺之異常含量及/或醣神經鞘脂質之較高含量之疾病之方法，其包括向有需要患者投與治療上有效量之如條項1至14中任一項之結晶形式或如條項15至18中任一項之醫藥組合物。

25.一種製備如條項1至8中任一項之結晶形式之方法，其包括使化合物(I)之樣品與溶劑接觸。

26.如條項25之方法，其中該溶劑係選自乙腈、乙酸乙酯、異丙醇、苯甲醚、水及第三丁基甲基醚(TBME)。

27.如條項25或條項26之方法，其中在使該化合物(I)之樣品與該溶劑接觸之前，將該化合物(I)之樣品純化。

28.如條項27之方法，其中該化合物(I)之樣品係使用層析法純化。

29.如條項28之方法，其中該化合物(I)之樣品係使用矽膠管柱層析法純化。

30.如條項27至29中任一項之方法，其中於純化後，該化合物(I)之樣品不含有硼酸酯。

31.如條項25至30中任一項之方法，其中如條項9至14中任一項之結晶形式作為中間體在形成如條項1至8中任一項之結晶形式之前形成。

32.一種化合物(I)之結晶形式，其藉由進行如條項25至31中任一項之方法獲得。

33.一種化合物(I)之游離鹼於製備結晶形式之用途。

34.一種製備化合物(I)之結晶形式之方法，其包括使該化合物(I)之游離鹼結晶。

35.一種化合物(I)之結晶形式，其藉由如條項34之方法獲得。

36.一種製備化合物(I)之結晶形式之方法，其包括以下步驟：

i.將化合物(I)添加至純化管柱中以產生經純化之化合物(I)樣品；

ii.將溶劑添加至該經純化之化合物(I)樣品中以產生含於溶劑中之化合物(I)之懸浮液；

iii.將含於溶劑中之化合物(I)之懸浮液攪拌以產生化合物(I)之結晶形式；及

iv.將化合物(I)之結晶形式分離以產生化合物(I)之結晶形式之純樣品。

37.如條項36之方法，其中該經純化之化合物(I)樣品不含硼酸酯。

38.如條項36或37之方法，其中該溶劑係選自乙腈、乙酸乙酯、異丙醇、苯甲醚、水及第三丁基甲基醚(TBME)。

39.如條項36至38中任一項之方法，其中步驟ii係在25至35°C之間之溫度下進行。

40.如條項36至39中任一項之方法，其中步驟(iii)中之攪拌係在20至35°C之間之溫度下進行。

41.如條項36至40中任一項之方法，其中進行步驟(iii)中之攪拌至少1小時。

42.如條項41之方法，其中進行步驟(iii)中之攪拌至少16小時。

實驗部分

【0127】 示差掃描量熱法(DSC)係利用TA Instruments Q2000儀器(封閉鋁樣品鍋或蓋中具有針孔之鋁樣品鍋，加熱速率20 K/min)進行。將熔點理解為峰最大值。

【0128】動態蒸汽吸附(DVS)量測係利用來自ProUmid (前名為「Projekt Messtechnik」), August-Nagel-Str. 23, 89079 Ulm (Germany) 之SPS11-100n 「Sorptions Prüfsystem」進行。將約5 mg至20 mg樣品放入鋁樣品鍋中。使用每小時5%之濕度變化率。可如下描述所應用之量測程式：

【0129】將樣品放在微量天平上方之鋁或鉑架上及允許在50%之相對濕度(RH)下平衡，之後開始預定義之濕度程式：

- (1) 在50% RH下2小時
- (2) 50 → 0% RH (5%/h)；在0% RH下5小時
- (3) 0 → 95% RH (5%/h)；在95% RH下5小時
- (4) 95 → 0% RH (5%/h)；在0% RH下5小時
- (5) 0 → 95% RH (5%/h)；在95% RH下5小時
- (6) 95 → 50% RH (5%/h)；在50% RH下2小時

【0130】粉末X-射線繞射係利用配備有Mythen1K檢測器之Stoe Stadi P繞射儀利用Cu-K α_1 輻射操作進行。利用此儀器之量測係以傳輸在40 kV之管電壓及40 mA管功率下進行。彎曲Ge單色儀允許利用Cu-K α_1 輻射測試。設置下列參數：0.02° 2 θ 步長，12 s步進時間，1.5至50.5° 2 θ 掃描範圍及1°2 θ 檢測器步進(以步進掃描之檢測器模式)。針對典型樣品製備，將約10 mg樣品放在兩個乙酸酯箔之間及安裝至Stoe傳輸樣品架。在量測期間將樣品旋轉。於環境空氣氛圍(約25°C)下進行所有樣品製備及量測。

【0131】近似溶解度係藉由將溶劑增量添加至約10 mg化合物中及隨後振盪及/或音波處理短時間段來測定。若物質藉由添加總計至少10 ml

溶劑不溶解，則將溶解度指定為<1 mg/ml。實驗在約25°C下進行。

【0132】 熱重量測(TG-FTIR)係利用耦接至 Bruker FTIR 光譜儀 Vector 22之Netzsch Thermo-微量天平TG 209 (具有針孔之樣品鍋，N₂氛圍，加熱速率10°C/min)進行。

【0133】

實例

下列非限制性實例進一步說明本發明。

【0134】

實例1——結晶鹽形成

為試圖獲得化合物(I)之結晶形式，在六種不同條件下利用表1中識別之16種不同鹽形成劑進行化合物(I)之高通量鹽篩選程式。

【0135】 藉由以下進行初始篩選實驗：將含於丙酮中之0.05M化合物(I)溶液添加至石英96-微量滴定板之各孔，接著以0.1M之濃度添加鹽形成劑儲備溶液。將溶劑在氮氣流下在室溫下自各孔蒸發。藉由偏振光顯微鏡研究孔中之固體殘留物。

鹽形成劑	分子量	斯塔爾(Stahl)類別
己二酸	146.14	1
苯磺酸	158.17	2
苯甲酸	122.12	2
檸檬酸	192.12	1
富馬酸	116.07	1
龍膽酸	154.12	2
鹽酸	36.46	1
L-乳酸	90.08	1
馬來酸	116.07	1
L-蘋果酸	134.09	1
DL-扁桃酸	152.15	1

磷酸	97.99	1
琥珀酸	118.09	1
硫酸	98.08	1
L-酒石酸	150.09	1
甲苯磺酸	190.22	2

表1.針對鹽篩選程式所選之酸

【0136】 雖然此初始實驗之目的為獲得1:1比率之化合物(I):鹽形成劑，但是光學顯微鏡學研究者揭示一些適用於結晶形式形成之實驗條件。例如，將化合物(I)與苯磺酸、鹽酸、DL-扁桃酸、L-酒石酸、磷酸及硫酸混合形成結晶殘留物。

【0137】 於另外篩選實驗中，選擇六種溶劑體系，即，丙酮、乙腈、乙酸乙酯、乙醇、異丙醇-水(3:1)混合物及丙酮/水(9:1)混合物。將200 μL溶劑添加至各孔中之殘留物中用於漿液平衡。將所製備之微量滴定板在400 rpm下在室溫(約25°C)下攪動1天。然後，將溶劑在氮氣流下蒸發及藉由偏振光顯微鏡研究所獲得之固體殘留物。

【0138】 基於光學顯微鏡研究，針對苯磺酸、龍膽酸、鹽酸、L-乳酸、D-扁桃酸、磷酸、L-酒石酸及甲苯磺酸發現可能鹽之線索。選擇最有前景線索中之一些用於50至200 mg之規模之跟進實驗(規模擴大實驗)。

【0139】 針對所有試驗條件之規模擴大實驗導致化合物(I)之非晶型形式或化合物(I)之液體結晶鹽之形成。雖然微觀檢查經常揭示雙折射，但是所獲得之混合物之過濾係不可能，且無固體材料可於實驗中之任一者中回收。

【0140】 總之，利用鹽形成劑之所有實驗無法產生化合物(I)之結晶形式。

【0141】

放。在更高溫度下，觀察到熱分解。DSC揭示兩個顯著吸熱事件。具有約70°C之峰溫度及約54 J/g之焓之第一強吸熱，隨後為在81°C及約3 J/g之焓下之較弱信號。

【0146】 此外，在可變水蒸氣壓下研究結晶游離鹼樣品之行為。在高的相對濕度下，樣品吸附約18%之水；然而，當相對濕度返回至50% RH時，釋放大多數吸附之水。來自DVS量測之結果呈現於圖4A及4B中。

【0147】 於表3中提供作為實例2之一部分獲得之化合物(I)之結晶形式之特徵的匯總。

特徵	值/描述
熔點	約70°C
吸濕性	在95% RH下18%；吸濕
於水中之溶解度	約80 mg/mL

表3. 化合物(I)之形式2結晶形式之特徵的匯總。

【0148】 所獲得之化合物(I)之形式2結晶形式具有低穩定性及在暴露於增加之溫度(高於約30°C)約1至5分鐘後轉變成化合物(I)之另外形式3結晶形式。或者，形式2在於溶劑(例如，丙酮)中在約25°C下平衡大於5分鐘後轉變成形式3。化合物(I)之此另外游離鹼形式3結晶形式具有更佳穩定性及獨特物理化學性質集。

【0149】

實例3——形式3

獨立地，化合物(I)之穩定結晶形式係自經純化化合物(I)於各種各自溶劑中，例如，各自於乙腈、乙酸乙酯、異丙醇、苯甲醚、水或TBME中在室溫(約25°C)下之懸浮液平衡實驗獲得。

【0150】 特定言之，化合物(I)之形式3結晶形式藉由下列實驗方法獲得：

1)將約74 mg 化合物(I)添加至2.0 ml 乙腈中及將懸浮液在室溫(約25°C)下攪拌3天，然後過濾；

2)將約74 mg 化合物(I)添加至2.0 ml 苯甲醚中及將懸浮液在室溫(約25°C)下攪拌3天，然後過濾；

3)將約82 mg 化合物(I)添加至1.0 ml 乙酸乙酯中及將懸浮液在室溫(約25°C)下攪拌3天，然後過濾；

4)將約82 mg 化合物(I)添加至1.0 ml 異丙醇中及將懸浮液在室溫(約25°C)下攪拌3天，然後過濾；

5)將約45 mg 化合物(I)添加至1.0 ml 水中及將懸浮液在室溫(約25°C)下攪拌3天，然後過濾；

6)將約100 mg 化合物(I)添加至3.0 ml TBME中及將懸浮液在室溫(約25°C)下攪拌3天，然後過濾。

【0151】 在添加溶劑之前將化合物(I)使用矽膠管柱純化以移除硼酸酯。

【0152】 所獲得之化合物(I)之結晶形式藉由偏振光顯微鏡、粉末X-射線繞射、TG-FTIR、DSC及DVS表徵。

【0153】 針對所選溶劑之偏振光顯微鏡研究之結果呈現於圖5中。

【0154】 自利用乙腈之懸浮液平衡實驗獲得之化合物(I)之形式3結晶形式之PXRD圖示於圖6A中。自利用其他溶劑之懸浮液平衡實驗獲得之化合物(I)之形式3結晶形式之PXRD圖的重疊示於圖6B中。化合物(I)之此結晶形式顯示在 $17.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $17.8 \pm 0.2^\circ$ 、 $21.2 \pm 0.2^\circ$ 及 $22.4 \pm 0.2^\circ$ 之 2θ 值處之最強反射。儘管使用不同溶劑來獲得化合物(I)之結晶形式，但是此係一致。

【0155】 為了比較，圖7顯示於實例2 (形式2)及本實例(形式3)中獲得之結晶形式之PXRD圖之重疊。兩種結晶形式具有不同PXRD圖。

【0156】 化合物(I)之形式3結晶形式之示例性TG-FTIR表徵實驗之結果示於圖8A (乙酸乙酯)及8B (異丙醇)中。

【0157】 圖8A揭示藉由利用乙酸乙酯平衡獲得之含有約0.7%乙酸乙酯之化合物(I)之形式3結晶形式的樣品，儘管在真空下在40°C下乾燥若干天。乙酸乙酯在約100°C與200°C之間釋放。在更高溫度下，觀察到熱分解。

【0158】 自含於異丙醇中之化合物(I)之懸浮液(及於空氣中在室溫下乾燥)產生之形式3樣品出人意料地顯示，初始異丙醇含量低於0.5% (參見圖8B)。

【0159】 圖8C中描述藉由利用乙酸乙酯平衡獲得之化合物(I)之形式3結晶形式之樣品的示例性DSC量測及顯示與約103 J/g之焓相關聯之在約92°C下之鋒利吸熱熔化峰。因此，作為此實例之一部分獲得之化合物(I)之形式3結晶形式具有較來自實例2之結晶形式(形式2)更高的熔點。

【0160】 此外，在可變水蒸氣壓力下研究藉由利用乙酸乙酯平衡獲得之化合物(I)之形式3結晶形式之樣品的行為。在95%之最高相對濕度下，樣品吸附約1.2%之水，當相對濕度返回至50% RH時，其經釋放。來自DVS量測之結果示於圖9A及9B中。吸附之水之量係小的，且水吸附係可逆。因此，化合物(I)之此形式3結晶形式係非吸濕性或實質上非吸濕性。

【0161】 於表4中提供作為實例3之一部分獲得之化合物(I)之形式3結晶形式之特徵的匯總。

特徵	值/描述
熔點	約92.5°C
吸濕性	在95% RH下約1%；實質上非吸濕
於水中之溶解度	未量測

表4.化合物(I)之形式3結晶形式之特徵的匯總。

【0162】

實例4——向患有C型尼曼-匹克氏(NPC)病之小鼠投與化合物(I)之結晶形式之效應

於本實例中，AZ-3102-00為呈形式3之化合物(I)之名稱。

【0163】

研究目標

該研究之目標為評價年輕NPC1 (NPC (-/-)小鼠(P11至P70)利用AZ-3102-00之預測之藥理學活性劑量使用口服管飼的治療，及評估PK及組織學標誌物以表徵可發生之神經病理學。

【0164】

研究設計

在包含於此研究中之38隻小鼠中，存在30隻NPC (-/-)基因敲除(KO)小鼠，4隻NPC (+/-)雜合小鼠及4隻NPC (+/+)野生型(WT，Balb/c)小鼠。NPC1(-/-)小鼠具有蛋白質之提早截短，其刪除13個跨膜域中的11個，留下前兩個跨膜域完整。針對尼曼匹克氏C1型基因之隱性NIH對偶基因(Npc1m1N)純合之NPC1(-/-)小鼠顯示神經鞘磷脂酶及葡萄糖腦苷脂酶活性(JAX# 003092)之雙重缺乏。將動物在BALB/c OlaHsd背景下飼養。

【0165】 將24隻NPC1 (-/-)小鼠經口服管飼利用AZ-3102-00自出生後第11天(P11)至出生後第70天(P70)治療。年齡匹配之對照小鼠包含利用媒劑治療之6隻NPC (-/-)及4隻NPC (+/-)小鼠，及4隻NPC (+/+)小鼠接受

AZ-3102-00。於在P70之最後一次治療後，將NPC (-/-)小鼠(每個時間點n=4)藉由在下列時間點IP注射600 mg/kg戊巴比妥(pentobarbital)安樂死：30分鐘、1小時、2小時、4小時、8小時及24小時。於最後一次治療後(時間不關鍵)亦將對照小鼠處死。藉由心臟穿刺於EDTA塗覆管中收集末梢血。藉由離心(在室溫下3000 x g持續10分鐘)收集血漿及將50 µL血漿等分試樣轉移至1.5 mL管中，在乾冰上冷凍及儲存在-80°C。

【0166】 於經心臟灌注後，移除腦及切成對半。將右半腦後固定及包埋於冷凍模具中用於進一步免疫組織化學分析。將左半腦在乾冰上冷凍用於進一步分析。

【0167】 將腦冷凍切片(12個層面，各具有5個切片)。然後將5個切片/動物用於兩個腦區域中之小神經膠質(MAC1)及星形細胞(GFAP)之定量免疫螢光標記。

【0168】

測試系統及測試系統之合理性

C型尼曼匹克氏 (NPC)病為與NPC1及NPC2基因之突變相關聯之常染色體隱性神經退化性病症及藉由未經酯化之膽固醇及醣神經鞘脂質(GSL)之累積表徵。約95% C型尼曼-匹克氏病例由NPC1基因之基因突變引起，稱作C1型；5%由NPC2基因之突變引起，稱作C2型。C1及C2型尼曼-匹克氏之臨床表現係相似的，因為各自基因均涉及脂質(特定言之膽固醇)自晚期胞內體或溶酶體之排出。NPC1基因編碼位於細胞內部之膜中之蛋白質，且涉及細胞內之膽固醇及脂質之移動。此蛋白質之缺乏導致細胞膜內之脂質及膽固醇之異常累積。NPC2基因編碼結合及轉運膽固醇之蛋白質。對尼曼匹克氏C1型基因之隱性NIH對偶基因純合之小鼠顯示神經鞘磷

脂酶及葡糖腦苷脂酶活性之雙重缺乏。突變體小鼠在約7週齡時開始損失體重及顯示震顫及共濟失調步態。在約12至14週齡時體重損失繼續及震顫及共濟失調變得更嚴重直至死亡。肝及脾亦腫大及小腦中之浦金耶細胞嚴重耗盡。小鼠之此等徵兆中的一些與人類C型尼曼-匹克氏病患者類似。

試驗品項

試驗品項之名稱	AZ-3102-00
試驗品項批次編號	CR-20-02149
商標	不適用
穩定性	重複測試日期為2021年4月
組合物	不適用
純度	99.4%
分子量	433.5 g/mol
失效日	重複測試日期為2021年4月
儲存條件(調配物)	儲存及於媒劑中之穩定性：在氮氣下在室溫下避光穩定儲存至少24小時，在氮氣下於冰箱(2至8°C)中儲存至少8天及在氮氣冷凍下於冷凍器(≤ -15°C)中儲存至少21天(3週)。
媒劑	經酸化之水
治療劑量	1.5 mg/kg (自P11至P25)及3 mg/kg (自P26至P70)
投與途徑及體積	經口服管飼，10 mL/kg
治療頻率	每日治療持續60天

表5.試驗品項資訊。

【0169】

化合物製備：

在要求之情況下，將劑量調配物分成等分試樣以允許在各給藥場合分配。

劑量調配物	投與劑量形式	程序	製備頻率	設置以維持之儲存條件
試驗品項	溶液	藉由於氮氣環境中將試驗品項溶解於 Ampuwa 水中來製備調配物 (w/w)	若在溶解期間不可使用氮氣環境，則至少每週一次或每週兩次	2至8°C避光

表6.調配物資訊。

【0170】 將所需量之試驗品項稱重及溶解於Elix水(w/w)中及將pH調整至酸性pH。不添加另外賦形劑。

【0171】 針對試驗品項之比重，或試驗品項之純度/組成不進行校正。

【0172】 於各劑量製備後，將保留之溶液冷凍用於在研究結束時分析。

【0173】 先前結合方法開發及驗證研究進行之穩定性分析證實，當在相同條件下在劃界用於此研究中之彼等之濃度下在室溫下至少24小時避光，至少8天冷凍(2至8°C)及在劃界用於本研究之彼等之濃度(0.01至2 mg/mL)下於冷凍器(≤ -15°C)中至少3週經製備及儲存時，試驗品項於媒劑中係穩定的。

【0174】

動物管理

動物之適應

將動物圈養於有由Rettenmaier供應之標準化之嚙齒動物床品之個別通風籠中。各籠含有最多五隻小鼠。將起居室內之溫度維持在20至24°C及將相對濕度維持在45與65%之間。將動物在恆定光照循環(12小時光照/

黑暗)下圈養。經乾燥之製成小球之標準嚙齒動物食物(Altromin)以及正常自來水係對動物隨意可得。在主治獸醫之指導下，對動物供應濕潤食物。

【0175】

識別

將動物藉由經典打耳標連續編號。

【0176】 各籠藉由指示動物之研究編號、性別、個別登記號(IRN)、出生日期以及治療組分配之色卡識別。各動物之基因型(轉殖基因或野生型)藉由特異性針對轉殖基因構築體之PCR測定。在研究開始之前，將各小鼠使用自耳活組織檢查分離之DNA進行基因分型。

【0177】

組分配

僅表觀良好健康狀況之動物包含於該研究。每籠進行組分配之隨機化。將動物分配給不同起始組(隊組)，其包含所有治療組之動物。限制起始組中之動物之數目以確保相同年齡及均勻處理。

【0178】

健康狀態及籠側觀察結果

在招募至該研究之前，評價各個別動物之健康狀態。在該研究期間，進行每日觀察，及記錄任何明顯籠側觀察結果及立即報告給決定進一步行動(例如，安樂死)之研究負責人及主治獸醫。

【0179】 每日記錄體重及健康狀態持續第一週及後續每週一次。

【0180】

提早終止及人道終點

無動物必須提早安樂死。

【0181】

材料及方法

動物

小鼠系：	NPC (-/-)
飼養員：	QPS Austria GmbH, Grambach, Austria
開始時之年齡：	在出生後第11天(P11)至出生後第70天(P70)
性別：	混合
動物之數目：	30隻NPC (-/-)，4隻NPC (+/-)，4隻NPC (+/+)

【0182】

治療

將24隻NPC1 (-/-)小鼠(組D至I)經口服管飼(10 mL/kg)利用AZ-3102-00自出生後第11天(P11)至出生後第70天(P70)治療。給藥將以1.5 mg/kg自P11開始至P25，接著3 mg/kg自P26至P70。對照小鼠包含利用媒劑治療之6隻NPC1 (-/-)及4隻NPC (+/-)小鼠及4隻NPC (+/+)小鼠接受AZ-3102-00 (組A至C)。

【0183】 於在P70之最後一次治療後，將NPC (-/-)小鼠(每個時間點n=4；組D至I)藉由在下列時間點IP注射600 mg/kg戊巴比妥安樂死：30分鐘、1小時、2小時、4小時、8小時及24小時。於最後一次治療後(時間不關鍵)亦將對照小鼠(組A、B及C)處死。

組	動物	性別	治療	試驗品項	濃度 ^(a)	n
A	NPC (-/-)	混合	p.o	媒劑	N/A	6
B	NPC (+/-)	混合	p.o	媒劑	N/A	4
C	NPC (+/+)	混合	p.o	AZ-3102-00	劑量1及3 mg/kg	4
D	NPC (-/-)	混合	p.o	AZ-3102-00	劑量1及3 mg/kg	4
E	NPC (-/-)	混合	p.o	AZ-3102-00	劑量1及3 mg/kg	4
F	NPC (-/-)	混合	p.o	AZ-3102-00	劑量1及3 mg/kg	4
G	NPC (-/-)	混合	p.o	AZ-3102-00	劑量1及3 mg/kg	4
H	NPC (-/-)	混合	p.o	AZ-3102-00	劑量1及3 mg/kg	4
I	NPC (-/-)	混合	p.o	AZ-3102-00	劑量1及3 mg/kg	4
^(a) 將小鼠以1 mg/kg自P11至P25及然後3 mg/kg自P26至P70治療						

表7：治療組概觀。

【0184】

組織採樣

於在P70之最後一次治療後30分鐘（組D）、1小時（+/- 5分鐘。組E）、2小時（+/- 5分鐘。組F）、4小時（+/- 5分鐘。組G）、8小時（+/- 5分鐘。組H）及24小時（+/- 5分鐘。組I）（所有時間關鍵），將小鼠藉由i.p.注射安樂死。

【0185】 將經治療之組A之6隻NPC1 (-/-)、組B之4隻NPC (+/-)以及用作對照之組C之4隻NPC (+/+)小鼠及亦在P70（於最後一次治療後約2小時)安樂死。

【0186】 將小鼠最後藉由i.p.注射戊巴比妥(600 mg/kg，劑量10 μL/g體重)麻醉。

【0187】

血液採樣

打開胸腔，及藉由利用23號針心臟穿刺來收集血液。移除針，及將血液轉移至樣品管(MiniCollect® K2EDTA (乙二胺四乙酸鉀))中。將管充分倒置以促進EDTA之均勻分佈並防止凝血。將血液樣品在室溫(22°C)

下在3000 x g下離心10分鐘。將50 µL血漿等分試樣轉移至預先標記之1.5 ml *LoBind*埃彭道夫(Eppendorf)管中，在乾冰上冷凍及儲存在-80°C下。

【0188】

灌注

然後將動物利用0.9%鹽水經心臟灌注。為此，將連接至具有0.9%鹽水之瓶之23號針插入左心室。將在肺與肝之間之胸主動脈用止血鉗夾住以阻斷血液自心臟流至腹部，但是允許血液流至腦。將右心室用剪刀打開。藉由將溶液瓶連接至壓力計控制之空氣壓縮機在灌注溶液上維持100至120 mm Hg之恆定壓力。繼續灌注直至顱骨表面已變得蒼白及僅灌注溶液代替血液自右心室流出。

【0189】

腦採樣

於灌注後，打開顱骨，及小心移除腦及在冷卻表面上切成對半。將左半球稱重，在乾冰上速凍及儲存在-80°C下。在室溫下，將右半球藉由浸漬於含於磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)中之4%多聚甲醛中2小時來固定。

【0190】

組織學

組織製備

在室溫下，將小鼠右半腦藉由浸漬於經新鮮製備之含於PB (pH 7.4)中之4%多聚甲醛中2小時來固定。之後，將半球轉移至15 %蔗糖/PBS中及儲存在4°C下直至下沉以確保冷凍保護。然後視需要修剪組織塊，轉移至冷凍模具中，包埋於OCT介質中，於經乾冰冷卻之異戊烷中冷凍及儲存於超深冰箱(設置在-80°C目標溫度下)中。

【0191】

切片

將五個連續冷凍切片在Leica冷凍切片機上以10 μm厚度矢狀切割。遺棄接下來25個切片/層面。此收集方案針對12個層面重複及可經修改以自正確層面收集，例如，若由於年輕年齡或基因型，腦係更小。總計收集 $12 \times 5 = 60$ 個切片。根據Paxinos及Franklin之腦寰椎(「The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates」，第2版，2001)選擇切片層面。切片之收集在距中線側約0.2 mm層面下開始及通過半球延伸以確保通過目標區域之系統隨機採樣(圖10及圖15)。將切片儲存在-20°C下。將幾乎整個腦切片，因此當收集所有切片時，處置殘留組織塊。

【0192】

免疫螢光Exp3531 (鈣結合蛋白-D28k)

針對各培育，選擇五個切片/小鼠之均勻系統隨機集(各來自層面2、4、6、8、10一個切片)；關於系統隨機採樣之資訊按照此鏈接：
<http://www.stereology.info/sampling/>

【0193】 除非另有指定，否則在室溫下於杜貝克氏(Dulbecco's)磷酸鹽緩衝鹽水pH 7.2至7.8 (PBS)中執行所有步驟。

- 1.將冷凍切片空氣乾燥45分鐘及於PBS中洗滌10分鐘
- 2.將非特異性結合位點於潮濕室中用10%正常驢血清(Jackson Immuno Research)於0.1% TritonX-100/PBS中阻斷60分鐘
- 3.將切片各於PBS中洗滌3 x 5分鐘
- 4.將切片於潮濕室中在4°C下用初級抗體於1%正常驢血清/PBS中培育過夜

●豚鼠多株抗體:鈣結合蛋白-D28k (Synaptic Systems, 214005)

1:1000

5.將切片各於PBS中洗滌3 x 5分鐘

6.將切片於潮濕室中(避光)用二級抗體於1%正常驢血清/PBS中培育60分鐘

- 驢抗豚鼠(H+L)，Cy3結合(Jackson ImmunoResearch, 706-165-148)，1:500

7.將切片各於PBS中洗滌3 x 5分鐘(避光)

8.將切片用DAPI工作溶液培育15分鐘(避光)

9.將切片於PBS中洗滌2 x 5分鐘(避光)

10.將切片於ddH₂O中洗滌5分鐘(避光)

11.將切片用Mowiol及蓋玻片覆蓋(避光)

【0194】

成像

在具有高孔徑透鏡之Zeiss自動顯微鏡AxioScan Z1上記錄染色切片之全滑動掃描，該顯微鏡配備有Zeiss AxioCam 506 mono及Hitachi 3CCD HV-F202SCL照相機及Zeiss ZEN 2.3軟體。

【0195】

定量

利用Image Pro 10 (Media Cybernetics)進行影像分析。在開始時，藉由在影像上繪製受關注區域(ROI)來識別目標區域(小腦及海馬體，或胼胝體及紋狀體)。另外ROI排除起皺、氣泡或干涉量測之任何其他偽影。之後，於經識別區域內定量評價免疫螢光。

【0196】 為了定量，若必要，則吾人使用背景校正及藉由適當定限化及形態過濾(大小、形狀)來檢測免疫反應性對象。然後將不同對象特徵定量；其中，基於ROI大小之累積對象區域之百分比(免疫反應性區域；

此為最綜合參數，其指示是否存在免疫反應性之差異)、標準化至ROI大小之對象數目(對象密度)、經識別對象之平均信號強度(平均強度；此指示於目標蛋白之細胞表現程度中是否存在差異)及臨限值以上對象之大小。一旦目標對象之參數於測試運行中經定義，定量影像分析就自動運行使得結果係操作者獨立性且完全可重現。

【0197】 將原始數據於Excel中組織及分類，及然後轉移至GraphPad Prism用於統計分析及製圖。Prism圖為研究報告之一部分及於已執行品質檢查後將具有經分類之原始數據之表附接至最終報告上。

【0198】

小鼠血漿及腦組織中之AZ-3102及葡萄糖神經醯胺之量測

首先，將血漿樣品用含有500 nM內部標準葡萄糖神經醯胺C17:0 (GlcCer C17:0)及0.1%甲酸之乙腈/超純水/甲醇(90:5:5)之溶液進行蛋白質沉澱。於室溫下混合5分鐘後，將樣品離心5分鐘(13,000 rpm，20°C)及將50 µL上清液轉移至經矽化之MTP 96孔板中。

【0199】 使用FastPrep 24™微管均質器將腦組織於具有0.1 %甲酸之超純水:甲醇(1:1)之溶液(針對各克組織4 mL)中均質化。然後將組織勻漿與含有500 nM GlcCer C17:0及0.1%甲酸之乙腈/超純水/甲醇(90:5:5)之溶液混合用於蛋白質沉澱。於室溫下培育5分鐘後，將樣品離心5分鐘(13000 rpm，20°C)及將50 µL上清液轉移至經矽化之MTP 96孔板中。

【0200】

AZ-3102之量測

將血漿樣品首先與含有50 ng/mL之AZ-3101 (內部標準)之乙腈之溶液混合用於蛋白質沉澱。於室溫下培育5分鐘後，將樣品離心5分鐘(13000 rpm，4°C)及將上清液於具有0.1%甲酸之超純水中稀釋10倍。

【0201】 使用FastPrep 24™微管均質器(MP Biomedicals, USA)將腦組織於具有0.1 %甲酸之超純水:甲醇(1:1)之溶液(針對各克組織4 mL)中均質化。將腦勻漿與含有10 ng/mL之AZ-3101 (內部標準)之乙腈之溶液混合用於蛋白質沉澱。於室溫下培育5分鐘後，將樣品離心5分鐘(13000 rpm, 4°C)及將上清液於具有0.1%甲酸之超純水中稀釋10倍。

【0202】 將經稀釋之血漿及腦組織上清液藉由自動樣品注射器(SIL-30, Shimadzu, USA)注射至Agilent LC系統(Agilent, USA)中。將分析物藉由液相層析法使用流動相B之線性梯度在0.800 mL/min之流率下在保持在40°C之溫度下之逆相XBridge BEH C8管柱(2.1*50 mm, 2.5 µm粒子尺寸; Waters, USA)上分離。流動相A由具有0.1%甲酸之超純水組成。流動相B為具有0.1%甲酸之乙腈。

【0203】 使用配備有Turbo離子噴霧介面之API 5500三重四極質譜儀(AB Sciex, USA)以正電離模式達成擷取。將數據使用Analyst™數據系統(AB Sciex, 版本1.6.3)校正及定量。針對AZ-3102之LLOQ各自於血漿樣品中為0.2 ng/mL, 及於腦中為2 ng/g組織。

【0204】

葡糖神經醯胺之量測

首先，將血漿樣品用含有500 nM內部標準葡糖神經醯胺C17:0 (GlcCer C17:0)及0.1%甲酸之乙腈/超純水/甲醇(90:5:5)之溶液進行蛋白質沉澱。於室溫下混合5分鐘後，將樣品離心5分鐘(13,000 rpm, 20°C)及將50 µL上清液轉移至經矽化之MTP 96孔板中。

【0205】 使用FastPrep 24™微管均質器將腦組織於具有0.1 %甲酸之超純水:甲醇(1:1)之溶液(針對各克組織4 mL)中均質化。然後將組織勻漿與含有500 nM GlcCer C17:0及0.1%甲酸之乙腈/超純水/甲醇(90:5:5)之

溶液混合用於蛋白質沉澱。於室溫下培育5分鐘後，將樣品離心5分鐘(13000 rpm，20°C)及將50 µL上清液轉移至經矽化之MTP 96孔板中。

【0206】 將葡萄糖神經醯胺C16:0 (GlcCer C16:0)、葡萄糖神經醯胺C18:0 (GlcCer C18:0)及葡萄糖神經醯胺C24:1 (GlcCer C24:1)腦樣品之濃度以多重反應監測模式(MRM)藉由HPLC-MS/MS檢測來定量。將上清液藉由HPLC-MS/MS，同時使用來自Advanced Materials Technology之HALO HILIC管柱(150*4.6 mm，2.7 µm)分析以在半乳糖基-與葡萄糖基-神經醯胺異構體之間區分。MS/MS擷取以正電離模式使用配備有Turbo離子噴霧介面之API 4000三重四極(Applied Biosystems, USA)達成。GlcCer C16:0及GlcCer C18:0之分析係使用具有流動相A：5 mM乙酸銨/94.5%乙腈、2.5%甲醇、2.5%超純水及0.5%甲酸及流動相B：超純水及0.1%甲酸之梯度進行。腦樣品中之LLOQ針對GlcCer 16:0、GlcCer 18:0及GlcCer 24:1各自為25, 1、250及381.5 pmol/g組織。

【0207】

統計學

於GraphPad Prism 9中進行統計分析。將數據呈現為平均值±平均值標準誤差(SEM)或平均值+平均值標準誤差。

【0208】 活體內：針對重複測量值，利用二因子ANOVA接著邦費羅尼氏(Bonferroni's)或鄧尼特氏(Dunnett's)事後分析，測試組之間之差異。

【0209】 組織學：由於低n，無法測試數據之分佈，因此假設正態分佈。利用單因子ANOVA，接著鄧尼特氏事後分析，測試組之間之差異。將組A (NPC-/-，經媒劑治療)用作參考組用於成對比較。

【0210】

項目編號：			株系：NPC1			日期：			時間：			實驗者(名稱/簽名)：											
參數			體重損失			一般健康/活動			臨床發現					直線特異性					評分之加總	備註(指定臨床徵兆)*			
隊組	組	IRN	未影響或體重增加	改變<5%	體重損失 5至10%	體重損失 11至20%	體重損失>20%	光滑且發亮皮毛，正常活動	粗糙毛髮，眼睛渾濁	小傷口，臟毛髮，中度脫垂，異常姿勢，活動減少	潮濕被忽視之竅，脫水，彎腰駝背姿勢，高度脫垂，隔離(活動嚴重減少)	正常體溫及呼吸	正常情況之輕微偏離	動物感覺比正常更冷，冷四肢，快速淺呼吸	體溫或呼吸之中度偏離，腹部腫大	體溫或呼吸之嚴重偏離(嚴重費力呼吸)	存在翻正反射，正常移動	輕微不協調，輕微-中度震顫			高程度震顫，不協調移動	翻正反射減少	於24小時內體重損失>1 g，失去翻正反射
評分			0	1	5	10	20	0	1	5	10	0	1	5	10	20	0	1	5	10	20		

*在備註下做筆記(臨床檢查或症狀之下列標準之偏離)				
a：體重損失	c：運動	e：皮毛/皮膚表面	g：腹部	i：行為/活動
b：姿勢	d：眼睛	f：脫水	h：呼吸	k：體溫
m：震顫	o：直腸脫垂	p：陰莖脫垂	s：研究特異性	

評價，量度	評分之加總
壓力等級0=無壓力	0
壓力等級1=輕程度壓力， 待仔細觀察	1至9
壓力等級2=中等程度壓力， 必須通知獸醫	10至19
壓力等級3=高程度壓力， 必須通知獸醫及研究負責人， 若需要，則獸醫護理 或寧願安樂死	20或更多

表9.臨床徵兆評分表

震顫評分

震顫評分	描述 (當手動將籠傾斜時及/或在工作臺下打開籠時，觀察到動物之震顫)
直線特異性評分1；「輕微不協調，輕微-中度震顫」：	動物仍能直線行走。動物具有輕度受損步態(搖晃地行走及輕微震顫)。
直線特異性評分5；「高程度震顫，不協調移動」：	當於籠內移動時，動物頻繁不能直線行走且具有與評分1更確切受損的步態。由於強烈震顫及失去協調，動物有時將跌倒。
直線特異性評分10；「減少之翻正反射」：	動物顯示與在評分5下所述相同之症狀。另外，動物於由檢查者將其背部翻過去後花費幾秒(約至少2至3秒)獲得胸骨仰臥。

表10.震顫評分。

【0215】 圖13顯示跨所有域及按治療組針對各NPC (-/-)經媒劑及經AZ-3102治療小鼠之自PND 56至70之總臨床徵兆評分的匯總。左側：如以梯度可視化之按動物及治療組之總評分，其中低分為綠色及高分為紅色。右側：達到數值臨限值之評分之匯總。大於7之臨限值評分針對經治療組不頻繁發生；然而，未經治療之組在研究過程期間具有更高數字的總評分。

【0216】 結果顯示，NPC (-/-)經媒劑治療之小鼠與NPC (-/-)經AZ-3102治療之動物相比具有總體臨床徵兆之惡化(更大評分)。此於圖13中進一步顯示：右側，其中(例如)大於8之評分於NPC (-/-)經媒劑治療之組中與NPC (-/-)經AZ-3102治療之動物相比更頻繁觀察到。研究此等評分，吾人發現，震顫之引發、持續時間以及強度亦藉由利用AZ-3102治療減少(圖14)。於所有(除了一個)NPC (-/-)經媒劑治療之動物中觀察到高程度之震顫；然而，AZ-3102基本上消除所有動物(除了所測試之24隻動物中之

一者)之此高程度震顫。

【0217】 圖14顯示NPC (-/-)經媒劑及AZ-3102治療之小鼠自出生後第56至70天之震顫評分。粉紅色(=淺灰色)條表示高程度震顫之出現及持續時間(評分為5)；然而綠色(=深灰色)條表示輕微或中度震顫之出現及持續時間。未經治療之組中除了單隻小鼠，所有其他小鼠展示高程度之震顫(5隻小鼠中之4者)。相比之下，經AZ-3102治療之組中之僅一隻小鼠具有高程度之震顫(24隻中之1者)。可能震顫評分：0：無震顫；1：輕微不協調，輕微-中度震顫；5：高程度震顫，不協調移動；10：減少之翻正反射(無動物達到此評分)。

【0218】

組織學結果

目標區域之定義

目標區域藉由定義受關注區域(ROI)來手動圈出輪廓用於螢光標記之後續定量分析。

【0219】

定量分析之讀出

以下呈現之表特徵表示四個標準讀出。

- 區域大小[mm²]：此等數據顯示，由目標區域覆蓋之每個腦切片之平均面積。此資訊對驗證正確採樣係重要的。其對識別腦萎縮亦有幫助，腦萎縮為一些動物模型之表現型之一部分。

- 免疫反應性區域[%]：由臨限值以上免疫反應性對象(例如：體細胞、神經突、斑塊)覆蓋之ROI之百分比；此為最綜合參數，其指示是否存在免疫反應性之總體差異。

- 對象密度[對象數目/mm²]：標準化至目標區域之大小之臨限值以上免疫反應性對象之數目；此尤其可用於檢測神經元密度之變化。
- 對象強度[a.u.]：臨限值以上免疫反應性對象之像素之平均亮度；此指示於目標蛋白質之細胞表現程度中是否存在差異。
- 對象大小[μm²]：臨限值以上免疫反應性對象之大小；此可用於檢測小神經膠質之活化或斑塊之生長之差異。

【0220】

鈣結合蛋白-D28k

利用豚鼠多株抗體檢測鈣結合蛋白-D28k之免疫螢光，及於小腦及海馬體形成中定量該信號。NCP(-/-)小鼠與NCP(+/-)及NPC(+/-)小鼠相比顯示強烈減少之鈣結合蛋白-D28k標記。利用試驗品項治療於所有讀出中顯著增加小腦中之鈣結合蛋白-D28k。所有效應係區域特異性，因為於海馬體中未檢測到顯著組差異。

【0221】 圖16顯示腦免疫組織化學之結果：與NPC (+/-，野生型小鼠)及NPC (-/-)經治療小鼠相比，NCP(-/-)及NPC(+/-)經媒劑治療之小鼠中之鈣結合蛋白-D28k標記。圖表示在5個腦切片/小鼠(n = 2至4隻/組)上於ROI內量測之免疫螢光信號之平均值。藉由單因子ANOVA及鄧尼特氏事後檢驗分析數據。條形圖表示組平均值+ SEM。條形圖表示組平均值+ SEM，*Adj. P-值：<0.001。

【0222】 採用免疫組織學技術使用針對浦金耶細胞之鈣結合蛋白-D28k標誌物，吾人發現，AZ-3102治療與經媒劑治療之NPC (-/-)小鼠相比顯著限制小腦浦金耶細胞損失(圖16)。

【0223】

結論

AZ-3102為正在開發用於各種溶酶體貯積症之新穎口服小分子。AZ-3102之獨特作用模式在於，其對葡萄糖神經醯胺合成酶(GCS)、非溶酶體葡萄糖腦苷脂酶(GbA2)之高效力，以及其腦滲透性質。於C型尼曼-匹克氏病之小鼠模型中研究AZ-3102[1、2]，其中NPC基因之隱性NIH對偶基因純合型小鼠在約7週齡時開始損失體重及顯示震顫及共濟失調步態[3]。疾病嚴重度係與顯著小腦浦金耶細胞損失相關聯且臨床徵兆惡化直至達成人道終點(通常在12至14週齡)[3]。於此研究中，吾人研究將AZ-3102自出生後天數(PND)第11至70天向NPC (-/-)、NPC (-/+)及WT (NPC (+/+))；Balb/c)小鼠每日口服給藥以評估其藥物動力學(PK)性質，調節葡萄糖神經醯胺(GlcCer C16:0，GlcCer C18:0)之能力及改善臨床徵兆。此外，吾人亦檢查對浦金耶細胞之免疫組織化學標誌物之治療效應，其與神經病理學一致。自PND 11至70重複每日口服給藥後，AZ-3102。如由平均體重增重百分比所指示之動物之一般健康不受AZ-3102阻止及利用AZ-3102治療之NPC (-/-)小鼠之兩種性別較NPC (-/-)未經治療之動物增重更多(圖11)。AZ-3102證實高的腦:血漿暴露(表8)及與AZ-3102目標接合一致，與經媒劑治療之動物相比自全腦勻漿量測之GlcCer種類增加，針對GlcCer 16:0增加大於2倍，及針對GlcCer 18:0增加大於約9倍。此等兩個GlcCer種類可能代表亦可對AZ-3102響應之其他GlcCer種類。為評價AZ-3102是否達到影響一般健康及神經病理學之更多特定徵兆之足夠腦濃度，量測各種臨床徵兆(表9)。當在觀察期內加總時，此等評分提供自PND 56至70之健康圖景。圖13為按觀察隊組之各動物隨時間之圖形化視圖。於此圖中，NPC (-/-)經媒劑治療之小鼠與NPC (-/-)經AZ-3102治療之動物相比具有總體臨

床徵兆之惡化(更大評分)。此於(圖13：右側)中進一步定量，其中(例如)大於8之評分於NPC (-/-)經媒劑治療之組中與NPC (-/-)經AZ-3102治療之動物相比更頻繁觀察到。研究此等評分，吾人發現，震顫之引發、持續時間以及強度亦藉由利用AZ-3102治療減少(圖14)。於所有(除了一個)NPC (-/-)經媒劑治療之動物中觀察到高程度震顫；然而，AZ-3102基本上消除所有動物(所測試之24隻動物中除了一者)之此高程度震顫。採用免疫組織學技術使用針對浦金耶細胞之鈣結合蛋白-D28k標誌物，吾人發現，AZ-3102治療與經媒劑治療之NPC (-/-)小鼠相比顯著限制小腦浦金耶細胞損失(圖16)。此發現結果與人類中之C型尼曼-匹克氏相關，因為神經元死亡及特定言之浦金耶細胞以及腦萎縮為該疾病之標誌[4]。因為小腦功能對移動係重要的，所以改善之臨床徵兆及高程度震顫之顯著降低可能為小腦浦金耶細胞生存之結果。

【0224】 總之，AZ-3102 (GCS及GbA2二者之口服可用，高度強效(nM)抑制劑)能滲透NPC (-/-)及野生型動物之腦。此外，AZ-3102抑制腦中之此等酶，如通過與經媒劑治療之動物相比調節GlcCer種類、改善臨床徵兆、顯著降低高程度震顫及限制小腦浦金耶細胞損失所清晰顯示。

1. Loftus, S.K. 等人，Murine model of Niemann-Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene. Science, 1997. 277(5323)：第232至235頁。

2. Zervas, M.、K. Dobrenis及S.U. Walkley, Neurons in Niemann-Pick disease type C accumulate gangliosides as well as unesterified cholesterol and undergo dendritic and axonal alterations. J Neuropathol Exp Neurol, 2001. 60(1)：第49至64頁。

3. Santiago-Mujica, E. 等人，Hepatic and neuronal phenotype of NPC1^{-/-} mice. Heliyon, 2019. 5(3)。

4. Vanier, M.T., Niemann-Pick disease type C. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2010. 5(1)：第16頁。

【0225】

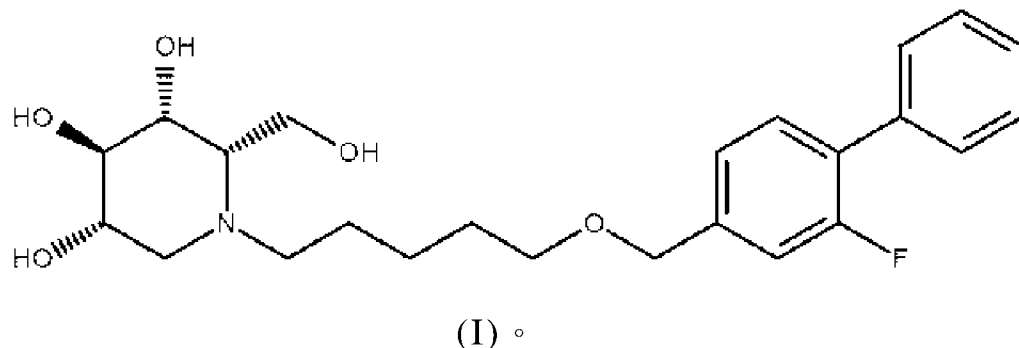
實例5——向患有山多夫氏病之小鼠(通過突變破壞鼠科Hexb基因[Hexb (-/-)])投與化合物(I)之結晶形式之效應

向患有山多夫氏病之小鼠投與治療上有效量之AZ-3102。初始數據指示，類似於治療C型尼曼-匹克氏，患病動物之臨床徵兆已改善。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種化合物(I)之結晶形式，



【請求項2】

如請求項1之結晶形式，其中該結晶形式為結晶游離鹼。

【請求項3】

如請求項1或請求項2之結晶形式，其中該結晶形式顯示於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $17.8 \pm 0.2^\circ$ 處之反射，其中該在 $17.8 \pm 0.2^\circ$ 處之反射為該X-射線粉末繞射圖中之四個最強反射中之一者。

【請求項4】

如請求項3之結晶形式，其進一步顯示於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $4.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $8.3 \pm 0.2^\circ$ 、 $12.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $13.6 \pm 0.2^\circ$ 、 $14.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $14.9 \pm 0.2^\circ$ 、 $15.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $17.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $19.3 \pm 0.2^\circ$ 、 $21.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $22.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $22.9 \pm 0.2^\circ$ 及 $23.3 \pm 0.2^\circ$ 中之一或多者處之一或多個反射。

【請求項5】

如請求項1至4中任一項之結晶形式：

(a)具有 89°C 至 96°C 之熔點；及/或

(b)其中該結晶形式實質上非吸濕性。

【請求項6】

如請求項1或請求項2之結晶形式，其中該結晶形式顯示於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $16.9 \pm 0.2^\circ$ 處之反射，其中該在 $16.9 \pm 0.2^\circ$ 處之反射為該X-射線粉末繞射圖中之四個最強反射中之一者，視情況其中該結晶形式進一步顯示於X-射線粉末繞射圖中表述為 2θ 值之在 $15.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $16.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $16.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $18.9 \pm 0.2^\circ$ 、 $23.1 \pm 0.2^\circ$ 、 $25.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $27.7 \pm 0.2^\circ$ 及 $28.5 \pm 0.2^\circ$ 中之一或多者處之一或多個反射。

【請求項7】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至6中任一項之結晶形式。

【請求項8】

如請求項7之醫藥組合物，其中該醫藥組合物含於膠囊中，視情況其中該醫藥組合物含於該膠囊中：

- (a)不具有任何其他成分；或
- (b)具有至少一種醫藥上可接受之載劑。

【請求項9】

如請求項1至6中任一項之結晶形式，或如請求項7或請求項8之醫藥組合物，其用於療法中。

【請求項10】

如請求項1至6中任一項之結晶形式，或如請求項7或請求項8之醫藥組合物，其用作藥劑。

【請求項11】

如請求項1至6中任一項之結晶形式，或如請求項7或請求項8之醫藥組合物，其用於治療涉及葡糖神經醯胺之異常含量及/或醣神經鞘脂質之

較高含量之疾病，視情況其中該涉及葡糖神經醯胺之異常含量及/或醣神經鞘脂質之較高含量之疾病為溶酶體貯積病，諸如高歇氏病(Gaucher disease)、Fabry氏病(Fabry disease)、GM1神經節苷脂沉積症、GM2神經節苷脂沉積症(諸如泰薩二氏病(Tay-Sachs disease)、山多夫氏病(Sandhoff disease)或AB變型)、唾液酸沉積症(Sialidosis)、C型尼曼-匹克氏病(Niemann-Pick disease)及動作性肌陣攣性腎衰竭症候群，或共同歸類為代謝症候群之疾病中之一者之症狀，諸如肥胖症、胰島素抗性、高脂血症、高膽固醇血症、多囊性腎病、II型糖尿病及慢性發炎，或神經退化性病，諸如帕金森氏病(Parkinson disease)或路易體(Lewy-body)癡呆、或動脈粥樣硬化。

【請求項12】

一種製備如請求項1至6中任一項之結晶形式之方法，其包括使化合物(I)之樣品與溶劑接觸，視情況其中：

(a)該溶劑係選自乙腈、乙酸乙酯、異丙醇、苯甲醚、水及第三丁基甲基醚(TBME)；及/或

(b)在使該化合物(I)之樣品與該溶劑接觸之前，將該化合物(I)之樣品純化，視情況其中該化合物(I)之樣品係使用層析法純化。

【請求項13】

一種化合物(I)之結晶形式，其藉由進行如請求項12之方法獲得。

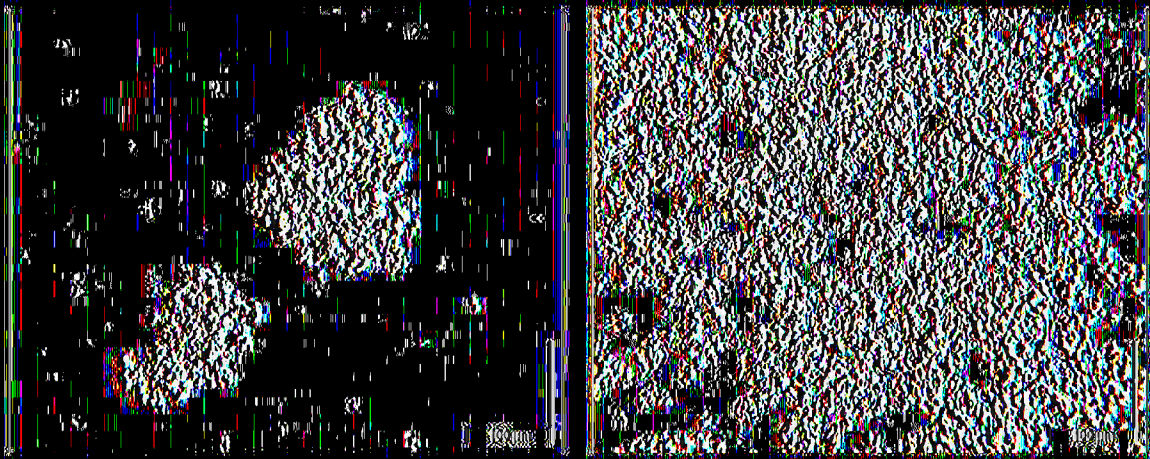
【請求項14】

一種化合物(I)之游離鹼於製備結晶形式之用途。

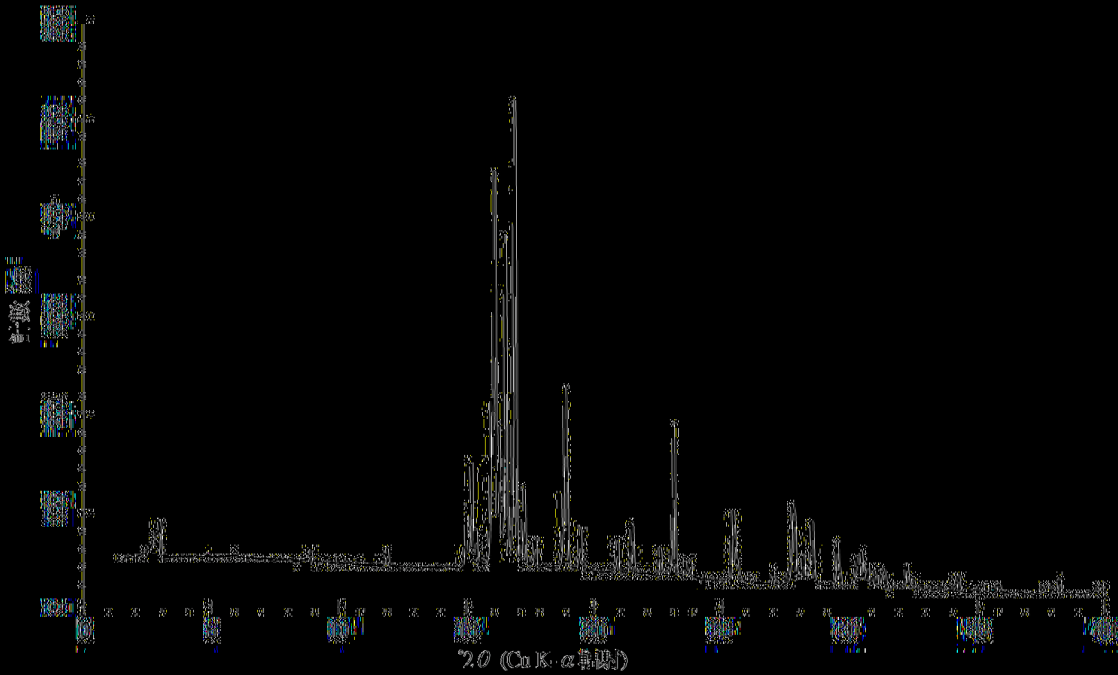
【請求項15】

一種製備化合物(I)之結晶形式之方法，其包括使該化合物(I)之游離鹼結晶。

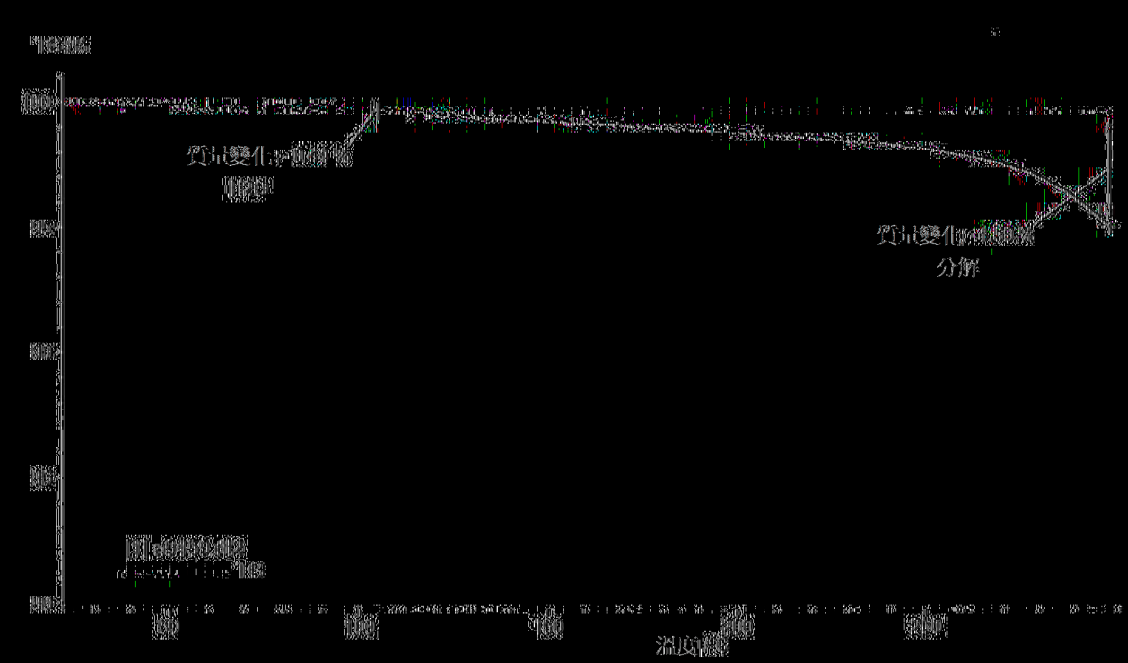
|(發明圖式)|



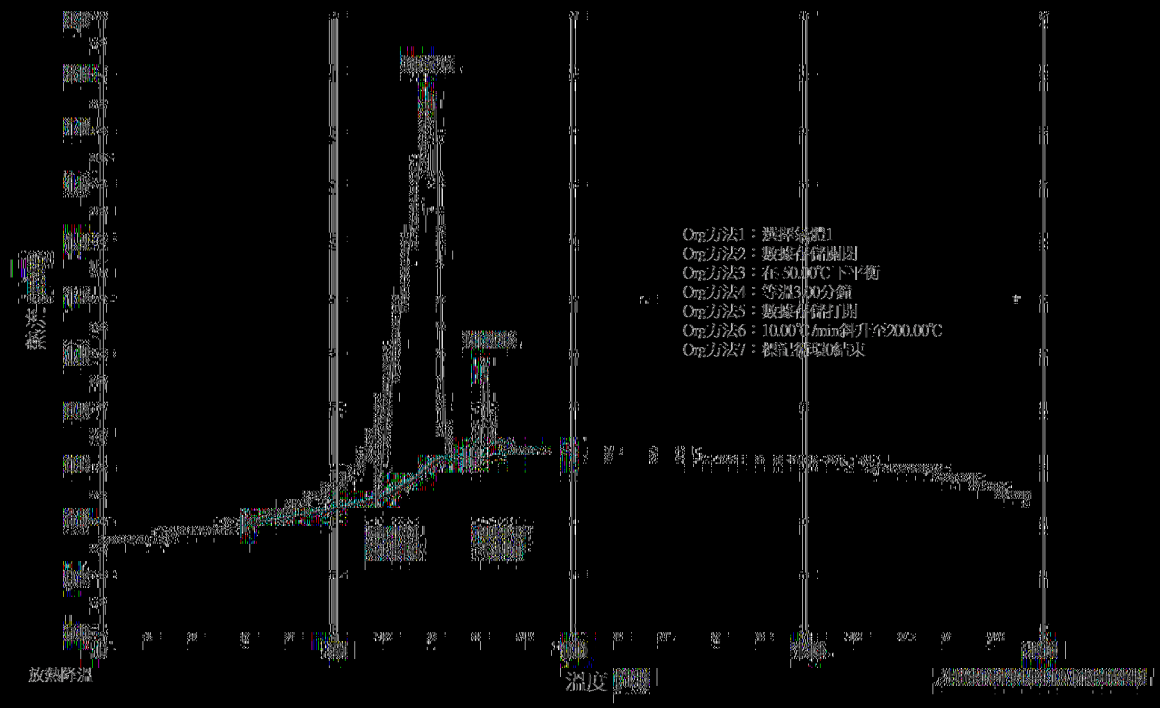
|(圖1)|



|(圖2)|

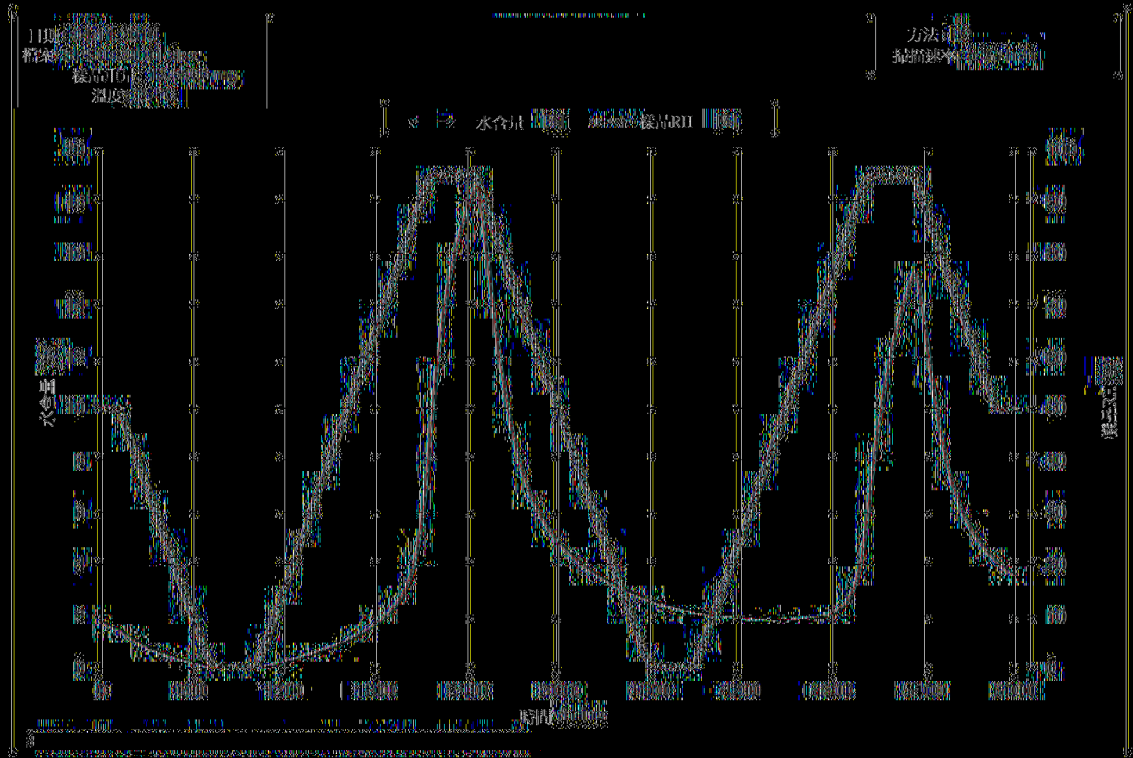


(圖3A)

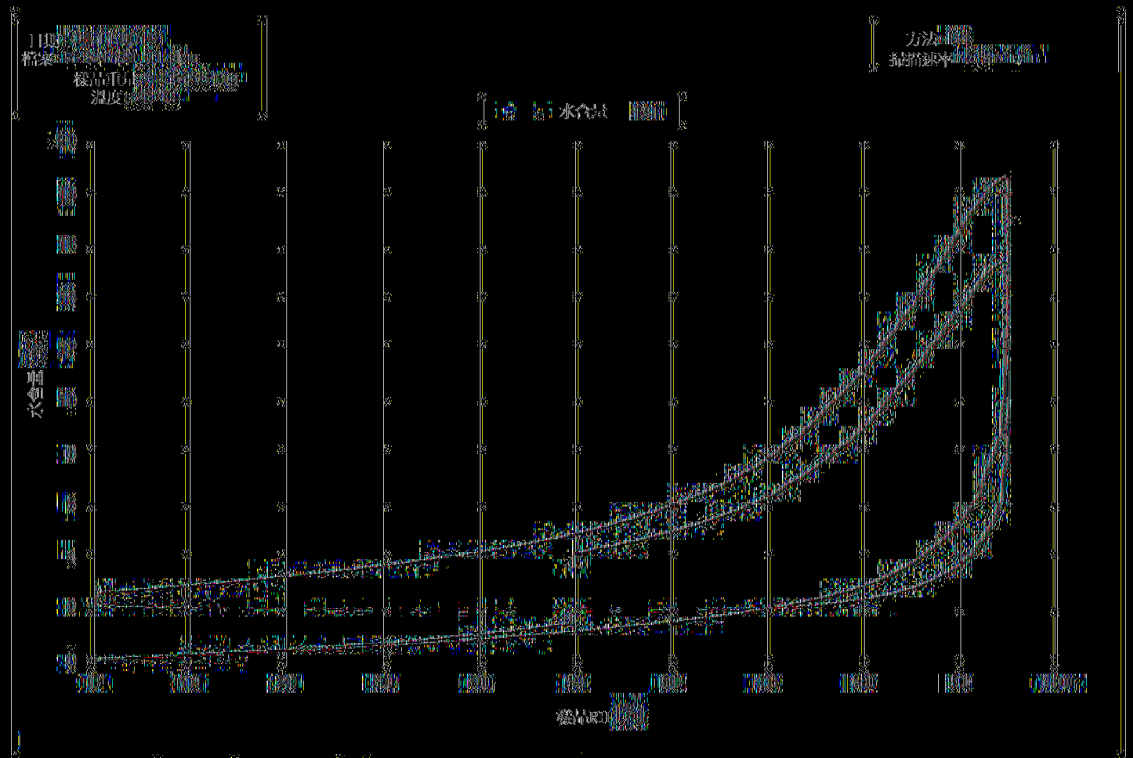


- Op方法1: 選擇參數1
- Op方法2: 選擇參數2
- Op方法3: 在 50.00°C 下平衡
- Op方法4: 等溫300分鐘
- Op方法5: 數據存儲打開
- Op方法6: 10.00°C/min 斜升至 200.00°C
- Op方法7: 從最後點結束

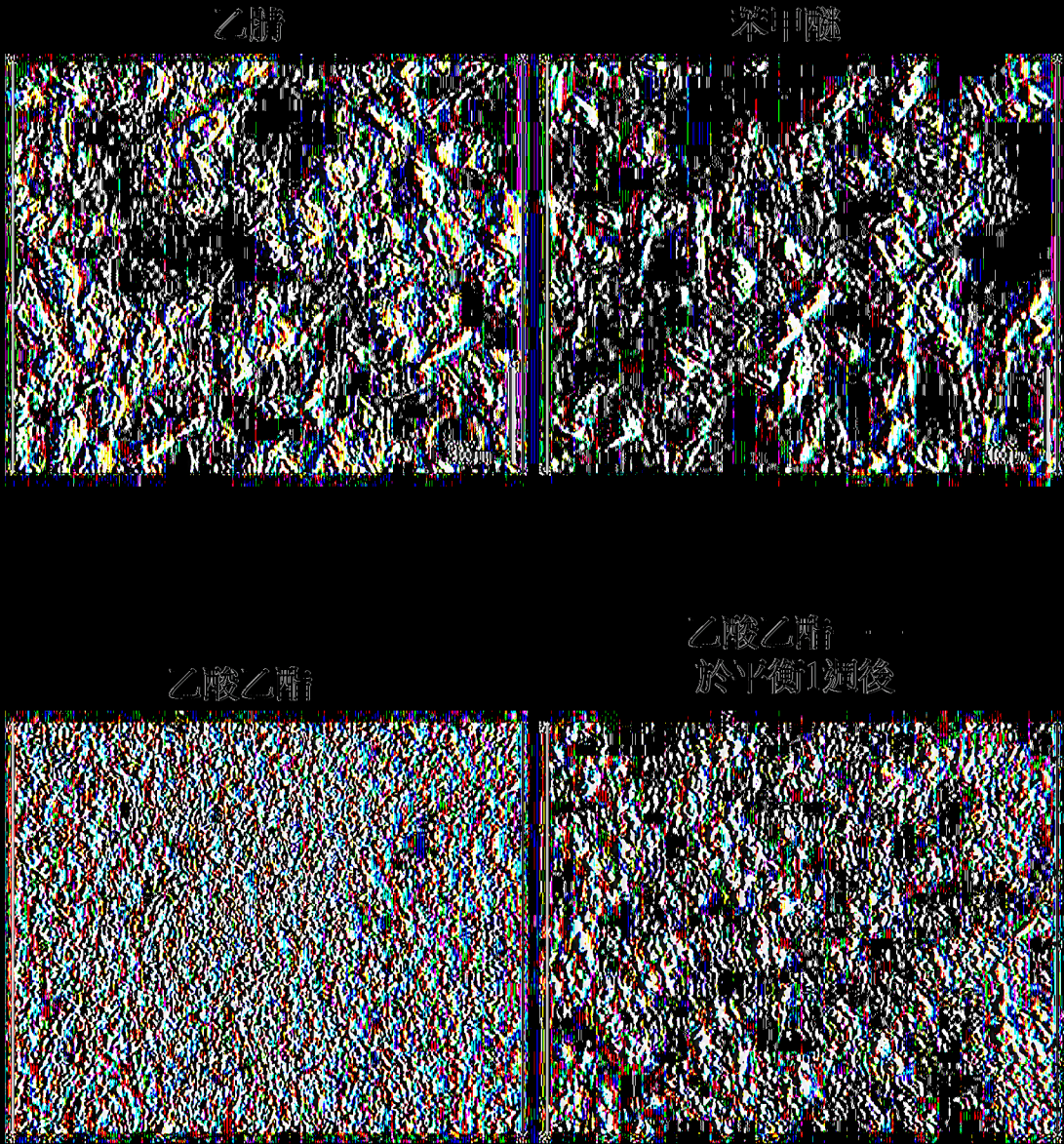
(圖3B)



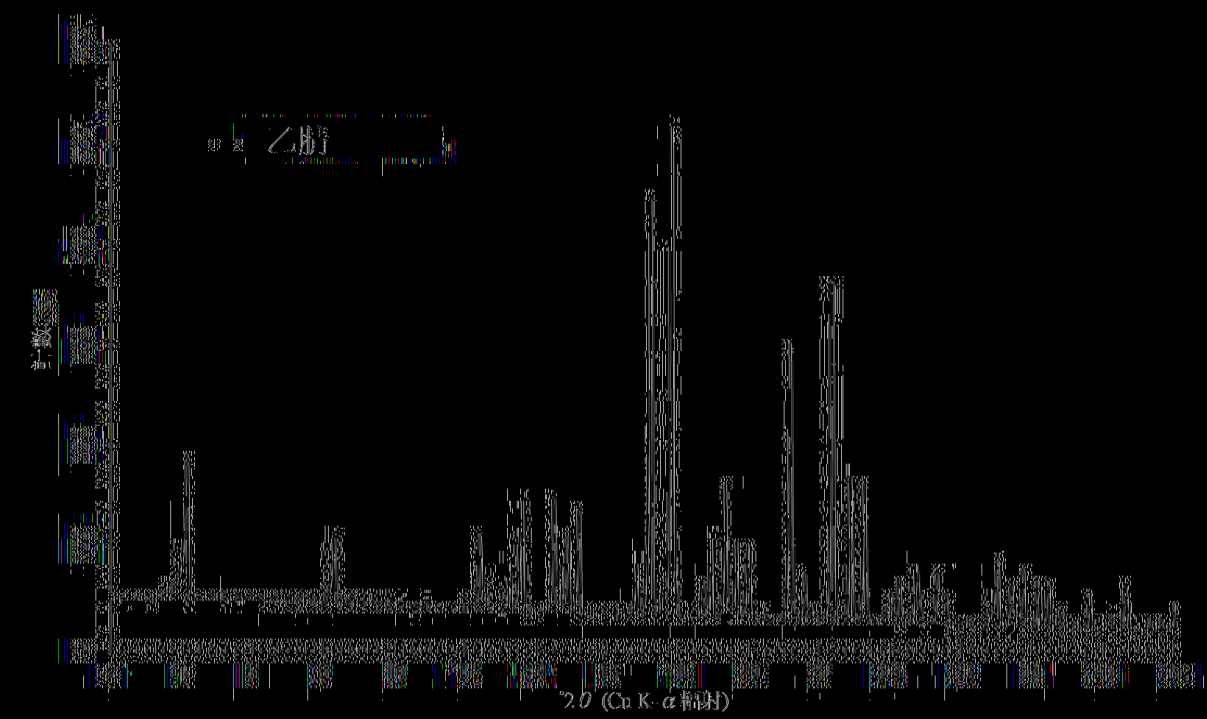
(圖4A)



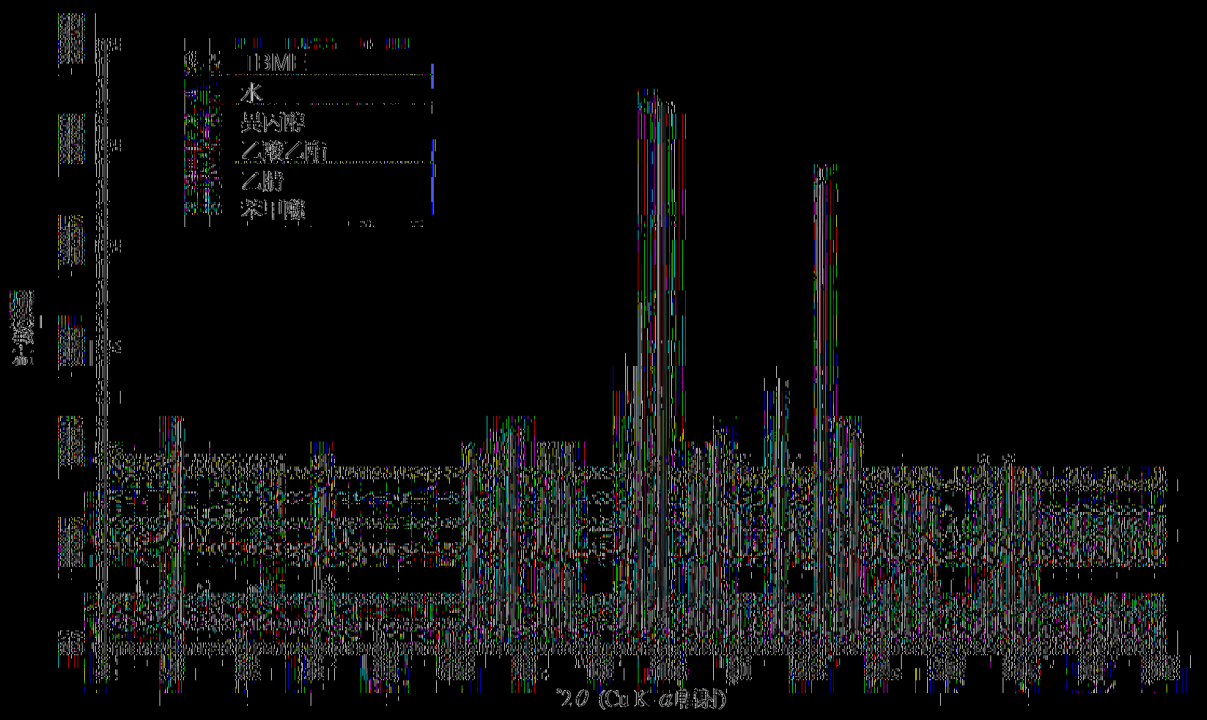
(圖4B)



(圖5)

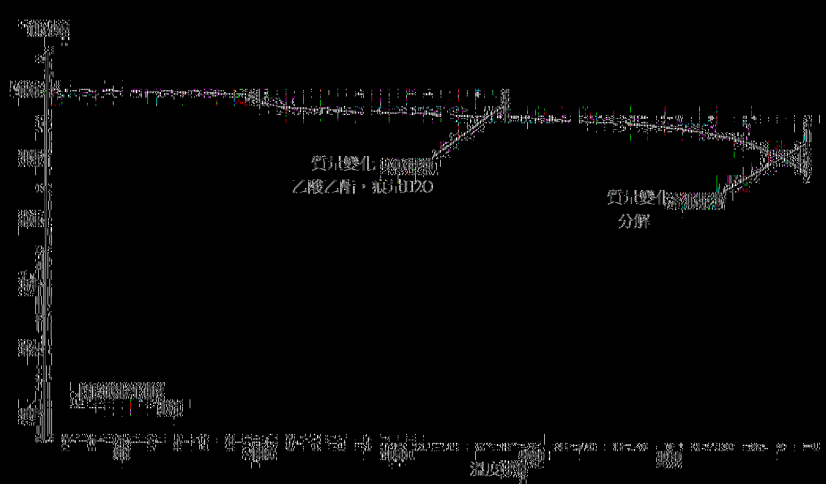


(図6A)

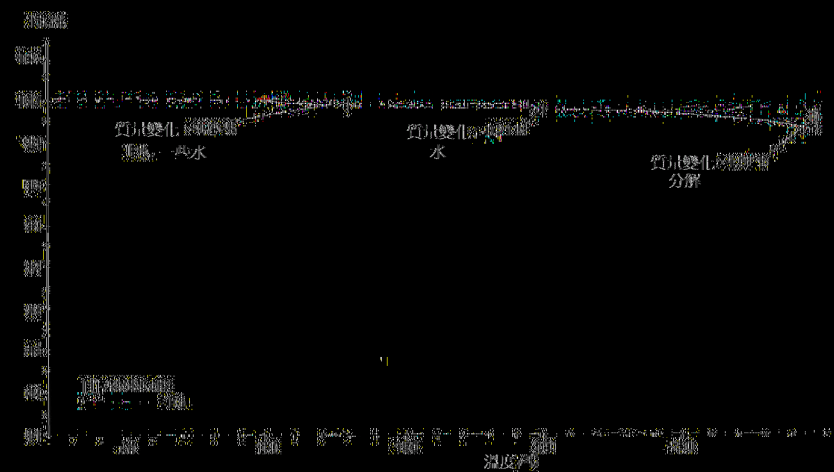


(図6B)

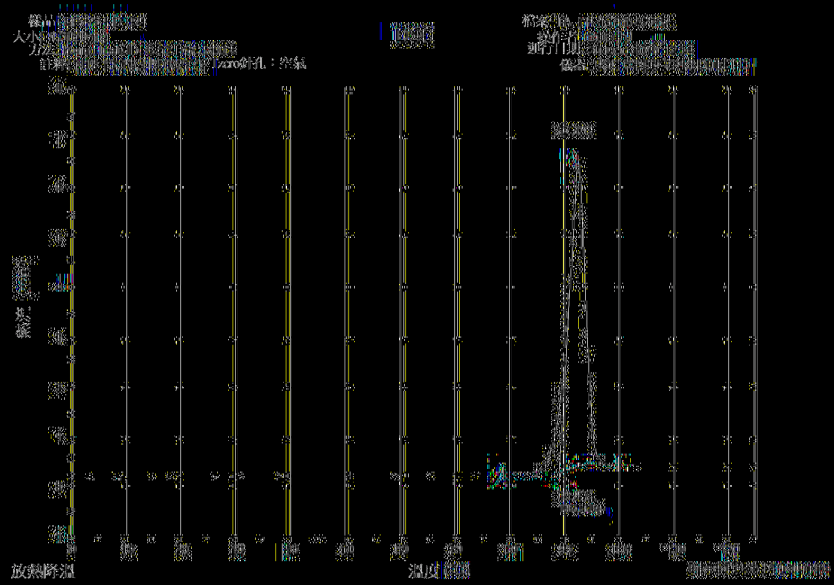




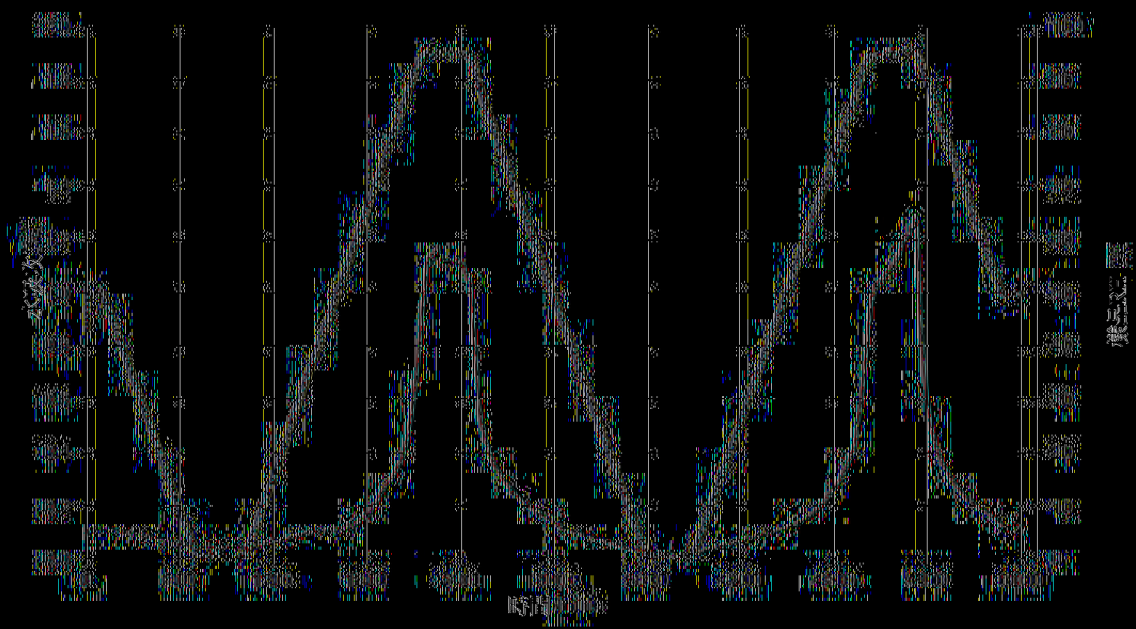
(圖8A)



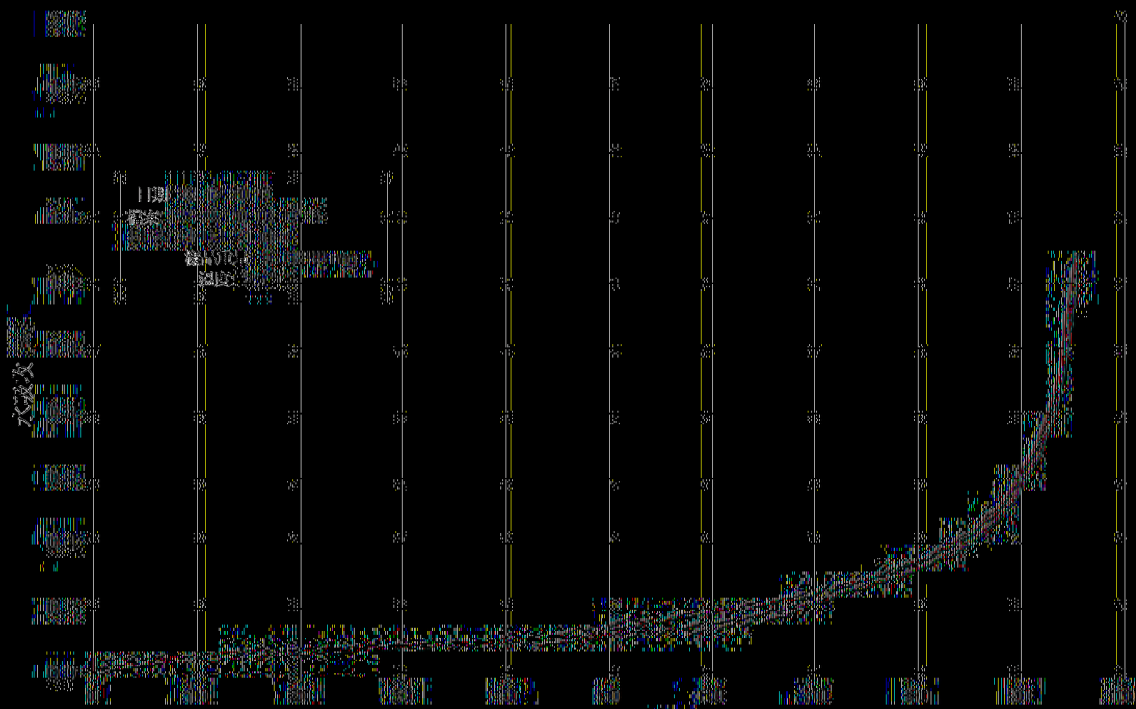
(圖8B)



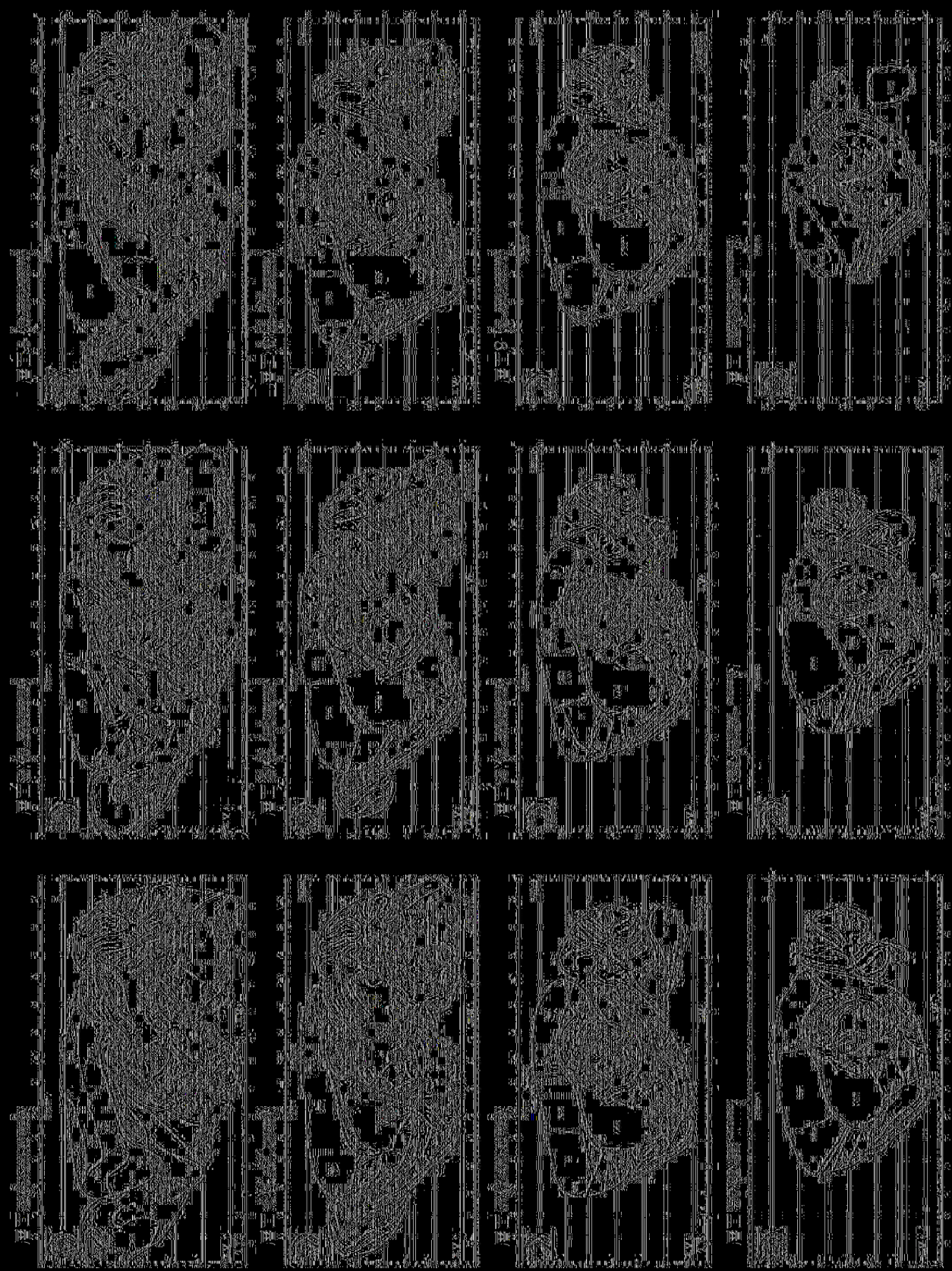
(圖8C)

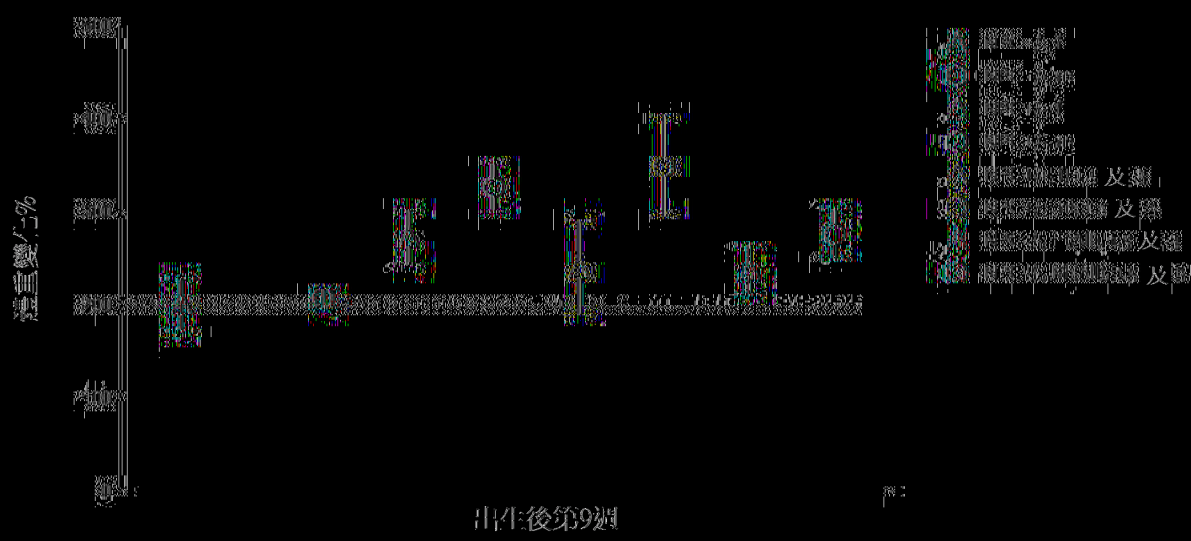


(同9A)



(同9B)





[(圖11)]

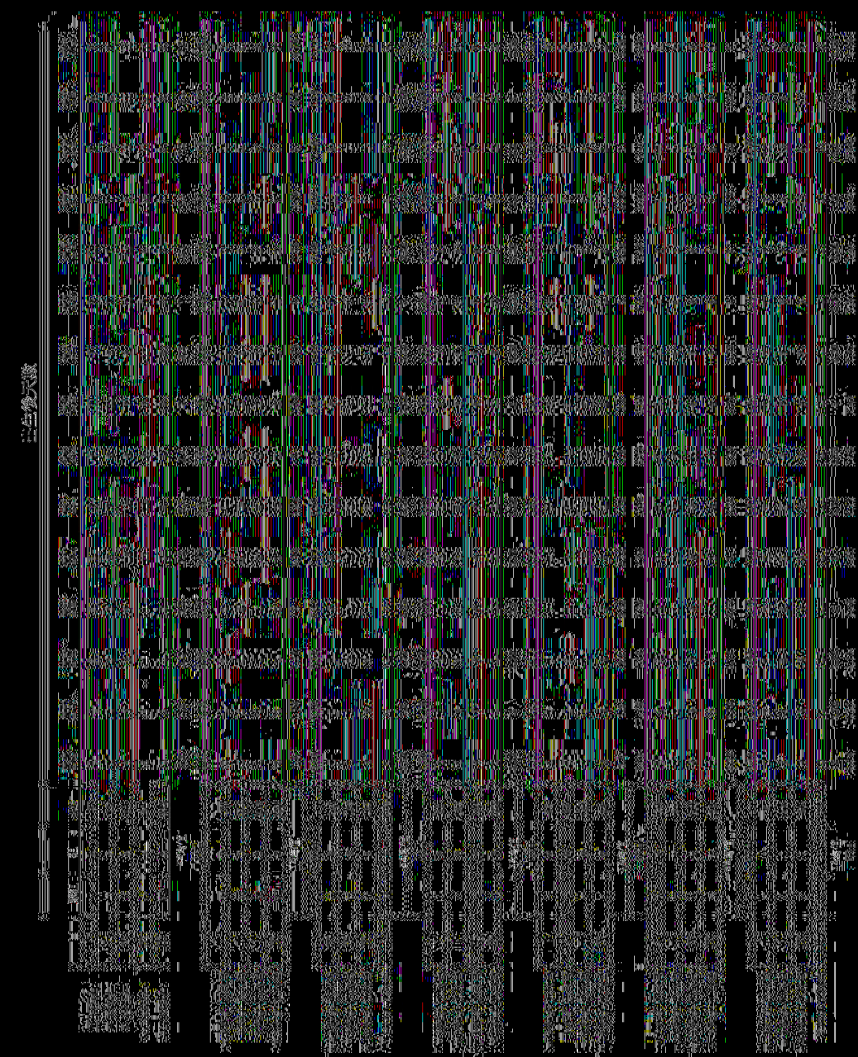
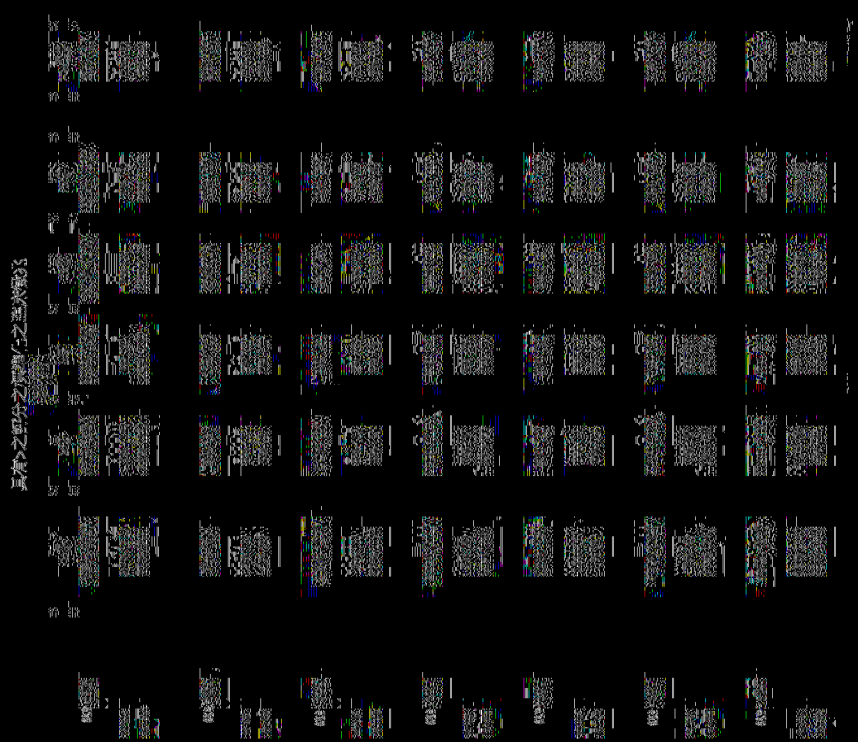
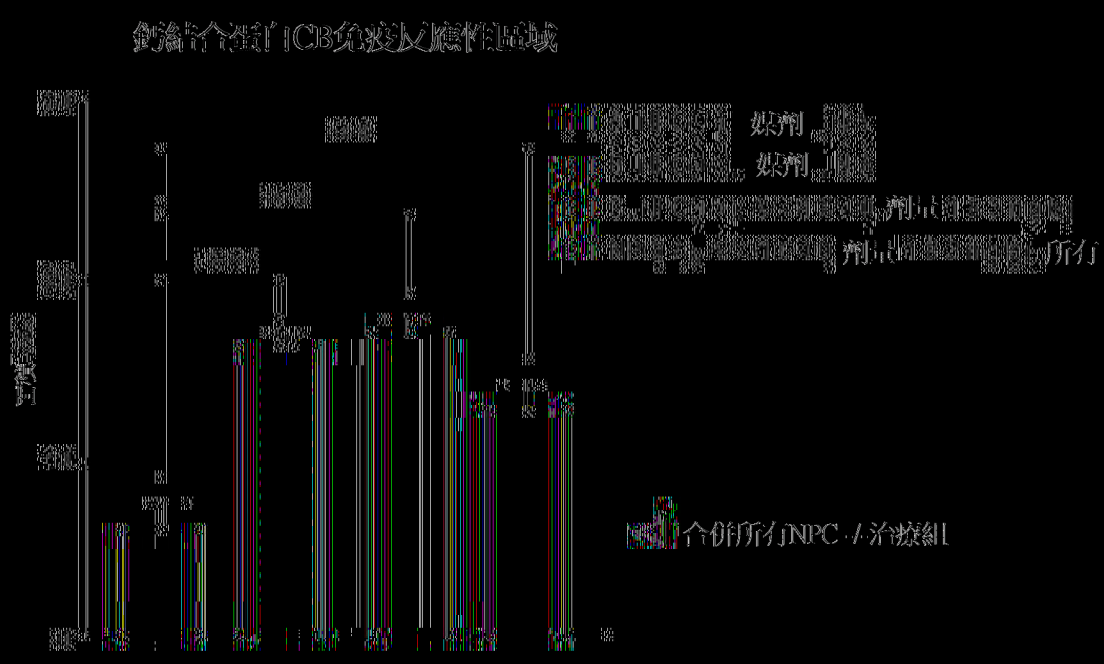


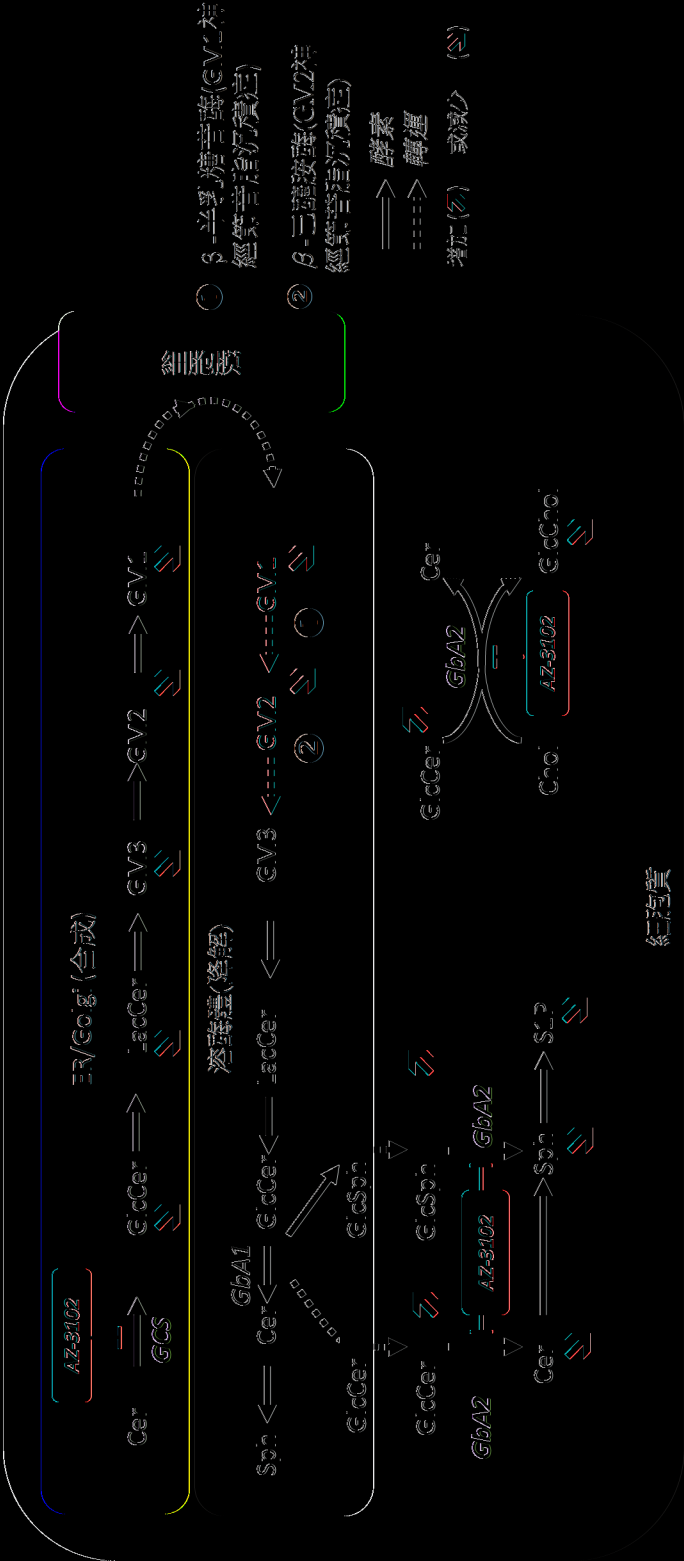
圖 1



(圖15)



(圖16)



[圖 7]